

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **237808**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **413202**

(22) Data zgłoszenia: **20.07.2015**

(51) Int. Cl.
A61K 36/28 (2006.01)
A61K 31/365 (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01)

(54) **Sposób pozyskiwania helenaliny i dihydrohelenaliny oraz estrów tych substancji
z kultur in vitro Arnica**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
30.01.2017 BUP 03/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
31.05.2021 WUP 11/21

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Wrocławski, Wrocław, PL
UNIwersytet Medyczny im. Piastów
Śląskich we Wrocławiu, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

KRYSTYNA KROMER, Wrocław, PL
AGATA KIERASIŃSKA, Wrocław, PL
JERZY WIŚNIEWSKI, Wrocław, PL
DOROTA PORUTAŁA, Wrocław, PL
ANDRZEJ GAMIAN, Wrocław, PL

PL 237808 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób pozyskiwania helenaliny i dihydrohelenaliny oraz estrów tych substancji z kultur *in vitro* arniki znajdujący zastosowanie na rynku kosmetycznym i farmakologicznym.

Arnica pełni znaczącą rolę w zdrowiu człowieka, zarówno w zbalansowanej diecie, a także jako środek farmaceutyczny o potencjalnym znaczeniu w leczeniu chorób układu krążenia oraz w nowotworach.

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania naturalnymi metodami leczenia. Gwałtowne zwiększanie sprzedaży leków roślinnych, wzmożony popyt na surowce roślinne powodują, że zasoby roślin leczniczych pochodzących ze stanowiska naturalnego zmniejszają się w zastraszającym tempie.

Wobec powyższych zagrożeń, wiele roślin, w tym cenne rośliny lecznicze, objęto ochroną gatunkową i rezerwatową. Koniecznym stało się poszukiwanie nowych możliwości pozyskiwania surowców roślinnych, m. in. poprzez zakładanie plantacji czy technikę kultur *in vitro*.

Znany jest sposób pozyskiwania wykazujący obecność laktonów seskwiterpenowych helenaliny i 11,13-dihydrohelenaliny oraz ich estrów w kulturze *in vitro* *A. montana*, którą wykazali Malarz i in. (1993). Pędy i roślinki zdolne były do produkcji laktonów, jakkolwiek komponenty te potwierdzone zostały jedynie w częściach zielonych, natomiast laktonów nie zawierały korzenie. Malarz i in. (1993) wykazali obecność octanu helenaliny (0,073%) w suchej masie liści i zawartość ta była 4-krotnie wyższa niż w pozyskiwanych z kultury pędach. Obecność laktonów seskwiterpenowych, jak przypuszcza Malarz i in. (1993) może być zależna od stadium rozwojowego i obecności korzeni. Zawartość seskwiterpenów oznaczana była metodą TLC/FID.

Z kolei Schmidt i in. (1998) stwierdzili, że pędy rosnące na płynnym podłożu MS z dodatkiem BAP (1,13 mg/l), NAA (0,09 mg/l) i z sacharozą (10 g/l) zawierały laktony, jakkolwiek ich ilość była 10-krotnie niższa niż w roślinach pozyskiwanych ze stanowisk naturalnych, podczas gdy kultura kalusa transformowanego i transgenicznego korzenie uzyskane po infekcji *A. rhizogenes* nie zawierały laktonów seskwiterpenowych. Kalynyak i in. (1995) wśród kalusów wyprowadzonych z korzeni uzyskali po dwóch latach linie, które odzyskiwały zdolność syntezy biologicznie aktywnych komponentów specyficznych dla rosnących w naturze gatunków *A. montana* i *A. chamissonis*. Wstępne analizy hodowanego *in vitro* kalusa *A. chamissonis* *supp. foliosa* wykazały obecność kwasu chlorogenowego, estrów kwasu kawowego i kwasu chinowego oraz alanto- i izoalantolaktonów.

Najwięcej doniesień na temat kultur *in vitro* *Arnica montana* pochodzi z prac Weremczuk-Jeżyny i Wysokińskiej (2000, 2004), Pawłowskiej, Weremczuk-Jeżyny i Chmiela (2005, 2011). Celem ich badań było opracowanie warunków mikrorozmnażania oraz uzyskanie różnych typów kultur, a mianowicie tkanki kalusowej, kultur zawieszinowych, pędowych oraz korzeni transgenicznych. Analizy fitochemiczne wykazały, że uzyskane z kultury rośliny arniki produkowały laktony seskwiterpenowe (helenalinę, dihydrohelenalinę oraz octan dihydrohelenaliny), sterole (sitosterol, stigmasterol), kwasy fenolowe (kwas chlorogenowy, kwas kawowy) pochodne tymolu oraz olejek eteryczny, jednak w śladowych ilościach. Stefanache i in. (2014) ujawnili, że w pochodzących z kultury *in vitro* roślinach *Arnica montana* poziom laktonów seskwiterpenowych wynosił 1,29% i jest porównywalny z poziomem odnajdywanym w kwiatach superelity w uprawie polowej.

Jak wynika z przedstawionego przeglądu literatury, do chwili obecnej, z powodu niewielkiej ilości aktywnych metabolitów wtórnych arnika tworzonych w warunkach kultury, droga z zastosowaniem biotechnologii do wykorzystania tej rośliny w procesach produkcyjnych nie była jeszcze otwarta. Nieoczekiwanie dzięki niniejszemu wynalazkowi można osiągnąć ten efekt.

Przedmiotem wynalazku jest sposób pozyskiwania helenaliny i dihydrohelenaliny oraz estrów tych substancji w kulturze *in vitro* z *A. montana*, *A. montana* cv. Arbo, *A. chamissonis* polegający na tym, że materiał do ekstrakcji pozyskuje się z liści ukorzenionych roślin o rozetach średnicy od 2 cm do 15 cm, na podłożach płynnych lub zestalonych agarem, bogatych w makro- i mikroskładniki (w ilości 0,46–15 g/l), pozbawionych fitohormonów, z dodatkiem sacharozy (w ilości 5–40 g/l), dostarczanych sukcesywnie lub jednorazowo w czasie czterech tygodni kultury, przy czym cały bioprocess prowadzony jest w warunkach wysokiej intensywności światła ($10\text{--}150\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) i temperaturze $10\text{--}30^{\circ}\text{C}$. Przedmiotem wynalazku jest, w odmianie, sposób pozyskiwania helenaliny i dihydrohelenaliny oraz estrów tych substancji w kulturze *in vitro* *A. montana*, *A. montana* cv. Arbo, *A. chamissonis* polegający na tym,

że materiał pozyskuje się w bioreaktorze, korzystnie kulowym, z wymianą pożywki, bez systemu mieszania, z wlotem sterylnego powietrza, przy zachowaniu proporcji pożywki w stosunku do materiału roślinnego.

Innowacyjność rozwiązania polega na zastosowaniu metody kultury *in vitro* arniki górskiej (*Arnica montana*), jej odmiany Arbo (*A. montana* cv. Arbo) i arniki łąkowej (*A. chamissonis*) do produkcji tych cennych laktonów seskwiterpenowych.

Hodowla *in vitro* daje 7 do 30-krotnie wyższą wydajność estrów helenaliny i dihydrohelenaliny w porównaniu z uprawą polową w przypadku liści. Natomiast w porównaniu do kwiatów to produktywność ta zwiększona jest 2,8 do 10-krotnie w zestawieniu z analogicznymi populacjami prowadzonych w gruncie.

Zawartość laktonów w odniesieniu do minimalnych wymagań (4 mg/g s. m.), dotyczących surowca *Arnicae flos* to w kulturze *in vitro* w proponowanych przez nas warunkach wzrost ten jest 10 do 17-krotny. W stosunku do surowca z plantacji z selekcionowanego elitarnego materiału sadzeniowego (9,6 mg/g s. m.) w warunkach prowadzonego przez nas produkcyjnego procesu biotechnologicznego zawartość laktonów seskwiterpenowych jest 4,2 do 6,8-krotnie wyższa.

Podsumowując, w dokonanych przez nas analizach porównawczych, dotyczących zawartości laktonów w poszczególnych organach badanych gatunków rosnących w gruncie i w kulturze *in vitro* wykazano rozwój profilu syntetyzowanych związków i znacznie wzmożoną ich syntezę.

Ekstrakty z kwiatów arniki górskiej (*A. montana*) uprawianej w gruncie we Wrocławiu wykazały obecność helenaliny, dihydrohelenaliny i 10 ich estrów o ogólnej zawartości 6,86 mg/g s. m. W liściach stwierdzono śladowe ilości helenaliny i jej pochodnych, natomiast obecna była głównie dihydrohelenalina i 4 jej estry (97,92%) o sumarycznej zawartości 1,47 mg/g s. m., podczas gdy w kłęczach (0,08 mg/g s. m.) i korzeniach (0,19 mg/g s. m.) obecna była jedynie i wyłącznie dihydrohelenalina.

Kwiaty *A. chamissonis* zawierały 2,59 mg/g s. m. laktonów seskwiterpenowych (LS), głównie pochodnych helenaliny (71%) i chamissonolidy, a w liściach (0,98 mg/g s. m.) obecna była prawie wyłącznie helenalina i jej pochodne oraz chamissonolidy.

Kwiaty *A. montana* cv. Arbo (10,10 mg/g s. m. LS) zawierały 34,4% helenaliny i jej pochodnych, a liście (6,03 mg/g s. m. LS) charakteryzowała znacząca przewaga dihydrohelenaliny i jej estrów (97,2%). Jedynie dihydrohelenalinę zawierały również kłęcza (0,05 mg/g s. m.) i korzenie (0,19 mg/g s. m. LS).

Badania prowadzone nad produktywnością w kulturze *in vitro* liści arniki wykazały, po pierwsze wysoką sumaryczną zawartość laktonów seskwiterpenowych. Po drugie produktywność zmieniała się zależnie od typu stosowanego podłoża. Po trzecie, znacznemu wzbogaceniu ulegał profil syntetyzowanych laktonów i obecne były helenalina, dihydrohelenalina i wszystkie znane pochodne obu związków (od 7,2 do 68,42 mg/g suchej masy).

Metoda *in vitro* polega na hodowli roślin oraz izolowanych tkanek i komórek w odpowiednich pojemnikach, np. w szkle, w sterylnych warunkach, przy kontrolowanej temperaturze, wilgotności i oświetleniu, na pożywce płynnej lub stałej. Jest bardzo dobrym sposobem rozmnażania wielu gatunków roślin, zwłaszcza gatunków sprawiających trudności przy rozmnażaniu generatywnym. Dzięki kulturom *in vitro* poznać można wymogi żywieniowe roślin i ich cykl życiowy. Ponadto stanowi jedną z dróg ochrony zagrożonych gatunków roślin, pozwalając na długotrwałe zachowanie ich zasobów genowych.

Alternatywną drogą pozyskiwania tych metabolitów będą hodowle *in vitro* w bioreaktorach po opracowaniu warunków optymalizacji produkcji. Uzyskanie stałej, wysokiej produktywności laktonów seskwiterpenowych w hodowli *in vitro* arniki stwarza realne i opłacalne sposoby ich pozyskiwania metodami biotechnologicznymi w bioreaktorach. Najbardziej dostosowana do bioreaktorów o tradycyjnej konstrukcji jest kultura zawieszinowa, która pod pewnymi względami przypomina kulturę mikroorganizmów. Przy obecnym poziomie zaawansowania technologicznego w celu mikrorozmnażania roślin w bioreaktorach można prowadzić praktycznie każdy typ kultury, który został opracowany w skali laboratoryjnej. Bioreaktor odpływowo-zalewowy umożliwia nawet uprawę całych roślin. W praktyce głównym kryterium doboru bioreaktora jest sposób mieszania oraz napowietrzania pożywki, a oba te parametry powinny być dopasowane do mechanicznej odporności roślin, tak aby nie zmieniać w sposób niekorzystny jej właściwości produkcyjnych. Powstanie nowatorskiego systemu okresowego zalewania pożywką (temporary imersion system) okazało się szczególnie efektywne przy mikrorozmnażaniu roślin. Najczęściej wykorzystywane do tego celu są bioreaktory TIS RITA.

Przykład 1

Metoda pozyskiwania laktonów seskwiterpenowych z kultury *in vitro* *A. montana* i *A. montana* cv. ARBO na pożywce Murashige i Skoog (1962) w pełnym stężeniu zawierająca 30 g/l sacharozy w formie płynnej lub zestalonej agarem. Odczyn pożywki ustalony na 5,8. Na pożywkę wszczone pędy uzyskane w drodze wcześniejszej izolacji jałowych wierzchołków wzrostu lub prościej wysiewu zdezynfekowanych nasion. Po ustabilizowaniu kultury przez kilka pasażów prowadzone jest namnażanie materiału roślinnego przy zastosowaniu podłoża MS bez dodatku hormonów, a dla wierzchołków wzrostu podłoża zawierającego cytokininę (0,5–1,0 mg/l BA) i auksynę (0,1 mg/l IBA). Po namnożeniu pożądanej ilości pędów przystępuje się do dwóch cykli przygotowawczych.

Rośliny przenoszone są na podłoża pozbawione hormonów roślinnych i umieszczane w dobrych warunkach świetlnych $60 \mu\text{mol}^{-2} \text{s}^{-1}$. W tych warunkach rozpoczyna się obfity rozwój liści, kłączy i korzeni. Równocześnie ze wzrostem następuje namnażanie kultury przez obfitą inicjację pąków kątowych. Gatunek charakteryzuje się szybkimi przyrostami masy i wykorzystuje zawarte w pożywce składniki mineralne w ciągu 6-8 tygodni. Cykl produkcyjny trwa maksymalnie 8 tygodni, a po tym czasie rośliny pozostawione na tej pożywce szybko zamierają z uwagi na brak składników odżywczych.

Przykład 2

W przypadku *A. chamissonis* stosuje się analogiczne podłoże i warunki wzrostu, jak dla gatunku *A. montana*. Takson ten reprezentuje inny typ wzrostu, w przeciwieństwie do rozetowej arniki górskiej, jest to bylina z długim pełzającym kłączem. Ze znajdujących się na kłączach węzłów obficie wyrastają ulistnione pędy boczne. W kulturze *in vitro* rozwijające się na tych pędach liście są także źródłem cennych laktonów i chamissolidów w ilości 7,2 mg/g s. m.

Przykład 3

Innym przykładem produkcji laktonów seskwiterpenowych w kulturze *in vitro* jest zastosowanie tej samej pożywki MS w formie zestalonej agarem. Ten rodzaj podłoża u testowanych taksonów powoduje porównywalny z podłożem płynnym poziom laktonów w liściach, ale w przypadku *A. montana* cv. Arbo synteza tych związków wzrasta do 68,42 mg/g s. m, z równoczesnym przesunięciem proporcji pochodnych w kierunku helenaliny (1:2,8).

Przykład 4

Sposób ekstrakcji: 5 g świeżej masy materiału roślinnego roztarto w moździerzu ceramicznym, ekstrahowano 20 ml 96% etanolu lub chloroformie i 96% etanolu (1:1). Przefiltrowano i odparowano do objętości 11,5 ml. Ekstrakt rozcieńczono w 50% etanolu, 40% wody oraz 10% acetonu i analizowano za pomocą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas.

Analizę zawartości estrów laktonów seskwiterpenowych (helenaliny oraz 11 α ,13-dihydrohelenaliny) przeprowadzono na aparacie Waters Acquity LC (Waters Corp., Milford, MA, USA) wyposażonym w kolumnę analityczną ACQUITY UPLC® HSS T3 1,8 μm (50 mm x 1 mm; USA). Temperaturę kolumny analitycznej ustawiono na 40°C i rozpoczęto program gradientowy elucji 70% rozpuszczalnika A (0,1% kwasu mrówkowego w wodzie MilliQ) i 30% rozpuszczalnika B (0,1% kwasu mrówkowego w acetonitrylu). Kolumnę eluowano z liniowym gradientem 30% do 95% rozpuszczalnika B w czasie 1 do 10 min; 95% rozpuszczalnika B utrzymywano przez 1 minutę, a następnie z powrotem do 30% w 10,1 do 15 min przy szybkości przepływu 40 $\mu\text{l}/\text{min}$. Przy pomocy Xevo G2-Q-TOF (Waters Corp., Milford, MA, USA) dokonano analizy masowej. Spektrometr był wyposażony w Z-spray (źródło jonizacji elektrorozpylanie). Napięcie kapilarne wynosiło 3 kV, napięcie stożkowe 30 V. Gaz stożkowy i gazu desolwatacji zostały ustawione odpowiednio na 45 i 350 (l/h). Temperatura źródła wynosiła 90°C oraz temperatura desolwatacji 500°C. Podczas analizy użyto trybu jonów dodatnich. Spektrometr masowy kalibrowano standardem-enkefaliną leucynową (Waters Corp., Milford, MA, USA). Zakres badanych mas to 200–2000 m/z.

W opisanych poniżej warunkach kultury *in vitro* roślin arniki otrzymano wyższe wydajności ważnych produkcyjnie laktonów seskwiterpenowych (10-krotnie w stosunku do standardowych upraw kwiatów, a 4 do 7-krotnie wyższe dla kwiatów pochodzących z genetycznie wyselekcjonowanego materiału) oraz wzbogacono profil występujących estrów helenaliny i dihydrohelenaliny. Dzięki zastosowaniu powyższej metody uzyskano produkcję niezależną od przebiegu warunków pogodowych, klęsk żywiołowych, ataku patogenów grzybowych bakteryjnych i inwazji szkodników (owadów, ślimaków, gryzoni). Powyższa metoda zapewnia stabilną i zrównoważoną syntezę metabolitów aktywnych w ciągu całego roku, właściwie niewymagająca obsługi z wyjątkiem okresu załadowania reaktora lub zatrudnienia czasowego 1 do 2 osób personelu w przypadku stosowania pożywki zestalonej agarem. W porównaniu do

uprawy polowej musimy liczyć koszty ziemi, materiału sadzeniowego, nawozów, środków ochrony, herbicydów, personelu ogrodniczego, zbieraczy kwiatów. Wymagania gatunku, co do typu gleby są dość specyficzne - odczyn słabo kwaśny z dużą ilością humusu, gleba średnio lekka. Po 3 latach koszty przeniesienia plantacji w inne miejsce, prawdopodobnie na skutek zmęczenia ziemi. Znaczenie ma również to, że w tej metodzie pozyskuje się metabolity z jałowych roślin, co w świetle nowych nadchodzących uregulowań prawnych tworzonych w Unii Europejskiej ma duże znaczenie.

Przykład 5

Przebieg i warunki kultury *in vitro* *Arnica montana*, *A. montana* cv. *Arbo*, *A. chamissonis* w bioreaktorze: wszystkie etapy kultury *in vitro* i hodowli w bioreaktorach należy prowadzić zgodnie z zasadami tej techniki opisanej obficie w literaturze. Konieczne wyposażenie producenta w komory z laminarnym przepływem powietrza, autoklaw i suszarki.

- a. Inicjacja kultury z selekcjonowanego, badanego wcześniej na zawartość laktonów seskwiterpenowych materiału roślinnego w postaci nasion, odmian lub sterylnych mikrosadzonek nabytych w wyspecjalizowanych laboratoriach. W przypadku samodzielnej inicjacji kultury jest to faza trwająca najdłużej, bo do 6 miesięcy. Nasiona przeznaczone do inicjacji kultury umieszczamy w pakiecie z dobrej bibuły filtracyjnej lub filtra do kawy, zanurzamy na kilkanaście sekund w 70% alkoholu. Do właściwego odkażania nasion stosujemy roztwór podchlorynu sodu 10–15 ml podchlorynu (ACE) na 100 ml sterylnej wody destylowanej. Naczynie wytrząsamy przez 15 minut, a odkażone, jałowe nasiona lub materiał roślinny umieszczamy na jałowej pożywce.
- b. Podłoże stosowane w rozmnażaniu to pożywka Murashige i Skoog'a (1962) w formie płynnej lub zestalonej agarem firmy Merck agar-agar for microbiology (8–9 g/l). Kultura prowadzona w pojemnikach o dużej pojemności, tj. kolby 2–5 litrowe, słoiki o pojemności 1–3 litra. Optymalna objętość pożywki zestawionej agarem to 100 ml na 7–9 g świeżej masy roślin na okres wzrostu od 6 do 8 tygodni. Stosując większe objętości pożywki czas ten można nieco wydłużyć. Po tym czasie składniki podłoża są wyczerpane, czego oznaką jest żółknięcie brzegów liści. Jest to jednocześnie sygnał, informujący o konieczności wykonania pasażu, czyli przeniesienia roślin na świeże pożywki. W przypadku pożywki płynnej objętość początkowa musi być dobrze dobrana do wielkości roślin, a materiał roślinny nie może być całkowicie zanurzony.
- c. Pasaż-przenoszenie kultury na świeże podłoże. W czasie przenoszenia roślin na świeże pożywki oddzielamy martwe fragmenty materiału roślinnego, a kępy rozrywamy lub w całości przenosimy do naczyń o większej pojemności zawierających pożywkę płynną lub zestawioną agarem.
- d. Objętość stosowanej pożywki zależna jest od pojemności naczynia, w przypadku podłoża płynnego, objętość ta może być zwiększana w trakcie procesu produkcyjnego. W naczyniach w początkowym etapie kultury poziom płynu nie powinien przekraczać 5 cm, całkowite zalanie roślin pożywką hamuje wzrost i powoduje zamieranie roślin.
- e. Warunki fizyczne otoczenia kultury są krytyczne dla wydajności. Wysoka produkcja laktonów seskwiterpenowych zależy od intensywności światła pochodzącego z mieszaniny świetlówek typu Day Light, Cool Light i Flora, która powinna osiągać $60 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Temperaturę otoczenia kultury utrzymujemy w zakresie 20–25°C stosując dobrane odpowiednio systemy chłodzenia (klimatyzacji).
- f. Wydajność procesu. Przyrosty biomasy kultury w proponowanych warunkach są szybkie w ciągu 7 tygodni zwiększają się one 7 do 10-krotnie, co jest podstawą sukcesu. Wydajność porównywalną z plonem kwiatów o bardzo wysokiej zawartości laktonów 9,4 mg/g s. m. uzyskujemy w ciągu 7 tygodni w przypadku *A. montana* cv. *Arbo* (55,68–68,42 mg/g s. m.) w 210 litrach pożywki płynnej zawierającej w litrze 18 g roślin. Dla *A. montana* (42,23–45,72 mg/g s. m.) wydajność tę uzyskamy z 400 litrów pożywki, a dla *A. chamissonis* (7,2 mg/g s. m.) z powodu najniższej produktywności wydajność tę osiągniemy dopiero z 2000 litrów pożywki płynnej, Godne odnotowania jest skrócenie czasu produkcji z sezonu wegetacyjnego do 7 tygodni.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób pozyskiwania helenaliny i dihydroheleniny oraz estrów tych substancji w kulturze *in vitro* *A. Montana*, *A. montana* cv. *Arbo*, *A. chamissonis* **znamienny tym**, że materiał do ekstrakcji pozyskuje się z liści ukorzenionych roślin o rozetach średnicy od 2 cm do 15 cm, na podłożach płynnych lub zestalonych agarem, bogatych w makro- i mikroskładniki (w ilości 5–40 g/l), pozbawionych fitohormonów, z dodatkiem sacharozy (w ilości 5–40 g/l), dostarczanych sukcesywnie lub jednorazowo w czasie czterech tygodni kultury, przy czym cały bioprocess prowadzony jest w warunkach wysokiej intensywności światła ($10\text{--}60\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) i temperaturze $10\text{--}30^{\circ}\text{C}$.
2. Sposób pozyskiwania helenaliny i dihydroheleniny oraz estrów tych substancji w kulturze *in vitro* *A. Montana*, *A. montana* cv. *Arbo*, *A. chamissonis* **znamienny tym**, że materiał do ekstrakcji pozyskuje się w bioreaktorze, korzystnie kulowym, z wymianą pożywki, bez systemu mieszania z wlotem sterylnego powietrza, przy zachowaniu proporcji pożywki w stosunku do materiału roślinnego.