

## ENZYMATYCZNA BIOPRODUKCJA WODORU – BUDOWA, WŁAŚCIWOŚCI I ZASTOSOWANIA HYDROGENAZ

Małgorzata Witkowska\*, Agnieszka Żylicz-Stachula, Anna Struck

Katedra Biotechnologii Molekularnej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański

Wpłynęło w lipcu 2020 r., zaakceptowano w styczniu 2021 r.

**Streszczenie:** Hydrogenazy to multimeryczne metaloenzymy, katalizujące odwracalną reakcję redukcji protonów do wodoru cząsteczkowego. Obecnie hydrogenazy próbuje się wykorzystywać jako element laboratoryjnych układów do bioprodukcji wodoru. Przeniesienie tych procesów na skalę przemysłową wymaga jednak zastosowania metod inżynierii genetycznej, w celu poprawy trwałości tych enzymów, a także usprawnienia procesu ich produkcji. W poniższym artykule przedstawiono informacje dotyczące struktury i klasyfikacji hydrogenaz oraz przykłady zastosowania tych enzymów.

1. Bioprodukcja wodoru. 2. Hydrogenazy. 2.1. Hydrogenazy [NiFe]. 2.2. Hydrogenazy [FeFe]. 2.3. Hydrogenazy [Fe]. 3. Zastosowanie hydrogenaz. 4. Podsumowanie. 5. Piśmiennictwo

### ENZYMATIC HYDROGEN BIOPRODUCTION. STRUCTURE, FUNCTION AND APPLICATION OF HYDROGENASES

**Abstract:** Hydrogenases are multimeric metalloenzymes that are able to catalyze the reversible reaction of proton reduction to molecular hydrogen. These enzymes have been already used for small-scale hydrogen bioproduction. However, scaling up this process for industrial application requires genetic engineering of hydrogenases to improve their stability, as well as to develop a streamlined strategy for their production. The following article provides information on the structure, classification and applications of hydrogenases.

1. Hydrogen bioproduction. 2. Hydrogenases. 2.1. [NiFe] hydrogenases. 2.2. [FeFe] hydrogenases. 2.3. [Fe] hydrogenases. 3. Application of hydrogenases. 4. Summary. 5. References

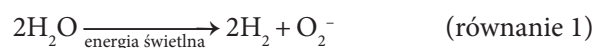
**Słowa kluczowe:** bioprodukcja wodoru, hydrogenazy, metaloenzymy

**Keywords:** hydrogen bioproduction, hydrogenases, metalloenzymes

## 1. Bioprodukcja wodoru

Wodór stanowi 75% masy materii we Wszechświecie; na Ziemi występuje powszechnie w formie związków chemicznych [11]. Otrzymywanie czystego wodoru z konwencjonalnych źródeł energii wiąże się z wykorzystaniem drogich katalizatorów metalicznych oraz użyciem wysokich nakładów energii. Jednocześnie produkty tych reakcji przyczyniają się do zanieczyszczenia środowiska [35]. Organizmy żywe posiadają zdolność produkcji wodoru w temperaturze otoczenia, w środowisku wodnym. Procesy te mogą przebiegać z udziałem energii świetlnej (bezpośrednia biofotoliza i fotofermentacja) lub bez udziału energii świetlnej (ciemna fermentacja i biologiczna konwersja tlenku węgla) [82, 86]. Otrzymywany w ten sposób wodór wykorzystywany jest w reakcji asymilacji azotu (powstaje wówczas jako produkt uboczny) oraz do utleniania nadmiaru równoważników redukcyjnych. Rośliny, mikroalgi i cyjanobakterie wykorzystują energię świetlną do przeprowadzenia procesu fotolizy wody (równanie 1). Energia świetlna absorbowana jest

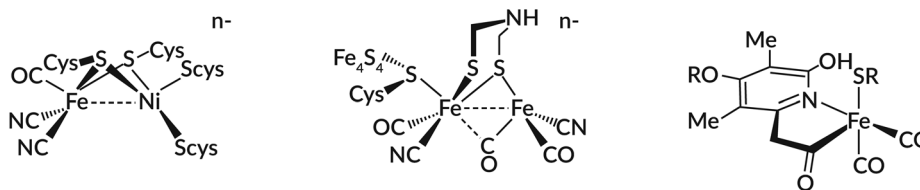
przez fotosystem I (PSI), fotosystem II (PSII) lub oba fotosystemy. Elektrony wytworzone podczas biofotolizy cząsteczki wody przekazywane są następnie na ferredoksynę i do enzymu hydrogenazy [4].



Hydrogenazy są wrażliwe na działanie tlenu. Dlatego niezbędne jest oddzielenie przestrzenne reakcji powstawania wodoru i tlenu. Warunkiem zachowania ciągłości procesu jest niskie stężenie tlenu w środowisku reakcji (poniżej 0,1%).

Procesy fotofermentacji prowadzą do otrzymania wodoru na drodze enzymatycznego rozkładu kwasów organicznych przez nitrogenazy. Reakcja ta wymaga dostarczenia energii przez fotosystem. W przypadku braku azotu cząsteczkowego, który jest preferowanym akceptorem powstających w wyniku reakcji elektronów, nitrogenazy redukują protony do wodoru cząsteczkowego [74]. Wodór może być również produktem reakcji, które nie wymagają bezpośredniego udziału energii świetlnej. Bakterie anaerobowe są zdolne wytworzyć wodór na drodze ciemnej fermentacji, rozkładając

\* Autor korespondencyjny: mgr Małgorzata Witkowska, Katedra Biotechnologii Molekularnej, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański, ul. Wita Stwosza 63, 80–309 Gdańsk; e-mail: m.witkowska.677@studms.ug.edu.pl



Ryc. 1. Centra aktywne hydrogenaz [NiFe], [FeFe] oraz [Fe]

substraty bogate w węglowodany. Ilość powstającego w wyniku tej reakcji wodoru determinowana jest przez odpowiedni szlak metaboliczny i rodzaj produktu końcowego. Jeżeli produktem końcowym jest kwas octowy, teoretycznie z jednego mola glukozy można uzyskać cztery mole wodoru (równanie 2). Pożywką dla bakterii zdolnych do wytwarzania wodoru (np. *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia*) mogą być również biopadaty [2, 72].



Inną drogą produkcji wodoru przez bakterie bez-tlenowe jest utlenianie (konwersja) tlenku węgla do dwutlenku węgla z wytworzeniem energii (równanie 3).



Proces ten wykorzystują zarówno bakterie Gram-ujemne, np. *Rhodospirillum rubrum* czy *Rubrivax gelatinosus*, jak i Gram-dodatnie, np. *Carboxydotherrmus hydrogenoformans*. Obecność CO indukuje szlaki syntezy hydrogenaz oraz dehydrogenaz. Elektrony powstające w wyniku utleniania CO przenoszone są za pomocą białek posiadających klastry Fe-S do hydrogenaz wytwarzających wodór [4, 13].

Kluczowym elementem dla większości szlaków biochemicznych produkcji wodoru w organizmach żywych są hydrogenazy, jednak ich bezpośrednie wykorzystanie w produkcji przemysłowej nastrocza trudności ze względu na właściwości tych enzymów.

## 2. Hydrogenazy

Hydrogenazy (EC 1.12) to zróżnicowana grupa metaloenzymów, mająca zdolność do katalizowania odwracalnej reakcji redukcji protonu do wodoru cząsteczkowego (równanie 4). Enzymy te są kluczowym elementem szlaków metabolicznych wielu mikroorganizmów należących do prokariotów, eukariotów jak i archeonów [12, 26, 46, 60, 87].

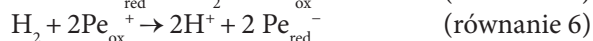
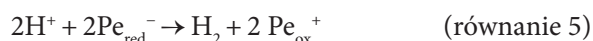


Ze względu na strukturę centrum katalitycznego, hydrogenazy podzielono na trzy główne grupy: (i) hydrogenazy [NiFe], (ii) hydrogenazy [FeFe] oraz (iii) hydrogenazy [Fe], początkowo uważane za hydro-

genazy niemetaliczne [35, 79, 84, 91]. Struktury centrum katalitycznego hydrogenaz należących do wymienionych grup przedstawiono na rycinie 1.

Większość z poznanych dotychczas hydrogenaz należy do grupy pierwszej lub drugiej. Pomimo, iż są to grupy filogenetycznie bardzo odległe, wykazują pomiędzy sobą pewne podobieństwa [23]. Wrażliwość na obecność tlenu jest cechą charakterystyczną wszystkich poznanych dotychczas hydrogenaz. Hydrogenazy [NiFe] wydają się być jednak szczególnie interesujące pod względem potencjalnego zastosowania do bioprodukcji wodoru. Niektóre enzymy z tej grupy ulegają jedynie częściowej, odwracalnej inaktywacji w obecności tlenu (oxygen-tolerant hydrogenases), a w warunkach redukujących ich aktywność może być niemal całkowicie przywrócona [27].

Wszystkie grupy hydrogenaz posiadają w centrum aktywnym nieorganiczne ligandy, niespotykane w innych enzymach [12]. Synteza i przyłączenie w prawidłowej orientacji grup CO oraz CN<sup>-</sup> w centrum aktywnym wymaga szeregu czynników, warunkujących dojrzewanie kompleksu enzymatycznego i umożliwiających powstanie w pełni funkcjonalnego enzymu [62, 83, 93, 97]. Różnicowanie hydrogenaz pod względem ich roli i struktury związane jest ściśle z ich funkcją fizjologiczną, jak również z umiejscowieniem w komórce [18]. Wyróżnia się hydrogenazy związane z błoną oraz cytoplazmatyczne (rozpuszczalne). Enzymy redukujące protony do wodoru znajdują się w cytoplazmie, podczas gdy te pobierające wodór są zazwyczaj zlokalizowane w obrębie błony komórkowej lub znajdują się w peryplazmie [90, 92]. Powstawanie wodoru jest sprzężone z utlenianiem przenośników elektronów (równanie 5), a jego rozkład z ich redukcją (równanie 6).



Pe – przenośnik elektronów

W organizmach żywych, donorami i akceptorami elektronów dla hydrogenazy mogą być związki niskocząsteczkowe (dwutlenek węgla, kwas fumarowy, tlen, siarczany czy azotany) lub kompleksy białkowe (cytochrom c3, cytochrom c6, ferredoksyna) [65, 90]. *In vivo*, reakcja katalizowana przez hydrogenazę może być wykorzystana zarówno w celu odtworzenia źródeł energii, jak i rozproszenia nadmiaru elektronów, zgromadzonych w wyniku aktywności metabolicznej

komórki. Stąd też, w komórce może znajdować się kilka hydrogenaz należących do różnych grup i wykazujących odmienne właściwości [10, 33, 39, 98]. Taka strategia umożliwia mikroorganizmom szybką odpowiedź na zmieniające się warunki środowiskowe poprzez dostosowanie aktywnych szlaków metabolicznych do zapotrzebowania energetycznego komórki. Szereg interesujących właściwości hydrogenaz, a także możliwość ich potencjalnego zastosowania w gospodarce opartej na alternatywnych źródłach energii, przyczyniły się znacznie do poszerzenia wiedzy na temat skomplikowanej biochemii tych enzymów. Jednakże wiele mechanizmów związanych z biochemią hydrogenaz nadal pozostaje niewyjaśnionych.

### 2.1. Hydrogenazy [NiFe]

Większość poznanych dotychczas hydrogenaz należy do grupy [NiFe]. Zidentyfikowano je w organizmach należących do archeonów oraz bakterii (ścisłych i fakultatywnych beztlenowców), a także w mikroorganizmach tlenowych [75]. Niektóre enzymy należące do grupy hydrogenaz [NiFe] wykazują znacznie mniejszą wrażliwość na działanie tlenu niż hydrogenazy [FeFe]. Wśród hydrogenaz [NiFe] wyróżnia się hydrogenazy standardowe ( $O_2$ -sensitive), które w obecności tlenu ulegają nieodwracalnej inaktywacji oraz hydrogenazy odporne na działanie tlenu ( $O_2$ -tolerant), które wykazują aktywność katalityczną również w obecności  $O_2$  [20, 22, 32].

Najlepiej poznana do tej pory grupą hydrogenaz opornych na działanie tlenu są hydrogenazy związane z błoną (MBHs, membrane-bound hydrogenases). Należą do nich między innymi enzymy pochodzące z morskiego mikroorganizmu *Hydrogenovibrio marinus* [103], bakterii wodorowych *Ralstonia eutropha* H16 [19], hipertermofilnych bakterii *Aquifex aeolicus* [63] oraz modelowego mikroorganizmu – *Escherichia coli* [6]. Enzymy te są heterodimerami, składającymi się z dużej podjednostki (LSU, large subunit), małej podjednostki (SSU, small subunit), a także cytochromu b, który jest integralnym białkiem błonowym [101]. Do grupy hydrogenaz opornych na działanie tlenu należą również hydrogenazy [NiFeSe]. Jest to podklasa hydrogenaz [NiFe], posiadająca w centrum aktywnym atom selenu zamiast jednego z atomów żelaza. Przykładami enzymów należących do tej grupy są hydrogenazy wyizolowane z *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F, czy z *Desulfomicrobium baculatum* [95]. Charakteryzują się one wyższą w porównaniu do hydrogenaz [NiFe] aktywnością katalityczną, która nie ulega inhibicji w obecności wodoru. Właściwości hydrogenaz [NiFeSe] związane są z obecnością selenocysteiny, jako jednego z ligandów w centrum aktywnym [49]. Dzięki wspomnianym powyżej właściwościom, enzymy te wykazują istotny potencjał biotechnologiczny w procesach bioprodukcji

wodoru. Porównanie struktury hydrogenaz [NiFe] z *Desulfovibrio gigas* oraz [NiFeSe] z *D. vulgaris* wykazało znaczne podobieństwa strukturalne w konserwowanych motywach szkieletu białkowego tych enzymów [7].

Mechanizm, dzięki któremu część enzymów z grupy hydrogenaz [NiFe] ulega jedynie odwracalnej inaktywacji w obecności tlenu, nie został dokładnie poznany. Wskazuje się jednak, że kluczowym elementem jest kształt oraz rozmiar kieszeni występujących w wewnętrznej strukturze enzymu. Kieszenie te tworzą hydrofobowe kanały, umożliwiające dostęp do centrum katalitycznego. Służą one jako szlaki transportu elektronów i protonów oraz umożliwiają przepływ gazów [32]. O ile wiadomo, że elektrony transportowane są przy udziale klastrów Fe–S, znajdujących się w małej podjednostce [15], szlaki transportu protonów oraz szlaki dyfuzji gazów ( $H_2$ ,  $O_2$ , CO) nie zostały dokładnie poznane [60]. Przypuszcza się jednak, że osłonięcie centrum katalitycznego, a przez to zmniejszenie ilości gazu docierającego do centrum aktywnego na drodze dyfuzji, umożliwia funkcjonowanie tych enzymów również w obecności tlenu [20, 59]. Mutageneza selenocysteiny z centrum katalitycznego [NiFeSe] hydrogenazy, skutkująca wymianą tego aminokwasu na mniejszą cząsteczkę cysteiny, doprowadziła do obniżenia oporności tego enzymu na działanie tlenu [7].

W centrum aktywnym hydrogenaz z grupy [NiFe] występują: (i) konserwowany ewolucyjnie rdzeń, zawierający jony niklu i żelaza, oraz, podobnie jak w przypadku omawianych dalej hydrogenaz [FeFe] i [Fe], (ii) niebiałkowe ligandy: tlenek węgla(II) i aniony cyjankowe, stabilizujące centralny jon żelaza na niskim (+2) stopniu utlenienia [70]. Analiza struktury krystalicznej hydrogenazy [NiFe] z *Desulfovibrio desulfuricans* ujawniła również obecność w centrum aktywnym tego enzymu ligandów SO [28]. W centrum katalitycznym hydrogenaz [NiFe] jon żelaza posiada w sferze koordynacyjnej dwa ligandy  $CN^-$  i jeden ligand CO [28]. W trakcie procesu katalizy jon żelaza pozostaje na stałym, niskim stopniu utlenienia. Jon niklu, zarówno w przypadku hydrogenaz [NiFe], jak i hydrogenaz [NiFeSe], może, na różnych etapach katalizy, występować na +1, +2 lub +3 stopniu utlenienia. Jony niklu i żelaza związane są przez grupy tiolowe, pochodzące z dwóch reszt cysteinowych, a także przez trzeci, dodatkowy ligand – zmienny w zależności od stanu redoks enzymu. W przypadku nieaktywnej, utlenionej formy enzymu, ligandem jest grupa  $OH^-$ . W momencie aktywacji hydrogenazy pozycja ta pozostaje wolna lub zajmowana jest przez  $H^-$  [81]. Kolejne dwie reszty cysteinowe (lub w przypadku hydrogenaz [NiFeSe]: reszta cysteinowa i selenocysteinowa) wiążą grupę prostetyczną z częścią białkową enzymu [21].

Wszystkie hydrogenazy [NiFe] są co najmniej dimerami, składającymi się z podjednostki LSU, która



Ryc. 2. Centrum aktywne hydrogenazy [NiFe]

Przedstawiono dwa stany: (a) stan Ni-A (unready state); (b) stan Ni-B (ready state).

zawiera centrum katalityczne oraz z podjednostki SSU, zawierającej od jednego do trzech klastrów siarkowo-żelazowych (Fe-S). Klastry te odpowiadają za transport elektronów pomiędzy centrum aktywnym a przenośnikami elektronów [85, 90]. Hydrogenazy [NiFe] podzielono na klasy i podklasy, których przedstawiciele pełnią podobne funkcje fizjologiczne. Pierwsza klasyfikacja, w której wyróżniono 6 klas hydrogenaz [NiFe], powstała w oparciu o podobieństwa sekwencji aminokwasowej motywów koordynujących centrum aktywne [100]. Późniejsze klasyfikacje również opierają się na tym kryterium [65, 90], a także na związkach filogenetycznych i podobieństwach w organizacji operonów [23].

Mechanizm katalityczny hydrogenaz nie jest dokładnie poznany pomimo rosnącej liczby przeprowadzonych eksperymentów. Na podstawie danych krystalograficznych i spektroskopowych, dotyczących hydrogenazy [NiFe] z *D. vulgaris* Miyazaki F, proponuje się mechanizm, w trakcie którego jon nikiel zmienia swój stopień utlenienia. W zależności od potencjału redoks hydrogenazy [NiFe], enzym może znajdować się w konfiguracji aktywnej lub nieaktywnej [42]. Forma utleniona jest formą nieaktywną enzymu, w której wyróżnia się dodatkowo stan Ni-A (unready state) oraz Ni-B (ready state). W strukturach obu stanów zidentyfikowano jony Fe(II) oraz Ni(III), a także związany jon tlenu (ryc. 2). Oba stany mogą zostać aktywowane w obecności  $H_2$ , jednak aktywacja Ni-A do Ni-SIa, w której nikiel znajduje się na drugim stopniu utlenienia, jest powolna (kilka godzin) i zależy od temperatury oraz pH [59]. Aktywacja stanu Ni-B przebiega w ciągu sekund i generuje, w zależności od liczby przeniesionych elektronów, jeden lub kilka stanów aktywnych: Ni-SI, Ni-C, Ni-R. Stan Ni-C nie może spontanicznie zredukować protonów do  $H_2$ , ponieważ w obecności wodoru jest niestabilny. Oksydacja Ni-SI za pomocą  $O_2$  prowadzi do utworzenia mieszaniny Ni-A oraz Ni-B, natomiast oksydacja w warunkach beztlenowych, na przykład za pomocą  $[Fe(CN)_6]^{3-}$ , prowadzi do odtworzenia wyłącznie stanu Ni-B [1].

## 2.2. Hydrogenazy [FeFe]

Przeważającą część hydrogenaz [FeFe] to enzymy monomeryczne, chociaż znane są także enzymy należące do tej grupy o strukturze dimerycznej, trimerycznej

oraz tetramerycznej [54]. Hydrogenazy [FeFe] katalizują głównie reakcję biegnącą w kierunku redukcji protonu do wodoru cząsteczkowego. W swojej strukturze zawierają konserwowany ewolucyjnie motyw nazywany klastrzem H (*H-cluster*). Składa się on z dwóch subklastrów: standardowego, kubicznego klastra  $[4Fe_4S]$  oraz struktury  $[2Fe_2S]$ , pełniące funkcje katalityczne. Dwa z czterech jonów żelaza w klastrze  $[4Fe_4S]$  koordynowane są przez dwa ligandy  $CN^-$  oraz trzy ligandy CO. Ligandy CO związane są słabiej niż ligandy  $CN^-$ , co umożliwia im zmianę pozycji w kolejnych etapach katalizy [57]. Oba typy ligandów stabilizują stan spinowy jonów żelaza. Sekwencje N- oraz C-końca hydrogenaz [FeFe] wykazują dużą zmienność. Odpowiadają one za wiązanie klastrów Fe-S oraz domen wiążących kofaktory, co sugeruje, że hydrogenazy [FeFe] mogą oddziaływać z wieloma różnymi substratami reakcji redoks [10, 51]. Klastr H połączony jest z resztą białkową wiązaniami kowalencyjnymi przez reszty cysteinowe, koordynujące jony Fe w klastrze kubicznym. Poza tymi wiązaniami, szkielet białkowy i niebiałkowe ligandy oddziałują ze sobą wyłącznie za pomocą wiązań wodorowych i oddziaływań elektrostatycznych [64].

W przypadku hydrogenaz [FeFe] mechanizm działania również jest niejasny. Podobnie jednak jak dla grupy hydrogenaz [NiFe] zidentyfikowano utlenione, nieaktywne formy enzymu. W centrum aktywnym oba jony żelaza występują na niskim stopniu utlenienia (Fe(II) – Fe(II)). Przypuszcza się, że obecność cząsteczki wody, związanej w sferze koordynacyjnej, może być przyczyną inaktywacji enzymu. Redukcja klastra  $2Fe$  powoduje usunięcie cząsteczki wody i związanie  $H_2$  lub utworzenie jonów wodorkowych. Uważa się, że heterolityczne cięcie wiązania w cząsteczce  $H_2$  zachodzi prawdopodobnie w pozycji terminalnej dystalnego jonu Fe [43, 56]. Anion wodorkowy pozostaje związany z jonem Fe, natomiast proton przenoszony jest do ligandu  $CN^-$  lub innego akceptora o charakterze zasadowym.

Hydrogenaza [FeFe] wyizolowana z *Chlamydomonas reinhardtii* (CrHyd1) nie zawiera w swojej strukturze klastrów Fe-S, a jedynie klastr H. Ze względu na prostotę struktury przyjęta została jako modelowa hydrogenaza typu [FeFe], również w badaniach dotyczących modeli dojrzewania centrum katalitycznego hydrogenaz tego typu [17, 53, 68]. Badania nad tą hydrogenazą pozwoliły zidentyfikować nowe produkty pośrednie

reakcji katalitycznej tworzenia wodoru, a także potwierdzić istotną rolę ligandów w tym procesie [45].

Zaobserwowano znaczne różnice pomiędzy funkcjami pełnionymi przez ligandy CO podczas katalizy w prostych hydrogenazach [FeFe], izolowanych z alg morskich, oraz bardziej skomplikowanych hydrogenazach [FeFe], takich jak na przykład hydrogenaza z *Clostridium pasteurianum* [10]. Struktury krystaliczne hydrogenaz [FeFe] z *C. pasteurianum* oraz *D. desulfuricans* pozwoliły na opracowanie modelu centrum katalitycznego, który w hydrogenazach tego rodzaju posiada unikalny klasterek [6Fe–6S]. Redukcja protonów do wodoru cząsteczkowego powiązana została z subklastrem 2Fe [58], związanym z ligandami CO, CN<sup>-</sup> oraz z ligandem ditiolowym [54]. Podobnie jak w przypadku hydrogenaz [NiFe] obecność ligandów CO oraz CN<sup>-</sup> stabilizuje jony żelaza na niskim stopniu utlenienia [66, 40].

Ważną rolę dla aktywności katalitycznej hydrogenaz oraz regulacji przepływu elektronów odgrywa również szkielet aminokwasowy, otaczający centrum aktywne. W strukturach enzymów należących do hydrogenaz [NiFe] oraz [FeFe] zidentyfikowano reszty aminokwasowe, obdarzone ładunkiem elektrycznym, które tworzą zewnętrzną sferę koordynacyjną. Biorą one udział w transferze protonów, koordynacji cząsteczek wody i oddziałują z klastrem H [37, 54]. Reszty aminokwasowe, znajdujące się w kieszeni hydrofobowej klastra H, biorą wraz z subklastrem 2Fe, udział w wiązaniu wodoru [9, 88].

Podobnie jak w wypadku hydrogenaz [NiFe], dojrzewanie hydrogenaz typu [FeFe] wymaga obecności zestawu białek specyficznych dla danego enzymu. U wszystkich organizmów, u których zidentyfikowano hydrogenazę HydA (w tym *E. coli*), zidentyfikowano również geny *hydE*, *hydF* oraz *hydG*, których produkty ekspresji są niezbędne do uzyskania aktywnej hydrogenazy HydA [36, 67]. Produkty ekspresji wymienionych genów (białka HydE oraz HydG) należą do rodziny enzymów wytwarzających rodniki S-adenozylometioniny (SAM) [8, 71]. Natomiast HydF jest monomerycznym białkiem, należącym do rodziny GTPaz [77], odpowiadającym za wiązanie klastrów żelazowo-siarkowych, które są wcześniej syntezowane w komórce [54]. Białko HydG bierze udział w katalizie reakcji, w wyniku których powstają dwuatomowe ligandy centrum katalitycznego: CO oraz CN<sup>-</sup> [41, 76]. W przypadku białka HydE nie udało się do tej pory dokładnie określić jego funkcji oraz substratu/substratów [65].

### 2.3. Hydrogenazy [Fe]

Hydrogenazy [Fe] są strukturalnie najmniej skomplikowaną grupą hydrogenaz. Katalizują reakcję wodorowania substratów biologicznych poprzez heterolityczny rozkład wodoru cząsteczkowego. Funkcją hydrogenaz

[Fe] jest odwracalna redukcja metenylotetrahydrometanopteryny (metenilo-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup>) do metylenotetrahydrometanopteryny (metyleno-H<sub>4</sub>MPT) [73]. Reakcja ta jest elementem szlaku metabolicznego metanogenów, redukującego CO<sub>2</sub> do metanu. Wodorowanie metenilo-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup> jest więc odpowiednikiem reakcji utleniania/redukcji H<sub>2</sub> u pozostałych grup hydrogenaz. W przeciwieństwie do pozostałych grup hydrogenaz, hydrogenazy [Fe] nie ulegają dezaktywacji w obecności 100% O<sub>2</sub>, jeżeli w centrum aktywnym nie ma związanego substratu. W obecności O<sub>2</sub> hydrogenazy tej grupy nie ulegają inhibicji, lecz stopniowej dezaktywacji [27, 30].

W centrum aktywnym hydrogenaz [Fe] występuje pojedynczy jon Fe koordynowany, podobnie jak w przypadku pozostałych hydrogenaz: (i) przez atom siarki, pochodzący z cysteiny, (ii) dwa ligandy CO, (iii) kofaktor pirydynowy oraz (iv) cząsteczkę wody [24, 48]. Na podstawie badań krystalograficznych oraz spektroskopowych ustalono, że centrum aktywne hydrogenaz [Fe] posiada geometrię oktaedryczną (6 koordynowanych ligandów) lub piramidy kwadratowej (pięć koordynowanych ligandów) [78]. Centralny jon żelaza, jest nieaktywny w reakcji redoks i nie ulega inaktywacji przez O<sub>2</sub> [35]. Kofaktor zawierający centrum żelazowe może być jednak rozłożony przez H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oraz O<sub>2</sub><sup>-</sup>, powstające w wyniku katalizowanej przez hydrogenazę reakcji redukcji O<sub>2</sub> do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. W przeciwieństwie do hydrogenaz [NiFe] oraz [FeFe], elektrony są dostarczane bezpośrednio do centrum katalitycznego hydrogenazy [Fe]. Powstające jony wodorkowe są bezpośrednio wiązane przez kofaktor metenilo-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup>.

Podobnie jak w przypadku hydrogenaz [NiFe] oraz [FeFe], mechanizm katalityczny hydrogenaz [Fe] nie jest dokładnie poznany. Uważa się, że cząsteczka H<sub>2</sub> ulega najpierw heterolitycznemu rozpadowi przy udziale Fe(II), a następnie jon wodorkowy przenoszony jest do akceptora (karbokation) [102]. Na podstawie struktury krystalicznej hydrogenazy [Fe] z *Methanocaldococcus jannaschii* ustalono, że na homodimer składają się trzy domeny: centralna oraz dwie zewnętrzne. Centralna domena złożona jest z dwóch splecionych domen C-terminalnych. Dwie zewnętrzne domeny to domeny N-końcowe, wiążące kofaktory [29]. Trzy domeny tworzą kieszeń, w której znajduje się centrum aktywne. Podczas wiązania się substratu kieszenie zamykają się, zbliżając do siebie jon żelaza i karbokation substratu, będący akceptorem jonów wodorowych. Po zamknięciu kieszeni, H<sub>2</sub> dociera do centrum aktywnego wąskim kanałem pomiędzy domeną centralną a zewnętrzną, podobnie jak w przypadku innych hydrogenaz. Do tej pory rozwiązano jedynie struktury krystaliczne hydrogenaz [Fe] w formie otwartej, w kompleksie z substratem, jednakże wyniki badań spektroskopii UV oraz elektronowe widma dichroizmu kołowego potwierdzają zmianę konformacji enzymu [80].

### 3. Zastosowanie hydrogenaz

Enzymy jako wysoce specyficzne, stereoselektywne i bezpieczne katalizatory, wykorzystywane są na skalę przemysłową do produkcji leków, żywności, środków chemicznych, a także w testach medycznych. Hydrogenazy znalazły zastosowanie jako biosensory, katalizatory w reakcjach syntezy związków chemicznych, takich jak NADPH, jak również jako elementy systemów zapobiegających biokorozji [50]. Obecnie prowadzi się intensywne badania nad możliwością wykorzystania hydrogenaz w nowoczesnej, niskoemisyjnej energetyce. Systemy oparte na tych enzymach wykorzystuje się do bioprodukcji wodoru, katalizy produkcji wodoru *in vitro*, zwłaszcza z wykorzystaniem metod fotoelektrochemicznych [31, 38, 47], oraz do wytwarzania energii elektrycznej w ogniwach paliwowych [34, 44, 96].

Obecnie, większość wodoru produkuje się w procesach reformingu, jednak badania nad zrównoważonymi metodami produkcji wodoru mogą uczynić z niego paliwo przyszłości. Wodór posiada wyższą gęstość energetyczną (142 kJ/g) niż metan (55,5 kJ/g) czy benzyna (47,3 kJ/g) [5], a jego spalanie nie powoduje emisji szkodliwych zanieczyszczeń i gazów cieplarnianych. Jako paliwo alternatywne, wodór może być stosowany w standardowej temperaturze i ciśnieniu, wykorzystywanym podczas typowych procesów termochemicznych [14], bezpośrednio w silnikach spalinowych. Może też zostać przekształcony w energię elektryczną za pomocą ogniw [61].

Ogniwo wykorzystujące elektrodę grafitową z immobilizowaną, oporną na działanie tlenu hydrogenazą [NiFe] jest w stanie osiągnąć napięcie 1V, nawet w obecności tlenu i tlenku węgla [89, 94]. W przeciwieństwie do elektrody platynowej, system wykorzystujący hydrogenazę jest tańszy i nie ulega zatruciu powszechnie występującymi zanieczyszczeniami. Hydrogenazy [FeFe] stosuje się w fotoelektrochemicznych ogniwach do produkcji wodoru, w których wydajność jest porównywalna z wydajnością elektrody platynowej [25]. Wodór można również produkować z pomocą systemów fotokatalitycznych, składających się z nanomateriałów sprzężonych z hydrogenazą, jak np. hydrogenaza pochodząca z *Thiocapsa roseopersicina* sprzężona z cząsteczkami CdS [55], czy hydrogenaza [FeFe] z *Clostridium perfringens* oraz hydrogenaza [NiFe] z *Pyrococcus furiosus*, adsorbowane na cząsteczkach TiO<sub>2</sub> [52].

Hydrogenaza [NiFeSe], wyizolowana z *Ralstonia metallidurans*, immobilizowana na sensybilizowanych za pomocą barwnika nanocząsteczkach TiO<sub>2</sub>, pozwala na produkcję wodoru pod wpływem światła widzialnego z wody w temperaturze pokojowej [69]. Inne systemy do fotochemicznej produkcji wodoru opierają się na fuzji hydrogenaz z różnymi białkami, co umożliwia bezpośredni przepływ elektronów. Przykładem takiej

fuzji może być hydrogenaza [NiFe] z *Chromatium vinosum*, którą sprzężono z tylakoidami szpinaku [3]. Hydrogenazę [FeFe] z *C. reinhardtii*, a także hydrogenazę [NiFe] z *R. eutropha* H16 połączono z cyjanobakteryjnym fotosystemem I, osiągając wydajność produkcji H<sub>2</sub> odpowiednio rzędu 0,58 μmol H<sub>2</sub> · mg/(h · chl) oraz 30 μmol H<sub>2</sub> · mg/(h · chl) [94].

Inny system, w którym katalizatorem produkcji wodoru jest hydrogenaza, zakłada całkowite utlenianie różnych cukrów, np. skrobi, celulozy, ksylozy czy sacharozy, do dwutlenku węgla i wodoru. W porównaniu do procesu fermentacji w komórkach (4H<sub>2</sub>/mol glukozy), w wyniku syntetycznej biotransformacji cukru z wykorzystaniem hydrogenazy SHI z *P. furiosus* otrzymuje się teoretycznie trzy razy więcej produktu (12H<sub>2</sub>/mol glukozy) [99].

Stabilizacja jonu wodorkowego przez jon żelaza hydrogenaz [FeFe] w trakcie katalizy mogłaby być wykorzystana do redukcji związków niepolarnych, a także jako model do tworzenia nowych selektywnych katalizatorów [16].

### 4. Podsumowanie

Hydrogenazy [FeFe] oraz [NiFe] są doskonałym przykładem konwergentnej ewolucji enzymów. Zarówno mechanizm działania jak i biosynteza enzymów należących do obu grup wykazują uderzające podobieństwa, ale też wyraźne różnice. Enzymy te, niezależnie od liczby podjednostek, wymagają obecności wielu białek umożliwiających prawidłowe przeprowadzenie procesu dojrzewania kompleksu. Niezbędne są również białka szkieletowe, w obu przypadkach należące do tej samej podklasy GTPaz aktywowanych przez litowce. Ponadto, w przypadku obu grup hydrogenaz, procesy tworzenia i transferu klastrów żelazowych cechują się pewnym podobieństwem, pomimo różnych substratów wykorzystywanych do biosyntezy.

Hydrogenazy są ważnym elementem szlaków metabolicznych litotrofów, autotrofów, metanogenów, aerobów oraz anaerobów [96]. Enzymy te katalizują odwracalną reakcję redukcji protonu do wodoru cząsteczkowego, która wydaje się być stosunkowo prosta. Jednakże, zarówno różnorodność filogenetyczna tej grupy enzymów jak i wieloczynnikowy proces ich dojrzewania odzwierciedlają złożoność procesów niezbędnych do przeprowadzenia tej reakcji w środowisku biologicznym. Z tego powodu, potencjalne wykorzystanie hydrogenaz do wydajnej, przemysłowej bioprodukcji wodoru wymaga szczegółowego zbadania i zrozumienia skomplikowanej sieci procesów zarządzania zasobami energetycznymi komórki.

Przedstawione powyżej przykłady zastosowania hydrogenaz w procesach produkcji energii charaktery-

zują się nadal zbyt niską wydajnością, co uniemożliwia wyjście poza skalę laboratoryjną. Potencjalne wykorzystanie hydrogenaz w systemach do bioprodukcji wodoru (w postaci rekombinowanego enzymu lub genetycznie modyfikowanych mikroorganizmów) wymaga rozwiązania problemów, związanych z ograniczeniami tych enzymów, takimi jak inaktywacja pod wpływem tlenu czy inhibicja wodorem [95]. Hydrogenazy posiadają właściwości katalityczne porównywalne z wykorzystywanymi obecnie katalizatorami, bazującymi na metalach szlachetnych. Mogą jednak pracować z dużą specyficznością w warunkach standardowej temperatury i ciśnienia. Rozwój metodologii oraz technik badawczych związanych z biotechnologią, metabolomiką oraz inżynierią białkową może w przyszłości pozwolić na szersze wykorzystanie hydrogenaz i bioprodukcję wodoru, jako czystego źródła energii.

#### Podziękowania

Artykuł został sfinansowany ze środków DS 531-T040-D839-21.

#### Piśmiennictwo

- Abou Hamdan A., Dementin S. i wsp.: O<sub>2</sub>-independent formation of the inactive states of NiFe hydrogenase. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 15–17 (2013)
- Angenent L.T., Karim K., Al-Dahhan M.H., Wrenn B.A., Domínguez-Espinosa R.: Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends Biotechnol.* **22**, 477–485 (2004)
- Arnon D.I., Losada M., Nozaki M., Tagawa K.: Photoproduction of hydrogen, photofixation of nitrogen and a unified concept of photosynthesis. *Nature*, **190**, 601–606 (1961)
- Balat M.: Production of hydrogen via biological processes. *Energ. Source Part A*, **20**, 1802–1812 (2009)
- Balat M.: Potential importance of hydrogen as a future solution to environmental and transportation problems. *Int. J. Hydrogen. Energ.* **33**, 4013–4029 (2008)
- Ballantine S.P., Boxer D.H.: Nickel-containing hydrogenase isoenzymes from anaerobically grown *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **163**, 454–459 (1985)
- Barbosa T.M., Baltazar C.S.A., Cruz D.R., Lousa D., Soares C.M.: Studying O<sub>2</sub> pathways in [NiFe]- and [NiFeSe]-hydrogenases. *Sci. Rep.* **10**, 10540 (2020)
- Brazzolotto X., Rubach J.K., Gaillard J., Gambarelli S., Atta M., Fontecave M.: The [Fe-Fe]-Hydrogenase maturation protein HydF from *Thermotoga maritima* is a GTPase with an Iron-Sulfur Cluster. *J. Biol. Chem.* **281**, 769–774 (2006)
- Bruschi M., Greco C., Kaukonen M., Fantucci P., Ryde U., De Gioia L.: Influence of the [2Fe]H subcluster environment on the properties of key intermediates in the catalytic cycle of [FeFe] hydrogenases: hints for the rational design of synthetic catalysts. *Angew. Chem. Int. Edit.* **48**, 3503–3506 (2009)
- Calusinska M., Happe T., Joris B., Wilmotte A.: The surprising diversity of clostridial hydrogenases: A comparative genomic perspective. *Microbiology*, **156**, 1575–1588 (2010)
- Cameron A.G.W.: Abundances of the elements in the solar system. *Space Sci. Rev.* **15**, 121–146 (1973)
- Cammack R.: Hydrogenase sophistication. *Nature*, **397**, 214–215 (1999)
- Constant P., Hallenbeck P.C.: Hydrogenase (w) Biohydrogen (Second Edition), red. A. Pandey, S. Mohan, J-S. Chang, P.C. Hallenbeck, C. Larroche, Elsevier, 2019, s. 49–78
- Debabrata D., Namita K., Nejat Veziroğlu T.: Recent developments in biological hydrogen production processes. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* **14**, 57–67 (2008)
- Dementin S., Burlat B., Fourmond V., Leroux F., Liebgott P-P., Hamdan A.A., Léger C., Rousset M., Guigliarelli B., Bertrand P.: Rates of intra- and intermolecular electron transfers in hydrogenase deduced from steady-state activity measurements. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 10211–10221 (2011)
- Edwards J.K., Solsona B., Ntainjua E.N., Carley A.F., Herzing A.A., Kiely C.J., Hutchings G.J.: Switching off hydrogen peroxide hydrogenation in the direct synthesis process. *Science*, **323**, 1037–1041 (2009)
- English C.M., Eckert C., Brown K., Seibert M., King P.W.: Recombinant and *in vitro* expression systems for hydrogenases: new frontiers in basic and applied studies for biological and synthetic H<sub>2</sub> production. *Dalton Trans.* **45**, 9970–9978 (2009)
- Fontecilla-Camps J.C., Volbeda A., Cavazza C., Nicolet Y.: Structure/Function relationships of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases. *Chem. Rev.* **107**, 4273–4303 (2007)
- Frielingsdorf S., Schubert T., Pohlmann A., Lenz O., Friedrich B.: A trimeric supercomplex of the oxygen-tolerant membrane-bound [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16. *Biochemistry-US*, **50**, 10836–10843 (2011)
- Fritsch J., Lenz O., Friedrich B.: Structure, function and biosynthesis of O<sub>2</sub>-tolerant hydrogenases. *Nat. Rev. Microb.* **11**, 106–114 (2013)
- Fritsch J., Scheerer P., Frielingsdorf S., Kroschinsky S., Friedrich B., Lenz O., Spahn C.M.T.: The crystal structure of an oxygen-tolerant hydrogenase uncovers a novel iron-sulphur centre. *Nature*, **479**, 249–252 (2011)
- Goris T., Lenz O. i wsp.: A unique iron-sulfur cluster is crucial for oxygen tolerance of a [NiFe]-hydrogenase. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 310–318 (2011)
- Greening C., Biswas A., Carere C.R., Jackson C.J., Taylor M.C., Stott M.B., Cook G.M., Morales S.E.: Genomic and metagenomic surveys of hydrogenase distribution indicate H<sub>2</sub> is a widely utilised energy source for microbial growth and survival. *ISME J.* **10**, 761–777 (2016)
- Guo Y., Cramer S.P. i wsp.: Characterization of the Fe site in iron-sulfur-cluster-free hydrogenase (Hmd) and of a model compound via nuclear resonance vibrational spectroscopy (NRVS). *Inorg. Chem.* **47**, 3969–3977 (2008)
- Hambourger M., Gervaldo M., Svedruzic D., King P.W., Gus D., Ghirardi M., Moore A.L., Moore T.A.: [FeFe]-Hydrogenase-Catalyzed H<sub>2</sub> production in a photoelectrochemical biofuel cell. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 2015–2022 (2008)
- Happe T., Hemschemeier A., Winkler M., Kaminski A.: Hydrogenases in green algae: do they save the algae's life and solve our energy problems? *Trends Plant Sci.* **7**, 246–250 (2002)
- Hideese R., Ataka K., Bill E., Shima S.: CuI and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Inactivate and FeII inhibits [Fe]-hydrogenase at very low concentrations. *ChemBioChem.* **16**, 1861–1865 (2015)
- Higuchi Y., Yagi T., Yasuoka N.: Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. *Structure*, **5**, 1671–1680 (1997)
- Hiroamoto T., Warkentin E., Moll J., Ermler U., Shima S.: The crystal structure of an [Fe]-hydrogenase-substrate complex reveals the framework for H<sub>2</sub> activation. *Angew. Chem. Int. Edit.* **48**, 6457–6460 (2009)

30. Huang G., Wagner T., Ermler U., Bill E., Ataka K., Shima S.: Dioxygen sensitivity of [Fe]-hydrogenase in the presence of reducing substrates. *Angew. Chem. Int. Edit.* **57**, 4917–4920 (2018)
31. Ihara M., Okura I. i wsp.: Light-driven hydrogen production by a hybrid complex of a [NiFe]-hydrogenase and the cyanobacterial photosystem I. *Photochem. Photobiol.* **82**, 676–682 (2006)
32. Kalms J., Scheerer P. i wsp.: Tracking the route of molecular oxygen in O<sub>2</sub>-tolerant membrane-bound [NiFe] hydrogenase. *PNAS*, **115**, E2229–E2237 (2018)
33. Kanai T., Matsuoka R., Beppu H., Nakajima A., Okada Y., Atomi H., Imanaka T.: Distinct physiological roles of the three [NiFe]-hydrogenase orthologs in the hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *J. Bacteriol.* **193**, 3109–3116 (2011)
34. Karyakin A.A., Morozov S.V., Karyakina E.E., Zorin N.A., Perelygin V.V., Cosnier S.: Hydrogenase electrodes for fuel cells. *Biochem. Soc. T.* **33**, 73–75 (2005)
35. Kim D.-H., Kim M.-S.: Hydrogenases for biological hydrogen production. *Bioresource Technol.* **102**, 8423–84231 (2011)
36. King P.W., Posewitz M.C., Ghirardi M.L., Seibert M.: Functional studies of [FeFe] hydrogenase maturation in an *Escherichia coli* biosynthetic system. *J. Bacteriol.* **188**, 2163–2172 (2006)
37. Knörzer P., Silakov A., Foster C.E., Armstrong F.A., Lubitz W., Happe T.: Importance of the protein framework for catalytic activity of [FeFe]-hydrogenases. *J. Biol. Chem.* **287**, 1489–1499 (2012)
38. Krassen H., Schwarze A., Friedrich B., Ataka K., Lenz O., Heberle J.: Photosynthetic hydrogen production by a hybrid complex of photosystem I and [NiFe]-hydrogenase. *ACS Nano*, **3**, 4055–4061 (2009)
39. Kruse S., Goris T., Wolf M., Wei X., Diekert G.: The NiFe hydrogenases of the tetrachloroethene-respiring Epsilonproteobacterium *Sulfurospirillum multivorans*: biochemical studies and transcription analysis. *Front. Microbiol.* **8**, e444 (2017)
40. Kubas G.J.: Fundamentals of H<sub>2</sub> binding and reactivity on transition metals underlying hydrogenase function and H<sub>2</sub> production and storage. *Chem. Rev.* **107**, 4152–4205 (2007)
41. Kuchenreuther J.M., George S.J. i wsp.: The HydG enzyme generates an Fe(CO)<sub>2</sub>(CN) synthon in assembly of the FeFe hydrogenase H-cluster. *Science*, **343**, 424–427 (2014)
42. Lamle S.E., Albracht S.P.J., Armstrong F.A.: Electrochemical potential-step investigations of the aerobic interconversions of [NiFe]-hydrogenase from *Allochromatium vinosum*: Insights into the puzzling difference between unready and ready oxidized inactive states. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 14899–14909 (2004)
43. Liu Z.-P., Hu P.: Mechanism of H<sub>2</sub> metabolism on Fe-only hydrogenases. *J. Chem. Phys.* **117**, 8177–8180 (2002)
44. Lojou E.: Hydrogenases as catalysts for fuel cells: Strategies for efficient immobilization at electrode interfaces. *Electrochim. Acta*, **56**, 10385–10397 (2011)
45. Lorent Ch., Katz S., Duan J., Kulka C.J., Caserta G. i wsp.: Shedding light on proton and electron dynamics in [FeFe] hydrogenases. *J. Am. Chem. Soc.* **142**, 5493–5497 (2020)
46. Lubitz W., Ogata H., Rüdiger O., Reijerse E.: Hydrogenases. *Chem. Rev.* **114**, 4081–4148 (2014)
47. Lubner C.E., Knörzer P., Silva P.J.N., Vincent K.A., Happe T., Bryant D.A., Golbeck J.H.: Wiring an [FeFe]-hydrogenase with photosystem I for light-induced hydrogen production. *Biochemistry*, **49**, 10264–10266 (2010)
48. Lyon E.J., Shima S., Boecher R., Thauer R.K., Grevels F.W., Bill E., Roseboom W., Albracht S.P.J.: Carbon monoxide as an intrinsic ligand to iron in the active site of the iron-sulfur-cluster-free hydrogenase H<sub>2</sub>-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase as revealed by infrared spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 14239–14248 (2004)
49. Marques M.C., Tapia C., Gutiérrez-Sanz O., Ramos A.R., Keller K.L., Wall J.D., De Lacey A.L., Matias P.M., Pereira I.A.C.: The direct role of selenocysteine in [NiFeSe] hydrogenase maturation and catalysis. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 544–550 (2017)
50. Mertens R., Liese A.: Biotechnological applications of hydrogenases. *Curr. Opin. Biotech.* **15**, 343–348 (2004)
51. Meyer J.: [FeFe] hydrogenases and their evolution: a genomic perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 1063 (2007)
52. Morra S., Valetti F., Sarasso V., Castrignanò S., Sadeghi S.J., Gilardi G.: Hydrogen production at high Faradaic efficiency by a bio-electrode based on TiO<sub>2</sub> adsorption of a new [FeFe]-hydrogenase from *Clostridium perfringens*. *Bioelectrochemistry*, **106**, 258–262 (2015)
53. Mulder D.W., Boyd E.S., Sarma R., Lange R.K., Endrizzi J.A., Broderick J.B., Peters J.W.: Stepwise [FeFe]-hydrogenase H-cluster assembly revealed in the structure of HydA(DeltaEFG). *Nature*, **465**, 248–251 (2010)
54. Mulder D.W., Ortillo D.O., Gardenghi D.J., Naumov A.V., Ruebush S.S., Szilagyi R.K., Huynh B., Broderick J.B., Peters J.W.: Activation of HydA(DeltaEFG) requires a preformed [4Fe-4S] cluster. *Biochemistry*, **48**, 6240–6248 (2009)
55. Nedoluzhko A.I., Shumilin I.A., Mazhorova L.E., Popov V.O., Nikandrov V.V.: Enzymatic oxidation of cadmium and lead metals photodeposited on cadmium sulfide. *Bioelectrochemistry*, **53**, 61–71 (2001)
56. Nicolet Y., de Lacey A.L., Vernède X., Fernandez V.M., Hatchikian E.C., Fontecilla-Camps J.C.: Crystallographic and FTIR spectroscopic evidence of changes in Fe coordination upon reduction of the active site of the Fe-only hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 1596–1601 (2001)
57. Nicolet Y., Fontecilla-Camps J.C.: Structure-Function relationships in [FeFe]-hydrogenase active site maturation. *J. Biol. Chem.* **287**, 13532–13540 (2012)
58. Nicolet Y., Piras C., Legrand P., Hatchikian C.E., Fontecilla-Camps J.C.: *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Structure*, **7**, 13–23 (1999)
59. Nishikawa K., Ogata H., Higuchi Y.: Structural Basis of the Function of [NiFe]-hydrogenases. *Chem. Lett.* **49**, 164–173 (2020)
60. Ogata H., Lubitz W., Higuchi Y.: Structure and function of [NiFe] hydrogenases. *J. Biochem.* **160**, 251–258 (2016)
61. Ono K.: Fundamental theories on a combined energy cycle of electrostatic induction hydrogen electrolytic cell and fuel cell to produce fully sustainable hydrogen energy. *IEEJ T. Fund. Mat.* **133**, 615–621 (2013)
62. Pagnier A., Martin L., Zeppieri L., Nicolet Y., Fontecilla-Camps J.C.: CO and CN<sup>-</sup> syntheses by [FeFe]-hydrogenase maturase HydG are catalytically differentiated events. *PNAS*, **113**, 104–109 (2016)
63. Pandelia M.-E., Fourmond V., Tron-Infossi P., Lojou E., Bertrand P., Léger C., Giudici-Orticoni M.-T., Lubitz W.: Membrane-bound hydrogenase I from the Hyperthermophilic Bacterium *Aquifex aeolicus*: enzyme activation, redox intermediates and oxygen tolerance. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 6991–7004 (2010)
64. Peters J.W., Lanzilotta W.N., Lemon B.J., Seefeldt L.C.: X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science*, **282**, 1853–1858 (1998)
65. Peters J.W., Schut G.J., Boyd E.S., Mulder D.W., Shepard E.M., Broderick J.B., King P.W., Adams M.W.W.: [FeFe]- and [NiFe]-hydrogenase diversity, mechanism, and maturation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1853**, 1350–1369 (2015)
66. Pierik A.J., Hulstein M., Hagen W.R., Albracht S.P.J.: A low-spin iron with CN and CO as intrinsic ligands forms the



- core of the active site in [Fe]-hydrogenases. *Eur. J. Biochem.* **258**, 572–578 (1998)
67. Posewitz M.C., King P.W., Smolinski S.L., Zhang L., Seibert M., Ghirardi M.L.: Discovery of two novel radical S-adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase. *J. Biol. Chem.* **279**, 25711–25720 (2004)
68. Posewitz M.C., Mulder D.W., Peters J.W.: New frontiers in hydrogenase structure and biosynthesis. *Curr. Chem. Biol.* **2**, 178–199 (2008)
69. Reiser E., Fontecilla-Camps J.C., Armstrong F.A.: Catalytic electrochemistry of a [NiFeSe]-hydrogenase on TiO<sub>2</sub> and demonstration of its suitability for visible-light driven H<sub>2</sub> production. *Chem. Commun.* **5**, 550–552 (2009)
70. Reissmann S., Hochleitner E., Wang H., Paschos A., Lottspeich F., Glass R.S., Böck A.: Taming of a poison: biosynthesis of the NiFe-hydrogenase cyanide ligands. *Science*, **299**, 1067–1070 (2003)
71. Rubach J.K., Brazzolotto X., Gaillard J., Fontecave M.: Biochemical characterization of the HydE and HydG iron-only hydrogenase maturation enzymes from *Thermatoga maritima*. *FEBS Lett.* **579**, 5055–5060 (2005)
72. Rupprecht J., Hankamer B., Mussgnug J.H., Ananyev G., Dismukes C., Kruse O., Perspectives and advances of biological H<sub>2</sub> production in microorganisms. *Appl. Microbiol. Biot.* **72**, 442–449 (2006)
73. Salomone-Stagni M., Stellato F., Whaley C.M., Vogt S., Morante S., Shima S., Rauchfuss T.B., Meyer-Klaucke W.: The iron-site structure of [Fe]-hydrogenase and model systems: an X-ray absorption near edge spectroscopy study. *Dalton Trans.* **39**, 3057–3064 (2010)
74. Schoelmerich M.C., Müller V.: Energy-converting hydrogenases: the link between H<sub>2</sub> metabolism and energy conservation. *Cell. Mol. Life Sci.* **77**, 1461–1481 (2020)
75. Shafaat H.S., Rüdiger O., Ogata H., Lubitz W.: [NiFe] hydrogenases: A common active site for hydrogen metabolism under diverse conditions. *BBA-Bioenergetics*, **1827**, 986–1002 (2013)
76. Shepard E.M., Broderick J.B. i wsp.: [FeFe]-Hydrogenase maturation: HydG-catalyzed synthesis of carbon monoxide. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 9247–9249 (2010)
77. Shepard E.M., McGlynn S.E., Bueling A.L., Grady-Smith C.S., George S.J., Winslow M.A., Cramer S.P., Peters J.W., Broderick J.B.: Synthesis of the 2Fe subcluster of the [FeFe]-hydrogenase H cluster on the HydF scaffold. *PNAS*, **107**, 10448–10453 (2010)
78. Shima S., Pilak O., Vogt S., Schick M., Stagni M.S., Meyer-Klaucke W., Warkentin E., Thauer R.K., Ermler U.: The crystal structure of [Fe]-hydrogenase reveals the geometry of the active site. *Science*, **321**, 572–575 (2008)
79. Shima S., Thauer R.K.: A third type of hydrogenase catalyzing H<sub>2</sub> activation. *Chem. Rec.* **7**, 37–46 (2007)
80. Shima S., Vogt S., Göbels A., Bill E.: Iron-chromophore circular dichroism of [Fe]-hydrogenase: The conformational change required for H<sub>2</sub> activation. *Angew. Chem. Int. Edit.* **49**, 9917–9921 (2010)
81. Shomura Y., Higuchi Y.: Structural aspects of [NiFe]-hydrogenases. *Rev. Inorg. Chem.* **33**, 173–192 (2013)
82. Show K-Y., Lee D-J.: Bioreactor and bioprocess design for biohydrogen production (w) Biohydrogen red. A. Pandey, J-S. Chang, P.C. Hallenbeck, C. Larroche, Elsevier, 2013, s. 317–337
83. Soboh B., Stripp S.T., Muhr E., Granich C., Brusseemann M., Herzberg M., Heberle J., Gary Sawers R.: [NiFe]-hydrogenase maturation: isolation of a HypC-HypD complex carrying diatomic CO and CN<sup>-</sup> ligands. *FEBS Lett.* **586**, 3882–3887 (2012)
84. Søndergaard D., Pedersen C.N.S., Greening C.: HydDB: A web tool for hydrogenase classification and analysis. *Sci. Rep-UK.* **6**, 34212 (2016)
85. Sun J., Hopkins R.C., Jr F.E.J., McTernan P.M., Adams M.W.W.: Heterologous expression and maturation of an NADP-dependent [NiFe]-hydrogenase: A key enzyme in biofuel production. *PLOS ONE*, **5**, e10526 (2010)
86. Teng Y., Xu Y., Wang X., Christie P.: Function of biohydrogen metabolism and related microbial communities in environmental bioremediation. *Front. Microbiol.* **10**, 106 (2019)
87. Thauer R.K.: Hydrogenases and the global H<sub>2</sub> cycle. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2011**, 919–921 (2011)
88. Trohalaki S., Pachter R.: Mechanism of hydrogen production in [Fe-Fe]-hydrogenases: A quantum mechanics/molecular mechanics study. *Int. J. Hydrogen Energ.* **35**, 5318–5331 (2010)
89. Tye J.W., Hall M.B., Darensbourg M.Y.: Better than platinum? Fuel cells energized by enzymes. *PNAS*, **102**, 16911–16912 (2005)
90. Vignais P.M., Billoud B., Meyer J.: Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 455–501 (2001)
91. Vignais P.M., Billoud B.: Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chem. Rev.* **107**, 4206–4272 (2007)
92. Vignais P.M., Colbeau A.: Molecular biology of microbial hydrogenases. *Curr. Issues Mol. Biol.* **6**, 159–188 (2004)
93. Vignais P.M., Toussaint B.: Molecular biology of membrane-bound H<sub>2</sub> uptake hydrogenases. *Arch. Microbiol.* **161**, 1–10 (1994)
94. Vincent K.A., Cracknell J.A., Lenz O., Zebger I., Friedrich B., Armstrong F.A.: Electrocatalytic hydrogen oxidation by an enzyme at high carbon monoxide or oxygen levels. *PNAS*, **102**, 16951–16954 (2005)
95. Volbeda A., Amara P., Iannello M., De Lacey A.L., Cavazza C., Fontecilla-Camps J.C.: Structural foundations for the O<sub>2</sub> resistance of *Desulfomicrobium baculatum* [NiFeSe]-hydrogenase. *Chem. Commun. (Camb.)* **49**, 7061–7063 (2013)
96. Wait A.F., Parkin A., Morley G.M., dos Santos L., Armstrong F.A.: Characteristics of enzyme-based hydrogen fuel cells using an oxygen-tolerant hydrogenase as the anodic catalyst. *J. Phys. Chem. C* **114**, 12003–12009 (2010)
97. Watanabe S., Matsumi R., Arai T., Atomi H., Imanaka T., Miki K.: Crystal structures of [NiFe] hydrogenase maturation proteins HypC, HypD, and HypE: Insights into cyanation reaction by thiol redox signaling. *Mol. Cell.* **27**, 29–40 (2007)
98. Wu C-H., Haja D.K., Adams M.W.W.: Cytoplasmic and membrane-bound hydrogenases from *Pyrococcus furiosus* (w) Methods in Enzymology, red. F. Armstrong, Academic Press, 2018, s. 153–168
99. Wu C-H., McTernan P.M., Walter M.E., Adams M.W.W.: Production and application of a soluble hydrogenase from *Pyrococcus furiosus*. *Archaea*, **2015**, Article ID 912582 (2015)
100. Wu L-F., Mandrand M.A.: Microbial hydrogenases: Primary structure, classification, signatures and phylogeny. *FEMS Microbiol. Lett.* **104**, 243–269 (1993)
101. Wulff P., Thomas C., Sargent F., Armstrong F.A.: How the oxygen tolerance of a [NiFe]-hydrogenase depends on quaternary structure. *J. Biol. Inorg. Chem.* **21**, 121–134 (2016)
102. Xu T., Yin C-J.M., Wodrich M.D., Mazza S., Schultz K.M., Scopelliti R., Hu X.: A Functional model of [Fe]-hydrogenase. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 3270–3273 (2016)
103. Yoon K.S., Fukuda K., Fujisawa K., Nishihara H.: Purification and characterization of a highly thermostable, oxygen-resistant, respiratory [NiFe]-hydrogenase from a marine, aerobic hydrogen-oxidizing bacterium *Hydrogenovibrio marinus*. *Int. J. Hydrogen Energ.* **36**, 7081–7088 (2011)