

Tipul proiectului: **Proiect de cercetare postdoctorală - tip PD**

Responsabil proiect: **Grosu-Tudor Silvia Simona**

Titlul proiectului: **„Izolarea unor bacterii lactice din produse vegetale fermentate cu potențiale aplicații în industria alimentară și în sănătate”**

Durata proiectului: **2 ani** (august 2010- iulie 2012)

Buget: **340000** lei

### **Rezumatul proiectului:**

Este cunoscut faptul că produsele vegetale sunt recomandate în dieta zilnică deoarece conțin cantități însemnate de antioxidanți, vitamine, fibre alimentare și minerale. Deși o cantitate mare de legume sunt consumate proaspete, acestea prezintă dezavantajul alterării rapide, iar în cazul utilizării acestora în diverse preparate culinare, acestea își modifică considerabil caracteristicile fizice și compoziția chimică. Din acest motiv, fermentarea produselor vegetale cu ajutorul bacteriilor lactice poate fi considerată cea mai simplă dar semnificativă metodă de conservare și totodată menținere și/sau îmbunătățire a proprietăților nutriționale și senzoriale ale produselor vegetale. Pe de altă parte, ca și în cazul produselor lactate, conservarea produselor vegetale (legume și fructe) prin acest procedeu, al fermentației lactice are și o serie de avantaje, pe lângă simpla conservare. Proliferarea bacteriilor lactice face ca aceste produse să fie mai ușor digerabile de către consumatori, iar conținutul lor în vitamine să crească. În plus, bacteriile lactice produc o serie de enzime utile, cu efecte benefice, precum și substanțe antibiotice și anticarcinogene. Principalul lor produs de fermentație, acidul lactic, contribuie la conservare, dar are și un efect benefic asupra creșterii microbiotei utile în intestinul consumatorilor. În acest context, proiectul de față își propune izolarea și identificarea (fenotipică și genotipică) a bacteriilor lactice care intervin în aceste fermentații spontane ale produselor vegetale. În plus, ne propunem testarea bacteriilor lactice nou izolate pentru producerea de bacteriocine și polizaharide, purificarea și caracterizarea acestora cât și evaluarea caracteristicilor probiotice ale unor bacterii lactice selectate prin testarea rezistenței la săruri biliare, supraviețuirea la valori scăzute de pH, toleranța la diferite concentrații de NaCl, și prin testarea activității antimicrobiene în prezența/absența unor prebiotice.

### **Obiectivele proiectului:**

În prima parte a proiectului au fost colectate probe constând în produse vegetale fermentate diverse (conopidă, gogonele, morcovi, varză, castraveți, etc.), din care bacteriile lactice au fost izolate, folosind medii de cultură sintetice (MRS - de Man et. al., 1960). Coloniile dezvoltate pe aceste medii, prezentând aspecte diferite (mărime, culoare, formă), au fost prelevate, purificate și apoi supuse unei identificări preliminare (colorație Gram, testul catalazei, morfologie celulară), iar cele de interes (Gram pozitive, catalază-negative) au fost depozitate la -75°C.

În continuare, bacteriile lactice nou izolate au fost identificate genotipic prin tehnica rep-PCR, care este o metodă rapidă, cu o rezoluție înaltă, și care a permis înlăturarea clonelor (tulpini identice izolate din aceeași probă). De asemenea, pentru confirmarea sau pentru identificarea tulpinilor cu identitate necunoscută după rep-PCR, a fost folosită tehnica SDS-PAGE

(electroforeză denaturantă a proteinelor celulare totale, urmată de compararea spectrului de benzi cu cel al tulpinilor bacteriene identificate la nivel de specie). Aceste identificări folosind tehnici moderne, de biologie moleculară și biochimice au fost realizate în colaborare cu Laboratorul de Microbiologie Industrială și Biotehnologii Alimentare al Universității Libere din Bruxelles din Belgia. Tulpinile bacteriene reprezentative au fost păstrate la  $-75^{\circ}\text{C}$  și apoi folosite pentru experimentele ulterioare.

În partea a doua a proiectului, tulpinile bacteriene nou izolate au fost în primul rând testate pentru producerea de exopolizaharide și bacteriocine după care se vor evalua caracteristicile probiotice ale bacteriilor lactice izolate.

Testarea bacteriilor lactice din punct de vedere al producerii de exopolizaharide a fost realizată prin metode microbiologice (evidențierea microscopică a capsulei polizaharidice, determinarea caracterului „ropy” sau „muroid” a coloniilor bacteriene pe mediu agarizat, etc.). În plus, exopolizaharidele vor fi izolate din mediul de cultură folosind o metodă ce implică îndepărtarea proteinelor din mediul de cultură cu acid tricloracetic urmată de precipitarea exopolizaharidelor cu acetonă. Exopolizaharidele astfel izolate vor fi caracterizate biochimic (masa moleculară, compoziția glucidică), folosind tehnici cromatografice: FPLC, respectiv HPLC sau cromatografie în strat subțire.

Pentru selectarea tulpinilor de bacterii lactice producătoare de bacteriocine se vor folosi mai multe metode, toate bazându-se pe faptul că bacteriocinele difuzează în medii solide sau semisolide. Există două categorii de metode, unele care folosesc cultura ca atare și altele care folosesc doar supernatantul culturii testate, după ce, în prealabil, celulele au fost îndepărtate prin centrifugare, și eventual, filtrare sterilă. Atunci când se urmărește selectarea de tulpini producătoare de bacteriocine, este important să se folosească mai multe metode concomitent, deoarece nu întotdeauna în condițiile optime de creștere se obțin și cantități maxime de bacteriocine. Ca tulpini indicator, se are în vedere folosirea atât unor tulpini Gram pozitive, cât și Gram negative.

În final, proiectul de față îți propune evaluarea caracteristicilor probiotice ale bacteriilor lactice nou izolate printr-o serie de teste biochimice ce implică testarea toleranței la săruri biliare, la diferite concentrații de NaCl cât și estimarea ratei de supraviețuire la valori scăzute de pH. De asemenea, va fi testată activitatea antimicrobiană a tulpinilor selectate în prezența/absența unor prebiotice (Raftilina, Raftiloza, Oligofructoza).

#### **Valorificarea rezultatelor:**

Rezultatele științifice originale obținute până în prezent vor fi prezentate la conferința internațională: “INTERNATIONAL SCIENTIFIC CONFERENCE ON NUTRACEUTICALS AND FUNCTIONAL FOODS 2011 – FF2011” (sub formă de prezentare orală) organizată în perioada 25 -27 octombrie 2011 la Košice, Slovacia și la Simpozionul internațional „4<sup>th</sup> INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF BIOTECHNOLOGY” organizat în perioada 10-11 noiembrie 2011 la București (sub forma unui poster).

Deasemenea, un articol a fost trimis spre publicare la revista “Food Microbiology” iar altul este în curs de tehnoredactare și va fi trimis spre publicare la o revistă cotate ISI.