

IV. ВЪЗОбНОВЯЕМИ ЕНЕРГИЙНИ ИЗТОЧНИЦИ И БИОГОРИВА

ВЪЗМОЖНОСТИТЕ НА МИКРОВОДОРАСЛИТЕ ЗА ПРОИЗВОДСТВО НА БИОГОРИВА

К. Лахчев, М. Дойнова

MICROALGAE ARE PROMISING SOURCE OF BIOFUELS

K. Lahtchev, M. Doynova

Abstract: During the last decades microalgae emerge as promising organisms for industrial biofuel production. Microalgae are a large and diverse group of photosynthetic microorganisms capable to convert sun light and carbon dioxide into carbohydrates and oxygen. The reasons for steadily increasing attention to microalgae are their rapid growth and ability to accumulate high amount of lipids. Lipids can be easily extracted and used as biofuels without significant and expensive treatments. Additionally microalgae have some attractive characteristics such as their ability to utilize carbon dioxide from industrial gases and to purify waste waters. Microalgae can be cultivated on areas that are not suited for agricultural plants; their biomass is a subject of bio-degradation and can be used as food, feed and fine chemicals. However, most of the widely distributed species in nature can't be used as biofuel donors, because they don't possess the necessary qualities for inexpensive production. Promising species also occur, but they are objects of genetic manipulations with the purpose to be created 'domesticated' algae for biofuel manufacturing. This review describes some of the main microalgal species with biotechnological and genetic potential and the molecular manipulations for improving their growth rates and lipid content. The main difficulties that appear in front of scientists are also discussed.

Key words: microalgae, biofuels, *Chlorella*, *Chlamydomonas reinhardtii*, genetic improvement

1. УВОД

Един от най-важните проблеми, който поставя 21 век пред човечеството безспорно е устойчивото промишлено производство на въглеродороди в качеството на енергоносители. Основните причини са предизвикани от бързото изчерпване на естествените им източници в съчетание с постоянно нарастващите индустриални потребности. Като възможен и плавен преход към бъдещите енергийни източници, се разглеждат биогоривата и особено биодизела [7, 19, 31, 34] и биоетанола [1, 16, 34, 40]. Получаваните чрез наличните технологии биогорива са скъпи, производството им е нерентабилно и поради това те не са конкурентноспособни на петролните продукти. Това налага необходимостта от търсене на авангардни и ефективни технологии, основаващи са на използването на нови, по-надеждни и евтини природни ресурси. Големи надежди се възлагат на микроводораслите, като продуценти на евтини и ефикасни биогорива. Интересът към тях датира от 1950 година, но първоначалният бурен оптимизъм беше последван от фази на разочарование и отново възвращащи се приливи на надежди.

Целта на този обзор е да се покажат перспективите пред използването на микроводораслите

като продуценти на биогорива, както и основните проблеми, които трябва да се преодолеят. В центъра на вниманието са биологичните особености на различните видове микроводорасли и генетичните подходи, които се използват за повишаване на продуктивността им.

2. ОБЩИ СВОЙСТВА НА МИКРОВОДОРАСЛИТЕ

Микроводораслите са разнородна група от едноклетъчни микроскопични организми, чиято еволюционна възраст е около 3,5 милиарда години. Наричат се още микроалги, фитопланктон, цианобактерии или цианобактерии. Способностите им за адаптиране към условията на околната среда са изумителни. Срещат се в крайният север, в горещите екваториални области, в силно замърсени среди, дори и при високи стойности на радиация (например след катастрофата в Чернобил). Чрез процеса фотосинтеза, микроводораслите трансформират видимата светлина и въглеродният диоксид (CO₂) в химичната енергия на въглехидратите и освобождават атмосферен кислород (O₂). Те са значително по-ефективни преобразователи на слънчевата светлина отколкото растенията, тъй като живеят в суспензии, в които имат неограничен достъп до вода, CO₂ и разтворените хранителни

вещества. Показано е, че при култивиране в големи водни басейни микроводораслите са способни да усвояват около 99% от разтвореният CO_2 [45]. Микроводораслите осигуряват огромни количества кислород и храна за всички живи същества на Земята и така участват в регулацията на земната екосистема. Те имат важно значение за индустрията като източници на хранителни добавки, за почистване на отпадни води, добиване на пигменти и други ценни продукти. За биотехнологиите те са многообещаващи продуценти на различни биогорива: биодизел, биоетанол, биогаз, водород (H_2) и др. В тези организми, удачно са съчетани добри растежни характеристики, биосинтеза на ценни метаболити, евтини и надеждни способи за култивиране и др. Най-атраktivните характеристики на водораслите са следните: те са бързо растящи, високопродуктивни и позволяват производството на големи количества биомаса и желан продукт. Могат да се развиват в морска и океанска вода и не влияят на източниците на питейни води. Култивират се върху земи и води, които са неподходящи за културни и други растения. Водораслите подлежат на биодеградация, оказват по-малко вредни въздействия на околната среда и се избягват емисиите на вредни газове в атмосферата. Техните възможности за добиви на биогорива от квадратен метър обработваема площ значително превъзхождат тези на останалите селскостопански култури: палмово масло, тръстикова захар, зърнени храни и др.

3. КЛАСИФИКАЦИЯ

Класификацията на водораслите е силно затруднена от огромното им разнообразие. Те могат да бъдат едноклетъчни, колониални или многоклетъчни, да се придвижват активно или пасивно (чрез дрейфуване) или да се развиват прикрепени към скали, растения или други твърди предмети. Срещат се самостоятелно или в симбиоза с бактерии, гъби или други морски организми. Използват се различни класифиции в зависимост от тяхната морфология, пигментация, размери, подвижност и др. Напоследък се предпочитат класификации оновани на данните от секвенирането на ядрената ДНК. Има спорове около статуса на групата цианобактерия, която включва синьо-зелените водорасли, понеже те са прокариоти и не се разглеждат като истински водорасли. От тях с най-голяма популярност се ползва хранителната добавка спирулина, която е получавана от два вида цианобактерии: *Arthrospira platensis* и *Arthrospira maxima*. Наричат се спирулина, понеже първоначално тези два вида са били класифицирани към

род *Spirulina*, но сега се приема, че се отнасят към род *Arthrospira*. Биомасата на спирулина е богата на незаменимата гама-линоленова киселина и други мастни киселини [3, 42].

Точният брой на известните видове еукариотни микроводорасли не е известен. Според различни автори той варира от около 40 000 до 65 000, а това по всяка вероятност е само малка част от общият брой налични видове [23]. Към еукариотните водорасли се отнасят зелените (*Chlorophyta*), червените (отдел *Rhodophyta*) и кафявите водорасли (подотдел *Phaeophyta*), а също така тези на диатомеите (*Heterokontophyta*, *Chromista*) и динофлагелатите (*Dinoflagellata* или *Pyrrophyta*). Избрани представители на най-известните видове микроводорасли, считани като перспективни за производството на биогорива са представени в Таблица 1. От тях най-многобройна е групата на зелените водорасли. Много представители на зелените водорасли са добре изучени, а някои от тях са използвани като моделни организми с добре развити методи на класическата и молекулярната генетика. Провеждането на класически генетичен анализ изисква знания за особеностите на клетъчният цикъл на дадения вид. Микроводораслите притежават изключително разнообразие от жизнени цикли, както вегетативни, така и полови. За вегетативните им фази са характерни прости митотични деления. Полов процес е открит само за някои видове, а много от останалите все още не са добре проучени. Най-общо могат да бъдат изброени три основни типа полови цикъла: гаметен, зиготен и споров мейозис. Предпоставки за успешни молекулярни изследвания са наличието на подходящи експресионни вектори, силни и регулируеми промотори, ефикасни методи за генетична трансформация, данни за пълните нуклеотидни последователности на ядрената, митохондриалната и пластидната ДНК и др. На тези условия отговарят много малък брой видове, като от тях най-популярни и добре изучени са видовете *Chlamydomonas reinhardtii* и *Chlorella vulgaris*.

3.1. Зелени водорасли

Представителите на род *Chlorella* имат важно икономическо значение, предимно като хранителни добавки. Това са лишени от флагелуми едноклетъчни зелени водорасли, чиито хлоропласти съдържат хлорофил *a* и *b*. Видовете *Chlorella* се считат перспективни за производството на биогорива понеже съдържат висок процент липиди на грам сухо тегло и се развиват бързо при наличието на минимум хранителни вещества,

както при отсъствието на светлина, така и при нейното наличие. При оптимални условия на култивиране, клетките на *Chlorella* усвояват 20% от слънчевата светлина и натрупват биомаса, която съдържа липиди, богати на полиненаситени мастни киселини. Липсата на полов процес силно затруднява генетичните манипулации, но въпреки това са проведени много опити по мутагенна обработка. Разполагаме с данни за пълното секвениране геномите на няколко вида *Chlorella*. Геномът на *Chlorella variabilis* наброява 9 791 гена и наличните данни ще бъдат използвани за подобряване растежните характеристики на този вид [5]. Анализът на генома на *Chlorella variabilis* показва неочаквано наличието на гени, участващи във все още неоткрит полов цикъл [5].

От зелените микроводорасли най-добре изучен в генетично отношение е видът *Chlamydomonas reinhardtii*. Този едноклетъчен организъм се придвижва с два флагелума и съдържа *a* и *b* хлорофил. При наличие на светлина клетките му фотосинтезират, но при наличие на органични въглеродни източници могат да се развиват и на тъмно. Вегетативните клетки са хаплоидни и съдържат 17 малки хромозоми. При условия на азотно гладуване те се превръщат в гамети, които са от два полови типа mt(+) и mt(-). След копулирането им се получава безфлагелатна зигота, която под действието на слънчева светлина претърпява мейозис и се освобождават четири хаплоидни флагелни клетки, които се включват във вегетативния клетъчен цикъл. За този организъм методите на класическата и молекулярната генетика са добре развити. Разработени са системи за трансформация с плазмидна ДНК, но сериозен проблем е липсата на хомоложна рекомбинация, което затруднява инактивирането на гени чрез тяхното разкъсване (gene disruption). Разполагаме с данни за пълното секвениране на хромозомната [8], митохондриалната [9] и хлоропластната ДНК [10]. *C. reinhardtii* е интересен обект за биотехнологията поради способността си да произвежда водород (H₂), считан като „чисто гориво на бъдещето“ (Виж по-нататък в текста). Други популярни представители на зелените водорасли са *Botryococcus braunii*, *Nannochloropsis oculata*, *Dunaliella salina* и *Paricthochloris incise*. (Табл. 1).

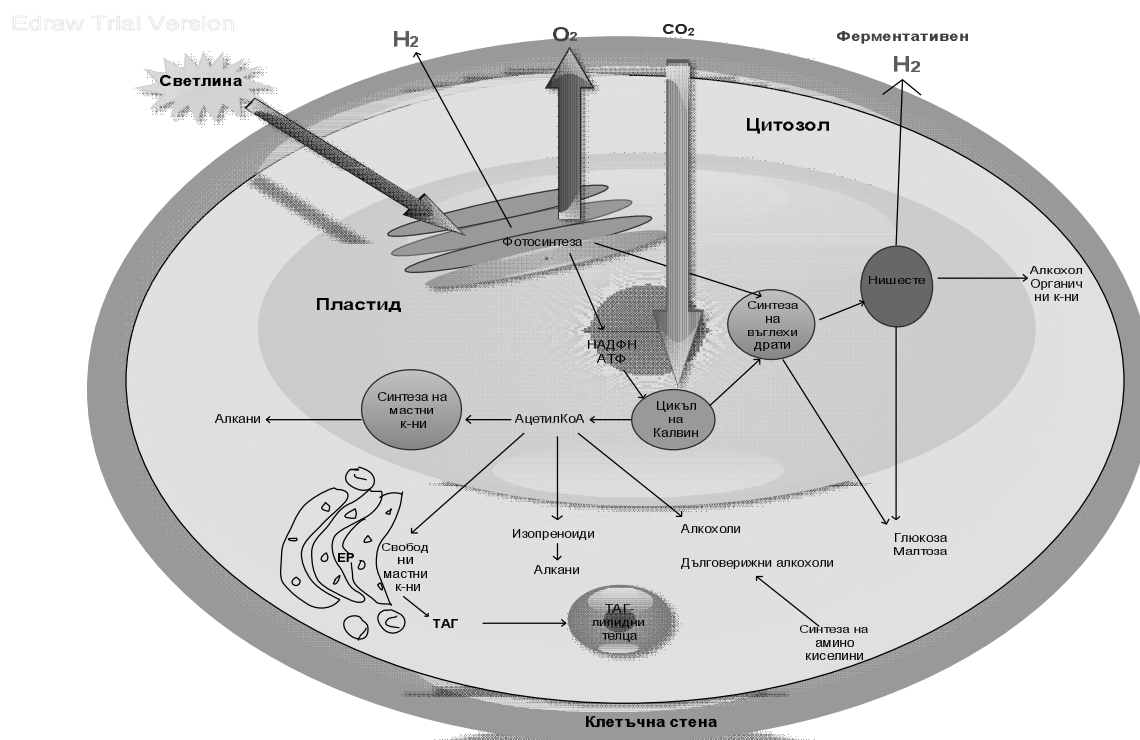
3. 2. Други микроводорасли

Диатомеите (*Bacillariophyceae*) са едноклетъчни еукариотни водорасли с ясно изразена клетъчна стена. Те са най-разпространените микроорганизми

сред океанските простори, където образуват 1/4 от всичкият атмосферен O₂. Биомасата на диатомеите съставлява около 40% от първичната продукция в световните океани [18]. Предполага се, че древните диатомеи са отговорни за създаването на значителни количества от суровия петрол [32]. Поради това се счита, че те биха могли да бъдат използвани като продуценти на биогорива. За съжаление за сега диатомеите имат слабо приложение в биотехнологиите. Считат се като особено перспективни в нанотехнологиите за получаване на силициеви монослоеве. Тази група от водорасли е сравнително слабо проучена в генетично отношение. С най-много информация разполагаме за видовете *Thalassiosira pseudonana* [2] и *Phaeodactylum tricorutum* [6], чиито геноми са напълно секвенирани. Групата на динофлагелатите наброява около 2 000 вида, от които само половината са фотосинтетични. Това са едноклетъчни защитени от целуозна броня водорасли, притежаващи флагелум, който им позволява да плуват. За биотехнологиите интерес представлява вида *Cryptocodinium cohnii* поради способността му да натрупва големи количества нишестени гранули [12].

4. ПОДОБРЯВАНЕ РАСТЕЖНИТЕ СВОЙСТВА НА МИКРОВОДОРАСЛИТЕ

Синтезираните от микроводораслите въглеродороди имат същите свойства и структури както тези от минерален произход, което дава възможност за производство на биогорива, след много малка предварителна обработка. Основа за получаването им са разнообразните метаболитни пътища, участващи в синтеза на мастни киселини, естери, алкани и алкохоли (Фиг. 1). Благодарение на тяхното функциониране се синтезират вещества във вид на естествени прекурсори или като крайни продукти, които могат непосредствено или след обработка да бъдат използвани като биогорива. Последните могат да се получат чрез екстрахиране от водорасловата биомаса или чрез непосредствената им секреция в културалната среда. Вторият способ е особено атрактивен, но все още е обект само на лабораторни изследвания. Почти всички биогорива засега се получават чрез преработка на водорасловата биомаса, което обяснява огромният интерес към начините за нейното добиване и свойства. Освен липиди и въглехидрати, тя съдържа богат набор от незаменими аминокиселини, естествени витамини, минерали, микроелементи, и други ценни за здравето на човека хранителни съставки.



Фиг. 1. Метаболитни пътища в микроводораслите, които могат да бъдат използвани за производство на биогорива.

Таблица 1. Биотехнологични характеристики и генетични особености на някои видове микроводорасли

Видове микроводорасли	Процентно съдържание на:		Налични данни за:		
	Въглехидрати (грам/сухо тегло)	Липиди (грам/сухо тегло)	Секвениране на генома	Системи за трансформация	Приложение в индустрията
Зелени					
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	17	21	+	+	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	17-20	14-22	+	+	+
<i>Botryococcus braunii</i>	15-20	25-75	+	-	+
<i>Nannochloropsis oculata</i>	12-18	18-35	+	+	-
<i>Dunaliella salina</i>	32	6	+	+	+
<i>Parictochloris incise</i>	18	43	-	-	-
Диатомей					
<i>Thalassiosira pseudomonas</i>	10	7-34	+	+	-
<i>Phaeodactylum tricorinitum</i>	16	14-32	+	+	-
Динофлагелатни					
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	25	16-29	-	-	-

Поради това някои видове водорасли са били използвани от дълбока древност като източник на храна. Те се развиват в различни водни източници и могат да се култивират изкуствено при използването на различни отворени и затворени системи. Под отворени системи се разбират открити водни басейни – езера, язовири и т.н. Липсата на първоначални инвестиции прави този вид култивирания многообещаващи, но за съжаление те са много чувствителни към различни външни въздействия, като изменения в състава и концентрациите на хранителните вещества, температурата, светлината и др. Нежелателен страничен ефект имат замърсяванията от инфектиращи “дивни” водорасли и други микроорганизми, а и екологичните последици са доста неясни. Тези промени намаляват получаваните добиви и предизвикват проблеми във връзка с изолирането и преработването на биомасата. Изброените причини правят предимствата на откритите култивирания съмнителни, но въпреки това непрекъснато се предлагат различни хитроумни нововъведения. Те включват опити за покриване на малки водни басейни с полимерни мембрани или пък създаване на морски и океански ферми, в които водораслите ще бъдат прикрепени към закотвени носители, което ще облекчава тяхното лесно и бързо събиране [22]. Затворените системи имат повече предимства понеже дават възможност за прецизно регулиране на растежните условия. Техен недостатък са сравнително големите средства за инвестиране, но добрата новина е, че цената им постоянно спада. Затворените системи включват голямата и разнообразна група на фотобиореакторите. Това са най-разнообразни и специално конструирани апарати, които се различават по дизайн, подвижност, начини на култивиране (периодично или непрекъснато) и т.н [28]. Има съобщения за авангардни фотобиореактори, основаващи се на постиженията на нанотехнологиите. Те обещава осигуряване на оптимално осветление и високи добиви на биомаса.

Върху скоростта на растеж оказват негативно влияние различни генетични фактори и физиологични особености. Акумулирането на липидите предизвиква забавяне на клетъчните деления понеже изисква допълнителен разход на енергия. Ето защо някои бедни на липиди видове се размножават значително по-бързо от шамове с високо липидно съдържание. Тези особености налагат провеждането на специализирани

изследвания и манипулации за подобряване качествата на шамовете продуценти. За да бъдат тези подобрения ефективни, от първостепенно значение са изходните свойства на природният изolat. Това налага провеждането на постоянни и интензивни работи за търсене, изолиране и характеризирание на нови видове от най-разнообразни екосистеми. Модерно направление е търсенето на халофилни микроводорасли, способни да се развиват в силно солена среда, неподходяща за култивиране на други организми. Има данни за скринирането на около 3 000 вида микроводорасли за способността им да произвеждат биогорива, а значителен брой други видове са в процес на изучаване [33, 36]. От природните изолати се получават чисти култури, които се тестват за предварителна оценка на растежните характеристики. Използването на съвременни методи и апарати позволява едновременното микрокултивиране на голям брой шамове в различни условия (хранителни среди, температури, осветление и т.н.). Наличието на бързи и надеждни хроматографски методи спомага за количественото и качествено определяне на синтезираните продукти. Тези експерименти дават възможност за бързото идентифициране на перспективните шамове, които се подлагат на допълнителни проучвания в по-мощни култивирания. За съжаление предвид евентуалните бъдещи печалби и особено запазването на търговска тайна, резултатите от тези проучвания са обект на патентно и авторско право, поради което е трудно да се намерят данни за новооткрити шамове, които имат свойства, превъзхождащи тези на вече известните.

Новоизолираните природни шамове служат като основа за провеждане на бъдещи селекционни работи или като донори на гени с ценни свойства. Генетично-селекционните работи целят да се подобряват фотосинтетичните свойства и елиминират гените, които забавят нормалното развитие. Първите успешни опити в това направление са били постигнати чрез обработка с различни химични и физични мутагени. По този начин са били изолирани мутанти, притежаващи по-високи скорости на растеж. За видовете, които притежават полов цикъл изолираните мутанти могат да бъдат кръстосани и от получените хибриди да бъдат изолирани мейотични продукти, съчетаващи ценните производствени качества. През последните години като перспективен подход за повишаване скоростта на растеж се счита изолирането на мутанти, които

са устойчиви спрямо различни видове стресиращи въздействия. Известно е, че многобройните стресови фактори, като резките промени на солевите концентрации, температурата, рН, светлинната интензивност и т.н., инхибират растежа. Тези фактори могат да бъдат контролирани до известна степен в зависимост от използваните методи за култивиране, инженерни решения и качествата на използваните щамове, но ефикасен способ за тяхното противодействие е изолирането на мутанти, които са устойчиви спрямо стресиращите фактори. Подходящата интензивност на светлинния поток е важно условие за нормалния растеж на микроводораслите. Повечето микроводорасли не могат да се развиват нормално през целият ден поради стреса, предизвикан от силна светлина. Този процес се нарича фотоинхибиране и предизвиква намаляване скоростта на растеж. Поради това са предприети опити за подобряване на фотосинтегичната ефективност и намаляване вредното въздействие на фотоинхибирането. Чрез мутагенна обработка са изолирани мутанти с намален размер на хлорофилната антена [25], както и такива с намален брой на светловловителните комплекси [29]. В тези мутанти е била минимизирана абсорбцията на слънчевата светлина от индивидуалните хлоропласти, което е довело до значително увеличаване на биомасата в лабораторни условия при облъчване със силна светлина. Други стресиращи фактори са повишените концентрации на соли, екстремни стойности на рН, високите и ниски температури и др. Идентифицирани са много гени, които отговарят за обезвреждането на реактивния кислород, като кодиращите за ензимите глутатион пероксидаза [41] и аскорбат пероксидаза [40], а също и ензимите, които катализират производството на осмоцити, като манитол [37] и ононитол [39] и др. Чрез хетероложна експресия и свръхсинтеза на тези ензими може да се очаква подобряване на растежните свойства при стресови условия. Обещаващо приложение на водораслите е едновременното им използване за почистване на отпадни води и добив на биогорива. Поради това използването на мутанти, устойчиви спрямо съдържащите се в отпадните води токсични вещества, като например, соли на тежки метали, ще се отрази благоприятно и на добива на биогорива.

Недостатък на повечето микроводорасли е, че не могат да се развиват до високи клетъчни плътности. Това изисква допълнително концен-

триране на биомасата чрез използването на различни методи, които са скъпи и енергоемки. За тази цел може да се работи върху повишената синтеза на вещества, чрез които клетките “чувстват” и реагират на клетъчните плътности (т.н. quorum sensing молекули). Отделянето на биомасата от културалната среда може да се улесни чрез процесът флокулация, при който клетките образуват големи и бързо-утаяващи се агрегати. Флокулацията се осъществява от разположени върху външната страна на клетъчната стена лектиноподобни белтъци. Подобни белтъци са описани за водораслите, но те биха могли да бъдат “привнесени” чрез трансгенна, хетероложна експресия от дрожди, където са широко разпространени. Друго препятствие са дебелите клетъчни стени на някои видове водорасли, които затрудняват екстракцията на липидите. Това може да се реши чрез изолирането на мутанти с по-тънка клетъчна стена. Мутанти с подобни свойства са били изолирани при дрождите чрез селекция на клонове, които са чувствителни към действието на различни дрожделитични ензими, например стомашен сок от охлюви. Няколко групи от изследователи предлагат проблемите, свързани със замърсяванията от диви щамове дрожди да бъдат разрешени чрез въвеждане и експресия на гени, кодиращи устойчивост към хербициди. Обработката на индустриалните култури с такива хербициди ще елиминира дивите водорасли и цианобактерии и ще осигури нормално развитие на “културните” водорасли. Изолирането на мутантни щамове с някои от описаните свойства е само първият етап от селекционните работи. За да се конструира щам с желаните характеристики е необходимо да се съчетаят в един генотип качествата на няколко различни мутанта. Това ще доведе до конструиране на щамове, които могат да се развиват добре в различни среди и условия на култивиране и да са високопродуктивни продуценти на желаните метаболити.

5. ПОДОБРЯВАНЕ ЛИПИДНИТЕ СВОЙСТВА НА МИКРОВОДОРАСЛИТЕ

Разгледаните генетични подходи дават възможност за подобряване общите растежни свойства на щамовете. За индустриалното производство е съществено да се изменят някои специфични характеристики като, например, повишаване общото количество на синтезираните липиди, промени в техния качествен състав, като дължина на въглеродните

вериги, степента на тяхната ненаситеност и др. Това може да се постигне чрез прилагането на най-авангардните методи на съвременната биотехнология: генно и метаболитно инженерство, геномика и протеомика. Тези методи позволяват бързото преодоляване на съществуващите недостатъци и спомагат за създаването на нови щамове-продуценти. За да се постигне това са необходими задълбочени фундаментални познания за особеностите на липидния метаболизъм у водораслите, неговият генетичен контрол, клетъчна локализация, особености, влияние на условията на култивиране и т.н. За съжаление, биосинтезата и катаболизма на липидите при микроводораслите, както и механизмите, контролиращи дължините на въглеродородните вериги и степента на ненаситеност са слабо изучени. Поради това за много от тях се съди по аналогия от знанията за липидната биосинтеза и катаболизъм у висшите растения и човека. Известно е, че синтезата на мастните киселини протича в митохондриите върху мултиензимни комплекси, наречени синтетизи на мастните киселини, а разграждането им протича в цитоплазмата. Интензитетът на тяхната биосинтеза зависи от интензитета на пентозофосфатния цикъл и отчасти цикъла на трикарбоновите киселини. Скоростта на синтезата на мастните киселини зависи още и от наличните количества ацетил-КоА, като по-високите концентрации на ацетил-КоА ускоряват синтезата. Много от гените, контролиращи липидната биосинтеза при микроводораслите имат хомология с тези от висшите растения. Това показва, че липидният метаболизъм е консервативен и, че методите, използвани за промяна на липидното съдържание при висшите растения могат успешно да се приложат и при микроводораслите [31]. Често използвана стратегия е свръхекспресията на гени, участващи в съответният метаболитен път. Обаче, първите опити за свръхекспресия на гени, контролиращи биосинтезата на мастните киселини при микроводорасли бяха разочароващи. Трикратното увеличаване активността на ацетил-коензимА-карбоксилаза у *Cyclotella cryptica* [17] не доведе до увеличаване на общото липидно съдържание. Причините за този неуспех, вероятно се обясняват с особената регулация на липидите при водораслите. За разлика от тях, свръхекспресията на глицерол-3-фосфат дехидрогеназата, ген, участващ в събирането на триацилглицеролите (ТАГ), е показала почти 40% увели-

чаване на липидното съдържание в *B. napus* [43]. Последният резултат показва, че опитите за свръхекспресия не са лишени от смисъл и може да доведат до положителни резултати. Неочаквани резултати бяха получени при изследване свойствата на мутанти *C. reinhardtii* които са неспособни да синтезират нишесте. Инактивирането на ензима АДФ пиррофосфорилаза е довело до хиперакумулиране на ТАГ⁺⁺, което показва, че този подход може успешно да се използва за повишаване на общото количество липиди [26].

Друга стратегия за повишаване на липидното съдържание е да се намали липидния катаболизъм [31]. Засега липсват данни за използването на този подход при микроводораслите и за неговите възможности може да се съди от резултатите, получени при висшите растения и дрождите. В някои от тези организми гените, които активират липидния катаболизъм са били премахнати чрез метода на генното нокаутиране, което е довело до увеличаване на липидното съдържание. Други потенциални кандидат "мишени" са гените, отговорни за бета-окислението на мастните киселини, но засега липсват данни за подобни експерименти.

Чрез прилагането на генетични подходи може да се променят дължината на въглеродородните вериги и степента на тяхната ненаситеност. Най-подходящи за дизеловите горива са мастните киселини от вида 12:0 и 14:0, докато повечето видове микроводорасли синтезират мастни киселини с дължина на веригата между 14 и 20 въглеродни атома. Много от известни видове образуват вериги от типовете 16:1, 16:0 и 18:1. Следователно, опитите за промяна на качеството на липидите може да подобрят качеството на дизеловото гориво. Дължината на веригите на мастните киселини се определя от активността на ацил-АСР-тиоестеразите, които освобождават новосъздадените молекули от мултиензимния комплекс наречен "синтетиза" на мастните киселини. Различните видове микроводорасли имат различни ацил-АСР-тиоестерази, които са специфични спрямо дължините на веригите на мастните киселини. Предполага се, че трансгенната свръхекспресия на подходящите гени, може да доведе до промяна в дължината на синтезираните мастни киселини. Подобни експерименти са били проведени с гените, отговорни за експресията на 12:0 и 14:0 тиоестерази и получените резултати са показали значителна промяна в профила на синтезираните

мастни киселини, съпроводени със значително увеличаване продукцията на лаурилова [44] и миристинова киселини [49]. Усилията да бъдат намалени дължините на въглеродородните вериги също са били успешни. Свърхекспресията на 8:0 и 10:0 тиоестераза от *C. hookeriana* в *Brassica napus* е довела до увеличаване синтезата на късоверижни мастни киселини [14]. Провеждането на такива експерименти с микроводорасли може би ще бъдат успешни. Една от най-привлекателните идеи е да се манипулира биологията на щамовете продуценти, за да се осъществи секретирането на горивата направо в културалната среда. Основание за това е наличието в природата на няколко метаболитни пътища, които дават възможност за секретирането на различни хидрофобни вещества като например, триацилглицероли, алкани и свободни мастни киселини (Фиг. 1). Липсват данни за подобни опити, но основание за тях са наличието на дрождеви мутанти, способни да секретират свободни мастни киселини. Предполага се, че такива мутанти могат да се изолират и при микроводораслите. Едната възможност е да се осъществи свърхекспресия на АВС-подобни транспортерни белтъци при микроводорасли, за да се постигне успешна секреция на ТАГ. За съжаление, съвременното състояние на знанията за секреторните пътища е в началните етапи на изучаване и не може точно да се каже доколко подобни очаквания са реалистични.

6. ВИДОВЕ БИОГОРИВА ПОЛУЧАВАНИ ОТ МИКРОВОДОРАСЛИ

Водорасловата биомаса може да бъде преработена в биогорива чрез следните методи: превръщане в биодизел чрез трансестерификация, преработка в биоетанол чрез ферментация, превръщане в биогаз чрез пиролиза, и др. Накратко ще бъдат разгледани най-важните и перспективни биогорива, които могат да се получат от микроводорасли.

6. 1. Биодизел

Дизеловото гориво (синоним, нафта) е течен продукт, използван като гориво в дизеловите двигатели. Под този термин се разбира гориво, получено или от керосиново-газголеви дестилации на нефта, или по синтетичен път чрез дестилация на кафяви каменни въглища. За разлика от него, биодизелът се произвежда от животински мазнини или от водораслови и растителни масла: соя, рапица, слънчоглед, кокосово масло и др.

Биодизелът се използва в автомобилни и други двигатели като подобрява работата на двигателя и увеличава мощността му. Той не съдържа сяра, намалява разхода на гориво и не на последно място – не се облага с акциз. Възпламенява се при температура около 350⁰С, като изгарянето му в цилиндъра на двигателя не е съпроводено с образуването на нагар и отделянето на т.н. сажди. Най-големите му предимства са, че може ежегодно да се добива от възобновяеми източници и на практика не замърсява околната среда. Според Европейска директива 5,75% от използваните горива през 2010 г. трябва да бъдат от растителен произход. Биодизелът се произвежда чрез трансестерификация на късоверижни алкохоли или естерификация на мастни киселини. Трансестерификацията се състои в превръщане на триглицеридите в алкилни естери на мастните киселини в присъствието на алкохоли (метилови или етилови) и катализатор, например киселини или основи, с получаване на глицерол като страничен продукт. Но тази процедура изисква използването на допълнително химични реакции, което оскъпява производството. Възможно решение на проблема е *in vivo* конверсията на мастните киселини в биогориво чрез едновременната свърхекспресия на гени от *Zyomonas mobilis* и *Acinetobacter baylyi* в бактерията *E. coli* [24]. В резултат от провеждането на такива експерименти е бил осъществен синтез на етилови естери на мастните киселини, които могат да се използват като биодизел.

6. 2. Алкани

Алканите са изградени от къси и средно дълги въглеродородни вериги и могат да се използват непосредствено като биогорива. Те могат да се получат от мастни киселини, синтезирани от микроводорасли. За да станат последните продуценти на алкани те трябва да бъдат подложени на генетични манипулации за непосредствена продукция на алкани. Този процес изисква серия от трансформации на мастните киселини до алдехиди и след това до алкани. Последният етап от тези превръщания се осъществява от ензима карбонилаза. За съжаление, няма данни за успешно клониране на функционираща карбонилаза у водорасли. Такъв ензим е открит у вида *B. braunii* [15] където отговаря за синтезата на дълговерижни въглеродороди, с повече от 22 С-атома. Те не могат да се използват непосредствено като биогориво и подлежат на допълнителен процесинг.

6. 3. Биоетанол

Микроводораслите могат да се използват за производството на биоетанол чрез прилагането на два подхода. Първият се основава на използването на микроводорасли, синтезиращи и натрупващи големи количества въглехидрати /гликоген, нишесте, ламинарин, хризоламинин и др./, които на по-късен етап се подлагат на ферментация от дрожди до получаването на биоетанол. Другият подход се състои в директното свързване биосинтезата на етанола към *in situ* фотосинтетичната фиксация на въглерода. Много видове микроводорасли притежават метаболитни пътища за получаване на етанол, но тяхното скачване към фотосинтетичният метаболизъм изисква въвеждането на нови метаболитни вериги и големи промени в цялостната регулация. Показано е, че хетероложната експресия на гените, кодиращи пируват декарбоксилазата и алкохол дехидрогеназата от *Zyomonas mobilis* в цианобактерии могат да доведат до продукция на етанол [40, 34]. Този метаболитен път може да бъде въведен в микроводораслите, но споменатите ензими не функционират в еукариотни клетки, което налага провеждането на допълнителни изследвания. Много видове микроводорасли натрупват резервни въглехидрати, които могат да се метаболизират от дрожди до етанол. Добивът от тези въглехидрати може да се увеличи чрез прилагането на различни генетични стратегии. Първата се заключава в опити за увеличаване на глюкановите запаси чрез променяне свойствата на ензима АДФ-глюкозо пирофосфорилаза, но получените резултати са противоречиви. Вторият подход се състои в намаляване катаболизма на нишестето. Това може да се постигне чрез ”нокаутиране” на гените, кодиращи амилазите от хидролитичния път. Обаче, въпреки успешното елиминиране на тези гени, нишестеният катаболизъм продължава да функционира чрез използването на алтернативния фосфоролитичен път [48]. Успехи са били постигнати в опитите за елиминирането на гени, кодиращи регулатори на нишестения катаболизъм. За мутанти, които са дефектни по гена *sex1* при *Arabidopsis thaliana* са били наблюдавани количества нишесте, които надвишават от четири до шест пъти тези при щамове див тип [49]. Това показва, че фосфоролитичния път е особено важен за катаболизма на нишестето и, че участващите в него гени са перспективни за генни манипулации. И накрая, третата стратегия се базира на възможността разтворимите въглехидрати да се секретират в културалната среда. За съжаление,

механизмите чрез които се осъществява тази секреция са слабо изучени и липсват данни за изолирането на такива мутанти.

6. 4. Биобутанол, биоизопропанол

Недостатъци на етанола са сравнително ниското му енергийно съдържание и проблемите, свързани със съхранението и транспортирането му. В това отношение изопропанолът и бутанолът имат по-добри свойства и се считат за перспективни биогорива. Те се произвеждат от няколко рода бактерии, най-известният от който е *Clostridium*, а за промишлено производство се използва вида *Clostridium acetobutylicum*. Недостатъци на тези организми са бавното им развитие и неудобствата за генетични работи. Поради това са направени опити за производството на изопропанол и бутанол от *E. coli* чрез свръхекспресията на 6 гена от *Clostridium* [21]. Била е регистрирана успешната продукция на изопропанол в *E. coli*. Това показва, че провеждането на подобни опити с микроводорасли е перспективно направление, въпреки, че подобна трансгенна синтеза би предизвикала сериозни проблеми за клетката-гостоприемник.

6. 5. Биогаз

Микроводораслите се използват за получаването на различни видове биогаз, като метан, водород и др. Метанът може да се получи от водорасловата биомаса чрез газификация, пиролиза или анаеробно разграждане. При газификацията и пиролизата метанът се екстрахира при високи температури и налягания, докато анаеробното разграждане се осъществява от анаеробни бактерии които образуват смес от различни газове, включващи и метан. Някои видове микроводорасли могат да произвеждат водород под действието на слънчевата светлина. Водородният метаболизъм е изследван най-задълбочено у *C. reinhardtii*. При специални условия неговите клетки спират да произвеждат O_2 и под действието на ензима хидрогеназа, който е активен в безкислородна среда, превключват към производство на H_2 . Известни са два класа хидрогенази [NiFe] и [FeFe], които се класифицират в зависимост от вида на металните йони в техните активни сайтове. Те са филогенетично различни и само [FeFe] хидрогеназите се срещат в микроводораслите, докато [NiFe] хидрогеназите са характерни за цианобактериите. [FeFe] хидрогеназите при зелените водорасли са способни ефективно да се

свързват към фотосинтетичните електронно-транспортни вериги на нивото на фередоксина и по този начин да произвеждат H_2 чрез окисление на водата. Недостатък на всички водораслови [FeFe] хидрогенази е, че са извънредно чувствителни към O_2 , което инхибира водородния метаболизъм и води до получаването на ниски количества отделен H_2 . За да се увеличи производството на H_2 се предлагат два подхода. Чрез единия се цели вредното въздействие на O_2 да бъде намалено чрез подходящи условия за гладуване, най-вече по сярата [46]. По този начин се отслабва фотосинтетичната активност и увеличава H_2 фотопродуктивността. Идеята на втория се състои в разделянето на водородният метаболизъм от фотосинтезата, за да не може O_2 да инхибира производството на H_2 . Това би могло да се постигне чрез променяне структурата на дехидрогеназата, за да стане нечувствителна към O_2 . [11]. Наскоро се появиха данни за друг подход, който включва пренос на толерантната към O_2 [NiFe] хидрогеназа от цианобактериите в генома на *Thiocapsa roseopersicina* [27].

6. 6. Самолетни горива

Международната асоциация за въздушен транспорт (IATA) има за цел в близко бъдеще около 10% от използваният самолетен керосин да бъде заменен от биогорива и поради това финансира изследвания, имащи за цел получаването на водораслови биогорива. За да бъдат използвани в самолетните двигатели, биогоривата трябва да отговарят на следните високи изисквания: да не замръзват при ниски температури, да не образуват налепи върху двигателите вследствие на изгарянето, да имат високо енергийно съдържание, да се смесват добре със самолетния керосин и др. Проведени са успешни пробни полети с използването на биокеросинови горива от различни компании, като Air New Zealand, Continental Airlines, Virgin Airlines. Това показва, че биокеросинът има бъдеще и може да се очаква още по-голямо приложение. Използваният в тези полети биокеросин е бил от растителен произход, но, очевидно, при успешно развитие на производството на водораслови биогорива, те ще се наложат като заместители.

7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представените данни разкриват огромния потенциал на микроводораслите като продуценти на биогорива. Техните възможности карат някои ентузиастични да предричат настъпването на

нова промишлена революция. За съжаление този потенциал все още не е реализиран понеже липсва функционираща и конкурентноспособна промишленост, основана на техните свойства. Разполагаме само с лабораторни разработки, пилотни инсталации и отделни малки предприятия, които произвеждат ограничени количества биогорива на цени, които са 1.2 - 1.3 пъти по-високи от тези на горивата от минерален произход. Тези цени са в пряка зависимост от световните цени на петрола и, очевидно, постоянното нарастване на последните ще доведе до превръщането на водорасловите биогорива в рентабилен и печеливш продукт. Според американския департамент по енергетика обаче внедряването на технология за масово производството на гориво от водорасли ще отнеме години. Основният проблем на този етап са капиталните разходи, които са необходими за създаване на логистична инфраструктура, покупка и инсталиране на фотобиореактори, машини и съоразения, изграждане на тръбопроводни системи и т. н.

За да се превърне водорасловото биогориво в печеливш бизнес е необходимо да се предприемат действия в различни направления, като се започне от законодателната власт, която трябва да инициира изработване и приемане на закони, насърчаващи инвестициите, защитата на авторските права, създаването на нови форми на финансиране, което да дава данъчни преференции за „зелените технологии” и др. Прави впечатление, че финансирането на водорасловите биогорива през началните периоди е било предимно държавно, а сега е главно от частни компании. Например, някои големи държавни програми в САЩ и Япония са прекратени като безперспективни, но за сметка на това са стартирани нови, даже още по-мощни, но финансирани от частни компании. Нефтеният гигант Ексон-Мобил е инвестирал 600 млн. долара за разработване на биогориво от водорасли. Ръководна роля в тези изследвания има ръководената от Крейг Вентър компания Synthetic Genomics. Според направените от него изявления в момента хиляди видове водорасли се тестват за качества, които биха направили производството на биогориво възможно. След това избраните видове да бъдат подложени на генетично модифициране [38]. Този пример показва, че представители на крупния бизнес са осъзнали необходимостта от сериозна изследователска и развойна дейност за създаване и

култивиране на нови щамове водорасли - продуценти на биогорива. В хода на тези изследвания ще се натрупат и експертни знания за превръщането на лабораторните успехи в системи за масово производство. Именно при прехода от лабораторните експерименти към по-мощни култивирания се очаква да възникнат най-сериозните проблеми.

За да се превърнат водорасловите биогорива в печеливш бизнес трябва да се предприемат и урбанистични решения от нов тип. Някои автори считат, че бъдещето на микроводораслите като източник на биогорива е в построяването на големи промишлени комплекси, които да съчетават освобождаването на голямо количество CO₂ (например производство на алкохол, цимент, топлоцентрали, нефтени рафинерии и др.) с наличието на ефективни технологии, позволяващи неговото улавяне и последващо използване от микроводораслите. Това би решило въпроса за почистване на вредните газове и особено за наличието на въглероден източник. Същото важи и за почистването и оползотворяването на отпадните води, които съдържат вещества, които могат да се оползотворяват от водораслите. Подобни производства дават възможност за получаване на странични продукти, чието производство ще доведе до снижаване на цените. Например отпадната биомаса може да се използва като фураж за животните и рибите, от нея могат да се изолират багрила, химикали и др. Най-важната изгода обаче е, че създаването на промишлени комплекси от нов тип би довело до затваряне на производствения цикъл и значителни екологични ползи. Допълнително се разкриват и огромни възможности за чувствителни икономии от транспортни разходи, понеже част от произведените биогорива ще се използват на самото място или на близки разстояния. Построяването на такъв тип комплекси ще бъде основа за създаване на реална конкуренция, основаваща се на наличието на голям брой предприятия. След като обемите на производство нарастнат, ситуацията ще се промени кардинално, което ще доведе до постоянно повишаване качеството на продукцията и намаляване на себестойността. Въпросът за интелектуалната собственост не се коментира, но безспорно той ще бъде сред особено важните. Беглият преглед на наличните данни по разглежданата тематика, показва, че в Интернет е пълно със съобщения, рекламиращи „огромните“ постижения на различни фирми, но никъде не се споменават

реални данни за добиви, щамове и т.н. Очевидно, предвид огромните бъдещи печалби, основните данни от изследователските проучвания са засекретени и не се разгласяват. В обзора се дават примери за постоянната работа в областта на инженерните търсения, които са свързани предимно с конструирането на принципно нови фотобиореактори, апарати и съоразения, които да обслужват тази промишленост и да спомагат за увеличаването на производителността и намаляването на себестойността на продукцията. Основната идея на обзора е да се посочат възможностите на авангардните биотехнологии за създаване на принципно нов тип щамове микроводорасли, които да обслужват този нов тип индустрия. Тези технологии обаче са изправени пред решаването на няколко критични въпроса. Въпреки огромният си потенциал, природно съществуващите видове водорасли не могат да решат въпроса за биогоривата, подобно на това както природно съществуващите растения не могат да изхранят човечеството. Следователно, необходими са усилия за създаване на „културни“ или „енергетични“ водорасли с променени гени и метаболитни свойства, способни да отговарят на изискванията на една конкурентноспособна промишленост. Очевидно, тези „културни“ микроводорасли трябва да отговарят на минимум две основни изисквания - способност за бързо натрупване на големи количества биомаса и ефективна синтеза на промишлено важните метаболити. Това вече е осъзнато в някои страни, които изпитват остър недостиг на въглеродороди (Япония, Китай, Израел, Индия и др.) или имат много развита научна инфраструктура, като САЩ. На фона на бурните изследователски работи, провеждани в другите страни прави впечатление пренебрежението към този проблем у нас. Не се откриват данни за финансиране на научни изследвания, а по данни от печата и Интернет разполагаме само с една фирма от Велико Търново, която се специализира в производството на фотобиореактори и фирмата Greon от Варна, която съобщава за първата инсталация за добив на биомаса от водорасли в България. Дейността на тази фирма е свързана с добива на биомаса от зелени микроводорасли от вида *Botryococcus braunii*, а данни за количествата произведен продукт не могат да бъдат открити. Очевидно приведените примери са крайно недостатъчни за нуждите на България и са необходими сериозни усилия за стартиране на системни работи в областта на водорасловите биогорива.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лахчев К., (Биоетанол: производство, перспективи и проблеми), Екологично инженерство и опазване на околната среда, №1, 2009, 58-69.
2. Armbrust E., J.A. Berges, C. Bowler, et al., (The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism), Science, Vol. 306, 2004, 79–86.
3. Babadzhanyan A., et al., (Chemical Composition of *Spirulina Platensis* Cultivated in Uzbekistan), In: Chemistry of Natural Compounds, Vol. 40, 2004, 3-7.
4. Beer L., E.S. Boyd, J.W. Peters, M.C. Posewitz, (Engineering algae for biohydrogen and biofuel production), Curr Opin Biotechnol., Vol. 20, 2009, 264-71.
5. Blanc G., G. I. Duncan, M. Agarkova, J. Borodovsky, A. Gurnon Kuo, E. Lindquist, et. al., (The *Chlorella variabilis* NC64A Genome Reveals Adaptation to Photosymbiosis, Coevolution with Viruses, and Cryptic Sex), The Plant Cell, 2010; DOI: 10.1105/tpc.110.076406
6. Bowler C., A.E. Allen, J.H. Badger, J. Grimwood, K. Jabbari, et al., (The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes), Nature, Vol. 456, 2008, 239–244.
7. Chisti Y., (Biodiesel from microalgae), Biotechnol Adv., Vol. 25, May-Jun 2007, 294-306.
8. *Chlamydomonas reinhardtii*. <http://genome.jgi-psf.org/Chlre3/Chlre3.home.html/>,
9. *Chlamydomonas reinhardtii*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
10. *Chlamydomonas reinhardtii* <http://www.chlamy.org/chloro.htm/>.
11. Cournac L., F. Musa, L. Bernarda, G. Guedeneya, P. Vignais, G. and Peltie, (Limiting steps of hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Synechocystis* PCC 6803 as analysed by light-induced gas exchange transients), International Journal of Hydrogen Energy, Vol. 27, 2002, 1229–1237.
12. Dauvillée D., P. Deschamps, J-P. Ral, C. Plancke, J-L. Putaux, J. Devassine, A. Durand-Terrasson, A. Devin, and G. Ball, (Genetic dissection of floridean starch synthesis in the cytosol of the model dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*), Proc Natl Acad Sci U S A., Vol. 15, 2009, 21126–21130.
13. Dawson H. N., R. Burlingame and A. C. Cannons, (Stable transformation of *Chlorella*: rescue of nitrate reductase-deficient mutants with the nitrate reductase gene), Curr. Microbiol., Vol. 35, 1997, 356–362.
14. Dehesh K., A. Jones, D. S. Knutzon and T. A. Voelker, (Production of high levels of 8:0 and 10:0 fatty acids in transgenic canola by overexpression of Ch FatB 2, a thioesterase cDNA from *Cuphea hookeriana*), Plant J., Vol. 9, 1996, 167–172.
15. Dennis M., and P. E. Kolattukudy, (A cobalt-porphyrin enzyme converts a fatty aldehyde to a hydrocarbon and CO) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., Vol. 89, 1992, 5306–5310.
16. Dexter J., and P. Fu, (Metabolic engineering of cyanobacteria for ethanol production), Energy Environ. Sci., Vol. 2, 2009, 857–864.
17. Dunahay T. G., E. E. Jarvis, and P. G. Roessler, (Genetic transformation of the diatoms *Cyclotella cryptica* and *Navicula saprophila*) J. Phycol., Vol. 31, 1995, 1004–1011.
18. Field C.B., M.J. Behrenfeld, J.T. Randerson, P. Falkowski, (Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components), Science, Vol. 281, 1998, 237–240.
19. Gouveia L., A.C. Oliveira, (Microalgae as a raw material for biofuels production), J Ind Microbiol Biotechnol., Vol. 36, Feb 2009, 269-74.
20. Greenwell H.C., L.M. Laurens, R.J. Shields, R.W. Lovitt, K.J. Flynn, (Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges), J R Soc Interface., Vol. 6, 2010, 703-26.
21. Hanai T., S. Atsumi, J. Liao, (Engineered synthetic pathway for isopropanol production in *Escherichia coli*), Appl. Environ. Microbiol., Vol. 73, 2007, 7814–7818.
22. <http://www.sciencedaily.com/releases/2008/06/080626145543.htm>
23. Hu Q., M. Sommerfeld, E. Jarvis, M. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert and A. Darzins, (Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances), Plant J., Vol. 54, 2008, 621–639.
24. Kalscheuer R., T. Stolting, and A. Steinbuchel, (Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production), Microbiology, Vol. 152, 2006, 2529–2536.
25. Lee J. W., L. Mets and E. Greenbaum, (Improvement of photosynthetic CO₂ fixation at high light intensity through reduction of chlorophyll antenna size), Appl. Biochem. Biotechnol., Vol. 98, 2002, 37–48.
26. Li Y., D. Han, G. Hu, D. Dauvillee, M. Sommerfeld, S. Ball, Q. Hu, (*Chlamydomonas* starchless mutant defective in ADP-glucose pyrophosphorylase hyperaccumulates triacylglycerol), Metab Eng., Vol.12, 2010, 387-91.
27. Maróti G., Y. Tong, S. Yooseph, H. Baden-Tillson, H. Smith, K. L. Kovács, M. Frazier, J. Craig Venter and Xu Qing, (Discovery of [NiFe] Hydrogenase Genes in Metagenomic DNA: Cloning and Heterologous Expression in *Thiocapsa roseopersicina*), Appl Environ Microbiol., Vol. 75, 2009, 5821–5830.
28. Morweiser M., O. Kruse, B. Hankamer, C. Posten, (Developments and perspectives of photobioreactors for biofuel production), Appl Microbiol Biotechnol., Vol. 87, 2010, 1291-301.
29. Mussgnug J. H., S. Thomas-Hall, J. Rupprecht, A. Foo, V. Klassen, A. McDowall, P. M. Schenk, O. Kruse, and B. Hankamer, (Engineering photosynthetic light capture: impacts on improved solar energy to biomass conversion), Plant Biotechnol., Vol. 5, 2007, 802–814.
30. Poulsen N., N. Kroger, (A new molecular tool for transgenic diatoms), FEBS J., Vol. 272, 2005, 3413–3423.

31. Radakovits R., R. E. Jinkerson, Al Darzins, M. C. Posewitz, (Genetic Engineering of Algae for Enhanced Biofuel Production), *EUKARYOTIC CELL*, Vol. 9, 2010, 486–501.
32. Ramachandra T. V., D. M. Mahapatra, B. Karthick, and R. Gordon, (Milking diatoms for sustainable energy: biochemical engineering versus gasoline-secreting diatom solar panels), *Ind. Eng. Chem. Res.*, Vol. 48, 2009, 8769–8788.
33. Rodolfi L., G. Chini Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, M.R. Tredici, (Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor), *Biotechnol Bioeng.*, Vol. 102, 2009, 100–112.
34. Scott S.A., M.P. Davey, J.S. Dennis, I. Horst, C.J. Howe, D.J. Lea-Smith, A.G. Smith, (Biodiesel from algae: challenges and prospects), *Curr Opin Biotechnol.*, Vol. 21, 2010, 277–86.
35. Service R.F., (Biofuels. ExxonMobil fuels Venter's efforts to run vehicles on algae-based oil), *Science*, Vol. 5939, 2009, 325–379.
36. Sheehan J., T. Dunahay, J. Benemann, and P. Roessler, (A look back at the US Department of Energy's Aquatic Species Program—biodiesel from algae), National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado, 1998.
37. Shen B., R. G. Jensen, H. J. Bohnert, (Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts) *Plant Physiol.*, Vol. 113, 1997, 1177–1183.
38. Service R.F., (Biofuels. ExxonMobil fuels Venter's efforts to run vehicles on algae-based oil), *Science*, Vol. 5939, 2009, 325–379.
39. Sheveleva, E., W. Chmara, H. J. Bohnert, and R. G. Jensen, (Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum L.*), *Plant Physiol.*, Vol. 115, 1997, 1211–1219.
40. Shigeoka S., T. Ishikawa, M. Tamoi, Y. Miyagawa, T. Takeda, Y. Yabuta, K. Yoshimura, (Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes), *J. Exp. Bot.*, Vol. 53, 2002, 1305–1319.
41. Takeda T., K. Miyao, M. Tamoi, H. Kanaboshi, H. Miyasaka, S. Shigeoka, (Molecular characterization of glutathione peroxidase-like protein in halotolerant *Chlamydomonas* sp. W80), *MINIREVIEWS EUKARYOT. CELL Physiol. Plant.*, Vol. 117, 467–475.
42. Tokusoglu O., M.K. Unal, (Biomass Nutrient Profiles of Three Microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*), *Journal of Food Science*, Vol. 68, 2003, 4–8.
43. Vigeolas H., P. Waldeck, T. Zank, P. Geigenberger, (Increasing seed oil content in oil-seed rape (*Brassica napus L.*) by over-expression of a yeast glycerol-3-phosphate dehydrogenase under the control of a seedspecific promoter), *Plant Biotechnol. J.*, Vol. 5, 2007, 431–441.
44. Voelker T. A., A. C. Worrell, L. Anderson, J. Bleibaum, C. Fan, D. J. Hawkins, S. E. Radke, H. M. Davies, (Fatty acid biosynthesis redirected to medium chains in transgenic oilseed plants), *Science*, Vol. 257, 1992, 72–74.
45. Weissman J. C., D. M. Tillett, (Design and operation of an outdoor microalgae test facility), In: Bollmeier (W. S. and S. Sprague), *Aquatic Species Program Annual Report*, Solar Energy Research Institute, Golden, CO September 1989, 2321–3579.
46. Wykoff D. D., J. P. Davies, A. Melis, A. R. Grossman, (The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*), *Plant Physiol.*, Vol. 117, 1998, 129–139.
47. Yu T.S., H. Kofler, R. E. Hausler, D. Hille, U.I. Flugge, S. C. Zeeman, A. M. Smith, J. Kossmann, J. Lloyd, G. Ritte, M. Steup, W.L. Lue, J. Chen, and A. Weber, (The Arabidopsis *sex1* mutant is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter), *Plant Cell*, Vol. 13, 2001, 1907–1918.
48. Yu T.S., S. C. Zeeman, D. Thorneycroft, D. C. Fulton, H. Dunstan, W.L. Lue, B. R. Hegemann, S.Y. Tung, T. Umemoto, A. Chapple, D.L. Tsai, S.M. Wang, A. M. Smith, J. Chen, S. M. Smith, “Alfa-Amylase is not required for breakdown of transitory starch in Arabidopsis leaves), *J. Biol. Chem.*, Vol. 280, 2005, 9773–9779.
49. Yuan L., T. A. Voelker, D. J. Hawkins, (Modification of the substrate specificity of an acyl-acyl carrier protein thioesterase by protein engineering), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Vol. 92, 1995, 10639–10643.

Доц. Кънчо Лахчев
Малина Дойнова

Институт по микробиология „Стефан Ангелов”,
Българска Академия на Науките
ул. „Акад. Г. Бончев” №26
1113 София, България
Тел: + (3592) 979 31 79
Fax: + (3592) 87 00 109
E-mail: kantcholahtchev@microbio.bas.bg
E-mail: malina_19@abv.bg

Assoc. Prof. Kantcho Lahtchev
Malina Doynova

“The Stefan Angelov” Institute of Microbiology,
Bulgarian Academy of Science
26, “Acad. G. Bontchev” Str.
1113 Sofia, Bulgaria
Tel: + (3592) 979 31 79
Fax: + (3592) 87 00 109
E-mail: kantcholahtchev@microbio.bas.bg
E-mail: malina_19@abv.bg