



УКРАЇНА

(19) UA (11) 17958 (13) A

(51)6 C 12 N 1/20

ДЕРЖАВНЕ  
ПАТЕНТНЕ  
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ  
НА ВІНАХІДбез проведення експертизи по суті  
на підставі Постанови Верховної Ради України  
№ 3769-XII від 23.XII 1993 р.Публікується  
в редакції заявника

## (54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ БАКТЕРІОРОДОПСИНУ

1

(21) 97020838

(22) 25.02.97

(24) 17.06.97

(46) 31.10.97. Бюл. № 5

(47) 17.06.97

(72) Корчагін Владімір Васильєвич (RU)

(73) Товариство з обмеженою відповідальністю "Фірма "КонСТІС ЛТД" (UA), Статніков Давид Самійлович (UA)

(57) 1. Способ получения бактериородопсина из культуры галофильных бактерий *Halobacterium halobium*, включающий приготовление питательной среды и выращивание культуры при поддержании температурного режима, аэрации воздухом и люминесцентном освещении, выделение биомассы и получение лизата и из него целевого продукта, отличающийся тем, что в качестве культуры галофильных бактерий используют

2

штамм *Halobacterium halobium* KCU-97FF, выращивание культуры проводят при постоянном контроле за термогенезом и при минимальных значениях термогенеза снижают объем подаваемого воздуха при аэрации на 45-55%, а перед выделением биомассы выращенную культуру охлаждают до 20-25°C.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что питательную среду готовят согласно следующему составу, вес. %:

Хлористый натрий	25,0-25,5
Сернокислый магний	2,0-2,5
Хлористый калий	0,2-0,25
Лимоннокислый натрий трехзамещенный	0,25-0,3
Ферментоллизат бесклеточный осветленный	0,9-1,0
Экстракт дрожжевой	0,03-0,07

Изобретение относится к микробиологии и касается получения физиологически активных соединений из микробиологического сырья, а именно способов получения белка бактериородопсина из галофильных бактерий.

Галофильные бактерии обитают в насыщенной солевой среде засоленных озер. Паста из галофильных бактерий содержит белок бактериородопсин (75%) и фосфолипиды (25%).

Бактериородопсин под действием энергии света осуществляет перемещение про-

тонов через мембрану, что способствует образованию на мембране электрохимического потенциала, т.е. этот белок преобразовывает световую энергию в электрическую на клеточном уровне. Именно благодаря этой способности препараты бактериородопсина предлагают использовать для создания электронных компонентов оптических компьютеров, процессоров, цифровых накопителей информации.

Известны способы получения бактериородопсина из культуры галофильных бактерий, которые включают приготовление

(19) UA (11) 17958 (13) A

питательной среды, выращивание культуры, выделение биомассы, получение лизата и целевого продукта (J. Nature new Biology, 1970, № 29, с. 149 [1], авт. св. СССР № 626583, кл. С 12 N 1/20, заявлено 23.05.77, опублик. 15.12.93.

Прототипом заявляемого изобретения является способ, в котором бактериородопсин получают из штамма *Halobacterium halobium* 353 – пущинский.

Питательную среду готовят согласно следующему составу, вес. %:

Хлористый натрий	25,0
Сернокислый магний	2,0
Хлористый калий	0,2
Лимоннокислый натрий трехзамещенный	0,3
Пептон	0,5

Культуру галофильных бактерий *Halobacterium halobium* штамм 353 – пущинский выращивают в плоской кювете объемом 6 л<sup>3</sup> с рабочим заполнением 3 л<sup>3</sup> при температуре 38°C, pH 7,2–7,4 аэрации воздуха 1 л/мин на 1 л суспензии при непрерывном освещении 0,3 x 10 эрг/см с лампами ЛБ-40.

Первоначально в кювету заливают 2,5 л питательной среды и 0,5 л посевного материала, выращенного в колбе. Через 3 ч при помощи насоса подают питательную среду с посевным материалом в соотношении 5:1. Перемешивание осуществляют при помощи аэрирующего воздуха. Слив суспензии сверх установленного рабочего количества проводят через сливную трубку, один конец которой располагают на уровне поверхности рабочего объема в кювете, а второй – на выходе из нее. В дальнейшем через каждые 3 ч подают питательную среду с посевным материалом и сливают излишек суспензии сверх рабочего количества. Таким образом осуществляют непрерывный процесс выращивания. Затем выделяют биомассу (3,0–3,1 г/л), добавляют ДНК-азу для получения лизата, и затем после центрифугирования лизата получают бактериородопсин (40,8 мл/г биомассы). Однако известный способ недостаточно производительный и относительно сложный при осуществлении.

В основу изобретения поставлена задача повысить выход бактериородопсина и упростить технологию его получения путем использования нового штамма-продуцента бактериородопсина и совершенствования этапов технологии получения.

Технический результат при сравнении с прототипом заключается в следующем:

– повышение выхода бактериородопсина на 50–75 %.

– сокращение технологического времени на 50–60 часов вместо 70–80 часов в прототипе.

Этот результат достигается благодаря использованию штамма *Halobacterium halobium* KCU-97FF и совершенствованию операций выращивания культуры и выделения биомассы.

В новом способе получения бактериородопсина из культуры галофильных бактерий *Halobacterium halobium*, который включает известные операции: приготовление питательной среды и выращивание культуры при поддержании температурного режима, при аэрации воздухом и люминесцентном освещении, выделение биомассы и получение лизата и из него целевого продукта, предложены следующие новые операции и режимы:

– в качестве культуры галофильных бактерий используют штамм *Halobacterium halobium* KCU-97FF,

– выращивание культуры проводят при постоянном контроле за термогенезом и при минимальных значениях термогенеза снижают объем подаваемого воздуха при аэрации на 45–55 %,

– перед выделением биомассы выращенную культуру охлаждают до 20–25°C.

Предложено также приготовление питательной среды согласно следующему составу, вес. %:

Хлористый натрий	25,0–25,5
Сернокислый магний	2,0–2,5
Хлористый калий	0,2–0,25
Лимоннокислый натрий трехзамещенный	0,25–0,3
Ферментолитат бесклеточный осветленный	0,9–1,0
Экстракт дрожжевой	0,03–0,07

Сравнение нового способа и прототипа выявляет их сходство и различие. Сходными существенными признаками обоих технических решений являются следующие операции: использование культуры галофильных бактерий, приготовление питательной среды, выращивание культуры при соблюдении необходимых условий аэрации, освещения и температурного режима и затем выделение биомассы, получение лизата и из него – бактериородопсина. Отличие заключается в использовании нового продуцента бактериородопсина – штамма *Halobacterium halobium* KCU-97FF, постоянное осуществление контроля за термогенезом и соответствующее регулирование подачи воздуха при аэрации на этапе выращивания культуры, а также охлаждение культуры перед выделением биомассы.

В известном способе аэрацию воздухом проводят в течение всей операции выращи-

вания культуры галобактерии. В новом способе автором было обнаружено, что для интенсификации роста галобактерий при выращивании культуры необходимо контролировать термогенез и при падении термогенеза снижать подачу аэрирующего воздуха практически в два раза. Это связано с тем, что в период снижения термогенеза избыток аэрирующего воздуха в фотореакторе тормозит образование бактериородопсина в биомассе. Кроме того, охлаждение выращенной культуры обеспечивает более полное извлечение биомассы из суспензии, а именно 3,5–3,7 г/л вместо 3,0–3,1 г/л в прототипе.

Благодаря осуществлению предложенной совокупности операций в новом способе достигается повышение выхода бактериородопсина на 50–75% и сокращение технологического времени на 15–20 часов. Изобретение иллюстрируется пооперационным описанием способа, однако не ограничивается представленными примерами его осуществления.

**Пример 1.** Питательную среду готовят в емкости объемом 4 м<sup>3</sup> с рабочим заполнением 3 м<sup>3</sup> дистиллированной водой при температуре воды 50°C согласно следующему составу, вес. %:

Хлористый натрий	25,5
Сернокислый магний	2,5
Натрий лимоннокислый	
трехзамещенный	0,3
Хлористый калий	0,25
Ферментализат бесклеточный	
осветленный	1,0
Экстракт дрожжевой	0,03

Культуру галобактерий штамм *Halobacterium halobium* KCU-97FF выращивают в батарее фотореакторов, каждый объемом 10 л<sup>3</sup>, с заполнением 5 л<sup>3</sup> при температуре 38°C и люминесцентном освещении 0,2 x 10 эрг/см<sup>2</sup>с.

Выращивание биомассы осуществляют при поддержании постоянной температуры 38°C с помощью кондиционера. Аэрацию воздуха проводят при подаче 1 л/мин на 1 л суспензии. С помощью датчика термогенеза проводят постоянный контроль за термогенезом. При циклическом падении термогенеза до минимальных значений 0,1 кал/с на 1 л суспензии подачу воздуха снижают до 0,55 л/мин на 1 л суспензии. Затем выращенную культуру бактерий охлаждают до температуры 25°C и сепарируют на молочном сепараторе при 8000 об/мин. Полученную биомассу в количестве 3,5 г/л в емкости 100 л разбавляют 50 л дистиллированной воды в соотношении 1:18. Для получения лизата биомассу размельчают в течение 3 мин мешалкой 1200 об/мин. Затем получен-

ный лизат ультрацентрифугируют на ультрацентрифуге УЦФ-35 при 20000 об/мин в течение 25 мин. В результате получают бактериородопсин в количестве 75 мл/г биомассы. Время осуществления способа 50 часов.

**Пример 2.** Питательную среду готовят в емкости объемом 4 м<sup>3</sup> с рабочим заполнением 3 м<sup>3</sup> дистиллированной водой при температуре воды 50°C согласно следующему составу, вес. %:

Хлористый натрий	25,0
Сернокислый магний	2,0
Натрий лимоннокислый	
трехзамещенный	0,25
Хлористый калий	0,2
Ферментализат бесклеточный	
осветленный	0,8
Экстракт дрожжевой	0,07

Культуру галобактерий штамм *Halobacterium halobium* KCU-97FF выращивают в батарее фотореакторов, каждый объемом 10 л<sup>3</sup>, с заполнением 5 л<sup>3</sup> при температуре 38°C и искусственном освещении 0,2 x 10 эрг/см<sup>2</sup>с. Выращивание биомассы осуществляют при поддержании постоянной температуры 38°C с помощью кондиционера. Аэрацию воздуха проводят при подаче 1 л/мин на 1 л суспензии.

С помощью датчика термогенеза проводят постоянный контроль за термогенезом. При циклическом падении термогенеза до минимальных значений 0,2 кал/с на 1 л суспензии подачу воздуха снижают до 0,45 л/мин на 1 л суспензии.

Затем выращенную культуру галобактерий охлаждают до температуры 20°C и сепарируют на молочном сепараторе при 8000 об/мин. Полученную биомассу в количестве 3,7 г/л в емкости 100 л разбавляют 50 л дистиллированной воды в соотношении 1:20. Для получения лизата биомассу размельчают в течение 5 мин мешалкой 1200 об/мин. Затем полученный лизат ультрацентрифугируют на ультрацентрифуге УЦФ-35 при 20000 об/мин в течение 30 мин. В результате получают бактериородопсин в количестве 70 мл/г биомассы. Время осуществления способа 50 часов.

Получаемый бактериородопсин — это белковый препарат, устойчивый к повреждающим воздействиям, а именно: к высокой температуре, кислотам, щелочам, фотоокислению и химическим окисляющим агентам. Разработанный способ может быть реализован в промышленности, так как штамм *Halobacterium halobium* KCU-97FF является высокопродуктивным источником получения бактериородопсина, а технологическая схема отличается простотой и не требует специального оборудования для осуществления.

17958

Упорядник

Техред Є Копча

Коректор О. Обручар

Замовлення 4259

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,  
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101