



MD 1467 Y 2020.11.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1467** (13) **Y**
(51) Int.Cl: *C12N 1/04* (2006.01)
C12N 1/14 (2006.01)
C12R 1/66 (2006.01)
C01G 49/06 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

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

În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: s 2020 0052 (22) Data depozit: 2020.05.21	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.11.30, BOPI nr. 11/2020
(71) Solicitant: I.P. INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD (72) Inventatori: SÎRBU Tamara, MD; TIMUȘ Ion, MD; GORINCIOI Viorina, MD; ȚURCAN Olga, MD; MOLDOVAN Cristina, MD (73) Titular: I.P. INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE, MD	

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

(57) **Rezumat:**

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

2
Mediul, conform invenției, conține, %:
glucoză - 7, nanoparticule de Fe₂O₃ - 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 1467 Y 2020.11.30

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

1

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

The medium, according to the invention, comprises, %: glucose - 7, Fe₂O₃ nanoparticles - 0.0005 and skim milk - the rest.

2

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

Claims: 1

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

1

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

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

2

Fe₂O₃ - 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 fungi din genul *Aspergillus* și poate fi utilizată pentru conservarea, păstrarea și studierea genofondului microbial autohton de interes științific și biotehnologic.

Sunt cunoscute medii pentru liofilizarea tulpinilor de micromicete ce conțin zaharoză, glucoză, lapte degresat, gelatină etc. în diferite concentrații și combinații: lapte degresat de 1% [1], zaharoză 20% (Z 20%), lapte degresat +7% glucoză (LD+7%G) [2].
10 Însă, neajunsul acestor medii de protecție constă în viabilitatea scăzută a tulpinilor după liofilizare.

Cea mai apropiată soluție a mediului pentru liofilizarea tulpinilor din genul *Aspergillus* este mediul care conține: lapte degresat +7% glucoză [3]. La conservarea tulpinilor pe acest mediu de protecție în condiții proximale viabilitatea lor după liofilizare variază între 71,3-85,6%. Dezavantajul acestui mediu constă în faptul că compoziția
15 mediului nu asigură o protecție deplină tulpinilor de micromicete 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.

20 Mediul pentru liofilizarea tulpinilor de fungi din genul *Aspergillus*, conform invenției, conține, %: glucoză - 7, nanoparticule de Fe₂O₃ cu dimensiunea de 2-10 nm - 0,0005 și lapte degresat - restul.

Pentru obținerea nanoparticulelor (NP) de Fe₂O₃ au fost folosiți ca precursori monocristale de compus homonuclear
25 [Fe₃O(SalH)₇(H₂O)₂](DMAA)₂(MeOH)(THF)_{1,5}(H₂O)_{2,6}. Ca surfactant a fost folosit acidul oleic și 1-octadecena după metoda cunoscută din literatură (Gorinchoy V., Shova S., Melnic E., Kravtsov V., Turta C. Homotrimeric Ee₃(III)μ-oxo salicylate cluster. Synthesis, structure and properties. Chem. J. Mold., 2013, v. 8(2), p. 83-89). Produsele reacției au fost spălate cu amestec de solvenți organici și centrifugate. Suspensiile cu
30 nanoparticule au fost studiate la microscopul electronic prin transmisie TESLA BS-500. S-a stabilit că nanoparticulele obținute au formă sferică cu tendință spre formă cubică, hexagonală și dreptunghiulară, dimensiunile variază în limitele 2-10 nm, predominând particule cu dimensiuni de 2-4 nm.

Efectul pozitiv se datorează suplínirii mediului de protecție cunoscut (lapte degresat+7% glucoză) cu nanoparticule (NP) de Fe₂O₃, care, pătrunzând în interiorul
35 celulei, acționează asupra enzimelor oxidative, sporind activitatea acestora, astfel oferind tulpinii o protecție suplimentară, ceea ce contribuie la majorarea viabilității ei după liofilizare.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea cu 6-14% a viabilității tulpinilor de
40 fungi din genul *Aspergillus* după liofilizare și cu 4-12,4 % după 1 an de păstrare față de mediul proxim (Tab.1, Tab. 2). Experiențele efectuate au fost repetate de 3 ori.

Exemplu de realizare a invenției

În tuburi înclinate cu mediu agarizat Czapek, în condiții sterile, se cultivă tulpinile ce aparțin genului *Aspergillus* timp de 10-14 zile, în termostat la temperatura de 29...30°C.
45 Materialul semincer obținut se transferă în mediul de protecție lichid cu următoarea componență: lapte degresat+7% glucoză+5mg/l NP Fe₂O₃. Suspensia obținută se plasează câte 1 ml în flacoane pentru liofilizare. Probele se congelează brusc la temperatura de -50°C. Peste 12 ore se efectuează liofilizarea la temperatura condensatorului de -88...-94°C, vid 6...7 Pa, timp de 12 ore. Probele liofilizate se sigilează în vid și se păstrează la
50 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 logaritmul numărului de celule viabile înainte de liofilizare BL înmulțit cu
55 100 (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).

Datele prezentate în Tab. 1 demonstrează că viabilitatea maximă a tulpinilor de fungi după liofilizare se obține în varianta cu mediul de protecție LD+7%G+5 mg/l NP

Fe₂O₃. Viabilitatea tulpinilor de *Aspergillus* după liofilizare în varianta martor (M) variază în limitele 71,3±2,1-85,6±4,2%, iar în varianta propusă (M + 5 mg/l NP Fe₂O₃) în limitele 79,7±1,9-99,0±4,2, cu 6-14,0% mai mult decât în varianta martor (Tab. 1).

Tabelul 1

5 Viabilitatea tulpinilor din genul *Aspergillus* după liofilizare

Tulpina	Titrul inițial, %	Viabilitatea tulpinilor după liofilizare, % față de titrul inițial			
		Mediul proxim (LD+7%G) (M)	M+NP Fe ₂ O ₃ 1 mg/l	M+NP Fe ₂ O ₃ 5 mg/l	M+NP Fe ₂ O ₃ 10 mg/l
<i>A. flavus</i> BKMF 3292D	100	85,6±4,2	85,8±4,1	91,6±0,8	88,8±1,7
<i>A. alliaceus</i> CNM FA 01	100	82,5±4,6	90,3±0,5	92,6±4,3	88,6±1,9
<i>A. fumigatus</i> CNM FA 04	100	85,0±5,8	94,0±1,5	99,0±4,2	94,7±0,6
<i>A. niger</i> CNM FA 03	100	77,1±3,4	83,1±0,9	85,2±3,5	82,3±2,0
<i>A. niger</i> CNMN FD 01	100	71,3±2,1	77,6±1,4	79,7±1,9	75,4±2,2

După 1 an de păstrare în stare liofilizată viabilitatea acestor tulpini în varianta martor variază în limitele 67,4±1,6-81,4±2,5, iar în varianta propusă (M+5 mg/l NP Fe₂O₃) - 75,6±1,0-90,0±1,0 %, cu 4-12,4 % mai mult decât în varianta martor (Tab. 2).

10

Tabelul 2

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

Tulpina	Titrul inițial, %	Viabilitatea tulpinilor, % față de titrul inițial			
		Mediul proxim după liofilizare (M)	Mediul proxim după 1 an de păstrare	M+NP Fe ₂ O ₃ 5 mg/l, după liofilizare	M+NP Fe ₂ O ₃ 5 mg/l, după 1 an de păstrare
<i>A. flavus</i> BKMF 3292D	100	85,6 ± 4,2	78,0 ± 2,0	91,6±0,8	82,0±0,8
<i>A. alliaceus</i> CNM FA 01	100	82,5 ± 4,6	81,4 ± 2,5	92,6±4,3	90,0±1,0
<i>A. fumigatus</i> CNM FA 04	100	85,0 ± 5,8	72,6 ± 1,5	99,0±4,2	85,0±1,2
<i>A. niger</i> CNM FA 03	100	77,1 ± 3,4	76,5 ± 0,5	85,2±3,5	85,0±1,0
<i>A. niger</i> CNMN FD 01	100	71,3 ± 2,1	65,0 ± 0,7	79,7±1,9	75,6±1,0

Astfel, rezultatele prezentate în Tab.1 și Tab.2 demonstrează că mediul de protecție propus: lapte degresat+7% glucoză+5 mg/l NP de Fe₂O₃, utilizat la liofilizarea tulpinilor de fungi din genul *Aspergillus*, contribuie la stimularea viabilității tulpinilor după liofilizare și păstrare în stare liofilizată.

15

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Кангерова А.В., Важинская 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 *Aspergillus*, care conține lapte degresat, glucoză și nanoparticule de Fe_2O_3 cu dimensiunea de 2-10 nm, în următorul raport al componentelor, %:

- glucoză - 7
- nanoparticule de Fe_2O_3 - 0,0005
- lapte degresat - restul.