



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2011 01174**

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

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

(41) Data publicării cererii:
30/04/2013 BOPI nr. **4/2013**

(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

(56) Documente din stadiul tehnicii:
H. M. PROBERT, J. H. A. APAJALAHTI,
N. RAUTONEN, J. STOWELL ȘI G. R.
GIBSON, "POLYDEXTROSE, LACTITOL,
AND FRUCTO-OLIGOSACCHARIDE
FERMENTATION BY COLONIC BACTERIA
IN A THREE-STAGE CONTINUOUS
CULTURE SYSTEM", APPL. AND
ENVIRON. MICROBIOL., VOL. 70(8),
PP. 4505-4511, 2004; C. CINQUIN,
G. LE BLAY, I. FLISS, C. LACROIX,
"NEW THREE-STAGE IN VITRO MODEL
FOR INFANT COLONIC FERMENTATION
WITH IMMOBILIZED FECAL
MICROBIOTA", MICROBIOL ECOLOGY,
2006

(54) **METODĂ DE TESTARE *IN VITRO* A VIABILITĂȚII
TULPINILOR PROBIOTICE LA TRANZITUL PRIN COLON, ȘI
SISTEM PENTRU APLICAREA METODEI**



RO 128300 B1

1 Inventția se referă la un sistem *in vitro* de simulare a microbiotei colonului prin deter-
minarea efectului administrării unor probiotice de bacterii lactice asupra raportului dintre
3 diferitele grupe de microorganisme în trei faze. Scopul invenției îl reprezintă simularea con-
dițiilor fiziologice ale celor trei segmente ale colonului uman și microbiota corespunzătoare,
5 în vederea testării de produse probiotice, prebiotice, sinbiotice și alimentare.

La ora actuală, se pune foarte mult accentul pe rezolvarea unor probleme de sănă-
7 tate prin intermediul microorganismelor indigene și prin stimularea dezvoltării sau activității
lor metabolice. Efectul pozitiv se urmărește a fi concentrat asupra stimulării proprietăților anti-
9 tumorale, rezistența la organisme patogene digestive, reducerea colesterolului din sânge,
stimularea sistemului imunitar, constipație, dar, totuși, un efect clar nu poate fi verificat pe
11 deplin. Dacă o administrare orală a microorganismelor poate fi considerată a avea un efect
pozitiv sigur, rezultatul final este în mare măsură influențat de viabilitatea în timpul tranzitului
13 intestinal, deoarece un efect clar este aproape imposibil de garantat.

Intestinul uman conține un număr foarte mare de bacterii; din stomac până la colon
15 numărul de bacterii crește concomitent cu trecerea de la un compartiment la altul. În acest
sens, cantitatea cea mai mare de bacterii se află în colon, în jur de 1000 UFC/ml de conținut
17 intestinal. Dintre toate speciile care există în intestin, tulpinile de lactobacili și de bifido-
bacterii sunt printre cele mai importante.

19 De exemplu, flora intestinală în cazul nou-născuților începe atunci când tractul intes-
tinal al copilului este inoculat cu tulpini de *Bifidobacterium*, *Clostridium* și coci Gram pozitivi,
21 și se schimbă treptat, odată cu dieta. După o dietă în care predomină bifidobacteriile, atunci
când copiii sunt hrăniți cu lapte matern, compoziția florei coloniale se schimbă spre compo-
23 ziția microbiană adultă, pe măsură ce se introduce hrana solidă în alimentația copilului. Însă
o diferență foarte mare se poate observa între copiii hrăniți cu lapte matern și cei cu hrană
25 pentru bebeluși.

Microorganismele probiotice, lactobacilii sau bifidobacteriile și prebioticele, ca oligo-
27 zaharidele nedigestibile, sunt considerate, totuși, a fi promotori ai sănătății la oameni, și, de
ce nu, la animale. Studiile clinice recente ne arată efectele pozitive asupra intoleranței la
29 lactoză, malnutriției, constipației și absorbției de Ca.

Bacteriile din colon trebuie să găsească un loc adecvat pentru aderența intestinală.
31 Patru habitate caracteristice au fost descrise în intestin: lumenul intestinal, stratul de mucus
și de gel de mucus care se suprapune pe epiteliul intestinal, stratul profund de mucus din
33 criptele mucoasei intestinale și celulele epiteliale de suprafață. Anaerobii obligatorii sunt
predominanți numeric printre bacteriile gastrointestinale, intim asociate cu peretele intestinal,
35 pentru a forma straturi pe epiteliul mucoasei. Suprafețele microbiene trebuie să fie suficient
de similare pentru a găzdui antigeni pentru a evita declanșarea reacțiilor imunologice. Pentru
37 a persista în intestin, microorganismele ar trebui să poată supraviețui în intestin în condițiile
fizico-chimice și să concureze cu succes cu speciile stabilite, și cu altele care încearcă să
39 ocupe aceleași situsuri intestinale. Microorganismele necesită aprovizionarea adecvată cu
nutrienți, în sprijinirea unei creșteri suficiente.

41 Există diferențe în ceea ce privește nivelurile de compoziție și de colonizare în diferite
regiuni anatomice ale tractului gastrointestinal. La omul adult, cavitatea bucală conține o
43 microfloră indigenă de aproximativ 200 de specii, cu o densă populație bacteriană în placa
dentară, de 10^{11} bacterii g/l, și o populație bacteriană tranzitorie în salivă. Stomacul uman
45 și partea superioară din intestin (de exemplu, duodenul și jejunul) conțin un număr relativ
redus de microorganisme ($10^3 \dots 10^4$ bacterii). Acestea sunt limitate de un pH scăzut. Aceste
47 microorganisme sunt în cea mai mare parte lactobacili și streptococi toleranți la acid, și sunt
în tranzit din cavitatea bucală, mai degrabă, decât indigeni. Intestinul distal mic (ileonul)

menține o microfloră mai diversă și o populație de bacterii mai mare (10^8 bacterii/l), și este zona de interfață dintre microfloră din intestinul superior și microflora colonului ($10^{10} \dots 10^{11}$ bacterii/l conținut intestinal). Intestinul gros este locul principal al colonizării microbiene din cauza aprovizionării cu nutrienți, cu un flux lent de digestie și un potențial redox scăzut. Diverși alți factori pot influența și pot stabili condițiile pentru colonizarea microbială în anumite regiuni ale tractului gastrointestinal gazdă. Astfel de factori includ vârsta, sexul, pH-ul intestinal și potențialul redox, nutrienții endogeni, diverse funcții fiziologice, cum ar fi funcția suprarenalelor, peristaltismul (motilitatea intestinală), secrețiile de enzime digestive, acid clorhidric, bilă și mucus, imunitatea gazdei, receptorii bacterieni din mucoasă și stresul emoțional.

Mare parte din bacteriile probiotice sunt administrate atunci când se consumă iaurt. Laptele este fermentat de aceste bacterii care convertesc lactoza la acid lactic. Producția de acid lactic conduce la gustul caracteristic al iaurtului, iar datorită precipitării și denaturării caseinei, se ajunge la consistența semisolidă. Iaurturile bioactive sunt fabricate cu ajutorul anumitor tulpini probiotice de bacterii, cum ar fi: *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*.

În documentul H. M. Probert, J. H. A. Apajalahti, N. Rautonen, J. Stowell, G. R. Gibson, în lucrarea **Polydextrose, lactitol, and fructo-oligosaccharide fermentation by colonie bacteria in a three-stage continuous culture system**, în 2004 este descrisă o fermentație continuă, formată din trei bioreactoare montate în serie, pentru a testa efectul oligofructozelor, polidextrozei și lactitolului asupra microflorei colonice umane. În schimb, în anul 2006, C. Cinquin, G.I. Le Blay, I. Fliss, C. Lacroix, în **New three-stage *in vitro* model for infant colonie fermentation with immobilized fecal microbiota**, utilizează trei fermentații de tip batch (discontinuu), pentru a simula cele trei părți ale colonului uman. În plus, aceste bioreactoare sunt legate în serie și se transferă conținutul următorului vas de fermentație. Prezentul sistem de testare, GIS2, reunește aceste două cercetări, prin realizarea unui sistem de testare *in vitro* de sine stătător, printr-o fermentație de tip continuu, cu trei vase (trei sticle Duran cu o configurație specială) care sunt conectate permanent între ele, prin pompe peristaltice.

Problema pe care o rezolvă invenția este de a prezenta o metodă de testare *in vitro* și un sistem de testare *in vitro* a viabilității tulpinilor probiotice la tranzitul prin colon.

Metoda conform invenției înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că se adaugă într-un vas 5000 ml mediu de cultură, pentru a simula conținutul din colonul inoculat cu 100 ml soluție fecale, pentru perioada de stabilizare, se scot 100 ml mediu fermentat după 12 h, în același timp reintroducându-se 100 ml de mediu proaspăt; procesul se repetă la fiecare 12 h, în acest prim vas se introduc 10 ml de produs liofilizat care conține $10^9 \dots 10^{10}$ UFC/ml de bacterii lactice dizolvate în HCl 0,5%, pH-ul se aduce la 5,6...6,0 cu NaCl 6 N, pentru o perioadă de 4 h, cei 100 ml de mediu fermentat scoși din primul vas sunt introduși în al doilea vas, pH-ul se aduce la 5,6...6,0 cu NaCl 6 N, pentru o perioadă de 5 h, apoi sunt trecuți în al treilea vas, pH-ul se aduce la 5,6...6,0 cu NaCl 6 N, pentru o perioadă de 5 h, apoi se iau probe la fiecare 60 de min, pentru a determina viabilitatea microbială prin însămânțare pe un mediu specific tulpinii testate, iar determinarea numărului de colonii se face cu ajutorul unui contor automat.

Sistemul de testare, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că este constituit din trei vase A, B și C, din sticlă borosilicată, acoperite cu capac, fiecare capac este prevăzut cu o intrare pentru un electrod de pH, un termometru și una sau două pompe, de asemenea, sistemul cuprinde patru pompe peristaltice, care sunt utilizate pentru a introduce probioticul/inoculul prin pompa peristaltică 1 (P1), mediul de cultură/NaOH 6N prin pompa peristaltică 2 (P2), iar pompele peristaltice 3 și 4 (P3 și P4) asigură trecerea mediului fermentat din vasul 1 în vasul 2, respectiv, din vasul 2 în vasul 3; vasele sunt așezate pe un agitator magnetic cu plită ceramică încălzită.

RO 128300 B1

1 Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:
- se realizează o evaluare primară, rapidă a efectului exercitat de către bacteriile pro-
3 biotice și prebiotice asupra microbiotei simulate a colonului unui adult sau al unui copil;
- se realizează un sistem de testare *in vitro* de sine stătător, printr-o fermentație de
5 tip continuu.

În continuare se prezintă un exemplu de realizare a invenției.

7 Exemplu

Structura de bază a sistemului GIS2 este compusă din:

- 9 - 3 sticle Duran din sticlă borosilicată, capacitate 1000 ml, prevăzute, fiecare, cu un dop filetat, cu patru intrări;
- 11 - 3 pH-metre digitale Hanna Benchtop HI 2211, cu un electrod de 4 mm grosime, sterilizabil;
- 13 - 4 pompe peristaltice Behrotest, Type PLP 33, debit 0,4...2,0 l/h;
- 15 - 3 agitatoare magnetice cu plită ceramică încălzită IKA C-MAG HS 7 și senzor de temperatură.

S-au utilizat probe de fecale ce au provenit de la un sugar de aproximativ 12 luni. Copilului nu i-au fost administrate probe de bacterii probiotice până în momentul recoltării probelor antibiotice. Hrana administrată de la naștere a constat din laptele matern, iar în ultima lună s-a suplimentat cu cereale și fructe pasate. Probele au fost prelevate din scutece și au fost introduse într-un tub Nalgene steril, ce conține 1 ml apă ultrapură sterilă. Fecalele colectate au fost reunite și omogenizate cu apă peptonată, pentru a rezulta o concentrație de 25%. Probele au fost centrifugate la 1000 G timp de 1 min, pentru îndepărtarea particulelor de mari dimensiuni din fecale.

Proceduri. Toate experimentele au fost realizate *in vitro* în sistem continuu. Fermentațiile au fost realizate prin utilizarea unui inocul din fecale. Mediul de cultură (inclusiv pentru inocul) este similar cu cel prezentat de Macfarlane et al. și Cinquin et al (g/l): NaCl 4,5; KCl 4,5; MgSO₄ 1,25; CaCl₂ 0,15; K₂HPO₄ 0,5; NaHCO₃ 1,5; FeSO₄ 0,005; cisteină 0,8; săruri biliare 0,05; mucină 4,0; Tween 80 1,0; hemină 0,01; extract drojdie 2,5; peptonă 0,5; triptonă 0,5; caseină 1,2; hidrolizat proteic din zer 7,2; amidon solubil 6,8; dextrină 1,2; lactoză 5,0; uree 0,4; minerale 10 ml. Soluția de elemente minerale a avut următoarea formulă (g/l): FeSO₄ 3,6; MnSO₄ 1,9; ZnSO₄ 0,4; CoCl₂ 0,1; CuSO₄ 0,01; Mo(NH₄)₆O₂₄ 0,001.

Fermentațiile s-au realizat în 3 vase Duran de 1 l, ce conțin un volum de lucru mediu de 500 ml. Inocularea s-a realizat cu 20% fecale proaspete anterior pregătite. În mediu s-au introdus, înaintea sterilizării, bile din sticlă, pentru a determina o mai bună simulare a peristaltismului, și pentru a favoriza colonizarea. Prima etapă a experimentelor constă din etapa de colonizare, care durează două zile. Vasele s-au menținut la o temperatură constantă de 37°C, pe o plită ceramică încălzită IKA C-MAG HS 7, cu agitare constantă de 50 rpm, cu ajutorul unei bare magnetice.

39 Descrierea sistemului de simulare *in vitro*

Sistemul de simulare *in vitro* a colonului constă din 3 vase Duran cu dop, de 1000 ml capacitate, făcute din sticlă borosilicată. Fiecare dop are 4 intrări:

- 41 - sticla Duran 1: prima intrare este pentru soluție NaOH 6 N; a doua intrare este pentru eliminarea a câte 100 ml mediu la fiecare 12 h (perioadă de stabilizare);
- 43 - sticla Duran 2: prima intrare este pentru soluție NaOH 6 N; a doua intrare este pentru a transfera un volum de 25 mL h⁻¹ în vasul următor;
- 45 - sticla Duran 3: prima intrare este pentru soluție NaOH 6 N; a doua intrare este pentru eliminarea unui volum de 25 mL h⁻¹ din sistem.

RO 128300 B1

Fiecare capac al vaselor Duran are o intrare pentru electrodul de pH, 4 mm diametru, Hanna Benchtop pH Meters HI 2211, și pentru un termometru ce păstrează temperatura la 37°C. Pentru intrările în sistem se utilizează 4 pompe peristaltice de laborator, Behrotest, Type PLP 33, debit 0,4...2,0 l h ⁻¹ . Vasele Duran sunt așezate pe un agitator magnetic cu plită ceramică încălzită IKA C-MAG HS 7, pentru păstrarea unei agitări constante de 50 rpm. Vasul Duran are un racord pentru prelevarea de probe.	1
Condițiile de operare sunt următoarele:	7
5000 ml mediu de cultură pentru simularea conținutului din colon inoculat cu 100 ml soluție fecale pregătite anterior sunt adăugate în vasul Duran 1 pentru perioada de stabilizare, cu ajustarea pH-ului la 5,7...7,5 cu 4 N NaOH; se scot 100 ml mediu fermentat după 12 h. În același timp se reintroduc 100 ml de mediu proaspăt, la fiecare 12 h; 10 ml produs liofilizat (dizolvat în 0,5% NaCl), conținând o cantitate de 10 ⁹ ... 10 ¹⁰ UFC/ml bacterii lactice, sunt introduși în primul vas Duran; pH-ul este ajustat la valoarea 5,6...5,9 cu 6 N NaOH, pentru o perioadă de 4 h - colonul ascendent; pH-ul este ajustat la valoarea 5,9...6,2 cu 6 N NaOH, pentru o perioadă de 5 h - colonul transvers; pH-ul este ajustat la valoarea 6,6...6,7 cu 6 N NaOH, pentru o perioadă de 4 h - colonul descendent.	9
Toate soluțiile sunt proaspăt pregătite înainte de fiecare experiment. Se iau probe la fiecare 60 min, pentru determinarea viabilității, cu ajutorul ColonyQuant și al unui soft corespunzător. Se utilizează următoarele medii de cultură:	17
- pentru determinarea numărului total de microorganisme facultativ anaerobe, se utilizează Bulionul B. H. I. (Brain Heart Infusion Broth) - dezvoltare 24 h;	19
- pentru determinarea numărului total de microorganisme anaerobe, se utilizează Bulionul B. H. I. (Brain Heart Infusion Broth) + 0,2% cisteină - dezvoltare 72 h;	21
- pentru determinarea numărului total de lactobacili - Mediu Rogosa - dezvoltare 72 h;	23
- pentru determinarea numărului total de germeni coliformi - Mediu Mac Conkey - dezvoltare 24 h;	25
- pentru determinarea selectivă a stafilococilor patogeni - Mediu Chapman Solid (Manitol Salt Agar) - dezvoltare 48 h;	27
- pentru determinarea enterococilor se utilizează Bulion cu azidă și etil violet (Ethil Violet Azide Broth E. V. A) - dezvoltare 48 h.	29
Prezentul sistem de testare GIS2 este dedicat exclusiv simulării microbiotei colonului din cele trei compartimente (ascendent, transversal și descendent), în vederea studierii influenței administrării, în principal, de produse funcționale de tip probiotic.	31
La testarea GIS2 s-au folosit tulpinile <i>Lactobacillus rhamnosus</i> IL1, <i>Lactobacillus paracasei</i> IL2, <i>Lactobacillus plantarum</i> IL3, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> IL4.2, <i>Streptococcus thermophilus</i> IL5, din colecția Facultății de Biotehnologii București, România. Biomasa a fost obținută prin cultivare în mediu MRS la 37°C. Biomasele au fost separate prin centrifugare la 5000 rpm, și au fost spălate de trei ori cu ser fiziologic steril. Pentru realizarea experimentelor, biomasa a fost liofilizată în liofilizatorul Christ-Alpha 1-2 LD, în prezență de (g l ⁻¹) gelatină, 10; sucrosă, 20; trehalosă, 10. Produsul PROEXO constă din biomasa liofilizată de bacterii lactice, utilizată sub forma a două formule (%/g produs): PROEXO v.1: IL1 25%, IL2 15%, IL3 15%, IL4.2 25%, IL5 20%; PROEXO v.2: IL1 40%, IL4.2 40%, IL5 20%.	33
Sistemul GIS2 este destinat unei evaluări primare, rapide a efectului exercitat de către tulpini probiotice și prebiotice asupra microbiotei simulate a colonului unui adult sau al unui copil. Simularea, ce cuprinde cele trei segmente, are ca scop principal evaluarea efectului avut de ingerarea unor tulpini noi liofilizate, a sintezei de polizaharide cu compoziție prebiotică, dar și a raportului dintre diferiți acizi organici și cantitatea de ammonium produsă.	35
	37
	39
	41
	43
	45
	47

RO 128300 B1

1 S-a determinat oră de oră numărul bacteriilor coliforme, lactobacilii, enterococii,
Clostridia, stafilococii, bifidobacteria, anaerobii facultativi și numărul total de anaerobi
3 (tabelul 1), în cazul microflorei netratate, normale. Numărul normal de microorganisme la un
individ sănătos este de aproximativ $10^{12} \dots 10^{14}$. Administrarea celor două formule ale pro-
5 dusului PROEXO a avut ca efect o creștere a numărului de lactobacili, cât și de bifidobacterii,
dar și o echilibrare, în ansamblu, pentru celelalte grupuri bacteriene determinate. Numărul
7 de lactobacilli a crescut în toate segmentele colonului la administrarea PROEXO v.1, și în
colonul ascendent și transversal la tratarea cu PROEXO v.2. În cazul primei situații, creș-
9 țerea medie a fost de 0,5 log CFU/ml și a scăzut în segmentul distal pentru a doua variantă
cu aproximativ 0,78 log CFU/ml.

RO 128300 B1

Analiza microbiană în colonul ascendent, transversal și descendent, simulate în GIS2

Tabelul 1

Grup bacterian	Tratament	Colon ascendent				Colon transversal					Colon descendent			
		1h	2h	3h	4h	1h	2h	3h	4h	5h	1h	2h	3h	4h
Anaerobii facultativi	Control	6,51±0,07	6,53±0,32	6,51±0,63	6,69±0,34	6,69±0,54	6,67±0,72	6,75±0,41	6,77±0,58	6,76±0,44	7,16±0,85	7,36±0,42	7,33±0,34	7,08±0,28
	PROEXO v.1	6,01±0,32	6,03±0,3	6,13±0,03	6,39±0,11	6,41±0,21	6,11±0,38	5,89±0,02	6,07±0,15	6,13±0,07	6,1±0,25	6,25±0,02	5,94±0,21	6,08±0,08
	PROEXO v.2	6,34±0,07	6,15±0,21	6,18±0,14	6,31±0,7	6,17±0,02	6,3±0,04	6,21±0,01	6,05±0,56	6,24±0,12	6,16±0,24	6,35±0,07	6,28±0,13	6,14±0,48
Anaerobi	Control	7,5±0,21	7,95±0,31	8,06±0,64	8,43±0,53	7,85±0,5	7,95±0,06	7,96±0,14	8,21±0,32	8,32±0,06	8,57±0,09	8,31±0,33	8,43±0,75	8,32±0,05
	PROEXO v.1	7,76±0,16	8,15±0,01	7,86±0,24	8,62±0,13	8,47±0,26	8,75±0,03	8,98±0,54	8,75±0,12	8,48±0,41	8,95±0,29	8,74±0,05	8,88±0,21	8,9±0,85
	PROEXO v.2	7,55±0,04	8,15±0,66	7,44±0,27	7,62±0,17	8,12±0,25	8,65±0,09	8,48±0,02	8,88±0,07	8,81±0,11	8,79±0,63	8,43±0,29	8,38±0,06	8,5±0,04
Lactobacilli	Control	6,97±0,04	6,64±0,02	6,85±0,11	7,37±0,07	7,16±0,21	6,95±0,41	7,11±0,71	6,43±0,17	6,78±0,36	7,78±0,61	7,75±0,42	7,23±0,62	7,32±0,55
	PROEXO v.1	7,36±0,35	7,22±0,32	7,61±0,01	7,13±0,32	7,34±0,31	7,29±0,31	7,41±0,42	7,47±0,24	7,51±0,16	7,76±0,29	7,13±0,17	7,29±0,05	7,22±0,31
	PROEXO v.2	7,37±0,05	7,6±0,3	7,46±0,88	7,45±0,54	7,26±0,57	7,24±0,27	7,07±0,94	7,7±0,36	7,19±0,58	6,53±0,21	6,53±0,5	6,87±0,45	7,03±0,72
Bifidobacterii	Control	7,08±0,34	7,25±0,54	6,9±0,81	7,5±0,73	7,46±0,75	7,42±0,37	7,74±0,28	6,76±0,03	7,58±0,63	7,85±0,63	7,32±0,73	7,23±0,01	7,4±0,95
	PROEXO v.1	7,21±0,04	7,22±0,34	7,05±0,31	7,46±0,03	7,75±0,55	7,17±0,19	7,58±0,3	7,16±0,18	7,26±0,06	7,79±0,25	7,93±0,05	7,52±0,75	7,48±0,01
	PROEXO v.2	7,2±0,26	7,17±0,51	7,23±0,48	7,46±0,62	7,24±0,5	7,08±0,48	7,61±0,38	7,33±0,87	7,59±0,25	7,13±0,72	7,67±0,28	7,3±0,35	7,5±0,53
Coliformi	Control	7,25±0,05	6,63±0,35	6,6±0,41	7,06±0,08	6,89±0,41	6,9±0,09	6,73±0,65	6,75±0,73	6,82±0,48	7,01±0,03	6,78±0,76	6,46±0,32	5,9±0,48
	PROEXO v.1	7,46±0,05	7,44±0,2	7,46±0,28	7,14±0,23	7,68±0,03	7,75±0,35	7,46±0,09	7,77±0,03	7,79±0,19	6,39±0,53	6,77±0,38	6,66±0,12	7,23±0,62
	PROEXO v.2	7,26±0,07	7,6±0,13	7,63±0,18	7,75±0,4	7,09±0,59	7,29±0,39	6,61±0,12	7,12±0,06	7,11±0,06	6,88±0,2	6,98±0,17	6,66±0,01	7,32±0,3
Enterococci	Control	6,77±0,55	6,5±0,91	6,59±0,77	6,6±0,12	7,11±0,35	7,18±0,51	7,25±0,36	7,16±0,05	7,27±0,7	7,16±0,43	6,39±0,47	6,0±0,75	6,75±0,73
	PROEXO v.1	7,19±0,61	7,36±0,01	7,67±0,07	6,99±0,32	7,37±0,24	7,46±0,23	7,48±0,03	7,33±0,74	7,53±0,16	6,98±0,38	7,2±0,07	7,19±0,52	7,44±0,45
	PROEXO v.2	7,59±0,03	7,59±0,05	7,36±0,01	7,5±0,1	7,39±0,11	7,34±0,2	6,87±0,23	7,26±0,16	7,28±0,18	7,13±0,09	6,9±0,32	7,33±0,05	7,29±0,41

1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25
27
29
31
33
35
37
39

RO 128300 B1

Tabelul 1 (continuare)

Grup bacterian	Tratament	Colon ascendent				Colon transversal					Colon descendent			
		1h	2h	3h	4h	1h	2h	3h	4h	5h	1h	2h	3h	4h
Clostridii	Control	6,75±0,72	6,69±0,5	6,69±0,01	6,54±0,63	6,51±0,72	6,29±0,07	6,54±0,84	6,48±0,09	6,55±0,04	6,6±0,53	6,54±0,75	6,67±0,84	6,84±0,64
	PROEXO v.1	6,68±0,5	6,7±0,53	6,21±0,15	6,28±0,44	6,08±0,05	6,21±0,22	6,04±0,37	6,03±0,51	5,88±0,21	5,96±0,09	6,25±0,01	6,01±0,11	5,84±0,37
	PROEXO v.2	6,43±0,07	6,6±0,32	6,07±0,45	5,76±0,4	6,32±0,52	6,1±0,14	5,89±0,14	6,25±0,07	6,28±0,76	5,96±0,46	5,9±0,42	5,71±0,28	5,82±0,6
Stafilococci	Control	6,84±0,21	6,25±0,52	6,04±0,76	6,91±0,51	7,13±0,58	6,84±0,48	6,74±0,35	7,0±0,97	6,7±0,06	6,68±0,52	6,47±0,82	6,6±0,81	6,38±0,72
	PROEXO v.1	6,61±0,09	6,31±0,25	6,32±0,77	6,23±0,49	6,03±0,27	6,16±0,4	6,59±0,07	6,22±0,04	5,79±0,3	6,1±0,32	6,28±0,08	6,08±0,39	6,15±0,03
	PROEXO v.2	6,32±0,39	6,3±0,17	6,27±0,42	6,45±0,55	6,11±0,29	6,09±0,07	5,87±0,41	6,04±0,51	5,99±0,17	6,18±0,19	5,97±0,73	6,21±0,2	6,08±0,46

Analiza microbiană, după administrarea directă de exopolizaharide, în colonul ascendent, transversal și descendent, simulate în GIS2

Tabelul 2

Grup bacterian	Tratament	Colon ascendent				Colon transversal					Colon descendent			
		1h	2h	3h	4h	1h	2h	3h	4h	5h	1h	2h	3h	4h
Anaerobi facultativi	Polizaharide	6,5±0,12	6,57±0,03	6,64±0,67	6,5±0,28	6,6±0,48	6,85±0,06	6,39±0,52	6,59±0,11	6,63±0,07	6,83±0,23	6,76±0,21	6,79±0,78	6,58±0,37
Anaerobi	Polizaharide	7,01±0,27	8,18±0,11	8,26±0,47	8,12±0,96	8,19±0,2	8,06±0,75	8,48±0,08	8,65±0,67	8,48±0,81	8,35±0,41	8,36±0,33	7,22±0,07	8,16±0,52
Lactobacilli	Polizaharide	6,95±0,32	6,67±0,33	7,06±0,17	7±0,09	7,09±0,41	7,04±0,38	7,04±0,25	7,05±0,57	7,1±0,19	6,68±0,63	7,16±0,22	6,79±0,6	6,67±0,44
Bifidobacterii	Polizaharide	7,1±0,034	7,2±0,74	7,42±0,06	7,55±0,48	7,55±0,04	7,58±0,25	7,93±0,02	7,38±0,28	7,61±0,21	7,78±0,13	7,59±0,27	7,51±0,57	7,45±0,41
Coliformi	Polizaharide	7,11±0,2	6,59±0,47	6,39±0,09	7,01±0,47	6,74±0,18	6,25±0,21	6,28±0,64	6,13±0,68	6,24±0,06	6,22±0,45	6,39±0,48	6,27±0,37	6,06±0,61
Enterococci	Polizaharide	6,81±0,06	6,63±0,17	6,76±0,21	6,77±0,18	6,27±0,5	6,73±0,06	7,46±0,32	6,95±0,25	6,86±0,17	7,09±0,43	7,35±0,28	7,33±0,01	7±0,41
Clostridii	Polizaharide	6,7±0,49	6,56±0,07	6,31±0,42	6,3±0,77	6,29±0,54	6,34±0,1	6,19±0,45	6,21±0,37	6,5±0,6	6,24±0,61	6,3±0,97	6,58±0,39	6,7±0,05
Stafilococci	Polizaharide	6,79±0,2	6,17±0,35	6,07±0,5	6,34±0,57	6,56±0,05	6,53±0,64	6,39±0,71	6,53±0,23	6,47±0,18	6,41±0,43	6,35±0,06	6,43±0,61	6,35±0,4

RO 128300 B1

Numărul de bifidobacterii a avut o scădere medie de 0,4 log CFU/ml pentru administrarea primei formule de produs, și s-a păstrat constantă în cazul celei de-a doua versiuni. O valoare medie mai mare s-a observat pentru v.1 în partea transversală a colonului, și suplimentar în cea distală pentru v.2 a PROEXO. Datele obținute confirmă diferența dintre segmentele colonului în privința numărului de microorganisme. Astfel, având o medie de maximum 5% din numărul total, creșterea datorată administrării v.2 a produsului confirmă datele prezentate, care demonstrează un efect similar. Aceste date, din tabelul 1, au fost susținute și de cercetări *in vivo*, observându-se o creștere a numărului de bifidobacterii în fecale, care au fost antrenate din secțiunea terminală a colonului.

Astfel, tendințele prezentate anterior sunt evidențiate, mai exact, prin creșterea numărului total de microorganisme anaerobe, în cazul administrării celor două formule de produs. Nu se observă o modificare în primul segment simulat al colonului, datorită perioadei de adaptare a liofilizateelor la mediul din sistemul GIS2. Odată cu trecerea în segmentul transversal, creșterea observată pentru v.1 a fost de aproximativ 0,6 log CFU/ml, și 0,5 log CFU/ml, în cazul v.2. Trecerea în colonul descendent arată o viabilitate similară în cazul administrării v.2 cu microflora netratată. În schimb, v.1 are ca rezultat o diferență suplimentară medie de maximum 0,5 log CFU/ml.

În cazul celorlalte grupuri bacteriene determinate, se observă o scădere a numărului de clostridii și stafilococi cu o medie de 0,5 log CFU/ml. Scăderea este observată în segmentul transversal și în cel descendent. În cazul enterococilor, se păstrează o concentrație totală egală în cazul celor trei variante prezentate. În schimb, s-a determinat o creștere de maximum 0,5 log CFU/ml pentru coliformi, pentru segmentul ascendent și transversal al colonului, pentru v.1, și de maximum 0,3 log CFU/ml pentru v.2.

A fost determinată și influența administrării directe de exopolizaharide (tip inulină) produse de tulpinile IL1 și IL4.2 asupra microflorei simulate în sistemul GIS2 (tabelul 2). S-a determinat o creștere în primele două segmente a numărului de lactobacili și bifidobacterii. În segmentul descendent se observă o menținere constantă a numărului de celule viabile doar pentru bifidobacterii, scăderea numărului de lactobacili fiind datorată utilizării complete a polizaharidelor cu efect prebiotic. Astfel, numărul de microorganisme anaerobe a înregistrat o creștere în toate segmentele, cu o medie de 0,5 log CFU/ml. Numărul de microorganisme a înregistrat scăderi în cazul tuturor grupelor determinate. Aceste date sunt corelate printr-o scădere mai accentuată în partea ascendentă și în cea transversală a colonului, odată cu creșterea numărului celor două tulpini anaerobe favorabile, în aceleași secțiuni. Odată cu scăderea aportului de polizaharid, numărul de lactobacili scade, iar tulpinile cu potențial patogen păstrează raportul față de cele două tulpini anaerobe. Acestea arată că tulpinile au un rol mult mai complex, fiind responsabile de păstrarea unui raport optim între grupele benefice și restul microflorei. Aceste date sunt corelate cu cercetări anterioare, care au arătat că administrarea directă a inulinei are ca efect o creștere a numărului de lactobacili și bifidobacterii, tot prin teste *in vitro* de simulare a colonului în trei etape.

RO 128300 B1

Revendicări

1

3

1. Metodă de testare *in vitro* a viabilității tulpinilor probiotice la tranzitul prin colon, **caracterizată prin aceea că** se adaugă într-un vas 5000 ml mediu de cultură, pentru a simula conținutul din colonul inoculat cu 100 ml soluție fecale, pentru perioada de stabilizare, se scot 100 ml mediu fermentat după 12 h, în același timp reintroducându-se 100 ml de mediu proaspăt; procesul se repetă la fiecare 12 h, în acest prim vas se introduc 10 ml de produs liofilizat care conține 10^9 - 10^{10} UFC/ml de bacterii lactice, dizolvate în HCl 0,5%, pH-ul se aduce la 5,6...6,0 cu NaCl 6N, pentru o perioadă de 4 h, cei 100 ml de mediu fermentat, scoși din primul vas, sunt introduși în al doilea vas, pH-ul se aduce la 5,6...6,0 cu NaCl 6 N, pentru o perioadă de 5 h, apoi sunt trecuți în al treilea vas, pH-ul se aduce la 5,6...6,0 cu NaCl 6 N, pentru o perioadă de 5 h, apoi se iau probe la fiecare 60 min, pentru a determina viabilitatea microbiană prin însămânțare pe un mediu specific tulpinii testate, iar determinarea numărului de colonii se face cu ajutorul unui contor automat.

15

2. Sistem de testare *in vitro* a efectului tranzitului prin colon al bacteriilor lactice, **caracterizat prin aceea că** este constituit din trei vase (A, B și C) din sticlă borosilicată, acoperite cu capac, fiecare capac este prevăzut cu o intrare pentru un electrod de pH, un termometru și una sau două pompe; de asemenea, sistemul cuprinde patru pompe peristaltice, care sunt utilizate pentru a introduce probioticul/inoculul prin pompa peristaltică 1 (P1), mediul de cultură/NaOH 6 N, prin pompa peristaltică (P2), iar pompele peristaltice (P3 și P4) asigură trecerea mediului fermentat din primul vas în vasul al doilea, respectiv, din vasul al doilea în al treilea; vasele sunt așezate pe un agitator magnetic, cu plită ceramică încălzită.

17

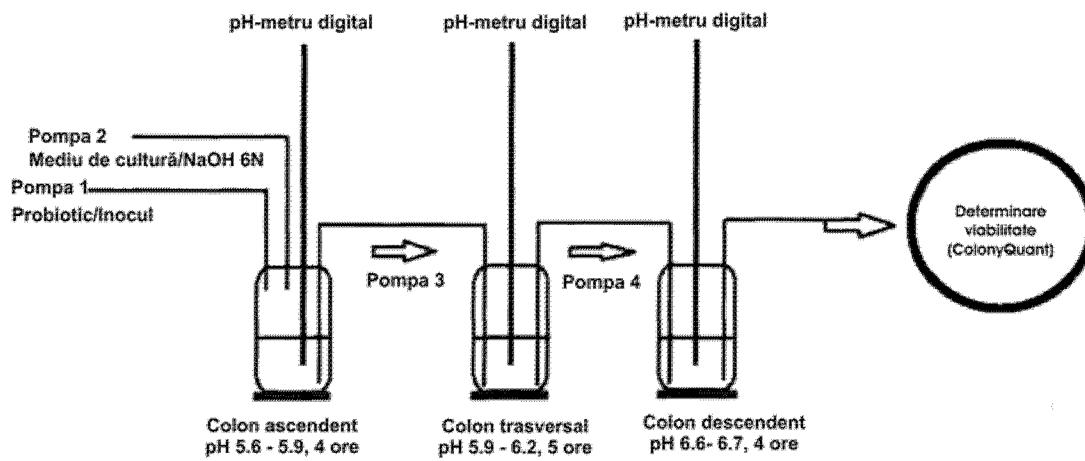
19

21

(51) Int.Cl.

C40B 30/00 (2006.01),

C12M 3/00 (2006.01)



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la: Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 437/2016