

## Получение водорода биологическим путем

А. А. Цыганков

*АНАТОЛИЙ АНАТОЛЬЕВИЧ ЦЫГАНКОВ — доктор биологических наук, заведующий лабораторией биотехнологии и физиологии фототрофных организмов Института фундаментальных проблем биологии РАН. Область научных интересов: фотобиотехнология, метаболизм водорода и азотфиксация фототрофных микроорганизмов, фотобиореакторы.*

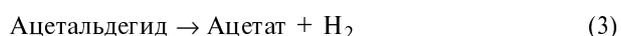
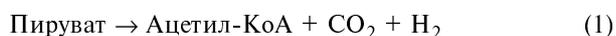
142290 г. Пушкино, Московская обл., Институт фундаментальных проблем биологии РАН, ул. Институтская, 2.

В настоящее время, в связи с высокими ценами на топливо и негативным воздействием продуктов его сгорания на климат, усиливается интерес к нетрадиционным источникам энергии. Водород является экологически чистым энергоносителем для грядущей энергетики. В современной промышленности водород получают паровой конверсией метана, каталитической конверсией углеводов и электролизом воды [1]. Получение водорода из ископаемых топлив можно рассматривать как необходимый переходный этап к водородной энергетике [2]. Процессы, использующие для получения водорода энергию солнца, ветра, воды, геотермальных источников и энергию, запасенную в отходах, наиболее безопасны для окружающей среды.

В связи с активным изучением выделения водорода в последние годы в зарубежной литературе появился специальный термин — «биоводород», которым называют водород, полученный биологическим путем. На основе используемых микроорганизмами источников энергии и доноров электронов, микробиологические процессы можно подразделить на темновое анаэробное выделение водорода, светозависимое выделение водорода без выделения кислорода, а также светозависимое выделение водорода и кислорода (биофототрип). Выделение водорода с использованием субклеточных биологических структур является предметом отдельного рассмотрения. В предлагаемом кратком обзоре описаны основные достижения последних лет получения биоводорода с использованием целых клеток микроорганизмов.

### Темновое выделение водорода

Микроорганизмы разных таксономических групп способны при брожении восстанавливать протоны, избавляясь таким образом от избытка восстановителя, когда в среде нет конечного акцептора электронов (например, кислорода, нитрата, нитрита, сульфата). При всем многообразии метаболических путей, в результате которых происходит выделение водорода в темноте, число используемых конечных реакций невелико и связано с разложением пирувата, формиата, ацетальдегида, пиридиннуклеотидов (НАД(Ф)Н<sub>2</sub>) и конверсии оксида углерода водой:



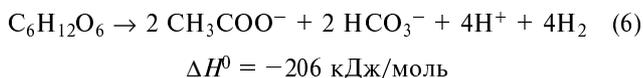
Реакции (1)–(4) реализуются в микроорганизмах, осуществляющих разные типы брожения.

Реакцию (1) ведут строгие анаэробные бактерии (например, клостридии) при брожении углеводов с участием пируват:ферредоксин-оксидоредуктазы, ферредоксина (Фд) и Фд-зависимой гидрогеназы. Реакция (2) осуществляется энтеробактериями при помощи формиатгидрогеназного комплекса, в который входят формиатдегидрогеназа, переносчики электронов и гидрогеназа. Используемый для выделения водорода формиат может присутствовать в среде культивирования или образовываться из пирувата за счет функционирования пируват:формиатлиазы. Реакция (3) описана для микроорганизма, выделенного из симбиотической ассоциации с метанообразующей бактерией [3]. Реакция (4) встречается у всех микроорганизмов, способных к синтезу НАД(Ф)Н-зависимых гидрогеназ *hoxYH* типа [4].

Значительное число микроорганизмов различных групп способны к анаэробному окислению СО с образованием водорода по реакции (5), используя эту реакцию для получения энергии [5]. Реакция может иметь практическое значение, особенно при удалении СО из синтез газа, но ее рассмотрение выходит за рамки предлагаемого обзора.

К настоящему времени многое известно о путях метаболизма, приводящих при брожении к образованию водорода, участвующих в процессе ферментах и генах, ответственных за синтез ферментов. Появляются также работы, в которых описаны новые пути метаболизма. Например, недавно показано, что мембранные везикулы из гипертермофильной археобактерии *Pyrococcus furiosus* при выделении водорода из восстановленного Фд способны к синтезу аденозинтрифосфата (АТФ) за счет трансмембранного потенциала, осуществляя таким образом простейший тип дыхания [6]. Восстановление Фд происходит в этой бактерии при гликолизе не только за счет реакции (1), но и при окислении глицеральдегидрофосфата с восстановлением не НАД, а Фд необычным ферментом глицеральдегидрофосфат:Фд оксидоредуктазой.

При брожении углеводов наряду с  $H_2$  образуются и другие соединения (этанол, ацетат, пропионат, бутанол и др.). Это связано с тем, что при стехиометрическом разложении глюкозы на 12 молекул  $H_2$  и 6 молекул  $CO_2$  бактерии не могут получить энергию, необходимую для роста. Теоретические расчеты показывают [7, 8], что разложение глюкозы, обеспечивающее бактерии энергией и дающее максимальное количество водорода, возможно в реакции:



В экспериментах с разными бактериями и их консорциумами обычно получают значения 0,5–4,0 моля  $H_2$ /моль глюкозы [9], при этом максимальные значения выхода получены с использованием термофильных анаэробных бактерий [10, 11]. Из уравнения (6) следует, что при брожении не более 1/3 энергии, запасенной в глюкозе, высвобождается в виде  $H_2$ . В то же время при полном разложении углеводов на метан и углекислоту в метане сохраняется до 85% энергии, запасенной в углеводах [12]. Более того, в природных условиях ферментативное выделение водорода всегда сопровождается поглощением водорода для образования метана, что энергетически выгодно [13].

Вследствие низкого выхода и наличия побочных продуктов брожения (что не позволяет отнести темное выделение водорода к безотходному производству), выделение водорода при брожении углеводов до недавнего времени не рассматривалось как практически реальный способ получения топлива. В связи с этим работам по оптимизации этого процесса до конца прошлого века уделялось мало внимания. Публикации, касающиеся выделения водорода из углеводов, были посвящены прежде всего изучению метаболических путей разложения углеводов и стехиометрии процесса. Тем не менее, уже более четверти века назад были описаны процессы, при которых скорость выделения водорода достигала 1,8–2,3 л  $H_2$  ч<sup>-1</sup> л<sup>-1</sup> суспензии [3].

В последние годы интерес к темному выделению водорода бактериями усилился (описание проектов, финансируемых в разных странах, можно найти в работе [14]). Это обусловлено следующими причинами:

1. Если раньше все энергетические станции рассматривались как централизованные системы, с мощностью не менее 30 МВт [15], то сейчас, в связи с развитием топливных элементов, появился интерес к децентрализованным системам [14]. В этом случае энергетические станции можно устанавливать рядом с источником сырья, что значительно снижает транспортные расходы.

2. Выделение водорода и метана может происходить при участии консорциума микроорганизмов, использующих самые разные содержащие углеводы отходы, а также специально выращенную растительную биомассу.

3. Сопутствующий выделению водорода углекислый газ выделяется только в месте производства энергии, что облегчает его дальнейший сбор.

4. С накоплением наших знаний и успехами генетических исследований появились возможности направленно менять метаболизм клеток.

5. Появились первые данные, указывающие, что объединение сбраживания целлюлозосодержащих отходов до органических кислот с последующим светозависимым выделением из них водорода по эффективности получения водорода не уступает метаногенезу [13].

С началом финансирования работ по темному выделению водорода появились и публикации, изучающие практическую сторону этого процесса. Ключевые вопросы, требующие решения для начала опытно-конструкторских работ, это стабильность процесса, удельная скорость в расчете на единицу объема биореактора, эффективность использования субстрата и определение спектра возобновляемого сырья.

В реальных условиях при использовании нестерильных субстратов высока вероятность трансформации процесса ферментации в метаногенез или же его остановка/переключение на другой тип брожения при ингибировании продуктами. Испытывают разные способы селективного подавления метаногенных бактерий, основанные на их физиологических особенностях: неспособность образовывать споры, токсическое действие кислорода, более узкий диапазон pH, доступный для роста, наличие специфических ингибиторов (2-бромэтансульфоновая кислота, йодопропан и ацетилен). Наиболее распространена термообработка почв и илов, используемых в качестве посевного материала: образцы прогревают 15–120 мин при 84–104 °C [16–20]. Показано также, что кислотная обработка активного ила (pH = 3; 30 мин) была более эффективна, чем обработка щелочью (pH = 10; 30 мин) [20]. С использованием многофакторного планирования изучали влияние условий предобработки посевного материала: температуры обработки и культивирования (37 и 55 °C), добавления бромэтансульфоната или ацетилена, влияние типа инокулята (мезофильные и термофильные образцы) на количественные характеристики выделения водорода [21]. Показано, что предобработка ацетиленом приводила к большему количеству выделившегося водорода и сокращению лаг периода процесса (времени, необходимому для перестройки метаболизма микроорганизмов и предшествующему моменту начала выделения водорода).

Следует отметить, что указанные способы предобработки продуктивны в лабораторных условиях. Их использование ускоряет выделение водорода и увеличивает его выход в расчете на моль субстрата. Однако применение предобработки на практике представляется сомнительным, поскольку попадающие с субстратом метаногенные бактерии со временем могут перевести процесс выделения водорода в реальном биореакторе в метаногенез. Проведение предобработки всего сырья делает невыгодным сам процесс получения водорода. Поэтому более перспективны исследования, подбирающие pH внутри биореактора, при котором метаногенез подавляется почти полностью. Так, показано, что при pH 5,5 происходит стабильное выделение водорода из глюкозы в течение 234 дней в нестерильных условиях [22]. Другими авторами показано, что смешанные суспензионные культуры стабильно

выделяли водород в мезофильных условиях при pH 5,2—5,3 [23]. Предотвращение переключения процесса на метаногенез возможно и в гипертермофильных условиях [24]. Однако и в этом случае в процессе начала формирования гранул в UASB реакторе (анаэробный реактор, в котором микроорганизмы локализованы в гранулах, заполняющих весь объем) авторы применяли бромэтансульфонат.

Важным аспектом изучения стабильности процесса является выявление ингибирующих концентраций субстратов и продуктов метаболизма. Прежде всего, анаэробное выделение водорода ингибируется самим водородом, что следует из термодинамики процесса. Хорошо документировано, что наличие высоких концентраций водорода не только снижает скорость его выделения, но и приводит к образованию более восстановленных, чем ацетат, продуктов метаболизма. При изучении выделения водорода при разложении сахарозы экстремально термофильной бактерией *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* показано, что после инертного газа следующим по значимости ингибитором был ацетат [25]. В этой же работе отмечено, что при концентрации сахарозы около 120 г/л выделение водорода полностью останавливалось. Другими авторами отмечено, что смешанная мезофильная культура значительно снижала скорость выделения водорода и эффективность преобразования сахарозы уже при 50 г/л сахарозы [23]. Концентрация продуктов может не только изменять скорость выделения водорода, но и полностью изменить путь брожения. Так, добавление в реактор, выделяющий водород, 4 г/л бутирата приводило к остановке выделения водорода, началу синтеза пропионата и удвоению концентрации бутирата (с 9,83 до 18,9 г/л) [23].

Несмотря на то, что стабильность процесса следует изучать в условиях, максимально приближенных к реальным, следует отметить, что при питании лабораторного биореактора синтетической средой с сахарозой выделение водорода было стабильным в течение 3 лет [26].

Скорость выделения водорода зависит от концентрации активной биомассы в реакторе и массообменных характеристик самого реактора. Важными параметрами являются концентрация углеводов в подаваемом растворе и время его удержания при непрерывной подаче. Роль этих параметров, а также процедуры старта описана ранее [27]. В предлагаемом обзоре описаны основные факторы, влияющие на продуктивность процесса, с акцентом на последние публикации.

Реакторы с иммобилизованными бактериями или с гранулами активного ила в оптимальных условиях обычно выделяли водород с большей скоростью, чем суспензии. Так, использование волокон внутри реактора в качестве матрицы для иммобилизации, приводило к длительному стабильному выделению водорода со скоростью около  $1 \text{ л} \cdot \text{ч}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$  реактора и эффективностью преобразования глюкозы 1,1 моль  $\text{H}_2$ /моль глюкозы [22]. Другими авторами подобран носитель, активирующий создание гранул для мезофильного процесса [28]. На дно реактора укладывали активированный уголь (в виде небольших сфер), инокулировали реактор активным илом и через 100 ч непрерывного протока среды получали уже сформировавшиеся гранулы. Концентрация биомассы достигала 26 г/л и

ее вымывания не происходило при времени удержания 0,5 ч. В оптимальных условиях (время удержания 0,5 ч, концентрация сахарозы в подаваемой среде 20 г/л) скорость выделения водорода достигала  $7,3 \text{ л} \cdot \text{ч}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ , при этом из 1 моля сахарозы (при ее потреблении более 90%) образовывалось около 3 молей  $\text{H}_2$ . Авторы предположили, что изменение отношения высоты реактора к его диаметру может изменить массообменные характеристики процесса, и в другой работе проверили это предположение [29]. Оказалось, что существует оптимальное отношение высоты к диаметру, при котором скорость выделения водорода достигала  $6,9 \text{ л} \cdot \text{ч}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ . При этом из одного моля сахарозы выделялось до 3,5 моля водорода, хотя оптимальны для скорости выделения и эффективности преобразования сахарозы не совпадали. Если же гранулы активного ила механически перемешивать, скорость выделения водорода достигала  $9,3 \text{ л} \cdot \text{ч}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ , при эффективности преобразования 4 моля  $\text{H}_2$ /моль сахарозы.

Проверяли также иммобилизацию активного ила в силикон [30]. UASB реактор заполняли частицами иммобилизованного в силиконе активного ила и с высокой скоростью подавали питательный раствор, содержащий сахарозу. Оказалось, что такие частицы стимулировали формирование гранул активного ила. В итоге концентрация биомассы достигала 35 г/л и не уменьшалась даже при времени удержания 0,5 ч. При оптимальных условиях скорость выделения водорода достигала  $15 \text{ л} \cdot \text{ч}^{-1} \cdot \text{л}^{-1}$ . При этом из 1 моля сахарозы образовывалось около 3,5 молей водорода. Авторы отметили, что при увеличении времени удержания снижалась не только скорость выделения водорода, но и количество разных видов водородобразующих бактерий в гранулах.

Для питания 5 кВт топливных элементов, обеспечивающих полное энергоснабжение дома для одной семьи [31, 32], достаточно подавать в топливный элемент водород со скоростью около  $2900 \text{ л} \cdot \text{ч}^{-1}$ . Если предположить, что при масштабировании скорость выделения водорода не снижается, то при использовании процесса, описанного в [30], достаточно установить реактор объемом около 200 л, что уже осуществимо на практике.

Наряду с оптимизацией процесса темного выделения водорода имеются и другие подходы повышения эффективности преобразования субстрата в водород. Первый основан на переводе культур в условия несбалансированного питания, когда культуры практически не растут, но продолжают преобразовывать субстрат в водород [15]. Можно полагать, что в этих условиях выделение водорода будет связано не только с получением энергии, но и с понижением концентрации растворимых продуктов метаболизма. Несмотря на то, что первые попытки использования такого подхода не привели к существенному изменению стехиометрии процесса [33], для окончательного вывода требуются дальнейшие исследования. Другой подход основан на метаболической инженерии бактерий [34, 35]. При этом подходе предполагается тщательный анализ имеющихся в консорциуме типов брожения и направленное изменение в сторону повышения выхода водорода путем подавления, введения новых или сверхэкспрессии имеющихся генов.

Однако необходима еще дополнительная разработка методологии такого подхода, прежде чем его можно будет проверить на практике.

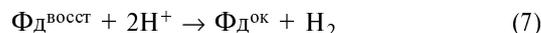
Очевидно, что ни глюкоза, ни сахароза не могут служить субстратами для выделения водорода реальными системами. Гораздо предпочтительнее использование легкоразлагаемых целлюлозосодержащих отходов (опилки, стружка, травяные остатки и др.), которые деполимеризуются до сахаров. В этом случае наряду с получением водорода возможна утилизация отходов, количество которых с развитием цивилизации только возрастает. Возможны 2 подхода при использовании целлюлозосодержащих отходов для получения водорода: интеграция процессов разложения целлюлозы и получения водорода в одном биореакторе и предварительный гидролиз отходов до сахаров (химический или ферментативный) с последующей подачей гидролизата в биореактор для выделения водорода. Возможности использования целлюлозосодержащих отходов в интегральном процессе обрабатываются на чистых культурах микроорганизмов и их консорциумах. Хорошо известно, что клостридии содержат набор ферментов, необходимых для гидролиза целлюлозы. Рядом исследователей показана принципиальная возможность получения водорода чистыми или смешанными культурами при использовании различного сырья: сырого крахмала [17, 18], микрокристаллической целлюлозы [36],  $\alpha$ -целлюлозы, измельченной фильтровальной бумаги, делигнифицированных древесных волокон и целлобиозы [37], также отходов производства крахмала из батата, содержащих крахмал, целлюлозу и лигнин [27]. Однако требуются дальнейшие исследования для интенсификации выделения водорода при разложении реальных отходов. Таким образом, имеющиеся к настоящему времени данные свидетельствуют о высоком потенциале темнового выделения водорода как практически значимого процесса. Вместе с тем до его применения на практике потребуются большие усилия ученых не только для оптимизации отдельных стадий, но и для интеграции в единую технологическую цепь процессов подготовки сырья, выделения водорода и удаления нежелательных побочных продуктов, прежде всего органических кислот.

#### Светозависимое выделение водорода

В основе всех процессов выделения водорода микроорганизмами на свету лежит процесс фотосинтеза. Среди фотосинтезирующих микроорганизмов, способных выделять водород, наибольшее внимание привлекают микроводоросли, гетероцистные цианобактерии и пурпурные несерные бактерии. Микроводоросли и цианобактерии обладают двумя фотосистемами и способны к разложению воды и выделению кислорода. Бактерии, обладающие одной фотосистемой (прежде всего пурпурные и зеленые серные и несерные бактерии), не способны к выделению кислорода и для осуществления фотосинтеза нуждаются в более восстановленных, чем вода, донорах электрона.

**Микроводоросли** в обычных условиях не выделяют водород, используя энергию, запасенную при фотосинтезе в виде АТФ и НАДФН для собственного метаболизма. Восстановление НАДФН происходит при переносе электронов от восстановленного за счет фо-

тосинтеза Фд к НАДФ за счет Фд:НАДФ оксидоредуктазы. Виды, синтезирующие Fe-гидрогеназы, способны к светозависимому выделению водорода после предварительной темновой анаэробной адаптации. В этом случае восстановленный Фд способен окисляться за счет Фд-зависимой Fe-гидрогеназы с выделением водорода:



Микроводоросли, в частности, *Chlamydomonas reinhardtii*, синтезируют 2 Фд-зависимые гидрогеназы *hydA1* и *hydA2* [38]. Обе гидрогеназы относятся к Fe-гидрогеназам, обладают высокой активностью и синтезируются в анаэробных условиях. Общим свойством всех Fe-гидрогеназ является их быстрая инактивация в присутствии следов кислорода.

Считается, что выделение водорода необходимо микроводорослям для сброса избытка восстановителя при переходе от анаэробных темновых условий к световым [39]. В темновых условиях фиксация углекислоты в цикле Кальвина (основное потребление НАДФН) не происходит, и требуется время для включения этого цикла после появления света. При включении света фотосинтез происходит сразу же, восстанавливая Фд. В этот момент в клетках имеется избыток НАДФН, образовавшийся в процессе темнового анаэробного метаболизма. Поэтому, для сброса избытка восстановителя, восстановленный Фд окисляется за счет гидрогеназы, выделяя водород. Одновременно с водородом выделяется и кислород (что позволяет называть этот процесс прямым биофотолизом воды). Таким образом, выделение водорода адаптированными микроводорослями длится до тех пор (в разных экспериментальных системах от секунд до минут), пока концентрация выделяющегося кислорода не достигнет значения, при котором происходит полная инактивация гидрогеназы.

Подробное описание микроводорослей, способных к биофотолизу воды, а также биохимии и биофизики процесса, приведено в обзорах Бойченко с соавторами [40, 41]. Здесь следует лишь отметить, что квантовый выход выделения водорода микроводорослями в оптимальных условиях близок к теоретическому максимуму [42], а начальные скорости процесса достигают 200 мкмоль  $\text{H}_2 \text{ ч}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$  хлорофилла [40], что близко к максимальной скорости фотосинтеза.

Однако токсическое действие кислорода значительно ограничивает длительность выделения водорода. В попытках устранить это действие исследуются возможности генетической модификации гидрогеназ для повышения их устойчивости к кислороду и разделения процессов выделения кислорода и водорода во времени.

Длительное время осуществляются попытки повышения устойчивости гидрогеназ путем случайного мутагенеза и отбора полезных мутантов [43]. Однако, несмотря на интенсивные исследования, устойчивость гидрогеназ в мутантах пока не позволяет надеяться на полный успех такого подхода. В настоящее время значительные успехи достигнуты в понимании механизмов синтеза, молекулярной структуры и механизма действия гидрогеназ [4]. Модели с использованием методов молекулярной динамики показывают, что водород может диффундировать к активному центру

гидрогеназы через большое количество полостей молекулы, тогда как кислород проникает только по двум каналам [44]. На основе этого предлагается сайт-направленный мутагенез гидрогеназы. Путем замены отдельных аминокислот предлагается уменьшить размеры полостей, по которым кислород поступает в активный центр [45]. Работы по созданию модифицированных таким образом гидрогеназ еще не завершены.

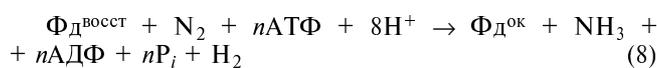
Разделение во времени выделения кислорода и водорода возможно, если микроводоросли подвергнуть стрессу из-за недостатка серы [46]. При недостатке серы *C. reinhardtii* на свету сначала выделяла кислород. Со временем инкубации в этих условиях активность фотосистемы 2 снижалась и скорость выделения кислорода становилась ниже скорости дыхания, что приводило к анаэробизму в присутствии света, индукции синтеза гидрогеназы и началу выделения водорода. Последующие за этой работой публикации из ряда лабораторий описали этот процесс подробнее, выделив 5 фаз перехода культур от избытка серы к ее отсутствию [47], отметили особенности поведения фотосистемы 2 [48], показали влияние интенсивности света [49] и pH [50], описали морфологические и биохимические особенности культур при недостатке серы [51]. Однако, за исключением оптимального pH для роста [50], все эти работы приводили значения около 0,10–0,15 л водорода, производимого 1 л культуры в течение 120–150 ч. Это значение ниже требуемых для практики скоростей на 3–4 порядка [31, 32].

Следует отметить, что «составные части» биохимической «машины», вовлеченной в биофотолит воды, уже известны. Но ее сложность, наряду с большим количеством «составных частей», в значительной степени определяется наличием огромного количества регуляторных участков и конкурирующих за восстановленный Фд ветвей метаболизма. В качестве иллюстрации этого утверждения можно привести данные по выделению водорода мутантом *C. reinhardtii*, у которого нарушен переход антенны к фотосистеме 1 и 2 [52]. Этот мутант характеризовался также и неспособностью к циклическому транспорту электронов от восстановленного Фд в пул пластохинонов (мембранных переносчиков электронов, функционирующих между фотосистемой 1 и фотосистемой 2). Скорость выделения водорода этим мутантом на порядок превышала скорость дикого штамма. Это открывает дополнительные возможности увеличения выхода водорода при прямом биофотолитозе.

Таким образом, несмотря на высокую привлекательность прямого биофотолитоза воды, этот метод еще далек от практического применения и требуются принципиально новые, «прорывные» решения, которые могут появиться только в результате фундаментальных исследований.

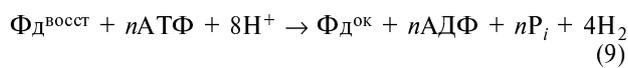
**Цианобактерии**, или сине-зеленые водоросли — это прокариоты, способные к фотосинтезу с выделением кислорода. Представители этих микроорганизмов обладают hup и hox гидрогеназами и разными нитрогеназами. Вследствие наличия нескольких водородоактивирующих ферментов, пути метаболизма, приводящие к выделению водорода, у них различны [53–55]. Несмотря на высокую энергетическую «стоимость» (ср. реакции (7) и (8)) получаемого таким образом водорода,

наиболее перспективным считается светозависимое выделение водорода гетероцистными цианобактериями за счет действия нитрогеназы (и далее будет рассмотрен только этот путь метаболизма):



Нитрогеназа в этих цианобактериях преимущественно локализована в специализированных клетках, гетероцистах. Гетероцисты синтезируются в условиях недостатка связанных форм азота. Их дополнительной особенностью является отсутствие фотосистемы 2, то есть они не способны к выделению кислорода. Таким образом, нитрогеназа пространственно отделена от кислорода, неизбежно присутствующего в среде во время фотосинтеза, при этом кислород образуется в вегетативных клетках, а водород — в гетероцистах. Поскольку эти процессы проходят в разных клетках, они связаны большим количеством промежуточных этапов, включающих диффузию сахаров из вегетативной клетки в гетероцист, и их суммарный результат называется «непрямой биофотолитоз воды».

В обычных условиях в процессе азотфиксации цианобактерии не выделяют водород вследствие того, что имеющаяся hupSL гидрогеназа эффективно его поглощает в оксигородной реакции [56]. Мутанты, лишённые этого фермента, выделяют водород в атмосфере воздуха, хотя в отсутствие молекулярного азота скорость выделения водорода существенно выше:



С созданием мутантов, лишённых одной или обеих гидрогеназ [57] появилась серия работ по изучению влияния синтеза Mo- и V-содержащих нитрогеназ [58], O<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub> [56], оценке реальных фотобиореакторов в лаборатории [59] и на открытом воздухе [60]. Показано, что скорость выделения водорода в реальных условиях (эксперименты проводились летом в Лондоне в 1998 и 1999 г.) достигала 0,01 л·ч<sup>-1</sup>·л<sup>-1</sup> фотобиореактора. Эффективность преобразования энергии света в теплоту сгорания биомассы и водорода составляла 0,60–0,85%, причем в биомассе накапливалось 85–97% всей запасенной энергии.

Для повышения эффективности выделения водорода на ярком свете применяли интенсивные культуры *A. variabilis* PK84 при недостатке азота [61]. Показано, что при концентрации клеток 48 мг Хл а · л<sup>-1</sup> (Хл а — хлорофилл а) — основной пигмент, вовлеченный в фотосинтез у цианобактерий) и освещении 352 мкЕ · м<sup>-2</sup> · с<sup>-1</sup> скорость выделения H<sub>2</sub> достигала 0,022 л · л<sup>-1</sup> · ч<sup>-1</sup> с эффективностью преобразования энергии света 1,2–1,4%. Полученные данные свидетельствуют о возможности получения водорода с относительно высокой эффективностью и на ярком свете.

Авторы ряда статей и обзоров отмечают проблемы, ограничивающие применение цианобактерий для преобразования солнечной энергии. Прежде всего это низкая эффективность и скорость процесса. Отмечается также чувствительность процесса к кислороду и одновременное выделение кислорода и водорода. Предлагаются направления дальнейших исследований для повышения скоростей процесса [31, 32, 53, 62]: поиск новых, более продуктивных штаммов, попытки

модификации или сверхэкспрессии нитрогеназы и даже ее замены на Fe-гидрогеназу, обладающую большей скоростью реакции, что может повысить эффективность выделения водорода. Отмечается необходимость создания принципиально новых фотобиореакторов, позволяющих более равномерно освещать культуры цианобактерий, и интенсификации исследований с иммобилизованными культурами с целью повышения концентрации клеток в реакторе. Данные направления исследований, несомненно, смогут привести к дальнейшему увеличению скорости выделения водорода цианобактериями, но не решают проблему одновременного выделения кислорода и водорода. Вместе с тем, сама структурная организация гетероцистных цианобактерий уже осуществляет разделенное на микрорастояния выделение кислорода и водорода. Пространственно-ориентированная иммобилизация гетероцистных цианобактерий (например, путем генетического создания на стенках гетероцист специализированных меток) на газоселективных мембранах позволит реализовать это разделение уже на макрорастояниях.

Суммируя, следует признать, что не прямой биофототоллиз воды, хотя и имеет значительные достижения за последние годы, все еще требует мультидисциплинарных фундаментальных исследований.

**Пурпурные несерные бактерии** способны выделять водород за счет действия hox-гидрогеназы и нитрогеназы. Наибольшие скорости выделения водорода получены за счет нитрогеназы в реакции (9). Поэтому в данном обзоре ограничимся рассмотрением только этого процесса. Пурпурные бактерии обладают только одной фотосистемой. Донорами электронов для фотосинтеза могут служить, наряду с восстановленными соединениями серы, летучие жирные кислоты и их производные.

К настоящему времени хорошо известны факторы, влияющие на скорость светозависимого образования водорода пурпурными бактериями [3, 63]. Для получения высоких скоростей необходимо создать условия недостатка любых форм азота, обеспечить культуры минеральными компонентами и органическим субстратом, обеспечить их светом насыщающей интенсивности и поместить в анаэробные условия с оптимальной температурой и рН. Типичные значения скоростей выделения водорода разными видами пурпурных несерных бактерий в оптимальных условиях, опубликованные последние 30 лет, лежат в диапазоне 100—250 мл  $H_2 \cdot ч^{-1} \cdot г^{-1}$  сухой биомассы [63].

Уже известно, что имеются конкурирующие с выделением водорода процессы: синтез полигидроксиалканатов и рециклизация водорода за счет функционирования hup-гидрогеназы [12, 64]. Последние годы получены мутанты, у которых нарушен синтез hup-гидрогеназы [64] и/или синтез полигидроксиалканатов [65, 66]. Сравнительный анализ скоростей выделения водорода мутантами и родительским штаммом, проведенный авторами работ свидетельствует о значительном увеличении (до 2,5 раз [66]) выделения водорода двойными мутантами. Однако оценки скоростей выделения водорода в этих случаях проводились в неоптимальных условиях, что затрудняет сопоставление полученных данных с результатами других авторов. Возможно, это является одной из причин того, что,

несмотря на значительные усилия по созданию новых мутантов, по удельным скоростям выделения водорода они близки к природным штаммам в более ранних работах.

Интенсификация процесса в лабораторных условиях за счет увеличения концентрации клеток в фотобиореакторе затруднена вследствие экспоненциального падения интенсивности света в поглощающей среде. Так, по оценкам автора, при концентрации клеток пурпурных бактерий всего  $1 г \cdot л^{-1}$  (для сравнения, темновые культуры имеют концентрации до  $35 г \cdot л^{-1}$ , см. выше) после прохождения света через слой суспензии толщиной 1 см его интенсивность падает на порядок. Поэтому дальнейшие слои культур будут находиться в зоне ограниченного освещения или даже в темноте. Этот факт предъявляет жесткие требования к фотобиореакторам для всех фотосинтезирующих микроорганизмов. Обычно в экспериментах используют фотобиореакторы с толщиной слоя суспензии 1—5 см [63, 67, 68]. При этом скорости выделения водорода в расчете на литр суспензии, полученные разными авторами, лежат в диапазоне  $0,08—0,26 л H_2 \cdot ч^{-1} \cdot л^{-1}$ .

Повышение концентрации клеток внутри реактора возможно при иммобилизации клеток на светопроводящих матрицах с высоким отношением поверхности к объему [67, 68]. В этом случае возможна иммобилизация до 12 г клеток (по сухому весу) в литре матрицы. При этом скорости выделения водорода в расчете на единицу объема значительно возрастают. Так, *Rhodobacter sphaeroides*, иммобилизованная на пористом стекле, стабильно выделяла водород со скоростью  $1,1 л \cdot ч^{-1} \cdot л^{-1}$  матрицы в течение более 1000 ч, при этом максимальные скорости достигали  $3,8 л \cdot ч^{-1} \cdot л^{-1}$  матрицы при эффективности преобразования органической кислоты до 80% [69, 70].

Дальнейшее увеличение скорости выделения водорода в расчете на единицу объема за счет увеличения концентрации клеток, возможно при генетической модификации фотосинтетического аппарата при уменьшении количества пигмента антенны. В этом случае одновременно следует ожидать и увеличения насыщающей интенсивности света, которая для пурпурных бактерий с обычным составом антенны составляет 1/20 от интенсивности солнечной радиации. Такие работы уже начаты [71, 72].

Учитывая высокие скорости процесса, пурпурные бактерии являются перспективными объектами для получения водорода. Поэтому в последнее время интенсифицировались работы по поиску дешевых субстратов для выделения водорода. Испытывали сточные воды молочной промышленности [70], отходы производства оливкового масла [73], переработки сои [74] и даже бытовые сточные воды [75]. Однако вследствие довольно узкого спектра используемых пурпурными бактериями органических соединений очистки сточных вод при таком способе получения водорода не происходит.

Побочным продуктом темного получения водорода являются в основном летучие жирные кислоты, которые легко усваиваются пурпурными бактериями, поэтому предлагается объединить темное выделение водорода пурпурными бактериями со светозависимым [14, 76]. В этом случае можно увеличить выход водорода при использовании целлюлозосодержащих отхо-

дов до 11 молей на моль глюкозы, причем до 4 молей водорода может образоваться в реакторе для темного процесса и до 8 молей в фотобиореакторе с пурпурными бактериями из жирных кислот, полученных в процессе брожения.

Два эти процесса отличаются большими скоростями выделения водорода по сравнению с другими биологическими процессами и такая интегральная система, по-видимому, может раньше других перейти из раздела фундаментальных исследований в область практических разработок. Однако для этого требуются значительные усилия не только по оптимизации отдельных процессов, но и по их интеграции.

В заключение следует отметить, что все описанные процессы получения биоводорода могут иметь практическое значение для децентрализованных систем генерации энергии. По-видимому, ближе других к началу опытно-конструкторских работ является интегральный способ получения биоводорода из легко разлагаемых целлюлозосодержащих отходов с одновременным использованием энергии солнца.

Работа поддержана проектом РФФИ 04-04-97205 и Программой № 7 фундаментальных исследований РАН.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Кузык Б.Н., Кушлин В.И., Яковец Ю.В. На пути к водородной энергетике. Москва: Институт экономических стратегий, 2005, 160 с.
- Turner J.A. Science, 2004, v. 305, с. 972—974.
- Кондратьева Е.Н., Гозотов И.Н. Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов. Москва: Наука, 1981, 343 с.
- Vignais P.M., Colbeau A. Curr. Issues Mol. Biol., 2004, v. 6, p. 159—188.
- Sipma J., Henstra A.M., Parshina S.N., Lens P.N.L., Lettinga G., Stams A.J.M. Crit. Revs Biotechnol., 2006, v. 26, № 1, p. 41—65.
- Sapra R., Bagramyan K., Adams M.W.W. PANS, 2003, v. 100, № 13, p. 7545—7550.
- Kengen S.W., Stams A.J.M., Vos D. FEMS Microbiol. Rev., 1996, v. 18, № 1, p. 119—137.
- Solomon B.O., Zeng A.P., Biebl H., Schlieker H., Posten C., Deckwer W.D. J. Biotechnol., 1995, v. 39, № 1, p. 107—117.
- De Vrije T., Claassen P.A.M. In: Bio-methane and Biohydrogen. Novem: The Hague, 2003, p. 103—123.
- Schroder C., Selig M., Schonheit P. Arch. Microbiol., 1994, v. 161, № 6, p. 460—470.
- Van Niel E.W.J., Budde M.A.W., De Haas G.G., F.J. V.D.W., Claassen P.A.M., Stams A.J.M. Int. J. Hydrogen Energy, 2002, v. 27, № 11/12, p. 1391—1398.
- Кондратьева Е.Н. Автотрофные прокариоты. Москва: Изд-во МГУ, 1996, 312 с.
- Amend J.P., Shock E.L. FEMS Microbiol. Rev., 2001, v. 25, № 2, p. 175—243.
- Claassen P.A.M., De Vrije T. Int. J. Hydrogen Energy, 2006, v. 31, № 11, p. 1416—1423.
- Benemann J.R. In: Biohydrogen. Int. Conf. on Biological Hydrogen Production. Waikoloa, Hawaii. Ed. O. Zaborsky. Plenum Press, 1997, p. 19—30.
- Lay J.J., Fan K.-S., Chang J., Ku C.-H. Int. J. Hydrogen Energy, 2003, v. 28, p. 1361—1367.
- Lay J.J. Biotechnol. Bioeng., 2000, v. 68, № 3, p. 269—278.
- Hussy I., Hawkes F.R., Dinsdale R., Hawkes C.V. Ibid., 2003, v. 84, № 6, p. 619—626.
- Oh S.E., Iyer P., Bruns M.A., Logan B.E. Ibid., 2004, v. 87, № 1, p. 119—127.
- Zhu H., Beland M. Int. J. Hydrogen Energy, 2006, v. 31, № 14, p. 1980—1988.
- Valdez-Vazquez I., Rhos-Leal E., Mucoz-Paez K.M., Carmona-Martinez A., Poggi-Varaldo H.M. Biotechnol. Bioeng., 2006, v. 95, № 3, p. 342—349.
- Oh Y.-K., Kim S.H., Kim M.-S., Park S. Ibid., 2004, v. 88, № 6, p. 690—698.
- Kyazze G., Martinez-Perez N., Dinsdale R., Premier G.C., Hawkes F.R., Guwy A.J., Hawkes D.L. Ibid., 2006, v. 93, № 5, p. 971—979.
- Kotsopoulos T.A., Zeng R.J., Angelidaki I. Ibid., 2006, v. 94, № 2, p. 296—302.
- Van Niel E.W.J., Claassen P.A.M., Stams A.J.M. Ibid., 2003, v. 81, № 3, p. 255—262.
- Yu H.-Q., Mu Y. Ibid., 2006, v. 94, № 5, p. 988—995.
- Hawkes F.R., Dinsdale R., Hawkes D.L., Hussy I. Int. J. Hydrogen Energy, 2002, v. 27, № 11—12, p. 1339—1347.
- Lee K.-S., Wu J.-F., Lo Y.-S., Lo Y.-C., Lin P.-J., Chang J.-S. Biotechnol. Bioeng., 2004, v. 87, № 5, p. 648—657.
- Lee K.-S., Lo Y.-C., Lin P.-J., Chang J.-S. Int. J. Hydrogen Energy, 2006, v. 31, № 12, p. 1648—1657.
- Wu S.-Y., Hung C.-H., Lin C.-N., Chen H.-W., Lee A.-S., Chang J.-S. Biotechnol. Bioeng., 2006, v. 93, № 5, p. 934—946.
- Levin D.B. Int. J. Hydrogen Energy, 2004, v. 29, № 13, p. 1425—1426.
- Levin D.B., Pitt L., Love M. Ibid., 2004, v. 29, № 2, p. 173—185.
- Bissalton A., Turcot J., Hallenbeck P.C. Ibid., 2006, v. 31, № 11—12, p. 1504—1508.
- Keasling J.D., Benemann J.R., Pramanik J., Carrier T.A., Jones K.L., Dien S.J. In: Biohydrogen. Proc. of an Int. Conf. on biological hydrogen production. Waikoloa, Hawaii. Ed. O. Zaborsky. Plenum Press, 1997, p. 87—97.
- Benemann J.R. J. Appl. Phycol., 2000, v. 12, № 3—5, p. 291—300.
- Lay J.J. Biotechnol. Bioeng., 2001, v. 74, № 4, p. 280—287.
- Levin D.B., Islam R., Cicek N., Sparling R. Int. J. Hydrogen Energy, 2006, v. 31, № 11—12, p. 1496—1503.
- Forestier M., King P., Zhang L.P., Posewitz M., Schwarzer S., Happe T., Ghirardi M.L., Seibert M. Eur. J. Biochem., 2003, v. 270, № 13, p. 2750—2758.
- Appel J., Schulz R. J. Photochem. Photobiol. B-Biology, 1998, v. 47, № 1, p. 1—11.
- Boichenko V.A., Hoffmann P. Photosynthetica, 1994, v. 30, № 4, p. 527—552.
- Boichenko E.A., Greenbaum E., Seibert M. In: Photoconversion of solar energy: molecular to global photosynthesis. London: Imperial College Press, 2004, p. 397—452.
- Бойченко В.А., Лумбин Ф.Ф. Докл. АН СССР, 1988, т. 301, с. 1497—1500.
- Flynn T., Ghirardi M.L., Seibert M. Int. J. Hydrogen Energy, 2002, v. 27, № 11—12, p. 1421—1430.
- Cohen J., Kim K., Posewitz M., Ghirardi M.L., Schulten K., Seibert M., King P. Biochem. Soc. Trans., 2005, v. 33, p. 80—82.
- Ghirardi M.L. Indian J. Biochem. Biophys., 2006, v. 43, p. 201—210.
- Melis A., Zhang L.P., Forestier M., Ghirardi M.L., Seibert M. Plant Physiol., 2000, v. 122, № 1, p. 127—135.
- Kosourov S., Tsygankov A., Seibert M., Ghirardi M.L. Biotechnol. Bioeng., 2002, v. 78, № 7, p. 731—740.
- Антал Т.К., Кренделева Т.Е., Лауринавичене Т.В., Макарова В.В., Цыганков А.А., Сейберт М., Рубин А.Б. Доклады АН, 2001, т. 381, № 1, с. 1—4.
- Laurinavichene T.V., Tolstygina I.V., Tsygankov A. J. Biotechnol., 2004, v. 114, p. 143—151.
- Kosourov S., Seibert M., Ghirardi M.L. Plant Cell Physiol., 2003, v. 44, № 2, p. 146—155.
- Zhang L.P., Happe T., Melis A. Planta, 2002, v. 214, № 4, p. 552—561.
- Kruse O., Rupprecht J., Bader K.P., Thomas-Hall S., Schenk P.M., Finazzi G., Hankamer B. J. Biol. Chem., 2005, v. 280, № 40, p. 34170—34177.

53. Prince R.C., Khesghi H.S. Crit. Rev. Microbiol., 2005, v. 31, № 1, p. 19–31.
54. Dutta D., De, Chaudhuri S., Bhattacharya S.K. Microbial Cell Factories, 2005, v. 4, p. 36–47.
55. Schutz K., Happe T., Troshina O., Lindblad P., Leitao E., Oliveira P., Tamagnini P. Planta, 2004, v. 218, № 3, p. 350–359.
56. Tsygankov A.A., Serebryakova L.T., Rao K.K., Hall D.O. FEMS Microbiol. Lett., 1998, v. 167, № 1, p. 13–17.
57. Mikheeva L.E., Schmitz O., Shestakov S.V., Bothe H. J. Biosci., 1995, v. 50, № 7–8, p. 505–510.
58. Tsygankov A.S., Serebryakova L.T., Sveshnikov D.A., Rao K.K., Gogotov I.N., Hall D.O. Int. J. Hydrogen Energy, 1997, v. 22, № 9, p. 859–867.
59. Borodin V.B., Tsygankov A.A., Rao K.K., Hall D.O. Biotechnol. Bioeng., 2000, v. 69, № 5, p. 478–485.
60. Tsygankov A.A., Fedorov A.S., Kosourov S.N., Rao K.K. Ibid., 2002, v. 80, № 7, p. 777–783.
61. Liu J.G., Bukatin V.E., Tsygankov A.A. Int. J. Hydrogen Energy, 2006, v. 31, № 11–12, p. 1591–1596.
62. Tamagnini P., Axelsson R., Lindberg P., Oxelfelt F., Wunschiers R., Lindblad P. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2002, v. 66, № 1, p. 1–20.
63. Rocha J., Barbosa H.R., Wijffels R.H. In: Biohydrogen 2. An approach to environmentally acceptable technology. Amsterdam: Pergamon, 2001, p. 3–32.
64. Zorin N.A., Lissolo T., Colbeau A., Vignais P.M. J. Mar. Biotechnol., 1996, v. 4, p. 28–33.
65. Franchi E., Tosi C., Scolla G., Della Penna G., Rodriguez F., Pedroni P.M. 2004, v. 6, № 6, p. 552–565.
66. Kim M.S., Baek J.S., Lee J. Int. J. Hydrogen Energy, 2006, v. 31, № 1, p. 121–127.
67. Tsygankov A. In: Biohydrogen 2. An approach to environmentally acceptable technology. Amsterdam: Pergamon, 2001, p. 229–244.
68. Tsygankov A. In: Biohydrogen III. Renewable energy system by biological solar energy conversion. Elsevier, 2004, p. 57–74.
69. Tsygankov A.A., Hirata Y., Miyake M., Asada Y., Miyake J. J. Ferm. Bioengin., 1994, v. 77, p. 575–578.
70. Цыганков А.А., Федоров А.С., Талипова И.В., Лауринавичене Т.В., Мияки Д., Гоготов И.Н. Прикл. биохимия и микробиол., 1998, т. 34, № 1, с. 1–5.
71. Kim E.J., Kim J.S., Kim M.S., Lee J.K. Int. J. Hydrogen Energy, 2006, v. 31, № 4, p. 531–538.
72. Kondo T., Wakayama T., Miyake J. Ibid., 2006, v. 31, № 11–12, p. 1522–1526.
73. Eroglu E., Eroglu I., Gunduz U., Turker L., Yucel M. Ibid., 2006, v. 31, № 11–12, p. 1527–1535.
74. Zhu H., Suzuki T., Tsygankov A., Asada Y., Miyake J. Ibid., 1999, v. 24, № 2, p. 305–310.
75. Fascetti E., Daddario E., Todini O., Robertiello A. Ibid., 1998, v. 23, № 9, p. 753–760.
76. Melis A., Melnicki R. Ibid., 2006, v. 31, № 11–12, p. 1563–1573.