

В.М. Мокросноп, О.В. Поліщук, О.К. Золотарьова

Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного НАН України,
вул. Терещенківська, 2, 01004, Київ; тел.: +38(044) 272 32 31,
e-mail: membrana@ukr.net

ВПЛИВ ЕТАНОЛУ НА ДИХАННЯ І ФОТОСИНТЕЗ *EUGLENA GRACILIS*

Метою роботи є вивчення впливу етанолу на швидкість фотосинтезу, дихання і ріст *Euglena gracilis*. **Методи.** Швидкість росту культури визначали за концентрацією клітин. Інтенсивність фотосинтезу розраховували за кількістю світлозалежного утворення O_2 , а інтенсивність дихання – за поглинанням розчинного кисню. Зміни концентрації O_2 визначали за допомогою закритого платинового електроду Кларка. Ефективність фотосинтетичної трансформації енергії оцінювали за величиною ефективного квантового виходу фотосистеми 2, вимірюючи інтенсивність модульованої флуоресценції хлорофілу на флуориметрі ХЕ-РАМ (Walz, Німеччина). **Результати.** Ріст культури *E. gracilis* при освітленні значно стимулювався після додавання 100 мМ етанолу, при цьому втричі зростала швидкість темного дихання, а інтенсивність фотосинтезу збільшувалася вдвічі. Метанол не викликав суттєвих змін. **Висновки.** Етиловий спирт ефективно асимілюється *E. gracilis*, яка культивується на світлі, що супроводжується активацією фотосинтезу та прискорює накопичення біомаси культури.

Ключові слова: *Euglena gracilis*, фотосинтез, дихання, етанол, варіабельна флуоресценція хлорофілу.

Еукаріотична джгутикова мікроводорість *Euglena gracilis* добре росте в широкому діапазоні значень рН і температури, а також пристосована до виживання в анаеробних умовах. Цей організм продукує у значних кількостях біологічно активні сполуки і тому має перспективу для використання в біотехнології. Клітини *E. gracilis* накопичують протеїни, поліненасичені жирні кислоти, парамілон – поліцукрид з імуностимулювальними і імунопротекторними властивостями, попередники тетратерпеноїдів, каротиноїдів, вітамінів А, С і Е [3, 4, 14].

E. gracilis може рости автотрофно за рахунок фотосинтезу, з використанням CO_2 як єдиного джерела вуглецю. В темряві стимуляція росту мікроводорості забезпечується використанням різноманітних органічних речовин, зокрема етанолу, який нею швидко утилізується. Здатність цієї мікроводорості інтенсивно рости у присутності етанолу відрізняє її від інших фотосинтезуювальних мікроорганізмів [2]. Основними метаболічними ефектами етанолу є підвищення рівня дихання, інгібування гліколітичного розщеплення глюкози, стимуляція глюконеогенезу та синтез парамілону [5, 8, 12]. Вже за декілька



хвилин після внесення етанолу у адаптовану до темряви культуру *E. gracilis* швидкість мітохондріального дихання її клітин значно зростає [5]. За біохімічними показниками мітохондріон *E. gracilis* займає проміжне положення між аеробними та анаеробними мітохондріями, завдяки чому види *Euglena* адаптуються до широкого діапазону концентрацій кисню і здатні існувати за анаеробних умов [7, 9].

Метаболізм етанолу в мітохондріоні і цитозолі *E. gracilis* відбувається за участі унікальних НАД⁺ – алкогольдегідрогеназ, та високоактивних альдегіддегідрогеназ [13, 15]. Було показано, що додавання етанолу до суспензії клітин *E. gracilis*, фотосинтетичний апарат яких сформований у присутності світла, призводить до стимуляції росту культури і накопичення біологічно активних речовин [3, 4]. За наявності в культуральному середовищі, адаптованої до темряви *E. gracilis*, екзогенних джерел вуглецю, таких як етанол, глюкоза, сукцинат та ін., світлозалежний розвиток хлоропластів, синтез хлорофілу і ліпідів гальмується [8, 10]. Це явище відоме як катаболітна репресія біогенезу фотосинтетичного апарату [1, 11]. Чи викликає додавання етанолу до автотрофної культури пригнічення фотосинтезу і активацію дихання, до теперішнього часу не визначено. Тому метою даної роботи було вивчення впливу екзогенного етанолу на інтенсивність темного дихання і фотосинтезу автотрофної культури *E. gracilis*.

Матеріали і методи

Культуру мікроводорості *E. gracilis* var. *bacillaris* вирощували автотрофно протягом шести діб у сольовому поживному середовищі (Cramer and Myers, 1952) без перемішування та аерації за інтенсивності світла $100 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ та температури 20°C до концентрації $\sim 10^6$ клітин/мл. Швидкість росту культури оцінювали за концентрацією клітин методом підрахунку в камері Горяєва. На цьому добу аліквоти суспензій розділяли на 3 варіанти: автотрофний контроль (варіант «Контроль»), варіанти з 100 мМ метанолом (варіант «+Мет») та 100 мМ етанолом (варіант «+Ет») та інкубували протягом доби. Темнове поглинання та світлозалежне виділення кисню вимірювали за допомогою сконструйованого нами комп'ютеризованого полярографа, оснащеного електродом Кларка та термостатованим водяним кожухом. Зразок освітлювали 5 Вт світлодіодною лампою білого світла (світлова температура 4100 К). Для дослідження інтенсивності фотосинтезу визначали швидкість виділення кисню за насичуючої інтенсивності світла ($500 \text{ мкмоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) з поправкою на темнове дихання. Паралельно, для оцінки змін інтенсивності фотосинтетичного електронного транспорту використовували флуориметр ХЕ-РАМ (Walz, Німеччина). В основі методу лежить прямий зв'язок між рівнем флуоресценції хлорофілу в складі фотосистеми 2 (ФС 2) і відновленістю первинного хінонового акцептора ФС 2 – Q_A , і, відповідно, зворотній зв'язок із здатністю ФС 2 до електронного транспорту. Клітини адаптуються до кількісного і якісного складу діючого світла (мінімальна насичуюча інтенсивність світла) протягом 15 хв, при



цьому активність механізмів фотохімічного перетворення та нефотохімічної дисипації світлової енергії стабілізується і флуоресценція хлорофілу виходить на стаціонарний рівень, F_s . Потім вмикається насичуючий спалах світла, під час дії якого практично всі центри ФС 2 відновлюються і флуоресценція зростає до максимального рівня в адаптованому до світла стані – F'_m . В цій точці ефективність фотохімічних перетворень, тобто електронного транспорту, наближається до нуля. Відносне положення рівнів F_s і F'_m характеризує ефективний квантовий вихід ФС 2, $\Phi_{PS II} = (F'_m - F_s) / F'_m$ [6].

Результати досліджень та їх обговорення

Після інкубації зразків культури протягом доби без перемішування концентрація кисню в суспензії клітин *E. gracilis* встановлювалася на рівні, який визначався співвідношенням інтенсивностей фотосинтетичного виділення кисню і його поглинання в процесі клітинного дихання (рис. 1). За автотрофного культивування концентрація кисню встановлювалася на рівні 290 мкМ. У присутності етанолу рівноважна концентрація кисню знижувалася вдвічі, що може свідчити як про пригнічення фотосинтезу, так і про значну стимуляцію дихання. Для порівняння було досліджено вплив метанолу, як спирту, що за літературними даними не є ефективним субстратом дихання. У присутності метанолу рівноважна концентрація кисню не змінювалася.

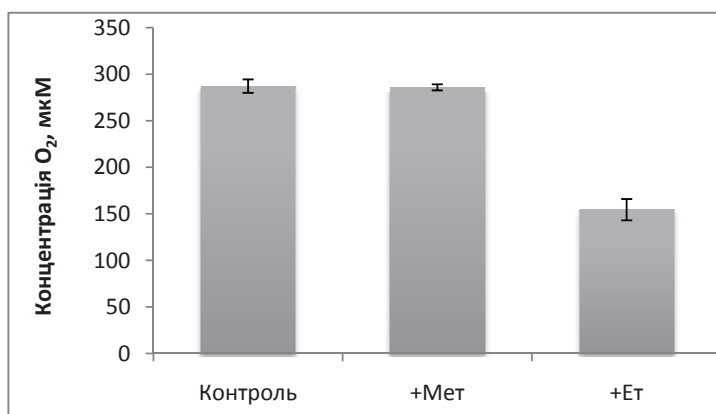


Рис. 1. Рівноважна концентрація кисню в суспензії *E. gracilis*, інкубованих протягом доби у присутності метилового та етилового спиртів

Fig. 1. Equilibrium oxygen concentrations in *E. gracilis* cell suspension incubated for one day in the presence of methyl and ethyl alcohols

Таким чином, при додаванні досліджуваних джерел вуглецю інтенсивності дихання та фотосинтезу змінювалися порівняно з контрольним, автотрофним варіантом. Обидва процеси достовірно стимулювалися етанолом. Найбільша стимуляція дихання, майже в 3 рази порівняно з контролем, спостерігалася у клітин, інкубованих з етанолом (рис. 2). Метанол суттєво не стимулював дихання клітин *E. gracilis*, порівняно з контролем.

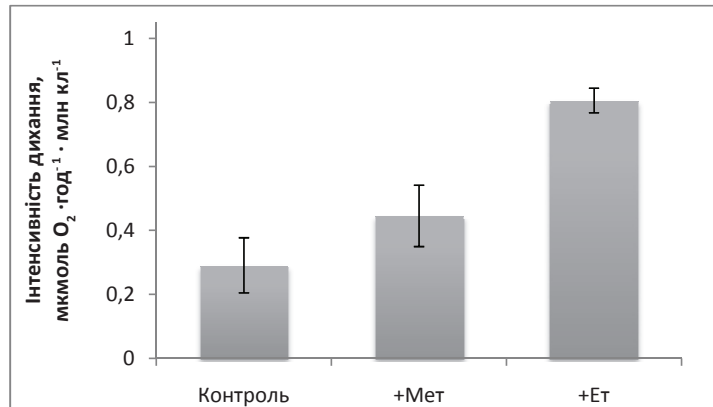


Рис. 2. Інтенсивність дихання *E. gracilis* у присутності метилового та етилового спиртів

Fig. 2. Respiration rate of *E. gracilis* in the presence of methyl and ethyl alcohols

Інтенсивність світлозалежного виділення кисню, з поправкою на рівень темного дихання, змінювалася у вузьких межах, ніж інтенсивність дихання (рис. 3, А).

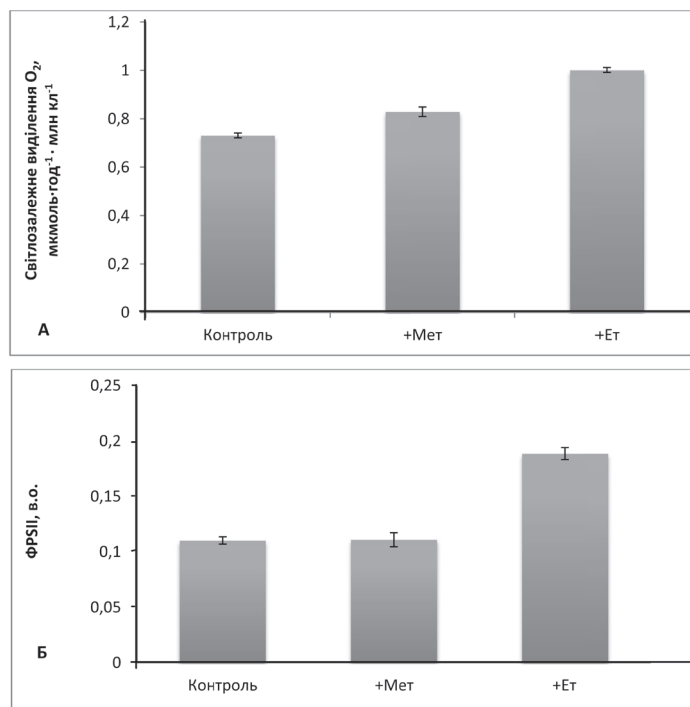


Рис. 3. Інтенсивність світлозалежного виділення кисню (А) та ефективний квантовий вихід ФС 2 (Φ_{PSII}) (Б) у культурі клітин *E. gracilis* в присутності метилового та етилового спиртів

Fig. 3. Light-dependent oxygen evolution activity and effective PSII quantum yield (Φ_{PSII}) in *E. gracilis* cell culture in the presence of methyl and ethyl alcohols

Обидва джерела вуглецю стимулювали фотосинтетичне виділення кисню, причому найбільш вираженим цей ефект був у варіанті з додаванням етилового спирту. Такий ефект може бути зумовлений накопиченням в клітинах головного субстрату фотосинтезу – CO_2 .

Специфічнішим показником функціонування фотосинтетичного електрон-транспортного ланцюга, ніж світлозалежне виділення кисню, є ефективний квантовий вихід ФС 2, який в наших дослідах достовірно збільшувався у 2 рази в присутності етанолу (рис. 3, Б). Метанол не впливав на цей показник. Менш виражений вплив етанолу на швидкість виділення кисню на світлі, порівняно з Φ_{PSII} , може бути зумовлений одночасним поглинанням кисню в інших процесах, серед яких найбільш значимим є фотодихання.

Культивування *E. gracilis* на світлі у присутності етанолу суттєво стимулює її ріст порівняно з автотрофною культурою (рис. 4.). По досягненню середини експоненційної фази росту, концентрація клітин міксотрофної культури вже перевищувала значення контрольної в 5 разів.

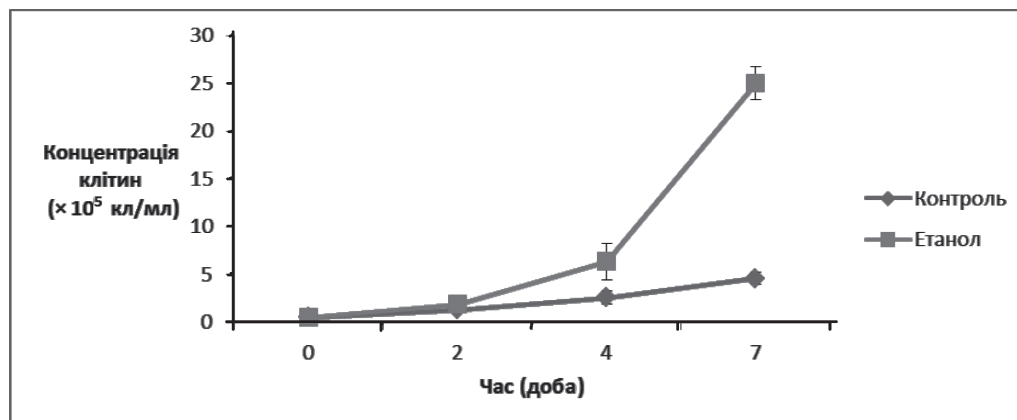


Рис. 4. Ефект етанолу на ріст культури *E. gracilis* у порівнянні з контролем

Fig. 4. Effect of ethanol on growth of *E. gracilis* culture compared with control

Таким чином, *E. gracilis*, яка культивується на світлі, ефективно використовує етиловий спирт як джерело вуглецю та енергії, що супроводжується активацією фотосинтезу та прискорює накопичення біомаси культури.

Додавання етанолу до автотрофної культури *E. gracilis* значно стимулює її ріст. Добова інкубація у присутності 100 мМ етилового спирту на світлі призводить до підвищення інтенсивності темного дихання в 3 рази та двократної активації фотосинтезу. При цьому вміст кисню суттєво знижується і згодом досягає мінімального значення, що зумовлює перехід культури до анаеробного існування. Активація фотосинтезу у *E. gracilis* за присутності етанолу може бути викликана підвищеною внутрішньоклітинною концентрацією CO_2 внаслідок значної інтенсифікації дихання.

V.M. Mokrosnop, O.V. Polishchuk, O.K. Zolotareva

M.G. Kholodny Institute of Botany, NASU, 2, Tereshchenkivska str., 01004, Kyiv, Ukraine;
tel.: +38 (044) 272 32 31, e-mail: membrana@ukr.net

**EFFECT OF ETHANOL ON RESPIRATION AND PHOTOSYNTHESIS
OF *EUGLENA GRACILIS***

Summary

The aim of the present work was to study the effect of ethanol on the rates of photosynthesis and respiration, and productivity of *Euglena gracilis*. **Methods.** The growth rate of culture was determined by cell concentration. Dark respiration and net photosynthesis were measured by O₂ concentration changes with a Clark-type electrode. Photosynthesis efficiency was also determined as effective quantum yield of PSII with Xe-PAM fluorometer (Walz, Germany). **Results.** Addition of 100 mM ethanol significantly stimulated the growth of light-adapted *E. gracilis*. At the same time, respiration rate tripled and light-dependent oxygen evolution rate doubled. Methanol caused no significant changes. **Conclusions.** Cultivated on the light *E. gracilis* effectively assimilated ethyl alcohol, that was accompanied by photosynthesis activation and culture biomass accumulation.

Key words : *Euglena gracilis*, photosynthesis, respiration, ethanol, variable chlorophyll fluorescence.

В.М. Мокросноп, А.В. Полищук, О.К. Золотарева

Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины,
ул. Терещенковская, 2, Киев, 01004, Украина;
тел.: +38 (044) 272 32 31, e-mail: membrana@ukr.net

**ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛА НА ДЫХАНИЕ И ФОТОСИНТЕЗ
*EUGLENA GRACILIS***

Реферат

Целью работы является изучение влияния этанола на скорость фотосинтеза, дыхания и рост микроводоросли *Euglena gracilis*. **Методы.** Скорость роста культуры определяли по концентрации клеток. Интенсивность фотосинтеза рассчитывали по выделению O₂ при освещении клеток, а интенсивность дыхания – по поглощению растворимого кислорода в темноте. Изменения концентрации O₂ определяли с помощью закрытого платинового электрода Кларка. Эффективность фотосинтетической трансформации энергии оценивали по величине эффективного квантового выхода фотосистемы 2, измеряя интенсивность модулированной флуоресценции хлорофилла на флуориметре XE-PAM (Walz, Германия). **Результаты.** Рост культуры *E. gracilis* на свету значительно стимулировался после добавления 100 Мм этанола, при этом втрое возрастала



интенсивность темнового дыхания, а интенсивность фотосинтеза увеличивалась вдвое. Метанол не вызывал существенных изменений. **Выводы.** Этиловый спирт эффективно ассимилируется *E. gracilis*, которая культивируется на свету, что сопровождается активацией фотосинтеза и ускоряет накопление биомассы культурой.

Ключевые слова: *Euglena gracilis*, фотосинтез, дыхание, этанол, варибельная флуоресценция хлорофилла.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Сиваш О.О., Михайленко Н.Ф., Золотарьова О.К. Цукри як ключова ланка в регуляції метаболізму фотосинтезуючих клітин // Укр. бот. журн. – 2001. – 58, № 1. – С. 121–127.
2. Степанов С.С., Золотарева Е.К. Фотосинтез, дихання і ріст мікробіодоросли *Chlamydomonas reinhardtii* в присутстві етанолу // Мікробіологія і біотехнологія. – 2013. – № 4. – С. 62–71.
3. Afukwa C., Ogbonna J. Effects of mixed substrates on growth and vitamin production by *Euglena gracilis* // Afr. J. Biotech. – 2007. – 6, № 22. – P. 2612–2615.
4. Fujita T., Aoyagi H., Ogbonna J., Tanaka H. Effect of mixed organic substrate on α -tocopherol production by *Euglena gracilis* in photoheterotrophic culture // Appl. Microbiol. and Biotechnol. – 2008. – 79, № 3. – P. 371–378.
5. Garlaschi F., Garlaschi A., Lombardi A., Glorgio F. Effect of ethanol on the metabolism of *Euglena gracilis* // Plant. Sci. Lett. – 1974. – 2. – P. 29–39.
6. Genty B., Briantais J.M., Baker N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – 990. – P. 87–92.
7. Hoffmeister M., van der Klei A., Rotte C., van Grinsven K.W.A., van Hellemond J.J., Henze K., Tielens A.G.M., Martin W. *Euglena gracilis* Rhodoquinone:Ubiquinone Ratio and Mitochondrial Proteome Differ under Aerobic and Anaerobic Conditions // J. Biol. Chem. – 2004. – 279, № 21. – P. 22422–22429.
8. Horrum M., Schwartzbach S. Nutritional regulation of organelle biogenesis in *Euglena* // Plant Physiol. – 1980. – 65. – P. 382–386.
9. Matsuda F., Hayashi M., Kondo A. Comparative profiling analysis of central metabolites in *Euglena gracilis* under various cultivation conditions // Biosci. Biotechnol. Biochem. – 2011. – 75, № 11. – P. 2253–2256.
10. Monroy A.F., Schwartzbach S.D. Catabolite repression of chloroplast development in *Euglena* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1984. – 81, № 9. – P. 2786–2790.
11. Ogbonna J., Ichige E., Tanaka H. Interactions between photoautotrophic and heterotrophic metabolism in photoheterotrophic cultures of *Euglena gracilis* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – 58. – P. 532–538.



12. Ono K., Kawanaka Y., Inui H., Miyatake K., Kitaoka S., Nakano Y. Mitochondrial alcohol dehydrogenase from ethanol-grown *Euglena gracilis*// J. Biochem. – 1995. – 117. – P. 1178–1182.
13. Rodriguez-Zavala J., Ortiz-Cruz M., Moreno-Sanchez R. Characterization of an aldehyde dehydrogenase from *Euglena gracilis*// J. Eukaryot. Microbiol. – 2006. – 53, № 1. – P. 36–42.
14. Rodriguez-Zavala J., Ortiz-Cruz M., Mendoza-Hernandez G., Moreno-Sanchez R. Increased synthesis of α -tocopherol by *Euglena gracilis* under conditions of high biomass production // J. Appl. Microbiol. – 2010. – 109. – P. 2160–2172.
15. Yoval-Sánchez B., Jasso-Chávez R., Lira-Silva E., Moreno-Sanchez R., Rodriguez-Zavala J. Novel mitochondrial alcohol metabolizing enzymes of *Euglena gracilis* // J. Bioenerg. Biomembr. – 2011. – 43, № 1. – P. 519–530.

Стаття надійшла до редакції 20.03.2014 р.

