



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01175**

(22) Data de depozit: **17/11/2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/02/2018** BOPI nr. **2/2018**

(41) Data publicării cererii:  
**30/08/2012** BOPI nr. **8/2012**

(73) Titular:  
• **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE  
AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ  
DIN BUCUREȘTI, BD.MĂRĂȘTI NR.59,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:  
• **VAMANU EMANUEL,  
ALEEA VALEA CĂLUGĂREASCĂ NR.3,  
BL.A 10, SC.D, ET.2, AP.53, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **VAMANU ADRIAN,  
ALEEA CÂMPUL CU FLORI NR.2 B,  
BL.C 17 A, SC.B, ET.5, AP.68, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;**

• **NIȚĂ SULTANA, STR.BĂRBAT VOIEVOD  
NR.21, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **PELINESCU DIANA,  
STR. CRISTEA MATEESCU NR.3, BL.T4B,  
SC.1, AP.42, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,  
RO;**  
• **RUSU NICOLETA, STR.ARIEȘUL MARE  
NR.1, BL.I 5, SC.B, AP.28, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**BLAZENKA KOS, JAGODA SUSKOVIC,  
JADRANKA GORETA ȘI SRECKO  
MATOSIC, "EFFECT OF PROTECTORS ON  
THE VIABILITY OF LACTOBACILLUS  
ACIDOPHILUS M92 IN SIMULATED  
GASTROINTESTINAL CONDITIONS",  
2000; US 7666638**

(54) **PROCEDEU DE TESTARE A VIABILITĂȚII BACTERIILOR  
LACTICE LA TRANZITUL TRACTULUI GASTROINTESTINAL  
UMAN**



# RO 127731 B1

1 Invenția se referă la un procedeu de testare a viabilității unor tulpini de *Lactobacillus sp.*,  
2 ce sintetizează exopolizaharide, în vederea realizării de produse probiotice și sinbiotice, prin  
3 utilizarea unui procedeu experimental de simulare *in vitro* a nivelului gastric și intestinal uman.

4 Rezistența la trecerea prin tractul intestinal uman a reprezentat tema principală a multor  
5 proiecte de cercetare pentru demonstrarea potențialului probiotic la numeroase tulpini de  
6 bacterii lactice și bifidobacterii. În ultimul deceniu, se urmărește transferul unor astfel de studii,  
7 *in vitro*, la nivelul unor modele de laborator care să simuleze fiecare parte a tubului digestiv  
8 uman.

9 Testarea produselor se poate face prin simularea separată a condițiilor din stomac și  
10 intestin subțire. Astfel, pentru testarea unei tulpini în vederea utilizării ei în realizarea de pro-  
11 duse probiotice și/sau sinbiotice, utilizează sisteme de simulare sau procedee experimentale  
12 *in vitro* pentru nivelul gastric și intestinal. Una dintre cele mai importante proprietăți ale  
13 microorganismelor probiotice este capacitatea lor de a supraviețui la trecerea prin mediul acid  
14 din stomacul uman, și la atacul acizilor biliari în intestin. Mai mulți cercetători au studiat supra-  
15 viețuirea lui *Lactobacillus acidophilus* și *Bifidobacterium spp.* în prezența valorilor scăzute de  
16 pH și sărurilor biliare. Pentru că a supraviețuit mai bine, *Bifidobacterium animalis* este adesea  
17 folosit în produsele fermentate. S-a studiat supraviețuirea a diferite tulpini ale genului  
18 *Bifidobacterium* în mediu acid similar celui gastric. S-a stabilit că *Bifidobacterium longum*  
19 tolerează concentrațiile de acizi/săruri biliare mai mari cu 4%. Acele tulpini de *Lactobacillus sp.*  
20 și *Bifidobacterium sp.* nu supraviețuiesc condițiilor din momentul tranzitului gastrointestinal, și  
21 nu sunt, sau nu ar trebui utilizate la obținerea de produse funcționale. Astfel, selecția de tulpini,  
22 pe baza toleranței la acidul gastric și săruri biliare, contribuie la evidențierea proprietăților  
23 biologice și la cunoașterea comportamentului la stres al acestor tulpini probiotice bacteriene.

24 Brevetul American **US 7666638** determină rezistența a două tulpini de *Lactobacillus*  
25 *reuteri* și *Lactobacillus buchneri* la acidul gastric și săruri biliare, în prezența laptelui, obținând  
26 valori ale viabilității de  $10^2 \dots 10^6$  UFC/ml. Datele de literatură indică faptul că, pentru a se obține  
27 efecte terapeutice dorite, viabilitatea ar trebui să fie de  $10^5 \dots 10^6$  UFC/ml.

28 **Blazenka Kos, Jagoda Suskovic, Jadranka Goreta și Srečko Matosic, "Effect of**  
29 **Protectors on the Viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated Gastrointestinal**  
30 **Conditions", 17 ianuarie 2000**, prezintă influența efectului protectorilor mucină și a  
31 constituenților regimului alimentar, cum ar fi cazeina, proteine concentrate din zer (WPC) și  
32 lapte degresat asupra viabilității *L. acidophilus* M92 în condiții gastrointestinale simulate.  
33 *L. acidophilus* este considerat a fi printre lactobacilii prezenți în mod predominant în tractului  
34 testinal al oamenilor sănătoși. Capacitatea *L. acidophilus* de a supraviețui și să-și păstreze via-  
35 bilitatea la trecerea prin tractul gastrointestinal (GI) este una dintre principalele caracteristici  
36 dezirabile pentru activitatea probiotică. A fost determinată influența mucinei și a constituenților  
37 dietetici, cum ar fi cazeina, proteine concentrate din zer (WPC) și lapte degresat, asupra supra-  
38 viețuirii *L. acidophilus* M92 în condiții izolate simulate. O suspensie de celule spălate a fost ex-  
39 pusă la pepsină (3 g/L) și clorură de sodiu (5 g/l) la pH = 1,5, 2,0, 2,5 și 3,0, precum și la pan-  
40 creatină (1 g/L), clorură de sodiu (5 g/l) și oxgall (1,5, 2,0, 3,0, 5,0 mg/ml) la pH = 8,0, imitând  
41 mediu GI. Mult mai mare toleranță la sucul gastric și din intestinul subțire a fost observată în  
42 prezență de mucină și proteine din lapte, în special cu WPC. Influența WPC, ca cel mai bun  
43 protector asupra viabilității celulare a *L. acidophilus* M92 în sucul gastric și intestinul subțire  
44 simulat, a fost confirmat printr-un model matematic. S-au stabilit puncte critice, indicând condiții  
45 GI în care *L. acidophilus* M92 poate fi tolerat. Aceste observații au arătat că *L. acidophilus* M92  
46 supraviețuiește la pH = 1,99 în suc gastric artificial timp de 2 h, și la 3,1 mg/ml oxgall în suc  
47 intestinal simulat timp de 4 h, în timp ce, în prezența WPC, acesta tolerează până la pH chiar  
mai mic (1,77) și concentrație mai mare de oxgall (4,25 g/L). În plus, doar 15% din

# RO 127731 B1

celule de *L. acidophilus* M92 au supraviețuit tranzitului direct din sucul gastric simulat la sucul intestinului subțire simulat, dar cu adaos de WPC, 45% din celulele *L. acidophilus* M92 au supraviețuit. Aceste rezultate au sugerat adăugarea WPC ca protector în preparatul de *L. acidophilus* M92, pentru utilizare ca probiotic. 1 3

Problema pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unui procedeu de testare a viabilității unor tulpini de bacterii lactice, producătoare de exopolizaharide, prin utilizarea unui sistem de simulare *in vitro* a tractului gastrointestinal. 5 7

Procedeu conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că sucul gastric sau sucul intestinal, conținând sărurile biliare de la nivelul gastric și al intestinului subțire, se filtrează pe un filtru Millipore cu porozitate de 0,45 μm, în condiții sterile, se adaugă în tuburi Duron, din sticlă borosilicată, prevăzute cu dop GL 18 și sept din silicon sterilizabil, cu volum de 20 ml, peste care se adaugă culturi de tulpini microbiene, pentru testat, sub formă de suspensii de celule viabile, se agită și se determină viabilitatea în mod computerizat, cu un sistem de citire automat, prin intermediul unui soft adecvat. 9 11 13

Prin aplicarea invenției se obține următorul avantaj: tulpinile pot fi testate în profunzime din punct de vedere microbiologic (viabilitate), rezultând cu precizie la ce compuși sunt sensibile și în ce concentrație, comparativ cu studiile anterioare. 15 17

Prezența invenției dezvoltă un protocol experimental de testare a viabilității tulpinilor probiotice de bacterii lactice, având ca model protocolul prezentat de către Kos și colab., prin utilizarea tulpinii *Lactobacillus rhamnosus* IL 1 și IL 4.2. Procedeu dezvoltat utilizează tuburile Duran prevăzute cu sept din silicon sterilizabil. Aceste tuburi sunt sterilizate, în prima fază, prin autoclavare, goale, la 121°C, timp de 20 min. Întreg procedeu propus are loc într-o hotă în flux laminar, iar soluțiile care se prepară se folosesc după sterilizare cu filtru Millipore Millex-HA, porozitate 0,45 μm. Soluțiile test se introduc în momentul utilizării cu o seringă sterilă, volum 50 ml, iar în momentul introducerii tulpinii liofilizate, se elimină filtrul. Aceeași procedură de filtrare se aplică și soluției corectoare a pH-ului. Soluțiile se realizează în NaCl 0,5...0,9%, deoarece nu s-a observat a avea o influență a concentrației asupra rezultatului final. Probele din tubul Duran se obțin tot cu o seringă, 5 ml volum, sterilă. Diluția probelor, pentru determinarea viabilității rămase, se face în NaCl 0,9%. De asemenea, s-a mai urmărit realizarea unor condiții de anaerobioză, dar care și permit o agitare corespunzătoare a mediului simulat într-un agitator de laborator Vortex Genius 3, turație minimă 500 rpm. Astfel, se ocupă un volum de aproximativ 80% din cel total al eprubetei, în momentul efectuării testelor. De asemenea, se determină influența avută asupra viabilității celulare în prezența unor protectori de tipul mucinei și caseinei, în funcție de condițiile fiziologice normale. La final, plăcile Petri însămânțate se introduc într-un Jar unde condițiile de anaerobioză se realizează cu ajutorul GAS-Pack-Kit CO<sub>2</sub>. 19 21 23 25 27 29 31 33 35

Procedeu realizat conform invenției cuprinde etapele prezentate în continuare (figură).

Realizarea sucului gastric simulat: se prepară prin adăugarea a 3 g/l pepsină în soluție de NaCl 0,5...0,9%. pH-ul se ajustează la valorile de 1,5...3 cu HCl 12N. Soluțiile se folosesc după sterilizare cu filtru Millipore Millex-HA, porozitate 0,45 μm, la introducerea în tubul Duran. 37 39

Realizarea sucului intestinal (intestinul subțire): se prepară prin amestecarea a 1 g/l pancreatină și săruri biliare, concentrații diferite 1,5...5 mg/ml, în soluție de NaCl 0,5...0,9%. Se ajustează pH-ul la 7 cu soluție de NaOH 0,2N. Soluțiile se folosesc după sterilizare cu filtru Millipore Millex-HA, porozitate 0,45 μm, la introducerea în tubul Duran. 41 43

Determinarea capacității de supraviețuire a tulpinilor probiotice sub influența sucului gastric simulat: se utilizează tuburi Duran sterile, prevăzute cu sept din silicon sterilizabil. În aceste tuburi, în hota în flux laminar, se adaugă 2 ml soluție de celule viabile de bacterie probiotică, 10 ml soluție suc gastric și 3 ml NaCl 1%, ultimele soluții fiind sterilizate prin filtrare 45 47

# RO 127731 B1

1 cu filtru Millipore Millex-HA, porozitate 0,45 µm. Se amestecă într-un agitator de laborator Vortex  
Genius 3 la turație minimă, timp de 2 h. Se determină viabilitatea prin însămânțare în dublu strat  
3 pe mediu MRS/MRS + 0,2% clorhidrat de cisteină. Se determină numărul de celule viabile după  
24...48 h în condiții anaerobe, la 37°C, utilizând Schuett colonyQuant și softul corespunzător.

5 Determinarea capacității de supraviețuire a tulpinilor probiotice sub influența sucului  
intestinal (intestinul subțire): se utilizează tuburi Duran sterile, prevăzute cu sept din silicon  
7 sterilizabil. În aceste tuburi, în hota în flux laminar, se pun 2 ml soluție de celule viabile de  
bacterie probiotică, 10 ml soluție suc intestinal (intestinul subțire) și 3 ml NaCl 1%, ultimele  
9 soluții fiind sterilizate prin filtrare cu filtru Millipore Millex-HA, porozitate 0,45 µm. Se amestecă  
într-un agitator de laborator Vortex Genius 3 la turație minimă, timp de 4 h. Se determină  
11 viabilitatea prin însămânțare în dublu strat pe mediu MRS/MRS + 0,2% clorhidrat de cisteină.  
Se determină numărul de celule viabile după 24...48 h în condiții anaerobe, la 37°C, utilizând  
13 Schuett colonyQuant și softul corespunzător.

15 Influența protectorilor (cazeină și mucină) asupra viabilității tulpinilor probiotice în suc  
gastric/sucul intestinal simulat: se utilizează tuburi Duran sterile, prevăzute cu sept din silicon  
sterilizabil. În aceste tuburi, în hota în flux laminar, se pun 2 ml soluție de celule viabile de bac-  
17 terie probiotică, 10 ml soluție suc gastric/suc intestinal și 3 ml cazeină sau mucină (concentrație  
0,1%) în NaCl 0,9%. Soluțiile se sterilizează prin filtrare cu filtru Millipore. Se amestecă într-un  
19 agitator de laborator Vortex Genius 3 la turație minimă, timp de 2, respectiv, 4 h. Se determină  
viabilitatea prin însămânțare în dublu strat pe mediu MRS/MRS+0,2% clorhidrat de cisteină. Se  
21 determină numărul de celule viabile după 24...48 h, la 37°C, utilizând Schuett colonyQuant și  
softul corespunzător.

23 Efectul combinat al sucului gastric și al celui intestinal (intestinul subțire) asupra  
viabilității tulpinilor probiotice: 2 ml suspensie de celule probiotice se amestecă într-un tub Duran  
25 cu 10 ml soluție suc gastric pH 2...3 și 3 ml NaCl 1%, timp de 2 h, într-un agitator de laborator  
Vortex Genius 3, la turație minimă. După acest interval, amestecul se centrifughează la  
27 5000 rpm, 10 min. Apoi, peste sedimentul celular se adaugă 10 ml soluție suc intestinal  
3...4 mg/ml săruri biliare pH 7, și 3 ml NaCl 1%, amestecându-se timp de 4 h într-un agitator de  
29 laborator Vortex Genius 3, la turație minimă. Același protocol se face și în cazul adăugării a 3 ml  
cazeină/ mucină (concentrație 0,1% în NaCl 0,9%). Se determină viabilitatea prin însămânțare  
31 în dublu strat pe mediu MRS/MRS + 0,2% clorhidrat de cisteină. Se determină numărul de  
celule viabile după 24...48 h, la 37°C, utilizând Schuett colonyQuant și softul corespunzător.

33 Determinarea viabilității și mortalității tulpinilor probiotice în condițiile de simulare *in vitro*:  
- viabilitatea celulară în sucul gastric, la diferite valori de pH, și în sucul intestinal, la  
35 diferite concentrații de săruri biliare:

$$V\% = (V_n/V_0) \times 100, \text{ unde:}$$

37 V - viabilitatea celulară în cele două sucuri digestive;

V - UFC/ml la diferite concentrații;

39 V<sub>0</sub> - UFC/ml la momentul inițial;

- mortalitatea celulară în sucul gastric și cel intestinal:

$$M\% = 100 - V, \text{ unde:}$$

41 M - mortalitatea celulară;

43 V - rezultatul anterior obținut.

În continuare sunt prezentate 2 exemple de realizare în legătură cu figura ce reprezintă  
45 etapele de procedeu realizat conform invenției.

**Exemplul 1***Testare viabilității tulpinii IL1*

Tulpina testată trebuie să prezinte o viabilitate bună în scopul utilizării sale ca probiotic, deoarece una dintre marile probleme ale acestor tulpini este rezistența lor (viabilitatea) în condițiile tranzitului gastric și intestinal. Efectul tranzitului gastrointestinal început în stomac este exercitat de către pepsină, la un pH cuprins în intervalul 1,5...3. Timpul de staționare la acest nivel nu depășește 2 h. Astfel, se observă că viabilitatea tulpinii este direct influențată de pH. La pH de 1,5, aceasta reprezintă aproximativ 97% din viabilitatea înregistrată la celelalte valori de pH la 0 h de expunere. Aceasta scade până la 17,5% la 2 h de expunere la pH 1,5. La un pH ce depășește valoarea 2, tulpina își păstrează constantă viabilitatea după 1 h de expunere la suc gastric simulat. După 2 h, pe măsura creșterii pH de la 1,5 la 2, crește și viabilitatea, și rămâne constantă după un pH de 2,5, fiind 65,5% din cea inițială. Din datele prezentate, rezultă că tulpina este rezistentă la pH scăzut, fapt extrem de rar printre tulpinile de bacterii lactice probiotice.

Mucina se prezintă ca un protector mai bun decât cazeina în cazul viabilității tulpinii *Lactohacillus rhamnosus* IL1 la acțiunea sucului gastric simulat. Bineînțeles că viabilitatea depinde de pH, dar ea este mai mare decât în cazul lipsei acestor substanțe. În general, valorile viabilității sunt mai mari cu 25 până la 50%, la un pH 1,5, atât pentru cazeină, cât și pentru mucină. În schimb, la pH de 2, valoarea viabilității în cazul prezenței mucinei este cu 12% mai mare decât în prezența cazeinei. La valoarea de 2,5 sau 3 a pH-ului, viabilitatea este relativ constantă, indiferent de prezența cazeinei sau a mucinei. Diferențele în favoarea prezenței mucinei, la valori de 2,5 și 3 ale pH-ului, sunt de aproximativ 5%, la o expunere de 1 sau 2 h.

Înainte de testarea viabilității, în cazul expunerii la suc intestinal simulat, s-a determinat și influența altor enzime asupra tulpinii *Lactohacillus rhamnosus* IL1. Astfel, a rezultat o păstrare a viabilității la acțiunea tripsinei, pronazei și chimotripsinei, în medie de 6,58 log (UFC/ml) față de viabilitatea tulpinii fără enzime. Adică rezultă o scădere la 2 h, sub acțiunea celor trei enzime menționate, de sub 10%.

În cazul expunerii directe la suc intestinal simulat, prezența sărurilor biliare are un efect de scădere a viabilității, în primul rând datorită creșterii concentrației acestora. O creștere de 3 sau 5 mg/ml săruri biliare determină, după 2 h de expunere, o scădere semnificativă a viabilității, de 25% pentru 3 mg/ml săruri biliare, și 40% pentru creșterea concentrației de săruri biliare la 5 mg/ml. De observat este faptul că, pentru 2 mg/ml săruri biliare, viabilitatea scade sub  $10^5$  UFC/ml abia după 3 h de expunere. Reiese clar din această figură că, odată cu creșterea timpului de staționare în prezența sărurilor biliare, viabilitatea este direct influențată în sens negativ. Dublarea concentrației de săruri biliare determină, după 4 h de expunere, scăderea viabilității cu 40%.

Și în cazul sucului intestinal simulat s-a determinat influența cazeinei și a mucinei. Se observă că acestea, dar în principal mucina, au un efect protectiv asupra viabilității tulpinii probiotice, în opoziție cu efectul pancreatinei și al sărurilor biliare. Deși diferența este mică, se observă că prezența cazeinei determină o scădere mai mare a viabilității. Scăderea este direct corelată cu creșterea concentrației de săruri biliare și timpul de staționare. La 2 h de expunere, indiferent de concentrația de săruri biliare, viabilitatea scade în medie cu 35%. După alte 2 h, viabilitatea scade în medie cu 6%. În cazul prezenței agenților protectori, viabilitatea nu scade sub  $10^5$  UFC/ml, indiferent de concentrația de săruri biliare sau timpul de staționare.

Parametrii matematici ai viabilității și mortalității au fost determinați la diferite valori de pH, și în prezența a diferite concentrații de săruri biliare. Din datele prezentate anterior rezultă că mucina este un protector mai bun decât cazeina. De remarcat este că linia mortalității și cea a viabilității, în prezența mucinei, nu se intersectează, rezultând o protecție corespunzătoare

1 la valori mai mici de 2 ale pH-ului. Conform calculelor matematice, viabilitatea la pH de 2 crește  
în prezența ei cu 23,1%. Din aceeași figură, reiese că tulpina *Lactobacillus rhamnosus* IL1 are  
3 o viabilitate corespunzătoare la un pH de 1,8, conform datelor de literatură, de minimum  $10^5$   
UFC/ml pentru probiotice.

5 Aceași tendință se observă și în cazul sucului intestinului subțire simulat. Și în acest  
caz prezența mucinei protejează foarte bine viabilitatea celulară, fapt întărit de neintersectarea  
7 graficului viabilității și al mortalității. În lipsa mucinei, tulpina este puternic inhibată de creșterea  
peste 2 mg/ml a concentrației de săruri biliare. Astfel, la o concentrație de săruri biliare de 3 și  
9 5 mg/ml, prezența mucinei determină o creștere a viabilității în medie cu 40%.

11 Efectul protector al prezenței mucinei se observă și în cazul acțiunii cumulate a sucului  
gastric și al celui al intestinului subțire asupra viabilității tulpinii IL1. Viabilitatea este direct in-  
fluențată de mucină, deși în cazul acțiunii sucului gastric este ridicată, de peste 50%, la pH de  
13 2. Prezența mucinei crește valoarea viabilității, în această situație, cu peste 10%. Dacă asupra  
lor acționează și sucul intestinului subțire simulat, conținând o concentrație de 2...3 mg/ml săruri  
15 biliare, viabilitatea se păstrează în proporție de 40%, atunci când este prezentă și mucina.

17 Deși este o prezență normală la nivelul mucoasei gastrice, aceasta oferă o protecție  
foarte bună și tulpinilor de bacterii lactice în cazul administrării lor directe. Efectul combinării  
19 mucinei cu tulpini liofilizate de bacterii lactice nu determină decât o creștere a viabilității la  
trecerea prin compartimentele tractului gastrointestinal uman. Această creștere a numărului de  
21 celule, la stresul exercitat de un pH de 2 și o concentrație de 2...3 mg/ml săruri biliare, contribuie  
la găsirea de noi tulpini de bacterii lactice extrem de rezistente. Deși în mod normal se men-  
23 ționează păstrarea unei viabilități de aproximativ 20%, după un astfel de tranzit, găsirea unor  
tulpini și a unor condiții în care se dublează această viabilitate este un aspect semnificativ.

## Exemplul 2

### Testare viabilității tulpinii IL4.2

25 Tulpina testată trebuie să prezinte o viabilitate bună în scopul utilizării sale ca probiotic,  
27 deoarece una dintre marile probleme ale acestor tulpini este rezistența lor (viabilitatea) în  
condițiile tranzitului gastric și intestinal. Efectul tranzitului gastrointestinal început în stomac este  
29 exercitat de către pepsină, la pH cuprins în intervalul 1,5...3. Timpul de staționare la acest nivel  
nu depășește 2 h. Astfel, se observă că viabilitatea tulpinii este direct influențată de pH. La pH  
31 de 1,5, tulpina IL4.2 are o pierdere a viabilității de 30% față de cea înregistrată la 0 h de  
expunere. La pH ce depășește valoarea 2, tulpina își păstrează constantă viabilitatea după 1 h  
33 de expunere la sucul gastric simulat. După 2 h, pe măsura creșterii pH-ului de la 1,5 la 2, crește  
și viabilitatea, și nu scade sub cea înregistrată la pH de 1,5. Din datele prezentate, rezultă că  
35 tulpina este rezistentă la pH scăzut, păstrându-și valoarea viabilității ridicată indiferent de  
valoarea pH-ului gastric.

37 Mucina se prezintă ca un protector mai bun decât cazeina, în cazul viabilității tulpinii  
*Lactobacillus rhamnosus* IL4.2 la acțiunea sucului gastric simulat. Deși viabilitatea depinde de  
39 pH, ea este mai mare decât în cazul lipsei acestor substanțe. În general, valorile viabilității sunt  
mai mari cu aproximativ 5% la pH de 1,5, atât pentru cazeină, cât și pentru mucină. În schimb,  
41 la pH de 2, valoarea viabilității în cazul prezenței mucinei este cu 1% mai mare decât în pre-  
zența cazeinei. La valoarea de 2,5 sau 3 a pH-ului, viabilitatea este relativ constantă, indiferent  
43 de prezența cazeinei sau a mucinei. Diferențele în favoarea prezenței mucinei, la valori de 2,5  
și 3 ale pH-ului, sunt de aproximativ 2...3%, la o expunere de 1 sau 2 h.

45 Înainte de testarea viabilității, în cazul expunerii la sucul intestinului subțire, s-a deter-  
minat și influența altor enzime asupra tulpinii *Lactobacillus rhamnosus* IL4.2. Astfel, a rezultat  
47 o păstrare a viabilității la acțiunea tripsinei, pronazei și chimotripsinei, în medie de 6 log  
(UFC/ml) față de viabilitatea tulpinii fără enzime. Sub acțiunea celor trei enzime rezultă o  
49 scădere de aproximativ 10%, la un interval de 2 h.

# RO 127731 B1

În cazul expunerii directe la acțiunea sucului intestinului subțire simulat, prezența 1  
sărurilor biliare are un efect de scădere a viabilității, în primul rând din cauza timpului de 1  
expunere și, secundar, din cauza creșterii concentrației acestora. O cantitate de 2, 3 sau 3  
5 mg/ml săruri biliare determină, după 1 h de expunere, o scădere a viabilității în medie cu 26%.  
După 2 h urmează o plafonare a viabilității. O scădere mai mare a viabilității se observă la 5  
5 mg/ml săruri biliare, după 4 h de expunere. Reiese din această figură că, odată cu creșterea  
timpului de staționare în prezența sărurilor biliare, scăderea viabilității este mică și constantă, 7  
în medie de 1...2%.

Și în cazul sucului intestinului subțire s-a determinat influența cazeinei și a mucinei. Se 9  
observă că acestea, dar în principal mucina, au un efect protectiv asupra viabilității tulpinii  
probiotice, în opoziție cu efectul pancreatinei și al sărurilor biliare. Deși diferența este mică, se 11  
observă că prezența cazeinei determină o scădere mai mare a viabilității. Scăderea este direct  
corelată cu creșterea concentrației de săruri biliare și timpul de staționare. După 2 h de 13  
expunere, indiferent de concentrația de săruri biliare, viabilitatea scade în medie cu 26%. După  
alte 2 h, viabilitatea scade în medie cu 5%. În cazul prezenței agenților protectori, viabilitatea 15  
nu scade sub  $10^5$  UFC/ml, indiferent de concentrația de săruri biliare sau timpul de staționare.

Parametrii matematici ai viabilității și mortalității au fost determinați la diferite valori de 17  
 $pH$  și în prezența a diferite concentrații de săruri biliare. Din datele prezentate anterior, rezultă  
că mucina este, în general, un protector mai bun decât cazeina. De remarcat este că linia 19  
mortalității și cea a viabilității, în prezența mucinei, nu se intersectează, rezultând o protecție  
corespunzătoare la valori mai mici de 2 ale  $pH$ -ului. Conform calculelor matematice, la  $pH$  de 21  
2, viabilitatea crește în prezența mucinei cu 3%. Din aceeași figură rezultă că tulpina  
*Lactobacillus rhamnosus* IL4.2 are o viabilitate corespunzătoare la  $pH$  cuprins în intervalul 23  
1,5...2, conform datelor de literatură, de minimum  $10^5$  UFC/ml pentru probiotice.

Aceeași tendință se observă și în cazul sucului intestinului subțire simulat. Prezența 25  
mucinei menține viabilitatea celulară, fapt întărit de neintersectarea graficului viabilității și al  
mortalității. În lipsa mucinei, tulpina este inhibată de creșterea peste 3 mg/ml a concentrației de 27  
săruri biliare. Astfel, la o concentrație de săruri biliare de 3 și 5 mg/ml, prezența mucinei nu  
determină o creștere a viabilității, ea rămânând relativ constantă. 29

Efectul protector al prezenței mucinei se observă și în cazul acțiunii cumulate a sucului 31  
gastric și al intestinului subțire asupra viabilității tulpinii IL4.2. Viabilitatea este direct influențată  
de mucină, deși în cazul acțiunii sucului gastric este ridicată, de peste 25%, la  $pH$  de 2.  
Prezența mucinei crește valoarea viabilității cu peste 15%. Dacă asupra tulpinii acționează și 33  
sucul intestinului subțire simulat, conținând o concentrație de 2...3 mg/ml săruri biliare,  
viabilitatea se păstrează în proporție de 93%, atunci când este prezentă și mucina. 35

Deși este o prezență normală la nivelul mucoasei gastrice, mucina oferă o protecție 37  
foarte bună și tulpinilor de bacterii lactice, în cazul administrării lor directe. Efectul combinării  
mucinei cu tulpini liofilizate de bacterii lactice nu determină decât o creștere a viabilității la 39  
trecerea prin compartimentele tractului gastrointestinal uman. Această creștere a numărului de  
celule, la stresul exercitat de  $pH = 2$  și o concentrație de 2...3 mg/ml săruri biliare, contribuie la 41  
găsirea de noi tulpini de bacterii lactice extrem de rezistente. Datele de literatură (bibliografie)  
indică păstrarea unei viabilități de aproximativ 20% după un astfel de tranzit. Selecția unor 43  
tulpini și stabilirea unor condiții în care se mărește valoarea viabilității reprezintă aspecte  
semnificative pentru obținerea de produse de tip probiotic.

# RO 127731 B1

1

## Revendicare

3

Procedeu de testare a viabilității unor tulpini de bacterii lactice producătoare de exopolizaharide, prin utilizarea unui sistem de simulare *in vitro* a tractului gastrointestinal,

5

**caracterizat prin aceea că** sucul gastric sau sucul intestinal, conținând sărurile biliare, de la nivelul gastric și al intestinului subțire, se filtrează pe un filtru Millipore cu porozitate de 0,45 μm,

7

în condiții sterile, se adaugă în tuburi Duron din sticlă borosilicată, prevăzute cu dop GL18 și

9

sept din silicon sterilizabil, cu volum de 20 ml, peste care se adaugă culturi de tulpini microbiene pentru testat, sub formă de suspensii de celule viabile, se agită și se determină viabilitatea în mod computerizat, cu un sistem de citire automat, prin intermediul unui soft adecvat.



