

УДК 57.023.581.1

ВИКОРИСТАННЯ МЕТАНОЛУ ТА ІЗОАСКОРБАТУ ДЛЯ ПІДВИЩЕННЯ ФОТОПРОДУКУВАННЯ ВОДНЮ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

© 2021 р. С. С. Степанов, О. В. Поліщук, О. К. Золотарьова

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

З метою поліпшення існуючих біотехнологій отримання фотоводню з використанням живих культур одноклітинних зелених водоростей досліджено особливості впливу органічних консервантів, таких як метанол і ізоаскорбат натрію, на утворення H_2 міксотрофною культурою *Chlamydomonas reinhardtii* в закритій системі на середовищі культивування ТАР-S. Додавання 50 мМ метанолу в середовище культивування пришвидшувало продукування H_2 за рахунок зменшення тривалості аеробної фази порівняно з контролем. Додавання 100 мМ ізоаскорбату за тих самих умов зумовлювало зменшення тривалості аеробної і продуктивної фаз на 1 добу, а також зниження відсоткового вмісту H_2 в кінці досліду. Стан фотосинтетичного апарату *C. reinhardtii* визначали за параметрами РАМ-флуориметрії в кінці досліду. За наявності метанолу в середовищі параметри F_v/F_m , qP , Φ_{PSII} та F_v'/F_m' вірогідно не відрізнялися від контролю. Наявність ізоаскорбату в середовищі за тих самих умов супроводжувалася падінням F_v/F_m та F_v'/F_m' .

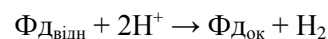
Ключові слова: *Chlamydomonas reinhardtii*, фотопродукування водню, біотехнологія, метанол, ізоаскорбат

DOI: <https://doi.org/10.35550/vbio2021.03.049>

Вичерпання запасів традиційних джерел енергії (нафтопродукти, кам'яне вугілля, природний газ) привертає увагу суспільства до використання альтернативних поновлюваних джерел енергії (Ghirardi et al., 2000). Особлива увага приділяється технології отримання біопалива за участю живих організмів (вищі рослини, бактерії, мікроводорості) (Rupprecht et al., 2006). Біопаливо отримується як продукт життєдіяльності (біоетанол, біоводень) або в результаті переробки організму продуцента (біодизель). Особливість отримання біопалива з живих організмів пов'язана з необхідністю створення оптимальних умов росту, що забезпечують найбільший вихід біопалива.

Одним з перспективних енергоносіїв майбутнього є біоводень (Faraloni et al., 2011), який є екологічно безпечним паливом, оскільки його використання не супроводжується виді-

ленням CO_2 та інших парникових або токсичних газів. Ряд мікроорганізмів у спеціальних умовах здатні продукувати водень. Серед них ціанобактерії, пурпурні несіркові фототрофні бактерії, клостридії та одноклітинні зелені водорості (Золотарева и др., 2010; Якімова, Білявська, 2010). Деякі зелені мікроводорості, зокрема *Chlamydomonas reinhardtii*, в умовах аноксії та дефіциту мінерального живлення здатні продукувати водень за участю гідрогеназ. Гідрогепаза зелених мікроводоростей каталізує утворення H_2 з протонів з використанням енергії відновленого феридоксину:



За нормальних умов росту за участю $\Phi_{\text{Двідн}}$ відбувається відновлення НАДФ⁺ в електрон-транспортному ланцюгу хлоропластів, відновлення нітритів та сульфідів, а також глутатіону (Yagi et al., 2016). У зв'язку з цим, при відтоці електронів через гідрогеназу і утворенні

Адреса для кореспонденції: Степанов Сергій Степанович, Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України, вул. Терещенківська, 2, Київ 01004, Україна; e-mail: serhiy1986@ukr.net

H_2 пригнічуються процеси росту, а саме синтез амінокислот та запасних вуглеводів. Електрони для відновлення протонів можуть надходити ФСII-залежним та/або ФСII-незалежним шляхом – через відновлення пулу пластохіну за участю НАД(Ф)Н-пластохінон оксидоредуктази. Виділення H_2 при ферментації органічних субстратів у темряві відбувається за рахунок активності піруват-феридоксин оксидоредуктази (Jurado-Oller et al., 2015). Однак, не менше 80% водню *Chlamydomonas reinhardtii* продукує на світлі ФСII-залежним шляхом в результаті фотолізу води (Якімова, Білявська, 2010).

Мінеральне голодування за макроелементами, такими як сульфур, нітроген, фосфор чи магній в замкненій системі без доступу повітря індукує стресову реакцію *C. reinhardtii*, одним з проявів якої є перехід до анаеробного метаболізму та індукція синтезу гідрогенази (HYDA1). Найбільш ефективно синтез H_2 індукується переведенням мікроводоростей на безсіркове середовище (Melis et al., 2010). Недостатність сульфору спричиняє припинення росту та порушення у функціонуванні фотосинтетичного апарату, у першу чергу ФСII. Це супроводжується зниженням концентрації O_2 в середовищі культивування. Коли швидкість утворення O_2 в процесі фотолізу води не перевищує швидкості його поглинання в процесі дихання, створюються умови аноксії і відбувається індукція експресії HYDA1. Проміжок часу від переведення на безсіркове середовище до початку утворення H_2 називають аеробною стадією, протягом цього проміжку часу відбувається падіння концентрації O_2 в культурі мікроводоростей до рівня, за якого індукується синтез гідрогенази (Melis et al., 2010). Протягом аеробної стадії відбувається адаптація метаболізму *C. reinhardtii*, що в подальшому забезпечує виділення H_2 в наступній анаеробній або продукуючій фазі біотехнології отримання H_2 . Завдання біотехнології полягає у створенні умов культивування, що скорочують аеробну та подовжують продукуючу стадію. Скорочення аеробної стадії можна досягти шляхом створення умов, котрі забезпечують швидке виведення O_2 з середовища культивування. Раніше було встановлено, що використання мутантного штаму *C. reinhardtii* з активним мітохондріальним диханням супроводжується збільшенням виходу H_2 порівняно з штамом дикого типу (Volgusheva et al., 2013). Також при додаванні субстратів дихання глюкози та ацетату відбувається скорочення аеробної фази і підвищується швидкість виділення H_2 . Подібний ефект спостерігався при додаванні глюкозооксидази в

середовище культивування (Золотарева и др., 2010).

Метою даної роботи було дослідження особливостей впливу метанолу та ізоаскорбату натрію, що використовуються як органічні консерванти, на утворення H_2 міксотрофною культурою *Chlamydomonas reinhardtii* у закритій системі.

МЕТОДИКА

Об'єкт та умови росту. Для дослідження використовували одноклітинну зелену мікроводорість *C. reinhardtii* з колекції IBASU-V Інституту ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України. Водорість культивували міксотрофно на ТАР середовищі при освітленні білими флуоресцентними лампами з щільністю потоку квантів фотосинтетично активної радіації на поверхні колб 100 мкмоль фотонів·м²·с⁻¹ за температури 25°C. При досягненні середини логарифмічної фази росту культуру концентрували шляхом центрифугування при 3000 rpm. Клітини переводили на безсіркове середовище ТАР-S та поміщали у закриті реактори без доступу повітря. При переведенні на середовище ТАР-S додавали 50 мМ метанолу або 100 мМ ізоаскорбату.

Визначення концентрації клітин. Кількість клітин в 1 мл середовища культивування підраховували в камері Горяєва при 200-разовому збільшенні світлового мікроскопа. Проби для аналізу відбирали після ретельного перемішування культури. Клітини в сітці камери фотографували на цифрову фотокамеру. Отримані зображення обробляли за допомогою комп'ютерної програми Adobe photoshop CS.

РАМ-флуориметрія. РАМ-флуоресценцію хлорофілу *a* визначали за загальноприйнятою методикою на флуориметрі ХЕ-РАМ (Walz, Німеччина). Інтенсивність діючого світла відповідала інтенсивності освітлення при культивуванні водоростей (100 мкмоль фотонів·м²·с⁻¹). Дослідження проводили при кімнатній температурі (25°C). Запис даних у форматі файлів Excel проводили за допомогою мультимера UT-60E (Тайвань), з'єднаного з комп'ютером. Клітини перед початком експерименту адаптували до темряви протягом 1 хв для окиснення первинного хінонового акцептора комплексів ФСII. Згідно з параметрами гасіння флуоресценції вираховували максимільний квантовий вихід (F_v/F_m), фотохімічне гасіння флуоресценції (qP), квантовий вихід електронного транспорту (Φ_{PSII}), ефективний квантовий вихід (F_v'/F_m') і нефотохімічне

ВИКОРИСТАННЯ МЕТАНОЛУ ТА ІЗОАСКОРБАТУ

Таблиця 1. Особливості фотопродукування H_2 *C. reinhardtii* на TAP-S середовищі в закритій системі в контролі та з додаванням метанолу або ізоаскорбату натрію
[Table 1. Features of photoproduction of H_2 *C. reinhardtii* on TAP-S medium in a closed system under control and with the addition of methanol or sodium isoascorbate]

Варіант [Variant]	Тривалість аеробної фази, діб [Duration of the aerobic phase, days]	Тривалість продуктивної фази, діб [Duration of the productive phase, days]	Об'єм газової фази реактора, мл [Reactor gas phase volume, ml]	Вміст H_2 , % [The content of H_2 , %]	Вміст CO_2 , % [The content of CO_2 , %]
Контроль [Control]	5	5	25	95	0,5
Метанол (50 мМ) [methanol (50 mM)]	4	5	25	90	2
Ізоаскорбат (100 мМ) [isoascorbate (100 mM)]	4	4	20	62	7

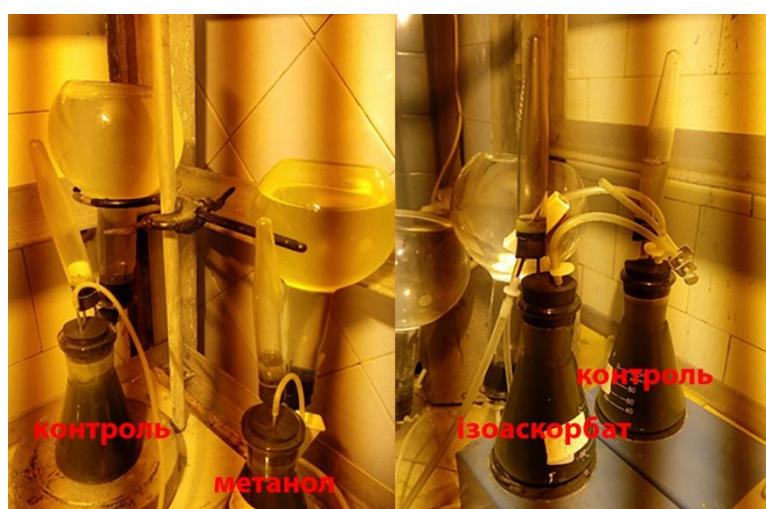


Фото установок для отримання H_2 на четверту добу культивування *C. reinhardtii* з додаванням 50 мМ метанолу, 100 мМ ізоаскорбату та в контролі.

[Photo of installations for obtaining H_2 on the fourth day of cultivation of *C. reinhardtii* with the addition of 50 mM methanol, 100 mM isoascorbate and in control].

гасіння флуоресценції за Штерном-Вольмером (NPQ) (Maxwell, Johnson 2000).

Амперметричне визначення O_2 . Визначення концентрації O_2 здійснювали амперметрично за допомогою платиного електрода Кларка в скляній комірці об'ємом 2 мл (Зеленський, 1986). Вимірювання O_2 проводили при постійному перемішуванні культури мікрорості на магнітному змішувачі при температурі 25°C.

Визначення водню. Вимірювання концентрації водню проводили після завершення продуктивної фази. Проби для визначення відбирали з реактора герметично в об'ємі 5 мл. Визначення вмісту H_2 здійснювали амперметрично за допомогою платиного електрода Кларка в газовій фазі скляної комірки при температурі 25°C. Вміст H_2 у газовій фазі визначали у відсотках до чистого H_2 , який отримували в резуль-

таті реакції цинку з хлоридною кислотою в апараті Кіпа.

Статистична обробка результатів. Експерименти проводили в трьох біологічних повтореннях, кількість аналітичних повторень у межах однієї біологічної також не менше ніж трьох. Експериментальні дані (крім попередніх досліджень), що наведені в таблицях, представлені у вигляді середнього арифметичного зі стандартною похибкою.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

При додаванні метанолу та ізоаскорбату відбувалося скорочення аеробної фази і такі культури раніше починали продукувати H_2 (табл. 1, рисунок). Однак, присутність ізоаскорбату в середовищі культивування зумовлювала скорочення також тривалості продуктивної фази виділення H_2 порівняно з контролем без додавання консервантів. Об'єм газової фази

в реакторах в кінці досліду був однаковий в контролі та з додаванням 50 мМ метанолу. Відсотковий вміст водню в контролі становив 95 %, з додаванням метанолу – 90%, а ізоаскорбату – 62%. Вміст CO_2 в газовій фазі, що накопичується до кінця досліду, опосередковано характеризує вміст O_2 та ступінь реактивації термінальної оксидази мітохондрій. У досліджуваних варіантах відсотковий вміст CO_2 був обернено пропорційним відсотковому вмісту H_2 (табл. 1).

Таким чином, додавання метанолу зумовлює скорочення періоду аеробної фази в процесі продукування H_2 . Такий вплив на стан культури зелених мікроводоростей досить передбачуваний, оскільки, як активатор дихання рослинних організмів, метанол може зумовлювати зниження концентрації O_2 в середовищі культивування. Подібне скорочення тривалості аеробної фази характерне також для мутантного штаму *Stm6 C. reinhardtii*. Цей штам характеризується відсутністю циклічного електронного транспорту через першу фотосистему, низькою інтенсивністю виділення O_2 в процесі фотосинтезу та модифікованим дихальним метаболізмом (Volgusheva et al., 2013). Такі особливості надають можливість *Stm6* отримувати в 5 разів більший вихід H_2 при анаеробному культивуванні на TAP-S середовищі без доступу повітря. Раніше ми спостерігали активацію мітохондріального дихання *C. reinhardtii* як за поглинанням O_2 , так і за виділенням CO_2 культурою в темряві, які зростали на 26 та 23 %, відповідно. Також раніше ми встановили, що додавання метанолу підвищує вміст відновлених форм нікотинамідних коферментів (НАД(Ф) H_2) (Stepanov, Zolotareva 2015). Відновлювальні еквіваленти, утворені в результаті метаболізму метанолу, можуть надходити в електрон-транспортний ланцюг хлоропластів та мітохондрій і таким чином активувати дихання та фотосинтез.

Однак, наявність метанолу не супроводжувалася збільшенням виходу H_2 в процесі культивування в закритій системі на TAP-S середовищі порівняно з контролем (табл. 1). Теоретично, відновлювальні еквіваленти, які утворюються при метаболізмі метанолу, мають підвищувати вихід H_2 , тому ми плануємо в подальшому дослідити вплив вищих концентрацій метанолу.

Додавання ізоаскорбату викликало зменшення тривалості як аеробної, так і продуктивної фази продукування H_2 . Як і у випадку з метанолом, зменшення тривалості аеробної фази

можна пояснити швидким зниженням концентрації O_2 в середовищі культивування. Зниження тривалості продуктивної фази можна пояснити стресовим впливом, що супроводжується пошкодженням фотосинтетичного апарату або зниженням інтенсивності фотосинтетичного транспортування електронів.

З літературних джерел відомо, що ізоаскорбат натрію збільшує накопичення біомаси *C. vulgaris* в умовах міксотрофного росту, при цьому знижується концентрація O_2 в середовищі культивування. Детально метаболізм ізоаскорбату у мікроводоростей не досліджений, автори статті вважають що ізоаскорбат може метаболізуватися подібно до глюкози і використовується як джерело карбону та енергії (Cui et al., 2017). Зниження концентрації O_2 в культурі *C. vulgaris* за присутності ізоаскорбату може бути як пов'язане з прямою його взаємодією з молекулярним киснем, так і бути результатом інтенсифікації клітинного дихання.

Щоб визначити фізіологічний стан фотосинтетичного апарату, ми дослідили параметри гасіння флуоресценції хлорофілу після завершення продукування H_2 *C. reinhardtii* за наявності метанолу, ізоаскорбату та в контролі.

Встановлено, що при культивуванні без доступу повітря на TAP-S середовищі відбувається пошкодження фотосинтетичного апарату *C. reinhardtii*, що проявляється у зниженні F_v/F_m , qP , Φ_{PSII} та F_v'/F_m' . Для фотопродукування H_2 ключове значення має ступінь пошкодження ФСII, а саме наявність її активних реакційних центрів (Volgusheva et al., 2013). Ступінь пошкодження ФСII характеризується параметром F_v/F_m в адаптованих до темряви мікроводоростей та параметром F_v'/F_m' – в адаптованих до світла. Ефективність функціонування ФСII та інтенсивність транспортування електронів в хлоропластах характеризується параметрами qP , Φ_{PSII} та NPQ (Maxwell, Johnson 2000). При культивуванні *C. reinhardtii* з метою отримання H_2 в нашому дослідженні відбувалося зниження всіх параметрів (табл. 2). За наявності метанолу в середовищі культивування параметри кривої індукції флуоресценції не відрізнялися від контролю в процесі продукування H_2 на TAP-S середовищі.

Додавання ізоаскорбату в процесі продукування H_2 супроводжувалося пошкодженням ФС II, що проявлялося у зниженні F_v/F_m та F_v'/F_m' на 42% та 47% відповідно. Однак за наявності ізоаскорбату зростала ефективність функціонування ФСII, що проявлялось в підвищенні qP на 80% порівняно з контролем на TAP-S

ВИКОРИСТАННЯ МЕТАНОЛУ ТА ІЗОАСКОРБАТУ

Таблиця 2. Параметри гасіння флуоресценції хлорофілу у *C. reinhardtii* в контролі та після завершення продукування H₂

[Table 2. Parameters of chlorophyll fluorescence quenching in *C. reinhardtii* in control and after completion of H₂ production]

Варіант [Variant]	F _v /F _m	qP	NPQ	Φ _{PSII}	F _v '/F _m '
ТАР	0,63±0,05	0,72±0,11	0,23±0,12	0,42±0,07	0,58±0,09
ТАР-S	0,26±0,07	0,26±0,07	0,16±0,08	0,09±0,02	0,34±0,05
Ізоаскорбат (100 мМ) [iso-ascorbate (100 mM)]	0,15±0,02	0,47±0,13	0,09±0,03	0,1±0,01	0,18±0,06
Метанол (50 мМ) [methanol (50 mM)]	0,24±0,05	0,27±0,09	0,26±0,07	0,06±0,01	0,31±0,08

середовищі. Підвищення ефективності функціонування ФС II за дії ізоаскорбату можна пояснити компенсаторною реакцією на зниження кількості реакційних центрів ФС II в результаті її пошкодження. Тому продуктивна фаза отримання H₂ за дії ізоаскорбату закінчувалась швидше і відсотковий вміст H₂ в газовій фазі був меншим ніж в контролі.

Отже, додавання метанолу в технології отримання H₂ *C. reinhardtii* супроводжується зниженням тривалості аеробної фази та не впливає на тривалість продуктивної фази. За наявності метанолу на 5% знижується вміст H₂ в газовій фазі, але тривалість аеробної фази скорочується, тому доцільно додавати метанол з метою отримання H₂. Додавання ізоаскорбату натрію в технології отримання H₂ супроводжується зниженням тривалості як аеробної, так і продуктивної стадії. При цьому порівняно з контролем знижується як кінцевий об'єм газової фази, так і відсотковий вміст H₂. Отже, додавати ізоаскорбат з метою отримання H₂ не доцільно.

ЛІТЕРАТУРА

Зеленский М.И. 1986. Полярнографическое определение кислорода в исследованиях по фотосинтезу и дыханию. Ленинград : Наука.

Золотарева О.К., Шнюкова Е.И., Подорванов В. 2010. Микроводоросли как продуценты водорода. Альгология. 2 : 224-249.

Якімова О.В., Білявська Н.О. 2010. Біохімічні та молекулярні аспекти фотопродукування водню. Вісн. Харків. нац. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. 3 (21) : 23-29.

Cui H., Meng F., Li F., Wang Y. 2017. Application of sodium erythorbate to promote the growth of *Chlorella vulgaris*. J. Appl. Phycol. 29 (3) : 1135-1144.

Faraloni C., Ena A., Pintucci C., Torzillo G. 2011. Enhanced hydrogen production by means of sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures grown in pretreated olive mill wastewater. Fuel and Energy

Abstracts. 36 : 5920-5931.
<https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.02.007>.

Ghirardi M. L., Zhang L., Lee J. W., Flynn T., Seibert M., Greenbaum E., Melis A. 2000. Microalgae: a green source of renewable H₂. Trends Biotechnol. 18 (12) : 506-511.

Jurado-Oller J. L., Dubini A., Galván A., Fernández E., González-Ballester D. 2015. Low oxygen levels contribute to improve photohydrogen production in mixotrophic non-stressed *Chlamydomonas* cultures. Biotechnology for Biofuels. 8 (1) : 1-14.

Maxwell K., Johnson G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. J. Exp. Bot. 51 (345) : 659-668.

Melis A., Zhang L., Forestier M., Ghirardi M. L., Seibert M. 2000. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. 122 (1) : 127-136.

Rupprecht J., Hankamer B., Mussgnug J.H., Ananyev G., Dismukes C., Kruse O. 2006. Perspectives and advances of biological H₂ production in microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72 (3) : 442-449.

Stepanov S.S., Zolotareva E.K. 2015. Methanol-induced stimulation of growth, intracellular amino acids, and protein content in *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Appl. Phycol. 27 (4) : 1509-1516.

Volgusheva A., Styring S., Mamedov F. 2013. Increased photosystem II stability promotes H₂ production in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc. Natl. Acad. Sci. 110 (18) : 7223-7228.

Yagi T., Yamashita K., Okada N., Isono T., Momose D., Mineki S., Tokunaga E. 2016. Hydrogen photoproduction in green algae *Chlamydomonas reinhardtii* sustainable over 2 weeks with the original cell culture without supply of fresh cells nor exchange of the whole culture medium. J. Plant Res. 129 (4) : 771-779.

REFERENCES

Zelenskiy M.I. 1986. Polyarograficheskoye opredeleniye kisloroda v issledovaniyakh po fotosintezu i dykhaniyu (Polarographic determination of oxygen

- in research on photosynthesis and respiration). Leningrad : Nauka (In Russian).
- Zolotareva E.K., Shnyukova E.I., Podorvanov V.V. 2010. Microalgae as hydrogen producers. *Algologia* 20 (2) : 224-249. (In Russian).
- Yakimova O.V., Bilyavska N.O. 2010. Biochemical and molecular aspects of hydrogen photoproduction. *Visn. Hark. nac. agrar. univ., Ser. Biol.* 3 (21) : 23-29. (In Ukrainian).
- Cui H., Meng F., Li F., Wang Y. 2017. Application of sodium erythorbate to promote the growth of *Chlorella vulgaris*. *J. Appl. Phycol.* 29 (3) : 1135-1144.
- Faraloni C., Ena A., Pintucci C., Torzillo G. 2011. Enhanced hydrogen production by means of sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures grown in pretreated olive mill wastewater. *Fuel and Energy Abstracts.* 36 : 5920-5931. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.02.007>.
- Ghirardi M.L., Zhang L., Lee J.W., Flynn T., Seibert M., Greenbaum E., Melis A. 2000. Microalgae: a green source of renewable H₂. *Trends Biotechnol.* 18 (12) : 506-511.
- Jurado-Oller J. L., Dubini A., Galván A., Fernández E., González-Ballester D. 2015. Low oxygen levels contribute to improve photohydrogen production in mixotrophic non-stressed *Chlamydomonas* cultures. *Biotechnology for Biofuels.* 8 (1) : 1-14.
- Maxwell K., Johnson G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51 (345) : 659-668.
- Melis A., Zhang L., Forestier M., Ghirardi M.L., Seibert M. 2000. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 122 (1) : 127-136.
- Rupprecht J., Hankamer B., Mussgnug J.H., Ananyev G., Dismukes C., Kruse O. 2006. Perspectives and advances of biological H₂ production in microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72 (3) : 442-449.
- Stepanov S.S., Zolotareva E.K. 2015. Methanol-induced stimulation of growth, intracellular amino acids, and protein content in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Appl. Phycol.* 27 (4) : 1509-1516.
- Volgusheva A., Styring S., Mamedov F. 2013. Increased photosystem II stability promotes H₂ production in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (18) : 7223-7228.
- Yagi T., Yamashita K., Okada N., Isono T., Mose D., Mineki S., Tokunaga E. 2016. Hydrogen photoproduction in green algae *Chlamydomonas reinhardtii* sustainable over 2 weeks with the original cell culture without supply of fresh cells nor exchange of the whole culture medium. *J. Plant Res.* 129 (4) : 771-779.

Надійшла до редакції
20.06.2021 р.

USING OF PRESERVATIVES (METHANOL, ISOASCORBATE) IN ORDER TO INCREASE THE PHOTOPRODUCTION OF H₂ BY *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

S. S. Stepanov, O. V. Polishchuk, E. K. Zolotareva

*Kholodny Institute of Botany
of the National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)
E-mail: serhiy1986@ukr.net*

In order to improve the existing biotechnologies for photo-hydrogen production using live cultures of unicellular green algae, we investigated the effects of organic preservatives such as methanol and sodium isoascorbate on H₂ formation by *Chlamydomonas reinhardtii* mixotrophic culture in a closed system on the TAP-S culture medium. The addition of 50 mM methanol to the culture medium resulted in a faster production of H₂ by reducing the duration of the aerobic phase compared to control. The addition of 100 mM isoascorbate under the same conditions resulted in decrease in the duration of the aerobic and productive phases by 1 day, as well as decrease in the amount of H₂ accumulated at the end of the experiment. The state of the photosynthetic apparatus of *C. reinhardtii* was determined by the parameters of PAM-fluorometry at the end of the experiment. In the presence of methanol in the medium, the parameters F_v/F_m, qP, F_{PSII} and F_v'/F_m' did not differ significantly from the control by the end of the experiment. The presence of isoascorbate under the same conditions was accompanied by a decrease in F_v/F_m and F_v'/F_m'.

Key words: *Chlamydomonas reinhardtii*, photohydrogen production biotechnology, methanol, isoascorbate

ВИКОРИСТАННЯ МЕТАНОЛУ ТА ІЗОАСКОРБАТУ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТАНОЛА И ИЗОАСКОРБАТА ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ФОТОПРОДУКЦИИ ВОДОДОДА *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

С. С. Степанов, А. В. Полищук, Е. К. Золотарева

*Институт ботаники им. Н. Г. Холодного
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)
E-mail: serhiy1986@ukr.net*

Для улучшения существующих биотехнологий производства фотоводорода с использованием живых культур одноклеточных зеленых водорослей исследовано влияние органических консервантов, таких как метанол и изоаскорбат натрия, на образование H_2 миксотрофной культурой *Chlamydomonas reinhardtii* в закрытой системе на культуральной среде TAP-S. Добавление 50 мМ метанола в культуральную среду TAP-S вызывало более быстрое накопление H_2 за счет сокращения продолжительности аэробной фазы по сравнению с контролем. Добавление 100 мМ изоаскорбата в тех же условиях вызывало уменьшение продолжительности как аэробной, так и продуктивной фаз на 1 день, а также уменьшение процентного содержания H_2 в конце эксперимента. Состояние фотосинтетического аппарата *C. reinhardtii* определяли по параметрам РАМ-флуориметрии в конце эксперимента. В присутствии метанола в среде параметры F_v/F_m , qP , Φ_{PSII} и F_v'/F_m' существенно не отличались от контроля в конце эксперимента. Присутствие изоаскорбата в тех же условиях сопровождалось снижением F_v/F_m и F_v'/F_m' .

Ключевые слова: *Chlamydomonas reinhardtii*, производство фотоводорода, биотехнология, метанол, изоаскорбат