



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

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

(22) Data de depozit: **21.08.2012**

(41) Data publicării cererii:
30.07.2013 BOPI nr. 7/2013

(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) **REALIZAREA DE PREPARATE GLICEROALCOOLICE ȘI
HIDROGLICEROALCOOLICE CU EFECT ANTIOXIDANT DIN
MICELIULPLEUROTUS OSTREATUS**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unui extract hidrogliceroalcoolic și a unui gliceroalcoolic, asemănător preparatelor gemoterapice, cu efect antioxidant, din miceliul proaspăt al ciupercii *Pleurotus ostreatus*, obținut prin cultivare submersă în bioreactor. Protocolul conform invenției presupune extracția unui amestec de 10 g miceliu/ 100 ml solvent, timp de 10 zile, agitare la 150 rpm, la o temperatură

cuprinsă în intervalul 4...9°C, cu un amestec apă distilată purificată:glicerol:etanol (1:1:1) - extract hidrogliceroalcoolic și etanol:glicerol (2:1) - extract gliceroalcoolic, urmat de separarea miceliului prin filtrare sub vid, și a alcoolului prin evaporare, extractele obținute fiind păstrate la rece.

Revendicări: 4



DESCRIEREA INVENȚIEI

Realizarea de preparate gliceroalcoolice și hidrogliceroalcoolice cu efect antioxidant din miceliul *Pleurotus ostreatus*

Invenția se referă la obținerea unor preparate gliceroalcoolice și hidrogliceroalcoolice cu activitate antioxidantă semnificativă din miceliul proaspăt al ciupercii *Pleurotus ostreatus*. Se utilizează miceliu proaspăt, în fază de creștere, separate fără nici o prelucrare după obținerea lor prin cultivare în mediu submers.

Astfel de preparate sunt similar celor gemoterapice care au o largă utilizare în medicina alternativă celei alopate, în scopul lărgirii gamei de produse cu efect antioxidant ce poate fi utilizat ca și supliment nutritiv. Comparativ cu fitoterapia, ce utilizează planta matură 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 principia biologic active. S-a demonstrat, de asemenea, că unii compuși sunt prezenți exclusive în aceste tip de țesuturi și/sau în muguri.

Obținerea unor produse naturale ușor de realizat care au un conținut ridicat al principiilor active (în general fitocompauziți), reprezintă o tendință actuală de cercetare. Metabolismul uman ca urmare al stilului actual de viață și poluării produce o serie de radicali liberi cu efecte negative semnificative asupra sănătății umane. Radicalii liberi sunt implicați cel mai frecvent în apariția cancerului, boli neurodegenerative și cardiovasculare. În cazul ciupercilor principalul component cu efect antioxidant îl reprezintă compușii fenolici, flavonoidele, carotenoizii (licopenul și β -carotenu), acidul ascorbic, precum și diferiți tocoferoli.

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



Rector USAMV București Prof. Univ. Dr. Cimpeanu Sorin Mihai

Sef lucrari dr. Vamanu Emanuel

Comparativ cu cererea de brevet a 2010 00498 din 8.06.2010, care propune pe lângă părți meristematice din trei plante și butonii a trei ciuperci comestibile (*Agaricus bisporus*, *P. ostreatus*, *Lentinula edodes*), prezenta invenție propune o extracție din miceliul proaspăt de *P. ostreatus*. Deoarece obținerea de ciuperci în vederea folosirii la extracte cu efect antioxidant durează o perioadă lungă de timp și necesită etape laborioase și condiții speciale, utilizarea miceliului reprezintă o alternativă. Cultivarea miceliului ciupercilor comestibile (cu proprietăți 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 realiza fermentații identice, într-un număr infinit, prin păstrarea unor condiții identice de cultivare.

Etapele prezentei invenții constau în următoarele etape:

1. Revitalizarea culturii (miceliului) de *P. ostreatus* din cultura pe boabe de orz de la -80°C , în glicerol 20%. Boabele de orz cu miceliu dezvoltat pe suprafața lor se pune cu o pensetă sterilă pe mediu PDA (cutie Petri). Compoziția mediului PDA (potato dextrose agar) este: soluția rezultată de la fierea a 200 g cartofi curățați și tăiați în bucați la 1000 ml apă, 2% glucoză și 2% agar;
2. După dezvoltarea miceliului se adaugă câteva boabe de orz sterilizate prin autoclavare pentru a se putea dezvolta miceliu pe suprafața lor. După 3 – 5 zile, boabele acoperite cu miceliu vor servi la inocularea mediului lichid de obținere a inoculului;
3. Obținerea inoculului prin cultivarea în flacoane Erlenmeyer, cu 300 ml mediu într-un flacon de 500 ml capacitate totală. Mediul de cultură conține (g/litru): 6 g glucoză, 100 g extract de malt, 20 g extract de drojdie, 1 g KH_2PO_4 , 0.5 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Condițiile de cultivare sunt: 25°C , 150 rpm, pH 5.5 – 6, timp de 7 – 10 zile.
4. Cultivare în sistem batch la nivel de bioreactor, volum util 4 litri. Condițiile de cultivare sunt: 25°C , 150 rpm, pH 5.5 – 6, timp de 7 zile, debit aer 1 litru aer/l mediu/oră. Mediu de cultură este similar cu cel de la obținerea inoculului, dar suplimentat cu extract porumb (substanță uscată 40%).
5. Separarea miceliului obținut prin centrifugare la 4000 - 5000 rpm 15 minute; se aruncă supernatantul.

Rector USAMV Bucuresti-Prof. Univ. Dr. Cimpeanu Sorin Mihai



Se lucrați dr. Vamanu Emanuel

6. Realizarea extractelor se realizează astfel: 10% miceliu proaspăt este supus extracției cu un amestec apă distilată purificată:glicerol:etanol (1:1:1) pentru extractul hidroglicerolalcoolic și cu un amestec etanol:glicerol (2:1) pentru extractul glicerolalcoolic. Extracția are loc timp de 10 zile, 150 rpm la rece (4 – 9°C) într-un agitator cu răcire.
7. Separarea miceliului supus extracției obținut prin filtrare sub vid.
8. Înlăturarea alcoolului și apei din cele două tipuri de extracte într-un rotavapor prevăzut cu controler de vid, în sistem de evaporare paralel.
9. Extractele se introduc în etuvă la 65°C, până la înlăturarea completă a alcoolului rămas și se păstrează la rece.

Pentru demonstrarea efectului antioxidant s-au realizat următoarele determinări din cele două tipuri de extracte finale: capacitatea de inhibare a radicalului DPPH, putere de reducere, cantitatea totală de fenoli și flavonoide.

Experimentul 1 – extractul hidroglicerolalcoolic:

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%).

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.

În cazul puterii de reducere, care reprezintă un indicator al capacității antioxidante al 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.

Ordinea descrescătoare a cantității (mg quercitină/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±3.12 (*P. ostreatus* PQMZ91109). Ordinea a fost direct proporțională cu randamentul de extracție. Diferențele obținute sunt interpretate prin faptul că

Rector USAMV București Prof. Univ. Dr. Ciâmpeanu Sorin Mihai



Sef lucrări dr. Vamanu Emanuel



extractul hidrogliceroalcoolic din *P. ostreatus* M2191 conține și alți compuși cu efect antioxidant (acid ascorbic și/sau α – tocoferol).

Experimentul 2 – extractul gliceroalcoolic:

S-au utilizat trei tulpini de *P. ostreatus* iar în urma protocolului prezentat s-au obținut următoarele randamente de extracție: *P. ostreatus* M2191 ($28.37 \pm 1.05\%$) > *P. ostreatus* PQMZ91109 ($25.22 \pm 2.4\%$) > *P. ostreatus* PSI101109 ($5.28 \pm 2.0\%$).

Activitatea antioxidantă exprimată sub forma inhibării radicalului DPPH a fost de $87.4 \pm 3.03\%$ pentru *P. ostreatus* M2191, $47.22 \pm 2.68\%$ pentru *P. ostreatus* PQMZ91109 și 44.37% pentru *P. ostreatus* PSI101109.

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.

Ordinea descrescătoare a cantității (mg quercitină/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 hidrogliceroalcoolic 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.



Rector USAMV Bucuresti Prof. Univ. Dr. Cimpeanu Sorin Mihai

Sef lucrari dr. Vamanu Emanuel

Documente din stadiul invenției:

1. Fernando Pitera, Compendiu de gemoterapie clinica, Ed. Fundației Creștine de Homeopatie SIMILE Constanța, România.
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.
3. Chirinang P., Intarapichet K.O., 2009, Amino acids and antioxidant properties of the oyster mushrooms, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju*, ScienceAsia, 35, 326–331.
4. Akindahunsi A.A., Oyeyayo F.L., 2006, Nutrient and antinutrient distribution of edible mushroom, *Pleurotus tuber-regium* (fries) singer, LWT Food Science and Technology, 39, 548–53.
5. Cerere brevet a 2010 00498/8.06.2010, Procedeu de obținere a unui preparat gemoterapic pe bază de plante și ciuperci, Ianculov I., Butău D., Ciulcă S., Palicina R.D., Cucu M., Franț A.
6. http://en.wikipedia.org/wiki/Potato_dextrose_agar
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, 47–49.
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.
9. Militaru A.V., Simedrea I., Alexoi I., Peev C., Bernad E., Toma C.C., 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.
10. Saman 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.



Rector USAMV Bucuresti Prof. Univ. Dr. Cimpeanu Sorin Mihai

Șef lucrari dr. Vamanu Emanuel

11. Vamanu E., Influence of total phenols content on the antioxidant capacity in hydroglyceroalcoholic extracts from fresh *Pleurotus ostreatus* mycelium, Proceeding XXVIth International Conference on Polyphenols, Florența, Italia, 23 – 26 Iulie, 2012.
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 13th International Congress of the Society for Ethnopharmacology, Graz, Austria, 2 – 7 septembrie, 2012.
13. Vamanu E., 2012, *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of ethanolic extract of lyophilized mycelium of *Pleurotus ostreatus* PQMZ91109, *Molecules*, 17, 3653-3671.



Rector USAMV Bucuresti Prof. Univ. Dr. Cimpeanu Sorin Mihai

Sef lucrari dr. Vamanu Emanuel

REVENDICARE

Obținerea de preparate gliceroalcoolice și hidrogliceroalcoolice din miceliul prospăt de *P. ostreatus* cultivat în sistem batch cuprinde următoarele etape descrise mai sus:

1. Revitalizarea miceliului crescut pe boabe de orz.
2. Obținerea inoculului la flacoane Erlenmeyer.
3. Obținerea miceliului prin cultivare în bioreactor în sistem batch.
4. Obținerea extractelor hidrogliceroalcoolice și gliceroalcoolice.



Rector USAMV Bucuresti Prof. Univ. Dr. Cimpeanu Sorin Mihai

Sef lucrari dr. Vamanu Emanuel