

Лаборатория биотехнологии и физиологии фототрофных организмов



Состав лаборатории



Анатолий Анатольевич
Цыганков, д.б.н.,
заведующий лабораторией



Татьяна Викториновна
Лауринавичене,
к.б. н., в.н.с.



Николай Алексеевич
Зорин, к.б.н., в. н. с.



Елена Петровна
Иванова, к.б.н., с.н.с



Ольга Петровна
Сердюк к.б.н., с.н.с.



Лидия Дмитриевна
Смолыгина, к.б.н., с.н.с.



Дарья Николаевна
Текучева, к.б.н., с.н.с.



Хорческа Александровна
Батырова, к.б.н., н.с.



Антон Вадимович
Ланкин, к.б.н., н.с.



Зинаида Александровна
Ельцова, к.б.н., н.с.



Екатерина Павловна
Петушкова, н.с.



Анна Наилевна
Хуснутдинова, к.б.н., н.с.



Евгений Сергеевич
Шастик, к.б.н., н.с.



Азат Вадимович
Абдуллатыпов к.б.н., н.с.



Вера Игоревна
Гречаник, аспирант, м.н.с.



Анастасия Игоревна
Романова, м.н.с.



Валентина Андреевна
Морозова,
ведущий инженер



Юлия Васильевна Сенина
ведущий инженер



Зинаида Васильевна
Соболева,
ведущий инженер



Ольга Олеговна
Чудакова, аспирант

Область научных исследований лаборатории

В настоящее время все больше усугубляются экологические проблемы, возникающие при использовании традиционных ископаемых видов топлива. Происходит повышение средней температуры атмосферы Земли. Кроме того, происходит загрязнение почв и вод нефтью и продуктами ее сгорания. В этом отношении молекулярный водород является перспективным экологически чистым топливом.

В современной промышленности водород получают из ископаемых видов топлива, но также активно во всем мире проводятся исследования, направленные на изучение механизмов преобразования солнечной энергии в водород разными биологическими системами.

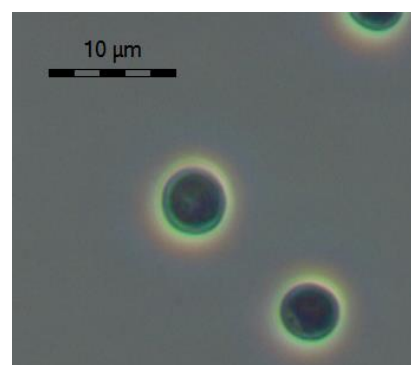


Рис. 1. Микрофотография
нативного препарата *Chlorella
pyrenoidosa*

Для преобразования полученного водорода в электрический ток возможно использование отдельных ферментных систем, осуществляющих перенос электронов на электрод при поглощении/выделении водорода.

Принципиальными проблемами, требующими решения для практической реализации фотобиологических систем, являются эффективность преобразования энергии света и/или органических соединений в водород и удельная скорость процесса. Преобразование энергии света возможно как биологическими системами на основе консорциума микроорганизмов, так и на основе монокультур, или на основе отдельных белковых комплексов и молекул (как самих по себе, так и встроенных в биотехнологические устройства, например, электроды топливных элементов).

В настоящее время в лаборатории биотехнологии и физиологии фототрофных организмов проводятся исследования «горячих точек» на разных уровнях организации биологических систем, способных к преобразованию световой энергии.

В качестве объектов исследований используются естественные и трансгенные микроорганизмы, относящиеся к различным систематическим группам: одноклеточным водорослям (*Chlamidomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* и др.), пурпурным серным бактериям (*Thiocapsa roseopersicina*), пурпурным несерным бактериям (*Rba. capsulatus*, *Rba. sphaeroides*, *Rhodopseudomonas palustris* и др.), цианобактериям (*Anabaena* sp. и др.) и др. Помимо изучения физиологии перечисленных организмов и проведения работ по повышению эффективности образования ими водорода, в лаборатории проводятся исследования по получению из биомассы микроорганизмов и других практически значимых веществ.

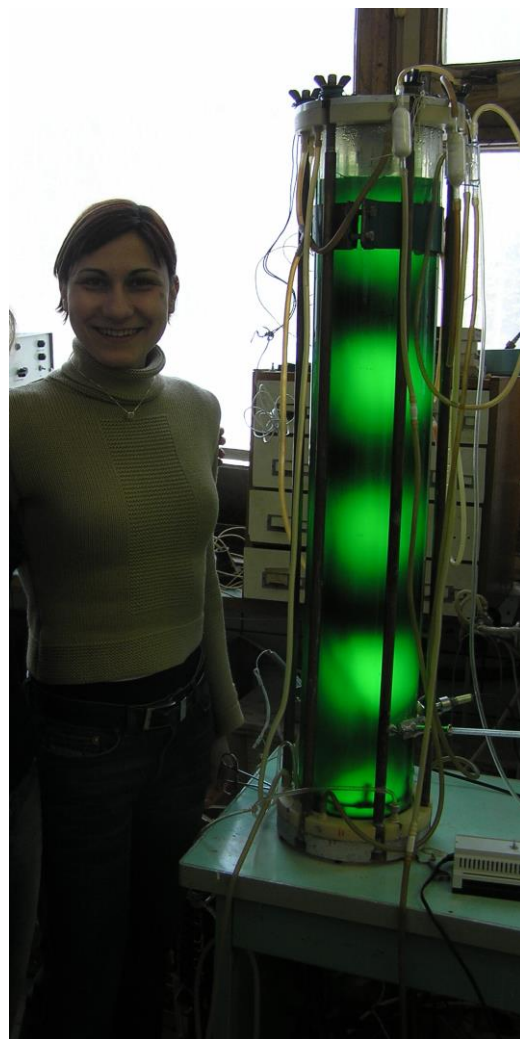


Рис. 2. Фотобиореактор «ПИЛОТ» для управляемого культивирования фотосинтезирующих микроорганизмов.

Основные направления исследований.

1. Изучение ферментов водородного метаболизма.



Гидрогеназы - это ферменты, катализирующие активацию молекулярного водорода. В зависимости от структуры гидрогеназы, синтезируемой микроорганизмом, ее

локализации, а также природного донора/акцептора электрона, она может участвовать в поглощении или выделении водорода микроорганизмами.

Из пурпурной серной бактерии *Thiocapsa roseopersicina* выделена термостабильная гидрогеназа HydSL, которая изучается как с точки зрения механизма функционирования, так и в целях практического применения. Этот фермент обладает высокой стабильностью: имеет температурный оптимум около 80°C, способен к активации молекулы H_2 в присутствии O_2 . Данные характеристики фермента, наряду с его способностью к переносу электронов на электрод при поглощении/выделении водорода, делают его перспективным для создания водородных электродов. Данные электроды могут применяться как в качестве сенсора, так и для использования в топливных элементах без благородных металлов, а также для применения в

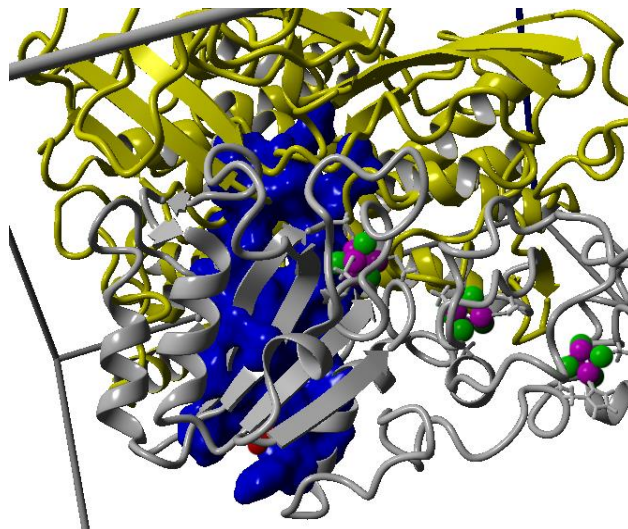


Рис. 3 Туннель выхода кислорода из активного центра гидрогеназы HydSL *T. roseopersicina* через малую субъединицу. Желтым цветом показана большая субъединица, серым – малая субъединица. Поверхность остатков туннеля выделена синим цветом. Красным цветом показана выходящая из малой субъединицы молекула кислорода. Зеленым цветом показаны атомы серы, фиолетовым – атомы железа (в железосерных кластерах).

гибридных микробных системах для преобразования H_2 в электричество.

Показано, что гидрогеназный электрод способен функционировать в условиях водород-выделяющего биореактора с кластриальным консорциумом и тем самым осуществлять прямую конверсию биоводорода в электрический ток с одновременной очисткой среды от органики.

Исследовано ингибирование этой гидрогеназы цианидом, показавшее, что цианид вызывает разрушение железо-серных кластеров фермента с образованием ферроцианида.

Также показано, что положительно заряженные пептиды ингибируют гидрогеназу по конкурентному механизму.

С помощью методов компьютерного моделирования получена трёхмерная структура гидрогеназы HydSL, а также родственной ей гидрогеназы из *Alteromonas macleodii*.

2. Исследование водородного метаболизма фототрофных организмов и перспектив его промышленного применения.



Изучение водородного метаболизма и возможностей его модификации актуально в переходе на альтернативный источник энергии – биоводород. Существует несколько способов получения водорода биологическим путём с использованием микроорганизмов:

1. Биофотоллиз воды (прямой и непрямой). С помощью микроводорослей или цианобактерий. Образование молекулярного водорода при прямом биофотоллизе воды осуществляется с участием гидрогеназы, чувствительной к кислороду. При непрямом биофотоллизе за образование водорода ответственна нитрогеназа и/или гидрогеназа.

2. Фото-ферментация – это светозависимое образование водорода с участием нитрогеназы в условиях дефицита источника азота при фотоброжении глюкозы и окисления простых жирных кислот в цикле трикарбоновых кислот у бактерий, осуществляющих аноксигенный фотосинтез. Наиболее перспективными продуцентами водорода данным способом являются пурпурные несерные бактерии, продемонстрировавшие наибольшую эффективность преобразования энергии и способность использовать большое разнообразие углеродных субстратов.

3. Образование водорода в процессе темновой ферментации органических веществ, осуществляемой облигатными и факультативными анаэробами. Помимо водорода продуктами данного процесса являются углекислота и такие метаболиты, как ацетат, лактат, этанол и др.

4. Гибридные системы, содержащие разные виды микроорганизмов. Например, одновременное использование культур, осуществляющих биосинтез водорода при темновой ферментации (кlostридиальный консорциум) и фото-ферментации органических соединений (пурпурные несерные бактерии) позволяет повысить эффективность процесса и уменьшить количество метаболитов, содержащихся в растворе. Последний факт делает процесс выгодным не только с точки зрения получения биоводорода, но и очистки сточных вод многих производств.

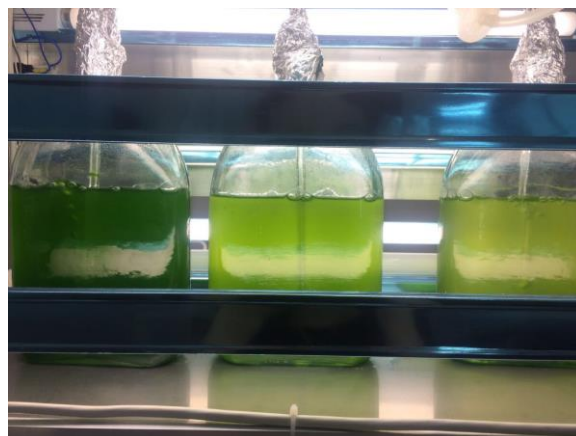


Рис. 4. Периодические культуры микроводорослей, выращенные в фотоавтотрофных условиях при добавлении CO_2 .

2.1. Изучение биофотоллиза воды микроводорослями и цианобактериями.

Микроводоросли и цианобактерии могут осуществлять прямой и непрямой биофотоллиз воды – разложение воды на водород и кислород. Однако главным препятствием на пути практического использования этой особенности является высокая чувствительность ферментов водородного метаболизма, гидрогеназы и нитрогеназы, к ингибирующему действию кислорода. Поэтому для успешного выделения водорода необходимо поддерживать условия анаэробноза.

В случае зелёных водорослей это достигается за счёт голодания по ряду элементов, приводящего к деструкции белка D1 и установлению анаэробноза. В лаборатории разработана методика для фотовыделения водорода в условиях фосфорного голодания, что открывает возможность для получения больших количеств водорода морскими микроводорослями. Показано увеличение скорости выделения водорода зелёными микроводорослями за счёт уменьшения парциального давления водорода в газовой фазе фотобиореактора.



Рис. 5. Фотобиореактор на основе коаксиальных цилиндров для фототрофного культивирования микроорганизмов, сопряженный с ПАМ-флюориметром.

Также в лаборатории исследуется выделение водорода цианобактериями, которое осуществляется в гетероцистах. Исследованы мутанты цианобактерий по водород-поглощающей гидрогеназе, которые показали выделение водорода в условиях культивирования в закрытых фотобиореакторах, расположенных непосредственно в условиях внешней среды.

2.2. Изучение выделения водорода пурпурными несерными бактериями.

Пурпурные несерные бактерии осуществляют выделение водорода в фотогетеротрофных условиях роста с использованием преимущественно органических кислот. В лаборатории исследуются разные системы генерации водорода с участием этих бактерий:

1) С использованием монокультур пурпурных бактерий – исследовано выделение водорода штаммами *Rhodobacter sphaeroides* с редуцированным фотосинтетическим аппаратом. Показано, что способность этих штаммов выделять водород при высоких интенсивностях света превышает таковую для родительского штамма, что говорит о перспективности их исследования в дальнейшем. Используя автоматизированные системы культивирования, исследована способность пурпурных несерных бактерий к выделению водорода в условиях недостатка азота при различном содержании биомассы в культуральной суспензии.

2) С использованием двухстадийных систем, включающих на первой стадии темновую ферментацию сложных субстратов (крахмал, картофельный гомогенат, послеспиртовая барда) клостридиальным консорциумом и на второй стадии фотоферментацию полученных органических кислот пурпурными бактериями. Это позволяет увеличить выход водорода и добиться более полной очистки стоков. Исследовано влияние различных ингибиторов (кислот, спиртов, ацетона, металлов) на выделение водорода пурпурными серными бактериями. Выходы водорода составили до 12 литров на 1 литр послеспиртовой барды.

3) С использованием многостадийных систем, направленных на использование биомассы водорослей для конверсии солнечной энергии в водород.

Система включала:

- культивирование микроводорослей в фотолитоавтотрофных условиях;
- химический гидролиз биомассы;
- темновое брожение гидролизата клостридиальным консорциумом;
- фотовыделение водорода пурпурными несерными бактериями.

4) С использованием смешанных культур клостридий и пурпурных бактерий проведено исследование выделения водорода при ферментации крахмала. Показано, что эффективность выделения водорода в смешанных культурах повышается, причем рост клостридий подавлен.



Рис. 6. Фотобиореактор на основе коаксиальных цилиндров для фототрофного культивирования микроорганизмов.

3. Разработка технологии промышленного производства бактериохлорофилла из пурпурных несерных бактерий.

Бактериохлорофилл *a*, основной пигмент фотосинтетических реакционных центров пурпурных несерных бактерий, является ценным сырьём для медицинской химии. На его основе синтезируют фотосенсибилизаторы – вещества, токсичные для клеток при освещении, которые используются в фотодинамической терапии онкологических заболеваний. В лаборатории разрабатывается технология выращивания пурпурных бактерий рода *Rhodobacter*. Ведутся исследования регуляции биосинтеза бактериохлорофилла для повышения его выхода. Разработан лабораторный метод хемотротрофного культивирования этих бактерий, позволяющий получать до 22 г сухой биомассы в литре с содержанием бактериохлорофилла *a* до 8 мг/г сухой биомассы.



Рис. 7. Темновой биореактор АНКУМ с культурой пурпурных несерных бактерий

4. Изучение пурпурных несерных бактерий как продуцентов цитокининов.

Пурпурные бактерии чрезвычайно перспективны как продуценты цитокининов, стимуляторов роста растений. В лаборатории впервые были исследованы природные цитокинины пуринового ряда у фототрофных пурпурных бактерий. Был обнаружен собственный *ipt* ген их биосинтеза с низким уровнем экспрессии. Проведена трансформация пурпурных бактерий агробактериальным геном *ipt*. Показано влияние чужеродного гена биосинтеза цитокининов на внешнюю мембрану клеточной стенки бактерий, биосинтез фотосинтезирующих комплексов и морфологию клеток. Обнаружена способность пурпурных несерных бактерий к биосинтезу и секретированию в культуральную жидкость 4-гидроксифенэтилового спирта, проявляющего высокую цитокининовую активность в биотестах. Предполагается, что это цитокинин-подобное соединение может выполнять функцию классических цитокининов, имеющих у пурпурных бактерий низкий уровень экспрессии.

5. Исследование углеродного метаболизма пурпурных несерных бактерий.

Поскольку пурпурные бактерии являются ценными организмами для получения практически значимых химических соединений, весьма важным является изучение фундаментальных основ их жизнедеятельности, и в частности, углеродного метаболизма. В лаборатории исследуется возможность существования различных путей восполнения

пула щавелевоуксусной кислоты (ЩУК) в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК), у пурпурных несерных бактерий.

Проанализирован известный в настоящее время набор ферментативных реакций, в которых участвуют предшественники метаболитов ЦТК. Это позволило обнаружить цепочки ранее не установленных метаболических путей. Создана универсальная метаболическая схема путей восполнения пула ЩУК в ЦТК у прокариот. Ее анализ показал, что пути восполнения пула ЩУК имеют как общие, так и вариабельные участки. Учитывая обнаруженные закономерности, впервые осуществлена классификация данных путей по образуемому в них метаболиту, через который происходит восполнение пула ЩУК и предшественников ЩУК в ЦТК.

Собранная и систематизированная информация была успешно использована для изучения особенностей фотоассимиляции ацетата у пурпурной несерной бактерии *Rhodobacter capsulatus*.

Гранты лаборатории

- 1) РФФИ: 14-04-01676-а «Мембран-ассоциированная гидрогеназа hydSL пурпурной серной бактерии *Thiocapsa roseopersicina*», (РФФИ), 2014-2016;
- 2) РФФИ: 15-54-50032-ЯФ «Сравнительное изучение выделения водорода различными мутантами цианобактерий и пурпурных бактерий», (РФФИ), 2015-2016;
- 3) РФФИ: 16-34-00940-мол_а «Спектр запасных продуктов у непрерывных культур *Rhodobacter sphaeroides* при разных интенсивностях света», (РФФИ), 2016-2017;
- 4) РФФИ: 14-04-00246-а «Взаимодействие фототрофных и гетеротрофных бактерий в смешанных культурах», (РФФИ), 2014-2016;
- 5) РНФ: № 15-14-30007 «Природный и искусственный фотосинтез для получения энергоносителей», (РНФ), 2015-2017;
- 6) Грант УМНИК «Разработка технологии применения ионных жидкостей в гидрогеназном электроде», 2014-2016; (Абдуллатыпов А.В.)
- 7) Госконтракт № 14.512.11.0096 «Исследование механизмов фотосинтетической аккумуляции энергии с целью создания фотобиореакторов для накопления биомассы и водорода» 2014 г.

Преподавательская деятельность.

За последние 5 лет в лаборатории защищено 6 кандидатских диссертаций, 10 магистерских и бакалаврских диссертаций.

Избранные статьи лаборатории за 2007-2017 гг.

1. Nikolay A. Zorin, Alexey A. Zabelin, Anatoly Ya. Shkuropatov, Anatoly A. Tsygankov. Interaction of HydSL hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina* with cyanide leads to destruction of iron-sulfur clusters. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2017, 177, 190-197.
2. Петушкова Е.П., Цыганков А.А. / Метаболизм ацетата пурпурной несерной бактерии *Rhodobacter capsulatus* // БИОХИМИЯ, 2017, том 82, вып. 5, с. 786 – 807.
3. Сердюк О.П., Ширшикова Г.Н., Смольгина Л.Д., Бутанаев А.М., Креславский В.Д., Ярцева Н.В., Чекунова Е.М. Обнаружение агробактериального гена биосинтеза цитокининов *ipt* у фототрофных несерных пурпурных бактерий *Rhodobacter sphaeroides* и *Rhodopseudomonas palustris* // Генетика, 2017, том 53, № 10, с. 1179-1187.

4. Laurinavichene T., Laurinavichius K., Shastik E., Tsygankov A. Inhibited growth of *Clostridium butyricum* in efficient H₂ producing co-culture with *Rhodobacter sphaeroides*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100 (2016) 10649.
5. Eltsova Z., Bolshakov M., Tsygankov A. Effect of light intensity and various organic acids on the growth of *Rhodobacter sphaeroides* LHII-deficient mutant in a turbidostat culture. *Photosynth Res.* 2016; 130(1-3):307-316.
6. Jiang Liu, Wen-Jie Wu, Fang Fang, Nikolay A. Zorin, Meng Chen, Dong-Jin Qian. Immobilization of hydrogenase on carbon nanotube polyelectrolytes as heterogeneous catalysts for electrocatalytic interconversion of protons and hydrogen. *J. Nanopart. Res.*, 2016, 18, 220-233.
7. Laurinavichene T., Tsygankov A. Hydrogen photoproduction by co-culture *Clostridium butyricum* and *Rhodobacter sphaeroides*. *Int. J. Hydrogen Energy*. 2015, 40, 14116
8. A.I. Gavarisheva, B.F. Belokopytov, V. I. Semina, T.V. Laurinavichene, A.A. Tsygankov. Mass-energy balance analysis for estimation of light energy in an integrated system of biological H₂ production. *Biofuel*. 2015, 8, 258 – 266.
9. Abdullatypov A. V., Tsygankov A. A. Modeling three-dimensional structure of two closely related hydrogenases // *Photosynthesis Research*. 2015, 125, 341-353.
10. Jokel M, Kosourov S, Battchikova N, Tsygankov AA, Aro EM, Allahverdiyeva Y. Chlamydomonas flavodiiron proteins facilitate acclimation to anoxia during sulfur deprivation. *Plant Cell Physiology* (2015) 56, 1598.
11. Batyrova H., Gavarisheva A., Ivanova E., Jianguo Liu and Tsygankov A. Sustainable Hydrogen Photoproduction by Phosphorus-Deprived Marine Green Microalgae *Chlorella* sp. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 2705-2716.
12. Цыганков А.А, Хуснутдинова А.Н. Участие H₂ в метаболизме пурпурных бактерий и перспективы практического использования. *Микробиология*, 84(1), 3-26 (2015)
13. Laurinavichene T., Laurinavichius K., Tsygankov A. Integration of purple non-sulfur bacteria into the starch-hydrolizing consortium. *Int. J. Hydrogen Energy*, (2014) 39, 7713-7720.
14. Kosourov S., Leino H., Murukesan G., Lynch F., Sivonen K., Tsygankov A., Aro E.-M., Allahverdieva Y. Hydrogen photoproduction by immobilized N₂-fixing cyanobacteria: understanding the role of the uptake hydrogenase in the long-term process. *Applied and Environmental Microbiology* (2014) 80, 5807-5817.
15. Antal T., Matorin D., Kukarskikh G., Lambreva M., Tyystjarvi E., Tatyana E. Krendeleva T., Tsygankov A., Rubin A. Pathways of hydrogen photoproduction by immobilized *Chlamydomonas reinhardtii* cells deprived of sulfur. *Int. J. Hydrogen Energy* 39, 18194 (2014)
16. Mikhail A. Grin, Roman Reshetnikov, Raisa I. Yakubovskaya, Anatoliy A. Tsigankov, Andrey F. Mironov Novel bactriochlorophyll-based photosensitizers and their photodynamic activity. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 18, 129 (2014)
17. Абдуллатыпов А.В., Зорин Н.А., Цыганков А.А. Взаимодействие гидрогеназы

HydSL пурпурной серной бактерии *Thiocapsa roseopersicina* BBS с метилвиологеном и положительно заряженными полипептидами. Биохимия, 2014, 79, 805-811.

18. Laurinavichene T., Laurinavichius K., Belokopytov B., Laurinavichyute D., Tsygankov A. Influence of sulfate-reducing bacteria, sulfide and molybdate on hydrogen photoproduction by purple nonsulfur bacteria. *Int. J. Hydrogen Energy*, (2013) 38, 5545 -5554.

19. Minkevich I.G., Fursova P.V., Tjorlova L.D., Tsygankov A.A., Riznichenko G.Yu. The stoichiometry and energetics of oxygenic phototrophic growth. *Photosynth Res*, (2013) 116, 55–78.

20. Сердюк О.П., Смолыгина Л.Д., Чекунова Е.М., Санникова Е.П., Ширшикова Г.Н., Хуснутдинова А.Н., Ярцева Н.В. Прямой перенос плазмиды pGA482:ipt с геном биосинтеза цитокининов в клетки фототрофных пурпурных бактерий *Rhodobacter sphaeroides* и *Rhodopseudomonas palustris* // Доклады Академии Наук, 2013, том 451, № 2, с. 232-235

21. Khusnutdinova A.N., Ovchenkova E.P., Khristova A.P., Laurinavichene T.V., Shastik E.S., Liu Jianguo, Tsygankov A.A. New tolerant strains of purple nonsulfur bacteria for hydrogen production in a two-stage integrated system. *International Journal of Hydrogen Energy* (2012) 37 8820-8827.

22. Текучева Д.Н., Цыганков А.А. Сопряженные биологические системы получения водорода (обзор). Прикладная биохимия и микробиология (2012) 48, 357-375

23. Tekucheva D.N., Laurinavichene T.V., Seibert M., Tsygankov A.A. Immobilized purple bacteria for light-driven H₂ production from starch and potato fermentation effluents. *Biotechnology Progress* (2011) 27(5), 1248-1256.

24. E.S. Shastik, D.V. Vokhmyanina, N.A. Zorin, O.G. Voronin, A.A. Karyakin, A.A. Tsygankov. Demonstration of hydrogenase electrode operation in a bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology* (2011) 49, 453-458.

25. Петушкова Е.П., Цыганков А.А. Основные факторы, влияющие на изоцитратлиазную активность *Rhodobacter capsulatus* B10 в фототрофных условиях. Микробиология (2011) 80, 606-611.

26. Laurinavichene T.V., Belokopytov B.F., Laurinavichius K.S., Tekucheva D.N., Ghirardi M.L., Seibert M., Tsygankov A.A. Towards the integration of dark- and photo-fermentative waste treatment. 3. Potato as substrate for sequential dark fermentation and light-driven H₂ production. *International Journal of Hydrogen Energy* (2010) 35, 8536-8543.

27. Ельцова З.А., Васильева Л.Г., Цыганков А.А. Выделение водорода рекомбинантными штаммами *Rhodobacter sphaeroides* с модифицированным фотосинтетическим аппаратом. Прикладная биохимия и микробиология (2010) 46, 532-537.

28. Гоготов И.Н., Задворный О.А., Зорин Н.А., Серебрякова Л.Т. Бактериальные гидрогеназы. В кн.: Труды Института микробиологии имени С.Н.Вернадского, вып.15: Фотосинтезирующие микроорганизмы (отв. Редактор В.Ф. Гальченко). – М.: МАКС Пресс, 2010, с. 260-289.

- 29.** Serebryakova L.T., Zorin N.A., Karyakin A.A. Improvement of hydrogenase enzyme activity by water-miscible organic solvents. //Enzyme and Microbial Technology, 2009. 44, 329-333.