

## 绿藻氢化酶及其产氢代谢的分子生物学研究进展

## Advances in molecular biology of green algae for biohydrogen production

范晓蕾<sup>1</sup>, 郭荣波<sup>1</sup>, 王广策<sup>2</sup>, 许晓晖<sup>1</sup>, 时艳侠<sup>1</sup>

(1. 中国科学院 青岛生物能源与过程研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

中图分类号: Q819

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096 (2009) 01-0077-07

随着全球工业的迅猛发展,对能源的需求量大幅增加,由于不可再生的矿物能源储量有限,导致能源危机逐渐映现,因此,开发可再生的洁净新能源成为亟待解决的全球性问题。 $H_2$ 由于其能量密度高,燃烧后只生成水,不造成任何污染,成为最理想的可再生能源之一。在各种制氢方法中,绿藻制氢以太阳光为能源,以水为原料,通过光解水制取 $H_2$ ,是目前生物制氢技术研究的热点。

绿藻产氢现象由Gaffron<sup>[1]</sup>首次发现,此后,许多科学工作者从不同的角度开展了绿藻产氢研究。目前已知的具有产氢能力的绿藻集中在团藻目和绿球藻目,包括莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)、*Chlamydomonas moewusii*、夜配衣藻(*Chlamydomonas noctigama*)、*Chlorella fusca*、斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)、*Scenedesmus vacuolatus*、*Chlorococcum littorale*、*Chlorococcum submarinum*、*Lobochlamys segnis*和亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*)<sup>[2~4]</sup>等。

尽管绿藻产氢优势突出,但相对于产业化的目标来讲,仍有很多技术问题需要解决,特别是产氢效率低以及氢化酶耐氧性差等问题,因此,绿藻产氢代谢和氢化酶反应机理研究引起了广泛关注。分子生物学技术是研究绿藻产氢代谢机理、鉴定基因功能和进行藻株改良的重要手段。由于绿藻中莱茵衣藻的基因组得到过大规模的测序,遗传学背景比较清晰,同时还具有培养容易、生长速度快、氢化酶活性高等特点,近年来,各国科学家主要以莱茵衣藻为研究对象,在绿藻产氢代谢和氢化酶结构与

功能方面进行了大量的分子生物学研究。作者就该领域的最新研究动态进行了综述。

## 1 氢化酶的分子生物学研究

### 1.1 绿藻氢化酶的结构

氢化酶是催化产氢反应的关键酶,根据其活性中心包含金属原子的不同,可以分为Fe氢化酶和Ni-Fe氢化酶两种。目前发现的绿藻氢化酶主要是可逆Fe氢化酶。其中,莱茵衣藻的氢化酶最先得到了分离鉴定,为47.5 ku大小的单体可逆Fe氢化酶<sup>[5~7]</sup>。随后,*C. fusca*<sup>[8]</sup>、*C. moewusii*<sup>[9]</sup>、*C. littorale*<sup>[10]</sup>以及亚心形扁藻<sup>[11]</sup>中也相继发现了可逆Fe氢化酶。而在斜生栅藻<sup>[12]</sup>中,则有研究表明可能同时存在可逆Fe氢化酶和Ni-Fe氢化酶两种氢化酶。

与梭菌(*Clostridium pasteurianum*)的单体Fe氢化酶相比,绿藻Fe氢化酶的C末端(包括HC催化反应中心)序列同源性较高,而N末端序列发生大片段缺失,失去了所有的[FeS]簇结构域,这表明在绿藻中,电子是直接从硫氧还蛋白传递到催化反应中心的<sup>[13]</sup>。酶活性研究则表明,藻类Fe氢化酶的催化效率要远远高于细菌氢化酶,似乎这种高度缺失的结构更有利于电子的转移<sup>[13]</sup>。

绿藻Fe氢化酶基因比较复杂,从结构上来讲,其一般由多个内含子及外显子序列组成。以斜生栅藻为例,其Fe氢化酶基因就由5个内含子和6个外

收稿日期: 2008-07-09; 修回日期: 2008-09-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40806062)

作者简介: 范晓蕾(1980-),女,山东武城人,助理研究员,主要从事生物制氢研究,电话: 0532-80662708, E-mail: fanx1@qibebt.ac.cn

显子组成,全长cDNA由2 609对碱基组成,编码大约448个氨基酸<sup>[13]</sup>。现已知绿藻氢化酶的结构如表1<sup>[13]</sup>所示。绿藻Fe氢化酶基因的复杂性还表现在一种绿藻中可能同时含有多种Fe氢化酶。Wunschiers等<sup>[14]</sup>曾在斜生栅藻中扩增得到了一种完全不同类型的Fe氢化酶基因,该氢化酶基因的表达不受厌氧调控,而呈组成性表达。Forestier等<sup>[15]</sup>和Zhang等<sup>[16]</sup>在莱茵衣藻中也扩增到与HydA1不同的基因HydA2,其编码蛋白(505aa,49 ku)比HydA1(441aa,

47.5 ku)略大,二者氨基酸序列的相似度达68%,并且与厌氧菌的氢化酶高度相似,保留了催化中心所有的保守基元。与斜生栅藻不同的是,莱茵衣藻的这两个Fe氢化酶都有很强的专一性,受无氧条件的诱导表达和缺氧时间、培养基中有无乙酸和硫酸等生长条件的调控,但为不同的启动子和调控机理所调控<sup>[15,17]</sup>。目前,这些不同类型的Fe氢化酶的生物功能还在进一步研究中。

表1 藻类Fe氢化酶的结构特征

Tab. 1 Structural characteristics of algal Fe-hydrogenase from *C. reinhardtii* (Cr HydA1 and Cr HydA2), *S. obliquus* (So HydA1), and *C. fusca* (Cf HydA). The respective genbank accession numbers are AF289201, AY055756, AJ271546, and AJ298227

氢化酶性质	外显子个数	内含子个数	编码区碱基对数	5'UTR碱基对数	3'UTR碱基对数	编码蛋白质残基数	信号肽残基数	TATA框位置
Cr HydA1	8	7	1494	158	747	497	50	5'UTR 上游 187bp
Cr HydA2	10	9	1515	139	873	505	62	5'UTR 上游 24bp
So HydA1	6	5	1344	154	1100	448	35	5'UTR 上游 25bp
Cf HydA	6	5	1310			436	21	5'UTR 上游 25bp

注: Cr HydA1. 莱茵衣藻氢化酶HydA1; Cr HydA2. 莱茵衣藻氢化酶HydA2; So HydA1. 斜生栅藻氢化酶HydA1; Cf HydA. *C. fusca*氢化酶

## 1.2 绿藻Fe氢化酶的表达

2002年, Happe等<sup>[17]</sup>将莱茵衣藻的氢化酶基因*hydA1*克隆到大肠杆菌中进行了表达, 尽管利用Western blot检测到了HydA1蛋白的大量表达, 但是并未检测到其催化活性, 说明HydA1蛋白的活性表达可能还需要辅助因子的后期修饰。此后不久, Posewitz等<sup>[18,19]</sup>发现*hydEF*基因的突变, 会导致莱茵衣藻Fe氢化酶的活性丧失, *HydG*对实现HydA1和HydA2活性至关重要。Posewitz<sup>[20]</sup>通过在大肠杆菌(*Escherichia coli*)中共表达莱茵衣藻的*HydEF*、*HydG*和*HydA1*基因, 首次得到了一个有活性的HydA1酶, 但该活性HydA1酶的表达并不十分稳定<sup>[21]</sup>。而在丙酮丁酸梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)中表达藻源HydA1酶, 虽然可以得到稳定活性表达的HydA1酶, 但是表达量却很低<sup>[22]</sup>。King等<sup>[22]</sup>通过将丙酮丁酸梭菌来源的*HydE*、*HydF*和*HydG*与莱茵衣藻的*HydA1*共转化大肠杆菌细胞发现, HydA1氢化酶不但可以得到稳定表达活性, 氢化酶的表达量也得到了大大提高。

值得注意的是, 由于细胞壁的存在, 所有体内表达策略在进行蛋白质表达以及折叠的调控研究上都存在很大的局限性, 若要深入研究绿藻氢化酶

的成熟机理, 则必须打破细胞壁的限制。2007年, Boyer等<sup>[23]</sup>报道了一种在大肠杆菌来源的无细胞体系中实现绿藻氢化酶的异源活性表达的方法, 使得深入认识绿藻氢化酶等复杂蛋白质表达以及折叠的调控机理成为可能。

## 1.3 绿藻Fe氢化酶的氧敏感性

Fe氢化酶氧化还原电位低, 催化活性高且不需要消耗ATP, 与Ni-Fe氢化酶和固氮酶相比, 优势明显, 其最大的问题是对氧极为敏感, 遇氧迅速失活, 与绿藻的光合作用形成矛盾, 限制了绿藻制氢研究的发展。近年来, 科学家们为深入揭示Fe氢化酶的氧敏感性机理进行了一系列的研究, 发现藻类Fe氢化酶与细菌Fe氢化酶一样, 其氧敏感性源自其催化中心位点[2Fe2S]的可逆氧化作用<sup>[24]</sup>。目前对细菌氢化酶结构的研究已经表明, O<sub>2</sub>可能通过一些由多肽折叠形成的气体通道到达催化位点<sup>[25,26]</sup>。由于藻类Fe氢化酶的晶体还难以获得, 目前对而其结构的研究主要是通过同源建模的方法进行。通过对莱茵衣藻HydA1和HydA2的同源建模发现, 在其表面也存在可能的气体通道<sup>[15]</sup>, 并且这些氢化酶的气体通道孔径大于H<sub>2</sub>与O<sub>2</sub>的分子直径<sup>[9]</sup>。这些通道的孔径大小并不相同, 有人认为孔径较大的为O<sub>2</sub>通道, 而较

小的为H<sub>2</sub>通道<sup>[27]</sup>。一些初步研究已经表明,氢化酶的耐氧性的确与其氨基酸序列密切相关<sup>[28]</sup>。King等<sup>[29]</sup>利用定点突变技术对莱茵衣藻HydA1气体通道的相应氨基酸进行了替换,减小了气体通道的孔径,发现其氧耐受性可提高一倍左右,证明通过改造绿藻氢化酶的遗传信息来改良其耐氧性是完全可能的,并且将成为绿藻产氢研究中一个极具前景的研究方向。

## 2 绿藻产氢代谢的分子生物学研究

### 2.1 绿藻产氢代谢途径

目前,绿藻产氢途径主要可以分为直接生物光解途径和间接生物光解途径。在直接生物光解途径中,绿藻通过捕获太阳光,利用光能经由光合反应将水分子光解,获得低电位的还原力,并最终还原Fe氢化酶释放出氢气<sup>[30]</sup>(图1)。间接生物光解途径可以分为两个阶段,在第一个阶段中,绿藻细胞在有氧条件下通过光合作用固定二氧化碳,合成细胞物质,而在第二个阶段中,在无氧条件下,这些细胞物质会通过酵解产生还原力,用于Fe氢化酶的还原和氢气的释放<sup>[30]</sup>(图2)。直接生物光解途径面临的最主要的问题仍然是Fe氢化酶的氧抑制问题,而

在间接生物光解途径中,最主要的问题则是由于一些未知原因,产氢能力只能维持在光合放氧的基线水平,产氢潜力得不到完全释放<sup>[31]</sup>。近年来的研究多以发掘功能基因、寻找调控靶点为主,在这种情况下,对莱茵衣藻DNA插入突变库进行筛选,成为鉴定代谢相关的重要功能基因的最为有效的策略<sup>[18,32-36]</sup>,并相继发现了与绿藻产氢密切相关的多种基因。

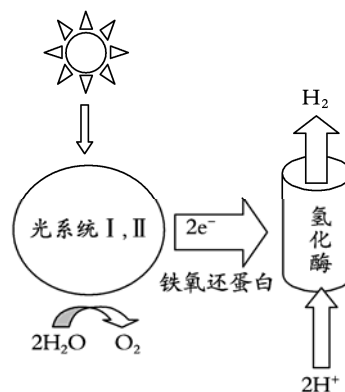


图1 直接生物光解产氢途径

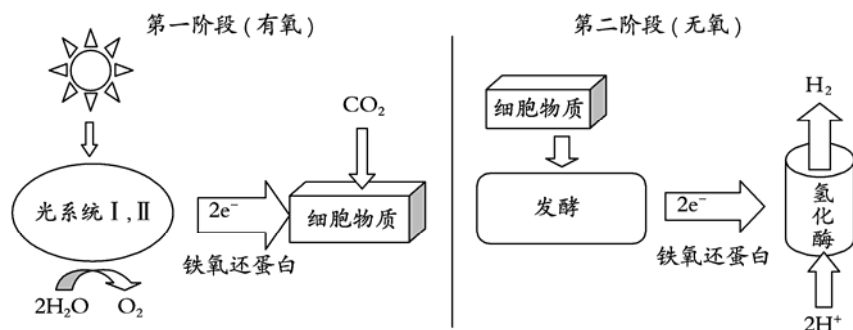


图2 间接生物光解产氢途径

### 2.2 绿藻产氢代谢的重要相关基因

#### 2.2.1 叶绿体硫渗透酶基因 *SulP*

硫元素作为绿藻生长的必需元素,可以直接影响到绿藻生理代谢过程。研究表明,莱茵衣藻细胞在无硫培养的状态下,其光合放氧速率会迅速大幅下降,而呼吸速率则变化较小,有助于造成厌氧环境,因此,无硫培养技术成为目前主要的绿藻制氢技术之一<sup>[37]</sup>。由此看来,硫代谢可通过影响光合作用来影响绿藻的产氢代谢,因而对硫代谢途径进行适当调控完全可能提高产氢代谢的效率。在莱茵衣

藻的硫代谢过程中,Chen等<sup>[38]</sup>首先发现了叶绿体硫渗透酶基因*SulP*,其编码的蛋白是ABC型叶绿体膜硫转运复合物的的重要组成部分,该复合物位于叶绿体表面,对硫的运输与富集起重要作用。研究发现,*SulP*的突变可以引起光系统II的修复能力下降<sup>[39,40]</sup>,由此看来,该基因极有可能成为代谢调控的一个重要靶点,例如可通过代谢工程量化控制该硫渗透酶活性,使得在密闭培养时,微藻细胞光合作用的速率与呼吸作用相匹配,既保证微藻的正常生长又保证整个体系的厌氧或微氧环境,理论上实现活

性氢化酶的持续表达和高效持续光照产氢将是完全可行的<sup>[9]</sup>。目前,在Sulp的抑制实验中,发现细胞会表现出明显的硫缺乏状态,其中一些*antiSulp*衣藻植株甚至已经实现了光照条件下的持续产氢<sup>[37,41]</sup>。

### 2.2.2 异淀粉酶基因 *sta7*

2004年, Posewitz等<sup>[18]</sup>对莱茵衣藻突变库进行了产氢能力筛选,得到一个产氢功能缺失突变株*sta7-10*。对该藻株的突变基因*sta7*进行分离发现,其编码产物与其他植物的异淀粉酶高度同源,同时对突变株*sta7-10*检测还发现,该突变株的不可溶性淀粉含量仅不到野生型含量的5%,并且氢化酶的转录速度与降解速度出现明显异常,产氢量远低于野生型。

关于异淀粉酶在淀粉合成中的功能,目前存在三种解释,一种认为它的作用是修饰支链淀粉前体的某些分支位点,有助于淀粉晶体的形成;另一种则认为该酶的作用是降解可溶性葡聚糖,而这些可溶性葡聚糖的存在会竞争性抑制淀粉晶体的形成;还有一种认为该酶的作用与控制淀粉核的形成有关。不管哪一种解释,毫无疑问,异淀粉酶会直接影响到淀粉晶体的形成。由于在厌氧诱导的藻细胞中,存在两种电子供给途径,除了PS II光解水的途径之外,内源物质主要是淀粉等的降解也可以为氢化酶提供大量电子<sup>[37]</sup>,因而推测在异淀粉酶突变株中淀粉晶体含量的下降,会直接影响到产氢电子的供给,进而影响H<sub>2</sub>的产量。当然,氢化酶的转录本的降解速度的加快也可能是影响H<sub>2</sub>产量的原因。如果可以明确异淀粉酶影响绿藻产氢的具体机制,就有可能通过调控该异淀粉酶的活性的方法来调控绿藻淀粉含量,增加莱茵衣藻产氢持续时间与产氢量,因此异淀粉酶研究也将成为绿藻产氢代谢调控研究的一个重要方面。

### 2.2.3 *Tla1* 基因及其类似功能基因

光反应所产生并传递的电子是产生H<sub>2</sub>的原初还原力,因而藻株光合作用效率的高低制约着其最大产氢量。天线色素体在光合作用中负责光能的吸收和传递,在绿藻中由大约750个叶绿素分子组成,其中,仅有大约122个叶绿素分子是光反应所必须的,而多余的色素分子目前并未发现有重要的生理学功能<sup>[36]</sup>。一般来讲,在强光照射条件下(如太阳光直接照射下),天线色素吸收的约有90%以上的光能以荧光和热能的形式浪费掉。而在实际的微藻培养中,藻体天线色素含量过高,往往还会给藻体

的高密度培养造成困难,从而大大降低了培养体系的光转化效率和光合生产力<sup>[40]</sup>。

自20世纪中叶起,减小天线色素体能够增加微藻培养体系的光能利用效率和光合生产力的假设就相继得到理论论证<sup>[40,42]</sup>。2001年, Polle等<sup>[43]</sup>对莱茵衣藻随机插入突变文库进行叶绿素突变体筛选时发现,其中一株PS II中天线色素体的大小不到野生型的一半,但光合速率却是野生型的3倍,影响叶绿素天线色素体大小的*Tla1*基因也因此得以发现<sup>[36]</sup>。同年, Masuda等<sup>[44]</sup>在杜氏盐藻(*Dunaliella Salina*)中又发现,叶绿素a氧化酶基因(CAO)和*Lhcb*的表达在光介导的天线色素体大小变化过程中也具有非常重要的作用。*Tla1*基因及其类似功能基因的发现表明,天线色素复合体的大小是可以通过改变微藻遗传信息来调控的,对其进行研究将有助于解决绿藻产氢过程中的光利用效率低的问题,可用于绿藻的规模培养,以增加生物量积累、碳固定和产氢量。

## 3 分子生物学技术在绿藻制氢中的应用前景

随着对绿藻氢化酶以及产氢代谢机理了解的越发深入,分子生物学技术在绿藻氢化酶的改造以及产氢代谢调控中的优势也变得越发明显。以现代分子生物学技术为主要手段,主动地改造基因、调控代谢的研究正逐渐成为未来制氢微藻研究的主流。

### 3.1 蛋白质改良研究

氢化酶对O<sub>2</sub>的敏感性是由其催化位点的结构和催化位点对O<sub>2</sub>的亲和能力这两个因素决定的。目前已经得到多种细菌氢化酶的三维晶体结构<sup>[45]</sup>,并且预测了H<sub>2</sub>和O<sub>2</sub>进出催化中心的通道,但绿藻氢化酶的三维晶体结构还未得到诠释。尽管King等<sup>[29]</sup>通过设计莱茵衣藻Fe氢化酶气体通道结构,取得了一些进展,但是由于缺乏对Fe氢化酶基因及其编码蛋白产物的三维结构及功能等方面信息的了解,现有的知识基础还不足以对Fe氢化酶进行完全理性化分子设计,因此定向突变技术的应用还有待于绿藻Fe氢化酶三维结构及功能的进一步研究。

基因改组技术(gene shuffling)是一种试管内分子进化技术,目前该技术已广泛应用于蛋白质工程领域,并在改造多种酶的特异性、抗性、活性以及稳定性等方面取得了巨大的成功<sup>[39]</sup>。由于在进化过程中不同物种的同源基因保留了极其丰富的功

能库, 基因改组技术可以通过基因家族在分子水平上的重组, 创造分子的多样性, 有利于迅速筛选到理想的变异, 并且有利于深化分子结构与功能关系研究。该技术与定点突变技术相比不需要对蛋白产物的三维结构及功能有深入的了解, 而相对于化学诱变的方法又能将突变局限在特定基因内, 并且能大大提高良性突变的概率, 因此, 基因改组技术十分适用于当前研究水平的绿藻Fe氢化酶改良研究。目前, Nagy等<sup>[46]</sup>已经将其应用于梭菌属(*Clostridia*)的氢化酶改造, 建立了shuffling突变基因库, 并从中筛选到了催化活性明显提高的重组藻株。

除此以外, 如果能在自然界微生物中筛选到具有耐氧性的氢化酶基因资源, 并实现其在绿藻中的活性表达及与光合作用的偶联, 也有望大大提高绿藻产氢的氧耐受性, 目前对氢化酶资源的筛选工作尚在进行中<sup>[47]</sup>。

### 3.2 代谢工程研究

虽然绿藻产氢相关代谢中的许多关键功能基因已经得到发掘和功能鉴定, 但是, 其大都通过影响其他代谢来间接影响产氢代谢, 若要实现对绿藻产氢代谢通路的有效调控, 仍尚需更为直接有效的调控靶点的揭示。而通过对突变库进行功能筛选的方法来发掘基因, 效率相当低。如果能将高通量的比较蛋白质组学分离技术以及基因差异显示技术应用到研究中, 将有可能大大加快重要代谢功能基因的筛选进程, 从而有助于我们更快更深入的了解绿藻的产氢代谢机理。

在发掘重要功能基因的基础上, 通过代谢工程手段有目的的对绿藻产氢代谢的关键点进行调控研究, 例如过表达某些限速酶如淀粉异构酶, 或者利用反义核酸技术或基因剔除技术等抑制或失活某些基因如硫酸通透酶和 *Tla1*、*CAO* 和 *Lhcb* 等天线色素大小相关基因的表达等等, 可以实现微藻的氢代谢途径向利于产氢的方向转变, 有助于得到高效产氢的工程藻株。

与废水废气处理相耦合也是绿藻产氢代谢工程研究的一个重要方面。目前, 已有研究将 *Chlorella kessleri* 的 *HUP1* 基因在莱茵衣藻 *Stm6* 中表达, 使莱茵衣藻可以同时利用外源六碳糖和  $H_2O$  产生  $H_2$ , 比 *Stm6* 的产氢量提高了 50%, 同时提供了利用绿藻处理含糖废物联合高效产氢的可能<sup>[48]</sup>。

## 4 结语

绿藻光解水制氢在制氢领域具有巨大的发展潜力, 但产氢效率低、氢化酶耐氧性差是限制其发展的两大主要问题。分子生物学技术凭借其可对遗传物质直接进行操作的得天独厚的优势, 已经在了解绿藻光解水制氢机理研究中发挥了巨大作用。随着认识的深入, 提高氢化酶耐氧性和调控绿藻产氢相关代谢的研究将成为未来研究的重要方向, 从而将为大量现代分子生物学技术的应用提供更为广阔的空间。

### 参考文献:

- [1] Gaffron H. Reduction of carbon dioxide with molecular hydrogen in green algae [J]. **Nature**, 1939, 143: 204-205.
- [2] 冉春秋, 张卫, 虞星炬, 等. 解偶联剂CCCP对莱茵衣藻光照产氢过程的调控[J]. 高等学校化学学报. 2006, 27: 62-66.
- [3] Skianes K, Knutsen G, Kallquist T, *et al.*  $H_2$  production from marine and freshwater species of green algae during sulfur deprivation and considerations for bioreactor design [J]. **International journal of hydrogen energy**, 2008, 33: 511-521.
- [4] Kamp C, Silakov A, Winkler M, *et al.* Isolation and first EPR characterization of the [FeFe]-hydrogenase from green algae [J]. **Biochimica et Biophysica**, 2008, 1 777: 410-416
- [5] Roessler P G, Lien S. Purification of hydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. **Plant Physiol**, 1984, 75(3): 705-709.
- [6] Happe T, Naber J D. Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. **European Journal of Biochemistry**, 1993, 214(2): 475-481.
- [7] Happe T, Mosler B, Naber J D. Induction, localization and metal content of hydrogenase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. **European Journal of Biochemistry**, 1994, 222(3): 769-774.
- [8] Winkler M, Heil B, Happe T. Isolation and molecular characterization of the [Fe]-hydrogenase from the unicellular green alga *Chlorella fusca* [J]. **Biochim Biophys Acta**, 2002, 1 576: 330-334.
- [9] Melis A, Seibert M, Happe T. Genomics of green algal hydrogen research [J]. **Photosynth Res**, 2004, 82: 277-

- 288.
- [10] Winkler M, Heil B, Happe T. Isolation and molecular characterization of the [Fe]-hydrogenase from the unicellular green alga *Chlorella fusca* [J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2002, 1576: 330-334.
- [11] Guo Z, Chen Z, Yu X, *et al.* Subcellular localization and identification of hydrogenase isolated from the marine green alga *Platymonas subcordiformis* using immunoprecipitation and MALDI-TOF MS [J]. **Chin J Biotech**, 2007, 23(2): 297-302.
- [12] Florin L, Tsokoglou A, Happe T. A novel type of iron hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* is linked to the photosynthetic electron transport chain [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2001, 276 (2) : 6125-6132.
- [13] Ghirardi M L, Posewitz M C, Maness P C, *et al.* Hydrogenases and hydrogen photoproduction in oxygenic photosynthetic organisms [J]. **Annu Rev Plant Biol**, 2007, 58: 71-91.
- [14] Wunschiers R, Senger H, Schulz R. Electron pathways involved in H<sub>2</sub>-metabolism in the green alga *Scenedesmus obliquus* [J]. **Biochim Biophys Acta**, 2001, 1503: 271-278.
- [15] Forestier M, King P, Zhang L, *et al.* Expression of two [Fe]-hydrogenases in *Chlamydomonas reinhardtii* under anaerobic conditions [J]. **European Journal of Biochemistry**, 2003, 270: 2750-2758.
- [16] Zhang L, Zhang W, Jin M, *et al.* Cloning and structure analysis of hydrogenase gene from *Chlamydomonas reinhardtii* SE [J]. **Process Biochemistry**, 2005, 40: 2968-2972.
- [17] Happe T, Kaminski A. Differential regulation of the Fe-hydrogenase during anaerobic adaptation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. **European Journal of Biochemistry**, 2002, 269: 1022-1032.
- [18] Posewitz M C, Smolinski S L, Kanakagiri S, *et al.* Hydrogen photoproduction is attenuated by disruption of an isoamylase gene in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. **The Plant Cell**, 2004, 16: 2151-2163.
- [19] Posewitz M C, King P W, Smolinski S L, *et al.* Identification of genes required for hydrogenase activity in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. **Biochem Soc Trans**, 2005, 33: 102-104.
- [20] Posewitz M C, King P W, Smolinski S L, *et al.* Discovery of two novel radical S-Adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2004, 279(24): 25711-25720.
- [21] King P W, Posewitz M C, Ghirardi M L, *et al.* Functional studies of [FeFe] hydrogenase maturation in an *Escherichia coli* biosynthetic system [J]. **Journal of Bacteriology**, 2006, 188(6): 2163-2172.
- [22] Girbal L, von Abendroth G, Winkler M, *et al.* Homologous and heterologous overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and characterization of purified clostridial and algal Fe-only hydrogenases with high specific activities [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2005, 71(5): 2777-2781.
- [23] Boyer M E, Stapleton J A, Kuchenreuther J M, *et al.* Cell-free synthesis and maturation of [FeFe] hydrogenases [J]. **Biotechnol Bioeng**, 2008, 99(1): 59-67.
- [24] Adams M W. The structure and mechanism of iron hydrogenases [J]. **Biochim Biophys Acta**, 1990, 1020(2): 115-145.
- [25] Montet Y, Amara P, Volbeda A, *et al.* Gas access to the active site of Ni-Fe hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics [J]. **Nature Structural Biology**, 1997, 4: 523-526.
- [26] Nicolet Y, Piras C, Legrand P, *et al.* *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center [J]. **Structure**, 1998, 7: 13-23.
- [27] Cohen J, Kim K, King P, *et al.* Finding gas diffusion pathways in proteins: application to O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> transport in CpI [FeFe]-hydrogenase and the role of packing defects [J]. **Structure**, 2005, 13: 321-329.
- [28] Buhrke T, Lenz O, Krauss N, *et al.* Oxygen tolerance of the H<sub>2</sub>-sensing [NiFe] hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 is based on limited access of oxygen to the active site [J]. **J Biol Chem**, 2005, 280 (25): 23791-23796.
- [29] King P, Ghirardi M L, Seibert M. Oxygen-resistant hydrogenases and methods for designing and making same? The U.S. patent. Pub. No.: US 2006/0228774 A1.

- [30] Hallenbecka P C, Benemann J R. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes [J]. **International Journal of Hydrogen Energy**, 2002, 27: 1 185-1 193.
- [31] 朱毅, 李永兴, 王可玢, 等. 提高衣藻放氢效率的方法. 中华人民共和国发明专利, CN 1657605 A. 2005.
- [32] Debuchy R, Purton S, Rochaix J D. The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: An important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus [J]. **EMBO J**, 1989, 8: 2 803-2 809.
- [33] Tam L W, Lefebvre P A. Insertional mutagenesis and isolation of tagged genes in *Chlamydomonas* [J]. **Methods Cell Biol**, 1995, 47: 519-523.
- [34] Moseley J, Quinn J, Eriksson M, *et al.* The *Crd1* gene encodes a putative di-iron enzyme required for photosystem I accumulation in copper deficiency and hypoxia in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. **EMBO J**, 2000, 19: 2 139-2 151.
- [35] Van K, Wang Y, Nakamura Y, *et al.* Insertional mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* that require elevated CO<sub>2</sub> for survival [J]. **Plant Physiol**, 2001, 127: 607-614.
- [36] Polle J E, Kanakagiri S D, Melis A. Tla1, a DNA insertional transformant of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* with a truncated light-harvesting chlorophyll antenna size [J]. **Planta**, 2003, 217: 49-59.
- [37] Melis A, Chen, HC. 2005. Chloroplast sulfate transport in green algae - genes, proteins and effects [J]. **Photosynthesis Research**, 2005, 86:299-307.
- [38] Chen H C, Yokthongwattana K, Newton A J, *et al.* *SulP*, a nuclear gene encoding a putative chloroplast-targeted sulfate permease in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. **Planta**, 2003, 218: 98-106.
- [39] Zhang L, Niyogi K K, Baroli I, *et al.* DNA insertional mutagenesis for the elucidation of a photosystem II repair process in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. **Photosynth Res**, 1997, 53: 173-184.
- [40] 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]. **J Applied Phycol**, 1999, 10: 515-525.
- [41] Chen H C, Newton A J, Melis A. Role of *SulP*, a nuclear-encoded chloroplast sulfate permease, in sulfate transport and H<sub>2</sub> evolution in *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. **Photosynth Res**, 2005, 84: 289-296.
- [42] Kok B. Photosynthesis [A]. Gibbs M. Proceedings of the Workshop on Biosolar Hydrogen Conversion [C]. Bethesda, MD, 1973. 22-30.
- [43] Polle J, Kanakagiri S, Benemann J R, *et al.* Maximizing photosynthetic efficiencies and hydrogen production by microalgal cultures [A]. Miyake J, Matsunaga T, and San Pietro A. Biohydrogen II: An Approach to Environmentally Acceptable Technology [C]. Pergamon. 2001. 111-130.
- [44] Masuda T, Tanaka A, Melis A. Chlorophyll antenna size adjustments by irradiance in *Dunaliella salina* involve coordinate regulation of chlorophyll a oxygenase (CAO) and *Lhcb* gene expression [J]. **Plant Molecular Biology**, 2003, 51(5): 757-771.
- [45] 刘晶晶, 龙敏南. 氢化酶结构及催化机理研究进展[J]. 生物工程学报, 2005, 21 (3) : 348-353.
- [46] Nagy L E, Meuser J E, Plummer S, *et al.* Application of gene-shuffling for the rapid generation of novel [FeFe]-hydrogenase libraries [J]. **Biotechnol Lett**, 2007, 29: 421-430.
- [47] 吴双秀, 王全喜. 衣藻生物制氢的研究进展[J]. 中国生物工程杂志. 2006, 26(10): 88-89
- [48] Doebbea A, Rupprecht J, Beckmanna J, *et al.* Functional integration of the *HUPI* hexose symporter gene into the genome of *C. reinhardtii*: Impacts on biological H<sub>2</sub> production [J]. **Journal of Biotechnology**, 2007, 131: 27-33.

(本文编辑: 康亦兼)