



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2017 00459**

(22) Data de depozit: **07/07/2017**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29/12/2023** BOPI nr. **12/2023**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2018 BOPI nr. **3/2018**

(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;**
• **SĂRBU IONELA, STR.BĂICULEȘTI 21,
BL.D13, SC.A, ET.5, AP.21, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **POP OCTAVIAN, STR. SĂȘAR 23,
BAIA SPRIE, MM, RO;**
• **POP ERDELYI ANDREA,
BD.BUCUREȘTI 28, AP.17, BAIA MARE,
MM, RO;**
• **ENE MIHAELA, STR.CUPOLEI 2, BL.105,
SC.C, ET.8, AP.102, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
**E. VAMANU, D. PELINESCU, I. AVRAM, S.
NIȚĂ, "AN IN VITRO EVALUATION OF
ANTIOXIDANT AND COLONIC MICROBIAL
PROFILE FOLLOWING MUSHROOM
CONSUMPTION", HIDAWI PUBLISHING
CORPORATION, BIOMED RESEARCH
INTERNATIONAL, VOL. 2013, PP. 1-9,
2013; R. NOWAC, N.
NOWACKA-JEHALKE, M. JUDA, A.**

**MALM, "THE PRELIMINARY STUDY OF
PREBIOTIC POTENTIAL WILD
MUSHROOM POLYSACCHARIDES: THE
STIMULATION EFFECT ON
LACTOBACILLUS STRAINS GROWTH",
EUR. J. NUTR., VOL. 57, PP. 1511-1521,
2018; G. MA ȘI AL., "IN VIVO
FERMENTATION OF A PLEUROTUS
ERYNGII POLYSACCHARIDE AND ITS
EFFECTS ON FECAL MICROBIA
COMPOSITION AND IMMUNE
RESPONSE", FOOD FUNCT., VOL. 8, PP.
1810-1821, 2017 E. VAMANU, D.
PELINESCU, I. AVRAM, S. NIȚĂ, "AN IN
VITO EVALUATION OF ANTIOXIDANT AND
COLONIC MICROBIAL PROFILE
FOLLOWING MUSHROOM
CONSUMPTION", HIDAWI PUBLISHING
CORPORATION, BIOMED RESEARCH
INTERNATIONAL, VOL. 2013, PP. 1-9,
2013; R. NOWAC, N.
NOWACKA-JEHALKE, M. JUDA, A.
MALM, "THE PRELIMINARY STUDY OF
PREBIOTIC POTENTIAL OF POLISH WILD
MUSHROOM POLYSACCHARIDES: THE
STIMULATION EFFECT ON
LACTOBACILLUS STRAINS GROWTH",
EUR. J. NUTR., VOL. 57, PP. 1511-1521,
2018; G. MA ET AL. "IN VIVO
FERMENTATION OF A PLEUROTUS
ERYNGII POLYSACCHARIDE AND ITS
EFFECTS ON FECAL MICROBIOTA
COMPOSITION AND IMMUNE RESPONSE",
FOOD FUNCT., VOL. 8,
PP. 1810-1821, 2017**

(54) **COMPOZIȚIE FUNCȚIONALĂ DIN CIUPERCI SĂLBATICE
COMESTIBILE, PENTRU ÎMBUNĂTĂȚIREA AMPRENTEI
MICROBIOTEI COLONULUI**



RO 132421 B1

1 Invenția se referă la o compoziție funcțională, bazată exclusiv pe utilizarea extractului
atomizat din bazidiocarpul uscat al următoarelor specii de ciuperci sălbatice comestibile
3 (recoltate din flora spontană a României): specii diferite din genul *Boletus*, *Pleurotus eryngii*,
Armillaria mellea și *Tuber melanosporum*. Produsul se utilizează pentru corectarea dereglării
5 microbiotelor (amprentei microbiene), efect asociat patologiilor nutriționale (de exemplu,
diabet) și cardiovasculare. Odată cu administrarea, se obține și o creștere a capacității
7 antioxidante la nivelul colonului, datorită compoziției în compuși bioactivi a ciupercilor, cu rol
în combaterea efectelor determinate de stresul oxidativ.

9 Problemele cauzate de aceste două patologii sunt bine cunoscute și reprezintă unele
din cauzele principale de mortalitate la ora actuală. Patologiile sunt asociate cu un
11 dezechilibru la nivelul microbiotei colonului. Compoziția funcțională conform invenției reali-
zează un control al microbiotei acestor grupuri țintă de populație, prin stimularea multiplicării
13 tulpinilor favorabile (tulpini din genurile *Lactobacillus* și *Bifidobacterium*), ca mijloc direct de
acțiune împotriva creșterii glicemiei și a colesterolului din sânge.

15 Intervenția asupra microbiotei pentru controlul și diminuarea efectelor negative ale
unor patologii cu incidență ridicată reprezintă o noutate în domeniul suplimentelor funcționale
17 și conduce la obținerea unui produs inovativ, fără toxicitate, bazat pe materii prime indigene.

19 Nu au fost identificate brevete care să utilizeze specii de ciuperci sălbatice comesti-
bile pentru controlul microbiotei colonului. În schimb, studiul publicat în PLoS One. 2016;
11(12): e0167754, a descris efectul pe care îl exercită extractul apos bazat pe miceliul
21 *Agaricus blazei* Murill (82,4%), *Hericeum erinaceus* (14,7%) and *Grifola frondosa* (2,9%)
asupra tumorilor de la nivelul intestinului subțire și colonului la șoareci.

23 Brevetul **US 20140294997 A1** se referă la controlul greutateii și al creșterii capacității
metabolice prin administrarea unui produs/extract din fructe de pădure. Produsul acționează
25 prin controlul structurii compoziției microbiotei, reducerea microbiotei nedorite în scopul
scăderii greutateii corporale și a nivelului glucozei din sânge.

27 Materia primă din care se obține compoziția conform invenției este constituită din
ciuperci comestibile sălbatice și este bazată pe un amestec format din următoarele patru
29 specii de ciuperci: *Boletus sp.*, *Pleurotus eryngii*, *Armillaria mellea* și *Tuber melanosporum*.
Componenta fenolică este esențială în formularea compoziției funcționale, deoarece asigură
31 viabilitatea acțiunii acesteia asupra microbiotei. Compoziția conține un extract atomizat, care
păstrează nealterați compușii bioactivi (compuși fenolici), iar atomizarea extractului nu
33 determină degradarea acestora în timpul păstrării.

35 Conform invenției, compoziția funcțională destinată controlului microbiotelor disbiotice
(scădere a diversității microbiene de la nivelul microbiotei colonului uman) conține (sub formă
atomizată) extract apos din *Boletus sp.*, *Pleurotus eryngii*, *Armillaria mellea* și *Tuber*
37 *melanosporum*. Aceste ciuperci sunt amestecate, în rapoarte de greutate 30:7:2:1, la care
se adaugă în raport de 7% (7 g/100 mL extract) maltodextrină, ca excipient farmaceutic.

39 Compoziția atomizată din ciuperci sălbatice comestibile are următoarele efecte
asupra/la nivelul microbiotei colonului uman: adjuvant în disfuncții ale microbiotei colonului
41 cauzate de patologii cardiovasculare și boli nutriționale (diabet), corectare a metabolismului
microbian prin echilibrarea amprentei microbiene a microbiotei, stimulare a multiplicării
43 tulpinilor favorabile din colonul uman.

45 Ciupercile comestibile din flora spontană reprezintă o sursă naturală de compuși
bioactivi (acizi fenolici, în principal) și acționează pentru menținerea echilibrului microbian
din colonul uman. Prezența unei microbiote favorabile, stabile reprezintă o garanție a unei
47 stări de sănătate bune, rezultând o reechilibrare a funcțiilor fiziologice normale. Avantajele
formulei propuse rezultă din faptul că reprezintă o modalitate lipsită de toxicitate și efecte

RO 132421 B1

secundare și că acționează în scopul multiplicării tulpinilor favorabile din genurile <i>Lactobacillus</i> și <i>Bifidobacterium</i> . Caracteristicile metabolice pe care le determină demonstrează prezența unor compuși bioactivi (compuși fenolici) care este corelată cu profilul fermentativ de la nivelul colonului și cu numărul tulpinilor favorabile. Această compoziție funcțională se bazează pe un substrat natural care stimulează procesele fermentative și reduce acțiunea microbiotei patogene (de exemplu, enterobacterii). Reechilibrarea microbiotei previne efectele flatulenței prin reducerea sintezei unor compuși ce determină senzația de balonare (ionii de amoniu).	1 3 5 7
Se dă în continuare un exemplu de realizare a compoziției conform invenției. Compoziția funcțională atomizată a fost realizată conform următoarelor etape:	9
1. Ciupercile (<i>Boletus sp.</i> , <i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Armillaria mellea</i> și <i>Tuber melanosporum</i>) se recoltează, se sortează, se spală și se usucă în curent de aer până la greutate uscată. Apoi se dozează amestecul de ciuperci, exprimat în rapoarte de greutate - 30:7:2:1 și se mărunțesc.	11 13
2. Se amestecă cu enzimă de extracție (Viscozyme L, Novozyme, Danemarca) în cantitate de 3 mL/kg ciuperci și se supun procesului de extracție în turboextractor (concepție și producător Hypericum Impex SRL) timp de 3 h, la 40°C.	15 17
3. Extractul 1 se obține prin presarea amestecului cu o presă cu tambur.	19
4. Resturile de ciupercă se introduc într-un infuzor cu abur, la 120°C, iar extractul 2 se obține identic cu extractul 1.	19
5. Se amestecă mecanic extractul 1 și 2 și soluția se decantează.	21
6. Decantatul se filtrează manual, prin filtre cu porozitate mare (fabricate din tablă de inox austenitic cu diametrul între 0,5 și 1 mm), folosite pentru filtrarea soluției care urmează a se introduce în atomizor.	23
7. Lichidul rezultat se amestecă manual cu 7 g/100 mL lichid (extract) de maltodextrină (indice de dextroză 17%) până la omogenizare totală.	25
8. Amestecul rezultat se atomizează (Spry-Dry, Niro, Danemarca) și se colectează pulberea rezultată.	27
9. Cu o mașină de dozare capsule se realizează (se umplu) capsule enterosolubile (gastrorezistente), cu o greutate medie de 240 mg/capsulă.	29
Valoarea biologică a compoziției funcționale s-a realizat printr-o serie de teste <i>in vitro</i> (realizate la o concentrație standard de 1 mg/mL):	31
- compoziția funcțională atomizată destinată microbiotei umane manifestă o activitate antioxidantă totală de peste 90% și o putere de reducere de 0,27;	33
- produsul funcțional atomizat destinat microbiotei umane are un conținut total de compuși fenolici de 7,8 μg/mL echivalent acid galic.	35
Pentru demonstrarea efectelor biologice ale compoziției conform invenției asupra microbiotei umane s-au realizat o serie de teste <i>in vitro</i> , într-un sistem de simulare unicameral (Brevet RO 127801 B1), Faza 2 din brevet. În aceste teste biologice <i>in vitro</i> s-a utilizat o microbiotă obținută de la voluntari maturi, care suferă de disfuncții nutriționale (experiment 1) și boli cardiovasculare (experiment 2). Probele au fost obținute în urma prelevării de fecale, steril.	37 39 41
Microbiota a fost reconstituită în apă peptonată, după 7 zile. Produsul (capsule gastrorezistente) a fost administrat după această perioadă, conform protocolului detaliat în brevetul RO 127801 B1 .	43 45

RO 132421 B1

1 Experiment 1

3 Administrarea capsulelor *in vitro* în cazul microbiotei persoanelor care suferă de
disfuncții nutriționale (de exemplu, diabet de tip 2) a determinat o variație semnificativă a
5 numărului de microorganisme nefavorabile (exprimată ca variație pozitivă a enterobacterii-
lor). În primul segment de colon (colonul ascendent) variația acestor bacterii a fost de aproxi-
7 mativ 1,0 log UFC/mL, comparativ cu proba martor (microbiota de la o persoană sănătoasă
din punct de vedere clinic). Deși numărul lor a variat cu 0,5 log UFC/mL de la un segment
9 la altul al colonului, la finalul etapei de simulare *in vitro*, diferența s-a păstrat față de proba
martor.

11 Tulpinile favorabile (bacteriile din genul *Lactobacillus* și *Bifidobacterium*) au scăzut
cu maximum 1 log UFC/mL în timpul tranzitului prin colonul ascendent. S-a ajuns la o valoare
13 de aproximativ 7 log UFC/mL. Odată cu trecerea în segmentul transversal și în colonul
descendent, variația microorganismelor a fost din ce în ce mai puțin, cu un maxim de 0,5 log
15 UFC/mL. La nivelul colonului descendent, tulpinile din genurile *Lactobacillus* și
Bifidobacterium s-au menținut într-un număr constant.

17 Amprenta metabolomică a prezentat câteva caracteristici prin determinarea unor
valori ridicate de amoniu (NH_4^+ ; determinat cu The Ammonium Quanto fix kit; Macherey-
19 Nagel GmbH & Co. KG, Duren, Germany) și valori scăzute ale L(+)-lactat (Lactate Assay Kit;
Merck KGaA, Darmstadt, Germany), cuprinse între 1-5 mM. Nivelul maxim de amoniu a fost
21 identificat în colonul descendent, de aproximativ 200 mg/L. Valorile obținute au fost mai mari
pentru toți parametrii cu aproximativ 10% față de microbiota martor.

23 Este de așteptat ca administrarea compoziției funcționale, ca urmare a creșterii
activității fermentative (sinteză de amoniu), să determine balonare, flatulență, cu toate că
25 raportul dintre tulpinile favorabile și cele nefavorabile a fost unul echilibrat. Administrarea
ajută la fermentarea superioară a nutrienților și eliberarea unor componente biologice
(compuși fenolici în amestec cu alți compuși bioactivi - resturi polizaharidice).

27 Experiment 2

29 Administrarea capsulelor *in vitro* în cazul microbiotei persoanelor care suferă de
disfuncții cardiovasculare (de exemplu, hipertensiune) a determinat un efect pozitiv, prin
31 creșterea cu peste 1 log UFC/mL a numărului de tulpini favorabile. Creșterea a fost una gra-
duală (aproximativ 0,2 log UFC/mL, în 24 h), cu un maximum înregistrat în ultimul segment
33 (0,5 log UFC/mL). Numărul tulpinilor din genul *Lactobacillus* a depășit cu 3 log UFC/mL
tulpinile din genul *Bifidobacterium*. Tulpinile din aceste două genuri au avut o valoare egală
35 cu cea a enterobacteriilor, demonstrând o instaurare a homeostaziei la nivelul microbiotei.
Aceste date au fost obținute în comparație cu lotul martor (netratat), unde acest efect nu a
putut fi identificat.

37 Scăderea de pH în primul segment a fost una accelerată ($\text{pH} \leq 5$ în 24 h de la
administrare), fiind înregistrată și o cantitate semnificativă de L(+)-lactat (peste 5 mM).
39 Amoniul (NH_4^+) a fost identificat în cantitate redusă, sub 50 mg/L.

41 Modularea microbială a fost una pozitivă în cazul persoanelor ce suferă de disfuncții
cardiovasculare, fiind o compoziție funcțională utilă în corectarea efectelor secundare
43 (probleme digestive și perturbarea biodisponibilității unor compuși bioactivi) rezultate din
prezența disbiozei. Șansele de a dezvolta efecte secundare sunt nule, neexistând tendința
acumulării de produși metabolici care să aibă o influență negativă.

Bibliografie	1
1. G. Hetland, D.M. Eide, J.M. Tangen, M.H. Haugen, M.R. Mirlashari, J.E. Paulsen, <i>The Agaricus blazei-Based Mushroom Extract, Andosan™, Protects against Intestinal Tumorigenesis in the A/J Min/+ Mouse</i> , PLoS One. 2016; 11(12): e0167754.	3 5
2. M.L. Heiman, D.P. Stull, J.W. Peno, <i>Composition and use of a formulation to mcrease the ratio of gastrointestinal microbiota in phylum bacteroidites to microbiota of firmuctes phylum</i> , brevet US 20140294997 A1 .	7
3. S.G. Colceru-Mihul, S. Niță, A.E. Grigore, A. Vamanu, A. Andrieș, F. Rădulescu, D. Rughinis, C. Bazdoacă, E. Vamanu, R. luksel, <i>Produs fitoterapeutic pentru reducerea afecțiunilor asociate proceselor de îmbătrânire și procedeu de obținere a acestuia</i> , brevet 128193/2014.	9 11
4. Ș. Manea, V. Tamaș, I.G. Crețu, <i>Compoziție fitoterapeutică destinată reechilibrării funcțiilor hepato-biliare</i> , brevet 122802/2010.	13 15

RO 132421 B1

1

Revendicare

3

Compoziție funcțională din ciuperci sălbatice comestibile, destinată echilibrării amprentei microbiotei bolnavilor cardiovasculari și a celor ce suferă de disfuncții nutriționale,

5

caracterizată prin aceea că este un extract obținut dintr-un amestec de ciuperci din genul *Boletus sp.*, *Pleurotus eryngii*, *Armillaria mellea* și *Tuber melanosporum*, în raport, în

7

greutate de 30:7:2:1, la care se adaugă 7% maltodextrină, procent exprimat în greutate, ca excipient farmaceutic.



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci
sub comanda nr. 492/2023