

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.355

Роль реакций брожения в длительной продукции водорода на свету клетками микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* в условиях дефицита серы

А.А. Волгушева^{1, *} , Е.В. Петрова¹ , Г.П. Кукарских¹ ,
А. Дубини² , Т.К. Антал³ 

¹Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Córdoba, Edif. Severo Ochoa, Campus de Rabanales, 14071, Córdoba, Spain;

³Лаборатория комплексных экологических исследований, Псковский государственный университет, Россия, 180000, г. Псков, пл. Ленина, д. 2

*e-mail: volg-alena@yandex.ru

В работе исследовано влияние одного из основных ферментов брожения — пируватформатлиазы — на индуцированное минеральным голоданием фотообразование водорода клетками зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. Для этого инкубировали культуры дикого типа (CC-125) и мутанта *pfl1* без пируватформатлиазной активности на среде без серы на постоянном свете в течение 96 ч и оценивали выделение водорода, а также факторы, влияющие на этот процесс: фотосинтетическую активность, дыхание и содержание крахмала в клетках. Оба штамма характеризовались сходными значениями фотосинтетической активности и содержания крахмала при культивировании на полной среде. В условиях дефицита серы культуры мутанта *pfl1* начинали выделять водород позже по сравнению с диким типом, однако этот процесс продолжался существенно дольше у мутанта. Культуры *pfl1* характеризовались более высокой скоростью накопления и расщепления крахмала на начальных и поздних стадиях инкубации без серы соответственно, а также более высокой фотосинтетической активностью на поздних стадиях голодания. Полученные результаты свидетельствуют о тесной взаимосвязи между процессами фотосинтетического электронного транспорта, гидрогеназной реакцией, метаболизмом углеводов и процессом брожения, указывая на возможность использования методов генетической модификации реакций брожения для повышения выхода фотосинтетического образования водорода в биотехнологии.

Ключевые слова: фотопродукция водорода, серное голодание, брожение, пируватформатлиаза, гидрогеназа, *Chlamydomonas*

Длительное фотообразование водорода (H_2) является специфической ответной реакцией некоторых зеленых микроводорослей на дефицит таких макроэлементов, как азот, сера, фосфор, магний и др. В основе данного феномена лежит скоординированное взаимодействие между аэробными и анаэробными процессами в клетке, в том числе первичными реакциями фотосинтеза, в ходе которых происходит выделение O_2 и восстановление ферредоксина (Фд) в хлоропласте, анаэробной реакцией окисления Фд и генерации H_2 хлоропластной гидрогеназой, углеводным метаболизмом, включая синтез и распад крахмала, дыханием и реакциями брожения [1, 2]. Ранее нами было показано, что фотообразование H_2 в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* является частью комплексного адаптационного механизма, обеспечивающего клеточный гомеостаз путем регуляции клеточного редокс-по-

тенциала, pH и энергетического обеспечения в условиях минерального голодания [3].

Механизмы длительного фотообразования H_2 при минеральном голодании достаточно подробно изучены с точки зрения перспективы использования микроводорослей в биотехнологии для получения наиболее экологически чистого источника энергии. В частности, была изучена роль первичных процессов фотосинтеза и процессов запасаения и распада крахмала в фотообразовании H_2 [4, 5]. В то же время взаимодействие между реакциями брожения и фотообразованием H_2 в голодающих клетках изучено в меньшей степени.

Реакции брожения обеспечивают гомеостаз клеток в анаэробии, поддерживая гликолиз за счет утилизации его продукта — пирувата — в условиях низкой активности цикла Кребса и дыхания. Обычно брожение сопровождается генерацией

АТФ и утилизацией избытка восстановителя (НАДН) в клетке. Мультиферментная система брожения активируется в клетках *Ch. reinhardtii* в анаэробных условиях с образованием таких основных конечных метаболитов, как формиат, этанол, ацетат, а также минорных продуктов: лактата, H_2 , CO_2 и др. [6]. Начальный этап превращения пирувата в ацетил-КоА в клетках хламидомонады контролируется двумя основными реакциями, катализируемыми пируватформиатлиазой (PFL1) и пируват:ферредоксин-оксидоредуктазой, протекающими, в том числе, в хлоропласте. В частности, активность фермента PFL1 в клетке хламидомонады наблюдается в митохондриях и хлоропласте [7, 8]. Реакция, катализируемая PFL1 в присутствии КоА, приводит к образованию формиата и ацетил-КоА. Пируват:ферредоксин-оксидоредуктаза катализирует реакцию окисления пирувата в присутствии КоА до ацетил-КоА и CO_2 с образованием восстановленного Фд, который может донировать электрон на гидрогеназу с последующей генерацией молекулярного H_2 . Высокоэнергетическая молекула ацетил-КоА используется в качестве субстрата в целом ряде метаболических процессов, в том числе последующих реакций брожения, при синтезе липидов, в цикле Кребса и др.

Ранее с целью исследования процесса брожения у микроводорослей были сконструированы мутанты *Ch. reinhardtii* со сниженной или отсутствующей активностью PFL1 [9–11] и показано, что мутация приводит к уменьшению выхода формиата и этанола как основных продуктов брожения и увеличению продукции ряда минорных метаболитов, включая лактат и CO_2 , как в темноте так и на свету при серном голодании. В клетках мутантов наблюдался повышенный выход H_2 в темноте, что свидетельствует о конкурентном преимуществе реакции, катализируемой пируват:ферредоксин-оксидоредуктазой, по сравнению с реакцией, катализируемой PFL1 в данных экспериментальных условиях. При этом экспрессия гидрогеназы HYD1 была сниженной в клетках мутантов.

В данной работе впервые исследовали влияние реакций брожения на длительную фотопroduкцию H_2 и на процессы, от которых она зависит, в клетках *Ch. reinhardtii*. Для этого проводили измерения и сравнительный анализ содержания H_2 в фотореакторе, крахмала в клетках, фотосинтетической активности и скорости дыхания в культурах мутанта *pfl1-1*, лишенного активности фермента PFL1, и соответствующего дикого типа CC-125 на разных стадиях серного голодания на постоянном свете.

Материалы и методы

Культивирование микроводорослей. Штамм зеленой микроводоросли *Ch. reinhardtii pfl1-1* (далее в тексте *pfl1*) без активности фермента PFL1 и соответствующий ему дикий тип CC-125 (WT) были любезно предоставлены А. Гроссманом [10].

Культуры *Ch. reinhardtii* растили в фотогетеротрофных условиях на трис-ацетатфосфатной среде (ТАР), pH 7,0, на постоянном свете. Культивирование проводили в конических колбах Эрленмейера объемом 300 мл на шейкере (120 об./мин) при температуре 25 °С и освещенности 120 мкмоль фотонов $m^{-2} s^{-1}$ до достижения концентрации хлорофилла (Хл) в среде 10–15 мкг ml^{-1} , что соответствует поздней логарифмической фазе роста.

Для переноса на среду без серы клетки трижды осаждали и ресуспендировали в ТАР-среде без серы, в которой сульфат был заменен эквивалентным количеством хлорида. После этого культуры объемом 8 мл помещали в герметично закрытые фотореакторы объемом 12 мл при начальной концентрации Хл 15 мкг ml^{-1} и инкубировали на шейкере (120 об./мин) при температуре 25 °С и освещенности 40 мкмоль фотонов $m^{-2} s^{-1}$, которая рекомендована как оптимальная для фотопroduкции H_2 в условиях серного голодания [12].

Определение содержания хлорофилла и крахмала. Содержание Хл определяли спектрофотометрически [13] путем экстракции в 95%-ном этаноле. Процедуру анализа крахмала проводили в соответствии с описанным ранее методом [6] с использованием амилоглюкозидазы (Sigma, Германия).

Измерение скорости светового выделения и темнового поглощения кислорода. Скорости выделения и поглощения O_2 в суспензии микроводорослей измеряли с помощью Oxygraph Plus (Hansatech, Великобритания) при постоянном перемешивании и температуре 25 °С. Перед измерением образцы объемом 1 мл помещали в темноту на 5 мин. Скорость фотообразования O_2 (скорость фотосинтеза) измеряли на насыщающем свете интенсивностью 1500 мкмоль фотонов $m^{-2} s^{-1}$ в присутствии 5 мМ $NaHCO_3$ и выражали в мкмоль O_2 (мг Хл) $^{-1} ч^{-1}$. После выключения насыщающего света измеряли скорость темнового поглощения кислорода (дыхания). При расчете скорости фотопroduкцию кислорода делали поправку на скорость дыхания.

Газовая хроматография. Концентрацию H_2 в газовой фазе фотореактора определяли с помощью газового хроматографа Clarus 500 (Perkin Elmer Inc., США) с использованием детектора теплопроводности и аргона в качестве несущего газа. Пробы газовой фазы (200 мкл) отбирали с помощью газонепроницаемого шприца Гамильтона (Hamilton, США).

Флуоресценция хлорофилла. Флуоресценцию Хл регистрировали с помощью флуориметра Pulse-Amplitude-Modulation 2000 (Walz, Германия). В ходе экспериментов регистрировали минимальный выход флуоресценции Хл (F_0), которую индуцировали импульсами возбуждающего света интенсивностью 0,1 мкмоль фотонов $m^{-2} s^{-1}$ и длительностью 3 мкс. Для регистрации максимального выхода флуоресценции Хл (F_M) образец

дополнительно освещали насыщающей вспышкой света интенсивностью $1100 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ длительностью 0,8 с для перевода центров фотосистемы (ФС) 2 в состояние с восстановленным первичным хинонным акцептором электронов Q_A . В этом состоянии ФС2 не способна к фотохимическому преобразованию поглощенной энергии и энергия диссипирует в виде тепла или флуоресценции Хл. Максимальную эффективность фотохимического преобразования энергии в ФС2 рассчитывали по формуле: $F_V/F_M = (F_M - F_0)/F_M$ [14]. Перед измерением параметров флуоресценции Хл образцы с микроводорослями адаптировали к темноте в течение 15 мин. Измерения параметров флуоресценции проводили либо непосредственно в фотореакторе через стеклянную стенку, либо в отобранных из фотореактора образцах после их аэрации путем барботирования воздухом в течение 15 мин в темноте.

Статистический анализ. В эксперименте использовали шесть биологических повторностей (6 фотореакторов с культурами WT и 6 фотореакторов с культурами мутанта *pfl1*). Всего провели два независимых эксперимента. Количество технических повторностей зависело от измеряемой характеристики. Так, при измерениях флуоресценции Хл и газового состава использовали две технические повторности, для остальных характеристик — три. Статистическую значимость разли-

чий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One way ANOVA) и параметрического критерия Тьюки (Tukey test). Различия между показателями при $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

Результаты и обсуждение

Измерение концентрации клеток и Хл в культурах WT и мутанта *pfl1 Ch. reinhardtii* в ходе 96 ч инкубации на среде без серы на постоянном свете не выявило различий в динамике роста этих штаммов (данные не приведены), свидетельствуя о том, что нарушение процесса брожения оказывает слабое влияние на деление клеток в голодающих по сере культурах.

При инкубации WT *Ch. reinhardtii* на среде без серы на свете H_2 обнаруживался в газовой фазе фотореакторов через 24 ч после начала эксперимента; его содержание на мл культуры составляло $5,1 \text{ мкмоль мл}^{-1}$, возрастая до $11,2$ и $12,8 \text{ мкмоль мл}^{-1}$ через 48 и 72 ч инкубации соответственно (рис. 1А). Через 96 ч количество H_2 в газовой фазе фотореакторов снижалось, указывая на прекращение выделения газа в результате общего нарушения метаболических процессов. Необходимо отметить, что через 120 ч инкубации без серы происходила гибель части культур. Динамика выделения H_2 культурами мутанта *pfl1* характеризовалась более поздней инициализацией и большей продолжительностью это-

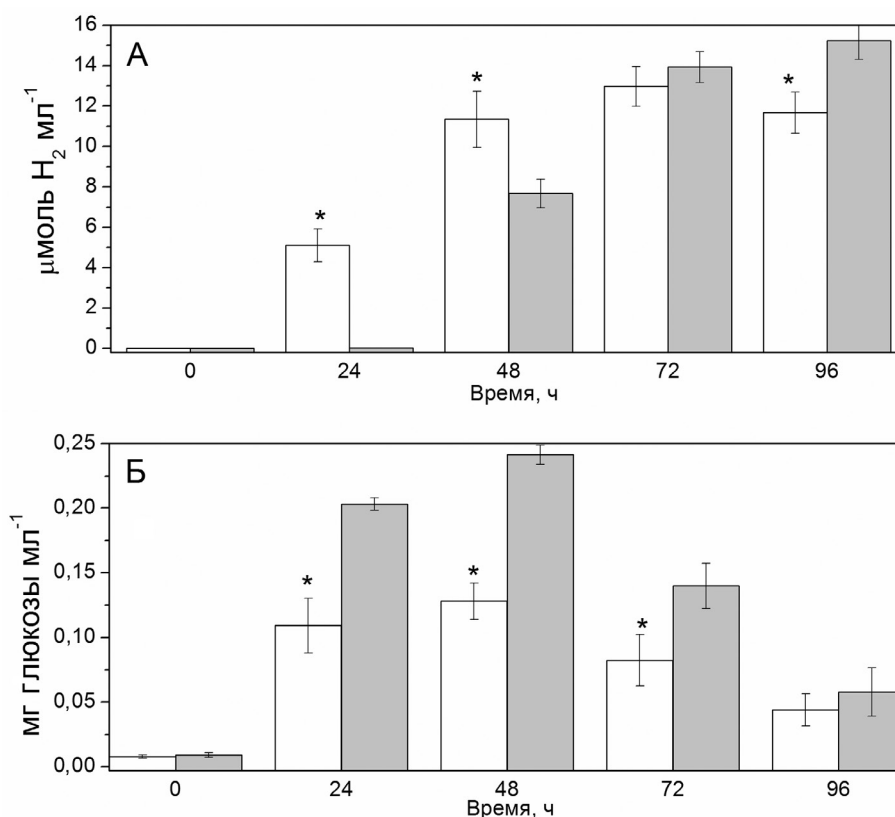


Рис. 1. Количество H_2 в газовой фазе фотореактора (А) и содержание крахмала (Б) в культурах WT (белые столбцы) и *pfl1* (серые столбцы) *Ch. reinhardtii* при инкубации на среде без серы на постоянном свете ($40 \text{ мкмоль фотонов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$). На рисунке показаны средние значения ($n=6$, биологические повторности) и стандартное отклонение. * — статистически значимые различия между средними значениями показателей у WT и *pfl1*, $p < 0,05$.

го процесса по сравнению с WT. Так, в культурах мутанта H_2 отсутствовал в газовой фазе фотореакторов через 24 ч инкубации без серы, а в 48 ч его количество составляло 7,8 мкмоль мл⁻¹, что ниже соответствующего показателя в культурах WT. Через 72 ч эксперимента количество H_2 , выделенного клетками WT и *pfl1*, было примерно одинаковым, а к 96 ч величина этого показателя в культурах мутанта превышала величину у WT примерно на 30%. Полученный результат указывает на то, что фотообразование H_2 в клетках *pfl1* характеризуется большей устойчивостью к стрессу по сравнению с WT. Наши данные отличаются от опубликованных ранее [11], в которой показано, что инактивация фермента PFL1 не оказывает значительного влияния на выход H_2 на свету в голодающих по сере культурах *Ch. reinhardtii*. В экспериментах, описанных в упомянутой статье, инкубация без серы проводилась на свету интенсивностью 140 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹, который существенно превышает оптимальную величину для фотообразования H_2 клетками *Ch. reinhardtii* – 40 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹ [12]. Как известно, избыточная освещенность в условиях серного голодания способствует фотоингибированию и приводит к снижению электронного транспорта из фотосинтетической электрон-транспортной цепи на гидрогеназу и, соответственно, снижению общего выхода H_2 .

Как известно, метаболизм крахмала и активность первичных реакций фотосинтеза являются ключевыми факторами, влияющими на способность зеленых микроводорослей выделять H_2 на свету в условиях дефицита элементов минерального питания [1, 2]. В связи с этим мы изучили изменения содержания крахмала и скорости фотосинтеза в культурах WT и *pfl1*.

Начальное содержание крахмала в 1 мл культуры было незначительным у обоих штаммов, составляя около 0,01 мг мл⁻¹ (рис. 1Б). Через 24 ч инкубации без серы его величина в культурах WT вырастала на порядок до 0,11 мг мл⁻¹, а через 48 ч достигала максимального значения – 0,13 мг мл⁻¹. На последующей стадии голодания содержание крахмала в WT постепенно снижалось с 0,13 мг мл⁻¹ до 0,08 мг мл⁻¹ к 72 ч и до 0,05 мг мл⁻¹ к 96 ч. Полученная динамика данного показателя у *Ch. reinhardtii* соответствует литературным данным и отражает переключение метаболизма микроводорослей с активного фотосинтеза и деления клеток в стандартных условиях в состояние с низкой активностью фотосинтеза и редуцированным делением клеток на начальных стадиях голодания (0–48 ч), когда наблюдается запасание углеводов и липидов – в основном, за счет поглощения ацетата из среды. На последующих стадиях серного голодания (48–96 ч) в клетках микроводорослей полностью инактивируются процессы фиксации двуокиси углерода и поглощения ацетата из среды, поэтому запасенные углеводы используются в качестве источника углерода и энергии.

Культуры мутанта *pfl1* продемонстрировали похожую с культурами WT динамику содержания крахмала в ходе эксперимента (рис. 1Б), однако количество запасенного в течение 48 ч крахмала превышало значения в культурах WT практически в два раза. В последующие 48 ч инкубации наблюдалось более быстрое снижение содержания крахмала в культурах мутанта по сравнению с WT, и величина этого показателя в 96 ч была примерно одинаковой у обоих штаммов. Полученный результат указывает на значительно более выраженную способность мутанта аккумулировать и расходовать крахмал на ранних и поздних стадиях голодания соответственно. Ранее было показано, что способность голодающих по сере клеток *Ch. reinhardtii* аккумулировать значительные запасы крахмала является важным фактором, оказывающим позитивное влияние на выход H_2 [15].

Фотосинтетическую активность и дыхание в клетках *Ch. reinhardtii* оценивали по скорости выделения O_2 в присутствии $NaHCO_3$, как источника CO_2 , на насыщающем свету и по скорости поглощения O_2 в темноте соответственно (таблица). Скорость выделения O_2 отражает активность фотосинтетического электронного транспорта на конечные акцепторы, иные чем O_2 . В контрольных культурах (0 ч) скорость фотосинтеза составляла около 300 мкмоль O_2 (мг Хл)⁻¹ ч⁻¹ у WT и *pfl1*. Дефицит серы в среде индуцировал инактивацию фотосинтеза, скорость которого в культурах WT снижалась примерно на 100 мкмоль O_2 (мг Хл)⁻¹ ч⁻¹ каждые 24 ч в течение 72 ч, падая до нулевого уровня к 96 ч. У мутанта наблюдалось скачкообразное снижение скорости фотосинтеза в интервале времени 24–48 ч: с 245 до 81 мкмоль O_2 (мг Хл)⁻¹ ч⁻¹. Однако клетки мутанта, в отличие от WT, сохраняли фотосинтетическую активность на поздней стадии серного голодания (96 ч) на уровне 29 мкмоль O_2 (мг Хл)⁻¹ ч⁻¹. Функционирование фотосинтетического электронного транспорта в клетках *pfl1* на поздней стадии серного голодания согласуется с сохранением у мутанта способности к фотообразованию H_2 и повышенным расходом крахмала.

Таблица

Скорости светового выделения O_2 (фотосинтез, мкмоль O_2 (мг Хл)⁻¹ ч⁻¹) и темнового поглощения O_2 (дыхание, мкмоль O_2 (мг Хл)⁻¹ ч⁻¹) в культурах WT и *pfl1 Ch. reinhardtii* в ходе инкубации на среде без серы на постоянном свету

Время инкубации, ч	WT		PFL1	
	Фотосинтез	Дыхание	Фотосинтез	Дыхание
0	306±15	23±2,4	308±12	28±2,2
24	230±13*	26±4,2	245±16*	32±3,5
48	126±14*	26±2,8*	81±13*	34±3,2*
72	30±8	24±3,2	27±9	30±2,7
96	0	22±4,3	31±4	27±2,3

Примечание: В таблице приведены средние значения (n=6, биологические повторности) и стандартное отклонение. * – статистически значимые различия между средними значениями показателей у WT и *pfl1*, p < 0,05.

Скорость дыхания в клетках *Ch. reinhardtii* при культивировании на полной среде (0 ч) составила 23 и 28 мкмоль O_2 (мг Хл) $^{-1}$ ч $^{-1}$ у WT и *pfl1*, соответственно (таблица). Дефицит серы в среде индуцировал сходные изменения скорости дыхания в клетках обоих штаммов, а именно, незначимый рост величины данного показателя на 10–15% в течение 48 ч с последующим снижением примерно до начального уровня в конце эксперимента (96 ч). Таким образом, дыхание изменялось сходным образом в клетках WT и *pfl1* в ходе инкубации на среде без серы, однако количественно скорость дыхания в клетках мутанта была выше примерно на 20% таковой у WT. Ранее было высказано предположение о том, что высокая скорость дыхания в клетках *Ch. reinhardtii* способствует фотообразованию H_2 в условиях серного голодания, поддерживая анаэробноз в культуре при остаточной активности ФС2 [16].

Ранее нами было показано, что дефицит серы индуцирует снижение активности ФС2 в клетках *Ch. reinhardtii* не только в результате необратимой деструкции ФС2, но и в результате обратимой регуляции редокс-состояния акцептора Q_A в ФС2 в зависимости от редокс-состояния пластохинонового пула [4]. Так, восстановление пластохинонового пула на анаэробной стадии серного голо-

дания приводит к восстановлению Q_A на свету и, соответственно, функциональной инактивации ФС2. Аэрирование образцов голодающих микроводорослей индуцирует окисление пластохинонового пула кислородом и, соответственно, реактивацию ФС2. Параметр флуоресценции F_V/F_M широко используется для неинвазивной оценки квантового выхода фотохимического преобразования энергии в ФС2. Измерение этого параметра в голодающей культуре микроводорослей до и после аэрации позволяет оценить вклад редокс-зависимого компонента в регуляцию ФС2. Результаты измерений F_V/F_M в фотореакторе и в аэрированных образцах WT и *pfl1* на разных стадиях инкубации без серы показаны на рис. 2. Изменения величины F_V/F_M в фотореакторах были схожи с соответствующими изменениями скорости выделения O_2 (фотосинтетической активности) (см. таблицу). Так, культуры *pfl1* характеризовались более быстрым снижением величины F_V/F_M по сравнению с WT в интервале 24–48 ч, а в конце эксперимента (96 ч) величина F_V/F_M у мутанта достоверно превышала соответствующее значение этого параметра у WT примерно на 30%. На полностью анаэробных стадиях голодания (72 и 96 ч) аэрация образцов индуцировала многократный рост активности ФС2. Величина F_V/F_M в аэриро-

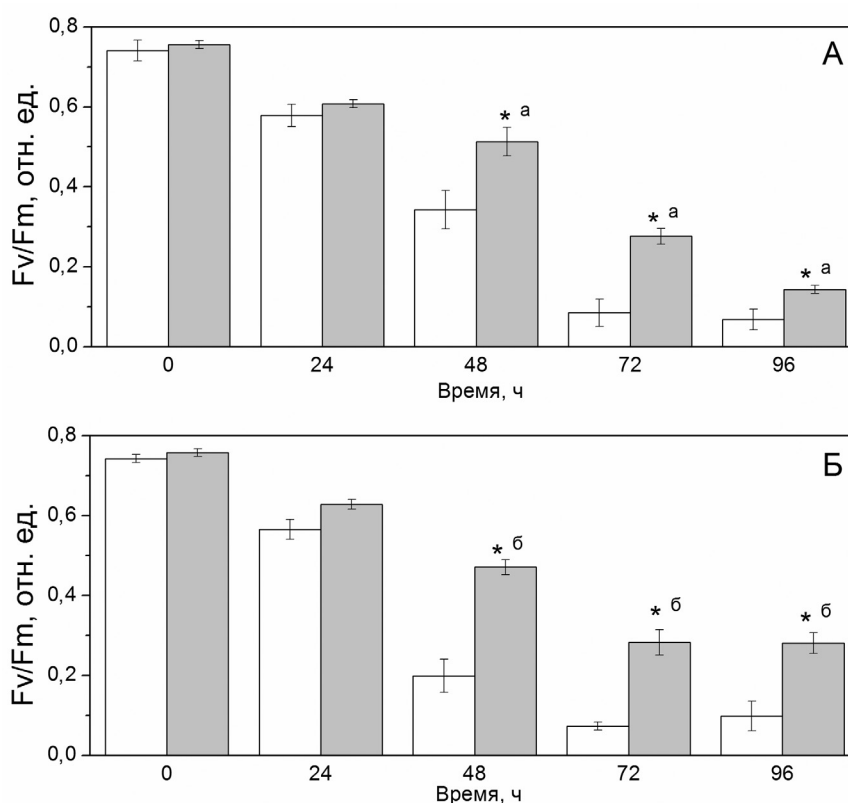


Рис. 2. Изменения параметра флуоресценции хлорофилла F_V/F_M в культурах WT (А) и мутанта *pfl1* (Б) *Ch. reinhardtii* при инкубации на среде без серы на постоянном свете. Белым цветом обозначены результаты измерений в закрытом фотобиореакторе, серым — результаты для аэрированных образцов. На рисунке показаны средние значения ($n=6$, биологические повторности) и стандартное отклонение.

^{a, б} — статистически значимые различия между средними значениями F_V/F_M в образцах до и после продувки воздухом, $p < 0,05$.

* — статистически значимые различия между средними значениями F_V/F_M у WT (А) и *pfl1* (Б), $p < 0,05$.

ванных образцах через 96 ч инкубации без серы была заметно выше (примерно на 100%) в клетках *pfl1* по сравнению с клетками WT, указывая на более активное и стабильное состояние ФС2 у мутанта на поздней стадии серного голодания. Ранее отмечалось, что электронный транспорт через ФС2 и фотообразование H_2 клетками микроводорослей в условиях серного голодания являются тесно взаимосвязанными процессами [16]. Так, активность ФС2 обеспечивает более интенсивный транспорт электронов от воды на гидрогеназу через ряд фотосинтетических переносчиков, способствуя фотообразованию H_2 . При этом выделяемый в ФС2 кислород быстро поглощается в реакциях дыхания. Восстановительные эквиваленты для дыхания преимущественно генерируются в процессе деградации крахмала, накопленного на начальных стадиях серного голодания.

Полученные в работе результаты свидетельствуют о том, что клетки *pfl1*, в отличие от WT, характеризуется более выраженной способностью к фотопродукции H_2 на поздних стадиях серного голодания, когда наблюдается сильное угнетение метаболической активности в клетках. Также мутант характеризуется более интенсивным расходом запасенного крахмала и более высокой фотосинтетической активностью, а также активностью ФС2 на поздних стадиях серного голодания, что оказывает стимулирующее действие на фотообразование H_2 и отражает, в целом, большую устойчивость к стрессу. Подобное действие мутации *pfl1* на способность клеток *Ch. reinhardtii* адаптироваться к анаэробным условиям, индуцированным серным голоданием на свету, может быть следствием, например, снижения выхода токсичных продуктов брожения, таких

как формиат и этанол, в клетках мутанта, что может оказывать общее позитивное воздействие на жизнеспособность клеток. Мутант *pfl1* характеризовался не только способностью накапливать больше крахмала, чем WT, но и низкой способностью аккумулировать липиды. Общее содержание жирных кислот в культуре WT увеличивалось примерно в два раза в течение 24 ч голодания, в то время как в культуре *pfl1* этот показатель увеличивался только на 20%. В последующие часы эксперимента общее содержание жирных кислот обоих штаммов оставалось практически неизменным (данные не приведены). Данный эффект мутации *pfl1* может быть обусловлен снижением образования ацетил-КоА, который является субстратом для синтеза жирных кислот. Перераспределение запасов углерода между углеводами и липидами в клетках *pfl1* в пользу углеводов может способствовать фотообразованию H_2 .

Таким образом, в работе показано, что реакции брожения оказывают значительное влияние на фотопродукцию H_2 голодающими по сере клетками *Ch. reinhardtii*, особенно на поздних стадиях, а мутации на уровне пируватформатлиазы могут рассматриваться в качестве перспективных для увеличения продолжительности процесса фотопродукции H_2 в биотехнологических целях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-64-46018). Результаты, полученные флуоресцентным методом, выполнены в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032500058-7.

Исследования проведены без использования лабораторных животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Antal T.K. The metabolic acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to depletion of essential nutrients: application for hydrogen production // Microalgal Hydrogen Production: Achievements and Perspectives / Eds. M. Seibert, G. Torzillo. RSC Publishing, 2018. P. 235–264.
2. Kosourov S., Böhm M., Senger M., Berggren G., Stensjö K., Mamedov F., Lindblad P., Allahverdiyeva Y. Photosynthetic hydrogen production: novel protocols, promising engineering approaches and application of semi-synthetic hydrogenases // Physiol. Plant. 2021. Vol. 173. N 2. P. 555–567.
3. Antal T., Petrova E., Slepnyova V., Kukarskikh G., Volgusheva A., Dubini A., Baizhumanov A., Tyysjärvi T., Gorelova O., Baulina O., Chivkunova O., Solovchenko A., Rubin A. Photosynthetic hydrogen production as acclimation mechanism in nutrient-deprived *Chlamydomonas* // Algal Res. 2020. Vol. 49: 101951.
4. Antal T.K., Krendeleva T.E., Laurinavichene T.V., Makarova V.V., Ghirardi M.L., Rubin A.B., Tsygankov A.A., Seibert M. The dependence of algal H_2 production on Photosystem II and O_2 consumption activities in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells // Biochim. Biophys. Acta. 2003. Vol. 1607. N 2–3. P. 153–160.
5. Kosourov S., Seibert M., Ghirardi M.L. Effects of extracellular pH on the metabolic pathways in sulfur-deprived, H_2 -producing *Chlamydomonas reinhardtii* cultures // Plant Cell Physiol. 2003. Vol. 44. N 2. P. 146–155.
6. Gfeller R.P., Gibbs M. Fermentative metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*: I. analysis of fermentative products from starch in dark and light // Plant Physiol. 1984. Vol. 75. N 1. P. 212–218.
7. Atteia A., van Lis R., Gelius-Dietrich G., Adrait A., Garin J., Joyard J., Rolland N., Martin W. Pyruvate formate-lyase and a novel route of eukaryotic ATP synthesis in *Chlamydomonas* mitochondria // J. Biol. Chem. 2006. Vol. 281. N 15. P. 9909–9918.
8. Terashima M., Specht M., Naumann B., Hippler M. Characterizing the anaerobic response of *Chlamydomonas*

reinhardtii by quantitative proteomics // Mol. Cell Proteomics. 2010. Vol. 9. N 7. P. 1514–1532.

9. Philipps G., Krawietz D., Hemschemeier A., Happe T. A pyruvate formate lyase (PFL1) deficient *Chlamydomonas reinhardtii* strain provides evidence for a link between fermentation and hydrogen evolution in green algae // Plant J. 2011. Vol. 66. N 2. P. 330–340.

10. Catalanotti C., Dubini A., Subramanian V., Yang W., Magneschi L., Mus F., Seibert M., Posewitz M.C., Grossman A.R. Altered fermentative metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* mutants lacking pyruvate formate lyase and both pyruvate formate lyase and alcohol dehydrogenase // Plant Cell. 2012. Vol. 24. N 2. P. 692–707.

11. Burgess S.J., Tredwell G., Molnár A., Bundy J.G., Nixon P.J. Artificial microRNA-mediated knockdown of pyruvate formate lyase (PFL1) provides evidence for an active 3-hydroxybutyrate production pathway in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // J. Biotechnol. 2012. Vol. 162. N 1. P. 57–66.

12. Laurinavichene T., Tolstygina I., Tsygankov A. The effect of light intensity on hydrogen production by sulfur-de-

prived *Chlamydomonas reinhardtii* // J. Biotechnol. 2004. Vol. 114. N 1–2. P. 143–151.

13. Lichtenthaler H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes // Methods Enzymol, vol. 148 / Eds. R. Douce and L. Packer. N.Y.: Press Inc., 1987. P. 350–382.

14. Shreiber U., Hormann H., Neubauer C., Klughammer C. Assessment of photosystem II photochemical quantum yield by chlorophyll fluorescence quenching analysis // Plant Physiol. 1995. Vol. 22. N 2. P. 209–220.

15. Hemschemeier A., Fouchard S., Cournac L., Peltier G., Happe T. Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*: an elaborate interplay of electron sources and sinks // Planta. 2008. Vol. 227. N 2. P. 397–407.

16. Volgusheva A., Styling S., Mamedov F. Increased photosystem II stability promotes H₂ production in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2013. Vol. 110. N 18. P. 7223–7228.

Поступила в редакцию 21.11.2021

После доработки 19.01.2022

Принята в печать 01.02.2022

RESEARCH ARTICLE

Influence of fermentation reactions on continuous hydrogen photoproduction by microalga *Chlamydomonas reinhardtii* under sulfur deficiency

A.A. Volgusheva¹, * , E.V. Petrova¹ , G.P. Kukarskikh¹ ,
A. Dubini² , T.K. Antal³ 

¹Department of Biophysics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia;

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, University of Córdoba,
Edif. Severo Ochoa, Campus de Rabanales, 14071, Córdoba, Spain;

³Laboratory of Integrated Environmental Research, Pskov State University,
21 Sovetskaya Street, Pskov, 180000, Russia

*e-mail: volg-alena@yandex.ru

The study investigated the effect of the major fermentation enzyme – pyruvate formate lyase – on hydrogen photoproduction by green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* under mineral deprivation. Cultures of the wild type (CC-125) and mutant *pfl1* without pyruvate formate lyase activity were incubated on a medium without sulfur in the sealed photoreactors under constant illumination for 96 h. During experiment, accumulation of hydrogen in gas phase of photoreactors and factors affecting hydrogen production, such as photosynthetic activity, respiration, and starch content in cells were assessed. Both strains showed similar photosynthetic activity and starch content when cultivated in the complete medium. Under sulfur depletion, the cultures of the *pfl1* mutant began to evolve hydrogen later than the wild type; however, this process lasted much longer in the mutant. The *pfl1* cultures showed higher rates of starch accumulation and breakdown at the initial and late stages of sulfur deprivation, respectively. Moreover, the mutant was characterized by higher photosynthetic activity at the later stage of starvation. The obtained results indicate close relationships between photosynthetic electron transport, hydrogenase reaction, carbohydrate metabolism and fermentation process, pointing to the prospect of using genetic engineering to modify fermentation reactions in order to improve photosynthetic hydrogen production in biotechnology.

Keywords: *hydrogen photoproduction, sulfur deprivation, fermentation, pyruvate formate lyase, hydrogenase, Chlamydomonas*

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 20-64-46018. The results obtained by using fluorescence methods were carried out with support of the Scientific Project of Lomonosov Moscow State University №121032500058-7.

Сведения об авторах

Волгушева Алёна Александровна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-19-63; e-mail: *volg-alena@yandex.ru*

Петрова Елена Вячеславовна — науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-17-46; e-mail: *eslepova@list.ru*

Кукарских Галина Павловна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-19-63; e-mail: *gkukarsk@mail.ru*

Дубини Александра — Ph.D., науч. сотр. кафедры биохимии и молекулярной биологии факультета естественных наук, Университет Кордовы, Испания. Тел.: +3-495-721-83-52; e-mail: *alexandra.dubini@uco.es*

Антал Тарас Корнелиевич — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. ПсковГУ, проректор ПсковГУ. Тел.: 8-8112-29-70-06; e-mail: *taras_an@mail.ru*