



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00808

(22) Data de depozit: 04/12/2020

(41) Data publicării cererii:  
30/06/2022 BOPI nr. 6/2022

(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 OBTINERE  
DE MASĂ CELULARĂ PROLIFERATIVĂ ÎNALT  
PRODUCĂTOARE DE COMPUȘI BIOACTIVI LA FRAGARIA X  
ANANASSA DUCH.(CĂPȘUN) ȘI A EXTRACTULUI BRUT**

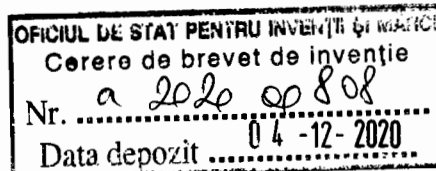
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu biotehnic de obținere a calusului roșu de căpșun din plantele întregi de *Fragaria X ananassa Duch* rezultate prin germinarea aseptică a achenelor, cu aplicabilitate în industria farmaceutică. Procedul, conform invenției, cuprinde etapele: germinarea aseptică a achenelor de căpșun cu obținerea plantulelor, inocularea plantulelor și obținerea calusului primar, obținerea și proliferarea calusului secundar, selecția liniilor celulare proliferative înalt producătoare de metaboliți secundari de interes, stabilizarea liniilor celulare selecționate, obținerea extractului brut prin mojararea calusului rezultat cu metanol

absolut, menținerea acestuia cu agitare timp de 3 zile, la temperatura camerei, centrifugarea omogenatelor cu obținerea extractului final care prezintă următoarele caracteristici biochimice: concentrație flavonoizi: 192,292+/-39,08 mg echivalent rutin/g s.u., concentrație polifenoli: 110,55+/-14,50 mg echivalent acid galic/g s.u., concentrație antociani: 41, 86+/-0,35 mg echivalent catechin-3-glucozid/g s.u. și activitate oxidantă: 1,560+/-0,239 M echivalenți Trolox/g s.u.

Revendicări: 3  
Figuri: 5





1

Procedeu biotehnologic de inițiere și obținere de masă celulară proliferativă înalt producătoare de compuși bioactivi la *Fragaria X ananassa* Duch. (căpșun) 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 achene germinate aseptice de *Fragaria X ananassa* Duch. (căpșun), cât și a extractului brut bioactiv obținut din acesta, extract bogat în metaboliți secundari de interes economic în industria cosmetică, farmaceutică și alimentară.

Căpșunul (*Fragaria X ananassa* Duch.) este o specie foarte bogată în metaboliți secundari de interes economic, compuși care se regăsesc și în cultura de calus obținută prin procedeu biotehnologic care face obiectul invenției.

Este o specie horticolă perenă, erbacee, din fam. Rosaceae, cultivată în regiunile temperate și semitropicale. *Fragaria x ananassa* prezintă stemul scurt cu frunze în rozetă la bază, cu margini dințate, flori albe pe tipul cinci, fructul este fals (receptacol) care poartă semințe de tip achene nedehiscente.

Datorită nenumăratelor cauze care periclitează producția la căpșun (insecte, nematode, fungi, virusuri, exces termic, hidric), cultura *in vitro* de celule și țesuturi a devenit o direcție importantă în biotehnologiile pentru exploatarea compușilor bioactivi.

Numeroasele studii de specialitate confirmă faptul că *Fragaria x ananassa* Duch. este bogată în fitocompuși cu acțiuni benefice dovedite pentru sănătatea umană, printre care: polifenoli, flavonoizi, pigmenți antocianici, acid elagic, compuși cu sulf, vitaminele C, B1, B2, B3, B6, K, A și E și minerale precum mangan, potasiu, magneziu, fosfor, cupru și fier.

Astfel, compușii polifenolici prezenți în această plantă sunt utili în tratarea foarte multor patologii umane, de tipul cancerelor, bolilor cardiovasculare, diabetului de tip II, inflamației și bolilor neurodegenerative.

Extractele de căpșun îmbogățite cu pigmenți antocianici sunt propuse drept alternativă la tratamentele medicamentoase sintetizate chimic și general toxice în vederea prevenției, controlării și ameliorării bolilor neurodegenerative, cum este maladia Alzheimer.

Studiile au evidențiat faptul că utilizarea produselor cosmetice îmbogățite cu extracte din căpșun a avut un rol protectiv la nivelul pielii față de efectele dăunătoare induse de radiațiile ultraviolete: fotoîmbătrânire, hiperplazie, eritem, inflamație, cancer.

Sistemul *in vitro* utilizat în cadrul invenției este reprezentat de *cultura de calus*, celule totipotente, nespecializate, nediferențiate, dar care au capacitatea atât de a se divide în mod nelimitat, cât și de a sintetiza metaboliți secundari care de regulă sunt produși în țesuturi specializate, calusul fiind asimilat cu “celulele stem vegetale”.

Se cunosc procedee de obtinere a calusului la diferite plante prin prelucrarea fragmentelor de frunze, tulpini sau muguri. Un exemplu este:

CN111448984 - Invenția prezintă o metodă pentru cultivarea calusului de *cinnamomum camphora*. Metoda presupune spălarea pețiolilor și tulpinilor de *cinnamomum camphora* pentru a obține un material de bază și tăierea materialului dezinfectat în bucăți astfel ca acestea vor fi induse să genereze calusul folosit pentru obținerea aromelor.

MX2019000137 - invenția se referă la culturi de celule de plante *Harpagophytum procumbens*, linii celulare și extracte, precum și metode pentru prepararea lor și utilizări ale acestora.

Celulele utilizate sunt furnizate ca o probă de material de calus produs dintr-un internod de tulpină a unei plante obținute *in vitro*, și prelucrarea acestuia.

Dezavantajele acestor procedee sunt :

- în culturile agro-industriale se utilizează tratamente cu pesticide, erbicide, fertilizatori sau tratamente împotriva bolilor sau dăunătorilor, foarte numeroase la capsun;
- culturile de *Fragaria X ananassa* Duch. (căpșun) 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 *Fragaria X ananassa Duch.* (căpșun) obținute prin germinarea aseptică a semințelor, precum și a extractului brut obținut din acesta.

Procedeul biotehnologic de inițiere și obținere de masă celulară proliferativă înalt producătoare de compuși bioactivi – calus - cât și a extractului brut din acesta, caracterizat prin aceea că inițierea calusării se obține din plantule întregi rezultate prin germinarea aseptică a achenelor de *Fragaria X ananassa Duch.* (căpșun), care se procesează conform astfel:

- 80.....120 achene de *Fragaria x ananassa* se pun într-un săculeț de pânză, se spală sub jet continuu cu apă de la robinet timp de 2-4 ore după care se imersează în etanol 70%, timp de 20-30 de secunde, se sterilizează în  $H_2SO_4$  (acid sulfuric) 1N (1 normal), timp de 5-10 minute, urmată de 3 spălări cu ADS (apă distilată sterilă) apoi achenele sunt imersate în ADS (apă distilată sterilă) timp de 24 de ore, după care achenele sterilizate se inoculează pe mediul nutritiv MS (Murashige, Skoog, 1962), diluat la jumătate, adăugat cu 2% zaharoză, în cutii Petri, câte 10/vas Petri (20 ml mediu MS/vas Petri), astfel pregătite achenele germinează în procent de 84%, în decurs de 4 săptămâni, la 25°C și întuneric, urmează trecerea plantulelor la lumină, la o intensitate de 2000 - 2500 lux, cu o fotoperioadă de 16 ore lumină și 8 ore întuneric, la aceeași temperatură de 25°C;
- inocularea plantulelor și obținerea calusului primar (etapa 2) se realizează prin plasarea plantulelor întregi, orizontal pe mediul de calusare câte 2-3 plantule/vas Petri, astfel calusarea este inițiată pe toată suprafața plantulei, la 25°C, în condiții de fotoperioadă: 16 ore lumină cu intensitatea de 1000 - 1500 lux timp de 8 h întuneric, timp de 2 - 3 săptămâni când apare pe întreaga suprafață a plantulelor colonii de celule, în majoritate nepigmentate, albe, care alcătuiesc calusul primar;

- 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, la temperatura de 23°C, la lumină cu intensitatea de 2000 – 2500 lux, cu o fotoperioadă de 16 h lumină și 8 h întuneric, fiind trecut (subcultivat) pe mediu proaspăt la fiecare 3 săptămâni (pasaj), când apar celulele pigmentare;

- selecția liniilor celulare proliferative înalt producătoare de metaboliți secundari de interes (etapa 4) se realizează prin selecția vizuală, la fiecare pasaj din etapa anterioară, a zonelor de calus cu cel mai mare conținut în pigmenți și cu cea mai mare rată de proliferare celulară și acumulare de masă, pasaje realizate cu frecvența de 3 săptămâni, la temperatura de 23 °C, lumină cu intensitatea de 2000 lux, cu o fotoperioadă de 16 h lumină și 8 h întuneric;

- stabilizarea liniilor celulare selecționate (etapa 5) se realizează prin subcultivarea lor repetată și regulată la 3 săptămâni, în condiții de mediu constante de temperatură 23°C, fotoperioadă 16 ore lumină cu intensitatea de 500 lux alternând cu 8 ore întuneric și pe aceeași variantă de mediu nutritiv, pe o perioada 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 mediu de masă celulară/vas Petri/pasaj este de  $8,43 \pm 0,82$  g calus/inocul la 3 saptamani de la inoculare, sporul mediu de masă celulară/vas Petri este de  $11,24 \pm 1,093$  g calus/inocul la o lună de la inoculare, în timp ce rata de creștere medie lunară este de  $38,84 \pm 3,68$  cu un randament de aproximativ 38 ori față de inoculul corespunzător.

- mediul de cultură pentru inducerea calusării este obținut din mediul nutritiv bazal MS (Murashige, Skoog, 1962), adăugat cu:

1-3% zaharoză

1-3% glucoză

1-3 mg/l 2,4D (acid 2,4-diclorfenoxiacetic)

1-3 mg/l ANA (acidul  $\alpha$ -naftil acetic)

1-3 mg/l K (kinetină)

0,5 - 1 % agar

20 - 80 mg/l vitamina C

- extractul brut se realizează prin mojararea calusului de *Fragaria x ananassa*, obținut în etapa a 6-a, cu metanol absolut, în raport de 1:5 (m/v) timp de 3 zile, cu agitare, la 300 RPM (rotații pe minut), la temperatura camerei, după care omogenatele obținute se centrifughează de 2 ori la 10000 RCF (forța centrifugală relativă) timp de 15 minute și supernatantul final are următoarele caracteristici biochimici și compuși bioactivi:

- concentrație flavonoizi: 192,292±39,08 mg echivalent rutin/g substanță uscată
- concentrație polifenoli: 110,55±14,50 mg echivalent acid galic/g substanță uscată
- concentrație pigmenți antocianici: 1,86±0,351 mg echivalent catechin-3-glucozid/g subst. uscata
- activitate antioxidantă: 1,560±0,239 M echivalenți Trolox/g substanță uscată

Invenția prezintă următoarele avantaje:

- procedeul este rapid, nu este dependent de parcurgerea ciclului de viață al plantei. În planta cultivată metaboliții secundari sunt sintetizați doar de către celule specializate în anumite țesuturi, la anumite momente ale ciclului de dezvoltare;
- în cultura de calus 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;
- compuși care în mod natural nu există în plantă sau sunt sintetizați în cantitate foarte mică, pot fi sintetizați *de novo* sau în cantitate mult mai mare în cultura de calus;
- în calusul de capsun se produc de aproximativ 7 ori mai mulți polifenoli și de aproximativ 160 ori mai mulți flavonoizi comparativ cu fructele din 90 de soiuri de capsun (Nowicka și col., 2019)
- nu se produce stresul de rănire, care îngreunează, încetinește sau uneori chiar împiedică producerea de calus. La locul rănirii se secretă uneori compuși care se oxidează și devin toxici pentru explant;
- plantula întreaga utilizată ca inocul pentru inițierea calusării 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 meristematice (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 obținerea unui calus uniform, omogen, bogat în metaboliți secundari valoroși pentru industria cosmetică, alimentară, farmaceutică;
- calusul este cultivat în condiții strict controlate de temperatură, iluminare și umiditate, astfel încât se pot asigura condiții optime din punct de vedere fiziologic;
- producerea de metaboliți secundari în sistemul *in vitro* se realizează pe toată durata anului, este neafectată de anotimpuri sau hazarduri naturale (ploi acide, inundații, secetă, grindină, accidente nucleare, erupții vulcanice, etc);
- în sistemul *in vitro* nu se utilizează tratamente cu pesticide, ierbicide, fertilizatori sau tratamente împotriva bolilor (foarte numeroase la căpșun) sau dăunătorilor, cum se realizează în culturile agro-industriale de căpșun;
- condițiile constante nutritionale și de cultivare asigură în cultura *in vitro* o producție continuă și uniformă de metaboliți secundari bioactivi;
- din 100 g calus proaspăt se obține extract cu o concentrație de polifenoli egală cu  $499,3 \pm 65$  mg GAE/100 g substanță proaspătă (adică de aproape 7 ori mai mult) și o concentrație de flavonoizi egală cu  $868,5 \pm 176$  mg RE/100 g substanță proaspătă (adică de aproape 160 de ori mai mult).

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

Fig. 1 Achene de căpșun germinate aseptice în vas Petri pe mediu nutritiv Murashige-Skoog diluat la jumătate;

Fig. 2A - Plantule întregi de căpșun plasate orizontal pe mediul de inducere a calusării

Fig. 2B - Obținerea calusului primar pe suprafața plantulei inoculată orizontal pe mediul de calusare

Fig. 3 Calus secundar de căpșun (*Fragaria X ananassa* Duch.)

Fig. 4 - Linie celulară de calus de căpșun selecționată și stabilizată pentru producerea de compuși bioactivi de interes economic și proliferare celulară intensă

Fig. 5 - Producerea de masă celulară proliferativă înalt producătoare de compuși bioactivi la căpșun (calusuri obținute dintr-un litru de mediu nutritiv)

Conform invenției, procedeul biotehnic de inițiere și obținere de masă celulară proliferativă înalt producătoare de compuși bioactivi la *Fragaria X ananassa* Duch. (căpșun) și a extractului brut cuprinde următoarele etape:

Etapa 1 - obținerea plantulelor din achene germinate aseptice

80.....120 achene de *Fragaria x ananassa* se pun într-un săculeț de pânză, se spală sub jet continuu apă de la robinet timp de 2-4 ore după care se imersează în etanol 70%, timp de 20-30 de secunde. Sterilizarea obține cu H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (acid sulfuric) 1N (1 normal), timp de 5-10 minute, urmată de 3 spălări cu ADS (apă distilată sterilă) apoi achenele sunt imersate în ADS (apă distilată sterilă) timp de 24 de ore.

Achenele sterilizate se inoculează pe mediul nutritiv bazal MS (Murashige, Skoog, 1962), diluat la jumătate, adăugat cu 2% zaharoză, în cutii Petri, câte 10/vas Petri (20 ml mediu MS/vas Petri), așa cum sunt prezentate în fig. 1.

Achenele au germinat în decurs de 4 săptămâni (la întuneric, 25°C), în procent de 84%. După germinare, pentru a se dezvolta, plantulele au fost trecute la lumină, la o intensitate de 2000 lux, cu o fotoperioadă de 16 ore lumină și 8 ore întuneric, la aceeași temperatură (25°C).

Etapa 2 - Inocularea plantulelor și obținerea calusului primar.

Plantulele au fost plasate întregi, așezate orizontal pe mediul de calusare câte 2-3 plantule/vas Petri. (Fig. 2A). În acest mod obținerea calusului primar este inițiată pe toată suprafața plantulei (Fig. 2B).

Compoziția mediului de cultură pentru inducerea calusării este realizat din mediul nutritiv MS (Murashige, Skoog, 1962), la care se adaugă:

1-3% zaharoză

1-3% glucoză

1-3 mg/l 2,4D (acid 2,4-diclorfenoxiacetic)

1-3 mg/l ANA (acidul  $\alpha$ -naftil acetic)

1-3 mg/l K (kinetină)

0,5 - 1 % agar

20 - 80 mg/l vitamina C



Vasele de cultură au fost menținute într-o cameră de creștere Fitotron Weiss-Gallenkamp SCG 120, la 25°C, în condiții de fotoperioadă: 16 ore lumină cu intensitatea de 1000 lux timp de 8 h întuneric. Pe durata a 2 - 3 săptămâni au început să apară pe întreaga suprafață a plantulelor colonii de celule, în majoritate nepigmentate, albe, care alcătuiesc calusul primar.

#### Etapa 3 - Obținerea și proliferarea calusului secundar

Calusul primar, obținut în etapa a 2-a, a fost secționat în fragmente mici, de 2-5 mm și inoculat pe aceeași variantă de mediu nutritiv, la temperatura de 23°C, dar la lumină cu intensitatea de 2000 lux, cu o fotoperioadă de 16 h lumină/8 h întuneric, fiind trecut (subcultivat) pe mediu proaspăt la fiecare 3 săptămâni (pasaj). Celulele pigmentare apar în special la suprafața masei de calus proliferativ, ca răspuns la stimulul luminos. Se obține astfel cultura de calus secundar (Fig. 3).

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

La fiecare pasaj se realizează selecția vizuală a zonelor de calus cu cel mai mare conținut în pigmenți și cu cea mai mare rată de proliferare celulară și acumulare de masă. Pasajele au fost realizate la 3 săptămâni, inclusiv după ce cultura de calus a acumulat pigment în cantitate foarte mare. Cultura de calus a fost menținută la temperatura de 23 °C, la lumină cu intensitatea de 2000 lux, cu o fotoperioadă de 16 h lumină și 8 h întuneric. (Fig. 4)

#### Etapa 5 - Stabilizarea liniilor celulare selecționate

Stabilizarea liniilor celulare selecționate implică subcultivarea lor repetată și regulată la 3 săptămâni, în condiții de mediu constante: temperatură 23°C, fotoperioadă 16 ore lumină cu intensitatea de 500 lux alternând cu 8 ore întuneric și 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. 5);

#### Etapa 6 - Obținerea extractului brut din calus de *Fragaria x ananassa* Duch. (căpșun)

Extracția se realizează prin mojararea a 2 g calus, obținut în etapa a 5-a, cu 10 ml metanol absolut, în raport de 1:5 (m/v) 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 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 metodei pH-ului diferențial descrise de Giusti și Wrolstad (2001) și AOAC Official Methods Program Manual, 2003, precum și determinarea activității antioxidante prin metoda DPPH, conform Marxen și colab. (2007).

Extractul alcoolic 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 obținut poate fi standardizat pentru un compus sau pentru o clasă de compuși (în funcție de utilizarea ulterioară a extractului) prin diluare sau prin concentrare într-un concentrator Eppendorf Vacufuge Conplus până se atinge concentrația dorită (standard).

Se prezintă în continuare dinamica de proliferare a calusului de căpșun roșu cultivat și randamentul de obținere a extractului brut prin aplicarea invenției.

Sporul mediu de masă celulară/vas Petri/pasaj la 3 săptămâni de la inoculare este de  $8,43 \pm 0,82$  g calus/inocul

Sporul mediu de masă celulară/vas Petri la o lună de la inoculare este de  $11,24 \pm 1,093$  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 562 g calus, iar din acesta se obțin 2810 ml extract brut. Din cei 2810 ml extract brut se pot obține prin evaporare 16,0915 g extract solid.

Rata de creștere medie lunară (masa calus final/masa calus inițial) este de  $38,84 \pm 3,68$  ceea ce înseamnă că fiecare probă de calus crește de aproximativ 38 ori față de inocul corespunzător într-o lună de cultivare.

Din punct de vedere biochimic extractul are următoarele caracteristici:

- concentrație flavonoizi:  $192,292 \pm 39,08$  mg echivalent rutin/g substanță uscată
- concentrație polifenoli:  $110,55 \pm 14,50$  mg echivalent acid galic/g substanță uscată
- concentrație pigmenți antocianici:  $1,86 \pm 0,351$  mg echivalent catechin-3-glucozid/g subst. uscata
- activitate antioxidantă:  $1,560 \pm 0,239$  M echivalenți Trolox/g substanță uscată

Altfel spus:

- din 1g de calus proaspat se obtin aproximativ 5 ml extract care contine  $8,685 \pm 1,76$  mg flavonoizi,  $4,993 \pm 0,65$  mg polifenoli si  $84,03 \pm 15,86$   $\mu$ g antociani, sau
- din 100g calus proaspat se obtin  $868,5 \pm 176$  mg flavonoizi,  $499,3 \pm 65$  mg polifenoli si  $8,403 \pm 1,58$  mg antociani.

## REVENDICARI

1 - Procedul biotehologic de inițiere și obținere de masă celulară proliferativă înalt producătoare de compuși bioactivi – calus - cât și a extractului brut din acesta, caracterizat prin aceea că inițierea calusării se obține din plantule întregi rezultate prin germinarea aseptică a achenelor de *Fragaria X ananassa* Duch. (căpșun), care se procesează conform următoarelor etape:

- Obținerea plantulelor din achene germinate aseptice (etapa 1) - 80.....120 achene de *Fragaria x ananassa* se pun într-un săculeț de pânză, se spală sub jet continuu cu apă de la robinet timp de 2-4 ore după care se imersează în etanol 70%, timp de 20-30 de secunde, se sterilizează în H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (acid sulfuric) 1N (1 normal), timp de 5-10 minute, urmată de 3 spălări cu ADS (apă distilată sterilă) apoi achenele sunt imersate în ADS (apă distilată sterilă) timp de 24 de ore, după care achenele sterilizate se inoculează pe mediul nutritiv MS (Murashige, Skoog, 1962), diluat la jumătate, adăugat cu 2% zaharoză, în cutii Petri, câte 10/vas Petri (20 ml mediu bazal MS/vas Petri), astfel pregătite achenele germinează în procent de 84%, în decurs de 4 săptămâni, la 25°C și în tunic, urmează trecerea plantulelor la lumină, la o intensitate de 2000 - 2500 lux, cu o fotoperioadă de 16 ore lumină și 8 ore în tunic, la aceeași temperatură de 25°C;

- Inocularea plantulelor și obținerea calusului primar (etapa 2) se realizează prin plasarea plantulelor întregi, orizontal pe mediul de calusare câte 2-3 plantule/vas Petri, astfel încât obținerea calusului primar este inițiată pe toată suprafața plantulei, la 25°C, în condiții de fotoperioadă: 16 ore lumină cu intensitatea de 1000 -1500 lux timp de 8 h în tunic, timp de 2 - 3 săptămâni când au început să apară pe întreaga suprafață a plantulelor colonii de celule, în majoritate nepigmentate, albe, care alcătuiesc calusul primar;

- Obținerea și proliferarea calusului secundar (etapa 3) se obține 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, la temperatura de 23°C, la lumină cu intensitatea de 2000 – 2500 lux, cu o fotoperioadă de 16 h lumină și 8 h în tunic, fiind trecut (subcultivat) pe mediu proaspăt la fiecare 3 săptămâni (pasaj), când apar celulele pigmentate;

- Selecția liniilor celulare proliferative înalt producătoare de metaboliți secundari de interes (etapa 4) se realizează prin selecția vizuală, la fiecare pasaj din etapa anterioară, a zonelor de

calus cu cel mai mare conținut în pigmenți și cu cea mai mare rată de proliferare celulară și acumulare de masă, pasaje realizate cu frecvența de 3 săptămâni, la temperatura de 23 °C, lumină cu intensitatea de 2000 lux, cu o fotoperioadă de 16 h lumină și 8 h întuneric;

- stabilizarea liniilor celulare selecționate (etapa 5) se realizează prin subcultivarea lor repetată și regulată la 3 săptămâni, în condiții de mediu constante de temperatură 23°C, fotoperioadă 16 ore lumină cu intensitatea de 500 lux alternând cu 8 ore întuneric și pe aceeași variantă de mediu nutritiv, pe o perioada 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 mediu de masă celulară/vas Petri/pasaj este de 8,43±0,82 g calus/inocul la 3 săptămâni de la inoculare, sporul mediu de masă celulară/vas Petri este de 11,24±1,093 g calus/inocul la o lună de la inoculare, în timp ce rata de creștere medie lunară este de 38,84±3,68 cu un randament de aproximativ 38 ori față de inoculul corespunzător.

2 - Procedeu biotehnologic de inițiere și obținere de masă celulară proliferativă înalt producătoare de compuși bioactivi – calus - cât și a extractului brut din acesta conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că mediul de cultură pentru inducerea calusării este obținut din mediul nutritiv MS (Murashige, Skoog, 1962), adăugat cu:

1-3% zaharoză

1-3% glucoză

1-3 mg/l 2,4D (acid 2,4-diclorfenoxiacetic)

1-3 mg/l ANA (acidul  $\alpha$ -naftil acetic)

1-3 mg/l K (kinetină)

0,5 - 1 % agar

20 - 80 mg/l vitamina C

3 - Procedeu biotehnologic de inițiere și obținere de masă celulară proliferativă înalt producătoare de compuși bioactivi – calus - cât și a extractului brut din acesta conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că extracția se realizează prin mojararea calusului de *Fragaria x ananassa*, obținut în etapa a 5-a, cu metanol absolut, în raport de 1:5 (m/v) timp de 3 zile, cu agitare, la 300 RPM ( rotații pe minut), la temperatura camerei, după care

omogenatele obținute se centrifughează de 2 ori la 10000 RCF (forța centrifugală relativă) timp de 15 minute și supernatantul final are următoarele caracteristici biochimice:

- concentrație flavonoizi:  $192,292 \pm 39,08$  mg echivalent rutin/g substanță uscată
- concentrație polifenoli:  $110,55 \pm 14,50$  mg echivalent acid galic/g substanță uscată
- concentrație pigmenți antocianici:  $1,86 \pm 0,351$  mg echivalent catechin-3-glucozid/g subst. uscata
- activitate antioxidantă:  $1,560 \pm 0,239$  M echivalenți Trolox/g substanță uscată

35

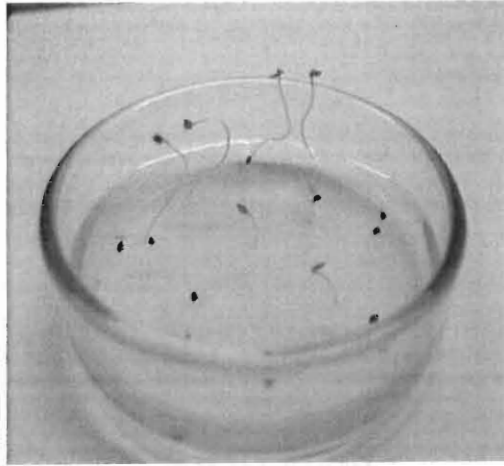


Fig. 1

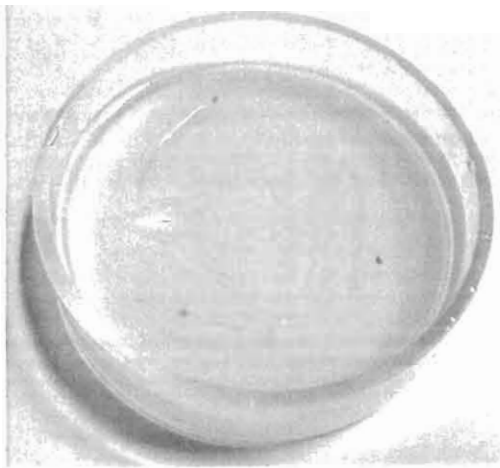


Fig. 2A

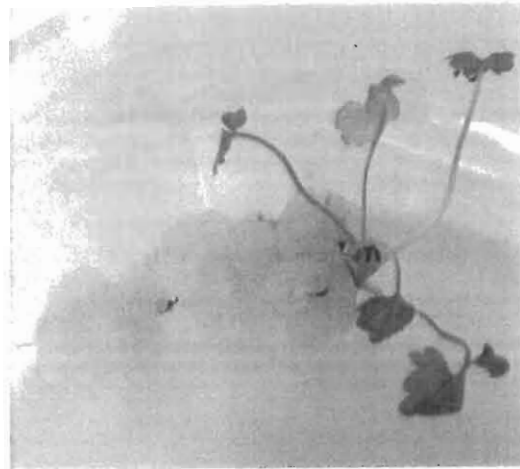


Fig. 2B

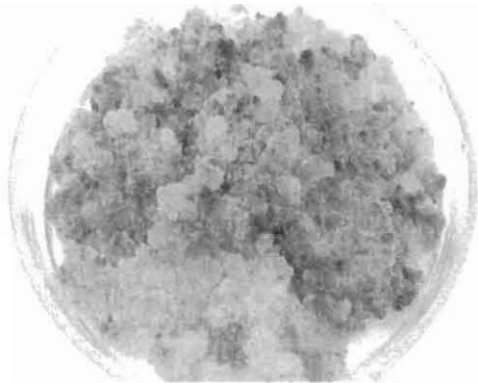


Fig. 3

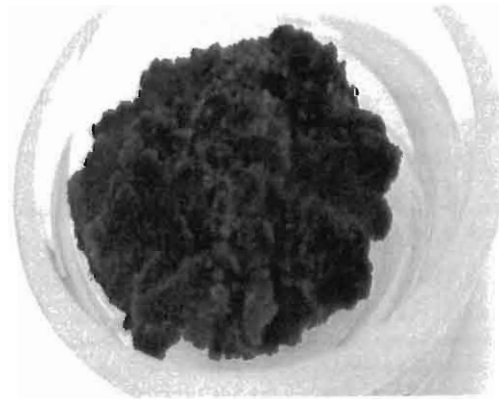


Fig. 4



Fig. 5