



MD 1226 Z 2018.08.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1226** (13) **Z**
(51) Int.Cl: *C12N 1/04* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/465 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE DE SCURTĂ DURATĂ

(21) Nr. depozit: s 2017 0081 (22) Data depozit: 2017.06.29	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2018.01.31, BOPI nr. 1/2018
(71) Solicitanți: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (72) Inventatori: CHISELIȚA Oleg, MD; BURȚEVA Svetlana, MD; BÎRSA Maxim, MD; MAȘCENCO Natalia, MD (73) Titulari: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	

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

Esența invenției constă în aceea că mediul conține, % mas.: gelatină 2,5; glucoză 7,5;

2
extract de glicozide iridoide obținute din *Linaria genistifolia* (L.) Mill prin extragere cu soluție alcoolică de 60% 0,00005...0,05 și apă distilată restul.

Revendicări: 1

MD 1226 Z 2018.08.31

(54) Protective medium for preservation 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 preservation and long-term storage of a strain of actinomycetes of the genus *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02.

Summary of the invention consists in that the medium comprises, mass %: gelatin 2.5;

2

glucose 7.5; extract of iridoid glycosides obtained from *Linaria genistifolia* (L.) Mill by extraction with 60% alcoholic solution 0.00005...0.05 and distilled water the rest.

Claims: 1

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

(57) Реферат:

1

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

Сущность изобретения состоит в том, что среда содержит, масс. %: желатин 2,5; глюкозу 7,5; экстракт иридоидных

2

гликозидов полученных из *Linaria genistifolia* (L.) Mill путем экстрагирования 60%-ным спиртовым раствором 0,00005...0,05 и дистиллированную воду остальное.

П. формулы: 1

Descriere:

5 Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un mediu de protecție a actinomicetelor din genul *Streptomyces* și poate fi aplicată pentru conservarea, păstrarea, studierea și utilizarea eficientă a genofondului microbial autohton de interes științific și biotehnologic.

Sunt cunoscute medii de protecție pentru liofilizarea tulpinilor de actinomicete ce conțin gelatină, zaharoză, glucoză, lapte degresat în diferite concentrații și combinații [1, 2, 3]. Înșă, neajunsul acestor medii de protecție constă în viabilitatea scăzută a tulpinilor după liofilizare și păstrare îndelungată.

10 În calitate de cea mai apropiată soluție a invenției revendicate este mediul de protecție pentru liofilizarea 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 [4].

15 La conservarea tulpinii pe acest mediu de protecție în condiții proximale viabilitatea ei după liofilizare constituie $102,9 \pm 0,1$ și $128,3 \pm 6,3\%$, iar după păstrare timp de 1 an $99,6 \pm 1,6$ și $118,9 \pm 5,7\%$ din numărul inițial, în dependență de concentrația polizaharidelor sulfatate.

20 Dezavantajul acestui mediu constă în faptul că compoziția chimică a mediului asigură o viabilitate mai mică tulpinii de actinomicete în timpul liofilizării și păstrării îndelungate, decât mediul protector revendicat.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în diversificarea și majorarea asortimentului de substanțe biologice active naturale cu efect lioprotector și elaborarea unui mediu de protecție care asigură viabilitate înaltă tulpinii după liofilizare și păstrarea ei eficientă la nivel înalt timp de 1 an.

25 Esența invenției constă în aceea că mediul conține, % mas.: gelatină 2,5; glucoză 7,5; extract de glicozide iridoide obținute din *Linaria genistifolia* (L.) Mill prin extragere cu soluție alcoolică de 60% 0,00005...0,05 și apă distilată restul. Extractul de glicozide iridoide a fost obținut din biomasa uscată a plantei *Linaria genistifolia*. Metoda de extracție și compoziția biochimică a extractului este descrisă în sursa: Natalia Mashchenko, Angela Gurev, Galina Lupascu, Elena Gorincioi. Iridoid glycosides from *Linaria genistifolia* (L.) Mill in biological control of soil-borne fungal pathogens of wheat and some structure considerations. Chemistry Journal of Moldova. General, Industrial and Ecological Chemistry. 2015, 10(1), p. 57-63.

30 Inlocuirea extractului de polizaharide sulfatate în mediul de protecție cunoscut prin extract de glicozide iridoide de origine vegetală, cu acțiune antioxidantă, adaptogenă, de stimulare a regenerării țesuturilor și de protecție a membranelor celulare prin reducerea peroxidării lipidelor, oferă tulpinii o protecție suplimentară, contribuind astfel la majorarea viabilității tulpinii și menținerea ei la nivel înalt pe durata păstrării îndelungate (Ghisalberti E. L. Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. Phytomedicine, 1998, v. 5(2), p. 147-163).

40 Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea cu 11,3...18,0% a viabilității tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare și cu 6,5...16,6% după 1 an de păstrare, față de cea mai apropiată soluție (vezi tabelul), prin utilizarea concentrațiilor cu până la 3 ordine mai mici ale extractului de glicozide iridoide (genistifoliozide). Datorită includerii în mediul protector a extractului de glicozide iridoide, care manifestă acțiune antioxidantă, adaptogenă, de stimulare a regenerării țesuturilor și de protecție a membranelor celulare, se 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.

50 Exemplu de realizare a invenției

Exemplul 1

55 În tuburi inclinate cu mediul 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: gelatină 2,5%, glucoză 7,5% și extract de glicozide iridoide (genistifoliozide) 0,05...0,005, până la obținerea titlului 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 condensului 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. Utilizând metoda diluțiilor succesive, probele se însămânțează pe medii agarizate și se numără unitățile formatoare de colonii UFC, până, după liofilizare și peste 1 an de păstrare.

- 5 In varianta martor viabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 este de 102,9...128,3% după liofilizare și de 99,6...118,9% peste 1 an de păstrare, iar în variantele conform invenției de 120,9...127,3% și, respectiv, 116,6...121,2%, ceea ce este cu 8,5 și, respectiv, 9,6% mai mult.

Exemplul 2

- 10 In tuburi inclinate cu mediul agarizat Czapek, în condiții sterile, se cultivă tulpina *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 timp de 14 zile, tuburile fiind plasate în termostaț 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 glicozide iridoide (genistifoliozide) 0,0005...0,00005, până la obținerea titrului de 10^{10} ... 10^{11} UFC ml⁻¹.
15 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. Utilizând metoda diluțiilor succesive, probele se însămânțează pe medii agarizate și se numără unitățile formatoare de colonii UFC, până, după liofilizare și peste 1 an de păstrare.

- 20 In varianta martor viabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 este de 102,9...128,3% după liofilizare și de 99,6...118,9% peste 1 an de păstrare, iar în variantele conform invenției de 132,7...139,6% și, respectiv, 116,2...125,4%, ceea ce este cu 20,5 și, respectiv, 11,5% mai mult.

- 25 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 $BSR = (\log AL / \log BL) \cdot 100$, unde BSR este viabilitatea în %, $\log AL$ – logaritm zecimal al numărului UFC până la liofilizare și $\log BL$ - logaritm zecimal al numărului UFC după liofilizare sau păstrare îndelungată (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, v. 72, 1, p. 472–477).
30

Tabel

35 Viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 până, după liofilizare și la 1 an de păstrare pe medii de protecție cu diversă compoziție biochimică

Mediul conform celei mai apropiate soluții			Mediul conform invenției							
			Extract de glicozide iridoide, % mas.							
Extract de polizaharide sulfatate, % mas: 1...50			0,00005		0,0005		0,005		0,05	
până	după	1 an	după	1 an	după	1 an	după	1 an	după	1 an
100	102,9 ±0,1 ?	99,6 ±1,6 ?	132,7 ±1,4	116,2 ±2,9	139,6 ±3,2	125,4 ±3,1	127,3 ±0,4	121,2 ±3,5	120,9 ±1,1	116,6 ±0,6
	128,3 ±6,3	118,9 ±5,7								

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Кушлетская М. Б., Аркадьева З. А. Методы длительного хранения коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии Московского Государственного Университета. Микробиология, 1997, т. 66, № 2, p. 283-288
2. Yocheva L., Najdenova M., Doncheva D., Antonova-Nicolova 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. Oleg Chiselița, Svetlana Burțeva, Maxim Birsă, Valentina Bulimaga, Anastasia Vasiliciuc. Viability and antimicrobial activity of streptomyces strains from NCNM after lyophilization. STUDIA UNIVERSITATIS MOLDAVIAE, Seria "Științe reale și ale naturii", 2016, nr. 1 (91), p. 61-71
4. MD 4474 B1 2017.03.31

(57) Revendicări:

Mediu de protecție pentru conservarea și păstrarea îndelungată a tulpinii de *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02, care conține: gelatină, glucoză, extract de glicozide iridoide obținute din *Linaria genistifolia* (L.) Mill prin extragere cu soluție alcoolică de 60% și apă distilată, în următorul raport al componentelor, % mas.:

gelatină	2,5
glucoză	7,5
extract de glicozide iridoide din <i>Linaria genistifolia</i> (L.) Mill	0,00005...0,05
apă distilată	restul.

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii		
(21) Nr. depozit: s 2017 0081 (22) Data depozit: 2017.06.29 (71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD; INSTITUTUL DE GENETICĂ, FIZIOLOGIE ȘI PROTECȚIE A PLANTELOR AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD (54) Titlul: Mediu de protecție pentru conservarea și păstrarea îndelungată a tulpinii <i>Streptomyces canosus</i> CNMN-Ac-02		
II. Clasificarea obiectului invenției:		
(51) Int.Cl: <i>C12N 1/04</i> (2006.01) <i>C12N 1/20</i> (2006.01) <i>C12R 1/465</i> (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): Int.Cl: <i>C12N 1/04</i> (2006.01) <i>C12N 1/20</i> (2006.01) <i>C12R 1/465</i> (2006.01) mediu, conservare, păstrare, <i>Streptomyces canosus</i>, glicozidă, iridoidă, <i>Linaria genistifolia</i> (L.) Mill EA, CIS (Eapatis): Int.Cl: <i>C12N 1/04</i> (2006.01) <i>C12N 1/20</i> (2006.01) <i>C12R 1/465</i> (2006.01) среда, консервирование, хранение, <i>Streptomyces canosus</i>, гликозид, иридоид, <i>Linaria genistifolia</i> (L.) Mill		
IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate		
www.google.com http://www.cjm.asm.md/iridoid-glycosides-from-linaria-genistifolia-l-mill-in-biological-control-of-soil-borne-fungal-pathogens-of-wheat-and-some		
V. Documente considerate a fi relevante		
Categorია*	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 Московского Государственного Университета. Микробиология, 1997, т. 66, № 2, р. 283-288	1
A, D	Yocheva L., Najdenova M., Doncheva D., Antonova-Nicolova S. Influence of the long-term preservation on	1

	some biological features of three streptomyces strains, producers of antibiotic substances. Journal of culture collection, 2002, v. 3, p. 25-32	
A, D	Oleg Chiselita, Svetlana Burteva, Maxim Birsa, Valentina Bulimaga, Anastasia Vasiliciuc. Viability and antimicrobial activity of streptomyces strains from NCNM after lyophilization. STUDIA UNIVERSITATIS MOLDAVIAE, Seria "Științe reale și ale naturii", 2016, nr. 1 (91), p. 61-71	1
A, D, C	MD 4474 B1 2017.03.31	1
A, D	Mashcenko N., Gurev A., Lupașcu G., Gorincioi E. Iridoid glycosides from Linaria genistifolia (L.) Mill. in biological control of soil-borne fungal pathogens of wheat and some structure considerations. Chemistry Journal of Moldova. General, Industrial and Ecological Chemistry, 2015, 10 (1), p. 57-63	1
A, D	Ghisalberti E. L. Biological and pharmacological activity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. Phytomedicine, 1998, v. 5 (2), p. 147-163	1
A	MD 1353 F1 1999.11.30	1
A	MD 4473 B1 2017.03.31	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	2017.11.27	
Examinator	DUMANSCAIA Oliga	