*Etapa 3 - Demonstrarea functionalității în condiții de operare*

**REZUMAT**

Rezultatele obținute în urma analizelor și determinarilor efectuate în această etapă au permis atingerea obiectivelor etapei a 3-a. Indicatorii de rezultat prevăzuți au fost realizați.

*Rezultate estimate:*granule de kefir ameliorate cu stabilitate demonstrata, un produs 3-biotic cu proprietăti reproductibile, metode reproductibile de verificare a activității biopeptidelor din compozitia produselor obtinute, formule de produse nutraceutice și cosmeceutice conținând produs 3-biotic, brevarea unui produs cosmeceutic.

In urma activitatilor desfasurate pe parcursul acestei etape a proiectului a fost demonstrata stabilitatea granulei de kefir ameliorate (de catre partenerul UDJ). Prin verificarea reproductibilității procesului fermentativ în 5 probe realizate în paralel, s-a demonstrat că procesul fermentativ este reproductibil indiferent de varianta de inocul utilizată ceea ce demonstrează stabilitatea metabolică și a funcționalității culturii ameliorate.

De asemenea, s-a demonstrat reproductibilitatea diferitelor sarje de colostru fermentat cu kefir ameliorat, obtinute si analizate la partenerul Laboratoarele Medica. A fost analizata reproductibilitatea procesului de fabricare prin monitorizarea unor parametrii (timp, temperatura, pH, randament) pentru 10 sarje. De asemenea, au fost analizate caracteristicile fizico – chimice ale produselor obtinute in trei sarje diferite, constatandu-se reproductibilitatea acestora. A fost stabilita formula unui produs 3-biotic si s-au demonstrat caracteristicile acestuia pe baza analizelor efectuate la partenerul INCDSB. S-au realizat formule de produse nutraceutice (gama Col–Kefir 3xBiotics) si cosmeceutice (gama COL KEFIR MILK THERAPY) avand la baza produsul Col-Kefir (la partenerul Laboratoarele Medica). A fost realizata verificarea si s-a demonstrat reproductibilitatii metodelor de determinare a activitatii antioxidante si de stimulare a probioticelor pentru peptidele cu masa moleculară mai mică de 10kDa separate din mediul fermentat obținut în cea mai performantă metodă tehnologică propusă (la partenerul UDJ).

La partenerul INCDSB a fost efectuata verificarea reproductibilitatii metodelor de determinare a activitatii de inhibare a ACE. Aceasta determinare s-a realizat pentru peptidele cu masa moleculara mica separate din trei sarje de costru bovin fermentat cu granule de kefir ameliorate, obtinute la Laboratoarele Medica. Pentru verificarea reproductibilitatii metodelor de determinare a activitatii de citomodulare a peptidelor separate din probele de colostru fermentat cu granule de kefir ameliorate, in aceasta etapa a proiectului s-a efectuat determinarea citotoxicitatii, determinarea efectului antiproliferativ pe celule tumorale, determinarea efectului asupra apoptozei celulare, determinarea efectului cicatrizant si a efectului anti-inflamator *in vitro.* Siteul web al proiectului, actualizat, este vizibil la adresa: http://pro-natura.ro/eureka-3biotic/. Diseminarea rezultatelor obținute în etapa III-a a proiectului a constat in 6 comunicări la simpozioane internaționale, o lucrare publicată în revistă ISI, o lucrare în curs de evaluare trimisă spre publicare la revistă ISI și depunerea unei cereri de brevet la OSIM.

STAGE 3 - Demonstrating the functionality in operating conditions

SUMMARY

The results obtained from the analyzes and determinations performed in this stage allowed the achievement of the objectives of the 3rd stage. The predicted result indicators have been achieved.

Estimated results: improved kefir granules with demonstrated stability, a 3-biotic product with reproducible properties, reproducible methods for verifying the activity of biopeptides from composition of the obtained products, nutraceutical and cosmetic formulas containing 3-biotic product, patenting of a cosmeceutical product.

Following the activities carried out during this stage of the project, has been demonstrated the stability of the improved kefir granule (by the UDJ partner). By checking the reproducibility of the fermentation process in 5 samples performed in parallel, it was demonstrated that the fermentation process is reproducible regardless of the inoculum variant used, which demonstrates the metabolic stability and functionality of the improved culture.

Also, was demonstrated the reproducibility of the different batches of colostrum fermented with improved kefir, obtained and analyzed at the partner Medical Laboratories.

The reproducibility of the manufacturing process was analyzed by monitoring some parameters (time, temperature, pH, yield) for 10 batches. Also, the physico-chemical characteristics of the products obtained in three different batches were analyzed, ascertaining their reproducibility.The formula of a 3-biotic product was established and the characteristics has been demonstrated based on the analyzes performed at the INCDSB partner. Formulas for nutraceuticals (Col – Kefir 3xBiotics range) and cosmetics (COL KEFIR MILK THERAPY range) were developed based on the Col-Kefir product (from the partner Laboratoarele Medica).The verification of the reproducibility of the methods for determining the antioxidant activity and for stimulating the probiotics was performed for peptides with a molecular weight of less than 10 kDa separated from the fermented medium obtained in the most advanced technological method proposed (at the UDJ partner).

Also, at the INCDSB partner was performed the verification of the reproducibility of the methods for determining the ACE inhibition activity.This determination was made for low molecular weight peptides separated from three batches of fermented bovine colostrum with improved kefir granules, obtained from Medical Laboratories. In order to verify the reproducibility of the methods for determining the cytomodulation activity of peptides separated from samples of fermented colostrum with improved kefir granules, in this stage of the project the determination of cytotoxicity, determination of antiproliferative effect on tumor cells, determination of effect on cell apoptosis, determination of cyclic effect and the anti-inflammatory effect in vitro. The website of the project, updated, is visible at: http://pro-natura.ro/eureka-3biotic/. The dissemination of the results obtained in the third stage of the project consisted of 6 papers at international symposia, a paper published in the ISI journal, a paper under evaluation sent for publication in an ISI journal and the filing of a patent application at OSIM.