

(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00740

(22) Data de depozit: 17/11/2020

(41) Data publicării cererii:
30/05/2022 BOPI nr. 5/2022

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL DE BIOLOGIE BUCUREȘTI,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.296,
BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• COGĂLNICEANU GINA-CARMEN,
STR. PAȘCANI NR. 5, BL. D7, SC. B, ET. 2,
AP. 16, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• MITOI ELENA MONICA, STR. ODEI, NR. 7,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• CIOCAN ALEXANDRA-GABRIELA,
STR. EUFROSINA POPESCU, NR.54, BL.37
A+B, SC.F, ET.7, AP.251, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;

• HOLOBIUC MIHAELA-IRINA,
STR.FORTUNEI, NR.67, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• MAXIMILIAN RODICA-CARMEN,
INTRAREA COSMINA, NR.54-62, PARTER,
AP.6, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• HELEPCIUC FLORENȚA-ELENA,
STR.PODULUI, NR.62, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• MOROȘANU ANA-MARIA,
STR. OCCIDENTULUI, NR.13,
SAT BERGENI, COMUNA BERGENI, IF, RO

(74) Mandatar:
CABINET N.D. GAVRIL S.R.L.,
STR.ȘTEFAN NEGULESCU NR.6A,
SECTOR 1, BUCUREȘTI

(54) **PROCEDEU BIOTEHNOLOGIC DE INIȚIERE ȘI OBȚINERE
DE MASĂ CELULARĂ PROLIFERATIVĂ ÎNALT
PRODUCĂTOARE DE COMPUȘI BIOACTIVI LA
LEONTOPODIUM ALPINUM CASS (FLOARE DE COLȚ)
ȘI A EXTRACTULUI BRUT**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu biotehнологic pentru inițierea și obținerea de masă celulară proliferativă înalt producătoare de compuși bioactivi la *Leontopodium alpinum* Cass. - floarea de colț, precum și a extractului brut. Procedeu conform invenției constă în obținerea calusului primar prin plasarea orizontală pe mediul nutritiv de calusare a plantulelor întregi obținute din semințe germinate aseptice, calusul primar servind pentru obținerea și proliferarea calusului secundar, la nivelul căruia se realizează selecția vizuală a zonelor de calus cu cel mai mare conținut de pigmenți - metaboliți secundari și cu cea mai mare proliferare celulară și acumulare de masă, iar prin subcultivarea - pasarea repetată și regulată, în aceleași condiții de cultură, pe același mediu de calusare, pe o perioadă mare de timp, se realizează stabilizarea și omogenizarea liniilor celulare de calus selecționate, cu o rată medie de proliferare a calusului de $18,32 \pm 1,83$, din calusurile selecționate și stabilizate obținându-se un extract brut cu următoarele caracteristici biochimice: concentrație flavonoizi 464 ± 98 mg echivalent rutin/g substanță uscată, concen-

trație polifenoli 236 ± 34 mg echivalent acid galic/g substanță uscată, concentrație pigmenți antocianici $0,672 \pm 0,15$ mg echivalent cianidin 3 - glucozid/g substanță uscată și activitate antioxidantă 905 ± 94 mM echivalenți Trolox/g substanță uscată.

Revendicări: 4
Figuri: 6

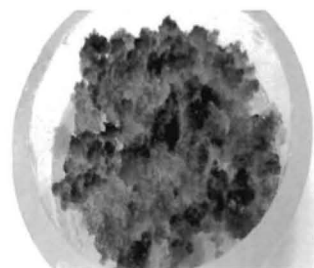


Fig. 4B

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI BREVETE
Cerere de brevet de invenție
Nr. a 220 0740
Data depozitului 17-11-2020

Procedeu biotehnologic de inițiere și obținere de masă celulară proliferativă înalt producătoare de compuși bioactivi la *Leontopodium alpinum* Cass. (floare-de-colț) și a extractului brut

Invenția se referă la un procedeu biotehnologic de obținere de masă celulară proliferativă înalt producătoare de compuși bioactivi - calus - din plantule întregi rezultate din semințe germinate aseptice la *Leontopodium alpinum* Cass. (floare-de-colț), cât și a extractului brut obținut din acesta, extract bogat în metaboliți secundari de interes economic pentru industria cosmetică, farmaceutică și alimentară.

Datorită colectării intensive și ca urmare a schimbărilor climatice recente, populațiile din natură au suferit un declin, specia a devenit amenințată, căpătând statut de specie rară. Cel puțin în Europa, colectarea din natură a acestor plante este interzisă prin lege și prin urmare, în anumite țări sunt cultivate.

În România, specia este ocrotită prin lege din 1933 și are statut de specie vulnerabilă.

Există utilizări tradiționale ale acestei specii în medicina naturistă, fiind cunoscută ca având efecte antiinflamatoare, antimicrobiene, antioxidante și chemoprotective, fiind folosită pentru tratamentul bolilor de inimă, a bronșitei, diareei, dizinteriei, febrei, pneumoniei, a durerilor reumatice, a cancerului.

În prezent au fost găsite noi aplicații ale acestei plante, extractul său intrând în compoziția ecranelor de protecție solară ale pielii și pentru tratamentul bolilor degenerative neuroase (Alzheimer).

Sistemul *in vitro* utilizat în cadrul invenției este reprezentat de cultura de calus (celule nespecializate, nediferențiate, dar care au capacitatea atât de a se divide în mod nelimitat, cât și de a sintetiza metaboliți secundari). Calusul este denumit în literatura de specialitate și “celule stem vegetale”.

Se cunosc procedee de obținere a extractului din floarea de colț (*Leontopodium* sp.) prin prelucrarea frunzelor plantelor cultivate sau din floarea spontană astfel:


WO2009098145A2 invenția prezintă un procedeu de extragere și utilizare în diverse compoziții a substanțelor din speciile asiatice de floare de colț: *Leontopodium ochroleuceum* și/sau *Leontopodium leontopoides* și/sau *Leontopodium himalayanum*. Pentru aceasta este necesară colectarea plantelor întregi cu frunze, flori, tulpini și / sau rădăcini și uscarea și liofilizarea acestora pentru obținerea de pulberi. Compușii din pulberea rezultată se extrag cu o soluție de alcool, prin agitare pentru mai multe ore (aprox. 24 h), urmată de separarea solidelor și, opțional, concentrarea extractului. Stabilizarea soluției se realizează prin adăugarea unui conservant ce conține paraben și, opțional, prin înlăturarea completă a alcoolului. Produsul rezultat se folosește, în special, în stomatologie.

CN110025534A invenția prezintă un procedeu de obținere a unui extract din floarea de colț. Pentru aceasta este necesară măcinarea plantei uscate, amestecarea pulberii obținute cu un reactiv de fază solidă și adăugarea unei soluții de etanol. În continuare, soluția este diluată cu apă, filtrată și se parcurg mai multe etape de concentrare a soluției până se ajunge la valoarea dorită.

KR20190143110A invenția prezintă un procedeu de producție în masă a *Leontopodium coreanum* Nakai, utilizând cultura in vitro, din care sunt extrași compuși, cu statut de ingrediente active, incluși într-o compoziție cu proprietăți antioxidante, antiinflamatorii și antirid. Metoda presupune colectarea, spălarea și secționarea frunzelor în fragmente, care vor fi utilizate pentru inițierea culturilor de calus. Urmează subcultivări multiple pentru multiplicarea culturilor și plasarea calusurilor pe medii pentru a induce formarea de regeneranți. Extractul de *Leontopodium coreanum* Nakai poate fi inclus în compoziții cosmetice, farmaceutice și alimentare, deoarece prezintă o bună activitate antioxidantă și nu manifestă citotoxicitate sau efecte secundare.

Dezavantajele acestor procedee sunt:

- în culturile agro-industriale se utilizează tratamente cu pesticide, ierbicide, fertilizatori sau tratamente împotriva bolilor sau dăunătorilor;
- colectarea intensivă a plantelor din natură a necesitat protejarea prin lege a acestei specii;
- culturile de *Leontopodium*, acolo unde se practică, sunt supuse condițiilor climatice în continuă schimbare;



- folosirea explantelor reprezentate de fragmente de organe sau țesuturi dau un randament scăzut pentru obținerea de compuși bioactivi de calitate;
- la locul rănirii pentru obținerea fragmentelor de organe se secretă uneori compuși care se oxidează și devin toxici pentru explant;
- în planta cultivată metaboliții secundari sunt sintetizați doar de către celule specializate în anumite țesuturi, în anumite momente ale ciclului de dezvoltare;
- producerea de metaboliți secundari în plantele cultivate este dependentă de anotimpuri și poate fi afectată de hazarduri naturale (inundații, secetă, grindină, erupții vulcanice, etc) sau antropice (poluare, ploii acide, accidente nucleare).

Problema pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unui procedeu pentru inițierea și obținerea de masă celulară înalt proliferativă (calus) și înalt producătoare de compuși bioactivi din plantule întregi de *Leontopodium alpinum* Cass. (floare-de-coliț) obținute prin germinarea aseptică a semințelor, precum și a extractului brut obținut din acesta.

Procedeul biotehnologic pentru inițierea și obținerea de masă celulară proliferativă înalt producătoare de compuși bioactivi - calus - și a extractului brut, conform invenției, înlătură dezavantajele menționate, prin aceea că inițierea și obținerea de masă celulară precum și a extractului brut se realizează din plantule întregi dezvoltate prin germinarea aseptică a semințelor de *Leontopodium alpinum* Cass. (floare-de-coliț), care se procesează astfel:

- semințele de *Leontopodium alpinum* sunt puse în pânză specială în ADS (apă distilată sterilă) pe agitator timp de 24 ore, la 50 RPM (rotații pe minut), se sterilizează în 0,1% HgCl₂ în 2 băi a câte 3.....5 minute fiecare după care semințele se inoculează, în vase Petri, câte 100.....120/vas pe mediu nutritiv Murashige-Skoog (1962) diluat la jumătate, semințele astfel pregătite germinează în 2 săptămâni, la 25grd.C și întuneric în proporție de 70%, urmează trecerea semințelor germinate la lumină, la 2000 lux -2500 lux, cu o fotoperioadă de 16 ore întuneric și 8 ore lumină (etapa 1);
- inocularea plantulelor întregi și obținerea de calus primar (etapa 2) se realizează prin plasarea acestora orizontal pe mediul nutritiv de calusare câte 6-8 plantule/vas Petri, astfel calusarea este inițiată pe toată suprafața plantulei, la 25°C și 3500 lux;



- obținerea și proliferarea calusului secundar (etapa 3) se realizează din calusul primar, obținut în etapa anterioară (etapa 2), care este secționat în fragmente mici, de 2-5 mm și inoculat pe aceeași variantă de mediu nutritiv ca în etapa 2, cultivat la temperatura de 25 grd.C, la lumină cu intensitatea de 3500 lux, pasat (fragmentat și trecut pe mediu proaspăt) la fiecare 3 săptămâni;

- selecția liniilor celulare proliferative și înalt producătoare de metaboliți secundari de interes (etapa 4) se realizează prin selecția vizuală a zonelor de calus cu cel mai mare conținut în pigmenți și cu cea mai mare proliferare celulară și acumulare de masă la fiecare pasaj, din etapa 3, pasaje realizate cu frecvența de 3 săptămâni, frecvența fiind scurtată la 2 săptămâni pe măsură ce cultura de calus a acumulat un conținut semnificativ de metaboliți secundari – pigmenți – și s-a obținut o masă celulară cu rată intensă de proliferare la 20°C, 5000 lux;

- stabilizarea liniilor celulare selecționate (etapa 5) se realizează prin subcultivarea (pasarea) lor repetată și regulată, la 2 săptămâni, în aceleași condiții de iluminare și temperatură (20°C, 5000 lux), pe aceeași variantă de mediu nutritiv, pe o perioadă mare de timp pentru a se omogeniza componența populației celulare, în sensul că la fiecare pasaj sunt selectate celulele care sunt cel mai bine adaptate la condițiile de cultivare *in vitro*, cu rata cea mai mare de diviziune și care au cel mai mare conținut de metaboliți secundari de interes, calusul obținut având următoarele caracteristici :sporul de masă celulară/vas Petri de este de 5,15±0,54 g la 2 săptămâni de creștere, respectiv de 10,3±0,54 g la o lună de la inoculare, sporul lunar mediu de masă este de 10,3±0,54 g calus/inocul, în timp ce rata de creștere medie a calusului, la fiecare pasaj, este de 18,32±1,83 cu un randament de 18 ori față de inoculul corespunzător;

- mediul de cultură pentru inducerea calusării este obținut din mediul bazal Gamborg (1968) adăugat cu: 2-3% zaharoza; 0,01-0,1 % hidrolizat de cazeină; 1-3 mg/l 2,4D (acid 2,4-diclorfenoxiacetic); 1-3 mg/l BAP (6-benzilaminopurină); 0,1-1 mg/l IAA (acidul indolil acetic); 20-200 mg/l CaCO₃ (carbonat de calciu);

- la cultivarea calusurilor se folosesc mai multe condiții de iluminare și anume:

varianta la lumina (unde încep să apară colonii de celule pigmentate violaceu), cu o intensitate de:

- 3500 lux în etapa 2 și 3 , de obținere a calusului primar, respectiv secundar
- 5000 lux în etapa 4 și 5, de selecție, respectiv de stabilizare a liniilor de calus



și varianta la întuneric, unde calusul obținut are o culoare alb-gălbuie, culturile fiind crescute în condiții controlate, cu o fotoperioada 8 ore întuneric/16 ore iluminare și o temperatură de 20°C;

- extractul brut din calus de *Leontopodium alpinum* se obține prin mojararea calusului obținut în etapa 5 și adăugarea de metanol absolut, în raport de 1:5 (m/v) (masă/volum) timp de 3 zile, cu agitare, la 300 RPM (rotații pe minut), la temperatura camerei. Omogenatele obținute se centrifughează de 2 ori la 10000 RCF (forța centrifugală relativă) timp de 15 minute, iar supernatantul final reprezintă extractul brut, cu următoarele caracteristici biochimice și compuși bioactivi :

- concentrație flavonoizi: 464±98 mg echivalent rutin/g substanță uscată
- concentrație polifenoli: 236±34 mg echivalent acid galic/g substanță uscată
- concentrație pigmenți antocianici: 0,672±0,15 mg echivalent cianidin 3-glucozid/g substanță uscată
- activitate antioxidantă: 905±94 mM echivalenți Trolox/g substanță uscată

Invenția prezintă următoarele avantaje :

- procedeul este rapid și eficient, permițând obținerea la floarea-de-colt (*Leontopodium alpinum*) de masă celulară înalt proliferativă și înalt producătoare de metaboliți secundari de interes, de o calitate uniformă, în condiții perfect controlate, optime pentru scopul propus, metaboliți care se regăsesc în extractul brut obținut în final;
- calusul este cultivat în condiții strict controlate de temperatură, iluminare și umiditate, astfel încât se pot asigura condiții optime din punct de vedere fiziologic ;
- condițiile constante nutriționale și de cultivare asigură în cultura *in vitro* o producție continuă și uniformă de metaboliți secundari bioactivi ;
- plantulele nu sunt supuse stresului de rănire, care îngreunează, încetinește sau uneori chiar împiedică producerea de calus;
- plantula întregă conține un amestec mult mai mare de tipuri celulare și tisulare, ceea ce lărgeste foarte mult aria semnalelor de inițiere și activare a unor căi metabolice de interes;
- plantula conține apexurile meristemice (la nivelul vârfului tulpinii și al rădăcinii), zone cu celule nediferențiate, totipotente, specializate în proliferare prin diviziune celulară, sursă ideală pentru inițierea producerii de calus;



- perioada de obținere a culturii de calus este redusă, cu un bun randament și cu producerea unui calus uniform, omogen, bogat în metaboliți secundari valoroși pentru industria cosmetică, alimentară, farmaceutică;
- în sistemul *in vitro* nu se utilizează tratamente cu pesticide, ierbicide, fertilizatori sau tratamente împotriva bolilor sau dăunătorilor cum se realizează în culturile agro-industriale;
- procedeul conform invenției este rapid, deoarece nu este dependent de parcurgerea ciclului de viață al plantei și producerea de metaboliți secundari în sistemul *in vitro* se realizează pe toată durata anului;
- procedeul este inițiat de la semințe de floare-de-colț comercializate, obținute în cultură, astfel încât populațiile de *Leontopodium alpinum* din natură sunt protejate, impactul asupra mediului este diminuat și biodiversitatea este prezervată;
- în procedeul *in vitro* se pot folosi precursori sau elicitori pentru a spori cantitatea sintetizată dintr-un metabolit secundar de interes sau se poate induce fenomenul de bioconversie, prin care cultura de calus este utilizată pentru a transforma compuși cu valoare economică slabă în compuși cu valoare economică mare;
- în calusul obținut și cultivat conform invenției se biosintetizează pigmenți antocianici de culoare violacee (conform figurilor 3 și 4 și a analizei biochimice a concentrației de pigmenți antocianici) spre deosebire de planta din natură care nu prezintă această culoare, deci nu biosintetizează pigmenți antocianici (floarea este albă, frunzele sunt verzi), adică se sintetizează compuși noi, care nu sunt prezenți în planta de origine.

Se dă în continuare un exemplu de realizare în legătură și cu fig. 1 - 5, care reprezintă:

Fig. 1 - Semințe de floare-de-colț inoculate în vas Petri pe mediul nutritiv Murashige-Skoog;

Fig. 2 - Plantule întregi plasate orizontal pe mediul de calusare în vase Petri - calusarea este inițiată pe toată suprafața plantulei

Fig. 3 - Calus secundar

Fig. 4 A - calus cu o bună proliferare, dar mai puțin încărcat în metaboliți secundari

Fig. 4 B - calus foarte proliferativ și cu o încărcare mai mare de metaboliți secundari

Fig. 5 A - Stoc omogen de calusuri stabilizate, cu o rată înaltă de proliferare și de sinteză de metaboliți secundari

Fig. 5 B - Calus cu o rată înaltă de proliferare și foarte încărcat cu metaboliți secundari

Conform invenției, procedeul biotehnologic de obținere de calus din plantule întregi obținute prin germinarea aseptică a semințelor de *Leontopodium alpinum* Cass. (floare-de-colt), și a extractului brut bioactiv pentru obținerea de metaboliți secundari cuprinde următoarele faze:

Etapa 1 - Obținerea plantulelor din semințe germinate aseptice

700..... 750 semințe de *Leontopodium alpinum* sunt puse în pânză specială în ADS (apă distilată sterilă) pe agitator timp de 24 ore, la 50 RPM (rotații pe minut). Sterilizarea se realizează în 0,1% HgCl₂ (clorură mercurică) în 2 băi a câte 5 minute fiecare, urmată de 3 spălări cu apă distilată sterilă a câte 5 minute fiecare. După sterilizare semințele se inoculează, în vase Petri, câte 100-120/vas pe mediu nutritiv Murashige-Skoog (1962) diluat la jumătate, așa cum sunt prezentate în fig.1. În două săptămâni, semințele germinează la 25 grd.C și întuneric în proporție de 70%. După germinare semințele au fost trecute la lumină, la 2000 lux, cu o fotoperioadă de 16 ore întuneric și 8 ore lumină.

Etapa 2 - Inocularea plantulelor și obținerea de calus primar.

Plantulele întregi, obținute prin germinarea aseptică a semințelor, sunt plasate orizontal pe mediul de calusare câte 6-8 plantule/vas Petri de 10 cm. (fig. 2). În acest mod calusarea este inițiată pe toată suprafața plantulei.

Compoziția mediului de cultură pentru inducerea calusării este realizat din mediul bazal Gamborg (1968) adiționat cu: 2-3% zaharoza; 0,01-0,1 % hidrolizat de cazeină; 1-3 mg/l 2,4D (acid 2,4-diclorfenoxiacetic); 1-3 mg/l BAP (6-benzilaminopurină); 0,1-1 mg/l IAA (acidul indolil acetic); 20-200 mg/l CaCO₃ (carbonat de calciu);

Calusurile sunt cultivate în două condiții de iluminare:

- la lumină, cu o intensitate de 3500 lux, unde încep să apară colonii de celule pigmentate violaceu și
- la întuneric, unde calusul obținut are o culoare alb-gălbuie.

Culturile sunt crescute într-un Fitotron Weiss-Gallenkamp SCG 120, în condiții controlate, cu o fotoperioada 8 ore întuneric/16 ore iluminare și la o temperatură de 25 grd.C.

Etapa 3 - Obținerea și proliferarea calusului secundar



Calusul primar, obținut în etapa a 2-a, este secționat în fragmente mici, de 2-5 mm și inoculat pe aceeași variantă de mediu nutritiv ca în etapa 2, cultivat la temperatura de 25 grd.C, la lumină cu intensitatea de 3500 lux, este pasat (fragmentat și trecut pe mediu proaspăt) la fiecare 3 săptămâni (Fig. 3).

Etapa 4. Selecția liniilor celulare proliferative și înalt producătoare de metaboliți secundari de interes

La fiecare pasaj, din etapa 3, se realizează selecția vizuală a zonelor de calus cu cel mai mare conținut în pigmenți și cu cea mai mare proliferare celulară și acumulare de masă. Pasajele sunt realizate la 3 săptămâni, dar pe măsură ce cultura de calus a acumulat pigment în cantitate din ce în ce mai mare, intervalul dintre pasaje este diminuat la 2 săptămâni. În fig. 4A și 4B sunt prezentate etape succesive ale procesului de selecție vizuală a liniilor de calus, cu o încărcare din ce în ce mai mare de metaboliți secundari. Din calusurile cultivate la temperatura de 25 grd.C și 5000 lux se obține o masă celulară cu o rată intensă de proliferare și cu un conținut semnificativ de metaboliți secundari de interes.

Etapa 5. Stabilizarea liniilor celulare selecționate

Stabilizarea liniilor celulare selecționate în etapa 4, implică subcultivarea (pasarea) lor repetată și regulată, la 2 săptămâni, în aceleași condiții de iluminare și temperatură, pe aceeași variantă de mediu nutritiv, pe o perioadă mare de timp pentru a se omogeniza componența populației celulare, în sensul că la fiecare pasaj sunt selectate celulele care sunt cel mai bine adaptate la condițiile de cultivare in vitro, cu rata cea mai mare de diviziune și care au cel mai mare conținut de metaboliți secundari de interes. Fig. 5A și 5B prezentate culturi stabilizate obținute în urma selecției, optimizării și stabilizării liniilor celulare de calus prin subcultivare (pasare) repetată, regulat, în aceleași condiții de cultivare. În urma procesului de stabilizare nu mai apar variații prea mari ca performanță de proliferare și biosinteză de metaboliți secundari între diferitele calusuri obținute (repetiții).

Etapa 6. Obținerea extractului brut din calus de *Leontopodium alpinum*, caracterizarea și standardizarea lui.

Extracția se realizează prin mojararea calusului, obținut în etapa 5, și adăugarea de metanol absolut, în raport de 1:5 (m/v) (masă/volum) timp de 3 zile, cu agitare, la 300 RPM (rotații pe minut), la temperatura camerei. Omogenatele obținute se centrifughează de 2 ori la 10000



RCF (forța centrifugală relativă) timp de 15 minute, iar supernatantul final (extractul brut) se caracterizează biochimic.

Caracterizarea extractului implică dozarea polifenolilor totali, conform metodei descrise de Mihailovic și colab. (2013), a flavonoizilor totali, conform metodei descrise de Zhishen și colab. (1999), cu mici ajustări, a pigmentilor antocianici monomerici sau polimerizați sau oxidați, conform Giusti și Wrolstad (2001) și AOAC Official Methods Program Manual, 2003, determinarea activității antioxidante prin metoda DPPH, conform Marxen și colab. (2007). Extractul metanolic brut poate fi evaporat sau liofilizat și se poate obține un extract solid care poate fi reluat în orice alt solvent și adus la concentrația dorită.

Extractul astfel obținut este standardizat pentru un compus sau pentru o clasă de compuși (în funcție de utilizarea preconizată a extractului) prin diluare sau prin concentrare într-un concentrator Eppendorf Vacufuge Concplus până se atinge concentrația dorită (standard).

Se prezintă în continuare dinamica de proliferare a calusului de floare-de-colț (*Leontopodium alpinum*) și randamentul de obținere a extractului brut prin aplicarea invenției.

Sporul de masă celulară/vas Petri, față de inoculul standard (0,3 g), este de $5,15 \pm 0,54$ g la 2 săptămâni de creștere, respectiv de $10,3 \pm 0,54$ g la o lună de la inoculare.

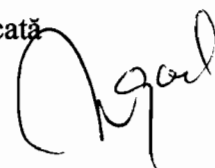
Calusul de floare-de-colț atinge un spor lunar mediu de masă (diferența dintre masa de calus la t_{30} zile de cultivare - masa inițială de calus la t_0) de $10,3 \pm 0,54$ g calus/inocul.

Prin utilizarea unui litru de mediu nutritiv (50 vase Petri a câte 20 ml nutritiv fiecare), într-o lună de cultivare, se obțin 515 g calus, iar din acesta se obțin 2.575 ml extract brut. Din cei 2,575 l extract brut se pot obține prin evaporare 1,320 g extract solid.

Rata de creștere medie a calusului, la fiecare pasaj, este de $18,32 \pm 1,83$, ceea ce înseamnă că fiecare probă de calus crește de aproximativ de 18 ori față de inoculul corespunzător, într-o perioadă de 2 săptămâni de cultivare.

Din punct de vedere biochimic extractul are următoarele caracteristici :

- concentrație flavonoizi: 464 ± 98 mg echivalent rutin/g substanță uscată
- concentrație polifenoli: 236 ± 34 mg echivalent acid galic/g substanță uscată
- concentrație pigmenti antocianici: $0,672 \pm 0,15$ mg echivalent cianidin 3-glucozid/g substanță uscată
- activitate antioxidantă: 905 ± 94 mM echivalenti Trolox/g substanță uscată



REVENDICARI :

1 - Procedul biotehnologic pentru inițierea și obținerea de masă celulară proliferativă înalt producătoare de compuși bioactivi – calus – cât și a extractului brut din aceasta caracterizat prin aceea că inițierea calusării se obține din plantule întregi rezultate prin germinarea aseptică a semințelor de *Leontopodium alpinum* Cass. (floare-de-colț), care se procesează conform următoarelor etape:

- Obținerea plantulelor din semințe germinate aseptice (etapa 1) 700-750 semințe de *Leontopodium alpinum* sunt puse în pânză specială în ADS (apă distilată sterilă) pe agitator timp de 24 ore, la 50 RPM (rotații pe minut), se sterilizează în 0,1% HgCl₂ în 2 băi a câte 3...5 minute fiecare după care semințele se inoculează, în vase Petri, câte 100.....120/vas pe mediu nutritiv Murashige-Skoog (1962) diluat la jumătate, semințele astfel pregătite germinează în 2 săptămâni, la 25 grd.C și întuneric în proporție de 70%, urmează trecerea semințelor germinate la lumină, la 2000 lux -2500 lux, cu o fotoperioadă de 16 ore întuneric și 8 ore lumină;

- Inocularea plantulelor întregi și obținerea de calus primar (etapa 2) se realizează prin plasarea acestora orizontal pe mediul nutritiv de calusare câte 6-8 plantule/vas Petri, astfel calusarea este inițiată pe toată suprafața plantulei, la 25°C și 3500 lux;

- Obținerea și proliferarea calusului secundar (etapa 3) se realizează din calusul primar, obținut în etapa anterioară (etapa 2), care este secționat în fragmente mici, de 2-5 mm și inoculat pe aceeași variantă de mediu nutritiv ca în etapa 2, cultivat la temperatura de 25 grd.C, la lumină cu intensitatea de 3500 lux, pasat (fragmentat și trecut pe mediu proaspăt) la fiecare 3 săptămâni;

- Selecția liniilor celulare proliferative și înalt producătoare de metaboliți secundari de interes (etapa 4) se realizează prin selecția vizuală a zonelor de calus cu cel mai mare conținut în pigmenți și cu cea mai mare proliferare celulară și acumulare de masă la fiecare pasaj, din etapa 3, pasaje realizate cu frecvența de 3 săptămâni, frecvența fiind scurtată la 2 săptămâni pe măsură ce cultura de calus a acumulat un conținut semnificativ de metaboliți secundari – pigmenți – și s-a obținut o masă celulară cu rată intensă de proliferare la 20°C, 5000 lux;

- Stabilizarea liniilor celulare selecționate (etapa 5) se realizează prin subcultivarea (pasarea) lor repetată și regulată, la 2 săptămâni, în aceleași condiții de iluminare și temperatură (20°C, 5000 lux), pe aceeași variantă de mediu nutritiv, pe o perioadă mare de timp pentru a se

omogeniza componența populației celulare, în sensul că la fiecare pasaj sunt selectate celulele care sunt cel mai bine adaptate la condițiile de cultivare *in vitro*, cu rata cea mai mare de diviziune și care au cel mai mare conținut de metaboliți secundari de interes, calusul obținut având următoarele caracteristici : sporul de masă celulară/vas Petri de este de $5,15 \pm 0,54$ g la 2 săptămâni de creștere, respectiv de $10,3 \pm 0,54$ g la o lună de la inoculare, sporul lunar mediu de masă este de $10,3 \pm 0,54$ g calus/inocul, în timp ce rata de creștere medie a calusului, la fiecare pasaj, este de $18,32 \pm 1,83$ cu un randament de 18 ori față de inoculul corespunzător.

2 - Procedeu biotehnologic pentru inițierea și obținerea de masă celulară proliferativă înalt producătoare de compuși bioactivi – calus – cât și a extractului brut din aceasta conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că mediul de cultură pentru inducerea calusării este obținut din mediul bazal Gamborg (1968) adăugat cu: 2-3% zaharoza; 0,01-0,1 % hidrolizat de cazeină; 1-3 mg/l 2,4D (acid 2,4-diclorfenoxiacetic); 1-3 mg/l BAP (6-benzilaminopurină); 0,1-1 mg/l IAA (acidul indolil acetic); 20-200 mg/l CaCO_3 (carbonat de calciu).

3 - Procedeu biotehnologic pentru inițierea și obținerea de masă celulară proliferativă înalt producătoare de compuși bioactivi – calus – cât și a extractului brut din aceasta conform revendicărilor 1 și 2, caracterizat prin aceea că se folosesc mai multe condiții de iluminare la cultivarea calusurilor și anume:

variante la lumina (unde încep să apară colonii de celule pigmentate violaceu), cu o intensitate de:

- 3500 lux în etapa 2 și 3 , de obținere a calusului primar, respectiv secundar
- 5000 lux în etapa 4 și 5, de selecție, respectiv de stabilizare a liniilor de calus

și varianta la întuneric, unde calusul obținut are o culoare alb-gălbuie, culturile fiind crescute în condiții controlate, cu o fotoperioada 8 ore întuneric/16 ore iluminare și o temperatură de 20°C

4 - Procedeu biotehnologic pentru inițierea și obținerea de masă celulară proliferativă înalt producătoare de compuși bioactivi - calus - cât și a extractului brut din aceasta conform revendicării 4 caracterizat prin aceea că extractul brut din calus de *Leontopodium alpinum* se obține prin mojararea calusului obținut în etapa 5 și adăugarea de metanol absolut, în raport de 1:5 (m/v) (masă/volum) timp de 3 zile, cu agitare, la 300 RPM (rotații pe minut), la temperatura camerei. Omogenatele obținute se centrifughează de 2 ori la 10000 RCF (forța



centrifugală relativă) timp de 15 minute, iar supernatantul final reprezintă extractul brut, cu următoarele caracteristici biochimice și compusi bioactivi:

- concentrație flavonoizi: 464 ± 98 mg echivalent rutin/g substanță uscată
- concentrație polifenoli: 236 ± 34 mg echivalent acid galic/g substanță uscată
- concentrație pigmenți antocianici: $0,672 \pm 0,15$ mg echivalent cianidin 3-glucozid/g substanță uscată
- activitate antioxidantă: 905 ± 94 mM echivalenți Trolox/g substanță uscată



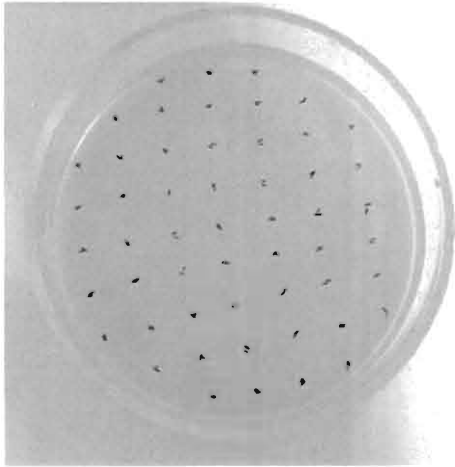


Fig. 1

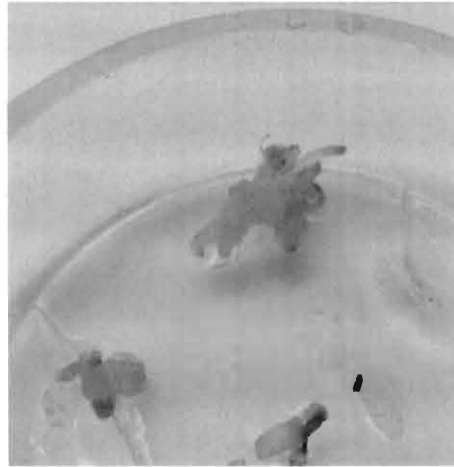


Fig. 2

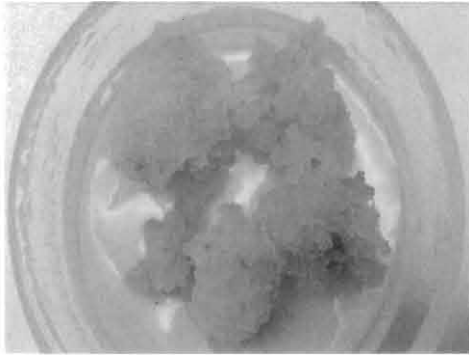


Fig. 3

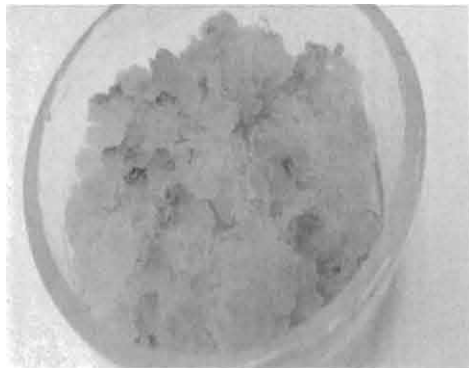


Fig. 4A

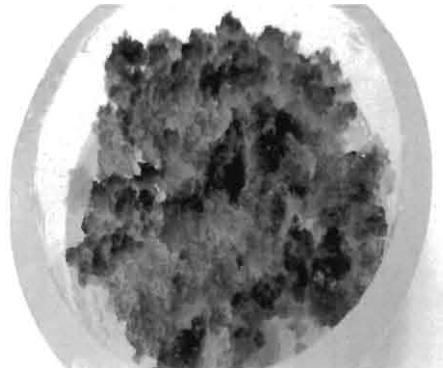


Fig. 4B

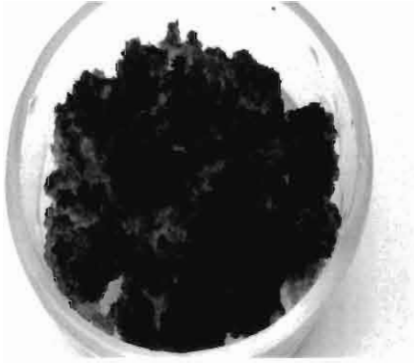


Fig. 5A



Fig. 5B

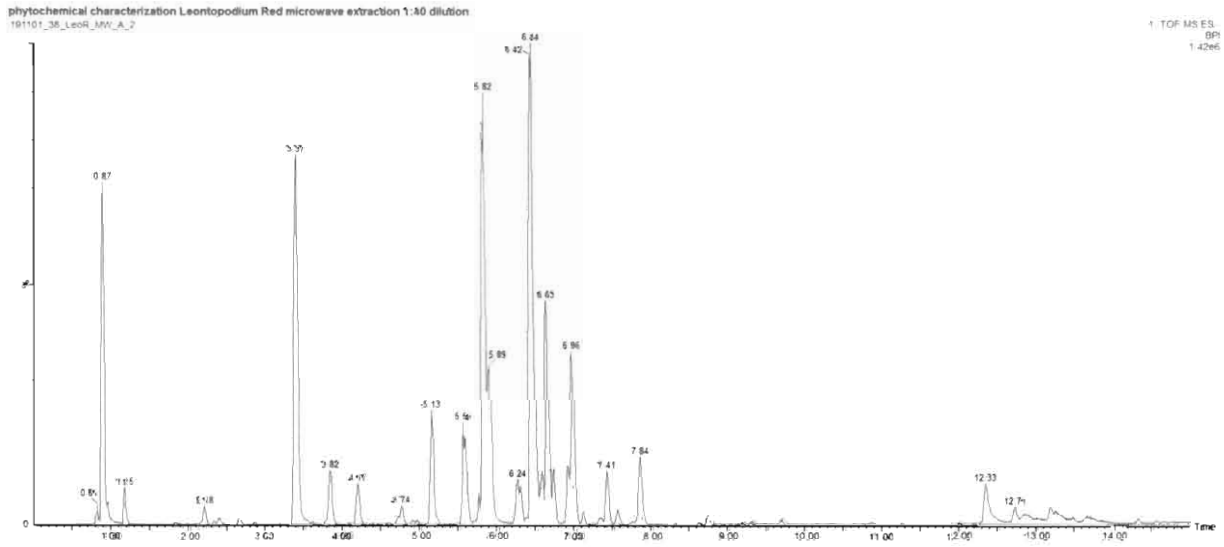


FIG. 6