



ÉDESVÍZI ZÖLDALGA INTRACELLULÁRIS POLISZACHARID TERMELÉSÉNEK VIZSGÁLATA

Analysis of intracellular polysaccharide production of freshwater green algae

TDK dolgozat

Készítette:

Szilágyi Viktor Gergő

Neptun kód: BJD4ZF

Biomérnök BSc.

nappali tagozat

Budai Campus

Témavezető:

Dr. Kohári-Farkas Csilla

egyetemi adjunktus

Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Budai Campus

Budapest

2022.

TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETÉS	1
2	MUNKA CÉLJA	2
3	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	3
3.1	Biomassza energetikai hasznosítása	3
3.2	Bioetanol technológiák	4
3.3	Alga-alapú bioetanol.....	7
3.3.1	A mikroalgák általános jellemzése.....	7
3.3.2	Mikroalga tenyésztése	9
3.3.2.1	<i>Nyílt medencés rendszerek</i>	<i>11</i>
3.3.2.2	<i>Zárt rendszerű fotobioreaktorok</i>	<i>12</i>
3.3.3	Algabiomassza feldolgozása	13
3.3.3.1	<i>Sejtfeltárási technikák</i>	<i>14</i>
4	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	16
4.1	Mikroalga törzs.....	16
4.2	Mikroalga tápoldatok.....	16
4.3	Laboratóriumi mikroalga tenyésztés	17
4.4	Szaporodáskinetika	18
4.5	Liofilizálás	18
4.6	Sejtfeltárás	19
4.7	Fenol-kénsavas módszer.....	20
4.8	Etanolfermentáció.....	21
4.9	HPLC technika	22
5	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK.....	23
5.1	Egylépeses és kétlépeses sejtfeltárási technikák	23
5.2	Tenyészthetőség és intracelluláris szénhidráttermelés különböző összetételű alga tápoldatokban	24
5.2.1	Szervetlen természetű tápoldatok hatása.....	24
5.2.1.1	<i>Szénhidráttartalom alakulása tárolás során.....</i>	<i>28</i>
5.2.2	Szerves természetű növényi tápoldatok hatása	29
5.3	Léptéknövelt algatenyésztés és etanolfermentáció	31
6	ÖSSZEFOGLALÁS	32
7	IRODALOMJEGYZÉK	34

1 BEVEZETÉS

Az utóbbi évtizedben a környezettudatosság, valamint a megújuló energiaforrások használata egyre nagyobb jelentőséget kapott a köztudatban, amelynek oka az emberiség egyre növekvő energiaigénye és az elérhető fosszilis energiahordozók mennyiségének csökkenése. A fosszilis energiahordozók felhasználásával a klímaváltozás folyamatát gyorsítjuk, mivel a felhasználásuk során szén-dioxid, illetve egyéb üvegházhatású gázok jutnak a légkörbe. Az energiaipar szén-dioxid kibocsátásának csökkentésének lehetséges módszere a megújuló energiaforrások lehetőségeinek kiaknázása lenne, amelyek között a biomassza-energiát a kutatók és a gyártók igen nagy figyelemben részesítik.

Az algák termesztése és ipari hasznosításuk feltérképezése az utóbbi években intenzíven kutatott területté erősödött. Az algatechnológiák előnye, hogy az algabiomassza nagy mennyiségben tartalmaz értékes komponenseket, mint poliszacharidokat, lipideket, esszenciális aminosavakat, vitaminokat, így kiváló nyersanyagát képezheti állatitakarmányok, táplálékkiegészítők, kozmetikumok, biotechnológiai és gyógyszeripari termékek, sőt bioenergetikai termékek, mint például biodízel, biohidrogén, bioetanol előállításának is.

Az alga-alapú etanolfermentáció igen nagy gazdasági potenciállal bír. A magas intracelluláris poliszacharid tartalmú mikroalgák tenyésztése (az algák többségéhez hasonlóan) kevésbé költséges folyamat. Mivel az algák fototróf szervezetek, így az algabiomassza előállítása vizet, napfényt és szén-dioxidot igényel. A gyors szaporodásuknak köszönhetően egész évben rendelkezésre állnak, továbbá többségük jól tolerálja a környezeti tényezők ingadozását. A technológia során ipari szennyvizekben vagy akár szerves maradványokat, mint kommunális zöldségeket, gyümölcs hulladékokat tartalmazó tápoldatokban is tenyészthetők (heterotróf, mixotróf tenyésztés), ezáltal csökkenthető a vízhasználat, mitöbb a modern hulladékkezelés egyik megoldásának is tekinthető az alkalmazásuk. Ezt fontos kiemelni, hiszen kezeletlen formában a szennyvíz komoly károkat okozhat vízkészleteinkben és azok élővilágában, hasonlóan a gyümölcs és zöldség terményekhez, maradványokhoz, amelyekből a szeméttelpeken anaerob folyamatok során üvegházhatású gázok szabadulnak fel. Az algabiomassza előállítása nem igényel értékes termőföldet, ezáltal nem versenyez az agroipari kultúrnövényekkel, elsősorban az elsőgenerációs bioetanol alapanyagforrásaival.

A gazdaságilag kivitelezhető és ökológiailag fenntartható alga-biomassza alapú etanolfermentáció technológiájának kidolgozása azonban még mérnöki kihívásokat, optimalizáló folyamatokat rejt magában.

2 MUNKA CÉLJA

A szakdolgozati kutatómunkám az édesvízi *Scenedesmus rubescens* izolátum tenyésztésének megismerésére és az intracelluláris szénhidráttartalom környezetbarátabb kinyerésére irányult. A kinyert intracelluláris szénhidrátok (keményítő) a harmadik generációs bioetanol előállítás alapanyagaként hasznosíthatók.

Az alábbi részfeladatokat tűztem ki:

- 1. Liofilizált algabiomassza sejtfeltárási hatékonyságának vizsgálata kemikáliáktól mentes mechanikai, fizikai és enzimes technikák alkalmazásával.**
 - a. Egylépéses technikák: ultrahangos és mikrohullámú kezelés, üveggyöngyös rázatás, hőkezelés, enzimes bontás
 - b. Kétlépéses, kombinált technikák
- 2. Mikroalga tenyésztetősége és az intracelluláris szénhidráttartalom alakulása különböző összetételű tápközegekben.**
 - a. Szervetlen természetű tápközegek hatása: BG-11, BBM és M4N
 - b. Szerves természetű, növényi-alapú préslé, valamint a préslé koncentráció (5 %, 10 %, 15 %) hatása
- 3. Léptéknövelt algatenyésztés és az etanol-fermentáció modellezése laboratóriumi szinten, szakaszos fermentációs technika alkalmazásával.**

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 Biomassza energetikai hasznosítása

A fosszilis (primer) energiahordozók (szén, kőolaj, földgáz) kitermelése és az azokra épített ipari (termelési és szolgáltatási) tevékenységek jelentős mértékben hozzájárulnak az üvegházhatású gázok kibocsátásért. Az utóbbi évtizedekben az üvegházhatású gázok (elsősorban a szén-dioxid) kibocsátásának mértéke exponenciálisan növekedett, ami a klímaváltozás jelenségeit erősítette. A környezeti károk mérséklésére megoldást jelenthetnek a megújuló/megújítható energiaforrások, amelyek részben vagy teljes mértékben kiválthatják a fosszilis energiagényt. Az alternatív energiaforrások között említhető a napenergia, a szélenergia, a vízenergia, a geotermikus és hidrogén-alapú energia, valamint a biomassza-alapú energia is. A biomassza energetikai hasznosításának lehetőségei és a gazdaságos technológiák kivitelezése egyre növekvő figyelemben részesülnek (Ang *et al.* 2022).

A biomassza a bioszférában létrejövő szervesanyag-tömeg. A biomassza igen nagy változatosságot mutat minőségben és mennyiségben egyaránt, ezért csoportosításuk történhet, aszerint, hogy honnan származnak, valamint mi a célja hasznosításuknak. Az eredet alapján megkülönböztetünk elsődleges (primer) biomasszát, amelyet maga a növényvilág, a természetes vegetáció alkot. A másodlagos (szekunder) biomassza az állatvilágban és az állattenyésztés során (fő- és melléktermékei, valamint hulladékai) keletkeznek. A harmadlagos (tercier) biomasszát az ellátási lánc mentén, a feldolgozóiparból és a háztartásokból származó szerves anyagok teszik ki (Tursi 2019).

A biomassza több módon is hasznosítható energiatermelési folyamatok alapanyagaként, összetételétől és szerkezeti tulajdonságaitól függően. A nagyon alacsony nedvességtartalommal rendelkező biomassza, mint a gabonaszalma, a tűzifa-apríték és fűrészpor stb. magas fűtőértékűek, emiatt közvetlen elégetésükkel jelentős hőenergia nyerhető (Saleem 2022, Perea-Moreno *et al.* 2019). A nagyobb nedvességtartalmú biomassza, mint a magas cukortartalmú növények, zöld növényi hulladékok, szennyvizek stb. magas hőmérsékleten (700-1100°C) elgázosításra kerülhetnek. A biomasszából így éghető gázkeverék nyerhető. A szerves maradványokból anaerob környezetben, szabályozott körülmények között lejátszódó degradáció (rothasztás) során biogáz is termelhető. A biogáz elsősorban metán és szén-dioxid keveréke, amely alkalmas villamosenergia-termelésre gázturbina segítségével, valamint üzemanyagcellák létrehozására is (Yaqoob *et al.* 2021). A biomasszából motorhajtó üzemanyagok is előállíthatók, amelyek között világviszonylatban a biodízel és a bioetanol

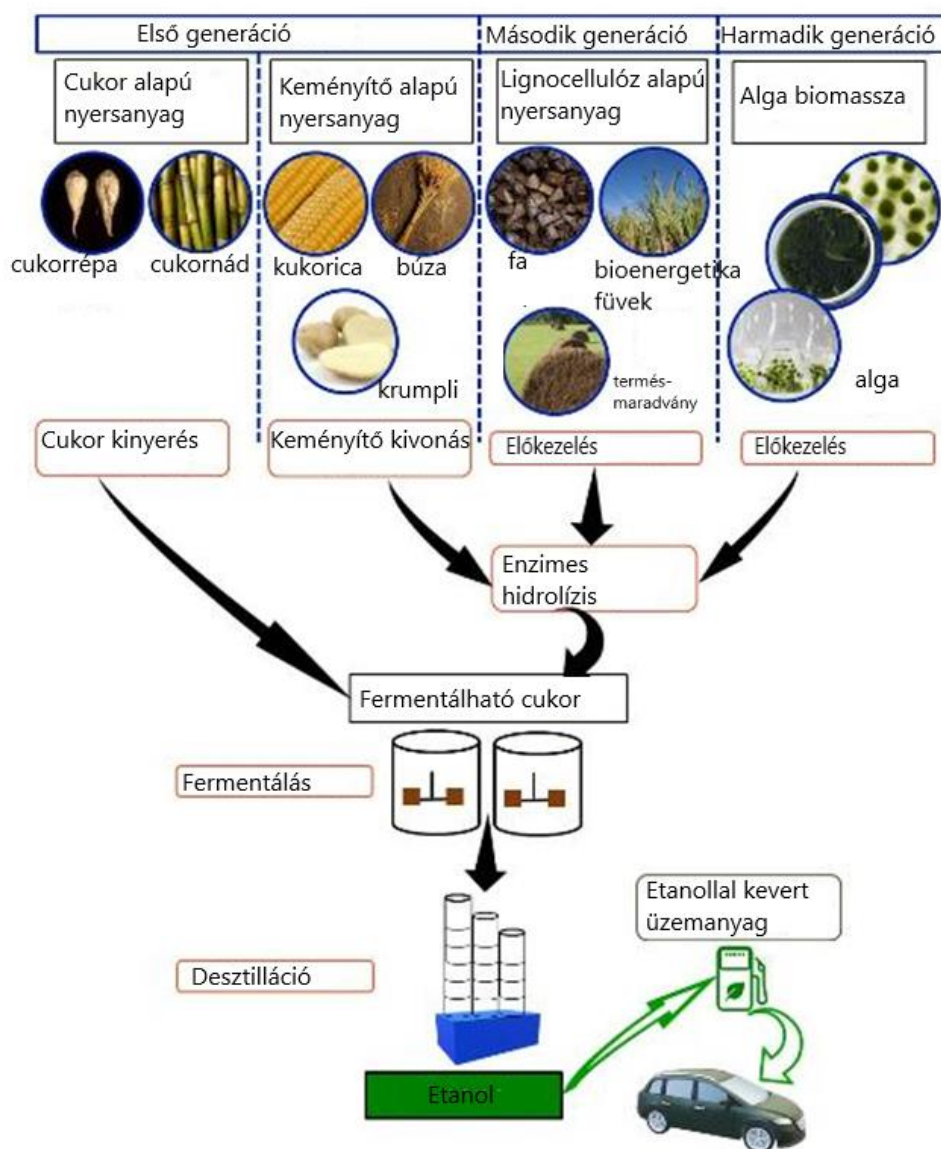
terjedt el, ami mellett a biohidrogén és a bioelektromosság is egyre nagyobb teret hódít (Chen *et al.* 2021). A **biodízelt** a biomasszából nyert lipidekből állítják elő rövid szénláncú alkoholok (metanol, etanol) és katalizátor jelenlétében, kémiai (savas, bázikus) vagy biokémiai (enzimes) átszterezési, hidroészterezési eljáráson keresztül. A biodízel hosszú szénláncú zsírsavakból, monoalkil-észterekből, mint metil- vagy etil-észterből áll (Ferreira Mota *et al.* 2022). A **bioetanol** előállítása a biomasszából kinyert erjeszthető cukrok alkoholos erjesztésével történik. Az etanol energiasűrűsége kisebb a fosszilis energiahordozóknál, magasabb oxigéntartalma tisztább égést tesz lehetővé, ezáltal gyakori üzemanyagadalék (Callegari *et al.* 2020). A **biohidrogén** magas energiatartalma miatt egyre nagyobb érdeklődés övezi a kutatók és a gyártók körében. Fermentatív úton hidrogén-termelő algák, cianobaktériumok, baktériumok alkalmazásával energia hozható létre. A technológiai fejlesztéseknek (fotofermentáció, sötét fermentáció, ko-fermentáció stb.) köszönhetően a potenciális termelő szervezetekkel a hozamok növelhetőek (Bhatia *et al.* 2021). A mikrobiológiai energiacellák (MÜC) olyan bioelektrokémiai rendszerek, amely által **bioelektromosság** generálható. Az anódtérben a mikroorganizmus (baktérium) a rendszerbe adagolt tápanyagban rejtett kémiai energiát alakítja át, elektronokat és protonokat (hidrogén) hoz létre. A protonok egy szelektív membránon keresztül áthaladnak, míg az elektronok egy külső áramkörön keresztül áramolnak a katódtérbe. A katódtérben szintén mikroorganizmus (alga) található, ahol a fotoszintézis során keletkezett oxigén az elektronokkal és a protonokkal vízzé egyesül. A mikrobiális energiacellák további fejlesztésével lehetővé válhat az igény szerinti biohidrogén és bioelektromosság előállítása is (Enamala *et al.* 2020).

3.2 Bioetanol technológiák

A bioüzemanyagok természetes alapanyagokból, biomasszából előállított szilárd, cseppfolyós (bioetanol, biodízel) és gáznemű (biohidrogén) megújuló energiaforrások, amelyek potenciálisan alkalmazhatók a fosszilis üzemanyagok részbeni, esetleg teljes kiváltására. A bioüzemanyagok az előállításuk során hasznosított alapanyagok, valamint a termelési technológia alapján generációkba sorolhatók (1. ábra) (Demirbas 2011).

A bioüzemanyagok körében világviszonylatban ismert és elterjedt a bioetanol és a biodízel, amelyek gyártástechnológiája ma még jellemzően mezőgazdasági termőterületen termesztett kultúrnövényeken alapul. Az **elsőgenerációs** bioetanol alapanyagforrását nagyrészt a magas szacharóz- és a keményítő tartalmú növények, mint a cukorrépa, a búza, a kukorica, a burgonya stb. teszik ki, míg az elsőgenerációs biodízel előállításánál magas olajtartalmú növényeket, mint

napraforgó, repce stb. hasznosítanak (Demirbas 2009). Ezen növények egyben élelmezési és takarmányozási célokat is szolgálnak, így termesztésük nagy területet és magas minőségű termőföldet igényel. Az alapanyag többirányú hasznosítása feszültséget vált ki az élelmezési és a bioenergetikai tevékenységek között, sőt az elsőgenerációs biomassza üzemanyag célú levezetése az élelmiszerek és takarmányok drágulásához járulhat hozzá (Dutta *et al.* 2014).



1. ábra: Bioetanol generációk és előállítási technológiák (Bera *et. al.* 2020)

A **második generációs** bioüzemanyagok alapanyagaként elsősorban a cellulózban gazdag növényi biomassza szolgál, amely származhat a mezőgazdasági tevékenységekből, a termelési és feldolgozási folyamatokból (gabonaszalma, kukoricacsutka, napraforgószár, cukornádbagasz stb.), háztartási és települési szerves hulladékokból (gyümölcs és zöldség

maradványok, zöld hulladékok - ágak, gallyak stb.), egyéb ipari tevékenységekből, mint az erdészetből és a papíriparból is, sőt erre a célra termesztett rövid vágásfordulójú erdőkből és egyéb energianövény ültetvényekből is (Sims *et al.* 2010). A bioetanol gyártási technológiájának lehetőségei ugyan már léteznek, azonban annak kivitelezése nehézségekbe ütközik. A technológia limitáló tényezője az összetett, nehezen kezelhető növényi struktúra, amely a külső hatásokkal szemben nagy ellenállóságot mutat. Ma már számos előkezelési technika ismert, azonban a növényi biomassza változatossága miatt egy sem alkalmazható egységesen az értékes szénhidrátok kinyeréséhez. A bioetanol ipari szintű termelésénél ezért világszerte az elsőgenerációs technológiát alkalmazzák, a második generációs technológiák gazdaságosan még nem kivitelezhetők (Xu *et al.* 2018). Az első- és második generációs bioetanol (valamint a harmadik generációs bioetanol) előállítás műveleteit az 1. ábra szemlélteti. A cellulóz-alapú bioetanol előállítás 4 lépésre osztható. A termelési folyamat az alapanyag előkezelésével indul, amely során a lignocellulóz szerkezet roncsolása, valamint a cellulóz hozzáférhetőségének növelése fizikai, kémiai, biológiai, esetleg kombinált technikák alkalmazásával történik. A fizikai és kémiai módszerek együttes alkalmazása terjedt el, amelyek többnyire extrém körülményeket, magas nyomást és hőmérsékletet, továbbá kemikáliákat és nagy mennyiségű vizet is igényelnek. Az előkezelés a teljes technológia költségeinek akár 60 %-át is kiteheti. A további lépések megegyeznek a keményítő-alapú elsőgenerációs etanol előállítás lépéseivel, ahol az előkészített alapanyag enzimikus hidrolízisét, cukrosítását, az oldatba vitt erjeszthető cukrok etanollá konvertálása követ. A fermentációs eljárásoknak több változata is ismert, amelyek között széles körben az időben elkülönített, szeparált cukrosítást és erjesztést, valamint a szimultán cukrosítást és erjesztést alkalmazzák. A fermentáció végén a cefre előkészítése és desztillálása során a céltermék, az etanol elválasztásra kerül (Chen *et al.* 2021).

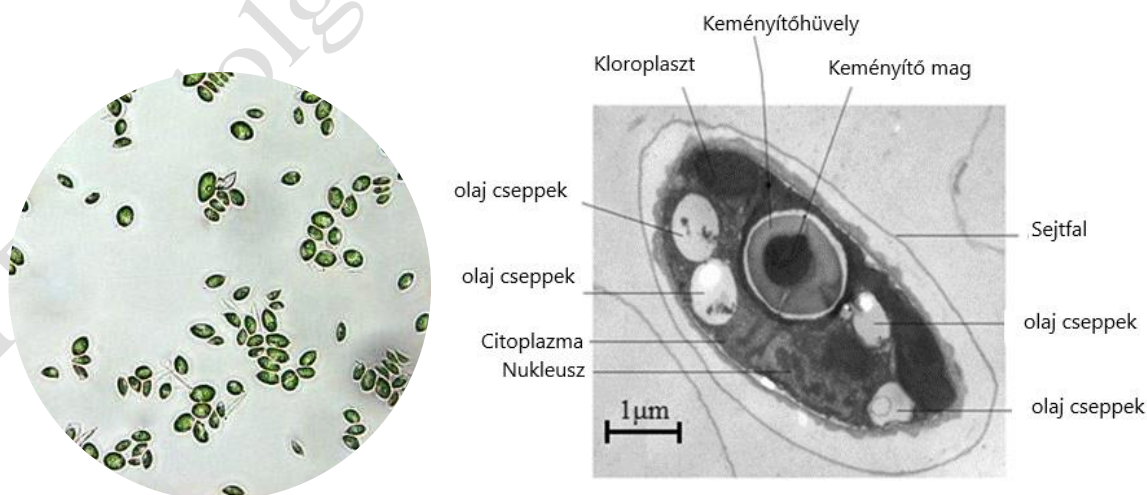
A **harmadik generációs** bioüzemanyagok előállításához alga biomassza kerül felhasználásra. Az újgenerációs technológia az első- és második generációs bioüzemanyagok hátrányait részben kiküszöböli. Egyes algakultúrák jelentős mennyiségben termelnek olyan értékes anyagokat, mint lipideket, szénhidrátokat, amelyek potenciális alapanyagát adják a bioetanol és a biodízel termelésnek (Ananthi *et al.* 2021). Az alga biomasszából jól fenntartható bioüzemanyagok állíthatók elő, köszönhetően annak, hogy a termesztett növényekkel szemben, amelyeket évente egyszer, esetleg kétszer lehet betakarítani, az algák lényegesen rövidebb termesztési ciklussal rendelkeznek, ez akár 1-10 nap lehet. A folyamatos termelés nem csak a természetben, hanem zárt térben, különböző bioreaktor konstrukciókban is megvalósítható,

amelyek kisebb területet igényelnek, a termőföldet nem vonják el az élelmezési és takarmányozási növényektől sem (Dragone *et al.* 2010, Chowdhury és Loganathan 2019). Sőt, a növényi biomassa 10-szeres, akár 100-szoros mennyisége is termelhető mikroalgákkal, tehát lényegesen kedvezőbb a termeszthetőségük. Genetikai módosítással, valamint az anyagcseremérnökség eszközeinek alkalmazásával nagyobb biomassa hozam, valamint lipid és szénhidrát termelés érhető el, ami az újabb generációs bioüzemanyagok fejlesztésének nyit teret (Abdullah *et al.* 2019).

3.3 Alga-alapú bioetanol

3.3.1 A mikroalgák általános jellemzése

A mikroalgák, ahogy más energetikai célra hasznosított növényi biomassa, lehetővé teszik a napenergia begyűjtését, átalakítását és tárolását kémiai formában. Evolúciós szempontból a mikroalgák a cianobaktérium és a fotoszintetikus plazmid elsődleges endoszimbiózisából származnak és azóta a Föld szinte összes sós-, és édesvízi ökoszisztémájának részévé váltak. A mikroalgák identifikálása, a fajok azonosítása és osztályozása mikroszkópos morfológia vizsgálattal, specifikus rövid szekvenciák azonosításával, valamint áramlási citometriás módszerrel történhet. A módszerektől függetlenül a mikroalgák taxonómiája az utóbbi években sokszor változott és jelenleg sincs egyhangúan elfogadott rendszer (Levasseur *et al.* 2020).



2. ábra: Édesvízi *Scenedesmus* nemzetség sejtmorfológia és általános sejtfelépítés
(Shao *et al.* 2020)

A mikroalgák eukarióta szervezetek. A mikroalgák a fotoszintetizáló képességüknek köszönhetően jelentős szén-dioxid megkötési képességgel bírnak. A környezetvédelemben betöltött szerepük így igen jelentőssé vált az elmúlt években (Tena és Guillermo 2019).

A mikroalgákat csoportosíthatjuk a sejtszerkezetük, életciklusuk, tartaléktápanyaguk és pigmentációjuk alapján. A mikroalgákat többnyire a 2-200 µm közötti sejtméret jellemzi. Az anyagcsere folyamatok alapján lehetnek autotróf, valamint heterotróf szervezetek, sőt a tenyésztési körülményektől függően, akár mind a két anyagcserét is mutathatják, ez utóbbiak a mixotróf szervezetek. Az algabiomassza számos értékes komponens: lipideket, fehérjéket, szénhidrátokat, bioaktív anyagokat (mint pigmenteket, fenolos vegyületeket stb.), többszörösen telítetlen zsírsavakat, vitaminokat stb. termelnek. Az értékes komponensek mennyisége nagymértékben függ a mikroalga fajtól/törzstől, valamint a tenyésztés körülményeitől is (Velazquez-Lucio *et al.* 2018).

A mikroalga sejtekben a fotoszintézisért a klorofillban gazdag plasztidok felelősek. Az autotróf anyagcsere esetén az energiát és az organikus komponenseket a szén-dioxid felhasználásával termelik és ehhez energiaforrásnak a napfényből nyert energiát használják fel. A heterotróf anyagcsere során fényenergia jelenlétében szénforrásként szerves tápanyagokat, gyakrabban glükózt hasznosítanak, de némely mikroalga faj a glicerint, acetont is képes hatékonyan metabolizálni. A mixotróf anyagcsere két fázisból, növekedési szakaszból tevődik össze: az első fázisban heterotróf természetű, ekkor kezdetét veszi a szerves anyagok hasznosítása, a második fázisban, ahol már a szerves szubsztrátum mennyisége korlátozott, az autotróf anyagcsere veszi át a helyet (Ferreira Mota *et al.* 2022, Vale *et al.* 2020).

A *Scenedesdecaceae* alga család taxonómiaiilag 3 alcsaládba: a *Desmodesmoidea*, a *Scenedesmoidea* és a *Coelastroidea* alcsaládba sorolható. Az alga család magába foglalja a legelterjedtebb édesvízi mikroalga fajokat. Taxonómiai szempontból besorolásukat nehezíti, hogy viszonylag egyszerű morfológiai jegyeket mutatnak és a környezeti feltételek megváltozásának hatására módosult fenotípusok (fenotipikai plaszticitás) alakulhatnak ki. Ez utóbbi esetén többek között előfordulhat a cönobiumos, valamint az egysejtes életmód, továbbá a sejtméret, esetleg a tüskék számának változása. A *Scenedesmus fuscus* faj például elvesztette a képességet a többsejtes-cönobiumok képzésére, az egysejtes életmód jellemzi (Baudalet *et al.* 2017). A ***Scenedesmus* nemzetségre** általános jellemző, hogy autospórás szervezetek, többmagvú anyasejteket képeznek 4-8 sejtmaggal a sejtfalon belül. Az alga sejtek átlagosan 2-12 µm átmérőjűek. Fehérjében gazdag mikroalgák (8-56%), azonban egyes fajoknál kedvező tartalék szénhidrát (keményítő) és lipid termelés is leírásra került. A keményítő szintézise a

fotoszintézis sötét szakaszában, a Calvin-ciklusban (Calvin-Benson-Bassham-ciklus, CBB) biokémiai redox-reakciók eredményeként keletkezik a kloroplasztisz membránközi terében, a sztrómában. A tartalék tápanyag szintéziséhez az alga sejtek a fotoszintézis fényszakaszának termékeinek (ATP, NADPH+H⁺) hasznosításával a környezetből szén-dioxidot fixálnak. Az intracelluláris szénhidrátok (keményítő) a szárazanyag tartalom 10-52 %-át, a lipidek pedig 2-40 %-át tehetik ki (Demirbas *et al.* 2017, Kannah *et al.* 2021). Az 1. táblázat néhány mikroalga faj összetételét, a szárazanyagtartalom alapján a fehérje, szénhidrát és lipid tartalom megoszlását szemlélteti százalékos formában. Tenyésztésük gazdaságilag rengeteg területen kiaknázzható, többek között az élelmiszeriparban, mezőgazdaságban, gyógyszeriparban és a bioenergetika területén is (Menegazzo és Fonseca 2019).

1. táblázat: Mikroalga fajok értékes anyagcseretermékeinek megoszlása (Russell *et al.* 2022)

Mikroalga faj	Fehérje m/m %	Szénhidrát m/m %	Lipid m/m %
<i>Botryococcus braunii</i>	40	6	33
<i>Chlorella luteoviridis</i>	47	12	22
<i>Chlorella sorokiniana</i>	56	17	22
<i>Haematococcus pluvialis</i>	68	9	26
<i>Parachlorella kessleri</i>	51	16	25
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	28	29	16
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Chlorella vulgaris</i>	58	17	22
<i>Scenedesmus obliquus</i>	56	17	14
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	48	17	21

3.3.2 Mikroalga tenyésztése

A fototróf mikroalgák természetes körülmények között elnyelik a napfényt és a légkörből a szén-dioxidot vagy a környezetben elérhető szerves tápanyagokat hasznosítják. Ezért amennyire lehetséges a növekedési feltételeket a mesterséges termesztésnél alkalmazott konstrukciónál biztosítani kell (Brennan és Owende 2010). Az etanol célú algabiomassza termelés igen fontos tényezője az intracelluláris (tartalék) szénhidrát felhalmozásának

képessége, amelyet a mikroalga természete és a környezeti hatások is nagymértékben befolyásolnak. A legfőbb környezeti hatás a fényintenzitás, a kémhatás, a sótartalom, a hőmérséklet (de Farias Silva és Bertucco 2016). Az 2. táblázat néhány mikroalga és cianobaktérium esetén a tenyésztési körülményeket, az algabiomassza hozamot és az intracelluláris szénhidráttartalmat szemlélteti.

2. táblázat: Mikroalgák és cianobaktérium intracelluláris poliszacharid tartalma

Mikroalga/Cianobaktérium	Tenyésztési körülmények	Száraz biomassza g/L	Szénhidrát tartalom m/m %
<i>Anthrospira platensis</i>	150 $\mu\text{mol m}^{-2} / \text{s}^{-1}$, 30 °C, buborékoltatott levegőztetés	2–2,2	58
<i>Chlamydomonas fasciata</i> Ettl 437	3000 Lux, 25 °C (CO ₂ -levegő)	–	43,5
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> UTEX 90	450 $\mu\text{mol m}^{-2} / \text{s}^{-1}$, 23 °C, 4 nap és 130 rpm	12,4	59,7
<i>Chlorella variabilis</i> NC64A	150 $\mu\text{mol m}^{-2} / \text{s}^{-1}$, 25 °C, 2% CO ₂	0,43	37,8
<i>Chlorella vulgaris</i> P12	70 $\mu\text{mol m}^{-2} / \text{s}^{-1}$, 30 °C, 2% CO ₂	–	41
<i>Chlorella vulgaris</i> FSP-E	60 $\mu\text{mol m}^{-2} / \text{s}^{-1}$, 2% CO ₂	7,5	52
<i>Chlorella vulgaris</i> KMMCC-9 UTEX26	150 $\mu\text{mol m}^{-2} / \text{s}^{-1}$, 20–22 °C, buborékoltatott levegőztetés	–	22,4
<i>Chlorella</i> sp. KR-1	80 $\mu\text{mol m}^{-2} / \text{s}^{-1}$, 30 °C, 10 % CO ₂	–	49,7
<i>Chlorococcum humicola</i>	Kültéri és buborékoltatott levegőztetés 34.5 kPa	–	32
<i>Dunaliella tertiolecta</i> LB999	60 $\mu\text{mol m}^{-2} / \text{s}^{-1}$, 20–25 °C, 2% CO ₂	–	37,8
<i>Dunaliella tertiolecta</i> LB999	60 $\mu\text{mol m}^{-2} / \text{s}^{-1}$, 20–25 °C	–	40,5
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	50–1200, 25 °C, 2% CO ₂	5	45-50

<i>Scenedesmus obliquus</i>	150 $\mu\text{mol m}^{-2} / \text{s}^{-1}$, 25 °C, buborékoltatott levegőztetés	–	30
<i>Scenedesmus obliquus</i> CNW-N	210-230 $\mu\text{mol m}^{-2} / \text{s}^{-1}$, 28 °C, 300 rpm, 2.5% CO ₂	4,5	51,8
<i>Scenedesmus bijugatus</i>	kültéri	–	26
<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942	200 $\mu\text{mol m}^{-2} / \text{s}^{-1}$, 28 °C, 5% CO ₂	–	28
<i>Synechococcus sp.</i> PCC 7002	250 $\mu\text{mol m}^{-2} / \text{s}^{-1}$ 1% CO ₂	3	59
<i>Tetraselmis subcordiformis</i>	200 $\mu\text{mol m}^{-2} / \text{s}^{-1}$, 25 °C, 3% CO ₂	6	45-50
<i>Tetraselmis subcordiformis</i> FACHB-1751	150 $\mu\text{mol m}^{-2} / \text{s}^{-1}$, 25 °C, 3% CO ₂	4,5	40

A mikroalga tenyésztés történhet nyílt medencés rendszerekben, valamint zárt fotobioreaktorokban is (Singh és Sharma 2012).

3.3.2.1 Nyílt medencés rendszerek

A nyílt medencés tenyésztő rendszerek üzemeltetése az egyszerűségük miatt a zárt tenyésztő rendszerekhez képest lényegesen olcsóbb, azonban nagyobb területet igényelnek (Ugwu *et al.* 2008). A tenyésztő medencék burkolata általában beton vagy műanyag (fehér), ami megakadályozza a víz elszivárgását. A medencékben az alga tápoldat áramlását lapátkerék tartja fent, ezáltal egyenletesebb anyagáram érhető el, az alga sejtek nem ülepednek le. A megvilágítás (napfény) biztosítása érdekében a medencék általában nagy felülettel és sekély mélységgel rendelkeznek. A autotróf szervezetek esetén a felszíni szén-dioxid felvételen túl további szén-dioxid adagolásra is szükség van (Brennan és Owende 2010, Sirohi *et al.* 2022, Singh és Sharma 2012). A nyílt medencés tenyésztő rendszerek hátrányos tulajdonsága, hogy kis hatékonysággal képesek a napenergiát hasznosítani, vízveszteség lép fel a párolgás során, a sekélység miatt nagy területet igényelnek, és hajlamosak a befertőződésre gyorsan szaporodó, vagy mikroalgákkal táplálkozó mikroorganizmusokkal. A befertőződés kockázatának csökkentése érdekében az ilyen rendszerekben olyan mikroalga fajokat tenyésztene, amelyek képesek valamilyen extrém környezeti hatást, mint magas sótartalmat, kémhatást tolerálni (Cañedo és Lizárraga 2016).

3.3.2.2 Zárt rendszerű fotobioreaktorok

A fotobioreaktor egy zárt megvilágított tenyésztőedény, amelyben a külső hatások kizárásával, szabályozott körülmények (hőmérséklet, kémhatás, megvilágítás, oldott oxigén koncentráció, tápanyag ellátás stb.) között valósítható meg az algabiomassza termelése. A zárt rendszerekben lényegesen magasabb algabiomassza hozam érhető el (Singh és Sharma 2012). Ezidáig igen sokfajta fotobioreaktor konstrukciót terveztek és alakítottak ki, amelyek között cső, panel, tank, és hibrid bioreaktorok is találhatók, sőt üzemi méretekben is alkalmazzák azokat (Egbo *et al.* 2018).

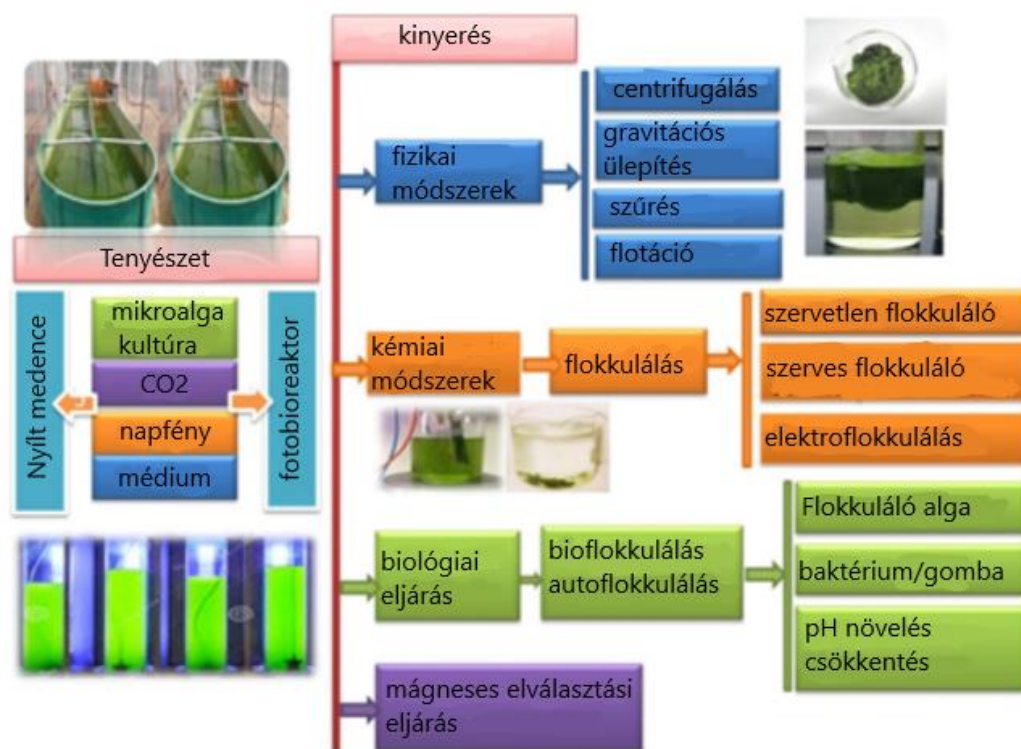
A csőreaktorok hengeres geometriával rendelkeznek, amelyek orientációja lehet horizontális és vertikális. A zárt rendszerű bioreaktorok között ezt a típust tartják a kedvezőbbnek a mikroalgák kültéri, üzemi-léptékű termelésére (Kurniawan *et al.* 2022). A bioreaktort felépítő csövek átlátszó műanyagból vagy üvegből készülnek. A csövek elhelyezkedése a befogott fény maximalizálása szerint történik. A csövekben a mikroalga tenyésztet perisztaltikus pumpa vagy a levegőztető rendszer segítségével tartják mozgásban. A csövek 10-60 mm átmérőjű tartományban kerülnek alkalmazásra, hosszuk pedig több 100 méter is lehet (Huang *et al.* 2017). A kis csőátmérővel rendelkező bioreaktorokban a kezdeti alacsony sejtsűrűségű fázisban problémát jelenthet a túlzott fénysugárzás, amely fotonvesztéshez vagy akár fotoinhibícióhoz vezethet. A mikroalga fotoszintetikus kapacitásának csökkenését a fény váltja ki. Ez a probléma részben kiküszöbölhető nagyobb átmérőjű csövekkel, hatékonyabb keveréssel és árnyékolással (Wang *et al.* 2012).

A panel-fotobioreaktorok egy vagy több fény gyűjtő lapos panel egységből állnak. A vékony panelek átlátszó műanyagból vagy üvegből készülnek. A panelek pumpával vannak összeköttetésben, ezzel tartható fent a tenyésztet áramlása. Számos előnnyel rendelkeznek, mint a magas terület/térfogat arány, magas biomassza termelékenység és alacsony költségek. A hátrányok közé sorolható a nehezen megoldható léptéknövelés, a hőmérséklet szabályozás, valamint a nagy energiaigény (Touloupakis *et al.* 2022).

A hibrid tenyésztő rendszerek két vagy több típusú tenyésztőrendszer összekapcsolásából származnak. A hibrid rendszerek állhatnak egy kis méretű zárt fotobioreaktorból, amely egy nagyobb nyílt tenyésztő medencéhez csatlakozik, így mindkét eljárás előnyeit maximalizálni lehet. A hibrid rendszerek szennyvíz kezelésnél történő alkalmazása igen alkalmas az algabiomassza előállítás költségeinek csökkentésére (Bhatia *et al.* 2021).

3.3.3 Algabiomassza feldolgozása

Az algabiomassza elválasztása nélkülözhetetlen művelet, amelyre ma már több feldolgozási (downstream) technika is rendelkezésre áll. A különböző technikákat az alábbi 3. ábra szemlélteti.



3. ábra: A mikroalga biomassza elválasztási módszereinek csoportosítása
(Mathimani és Mallick 2018)

Az elválasztási folyamat összetettségét és költségét a mikroalga sejtmérete (2-20 μm , a *Scenedesmus* fajoknál 2-12 μm), valamint a tápoldatban a mikroalga kolloid stabilitása növeli. Az alga biomassza kinyerése történhet fizikai, kémiai, biológiai úton, valamint kettő vagy annál több módszer, akár kombináltan történő alkalmazása által. A sejtfalszerkezet összetétele és ellenállósága miatt egyes esetekben több módszer egymást követő használata szükséges (Yin *et al.* 2020). A fizikai módszerek közé sorolható a centrifugálás, amely során a fellépő centrifugális erő hatására a fázisok a sűrűségük szerint szétválnak, az algabiomassza üledéket képez. A centrifugálás ugyan gyors elválasztási művelet, ám nagy energiaigénye miatt igen nagy költségekkel jár (Mathimani és Mallick 2018). Ezzel szemben a gravitációs ülepítés költséghatékonyabb elválasztási módszer, ahol az algabiomassza a gravitációs erő hatására

ülepedik le. A folyamat hatékonyságát nagy mértékben befolyásolja a mikroalga sűrűsége, így a módszer megbízhatósága alacsony. Az algák ülepedési sebessége 0,1 és 2,6 cm/h között van, amely nagyon lassú folyamatot eredményez, ami idővel a biomassa minőségének romlásához vezethet. Az ülepedés gyorsítása lehetséges, elsősorban koagulációs vagy flokkulációs előkezeléssel (Barros *et al.* 2015). A szűrési technikák esetén a mikroalga tenyészet egy szűrő berendezésen halad át, amelynek pórusmérete nem nagyobb, mint a sejtek átmérője, így a sejtek a szűrőn fennmaradnak, a tápoldat pedig tovább tud haladni. A folyamat addig tart, amíg a szűrők nagy mennyiségű algabiomasszát nem tartalmaznak és a szűrési hatékonyság csökkenni nem kezd. A szűrési technikák között ismert a mikroszűrés, a „dead-end” szűrés, a vákuum szűrés, az ultraszűrés stb. (Pragya *et al.* 2013). A flotáció adhéziós jelenségen alapul. A tenyészetbe ekkor levegő vagy gáz buborékokat juttatnak, amelyekhez az algasejtek kötődnek és azokkal együtt felfelé mozognak, a tápoldat felszínére emelkednek, ahol leföldrözéssel leválasztásra kerülnek (Mathimani és Mallick 2018). A flokkuláció során az algasejtek összetapadnak, ezzel nagyobb aggregátumokat alkotnak, ami az ülepedés időtartamát csökkenti. Az egyszerű flokkuláció a töltéseloszlás mechanizmusán alapul, azaz a mikroalgák negatív töltést hordoznak a szerves anyagokból származó ionok abszorbeálásának köszönhetően, ami nem engedi az aggregációt a tenyészetben belül. A flokkuláció előidézhető kemikáliák adagolásával, ezáltal az algasejtek negatív felületi töltése semlegesítésre kerül. A flokkulációs eljárásoknál megkülönböztetünk auto-flokkulációt, kémiai flokkulációt és elektromos flokkulációt (Pragya *et al.* 2013, Chen *et al.* 2011).

3.3.3.1 Sejtfeltérési technikák

A mikroalga sejteket vastag, merev és egybefüggő mikrofibrillum réteg veszi körül, amelyet sejtfalnak nevezünk. A sejtfal összetett poliszaccharid és glikoprotein mátrixból tevődik össze, ennek köszönhetően a különböző környezeti feltételekkel szemben a sejtek nagy adaptációs képességgel rendelkeznek. A sejtfal összetettsége és heterogenitása elengedhetetlen a sejtek megfelelő struktúrájának, védelmének, és a különböző biotikus és abiotikus behatásokkal szembeni ellenállóképességének kialakulásához. A *Scenedemus* nemzetségre jellemző, hogy a sejtfal három rétegből áll, amelyek cellulózban és pektinben gazdagok, továbbá hemicellulózt és kitint is tartalmaznak (Jothibasu *et al.* 2022).

A sejtfeltérési szükséges művelet minden biofinomítási és bioenergetikai folyamat során. Lényege, hogy az intracellulárisan termelt értékes anyagcseretermékek (szénhidrátok, fehérjék, lipidek, antioxidánsok, pigmentek stb.) hozzáférhetővé váljanak. A szénhidrátok a

mikroalga sejtfalából is nyerhetőek, a cellulóz, hasonlóan a keményítőhöz, glükóz egységekre bontható. A keményítő a plasztidokban foglal helyet (Velazquez-Lucio *et al.* 2018).

A sejtfeltárás lehet mechanikai, fizikai, kémiai, biológiai, valamint kombinált módszer (Dahunsi 2019). A mechanikai sejtfeltárás történhet nagy nyomáson történő átréssel, amely során az alga szuszpenzió fojtáson, szűkítésen halad át és a nagy sebesség gradiense hatására a sejtek szétszakadnak, feltárássá kerülnek. Fagyasztott algabiomassza átréssel is van lehetőség, ekkor extrém nagy nyomás szükséges, hogy a fagyasztott alga szuszpenzió áthaladjon a fojtáson. A sebesség gradiensen túl a jégkristályok roncsoló hatása is segíti a sejtek feltárássának hatékonyságát (Petrier *et al.* 1998, Russell *et al.* 2022). A gyöngyökkel történő feltárás igen nagy potenciállal rendelkezik, kiváló sejtfeltárási teljesítménye, egy lépéses működése és alacsony munkaintenzitása miatt. A sejtfeltárás során az algabiomasszához üveg, kerámia vagy acél gyöngyök kerülnek. Kevertetéssel, rázatással a gyöngyöknek kinetikai energiát adnak át, ami a gyöngyök ütközéséhez vezet. Az ütközési zónákban lévő szuszpendált sejtek a gyöngyöktől átvett nyíróerők hatására roncsolódnak. Nagyobb algabiomassza mennyiségek esetén nagyobb kapacitású kolloid malmokat, golyós malmokat alkalmaznak. Az eljárással ugyan intenzív feltárást lehet elérni, azonban a hőmérséklet gyors emelkedése a rendszer hűtésűt igényelheti (Günerken *et al.* 2015). Az ultrahangos sejtfeltárás során a sejtek roncsolását a kavitációs hatások okozzák. Az ultrahang hullámok hatására mikrobuborékok keletkeznek, amelyeknek az összeomlása nagy mennyiségű energiát szabadít fel és lökéseket, örvényeket generál. A folyadék térben kialakuló nyomáskülönbség a sejteket károsítja (Liu *et al.* 2022). A fizikai módszerek között az ozmotikus sokk, a hőhatás stb., a kémiai módszerek között a különböző kemikáliák alkalmazása említhető. A biológiai sejtfeltárás biokatalizátorok alkalmazásával, mint egész sejt rendszerrel, enzimkészítményekkel (pektináz, celluláz, xilanáz, amiláz, kitináz, lizozim tb.) történhet (Kim *et al.* 2014).

4 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1 Mikroalga törzs

A kutatómunkám során egy édesvízi *Scenedesmus rubescens* zöldalga izolátum tenyésztetőségét és intracelluláris poliszacharid tartalmát különböző összetételű, szerves és szervetlen természetű tápoldatokban követtem nyomon. Az izolátumot az Albitech Kft. (Budapest) biztosította.

4.2 Mikroalga tápoldatok

A mikroalga tenyésztése szervetlen természetű (szintetikus) BG-11, M4N és BBM tápoldatokban (3. táblázat), valamint szerves természetű, zöldség-gyümölcs présle-alapú (5, 10, 15 %) tápoldatokban történt. A növények és azok maradványai (alma, almahéj, répa és fejessaláta) nagyobb részt háztartásokból származtak. A maradványok préselése laboratóriumi présgép segítségével történt.

3. táblázat: BG-11, M4N és BBM összetétele

Komponens (mg/l)	BG-11	BBM	M4N
NaNO ₃	1500	250	-
KNO ₃	-	-	5000
KH ₂ PO ₄	40	175	-
K ₂ HPO ₄	-	75	1250
CaCl ₂ *2H ₂ O	36	25	100
NaCl	-	25	-
MgSO ₄ *7H ₂ O	75	75	25000
Ammónium-vas(III)-citrát	6	-	-
FeSO ₄ *7H ₂ O	-	-	30
Citromsav-monohidrát	6	-	-
Na ₂ EDTA	1	-	-
Na ₂ CO ₃	20	-	-
desztillált víz	1000 ml	1000 ml	1000 ml
Mikroelem törzsoldat (mg/l)	1 ml	1 ml	1 ml
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	222	8820	222

MnCl ₂ * 4H ₂ O	1810	1440	1810
MoO ₃	-	710	-
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	390	-	390
CuSO ₄ * 5H ₂ O	80	1570	80
Co(NO ₃) ₂ * 6H ₂ O	49,4	490	49,4
H ₃ BO ₃	2860	-	2860
desztillált víz	1000 ml	1000 ml	1000 ml
Oldat 1 (mg/l)	-	1 ml	-
Na ₂ EDTA	-	50000	-
KOH	-	3100	-
desztillált víz	1000 ml	1000 ml	1000 ml
Oldat 2 (mg/l)	-	1 ml	-
FeSO ₄	-	4980	-
H ₂ SO ₄ (Conc.)	-	1	-
desztillált víz	1000 ml	1000 ml	1000 ml
pH= 7 (0,1 n NaOH)			

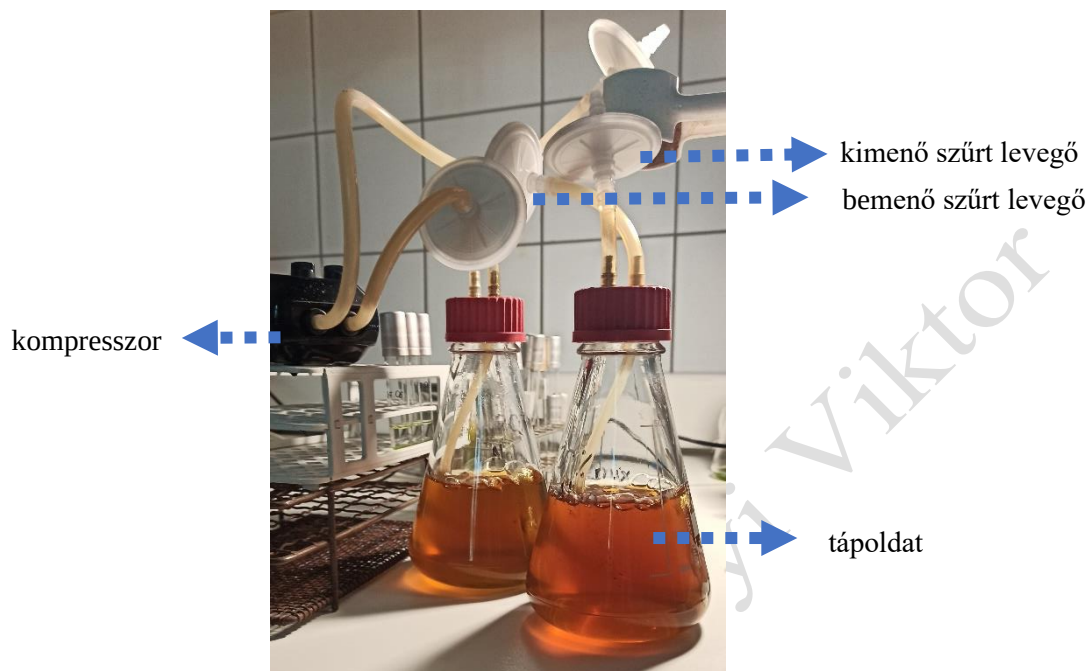
A tápoldatokat 500 ml-es csavaros lombikokban 300 ml-ként osztottam szét. A tápoldatok sterilizése 121 °C-on, 15 percen át autoklávban történt.

4.3 Laboratóriumi mikroalga tenyésztés

Az algatenyésztés szervesetlen tápoldatokban 14, 28 és 56 napon át, a növényi tápoldatokban pedig 25 napon át történt állandó megvilágítás (1400 lumen, meleg fehér fényű led lámpa) mellett, laboratóriumi méretű levegőztetett bioreaktorokban (4. ábra). A szerves tápoldatok esetén a befertőződés kockázatának csökkentése érdekében természetes gátlószert, nátrium-kloridot (1-15 g/l) alkalmaztam. Az etanol fermentáció kivitelezéséhez a léptéknövelt algatenyésztést 3 literes BG-11 tápoldatot tartalmazó levegőztetett reaktorban indítottam el.

A mintavételt időközönként, steril körülmények között, lamináris fülke alatt végeztem. A mintáknál mértem a pH, valamint a sejtszám időbeni alakulását. A tenyésztést követően az algabiomasszát 10000 rpm sebességen 10 percen át tartó centrifugálással választottam el. A nedves algabiomasszában visszamaradt tápoldat komponensei a fenol-kénsavas módszer pontosságát ronthatják, ezért a komponensek maradéktalan eltávolítását az algabiomassza

desztillált vízzel történő átmosásával és centrifugálásával biztosítottam, amit három, esetenként négy ciklusban ismételtem.



4. ábra: Laboratóriumi levegőztetett algabioreaktor (növényi prés)

4.4 Szaporodáskinetika

A tápoldatokban a mikroalga sejtszám meghatározása Bürker-kamrás módszerrel, 40-szeres nagyítású objektív alatt, fénymikroszkóp alkalmazásával történt. Az algasejtszámokat az idő függvényében ábrázoltam és az exponenciális szaporodási szakaszra lineáris trendvonalat illesztettem. Az egyenes egyenlet meredekségének ismeretében a szaporodáskinetikai paraméterek: a fajlagos szaporodási sebesség (μ , 1/nap) és a generációs idő (t_{gen} , nap) számítható.

$$tga=\mu/2,303 \text{ és } t_{gen}=0,693/\mu$$

4.5 Liofilizálás

A különböző sejtfeltárási technikáknak és az intracelluláris szénhidráttartalomnak a vizsgálatát nedves, valamint víztelenített (fagyasztva szárított) algabiomassán végeztem. A liofilizálás $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolt, fagyasztott algabiomassán történt. Az alga biomassa szárítása a Christ Alpha LSC Plus (Martin Christ GmbH, Németország) típusú berendezésben történt. A szárítókamra hőmérséklete $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ volt. A fagyasztott algabiomassa szárítása vákuummal ($0,25\text{ mbar}$) történt. A fagyasztva szárítás ideje 2 nap volt.

4.6 Sejtfeltárás

Kísérleteim során olyan sejtfeltárási technikákat alkalmaztam, amelyek környezetbarátabb technikáknak számítanak, a sejtfal roncsolása nem igényel kemikáliákat, ezáltal a további biofeldolgozási művelet során (etanolfermentáció) azoknak a rendszerből történő elválasztására nincsen szükség, a folyamat költségei csökkenthetők. A sejtfeltárás során egy lépéses és kétlépéses technikákat is alkalmaztam.

4. táblázat: Egy lépéses és kétlépéses sejtfeltárási technikák

Sorszám	Sejtfeltárási módszer I.	Sejtfeltárási módszer II.
1.	Ultrahang (35-40 kHz, 15 perc)	-
2.	Ultrahang (35-40 kHz, 15 perc)	Enzim (Lallzyme EX-V) (3 óra, 20 °C)
3.	Ultrahang (35-40 kHz, 30 perc)	Enzim (Lallzyme EX-V) (3 óra, 20 °C)
4.	Ultrahang (35-40 kHz, 45 perc)	Enzim (Lallzyme EX-V) (3 óra, 20 °C)
5.	Üveggyöngy (5 perc, rázatás)	-
6.	Üveggyöngy (5 perc, rázatás)	Enzim (Lallzyme EX-V) (3 óra, 20 °C)
7.	Mikrohullám (15 másodperc, 4 ciklusban)	-
8.	Mikrohullám (15 másodperc, 4 ciklusban)	Enzim (Lallzyme EX-V) (3 óra, 20 °C)
9.	Hőkezelés (121 °C, 15 perc)	-
10.	Hőkezelés (121 °C, 15 perc)	Enzim (Lallzyme EX-V) (3 óra, 20 °C)
11.	French Press nagynyomású homogenizátor (8 bar nyomás, 3 ciklusban)	-
12.	French Press nagynyomású homogenizátor (8 bar nyomás, 3 ciklusban)	Enzim (Lallzyme EX-V) (3 óra, 20 °C)
13.	Enzim (Lallzyme EX-V) (3 óra, 20 °C)	-
14.	Enzim (Lallzyme EX-V) (3 óra, 20 °C)	Ultrahang (35-40 kHz, 45 perc)
15.	Kontroll (sejtfeltárás nélkül)	

A sejtfeltárási technikáknál alkalmazott Lallzyme EX-V (Kokoferm Kft.) *Aspergillus niger* mezofil fonalagomba eredetű enzimekészítmény, amely az erős pektinbontó aktivitásán túl cellulóz- és hemicellulóz-bontó aktivitásokkal is rendelkezik.

4.7 Fenol-kénsavas módszer

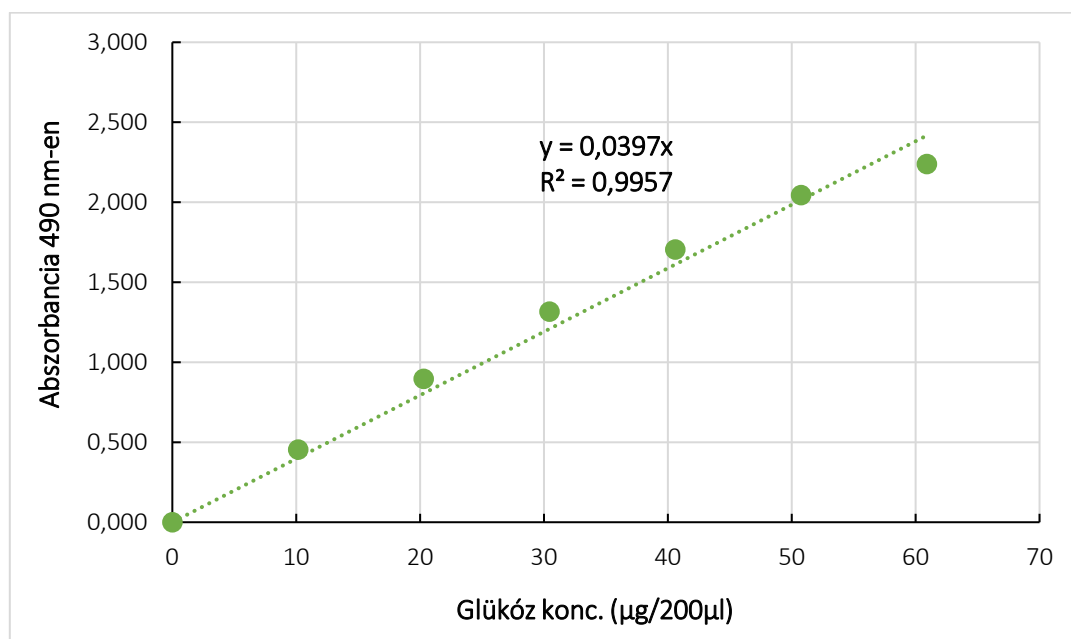
A fenol-kénsavas eljárás az összes szénhidráttartalom meghatározására szolgáló analitikai módszer, amely lehetővé teszi a mintában található összes monoszacharid, diszacharid, oligoszacharid és poliszacharid egyidejű mérését. A mérés alapja, miszerint a tömény kénsav a szénhidrátokat egységeikre, monoszacharidokra bontja le. A pentózok (5 szénatomos vegyületek) ekkor furfurollá dehidratálódnak, a hexózok (6-szénatomos vegyületek) pedig hidroximetil-furfurollá. A keletkezett vegyületek a fenollal reakcióba lépnek és aranysárgává válnak, így az elegy fényelnyelése 490 nm-en mérhető. A továbbiakban a minták szénhidrát mennyiségének meghatározása ismert koncentrációjú glükóz (standard) oldat hígítási sorából készített kalibráció egyenesének segítségével történt (DuBois *et al.* 1956).

5. táblázat: Glükóz (standard) törzsoldat hígítási sorozat

Mintaszám	Glükóz törzsoldat (0,5 mg/ml) (μ l)	Desztillált víz (μ l)	Glükóz konc. (μ g/200 μ l)
1	0	200	0
2	20	180	10
3	40	160	20
4	60	140	30
5	80	120	40
6	100	100	50
7	120	80	60

A glükóz (standard) törzsoldat hígítási sorozatát az 5. táblázat szemlélteti. A félkémcsövekbe 200 μ l hígított glükóz oldatot és 200 μ l 5 (m/v) % fenol oldatot pipettáztam, majd a hígítási tagokhoz további 1 ml tömény kénsavat adtam elszívó fülke alatt. Az elegyeket gyorsan és óvatosan összeráztam. A hígítási tagokat 20 percen át szobahőmérsékleten állni hagytam, végezetül az abszorbancia értékeket spektrofotométer (UNICAM, α Helios)

alkalmazásával 490 nm-en mértem le. A standard görbe és az egyenes egyenlete az alábbi 5. ábrán látható.



5. ábra: Glükóz (standard) kalibráció

A sejtfeltérési technikák hatékonyságának vizsgálata során (ismeretlen szénhidrát mennyiség) 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe analitikai mérlegen bemért 5 mg liofilizált algabiomasszát 500 µl desztillált vízben rehidratáltam. A rehidratálást követően az előkezeléseket adott környezeti beállítások mellett indítottam el, majd a csövek tartalmát 14000 rpm sebességen, 10 percen át centrifugáltam. A felszabadított szénhidrátok meghatározása a felülúszóból történt. A mérés menete a glükóz oldat esetén leírt lépésekkel egyezően történt.

4.8 Etanolfermentáció

A léptéknövelt tenyésztésnél nyert nedves algabiomasszát 100 ml desztillált vízben oldottam vissza és a rangsorolt sejtfeltérési módszerek közül a kedvezőbb hatékonysággal jellemzett eljárást alkalmaztam a szénhidrátok felszabadítása érdekében. A szénhidrátok enzimes cukrosítása *Aspergillus niger* eredetű glükoamiláz enzimmészítmény (AMG 300L) (Novozymes, Dánia) alkalmazásával pH 4,5 értéken (0,1 n sósav), 50 °C-on, 180 rpm rázatási sebességen, 24 órán át tartott. Ezt követően a fermentációs közeget 0,02 g Uvaferm Uvavital élesztőtápsóval (Danstar Ferment AG, Franciaország) egészítettem ki, a kémhatást pedig pH 3,5 értékre (0,1 n sósav) vittem le. Az etanolfermentációt Uvaferm *Saccharomyces cerevisiae*

DANSTIL A (Danstar Ferment AG, Franciaország) élesztőszuszpenzió beoltásával indítottam el. A beoltási ráta 10 (v/v) % volt. Az erjesztési kísérlet 30 °C-on, 24-48 órán át tartott.

4.9 HPLC technika

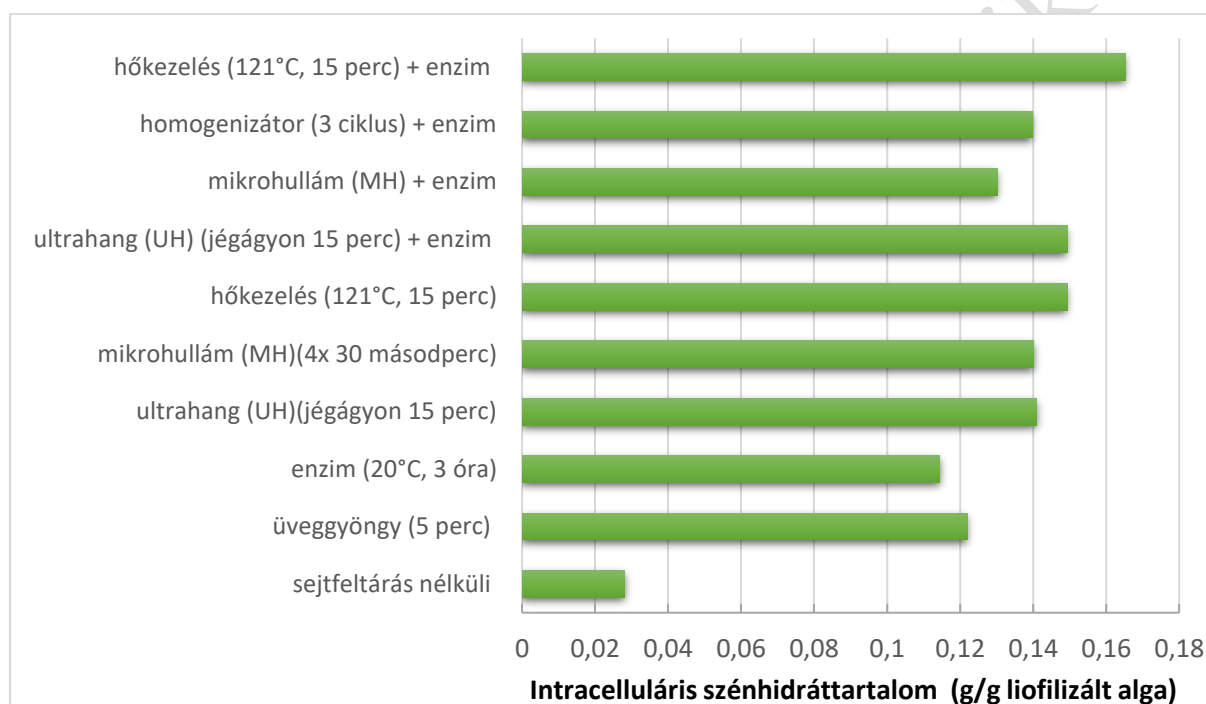
A sejtfeltárási technikák és az erjesztési kísérlet során az oldott szénhidrátok és az etanol mennyiségi meghatározásához nagyteljesítményű folyadékkromatográfiát, HPLC technikát alkalmaztam. A szénhidrátok azonosítása ismert koncentrációjú standard oldatok (glükóz, maltóz, maltotrióz) segítségével történt. A Thermo Fisher Scientific Corporation által gyártott Surveyor típusú HPLC készülék az alábbi paraméterekkel rendelkezett:

- Oszlop: Aminex - 87H (Bio-Rad, USA)
- Eluens: 0,005 N H₂SO₄
- Integráló szoftver: ChromQuest 5.0
- Detektor: RI
- Oszlop hőmérséklete: 45°C
- Detektor hőmérséklete: 40°C
- Áramlási sebesség: 0,6 ml/perc
- Eluálási mód: izokratikus

5 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1 Egylépéses és kétlépéses sejtfeltárási technikák

Kísérleteim során BG-11 tápoldatban tenyésztett 28 napos algabiomassza liofilizátumon teszteltem a különböző sejtfeltárási technikák hatékonyságát. A technikák rangsorolása az oldatba vitt szénhidrátok mennyisége alapján történt (6. ábra). A liofilizálás sejtroncsoló hatásának kiszűrése érdekében sejtfeltárási nélküli algabiomassza (kontroll) esetén is mértem a felülúszó szénhidráttartalmát.



6. ábra: Különböző sejtfeltárási technikák hatása

Láthatóan a liofilizálás is részben károsította a sejtfal szerkezetét, ugyanis a sejtfeltárási nélküli minta felülúszójában is mértem oldott szénhidráttartalmat. Azonban a sejtekre kifejtett hatás a mechanikai, fizikai és enzimes sejtfeltárási technikákkal szemben nem tekinthető jelentősnek, az oldott szénhidráttartalom csupán 0,02 g/g értéket mutatott. Az egylépéses technikáknál a hőkezelés, valamint a mikrohullámú és ultrahangos kezelés nagyobb mértékben szabadította fel a szénhidrátokat, melyeket az üveggyöngyös rázatás és a biokatalizátor (enzim) jelenlétében történő kezelés követett. A fenol-kénsavas módszerrel mért oldott szénhidráttartalom ezen esetekben 0,11 és 0,15 g/g érték között alakult (6. ábra).

A továbbiakban kétlépéses technikák: mechanikai-enzimes és fizikai-enzimes technikák alkalmazhatóságát vizsgáltam. Eredményesebbnek az előzetesen hőkezelt liofilizátum enzimes

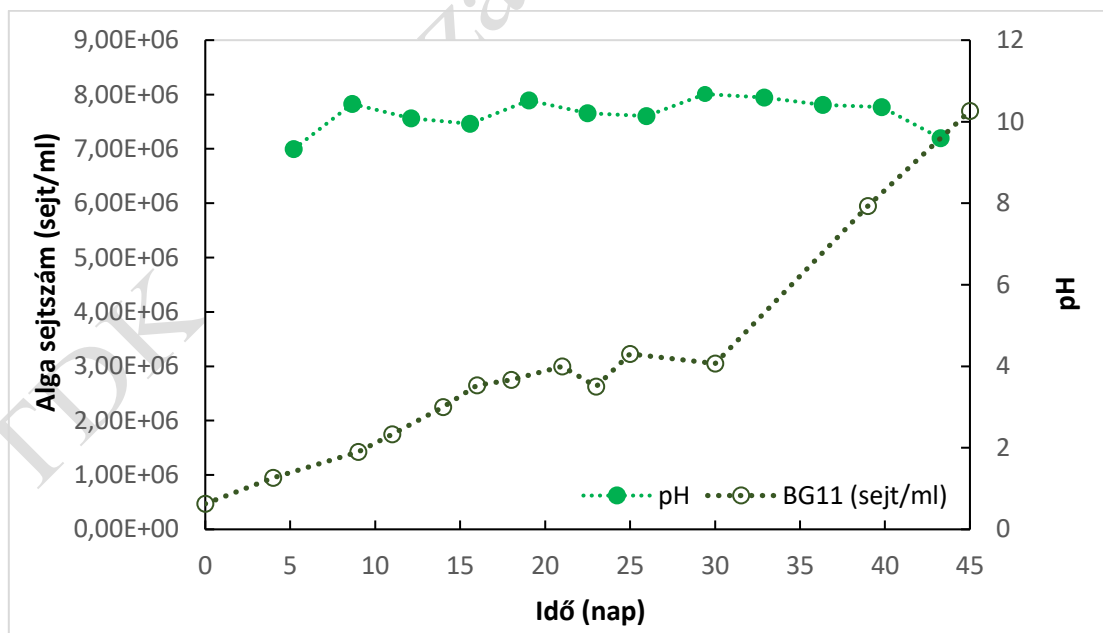
bontása bizonyult, ekkor az oldott szénhidráttartalom elérte a 0,17 g/g értéket. A nagy nyomáson átréselést (homogenizátor), valamint a mikrohullámmal kezelt algabiomassza enzimés bontása során az oldott szénhidráttartalom lényegi változást nem mutatott. Az ultrahanggal kezelt algabiomassza esetén az enzimés kezeléssel sikerült elérni azt a hatékonyságot, amelyet az egylépéses technikáknál a hőkezelés eredményezett.

5.2 Tenyésztetőség és intracelluláris szénhidráttermelés különböző összetételű alga tápoldatokban

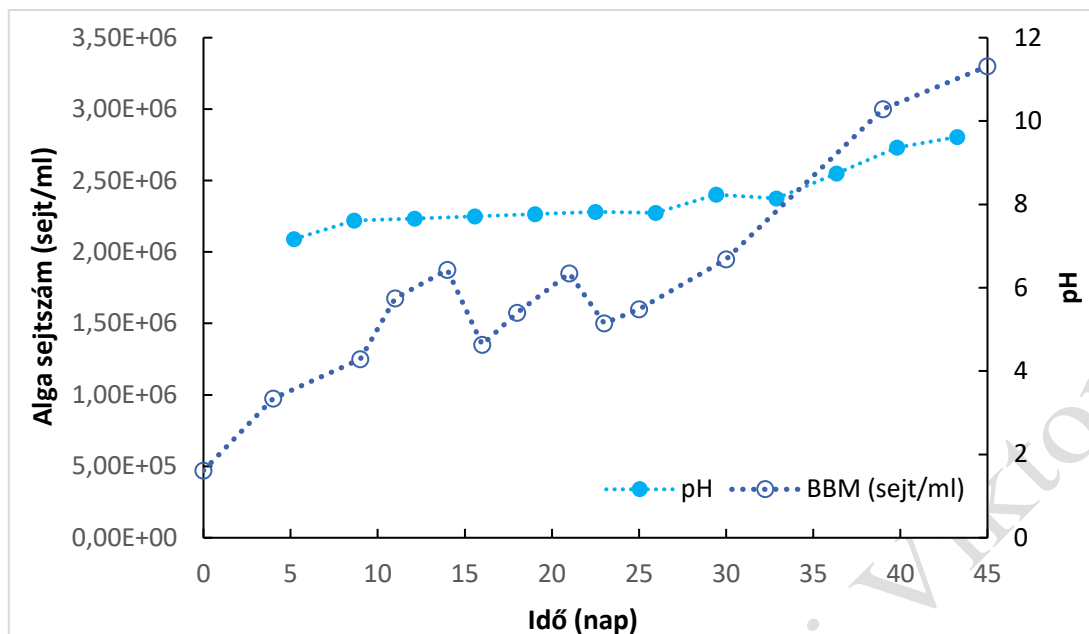
A következő kísérletsorozatban a *Scenedesmus rubescens* izolátum tenyésztetőségét és a liofilizátumokból kinyerhető szénhidráttartalom alakulását szerves természetű tápoldatokban: BG-11, BBM és M4N, valamint szerves természetű, gyümölcs és zöldség préslevet tartalmazó tápoldatokban követtem nyomon. A tápoldatok kezdeti pH értéke minden esetben pH 7 volt.

5.2.1 Szerves természetű tápoldatok hatása

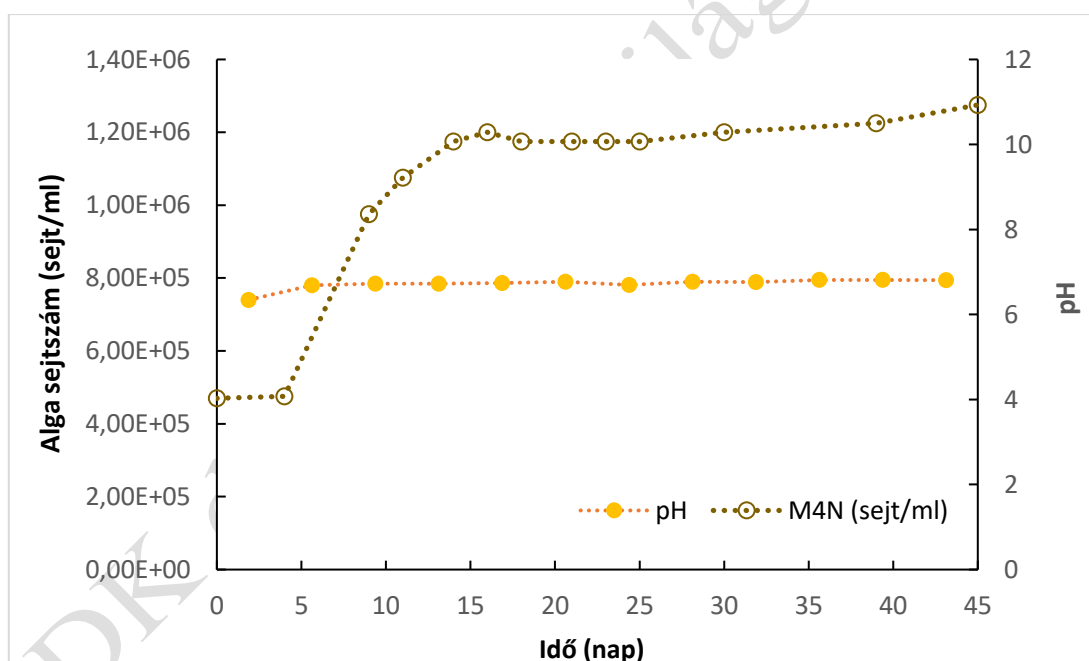
A BG-11, BBM és M4N tápoldatok kémhatásának, valamint a sejtszám alakulását 45 napon át mértem, amelyet az alábbi 7., 8., és 9. ábra szemléltet.



7. ábra: BG-11 tápoldatban a sejtszám, és a pH alakulása a tenyésztés során



8. ábra: BBM tápoldatban a sejtszám, és a pH alakulása a tenyésztés során



9. ábra: M4N tápoldatban a sejtszám-, és a pH alakulása a tenyésztés során

A mikroalga szaporodásának a BG-11 tápoldat kedvezett, ez esetben lényegesen nagyobb sejtszámot értem el a tenyésztés során. A beoltási algasejtszám, amely mind a három tápoldatnál $4,7 \times 10^5$ sejt/ml sejtkoncentráció volt, a tenyésztés 45. napjára több mint egy nagyságrendet ($7,7 \times 10^6$ sejt/ml) nőtt. A tápoldat kémhatása jellemzően alkalikus tartományba tolódott, már a tenyésztés kezdetén, az első 5 napban pH 7 értékről pH 9 felé emelkedett, amit

követően a tápoldat 9,3 és 10,7 közötti pH tartományban mozgott. A BBM tápoldat enyhén alkalikus kémhatást mutatott (pH 7-8) egészen a tenyésztés 21. napjáig, majd a 21-45 nap között már elérte pH 9 körüli értéket is. A tápközeg összetétele már kevésbé kedvezett a mikroalga szaporodásának, amit alátámasztott a sejtszám vontatott növekedése is. A tenyésztés 45. napján a sejtszám $3,3 \times 10^6$ sejt/ml volt. Az M4N tápoldatot ennél is kisebb sejtszaporulat jellemezte, a tenyészet ml-ként csupán $1,25 \times 10^6$ sejtet tartalmazott. Ebben az esetben a tápoldat kémhatása kis ingadozást mutatott, jellemzően pH 6-7 között alakult.

A szervetlen tápoldatok szaporodáskinetikai jellemzői is jól mutatják a tápoldatok közötti különbségeket. Az alábbi 6. táblázat a *Scenedesmus rubescens* izolátum szaporodáskinetikai paramétereit szemlélteti.

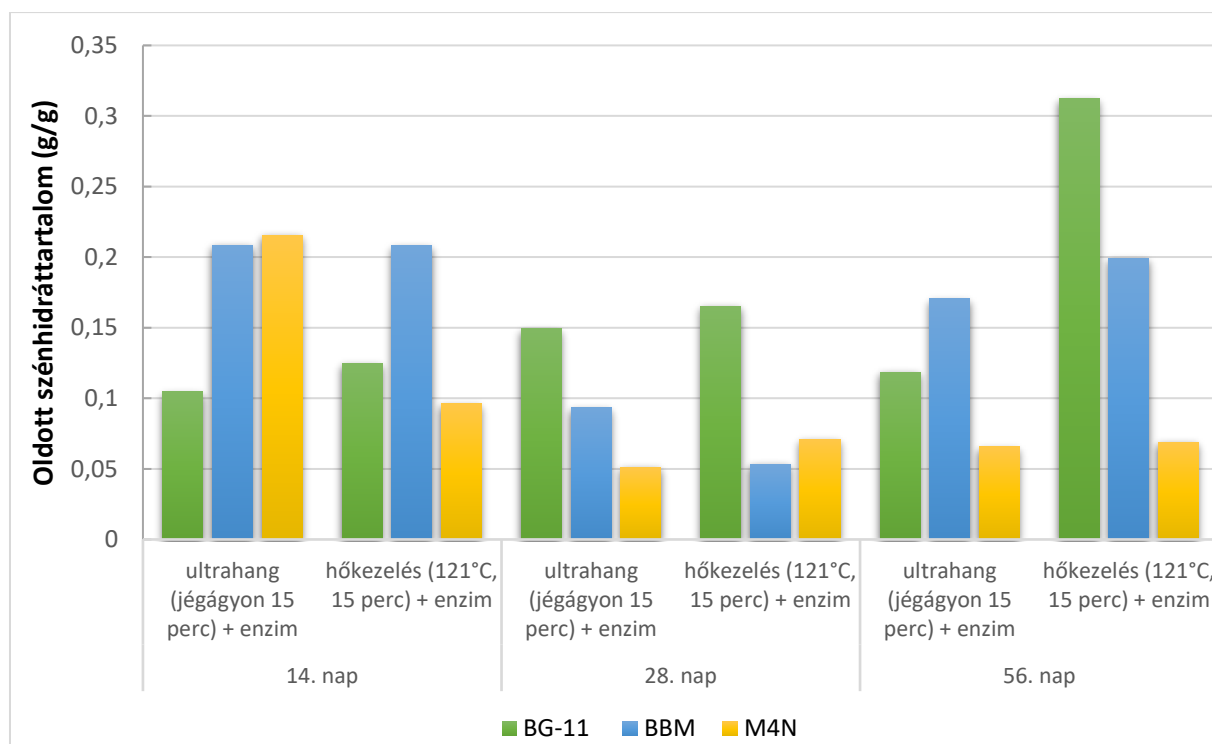
6. táblázat: Szaporodáskinetikai paraméterek

BG-11		BBM		M4N	
μ	t_{gen}	μ	t_{gen}	μ	t_{gen}
0,248 1/nap	2,47 nap	0,219 1/nap	3,10 nap	0,178 1/nap	3,54 nap

A mikroalga fajlagos szaporodási sebessége a BG-11 tápoldatban 0,248 1/nap, a BBM tápoldatban 0,219 1/nap, az M4N tápoldatban pedig 0,178 1/nap. A generációs idő, az az idő, amely alatt a sejtszaporulat a duplájára nő, a BG-11 tápoldatban tenyésztett mikroalga esetén 2,47 nap, a BBM esetén 3,1 nap, az M4N esetén pedig 3,54 nap volt.

Az alga liofilizátumok intracelluláris szénhidráttartalmának vizsgálata során a korábban hatásosabb feltárási technikákat, a hőkezelt és ultrahanggal kezelt alga liofilizátumok enzim bontását alkalmaztam és a technikák teljesítményét hasonlítottam össze. Minden tápoldat esetén a 14., a 28. és az 56. napon át tenyésztett és liofilizált mintákat tártam fel. A sejtekből kinyerhető szénhidrátok mennyiségének alakulását tápoldatonként és tenyésztési időtartamonként az 10. ábra szemlélteti. A BG-11 tápoldatban tenyésztett alga esetén jól látható, hogy a tenyésztés időtartamának növelése során a liofilizátumból oldatba vihető szénhidrátok mennyisége nőtt. A 14. napos tenyészetnél az oldatba vitt szénhidrátok mennyisége 0,1-0,12 g/g volt, addig a 28. napos tenyészetnél 0,15-0,17 g/g, az 56. napos tenyészetnél már 0,31 g/g értéket is mértem. A BBM és M4N tápoldatokban tenyésztett és liofilizált algabiomassza jelentős változékonyságot mutatott, ami az alga számára a kevésbé kedvező tenyésztési feltételekből, a tartalék szénhidrát (keményítő) egyidejű termeléséből és hasznosításából következett. A BBM tápoldat esetén a 14. és az 56. napos feltárt minták felülúszóiban mértem közel hasonló értékeket, ami 0,2 g/g

körül alakult. Az M4N tápoldatnál a 14. napon értem el a hőkezelt minták enzimés bontását követően szintén 0,2 g/g körüli oldott szénhidráttartalmat, azonban az ultrahanggal kezelt minták enzimés bontásánál ennél alacsonyabb értéket (0,09 g/g) mértem, amit a liofilizátumban maradt szervesetlen tápoldat komponensek mérési módszerre kifejtett zavaró hatása okozhatott.



10. ábra: A szervesetlen tápoldatokban tenyésztett *Scenedesmus rubescens* mikroalga izolátum intracelluláris szénhidráttartalma

Az értékes szénhidrátok kinyerésének további javítása érdekében az ultrahanggal kezelt minták enzimés bonthatóságát fejlesztettem, ahol az ultrahangos kezelés időtartamának, valamint a kétlépéses technika sorrendjének hatását követtem nyomon BG-11 tápoldatban tenyésztett (28. nap) és liofilizált algabiomasszában (7. táblázat). Abban az esetben, amikor az ultrahangos kezelés időtartamát 15 percről 30 percre, valamint 45 percre növeltem, nagyobb sejtfeltárási hatékonyságot sikerült elérni. A 15 perces ultrahangos kezelést követő enzimés bontásnál még 0,12 g/g szénhidrát szabadult fel és került oldatba, addig a 45 perces kezelést követő enzimés bontásnál 0,27 g/g-ra nőtt a mért szénhidráttartalom. A sejtfeltárási lépések sorrendjének fordítása tovább növelte a szénhidrátok mennyiségét, ekkor az enzimés sejtfalbontást követő 45 perces ultrahangos kezelés a felülúszóban 0,4 g/g szénhidrátot eredményezett. Ennek oka lehet, hogy az enzim hatékony működését az ultrahangos kezelés

segítette, így nagyobb hatékonysággal tárt fel a sejtfalakat és tette elérhetővé a szénhidrát raktárokat.

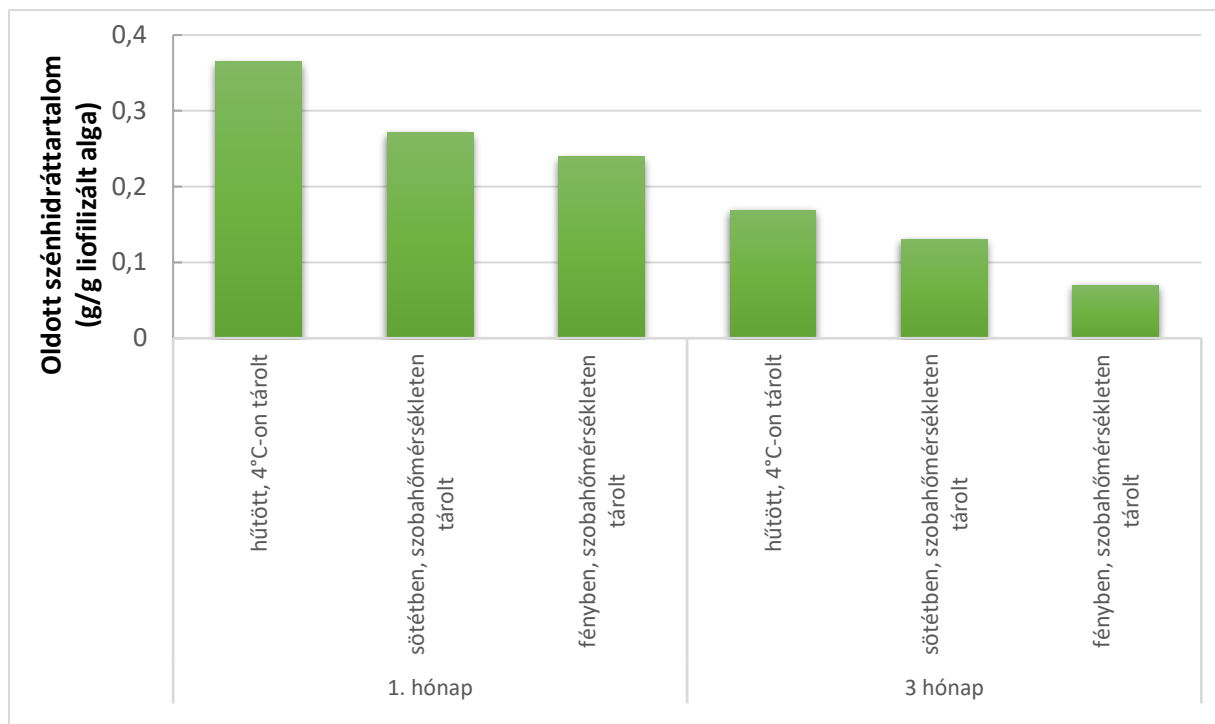
7. táblázat: Az ultrahangos kezelés időtartamának és a kezelés sorrendjének hatása

Kétlépéses sejtfeltérési technikák	Oldott szénhidráttartalom (g/g liofilizált alga)
Ultrahangos kezelés (15 perc, jég ágyon) és enzimes kezelés (3 óra, 20°C)	0,12
Ultrahangos kezelés (30 perc, jég ágyon) és enzimes kezelés (3 óra, 20°C)	0,14
Ultrahangos kezelés (45 perc, jég ágyon) és enzimes kezelés (3 óra, 20°C)	0,27
Enzimes kezelés (3 óra, 20°C) és ultrahangos kezelés (45 perc, jég ágyon)	0,4

A *Scenedesmus*, a *Chlorella*, a *Dunaliella*, a *Chlamydomonas*, a *Spirulina* algafajok igen magas intracelluláris szénhidráttartalommal rendelkezhetnek, a keményítő tartalom akár a sejtek szárazanyagtartalmának 50 %-át is elérheti (Hirano *et al.* 1997). Zhao és munkatársai (2013) liofilizált *Chlorella* sp. ATCC 14854 mikroalga intracelluláris szénhidráttartalmának kinyerési hatékonyságát három sejtfeltérési technikánál: az oldószeres extrakciónál, az üveggyöngyökkel töltött fluidizált ágyreaktorban és ultrahangos kezelés során követték nyomon. Eredményesebb szénhidrát hozamot szintén az ultrahangos kezelés (kemikáliák nélkül) mutatott. Az ultrahang erősségének, az extrakciós időnek (esetükben 80 perc) és az az algabiomassza mennyiségének optimalizálásával az oldatba vitt szénhidrátok mennyisége 0,36 g/g körül alakult.

5.2.1.1 Szénhidráttartalom alakulása tárolás során

A tárolási kísérletek során arra kerestem a választ, hogy az eltérő környezeti feltételek mellett tárolt liofilizátumok esetén a sejtfeltérás során oldatba vihető szénhidrátok mennyisége miként alakul. Az alábbi 11. ábra szemlélteti a tárolás hatását. A kísérlet során a BG-11 tápoldatban tenyésztett (56. nap) és liofilizált mintákat használtam. A tárolt liofilizátumok feltérása kétlépéses úton, enzimes kezeléssel és azt követő ultrahangos kezeléssel történt (45 perc). A felülűszóban mért szénhidráttartalom minden esetben csökkent, azonban annak mértékében a tárolási technikák eltéréseket mutattak.



11. ábra: Az intracelluláris szénhidráttartalom alakulása a tárolás során

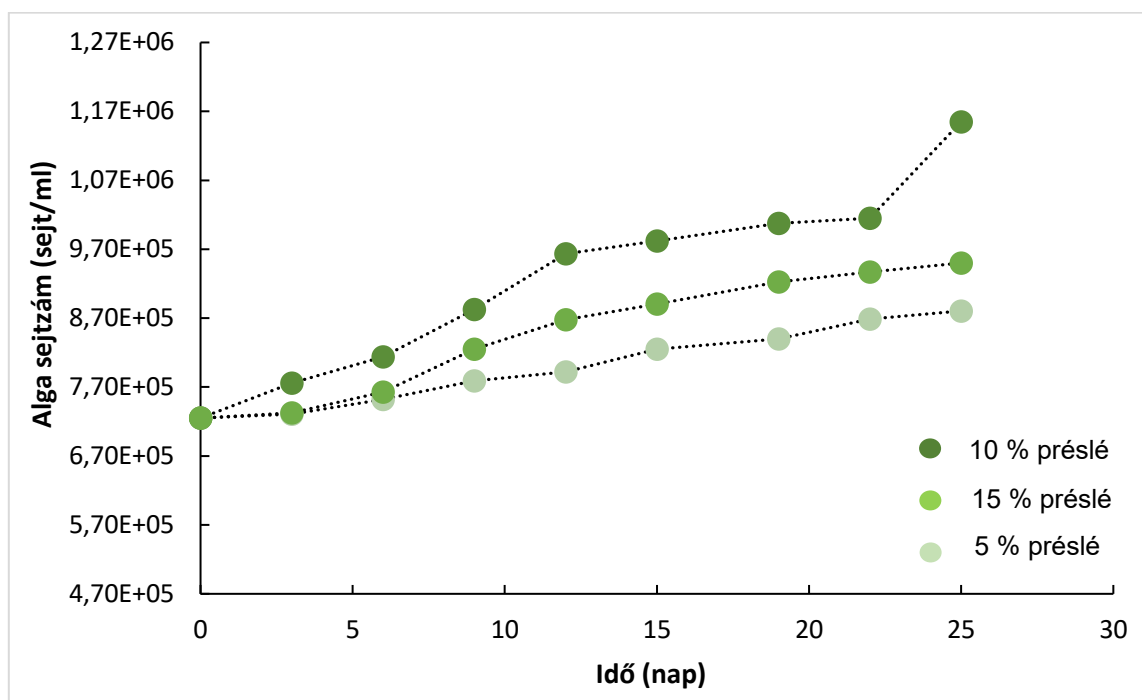
A hűtőben tárolt mintáknál 3 hónap alatt több mint a felére csökkent a kinyert szénhidrátok mennyisége (0,17 g/g), míg a fényben, szobahőmérsékleten tárolt mintáknál 0,1 g/g alá esett.

5.2.2 Szerves természetű növényi tápoldatok hatása

A továbbiakban a *Scenedesmus rubescens* izolátum tenyésztetőséget 5 %-os, 10 %-os és 15 %-os növényi présleiben követtem nyomon. A tápoldat a szerves természetéből adódóan hajlamosabb a befertőződésre. A kockázat csökkentése érdekében természetes gátlószerként a NaCl hatását 1 g/l, 5 g/l, 10 g/l és 15 g/l koncentrációban teszteltem 10 %-os növényi présleiben. A 25 napon át tartó tenyésztéseknél befertőződést már nem tapasztaltam, azonban 5 g/l feletti NaCl koncentráció az alga szaporodására is gátló hatást fejtett ki. A tapasztalatok alapján, a továbbiakban 5 g/l NaCl jelenlétében indítottam el a tenyésztési kísérleteket.

Az alábbi 12. ábra a növényi présleiben az alga sejtszám alakulását szemlélteti. Nagyobb sejtszaporulatot a 10 %-os növényi tápoldatban értem el, ahol a beoltási $7,25 \times 10^5$ sejt/ml érték a tenyésztés során $1,16 \times 10^6$ sejt/ml értékre nőtt. Látható, hogy a szerves természetű BG-11 tápoldatban mutatott sejtkoncentrációt nem sikerült elérni és meghaladni. Lényegesen lassabb folyamatnak bizonyult az algabiomassza termelése. Az algasejteknek több időt igényelt a

környezeti feltételekhez, szerves tápanyagokhoz történő alkalmazkodás. A tápoldatok kémhatása alkalikus tartományban mozgott, pH 7 értékről pH 10-11-re nőtt a tenyésztés során.



12. ábra: A növényi présle-alapú tápoldatban az alga sejtszaporulat alakulása

Az 8. táblázatban a szaporodáskinetikai jellemzők is jól mutatják a szerves tápoldat koncentrációjának hatását. Az alga fajlagos szaporodási sebessége jelentősen csökkent, 0,008-0,023 1/nap között alakult, míg a sejtszaporulat kétszerezéséhez szükséges idő az 5-10 %-os présle esetén több mint 10-szeresére, sőt a 15 %-os préselnél közel 30-szorosára is emelkedett.

8. táblázat: A növényalapú szerves tápoldatok szaporodáskinetikai jellemzői

5 %-os növényi tápoldat		10 %-os növényi tápoldat		15 %-os növényi tápoldat	
μ	t_{gen}	μ	t_{gen}	μ	t_{gen}
0,008 1/nap	86,38 nap	0,023 1/nap	29,52 nap	0,016 1/nap	43,35 nap

A liofilizált algabiomassza kétlépéses sejtfeltárásának eredményeként, a 10 %-os növényi tápoldatban történő tenyésztés hatására az intracelluláris szénhidráttartalom meghaladta a 0,4 g/g értéket (0,45 g/g) szintet, ami a szerves BG-11 tápoldatban tenyésztett és liofilizált alga esetén kinyert szénhidráttartalomnál nagyobbak bizonyult. Az 5 %-os

préslében ennél kevesebb felszabadított szénhidrátot mértem, csupán 0,13 g/g volt, míg a 15 %-os préslében 0,33 g/g körül alakult a szénhidrát tartalom.

5.3 Léptéknövelt algatenyésztés és etanolfermentáció

A harmadik generációs etanolfermentáció tesztelése érdekében léptéknövelt tenyésztést indítottam el BG-11 tápoldatban és 10 %-os növényi préslében. A présle 5 g/l koncentrációban NaCl-ot is tartalmazott. A beoltási alga sejtszám $3,5 \times 10^6$ sejt/ml volt. A 3 literes levegőztetett reaktorokban a tenyésztés 25 napon át tartott, amely során csak a BG-11 esetén értem el azt a nedves algabiomassza tömeget (6,9 g), amelynek feltárását és enzimes cukrosítását követően etanol konverziót tudtam indítani. Az elválasztott algabiomasszát ezesetben nem liofilizáltam, a sejtfeltárás hatékonyságát nedves biomasszán, kétlépéses technikával végeztem el, amelynek eredményeként az oldatba 0,15 g/100 ml szénhidrát került. Ebből adódóan látható, hogy a liofilizált alga mintáknál kedvezőbb sejtfeltárás érhető el. Az oldatba vitt szénhidrátok cukrosítása során az erjeszthető cukrok (glükóz, maltóz) össz mennyisége 0,08 g/100 ml volt. Az etanolfermentáció 24-48 órán át tartott, a cukrokat az etanologén élesztő, a *Saccharomyces cerevisiae* igen gyorsan hasznosította. Az etanol konverzió hatékonysága 75 % volt. Chandra és munkatársai (2020) a *Scenedesmus acuminatusa* algabiomasszán történő etanolfermentáció során csupán 30-44 % körüli konverziós hatékonyságot értek el.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

A munkám során a mikroalga biomassza tenyésztetőségét és az intracelluláris szénhidráttartalom alakulását követtem nyomon különböző összetételű alga tápoldatokban laboratóriumi körülmények között. Az intracelluláris szénhidráttartalom potenciális alapanyagforrását adhatja az etanol-fermentációnak, ezáltal a harmadik generációs bioetanol előállítás technológiai fejlesztésének. Az értékes szénhidrátok kinyerése azonban sejtfeltárást igényel. Ma már számos sejtfeltárási technika ismert, amely a sejtfal összetételétől függően eltérő hatékonysággal alkalmazhatók. Ezért a kísérleteim első szakaszában BG-11 tápoldatban tenyésztett és liofilizált *Scenedesmus rubescens* algabiomassza hatásos sejtfeltárási lehetőségeit térképeztem fel. A környezetkímélő sejtfeltárások során nem keletkeznek káros melléktermékek, így a sejtfeltárási utáni tisztítási és kezelési lépések költségei lényegesen csökkenthetők. Az egylépéses és kétlépéses sejtfeltárási módszerek körében két esetben: az ultrahanggal (15 perc, jég ágyban) és a hővel (121°C, 15 perc) kezelt liofilizátum enzimes bontása (Lallzyme EX-V, 3 óra, 20°C) fejtett ki nagyobb hatást, ezen esetekben a szénhidráttartalom 0,15-0,16 g/g körül alakult. Az ultrahangos kezelés hatása lényegesen javult, amennyiben a kezelés időtartamát 15 percről 30 és 45 percre növeltem, ekkor a szénhidráttartalom az enzimes sejtfalbontást követően elérte a 0,27 g/g szénhidrát hozamot. Ezt lényegesen fokozta a lépések fordított sorrendben történő alkalmazása, amely 0,4 g/g oldott szénhidrátot eredményezett. A munkám második részében a szerves tápoldatok hatását a növényi alapú szerves tápoldatokban történő alga tenyésztés és a liofilizált algabiomasszából kinyerhető szénhidrátok mennyiségével hasonlítottam össze. Nagyobb sejtszaporulatot a szerves természetű BG-11 tápoldat eredményezett és a szaporodáskinetikai jellemzők alapján is a BG-11 tápoldatban mutatott kedvezőbb fajlagos szaporodási sebességet (0,248 1/nap) és generációs időt (2,47 nap). A liofilizált algabiomassza sejtfeltárása során az oldott szénhidrát hozam 0,31 g/g volt. Ennél magasabb értéket a 10 %-os növényi présleiben mértem, ami 0,45 g/g volt. A munkám harmadik részében az etanol-fermentáció laboratóriumi modellezéséhez léptéknövelt algatenyésztést végeztem BG-11 tápoldatban, majd az elválasztott és nedvesen feltárt algabiomasszából a kinyert szénhidrátokat enzimes úton cukrosítottam. Az alga-alapú fermentációs közegben az etanologén *Saccharomyces cerevisiae* a rendelkezésre álló erjeszthető cukrok (glükóz, maltóz) 75 %-át etanollá konvertálta.

Az elért eredmények megfelelő alapot adnak egy nagyobb léptékű mikroalga-alapú etanol-fermentáció kidolgozásához, ahol alternatív alapanyagként az ellátási lánc mentén

keletkezett, nagy mennyiségben és viszonylag olcsón elérhető gyümölcs- és zöldség maradványok szolgálhatnak. Az intracelluláris szénhidrátok kinyerésének növelése érdekében a továbbiakban célszerű lenne a környezetbarátabb sejtfeltárási módszerek mélyrehatóbb vizsgálata, és a tenyésztési körülményeknek, elsősorban a tenyészet oxigénigényének és különböző megvilágítási módszereknek, valamint más termelő törzseknek a feltérképezése. A technológia gazdaságosságának fényében érdemes a szakaszos tenyésztést követően a visszamaradt, még értékes komponenseket tartalmazó növényi tápoldat ismételt felhasználási lehetőségének megismerése.

7 IRODALOMJEGYZÉK

- Abdullah, B., Shokravi, Z., Ismail, S., Kassim, K.A., Mahmood, A.N., Aziz, M.M.A. 2019. Fourth generation biofuel: A review on risks and mitigation strategies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 107:37–50. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.02.018>.
- Ananthi, V., Raja, R., Carvalho, I.S., Brindhadevi, K., Pugazhendhi, A., Arun, A. 2021. A realistic scenario on microalgae based biodiesel production: Third generation biofuel. *Fuel* 284:118965. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118965>.
- Ang, T.Z., Salem, M., Kamarol, M., Das, H.S., Nazari, M.A., Prabakaran, N. 2022. A comprehensive study of renewable energy sources: Classifications, challenges and suggestions. *Energy Strategy Reviews* 43:100939. <https://doi.org/10.1016/j.esr.2022.100939>.
- Barros, A.I., Gonçalves, A.L., Simões, M., Pires, J.C.M. 2015. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 41:1489–1500. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.09.037>.
- Baudelet, P.H., Ricochon, G., Linder, M., Muniglia, L. 2017. A new insight into cell walls of chlorophyta. *Algal Research* 25:333–71. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.008>.
- Bera, Tanumoy, Kanika Inglett, és Ann Wilkie. 2020. „Biofuel: Concepts and Considerations”. *EDIS* 2020. doi: 10.32473/edis-ss688-2020.
- Bhatia, S.K., Mehariya, S., Kumar, M., Pugazhendhi, A., Awasthi, M.K., Atabani, A.E., 2021a. Wastewater based microalgal biorefinery for bioenergy production: progress and challenges. *Science of The Total Environment* 751:141599. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141599>.
- Brennan, L., Owende, P. 2010. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14 (2): 557–77. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>.
- Callegari, A., Bolognesi, S., Cecconet, D., Capodaglio, A.G. 2020. Production technologies, current role, and future prospects of biofuels feedstocks: A state-of-the-art review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 50 (4): 384–436. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1629801>.

- Cañedo, J. C. G., Lizárraga, G.L.L. 2016. Considerations for photobioreactor design and operation for mass cultivation of microalgae. *Algae - Organisms for Imminent Biotechnology*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/63069>.
- Chen, C.Y., Yeh, K.L., Aisyah, R., Lee, D.J, Chang, J.S. 2011. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, Special Issue: Biofuels - II: Algal Biofuels and Microbial Fuel Cells, 102 (1): 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>.
- Chen, J., Zhang, B., Luo, L., Zhang, F., Yi, Y., Shan, Y., Liu, B., Zhou, Y., Wang, X., Lü. X. 2021. A review on recycling techniques for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 149:111370. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111370>.
- Chowdhury, H., Loganathan, B. 2019. Third-generation biofuels from microalgae: A review. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, Bioresources, Biomass, Biofuels and Bioenergies, 20: 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.09.003>.
- Dahunsi, S. O. 2019. Mechanical pretreatment of lignocelluloses for enhanced biogas production: methane yield prediction from biomass structural components. *Bioresource Technology* 280: 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.006>.
- Demirbas, A. 2009. Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. *Applied Energy*, Bio-fuels in Asia, 86: S108–17. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2009.04.036>.
- Dragone, G., Fernandes, B., Vicente, A.A, Teixeira, J. 2010. Third generation biofuels from microalgae, 12.
- DuBois. M, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, és F. Smith. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances *Analytical Chemistry* 1956 28 (3), 350-356 DOI: 10.1021/ac60111a017
- Dutta, K., Daverey A., Lin., J.G. 2014. „Evolution retrospective for alternative fuels: first to fourth generation. *Renewable Energy* 69: 114–22. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.02.044>.
- Egbo, M., Okoani, A., Okoh. I. 2018. Photobioreactors for microalgae cultivation: An Overview
- Enamala, M.K., Dixit, R., Tangellapally, A., Singh, M., Dinakarrao, S.M.P, Chavali, M. Pamanji, S.R., Ashokkumar, V., Kadier, A., Chandrasekhar, K. 2020. Photosynthetic microorganisms (algae) mediated bioelectricity generation in microbial fuel cell:

- concise review. *Environmental Technology & Innovation* 19: 100959. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100959>.
- Faris Silva, C.E., Bertucco, A. 2016. Bioethanol from microalgae and cyanobacteria: A review and technological outlook. *Process Biochemistry*, Bioenergies : Present & Prospects, 51 (11): 1833–42. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.02.016>.
- Ferreira Mota, G., de Sousa, I.G., Barros de Oliveira, A.B., Cavalcante, A.L.G., da Silva Moreira, C., Cavalcante, F.T.T, da Silva Souza, J.E. 2022a. Biodiesel Production from microalgae using lipase-based catalysts: Current challenges and prospects. *Algal Research* 62: 102616. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102616>.
- Günerken, E., E. D'Hondt, M. H. M. Eppink, L. Garcia-Gonzalez, K. Elst, és R. H. Wijffels. 2015. „Cell Disruption for Microalgae Biorefineries”. *Biotechnology Advances* 33 (2): 243–60. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008>.
- Huang, Q., Jiang, F., Wang, L., Yang, C. 2017. Design of photobioreactors for mass cultivation of photosynthetic organisms. *Engineering* 3 (3): 318–29. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.03.020>.
- Jothibas, K., Muniraj, I., Jayakumar, T., Ray, B., Dhar, D. W., Karthikeyan, S., Rakesh, S. 2022. Impact of microalgal cell wall biology on downstream processing and nutrient removal for fuels and value-added products. *Biochemical Engineering Journal* 187: 108642. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108642>.
- Kurniawan, S.B., Azmi, A., Imron, M.F., Abdullah, S.R.T., Othman, A.R., Hasan., H.A. 2022. Potential of microalgae cultivation using nutrient-rich wastewater and harvesting performance by biocoagulants/bioflocculants: Mechanism, multi-conversion of biomass into valuable products, and future challenges. *Journal of Cleaner Production* 365:132806. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.132806>.
- Levasseur, W., Perré, P., Pozzobon, V. 2020. A Review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology Advances* 41: 107545. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107545>.
- Liu, Y., Liu, X., Cui, Y., Yuan, W. 2022. Ultrasound for microalgal cell disruption and product extraction: A review. *Ultrasonics Sonochemistry* 87: 106054. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.106054>.
- Mathimani, T., Mallick, N. 2018. A comprehensive review on harvesting of microalgae for biodiesel – key challenges and future directions. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 91: 1103–20. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.083>.

- Menegazzo, M.L., Fonseca, G.G. 2019. Biomass recovery and lipid extraction processes for microalgae biofuels production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 107: 87–107. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.01.064>.
- Perea-Moreno, M.A., Samerón-Manzano, E., Perea-Moreno, A.J. 2019. Biomass as renewable energy: worldwide research trends. *Sustainability* 11 (3): 863. <https://doi.org/10.3390/su11030863>.
- Petrier, C., Yi, J., Lamy, M.F. 1998. Ultrasound and environment: sonochemical destruction of chloroaromatic derivatives. *Environmental Science & Technology* 32 (9): 1316–18. <https://doi.org/10.1021/es970662x>.
- Pragya, N., Pandey, K.K, Sahoo, P.K. 2013. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production technologies from microalgae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 24: 159–71. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.03.034>.
- Russell, C., Rodriguez, C., Yaseen, M. 2022. Microalgae for lipid production: cultivation, extraction & detection. *Algal Research* 66: 102765. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102765>.
- Russell, C., Rodriguez, C., Yaseen, M. 2022. High-value biochemical products & applications of freshwater eukaryotic microalgae. *Science of The Total Environment* 809: 151111. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151111>.
- Saleem, M. 2022. Possibility of utilizing agriculture biomass as a renewable and sustainable future energy source. *Heliyon* 8 (2): e08905. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08905>.
- Shao, Y., Weimin, G., Qiu, Y., Wang, S., Peng, Y., Zhu, Y.M.M., Zhuang, S. 2020. Lipids monitoring in *Scenedesmus obliquus* based on terahertz technology. *Biotechnology for Biofuels* 13 (1): 161. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01801-0>.
- Sims, R.E.H., Mabey, W., Saddler, J.N. Taylor, M. 2010. An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology* 101 (6): 1570–80. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.046>.
- Singh, R.N., Sharma, S. 2012. Development of suitable photobioreactor for algae production – a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16 (4): 2347–53. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.026>.
- Sirohi, R., Pandey, A.K., Ranganathan, P., Singh, S., Udayan, A., Awasthi, M.K., Hoang, A.T., Chilakamarry, C.R., Kim, S.M., Sim, S.J. 2022. Design and applications of

- photobioreactors - a review. *Bioresource Technology* 349: 126858. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126858>.
- Tandon, P., Jin, Q. 2017. Microalgae culture enhancement through key microbial approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 80: 1089–99. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.260>.
- Tena, O., Guillermo, J. 2019. Material utilization of algal carbohydrates: focus on analytical methods and enzymatic processing. Technische Universität München. <https://mediatum.ub.tum.de/1506599>.
- Touloupakis, E., Faraloni, C., Carlozzi, P. 2022. An outline of photosynthetic microorganism growth inside closed photobioreactor designs. *Bioresource Technology Reports* 18: 101066. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2022.101066>.
- Tursi, A. 2019. „A review on biomass: Importance, chemistry, classification, and conversion”. *Biofuel Research Journal* 6 (június): 962–79. <https://doi.org/10.18331/BRJ2019.6.2.3>.
- Ugwu, C. U., H. Aoyagi, és H. Uchiyama. 2008. „Photobioreactors for Mass Cultivation of Algae”. *Bioresource Technology* 99 (10): 4021–28. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.046>.
- Vale, M. A., Ferreira, A., Pires, J.C.M., Gonçalves, A.L. 2020. Chapter 17 - CO₂ capture using microalgae. In: *Advances in Carbon Capture* (eds) Rahimpour, M.R., Farsi, M. Makarem, M.A. 381–405. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819657-1.00017-7>.
- Velazquez-Lucio, J., Rodríguez-Jasso, R.M., Colla, L.M., Sáenz-Galindo, A., Cervantes-Cisneros, D.E., Aguilar, C.N., Fernandes, B.D., Ruiz, H.A.. 2018. Microalgal biomass pretreatment for bioethanol production: a review. *Biofuel Research Journal* 5 (1): 780–91. <https://doi.org/10.18331/BRJ2018.5.1.5>.
- Wang, B., Lan, C.Q., Horsman, M. 2012. Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses. *Biotechnology Advances*, Biorefining: Thermochemical and Enzymatic Biomass Conversion, 30 (4): 904–12. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.019>.
- Xu, Y., Zhang, M. Roozeboom, K., Wang, D. 2018. Integrated bioethanol production to boost low-concentrated cellulosic ethanol without sacrificing ethanol yield. *Bioresource Technology* 250: 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.056>.
- Yaqoob, H., Teoh, Y.H., Din, Z.U., Sabah, N.U., Jamil, M.A., Mujtaba, M. A., Abid, A. 2021. The potential of sustainable biogas production from biomass waste for power generation

- in Pakistan. *Journal of Cleaner Production* 307: 127250. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127250>.
- Yin, Z., Zhu, L., Li, S., Hu, T., Chu, R., Mo, F., Hu, D., Liu, C., Li, B. 2020. A comprehensive review on cultivation and harvesting of microalgae for biodiesel production: Environmental pollution control and future directions. *Bioresource Technology* 301: 122804. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122804>.
- Kannah, Y., Kavitha, R.S., Preethi, O., Karthikeyan, P., Gopalakrishnan, K., N. Vo. Dai-Viet, és Banu, J.R. 2021. „Techno-Economic Assessment of Various Hydrogen Production Methods – A Review”. *Bioresource Technology* 319: 124175. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124175>.
- Xu, Y., Zhang, M. Roozeboom, K., Wang, D. 2018. Integrated bioethanol production to boost low-concentrated cellulosic ethanol without sacrificing ethanol yield. *Bioresource Technology* 250: 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.056>.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Kohári-Farkas Csilla egyetemi adjunktusnak, hogy szakmai támogatásával iránymutatást és rengeteg segítséget nyújtott a kutatómunkámhoz, értékes és hasznos tanácsaival a konzultációk során segítette a szakdolgozatom elkészítését.

Köszönettel tartozom továbbá a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék dolgozóinak és vezetőségének, hogy kutatási tevékenységemhez biztosították a laboratórium és eszközök, anyagok használatát, és mindig támogató segítséget nyújtottak.