



(12)

# **CERERE DE BREVET DE INVENTIE**

(21) Nr. cerere: a 2011 01175

(22) Data de depozit: 17.11.2011

**(41) Data publicării cererii:**  
**30.08.2012**      BOPI nr. **8/2012**

(71) Solicitant:  
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE  
AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ  
DIN BUCUREȘTI, BD. MĂRĂȘTI NR. 59,  
SECTOR 1, BUCURESTI, B. RO

**(72) Inventatori:**  
• **VAMANU EMANUEL,**  
**ALEEA VALEA CĂLUGĂREASCĂ NR.3,**  
**BL.A10, SC.D, ET.2, AP.53, SECTOR 6,**  
**BUCUREŞTI, B, RO;**

- **VAMANU ADRIAN,**  
ALEEA CÂMPUL CU FLORI NR. 2B,  
BL. C17A, SC. B, ET.5,  
AP. 68, SECTOR 6, BUCUREŞTI, B, RO;
- **NITĂ SULTANA,** STR.BĂRBAT VOIEVOD  
NR.21, SECTOR 2, BUCUREŞTI, B, RO;
- **PELINESCU DIANA,**  
STR. CRISTEA MATEESCU NR.3, BL.T4B,  
SC.1, AP.42, SECTOR 2, BUCUREŞTI, B,  
RO;
- **RUSU NICOLETA,** STR.ARIEŞUL MARE  
NR.1, BL.I 5, SC.B, AP.28, SECTOR 6,  
BUCHARESTI, B, RO

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

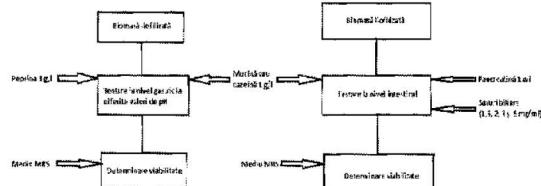
**(57) Rezumat:**

Prezenta inventie se refera la un procedeu de testare a viabilitatii unor tulpini de bacterii lactice producatoare de exopolizaharide, sub forma liofilizata, prin utilizarea unui sistem de simulare *in vitro* a tractului gastrointestinal, in conditii de sterilitate si anaerobioza, in tuburi Duran prevazute cu sept din silicon, ce simuleaza conditiile din tuburile Hungate. Procedeul presupune realizarea sucului gastric si a celui intestinal, sterilizarea prin filtrare cu filtrul Millipore, in momentul introducerii in tubul Duran steril, determinarea viabilitatii la conditiile gastrointestinale simulate, specifice fiecarui compartiment, conform dinamicii fiziologice a tranzitului prin fiecare compartiment si calcularea viabilitatii si mortalitatii *in vitro*, citirea si interpretarea rezultatelor se face in mod

complet automat, prin utilizarea colonyQuant și a soft-ului corespunzător, la maximum 48 h după dezvoltarea coloniilor pe mediul specific.

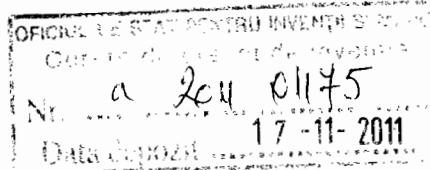
Revendicări: 9

Figuri: 1



Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





## DESCREREA INVENTIEI

### PROCEDEU DE TESTARE A VIABILITĂȚII BACTERIILOR LACTICE LA TRANZITUL TRACTULUI GASTROINTESTINAL UMAN

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

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

Testarea produselor se poate face prin simularea separată a condițiilor din stomac și intestin subțire. Astfel pentru testarea unei tulpini în vederea utilizării ei în realizarea de produse probiotice și/sau sinbiotice utilizează sisteme de simulare sau procedee experimentale *in vitro* pentru nivelul gastric și intestinal. Una dintre cele mai importante (sensibile) caracteristici ale microorganismelor probiotice este capacitatea lor de a supraviețui la trecerea prin acidul din stomacul uman și la atacul acizilor biliari în intestin. Mai mulți cercetători au studiat supraviețuirea lui *Lactobacillus acidophilus* și *Bifidobacterium spp.* în prezența valorilor scăzute de pH și sărurilor biliare. Pentru că a supraviețuit mai bine, *Bifidobacterium animalis* este adesea folosit în produsele fermentate. S-a studiat supraviețuirea *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, și *Bifidobacterium bifidum*, în prezență de acid, reesind că *Bifidobacterium longum* a supraviețuit cel mai bine. S-a stabilit că *Bifidobacterium longum* tolerează concentrațiile de acizi/săruri biliare mai mari cu 4.0%. Multe tulpini de *Lactobacillus acidophilus* și *Bifidobacterium spp.* nu au capacitatea de a supraviețui unor condiții aspre în intestin și nu pot fi adecvate pentru utilizare ca utilizatori dietetici în produse specifice. S-au găsit trei tulpini de *Lactobacillus acidophilus* care supraviețuiesc în condiții acide. Alte două tulpini de *Lactobacillus acidophilus* au arătat o mai bună toleranță la săruri biliare. *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium pseudolongum*, și *Bifidobacterium infantis* au arătat cea mai bună toleranță la săruri biliare. Cu toate acestea, *Bifidobacterium infantis* a supraviețuit slab, în condiții acide și nu poate fi potrivit pentru includerea în produse dietetice. Astfel, selecția de



RECTOR: prof. univ. dr. Diaconescu Ștefan

Lector dr. Vamanu Emanuel

tulpini, pe baza toleranței la acid și săruri biliare ar contribui la îmbunătățirea viabilității și la cunoașterea comportamentului la stres al acestor tulpini probiotice bacteriene.

Brevetul American USP US7666638 determină rezistența a două tulpini de *Lactobacillus reuteri* și *Lactobacillus buchneri* la acidul gastric și săruri biliare în prezența laptelui obținând valori ale viabilității de  $10^2$  –  $10^6$  UFC/ml. Datele de literatură indică faptul că pentru a se obține efecte terapeutice dorite, viabilitatea ar trebui să fie de  $10^5$  –  $10^6$  UFC/ml.

Prezenta inventivă dezvoltă un protocol experimental de testare a viabilității tulpinilor probiotice de bacterii lactice, prin utilizarea tulpinii *Lactobacillus rhamnosus* IL1 și IL 4.2. De asemenea, se determină influența avută asupra viabilității celulare în prezența unor protector de tipul mucinei și caseinei.

Procedeul realizat conform invenției cuprinde următoarele etape (Figura 1):

*Realizarea sucului gastric simulat:* se prepară prin adăugarea a 3 g/l pepsină în soluție de NaCl 0,5%. pH se ajustează la valorile de 1,5, 2, 2,5 și 3 cu HCl 12N. Sterilizarea se face prin filtrare cu filtru Millipore 0,45 μm.

*Realizarea sucului intestinal (intestinul subțire):* se prepară prin amestecarea a un g/litru pancreatină cu săruri biliare, concentrații diferite – 1,5, 2, 3 și 5 mg/ml, în soluție de NaCl 0,5%. Se ajustează pH la 6,8 cu soluție de NaOH 0,2N. Sterilizarea se face prin filtrare cu filtru Millipore 0,45 μm.

*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 hotă în flux laminar, se pun 0,2 ml soluție de celule viabile de bacterie probiotică, 1 ml soluție suc gastric și 0,3 ml NaCl 0,5%, ultimele soluții sterilizate prin filtrare cu filtru Millipore. Se amestecă timp de 2 ore. Se determină viabilitatea prin însămânțare în dublu strat pe mediu MRS/MRS+0,2% clorhidrat de cisteină. Se determină numărul de celule viabile după 48 de ore, la  $37^0$ C, utilizând Schuett ColonyQuant și softul corespunzător.

*Determinarea capacității de supraviețuire a tulpinilor probiotice sub influența sucului intestinal (intestinul subțire) :* se utilizează tuburi Duran sterile prevăzute cu sept din silicon sterilizabil. În aceste tuburi, în hotă în flux laminar, se pun 0,2 ml soluție de celule viabile de bacterie probiotică, 1 ml soluție suc intestinal (intestinul subțire) și 0,3 ml NaCl 0,5%, ultimele soluții sterilizate prin filtrare cu filtru Millipore. Se amestecă timp de 4 ore. Se determină viabilitatea prin însămânțare în dublu strat pe mediu MRS/MRS+0,2% clorhidrat de cisteină. Se determină numărul de celule viabile după 48 de ore, la  $37^0$ C, utilizând Schuett



Rector USAMVB Prof. univ. dr. Diaconescu Ștefan

Lector dr. Vamanu Emanuel

ColonyQuant și softul corespunzător.

*Influența cazeinei și a mucinei asupra viabilității tulpinilor probiotice în sucul gastric simulat:* se utilizează tuburi Duran sterile prevăzute cu sept din silicon sterilizabil. În aceste tuburi, în hota în flux laminar, se pun 0,2 ml soluție de celule viabile de bacterie probiotică, 1 ml soluție suc gastric și 0,3 ml NaCl 0,5%, cazeină 0,3 ml, mucină 0,3 ml. Cazeina și mucina se prepară inițial în soluție de NaCl 0,5% la o concentrație de 1 g/litru. Soluțiile se sterilizează prin filtrare cu filtru Millipore. Se amestecă timp de 2 ore. Se determină viabilitatea prin însămânțare în dublu strat pe mediu MRS/MRS+0,2% clorhidrat de cisteină. Se determină numărul de celule viabile după 48 de ore, la 37°C, utilizând Schuett ColonyQuant și softul corespunzător.

*Influența cazeinei și a mucinei asupra viabilității tulpinilor probiotice în sucul intestinal simulat (intestinul subțire):* se utilizează tuburi Duran sterile prevăzute cu sept din silicon sterilizabil. În aceste tuburi, în hota în flux laminar, se pun 0,2 ml soluție de celule viabile de bacterie probiotică, 1 ml soluție suc intestinal (intestin subțire) și 0,3 ml NaCl 0,5%, cazeină 0,3 ml, mucină 0,3 ml. Cazeina și mucina se prepară inițial în soluție de NaCl 0,5% la o concentrație de 1 g/litru. Soluțiile se sterilizează prin filtrare cu filtru Millipore. Se amestecă timp de 2 ore. Se determină viabilitatea prin însămânțare în dublu strat pe mediu MRS/MRS+0,2% clorhidrat de cisteină. Se determină numărul de celule viabile după 48 de ore, la 37°C, utilizând Schuett ColonyQuant și softul corespunzător.

*Efectul combinat al sucului gastric și a celui intestinal (intestinul subțire) asupra viabilității tulpinilor probiotice:* 0,2 ml suspensie de celule probiotice se amestecă într-un tub Duran cu 1 ml soluție suc gastric pH 2 și 0,3 ml NaCl 0,5%, timp de 2 ore. După acest interval amestecul se centrifughează la 5.000 rpm, 10 minute. Apoi, peste sedimentul celular se adaugă 1 ml soluție suc intestinal 3 mg/ml (intestinul subțire) pH 8,3 și 0,3 ml NaCl 0,5%, amestecându-se timp de patru ore. Același protocol se face și în cazul adăugării a 0,3 ml cazeină/mucină (concentrație 1 g/litru în NaCl 0,5%). Se determină viabilitatea prin însămânțare în dublu strat pe mediu MRS/MRS+0,2% clorhidrat de cisteină. Se determină numărul de celule viabile după 48 de ore, la 37°C, utilizând Schuett ColonyQuant și softul corespunzător.

*Determinarea matematică a viabilității/mortalității tulpinilor probiotice în condițiile de simulare in vitro:*

- Viabilitatea celulară în sucul gastric și sucul intestinal (intestinul subțire) fără pancreatină și fără pepsină:



Rector USAMVB Prof. univ. dr. Diaconescu Ștefan

Lector dr. Vamanu Emanuel

$$V\% = \frac{N_t}{N_0} \times 100, \text{ unde:}$$

$V\%$  - viabilitatea celulară (fără enzime);

$N_t$  – număr celule viabile/ml în sucul gastric și intestinal;

$N_0$  – număr celule viabile/ml la  $t=0$ .

b. Viabilitatea celulară în sucul gastric la diferite valori de pH și în sucul intestinal, la diferite concentrații de săruri biliare:

$$V_E \% = \frac{N_{Et}}{N_0} \times 100, \text{ unde:}$$

$V_E\%$  - viabilitatea celulară în cele două sucuri digestive;

$N_{Et}$  – număr celule viabile/ml la diferite concentrații;

$N_0$  – număr celule viabile/ml la  $t=0$ .

c. Mortalitatea celulară în sucul gastric și sucul intestinal (intestinul subțire) fără pancreatină și fără pepsină:

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

$M$  – mortalitatea celulară (fără enzime);

$V$  – rezultatul punctului a..

d. Mortalitatea celulară în sucul gastric și cel intestinal:

$$M_E/\% = 100 - V_E, \text{ unde:}$$

$M_E$  – mortalitatea cellulară;

$V_E$  – rezultatul punctului b..

e. Mortalitatea celulară specifică:

$$M_S = \frac{M_E \times M}{V} \times 100, \text{ unde:}$$

$M_S$  – mortalitatea cellulară specifică;

$M_E$  – rezultatul punctului d.;

$M$  – rezultatul punctului c.;

$V$  – rezultatul punctului a..

f. Viabilitatea specifică celulară:

$$V_S = 100 - M_S, \text{ unde:}$$

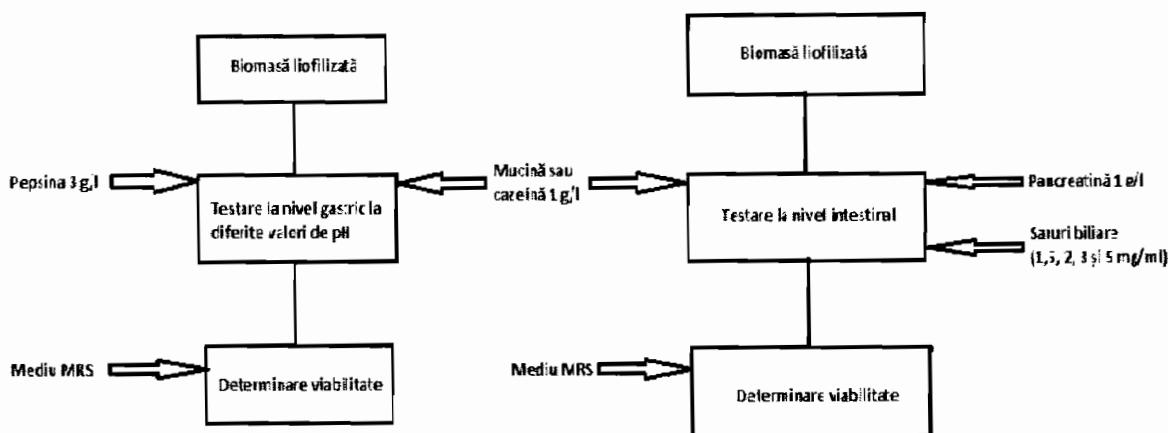
$V_S$  – viabilitatea cellulară specifică;

$M_S$  – rezultatul punctului e..



Rector USAMVB Prof. univ. dr. Diaconescu Ștefan

Lector dr. Vamanu Emanuel



**Figura 1. Schema de testare a tulpinilor probiotice la nivel gastric și intestinal**

#### **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 tulpi 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 între 1.5 - 3. Timpul de staționare la acest nivel nu depășește 2 ore. Astfel, se observă că viabilitatea tulpinii este direct influențată de pH. La pH 1.5 aceasta reprezintă aproximativ 97% din viabilitatea înregistrată la celelalte valori de pH la 0 ore de expunere. Aceasta scade până la 17.5 % la două ore de expunere la pH 1.5. La un pH ce depășește valoarea 2, tulpina își păstrează constantă viabilitatea după o oră de expunere la sucul gastric simulat. După două ore, 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 *Lactobacillus 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 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, 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, sunt de aproximativ 5%, la o expunere de una sau două ore.

Înaintea testării viabilității, în cazul expunerii la sucul intestinului subțire, s-a



Rector USAMVB Prof. univ. dr. Diaconescu Stefan

Lector dr. Vamanu Emanuel

determinat și influența altor enzime asupra tulpinii *Lactobacillus 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 două ore, sub acțiunea celor trei enzime menționate de sub 10%.

În cazul expunerii directe la sucul intestinalului subțire 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 două ore 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 ore 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 ore de expunere, scăderea viabilității cu 40%.

Și în cazul sucului intestinalului subțire 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 pancreatici 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 două ore de expunere, indiferent de concentrația de săruri biliare, viabilitatea scade în medie cu 35%. După alte două ore, 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 concentrării 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 la valori mai mici de 2 ale pH. Conform calculelor matematice viabilitatea, la pH 2, crește în prezența ei cu 23.1%. Din aceeași figură, reiese că tulpina *Lactobacillus rhamnosus* IL1 are o viabilitate corespunzătoare la un pH de 1.8, conform datelor de literatură, de minim  $10^5$  UFC/ml pentru probiotice.

Aceeași tendință se observă și în cazul sucului intestinalului subțire simulat. Și în acest caz prezența mucinei protejează foarte bine viabilitatea celulară, fapt întărit de neintersectarea graficului viabilității și a mortalității. În lipsa mucinei, tulpina este puternic inhibată de



Rector

USAMVB Prof. univ. dr. Diaconescu Ștefan

Lector dr. Vamanu Emanuel

creșterea peste 2 mg/ml a concentrației de săruri biliare. Astfel, la o concentrație de săruri biliare de 3 și 5 mg/ml, prezența mucinei determină o creștere a viabilității în medie cu 40%.

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 influențată de mucină, deși în cazul acțiunii sucului gastric este ridicată, de peste 50%, la pH 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 biliare, viabilitatea se păstrează în proporție de 40%, atunci când este prezentă și mucina.

Deși este o prezență normală la nivelul mucoasei gastrice, ea oferă o protecție 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 trecerea prin compartimentele tractului gastrointestinal uman. Această creștere a numărului de celule, la stresul exercitat de un pH 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 menționează 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.**

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 pH cuprins între 1.5 - 3. Timpul de staționare la acest nivel nu depășește 2 ore. Astfel, se observă că viabilitatea tulpinii este direct influențată de pH. La pH 1.5, tulpina IL4.2, are o pierdere a viabilității de 30% față de cea înregistrată la 0 ore de expunere. La pH ce depășește valoarea 2, tulpina își păstrează constantă viabilitatea după o oră de expunere la sucul gastric simulat. După două ore, pe măsura creșterii pH 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 tulpina este rezistentă la pH scăzut, păstrându-și valoarea viabilității ridicată indiferent de valoarea pH gastric.

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 pH, ea este mai mare decât în cazul lipsei acestor substanțe. În general, valorile viabilității



Lector dr. Vamanu Emanuel

17 -11- 2011

6

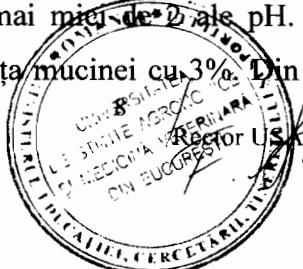
sunt mai mari cu aproximativ 5%, la pH de 1.5, atât pentru cazeină, cât și pentru mucină. În schimb, la pH 2, valoarea viabilității în cazul prezenței mucinei este cu 1% mai mare decât în prezența cazeinei. La valoarea de 2.5 sau 3 a pH, viabilitatea este relativ constantă, indiferent de prezența cazeinei sau a mucinei. Diferențele în favoarea prezenței mucinei, la valori de 2.5 și 3 ale pH, sunt de aproximativ 2 - 3%, la o expunere de una sau două ore.

Înainte de testarea viabilității, în cazul expunerii la sucul intestinului subțire, s-a determinat și influența altor enzime asupra tulpinii *Lactobacillus rhamnosus* IL4.2. Astfel, a rezultat 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 scădere de aproximativ 10%, la un interval de două ore.

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

Și în cazul sucului intestinului subțire 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 opozиie cu efectul pancreatici 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. După două ore de expunere, indiferent de concentrația de săruri biliare, viabilitatea scade în medie cu 26%. După alte două ore, viabilitatea scade în medie cu 5%. 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 concentrării de săruri biliare. Din datele prezentate anterior, rezultă că mucina este, în general, 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 la valori mai mici de 2 ale pH. Conform calculelor matematice viabilitatea, la pH 2, crește în prezența mucinei cu 3%. Din aceeași figură rezultă că tulpina



Rector USMVB Prof. univ. dr. Diaconescu Stefan  
Lector dr. Vamanu Emanuel

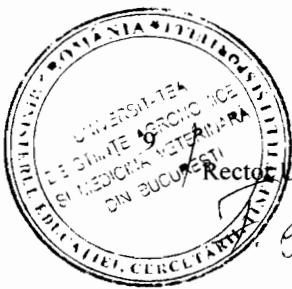
17 -11- 2011

*Lactobacillus rhamnosus* IL4.2 are o viabilitate corespunzătoare la pH între 1.5 - 2, conform datelor de literatură, de minim  $10^5$  UFC/ml pentru probiotice.

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

Efectul protector al prezenței mucinei se observă și în cazul acțiunii cumulate a sucului gastric și al intestinalului 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 2. Prezența mucinei crește valoarea viabilității cu peste 15%. Dacă asupra tulpinii acționează și sucul intestinalului subțire simulant, conținând o concentrație de 2 - 3 mg/ml săruri biliare, viabilitatea se păstrează în proporție de 93%, atunci când este prezentă și mucina.

Deși este o prezență normală la nivelul mucoasei gastrice, mucina oferă o protecție foarte bună și tulpinilor de bacterii lactice în cazul administrării lor directe. Efectul combinării mucinei cu tulpi liofilizate de bacterii lactice nu determină decât o creștere a viabilității la 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 găsirea de noi tulpi de bacterii lactice extrem de rezistente. Datele de literatură (bibliografie) indică păstrarea unei viabilități de aproximativ 20%, după un astfel de tranzit. Selecția unor tulpi și stabilirea unor condiții în care se mărește valoarea viabilității reprezintă un aspect semnificativ pentru obținerea de produse de tip probiotic.



UNIVERSITATEA DE  
MEDIICINA SI  
CIRURGIE DIN  
TARGU MURES  
1990  
RECTOR: USAMVB Prof. univ. dr. Diaconescu Stefan  
Lector dr. Vamanu Emanuel

A-2011-01175--  
17-11-2011

**Documente din stadiul tehnicii:**

Vincenzina Andreoni, Alberto Benedetti, Enrica Canzi, Salvatore Ciappellano,  
Michela Fumagalli, Selenium enriched biomass, method for preparing thereof and probiotic  
and nutraceutical products, United States Patent US7666638, 2010.



Rector UAMVB Prof. univ. dr. Diaconescu Stefan

Lector dr. Vamanu Emanuel

17 -11- 2011

## REVENDICARE

Procedeu de testare a viabilității unor tulpini de bacterii lactice producătoare de exopolizaharide prin utilizarea unui sistem de simulare *in vitro* a tractului gastrointestinal care cuprinde următoarele aspecte descrise mai sus:

1. Realizarea sucului gastric simulate.
2. Realizarea sucului intestinal (intestinul subțire).
3. Determinarea capacitatei de supraviețuire a tulpinilor probiotice sub influența sucului gastric simulate.
4. Determinarea capacitatei de supraviețuire a tulpinilor probiotice sub influența sucului intestinal (intestinul subțire).
5. Influența cazeinei și a mucinei asupra viabilității tulpinilor probiotice în sucul gastric simulat.
6. Influența cazeinei și a mucinei asupra viabilității tulpinilor probiotice în sucul intestinal simulat (intestinul subțire).
7. Efectul combinat al sucului gastric și a celui intestinal (intestinul subțire) asupra viabilității tulpinilor probiotice.
8. Determinarea matematică a viabilității/mortalității tulpinilor probiotice în condițiile de simulare *in vitro*.
9. Schema de testare a tulpinilor probiotice la nivel gastric și intestinal.



Lector dr. Vamanu Emanuel

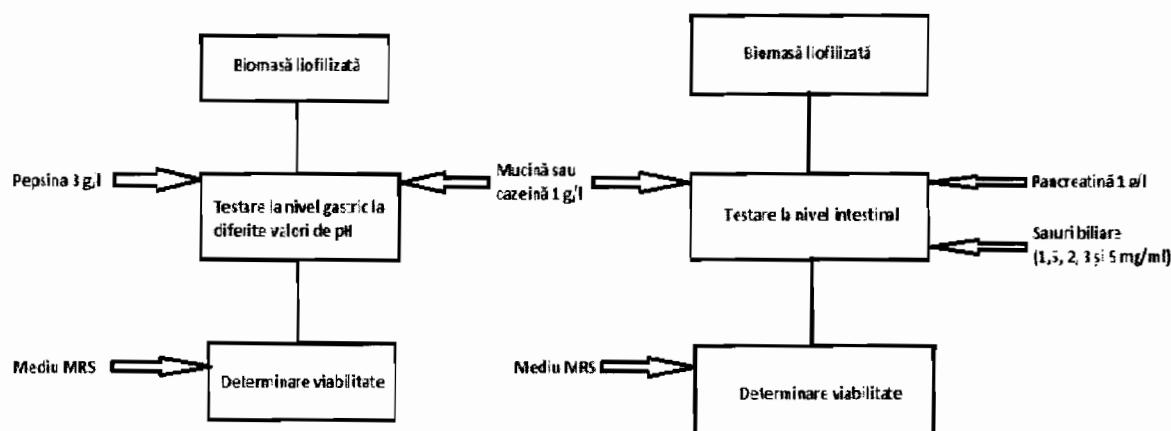


FIGURA 1



Rector UVMVB Prof. univ. dr. Diaconescu Ștefan

Lector dr. Vamanu Emanuel