



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2012 00609**

(22) Data de depozit: **21/08/2012**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/03/2018** BOPI nr. **3/2018**

(41) Data publicării cererii:  
**30/07/2013** BOPI nr. **7/2013**

(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:  
**JPH 05317016 A; RO 126906 A2;  
RU 2438685 C1; WO 2006/053415 A1;  
EMANUEL VAMANU, "IN VITRO  
ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT  
ACTIVITIES OF ETHANOLIC EXTRACT  
OF LYOPHILIZED MYCELIUM OF  
PLEUROTUS OSTREATUS PQMZ91109",  
MOLECULES, NR. 4, VOL. 17, PP.  
3653-3671, 2012**

(54) **PROCEDEU DE OBȚINERE A UNUI EXTRACT  
HIDROGLICEROALCOOLIC ȘI, RESPECTIV, A UNUI  
EXTRACT GLICEROALCOOLIC CU EFECT ANTIOXIDANT  
DIN MICELIUL CIUPERCII *PLEUROTUS OSTREATUS***



# RO 128598 B1

1 Inventția se referă la un procedeu de obținere a unui extract hidroglicerolacoolic și,  
respectiv, a unui extract glicerolalcoolic, cu efect antioxidant, din miceliul ciupercii *Pleurotus*  
3 *ostreatus*.

5 Astfel de preparate sunt similare celor gemoterapice care au o largă utilizare în medi-  
cina alternativă celei alopate, în scopul lărgirii gamei de produse cu efect antioxidant ce  
poate fi utilizat ca supliment nutritiv. Comparativ cu fitoterapia, ce utilizează planta matură  
7 uscată, în obținerea de preparate gemoterapice sunt folosite țesuturile meristemice tinere,  
deoarece se cunoaște că în compoziția lor se găsește o cantitate mai mare de principii biolo-  
9 gic active. S-a demonstrat, de asemenea, că unii compuși sunt prezenți exclusiv în aceste  
tipuri de țesuturi și/sau în muguri.

11 Obținerea unor produse naturale ușor de realizat, care au un conținut ridicat al princi-  
piilor active (în general fitocompnenți), reprezintă o tendință actuală de cercetare. Metabo-  
13 lismul uman, ca urmare a stilului actual de viață și a poluării, produce o serie de radicali liberi  
cu efecte negative semnificative asupra sănătății umane. Radicalii liberi sunt implicați cel mai  
15 frecvent în apariția cancerului, a bolilor neurodegenerative și a celor cardiovasculare. În  
cazul ciupercilor, principalul component cu efect antioxidant îl reprezintă compușii fenolici,  
17 flavonoidele, carotenoizii (licopenul și  $\beta$ -carotenul), acidul ascorbic, precum și diferiți  
tocoferoli.

19 *Pleurotus ostreatus* este o ciupercă care se găsește în mod spontan în pădurile de  
munte din România. Este utilizată ca aliment, dar nu într-o cantitate la fel de mare ca specia  
21 *Agaricus bisporus*. Din punct de vedere nutrițional, are un conținut scăzut de grăsimi, fiind  
bogată în fibre alimentare, proteine, vitamine și minerale.

23 Documentul **RU2438685 C1** descrie o metodă de obținere a unor extracte de ciuperci  
mărunțite, în soluții apoase ce conțin glicerină și etanol. Cererea de brevet internațională  
25 **WO 2006/053415 A1** menționează că extractele vegetale se pot obține prin extracție cu  
solvenți alcoolici, cum ar fi etanolul și glicerina, sau cu combinații ale acestora din materiale  
27 vegetale, precum ciupercile din specia *Pleurotus*. Cererea de brevet a **2010 00498**  
**(RO 126906 A2)** din 08.06.2010 propune pe lângă părți meristemice din trei plante și  
29 butonii a trei ciuperci comestibile (*Agaricus bisporus*, *P. ostreatus*, *Lentinula edodes*).  
Comparativ cu a **2010 00498 (RO 126906 A2)**, dar și cu documentele **RU 2438685 C1** și  
31 **WO 2006/053415 A1**, prezenta invenție propune o extracție din miceliul proaspăt de *P.*  
*ostreatus*. Deoarece obținerea de ciuperci în vederea folosirii la extracte cu efect antioxidant  
33 durează o perioadă lungă de timp și necesită etape laborioase și condiții speciale, utilizarea  
miceliului reprezintă o alternativă. Cultivarea miceliului ciupercilor comestibile (cu proprietăți  
35 medicinale) în mediu lichid în bioreactor reprezintă o alternativă facilă datorită ușurinței în  
manipularea echipamentului, dar și prin posibilitatea de standardizare a procesului. Se pot  
37 realiza fermentații identice, într-un număr infinit, prin păstrarea unor condiții identice de  
cultivare.

39 În stadiul tehnicii mai sunt cunoscute procedee de obținere a unor extracte în apă sau  
în alcool din miceliul uscat sau liofilizat de *Pleurotus* (**JPH05317016 A**, Emanuel Vamanu  
41 "**In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities of Ethanolic Extract of Lyophilized**  
**Mycelium of *Pleurotus ostreatus* PQMZ91109**", *Molecules*, 26 martie 2012, vol. 17,  
43 nr. 4, pp. 3653-3671). În lucrarea științifică "**In Vitro Antimicrobial and Antioxidant**  
**Activities of Ethanolic Extract of Lyophilized Mycelium of *Pleurotus ostreatus***  
45 **PQMZ91109**", *Molecules*, 26 martie 2012, vol. 17, nr. 4, pp. 3653-3671, se descrie  
obținerea unui extract etanolic din *Pleurotus ostreatus*. Procedeu presupune menținerea  
47 miceliului pe PDA, cultivarea fungilor pe PDA timp de 10 zile la 25°C, prepararea inoculului

# RO 128598 B1

- prin cultivarea miceliului la 150 rpm timp de 5 zile, la 25°C, în pahare Erlenmeyer de 500 ml care conțin un mediu de cultură cu 6 g glucoză, 100 g extract de malt, 20 g extract de drojdie, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, la pH 5,5, fermentația submersă în mediu lichid, care poate conține extract de porumb ca sursă de azot, la 150 rpm, 25°C, timp de 7 zile, recuperarea miceliului din mediu lichid prin centrifugare, spălare, cu apă distilată, liofilizare și extracție cu etanol. 1
- În continuare, se prezintă o listă a documentelor din stadiul tehnicii în care se pot regăsi informațiile la care s-a făcut referire anterior: 7
1. Fernando Pitera, "Compendiu de gemoterapie clinică", Ed. Fundației Creștine de Homeopatie SIMILE Constanța, România. 9
  2. Ameer A., Al-Laith A., 2010, "Antioxidant components and antioxidant/antiradical activities of desert truffle (*Tirmania nivea*) from various Middle Eastern origins", Journal of Food Composition and Analysis, 23, 15-22. 11
  3. Chirinang P., Intarapichet K. O., 2009, "Amino acids and antioxidant properties of the oyster mushrooms, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*", Science Asia, 35, 326-331. 15
  4. Akindahunsi A. A., Oyetayo F. L., 2006, "Nutrient and antinutrient distribution of edible mushroom, *Pleurotus tuber-regium* (fries) singer", LWT Food Science and Technology, 39, 548-553. 17
  5. Cerere brevet a 2010 00498/8.06.2010, "Procedeu de obținere a unui preparat gemoterapie pe bază de plante și ciuperci", Ianculov I., Butău D., Ciulea S., Palicina R. D., Cucu M., Franț A. 19
  6. [http://en.wikipedia.org/wiki/Potato\\_dextrose\\_agar](http://en.wikipedia.org/wiki/Potato_dextrose_agar) 21
  7. Altaf S. A., Umar D. M., Muhammad M. S., 2010, "Production of xylanase enzyme by *Pleurotus eryngii* and *Flamulina velutipes* grown on different carbon sources under submerged fermentation", World Applied Sciences Journal, 8, A1-A9. 23
  8. Vamanu E., 2012, 2012, "In vitro antimicrobial and antioxidant activities of ethanolic extract of lyophilized mycelium of *Pleurotus ostreatus* PQMZ91109", Molecules, 17, 3653-3671. 25
  9. Militam A. V., Simedrea I., Alexoi L., Peev C., Bernad E., Toma CC, 2010, "Plant extracts from meristematic tissues (foliar buds and shoots): antioxidant and therapeutic action", Studia Universitatis "Vasile Goldiș", Seria Științele Vieții, 20, 3, 45-47. 27
  10. Șaman H., Khalil-Ur-Rehman, Dogar Z. U. H., Jahan N., Hameed M., Khan Z.I., Ahmad K., Mukhtar K., Valeem E. E., 2010, "Cardioprotective effect of gemmotherapeutically treated *Withania somnifera* against chemically induced myocardial injury", Pakistan Journal of Botany, 42, 2, 1487-1499. 29
  11. Vamanu E., "Influence of total phenols content on the antioxidant capacity in hydroglyceroalcoholic extracts from fresh *Pleurotus ostreatus* mycelium", Proceeding XXVI<sup>th</sup> International Conference on Polyphenols, Florența, Italia, 23-26 Iulie, 2012. 31
  12. Vamanu E., "Influence of total phenols content on the antioxidant capacity in glyceroalcoholic extracts from fresh *Pleurotus ostreatus* and *Coprinus comatus* mycelium", lucrare acceptată la 13<sup>th</sup> International Congress of the Society for Ethnopharmacology, Graz, Austria, 2-7 septembrie, 2012. 33
  13. Vamanu E., 2012, "In vitro antimicrobial and antioxidant activities of ethanolic extract of lyophilized mycelium of *Pleurotus ostreatus* PQMZ91109", Molecules, 17, 3653-3671. 35
- Problema tehnică pe care își propune să o rezolve invenția este de a obține preparate care au un conținut ridicat al principiilor active din miceliu de *Pleurotus*. 47

# RO 128598 B1

1 Conform invenției, procedeul de obținere a unui extract hidroglicerolalcoolic și, respec-  
2 tiv, a unui extract glicerolalcoolic, cu efect antioxidant, din miceliul ciupercii *Pleurotus*  
3 *ostreatus* obținut prin cultivare submersă, în sistem discontinuu, la nivel de bioreactor, constă  
4 în aceea că se revitalizează miceliul de *Pleurotus ostreatus* de pe boabe de orz, se obține  
5 un inocul și se cultivă în sistem discontinuu pe mediu lichid, se separă miceliul proaspăt în  
6 fază de creștere prin centrifugare, apoi 10% din miceliul proaspăt astfel rezultat se supune  
7 extracției cu un amestec de apă distilată purificată:glicerol:etanol = 1:1:1, în vederea obținerii  
8 extractului hidroglicerolalcoolic, sau cu un amestec de etanol:glicerol = 2:1, în vederea obți-  
9 nerii extractului glicerolalcoolic, timp de 10 zile, la 150 rpm, la 4...9°C, iar în final, miceliul se  
10 separă prin filtrare sub vid, se evaporă alcoolul, iar extractele obținute se păstrează la rece.

11 Miceliul de *Pleurotus ostreatus* se revitalizează dintr-o cultură pe boabe de orz menți-  
12 nută la -80°C, în glicerol 20%. Boabele de orz cu miceliu dezvoltat pe suprafața lor se așază  
13 pe mediu PDA din cartofi, dextroză și agar, iar după dezvoltarea miceliului se adaugă câteva  
14 boabe de orz sterilizate, după 3...5 zile obținându-se boabe acoperite cu miceliu, care vor  
15 servi la inocularea mediului lichid de obținere a inoculului care cuprinde glucoză, extract de  
16 malț, extract de drojdie,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ . Obținerea inoculului se realizează la 25°C,  
17 150 rpm, pH 5,5...6, timp de 7...10 zile. În continuare, cultivarea în sistem discontinuu, la  
18 nivel de bioreactor, se realizează în aceleași condiții și într-un mediu cu compoziție similară  
19 celui din faza de inocul, dar suplimentat cu extract de porumb.

20 Procedeul conform invenției permite obținerea unor preparate gliceroalcoolice și  
21 hidrogliceroalcoolice cu activitate antioxidantă semnificativă, cu conținut ridicat de polifenoli  
22 și flavonoide, din miceliul proaspăt al ciupercii *Pleurotus ostreatus*. Se utilizează miceliu  
23 proaspăt, în fază de creștere, separate fără nicio prelucrare, după obținerea lor prin cultivare  
24 în mediu submers.

25 În continuare, se prezintă un exemplu concret de realizare a procedurii conform  
26 invenției.

27 **Exemplu.** Etapele procedurii conform invenției constau în:

28 1. Revitalizarea culturii (miceliului) de *P. ostreatus* din cultură pe boabe de orz de la  
29 -80°C, în glicerol 20%. Boabele de orz cu miceliu dezvoltat pe suprafața lor se pun cu o  
30 pensetă sterilă pe mediu PDA (cutie Petri). Compoziția mediului PDA (potato dextrose agar)  
31 este: soluția rezultată de la fierea a 200 g cartofi curățați și tăiați în bucăți la 1000 ml apă,  
32 2% glucoză și 2% agar.

33 2. După dezvoltarea miceliului, se adaugă câteva boabe de orz sterilizate prin  
34 autoclavare pentru a se putea dezvolta miceliu pe suprafața lor. După 3...5 zile, boabele  
35 acoperite cu miceliu vor servi la inocularea mediului lichid de obținere a inoculului.

36 3. Obținerea inoculului prin cultivarea în flacoane Erlenmeyer, cu 300 ml mediu într-un  
37 flacon de 500 ml capacitate totală. Mediul de cultură conține (g/l): 6 g glucoză, 100 g extract  
38 de malț, 20 g extract de drojdie, 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ . Condițiile de cultivare sunt:  
39 25°C, 150 rpm, pH 5,5...6, timp de 7...10 zile.

40 4. Cultivare în sistem discontinuu la nivel de bioreactor, volum util 4 l. Condițiile de  
41 cultivare sunt: 25°C, 150 rpm, pH 5,5...6, timp de 7 zile, debit aer 1 l aer/l mediu/h. Mediu de  
42 cultură este similar cu cel de la obținerea inoculului, dar suplimentat cu extract porumb (sub-  
43 stanță uscată 40%).

44 5. Separarea miceliului obținut prin centrifugare la 4000...5000 rpm 15 min; se aruncă  
45 supernatantul.

46 6. Realizarea extractelor se realizează astfel: 10% miceliu proaspăt este supus extrac-  
47 ției cu un amestec apă distilată purificată:glicerol:etanol (1:1:1) pentru extractul hidroglicero-  
48 alcoolic și cu un amestec etanol:glicerol (2:1) pentru extractul gliceroalcoolic. Extracția are  
49 loc timp de 10 zile, 150 rpm la rece (4...9°C) într-un agitator cu răcire.

# RO 128598 B1

7. Separarea miceliului supus extracției obținut prin filtrare sub vid. 1
8. Înlăturarea alcoolului și apei din cele două tipuri de extracte într-un rotavapor prevăzut cu controler de vid, în sistem de evaporare paralel. 3
9. Extractele se introduc în etuvă la 65°C, până la înlăturarea completă a alcoolului rămas, și se păstrează la rece. 5
10. Pentru demonstrarea efectului antioxidant, s-au realizat următoarele determinări din cele două tipuri de extractele finale: capacitatea de inhibare a radicalului DPPH, putere de reducere, cantitatea totală de fenoli și flavonoide. 7
- Experimentul 1 - extractul hidroglicerolcoolic: 9
- S-au utilizat trei tulpini de *P. ostreatus*, iar în urma protocolului prezentat s-au obținut următoarele randamente de extracție: *P. ostreatus* M2191 (39,65 ± 2,69%) > *P. ostreatus* PBS281009 (11,35 ± 4,33%) > *P. ostreatus* PQMZ91109 (9,45 ± 1,6%). 11
- Activitatea antioxidantă exprimată sub forma inhibării radicalului DPPH a fost de 51,85 ± 0,6% pentru *P. ostreatus* M2191, 47,91 ± 1,6% pentru *P. ostreatus* PQMZ91109 și 44,37 ± 3,59% pentru *P. ostreatus* PBS281009. 13
- În cazul puterii de reducere, care reprezintă un indicator al capacității antioxidante a unui extract, s-au obținut următoarele rezultate: 1,82 ± 0,55 pentru *P. ostreatus* M2191, 1,59 ± 0,7 pentru *P. ostreatus* PQMZ91109 și 1,18 ± 0,36 pentru *P. ostreatus* PBS281009. 17
- Ordinea descrescătoare a cantității (mg quercetină/g extract) de flavonoide a fost următoarea: *P. ostreatus* PBS281009 (77,1 ± 0,58) > *P. ostreatus* M2191 (74,7 ± 1,55) > *P. ostreatus* PQMZ91109 (59,25 ± 0,41). De asemenea, conținutul total de polifenoli (mg gallic acid/g extract) a avut următoarea ordine: 42,54 ± 2,53 (*P. ostreatus* M2191) > 36,24 ± 1,01 (*P. ostreatus* PBS281009) > 31,86 ± 312 (*P. ostreatus* PQMZ91109). Ordinea a fost direct proporțională cu randamentul de extracție. Diferențele obținute sunt interpretate prin faptul că extractul hidroglicerolcoolic din *P. ostreatus* M2191 conține și alți compuși cu efect antioxidant (acid ascorbic și/sau α - tocoferol). 21
- Experimentul 2 - extractul glicerolcoolic: 23
- S-au utilizat trei tulpini de *P. ostreatus*, iar în urma protocolului prezentat s-au obținut următoarele randamente de extracție: *P. ostreatus* M2191 (28,37 ± 1,05%) > *P. ostreatus* PQMZ91109 (25,22 ± 2,4%) > *P. ostreatus* PSI101109 (5,28 ± 2,0%). 25
- Activitatea antioxidantă exprimată sub forma inhibării radicalului DPPH a fost de 87,4 ± 3,03% pentru *P. ostreatus* M2191, 47,22 ± 2,68% pentru *P. ostreatus* PQMZ91109 și 44,37% pentru *P. ostreatus* PSI101109. 27
- În cazul puterii de reducere, care reprezintă un indicator al capacității antioxidante al unui extract, s-au obținut următoarele rezultate 1,33 ± 0,1 pentru *P. ostreatus* M2191, 1,00 ± 0,05 pentru *P. ostreatus* PQMZ91109 și 1,13 ± 0,21 pentru *P. ostreatus* PSI101109. 29
- Ordinea descrescătoare a cantității (mg quercetină/g extract) de flavonoide a fost următoarea: *P. ostreatus* PQMZ91109 (61,8 ± 2,31) > *P. ostreatus* M2191 (34,5 ± 3,4) > *P. ostreatus* PSI101109 (12,00 ± 0,88). De asemenea, conținutul total de polifenoli (mg acid galic/g extract) a avut următoarea ordine: 47,3 ± 3,53 (*P. ostreatus* M2191) > 32,36 ± 3,1 (*P. ostreatus* PQMZ91109) > 5,88 ± 1,3 (*P. ostreatus* PSI101109). Ordinea a fost direct proporțională cu randamentul de extracție. Diferențele obținute sunt interpretate prin faptul că extractul hidroglicerolcoolic din *P. ostreatus* M2191 conține și alți compuși cu efect antioxidant (acid ascorbic și/sau α - tocoferol), dar și prin faptul că principalul responsabil de efectul antioxidant îl reprezintă componenta fenolică. 31
- 33
- 35
- 37
- 39
- 41
- 43
- 45

## Revendicări

1

3

5

7

9

11

13

1. Procedeu de obținere a unui extract hidroglicerolalcoolic și, respectiv, a unui extract glicerolalcoolic, cu efect antioxidant, din miceliul ciupercii *Pleurotus ostreatus* obținut prin cultivare submersă, în sistem discontinuu, la nivel de bioreactor, **caracterizat prin aceea că se revitalizează miceliul de *Pleurotus ostreatus* folosind boabe de orz colonizate cu acest miceliu**, se obține un inocul și se cultivă în sistem discontinuu pe mediu lichid, se separă miceliul proaspăt în fază de creștere prin centrifugare, apoi 10% din miceliul proaspăt astfel rezultat se supune extracției cu un amestec de apă distilată purificată:glicerol:etanol = 1:1:1, în vederea obținerii extractului hidroglicerolalcoolic, sau cu un amestec de etanol:glicerol = = 2:1, în vederea obținerii extractului glicerolalcoolic, timp de 10 zile, la 150 rpm, la 4...9°C, iar în final, miceliul se separă prin filtrare sub vid, se evaporă alcoolul, iar extractele obținute se păstrează la rece.

15

17

19

2. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, în vederea obținerii inoculului, miceliul de *Pleurotus ostreatus* se revitalizează dintr-o cultură pe boabe de orz menținută la -80°C, în glicerol 20%, boabele de orz cu miceliu dezvoltat pe suprafața lor se așează pe mediu PDA din cartofi, dextroză și agar, iar după dezvoltarea miceliului, se adaugă câteva boabe de orz sterilizate, după 3...5 zile obținându-se boabe acoperite cu miceliu care vor servi la inocularea mediului lichid de obținere a inoculului.

21

23

3. Procedeu conform revendicării 2, **caracterizat prin aceea că** se inoculează mediul lichid care cuprinde glucoză, extract de malț, extract de drojdie,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , la 25°C, 150 rpm, pH 5,5...6, timp de 7...10 zile.

25

4. Procedeu conform oricăreia dintre revendicările de la 1 la 3, **caracterizat prin aceea că** se realizează cultivarea în sistem discontinuu la nivel de bioreactor în aceleași condiții și într-un mediu cu compoziție similară celui din faza de inocul, dar suplimentat cu extract de porumb.

