

ПРОДУЦЕНТЫ, БИОЛОГИЯ,  
СЕЛЕКЦИЯ, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

УДК 579.222.3+579.663

ПУРПУРНАЯ НЕСЕРНАЯ БАКТЕРИЯ *Cereibacter sphaeroides* – ПРОДУЦЕНТ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА *a* И ЕЕ ИНТЕНСИВНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ

© 2022 г. О. О. Чудакова<sup>1</sup>, \*, П. А. Старыгина<sup>1</sup>, А. Н. Хуснутдинова<sup>1</sup>, Т. В. Лауринавичене<sup>1</sup>, М. А. Грин<sup>2</sup>, А. Ф. Миронов<sup>2</sup>, Е. В. Филоненко<sup>3</sup>, А. А. Цыганков<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт фундаментальных проблем биологии РАН, ФИЦ Пущинский научный центр биологических исследований, (ИФПБ ФИЦ ПНЦБИ РАН) Московская область, Пущино, 142290 Россия

<sup>2</sup>МИРЭА – Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова), Москва, 119571 Россия

<sup>3</sup>Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена (МНИОИ) – филиал ФГБУ Национального медицинского исследовательского центра радиологии (НМИЦ) МЗ РФ, Москва, 125284 Россия

\*e-mail: Chuda94@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.05.2022 г.

После доработки 18.06.2022 г.

Принята к публикации 20.06.2022 г.

В данной статье проведено сравнение типового штамма *Rhodobacter capsulatus* В10 и *Cereibacter sphaeroides* ВКМ В-3534D. Последний способен расти при более высоких концентрациях основных компонентов питательной среды (молочной и уксусной кислот, ионов аммония и  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) чем типовой штамм, имеет более высокую скорость роста, а также накапливает в клетках большее количество бактериохлорофилла *a*. Подобрана трехстадийная схема культивирования штамма ВКМ В-3534D с регулированием содержания растворенного кислорода в реакторе. При использовании продленного периодического культивирования за 48 ч может быть получено около 50 г/л высушенных клеток и содержанием бактериохлорофилла *a* более 400 мг/л культуры. Штамм *Cereibacter sphaeroides* ВКМ В-3534D является перспективным в качестве штамма-продуцента бактериохлорофилла *a* для промышленного культивирования.

**Ключевые слова:** *Cereibacter sphaeroides*, бактериохлорофилл *a*, продленное периодическое культивирование, пурпурные несерные бактерии, штамм-продуцент бактериохлорофилла *a*

**DOI:** 10.56304/S0234275822040056

Методы лечения и диагностики, использующие достижения в области фотохимии, фотобиологии и квантовой физики, в том числе метод фотодинамической терапии (ФДТ), активно развиваются уже более 30 лет. Принцип действия ФДТ основан на разрушении опухолевого очага или бактериальных клеток свободными радикалами, возникающими в результате поглощения света фотосенсибилизатором (ФС), который накапливается преимущественно в больных клетках [1]. При этом особый интерес вызывают бактериохлороины, у которых максимум поглощения расположен в ближней ИК-области спектра, что позволяет использовать их при наибольшей глубине проникновения возбуждающего света [2]. Самым простым путем

получения бактериохлороинов, является химическая модификация бактериохлорофилла *a* (Бхл *a*), который синтезируется микроорганизмами.

Бхл *a* является важным компонентом фотосинтетического аппарата пурпурных бактерий, эритробактерий и отдельных представителей фила *Chloroflexi*, причем пурпурные бактерии синтезируют его в больших количествах. Пурпурные бактерии можно разделить на 2 группы – серные и несерные бактерии. Пурпурные несерные бактерии ввиду их метаболической гибкости являются наиболее предпочтительными для их использования в качестве продуцентов. Они способны расти как в фотогетеротрофных и фотоавтотрофных анаэробных, так и в хемогетеротрофных и хемоавтотрофных аэробных условиях в широком диапазоне концентраций растворенного кислорода, а также в хемогетеротрофных анаэробных условиях за счет брожения [3]. При этом многие их представители способ-

Список сокращений: Бхл *a* – бактериохлорофилл *a*; ВВК – вес высушенных клеток; D – оптическая плотность;  $p\text{O}_2$  – парциальное давление кислорода; ФДТ – фотодинамическая терапия; ФС – фотосенсибилизатор.

ны расти с одинаковой скоростью как на свету, так и в темновых аэробных условиях [4].

Максимальное содержание Бхл *a* в клетках пурпурных бактерий наблюдается в фототрофных анаэробных условиях при лимитировании их роста светом [5]. Однако, вследствие особенностей распространения света в поглощающих средах, интенсивное выращивание пурпурных бактерий на свету приводит лишь к концентрациям клеток до 3.5 г сухой биомассы в литре [6, 7]. Помимо этого, промышленные фотобиореакторы для культивирования чистых фотогетеротрофных культур практически недоступны.

Другим возможным вариантом культивирования пурпурных бактерий для получения Бхл *a* является хемогетеротрофное аэробное культивирование. В литературе описаны интенсивные культуры пурпурных несерных бактерий в хемогетеротрофных условиях. Так, при культивировании пурпурной несерной бактерии *Rhodobacter capsulatus* в непрерывном режиме с лимитированием роста культуры низким содержанием кислорода в среде получена стабильная культура с концентрацией сухой биомассы 20 г/л [6]. К сожалению, непрерывная культура очень редко используется в промышленности вследствие высоких требований к чистоте производства. Описан также процесс продленного периодического культивирования пурпурной несерной бактерии *Rhodospirillum rubrum*, основанный на модели потребления культурой компонентов питательной среды [8]. Авторам удалось получить 59 г сухой биомассы в литре культуральной жидкости. Несмотря на использование модели, авторы непрерывно измеряли содержание основных компонентов питательной среды и проводили ручную корректировку подачи питательного раствора, что требует дополнительного оборудования для анализа среды и привлечения квалифицированного персонала. При этом целью авторов было получение биомассы, а не Бхл *a*, вследствие чего содержание этого пигмента в ней было низким. Запатентован способ продленного периодического культивирования *Rhodovulum sulfidofilum* [9]. Согласно этому патенту благодаря использованию в качестве органических соединений сахарозы и сукцината, а также непрерывному анализу состава культуральной жидкости и ручному добавлению необходимых питательных веществ за 120 ч культивирования авторам удалось получить до 600 мг Бхл *a* в литре культуры.

В промышленных масштабах хемогетеротрофное аэробное культивирование пурпурных бактерий является перспективным. Однако в аэробных условиях синтез Бхл *a* этими бактериями подавлен сложной системой регуляции, зависящей от концентрации кислорода и уровня восстановленности клеток [10, 11]. Повышенный синтез Бхл *a* наблюдается лишь в микроаэробных условиях [12].

Таким образом, промышленное культивирование пурпурных бактерий как продуцентов Бхл *a* в хемогетеротрофных условиях возможно при пониженном парциальном давлении растворенного кислорода ( $pO_2$ ). При этом для снижения трудозатрат и непрерывного мониторинга основных компонентов питательной среды целесообразно ориентироваться на режим продленного периодического культивирования, при котором происходит автоматическая подача концентрированного раствора компонентов среды. Для пурпурных бактерий хорошим субстратом являются органические кислоты, при потреблении которых в хемогетеротрофных условиях происходит повышение pH, причем это повышение больше при использовании органических кислот с малым количеством атомов углерода в молекуле. Добавление концентрированного раствора компонентов среды может происходить автоматически в ответ на изменение pH.

При выборе конкретного штамма-продуцента Бхл *a* для промышленного получения этого пигмента необходимо определить критерии, которым должен удовлетворять такой штамм с учетом выбранного способа культивирования. Во-первых, выбранный штамм должен синтезировать Бхл *a* в высоких концентрациях. Во-вторых, для штамма, который планируется использовать в промышленном процессе, важна высокая скорость роста на средах с дешевыми органическими субстратами (например, лактатом и ацетатом), чтобы ускорить процесс культивирования. Помимо этого, при интенсивном культивировании даже при автоматической подаче среды возможны колебания концентраций различных компонентов питательной среды в широком диапазоне вследствие возможного несбалансированного роста культуры в начале процесса и добавок потребляемых компонентов среды. Таким образом, штамм должен обладать повышенной устойчивостью к существенным изменениям концентраций компонентов питательной среды.

Ранее нами были выделены штаммы различных пурпурных несерных бактерий в качестве продуцентов водорода [13]. Один из них, позднее охарактеризованный как *Cereibacter (C.) sphaeroides* и депонированный в ВКМ под номером В-3534D, обладал способностью к росту в присутствии повышенной концентрации NaCl и выделял водород с высокой скоростью.

Целью работы является сравнение скорости роста в аэробных хемогетеротрофных условиях *C. sphaeroides* ВКМ В-3534D и типового штамма *Rhodobacter (R.) capsulatus* В10 и влияние на их рост повышенных концентраций лактата, ацетата, аммония и  $KH_2PO_4$ , а также зависимость накопления Бхл *a* в клетках *C. sphaeroides* ВКМ В-3534D от уровня  $pO_2$  в среде и демонстрация возможно-

сти интенсивного культивирования данной бактерии для получения Бхл *a* при продленном периодическом культивировании с автоматической добавкой среды.

### УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штамм *Cereibacter sphaeroides* был выделен из пробы, отобранной из прибрежных вод Желтого моря, на юго-восточном побережье полуострова Шаньдун в районе горы Лаошань, Китай. Штамм был депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) под номером В-3534D и поддерживается в лаборатории биотехнологии и физиологии фототрофных организмов ИФПБ РАН – обособленном подразделении ФИЦ ПНЦБИ РАН.

Штамм *Rhodobacter capsulatus* В10 был получен из коллекции пурпурных бактерий кафедры микробиологии МГУ им. М.В. Ломоносова (Москва) в 1978 г. и поддерживается в лаборатории биотехнологии и физиологии фототрофных организмов ИФПБ РАН – обособленном подразделении ФИЦ ПНЦБИ РАН. Штамм *Rhodobacter capsulatus* В10 депонирован в Американской коллекции культур микроорганизмов (АТСС) под номером 33303.

Выращивание инокулята для экспериментов проводили анаэробно на среде Ормеруда [3] с добавлением лактата (20 мМ) при 30°C, рН 7.0 и при освещении лампами накаливания (40 Вт/м<sup>2</sup> освещаемой поверхности сосудов) в полностью заполненных сосудах объемом 75 мл. Во всех экспериментах инокулят вносили в количестве 1% от общего объема. Нагревания сосудов выше 30°C в процессе культивирования не происходило вследствие высокой интенсивности перемешивания воздуха в фотостате.

При изучении скорости роста и влияния рО<sub>2</sub> на рост культур, а также при интенсивном культивировании выращивание проводили в биореакторе объемом 3 л, оснащенный комплексом автоматической регулировки температуры, рН, уровня рО<sub>2</sub> в среде и датчиком оптической плотности культуры [6] при температуре 30°C и рН 7.0 в аэробных хемогетеротрофных условиях. Выращивание проводили на среде Ормеруда с добавлением 15 мМ лактата и 15 мМ ацетата. Состав титранта (концентрированной питательной среды, автоматически подаваемой в ответ на повышение рН) на 1 л: 120 мл молочной кислоты (80%); 120 мл ледяной уксусной кислоты; 8.5 г NaOH; 9.0 г KOH; 27.54 мл аммиака водного (25%); 13.9 г КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>; 12 г (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 7 г MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0.4 г CaCl<sub>2</sub>; 0.4 г FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0.4 г MgCl<sub>2</sub>; 32 мг MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O; 11 мг Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 3.6 мг ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0.6 мг Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O; 42 мг Н<sub>3</sub>ВО<sub>3</sub>; 90 мг тиамин; 80 мг никотиновой кислоты; 4 мг парааминобензойной кислоты; 0.4 мг биотина.

При изучении влияния концентраций смеси лактата и ацетата, аммония и КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> на рост культур выращивание проводили в анаэробных фотогетеротрофных условиях (интенсивность света 40–60 Вт/м<sup>2</sup> освещаемой поверхности сосудов) при 30°C в сосудах объемом 75 мл на среде Ормеруда, изменяя концентрации перечисленных компонентов как указано в тексте. При изучении действия лактата и ацетата измеряли оптическую плотность культуральной жидкости в процессе роста культур, при исследовании влияния концентрации аммония – только конечную концентрацию клеток через 3 сут, а в присутствии разных концентраций КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> – фиксировали наличие или отсутствие роста. Нагревания сосудов выше 30°C в процессе культивирования не происходило вследствие высокой интенсивности перемешивания воздуха в фотостате.

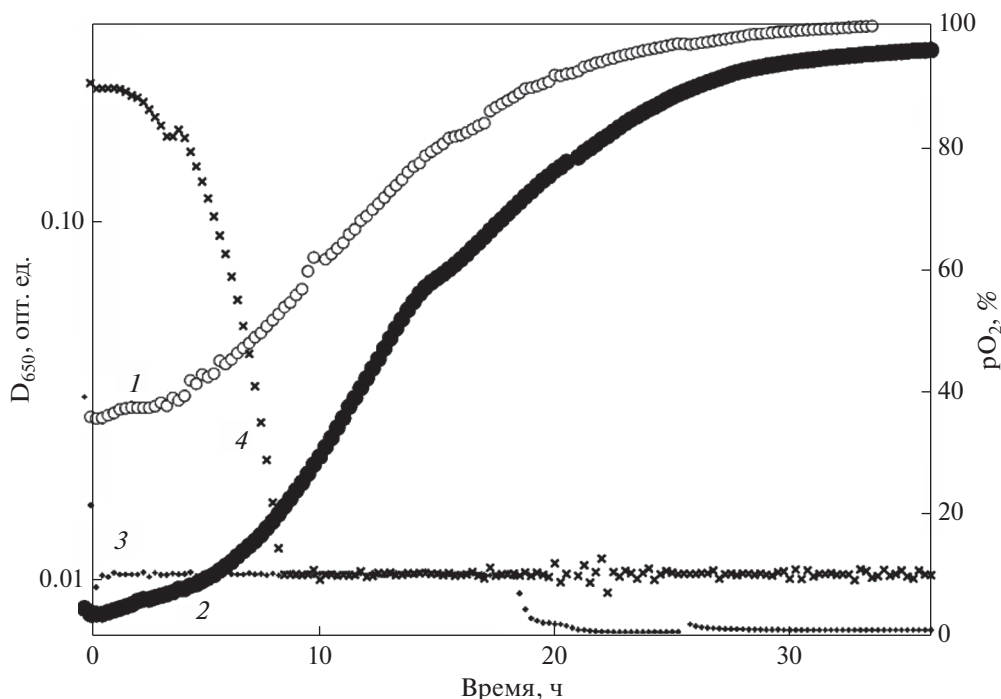
Измерение оптической плотности (D) культуральной суспензии (в дополнение к показателям датчика оптической плотности реактора) проводили спектрофотометрически на спектрофотометре UV-vis I240 Shimadzu (Япония) при длине волны 650 нм с использованием стеклянной кюветы с длиной оптического пути 1 см.

Вес высушенных клеток (ВВК) определяли, отбирая 5–15 мл культуральной жидкости. После центрифугирования на миницентрифуге Eppendorf 5430R (Германия) в режиме 5752 г в течение 15 мин и отмывания клеток от солей, биомассу помещали в предварительно взвешенные алюминиевые чашки и высушивали при 105°C до постоянного веса (обычно в течение сут).

Количество Бхл *a* в клетках бактерий определяли методом ацетон-метанольной экстракции. Для этого 1 мл культуры помещали в микропробирку объемом 1.5 мл, после чего центрифугировали на ультрацентрифуге Eppendorf MiniSpin (Германия) в режиме 7267 г в течение 3 мин. После центрифугирования 0.9 мл надосадочной жидкости сливали, осадок тщательно суспендировали в оставшемся супернатанте. Затем в микропробирку добавляли 0.9 мл смеси ацетон : метанол (7 : 2). Содержимое пробирки тщательно ресуспендировали и выдерживали 5 мин в темноте для максимальной экстракции Бхл *a*. По истечении этого времени микропробирку вновь центрифугировали в том же режиме. Далее производили измерение оптической плотности надосадочной жидкости при длине волны 772 нм в стеклянной кювете с длиной оптического пути 1 см, принимая коэффициент молярной экстинкции равным 75 мМ<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> [14].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для сравнения скоростей роста штамма *C. sphaeroides* ВКМ В-3534D и типового *R. capsulatus* В10 их выращивали в аэробных хемогетеро-



**Рис. 1.** Изменение оптической плотности (в полулогарифмических координатах) и  $pO_2$  в реакторе при аэробном хемогетеротрофном культивировании исследуемых штаммов в присутствии 15 мМ лактата и 15 мМ ацетата. Оптическая плотность 1 – *R. capsulatus* B10, 2 – *C. sphaeroides* VKM B-3534D;  $pO_2$  в реакторе 3 – *R. capsulatus* B10, 4 – *C. sphaeroides* VKM B-3534D.

**Fig. 1.** Optical density (semi-logarithmic coordinates) and  $pO_2$  change in aerobic chemoheterotrophic cultures growing with 15 mM of lactate and 15 mM of acetate. Optical density 1 – *R. capsulatus* B10, 2 – *C. sphaeroides* VKM B-3534D;  $pO_2$  at the reactor 3 – *R. capsulatus* B10, 4 – *C. sphaeroides* VKM B-3534D.

трофных условиях как описано в УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА. Было установлено, что при одинаковых условиях ( $pH$ , температура,  $pO_2$ , питательная среда) скорость роста *C. sphaeroides* VKM B-3534D, определенная по участкам линейного изменения оптической плотности на графиках в полулогарифмических координатах, была выше, чем у *R. capsulatus* B10 (рис. 1). На графике зависимости оптической плотности от времени культивирования для *R. capsulatus* B10 линейный участок наблюдали в интервале 6–11 ч от начала процесса. Для *C. sphaeroides* линейный участок в интервале 9–13.75 ч.

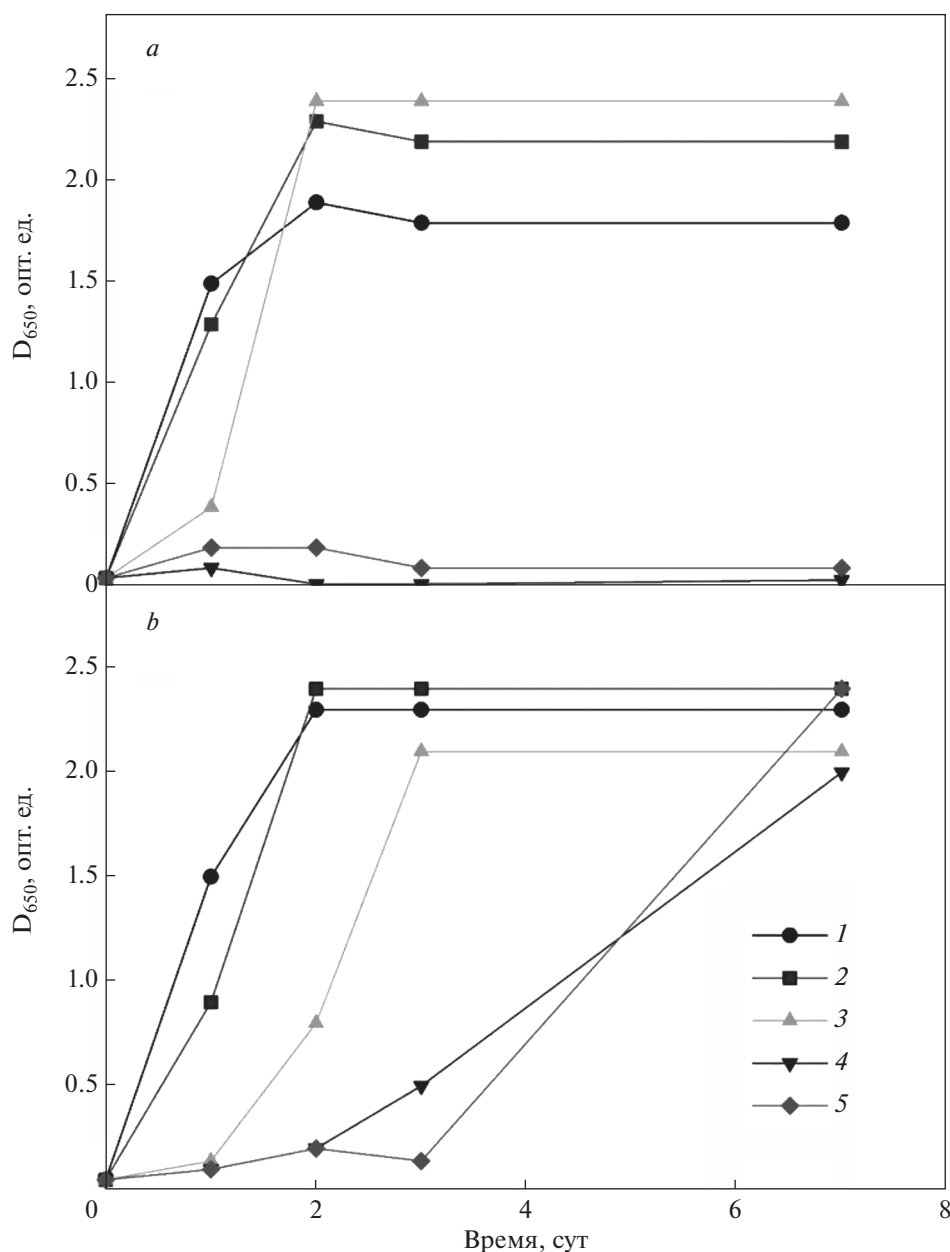
Скорость роста *R. capsulatus* B10 составила  $0.175 \text{ ч}^{-1}$ , а для *C. sphaeroides* VKM B-3534D –  $0.244 \text{ ч}^{-1}$ . Таким образом, *C. sphaeroides* VKM B-3534D при интенсивном культивировании будет достигать конечных концентраций биомассы быстрее, что важно при промышленном культивировании.

При изучении влияния разных концентраций смеси лактата и ацетата, культуры обоих штаммов выращивали в фотогетеротрофных условиях. При этом, концентрацию уксусной и молочной кислот варьировали в диапазоне от 20 до 60 мМ каждой. Согласно данным, представленным на рис. 2, даже

концентрации 60 мМ молочной и 60 мМ уксусной кислот не являлись ингибирующими для *C. sphaeroides* VKM B-3534D, а лишь замедляли достижение высоких значений оптической плотности. Было показано, что *C. sphaeroides* способна выдерживать и более высокие концентрации уксусной и молочной кислот.

При изучении влияния концентрации аммония на рост штаммов культуры также выращивали в фотогетеротрофных условиях, а концентрацию сульфата аммония в среде варьировали от 10 до 130 мМ (от 20 до 260 мМ  $NH_4^+$ ). Через 3 сут измеряли конечную концентрацию клеток (по оптической плотности) (рис. 3). Обнаружено, что *C. sphaeroides* VKM B-3534D значительно устойчивее типового штамма *R. capsulatus* B10 по отношению к ионам аммония в среде и способен расти даже при их концентрации 260 мМ.

Варьируя концентрацию  $KH_2PO_4$  в среде от 1.2 до 27 г на литр, качественно оценивали влияние соли на рост штаммов. В соответствии с данными приведенными в табл. 1, *C. sphaeroides* VKM B-3534D способен выдерживать более высокие концентрации  $KH_2PO_4$  по сравнению с *R. capsulatus* B10 и может расти при концентрации  $KH_2PO_4$  в среде 27 г/л.



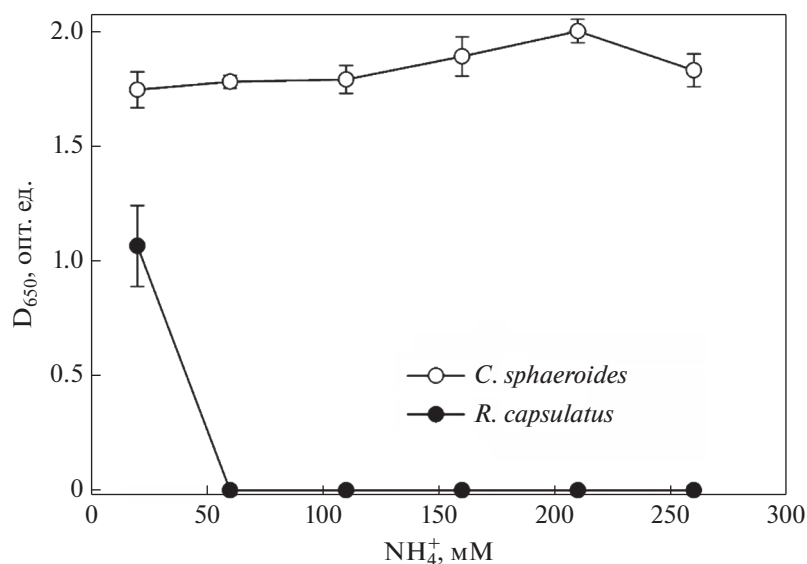
**Рис. 2.** Изменение оптической плотности при фотогетеротрофном культивировании *R. capsulatus* B10 (a) и *C. sphaeroides* VKM B-3534D (b) в присутствии разных концентраций лактата и ацетата. 1 – 20, 2 – 30, 3 – 40, 4 – 50, 5 – 60 мМ каждого субстрата.

**Fig. 2.** Optical density change in photoheterotrophic anaerobic cultures of *R. capsulatus* B10 (a) and *C. sphaeroides* VKM B-3534D (b) growing with different amounts of lactate and acetate. 1 – 20, 2 – 30, 3 – 40, 4 – 50, 5 – 60 mM of each substrates.

Таким образом, культура *C. sphaeroides* имеет более высокую скорость роста, чем *R. capsulatus* и способна расти в среде с более высокими концентрациями лактата, ацетата, аммония и  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . Поэтому штамм *C. sphaeroides* VKM B-3534D может рассматриваться как продуцент биомассы при интенсивном культивировании. Однако для использования его в качестве продуцента Бхл *a* необходимо исследовать эффективность синтеза этого пигмента при разных значениях  $\text{pO}_2$ .

Если культуру *C. sphaeroides*, выросшую в фотогетеротрофных условиях, поместить в хемогетеротрофные при 20%  $\text{pO}_2$ , то удельная концентрация Бхл *a* начинает снижаться и через 64 ч составляет около 4% от исходного значения. Таким образом, синтез Бхл *a* при этом значении  $\text{pO}_2$  практически не происходит (рис. 4).

Зависимость удельной концентрации Бхл *a* в клетках *C. sphaeroides* от  $\text{pO}_2$  изучали выращивая культуры в хемогетеротрофных условиях в биоре-



**Рис. 3.** Зависимость конечной концентрации клеток в фотогетеротрофных анаэробных культурах *R. capsulatus* B10 и *C. sphaeroides* VKM B-3534D от начальной концентрации ионов аммония в среде.

**Fig. 3.** The dependence of final cell concentration in photoheterotrophic anaerobic cultures of *R. capsulatus* B10 and *C. sphaeroides* VKM B-3534D on initial concentration of ammonium ions at medium.

акторе при  $pO_2 = 10\%$  или  $pO_2 = 20\%$ , а затем поддерживая изучаемое  $pO_2$  не менее 10 ч. Обнаружено, что при уменьшении значения  $pO_2$  в среде содержание Бхл *a* в клетках возрастает и достигает около 11 мг Бхл *a*/г ВВК при  $pO_2 = 0.1\%$ . (рис. 5)

Таким образом, *C. sphaeroides* может рассматриваться как промышленный продуцент Бхл *a*. Однако для интенсивного культивирования необходимо подобрать не только среду, но и режим культивирования.

Учитывая, что при повышенном  $pO_2$  снижается скорость роста биомассы (рис. 1) и отсутствует синтез Бхл *a* (рис. 5), для сокращения времени культивирования необходимо уменьшить длительность пребывания культур при высоких значениях  $pO_2$  в начале выращивания. Этого можно достичь, путем продувания реактора аргоном, использованием среды с пониженным содержанием кислорода, а также применя более высокую концентрацию инокулята. Вместе с тем, рост клеток при  $pO_2 = 0.5\%$  будет происходить медленно, по-

скольку это содержание кислорода является лимитирующим. Поэтому целесообразно выращивать культуры при  $pO_2 = 10\%$ , а при достижении требуемой концентрации клеток переводить культуру в режим лимитирования кислородом ( $pO_2 = 0.5\%$  и ниже) и поддерживать этот уровень  $pO_2$  не менее 10 ч.

Таким образом, рекомендуемый режим культивирования предлагаемого штамма-продуцента предполагает 3 фазы: инокуляция и адаптация культуры к условиям внутри биореактора, выращивание при  $pO_2 = 10\%$ , а затем перевод культур в режим лимитирования их роста кислородом ( $pO_2 = 0.1-0.5\%$ ).

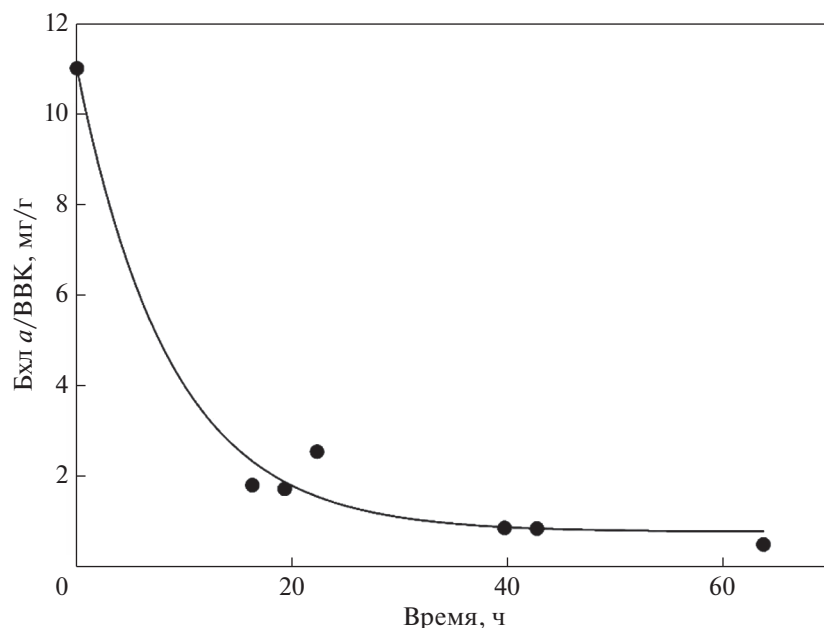
С учетом указанных рассуждений проводили выращивание *C. sphaeroides* при продленном периодическом культивировании с автоматическим регулированием pH путем добавления подобранной среды-титранта при регулировании значения  $pO_2$  в реакторе (рис. 6).

Культивирование проводилось в три стадии: на первой (от 2 до 8 ч в разных экспериментах)

**Таблица 1.** Влияние концентрации  $KH_2PO_4$  на рост *C. sphaeroides* VKM B-3534D и типового штамма *R. capsulatus* B10

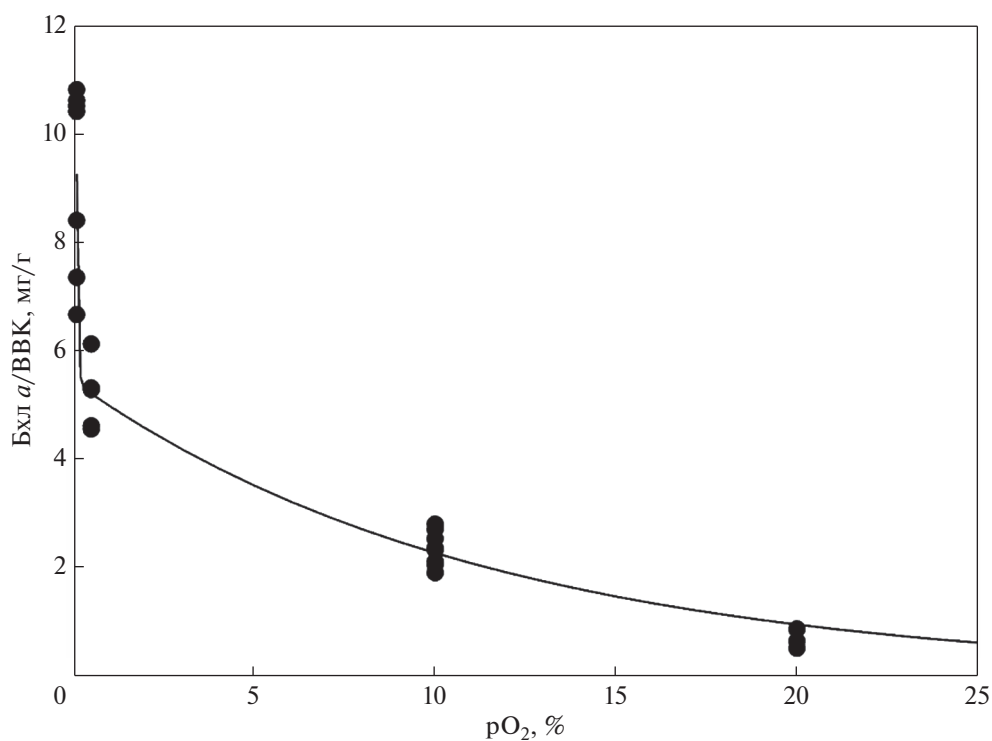
**Table 1.** The dependence of growth *C. sphaeroides* VKM B-3534D and type strain *R. capsulatus* B10 cultures on concentration of  $KH_2PO_4$  at medium

Штаммы	Концентрация $KH_2PO_4$ , г/л			
	1.2	9.5	17.9	27.0
<i>C. sphaeroides</i> VKM B-3534D	+	+	+	+
<i>R. capsulatus</i> B10	+	+	+	-



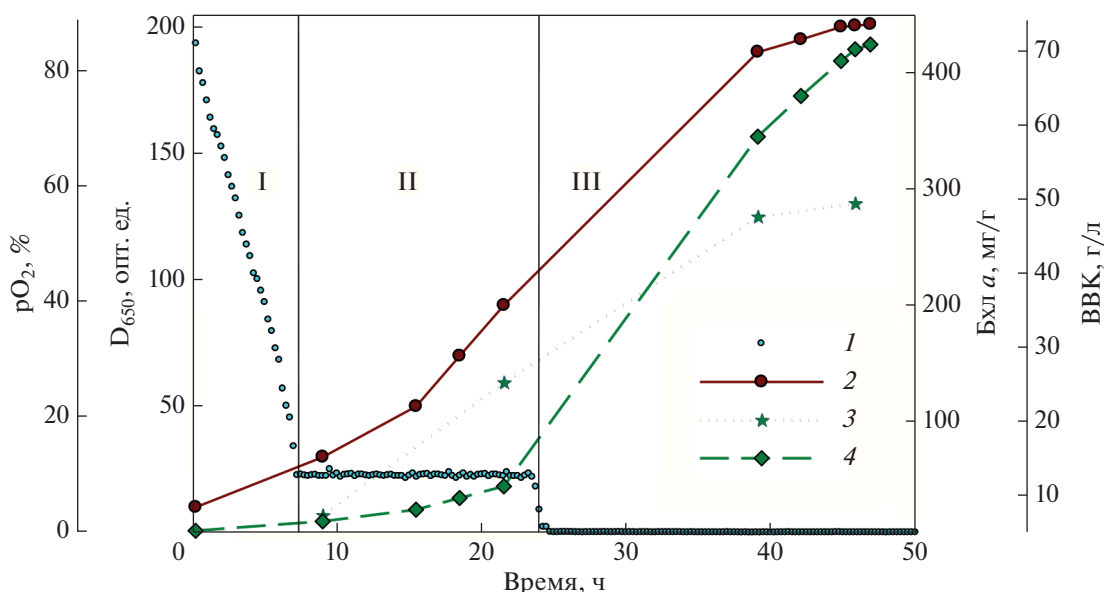
**Рис. 4.** Изменение удельной концентрации Бхл *a* в культуре *C. sphaeroides* VKM B-3534D в хемогетеротрофных аэробных условиях при  $pO_2$  20% от насыщения воздухом.

**Fig. 4.** Specific BChl *a* concentration change in chemoheterotrophic aerobic cultures of *C. sphaeroides* VKM B-3534D at  $pO_2$  20% of air saturation.



**Рис. 5.** Зависимость удельной концентрации Бхл *a* в культуре *C. sphaeroides* VKM B-3534D от значения  $pO_2$  в среде в процессе культивирования.

**Fig. 5.** The dependence of specific BChl *a* concentration in *C. sphaeroides* VKM B-3534D cultures on  $pO_2$  value at medium during cultivation.



**Рис. 6.** Аэробное хемогетеротрофное культивирование *C. sphaeroides* VKM B-3534D в присутствии 15 мМ лактата и 15 мМ ацетата. 1 – изменение  $pO_2$  в процессе культивирования, 2 – изменение оптической плотности, 3 – изменение ВВК, 4 – изменение концентрации Бхл *a*. I – стадия адаптации культуры к условиям внутри реактора; II – стадия наращивания биомассы; III – стадия накопления Бхл *a* в клетках бактерий.

**Fig. 6.** Aerobic chemoheterotrophic cultivation of *C. sphaeroides* VKM B-3534D culture growing with 15 mM lactate and 15 mM acetate. 1 –  $pO_2$  value change during cultivation, 2 – optical density change, 3 – DCW change, 4 – BChl *a* concentration change. I – phase of bacteria adaptation to conditions at the reactor; II – phase of biomass production; III – phase of BChl *a* synthesis at bacteria cells.

происходит адаптация культуры к условиям внутри биореактора с понижением содержания растворенного кислорода до оптимального для роста уровня; на второй стадии наращивают биомассу бактерий при оптимальных для роста условиях при  $pO_2 = 10\%$  (20–30 ч от начала культивирования в разных экспериментах); на третьей стадии проводят доразращивание биомассы при лимитировании роста культуры кислородом ( $pO_2 = 0.1–0.5\%$ ), что приводит к синтезу основного количества Бхл *a*.

В подобранных условиях после 48 ч культивирования штамм *C. sphaeroides* VKM B-3534D удавалось получать около 50 г/л ВВК, а содержание Бхл *a* составляло более 400 мг/л.

Таким образом, штамм *C. sphaeroides* VKM B-3534D при интенсивном культивировании может рассматриваться как продуцент Бхл *a*.

#### БЛАГОДАРНОСТИ.

Работа проведена с использованием оборудования ЦКП ФИЦ ПНЦБИ РАН.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ.

Исследование выполнено в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № АААА-А17-117030110141 (2018–2021) и 122041200039-0 (2022)).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Якубовская Р.И., Морозова Н.Б., Панкратов А.А., Казачкина Н.И., Плотинская А.Д., Кармакова Т.А., Андреева Т.Н., Венедиктова Ю.Б., Плотникова Е.А., Немцова Е.Р., Соколов В.В., Филоненко Е.В., Чиссов В.И., Коган Б.Я., Бутенин А.В., Феофанов А.В., Страховская М.Г. Экспериментальная фотодинамическая терапия: 15 лет развития метода. *Рос. хим. ж.*, 2013, 57(2), 10–30.
2. Grin M.A., Suvorov N.V., Mironov A.F. Natural chlorins as a promising platform for creating targeted theranostics in oncology. *Mendeleev Communications*, 2020, 30(4), 406–418. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2020.07.003>
3. Ormerod J.G., Ormerod S.K., Gest H. Light-dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria; relationships with nitrogen metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, 64(3), 449–463. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(61\)90073-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(61)90073-X)
4. Цыганков А.А., Гоготов И.Н. Получение биомассы пурпурных несерных бактерий. *Прикл. биохимия и микробиология*, 1990, 26(6), 819–824.
5. Tsygankov A.A., Laurinavichene T.V. Influence of the degree and mode of light limitation on growth characteristics of the *Rhodobacter capsulatus* continuous cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, 51(5), 605–612. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960905\)51:5%3C605::AID-BIT13%3E3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960905)51:5%3C605::AID-BIT13%3E3.0.CO;2-G)
6. Патрушева Е.В., Федоров А.С., Белера В.В., Минкевич И.Г., Цыганков А.А. Синтез бактериохлорофил-



- ла *a* пурпурной несерной бактерией *Rhodobacter capsulatus*. Прикл. биохимия и микробиология, 2007, 43(2), 208–214.
7. Tsygankov A.A., Laurinavichene T.V., Bukatin V.E. Bio-mass production by continuous cultures of *Rhodobacter capsulatus* grown in various bioreactors. *Applied Biochem. Microbiol.*, 1997, 33(5), 485–490.
  8. Zeiger L., Grammel H. Model-based high cell density cultivation of *Rhodospirillum rubrum* under respiratory dark conditions. *Biotechnol. Bioeng.*, 2010, 105(4), 729–739. <https://doi.org/10.1002/bit.22589>
  9. Doron E., Mazor N. Method for producing bacteriochlorophyll *a*. Patent of United States, 0024542 A1, C. 12. P. 17/18. 2016.
  10. Pandey R., Flockerzi D., Hauser M.J., Straube R. An extended model for the repression of photosynthesis genes by the AppA/PpsR system in *Rhodobacter sphaeroides*. *FEBS J*, 2012, 279(18), 3449–3461. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08520.x>
  11. Kovacs A.T., Rakhely G., Kovacs K.L. The PpsR regulator family. *Research in Microbiology*, 2005. 156(5–6), 619–625. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.02.001>
  12. Dierstein R., Drews G. Nitrogen-limited continuous culture of *Rhodopseudomonas capsulata* growing photosynthetically or heterotrophically under low oxygen tensions. *Arch. Microbiol.*, 1974, 99(2), 117–128. <https://doi.org/10.1007/BF00696228>
  13. Khusnutdinova A.N., Ovchenkova E.P., Khristova A.P., Laurinavichene T.V., Shastik E.S., Liu J., Tsygankov A.A. New tolerant strains of purple nonsulfur bacteria for hydrogen production in a two-stage integrated system. *Int. J. Hydrog. Energy*, 2012, 37(10), 8820–8827. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.02.003>
  14. Oelze J. Analysis of Bacteriochlorophylls. *Methods Microbiol.*, 1985, 18, 257–284. [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70478-1](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70478-1)

## Purple Nonsulfur Bacteria *Cereibacter sphaeroides* – Producer of Bacteriochlorophyll *a*, and Its Intensive Cultivation

O. O. Chudakova<sup>a, #</sup>, P. A. Starygina<sup>a</sup>, A. N. Khusnutdinova<sup>a</sup>, T. V. Laurinavichene<sup>a</sup>,  
M. A. Grin<sup>b</sup>, A. F. Mironov<sup>b</sup>, E. V. Filonenko<sup>c</sup>, and A. A. Tsygankov<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow oblast, Pushchino, 142290 Russia*

<sup>b</sup>*MIREA – Russian Technological University (Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies), Moscow, 119571 Russia*

<sup>c</sup>*P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute, National Medical Research Radiological Center, Moscow, 125284 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: Chuda94@yandex.ru*

**Abstract**—In this work, a comparison of the cultural and biosynthetic properties of a typical *Rhodobacter capsulatus* B10 strain and a *Cereibacter sphaeroides* VKM B-3534D strain has been carried out. The latter is able to grow at higher concentrations of the main nutrients (lactic and formic acids, ammonium ions and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) than the typical strain, has a higher growth rate and accumulates more bacteriochlorophyll *a*. A three-stage cultural pattern for the VKM B-3534D strain with a controlled content of dissolved oxygen in the reactor was selected. In fed-batch cultivation, the concentration of dry cells in the culture can reach 50 g/L with a bacteriochlorophyll *a* content of over 400 mg/L. *C. sphaeroides* VKM B-3534D strain is a promising producer of bacteriochlorophyll *a* for industrial cultivation.

**Keywords:** *Cereibacter sphaeroides*, bacteriochlorophyll *a*, fed-batch cultivation, purple nonsulfur bacteria, bacteriochlorophyll *a* producer strain