



MD 4498 C1 2018.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4498** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/04* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12N 11/02 (2006.01)
C12R 1/465 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2016 0083 (22) Data depozit: 2016.07.15	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2017.07.31, BOPI nr. 7/2017
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	
(72) Inventatori: BURȚEVA Svetlana, MD; CHISELIȚA Oleg, MD; BÎRSA Maxim, MD; VASILICIUC Anastasia, MD; RUDIC Valeriu, MD	
(73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

(54) Mediu de protecție pentru conservarea tulpinii *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un mediu de protecție pentru conservarea tulpinii de actinomicete *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06.

Mediul, conform invenției, conține 2,5% gelatină, 7,5% glucoză, 0,5...2,0% vol.

2
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.

Revendicări: 2

MD 4498 C1 2018.02.28

(54) Protective medium for the preservation of *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 strain

(57) Abstract:

1
The invention relates to biotechnology, namely to a protective medium for the preservation of *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 actinomycete strain.

The medium, according to the invention, comprises 2.5% of gelatin, 7.5% of glucose,

2
0.5...2.0% vol. of extract of amino acids and oligopeptides with a concentration of 5 mg/ml, obtained from *Spirulina platensis* CNMN-CB-02 cyanobacterium strain biomass and distilled water the rest.

Claims: 2

(54) Защитная среда для консервации штамма *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к биотехнологии, а именно к защитной среде для консервации штамма актиномицета *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06.

Среда, согласно изобретению, содержит 2,5% желатина, 7,5% глюкозы, 0,5...2,0%

2
об. экстракта аминокислот и олигопептидов с концентрацией 5 мг/мл, полученного из биомассы штамма цианобактерии *Spirulina platensis* CNMN-CB-02 и дистиллированную воду остальное.

П. формулы: 2

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

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

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

10 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].

15 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.

20 Cea mai apropiată soluție a mediului de protecție revendicat pentru liofilizarea tulpinii *Streptomyces massaporeus* 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 proximale viabilitatea ei după liofilizare constituie $75,7 \pm 1,4\%$ 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.

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

30 Mediul de protecție pentru conservarea tulpinii de actinomicete *Streptomyces massaporeus* 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.

35 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.

40 Efectul pozitiv se datorează suplirii 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.

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

50 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

55 În tuburi înclinate cu mediu agarizat Czapek, în condiții sterile, se cultivă tulpina *Streptomyces massaporeus* 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 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.

5 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

10 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 10⁸...10¹⁰ 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

15 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.

20 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

25 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 10⁸...10¹⁰ 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,

30 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).

35 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.

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

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

45 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 proxim		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

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Куплетская М. Б., Аркадьева З.А. Методы длительного хранения коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ. Микробиология. 1997, т. 66, № 2, p. 283-288
2. Yocheva L., Najdenova M., Doncheva D., Antonova-Niconova S. Influence of the long-term preservation on some biological features of three streptomycetes strains, producers of antibiotic substances. Jornal of culture collection, 2002, v. 3, p. 25-32
3. Chiselita Oleg, Burteva Svetlana, Birsă Maxim, Bulimaga Valentina, Vasiliuc Anastasia. Viability and antimicrobial activity of streptomycetes strains from NCNM after lyophilization. Studia Universitatis Moldaviae, Seria Stiinte reale si ale naturii. 2016, nr.1(91), p. 61-71

(57) Revendicări:

1. Mediu de protecție pentru conservarea tulpinii de actinomicete *Streptomyces massaporeus* CNMN-Ac-06, care 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.
2. Mediu, conform revendicării 1, în care 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.