



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00837

(22) Data de depozit: 17/12/2020

(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 LACOTINUS
COGGYGRIA SCOP. (SCUMPIE) ȘI A EXTRACTULUI BRUT**

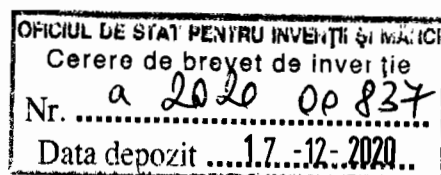
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu biotehнологic de obținere a calusului de scumpie din plantele întregi de *Cotinus coggygria Scop.*, rezultate prin germinarea aseptică a semințelor, cu aplicabilitate în industria farmaceutică. Procedul, conform invenției, cuprinde etapele: germinarea aseptică a semințelor cu obținerea plantulelor, inocularea plantulelor întregi 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 extrac-

tului final care are următoarele caracteristici biochimice: concentrație flavonoizi: 211,337+/-18,56 mg echivalent rutin/g s.u., concentrație polifenoli: 91,87+/-4,88 mg echivalent acid galic/g s.u., concentrație antociani: 2,24+/-1,09 mg echivalent catechin- 3- glucozid/g s.u. și activitate oxidantă: 784,72+/-130,25 mM echivalent Trolox/g s.u.

Revendicări: 3
Figuri: 4





Procedeu biotehnologic de inițiere și obținere de masă celulară proliferativă înalt producătoare de compuși bioactivi la *Cotinus coggygia* Scop. (scumpie) și a extractului brut

Invenția se referă la un procedeu biotehnologic de obținere de calus din plantele întregi rezultate din semințe germinate aseptice la *Cotinus coggygia* Scop. (scumpie), și a extractului brut bioactiv obținut din acesta, extract bogat în metaboliți secundari de interes economic în industria cosmetică, farmaceutică și alimentară.

Genul *Cotinus* aparține familiei *Anacardiaceae* și prezintă două specii de arbuști: *Cotinus obovatus* Raf., de origine americană și *Cotinus coggygia* Scop., specie răspândită din sudul Europei până în nordul Chinei și regăsită și în flora României, dar doar în zona Banatului și în Dobrogea. Această plantă a fost folosită de oameni din vremuri imemorabile atât în scop medical, cât și cosmetic și ornamental (Shagun și colab., 2019; Teixeira da Silva și colab., 2018; Ilczuk și Jacygrad, 2016).

Datorită compoziției de metaboliți secundari, scumpia este recunoscută ca având efecte antioxidante (Matić și colab., 2011a), anticancerigene (Marčetić și colab., 2013), antimicrobiene (Marčetić și colab., 2013; Rendeková și colab., 2015), antivirale, antigenotoxice (Matić și colab., 2011b), antiinflamatorii, conferă protecție hepatică (Matić și colab., 2013; Kong și colab., 2019), însă poate fi puternic genotoxică și citotoxică dacă extractul este administrat în concentrații foarte mari (Stanić și colab., 2011).

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 calusului la diferite plante prin prelucrarea fragmentelor din acestea, ca de exemplu:

CN111248085 (A) – Invenția prezintă o metodă pentru inducerea formării calusului utilizând muguri de iernare de *Lonicera fragrantissima* cărora li se îndepărtează stratul exterior pentru a obține părțile tinere, inoculate pe un mediu de cultură după ce au fost sterilizate.

CN110679483 (A) - Invenția prezintă o metodă pentru inducerea formării calusului la Chinese dogwoods (*Cornus kousa*) prin folosirea tulpinilor pretratate, sterilizate și cultivate pe medii de cultură.

Riaz și colab. (2012) au determinat concentrația de polifenoli totali din planta întreagă, uscată de scumpie din mai multe fracții, iar valoarea cea mai mare a fost observată în cazul fracției solubile de etil acetat, care a măsurat $229,34 \pm 0,57 \mu\text{g GAE/g}$ substanță uscată.

Marcetic și colab. (2013) au determinat concentrația de flavonoizi din lăstari tineri (frunze + ramuri), uscați de scumpie din mai multe fracții, iar valoarea cea mai mare a fost de $35,5 \pm 0,2 \text{ mg RE/g}$ substanță uscată.

Matic și colab. (2013) au determinat concentrația de polifenoli totali și flavonoizi din planta întreagă, uscată de scumpie, astfel au identificat o concentrație de **polifenoli** egală cu $3,78 \text{ mg GAE/g}$ substanță uscată și de **flavonoizi** egală cu $8,29 \text{ mg RE/g}$ substanță uscată.

Dezavantajele acestor metode sunt:

- în plantele întregi metabolitii secundari sunt sintetizați doar de către celulele specializate în anumite țesuturi, în anumite momente ale ciclului de dezvoltare;
- producția de metaboliti secundari este dependentă de anotimpuri și poate fi afectată de hazarduri naturale (inundații, seceta, etc.) sau antropice (poluare, ploii acide, etc.).
- 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 secreta uneori compuși care se oxidează și devin toxici pentru explant.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în realizarea unui procedeu biotehnologic de inițiere și obținere de masă celulară proliferativă înalt producătoare de compuși bioactivi – calus - la *Cotinus coggygria* Scop. (scumpie) din plantele întregi prin germinarea aseptică a semințelor cât și a extractului brut.

Procedeu biotehnologic de inițiere și obținere de masă celulară proliferativă înalt producătoare de compuși bioactivi – calus - la *Cotinus coggygria* Scop. (scumpie) cât și a extractului brut din acesta, constă în aceea că inițierea calusării se obține pe plantele întregi care se procesează astfel :

- semințele de *Cotinus coggygria* se pun într-un săculeț de pânză și se imersează în apă 24 de ore, după care sunt imersate în etanol 70%, timp de 30 de secunde, timp de 5 minute se aplica

un tratament de scarificare cu H_2SO_4 (acid sulfuric) 2N (2 normal), urmata de spălare de 3 ori cu ADS (apă distilată sterilă), sterilizare cu $HgCl_2$ (clorură mercurică) 0,1%, timp de 18 minute și spălare de 3 ori cu ADS (apă distilată sterilă), după care semințele sterilizate sunt inoculate pe mediul nutritiv MS (Murashige, Skoog, 1962) diluat la jumătate, adăugat cu 2% zaharoză, în vase Petri cu diametrul de 10 cm, câte 9/vas, astfel pregătite semințele germinează în proporție de 10%, în decursul a 8-10 săptămâni la întuneric și o temperatură de $10^\circ C$, urmează trecerea plantulelor la lumină, la o intensitate de 2000 lux, cu o fotoperioadă de 16 ore lumină și 8 ore întuneric, la $25^\circ C$ temperatură; (etapa 1).

- plantulele întregi, obținute anterior, sunt plasate orizontal pe mediul de calusare, în cutii Petri cu diametrul de 10 cm, câte o plantulă/cutie Petri, astfel încât obținerea calusului primar este inițiată pe toată suprafața plantulei, sunt menținute în condiții de fotoperioadă: 16 h lumină 2000 lux și 8 h întuneric, la o temperatură de $25^\circ C$, timp de 1-2 luni când apar pe întreaga suprafață a plantulelor colonii de celule, în majoritate nepigmentate, albe, care alcătuiesc calusul primar; (etapa 2)

- calusul primar realizat în etapa anterioară (etapa 2), este secționat în fragmente mici, de 2-5 mm și inoculat pe aceeași variantă de mediu nutritiv, la temperatura de $25^\circ C$, cu o fotoperioadă de 16 h lumină 2000 lux și 8 h întuneric, fiind trecut pe mediu proaspăt la fiecare 2 săptămâni, în timp ce, doar pe durata unui singur pasaj în mediul nutritiv se adăuga acid abscisic (ABA) în concentrație de 0,2-2mg/l și intensitatea luminii se aduce la 3500 lux., cultura de calus secundar se obține după mai multe pasaje;

- selecția liniilor celulare proliferative înalt producătoare de metaboliți secundari de interes (etapa 4) se realizează, la fiecare pasaj din etapa anterioară, 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, pasajele realizate cu frecvența de 2 săptămâni la temperatura de $23^\circ C$, la lumină 3500 lux și 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 2 săptămâni, în condiții constante de mediu la $23^\circ C$, fotoperioadă de 16 h lumină de 2000 lux și 8 h 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 calusul obținut având următoarele caracteristici: sporul mediu de masă

celulară/vas Petri, față de inoculul standard (200 mg), este de $6,54 \pm 0,27$ g la 2 săptămâni de creștere, respectiv de $13,08 \pm 0,54$ g la o lună de la inoculare, în timp ce rata de creștere medie lunară a calusului este de $45,62 \pm 1,8$, cu un randament de aproximativ de 45 de ori față de inoculul corespunzător.

- mediul de cultura pentru inducerea calusarii este realizat din mediul bazal Murashige-Skoog (1962) adăugat cu vitaminele din formula Gamborg (1968) la care se adaugă:

- 3% zaharoză
- 0,1 - 1 mg/l ANA (acidul α naftil-acetic)
- 0,1 - 1 mg/l IAA (acidul indolil-acetic)
- 0,1 - 1 mg/l K (kinetină)
- 0,1 - 1 mg/l 2,4 D (acid 2,4-diclorfenoxiacetic)
- 300 - 500 mg/l CaCO_3 (carbonat de calciu)
- 0,8% agar

- extractul brut se realizează prin mojararea calusului de *Cotinus coggygria* Scop. (scumpie), obținut în etapa 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 iar supernatantul final are următoarele caracteristici biochimice:

- concentrație flavonoizi: $211,337 \pm 18,56$ mg echivalent rutin/g substanță uscată
- concentrație polifenoli: $91,87 \pm 4,88$ mg echivalent acid galic/g substanță uscată
- concentrație antociani: $2,24 \pm 1,09$ mg echivalent catechin-3-glucozid/g substanța uscată
- activitate antioxidantă: $784,72 \pm 130,25$ mM 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;
- nu se produce stresul de rănire, care îngreunează, încetinește sau uneori chiar împiedică producerea de calus ;

- plantula întreagă conține un amestec mare de tipuri celulare și tisulare, ceea ce lărgeste foarte mult aria semnalelor de inițiere și activare a căilor 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;
- 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);
- condițiile constante nutriționale și de cultivare asigură în cultura *in vitro* o producție continuă și uniformă de metaboliți secundari bioactivi;
- 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.
- 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.
- în extractul obținut din calus de scumpie a fost identificat o concentrație de polifenoli totali de $91,87 \pm 4,88$ mg GAE/g substanță uscată = 91870 μ g (de aproape 400 de ori mai mult decât în extractul din planta întreaga);
- în extractul obținut din calus de scumpie concentrația de flavonoizi este de $211,337 \pm 18,56$ mg RE/g substanță uscată (de 6 ori mai mult decât în extractul din planta întreaga);

Se da în continuare un exemplu de realizare în legatura și cu fig. 1- 4, care reprezintă:

Fig. 1 - Semințe de scumpie sterilizate și inoculate pe mediul de germinare (Murashige, Skoog, 1962) diluat la jumătate;

Fig. 2 - Calus secundar de scumpie (*Cotinus coggygia* Scop.) în cursul procesului de selecție a liniilor celulare cele mai performante;

Fig. 3 - - Linie celulară de calus de scumpie selecționată și stabilizată pentru producerea de compuși bioactivi de interes economic și proliferare celulară intensă;

Fig. 4 - Producerea de masă celulară proliferativă înalt producătoare de compuși bioactivi la scumpie (*Cotinus coggygia* Scop.)

Conform invenției, procedeul biotehnologic de inițiere și obținere de masă celulară proliferativă înalt producătoare de compuși bioactivi la *Cotinus coggygia* Scop. (scumpia) și a extractului brut cuprinde următoarele etape:

Etapa 1 - obținerea plantulelor din semințe germinate aseptice

semințe de *Cotinus coggygia* se pun într-un săculeț de pânză și se imersează în apă 24 de ore, după care sunt imersate în etanol 70%, timp de 30 de secunde. Timp de 5 minute se aplică un tratament de scarificare cu H₂SO₄ (acid sulfuric) 2N (2 normal), urmată de spălare de 3 ori cu ADS (apă distilată sterilă), sterilizare cu HgCl₂ (clorură mercurică) 0,1%, timp de 18 minute și spălare de 3 ori cu ADS (apă distilată sterilă).

Semințele sterilizate sunt inoculate pe mediul nutritiv MS (Murashige, Skoog, 1962) diluat la jumătate, adăugat cu 2% zaharoză, în vase Petri cu diametrul de 10 cm, câte 9/vas. Fig. 1
Semințele germinează în decursul a 8-10 săptămâni la întuneric și o temperatură de 10°C, în proporție de 10%. 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 25°C temperatură.

Etapa 2. - inocularea plantulelor și obținerea calusului primar.

Plantulele întregi au fost plasate orizontal pe mediul de calusare, în cutii Petri cu diametrul de 10 cm, câte o plantulă/cutie Petri, astfel încât obținerea calusului primar este inițiată pe toată suprafața plantulei.

Mediul de cultură pentru inducerea calusării la scumpie este realizat din mediul bazal Murashige-Skoog (1962) adăugat cu vitaminele din formula Gamborg (1968) la care se adaugă:

- 3% zaharoză

- 0,1 - 1 mg/l ANA (acidul α naftil-acetic)
- 0,1 - 1 mg/l IAA (acidul indolil-acetic)
- 0,1 - 1 mg/l K (kinetină)
- 0,1 - 1 mg/l 2,4 D (acid 2,4-diclorfenoxiacetic)
- 300 - 500 mg/l CaCO_3 (carbonat de calciu)
- 0,8% agar

Culturile sunt menținute în condiții de fotoperioadă: 16 h lumină (2000 lux) și 8 h întuneric într-un Fitotron Weiss-Gallenkamp SCG 120, la o temperatură de 25°C. Pe durata a 1-2 luni 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 este secționat în fragmente mici, de 2-5 mm și inoculat pe aceeași variantă de mediu nutritiv, la temperatura de 25°C, cu o fotoperioadă de 16 h lumină și 8 h întuneric, fiind trecut pe mediu proaspăt la fiecare 2 săptămâni. Pentru activarea căii metabolice de sinteză a pigmentilor antocianici, doar pe durata unui singur pasaj în mediul nutritiv a fost adăugat acid abscisic (ABA) în concentrație de 0,2-2mg/l. Tot în același scop, intensitatea luminii a fost crescută la 3500 lux. Celulele pigmentare au apărut în special la suprafața masei de calus proliferativ, ca răspuns la stimulul luminos. În urma mai multor pasaje s-a obținut cultura de calus secundar. Fig. 2.

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 proliferare celulară și acumulare de masă. Pasajele sunt realizate la 2 săptămâni (inclusiv după ce cultura de calus a acumulat pigment în cantitate foarte mare) la temperatura de 23 °C, la lumină 3500 lux, cu o fotoperioadă de 16 h lumină și 8 h întuneric. Fig. 3.

Etapa 5. - stabilizarea liniilor celulare selecționate

Stabilizarea liniilor celulare selecționate implică subcultivarea lor repetată și regulată la 2 săptămâni, în condiții constante de mediu la 23 °C, fotoperioadă de 16 h lumină de 2000 lux și 8 h 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. 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). Fig. 4.

Etapa 6. - obținerea și caracterizarea extractului.

Extracția se realizează prin mojararea a 2 g calus 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 obtine 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 Conclplus până se atinge concentrația dorită (standard). Se prezintă în continuare dinamica de proliferare a calusului de scumpie (*Cotinus coggygria*) și randamentul de obținere a extractului brut.

Sporul mediu de masă celulară/vas Petri, față de inoculul standard (200 mg), este de $6,54 \pm 0,27$ g la 2 săptămâni de creștere, respectiv de $13,08 \pm 0,54$ g la o lună de la inoculare.

Calusul de scumpie 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 $13,08 \pm 0,54$ 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 654 g calus, iar din acesta se obțin 3270 ml extract brut. Din cei 3,270 l extract brut se pot obține prin evaporare 17,803 g extract solid.

Rata de creștere medie lunară a calusului este de $45,62 \pm 1,8$, ceea ce înseamnă că fiecare probă de calus crește de aproximativ de 45 de ori față de inoculul corespunzător, într-o perioadă de 4 săptămâni de cultivare.

Din punct de vedere biochimic extractul are următoarele caracteristici :

- concentrație flavonoizi: $211,337 \pm 18,56$ mg echivalent rutin/g substanță uscată
- concentrație polifenoli: $91,87 \pm 4,88$ mg echivalent acid galic/g substanță uscată
- concentrație antociani: $2,24 \pm 1,09$ mg echivalent catechin-3-glucozid/g substanța uscată
- activitate antioxidantă: $784,72 \pm 130,25$ mM echivalenti Trolox/g substanță uscată

Altfel spus, dintr-un 1 g de calus proaspăt se obțin aproximativ 5 ml extract care conține $7,645 \pm 0,68$ mg flavonoizi, $3,367 \pm 0,22$ mg polifenoli și $82,346 \pm 39,97$ μg antociani. Sau din 100g calus proaspăt se obțin $764,5 \pm 68$ mg flavonoizi, $336,7 \pm 22$ mg polifenoli și $8,234 \pm 3,99$ 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 ca inițierea calusarii se obtine din plantule întregi rezutate prin germinarea aseptica a semintelor de *Cotinus coggygia* Scop. (scumpie), care se proceseaza conform urmatoarelor etape:

- obținerea plantulelor din semințe germinate aseptice (etapa 1) - semințele de *Cotinus coggygia* se pun într-un săculeț de pânză și se imersează în apă 24 de ore, după care sunt imersate în etanol 70%, timp de 30 de secunde, timp de 5 minute se aplică un tratament de scarificare cu H₂SO₄ (acid sulfuric) 2N (2 normal), urmata de spălare de 3 ori cu ADS (apă distilată sterilă), sterilizare cu HgCl₂ (clorură mercurică) 0,1%, timp de 18 minute și spălare de 3 ori cu ADS (apă distilată sterilă), după care semințele sterilizate sunt inoculate pe mediu nutritiv MS (Murashige, Skoog, 1962) diluat la jumătate, adăugat cu 2% zaharoză, în vase Petri cu diametrul de 10 cm, câte 9/vas, astfel pregătite semințele germinează în proporție de 10%, în decursul a 8-10 săptămâni la întuneric și o temperatură de 10°C, urmează trecerea plantulelor la lumină, la o intensitate de 2000 lux, cu o fotoperioadă de 16 ore lumină și 8 ore întuneric, la 25°C temperatură;

- inocularea plantulelor și obținerea calusului primar (etapa 2) - plantulele întregi sunt plasate orizontal pe mediul de calusare, în cutii Petri cu diametrul de 10 cm, câte o plantulă/cutie Petri, astfel încât obținerea calusului primar este inițiată pe toată suprafața plantulei, sunt menținute în condiții de fotoperioadă: 16 h lumină 2000 lux și 8 h întuneric, la o temperatură de 25°C, timp de 1-2 luni când apar pe întreaga suprafață a plantulelor colonii de celule, în majoritate nepigmentate, albe, care alcătuiesc calusul primar;

- obținerea și proliferarea calusului secundar (etapa 3) – calusul primar realizat în etapa anterioară (etapa 2), este secționat în fragmente mici, de 2-5 mm și inoculat pe aceeași variantă de mediu nutritiv, la temperatura de 25°C, cu o fotoperioadă de 16 h lumină 2000 lux și 8 h întuneric, fiind trecut pe mediu proaspăt la fiecare 2 săptămâni, în timp ce, doar pe durata unui singur pasaj în mediul nutritiv se adăuga acid abscisic (ABA) în concentrație de 0,2-2mg/l și intensitatea luminii se aduce la 3500 lux., cultura de calus secundar se obține după mai multe pasaje;

- selecția liniilor celulare proliferative înalt producătoare de metaboliți secundari de interes (etapa 4) se realizează, la fiecare pasaj din etapa anterioară, 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, pasajele realizate cu frecvența de 2 săptămâni la temperatura de 23 °C, la lumină 3500 lux și 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 2 săptămâni, în condiții constante de mediu la 23 °C, fotoperioadă de 16 h lumină de 2000 lux și 8 h 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 calusul obținut având următoarele caracteristici: sporul mediu de masă celulară/vas Petri, față de inoculul standard (200 mg), este de $6,54 \pm 0,27$ g la 2 săptămâni de creștere, respectiv de $13,08 \pm 0,54$ g la o lună de la inoculare, în timp ce rata de creștere medie lunară a calusului este de $45,62 \pm 1,8$, cu un randament de aproximativ de 45 de 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 cultura pentru inducerea calusării este realizat din mediul bazal Murashige-Skoog (1962) adăugat cu vitaminele din formula Gamborg (1968) la care se adaugă:

- 3% zaharoză
- 0,1 - 1 mg/l ANA (acidul α naftil-acetic)
- 0,1 - 1 mg/l IAA (acidul indolil-acetic)
- 0,1 - 1 mg/l K (kinetină)
- 0,1 - 1 mg/l 2,4 D (acid 2,4-diclorfenoxiacetic)
- 300 - 500 mg/l CaCO_3 (carbonat de calciu)
- 0,8% agar

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 și 2, caracterizat prin aceea că extractia se realizează prin mojararea calusului de *Cotinus coggygria* Scop. (scumpie), obținut în etapa 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 iar supernatantul final are următoarele caracteristici biochimice:

- concentrație flavonoizi: $211,337 \pm 18,56$ mg echivalent rutin/g substanță uscată
- concentrație polifenoli: $91,87 \pm 4,88$ mg echivalent acid galic/g substanță uscată
- concentrație antociani: $2,24 \pm 1,09$ mg echivalent catechin-3-glucozid/g substanță uscată
- activitate antioxidantă: $784,72 \pm 130,25$ mM echivalenți Trolox/g substanță uscată

30'

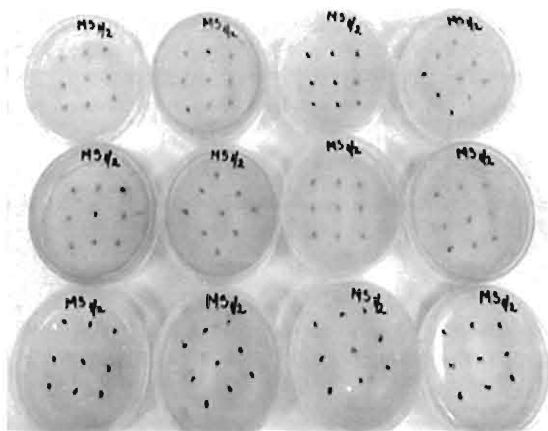


Fig. 1

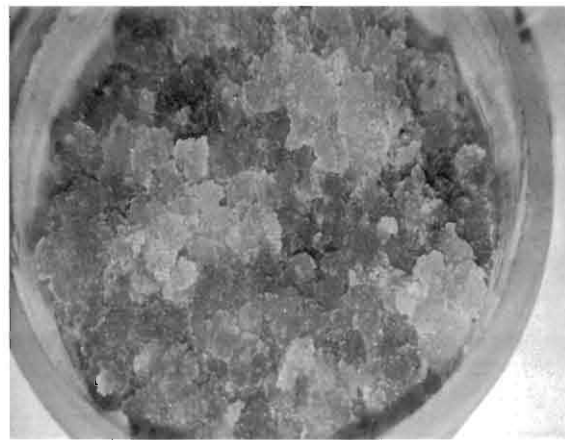


Fig. 2

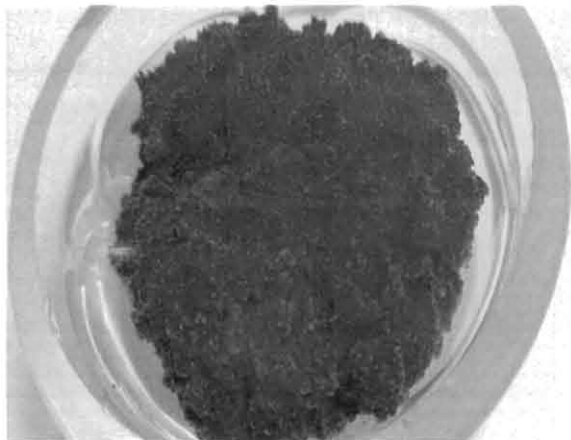


Fig. 3

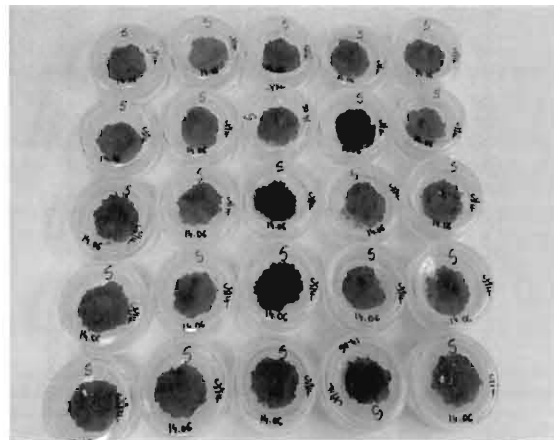


Fig. 4