



MD 4474 C1 2017.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4474** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C12N 1/04* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
C12R 1/465 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2016 0086 (22) Data depozit: 2016.07.15	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2017.03.31, BOPI nr. 3/2017
(71) Solicitant: INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD	
(72) Inventatori: CHISELIȚA Oleg, MD; BURȚEVA Svetlana, MD; BÎRSA Maxim, 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 liofilizarea 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 liofilizarea și păstrarea îndelungată a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02.

Mediul, conform invenției, conține 7,5% glucoză, 2,5% gelatină și 1,0...50,0% vol.

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

Revendicări: 2

MD 4474 C1 2017.10.31

(54) Protective medium for lyophilization 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 lyophilization and long-term storage of *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 strain.

The medium, according to the invention, comprises 7.5% glucose, 2.5% gelatin and

2
0.1...50.0%vol. extract of sulphated polysaccharides with a concentration of 10 mg/ml, obtained from the biomass of *Spirulina platensis* CNMN-CB-02 cyanobacterium strain.

Claims: 2

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

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к биотехнологии, а именно к защитной среде для лиофилизации и длительного хранения штамма *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02.

Среда, согласно изобретению, содержит 7,5% глюкозы, 2,5% желатина и

2
1,0...50,0%об. экстракта сульфатированных полисахаридов с концентрацией 10 мг/мл, полученного из биомассы штамма цианобактерии *Spirulina platensis* CNMN-CB-02.

П. формулы: 2

Descriere:

5 Invenția se referă la biotehnologie, și anume la un mediu de protecție pentru liofilizarea și păstrarea îndelungată a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 și poate fi aplicată pentru conservarea, păstrarea, studierea și utilizarea eficientă a genofondului microbial autohton de interes științific și biotehologic.

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

În calitate de cea mai apropiată soluție a invenției revendicate poate servi mediul care conține (%): gelatină 2,5 și glucoză 7,5 [3].

15 La conservarea tulpinii pe acest mediu de protecție în condiții proximale viabilitatea ei după liofilizare constituie $90,3 \pm 2,0\%$, iar după păstrarea timp de 1 an $79,1 \pm 1,4\%$ din numărul inițial.

Dezavantajul acestui mediu constă în faptul că compoziția chimică a mediului nu asigură o protecție adecvată (deplină) tulpinii de actinomicete în timpul liofilizării și păstrării îndelungate, astfel după liofilizare obținându-se o viabilitate joasă, care scade semnificativ pe durata păstrării timp de 1 an.

20 Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în elaborarea unui mediu de protecție care asigură viabilitate înaltă tulpinii după liofilizare și păstrarea ei eficientă la nivel înalt timp de 1 an.

Invenția soluționează problema prin aceea că se propune un mediu de protecție pentru liofilizarea și păstrarea îndelungată a 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.

30 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 s-a adăugat soluție de 1% de bromură de cetiltrimetilamoniu pentru precipitarea polizaharidelor cu centrifugare repetată la aceiași parametri. Precipitatul obținut a fost spălat cu soluție saturată de acetat de sodiu în alcool de 95%, apoi repetat cu alcool de 96% (Ratana Chikahan, Nattayaporn Chriasuwan, Panya Triratana, Veara Loha, Suvit Tia, Boosya Bunnag. Polysaccharide extraction from *Spirulina* sp. And antioxidant capacity. International Journal of Biological Macromolecules. 2013, v.58, p.73-78).

35 Extractul de polizaharide obținut este constituit din 87,7% hidrați de carbon și 12,3% peptide.

40 Suplinirea mediului de protecție cu extract de aminoacizi și oligopeptide de origine cianobacteriană, care manifestă acțiune antioxidantă, de stabilizare a membranelor celulare și de stimulare a regenerării țesuturilor, 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, oferind tulpinii o protecție suplimentară, contribuind astfel la majorarea viabilității după liofilizare și menținerea ei la un nivel înalt pe durata păstrării îndelungate.

45 Rezultatul tehnic al invenției constă în sporirea cu 12,6...38,0% a viabilității tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 după liofilizare și cu 20,5...39,8% după 1 an de păstrare, față de cea mai apropiată soluție (vezi tabelul).

Exemple de realizare a invenției

50 Exemplul 1

În tuburi înclinate cu mediu 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: 2,5% gelatină; 7,5% glucoză și 1,0...10,0% vol. extract de polizaharide sulfatate (10 mg/ml), până la obținerea titrului de 10^{10} ... 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 condensatorului 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.

- In varianta martor viabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 este de 90,3,2±2,0 după liofilizare și de 79,1±1,4% peste 1 an de păstrare, iar în variantele conform invenției de 109,6...110,4% și, respectiv, 105,5...107,2%, ceea ce este cu 19,3...20,1 și, respectiv, 26,4...28,1% mai mult.

Exemplul 2

- În tuburi înclinate cu mediu 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: 2,5% gelatină; 7,5% glucoză și 20,0...50,0% vol. extract de polizaharide sulfatate (10 mg/ml), până la obținerea titrului de 10¹⁰...10¹¹ 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 condensatorului 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.

- In varianta martor viabilitatea tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02 este de 90,3±2,0 după liofilizare și de 79,1±1,4% peste 1 an de păstrare, iar în variantele conform invenției de 102,9...128,3 și, respectiv, 99,6...118,9%, ceea ce este cu 12,6...38,0 și, respectiv, 20,5...39,8% mai mult.

- 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 $BSR = (\log AL / \log BL) \cdot 100$ (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).

Tabelul 1

Viabilitatea tulpinii *S. canosus* CNMN-Ac-02 până, după liofilizare și la 1 an de păstrare pe mediu proxim și pe mediu de protecție cu extract de polizaharide sulfatate

30

Mediul proxim			Mediul cu adaos de extract de polizaharide sulfatate (10mg/ml), (% vol.)								
Gelatină 2,5%+ glucoză 7,5%			1,0			5,0			10,0		
Viabilitatea, %											
până	după	1 an	până	după	1 an	până	după	1 an	până	după	1 an
100	90,3± 2,0	79,1± 1,4	100	109,6± 1,0	105,5± 2,6	100	109,9± 1,5	106,2± 3,0	100	110,4± 1,5	107,2± 3,0
Mediul proxim			Mediul cu adaos de extract de polizaharide sulfatate (10mg/ml), (% vol.)								
Gelatină 2,5%+ glucoză 7,5%			20,0			30,0			50,0		
Viabilitatea, %											
până	după	1 an	până	după	1 an	până	după	1 an	până	după	1 an
100	90,3± 2,0	79,1± 1,4	100	102,9± 0,1	99,6± 1,6	100	128,3± 6,3	118,9± 5,7	100	105,8± 1,5	103± 0,4

(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 streptomycetes strains, producers of antibiotic substances. Journal of culture collection, 2002, v. 3, p. 25-32
3. Chiselîța Oleg, Burțeva Svetlana, Bîrsa Maxim, Bulimaga Valentina, Vasiliuc Anastasia. Viability and antimicrobial activity of streptomycetes strains from NCNM after lyophilization. Studia Universitatis Moldaviae, Seria Științe reale și ale naturii, 2016, nr.1(91), p. 61-71

(57) Revendicări:

1. Mediu de protecție pentru liofilizarea și păstrarea îndelungată a 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.

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 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.

Șef adjunct Direcție Brevete:

GUȘAN Ala

Șef Secție Examinare:

LEVIȚCHI Svetlana

Examinator:

COLESNIC Inesa

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2016 0086 (32) Data de prioritate recunoscută:
 (22) Data depozit: 2016.07.15 Raport de documentare internațională: da
 (67) Numărul cererii transformate și data transformării:
 (71) Solicitant: **INSTITUTUL DE MICROBIOLOGIE ȘI BIOTEHNOLOGIE AL ACADEMIEI DE ȘTIINȚE A MOLDOVEI, MD**
 (54) **Titlul: Mediu de protecție pentru liofilizarea și păstrarea îndelungată a tulpinii *Streptomyces canosus* CNMN-Ac-02**

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):

Int.Cl: *C12N 1/04* *C12N 1/20* *C12N 11/02* *C12R 1/465*
 mediu, conservare, liofilizare, polizaharide, *Streptomyces canosus*, *Spirulina*

"Worldwide" (Espacenet):

Int.Cl: *C12N 1/04* *C12N 1/20* *C12N 11/02* *C12R 1/465*
 medium, lyophilisation, preservation, freeze, polysaccharides, *Streptomyces canosus*, *Spirulina*

EA, CIS (Eapatis):

Int.Cl: *C12N 1/04* *C12N 1/20* *C12N 11/02* *C12R 1/465*
 питательная среда, консервирование, полисахариды, *Streptomyces canosus*, *Spirulina*

SU: Int.Cl: *C12N 1/04* *C12N 1/20* *C12N 11/02* *C12R 1/465*

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

www.google.com

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 1353 F1 1999.11.30	1
A	MD 617 B1 1996.11.30	1
A	MD a 2001 0233 A 2003.02.28	1
A	RU 2006138233 A 2008.05.10	1
A	UA 27038 U 2007.10.10	1

A	JPH 05308955 A 1993.11.22	1
A	JPH 05308956 A 1993.11.22	1
A	Нечисляев В. А., Орлова В. Е., Бахтин И. А. Универсальная защитня среда для лиофилизации пробиотических преператов. Казанский медицинский журнал. 2010, том 91, №1. Găsit internet: <URL: http://cyberleninka.ru/article/n/universalnaya-zaschitnaya-sreda-dlya-liofilizatsii-probioticheskikh-preparatov >	1
A, D	Куплетская М. Б., Аркадьева З.А. Методы длительного хранения коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ. Микробиология, 1997, т. 66, № 2, р. 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. Journal of culture collection. 2002, v. 3, p. 25-32	1
A, C	Chiselița Oleg, Burțeva Svetlana, Bîrsa Maxim, Bulimaga Valentina, Vasiliciuc Anastasia. Viability and antimicrobial activity of streptomyces strains from NCNM after lyophilization. Studia Universitatis Moldaviae, Seria Stiințe reale și ale naturii, 2016, nr.1(91), p. 61-71	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 evidența principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fu considerată nouă sau implicand 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 fu 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 inainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri

Data finalizării documentării 2016.12.09

Examinator COLESNIC Inesa