

UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE INTEGRATIVĂ

TEZĂ DE DOCTORAT

Rezumat

Coordinator Științific

Prof. Dr. *Emeritus* Elena RAKOSY

Student doctorand

Maricel BOCĂNEALĂ

CLUJ-NAPOCA

2025

UNIVERSITATEA BABEȘ-BOLYAI
FACULTATEA DE BIOLOGIE ȘI GEOLOGIE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE BIOLOGIE INTEGRATIVĂ

TEZĂ DE DOCTORAT
Rezumat

**Avansarea produselor cianobacteriene cu valoare adăugată
printr-o abordare multidisciplinară, integrând cunoștințele
științifice cu relevanța industrială**

Coordinator Științific
Prof. Dr. *Emeritus* Elena RAKOSY

Student doctorand
Maricel BOCĂNEALĂ

CLUJ-NAPOCA
2025

Conținut	
Sumarul tezei.....	1
Prefață.....	4
CAPITOLUL I.....	5
Introducere generală.....	5
I.1. Introducere.....	5
I.2. Utilizările cianobacteriilor și produselor cianobacteriene.....	6
I.2.1. Pigmenți.....	7
I.2.1.1 Clorofilă.....	7
I.2.1.2. Carotenoizi.....	8
I.2.1.3. Ficobiliproteine.....	9
I.2.1.4. Scitonemină.....	10
I.2.2. Biocombustibili.....	10
I.2.2.1. Procesare de biomasă.....	11
I.2.2.2. Producție de hidrogen.....	12
I.2.3. Bioplastice.....	12
I.2.3. Componente bioactive.....	13
I.2.4. Exopolizaharide.....	14
I.2.5. Progrese recente în obținerea produselor cianobacteriene.....	15
I.2.5.1. Ingineria de tulpini cianobacteriene.....	15
I.2.5.2. Inovații ale fotobioreactoarelor.....	16
I.3. Exopolizaharide produse de cianobacterii.....	17
I.3.1. Diversitatea structurală a cianobacteriilor.....	18
I.3.1.1. Monozaharidele C5 și C6.....	18
I.3.1.2. Heteropolimeri.....	18
I.3.1.3. Proprietăți fizice diverse.....	19
I.3.2. Rolul exopolizaharidelor în ecologie și fiziologie.....	19
I.3.2.1. Matrici de biofilm și adeziune.....	20
I.3.2.2. Protecție și toleranță la stres.....	20
I.3.2.3. Motilitate și dezvoltare.....	21
I.3.2.4. Rezervoare de nutrienți.....	22
I.3.3. Aplicații ale exopolizaharidelor cianobacteriene.....	22

I.3.3.1. Aplicații medicale și farmaceutice.....	22
I.3.3.2. Aplicații pentru mediul înconjurător.....	23
I.3.3.3. Aplicații alimentare și industriale.....	24
I.4. Mecanismul propus al producerii exopolizaharidelor.....	24
I.4.1. Căi biosintetice și clustere genice.....	24
I.4.2. Reglarea sintezei exopolizaharidelor în condiții de mediu.....	27
I.4.3. Îmbunătățiri prin inginerie genetică.....	29
I.5. Procese biotehnologice pentru extracția și purificarea exopolizaharidelor.....	30
I.6. Scopul tezei.....	32
I.7. Referințe.....	33
CAPITOLUL II.....	43
Maparea producției academice privind exopolizaharidele cianobacteriene și aplicațiile lor industriale.....	43
II.1. Introducere.....	43
II.2. Materiale și metode.....	44
II.2.1. Obținerea datelor bibliometrice.....	44
II.2.1.1. Criterii de selecție a articolelor pentru setul de date filtrat.....	45
II.2.2. Setul de date filtrat.....	45
II.2.3. Setul de date cu brevete Espacenet.....	46
II.3. Rezultate.....	46
II.3.1. Maparea producției academice privind exopolizaharidele cianobacteriene – setul de date complet.....	46
II.3.1.1. Producția științifică anuală.....	47
II.3.1.2. Autorat și rețele de cercetare.....	49
II.3.1.3. Jurnale ce publică cercetarea privind exopolizaharidele cianobacteriene.....	51
II.3.1.4. Arii de cercetare.....	52
II.3.2. Maparea producției de cercetare privind aplicațiile industriale ale exopolizaharidelor cianobacteriene – setul de date filtrat.....	57
II.3.3. Analiza brevetelor din Espacenet.....	61
II.4. Discuții.....	65
II.5. Concluzii.....	67
II.6. Finanțare.....	67
II.7. Mulțumiri.....	67

II.8. Referințe.....	68
CAPITOLUL III.....	74
Caracterizarea spectroscopică și cromatografică a exopolizaharidelor purificate intern din specia <i>Coelomoron pussilum</i> AICB1012.....	74
III.1. Introducere.....	74
III.2. Materiale și metode.....	78
III.2.1. Materiale.....	78
III.2.2. Producerea, purificarea și caracterizarea probelor de exopolizaharide.....	78
III.2.3. Analiza FT-IR.....	79
III.2.4. Analiza HPLC.....	79
III.2.5. Măsurători de spectroscopie SERS.....	79
III.3. Rezultate și discuții.....	80
III.3.1. Caracterizare spectroscopică.....	80
III.3.1.1. Investigația SERS.....	80
III.3.2. Analiza FT-IR.....	82
III.3.3. Analiza cromatografică.....	84
III.4. Concluzii.....	85
III.5. Finanțare.....	87
III.6. Mulțumiri.....	87
III.7. Referințe.....	87
CAPITOLUL IV.....	93
Profilarea suplimentelor alimentare cu Spirulină disponibile pe piața din România.....	93
IV.1. Introducere.....	93
IV.2. Materiale și metode.....	95
IV.2.1. Set de date.....	95
IV.2.2. Prepararea probelor și analiza elementală.....	96
IV.2.3. Analiza prin spectrometrie de masă a raportului izotopic.....	97
IV.2.4. Analiza datelor.....	97
IV.3. Rezultate și discuții.....	99
IV.3.1. Rezultate elementale.....	99
IV.3.2. Rezultate izotopice.....	99
IV.3.3. Analiza profilului Spirulinei.....	100

IV.4. Concluzii.....	111
IV.5. Finanțare.....	112
IV.6. Mulțumiri.....	112
IV.7. Referințe.....	112
CAPITOLUL V.....	118
Concluzie generală și perspective de viitor.....	118
MATERIALE SUPLIMENTARE CAPITOLUL II.....	121
MATERIALE SUPLIMENTARE CAPITOLUL III.....	154
MATERIALE SUPLIMENTARE CAPITOLUL IV.....	157
LISTA PUBLICAȚIILOR INCLUSE ÎN TEZĂ DREPT CAPITOLE.....	158
LISTA PUBLICAȚIILOR NEINCLUSE ÎN TEZĂ DREPT CAPITOLE.....	158
PARTICIPĂRI LA CONFERINȚE.....	159
IMPLICARE ÎN PROIECTE DE CERCETARE CA MEMBRU AL ECHIPEI.....	159
MULȚUMIRI.....	161

Schița tezei

Cianobacteriile sunt o linie veche de organisme cu un impact biogeochimic profund de-a lungul istoriei Pământului. Cea mai notabilă realizare a lor este Marele Eveniment de Oxidare, un efect secundar masiv al evoluției aparatului fotosintetic care a adus nivelul de oxigen atmosferic la nivelurile de astăzi și a modelat lumea așa cum o știm. Această descendență străveche nu este străină de societățile umane care au folosit membri din acest grup pentru alimente, furaje, remedii populare sau cosmetice. Aceste organisme devin din ce în ce mai valoroase în setul de instrumente al umanității, în special odată cu descoperirile polizaharidelor extracelulare (EPS) produse de ele.

Munca prezentată în această teză are ca obiective:

- I. să analizeze literatura academică privind exopolizaharidele cianobacteriene și aplicațiile lor industriale;
- II. să caracterizeze exopolizaharidele folosind metode spectroscopice și cromatografice, pentru a permite o producție îmbunătățită și diversificată pentru sectorul industrial;
- II. să exploreze profilurile de nutrienți și elemente toxice din produsele Spirulina disponibile pe piața din România

Rezumat

CAPITOLUL I. Introducere generală

Capitolul I prezintă cunoștințele generale despre produsele cianobacteriene, inclusiv alimente, pigmenți, compuși bioactivi, biocombustibili și bioplastice. O atenție deosebită este acordată exopolizaharidelor, detaliindu-se caracteristicile lor structurale, rolurile cunoscute și potențiale pentru fiziologia cianobacteriilor și potențialele lor aplicații biotehnologice. Acest capitol evidențiază perspective fundamentale și avantaje practice pentru exploatarea produselor cianobacteriene.

Biomasa cianobacteriană a fost recunoscută ca o resursă valoroasă de-a lungul istoriei civilizației umane. Cea mai veche înregistrare istorică pare să fie din jurnalele conchistadorilor, care descriu *tecuitlatl* (Farrar, 1966). Cianobacteriile sunt un grup de organisme capabile să efectueze fotosinteza oxigenată. Capacitatea lor de a fotosintetiza se bazează pe 3 clase majore de compuși colorați care pot interacționa cu lumina, și anume clorofila, carotenoizii și ficobiliproteinele. Acești compuși bioactivi pot fi utilizați pentru diverse aplicații biotehnologice în industriile cosmetice, alimentare sau farmaceutice (Assunção et al., 2022).

Clorofila (o poliena colorată conjugată) este cel mai abundent pigment fotosintetic în cianobacterii și alte organisme fotoautotrofe. Carotenoizii sunt pigmenți nepolari care joacă un rol crucial în fotoprotecție. Ei pot absorbi lumina din spectrul vizibil care diferă de spectrul de absorbție al moleculelor de clorofilă. Ficobiliproteinele sunt compuși fluorescenți solubili în apă, cu rolul biologic principal de a absorbi lumina în intervalul spectral vizibil și de a proteja celulele cianobacteriene atunci când sunt expuse la intensitate mare a luminii.

Cianobacteriile au o caracteristică fiziologică care le diferențiază de alte bacterii Gram-negative, și anume straturile lor externe mucilaginoase. Din punct de vedere chimic, acest strat este format de cele mai multe ori din polizaharide. Aceste polizaharide pot fi clasificate în funcție de relația lor cu celula bacteriană: înveliș, capsulă sau slime și polizaharide solubile.

Polizaharidele reprezintă molecule biologice produse de cianobacterii, cu avantaje din punct de vedere economic, datorită versatilității lor în aplicații industriale. Pentru fezabilitatea economică, producția la scară industrială utilizează în principal surse microbiene pentru obținerea acestor polimeri. Interesul pentru cianobacterii ca sursă de exopolizaharide provine din capacitatea lor fotosintetică (abilitate superioară de a fixa carbonul comparativ cu plantele, eliberând oxigen), din

cerințele nutriționale reduse care pot fi acoperite cu adaosuri minime provenite din diferite surse de ape reziduale, precum și din capacitatea de a produce o gamă diversă de produse polimerice cu aplicații variate, unele tulpini fiind capabile să le sintetizeze și în volume mari. La toate aceste avantaje se adaugă și faptul că aceste produse polimerice sunt biodegradabile, ceea ce le sporește și mai mult atractivitatea economică.

Exopolizaharidele cianobacteriene sunt alcătuite din unități repetitive, care la rândul lor sunt formate din diferite monozaharide. O unitate repetitivă poate conține între cinci și opt monozaharide, însă au fost raportate și cazuri extrem de complexe în care o unitate repetitivă includea și 15 monozaharide. Aceste caracteristici fizico-chimice variate sunt rezultatul direct al diversității structurale a exopolizaharidelor cianobacteriene și sunt strâns legate atât de rolul lor ecologic, cât și de potențialele aplicații biotehnologice.

Procesul de biosinteză poate fi împărțit în trei etape, desfășurate în compartimente celulare diferite. În primul rând, în citoplasmă are loc activarea monozaharidelor și conversia acestora în nucleotide. În al doilea rând, la nivelul membranei plasmatică, zaharurile activate sunt asamblate în unități repetitive prin adăugarea secvențiale pe un transportor lipidic. În cele din urmă, tot la nivelul membranei plasmatică, pe fața periplasmică, are loc polimerizarea unităților repetate. Această ultimă etapă este și momentul în care noii polimeri sunt exportati la suprafața celulei (Pereira et al., 2009; Potnis et al., 2021).

Pentru succesul producției și aplicării biotehnologice a exopolizaharidelor cianobacteriene, identificarea parametrilor de cultură este esențială. Până în prezent, s-a generat un volum mare de cercetări care urmăresc identificarea celor mai adecvate condiții de cultură și medii nutritive, astfel încât să se obțină exopolizaharide de calitate în cantități profitabile.

Potentialul exopolizaharidelor în aplicațiile industriale poate fi exploatat și prin inginerie genetică. Chiar dacă nu toate detaliile legate de căile biosintetice au fost investigate în profunzime, oportunitățile de manipulare genetică pentru a modifica cantitatea sau calitatea polimerilor produși de tulpinile de cianobacterii sunt prezente în fiecare etapă a căii biosintetice.

Metodele alese pentru izolarea și purificarea exopolizaharidelor pot influența randamentul final și calitatea produsului, unele protocoale necesitând optimizare pentru ca produsul obținut să corespundă scopului real de utilizare. În plus, adecvarea acestor protocoale trebuie să țină cont și de ușurința în utilizare, eficiență și posibilitatea de scalare.

Rezumat

CAPITOLUL II. Analiza producției științifice privind exopolizaharidele cianobacteriene și aplicațiile lor industriale

Capitolul II a fost acceptat pentru publicare ca: **Bocăneală, M.**, Goron, G. M., Rakosy-Tican, E. 2025. Charting the Academic Output on Cyanobacterial Exopolysaccharides and Their Industrial Applications. *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Biologia*

Exopolizaharidele cianobacteriene (EPS) au demonstrat un potențial considerabil în diverse domenii industriale. În industria alimentară, ele pot fi utilizate ca agenți de îngroșare, stabilizatori și emulgatori naturali, îmbunătățind textura și durata de valabilitate a produselor (Vicente-García et al., 2004; Jindal et al., 2013; Najdenski et al., 2013; Nath et al., 2021). În domeniul farmaceutic, proprietățile lor bioactive, precum activitatea antioxidantă, antibacteriană și antivirală, le fac potrivite pentru dezvoltarea de noi agenți terapeutici (Gacheva et al., 2013; Bhatnagar et al., 2014; Shen et al., 2018; Flores et al., 2019; Ramachandran et al., 2020). Aplicațiile de mediu includ bioremedierea, unde exopolizaharidele pot lega metale grele și poluanți, facilitând eliminarea acestora din zonele contaminate (Colica et al., 2010; Santos et al., 2014; Mota et al., 2016; Mohamed et al., 2023). În plus, în agricultură, cianobacteriile producătoare de exopolizaharide contribuie la stabilizarea și fertilitatea solului, promovând practici agricole sustenabile (Van Camp et al., 2022; Falsini et al., 2023; Vinoth et al., 2023).

Studiul nostru oferă o analiză a peisajului academic și industrial privind exopolizaharidele cianobacteriene în perioada 2004–2023. Prin utilizarea analizelor bibliometrice și a celor bazate pe brevete, am identificat tendințele cheie, principalii contribuitori și un potențial crescut pentru aplicațiile industriale ale cercetărilor asupra exopolizaharidelor cianobacteriene. În cele ce urmează, discutăm implicațiile acestor constatări, relevanța lor pentru comunitățile științifice și industriale, precum și limitările acestui studiu.

Constatările noastre evidențiază o creștere constantă a volumului de cercetări privind EPS cianobacteriene, cu o rată anuală de creștere de 13,14% pe parcursul perioadei studiate (2004–2023). Această creștere reflectă un interes tot mai mare pentru acest domeniu. Cu toate acestea, tematica cercetărilor rămâne concentrată în jurul sănătății, industriei farmaceutice și aplicațiilor de mediu, ceea ce indică faptul că aceste domenii industriale domină agenda de cercetare.

Analiza autoratului și a rețelelor de colaborare evidențiază un efort concentrat în rândul unui grup select de cercetători și instituții, în special din China, SUA, India și Europa. Această colaborare

este în concordanță cu natura multidisciplinară a aplicațiilor exopolizaharidelor, dar indică totodată și existența unor disparități geografice și instituționale în ceea ce privește intensitatea și focalizarea cercetării.

Setul de date filtrat evidențiază un interes semnificativ pentru domeniile sănătății și mediului, acestea reprezentând peste jumătate din focalizarea cercetărilor. Proprietățile bioactive și de bioremediere ale exopolizaharidelor au determinat aceste tendințe, făcând din ele candidați promițători pentru dezvoltarea de medicamente, vindecarea rănilor și eliminarea poluanților. În ciuda acestei concentrări, cercetarea privind aplicațiile în sectoarele alimentar, agricol și energetic rămâne sporadică și slab dezvoltată, posibil din cauza finanțării limitate.

Rata pozitivă de creștere anuală a publicațiilor, dominația economiilor globale de top ca principali producători de cercetare și orientarea aplicativă a celor mai importante reviste și articole intens citate evidențiază caracterul translativ al acestui domeniu. Aceste constatări indică faptul că cercetarea privind EPS cianobacteriene este orientată spre aplicații potențiale.

Creșterea numărului de cereri de brevet după 2014 reflectă extinderea interesului potențial din partea industriei, cu SUA și China ca actori principali. Totuși, se observă o discrepanță între producția academică și activitatea de brevetare, în special în țări precum China, care conduce la nivelul frecvenței publicațiilor, dar este în urmă în ceea ce privește brevetele. Acest aspect poate sugera existența unor provocări în transpunerea cercetării academice în produse comerciale.

Remarcăm posibile limitări legate de căutările în domeniul proprietății intelectuale – căutarea în baza Espacenet a fost realizată pe baza a doi termeni: *cyanobacteria* și *exopolysaccharide*. Este posibil ca unele cereri de brevet să fie mai specifice și să menționeze un anumit gen, specie, tulpină de cianobacterii, un anumit tip de polizaharid extracelular sau un proces specific, fără a utiliza neapărat acești termeni generali. Totuși, căutarea a fost efectuată folosind filtrul „full text”, ceea ce înseamnă că au fost incluse toate brevetele care conțin acești termeni în documentația aferentă. Deși acest lucru nu garantează că toate brevetele relevante au fost incluse, aduce rezultatul mai aproape de realitate.

În ceea ce privește colectarea datelor de publicare – studiul nostru se bazează pe Web of Science pentru datele bibliometrice și am inclus doar articole redactate în limba engleză. Am utilizat un șir de căutare relativ general, care ar trebui să fi inclus majoritatea lucrărilor relevante. Nu am introdus în interogarea de căutare denumiri specifice de specii de cianobacterii, însă am folosit opțiunea „all fields”. Având în vedere că este puțin probabil ca lucrările axate pe tulpini specifice de cianobacterii să nu fi utilizat termenul *cyanobacteria* sau un termen similar în câmpurile de indexare, considerăm că toate rezultatele relevante au fost incluse.

Rezumat

CAPITOLUL III. Caracterizarea spectroscopică și cromatografică a exopolizaharidelor purificate din specia *Coelomoron pussilum* AICB1012

Manuscris în proces de revizie

Cianobacteriile reprezintă un grup de organisme tot mai apreciat în sectorul industrial (Liu et al., 2021; Diaz et al., 2023; Zedler et al., 2023). Capacitatea lor de a capta CO₂, aparatul enzimatic diversificat și abilitatea de a produce varii compuși cu utilitate industrială sunt câteva dintre cele mai valoroase atuuri ale acestora. *Coelomoron pussilum* AICB1012 este o astfel de specie, însă există puține studii privind particularitățile sale din punct de vedere spectral sau biochimic (Komárek, 1989). Studii anterioare au arătat că această tulpină de cianobacterii poate fi o sursă de ficoeritrină, ficocianină și aloficocianină (Porav et al., 2020). Astfel de produse se obțin prin procesarea biomasei. Pentru a valorifica mai bine procesul de creștere al acestor cianobacterii, mediul de cultură uzat a fost sursă pentru extracția unor compuși potențial valoroși. Compușii identificați în mod obișnuit în mediul de cultură uzat al cianobacteriilor sunt exopolizaharidele eliberate, o clasă diversificată de compuși cu activități biologice variate (Wu et al., 2021; Liang et al., 2024).

Spectroscopia în infraroșu a fost utilizată pentru analiza grupărilor funcționale prezente în probele de exopolizaharide. Spectroscopia Raman este frecvent folosită pentru identificarea benzilor asociate cu modurile vibraționale ale grupărilor funcționale dintr-o probă solidă sau lichidă și pentru a distinge fluctuații spectrale fine în cazul probelor cu mai mulți compuși. Informații calitative despre monozaharidele componente au fost determinate cu ajutorul cromatografiei de lichide de înaltă performanță prin compararea timpilor de retenție pentru exopolizaharidele analizate cu cei ai zaharurilor standard.

Coelomoron pussilum AICB1012 a fost cultivat în mediu BG11 cu modificări (Allen și Stanier, 1968). Toate culturile au fost menținute la 25°C, în condiții de iluminare continuă, iar agitarea optimă a fost asigurată prin aerare continuă. Culturile au fost expuse la diferite rapoarte procentuale de C:N, după cum urmează: 100:100 (control BG11), 100:50, 50:100, 50:50, 50:10, 10:50.

Având în vedere similaritățile spectrale Raman între toate probele, atenția noastră s-a concentrat pe pozițiile benzilor și intensitățile lor relative pentru a discrimina componentele

monozaharidice. Cele mai intense benzi au fost atribuite monozaharidelor manoză, galactoză, ramnoză și glucoză, așa cum reiese și din analizele vibraționale și cromatografice suplimentare. Cu contribuții minore, au fost identificate și benzi specifice pentru fucoză și acid glucuronic, precum cele de la 587 cm^{-1} , $938\text{--}943\text{ cm}^{-1}$ și 1373 cm^{-1} (Park și Kim, 2010).

Spectrele în infraroșu ale probelor de exopolizaharide liofilizate prezintă un model similar, cu diferențe minore în intensitățile benzilor. Așa cum a fost raportat anterior (Hong et al., 2021), spectrele polizaharidelor investigate sunt împărțite în cinci intervale spectrale. Regiunea I ($4000\text{--}2500\text{ cm}^{-1}$) este dominată de o bandă largă și intensă între $3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$, corespunzătoare vibrațiilor de întindere ale grupării hidroxil. Vibrațiile de întindere ale grupărilor CH și CH_2 apar în această regiune la 2851 cm^{-1} și 2922 cm^{-1} . A doua și a treia regiune ($1800\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ și $1500\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$) sunt atribuite, în general, vibrațiilor de întindere ale legăturilor duble și vibrațiilor grupărilor cu simetrie locală. În cazul nostru, banda largă dintre $1507\text{--}1423\text{ cm}^{-1}$ este cel mai probabil asociată cu îndoirea în plan a legăturilor C-H, în timp ce banda de la 1645 cm^{-1} este datorată vibrației moleculelor de apă (Wiercigroch et al., 2017). Regiunea cuprinsă între $1200\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ reprezintă zona de „amprentă” și, în cazul carbohidraților, oferă informații despre configurația legăturii glicozidice. Absorbțiile de la 1097 cm^{-1} și 1059 cm^{-1} sunt atribuite vibrațiilor de întindere ale inelului piranic, iar cea de la 866 cm^{-1} indică configurația β a unităților zaharice (Edelmann et al., 2001). Vibrațiile din regiunea sub 800 cm^{-1} sunt atribuite modurilor scheletale ale inelelor carbohidratice.

Analiza cromatografiei de lichide de înaltă performanță a probelor hidrolizate a fost utilizată pentru a evalua calitativ reziduurile de zaharuri constitutive ale exopolizaharidelor. Cu excepția probei EPS 100:50, acizii uronici au fost identificați în toate probele, în proporții diferite (timpuri de retenție de 8.5 și 9.1 minute). Prezența glucozei (9.7 minute) poate fi confirmată clar doar pentru proba EPS 100:50. Probele EPS 10:50, 50:10, 50:100 și 100:50 conțin manoză sau galactoză (timp de retenție 10.3 minute). Fructoza și ramnoza au fost identificate în probele EPS 50:100 și EPS 100:50. Cromatogramele probelor EPS 50:10 și EPS 50:50 indică, de asemenea, prezența unei cantități de fucoză.

Per ansamblu, rezultatele prezentate în această lucrare arată că tehnicile spectroscopice și cromatografice pot fi utilizate eficient pentru caracterizarea moleculară a unui bioproduct cu un efort și resurse minime. Exopolizaharidele cianobacteriene din mediile de cultură uzate nu reprezintă doar un produs cu valoare adăugată, ci pot fi exploatate și în conformitate cu principiile economiei circulare. Conținutul de zaharuri rare se traduce prin oportunități de piață, deoarece acestea nu se găsesc ușor în natură. Prezența lor în structura polizaharidului implică caracteristici fizico-chimice

care determină activități biologice unice (precum stabilizatori de emulsie, agenți de îngroșare, materiale pentru nano/microparticule sau suporturi pentru inginerie tisulară, printre altele) (Roca et al., 2015).

Rezumat

Capitolul IV. Profilarea suplimentelor alimentare pe bază de Spirulină disponibile pe piața din România

Capitolul IV a fost publicat sub forma: **Bocăneală, M.**, Hategan, A.R., David, M., Dehelean, A., Cristea, G., Szücs-Balázs, J.Z., Rakosy-Tican, E. and Magdas, D.A., 2025. Profiling the Spirulina Dietary Supplements Available on the Romanian Market. *Applied Sciences*, 15(5), p.2658.

doi: [10.3390/app15052658](https://doi.org/10.3390/app15052658)

În ultimele două decenii, consumul de suplimente alimentare a crescut la nivel global. În plus, interesul pieței pentru aceste produse a crescut în timpul pandemiei de COVID-19, ca o metodă de susținere a sistemului imunitar (Djaoudene et al., 2023). În acest context, unul dintre cele mai consumate suplimente alimentare la nivel mondial este Spirulina. *Arthrospira platensis*, cunoscută comercial sub denumirea de Spirulină, este o cianobacterie filamentoasă capabilă să reziste la alcalinitate ridicată, temperaturi mari și salinitate crescută (Cepoi și Zinicovscaia, 2020). Spirulina este foarte apreciată ca supliment alimentar, furaj și agent cosmetic. Are un conținut ridicat de proteine (până la 70%), un conținut ridicat de acizi grași liberi (până la 80% din totalul lipidelor) și un conținut relativ redus de carbohidrați (până la 20%). Este, de asemenea, o sursă bună de vitamine (A, B1, B2, B3, cianocobalamină, E etc.) (Mishra et al., 2014) și minerale (fier, calciu și magneziu). În plus, Spirulina are o listă extinsă de compuși bioactivi, de la clorofilă, beta-caroteni și xantofile, până la polizaharide, peptide și proteine, cel mai cunoscut fiind pigmentul albastru ficocianina, cu rol fiziologic de antenă de captare a luminii și antioxidant puternic în organismele animale (Romy et al., 2003). Ca urmare, numeroase studii au raportat activități antioxidante, antitumorale, antiinflamatorii, imunostimulatoare și hipoglicemice (Ismail et al., 2009; Deng și Chew, 2010; Nasirian et al., 2018).

Lucrarea de față reprezintă prima analiză cuprinzătoare a tuturor tipurilor de mostre de Spirulină disponibile pe piața din România, având ca scop evidențierea diversității produselor pe bază de Spirulină din perspectiva conținutului de macro-, micro- și ultramicroelemente, pentru a evalua dacă acest produs, considerat de unii un „superaliment”, își poate îndeplini cu adevărat promisiunile. De asemenea, a fost aplicată o analiză statistică pentru a discuta diferențele în conținutul de macro- și microelemente, precum și influențele de marketing.

În cadrul studiului a fost utilizat un set de date compus din 66 de mostre de Spirulină disponibile pe piața online din România, comercializate sub formă de tablete, pulbere și capsule, în

diverse tipuri de ambalaje. Dintre aceste mostre, 49 aveau indicată originea geografică (non-UE — 45; UE — 4), iar 32 erau menționate ca fiind produse în regim de agricultură ecologică. În plus, a fost analizată și o mostră de Spirulină obținută intern.

Cuantificarea elementelor a fost realizată utilizând un spectrometru de absorbție atomică cu flacără (FAAS) și un spectrometru de masă cu plasmă cuplată inductiv (ICP-MS). Pentru înregistrarea semnăturii izotopice ^{13}C a Spirulinei, s-a folosit spectrometria de masă cu raport izotopic (IRMS). Analiza statistică a datelor experimentale, care a inclus valoarea izotopică ^{13}C și 23 de determinări elementare ale mostrelor de Spirulină, a fost realizată pe baza programării în limbajul Python. PCA, o tehnică statistică multivariată nesupravegheată, bazată pe analiza valorilor proprii ale matricei de covarianță, a fost aplicată în cadrul acestui studiu ca metodă de analiză exploratorie a datelor, permițând identificarea grupărilor potențiale de mostre similare, precum și detectarea valorilor aberante sau a punctelor izolate. Ulterior, s-a aplicat analiza varianței (ANOVA) pentru a identifica dacă valorile izotopice sau elementare s-ar putea corela tipului de formulare a Spirulinei (capsule, tablete sau pulbere), tipului și materialul de ambalaj, provenienței geografice și regimului de cultivare specificat.

Per ansamblu, cel mai abundent mineral identificat în mostrele de Spirulină a fost potasiul (K), cu excepția a trei mostre care au prezentat sodiu (Na) în cea mai mare concentrație, în timp ce cele mai scăzute concentrații au fost observate pentru cadmiu (Cd) și antimoniu (Sb). Amprenta izotopică a mostrelor de Spirulină analizate a variat între $-33,6$ și $-16,0\text{‰}$, cu o valoare medie de $-23,9\text{‰}$. Aceste valori sunt în concordanță cu cele publicate de Kejžar et al. (2021) pentru *Spirulina spp.*, care au înregistrat o valoare medie de $\delta^{13}\text{C} = -23,0\text{‰}$.

Studiul nostru analizează toate tipurile de mostre de Spirulină disponibile pe piața din România, inclusiv una cultivată intern. Rezultatele prezentate sunt în concordanță cu ceea ce este cunoscut în general, și anume faptul că Spirulina reprezintă o sursă valoroasă de macro- și microelemente precum Ca, Mg, Fe și Zn. În ceea ce privește alte elemente potențial toxice, precum As, Pb și Cd, deși valorile acestora se află sub pragurile reglementate, ele trebuie totuși luate în considerare cu prudență atunci când Spirulina este consumată pe perioade îndelungate. Având în vedere că studiul nostru a evidențiat o variabilitate semnificativă a concentrațiilor elementare din mostre și ținând cont de lipsa unor reglementări stricte pentru acest tip de supliment alimentar, riscul pentru consumator este amplificat. În ceea ce privește influența formei de prezentare, a tipului de ambalaj și a originii geografice, studiul nostru nu a evidențiat diferențe semnificative între clase. Mai mult, nu au rezultat diferențe semnificative între mostrele etichetate ca fiind ecologice și cele

fără astfel de etichete, fapt ce subliniază că regimul de cultivare „eco/bio” este motivat în principal de considerente economice, fără o justificare din punct de vedere nutrițional.

Rezumat

CAPITOLUL V. Concluzii generale și perspective de viitor

Impactul cianobacteriilor ca grup de organisme poate fi măsurat la scală geologică. Istoria lor străveche le-a permis nu doar să colonizeze noi nișe ecologice, ci și să le transforme, făcându-le mai locuibile atât pentru ele, cât și pentru alte organisme. Ele folosesc lumina solară ca sursă de energie și sunt implicate în ciclurile biogeochimice ale celor mai importante elemente vitale pentru viața de pe Pământ. Atenția pe care au atras-o ca potențiali factori în soluționarea multora dintre problemele omenirii nu este o exagerare, dacă luăm în considerare diversitatea și versatilitatea lor. Cu toate acestea, sunt necesare eforturi substanțiale pentru ca aceste organisme să își atingă întregul potențial..

Având în vedere aceste aspecte, această teză își propune să contribuie la dezvoltarea produselor cu valoare adăugată obținute din cianobacterii prin mijloace multidisciplinare, integrând analiza literaturii și a datelor din brevete, caracterizarea moleculară și evaluarea aplicativă a produselor comerciale. Rezultatele acestei lucrări se reflectă astfel:

- I. analiza literaturii academice și a datelor din brevete a evidențiat un interes tot mai mare pentru exopolizaharidele cianobacteriene, cu un accent din ce în ce mai puternic pe proprietățile lor funcționale și aplicațiile industriale;
- II. caracterizarea exopolizaharidelor prin metode combinate spectroscopice și cromatografice a dus la identificarea unor zaharuri rare și a demonstrat că acești polimeri pot servi drept produse secundare funcționale cu valoare adăugată;
- III. analiza elementară a produselor pe bază de Spirulină disponibile pe piața din România a evidențiat compoziția acestora în termeni de macro- și microelemente (de exemplu Ca, Mg, Fe, Zn), oferind totodată informații despre prezența unor elemente potențial toxice (de exemplu Pb, As, Cd).

Originalitatea acestei lucrări constă în prezentarea primei analize bibliometrice a literaturii științifice și a datelor din brevete legate de potențialul industrial al exopolizaharidelor cianobacteriene, în prima investigație a speciei *Coelomoron pussilum* AICB 1012 cu accent pe exopolizaharidele eliberate și în prima evaluare cuprinzătoare a suplimentelor alimentare pe bază de Spirulină disponibile pe piața din România

Ca perspectivă de viitor, explorarea completă a potențialului speciei *Coelomoron pussilum* AICB 1012 pentru aplicații biotehnologice ar reprezenta următorul demers important. Optimizarea completă a condițiilor de cultură pentru obținerea unei biomase cu randament ridicat ar trebui să fie

primul pas. O abordare de tip biorafinărie, cu un proces de cultivare în două etape, ar fi soluția sigură pentru a extrage întregul spectru de compuși bioactivi din biomasa obținută. Desigur, pentru valorificarea completă a acestei tulpini de cianobacterii, s-ar putea aplica tehnici de transcriptomică, proteomică și metabolomică, care nu doar că ar sprijini succesul acestui demers, ci ar oferi și informații valoroase despre căile și procesele biologice implicate.

LISTA PUBLICAȚIILOR INCLUSE ÎN TEZĂ DREPT CAPITOLE

Chapter II

Bocăneală, M., Goron, G. M., Rakosy-Tican, E. 2025. Charting the Academic Output on Cyanobacterial Exopolysaccharides and Their Industrial Applications. *Studia Universitatis Babeș-Bolyai, Biologia, Manuscript accepted. (BDI)*

Chapter III

Bocăneală, M., Brezeștean, I., Rakosy-Tican, E. and Dina, N.E., 2025. Spectroscopic and chromatographic analysis of in house purified exopolysaccharides from *Coelomorion pussilum* AICB1012 species. *Manuscript under revision*

Chapter IV

Bocăneală, M., Hategan, A.R., David, M., Dehelean, A., Cristea, G., Szücs-Balázs, J.Z., Rakosy-Tican, E. and Magdas, D.A., 2025. Profiling the Spirulina Dietary Supplements Available on the Romanian Market. *Applied Sciences*, **15**(5), p.2658. <https://doi.org/10.3390/app15052658> (ISI IF₂₀₂₃ = 2.5, AIS₂₀₂₃ = 0.428)

LISTA DE PUBLICAȚII NEINCLUSE DREPT CAPITOLE ALE TEZEI

1. Porav, A.S., **Bocăneală, M.**, Fălămaș, A., Bogdan, D.F., Barbu-Tudoran, L., Hegeduş, A. and Dragoş, N., 2020. Sequential aqueous two-phase system for simultaneous purification of cyanobacterial phycobiliproteins. *Bioresource technology*, 315, p.123794. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123794> (ISI IF₂₀₂₀ = 9.642, AIS₂₀₂₀ = 1.245)
2. Brezeştean, I., **Bocăneală, M.**, Gherman, A.M.R., Porav, S.A., Kacsó, I., Rakosy-Tican, E. and Dina, N.E., 2021. Spectroscopic investigation of exopolysaccharides purified from *Arthrospira platensis* cultures as potential bioresources. *Journal of Molecular Structure*, 1246, p.131228. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131228> (ISI IF₂₀₂₁ = 3.841, AIS₂₀₂₁ = 0.315)
3. Ciorîță, A., Suciu, M., Rostas, A.M., Tarța, A., Popovici, G., **Bocăneală, M.**, Nekvapil, F., Macavei, S.G., Potara, M., Marica, I. and Kacso, I., 2024. Interaction of Low-Density Polyethylene Nanofragments with Autotrophic and Chemotrophic Bacteria. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 12(29), pp.10831-10840. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.4c02440> (ISI IF₂₀₂₃ = 7.1, AIS₂₀₂₃ = 1.358)

PARTICIPĂRI LA CONFERINȚE

1. Porav, A.S., **Bocăneală, M.**, Falamas, A., Barbu, L. and Dragos, N., (2019) A simple method for obtaining high purity phycobiliproteins
 - Poster presentation — 12th International Conference Processes in Isotopes and Molecules, September 25-27, 2019, Cluj-Napoca, Romania;
2. Brezeștean, I., **Bocăneală, M.**, Gherman, A.M.R., Porav, A.S., Kacsó, I., Rakosy-Tican, E., Dina, E.N., (2021) Spectroscopic investigation of exopolysaccharides purified from *Arthrospira plantensis* cultures as potential bioresources
 - Poster presentation — 7th Edition of BIO.T.A. Symposium, November, 19-20, 2021, Cluj-Napoca, Romania;

IMPLICARE ÎN PROIECTE DE CERCETARE CA MEMBRU AL ECHIPEI

- **2018 - 2020** — Proiecte complexe realizate în consorții CDI PN-IIIP1-1.2-PCCDI2017-0010; titlu: ‘Emerging molecular technologies based on micro and nano-structured systems with biomedical applications TEHNOBIOMED’; director de proiect: Dr. Ioan Turcu

- National patent application OSIM no. A00882 11/12/2019;

Dorobanțu, I., Neagu, L., Porav, S., Fălămaș A., **Bocăneală M.**;

Procedure for separating specific antibodies from polyclonal anti-phycoerythrin antisera using an affinity column with the SiO₂-ovalbumin-phycoerythrin nanoimmunosorbent. (Procedeu de separare a anticorpilor specifici din antiseruri policlonale antificoeritrină pe coloană de afinitate utilizând nanoimunosorbentul SiO₂-ovalbumină-ficoeritrină)

- National patent application OSIM no. 774/25/03/2021;

Coman, C., Onu, A., Codiță, I., Dinu, A.I., Dorobanțu, I., Neagu L., Stoica R.D., Mustăciosu C.C., Porav S., **Bocăneală M.**;

Improved procedure for obtaining polyclonal hyperimmune antisera against phycoerythrin and phycoerythrin (Procedeu îmbunătățit de obținere a unor antiseruri hiperimmune policlonale antificoeritrină și antificoeritrină)

- **2021 – 2023** — Proiect de cercetare exploratorie PN-III-P4-ID-PCE-2020-1463; titlu: ‘Unveiling the mystery behind the strong polydopamine adhesion: an original approach by introducing local isotopic markers IZO-PDA’; director de proiect: Dr. Claudiu Filip
- **2024 – 2026** — Planulul Național de Redresare și Reziliență PNRR-III-C9-2022-I8; titlu: ‘Development of New Polymeric Antibacterial Materials’; investigator principal: Dr. Anzar Khan