



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) **NO**

(11) **174854**

(13) **B**

(51) **Int Cl⁵ C 12 N 5/04**

Styret for det industrielle rettsvern

(21) Søknadsnr	893594	(86) Int. inng. dag og	
(22) Inng. dag	07.09.89	søknadsnummer	
(24) Løpedag	07.09.89	(85) Videreføringsdag	
(41) Alm. tilgj.	20.03.90	(30) Prioritet	19.09.88, EP, 88115354
(44) Utlegningsdato	11.04.94		

(71) Patentsøker	Société des Produits Nestlé SA, Case postale 353, CH-1800 Vevey, CH
(72) Oppfinner	Ghislaine De March, St. Cyr Sur Loire, FR Jean Hariel, Vétraz-Monthoux, FR Vincent Petiard, Tours, FR
(74) Fullmektig	Bryns Patentkontor AS, Oslo

(54) **Benevnelse** **Fremgangsmåte for fremstilling av vegetabiliske stoffer**

(56) **Anførte publikasjoner** Biological Abstracts, vol. 83 (4), 1987, no. 37813

(57) **Sammendrag** For å produsere stoffer av vegetabilisk opphav
implanteres et vegetabilisk organ i et kulturmedium og
holdes under hypoksi ved neddykking under et lag av
olje, og stoffene som produseres ekstraheres fra
organet, mediet og/eller oljen.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av vegetabiliske stoffer ved bruk av "in vitro"-kultur.

5 Tallrike stoffer av vegetabilisk opphav er av en viss økonomisk verdi for slike industrigrener som den farmasøytiske industrien (aktive prinsipper i medikamenter), den kosmetiske industrien (parfyme) og næringsmiddelindustrien (smakstoffer og additiver). De aktuelle stoffene fremstilles ved ekstraksjon fra samlede eller dyrkede planter. Imidlertid har denne fremgangsmåten mange ulemper, spesielt med hensyn til fornyelse av lagerbeholdningen av det vegetabiliske utgangsmaterialet (periodisitet, stabilitet, kvalitet, osv.).

15 Forskjellige erstatningsprosesser har vært undersøkt for å oppheve disse ulempene. De innbefatter "in vitro"-prosessen for dyrking av udifferensierte vev eller celler fra produktive spesies. Det vises i dette henseende til japansk patent JP 57-39778, som vedrører kulturen av kallus i et omrørt flytende medium inneholdende cellulose for å ekstrahere de aktive prinsippene derfra med parafin og/eller fett, og artikkelen til Bisson et al (Journal of Medicinal Plant Research, 1983, 47, 164) som vedrører ekstraksjonen av eteriske oljer fra en kultur av udifferensierte celler av kamille ved tilsats til næringsmediet av dråper av en fettfase hvori oljene skal akkumuleres. Fordi de anvender udifferensierte celler er disse teknikkene imidlertid begrenset til fremstillingen av vel-definerte produkter.

30 Formålet med foreliggende oppfinnelse er å kombinere fordelene ved det differensierte systemet med fordelene ved "in vitro"-kultur.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer følgelig en fremgangsmåten av den innledningsvis angitte art som er kjenne-
35 tegnet ved at

- et vegetabilsk organ dekontamineres,
- det vegetabilske organet implanteres i et kulturmedium og
- 5 - holdes under hypoksi ved neddykking under et lag av olje ved en temperatur mellom 18 og 35°C, hvor oljen som benyttes er et konserveringsmiddel som sikrer hypoksi, er ikke-toksisk og eventuelt fungerer som ekstraksjonsmiddel for lipofile stoffer, og
- 10 - stoffene av vegetabilsk opphav som fremstilles ekstraheres fra det vegetabilske organet, kulturmediet og/eller oljen.

De fremstilte stoffene ekstraheres som angitt ovenfor fra det vegetabilske organet, fra kulturmediet og/eller fra oljen. Konvensjonelle ekstraksjonsteknikker kan benyttes for dette formålet. Hovedfordelen ved fremgangsmåten ligger i "in-vitro"-kulturen av vegetabilske organer som produserer de ønskede stoffene og i deres livsopphold og deres produksjon av disse stoffene over lange perioder.

Oljen som benyttes for å opprettholde hypoksi kan gjøre det mulig å unngå tap av flyktige stoffer og ekstraksjon av de aktuelle stoffene.

En fordel ved foreliggende oppfinnelse er at den muliggjør at stoffene fremstilles på en konstant og reproducerbar måte. En annen fordel med oppfinnelsen er at den gjør det mulig at produksjonsfasen for stoffene ved hjelp av vegetabilske organer utvides i lengre perioder enn den normale varigheten av "in situ"-produksjon ved planter.

En annen fordel med oppfinnelsen er at den gjør det mulig for det vegetabilske organet å bevare sine spesifikke kvalitative egenskaper, hvilket sjelden er tilfelle med udifferensierte cellekulturer hvor sekundære stoffer kan bli produsert.

På denne måten vil de vegetabiliske organene ikke bare unngå å forderves og overleve i flere måneder, de fortsetter også å akkumulere slike stoffer i vevet, kulturmediet og hypoksi-oljen som eteriske oljer identiske med eller tilsvarende de som produseres ved tradisjonelle fremgangsmåter ved ekstraksjon fra planter.

Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen vedrører livsoppholdet for vegetabiliske organer og ikke veksten og/eller formeringen av vev, selv om dette kan finne sted i redusert omfang i visse tilfeller.

Egnede kriterier for å bedømme overlevelsen av det vegetabiliske organet innbefatter

- som utseendemessige kriterier:
 - utviklingen av pigmentering i implantatet
 - tilsynekomsten av klorose eller bruning (oksydasjon),
- som morfologiske kriterier:
 - blomstring
 - tilsynekomsten av kallus og/eller røtter.

Disse kriteriene bedømmes på forskjellige måter, nemlig:

- visuelt
- ved biokjemiske forsøk (koloreringsforsøk, osv.) som gjør det mulig å bedømme levedyktigheten for organet.

De vegetabiliske organene som kultiveres kan være av en hvilken som helst type og kan kultiveres som deler eller som en helhet. De kan f.eks. være fragmenter av røtter, blader eller stilker eller også blomsterknopper eller åpne blomster.

Plantene eller organene kan være av et hvilket som helst opphav, dvs.

- oppnås enten ved høsting av dyrkede eller samlede planter, i hvilket tilfelle fremgangsmåten gjør det mulig å forbedre utnyttelsen av tradisjonell vegetabilsk produksjon ved utvidelse av biosyntesen og produksjonsfasen for de ønskede stoffene,
- eller dannet fra cellekulturer, i hvilket tilfelle fremgangsmåten gir fullstendig uavhengighet fra tradisjonell kultur.

Forurensningene fjernes fra plantene eller de vegetabilske organene før implantering i kulturmediet for å eliminere vanskelige mikroorganismer. Plantene eller organene dekontamineres ved neddykking i få minutter i en dekontaminerende oppløsning, så som Javel-vann, kvikksølvdiklorid, kalsium- eller natriumhypokloritt eller et hvilket som helst annet typisk dekontamineringsmiddel eller ved en hvilken som helst kjemisk eller fysikalsk fremgangsmåte (røntgenstråler, gammastråler, osv.).

Kulturmediet som anvendes bør forsyne det vegetabilske organet med næringsstoffene som er nødvendige for dets overlevelse i produksjonsfasen. Næringsmediet kan være i en halvfast form (vandig gelose) eller i form av en eventuelt omrørt væske for å forenkle dyrkingen av de vegetabilske organene. I sistnevnte tilfelle omfatter dyrkingen enkel neddykking av de dekontaminerte organene i næringsmediet, etterfulgt ved dekking med en film av olje for å unngå eventuelle endringer i overflaten.

Kulturmediet kan fornyes slik at organet alltid tilføres de nødvendige elementene for overlevelse og for å fjerne eventuelle diffunderende forbindelser (antagonistiske og/eller ønskede). Fornyelsen av kulturmediet kan være kontinuerlig eller halvkontinuerlig.

Tilsvarende kan kulturmediet modifiseres ved tilsats av vekstregulatorer og/eller ved tilsats av elementer som er i stand til å fremme produksjonen av de ønskede metabolittene (tilsats av forstadier).

5

Kulturmediet er fortrinnsvis et medium av typen som typisk anvendes ved "in vitro"-kultur av vev, så som et Gamborg-medium, Heller-medium eller også Murashige- og Skoog-medium, sammensetningene av disse er vist i tabell I nedenfor. Det foretrukne kulturmediet ifølge oppfinnelsen er Gamborgmedium.

10

Oljen som benyttes for å dekke det vegetabilske organet utfører to funksjoner, nemlig:

- 15 - den virker først og fremst som et konserveringsmiddel som sikrer opprettholdelsen av hypoksi og
- den kan virke som et oppfangings/ekstraksjonsmiddel for de ønskede lipofile stoffene.

20

Valget av oljen er avhengig av visse kriterier, så som:

- dens evne til å forårsake hypoksi, dvs. ikke å overføre noe ytre oksygen eller meget lite ytre oksygen til det vegetabilske organet og dets kulturmedium,
- 25
- dens oppløsende evne for de ønskede stoffene,
 - dens fravær av toksisitet med hensyn på de vegetabilske organene.
- 30

35

Siden det er foretrukket å fornye oljen periodisk, fordi den kan bli mettet ved ekstraksjon av de ønskede stoffene, er et flytende hypoksimum enklere å håndtere enn et fast medium, selv om et fast medium kan benyttes. Oljen kan fornyes kontinuerlig eller halvkontinuerlig. Egnede oljer innbefatter oljer av mineralsk, organisk eller vegetabilsk

opphav, syntetiske oljer og enhver annen olje som er i stand til å virke som et konserveringsmiddel. Den foretrukne oljen ifølge oppfinnelsen er en parafinolje. Oljen kan være avgasset og sterilisert før anvendelse. Avgassing kan
5 utføres ved å plassere oljen under vakuum, gassene som er tilstede deri unnslipper og erstattes eventuelt med nitrogen.

For å unngå nedbrytning av klorofyll, hvilket ville påvirke overlevelsen av det vegetabilske organet i negativ retning,
10 kan det benyttes svak belysning av størrelsesorden 0-400 lux ved utførelsen av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. Kulturtemperaturen er i området fra 18°C til 35°C, og er fortrinnsvis av størrelsesorden 25°C.

15 Fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen for fremstillingen av stoffer av vegetabilsk opphav kan utføres diskontinuerlig, halvkontinuerlig eller kontinuerlig.

Oppfinnelsen illustreres i større detalj i de etterfølgende eksemplene. Eksemplene A, B og C vedrører spesielt over-
20 levelsen og kriteriene anvendt for vurdering av denne. Forut for eksemplene følger tabellen som viser sammensetningen av det anvendte kulturmediet.

25

30

35

174854

7

Tabell I

Sammensetning av anvendte medier (pH = 5,8)

	Murashige- og Skoog- medium mg/l	Gamborg- medium mg/l	Heller- medium mg/l
5			
	Sukrose	20000	20000
	Agar (medier be- handlet med gelose)	8000	8000
10			
	<u>Makroelementer</u>		
	NH ₄ NO ₃	1650	-
	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134
	CaCl ₂ ·H ₂ O	440	150
15	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	250
	KCl	-	750
	KNO ₃	1900	2500
	KH ₂ PO ₄	170	-
	NaNO ₃	-	600
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	-	125
20			
	<u>Mikroelementer</u>		
	AlCl ₃ ·6H ₂ O	-	0,05
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	-	1,0
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	27,8
25	Na ₂ -EDTA	37,3	37,3
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	10,0
	NiCl ₂ ·6H ₂ O	-	0,03
	KI	0,83	0,75
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	2,0
	H ₃ BO ₃	6,2	3,0
30			
	<u>Vitaminer</u>		
	Kalsiumpantotenat	-	1
	Meso-inositol	100	100
	Nikotinsyre	10,5	1
	Pyridoksin (vitamin B ₆)	0,5	1
35	Tiamin (vitamin B ₁)	0,1	10
	Biotin	-	0,1

Eksempel A

Fragmenter av fennikelstengler dekontamineres ved neddykking i få minutter i en oppløsning av kalsiumhypokloritt og grundig rensing i sterilt, destillert vann. Disse fragmentene implanteres deretter i et Gamborgmedium størknet ved tilsats av agar-agar. De plasseres deretter under hypoksi ved tilsats av sterilisert parafinolje og får stå ved 25°C under svak belysning (200 lux). Utviklingen av pigmenteringen av fennikelstenglene plassert under hypoksi ved sammenligning med tilsvarende stengler plassert i det samme næringsmediet, men uten den tilsatte oljen, observeres over et tidsrom på 18 uker.

Etter 6 uker er alle stenglene under hypoksi fremdeles grønne uten noe tegn på klorose, mens sammenligningsstenglene alle viser begynnende klorose. 30% av sammenligningsstenglene er påvirket av oksydasjon eller total klorose etter 8 uker, mens bare 10% av stenglene under hypoksi viser begynnende klorose etter det samme tidsrommet, og bare 20% etter 12 uker. Etter 16 uker er 90% av sammenligningsstenglene fullstendig oksydert, mens tallet er 40% for stenglene under hypoksi, resten er fremdeles grønne. Etter 18 uker er 100% av sammenligningsstenglene fullstendig oksydert, mens bare 50% av stenglene under hypoksi er fullstendig oksydert, de igjenværende 50% viser bare begynnende klorose. Endelig, etter 6 uker, er ingen av sammenligningsstenglene fullstendig grønne, mens 50% av stenglene under hypoksi fremdeles er fullstendig grønne etter 16 uker.

Eksempel B

Blomsterknopper av tuberose samles ved tre forskjellige utviklingstrinn, nemlig:

trinn I: krone 1-1,5 cm lang - grønne kronblader

trinn II: krone 2 cm lang - begynnende hvitning av kronbladene

trinn III: krone 3 cm lang - hvite kronblader

De dekontamineres og implanteres i et Gamborgmedium behandlet med gelose. Knoppene plasseres deretter under hypoksi ved tilsats av parafinolje. Ingen olje tilsettes til sammenligningsknoppene. Det hele får stå under svak belysning (200 lux) ved 25°C.

Utviklingen av oksydasjonen av disse blomsterknoppene som funksjon av tiden registreres tilfeldig på en skala fra 0 til 7 hvor

0 = fravær av oksydasjonsflekker

1 = begynnende oksydasjon ved endene av kronbladene på høyst 10% av kronbladene.

2 = begynnende oksydasjon ved endene av kronbladene på mer enn 10% av kronbladene

3 = oksydasjon på halvparten av overflatearealet av kronbladene på høyst 10% av kronbladene

4 = oksydasjon av halvparten av overflatearealet av kronbladene på mer enn 10% av kronbladene

5 = oksydasjon av halvparten av overflatearealet av kronbladene på mer enn 50% av kronbladene

6 = betydelig oksydasjon ved blomsten (80%)

7 = fullstendig oksydasjon av blomsten.

Det bemerkes at tilsats av antioksidanter til parafinoljen ikke medfører noen betydelig reduksjon i oksydasjon.

Anvendelsen av avgasset olje gir ikke noen betydelig forskjell sammenlignet med ikke-avgasset olje. Derimot er det en klar forskjell mellom knappene plassert under hypoksi og sammenligningsknoppene.

5

De følgende tabellene viser utviklingen av oksydasjonsgraden som funksjon av tiden:

For knappene ved trinn I:

10

Tid (dager)	2	5	7	10	13	17	18	24	28
Sammenligning	0	0	1	1	5	5	6	7	7
Olje	0	0	0	1	1	1	2	2	3
Avgasset olje	0	0	0	1	1	1	2	2	3

15

Det fremgår at sammenligningsknoppene er fullstendig oksydert etter 24 dager, mens knappene under hypoksi overlever i mer enn 4 uker.

20

For knappene ved trinn II:

25

Tid (dager)	2	5	7	10	13	17	18	24	28
Sammenligning	0	0	2	2	5	7	7	7	7
Olje	0	0	0	1	1	1	1	2	2
Avgasset olje	0	0	0	1	1	1	1	2	2

30

Sammenligningsknoppene er oksydert etter 17 dager, mens knappene under hypoksi bare er svakt oksydert etter 4 uker.

35

For knoppene ved trinn III:

Tid (dager)	2	5	7	10	13	17	18	24	28
Sammenligning	2	5	7	7	7	7	7	7	7
Olje	0	0	1	1	2	3	3	4	4
Avgasset olje	0	1	1	2	3	4	4	5	5

Sammenligningsknoppene er oksydert etter 7 dager, mens knoppene under olje kan holdes i opp til 28 dager før de er fullstendig oksydert.

Eksempel C

Forskjellige vegetabiliske organer ble dekontaminert, implantert i et Gamborgmedium behandlet med gelose, deretter plassert under hypoksi under et lag av parafinolje og fikk stå ved 25°C i svak belysning (200 lux). De vegetabiliske organene innbefattet aromatiske planter (I), parfymeplanter (II) og planter som ikke produserer en aroma, men som produserer ikke-flyktige stoffer av farmakologisk eller kosmetisk verdi (III).

Resultatene av disse forsøkene er vist i den følgende tabellen:

	Spesies	Organer	M u l i g overlevelse under hypoksi	
5	I	• Ocimum basilicum	blader	10-12 uker
		• Verbena triphylia	blader	3-4 uker
	II	• Pelargonium capitatum	blader	8-10 uker
10		• Pogostemon patchouli	blader	8-10 uker
	III	• Ferula galbanum	røtter	10-12 uker tilsynekomst av kallus
15		• Gingko biloba	blader	14-16 uker

Uavhengig av typen plante eller organ som er implantert, er overlevelse under hypoksi mulig i minst en måned og kan opprettholdes så lenge som fire måneder.

Eksempel 1

Peppermynteblader som er dekontaminert og deretter implantert i et Gamborgmedium plasseres under hypoksi under et lag av parafinolja ved 25°C. Produksjonen av aromatiske forbindelser under overlevelsesfasen følges over en periode på 5 uker. Peppermyntebladene inndeles i tre grupper og underkastes forskjellige forsøksbetingelser:

gruppe A: sterkt lys (200 lux)

gruppe B: svakt lys (200 lux)

gruppe C: sterkt lys (2000 lux) og tilsats av terpenforstadium.

Nærværet i oljen av en forbindelse karakteristisk for den eteriske oljen, nemlig karvon, følges spesielt. Oljen fornyes regelmessig over et tidsrom på 35 dager i de tre gruppene og en kvantitativ analyse gjennomføres ved densitometri ved tynnsjikt-kromatografi for å bestemme mengden karbon tilstede i den samlede oljen. Resultatene bekreftes ved analyse ved hjelp av gassfasekromatografi. Den følgende tabellen viser mengden karbon som er samlet i oljen for de tre gruppene over et tidsrom på 5 uker. Mengden karvon uttrykkes i mikrogram pr. gram friskt implantert bladmateriale.

Tid (dager)	1	2	3	4	7	14	21	28	35
Gruppe A	20	60	10	240	10	170	120	240	110
Gruppe B	110	60	10	20	20	20	20	140	110
Gruppe C	620	60	80	10	170	170	260	340	170

En topp observeres i produksjonen av karvon ved begynnelsen av kinetikken, etterfulgt av et produksjonsfall og deretter av en gjenopptagelse med en ny akkumuleringstopp ved 28 dager.

Den følgende tabellen viser økningen i akkumuleringen av karvon over perioden på 35 dager (i $\mu\text{g/g}$ nytt materiale).

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

I : innledende karvoninnhold i implantert blad

II : karvon akkumulert i oljen i løpet av 35 dager

III: endelig karvoninnhold i det gjenværende vevet

IV : økning i karvon i løpet av 35 dager (II + III - I).

5

Disse tallene illustrerer klart gjenopptaket i syntesen av karvon i løpet av et tidsrom istedenfor et enkelt fast-stoff/væske-ekstraksjonsfenomen; den samlede mengden fremstilt kan nå tre ganger mengden som er tilstede i det opprinnelige implantatet.

10

Eksempel 2

Fennikelstengler ifølge eksempel A dyrkes in vitro under parafinolje i et Gamborgmedium behandlet med gelose. Syntesen av p-allylanisol, en forbindelse karakteristisk for den eteriske oljen, under overlevelsesfasen, følges over et tidsrom på 2 måneder.

15

Fennikelstenglene deles i tre grupper som underkastes forskjellige forsøksbetingelser:

20

Gruppe A: grunnleggende Gamborgmedium

sukrose: 20 g l⁻¹

belysning: 200 lux

25

Gruppe B: grunnleggende Gamborgmedium + vekstregulator

sukrose: 20 g l⁻¹

belysning: 200 lux

30

Gruppe C: 1/10 grunnleggende Gamborgmedium

sukrose: 10 g l⁻¹

belysning: 200 lux

35

Parafinoljen fornyes etter 1, 3, 5 og 7 uker og analyseres deretter kvantitativt og kvalitativt ved hjelp av gass-fasekromatografi. Nærværet av p-allylanisol i oljen og

tilsynekomsten av tallrike andre aromatiske forbindelser registreres.

Den følgende tabellen viser mengden av p-allylanisol som er
akkumulert i oljen (i $\mu\text{g/g}$ av nyimplantert bladmateriale) som
funksjon av tiden:

	Tid (dager)				I	II	III	IV
	7	21	35	49				
Gruppe A	222	42	122	spor	333	386	35	88
Gruppe B	400	48	42	spor	333	490	30	187
Gruppe C	291	94	52	136	333	573	106	346

I : innledende p-allylanisolinhold av implantert stengel

II : p-allylanisol akkumulert i oljen

III: endelig p-allylanisolinhold i gjenværende vev

IV : økning i p-allylanisol i løpet av 7 uker (II + III-I).

Den samlede produksjonen kan nå det dobbelte av mengden i
implantatet (gruppe C).

P a t e n t k r a v

1.

5 Fremgangsmåte for fremstilling av vegetabilske stoffer ved bruk av "in vitro"-kultur, k a r a k t e r i s e r t v e d a t

- et vegetabilsk organ dekontamineres,
- det vegetabilske organet implanteres i et kulturmedium og
- holdes under hypoksi ved neddykking under et lag av olje
- 10 ved en temperatur mellom 18 og 35°C, hvor oljen som benyttes er et konserveringsmiddel som sikrer hypoksi, er ikke-toksisk og eventuelt fungerer som ekstraksjonsmiddel for lipofile stoffer, og
- stoffene av vegetabilsk opphav som fremstilles ekstraheres
- 15 fra det vegetabilske organet, kulturmediet og/eller oljen.

2.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t kulturmediet og/eller oljen fornyes kontinuerlig

20 eller halvkontinuerlig.

3.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t oljen er en olje av mineralsk eller organisk

25 opphav, en olje av vegetabilsk opphav eller en syntetisk olje, og ved at den er sterilisert og/eller avgasset.

4.

Fremgangsmåte ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d a t oljen er en parafinolje.

30

5.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t det vegetabilske organet er hele eller del av en

35 rot, blad, blomst eller blomsterknopp.

6.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
v e d at forstadier og/eller vekstregulatorer tilsettes til
kulturmediet.

5

7.

Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
v e d at organet holdes under hypoksi i svakt lys på 0 til
400 lux.

10

15

20

25

30

35