



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2012 00504

(22) Data de depozit: 10.08.2011

(41) Data publicării cererii:
30.04.2014 BOPI nr. 4/2014

(62) Divizată din cererea:
Nr. a 2011 00806

(71) Solicitant:
• **ȚULUCA ELISAVETA-VALERIA**,
STR.FRAȚII FĂGĂRĂȘANU NR.38,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• **BIRIȘ IOVU-ADRIAN**, STR.VIDIN NR.12,
BL.58 BIS, SC.A, ET.3, AP.13, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **IVANA SIMONA**,
STR.ȘERBAN GHEORGHE NR.93,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• **CHIRA DĂNUȚ**, STR.LUNGĂ NR.54,
BRAȘOV, BV, RO;
• **ȘERBĂNESCU OCTAVIAN- VALENTIN**,
STR.IZVORUL OLTULUI NR.2, BL.25, SC.A,
ET.3, AP.12, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO

(72) Inventatori:
• **ȚULUCA ELISAVETA-VALERIA**,
STR.FRAȚII FĂGĂRĂȘANU NR.38,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• **BIRIȘ IOVU-ADRIAN**, STR.VIDIN NR.12,
BL.58 BIS, SC.A, ET.3, AP.13, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;
• **IVANA SIMONA**,
STR.ȘERBAN GHEORGHE NR.93,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• **CHIRA DĂNUȚ**, STR.LUNGĂ NR.54,
BRAȘOV, BV, RO;
• **ȘERBĂNESCU OCTAVIAN- VALENTIN**,
STR.IZVORUL OLTULUI NR.2, BL.25, SC.A,
ET.3, AP.12, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B,
RO

(54) PRODUSE BIOPROTECTIVE DIN CIUPERCI ȘI PROCEDEE
PENTRU OBTINEREA ACESTORA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu pentru obținerea unor produse bioprotective pe bază de micromicete din genul *Pleurotus*, cu utilizare ca suplimente funcționale și/sau energizante. Procedeele conform invenției constă din fracționarea, în etape succesive, a micromicetelor în solvenți cu polaritate diferențială, la o umiditate a ciupercilor de minimum 75%, din care se obțin un prim produs bioprotectiv lipofil, integrat în proteine deshidratate din zer, într-un raport de 1:5...10, având o dimensiune a particulelor de 20...40 μm, 90...92% substanță uscată, 75...78% proteină brută în s.u.,

1,1...1,3% cenușă brută în s.u., 0,6...1,1% grăsime brută în s.u., 0,5...1,2% fenoli totali în s.u., și un al doilea produs bioprotectiv hidrofil, din reziduu remanent, încorporat pe maltodextrine, având o dimensiune a particulelor de 10...17 μm, cu un conținut de substanță uscată de 92...94%, polizaharide biologic active de 2...4%, fenoli totali 0,2...0,4% în s.u., proteină brută 10...12% în s.u., cenușă brută 1,2...1,8% în s.u., maltodextrine 60...65% în s.u.

Revendicări: 2



Divizionar din CBI a 2011 00806

5.

OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 212 00504
Data depozit 10.08.2011

Produse bioprotective din ciuperci și procedee pentru obținerea acestora

Invenția se referă la produse obținute din ciuperci și la procedee pentru obținerea acestora care au o acțiune antitumorală, antiinflamatoare, anticolesterolemică, antireumatismală și energizantă.

Se cunosc numeroase specii de macromycete (ciuperci) care s-au impus ca resurse de hrană cu însușiri nutritive și senzoriale deosebite, precum și ca remedii energizante de stimulare fizică și neuronală și de contracarare a numeroase afecțiuni.

Progresele recente înregistrate de științele viului, dintre care amintim nutrigenomica, metabolomica, transcriptomica, și proteomica, au permis o mai bună cunoaștere a mecanismelor de stimulare a funcțiilor biologice, de către o categorie largă de compuși naturali localizați în ciuperci, cum ar fi ergosteroli, terpenoide, acizi ganoderici, lanostanoide, polizaharide imunomodulatoare α și β glucanice și proteoglicanii.

Întrucât bioprotecția antioxidantă imunomodularea și contracararea unor afecțiuni, ca de exemplu a tumorilor, a bolilor degenerative, a sindromului metabolic –(Mts)-, sunt corelate cu nivelele de regăsire a unor fitochimicale din structurile fungice, utilizarea rațională a macromycetelor necesită disponibilizarea și concentrarea compușilor bioactivi din matricea organică.

În funcție de variantele de procesare, selectate sub aspectul parametrilor tehnologici și a sistemelor de solvatare și concentrare pot fi obținute remedii cu acțiune fitoterapeutică selectivă.

Actualele descoperiri ale unor științe de frontieră ca nutrigenomica, transcriptomica sau metabolomica, au focalizat atenția asupra potențialului terapeutic al macromycetelor sub aspectul multitudinii de compuși bioactivi cu potențial de prevenire și tratament a numeroase afecțiuni.

Concomitent, dovedirea și explicitarea la nivel molecular a potențialului de interacțiune a unor constituenți naturali din ciuperci, asupra expresiei unor gene

implicate în echilibrarea homeostatică, în stimularea energetică sau în proliferarea tumorală s-au concretizat în utilizarea pe scară largă a macromycetelor, ca resursă primară de obținere, a numeroase sortimente alimentare și/sau alimente funcționale.

Aceste produse sunt în prezent extinse la nivel global de către firme multinaționale, care realizează prin comercializarea acestora profituri substanțiale. În acest sens prezintă semnificație și varietatea procedeele de procesare a macromycetelor din componența remediilor de acest tip oferite în prezent pe piața internațională.

Procedeele uzuale la nivel industrial de prelucrare a macromycetelor sub forma unor produse stabilizate, vizau deopotrivă nutrienții din categoria proteinelor și a aminoacizilor, a fibrelor solubile și a aromatizanților specifici, cât și a metaboliților secundari, bioactivi, cu potențial fitoterapeutic.

Astfel din brevetele J.P. 9173012. și U.S. 5780097 se cunosc procedee de extracție exclusivă a unor ciuperci uscate și pulverizate cu apă caldă, concentrarea extractului și mixarea pe suport de maltodextrine, urmată de uscarea prin atomizare.

De asemenea, din brevetul J.P. 60186260 se cunoaște un procedeu pentru obținerea unui extract cu o capacitate medie de aromatizare, prin extracție cu apă caldă (60-100°C), timp de 6-48 h, după care extractul concentrat este mixat cu ciclodextrine în proporție de 1/0,5...5.

Brevetul J.P. 7313089 descrie un procedeu de extracție atât a corpului fructifer, cât și a fructificațiilor cu apă caldă sau etanol, urmată de mixarea pe maltodextrine și uscare prin pulverizare .

De asemenea, din brevetul J. P. 4248531 se cunoaște o metodă de producere a extractelor utilizate în patiserie prin extracția și mixare a 17 părți de sare cu 100 părți extract.

Un alt brevet din domeniu JP 58081757 descrie obținerea „esenței de ciuperci” fără degradarea valorii nutriționale, prin extracția lentă cu apă, cu adaos de acizi, vitamina C, emulgatori, agenți de chelatare, extracție alcalină și tratamente enzimatice.

Din același domeniu al produselor, brevetul JP. 200004829 descrie un extract de ciuperci aromat care cuprinde 3-6% ciuperci din genul *Avalis*, 0,8-1,2%

Agaricus, 3-6% *Ganoderma lucidum*, cu adaos optimal de vitamine, extract de usturoi, etc. care poate fi utilizat pentru prepararea de alimente funcționale

Brevetul CN 121782 descrie un extract din ciuperci de pin, cu aromă puternică obținut cu apă caldă, care în continuare este mixat cu amidon, uscat la 80°C și granulat.

Brevetul KR 9810887 un produs din ciuperci obținut prin procesarea ciupercilor prin uscare la 80-100°C, timp de 1 ...3h și pulverizate, pulberea este extrasă cu apă caldă și eter, concentrată și uscată, extractul fluid sau solid, poate fi adăugat în alimente, ca de exemplu, biscuiți în proporție de 1-5%, băuturi 20-50%, produse zaharoase 1-5%.

În brevetul CT 1096931, Chim C.J. este descrisă utilizarea porțiunii de susținere a ciupercilor mai puțin digestibilă prin înmuierea a acestei porțiuni într-o soluție acidulată la pH = 4-5, timp de 1-1,5 h și apoi transferul într-o soluție alcalină la pH=9-10 care este ulterior neutralizată, fracțiunea lichidă se îndepărtează prin presare, se mixează cu 8... 10% sare se usucă la 50-55°C, timp de 50-70 minute, se presează din nou pentru a reduce conținutul în apă 20-25%, după care urmează o etapă de uscare finală la limite care asigură o stabilitate optimă.

Soluțiile cunoscute din stadiul tehnicii prezintă dezavantajul prelucrării într-un grad redus a materiei prime și a lipsei explicitării în detaliu a condițiilor extractive și de stabilizare a aromelor.

În acest sens, se cunosc procedee de distilare a compușilor volatili pentru acumularea unor compuși aromatici de tipul octen-3 ol, și încapsularea aromei cu 25% amidon și 1,3% pectină.

De asemenea, este cunoscut faptul că extrudarea unor ciuperci cu un conținut mare în fibre, ca de exemplu *Ganoderma lucidum* cu un conținut ridicat în substanță uscată. se realizează cu adaosul de făină de grâu obținându-se paste comercializate cu denumiri specifice, ca de exemplu „shitake flors”.

Se cunosc, de asemenea preparate pe bază de ciuperci utilizate ca suplimente alimentare prin înlocuirea parțială a făinii de grâu cu pulbere de ciuperci, de exemplu: cu pulbere de *Portabella* 20%, pudră de ciuperci *Pleurotus ostreatus*, proteine hidrolizate din soia și pudră de orez.

Este cunoscu faptul că tendințele actuale se concretizează pe obținerea de produse cu nivel mai precis conturat al categoriilor de compuși naturali sub

aspectul beneficiilor sanogene, aspect favorizat de progresele realizate în privința caracterizării și decelării de noi compuși bioactivi prin tehnologii analitice performante. Această abordare este susținută prin lucrări științifice de largă extindere prin care se evidențiază corelația dintre structurile naturale disponibilizate din diferitele specii de macromycete și potențialul lor de interacțiune asupra funcțiilor fiziologice ale organismului uman.

Deși, alături de produsele fungice, cu un nivel înalt de purificare și potențial sanogen de acțiune delimitat prin doze precis circumscrise, coexistă și se comercializează doar pulberi din ciuperci deshidratate ca atare, sau amestecuri din pulberi provenite din diferite specii de ciuperci pentru a realiza efecte sinergice, tendința predominantă este de a disloca și concentra selectiv compușii bioactivi cu destinații specifice în tratamentul diferitelor afecțiuni.

În acest sens se cunosc procedee de fracționare care vizează categorii de compuși dovediți prin teste a reprezenta alternative viabile față de medicina alopatică, cum ar fi: fracționarea ciupercii *Ganoderma lucidum* în cloroform pentru dislocarea de compuși antioxidanți și anticolesterolemici; izolarea și caracterizarea compușilor amari din *Ganoderma lucidum*, respectiv a terpenoidelor înalt oxigenate, lanostanoidelor, triterpenoidelor, 32-metil și 26-oxosteroli în solvenți organici în diferite amestecuri compoziționale de cloroform, acetat de etil și hexan, precum și utilizarea acestor fracțiuni în terapiile antitumorale, izolarea și identificarea a numeroși compuși bioactivi din ciuperci alimentare și terapeutice ca atare dar și din culturile submerse micelare în agenți solvolitici cu polaritate diferențiată, alături de solvenți organici, solvenți polari hidrofili, apă, alcalii sau solvenți cu polaritate medie, ca de exemplu acetona, care pot concentra compuși cu puternice însușiri de imunomodulare în solvenți lipofili, din categoria acizilor ganoderici și a terpenoidelor, dar și solvenții hidrofili pot solubiliza polizaharide cu potențial antioxidant și imunomodulator deosebit, ca de exemplu: structuri de tipul alfa și beta (1,3) – D- glucanilor sau proteoglicani, deasemenea, imunomodulatori.

Este cunoscut faptul că aria de utilizări a diferitelor fracțiuni este foarte extinsă preferându-se însă remediile din ciuperci cu acțiune antitumorală, antiinflamatoare, anticolesterolemice, antireumatismale și remediile energizante și revigorante, care au la bază și acumularea elementului chimic germaniu care

intensifică consumul de oxigen la nivelul mitocondriilor și, deci sporirea rezistenței organismului la eforturi fizice și stres.

Soluțiile menționate mai sus prezintă dezavantajul unor detalieri reduse a parametrilor de procesare extractivă, categoriile cele mai relevante de solvenți, stabilizarea eficientă a compușilor prioritari pentru un anume efect bioprotectiv care sunt de mare importanță în special în cazul unor domenii de utilizare pentru care medicina alopatică nu poate oferi produse corespunzătoare și sub aspectul lipsei de efecte secundare nedorite.

Din lucrarea „Advances în Mushroom Research, in the Last Decade” se cunoaște un procedeu de fracționare a diferitelor macromycete cu obținerea unor extracte concentrate în componenți cu activitate fiziologică distinctă pentru utilizări specifice cu indicarea solvenților care dislocă selectiv compușii bioactivi, etapele de bază fiind extracția și încorporarea pe suporturi, deopotrivă a extractelor provenite din ciupercile dezvoltate în condiții aerobe, cât și miceliile dezvoltate în culturi submerse.

De asemenea, din brevetul US 2001/0016197 se cunoaște un procedeu de extracție a compușilor anticolesterolemici din ciuperca *Pleurotus ostreatus*, respectiv a lovostatinului, extractantul fiind acetatul de etil sau etanolul.

Brevetul US 20040029955, prezintă procedee diferite de extracție a unui remediu a unei afecțiuni complexe, respectiv a angiogenezei, de proliferare masivă a capilarelor sanguine în cazul bolilor autoimune sau ca urmare a dezvoltării de tumori, care produce leziuni ireversibile a țesuturilor sanguine, respectiv a epitelului vascular.

Soluțiile din stadiul cunoscut al tehnicii prezentate mai sus prezintă dezavantajele obținerii unor produse alimentare și/sau terapeutice instabile și având conținut în substanțe active redus. De asemenea soluțiile cunoscute nu descriu procedee care să realizeze epuizarea biomasei fungice, atât în compuși hidrofili, cât și în compuși hidrofobi, în etape consecutive.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă din elaborarea unor condiții tehnice de procesare integrală a unor macromycete cu menținerea compușilor și stereostructurilor bioactive având utilizări terapeutice preventive și curative selective care asigură bioprotecție.

Produsul terapeutic, conform invenției, elimină dezavantajele menționate prin aceea că este constituit din substanță uscată 92...94%, polizaharide biologic

active α și β glucanice 2...4% în s.u., fenoli totali 0,2...0,4% în s.u., proteină brută 10...12% în s.u., cenușă brută 1,2...1,8% în s.u., maltodextrine 60...65% în s.u.

Produsul nutritiv, conform invenției, elimină dezavantajele menționate prin aceea că este constituit din substanță uscată 90...92%, proteine brută în s.u. 75...78%, cenușă brută în s.u. 1,2...1,5%, grăsime brută 0,5...0,9% în s.u., fenoli totali 1,2...1,8% din s.u.

Fertilizantul, conform invenției, elimină dezavantajele menționate prin aceea că are în componență 7,5...16, 5% substanțe organice de tip proteine, albumine, alte substanțe azotate, 1...3% glucide, 0,5...1% lipide, 0,5% acizi organici, enzime, vitamine, uleiuri eterice, 0,5...1,5% săruri minerale, raportate la 100 g substanță uscată.

Procedul de obținere a produsului terapeutic conform invenției, elimină dezavantajele menționate prin aceea că materia primă constând din ciuperci din speciile *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum* și *Coriolus versicolor*, se condiționează prin îndepărtarea impurităților și spălarea prin pulverizare, se feliază la dimensiuni de 0,5...2 cm, se supun într-o primă etapă fracționării în solvenți organici nemiscibili de tip cloroform și/sau acetat de etil cu apă la un raport de 1:4...1:8 și cu acid ascorbic 0,5%, după care se micronizează la dimensiuni de 20...30 microni, se extrag la temperatura ambiantă timp de 2,5...4 h, se presează și se separă prin centrifugare din care rezultă o biomasă fungică reziduală, precum și o fază organică care în continuare se distilă în vid la 40⁰ C, rezultând o biomasă ceroasă, lipofilă, cu un conținut de fitochimicale bioprotective, de tip ergosteroli, oxosteroli, lanostanoide, mono și triterpene, sesquiterpene, acizi ganoderici, glicozide sterolice, ergothioneină, taninuri, polifenoli, lipide care se omogenizează prin pulverizare pe proteine deshidratate din zer, în proporție de 1:5...1:10, constituind un produs sub formă pulverulentă de culoare bej-maronie, cu o granulație 20...40 microni, care se condiționează sub formă de gelule de 0,5 grame sau sub formă de flacoane de 50-100 grame, având acțiune energizantă, termogenă, antitumorală, antiinflamatoare, anticolesterolemică, antiobezogenă.

Procedul de obținere a produsului nutritiv conform invenției, elimină dezavantajele menționate prin aceea că materia primă constând din ciuperci din speciile *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum* și *Coriolus versicolor*,...se condiționează prin îndepărtarea impurităților și spălarea prin pulverizare, se

feliază la dimensiuni de 0,5...2cm, se supun într-o primă etapă fracționării în solvenți organici nemiscibili de tip cloroform și/sau acetat de etil cu apă la un raport de 1:4...1:8 și cu acid ascorbic 0,5%, se micronizează la dimensiuni de 20...30 microni, se extrag la temperatura ambiantă timp de 2,5...4 h, se presează și se separă prin centrifugare din care rezultă o fază organică și o biomasă fungică reziduală care se supune unei extracții în mediul hidrofili, pentru a solubiliza în continuare compușii bioactivi polari din categoria polizaharidelor, a glicozidelor fenolice și a proteoglicanilor la un raport de 1:6...1:8 biomasă umedă: soluție hidroetanolică de 50%, timp de 2,5...4 h, la temperatura ambiantă, urmată de o presare și centrifugare, rezultând o biomasă reziduală, precum și un extract hidroetanolic având un conținut de polizaharide α -(1,3)- Δ glucanice cu legături structurate (1,6). care se reunește cu extractul alcalin rezultat din prelucrarea biomasei reziduale, urmează uscarea acestora prin atomizare pe suport de maltodextrine și obținerea unui produs nutritiv sub formă pulverulentă de culoare bej cu granulația de 10...17 microni, care se condiționează sub formă de comprimate de 1...2 grame sau în flacoane.

Procedeul de obținere a fertilizantului, conform invenției, elimină dezavantajele menționate prin aceea că materia primă constând din ciuperci din speciile *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum* și *Coriolus versicolor*,...se condiționează prin îndepărtarea impurităților și spălarea prin pulverizare, se feliază la dimensiuni de 0,5...2cm, se supun într-o primă etapă fracționării în solvenți organici nemiscibili de tip cloroform și/sau acetat de etil cu apă la un raport de 1:4-1:8 și cu acid ascorbic 0,5%, se micronizează la dimensiuni de 20-30 microni, se extrag la temperatura ambiantă timp de 2,5-4 h, se presează și se separă prin centrifugare din care rezultă o fază organică și o biomasă fungică reziduală care se supune unei extracții în mediul hidrofili, pentru a solubiliza în continuare compușii bioactivi polari din categoria polizaharidelor, a glicozidelor fenolice și a proteoglicanilor la un raport de 1:6-1:8 biomasă umedă: soluție hidroetanolică de 50%, timp de 2,5-4 h, la temperatura ambiantă, urmată de o presare și centrifugare, rezultând un extract hidroetanolic, precum și o biomasă reziduală care se supune unei extracții în mediul alcalin, cu adaos de bicarbonat de amoniu la pH = 9...10 pentru a finaliza extracția, prin scindarea complementară a legăturilor intermoleculare a beta - (1,3) - D glucanilor structurați cu legături (1,6), din care rezultă un extract alcalin și o masă reziduală care este

condiționată prin uscare, din care rezultă un produs având caracteristici de utilizare ca premix furajer sau fertilizant organic

Instalația, pentru aplicarea procedeelor conform invenției, elimină dezavantajele menționate prin aceea că este alcătuită dintr-o bandă transportoare, un utilaj de spălare, prin pulverizare și barbotare, un dispozitiv de feliere tip ghilotină, o moară coloidală, niște extractoare pentru extracții în sistem integrat pentru extractul organic, pentru extractul etanolic, și respectiv, pentru extractul alcalin, niște prese cu șnec, pentru presarea rezidului consecutiv extracției în solvenți organici, în etanol și în soluție alcalină, niște separatoare centrifugale, pentru separarea fracțiunilor fluide hidrofobe, etanolice și alcaline, un distilator în vid și un omogenizator, pentru concentrarea și impregnarea extractului organic pe proteine deshidratate, precum și un dozator, pentru dozarea produsului terapeutic, un atomizor pentru deshidratarea extractelor reunite, etanolic și alcalin, un dozator pentru formarea produselor sub formă de comprimate.

Prin aplicare invenției se obțin următoarele avantaje:

- prin procesarea substratului fungic ca atare, fără o deshidratare și uscare prealabilă, se reduc pierderile în terpenoidele volatile, iar micronizarea substratului fungic la dimensiuni minimale de 20-30 meshi în moara coloidală facilitează o dislocare avansată a compușilor bioactivi din matricea organică, fără riscurile degradărilor termice.
- procedeul realizează epuizarea biomasei fungice, atât în compuși hidrofilii, cât și în compuși hidrofobi.
- prin fracționarea consecutivă etapizată, respectiv a compușilor hidrofobi în solvenți nemiscibili cu apa, urmată de extracția hidroetanolică, și în final extracția în mediul alcalin moderat, permite individualizarea compușilor nutraceutici în recepturi delimitate specific pentru multiple aplicații;
- prin stabilizarea biomasei ceroase lipofile pe proteine deshidratate din zer în cazul produsului nutritiv se realizează potențarea acțiunii nutraceutice prin mărirea gradului de utilizare a produsului la nivel gastro-intestinal, similar cu incorporarea licopenului pe același tip de proteine.
- utilizarea bicarbonatului de amoniu, ca agent de scindare a legăturilor de hidrogen intramoleculare în polizaharidele de tip β -(1,3)- Δ glucanice conjugate cu legături conduce la eliminarea reactantului alcalin prin formarea compușilor volatili

de CO₂ și NH₃, fără a necesita îndepărtarea în produsul terapeutic a unor compuși de sinteză.

-reziduul final prezintă o structură microporoasă, obținută exclusiv prin operații fizice de difuziune, solvoliză și dislocare a unor compuși, fără remanente de compuși chimici

-reziduul se utilizează ca fertilizant, formator de humus în sol sau ca biomasă microporoasă protejantă față de schimbările de temperatură, de asemenea, în izolații termice, având o densitate minimală per unitate de volum după uscare prealabilă.

-se prelucrează macromycete localizate în spațiul carpatic din flora spontană sau din culturile accesibile cu nivele investiționale convenabile.

-instalația și utilajele sunt sub formă de module integrabile care pot fi adaptate în numeroase alte procedee extractive de procesare a resurselor naturale.

Invențiile se referă la produse nutraceutice din ciuperci de cultură *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus*, *Lentinula edodes* și la ciupercile existente în flora spontană *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum*, *Trametes versicolor*, *Flamulina velutipes*, *Russula*, etc. și vizează cu precădere disponibilizarea extractivă a compușilor bioactivi cu însușiri fitoterapeutice din macromycete, fără a prejudicia structurile moleculare native, precum și situsurile intermoleculare care conferă bioprotecție interactivă față de acțiunea factorilor ambientali cauzatori de stres biotic și abiotic.

Materia primă utilizată pentru obținerea produselor, conform invenției, sunt ciuperci *Lentinula edodes*, *Flamulina velutipes*, *Pleurotus ostreatus*, *Grifola frondosa*, *Ganoderma lucidum*.

Solvenții utilizați în procedeele, conform invenției sunt hidrofobi de preferință hexan și cloroform precum și hidrofili., de preferință metanol, etanol, propanol. Proporțiile extractive sunt de asemenea largi, de la 9/1 la 1/9 preferabil 5/1...1/5, cel mai preferabil 3/1...1/1. De asemenea, timpul de extracție poate varia de la 10 minute la 10 ore. Temperatura poate prezenta variații, de la temperatura camerei, la 100°C. Extracția se poate realiza prin agitare sau refluxare.

Solventul de extracție se îndepărtează cu vacuum, după concentrare, produsul de bază fiind constituit din acid piroglutamic, care se purifică ulterior pe coloane cromatografice de silicagel, alumină, silicat de magneziu, cărbune activ sau celuloză.

Conform procedurii invenției se execută o fracționare etapizată în solvenți cu polaritate diferențiată, respectiv în solvenți organici nemiscibili cu apa preferabil, cloroform sau acetat de etil, prin care se pot disponibiliza extractiv și selectiv, cu precădere compușii lipofilici, iar în etapele ulterioare extracției consecutive cu solvenți polari hidrofilici, respectiv cu etanol de 50% v/v și cu soluții alcaline de bicarbonat de amoniu la pH = 9...10.

În final compușii lipofilici concentrați, de consistență ceroasă se încorporează într-un excipient proteic pulverulent, respectiv în proteinele deshidratate din zer, care asigură o mai bună absorbție la nivelul tractusului gastrointestinal. Rezultă produsul nutritiv, care poate fi integrat în suplimente alimentare și/sau în alimente funcționale cu beneficii pentru sănătate, ca adjuvant recunoscut în prezent pe scară largă în tratamentele anticanceroase, în stoparea inflamațiilor, ca protectiv cardio-vascular, anti-hipertensiv, hepatoprotectiv, de minimizare a sindromului metabolic - (Mts)-.

Produsul nutritiv care cumulează structurile disponibilizate în mediul hidroetanolic și în mediul alcalin se usucă împreună prin atomizare pe suport de maltodextrine. Atomizatele pulverulente prezintă o înaltă solubilitate în apă și pot fi integrate în suplimente alimentare fluide din categoria băuturilor tonice și a siropurilor, de asemenea în produse lactate și zaharoase, produse de patiserie și de panificație, etc.

Structurile solubile de α și β glucani din ciupercile *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum* și *Coriolus versicolor*, se încadrează în categoria „imunomodulatorilor inteligenți” ca alternative naturale în stoparea tumorilor, cu însușiri antiolesterolemice, antiobezogene, protectoare ale endoteliului microcapilarelor sanguine, etc.

Însușirile bioprotective benefice pentru sănătate ale extractelor din macromycete impun procesări la nivele minimale de temperatură. În acest sens, conform procedurii invenției biomasa fungică se introduce la procesare în stare umedă, eliminând etapele de uscare, preconizate în alte procedee. Se elimină astfel, distrucția compușilor labili termic, precum și a unor compuși volatili de aromă. De asemenea, micronizarea substratului în moara coloidală, facilitează o dislocarea mai avansată a compușilor bioactivi din matricea organică, elimină aportul termic și scurtează timpul de extracție.

Adaosul de acid ascorbic (0,5%), conform procedului invenției inhibă oxidarea grupărilor active, iar în mediul slab acid favorizează menținerea aromelor specifice ale ciupercilor.

În mediul hidroetanolic se realizează o bună solubilizare a polizaharidelor bioactive ale conformațiilor α -(1,3)- Δ glucanice și a unor proteoglicani. Polizaharidele cu conformația β -(1,3)- Δ glucani structurate cu legături (1,6), necesită ruperea unor legături de hidrogen intramoleculare pentru a fi dislocate din matricea organică.

Conform procedului invenției, se introduce după extracția hidroetanolică o etapă suplimentară de solubilizare în mediu slab alcalin la pH = 9-10, prin adaosul de bicarbonat de amoniu, care în etapa finală de uscare prin atomizare a produsului nutritiv se descompune la amoniac și CO_2 , iar produsul finit este liber de reactanți de sinteză.

Bicarbonatul de amoniu facilitează de asemenea o mai bună utilizare a rezidului final, întrucât pe parcursul uscării acestuia are loc de asemenea o degajare a reactantului alcalin remanent în biomasa umedă, cu eliminarea celor 2 componente volatile (amoniac și CO_2) care induce porozitate în matricea organică remanentă în urma extracțiilor anterioare.

Biomasele microporoase organice, se consideră a fi în prezent o alternativă viabilă în protecția culturilor față de secetă și variațiile mari ale temperaturii între zi și noapte, consernnate în ultimii ani.

Se dau în continuare 2 exemple de realizare a invenției în legătură cu Figurile 1 ... 3 care reprezintă :

fig.1.-fluxul procedului de obținere a produsului terapeutic, conform invenției;

fig.3.-fluxul procedului de obținere a produsului nutritiv, respectiv a fertilizantului, conform invenției

fig.4.-instalația pentru aplicarea procedeelor, conform invenției

Procedeele de obținere a produselor, conform invenției, constau din următoarele etape:

-ciupercile se trec din depozit pe o bandă transportoare 1 de pe care se sortează de eventualele impurități de tip resturi organice și minerale și apoi se introduc într-o instalație 2 de spălare prin pulverizare și barbotare cu apă de robinet.

-se mărunțesc, într-un feliator 3 tip „ghilotină” la dimensiuni de 0,5-2 cm;

-ciupercile umede mărunțite, cu o umiditate de minim 75% se transferă într-o moară 4 coloidală adăugând 0,5% acid ascorbic pentru a se crea un mediu slab acid, care menține aromele specifice ale ciupercilor și previne oxidarea structurilor bioactive. Operația de micronizare se realizează la o dimensiune a particulelor de 20-30 microni.

-dispersia micronizată se transvazează într-un extractor 5 automatizat și se adaugă solvenți organici, cloroform sau acetat de etil, la un raport față de dispersie de 1-4:1-8, extractorul fiind dotat cu un sistem de coordonare a parametrilor de procesare, pentru a comanda și menține presiunea și temperatura de extracție adecvate în timpul prescris și lucrează în sistem integrat de percolare și șocuri de presiune până la 8 bari. Durata de extracție, în funcție de rigiditatea biomasei este de 2,5-4 ore, la temperatura mediului ambiant dar nu mai mare 30°C.

-din extractorul 5 biomasa dispersată în solventul organic se transvazează la o presă 6 cu șnec pentru a separa biomasa reziduală de faza solidă;

-faza fluidă, constituită din solventul organic și cantități variabile de apă se trece într-un separator 7 centrifugal pentru a separa exclusiv faza organică, nemiscibilă cu apa.

-faza organică se trece într-un distilator 8 cu vid unde solventul se distilă la temperatura de 40°C ;

-după îndepărtarea solventului, substratul organic, care cumulează cantități variabile de compuși bioactivi, respectiv ergosteroli, oxosteroli, monoterpene, triterpene, sesquiterpene, lanostanoide, acizi ganoderici, taninuri, polifenoli, lipide, etc., se introduce într-un omogenizator 9 unde se omogenizează cu pulberea de proteine din zer în proporție de 1:5-1:10, rezultând un produs nutritiv cu utilizările menționate anterior;

-biomasa reziduală, după procesare și faza apoasă rezultată din separatorul centrifugal se reintroduc într-un extractor 5` automatizat pentru a realiza o a doua extracție în mediul hidroetanolic, a compușilor bioactivi cu o polaritate mai ridicată, din categoria polizaharidelor și a unor glicozide fenolice, după care se ajustează solvenul hidroetanolic la o valoare a concentrației în etanol de 50%, la un raport 1:6-1:8 biomasă umedă : soluție hidroetanolică de 50%, timp de extracție 2,5-4 ore la temperatura mediului ambiant

- urmează o nouă presare într-o presă 6` cu șnec și o separare identică a fazei etanolice hidrofile într-un separator 7` centrifugal;
- reziduu rămas după presarea a doua se introduce într-un extractor 5`` automatizat și se adaugă o soluție alcalină de bicarbonat de amoniu, pentru a realiza un pH, între 9 și 10, la un raport de 1:6-1:8 biomasă : reactant alcalin, parametrii extractivi menținându-se la valori identice cu a extracției etanolice anterioare;
- dispersia alcalină se reintroduce într-o presă 6`` cu șnec rezultând extractul fungic alcalin și o biomasă reziduală finală.
- Extractul hidroetanolic și extractul alcalin care cumulează atât polizaharidele α -(1,3)- Δ glucanice, cât și polizaharidele complexate β -(1,3)- Δ glucanice cu legături structurate (1,6), proteoglicanii, glicozidele fenolice, substanțele minerale, extractivele neazotate, etc. se reunesc și se adaugă pulbere de maltodextrine pentru a realiza o concentrație de minimum 12% substanță uscată și se trec la uscare prin pulverizare pe atomizorul 10, rezultând produsul nutritiv care poate fi utilizat în componența suplimentelor alimentare fluide sau comprimat în tablete sau gelule, sau adăugat în componența alimentelor funcționale în doze prestabilite.

Exemplul 1:

Ciupercile *Pleurotus ostreatus* cu următoarea compoziție medie brută: umiditate 78%, proteină brută în s.u. 17,5%, grăsime brută în s.u. 1,21%, cenușă brută în s.u. 1,28%, celuloză brută în s.u. 12,8%, extractive neazotate în s.u. 62%, capacitate antioxidantă 89,6 micromoli TEAC /g s.u. obținute prin metoda ORAC, se mărunțesc și se micronizează conform etapelor descrise anterior, se adaugă acid ascorbic 0,5 % și ca solvent organic nemiscibil cu apa, acetat de etil, la un raport față de dispersia micronizată de 1:4, Fazele obținute se extrag în extractorul automatizat, se separa faza organică prin presa cu șnec și separatorul centrifugal, se îndepărtează solventul prin distilare în vacuum la 40°C, din care rezultă un produs cu aspect ceros în care se cumulează în cantități variabile (dependente de proveniența și modul de cultivare al ciupercilor *Pleurotus ostreatus*) mono și triterpenoide, ergosteroli, hidrochinone, lipide, compușii de aromă specifici acestei ciuperci. Biomasa ceroasă se omogenizează pe suport purverurent de proteine din zer care reprezintă un suport adecvat pentru

potențare absorbției compușilor lipofilici astfel încât se realizează un synergism a efectelor bioprotective.

Biomasa reziduală după îndepărtarea fazei organice se prelucrează consecutiv în mediu hidroetanolic și în mediul alcalin conform etapelor descrise anterior pentru a disloca din ciupercă, atât polizaharidele α -(1,3)- Δ glucanice, cât și polizaharidele mai complexe β -(1,3)- Δ glucanice structurate cu legături 1,6 care necesită un mediu alcalin corespunzător pentru desfacerea legăturilor de hidrogen intramoleculare. Cea mai mare capacitate de imunomodulare fiind atribuită polizaharidelor cu legături tip β -(1,3)- Δ glucanice structurate cu legături (1,6).

Stabilizarea extractelor reunite prin uscarea pe suporturi de maltodextrine, conferă produsului nutritiv obținut, conform invenției din ciuperca *Pleurotus ostreatus* un nivel înalt de solubilitate în apă și facilități în incorporarea acestuia în produse lactate, zaharoase, de patiserie și panificație și chiar în produse de carne (mezelărie). Aditivarea sortimentelor din carne cu acest produs este benefică sub aspect bioprotectiv fitoterapeutic, prin aportul de proteine solubile cu un conținut înalt în aminoacizi esențiali și de asemenea, prin îmbunătățirea proprietăților reologice la prelucrare, retenția apei și însușirile senzoriale.

Produsul nutritiv este constituit din substanță uscată 92%, polizaharide biologic active α și β glucanice 2% în s.u., fenoli totali 0,2% în s.u., proteină brută 10% în s.u., cenușă brută 1,2% în s.u., maltodextrine 60% în s.u.

Exemplul 2:

Ciuperca *Ganoderma lucidum* provenită din flora spontană, cu următoarea compoziție medie brută: umiditate 15%, proteină brută în s.u. 20,4%, cenușă brută în s.u. 3,2%, grăsime brută în s.u. 0,45, celuloză brută în s.u. 8,2%, extractive neazotate în s.u. 48%, capacitate antioxidantă 10,14 TEAC micromoli/g s.u. prin metoda URAC se mărunțesc și se micronizează conform etapelor descrise anterior, solvenul organic nemiscibil cu apa, în cazul ciupercii *Ganoderma lucidum* fiind cloroformul. Pentru a facilita micronizarea se adaugă, după caz și apă de robinet ajustându-se umiditatea biomasei fungice la nivele de minim 75%. De asemenea, se adaugă 0,5% acid ascorbic pentru inhibarea peroxidării. Cloroformul se adaugă în extractor la un raport de 1:6 dispersie fungică apoasă : cloroform. Se procesează în continuare, ca în cazul exemplului I,

separând faza cloroformică prin presare în presa cu șneac și separatorul centrifugal, iar faza organică se distilă în vid la maximum 40°C.

Rezultă un produs de consistență ceroasă care cumulează cantități variabile de oxosteroli, lanostanoide, ergothionină, acizii ganoderici A, B, C, polifenoli, mono și triterpene, sesquiterpene, lipide, etc., fiind încorporat prin omogenizare pe suport purvelurent din proteine din zer., din care rezultă produsul terapeutic care poate fi integrat în suplimente alimentare și/sau în alimente funcționale cu beneficii pentru sănătate, ca adjuvant în tratamentele anticanceroase, în stoparea inflamațiilor, ca protectiv cardio-vascular, anti-hipertensiv, hepatoprotectiv, de minimizare a sindromului metabolic - (Mts)-.

Reziduul remanent, după extracția compușilor lipofilici, se prelucrează identic ca în exemplul I. Extractele hidroetanolicе și alcaline reunite și atomizate pe suport de maltodextrine prezintă de asemenea, înalte însușiri de imunomodulare fiind antitumorale, anticolesterolemice, antiinflamatoare, antiobezogene, din care rezultă produsul terapeutic care poate fi integrat în suplimente alimentare și/sau în alimente funcționale cu beneficii pentru sănătate, ca adjuvant în tratamentele anticanceroase, în stoparea inflamațiilor, ca protectiv cardio-vascular, anti-hipertensiv, hepatoprotectiv, de minimizare a sindromului metabolic - (Mts)-. Produs terapeutic, este constituit din substanță uscată 94%, polizaharide biologice active α și β glucanice .4% în s.u., fenoli totali 0,4% în s.u., proteină brută 12% în s.u., cenușă brută 1,8% în s.u., maltodextrine 65% în s.u

Exemplul 3

Se procedează identic ca la exemplul anterior, în care biomasa reziduală separată de extractul alcoolic, se supune unei etape suplimentare de solubilizare în mediu slab alcalin la pH = 9, prin adaosul de bicarbonat de amoniu, care în etapa finală de uscare prin atomizare a produsului nutritiv se descompune la amoniac și CO_2 , iar produsul finit este liber de reactanți de sinteză.

Bicarbonatul de amoniu facilitează o mai bună utilizare a reziduului final, deoarece pe parcursul uscării are loc o degajare a reactantului alcalin remanent în biomasa umedă, cu eliminarea celor 2 componente volatile: amoniac și CO_2 care induc porozitate în matricea organică remanentă în urma extracțiilor anterioare pentru a finaliza extracția, prin scindarea complementară a legăturilor intermoleculare a beta - (1,3) - D glucanilor structurați cu legături (1,6), din care

rezultă un extract alcalin și o masă reziduală care este condiționată prin uscare, din care rezultă un produs reziduul care se utilizează ca fertilizant, formator de humus în sol sau ca biomasă microporoasă protejantă față de schimbările de temperatură, de asemenea, în izolații termice, având o densitate minimală per unitate de volum după uscare prealabilă. având caracteristici de utilizare ca premix furajer sau fertilizant organic.

Produsul, are în componență 7,5% substanțe organice de tip proteine, albumine, alte substanțe azotate, 1% glucide, 0,5 lipide, 0,5% acizi organici, enzime, vitamine, uleiuri eterice, 0,5% săruri minerale, raportate la 100 g substanță uscată.

Extractele solubile de *Ganoderma lucidum* în a căror componență se includ (în cantități dependente de zona de colectare), micronutrienții minerali, germaniul, seleniul, zincul și manganul, prezintă deosebite însușiri energizante, un compus de referință, fiind reprezentat de elementul germaniu, complexat în matricea organică prin legături coordinative, care s-a dovedit că intensifică semnificativ consumul oxigenului la nivelul mitocondriilor, fiind considerat în prezent ca un remediu natural energizant.

Produsele finite, conform invențiilor, se condiționează sub formă de, comprimate, gelule, pastile, flacoane dozate conform necesității specifice și sunt diversificate pentru categorii diferite ale populației: copii, persoane vârstnice, sportivi de performanță.

Produse bioprotective din ciuperci și procedee pentru obținerea acestora

Revendicări

1. Produs nutritiv, **caracterizat prin aceea că** este constituit din substanță uscată 90...92%, proteine brută în s.u. 75...78%, cenușă brută în s.u. 1,2%-1,5%, grăsime brută 0,5...0,9% în s.u., fenoli totali 1,2...1,8% din s.u.

2. Procedeu pentru obținerea produsului definit la revendicarea 1 **caracterizat prin aceea că** materia primă constând din ciuperci din speciile *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma applanatum* și *Coriolus versicolor*,...se condiționează prin îndepărtarea impurităților și spălarea prin pulverizare, se feliază la dimensiuni de 0,5...2cm, se supun într-o primă etapă fracționării în solvenți organici nemiscibili de tip cloroform și/sau acetat de etil cu apă la un raport de 1:4...1:8 și cu acid ascorbic 0,5%, se micronizează la dimensiuni de 20...30 microni, după care se extrag la temperatura ambiantă timp de 2,5...4 h, se presează și se separă prin centrifugare din care rezultă o fază organică și o biomasă fungică reziduală care se supune unei extracții în mediul hidrofil, pentru a solubiliza în continuare compușii bioactivi polari din categoria polizaharidelor, a glicozidelor fenolice și a proteoglicanilor la un raport de 1:6...1:8 biomasă umedă: soluție hidroetanolică de 50%, timp de 2,5...4 h, la temperatura ambiantă, urmată de o presare și centrifugare, rezultând o biomasă reziduală, precum și un extract hidroetanolic având un conținut de polizaharide α -(1,3)- Δ glucanice cu legături structurate (1,6). care se reunește cu extractul alcalin rezultat din prelucrarea biomasei reziduale, urmează uscarea acestora prin atomizare pe suport de maltodextrine și obținerea unui produs nutritiv sub formă pulverulentă de culoare bej cu granulația de 10...17 microni, care se condiționează sub formă de comprimate de 1...2 grame sau în flacoane.