

СИНТЕЗ БИОВОДОРОДА КЛЕТКАМИ ЗЕЛЕННЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ И СПОСОБЫ ЕГО СТИМУЛЯЦИИ

М. А. МЫСЛЕЙКО¹⁾, М. С. ВЕЧЕРЕК¹⁾, Дж. Г. МАНОЯН²⁾,
Л. С. ГАБРИЕЛЯН²⁾, Т. В. САМОВИЧ³⁾, Н. В. КОЗЕЛ^{4), 5)},
А. О. МУРАВИЦКАЯ¹⁾, В. В. ДЕМИДЧИК¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

²⁾Ереванский государственный университет, ул. Алека Манукяна, 1, 0025, г. Ереван, Армения

³⁾Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича
НАН Беларуси, ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

⁴⁾Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
ул. Академическая, 27, 220072, г. Минск, Беларусь

⁵⁾Крестьянское (фермерское) хозяйство «Серебряный ручей»,
222202, д. Сосновая, Озеричко-Слободской с/с,
Смолевичский р-н, Минская обл., Беларусь

Аннотация. Использование микроводорослей для производства биоводорода является одним из перспективных направлений современной биотехнологии и прикладной альгологии. В клетках зеленых микроводорослей процесс синтеза биоводорода осуществляется в электрон-транспортной цепи хлоропластов с помощью фермента [FeFe]-гидрогеназы и служит физиологической адаптацией к анаэробным условиям. Детальное понимание механизма синтеза биоводорода позволяет эффективнее использовать микроводоросли в качестве источника экологически чистого топлива. В представленном аналитическом обзоре рассматриваются механизмы биопродукции H_2 и его потенциальные роли в физиологии, а также подходы к стимуляции производства H_2 для биотехнологических целей.

Ключевые слова: водоросли; биоводород; гидрогеназа; депривация элементов; фотобиореактор.

Образец цитирования:

Мыслейко МА, Вечерек МС, Маноян ДжГ, Габриелян ЛС, Самович ТВ, Козел НВ, Муравицкая АО, Демидчик ВВ. Синтез биоводорода клетками зеленых микроводорослей и способы его стимуляции. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2024;2:36–45.
EDN: NCZWSI

For citation:

Mysleiko MA, Vecherek MS, Manoyan JG, Gabrielyan LS, Samovich TV, Kozel NV, Muravitskaya AO, Demidchik VV. Synthesis of biohydrogen by green microalgae and methods of increasing it production. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2024;2:36–45. Russian.
EDN: NCZWSI

Авторы:

Маргарита Алексеевна Мыслько – студентка биологического факультета. Научный руководитель – кандидат биологических наук, доцент Б. В. Адамович.

Максим Сергеевич Вечерек – студент биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Джемма Гургеновна Маноян – аспирантка кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии биологического факультета. Научный руководитель – Л. С. Габриелян.

Лилит Сергеевна Габриелян – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии биологического факультета.

Татьяна Викторовна Самович – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник лаборатории роста и развития растений.

Николай Владимирович Козел – кандидат биологических наук, доцент; заведующий лабораторией биофизики и биохимии растительной клетки⁴⁾, главный технолог⁵⁾.

Анна Олеговна Муравицкая – аспирантка кафедры клеточной биологии и биоинженерии растений биологического факультета. Научный руководитель – В. В. Демидчик.

Вадим Викторович Демидчик – доктор биологических наук, член-корреспондент НАН Беларуси, профессор; декан биологического факультета.

Authors:

Margarita A. Mysleiko, student at the faculty of biology.

Maksim S. Vecherek, student at the faculty of biology.

Jemma G. Manoyan, postgraduate student at the department of biochemistry, microbiology and biotechnology, faculty of biology.

jmanoyan@ysu.am

Lilit S. Gabrielyan, PhD (biology), docent; associate professor at the department of biochemistry, microbiology and biotechnology, faculty of biology.

lgabrielyan@ysu.am

Tatyana V. Samovich, PhD (biology); senior researcher at the laboratory of plant growth and development.

samovich77@gmail.com

Nikolay V. Kozel, PhD (biology), docent; head of the laboratory of plant cell biophysics and biochemistry^d and chief technologist^e.

kozel.mikalai@gmail.com

Anna O. Muravitskaya, postgraduate student at the department of cell biology and plant bioengineering, faculty of biology.

Vadim V. Demidchik, doctor of science (biology), corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, full professor; dean of the faculty of biology.

dzemidchik@bsu.by

SYNTHESIS OF BIOHYDROGEN
BY GREEN MICROALGAE AND METHODS
OF INCREASING IT PRODUCTION

M. A. MYSLEIKO^a, M. S. VECHEREK^a, J. G. MANOYAN^b,
L. S. GABRIELIAN^b, T. V. SAMOVICH^c, N. V. KOZEL^{d,e},
A. O. MURAVITSKAYA^a, V. V. DEMIDCHIK^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

^bYerevan State University, 1 Aleka Manukjiana Street, Yerevan 0025, Armenia

^cInstitute of Experimental Botany named after V. F. Kuprevich,
National Academy of Sciences of Belarus,

27 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus

^dInstitute of Biophysics and Cell Engineering, National Academy of Sciences of Belarus,
27 Akademichnaja Street, Minsk 220072, Belarus

^ePeasant (farm) economy «Serebryanyj ruchej», Sasnovaja 222202,
Aziarycka-Slabadski village council, Smaliavichy District, Minsk Region, Belarus

Corresponding author: V. V. Demidchik (dzemidchyk@bsu.by)

Abstract. The use of microalgae for the production of biohydrogen is one of the promising areas of modern biotechnology and applied algology. In green microalgae cells, the process of biohydrogen synthesis is carried out in the electron transport chain of chloroplasts by the enzyme [FeFe]-hydrogenase and serves as a physiological adaptation to anaerobic conditions. A detailed understanding of the mechanism of biohydrogen synthesis makes it possible to more efficiently use microalgae as a source of environmentally clean fuel. This analytical review examines the mechanisms of H₂ bioproduction and its potential roles in physiology, as well as approaches to stimulating H₂ production for biotechnological purposes.

Keywords: algae; biohydrogen; hydrogenase; nutrient deprivation; photobioreactor.

Введение

На сегодняшний день большой интерес представляет культивирование автотрофных микроорганизмов, таких как зеленые микроводоросли, в целях производства биомассы [1–4]. Используя в качестве источника энергии солнечный свет, они способны наращивать большие объемы органической материи и синтезировать целевые соединения, что делает их привлекательным объектом для биотехнологии. Особенно перспективным представляется использование микроводорослей как источника топливных ресурсов, таких как водородное топливо (молекулярный водород (H₂) и производимый биологическими системами биоводород) [5].

Способность микроводорослей синтезировать H₂ известна с начала 1940-х гг. [6]. Однако только с недавнего времени данный феномен рассматривается в качестве источника получения биоводорода в промышленных масштабах [7; 8]. Ввиду этого в последние десятилетия усилились исследования метаболизма микроводорослей, связанного с продукцией H₂, а также интенсифицировались разработки в области промышленного получения биоводорода с помощью культур эукариотических микроводорослей [9–12].

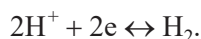
Целью настоящей работы являлся критический обзор и анализ современных исследований синтеза H₂ зелеными микроводорослями и его физиологической роли в клетке, а также исследований, направленных на разработку эффективных подходов к стимуляции генерации биоводорода физико-химическими методами.

Биосинтез H₂ зелеными микроводорослями:
механизм и роль в физиологии клетки

Биосинтез H₂ встречается у ряда бактерий и микроводорослей, принадлежащих к различным таксономическим группам [13–15]. Он осуществляется с помощью разных биохимических механизмов и является следствием различных физиологических адаптаций [9; 16]. Согласно работе [16] в природе существует несколько путей биосинтеза H₂ на свету: 1) кислородный фотосинтез в сочетании с производством H₂, которое катализируется [FeFe]-гидрогеназой (характерно для зеленых микроводорослей) [6]; 2) кислородный фотосинтез в сочетании с производством H₂, катализируемым нитрогеназой (свойственно цианобактериям) [13]; 3) неокислительный фотосинтез в сочетании с производством H₂, которое также катализируется нитрогеназой (известно для пурпурных бактерий) [15].

Образование H_2 имеет большое значение для клетки, так как оно играет роль альтернативного пути метаболизма в анаэробных условиях [10; 16; 17]. Производство водорода клетками зеленых микроводорослей на свету неразрывно связано с реакциями фотосинтеза и выступает одним из анаэробных механизмов регуляции транспорта электронов и сопряженных с ним процессов [16]. Выделение H_2 позволяет поддерживать поток электронов, необходимый для генерации АТФ [16].

Продукция H_2 зелеными микроводорослями впервые была описана более 80 лет назад [6]. При этом продемонстрировано, что в анаэробных условиях зеленые микроводоросли способны выделять H_2 как в темноте, так и на свету [6]. В дальнейшем показано, что для синтеза водорода в хлоропластах необходимо наличие специальных ферментов, которые будут осуществлять формирование H_2 [11; 18–20]. Такую функцию выполняют ферменты семейства гидрогеназ [11; 18; 19]. Данные ферменты играют важную роль в защите клетки от избытка электронов, образующихся в условиях анаэробного стресса на свету, тем самым предотвращая повреждение фотосинтетического аппарата [19]. Гидрогеназы являются ферментативными комплексами, состоящими из одной или нескольких субъединиц. Они катализируют обратимое восстановление протонов до молекулярного водорода следующим образом [19]:

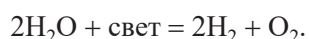


Особый интерес представляют возникновение и специализация гидрогеназ у зеленых микроводорослей, а также установление их тесного взаимодействия с фотосинтетическим аппаратом [11]. В качестве основной версии происхождения водородослеводородной гидрогеназы рассматривается горизонтальный перенос генов от представителей нефотосинтетических бактерий к предку современных водорослей [20]. В ходе эволюции у водорослей сформировался механизм локализации гидрогеназ в хлоропласте, где происходят их синтез и посттрансляционная модификация [18].

[FeFe]-гидрогеназы характеризуются наличием H-кластера в каталитическом центре [11]. Механизм образования молекулярного водорода с помощью [FeFe]-гидрогеназы реализуется следующим образом: посредством ферредоксина электроны доставляются к месту стыковки рядом с [4Fe4S]-кластером, откуда они переносятся в H-кластер, восстанавливая дистальный атом железа(II) [11]. Восстановленный атом Fe(II) стабилизируется благодаря присутствию лигандов CO и CN. Протонный путь от поверхности белка к каталитическому участку изучен не до конца. Вероятно, он включает остаток цистеина, расположенный рядом с H-кластером и действующий как конечный сайт связывания для одного из протонов. Второй протон, по-видимому, связывается с Fe(II). Конечная реакция включает процесс, в ходе которого образующийся гидрид-анион рекомбинирует со связанным протоном и выделяется в виде газа H_2 [11; 16].

Активный центр фермента, куда переносятся электроны от ферредоксина, чувствителен к кислороду, что лимитирует естественное производство H_2 в кислородных условиях [16]. Активность гидрогеназы ингибируется за счет подавления экспрессии генов *hyd*, окислительного повреждения каталитического центра и нарушения процесса созревания фермента [11; 21]. На свету анаэробные условия наступают, когда скорость фотосинтетического выделения O_2 становится ниже скорости митохондриального дыхания [22].

При нормальных аэробных условиях в хлоропластах зеленых микроводорослей осуществляется обычный процесс фотосинтеза, свойственный всем автотрофным организмам. Энергия света улавливается светособирающими белками реакционного центра фотосистемы-2 (ФС-2) и используется для расщепления воды на молекулы кислорода, протоны и электроны [17]. Эти фотосинтетические электроны посредством серии окислительно-восстановительных реакций продвигаются по электрон-транспортной цепи через комплекс цитохрома b_6f и фотосистему-1 (ФС-1) к железосерному белку ферредоксину, который затем переносит свои электроны на НАДФ⁺, восстанавливая его до НАДФН. В свою очередь, НАДФН является необходимым компонентом для функционирования цикла Кальвина, где происходят фиксация CO_2 и биосинтез важнейших для клетки веществ [16]. В анаэробных условиях ферредоксин вместо этого отдает свои электроны [FeFe]-гидрогеназе [11]. Такой путь известен как прямой биофототиз и свойствен исключительно зеленым микроводорослям (рис. 1). Водород образуется в результате расщепления воды ФС-2 в анаэробных условиях. В отсутствие кислорода световая энергия, собранная ФС-1 и ФС-2, линейно переносит электроны от воды к ферредоксину:



Производство H_2 эукариотическими зелеными микроводорослями путем прямого биофототиза требует от нескольких минут до нескольких часов анаэробной инкубации в темноте [23]. При переносе культуры из темновых анаэробных условий на свет выход водорода возрастает на несколько порядков [17]. Однако активное выделение H_2 носит временный характер, полностью затухая в течение нескольких минут. Именно этот феномен стал первым доказательством фотообразования водорода у зеленых микроводорослей [6]. Скачкообразный выброс водорода в указанных условиях является следствием быстрой индукции фотосинтетического транспорта электронов и восстановления ферредоксина и НАДФ⁺ в хлоропласте, пока ферменты цикла Кальвина находятся в инактивированном состоянии после инкубации

в темноте [24]. Причиной затухания процесса выступает, во-первых, дезактивация гидрогеназы в присутствии кислорода [21], а во-вторых, активация ферментов темновой фазы. Биосинтез H_2 конкурирует за электроны с другими восстановительными путями, прежде всего с ассимиляцией CO_2 . В исследованиях было продемонстрировано, что кратковременная выработка H_2 у вида *Chlamydomonas reinhardtii* наиболее высока при низкой концентрации CO_2 и наоборот [25]. Длительная выработка H_2 в отсутствие фиксации CO_2 предполагает центральную роль [FeFe]-гидрогеназы в поддержании фотосинтеза водорослей и приспособлении клеток к бескислородным условиям, а также защищает фотосинтетический аппарат от повреждений [17]. В случае инактивации цикла Кальвина потребление АТФ и НАДФН снижается, что обуславливает увеличение циклического транспорта через ФС-1, тем самым способствуя сильному подкислению люмена тилакоида. В свою очередь, подкисление люмена запускает механизмы фотозащитного тушения для рассеивания избыточной энергии, а также замедляет окисление пластохинона (PQ) комплексом цитохрома b_6f , следствием чего являются восстановление пула PQ и уменьшение переноса электронов из ФС-2 [22]. Все это в конечном итоге приводит к фотоповреждению фотосистем [17; 22]. Гидрогеназа может выступать в качестве конечного акцептора электронов в случае дезактивации цикла Кальвина [11]. Мутантный рибулозобисфосфаткарбоксилазодефицитный штамм *C. reinhardtii* продемонстрировал способность производить значительные количества H_2 в серосодержащей среде. В таком случае гидрогеназа, по-видимому, заменяет цикл Кальвина в качестве конечного акцептора электронов. В этом мутантном штамме, который почти не накапливает крахмал, электроны для выделения H_2 поступают преимущественно за счет расщепления воды в ФС-2 [10].

Установлено, что основным механизмом продукции H_2 является прямой биофотоллиз, или ФС-2-зависимый путь, при котором источником электронов служит фотоллиз воды [9; 16]. Однако ФС-2, по-видимому, не играет ключевую роль в выделении H_2 , а ее участие в процессе факультативно. В то же время ФС-1 участвует также в ФС-2-независимом пути образования водорода [10]. Этот путь называется непрямым биофотоллизом, или анаэробной темновой ферментацией (см. рис. 1). В данном случае источником электронов является органический субстрат, подвергнутый окислительному расщеплению. В качестве переносчика электрона выступает молекула НАД(Ф)Н, которая посредством НАД(Ф)Н-пластохиноноксидоредуктазы передает электрон на пул PQ, откуда он продвигается далее по электрон-транспортной цепи через цитохром b_6f , пластоцианин, ФС-1 и ферредоксин, в конечном итоге попадая на гидрогеназу [26].

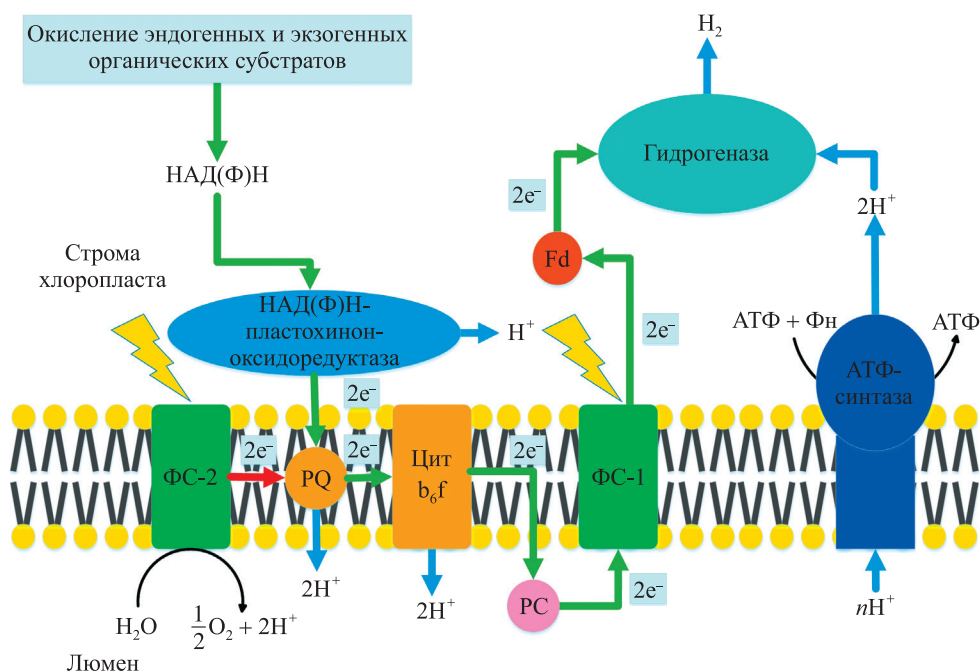


Рис. 1. Механизм синтеза H_2 в электрон-транспортной цепи на мембране тилакоида (Цит b_6f – цитохром b_6f ; PC – пластоцианин; Fd – ферредоксин; Фн – фосфат). Красная стрелка указывает путь переноса восстановительных эквивалентов при прямом биофотоллизе, зеленая стрелка – при прямом и непрямом биофотоллизе

Fig. 1. Mechanism of synthesis of H_2 in the electron transport chain in the thylakoid membrane (Цит b_6f – cytochrome b_6f ; PC – plastocyanin; Fd – ferredoxin; Фн – phosphate). The red arrow indicates the pathway of transfer of reducing equivalents during direct biophotolysis, green arrow – during direct and indirect biophotolysis

В темноте при ферментативном окислении эндогенного крахмала образуются такие продукты, как формиат, ацетат и этанол в соотношении 2,07 : 1,07 : 0,91 [27]. Помимо эндогенного крахмала, в качестве источника электронов могут выступать экзогенные углеродсодержащие соединения, в частности ацетат [28]. Ацетат имеет большое значение как субстрат для дыхания [29], а также возможный дополнительный источник электронов для образования H_2 при дефиците серы [8]. Метаболизм ацетата играет важную роль в процессе синтеза H_2 в клетке. Утилизация ацетата зависит от освещения и требует затрат АТФ. Существует два основных пути, которые могли бы объяснить образование CO_2 и H_2 из ацетата: 1) цикл лимонной кислоты; 2) цикл глиоксилата, связанный с превращением сукцината в углевод [28].

Согласно литературным данным выделение H_2 за счет эндогенного субстрата полностью блокировалось ингибитором дыхания фторуксусной кислотой, но эффекта со стороны 3-(3,4-дихлорфенил)-1,1-диметилмочевины (далее – 3,4-ДДМ) [30], являющейся ингибитором ФС-2, не наблюдалось [28]. Полученные результаты указывают на то, что в этих условиях реакция полностью зависит от окислительного метаболизма углерода в отличие от фотохимического пути выделения H_2 , когда 3,4-ДДМ оказывает ингибирующее действие на продукцию водорода [10; 12]. В случае использования экзогенного ацетата добавление 3,4-ДДМ снижает его поглощение. Анаэробное превращение ацетата в CO_2 и H_2 по чистому эффекту эквивалентно окислению в циклах лимонной кислоты и глиоксилата, отличие состоит в том, что образуется H_2 , а не H_2O . Электроны переносятся на пул PQ благодаря восстановленным пиридиновым нуклеотидам [26]. У водорослей ферменты циклов лимонной кислоты и глиоксилата расположены в митохондриях и цитоплазме соответственно. На основе непроницаемости оболочки хлоропласта для пиридиновых нуклеотидов было высказано предположение о том, что между митохондриями, цитоплазмой и хлоропластом функционирует переносчик дикарбоновой кислоты, обеспечивающий утилизацию восстановительной энергии, вырабатываемой дегидрогеназами, с конечным образованием H_2 [28].

Способы стимуляции продукции H_2 клетками зеленых микроводорослей

Наиболее изученным способом поддержания устойчивого образования H_2 является дефицит основных элементов минерального питания – серы (S), азота (N) и фосфора (P).

Сера поступает в клетку главным образом в виде сульфат-анионов (SO_4^{2-}) [31]. При нормальных условиях роста скорость фотосинтеза в 4–7 раз больше скорости дыхания, в то время как при S-депривации скорость дыхания превышает скорость фотосинтетического выделения O_2 , благодаря чему создаются анаэробные условия, подходящие для производства водорода [32]. Сера – незаменимый компонент аминокислот цистеина и метионина, при отсутствии которых биосинтез белка замедляется, и клетка не может синтезировать белок D1 ФС-2, в результате чего процесс восстановления ФС-2 от часто возникающих фотоокислительных повреждений блокируется [32]. Впервые на примере *C. reinhardtii* было обнаружено, что культивирование в условиях дефицита серы в течение 120 ч приводит к прогрессирующему снижению фотосинтетической способности в результате инактивации ФС-2 и повышения выделения O_2 до 95 %. Снижение активности переноса электронов обусловлено преобразованием центров ФС-2 из Q_B -восстанавливающей в Q_B -невосстанавливающую форму [32]. Абсолютная скорость фотосинтеза падает ниже скорости дыхания примерно через 24–30 ч культивирования при S-депривации [12; 33]. Как показали наши предварительные результаты, за этим переходом следует снижение окислительно-восстановительного потенциала среды от +400 мВ до примерно –300 мВ, что указывает на наступление анаэробноза (рис. 2).

Образование H_2 , наблюдаемое у клеток зеленых микроводорослей в условиях низкокислородного фотосинтеза и невысокой активности окислительного фосфорилирования, позволяет клетке выжить при стрессе, вызванном S-депривацией [9; 10]. Выделение H_2 – единственный доступный водорослям механизм, обеспечивающий выработку достаточного количества АТФ, необходимого для выживания организма в анаэробных условиях при дефиците серы [32]. Процесс предполагает последовательный переход через пять физиологических фаз: выделение O_2 , потребление O_2 , анаэробную стадию, фотопроизводство H_2 и терминацию [33].

При S-депривации в первые часы культивирования для образования H_2 необходима активная ФС-2 [9; 10]. То, что ФС-2 является основным источником электронов, демонстрирует добавление в культуру 3,4-ДДМ, которая связывается с Q_B -карманом ФС-2 и блокирует перенос электронов из ФС-2 в пул PQ [32]. При этом фотообразование водорода практически полностью прекращается [12; 14]. Однако в том случае, когда ингибитор ФС-2 вносился спустя некоторое время культивирования при дефиците серы, наблюдалось менее значительное снижение продукции H_2 [10]. В первые часы S-депривации в клетке происходит интенсивное накопление крахмала [16], который при переходе к фазе выделения водорода начинает деградировать, предоставляя электроны, поступающие в пул PQ, а далее на гидрогеназу [27].

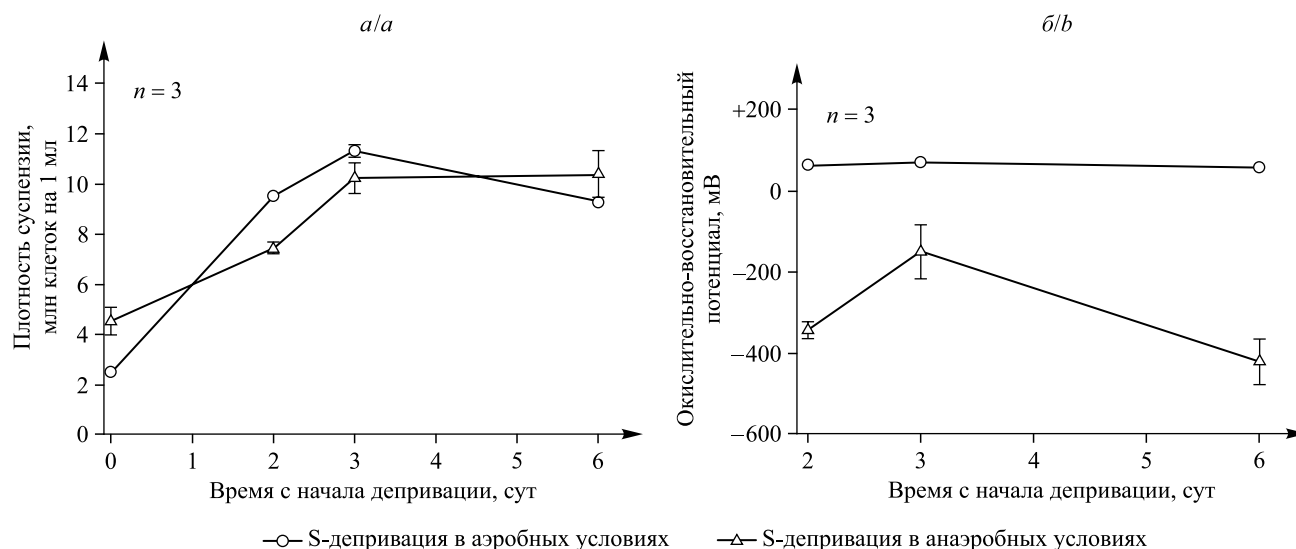


Рис. 2. Изменение плотности суспензии (а) и окислительно-восстановительного потенциала (б) суспензионной культуры *Parachlorella kessleri* RA-002 при S-депривации в аэробных и анаэробных условиях
Fig. 2. Changes of suspension density (a) and redox potential (b) of *Parachlorella kessleri* RA-002 under S-deprivation under aerobic and anaerobic conditions

Таким образом, вероятно, функционируют два пути образования H_2 в условиях S-депривации – ФС-2-зависимый и ФС-2-независимый пути [9; 12; 34]. Показано, что на долю фотоокисления воды в ФС-2 приходится до 80 % электронов, поступающих через электрон-транспортную цепь на гидрогеназу, оставшиеся 20 % электронов поступают в результате частичного окисления запасных продуктов, которые используются для восстановления пула PQ и впоследствии переносятся на ФС-1 при освещении [35]. Образование продуктов ферментативного метаболизма, таких как формат, ацетат и этанол, возрастает после добавления в культуру 3,4-ДДМ [30], что свидетельствует о переходе процесса производства H_2 на ФС-2-независимый путь [36].

Основным условием при использовании S-депривации для стимуляции синтеза H_2 является поддержание стабильной продукции H_2 на протяжении длительного времени. Однако в условиях S-депривации стабильная выработка биоводорода сохраняется только в течение нескольких дней, после чего фотосинтетические процессы безвозвратно угнетаются [34]. В связи с этим для поддержания длительной продукции H_2 необходимо периодически переводить культуру на полноценную среду для возобновления фотосинтетической функции [9].

Недостаток азота – серьезное стрессовое состояние для всех организмов, поскольку азот является основным компонентом белков и нуклеиновых кислот. В клетках растений этот элемент действует как строительный блок для хлорофиллов, и его дефицит приводит к снижению синтеза хлорофиллов и уменьшению количества единиц фотосинтетического аппарата [37]. Недостаток азота также является причиной деградации рибулозобисфосфаткарбоксилазы (далее – рубиско) и снижения фотохимической эффективности ФС-2 [38]. Более низкие количества ферредоксина при N-депривации [38] могут быть препятствием для переноса электронов к гидрогеназе, приводя к уменьшению выхода H_2 в таких условиях. Культуры, лишенные азота, демонстрируют устойчивую, но при этом низкую активность гидрогеназы и производят незначительные количества H_2 [37]. По этим причинам для подавления работы кислородвыделяющего комплекса и стимуляции продукции H_2 клетками зеленых микроводорослей используется не полная N-депривация, а частичное лимитирование обеспеченности данным элементом [37; 38].

Предположительный механизм стимуляции продукции H_2 при ограничении азота и совместной депривации серы и азота реализуется из-за блокирования переноса электронов и повреждения кислородвыделяющего комплекса [38]. Большая эффективность выделения H_2 при совместной депривации серы и азота показывает значительный вклад серы в процесс ингибирования кислородвыделяющего комплекса и продукции H_2 [38]. Внесение в культуру 3,4-ДДМ демонстрирует роль серы в функционировании ФС-2-независимого пути [38].

Влияние лимитирования азота, а также одновременной депривации серы и азота на синтез H_2 недавно было изучено на примере зеленой микроводоросли *Chlorella protothecoides* [37]. В случае одновременной депривации серы и азота продукция H_2 значительно повышалась по сравнению с контролем

и отдельными депривациями серы или азота. Для N-лимитирования были выбраны три концентрации аммония (1,75; 0,70 и 0,35 ммоль · л⁻¹). Начальная концентрация аммония для достижения максимального выхода H₂ составила 0,35 ммоль · л⁻¹ NH₄Cl в культуре [37]. Максимальный выход и средняя скорость образования H₂ при этом были равны 233,7 мл · л⁻¹ и 2,19 мл · л⁻¹ · ч⁻¹ соответственно [37].

В ходе исследования влияния ограничения азота на производство H₂ у *C. reinhardtii* была отмечена меньшая эффективность N-лимитирования, чем S-депривации [38]. N-лимитированная культура демонстрировала задержку в начале установления анаэробно-анаэробного режима и фазы образования H₂ по сравнению с S-дефицитной культурой (72 и 32 ч соответственно). Задержка также наблюдалась в достижении максимальной ферментативной активности гидрогеназы (192 и 120 ч). Обе дефицитные культуры постепенно поглощали O₂ до наступления гипоксии. Однако клетки с N-лимитированием демонстрировали задержку в потреблении O₂ и обнаруживали временное накопление кислорода [38]. Эта задержка сопровождалась более медленным снижением скорости эволюции фотосинтетического O₂ и более высокой долей неповрежденных активных центров ФС-2 [38]. Было высказано предположение о том, что в условиях N-лимитирования пул PQ в клетках может быть менее восстановлен, чем при S-депривации, обеспечивая большую скорость передачи электронов от Q_A к Q_B и повторное окисление Q_B [39]. Причина более окисленного пула PQ в N-лимитированных клетках по сравнению с пулом PQ в S-дефицитных клетках может заключаться в повышенной активности фотодыхания при N-депривации. Другой причиной различий в фотохимической активности ФС-2 может быть разница в содержании пигментов, наблюдаемая в клетках *C. reinhardtii* при S- или N-депривации. Клетки с N-лимитированием показали более низкое содержание хлорофилла и более высокое соотношение каротиноидов и хлорофилла, а также хлорофилла *a* и хлорофилла *b*. Различия в составе пигментов и антенн, вероятно, влияли на передачу световой энергии в фотосистему, что приводило к меньшему возбуждению и большей открытости реакционного центра ФС-2 [38].

В работе Л. С. Габриелян и соавторов исследовалась способность штамма *P. kessleri* RA-002, выделенного в Армении, к продукции биоводорода на средах TAP и Тамия при N-лимитировании и без него. Удаление азота привело к снижению скорости роста и уменьшению содержания фотосинтетических пигментов, одновременно повысив выход H₂. Максимальный выход H₂ при дефиците азота составил 5,25 ммоль · л⁻¹ (среда TAP) и 3,65 ммоль · л⁻¹ (среда Тамия), что в 4–5 раз больше, чем в случае нормальной обеспеченности данным элементом [40]. В другой работе того же коллектива авторов изучались уровень фотосинтетических пигментов, фотосинтетическая активность и генерация биоводорода у *C. vulgaris* IBCE C-19 и *P. kessleri* MDC6524 в ответ на дефицит серы и азота [41]. Полученные результаты показали, что недостаток этих элементов вызывал замедление роста в обеих культурах, что сопровождалось снижением уровня фотосинтетических пигментов, активности ФС-2 и синтеза полифенолов. Скорость генерации H₂ микроводорослями *C. vulgaris* и *P. kessleri* в контроле составила 0,40 и 0,34 мл · ч⁻¹ соответственно. Наибольший выход H₂ был показан при совместном дефиците серы и азота (60 мл · л⁻¹ для *C. vulgaris* (скорость генерации H₂ ~1,25 мл · ч⁻¹) и 68 мл · л⁻¹ для *P. kessleri* (скорость генерации H₂ ~1,42 мл · ч⁻¹), что в 3–4 раза превышает выход H₂ в контроле). Также была отмечена тенденция к большей стимуляции синтеза H₂ при N-лимитировании, чем при S-депривации [41].

Дефицит фосфора оказывает сходное с дефицитом серы влияние на активность ФС-2 и функционирование альтернативных путей электронного транспорта с конечным образованием H₂ [32; 42; 43]. Влияние P-депривации на работу фотосинтетического аппарата было исследовано на примере *C. reinhardtii* [32; 43]. Однако эффект P-депривации был выражен слабее по сравнению с эффектом S-депривации. Потребовалось более длительное время для установления анаэробного режима и начала стадии выделения H₂ (100 ч при P-депривации и 18–40 ч при S-депривации) [43]. Этот факт можно объяснить гораздо большими внутриклеточными запасами фосфора, чем серы [32]. Поскольку прямое исключение фосфора из среды не приводит к немедленному эффекту фосфорного голодания, был применен метод разведения [43]. При этом культуры, промытые от фосфора и разбавленные до уровня хлорофилла менее 2 мг · л⁻¹ в среде, не содержащей фосфатов, входили в анаэробно-анаэробный режим в фотобиореакторе после периода роста и производили H₂ в количествах, близких к таковым у культур с дефицитом серы. Максимальный полученный объем H₂ составил 68 мл · л⁻¹ [43].

Одним из способов снижения эксплуатационных затрат при производстве H₂ является осуществление процесса его синтеза в морской воде [42]. При данном подходе недостаток фосфора может стать эффективным методом повышения скорости фотопродукции H₂, так как недостаток серы невозможен из-за высокой концентрации сульфатов в морской воде [42].

Хотя депривация элементов минерального питания является наиболее простым и эффективным способом стимуляции клеток зеленых микроводорослей к выделению H₂, данный подход имеет недостатки, препятствующие его промышленному применению [44]. Процедура требует нескольких промывок,

производство H_2 начинается с задержкой примерно на 2 сут [36], зависит от ацетата [30] и в конечном итоге приводит к инактивации ФС-2 и деградации фотосинтетического аппарата [12; 34]. Продувка культуры инертным газом для удаления O_2 , центрифугирование с последующей сменой среды обуславливают вымывание и потерю плотности культуры. Для того чтобы избежать негативного эффекта от данных манипуляций и сделать процесс более быстрым и удобным, можно использовать метод иммобилизованных клеток. Для такой иммобилизации применяются классические гели, такие как альгинат и агар [45].

Имеются литературные данные о возможности использования химически индуцированной селекции для получения штаммов-продуцентов H_2 , характеризующихся низкой чувствительностью гидрогеназы к O_2 [21]. Данная селекция основана на токсическом воздействии метронидазола (окислителя ферредоксина) на работу фотосинтетического аппарата. Поскольку токсичность метронидазола зависит от накопления восстановленного ферредоксина, организм с активной гидрогеназой приобретает меньшую чувствительность к метронидазолу. Выжившие в присутствии метронидазола клетки демонстрировали высокую гидрогеназную активность при значительной концентрации O_2 (до 8 % парциального давления) [21].

Методы стимуляции продукции биоводорода клетками зеленых микроводорослей, предложенные в последние 20–30 лет, представлены в таблице.

Методы стимуляции продукции H_2 клетками зеленых микроводорослей
Methods of stimulation of H_2 production by green microalgae cells

Метод	Механизм действия	Источник
S-депривация	При недостатке серы нарушается синтез белков, необходимых для репарации ФС-2, вследствие чего снижается выход O_2 и устанавливаются анаэробные условия, которые требуются для активации гидрогеназы и выделения H_2	[9; 12; 34]
N-лимитирование	Дефицит азота приводит к подавлению синтеза хлорофиллов и уменьшению количества единиц фотосинтетического аппарата, а также к деградации рубиско и снижению фотохимической эффективности ФС-2	[37–41]
P-депривация	Недостаток фосфора оказывает схожее с дефицитом серы влияние на активность ФС-2 и функционирование альтернативных путей электронного транспорта с конечным образованием H_2	[32; 42; 43]
Селекция клеток с гидрогеназой, нечувствительной к O_2	Данный тип селекции основывается на токсическом действии метронидазола, являющегося сильным окислителем ферредоксина, на работу фотосинтетического аппарата. Так как токсичность метронидазола зависит от накопления восстановленного ферредоксина, организм с активной гидрогеназой приобретает меньшую чувствительность к метронидазолу, поскольку становится более доступным альтернативный путь для переноса электронов с ферредоксина	[21]

Заключение

Проанализированы механизмы образования H_2 в клетках зеленых микроводорослей и способы его стимуляции, а также приведена характеристика различных методов культивирования микроводорослей для эффективной продукции H_2 в целях использования его в качестве экологически чистого топлива. Анализ литературы показал, что на сегодняшний день наиболее эффективным и часто используемым методом стимуляции продукции биоводорода клетками зеленых микроводорослей является депривация макроэлементов минерального питания, таких как сера, азот и фосфор. В основе данного метода лежат инактивация работы ФС-2, приводящая к снижению выделения кислорода в ходе фотолиза воды, и установление анаэробии, являющегося ключевым условием образования H_2 . Однако метод депривации требует сложных манипуляций по смене среды, что препятствует его эффективному и масштабному применению. В настоящее время для преодоления ряда препятствий в развитии промышленного получения биоводорода зелеными микроводорослями ведется поиск других способов повышения эффективности этого процесса. Интерес для дальнейших исследований представляют метод селекции штаммов с гидрогеназой, нечувствительной к кислороду, совместное культивирование зеленых микроводорослей с бактериями, а также применение методов геной инженерии.

Библиографические ссылки / References

1. Niccolai A, Chini Zittelli G, Rodolfi L, Biondi N, Tredici MR. Microalgae of interest as food source: biochemical composition and digestibility. *Algal Research*. 2019;42:101617. DOI: 10.1016/j.algal.2019.101617.
2. Milledge JJ. Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 2011;10(1):31–41. DOI: 10.1007/s11157-010-9214-7.
3. Borowitzka MA. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology*. 1995;7(1):3–15. DOI: 10.1007/BF00003544.
4. Guccione A, Biondi N, Sampietro G, Rodolfi L, Bassi N, Tredici MR. *Chlorella* for protein and biofuels: from strain selection to outdoor cultivation in a green wall panel photobioreactor. *Biotechnology for Biofuels*. 2014;7(1):84. DOI: 10.1186/1754-6834-7-84.
5. Edwards PP, Kuznetsov VL, David WIF, Brandon NP. Hydrogen and fuel cells: towards a sustainable energy future. *Energy Policy*. 2008;36(12):4356–4362. DOI: 10.1016/j.enpol.2008.09.036.
6. Gaffron H, Rubin J. Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *Journal of General Physiology*. 1942;26(2):219–240. DOI: 10.1085/jgp.26.2.219.
7. Show K-Y, Lee D-J, Chang J-S. Bioreactor and process design for biohydrogen production. *Bioresource Technology*. 2011;102(18):8524–8533. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.04.055.
8. Show K-Y, Yan Y, Zong C, Guo N, Chang J-S, Lee D-J. State of the art and challenges of biohydrogen from microalgae. *Biore-source Technology*. 2019;289:121747. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121747.
9. Ghirardi ML, Zhang L, Lee JW, Flynn T, Seibert M, Greenbaum E. Microalgae: a green source of renewable H₂. *Trends in Biotechnology*. 2000;18(12):506–511. DOI: 10.1016/S0167-7799(00)01511-0.
10. Hemschemeier A, Fouchard S, Cournac L, Peltier G, Happe T. Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*: an elaborate interplay of electron sources and sinks. *Planta*. 2008;227(2):397–407. DOI: 10.1007/s00425-007-0626-8.
11. Ghirardi ML, Posewitz MC, Maness P-C, Dubini A, Yu J, Seibert M. Hydrogenases and hydrogen photoproduction in oxygenic photosynthetic organisms. *Annual Review of Plant Biology*. 2007;58:71–91. DOI: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103848.
12. Melis A, Zhang L, Forestier M, Ghirardi ML, Seibert M. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 2000;122(1):127–136. DOI: 10.1104/pp.122.1.127.
13. Benemann JR, Weare NM. Hydrogen evolution by nitrogen-fixing *Anabaena cylindrica* cultures. *Science*. 1974;184(4133):174–175. DOI: 10.1126/science.184.4133.174.
14. Khetkorn W, Rastogi RP, Incharoensakdi A, Lindblad P, Madamwar D, Pandey A, et al. Microalgal hydrogen production – a review. *Bioresource Technology*. 2017;243:1194–1206. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.07.085.
15. Basak N, Jana AK, Das D, Saikia D. Photofermentative molecular biohydrogen production by purple-non-sulfur (PNS) bacteria in various modes: the present progress and future perspective. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2014;39(13):6853–6871. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2014.02.093.
16. Ghirardi ML, Dubini A, Yu J, Maness P-C. Photobiological hydrogen-producing systems. *Chemical Society Reviews*. 2009;38(1):52–61. DOI: 10.1039/B718939G.
17. Kosourov S, Nagy V, Shevela D, Jokel M, Messinger J, Allahverdiyeva Y. Water oxidation by photosystem II is the primary source of electrons for sustained H₂ photoproduction in nutrient-replete green algae. *PNAS*. 2020;117(47):29629–29636. DOI: 10.1073/pnas.2009210117.
18. Sawyer A, Bai Y, Lu Y, Hemschemeier A, Happe T. Compartmentalisation of [FeFe]-hydrogenase maturation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Journal*. 2017;90(6):1134–1143. DOI: 10.1111/tpj.13535.
19. Happe T, Mosler B, Naber JD. Induction, localization and metal content of hydrogenase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Biochemistry*. 1994;222(3):769–774. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18923.x.
20. Meyer J. [FeFe] hydrogenases and their evolution: a genomic perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007;64:1063–1084. DOI: 10.1007/s00018-007-6477-4.
21. Ghirardi ML, Togasaki RK, Seibert M. Oxygen sensitivity of algal H₂-production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1997;63:141–151. DOI: 10.1007/BF02920420.
22. Erickson E, Wakao S, Niyogi KK. Light stress and photoprotection in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Journal*. 2015;82(3):449–465. DOI: 10.1111/tpj.12825.
23. Greenbaum E. Photosynthetic hydrogen and oxygen production: kinetic studies. *Science*. 1982;215(4530):291–293. DOI: 10.1126/science.215.4530.291.
24. Cournac L, Mus F, Bernard L, Guedeney G, Vignais P, Peltier G. Limiting steps of hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Synechocystis* PCC 6803 as analysed by light-induced gas exchange transients. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2002;27(11–12):1229–1237. DOI: 10.1016/S0360-3199(02)00105-2.
25. Cinco RM, MacInnis JM, Greenbaum E. The role of carbon dioxide in light-activated hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthesis Research*. 1993;38(1):27–33. DOI: 10.1007/BF00015058.
26. Gfeller RP, Gibbs M. Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. II. Role of plastoquinone. *Plant Physiology*. 1985;77(2):509–511. DOI: 10.1104/pp.77.2.509.
27. Gfeller RP, Gibbs M. Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Analysis of fermentative products from starch in dark and light. *Plant Physiology*. 1984;75(1):212–218. DOI: 10.1104/pp.75.1.212.
28. Gibbs M, Gfeller RP, Chen C. Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. III. Photoassimilation of acetate. *Plant Physiology*. 1986;82(1):160–166. DOI: 10.1104/pp.82.1.160.
29. Goulding KH, Merrett MJ. The photometabolism of acetate by *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Experimental Botany*. 1966;17(4):678–689. DOI: 10.1093/jxb/17.4.678.
30. Bishop NI. The influence of the herbicide, DCMU, on the oxygen-evolving system of photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1958;27:205–206. DOI: 10.1016/0006-3002(58)90313-5.
31. Tamburic B, Zemichael FW, Maitland GC, Hellgardt K. A novel nutrient control method to deprive green algae of sulphur and initiate spontaneous hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012;37(11):8988–9001. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.02.043.

32. Wykoff DD, Davies JP, Melis A, Grossman AR. The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*. 1998;117(1):129–139. DOI: 10.1104/pp.117.1.129.
33. Kosourov S, Tsygankov A, Seibert M, Ghirardi ML. Sustained hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: effects of culture parameters. *Biotechnology and Bioengineering*. 2002;78(7):731–740. DOI: 10.1002/bit.10254.
34. Zhang L, Happe T, Melis A. Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). *Planta*. 2002;214:552–561. DOI: 10.1007/s004250100660.
35. Kosourov S, Seibert M, Ghirardi ML. Effects of extracellular pH on the metabolic pathways in sulfur-deprived, H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. *Plant and Cell Physiology*. 2003;44(2):146–155. DOI: 10.1093/pcp/pcg020.
36. Scoma A, Durante L, Bertin L, Fava F. Acclimation to hypoxia in *Chlamydomonas reinhardtii*: can biophotolysis be the major trigger for long-term H₂ production? *New Phytologist*. 2014;204(4):890–900. DOI: 10.1111/nph.12964.
37. He M, Li L, Zhang L, Liu J. The enhancement of hydrogen photoproduction in *Chlorella protothecoides* exposed to nitrogen limitation and sulfur deprivation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012;37(22):16903–16915. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.08.121.
38. Philipps G, Happe T, Hemschemeier A. Nitrogen deprivation results in photosynthetic hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*. 2012;235(4):729–745. DOI: 10.1007/s00425-011-1537-2.
39. Peltier G, Schmidt GW. Chlororespiration: an adaptation to nitrogen deficiency in *Chlamydomonas reinhardtii*. *PNAS*. 1991;88(11):4791–4795. DOI: 10.1073/pnas.88.11.4791.
40. Manoyan J, Samovich T, Kozel N, Demidchik V, Gabrielyan L. Growth characteristics, biohydrogen production and photochemical activity of photosystems in green microalgae *Parachlorella kessleri* exposed to nitrogen deprivation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2022;47(38):16815–16823. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2022.03.194.
41. Manoyan J, Hakobyan L, Samovich T, Kozel N, Sahakyan N, Muravitskaya H, et al. Comparison of sulfur and nitrogen deprivation effects on photosynthetic pigments, polyphenols, photosystems activity and H₂ generation in *Chlorella vulgaris* and *Parachlorella kessleri*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2024;59:408–418. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2024.02.035.
42. Batyrova K, Gavrisheva A, Ivanova E, Liu J, Tsygankov A. Sustainable hydrogen photoproduction by phosphorus-deprived marine green microalgae *Chlorella* sp. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(2):2705–2716. DOI: 10.3390/ijms16022705.
43. Batyrova KA, Tsygankov AA, Kosourov SN. Sustained hydrogen photoproduction by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012;37(10):8834–8839. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.01.068.
44. Nagy V, Podmaniczki A, Vidal-Meireles A, Tengölics R, Kovács L, Rákhely G, et al. Water-splitting-based, sustainable and efficient H₂ production in green algae as achieved by substrate limitation of the Calvin – Benson – Bassham cycle. *Biotechnology for Biofuels*. 2018;11:69. DOI: 10.1186/s13068-018-1069-0.
45. Song W, Rashid N, Choi W, Lee K. Biohydrogen production by immobilized *Chlorella* sp. using cycles of oxygenic photosynthesis and anaerobiosis. *Bioresource Technology*. 2011;102(18):8676–8681. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.02.082.

Получена 18.05.2024 / исправлена 24.05.2024 / принята 25.05.2024.
Received 18.05.2024 / revised 24.05.2024 / accepted 25.05.2024.