



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2015 00407

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

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

(71) Solicitant:
• 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

(54) GIS3 - SISTEM SEMIAUTOMAT DE TESTARE *IN VITRO* A
VIABILITĂȚII TULPINILOR MICROBIENE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de testare *in vitro* a viabilității unor tulpini microbiene cu rol probiotic. Metoda conform invenției constă în simularea *in vitro* a tranzitului prin tractul gastrointestinal cu soluții de simulare care conțin 0,1% biomasă liofilizată de tulpini cu potențial probiotic, într-un vas Duran din sticlă borosilicată, și monitorizarea și controlul în timp real a

valorii pH pe un modul Arduino Yun la care sunt atașate un electrod de pH și o pompă peristaltică, prelevarea probelor în condiții sterile și determinarea viabilității microbiene.

Revendicări: 1



DESCRIEREA INVENȚIEI

GIS3 - Sistem semiautomat de testare *in vitro* a viabilității tulpinilor microbiene

Invenția se referă la realizarea unui sistem automat *in vitro* de simulare a tranzitului prin tractul gastrointestinal (stomac și intestin subțire) în vederea determinării viabilității unor tulpini microbiene cu rol probiotic. Automatizarea este bazată pe un modul Arduino Yun, pompă peristaltică și un electrod de pH, iar simularea realizându-se într-un vas Duran GL28 din sticlă borosilică.

Utilizarea acestor sisteme reprezintă o alternativă modernă la diferite metode 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 de noi suplimente funcționale, bazate, în principal, pe biomasă de bacterii lactice și drojdii. Utilizarea acestor sisteme grăbește punerea pe piață a acestor produse noi, care au la bază capacități funcționale certe și care nu vor suferii modificări care să afecteze calitatea. Prin astfel de teste se asigură o predictivitate din punct de vedere calitativ a tulpinilor ce vor fi alese a fi folosite la uz uman sau animal (industria zootehnică).

De asemenea, aceste teste au ca scop identificarea unor tulpini nou izolate în scopul restabilirii și îmbunătățirii microbiotei. Restabilirea echilibrului și îmbogățirea microbiotei cu tulpini noi, ce au capacități metabolice superioare reprezintă unul din scopurile folosirii acestor sisteme. Aceste tulpini cu proprietăți fermentative și metabolice certe sunt implicate în reducerea efectelor a diferite disfuncții nutriționale (de 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 apariției de celule canceroase (cancerul de colon), a căror proliferare este stimulată de consumul de alimente procesate.

Automatizarea urmărește eliminarea factorului uman și simularea într-un procent maxim a factorilor fiziologici 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 enzimele pancreatice.

Sunt binecunoscute similaritățile pe care structura morfologică și o parte din funcțiile fiziologice pe care omul le are cu porcul (*Sus domesticus*). Timpii de staționare sunt diferiți, la nivelul fiecărui compartiment digestiv, dar condițiile fiziologice sunt similare. Studiile de laborator folosesc enzime extrase din pancreasul de la porcine, inclusiv mucina de la nivelul



Rector USAMVB Conf. dr. Răzvan Ionuț Teodorescu

Lector dr. Yamanu Emanuel

17-06-2015

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. Deși, depășită din punct de vedere științific, preferându-se alte surse de ordin vegetal, naturale, au reprezentat o sursă importantă de tulpini microbiene valoroase.

Comparativ cu cererea de brevet a 2011 01030 din 18.10.2011, care propune un sistem static de simulare a tranzitului prin tractul gastrointestinal uman, prezenta invenție 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. 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.

Sistemul GIS3 este compus din:

- un vas Duran din sticlă borosilicată, capacitate 250 mL, prevăzut cu un capac filetat GL 28 cu patru intrări GL 18;
- 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;
- un agitator magnetic cu plită ceramică încălzită IKA C-MAG HS 7 și senzor de temperatură.
- Capacul filetat are următoarele intrări:
 - Prima pentru senzorul de T;
 - A doua pentru senzorul de pH, diametru 1 cm;
 - A treia pentru furtunul siliconat de la pompa peristaltică;
 - 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.

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

Director USA/AVB Conf. dr. Răzvan Ionuț Teodorescu



Lector dr. Vamanu Emanuel

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 unui conexiuni WiFi, integrată în modulul Arduino Yun, în serverul de Cloud ThingSpeak, la un interval de maxim 10 secunde. Datele sunt vizibile în canalul public - GIS3 *In Vitro* System.

Etapele simulării tranzitului gastrointestinal, în sistemul semiautomat GIS3, sunt:

A. Simularea de la nivel gastric:

1. 10 g rație hrană sterilizată (soia:grâu:porumb:tărâțe 1:1:1:1);
2. 20 mL soluție salivă sterilizată prin filtrare cu filtru Millipore (CaCl₂ - 0.22 g/L, KCl - 2.2 g/L, NaCl - 5 g/L, NaHCO₃ - 1.5 g/L);
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);
4. Se adaugă HCl 1 M (sterilizat prin autoclavare 20 minute la 121⁰C) până la pH 2;
5. Amestecul se menține cu o agitare constantă timp de 4 ore;
6. Temperatură 37 – 40⁰C.

B. Simularea de la nivelul intestinului subțire:

1. Se adaugă 40 mL pancreatină (5 mg/mL) și săruri biliare (5 mg/mL) în tampon fosfat de sodiu pH 7 (sterilizate prin filtrare cu filtru Millipore);
2. Se adaugă NaOH 1 M (sterilizat prin autoclavare 20 minute la 121⁰C) până la pH 7;
3. Amestecul se menține cu o agitare constantă timp de 4 ore;
4. Temperatură 37 – 40⁰C.

Pentru testarea sistemului de simulare *in vitro* s-au realizat următoarele experimente:

Experimentul 1 – *Saccharomyces cerevisiae*: s-a suplimentat formula amestecului de cereale cu 0.1% biomasă liofilizată de *S. cerevisiae* (tulpină provenită din colecția Centrului 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, glucoză 20 g/L, agar 20 g/L, sterilizare 20 minute la 121⁰C). 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 YPD agarizat într-o hotă în flux laminar. Analiza plăcilor s-a făcut cu ajutorul colonyQuant, prevăzut cu un soft culespunzător.



Conf. dr. Răzvan Ionuț Teodorescu

Lector dr. Vamanu Emanuel

17-06-2015

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

Experimentul 2 – *Lactobacillus plantarum*: s-a suplimentat formula amestecului de cereale cu 0.1% biomasă liofilizată de *L. plantarum* (tulpină provenită din colecția Centrului 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, 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 20 minute 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 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.

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 de minute de staționare în 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 determinat o reducere de maxim 40% a viabilității, care s-a dublat după 30 de min. de staționare la acest nivel al tubului digestiv. Până la final viabilitatea s-a menținut constantă, cu variații medii de 0.1%. Nu s-a înregistrat, la final, o scădere sub 5.2×10^5 CFU/mL a numărului de celule viabile.



Rector USAMVB Conf. dr. Răzvan Ionuț Teodorescu

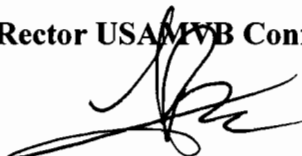
Lector dr. Yamanu Emanuel

REVEDICARE

Sistemul de simulare *in vitro* GIS3 cuprinde următoarele etape descrise mai sus:

1. Realizarea sistemului GIS3 de simulare *in vitro*.
2. Realizarea soluțiilor de simulare a mediului gastric.
3. Realizarea soluțiilor de simulare a mediului de la nivel intestinal (intestinul subțire).
4. Modalitatea tehnică de prelevare a probelor, în condiții sterile.
5. Determinarea viabilității microbiene.

Rector USAMV B Conf. dr. Răzvan Ionuț Teodorescu



Lector dr. Vamanu Emanuel

