

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un mediu de protecție pentru conservarea tulpinii de actinomicete *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06.

Invenția poate fi aplicată pentru conservarea, păstrarea, studierea și utilizarea eficientă a genofondului microbial autohton de interes științific și biotehlogic.

Sunt cunoscute medii de protecție pentru liofilizarea tulpinilor de actinomicete ce conțin gelatină, zaharoză, glucoză, lapte degresat în diferite concentrații și combinații: lapte degresat (LD), lapte degresat cu glucoză de 7% (LD+G7%), gelatină 1,0% cu zaharoză 10,0% (Gel1%+Z10%), gelatină 2,5% cu zaharoză 7,5% (Gel 2,5%+Z 7,5%) [1].

Mai este cunoscut mediul de protecție pentru liofilizarea tulpinilor de actinomicete ce conține: zahăr (10%), lapte degresat (5,5%) și gelatină (1,5%) [2].

Însă, neajunsul acestor medii de protecție constă în viabilitatea scăzută a tulpinilor după liofilizare.

Cea mai apropiată soluție a mediului de protecție revendicat pentru liofilizarea tulpinii *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 este mediul care conține, (%): gelatină - 2,5 și glucoză - 7,5 [3].

La conservarea tulpinii pe acest mediu de protecție în condiții proxime viabilitatea ei după liofilizare constituie 75,7±1,4% din numărul inițial.

Dezavantajul acestui mediu constă în faptul că compoziția chimică a mediului nu asigură o protecție deplină tulpinii de actinomicete în timpul liofilizării, astfel obținându-se o viabilitate scăzută.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu de protecție care asigură sporirea viabilității tulpinii după liofilizare.

Mediul de protecție pentru conservarea tulpinii de actinomicete *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, conform invenției, conține 7,5% glucoză, 2,5% gelatină, 0,5...2,0% vol. extract de aminoacizi și oligopeptide cu o concentrație de 5 mg/ml, obținut din biomasa tulpinii de cianobacterie *Spirulina platensis* CNMN-CB-02 și apă distilată restul.

Extractul de aminoacizi și oligopeptide este obținut din biomasa tulpinii de cianobacterie *Spirulina platensis* CNMN-CB-02 prin extragere succesivă cu hexan și etanol și fracționare ulterioară.

Extractul de aminoacizi și oligopeptide din *Spirulina platensis* (Nordst) Getil CNMN-CB-02 cu o concentrație de 5 mg/ml este obținut în conformitate cu MD 545 F1 1996.05.31.

Efectul pozitiv se datorează suplینirii mediului de protecție cunoscut cu extract de aminoacizi și oligopeptide de origine cianobacteriană, care manifestă acțiune antioxidantă, de stabilizare a membranelor celulare și de stimulare a regenerării țesuturilor, ce oferă tulpinii o protecție suplimentară, contribuind astfel la majorarea viabilității ei.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea viabilității tulpinii *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06.

Rezultatul se obține datorită includerii în mediul de protecție a extractului ce conține amestec de aminoacizi și oligopeptide de origine cianobacteriană, care manifestă acțiune antioxidantă, de stabilizare a membranelor celulare și de stimulare a regenerării țesuturilor, ce anihilează efectul negativ al temperaturilor joase, presiunii înalte, deshidratării și formelor reactive de oxigen, la care sunt supuse microorganismele în timpul liofilizării.

Exemplu de realizare a invenției

Exemplul 1

În tuburi înclinate cu mediu agarizat Czapek, în condiții sterile, se cultivă tulpina *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 timp de 14 zile, în termostat la 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 aminoacizi și oligopeptide de origine cianobacteriană (5 mg/ml) – 0,5% vol., până la obținerea titrului de $10^8 \dots 10^{10}$ UFC ml⁻¹. Suspensia obținută se plasează 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 condensatorului 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.

În varianta martor viabilitatea tulpinii *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 este de 75,7±1,4%, iar în varianta optimizată de 94,5±4,9%, ceea ce este cu 18,8% mai mult.

Exemplul 2

În tuburi înclinate cu mediu agarizat Czapek, în condiții sterile, se cultivă tulpina *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 timp de 14 zile, în termostat la 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 aminoacizi și oligopeptide de origine cianobacteriană (5 mg/ml) – 1% vol., până la obținerea titrului de $10^8 \dots 10^{10}$ UFC ml⁻¹. Suspensia obținută se plasează 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 condensatorului 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.

În varianta martor viabilitatea tulpinii *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 este de 75,7±1,4%, iar în varianta optimizată de 94,1±3,9%, ceea ce este cu 18,4% mai mult.

Exemplul 3

În tuburi înclinate cu mediu agarizat Czapek, în condiții sterile, se cultivă tulpina *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 timp de 14 zile, în termostat la 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 aminoacizi și

oligopeptide de origine cianobacteriană (concentrația de 5 mg/ml) – 2,0% vol., până la obținerea titrului de $10^8 \dots 10^{10}$ UFC ml⁻¹. Suspensia obținută se plasează 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 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. Viabilitatea tulpinii liofilizate se exprimă în procente față de numărul inițial de UFC (unități formatoare de colonii).

În varianta martor viabilitatea tulpinii *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 este de 75,7±1,4%, iar în varianta optimizată de 104,7±2,2%, ceea ce este cu 29,0% mai mult.

Viabilitatea tulpinii liofilizate se exprimă în procente față de numărul inițial de UFC (unități formatoare de colonii) și este calculată conform formulei $BSR = (\log AL / \log BL) \times 100$ [Muñoz-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].

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea cu 18,4...29,0% a viabilității tulpinii *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 față de cea mai apropiată soluție (tab.).

Tabel

Viabilitatea tulpinii *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 până și după liofilizare pe mediu de protecție cu extract de aminoacizi și oligopeptide de origine cianobacteriană (5 mg/ml) în diferite concentrații

Mediul prototip		Mediul cu adaos de extract de aminoacizi și oligopeptide de origine cianobacteriană (5 mg/ml), (%/vol.)					
gelatină 2,5%+ glucoză 7,5%		0,5%		1,0%		2,0%	
până	după	până	după	până	după	până	după
100%	75,7±1,4	100%	94,5±4,9	100%	94,1±3,9	100%	104,7±2,2