

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.

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 invenției revendicate poate servi 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 90,3±2,0%, iar după păstrarea timp de 1 an 79,1±1,4% din numărul inițial.

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.

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 1,0...50,0%vol. extract de polizaharide sulfatate cu o concentrație de 10 mg/ml, obținut din biomasa tulpinii de cianobacterie *Spirulina platensis* CNMN-CB-02.

Polizaharidele sulfatate au fost extrase din biomasă de spirulină cu apă distilată în raport de 1:45 (m/V) la temperatura de 90°C, timp de 2 ore. După centrifugare timp de 10 min, la 4800 rot./min, la supernatant s-a adăugat soluție de 1% de bromură de cetiltrimetilamoniu pentru precipitarea polizaharidelor cu centrifugare repetată la aceiași parametri. Precipitatul obținut a fost spălat cu soluție saturată de acetat de sodiu în alcool de 95%, apoi repetat cu alcool de 96% (Ratana Chikahan, Nattayaporn Chriasuwan, Panya Triratana, Veara Loha, Suvit Tia, Boosya Bunnag. Polysaccharide extraction from *Spirulina* sp. And antioxidant capacity. International Journal of Biological Macromolecules. 2013, v.58, p.73-78).

Extractul de polizaharide obținut este constituit din 87,7% hidrați de carbon și 12,3% peptide.

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 după liofilizare și menținerea ei la un nivel înalt pe durata păstrării îndelungate.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea cu 12,6...38,0% a viabilității tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare și cu 20,5...39,8% după 1 an de păstrare, față de cea mai apropiată soluție (vezi tabelul).

Exemple de realizare a invenției

Exemplul 1

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...10,0% vol. extract de polizaharide sulfatate (10 mg/ml), 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.

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 variantele conform invenției de 109,6...110,4% și, respectiv, 105,5...107,2%, ceea ce este cu 19,3...20,1 și, respectiv, 26,4...28,1% 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 20,0...50,0% vol. extract de polizaharide sulfatate (10 mg/ml), 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.

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 variantele conform invenției de 102,9...128,3 și, respectiv, 99,6...118,9%, ceea ce este cu 12,6...38,0 și, respectiv, 20,5...39,8% 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 $BSR = (\log AL / \log BL) \times 100$ (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).

Tabelul 1

Viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 până, după liofilizare și la 1 an de păstrare pe mediu proxim și pe mediu de protecție cu extract de polizaharide sulfatate

Mediul proxim			Mediul cu adaos de extract de polizaharide sulfatate (10mg/ml), (% vol.)								
Gelatină 2,5%+ glucoză 7,5%			1,0			5,0			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%	109,6± 1,0	105,5± 2,6	100	109,9± 1,5	106,2± 3,0	100	110,4± 1,5	107,2± 3,0
Mediul proxim			Mediul cu adaos de extract de polizaharide sulfatate (10mg/ml), (% vol.)								
Gelatină 2,5%+ glucoză 7,5%			20,0			30,0			50,0		
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	102,9± 0,1	99,6± 1,6	100	128,3± 6,3	118,9± 5,7	100	105,8± 1,5	103± 0,4