



MD 1235 Y 2018.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1235** (13) **Y**
(51) Int.Cl: *C12N 1/04* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/465 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ

În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului

(21) Nr. depozit: s 2017 0082
(22) Data depozit: 2017.06.29

(45) Data publicării hotărârii de
acordare a brevetului:
2018.02.28, BOPI nr. 2/2018

(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD

(72) Inventatori: CHISELIȚA Oleg, MD; BURȚEVA Svetlana, MD; BÎRSA Maxim, MD; MAȘCENCO Natalia, MD

(73) Titulari: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD

(54) Mediu de protecție pentru conservarea și păstrarea îndelungată a tulpinii
Streptomyces canosus CNMN-Ac-02

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un mediu de protecție pentru conservarea și păstrarea îndelungată a tulpinii de actinomicete din genul *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02.

Esența invenției constă în aceea că mediul conține, % mas.: gelatină 2,5; glucoză 7,5;

2
extract de glicozide iridoide obținute din *Verbascum phlomoides* L. prin extragere cu soluție etanolică de 50% 0,0005...0,05 și apă distilată restul.

Revendicări: 1

MD 1235 Y 2018.02.28

(54) Protective medium for the preservation and long-term storage of *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 strain

(57) Abstract:

1
The invention relates to biotechnology, namely to a protective medium for the preservation and long-term storage of a strain of actinomycetes of the genus *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02.

Summary of the invention consists in that the medium comprises, mass %: gelatin 2.5;

2
glucose 7.5; extract of iridoid glycosides obtained from *Verbascum phlomoides* L. by extraction with 50% ethanol solution 0.0005...0.05 and distilled water the rest.

Claims: 1

(54) Защитная среда для консервации и длительного хранения штамма *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к биотехнологии, а именно к защитной среде для консервации и длительного хранения штамма актиномицетов рода *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02.

Сущность изобретения состоит в том, что среда содержит, масс. %: желатин 2,5;

2
глюкозу 7,5; экстракт иридоидных гликозидов полученных из *Verbascum phlomoides* L. путем экстрагирования 50%-ным этанольным раствором 0,0005...0,05 и дистиллированную воду остальное.

П. формулы: 1

Descriere:

5 Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un mediu de protecție pentru conservarea și păstrarea îndelungată a tulpinii de actinomicete din genul *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02.

Sunt cunoscute medii de protecție pentru liofilizarea tulpinilor de actinomicete ce conțin gelatină, zaharoză, glucoză, lapte degresat în diferite concentrații și combinații [1, 2, 3]. Înșă, neajunsul acestor medii de protecție constă în viabilitatea scăzută a tulpinilor după liofilizare și păstrare îndelungată.

În calitate de cea mai apropiată soluție a invenției revendicate este mediul de protecție pentru liofilizarea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02, care conține 2,5% gelatină, 7,5% glucoză și 1,0...50%vol. extract de polizaharide sulfatate cu o concentrație de 10 mg/ml, obținut din biomasa tulpinii de cianobacterie *Spirulina platensis* CNMN-CB-02 [4].

15 La conservarea tulpinii pe acest mediu de protecție în condiții proxime viabilitatea ei după liofilizare variază între 102,9±0,1 și 128,3±6,3%, iar după păstrare timp de 1 an între 99,6±1,6 și 118,9±5,7% din numărul inițial, în dependență de concentrația polizaharidelor sulfatate.

20 Dezavantajul acestui mediu constă în faptul că compoziția lui chimică asigură o viabilitate slabă tulpinii de actinomicete în timpul liofilizării și păstrării îndelungate.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în diversificarea și majorarea asortimentului de substanțe biologice active naturale cu efect lioprotector și elaborarea unui mediu de protecție care să asigure o viabilitate înaltă tulpinii după liofilizare și păstrarea ei eficientă la nivel înalt timp de 1 an.

25 Esența invenției constă în aceea că mediul conține, % mas.: gelatină 2,5, glucoză 7,5, extract de glicozide iridoide obținute din *Verbascum phlomoides* L. prin extragere cu soluție etanolică de 50% 0,0005...0,05 și apă distilată restul. Extractul de glicozide iridoide a fost obținut din biomasa proaspătă a plantei *Verbascum phlomoides* (L.). Metoda de extracție și compoziția biochimică a extractului sunt prezentate în MD 328 Y 30 2011.02.28.

Înlocuirea extractului de polizaharide sulfatate în mediul de protecție cunoscut prin extract de glicozide iridoide de origine vegetală, cu acțiune antioxidantă, adaptogenă, de stimulare a regenerării țesuturilor și de protecție a membranelor celulare prin reducerea peroxidării lipidelor, oferă tulpinii o protecție suplimentară, contribuind astfel la majorarea viabilității tulpinii cu menținerea ei la nivel înalt pe durata păstrării îndelungate (Ghisalberti E. L. Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. Phytomedicine, 1998, v. 5 (2), p. 147-163).

35 Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea cu 10,1% a viabilității tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare și cu 5,4% după 1 an de păstrare, față de cea mai apropiată soluție (vezi tabelul), prin utilizarea concentrațiilor cu până la 3 ordine mai mici ale extractului de glicozide iridoide (verbascozide) de origine vegetală. Datorită includerii în mediul protector a extractului de glicozide iridoide, care manifestă acțiune antioxidantă, adaptogenă, de stimulare a regenerării țesuturilor și de protecție a membranelor celulare, ce anihilează efectul negativ al temperaturilor joase, presiunii înalte, 45 deshidratării și formelor reactive de oxigen, la care sunt supuse microorganismele în timpul liofilizării și păstrării îndelungate.

Exemplu de realizare a invenției

În tuburi inclinate pe mediul agarizat Czapek, în condiții sterile, se cultivă tulpina *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 timp de 14 zile, tuburile fiind plasate în termostat la 50 temperatura de +27°C. Materialul semincer obținut se transferă în mediul de protecție lichid cu următoarea componență: gelatină 2,5%, glucoză 7,5% și extract de glicozide iridoide (verbascozide) 0,0005...0,05, până la obținerea titrului de 10¹⁰...10¹¹ UFC ml⁻¹. Suspensia obținută se divizează câte 1 ml în flacoane pentru liofilizare. Probele se congelează brusc la temperatura de minus 50°C. Peste 12 ore se efectuează liofilizarea la temperatura 55 condensorului de minus 88...94°C, vid 6...7 Pa, timp de 12 ore. Probele liofilizate se sigilează în vid și se păstrează la temperatura de +4...5°C. Utilizând metoda diluțiilor succesive, probele se însămânțează pe medii agarizate și se numără unitățile formatoare de colonii UFC, până, după liofilizare și peste 1 an de păstrare.

În varianta martor viabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 este de 102,9...128,3% după liofilizare și de 99,6...118,9% peste 1 an de păstrare, iar în varianta conform invenției de 121,2...130,2% și, respectiv, 112,2...117,0%, ceea ce este cu 10,1 și, respectiv, 5,4% mai mult.

- 5 Viabilitatea tulpinii, după liofilizare și păstrare timp de 1 an, se exprimă în procente față de numărul inițial de UFC (unități formatoare de colonii) și este calculată conform formulei $BSR = (\log AL / \log BL) \cdot 100$, unde BSR este viabilitatea în %, $\log AL$ – logaritm zecimal al numărului UFC până la liofilizare și $\log BL$ - logaritm zecimal al numărului UFC după liofilizare sau păstrare îndelungată (Munoz-Rojas, J., Bernal, P., Duque, E., Godoy, P., Segura, A., Ramos, J. Involvement of Cyclopropane Fatty Acids in the Response of *Pseudomonas putida* KT2440 to Freeze-Drying. In: Applied Environmental Microbiology. 2006, vol. 72, № 1, p. 472–477).
- 10

Tabel

- 15 Viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 până, după liofilizare și 1 an de păstrare pe medii de protecție cu diferită compoziție biochimică

Mediu conform celei mai apropiate soluții			Mediu conform invenției					
Extract de polizaharide sulfatate, % mas.: 1...50			Extract de glicozide verbascozide, % mas.					
			0,0005		0,005		0,05	
până	după	1 an	după	1 an	după	1 an	după	1 an
100	102,9±0,1 ? 128,3±6,3	99,6±1,6 ? 118,9±5,7	121,2 ±0,6	112,2 ±1,6	130,2 ±0,8	117,0 ±0,6	125,1 ±2,0	114,5 ±2,7

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Куплетская М. Б., Аркадьева З. А. Методы длительного хранения коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии Московского Государственного Университета. Микробиология, 1997, т. 66, № 2, p. 283-288
2. Yocheva L., Najdenova M., Doncheva D., Antonova-Nicolova S. Influence of the long-term preservation on some biological features of three streptomycetes strains, producers of antibiotic substances. Journal of culture collection, 2002, v. 3, p. 25-32
3. Oleg Chiselița, Svetlana Burțeva, Maxim Birsă, Valentina Bulimaga, Anastasia Vasiliuc. Viability and antimicrobial activity of streptomycetes strains from NCNM after lyophilization. STUDIA UNIVERSITATIS MOLDAVIAE, Seria "Științe reale și ale naturii", 2016, nr. 1 (91), p. 61-71
4. MD 4474 B1 2017.03.31

(57) Revendicări:

Mediu de protecție pentru conservarea și păstrarea îndelungată a tulpinii de *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02, care conține: gelatină, glucoză, extract de glicozide iridoide obținute din *Verbascum phlomoides* L. prin extragere cu soluție etanolică de 50% și apă distilată, în următorul raport al componentelor, % mas.:

gelatină	2,5
glucoză	7,5
extract de glicozide iridoide din <i>Verbascum phlomoides</i> L.	0,0005...0,05
apă distilată	restul.