

Etapa IV (01.01.2021 - 30.09.2021)

Etapa a- IV-a a proiectului 5 PCCDI reprezinta si etapa finala, rezultata in urma aplicarii prevederilor actului aditional nr 2/2020. In consecinta, in cadrul acestei etape au fost finalizate activitatile proiectului, accentul fiind pus pe diseminarea rezultatelor prin participari la conferinte (activitate limitata de conditiile pandemice specifice actualei perioade), publicarea de articole, depunerea de cereri de brevete. Sumarizam in acest raport principalele rezultate obtinute in cadrul fiecarui proiect. Diseminarea rezultatelor poate fi urmarita in detaliu in cadrul sectiunii „ARTICOLE PUBLIFICATE” pe pagina web a proiectului.

In cadrul **proiectului component 1** aceasta etapa (denumire etapa: Protejarea proprietatii intelectuale prin brevetare unui procedeu tehnologic si diseminarea pe scara larga a aspectelor de cercetare fundamentala) a implicat desfasurarea a doua activitati dedicate diseminarii rezultatelor:

Activitatea 4.1. Inregistrarea la OSIM a unei cereri de brevet (ex.: “Metoda bazata pe folosirea radiatiilor gamma pentru stimularea bio-sintezei de melanina hidrosolubila in fungi filamentosi”). Formularea tehnologiei.

A fost depusa la OSIM (Oficiul de Stat pentru Inventii si Marci) cererea A/00451 din 30.07.2021, pentru brevetul [Indicator de realizare] cu titlul: “Procedeu de obtinere a melaninei hidrosolubile prin biosinteza, folosind miceliul ciupercii *Fomes fomentarius*”.

Activitatea 4.2. Centralizarea si interpretarea tuturor rezultatelor obtinute in proiect, despre melanina la fungii filamnetosi; redactarea unei lucrari stiintifice.

Au fost publicate 3 articole in reviste cotate ISI, dupa cum urmeaza:

1. "Low Doses of Gamma Irradiation Stimulate Synthesis of Bioactive Compounds with Antioxidant Activity in *Fomes fomentarius* Living Mycelium". Cristina F. Pelcaru, Mihaela Ene, Alina-Maria Petrache, Daniel C. Neguț / 2021 / Applied Sciences 11, no. 9: 4236. <https://doi.org/10.3390/app11094236>. IF 2.679 / 2020.

2. "Submerged Cultivation of *Inonotus obliquus* Mycelium Using Statistical Design of Experiments and Mathematical Modeling to Increase Biomass Yield". Alexandru Petre, Mihaela Ene, & Emanuel Vamanu. 2021. Applied Sciences 11, no. 9: 4104. <https://doi.org/10.3390/app11094104>. IF 2.679 / 2020.

3. "The use of gamma irradiation to stimulate bioactive compound synthesis in submerged cultures". Petre Alexandru, Ene Mihaela, Negut Daniel Constantin, Gatea Florentina & Vamanu Emanuel. Nukleonika, vol.66, no.3, 2021, pp.83-90. <https://doi.org/10.2478/nuka-2021-0012>; IF 0.941 / 2020.

Un articol ce reuneste rezultatele analizelor fizico-chimice si biologice de caracterizare a melaninei excretate de *Fomes fomentarius* este in faza avansata de redactare (impreuna cu partenerii de la UMF-Cluj).

In cadrul **proiectului component 2** aceasta etapa (denumire etapa: Evaluarea stabilității efectului indus de radiațiile gamma asupra metabolismului secundar în culturile de calus în vederea producerii de compuși bioactivi de interes economic) a implicat desfasurarea urmatoarelor activitati:

Activitatea 4.3. Determinarea stabilității efectului indus de radiațiile gamma asupra dinamicii de creștere și a potențialului de biosinteză a calusurilor; indicator de realizare: Studiu privind stabilitatea efectului indus de radiațiile gamma asupra parametrilor biotehnologici și biochimici ai culturilor de calus.

S-a utilizat în cadrul prezentului studiu iradierea cu doza de 30 Gy, ca având cel mai mare potențial de stimulare asupra metabolismului secundar (conform rezultatelor din studiile realizate în cadrul etapelor anterioare), dar fără a afecta semnificativ dinamica de creștere a calusurilor. Schema experimentală a presupus iradierea la momentul initial, urmată de 3 pasaje (subcultivări) succesive, efectuate la 3 săptămâni distanță. Parametrii biologici monitorizați au fost: rata de creștere a calusurilor, masa uscată, concentrația de polifenoli totali, flavonoizi, precum și capacitatea antioxidantă a extractului metanolic brut. Studiile s-au realizat pe următoarele linii de callus: calus rosu de *Leontopodium alpinum* (floare de colt) și calusul rosu de *Fragaria X Ananassa* (căpșun).

Deși pe parcursul celor 3 pasaje ulterioare iradierii monitorizate sunt surprinse momente diferite ale curbelor de creștere la cele 2 specii analizate, în mare parte patternurile de creștere și descreștere ale parametrilor morfometrici arată varfuri de creștere în faza de acumulare a apei care coincide cu o rată de creștere activă, urmată de faza de deshidratare ce determină și o scădere accentuată a ratei de creștere și apoi de o fază de diviziune activă în care se menține mai ridicat procentul de substanță uscată, dar începe să crească ușor și rata de creștere. Producerea de metaboliți nu este semnificativ afectată de aceste modificări ale parametrilor morfometrici, deși se observă o ușoară scădere a sintezei în faza de deshidratare. Spre deosebire însă de cultura control, calusurile iradiate au scăderi și creșteri mai accentuate. În faza de reluare a creșterii se remarcă o capacitate antioxidantă mai ridicată la probele iradiate care nu se corelează cu creșterea sintezei metaboliților monitorizați, probabil fiind datorată altor compuși cu activitate antioxidantă. Nu putem afirma că utilizarea iradierii Gamma ca factor de elicitare a metabolismului secundar în cultura de calus de căpșun sau de floare-de-colt a determinat o creștere semnificativă a unor cai de biosinteză de interes.

Activitatea 4.4. Analiza stabilității efectului indus de radiațiile gama asupra metabolismului secundar în culturile de calus. Indicator de realizare: Studiu privind analiza metabolismului secundar la diferite intervale de timp față de momentul iradierii gamma a culturilor de calus și identificarea cailor metabolice cele mai afectate de tratamentul gamma administrat.

Studiile s-au realizat pe aceleași modele biologice și au urmat același protocol ca și în cazul Activității 4.3, doar parametrii urmăriti au fost: acidul clorogenic, acidul 3,4-dicaffeoil chinic și acizii leontopodici A și B pentru calusurile de *Leontopodium alpinum* Cass. și catechinul și un trimer de procianidin pentru calusurile de *Fragaria ananassa*. Pentru ambele modele biologice s-au observat preponderent scăderi ale cantității de compuși fenolici majoritari în urma iradierii la pasajul 2, urmată de o revenire la valorile inițiale la pasajul 3 atât pentru proba cat și pentru martor.

Activitatea 4.5. Diseminarea rezultatelor științifice obținute prin participarea la manifestări tehnico-științifice.

Rezultatele obținute au fost prezentate la 4 conferințe (1 internațională și 3 naționale) prin 2 postere și 2 prezentări orale (detalii la secțiunea „ARTICOLE PUBLICATE”).

Activitatea 4.6. Diseminarea rezultatelor în reviste științifice de prestigiu.

In vederea publicarii rezultatelor obtinute sunt in diverse faze de lucru (evaluare la revista, redactare) trei articole.

In cadrul **proiectului component 3** aceasta etapa (denumire etapa: Protejarea proprietatii intelectuale prin brevetare unui procedeu tehnologic si diseminarea pe scara larga a aspectelor de cercetare fundamentala). S-au derulat urmatoarele activitati:

Activitatea 4.7 Stabilirea tulpinilor de microorganisme cu potential de biosinteza a unor compusi de interes stiintific si aplicativ (Partea a II-a)

Activitatea 4.8 Elaborarea unei biotehnologii microbiene, la nivel de stație pilot, în laborator, pentru producerea unor compuși de interes științic și aplicativ utilizând radiațiile gamma asupra culturilor de microorganism (Partea a II-a)

Cercetarile experimentale au continuat in anul 2021 avand ca scop realizarea unui procedeu biotehnologic pentru obținerea creșterii randamentului de biomasa, lipide si proteine totale, clorofile si caroteni totali din microalga verde *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230, de interes economic pentru industria farmaceutică și alimentară.

In mod particular, microalga *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 este folosită în special pentru producția la scară largă de lipide pentru biocombustibili precum și pentru compuși specifici de interes comercial cum ar fi antioxidanții de tipul carotenoizilor. Deși microalgele sunt surse fezabile pentru bioenergie și biofarmaceutice în general, la ora actuală există limitări in ceea ce priveste tehnologia de obținere a biomasei la scară industrială. Se cunosc diferite procedee biotehnologice de obtinere a biomasei microalgale cum ar fi cultivarea in coloană cu bule, ridicător de aer, ecran plat, coloană verticală, bioreactor tubular.

Elementul de noutate adus de procedeul tehnologic realizate este date de utilizarea expunerii la radiatii gama in scopul stimulării (i) producerii de biomasa si (ii) a capacitatii de sinteza a unor produse utili in aplicatii biotehnologice.

In cadrul **proiectului component 4** aceasta etapa (denumire etapa: Obținerea bazidiocarpiilor de *Agaricus blazei*, a extractului din aceștia și caracterizarea modificărilor ultrastructurale și biochimice induse de iradiere) s-au derulat 6 activitati dupa cum urmeaza.

Activitatea 4.9. Realizarea de culturi experimentale în micro-pilot ciupercărie pentru obținerea de bazidiocarpi din miceliile iradiate și neiradiate de *A.blazei*.

În această etapă din planul de realizare a proiectului am continuat cercetările anterioare, de data aceasta într-un experiment vizând obținerea de fructificații de la cele două tulpini de *Agaricus blazei* și evaluarea efectului iradierii asupra acestora. Materialul biologic a fost reprezentat de miceliile celor două tulpini de *Agaricus blazei* și anume AbzM-25, respectiv AbzM-26 și, pentru comparație într-o primă etapă, miceliile altor două specii de *Agaricus* din colecția laboratorului: *A.campestris* AcM-20 și *A.hortensis* AhM-28.

A fost elaborat și aplicat un Procedeu biotehnologic experimental de obținere de bazidiocarpi de *Agaricus blazei* în microculturi de testare, prin care au putut fi recoltați bazidiocarpi din tulpina AbzM-25 în vederea iradierii lor și, mai departe, a obținerii de extracte etanolice și metanolice din biomasa lor uscată. Procedeu a cuprins următoarele etape/secvențe tehnologice.

Activitatea 4.10. Aplicarea iradierii gamma asupra ciupercilor (bazidiocarpi/carpofori) de A.blazei în vederea stimulării creșterii capacității de sinteză a produșilor bioactivi și a duratei de păstrare în stare proaspătă.

Iradierile gama acute au fost efectuate utilizând iradiatorul de cercetare din cadrul Departamentului de Iradiere Tehnologice IRASM al IFIN-HH, asupra probelor biologice de la ICDFL Vidra, reprezentate prin carpofori de A.blazei. Iradierile s-au făcut conform următorului protocol: doze 100 Gy, 250 Gy, 500 Gy; timpi de iradiere 2 min 38 s, 6 min 35 s și, respectiv 13 min 9 s; debit mediu 0.63 Gy/s; temperatura de iradiere 34-35°C.

Activitatea 4.11. Obținerea extractelor din bazidiocarpi de A.blazei iradiați și neiradiați.

Prepararea extractelor cu etanol 96 % și metanol 80 % din corpi de fructificare ai A.blazei, s-a realizat în cadrul unei colaborări cu Institutul de Biologie al Academiei Române, Departamentul de Microbiologie. Materialul biologic a fost reprezentat de corpi de fructificare de Agaricus blazei tulpina AbzM-25. Ciupercile au fost, mai întâi, supuse iradierii cu radiații gamma, la dozele 100 Gy, 250 Gy și 500 Gy prin colaborarea cu Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Fizică și Inginerie Nucleară "Horia Hulubei".

Activitatea 4.12. Caracterizarea fizico-chimică prin spectrometrie de masă cuplată cu metode separative a extractelor din bazidiocarpi de A.blazei, înainte și după iradiere.

Bazidiocarpii speciei A. blazei expuși la diferite doze de radiații gamma (100, 250, 500 Gy) au fost supuse unor etape de extracție și analizei prin spectrometrie de masă cuplată cu metode separative în vederea evaluării impactului radiațiilor gamma asupra profilului metabolic.

Au fost analizate 24 de extracte metanolice 80% din bazidiocarpii speciei A. blazei tulpina Abz-25 expuse la 100 Gy, 250 Gy, 500 Gy și martor, 0 Gy (6 replicare tehnice/ probă) preparate la IBB și 24 extracte etanolice 96 % din bazidiocarpii speciei A. blazei tulpina Abz-25 expuse la 100 Gy, 250 Gy, 500 Gy și martor, 0 Gy (6 replicare tehnice/ probă) preparate la IBB.

În urma analizei au fost identificate în cazul extractelor metanolice 51 specii moleculare (diferentiate prin raportul masa/sarcină (m/z)) , respectiv 591 de specii moleculare (în cazul extractelor etanolice) a căror variație se corelează cu nivelul de iradiere.

În cadrul **proiectului component 5** aceasta etapa (denumire etapa: Efectul stimulativ al radiațiilor gamma asupra capacității de producere a compușilor bioactivi la plantele aclimatizate (II)) a proiectului plantele de salvie și roiniță expuse la radiații gamma au fost monitorizate în ceea ce privește influența tratamentului aplicat asupra viabilității pe termen lung a acestora. Evaluarea efectului dozelor mici de radiații gamma (10, 15 și 20 Gy) asupra celor două specii luate în studiu s-a realizat prin cuantificarea unor parametrii biochimici (pigmenți asimilatori, carbohidrați solubili și polifenoli totali) în vitroplante (la două săptămâni de la iradierea gamma) și în plante aclimatizate (la patru luni după aplicarea tratamentului cu radiații gamma). S-au derulat 6 activități după cum urmează.

Activitatea 4.16 - Caracterizarea complexă fizico-chimică și biologică a extractelor obținute din plantele aclimatizate iradiate și neiradiate (II)

În general efectul iradierii gamma asupra plantelor luate în studiu a depins de specie și de doza de iradiere. Roinița a fost mai sensibilă la iradiere comparativ cu salvia, dozele mai mari de radiații gamma (20 Gy) producând într-o proporție destul de mare necroze ale vitroplantelor soldate cu pierderea viabilității lor. Radiațiile gamma în doze mai mici (10 și 15 Gy) nu au produs însă în plante modificări care să afecteze creșterea și dezvoltarea lor, tratamentul cu radiații

gamma permițând regenerarea de plante de salvie și roiniță. Rezultatele obținute sugerează că atât iradierea gamma la doze mici, cât și cultura in vitro pot fi utilizate pentru a produce material biologic de înaltă calitate, sursă de extracte cu potențial terapeutic.

În urma analizei probelor au fost detectați 21 de compuși majoritari, dintre aceștia fiind identificați următorii: acid cafeic, glucozida acidului tuberonic, acid prolitospermic, luteolin-3-glucuronid, apigenin glucuronid, acid rosmarinic, derivat al glucozidei acidului tuberonic, acid salvianolic F, cirsimaritin, rosmanol isomer 1, rosmanol isomer 2, rosmanol isomer 3, salvin A/B, rosmadial, carnosol, 7-ethylrosmanol, acid carnosic și acid 12-O-methylcarnosic.

Centralizarea datelor experimentale a evidențiat modificări ale concentrației compușilor luați în studiu în ambele tipuri de probe analizate independent de doza de iradiere. Rezultatele au indicat faptul că, în general, dozele de radiații de până la 20 Gy nu au avut un efect pronunțat asupra compușilor fenolici identificați în extractele de salvie, având în vedere că nu s-au înregistrat diferențe importante în ceea ce privește concentrația lor. Cu toate acestea, în cazul ambelor tipuri de material biologic analizat (vitroplante și plante aclimatizate), tratamentul de iradiere (independent de doză) nu a avut efect negativ asupra acestora. Cea mai mare creștere a abundenței a fost înregistrată în cazul acidului carnosic (FC=2,69) în extractul obținut din plante aclimatizate, la patru luni după iradierea la 10 Gy. De asemenea, printre compușii cei mai abundenți, a existat o creștere de aproximativ două ori (FC=1,82) a acidului rosmarinic în extractul obținut din vitroplante, la două săptămâni după iradierea la 20 Gy. Deși creșterile nu au fost importante, o concentrație mai mare de compuși fenolici s-a înregistrat în toate probele iradiate comparativ cu proba martor, însă creșterile nu au fost dependente de doză în cazul tuturor compușilor identificați.

Activitatea 4.17 - Evidențierea la nivel ultrastructural a modificărilor induse de iradierea gamma asupra plantelor regenerate (*Salvia officinalis*).

Studiile de microscopie electronică realizate la 14 zile de la iradiere au completat tabloul modificărilor induse de radiațiile gamma la nivel ultrastructural asupra plantelor de *Salvia officinalis* cultivate in vitro. Rezultatele au arătat că cele mai sensibile organite la iradierea cu 10, 15 și 20 Gy au fost cloroplastele și mitocondriile. La plantele iradiate cu 15 Gy s-a observat creșterea numărului de cloroplaste comparativ cu varianta control. Mitocondriile au fost observate în număr mai mare la variantele iradiate cu 10 și 15 Gy. Ultrastructura mitocondriilor a fost de asemenea afectată, multe dintre ele având un număr redus de criste și un matrix mai puțin dens. Rezultatele noastre au evidențiat prezența corpilor de transport a tanosomilor la toate variantele experimentale, dar în cazul variantei martor aceștia au fost mai deși. Prezența acestora în număr mare la varianta control și creșterea nesemnificativă a depozitelor de taninuri la variantele iradiate indică faptul că metabolismul secundar nu este stimulat prin iradierea cu 10, 15 și 20 Gy. În ansamblu, iradierea plantulelor de *Salvia officinalis* obținute în condiții in vitro nu a intensificat metabolismul secundar al plantei, dar a influențat semnificativ ultrastructura organitelor prin rediferențierea cloroplastelor și distrugerea sistemului membranal al cloroplastelor și al mitocondriilor.

Activitatea 4.18 - Testarea potențialelor efecte ale principiilor bioactive din extractele vegetale obținute, asupra celulelor de mamifer (efecte antioxidante, antitumorale, etc.) (II).

S-au realizat investigații privind efectele citotoxice, antiproliferative și antioxidante ale extractelor de *Salvia officinalis* obținute din vitroplante și plante aclimatizate iradiate și neiradiate. Pentru studiile in vitro ale proprietăților extractelor vegetale s-a utilizat linia celulară

de fibroblaste umane normale BJ (ATCC, CRL 2522) și linia celulară de carcinom epidermoid uman A431 (ATCC, CRL 1555). Analizând valorile IC50 și indicii de selectivitate obținuți, se poate deduce că extractele obținute din salvie in vitro fie iradiată, fie neiradiată sunt mai eficiente în exprimarea efectelor antitumorale, antiproliferative ($IS > 2$).

Efectul antioxidant al extractelor de salvie, determinat cu metoda DPPH, a fost dependent de concentrația extractului. Extractele din plantele cultivate in vitro au condus la inhibarea a ~ 65% a radicalilor liberi la o concentrație de 10 mg/mL. Extractele din plante aclimatizate au prezentat, de asemenea, potențial antioxidant, dar au prezentat un efect inhibitor maxim al DPPH de ~ 52% la aceeași concentrație de 10 mg/mL. Aceste rezultate sugerează că extractele din plante cultivate in vitro conțin concentrații mai mari de compuși fitochimici care au capacitatea de a dona atomi de hidrogen către un radical liber și de a-și elimina potențialul dăunător dinspre biomolecule comparativ cu extractele din plante aclimatizate.

Potențialul antioxidant al probelor studiate a arătat că extractele din salvie in vitro și aclimatizată iradiată cu 0-20 Gy au prezentat modificări ale activităților antiradicale în funcție atât de concentrațiile de extracte, cât și de dozele utilizate ($P_{concentrație} = 0,0006$, $P_{doză} = 0,0017$ pentru extractul din plante in vitro și concentrația de $P < 0,001$ și $P_{doză} = 0,0073$ pentru extractul din plante aclimatizate). În cazul extractelor din salvie in vitro neiradiată, inhibarea antioxidantă a fost mai mare decât pentru extractele din plante iradiate. Dimpotrivă, extractele din salvie aclimatizată iradiată (10 Gy și 20 Gy) au prezentat o inhibare a DPPH mai mare decât în cazul extractelor din salvie aclimatizată neiradiată.

Ca urmare a implementării proiectului s-a realizat creșterea capacității instituționale a INCDBH Ștefănești-Argeș prin îmbunătățirea ofertei de servicii de cercetare și tehnologice cu servicii de obținere de extracte vegetale cu potențial terapeutic (<https://eeris.eu/erif-2000-000e-1316>). De asemenea, s-a depus o cerere de brevet de invenție ("Procedeu de obținere a unui extract de *Melissa officinalis* L. îmbogățit în compuși fitoterapeutici prin iradiere gama"), înregistrată la OSIM cu numărul A/00420/22.07.2021.