

III. RAPORT FINAL

Perioada implementare: 1.10.2016-30.09.2018

TITLUL: Dezvoltarea și optimizarea tehnologiei de fermentare inovativă a polenului de albine pentru realizarea de produse tri-biotice (3-BIOTIC)

Contract de finantare nr. 6 BG/2016

Scopul proiectului a fost acela de creștere a performanței și competitivității agentului economic Medica FarmImpex S.R.L. Otopeni, prin utilizarea expertizei existente la organizațiile publice partenere în proiect, USAMVB și INCDSB, în vederea optimizării tehnologiei moderne de fermentare cu SCOBY a polenului de albine, pentru obținerea de produse tribiotice.

1. Obiectivele prevăzute/realizate;

Se apreciaza ca toate obiectivele asumate în propunerea de proiect au fost atinse, reespetiv:

- ✓ Interconectarea expertizei existente la USAMVB și INCDSB și intensificarea cooperării cu agentul economic pentru evidențierea ameliorării consorțiilor SCOBY, în vederea obținerii unor efecte probiotice și postbiotice îmbunătățite;
- ✓ Transferul de cunoaștere de la USAMVB și INCDSB la agentul economic pentru dezvoltarea unui sistem de asigurarea calității, inclusiv a caracterului tribiotic, pentru polenul fermentat cu SCOBY și consolidarea pregătirii practice a studenților;
- ✓ Dezvoltarea abilităților antreprenoriale a cercetătorilor implicați, prin fundamentarea pe baza rezultatelor științifice a strategiei de marketing a produselor tribiotice din polen fermentat cu SCOBY.

2. Gradul de atingere a rezultatelor estimate

1.1 Îmbunătățirea/optimizarea tehnologiilor agentului economic

Produsele tribiotice reprezintă o nouă tendință în domeniul alimentelor funcționale, iar această nouă tendință s-a conturat după descrierea efectului post-biotic al metaboliților produși de microorganisme benefice / probiotice din tubul digestiv. Din polenul fermentat cu SCOBY se pot realiza produse tribiotice, întrucât: conține carbohidrați cu efect prebiotic, provenite din polenul folosit ca materie primă sau produse de bacteriile (acetice) din consorțiile SCOBY (nanoceluloză); include bacterii lactice și drojdii cu potențiale caracteristici probiotice și poate acumula metaboliți cu efect postbiotic, care pot fi concentrați în produsul final tribiotic, prin prelucrarea avansată a mediului de cultivare. În cazul consorțiilor din Kombucha (SCOBY) microorganismele probiotice aparțin bacteriilor din genurile *Lactobacillus*, *Leuconostoc* / *Weisella*, *Bifidobacterium* sau drojdiilor, cum este *Saccharomyces boulardii*.

Pentru optimizarea procesului tehnologic derulat de agentul economic Medica FarmImpex S.R.L. transferul de cunoaștere are, printre altele, în vedere necesitatea ameliorării permanente a consorțiilor SCOBY, prin creșterea ponderii microorganismelor probiotice, cu efecte probiotice și postbiotice îmbunătățite.

În prima etapă de derulare a proiectului a fost **dezvoltate** în vederea transferului către agentul economic **metode și tehnici** pentru următoarele aspecte: estimarea populațiilor de probiotice din consorții SCOBY prin cultivare pe medii specifice, realizarea testelor in vitro pentru probiotice, utilizarea kiturilor enzimaticice de determinare a fibrelor prebiotice, asimilarea metodei de analiza a oligozaharidelor prebiotice prin HPLC și asimilarea metodelor de determinare a glucidelor fermentescibile.

Referitor la estimarea populațiilor de probiotice din consorții SCOBY se recomandă utilizarea metodei clasice de cuantificare a microorganismelor viabile (UFC). În cazul bacteriilor lactice se recomandă mediul MRS suplimentat cu fluconazol, tehnica de însămânțare fiind prin *încorporare*. În cazul drojdiilor se recomandă mediul YPS suplimentat cu cloramfenicol, tehnica de însămânțare propusă fiind *”în gazon”*.

În cazul tehnicilor de biologie moleculară utilizate pentru evaluarea populației de probiotice din consorții SCOBY a fost dezvoltată metoda identificării prin amplificarea unor fragmente specifice grupelor de lactobacili cu caracteristici probiotice și s-a reușit elaborarea unei curbe etalon de cuantificare a populației probiotice prin intermediul qPCR. Secvențierea a evidențiat prezența speciei *Pediococcus pentosaceus* în produsul fermentat de Kombucha.

Pentru testarea producerii de bacteriocine se recomandă două metode, una de screening general (metoda ”spoturilor”), iar cea de a doua de selecție (metoda ”rondelilor decupate”), mediul de bază utilizat fiind MRS.

Pentru testarea hidrofobității suprafeței celulei bacteriene și propune testarea aderenței bacteriilor la hidrocarburi, cunoscută ca metoda BATH (adaptat după Rosenberg și al., 1983) care nu necesită prezența unor echipamente speciale.

Rezistența la prezența sărurilor biliare și a fenolului se recomandă a se testa în mediu MRS lichid suplimentat cu diferite concentrații din cele două substanțe; culturile bacteriene testate trebuie să fie proaspete; după 24 de ore de cultivare se măsoară turbiditatea la DO 600-620 nm și se compară cu martorul neinoculat.

S-au stabilit etapele și parametri de lucru pentru metodele de determinare a fibrelor prebiotice (fibre solubile, insolubile și totale) în vederea transferului de cunoaștere la agentul economic pentru utilizarea kiturilor enzimaticice de determinare a acestora.

De asemenea, s-au selectat metodele de identificare și cuantificare a oligozaharidelor prebiotice din diferite surse alimentare folosind tehnici HPLC specifice în scopul asimilării acestora de către agentul economic. Adicional, s-au stabilit principalele metode de determinare a glucidelor fermentescibile (dozarea glucidelor totale, a hexozelor totale și a pentozelor) pentru asimilarea acestor metode de către agentul economic în urma transferului de cunoaștere.

În etapa următoare au fost **validare o serie de tehnici și metode** de lucru asimilate de agentul economic Medica, dezvoltate și propuse anterior.

Din punct de vedere statistic, analiza de citometrie în flux rezultatele obținute conform standardului 19344:2015 a evidențiat faptul că bacteriile izolate din consorțiul Soby sunt viabile și nu au membrana celulară afectată (91,2 - 93,4% din totalul celulelor bacteriene din probele analizate sunt vii, în timp ce doar un procent redus de 0,4 - 0,7% sunt moarte).

În cazul testării caracteristicilor probiotice, ca urmare a screeningului pentru formarea de halou de bacteriocine și a rezistenței la săruri biliare s-au evidențiat izolatele de S1 și L5 au fost reținute pentru studii ulterioare ca tulpini cu potențial probiotic ridicat. Metodele au fost validate în aceleași condiții în laboratoarele Medica.

Referitor la adezivitatea celulelor bacteriene, în cazul tulpinii L5 creșterea timpului de expunere (4h) a celulelor intestinale la suspensia bacteriana a condus la o aderență semnificativă a lactobacililor la substratul celular. În concluzie, tulpina de bacterie lactică utilizată în acest studiu a arătat o aderență difuză la linia celulară Caco-2.

În probele de polen fermentat în kombucha s-a observat o scădere masivă a cantității de carbohidrați comparativ cu probele martor (probe de polen nefermentat). Prin fermentație are loc o creștere a biodisponibilității fito-nutrienților prezenți în granulele de polen. În cazul determinării glucidelor fermentescibile și a activității antioxidante, metodele de determinare cantitativă au fost validate în cadrul laboratoarelor de la agentul economic, prin efectuarea aceluiași metode la același tip de probe și cu aceleași echipamente. Rezultatele obținute la beneficiar au fost comparabile ca ordin de mărime, ceea ce a permis validarea metodelor.

Determinare cromatografică prin HPLC a glucidelor a fost validată la agentul economic. Validarea s-a realizat utilizând aceleași probe de polen fermentat în Kombucha față de un martor (polen nefermentat). Rezultatele obținute pe cele două echipamente au fost comparabile, ceea ce a permis validarea metodei.

În ultima etapă a partenerii au colaborat pentru transferul de cunoaștere referitor la optimizarea procesului tehnologic de obținere a produsului tri-biotc, pentru dezvoltarea de metode de analiză calitativă și cantitativă a acestui produs, precum și pentru stabilirea condițiilor de asigurare a reproductibilității efectului probiotic al produsului.

Metodele dezvoltate pe parcursul etapelor proiectului au fost validate prin teste comparative în minim două laboratoare distincte, precum și în laboratoarele agentului economic, acolo unde echipamentele au permis acest lucru, respectiv testarea compusilor postbiotici cu efecte biocide și testarea compusilor activi pe culturi de celule intestinale.

1.2 Dezvoltarea abilităților antreprenoriale și a experienței profesionale ale cercetătorilor/studentilor/masteranzilor

Membrii echipei de cercetare s-au implicat în alături de departamentul de marketing al agentului economic în elaborarea unor materiale de publicitate a noului produs tri-biotc (Amrita), ca parte integrantă a **planului de marketing** al Medica Farmimpex SRL. În acest sens s-au implicat în elaborarea unei broșuri care include și rezultate ale cercetărilor, a unui flyer în limba română și engleză, precum și a unui material în limba engleză pe suport electronic în format PPT util pentru promovarea produsului la evenimente internaționale (științifice sau târguri de profil).

Conform planului de implementare membrii echipei de proiect au fost implicați în completarea următoarelor documente din **dosarul de notificare** al produsului la IBA: fișa tehnologică de obținere a otetului de Kombucha, fișa tehnologică a produsului Amrita, analize de calitate ale produsului finit (capsule Amrita). Suplimentar, membrii echipei au detaliat pentru producător și Anexe la dosarul de notificare referitoare la metodele/tehnicele utilizate în determinarea efectului prebiotic, probiotic și post biotiv al produsului Amrita.

Referitor la **stagiile de practică**, pe parcursul celor 24 de luni de implementare au derulat stagii practice cu durate de la 1 la 5 luni la agentul economic 4 studenți masteranzi din cadrul Facultății de Biotehnologii din USAMV București, specializările Biotehnologii în Industria Farmaceutică (2) și Biotehnologie și Siguranța Alimentară (2), precum și 2 doctoranzi (Utoiu Elena Roxana, Matei Bogdan) din cadrul Scolii doctorale IMRVA, domeniul Biotehnologii. Rezultatele acestor stagii se

reflecta în lucrările de finalizare de studii ale masteranzilor și în rapoartele anuale de cercetare ale doctoranzilor.

3. Modul de atribuire și exploatare de către parteneri a drepturilor de proprietate (intelectuală, de producție, difuzare etc.) asupra rezultatelor proiectului

Agentul economic, Medica Farmimpex SRL este proprietarul unic al produsului final tri-biotic, comercializat sub denumirea de AMRITA. În diferitele etape ale proiectului Medica a acordat dreptul de acces la tehnologia pe care o deține, atât cercetătorilor de la USAMVB și INCDSB implicați în proiect, ca și studenților nominalizați pentru efectuarea stagiilor de practică în condiții de confidențialitate, cu drept de avizare prealabilă a diferitelor forme de diseminare a rezultatelor.

Conform condițiilor contractuale, drepturile de proprietate intelectuală asupra metodelor dezvoltate a fost corelat cu sarcinile asumate de către parteneri. Astfel, metodele de determinare a efectelor prebiotice, probiotice și postbiotice pe bază de tehnici de cultivare microorganisme și/sau biologie moleculară a acizilor nucleici aparțin USAMVB, iar metode de determinare a efectelor prebiotice, probiotice și postbiotice pe bază de tehnici de culturi celulare și/sau citometrie în flux aparțin INCDSB.

Referitor la raportarea rezultatelor, agentul economic a avizat toate rapoartele de cercetare înaintate către autoritatea contractantă; de asemenea, toate rezultatele activităților de transfer și validare care au condus la rezultate științifice, au fost publicate numai cu acordul și în colaborare cu agentul economic. Stagiile de practică ale masteranzilor și doctoranzilor au fost susținute în comisii cu acordul agentului economic, în cazul doctoranzilor reprezentanți ai agentului economic fiind prezenți la susțineri de rapoarte anuale.

În ceea ce privește **diseminarea** au fost obținute următoarele rezultate. S-au publicat 2 articole ISI cu factor de impact (Nutrients, IF = 4.196 și Romanian Biotechnological Letters IF = 0.406), două articole ISI din categoria ESCI (în Web of Science), membrii echipei participând pe parcursul celor 24 de luni de implementare la 3 simpozioane internaționale și 2 conferințe internaționale. De asemenea, reprezentantul agentului economic, Dr. Ionuț Moraru a participat (resurse proprii) la un congres mondial de apiterapie. Se remarcă faptul că publicațiile au drept autori cercetători de la toți parteneri, dar inclusiv de la agentul economic.

4. Impactul rezultatelor obținute

Principalul impact se înregistrează **la nivelul agentului economic** Medica FarmImpex SRL Otopeni, care a pus o piață un produs tri-biotic inovativ, cu denumirea de AMRITA 3xBiotics (figura de mai jos). Așa cum a demonstrat-o studiul de piață realizat în perioada elaborării strategiei de marketing, nu există competitori pe piață în acest domeniu, ceea ce reprezintă un avantaj major în promovarea lui, cât și a gamei de produse Kombucell 3 x Biotics ce conțin materia primă inovativă, respectiv polen poliflor fermentat în consorțiu de kombucha. Ca urmare a vânzării acestui produs s-a estimat o creștere a cifrei de afaceri cu aproximativ 50 mii de euro.



La nivelul **masteranzilor** implicati in stagii practice, activitatile din proiect au contribuit decisiv la dezvoltarea cunostintelor si abilitatilor acestora, astfel ca a toti patru au fost angajati de catre agentul economic Medica, fie pe lina de tehnologica a noului produs, fie in departamente care asigura analizele de calitate ale produsului (analize fizico-chimice, microbiologice). In ceea ce priveste cei doi doctoranzi, activitatile din proiect in care s-au implicat au contribuit atat la imbogatirea cunostintelor acestora in ceea ce priveste consortiile microbiene, cat si a efectelor cumulate prebiotic-probiotic si postbiotic. Metodele validate de analiza a probioticelor si a pre-post bioticelor sunt parte integrata a viitoarelor teze de doctorat. In plus, doctoranzii au fost implicati direct in elaborarea de articole stiintifice pentru reviste cotate si indexate ISI, ceea ce a condus la dezvoltarea competentelor acestora in eleboarea de lucrari stiintifice de inalta calitate.

La nivelul **membrilor echipei de cercetare**, acestia au fost implicati in dezvoltarea strategiei de marketing a produsului AMRITA, contribuind direct la elaborarea unor materiale publicitare cu continut stiintific. Astfel acestia si-au imbogatit cunostintele si competentele in ceea ce priveste promovarea si scoaterea pe piata a unui produs biotehnologic inovativ. Aceste competente vor fi utile in transferul de inovare al altor produse inovative obtinute de echipele partenerilor, iar in cazul USAMVB in transmiterea de competente antreprenoriale studentilor in cadrul procesului educational.

Nu in ultimul rand, se remarca **cooperarea** intensificata intre parteneri si agentul economic, astfel ca deja partenerul INCDSB deruleaza un nou proiect cu Medica, ce propune dezvoltarea unui nou produs inovativ dermato-cosmetic. USAMVB, prin Facultatea de Biotehnologii va continua colaborarea cu Medica Farmimpex pentru derularea de stagii de practica atat la nivel Master si Doctorat, cat si la nivel de licenta, in baza unui acord semnat.