



(11) **RO 132748 B1**

(51) **Int.Cl.**

A61K 35/741 (2015.01);
A61K 36/00 (2006.01);
A61P 1/00 (2006.01);
A23F 3/16 (2006.01)

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2017 01010**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/06/2023** BOPI nr. **6/2023**

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

(73) Titular:
• **LABORATOARELE MEDICA S.R.L.**,
*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*

(56) Documente din stadiul tehnicii:
CN 106509213 A; **H. BATTIK, A.
BAKHROUF, E. AMMAR**, "ANTIMICROBIAL
EFFECT OF KOMBUCHA ANALOGUES",
**LWT - FOOD SCIENCE AND
TECHNOLOGY VOL. 47, PP. 71-77, 2012**;
US 2014/0141123 A1; **N. O KOZYROVSKA,
O. M. REVA, V. B. REVA, V. B. GOGINYAN,
J. P. DE VERA**, "KOMBUCHA
MICROBIOME AS A PROBIOTIC: A VIEW
FROM THE PERSPECTIVE OF
POST-GENOMICS AND SYNTHETIC
ECOLGY", **BIOPOLYMERS AND CELL, NR.
2, VOL. 28,
PP. 103-113, 2012**

(54) **COMPOZIȚIE SINBIOTICĂ CONȚINÂND UN CONSORTIU
DE MICROORGANISME PROBIOTICE, ȘI PROCEDEU
DE OBȚINERE**



1 Prezenta invenție se referă la o compoziție sinbiotică, care include extracte vegetale
și consorții simbiotice de microorganisme prebiotice, și care este destinată combaterii
3 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
5 respectivei compoziții.

 Sunt cunoscute diferite compoziții sinbiotice, care includ tulpini de microorganisme
7 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
9 microorganismele benefice care colonizează intestinul omului și al animalelor (a se vedea
de exemplu: review-ul **Sharma și Devi, 2014, Critic. Rev. Food Sci. Nutr., 54, 537-552**).
11 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 selec-
13 tivă 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
15 influențează benefic gazda prin îmbunătățirea supraviețuirii și implantării unui supliment
nutritiv viu în tractul gastrointestinal, prin stimularea selectivă a creșterii și/sau prin activarea
17 metabolismului uneia sau a unui număr limitat de bacterii care favorizează starea de
sănătate”. Termenul de sinbiotic este rezultatul contracției expresiei „sinergism probiotice -
19 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
21 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 drojdii (de
23 exemplu 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
25 filamentoși benefici (**Hager și Ghannoum, 2017, Digest, Liver Dis., 49: 1171-1176**).

 Bacteriile anaerobe, din genul *Clostridium* (*C. perfringens*, *C. difficile*), care
27 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**)
29 și a folosirii de hrană preparată menținută în atmosferă lipsită de oxigen (**Labbe și Garcia,**
2013, Guide to Foodborne Pathogens, 2 Edition, John Wiley & Sons, Somerset, NJ,
31 **USA: 2013**). *C. perfringens* reprezintă una din cauzele principale ale toxiinfecțiilor alimentare
din SUA (**FDA 2012, Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and**
33 **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.**
35 **56(8): 1108-16**). Infecțiile recurente care au cel mai negativ prognostic se caracterizează
printr-o inflamație accentuată a membranei intestinale (colită pseudomembranoasă), care
37 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.**
39 **2015. Curr. Opin. Gastroenter. 31: 24-29**).

 Au fost descrise numai câteva compoziții sinbiotice la care s-a revendicat o acțiune
41 de prevenire a colonizării intestinului uman de către *C. perfringens*. Cererea de brevet **CN**
102524391 se referă la un produs lactat fermentat, care conține microorganisme probiotice
43 (*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium lactis* BB-12 și
Lactobacillus acidophilus) și oligozaharide prebiotice (fructooligozaharide și galactooligo-
45 zaharide), în cantități cuprinse între 0,5 și 120 g la 1000 g produs lactat fermentat.

RO 132748 B1

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, derivați 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 exemplu 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 exemplu review-ul **Cardona et al., 2013, J. Nutr. Biochem., 24: 1415-1422**), compușii polifenolici fiind incluși recent în categoria prebioticelor (**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 **WO 2011036316** 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 **EP 1600061** se referă la o compoziție orală și/sau topică, care includ un compus prebiotic din grupul fructooligozaharidelor, inulinei, izomaltooligozaharidelor,

RO 132748 B1

1 lactilolului, lactosucrozei, lactulozei, pirodextrine, oligozaharidelor din soia, transgalac-
2 tooligosaharidelor, xilooligozaharidelor și beta glucanilor, împreună cu polifenoli, (izo)flavone,
3 (izo)flavonoli, (izo)flavonone, (iso)flavonoide, catechine, ginkgolide A, B, C, bilobalide,
4 oliogoprocianidine și glicozidele lor, și/sau extracte din plante bogate în polifenoli. Extractele
5 din plante care sunt revendicate sunt *Ginkgo biloba*, *Camellia sinensis*, *Trifolium pratense*,
6 *Oleacea europensis*, *Litchi sinensis*, *Passiflora incarnata*, *Medicago sativa* și amestecurile
7 lor. Brevetul **RO 126461** protejează un produs alimentar de aditivare prebiotic constituit din
8 frunze de mur și zmeur, cu un conținut de: 46,5...49,8% fibre dietetice solubile, 40%
9 maltodextrina ca excipient de încorporare, 2...2,5% 7 zaharuri solubile, 1,9...2,1% extractive
10 ne azotate, 1...1,1% proteină brută, 1,2...1,4% fenoli solubili, 0,6...0,8% lipide, 3,1...3,5%
11 săruri minerale.

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

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

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

25 Reproductibilitatea acțiunii probiotice și anti-enterobacterii dăunătoare, inclusiv cele
26 din genul *Clostridium*, este determinată de dezvoltarea unui consorțiu care să includă atât
27 microorganisme (facultativ) anaerobe (drojdii care fermentează zaharurile cu producere de
28 alcool etilic, lactobacili cu activitate probiotică), cât și microorganisme aerobe, respectiv
29 bacteriile acetice din bacterii acetice din genul *Gluconacetobacter* și *Acetobacter*, care
30 oxidează alcoolul etilic produs de drojdii la acid acetic.

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

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

RO 132748 B1

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*, părțile fiind exprimate în unități de masă. 13

Procedeele conform invenției este alcătuit din următoarele etape: prepararea unei suspensii de frunze de ceai verde, 0,5 kg în 100 L 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*, *Zygosaccharo-mycetes*, *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, adică cu 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, și 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. 37

Invenția prezintă următoarele avantaje: 37

- 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; 39

- 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; 47

RO 132748 B1

1 - conține nano-celuloză cu acțiune probiotică și de stimulare a regenerării tisulare;
2 - include ingrediente active din plante, polifenoli/ flavonoide, triterpenoide, uleiuri
3 esențiale, care au efect complementar celui al probioticelor SCOPY, datorită acțiunilor
4 prebiotice/de stimulare a dezvoltării microorganismelor probiotice, de reducere a inflamației
5 intestinale și a colitei aferente și de stimulare a secreției de acizi biliari care contribuie la
6 restabilirea echilibrului din microbiocenoza intestinală datorită efectelor lor microbicide
7 specifice;

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

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

15 Prezenta invenție este ilustrată prin următorul exemplu.

Exemplul 1

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

31 Peste 49 părți extract apos de frunze de ceai verde, *Camellia sinensis*, standardizat
32 în 4% polifenoli totali, din care cel puțin 1,2% este epigallocatechin-3-galat, se adaugă 20
33 părți extract apos de părți aeriene de sunătoare, *Hypericum perforatum*, standardizat în 5%
34 hiperforină, 10 părți de extract apos de frunze de măslin, *Olea europaea*, standardizat în 4%
35 flavonoide totale, din care cel puțin 3% oleuropină, 10 părți de extract apos de castravete
36 amar, *Momordica charantia*, standardizat în 5% polifenoli totali, din care cel puțin 2,5%
37 charantin, 5 părți extract anghinare, *Cynara scolymus*, cu cel puțin 3% acid cafeoil-chinic,
38 5 părți extract apos de mentă, *Mentha piperita*, cu cel puțin 0,3% uleiuri esențiale, dintre care
39 cel puțin 0,12% mentol, părțile fiind exprimate în unități de masă.

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

42 Se prepară într-un vas de sticlă Simax de 150 L (Kavalierglass Sazava, Cehia), o
43 suspensie de frunze de ceai verde, 0,5 kg în 100 L apă adusă la 90...95°C. Se micronizează
44 frunzele de ceai și se uniformizează infuzia, prin amestecarea viguroasă într-un omo-
45 genizator de înaltă presiune cu piston (GEA Niro Soavi Arriete NS2006), prevăzut cu o valvă
46 de tip muchie de cuțit, două cicluri la 150 MPa. Se strecoară infuzia rezultată și se dizolvă
47 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/SCOPY, 1

RO 132748 B1

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*, *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*, 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 tabelul 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.

*Conținutul de epigallocatechin-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**

Tabelul 1

Varianta experimentală	Epigallocatechin-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 **caracterizată prin aceea că** 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 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*, părțile fiind exprimate în unități de masă.

2. Procedeu de realizare a compoziției sinbiotice din revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: prepararea unei suspensii de frunze de ceai verde, 0,5 kg în 100 L 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, cultivarea 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 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, și 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.

