



СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

ДЛЯ СЛУЖЕБНОГО ПОЛЬЗОВАНИЯ ЭКЗ. №

000000  
(19) **SU** (11) 1570291 A1

(51)5 C 12 N 1/00, 1/20

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ  
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ  
ПРИ ГКНТ СССР

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ И АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

1  
(21) 4433154/31-13, 4433141/31-13  
(22) 30.05.88  
(71) Ужгородский государственный университет  
(72) Б. М. Шарга  
(53) 577.15(088.8)  
(56) Чекулиева Л. Н. Галофилы - продуценты бактериородопсина. - Светочувствительные биологические комплексы и оптическая регистрация информации. Пуудино, 1985, с. 82-86.

Авторское свидетельство СССР  
№ 626583, кл. С 12 N 1/20, 1977 (не-публ.).

2  
(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БАКТЕРИОРОДОПСИНА  
(57) Изобретение относится к биотехнологии. Цель изобретения - улучшение условий культивирования, упрощение отделения выращенной биомассы и увеличение выхода бактериородопсина. Способ включает посев инокулята продуцента *Halobacterium halobium* в питательную среду и последующее непрерывное культивирование при 37°C, освещении  $0,2-0,4 \cdot 10^6$  эрг/см<sup>2</sup> - с, аэрации 1 л воздуха на 1 л среды в минуту, отделение биомассы, выделение из нее бактериородопсина. Способ заключается в выращивании галофильных бактерий-продуцентов, иммобилизованных на базальтовых волокнах.

Изобретение относится к биотехнологии и может быть применено в производстве бактериородопсина.

Цель изобретения - улучшение условий культивирования, упрощение отделения биомассы и увеличение выхода бактериородопсина.

Способ заключается в посеве инокулята в питательную среду, последующем непрерывном культивировании, отделении биомассы и выделении бактериородопсина. Для посева и последующего культивирования используют инокулят, иммобилизованный на базальтовых волокнах, его культивируют при аэрации и освещении, периодически заменяя в культивационной емкости использован-

ную питательную среду на свежую и отделяя базальтовые волокна с выращенной на их поверхности культурой от среды культивирования.

Переход к выращиванию бактерий в иммобилизованном состоянии, например, на пучках, обезжиренных базальтовых волокон, создает более благоприятные условия для роста, размножения и синтеза ими бактериородопсина, упрощает процесс отделения выращенной биомассы от использованной питательной среды (иммобилизованные клетки отделяются от культуральной жидкости вместе с волокнами).

Способ осуществляют следующим образом.



(19) **SU** (11) 1570291 A1

Иммобилизованный на поверхности обезжиренных базальтовых волокон, собранных в пучки по 600-800 штук, инокулят культуры продуцента бактериородопсина помещают в культивационную емкость в местах с уменьшенной скоростью тока жидкости и культивируют при 37°C, освещении 0,3-0,4 х 10<sup>6</sup> эрг/см<sup>2</sup>, с, аэрации с помощью насоса 1 л воздуха на 1 л среды в минуту, проводят замену использованной питательной среды на свежую через каждые 48-72 ч. После наращивания на пучках нужного количества биомассы их поочередно извлекают (в период замены питательной среды) из культивационной кюветы (емкости), освобождают от биомассы вручную в стерильных хирургических перчатках и помещают в культивационную емкость для продолжения культивирования (клетки, остающиеся на волокнах, служат инокулятом для последующего культивирования).

**П р и м е р.** Смывом культуры *Halobacterium halobium* 353 П или *H. halobium* ET 1001 или *H. halobium* R<sub>1</sub>M<sub>1</sub>, выращиваемой при 37°C в течение 72 ч со скошенной питательной среды, которая готовится на дистиллированной воде и состоит из следующих компонентов в расчете на 1 л среды: NaCl 250 г; MgSO<sub>4</sub> 20 г; KCl 2 г; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 2 г; цитрат Na 3 г; пептон 5 г; дрожжевой экстракт 5 г; агар-агар 20 г; глицерин 2,5 мл, pH 7,2 (устанавливают добавлением NaOH или HCl), засевают 500 мл жидкой питательной среды (того же состава, но без агар-агара) в колбе емкостью 1000 мл. Затем в среду в колбе опускают стерильный обезжиренный (в смеси хлороформа и метанола в соотношении (0,5:1)-(2:1) при перемешивании и медленном в течение 1-2 мин добавлении водного раствора KOH до состояния нейтрализации смеси в объеме, соответствующем 1/5 объема смеси) состоящий из 600-800 шт. базальтовых волокон толщиной 13 мкм и длиной 15 см подвешенный на нити пучок и выращивают инокулят при 37°C при комнатном освещении и покачивании 100 циклов в минуту в течение 48 ч. Если необходимо получить большее количество инокулята выращивание продолжают, заменяя использованную питательную среду на свежую через каждые 48 ч. По истечении указанного срока пучок базальтовых волокон с им-

мобилизованным на его поверхности инокулятом, переносят в культивационную емкость и размещают там при помощи стеклянного груза (или другим способом) в местах с уменьшенной скоростью тока питательной среды (среду готовят на дистиллированной воде с такими же ингредиентами, как и для жидкой питательной среды, используемой для приготовления иммобилизованного инокулята). Таким образом, готовят несколько пучков в зависимости от объема питательной среды.

Затем проводят культивирование при 37°C и освещении (от ламп ЛБ-40) 0,2-0,4 · 10<sup>6</sup> эрг/см<sup>2</sup>, с и аэрации при помощи насоса 1 л теплого (комнатной температуры) воздуха на 1 л среды в минуту в течение 72 ч. Далее удаляют использованную питательную среду через сливное отверстие в кювете, подают при помощи насоса свежую питательную среду и продолжают культивирование еще 72 ч в указанном режиме. Потом снова производят удаление питательной среды, извлекают пучки с вырощенной на их поверхности биомассой и отделяют ее вручную в стерильных хирургических перчатках, слегка зажав пучок в верхней его части и вытягивая его в таком положении вдоль волокон. При этом биомасса отделяется в стерильный сосуд и используется для получения бактериородопсина по одному из известных способов, а пучки базальтовых волокон с оставшимися на них клетками - инокулятом для продолжения культивирования снова помещают в культивационную емкость для выращивания следующей порции биомассы в предварительно поданной свежей питательной среде.

Выход бактериородопсина по известному способу из клеток *H. halobium* 353П составляет 40,8 мг на 1 г биомассы, по предлагаемому способу - 50 мг на 1 г биомассы. Для штамма *H. halobium* ET 1001 эти величины составляют 50 и 60 мг, для штамма *H. halobium* R<sub>1</sub>M<sub>1</sub> - 35 и 46 мг.

Выход биомассы на литр питательной среды увеличивается в предлагаемом способе не менее чем в 1,8 раза.

#### Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

Способ получения бактериородопсина, включающий посев и непрерывное

культивирование на питательной среде клеток продуцента *Halobacterium halobium* с последующим отделением биомассы для выделения бактериородопсина, отличающийся тем, что, с целью улучшения условий культиви-

рования, упрощения отделения выращенной биомассы и увеличения выхода бактериородопсина, для посева и культивирования используют клетки продуцента, иммобилизованные на базальтовых волокнах.

Редактор М. Стрельникова      Составитель А. Карякин  
Техред М. Дидык      Корректор О. Кравцова.

Заказ 1663/ДСП      Тираж 313      Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР  
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101

