



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2015 00407**

(22) Data de depozit: **17/06/2015**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/05/2022** BOPI nr. **5/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/12/2016 BOPI nr. **12/2016**

(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:
**RO 127801 A1; CN 103512562 A;
CN 104164363**

(54) **SISTEM SEMIAUTOMAT DE SIMULARE *IN VITRO*
A VIABILITĂȚII TULPINILOR BACTERIENE CU ROL
PROBIOTIC ȘI METODĂ DE TESTARE UTILIZÂND
ACEST SISTEM**



RO 131541 B1

1 Invenția se referă la dezvoltarea unei metode *in vitro* și realizarea unui sistem
semiautomat *in vitro* de simulare a tranzitului prin tractul gastrointestinal (stomac și intestin
3 subțire) în vederea determinării viabilității unor tulpini microbiene cu rol probiotic.

5 Este cunoscut din documentul **RO 127801 A1** o metodă de testare *in vitro* a viabilității
tulpinilor probiotice de bacterii lactice *Lactobacillus paracasei* YR și *Enterococcus faecium*
VL47 și un prebiotic respectiv lactuloza la tranzitul prin tractul gastrointestinal și la un sistem
7 de testare *in vitro* a efectului tranzitului prin tractul gastrointestinal uman a bacteriilor lactice.

9 Utilizarea acestor metode reprezintă o alternativă modernă la diferite procedee
microbiologice clasice și testele *in vivo*, care au numeroase limitări de ordin etic. Dezvoltarea
unor metode și sisteme noi are implicații importante în testarea unor tulpini noi și dezvoltarea
11 de noi suplimente funcționale, bazate, în principal, pe biomasa de bacterii lactice și drojdii.
Utilizarea acestor metode grăbește punerea pe piață a unor produse noi, care au la bază
13 capacități funcționale certe și care nu vor suferi modificări care să afecteze calitatea. Prin
astfel de teste se asigură o predictivitate din punct de vedere calitativ a tulpinilor ce vor fi
15 alese a fi folosite la uz uman sau animal (industria zootehnică).

17 De asemenea, aceste metode *in vitro* au ca scop identificarea/caracterizarea unor
tulpini nou izolate în scopul restabilirii și îmbunătățirii microbiotei. Restabilirea echilibrului și
19 îmbogățirea microbiotei cu tulpini noi, ce au capacități metabolice superioare reprezintă unul
dintre scopurile folosirii acestor metode (sisteme). Aceste tulpini cu proprietăți fermentative
și metabolice care sunt implicate în reducerea efectelor a diferite disfuncții nutriționale (de
21 exemplu, intoleranța la lactoză), dar și influențe asupra răspunsului imunitar. Nu în ultimul
rând, se urmărește selecția unor tulpini care sunt capabile să ofere protecție împotriva
23 aparitiei de celule canceroase (cancerul de colon), a căror proliferare este stimulată de
consumul de alimente procesate.

25 Problema pe care o rezolvă invenția constă în crearea unui sistem semiautomat de
simulare *in vitro* a tranzitului prin tractul gastrointestinal și metoda de testare a tulpinilor
27 bacteriene.

29 Sistemul semiautomat, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin
aceea că este constituit dintr-un vas Duran cu volumul 250 mL, prevăzut cu patru orificii
(unul pentru senzorul de T, unul pentru senzorul de pH conectat la modulul Arduino, unul
31 pentru intrarea unui furtun din silicon conectat la o pompă peristaltică și unul pentru un ac
de biopsie modificat pentru recoltarea de probe steril cu o seringă sterilă), care conține
33 mediul de simulare, un modul Arduino Yun, o pompă peristaltică pentru administrarea
regulată de urină din, debit 0,4 mL - 2 L/h controlată prin modulul Arduino.

35 Metodă de testare a tulpinilor bacteriene cu rol probiotic, conform invenției, înlătură
dezavantajele de mai sus prin aceea că se folosește sistemul semiautomat de simulare
37 definit în revendicarea 1 în care, în etapa inițială se obține mediul din vasul de simulare, se
adaugă produsul de testat prin pompa peristaltică și se menține temperatura constantă la 37-
39 40°C, asigurându-se un debit și un timp de interacțiune controlat cu modulul Arduino, odată
cu colectarea probelor în vasul și se determină viabilitatea bateriilor probiotice.

41 Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

43 -se grăbește punerea pe piață a unor produse noi, care au la bază capacități
funcționale certe și care nu vor suferi modificări care să afecteze calitatea;

45 -se asigură o predictivitate din punct de vedere calitativ a tulpinilor ce vor fi alese a
fi folosite pentru uz uman sau animal (industria zootehnică).

47 Automatizarea urmărește eliminarea factorului uman și simularea caracteristicilor
fiziologice din gazdă. În acest caz este vorba de un control strict a pH de la nivelul
stomacului și a intestinului subțire, la care se adaugă efectul sărurilor biliare, împreună cu
49 enzimele pancreatice.

RO 131541 B1

Automatizarea este bazată pe un modul Arduino Yun, pompă peristaltică și un electrod de pH, iar simularea se realizează într-un vas Duran GL.28 din sticlă borosilicată.	1
Sunt binecunoscute similaritățile pe care structura morfologică și o parte din funcțiile fiziologice pe care omul le are cu porcul (<i>Sus domesticus</i>). Timpii de staționare sunt diferiți, la nivelul fiecărui compartiment digestiv, clar condițiile fiziologice sunt similare. Studiile de laborator folosesc enzime extrase din pancreasul de la porcine, inclusiv mucina de la nivelul stomacului. De asemenea, numeroase tulpini probiotice au fost izolate din intestinul gros de porc și au fost utilizate la realizarea unor produse fermentate sau suplimente funcționale.	3 5 7
Comparativ cu brevetul RO 127801 A1 din 18.10.2011, care propune un sistem static de simulare a tranzitului prin tractul gastrointestinal uman, prezenta invenției presupune un sistem de simulare a tranzitului prin sistemul gastrointestinal bazat pe o monitorizare și control în timp real a valorii pH. Această monitorizare se bazează pe un modul Arduino Yun, la care este atașat un electrod de pH și o pompă peristaltică. Astfel se pot transmite regulat (la interval de secunde) valorile pH într-un server de Cloud (ThingSpeak - Channel 1D: 17210). Sistemul are la bază etapele fiziologice ce sunt parcurse la digestia prin stomacul și intestinul subțire de la porc. Sistemul este dedicat testării unor tulpini cu potențial probiotic de uz zootehnic, dar și uman, plecând de la similaritățile acestor etape fiziologice din timpul procesului de digestie.	9 11 13 15 17
Sistemul ce aplică metoda <i>in vitro</i> propusă este compus din:	19
- un vas Duran din sticlă borosilicată, capacitate 250 mL, prevăzut cu un capac filetat GL 28 cu patru intrări GL 18;	21
- modul Arduino Yun, prevăzut cu un senzor de pH Atlas Scientific LLC;	
- pompă peristaltică Behrotest. Type PLP 33, cu un debit variabil între 0,4-2,0 L/h;	23
- un agitator magnetic cu plită ceramică încălzită IKA C-MAG HS 7 și senzor de temperatură.	25
Capacul filetat are următoarele intrări:	
- prima pentru senzorul de T;	27
- a doua pentru senzorul de pH diametru 1 cm;	
- a treia pentru furtunul siliconat de la pompa peristaltică;	29
- a patra pentru un ac de biopsie modificat sterilizat chimic.	
Probele se prelevează prin detașarea capacului ergonomic de la partea superioară. În mijloc există un orificiu corespunzător pentru montarea unei seringi sterile de unică folosință. Din vasul de simulare se trage volumul de probă dorit, care se analizează din punct de vedere microbiologic.	31 33
Modulul Arduino Yun cuprinde un microcontroler bazat pe ATmega32U4 și pe Atheros AR9331. Atheros suportă distribuția Linux bazată pe OpenWRT - Linino. Întreaga automatizare este plasată într-o cutie de plastic transparent. Afișarea fazei din timpul procesului de digestie și pH este afișat pe un ecran LCD, situat la partea frontală a cutiei din plexiglas. Tot acolo se află și un buton, cu ajutorul căruia se poate schimba faza, iar sistemul va schimba valoarea de reper a pH. Transmiterea informațiilor (faza de lucru și valoare pH) se face prin intermediul unei conexiuni WiFi, integrată în modulul Arduino Yun, în serverul de Cloud ThingSpeak, la un interval de maximum 10 sec. Datele sunt vizibile în canalul public - GIS3 <i>in vitro</i> System.	35 37 39 41 43
Etapele simulării tranzitului gastrointestinal, în sistemul semiautomat, sunt:	
A. Simularea de la nivel gastric:	45
1. 10 g rație hrana sterilizată (soia:grâu:porumb:tărâțe 1:1:1:1);	
2. 20 mL soluție salivă sterilizată prin filtrare cu filtru Millipore (CaCl ₂ - 0,22 g/L, KCl - 2,2 g/L NaCl - 5 g/L, NaHCO ₃ - 1,5 g/L);	47

RO 131541 B1

1 3. 80 mL pepsină (0,5 mg/mL) și lipază (0,5 mg/mL) în tampon fosfat de sodiu pH 6
(sterilizate prin filtrare cu filtru Millipore);

3 4. Se adaugă HCl 1 M (sterilizat prin autoclavare 20 min la 121°C) până la pH 2:

5 5. Amestecul se menține cu o agitare constantă timp de 4 h;

5 6. Temperatura 37-40°C,

B. Simularea de la nivelul intestinului subțire;

7 1. Se adaugă 40 mL pancreatică (5 mg/mL) și săruri biliare (5 mg/mL) în tampon
fosfat de sodiu pH 7 (sterilizate prin filtrare cu filtru Millipore);

9 2. Se adaugă NaOH 1 M (sterilizat prin autoclavare 20 min la 121°C) până la pH 7;

11 3. Amestecul se menține cu o agitare constantă timp de 4 h;

4. Temperatură 37-40°C.

În continuare sunt prezentate 2 exemple de realizare a invenției.

13 **Exemplul 1 - *Saccharomyces cerevisiae*:** s-a suplimentat formula amestecului de
cereale cu 0,1% biomasă liofilizată de *S. cerevisiae* (tulpină provenită din colecția Centrului
15 Microgen, Facultatea de Biologie, Universitatea din București). Analiza viabilității s-a realizat
prin însămânțare pe mediu YPD (extract de drojdie 10 g/L, peptonă 20 g/L, glucoza 20 g/L,
17 agar 20 g/L, sterilizare 20 min la 121°C). După recoltare, din fiecare probă, s-au realizat diluții
succesive în NaCl 0,9% steril, iar ultima diluție a fost utilizată la însămânțarea plăcilor Petri
19 cu mediu YPD agarizat, într-o hotă în flux laminar. Analiza plăcilor s-a făcut cu ajutorul
colonyQuant, prevăzut cu un soft corespunzător.

21 Rezultatele au demonstrat o scădere a viabilității de aproximativ 25% la intrarea în
faza gastrică. Ulterior viabilitatea crește în medie cu 10% după 30 min de staționare în
23 aceste condiții. Variațiile observate au fost în medie de 1% până în momentul trecerii la con-
dițiile de simulare *in vitro* ale intestinului subțire. Acțiunea sărurilor biliare și a pancreatinei
25 au determinat o reducere de maximum 7% a viabilității, care s-a dublat la o oră de staționare
la acest nivel al tubului digestiv. Până la final viabilitatea a cescut treptat, cu aproximativ
27 10%, după fiecare 60 min. Nu s-a înregistrat, la final, o scădere sub 4×10^5 CFU/mL a
numărului de celule viabile.

29 **Exemplul 2 - *Lactobacillus plantarum*:** s-a suplimentat formula amestecului de
cereale cu 0,1% biomasă liofilizată de *L. plantarum* (tulpină provenită din colecția Centrului
31 Microgen, Facultatea de Biologie, Universitatea din București). Analiza viabilității s-a realizat
prin însămânțare pe mediu MRS (1,0% peptonă, 0,8% extract carne, 0,4% extract de drojdie,
33 2,0% glucoză, 0,5% acetat de sodiu, 0,1% Tween 80, 0,2% fosfat disodic, 0,2% citrat de
amoniu, 0,02% sulfat de magneziu, 0,005% sulfat de mangan, 1,0% agar, pH 6,2, sterilizat
35 20 min la 121°C). După recoltare, din fiecare probă, s-au realizat diluții succesive în NaCl
0,9% steril, iar ultima diluție a fost utilizată la însămânțarea plăcilor Petri cu mediu MRS
37 agarizat, într-o hotă în flux laminar. Analiza plăcilor, după termostatare în condiții anaerobe,
s-a făcut cu ajutorul colonyQuant, prevăzut cu un soft corespunzător.

39 Rezultatele au demonstrat o scădere a viabilității de aproximativ 2% la intrarea în
faza gastrică. Ulterior viabilitatea crește în medie cu 0,1% după 30 min de staționare în
41 aceste condiții. Variațiile observate au fost de 5-6% până în momentul trecerii la condițiile
de simulare *in vitro* ale intestinului subțire. Acțiunea sărurilor biliare și a pancreatinei au
43 determinat o reducere de maximum 40% a viabilității, care s-a dublat după 30 min de
staționare la acest nivel al tubului digestiv. Până la final viabilitatea s-a menținut constantă,
45 cu variații medii de 0,1%. Nu s-a înregistrat, la final, o scădere sub $5,2 \times 10^5$ CFU/mL a
numărului de celule viabile.

47

- | | |
|---|----|
| | 1 |
| 1. Sistem semiautomat de simulare <i>in vitro</i> a tranzitului prin tractul gastrointestinal | 3 |
| caracterizat prin aceea că , este constituit dintr-un vas Duran cu volumul 250 mL, prevăzut | 5 |
| cu patru orificii (unul pentru senzorul de T, unul pentru senzorul de pH conectat la modulul | 7 |
| Arduino, unul pentru intrarea unui furtun din silicon conectat la o pompă peristaltică și unul | 9 |
| pentru un ac de biopsie modificat pentru recoltarea de probe steril cu o seringă sterilă), care | |
| conține mediul de simulare, un modul Arduino Yun, o pompă peristaltică pentru administra- | |
| rea regulată de urină din, debit 0,4 mL - 2 L/h controlată prin modulul Arduino. | 9 |
| 2. Metodă de testare a tulpinilor bacteriene cu rol probiotic, caracterizată prin aceea | 11 |
| că , se folosește sistemul semiautomat de simulare definit în revendicarea 1 în care, în etapa | 13 |
| inițială se obține mediul din vasul de simulare, se adaugă produsul de testat prin pompa | |
| peristaltică și se menține temperatura constantă la 37-40°C, asigurându-se un debit și un | 13 |
| timp de interacțiune controlat cu modulul Arduino, odată cu colectarea probelor în vasul și | |
| se determină viabilitatea bateriilor probiotice. | 15 |

