

TEZA DE DOCTORAT

Utilizarea sinergică a microalgei *Aurantiochytrium limacinum* SR21 și a subprodusului din *Aronia melanocarpa*: bioproducție și obținerea batoanelor funcționale

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

Doctorand **Bogdan Constantin Bratosin**

Conducător de doctorat **Prof.univ. dr. Dan Cristian Vodnar**



CUPRINS

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

1. Proteina unicelulară: un potențial substituit
în nutriția umană și animală III

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

2. Obiectivele cercetării III
3. Studiul 1– Producția de compuși bioactivi de către
Aurantiochytrium limacinum SR21 în fermentație
Discontinuuă IV
4. Studiul 2 – Caracteristicile nutriționale și fizico-
chimice ale batoanelor inovative îmbogățite
cu pudră de *Aronia melanocarpa* VI
5. Studiul 3. Percepția consumatorilor referitoare la batoanele
nutritive. Studiu de caz: Batoanele pe bază de aronia VIII
5. Concluzii și recomandări IX
- BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ X

1. Proteina unicelulară: un potențial substituit în nutriția umană și animală

Multe microorganisme au fost utilizate direct ca hrană. SCP-urile pot salva vieți în zonele mai puțin privilegiate, unde malnutriția este o problemă reală și care pune viața în pericol. O specie de algă numită Spirulina a fost cultivată cu mulți ani în urmă în Lacul Ciad din Africa și a fost ulterior folosită ca hrană pentru a compensa deficitul de proteine al populației locale (Junaid *et al.*, 2020). Nemții au folosit o anumită specie de *Candida* în mesele lor în timpul Primului Război Mondial, inclusiv cârnați și supe. Proteinele generate din culturi bacteriene, fungice și alge au fost utilizate pe scară largă în alimente și ca hrană de atunci încolo. Conceptul de SCP a apărut din această metodă, aceste proteine sunt acum utilizate pe scară largă (Ali *et al.*, 2017).

Cercetătorii și întreprinderile din întreaga lume sunt interesate de producția SCP. Datorită multiplelor beneficii promițătoare pe care le oferă aceste proteine, au apărut diferite firme care pretind că pot comercializa SCP. Cu toate acestea, o provocare cheie pentru industrie este aprovizionarea cu un ingredient durabil, regenerabil, îmbogățit cu proteine (Takahashi *et al.*, 2020).

În prezent, făina de pește, împreună cu făinurile de plante terestre, constituie cea mai mare parte a conținutului de proteine din diete. Printre altele, algele, ciupercile, drojdia și bacteriile pot fi utilizate pentru producția de SCP, dar fiecare are propriile avantaje și dezavantaje. Bacteriile posedă rate de creștere mai mari, conținut mai mare de proteine și mai mulți aminoacizi care conțin sulf. Dintr-o perspectivă industrială, bacteriile de oxidare a metanului sunt cele mai avansate și mai pregătite bacterii pentru producția de SCP. Drojdiile au fost folosite ca sursă de SCP de mult timp. SCP din ciuperci s-a dovedit a fi util în hrana animalelor, în timp ce produse secundare specifice sunt folosite în sectorul băuturilor (Bratosin *et al.*, 2021; Junaid *et al.*, 2020).

3. Obiectivele cercetării

În vederea realizării tezei de doctorat au fost stabilite următoarele obiectiv, care sunt prezentate în cele ce urmează:

- Optimizarea condițiilor de cultivare pentru *Aurantiochytrium limacinum* SR21 prin identificarea parametrilor critici ai mediului de cultură, cum ar fi sarea de mare, glucoza de laborator și extractele proteice, pentru a maximiza producția de biomasă și conținutul de compuși bioactivi, în special acid docosahexaenoic (DHA).

- Maximalizarea randamentului de producție pentru *A. limacinum* SR21. Dezvoltarea și implementarea unui proces eficient pentru a obține o producție consistentă de conținut ridicat de proteine și DHA în biomasă uscată.
- Evaluarea potențialului antioxidant al pudrei de *Aronia melanocarpa*. Analiza și cuantificarea activității antioxidante a pulberii obținute din coji de *Aronia melanocarpa* derivate.
- Dezvoltare și caracterizare. Acest obiectiv se concentrează pe analiza și cuantificarea activității antioxidante a pudrei de *Aronia melanocarpa* derivată din subprodusele peelingurilor de *A. melanocarpa*, evaluând beneficiile și aplicațiile sale potențiale pentru sănătate în diverse industrii.

4. Studiu 1. Producția de compuși bioactivi din *Aurantiochytrium limacinum* SR21 prin fermentație discontinuă

Obiectivul studiului constă în optimizarea procesului de producție a compușilor bioactivi și nutraceutici din microalga *Aurantiochytrium limacinum* SR21. Acest lucru se va realiza prin identificarea și utilizarea eficientă a surselor de carbon și azot, precum și prin optimizarea parametrilor de creștere în cadrul procesului de fermentație. Scopul final este transformarea *A. limacinum* SR21 într-o sursă semnificativă de compuși valoroși pentru industria alimentară, contribuind la eficiență și durabilitate (Bratosin *et al.*, 2024a).

4.1. Material și Metodă

Cultivarea *A. limacinum* SR21 (ATCC MYA-1381) utilizată în acest studiu s-a realizat la Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Facultatea de Știința Alimentelor, din Cluj-Napoca. Celulele au fost activate în 10 ml de apă de mare artificială (ASW) care conține 20 g/L glucoză (VWR Chemicals, Belgia), 10 g/L extract de drojdie (Alfa Aesar, Karlsruhe, Germania) și 20 g/L săruri de mare (Sigma - Aldrich, SUA), compoziția ASW fiind raportată de Chin și colab. (2006).

Conținutul de acizi grași al fermentațiilor a fost determinat utilizând cromatografia de gaze cuplată cu spectrometrie de masă. Transesterificarea cu 1% SO₄ în metanol a fost utilizată pentru a obține profilul acizilor grași din lipidele totale (Dulf *et al.*, 2017; Mitrea *et al.*, 2019). Un cromatograf de gaze PerkinElmer Clarus 600 T cuplat cu un spectrometru de masă (PerkinElmer, Inc., Shelton, CT, SUA) a fost utilizat pentru a cuantifica acizii grași metilați din probă. O coloană capilară Supelcowax 10 (Supelco Inc., Darmstadt, Germania) de 60 m × 0,25 mm i.d. și o grosime a filmului de 0,25 μm cu capacitate de 0,5 μL de probă, a fost utilizată.

4.2. Rezultate și discuții

Conținutul de acizi grași din rezultați în urma fermentațiilor în falcon și bioreactor este prezentat în Fig. 3.5.

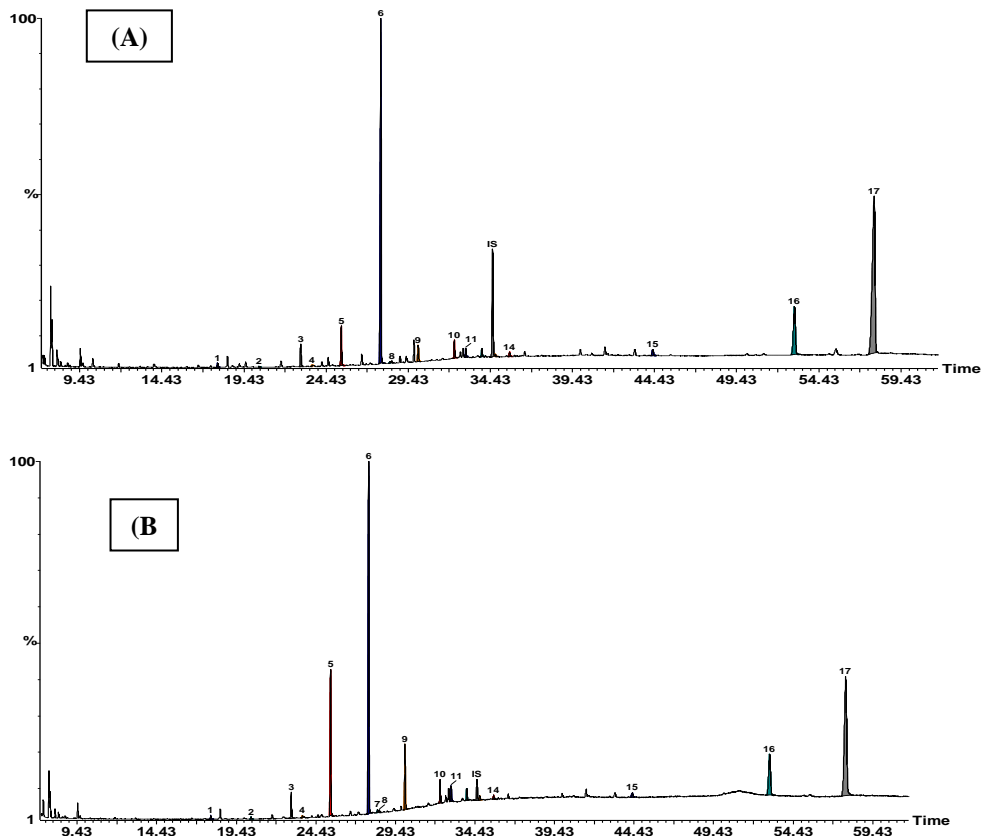


Figura 3.5. Analiza GC-MS a acizilor grași obținuți în urma fermentației în falcon (A) și bioreactor (B).

Vârfuri: (1) acid lauric; (2) acid tridecanoic; (3) acid miristic, (4) acid 11-tetradecenoic; (5) acid pentadecanoic; (6) acid palmitic; (7) acid hexadecenoic cis-7; (8) acid palmitoleic; (9) acid margaric; (10) acid stearic, (11) acid oleic, (12) acid linoleic; (13) acid γ -linolenic; (14) acid α -linolenic; (15) acid eicosapentaenoic, (16) acid adrenic; (17) acid docosahexaenoic (DHA)

După cum se poate observa, s-au obținut următoarele valori: acid lauric (+15,15%), acid palmitic (+3,30%), acid palmitoleic (+5,25%), acid α -linolenic (+31,25%), acid eicosapentaenoic (+29,23%), acid adrenic (+17,13%) și acidul docosahexaenoic (+43,13%) au avut o valoare mai mare în fermentația în falcon. În bioreactor s-a observat o cantitate mai mare de acizi grași pentru acid tridecanoic (+200%), acid miristic (+14,70%), acid 11-tetradecenoic (+44,44%), acid pentadecanoic (+270,47%), cis-7 acizi hexadecenoici (+71,42%), acid margaric (+294,66%), acid stearic (+30%), acid

oleic (+74,07%), acid linoleic (+53,03%), acid γ -linolenic (+141,17%). De asemenea, lipidele totale au fost aproape duble în balon $8,93 \pm 0,25$ (g/100g biomasă uscată) comparativ cu bioreactorul $4,89 \pm 0,35$ (g/100g biomasă uscată).

4. Studiu 2. Caracteristicile nutriționale și fizico-chimice ale batoanelor inovatoare îmbogățite cu produsul secundar rezultat de la prelucrarea *Aronia melanocarpa*

Obiectivul principal al studiului este studiul contribuției nutriționale și proprietățile funcționale ale subproduselor provenite de la *A. melanocarpa*, identificând rolul acestora în îmbunătățirea profilului nutrițional și benefic asupra sănătății umane al produselor alimentare. Studiul analizează diverse aplicații în industria alimentară, inclusiv dezvoltarea de batoane inovatoare, subliniind rolul valoros al acestor subproduse ca surse de antioxidanți și alți compuși bioactivi (Bratosin *et al.*, 2024a).

4.1. Material și Metodă

Măsurătorile reologice dinamice ale batoanelor proteice au fost efectuate folosind un reometru Anton Paar MCR 72 (Anton Paar, Graz, Austria) echipat cu un sistem de plăci Peltier (P-PTD 200/Air) și un controler de temperatură (setat la $T = 4$ °C și temperatura camerei). Reometrul avea o placă paralelă netedă cu diametrul de 50 mm (PP-50-67300). Inițial, în centrul plăcii inferioare a sistemului Peltier s-au adăugat 3 g de probă, cu un spațiu de 1,5 mm între plăci și s-au lăsat să se odihnească timp de 5 minute (Teleky *et al.*, 2022). După furnizarea probei, orice exces a fost îndepărtat și a fost adăugat ulei de siliciu pentru a preveni uscarea. Testele de baleiere de frecvență oscilativă au fost apoi efectuate la frecvențe unghiulare cuprinse între 0,628 și 628 rad/s pentru a determina modulul de stocare dinamic (elastic) (G' , Pa) și modulul de pierdere (vâscos) (G'' , Pa). G' și G'' reprezintă capacitatea materialului de a stoca energia de deformare elastică și, respectiv, porțiunea vâscoasă a materialului. Rezultatele din trei experimente, fiecare cu replici, au fost prezentate ca valoare medie \pm abatere standard (SD), unde $n = 3$. Cu Graph Prism Versiunea 8.0.1 a fost efectuată o analiză statistică (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, SUA).

4.2. Rezultate și discuții

În contextul studiului nostru, aplicarea măsurătorilor reologice dinamice pe batoanele nutritive înainte de fabricare are o importanță semnificativă din mai multe motive (Fig. 4.2).

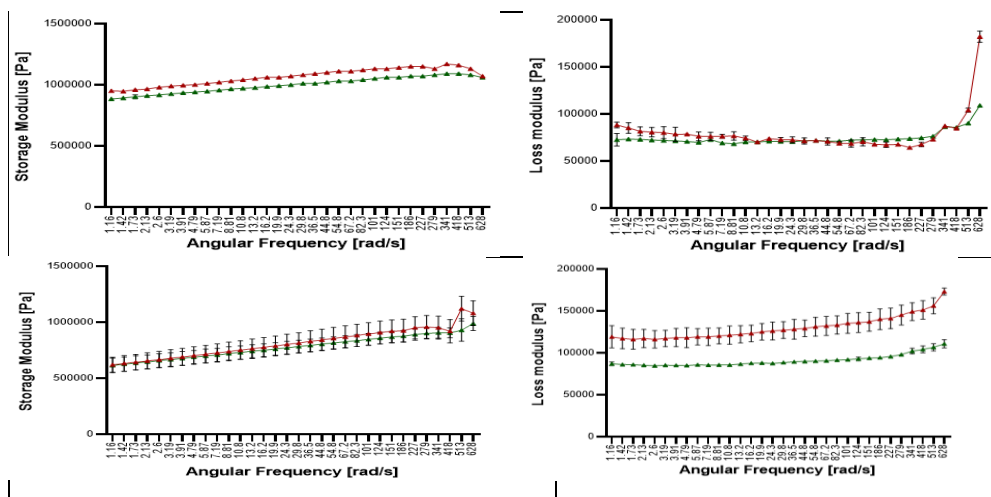


Figure 4.2. Proprietăți legate de curgerea și comportamentul la deformare a barelor înainte și după îmbogățirea cu pulbere de aronia la temperatura camerei (a, b) și la 4°C (c, d), unde roșu este bara de control și culoarea verde este completată cu baton de produs secundar de aronia

Reologia dinamică, care implică studiul fluxului și comportamentului de deformare al unui material în diferite condiții, oferă perspective cruciale asupra caracteristicilor structurale și texturale ale produselor alimentare. Aici, discutăm despre relevanța aplicării măsurătorilor reologice dinamice în faza de pre-fabricare a batoanelor îmbogățite cu aronia în comparație cu batoanele de control. Pentru a selecta cea mai bună variantă de compoziție pentru batoane, măsurătorile au fost efectuate pe toate loturile la temperatura camerei și 4 °C (Fig. 4.2).

Tabelul 4.5.

Rezultatele analizei nutriționale a celor două variante de batoane

Specificare	Baton martor	Baton cu aronia
Substanța uscată (%)	90.52	90.43
Umiditatea (%)	9.47	9.56
Cenușa (%)	1.82	1.87
Proteina (%)	12.20	12.28
Grăsimea (%)	20.51	20.46
Carbohidrații (%)	45.41	45.47
Fibrele (%)	10.58	10.35
Kcal	429.87	430.01
Kj	1798.59	1799.16

Statistica descriptivă prezintă \pm SD (n = 3). A fost efectuată analiza ANOVA pentru a determina diferențele semnificative între batonul martor și batonul cu aronia, urmată de testele de comparații multiple Sidak. În această analiză, a doua coloană a fost comparată cu prima coloană. Următoarele simboluri indică niveluri diferite de semnificație: N.S. (nu este semnificativ).

5. Studiul 3. Percepția consumatorilor referitoare la batoanele nutritive. Studiu de caz: Batoanele pe bază de aronia

Scopul studiului a fost de a investiga și analiza percepțiile și preferințele consumatorilor cu privire la batoanele nutriționale, cu un accent special pe cele realizate din subproduse de aronia. Cercetarea a urmărit să evidențieze factorii care influențează alegerile consumatorilor, credibilitatea surselor de informații și variantele preferate de produs.

5.2. Material și metodă

Un sondaj cantitativ cu 24 de itemi cu posibilități diferite de răspuns (da, nu, variante multiple) a fost realizat în perioada februarie – mai 2024. Au fost concepute și distribuite chestionare cu scopul de a identifica percepțiile și preferințele consumatorilor cu privire la batoanele nutriționale, cu un accent specific pe cele realizate din subproduse de aronia. Chestionarele sunt structurate în patru părți, referitoare la: profilul demografic, cunoștințele despre batoanele proteice și aronia, percepțiile și așteptările de la batoanele proteice și aronia și percepțiile generale despre batoanele cu aronia. Au fost repartizați la 384 de locuitori ai municipiului Cluj-Napoca, care au reședința în Cluj-Napoca, și sate situate în vecinătatea orașului.

4.2. Rezultate și discuții

Batoanele proteice pe bază de aronia sunt varianta cea mai preferată în rândul respondenților, reflectând un interes puternic al consumatorilor și o piață potențială pentru aceste produse. Alimentele funcționale integrate au, de asemenea, un atracție semnificativă, ceea ce sugerează că produsele care combină aronia cu alte ingrediente funcționale sunt bine primite. Pulberile, deși sunt mai puțin populare decât batoanele și alimentele integrate, dețin totuși o pondere notabilă a preferințelor. Capsulele și alte forme de produs sunt mai puțin favorizate, indicând un interes limitat al consumatorilor. Procentul minim de preferințe nespecifice sugerează că majoritatea consumatorilor au o idee clară despre tipul lor preferat de produs pe bază de aronia.

• Powder • Capsules • Proteic bars
• Integrated functional food • No specific preferences • Others

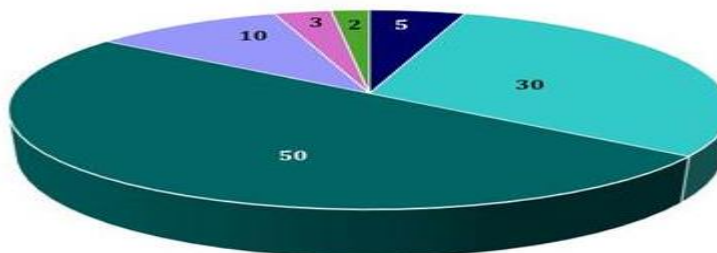


Figura 5.8. Variantele preferate de produse pe bază de aronia

6. Concluzii și recomandări

Rezultatele obținute în studii conduc la următoarele concluzii generale, care sunt prezentate în cele ce urmează.

Aurantiochytrium limacinum SR21 este o resursă promițătoare pentru industria alimentară și nutraceutică, oferind proteine, acizi grași polinesaturați, în special acizi grași omega-3, cum ar fi acidul eicosapentaenoic (EPA) și acidul docosahexaenoic (DHA), precum și compuși bioactivi valoroși precum acizii organici, inclusiv acizi grași mononesaturați cum ar fi acidul oleic și acizi grași saturați cum ar fi acidul palmitic.

Investițiile în cercetare și dezvoltare pentru a optimiza tehnicile de cultivare, extracție și procesare ar putea maximiza randamentul și biodisponibilitatea acestor compuși benefici, sporind astfel aplicarea lor în alimente funcționale, suplimente alimentare și alte produse care promovează sănătatea.

Batoanele și pulberea liofilizată din subprodusul de *Aronia melanocarpa* și-au păstrat proprietățile nutritive și antioxidante, în special 12% proteine, 20% grăsimi și un conținut caloric de 430 kcal. În plus, au prezentat o creștere semnificativă a compușilor fenolici cu 755,74% după faza de digestie. Cercetările ulterioare privind optimizarea metodelor de procesare și explorarea aplicațiilor suplimentare în industria alimentară și a băuturilor ar putea îmbunătăți utilizarea acestor produse secundare valoroase. Procesul de liofilizare a subprodusului *Aronia melanocarpa* a menținut și îmbunătățit proprietățile antioxidante ale pulberii. În plus, a demonstrat o creștere semnificativă a activității antioxidante, cu o îmbunătățire de 61% față de produsul secundar inițial, evidențiind potențialul antioxidant al pulberii. Familiaritatea cu „alimentele funcționale” și „batonul proteic” sunt dimensiunile primare ale cunoștințelor, explicând majoritatea variațiilor din setul de date. Încrederea în beneficiile batoanelor proteice și fructelor de aronia, deși este mai puțin semnificativă, contribuie totuși la înțelegerea generală a percepțiilor consumatorilor. Aceste informații ar putea fi valoroase pentru a viza eforturile educaționale sau de marketing pentru a îmbunătăți familiaritatea și încrederea în aceste produse.

Pe baza concluziilor, recomandările sunt formulate, după cum sunt redate în cele ce urmează. Optimizarea procesului de cultivare a *Aurantiochytrium limacinum* SR21. Recomandarea principală este continuarea eforturilor de cercetare pentru optimizarea condițiilor de cultivare a *Aurantiochytrium limacinum* SR21. Prin extinderea procesului de producție la nivel industrial, compușii valoroși pot fi produși mai eficient și mai durabil din microalge la scară mai mare, ceea ce ar putea avea un impact semnificativ asupra industriei alimentare și a suplimentelor alimentare sănătoase. Având în vedere creșterea semnificativă a conținutului de proteine și acid docosahexaenoic (DHA) în *Aurantiochytrium limacinum* SR21, se recomandă cercetarea și dezvoltarea unei tehnologii eficiente de producere a batoanelor îmbogățite cu această microalgă. Acest lucru ar putea oferi o modalitate inovatoare de a încorpora acești

compuși nutriționali benefici în consumul alimentar zilnic. Optimizarea procesului de liofilizare din subprodusul *Aronia melanocarpa*. Având în vedere îmbunătățirea semnificativă a activității antioxidante prin procesul de liofilizare a subprodusului *Aronia melanocarpa*, se sugerează explorarea și dezvoltarea în continuare a tehnologiei de liofilizare, cu accent pe materialele de liofilizare.

Datele cercetării noastre au sugerat că combinația de *Aurantiochytrium limacinum* SR21 și *Aronia melanocarpa* oferă beneficii sinergice. Se recomandă evaluarea sinergiei dintre aceste două surse de compuși bioactivi pentru dezvoltarea de produse alimentare inovatoare sau suplimente nutritive.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Ali, S., Mushtaq, J., Nazir, F., & Sarfraz, H. (2017). Production and processing of single cell protein (SCP) - A review. *Eur. J. Pharm. Med.Res.*, 4, 86–94.
2. **Bratosin, B. C., S. Darjan, & Vodnar, D. C. (2021). Single Cell Protein: A Potential Substitute in Human and Animal Nutrition. *Sustainability*, 13, 9284. <https://doi.org/10.3390/su13169284>. Impact Factor: 3.200.**
3. **Bratosin, B. C., Martău, G. A., Ciont, C., Ranga, F., Simon, E., Szabo, K., Darjan, S., Teleky, B. E. & Vodnar, D. C. (2024). Nutritional and Physico-Chemical Characteristics of Innovative Bars Enriched with *Aronia melanocarpa* By-Product Powder. *Appl. Sci.*, 14, 2338. <https://doi.org/10.3390/app14062338>. Impact Factor: 2.700.**
4. **Bratosin, B. C., & Vodnar, D. C. (2024). Production of Bioactive Compounds by *Aurantiochytrium limacinum* SR21 into discontinuous fermentation. *Journal of Algal Research*. Impact Factor: 5,100. (in press)**
5. Dulf, F. V., Vodnar, D. C., Dulf, E.V., & Pintea, A. (2017). Phenolic compounds, flavonoids, lipids and antioxidant potential of apricot (*Prunus armeniaca* L.) pomace fermented by two filamentous fungal strains in solid state system. *Chem. Cent. J.*, 11(1), 92.
6. Junaid, F., Khawaja, L. A., & Ali, S. (2020). Single cell proteins as a potential meat substitute: A critical review. *World J. Pharm. Res.*, 9, 141–161.
7. Mitrea, L., Ranga, F., Fetea, F., Dulf, F. V., Rusu, A., Trif, M., & Vodnar, D. C. (2019). 5 biodiesel-derived glycerol obtained from renewable biomass - A Suitable Substrate for the growth of *Candida zeylanoides* yeast strain ATCC 20367. *Microorganisms*, 7(8), 265.
8. Takahashi, J. A., Barbosa, B. V. R., Martins, B. D. A., Guirlanda, C. P., Moura, M. A. F.(2020). Use of the Versatility of Fungal Metabolism to Meet Modern Demands for Healthy Aging, Functional Foods, and Sustainability. *J. Fungi*, 2020, 6, 223.
9. Teleky, B. E., Martău, G. A., Ranga, F., Pop, I. D., & Vodnar, D. C. (2022). Biofunctional soy-based sourdough for improved rheological properties during storage. *Sci. Rep.*, 12, 1–11.