

Stage 1 - Design and testing of experimental models

Summary

The results obtained from the works and the experiments performed allowed the achievement of the stage objectives. The expected output indicators have been achieved. In the first stage of the project, high efficiency techniques were developed for the improvement of the kefir consortium and optimal conditions for the release of bioactive peptides from the colostrum during the kefir fermentation process were established. Optimal conditions of kefir colostrum fermentation at laboratory level were also established. The company has developed a method of colostrum conditioning before fermentation and critical control points were identified for risk management at industrial level of the conditioning process. Several methods for determining the activity of biopeptides obtained from the colostrum fermentation process have been tested. We identified the samples from which the peptide fractions having the highest antioxidant activity and the highest inhibitory activity of ACE (angiotensin converting enzyme) were obtained and that will be used for studies in next stages. To demonstrate the probiotic effect of microorganisms from the kefir consortium, intestinal cell lines to which these microorganisms adhere were selected through a co-culture experiment. Optical microscopy observations allowed the selection of intestinal cell line HT-29 as optimum for further study regarding the interaction of *Lactobacillus* (probiotic strain) to intestinal cells. The HT-29 line cells prove to be an ideal model for the study of probiotic-induced effects. The HT-29 line will be used in the *in vitro* experiments planned for stage II of the project. New generation of probiotics strains were cultured to select the culture with the highest adaptability, with beneficial influence on the fermented product (colostrum) properties. 18 strains of yeast, from the MIUG Collection of the Dunarea de Jos University from Galati, were tested in order to select strains that can improve the microorganisms consortium of the crafted tested kefir grains, and two of them, *Candida lipolytica* MIUG D99 and *Candida lipolytica* MIUG D67, which have been used to ameliorate the kefir consortium, have been selected. Also, probiotic cultures marketed by Chr. Hansen company can be used in order to improve kefir consortia for obtaining functional products. Thus, cultures of *Lactobacillus acidophilus* (LA-5®) and *Lactobacillus casei* (L. casei 431®) were selected for these purposes. Peptides obtained by the fermentation processes of colostrum with different types of artisanal and improved kefir grains were analyzed, and the variants that showed the highest antioxidant activity were selected. Our studies have demonstrated the effectiveness of the probiotic commercial culture FreshQ®, Chr. Hansen, Denmark, which contains the species *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei*, in the efficiency of the fermentative process and the functional value of the fermented product. They were established, by tests carried out to the company, the stages of the biotechnological process for the transfer of probiotic cultures in the kefir consortium. The

selection of the most important factors influencing the fermentation process and the properties of the fermented products was performed using the experimental model Plackett-Burman related to Design Expert. The cytomodulation activity of the bioactive peptides obtained from fermented colostrum was performed by analysis of cell proliferation and viability. The analyzed peptides are non - cytotoxic, allow the maintenance of cells viability and stimulate cell proliferation *in vitro*. The project website is visible at: <http://pro-natura.ro/eureka-3biotic/>. The dissemination of the obtained results in the first stage of the project consisted in the participation with papers (posters) at two international symposia and the submission for publication of a scientific article (*Colostrum-derived bioactive peptides obtained by fermentation with kefir grains enriched with selected yeasts*, Mihaela Cotârleț, Aida Mihaela Vasile, Alina Mihaela Cantaragiu, Alexandra Gaspar-Pintiliescu, Oana Craciunescu, Anca Oancea, Angela Moraru, Ionuț Moraru, Gabriela Elena Bahrim, The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati, Fascicle VI – Food Technology).

Etapa 1 - Realizarea si testarea modelelor experimentale

REZUMAT

Rezultatele obținute în urma lucrărilor și experimentelor efectuate au permis atingerea obiectivelor de etapă. Indicatorii de rezultat prevăzuți au fost realizați. În cadrul etapei a I a proiectului s-au elaborate tehnici de înalt randament pentru ameliorarea consorțiului de kefir și s-au stabilit condițiile optime de eliberare a peptidelor bioactive din colostru în timpul procesului de fermentare cu kefir. De asemenea au fost stabilite condițiile optime de fermentare a colostrului cu kefir la nivel de laborator. Agentul economic a elaborat metoda de condiționare a colostrului înainte de fermentare și a identificat punctele critice de control pentru managementul riscurilor în procesul de condiționare la nivel industrial. Au fost testate mai multe metode de determinare a activității biopeptidelor obținute în urma procesului de fermentare a colostrului. S-au identificat probele din care s-au obținut fracțiile peptidice care au prezentat cea mai mare activitate antioxidantă și cea mai mare activitate de inhibare a ACE (enzima de conversie a angiotensinei) care vor fi utilizate pentru studiile din etapele viitoare. Pentru demonstrarea efectului probiotic al microorganismelor din consorțiul de kefir au fost selectate linii celulare intestinale la care acestea aderă, printr-un experiment de co-cultura. Observațiile de microscopie optică au permis selecția liniei de celule intestinale HT-29 ca fiind optimă pentru aprofundarea studiilor cu privire la interacția lactobacililor (tulpini probiotice) cu celulele intestinale. Celulele liniei HT-29 se dovedesc a fi un model ideal pentru studiul efectelor induse de probiotice. Linia HT-29 va fi utilizată în experimentele *in vitro* planificate pentru etapa a II-a a proiectului. Au fost cultivate tulpini de probiotice de nouă generație în vederea

selecției culturii cu adaptabilitatea cea mai mare, cu influență benefică asupra proprietăților funcționale ale produsului (colostru) fermentat. Au fost testate 18 tulpini de drojdii, din Colecției MIUG a Universității Dunărea de Jos din Galați, pentru evidențierea tulpinilor care pot îmbunătăți consorțiul de microorganisme din granulele de kefir artisanale testate și au fost selecționate două dintre acestea, *Candida lipolytica* MIUG D99 și *Candida lipolytica* MIUG D67, care au fost utilizate pentru ameliorarea consorțiului de kefir. De asemenea, culturile probiotice comercializate de compania Chr. Hansen pot constitui culturi cu care se pot ameliora consorțiile de kefir în vederea obținerii de produse funcționale. Astfel, culturile de *Lactobacillus acidophilus* (LA-5®) și *Lactobacillus casei* (L. casei 431®) au fost selecționate pentru aceste scopuri. Au fost analizate peptidele obținute prin procesele de fermentație ale colostrului cu diferite tipuri de granule de kefir artisanale și ameliorate, fiind selectate variantele care au prezentat cea mai mare activitate antioxidantă. Studiile au dovedit eficiența culturii comerciale probiotice FreshQ®, Chr. Hansen, Danemarca, care conține speciile *Lactobacillus rhamnosus* și *Lactobacillus paracasei*, în eficiența procesului fermentativ și valoarea funcțională a produsului fermentat. Au fost stabilite, prin teste efectuate la agentul economic, etapele biotehnologice pentru transferul culturilor probiotice selectate în consorțiul de kefir. A fost realizată selecția celor mai importanți factori care influențează procesul fermentativ și proprietățile produselor fermentate, cu ajutorul modelului experimental Plackett-Burman aferent programului Design Expert. Analiza activității de citomodulare a peptidelor bioactive obținute din colostru fermentat a fost realizată prin analiza proliferării și viabilității celulare. Peptidele analizate sunt necitotoxice, permit menținerea viabilității și stimulează proliferarea celulară *in vitro*. Siteul web al proiectului este vizibil la adresa: <http://pro-natura.ro/eureka-3biotic/>. Diseminarea rezultatelor obtinute in etapa I a proiectului a constat in participarea cu lucrări (postere) la două simpozioane internaționale si trimiterea spre publicare a unui articol științific (*Colostrum-derived bioactive peptides obtained by fermentation with kefir grains enriched with selected yeasts*, Mihaela Cotârleț, Aida Mihaela Vasile, Alina Mihaela Cantaragiu, Alexandra Gaspar-Pintiliescu, Oana Craciunescu, Anca Oancea, Angela Moraru, Ionuț Moraru, Gabriela Elena Bahrim, The Annals of the University Dunărea de Jos of Galați, Fascicle VI – Food Technology).