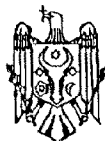




MD 4499 C1 2018.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4499** (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 0084 (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: CHISELIȚA Oleg, MD; BÎRSA Maxim, MD; BURȚEVA Svetlana, MD; VASILICIUC Anastasia, MD; RUDIC Valeriu, MD; BULIMAGA Valentina, 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 7,5% glucoză, 2,5% gelatină, 10...50% vol. extract

2
de polizaharide sulfatate cu o concentrație de 10 mg/ml, obținut din biomasa tulpinii de cianobacterie *Spirulina platensis* CNMN-CB-02 și apă distilată restul.

Revendicări: 2

MD 4499 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 7.5% of glucose, 2.5% of gelatin,

2
10...50% vol. of extract of sulfated polysaccharides with a concentration of 10 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 7,5% глюкозы, 2,5% желатина, 10...50% об.

2
экстракта сульфатированных полисахаридов с концентрацией 10 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 massasporeus* CNMN-Ac-06.

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

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 7,0% (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 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 massasporeus* 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 massasporeus* CNMN-Ac-06, conform invenției, conține 7,5% glucoză, 2,5% gelatină, 10...50% vol. extract de polizaharide sulfatate cu o concentrație de 10 mg/ml, obținut din biomasa tulpinii de cianobacterie *Spirulina platensis* CNMN-CB-02 și apă distilată restul.

35 Extractul de polizaharide sulfatate este obținut din biomasa tulpinii de cianobacterie *Spirulina platensis* CNMN-CB-02 prin extragere cu apă distilată la temperatura de 90°C, centrifugare, sedimentare cu soluție de 1% de bromură de cetil-trimetil-amoniu, spălare cu soluție saturată de acetat de sodiu și alcool etilic de 96% vol.

40 Polizaharidele sulfatate au fost extrase din biomasa 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 se adaugă soluție de 1% de bromură de cetil-trimetil-amoniu pentru precipitarea polizaharidelor și se repetă centrifugarea la aceiași parametri. Precipitatul obținut se spală cu soluție saturată de acetat de sodiu în alcool de 95%, apoi repetat cu alcool de 96% [Ratana Chaiklahan, Nattayaporn Chirasuwan, Panya Triratana, Veara Loha, Suvit Tia, Boosya Bunnag. Polysaccharide extraction from *Spirulina sp.* and its antioxidant capacity. International Journal of Biological Macromolecules., 2013, v. 58, p.73-78].

45 Extractul de polizaharide obținut este constituit din 87,7% hidrați de carbon și 12,3% peptide. Efectul pozitiv se datorează suplínirii mediului de protecție cunoscut cu extract de polizaharide sulfatate de origine cianobacteriană, care posedă acțiune antioxidantă și antiradicalică și oferă tulpinii o protecție suplimentară, contribuind astfel la majorarea viabilității ei după liofilizare.

50 Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea cu 30,0...36,9% a viabilității tulpinii de actinomicete *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 față de cea mai apropiată soluție (tab.), datorită includerii în mediul de protecție a extractului de polizaharide sulfatate de origine cianobacteriană, care posedă acțiune antioxidantă și antiradicalică și 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

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 polizaharide sulfatate de origine cianobacteriană (concentrația de 10 mg/ml) – 10 % 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.

În varianta martor viabilitatea tulpinii *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 este de 75,7±1,4%, iar în varianta optimizată de 105,7±1,5%, ceea ce este cu 30,0% mai mult.

Exemplul 2

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 polizaharide sulfatate de origine cianobacteriană (concentrația de 10 mg/ml) – 30% 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.

În varianta martor viabilitatea tulpinii *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 este de 75,7±1,4%, iar în varianta optimizată de 106,2±2,5%, ceea ce este cu 30,5% mai mult.

Exemplul 3

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 polizaharide sulfatate de origine cianobacteriană (concentrația de 10 mg/ml) – 50% 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.

În varianta martor viabilitatea tulpinii *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 este de 75,7±1,4%, iar în varianta optimizată de 112,6±2,4%, ceea ce este cu 36,9% mai mult.

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).

Tabel

Viabilitatea tulpinii *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 până și după liofilizare pe mediu de protecție cu extract de polizaharide sulfatate de origine cianobacteriană (10 mg/ml) în diferite concentrații

Mediul proxim		Mediul cu adaos de extract de polizaharide sulfatate de origine cianobacteriană (10 mg/ml), (%/vol.)					
gelatină 2,5%+ glucoză 7,5%		10%		30 %		50%	
până	după	până	după	până	după	până	după
100%	75,7±1,4	100%	105,7±1,5	100%	106,2±2,5	100%	112,6±2,4

(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 streptomyces strains, producers of antibiotic substances. Jornal of culture collection, 2002, v. 3, p. 25-32
3. Chiselita Oleg, Burteva Svetlana, Birsă Maxim, Bulimaga Valentina, Vasiliciuc Anastasia. Viability and antimicrobial activity of streptomyces 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 massasporeus* CNMN-Ac-06, care conține 7,5% glucoză, 2,5% gelatină, 10...50% vol. extract de polizaharide sulfatate cu o concentrație de 10 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 polizaharide sulfatate este obținut din biomasa tulpinii de cianobacterie *Spirulina platensis* CNMN-CB-02 prin extragere cu apă distilată la temperatura de 90°C, centrifugare, sedimentare cu soluție de 1% de bromură de cetiltrimetilamoniu, spălare cu soluție saturată de acetat de sodiu și alcool etilic de 96% vol.

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2016 0084 (32) Data de prioritate recunoscută:
 (22) Data depozit: 2016.07.15 Raport de documentare internațională: ☐ da
 (71) Solicitant: **INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD**
 (54) Titlul: **Mediu de protecție pentru conservarea tulpinii *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06**

II. Clasificarea obiectului invenției:

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

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): C12N 1/04

C12N 1/20

C12N 11/02

C12R 1/465

crioprotecție

conservare

liofilizare

Streptomyces

polizaharide

"Worldwide" (Espacenet): C12N 1/04

C12N 1/20

C12N 11/02

C12R 1/465

cryoprotective

lyophilisation

Streptomyces

polysaccharide

EA, CIS (Eapatis): C12N 1/04

C12N 1/20

C12N 11/02

C12R 1/465

криопротектор

Streptomyces

полисахариды

SU (nonpublic):

Alte BD –

www.google.com

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

https://ibn.idsi.md/sites/default/files/imag_file/Standartele%20procedurii%20de%20conservare%20a%20tulpinilor%20de%20actinomicete.pdf
<http://www.bioline.org.br/request?cc02003>

V. Documente considerate a fi relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A, D	Куплетская М. Б., Аркадьева З.А. Методы длительного хранения коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ. Микробиология. 1997, т. 66, № 2, p. 283-288	1
A, D	Yocheva L., Najdenova M., Doncheva D., Antonova-Niconova S. Influence of the long-term preservation on some biological features of three streptomyces strains, producers of antibiotic substances. Jornal of culture collection. 2002, v. 3, p. 25-32	1
A, D, C	Chiselita Oleg, Burteva Svetlana, Birsă Maxim, Bulimaga Valentina, Vasiliciuc Anastasia. Viability and antimicrobial activity of streptomyces strains from NCNM after lyophilization. Studia Univeritatis Moldaviae, Seria Stiinte reale si ale naturi. 2016, nr.1(91), p. 61-71	1
A	MD 1353 F1 1999.11.30	1
A	MD 617 B1 1996.11.30	1
A	UA 27038 U 2007.10.10	1
A	JPH 05308955 A 1993.11.22	1
A	SU 1652336 A1 1991.05.30	1
* categoriile speciale ale documentelor citate:		
A – document care definește stadiul anterior general		T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur		E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie		D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare		C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
		& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate		L – document citat cu alte scopuri
Data finalizării documentării 2017.02.14		
Examinator DUBĂSARU Nina		