



MD 4473 B1 2017.03.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4473** (13) **B1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/04* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
C12R 1/465 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2016 0085 (22) Data depozit: 2016.07.15	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2017.03.31, BOPI nr. 3/2017
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	
(72) Inventatori: BÎRSA Maxim, MD; BURȚEVA Svetlana, MD; CHISELIȚA Oleg, MD; RUDIC Valeriu, MD	
(73) Titular: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

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

Mediul, conform invenției, conține 7,5% glucoză, 2,5% gelatină și 0,1...10,0% 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.

Revendicări: 2

MD 4473 B1 2017.03.31

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

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

2
0.1...10.0% vol. extract of amino acids and oligopeptides with a concentration of 5 mg/ml, obtained from the biomass of *Spirulina platensis* CNMN-CB-02 cyanobacterium strain.

Claims: 2

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

(57) Реферат:

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

Среда, согласно изобретению, содержит 7,5% глюкозы, 2,5% желатина и

2
0,1...10,0%об. экстракта аминокислот и олигопептидов с концентрацией 5 мг/мл, полученного из биомассы штамма цианобактерии *Spirulina platensis* CNMN-CB-02.

П. формулы: 2

Descriere:

5 Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un mediu de protecție pentru liofilizarea și păstrarea îndelungată a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 și 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 [1, 2]. Însă, neajunsul acestor medii de protecție constă în viabilitatea scăzută a tulpinilor după liofilizare și păstrare îndelungată.

În calitate de cea mai apropiată soluție a mediului de protecție revendicat pentru liofilizarea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 poate servi mediul care conține (%): gelatină 2,5 și glucoză 7,5 [3].

15 La conservarea tulpinii pe acest mediu de protecție în condiții proxime viabilitatea ei după liofilizare constituie $90,3 \pm 2,0\%$, iar după păstrarea timp de 1 an este de $79,1 \pm 1,4\%$ din numărul inițial.

20 Dezavantajul acestui mediu constă în faptul că compoziția chimică a mediului nu asigură o protecție adecvată (deplină) tulpinii de actinomicete în timpul liofilizării și păstrării îndelungate, astfel după liofilizare obținându-se o viabilitate joasă, care scade semnificativ pe durata păstrării timp de 1 an.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu de protecție care asigură viabilitate înaltă tulpinii după liofilizare și păstrarea ei eficientă la nivel înalt timp de 1 an.

25 Invenția soluționează problema prin aceea că se propune un mediu de protecție pentru liofilizarea și păstrarea îndelungată a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02, care conține 7,5% glucoză, 2,5% gelatină și 0,1...10,0% vol. extract de aminoacizi și oligopeptide cu o concentrație de 5 mg/ml, obținut din biomasa tulpinii de cianobacterie *Spirulina platensis* CNMN-CB-02. Totodată 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 (MD 545 G1 1996.05.31).

30 Suplinirea mediului de protecție cu extract de aminoacizi și oligopeptide de origine cianobacteriană, care manifestă acțiune antioxidantă, de stabilizare a membranelor celulare și de stimulare a regenerării țesuturilor, anihilează efectul negativ al temperaturilor joase, presiunii înalte, deshidratării și formelor reactive de oxigen, la care sunt supuse microorganismele în timpul liofilizării și păstrării îndelungate, oferind tulpinii o protecție suplimentară, contribuind astfel la majorarea viabilității tulpinii și menținerea ei la nivel înalt pe durata păstrării îndelungate.

35 Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea cu 15,3...20,1% a viabilității tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare și cu 20,6...28,3% după 1 an de păstrare, față de cea mai apropiată soluție (vezi tabelul).

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

45 În tuburi înclinate cu mediu agarizat Czapek, în condiții sterile, se cultivă tulpina *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 timp de 14 zile, tuburile fiind plasate în termostat la temperatura de $+27^{\circ}\text{C}$. Materialul semincer obținut se transferă în mediul de protecție lichid cu următoarea componență: 2,5% gelatină; 7,5% glucoză și 0,1% vol. extract de aminoacizi și oligopeptide (5 mg/ml), obținut din biomasa tulpinii de cianobacterie *Spirulina platensis* CNMN-CB-02, până la obținerea titrului de 10^{10} ... 10^{11} 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 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 .

55 În varianta martor viabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 este de $90,3,2 \pm 2,0\%$ după liofilizare și de $79,1 \pm 1,4\%$ peste 1 an de păstrare, iar în varianta conform invenției este de $105,6 \pm 0,7$ și, respectiv, $101,1 \pm 3,4\%$, ceea ce este cu 15,3 și, respectiv, 22,0 % mai mult.

Exemplul 2

În tuburi înclinate cu mediu agarizat Czapek, în condiții sterile, se cultivă tulpina *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 timp de 14 zile, tuburile fiind plasate în termostat la temperatura de +27°C. Materialul semincer obținut se transferă în mediul de protecție lichid cu următoarea componență: 2,5% gelatină; 7,5% glucoză și 1,0% vol. extract de aminoacizi și oligopeptide (5 mg/ml), obținut din biomasa tulpinii de cianobacterie *Spirulina platensis* CNMN-CB-02, până la obținerea titrului de $10^{10} \dots 10^{11}$ 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 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 canosus* CNMN-Ac-02 este de 90,3±2,0% după liofilizare și de 79,1±1,4% peste 1 an de păstrare, iar în varianta optimizată este de 106,2±0,5 și, respectiv, 99,7±7,1%, ceea ce este cu 15,9 și, respectiv, 20,6% mai mult.

Exemplul 3

În tuburi înclinate cu mediu agarizat Czapek, în condiții sterile, se cultivă tulpina *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 timp de 14 zile, tuburile fiind plasate în termostat la temperatura de +27°C. Materialul semincer obținut se transferă în mediul de protecție lichid cu următoarea componență: 2,5% gelatină; 7,5% glucoză și 10,0% vol. extract de aminoacizi și oligopeptide (5 mg/ml), obținut din biomasa tulpinii de cianobacterie *Spirulina platensis* CNMN-CB-02, până la obținerea titrului de $10^{10} \dots 10^{11}$ 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 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.

În varianta martor viabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 este de 90,3±2,0% după liofilizare și de 79,1±1,4% peste 1 an de păstrare, iar în varianta conform invenției este de 110,4±1,1 și, respectiv, 107,4±2,3%, ceea ce este cu 20,1 și, respectiv, 28,3% mai mult.

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 $BSR = (\log AL / \log BL) \cdot 100$ (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).

Tabel

Viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 până, după liofilizare și la 1 an de păstrare pe mediul proxim și pe mediu de protecție cu extract de aminoacizi și oligopeptide de origine cianobacteriană

Mediul proxim			Mediu cu adaos de extract de aminoacizi și oligopeptide (5 mg/ml), (% vol.)								
Gelatină 2,5%+ glucoză 7,5%			0,1			1,0			10,0		
Viabilitatea, %											
până	după	1 an	până	după	1 an	până	după	1 an	până	după	1 an
100	90,3±2,0	79,1±1,4	100	105,6±0,7	101,1±3,4	100	106,2±0,5	99,7±7,1	100	110,4±1,1	107,4±2,3

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Кушлетская 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. Journal of culture collection, 2002, v. 3, p. 25-32
3. Chiselița Oleg, Burțeva Svetlana, Bîrsa Maxim, Bulimaga Valentina, Vasiliuc Anastasia. Viability and antimicrobial activity of streptomycetes strains from NCNM after lyophilization. Studia Universitatis Moldaviae, Seria Stiințe reale și ale naturii, 2016, nr.1(91), p. 61-71

(57) Revendicări:

1. Mediu de protecție pentru liofilizarea și păstrarea îndelungată a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02, care conține 7,5% glucoză, 2,5% gelatină și 0,1...10,0%vol. extract de aminoacizi și oligopeptide cu o concentrație de 5 mg/ml, obținut din biomasa tulpinii de cianobacterie *Spirulina platensis* CNMN-CB-02.
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.

Șef Direcție Brevete:

GUȘAN Ala

Examinator:

COLESNIC Inesa

Redactor:

LOZOVANU Maria