



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01030**

(22) Data de depozit: **18/10/2011**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/09/2016** BOPI nr. **9/2016**

(41) Data publicării cererii:  
**28/09/2012** BOPI nr. **9/2012**

(73) Titular:  
• **CENTRUL DE BIOCHIMIE APLICATĂ ȘI BIOTEHNOLOGIE - BIOTEHNOL - BUCUREȘTI, BD.MĂRĂȘTI NR.59, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ 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**

(56) Documente din stadiul tehnicii:

**I. SUMERI, L. ARIKE, K. ADAMBERG, T. PAALME, "SINGLE BIOREACTOR GASTROINTESTINAL TRACT SIMULATOR FOR STUDY OF SURVIVAL OF PROBIOTIC BACTERIA", APPL MICROBIOL BIOTECHNOL, VOL. 80, PP. 317-324, 2008;**  
**C. CINQUIN, G. LE BLAY, I. FLISS, C. LACROIX, "IMMOBILIZATION OF INFANT FECAL MICROBIOTA AND UTILIZATION IN AN IN VITRO COLONIC FERMENTATION MODEL", MICROBIAL ECOLOGY, 2003**

(54) **METODĂ DE TESTARE *IN VITRO* A VIABILITĂȚII TULPINILOR PROBIOTICE DE BACTERII LACTICE LA TRANZITUL TRACTULUI GASTROINTESTINAL, ȘI SISTEM UNICAMERAL PENTRU APLICAREA ACESTEIA**



1 Inventția se referă la un sistem *in vitro* de testare a efectului tranzitului unor tulpini de  
bacterii lactice prin tractul gastrointestinal uman în două faze. Scopul invenției este  
3 determinarea viabilității acestor tulpini microbiene la tranzitul prin stomac și intestinul subțire,  
precum și a efectului lor asupra microbiotei simulate a colonului, în vederea utilizării acestora  
5 în produse funcționale și alimentare.

Utilizarea unor produse funcționale ca suplimente în corectarea disfuncțiilor micro-  
7 florei intestinale normale reprezintă una dintre metodele actuale. O alternativă o reprezintă  
produsele fabricate prin fermentarea laptelui de către bacterii lactice probiotice specifice.  
9 Efectul lor este limitat de tulpinile utilizate la fabricarea produselor lactate. De multe ori  
acestea sunt utile la realizarea produsului, dar în momentul ingerării își pierd o mare parte  
11 din viabilitate datorită pH-ului gastric și/sau prezenței pancreatinei și a acizilor biliari din  
intestinul subțire. Alegerea tulpinilor se face în principal pe baze economice, în detrimentul  
13 utilizării de tulpini ce pot supraviețui tranzitului gastrointestinal și a capacității de colonizare  
la nivel intestinal.

15 Prebioticele și bacteriile lactice probiotice au efecte semnificative asupra creșterii  
rezistenței organismului la boli. Viabilitatea la trecerea prin compartimentul gastric și intes-  
17 tinal uman reprezintă elementul esențial pentru desfășurarea activității lor *in vivo*. Produsele  
care combină pre- și probiotice sunt numite sinbiotice. Alegerea pre- și probioticelor trebuie  
19 să se bazeze pe cercetări științifice. Tulpinile utilizate trebuie să fie alese pe baza unor studii  
*in vitro*.

21 Cea mai importantă și mai numeroasă comunitate microbiană din corpul uman se află  
la nivelul intestinului. Un interes major îl reprezintă legătura dintre microbiota intestinală și  
23 starea de sănătate. Microbiota colonului este constituită dintr-un număr foarte mare și  
diversificat de tulpini microbiene. Relația dintre aceste microorganisme și sănătatea umană  
25 reprezintă o temă actuală de cercetare. Principalul rol pe care îl are și pe care trebuie să-l  
îndeplinească îl reprezintă facilitarea absorbției de nutrienți și cel de protecție împotriva unor  
27 tulpini patogene. Colonizarea intestinului reprezintă un proces complex, care depinde de  
interacțiunea cu mediul, regimul alimentar și diferiți factori interni ai gazdei. Tulpinile care  
29 colonizează diferitele părți ale tractului gastrointestinal uman se caracterizează prin  
persistență.

31 Unul dintre cele mai interesante și mai utilizate modele pentru testarea influenței unui  
produs alimentar sau nutraceutic asupra microbiotei intestinale o reprezintă simularea  
33 colonului bebelușilor. Acesta este un ecosistem fragil și direct influențat de către dietă sau  
alte produse ingerate, ce conțin tulpini viabile de microorganisme. La acest nivel colonizarea  
35 începe imediat după naștere, cu tulpini care sunt comune microbiotei materne. Acestea  
provin din flora vaginală și din cea intestinală. Primele grupe de microorganisme sunt cele  
37 strict anaerobe și facultativ anaerobe, cum ar fi enterobacteriile, coliformii și lactobacilii. Deși  
este mai stabilă, microflora adultului este perturbată în principal de tratamentul cu antibiotice  
39 sau de către bolile infecțioase.

Lucrarea "**Single bioreactor gastrointestinal tract simulator for study of survival**  
41 **of probiotic bacteria**", autori I. Sumeri, L. Arike, K. Adamberg, T. Paalme, 2008,  
determină rezistența a patru tulpini de bacterii lactice probiotice (*Lactobacillus acidophilus*  
43 La-5, *Lactobacillus johnsonii* NCC 533, *Lactobacillus casei* străin Shirota și *Lactobacillus*  
*ramnosus* GG) la pH gastric și sărurile biliare într-un bioreactor, la ingerarea de alimente.  
45 Rezultatele depind de modelul alimentar utilizat, având un procent de supraviețuire cuprins  
între 10 și 100%.

47 Lucrarea "**Immobilization of Infant Fecal Microbiota and Utilization in an in vitro**  
**Colonie Fermentation Model**", autori C. Cinquin, G. Le Blay, I. Fliss, C. Lacroix, 2004,  
49 determină efectul imobilizării tulpinilor din fecalele bebelușilor în timpul simulării tranzitului  
prin cele trei segmente ale colonului, la nivelul unui singur bioreactor.

# RO 127801 B1

Problema pe care o rezolvă invenția constă în prezentarea unei metode și a unui sistem unicameral de testare *in vitro* a viabilității tulpinilor probiotice de bacterii lactice la tranzitul prin tractul gastrointestinal. 1  
3

Metoda de testare *in vitro* a viabilității tulpinilor probiotice de bacterii lactice la tranzitul prin tractul gastrointestinal înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că se adaugă într-un vas 100 ml de HCl 0,01 N și 40 ml de suc gastric stimulat, pentru a simula condițiile din stomac, se ajustează pH-ul la 2,0 cu HCl 1 N, apoi se adaugă 200 ml de produs liofilizat care conține  $10^9$ - $10^{10}$  UFC/ml de bacterii lactice *Lactobacillus paracasei* YR și *Enterococcus faecium* VL47, și un prebiotic, respectiv, lactuloza, dizolvate în HCl 0,5%, pH-ul se aduce la 3,0 cu HCl într-un interval de 1,5 h, se neutralizează conținutul la pH 6,0 prin adăugarea a 1 M NaHCO<sub>3</sub> la o rată de 4,5 ml/min, pentru a simula trecerea din stomac în duoden, într-un interval de maximum 10 min, se adaugă 60 ml de săruri biliare 7,5 g/l și 100 ml pancreatină 30 g/l la o rată de 4 ml/min, timp de 10 min, pH-ul culturii din vas fiind menținut la o valoare de 6...6,5 prin adăugarea de NaHNO<sub>3</sub> 1 M, pe o perioadă de 7 h, apoi se iau probe la fiecare oră, pentru a determina viabilitatea microbiană prin însămânțare pe un mediu agarizat specific tulpinii testate de diluții în ser biologic steril, iar determinarea numărului de colonii se face cu ajutorul unui contor automat. 5  
7  
9  
11  
13  
15  
17

Sistemul unicameral de testare *in vitro* a efectului tranzitului prin tractul gastrointestinal uman al bacteriilor lactice înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că este constituit: dintr-un vas A din sticlă borosilicată, de 1000 ml, prevăzut cu un dop filetat, cu patru intrări pentru patru pompe, prin care se introduc: suc gastric stimulat prin pompa peristaltică P1, HCl prin pompa peristaltică P2, NaHCO<sub>3</sub> prin pompa peristaltică P3, pancreatină/săruri biliare prin pompa peristaltică P4, dopul este prevăzut cu un pH-metru digital cu un electrod de 4 mm grosime, sterilizabil B, și vasul este așezat pe un agitator magnetic cu plită ceramică încălzită C, și un senzor de temperatură D. 19  
21  
23  
25

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- se realizează o evaluare primară, rapidă a efectului exercitat de către bacteriile probiotice de bacterii lactice asupra stomacului și intestinului subțire ale unui adult sau ale unui copil; 27  
29

- se realizează un sistem de testare *in vitro* de sine stătător, printr-o fermentație de tip continuu. 31

Prezenta invenție dezvoltă un sistem *in vitro* de testare a viabilității tulpinilor probiotice de bacterii lactice la tranzitul prin stomac și intestinul subțire, și a influenței asupra microbiotei simulate a colonului, prin utilizarea a două tulpini probiotice *Lactobacillus paracasei* YR and *Enterococcus faecium* VL47 și a unui prebiotic, lactuloză. Prezentul sistem, denumit GIS1, simulează separat tranzitul prin stomac și intestinul subțire - faza 1, și efectul asupra microbiotei colonului - faza 2, ce cuprinde cele trei segmente ale colonului. Faza 1 simulează efectul exercitat de pH, sinteza de acid clorhidric și pepsină - stomac, efectul trecerii din stomac în intestinul subțire și acțiunea pancreatinei și a sărurilor biliare. Faza 2 simulează colonul pe baza timpului de retenție și al pH-ului fiecărui segment al acestuia (colon ascendent, colon transversal și colon descendent). 33  
35  
37  
39  
41

Faza 1 implică efectul tranzitului prin stomac și intestinul subțire. Faza a doua testează efectul tulpinilor asupra microbiotei simulate a colonului, prin determinarea raportului dintre diferite tulpini microbiene. Testele efectuate în prezenta invenției au fost efectuate pe o microfloră simulată a colonului unui bebeluș, la nivelul căruia există un echilibru fragil. O astfel de microfloră poate demonstra mult mai clar efectul exercitat de către tulpinile testate. De asemenea, s-a determinat efectul lactulozei, ca prebiotic, în timpul testelor din cadrul ambelor faze. 43  
45  
47

# RO 127801 B1

1 Structura de bază a sistemului GIS1 este compusă din:  
2 - un vas Duran din sticlă borosilicată, capacitate 1000 ml, prevăzut cu un dop filetat,  
3 cu patru intrări;  
4 - un pH-metru digital Hanna Benchtop HI 2211, cu un electrod de 4 mm grosime,  
5 sterilizabil;  
6 - 4 pompe peristaltice Behrotest, Type PLP 33, debit 0,4...2,0 l/h;  
7 - un agitator magnetic cu plită ceramică încălzită IKA C-MAG HS 7 și senzor de  
8 temperatură.

9 GIS1 este conceput pentru a funcționa în două etape distincte.

10 În continuare se prezintă un exemplu de realizare a invenției.

## 11 **Exemplu**

12 **Etapa 1 - Simularea tranzitului prin stomac și intestinul subțire - evaluarea viabilității**  
13 **unei tulpini microbiene**

14 100 ml HCl 0,01 N și 40 ml suc gastric simulat - pompa 1 (pepsină 3 g/l, mucină 3 g/l  
15 au fost dizolvate în NaCl 0,5%) se adaugă în vasul Duran, pentru a simula condițiile din  
16 stomac, se ajustează pH-ul la 2 cu HCl 1 N; 200 ml produs liofilizat (dizolvat în NaCl 0,5%),  
17 ce conține o cantitate de  $10^9...10^{10}$  UFC/ml de bacterii lactice, se introduc cu pompa 1 în  
18 vasul Duran; pH-ul se aduce la valoarea 3 cu 1 N HCl - pompa 2 într-o perioadă de  
19 maximum 1,5 h; conținutul se neutralizează la pH 6,0, prin adăugarea a 1 M  $\text{NaHCO}_3$  -  
20 pompa 3 la o rată de 4,5 ml/min, pentru a simula trecerea din stomac în duoden, într-o  
21 perioadă de maximum 10 min; se adaugă 60 ml săruri biliare 7,5 g/l și 100 ml pancreatină  
22 30 g/l - pompa 4 în sistem cu o rată de 4 ml/min, timp de 10 min; pH-ul culturii în vasul Duran  
23 a fost menținut la o valoare de 6...6,5 prin adăugarea a  $\text{NaHCO}_3$  1 M, pe o perioadă de până  
24 la 7 h. Rolul său este și acela de a simula absorbția de la nivelul intestinului subțire.

25 Toate soluțiile sunt preparate înainte de fiecare experiment. Se iau probe la fiecare  
26 oră, pentru a determina viabilitatea microbiană prin însămânțare pe mediu agarizat specific  
27 tulpinii testate. Pentru analiza viabilității, se realizează diluții în ser fiziologic steril, iar deter-  
28 minarea numărului de colonii se face în mod automat, cu ajutorul ColonyQuant, printr-un soft  
29 specializat. Capacitatea de supraviețuire ( $C_s$ ) se calculează conform următoarei formule:

31 
$$C_s - \text{Viabilitatea la } T_t / \text{Viabilitatea la } T_0$$

32 Modelul descris de simularea gastrointestinală a fost validat pe baza unei serii de trei  
33 teste efectuate cu cele două tulpini microbiene, cu și fără prezența prebioticului (lactuloză),  
34 dar și în prezența unei tulpini probiotice cunoscute (*Lactobacillus acidophilus* LA1). Timpul  
35 normal de tranzit al bolului alimentar prin stomac este de aproximativ 20...30 min. Nivelul  
36 acidității variază de la o persoană la alta. La nivel gastric pH scăzut este prima barieră împo-  
37 triva microorganismelor ingerate. Pentru a obține o caracterizare cât mai exactă *in vitro*, pH  
38 nu este singura condiție care trebuie îndeplinită. Datorită acestor diferențe, s-a ales ca  
39 valoare des întâlnită pentru teste pH 3, și prezența mucinei ca o componentă normală a con-  
40 ținutului gastric. Rolul său este interpretat și ca acela de a oferi o protecție pH scăzut atât  
41 mucoasei, cât și, în timpul tranzitului, tulpinilor microbiene probiotice.

42 Prezența lactulozei a oferit o protecție crescută asupra viabilității tulpinilor testate.  
43 Diferența dintre viabilitatea determinată la 1 și 2 h de expunere gastrică simulată a fost de  
44 maximum 4%. Valoarea s-a păstrat constantă. După 2 h, tulpinile din produs au fost expuse  
45 la conținutul simulat al intestinului subțire. S-a observat o diferență relativ constantă între  
46 tulpini, la perioada de expunere în mediul intestinului subțire simulat. Prezența prebioticului  
47 a conferit o protecție suplimentară, prin mărirea valorii  $C_s$ . Scăderea mai mare a viabilității,

în jur de 25%, a avut loc în primele 2 h de expunere la conținutul intestinului subțire. Diferențele au fost de 15% și au scăzut odată cu creșterea timpului de staționare. La nivelul intestinului subțire, o pierdere peste jumătate a numărului de celule viabile s-a observat în lipsa lactulozei după 4 h de testare în sistemul GIS1. Pentru prezența lactulozei, tulpinile au prezentat o pierdere de cel puțin 50% a numărului de celule viabile după 5,5 h de testare. În prezența prebioticului (lactulozei), viabilitatea celulară a crescut cu minimum 30% ( $P < 0,05$ ). Este de remarcat și faptul că mărirea Cs nu s-a realizat prin multiplicare celulară, atât la nivel gastric, cât și al intestinului subțire simulat. Viabilitatea pentru ambele variante nu a scăzut sub  $10^7$ , indiferent de perioada de timp în care s-a realizat testarea. La o astfel de trecere viabilitatea unor tulpini probiotice *Lactobacillus rhamnosus* GG și *Lactobacillus johnsonii* LA1 este în jur de 41%. Valorile obținute se încadrează în aceste limite pentru varianta în care este prezent prebioticul ( $P < 0,05$ ). Astfel, atât la nivel gastric, cât și în cel al intestinului subțire, supraviețuirea poate fi îmbunătățită și prin prezența unui prebiotic (lactuloză), constatarea fiind susținută de studii care au utilizat xilooligozaharide și fructooligozaharide.

Pentru o mai bună caracterizare a viabilității și comportamentului celor două tulpini în sistemul GIS1, s-a stabilit procentul de viabilitate a fiecărei tulpini în comparație cu tulpina LA1. Acesta a prezentat diferențe mari în prezența lactulozei. Tulpina YR este puternic inhibată de pH gastric, dar și de trecerea în intestin, exercitată prin adăugarea de săruri biliare și pepsină după 2 h. Pierderea viabilității în mediul gastric simulat a fost de aproximativ 25%. Prezența sărurilor biliare a făcut ca viabilitatea să mai piardă 50%, în medie, în decursul unei ore. Tulpina YR a fost complet inhibată până la 4 h. În schimb VL47 și LA1 s-au dovedit a fi mai rezistente. Cea mai rezistentă a fost VL47, care, din punct de vedere al numărului de celule, a prezentat o viabilitate medie de 5 log CFU/ml comparativ cu LA1, a cărei viabilitate a scăzut semnificativ, cu aproximativ 33%, în prezența conținutului gastric simulat, până la 7 log CFU/ml. După simularea tranzitului în conținutul intestinului subțire, LA1 s-a dovedit a fi foarte rezistentă, în comparație cu VL47. Chiar dacă viabilitatea a mai scăzut cu 30% pe parcursul a 4 h, aceasta a fost în final mai mare decât cea a VL47 cu aproximativ 1...2 log CFU/ml.

În lipsa lactulozei, pierderea viabilității a fost mai accentuată pentru tulpina YR, cât și pentru LA1. La nivel gastric, scăderea de viabilitate pentru YR a avut o medie de 10% față de prezența lactulozei în sistemul GIS1, pierzând în totalitate viabilitatea după 4 h în sistemul GIS1. În schimb, pentru LA1, scăderea a fost mai mare cu peste 35%, ajungând la aproximativ 3 log CFU/ml. Ca și în determinările precedente, tulpina a fost mai rezistentă în mediul intestinului subțire simulat. La nivelul intestinului subțire, viabilitatea a scăzut cu câte 10% pe parcursul unei ore. VL47 a prezentat o viabilitate mai mică, în absența lactulozei, cu 1...2 log CFU/ml. Astfel, aceste două tulpini s-au adaptat mai bine condițiilor din intestin decât YR, care trebuie să fie într-o cantitate mai mare în momentul ingerării, pentru a supraviețui tranzitului.

Capacitatea de supraviețuire individuală a tulpinilor a fost de cel puțin 0,5 după 5 h. O valoare similară a fost determinată și pentru LA1, după aproximativ 2,5 h de la tranzitul din compartimentul gastric în cel al intestinului subțire. Dacă lipsește lactuloza, timpul în care LA1 și YR și VL47 ajung la o valoare de 0,5 a capacității de supraviețuire scade cu până la o oră.

Deoarece tulpinile probiotice sunt afectate în mod direct în momentul intrării în stomac de pH scăzut, rezultă că viabilitatea mai bună, obținută în prezența lactulozei, s-a datorat exclusiv acesteia. Aceste diferențe au demonstrat că prezența lactulozei a avut un efect de protecție asupra celulelor bacteriene în timpul tranzitului gastrointestinal, dar poate fi interpretat și ca un efect de prelungire a viabilității în timpul depozitării. Acest efect s-a

# RO 127801 B1

1 manifestat mai puțin sau nu a influențat deloc viabilitatea tulpinii VL47. În momentul trecerii  
treptate la pH alcalin, ce a ajuns până în jurul valorii 6, celulele care au supraviețuit tranzi-  
3 tului au putut chiar să se și multiplieze. Un alt moment semnificativ l-a reprezentat trecerea  
de la mediul gastric la cel intestinal, în care scăderea viabilității observate a fost în medie de  
5 1,5 log CFU/ml. Întreg procesul a depins de caracteristicile fiziologice ale tulpinii, deoarece,  
pentru YR, această etapă a determinat anularea viabilității. Scăderea numărului de celule  
7 a fost influențată și de compoziția produsului.

9 **Etapa 2 - Simularea tranzitului prin colon - evaluarea efectului asupra raportului dintre  
speciile microbiene care colonizează colonul uman**

11 500 ml mediu de cultură pentru simularea conținutului din colon inoculat cu 100 ml  
soluție fecale pregătite anterior sunt adăugate în vasul Duran pentru perioada de stabilizare,  
pH 5,7...7,5 corectat cu 4 N NaOH; se scot cu pompa 3 100 ml mediu fermentat. În același  
13 timp, se reintroduc cu pompa 1 100 ml de mediu proaspăt, la fiecare 12 h; 15 ml produs  
liofilizat (dizolvat în 0,5% NaCl), conținând o cantitate de  $10^9...10^{10}$  UFC/ml de produs  
15 probiotic, sunt introduși cu pompa 1 în vasul Duran; pH-ul este ajustat la valoarea 5,6...5,9  
cu 6 N NaOH - pompa 4, pentru o perioadă de 4 h - colonul ascendent; pH-ul este ajustat  
17 la valoarea 6,2...6,5 cu 6 N NaOH - pompa 4, pentru o perioadă de 8 h - colonul transvers;  
pH-ul este ajustat la valoarea 6,6...6,9 cu 6 N NaOH - pompa 4, pentru o perioadă de 12 h -  
19 colonul descendent.

Toate soluțiile sunt preparate înainte de fiecare experiment. Se iau probe la fiecare  
21 oră, pentru a determina viabilitatea microbiană. Pentru analiza viabilității, se realizează diluții  
în ser fiziologic steril, iar determinarea numărului de colonii se face în mod automat cu  
23 ajutorul ColonyQuant, printr-un soft specializat. Numărul total de anaerobi este determinat  
prin utilizarea brain heart infusion agar; Mc. Conkey agar, pentru coliformi; Azide blood agar  
25 base, pentru enterococci; Mannitol salt agar, pentru stafilococi; Tryptose sulfite cycloserine  
agar, pentru clostridii; Beerens agar, pentru bifidobacterii; Rogosa agar, pentru lactobacili.

27 Analiza microbiană a probelor din sistemul GIS1 de simulare a colonului a arătat că  
prezența celor două tulpini are o influență directă asupra numărului și raportului dintre micro-  
29 organisme. O creștere mai mare față de raportul dintre grupele de microorganisme o are  
administrarea tulpinilor în prezența a 1% lactuloză. Conform datelor prezentate, numărul de  
31 lactobacilli și cel al bifidobacteriilor s-a menținut relativ constant, aceeași tendință  
observându-se și în cazul enterococilor. Pentru aceste grupuri de microorganisme, numărul  
33 a variat în limita a 0,5 log CFU/ml. Deși numărul de lactobacilli nu depășește limita de 7 log  
CFU/ml, pe general numărul total de microorganisme anaerobe are o tendință de scădere  
35 la nivelul colonului distal. Aceasta se datorează faptului că și numărul de bifidobacterii scade,  
deoarece aceste microorganisme sunt direct influențate de schimbarea pH-ului în timpul  
37 tranzitului prin cele trei compartimente ale colonului.

Deși în general se consideră că și alte grupuri de microorganisme sunt influențate de  
39 către pH, în cazul prezenței YR și VL 47, fără lactuloză, numărul de microorganisme  
(coliformii, clostridiile, stafilococi) variază tot în limita a 0,5 log CFU/ml. Scăderea semnifi-  
41 cativă a valorii numărului de microorganisme din cele trei grupe menționate au loc în  
perioada simulării colonului transversal, odată cu creșterea pH-ului până la 6,5. Odată cu tre-  
43 cerea la un pH de maximum 6,9...7 (colonul descendent), numărul acestor microorganisme  
are în general o tendință de scădere, în limita medie de 0,7 CFU/ml. Cel mai mult scade  
45 numărul de stafilococi, cu aproximativ 0,8 CFU/ml, iar cel mai puțin cel al clostridiilor, cu  
maximum 0,2 CFU/ml. În schimb, numărul enterococilor se menține relativ constant, cu o  
47 viabilitate medie de 6,86 CFU/ml. Se observă o tendință de scădere atunci când pH-ul  
crește, scăderea observându-se, în principal, în timpul simulării ultimei secțiuni a colonului  
49 (colonul descendent), valoarea maximă observându-se în partea colonului ascendent și în  
prima parte a celui transversal, cu un maximum de 7,1 CFU/ml.

## RO 127801 B1

Prezența lactulozei a determinat creșterea numărului de lactobacilli cu aproximativ 1,0 log UFC mai mare ( $p < 0,01$ ) decât atunci când lipsește. Această tendință se manifestă în principal în perioada de simulare a colonului transversal și descendent. Aceeași tendință de creștere a fost observată și pentru bifidobacterii. Pentru enterococi, prezența lactulozei nu are ca efect o creștere a numărului acestora, care nu a depășit 7 log CFU/ml. În schimb, se observă o scădere moderată a numărului clostridiilor, în principal în perioada de simulare a colonului ascendent și descendent. Pentru coliformi, se observă o scădere în timpul simulării colonului descendent ( $p < 0,05$ ). Scăderea observată a numărului de microorganisme are ca efect un consum al lactulozei în timpul simulării primelor două secțiuni ale colonului. Numărul de stafilococi, crește ușor, cu un maximum de aproximativ 0,5 log CFU/ml, față de situația în care lactuloza lipsește.

Studiul prezentat a demonstrat efectul pozitiv asupra microbiotei colonului al celor două tulpini, prin studii *in vitro* utilizând sistemul GIS1. Consumul de produse probiotice, în combinație cu prebiotice, determină o echilibrare mai rapidă și mai bună a microflorei colonului uman. S-a observat o creștere a numărului tulpinilor anaerobe benefice, ce favorizează o digestie mai bună, necesară persoanelor cu diferite dezechilibre.

# RO 127801 B1

## Revendicări

1

3

1. Metodă de testare *in vitro* a viabilității tulpinilor probiotice de bacterii lactice la tranzitul prin tractul gastrointestinal, **caracterizată prin aceea că** se adaugă într-un vas 100 ml de HCl 0,01 N și 40 ml de suc gastric stimulat, pentru a simula condițiile din stomac, se ajustează pH-ul la 2,0 cu HCl 1 N, apoi se adaugă 200 ml de produs liofilizat, care conține  $10^9$ - $10^{10}$  UFC/ml de bacterii lactice *Lactobacillus paracasei* YR și *Enterococcus faecium* VL 47, și un prebiotic, respectiv, lactuloza, dizolvate în HCl 0,5%, pH-ul se aduce la 3,0 cu HCl într-un interval de 1,5 h, se neutralizează conținutul la pH 6,0, prin adăugarea a 1 M NaHCO<sub>3</sub> la o rată de 4,5 ml/min, pentru a simula trecerea din stomac în duoden, într-un interval de maximum 10 min, se adaugă 60 ml de săruri biliare 7,5 g/l și 100 ml pancreatină 30 g/l la o rată de 4 ml/min, timp de 10 min, pH-ul culturii din vas fiind menținut la o valoare de 6...6,5 prin adăugarea de NaHNO<sub>3</sub> 1 M, pe o perioadă de 7 h, apoi se iau probe la fiecare oră, pentru a determina viabilitatea microbiană, prin însămânțare pe un mediu agarizat specific tulpinii testate de diluții în ser biologic steril, iar determinarea numărului de colonii se face cu ajutorul unui contor automat.

17

2. Sistem unicameral de testare *in vitro* a efectului tranzitului prin tractul gastrointestinal uman al bacteriilor lactice, **caracterizat prin aceea că** este constituit dintr-un vas (A) din sticlă borosilicată, de 1000 ml, prevăzut cu un dop filetat, cu patru intrări, pentru patru pompe, prin care se introduce: suc gastric stimulat prin pompa peristaltică (P1), HCl prin pompa peristaltică (P2), NaHCO<sub>3</sub> prin pompa peristaltică (P3), pancreatină/săruri biliare prin pompa peristaltică (P4); dopul este prevăzut cu un pH-metru digital cu un electrod de 4 mm grosime, sterilizabil (B), și vasul este așezat pe un agitator magnetic cu plită ceramică încălzită (C), și un senzor de temperatură (D).

19

21

23



(51) Int.Cl.

A61B 5/00 (2006.01),

A61B 5/1495 (2006.01),

A61B 5/155 (2006.01)

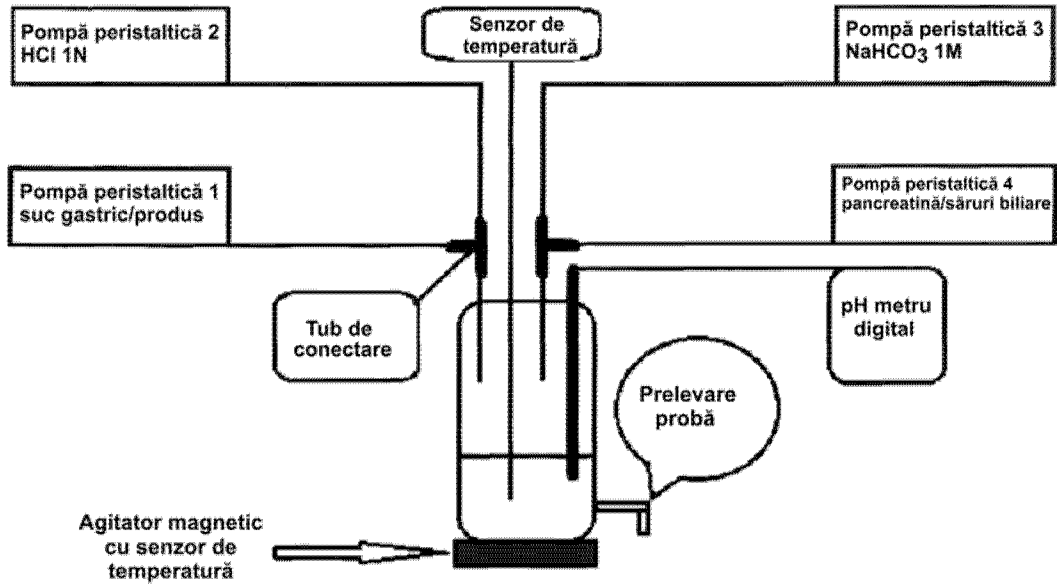


Fig. 1

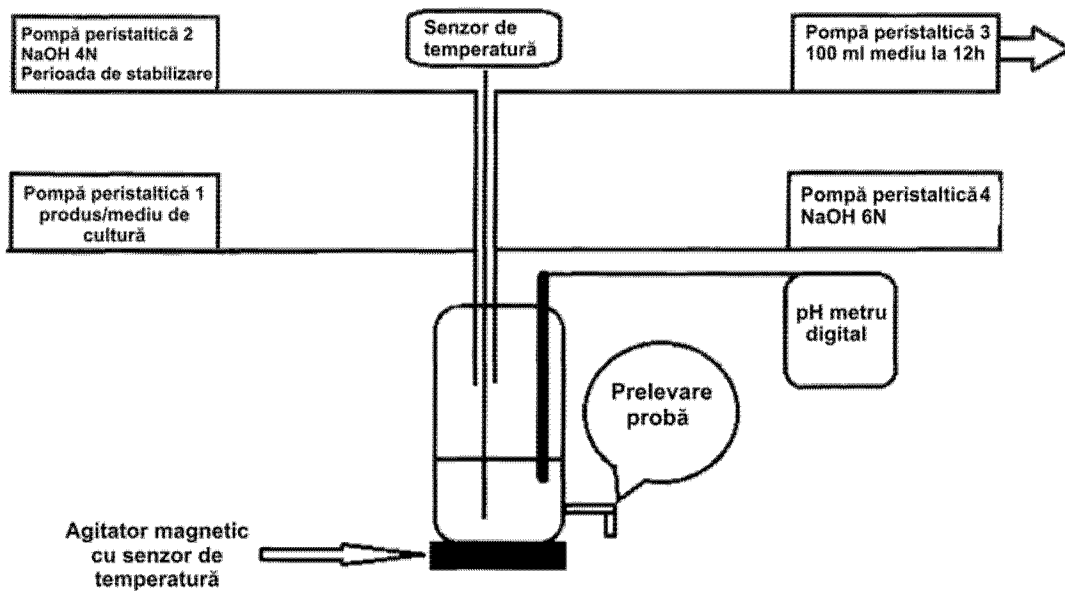


Fig. 2

