

На правах рукописи



Романова Анастасия Игоревна

Запасание энергии света в энергоносителе (водород) фотосинтезирующими микроорганизмами и эффективность процесса.

1.5.21. – Физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии и физиологии фототрофных организмов Института фундаментальных проблем биологии РАН – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований РАН».

Научный руководитель:

Доктор биологических наук Цыганков Анатолий Анатольевич

Официальные оппоненты:

Соловченко Алексей Евгеньевич

Доктор биологических наук, профессор кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

Намсараев Зоригто Баирович

Кандидат биологических наук, начальник лаборатории синтетической биологии Федерального государственного бюджетного учреждения "Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт" (НИЦ "Курчатовский институт").

Ведущая организация:

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН), г. Москва.

Защита состоится «23» июня 2022 г. в 13-00 часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 24.1.138.01 по специальности 1.5.21. – «Физиология и биохимия растений» (биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, г. Москва, Ботаническая ул., 35. Телефон: +7 (499) 678-54-20; e-mail: ifr@ippras.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, г. Москва, и на сайте <https://ippras.ru/>.

Автореферат разослан « » _____ 2022 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Последние годы во всем мире принята стратегия снижения выбросов парниковых газов в атмосферу. Необходимо снизить потребление ископаемых источников энергии и перейти на альтернативные источники энергии, в частности, водород. Водород может быть получен разными путями. Причем биологический путь один из самых перспективных.

Фотобиологическое выделение водорода гетероцистными цианобактериями и микроводорослями считается идеальным процессом получения возобновляемой энергии. Они используют воду в качестве электронного донора и свет как источник энергии (Prince, Kheshgi, 2005; Tamagnini et al., 2007; Bothe et al., 2010). Для улучшения характеристик процесса выделения водорода созданы и охарактеризованы разнообразные мутанты. Так Масукавой с соавт. (Masukawa et al., 2014) были сконструированы мутанты штамма *Anabaena sp.* PCC 7120 без Hup-гидрогеназы с аминокислотными заменами dc-Q193S и dc-R284H, расположенными в непосредственной близости от FeMo-кофактора нитрогеназы. Эти модификации в нитрогеназе привели к тому, что выделение водорода не снижалось в присутствии высоких концентраций азота в газовой фазе, что может значительно снизить стоимость процесса (Masukawa et al., 2014).

Такие мутанты могут оказаться важны при биотехнологическом получении водорода. Поэтому необходимо выяснение их ранее не изученных свойств в сравнении с родительским штаммом.

Лабораторное выращивание цианобактерий для получения водорода производится с использованием различных типов фотобиореакторов (ФБР), однако ни одна из систем не является коммерчески жизнеспособной (Lindblad et al., 2002; Tsygankov et al., 2002; Touloupakis et al., 2016). В качестве недорогих ФБР Сакураи и соавт. (Sakurai et al., 2007; Sakurai et al., 2010; Sakurai et al., 2015) предложили использовать прозрачные полиэтиленовые пакеты с низкой проницаемостью для H₂. Применимость таких ФБР была проверена в лабораторных условиях с использованием мутанта ΔHup цианобактерии *Nostoc sp.* PCC 7422 (Kitashima et al., 2012). Следует отметить, что исследований на открытом воздухе очень мало, и не было предпринято попыток повысить рентабельность этого процесса за счет применения дешевых ФБР.

Анализ разных биологических способов получения H₂ показывает, что каждый из них имеет как достоинства, так и недостатки. Путем интеграции разных процессов в одну систему можно преодолеть некоторые недостатки. При этом побочные продукты одной стадии могут служить субстратами для второй стадии, в результате повышается эффективность суммарного процесса. Одним из примеров интегрированных систем является трехстадийная система, в которой на первом этапе происходит накопление биомассы микроводорослей, богатой крахмалом, за которым следует темновое брожение биомассы водорослей и, наконец, фотоферментация продуктов темнового брожения (Ike et al., 1998; Ike et al., 2001; Kim et al., 2006). Таким образом, единственным источником энергии для такой системы является энергия света. Отдельные элементы таких систем были тщательно исследованы (Текучева, Цыганков, 2012), но нет оценки общей эффективности системы, то есть отношения полученной энергии H₂ к энергии падающего света.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы было сравнить разные подходы к биологическому преобразованию энергии света в энергию H₂ с точки зрения доступности и эффективности. Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Провести сравнительный анализ фотосинтетической активности и выделения водорода у родительского штамма гетероцистной филаментной цианобактерии *Anabaena sp.* 7120 ΔNup и его мутантов dc-Q193S и dc-R284H, с точечными мутациями вблизи активного центра нитрогеназы.
- 2) Изучить возможность выделения водорода цианобактерией *Anabaena sp.* 7120 ΔNup и влияющие факторы в природных условиях в Подмосковье с использованием простейших фотобиореакторов.
- 3) Воспроизвести трехстадийную интегрированную систему получения H_2 на основе биомассы микроводорослей с использованием хемо- и фототрофных бактерий и оценить эффективность преобразования энергии на каждом этапе.

Научная новизна работы. Показано, что выделение H_2 у мутантов *Anabaena sp.* PCC7120, ΔNup dc-Q193S и dc-R284H с модификациями вблизи активного центра нитрогеназы, в отличие от родительского штамма, не ингибировалось N_2 , хотя так же ингибировалось ацетиленом, т.е. аминокислотные замены у мутантов вызвали существенные изменения в реакции, требующей 8 электронов. Вместе с тем обнаружено, что мутанты имели более низкую фотосинтетическую и нитрогеназную (водород-выделяющую) активности, пониженный температурный оптимум, а также пониженную прочность филаментов. Это препятствует их использованию в масштабированных внелабораторных экспериментах.

Впервые показано, что выделение H_2 мутантом ΔNup возможно в природных условиях летом в Подмосковье с использованием простейших ФБР — пластиковых пакетов с газобарьерным слоем. В пилотных экспериментах продолжительность и максимальная скорость были невысокими (5 суток, 20,6 мл/л в день), что может быть обусловлено неоптимальными погодными условиями, а также конструктивными недостатками простейших ФБР и особенностями используемого штамма.

Воспроизведена трехстадийная схема получения H_2 , включающая синтез биомассы зеленых водорослей, ее темновое сбраживание и фотоферментацию продуктов брожения. Впервые была определена постадийная и суммарная эффективность преобразования энергии света в H_2 в такой интегрированной системе. В целом КПД системы, без учета затрат на промежуточные стадии и фотоферментацию, оказался равным 0,55%, т.е. схема пока неэффективна для биоконверсии световой энергии.

Научно-практическое значение работы. На основе ряда характеристик оценена перспективность применения родительского штамма *Anabaena sp.* PCC 7120 ΔNup и двух мутантов с аминокислотными заменами dc-Q193S и dc-R284H для выделения водорода в лабораторных условиях и на открытом воздухе. Впервые предложены критерии для отбора мутантов с точечными заменами аминокислот вблизи активного центра нитрогеназы.

Впервые продемонстрировано использование простейших ФБР – пластиковых пакетов – для выделения H_2 цианобактериями на открытом воздухе в средней полосе России. Применение таких ФБР может значительно снизить себестоимость процесса. Тщательная регистрация изменяющихся условий внешней среды и соотнесение с ними скоростей выделения H_2 позволяет обнаружить лимитирующие/ингибирующие факторы в этом процессе.

Показана возможность получения H_2 в трехстадийной системе с фотоавтотрофным синтезом биомассы микроводорослей на первой стадии. Применение закономерностей материально-энергетического баланса позволило оценить эффективность превращения световой энергии в энергию H_2 в сопряженной

системе, как на отдельных стадиях, так и в целом. Расчеты свидетельствуют, что такая схема является недостаточно эффективной и требует дополнительных улучшений.

Основные положения, выносимые на защиту.

- 1) Показано, что выделение водорода мутантами *Anabaena sp.* 7120 ΔHup (dc-Q193S и dc-R284H) с модификациями вблизи активного центра, в отличие от родительского штамма ($K_i=300$ мМ N_2), было нечувствительно к N_2 , но сами штаммы имели пониженную фотосинтетическую и нитрогеназную активности. Показано, что у мутанта нитрогеназная активность снижалась при температуре выше 35°C , что было обусловлено пониженной прочностью филаментов. Предложены дополнительные требования к мутантам на основе сайт-направленного мутагенеза.
- 2) Показана принципиальная возможность выделения H_2 мутантом *Anabaena sp.* PCC 7120 ΔHup на открытом воздухе в простейших ФБР и проведен анализ природных факторов, оказывающих наибольшее влияние на процесс.
- 3) Определена постадийная и суммарная (0,55%) эффективность преобразования энергии света в энергию водорода в трехстадийной интегрированной системе с фотоавтотрофным синтезом биомассы микроводорослей на первой стадии, темновым сбраживанием предобработанной биомассы и заключительной фотоферментацией.

Степень достоверности и апробация результатов. Все эксперименты были выполнены в трех-пяти биологических повторностях (2-3 аналитических в каждой биологической повторности). На рисунках, содержащих по одной кривой, приведены средние результаты опытов $\pm 95\%$ доверительный интервал. На рисунках, содержащих по 2-3 кривые, доверительный интервал не указан, он не превышал 20% от среднего значения.

Результаты работы были представлены на международном форуме «Возобновляемая энергетика: пути повышения энергетической и экономической эффективности» REENFOR-2013 (Москва, Россия, 2013), Всероссийской конференции XXI Пушинские чтения по фотосинтезу «Фотосинтез и фотобиотехнология. Фундаментальные и прикладные аспекты» (Пушино, Россия, 2015), V Съезде биофизиков (Россия, Ростов-на-Дону, 2015), международной конференции «International Conference Photosynthesis Research for Sustainability in honor of Nathan Nelson and T. Nejat Veziroglu» (Пушино, Россия, 2016), 5-ой Пушинской школе-конференции "Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов" (Пушино, Россия, 2018), IX Съезде Российского Фотобиологического Общества, конференция "Современные проблемы фотобиологии" (Шепси, Россия, 2021).

Связь с научными программами. Работа выполнялась в лаборатории биотехнологии и физиологии фототрофных организмов ИФПБ РАН и ФИЦ ПНЦБИ РАН в рамках госзадания АААА-А17-117030110141 и 122041200039-0 при поддержке грантов РФФИ №15-54-50032, РФФИ №15-14-30007, 19-14-00255.

Личный вклад автора в исследование. Автор работы принимал непосредственное участие в планировании и проведении экспериментов, а также в обсуждении результатов и подготовке рукописей к публикации. Большая часть экспериментальных результатов получена лично автором или при его активном участии.

Структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, а также разделов, где изложены результаты и их обсуждение. Работа включает в себя главу с выводами и список использованной литературы. Объем работы составляет 155 страниц, в ней содержится 18 рисунков и 13 таблиц. Список литературы включает 374 источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы рассмотрены основные характеристики выделения H_2 у разных продуцентов и пути их повышения. Рассмотрены подходы к интеграции биологических процессов для получения H_2 . Отмечена возможность внелабораторного культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов в целях получения H_2 .

Глава 2. Материалы и методы исследований

Объекты исследований. Штаммы цианобактерии *Anabaena sp.* PCC 7120 ΔNup , не синтезирующей водород-поглощающую Nup -гидрогеназу и её мутанты $dc-Q193S$ и $dc-R284H$, были любезно предоставлены профессором Сакураи, университет Канагава, Япония. Родительский штамм гетероцистной филаментной цианобактерии *Anabaena sp.* PCC 7120 ΔNup и её мутанты $dc-Q193S$ и $dc-R284H$ выращивали фотоавтотрофно на среде Алена-Арнона, разбавленной в 8 раз (AA/8) с добавлением стрептомицина и спектиномицина (по 2 мкг/мл). Культуры *Chlamydomonas reinhardtii* CC124 и *Chlorella pyrenoidosa* 82T выращивали автотрофно на среде HS, барботируя смесью 2% CO_2 в воздухе при 28°C на свету. Микробный консорциум с преобладанием клостридий, выращивали в анаэробных условиях на среде для газообразующих микробных сообществ при 37°C. Пурпурную несерную бактерию *Cereibacter sphaeroides* №71 (VKM B-3534D) (*Rhodobacter sphaeroides* VKM B-3059) выращивали на среде Ормеруда с 10 mM $(NH_4)_2 SO_4$ и 20 mM лактата при 28°C.

Выделение H_2 цианобактериями в лабораторных и внелабораторных условиях. Фотосинтетическую активность определяли у культур, выросших на среде со связанным азотом. Для изучения выделения H_2 родительский штамм выращивали на среде без связанного азота, а, мутанты – на среде AA/8+N до полного исчерпания связанного азота или с промежуточным отмыванием клеток от связанного азота. Большинство экспериментов проводилось на 6-й день с использованием второго подхода.

Для изучения выделения H_2 родительским штаммом на открытом воздухе использовали пластиковые пакеты с газобарьерным слоем (36 см × 50 см) (Kitashima et al., 2012). Пакеты были размещены на экспериментальном устройстве, включающем водяную баню, стабилизирующие ремни, датчики температуры и света, подключенные к модулю измерительной системы QMbox (Технолоджи, Россия), компьютер для записи данных. Культивирование проводилось на крыше четырехэтажного здания в Московской области летом 2016 г.

В эксперименте №1 клетки концентрировали и отмывали от связанного азота (Хл 23,3 мг/л). Газовая фаза – аргон с 5% CO_2 , и в ФБР1 добавлено 3,3% N_2 . В эксперименте № 2 культура (Хл ~ 4,3 мг/л) предварительно была адаптирована к высоким интенсивностям света. Эксперименты начали при пониженных интенсивностях света с использованием световых фильтров, далее повышая интенсивность. Воздух с 0,5-1,0% CO_2 последовательно барботировали через ФБР3 и 4 со скоростью 20-100 мл/мин.

Образцы газовой фазы (0,5 мл) отбирали из ФБР с использованием блокируемых шприцев в 8:00 и 20:00. В эксперименте № 1 выход и скорость выделения H_2 были рассчитаны на основе его концентрации и объема газовой фазы ФБР. В эксперименте № 2 скорость выделения и суммарное образование H_2 была рассчитано на основе его концентрации и скорости воздушного потока.

Выделение H_2 в сопряженной системе. Для получения биомассы микроводоросли *C. reinhardtii* и *Chl. pyrenoidosa* культивировали на среде HS на свету в режиме турбидостата. Культуру барботировали воздухом с 3% CO_2 при 137 мл/мин

на свету. Культуру центрифугировали (4500 об/мин, 15 мин) и хранили при -10°C . Размороженную биомассу *C. reinhardtii* (187,5 г или 15 г АСБ) инкубировали в 112,5 мл 3,5 N H_2SO_4 при 120°C , 1,2 атм, 30 мин. Перед ферментацией рН гидролизата доводили до 6,8. Ферментацию проводили анаэробно под N_2 при 37°C с использованием микробного консорциума. Культуру нейтрализовали до рН 7,0 и центрифугировали (4500 об/мин, 15 мин). Супернатант автоклавировали, снова центрифугировали и использовали в качестве ферментационной жидкости (ФЖ). Для культивирования пурпурных бактерий *Cr. sphaeroides* №71 использовали исходную или разбавленную ФЖ. Газовую фазу замещали аргоном. Пробирки инкубировали при 28°C при освещении 60 Вт/м².

Измерение фотосинтетической активности. Фотосинтетическое выделение кислорода измеряли при помощи электрода Кларка, используя разные интенсивности света (10-1700 мкмоль квантов/(м² с)) и температуры (16-35⁰С). Скорость фотосинтеза рассчитывали, как алгебраическую разность скоростей выделения O_2 на свету и поглощения в темноте.

Измерение нитрогеназной активности полярографическим или газохроматографическим методом. Выделение H_2 в зависимости от интенсивности света и температуры измеряли при помощи электрода Кларка при непрерывном перемешивании 100 об/мин. Ячейку продували аргоном и концентрированную культуру (1 мл) вносили анаэробно в потоке аргона. Скорость фотовыделения H_2 рассчитывали, как алгебраическую разность скоростей выделения водорода на свету и в темноте.

В экспериментах по изучению влияния N_2 и ацетилена концентрацию водорода определяли газохроматографически («ЛХМ80», Москва, Россия). Исследуемые культуры, порциями по 3,5 мл (10 мг Хл/л) помещали в 16 мл пробирки Хангейта. Газовую фазу заменяли на аргон, затем добавляли 4,8-100% N_2 или 2,3-20% C_2H_2 . Пробирки инкубировали на свету при 27°C с регулярным отбором проб.

Расчеты энергетической эффективности в сопряженной системе. Расчеты проводились с использованием закономерностей материально-энергетического баланса (Erickson et al., 1978; Минкевич, 2005). Содержание энергии в биомассе сухих водорослей (Q_6) рассчитывали по уравнению 1:

$$Q_6 (\text{кДж/г}) = 112,8 \times \gamma / M_6, (1)$$

где 112,8 - тепло, выделяемое при сгорании биомассы, которая содержит 1 грамм-атом углерода, со степенью восстановленности γ . M_6 представляет собой расчетную молекулярную массу биомассы, равную 25,564 и 25,532 г/моль для *C. reinhardtii* и *Chl. pyrenoidosa* соответственно.

Для расчета γ измеряли содержание СНН. Содержание О рассчитывали, предполагая, что биомасса содержит 95% СННО. Согласно нашим измерениям, эмпирический элементный состав *C. reinhardtii* и *Chl. pyrenoidosa* был $\text{CH}_{0,128}\text{N}_{0,178}\text{O}_{0,684}$ и $\text{CH}_{0,132}\text{N}_{0,192}\text{O}_{0,666}$, соответственно. Степень восстановленности биомассы (γ) рассчитывали на основе уравнения 2:

$$\gamma = 4 + x + 3y - 2z, (2)$$

где x, y, z представляют собой количество атомов Н, N, О, соответственно, исходя из состава биомассы. Таким образом, γ составляет 3,294 и 3,376, а содержание энергии в биомассе составляет 14,5 и 14,9 кДж/г для *C. reinhardtii* и *Chl. pyrenoidosa*, соответственно.

Эффективность преобразования энергии света в энергию, накопленную в биомассе (η), рассчитывали, как показано в уравнении 3:

$$\eta (\%) = 100 E_{\delta} / E_{\text{св}}, (3)$$

где E_{δ} - энергия теплового сгорания биомассы, произведенной ФБР в течение 1 часа, $E_{\text{св}}$ - энергия падающего света на ФБР в течение 1 часа.

Энергия теплового сгорания биомассы, произведенной ФБР в течение 1 часа (E_{δ}), была рассчитана следующим образом (уравнение 4):

$$E_{\delta} (\text{кДж/ч}) = 112,8 \times \mu \times C \times \gamma \times V, (4)$$

где μ – удельная скорость роста (ч^{-1}), C – стационарная концентрация биомассы в ФБР, измеренная как число молей углерода в биомассе на 1 л культуры (моль/л), V – объем культуры, равный 1,125 и 1,5 л для *C. reinhardtii* и *Chl. pyrenoidosa* соответственно.

Энергия падающего света за 1 час рассчитывалась следующим образом (уравнение 5):

$$E_{\text{св}} (\text{кДж/ч}) = 3600 \times I_0 \times S / 1000, (5)$$

где I_0 (Вт/м^2) - интенсивность падающего света, S (м^2) - освещенная поверхность культуры, равная 0,083 и 0,095 м^2 для *C. reinhardtii* и *Chl. pyrenoidosa*, соответственно. Удельная энергия сгорания субстрата (Q_c) была рассчитана для ацетата, лактата и глюкозы на основе их формулы $C_xH_yO_z$:

$$Q_c (\text{кДж/г}) = 112,8 \times \gamma / M_c, (6)$$

где γ равно 4, а M_c равно 30 (формула общего типа CH_2O). Таким образом, удельная энергия ацетата, лактата и глюкозы была одинаковой и составила 15,04 кДж/г.

Удельная энергия сгорания H_2 составляет 143,1 кДж/г.

Глава 3. Результаты и их обсуждение

1. Сравнительное исследование фотосинтетической и H_2 выделяющей активности у родительского штамма *Anabaena sp.* PCC 7120 ΔNup и у мутантов dc-Q193S, dc-R284N с модифицированной нитрогеназой. Перед экспериментами цианобактерии адаптировали к росту с барботированием воздушно-углекислотной смесью для уменьшения гетерогенности культур. Были подобраны условия центрифугирования и перемешивания цианобактерий в ячейке Кларка, чтобы максимально сохранить целостность филаментов.

Влияние интенсивности света на скорость фотосинтеза при разных температурах. Зависимость фотосинтетической активности от интенсивности света (10-1700 мкмоль квантов/ м^2 с)) изучали при разных температурах (16-35 $^{\circ}\text{C}$). Как видно из Рис. 1, скорость выделения кислорода родительским штаммом ΔNup (А) и мутантами dc-Q193S (Б), dc-R284N (В) увеличивалась с повышением интенсивности света. Причем у всех штаммов характер зависимости был сходным при разных температурах: 16, 20, 27, 35 $^{\circ}\text{C}$, за исключением родительского штамма ΔNup при 16 $^{\circ}\text{C}$, где активность снижалась при интенсивности света выше 300 мкмоль квантов/ м^2 с), т.е. имело место фотоингибирование.

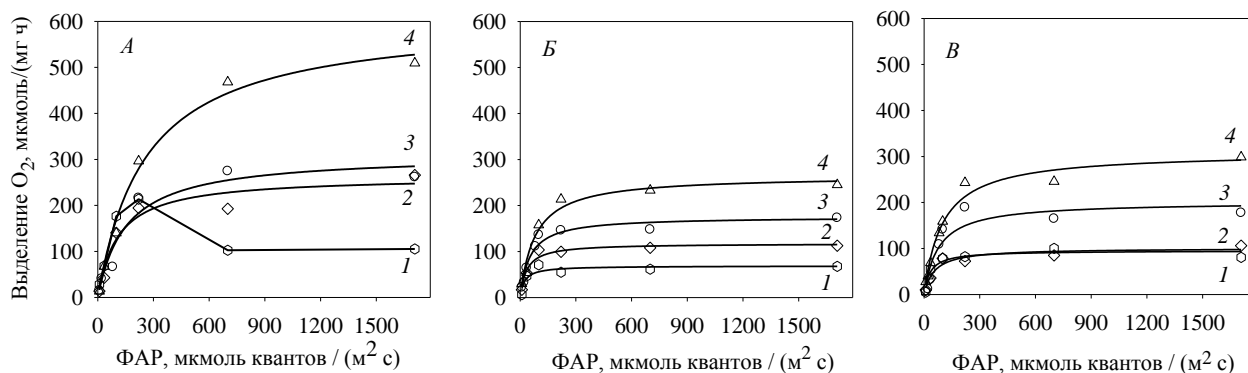


Рисунок 1. Фотосинтетическое выделение кислорода родителем штаммом Δ Hup (А) и мутантами dc-Q193S (Б), dc-R284H (В) в зависимости от интенсивности света при разных температурах (1 – 16⁰С; 2 – 20⁰С; 3 – 27⁰С; 4 – 35⁰С).

Максимальная скорость выделения кислорода у всех штаммов была при 35⁰С. В одинаковых условиях скорость выделения кислорода у родительского штамма была выше по сравнению с мутантами (Рис. 1). Для количественного анализа экспериментальные данные по влиянию интенсивности света (Рис. 1) аппроксимировали по уравнению Михаэлиса-Ментен. Все значения удовлетворительно описываются данным уравнением, коэффициент корреляции $R > 0,91$. Максимальная расчетная скорость фотосинтеза (как и полученная экспериментально) у всех штаммов была выше при 35⁰С, причем при каждой из проверенных температур она была выше у родительского штамма Δ Hup.

Константы насыщения светом при всех температурах были ниже у dc-Q193S и dc-R284H. Так, при температуре 27⁰С родительский штамм имел константу насыщения светом K_s – 153 мкмоль квантов/(м² с), по сравнению с 52 и 76 мкмоль квантов/(м² с) для мутантов (Рис. 1). Фотоингибирование имело место только при низкой температуре и только у родительского штамма Δ Hup (Рис. 1А).

Влияние интенсивности света на выделение H₂. Выделение H₂ измеряли полярографическим методом при 27⁰С и разных интенсивностях света (10-2800 мкмоль квантов/(м² с)) у культур с максимальной активностью, т.е. на 5-7 день.

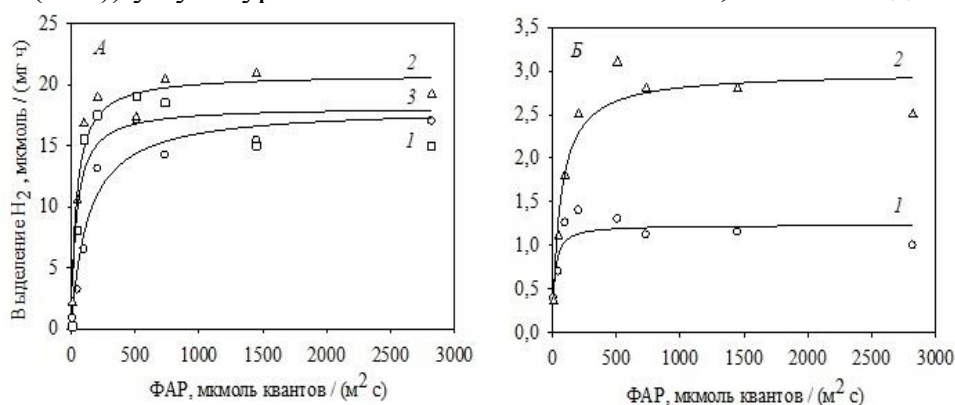


Рисунок 2. Влияние интенсивности света на скорость выделения водорода родителем штаммом Δ Hup (А) и мутантом dc-Q193S (Б) на разных стадиях роста (1 – 5 день; 2 – 6 день; 3 – 7 день).

Как видно из Рис. 2, скорость выделения водорода родителем штаммом Δ Hup и мутантом dc-Q193S увеличивалась с увеличением интенсивности света до ~500 мкмоль квантов/(м² с) и не изменялась до 2820 мкмоль квантов/(м² с). При этом более высокая скорость была у родительского штамма Δ Hup. Характер зависимости был одинаков для культур, отличающихся по возрасту. Поскольку 500 мкмоль квантов/(м² с) оказалось насыщающей интенсивностью света для всех штаммов, такую интенсивность использовали в дальнейших экспериментах.

По результатам аппроксимации экспериментальных данных на 6 день (Рис. 2), расчетная максимальная скорость выделения H₂ у родительского штамма (20,8 мкмоль H₂/мг Хл. а/час) была почти в 7 раз выше, чем у мутанта dc-Q193S (3 мкмоль H₂/мг Хл. а/час). Константы насыщения светом K_s у них мало отличались (41 и 62 мкмоль квантов/(м² с)). Это заведомо ниже максимальной дневной интенсивности света на

открытом воздухе. Ингибирования выделения H_2 при высоких интенсивностях света, близких к естественному дневному освещению, в описанных кратковременных экспериментах не наблюдалось. Наши результаты сопоставимы с результатами для *Anabaena* sp. PCC 7120 *hup* L (Marques et al., 2011).

Влияние температуры на выделение H_2 . В этой серии экспериментов выделение H_2 также измеряли полярографическим методом. Скорость выделения H_2 родительским штаммом Δ Hup возрастала при повышении температуры до $45^\circ C$, однако только в диапазоне $20-34^\circ C$ зависимость была линейной (Рис. 3А).

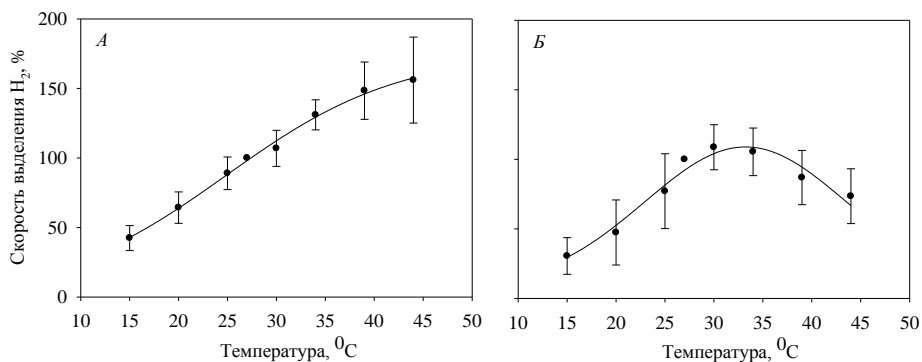


Рисунок 3. Влияние температуры на скорость выделения водорода родительским штаммом Δ Hup (А) и мутантом dc-Q193S (Б). 100% активность для родительского штамма Δ Hup – $22 \text{ мкмоль } H_2/(\text{мг ч})$ и для dc-Q193S – $3 \text{ мкмоль } H_2/(\text{мг ч})$.

Скорость выделения H_2 мутантом dc-Q193S линейно возрастала при увеличении температуры от 20 до $30^\circ C$, а выше $34^\circ C$ снижалась (Рис. 3Б). Таким образом, водород-выделяющая активность мутанта более чувствительна к температуре. Используя линейный участок зависимости, мы рассчитали некоторые параметры процесса. Так, энергия активации для родительского штамма составила $43,3 \text{ кДж/моль}$, а для мутанта dc-Q193S – $61,3 \text{ кДж/моль}$. Температурный коэффициент Q_{10} для родительского штамма оказался равным $1,9$, а для мутанта – $2,4$. Установлено, что при повышении температуры от $27^\circ C$ до $45^\circ C$, а также при понижении до $15^\circ C$ (и перемешивании) целостность филаментов у мутанта dc-Q193S, в отличие от родительского типа, сильно нарушалась: наблюдали разрыв нитей и свободноплавающие гетероцисты. При $27^\circ C$ доля свободных гетероцист составляла $1,2\%$, а при $45^\circ C$ и $15^\circ C$ – $11,4$ и $8,6\%$, соответственно. У родительского штамма при $27^\circ C$ доля свободных гетероцист составляла $0,4\%$, а при $45^\circ C$ и $15^\circ C$ – $1,0$ и $2,0\%$, соответственно. Таким образом, пониженная активность мутанта при неоптимальных температурах объясняется дезинтеграцией их филаментов и нарушением связи гетероцист с вегетативными клетками.

Полученные в наших экспериментах скорости выделения H_2 у родительского штамма Δ Hup были близки, а у мутантов – ниже по сравнению с опубликованным ранее (Masukawa et al., 2014). Это может объясняться высокой чувствительностью мутанта к механическим воздействиям в процессе подготовки культуры и самого анализа, что может быть связано с азотным голоданием или же с особенностями действия кассеты устойчивости к антибиотику, введенной в мутанты.

Влияние молекулярного азота на выделение H_2 . В этих экспериментах концентрацию H_2 определяли газохроматографически. При этом азот вводился в газовую фазу, что позволило использовать до 100% азота в газовой фазе (570 мкМ в жидкости). Как видно из Рис. 4, при добавлении $>57 \text{ мкМ } N_2$ ($>10\% N_2$) скорость выделения водорода у родительского штамма заметно снижалась, а при 300 мкМ

наблюдали 50% ингибирование. Однако даже при 570 мкМ сохранялось около 40% активности.

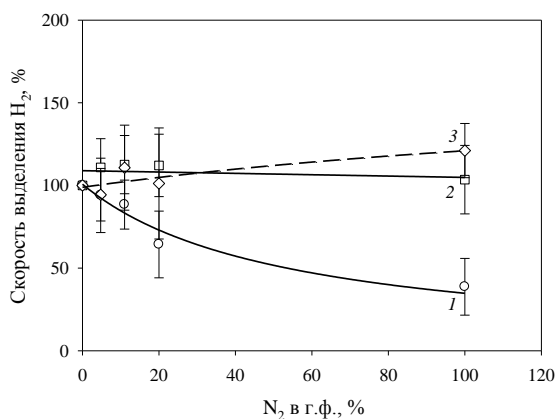


Рисунок 4. Влияние N₂ на скорость выделения водорода родительским штаммом ΔNup (1) и мутантами dc-Q193S (2), dc-R284H (3) (100% N₂ = 570 мкМ/л культуры при 27⁰С). 100% активность – 25, 17 и 18 мкмоль H₂/(мг ч) для родительского штамма ΔNup и мутантов dc-Q193S, dc-R284H, соответственно.

В отличие от этого выделение H₂ у мутантов не ингибировалось даже при 570 мкМ N₂ (Рис. 4), что подтверждает данные Масукавы (Masukawa et al., 2014). По-видимому, это связано с отсутствием потребления H₂ на синтез азотсодержащих соединений в отсутствие Nup-гидрогеназы.

Влияние ацетилена на выделение H₂ родительским штаммом и мутантами.

В этой серии экспериментов выделение H₂ также измеряли методом ГХ, при этом 20% ацетилена в газовой фазе соответствовало 7,7 мкМ в жидкости. Выделение H₂ у всех трех штаммов цианобактерий падало в 2-5 раз уже при 0,9 мкМ (2,3%) ацетилена и продолжало снижаться с увеличением концентрации ацетилена до 7,7 мкМ (Рис. 5).

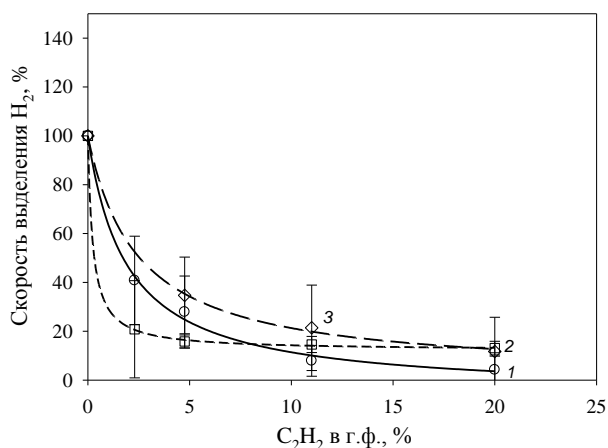


Рисунок 5. Влияние C₂H₂ на скорость выделения водорода родительским штаммом ΔNup (○) и его мутантами dc-Q193S (□), dc-R284H (◇) (100% C₂H₂ = 38,6 мкМ/л при 27⁰С). 100% активность – см. подпись к Рис. 4.

При 0,9 мкМ (2,3%) ацетилена наиболее сильно снижалась активность у мутанта dc-Q193S (Рис. 5). В среднем 50% ингибирование у всех штаммов достигалось при концентрации ацетилена 0,4-1,1 мкМ. Хотя наши эксперименты, в отличие от экспериментов Масукавы (Masukawa et al., 2014), проводились в широком диапазоне концентрации ацетилена (2,3-12%), результаты двух исследовательских групп близки. Поскольку N₂ не ингибирует выделение водорода и не используется для роста у мутанта dc-Q193S, можно полагать, что данная точечная мутация приводит к потере способности нитрогеназы к накоплению 8 электронов, в то время как способность принять два электрона и передать их молекуле субстрата практически не нарушена.

Для внелабораторных экспериментов нами был выбран родительский штамм, так как он показал более высокую активность и большую прочность филаментов.

Таким образом, основная цель получения мутантов, способных к выделению H₂ в присутствии высоких концентраций N₂, которую поставили авторы мутантов, достигнута. Однако, предоставленные мутанты практически неспособны расти с использованием N₂, обладают пониженной фотосинтетической и нитрогеназной

активностями, а также их филаменты более хрупки. Это не позволяет использовать их в дальнейших экспериментах. Можно предложить следующие требования к подобным мутантам:

1. Мутанты должны расти с использованием N_2 , хоть и с пониженной скоростью. Только при этом можно рассчитывать на длительное выделение H_2 .
2. Мутанты должны обладать скоростью фотосинтеза не ниже, чем у родительского штамма, поскольку свет является единственным источником энергии для выделения H_2 . Более того, перспективным является использование в качестве родительского штамма цианобактерии, обладающей еще более высокой скоростью роста и фотосинтеза.
3. Мутанты должны обладать более прочными филаментами.

Дальнейший этап работы был направлен на выяснение способности родительского штамма выделять водород в природных условиях. Вследствие указанных выше недостатков мутантов, для этого исследования нами был выбран родительский штамм.

2. Внелабораторные эксперименты по получению H_2 за счет цианобактериальных мутантов с использованием простых ФБР. В качестве недорогих ФБР Сакураи и соавт. (Sakurai et al., 2007) предложили большие прозрачные пластиковые пакеты с низкой проницаемостью для водорода, которые до наших экспериментов были протестированы в лабораторных условиях.

Мониторинг природных условий. Непрерывный мониторинг показал, что в эксперименте № 1 (Рис. 6а) средняя дневная температура составляла 21, максимальная – 31, минимальная – 16°C. Среднесуточная освещенность составила 290, максимальная 1520, минимальная <10 мкмоль квантов/(м² с). Во время эксперимента № 2 (Рис. 6б) средняя дневная температура составляла 21, максимальная – 31, минимальная – 15°C. Средняя дневная освещенность составляла 340, максимальная – 1650, минимальная – <10 мкмоль квантов/(м² с).

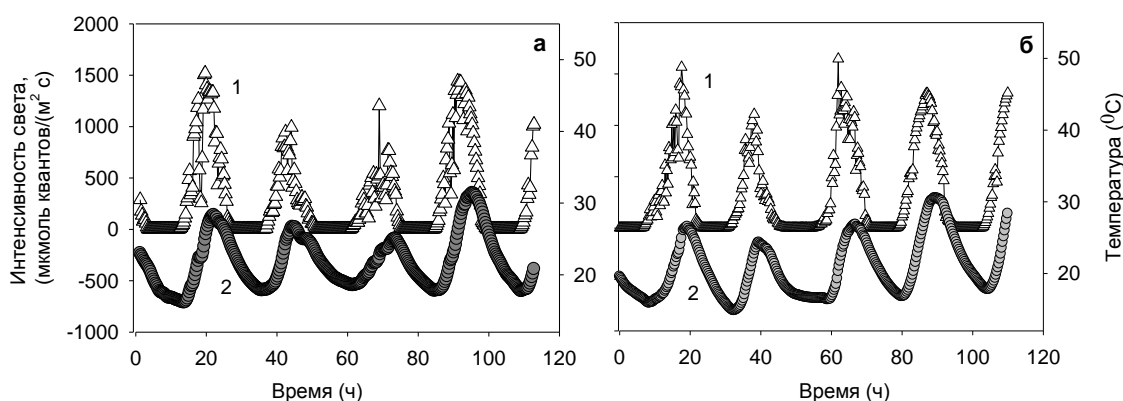


Рисунок 6. Мониторинг интенсивности света (1) и температуры (2) в эксперименте № 1 (а, 20-25 июля 2016 г.) и в эксперименте № 2 (б, 18-23 августа 2016 г.). Начало эксперимента № 1 в 14:00, первое измерение в 20:00 (0 точка). Начало эксперимента № 2 в 17:00 (0 точка), первое измерение в 13:00 следующего дня (точка 20 ч).

Влияние молекулярного азота, температуры и интенсивности света. В эксперименте №1 оба ФБР были заполнены аргоном. Поскольку ранее было показано, что присутствие низких концентраций N_2 (1,2-3%) увеличивает продолжительность процесса (Masukawa et al., 2014), поэтому в газовую фазу ФБР 1 было добавлено 3,3% N_2 . Оказалось, что кинетики накопления H_2 были одинаковыми в обоих ФБР (Рис. 7а)

в течение по крайней мере 5 суток. Максимальные скорости выделения H_2 наблюдались в полдень, но эти максимальные скорости варьировались в течение периода наблюдения (Рис. 7б). Снижение максимальной скорости на 2 и 3 сутки коррелировало с более низкой дневной температурой и освещенностью (Рис. 7б), с увеличением которых на 4 сутки скорость образования H_2 увеличивалась.

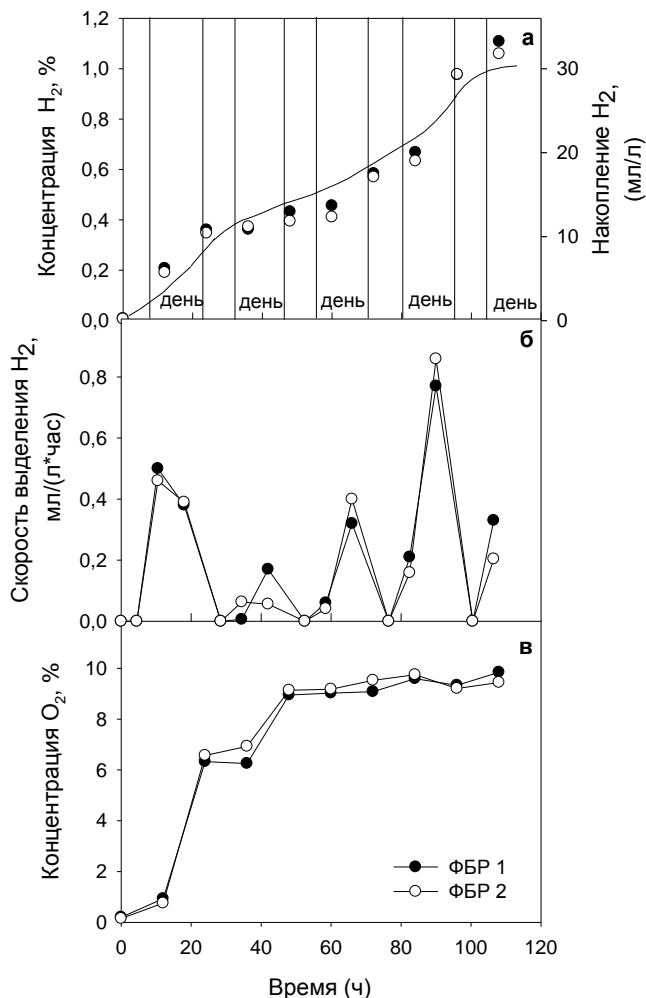


Рисунок 7. Концентрация и накопление водорода (а), скорость выделения водорода (б) и концентрация кислорода (в) в эксперименте № 1. В газовую фазу ФБР 1 изначально добавили 3,3% N_2 .

Влияние интенсивности света на выделение H_2 . Поскольку интенсивность света при лабораторном выращивании цианобактерий была 30 мкмоль квантов/ $(m^2 \text{ c})$, а на открытом воздухе в полуденные часы интенсивность света достигала 1400-1500 мкмоль квантов/ $(m^2 \text{ c})$, было высказано предположение, что неадаптированные культуры могут испытывать фотоингибирование. Поэтому в следующих экспериментах, инокулят постепенно адаптировали к высокой интенсивности света, затем снижая ее с помощью фильтров. В отличие от эксперимента №1, в эксперименте №2 пакеты с цианобактериями

продуvalи воздухом с 5% CO_2 .

Как максимальная, так и средняя скорость выделения H_2 (в дневное время) были самыми низкими в незатененной культуре при 1400 мкмоль квантов/ $(m^2 \text{ c})$ (табл. 1), что свидетельствует о возможности фотоингибирования.

Таблица 1. Влияние интенсивности света на скорость выделения H_2 (в дневное время) в эксперименте № 2.

Интенсивность света ¹ , мкмоль квантов/ $(m^2 \text{ c})$	Скорость выделения H_2 , мл/л*час	
	средняя	максимальная
220	0,22±0,14	0,72
330	0,32±0,07	0,36
650	0,20±0,07	0,48
1400	0,13±0,05	0,25

¹ Интенсивность света в полдень с затенением или без него

Эти данные (Табл. 1) отличаются от данных эксперимента № 1, где не наблюдалось ингибирования светом. Мы можем объяснить это более высокой (в ~5

раз) концентрацией Хл, а также более низкой концентрацией O_2 в эксперименте № 1, где не было протока воздуха, и культура находилась под аргоном. Следует отметить, что в краткосрочных (2 мин) экспериментах у клеточных суспензий той же культуры, ингибирования не наблюдалось даже при 2800 мкмоль квантов/(m^2 с). В наших экспериментах при различной интенсивности света не было существенных различий в концентрациях O_2 в газовой фазе (не показано).

Влияние утренней температуры на скорость выделения H_2 утром. При анализе выделения H_2 в утренние часы обнаружено, что низкие скорости выделения водорода коррелировали с более низкой температурой утром (Рис. 8) и предшествующей ночью (не показано).

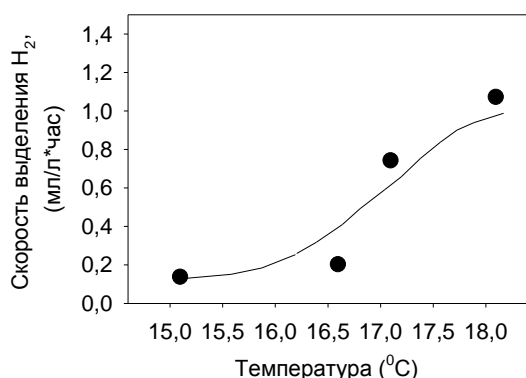


Рисунок 8. Влияние утренней температуры на скорость выделения водорода утром в ФБР 1 и 2 (эксперимент № 1).

Снижение биологической и биохимической активности с понижением температуры закономерно, но это снижение не должно быть столь драматичным (Jensen, Cox, 1983). В наших экспериментах активность падала в 5 раз при снижении температуры с 18,1 до

16,6°C. Причиной столь резкого снижения являлось, возможно, наложение других факторов. В лабораторных экспериментах мы показали, что фотосинтетическая активность этого штамма ингибировалась при низкой температуре (16°C) и высокой интенсивности света (>300 мкмоль квантов/(m^2 с)). Хотя средняя интенсивность света по утрам во внелабораторных экспериментах составляла около 100 мкмоль квантов/(m^2 с), а средняя температура 15,1-16,6°C, однако продолжительность воздействия была намного больше. Поэтому фотоингибирование может быть одним из объяснений зависимости, представленной на Рис. 8. В эксперименте №1 добавление 3,3% N_2 к газовой фазе Ag не влияло ни на скорость выделения H_2 , ни на его суммарное накопление, ни на продолжительность процесса (Рис. 7 а,б). Однако следует признать, что эксперимент был достаточно коротким, вследствие, видимо, некорректного доведения рН в отсутствие перемешивания. Тем не менее, хорошее совпадение результатов, полученных в двух ФБР в течение 5 дней, свидетельствует о воспроизводимости процесса.

Сравнительный анализ двух экспериментов на открытом воздухе. Средняя объемная скорость выделения H_2 не превышала 7,2-7,4 мл/л в сутки в течение 5 дней, тогда как расчетная максимальная скорость составляла 18,5-20,6 мл/л в сутки, хотя фактически она сохранялась в течение лишь нескольких часов. Максимальная скорость в расчете на 1 мг Хл составила 3,8 мл/сут в эксперименте № 2 с более низким содержанием Хл, а максимальное накопление H_2 достигало 33,2 мл/л в эксперименте №1. По сравнению с лучшими экспериментами на открытом воздухе (Lindblad et al., 2002; Tsygankov et al., 2002) довольно короткая продолжительность и низкие значения продукции H_2 в нашем исследовании могут быть обусловлены несколькими причинами: простейшая конструкция ФБР, плохое перемешивание и гетерогенность культуры, неконтролируемый рН, неоптимальные природные условия. В качестве дополнительного недостатка таких ФБР следует отметить низкую надежность

полиэтиленовых пакетов при использовании без механической защиты. Фактически, некоторые пакеты были забракованы после начала экспериментов из-за повреждений.

Тем не менее, наши первые эксперименты на открытом воздухе доказывают, что получение H_2 за счет энергии света с помощью цианобактерий в Московской области принципиально возможно, однако требует значительных улучшений, чтобы иметь практическое значение.

3. Использование сопряженной системы для получения H_2 и оценка эффективности преобразования энергии в ней. Нами предпринята попытка получения H_2 в сопряженной биологической системе, а также анализа эффективности преобразования энергии на разных стадиях и в целой системе с использованием закономерностей материально-энергетического баланса (Erickson et al., 1978; Минкевич, 2005).

Выращивание биомассы микроводорослей. Продукцию биомассы зеленых микроводорослей изучали с использованием *C. reinhardtii* CC124 и *Chl. pyrenoidosa* 82T в условиях турбидостатного культивирования в широком диапазоне интенсивностей света от 9,7 до 64,1 Вт/м².

Скорость роста *C. reinhardtii* CC124 увеличивалась с увеличением интенсивности света от 9,7 до 38,5 Вт/м² и достигала максимума 0,110-0,115 ч⁻¹ при насыщающей интенсивности 38,5-64,1 Вт/м² без признаков фотоингибирования (Табл. 2). Это совпадает с данными, ранее полученными для *C. reinhardtii* в диапазоне световой интенсивности 15-60 Вт/м² (Tsygankov et al., 2006; Oncel, Sukan, 2011).

Таблица 2. Влияние интенсивности падающего света на скорость роста и эффективность преобразования энергии света у *C. reinhardtii* CC124.

I_0 , (Вт/м ²)*	$E_{св.}$, (кДж/ч)	Скорость роста, μ (час ⁻¹)	Концентрация биомассы		Выход биомассы, мг/ч на ФБР	E_0 , (кДж/ч)	η , (%)
			г/л	моль/л			
9,7	2,9	0,011	0,22	0,009	0,11	0,04	1,4
14,1	4,2	0,046	0,27	0,011	0,59	0,20	4,8
18,7	5,6	0,057	0,27	0,011	0,71	0,26	4,6
29,5	8,8	0,079	0,24	0,009	0,80	0,30	3,4
38,5	11,5	0,110	0,24	0,009	1,11	0,41	3,6
64,1	19,2	0,115	0,27	0,011	1,42	0,53	2,8

*Интенсивность падающего света 9,7-64,1 Вт/м² соответствует 36,7-256,6 мкмоль квантов/(м² с).

Концентрация биомассы в ФБР составляла 0,25±0,02 г/л. С увеличением скорости потока увеличивался выход биомассы и заключенной в ней энергии (E_0), которая достигала 0,53 кДж/ч (Табл. 2). Энергия падающего света за 1 ч ($E_{св.}$) увеличивалась пропорционально интенсивности падающего света. Однако эффективность преобразования энергии света в энергию, накопленную в биомассе, была максимальной (4,8-4,6%) при низкой интенсивности света 14,1-18,7 Вт/м², когда скорость роста составляла 40-50% от максимума. Таким образом, оптимальные условия для скорости роста заметно отличались от таковых для эффективности преобразования световой энергии. В аналогичных исследованиях эффективность преобразования энергии света у *Chl. pyrenoidosa* 82T оказалась равной 5,5%.

Эти результаты согласуются с опубликованными данными об эффективности преобразования световой энергии у микроводорослей 0,2-6,3% (Klass, 1998; Weyer et al., 2010; Wobbe, Remacle, 2015). Следует отметить, что этот параметр часто

рассчитывали по отношению к поглощенной световой энергии, имея в виду, что непоглощенный (прошедший через культуру) свет может в дальнейшем использоваться в других процессах. Однако интенсивность прошедшего через суспензию света намного ниже по сравнению с падающим светом (10-12% в настоящем исследовании). Кроме того, прошедший через культуру свет представляет собой рассеянный свет с измененным спектральным составом, следовательно, его использование является непродуктивным. Поэтому в настоящей работе расчеты проводились на основе энергии падающего света.

Предобработка сырой биомассы микроводорослей. Полученную биомассу *C. reinhardtii* СС124 далее подвергали кислотному гидролизу. Это привело к увеличению общего количества углеводов в растворимой фракции от 44,8 до 229,7 мг/г АСБ, в т.ч. концентрация глюкозы увеличилась с 0,09 до 4,3 мг/г сухого веса.

Темновая анаэробная ферментация гидролизата биомассы микроводорослей. Темновую анаэробную ферментацию гидролизата *C. reinhardtii* проводили с использованием анаэробного консорциума с преобладанием клостридий. Полученная в результате брожения ФЖ охарактеризована в Таблице 3. Количество общих углеводов уменьшилось на 92%, т.е. углеводы потреблялись, при этом образовывались органические кислоты: ацетат (20 мМ) и лактат (35 мМ). Общее количество H_2 составило 5,8 ммоль на 1 л ФЖ (табл. 3), или 0,14 моль/моль глюкозы. Низкий выход H_2 , вероятно, был следствием его потребления водород-поглощающими бактериями консорциума.

Таблица 3. Продукты анаэробной темновой ферментации гидролизата *C. reinhardtii*.

Субстрат/ продукты	Концентрация субстрата/продуктов		Энергетическая ценность, кДж**		Содержание углерода, мМ
	мМ	мг/г АСБ	на 1 г АСБ	на 100 кДж биомассы	
<u>В гидролизате:</u>					
Общие углеводы	42,5±1	230,00	3,46	23,86	255,0
<u>В ФЖ*:</u>					
Общие углеводы	3,1±0,1	18,00	0,27	1,86	18,6
H_2	5,8	0,34	0,05	0,34	
CO_2	4,5	14,00	-	-	4,5
Ацетат	20,0±0,2	36,00	0,54	3,72	40
Лактат	35,0±1,7	99,00	1,49	10,28	105
Всего	-	-	2,35	16,21	168,1

* 1 л ФЖ соответствует начальному АСБ 33,3 г *C. reinhardtii*

Содержание углерода в анализируемых продуктах ферментации было около 65,9% от содержания углерода в субстрате (гидролизате). Это, вероятно, означает, что некоторые продукты ферментации не были учтены.

Исходное содержание энергии в углеводах гидролизата составило 3,46 кДж/г (Табл. 3), а в потребленных углеводах – 3,19 кДж/г. Общее содержание энергии в измеренных продуктах ферментации (ацетат, лактат, водород и остаточная глюкоза) составляло 2,35 кДж/г. Таким образом, эффективность преобразования энергии потребленных углеводов в энергию измеренных продуктов брожения составляла 68% (вероятно, цифра занижена, поскольку измеряли лишь ограниченный спектр продуктов). При этом эффективность преобразования энергии потребленных углеводов в H_2 составила всего 1,6%. Если же принять во внимание начальное

содержание энергии в исходной биомассе водорослей, равное 14,5 кДж/г АСБ, то эффективность преобразования энергии в продукты брожения и H₂ составит 6,2 и 0,3% соответственно.

Фотоферментация с использованием ФЖ. Используя 1 л ФЖ известного состава (Табл. 3), теоретически можно было получить 80 ммоль H₂ из ацетата, 210 ммоль из лактата и 37,2 ммоль из глюкозы, всего 327,2 ммоль H₂ на 1 л ФЖ. Реальное культивирование *Cr. sphaeroides* №71 на неразбавленной/разбавленной ФЖ не приводило к образованию H₂, хотя наблюдали рост бактерий и потребление лактата (80%) и ацетата (100%) (Табл. 4). Следовательно, используемая среда была пригодна для роста пурпурных бактерий, но не для образования H₂, что было, очевидно, связано с высоким уровнем содержания аммония (22,4 мМ), который подавляет синтез и ингибирует активность нитрогеназы. Другими словами, в испытываемой нами трехстадийной системе возможно получение биомассы пурпурных бактерий, богатой пигментами, убихинонами, аминокислотами, липидами, но такая система уже лежит вне области наших задач.

Таблица 4. Характеристики культуры *Cr. sphaeroides* №71, выросшей на ФЖ (разбавленной дистиллированной водой).

ФЖ	Бхл (мг/л)	Белок (мг/л)	NH ₄ ⁺ (мМ)	Лактат (мМ)	Ацетат (мМ)	Глюкоза (мМ)	H ₂ (ммоль/л)
50%	61,0±1,4	2,1±0,1	14,1±1,2	3,0±0,3	0	1,9±0,04	0
50%*	3,7±0,3	-	-	0	0	0	187,6±9,3

* синтетическая среда с эквивалентными концентрациями орг. кислот

Чтобы оценить возможность выделения водорода пурпурными бактериями из субстратов, содержащихся в 50% ФЖ, использовали синтетическую среду с эквивалентными концентрациями ацетата (10 мМ) и лактата (17,5 мМ), но пониженной концентрацией аммония (3,3 мМ). В этом случае субстраты потребились практически полностью, концентрация Бхл составила лишь 3,7 мг/л, но было получено 187,6 ммоль водорода на 1 л ФЖ, т.е. 57,3% от теоретически возможного.

Общий выход водорода за 2 стадии составил 4638,3 мл/л или 142,3 мл/г АСБ *S. reinhardtii*. Энергия полученного водорода оценивалась в 1,6 кДж/г АСБ. Содержание энергии в биомассе водорослей составляло 14,5 кДж/г АСБ. Таким образом, эффективность преобразования энергии биомассы водорослей в H₂ составила приблизительно 11%. Общая эффективность преобразования световой энергии в энергию H₂ (через стадии синтеза и ферментации биомассы) была не более 0,55%. Кроме того, мы не учитывали дополнительные затраты на разных этапах (гидролиз, центрифугирование, освещение и др.), что еще больше снизило бы эффективность.

Таким образом, применение закономерностей материально-энергетического баланса позволило оценить эффективность превращения световой энергии в энергию водорода в сопряженной системе, как на отдельных стадиях, так и в целом. Оказалось, что сопряженная система характеризуется низкой эффективностью (0,55 %), которая может достичь 1,4%, если принять во внимание лучшие литературные данные для фотоферментации (27%). Предполагается, что прямое свето-зависимое образование биотоплив (этанол, липиды, H₂) с помощью микроводорослей является более перспективным (Sarsekeyeva et al., 2015; Grechanik, Tsygankov, 2021). Однако из полной энергии светового излучения только небольшая часть может быть преобразована в энергию H₂ за счет фотосинтеза. Например, теоретическая эффективность превращения световой энергии в энергию H₂ у зеленых водорослей составляет 12%

(Dubini, Ghirardi, 2014; Torzillo et al., 2014), но на практике у иммобилизованных в пленке культур максимальная эффективность достигала 1,53% (Kosourov, Seibert, 2009), а у суспензионных – 0,24% (Ghirardi, 2006). Эффективность дополнительно снижается, когда выделение H_2 осуществляется при солнечном освещении (Scoma et al., 2012; Touloupakis, Torzillo, 2019).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Было изучено влияние интенсивности света и температуры на фотосинтетическую и нитрогеназную активность у родительского штамма цианобактерии *Anabaena sp.* PCC 7120 ΔNup (не синтезирующего водород-поглощающую гидрогеназу) и мутантов dc-Q193S и dc-R284H, с мутациями вблизи активного центра нитрогеназы. Выделение H_2 у мутантов мало отличалось от родительского штамма по энергии активации, по константам насыщения светом и по ингибированию ацетиленом, однако в отличие от родительского штамма не ингибировалось молекулярным азотом. Это предполагает возможность использования азота или воздуха вместо аргона при получении H_2 , что перспективно с практической точки зрения. Однако нитрогеназная и фотосинтетическая активность мутантов были ниже, чем у родительского штамма ΔNup , был ниже и температурный оптимум для выделения H_2 , что обусловлено повышенной хрупкостью филаментов. Таким образом, применение этих мутантов имеет ограниченный характер.

Изучена возможность выделения H_2 у цианобактерии *Anabaena sp.* PCC 7120 ΔNup и влияющие факторы в природных условиях в Подмоскowie с использованием простейших ФБР. Два эксперимента были выполнены в июле и августе при средней дневной температуре 21,7 и 20,6°C, средней дневной интенсивности света 290 и 340 мкмоль квантов/(м² с), соответственно. Максимальная скорость выделения H_2 составляла 20,6 мл день⁻¹ л⁻¹ культуры, продолжительность – 5 дней. Полученные активности были ниже по сравнению с лабораторными данными. Это могло быть связано с фотоингибированием, вызванным низкими ночными (утренними) температурами и высокой интенсивностью света утром и днем. Полученные результаты доказывают, что выделение H_2 цианобактериями возможно и на открытом воздухе в дешевых ФБР, однако в неконтролируемых условиях нельзя рассчитывать на высокие скорости выделения H_2 .

Воспроизведена трехстадийная интегрированная система получения H_2 на основе биомассы фотоавтотрофных микроводорослей и последующего брожения и фотоферментации с использованием хемо- и фототрофных бактерий, соответственно. Применение закономерностей материально-энергетического баланса позволило оценить эффективность превращения световой энергии в энергию H_2 в сопряженной системе, как на отдельных стадиях, так и в целом.

Следовательно, эта схема неэффективна для биоконверсии световой энергии из-за потерь на промежуточных этапах. Тем не менее, в условиях, когда микроводоросли растут без применения энергозатрат (например, в естественном водоеме), и затраты по их сбору и транспортировке к месту сбраживания и фотоферментации незначительны, такой подход при получении H_2 с одновременной очисткой эвтрофицированного водоема может иметь практическое значение.

ВЫВОДЫ

1) Показано, что исследованные мутанты *Anabaena sp.* 7120 ΔNup (dc-Q193S и dc-R284H) с модификациями вблизи активного центра нитрогеназы нечувствительны к N_2 , и подход к созданию продуктивных штаммов, основанный на точечных мутациях нитрогеназы, является перспективным, но требующим доработки.

2) Обнаружено, что фотосинтетическая и нитрогеназная активности мутантов ΔHup dc-Q193S и dc-R284H понижены по сравнению с родительским штаммом. Кроме того, у мутанта нитрогеназная активность снижалась при высоких температурах, что обусловлено, видимо, пониженной прочностью филаментов. Предложены дополнительные требования к мутантам с точечными мутациями нитрогеназы.

3) Впервые проведено изучение выделения H₂ цианобактерией *Anabaena sp.* 7120 ΔHup в условиях окружающей среды в Подмосковье с использованием простейших фотобиореакторов — пластиковых пакетов. Выделение H₂ в таких условиях возможно, хотя продолжительность и максимальная скорость были невысокими (5 суток, 20,6 мл/л в день). Это может быть обусловлено неблагоприятными погодными условиями и конструктивными особенностями используемых фотобиореакторов.

4) Воспроизведена трехстадийная схема получения H₂, включающая фотоавтотрофный синтез биомассы зеленых водорослей *C. reinhardtii*, ее темновое сбраживание анаэробным гетеротрофным консорциумом и фотоферментацию продуктов брожения *Cr. sphaeroides*.

5) С использованием закономерностей материально-энергетического баланса впервые рассчитана эффективность преобразования энергии света в энергию H₂ в такой системе, которая без учета потерь на промежуточных этапах и потребления света на этапе фотоферментации не превышает 0,55%.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах:

1. Gavrisheva A.I., Belokopytov B.F., Semina V.I., Shastik E.S., Laurinavichene T.V., Tsygankov A.A. (2015) Mass-energy balance analysis for estimation of light energy conversion in integrated system of biological H₂ production. *Biofuel. Res. J.*, **8**, 324-330.

2. Романова А.И., Лауринавичене Т.В., Цыганков А.А. (2020) Особенности мутантов *Anabaena* PCC 7120ΔHup с аминокислотными заменами в нитрогеназе. *Физиология растений*, **67(2)**, 214-224.

3. Shastik E., Romanova A., Laurinavichene T., Petushkova E., Sakurai H., Tsygankov A.A. (2020) Plastic bags as simple photobioreactors for cyanobacterial hydrogen production outdoors in Moscow region. *Int. J. Energy Environ. Eng.*, **11**, 1-8.

Статьи в сборниках научных трудов:

Романова А.И. (2017) Обзор. Выделение водорода гетероцистными цианобактериями. В сб: *Водородные энергетические технологии: Материалы семинара лаборатории ВЭТ ОИВТ РАН*: сб. науч. тр. / редкол.: Д.О. Дуников (отв. ред.) и др. М.: ОИВТ РАН, с. 172-189.

Тезисы докладов на конференциях:

1. Гавришева А.И., Семина В.И., Цыганков А.А. (2013) Запасание энергии света в биомассе *Chlamydomonas reinhardtii*. Материалы 1 международного форума «Возобновляемая энергетика: пути повышения энергетической и экономической эффективности» REENFOR-2013, Москва, Россия, с. 112.

2. Гавришева А.И., Семина В.И. (2013) Запасание энергии света в биомассе *Chlamydomonas reinhardtii* и *Chlorella pyrenoidosa*. Тезисы докладов школы-конференции молодых ученых на базе Института фундаментальных проблем биологии РАН «Биосистема: от теории к практике», Пущино, Россия, с. 28.

3. Гавришева А.И., Семина В.И., Цыганков А.А. (2015) Запасание энергии в биомассе микроводорослей *Chlamydomonas reinhardtii* и ее вовлечение в интегрированную систему получения водорода и других возможных компонентов. XXI Пущинские

- чтения по фотосинтезу и Всероссийская конференция «Фотосинтез и фотобиотехнология. Фундаментальные и прикладные аспекты», Пущино, Россия, с. 31.
4. Гавришева А.И., Лауринавичене Т.В., Семина В.И., Цыганков А.А. (2015) Запасание энергии света в интегрированной биологической системе. V Съезд биофизиков России, Ростов-на-Дону, Россия, с. 251.
5. Gavrisheva A., Masukawa H., Kitashima M., Sakurai H., Inoue K., Tsygankov A. (2016) Photosynthesis and hydrogen photoproduction by the cyanobacterium *Anabaena sp.* 7120 and its mutants with modified nitrogenase under different light and temperature. International Conference Photosynthesis Research for Sustainability in honor of Nathan Nelson and T. Nejat Veziroglu, Пущино, Россия, p. 195.
6. Романова А.И., Лауринавичене Т.В., Цыганков А.А. (2018) Особенности выделения водорода у мутантов *Anabaena* PCC 7120 с модифицированной нитрогеназой в отсутствие Нур гидрогеназы. 5-ая Пущинская школа-конференция "Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов", Пущино, Россия, с. 24.
7. Романова А.И., Лауринавичене Т.В., Цыганков А.А. (2021) Преобразование энергии света в водород фотосинтезирующими микроорганизмами и оценка эффективности процесса. IX Съезд Российского Фотобиологического Общества, конференция "Современные проблемы фотобиологии", пос. Шепси Краснодарского края, Россия, с. 149.