

ВЫДЕЛЕНИЕ ВОДОРОДА ФОТОАВТОТРОФНЫМИ КУЛЬТУРАМИ *Chlamydomonas reinhardtii* ПРИ НЕДОСТАТКЕ УГЛЕКИСЛОТЫ

© 2022 В.И. Гречаник, М.А. Большаков, А.А. Цыганков*

ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: ttt-00@mail.ru

Поступила в редакцию 06.07.2022

После доработки 08.08.2022

Принята к публикации 10.08.2022

Светозависимое выделение водорода микроводорослями привлекает внимание исследователей теоретической возможностью использования этого процесса для конверсии энергии Солнца в альтернативные формы энергии. Считается, что цикл Кальвина–Бенсона–Бассама является конкурентным процессом выделения водорода микроводорослями, и его ограничение субстратом может привести к увеличению выхода водорода, причём при таком стрессе не происходит разрушения фотосинтетического аппарата. Нами изучено состояние фотоавтотрофных культур *Chlamydomonas reinhardtii* при их лимитировании углекислотой. Показано, что при продувании воздухом без углекислоты культуры переходили в стационарную фазу со снижением активности фотосистемы 2 за счёт перевосстановления пула пластохинонов с последующей деградацией всего фотосинтетического аппарата. При продувании аргоном без углекислоты культуры переходили в микроаэробные условия с выделением водорода около 5 мл в сутки на 1 литр культуры. Вероятно, остаточный кислород в культуральной жидкости ингибировал гидрогеназную активность культур. При этом также происходило снижение активности фотосистемы 2 за счёт перевосстановления пула пластохинонов с дальнейшей деградацией фотосинтетического аппарата. Высоких стартовых скоростей выделения водорода удавалось достичь при удалении углекислоты из культуральной жидкости, выключении света и адаптации культур к анаэробным условиям с последующим их освещением светом низкой интенсивности. Таким образом, при недостатке углекислоты в атмосфере аргона фотоавтотрофные культуры способны к выделению водорода, причём низкая скорость процесса обусловлена главным образом ингибированием гидрогеназной активности кислородом, а не конкуренцией цикла Кальвина–Бенсона–Бассама и гидрогеназы за электроны.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фотовыделение водорода микроводорослями, фотоавтотрофные культуры *Chlamydomonas reinhardtii*, недостаток углекислоты.

DOI: 10.31857/S0320972522100050, EDN: BVTXRV

ВВЕДЕНИЕ

Восемьдесят лет назад Гаффрон и Рубин обнаружили, что одноклеточная микроводоросль *Scenedesmus* после анаэробной инкубации в темноте при последующем освещении была способна к выделению водорода [1]. Позднее было показано, что эта способность распространена среди Chlorophyta, Xanthophyta и Bacillariophyta [2]. Скорость выделения водорода может достигать скоростей фотосинтетического выделения кислорода, а квантовый

выход — достигать теоретического максимума (0,25) [3]. Это обстоятельство и является главной причиной постоянного интереса к фотовыделению водорода микроводорослями. Однако процесс выделения водорода с высокой скоростью очень краткосрочен: выделяющийся при освещении кислород инактивирует гидрогеназу и репрессирует её синтез [4].

Токсическое действие кислорода на выделение водорода микроводорослями известно давно, и разработаны различные методы решения этой проблемы. Для краткосрочных экспе-

Принятые сокращения: РЦ — реакционный центр фотосинтеза; ФСII — фотосистема 2; Хл — хлорофилл; eH — окислительно-восстановительный потенциал среды относительно Ag/AgCl; HSM — стандартная питательная среда для фотоавтотрофных культур; pO₂ — парциальное давление кислорода, выраженное в % от насыщения культуральной среды воздухом; PQ — пластохинон; TAP — трис-ацетат-фосфатная среда.

* Адресат для корреспонденции.

риментов использовали дитионит для удаления кислорода [5, 6]. Для длительных экспериментов использовали активное продувание суспензии микроводорослей инертными газами [7]. В некоторых случаях исследователи полностью ингибировали активность ФСII с помощью дихлорфенилдиметилмочевины (DCMU) [8]. Однако эти методы не приводили к длительному стабильному выделению водорода и не являются пригодными для практического применения.

В начале двадцать первого века Melis et al. [9] разработали новый подход к получению анаэробных культур микроводорослей при освещении: серное голодание. При недостатке серы культуры сначала выделяли кислород и синтезировали крахмал, а затем снижали активность ФСII и переходили в анаэробные условия. В этих условиях на свету происходил синтез гидрогеназ, и начиналось светозависимое выделение водорода, длящееся несколько суток. Было также показано, что при недостатке серы выделение водорода возможно и в фотоавтотрофных условиях, без использования ацетата [10]. В дальнейшем исследователи использовали подходы с недостатком других элементов минерального питания, таких как азот [11, 12] и фосфор [13]. Однако для стабильного и продолжительного выделения водорода культуры микроводорослей значительно снижали активность ФСII [14], что неизбежно ограничивало скорость его выделения.

Одновременно с решением проблемы токсичности кислорода для ключевого фермента в выделении водорода, гидрогеназы, изучались и альтернативные пути транспорта электронов, способные конкурировать с выделением водорода. Среди них поток электронов на восстановление НАДФ с последующей фиксацией углекислоты в цикле Кальвина–Бенсона–Бассама является наиболее активным. Nagy et al. [15] предложили подход инактивации цикла Кальвина–Бенсона–Бассама, основанный на его лимитировании субстратом. Для этого авторы использовали фотоавтотрофные культуры *Chlamydomonas reinhardtii*, из которых после выращивания удаляли углекислоту и инкубировали в темноте в анаэробных условиях. При включении света эти культуры выделяли водород с высокой скоростью. Авторы считают, что такой способ ограничения потока электронов, используемых для фиксации углекислоты, не приводит к разрушению ФСII, при этом выделение водорода идёт за счёт функционирования ФСII с получением электронов от воды. Однако авторам не удалось решить проблему ингибирующего действия кислорода на гидрогеназную активность, и они вводили в сосуды

поглотитель кислорода, основанный на железном порошке.

Целью данной работы было изучение возможности выделения водорода фотоавтотрофными культурами *C. reinhardtii* при лимитировании культур углекислотой с подробным анализом состояния ФСII.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Условия и способы культивирования. Исходные культуры *C. reinhardtii* Dang, штамм CC-124, поддерживали на чашках с агаром со стандартной трис-ацетатфосфатной (ТАР) средой (рН 6,9) при 28 °С и освещении (36 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹). Единичные колонии переносили в 10 мл среды ТАР и инкубировали 2 дня в тех же условиях.

Затем культуры выращивали фотоавтотрофно на среде High-Salt (HSM) [16] в колбах Эрленмейера на 500 мл, которые барботировали смесью воздуха с 2% CO₂ через мембранные фильтры с размером пор 0,2 мкм (Acro 37 TF, «Gelman Sciences, Inc.», США) до поздней экспоненциальной фазы. Для опытов культуры выращивали в условиях контроля в фотобиореакторе и затем использовали в качестве инокулята в том же реакторе, что снижало стресс, вызванный пересевом культуры.

C. reinhardtii выращивали в фотобиореакторе объёмом 1,5 литра, состоящем из стеклянных коаксиальных цилиндров с внутренней мешалкой [17]. Световой путь (толщина культурального слоя) составлял 22 мм. Температуру (28 °С) и рН (7,4) контролировали автоматически системой на основе микропроцессора и ПК, как описано ранее [18]. В процессе культивирования культуры продували газовой смесью (98% воздуха + 2% CO₂ или 98% аргона + 2% CO₂, 100 мл/мин) через мембранные фильтры Acro 37 TF с размером пор 0,2 мкм («Gelman Sciences, Inc.»). Для освещения культур в фотобиореакторе на оси стеклянных цилиндров располагали люминесцентные лампы холодного белого цвета (Навигатор НКЛ-4У 30 Вт 4000 К). Интенсивность света на поверхности культур составляла 169 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹ фотосинтетически активной радиации (ФАР) (измерено с помощью LiCOR LI-250, оснащённого датчиком квантов света). Фотобиореактор физически и программно был соединён с флуориметром JUNIOR-PAM («Walz», Германия), как описано ранее, причём в рециркуляционной петле движение осуществлялось импульсными пневматическими насосами [18]. Импульсы существенно замедляли обрастание кюветы.

Все эксперименты проводились с дважды концентрированной средой HSM (2*HSM).

Удаление углекислоты. В аэробных и анаэробных условиях недостаток углерода создавался удалением углекислого газа из газовой смеси. При этом при продувке культур воздухом он дополнительно очищался от углекислоты пропусканием через ловушку углекислоты, расположенную перед фильтром и содержащую 5 М раствор NaOH с установленным распылителем воздуха. Следует отметить, что при удалении углекислоты из культуральной среды pH в фотобиореакторе возрастал. Чтобы не вносить дополнительного стрессового фактора, pH среды поддерживался на уровне 7,4 путём автоматической добавки 0,2 М серной кислоты.

Измерения аскорбата. Для измерения аскорбата использовали протокол, описанный ранее [20]. Для измерений применяли систему ВЭЖХ Agilent 1100, оснащённую колонкой Supelco INC Waters spherisorb ODS2, 4,6 × 250 мм («Waters», США) с детектированием при 244 нм.

Другие методы. Содержание Хл ($a+b$) определяли спектрофотометрически в 95%-ном спиртовом экстракте [21]. Содержание крахмала, накопленного в клетках, определяли по количеству глюкозы, образующейся в результате ферментативного гидролиза [22]. Процентное содержание H_2 в газовой фазе фотобиореактора анализировали методом газовой хроматографии, как описано ранее [18]. Скорость выделения H_2 рассчитывали с учётом расхода газа (100 мл/мин) и процентного содержания H_2 на выходе, концентрации Хл и объёма культуры в реакторе. Накопление H_2 рассчитывали, предполагая, что между измерениями скорость выделения водорода неизменна.

Статистический анализ. Каждое измерение проводили в трёхкратной повторности. Для статистической обработки данных использовали Excel 2016. Данные представлены как средние значения с 95%-ным доверительным интервалом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование *C. reinhardtii* на воздухе с добавлением углекислоты. В качестве контроля использовали фотоавтотрофные культуры *C. reinhardtii* в фотобиореакторе с использованием той же среды (2*HSM), но продуваемые смесью воздух + 2% CO_2 . При культивировании *C. reinhardtii* в этих условиях концентрация Хл ($a+b$) возрастала в течение первых 73 ч с последующим снижением (рис. 1). При этом мак-

симальная концентрация хлорофилла составила 50,4 мг/л. Можно констатировать, что после 73 ч культура переходила в стационарную фазу в связи с исчерпанием какого-то минерального компонента [18]. В начале культивирования pO_2 возрастало в течение первых 40 ч. После 60–70 ч культивирования pO_2 постепенно снижалось, что свидетельствует о замедлении скорости фотосинтетического выделения кислорода культурой, которое происходило раньше перехода в стационарную фазу. Содержание крахмала в клетках и eH (рис. 1) не изменялись в течение всего периода культивирования. Содержание аскорбата в клетках изменялось незначительно и было минимальным в конце экспоненциальной фазы. При этом реальный квантовый выход ФСП $Y(II)$ у культур в начале составлял 0,73–0,77, постепенно снижаясь, причём это снижение ускорялось при наступлении стационарной фазы и достигало 0,4 после 48 ч стационарной фазы. Эти изменения типичны для фотоавтотрофных культур и в общем соответствуют описанным ранее [18, 23].

В целом рост *C. reinhardtii* в аэробных условиях представляет собой типичную картину фотоавтотрофного культивирования микродорослей без стрессов, но с переходом от нелIMITированного роста к светолIMITированию с последующим исчерпанием какого-то компонента питания в стационарной фазе.

Культивирование *C. reinhardtii* в присутствии воздуха с удалением углекислоты. С начала выращивания в данном режиме *C. reinhardtii* снабжали воздухом с углекислотой, как указано в методах. На 81 ч культивирования из подаваемой газовой смеси удаляли углекислоту (рис. 2). Уже через 15 мин после удаления углекислоты парциальное содержание растворённого кислорода в среде начинало снижаться. Одновременно с этим начинало снижаться $Y(II)$ за счёт некоторого возрастания F_T и значительного снижения F_m' . Через 7 ч после отключения CO_2 содержание кислорода стабилизировалось. Этот момент можно определить как переход культур в стационарную фазу, вызванную недостатком углерода (вследствие удаления углекислоты). Снижение F_m' и возрастание F_T свидетельствует о перевосстановленности пула PQ уже через 7 ч после удаления углекислоты, т.е. с наступлением стационарной фазы. После удаления углекислоты содержание Хл ($a+b$) снижалось всё время культивирования.

Таким образом, даже в аэробных условиях удаление углекислоты из подаваемой газовой фазы приводило к быстрому снижению $Y(II)$ за счёт перевосстановления пула PQ. При этом это снижение было более выражено, чем при

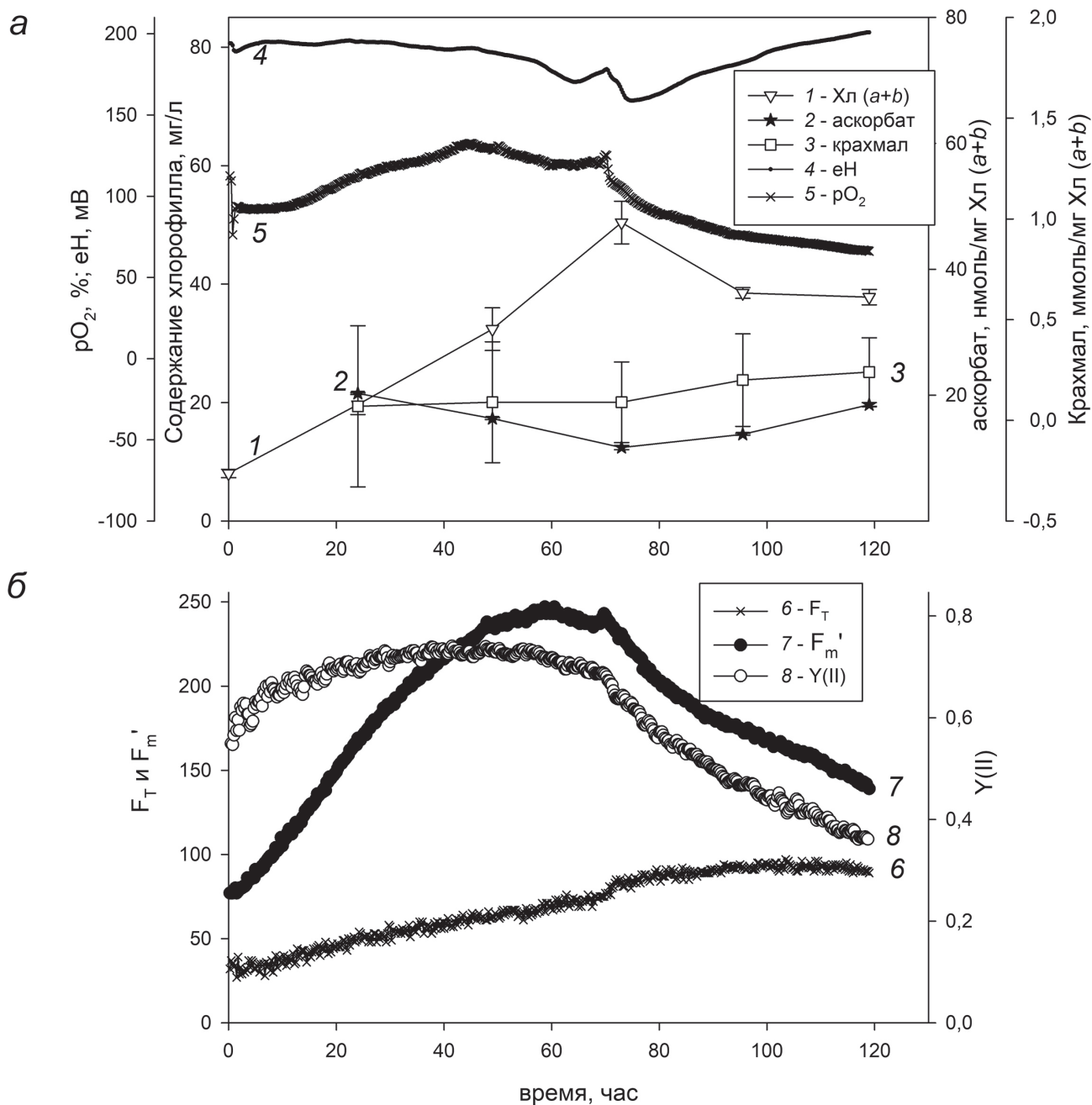


Рис. 1. Изменение (а) содержания Хл (а + b) (1), аскорбата (2), крахмала в клетках (3), еН (4), pO_2 (5) в культуральной жидкости, и (б) F_T (6), F_m' (7) и $Y(II)$ (8) при росте *C. reinhardtii* в фотоавтотрофных условиях на среде 2*HSM. В этом и последующем экспериментах освещённость $168 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$, $t = 28 \text{ }^\circ\text{C}$, $pH = 7,4$. Газовая фаза 98% воздух + 2% углекислоты

переходе контрольных культур в стационарную фазу (рис. 1). Учитывая значительное падение содержания Хл (а + b), следует отметить и общую деградацию фотосинтетического аппарата.

Культивирование *C. reinhardtii* в присутствии аргона. С начала выращивания в данном режиме *C. reinhardtii* снабжали аргоном с углекислотой, как указано в методах. На 42,5 ч углекислоту удалили из газовой фазы (рис. 3). После этого момента содержание Хл (а + b) в фотобио-

реакторе снижалось, как и в условиях подачи воздуха (рис. 2). Через 3 ч парциальное давление кислорода, растворённого в культуральной жидкости, начинало снижаться одновременно с началом снижения еН (рис. 3, а). Одновременно снижалось F_m' (рис. 3, б), что свидетельствует о перевосстановленности пула РQ. Параллельно снижалось и $Y(II)$. Через 7 ч после удаления углекислоты из газовой фазы pO_2 стабилизировалось, а в выходящей из фотобио-

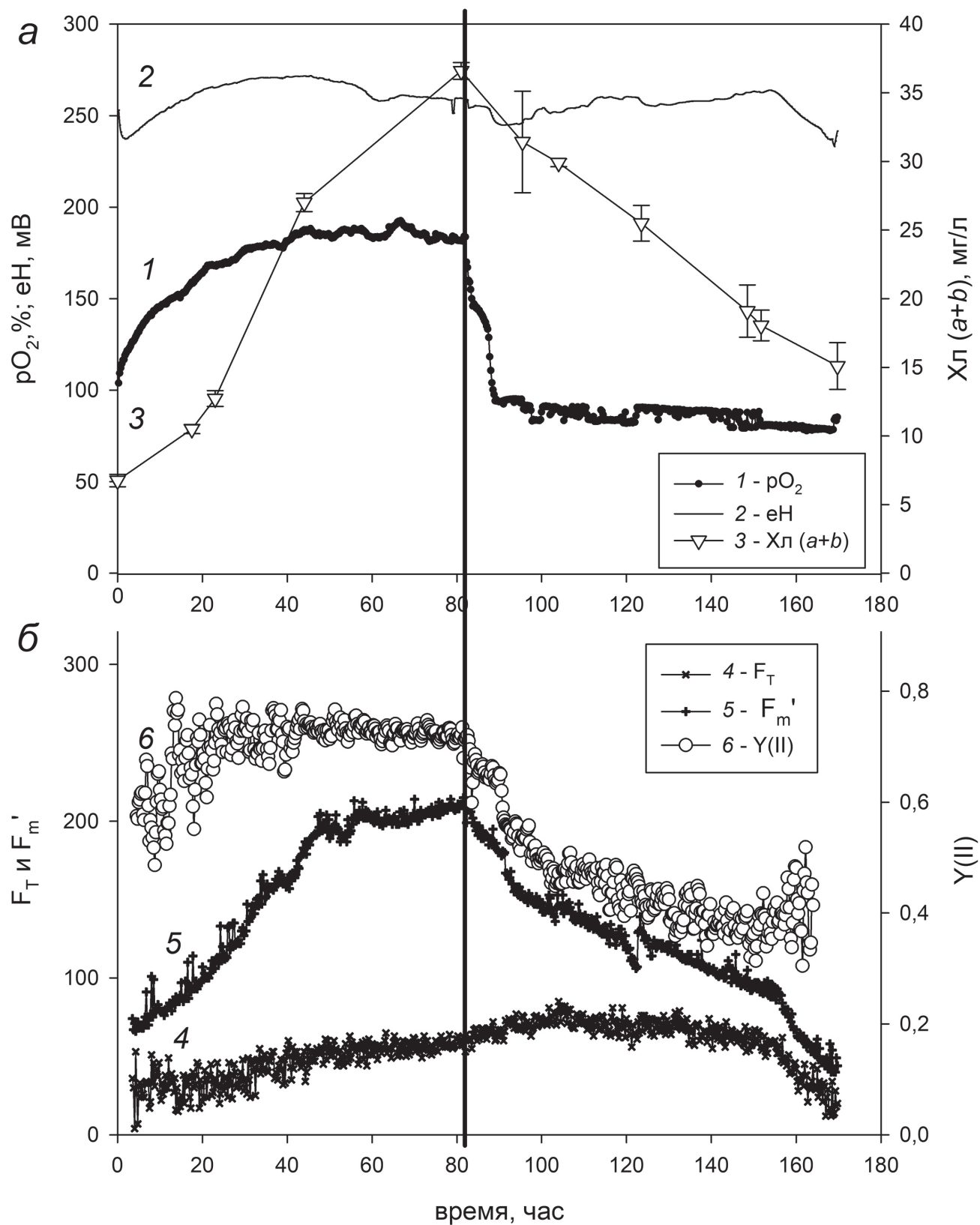


Рис. 2. Изменение (а) содержания pO_2 (1), eH (2) в культуральной жидкости и $Хл (a+b)$ (3) в клетках, и (б) F_T (4), F_m' (5) и $Y(II)$ (6) при росте *C. reinhardtii* в фотоавтотрофных условиях в присутствии воздуха с углекислотой. На 81 ч из подаваемой газовой смеси удалили углекислоту (отмечено вертикальной линией)

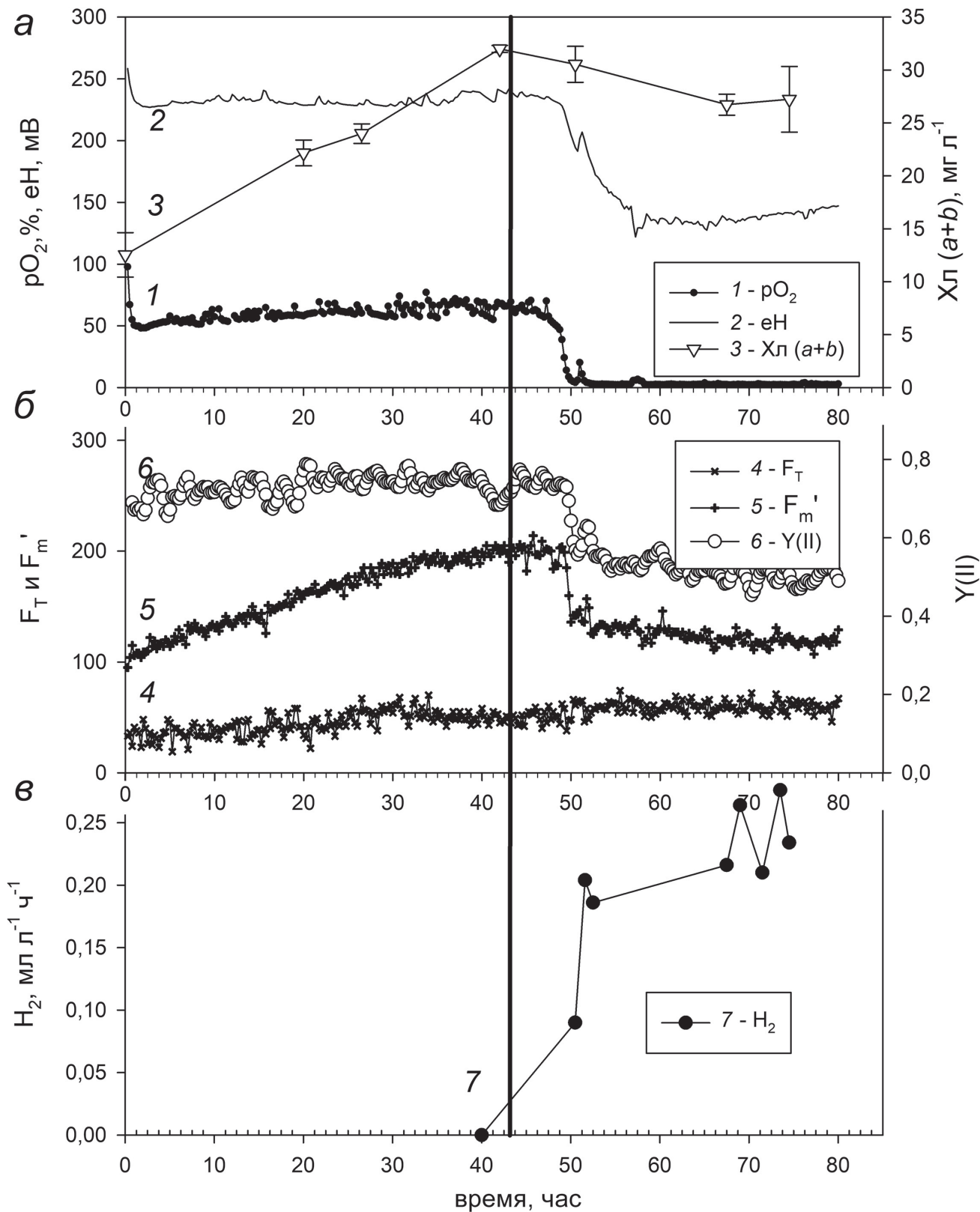


Рис. 3. Изменение (а) содержания pO_2 (1), eN (2) в культуральной жидкости и $Хл (a+b)$ (3) в клетках, и (б) F_T (4), F_m' (5), $Y(II)$, и (в) скорости образования водорода (7) при росте *C. reinhardtii* в фотоавтотрофных условиях в присутствии аргона с углекислотой. Удаление углекислоты на 42,5 ч

реактора газовой фазе обнаруживали водород (рис. 3, в). Важно отметить, что после исчерпания углекислоты pO_2 не падало до нуля, а было около 2,5%, поднимаясь в отдельные моменты до 5,5%, хотя культуры продували аргоном со скоростью 100 мл/мин (см. «Материалы и методы»). Количество выделившегося водорода составило 4,9 мл/литр культуры за 24 ч.

Если предположить, что в наших экспериментах, как и в статье Nagy et al. [15], выделение водорода происходило за счёт прямого биофототоллиза воды (т.е. с участием двух фотосистем и без вклада восстановительных эквивалентов, образующихся при разложении крахмала, в общий поток электронов), то скорость выделения кислорода должна быть вдвое меньше, чем скорость выделения водорода, т.е. 0,05–0,12 мл/ч (рис. 3, в). Если также предположить, что концентрация кислорода в культуральной жидкости находилась в равновесии с концентрацией в газовой фазе, то, учитывая скорость потока аргона (100 мл/мин), парциальное давление кислорода в культуральной жидкости не должно превышать $(0,12 \text{ мл/ч}) / (100 \text{ мл/мин}) = (0,12 \text{ мл/ч}) / (6000 \text{ мл/ч}) = 0,002\%$, что на три порядка ниже наблюдаемого нами в экспериментах. Очевидно, что в условиях образования кислорода в жидкости и при потоке газа 100 мл/мин в фотобиореакторе с объёмом культуры 1 литр даже при интенсивном перемешивании нельзя ожидать равновесной концентрации кислорода в жидкой и газовой фазах, т.е. приведённая расчётная оценка концентрации кислорода в жидкости является заниженной. Тем не менее нельзя исключить, что фотоавтотрофные культуры микроводорослей в микроаэробных условиях способны, как и фотоавтотрофные культуры в анаэробных условиях, к деградации крахмала с образованием ацетата [24] и, соответственно, углекислоты, которая реассимилируется при фотосинтезе с образованием кислорода. Однако для подтверждения такого предположения требуются дополнительные эксперименты.

Известно, что концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}) гидрогеназной активности кислородом составляет 0,3–0,4% [4]. Это значение примерно в 6–8 раз ниже содержания кислорода в культуральной жидкости в наших экспериментах. Таким образом, скорость выделения водорода определялась в нашем случае ингибированием гидрогеназной активности остаточным кислородом в среде.

В наших экспериментах количество выделившегося водорода было значительно ниже, чем описано в статье Nagy et al. [15], изучавших выделение водорода фотоавтотрофными культурами *C. reinhardtii* при удалении углекисло-

ты. Основным отличием наших экспериментов было отсутствие темнового инкубационного периода в анаэробных условиях. В целях выявления важности инкубации культур в темноте в анаэробных условиях, а также учитывая, что фотоавтотрофные культуры микроводорослей при серном голодании выделяли водород с наибольшей скоростью при пониженной интенсивности света в анаэробной и последующей фазах [10], в следующем эксперименте после удаления из культуральной жидкости углекислоты выключали свет на 2 ч и далее освещали культуры светом пониженной интенсивности (40 мкмоль фотонов $m^{-2} c^{-1}$).

Культивирование *C. reinhardtii* в присутствии аргона с анаэробной адаптацией. В начале культивирования (когда активность ФСII максимальна, и в среде есть CO_2) интенсивность света была 168 мкмоль фотонов $m^{-2} c^{-1}$. Через 47,5 ч культивирования из подаваемой газовой смеси убирали CO_2 (рис. 4; наиболее быстрые изменения параметров культуры, происходящие в диапазоне времени от 47 до 60 ч, подробнее показаны на рис. 5). После начала снижения концентрации кислорода (51,8 ч после начала культивирования) культуры переводили на 2,5 ч в темновые условия. По истечении темновой адаптации включали свет с пониженной интенсивностью (40 мкмоль фотонов $m^{-2} c^{-1}$). В этих условиях содержание суммарного хлорофилла возрастало в течение первых 47 ч, достигая 64 мг Хл ($a+b$)/литр, а в дальнейшем снижалось до 20 мг Хл ($a+b$)/литр к 167 ч (рис. 4, а). Концентрация кислорода вначале росла и к 25 ч стабилизировалась. В момент отключения CO_2 (47,5 ч) происходили изменения всех параметров культуры (рис. 5). Уже через час после исключения углекислоты из газовой фазы концентрация кислорода начинала снижаться. Одновременно с этим редокс-потенциал среды снижался и к моменту выключения света достигал +15 мВ. При снижении pO_2 до ~50% начиналось снижение $Y(II)$ до 0,35 за счёт одновременного падения F_m' и роста F_T . При падении pO_2 до нуля происходило дополнительное падение $Y(II)$ в основном за счёт роста F_T . Через ~30 мин после выключения света $Y(II)$ начинал возрастать до 0,45. Через час после включения света $Y(II)$ продолжал возрастать и достигал 0,65 через 4 ч. Это свидетельствует о том, что снижение $Y(II)$ после удаления углекислоты обусловлено перевосстановленностью пула PQ и не затрагивает структуру ФСII, поскольку является обратимым. Содержание аскорбата с момента удаления углекислоты до момента выключения света не изменялось, а при инкубации в темноте снижалось с последующим

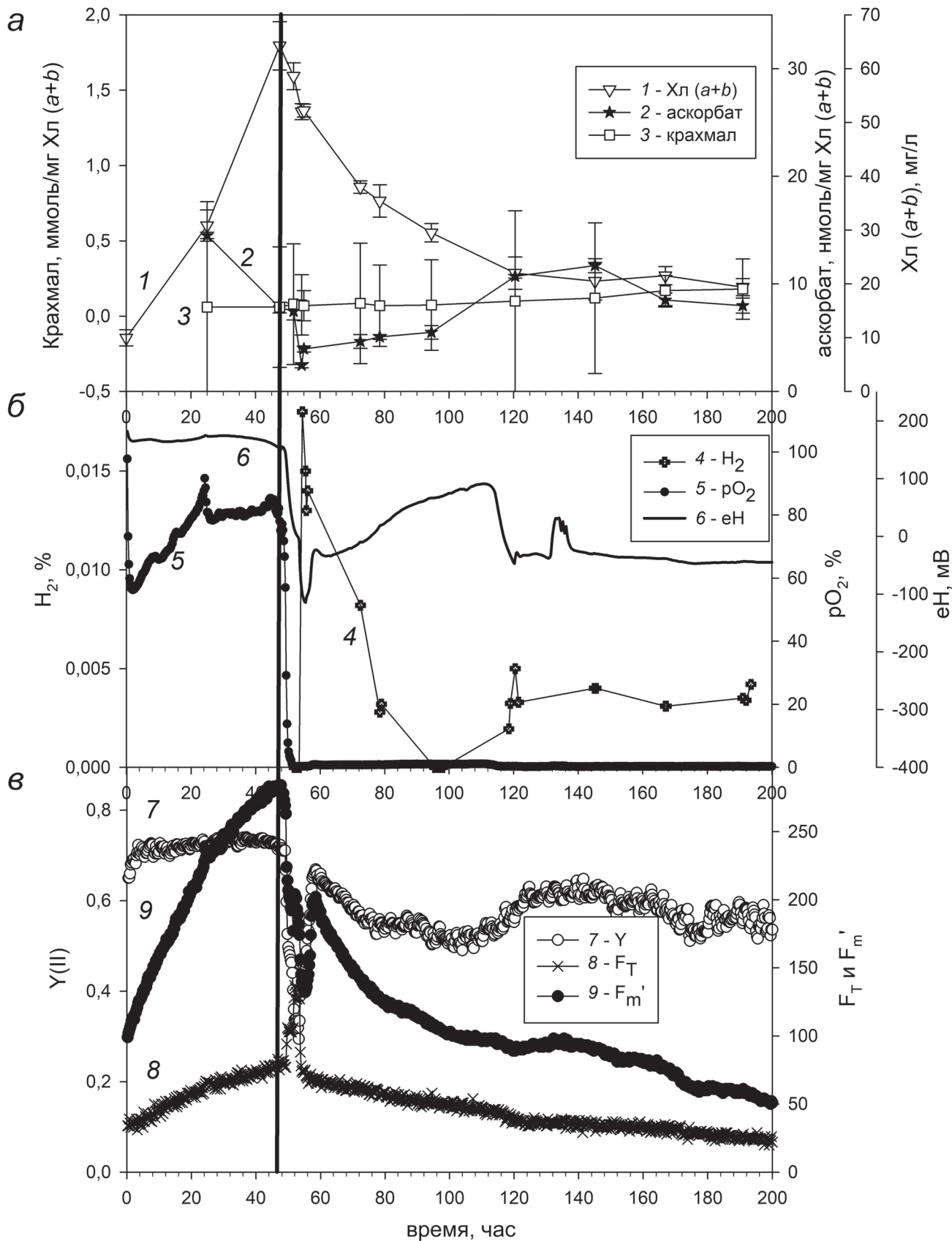


Рис. 4. Рост *S. reinhardtii* в фотобиореакторе в газовой фазе $Ar + 2\% CO_2$. *a* – Содержание Хл (а + б) (1), аскорбата (2) и крахмала (3); *б* – Содержание H_2 в газовой фазе (4), парциальное давление кислорода в жидкости (5) и eN (6); *в* – $Y(II)$ (7), F_T (8), F_m' (9) в фотобиореакторе. Удаление углекислоты в 47,5 ч (отмечено сплошной линией), выключение света ($168 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) в 51,8 ч, включение света ($40 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) в 54,3 ч с момента начала инкубации

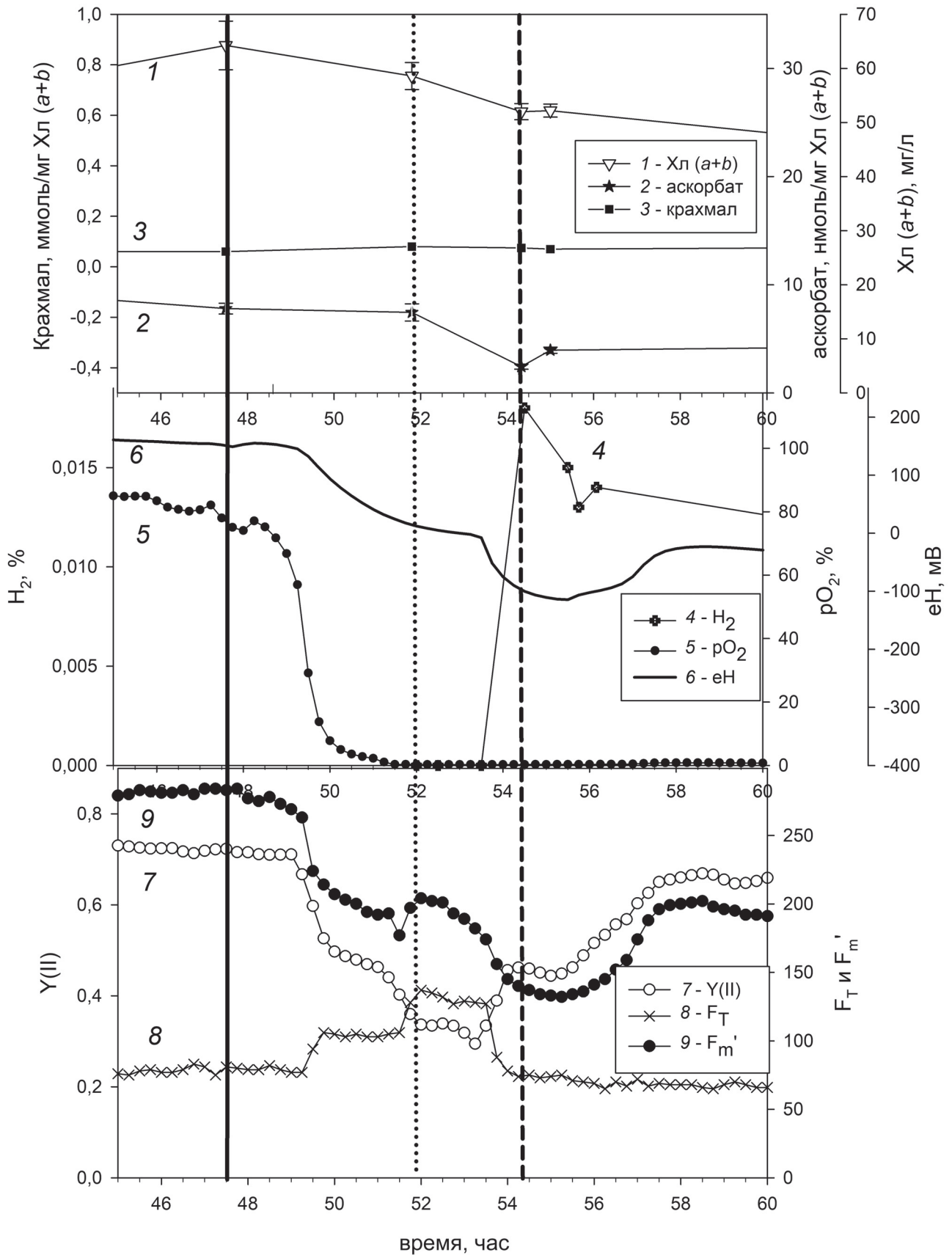


Рис. 5. Подробное представление изменений в культуре при удалении углекислоты (отмечено сплошной вертикальной линией), включая темновую адаптацию (отмечено пунктирной линией) и последующее включение света (штриховая линия). Кривые: 1 – Хл (a+b), 2 – аскорбат, 3 – крахмал, 4 – содержание Н₂ в газовой фазе, 5 – рО₂, 6 – eH, 7 – Y(II), 8 – F_T, 9 – F_m'

небольшим ростом после включения света. Это подтверждает отсутствие его конкуренции с водой за донирование электронов в ФСII, в отличие от микроводорослей при серном голодании в фотоавтотрофных условиях [25]. Содержание крахмала в клетках практически не изменялось.

Через 10 мин после включения света в выходящем из фотобиореактора газе обнаружилось 0,018% H_2 (рис. 4, 5). Это соответствует 1,1 мл H_2 в час на 1 литр культуры. Далее скорость выделения водорода существенно снижалась и даже падала до 0 на 95–98 ч, с возобновлением выделения на 118 ч. Всего за 138 ч (с 54,5 до 193,5 ч) выделилось 56 мл H_2 /литр культуры. Это несколько ниже, чем у фотоавтотрофных культур в условиях недостатка серы [18].

Следует отметить, что изменения данных ЛР-теста культур с анаэробной адаптацией после удаления углекислоты были аналогичны изменениям контрольных культур в стационарной фазе роста, вызванной истощением неизвестного компонента среды, то есть не являются специфическим ответом культур на углеродное голодание (данные не приведены).

Таким образом, культуры *C. reinhardtii* при глубоком лимитировании недостатком углерода способны к выделению водорода, но с низкой скоростью. Следует отметить, что культуры микроводорослей, выделяющие водород при недостатке элементов питания, одновременно реализуют три типа питания: фотосинтез, дыхание и брожение [8]. При этом доли энергетических вкладов этих типов питания взаимозависимы, но фотосинтез, по-видимому, является ключевым. Его активность определяет количество выделяющегося кислорода, который может использоваться в дыхании. Равновесная концентрация растворённого кислорода (отражающая равенство скоростей фотосинтеза и дыхания с учётом выноса кислорода потоком газа), в свою очередь, определяет остаточную активность брожения. Более того, в условиях, когда фиксация углекислоты подавлена (в нашем случае недостатком углекислоты), скорость фотосинтеза в значительной степени определяется скоростью выделения водорода (основной процесс, сбрасывающий избыток восстановленного ферредоксина). Выделение водорода, в свою очередь, определяется равновесной концентрацией кислорода, поскольку он является ингибитором активности гидрогеназы. Все эти процессы проходят со скоростями существенно ниже оптимальных. Для сравнения отметим, что скорость выделения кислорода фотоавтотрофными культурами *C. reinhardtii*, описанная для аналогичных условий, составляла 220–250 мкмоль $ч^{-1}$ $мг^{-1}$ Хл [24], что соот-

ветствует 150–170 мл $ч^{-1}$ литр $^{-1}$ культуры при концентрации Хл ($a+b$) 30 мг в 1 литре культуры. Гидрогеназная активность *C. reinhardtii* после анаэробной адаптации может достигать 300 мкмоль H_2 $ч^{-1}$ $мг^{-1}$ Хл [26], что соответствует 200 мл $ч^{-1}$ литр $^{-1}$ культуры при той же концентрации хлорофилла. Это на 2 порядка выше, чем полученные нами скорости выделения водорода. Низкое содержание крахмала в активно растущих фотоавтотрофных культурах микроводорослей косвенно свидетельствует, что скорость дыхания у таких культур не может быть высокой. Учитывая, что концентрация кислорода в наших экспериментах не была нулевой, такое низкое значение выделения водорода является результатом именно ингибирующего действия кислорода. Однако для окончательного вывода требуются дополнительные исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Удаление углекислоты из подаваемой газовой фазы при продувке культур аргоном приводило к выделению водорода, но скорость процесса была невысокой. Это обусловлено парциальным давлением кислорода в культуральной жидкости, значительно превышающим IC_{50} для гидрогеназы. Даже если цикл Кальвина и конкурирует за электроны с гидрогеназой, решающее значение имеет ингибирующее действие кислорода.

Для существенного увеличения количества выделившегося водорода необходимо было проводить предварительную инкубацию культур в темноте в анаэробных условиях и освещать адаптированные культуры светом пониженной интенсивности. Однако через сутки после включения света даже в этих условиях выделение водорода снижалось до уровня, близкого к таковому для неадаптированных к анаэробнозу культур. Таким образом, для культур, лимитированных углекислотой (субстратом цикла Кальвина–Бассама–Бенсона), как и для культур с недостатком других элементов питания, скорость выделения водорода не определяется конкуренцией гидрогеназы с другими потребителями потока электронов. Решающим фактором является концентрация растворённого кислорода.

Вклад авторов. В.И. Гречаник – проведение экспериментов, обсуждение результатов, обсуждение и редактирование рукописи; М.А. Большаков – измерение аскорбата, обсуждение результатов, обсуждение и редактиро-

вание рукописи; А.А. Цыганков – концепция, обсуждение результатов, написание рукописи, обсуждение и редактирование рукописи.

Финансирование. Работа выполнена частично в рамках госзадания 122041200039-0 (рис. 2) и при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00255), остальная часть.

Благодарности. В работе использовали оборудование (ВЭЖХ хроматограф Agilent, газовый

хроматограф Цвет 800 и флуориметры JUNIOR-РАМ и Aquaren PSI) центра коллективного пользования Пущинского научного центра биологических исследований.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gaffron, H., and Rubin, J. (1942) Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae, *J. Gen. Physiol.*, **26**, 219-240, doi: 10.1085/jgp.26.2.219.
- Boichenko, V. A., and Hoffmann, P. (1994) Photosynthetic hydrogen-production in prokaryotes and eukaryotes – occurrence, mechanism, and functions, *Photosynthetica*, **30**, 527-552.
- Бойченко В. А., Сатина Л. Ю., Литвин Ф. Ф. (1989) Эффективность фотовыделения водорода у водорослей и цианобактерий, *Физиол. Раст.*, **36**, 239-247.
- Ghirardi, M. L., Togasaki, R. K. and Seibert, M. (1997) Oxygen sensitivity of algal H₂-production, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **63-65**, 141-151, doi: 10.1007/BF02920420.
- Pow, T. and Krasna, A. I. (1979) Photoproduction of hydrogen from water in hydrogenase-containing algae, *Arch. Biochem. Biophys.*, **194**, 413-421, doi: 10.1016/0003-9861(79)90635-0.
- Urbig, T., Schulz, R., and Senger, H. (1993) Inactivation and reactivation of the hydrogenases of the green algae *Scenedesmus obliquus* and *Chlamydomonas reinhardtii*, *Z. Naturforsch. C, Biosci.*, **48**, 41-45, doi: 10.1515/znc-1993-1-208.
- Greenbaum, E. (1980) Simultaneous photoproduction of hydrogen and oxygen by photosynthesis, *Biotechnol. Bioengin. Symp.*, **10**, 1-13.
- Grechanik, V., and Tsygankov, A. (2022) The relationship between photosystem II regulation and light-dependent hydrogen production by microalgae, *Biophys. Rev.*, **14**, doi: 10.1007/s12551-022-00977-z.
- Melis, A., Zhang, L. P., Forestier, M., Ghirardi, M. L., and Seibert, M. (2000) Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.*, **122**, 127-135, doi: 10.1104/pp.122.1.127.
- Tsygankov, A. A., Kosourov, S. N., Tolstygina, I. V., Ghirardi, M. L., and Seibert, M. (2006) Hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under photoautotrophic conditions, *Int. J. Hydrogen Energy*, **31**, 1574-1584, 10.1016/j.ijhydene.2006.06.024.
- Philipps, G., Krawietz, D., Hemschemeier, A., and Happe, T. (2011) A pyruvate formate lyase-deficient *Chlamydomonas reinhardtii* strain provides evidence for a link between fermentation and hydrogen production in green algae, *Plant J.*, **66**, 330-340, doi: 10.1111/j.1365-3113X.2011.04494.x.
- He, M. L., Li, L., Zhang, L. T., and Liu, J. G. (2012) The enhancement of hydrogen photoproduction in *Chlorella protothecoides* exposed to nitrogen limitation and sulfur deprivation, *Int. J. Hydrogen Energy*, **37**, 16903-16915, doi: 10.1016/j.ijhydene.2012.08.121.
- Batyrova, K. A., Tsygankov, A., and Kosourov, S. (2012) Sustained hydrogen photoproduction by phosphorus deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures, *Int. J. Hydrogen Energy*, **37**, 8834-8839.
- Antal, T. K., Krendeleva T. E., Laurinavichene T. V., Makarova, V. V., Ghirardi, M. L., et al. (2003) The dependence of algal H₂ production on Photosystem II and O₂ consumption activities in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1607**, 153-160, doi: 10.1016/j.bbabi.2003.09.008.
- Nagy, V., Podmaniczki, A., Vidal-Meireles, A., Tengölics, R., Kovács, L., et al. (2018) Water-splitting-based, sustainable and efficient H₂ production in green algae as achieved by substrate limitation of the Calvin–Benson–Bassham cycle, *Biotechnol. Biofuels*, **11**, 69, doi: 10.1186/s13068-018-1069-0.
- Winkler, M., Heil, B., and Happe, T. (2002) Isolation and molecular characterization of the [Fe]-hydrogenase from the unicellular green alga *Chlorella fusca*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1576**, 330-334, doi: 10.1016/s0167-4781(02)00239-7.
- Tsygankov, A. A., Laurinavichene, T. V., and Gogotov, I. N. (1994) Laboratory-scale photobioreactor, *Biotechnol. Techniques*, **8**, 575-578, doi: 10.1007/BF00152149.
- Grechanik, V., Romanova, A., Naidov, I., and Tsygankov, A. (2020) Photoautotrophic cultures of *Chlamydomonas reinhardtii*: sulfur deficiency, anoxia,

- and hydrogen production, *Photosynth. Res.*, **143**, 275-286, doi: 10.1007/s11120-019-00701-1.
19. Гольцев В. Н., Каладжи Х. М., Паунов М., Баба В., Хорачек, Т., и др. (2016) Использование переменной флуоресценции хлорофилла для оценки физиологического состояния фотосинтетического аппарата растений, *Физиол. раст.*, **63**, 881-907.
 20. Kovacs, L., Vidal-Meireles, A., Nagy, V., and Toth, S. Z. (2016) Quantitative determination of ascorbate from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* by HPLC, *Bio Protocol.*, **16**, doi: 10.21769/BioProtoc.2067.
 21. Harris, E. H. (1989) *The Chlamydomonas Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use*. San Diego: Academic Press, doi: 10.1016/C2009-0-02778-0.
 22. Gfeller, R. P., and Gibbs, M. (1984) Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*, I: analysis of fermentative products from starch in dark and light, *Plant Physiol.*, **75**, 212-218, doi: 10.1104/pp.75.1.212.
 23. Grechanik, V., Naidov, I., Bolshakov, M., and Tsygankov, A. (2021) Photoautotrophic hydrogen production by nitrogen-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures, *Int. J. Hydrogen Energy* **46**, 3565-3575, 10.1016/j.ijhydene.2020.10.215.
 24. Kosourov, S., Patrusheva, E., Ghirardi, M. L., Seibert, M., and Tsygankov, A. (2007) A comparison of hydrogen photoproduction by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under different growth conditions, *J. Biotechnol.*, **128**, 776-787, doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.12.025.
 25. Nagy, V., Vidal-Meireles, A., Podmaniczki, A., Szentmihályi, K., Rákhely, G., et al. (2018) The mechanism of photosystem-II inactivation during sulphur deprivation-induced H₂ production in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant J.*, **94**, 548-561, doi: 10.1111/tpj.13878.
 26. Kosourov, S., Tsygankov, A., Seibert, M., and Ghirardi, M. L. (2002) Sustained hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: Effects of culture parameters, *Biotechnol. Bioeng.*, **78**, 731-740, doi: 10.1002/bit.10254.

HYDROGEN PRODUCTION BY CO₂ DEPRIVED PHOTOAUTOTROPHIC CULTURES *Chlamydomonas reinhardtii*

V. I. Grechanik¹, M. A. Bol'shakov¹, and A. A. Tsygankov^{1*}

*Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,
"Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences",
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: ttt-00@mail.ru*

Light-dependent microalgal hydrogen production attracts attention of researchers by potential possibility of practical application. It is accepted that Calvin–Benson–Bassham cycle competes with hydrogen production process for electrons and substrate (CO₂) limitation of the cycle can increase hydrogen production rate. Furthermore, photosystem II is not destroyed by CO₂ deficiency. We studied photoautotrophic cultures *Chlamydomonas reinhardtii* under CO₂ deficiency. Under the air atmosphere upon CO₂ exclusion from the gas phase cultures came to stationary phase of growth with down-regulation of photosystem II due to overreduction of plastoquinone pool with following degradation of whole photosynthetic machinery. Under Ar atmosphere CO₂ exclusion caused transfer to stationary phase and the establishment of microaerobic conditions with small (5 ml H₂ day⁻¹ liter⁻¹ culture) hydrogen production. Similar to Air atmosphere prolonged incubation of cultures under these conditions resulted in down-regulation of photosystem II due to overreduction of plastoquinone pool with following degradation of whole photosynthetic machinery. After exclusion of CO₂, transfer cultures into dark anaerobic conditions (2.5 h) with following illumination by low light cultures produced H₂ with high initial rate. Total microalgal hydrogen production under these conditions was 56 ml H₂ liter⁻¹ culture. Thus, CO₂-deprived photoautotrophic cultures produce hydrogen. Hydrogen production was limited by toxic action of oxygen for hydrogenase but not by Calvin–Benson–Bassham cycle competition with hydrogen production process.

Keywords: microalgal hydrogen production, photoautotrophic cultures, *Chlamydomonas reinhardtii*, CO₂ deprivation