

SATBAYEV UNIVERSITY

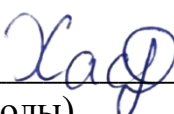
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ BIOTEХНОЛОГИЯ ФАКУЛЬТЕТИ

БИOTEХНОЛОГИЯ КАФЕДРАСЫ

Дипломдық жұмыс

Фотосистема 1 ингибиторларының негізінде сутек өнімділігін арттырудың
оңтайлы жолдарын зерттеу

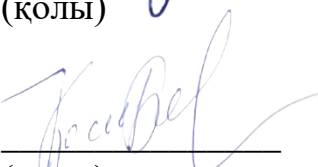
Орындаған:
бакалавр



Хасенов Д.Р.

(ҚОЛЫ)


Ғылыми жетекші:
б.ғ.к., аға оқытушы



Қосалбаев Б.Д.

(ҚОЛЫ)

Қорғауға жіберілді:
Кафедра
меңгерушісі,
б.ғ.к., доцент



Рафикова Х.С.

18 мамыр 2021 ж.

(ҚОЛЫ)

Алматы, 2021

ТҰЖЫРЫМ

Диссертациялық жұмысы 42 бет, 10 сурет, 69 әдебиеттен тұрады.

Түйінді сөздер: Сутек, цианобактерия, фотосистема, фотосинтез, биофототрофия, биомасса.

Зерттеу жұмысының мақсаты: Фотосистема 1 ингибиторлары арқылы сутек өнімділігін арттыру

Негізгі міндеттері:

1. Болашақта сутекті экологияға байланысты жергілікті мәселелерді шешуге көмектесетін негізгі отынға айналдыру
2. Сутегін алуға арналған цианобактериялар штаммдарының потенциалын анықтау
3. Фототрофты микроорганизмдерден сутегі өндірісін іске асыру
4. Цианобактериялардың жасушалары арқылы сутек алудың биологиялық процестерін және олардың өнімділігін арттырудың мүмкін жолдарын табу

Зерттеу нәтижелері:

1. Үш цианобактерия штамдары зерттелді (*Desertifilum* sp. IPPAS B-1220, *Synechococcus* sp. П12 және *Synechocystis* sp. PCC 6803). Цианобактерия штамдары бойынша H_2 жинақталуы қараңғы және жарық жағдайда зерттелді.

2. Алынған нәтижелерге сәйкес, қараңғы кезде 120 сағат ішінде 0,037 мкмоль H_2 /мг хл/сағ тұратын *Synechocystis* sp. PCC 6803 H_2 жоғары жинақталуы байқалды. Сонымен қатар, *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 жарықта 166 сағ инкубациядан кейін 0,229 мкмоль H_2 /мг хл/сағ түзді. DCMU 10 мкМ концентрациясы арқылы *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 сутек бөлінуі 1,5 есе арттырды.

3. Зерттелген штамдар арасында *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 сутегі шығару қабілеті басым болып саналды.

4. Барлық зерттелген штамдар қараңғыда H_2 шығарды. Ең жоғары өнімділік *Synechocystis* sp. PCC 6803 бақылау штаммымен байқалды.

Тәжірибелік маңыздылығы:

Сутегі энергияның жоғары болуына байланысты таза энергия көзі ретінде қазбалы отынға перспективалы балама болып табылады. Фототрофты микроорганизмдердің кейбір штамдары ғылыми зерттеулердің маңызды объектісі ретінде белгілі және олар биосутектің ($BioH_2$) өнімділігін арттыру үшін зерттелуде.

РЕФЕРАТ

Дипломная работа состоит из 42 страниц, 10 рисунков, 69 использованных источников литературы.

Ключевые слова: Водород, цианобактерия, фотосистема, фотосинтез, биофотолиз, биомасса.

Цель работы: Повышение производительности водорода с помощью ингибиторов фотосистемы I

Задачи:

1. В будущем превратить водород в основное топливо, которое поможет решить местные проблемы, связанные с экологией
2. Определение потенциала штаммов цианобактерий для получения водорода
3. Реализация производства водорода из фототрофных микроорганизмов
4. Найти биологические процессы получения водорода клетками цианобактерий и возможные пути повышения их продуктивности

Результаты исследования:

1. Исследованы три штамма цианобактерии (*Desertifilum* sp. IPPAS B-1220, *Synechococcus* sp. P12 и *Synechocystis* sp. PCC 6803). Накопление H_2 по штаммам цианобактерии изучалось в темных и светлых условиях.

2. Согласно полученным результатам, в темное время суток наблюдалось высокое накопление H_2 у *Synechocystis* sp. PCC 6803, содержащее 0,037 мкмоль H_2 /мг хл/ч в течение 120 часов. Кроме того, *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 образовал 0,229 мкмоль H_2 /мг хл/ч после инкубации на свету в течение 166 ч. Выделение водорода *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 с концентрацией DCMU 10 мкМ увеличено в 1,5 раза.

3. Среди исследованных штаммов преобладающей считалась способность *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 выделять водород.

4. Все исследованные штаммы выделяли H_2 в темноте. Наибольшая производительность отмечена контрольным штаммом *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Практическое использование:

Водород является перспективной альтернативой ископаемому топливу в качестве источника чистой энергии из-за высокой энергии. Некоторые штаммы фототрофных микроорганизмов известны как важные объекты научных исследований и изучаются для повышения продуктивности биоводорода ($BioH_2$).

ABSTRACT

Master thesis contain 42 pages, 10 figures, 69 references.

Key words: hydrogen, cyanobacteria, photosystem, photosynthesis, biophotolysis, biomass.

The purpose of the research work: to increase the yield of hydrogen by Photosystem 1 inhibitors

Tasks:

1. Turning hydrogen into the main fuel in the future to help solve local environmental problems
2. Determination of the potential of cyanobacteria strains to extract hydrogen
3. Implementation of hydrogen production from phototrophic microorganisms
4. Find out the biological processes of obtaining hydrogen by cyanobacteria cells and possible ways to increase their productivity

Research results:

1. Three strains of cyanobacteria were studied (*Desertifilum* sp. IPPAS B-1220, *Synechococcus* sp. I12 and *Synechocystis* sp. PCC 6803). The accumulation of H₂ in cyanobacteria strains was studied in dark and light conditions.

2. According to the results obtained, there was a high accumulation of H₂ in *Synechocystis* sp. PCC 6803 with a content of 0.037 μmol H₂/mg chl/h for 120 hours in the dark. In addition, *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 formed 0.229 μmol H₂/mg chl/h after 166 h incubation in light. At a concentration of 10 microns of DCMU, *Desertifilum* sp. IPPAs B-1220 increased hydrogen separation by 1.5 times.

3. Among the studied strains, the ability to produce hydrogen *Desertifilum* sp. IPPAs B-1220 was considered dominant.

4. All studied strains produced H₂ in the dark. The highest performance was observed with the control strain *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Practical application:

Hydrogen is a promising alternative to fossil fuels as a clean energy source due to its high energy consumption. Some strains of phototrophic microorganisms are known as important objects of scientific research, and they are being studied to increase the productivity of biohydrogen (BioH₂).

МАЗМҰНЫ

КІРІСПЕ	6
НЕГІЗГІ БӨЛІМ	6
1 ӘДЕБИЕТКЕ ШОЛУ	7
1.1 Цианобактерия жасушалары арқылы сутектің бөлінуін арттырудың мүмкін жолдары	7
1.2 Сутектің шығуын арттырудың метаболикалық тәсілдері	7
1.3 Сутегі өнімділігін арттырудың генетикалық тәсілдері	13
1.4 Цианобактериялардағы сутегі өндірісін арттырудың технологиялық тәсілдері	17
1.5 Цианобактериядағы биофотоллиз процесі	23
1.6 Биофотоллиз түрлері	24
2 ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ ЖӘНЕ ӘДІСТЕРІ	29
2.1 Зерттеу объектілері	29
2.2 H_2 өндіруге арналған жасушаларды дайындау	29
2.3 H_2 Өлшеу	30
3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕР ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ТАЛДАУ	31
3.1 Цианобактериялар өсірінділерімен H_2 босатылуын анықтау	31
3.2 Зерттелген цианобактериялардың штамдарымен H_2 босатуға DSMU әсері	34
ҚОРЫТЫНДЫ	37
ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ	38

КІРІСПЕ

Сутегі (H_2) - жаңартылатын, мол және экологиялық таза энергия көзі. Фотосинтетикалық организмдер күн сәулесін тиімді ұстап, оны органикалық молекулаларға айналдырады. Цианобактериялар органикалық қосылыстар мен суды ыдырату арқылы H_2 шығарады. Бұл зерттеуде биологиялық H_2 цианобактериялардың әртүрлі штамдарынан алынды. Сондай-ақ, *Synechocystis* sp. PCC 6803 арқылы H_2 жинақталуы қараңғыда 120 сағат ішінде 0,037 мкмоль /мг хл/сағ дейін молекулалық сутегін бөлді. Ал, жіпшелі, гетероцист емес *Desertifilum* sp. B-1220 IPPAS штаммымен анаэробты ортада максималды сутек шығымы 166 сағат ішінде жарықтың астында тіркелді (0,229 мкмоль /мг хл/сағ). 10 мкМ DCMU арқылы 1,5 есе 0.348 мкмоль H_2 / мг хл/ сағ *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 H_2 өндірісін артты. Бұл *Desertifilum* цианобактериясының H_2 өндіруге қабілеттілігі туралы алғашқы баяндама.

Жұмыстың өзектілігі: Сутегі алудың биологиялық әдістеріне фотосинтездік микроорганизмдер, оның ішінде жоғары метаболикалық потенциалы бар цианобактериялар ерекше қызығушылық тудырады. Көптеген шолулар мен эксперименттік жұмыстар цианобактериялардың жасушалары күн энергиясын түрлендіру арқылы сутегі түзілу процестеріне арналған. Морфологиялық және метаболикалық ерекшеліктер оларды ең перспективалы сутегі өндірушілеріне айналдырады.

Жұмыстың мақсаты: Фотосистема 1 ингибиторлары арқылы сутек өнімділігін арттырудың жолдарын табу

1. Болашақта сутекті экологияға байланысты жергілікті мәселелерді шешуге көмектесетін негізгі отынға айналдыру;

2. Сутегін алуға арналған цианобактериялар штаммдарының потенциалын анықтау;

3. Фототрофты микроорганизмдерден сутегі өндірісін іске асыру;

4. Цианобактериялардың жасушалары арқылы сутек алудың биологиялық процестері және олардың өнімділігін арттырудың мүмкін жолдарын табу;

Практикада қолданылуы: H_2 жоғары тиімді электр энергиясын өндіру үшін таза энергия көзі ретінде пайдаланылуы мүмкін. Цианобактерияларды осы организмдердің суды H_2 және оттегіге күн энергиясымен ыдырату қабілетіне байланысты 2 энергия көзі ретінде пайдалануға болады. Сонымен қатар, бірқатар микробалдырлар нитрогеназа немесе гидрогеназа арқылы катализдейтін қараңғыда сутекті ферментативті түрде шығаруға қабілетті. Мұндай өндіріс тиімдірек және энергияны аз қажет ететінін деп саналады.

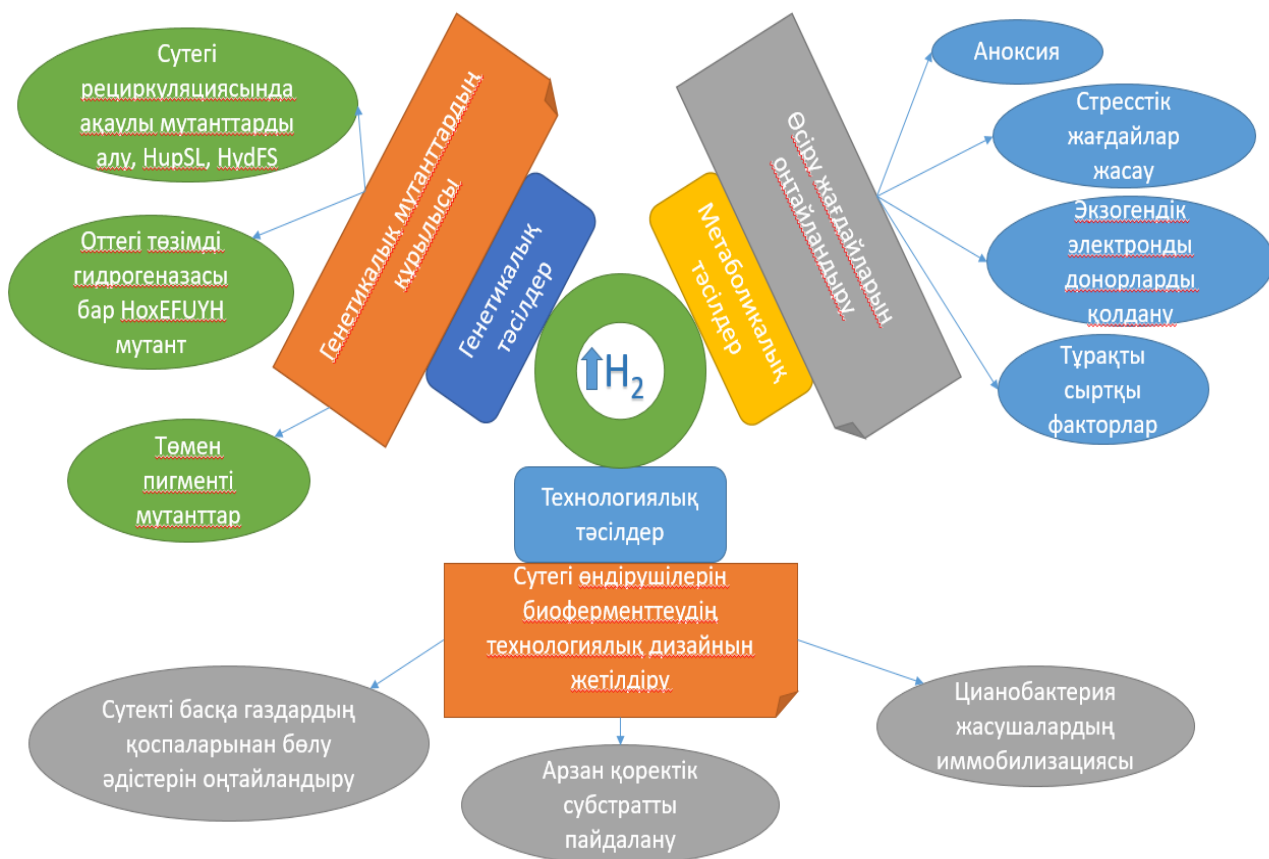
1 ӘДЕБИЕТКЕ ШОЛУ

1.1 Цианобактерия жасушалары арқылы сутектің бөлінуін арттырудың мүмкін жолдары

Қазіргі уақытта фототрофты микроорганизмдердің жасушалары сутегі өндірісінің негізгі процестерінің механизмдері жақсы зерттелгеніне қарамастан, сутектің биологиялық өндірісі әлі күнге дейін тәжірибеге енбейді. Сутектің тұрақты шығарылуының негізгі шектеулері - ферменттердің оттегіне сезімталдығы, қалпына келтірілген электрондарды қолдана отырып, әртүрлі жолдар арасындағы электрондар үшін бәсекелестік болып табылады. Сонымен қатар, қосымша асқынулар сутектің бөліну процесінің тұрақсыз болуымен байланысты. Сондықтан цианобактериялармен сутектің бөлінуі осы уақытқа дейін тек зертханалық жағдайда байқалды. Коммерциялық мақсатқа жету үшін сутектің шығарылу жылдамдығын және осы процестің ұзақтығын арттыру қажет. Қазіргі уақытта цианобактериялармен сутегі өндірісін жақсартудың көптеген тәсілдері зерттелуде. Барлық осы тәсілдер, әдетте, үш негізгі нүктеге дейін азаяды: метаболикалық, генетикалық және технологиялық тәсілдер сутегі өндірісін арттырады.

1.2 Сутектің шығуын арттырудың метаболикалық тәсілдері

Биосутек өндірісін арттырудың метаболикалық тәсілдері физиологиялық және биохимиялық тәсілдердің дамуымен байланысты, олар цианобактериялармен H_2 түзілу жылдамдығы мен ұзақтығын арттырады. Цианобактерия жасушаларының сутекті бөлу процесінің тиімділігі көптеген факторларға тәуелді болады, бұл оның ауқымды өндірісі үшін ерекше маңызды. Жарық қарқындылығынан, ортаның температурасы мен рН-тан басқа маңызды факторлардан басқа, молекулалық оттегінің болуы, тұздылығы, қоректік және газ тәріздес орталардың құрамы болады. Әр түрлі цианобактериялардың штаммдары бойынша сутегі алу процесінде әр түрлі параметрлер әр түрлі әсер еткені белгілі. Сонымен қатар, сутегі өндірісінің белсенділігіне көптеген газеттерде егжей-тегжейлі көрсетілген газ ортасының құрамы, жарықтандыру, ортаның рН және температура сияқты негізгі факторлар әсер етті. рН - сутегі өндірісіне қатты әсер еткен факторлардың бірі. Жақында жүргізілген зерттеулерге сәйкес сутектің өндірісі үшін оңтайлы рН 5 пен 7 аралығында болды. Бұл индикатор цианобактериялардың ферментативті механизмінің тиімділігін реттейді және жасушалардың тотығу-тотықсыздану әлеуетінде үлкен рөл атқарады. Жарық туралы айтар болсақ, жарықтандыру үшін цианобактериялық түрлерге деген қажеттілікке және осы дақылдардың жарық астында немесе қараңғыда сутегін беру қабілетіне қарамастан, белсенді сутектің бөлінуі көбінесе қараңғыда байқалады.



Сур. 1 - Цианобактериялар жасушалары арқылы сутегі өндірісін ұлғайтудың негізгі тәсілдері

Жарықтандыру үшін цианобактериялық түрлерге деген қажеттілікке карамастан, бұл бактерия дақылдары сутекті жарықта немесе қараңғыда бөлу қабілетіне ие; сутектің белсенді бөлінуі көбінесе қараңғыда байқалады. Мысалы, *Spirulina platensis* культурасымен сутектің бөлінуінің оңтайлы шарттары 32°C болды, толық анаэробизм жағдайында және жарықтың болмауы. *Synechococcus* Nag PCC 7942 сутегінің шығуы анаэробты жағдайда қараңғыда да байқалды. Цианобактериялардың сутегі шығару қабілетін арттыруда және ферментативті реакцияларды реттеу арқылы метаболизмді басқаруда температура мен рН маңызды рөл атқарды. Жарияланған мәліметтерге сәйкес, температураның оңтайлы талаптарының цианобактериялардың түріне қарай өзгеріп отыратын айырмашылықтары бар. Биосутекті цианобактериялы жасушалармен белсенді өндірудің оңтайлы диапазоны 30-дан 40°C-қа дейін жетеді. Көміртегі көзі, макро және өсуге қажетті микроэлементтер сияқты қоректік орталардың құрамы ферменттердің белсенділігіне әсер еткенін ескеру қажет. Осылайша, қарапайым органикалық қосылыстар болған кезде сутектің сіңірілуі жоғарылағаны белгілі, өйткені кофакторлы қосылыстардың электронды донорлығы нитрогеназаның белсенділігін арттырды. Әр түрлі қанттардың қосылуы сутектің өндірісін ынталандырғаны атап өтілді, мысалы, !маннозаны! қолдану сутектің шығыс жылдамдығын сағатына 5,58 нмоль сутекке дейін құрғақ салмаққа дейін

арттырды. Фототрофты микроорганизмдер жасушаларының биосутек өндіруіне әр түрлі микроэлементтердің әсері бір-біріне қарама-қайшы келеді. Алайда, Fe, Cu, Co, Mo, Zn және Ni сияқты әр түрлі микроэлементтердің қоректік ортаға қосылуы, олардың ферменттер құрамына қатысуына байланысты сутегі өндірісін едәуір арттырды. Осылайша, Хонтао Мин және Луи А. Шерман темірдегі аммоний цитраты түрінде ортадағы темір концентрациясының 10 есе артуы *Cyanothece* sp. ATCC 51,142 штаммының жасушаларының сутегін өндіруіне қолайлы болатындығын анықтады.

Сонымен қатар, ортаға никельдің қосылуы *Arthrospira* цианобактериялары үшін биомассаның қалыпты жинақталуын және сутек өндірісінің жылдамдығының айтарлықтай жоғарылауын қамтамасыз еткендігі туралы дәлелдер бар. Керісінше, кейбір зерттеулерде азот фиксациясының *Anabaena* spp. СА және *Anabaena* spp. 1F штамдарының жасушаларының H_2 шығуына төмен Ni_2^+ концентрациясына кері әсері байқалды. Бұл зерттеушілер Ni_2^+ , 10 мкМ концентрациясының төмендігі гидрогеназаның сіңіру белсенділігін ынталандырғанын және осылайша H_2 -тің алынуын блоктағанын анықтады. Осы нәтижелерге сәйкес никель сутегі сіңіретін гидрогеназаның синтезі мен активациясы үшін қажет. Цианобактериялардың жасушаларында сутектің шығуына әсер ететін көптеген әр түрлі факторлар және нәтижелерді айтарлықтай жақсартуға осы факторларды реттеу және өзгерту арқылы қол жеткізуге болатындығы сөзсіз. Осылайша, цианобактериялардың штамдарын іздеу сутекті көп мөлшерде өндіру мүмкіндігімен сипатталды және осы мәселені шешу мен жүзеге асыруда маңызды рөл атқарды. Сутегі өндірісі цианобактериялардың түрлері мен штамдарының алуан түрлілігінде зерттелген. Сутегі өндірісінің тиімділігі микроорганизмдердің метаболизмдік әлеуетіне байланысты, ол өз кезегінде цианобактериялардың түріне байланысты. Бүгінгі күнге дейін цианобактериялардың 14-тен астам тұқымдары әр түрлі өсіру жағдайларында сутегін өндіретіні белгілі. Олардың ішінде *Spirulina platensis* анаэробты жағдайда қараңғыда сутекті (1 мкмоль H_2 /мг/күрғақ вт/сағ) өндіре алатындығы туралы айтылады. Әдебиеттерге сәйкес, Анабаена тектес азотты бекітетін цианобактерия түрлері сутек өндіруші белсенділікке қатысты жақсы зерттелген. Осы тұқым өкілдерінің арасында штамм *Anabaena variabilis* ATCC 29413 жоғары сутектік белсенділікпен сипатталады және оның ең жақсы нәтижесі 45,16 мкмоль H_2 /мг хл/сағ болды. Сутектің жоғары өнімі *Anabaena variabilis* PK84–167,6 мкмоль /мг хл/ сағ штаммында байқалады. *Anabaena cylindrica* штамы сутегі мен оттекті аргон атмосферасында 30 күн ішінде жарықтандырудың шектеулі жағдайында бір уақытта өндіреді. *Cyanobacteria Anabaena* sp. азот жетіспейтін жағдайда сутегі мен *Anabaena* цилиндрикасын едәуір мөлшерде өндіруге қабілетті, ең көп сутек шығарады (30 мл/л/сағ) және т.б. *Nostoc* туысының мүшелері қысқа мерзімді болды газ шығымы 0,17-0,60 мкмоль H_2 /мг хл/сағ болатын сутектің бөлінуі. *Oscillatoria* sp. Miami BG-7 штамы гетероцист емес ең көп зерттелетін түр болып табылады, максималды босату жылдамдығы H_2 260 мкмоль /мг хл/сағ құрайды. Бір жасушалы цианобактериялардың арасында

азотты бекітетін перспективалы түрлердің бірі - Цианотека. Бұл организмнің сутегі өндірісіндегі жалпы теориялық қабілетін бағалау үшін оның толық метаболикалық моделі бар. Бұл штамм көміртегі көзі ретінде глицерин болған жағдайда 465 мкМ/мг хл/сағ жылдамдықпен сутек шығара алады. Вегетативті жасушалардағы нитрогеназа ферментінің белсенділігі арқасында 0,92 мкмоль H_2 /мг хл/сағ бөліп шығарған *Cyanothece* 7822 штаммында жақсы нәтижелер байқалды. Күкірттің аштық жағдайында *Gloeocapsa alpicola* бір жасушалы азот фиксацияланбайтын цианобактерияларында 0,58 мкмоль/мг ақуыз мөлшерінде сутек шығару мүмкіндігі сипатталған.

Synechococcus түрінің штамдары кеңінен зерттелген, сондықтан ең жақсы нәтиже *Synechococcus* PCC 7942-де тіркелді және сутектің шығымы 162,52 мкмоль/мг хл/сағ болды. *Synechocystis* штамдары - цианобактериялардың биосутек өндірісін зерттеудегі модельдік объектілері. PCC 6803 штаммымен көптеген зерттеулер жүргізілді, сутектің шығымының ең жақсы нәтижесі - 18,4 мл H_2 /мг хл/сағ. Галотолерантты цианобактериялардың сутегіні өндіруіне қатысты бірнеше дәлелдер бар және олардың арасында *Aphanothece halophytica* жақсы әлеуетті көрсетті. Анабаена тектес цианобактериялардың азотты бекітетін түрлері сутекті өндіру белсенділігі үшін жақсы зерттелген. Мысалы, *Anabaena* цилиндрикасы сутегі мен оттегіні аргон атмосферасында 30 күн ішінде шектеулі жарықтандыру жағдайында берді. *Anabaena* spp. азоттың жетіспеушілігі жағдайында сутектің көп мөлшерін өндіруге қабілетті және *Anabaena* цилиндрикасы сутектің көп мөлшерін шығарады (30 мл/л культура/сағ). Сонымен қатар, *Cyanothece* 51142 қазіргі уақытта перспективалы азотты бекітетін цианобактериялардың бірі болып табылады. Сонымен қатар, осы организмнің сутегі өндірісіндегі жалпы теориялық қабілетін бағалау үшін *Cyanothece* 51142 толық метаболикалық моделі бар. Коссалбаев және т.б. жарық пен қараңғы процедураларда төрт гетероцист емес цианобактерия штамдарының сутегіні өндіруді зерттеді. Азотты бекітетін *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 цианобактериясымен H_2 өндірісі 10 мкМ DCMU (0,348 мкмоль H_2 /мг хл/сағ) қосқаннан кейін 1,5 есе өсті. Бұл *Desertifilum* жабайы типтегі штаммының нитрогеназа және гидрогеназа ферменттерінің көмегімен H_2 -ні сіңіруге арналған алғашқы зерттеуі болды.

Молекулалық оттегі гидрогеназа және нитрогеназа белсенділігінің ингибиторы екені белгілі. Сондықтан PSII-де H_2O тотығуының жанама өнімі ретінде пайда болатын қоршаған ортадан оттегін шығару жарыққа тәуелді сутегі өндірісіне жауап беретін гендерді білдіру үшін қажет деп саналады. Осылайша, сутегі босатылған кезде цианобактериялардың өнімділігін арттыруға метаболикалық тәсілдердің негізгі процестері оттегісіз орта құру үшін PSI-ді тежеуге және нитрогеназдардың белсенділігін арттыруға бағытталған. Осы мақсатқа жету үшін культуралық ортаны инертті газдармен ауыстыру жүзеге асырылады. Бұл суспензиядан оттегіні кетіруге көмектеседі. Сонымен, *Azollae* және *Anabaena variabilis* цианобактериялары арқылы

сутектің едәуір ұзақ түзілуі аргонмен қоршаған ортаны тазарту нәтижесінде пайда болған анаэробты жағдайларда байқалды. Аргонды қолдану нитрогеназа белсенділігінің артуына және цианобактерияларда түзілетін гетероцисттер санының артуына әкелді. 73% аргон, 25% N₂ және 2% CO₂, 93% аргон, 5% N₂ және 2% CO₂ қатынасында газдар қоспасымен *A. variabilis* РК 84 өсіру кезінде биомассаны үрлеу жоғары сутегі шығымдылығына қол жеткізуге мүмкіндік берді (167,6 мкмоль/мг хл/сағ). Инертті газдармен үрлеуден басқа, цианобактериялық жасушалармен сутегі өндірісін ұлғайтудың келесі тәсілі - макродефицит жағдайларын жасау. Қоректік ортадан күкірт, азот және фосфор сияқты маңызды микроэлементтерді алып тастау метаболизмнің өзгеруіне байланысты жасушалардың сутегі өндірісін ынталандырғаны белгілі. Осылайша, аминқышқылдары, ақуыздар, дәрумендер және тиамин сияқты қосылыстардың пайда болуы үшін күкірт пен азоттың болмауы фотосинтетикалық организмдердің өсуін баяулатып, өміршендігін төмендетуі мүмкін. Микроэлементтік аштықтың сутегі өндірісіне әсері цианобактериялармен *G. alpicola* CALU 734 және *Synechocystis* sp. PCC 6803 азотсыз штамдарын қолдану арқылы зерттелді. *G. alpicola* CALU 734-тегі азотты ораза гликоген деңгейін шамамен 40% арттырды. Жасушаларда гликогеннің жинақталуының ұқсас өсуі күкіртті ортадан шығарғаннан кейін *G. alpicola* CALU 734 және *Synechocystis* sp. PCC 6803 үшін сипатталған. Осы нәтижелерге сәйкес, микроэлементтердің ашығуы жағдайында гидрогеназа белсенділігінің едәуір жоғарылауы байқалды, бұл сутегі бөліну уақытының максималды жылдамдығы 0,1–0,15 мкмоль H₂/мг хл/сағ 8 сағатқа дейін артуына әкелді. Осылайша, бұл күкірттің жетіспеушілігімен байланысты фотосинтездің бұзылуынан жасушалардағы оттегінің концентрациясы төмендеген деген болжам жасады.

Сонымен қатар, PSII-де D1 ақуыз синтезінің бұзылуы PSII қалпына келтіру циклінің баяулауына және нәтижесінде PSII белсенді орталықтарының құрамының төмендеуіне әкелді. Ашыққан жасушалардағы PSII инактивациясының бұл процесі фотобиореактордағы анаэробты жағдайлардың өздігінен орнығуы үшін маңызды және қажет болуы мүмкін. Осылайша, макроэлементтердің цианобактериялы дақылдардың аштықтан азаюын жарықта сутектің көбеюіне метаболикалық тәсіл деп санауға болады. Бұл жағдайда сутектің фотопродукция құбылысы екі стресс факторы: күкірт пен оттегінің жетіспеушілігі арасындағы синергетикалық әрекеттің нәтижесі болып табылатындығын ескеру қажет. Сутегі өндірісі кезінде цианобактерия жасушаларының өнімділігін арттырудың тағы бір тиімді тәсілі - бұл электронды тасымалдау ингибиторлары мен ферменттерін қолдану. Қазіргі уақытта 15-тен астам түрлі ингибиторлар қолданылады, олардың ішінде ең көп қолданылатын, соның ішінде DCMU, карбонил цианид *m*-хлорфенил гидразон (СССР), метил viologen (MV), калий цианид (KCN), левомецетин және 2,5-дибром-3-метил-6-изопропил-*p*-бензохинон (ДБМИБ), пентахлорфенол (PCP) және малонат. Сонымен қатар, деректер осы ингибиторлардың әрқайсысын

қолдану цианобактерия жасушалары арқылы H_2 өндірісінің өсуіне әкелуі мүмкін деп болжады.

DCMU - бұл кеңінен қолданылатын электронды тасымалдау ингибиторларының бірі, өйткені молекула құрылымы бір рет азайтылған пластохинонның құрылымына ұқсас. Бұл факт осы молекулалардың PSII реакция орталығындағы хинондармен байланысатын орталықпен берік байланысын түсіндірді. DCMU қолдану осы фотосистеманың белсенділігін тежеуге және молекулалық сутекті өндіруге қолайлы анаэробты жағдай жасауға бағытталған. Осылайша, DCMU хинонның аналогы ретінде әрекет ете отырып, PSII QB-мен байланысады және QA-дан электрондардың берілуін блоктайды. DCMU қатысуымен цианобактерия жасушаларының сутегі өндірісінің артуы бірнеше жұмыстарда көрсетілген. Курнак және басқалар қараңғы анаэробты жағдайда 75 мкМ DCMU қатысуымен *Synechocystis* sp. PCC 6803 жасушалары арқылы H_2 өндірісінің жоғарылауы туралы хабарлады. Цианобактериялар мен микробалдырларда PSII тежегішінің тағы бірі - бұл карбонил цианид m-хлорофенил гидразон (СССР). DCMU сияқты, карбонил цианид m-хлорофенил гидразин PSII фотохимиялық белсенділігін тежеп, O_2 бөлінуінің төмендеуіне әкелді. СССР жарықта PSII фотохимиялық белсенділігін тежейді цианобактериялардағы *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Synechococcus* sp. PCC 7942, *Nostoc* sp. және *Lyngbya* sp. *Oscillatoria chalybea* мен *Synechocystis* sp. PCC 6803-тің СССР әсерінен H_2 өндірісінің жоғарылағаны туралы бірнеше дәлелдер болды. Сонымен қатар, СССР АТФ синтезін тежейтіні, демек, *Anabaena variabilis* және *Anacystis* цианобактерияларында қараңғы тыныс алу жылдамдығы жоғарылағаны туралы айтылды. Нидуландар, KCN және РСР сияқты ингибиторлар хинолоксидазаны блоктайды, бұл PQ пулының көбірек төмендеуіне әкелді. Сонымен қатар, KCN Б2 және Крогманның ұсынғанындай және DBMIB-ге ұқсас пластоцианиннің белсенділігін басу арқылы H_2 сіңіру процесін немесе цитохромнан b_6f фотосистемаға I (PSI) электрондардың өтуін блоктауы мүмкін. DBMIB гендердің нитрат ассимиляциясын реттеуге қатысады. Нитраттардың ассимиляциялануының тежелуі H_2 сіңірудің жоғарылауына әкеледі. Алайда, DBMIB кері әсері, одан әрі зерттеуді қажет ететін сутектің фотоөнімінің төмендеуіне әкелуі мүмкін. Цианобактериялардың жасушаларының биосутекті сіңіру өнімділігін арттырудың бірдей тиімді метаболикалық әдісі - бұл ортаға әртүрлі экзогендік электронды донорларды қосу. Көміртегі көзі нитрогеназа ферментінің белсенділігіне әсер ететіні белгілі. Қарапайым органикалық қосылыстар болған кезде сутектің өндірісі жоғарылайды, өйткені кофакторлы қосылыстармен электронды донорлық беру нитрогеназаның белсенділігін арттырады. Сонымен, әр түрлі қанттардың қосылуы сутектің өндірілуін ынталандырды, ең жоғары жылдамдық - сағатына 49,3 нмоль сутегі құрғақ салмаққа глюкоза қосылған кезде байқалды деп хабарлайды.

Жоғарыда айтылғандарды қорытындылай келе, әртүрлі метаболикалық тәсілдер цианобактериялар арқылы N_2 өндірісінің жылдамдығы мен ұзақтығын едәуір арттыратынын атап өткен жөн. Алайда, ингибиторлардың, микроэлементтердің, қарапайым органикалық қосылыстардың белгілі бір концентрацияларын немесе цианобактериялардың ферментативті белсенділігіне және сәйкесінше сутегі өндірісіне бірдей әсер ететін басқа физика-химиялық және физиологиялық факторлардың белгілі бір дозаларын анықтау өте қиын.

1.3 Сутегі өнімділігін арттырудың генетикалық тәсілдері

Биосутекті сіңіру процесін оңтайландырудың бір әдісі сутегі алмасуының генетикалық бақылауын зерттеуге және тиімді өндіруші штамдарды алу үшін генетикалық тәсілдерді қолдануға негізделген. Сондықтан фото-сутегі алу үшін генетикалық мутанттарды құру экономикалық тұрғыдан орынды. Фототрофты микроорганизмдерді, соның ішінде цианобактерияларды модификациялаудың барлық генетикалық тәсілдері бар гендерді басу, жаңаларын енгізу немесе суперэкспрессиялау арқылы сутектің шығуын арттыруға бағытталған. Әдебиеттерге сәйкес, цианобактериялармен генетикалық манипуляциялар келесі негізгі мәселелерді шешу үшін қажет деп айтуға болады: 1) сіңіретін гидрогеназаның болуы және белсенділігі, 2) гетероцисттердің пайда болу жиілігі төмен, 3) тотықсыздандырғыштар үшін бәсекелестік, ассимиляцияның басқа әдістерінің болуы, 4) жарық жинайтын антенналардың фотохимиялық тиімділігінің төмендігі. Сонымен, цианобактериялардың бірнеше түрлерінің генетикалық модификациясынан кейін N_2 шығарылуы жабайы түрге қарағанда едәуір жоғары болды. Әдеби деректерді талдай отырып, алынған барлық мутанттарды алты негізгі топқа бөлуге болады: 1) сутегі рециклінде ақаулы мутанттар, *hupSL* және *hupF*, 2) аммоний иондарына төмен *Mo* нитрогеназа сезімталдығы бар мутанттар, 3) гетероцисттерді қалыптастыру және басу үшін қолданылатын *hetRFCLN* және *patS* гендерінде ақаулы мутанттар, 4) *hoxEFUYH* оксигентолерантты гидрогеназа бар мутанттар және т.б. 5) электронды ағынды мутанттар, сутегі метаболизміне қайта бағытталған және 6) төмен пигментті мутанттарға бағытталған.

Бактерияларды бекіту арқылы азот алмасуын бақылау кезінде сутекті шығару кезінде олардың өнімділігін арттырудың генетикалық тәсілдері сутегі сіңіретін гидрогеназаларды жою немесе инактивациялаумен, аммиакқа сезімтал емес мутанттардың пайда болуымен және жіптердегі гетероцист санының жасанды ұлғаюымен байланысты екенін атап өткен жөн. Азотты бекіту кезінде гидрогеназа тотыққан сутегі нитрогеназасын қайта өндеуге қатысатыны белгілі. Цианобактериялардың метаболизмін қарастыра және талдай отырып, сутекті алып-тастау гидрогеназаның сіңуі сутегі шығымының жоғарылауына әкелуі мүмкін деп айтуға болады. Бұл манипуляция туралы

генетикалық зерттеулер ұзақ уақыт бойы жүргізілген және олар көптеген еңбектерде сипатталған. Атап айтқанда, HupSL гидрогеназасының үлкен немесе кіші қосалқы бөлігінің гендері, сондай-ақ гидрогеназаның экспрессия деңгейін төмендететін реттегіш (hupr ақуызы) нокаутқа түседі, осылайша сутегі шығымын арттырады. Сонымен, химиялық мутагенез арқылы нитрофикациялайтын цианобактериялармен сутегі өндірісін арттыру үшін *anabaena variabilis* ATCC 29413, *Nostoc punctiforme* PCC 73102 және *Nostoc* PCC 7422 мутантты штамдары алынды. Бір қызығы, осы жарияланымдарда келтірілген нәтижелерге сәйкес анаэробты жағдайда мутантты штамдармен сутектің бөлінуі үш есе өсті. Авторлар мутантты жасушалардағы гидрогеназа белсенділігінің немесе оның нитрогеназа кешенімен функционалдық байланысының өзгеруі жасушаның дифференциациясын басқаратын жалпы реттеуші жүйенің немесе азот пен сутегі алмасуымен байланысты электрондардың берілу жолдарының бұзылуымен анықталады деп санайды. Masukawa және басқалары FeMo нитрогеназа кофакторына жақын орналасқан dc-Q193S және dc-R284H аминқышқыл алмастырғыштары бар Hup гидрогеназасы жоқ *Anabaena* PCC 7120 штаммының мутанттарын құрастырды және сипаттады.

Олардың фотосинтездейтін белсенділігі мен температураға және молекулалық азоттың болуына байланысты сутек өндіру қабілетін зерттеу мутанттардың сутегі өндірісі активтендіру энергиясының ата-аналық штаммынан айтарлықтай ерекшеленбейтіндігін көрсетті. Алайда, dc-Q193S мутанты, deltaHup ата-аналық штаммынан айырмашылығы, H₂ шығарындылары үшін температураның төмен температурасын көрсетті; сонымен қатар, бастапқы штамнан айырмашылығы, мутанттардағы сутектің бөлінуі газ фазасында 100% N₂ кезінде де тежелмеген. Бұл әсіресе практикалық тұрғыдан перспективалы, өйткені бұл процесте аргонның орнына арзан газ фазасын қолдануға мүмкіндік береді. Сутегі өндірісінің жоғары жылдамдығы Hup-гидрогеназаның белсенділігі шектелген ndhB ақауын көрсеткен мутантты *Synechocystis* PCC 6803 M55 штаммы үшін де көрсетілген.

Азотты бекітетін цианобактериялардың өнімділігін арттыруға арналған келесі генетикалық манипуляциялар аммиакқа сезімтал емес мутанттардың пайда болуымен байланысты. Аммоний иондарының жоғары концентрациясы белсенділікті тоқтататын нитрогеназа синтезін басу арқылы сутектің бөліну процесін тежейтіндіктен, H₂ шығымының артуы нитрогеназаның аммоний иондарына сезімталдығын төмендету есебінен мүмкін болады. Ұқсас әсерге NIFA генінің нүктелік мутациясы немесе глутамин синтаза гендерінің бірі glnA-ны өшіру арқылы қол жеткізуге болады, бұл NIFA ақуызын аммоний иондарына сезімтал етеді, нәтижесінде нитрогеназа синтезі қоректік ортада аммонийдің болуына тәуелді емес. Сонымен қатар, аммонийдің жасушаға тасымалдануына жауап беретін гендерге әсер ете отырып, нитрогеназаның синтезі мен белсенділігі ортадағы аммиак концентрациясына тәуелді емес

мутанттарды алуға болады. Осылайша, цианобактериялардың мутантты штамдары аммонийдің үлкен концентрациясы бар ағынды суларда өсірудің артықшылықтарын көрсетті; бұл сутегі өндірушілерін қолдана отырып отын жасау үшін төменгі қалдықтарды пайдалану арқылы қоршаған ортаға одан әрі көмектеседі.

Сонымен қатар, азотты бекітетін цианобактериялар арқылы сутектің белсенді өндірісін филаменттердегі гетероцист санын жасанды түрде көбейтуге болады, бұл нитрогеназа концентрациясының жоғарылауына әкеледі. Бұған гендік инженерия әдісімен де, химиялық өңдеу арқылы да қол жеткізуге болады, мысалы, 7-азатриптофан. Егер гетероцисттердің түзілуіне қатысатын негізгі гендер белгілі болса және азотты бекітетін болса, генетикалық құралдар гетероцисттердің түзілу жиілігін басқара алады, өйткені гетероцисттердің түзілуі кезінде 600-1000 ген ерекше белсендіріледі. Гетероцисттердің түзілуін бақылайтын бастапқы ген-бұл *hetR* гені, ал *patS* және *hetN* гендік өнімі олардың репрессиясын реттейді. *Anabaena* PCC 7120-да *hetR* генінің суперэкспрессиясына әкелетін генетикалық манипуляциялар гетероцисттердің түзілу жиілігін 29% - ға арттырды, ал азот ашығуы бұл мәнді 10% - ға дейін төмендетті. Сонымен қатар, гетероцисттерді қалыптастыруға, сақтауға және реттеуге қатысатын *hetR*, *patS* және *hetN* гендері генетикалық манипуляциялардың мақсаты болуы мүмкін. Осылайша, *hglk* генінің экспрессиясын арттыра отырып, гетероцистаның гликолипидті қабатын күшейтуге болады, осылайша оның ыдырауын азайтады.

Цианобактериялардың сутектік өнімділігін арттырудың ең қызықты генетикалық құралдарының бірі - құрамында пигменттің мөлшері аз, яғни антеннасы аз хлорофилл және мутантты штамдарды алу, және фикобилин пигменттері. Бұл жағдайда жасушаның фотосинтетикалық аппараты жоғары жарық интенсивтілігінде аз фотонды сіңіреді және сондықтан аз фотонды жұмсайды деп саналады. Сонымен қатар, электронды судан CO_2 немесе H_2 -ге ауыстырған кезде тек екі фотон қажет, өйткені бұл алмасуға екі фотожүйе қатысады. Сондықтан фотосинтездеу аппараттарында жарық жинайтын пигменттер саны азайтылған мутанттарды құру күн энергиясын көмірсуларға айналдыру тиімділігін 10% арттыруға мүмкіндік береді, одан сутегі отынын алуға болады. Бернат және басқалардың пікірі бойынша, *Synechocystis* sp. PCC 6803 антеннасы жетіспейтін мутантты штамды қолдану сағатына 200 мл H_2 - ге дейін өсіруді 1 л культурадан алуға болатындығын көрсетеді. Олар сондай-ақ, фикобилиномасыз мутантта желілік электронды ағын жылдамдығы жабайы типтегі штамға қарағанда 5,5 есе жоғары болғанын, ал циклдік электрондар ағынының жылдамдығы екі штам үшін де бірдей болғанын атап өтті. Электрондар ағынының сызықтық жылдамдығының артуы фотоавтотрофиялық жағдайда H_2 бөлінуін көбейтудің алғышарты болып табылады. Цианобактериялардың сутегі өнімділігін арттырудың маңызды генетикалық тәсілі гидрогеназаның оттегіне сезімталдығы мәселесін шешу болып табылады. Цианобактерияларда H_2 -ті тұрақты шығаруға арналған O_2 -

төзімді гидрогеназа ферментін құру туралы көптеген зерттеулер бар. Сонымен қатар, қышқылға төзімді гидрогеназалары бар цианобактериялардың жаңа рекомбинантты штамдарын алу бойынша зерттеулер жүргізілуде. Қажетті құрылымдық және көмекші гендердің интеграциясы *Thiocaspa roseoperscina* гидрогеназаның *Synechococcus elongatus* PCC 7942 хромосомасына синтезделуіне жауап берді. *Synechococcus elongatus* PCC 7942 цианобактерияларына клостридиальді Fe-гидрогеназаны кодтайтын құрылымдық гендерді енгізу және оларды кейіннен транскрипциялау және фотосинтетикалық микроорганизмде сутегі өндіретін функционалды ферментке аудару қызығушылық тудырады және әрі қарайғы зерттеулерге лайық. Сонымен қатар, Рубрививакс желатинозының жетілу гендерінен екі құрылымдық гидрогеназа гендерін енгізу арқылы рекомбинантты *Synechocystis* sp. PCC 6803 жасау мүмкіндігі бар. Оттегіне төзімді гидрогеназаның шамадан тыс экспрессиясымен осындай цианобактериялардың мутантты штамдарын алу және пайдалану анаэробты жағдайлар жасау үшін қоректік ортаны инертті газбен үрлеу қажеттілігінен құтқарады.

Жақында электрондар ағынын сутегі метаболизміне қайта бағыттау арқылы сутекті сіңіруді арттырудың гендік-инженерлік тәсілдеріне үлкен назар аударылды. Кальвин-Бенсон циклінде тыныс алу электрондарын тасымалдау жүйесі, нитратты сіңіру және көміртекті бекіту сияқты электрондармен бәсекелес болатын жолдарды жоюдың техникалық тәсілі сутекті өндіруді жақсарту мен оңтайландырудың өте тиімді және перспективалы әдісі бола алады. Сонымен, нитраттардың ассимиляциясы электрондардың сутегі түзілуіне ағынын азайтуға мүмкіндік беретін бәсекеге қабілетті жол болып табылады. Нитраттың ассимиляциясы бұзылған *Synechocystis* sp. SSR 6803 штамдары, мутанттар сутектің шығуын арттыруға мүмкіндік бергені анықталды. Сонымен қатар, хинолоксидазаны инактивациялау *Synechocystis* sp. PCC 6803-те *in vivo* сутегі оксидазасының көбеюіне әкелді. NADPH/NADP + коэффициентінің жоғарылауы, сонымен қатар, *Synechococcus* PCC 7002 штаммындағы NADPH тәуелді екі бағытты [NiFe] - гидрогеназаның сутек өндірісінің ұлғаюына себеп болды. Осылайша, сутегі өндірісінің өсуіне бәсекелес биохимиялық жолдарды азайту немесе жою арқылы қол жеткізуге болады. Қысқаша айтқанда, сипатталған генетикалық тәсілдердің әрқайсысы ерекше назар аударуға тұрарлық және көптеген іргелі мәселелерді шешу барысында биосутекті өндіру технологиясын жетілдірудің жаңа мүмкіндіктері ашылды. Заманауи технологиялар бар проблемалардың барлығын жеңе алмайтындығына қарамастан, гендік инженерия әдістерінің дамуы цианобактериялардың метаболизмін басқаруға мүмкіндік береді, бұл биологиялық сутегі өндірісінің тиімділігін арттырудың жаңа перспективаларын ашады.

1.4 Цианобактериялардағы сутегі өндірісін арттырудың технологиялық тәсілдері

Биосутек өндірісінің деңгейін арттыру үшін өсірудің инновациялық әдістерін жасау маңызды үлес қосты. Нақтырақ айтсақ, өндірушілердің өсіру жағдайларын оңтайландыру және тиімді фотобиореакторлық жүйелер құру. Сутегі шығымына әсер ететін негізгі физико-химиялық параметрлер - рН, температура, жарықтың қарқындылығы, оттегі, көмірқышқыл газының мөлшері, орта және көміртектің азотқа қатынасы. Осы параметрлерді реттеу арқылы биосутекті өндіруде керемет нәтижеге қол жеткізуге болады. Цианобактериялы дақылдардың көпшілігі үшін рН-тың оңтайлы мәні 7-8 құрайды, ал температура шегі 25-35°C аралығында. Мысалы, гликоген концентрациясының айтарлықтай өсуіне ортадағы негізгі қоректік заттардың концентрациясын оңтайландыру арқылы қол жеткізуге болады. Мысалы, *Synechocystis* sp. PCC 6803 жасушаларының сутегі өндірісінің айтарлықтай өсуіне (x150) қол жеткізілді. Сонымен қатар, тамақтандыру режиміне нитратты қосу, фитирленген режимде нитрат қосу арқылы көміртектің бекітілуін экспоненциалды өсу фазасын 3 күннен артық ұзарту арқылы цианобактериялар үшін 68,8%-ға өсті. Жарық - бұл ең маңызды параметрлердің бірі және үлкен көлемдегі сутегі өндірісінің негізгі шектеуші факторы, сондықтан жарық көзінің орны шешуші рөл атқарады.

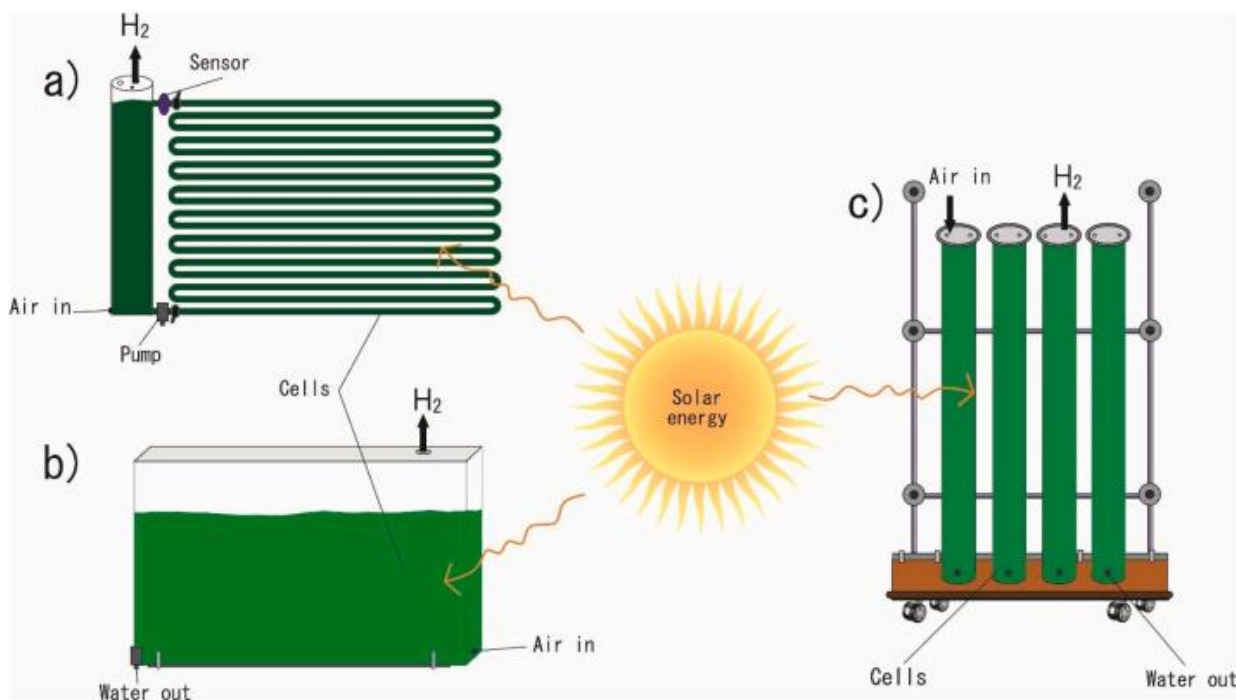
Фотобиореактордың ішінде жарықтандырылған бетке жақын фотонды аймақ және қараңғы аймақ бар. Қараңғы аймақ жасушалардың жарық сіңіруінен пайда болады және жарық жағдайларына және цианобактерия жасушаларының сіңіру қасиеттеріне байланысты. Цианобактериялар қызыл сәулені 680 нм толқын ұзындығында көп сіңіретіндіктен, культивация жүйелері үшін қызыл жарық беру үшін мамандандырылған биореакторда қызыл жарық панельдерін жобалау ұсынылады. Араласу нәтижесінде жасушалар реактордың жарық пен қараңғы аймақтары арасында белгілі бір жиілікпен белгілі бір аралықта айналады, бұл реактордың дизайны мен газбен жабдықталуына байланысты болады. Жарық көзі мен газ-сұйық гидродинамиканың орны цианобактериялардың өсуіне және сутегі өндірісіне де әсер етеді. Биосутекті цианобактерия дақылдарын кең көлемде өндіру үшін қолданылатын фотобиореакторлар келесі шарттарды талап етеді: 1) фотобиореакторлар өндірілген сутекті шығынсыз жинауға болатындай тұйық жүйе болуы керек, 2) реактордың дизайны жұмыстың жеңілдігін қамтамасыз етуі керек және тазалау мен зарарсыздандырудың қарапайымдылығы, 3) мөлдірлік (жарықтың енуі үшін) және беріктік құрылымда қолданылатын материалдар үшін маңызды, 4) фотобиореакторлар жоғары беттік пен көлемдік қатынасты және қоректік ортаны қарқынды араластыруды қамтамасыз етуі керек. Осы талаптарға сәйкес цианобактерияларды өсіруге арналған ашық жүйелер (тоғандар мен бассейндер) тек биомасса өндірісіне жарамды. Артықшылықтарына қарамастан, мұндай биореакторлар сутекті алу үшін қажет анаэробты жағдайларды қамтамасыз ете алмайды, температура, рН

және қоректік заттардың концентрациясы сияқты параметрлерді бақылау қиын.

Цианобактерияларды өсіруге арналған жабық жүйелерде, сонымен қатар, осы барлық маңызды параметрлерді бақылау дәрежесі өте жоғары және сутекті алу үшін өмірлік маңызы бар анаэробты жағдайларды жасауға мүмкіндік береді. Қазіргі уақытта сутекті алу үшін цианобактерияларды өсіру үшін қолданылған биореакторлардың әр түрлі типтері бар. Осылайша, биосутекті алу үшін микробалдырларды коммерциялық масштабта өсіру үшін жабық фотобиореакторлардың бірнеше типтері жасалды (2-сурет). Микробалдырлар мен цианобактерияларды өсіруге негізделген сутегі өндірісіне арналған фотобиореакторлардың үш негізгі түрін атап өту керек: құбырлы фотобиореактор (а), жалпақ панельді фотобиореактор (b) және тік бағаналы фотобиореактор (с). Түтікшелі фотобиореакторлар диаметрі 3-6 см және ұзындығы 10-100 м болатын мөлдір ұзын түтіктермен ұсынылған және цианобактериялар үшін ең практикалық болып саналады. Құбырлы фотобиореакторлардың әртүрлі конфигурациясы бар, оларда құбырларды әр түрлі жолмен орналастыруға болады, мысалы, олар көлденең жазықтықта әртүрлі иілген сандары бар түзу құбырлар түрінде орналасуы мүмкін. Олар коллекторлармен жалғанған көлденең көлбеу, параллель құбырларды иілу арқылы қоршау түрінде орналасқан тік жазықтықта болуы мүмкін. Культуралық сұйықтық осы түтіктер арқылы барлық түрдегі ферментациялардағы механикалық немесе ауа сорғыларының көмегімен айдалады. Параллель көлбеу құбырлардан тұратын NHTR көлденең құбырлы фотобиореакторында ауа реактордың төменгі жағында таңдалған құбырларға беріледі, бұл газ көпіршіктерінің еркін көтерілуіне мүмкіндік береді.

Бұл құбыр жүйесі газдың сақталуын азайтуға және оттегінің кетуін жақсартады. Анабаена азолласын пайдаланып сутекті екі сатылы өндіру үшін икемді пластиктен үш өлшемді спиральды рамаларға түзу құбырларды орау арқылы салынған құбырлы фотобиореакторлар қолданылды, сутектің шығымы 13 мл H_2 /л/сағ. Түтікшелі фотобиореакторлардың масса алмасу сипаттамалары және олардың сутектік өнімділігі реактордың пішініне және араластырылуына байланысты өзгеріп отырды. Мұндай биореакторлардың негізгі кемшіліктері құбырларды цианобактериялармен дақылдануына байланысты тазартудың қиындығы, сондай-ақ сутегі бөліну процесін фотобақылау мүмкіндігі болып табылады. Тік бағаналы фотобиореакторлар (2-сурет) жоғары сапалы әйнектен жасалған және айналасында судың температурасын ұстап тұруға мүмкіндік беретін және тиісті жарықтандыруды қамтамасыз ететін су күртешесімен қоршалған. Жоғарғы және төменгі жағында ортаға және аргон мен сутегі сияқты газдарға кіру және шығу бар. Балғын орта резервуарға жоғарыдан беріледі. Мұндай биореакторлардағы биомассаның өнімділігі жыл бойына айтарлықтай өзгеріп отырады, ал жазда максималды өнімділік қыстағыдан бірнеше есе жоғары болуы мүмкін. Мұндай құрылымдар сутегі алу үшін ыңғайлы емес, өйткені культураның араласуы

сұйықтық арқылы газды өткізуімен жүреді, бұл айналымдағы сутектің сұйылуына және сәйкесінше ағып кету қаупінің жоғарылауына әкеледі. Әдеттегі жалпақ панельді фотобиореактор (2-сурет) баспайтын болат жақтаудан және үш поликарбонат панелінен тұрады. Фотобиореактор жақын жерде орналасқан бір немесе екі бөлімнен тұруы мүмкін, ал алдыңғы бөлікте цианобактериалды дақыл бар. Бұл құрылыста жасанды жарық қолданылады; вольфрам-галогендік шамдар реактордың бір жағында жарық көзі ретінде орналасуы мүмкін. Мембраналық газ сорғысы реактордың түбіндегі шашыратқыштар арқылы газды айналдырады. Өндірілген H_2 газы газ қапшығына жиналады. Бұл реактор жүйесінде қысымды ыдыстар газ рециркуляциясы жүйесіндегі қысымның ауытқуын болдырмайды, ал клапан масса ағынының реттегішіне кірген кезде тұрақты қысымды ұстап тұрады. Мұндай фотобиореакторлар фотосинтетикалық цианобактерияларды өсіруге және үлкен жарықтандыру аймағының сипаттамаларына, жарықтың қысқа жолына, арзан және тазартудың қарапайымдылығына байланысты көбірек тартады және көп көңіл бөледі. Алайда, мұндай биореакторларды қолдану жасушаның жоғары тығыздығы мен сутектің жоғары өнімділігін алуға мүмкіндік беретініне қарамастан, масштабтау қиын. Сонымен қатар, оларда өсіру температурасын бақылау қиындықтарымен, фотобиореактор бетінде биофильмнің түзілуімен және айтарлықтай гидродинамикалық стресстің шектеулері бар. Осыған қарамастан, жоғары фотосинтетикалық тиімділік пен газ қысымын тиімді басқаруға қол жеткізуге болады. Сондықтан мұндай фотобиореактор басқа фотобиореакторлармен салыстырғанда экономикалық жағынан тиімді болып саналады. Фотобиореакторлардың салыстырмалы талдауы бойынша, біз сутегі өндірісі үшін жалпақ панельді фотобиореактор қолайлы деген қорытындыға келуге болатын еді, өйткені жинақталған сутектің артқы қысымын болдырмауға болады.



Сур. 2 - Биосутек алу үшін қолданылатын биореакторлардың негізгі түрлері.

Цианобактериялар мен микробалдырлардан сутек алу үшін осындай фотобиореакторлардың әр түрлі құрылымдық модификациялары жасалды және ұсынылды. Кондо және т.б. интенсивті түскен сәулені сұйылту және оны фотобиореакторға біркелкі шашырату үшін сұйылтылған торлар мен мембраналарды пайдалануға мүмкіндік беретін көп қабатты фотобиореактор салған. Осылайша, фото-сутегі өндірісін жақсарту үшін төрт бірдей бөлімнен тұратын фотобиореактор салынды. Жалпы, жазық дизайндағы фотобиореакторлардың артықшылығы өндірілген газды жинаудың жоғары тиімділігі болып саналады. Сутегін алу және цианобактерияларды өсіру үшін әдебиетте сипатталған барлық фотобиореакторлар жоғарыда сипатталған фотобиореакторлардың типтерінің кішігірім бөлшектерімен, араластыру техникаларымен, жылу алмасу жүйесімен және т.б. сипатталатын жазық фотобиореакторлар тиімді болып табылады. Сутегі өндірісі үшін, жоғары беттік-товольдік қатынаспен байланысты цианобактерияларды өсіруге арналған құбырлы және бағаналы фотобиореакторлардың артықшылықтарына қарамастан, алынған газды кетірудің ыңғайлылығы нәтижесінде. Әртүрлі елдердің ғылыми топтары сутегі шығымын арттыру үшін фотобиореакторлардың дизайнын оңтайландыру және жетілдіру бойынша белсенді жұмыс істейді. Қолданыстағы биореакторлық конструкцияларды әзірлеу мен жетілдірудегі басты міндет - цианобактериялармен сутектің жоғары өндірілуін қамтамасыз ету ғана емес, сонымен қатар өндірілген сутекті ағып кетпестен жинау. Мысалы, Скянес және басқалар микробалдырларды өсіру мен сутегін өндіруге арналған фотобиореактор жасады, ол жалпақ панельді ыдыстан тұрады, дақылдарды араластыруға арналған қозғалтқышы бар стендке орнатылған, газ жинау жүйесі, бақылау және басқару жүйесі бар. Бұл жағдайда өсіруге арналған жалпақ ыдыс стендте көлденең күйде болады, ол сұйық дақылдарды араластыру және газ алмасуды жақсарту үшін сорғы қозғалыстарын орындайды. Олардың зерттеулері бойынша, реактордың ішіндегі бос кеңістіктің көлемі аз болғанымен, көлденең жазық фотобиореактордың айдау қозғалыстары культура мен бос кеңістік арасындағы үлкен бетті қамтамасыз етеді, демек, бұл газ шығару және жинау үшін маңызды артықшылық болып табылады. Балдырларды өсіру процестерін қозғалыста босатылған сутекті жинау процестерімен үйлестіру үшін өсіру ыдысына газ жинау қондырғысы орнатылды. Сонымен қатар, фотобиореактор температураны, рН мен оптикалық тығыздықты ғана емес, сонымен қатар өндірілген газдың мөлшері мен еріген оттегінің концентрациясын есепке алу және бақылау үшін де арнайы жасалған арнайы басқару жүйесімен жабдықталған. Кез-келген фотобиореакторды жобалау және пайдалану процесінде жарықтандыру қарқындылығын реттеуге байланысты келесідей маңызды сәттерді ескеру қажет, мысалы, тиісті жарық көздерін қалай пайдалану керек (қарқындылығы мен толқын ұзындығы), жарықты түрлендіру тиімділігін қалай арттыру керектігін және ұзақ уақыт пайдалану кезінде жасушаның тиісті концентрациясын сақтауын. Сондықтан ұсынылған жобада күн сәулесі

фотобиореакторға жарықтың жоғары қарқындылығы мен біркелкі таралуын қамтамасыз ету үшін тікелей ашыту мәдениетіне батырылған бүйір жарығының оптикалық талшықтары арқылы берілді. Бұл жағдайда күн сәулесі Френель линзаларын пайдаланып жиналды, содан кейін оптикалық талшық арқылы жанарғы бар оптикалық талшықтарға өтті. Мұндай жарық қадағалау жүйесі әр линзаны күн бағытына қарай бұруға мәжбүр етеді, осылайша бүйір жарығының оптикалық талшықтары күндіз күн сәулесінен максималды жарық энергиясын ала алады. Үй ішіндегі жарық фотобиореактор ішіндегі жарық пен жарық қарқындылығының біркелкі таралуын сақтай алады және жасуша тығыздығының жоғарылауынан болатын скринингтік әсерлерден аулақ болады. Бұл фотобиореактор ацетат көміртегі көзі ретінде қолданылған Родопсевдомонас палустрисін өсіру кезінде жақсы өнімділікті көрсетті, сутектің түзілу жылдамдығы және шығымы сәйкесінше 22,7 мл Н₂/л/сағ және 62,3% құрады.

Фотобиореакторлардың технологиялық сипаттамаларын жақсартумен қатар, цианобактериялардың жасушалары арқылы сутегі өндірісін көбейтудің қызықты технологиялық тәсілдерінің бірі - олардың жасушаларын әртүрлі тасымалдаушыларға иммобилизациялау. Иммобилизация кезінде микроорганизмдер қолайсыз физикалық, химиялық және биологиялық экологиялық факторлардан, экстремалды температурадан, дегидратациядан, ультракүлгін сәулеленуден, қоректік заттардың жетіспеушілігінен, токсиканттардан қорғалған және салыстырмалы түрде тұрақты жағдайларда өмір сүре алады. Бұл тәсілді цианобактерияларда сутегі шығымдылығын арттыруға ықпал ететін өте қызықты және маңызды стратегия ретінде қарастыруға болады. Осылайша, биосутекті өндіруде жасанды жүйелердегі цианобактериялардың иммобилизациясы олардың жасушаларының стресске төзімділігін арттырады және бұл процесті ықтимал масштабтауға мүмкіндік береді. Цианобактерияларды қатты матрицаларға адсорбция немесе альгинат гельдеріне түсіру арқылы иммобилизациялау олардың функционалды өмір сүру уақытын, сондай-ақ жіп тәрізді цианобактериялардың ішіндегі гетероцисттердің санын едәуір арттыруы мүмкін. Сонымен қатар, цианобактериялық дақылдардың иммобилизациясы Н₂ фото окшаулауының тиімділігін арттырады. Сонымен қатар, автотрофты жағдайда иммобилизацияланған цианобактериялар *ΔhupL Anabaena* sp. PCC 7120 сутегі өндірісінің белсенділігін арттырды. Сутегі энергиясы саласындағы объект моделі *Synechocystis* sp. PCC 6803 жасушалары кальций альгинат гелінде сәтті иммобилизацияланды. Сонымен қатар, 2% каррагенан гелінде иммобилизацияланған *Anabaena* N-7363 жасушалары бос жасушалармен салыстырғанда сутектен 2,4 есе көп (1 г құрғақ гель үшін сағатына 3,24 мкмольге дейін) бөлінді. Альгинат түйіршіктеріндегі *Chlamydomonas reinhardtii* жасушаларының иммобилизациясының сутегі өндірісіне оң әсері атап өтілді, өйткені иммобилизация кезінде жасушалардағы оттегімен гидрогеназаның инактивация жылдамдығы төмендеді, өйткені альгинат қабаты түйіршіктерге оттегінің түсуін шектейді. Нәтижесінде

иммобилизацияланған жасушалар бос жасушаларға қарағанда көбірек сутегі шығарды. Сонымен қатар, бос және иммобилизацияланған жасушалардағы сутектің бөліну жылдамдығы бірдей болғанына қарамастан, *reinhardtii* жасушаларымен сутектің белсенді бөліну кезеңінің жоғарылауы байқалды. Дас және басқалар мәдениеттегі иммобилизацияланған гидрогельдерге негізделген жасанды құрылғы жасағандарын туралы хабарлады, ол екі іргелес канал жүйелерінің арасында қысылып, қоректік заттарды (төменгі қабат) жеткізуге және сутекті жинауға арналған (жоғарғы қабат). Осылайша, анаэробты жағдайлар жасалды және осы аппаратта өсіру кезінде 1 мл/л/сағ болатын сутегі өнімділігінің жоғары мәніне қол жеткізілді. Цианобактериялармен сутегі өндірісіне иммобилизацияның ұқсас әсері Лейно мен т.б. және Лайо еңбектерінде де көрсетілген. Сондықтан, нақты технологияларда жасушаларды иммобилизациялаудың дұрыс тасымалдаушысы мен әдісін іздегенде, фототрофты микроорганизмдердің иммобилизациясы биомассаны жинауды жеңілдетті, дақылдардың стресске төзімділігін арттырды және әртүрлі метаболиттерді, соның ішінде биосутекті алу үшін цианобактерияларды өсіруге арналған аппараттық құралдарды жасауды жеңілдетті.

Осылайша, цианобактериялық жасушалардан биосутекті өндіруді ұлғайтудың әртүрлі тәсілдері мен стратегияларын зерттеуде айтарлықтай прогреске қарамастан, жаңа фотобиореакторлардың одан әрі дамуы жасуша концентрациясын жоғарылату үшін және осылайша сутегі өндірісін арттыру үшін қажет. Сутегі отынын жоғары тиімділігі бар электр энергиясын өндіру үшін таза энергия ретінде отын элементтерінің әртүрлі түрлерінде қолдануға болады. Жалпы алғанда, цианобактерияларды қолдана отырып, биосутекті өндірудің технологиялық тізбегін келесі түйіндерден ұсынуға болады: а) биореактордағы цианобактерияларды өсіру, б) цианобактериялардың биомассасын шоғырландыру және алу, в) фотобиореактордағы цианобактерияларды анаэробты өсіру H_2 (қараңғыда немесе жарықта), г) сутегі алу және оны басқа газдар сияқты қоспалардан тазарту, д) газгольдерде сутегі газын сақтау, е) сутегі газын сутегі газына айналдыру электр энергиясы. Сутегі газын электр энергиясына айналдыру сутегі отын жасушасы сутегі мен оттегі судың пайда болуына қосылып, осы процестің нәтижесінде электр тогы пайда болған кезде судың кері электролизі ретінде қарастыруға болатын механизм арқылы жұмыс істейтіндігіне байланысты мүмкін болады. Жасуша протон алмасу мембранасымен (ПАМ) бөлінген екі электрод бетінен тұрады. Сутегі "анодтың" бір жағынан отын ұяшығына енеді және протондар мен электрондарға ыдырайтын каталитикалық бетке тап болады.

Мембрананың екінші жағында оттегі жасушаға еніп, протондар мен электрондармен бірге су түзеді: $2H_2 + O_2 \Rightarrow 2H_2O + energy$

1.5 Цианобактериядағы биофотоллиз процесі

Цианобактериялар, жасыл балдырлар сияқты, биофотоллиз арқылы сутегі өндірісінде зерттеушілердің назарын аударды. Биофотоллиз - бұл жарық жағдайында биологиялық жүйелерде суды оттеке және молекулалық сутегіне ыдырататын процесс. Цианобактериялар мен микробалдырлар сияқты фотосинтетикалық микроорганизмдер оттегі фотосинтезіне қабілетті. Фотосинтез кезінде фотосинтетикалық организмдердің тилакоидты мембранасындағы хлорофилл пигменттері жарықты сіңіріп, молекулалық оттегін шығарады. Содан кейін көмірқышқыл газы ферментативті реакцияларда АТФ және НАДФН көмегімен триозофосфатқа айналады. Цианобактериялар физиологиялық және морфологиялық жағынан әр түрлі және тікелей және жанама биофотоллиз арқылы H_2 өндіруге қабілетті.

Өзіміз білетіндей, тікелей биофотоллиз процесі фотосинтетикалық аппаратпен сіңірілген жарық энергиясын суды ыдырату үшін оттегі түзіп, протондарды қалпына келтіріп, сутегі түзіп, төмен потенциалды тотықсыздандырғыштарды өндіруді қамтиды. Тікелей биофотоллизде фотосинтез, ферредоксин немесе НАДФН шығаратын тотықсыздандырғыш гидрогеназды тікелей қалпына келтіреді. Процестің маңызды кемшілігі гидрогеназалардың оттегіне жоғары сезімталдығы болып табылады. Тиімділігі түрлендіру жарық энергиясы сутегі үлкен емес, және бұл көрсеткіш ұлғаюы мүмкін үздіксіз жою оттегі ортасы.

Жанама биофотоллиз - бұл судың бөлінуі және ферредоксиннің одан әрі азаюы көмірқышқыл газын бекіту үшін қолданылатын тікелей процестің бір түрі, ал алынған азайтылған көмірсулар қосылысы жеке реакцияда сутектің бөлінуін ынталандыру үшін қолданылуы мүмкін. Екі сатыда жүретін бұл процесс оттегінің тежелуіне жол бермеу үшін кеңістікте де, уақытта да оттегі мен сутегі эволюциясының кезеңдерін бөледі. *Oscillatoria* sp. және *Oscillatoria chalybea* тікелей биофотоллиз арқылы H_2 фотопродукциясын дамытты, ал *Anabaena* sp. UTEX-1448 12 сағат ішінде тікелей және жанама биофотоллиз арқылы H_2 көп мөлшерін синтездейді. Тулупакис және басқалардың айтуы бойынша, иммобилизациялау *Synechocystis* sp. PCC 6803 жанама биофотоллиздің процесстері кезінде H_2 максималды жылдамдықпен $40,6 \pm 4,9$ мкмоль/мг хл/сағ түзілді.

Алайда, соңғы жылдары тікелей және жанама биофотоллиз процесстерін зерттеудегі айтарлықтай жетістіктерге қарамастан, күн энергиясын осындай жолмен түрлендіру үшін цианобактерияларды қолдануды шектейтін қиындықтар әлі де бар екенін атап өткен жөн. Сонымен қатар, процестің оттегіге жоғары сезімталдығын қамтамасыз ететін оттегі мен H_2 -нің бір мезгілде шығарылуымен байланысты мәселелерді шешу үшін фотосинтетикалық дақылдардың сутегі өндірісінің тиімділігін арттыруға және осы процестің реакция жылдамдығын арттыруға байланысты іргелі зерттеулер жүргізу қажет.

1.6 Биофотоллиз түрлері

Биофотоллиз - бұл әртүрлі биологиялық хаттамалар арасында сутегі өндірісінің перспективалық тұжырымдамаларының бірі, нәтижесінде тек су қажетті субстрат болып табылады, ал сутегі алу метаболизммен байланысты емес болады (2 Сурет). Қазіргі кезде сутекті биологиялық өндірудің төрт әдісі бар және микроорганизмдердің әр түріне сәйкес әдістер қолданылады. Кез-келген жағдайда, кейбір артықшылықтар мен кемшіліктер бар.



Сур. 3 - Сутекті өндіру әдістері.

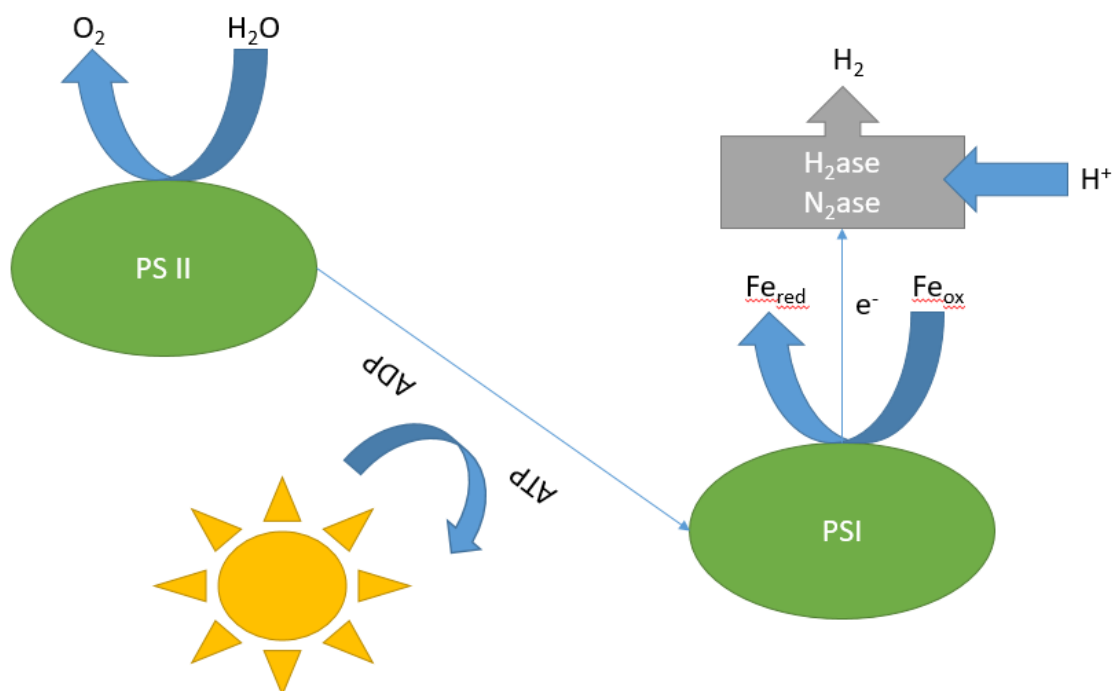
Тікелей биофотоллиз

Тікелей биофотоллиз өсімдіктер мен балдырлар жасушаларында болатын фотосинтез процесіне ұқсас. Бұл әдіс күн сәулесін молекулалық сутегі түрінде химиялық энергияға айналдыру үшін микробалдырлар фотосинтез жүйесі арқылы судан BiO_2 түзе алатын биологиялық және химиялық процесс болып табылады:



Анаэробты жағдайда биосутек шығаратын жасыл балдырлар, мысалы, *Chlamydomonas reinhardtii*, не H_2 түзе алады, не H_2 -ті электрон доноры ретінде қолдана алады. Төмендетілген ферредоксин (Fd) гидрогеназа (H_2 аза) ферменті арқылы сутек алу үшін судың биофотолізі деп аталатын процесте электронды донор рөлін атқарады. Осы процестің соңында сутегі газы судан және отын протондарынан айналады. H_2 аза ферменті 4-суретте көрсетілгендей сутек алу үшін Fd-ден электрондарды алады. Фотосинтездің екі процесі бар: I фотосистема (PSI) CO_2 төмендететін тотықсыздандырғыш шығарады, ал II фотосистема (PSII) суды ыдыратады және оттегі молекулаларын шығарады. Биофотоллиз процесі кезінде судан екі фотон алуға болады: H_2 аза қатысуымен

сутектің түзілуі немесе PSI көмегімен CO₂ тотықсыздануы. Барлық жасыл өсімдіктерде, H₂аза болмауына байланысты, CO₂ шығарындыларын азайту үшін ғана болуы мүмкін. Бұл операция кезінде PSII күн жүйесінен жарық энергиясын сіңірген кезде су электрондары пайда болады. Содан кейін электрондар күн энергиясы арқылы Fd компонентіне ауысады. H₂аза ферменті оттегі молекулаларына сезімтал болғандықтан, сутегі өндірісін ұстап тұру үшін оттегінің құрамын 0,1% деңгейде ұстап тұру қажет. Жасыл балдырлар *Chlamydomonas reinhardtii* тотықтырғыш тыныс алу кезінде оттегі молекулаларын шығара алатын осындай операция көрсетті. Алайда, бұл процесте демалатын және тұтынылатын субстраттың көп мөлшеріне байланысты бұл төмен тиімділікті көрсетеді. Соңғы уақытта микробалдырлардан және цианобактериялардан алынған мутанттардың O₂ өндірісі жақсы болатындығы, сондықтан сутегі өндірісі жоғары екендігі анықталды. Цианобактериялар мен микробалдырлар фотосинтезді жүзеге асыру үшін жарықты қолдана алады, өйткені оларда хлорофилл (хл) және фотосинтетикалық жүйелер бар: сәйкесінше PSII және PSI.

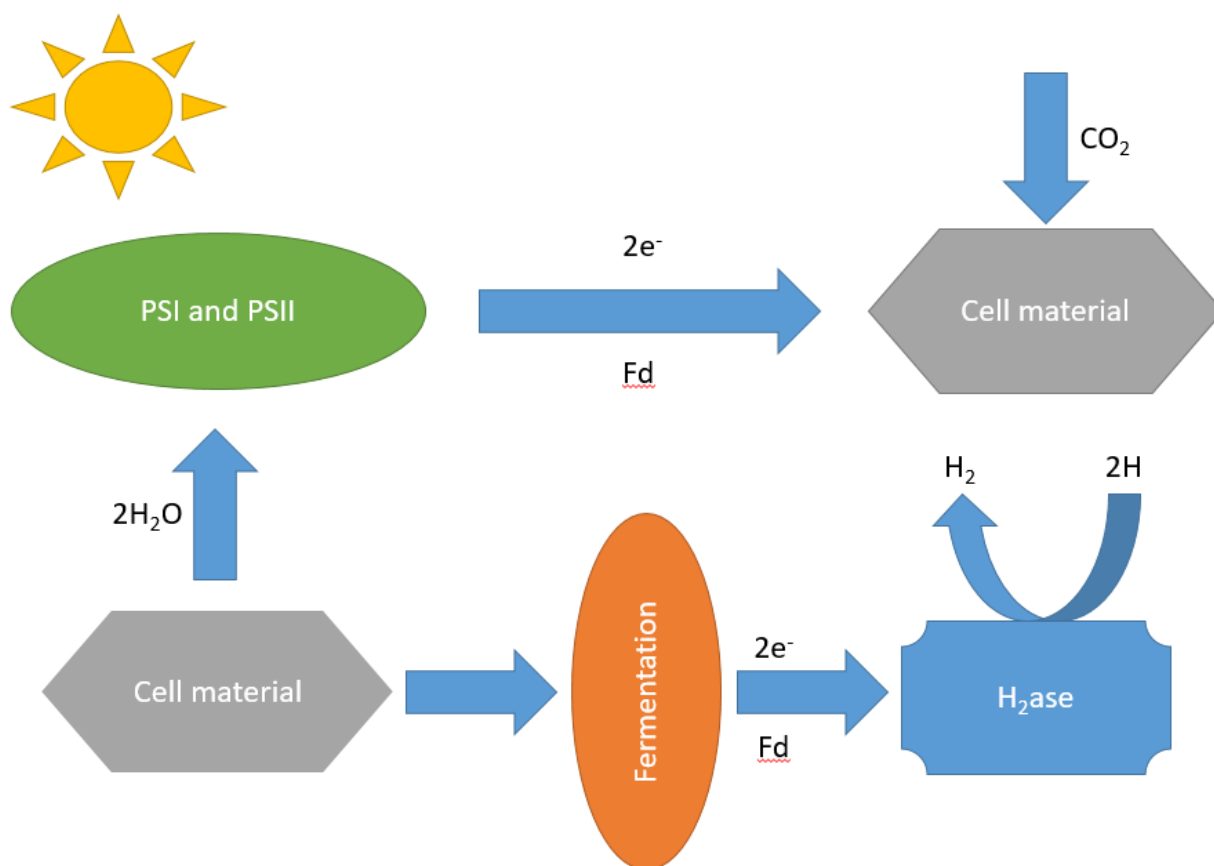


Сур. 4 - Жасыл балдырлар немесе цианобактериялардың тікелей биофотолізі.

Жанама фотолиз

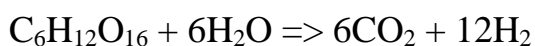
Микробалдырлар мен цианобактериялар жанама биофотоліз кезінде сақталған гликоген мен крахмалдан сутек түзеді. Бұл процесс екі кезеңнен тұрады. Біріншіден, көмірсулар синтезі жарық астында жүреді. Екіншіден, сутегі фотоферментация арқылы көмірсулардан алынады. Фотон конверсиясын кең ауқымды қолдану үшін жақсартуға болатын болса,

балдырлармен жанама биототализ арқылы сутегі өндірісі жүзеге асырылуы мүмкін. Кәдімгі дақыл өсімдіктері үшін фотосинтездің тиімділігін арттыру өте қиын (Сурет 5). Жасушалардың өсуінің қараңғы кезеңдеріндегі тұрақты көміртегі көзі - бұл жасыл балдырлармен сутекті алу әдісінің басты артықшылығы. Бұл жасыл балдырларды қараңғы тыныс алу көмегімен қараңғы ашыту (ҚА) ретінде де көрсетуге болады.



Сур. 5 - Сутегі өндірісінің жанама биофотолізі.

Цианобактериялармен жанама биофотоліз нәтижесінде сутектің түзілуін келесі реакциялар арқылы байқауға болады:

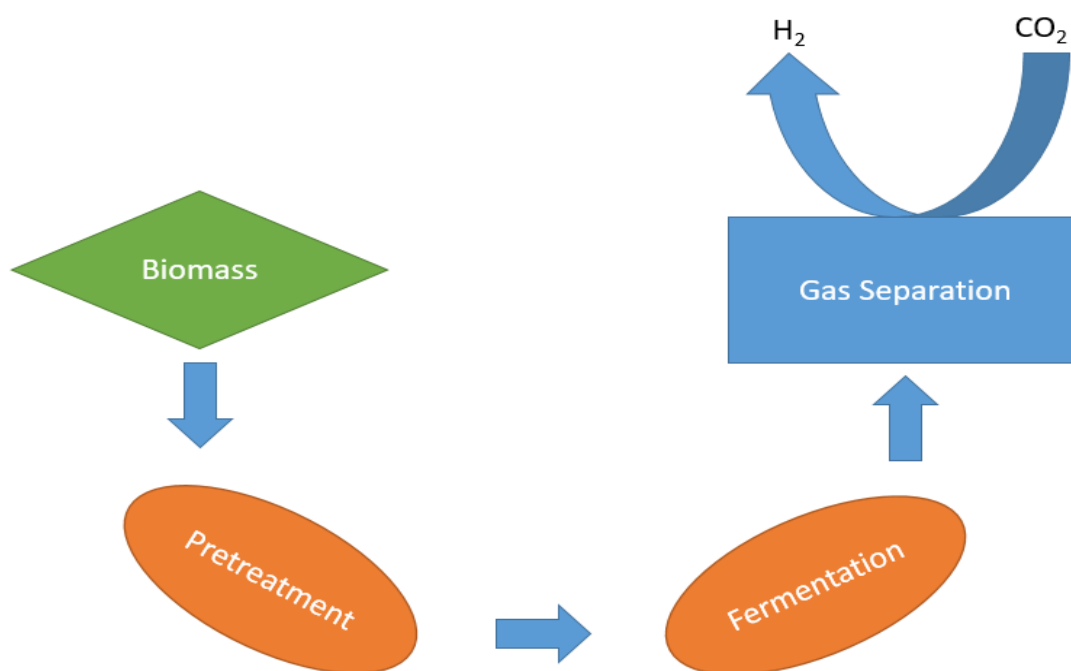


Қараңғы ашыту

Биосутектің қараңғы ферментативті өндірісі үнемді және экологиялық таза процесті қамтамасыз етеді. Бұл бактериялардың әртүрлі топтары анықтаған, анаэробты ауысу сияқты бірнеше сатыларды қолдана отырып, биохимиялық реакциялар сериясын білдіретін жиынтық процесс. Қараңғы ашыту негізінен анаэробты бактериялармен қолданылады, дегенмен кейбір балдырлар жеңіл энергияны қажет етпестен өсірілген көмірсуларға бай субстраттарда қолданылады (6-сурет). Сутегі газын өндіруге арналған

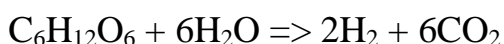
биологиялық ҚА өте тартымды, өйткені бұл процесте ол жаңартылатын және көміртекті бейтарап болады.

Алайда, әртүрлі улы немесе шамадан тыс қосылыстар тұрақты процесті және биотехнология саласын кеңінен тануды едәуір шектей алады, ал қазіргі уақытта ҚА процесі H_2 өндірісінің төмен өнімділігіне байланысты кең таралмады. ҚА жүйесіндегі микробтардың метаболизмі артық субстрат, микроэлементтер, макроэлементтер, металл иондары, жоғары температура, қышқыл рН, органикалық қышқылдар, бәсекелес микробтар және субстраттың улы заттары сияқты бірнеше химиялық компоненттерден тұрады. Тежеуді басқару бойынша инженерлік перспективалар қамтамасыз етіледі.



Сур. 6 - Қараңғы ферменттеу арқылы сутегі өндірісі.

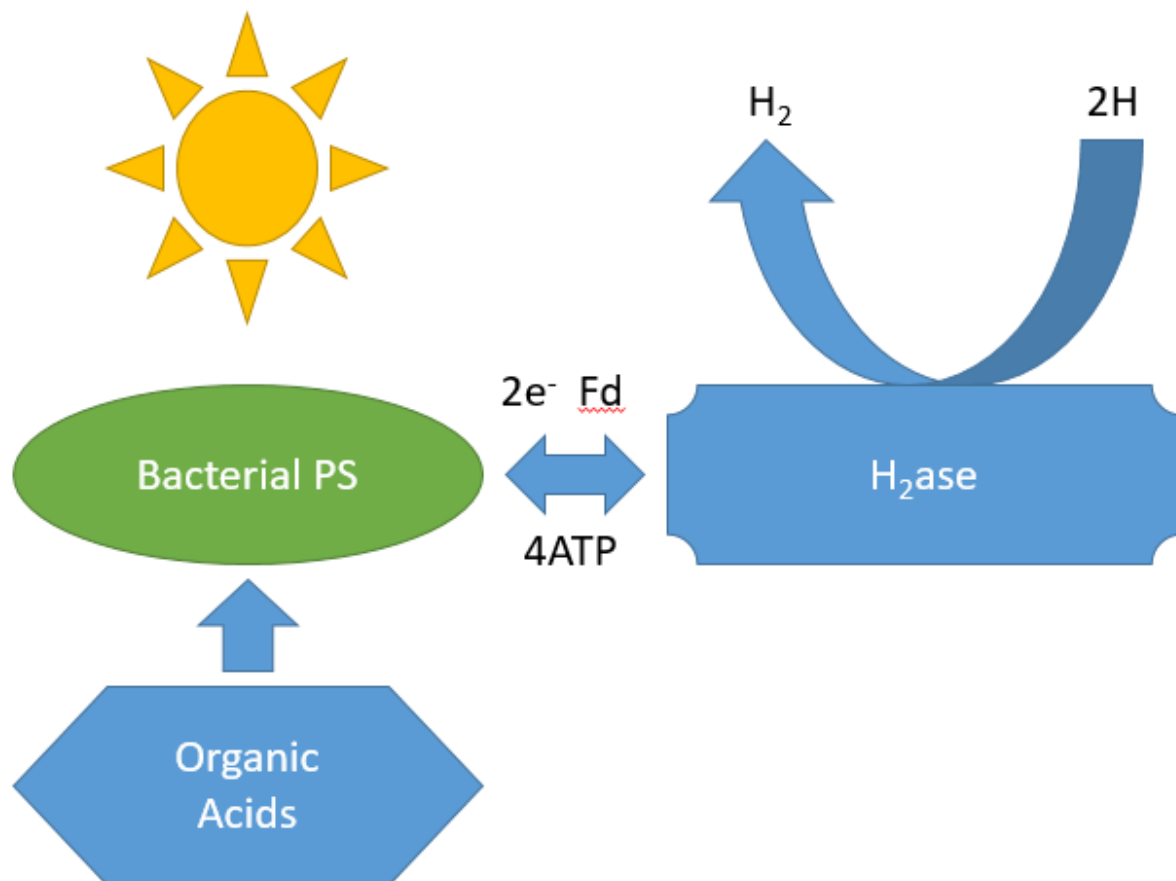
Қараңғы ашыту арқылы жарыққа тәуелсіз сутегі өндірісі әдетте жоғары жылдамдықпен жұмыс істейді. ҚА сутегі көміртегі көзі ретінде әр түрлі қалдықтардан өндіріледі және негізінен басқа ұшпа май қышқылдарымен бірге сірке және май қышқылдарын шығарумен аяқталады:



Фотоферментация

Фотоферментация - бұл фотосинтетикалық микроорганизмдердің әртүрлі тобы көрсететін органикалық субстраттың сутекке ферментативті айналуы. Фотоферментация BiO_2 өндірісі үшін жоғары тәуекелсіз ең тиімді

режимдердің бірі ретінде ұсынылған. Бұл жұмыста био-сутегі өндірісін кең модельдеу және фотоферментация моделінің әдісі арқылы көрсетілген. Электрондар PSII фотохимиялық тотығу арқылы судан бөлініп, [Fe]-гидрогеназаға өтіп, тікелей биофотоллиз процесінде сутектің фотосинтетикалық түзілуіне әкелетіні белгілі (7 суретті қараңыз). Сутектің микробтық өндірісінің негізгі процесі пируваттық анаэробты метаболизммен анықталады, ал пируваттың деградациясы теңдеулерде көрсетілген екі ферменттік жүйенің бірімен катализденеді:



Сур. 7 - Фотоферментация схемасы.

2 ЗЕРТТЕУ МАТЕРИАЛДАРЫ ЖӘНЕ ӘДІСТЕРІ

2.1 Зерттеу объектілері

Оқшаулау және деформация сипаттамасы

Тәжірибелер цианобактериялардың төрт штаммымен жүргізілді - *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220, *Synechococcus* sp. I12 және *Phormidium corium* B-26. *Synechocystis* sp. PCC 6803 Томо зертханасынан алынды (Токио ғылым университеті, Жапония). *Synechocystis* sp. PCC 6803 толығымен тізбектелген алғашқы біржасушалы цианобактериялар болды және H_2 өндірісі үшін үлгі организм ретінде қолданылды. *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 - бұл Баян-Өлгий Аймағындағы (Монғолия) тұщы көл Шар-Нуур көлінен оқшауланған жіп тәрізді цианобактерия. *Synechococcus* sp. I12 Түрген ыстық қайнарынан оқшауланған (Алматы, Қазақстан), осы штамдардың морфологиялық және мәдени қасиеттері Өсербаева және басқаларында сипатталған. Жіп тәрізді цианобактерия *Phormidium corium* B-26 Сорбұлақ көлінен оқшауланған (Алматы, Қазақстан).

Культураның жағдайы

Цианобактериялардың штаммдары жасанды жарықтандыру кезінде өсірілді (қарқындылығы: 45 мкмоль фотон/м²/с), құрамында 70 мл BG-11 сұйық қоректік ортасы бар шыны түтіктердің үш жағынан беріледі және SPP-25GA ауа сорғысымен (Техно Такацуки, Осака, Жапония) газдалған.

2.2 H_2 өндіруге арналған жасушаларды дайындау

Жасуша культуралары 40 мл пробиркаға ауыстырылды, олар 10 000*g кезінде 5 минут ішінде центрифугаланды. Супернатантты тастағаннан кейін жасуша дақылдарына 100 мл BG₀-11 ортасы қосылып, 3 минут ішінде араластырылды. Алдын-ала өсірілген жасушалар спектрофотометрмен (V-630; JASCO International Co.) анықталған 730 нм (OD_{730}) 0,4 кезінде оптикалық тығыздыққа жеткізілді. Культуралар бір жағынан берілетін жасанды жарықтандыру кезінде 24 сағат бойы инкубацияланды (қарқындылығы: 30 мкмоль фотон/м²/с) және центрифугалау арқылы жиналды (Nimac CR 22G жоғары жылдамдықты рефрижераторлық центрифуга; Hitachi Co., Ltd., Токио, Жапония) супернатант лақтырылғаннан кейін 5 минут ішінде 10 000*g кезінде жасушаларға 30 мл BG₀-11 ортасы қосылып, пробирканы 10 000*g кезінде 5 мин. бойы центрифугалады. Екі рет жуғаннан кейін жасушалар 50 мкМ HEPES-КОН (рН 7,4) және 100 мкМ NaHCO₃ газ хроматографиясы (GC) бөтелкесінде модификацияланған 7,5 мл BG₀-11 ортасында OD_{730} 1,5-ке дейін жиналып, шоғырландырылды (газдар үшін 10 мл бос орын қалдырады). Бұл процедура Шутз және т.б. сипаттаған әдіске қарағанда өзгертілген. Аргон газы оттегін ауыстыру үшін 1 сағат ішінде GC шприцінің көмегімен GC бөтелкесіне енгізіліп, бөлме температурасында ашық немесе қараңғы жағдайда

орналастырылды. Жарық процедурасы үшін GC бөтелкесі үздіксіз жарық астында орналастырылған (қарқындылығы: 30 мкмоль фотон/м²/с) бір жағынан беріліп, HS-10VA (AS ONE International, Inc., Санта-Клара, Калифорния, АҚШ) 150 айн/мин. қараңғы процедура үшін GC бөтелкесі фольгамен жабылған және BR-22FP (Taitec Corporation, Сайтама, Жапония) биошейкерінде 25°C температурада өсірілген.

2.3 Н₂ Өлшеу

Н₂ жинақталған молекулалық газы GC (3210; 5А молекулалық елегімен қапталған 2 метрлік тот баспайтын баған; 60/80 тор; GL Sciences, Inc., Токио, Жапония) өндірушінің нұсқауларына сәйкес. Газ өткізбейтін шприц (Hamilton Company, Reno, NV, USA) газ хроматографына енгізілген 0,15 мл газ тәрізді кеңістікті тікелей таңдау үшін пайдаланылды. Сутегі стандартты қисығы шыңдардың тіркелген аудандары бойынша сутегі мольдерін есептеу үшін қолданылды. Экспериментте сутегі алудың осы кезеңінде бастапқы рН 7,4 кезінде температура 25,0 ± 0,5°C деңгейінде сақталды. Н₂ өндірісі мкмоль Н₂/мг хл/сағ түрінде ұсынылған, Аг тасымалдаушы газ ретінде пайдаланылды. Өсу, хлорофилл *a* және Н₂ туралы деректерді статистикалық талдау 96% сенімділік деңгейімен біржақты дисперсиялық талдау (ANOVA) әдісімен жүргізілді.

Жарық қарқындылығын өлшеу

Өсіру кезеңінде әр түрлі уақытта LI-250A (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) жарық өлшегішінің көмегімен Quantum Q 40555 бөтелкесінің алдында және артында бес жерде (яғни төрт бұрышта және ортасында) жарықтың қарқындылығы (мкмоль фотон/м²/с) өлшенді.

Хлор өлшеу

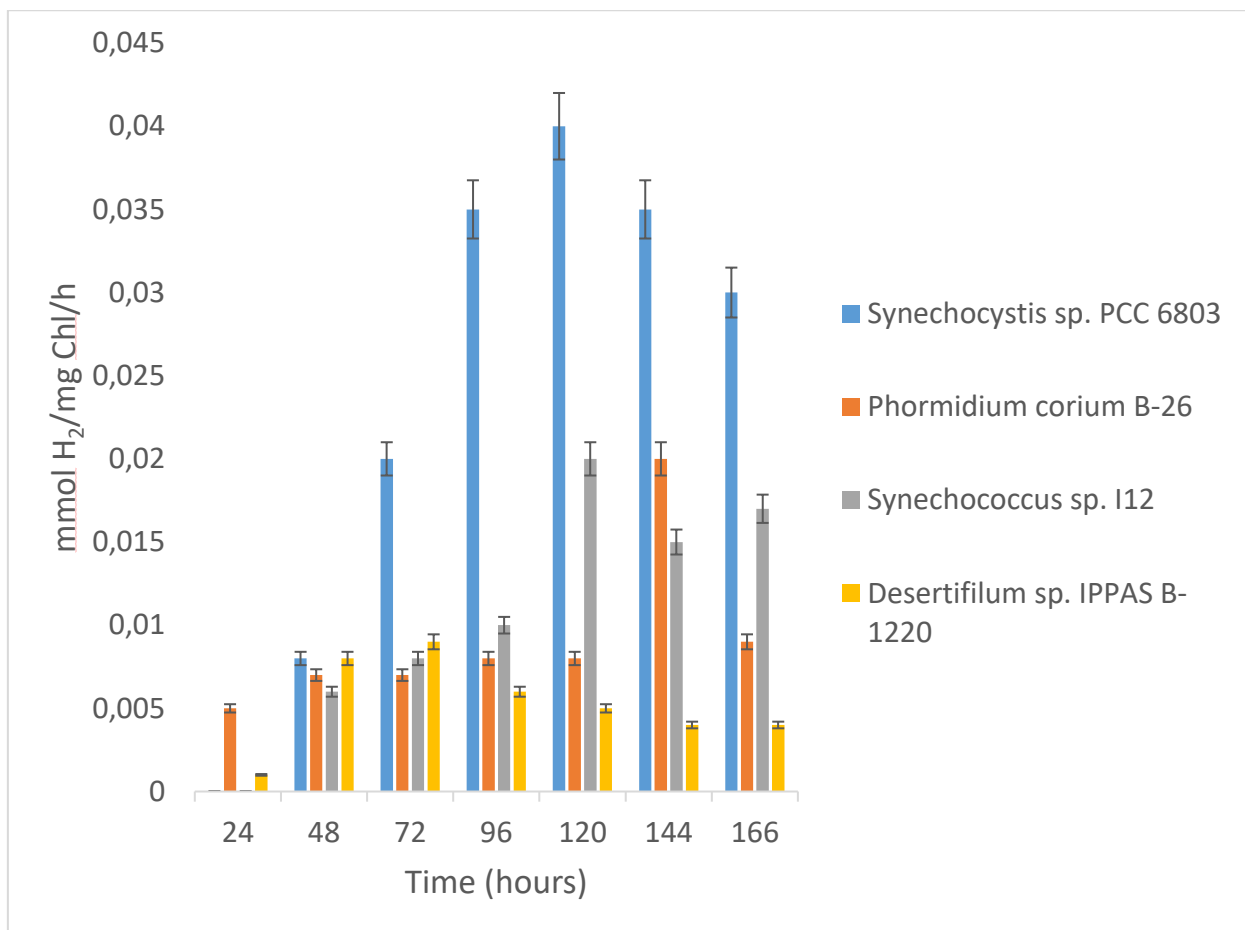
Әр үлгінің 1 мл аликвоты көлемі 1,5 мл пробиркаға жиналды және 5 минут ішінде 10.000*g кезінде SS-1500X жоғары жылдамдықты салқындатылған микроцентрифуганың көмегімен центрифугаланды. Супернатантты алып тастағаннан кейін жасуша культурасына 1 мл 100% метанол қосылып, пробирка 5 минут ішінде 10.000*g центрифугаланды.

3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖЕЛЕРІ ЖӘНЕ ОЛАРДЫ ТАЛДАУ

3.1 Цианобактериялар өсірінділерімен H_2 босатылуын анықтау

Цианобактериялардың өкілдері әртүрлі нитрогеназдар мен гидрогеназаларға ие болғандықтан, әртүрлі типтерде сутектің пайда болуына әкелетін метаболизм жолдары әртүрлі. Цианобактериялардың кейбір түрлері нитрогеназаны да, гидрогеназаны да синтездеуі мүмкін. Нитрогеназаның әсерінен гетероцистикалық цианобактериялардың сутегін шығаруы ең перспективалы болып саналады, өйткені протонды тотықсыздандырудың оттегі сезімтал реакциясы кеңістікте оттегі шығаратын фотосинтезден бөлінеді. Алайда, биосутек өндірудің энергия үнемдейтін процесі гетероцист түзбейтін цианобактериялар негізінде сутегі алу болып табылады, өйткені гетероцисттердің пайда болуы үлкен энергия шығынымен бірге жүретіні белгілі. Алайда, зерттеулердің көпшілігі гетероцист бар цианобактериялардың нитрогеназасын қамтитын сутегі өндірісіне бағытталған. Нитрогеназа және гидрогеназа ферменттерін пайдалана отырып цианобактериялардың гетероцист емес штамдарының сутегін алуы туралы мәліметтер жеткіліксіз. Сутегін белсенді өндіретін фототрофты микроорганизмдердің өнімді штамдарын табу үшін гетероцист түзбейтін цианобактериялардың үш штамдары зерттелді: *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220, *Synechococcus* sp. I12, *Phormidium corium* B-26. Гидрогеназа ферментінің арқасында сутекті белсенді түрде шығаратын штамм - цианобактериялардың *Synechocystis* sp. PCC 6803 штамы оң бақылау ретінде таңдалды. Нитрогеназаның белсенділігін алдынала зерттеу кезінде *Synechococcus* sp. I12 штамдары мен B-26 *corriumium* азотты бекітетін белсенділікті қамтамасыз етпегені анықталды. *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 штаммында нитрогеназа мен гидрогеназа бар. Төрт штамм да азотты бекітетін гетероцисталы дақылдар сияқты үлкен энергия шығынынсыз сутектің болашақ өндірушісін іздеу кезінде қызығушылық тудырады. Барлық төрт штамм азотты бекітетін гетероцистикалық дақылдар сияқты үлкен энергия шығыны жоқ перспективалы сутегі өндірушісін іздеуде қызығушылық тудырады.

Нәтижелер көрсеткендей, барлық зерттелген штамдар қараңғыда H_2 шығарды. Ең жоғары өнімділік *Synechocystis* sp. PCC 6803 бақылау штаммымен байқалды. Бұл штамның жасушалары бос кеңістікті аргонмен ауыстырғаннан кейін 24 сағ және 48 сағ ішінде H_2 қараңғыда шығара бастады (8 сурет). Осы уақытқа дейін H_2 шығысы 0,007 мкмоль H_2 /мг хл/сағ болды. Бұл дақылда сутектің максималды жинақталуы 120 сағат инкубациядан кейін байқалды және 0,037 мкмоль H_2 /мг хл/сағ құрады, эксперименттің келесі сағаттарында сутегі секрециясының баяу төмендеуі байқалады, бұл табиғи түрде жасушаішілік субстраттардың, атап айтқанда ашыту жылдамдығын шектейтін гликогеннің сарқылуымен байланысты.

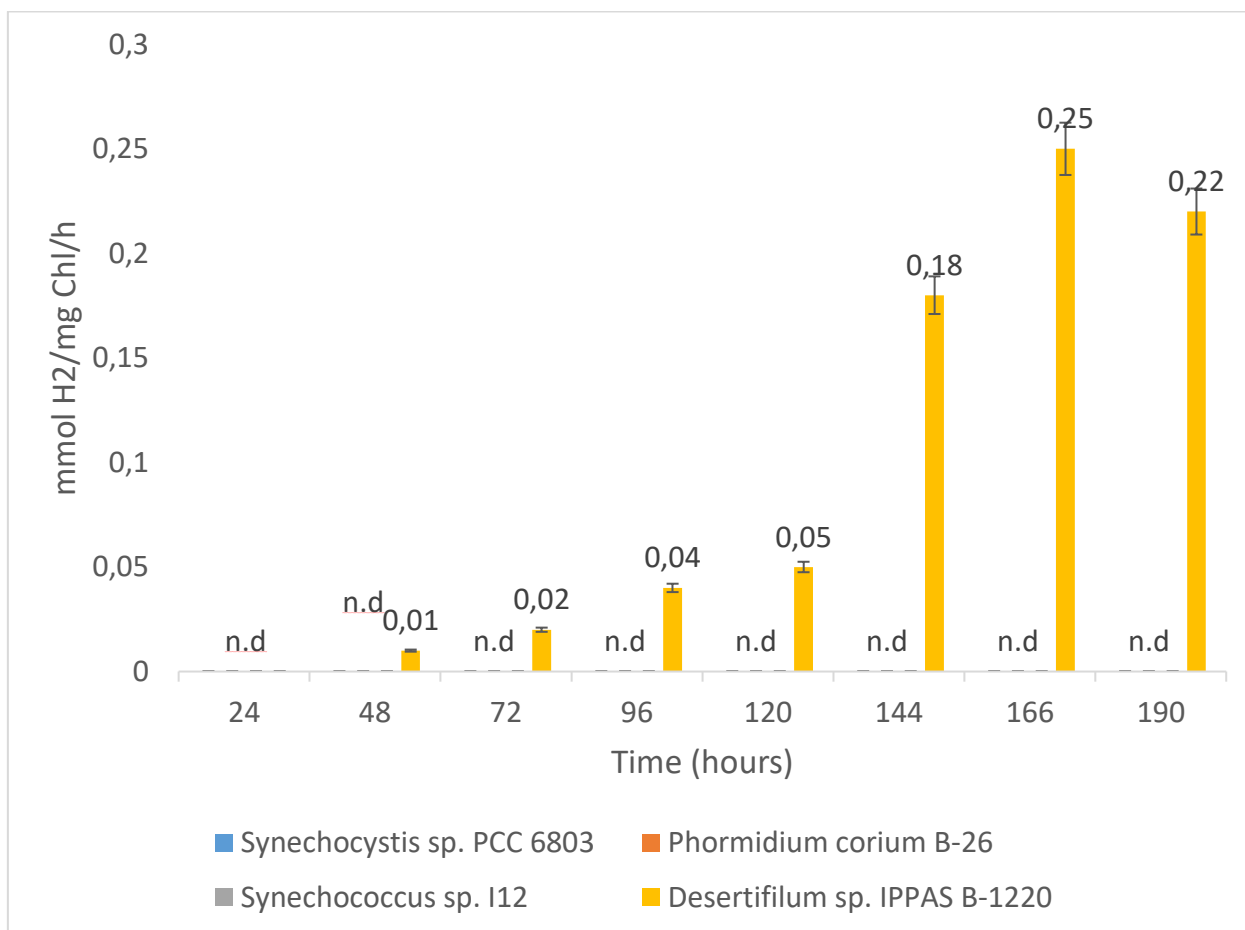


Сур. 8 - Анаэробты қараңғы жағдайларда цианобактериялардың зерттелген штаммымен сутектің бөлінуі.

Зерттелген тәжірибелік штамдар бақылау штаммымен салыстырғанда қараңғыда H_2 өнімділігі төмен болды. Тәжірибелік штамдар арасында *Phormidium corium* B-26 және *Synechococcus* sp. I12 H_2 ең көп мөлшерін өндірді. Бұл екі штамға ұқсас H_2 бөліну мөлшері тән болды, бірақ жинақталған H_2 максималды мөлшерімен ерекшеленді. 24 сағаттан кейін *Phormidium corium* B-26 жасушалары арқылы H_2 жиналуы 0,003 мкмоль H_2 /мг хл/сағ құрады, ол 144 сағаттан кейін максимум 0,02 мкмоль H_2 /мг хл/сағ дейін өсті. *Synechococcus* sp. I12-нің максималды H_2 бөлінуі 120 сағ инкубациядан кейін анықталды (0,019 мкмоль H_2 /мг хл/сағ). Зерттелген цианобактериялар штамдарының арасында *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 қараңғыда ең аз H_2 мөлшерін шығарды (H_2 максималды өнімділігі $\frac{1}{4}$ 0,011 мкмоль H_2 /мг хл/сағ). Алайда, бұл көрсеткіш 72 сағ инкубациядан кейін байқалғанын ескеру қажет. Осыдан кейін H_2 бөлінуі біртіндеп төмендеді.

Әрі қарай, жарық жағдайында цианобактериялардың штамдарымен H_2 жинақталуы зерттелді. Жарық энергиясы H_2 шығаруда маңызды және тікелей биофотоллиз үшін электронды донор ретінде әрекет етеді. Тікелей биофотоллиз цианобактериялармен жарық энергиясын қолдана отырып, суды $h\nu$ және O_2 -ге бөлу үшін кеңінен қолданылады. Жарық энергиясын цианобактериялардың жасушалары сіңіргенде, ол PSII-де H_2O молекулаларының тотығуын

күшейтеді, бөлінген протондар АТФ түзуге жұмсалады, ал электрондар PSI арқылы хлоропласт-ферредоксинге жеткізіледі. Fd [FeFe] - гидрогеназалар үшін электронды донор рөлін атқарады, бұл H^+H_2 молекуласына қалпына келтіруге көмектеседі. Бұл экспериментте зерттелген цианобактериялардың түрлері алдыңғы экспериментке ұқсас өсірілді, сутегі өнімділігін зерттеуде жасуша инкубациясының шарттары бірдей болды және тек жарықтандырудың болуымен ерекшеленді. Жүргізілген эксперименттің нәтижесінде жарықта сутектің бір ғана өндірушісі *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 штаммы болды.



Сур. 9 - Анаэробты жарық жағдайларында цианобактериялардың зерттелетін штаммдарымен сутектің бөлінуі (n. d. - табылған жоқ).

Desertifilum sp. IPPAS B-1220 жасушаларының сутегі өндірісі анаэробты жарық жағдайлары орнатылғаннан кейінгі екінші күні байқалды (Сур. 9). Бірінші күні жасушалар сутегі түзбеді. Белсенді сутектің бөлінуі 6 күн ішінде сақталды және ол азайды. Сутектің жинақталуының ең жоғары мәні 166 сағаттан кейін байқалды және 0,229 мкмоль H_2 /мг хл/сағ құрады.

Айта кету керек, жарықтандыру жағдайында скрининг кезінде басқа үш штамм, соның ішінде бақылау штаммы H_2 шығармады, дегенмен H_2 жинақталуы қараңғыда салыстырмалы түрде жоғары болды. *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 жарықта шығарған H_2 қараңғыға қарағанда 20 есе көп және

бақылау штаммынан (*Synechocystis* sp. PCC 6803) алты есе артық болды. Осылайша, зерттелген штамдар арасында *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 басым болды, оның жарықта H_2 түзе алатындығына байланысты.

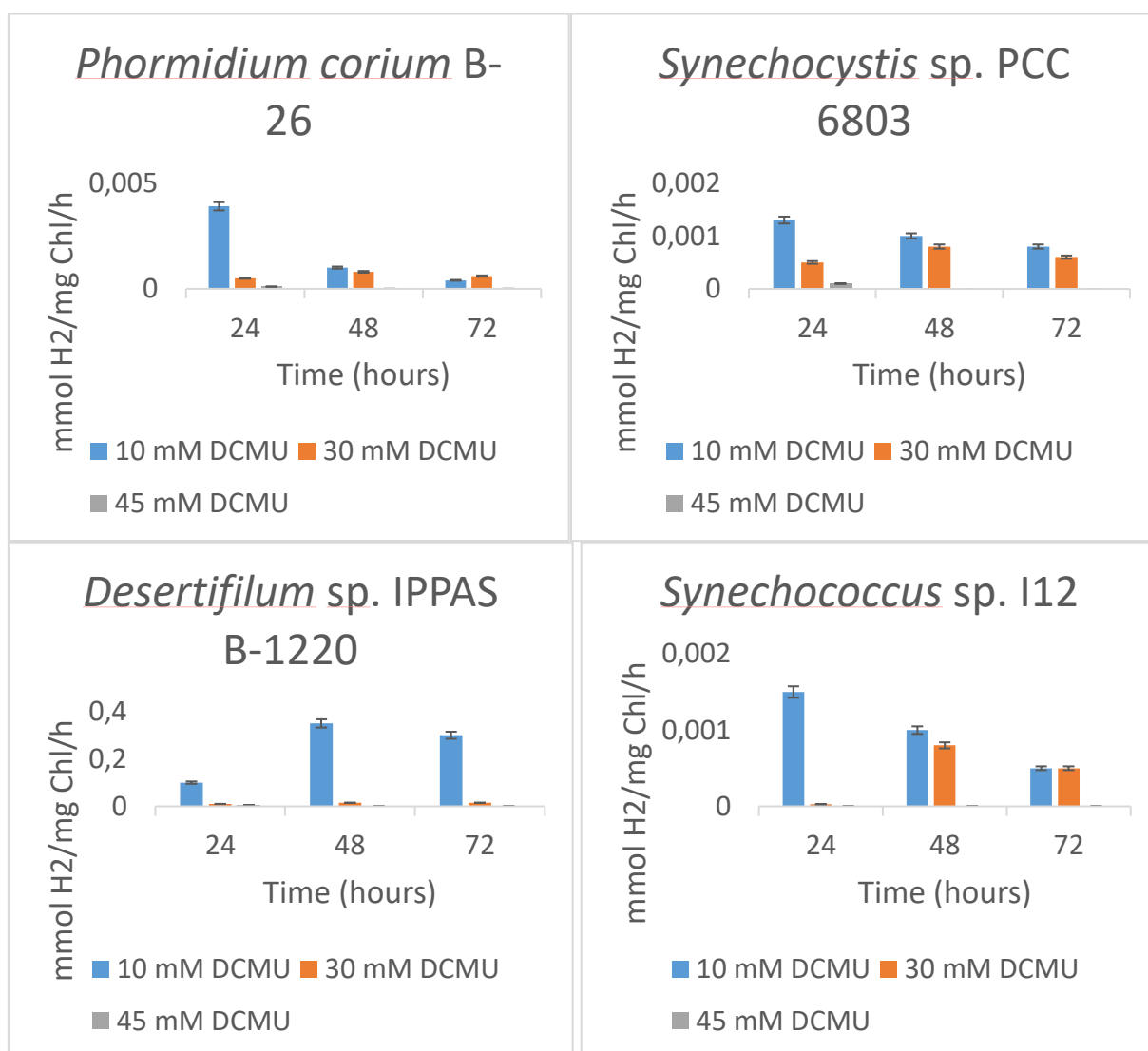
3.2 Зерттелген цианобактериялардың штамдарымен H_2 босатуға DCMU әсері

Әрі қарай, H_2 шығарылуына ықпал ететін цианобактериялар жасушаларында фотосинтетикалық процестерге әсер ететін фактор ретінде DCMU фотосинтез ингибиторының жарықтағы әсері зерттелді. DCMU құрылымы электронды тасымалдау ингибиторы ретінде қалпына келтірілген пластохинон құрылымына жақын, бұл PSII реакция орталығындағы хинонды байланыстыратын қалтадағы молекулалардың күшті байланысын түсіндіреді.

DCMU фотосистеманың белсенділігін тежеу және молекулалық H_2 алу үшін қолайлы анаэробты жағдайлар жасау үшін қолданылды. DCMU анаэробты жағдай жасау үшін цианобактериялар дақылдарының суспензиясына бір рет қосылды, содан кейін оның сутегі жинақталуына әсері әр 24 сағат сайын 3 күн бойы талданды. Алынған нәтижелерге сәйкес, барлық зерттелген штамдарда DCMU 10 мкМ және 30 мкМ концентрациясы кезінде H_2 максималды шығымы эксперименттен кейін (24-48 сағат), ортадағы оттегі таусылған кезде байқалды, содан кейін келесі күндері сутегі концентрациясының төмендеуі байқалды (Сур. 10). Зерттелетін цианобактериялардың штамдары 10 мкМ DCMU кезінде H_2 өндірді. Мұндай жағдайларда *Synechocystis* sp. PCC 6803 бақылау штаммының H_2 шығысы 24 сағаттан кейін 0.0013 мкмоль H_2 /мг хл/сағ, ал 48-72 сағаттан кейін 0.001-0.0009 мкмоль H_2 /мг хл/сек. Жасушаларының H_2 шығуы 24 сағаттан кейін 0,003 мкмоль H_2 /мг хл/сағ болды, ол 0,0016-0.0007 мкмоль H_2 /мг хл/сағ 48 сағаттан кейін төмендеді. Мұндай концентрацияда *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 ингибиторы ең жоғары H_2 жинақтауына ие болды. Сонымен, 48 сағаттан кейін H_2 фотографиялық өнімі 0,348 мкмоль H_2 /мг хл/сағ құрады, ол 72 сағаттан кейін 0,308 мкмоль H_2 /мг хл/сағ дейін төмендеді. Айта кету керек, фотосинтез ингибиторы жоқ жарық жағдайында бірдей штаммның H_2 өнімділігіне қарағанда жоғары мәндер күтілді.

Сонымен қатар, фотосинтез ингибиторының H_2 жиналуына қысқа мерзімді (2 күн) ынталандырушы әсеріне қарамастан, ұзақ экспозиция молекулалық H_2 фотопродукциясының төмендеуіне әкелді. DCMU-ның H_2 фотоөніміне ингибиторлық әсері оның уытты әсеріне байланысты H_2 түзілуінің PSII-тәуелді жолын басумен байланысты болуы мүмкін. Нәтижесінде ортаға оттегі шығарылады, ол H_2 фото өнімін қосымша тежейді. Бұны 10 мкМ DCMU бар *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 үш газдың ортасында (оттегі, сутегі және азот) жинақталуы дәлелдейді. *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 анаэробты жағдайында 10 мкМ DCMU қосқаннан кейінгі алғашқы 2 күн

ішінде H_2 белсенді түрде өндіре бастады, ал 3-ші күні H_2 шығарылымы төмендеді, оттегі мен азот өндірісінің айтарлықтай өсуі байқалды.



Сур. 10 - Әр түрлі цианобактериялардың жасушаларының сутегі молекулалық жинақталуына DCMU әртүрлі концентрациясының (10, 30, 45 мкМ) әсері.

DCMU фотосинтез ингибиторы концентрациясының ортада 30 мкМ және 45 мкМ-ге дейін жоғарылауы цианобактериялардың жасушалары арқылы сутектің фотоөніміне оң әсер етпеді. Сонымен, DCMU 30 мМ концентрациясында цианобактериялар жасушалары сутектің максималды шығуының едәуір төмен мәндерін алды (Сур. 10). DCMU концентрациясының 30 және 45 мкМ-ге дейін жоғарылауы цианобактериялардың H_2 өнімдеріне оң әсер етпеді. H_2 фотоөндірісіне DCMU ингибиторлық әрекеті, мүмкін, оның улы әсерінен H_2 түзілуінің PSII-тәуелді жолының басылуымен байланысты. Нәтижесінде ортаға оттегі бөлінеді, ол қосымша H_2 -нің фотоөнімін тежейді. Бұған *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 ортасында үш газдың (мысалы, оттегі, сутек және азот) анаэробты жағдайда 10 мкМ DCMU бар анаэробты жағдайда

жинақталуы дәлел. Анаэробты жағдайда 10 мкМ DCMU қосқаннан кейінгі алғашқы 2 күнде *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 белсенді түрде H_2 өндіре бастады, ал 3-ші күні H_2 бөлінуі төмендеп, өндірістің айтарлықтай оттегі мен азоттың өсуі байқалды. Фотосинтездің DCMU ингибиторы концентрациясының ортада 30 мкМ және 45 мкМ дейін жоғарылауы цианобактерия жасушалары арқылы сутектің фотопродукциясына оң әсерін тигізбеді. Сонымен, DCMU 30 мкМ концентрациясында цианобактерия жасушаларының максималды сутегінің шығарылуының айтарлықтай төмен мәндері алынды (Сур. 4). DCMU концентрациясының 30 және 45 мкМ дейін жоғарылауы цианобактериялардың H_2 түзілуіне оң әсерін тигізбеді. Осылайша, 30 мкМ концентрациядағы DCMU цианобактериялар өндіретін H_2 максималды өнімділікті айтарлықтай төмендетті. Бұл жағдайда *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 шығарған H_2 максималды шығыны 0,005 мкмоль H_2 /мг хл/сағ құрады, бұл 10 мкМ DCMU әсерінен сол штамнан 61 есе төмен болды. Қалған цианобактерия штамдары фотосинтез ингибиторының берілген концентрациясында бөлінетін әр түрлі молекулалық H_2 мөлшерін көрсетті. Алайда, зерттелген штамдардың барлығына ортақ үлгі ретінде, H_2 максималды шығымы DCMU берілген концентрациясында айтарлықтай төмен болды. Осылайша, *Synechocystis* sp. PCC 6803 бақылаушы штамы үшін H_2 максималды жинақталуы 2 күннен кейін 0.0009 мкмоль H_2 /мг хл/сағ құрады. *Phormidium corium* B-26 және *Synechococcus* sp. I12 үшін бұл мәндер сәйкесінше 0,001- 0,0009 мкмоль H_2 /мг хл/сағ болды.

45 мкМ DCMU-да сутектің шығуы зерттелген барлық штамдарда байқалмады. Осылайша, H_2 өндірісі үшін DCMU оңтайлы концентрациясы 10 мкМ болды. DCMU алғашқы 2 күн ішінде цианобактериялардың жасушалары арқылы H_2 фотополын қоздыратыны анықталды, содан кейін кері әсерлер байқалады.

ҚОРЫТЫНДЫ

ВіоН₂ фототрофты микроорганизмдерді алу парниктік газдардың ғаламдық шығарындыларын азайту үшін іздеуде маңызды рөл атқаратын биотехнология болып табылады. Биосутектің болашағы ғылыми прогреске байланысты, мысалы, қажетті сипаттамалары бар белсенді штамдарды іздеу және сутегі өндіруге арналған штамдарды жақсарту үшін тиісті технологияларды таңдау қажет. Зерттеу жұмысының мақсаты цианобактериялардың арасында перспективті сутегі өндірушілерін табу және осы процестің тетіктерін, био-сутегі өндірісін ұлғайту шарттарын түсіну болды. Алынған нәтижелерге сәйкес, Н₂-нің жоғары жинақталуы *Synechocystis* sp. PCC 6803 0.037 мкмоль Н₂/мг хл/сағ қараңғы кезінде 120 сағат ішінде байқалды. Сонымен қатар, *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 жарықта 166 сағат инкубациядан кейін 0.229 мкмоль Н₂/мг хл/сағ шығарды. *Desertifilum* sp. IPPAS B-1220 DCMU 10 мкМ концентрациясы Н₂ шығарылымын 1,5 есе арттырды (0,348 мкмоль Н₂/мг хл/сағ). Алынған нәтижелер цианобактерияларды биожүйелер ретінде одан әрі зерттеудің болашағын, практикалық маңыздылығын және экологиялық таза отын ретінде жарықты молекулалық сутекке тиімді түрлендіре алатындығын көрсетеді.

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

- [1] Rodionova MV, Poudyal RS, Tiwari I, Voloshin RA, Zharmukhamedov SK, Nam HG, Zayadan BK, Bruce BD, Hou HJM, Allakhverdiev SI. Biofuel production: challenges and opportunities. *Int J Hydrogen Energy*.
- [2] Allakhverdiev SI. Photosynthetic and biomimetic hydrogen production. *Int J Hydrogen Energy*.
- [3] Марков С. А., Протасов Е. С., Быбин В. А., Стом ДИ. Производство водорода микроорганизмами и микробными топливными элементами с использованием сточных вод и отходов. *Int Sci J Альтернативная энергетика*.
- [4] Antal TK, Lindblad P. Production of H₂ by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH. *J Appl Microbiol.*
- [5] Садвакасова А. К., Акмуханова Н. Р., Болатхан К., Зайдан Б. К., Усербаева А. А., Бауенова М. О., Ахметкалиева А. Е., Аллахвердиев С. сутегі энергетикасында биодизель отынын өндіру үшін табиғи көздерден алынған микробалдырлардың жаңа штамдарын-липидтер продуценттерін іздеу.
- [6] Марков С. А. Биосутек: балдырлар мен бактерияларды молекулалық сутекті өндіру үшін пайдалану мүмкіндігі. *Int Sci J баламалы энергетика экологиясы*.
- [7] Kumar D, Kumar HD. Hydrogen production by several cyanobacteria. *Int J Hydrogen Energy*.
- [8] Voloshin RA, Rodionova MV, Zharmukhamedov SK, Veziroglu TN, Allakhverdiev SI. Review: biofuel production from plant and algal biomass. *Int J Hydrogen Energy*.
- [9] Lindberg P, Lindblad P, Cournac L. Gas Exchange in the filamentous cyanobacterium *Nostoc punctiforme* strain ATCC 29133 and its hydrogenase-deficient mutant strain NHM5. *Appl Environ Microbiol.*
- [10] Madamwar D, Garg N, Shah V. Cyanobacterial hydrogen production. *World J Microbiol Biotechnol.*
- [11] Yeager CM, Milliken CE, Bagwell CE, Staples L, Berseth PA, Sessions HT. Evaluation of experimental conditions that influence hydrogen production among heterocystous cyanobacteria. *Int J Hydrogen Energy*.
- [12] Smith GD, Ewart GD, Tucker W. Hydrogen production by cyanobacteria. *Int J Hydrogen Energy*.
- [13] Masukawa H, Mochimaru M, Sakurai H. Hydrogenases and photobiological hydrogen production utilizing nitrogenase system in cyanobacteria. *Int J Hydrogen Energy*.
- [14] Aoyama K, Uemura I, Miyake J, Asada Y. Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *J Ferment Bioenergi.*
- [15] Jeffries TW, Timourien H, Ward RL. Hydrogen production by *Anabaena cylindrica*: effect of varying ammonium and ferric ions, pH and light. *Appl Environ Microbiol.*
- [16] Kosourov S, Murukesan G, Seibert M, Allahverdiyeva Y. Evaluation of light energy to H₂ energy conversion efficiency in thin films of cyanobacteria and green algae under photoautotrophic conditions. *Algal Res.*

- [17] Liao CH, Huang CW, Jeffrey C, Wu S. Hydrogen production from semiconductor-based photocatalysis via water splitting. Catalysts.
- [18] Xia A, Cheng J, Song W, Su H, Ding L, Lin R, Lu H, Liu J, Zhou J, Cen K. Fermentative hydrogen production using algal biomass as feedstock. *Renew Sustain Energy Rev*.
- [19] Lin C-Y, Nguyen TM-L, Chu C-Y, Leu H-J, Lay C-H. Fermentative biohydrogen production and its byproducts: a mini review of current technology developments. *Renew Sustain Energy Rev*.
- [20] Mohan SV, Bhaskar YV, Sarma PN. Biohydrogen production from chemical wastewater treatment in biofilm configured reactor operated in periodic discontinuous batch mode by selectively enriched anaerobic mixed consortia. *Water Res*.
- [21] Sharma A, Kumar SA. Hydrogen from algal biomass: a review of production process. *Biotechnol Reports*.
- [22] Demirci UB, Miele P. Overview of the relative greenness of the main hydrogen production processes. *J Clean Prod*.
- [23] Волошин Р. А., Родионова М. В., Жармухамедов С. К., Везироглу Т. Н., Аллахвердиев С. И. Обзор: производство биотоплива из биомассы растений и водорослей. *Int J Водородная энергия*.
- [24] Simionato D, Basso S, Giacometti GM, Morosinotto T. Optimization of light use efficiency for biofuel production in algae. *Biophys Chem*.
- [25] Заядан Б, Сәдуақасова АҚ, Өсербаева А, Болатхан қ.оқшаулау. Мутагенез. Биодизель отынын өндіру үшін микробалдырлардың штамдарын өсіруді оңтайландыру. Өсімдіктер физиологиясы.
- [26] Ainas M, Hasnaoui S, Bouara R, Abdi N, Drouiche N, Mameri N. Hydrogen production with the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Int J Hydrogen Energy*.
- [27] Lopez BR, Hernandez J-P, Bashan Y, Bashan LE. Immobilization of microalgae cells in alginate facilitates isolation of DNA and RNA. *J Microbiol Methods*.
- [28] Lee HS, Vermaas WFJ, Rittmann BE. Biological hydrogen production: prospects and challenges. *Trends Biotechnol*.
- [29] Jesus SS, Filho RM. Potential of algal biofuel production in a hybrid photobioreactor. *Chem Eng Sci*.
- [30] Prabakar D, Manimudi VT, Suvetha SK, Sampath S, Mahapatra DM, Rajendran K, Pugazhendhi A. Advanced biohydrogen production using pretreated industrial waste: outlook and prospects. *Renew Sustain Energy Rev*.
- [31] Holladay JD, Hu J, King DL, Wang Y. An overview of hydrogen production technologies. *Catal Today*.
- [32] Krahn E, Schneider K, Müller A. Comparative characterization of H₂ production by the conventional Mo nitrogenase and the alternative “iron-only” nitrogenase of *Rhodobacter capsulatus* hup - mutants. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- [33] Vignais P. Hydrogenases and H⁺ reduction in primary energy conservation. *Results Probl Cell Differ*.
- [34] Ghirardi ML, Mohanty P. Oxygenic hydrogen photoproduction –current status of the technology. *Curr Sci*.

- [35] Boison G, Schmitz O, Mikheeva L, Shestakov S, Bothe H. Cloning, molecular analysis and insertional mutagenesis of the bidirectional hydrogenase genes from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. FEBS Lett.
- [36] Boison G, Bothe H, Schmitz O. Transcriptional analysis of hydrogenase genes in the cyanobacteria *Anacystis nidulans* and *Anabaena variabilis* monitored by RTPCR. Curr Microbiol.
- [37] Houchins JP. The physiology and biochemistry of hydrogen metabolism in cyanobacteria. Biochim Biophys Acta.
- [38] Schmitz O, Boison G, Salzmann H, Bothe H, Schutz K, Wang SH, Happe T. HoxE – a subunit specific for the pentameric bidirectional hydrogenase complex (HoxEFUYH) of cyanobacteria. Biochim Biophys Acta.
- [39] Happe T, Schutz K, Bohme H. Transcriptional and mutational analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. J Bacteriol.
- [40] Weyman P, Pratte B, Thiel T. Transcription of hupSL in *Anabaena variabilis* ATCC 29413 is regulated by NtcA and not by hydrogen. Appl and env microbial.
- [41] Axelsson R, Lindblad P. Transcriptional regulation of Nostoc hydrogenases: effects of oxygen, hydrogen, and nickel. Appl Environ Microbiol.
- [42] Tatsuhiko Y, Higuchi Y. Studies on hydrogenase. In: Proceedings of the Japan academy. vol. 89; 2013. p. 16–33. Series B, Physical and Biological Sciences.
- [43] Khetkorn W, Khanna N, Incharoensakdi A, Lindblad P. Metabolic and genetic engineering of cyanobacteria for enhanced hydrogen production. Biofuels.
- [44] Chow TJ, Tabita FR. Reciprocal light-dark transcriptional control of nif and rbc expression and light-dependent post translational control of nitrogenase activity in *Synechococcus* sp. strain RF-1. J Bacteriol.
- [45] Huang T-C, Chow T-J. Comparative studies of some nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria isolated from rice fields. J Gsn Microbiol.
- [46] Troshina O, Serebryakova L, Sheremetieva M, Lindblad P. Production of H₂ by the unicellular cyanobacterium *Gloeocapsa alpicola* CALU 743 during fermentation. Int J Hydrogen Energy.
- [47] Prabakaran D, Arun KD, Uma L, Subramanian G. Dark hydrogen production in nitrogen atmosphere: an approach for sustainability by marine cyanobacterium *Leptolyngbya valderiana* BDU 20041. Int J Hydrogen Energy.
- [48] Min H, Sherman LA. Hydrogen production by the unicellular, diazotrophic cyanobacterium *Cyanothece* sp. strain ATCC 51142 under conditions of continuous light. Appl Environ Microbiol.
- [49] Schwarz S, Poss Z, Hoffmann D, Appel J. Hydrogenases and hydrogen metabolism in photosynthetic prokaryotes. Adv Exp Med Biol.
- [50] Tsygankov AA, Fedorov AS, Kosourov SN, Rao KK. Hydrogen production by cyanobacteria in an automated outdoor photobioreactor under aerobic conditions. Biotechnol Bioeng.
- [51] Khetkorn W, Baebprasert W, Lindblad P, Incharoensakdi A. Redirecting the electron flow towards the nitrogenase and bidirectional Hox-hydrogenase by using specific inhibitors results in enhanced H₂ production in the cyanobacterium *Anabaena siamensis* TISTR 8012. Bioresour Technol.

[52] Nyberg M, Heidorn T, Lindblad P. Hydrogen production by the engineered cyanobacterial strain *Nostoc PCC 7120 ΔhupW* examined in a flat panel photobioreactor. *J Biotechnol*.

[53] Aoyama K, Uemura I, Miyake J, Asada Y. Fermentative metabolism to produce hydrogen gas and organic compounds in a cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *J Ferment Bioeng*.

[54] Shah V, Gard N, Madamwar D. Ultrastructure of the fresh water cyanobacterium *Anabaena variabilis* SPU 003 and its application for oxygen-free hydrogen production. *FEMS Microbiol Lett* .

[55] Neuer G, Bothe H. Electron donation to nitrogenase in heterocysts of cyanobacteria. *Arch Microbiol*.

[56] Zhang ZP, Tay JH, Show KY, Yan R, Liang DT, Lee DJ, Jiang WJ. Biohydrogen production in a granular activated carbon anaerobic fluidized bed reactor. *Int J Hydrogen Energy*.

[57] Fedorov AS, Tsygankov AA, Rao KK, Hall DO. Production of hydrogen by an *Anabaena variabilis* mutant in photobioreactor under aerobic outdoor conditions. In: Miyake J, Matsunaga T, San PA, editors. *BioHydrogen II*. Oxford, United Kingdom: Elsevier; 2001. p. 223–8.

[58] Lambert GR, Smith GD. Hydrogen formation by marine Blue-green algae. *FEBS Lett*.

[59] Masukawa H, Nakamura K, Mochimaru M, Sakurai H. Photobiological hydrogen production and nitrogenase activity in some heterocystous cyanobacteria. In: Miyake J, Matsunaga T, San PA, editors. *BioHydrogen II*. Elsevier; 2001. p. 63–6.

[60] Марков С. А., Базин М. Дж., Холл Д.О. Фотопроизводство водорода и поглощение углекислого газа иммобилизованным *Anabaena variabilis* в фотобиореакторе с полым волокном. *Энзим Микроб Технол*.

[61] Sveshnikov DA, Sveshnikova NV, Rao KK, Hall DO. Hydrogen metabolism of mutant forms of *Anabaena variabilis* in continuous cultures and under nutritional stress. *FEMS Microbiol Lett*.

[62] Famiglietti M, Hochkoepler A, Luisi PL. Surfactant-induced hydrogen production in cyanobacteria. *Biotechnol Bioeng*.

[63] Howarth DC, Codd GA. The uptake and production of molecular hydrogen by unicellular cyanobacteria. *J Gen Microbiol*.

[64] Taikhao S, Phunpruch S. Increasing hydrogen production efficiency of N₂-fixing cyanobacterium *Anabaena siamensis* TISTR 8012 by cell immobilization. *Energy Procedia*.

[65] Серебрякова Л. Т., Шереметьева М. Е., Линдبلاد П. Н₂-поглощение и эволюция одноклеточной цианобактерии *Chroococcidiopsis thermalis* CALU 758. *Физиол-Биохимия растений*.

[66] Oost VJ, Bulthuis BA, Feitz S, Krab K, Kraayenhof R. Fermentation metabolism of the unicellular cyanobacterium *Cyanothece PCC 7822*. *Arch Microbiol*.

[67] Kufryk G. Advances in utilizing cyanobacteria for hydrogen production. *Adv Microbiol*.

[68] Қоссалбаев Б.Д., Томо Тацуя, Зайдан Б. К., Садвакасова А. К., Болатхан К., Аллахвердиев С. И. Сутегі өндіру үшін цианобактериялар штаммдарының әлеуетін анықтау. *Int J сутегі энергиясы*.

[69] Antal TK, Lindblad P. Production of H₂ by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH. *J Appl Microbiol*.