УДК 582.232; 522.263; 581.132; 581.132.1; 662.769.2

Е.К. ЗОЛОТАРЕВА, Е.И. ШНЮКОВА, В.В. ПОДОРВАНОВ

Ин-т ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,
ул. Терещенковская, 2, 01001 Киев, Украина

МИКРОВОДОРОСЛИ КАК ПРОДУЦЕНТЫ ВОДОРОДА

Представлен обзор исследований фотосинтетического выделения водорода микроводорослями. Полученные данные необходимы для создания альтернативной водородной биоэнергетики. Приведены сведения о механизмах образования водорода синезелеными и одноклеточными зелеными микроводорослями и ферментах, катализирующих этот процесс. Способность продуцировать водород в различных объемах проявляется при адаптации культур микроводорослей к стрессовым условиям существования. Проанализированы факторы, стимулирующие выход водорода, в частности, влияние режимов освещения, добавок субстратов дыхания, восстановителей, ингибиторов электронного транспорта. Приведены результаты оригинальных исследований процесса фотовыделения молекулярного H_2 штаммами водорослей из коллекции IBASU-B. Обсуждаются перспективы использования микроводорослей как преобразователей солнечной энергии в молекулярный водород.

Ключевые слова: микроводоросли, фотопродуцирование водорода, гидрогеназа, нитрогеназа.

Введение

Из-за ограничения запасов ископаемого топлива, негативного воздействия продуктов его сгорания на окружающую среду и климат возникла необходимость создания «новой» энергетики, основанной на нетрадиционных возобновляемых источниках энергии. В качестве наиболее перспективного высокоэнергетического экологически чистого энергоносителя рассматривается водород, способный на первых этапах дополнить, а в будущем и заменить ископаемые виды топлива (Волова, 1999; Серебрякова и др., 2001а, б; Козин, Волков, 2002; Dutta et al., 2005; Цыганков, 2006; Марков, 2007; Перспективи …, 2008).

В настоящее время водород как топливо используется в основном для обеспечения космических запусков. При нормальных условиях (0 ^{o}C, 0,1 МПА) окисление водорода кислородом сопровождается выделением большого количества тепла (120,6 МДж/кг или 33,4 кВт ч/кг). Среди преимуществ водородного топлива необходимо отметить отсутствие вредных выхлопов, высокую теплотворную способность, полноту сгорания практически во всем диапазоне соотношений топливо/окислитель, высокую температуру пламени и тепловой КПД, превышающий на 30-50 % КПД двигателей внутреннего сгорания, работающих на бензине (Тарасов, Лотоцкий, 2006).

Необходимость водородного топлива, как одного из заменителей нефтепродуктов, подтверждается инновационными программами, принятыми правительствами разных государств, растущим парком водородного транспорта и водородных автозаправочных станций, действующих в Евросоюзе и США. В настоящее время водород получают в основном конвертирующим путем в электрохимических или термохимических процессах. Для этого, например, применяется электролиз воды, однако его использование в промышленных масштабах требует значительного количества электроэнергии.

Американские ученые разработали новый метод получения водорода с помощью катализаторов на основе алюминия. По их мнению, использование его в перспективе позволит перейти от углеводородного топлива к алюминиевым брикетам (Иванов, 2008).

Хотя при использовании водородных топливных элементов не происходит загрязнения окружающей среды, производство водорода по существующим технологиям связано с использованием традиционных энергоносителей и, следовательно, образованием парниковых газов и вредных для окружающей среды отходов. Практически «чистым» возобновляемым источником могут стать биологические генераторы водорода, способные к фотосинтетической конверсии солнечного света в H_2. Светозависимое образование водорода двумя группами микроводорослей – синезелеными и одноклеточными зелеными, достаточно хорошо изучено и привлекает к себе внимание в связи с фактической неисчерпаемостью и возобновляемостью как солнечной энергии, так и субстрата – воды, а также нетоксичностью побочного продукта – кислорода (Волова, 1999; Кузык и др., 2005; Манаков, Скиба, 2006; Цыганков, 2007; Иванов, 2008).

Одним из актуальных направлений водородной энергетики является поиск объектов, продуцирующих водород без загрязнения окружающей среды, и разработка режимов, стимулирующих выход водорода. В этом отношении особое внимание уделяется фотосинтезирующим организмам, среди которых наиболее перспективными являются автотрофные синезеленые (*Cyanophyta, Cyanoprokariota*, *Cyanobacteria*) и зеленые (*Chlorophyta*) микроводоросли.

Водоросли как продуценты водорода на основе биоконверсии солнечной энергии

Первое сообщение о продуцировании молекулярного водорода микроводорослями рода *Anabaena* Bory появилось более 100 лет назад

(Jackson, Ellms, 1896). В 40-х годах XX в. способность некоторых одноклеточных зеленых водорослей продуцировать свободный молекулярный водород при освещении была показана Х. Гаффроном с сотр. (Gaffron, 1939, 1944; Gaffron, Rubin, 1942). Они установили, что зеленые водоросли в анаэробных условиях могут или использовать водород в качестве электронного донора в процессе фиксации CO_2, или продуцировать его как в темноте, так и на свету. В течение длительного времени выделение водорода этими объектами рассматривалось как курьезный факт, который не имеет особого практического значения: большинство водорослей выделяли водород в меньшем количестве, чем другие микроорганизмы (Марков, 2007). Однако позже эти данные были дополнены при исследовании других зеленых водорослей, в т. ч. *Chlamydomonas reinhardtii* Dang., *Chlorella fusca* и *Scenedesmus obliquus* Kütz.

В основе феномена светоиндуцированного выделения водорода микроводорослями лежит процесс фотосинтеза. В ходе фотохимических реакций в тилакоидных мембранах микроводорослей за счет энергии солнечного света при определенных условиях выделяется молекулярный водород.

В обычных условиях микроскопические водоросли не образуют водород. Они способны к разложению воды и выделению кислорода при участии двух трансмембранных фотосистем, трансформирующих энергию света в химическую энергию АТФ и НАДФН. Восстановление НАДФ происходит при переносе электронов от восстановленного за счет фотосинтеза ферредоксина (Фд) к НАДФ при участии Фд : НАДФ-оксидоредуктазы. Активность фотосистемы II (ФС II) не является необходимым условием фотовыделения водорода, хотя электроны, поступающие в электрон-транспортную цепь (ЭТЦ) тилакоидов при фоторазложении воды, могут акцептироваться гидрогеназой. Это приводит к тому, что в течение непродолжительного времени в клетках микроводорослей образуется и кислород, и водород (Gaffron, Rubin 1942*)*.

Однако поскольку в этих условиях гидрогеназа быстро инактивируется, процесс продолжается не более 60-90 сек (Ghirardi et al., 1997). Электроны, поступающие к гидрогеназе, могут поставляться в ЭТЦ, минуя ФС II, за счет окисления НАДФН пластохиноновым пулом (рис. 1). Эта реакция связана с активностью т.н. хлоропластного дыхания («хлородыхания»), сопряженного с функционированием НАДФН-пластохинон-оксидоредуктазы (НАДФН-дегидрогеназы, Ndh1), катализирующей нефотохимическое восстановление платохинонового пула (ПХ) с использованием восстановителей, образующихся в строме. В процессе хлородыхания участвует также терминальная оксидоредуктаза пластид (TOx), катализирующая окисление кислородом восстановленного ПХ. В электронном транспорте последовательно участвуют Пх, цитохром Ь6/комплекс (Цит b6f), пластоцианин (Пц), ФС I и ферредоксин (Фд), передающий электроны гидрогеназе HydAI. Фд выступает донором електронов также для ферредоксин-НАДФ-редуктазы (ФНР).

Светозависимое выделение водорода становится возможным после темновой анаэробной адаптации микроводорослей, в ходе которой индуцируется синтез Fe-гидрогеназ – ферментов, обеспечивающих перенос электронов с восстановленного ферредоксина на H^+ с образованием H_2 (Цыганков, 2006):

$$Фд_{восст} + 2H \rightarrow Фд_{ок} + H_2.$$

За последнее время был достигнут значительный прогресс в области исследования выделения водорода зелеными водорослями, в основных чертах определен механизм процесса и разработаны физиологические и биохимические подходы, позволяющие повышать скорость и продолжительность продуцирования H_2 (Benemann, 1998, 2007; Forestier et al., 2003; Melis, Happe, 2004; Posewitz et al., 2004; Ghirardi et al., 2005; Марков, 2007).

Среди представителей *Chlorophyta*, продуцирующих водород, наибольшее внимание уделяется *Chlamydomonas reinhadtii*. Как модельная система *Chlamydomonas* широко используется в исследовательских лабораториях для изучения разных аспектов фотосинтеза. Эта одноклеточная водоросль при благоприятных условиях быстро растет, в некоторых случаях она способна удваивать биомассу за 6 ч, при этом не требуется больших усилий для поддержания ее роста (Марков, 2007).

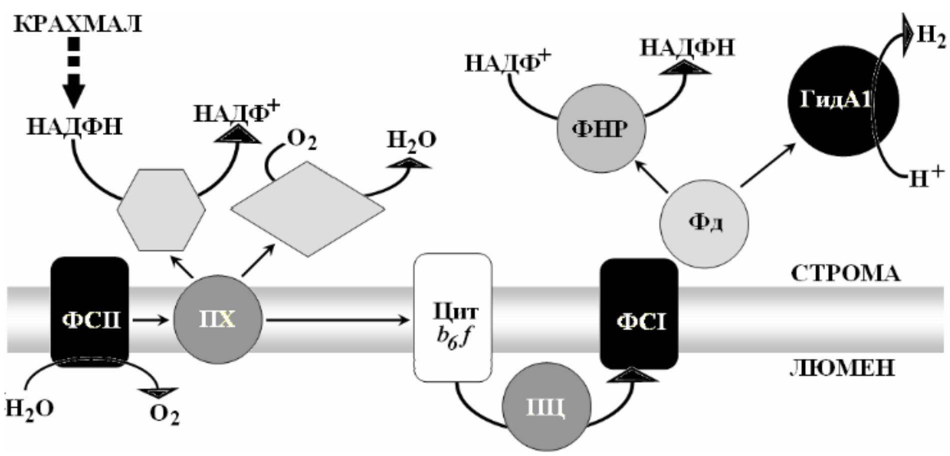

Рис. 1 Участие гидрогеназы (HydAI) в переносе электронов по фотосинтетической электрон-транспортной цепи (Hemschmeier, Happe, 2005)

Цыганков А.А. (2006) подчеркивает, что *Chlamydomonas*, который в процессе фотосинтеза обычно продуцирует углеводы, при дефиците в окружающей среде кислорода начинает выделять водород. Эффективность процесса в природе составляет всего 0, 1 %. Генная инженерия позволила вырастить культуру хламидомонад с эффективностью 2-2,5 %. Для того, чтобы процесс был экономически выгодным, его КПД, по мнению автора, должен быть не ниже 10 %. В этом случае водородный биореактор с хламидомонадами сможет конкурировать по эффективности энерго-преобразования с солнечными батареями.

В опытах, проведенных с *Ch. reinhadtii*, при недостатке серы в среде выращивания водорослей достигалось разделение во времени выделения водорода и кислорода. В этих условиях на свету водоросли сначала выделяли кислород, затем активность ФС II снижалась, скорость продуцирования кислорода постепенно уменьшалась и становилась меньше скорости дыхания. Таким образом, в процессе дыхания, скорость которого при недостатке серы не изменялась, поглощался весь кислород, образующийся за счет фотосинтеза. Это приводило к анаэробиозу, индукции синтеза гидрогеназы и, в результате, к выделению водорода (Melis et al., 2000).

Продуцирование водорода клетками синезеленых водорослей было впервые описано В.П. Ощепковым с соавт. (1973). Синезеленые водоросли по строению клеток и структуре на молекулярном уровне имеют много общих черт с бактериями. Однако, в отличие от последних, они являются первыми на Земле оксигенными фотосинтетиками, способными осуществлять фотосинтез с выделением кислорода, типичный для других водорослей и высших растений. Преимуществом синезеленых водорослей является то, что для поддержки их культур нужно меньше питательных веществ по сравнению с зелеными водорослями, поскольку некоторые представители *Cyanophyta* способны фиксировать азот из воздуха и использовать его для построения клеточных компонентов. Их недостатком является более медленный рост по сравнению с зелеными водорослями (Биохимия …, 1978).

В настоящее время все больше укрепляется мнение, что использование водорода, продуцируемого водорослями, в т.ч. сине-зелеными, в перспективе может дополнить или заменить традиционные технологии производства H_2 (химические, фотоэлектрические) (Dutta et al., 2005). Особо подчеркиваются такие преимущества водорослевого водорода, как природное происхождение, эффективность и возобно-вляемость. Его производство может стать коммерчески привлекательным.

Ферменты, обеспечивающие фотовыделение молекулярного водорода микроводорослями

У зеленых водорослей продуцирование водорода катализирует фермент гидрогеназа:

$$2H^{+} + 2e^{-} \rightarrow H_2.$$

Микроводоросли, в частности *Ch. reinhardtii,* синтезируют две Фд-зависимые гидрогеназы – *hud*A1 и *hud*A2 (Forestier et al., 2003). Оба эти фермента относятся к Fe-гидрогеназам, обладают высокой активностью и синтезируются в анаэробных условиях (Цыганков, 2006). Молекулярный кислород вызывает их инактивацию в течение 2-3 мин. К тому же при наличии кислорода не происходит экспрессии гена, ответственного за гидрогеназу. Таким образом, выделение водорода водорослями регистрируется только в бескислородных условиях. Чтобы получить водород из зеленых водорослей, их клетки помещают в атмосферу инертного газа, например аргона, или в атмосферу молекулярного азота, или в условия частичного вакуума (Markov et al., 1995**)**. При этом необходимо постоянно удалять кислород, который выделяется водорослями в процессе фотосинтеза.

Проблема чувствительности гидрогеназы и ее генов к кислороду долгое время замедляла исследования в области выделения водорода зелеными водорослями. Проводились работы по получению их мутантов с нечувствительной или мало чувствительной к кислороду гидрогеназой (Seibert et al., 1998**)**. Удалось получить мутант *Ch. reinhardtii* с гидрогеназой, на 330 % менее чувствительной к кислороду.

Последние достижения вызвали большой интерес в мире к зеленым водорослям, способным выделять H_2. Были определены гены, ответственные за получение водорода (Happe, Kaminski, 2002; Foresteier et al., 2003; Posewitz et al., 2004). Показано, что *Ch. reinhardtii* выделяет водород со скоростью до 5,5 мл/г сухой клеточной биомассы в час (Markov et al., 2006). В то же время ранее было установлено, что выход водорода синезеленой водорослью *Anabaena variabilis* Kütz. превышает приведенные выше объемы выделения H_2 культурой *Ch. reinhardtii* и достигает 20 мл/г сухой клеточной биомассы в час (Markov, 1998). Это свидетельствует о том, что не только зеленые, но и синезеленые водоросли могут рассматриваться как перспективные продуценты водорода (табл. 1).

Известно также, что многие бактерии способны выделять водород за счет брожения, используя для этого органические соединения, например сахара. Этот процесс катализирует гидрогеназа. Бактерии, выделяющие водород, найдены среди представителей 25 % родов.

Представитель продуцирующих H_2 карбоксидотрофных прокариот – мезофильная фототрофная несерная пурпурная бактерия *Rubrivivax gelatinosus* способна расти в темноте в анаэробных условиях вследствие окисления СО до CO_2, сопряженного с восстановлением воды до водорода (Markov et al., 1996).

Enterobacter aerogenes – факультативная анаэробная грамм-отрицательная бактерия, имеющая нитчатую форму, оксидаза и индол-отрицательная, каталаза и цитрит-положительная, продуцировала водород в процессе брожения в экспериментах с использованием в качестве субстрата мелясы.

Показано, что скорость образования водорода бактерией *E. aerogenes*, осуществляющей брожение, высока и составляет до 400 мл H_2/г сухой клеточной биомассы в час (Tanisho, 1996) (см. табл. 1). Однако эффективность образования водорода при брожении невысока. Обычно 20-30 % энергии, заключенной в используемом органическом веществе, трансформируется в форму H_2. Наряду с выделением водорода при брожении сахаров происходит образование других продуктов, например уксусной кислоты. В этих продуктах содержится остаток невысвобожденной энергии. Стоимость органических веществ – исходных субстратов для выделения водорода, таких как сахара или крахмал, относительно высока и количество их недостаточно (Марков, 2007).

Более высокий уровень выделения водорода достигался в опытах с прокариотической фототрофной несерной пурпурной бактерией *Rubrivivax gelatinosus* – до 700 мл H_2/г сухой клеточной биомассы в час (Markov et al., 1998). Микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* (Markov et al., 2006) и *Anabaena variabilis* (Markov, 1998) в представленных экспериментах оказались менее активными продуцентами молекулярного водорода (табл. 1).

Таблица 1. **Скорость выделения водорода водорослями и бактериями (Марков, 2007)**

Микроорганизм	Скорость выделения водорода, мл H_2/г сухой клеточной биомассы в час	Литературный источник
Chlamydomonas reinhardtii	до 5,5	Markov et al., 2006
Anabaena variabilis	до 20	Markov, 1998
Enterobacter aerogenes	до 400	Tanisho, 1996
Rubrivivax gelatinosus	до 700	Markov et al., 1998

У синезеленых водорослей, способных при освещении выделять молекулярный водород, этот процесс катализируется тремя типами ферментов: нитрогеназой, обратимой и необратимой гидрогеназой.

Нитрогеназа является ключевым ферментом фиксации молекулярного азота. Она участвует в процессе фотосинтетического выделения водорода у гетероцистних синезеленых водорослей, катализируя следующую реакцию (Марков, 2007):

$$N_2 + 6e^- + 6H^+ + 16АТФ \rightarrow NH_4^+ + 16АДФ + 16Ф_н + H_2,$$

где АТФ – аденозинтрифосфорная кислота; АДФ – аденозиндифосфорная кислота; $Ф_н$ – фосфор неорганический.

Основная функция этой реакции − ассимиляция молекулярного азота из воздуха. Продуктами реакции являются аммиак и молекулярный водород, который, как сопутствующий продукт, выделяется нитчатыми гетероцистными синезелеными водорослями при их росте в условиях дефицита азота.

Нитрогеназа состоит из двух частей: динитрогеназы (MoFe протеин, кодируемый генами *nifD* и *nifK*, α и β соответственно) и динитрогеназы-редуктазы (Fe протеин, кодируемый *nifH*). Динитрогеназа – $\alpha_2ß_2$ гетеротетрамер, имеет молекулярную массу от 220 до 240 кДа соответственно. Динитрогеназа-редуктаза является гомодимером с молекулярной массой от 60 до 70 кДа. Этот фермент играет специфичную роль посредника транспорта электронов от внешнего электронного донора, которым является ферредоксин или флаводоксин, к динитрогеназе (Orme-Johnson, 1992; Flores, Herrero, 1994). Существует три вида динитрогеназ, содержащих: 1) молибден; 2) ванадий вместо молибдена; 3) ион железа и молибден вместо ванадия (Kentemich et al., 1988, 1991; Thiel, 1993).

Как и гидрогеназа, нитрогеназа очень чувствительна к кислороду. При кратковременном освещении клеток синезеленых водорослей светом высокой интенсивности фотосинтетическое выделение кислорода подавляется и одновременно несколько стимулируется нитрогеназная активность.

У синезеленых водорослей, использующих нитрогеназу, этот фермент локализован преимущественно в специализированных клетках – гетероцистах, которые образуются в условиях недостатка связанных форм азота. Особенностью гетероцист гормогониевых синезеленых водорослей является то, что у них отсутствуют основные пигменты ФС II, т.е. они не способны к выделению кислорода, и функционирует только ФС I, где происходит фиксация молекулярного азота. При этом кислород образуется только в вегетативных клетках (Thomas, 1970). Гетероцисты имеют толстую оболочку, которая слабо пропускает кислород, к тому же им свойственно активное дыхание (с поглощением кислорода) (рис. 2). Таким образом, нитрогеназы пространственно защищены от ингибирующего действия кислорода, неизбежно присутствующего в среде во время фотосинтеза. Поскольку процессы выделения водорода и кислорода происходят в разных клетках, они связаны большим количеством промежуточных этапов, включающих диффузию сахаров из вегетативных клеток в гетероцисты, и их суммарный результат определяется как «непрямой биофотолиз воды» (Цыганков, 2006).

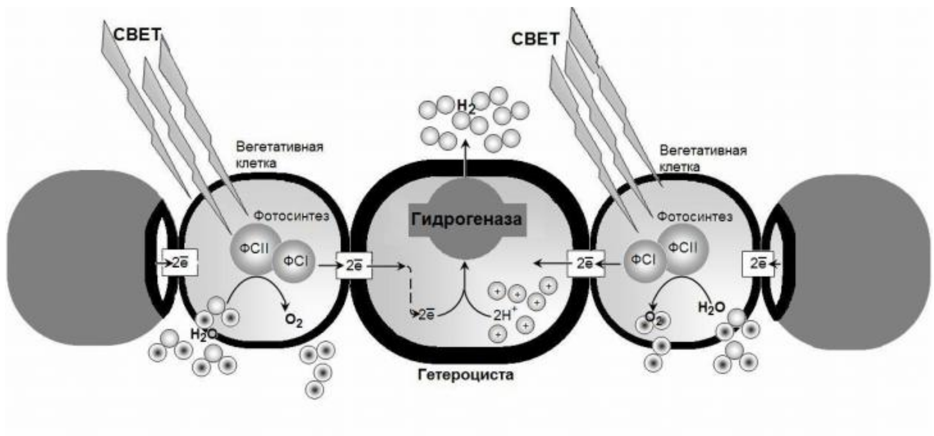

Рис. 2. Схема фотосинтетического выделения водорода гетероцистами синезеленых водорослей (Цыганков, 2006)

Благодаря описанным особенностям гетероцистные синезеленые водоросли являются единственными организмами, способными выделять водород в присутствии молекулярного кислорода в воздушной атмосфере (Марков, 2007). Принято считать, что светозависимое выделение водорода этими водорослями при участии нитрогеназы является наиболее перспективным (Цыганков, 2006).

У различных видов синезеленых водорослей существует два типа гидрогеназ, участвующих в продуцировнаии водорода: поглотительная и обратимая или двунаправленная. Поглотительная гидрогеназа, состоящая из двух субъединиц, кодируется hupS (Tamagnini et al., 2002). Она локализуется в тилакоидных мембранах гетероцист нитчатых синезеленых водорослей, где катализирует реакцию окисления водорода. Другой тип гидрогеназ – обратимая или двунаправленная гидрогеназа. Это мульти-фермент, состоящий из четырех или пяти различных субъединиц, очевидно, в зависимости от вида водорослей (Schmitz et al., 1995; Boison et al., 1999). Она кодируется hoxFUYH и катализирует как окисление, так и продуцирование водорода. Обратимая гидрогеназа ассоциирована с цитоплазматическими мембранами и, вероятно, функционирует как электронный акцептор от НАДН и H_2. Все альтернативные нитрогеназы синезеленых водорослей направляют на восстановление протонов до молекулярного водорода больше электронов, чем гидрогеназы. Образующийся в нитрогеназной реакции водород используется в метаболических процессах, поэтому суммарное выделение H_2 азотфиксирующими синезелеными водорослями ничтожно. Основную роль в процессе продуцирования водорода играют обратимые гидрогеназы.

Отдельные виды синезеленых водорослей могут синтезировать как нитрогеназу, так и гидрогеназу. Их способность к выделению водорода, которая катализируется только гидрогеназой, изучена слабо. Большинство исследований посвящено продуцированию водорода с участием нитрогеназы синезеленых водорослей, содержащих гетероцисты. Была проанализирована способность большого количества видов и штаммов выделять водород (Schütz et al., 2004). Скорость его выхода варьирует в пределах 0,4-135 мкмоль/мг хл./ч (табл. 2).

Таблица 2. **Выделение водорода гетероцистными синезелеными водорослями**

Вид	Характеристика штамма	Условия выращивания	Максимальный выход H_2, мкмоль/мг хл./ч	Литературный источник
Anabaena variabilis	Природный штамм		10	Happe et al., 2000
A. variabilis AVM13	$hupSL^-$		135	Happe et al., 2000
A. variabilis PK84	$hupSL^-$	Среда без Mo	106	Borodin et al., 2000
Anabaena sp. PCC 7120	Природный штамм		10	Masukawa et al., 2002
Anabaena sp. PCC 7120	$hupSL^-$		52	Masukawa et al., 2002
Anabaena sp. PCC 7120	$hupL^-$ $hoxH^-$		50	Masukawa et al., 2002
A. cylindrica	Природный штамм	Воздух + 0,2 % CO + 10 % C_2H_2 + 3 % CO_2	66	Lambert et al., 1979
Nostoc muscorum	Природный штамм		4	Scherer et al., 1980
Anabaena CA		Среда без Ni	0,4	Smith et al., 1985
Anabaena CA	$hupSL^-$ + Ni		0,4	Smith et al., 1985
Nostoc punctiforme	$hupSL^-$		6	Lindberg et al., 2004
Anabaena sp. TU37-1	Природный штамм		3	Kumazawa, 2003

Существенным недостатком систем продуцирования водорода, которые базируются на гетероцистных синезеленых водорослях, является то, что они тратят на этот процесс много клеточной энергии. До 40 % энергии, запасаемой в клетке в форме АТФ, используется для обеспечения работы нитрогеназы. Таким образом, выделение водорода, которое катализируется нитрогеназой, энергетически не эффективно. Более перспективно применение синезеленых водорослей, которые не содержат гетероцист и используют для выделения водорода только гидрогеназу без потребления огромного количества энергии. К тому же у таких водорослей вода непосредственно вовлечена в процесс продуцирования водорода. Однако гидрогеназы безгетероцистных синезеленых водорослей, также как и гидрогеназы зеленых водорослей, весьма чувствительны к кислороду, что затрудняет создание эффективных способов выделения водорода с использованием фотосинтезирующих микроводорослей (Марков, 2007).

Один из путей оптимизации процесса образования и выделения водорода базируется на изучении генетического контроля метаболизма водорода и применении генетических подходов для получения эффективных штаммов-продуцентов. Михеева Л.Е. с соавт. (1994) сообщили о выделении мутанта *Anabaena variabilis* Kütz. (*Cyanophyta*), продуцирующего водород за счет снижения в клетках H_2-поглотительной активности.

По мнению авторов, новый мутант перспективен для использования в биотехнологии. Для его получения использована бактериологически чистая культура штамма природного типа *A. variabilis*, АТСС 29413. Мутант получен при помощи химического мутагенеза с использованием нитрозогуанидина. Поиск штаммов, способных продуцировать водород, проводили среди клонов с пониженной скоростью роста на плотной среде, не содержащей связанных источников азота. Этот способ селекции основан на том, что слабый рост синезеленых водорослей может быть обусловлен снижением эффективности процесса азотфиксации в результате блокирования или снижения активности реутилизации водорода, обеспечивающей энергетику функционирования нитрогеназы.

Из 2000 полученных клонов авторами было отобрано несколько и один мутантный штамм РК-17, который обладал высокой генетической стабильностью (чистота реверсий около 10^{-9}) и повышенной скоростью выделения водорода в атмосфере аргона. В присутствии акцептора электронов феназин-метасульфата клетки и бесклеточный экстракт штамма природного типа поглощали водород примерно в 3-5 раз активнее, чем клетки мутанта или их экстракты. Это могло свидетельствовать о блокировании одной из поглощающих гидрогеназ или о значительном снижении суммарной гидрогеназной активности в клетках мутанта. В то же время мутантный штамм РК-17 растет медленнее как на безазотистой среде, так и на среде, содержащей источники связанного азота, и характеризуется морфологическими нарушениями: искривленностью филаментов, изменением строения гетероцист. Однако при росте на среде, не содержащей азота, частота появления гетероцист в культуре мутантного штамма выше, чем у штамма природного типа *A. variabilis*, АТСС 29413, причем ионы аммония репрессируют образование гетероцист и активность нитрогеназы в культурах и природного штамма, и мутанта. Кроме того, каталитическая активность нитрогеназы клеток мутанта в реакции восстановления ацетилена практически не отличается от штамма природного типа как при инкубации на воздухе, так и при инкубации в атмосфере аргона.

Предполагается, что общая эффективность процесса азотфиксации в культуре мутанта снижена по сравнению со штаммом природного типа. Это может быть связано с возрастанием активности поглотительных гидрогеназ, в результате чего культура мутантного штамма активно выделяет водород. Авторы считают, что изменение активности гидрогеназы либо ее функциональных связей с нитрогеназным комплексом в мутантных клетках определяется нарушением общей системы регуляции, контролирующей клеточную дифференцировку, или путей переноса электронов, связанных с метаболизмом азота и водорода.

В результате многолетних исследований С.В. Шестаковым и Л.Е. Михеевой (2006) обобщены собственные и литературные данные о генах, кодирующих гидрогеназы, ответственные за поглощение и образование водорода в клетках синезеленых водорослей. Значительное внимание авторы уделили характеристике свойств мутантных штаммов, продуцирующих водород, построив с помощью методов биоинформатики схему генной сети метаболизма водорода у гетероцистных азот-фиксирующих *Cyanophyta*. Но основе этой модели с использованием методов мутагенеза и генной инженерии предложены возможные пути конструирования «цианобактериальных штаммов» – продуцентов молекулярного водорода, перспективных для использования в фотобиотехнологии. Ранее авторами был запатентован штамм ЦМЛМ А-13 *Anabaena variabilis*, используемый для получения водорода (Михеева и др., 2004).

Как считает Дж. Бенеман (Benemann, 2007a), экономически важным способом получения фотоводорода является поиск или конструирование генетических мутантов клеток водорослей с уменьшенным содержанием пигментов, т.е. с меньшим количеством антенного хлорофилла или других пигментов (например, фикобилиновых пигментов у *Cyanophyta*). В таком случае фотосинтетический аппарат поглощает меньше фотонов при высокой интенсивности света и таким образом тратит впустую меньше фотонов. Как указывал Реддинг с соавт. (Redding et al., 1999), при переносе электронов от воды до CO_2 или H_2 требуется только один фотон.

Генетическое сокращение количества светособирающих пигментов в фотосинтетическом аппарате позволяет обеспечить 10 %-ную конверсионную эффективность солнечной энергии в углеводы, из которых может продуцироваться водородное или метановое топливо (Benemann, 2007).

Исследования, проведенные в Японии, показали, что в непрерывных лабораторных условиях культивирования микроводорослей при высокой интенсивности освещения производительность их мутантов с уменьшенным размером антенны по сравнению с природным штаммом возрастает на 50 % (Nakajima, Ueda, 1999; Nakajima et al., 2001).

Нитрогеназная активность и выделение H_2 были изучены у двух мутантов цианобактерии *A. variabilis* ATCC 29413, у которых был ослаблен метаболизм связывания молекулярного водорода. Сделаны выводы, что мутанты, лишенные поглощающих и обратимых (двунаправленных) гидрогеназ, перспективны для биотехнологических исследований выделения водорода. Продуктивность мутанта PK84 при длительном культивировании была в 4,3 раза выше по сравнению с природным типом. У всех культур наблюдалось усиление продуцирования водорода под влиянием азота (в 1,8-1,9 раз) и при голодании по CO_2 (в 1,4-1,5 раза) (Sveshnikov et al., 1997).

Способы активизации процесса продуцирования водорода микроводорослями

Эффективность процесса фотопродуцирования водорода зависит от многих факторов или параметров, значение которых возрастает при его масштабном производстве. Наиболее важными из них являются наличие молекулярного кислорода, уровень освещенности, температурный режим, соленость, состав газовой среды и т.д. Причем различные параметры по-разному влияют на процесс выделения водорода определенными видами микроводорослей (Dutta et al., 2005).

Выделение водорода изучалось у большого числа видов и штаммов *Cyanophyta*. Отмечено, что этот процесс осуществляется представителями как минимум 14 родов при обширном диапазоне условий культивирования (Lopes Pinto et al., 2002).

Большое влияние на продуцирование водорода оказывают условия освещения и связанный с этим уровень кислорода. Это показано при выращивании *A. variabilis* ATCC 29413 мутант PK84 в 4,34-литровом двухстадийном аэрлифтном фотореакторе объемом 4 л. Установлено, что продуцирование водорода возрастает с увеличением интенсивности физиологической радиации (ИФР) от 47 до 190 мкмоль/$м^2$·с, однако при дальнейшем возрастании освещения выход водорода замедляется в результате накопления избыточного молекулярного кислорода, ингибирующего нитрогеназу и гидрогеназу. Выделению водорода способствовало применение аргона, приводившее к увеличению нитрогеназной активности и количества гетероцист у водорослей (Liu et al., 2000).

Выделение водорода культурой *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. наблюдалось в анаэробных условиях на свету и в темноте. Оптимально этот процесс происходит при 32 °С, полном анаэробиозе в темноте (Aoyama et al., 1997). Выход водорода у *Synechococcus* Näg. PCC 7942 также наблюдался в темноте в анаэробных условиях (Asada, Miyake, 1999).

Штаммы четырех видов морских синезеленых водорослей выделяли водород при идентичных режимах их выращивания (обогащение воздуха 5 % CO_2 при освещении 7000 лк на поверхности сосуда) и при одинаковых инкубационных условиях определения водорода (барботация аргоном с 3 % CO_2 и освещение 4000 лк на поверхности сосуда). Наибольшей была продуктивность водорода у *Oscillatoria brevis* B-1567 – 0,168 мкмоль/мг сухой биомассы в час. Два вида *Calothrix* (Ag.) V. Poljansk. – *C. scopulorum* 141015 и *C. membranacea* BG7 обладали меньшей водородпродуцирующей активностью – 0,128 и 0,108 мкмоль/мг сухой биомассы в час соответственно. Среди исследованных видов и штаммов наиболее слабым продуцентом водорода оказалась *Anabaena cylindrica* B-629, в опытах с которой зарегистрировано лишь 0,103 мкмоль водорода/мг сухой биомассы в час (Lambert, Smith, 1977).

Более высокие показатели максимального выхода водорода получены при исследовании морской синезеленой водоросли *Oscillatoria* sp. Miami BG7 – 0,250 мкмоль/мг сухой биомассы в час. Такой результат достигнут в условиях аэрирования культуры в процессе ее роста, использования в качестве источника азота NH_4Cl и ИФР 100 мкмоль/м^2·с. Тестирование биомассы на наличие водорода проводилось в атмосфере аргона (100 %), при ИФР 90 мкмоль/м^2·с и температуре 37 °С (Phlips, Mitsui, 1983).

Изучение культур шести штаммов гетероцистных синезеленых водорослей рода *Anabaena* проводилось лишь с использованием аэрации и ИФР 20 мкмоль/м^2·с, а измерение выхода водорода осуществлялось также при аэрации инкубационной камеры и при ИФР 60 мкмоль/м^2·с. Показатели максимального выделения водорода исследованных штаммов составляли: *A. variabilis* Kütz. IA MM-1 – 4,2, *A. flos-aquae* Brèb. UTEX LB 2558 – 3,2, *Anabaena* sp. PCC 7120 – 2,6, *A. cylindrica* IAMM-1 – 2,1, *A. flos-aquae* UTEX 1444 – 1,7, *A. cylindrica* UTEX B 629 – 0,91 мкмоль/мг хл. *а*/ч. Три штамма *Nostoc*, выращенные и проанализированные в аналогичных условиях, характеризовались близким со штаммами *Anabaena* значениями выхода водорода: *N. muscorum* IAM M-14 выделял 0,60, *N. commune* Vauch. sensu Elenk. IAM M-13 – 0,25 и *N. linckia* (Roth) Born. et Flah. IAM M-30 – 0,17 мкмоль/мг хл. *а*/ч соответственно (Masukawa et al., 2001).

Следует отметить различный уровень продуцирования водорода одним и тем же мутантом в зависимости от условий его культивирования и приемов, стимулирующих выход водорода. Примером могут служить данные о выделении H_2 штаммами *Anabaena variabilis*, выращенными и тестированными в разных условиях. Так, аэрирование биомассы в процессе роста культуры *A. variabilis* PK 84 смесью 73 % аргона, 25 % N_2 и 2 % CO_2 при ИФР 90 мкмоль/м^2·с и регистрация выделяемого молекулярного водорода культурой в инкубационной камере, аэрированной 93 % аргона, 5 % N_2 и 2 % CO_2 при той же ИФР, позволили достичь высокого выхода водорода – 167,6 мкмоль/мг хл. *а/*ч (Sveshnikov et al., 1997). Использование указанной газовой смеси было направлено на создание бескислородных условий, благоприятных для продуцирования молекулярного водорода.

Другой штамм этого же вида – *A. variabilis* ATCC 29413 культивировался и тестировался на выход водорода в условиях, идентичных использованным в опыте с *A. variabilis* PK 84. Однако его водородная продуктивность оказалась значительно меньшей – 45,16 мкмоль/мг хл. *а/*ч (Sveshnikov et al., 1997).

В исследованиях А.А. Цыганкова с сотр. (Tsygankov et al., 1998) применялись иные условия выращивания штамма *A. variabilis* PK84 (турбидостат, аэрирование воздухом с 2 % CO_2, ИФР 113 мкмоль/м·^{2}с), а определение выделенного водорода осуществлялось в атмосфере аргона. В данных условиях выход водорода у штамма PK84 составлял 32,3 мкмоль/мг хл. *а/*ч. Эти показатели ниже, чем водородная продуктивность этого же штамма, достигнутая при более благоприятных для выхода молекулярного фотоводорода бескислородных условиях (Sveshnikov et al., 1997).

Более низкая способность выделять водород обнаружена у этого же мутанта, выращиваемого в фотобиореакторе при аэрировании с 2 % CO_2 и тестированного на водород при таких же условиях с дополнительным освещением суспензии (плотность потока излучения 400 W/м^2) – всего 0,11 мкмоль/мг хл./ч (Fedorov et al., 2001).

Активное продуцирование водорода достигнуто в опытах с иным штаммом – *A. variabilis* PK17R, для культивирования которого и регистрации водорода использованы те же условия, что и в опытах с мутантами PK84 и ATCC 29413: в процессе роста – 73 % аргона, 25 % N_2 и 2 % CO_2, ИФР 90 мкмоль/м^2·с; при определении водорода – 93 % аргона, 5 % N_2, 2 % CO_2, ИФР 90 мкмоль/м^2·с. В данном случае был получен более высокий результат – 59,18 мкмоль водорода/мг хл. *а/*ч (Sveshnikov et al., 1997).

Для анализа выделения водорода другим штаммом этой же нитчатой гетероцистной синезеленой водоросли *A. variabilis* 1403/48 ее биомассу выращивали при аэрировании и ИФР 15 мкмоль/м^2·с. Опыты проводили в отсутствие газовой фазы, клетки иммобилизировались в пористых фибриллах, ИФР на верхней поверхности реактора составляла 25 мкмоль/м^2·с, а на нижней – 13. В данных условиях биомасса штамма продуцировала 20 мкмоль водорода/мг хл. *а/*ч (Markov et al., 1995).

Темновое образование водорода, катализируемое нитрогеназой, ранее наблюдалось в культуре *A. variadilis* при добавлении органических субстратов (Ощепков и др., 1973; Гоготов и др., 1976).

При использовании доноров электронов – дитионита и дитиотреитола, а также медиатора – метилвиологена исследовали выделение и поглощение водорода интактными нитями, препаратами гетероцист и вегетативных клеток двух видов аэробнорастущих синезеленых водорослей *A. variadilis* и *A. cylindrica* Lemm. Показано, что целые нити, изолированные гетероцисты и вегетативные клетки способны продуцировать водород из восстановленного метилвиологена, т.е. обладают гидрогеназной активностью. Существенное ускорение реакции (в 3-4 раза) достигалось при введении в реакционную смесь метилвиологена на свету, при этом интенсивный свет подавлял образование водорода. Изолированные гетероцисты *A. variadilis* выделяли водород при освещении лишь в присутствии дитиотреитола и метилвиологена (Полесская и др., 1982).

Синезеленая водоросль *A. cylindrica*, как и некоторые другие представители отдела *Cyanophyta*, продолжительное время продуцировала водород на свету в анаэробных условиях в отсутствие экзогенных доноров электронов. Эта реакция протекала при участии нитрогеназы, катализирующей АТФ-зависимое образование водорода (Косяк и др., 1978). Установлено, что гидрогеназа осуществляет рециклизацию водорода, выделяемого нитрогеназой, и направляет его на поддержание процесса азотфиксации.

Привлекает внимание процесс фотопродуцирования молекулярного водорода не только нитчатыми гетероцистными водорослями, но и представителями *Chroococcales.* В частности, проведены исследования выделения водорода четырьмя одноклеточными штаммами *Synechococcus* Näg. (*Chroococcophyceae*), не обладающими способностью фиксировать молекулярный азот. Биомассу всех штаммов выращивали в идентичных аэробных условиях, ИФР составляла 20 мкмоль/м^2·с. С целью определения количества выделенного водорода для каждого штамма создавали индивидуальные условия, что существенно сказалось на количестве выделяемого ими водорода. Так, *Synechococcus* РСС 6830 в атмосфере аргона с 13,4 мкмоль СО и 1,34 мкмоль C_2H_2 в темноте выделял 0,26 мкмоль водорода/мг хл. *а/*ч. Несколько большим этот показатель был в опыте с *Synechococcus* РСС 602 – 0,66 мкмоль /мг хл. *а/*ч. Причиной тому могло служить исключение из инкубационной среды C_2H_2 и темнового режима при определении водорода. В опыте с третьим штаммом было использовано 13,4 мкмоль СО и ИФР 20-30 мкмоль/м^2·с. Значительно меньшей была продуктивность водорода у *Synechococcus* РСС 6301 – лишь 0,09 мкмоль /мг хл. *а*/ч, которая была отмечена при использовании аргона с 1,34 мкмоль C_2H_2 и ИФР 20-30 мкмоль/м^2·с. Минимальные результаты получены при анализе биомассы *Synechococcus* РСС 6307, выделение водорода у которого происходило при еще меньшем составе компонентов в инкубационной кювете для регистрации выделившегося водорода: в атмосфере 100 % аргона при ИФР 20-30 мкмоль/м^2·с – 0,02 мкмоль /мг хл. *а/*ч (Howarth, Codd, 1985).

В данном случае сравнительная характеристика самих штаммов *Synechococcus* затруднена из-за отсутствия идентичных условий определения выделяемого ими водорода. Тем не менее, полученные результаты позволяют оценить способность продуцировать водород отдельными таксонами при использовании конкретных указанных условий анализа.

Голодание по сере приводило зеленую микроводоросль *Chlamydomonas reinhadtii* к анаэробиозу в условиях освещенности, в результате чего происходило ингибирование фотосинтеза, индуцировался синтез гидрогеназы и в итоге усиливалось выделение водорода (Melis et al., 2000). Такие условия стимулировали также продуцирование водорода хроококковыми водорослями (например, *Gloeocapsa alpicola* и *Synechocystis* PCC 6803). Сера является очень важным компонентом ФС II, без нее блокируется синтез цистеина или метионина и резко ослабляется биосинтез протеина. Это приводит к недостатку протеина D1 (32 kDa), важного для функционирования ФС II. В связи с этим в условиях дефицита серы фотосинтез и дыхание уменьшаются даже при наличии света. Однако интенсивность фотосинтеза снижается намного быстрее, чем дыхание, поэтому точка равновесия достигается через некоторое время (обычно через 22 ч). После этого количество кислорода, используемого при дыхании, становится большим, чем кислорода, продуцируемого при фотосинтезе, и в клетках достигаются анаэробные условия. В этот период выделение водорода происходит в максимальных количествах. В итоге *Gloeocapsa alpicola* CALU 743, культивируемая в условиях серного голодания, барботирования 4 %-ным CO_2, при 25 мкмоль фотонов/м^2·с и тестированнная на выход водорода, в аналогичных условиях выделяла 0,58 мкмоль водорода/мг белка (Antal, Lindblad, 2005).

Перечень организмов, способных продуцировать водород, еще точно не определен, а условия интенсификации этого процесса требуют дальнейших исследований. С целью поиска новых нетрадиционных источников водорода сотрудники отдела мембранологии и фитохимии Ин-та ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины провели исследования светозависимого выделения водорода культурами гормогониевых и хроококковых синезеленых (*Cyanophyta*) и зеленых (*Chlorophyta*) микроводорослей из коллекции отдела – IBASU-B (Золотарева и др., 2006, Золотарьова та ін., 2006, Шнюкова и др., 2007; Перспективи …, 2008).

Объектами исследования служили 73 штамма, 17 видов, в частности 4 вида рода *Nostoc* Adan., 3 вида *Anabaena* Bory, *Anacystis nidulans* Drouet, *Microcystis aeruginosa* Kütz. emend. Elenk., *Phormidium* *inundatum* Kütz., *Synechocystis minuscula* Woronich., *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl., *Oscillatoria formosa* Bory, *Chlorella vulgaris* Beijer, *Chlamydomonas reinhardtii* Dang., *Ankistrodesmus braunii* (Näg.) Brun., *Botryococcus minor* Kütz. Основное внимание было уделено выявлению факторов, влияющих на ход фотосинтетического процесса в клетках микроводорослей и способствующих выделению водорода. Водоросли выращивали на минеральных средах в контролируемых условиях. Фотовыход водорода исследованными штаммами стимулировали такими стрессовыми условиями, как темновая инкубация культур, аноксия путем экспозиции водорослей в потоке инертного газа. Этот процесс стимулировали комплексным использованием экзогенных органических субстратов, в частности глюкозы, ингибитора электронного транспорта диурона, субстрата с высоким окислительно-восстановительным потенциалом – метилвиологена, освещения высокой интенсивности (плотность потока фотонов 400-800 мкмоль /$м^2$·с).

Установлено, что 19 исследованных штаммов 16 видов гормогониевих и хроококкових синезеленых, а также зеленых микроводорослей в разной степени проявляли способность к выделению молекулярного водорода на свету при условиях стимулирования этого процесса. Наиболее активными продуцентами водорода среди исследованных штаммов оказались: представитель гормогониевых гетероцистных синезеленых водорослей *Nostoc linckia* 86, продукционная способность которого достигала 2,4 мл/мг сухой биомассы в час, безгетероцистная гормогониевая синезеленая водоросль *Spirulina platensis* с выходом 2,11 мл/г сухой биомассы в час и зеленая микроводоросль *Chlamydomonas reinhardtii* – 2,2 мл водорода/мг сухой биомассы в час. Эти объекты по способности продуцировать водород в условиях угнетения активности ФС II являются приоритетными среди изученных штаммов. Продуктивность двух из четырех исследованных видов *Anabaena* – *A. cylindrica* и *Anabaena* sp. была ниже – 1,44 и 1,38 мл/г сухой биомассы в час соответственно.

Одно из последних исследований сотрудников отдела мембранологии и фитохимии посвящено изучению продуцирования водорода зеленой микроводорослью *Ch. reinhardtii* (Полищук и др., 2008). Как известно, удаление из среды культивирования минеральных источников серы приводит к частичному и обратимому ингибированию активности ФС II водорослей, окисляющей воду, однако слабо влияет на клеточное дыхание. В результате культура переходит из аэробных в анаэробные условия существования. В отсутствие кислорода в клетках водорослей индуцируется два типа [FeFe]-гидрогеназ – ферментов, которые катализируют восстановление протонов до молекулярного водорода за счет направленного фотосинтетического потока электронов (Forestier et al., 2003). Следовательно, высокая и стабильная дыхательная активность зеленых водорослей является необходимым условием перехода клеток к режиму продуцирования водорода. Эта активность поддерживается при наличии достаточной концентрации субстратов дыхания, таких как сахара или карбоновые кислоты.

Цель исследований состояла в оптимизации режимов выращивания одноклеточной зеленой водоросли *Ch. reinhardtii* и изучении влияния экзогенно добавленных субстратов на фотовыделение водорода зелеными водорослями после активации процесса в ходе сульфатного голодания. Культуру выращивали фотоавтотрофно в колбах на минеральной среде при освещении люминесцентными лампами и температуре 25 ^{o}C. В середине логарифмической фазы роста культуру переводили на среду без серы (pH 7,2) до финальной концентрации 10 мг хл./л, переносили в реактор, изолированный от атмосферы, и инкубировали в течение 2-5 сут при постоянном освещении (~50 мкмоль/м^{2}· с). Было исследовано влияние глюкозы, ацетата, сукцината и малата на продуцирование водорода. В отдельных опытах создавали анаэробные условия, добавляя к суспензии водорослей глюкозу и глюкозооксидазу. Скорость дыхания измеряли амперометрически с помощью закрытого платинового электрода Кларка. Состояние фотосинтетического аппарата клеток периодически контролировали с помощью импульсной флуориметрии, анализируя переменную флуоресценцию хлорофилла.

Опыты показали, что при фотоавтотрофном культивировании микроводорослей продуцирование водорода клетками было незначительным и многократно повышалось при условиях микотрофного питания. В присутствии 5 мМ глюкозы через 120 ч культивирования выход водорода составлял 1 ммоль/мг хлорофилла. Если в среде присутствовала глюкозаоокидаза, продуцирование водорода возрастало до 5 ммоль/мг хлорофилла. Таким образом, строго анаэробные условия, которые создавались в присутствии глюкозооксидазы, значительно стимулировали выход водорода. Добавление к реакционной среде субстратов дыхания способствовало сокращению периода анаэробной прединкубации приблизительно от 5 до 3 сут. Наиболее эффективными субстратами оказались глюкоза и ацетат. В присутствии ацетата выделение водорода начиналось через 80-100 ч инкубации и наблюдалось в течение 2 сут, достигая 5 ммоль/мг хлорофилла. Контроль состояния фотосинтетического аппарата показал, что к началу выделения водорода квантовый выход ФС II снижался до 0,5, в то время как в контрольных условиях он составлял 0,79 ммоль/мг хлорофилла. Поскольку выделение водорода строго зависит от наличия освещения, было проверено его влияние на общий выход H_2. Оптимальным оказалася невысокий уровень освещения – 50 мкмоль/м^{2}·с, повышение которого до 100-150 мкмоль/м^{2}·с приводило к резкому снижению продуцирования H_2. Вероятной причиной этого может быть слишком высокое активирование ФС II, способствующее появлению ингибирующих процесс концентраций кислорода.

Заключение

Биологическое продуцирование молекулярного водорода за счет фотосинтеза, которое имеет ряд преимуществ по сравнению с другими способами получения H_2, все больше привлекает исследователей как возможная альтернатива современным не возобновляемым энерго-технологиям. Одно из преимуществ биологического получения водорода – низкие энергетические затраты, особенно при производстве из водорослей и бактерий, использующих солнечный свет как источник энергии. Технология получения водорода, основанная на солнечной энергии, может быть внедрена в практику, если найти путь эффективного использования солнечного света водорослями и бактериями. Ссылаясь на имеющиеся данные (Prince, Kheshgi, 2005), С.А. Марков (2007) констатирует, что фотосинтезирующие водоросли и бактерии потенциально могут превращать солнечную энергию в энергию водорода с 30-40 % эффективности.

Однако в настоящее время максимальная описанная в литературе эффективность конверсии солнечной энергии в водород водорослями составляет не более 24 %. Тем не менее, это намного больше эффективности конверсии солнечной энергии в другие биологические топлива, основанные на фотосинтезе, такие как биоэтанол и биодизель (в настоящее время меньше 4 %). В связи с этим Национальный научный совет США советует перегруппировать национальную исследовательскую программу по биологическим топливам с тем, чтобы больше времени и ресурсов направлялось на фундаментальные исследования в области выделения водорода водорослями и бактериями, основанного на фотосинтезе (Марков, 2007). Немецкие исследователи в сотрудничестве с университетом Квинсленда (Австралия) намерены наладить получение экологического горючего будущего – водорода за счёт фотосинтеза микроскопических водорослей (Цыганков, 2007).

Аналогичная целевая комплексная программа «Фундаментальные проблемы водородной энергетики» выполняется на базе НАН Украины. Приведенные нами исследования по оптимизации процесса фотопродуцирования молекулярного водорода микроскопическими синезелеными и зелеными водорослями в рамках указанной Программы свидетельствуют о перспективности, практической значимости и необходимости дальнейшего изучения водорослей как биосистем, способных к эффективному преобразованию энергии света в химическую энергию водорода – альтернативного и экологически чистого топлива.

E.K. Zolotareva, E.I. Shnyukova, V.V. Podorvanov

M.G. Kholodny Institute of Botany, National Academy of Sciences of Ukraine,
2 Tereshchenkovskaya St., 01001 Kiev, Ukraine

MICROALGAE AS HYDROGEN PRODUCERS

The current state of research on photosynthetic hydrogen production by microalgae to create alternative bioenergetics is reviewed. Data on the mechanisms of hydrogen evolution by blue-green and unicellular green microalgae and the enzymes catalyzing these processes are given. The ability to produce hydrogen in different amounts is developed in th e process of adaptation of microalgal cultures to stress conditions. Factors stimulating the yield of hydrogen, in particular, the influence of modes of illumination, addition of respiratory substrates, reducing agents, inhibitors of electron transport, as well as the results of molecular H_2 photoproduction by strains from Culture Collection of algae of the Kholodny Institute of Botany NASU are analyzed. Prospects for the use of microalgae as transformers of solar energy in molecular hydrogen are considered.

K e y w o r d s : microalgae, H_2 photoproduction, hydrogenase, nitrogenase.

Биохимия синезеленых водорослей / Е.Г. Судьина, Е.И. Шнюкова, Н.В. Костлан и др. / Под ред. К.М. Сытника. – Киев: Наук. думка, 1978. – 261 с.

Волова Т.Г. Биотехнология / Ред. И.И. Гительзон. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, 1999. – 252 с.

Гоготов И.Н., Косяк Ф.В., Крупенко А.Н. Образование водорода цианобактериями *Anabatna variabilis* в присутствии света // Микробиология. – 1976. – **45**, вып. 6. – С. 941-945.

Золотарева Е.К., Полищук А.В., Шнюкова Е.И. и др. Светозависимое выделение водорода клетками цианобактерий и зеленых водорослей // Мат. IX з'їзду Укр. біохім. тов-ва (Харків, 24-27 жовт. 2006 р.). – Харків, 2006. – Т. 1. – С. 166.

Золотарьова О.К., Поліщук О.В., Шнюкова Є.І. та ін. Фотовиділення водню культурами *Cyanophyta* і *Chlorophyta* // Мат. XII з'їзду Укр. бот. тов-ва (Одесса, 15-18 травня 2006 р.). – Київ, 2006. – С. 519.

Иванов К. Водородные перспективы // Альтернат. топл. – 2008. – **8**, № 4. – С. 41-43.

Козин Л.Ф., Волков С.В. Водородная энергетика и экология. – Киев: Наук. думка, 2002. – 335 с.

Косяк А.В., Гоготов И.Н., Крупенко А.Н. Образование водорода цианобактериями *Anabaena cylindrica* // Микробиология. – 1978. – **47**, № 4. – С. 605.

Кузык Б.Н., Кушлин В.И., Яковец Ю.В. На пути к водородной энергетике. – М.: Ин-т эконом. стратег., 2005. – 160 с.

Манаков А.Ю., Скиба С.С. Использование клатратных соединений для хранения водорода // Рос. хим. журн. – 2006. – **50**, № 6. – С. 73-82.

Марков С.А. Получение биоводорода биологическим путем // Там же. – 2006. – С. 26-32.

Марков С.А. Биоводород: возможное использование водорослей и бактерий для получения молекулярного водорода // Альтернат. энерг. и экол. – 2007. – **45**, № 1. – С. 30-35.

Михеева Л.Е., Кокшарова О.Л., Шестаков С.В. Мутант цианобактерии *Anabaena variabilis*, АТСС 29413, продуцирующий молекулярный водород // Вестн. Моск. ун-та. – 1994. – **16**, № 2. – С. 54-57.

Михеева Л.Е., Кокшарова О.Л. Шестаков С.В. Штамм ЦМЛМ А-13 *Anabaena variabilis*, используемый для получения водорода: А. с. № 127064, 1986, цит. по: Ш.М. Асмоян, В.В. Зинченко, Е.А. Карбышева. Академику Сергею Васильевичу Шестакову 70 лет // Вестн. ВОГиС. – 2004. – **8**, № 3. – С. 103-113.

Ощепков В.П., Никитина К.А., Гусев М.В., Красновский А.А. Выделение молекулярного водорода культурами синезеленых водорослей // ДАН СССР. – 1973. – **213**, № 3. – С. 739-746.

Перспективи використання мікроводоростей в біотехнології / Під ред. О.К. Золотарьової. – К.: Альтерпрес, 2008. – 235 с.

Полесская О.Г., Мальцев С.В., Красновский Ф.Ф. Образование и поглощение водорода культурами и изолированными гетероцистами цианобактерий // Прикл. биохим. и микробиол. – 1982. – **18**, вып. 3. – С. 316-323.

Полищук О.В., Подорванов В.В., Шнюкова Є.І. та ін. Продукування водню мікроводоростями за рахунок фотосинтетичного перетворення сонячної енергії // Тези доп. наук.-звіт. сесії «Фундаментальні проблеми водневої енергетики», 12-13 лист. 2008 р. – Київ, 2008. – С. 51.

Серебрякова Л.Т., Трошина О.Ю., Гоготов И.Н. Биотехнологический потенциал одноклеточной цианобактерии *Gloeocapsa alpicola* как продуцента молекулярного водорода // Мат. междунар. науч. конф. „Биологические ресурсы и устойчивое развитие" (Пущино, 29 окт. – 2 нояб. 2001 г.). – М., 2001а. – С. 197-198.

Серебрякова Л.Т., Трошина О.Ю., Шереметьева М.Е. Продукция молекулярного водорода одноклеточной цианобактерией *Gloeocapsa alpicola* // От современной фундаментальной биологии к новым наукоемким технологиям: Тр. конф. (Пущино, 24-26 окт. 2001 г.). – Пущино, 2001б. – С. 98-99.

Тарасов Б.П., Лотоцкий М.В. Водородная энергетика: прошлое, настоящее, виды на будущее // Рос. хим. журн. – 2006. – **50**, № 6. – С. 6-18.

Цыганков А.А. Получение водорода биологическим путем // Там же. – С. 26-33.

Цыганков А.А. Азотфиксирующие цианобактерии – продуценты водовода (Обзор) // Прикл. биохим. и микробиол. – 2007. – **43**, № 3. – С. 279-288.

Шестаков С.В. Перспективы использования фототрофных бактерий в биотехнологии // Биотехнология / Ред. А.А. Баев. – М.: Наука, 1984. – С. 212-217.

Шестаков С.В., Михеева Л.Е. Генетический контроль метаболизма водорода у цианобактерий // Генетика. – 2006. – **42**, № 11. – С. 1512-1525.

Шнюкова Є.І., Поліщук О.В., Довбиш К.П. та ін. Трансформація сонячної енергії мікроводоростями з утворенням молекурярного водню // Укр. фітоцен. зб. Сер. С. – Фітоекологія. – 2007. – Вип. 25. – С. 79-96.

Antal T.K., Lindblad P. Production of H_2 by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH // J. Appl. Microbiol. – 2005. – **98**, N 1. – P. 114-120.

Aoyama K., Uemura I., Miyake J., Asada Y. Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a Cyanobacterium, *Spirulina platensis* **//** J. Ferment. Bioeng. – 1997. – **83**, N 1. – P. 17-20.

Asada Y., Miyake J. Photobiological hydrogen production // J. Biosci. Bioeng. – 1999. – **88**, N 1. – P. 1-6.

Benemann J.R. The technology of biohydrogen // Biohydrogen. – New-York: Plenum Press, 1998. – P. 19-30.

Benemann J.R. Hydrogen and methane production by microalgae // Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. – Oxford: Blackwell, 2007. – P. 403-416.

Boison G., Bothe H., Hansel A., Lindblad P. Evidence against a common use of the diaphorase subunits by the bidirectional hydrogenase and by the respiratory complex I in cyanobacteria // FEMS Microbiol. Lett. – 1999. – **174**, N 1. **–** P. 159-165.

Borodin V.B., Tsygankov A.A., Rao K.K., Hall D.O. Hydrogen production by *Anabaena variabilis* PK84 under simulated outdoor conditions // Biotechn. Bioeng. – 2000. – **69**. – P. 478-485.

Dutta D., De D., Chaudhuri S., Bhattacharya S.K. Hydrogen production by Cyanobacteria // Microbiol Cell Factor. – 2005. – **4**. – P. 36-47.

Fedorov A.S., Tsygankov A.A., Rao K.K., Hall D.O. Production of hydrogen by an *Anabaena variabilis* mutant in photobioreactor under aerobic outdoor conditions // Biohydrogen II. – Oxford: Elsevier Sci., Ltd., 2001. – P. 223-228.

Flores E., Herrero A. Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation // The molecular biology of cyanobacteria. – Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1994. – 487-517.

Forestier M., King P., Zhang L. et al. Expression of two [Fe]-hydrogenases in *Chlamidomonas reinhardtii* under anaerobic conditions // Europ. J. Biochem. – 2003. – **270**, N 13. – P. 2750-2758.

Gaffron H. Reduction of CO_2 with H_2 in green plants // Nature. – 1939. – **143**. – P. 204-205.

Gaffron H. Photosynthesis, photoreduction and dark reduction of carbon dioxide in certain algae // Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. – 1944. – **19**. – P. 1-20.

Gaffron H., Rubin J. Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae // J. General Physiol. – 1942. – **26**. – P. 219-248.

Ghirardi M.L., King P.W., Posewitz M.C. Approaches to developing biological H_2-producing organisms and processes // Biochem. Soc. Trans. – 2005. – **33**, N 1. – P. 70-72.

Ghirardi M.L., Togasaki R.K., Seibert M. Oxygen sensitivity of algal H_2-production // Appl. Biochem. Biotech. – 1997. – **63**, N 2. – P. 141-151.

Happe T., Schutz K., Bohme H. Transcriptional and mutational analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413 // J. Bacteriol. – 2000. – **182**, N 6 – P. 1624-1632.

Happe T., Kaminski A. Differential regulation of the Fe-hydrogenase during anaerobic adaptation in the green algae *Chlamidomonas reinhardtii* // Europ. J. Biochem. – 2002. – **269**, N 3. – P. 1020-1032.

Hemschmeier A., Happe T. The exceptional photofermentative hydrogen metabolism of the green alga *Chlamidomonas reinhardtii* // Biochem. Soc. Trans. – 2005. – **33**. – P. 39-41.

Howarth D.C., Codd G.H. The uptake and production of molecular hydrogen by unicellular cyanobacteria // J. Gen. Microbiol. – 1985. – **131**. – P. 1725-1758.

Jackson D.D., Ellms J.W. On odors and tastes of surface waters with special reference to *Anabaena*, a microscopial organism found in certain water supplies of Massachusetts // Rep. Mass. State Board Health. – 1896. – P. 410-420.

Kentemich T., Danneberg G., Hundeshagen B., Bothe H. Evidence for the occurence of the alternative, vanadium-containing nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* // FEMS Microdiol. Lett. – 1988. – **51**, N 1. – P. 19-24.

Kentemich T., Haverkamp G., Bothe H. The expression of a third nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis //* Z. Naturforsch. – 1991. – **46c**, N 3. – P. 217-222.

Kumazawa S. Photoproduction of hydrogen by the marine heterocystous cyanobacterium *Anabaena* species TU37-1 under a nitrogen atmosphere // Mar. Biotech. – 2003. – **5**, N 3. – P. 222-226.

Lambert G.R., Smith G.D. Hydrogen formation by marine blue-green algae // FEMS Lett. – 1977. – **83**, N 1. – P. 159-162.

Lambert G.R., Daday A., Smith G.D. Hydrogen evolution from immobilized cultures of the cyanobacterium *Anabaena cylindrica* B629 // Ibid. – 1979. – **101**, N 1. – P. 125-128.

Lindberg P., Lindblad P., Cournac L. Gas exchange in the filamentous cyanobacterium *Nostoc punctiforme* strain ATCC 29133 and Its hydrogenase-deficient mutant strain NHM5 // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – **70**, N 4. – P. 2137-2145.

Liu J.-G., Hall D.O., Rao K.K. et al. H_2 production by *Anabaena variabilis* mutant in computer controlled two-stage air-lift tubular photobioreactor // Chin. J. Oceanol. and Limnol. – 2000. – **17**, N 2. – P. 126-131.

Lopes Pinto F.A., Troshina O., Lindblad P. A brief look at three decades of research on cyanobacterial hydrogen evolution // Intern. J. Hydrogen Energy. – 2002. – **27**, N 11/12. – P. 1209-1215.

Markov S.A. Bioreactors for hydrogen production // Biohydrogen. – New York: Plenum Press, 1998. – P. 390-393**.**

Markov S.A., Bazin M.J., Hall D.O. Hydrogen photoproduction and carbon dioxide uptake by immobilized *Anabaena variabilis* in a hollow-fiber photobioreactor // Enzyme and Microbiol. Technol. – 1995. – **17**, N 4. – P. 306-310.

Markov S.A., Weaver P.F., Seibert M. Potential using microorganisms in hollow-fiber bioreactors for hydrogen production // Hydrogen Energy Progress XI: Proc. 11^{th} World Hydrogen Energy Conf. (Stuttgart, 23-28 June 1996). – Stuttgart. – P. 2619-2624.

Markov S.A., Eivazova E.R., Greenwood J. Photostimulation of H_2 production in the green alga *Chlamydo-monas reinhardtii* upon photoinhibition of its O_2-evolving system // Intern. J. Hydrogen. Energy. – 2006. – **31**, N 10. – P. 1314-1317.

Masukawa H., Nakamura K., Mochimaru M., Sakurai H. Photobiological hydrogen production and nitrogenase activity in some heterocystous cyanobacteria // BioHydrogen. Ed. II. – Oxford: Elsevier Sci., Ltd., 2001. – P. 63-66.

Masukawa H., Mochimaru M., Sakurai H. Disruption of the uptake hydrogenase gene, but not of the bidirectional hydrogenase gene, leads to enhanced photobiological hydrogen production by the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 // Appl. Microbiol. Biotech. – 2002. – **58**. – P. 618-624.

Melis A., Happe T. Trails of green alga hydrogen reserch – from Hans Gaffron to new frontiers // Photosyn. Res. – 2004. – **80**, N 1-3. – P. 401-409.

Melis A., Zhang L., Forestier M. et al. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant. Physiol. – 2000. – **122**, N 1. – P. 127-135.

Nakajima Y., Ueda R. Improvement of microalgal photosynthetic productivity by reducing the content of light harvesting pigment // J. Appl. Phycol. – 1999. – **11**, N 2. – P. 195-201.

Nakajima Y., Tsuzuki M., Ueda R. Improved productivity by reduction of the content of light harvesting pigment in *Chlamydomonas reinhardtii //* Ibid. – 2001. – **13**, N 2. – P. 95-101.

Orme-Johnson W.H. Nitrogenase structure: where to now? // Science. – 1992. – **257**, N 5077. – P. 1639-1640.

Phlips E., Mitsui A. Role of light intensity and temperature in the regulation of hydrogen photoproduction by the marine cyanobacterium *Oscillatoria* sp. Strain Miami DG7 // Appl. Environ. Microbiol. – 1983. – **45**, N 4. – P. 1212-1220.

Posewitz M.C., King P.W., Smolinski S.L. et al. Discovery of two novel radical *s*-adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**, N. 24. – P. 25711-5720.

Prince R.C., Kheshgi H.S. The photobiological production of hydrogen: potential efficiency and effectiveness as a renewable fuel // Critical Rev. Microbiol. – 2005. – **31**, N 1. – P. 19-31.

Redding K., Cournac L., Vassiliev I.R. et al. Photosystem I is indispensable for photoautotrophic growth, CO_2 fixation, and H_2 photoproduction in *Chlamydomonas reinhardtii* // J. Biol. Chem. – 1999. – **274**, N 15. – P. 10466-10473.

Scherer S., Kerfin W., Boger P. Increase of nitrogenase activity in the blue-green alga *Nostoc muscorum* (Cyanobacterium) // J. Bacteriol. – 1980. – **141**, N 3. – P. 1017-1023.

Schmitz O., Boison G., Hilscher R. et al. Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria // Eur. J. Biochem. – 1995. – **233**, N 1. – P. 266-276.

Schütz K., Happe T., Troshina O. et al. Cyanobacterial H_2 production – a comparative analysis // Planta. – 2004. – **218**, N 3 – P. 350-359.

Seibert M., Flynn T., Benson D., Tracy E., Ghirardi M. Development of selection and screening procedures for rapid identification of H_2-producing algal mutants with increased O_2 tolerance // Biohydrogen. – New York: Plenum Press, 1998. – P. 227-234.

Smith R.L., Kumar D., Zhang X.K., Tabita F.R., Van Baalen C. H_2, N_2, and O_2 metabolism by isolated heterocysts from *Anabaena* sp. strain CA // J. Bacteriol. – 1985. – **162**, N 2. – P. 565-570.

Sveshnikov D.A., Sveshnikova N.V., Rao K.K., Hall D.O. Hydrogen metabolism of mutant forms of *Anabaena variabilis* in continuous cultures and nutritional syress // FEBS Microbiol. Lett. – 1997. – **147**, N 2. – P. 297-301.

Tamagnini P., Axelsson R., Lindberg P. et al. Hydrogenases and hydrogen metabolism of canobacteria // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2002. – **66**, N 1. – P. 1-20.

Tanisho S. Feasibility study of biological hydrogen production from sugar cane by fermentation // Hydrogen Energy Progress XI: Proc. 11th World Hydrogen Energy Conf. (Stuttgart, 23-28 June 1996). – Stuttgart, 1996. – P. 2601-2606.

Thiel T. Characterization of genes for an alternative nitrogenase in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* // J. Bacteriol. – 1993. – **175**, N 19. – P. 6276-6286.

Thomas J. Absences of the pigments of photosystem 2 of photosynthesis in heterocysts of a blue - green algae. – Nature. – 1970. – **228**, N 5267. – P. 181.

Tsygankov A.A., Serebryakova L.T., Rao K.K., Hall D.O. Acetilene reduction and hydrogen photoproduction by wild tipe and mutant strains of *Anabaena* at different CO_2 and O_2 concentrations // FEBS Microbiol. Lett. – 1998. – **167**, N 1. – P. 13-17.

Получена 10.04.09

Рекомендовал к печати В.М. Шаларь