



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2017 01010

(22) Data de depozit: 29/11/2017

(41) Data publicării cererii:
30/08/2018 BOPI nr. 8/2018

(71) Solicitant:
• LABORATOARELE MEDICA SRL,
STR. FRASINULUI NR. 11, OTOPENI, IF,
RO

(72) Inventatori:
• MORARU ANGELA, STR. PETRICANI
NR. 1R, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• MORARU IONUȚ, STR. PETRICANI
NR. 1R, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• OANCEA FLORIN, STR. PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) COMPOZIȚIE SIMBIOTICĂ CONȚINÂND UN CONSORȚIU
DE MICROORGANISME PROBIOTICE, ȘI PROCEDEU
DE OBTINERE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție pe bază de extracte vegetale și consorții simbiotice de microorganisme prebiotice, destinată combaterii colonizării habitatului intestinal de diverse tipuri de bacterii anaerobe patogene, inclusiv *Clostridium difficile*, și la un procedeu de obținere a acestora. Compoziția, conform invenției, este un amestec de probiotice și prebiotice constituit din extracte apoase standardizate de frunze de ceai verde (*Camellia sinensis*), sunătoare (*Hypericum perforatum*), frunze de măslin (*Olea europaea*), castravete amar

(*Momordica charantia*), anghinare (*Cynara scolymus*), mentă (*Mentha piperita*) și cultură simbiotică de Kombucha. Procedeu, conform invenției, constă în prepararea culturii simbiotice de Kombucha prin cultivarea pe o infuzie realizată prin micronizarea frunzelor de ceai și amestecarea cu extractele vegetale standardizate, rezultând o compoziție cu acțiune antiinflamatoare, antioxidantă și coleretică, și cu efect colagog.

Revendicări: 2

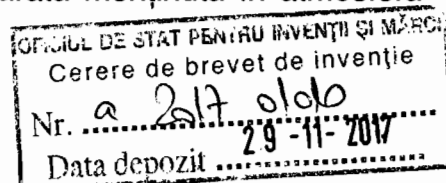


COMPOZIȚIE SINBIOTICĂ CONȚINÂND UN CONSORTIU DE MICROORGANISME PROBIOTICE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

Prezenta invenție se referă la o compoziție sinbiotică, care include extracte vegetale și consorții simbiotice de microorganisme prebiotice, și care este destinată combaterii efectelor negative produse la om datorită colonizării habitatului intestinal de către diferitele tipuri de bacterii anaerobe, inclusiv *Clostridium difficile*, ca și la un procedeu de obținere a respectivei compoziții.

Sunt cunoscute diferite compoziții sinbiotice, care includ tulpini de microorganisme probiotice și compuși prebiotici. Termenul de probiotic, introdus de Lilly și Stillwell, 1965, *Science*, 147:747–8, ca antonim pentru antibiotic, este folosit în prezent pentru a desemna microorganismele benefice care colonizează intestinul omului și al animalelor (a se vedea de ex. review-ul Sharma și Devi, 2014, *Critic. Rev. Food Sci. Nutr.*, 54, 537-552). Prebioticele au fost definite de Gibson și Roberfroid, 1995, *Journal of Nutrition* 125: 1401–12, ca fiind „ingrediente non-digestibile care influențează gazda prin stimularea selectivă a creșterii și/sau activității uneia sau a unui număr limitat de bacterii în colon...”. Aceeași autori au introdus și termenul de sinbiotic, ca fiind „amestecul de probiotice și prebiotice care influențează benefic gazda prin îmbunătățirea supraviețuirii și implantării unui supliment nutritiv viu în tractul gastrointestinal, prin stimularea selectivă a creșterii și/sau prin activarea metabolismului uneia sau a unui număr limitat de bacterii care favorizează starea de sănătate”. Termenul de sinbiotic este rezultatul contracției expresiei „sinergism probiotice – prebiotice”, fiind diferit de termenul simbiotic, care se referă la două (micro)organisme care trăiesc într-o asociație reciproc benefică. Fiind un termen științific consacrat, preluat din altă limbă, nu se supune regulilor ortografice ale limbii române. Cercetările din ultimii 15 ani au demonstrat faptul că microorganismele probiotice nu includ numai bacterii, ci și drojii (de ex. drojdiile din kefir, Diosma *et al.*, 2014, *World J. Microbiol. Biotech.*, 30:45-53, sau cele din kombucha, Kozyrovska *et al.*, 2012, *Biopolym. Cell*, 28: 103-113) sau fungi filamentoși benefici (Hager și Ghannoum, 2017, *Digest, Liver Dis.*, 49: 1171-1176).

Bacteriile anaerobe, din genul *Clostridium* (*C. perfringens*, *C. difficile*), care colonizează intestinul uman, au devenit o problemă majoră de sănătate umană, în special datorită abuzului de antibiotice (Hensgens *et al.*, 2012. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:742–48) și a folosirii de hrană preparată menținută în atmosferă



lipsită de oxigen (Labbé și García, 2013, Guide to Foodborne Pathogens, 2nd Edition, John Wiley & Sons, Somerset, NJ, USA: 2013). *C. perfringens* reprezintă una din cauzele principale ale toxinfecțiilor alimentare din SUA (FDA 2012, Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins, 2nd Edition, *Clostridium perfringens*, pp. 83-86). Infecțiile nozocomiale cu *C. difficile* determină o rată a mortalității de 13% (Hensgens *et al.* 2013. *Clin. Infect. Dis.* 56(8):1108–16). Infecțiile recurente care au cel mai negativ prognostic se caracterizează printr-o inflamație accentuată a membranei intestinale (colită pseudomembranoasă), care determină o reacție de reducere a eliminării de săruri / acizi biliari, cu generarea unui mediu care este favorabil dezvoltării clostridiilor și a protebacteriilor oportuniste (El Feghaly *et al.* 2015. *Curr. Opin. Gastroenter.* 31: 24-29).

Au fost descrise numai câteva compoziții sinbiotice la care s-a revendicat o acțiune de prevenire a colonizării intestinului uman de către *C. perfringens*. Cererea de brevet CN102524391 se referă la un produs lactat fermentat, care conține microorganisme probiotice (*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium lactis* BB-12 și *Lactobacillus acidophilus*) și oligozaharide prebiotice (fructooligozaharide și galactooligozaharide), în cantități cuprinse între 0,5 și 120 g la 1000 g produs lactat fermentat. Compoziția este prezentată ca având un efect de încetinire a dezvoltării bacteriilor *C. perfringens*. Brevetul AT506877 prezintă o compoziție sinbiotică care include: microorganisme probiotice (*Bifidobacterium thermophilum*, *Lactobacillus salivarius* și *Lactobacillus sobrius*, *Enterococcus faecium* DSMZ 3530, DSMZ 19764 sau DSMZ 16211, *Lactobacillus reuteri* DSMZ 21288 sau DSMZ 16350 sau *Bacillus subtilis* DSMZ 21287), prebiotice, incluzând oligozaharide, inulină, lactitol, lactosucroză, lactuloză, pirodextrine, derivati de drojdie, vitamină E, și materiale suport – zeoliți, carbonat de calciu, carbonat de magneziu, trehaloză, chitosan, silicat de aluminiu, bentonită, amidon, lapte praf, pudră de zer dulce, maltodextrină, lactoză, inulină, dextroză, uleiuri vegetale sau apă sau soluții saline. Compoziția este utilizată ca aditiv alimentar sau al apei de băut și are un efect preventiv, prin inhibiție competitivă, față de germenii enteropatogeni, inclusiv *C. perfringens*.

Principalul dezavantaj al compozițiilor descrise până în prezent este acțiunea lor exclusiv preventivă și limitată la cele 5% din tulpinile de *C. perfringens* de tip A, care produc enteroinfecții alimentare. Nu au fost descrise încă compoziții eficiente față de *C. difficile*. Infecțiile nozocomiale cu *C. difficile* sunt dificil de tratat

și determină infecții cronice recurente cu risc semnificativ. Unul din tratamentele cu eficiență clinică demonstrată este transplantul de microbiotă din fecale de la un adult sănătos (a se vedea de ex. review-ul Keller și Kuijper, 2015, *Ann. Rev. Med.* 66:373–86). Această modalitate de tratament transferă microorganismele benefice, inclusiv cele necultivabile / greu cultivabile, din intestinal uman sănătos la cel afectat de infecția intestinală cu *C. difficile*. Microorganismele astfel transplantate reduc inflamația intestinală, restabilesc buna funcționare a sistemului biliar și refac astfel homeostazia microbiocenozei intestinale specifice condiției de sănătate.

Autorii invenției au descoperit acțiunea de combatere *in vivo* a efectelor negative ale tulpinilor patogene de *C. difficile* de către o compoziție sinbiotică care include un consorțiu simbiotic de drojdii, bacterii acetice și bacterii lactice (symbiotic colonia of bacteria and yeast – SCOBY) și extracte de plante cu efect antioxidant. În cadrul consorțiului simbiotic de tip SCOBY coexistă microorganisme care se dezvoltă în anaerobioză (drojdiile care fermentează zaharurile cu producere de alcool, lactobacteriile) și bacterii strict aerobe – bacteriile acetice care produc membrana de nanoceluloză bacteriană și care oxidează alcoolul etilic la acid acetic. În cadrul acestor consorții microorganismele se protejează reciproc de acțiunea dăunătoare a factorilor de mediu agresivi, inclusiv oxigenul pentru anaerobi / lipsa oxigenului pentru aerobi. Consorțiile simbiotice de tip SCOBY includ și o serie de microorganisme greu cultivabile / necultivabile din categoria lactobacililor cu efect probiotic (Marsh *et al.*, 2014, *Food Microb.* 36: 171-178). Utilizarea acestor consorții, care au o rezistență naturală la aciditate și la alți factorii de stres specifici sistemului digestiv uman, permite o recolonizare a intestinului cu bacterii lactice benefice.

Extractele antioxidante din plante potențează efectele benefice ale microflorei intestinale benefice (a se vedea de ex. review-ul Cardona *et al.*, 2013, *J. Nutrit. Biochem.*, 24: 1415-1422), compușii polifenolici fiind incluși recent în categoria prebioticelelor (Gibson *et al.* 2017, *Nature Rev. Gastroenter. & Hepatol.* 14, 491–502).

Sunt cunoscute brevete care utilizează acest efect prebiotic al polifenolilor în compoziții sinbiotice sau prebiotice. Cererea de brevet WO2011036316 revendică utilizarea ca prebiotic a extractului de rodie (*Punica granatum*), standardizat în 5% fenoli totali, dintre care cel puțin 2% punicalagin, și compozițiile sinbiotice care includ acest extract standardizat de rodie și tulpinile

probiotice *Lactobacillus casei* DN 114-001 sau *Bifidobacterium animalis* DN-173 010. Brevetul EP1600061 se referă la o compoziție orală și/sau topică, care includ un compus prebiotic din grupul fructooligozaharidelor, inulinei, izomaltooligozaharidelor, lactilolului, lactosucrozei, lactulozei, pirodextrine, oligozaharidelor din soia, transgalactooligosaharidelor, xilooligozaharidelor și beta glucanilor, împreună cu polifenoli, (izo)flavone, (izo)flavonoli, (izo)flavonone, (iso)flavonoide, catechine, ginkgolide A, B, C, bilobalide, oligoprocianidine și glicozidele lor, și/sau extracte din plante bogate în polifenoli. Extractele din plante care sunt revendicate sunt *Ginkgo biloba*, *Camellia sinensis*, *Trifolium pratense*, *Oleacea europensis*, *Litchi sinensis*, *Passiflora incarnata*, *Medicago sativa* și amestecurile lor. Brevetul RO 126461 protejează un produs alimentar de aditivare prebiotic constituit din frunze de mur și zmeur, cu un conținut de: 46,5..49,8% fibre dietetice solubile, 40% maltodextrina ca excipient de încorporare, 2...2,5% 7 zaharuri solubile, 1,9...2,1% extractive ne azotate, 1...1,1% proteină brută, 1,2...1,4% fenoli solubili, 0,6...0,8% lipide, 3,1...3,5% săruri minerale.

O primă problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza o compoziție sinbiotică în care acțiunea anti-microorganisme dăunătoare din tubul digestiv, inclusiv asupra lui *Clostridium difficile*, a consorțiului simbiotic de drojdii, bacterii acetice și bacterii lactice (SCOPY) să fie completată de acțiunea antiinflamatoare, antioxidantă și coleretic-colagogă, și a unor componente care au și efect prebiotic, obținute din extracte vegetale.

Este un alt obiect al acestei invenții de a descrie un procedeu prin care să se obțină o compoziție sinbiotică cu efecte reproductibile în ceea ce privește acțiunea anti-microorganisme dăunătoare din tubul digestiv.

Consoțiul de drojdii, bacterii acetice și bacterii lactice, cunoscut și sub numele de Kombucha sau „ciupercă de ceai pentru viață lungă”, este cunoscut de o lungă perioadă de timp, iar băutura fermentată rezultată prin cultivarea acestui consorțiu pe infuziile de frunze de ceai (*Camellia sinensis*) este considerată un aliment cu efecte benefice asupra sănătății, în special în Asia de Est (Dufresne și Farnworth, Food Res. Int., 33:409-421).

Reproductibilitatea acțiunii probiotice și anti-enterobacterii dăunătoare, inclusiv cele din genul *Clostridium*, este determinată de dezvoltarea unui consorțiu care să includă atât microorganisme (facultativ) anaerobe (drojdii care fermentează zaharurile cu producere de alcool etilic, lactobacili cu activitate probiotică), cât și microorganisme aerobe, respectiv bacteriile acetice din bacterii

acetice din genul *Gluconacetobacter* și *Acetobacter*, care oxidează alcoolul etilic produs de drojdii la acid acetic.

Autorii au constatat că dezvoltarea echilibrată a consorțiului SCOBY încă din primele faze, cu o pondere semnificativă de lactobacili probiotici, este favorizată semnificativ de prezența antioxidantilor din ceaiul verde, și în special a epigallocatechin-3-galatului (EGCG). Anumite tipuri de ceai verde, transformate prin măcinare în pulberi foarte fine (micronizate) și preparate ca infuzie prin omogenizare energetică (ceaiul matcha) au un conținut de EGCG de 137 ori mai mare decât infuziile obținute uzual prin simpla expunere a frunzelor de ceai verde la acțiunea apei calde (Weis și Anderton, 2003, J. Chromat. 1011:173-180). Extracția superioară a principiilor active din ceaiul matcha se datorează structurii sale micronizate și modului de preparare, prin agitare energetică cu un tel special confecționat din lemn, și se realizează datorită creșterii suprafeței de contact dintre materialul vegetal și apa folosită pentru extracție.

A doua problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de a realiza un procedeu ușor de ridicat la scară industrială, prin care să se realizeze o infuzie de ceai verde cu un conținut optim de EGCG, care să stimuleze dezvoltarea lactobaciliilor probiotici anaerobi din consorțiul SCOBY, în condițiile unei cultivări în prezența oxigenului, care să asigure reproductibilitatea acțiunii anti-*Clostridium* a compoziției final obținute prin amestecarea consorțiului probiotic SCOBY cu extractele vegetale cu acțiune antiinflamatoare, antioxidantă și coleretic-colagogă.

Compoziția conform invenției este alcătuită din 49 părți extract apos de frunze de ceai verde, *Camellia sinensis*, standardizat în 4% polifenoli totali, din care cel puțin 1,2% este epigallocatechin-3-galat, 20 părți extract apos de inflorescențe și frunze de sunătoare, *Hypericum perforatum*, standardizat în 5% hiperforină, 10 părți de extract apos de frunze de măslin, *Olea europaea*, standardizat în 4% flavonoide totale, din care cel puțin 3% oleu opină, 10 părți de extract apos de castravete amar, *Momordica charantia*, standardizat în 5% polifenoli totali, din care cel puțin 2,5% charantin, 5 părți extract standardizat de anghinare, *Cynara scolymus*, cu cel puțin 3% acid cafeoil-chinic, 5 părți extract apos de mentă, *Mentha piperita*, cu cel puțin 0,3% uleiuri esențiale, dintre care cel puțin 0,12% mentol, 1 parte cultură de Kombucha, incluzând cel puțin 10^6 ufc/g de drojdii din genurile *Brettanomyces/Dekkera*, *Schizosaccharomyces*, *Torulasporea*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, cel puțin 10^8 ufc/g bacterii acetice din genul

Gluconacetobacter și *Acetobacter*, și cel puțin 10^6 ufc/g bacterii lactice din genul *Lactobacillus*.

Procedeul conform invenției este alcătuit din următoarele etape: prepararea unei suspensii de frunze de ceai verde, 0,5 kg în 100 litri apă adusă la 90...95°C, micronizarea frunzelor de ceai și uniformizarea infuziei prin amestecarea viguroasă într-un omogenizator de înaltă presiune cu piston, prevăzut cu o valvă de tip muchie de cuțit, două cicluri la 150 MPa, strecurarea infuziei rezultate și dizolvarea de zahăr cristal, în cantitate de 80 g la litru de infuzie, răcirea infuziei îndulcite la temperatura camerei, în condiții aseptice, inocularea infuziei îndulcite cu biofilm / peliculă de cultură de Kombucha / SCOBY, 1 parte biomasă umedă la 100 de părți infuzie îndulcită, cultivare consorțiului SCOBY timp de 8...10 zile la temperatura de 23°C, recoltarea aseptică a biofilmului / peliculei de Kombucha, care trebuie să conțină cel puțin 10^6 ufc/g de drojdii din genurile *Brettanomyces/Dekkera*, *Schizosaccharomyces*, *Torulasporea*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, cel puțin 10^8 ufc/g bacterii acetice din genul *Gluconacetobacter* și *Acetobacter*, și cel puțin 10^6 ufc/g bacterii lactice din genul *Lactobacillus*, și amestecare cu extractele vegetale standardizate, cu acțiune antiinflamatoare, antioxidantă și coleretic-colagogă.

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- Înglobează consorții microbiene simbiotice cu efecte probiotice recunoscute, care au o rezistență mare la factorii de mediu agresivi și care sunt puternic antagoniști față de *C. difficile* și proteobacteriile oportuniste stimulate de acesta;
- Compoziția conform invenției are un efect reproductibil în ceea ce privește acțiunea antagonistă, față de *C. difficile* și proteobacteriile oportuniste stimulate de acesta, pentru că este obținută prin utilizarea unui procedeu care asigură obținerea la nivel industrial a unei infuzii din frunze de ceai verde cu un conținut ridicat de epigallocatechin-3-galat, cu acțiune de favorizare a dezvoltării echilibrate a microorganismelor din consorțiul SCOBY, inclusiv a celor anaerobe care în mediul intestinal sunt antagoniste față de *C. difficile* și proteobacteriile oportuniste stimulate de acesta;
- Conține nano-celuloză cu acțiune probiotică și de stimulare a regenerării tisulare;
- Include ingrediente active din plante, polifenoli / flavonoide, triterpenoide, uleiuri esențiale, care au efect complementar celui al probioticelor SCOBY,

datorită acțiunilor prebiotice / de stimulare a dezvoltării microorganismelor probiotice, de reducere a inflamației intestinale și a colitei aferente și de stimulare a secreției de acizi biliari care contribuie la restabilirea echilibrului din microbiocenoza intestinală datorită efectelor lor microbicide specifice;

- Este o excelentă sursă de vitamine, A, B1, B6, B9, B12, C, E și K, minerale, calciu, magneziu, potasiu, sodiu, fier și zinc și aminoacizi, provenite din extractele vegetale și din consoziile microbiene, exercitând și o acțiune remineralizantă și vitaminizantă;

- Are un efect de îmbunătățire a stării psihice a pacienților cu infecții recurente de *C. difficile*, datorită efectului post-biotic al microflorei probiotice restabilite prin tratament, combinat cu cel relaxant și anti-depresiv al theoninei din ceaiul verde și al hiperforinei din sunătoare.

Prezenta invenție este ilustrată prin următorul exemplu.

Exemplu 1. Se realizează separat extracte apoase din frunze de ceai verde, *Camellia sinensis*, sunătoare, *Hypericum perforatum*, frunze de măslin, *Olea europaea*, castravete amar, *Momordica charantia*, anghinare, *Cynara scolymus*, mentă, *Mentha piperita*, prin infuzia a câte 100 grame de material vegetal mărunțit uscat în 1000 ml apă distilată fierbinte, timp de 30 min. În extractele apoase se determină ingredientele active prin tehnici standardizate HPLC. Extractele se standardizează în ingrediente active prin concentrare la rotavapor, obținându-se extract apos de frunze de ceai verde, *Camellia sinensis*, standardizat în 4% polifenoli totali, din care cel puțin 1,2% este epigallocatechin-3-galat, extract apos de părți aeriene de sunătoare, *Hypericum perforatum*, standardizat în 5% hiperforină, extract apos de frunze de măslin, *Olea europaea*, standardizat în 4% flavonoide totale, din care cel puțin 3% oleuropină, extract apos de castravete amar, *Momordica charantia*, standardizat în 5% polifenoli totali, din care cel puțin 2,5% charantin, extract standardizat de anghinare, *Cynara scolymus*, cu cel puțin 3% acid cafeoil-chinic, extract apos de mentă, *Mentha piperita*, cu cel puțin 0,3% uleiuri esențiale, dintre care cel puțin 0,12% mentol.

Peste 49 părți extract apos de frunze de ceai verde, *Camellia sinensis*, standardizat în 4% polifenoli totali, din care cel puțin 1,2% este epigallocatechin-3-galat, se adaugă 20 părți extract apos de părți aeriene de sunătoare, *Hypericum perforatum*, standardizat în 5% hiperforină, 10 părți de extract apos de frunze de măslin, *Olea europaea*, standardizat în 4% flavonoide totale, din care cel puțin 3% oleuropină, 10 părți de extract apos de castravete amar, *Momordica charantia*,

standardizat în 5% polifenoli totali, din care cel puțin 2,5% charantin, 5 părți extract anghinare, *Cynara scolymus*, cu cel puțin 3% acid cafeoil-chinic, 5 părți extract apos de mentă, *Mentha piperita*, cu cel puțin 0,3% uleiuri esențiale, dintre care cel puțin 0,12% mentol, părțile fiind exprimate în unități de masă.

Extractele se omogenizează, iar la cele 99 de părți rezultate se adaugă 1 parte de biofilm / peliculă de cultură de Kombucha obținută conform procedurii descris mai jos.

Se prepară într-un vas de sticlă Simax de 150 litri (Kavalierglass Sazava, Cehia), o suspensie de frunze de ceai verde, 0,5 kg în 100 litri apă adusă la 90...95°C. Se micronizează frunzele de ceai și se uniformizează infuzia, prin amestecarea viguroasă într-un omogenizator de înaltă presiune cu piston (GEA Niro Soavi Arriete NS2006), prevăzut cu o valvă de tip muchie de cuțit, două cicluri la 150 MPa. Se strecoară infuzia rezultată și se dizolvă zahăr cristal, în cantitate de 80 g la litru de infuzie. Infuzia se răcește la temperatura camerei, în condiții aseptice, și se inoculează cu biofilm / peliculă de cultură de Kombucha / SCOBY, 1 parte biomasă umedă la 100 de părți infuzie îndulcită. Se cultivă consorțiul SCOBY timp de 8...10 zile la temperatura de 23°C. În final se recoltează aseptice biofilmul / pelicula de Kombucha, care trebuie să conțină cel puțin 10^6 ufc/g de drojdii din genurile *Brettanomyces/Dekkera*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, cel puțin 10^8 ufc/g bacterii acetice din genul *Gluconacetobacter* și *Acetobacter*, și cel puțin 10^6 ufc/g bacterii lactice din genul *Lactobacillus*, care se amestecă cu extractele vegetale standardizate, cu acțiune antiinflamatoare, antioxidantă și coleretic-colagogă.

Compoziția realizată este distribuită în flacoane de sticlă de 30 până la 1000 ml, de culoare închisă, prevăzute cu dop filetat din material plastic. Flacoanele sunt închise, compoziția fiind stabilă timp de 10...12 săptămâni, prin depozitare la temperaturi de 4...6°C.

A fost determinat conținutul de epigallocatechin-3-galat (prin folosirea metodei descrise Weis și Anderton, 2003, *J. Chromat.* 1011:173-180) din infuzia preparată conform invenției, prin micronizarea frunzelor de ceai și uniformizare prin trecere printr-un omogenizator sub presiune, comparativ cu o infuzie preparată în mod obișnuit, prin simpla menținere a frunzelor de ceai în apă la 90-95°C, timp de 15 min. De asemenea s-a determinat numărul de lactobacili din pelicula de Kombucha (SCOBY), din probe prelevate din consorțiul cultivat conform invenției, pe infuzie de frunze de ceai verde extrase prin micronizare și

uniformizare pe omogenizator sub presiune, și infuzie de ceai verde preparată în mod uzual. Pentru enumerarea lactobacililor s-a folosit metoda unităților formatoare de colonii, pe un mediu selectiv de Man, Rogosa and Sharp (MRS - CM0361, Oxoid – Thermo Scientific, Hampshire, Marea Britanie), suplimentat cu nistatină, 200 U.ml^{-1} . Rezultatele, medie a trei determinări, prezentate în tab. 1 de mai jos, demonstrează o extracție superioară a EGCG, care protejează și stimulează dezvoltarea lactobacililor probiotici anaerobi din consorțiul SCOBY, în condițiile unei cultivări în prezența oxigenului.

Tab. 1. Conținutul de epigalocatechin-3-galat din infuzie preparată conform invenției, comparativ cu o infuzie preparată în mod obișnuit, și influența modului de preparare a infuziei de ceai verde asupra numărului de lactobacili din consorțiul SCOBY dezvoltat după cultivare*

Varianta experimentală	Epigalocatechin-3-galat (mg.100 ml^{-1})	Număr de lactobacili consorțiu SCOBY (ufc.g^{-1})
Infuzie preparată conform invenției	25,66	$4,5 \cdot 10^6$
Infuzie preparată în mod obișnuit	0,23	$6,3 \cdot 10^4$

Experimentele întreprinse au arătat o bună eficacitate a compoziției sinbiotice conținând un consorțiu de microorganisme probiotice în combaterea efectelor negative produse la om datorită colonizării habitatului intestinal de către bacteriile anaerobe patogene.

Revendicări

1. Compoziție sinbiotică conform invenției **caracterizată prin aceea** că este alcătuită din alcătuită din 49 părți extract apos de frunze de ceai verde, *Camellia sinensis*, standardizat în 4% polifenoli totali, din care cel puțin 1,2% este epigallocatechin-3-galat, 20 părți extract apos de părți aeriene de sunătoare, *Hypericum perforatum*, standardizat în 5% hiperforină, 10 părți de extract apos de frunze de măslin, *Olea europaea*, standardizat în 4% flavonoide totale, din care cel puțin 3% oleuropină, 10 părți de extract apos de castravete amar, *Momordica charantia*, standardizat în 5% polifenoli totali, din care cel puțin 2,5% charantin, 5 părți extract standardizat de anghinare, *Cynara scolymus*, cu cel puțin 3% acid cafeoil-chinic, 5 părți extract apos de mentă, *Mentha piperita*, cu cel puțin 0,3% uleiuri esențiale, dintre care cel puțin 0,12% mentol, 1 parte cultură de Kombucha, incluzând cel puțin 10^6 ufc/g de drojdii din genurile *Brettanomyces/Dekkera*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, cel puțin 10^8 ufc/g bacterii acetice din genul *Gluconacetobacter* și *Acetobacter*, și cel puțin 10^6 ufc/g bacterii lactice din genul *Lactobacillus*.

2. Procedeu de realizare a compoziției sinbiotice, conform invenției, **caracterizată prin aceea că** este alcătuit din alcătuit din următoarele etape: prepararea unei suspensii de frunze de ceai verde, 0,5 kg în 100 litri apă adusă la 90...95°C, micronizarea frunzelor de ceai și uniformizarea infuziei prin amestecarea viguroasă într-un omogenizator de înaltă presiune cu piston, prevăzut cu o valvă de tip muchie de cuțit, două cicluri la 150 MPa, strecurarea infuziei rezultate și dizolvarea de zahăr cristal, în cantitate de 80 g la litru de infuzie, răcirea infuziei îndulcite la temperatura camerei, în condiții aseptice, inocularea infuziei îndulcite cu biofilm / peliculă de cultură de Kombucha / SCOBY, 1 parte biomasă umedă la 100 de părți infuzie îndulcită, cultivare consorțiului SCOBY timp de 8...10 zile la temperatura de 23°C, recoltarea aseptică a biofilmului / peliculei de Kombucha, care trebuie să conțină cel puțin 10^6 ufc/g de drojdii din genurile *Brettanomyces/Dekkera*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Zygosaccharo-myces*, *Pichia*, cel puțin 10^8 ufc/g bacterii acetice din genul *Gluconacetobacter* și *Acetobacter*, și cel puțin 10^6 ufc/g bacterii lactice din genul *Lactobacillus*, și amestecare cu extractele vegetale standardizate, cu acțiune antiinflamatoare, antioxidantă și coleretic-colagogă.