

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Ekologická a evoluční biologie



Elena Osipenko

Fotosynteticky produkováný vodík
Photosynthetically produced hydrogen

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Yvonne Němcová, PhD.

Praha, 2023

Prohlášení: Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 09.12.2023

Podpis:

Poděkování

Děkuji především své školitelce doc. RNDr. Yvonne Němcové, PhD. za vedení práce, velikou trpělivost a spoustu cenných rad, oprav a připomínek, které mi při psaní práce poskytla.

Abstrakt

Biovodík produkovaný pomocí řas a sinic přitahuje komerční pozornost díky svému potenciálu alternativního, spolehlivého a obnovitelného zdroje energie. Fotosyntetická výroba vodíku z řas a sinic může být zajímavou a slibnou možností čisté energie, protože vodík se vyrábí při normální teplotě a tlaku a jako vedlejší produkt se uvolňuje pouze voda. Energie slunečního světla se využívá ke štěpení molekuly vody na protony (H^+), elektrony (e^-) a O_2 . Protony a elektrony se pak rekombinují pomocí enzymů hydrogenázy nebo nitrogenázy (v případě sinic) za vzniku H_2 . Oba tyto enzymy jsou citlivé na kyslík, a proto vyžadují oddělení procesů tvorby H_2 a fixace CO_2 . Cílem této bakalářské práce je popsat princip tvorby vodíku v různých systémech sinic a řas a zmínit hlavní problémy a omezení. Práce také představuje nejnovější přístupy, včetně genetického a metabolického inženýrství sinic a řas nebo společné kultivace řas a bakterií, kde se anaerobní prostředí vytváří zvýšenou bakteriální respirací.

Klíčová slova: hydrogenáza, nitrogenáza, řasy, sinice, sluneční energie, vodík

Abstract

Bio-hydrogen from microalgae and cyanobacteria has attracted commercial awareness due to its potential as an alternative, reliable, and renewable energy source. Photosynthetic hydrogen production from algae and cyanobacteria can be an interesting and promising option for clean energy, because hydrogen is produced at ambient temperature and pressure and releases only water as a by-product. The energy of sunlight is used to split the water molecule into protons (H^+), electrons (e^-) and O_2 . The protons and electrons are then recombined with the help of the hydrogenase or nitrogenase (in the case of cyanobacteria) enzymes to form H_2 . Both enzymes are sensitive to O_2 and therefore require the processes of H_2 formation and CO_2 fixation to be separated. This bachelor's thesis aims to describe the principle of H_2 formation in different cyanobacterial and algal systems and mention the problems and limitations. The thesis also presents recent approaches, including genetic and metabolic engineering of cyanobacteria and algae or co-culturing of algae and bacteria, where an anaerobic environment is created by enhanced bacterial respiration.

Keywords: hydrogenase, nitrogenase, algae, cyanobacteria, solar energy, hydrogen

Obsah

1. Úvod	1
2. Historie, ověření principu	2
3. Přímá a nepřímá fotosyntetická produkce vodíku řasami a sinicemi	3
3.1. Přímá fotoprodukce H ₂	3
3.2. Nepřímá fotoprodukce H ₂	4
4. Jak lze měřit vyprodukovaný H ₂	5
5. Enzymy produkující vodík	6
5.1. Hydrogenázy	6
5.1.1. [FeFe] hydrogenázy	7
5.1.2. [NiFe] hydrogenázy	7
5.2. Nitrogenázy	8
6. Vybrané modelové fototrofní organismy produkující vodík	9
6.1. Prokaryota	9
6.2. Eukaryota	15
7. Snaha o zvýšení produkce H ₂	18
7.1. Sinice	18
7.1.1. Genetické inženýrství	18
7.1.2. Zvýšení produkce redukčních ekvivalentů	20
7.1.3. Optimalizace fotosyntetického aparátu sinic	21
7.2. Zelené řasy	22
7.2.1. S-microdosing	22
7.2.2. Light switching	22
7.2.3. Médium deficientní na hořčík	23
7.2.4. Společná kultivace řas a bakterií	23
7.2.5. Imobilizace řas	24
7.2.6. Genetické inženýrství	26
8. Pokusy o kultivace ve větších objemech	27
9. Závěr	28
10. Zdroje	30

1. Úvod

Podle odhadů vědců vzroste lidská populace do roku 2050 až na 9 miliard. S tím souvisí předpokládaný nárůst množství odpadu, spotřeby energie a potravin. Podle prognóz může tato okolnost zvýšit emise minimálně o 50 %, což velice ohrožuje klimatickou bezpečnost (Oey et al., 2016).

Produkce elektřiny z obnovitelných zdrojů je dávno aktivně zaváděná, naopak nové technologie pro výrobu pohonných hmot silně zaostávají. Tuto stagnaci způsobují problémy se snižováním nákladů na výrobu paliv na úroveň 100 USD za barel ropného ekvivalentu, aby biopaliva mohla konkurovat fosilním palivům. První vlna vyšších investic do výzkumu začala v 80. letech 20. století, kdy perspektiva vyčerpání fosilních paliv začala ovlivňovat náladu ve společnosti. Avšak vyšší náklady na pěstování řas a relativně nízká cena ropy způsobily v roce 1995 zastavení této vlny investic. Četné nově vypracované technologie se staly základem druhé vlny v okamžiku, kdy na počátku 21. století rychle vzrostla cena ropy. Znakem této druhé vlny se stala kultivace řas za stresových podmínek. Přesto se s klesající cenou ropy zájem o alternativní paliva postupně snižoval. Za posledním snížením zájmu o kultivace a výzkum alternativních paliv obecně stálo zahájení těžby břidlicového plynu v USA v roce 2015 (Wang et al., 2021).

V současnosti lze vzhledem k politické situaci očekávat další nárůst zájmu o obnovitelné zdroje energie včetně vodíku. Infrastruktura založená na obnovitelných technologiích by mohla přispět k ekonomické nezávislosti zemí, které nemají zásoby fosilních paliv.

Nutnost co nejrychlejší změny směrem k dekarbonizaci navíc vyžaduje nasazení nákladově efektivní a obnovitelné technologie. Vodík je nejpokročilejším a atraktivním CO₂-free palivem, které se dá vyprodukovat různými způsoby. Jednou z možností je využití vodíku z fotosyntetické produkce sinic nebo řas. Bioreaktory mohou být integrované do ochlazovacích systémů atomových elektráren nebo čistíren odpadních vod jako vedlejší výrobní jednotka. Zatím stále není možné používat řasy a sinice jako producenty biovodíku ve velkém měřítku. Produkce vodíku sinicemi a řasami má potenciál být uhlíkově neutrální a méně náročná na energii, neboť proces probíhá při teplotě a tlaku okolního prostředí. Fotosyntetická produkce H₂ je zatím příliš drahá a není schopná konkurovat konvenčním metodám produkce H₂, které jsou založené na zpracování fosilních paliv (Khanna et al., 2016). Stále probíhají výzkumy vedené snahou zvýšit efektivitu této technologie.

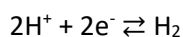
Cílem této práce je rešerše článků zabývajících se fotosyntetickou produkcí plynného vodíku různými druhy sinic a řas. Práce popisuje princip vzniku H₂ v jednotlivých systémech sinic a řas a také problémy a limitace této produkce. Závěrečné kapitoly práce prezentují příklady

nejnovějších postupů, zahrnujících genetické inženýrství řas a společnou kultivaci řas a bakterií, kdy je anaerobní prostředí vytvořeno zvýšenou respirací bakterií.

2. Historie, ověření principu

První zmínka o fotosyntetickém vodíku ve vědecké praxi pochází z roku 1896. Bylo popsáno, že sinice rodu *Anabaena* po umístění do skleněné nádoby produkuje vodík (Jackson & Ellms, 1896 cit. podle Benemann, 1997). Stephenson & Stickland (1930) potvrdili existenci bakteriálního enzymu, který aktivuje molekulární vodík, a nazvali ho hydrogenáza. V roce 1939 Gaffron poprvé popsal metabolismus vodíku u jednobuněčných zelených řas. Stanovil, že *Desmodesmus communis* (dříve *Scenedesmus quadricauda*) využívá vodík za tmy jako donor elektronů, ale za světla ho naopak produkuje. Tímto objevil obousměrnou hydrogenázu typickou pro zelené řasy (Gaffron et al., 1939). Benemann & Weare (1974) představili koncept produkce H₂ u *Anabaena cylindrica* a poprvé se zmínili o fotosynteticky produkovaném vodíku jako o možném palivu z obnovitelných zdrojů. Kultura *Anabaena*, která byla vystavená kyslíkovému deficitu (atmosféra se skládala z argonu smíchaného s kyslíkem v poměru 82 : 18) produkovala vodík. Produkce vodíku byla silně inhibovaná přítomností N₂. Produkce vodíku je zde popsána jako vedlejší reakce související s redukcí vzdušného N₂ na amoniak pomocí nitrogenázy.

Samotnou biochemickou reakci lze popsat jednoduchou rovnicí:



Tato rovnice je jednoduchá jen zdánlivě, protože protony a elektrony prezentované v této rovnici nejsou „volné“, ale pochází z různých zdrojů v závislosti na mikroorganismu a jím použité metabolické dráze. (Khanna et al., 2016)

Hydrogenázy hrají klíčovou roli v metabolismu vodíku. Všechny hydrogenázy jsou metaloenzymy, což znamená, že představují protein s komplexem obsahujícím metalový iont. Pro hydrogenázy je typický železosirný komplex, který pomáhá uskutečňovat transport elektronu a také funguje jako katalyzátor této reakce. Nesmíme opomíjet nitrogenázu, která je také složena z komplexu metaloenzymu, přičemž jeden obsahuje železo, druhý molybdenově železitý kofaktor. Reakce, kterou provádí nitrogenáza, vyžaduje energii ve formě ATP a vodík zde vystupuje jako vedlejší produkt. (Holm et al., 1996)

Různé organismy mají různé způsoby ochrany enzymů citlivých na kyslík. Hlavním principem je prostorové oddělení citlivého enzymu od fotosystému II produkujícího O₂. U sinic *Anabaena*

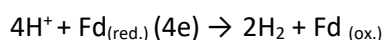
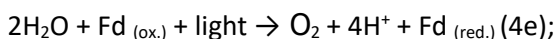
a *Nostoc* probíhá kyslík produkující fotosyntéza ve vegetativních buňkách, zatímco na kyslík citlivá fixace N₂ a produkce H₂ je soustředěna v heterocytech, kde chybí fotosystém II (Wei et al., 1994). Některé sinice, například *Microcoleus chthonoplastes* a *Lyngbya* sp. mají tendenci se shlukovat s dalšími kmeny mikroorganismů, a společně tak tvořit nárosty nepropustné pro kyslík, kde produkují podmínky nutné pro fixaci dusíku (Omoregie et al., 2004).

3. Přímá a nepřímá fotosyntetická produkce vodíku řasami a sinicemi

Produkce vodíku v řasách je těsně spojená s fotolýzou vody a fotosyntézou. Hydrogenázy jsou napojeny na elektrontransportní řetězec přes ferredoxin. Redukovaný ferredoxin slouží jako donor elektronů pro hydrogenázu. Hydrogenáza může být redukována elektrony ferredoxinu dvěma různými drahami, a to buď přímo (přímá fotosyntetická produkce H₂), nebo nepřímo (nepřímá fotosyntetická produkce H₂). Za anaerobních podmínek je redukována hydrogenáza schopná redukovat protony (H⁺) na vodík (viz Obrázek 1).

3.1. Přímá fotoprodukce H₂

Lze ji popsat těmito rovnicemi (Chen et al., 2022):



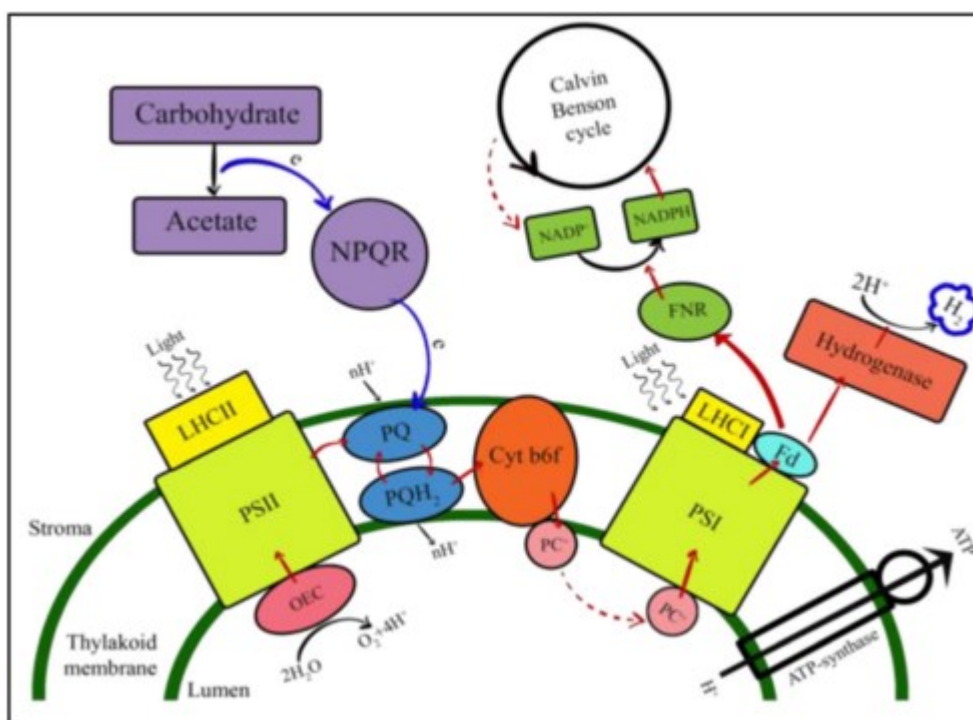
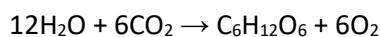
Přímá fotoprodukce je typická pro zelené řasy (Khanna et al., 2016). Protony vzniklé fotolýzou vody putují do stromatu, kde tvoří gradient, který je pak využit k tvorbě ATP z ADP. Elektrony vytvořené fotolýzou vody pokračují do fotosyntetického elektrontransportního řetězce, nejdříve z PSII přes plastochinon (PQ), cytochrom b₆f, PSI na ferredoxin a následně redukují NADP⁺ na NADPH (pomocí enzymu ferredoxin-NADP⁺ oxido-reduktáza). NADPH a ATP je využito v Benson-Calvinově cyklu k fixaci CO₂ na cukry a škrob (Melis & Happe, 2001). Za normálních aerobních podmínek fotosyntéza produkuje karbohydráty. Avšak za anaerobních podmínek je mitochondriální oxidativní fosforylace z velké části inhibována, což vede k nadměrné produkci redukčních ekvivalentů v chloroplastech, zpomalení elektrontransportního řetězce, a v konečném důsledku až k fotopoškození a snížení produkce ATP. Za těchto podmínek mohou být H⁺ a e⁻ extrahované z vody převáděny na hydrogenázu, která rekombinuje H⁺ a e⁻ za vzniku H₂, který je odstraněn z buňky (Oey et al., 2016). Tento proces funguje jako pojistka pro odstranění nadbytečných elektronů z elektrontransportního řetězce, které mohou poškodit buňku (Tolleter et al., 2011).

Přímá fotoprodukce představuje ideální způsob tvorby H₂ z vody a světla. Nicméně proces skýtá některé limitace – hydrogenáza je inhibovaná kyslíkem a o redukční ekvivalenty kompetují různé metabolické dráhy. (Khanna et al., 2016)

3.2. Nepřímá fotoprodukce H₂

Tento proces probíhá jak v řasách, tak v sinicích (Oey et al., 2016). Hlavní rozdíl spočívá v tom, že sluneční energie je nejdřív přeměněná na karbohydráty (Benson-Calvinův cyklus). Redukční ekvivalenty jsou pak získány degradací těchto zásobních látek. Vstupují do elektrontransportního řetězce v místě plastochinonu. Elektrony jsou zase postupně přeneseny až na ferredoxin, který redukuje hydrogenázu stejně jako během přímého procesu (Khosravitar, 2020). Hlavní výhodou je prostorové nebo časové oddělení fixace CO₂ a produkce H₂.

Proces lze popsat následující rovnicí (Chen et al., 2022):



Obrázek 1: Schematické zobrazení přímé a nepřímé fotosyntetické produkce H₂. Fotoprodukce H₂ je buď přímo, nebo nepřímo spojena s fotosyntézou elektronovým transportním řetězcem, v němž je redukce ferredoxinu indukována elektrony získanými ze štěpení vody nebo rozkladem sacharidu. Přímá cesta je znázorněna pomocí červených šipek, začátek nepřímé cesty je zobrazen modrými šipkami. (Khosravitar, 2020)

4. Jak lze měřit vyprodukovaný H₂

Ve studii, kde byla experimentálně prokázána existence enzymu hydrogenázy, bylo množství produkovaného vodíku stanoveno kolorimetricky. Produkovaný vodík redukoval methylenovou modř. Na základě rozpustnosti H₂, koncentrace methylenové modři a délky redukční reakce byl stanoven tlak produkovaného vodíku v mmHg. (Stephenson & Stickland, 1930)

Přímé měření rozpuštěného H₂ v médiu lze provést pomocí komerčně dostupných elektrod typu Clark (Melnicki et al., 2012; Appel et al., 2020). Elektrody typu Clark měří parciální tlak plynu v kapalině pomocí katalytického povrchu vyrobeného nejčastěji z platiny. Platinová elektroda je pokryta polopropustnou teflonovou membránou, která omezuje pokovování platiny. Membrána je propustná pro molekulární vodík a umožňuje, aby se tento plyn dostal ke katodě, kde se elektrolyticky redukuje. Původně je elektroda určena pro měření kyslíku, ale elektrodu lze upravit tak, aby detekovala vodík (Kanwisher, 1959; Godaux et al., 2015).

Další technikou, která dovoluje měřit produkovaný vodík *in situ*, je hmotnostní spektrometrie s membránovým vstupem (membrane-inlet mass spectrometry; MIMS). Nádoba určená pro vzorek je spojena trubicí s vakuovou komorou hmotnostního spektrometru. Mezi vzorkem a vakuovou komorou spektrometru se nachází membrána z polyethylenu nebo teflonu, která umožňuje plynům difundovat do komory spektrofotometru. Po ionizaci jsou nabitě molekuly urychleny elektrickým polem, vychýleny magnetickým polem a zachyceny detektorem. (Burlacot et al., 2020; Tamburic et al., 2011).

Další používanou metodou detekce je spektroskopie nukleární magnetické rezonance (nuclear magnetic resonance spectroscopy; NMR spectroscopy), která dovoluje určit složení, množství a prostorovou strukturu molekul. Může být využívána během sestavení modelu syntetických enzymů, včetně Fe-hydrogenáz (Xu et al., 2016). NMR spektroskopie je fyzikální metoda, která využívá interakci atomových jader s magnetickým polem. Na základě absorpce radiofrekvenčního záření vzorkem umístěným v silném magnetickém poli poskytuje informace o struktuře zkoumané látky (Schuff, 2010).

Další metoda, která se využívá pro měření množství plynu v kulturách, je plynová chromatografie (Nagy et al., 2018). Plynová chromatografie je obecně určena k separaci a stanovení plynů, kapalin i pevných látek. Metoda je založena na rozdělování složek mezi dvě fáze: mobilní a stacionární. Mobilní fázi je většinou inertní plyn, nazývaný nosný plyn. Stacionární fáze je umístěna v chromatografické koloně. Stacionární fáze u náplňových kolon je většinou pevná látka (aktivní uhlí, silikagel nebo oxid hlinitý). Kolonou se stacionární fází stále prochází nosný plyn. Vzorek se nastříkne do injektoru, kde se odpaří a ve formě páry je unášen

nosným plynem do kolony. Složky ze vzorku se sorbují na začátku kolony ve stacionární fázi a pak resorbují čerstvým přicházejícím nosným plynem. Nosný plyn unáší složky vzorku postupně ke konci kolony a dělicí proces se neustále opakuje. Detektor indikuje okamžitou koncentraci separovaných látek v nosném plynu. Signál detektoru je vhodně upraven a plynule se registruje (James & Martin, 1951; Hunt & Smith, 1961).

5. Enzymy produkující vodík

Hlavními enzymy zapojenými do metabolismu vodíku jsou hydrogenázy a nitrogenázy. Jsou to metaloenzymy nebo holoenzymy obsahující metalický iont jako kofaktor (Hoppert, 2011). Enzymy spojené s produkcí vodíku byly zjištěny skoro u všech organismů, kde zastávají velmi různorodé fyziologické funkce (Vignais & Billoud, 2007). Nicméně o produkci vodíku pomocí těchto enzymů lze mluvit jen u sinic, zelených řas a některých bakterií nebo archeí (Chen et al., 2022). Mezi bakterie schopné produkovat vodík náleží například fotosyntetické bakterie *Rhodobacter sphaeroides*, *R. capsulatus*, *R. sulidophilus*, *Thiocapsa roseopersicina* (Khetkorn et al., 2017).

Jak už bylo řečeno výše, hlavní funkcí této skupiny enzymů je ochrana proti stresu způsobenému redukovánými ekvivalenty v anaerobních podmínkách. Z tohoto důvodu jsou tyto enzymy naprogramované k degradaci po vazbě s kyslíkem (Vignais & Billoud, 2007).

5.1. Hydrogenázy

V současnosti jsou známy tři hlavní třídy podle přítomnosti kovů v aktivním centru: [FeFe] hydrogenázy, [NiFe] hydrogenázy a [Fe] hydrogenázy. [Fe] hydrogenázy byly potvrzeny jen u některých metanogenních archeí a neobsahují v aktivním místě železosírné klastry (Vogt et al., 2007). Zbylé dvě skupiny železosírné klastry obsahují.

Vazba kyslíku na aktivní místo (ve formě kyslíkového můstku, hydroxidu, nebo peroxidu) deaktivuje enzymy. Redukcí pomocí H_2 se tento ligand odstraní a nahradí se hydridem, čímž vzniknou aktivní enzymy (Burgdorf et al., 2005).

Podle směru, kterým probíhá reakce ($2 H^+ + 2 e^- \rightleftharpoons H_2$), můžeme hydrogenázy rozdělit na:

- 1) **hydrogenázy pohlcující H_2 (H_2 -uptake):** za přítomnosti akceptoru elektronu vodík spotřebovává, dovoluje buňce využívat H_2 jako zdroj energie;
- 2) **hydrogenázy uvolňující H_2 (H_2 -evolving):** uvolňují nadbytečné redukční ekvivalenty jako molekulární H_2 ;

3) **hydrogenázy obousměrné (bidirectional)**: katalyzují reakci oběma směry, udržují v buňce redoxní rovnováhu.

Pro produkci biovodíku jsou významné [FeFe] hydrogenázy a [NiFe] hydrogenázy (Vignais & Billoud, 2007).

5.1.1. [FeFe] hydrogenázy

[FeFe] hydrogenázy typické pro bakterie a eukaryota jsou nevratně inhibovány kyslíkem. [FeFe] hydrogenáza je obousměrná a může katalyzovat buď produkci H₂, nebo protonu (H⁺) uvolněného z vodíku. Představují monomer a mají molekulovou hmotnost kolem 45–50 kDa. [FeFe] hydrogenázy zelených řas se vyznačují přítomností H-klastru v katalytických centrech a klastrem [4Fe4S] koordinovanými třemi cysteinovými zbytky (Ghirardi et al., 2009). Unikátní aktivní centrum (H-klastr) má asi 100× vyšší aktivitu než hydrogenázy jiných typů (Vogt et al., 2007).

Zajímavé je, že [FeFe] hydrogenáza v zelených řasách se nachází v chloroplastech, organelách endosymbiotického původu. Není pochyb o tom, že chloroplasty pocházejí od sinic, jejich předků, ale u sinic nebyly nalezeny žádné náznaky [FeFe] hydrogenáz. Hydrogenázy zelených řas vznikly nejspíše prostřednictvím jiné symbiózy. [FeFe] hydrogenázy zelených řas jsou kódovány v jádře a po maturaci lokalizovány v chloroplastu, pravděpodobně jde o adaptaci na jejich interakci s elektrontransportním řetězcem. (Meyer et al., 2007)

5.1.2. [NiFe] hydrogenázy

Tato skupina je typická pro prokaryotní organismy a je nejčastěji se vyskytující skupinou hydrogenáz v přírodě. [NiFe] hydrogenázy jsou výrazně tolerantnější ke kyslíku než [FeFe] hydrogenázy. Inhibice [NiFe] hydrogenáz je reverzibilní. [NiFe] hydrogenázy se odlišují od ostatních tříd přítomností niklu v katalytickém centru (English et al., 2009).

U sinic jsou nejvýznamnější tyto:

1) [NiFe] pohlcující (uptake) Hup-hydrogenáza

Vyskytuje se výhradně u sinic fixujících vzdušný dusík. Přesná lokalizace enzymu není známá, nachází se buď na cytoplazmatické straně tylakoidní, nebo plazmatické membrány heterocytu. Aktivita enzymu je zesílena v podmínkách chudých na dusík a těsně spojená s funkcí nitrogenázy. Skládá se ze dvou podjednotek: velké podjednotky HupL (60 kDa) a malé podjednotky HupS (30 kDa). Ve velké podjednotce se nachází NiFe centrum. Malá podjednotka obsahuje železosírné klastry, zprostředkující transport elektronu z aktivního místa na akceptor. Hlavní

funkcí Hup-hydrogenázy je dodávání elektronů nitrogenáze a poskytování ATP buňce. Při tvorbě ATP je vodík vyprodukovaný během aktivity nitrogenázy oxidován (spotřebován) v heterocytech. Tato reakce tak představuje další ochranu nitrogenázy před O₂ (Tamagnini et al., 2002; Vignais & Billoud, 2007).

2) [NiFe] obousměrná (bidirectional) Hox-hydrogenáza

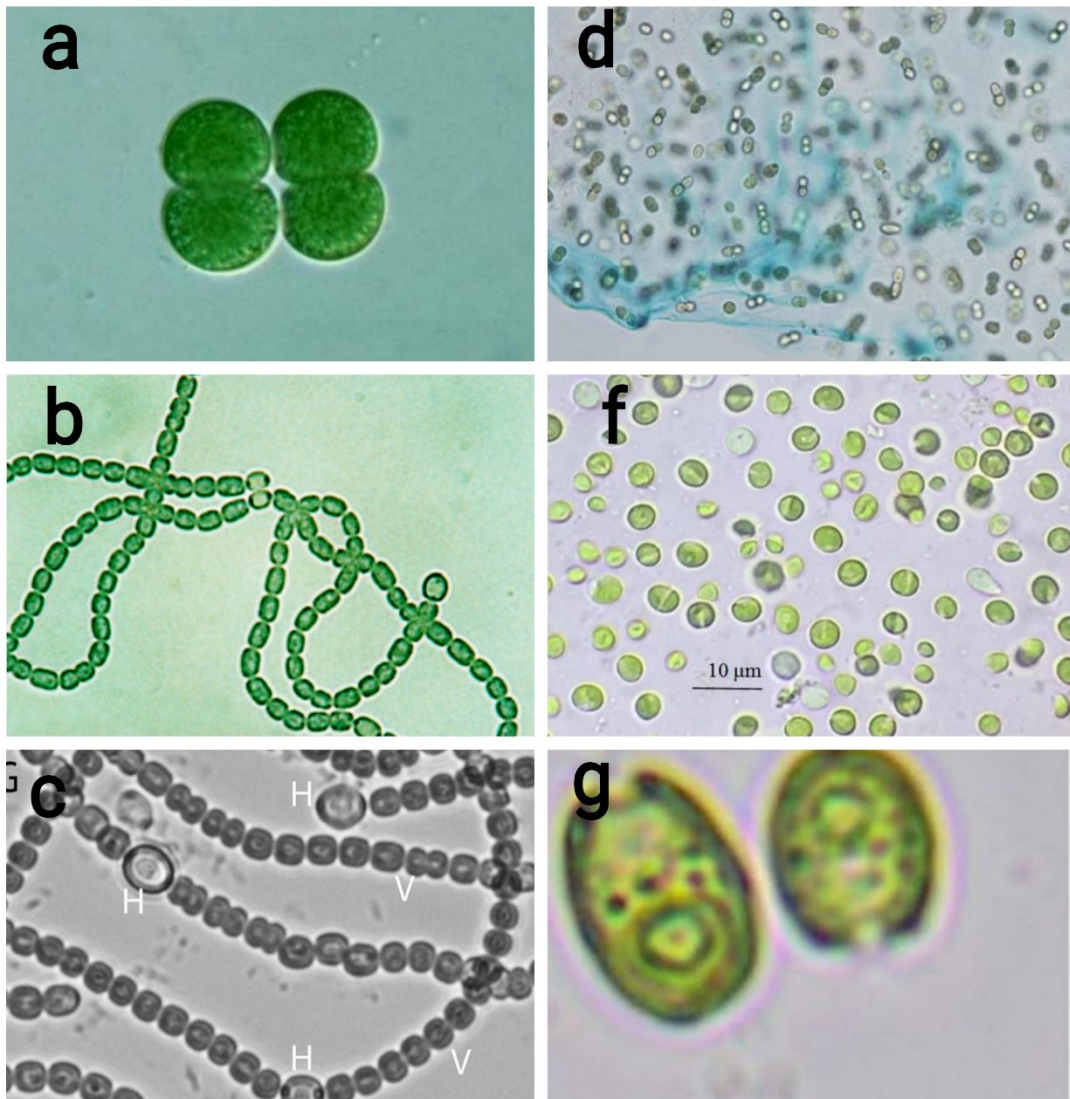
Můžeme ji najít téměř ve všech sinicích (kromě mořských kmenů žijících v povrchových vrstvách oceánu). Tento enzym má vysokou afinitu k vodíku a je snadno degradován v přítomnosti kyslíku. Také bylo zjištěno, že tento typ je nezávislý na množství dusíku v prostředí a není spojen s aktivitou nitrogenázy. Enzym se skládá z 5 komplexů (HoxE, HoxF, HoxU, HoxY, HoxH). HoxH obsahuje aktivní místo, které katalyzuje redukci protonu nebo oxidaci H₂ (Tamagnini et al., 2002; Vignais & Billoud, 2007).

5.2. Nitrogenázy

Mnohé sinice jsou schopny fixovat atmosférický N₂ na amoniak (NH₃) a produkovat vodík jako vedlejší produkt pomocí nitrogenázy. Nitrogenáza je metaloproteinový enzymový komplex, skládající se ze dvou částí: dinitrogenázy (MoFe protein) a dinitrogenázy-reduktázy (Fe protein). Dinitrogenáza je heterotetramer (220–240 kDa). Funkce dinitrogenázy je redukce vazeb N₂ vedoucí k tvorbě amoniaku. Dinitrogenáza-reduktáza je homodimer (60–70 kDa). Hraje důležitou roli při přenosu elektronů z vnějšího donoru elektronů na dinitrogenázu.

Zajímavé je, že nitrogenázy mohou v aktivním centru obsahovat molybden (Mo), vanad (V) nebo železo (Fe). V závislosti na typu obsahuje nitrogenáza různé množství elektronů pro fixaci N₂ a produkci H₂. V-nitrogenáza je exprimována pouze tehdy, když je V přítomen za podmínky s nedostatkem Mo, a proto byla považována za alternativní nebo „záložní“ systém, který byl nalezen u *Anabaena variabilis* (Rehder, 2000). Fe-nitrogenáza byla nalezená jen u některých bakterií (Zhao et al., 2006). Alternativní nitrogenázy, ačkoli je o nich u sinic stále málo dostupných poznatků, mohou být lepšími producenty H₂ ve srovnání s běžnými nitrogenázami obsahujícími v reakčním centru molybden (Tamagnini et al., 2007). V případě nepřítomnosti substrátu N₂ může nitrogenáza katalyzovat výhradně tvorbu vodíku. Produkce vodíku nitrogenázou však vyžaduje značné množství elektronů, redukčních ekvivalentů a minimálně 16 molekul ATP, které pocházejí z fotosyntézy nebo z rozkladu sacharidů v buňce (Khetkorn et al., 2017).

6. Vybrané modelové fototrofní organismy produkující vodík



Obrázek 2: Zobrazení vybraných modelových organismů: (a) *Synechocystis* sp. (Heng et al., 2016), (b) *Anabaena* PCC 7120 (Pernil et al., 2015), (c) *Nostoc* sp.; H – heterocyty, V – veg. buňky (Guljamow et al., 2017), (d) *Cyanosphaera* sp. (Ohki et al., 2013), (f) *Chlorella vulgaris* (Ramraj et al., 2016), (g) *Chlamydomonas reinhardtii* (Pradhan et al., 2022).

6.1. Prokaryota

Sinice jsou jedna z největších a nejdůležitějších bakteriálních skupin na Zemi, které jsou schopné fotosyntézy s využitím vody jako donoru elektronů. Vyskytují se téměř ve všech ekosystémech. Primitivní sinice před 2,4 miliardami let převedly ranní redukční atmosféru na oxidační, a tím zajistily další rozvoj života v aerobních podmínkách. Jsou široce používány jako modelové organismy při studiu základních principů fotosyntézy, stresových reakcí a evolučních procesů. Také jsou slibnými adepty pro využití v biotechnologiích, především pro svou schopnost

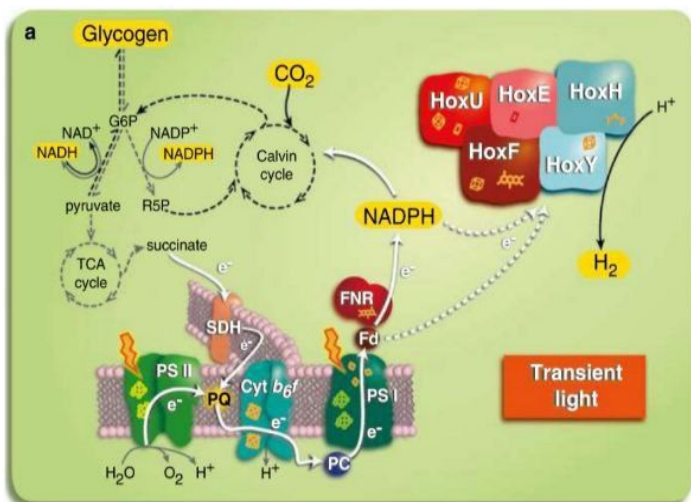
vytvářet biomasu v krátkém časovém horizontu a produkovat širokou škálu cenných sloučenin. Navíc jejich pěstování není příliš náročné. Proto patří mezi velmi slibné organismy pro fotoprodukcí vodíku. (Zavřel et al., 2017; Pisciotta et al., 2010)

***Synechocystis* sp. (PCC 6803)**

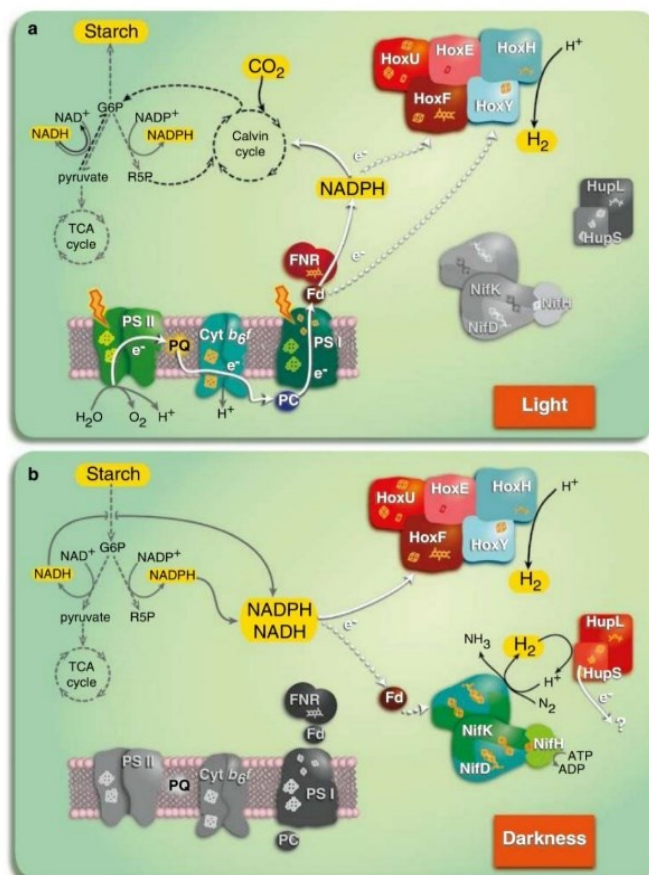
Na základě polyfázického přístupu je tento kmen zařazen do *Bacteria*, kmen *Cyanobacteriota*, třída *Cyanophyceae*, řád *Synechococcales*, čeleď *Merismopediaceae*, rod *Synechocystis* (Komárek et al., 2014). Je uložen v Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria (PCC) a také v American Type Culture Collection (ATCC 27184). Sinicový rod *Synechocystis* byl popsán s typovým druhem *S. aquatilis* v roce 1892 Sauvageau. Kmen PCC 6803 byl izolován v roce 1968 ze sladkovodního prostředí (Kalifornie, USA) a byl prvním kmenem sinic, jehož celkový genom byl sekvenován (Kaneko et al., 1995; Korelusova et al., 2009).

Buňky se vyskytují soliterně nebo krátce po dělení v párech, nemají sliz nebo pouze bezbarvou nevýraznou slizovou vrstvu kolem buněk, difúzní na okrajích. Buňky jsou kulovité, před dělením mohou být oválné, modrozelené nebo olivově zelené barvy. Buňky mají v průměru 0,7–15 (30) μm . Obsah buněk je spíše homogenní: má rozlišitelnou centroplazmu a chromatoplazmu, tylakoidy jsou umístěné parietálně. Buněčné dělení probíhá binárním dělením. Buňky dorostou do původní velikosti a tvaru před dalším dělením. Ve vodě se pohybují pomocí plyných vezikulů. Většina z nich je součástí fytoplanktonu a metafytonu, některé se ale vyskytují v termálních pramenech, minerálních a slaných prostředích. Mohou být i symbionti obrněnek. (Zavřel et al., 2017; Korelusová et al., 2009; Komárek, 2003)

Zástupci rodu *Synechocystis* nefixují dusík, proto jim chybí nitrogenáza a také uptake-hydrogenáza, která funguje ve spojení s nitrogenázou (Cournac et al., 2004). Enzymem, který je zodpovědný za produkci vodíku u *Synechocystis*, je obousměrná [NiFe] Hox-hydrogenáza, která se nachází na tylakoidní membráně. Směr procesu katalyzovaného hydrogenázou je určen redoxním potenciálem a koncentrací substrátu. Pokud je přítomen akceptor elektronů, hydrogenáza spotřebuje vodík pro tvorbu radikálů. Ovšem v případě, že je přítomen donor elektronů, dochází k produkci vodíku. Hlavní funkcí hydrogenázy je předcházet zpomalování elektronového řetězce a fungovat jako ventil pro odstranění excitovaných elektronů, které mohou narušit funkci elektrontransportního řetězce. (Appel et al., 2000)



Obrázek 3: Schéma produkce vodíku v *Synechocystis*. (a) Přímá biofotolýza. Elektrony z fotolýzy ve fotosystému II (PSII) jsou přenášeny do fotosyntetického elektrontransportního řetězce prostřednictvím řady transportních molekul: plastochinonu (PQ), cytochromu b6f (Cyt b6f) a plastocyaninu (PC). Poté putují na fotosystém I (PSI), aby redukovaly ferredoxin (Fd). Ferredoxin pak redukuje NADP+ na NADPH pomocí enzymu ferredoxin NADP(H) reduktáza (FNR). NADPH pak mohou postupovat rovnou na Hox-hydrogenázu, nebo do Calvinova cyklu (Khanna et al., 2016).



Obrázek 4: Schéma produkce vodíku v *Cyanobacteria*. (a) Během dne dochází k fotosyntéze, fixaci CO₂ v Calvinově cyklu a ukládání škrobu. Během dne produkce vodíku probíhá pomocí Hox-hydrogenázy. (b) Ve tmě dochází k fixaci dusíku s využitím škrobu jako zdroje. Vodík je produkován nitrogenázou jako vedlejší produkt. Vodík produkovaný nitrogenázou je zpětně zachycen pomocí Hup-hydrogenázy. (Khanna et al., 2016)

Synechocystis sp. je schopen přímé a nepřímé fotoprodukci vodíku. Přímá fotoprodukce probíhá za světla, na začátku fotosyntézy, nedochází zde k časové nebo prostorové separaci produkce H₂ a O₂ (viz Obrázek 3). Redukční ekvivalenty, vyrobené pomocí fotolýzy vody ve fotosystému II putují elektrontransportním řetězcem, pak po procházení různými přenašeči redukuje ferredoxin. Ferredoxin redukuje NADP⁺ na NADPH pomocí enzymu ferredoxin-NADP(H)-oxireduktázy (FNR) (Khanna et al., 2016). Dále dochází ke kompetici o redukční ekvivalenty s Calvinovým cyklem, kdy se část elektronů dostane na Hox-hydrogenázu. Ferredoxin je též schopen předávat elektrony rovnou na Hox-hydrogenázu. Hox-hydrogenáza je citlivá na kyslík. Nasvědčuje tomu jev, během kterého produkce vodíku po začátku fotosyntézy rychle stoupne a vzápětí odezní. Vysvětluje se to opožděnou aktivitou fotosystému II a uvolněním kyslíku z fotolýzy vody, který následně inaktivuje hydrogenázu. Hydrogenáza může být poměrně rychle reaktivovaná přidáním NADH nebo NADPH. (Cournac et al., 2004)

Synechocystis sp. také provádí nepřímou fotoprodukcí. V tomto případě redukční ekvivalenty, které odputovaly do Calvinova cyklu, redukuje CO₂ na karbohydráty (glykogen). Anaerobně ve tmě je glykogen rozkládán při glykolýze nebo pentózofosfátovém cyklu. Cílem je produkce NADH/NADPH. Obě cesty přenáší elektrony na ferredoxin, ten pak na Hox-hydrogenázu. V první fázi dochází k fixování a ukládání uhlíku, který může být později využit při druhé anaerobní fázi (produkci H₂). Dochází zde k časoprostorovému oddělení fotosyntézy a produkce H₂. Hlavním omezením je citlivost hydrogenázy na kyslík a konkurence NADPH s Calvinovým cyklem a fixací uhlíku pro potřeby samotného organismu. (Dickson et al., 2011)

***Anabaena* PCC 7120**

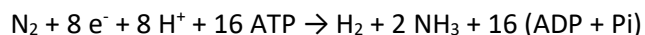
Podle polyfázického přístupu ji řadíme do *Bacteria*, kmen *Cyanobacteriota*, třída *Cyanophyceae*, řad *Nostocales*; čeleď *Nostocaceae*. Původní název je *Nostoc* PCC 7120. (Komárek et al., 2014) Byla poprvé zaznamenána jako *Nostoc muscorum* a uložena v Pasteurově sbírce kultur (PCC). Genom *Anabaena* PCC 7120 byl plně sekvenován v roce 2001 (Kaneko, 2001).

Vegetativní buňky mají různý tvar, jsou nejčastěji oválné, sférické či cylindrické o velikosti 2–5 μm. Jednotlivé buňky se dělí v jednom směru a tvoří filamenty. Ty jsou obaleny slizem polysacharidového charakteru, který chrání buňky před vysušením a obsahuje látky absorbující UV záření. Stejně tak napomáhá adhezi buněk k pevnému povrchu a přispívá k tvorbě biofilmů.

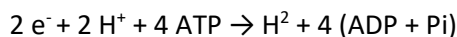
Jako reakci na stres tvoří hormogonia, které obsahují aerotopy (plynové vezikuly), a tím se šíří (Armstrong et al., 1982). Mohou diferenciovat kulaté heterocyty o velikosti 5–7 μm, v nichž probíhá fixace dusíku (Rossi & Philippis, 2015; Allison et al., 1937). Je dobře prostudovaným modelovým organismem a používá se pro výzkum tvorby heterocytů. Hlavním účelem heterocytů je nastolení anaerobních podmínek nutných pro správnou funkci nitrogenázy. Geny pro [FeMo]nitrogenázu u *Anabaena* PCC 7120 se vyskytují jak ve vegetativních buňkách, tak i v heterocytech. Ovšem expirace genu spojených s maturací nitrogenáz je závislá na tom, jestli jsou podmínky aerobní, nebo anaerobní. (Wang et al., 2018)

Anabaena sp. má celkem tři enzymy, které jsou spojené s produkcí vodíku. Prvním je obousměrná Hox-hydrogenáza aktivní jak ve vegetativních buňkách, tak v heterocytech. Vegetativní buňky mohou vyrábět vodík nepřímou fotoprodukcí pomocí Hox-hydrogenázy stejně jako *Synechocystis* sp. pomocí enzymu Ferredoxin-NADP(H)-oxireduktázy (FNR) (viz *Synechocystis* sp.). Druhým enzymem účastnícím se produkce vodíku je nitrogenáza. Na rozdíl od reakce hydrogenázy, která je reverzibilní, nitrogenáza katalyzuje jednosměrnou

produkci H₂, ovšem se značnou spotřebou energie ve formě ATP. Za optimálních podmínek vypadá reakce fixace dusíku takto:



V podmínkách absence N₂ všechny elektrony redukují protony následovně:



(Masukawa et al., 2010).

Spotřeba ATP nitrogenázou dělá energetickou účinnost produkce vodíku poměrně nízkou, navíc produkovaný vodík je účinně přijímán zpátky do organismu pomocí třetího enzymu: uptake-hydrogenázy, tj. je oxidován na vodu. Hlavní úlohou uptake-hydrogenázy je recyklovat vodík vytvořený nitrogenázou a vracet redukční ekvivalenty zpátky do biochemických procesů v buňce. (Khanna et al., 2016)

***Nostoc punctiforme* (PCC 73102)**

Na základě polyfázického přístupu je zařazen do *Bacteria*, kmen *Cyanobacteriota*, třída *Cyanophyceae*, řád *Nostocales*; čeleď *Nostocaceae* (Komárek et al., 2014).

Nostoc punctiforme PCC 73102 byl izolován ze symbiotické asociace s cykasem rodu *Macrozamia* v Australii v roce 1973. Poté byl uložen do Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria (PCC). Tvoří hormogonie s plynovými vezikuly, zralé filameny s hormogonií mohou mít spirálně stočený tvar. Také je schopen produkovat akinety. Je rozšířený v terestrických ekosystémech, kde se vyskytuje v půdě a v symbiózách. Může růst pod přímým světlem v krustách bez slizu. Je dobře přizpůsoben terestrickým podmínkám. Fakultativně může heterotrofně růst na glukóze, sacharóze nebo fruktóze. Zvládá vysoké UV záření pomocí syntézy sloučenin pohlcujících světlo. *N. punctiforme* syntetizuje dvě třídy sloučenin absorbujících UV světlo: scytonemin a aminokyseliny podobné mikrosporinu. (Rippka et al., 1979; Meeks et al., 2001; Campbell et al., 2007)

Nostocales jsou obecné známé kvůli jejich schopnosti tvořit symbiózy, v nichž vystupují jako poskytovatel dusíku. *Nostoc punctiforme* PCC 73102 je modelovým organismem pro studium symbiotického vztahu mezi rostlinou a cyanobakterií. (Alvarez et al., 2020)

Sekvenační analýzy ukázaly, že *Nostoc punctiforme* PCC 73102 má jednu nitrogenázu spojenou s uptake-hydrogenázou. Obousměrná Hox-hydrogenáza chybí (Meeks et al., 2001). Pro tvorbu vodíku u *N. punctiforme* je klíčový komplex enzymů nitrogenáza, který se nachází v heterocyty. Redukční ekvivalenty nutné pro průběh reakce pocházejí z degradace

nashromážděných cukrů importovaných z vegetativní buňky. Elektronky jsou přenášeny pomocí NADPH a pro heterocyt specifického ferredoxinu, který redukuje nitrogenázu. Vodík produkovaný nitrogenázou je ihned zachycen uptake-hydrogenázou a vrací se do metabolismu buňky (Lindberg, 2003). Tímto činnost uptake-hydrogenázy zmenšuje produkci vodíku. Lindberg et al. (2002) zvýšili produkci H₂ tak, že pomocí inzerce deaktivovali gen *hupL*, který kóduje velkou podjednotku uptake-hydrogenázy. Je zřejmé, že *Nostoc punctiforme* bez modifikací a dalšího výzkumu není perspektivním producentem vodíku (Lindberg et al., 2002).

***Cyanothece* ATCC 51142**

Na základě polyfázického přístupu řadíme tuto sinici do *Bacteria*, kmen *Cyanobacteriota*, třída *Cyanophyceae*, řad *Oscillatoriales*, čeleď *Cyanothecaceae* (Komárek et al., 2014). Buňky obalené slizem mají kulovitý až oválný tvar o průměru do 4–5 μm, během životního cyklu se buňky postupně prodlužují a dosahují až 8 μm těsně před dělením. *Cyanothece* ATCC 51142 byl izolován z přílivových písků na pobřeží Texaského zálivu a uložen v American Type Culture Collection (ATCC) (Reddy et al., 1992). Žije ve slaných vodách v bentosu. Mořské ekosystémy jsou obecně limitované dusíkem, proto je *Cyanothece* ATCC 51142 vybaven speciálními adaptacemi. Tyto organismy dokáží upravit svůj buněčný aparát v závislosti na dostupnosti dusíku, což zahrnuje schopnost syntetizovat zásobní látky během dne do inkluzivních tělísek, aby je mohly využívat během noci (Welsh et al., 2008). Například fixovaný dusík se ukládá během noci v granulích cyanofycinu složených z aminokyselin aspartátu a argininu. Uhlík, který byl fixován v Benson-Calvinově cyklu během fotosyntézy, je uložen ve velkých granulích glykogenu, které se tvoří mezi tylakoidy. Tyto granule mohou zabírat velkou část buněčného objemu na konci světelné periody. Granule se ve tmě rychle rozkládají a používají se jako substrát pro dýchání za účelem výroby energie a na odstranění intracelulárního kyslíku respirací. Takové střídavé zásobování je pro *Cyanothece* ATCC 51142 nezbytné, protože fixace uhlíku a dusíku nemohou probíhat současně. *Cyanothece* ATCC 51142 neformuje heterocyty, proto odděluje anaerobní fixaci dusíku a aerobní fotosyntézu v čase. Fixace N₂ je přísně řízená cirkadiálním cyklem, zatímco geny pro fotosyntézu a dýchání nejsou stejně přísně regulované. (Toepel et al., 2008)

Podle sekvenční analýzy organismus obsahuje bidirectional-hydrogenázu, uptake-hydrogenázu a [MoFe] nitrogenázu (Min & Sherman, 2010). Samozřejmě je produkce vodíku také těsně spjatá s cirkadiálním cyklem (viz Obrázek 4). Operon, kódující nitrogenázu (*nifHDK*) je transkribován během prvních několika hodin temné fáze, během noci je aktivní a poté úplně proteolyticky degradován na začátku světelné fáze cyklu. Fotosyntéza se také

podstatně mění v průběhu dne a maxima dosahuje v poledne. Respirace chrání nitrogenázu před kyslíkem a dosahuje maxima ve stejnou dobu jako fixace dusíku, poté postupně klesá (Toepel et al., 2008). Vodík produkovaný nitrogenázou je částečně spotřebován uptake-hydrogenázou. Přesto je *Cyanotheca* ATCC 51142 schopen extrémně vysoké úrovně čisté produkce vodíku pomocí nitrogenázy i v přítomnosti uptake-hydrogenázy (Min & Sherman, 2010). Během světelné části cyklu dochází k aerobním procesům, produkce vodíku je zejména prováděna bidirectional-hydrogenázou (Khanna et al., 2016). Některé studie naznačují, že *Cyanotheca* ATCC 51142 má velice flexibilní metabolismus, který dovoluje v podmínkách nepřetržitého světla dokonce kombinovat fotosyntézu a fixaci dusíku, i když s různou intenzitou (Melnicky et al., 2012).

Z výše řečeného rovněž vyplývá že *Cyanotheca* ATCC 51142 je velice slibným kandidátem pro velkoplošnou produkci biovodíku. Důkazem může být i to, že obsahuje všechny geny související s fermentací, které také mohou být zapojené do produkce vodíku (Welsh et al., 2008). Dalším důvodem je schopnost *Cyanotheca* ATCC 51142 dlouhodobě žít heterotrofně bez zdroje světla a jako zdroj uhlíku používat glycerol (Khanna et al., 2016).

6.2. Eukaryota

Mikrořasy jsou mikroskopické eukaryotické fotosyntetizující jednobuněčné nebo koloniální organismy, které se vyskytují v široké škále podmínek. Mohou být sladkovodní nebo mořské, také byly nalezené v pouštích, pod sněhem a v prostředí s vysokou aciditou. Jsou to důležití producenti biomasy a mají zásadní význam pro globální koloběh uhlíku. V průběhu evoluce docházelo k četným endosymbiózám a dalším změnám, následkem kterých jsou buňky eukaryotických řas větší a komplexnější než buňky sinic. (Russell et al., 2022)

Z hlediska produkce vodíku jsou nejatraktivnější zelené řasy (oddělení Chlorophyta). *Chlorella vulgaris* a *Chlamydomonas reinhardtii* jsou dobře prozkoumanými organismy. Produkce vodíku u obou organismů je velice podobná a je založená na funkci [FeFe] obousměrné-hydrogenázy (Chader et al., 2009).

Chlorella vulgaris

Chlorella vulgaris patří mezi Chlorophyta, do třídy Trebouxiophyceae, řádu Chlorellales, čeledi Chlorellaceae a rodu *Chlorella* (Heeg & Wolf, 2015). *Chlorella vulgaris* byla izolovaná z mělkého rybníku v blízkosti Delftu (Nizozemsko) a byla popsána v roce 1890 (Beijerinck, 1890 cit. podle Safi et al., 2014).

Chlorella vulgaris má kulovité nebo elipsoidní buňky bez bičíku, které mohou být obklopené slizem. Mohou žít soliterně nebo tvořit kolonie, které se skládají z dceřiných buněk. Pyrenoid je většinou obklopen škrobovými zrny. Chloroplast je jednoduchý, obalený dvojitou membránou. Uvnitř chloroplastu se nacházejí tylakoidy obsahující zelený pigment chlorofyl. Rozmnožování probíhá pomocí autospory, zoospory chybějí. Zralé autospory se uvolňují narušením mateřské buněčné stěny. Řasy rodu *Chlorella* se vyskytují téměř ve všech zeměpisných oblastech. Rod zahrnuje druhy v sladkovodních jezerech, půdě, mořských, brakických a suchozemských biotopech. Některé druhy jsou také symbionty lišejníků, protistů a bezobratlých (Aigner et al, 2020; Safi et al., 2014).

Chlamydomonas reinhardtii

Patří do oddělení *Chlorophyta*, třídy *Chlorophyceae*, řádu *Chlamydomonadales*, čeledi *Chlamydomonadaceae*, rodu *Chlamydomonas* (Pröschold et al., 2001). Původně popsána jako *Chlamydomonas pulvisculus* (1830). Kmen *Ch. reinhardtii*, který se dnes převážně používá k experimentům je laboratorní kmen divokého typu, který byl izolován v Amherstu (Massachusetts, USA) v roce 1945. Celý genom byl sekvenován v roce 2000. Je uložena v Chlamydomonas Resource Center (CRC) a také na University of Texas, USA a v Culture Collection of Algae na Univerzitě v Göttingenu, Německo. Kromě biotechnologií se široce používá ve výzkumu fotosyntézy, chloroplastů, řízení buněčného cyklu, také při studiu struktury a funkcí řasinek. (Salome & Merchant, 2019)

Chlamydomonas reinhardtii má buňky vejčitého tvaru o velikosti 5–10 nm. Buňka je obklopena buněčnou stěnou složenou z glykoproteinů a sacharidů, uspořádaných do sedmi vrstev (Goodenough a Heuser, 1985). Axonémy bičíků mají uspořádání 9+2, skládají se z devíti párů mikrotubulů obklopujících centrální pár. V blízkosti bičíkových bází jsou kontraktilní vakuoly vypuzující vodu, které slouží pro udržení stálého osmotického tlaku (Luykx et al., 1997; Xu et al., 2016). Chloroplast miskovitého tvaru je obklopen dvojitou membránou a zaujímá více než polovinu buňky (Sager & Palade, 1957). Chloroplast obsahuje pyrenoid, obklopený škrobovými zrny. Má světločivné oko, které se skládá ze shluku chloroplastu s karotenoidy (Eitzinger et al., 2015). Pokud jsou podmínky příznivé, množí se asexuálně mitotickým dělením. V podmínkách deficitu živin produkuje morfologicky neodlišené gamety (izogamety), které splývají a tvoří zygotu a následně zygosporu. Zástupci rodu *Chlamydomonas* se vyskytují na různých stanovištích s různými parametry vlhkosti, teploty a salinity. Druhy byly nalezeny na vlhkém povrchu půdy a v sladkovodních i mořských habitatech. Některé druhy jsou poměrně odolné vůči znečištění a lze je nalézt také v odpadních vodách. (Salome & Merchant, 2019)

Produkce vodíku u *Chlamydomonas reinhardtii* a *Chlorella vulgaris*

Jak *Chlorella*, tak *Chlamydomonas* obsahují velice účinnou [FeFe] hydrogenázu, kódovanou genem *HydA*. Tato hydrogenáza je kódovaná v jádře, pak syntetizovaná v cytosolu a následně importovaná do stromatu chloroplastů. Kyslík produkovaný během fotolýzy vody je inhibítoem tohoto enzymu a zároveň pozitivním supresorem exprese genu hydrogenázy (*HydA*). V přirozených podmínkách dochází k expresi genu *HydA* za anaerobních podmínek, kdy nedochází k fixaci uhlíku. Pro řasu je produkce H₂ jedinou alternativou, jak vygenerovat potřebné množství ATP. (Zhang et al., 2002; Melis, 2007; Hemschemeier, 2007) U zelených řas je produkce vodíku možná přímou a nepřímou cestou, podobně jako u sinic. Během přímé fotoprodukce dochází po dopadu světla na PSII k fotolýze vody a elektron putuje postupně elektrontransportním řetězcem, jak již bylo popsáno u sinic (viz *Synechococcus*). Ve výsledku elektron redukuje ferredoxin a následně [FeFe] obousměrnou-hydrogenázu. Během nepřímé fotoprodukce se sluneční energie stejně jako u sinic nejprve přeměňuje na chemickou energii ve formě zásobních látek, které se pak používají jako zdroj energie a redukčních ekvivalentů k produkci vodíku (viz *Synechococcus*). Nepřímá cesta představuje alternativní přístup pro rozdělení fotosyntetické oxidace H₂O a produkce H₂. V tomto případě jsou aerobní a anaerobní procesy od sebe časově odděleny. (Melis et al., 2000)

Hydrogenáza *Chlamydomonas reinhardtii* je extrémně citlivá na kyslík: stačí 0,2 % parciálního tlaku O₂ k vyvolání 50% inhibice fotoprodukce (Zhang et al., 2002). Proto nelze produkovat vodík přímou cestou bez uměle vytvořených anaerobních podmínek. Touto otázkou se zabývala klasická práce Melis et al. (2000), kde byla kultura *Chlamydomonas* pěstovaná ve dvou fázích. Během první fáze v aerobních podmínkách dochází k hromadění zásobních látek. V druhé fázi je kultura přenesena do média bez síry. Síra je součástí aminokyselin cysteinu a methioninu, které jsou nezbytné pro tvorbu proteinů. Ty jsou nutné pro bezchybný chod fotosyntézy. Absence síry pak způsobuje inhibice biosyntézy *de novo* proteinu D1/32 kD, který se nachází v PSII. Tímto je opravný cyklus PSII zablokovaný a jsou nastoleny anaerobní podmínky (Wykoff et al., 1998). Produkce vodíku v podmínkách chudých na síru nemůže být udržovaná trvale, protože dochází k velké spotřebě endogenního substrátu. Výsledky studii ukázaly, že škrob nemůže být substrátem pro druhou fázi. Jako substrát zde vystupují bílkoviny. V podmínkách chudých na síru je použití bílkovin zaměřeno nejen na tvorbu organického substrátu pro udržení procesů produkce H₂ a tvorby ATP, ale také na uvolnění síry pro biosyntézu *de novo* bílkovin nezbytných pro přežití buněk (Melis et al., 2000).

[FeFe] hydrogenáza *Chlorella vulgaris* je podobně jako hydrogenáza *Chlamydomonas reinhardtii* velice citlivá na kyslík. V některých případech však může *Ch. vulgaris* tuto citlivost obejít: Hwang et al. (2014) zjistili, že hydrogenáza *Ch. vulgaris* získala toleranci ke kyslíku po vystavení vysokému parciálnímu tlaku kyslíku po dobu 8 dní, pokud využívá CO₂ jako zdroj uhlíku při kontinuálním osvětlení. Některé kmeny byly schopné produkovat vodík ve směsi CO₂ a O₂ (nejvyšší množství je 1,9 ml vodíku na litr biomasy v atmosféře 5% O₂ a 10% CO₂). Aerobní podmínky snížily aktivitu hydrogenázy o 72,5 %, ale následný přenos do anaerobních podmínek reaktivoval hydrogenázu a obnovil 73 % původní aktivity. Hydrogenáza byla reaktivována i po 48hodinové expozici v atmosféře 25% O₂. Ačkoli bylo množství produkovaného H₂ nesrovnatelně nižší než obvykle (nejvyšší hodnoty produkce vodíku za aerobních podmínek dosahovaly 0,17 % a 0,23 %, zatímco za anaerobních podmínek při 10% CO₂ bylo dosaženo 24,6 % a 18,2 %), tyto hodnoty naznačují, že *Chlorella* je slibným kmenem pro další výzkum. Obecně mají kmeny *Chlorella* menší velikost antén v reakčních fotosyntetických centrech, což může přispívat k rovnoměrné absorpci světla kulturou a poskytovat výhodu při kultivaci ve fotobioreaktorech. Další výhodou je vysoká rychlost respirací, která přispívá k eliminaci kyslíku (Toulopaskis et al., 2021). U několika kmenů rodu *Chlorella*, izolovaných z půdy v alžírské poušti, nebyla produkce vodíku ovlivněna vysokým parciálním tlakem O₂. Výsledky ukázaly, že navzdory vysokému množství kyslíku v médiu (11,5 % a 15,4 %) byla produkce vodíku zachována na rozdíl od referenčního kmene *C. reinhardtii*, ve kterém byla fotoprodukce H₂ inhibována o 50 % v koncentraci kyslíku 0,2 %. Podle předpokladů vědců je tolerance hydrogenázy vůči kyslíku následkem adaptace organismu na život v pouštní suché půdě. Proto představují objekt zájmu pro další výzkum (Chader et al., 2009).

7. Snaha o zvýšení produkce H₂

7.1 Sinice

Sinice představují zajímavou skupinu organismů pro tvorbu fotosyntetického vodíku. Prokaryotní buňky lze snadněji geneticky modifikovat. Hlavním omezením tohoto procesu je citlivost enzymů produkujících vodík na přítomnost O₂. Většina studií se zaměřila hlavně na způsoby, jak eliminovat kyslík ze systému, ale existují i jiná zajímavá řešení (Khanna et al., 2016).

7.1.1 Genetické inženýrství

Hlavní funkcí pohlcující (uptake)-hydrogenázy je vychytávání redukčních ekvivalentů a jejich vrácení do oběhu, čímž se výrazně snižuje produkce vodíku. Zajímavým směrem výzkumu je tedy pokus o její deaktivaci pomocí genetického inženýrství. Tuto strategii využila studie Lindberg et al. (2002), kde byl gen *hupL*, kódující velkou podjednotku uptake-hydrogenázy u kmene *Nostoc* sp. ATCC 29133 inaktivován pomocí inzertní mutagenese. Pokud je kmen *Nostoc* PCC 73102

pěstován v přítomnosti dusíku, nitrogenáza bude produkovat vodík, který bude rychle spotřebováván uptake-hydrogenázou. Pokud jsou však buňky inkubovány v argonové atmosféře za nepřítomnosti dusíku, v kultuře se uvolňuje vodík. Mutantní kmen *hupL Nostoc* ATCC 29133 byl vytvořen nahrazením genu *hupL* inaktivovanou kopií pomocí homologní rekombinace. Bylo zjištěno, že mutantní kmen vyvíjel molekulární vodík a rychlost produkce vodíku během inkubace se zvýšila v porovnání s divokým kmenem. Divoký kmen *Nostoc* ATCC 29133 za stejných podmínek nevyvíjel žádný vodík, dokonce místo toho vykazoval aktivitu příjmu vodíku, když mu byla zpřístupněna voda nasycená vodíkem. (Lindberg et al., 2002)

Další zajímavou modifikaci nabízí práce Masukawa et al. (2010). Ve snaze zvýšit produkci H₂ u kmene *Anabaena* PCC 7120 bylo modifikováno šest aminokyselin, o nichž se předpokládá, že se nacházejí ve vzdálenosti 5 Å od [FeMo] clusteru nitrogenázy. Cílem byla modifikace enzymu tak, aby upřednostňoval produkci vodíku. Modifikace aminokyselin v blízkosti [FeMo] tvoří u kmene *Anabaena* PCC 7120 varianty [FeMo] proteinů, které přesměrovávají tok elektronů přednostně k redukci protonů, aby se syntetizovalo více H₂ v přítomnosti N₂ v aerobním prostředí.

Modifikovaný enzym nemůže redukovat N₂ účinně, ale molekula dusíku se může vázat na aktivní místo nitrogenázy. Záměna několika genů *NifD2 Anabaena variabilis* vedla k výraznému snížení N₂ a zároveň umožnila produkci H₂ v přítomnosti dusíku ve stejném množství jako u buněk divokého typu v atmosféře argonu. Míry produkce H₂ u několika mutantních kmenů (Q193K, H197T a R284) se v atmosféře vzduchu přiblížily nebo dokonce překročily svou produkci v atmosféře Ar (63–82 %, 72–98 %, 99–120 %). Po týdnu vykazovaly mutantní kmeny 87 % produkce původního kmene v neutrální atmosféře argonu. Tento výsledek zdůrazňuje potenciál použití tohoto mutantu k dalšímu výzkumu. (Masukawa et al., 2010)

Další zajímavou strategií je exprese cizích hydrogenáz v sinici. Ducat et al. (2011) ve své studii přenesli gen pro [FeFe] hydrogenázu *HydA* z bakterie *Clostridium acetobutylicum* do sinice *Synechococcus elongatus* sp. 7942, která neváže dusík a má méně účinnou [NiFe] hydrogenázu. Bylo prokázáno, že heterologně exprimovaná hydrogenáza je funkční *in vitro* i *in vivo*. Za anoxických podmínek je aktivita *HydA* schopna podporovat tvorbu vodíku za světla při teplotě 1,5 °C rychlostí 500× vyšší, než je rychlost podporovaná endogenní [NiFe] hydrogenázou. Zatímco [NiFe] hydrogenázy se vyskytují v celé řadě organismů, [FeFe] hydrogenázy se vyskytují hlavně u řas a několika bakterií, ale nevyskytují se u všech dosud zkoumaných sinic. Ačkoli obě hydrogenázy katalyzují stejnou reakci, jsou strukturně nepříbuzné a fylogeneticky odlišné. Kromě toho že se liší strukturou železosírného klastru, interagují také s různými nosiči elektronů pro redoxní reakci. Zatímco [NiFe]-hydrogenázy jsou typicky spojené s NAD(P)H, mnoho [FeFe] hydrogenáz je spojeno s bílkovinou ferredoxinem, která může nést elektrony s výrazně

nižším redukčním potenciálem. Reakce [FeFe] hydrogenázy je termodynamicky výhodnější z hlediska produkce vodíku v porovnání s [NiFe] hydrogenázou, která je často považována za enzym určený pro příjem H_2 (Ghirardi et al., 2007). Je pravděpodobné, že exprimovaná [FeFe] hydrogenáza interaguje s endogenními ferredoxiny rostlinného typu *S. elongatus petF*, které mohou jen slabě interagovat s heterologní hydrogenázou. Bylo demonstrováno, že dodání cizího ferredoxinu, který je preferován [FeFe] hydrogenázou, ale méně integrován s endogenními redoxními cestami *Synechocystis*, může „zkratovat“ redoxní okruh závislý na heterologní [FeFe] hydrogenáze (Ducat et al., 2011).

Další strategií je snaha udělat enzymy tolerantnější vůči kyslíku. Je známo, že [NiFe] hydrogenázy, které byly inaktivovány při dlouhodobém působení O_2 , mohou být reaktivovány, zatímco [FeFe] hydrogenázy jsou obvykle nevratně poškozené. Tento rozdíl je dán sítí enzymových kanálů mezi povrchem proteinu a aktivním místem. Enzymové kanály jsou protáhlé dutiny v enzymu, které usnadňují přístup substrátu, nebo dovolují vést meziprodukty z jednoho aktivního místa na druhé u multifunkčních enzymů (Leroux et al., 2008). V blízkosti [NiFe] klastru se nacházejí dva hydrofobní kanály, které obsahují zbytky dvou aminokyselin, nejčastěji valin a leucin. Na jejich místo byly substitucí přeneseny 2 metioniny. Volba methioninu byla inspirována jeho rolí při odpovědi na oxidativní stres a afinitou atomu síry ke kyslíku, což má obecně za následek silnou reaktivitu s reaktivními formami kyslíku (ROS). Také se uvažovalo o schopnosti metioninu vytvářet slabé S-O interakce, které dovolují následně snadno uvolnit navázaný kyslík z aktivního místa. Methioniny nemodifikují katalytický mechanismus, ale spíše ovlivňují reaktivitu enzymu s O_2 na kinetické úrovni. Mutované enzymy zvládly udržet aktivitu v přítomnosti koncentrace O_2 blízké té, která se vyskytuje v aerobních roztocích v rovnovážném stavu se vzduchem, zatímco enzym divokého typu byl inhibován během několika sekund. (Dementin et al., 2009)

7.1.2. Zvýšení produkce redukčních ekvivalentů

Další zajímavou cestou zlepšení produkce vodíku jsou změny v glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáze (GAPDH-1), kódované genem *gap1*, jejichž hlavní regulační místo leží ve spojení cest OPP a glykolýzy. V práci Kumaraswamy et al. (2013) byl použit *Synechococcus* sp. kmen PCC 7002, což je jednobuněčná, rychle rostoucí, dusík nefixující sinice, která produkuje vodík pomocí obousměrné [NiFe] hydrogenázy za temných anoxických podmínek. Pro tvorbu vodíku katabolizuje intracelulární sacharidy prostřednictvím glykolýzy, aby se vytvořil ATP. Glykolýzou se vytvoří 2 molekuly ATP a 2 molekuly NADH na 1 glukózu. Pentozofosfátový cyklus (OPP), který sdílí prekurzor glukóza-6-fosfát s glykolýzou, produkuje větší počet redukovaných pyridinových nukleotidů na jednu molekulu glukózy: 6 NADPH a 1 NADH. Nicméně, OPP se moc nepoužívá

buňkou v temných anoxických podmínkách. Pomocí genetického inženýrství byly vytvořeny 2 kmeny: jeden s delecí genu *gap1(gap1::aphII)* za účelem eliminovat GAPDH-1, a tak přesměrovat některé glykolytické sacharidy cestou OPP, a tím zvýšit hladiny NADPH; druhý kmen s nadměrnou expresí GAPDH-1 (*gap1⁺*) za účelem zvýšení glykolytického katabolismu a větší produkce NADH. Oba kmeny prokázaly výrazně zvýšené množství vodíku a NADH ve srovnání s divokým typem. Kmen *gap1⁺* produkoval 4× víc NADH; 2,9× více NADPH a 3× více vodíku než divoký typ. Mutant *gap1::aphII* s 5,7× vyšším NADPH a 0,9× vyšším NADH produkoval 2,3× více vodíku než divoký typ. Mutantní kmen *gap1::aphII* se dá považovat za slibný kmen pro další výzkum. (Kumaraswamy et al. 2013)

7.1.3. Optimalizace fotosyntetického aparátu sinic

Sinice zachycují světelnou energii pomocí světlosběrných antén označovaných jako fykobilizomy (PBS). Fykobilizomy jsou bílkovinné struktury, které se nachází na povrchu tylakoidů sinic a jsou určeny pro účinný příjem světelného kvanta na centrální molekulu chlorofylu *a* ve fotosystému (Singh et al., 2014). Zajímavou cestou zlepšení produkce vodíku je optimalizace světlosběrných antén. Anténa absorbuje v přirozených podmínkách mnohem více fotonů, než dokáže buňka využít pro fotosyntézu. To znamená, že se většina fotonů rozptýlí jako fluorescence nebo teplo, a výtěžek čistého toku elektronů (z fotolýzy vody), tj. lineárního transportu elektronů, který může potenciálně být využit k produkci vodíku, je nízký. Kromě toho, buňky sinic absorbují většinu světla v tenké vrstvě na povrchu kvůli jejich vysoké koncentraci anténních pigmentů, a tím stíní buňky z hlubších vrstev.

Optimalizaci fotosyntetického aparátu se věnuje studie Bernat et al. (2009). V této práci byl prozkoumán vliv světlosběrných antén na biochemické pochody v buňce, hlavně na ty spojené s produkcí vodíku. Byly prozkoumány tři kmeny *Synechocystis* PCC 6803: divoký typ (WT), který má kompletní antény, pak Δ apcE, kterému chyběl protein propojující fykobilizom s fotosystémem v kombinaci s potlačeným přenosem energie, kmen Olive (olivové barvy) kterému ve fykobilizomu chyběl fykocyanin, a také mutantní kmen PAL (žluté barvy), kterému chybí celý fykobilizom. Absence nebo dysfunkce antén zesiluje lineární transport elektronu a má za následek větší množství oxidovaného PQ (v důsledku méně účinného využití světelné energie). V důsledku toho buňka zvyšuje množství PSII a lineární přenos elektronu, následně se zvyšuje i produkce H₂, a to díky zvýšení poměru PSII/PSI.

Výzkum prokázal, že nejvhodnější kandidát pro velkoplošnou produkci vodíku je kmen s nefunkčními anténami nebo s absencí antén (Olive a PAL), pěstovaný ve fotoautotrofních podmínkách v kombinaci s odpojením elektronového transportu a pod infračerveným světlem, které přednostně excituje PSI. Zajímavé je, že paralelní nárůst cyklického a lineárního

elektronového transportu, který byl výrazný u mutanta Olive, ale chyběl u PAL, je spíše závislý na stavbě fykobilizomu. Tento názor může být podpořen skutečností, že jedna z klíčových složek přímého cyklického transportu, ferredoxin NADP-oxidoreduktáza (FNR), se zřejmě váže na tyčinky fykobilizomu prostřednictvím své linkerové domény. Vazba FNR na jádro allophycocyaninu byla také potvrzena. Pozorovaná nízká cyklická aktivita mutanta PAL (kterému chybí celý fykobilizom) by mohla souviset s chybějícím vazebným místem pro FNR na membráně. Souhrnně lze říci, že kombinace vhodných mutantních kmenů a optimalizovaného prostředí výrazně zvyšuje lineární transport elektronů, což je zase předpokladem pro dosažení vysokých výtěžků produkce vodíku na základě fotosyntézy. (Bernat et al., 2009)

7.2. Zelené řasy

7.2.1. S-microdosing

Známa studie Melis et al. (2000) popisuje dvoufázový protokol produkce vodíku u *Chlamydomonas reinhardtii*, kdy jsou nutné anaerobní podmínky vyvolány vystavením kultury médiu bez síry. Síra je nezbytná pro syntézu proteinu reakčního centra D1 v oxidačním komplexu PSII *de novo* a její nedostatek reverzibilně blokuje opravný cyklus PSII. Dochází k postupné ztrátě schopnosti PSII štěpit vodu, a v důsledku respirace k ustanovení anaerobního prostředí. Produkce vodíku při deprivaci sírou není dlouho udržitelná. Současně s produkcí vodíku dochází ke spotřebě vnitřních zdrojů buňky, především karbohydrátů nutných pro mitochondriální respiraci a růst buňky. Kosourov et al. (2005) nabízí použití opakovaných malých dávek síranu (1–10 μM), která umožňuje opravu PSII. Opětovné přidání síry znovu aktivuje činnost PSII tím, že dovoluje buňce zvýšit počet aktivních center PSII prostřednictvím syntézy proteinu D1 *de novo*. V důsledku bylo pozorováno počáteční zvýšení aktivity produkce H_2 , po kterém následovala inhibice. Ta byla pravděpodobně způsobena nahromaděním fotosynteticky uvolněného O_2 uvnitř buňky a inhibicí hydrogenázy. Jakmile byl znovu přidán síran kulturami spotřebován, produkce vodíku se obnovila. Ukázalo se, že dodání síry nejen reaktivuje fotochemickou reakci PSII, ale také zvyšuje její účinnost a aktivitu při uvolňování O_2 a následně zvyšuje rychlost přenosu elektronů elektrontransportním řetězcem. Tento přístup je účinnější než klasický protokol deprivace síry a může poskytnout základ pro kontinuální proces produkce H_2 . (Kosourov et al., 2005)

7.2.2. Light switching

Protokoly zahrnující nedostatek síry umožňují fotoprodukcí vodíku v řasách, zároveň dochází k nižšímu toku elektronů na hydrogenázu, závislé na oxidaci vody, což má za následek celkovou nízkou účinnost procesu. Deprivace sírou také vyžaduje rozsáhlé a časově náročné odstředování,

což ztěžuje použití tohoto protokolu dokonce i v laboratorním měřítku. Kosourov et al. (2018) ukázali, že produkci vodíku lze udržet v rostoucí kultuře *Ch. reinhardtii* po dobu nejméně tří dnů jednoduchou změnou kontinuálního osvětlení na sérii krátkých silných světelných pulzů střídaných buď tmou, nebo trvalým slabým osvětlením. Kultura *Ch. reinhardtii* byla vystavena sérii krátkých světelných pulzů (1–5 s) přerušovaných delšími (3–9 s) tmavými fázemi. Doba trvání každého světelného pulzu byla dostatečně krátká, což vedlo k minimalizaci toku elektronů do Calvinova cyklu, a tím se zabránilo akumulaci kyslíku. Řasové buňky v podstatě fungovaly jako biokatalyzátor přivádějící elektrony generované fotosyntézou přímo na hydrogenázu bez aktivace Calvinova cyklu. Výtěžek u kultur, které byly vystaveny světelným pulzům byl skoro stejný jako u kultur pěstovaných v médiu bez síry. Nicméně, řasy v médiu bez síry potřebují dalších 24–48 hodin pro inaktivaci PSII a během této doby neprodukují vodík. Dalším důležitým aspektem je postupné odumírání buněk v médiu bez síry. Naopak použití světelných pulzů řasy nepoškozuje. (Kosourov et al., 2018)

7.2.3. Médium deficientní na hořčík

Hořčík (Mg) je důležitým prvkem pro fotosyntézu. Mg zaujímá klíčové postavení ve fotosyntetickém aparátu jako centrální součást molekuly chlorofylu. V podmínkách chudých na hořčík klesá počet molekul tvořících světlosběrné antény. Zmenšení antén způsobuje větší zastínění buněk více vzdálených od zdroje světla v bioreaktoru. Volgusheva et al. (2018) uvádí nový protokol založený na deficienci hořčíku. *Chlamydomonas reinhardtii* byl kultivován po dobu 7 dní v médiu deficientním na hořčík. Došlo k výraznému poklesu chlorofylu (o 60 %) a také ke zvýšení poměru chlorofylu *a/b*. Míra respirace byla zvýšena o 11 %, což bylo určeno menší fotosyntetickou aktivitou. Po přenesení do uzavřeného fotobioreaktoru byl během několika hodin veškerý kyslík prodýchán a kultura začala produkovat vodík. Kultura procházela stejnými fyziologickými stádii jako buňky pěstované v S-deficientním médiu: fáze produkce O₂, fáze spotřeby O₂, anaerobní fáze a fáze produkce vodíku. Buňky byly schopny produkovat dvojnásobné množství H₂ a udržet tuto produkci po mnohem delší dobu ve srovnání s buňkami pěstovanými v médiu bez síry, kde došlo k úplnému vypnutí PSII. Fotosystém II přispívá k tvorbě elektronů fotolýzou vody. Tyto elektrony mohou tvořit až 80 % elektronů potřebných pro hydrogenázovou aktivitu. Lze tedy předpokládat, že PSII je nepostradatelný pro tvorbu H₂. (Volgusheva et al., 2018)

7.2.4. Společná kultivace řas a bakterií

Bylo zjištěno, že společně se zelenou řasou *Chlamydomonas* sp. se během kultivace často vyskytují různé druhy bakterií. Bakteriální partneři obecně podporovali růst řas a vedli

k významnému zvýšení biomasy. Bakterie mohou zvýšit produkci vodíku řas svou účinnou respirací, což vede k rychlé anaerobióze. Ve studii Lakatos et al. (2014) byla izolovaná řada přirozených bakteriálních partnerů a bylo zjištěno, že většina z nich patří k rodům *Rhodococcus*, *Brevundimonas* a *Leifsonia*. Byl prozkoumán vliv bakteriálních partnerů na řasové kmeny z hlediska růstu a výnosu biomasy. Kromě přírodních asociací byly zkoumány i uměle vytvořené dvojice. Nejvyšší produkce vodíku byla zjištěna, pokud byla jako symbiont použita mutantní bakterie *Escherichia coli* s nefunkční hydrogenázou. Tyto výsledky naznačují, že eliminace kyslíku představuje klíčový faktor ovlivňující produkci vodíku u řas a efektivní respirace bakterií je nezbytná pro aktivaci řasových hydrogenáz (Lakatos et al., 2014).

V pozdější studii od Lakatos et al. (2017) byly zkoumány faktory ovlivňující produkci vodíku ve společných kulturách řas a bakterií. Různé kmeny řas byly testovány z hlediska produkce vodíku s vybraným bakteriálním partnerem: *Escherichia coli* s nefunkční hydrogenázou.

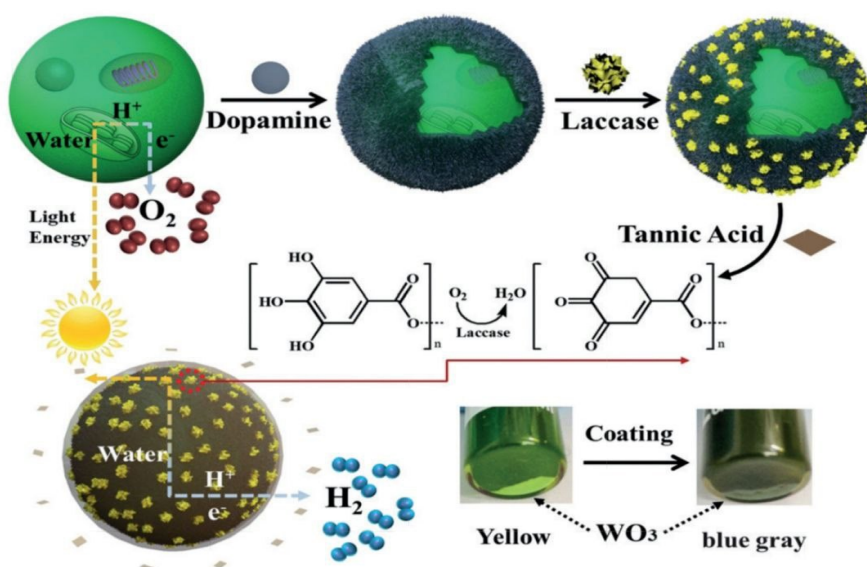
Produktivita vodíku *Chlorella* sp. MACC 360 společně s *E. coli* $\Delta hypF$ byla lepší než všechny ostatní testované kombinace. Akumulovaný výtěžek vodíku byl rovněž silně ovlivněn velikostí buněk řas, přičemž menší velikost buněk korelovala s vyšší rychlostí vzniku vodíku. Výroba vodíku byla omezena dvěma faktory: zvětšením objemu vodíku, následně změnou parciálního tlaku v prostoru kolem kultur, a také opětovnou produkcí kyslíku z řas. Opětovné spuštění produkce kyslíku se povedlo regulovat přidáním kyseliny octové, která zesilovala respiraci v buňkách. Rovněž je u daného protokolu třeba dbát na čistotu smíšených kultur a snažit se omezit kontaminaci. (Lakatos et al., 2017)

7.2.5. Imobilizace řas

Zajímavou strategii nabízí inženýrství buněčného povrchu a konstrukce vrstev podobných buněčným stěnám, které umožňují přidat další extracelulární prostor pro doplňkové funkce, a tím řídit fyziologické procesy buněk živých organismů vyžadovaným směrem. Ve studii Su et al. (2019) byl použit polydopamin, lakáza a kyselina tříslivá jako stavební bloky pro zapouzdření buňky *Auxenochlorella pyrenoidosa* (dříve *Chlorella pyrenoidosa*) před vlivem stresu, a umožnila jí přepnout z normální fotosyntetické produkce O_2 na fotobiologickou produkci H_2 (viz Obrázek 5). Vytvořená vrstva polydopaminu zvyšuje adhezi zapouzdřené buňky k různým substrátům, což umožňuje další modifikaci zapouzdřené buňky (konjugaci lakázy na povrch potažené buňky). Po přidání kyseliny tříslivé (TA) do roztoku se TA rychle usazovala na povrchu potažených buněk a následně došlo k vytvoření sendvičové vrstvy TA-lakáza-PDA. TA je substrátem lakázy s fenolickými hydroxylovými částmi, které jsou oxidovány na chinony za spotřeby O_2 . Ve výsledku vnější vrstva spotřebovává kyslík pocházející z vnitřní vrstvy. To vede k vytvoření

anaerobního prostředí kolem každé potažené buňky. Tento zkonstruovaný systém vykazoval 1,6násobné zvýšení účinnosti produkce H_2 v porovnání s kulturou bez úprav. Studie ukázala, že potažená buňka může kontinuálně produkovat H_2 průměrnou rychlostí $0,32 \mu\text{mol } H_2/h$ po dobu 7 dní, následně docházelo k apoptóze obalených buněk. Významné taky je, že vytvořená vrstva vykazovala menší vliv na aktivitu PSII. (Su et al., 2019)

Práce Xu et al. (2020) popisuje tvorbu umělých kulovitých mikroreaktorů obsahujících řasu *Auxenochlorella pyrenoidosa*. Mikroreaktor vznikl smícháním denaturovaného BSA (Bovine Serum Albumin) s roztokem dextranu a vysokým počtem buněk následným vstříknutím směsi do rychle míchaného polyethylenglykolu (PEG), čímž se vytvořily robustní kulovité útvary složené z těsně na sebe navazujících shluků buněk řas imobilizovaných v hydrogelové matrici dextranu a BSA. Následně byly stlačené do těsných mnohobuněčných sféroidů ponořením do hyperosmotického roztoku. Buňky v hydrogelové matrici postupně vyčerpávají kyslík respirací a vytváří hypoxické prostředí uvnitř koule a aerobní na jejím povrchu. Produkce vodíku byla závislá na velikosti kulovitého mikroreaktoru. Buňky *Auxenochlorella* umístěné na povrchu a blízko povrchových částí koule byly fotosynteticky aktivní. Avšak i za optimálních podmínek byla rychlost produkce vodíku těchto mikroreaktorů přibližně třikrát nižší než rychlost stanovená v atmosféře argonu, což naznačuje, že přibližně dvě třetiny buněk nepřispívaly k produkci vodíku. Přidáním vnější vrstvy obsahující intenzivně respirující bakterie *Escherichia coli*, byla rychleji dosažena hypoxie, navíc bakterie poskytly řasovým buňkám i mechanickou ochranu. Biomasa pocházející z řas byla využita jako substrát pro bakterie. (Xu et al., 2020)

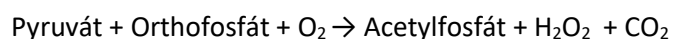


Obrázek 5: Schéma konstrukce modulovaného systému anaerobní vrstvy kolem jednotlivých buněk *Auxenochlorella pyrenoidosa* pomocí dopaminu, lakázy a TA. (Su et al., 2019).

7.2.6. Genetické inženýrství

Metody genetického inženýrství nabízí velké množství různých způsobů, jak zvýšit výtěžek vodíku a udržitelnost procesu. Hlavní problém opět představuje inaktivace hydrogenáz kyslíkem. Elman et al. (2020) exprimovali mutantní hydrogenázu (Cp1) původem z bakterie *Clostridium pasteurianum*, která prokázala velkou míru odolnosti vůči kyslíku do chloroplastového genomu *Ch. reinhardtii*. Mutovaná varianta enzymu Cp1^{T356V/S357T} je nejméně 200× odolnější vůči O₂ než původní Cp1, navíc mutovaná varianta vynikala výtěžkem H₂ 250 % oproti divokému typu Cp1. Podle očekávání vykazovaly kmeny řas exprimující Cp1 vyšší odolnost vůči O₂ ve srovnání s kmeny řas exprimujícími původní řasovou hydrogenázu. Ačkoliv odolnost vůči kyslíku dosáhla výjimečných hodnot, Cp1 a Cp1^{T356V/S357T} vykazují výrazně nízkou úroveň fotosyntetické produkce H₂ ve srovnání s řasovou hydrogenázou. Experimenty provázely problémy, jako je nesprávná translace, nepřesné posttranslační procesy nebo nestabilita modifikovaných proteinů. Autoři formulovali hypotézu, že řasa jako hostitel by mohla mít obranný mechanismus proti nepůvodnímu genetickému materiálu. (Elman et al., 2020)

Další práce od Xu et al. (2011) nabízí novou cestu, která umožňuje spotřebovávat kyslík, a tím podporovat produkci vodíku v *Chlamydomonas reinhardtii*. Pyruvát oxidáza z *Escherichia coli* (POX) a kataláza ze *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (CAT) byly klonovány a integrovány do chloroplastu *Chlamydomonas reinhardtii*. Pyruvát oxidáza je enzym, který katalyzuje tvorbu kyslíku dekarboxylací pyruvátu na acetylfosfát a CO₂ podle reakce:



Vzhledem k tomu, že H₂O₂ může potenciálně poškodit buňku, byl také zaveden enzym kataláza (CAT), který redukuje H₂O₂. Za normálních podmínek se cizí geny neexprimovaly, ale při nepřetržitém ošetření tepelným šokem byly POX a CAT exprimovány ve vysokých hladinách. Produkce vodíku měla nízkou účinnost při vysokém osvětlení (jak u transgenních řas, tak u divokého typu), ale po inkubaci buněk řas ve tmě obsah rozpuštěného kyslíku v kulturách řas klesl. Po 48 hodinách byla produkce vodíku v uzavřené kultuře transgenních řas přibližně 3× vyšší než u řas divokého typu. Hlavní problém použití promotorů indukujících tepelný šok je poškození buňky při kontinuálním působení šoku. Konstitutivní promotor by vedl cizí geny k expresi na vysoké úrovni bez přidání vnějšího stresu. Autoři nabízí dvě strategie dalšího zlepšení účinnosti produkce vodíku transgenním kmenem POX: použití konstitutivního promotoru k řízení POX a exprese optimalizovaného fragmentu POX. Závěrem lze říci, že tato práce určuje další optimalizaci tohoto přístupu, aby se povedlo zvýšit účinnost výroby vodíku. (Xu et al., 2011).

Cílem studie Lin et al. (2013) bylo vypnout protein PsbO v buňkách *Chlorella* sp. PsbO je klíčovou podjednotkou kyslík vyvíjejícího komplexu (oxygen-evolving complex) u řas. Eliminace genu *psbO* neovlivnila expresi genu *HydA* pro [FeFe] hydrogenázu, která zůstala plně funkční. Při nižším osvětlení a v semi-aerobních podmínkách zvládly PsbO-knockdown mutanty produkovat H₂, jehož produkce se zvýšila až 10× ve srovnání s divokým typem.

V další práci od Yang et al. (2019) byla použita zelená řasa *Chlorella* sp. která byla geneticky upravena zmutováním genu *CshydAc* tak, aby modifikovala aminokyselinové zbytky A105I, V265W, G113I nebo V273I kolem plynového tunelu hydrogenázy, a tím se zabránilo přístupu O₂ k aktivnímu místu enzymu. To vedlo k zúžení plynového kanálu, což vedlo k omezení přístupu kyslíku a následné zvýšení produkci vodíku. Bylo zjištěno, že produkce H₂ u kmenu s dvojitými mutacemi nebyla o mnoho vyšší než u kmenu s jednotlivou mutací. Stačila jednoduchá mutace na jednom místě, aby způsobila závažné strukturální změny v plynovém tunelu, což vedlo k omezení jeho funkčnosti. V testech *in vitro* bylo zjištěno, že transgenní kmen produkoval až 7× více H₂ než divoký typ v přítomnosti 5 % O₂ během fotoprodukce. Kromě toho, za použití *in vivo* testu po několika dnech byly některé z transgenních kmenů s dvojitou mutací schopny produkovat až 30× více H₂ než původní kmen v přítomnosti O₂ (Yang et al., 2019).

8. Pokusy o kultivace ve větších objemech

Ačkoliv pokusy v laboratorních podmínkách občas vykazují nadějně výsledky, kultivace ve větších objemech stále není rozšířena a není důkladně prozkoumána. Lze uvést jen několik vědeckých prací, které ilustrují, jaké nové výzvy může poskytnout kultivace za účelem výroby biovodíku ve velkých objemech. Tsygankov et al. (2002) popisují kultivaci mutantního kmenu *Anabaena variabilis* PK84 s neaktivní uptake-hydragenázou ve venkovním fotobioreaktoru. Automatický spirálový fotobioreaktor o objemu 4,35 litrů (vnitřní průměr 10 mm) byl umístěn na střeše budovy v Londýně během léta roku 1998 a 1999. Promíchávání kultury sinic probíhalo pomocí kuliček z polyuretanové pěny, které cirkulovaly spolu s kulturou. Kultura v bioreaktoru byla syčena 2 % CO₂. Sinice byly pěstované v kultivačním médiu za sterilních podmínek. Celkem bylo provedeno 6 experimentů. Nejdelší experiment, během kterého se povedlo vyrobit 24,5 litru vodíku, trval 40 dní (bez přidání čerstvého inokula). Produkce vodíku závisela především na světle a teplotě. Po východu slunce se koncentrace kyslíku v médiu zvyšovala díky fotosyntéze, nicméně při ostrém slunci rychle klesla, pravděpodobně v důsledku fotoinhibice. Když byl fotobioreaktor zakryt černým plastovým pytlím v podmínkách denního světla, produkce vodíku klesla z 29 ml/h až na 0,25–0,35 ml/h. Vliv teploty byl mnohem výraznější: pokud byla teplota nižší než optimum (30 °C, optimum pro produkci vodíku je vyšší), denní

produkce vodíku byla nízká (10–242 ml/den). Průměrná letní teplota v Londýně je obvykle nižší než 30 °C během dne, což negativně ovlivnilo produkci vodíku. Obecně lze říct, že kultura *Anabaena variabilis* PK84 byla stabilní a pokus se dá považovat za relativně úspěšný. Nicméně účinnost produkce z venkovního bioreaktoru se lišila od produkce v laboratoři se stejným mutantem za simulovaných venkovních podmínek jen o 0,12–0,15%. (Tsygankov et al., 2001)

Scoma et al. (2011) pěstovali *Chlamydomonas reinhardtii* v médiu bez síry v 50litrovém tubulárním fotobioreaktoru, který se skládal z 10 paralelních skleněných trubic, spojených PVC oblouky. Tubulární bioreaktor byl umístěn vodorovně do demineralizované vody pro zlepšení vodivosti tepla. Míchání kultur bylo dosaženo probubláváním směsi vzduchu a CO₂ (97 : 3). Pokus se prováděl v létě v Itálii (Firence), kde se teplota pohybovala kolem 28 °C během dne a 25 °C v noci. Kultury byly v noci vystavené umělému světlu, aby byla podpořena fotosyntéza a nedocházelo k výrazné respiraci. Bez předběžné aklimatizace vedl přenos laboratorních kultur rovnou do venkovního fotobioreaktoru osvětleného slunečním zářením k minimální produkci vodíku. Experimenty s kmeny produkujícími vodík byly prováděny v umělém LED osvětlení i v přímém slunečním světle. V obou případech dosahoval výtěžek H₂ jen 18–20 % z toho, co bylo získáno v laboratoři. Část tohoto vodíku mohla být získána fermentací, což naznačoval úbytek sacharidů. Hlavním důvodem nízké efektivity bylo vystavení kultur dvojímu stresu, kombinaci vysoké intenzity slunečního světla a nedostatku síry. Nedostatek síry zabránil buňkám v tvorbě nových podjednotek fotosystému a nadměrné ozáření spouštělo obranné mechanismy, např. xantofylový cyklus. Po 27 hodinách kultivace v médiu bez síry došlo ke zvýšení obsahu zeaxantinu, zejména v kultuře, která neprošla aklimatizací. Dalším faktorem, který snižoval efektivitu, bylo jednostranné osvětlení horizontálního fotobioreaktoru. Ačkoliv nebylo dosaženo vysokého výtěžku vodíku, studie naznačila směr, kterým by se měl ubírat další výzkum. (Scoma et al., 2012)

9. Závěr

V současnosti představuje vodík atraktivní palivo, které má téměř nulové emise a široké spektrum využití. V případě, že se podaří produkovat vodík na základě fotosyntézy, bude to znamenat využití pohonu energie slunce jako nevyčerpatelného zdroje energie.

Podle ekonomické analýzy Benemanne (1997) by mohl 1 GJ fotochemicky produkovaného vodíku stát 10 až 20 USD (1 GJ benzínu stojí 7,67 USD a 1 GJ metanolu 15,4 USD). Je třeba zdůraznit, že tato ekonomická analýza byla založená na velice optimistických předpokladech, které počítaly s podporou ekopaliv a zvýšením cen konvenčních paliv na světovém trhu na konci 20. století. Reálná cena produkce vodíku může být mnohem vyšší z důvodu údržby samotných

bioreaktorů a nezbytné obnovy kultur. Zavedení vodíku jako paliva pro široké využití má další překážky, především chybí příslušná infrastruktura a problémy při skladování; kromě toho je vodík prudce hořlavý. (Benemann, 1997; Ogden, 1999; Shaw et al., 2012; Li et al., 2020).

Pokročilé metody genetického inženýrství a inženýrství buněčného povrchu by mohly poskytnout nové směry výzkumu, jehož cílem je udržitelnost a obnovitelnost produkce vodíku za přiměřenou cenu. Pokusů o velkoplošnou kultivaci sinic a řas za účelem získávání vodíku je zatím velice málo, a ty existující se potýkají s řadou problémů. Jedná se zatím o testování metod a výběr vhodných organismů. Ze sinic se jeví jako nejvíc atraktivní *Cyanothece* ATCC 51142, která rozděluje aerobní a anaerobní procesy v čase. Navíc za určitých podmínek zvládá produkci vodíku i pomocí uptake-hydrogenázy. Kombinace metod genetického inženýrství a úprav světelného režimu by mohla poskytnout zajímavé výsledky. U zelených řas bylo velké množství vědeckých publikací věnováno produkci vodíku *Chlamydomonas reinhardtii* a různých kmenů *Chlorella*, které jsou atraktivní tím, že v porovnání s *Chlamydomonas reinhardtii* mají menší velikost buněk a menší velikost světlosběrných antén. Navíc je důležité rozšiřovat spektrum modelových organismů pro další zlepšení.

10. Zdroje

- Aigner, S., Glaser, K., Arc, E., Holzinger, A., Schletter, M., Karsten, U., & Kranner, I. (2020). Adaptation to Aquatic and Terrestrial Environments in *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta). *Frontiers in Microbiology*, *11*, 585836.
- Álvarez, C., Navarro, J. A., Molina-Heredia, F. P., & Mariscal, V. (2020). Endophytic Colonization of Rice (*Oryza sativa* L.) by the Symbiotic Strain *Nostoc punctiforme* PCC 73102. *Molecular Plant-Microbe Interactions*[®], *33*(8), 1040–1045.
- Appel, J., Hueren, V., Boehm, M., & Gutekunst, K. (2020). Cyanobacterial *in vivo* Solar Hydrogen Production Using a Photosystem I–hydrogenase (PsaD-HoxYH) Fusion Complex. *Nature Energy*, *5*(6), 458–467.
- Appel, J., Phunpruch, S., Steinmüller, K., & Schulz, R. (2000). The Bidirectional Hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 Works as an Electron Valve During Photosynthesis. *Archives of Microbiology*, *173*(5–6), 333–338.
- Armstrong, R. E., Hayes, P. K., & Walsby, A. E. (1983). Gas Vacuole Formation in Hormogonia of *Nostoc muscorum*. *Microbiology*, *129*(2), 263–270.
- Benemann, J. R., & Weare, N. M. (1974). Hydrogen Evolution by Nitrogen-Fixing *Anabaena cylindrica* Cultures. *Science*, *184*(4133), 174–175.
- Bernát, G., Waschewski, N., & Rögner, M. (2009). Towards Efficient Hydrogen Production: The Impact of Antenna Size and External Factors on Electron Transport Dynamics in *Synechocystis* PCC 6803. *Photosynthesis Research*, *99*(3), 205–216.
- Burgdorf, T., Hartog, A. F., Muijsers, A. O., de Koster, C. G., Albracht, S. P. J., & Friedrich, B. (2005). The Soluble NAD⁺-Reducing [NiFe]-Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 Consists of Six Subunits and Can Be Specifically Activated by NADPH. *J. BACTERIOL.*, *187*.
- Burlacot, A., Burlacot, F., Li-Beisson, Y., & Peltier, G. (2020). Membrane Inlet Mass Spectrometry: a Powerful Tool for Algal Research. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 1302.
- Campbell, E. L., Summers, M. L., Christman, H., Martin, M. E., & Meeks, J. C. (2007). Global Gene Expression Patterns of *Nostoc punctiforme* in Steady-State Dinitrogen-Grown Heterocyst-Containing Cultures and at Single Time Points during the Differentiation of Akinetes and Hormogonia. *Journal of Bacteriology*, *189*(14), 5247–5256.
- Cournac, L., Guedeney, G., Peltier, G., & Vignais, P. M. (2004). Sustained Photoevolution of Molecular Hydrogen

- in a Mutant of *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 Deficient in the Type I NADPH-Dehydrogenase complex. *Journal of Bacteriology*, *186*(6), 1737–1746.
- Chader, S., Hacene, H., & Agathos, S. N. (2009). Study of Hydrogen Production by Three Strains of *Chlorella* Isolated from the Soil in the Algerian Sahara. *International Journal of Hydrogen Energy*, *34*(11), 4941–4946.
- Dementin, S., Leroux, F., Cournac, L., Lacey, A. L. D., Volbeda, A., Léger, C., Burlat, B., Martinez, N., Champ, S., Martin, L., Sanganas, O., Haumann, M., Fernández, V. M., Guigliarelli, B., Fontecilla-Camps, J. C., & Rousset, M. (2009). Introduction of Methionines in the Gas Channel Makes [NiFe] Hydrogenase Aero-Tolerant. *Journal of the American Chemical Society*, *131*(29), 10156–10164.
- Dickson, D. J., & Ely, R. L. (2011). Evaluation of Encapsulation Stress and the Effect of Additives on Viability and Photosynthetic Activity of *Synechocystis* sp. PCC 6803 Encapsulated in Silica Gel. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *91*(6), 1633–1646.
- Ducat, D. C., Sachdeva, G., & Silver, P. A. (2011). Rewiring Hydrogenase-Dependent Redox Circuits in Cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(10), 3941–3946.
- Eitzinger, N., Wagner, V., Weisheit, W., Geimer, S., Boness, D., Kreimer, G., & Mittag, M. (2015). Proteomic Analysis of a Fraction with Intact Eyespots of *Chlamydomonas reinhardtii* and Assignment of Protein Methylation. *Frontiers in Plant Science*, *6*.
- Elman, T., Schweitzer, S., Shahar, N., Swartz, J., & Yacoby, I. (2020). Engineered Clostridial [FeFe]-hydrogenase Shows Improved O₂ Tolerance in *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Hydrogen Energy*, *45*(55), 30201–30210.
- English, C. M., Eckert, C., Brown, K., Seibert, M., & King, P. W. (2009). Recombinant and *in vitro* Expression Systems for Hydrogenases: New Frontiers in Basic and Applied Studies for Biological and Synthetic H₂ Production. *Dalton Transactions*, *45*, 9970.
- Ghirardi, M. L., Dubini, A., Yu, J., & Maness, P.-C. (2009). Photobiological Hydrogen-Producing Systems. *Chem. Soc. Rev.*, *38*(1), 52–61.
- Ghirardi, M. L., Posewitz, M. C., Maness, P.-C., Dubini, A., Yu, J., & Seibert, M. (2007). Hydrogenases and Hydrogen Photoproduction in Oxygenic Photosynthetic Organisms. *Annual Review of Plant Biology*, *58*(1), 71–91.
- Godaux, D., Bailleul, B., Berne, N., & Cardol, P. (2015). Induction of Photosynthetic Carbon Fixation in Anoxia

- Relies on Hydrogenase Activity and Proton-Gradient Regulation-Like-Mediated Cyclic Electron Flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 168(2), 648–658.
- Goodenough, U. W., & Heuser, J. E. (1985). The *Chlamydomonas* Cell Wall and Its Constituent Glycoproteins Analyzed By the Quick-Freeze, Deep-etch Technique. *The Journal of Cell Biology*, 101(4), 1550–1568.
- Guljamow, A., Kreische, M., Ishida, K., Liaimer, A., Altermark, B., Bähr, L., Hertweck, C., Ehwald, R., & Dittmann, E. (2017). High-Density Cultivation of Terrestrial *Nostoc* Strains Leads to Reprogramming of Secondary Metabolome. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(23), e01510-17.
- Heeg, J. S., & Wolf, M. (2015). ITS2 and 18S rDNA Sequence-Structure Phylogeny of *Chlorella* and Allies (Chlorophyta, Trebouxiophyceae, Chlorellaceae). *Plant Gene*, 4, 20–28.
- Hemschemeier, A., Fouchard, S., Cournac, L., Peltier, G., & Happe, T. (2007). Hydrogen Production by *Chlamydomonas reinhardtii*: An Elaborate Interplay of Electron Sources and Sinks. *Planta*, 227(2), 397–407.
- Heng, R.-L., & Pilon, L. (2016). Radiation Characteristics and Effective Optical Properties of Dumbbell-Shaped Cyanobacterium *Synechocystis* sp. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 174, 65–78.
- Holm, R. H., Kennepohl, P., & Solomon, E. I. (1996). Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. *Chemical Reviews*, 96(7), 2239–2314.
- Hoppert, Michael. Metalloenzymes. Online. In: Reitner, Joachim a Thiel, Volker (ed.). *Encyclopedia of Geobiology*. Encyclopedia of Earth Sciences Series. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011, s. 558-563. ISBN 978-1-4020-9211-4.
- Hunt, P. P., & Smith, H. A. (1961). The Separation of Hydrogen, Deuterium and Hydrogen Deuteride Mixtures by Gas Chromatography. *The Journal of Physical Chemistry*, 65(1), 87–89.
- Hwang, J.-H., Kim, H.-C., Choi, J.-A., Abou-Shanab, R. A. I., Dempsey, B. A., Regan, J. M., Kim, J. R., Song, H., Nam, I.-H., Kim, S.-N., Lee, W., Park, D., Kim, Y., Choi, J., Ji, M.-K., Jung, W., & Jeon, B.-H. (2014). Photoautotrophic Hydrogen Production by Eukaryotic Microalgae Under Aerobic Conditions. *Nature Communications*, 5(1), 3234.
- Chen, Y. (2022). Global Potential of Algae-based Photobiological Hydrogen Production. *Energy & Environmental Science*, 15(7), 2843–2857.
- James, A. T., & Martin, A. J. P. (1952). Gas-liquid Partition Chromatography: The Separation and Micro-

- estimation of Volatile Fatty Acids from Formic Acid to Dodecanoic Acid. 50.
- Kaneko, T. (2001). Complete Genomic Sequence of the Filamentous Nitrogen-fixing Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *DNA Research*, 8(5), 205–213.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Tabata, S. (1996). Sequence Analysis of the Genome of the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. II. Sequence Determination of the Entire Genome and Assignment of Potential Protein-coding Regions (Supplement). *DNA Research*, 3(3), 185–209.
- Kanwisher, J. (1959). Polarographic Oxygen Electrode. *Limnology and Oceanography*, 4(2), 210–217.
- Khanna, N., Raleiras, P., & Lindblad, P. (2016). Fundamentals and Recent Advances in Hydrogen Production and Nitrogen Fixation in Cyanobacteria. In M. A. Borowitzka, J. Beardall, & J. A. Raven (Ed.), *The Physiology of Microalgae* (s. 101–127). Springer International Publishing.
- Khetkorn, W., Rastogi, R. P., Incharoensakdi, A., Lindblad, P., Madamwar, D., Pandey, A., & Larroche, C. (2017). Microalgal Hydrogen Production – A review. *Bioresource Technology*, 243, 1194–1206.
- Khosravitar, F. (2020). Microalgal biohydrogen photoproduction: Scaling Up Challenges and the Ways Forward. *Journal of Applied Phycology*, 32(1), 277–289.
- Komárek, J. (2003). Coccoid and Colonial Cyanobacteria. In *Freshwater Algae of North America* (s. 59–116). Elsevier.
- Korelusová, J., Kas̆tovský, J., & Komárek, J. (2009). Heterogeneity of the Cyanobacterial Genus *Synechocystis* and Description of a New Genus, *Geminocystis*¹. *Journal of Phycology*, 45(4), 928–937.
- Kosourov, S., Jokel, M., Aro, E.-M., & Allahverdiyeva, Y. (2018). A New Approach for Sustained and Efficient H₂ Photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Energy & Environmental Science*, 11(6), 1431–1436.
- Kosourov, S., Makarova, V., Fedorov, A. S., Tsygankov, A., Seibert, M., & Ghirardi, M. L. (2005). The Effect of Sulfur Re-Addition on H₂ Photoproduction by Sulfur-Deprived Green Algae. *Photosynthesis Research*, 85(3), 295–305.
- Kumaraswamy, G. K., Guerra, T., Qian, X., Zhang, S., Bryant, D. A., & Dismukes, G. C. (2013). Reprogramming the Glycolytic Pathway for Increased Hydrogen Production in Cyanobacteria: Metabolic Engineering of NAD⁺-dependent GAPDH. *Energy & Environmental Science*, 6(12), 3722.
- Lakatos, G., Balogh, D., Farkas, A., Ördög, V., Nagy, P. T., Bíró, T., & Maróti, G. (2017). Factors Influencing Algal

- Photobiohydrogen Production in Algal-bacterial Co-cultures. *Algal Research*, 28, 161–171.
- Lakatos, G., Deák, Z., Vass, I., Rétfalvi, T., Rozgonyi, S., Rákhely, G., Ördög, V., Kondorosi, É., & Maróti, G. (2014). Bacterial Symbionts Enhance Photo-fermentative Hydrogen Evolution of *Chlamydomonas* algae. *Green Chem.*, 16(11), 4716–4727.
- Leroux, F., Dementin, S., Burlat, B., Cournac, L., Volbeda, A., Champ, S., Martin, L., Guigliarelli, B., Bertrand, P., Fontecilla-Camps, J., Rousset, M., & Léger, C. (2008). Experimental Approaches to Kinetics of Gas Diffusion in Hydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(32), 11188–11193.
- Li, D., Du, W., Fu, W., & Cao, X. (2020). A Quick Look Back at the Microalgal Biofuel Patents: Rise and Fall. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 1035.
- Lin, H.-D., Liu, B.-H., Kuo, T.-T., Tsai, H.-C., Feng, T.-Y., Huang, C.-C., & Chien, L.-F. (2013). Knockdown of *PsbO* leads to Induction of *HydA* and Production of Photobiological H₂ in the Green Alga *Chlorella* sp. DT. *Bioresource Technology*, 143, 154–162.
- Lindberg, P. (2002). A Hydrogen-producing, Hydrogenase-free Mutant Strain of *Nostoc punctiforme* ATCC 29133. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11–12), 1291–1296.
- Lindberg, P., Lindblad, P., & Cournac, L. (2004). Gas Exchange in the Filamentous Cyanobacterium *Nostoc punctiforme* Strain ATCC 29133 and Its Hydrogenase-Deficient Mutant StrainNHM5. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2137–2145.
- Luykx, P., Hoppenrath, M., & Robinson, D. G. (1997). Structure and Behavior of Contractile Vacuoles in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protoplasma*, 198(1–2), 73–84.
- Masukawa, H., Inoue, K., Sakurai, H., Wolk, C. P., & Hausinger, R. P. (2010). Site-Directed Mutagenesis of the *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 Nitrogenase Active Site To Increase Photobiological Hydrogen Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(20), 6741–6750.
- Meeks, J. C., & Elhai, J. (2002). Regulation of Cellular Differentiation in Filamentous Cyanobacteria in Free-Living and Plant-Associated Symbiotic Growth States. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(1), 94–121.
- Meeks, J. C., Elhai, J., Thiel, T., Potts, M., Larimer, F., Lamerdin, J., Predki, P., & Atlas, R. (2001). An overview of the genome of *Nostoc punctiforme*, a multicellular, symbiotic cyanobacterium.
- Melis, A., & Happe, T. (2001). Hydrogen production. Green algae as a source of energy. *Plant Physiology*, 127(3), 740–748.

- Melis, A. (2007). Photosynthetic H₂ Metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* (unicellular green algae). *Planta*, 226(5), 1075–1086.
- Melis, A., Zhang, L., Forestier, M., Ghirardi, M. L., & Seibert, M. (2000). Sustained Photobiological Hydrogen Gas Production upon Reversible Inactivation of Oxygen Evolution in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 122(1), 127–136.
- Melnicki, M. R., Pinchuk, G. E., Hill, E. A., Kucek, L. A., Fredrickson, J. K., Konopka, A., & Beliaev, A. S. (2012). Sustained H₂ Production Driven by Photosynthetic Water Splitting in a Unicellular Cyanobacterium. *MBio*, 3(4), e00197-12.
- Meyer, J. (2007). [FeFe] hydrogenases and their Evolution: A Genomic Perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(9), 1063–1084.
- Nagy, V., Podmaniczki, A., Vidal-Meireles, A., Tengölics, R., Kovács, L., Rákhely, G., Scoma, A., & Tóth, S. Z. (2018). Water-splitting-based, Sustainable and Efficient H₂ Production in Green Algae as Achieved by Substrate Limitation of the Calvin–Benson–Bassham Cycle. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 69.
- Oey, M., Sawyer, A. L., Ross, I. L., & Hankamer, B. (2016). Challenges and Opportunities for Hydrogen Production from Microalgae. *Plant Biotechnology Journal*, 14(7), 1487–1499.
- Ogden, J. M. (1999). Prospects for Building a Hydrogen Energy Infrastructure. *Annual Review of Energy and the Environment*, 24(1), 227–279.
- Ohki, K., Le, N. Q. T., Yoshikawa, S., Kanesaki, Y., Okajima, M., Kaneko, T., & Thi, T. H. (2014). Exopolysaccharide Production by a Unicellular Freshwater Cyanobacterium *Cyanothece* sp. Isolated From a Rice Field in Vietnam. *Journal of Applied Phycology*, 26(1), 265–272.
- Omoregie, E. O., Crumbliss, L. L., Bebout, B. M., & Zehr, J. P. (2004). Determination of Nitrogen-Fixing Phylotypes in *Lyngbya* sp. And *Microcoleus chthonoplastes* Cyanobacterial Mats from Guerrero Negro, Baja California, Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2119–2128.
- Pernil, R., Picossi, S., Herrero, A., Flores, E., & Mariscal, V. (2015). Amino Acid Transporters and Release of Hydrophobic Amino Acids in the Heterocyst-Forming Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. *Life*, 5(2), 1282–1300.
- Pisciotta, J. M., Zou, Y., & Baskakov, I. V. (2010). Light-Dependent Electrogenic Activity of Cyanobacteria. *Plos one*, 5(5), e10821.
- Pradhan, B., Patra, S., Nayak, R., Swain, S. S., Jit, B. P., Behera, C., Ragusa, A., Ki, J.-S., & Jena, M. (2022). Low-

- dose Priming of Gamma Radiation Enhanced Cadmium Tolerance in *Chlamydomonas reinhardtii* by Modulating Physio-biochemical Pathways. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(53), 80383–80398.
- Pröschold, T., Darienko, T., Krienitz, L., & Coleman, A. W. (2018). *Chlamydomonas schloesseri* sp. Nov. (Chlamydomophyceae, Chlorophyta) Revealed by Morphology, Autolysin Cross Experiments, and Multiple Gene Analyses. *Phytotaxa*, 362(1), 21.
- Ramaraj, R., Unpaprom, Y., & Dussadee, N. (2016). Cultivation of Green Microalga, *Chlorella vulgaris* for Biogas Purification. *International Journal of Scientific & Technology Research* 2(3).
- Reddy, K. J., Haskell, J. B., Sherman, D. M., & Sherman, L. A. (1993). Unicellular, Aerobic Nitrogen-fixing Cyanobacteria of the Genus *Cyanothece*. *Journal of Bacteriology*, 175(5), 1284–1292.
- Rehder, D. (2000). Vanadium Nitrogenase. *Journal of Inorganic Biochemistry* 80 (2000) 133–136
- Rossi, F., & De Philippis, R. (2015). Role of Cyanobacterial Exopolysaccharides in Phototrophic Biofilms and in Complex Microbial Mats. *Life*, 5(2), 1218–1238.
- Russell, C., Rodriguez, C., & Yaseen, M. (2022). High-Value Biochemical Products & Applications of Freshwater Eukaryotic Microalgae. *Science of The Total Environment*, 809, 151111.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, Composition, Production, Processing and Applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278.
- Sager, R., & Palade, G. E. (1957). Structure and Development of the Chloroplast in *Chlamydomonas*. *The Journal of Cell Biology*, 3(3), 463–488.
- Salomé, P. A., & Merchant, S. S. (2019). A Series of Fortunate Events: Introducing *Chlamydomonas* as a Reference Organism. *The Plant Cell*, 31(8), 1682–1707.
- Schuff, Norbert. In Vivo NMR Methods, Overview of Techniques. Online. In: *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. Elsevier, 2010, s. 1107-1111. ISBN 9780123744135.
- Scoma, A., Giannelli, L., Faraloni, C., & Torzillo, G. (2012). Outdoor H₂ Production in a 50-L Tubular Photobioreactor by Means of a Sulfur-deprived Culture of the Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology*, 157(4), 620–627.
- Show, K. Y., Lee, D. J., Tay, J. H., Lin, C. Y., & Chang, J. S. (2012). Biohydrogen Production: Current Perspectives and the Way Forward. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(20), 15616–15631.

- Singh, N. K., Sonani, R. R., Rastogi, R. P., & Madamwar, D. (2015). The Phycobilisomes: An Early Requisite for Efficient Photosynthesis in Cyanobacteria. *EXCLI Journal*; 14: Doc268; ISSN 1611-2156.
- Stanier, R. Y., Deruelles, J., Rippka, R., Herdman, M., & Waterbury, J. B. (1979). Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Microbiology*, 111(1), 1–61.
- Stephenson, M., & Stickland, L. H. (1930). XXVII. Hydrogenase: a Bacterial Enzyme Activating Molecular Hydrogen. I. The Properties of the Enzyme.
- Su, D., Qi, J., Liu, X., Wang, L., Zhang, H., Xie, H., & Huang, X. (2019). Enzyme-Modulated Anaerobic Encapsulation of *Chlorella* Cells Allows Switching from O₂ to H₂ Production. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(12), 3992–3995.
- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wünschiers, R., & Lindblad, P. (2002). Hydrogenases and Hydrogen Metabolism of Cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(1), 1–20.
- Tamburic, B., Zemichael, F. W., Crudge, P., Maitland, G. C., & Hellgardt, K. (2011). Design of a Novel Flat-plate Photobioreactor System for Green Algal Hydrogen Production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(11), 6578–6591.
- Toepel, J., Welsh, E., Summerfield, T. C., Pakrasi, H. B., & Sherman, L. A. (2008). Differential Transcriptional Analysis of the Cyanobacterium *Cyanothece* sp. Strain ATCC 51142 during Light-Dark and Continuous-Light Growth. *Journal of Bacteriology*, 190(11), 3904–3913.
- Tolleter, D., Ghysels, B., Alric, J., Petroutsos, D., Tolstygina, I., Krawietz, D., Happe, T., Auroy, P., Adriano, J.-M., Beyly, A., Cuiné, S., Plet, J., Reiter, I. M., Genty, B., Cournac, L., Hippler, M., & Peltier, G. (2011). Control of Hydrogen Photoproduction by the Proton Gradient Generated by Cyclic Electron Flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Cell*, 23(7), 2619–2630.
- Touloupakis, E., Faraloni, C., Silva Benavides, A. M., Masojídek, J., & Torzillo, G. (2021). Sustained Photobiological Hydrogen Production by *Chlorella vulgaris* Without Nutrient Starvation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(5), 3684–3694.
- Tsygankov, A. A., Fedorov, A. S., Kosourov, S. N., & Rao, K. K. (2002). Hydrogen Production by Cyanobacteria in an Automated Outdoor Photobioreactor Under Aerobic Conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 80(7), 777–783.
- Vignais, P. M., & Billoud, B. (2007). Occurrence, Classification, and Biological Function of Hydrogenases: An Overview. *Chemical Reviews*, 107(10), 4206–4272.

- Vogt, S., Lyon, E. J., Shima, S., & Thauer, R. K. (2008). The Exchange Activities of [Fe] Hydrogenase (iron–sulfur-cluster-free hydrogenase) From Methanogenic Archaea in Comparison With the Exchange Activities of [FeFe] and [NiFe] Hydrogenases. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *13*(1), 97–106.
- Volgusheva, A., Kukarskikh, G., Krendeleva, T., Rubin, A., & Mamedov, F. (2015). Hydrogen Photoproduction in Green Algae *Chlamydomonas reinhardtii* Under Magnesium Deprivation. *RSC Advances*, *5*(8), 5633–5637.
- Wang, K., Khoo, K. S., Chew, K. W., Selvarajoo, A., Chen, W.-H., Chang, J.-S., & Show, P. L. (2021). Microalgae: The Future Supply House of Biohydrogen and Biogas. *Frontiers in Energy Research*, *9*, 660399.
- Wang, Y., Gao, Y., Li, C., Gao, H., Zhang, C.-C., & Xu, X. (2018). Three Substrains of the Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120 Display Divergence in Genomic Sequences and *hetC* Function. *Journal of Bacteriology*, *200*(13).
- Welsh, E. A., Liberton, M., Stöckel, J., Loh, T., Elvitigala, T., Wang, C., Wollam, A., Fulton, R. S., Clifton, S. W., Jacobs, J. M., Aurora, R., Ghosh, B. K., Sherman, L. A., Smith, R. D., Wilson, R. K., & Pakrasi, H. B. (2008). The Genome of *Cyanothece* 51142, a Unicellular Diazotrophic Cyanobacterium Important in the Marine Nitrogen Cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(39), 15094–15099.
- Wei, T. F., Ramasubramanian, T. S., & Golden, J. W. (1994). *Anabaena* sp. strain PCC 7120 *ntcA* gene Required for Growth on Nitrate and Heterocyst Development. *Journal of Bacteriology*, *176*(15), 4473–4482.
- Wykoff, D. D., Davies, J. P., Melis, A., & Grossman, A. R. (1998). The Regulation of Photosynthetic Electron Transport during Nutrient Deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii* 1. *Plant Physiology*, *117*(1), 129–139.
- Xu, F., Wu, X., Jiang, L.-H., Zhao, H., & Pan, J. (2016). An Organelle K⁺ Channel is Required for Osmoregulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Cell Science*, jcs.188441.
- Xu, F.-Q., Ma, W.-M., & Zhu, X.-G. (2011). Introducing Pyruvate Oxidase into the Chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* Increases Oxygen Consumption and Promotes Hydrogen Production. *International Journal of Hydrogen Energy*, *36*(17), 10648–10654.
- Xu, Z., Wang, S., Zhao, C., Li, S., Liu, X., Wang, L., Li, M., Huang, X., & Mann, S. (2020). Photosynthetic Hydrogen Production by Droplet-based Microbial Micro-reactors Under Aerobic Conditions. *Nature Communications*, *11*(1), 5985.
- Yang, D.-W., Syn, J.-W., Hsieh, C.-H., Huang, C.-C., & Chien, L.-F. (2019). Genetically Engineered Hydrogenases

- Promote Biophotocatalysis-mediated H₂ Production in the Green Alga *Chlorella* sp. DT. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(5), 2533–2545.
- Zavřel, T., Očenášová, P., Červený, J. (2017). Phenotypic Characterization of *Synechocystis* sp. PCC 6803 Substrains Reveals Differences in Sensitivity to Abiotic Stress. *Plos one*, 12(12), e0189130.
- Zhang, L., Happe, T., Melis, A. (2002). Biochemical and Morphological Characterization of Sulfur-deprived and H₂-Producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). *Planta*, 214(4), 552–561.
- Zhao, Y., Bian, S., Zhou, H., & Huang, J. (2006). Diversity of Nitrogenase Systems in Diazotrophs. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48(7), 745–755.