

УДК 582.232

БІОХІМІЧНІ ТА МОЛЕКУЛЯРНІ АСПЕКТИ ФОТОПРОДУКУВАННЯ ВОДНЮ

© 2010 р. **О. В. Якімова, Н. О. Білявська**

*Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного
Національної академії наук України
(Київ, Україна)*

Водень є екологічно безпечним та економічно вигідним видом палива. Вважається перспективною здатність деяких фотосинтезуючих організмів, особливо ціанобактерій та мікроводоростей, перетворювати сонячну енергію на водень. В основі цієї здатності лежить процес фотосинтезу. За анаеробних умов організми-продуценти здатні переключати метаболізм із фотоавтотрофного продукування кисню на фотогетеротрофний шлях продукування водню. Одноклітинна зелена водорість *Chlamydomonas reinhardtii* вважається найбільш перспективним продуцентом водню через ряд переваг. Найшвидшим і економічно виправданим способом досягнення анаеробіозу для неї є переведення культури водорості на безсіркове середовище. При цьому в клітині мікроводорості переривається світлова фаза фотосинтезу внаслідок пошкодження білка D1 другої фотосистеми. Після встановлення повного анаеробіозу активується робота фередоксин-залежних гідрогеназ, які є надзвичайно чутливими навіть до найменшої кількості кисню. Через велику кількість регуляторних ділянок та метаболічних відгалужень процес світлозалежного біопродукування водню є складним і потребує подальшого вивчення.

Ключові слова: *Chlamydomonas reinhardtii*, анаеробіоз, гідрогеназа, дефіцит сірки, зелені водорості, фотопродукування водню, фотосинтез

Утворення водню із води фотосинтетичними організмами має важливе прикладне значення для людства як екологічно безпечний та економічно вигідний вид палива. Для виробництва біоводню як палива необхідні лише відновні природні ресурси: вода, енергія Сонця і власне організми-продуценти. Крім того, цей альтернативний вид палива не спричиняє викидів вуглекислого газу в атмосферу. Процес продукування водню до того ж може бути поєднаний з процесом очищення води морськими водоростями.

В основі всіх процесів світлозалежного виділення організмами водню лежить процес фотосинтезу. Серед фотосинтезуючих організмів, здатних до виділення водню, найбільшої уваги заслуговують мікроводорості, гетероцистні ціанобактерії та пурпурові несірчані бактерії (Золотарьова та ін., 2008). Мікроводорості та

ціанобактерії мають дві фотосистеми, тому вони здатні до розкладання води та виділення кисню. Бактерії, що мають одну фотосистему (пурпурові та зелені сірчані й несірчані бактерії), не здатні до виділення кисню і для здійснення фотосинтезу потребують більш відновлених донорів електронів, ніж вода (Золотарева, 2010).

Вважається, що існують три шляхи потоку електронів при продукуванні водню – два фотозалежних і один темновий (ферментативний).

Перший шлях фотопродукування – прямий біофотоліз – залежить як від першої фотосистеми (ФС I), так і від другої (ФС II). Він включає світлоіндуковане окиснення води у ФС II, перехід електронів від ФС II до ФС I, світлозалежне збудження електронів у ФС I та наступне відновлення фередоксину (Фд) — фізіологічного донора електронів для гідрогенази *Chlamydomonas reinhardtii*. Залежно від штаму і умов культивування мікроводорості, прямий біофотоліз залучає 50-90% загального потоку

Адреса для кореспонденції: Якімова Ольга Володимирівна, Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, вул. Терещенківська, 2, Київ, 01601, Україна;
e-mail: membrana@ukr.net

електронів у фотопродукуванні водню (Kosourov et al., 2003).

Другий шлях фотопродукування – непрямої біофотоліз. Його було досліджено при обробці культури водоростей *C. reinhardtii* інгібітором N,N-дициклогексилкарбодімідом (ДЦКД), що блокує перенесення електронів від ФС II на пластохіноновий пул (Ben-Amotz et al., 1975). Донором електронів для непрямого біофотолізу слугує переважно крохмаль. Утворений в результаті НАД(Ф)Н нефотохімічно відновлює пластохінон, який, в свою чергу, віддає електрони на ФС I, остання ж світлозалежно відновлює Фд. Цей шлях не залежить від активності ФС II, проте залежить від активності ферменту НАД(Ф)Н-пластохінон-оксидоредуктази (Bennoun, 2001; Mus et al., 2005).

Темновий шлях пов'язаний із катаболізмом крохмалю. Він ще недостатньо вивчений, проте вважається аналогом гетероферментативного шляху продукування водню, який був виявлений у анаеробних бактерій (Saint-Amans et al., 2001) та у амітохондріальних еукаріотів (Dyall et al., 2004). Для цих організмів характерним є спряження процесів окислення пірувату і відновлення Фд за допомогою ферменту піруват-ферредоксин-оксидоредуктази.

Серед організмів, які продукують водень, найбільш перспективною виявилася одноклітинна зелена мікроводорість *C. reinhardtii*, яка є добре вивченою, невибагливою до умов культивування і широко розповсюдженою у природі. *C. reinhardtii* здатна синтезувати дві Фд-залежні гідрогенази *hydA1* (hydrogenase A1) та *hydA2* (Forestier et al., 2003). Обидві гідрогенази містять Fe, мають високу активність та синтезуються за анаеробних умов. Ці ферменти надзвичайно чутливі навіть до незначної кількості кисню. З метою усунути інактивуючу дію кисню проводяться дослідження у двох напрямках: генетична модифікація гідрогеназ та розділення процесів виділення кисню і водню в часі. Так, на основі даних, отриманих з використанням методів молекулярної динаміки, показано, що водень може проникати до активного центру гідрогенази через велику кількість каналів, тоді як кисень проходить лише за двома каналами (Ghirardi et al., 2005). Пропонується спрямований мутагенез гідрогенази, який призводить до заміни окремих амінокислот, та зменшення розміру каналів, якими кисень може надійти до активного центру. Роботи зі створення модифікованих таким чином гідрогеназ ще не завершені.

Розділення у часі процесів виділення кисню та водню може відбуватися, якщо для мікроводоростей створити стресові умови шляхом вилучення сірки (Melis et al., 2000). Усунення такого важливого компонента поживного середовища як сірка сприяє переходу мікроводорості від фотоавтотрофного до фотогетеротрофного типу живлення (Melis et al., 2001). У наступних роботах вчених з кількох лабораторій цей процес було досліджено докладніше. Зокрема, дослідники виділили 5 фаз переходу культури водоростей до умов дефіциту сірки (Kosourov et al., 2002), виявили особливості поведінки ФС II (Антал і др., 2001), визначили вплив інтенсивності світла (Laurinavichene et al., 2004), типу біореактора та концентрації хлорофілу (Giannelli et al., 2009), рН середовища (Kosourov et al., 2003), описали морфологічні та біохімічні особливості культур за цих умов (Zhang et al., 2002). Проте цих даних було недостатньо ані для повного розуміння процесу біофотолізу зеленими водоростями, ані для практичного застосування феномену фотопродукування водню для одержання біопалива. Складність функціонування біохімічної машини, яка задіяна в біофотолізі води, значною мірою визначається наявністю великої кількості регуляторних ділянок та метаболічних відгалужень, що конкурують за субстрат. Тільки узагальнивши отримані дослідним шляхом дані, можна скласти цілісну картину того, що відбувається у клітинах мікроводорості *C. reinhardtii* за умов відсутності сірки.

Як було сказано вище, переведення культури зелених водоростей на безсіркове середовище сприяє розділенню у часі процесів виділення кисню та водню, в результаті чого водорості стають здатними підтримувати фотозалежне утворення водню протягом близько чотирьох діб, що свідчить про потенціал цих організмів до продукування значної кількості водню (Seibert et al., 2008).

Втрата сірки клітинами *C. reinhardtii* супроводжується як загальною, так і специфічною реакціями. Загальна реакція на усунення макроелемента включає зменшення росту і поділу клітин, збільшення синтезу запасних вуглеводів, модулювання основних метаболічних процесів, в тому числі зниження інтенсивності фотосинтезу. Специфічна реакція включає підвищення синтезу SO_4^{2-} -транспортерів, гідролітичних ферментів, перехід на функціональні аналоги сірковмісних білків та ін. Якщо ж втрата сірки супроводжується також переходом на

інший тип метаболізму, кількість змін у клітині збільшується на порядок.

Молекулярний аналіз виявив, що у відповідь на анаеробні умови, що супроводжуються посиленням виділення водню, у клітині-продуценті активуються такі гени: 22 гени фотосинтезу, 8 генів метаболізму сірки, 4 гени метаболізму вуглецю, 5 генів протеолізу, 4 гени амінокислотного синтезу, 10 генів транскрипції і трансляції, 3 гени редокс-циклів, 27 генів інших шляхів і процесів, а також 83 невідомих за функцією генів (Timmins et al., 2009). Ці дані дають підстави вважати, що зміни, які відбуваються в геномі клітин мікрободорості внаслідок усунення сірки, є кардинальними і досі недостатньо вивченими.

Для оцінки стану фотосинтетичного апарату клітин-продуцентів *in vivo* за умов впливу різних стресорів (в тому числі і сіркового голодування) широко використовується вимірювання параметрів флюоресценції хлорофілу. Метод індукції флюоресценції хлорофілу дає інформацію про рівень відновлення Q_A – первинного хінонового акцептора електронів від ФС II. Максимальний рівень флюоресценції досягається тоді, коли всі центри Q_A повністю відновлені, наприклад, у присутності ДЦКД, який блокує електронний транспорт між ділянками Q_A і Q_B . Проведені дослідження свідчать, що в перший день переведення культури *S. reinhardtii* на безсіркове середовище максимальний рівень флюоресценції більш або менш однаковий для оброблених та необроблених ДЦКД водоростей, тобто, в перші години безсіркового культивування в культурі *S. reinhardtii* відбувається перевідновлення електрон-транспортного ланцюга внаслідок пошкодження функціонування ФС II.

Ступінь такого перевідновлення і розвиток фотодеструктивних процесів у ФС II залежать від ефективності функціонування таких фотозахисних процесів, як утворення у світлозбиральних комплексах (СЗКII) каротиноїдів антраксантину і зеаксантину (ксантофіловий цикл), а також перерозподіл СЗКII між ФС II і ФС I (перехід між станами 2 і 1). Дослідження параметрів флюоресценції підтвердили, що в перші години переведення на безсіркове середовище в клітинах *S. reinhardtii* дійсно спостерігався такий перехід в стан 2. Механізм переходу в цей стан полягає в міграції певної частини популяції СЗКII від ФС II до ФС I внаслідок фосфорилування цього поліпептиду за участю кінази, активність якої контролюється редокс-станом пулу хінонів. Відновлений плас-

тохінон змінює конформацію цитохрому b_{6f} , прикріплюючись до нього в місці зв'язування з кіназою, внаслідок чого остання активується. Як відомо, цей процес надзвичайно важливий для регуляції розподілу енергії між ФС II та ФС I, особливо у одноклітинних водоростей, де в ньому бере участь до 80% клітинного СЗКII (Delosme, 1996). Станом на 6 годину безсіркового культивування співвідношення ФС II/ФС I було таким, як і для клітин, що освітлювалися далеким червоним світлом (стан 1 індукується за освітлення довжиною хвилі $\lambda > 714$ нм) (Wykoff et al., 1998). Пластохіноновий пул на цю годину був більш-менш окисненим. У цей час збільшувалася активність фіксації CO_2 і починалося надмірне накопичення крохмалю (у 8-20 разів більше, ніж у організмів за умов контролю) (Tsygankov et al., 2002). Такий відтік електронів, ймовірно, є необхідним для відновних біосинтетичних процесів.

Оскільки кисень продовжував споживатися мітохондріями, а новий не утворювався внаслідок світлозалежного розкладання води, в клітинах водорості швидко настав анаеробіоз (Antal et al., 2003), який спричиняв активацію ферментів гідрогеназ $hydA1$ та $hydA2$, про що свідчило виявлення відповідних функціональних білків вже після 3-4 годин культивування без сірки (Forestier et al., 2003), і виділення водню, починаючи з 5 години такого культивування (Antal et al., 2003). Акумуляція крохмалю призупинялася і змінювалася його деградацією (Tsygankov et al., 2002), а це, в свою чергу, призводило до накопичення відновних еквівалентів, а також пірувату, який дисимілюється до ацетату, форміату (Happe et al., 2002) та, як варіант, до етанолу (Kosourov et al., 2003). Зрозуміло, що за анаеробних умов не відбувається фіксації CO_2 , що підтверджується втратою активності ферменту рибулозо-1,5-бісфосфаткарбоксилази/оксигенази – РБФК/О (Zhang et al., 2002).

Значення крохмалю в фотопродукуванні водню слід розглянути окремо, оскільки, безумовно, його роль вважається визначальною, проте дані експериментальних досліджень часом суперечать одне одному.

Крохмаль у зелених водоростей міститься в хлоропласті: щільні крохмальні гранули оточують базально розташований піреноїд. Лібеззар зі співавт. показали, що структура (зокрема вміст амілози) та склад крохмалю в клітинах *S. reinhardtii* різко змінювалися залежно від умов культивування (Libessart et al., 1995). Як зазначалося вище, надмірне накопичення крохмалю

спостерігалось на початкових стадіях переведення культури мікроводоростей на безсіркове середовище, тоді як інтенсивне розкладання крохмалю – вже на пізніх етапах.

Більшість дослідників вважають, що виділення водню прямо пропорційно залежить від кількості накопиченого крохмалю в клітині-продуценті мікроводорості. Так, Крузе та співавт. було зафіксовано збільшення виходу фотопродукування водню мутантом *stm6 C. reinhardtii* порівняно з материнським штамом (Kruse et al., 2005). У штаму *stm6 C. reinhardtii* в результаті інсерційної мутації був відсутній синтез білка МОС1, який бере участь у побудові мітохондріального дихального ланцюга на світлі, внаслідок чого порушується перехід між станами 1 та 2, знижується активність ФС II і відбувається надмірне накопичення крохмалю. Оскільки інші мутанти, у яких також був порушений перехід між станами, не виявляли здатності до утворення такої ж підвищеної кількості водню, з'явилося припущення, що характерний для штаму *stm6* високий рівень виділення водню є наслідком синергічного ефекту порушення циклічного транспорту, редукованої активності ФС II та надмірного накопичення крохмальних зерен. У роботі Уайта та Меліса на прикладі мутанта *C. reinhardtii*, який не міг накопичувати запасні речовини внаслідок відсутності ферменту РБФК/О, було продемонстровано зменшення рівня фотопродукування водню (White, Melis, 2006).

Проте, на відміну від наведених вище свідчень про роль крохмалю, в роботі французьких дослідників (Chochois et al., 2009) було показано, що мутанти *C. reinhardtii*, які були нездатними синтезувати крохмаль (дефектні за геном *stab*), за умов усунення сірки продукували таку ж кількість водню, що й материнський штам. Ці мутантні штами виявили значно нижчий рівень фотопродукування водню при обробці їх ДЦКД (імітування умов непрямого біофотолізу), ніж у материнського штаму. Тобто, згідно з цими даними, виділення водню може відбуватися і за відсутності крохмалю, оскільки останній важливий лише для непрямого шляху фотопродукування як донор електронів для пулу пластохінонів.

Ці ж автори наводять й інший важливий висновок: індукція гідрогенази за умов анаеробіозу регулюється світлом внаслідок протонного градієнту, що утворюється циклічним потоком електронів навколо ФС I (Chochois et al., 2009). Підставою для цього були спостережен-

ня, що індукція активності гідрогенази у мутантного штаму *stab* значно послаблювалася у темряві і відновлювалася світловою експозицією, а також була нечутливою до дії ДЦКД, проте вона значно інгібувалася обробкою мутантних мікроводоростей інгібітором цитохром-*b₆f*-комплексу або роз'єднувачів. Окрім того, було показано, що збільшення ступеня відновлення пластохінонового пулу корелює зі збільшенням рівня експресії генів гідрогеназ (Posewitz, 2004), хоча поки що не існує прямих доказів механізмів, які б пояснювали ці ефекти.

На пізніх термінах безсіркового культивування відбувалося зменшення кількості крохмалю, причому лише одночасно з виділенням водню. Якщо ж останній процес припинявся, рівень крохмалю залишався високим незалежно від втрати фотосинтетичної активності (Cao et al., 2001). Збільшення в середовищі культивування утворених внаслідок катаболізму крохмалю таких малих органічних молекул, як форміат, ацетат та етанол (Winkler et al., 2002), дає підстави для висновку, що на пізніх стадіях культивування на безсірковому середовищі крохмаль, з одного боку, передає електрони на пул пластохінонів в хлоропластах і, з іншого боку, підтримує мітохондріальне дихання для більш швидкого розвитку анаеробіозу в клітині мікроводорості (Melis et al., 2007).

За умов відсутності сірки фотопродукування водню з часом зупиняється, ймовірно, через генералізацію негативних ефектів на клітинному рівні. Тому для практичного застосування фотозалежного біопродукування водню важливим є питання збільшення ефективності виходу продукту.

Оскільки фотосинтетична ємність клітин зелених водоростей, переведених на безсіркове середовище, складає 10% від рівня контролю, теоретична ефективність перетворення світла у такої культури не буде перевищувати 1%, тоді як мінімальна комерційно обґрунтована ефективність має бути не нижче 10% (Rao, Cammack, 2001). Максимальна теоретична ефективність перетворення світла на енергію водню для зелених водоростей складає близько 10-13% (Ghirardi et al., 2006). Проте ця ефективність за високої інтенсивності світла обмежується реакціями переносу електронів під час фотосинтезу і може бути досягнута лише мутантами з короткою світлозбиральною антеною (Melis, 1998).

Подовження періоду фотопродукування наразі досягається двома шляхами: циклічною

заміною середовища з сіркою та середовища без неї (Ghirardi et al., 2000) або просторовим розділенням процесів виділення кисню та водню у спеціальному фотобіореакторі (Fedorov, 2005). Для збільшення ефективності фотоковерсії випробовують й інші підходи, зокрема, пошук мутантів. Так, Melis зі співавт. за допомогою технології створення антисенсової РНК отримали штам, дефектний за геном *sulp*, що кодує білок, який транспортує сульфати до хлоропласту (Chen, Melis, 2004). Для таких штамів співвідношення фотосинтетично виділеного кисню до поглинутого кисню близьке до одиниці, що дозволяє культурі мікроводорості переходити до анаеробіозу навіть у присутності незначних концентрацій сульфатів (до 75 мкмоль).

Мутанти *C. reinhardtii*, отримані шляхом делецій певних амінокислот на Q_B -зв'язуючому сайті білка D1, характеризувалися більш високою чутливістю до фотоінгібування, зменшенням кількості хлорофілу в клітинах, більш високим співвідношенням дихання до фотосинтезу, більшим рівнем накопичення вуглеводів під час аеробної фази, вищим рівнем синтезу пігментів ксантофілового циклу. Ці відмінності призводили до значного (від 5- до 12-18-разового залежно від мутанта) збільшення рівня продукування водню порівняно з материнським штамом (Torzillo et al, 2009; Faraloni, Torzillo, 2010).

Таким чином, можна підсумувати, що точками фокусування дослідницьких зусиль в сфері вивчення фотопродукування водню мають стати такі напрями: по-перше, вирішення проблеми оксигенної чутливості процесів транскрипції, дозрівання та досягнення оптимальної каталітичної активності ферментом гідрогеназою, по-друге, з'ясування ролі крохмалю в експресії генів, що кодують гідрогенази, і, по-третє, з'ясування механізмів конкуренції за відновні еквіваленти, що надходять від Фд до ланцюга циклічного електронного транспорту, можливостей блокування цих механізмів та створення мутантів, що відповідають цій меті.

ЛІТЕРАТУРА

Антал Т. К., Кренделева Т. Е., Лауринавичене Т. В. и др. Связь активности фотосистемы 2 микроводорослей *Chlamydomonas reinhardtii* с выделением водорода при серном голодании // Докл. АН [Россия]. – 2001. – Т. 381, № 1. – С. 119-122.

Золотарева О.К., Шнюкова Е.И., Подорванов В. Микроводоросли как продуценты фотоводорода // Альгология. – 2010. – № 2. – С. 224-249.

Золотарьова О.К., Шнюкова Є.І., Сиваш О.О. та ін. Перспективи використання мікроводоростей у біотехнології. – К.: Альтерпрес, 2008. – 234 с.

Ben-Amotz A., Gibbs M. H₂ metabolism in photosynthetic organisms. II. Light-dependent H₂ evolution by preparations from *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* and spinach // Biochem. Biophys. Res. Comm. – 1975. – V. 64. – P. 355-359.

Bennoun P. Chlororespiration and the process of carotenoid biosynthesis // Biochim. Biophys. Acta. – 2001. – V. 1506. – P. 133-142.

Cao H., Zhang L., Melis A. Bioenergetic and metabolic processes for the survival of sulfur-deprived *Dunaliella salina* (Chlorophyta) // J. Appl. Phycol. – 2001. – V. 13. – P. 25-34.

Chochois V., Dauvillee D., Beyly A. et al. Hydrogen production in *Chlamydomonas*: photosystem II-dependent and -independent pathways differ in their requirement for starch metabolism // Plant Physiol. – 2009. – V. 151. – P. 631-640.

Delosme R., Olive J., Wollman F.A. Changes in light energy distribution upon state transition: an in vivo photoacoustic study of the wild type and photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* // Biochim. Biophys. Acta. – 1996. – V. 1273. – P. 150-158.

Dyall S.D., Yan W., Delgadillo-Correa M.G. et al. Non-mitochondrial complex I proteins in a hydrogenosomal oxidoreductase complex // Nature. – 2004. – V. 431. – P. 1103-1107.

Faraloni C., Torzillo G. Phenotypic characterization and hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii* Q_B -binding D1-protein mutants under sulfur starvation: changes in chl fluorescence and pigment composition1 // J. Phycol. – 2010. – V. 46. – P. 650-658.

Fedorov A., Kosourov S., Ghirardi M. et al. Continuous hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii* // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2005. – V. 121. – P. 403-412.

Forestier M., King P., Zhang L. et al. Expression of two [Fe]-hydrogenases in *Chlamydomonas reinhardtii* under anaerobic conditions // Eur. J. Biochem. – 2003. – V. 270, N 13. – P. 2750-2758.

Ghirardi M. L. Hydrogen production by photosynthetic green algae // Indian J. Biochem. Biophys. – 2006. – V. 43. – P. 201-210.

Ghirardi M.L., King P.W., Posewitz M.C. et al. Approaches to developing biological H₂-photoproducing organisms and processes // Biochemical Society Transactions. – 2005. – V. 33. – P. 70-72.

- Ghirardi M.L., Zhang L., Lee J.W. et al.* Microalgae: A green source of renewable H₂ // Trends Biotechnol. – 2000. – V. 18. – P. 506-551.
- Giannelli L., Scoma A., Torzillo G.* Interplay between light intensity, chlorophyll concentration and culture mixing on the hydrogen production in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures grown in laboratory photobioreactor // Biotechnol. Bioeng. – 2009. – V. 104. – P. 76-90.
- Happe T., Hemschemeier A., Winkler M. et al.* Hydrogenases in green algae: do they save the algae's life and solve our energy problems? // Trends Plant Sci. – 2002. – V. 7. – P. 246-250.
- Kosourov S., Seibert M., Ghirardi M. L.* Effects of extracellular pH on the metabolic pathways in sulfur-deprived, H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* cultures // Plant Cell Physiol. – 2003. – V. 44. – P. 146-155.
- Kosourov S., Tsygankov A., Seibert M. et al.* Sustained hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: effects of culture parameters // Biotechnol. Bioeng. – 2002. – V. 78, № 7. – P. 731-740.
- Laurinavichene T., Tolstygina I., Tsygankov A.* The effect of light intensity on hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* // J. Biotechnol. – 2004. – V. 114. – P. 143-151.
- Libessart N., Maddelein M.L., van den Koornhuysen N. et al.* Storage, photosynthesis and growth: the conditional nature of mutations affecting starch synthesis and structure in *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Cell. – 1995. – V. 7. – P. 1117-1127.
- Timmins M., Zhou W.X., Rupprecht J. et al.* The metabolome of *Chlamydomonas reinhardtii* following induction of anaerobic H₂ production by sulfur depletion // J. Biol. Chem. – 2009. – V. 284, № 35. – P. 23415-23425.
- Melis A.* Photosynthetic H₂ metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* (unicellular green algae) // Planta. – 2007. – V. 226. – P. 1075-1086.
- Melis A., Happe T.* Hydrogen production: green algae as a source of energy // Plant Physiol. – 2001. – V. 127, № 3. – P. 740-748.
- Melis A., Neidhardt J., Benemann J.* *Dunaliella salina* (Chlorophyta) with small chlorophyll antenna sizes exhibit higher photosynthetic productivities and photon use efficiencies than normally pigmented cells // J. Appl. Phycol. – 1998. – V. 10. – P. 515-525.
- Melis A., Zhang L., Forestier M. et al.* Sustained photo-biological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Physiol. – 2000. – V. 122. – P. 127-136.
- Mus F., Cournac L., Cardellini W. et al.* Inhibitor studies on non-photochemical plastoquinone reduction and H₂ photoproduction in *Chlamydomonas reinhardtii* // Biochim. Biophys. Acta. – 2005. – V. 1708. – P. 322-332.
- Posewitz M.C., Smolinski S.L., Kanakagiri S. et al.* Hydrogen photoproduction is attenuated by disruption of an isoamylase gene in *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Cell. – 2004. – V. 16. – P. 2151-2163.
- Rao K.K., Cammack R.* Producing hydrogen as a fuel // Hydrogen as a Fuel. – 2001. – P. 201-330.
- Saint-Amans S., Girbal L., Andrade J. et al.* Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 grown on glucose-glycerol mixtures // J. Bacteriol. – 2001. – V. 183. – P. 1748-1754.
- Seibert M., King P.W., Posewitz M.C. et al.* Photosynthetic water-splitting for hydrogen production // Bioenergy / Ed. J. Wall. – Washington, D.C.: ASM Press, 2008. – P. 273-291.
- Torzillo G., Scoma A., Faraloni C. et al.* Increased hydrogen photoproduction by means of a sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* D1 protein mutant // Int. J. Hydrogen Energy. – 2009. – V. 34. – P. 4529-4536.
- Tsygankov A., Kosourov S., Seibert M. et al.* Hydrogen photoproduction under continuous illumination by sulfur-deprived, synchronous *Chlamydomonas reinhardtii* cultures // Int. J. Hydrogen Energy. – 2002. – V. 27. – P. 1239-1244.
- White A., Melis A.* Biochemistry of hydrogen metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* wild type and a Rubisco-less mutant // Int. J. Hydrogen Energy. – 2006. – V. 31. – P. 455-464.
- Winkler M., Hemschemeier A., Gotor C. et al.* [Fe]-hydrogenases in green algae: photo-fermentation and hydrogen evolution under sulfur deprivation // Int. J. Hydrogen Energy. – 2002. – V. 27. – P. 1431-1439.
- Wykoff D.D., Davies J.P., Melis A. et al.* The regulation of photosynthetic electron-transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Physiol. – 1998. – V. 117. – P. 129-139.
- Zhang L., Happe T., Melis A.* Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga) // Planta. – 2002. – V. 214. – P. 552-561.

Надійшла до редакції
26.07.2010 p.

БІОХІМІЧНІ ТА МОЛЕКУЛЯРНІ АСПЕКТИ

BIOCHEMICAL AND MOLECULAR ASPECTS OF HYDROGEN PHOTOPRODUCTION

O. V. Yakimova, N. O. Bilyavska

*N.G. Kholodny Institute of Botany,
of National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)*

Hydrogen is environmentally safe and economically profitable alternative type of fuel. The ability of some photosynthetic organisms, especially cyanobacteria and microalgae to convert the sun energy into hydrogen is considered as perspective. Process of their photosynthesis is the basis of this ability. Under anaerobic conditions, producers are able to shift metabolism of photoautotrophic oxygen production to one of photoheterotrophic hydrogen production. Unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* is considered to be the most perspective hydrogen producer due to some advantages. Sulfur deprivation is the high-speed and economically sound method for development of anaerobiosis in it. As a result of D1 protein degradation in photosystem II, the light phase of photosynthesis is interrupted in the cell of microalgae. Following the full anaerobiosis establishment the algal ferredoxin-dependent hydrogenases, which are extraordinarily sensible even to the least amount of oxygen, are activated. The process of the light-dependent hydrogen bioproduction is very intricate and requires further study because of the great number of regulator sites and metabolic offshoots.

Key words: *Chlamydomonas reinhardtii, anaerobiosis, hydrogenase, sulfur deficiency, green algae, hydrogen photoproduction, photosynthesis*

БИОХИМИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ ФОТОПРОДУЦИРОВАНИЯ ВОДОРОДА

О. В. Якимова, Н. А. Белявская

*Институт ботаники им. Н.Г. Холодного
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)*

Водород является экологически безопасным и экономически выгодным видом топлива. Считается перспективной способностью некоторых фотосинтезирующих организмов, особенно цианобактерий и микроводорослей, превращать солнечную энергию в водород. В основе этой способности лежит процесс фотосинтеза. При анаэробных условиях организмы-продуценты способны переключать метаболизм с фотоавтотрофного продуцирования кислорода на фотогетеротрофный путь продуцирования водорода. Одноклеточная зеленая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii* считается наиболее перспективным продуцентом водорода в связи с рядом преимуществ. Самым быстрым и экономически оправданным для нее способом достижения анаэробноза является перевод культуры водоросли на среду без серы. При этом в клетке микроводоросли прерывается световая фаза фотосинтеза в результате повреждения белка D1 второй фотосистемы. После установления полного анаэробноза активируется работа ферредоксин-зависимых гидрогеназ, которые являются чрезвычайно чувствительными даже к минимальному количеству кислорода. Из-за большого количества регуляторных участков и метаболических ответвлений процесс светозависимого биопродуцирования водорода является сложным и требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: *Chlamydomonas reinhardtii, анаэробноз, гидрогеназа, дефицит серы, зеленые водоросли, фотопродуцирование водорода, фотосинтез*