

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS
INFORMATIKAI KAR

Biotechnológiai Tanszék

BIOLÓGIA TDK 2014

ŐSZI FORDULÓ

Alternatív hidrogén termelő
módszerek vizsgálata alga-baktérium
kultúrákban

(Research of alternative hydrogen production methods in
algal-bacterial cultures)

Laszli Adrienn

Biomérnök szakos hallgató

Témavezető: *Dr. Maróti Gergely* kutatásvezető
(MTA SzBK, Biokémiai Intézet)

Belső konzulens: *Dr. Rákhely Gábor*

2014

TARTALOMJEGYZÉK

1.1. ALTERNATÍV ENERGIAFORRÁSOK JELENTŐSÉGE.....	2
1.1.1. Hidrogén, mint energiaforrás.....	2
1.1.1.1. Felhasználás	3
1.1.1.2. Előállítás.....	3
1.2. BIOHIDROGÉN.....	4
1.2.1. A hidrogenáz	6
1.2.2. Alga alapú hidrogén termelés	7
1.2.2.1. Algák napjainkban	7
1.2.2.2. Algák hidrogén termelése	8
2. CÉLKITŰZÉS	11
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	12
3.1. Tiszta és kevert kultúrák előállítása.....	12
3.1.1. Felhasznált anyagok és tápoldatok.....	12
3.1.2. A használt alga fajok származása	13
3.1.3. Az alga fajok szaporítása, fenntartása.....	13
3.1.4. A felhasznált baktérium törzsek izolálása	13
3.1.6. Gázkromatográfiás analízis	14
3.1.7. A fotoszintézis gátlása	14
4. EREDMÉNYEK	15
4.1. Bakteriális partner kiválasztása.....	15
4.2. Az algák hidrogén fejlesztésének jellemzése fény jelenlétében	15
4.3. Az algák hidrogén fejlesztésének jellemzése kénmegvonást alkalmazva	17
4.4. Az algák hidrogén fejlesztésének vizsgálata sötét fermentáció során	20
4.5. A szimpla <i>Chlamydomonas</i> sp. 549 törzs és a tervezett kokultúra növekedésének tulajdonságai sötét fermentáció során.....	21
4.6. A termelt hidrogén forrásának vizsgálata DCMU-val	22
5. IRODALOMJEGYZÉK	24
6. MELLÉKLETEK JEGYZÉKE	26
7. TÉTELES SZAKMAI HOZZÁJÁRULÁS	34

1. BEVEZETÉS

1.1. ALTERNATÍV ENERGIAFORRÁSOK JELENTŐSÉGE

Napjaink egyik legnagyobb kihívása az emberiség energiával való ellátása. A mindennapi életünkben sajátos és kiemelt jelentősége van a természeti erőforrásokkal való gazdálkodásnak. Az energia biztosítja azt, hogy napi tevékenységeinket a nyers emberi erő sokszorosára növeljük [Barótfi I. 2000]. Az emberiség a történelem folyamán döntő mértékben a biomassza energiáját használta fel tüzelőanyag és biológiai energia formájában. A napenergia egy formájának tekinthető a biomassza, mely az évmilliók során elraktározódott és átalakult fosszilis energiahordozókká, mint a földgáz, a kőolaj és a kőszén. A fosszilis energiakészletek gyors elhasználását a növekvő energiaigénynek tudhatjuk be, mely két okra vezethető vissza: a fejlődő országok fejlődéséhez egyre több energiára van szükség, illetve a világ népessége intenzíven növekszik [Halász J. et al 2007].

A természeti erőforrások fosszilis tüzelőanyagokként való felhasználása korlátozottan áll rendelkezésünkre, illetve a környezetszennyezésben is jelentős szerepet játszik. Mindkét állításból következően mindent meg kell tennünk az energiával való takarékoskodásért, és a megújuló energiaforrások széleskörű elterjedéséért [Barótfi I. 2000].

Alternatív energiaforrásnak a gazdaságilag hasznosítható, fosszilis energiahordozóktól eltérő energiafajtákat tekintjük, amelyeket a kimerülés veszélye nem fenyeget, illetve egy jellemző időciklus alatt képesek újratermelődni. A megújuló energiaforrások közé soroljuk a közvetlen napenergiát – napkollektorokat, fotoelektromos átalakítókat, naperőműveket-, valamint a közvetett napenergiához tartozik a szél-, víz-, zöld(biomassza)-, az árapály-, a geotermális energia, az óceánok hőtartalma és hullámzásának energiája. Másodlagos megújuló energiaforrásként pedig egyre nagyobb teret kap az energia fejlődésében a metanol, a megújuló energiaforrásokkal előállított elektromos energia, valamint a hidrogén [Lukács G. 2010, Halász J. et al 2007].

1.1.1. Hidrogén, mint energiaforrás

Napjainkban a hidrogén felhasználásával egy olyan energiaforrást fedeztek fel, amely nagyhatékonyságú és valóban környezetbarát. Ezen tulajdonságainak köszönhetően az energia iparban egyre jelentősebb szerepet tölt be, úgy is mondhatnánk, hogy napjainkban „hidrogénforradalom” játszódik le.

A földön óriási mennyiségben előfordul, bár nagy reakcióképessége miatt a természetben kötött állapotban, vegyületként található meg (pl. a vízben és a szénhidrogénekben) [Halász J. et al 2007].

1.1.1.1. Felhasználás

A hidrogént tulajdonságai alapján számos ipari terület alkalmazza már termékei előállítására - kifejezetten a vegyipar, a gyógyszeripar és a gépipar. Az utóbbi években a nagyobb vállalatok, mint a gépkocsigyártó, olajkitermelő és –feldolgozó vállalatok dollár milliókat fektetnek a hidrogénre alapozott technológiák kifejlesztésébe [Lukács G. 2010].

Hidrogén keletkezhet melléktermékként több vegyipari folyamatnál, máshol viszont pl. kőolaj-finomítóknál nélkülözhetetlen a folyamatok eredményes véghezviteléhez. A hidrogén energetikailag többféle módon hasznosítható: hőerőművekben termikus égetés során, felhasználható motorhajtóanyagként, hálózati vagy önálló elektromos energiaként, valamint gépjárművek üzemanyagaként [Halász J. et al 2007].

Az egyre szélesebb körű tüzelőanyag-cellás hidrogén felhasználás eredményei bebizonyították, hogy ez a leghatékonyabb módszer az elektromos energia előállítására [Halász J. et al 2007]. Az üzemanyagcella (fűtőanyagelem) olyan eszköz, mely elektrokémiai reakció során képes az üzemanyag kémiai energiáját közvetlenül elektromos energiává alakítani [Lukács G. 2010]. Ezen módszer alkalmazásának előnyei közé tartozik, hogy gazdaságos, környezetbarát, és folyamatosan alkalmazható a Földön megtalálható nagy mennyiségű hidrogénkészlet miatt [Halász J. et al 2007].

1.1.1.2. Előállítás

A hidrogén egyszerű atomi felépítése miatt rendkívül reakcióképes elem, ezért a Földön számos kötésben jelen van, többek között számtalan szénhidrogénben, amelyeket a szerves világ alappilléreként tartunk számon. A hidrogént gyakorlatilag minden olyan kémiai kötésből ki lehet vonni, amelyben jelen van, így számos technológiai folyamattal elő tudjuk állítani több vagy kevesebb energia befektetésével [Boetius H. 2006].

A hidrogén energia befektetés nélküli előállítása fémből és savból, illetve lúgból történik, de ez csak laboratóriumi körülmények között, kis mennyiségű gáz kinyerésekor használatos [Boetius H. 2006].

A hidrogén ipari előállításához más módszerek alkalmazása szükséges, mint a szén elgázosítása, a földgáz vízgőzös reformálása, vízelektrolízis, fotolízis napenergia felhasználásával [Halász J. et al 2007].

Mai tudásunk szerint az élő szervezetek számos módon képesek –önmagukban vagy kombinálva- jelentős mennyiségű, megújuló biohidrogén termelésére [Lukács G. 2010].

1.2. BIOHIDROGÉN

A fotoszintézis olyan biológiai rendszer, amely kifejlesztette az evolúció évmilliói alatt a nehezen megfogható napenergia kémiai energiává alakításának képességét. A fotoszintézis kulcsfontosságú energia-raktározási és szervesanyag-felépítési folyamat, amely lejátszódása során a légköri szén-dioxid átalakításával biomassza keletkezik [Kovács K. et al 2010].

A fényenergia közvetlen hasznosítása szempontjából a fotoszintézisre képes mikroszkopikus élőlények – mint az algák és baktériumok – jöhetnek elsősorban számításba, mert viszonylag olcsón, nagy tömegben és gyorsan tenyészthetők [Kovács K. et al 2005].

Az algák és egyéb zöld növények vízbontásuk során használják fel a fényenergiát, mely végeredményeként oxigén és hidrogéngáz keletkezik. Az oxigén és a hidrogén egymástól elkülönítve jól tárolható és szállítható, a felhasználásuk helyén napenergia szabadul fel, az égés során pedig víz keletkezik belőlük. Így a napfényt, - amely gyakorlatilag kimeríthetetlen forrás - egy körfolyamat során tesszük energetikailag hasznosíthatóvá, mely folyamán vizet bontunk összetevőire és felhasználásakor pedig vizet állítunk elő komponenseiből, a hidrogénből és az oxigénből [Kovács K. 2005].

Nagy számban léteznek alga fajok, amelyek képesek hidrogén termelésre. Az algák napenergiával történő hidrogén termelését több évtizede fedezték fel, azóta különböző módszerekkel és eszközökkel próbálták továbbfejleszteni a folyamatot [Skari S. et al 2013]. A biohidrogén előállítására számos útvonalat ismerünk, melyek a fényt igénylő fermentációs eljárások (direkt biofotolízis, indirekt biofotolízis, fotofermentáció) és a fényt nem igénylő fermentációs eljárások (sötét fermentáció).

A direkt biofotolízis folyamata hasonlóan működik növényekben és algákban egyaránt. A folyamat alatt a napenergia a fotoszintézis során konvertálódik, szubsztrátként vizet igényel, amely oxigénné és hidrogénné bomlik.

Az indirekt biofotolízis során problémát jelent a hidrogén termelő eljárás érzékenysége, az oxigén és hidrogén fejlesztés térben és/vagy időben teljesen elválasztott folyamat. Így az indirekt biofotolízis során a hidrogén és oxigén fejlesztés különböző szakaszokban történő elválasztása párosul a szén-dioxid fixációjával/termelésével. A cianobaktériumok egyedien használják fel a légkörben megtalálható szén-dioxidot, mint

szén forrást és a nap energiát, mint energia forrást. A sejtek elsőként sejtalkotók előállítására használják fel a szén-dioxidot, amit később hidrogén termelésére fordítódik. A cianobaktériumokban történő indirekt biofotolízis folyamatát a következő reakció mutatja be:



[Rangan B. et al 2008].

A foto-fermentáció során a fotoszintézisre képes mikroorganizmusok nitrogenáz enzim által katalizált molekuláris hidrogén előállítására képesek megfelelő nitrogén-hiányos körülmények között fényenergia és redukált vegyületek jelenlétében [Levin D. B. et al 2004]. Ezek a baktériumok önmagukban nem képesek vízbontásra, anaerob körülmények között képesek szerves savakat (mint például az ecetsav) elektron donorként felhasználni. Ezek az elektronok az ATP-ből nyert energiát felhasználva a ferredoxinon keresztül a nitrogenáz enzimig szállítódnak. Amikor a rendszerben nincs jelen nitrogén, a nitrogenáz enzim képes a protonokat hidrogén gázzá redukálni, melyhez ismét ATP-ből nyert energia felhasználása szükséges [Rangan B. et al 2008].

A sötét fermentáció során a hidrogéntermelés anaerob baktériumok által valósul meg, melyek ehhez a folyamathoz sötétben történő növekedést és szénhidrát gazdag szubsztrátot igényelnek. A mikrobiális hidrogén termelés ebben az esetben legtöbbször a piruvát anaerob metabolizmusán alapul, mely a különböző szubsztrátok lebontása által valósul meg. A piruvát lebontását két enzim katalizálhatja:

1. Piruvát: formát liáz (PFL)



2. piruvát: ferredoxin oxido reduktáz (PFOR)



[Rangan B. et al 2008].

Az algák által megvalósult sötét fermentáción alapuló hidrogén termelés során a piruvátról egy elektron transzport történik a hidrogenáz enzimekre (HYDA1, HYDA2), mely folyamatot a piruvát-ferredoxin-oxidoreduktáz enzim katalizálja anaerob körülmények között [Alexandra D. és Maria L.G., 2014].

A hidrogén termelés biológiai fejlődése alapvetően függ a hidrogén termelésre képes enzimek jelenlététől. Ezek az enzimek katalizálják a hidrogén keletkezésekor lejátszódó kémiai reakciót: $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- = \text{H}_2$. Az összes jelenleg ismert hidrogén termelésre képes enzim tartalmaz aktív centrumként egy fém-kötőhelyet, így metalloenzimeknek is nevezzük

őket. Napjainkban ismereteink szerint 3 enzim felelős a folyamatért: a nitrogenáz, a Fe-hidrogenáz és a NiFe-hidrogenáz.

A biofotolitikus módszereknél a Fe-hidrogenáz enzim használatos, míg a fotof fermentációs folyamatoknál nitrogenáz szükségeltetik [Rangan B. et al 2008]. [Dong-Hoon K., Mi-Sun K. 2011]. Mindkét enzim felhasználásával megvalósulhat a biotechnológiai úton történő hidrogén előállítás, viszont a nitrogenáz olyan sok kémiai energiát igényel a reakció katalizálásához, hogy az egész folyamat energetikailag ráfizetés a sejt számára, így a kutatások során a hidrogenáz enzim használata vált elterjedté [Kovács K. et al 2010].

1.2.1. A hidrogenáz

Az ismert hidrogenázok zöme fématomokat tartalmazó enzim [Kovács K. et al 2010]. Az aktív centrumukban elhelyezkedő fémtől függően 3 külön csoportra bonthatjuk őket: egy nikkell és egy vas atomot tartalmazó [NiFe]-, két vas atomot tartalmazó [FeFe]-, és egy vas atomot tartalmazó [Fe]- hidrogenázra [Dong-Hoon K. és Mi-Sun K. 2011].

A [NiFe]-hidrogenázok alkotják a hidrogenázok legnagyobb csoportját. Az enzim egy heterodimer, két alegysége ismert: az α és a β alegység. Az α alegység nagyobb méretű és aktív centrumában fémet tartalmaz, míg a kisebb β alegységben találhatóak a vas-kén centrumok, amelyek az aktív centrum és a fiziológiai elektron akceptorok/donorok között szállítják az elektronokat. A két fémet tartalmazó aktív centrumhoz tartozik még négy ciszteinből származó 4 S atom [Dong-Hoon K. et al 2011]. A vas atomhoz kapcsolódnak a nem protein-szerű ligandok, egy CO és két CN. A [NiFe] hidrogenázokban jelenlévő [4Fe-4S] és [3Fe-4S] kockák biztosítják az elektronok áramlását a funkcionális partner felé, amely pl. a citokróm lehet [Dong-Hoon K. et al 2011, Maróti G. et al 2003].

A hidrogenázok következő csoportját alkotják a [FeFe] hidrogenázok, amelyek csakis egy katalitikus alegységgel rendelkeznek, amelynek mérete rendkívül változatos lehet. A konzervált méretű domének mellett - ahol az aktív centrumban jelen levő H-klaszter is található -, gyakran tartalmaznak további doméneket, melyekben vas-kén csoportok is jelen vannak. A H-klaszter tartalmaz egy binukleáris [FeFe] központot, amelyhez [4Fe-4S] csoport kötődik egy áthidaló ciszteinennel és négy cisztein ligandon keresztül kapcsolódik a fehérjéhez. A [FeFe] hidrogenázok megtalálhatók az anaerob környezetben élő prokariótákban és egyedülként az eukarióta élőlényekben is fellelhetők. Míg a [NiFe] hidrogenázok hajlamosak részt venni a H_2 felhasználásban, addig a [FeFe] hidrogenázok

általában a hidrogén termelésben játszanak szerepet, így előnyösebb a kutatások során ezt az enzimet alkalmazni a jobb eredmény elérése céljából [Dong-Hoon K. et al 2011].

A [Fe]-hidrogenáz katalizálja a szén-dioxid metánná történő redukcióját hidrogén jelenlétében [Dong-Hoon K. et al 2011]. A [Fe]-hidrogenáz alapvetően különbözik a másik két hidrogén termelésre képes enzimtől a redox partnerek enzimatisz mechanizmusa és az elektronok aktív helyig történő szállítását tekintve. A [NiFe] és [FeFe] hidrogenázokban az elektronok fém-tartalmú klasztereken keresztül jutnak el a távoli aktív helyig, amelynek az egész folyamat alatt változatlan marad a struktúrája. A [Fe]-hidrogenázokban ezzel szemben közvetlenül szállítódnak az elektronok egy vas-kofaktoron keresztül az aktív helyig, mely sokkal közelebb található, mint a többi enzimben [Greening C. et al 2014].

A hidrogenázok működésük során rendkívül érzékenyek a környezet oxigén és szén-dioxid tartalmára, így a megfelelő anaerobicitásra kiemelt figyelmet kell fordítanunk, ugyanis az oxigén jelenléte egy bizonyos határ érték felett reverzibilisen vagy irreverzibilisen képes meggátolni a hidrogenázok katalitikus működését [Dong-Hoon K. et al 2011].

1.2.2. Alga alapú hidrogén termelés

1.2.2.1. Algák napjainkban

Az algák képviselik az élőlények legváltozatosabb csoportját, ugyanis képesek bármilyen körülményhez alkalmazkodni. Az algák egyaránt megtalálhatók magas vagy alacsony hőmérsékletű, pH értékű, só koncentrációjú, fényintenzitású környezetben, illetve vízzel borított területeken, sivatagokban vagy akár szimbiota életmódot élve állatokban is [Skari S. et al 2013].

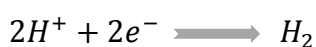
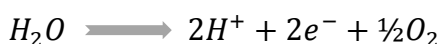
A különböző alga fajokat több évtizede termelik kereskedelmi hasznosításra (az egészségügyi alkalmazástól az emberi fogyasztásra szánt élelmiszereken, állati takarmányokon át, egészen a kozmetikai és színezőanyagokat alkotó alapanyagokig). A zöld algák több terméket képesek előállítani bonyolult metabolikus folyamatokon keresztül, melyek eredményeként másodlagos anyagcseretermékek keletkeznek, amelyek a biomasszából kinyerhetők és hasznosíthatók [Skari S. et al 2013].

A technika folyamatos fejlődése lehetővé teszi, hogy a gyorsan növekvő algák segítségével a biohidrogénen kívül más, hasznos energiaforrásokat is képesek legyünk előállítani. Ezek az energiaforrások a biodízel, biogáz, bioetanol és a BTL.

1.2.2.2. Algák hidrogén termelése

A mikro algák fotobiológiai úton történő hidrogén fejlesztése egy ígéretes, emissziómentes bioüzemanyag termelő folyamat, mely a jövőben a légköri szén-dioxid megkötésére is alkalmassá válhat [Peer M. et al, 2008].

Az alga alapú biohidrogén termelésről szóló legtöbb tanulmány modell organizmusként a *Chlamydomonas reinhardtii* zöld algát vette alapul a fotoszintetikus útvonalak és az aerob-anaerob ciklus vizsgálat céljából. A biohidrogén termelő folyamat kecsegtető a jövőre nézve, ugyanis a napfény által alakult át a víz oxigénné és hidrogénné egy két fázisú folyamaton keresztül:



Az első reakció minden fotoszintetikus élőlényre jellemző, míg a második reakciót speciális vastartalmú kloroplasztisz-hidrogenáz enzimek közvetítik, melyek csak az algák egy elkülönített csoportjára jellemzőek. A második fázis anaerob körülmények között játszódik le, oxigén hiányában az oxidatív foszforilációból eredő ATP termelés és a NADH/NADPH alak keletkezése gátolódik. Ezen körülmények között bizonyos mikroalgák, mint például a *Chlamydomonas reinhardtii* a szénhidrátokban tárolt energiát átirányítják a kloroplasztban található hidrogenáz enzimekhez, hogy megkönnyítsék a fotofoszforiláción keresztül történő ATP termelést és megakadályozzák az elektron transzport lánc túlzott mértékű redukálódását [Peer M. et al 2008]. Így a hidrogenáz enzimek különböző fermentatív folyamatokkal együtt lényegében proton/elektron felszabadító szelepként működnek a közegből felszabaduló protonok és a redukált ferredoxinból származó elektronok újraegyesítése során, mely eredményeként a sejtből kiválasztódik a keletkező hidrogén gáz. A hidrogén termelés legnagyobb előnye, hogy a hidrogén nem akkumulálódik a kultúrában, gyorsan felszabadul gáz formájában a sejtből, ellentétben a fermentációs termékekkel, amelyek toxikusak lehetnek a sejt számára [Peer M. et al 2008].

A *Chlamydomonas* fotolitikus hidrogén termelése a fotoszintézishez kapcsolódik, ahol a napenergia kémiai energiává alakul a Z sémát követve. A PSII-ben elnyelődő abszorbeált fény indukál egy töltés elválasztott állapotot, tartalmazva a P680⁺ fehérjét és a feofitint, amelyek kivonják az elektronokat a vízből és felszabadítják a kloroplaszt lumenből az oxigént, illetve a protonokat. Emellett a PSI által kötött abszorbeált fény generál egy erősen oxidált P700⁺ fehérjét, amely oxidál egy közbenső elektron karriert (általában a plasztocianint); az elektron felszabadul a P700⁺ proteinből és redukálja az elektron akceptor ferredoxint. A lineáris elektron áramlásban, az elektronok a PSII-ből származnak, majd a

plasztokinonra szállítódnak, ezt követően egy elektron szállító láncon keresztül redukálja a plasztocianint. A végső elektron akceptor (a PSI-ben a ferredoxin) elektronokat szállít a ferredoxin-NADP oxidoreduktázhoz, ahol a NADP^+ NADPH^+ -vá redukálódik, amely szerepet játszik a szén-dioxid fixációjában. Anaerob körülmények között a ferredoxin képes redukálni a hidrogenázokat és katalizálni a protonok reverzibilis redukcióját molekuláris hidrogénné [Alexandra D. és Maria L. G., 2014].

Alternatív módon a hidrogén termelés kiváltható anaerob környezetben történő sötét inkubációval is, mely alatt az úgynevezett sötét fermentáció játszódik le. Az alga kultúra sötétben történő inkubálása során a fotoszintézis és oxigén termelés gátolódik, a rendszerben fennmaradó oxigén respirációra fordítódik. Ha a fényben és sötétben történő nevelési intervallumokat váltakoztatjuk, az alga biomassa felépülhet a fotoszintézis fény szakaszában, és elhasználódhat a fermentatív folyamat sötét szakaszában [Skari S. et al 2013].

A zöld algákkal történő hidrogén termelés gyakran használt útvonala a tápanyag limitáció, esetünkben kén megvonás. Ha az algák számára jelentős tápanyagot vonunk el, úgynevezett vészreakció jelentkezik metabolizmusukban, például a környezetükből fokozott tápanyag felvétel, intracelluláris vegyületek bontása, melyekre már nincs szüksége az organizmusnak, de tartalmazza a hiányzó tápanyagot. Amikor a fontos tápanyagok nincsenek jelen a rendszerben az algák nem képesek tovább szaporodni és a strukturális komponensek, mint a proteinek, lipidek és szénhidrátok termelése leáll. A kén megvonás során a RuBisCo specifikus degradációja következik be, amely nagy mennyiségű ként tartalmaz a Calvin-ciklusban betöltött szerepe miatt. A kén limitációt alkalmazva pár napon belül az algában megemelkedik a celluláris keményítő termelésének szintje, ugyanakkor több tényező által fokozatosan inaktiválódik a PSII reakció centruma. A PSII részleges inaktiválódása miatt az oxigén termelő folyamat is részlegesen károsodik. Az oxigén jelenléte elég alacsony ahhoz, hogy a respirációval elhasználódjon a mitokondriumból és a rendszer anaerobbá váljon. Ebben a helyzetben, amikor a Calvin-ciklus leállt és már nem funkcionál szén és energia felhasználóként, a rendszer redukált helyzetbe kerül és a sejtek a rendszerből felszabaduló elektronoktól függenek, annak érdekében, hogy elkerüljék az oxidatív károsodást. Néhány alga, hogy megszabaduljon az anaerob környezetben történő redukzív nyomástól képes hidrogenáz enzimeket termelni, melyek katalizálják a hidrogén termelést azáltal, hogy a ferredoxinról elektronokat von el. Többnyire két lehetséges fény függő folyamat által valósulhat meg a hidrogén termelés: az elektronok származhatnak a PSII vízbontó komplexéből (PSII függő útvonal), illetve a keményítő fermentációjából,

amelyek a plasztokinonon keresztül lépnek be a tilakoid elektron transzportláncba (PSII független útvonal). Ezáltal megmutatkozik, hogy a kén megvonás általi hidrogén termelés szorosan kapcsolódik a sejtek keményítő tartalmával [Skari S. et al 2013].

A legtöbb kutatás során tiszta alga és baktérium kultúrákat vizsgáltak a hidrogéntermelő képességükre fókuszálva, míg ezen dolgozat során alga-baktérium konzorcium hidrogénhozamát mértük a következő módszereket alkalmazva: sötét fermentáció, kén megvonás, fotoszintetikus útvonal gátlása DCMU-val ((3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) a jobb eredmény elérése és a folyamat megismerése céljából.

2. CÉLKITŰZÉS

Kutatásaim során alga-baktérium konzorcium hidrogén termelését vizsgáltam a sötét fermentáció alatt, illetve tápanyag limitációt (kén megvonás) alkalmazva, valamint a fotoszintetikus útvonal DCMU-val történő gátlása során. A konzorciumban hidrogenáz enzimmel nem rendelkező mutáns baktérium fajokat használtam, így csak az alga által termelt hidrogén mennyisége volt mérhető a rendszerben.

Kutatásaim során egy jobb, hatékonyabb hidrogén fejlesztési rendszer kialakítását tűztem ki célul, mely a következő lépések által valósult meg:

1. Tiszta és kevert (alga és baktérium törzsek) kultúrák szaporítása, fenntartása
2. Hidrogénhozam és oxigén szint változás detektálása a különböző mesterséges alga-baktérium kultúrákban fényen történő inkubáció során
3. Az alga sejtszám változásának megfigyelése
4. Az alga-baktérium konzorcium hidrogénhozamának vizsgálata kénmegvonást alkalmazva
5. Az alga-baktérium konzorcium hidrogénhozamának vizsgálata sötét fermentációt alkalmazva
6. Az alga-baktérium konzorcium hidrogénhozamának vizsgálata a fotoszintetikus útvonalat gátló DCMU alkalmazásával

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Tiszta és kevert kultúrák előállítása

3.1.1. Felhasznált anyagok és tápoldatok

Az algák növekedéséhez TAP tápoldatot használtunk, mely elkészítése során elsőként az 1., 2., 3. oldatokat a hozzávalókból - a leírt arányoknak megfelelően összemérve - elkészítjük. A 3. oldat elkészítése után a kapott elegy pH-ját KOH-dal 7-re állítjuk. Desztillált vízben 2,42 g Tris Base-t feloldunk, majd az oldatokat hozzámérve fehér csapadékos oldatot kapunk. Ezt kuktában sterilizzuk, majd a TAP tápoldat esetében 1 mL tömény ecetsavat adunk hozzá vagy pH-ját sósavval 7,3-ra állítjuk TP tápoldat készítésekor. Az agar hozzáadásával szilárdítjuk a táptalajt.

A későbbiekben izolált baktérium törzsek pedig LB (Luria-Broth) táptalajon nevelkedtek.

TAP tápoldat elkészítésének leírása 1000 ml végtérfogatú tápoldathoz		
	Alkotó	Mennyiség
1.TAP sóoldal – 25 mL (1 liter desztillált vízben oldva)	NH ₄ Cl	15.0 g
	MgSO ₄ × 7H ₂ O	4.0 g
	CaCl ₂ × 2H ₂ O	2.0 g
2.Foszfát oldat – 0,375 mL (100 mL desztillált vízben oldva)	K ₂ HPO ₄	28.8 g
	KH ₂ PO ₄	14.4 g
3.Trace elements oldat – 1.0 mL	EDTA (250 mL desztillált vízben oldva)	50.0 g
	ZnSO ₄ × 7H ₂ O (100 mL desztillált vízben oldva)	22.0 g
	H ₃ BO ₃ (200 mL desztillált vízben oldva)	11.4 g
	MnCl ₂ × 4H ₂ O (50 mL desztillált vízben oldva)	5.06 g
	CoCl ₂ × 6H ₂ O (50 mL desztillált vízben oldva)	1.61 g
	CuSO ₄ × 5H ₂ O (50 mL desztillált vízben oldva)	1.57 g
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4H ₂ O (50 mL desztillált vízben oldva)	1.10 g
	FeSO ₄ × 7H ₂ O (50 mL desztillált vízben oldva)	4.99 g
4.Tris Base		2.42 g
5.Ecetsav (glaciális)		1.0 mL

6.HCl (TRIS minimál táptalajhoz) – 7,3 pH beállításához		
7.Agar		15 g/L

1.táblázat: TAP tápoldat elkészítésének leírása 1000 ml végtérfogatú tápoldathoz

LB (Luria-Broth) tápoldat elkészítésének leírása 1000 ml végtérfogatú tápoldathoz	
Alkotó	Mennyiség [g]
Trypton	10
Élesztő kivonat (Yeast Extract)	5
NaCl	10

2.táblázat: LB (Luria-Broth) tápoldat elkészítésének leírása 1000 ml végtérfogatú tápoldathoz

3.1.2. A használt alga fajok származása

Az alga kultúrákat a Mosonmagyaróvári Alga Kultúra Gyűjteményből (Mosonmagyaróvár Algal Culture Collection – MACC) szelektálták.

3.1.3. Az alga fajok szaporítása, fenntartása

A *Chlamydomonas* sp. 549 törzse és a *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 törzse TAP (TRIS-acetát-foszfát médium) és TP (TRIS-foszfát-médium) rifampicin tartalmú táptalajokon növekedtek. A TAP és TP táptalajon növesztett algákat 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ fény intenzitás mellett, 25°C-on inkubáltuk. Először az algákat szélesztettük agarral kiegészített, szilárd TP táptalajra, amit rifampicin antibiotikummal kiegészítettünk, majd áthelyeztük TAP folyékony tápoldatba. A kén hiányt úgy értük el, hogy a kultúrák átoltása előtt háromszor szuszpendáltuk és pelletáltuk az algákat TAP-S (ként nem tartalmazó TRIS-acetát-foszfát táptalaj) táptalajon. Az alga szuszpenziókat egyenletesen eloszlattuk 40 mL-es Hypo-Vial üvegekbe, így a végső térfogat 35 mL lett, a végső optikai denzitás (OD750) pedig 0,7.

3.1.4. A felhasznált baktérium törzsek izolálása

A baktérium fajok a Magyar Tudományos Akadémia Biológiai Kutatóközpontjának Biokémiai Intézetéből, illetve a Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszékéről származnak. Az izolált baktériumok (*E. coli*, *Rhodococcus*) sötétben és 30°C-on LB (Luria-Bertani táptalaj) táptalajon nevelkedtek. A baktériumokat, melyeket az alga-baktérium kokultúrából szelektáltunk egy napon keresztül LB táptalajon növesztettük, majd folyékony TAP tápoldatba oltottuk át őket. Ezeket a bakteriális törzsoldatokat egyenlően eloszlattuk 40 mL-es Hypo-Vial üvegekbe, így a végső térfogat 35 mL, illetve a végső optikai denzitás (OD600) 0,5 lett. Az alga-baktérium folyékony tenyészeteket úgy hoztuk létre, hogy

kevertük a tiszta alga és baktérium kultúrákat 40 mL-es Hypo-Vial üvegekbe, melyeknek a végső térfogata 35 mL lett, a végső optikai denzitása pedig az előzőekkel megegyező. A palackokat butil-dugóval és alumínium kupakkal zártuk le. Minden kísérlet során három párhuzamos mintát készítettünk.

Törzs	Releváns genotípus vagy fenotípus	Referencia
<i>Rhodococcus</i> sp	vad típusú	[20]
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> cc124	vad típusú	[21]
<i>Chlamydomonas</i> sp. 549	vad típusú	[20]
<i>Escherichia coli</i> MC4100	Δ HypF	[22]

3.táblázat: Felhasznált törzsek releváns genotípusa vagy fenotípusa.

3.1.5. Alga sejtszám meghatározás

Az alga kultúrák sejtszámlálásához mikroszkópot és Bürker-kamrát használtunk. Minden kísérletet háromszor megismételtünk.

3.1.6. Gázkromatográfiás analízis

A gázkromatográfiás analízis során a Hypo-Vial üvegek légterében lévő oxigén és hidrogén szintjét mértük. Az Agilent 7890 A típusú gáz kromatográfot használtuk, mely rendelkezik egy termikus vezetőképességet mérő detektorral és egy Agilent-HP Molsieve oszloppal (hossza: 30 m, átmérője: 0,320 mm, hártya: 12,0 μ m). Vivőgázként Linde HQ 5.0 argon gázt használtunk a műszerben. Az injektort, a TCD detektort, illetve az oszlopot 150°C, 160°C és 60°C-os hőmérsékleten tartottuk. Az oszlop nyomása 47,618 psi volt, az oszlop áramlási sebessége pedig 12 mL/perc. A mintákat 50 μ l térfogatban elemeztük, a méréseket háromszor ismételtük meg minden mintánknál.

3.1.7. A fotoszintézis gátlása

A herbicid DCMU-t (3-[3,4-diklór-fenil]-1,1-dimetil-karbamid) - 200 μ l végkoncentrációban - a fotoszintetikus elektron transzportláncban, a QB-kötő (másodlagos kinon akceptor) régióban megvalósuló elektron transzport blokkolására használtuk.

4. EREDMÉNYEK

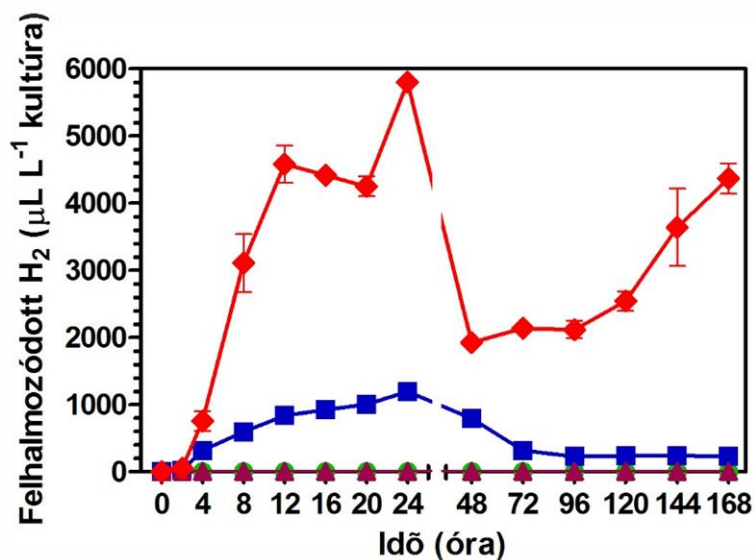
4.1. Bakteriális partner kiválasztása

A *Chlamydomonas* sp. 549 különböző baktérium kultúrákkal fertőzött volt. Számos eltérő színű baktérium telep vette körül a TAP tápoldatban növekedő fiatal zöld alga plakkokat. A bakteriális szennyeződések izoláltak és kapilláris szekvenálással azonosítottuk. Az alga-baktérium kevert kultúrákból azokat a baktérium kolóniákat izoláltuk, melyeknek fenotípusa egyértelműen eltért a többitől. Az *Escherichia coli* és *Rhodococcus* törzsek megfelelően bizonyultak a kísérlethez könnyű tenyésztetőségük miatt, illetve fertőzésük során a hidrogén termelés nagy mértékben megnőtt. Különböző antibiotikum vizsgálatokat végeztünk el az alga és baktérium kultúrákon, melyek közül a rifampicin bizonyult a legnagyobb hatékonyságúnak minden szennyező bakteriális törzs ellen és ezért a tiszta alga kultúrák fenntartásához kitűnően használható. Ezt követve értékeltem a bakteriális partnerek hatását az alga kultúrák biomassza termelésére. Az eredmények azt mutatták, hogy a bakteriális partnerek elősegítették az alga sejtek növekedését, ezáltal a biomassza hozamot is. Ezt a megfigyelést a mikroszkópos vizsgálatok is alátámasztották. Összehasonlítva a tiszta alga kultúrával, a biomassza növekedés az alga-baktérium asszociációban résztvevő alga sejtek által nagyobb mértékben valósult meg.

4.2. Az algák hidrogén fejlesztésének jellemzése fény jelenlétében

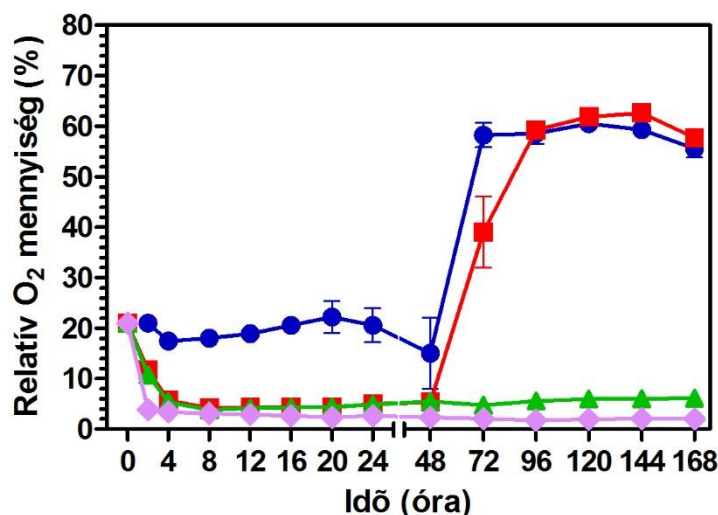
A *Chlamydomonas* sp. 549 törzs hidrogén-fejlesztő képességét vizsgáltuk tiszta kultúraként és *E. coli* Δ HypF hozzáadásával. A *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 törzset viszonyításképpen használtuk a kén megvonással járó és kén megvonás nélküli hidrogén termelés módszerének vizsgálatakor. A hidrogén termelés csak a TAP tápoldatban, megvilágítás alatt nevelkedett alga-baktérium kultúráknál volt megfigyelhető [a teljes egy nap alatt felhalmozott hidrogén mennyiségek: $1196.06 \pm 4.42 \mu\text{L L}^{-1}$ (*Chlamydomonas* sp. - 549 *E. coli* Δ HypF) és $5800.54 \pm 65.73 \mu\text{L L}^{-1}$ (*Chlamydomonas reinhardtii* cc124 – *E. coli* Δ HypF)]. Ahogy az 1. ábra mutatja a kevert kultúrákban a hidrogén termelés egy 2-4 órás lag fázis után 16-24 óra elteltéig megvalósult. A megtermelt hidrogén átlagos mennyisége $49.83 \pm 0.18 \mu\text{L L}^{-1}$ (*Chlamydomonas* sp. 549 – *E. coli* Δ HypF) és $241.68 \pm 2.73 \mu\text{L L}^{-1}$ (*Chlamydomonas reinhardtii* cc124 – *E. coli* Δ HypF) volt óránként. A hidrogén fejlesztés 24 óra elteltével megszűnt, a *Chlamydomonas* sp 549 törzs és az *Escherichia coli* Δ HypF kevert kultúrák, illetve a *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 törzs és az *Escherichia coli*

Δ HypF kevert kultúrák esetében is a felgyülemlett hidrogén szintje lassan csökkenni kezdett. Érdekes, hogy a *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 és *Escherichia coli* Δ HypF kevert kultúrában a hidrogén termelés újraindult 48 óra eltelte után.



1. ábra: *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 + *Escherichia coli* Δ HypF (rombusz), *Chlamydomonas* sp. 549 + *Escherichia coli* Δ HypF (négyzet), tiszta *Chlamydomonas* sp. 549 (háromszög) és tiszta *Escherichia coli* Δ HypF (kör) törzsek fényben történő hidrogén termelése az idő függvényében TAP tápoldatban inkubálva.

Ahogy a 2. ábra mutatja a tiszta *Escherichia coli* Δ HypF és a kevert *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 + *Escherichia coli* Δ HypF kultúrák oxigén szintje a kísérlet folyamán állandó alacsony szinten stagnált, míg a *Chlamydomonas* sp. 549 tiszta alga kultúra és a kevert kultúra esetében 48 óra elteltével hirtelen növekedésnek indult. A legnagyobb oxigén termelési arány a *Chlamydomonas* sp. 549 és *Escherichia coli* Δ HypF kevert kultúrára volt jellemző. A hidrogén fejlesztő folyamatok oxigén szenzitivitása rendkívül nagy a folyamatban részt vevő hidrogenáz enzimek miatt, így a magas oxigén szint ezek működését csökkenti/gátolja. A *Chlamydomonas* sp. 549 és az *Escherichia coli* HypF kevert kultúrák hidrogén fejlesztése az oxigén szinttel fordítottan aránylik.



2. ábra: *Chlamydomonas* sp. 549 (kör), *Chlamydomonas* sp. 549 + *Escherichia coli* ΔHypF (négyzet), tiszta *Escherichia coli* ΔHypF (háromszög) és *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 + *Escherichia coli* ΔHypF (rombusz) törzsek fényben történő oxigén termelése az idő függvényében TAP tápoldatban inkubálva.

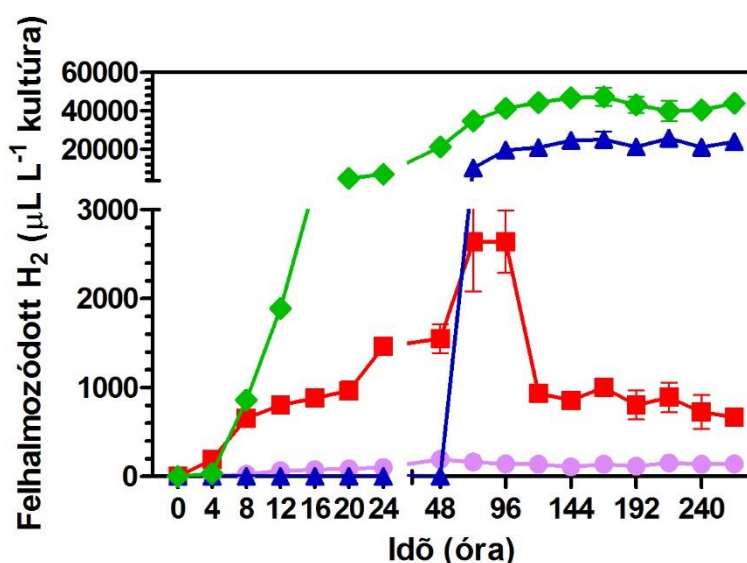
4.3. Az algák hidrogén fejlesztésének jellemzése kénmegvonást alkalmazva

A kénmegvonás által megvalósult hidrogén termelési mód során a két alga-baktérium kokultúra különböző mennyiségű hidrogént termelt. Jelentős különbségeket fedeztünk fel a kén megvonás alatt (7 nap) és a teljes tápoldatban növekedő (3 nap) különböző kultúrák hidrogén fejlesztési periódusának hossza között (3. ábra).

Az *Chlamydomonas* sp. 549 törzs $2637.47 \pm 555.42 \mu\text{l L}^{-1}$ hidrogén termelt 3 nap alatt, míg a cc124 törzs $47\,241.3 \pm 4660.69 \mu\text{l L}^{-1}$ hidrogént termelt 7 nap alatt. A két kén megvonással növekedett alga törzs hidrogén termelése között megfigyelhető különbségeket fedeztünk fel. A tiszta *Chlamydomonas* sp 549 törzs hidrogén hozama alig volt detektálható (2 nap alatt $193.5 \pm 66.81 \mu\text{l L}^{-1}$ hidrogént termelt) a cc124 törzs aktivitásához képest (7 nap alatt $25\,028 \pm 3943.47 \mu\text{l L}^{-1}$ termelt). Ennek a figyelemre méltó különbségnek az oka lehet, hogy nagyon eltérő mértékű a D1 protein degradációja a *Chlamydomonas* sp. 549 és a *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 törzsekben. A D1 fehérje a PSII reakció központjában található, mely sokkal gyorsabban alakul át fény-függő módon, mint bármelyik kloroplasztiszban fellelhető protein, illetve ez a fehérje az elsődleges célpontja a fotoinhibíciós károsodásnak. A *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 törzsben a PSII fotokémiai hatékonysága csökken mialatt a hidrogén termelés mértéke növekszik. A

Chlamydomonas sp. 549 törzs sokkal lassabban bontja el a D1 fehérjét, így az oxigén termelés mértéke lassabban csökken, mint a *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 esetében.

Megfigyeltük, hogy a kén megvonás alatt növekedő tiszta *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 törzs és a kevert *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 alga-baktérium kultúrák feltűnően eltérő arányban termelnek hidrogént. A felhalmozott hidrogén mennyisége $25028.1 \pm 3943.47 \mu\text{L L}^{-1}$ volt tiszta *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 alga kultúra esetében, míg az *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 alga-baktérium kultúra légterében majdnem kétszeres mennyiségű hidrogént detektáltunk ($47241.3 \pm 4660.69 \mu\text{L L}^{-1}$).

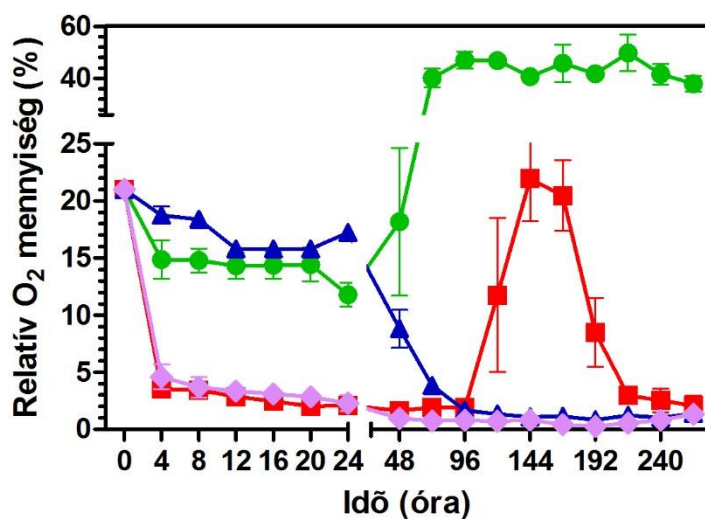


3. ábra: Kénmegvonás alatt termelt hidrogén mennyiségek *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 + *Escherichia coli* ΔHypF (rombusz), *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 (háromszög), *Chlamydomonas* sp. 549 + *Escherichia coli* ΔHypF (négyzet) és *Chlamydomonas* sp. 549 (kör) tiszta és kevert kultúrák esetében TAP-S tápoldatban növekedve.

A kevert kultúrákban a hidrogén fejlesztés kezdeti lépése a légterben jelenlévő oxigén koncentráció 4-5%-ra csökkenése a légköri 21%-os oxigén szintjéhez képest. Az oxigén szintje állandó maradt a *Chlamydomonas* sp 549 törzsben a második nap végéig (48 óra elteltével). Ezt az időszakot követően az oxigén szintje gyorsan megemelkedett és egy viszonylag állandó 58%-60%-os szintet ért el. A *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 + *Escherichia coli* ΔHypF kevert kultúra légterében lévő oxigén koncentráció az egész kísérlet alatt alacsony szinten (2%) maradt. A tiszta *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 kultúrák

légterében jelenlévő oxigén koncentráció az első 48 óra alatt állandó 18%-20%-os szinten stagnált.

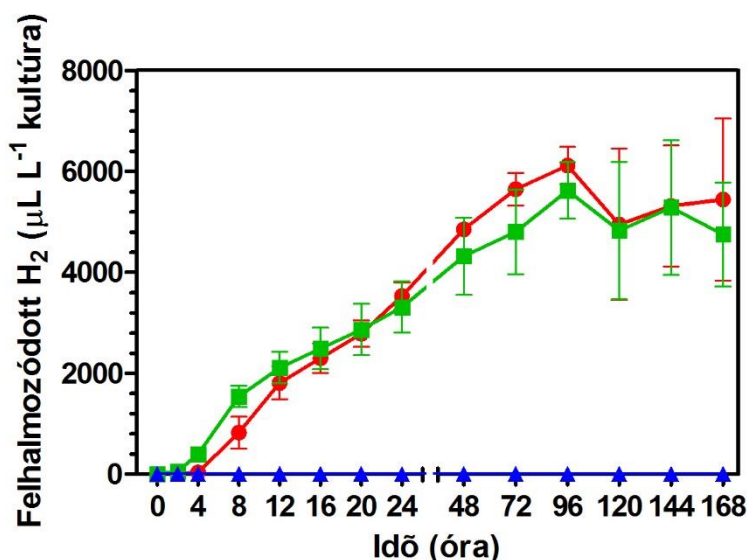
Az első nap alatt a kénhiányos körülmények között növekedett tiszta *Chlamydomonas* sp 549 és tiszta *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 törzsek légterében a relatív oxigén szint 21%-ról 15%-16%-ra csökkent (4. ábra). Azonban a második nap kezdetén a tiszta alga kultúrák oxigén koncentrációja jelentősen megváltozott. A *Chlamydomonas* sp. 549 törzs esetében a légterben jelenlévő oxigén tartalom 45%-ra növekedett, míg a *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 esetében 1%-2%-ra csökkent. A kokultúra létrehozását követő pár órában a kénhiányos körülmények között nevelkedett kevert kultúrák (mindkét alga törzs esetében) légterében mérhető oxigén szint alacsony (4%-5%) szintet ér el. A *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 esetében ez az alacsony oxigén arány állandó maradt, míg a *Chlamydomonas* sp 549-et tekintve az oxigén szint gyorsan 20%-ra emelkedett a kísérlet negyedik napján. Ez csak átmeneti jelenség, mivel a hetedik napon az oxigén szint visszatért 3%-ra és stabil maradt.



4. ábra: Kénmegvonás alatt termelt oxigén mennyiségek *Chlamydomonas* sp. 549 (kör), *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 (háromszög), *Chlamydomonas* sp. 549 + *Escherichia coli* ΔHypF (négyzet) és *Chlamydomonas reinhardtii* cc124 + *Escherichia coli* ΔHypF (rombusz) tiszta és kevert kultúrák esetében TAP-S tápoldatban növekedve.

4.4. Az algák hidrogén fejlesztésének vizsgálata sötét fermentáció során

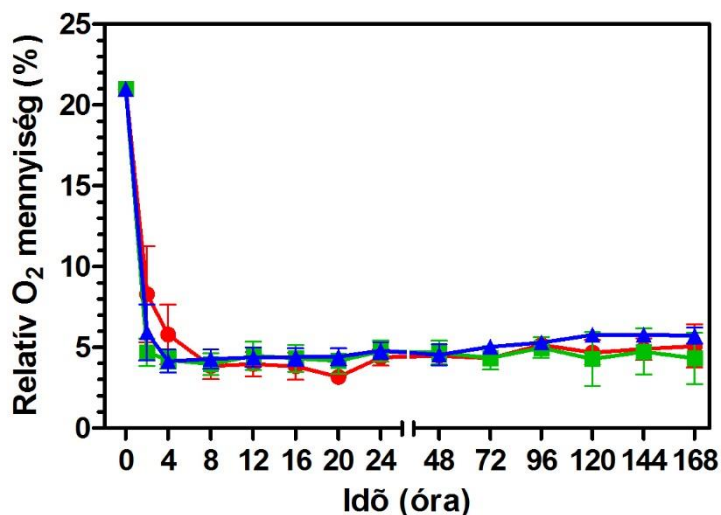
A fény hiányában történő hidrogénfejlesztés detektálható volt mind a tiszta alga, mind a kevert alga-baktérium kultúrák esetében. A megvilágított kevert kultúrákhoz hasonlóan a hidrogén termelés több fázisa volt megfigyelhető. Az 5. ábrán látható adatok alapján a hidrogén fejlesztés a leoltást követő rövid lag (2-4 óra) fázissal kezdődött. Mindkét esetben 3 napig tartott a hidrogén termelés. A tiszta alga kultúrák ($6114 \pm 396 \mu\text{L L}^{-1}$) és a kevert kultúrák ($5621 \pm 645 \mu\text{L L}^{-1}$) hidrogén termelése között nem figyeltünk meg jelentős különbséget. Sötét fermentáció során a tiszta alga vagy a kevert alga-baktérium kokultúrák által végbemenő hidrogén termelés mértéke $60.5 \pm 2.5 \mu\text{L L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ volt. Ahogy vártuk, a hidrogén fejlesztés a tiszta baktérium kultúrákban nem volt kimutatható.



5. ábra: *Chlamydomonas* sp. 549 (kör), *Chlamydomonas* sp. 549 + *Rhodococcus* sp. (négyzet) és a tiszta *Rhodococcus* sp. (háromszög) hidrogén hozama a sötét fermentáció során TAP tápoldatban nevelkedve.

A sötét fermentációt alkalmazva a folyadék kultúrák légterében jelenlévő oxigén értékek végig alacsony szinten maradtak. Ahogy az a 6. ábrán látható, a kevert és a tiszta baktérium kultúrák a beoltást követő negyedik órában elérték a minimális oxigén koncentrációt (3%-5%), míg a tiszta alga tenyészetek ugyanezt az értéket 8 óra alatt érték el. A kísérlet során a rendszerben végig fenn maradt ez a mikroaerob állapot. A hidrogén

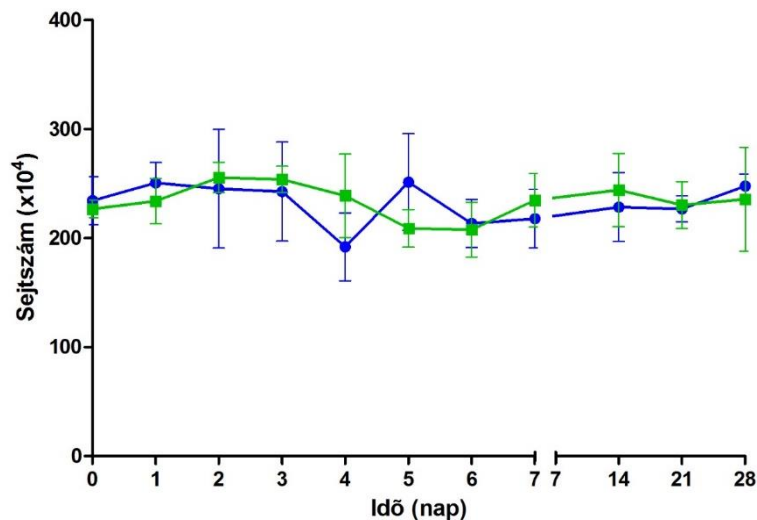
termelés során a folyadék fázis oxigén szintje megegyezett a megvilágított tenyészetekben mértékkel ($1-2 \mu\text{mol L}^{-1}$).



6. ábra: Tiszta *Rhodococcus* sp. (háromszög), tiszta *Chlamydomonas* sp. 549 (kör) és *Chlamydomonas* sp. 549 + *Rhodococcus* sp. (négyzet) kultúrák légterének oxigén szintje sötét fermentáció során.

4.5. A szimpla *Chlamydomonas* sp. 549 törzs és a tervezett kokultúra növekedésének tulajdonságai sötét fermentáció során

A természetes bakteriális partnerek közül egyet (*Rhodococcus* sp.). társítottunk a tiszta *Chlamydomonas* sp. 549 kultúrával a kevert kultúra tesztelése céljából. A sötét fermentáció során, ahogy az várható volt a fény energiája nélkül a tiszta és kevert kultúrákban az alga sejtek nem osztódtak, így számuk konstans maradt (7. ábra).

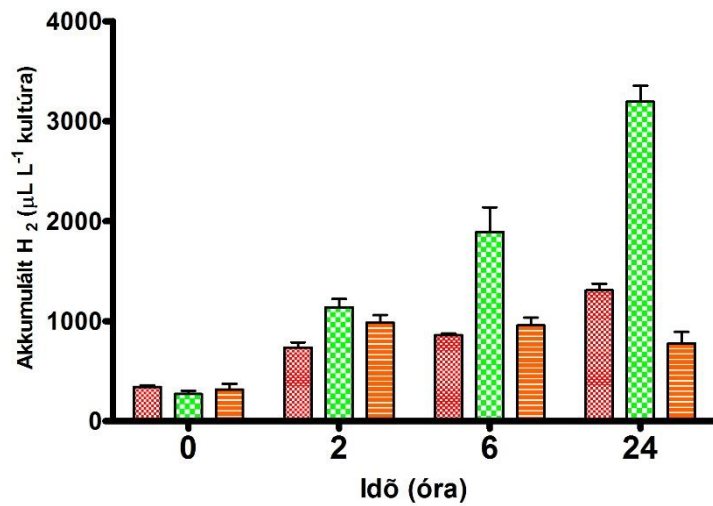


7. ábra: TAP tápoldatban növekedő *Chlamydomonas* sp. 549 (kék kör) és *Chlamydomonas* sp. 549 + *Rhodococcus* sp. (zöld négyzet) kultúrák alga sejtszám változása az idő függvényében sötét fermentációt alkalmazva.

4.6. A termelt hidrogén forrásának vizsgálata DCMU-val

Az algák hidrogén termelésének mélyebb megismeréséhez a fotoszintézist gátló DCMU-t használtuk. A DCMU molekula gátolja a PSII plasztokinon (PQ) kötő helyét, és gátolja a PSII-től történő elektron áramlást a Fe-hidrogenáz felé. Az ily módon történő fotoszintetikus gátlás a DCMU hozzáadásától számított 24 óra elteltével jól láthatóan csökkentette az alga hidrogén termelő képességét (*Chlamydomonas* sp 549 – *Escherichia coli* Δ HypF kevert kultúra kiegészítve 2% etanollal $3194.84 \pm 159.23 \mu\text{L L}^{-1}$ DCMU kezelt *Chlamydomonas* sp 549 – *Escherichia coli* Δ HypF kevert kultúra $778.34 \pm 115.71 \mu\text{L L}^{-1}$), jelezve hogy a teljes termelt hidrogén egy jelentős része fotolitikus forrásból származik (8. ábra).

Egyértelműen látszik, hogy DCMU-val történő kezelés után csökkent a hidrogén fejlesztés a rendszerben. Az oldott szén tartalmú komponensek felhasználása mellett, a fény is jelentős szerepet játszik a hidrogén termelésben. Már 200 μl DCMU oldat hozzáadása is nagymértékben gátolja a fotoszintézist.



8. ábra: Hidrogén változás detektálása az idő függvényében. Kontrollként alkalmazott *Chlamydomonas* sp. 549 + *Escherichia coli* Δ HypF (piros) kevert kultúra, alkohol hozzáadásával inkubált *Chlamydomonas* sp. 549 + *Escherichia coli* Δ HypF (zöld) kevert kultúra és *Chlamydomonas* sp. 549 + *Escherichia coli* Δ HypF (narancssárga) DCMU hozzáadásával történő hidrogén fejlesztésének összehasonlítása.

5. IRODALOMJEGYZÉK

Ács Éva, Kiss Keve Tihamér: *Algológiai praktikum*, ELTE Eötvös Kiadó, Budapest, 2004

Alexandra Dubini, Maria L. Ghirardi: *Engineering photosynthetic organism for the production of biohydrogen*, Photosynthetic Research, (2014) [DOI - 10.1007/s11120-014-9991-x]

Barótfi L.,dr.:*Környettechnika*, Mezőgazda Kiadó, 2000

Boetius, H.: *Hidrogén forradalom*, Corvina Kiadó, Budapest, 2006

Dong-Hoon Kim, Mi-sun Kim: *Hydrogenases for biological hydrogen production*, Bioresource Technology 102 (2011) 8423-8431

Gergely Lakatos, Zsuzsanna Deák, Imre Vass, Tamás Rétfalvi, Szabolcs Rozgonyi, Gábor Rákhely, Vince Ördög, Éva Kondorosi, Gergely Maróti: *Bacterial symbionts enhance photo-fermentative hydrogen evolution of Chlamydomonas algae*, Royal Society of Chemistry, 2014

Gergely Maróti, Barna D. Fodor, Gábor Rákhely, Ákos T. Kovács, Solmaz Arvani, Kornél L. Kovács: *Accessory proteins functioning selectively and peliotropically in the biosynthesis of [NiFe] hydrogenases in Thiocapsa roseopersicina*, Eur. J. Biochem., 270, 2218-2227 (2003)

Greening C., Berney M., Hards K., Cook GM, Conrad R.:*A soil actinobacterium scavenges atmospheric H₂ using two membrane-associated, oxygen dependent [NiFe] hydrogenases*, PNAS vol.111 no.11, 4257-4261 (2014)

Halász János, Hannus István, Kiricsi Imre: *Környezetvédelmi Technológia*, Egyetemi Kiadó, Szeged, 2007

Kovács K., Fülöp A., Herbel Zs., Nyilasi A., Rákhely G.: *Tiszta, megújuló energia, a biohidrogén*, Környezetvédelem (2010), 2010/2:20-21

Kovács Kornél: Tiszta, megújuló energia: *A hidrogén alapú gazdaság kihívása az emberiség és biotechnológia számára*, Magyar Tudomány, 2005/3 258.o

Levin D.B., Pitt L., Love M.: *Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application*, *International Journal of Hydrogen Energy*, (2004); 29:173-185

Lukács Gergely Sándor: *Megújuló energiák könyve*, Szaktudás Kiadóház, Budapest, 2010

Mi-Sun Kim, Jin-Sook Baek, Young-Su Yun, Sang Jun Sim, Sunghun Park, Sung-Chang Kim: *Hydrogen production from Chlamydomonas reinhardtii biomass using a two-step cenversion process: Anaerobic conversion and photosynthetic fermentation*, *International Journal of Hydrogen Energy* 31 (2006) 812-816

Peer M. Schenk, Skye R. Thomas Hall, Evan Stephens, Ute C. Marx, Jan H. Mussnug, Clemens Posten, Olaf Kruse, Ben Hankamer: *Second Generation biofuels:High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production*, *Bioeng. Res.*, (2008) 1:20-43

S.Manish, Rangan Banerjee: *Comparison of biohydrogen production processes*, *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008, 33: 279-286

S.N.Kosomor, M.L.Ghirardi, M.Seibert, *International Journal of Hydrogen Energy*, 2011, 36, 2044-2048

Skari Skjanes, Céline Rebours, Peter Lindblad: *Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process*, *Critical Reviews in Biotechnology*, 2013; 33(2): 172-215

T.Maier, U.Binder, A.Böck: *Arch.Microbiol.*, 1996,165, 333-341

6. MELLÉKLETEK JEGYZÉKE

1. számú melléklet: A fényen nevelt tiszta alga és kevert alga-baktérium kultúrák hidrogén fejlesztésének ($\mu\text{L L}^{-1}$) vizsgálatának mérési eredményeit összefoglaló táblázat

(A táblázatban szereplő számadatok a 3 párhuzamos mérésből származó eredmények átlagolt értékei.)

Idő (óra)	<i>Chlamydomonas</i> sp. 549	<i>E. coli</i> ΔHypF	<i>Chlamydomonas</i> sp. 549 + <i>E. coli</i> ΔHypF	<i>Chlamydomonas</i> <i>reinhardtii</i> cc124 + <i>E. coli</i> ΔHypF
0	0	0	0	0
2	0	0	16,13	48,42
4	0	0	314,89	754,24
8	0	0	593,83	3107,82
12	0	0	836,92	4580,54
16	0	0	920,81	4414,73
20	0	0	1004,7	4248,92
24	0	0	1196,06	5800,54
36	0	0		
48	0	0	795,06	1922,75
60	0	0		
72	0	0	315,49	2129,35
84	0	0		
96	0	0	224,13	2114,82
108	0	0		
120	0	0	233,65	2540,43
132	0	0		
144	0	0	240,18	3639,68
156	0	0		
168	0	0	228,59	4367,11

2. számú melléklet: A fényen nevelt tiszta alga és kevert alga-baktérium kultúrák légterében jelenlévő oxigén szint (%) mérési eredményeit összefoglaló táblázat

(A táblázatban szereplő számadatok a 3 párhuzamos mérésből származó eredmények átlagolt értékei.)

Idő (óra)	<i>Chlamydomonas</i> sp. 549	<i>E. coli</i> Δ HypF	<i>Chlamydomonas</i> sp. 549 + <i>E. coli</i> Δ HypF	<i>Chlamydomonas</i> <i>reinhardtii</i> cc124 + <i>E. coli</i> Δ HypF
0	21	21	21	21
2	21,01	10,69	11,69	3,85
4	17,45	5,35	5,71	3,41
8	17,99	3,81	4,17	3,05
12	18,90	4,14	4,31	2,89
16	20,55	4,26	4,28	2,62
20	22,19	4,39	4,26	2,33
24	20,56	4,83	4,97	2,64
36				
48	15,01	5,52	5,32	2,31
60				
72	58,22	4,74	39,00	2,09
84				
96	58,56	5,56	59,24	1,74
108				
120	60,49	5,96	61,87	1,94
132				
144	59,33	5,99	62,61	2,09
156				
168	55,57	6,16	57,74	2,01

3. számú melléklet: A kén-megvonás alatt nevelkedett tiszta alga és kevert alga-baktérium kultúrák hidrogén fejlesztésének ($\mu\text{L L}^{-1}$) vizsgálatának mérési eredményeit összefoglaló táblázat

(A táblázatban szereplő számadatok a 3 párhuzamos mérésből származó eredmények átlagolt értékei.)

Idő (óra)	<i>Chlamydomonas</i> sp. 549	<i>Chlamydomonas</i> <i>reinhardtii</i> cc124	<i>Chlamydomonas</i> sp. 549 + <i>E. coli</i> ΔHypF	<i>Chlamydomonas</i> <i>reinhardtii</i> cc124 + <i>E. coli</i> ΔHypF
0	0	0	0	0
4	0	0	194,54	34,97
8	27,79	0	653,64	862,45
12	65,91	0	802,87	1888,26
16	76,92	0	884,15	3281,06
20	87,93	0	965,44	4673,85
24	103,62	0	1461,33	6863,35
48	193,51	0	1550,74	21177,26
72	163,36	10142,13	2637,48	34613,19
96	141,78	19520,43	2639,95	41212,02
120	138,47	20741,86	938,07	44212,00
144	111,03	24407,26	856,51	46732,83
168	139,86	25028,09	1000,84	47241,31
192	116,68	21089,17	804,54	42973,60
216	152,53	25627,86	888,53	39821,11
240	139,43	20900,52	725,21	40360,93
264	141,98	23744,10	668,34	43886,42

4. számú melléklet: A kén-megvonás alatt nevelkedett tiszta alga és kevert alga-baktérium kultúrák légterében jelenlévő oxigén szint (%) mérési eredményeit összefoglaló táblázat

(A táblázatban szereplő számadatok a 3 párhuzamos mérésből származó eredmények átlagolt értékei.)

Idő (óra)	<i>Chlamydomonas</i> sp. 549	<i>Chlamydomonas</i> <i>reinhardtii</i> cc124	<i>Chlamydomonas</i> sp. 549 + <i>E. coli</i> Δ HypF	<i>Chlamydomonas</i> <i>reinhardtii</i> cc124 + <i>E. coli</i> Δ HypF
0	21	21	21	21
4	14,86	18,75	3,54	4,57
8	14,77	18,36	3,44	3,68
12	14,32	15,79	2,88	3,35
16	14,37	15,79	2,45	3,09
20	14,43	15,78	2,02	2,84
24	11,78	17,23	2,10	2,28
48	18,17	8,81	1,65	0,96
72	40,16	3,84	1,93	0,73
96	46,99	1,66	1,89	0,79
120	46,79	1,33	11,74	0,71
144	40,63	1,08	21,93	0,82
168	45,79	1,14	20,45	0,41
192	41,77	0,81	8,47	0,27
216	49,73	1,21	2,97	0,54
240	41,70	1,02	2,53	0,79
264	37,92	1,39	2,04	1,34

5. számú melléklet: A sötétben nevelt tiszta alga és kevert alga-baktérium kultúrák hidrogén fejlesztésének ($\mu\text{L L}^{-1}$) vizsgálatának mérési eredményeit összefoglaló táblázat

(A táblázatban szereplő számadatok a 3 párhuzamos mérésből származó eredmények átlagolt értékei.)

Idő (óra)	<i>Chlamydomonas</i> sp. 549	<i>Chlamydomonas</i> sp. 549 + <i>Rhodococcus</i> <i>jostii</i>	<i>Rhodococcus</i> <i>jostii</i>
0	0	0	0
2	0	55,15	0
4	32,38	394,51	0
8	820,15	1538,67	0
12	1810,48	2108,13	0
16	2296,08	2485,41	0
20	2781,69	2862,69	0
24	3528,41	3308,09	0
48	4851,31	4315,23	0
72	5644,23	4800,26	0
96	6114,76	5620,89	0
120	4949,52	4822,92	0
144	5315,27	5286,08	0
168	5439,49	4747,85	0

6. számú melléklet: A sötétben nevelt tiszta alga és kevert alga-baktérium kultúrák légterében jelenlévő oxigén szint (%) mérési eredményeit összefoglaló táblázat

(A táblázatban szereplő számadatok a 3 párhuzamos mérésből származó eredmények átlagolt értékei.)

Idő (óra)	<i>Chlamydomonas</i> sp. 549	<i>Chlamydomonas</i> sp. 549 + <i>Rhodococcus</i> <i>jostii</i>	<i>Rhodococcus</i> <i>jostii</i>
0	21	21	21
2	8,29	4,69	5,92
4	5,78	4,21	4,15
8	3,83	3,96	4,27
12	3,95	4,48	4,38
16	3,83	4,32	4,39
20	3,16	4,16	4,41
24	4,38	4,75	4,79
48	4,48	4,67	4,53
72	4,32	4,35	5,03
96	5,16	4,98	5,29
120	4,68	4,27	5,76
144	4,88	4,73	5,76
168	5,08	4,31	5,73

7. számú melléklet: A sötét fermentáció során történő tiszta alga és alga-baktérium kevert kultúra sejtszám ($\times 10^4$) változásának mérési eredményeit összefoglaló táblázat

(A táblázatban szereplő számadatok a 3 párhuzamos mérésből származó eredmények átlagolt értékei.)

Idő (óra)	<i>Chlamydomonas</i> sp. 549	<i>Chlamydomonas</i> sp. 549 + <i>Rhodococcus</i> <i>jostii</i>
0	234	227
1	251	234
2	245	256
3	243	254
4	192	239
5	251	209
6	213	208
7	218	235
14	228	244
21	227	230
28	248	236

8. számú melléklet: A DCMU használatával termelt hidrogén mennyiségek ($\mu\text{L L}^{-1}$) mérési eredményeit összefoglaló táblázatok

(A táblázatban szereplő szám adatok a 3 párhuzamos mérésből származó eredmények átlagolt értékei.)

Idő (óra)	<i>Chlamydomonas</i> sp. 549 + <i>E. coli</i> ΔHypF (kontroll)	<i>Chlamydomonas</i> sp. 549 + <i>E. coli</i> ΔHypF (+alkohol)	<i>Chlamydomonas</i> sp. 549 + <i>E. coli</i> ΔHypF (+DCMU)
0	341,10	217,17	316,33
2	737,32	1140,55	984,39
6	858,35	1891,01	956,83
24	1309,16	3194,83	778,34

7. TÉTELES SZAKMAI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott, Laszli Adrienn a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- Alga és baktérium vonalak fenntartását
- Gáz kromatográfiás analízist
- Bakteriális CFU-t
- Alga-sejtszámlálást Bürker-kamrával

végeztem el.

.....
aláírás

Szeged, 2014. november 12.