



MD 1475 Z 2021.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1475** (13) **Z**
(51) Int.Cl: *C12N 1/04* (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)
C12R 1/885 (2006.01)
C01G 49/02 (2006.01)
C01G 9/02 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

(21) Nr. depozit: s 2020 0051 (22) Data depozit: 2020.05.21	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.12.31, BOPI nr. 12/2020
(71) Solicitant: I.P. INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD (72) Inventatori: SIRBU Tamara, MD; TIMUȘ Ion, MD; GORINCIOI Viorina, MD; MOLDOVAN Cristina, MD; ȚURCAN Olga, MD (73) Titular: I.P. INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD	

(54) **Mediu pentru liofilizarea tulpinilor de fungi din genul *Trichoderma***

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un mediu pentru liofilizarea tulpinilor de fungi din genul *Trichoderma* și poate fi utilizată pentru conservarea și păstrarea îndelungată a tulpinilor de fungi.

2
Mediul, conform invenției, conține, %:
glucoză - 7, nanoparticule de Fe_2ZnO_4 - 0,0005
și lapte degresat - restul.

Rezultatul invenției constă în sporirea viabilității tulpinilor de fungi după liofilizare și după păstrare în stare liofilizată.

Revendicări: 1

MD 1475 Z 2021.07.31

(54) Medium for lyophilization of fungal strains of the genus *Trichoderma***(57) Abstract:**

1

The invention relates to biotechnology, namely to a medium for lyophilization of fungal strains of the genus *Trichoderma* and can be used for conservation and long-term storage of fungal strains.

The medium, according to the invention, comprises, %: glucose - 7, Fe₂ZnO₄ nanoparticles - 0.0005 and skim milk - the rest.

2

The result of the invention consists in increasing the viability of fungal strains after lyophilization and after storage in lyophilized state.

Claims: 1

(54) Среда для лиофилизации штаммов грибов рода *Trichoderma***(57) Реферат:**

1

Изобретение относится к биотехнологии, а именно к среде для лиофилизации штаммов грибов рода *Trichoderma* и может быть использовано для консервации и длительного хранения штаммов грибов.

Среда, согласно изобретению, содержит, %: глюкозу - 7, наночастицы

2

Fe₂ZnO₄ - 0,0005 и обезжиренное молоко - остальное.

Результат изобретения состоит в повышении жизнеспособности штаммов грибов после лиофилизации и после хранения в лиофилизированном состоянии.

П. формулы: 1

Descriere:

5 Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un mediu pentru liofilizarea tulpinilor de
 5 fungi din genul *Trichoderma* și poate fi utilizată pentru conservarea și păstrarea îndelungată a
 tulpinilor de fungi.

Sunt cunoscute medii de protecție pentru liofilizarea tulpinilor de micromicete, ce conțin
 lapte degresat de 1% [1], zaharoză, glucoză, lapte degresat în diferite concentrații și combinații [2].
 10 Însă, neajunsul acestor medii de protecție constă în viabilitatea scăzută a tulpinilor după liofilizare
 și păstrare de lungă durată.

Cea mai apropiată soluție este un mediu pentru liofilizarea tulpinilor din genul
Trichoderma, care conține lapte degresat +7% glucoză [3]. La conservarea tulpinilor pe acest
 mediu de protecție în condiții proximale viabilitatea lor după liofilizare variază între 66,9±2,0 și
 81,8±4,4%, din numărul inițial. Dezavantajul acestui mediu constă în faptul că compoziția chimică
 15 a mediului asigură o viabilitate insuficientă tulpinilor de fungi după liofilizare și păstrare
 îndelungată.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu de protecție
 care asigură o viabilitate mai înaltă tulpinilor după liofilizare și păstrare.

20 Mediul pentru liofilizarea tulpinilor de fungi din genul *Trichoderma*, conform invenției,
 conține, %: glucoză - 7,0, nanoparticule de Fe₂ZnO₄ cu dimensiunea de 8-15 nm - 0,0005 și lapte
 degresat - restul.

Pentru obținerea nanoparticulelor de Fe₂ZnO₄ au fost folosiți ca precursori monocristale de
 compuși ai acidului salicilic și compusul heteronuclear cu formula generală
 [Fe₂MO(Sal)₆(L)(3-x)(L')(x)]·nSolv·mH₂O, unde M= Zn(II). Ca surfactant a fost folosit acidul
 25 oleic și 1-octadecena, conform unei metode cunoscute din literatură (William W.Yu., Joshua C.
 Falkner ș.a. Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron
 carboxylate salts. Chem Commun. (Camb.), 2004, 20, p. 2306-2307). Produsele reacției au fost
 spălate cu amestec de solvenți organici și centrifugate. Suspensiile cu nanoparticule au fost
 studiate la microscopul electronic prin transmisie TESLA BS-500. S-a stabilit că nanoparticulele
 30 obținute au formă sferică cu tendință spre formă cubică cu dimensiuni mai omogene, cuprinse între
 8-15 nm.

Efectul pozitiv este cauzat de pătrunderea nanoparticulelor (NP) în interiorul celulei și
 acțiunea acestora asupra proceselor vitale ale acesteia, și anume la sporirea activității enzimelor
 oxidative, care protejează celula de factorii de stres, contribuind astfel la majorarea viabilității
 35 celulelor formatoare de colonii după liofilizare.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea cu 8-16% a viabilității tulpinilor de fungi
 din genul *Trichoderma* față de cea mai apropiată soluție, prin suplimentarea a 5 mg/l de NP de
 Fe₂ZnO₄ în mediul proxim (tab.1). Datorită includerii în mediul protector a nanoparticulelor de
 Fe₂ZnO₄, care, pătrunzând în interiorul celulei, acționează asupra sistemului enzimatic (precum
 40 catalaza, etc.), sporind activitatea acestuia, care anihilează efectul negativ al formelor reactive de
 oxigen, temperaturilor joase și presiunii înalte, la care sunt supuse microorganismele în timpul
 liofilizării și păstrării îndelungate.

Experiențele efectuate au fost repetate de 3 ori.

Exemplu de realizare a invenției

45 În tuburi înclinate cu mediu agarizat Czapek, în condiții sterile, se cultivă separat tulpinile
 din genul *Trichoderma* timp de 10-14 zile, în termostat la temperatura de 29-30°C. Materialul
 semincer obținut se transferă în mediul protector – lapte degresat+7% glucoză+5 mg/l NP de
 Fe₂ZnO₄. Suspensia obținută (1 ml) se plasează în flacoane pentru liofilizare. Probele se
 congelează brusc la temperatura de minus 50°C. Peste 12 ore se efectuează liofilizarea la
 50 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) și este calculată conform formulei $BSR = (\log AL / \log BL) \times 100$. Unde:
 BSR este raportul logaritmului numărului de celule prezente în suspensie după liofilizare AL la
 55 logaritmul numărului de celule viabile înainte de liofilizare BL, înmulțit cu 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. Applied Environmental
 Microbiology, 2006, v. 72(1), p. 472-477).

MD 1475 Z 2021.07.31

4

Cea mai înaltă viabilitate a micromicetelor după liofilizare a fost obținută în varianta LD + 7%G + 5 mg/l NP Fe₂ZnO₄. În varianta martor viabilitatea tulpinilor de fungi variază în limitele 66,9±2,0 și 81,8±4,4%, iar în varianta optimă (LD + 7%G + 5 mg/l NP Fe₂ZnO₄) - 77,0±1,8 - 91,5±5,7%, cu 8,1-16,0% mai mult (Tab. 1).

5

Tabelul 1

Viabilitatea tulpinilor din genul *Trichoderma* după liofilizare

<i>T. virens</i> CNMN FD 13	100	80,2 ± 3,2	85,7 ± 1,7	88,2 ± 4,3	82,0 ± 1,3
Tulpina	Titrul inițial (Până la liofilizare), %	Viabilitatea după liofilizare, % față de titrul inițial			
		Mediul proxim (LD +7% G) (M)	M+NP Fe ₂ ZnO ₄ , 1 mg/l	M+NP Fe ₂ ZnO ₄ , 5 mg/l	M+NP Fe ₂ ZnO ₄ , 10 mg/l
<i>T. ligmorum</i> CNMN FD 14	100	67,0 ± 1,3	78,8 ± 1,6	81,5±3,5	78,5 ± 1,2
<i>T.ma koningii</i> CNMN FD 15	100	66,9 ±2,0	74,0 ± 1,3	77,0±1,8	75,4 ±2,6
<i>T. harzianum</i> CNMN FD 16	100	75,5 ± 6,2	84,1 ± 1,6	91,5±5,7	87,4 ± 1,6
<i>T. viride</i> CNMN FD 17	100	81,8 ± 4,4	88,6 ± 2,1	89,9±0,1	88,0 ±3,9

10 După 1 an de conservare în stare liofilizată viabilitatea tulpinilor în varianta martor variază în limitele 62,8±0,7-80,2±0,2, iar în varianta propusă 76, ±1,1-85,2±1,0 (cu 5-14,7% mai mult decât în varianta martor) (Tab. 2).

Tabelul 2

Viabilitatea tulpinilor din genul *Trichoderma* după 1 an de păstrare în stare liofilizată

Tulpina	Titrul inițial %	Viabilitatea tulpinilor după 1 an de la liofilizare, % față de titrul inițial			
		Mediul proxim după liofilizare (M)	Mediul proxim după 1 an de la liofilizare	M + NP Fe ₂ ZnO ₄ 5 mg/l, după liofilizare	M + NP Fe ₂ ZnO ₄ 5 mg/l, după 1 an de la liofilizare
<i>T. virens</i> CNMN FD 13	100	80,2 ± 3,2	76,8 ± 2,8	88,2 ± 4,3	82,0 ± 1,2
<i>T. ligmorum</i> CNMN FD 14	100	67,0 ± 1,3	62,8 ± 0,7	81,5±3,5	77,1 ± 0,4
<i>T.ma koningii</i> CNMN FD 15	100	66,9 ±2,0	66,2 ± 0,8	77,0±1,8	76,3 ± 1,1
<i>T. harzianum</i> CNMN FD 16	100	75,5 ± 6,2	70,0 ±0,6	91,5±5,7	84,7 ± 0,8
<i>T. viride</i> CNMN FD 17	100	81,8 ± 4,4	80,2 ± 0,2	89,9±0,1	85,2 ± 1,0

15

Mediul de protecție propus (LD +7% G + 5 mg/l NP Fe₂ZnO₄) pentru liofilizarea fungilor din genul *Trichoderma* contribuie la stimularea viabilității acestora după liofilizare și păstrare în stare liofilizată.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Кантерова А.В., Вазинская И.С., Новик Г.И. Жизнеспособность и активность роста грибов родов *Penicillium* и *Aspergillus* после длительного хранения в лиофилизированном состоянии. Materialele Conf. șt. naț. cu participare internaț. consacrată celei de-a 50 aniversare de la fondarea Secției de Microbiologie „Probleme actuale ale microbiologiei și biotehnologiei”, Chișinău, 2009, p. 44-46
2. Sîrbu T., Codreanu S. Influența condițiilor de liofilizare asupra viabilității micromicercelor. Buletinul AȘM. Științele vieții, 2007, 2(302), p. 134-138
3. Timuș Ion. Viabilitatea și stabilitatea tulpinilor de micromicete după liofilizare. Materialele Conf. șt. a doctoranzilor, ed. a VIII-a, Chișinău, 2019, v. 1, p. 151-156

(57) Revendicări:

Mediu pentru liofilizarea tulpinilor de fungi din genul *Trichoderma*, care conține lapte degresat, glucoză și nanoparticule de Fe_2ZnO_4 cu dimensiunea de 8-15 nm, în următorul raport al componentelor, %:

glucoză - 7,0;

nanoparticule de Fe_2ZnO_4 - 0,0005

lapte degresat - restul.