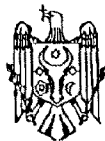




MD 4498 B1 2017.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4498** (13) **B1**
(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

In termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului	
(21) Nr. depozit: a 2016 0083 (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: BURȚEVA Svetlana, MD; CHISELIȚA Oleg, MD; BÎRSA Maxim, MD; VASILICIUC Anastasia, MD; RUDIC Valeriu, 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 2,5% gelatină, 7,5% glucoză, 0,5...2,0% vol.

2
extract de aminoacizi și oligopeptide cu o concentrație de 5 mg/ml, obținut din biomasa tulpinii de cianobacterie *Spirulina platensis* CNMN-CB-02 și apă distilată restul.

Revendicări: 2

MD 4498 B1 2017.07.31

(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 2.5% of gelatin, 7.5% of glucose,

2
0.5...2.0% vol. of extract of amino acids and oligopeptides with a concentration of 5 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 2,5% желатина, 7,5% глюкозы, 0,5...2,0%

2
об. экстракта аминокислот и олигопептидов с концентрацией 5 мг/мл, полученного из биомассы штамма цианобактерии *Spirulina platensis* CNMN-CB-02 и дистиллированную воду остальное.

П. формулы: 2

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un mediu de protecție pentru conservarea tulpinii de actinomicete *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06.

5 Invenția 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: lapte degresat (LD), lapte degresat cu glucoză de 7% (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].

Mai este cunoscut mediul de protecție pentru liofilizarea tulpinilor de actinomicete ce conține: zahăr (10%), lapte degresat (5,5%) și gelatină (1,5%) [2].

15 Însă, neajunsul acestor medii de protecție constă în viabilitatea scăzută a tulpinilor după liofilizare.

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].

20 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.

Mediul de protecție pentru conservarea tulpinii de actinomicete *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06, conform invenției, conține 7,5% glucoză, 2,5% gelatină, 0,5...2,0% vol. extract de aminoacizi și oligopeptide cu o concentrație de 5 mg/ml, obținut din biomasa tulpinii de cianobacterie *Spirulina platensis* CNMN-CB-02 și apă distilată restul.

30 Extractul de aminoacizi și oligopeptide este obținut din biomasa tulpinii de cianobacterie *Spirulina platensis* CNMN-CB-02 prin extragere succesivă cu hexan și etanol și fracționare ulterioară.

35 Extractul de aminoacizi și oligopeptide din *Spirulina platensis* (Nordst) Getil CNMN-CB-02 cu o concentrație de 5 mg/ml este obținut în conformitate cu MD 545 F1 1996.05.31.

40 Efectul pozitiv se datorează suplínirii mediului de protecție cunoscut cu extract de aminoacizi și oligopeptide de origine cianobacteriană, care manifestă acțiune antioxidantă, de stabilizare a membranelor celulare și de stimulare a regenerării țesuturilor, ce oferă tulpinii o protecție suplimentară, contribuind astfel la majorarea viabilității ei.

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea viabilității tulpinii *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06.

45 Rezultatul se obține datorită includerii în mediul de protecție a extractului ce conține amestec de aminoacizi și oligopeptide de origine cianobacteriană, care manifestă acțiune antioxidantă, de stabilizare a membranelor celulare și de stimulare a regenerării țesuturilor, ce anihilează efectul negativ al temperaturilor joase, presiunii înalte, deshidratării și formelor reactive de oxigen, la care sunt supuse microorganismele în timpul liofilizării.

50 Exemplu de realizare a invenției

Exemplul 1

55 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 aminoacizi și oligopeptide de origine cianobacteriană (5 mg/ml) – 0,5% 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 94,5±4,9%, ceea ce este cu 18,8% 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 aminoacizi și oligopeptide de origine cianobacteriană (5 mg/ml) – 1% 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 94,1±3,9%, ceea ce este cu 18,4% 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 aminoacizi și oligopeptide de origine cianobacteriană (concentrația de 5 mg/ml) – 2,0% 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. Viabilitatea tulpinii liofilizate se exprimă în procente față de numărul inițial de UFC (unități formatoare de colonii).

În varianta martor viabilitatea tulpinii *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 este de 75,7±1,4%, iar în varianta optimizată de 104,7±2,2%, ceea ce este cu 29,0% 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].

Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea cu 18,4...29,0% a viabilității tulpinii *Streptomyces massasporeus* CNMN-Ac-06 față de cea mai apropiată soluție (tab.).

Tabel

Viabilitatea tulpinii *S. massasporeus* CNMN-Ac-06 până și după liofilizare pe mediu de protecție cu extract de aminoacizi și oligopeptide de origine cianobacteriană (5 mg/ml) în diferite concentrații

Mediul prototip		Mediul cu adaos de extract de aminoacizi și oligopeptide de origine cianobacteriană (5 mg/ml), (%/vol.)					
gelatină 2,5%+ glucoză 7,5%		0,5%		1,0%		2,0%	
până	după	până	după	până	după	până	după
100%	75,7±1,4	100%	94,5±4,9	100%	94,1±3,9	100%	104,7±2,2

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Кушлетская 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 streptomycetes strains, producers of antibiotic substances. Jurnal 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 massaporeus* CNMN-Ac-06, care conține 7,5% glucoză, 2,5% gelatină, 0,5...2,0% vol. extract de aminoacizi și oligopeptide cu o concentrație de 5 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 aminoacizi și oligopeptide este obținut din biomasa tulpinii de cianobacterie *Spirulina platensis* CNMN-CB-02 prin extragere succesivă cu hexan și etanol și fracționare ulterioară.

Șef adjunct Direcție Brevete :

GUȘAN Ala

Examinator:

DUBĂSARU Nina

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2016 0083 (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): C12N1/04

C12N1/20
 C12N11/02
 C12R 1/465

protecție
 conservare
 Streptomyces
 oligopeptide
 extract aminoacizi

"Worldwide" (Espacenet): C12N1/04

C12N1/20
 C12N11/02
 C12R 1/465
 Streptomyces
 oligopeptide

EA, CIS (Eapatis): C12N1/04

C12N1/20
 C12N11/02
 C12R 1/465
 защитная среда
 лиофилизация
 хранение

Streptomyces
 oligopeptide

SU (nonpublic):

Alte BD –
www.google.com

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

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 streptomycetes strains, producers of antibiotic substances. Jornal of culture collection. 2002, v. 3, p. 25-32	1
A, D, C	Chiselita Oleg, Burteva Svetlana, Birsa 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	RU 22088656 C1 1997.08.27	1
A	UA 27038 U 2007.10.10	1
A	KZ 29269 A4 2014.12.15	1
A	JPH 05308955 A 1993.11.22	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 2017.02.15		
Examinator DUBĂSARU Nina		