



F1000095283B



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus  
Patent- och registerstyrelsen(B) (11) KUULUTUSJULKAISU  
UTLAGGNINGSSKRIFT

95283

C (45) Patentti myönnetty  
Patent meddelat 10 01 199 6

(51) Kv.1k.6 - Int.cl.6

C 12N 5/04

(21) Patentihakemus - Patentansökning	894240
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	08.09.89
(24) Alkupäivä - Löpdag	08.09.89
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	20.03.90
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	29.09.95
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
19.09.88 EP 88115354 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Societe des Produits Nestle S.A., 1800 Vevey, Switzerland, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. de March, Ghislaine, 18, Rue Henri Lebrun, 37540 St Cyr sur Loire, France, (FR)  
 2. Harie!, Jean, 36 Chemin du Vivier, Le Haut-Monthoux, 74100 Vétraz-Monthoux, France, (FR)  
 3. Petiard, Vincent, 28 Allée Cote Fleurie, 37100 Tours, France, (FR)

(74) Asiamies - Ombud: Leitzinger Oy

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä kasviperäisten aineiden valmistamiseksi  
 Förfarande för framställning av växtbaserade substanser

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

DE A 3138493 (C 12N 5/02),  
 Biol. Abstr. vol. 83, nro 4, 1987, abstr. nro 37813

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Esillä oleva keksintö koskee menetelmää kasviperäisten aineiden valmistamiseksi. Kasviperäisten aineiden valmistamiseksi kasvinosa istutetaan viljelyaineeseen ja pidetään niukassa hapessa upottamalla öljykerroksen alle ja näin tuotetut aineet uutetaan kasvinosasta, väliaineesta ja/tai öljystä.

Uppfinningen avser ett förfarande för framställning av växtbaseade ämnen. För deras framställning planteras en växt del i ett odlingsmaterial och hålles i knappt syre genom inbäddning under ett oljeskikt och de på detta sätt producerade ämnena extraheras från växt delen, odlingsmaterial och/eller oljan.

Menetelmä kasvipiperäisten aineiden valmistamiseksi

Esillä oleva keksintö koskee menetelmää kasvipiperäisten aineiden valmistamiseksi viljelemällä "in vitro".

5

Monilla kasvipiperäisillä aineilla on tietty taloudellinen arvo sellaisilla teollisuudenaloilla kuten lääketeollisuus (lääkeaineiden aktiiviset aineet), kosmetiikkateollisuus (hajurvedet) ja elintarviketeollisuus (maku- ja lisäaineet).  
10 Kyseessä olevat aineet valmistetaan yleensä uuttamalla kerätyistä tai viljellyistä kasveista. Tällä menetelmällä on kuitenkin monia haittapuolia, esimerkiksi kun kasvipiperäisen lähtöaineen varastoja on täydennettävä (kausiluonteisuus, stabiilius, laatu, jne.).

15

Monia korvaavia menetelmiä näiden haittapuolien välttämiseksi on tutkittu. Yksi niistä on "in vitro" -menetelmä satoisien lajien ei-erilaistuneiden kudosten tai solujen viljelemiseksi. Tähän liittyen viitataan japanilaiseen  
20 patenttiin JP 57-39778, joka koskee haavasolukkojen viljelyä sekoitettavassa nesteväliaineessa, joka sisältää selluloosaa aktiivisten aineiden uuttamiseksi siitä parafiiniöljyn ja/tai rasvojen avulla; ja Bisson et al:n artikkeliin (Journal of Medicinal Plant Research, 1983, 47, 164), joka  
25 koskee eteeristen öljyjen uuttamista kamomillan ei-erilaistuneita soluja sisältävästä viljelmästä lisäämällä ravintoaineeseen rasvafaasitippoja, johon öljyt kerääntyvät. Koska näissä menetelmissä kuitenkin käytetään ei-erilaistuneita  
30 soluja, rajoittuu niiden käyttö tarkasti määriteltyjen tuotteiden valmistukseen.

:

Esillä olevan keksinnön tavoitteena on yhdistää erilaistuneen järjestelmän edut ja "in vitro" -viljelyn edut.

35

Tämän tavoitteen saavuttamiseksi keksinnön mukainen menetelmä on tunnettu siitä, että kasvinosa istutetaan viljelyaineeseen ja pidetään niukassa hapessa upottamalla öljyker-

rokseen, ja tuotetut kasvisperäiset aineet uutetaan öljystä.

5 Valmistettavat aineet uutetaan parhaiten kasvinosasta, viljelyaineesta ja/tai öljystä. Tähän tarkoitukseen voidaan käyttää tavanomaisia uuttomenetelmiä. Menetelmän suurin etu liittyy kasvinosien "in vitro" -viljelyyn, jotka tuottavat haluttuja aineita, ja niiden ylläpitoon ja näiden aineiden pitkän aikaa kestävään valmistukseen niistä.

10

Hapen niukkuuden ylläpitämiseksi käytettävä öljy saattaa aiheuttaa joidenkin vältettävien haihtuvien aineiden häviämisen ja kyseessä olevien aineiden uuton.

15 Yksi esillä olevan keksinnön eduista on, että sen avulla aineita voidaan valmistaa jatkuvalla ja toistuvalla tavalla. Keksinnön toinen etu on, että sen avulla kasvinosista valmistettavien aineiden valmistusvaihetta voidaan ylläpitää huomattavasti kauemmin kuin tavanomainen "in situ"-  
20 kasvivalmistus kestää. Keksinnön etuna on edelleen se, että sen avulla kasvinosa säilyttää tietyt laadulliset ominaisuutensa, joka on harvinaista ei-erilaistuneissa soluviljelmissä, joissa voidaan valmistaa toissijaisia aineita.

25 Tällä tavoin kasvinosat eivät pilaannu ja säilyvät useita kuukausia ja sen lisäksi niiden kudoksiin, viljelyaineeseen ja hapen niukkuuden aiheuttavaan öljyyn kerääntyy jatkuvasti sellaisia aineita kuten eteerisiä öljyjä, jotka ovat luonteeltaan samanlaisia tai samantapaisia kuin ne, joita  
30 valmistuu tavanomaisissa kasviuuttomenetelmissä.

:  
Keksinnönmukainen menetelmä koskee kasvinosien ylläpitoa, eikä kudosten kasvua ja/tai lisääntymistä, vaikka näitä saattaakin rajoitetussa määrin esiintyä tietyissä tapauksissa.  
35

Sopivia kriteerejä kasvinosan eloonjäämisen arvioimiseksi ovat

- ulkonäkökriteereinä:

- \* pigmentin muodostuminen istutukseen
- 5 \* kloroosin tai ruskettumisen esiintyminen (hapettuminen),

- morfologisina kriteereinä:

- \* kukkiminen
- 10 \* haavasolukoiden ja/tai juurien muodostuminen.

Näitä kriteereitä arvioidaan eri tavoin, nimittäin:

- visuaalisesti
- biokemiallisin kokein (värjäyskoe, jne.), joiden avulla
- 15 kasvinosan elinkykyisyys voidaan arvioida.

Viljeltävät kasvinosat voivat olla minkälaisia tahansa ja niitä voidaan viljellä osina tai kokonaisina. Ne voivat olla esimerkiksi juurten, lehtien tai varsien osia tai jopa

20 kukkanappuja tai auenneita kukkia.

Kasvit tai kasvinosat voivat olla peräisin mistä tahansa lähteestä, toisin sanoen saatu

- joko viljeltyjen tai kerättyjen kasvien sadonkorjuusta,
- 25 jolloin menetelmässä voidaan käyttää perinteistä kasvien tuottoa, jota parannetaan pidentämällä haluttujen aineiden biosynteesiä ja valmistusvaihetta,
- tai muodostamalla soluviljelmistä, missä tapauksessa menetelmä on täysin riippumaton perinteisestä viljelystä.

30

Kasvit tai kasvinosat voidaan puhdistaa ennen niiden istuttamista viljelyaineeseen haitallisten mikro-organismien poistamiseksi. Kasvit tai kasvielimet voidaan puhdistaa upottamalla muutamaksi minuutiksi puhdistusliuokseen,

35 esimerkiksi Javelin veteen, elohopeadikloridiin, kalsium- tai natriumhypokloriittiin tai muuhun tavanomaiseen puhdis-

tusaineeseen, tai muulla kemiallisella tai fysikaalisella tavalla (röntgensäteet,  $\gamma$ -säteet, jne.).

5 Viljelyaineen tulee sisältää kaikkia niitä ravintoaineita, joita kasvinosa tarvitsee selviytyäkseen valmistusvaiheesta. Tämä ravintoaine voi olla puolijähmeässä muodossa (vesipitoinen gelloosi) tai vaihtoehtoisesti sekoitettavan nesteen muodossa kasvinosien viljelyn yksinkertaistamiseksi. Jälkimmäisessä tapauksessa viljely saattaa käsittää  
10 ainoastaan puhdistettujen osien upottamisen ravintoaineeseen, jonka jälkeen se peitetään öljykalvolla ettei pinnalla pääse tapahtumaan muutoksia.

Viljelyainetta voidaan uusia siten, että kasvinosalla on  
15 aina käytettävissään niitä aineita, joita se tarvitsee jäädäkseen eloon ja että siihen sekoittuneet yhdisteet (antagonistiset ja/tai halutut) poistuvat. Viljelyaineen uusiminen voi olla jatkuvaa tai puolijatkuvaa.

20 Samalla tavoin viljelyainetta voidaan muuntaa lisäämällä kasvunsäätelyaineita ja/tai lisäämällä aineita, jotka edistävät haluttujen metaboliittien muodostumista (esias-  
teiden lisääminen).

25 Viljelyaine on parhaiten sellaista tyyppiä, jota käytetään yleisesti kudosten "in vitro"-viljelyssä, esimerkiksi Gamborgin väliainetta, Hellerin väliainetta tai jopa Murashigen ja Skoogin väliaineita, joiden koostumukset on esitetty jäljempänä taulukossa I. Esillä olevassa keksin-  
30 nössä edullisin viljelyaine on Gamborgin väliaine.

: Kasvinosan peittämiseen käytetyllä öljyllä voi olla kaksi tarkoitusta, nimittäin:

- se toimii ennen kaikkea säilöntäaineena varmistaen, että  
35 hapen niukkuus pysyy yllä ja
- se voi toimia pidätys-/uuttoaineena haluttuja lipofiilisiä aineita varten.

Öljyn valinta riippuu tietyistä kriteereistä, kuten:

- sen kyvystä aikaansaada hapen niukkuutta, eli kyvystä olla päästämättä yhtään ulkopuolista happea kasvinosaan, tai siirtää hyvin vähän ulkopuolista happea kasvinosaan ja sen viljelyaineeseen,
- sen kyvystä liuottaa haluttuja aineita,
- sen myrkyttömyydestä suhteessa kasvinosiin.

Koska on suositeltavaa uusia öljy määräjain - sillä se saattaa haluttuja aineita uutettaessa tyydyttyä - neste-  
mäistä hapen niukkuutta aikaansaavaa väliainetta on helpompi käsitellä kuin kiinteää väliainetta, joskin kiinteääkin väliainetta voidaan käyttää. Öljyä voidaan vaihtaa jatkuvasti tai puolijatkuvasti. Sopivia öljyjä ovat mineraali-  
öljyt, orgaaniset tai kasviperäiset öljyt, synteettiset öljyt ja kaikki muut sellaiset öljyt, jotka voivat toimia säilöntäaineena. Esillä olevan keksinnön mukaan edullisin öljy on parafiiniöljy. Öljystä voidaan poistaa kaasu ja se voidaan steriloida ennen käyttöä. Kaasu voidaan poistaa sijoittamalla öljy tyhjiöön, jolloin siinä olevat kaasut pakenevat ja vaihtoehtoisesti korvataan typellä.

Klorofyllin heikentymisen estämiseksi - mikä voisi vaikuttaa huonontavasti kasvinosan eloonjäämiseen - himmeää valaistusta, noin 0-400 luksin luokkaa, voidaan käyttää sovellettaessa keksinnönmukaista menetelmää. Viljelylämpötila voi vaihdella välillä 18°C - 35°C ja on parhaiten 25°C:n luokkaa.

Keksinnönmukainen menetelmä kasviperäisten aineiden valmistamiseksi voidaan toteuttaa katkonaisesti, puolijatkuvasti tai jatkuvasti.

Keksintöä on kuvattu yksityiskohtaisemmin seuraavissa esimerkeissä. Esimerkit A, B ja C liittyvät pääasiassa ylläpitoon ja sen arvioinnissa käytettäviin kriteereihin.

Ennen esimerkkejä esitetään seuraava taulukko, jossa on kuvattu käytettävän viljelyaineen koostumus.

Taulukko I:

5 Käytettyjen väliaineiden koostumukset (pH = 5,8)

	Murashigen ja Skoogin väliaineet	Gamborgin väliaine	Hellerin väliaine
	mg/l	mg/l	mg/l
10	Sakkaroosi	20000	20000
	Agar-agar (väliaineet) käsitelty geloosilla)	8000	8000
15	<u>Makroelementit</u>		
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	-
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		134
	CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	440	150
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	250
20	KCl	-	750
	KNO <sub>3</sub>	1900	2500
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	-
	NaNO <sub>3</sub>	-	600
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	125
25	<u>Mikroelementit</u>		
	AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	-	-
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025
30	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	-	-
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8
:	Na <sub>2</sub> -EDTA	37,3	37,3
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,3	10,0
	NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	-	-
35	KI	0,83	0,75
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,6	2,0
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	3,0

	Murashigen ja Skoogin väliaineet mg/l	Gamborgin väliaine mg/l	Hellerin väliaine mg/l
5	<u>Vitamiinit</u>		
	Kalsiumpantotenaatti	-	1
	Mesoinositoli	100	100
	Nikotiinihappo	10,5	1
	Pyridoksiini (vit. B <sub>6</sub> )	0,5	1
10	Tiamiini (vit. B <sub>1</sub> )	0,1	10
	Biotiini	-	0,1

ESIMERKKI A

15 Fenkolinvarsien osia puhdistettiin upottamalla muutamaksi  
minuutiksi kalsiumhypokloriittiliuokseen ja huuhtomalla  
huolellisesti steriilissä tislatussa vedessä. Sen jälkeen  
nämä osat istutettiin Gamborgin väliaineeseen, joka oli  
jähmetetty lisäämällä agar-agaria. Sen jälkeen ne sijoitet-  
20 tiin niukkaan hapteen lisäämällä steriloitua parafiiniöljyä  
ja jätettiin seisomaan 25°C:een, himmeässä valaistuksessa  
(200 luksia). Fenkolinvarsien värinmuodostuksen kehitty-  
mistä niukassa hapessa verrattuna samanlaisiin varsiin,  
jotka sijoitettiin samaan ravintoaineeseen, mutta lisäämät-  
25 tä öljyä, seurattiin 18 viikon ajan.

Kuuden viikon kuluttua kaikki niukassa hapessa olleet  
varret olivat edelleen vihreitä eikä niissä ollut merkkiä-  
kään kloroosista, kun taas kaikissa vertailuvarsissa oli  
30 havaittavissa alkavaa kloroosia. 30 %:iin vertailuvarsista  
oli vaikuttanut hapettuminen tai täydellinen kloroosi 8  
viikon kuluttua, kun puolestaan niukassa hapessa olevista  
varsista vain 10 %:ssa oli havaittavissa alkavaa kloroosia  
saman ajanjakson kuluttua, ja vain 20 %:ssa 12 viikon  
35 kuluttua. 16 viikon kuluttua 90 % vertailuvarsista oli  
kokonaan hapettunut verrattuna 40 %:iin niukassa hapessa  
olleista varsista, joista loput olivat edelleen vihreitä.  
18 viikon kuluttua 100 % vertailuvarsista oli täysin hapet-

tunut, kun puolestaan vain 50 % niukassa hapessa olevista varsista oli täysin hapettunut ja lopuissa 50 %:ssa esiin-  
tyi vain alkavaa kloroosia. Lopulta, 16 viikon kuluttua yksikään vertailuvarsista ei enää ollut täysin vihreä, kun  
5 puolestaan 50 % niukassa hapessa olleista varsista oli edelleen täysin vihreitä 16 viikon jälkeen.

#### ESIMERKKI B

10 Tuberoosan kukkanuppua kerättiin kolmessa eri kehitysvaiheessa, nimittäin:

vaihe I: teriö 1-1,5 cm pitkä - vihreät terälehdet

vaihe II: teriö 2 cm pitkä - terälehdet alkaneet muuttua  
15 valkoisiksi

vaihe III: teriö 3 cm pitkä - valkoiset terälehdet

Ne puhdistetaan ja istutetaan Gamborgin väliaineeseen, jota on käsitelty gelloosilla. Sen jälkeen nuput sijoitetaan  
20 niukkaan happeen lisäämällä parafiiniöljyä. Vertailunuppuihin ei lisätä öljyä. Kaikki jätetään himmeään valoon (200 luksia), 25°C:een lämpötilaan.

Näiden kukkanuppujen hapettumisen kehittyminen ajan funktiona rekisteröidään mielivaltaisesti asteikolla 0 - 7, jossa

0 = hapettumisen aiheuttamia läikkiä ei ole 1 = hapettumisen alkanut terälehtien päistä korkeintaan 10 %:ssa terälehdistä

30 2 = hapettuminen alkanut terälehtien päistä yli 10 %:ssa terälehdistä

: 3 = puolet terälehtien pinta-alasta on hapettunut korkeintaan 10 %:lla terälehdistä

4 = puolet terälehtien pinta-alasta on hapettunut yli  
35 10 %:lla terälehdistä

5 = puolet terälehtien pinta-alasta on hapettunut yli 50 %:lla terälehdistä

6 = kukka on hapettunut huomattavissa määrin (80 %)

7 = kukka on hapettunut kokonaan.

Huomautettakoon, että antioksidanttien lisääminen para-  
5 fiiniöljyyn ei vähennä hapettumisen muodostumista merkittä-  
västi.

Sellaisen öljyn käyttö, josta kaasua oli poistettu ei anta-  
nut oleellisesti erilaisia tuloksia kuin öljy, josta kaasua  
10 ei oltu poistettu. Sen sijaan niukkaan hapteen sijoitettujen  
nuppujen ja vertailunuppujen välillä oli selvä ero.

Seuraavissa taulukoissa on esitetty hapettumisasteen kehittäminen ajan funktiona:

15

Vaiheessa I olevat nuput:

	<u>Aika (päivinä)</u>	2	5	7	10	13	17	18	24	28
20	Vertailu	0	0	1	1	5	5	6	7	7
	Öljy	0	0	0	1	1	1	2	2	3
	Kaasuton öljy	0	0	0	1	1	1	2	2	3

Tästä voidaan nähdä, että vertailunuput olivat hapettuneet  
täysin 24 päivän kuluttua, kun taas niukassa hapessa olevat  
25 säilyivät yli 4 viikkoa.

Vaiheessa II olevat nuput:

	<u>Aika (päivinä)</u>	2	5	7	10	13	17	18	24	28
30	Vertailu	0	0	2	2	5	7	7	7	7
	Öljy	0	0	0	1	1	1	1	2	2
	Kaasuton öljy	0	0	0	1	1	1	1	2	2

Vertailunuput olivat 17 päivän kuluttua hapettuneet, kun  
35 puolestaan niukassa hapessa olleet nuput olivat hapettuneet  
vain hieman 4 viikon kuluttua.

Vaiheessa III olevat nuput:

Aika (päivinä)	2	5	7	10	13	17	18	24	28
Vertailu	2	5	7	7	7	7	7	7	7
5 Ölly	0	0	1	1	2	3	3	4	4
Kaasuton öljy	0	1	1	2	3	4	4	5	5

Vertailunuput olivat hapettuneet 7 päivän kuluttua, kun öljyssä olevia nappuja voitiin puolestaan säilyttää jopa 28 päivää ennen kuin ne hapettuivat kokonaan.

### ESIMERKKI C

Useita kasvinosia steriloidtiin, istutettiin Gamborgin väliaineeseen, jota oli käsitelty gelloosilla, sijoitettiin sen jälkeen niukkaan happeen parafiiniöljykerroksen alle ja jätettiin seisomaan 25°C:een, himmeään valoon (200 luksia). Kasvit olivat maustekasveja (I), hajustekasveja (II) ja sellaisia kasveja, jotka eivät tuota aromia, mutta tuottavat haihtumattomia aineita, joilla on arvonsa lääkeaineissa tai kosmeettisissa tuotteissa (III).

Näiden kokeiden tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa:

	Laji	Osat	Mahdollinen säilyvyys niukassa hapessa
25	I * <i>Ocimum basilicum</i>	lehdet	10 - 12 viikkoa
	* <i>Verbena triphylia</i>	lehdet	3 - 4 viikkoa
30	II * <i>Pelargonium capitatum</i>	lehdet	8 - 10 viikkoa
	* <i>Pogostemon patchouli</i>	lehdet	8 - 10 viikkoa
:	III * <i>Ferula galbanum</i>	juuret	10 - 12 viikkoa haavasolukkojen esiintymistä
35	* <i>Gingko biloba</i>	lehdet	14 - 16 viikkoa

Istutetusta kasvi- tai kasvinosatyyppistä riippumatta säilyminen niukassa hapessa on mahdollista jopa kuukauden ajan ja voidaan ylläpitää jopa neljä kuukautta.

5 ESIMERKKI 1

Mintun lehtiä, jotka oli puhdistettu ja sen jälkeen istutettu Gamborgin väliaineeseen, sijoitettiin niukkaan hapteen parafiiniöljykerroksen alle 25°C:ssa. Aromaattisten yhdisteiden muodostumista säilymisvaiheen aikana seurattiin 10 5 viikon ajan. Mintun lehdet jaettiin kolmeen ryhmään ja alistettiin erilaisille koeolosuhteille:

ryhmä A: voimakas valo (2000 luksia)  
 15 ryhmä B: heikko valo (200 luksia)  
 ryhmä C: voimakas valo (2000 luksia) ja lisätty terpeenin esiastetta.

Öljyssä olevaa eteeriselle öljylle ominaista yhdistettä, 20 nimittäin karvonin, seurattiin erityisesti. Öljyä uusittiin säännöllisesti 35 päivän ajan kaikissa kolmessa ryhmässä ja kvantitatiivinen analyysi suoritettiin densitometrisesti ohutkerroskromatografialla kerätyssä öljyssä olevan karvonin määrän määrittämiseksi. Tulokset vahvistettiin kaasufaasikromatografialla. Alla olevassa taulukossa on esitetty 25 öljyyn kerääntyneen karvonin määrä kolmessa ryhmässä 5 viikon jakson aikana. Karvonin määrä on annettu mikrogrammoina grammaa tuoretta istutettua lehtimateriaalia kohti.

30	<u>Aika (päivinä)</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>7</u>	<u>14</u>	<u>21</u>	<u>28</u>	<u>35</u>
	Ryhmä A	20	60	10	240	10	170	120	240	110
	Ryhmä B	110	60	10	20	20	20	20	140	110
	Ryhmä C	620	60	80	10	170	170	260	340	170

35 Huippu karvonin muodostumisessa voidaan havaita kinetiikan alussa, jonka jälkeen muodostuminen väheni ja sen jälkeen

jatkuu ja uusi kerääntymishuippu muodostui 28 päivän kohdalla.

Seuraavassa taulukossa on esitetty karvonin muodostumisen lisääntyminen 35 päivän ajanjaksolla ( $\mu\text{g/g}$  tuoretta materiaalia).

	I	II	III	IV
Ryhmä A	690	980	635	925
Ryhmä B	690	510	600	520
10 Ryhmä C	690	1880	820	2010

- I: alkuperäinen karvonimäärä istutetussa lehdessä  
 II: öljyyn 35 päivän aikana kerääntynyt karvoni  
 III: jäljelle jääneissä kudoksissa oleva lopullinen karvonimäärä  
 15 IV: karvonin lisäys 35 päivän aikana (II + III - I).

Nämä luvut osoittavat selvästi karvonin synteesin jatkumisen tietyn ajanjakson kuluessa pikemmin kuin yksinkertaisena kiinteä aine/neste uuttotapahtumana; kokonaistuotantomäärä voi olla kolminkertainen verrattuna alkuperäisessä istutuksessa olevaan määrään.

#### ESIMERKKI 2

25

Esimerkin A mukaisia fenkolinvarsia viljeltiin in vitro parafiiniöljyllä peitettynä Gamborgin väliaineessa, jota oli käsitelty gelloosilla. P-allyyl anisolin - joka on eteeriselle öljylle ominainen yhdiste - synteesiä seurattiin säilymisvaiheessa 2 kuukauden ajan.

30

: Fenkolinvarret jaettiin kolmeen ryhmään, jotka alistettiin erilaisille koeolosuhteille:

- 35 Ryhmä A: tavallista Gamborgin väliainetta  
 sakkaroosia:  $20 \text{ g l}^{-1}$   
 valaistus: 200 luksia

Ryhmä B: tavallista Gamborgin väliainetta + kasvunsäätely-  
ainetta

sakkaroosia: 20 g l<sup>-1</sup>

valaistus: 200 luksia

5

Ryhmä C: 1/10 Gamborgin väliainetta

sakkaroosi: 10 g l<sup>-1</sup>

valaistus: 200 luksia

10 Parafiiniöljyä uusittiin säännöllisesti 1, 3, 5 ja 7 viikon  
jälkeen ja analysoitiin sen jälkeen kvantitatiivisesti ja  
kvalitatiivisesti kaasufaasikromatografialla. P-allyyl  
anisolin läsnäolo öljyssä ja useiden muiden aromaattisten  
yhdisteiden esiintyminen kirjattiin.

15

Seuraavassa taulukossa on esitetty öljyyn kerääntyneen  
p-allyyl anisolin määrä (µg/g tuoretta istutettua lehtimate-  
riaalia) ajan funktiona:

20	Aika (päivinä)	7	21	35	49	I	II	III	IV
	Ryhmä 2	222	42	122	jälkiä	333	386	35	88
	Ryhmä B	400	48	42	jälkiä	333	490	30	187
	Ryhmä C	291	94	52	136	333	573	106	346

25 I: alkuperäinen p-allyyl anisolin pitoisuus istutetussa  
varressa

II: öljyyn kerääntynyt p-allyyl anisoli

III: jäljelle jääneissä kudoksissa oleva lopullinen p-allyyl  
anisolin määrä

30 IV: p-allyyl anisolin lisääntyminen 7 viikon aikana (II +  
III - I)

Kokonaistuotanto voi olla kaksinkertainen istutukseen  
verrattuna (ryhmä C).

35

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä kasvipiperäisten aineiden valmistamiseksi viljelemällä "in vitro", t u n n e t t u siitä, että kasvinosa  
5 istutetaan viljelyaineeseen ja pidetään niukassa hapessa upottamalla öljykerrokseen, ja tuotetut kasvisperäiset aineet uutetaan öljystä.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t -  
10 t u siitä, että kasvinosa on kokonainen juuri, lehti, kukka tai kukkanuppu tai osa siitä.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t -  
15 t u siitä, että öljy on mineraaliöljy tai orgaaninen öljy, kasvipiperäinen tai synteettinen öljy.
4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t -  
t u siitä, että öljy on parafiiniöljy.
- 20 5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t -  
t u siitä, että kasvinosan pidetään niukassa hapessa, himmeässä valossa välillä 0 - 400 luksia ja lämpötilassa välillä 18 - 35°C.
- 25 6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t -  
t u siitä, että esiasteita ja/tai kasvunsäätelyaineita lisätään viljelyaineeseen.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av växtbaserade ämnen genom kultivering "in vitro", k ä n n e t e c k n a t därav,  
5 att växtdelen inplanteras i kultiveringsmediet och hålles under knapp syre genom nedsänkning i ett oljeskikt, och de producerade växtbaserade ämnen extraheras ur oljan.
2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k -  
10 n a t därav, att växtdelen är hela roten, bladet, blomman eller blomknoppen eller en del därav.
3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k -  
15 n a t därav, att oljan är mineralolja eller organisk olja, en vegetabilisk eller syntetisk olja.
4. Förfarande enligt patentkravet 3, k ä n n e t e c k -  
n a t därav, att oljan är paraffinolja.
- 20 5. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k -  
n a t därav, att växtdelen hålles i knapp syre, dämpat ljus mellan 0 - 400 lux och vid en temperatur av mellan 18 - 35°C.
- 25 6. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k -  
n a t därav, att förstadier och/eller tillväxt reglerande ämnen tillsätts kultiveringsmediet.