

37. OTDK Biológia Szekció

Fenntartható hidrogéntermelés megvalósítása váltakozó
fényintenzitáson *pgr5* mutáns *Chlamydomonas* zöldalgával

Dabosi Zsombor

Biológia MSc 2. félév

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar

Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Növénybiológiai Intézet

TÉMAVEZETŐK:

Dr. Nagy Valéria – tudományos főmunkatárs

Dr. Tóth Szilvia Zita – tudományos tanácsadó

Szeged

2024

Tartalmi összefoglaló

Chlamydomonas reinhardtii egysejtű zöldalga által termelt hidrogén egy ígéretes alternatív energiaforrás. A természetben, fényszegény körülmények között a zöldalgák gyakran kerülnek anoxiás állapotba, melynek következtében a hidrogenáz enzimük aktiválódik, majd megvilágítás hatására megindul a hidrogéntermelés. Ez a folyamat normál körülmények között néhány percig tart, ugyanis fény hatására a Calvin-Benson ciklus (széndioxid-fixáció) aktiválódik, majd oxigén is képződik, ami gátolja a hidrogenáz enzim kifejeződését és aktivitását.

A kutatócsoport által korábban kidolgozott rendszernek megfelelően, a hatékony hidrogéntermelés érdekében az algakultúrákat széndioxid hiányában és acetátmentes tápoldatban tartjuk, annak érdekében, hogy a Calvin-Benson ciklus, ami a hidrogenázzal verseng az elektronokért, inaktív maradjon. A kultúrákat légmentesen lezárható, vízszintesen elhelyezett fotobioreaktorba (PBR üveg) helyezzük, amelyben az algakultúra vékony rétegben helyezkedik el, ezáltal a sejtek hatékonyabban tudják hasznosítani a fényt.

E munka keretében sikerült kifejlesztenünk és a PBR üveghez csatlakoztatni egy teljesen automatizált rendszert, amellyel programozhatóvá vált a fotobioreaktor légteréből történő gázmintavétel és a légtér cseréje. Emellett egy programozható LED fénypanelnek köszönhetően lehetővé vált az alगतörzsek váltakozó és állandó fényintenzitással történő megvilágítása. E rendszerben hasonlítottuk össze a vad típusú (CC-124) kultúrák és az I. fotokémiai rendszer ciklikus elektrontranszportjában érintett *pgr5* mutáns hidrogéntermelését. A ciklikus elektrontranszport a hidrogenáz enzimmel verseng az elektronokért, ezért azt vártuk, hogy a PGR5 fehérje hiányában a hidrogéntermelés fokozódik.

Váltakozó fényintenzitáson kb. 200 %-kal, míg állandó fényben 250%-kal több hidrogént termelt a *pgr5* mutáns, mint a CC-124 törzs, öt napos időtartam alatt. Eredményeink jelentős előrelépést jelenthetnek a zöldalgák hidrogéntermelésének megújuló energiaforrásként történő hasznosításában.

Kulcsszavak: hidrogéntermelés, fotobioreaktor, *Chlamydomonas*, fotoautotróf, PGR5

Tartalomjegyzék

Tartalmi összefoglaló	1
1. Bevezetés	3
1.1. Hidrogén, mint energiahordozó.....	3
1.2. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> hidrogéntermelése	4
1.3. Hidrogéntermelés indukciója	7
2. Célkitűzés	9
3. Anyagok és módszerek.....	10
3.1. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> törzsek nevelése és fenntartása.....	10
3.2. Mérési módszerek	12
3.2.1. Klorofilltartalom meghatározása	12
3.2.2. Hidrogén és oxigén mennyiségének meghatározása gázkromatográfia segítségével	12
3.2.3. Statisztikai elemzés	13
3.2.4. <i>In vitro</i> hidrogenáz aktivitás meghatározása	13
3.2.5. Klorofill <i>a</i> fluoreszencia mérése	13
3.2.6. Western blot analízis	13
4. Eredmények	15
4.1. Gázkromatográfhoz kapcsolható automata mintavevő fejlesztése és tesztelése	15
4.1.1. Automata mintavevő műszaki felépítése és műszerezettsége	15
4.1.2. Algae Grower Sampler – vezérlő program	18
4.2. CC-124 és <i>pgr5</i> mutáns törzs hidrogéntermelésének összehasonlítása	19
4.3. A váltakozó fényviszonyok hatása a fotoszintetikus apparátusra és a HydA enzimre .	23
5. Következtetések	28
6. Köszönetnyilvánítás	29
7. Irodalomjegyzék.....	30
8. Nyilatkozat	34

1. Bevezetés

1.1. Hidrogén, mint energiahordozó

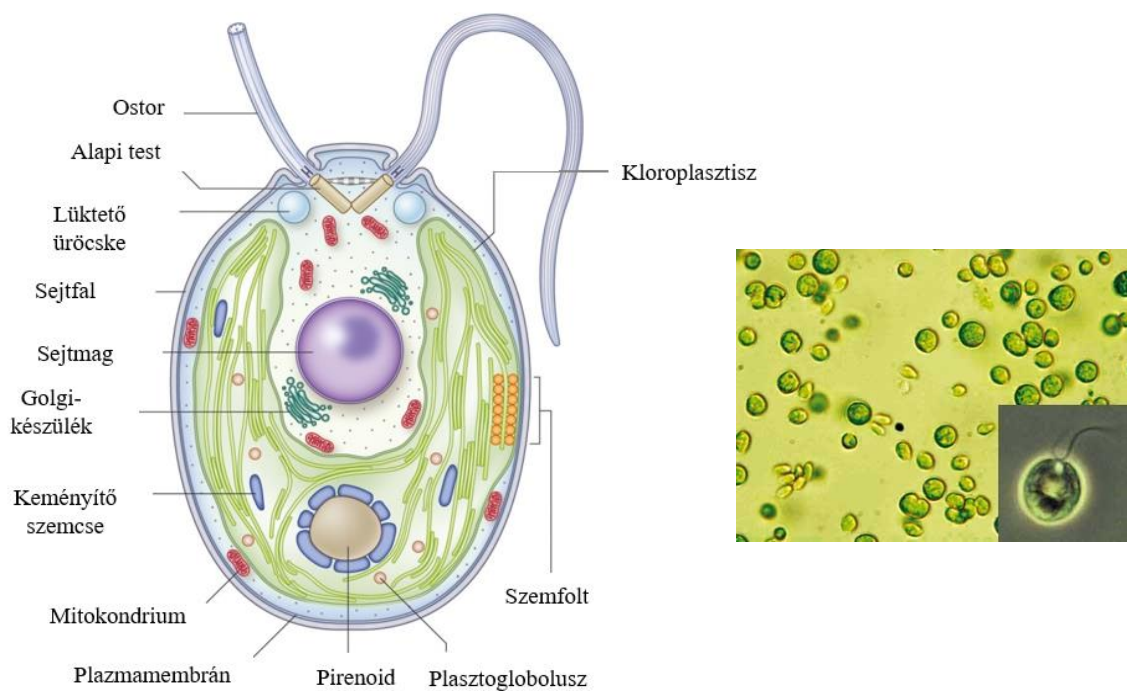
A fosszilis tüzelőanyagok, mint például a szén, kőolaj, földgáz a leggyakrabban használt nem megújuló energiaforrások közé tartozik. Keletkezésük évmilliók alatt ment végbe elpusztult állati és növényi maradványokból a Föld mélyebb rétegeiben. Azonban a hatalmas népességnövekedés következtében megsokszorozódott energiaigény miatt a fosszilis energiahordozók hosszú távon nem fenntarthatóak, mivel ezek az energiaforrások véges mennyiségben állnak rendelkezésre (Crabtree és mtsai., 2004, Abdalla és mtsai., 2018). Hátrányt jelent továbbá, hogy ezek a készletek csak a Föld bizonyos részein találhatóak meg, és csak bizonyos országok rendelkeznek vele (Crabtree és mtsai., 2004; Yilmaz és mtsai., 2012), aminek eredményeként nagy kihívást jelent biztosítani a Föld többi országának a folyamatos és megbízható energiaellátását. A globális energiahíányon túl a fosszilis tüzelőanyagok elégetése, kitermelése, feldolgozása és szállítása jelentős széndioxid kibocsátással jár, ami az üvegházhatáson keresztül befolyásolja éghajlatunkat, illetve egészségünkre is nagy veszélyt jelentenek (Crabtree és mtsai., 2004). Ezért korunk egyik legfontosabb feladata az alternatív vagy megújuló energiaforrások használatának megalapozása.

A hidrogéngáz egy tiszta energiahordozó, amelynek elégetése során nem keletkezik széndioxid, csak vízgőz. A dízel üzemanyag és a benzin helyettesíthető hidrogénnel, de nagy mennyiségben használják kőolajfinomításhoz, nitrogén-műtrágyák gyártásához, élelmiszerek és kozmetikumok előállításához (telítetlen kötéseket tartalmazó zsírok, olajok és cukoralkoholok gyártásához; élelmiszeripari adalékanyag E949), valamint a gépiparban (pl. hűtőközegként).

Az emberiség által felhasznált hidrogén kb. 99%-át azonban jelenleg fosszilis tüzelőanyagokból állítják elő, amely óriási széndioxid kibocsátással jár, ezért szükség van megújuló energiaforrásokon alapuló hidrogéntermelési módszerek kidolgozására. Ezen a területen az utóbbi években jelentős előrelépések történtek; az egyik legígéretesebb módszer a zöldalgák fotobiológiai hidrogéntermelése, melynek elméleti hatékonysága igen kedvező, az algák nevelése nem igényel termőterületet és a megtermelt biomassa is felhasználható.

1.2. *Chlamydomonas reinhardtii* hidrogéntermelése

A kb. 5-10 μm nagyságú, talajban és vízben is előforduló *Chlamydomonas reinhardtii* egysejtű zöldalga (1. ábra) az egyik leggyakrabban használt modellszervezet. Az egyszerű sejtfelépítése és viszonylag kis genomja lehetővé teszi a genetikai módosítását. A zöldalgák fotoautotróf élőlények, fényenergia felhasználásával széndioxidból és vízből szerves anyagokat állítanak elő a fotoszintézis során. Sötétben, heterotróf módon is életben tudnak maradni, ha biztosítunk számukra szerves szénforrást, például acetátot (Spreitzer és Mets, 1981).



1. ábra: *Chlamydomonas reinhardtii* sejt felépítése (Sasso és mtsai. (2018) nyomán). A sejten két darab csilló helyezkedik el, amelyek 9+2 mikrotubulus szerkezettel rendelkeznek (Harris, 2001), ami az eukarióták mozgását biztosító csillókra jellemző (Dutcher és O'Toole, 2016). A sejt legnagyobb részét az U alakú kloroplasztisz teszi ki. A sejtmembrán és a kloroplasztisz határán helyezkedik el a szemfolt, ami a sejtek fototaxisát biztosítja. A sejtben még megtalálható a sejtmag, mitokondriumok, lükettő üröcske, pirenoid, és a Golgi-testek.

A hidrogenázok fémtartalmú enzimek, melyek a hidrogén reverzibilis oxidációját és redukcióját katalizálják (Mulder és mtsai., 2011). Az aktív centrumukban megtalálható fématomok szerint három csoportot különböztetünk meg: [Ni-Fe]-, [FeFe]- és a vas-kén centrumot nem tartalmazó [Fe]-hidrogenázokat (Happe és Kaminski, 2002).

Bizonyos zöldalgák, mint a *C. reinhardtii* is, képesek arra, hogy a fényenergia-hasznosításhoz kapcsolatosan, azaz fotoszintetikus működésük során, hidrogéngázt termeljenek a hidrogenáz enzimük segítségével. A *C. reinhardtii*-ban kétféle [FeFe]-típusú hidrogenáz, a HydA1 és a HydA2 található meg (Gonzalez-Ballester és mtsai., 2015). A hidrogéntermelés nagy részéért fényben a HydA1 felelős, míg a HydA2 a hidrogéntermelésnek csak kb. a 25%-át teszi ki (Meuser és mtsai., 2012).

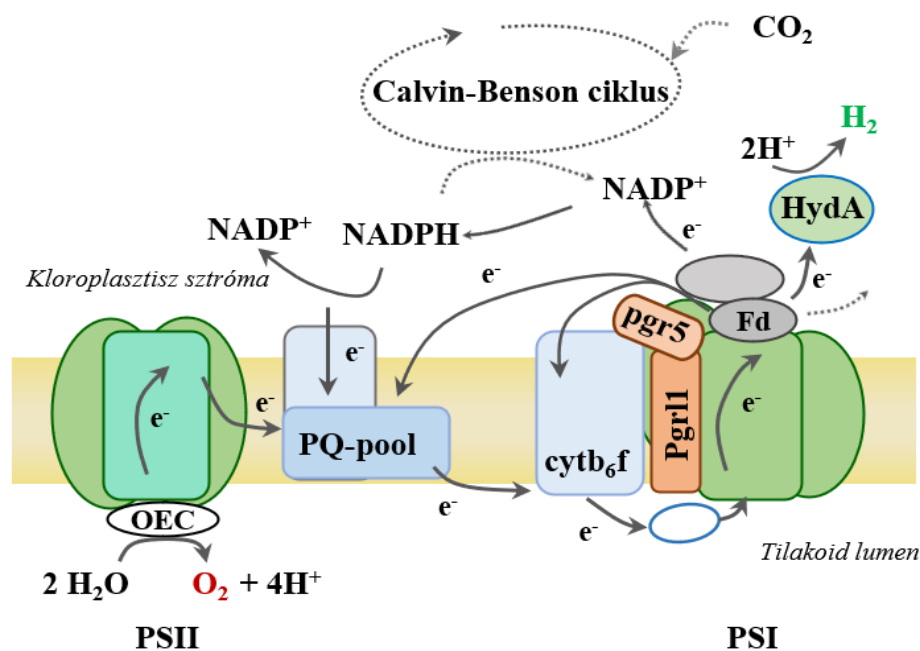
A *C. reinhardtii*-ban a hidrogenázok az első fotokémiai rendszer (PSI) akceptor oldalán helyezkednek el (2. ábra) és a működésükhöz szükséges elektronokat közvetlenül a ferredoxintól kapják. Az elektronok a hidrogenáz enzimhez három útvonalon keresztül érkezhetnek:

1. A második fotokémiai rendszertől (PSII)-függő útvonal, ahol az elektronok a vízbontásból keletkeznek és a PSII-n a citokróm *b₆f*-en és a PSI-en át vezető lineáris elektrontranszporton keresztül jutnak el a hidrogenázhoz.

2. A PSII-független útvonalon a hidrogenáz enzim a keményítőbontásból kapja a működéséhez szükséges elektronokat, amelyek a plasztokinon-pool-on keresztül csatlakoznak a lineáris elektrontranszportporthoz.

3. A sötétben, anaerob módon történő fermentációs útvonal, ilyenkor a glikolízisben keletkező piruvát a piruvát-oxidoreduktáz segítségével acetil-Ko-A-vá alakul, miközben ferredoxin redukálódik, ahonnan az elektronok a hidrogenáz enzimre kerülnek.

A két utóbbi útvonal hidrogéntermelése jóval kisebb hatékonyságú, mint a PSII-függő útvonalé.



2. ábra: Fotoszintetikus elektrontranszportlánc (Tóth és Yacoby (2019) nyomán). OEC: vízbontó komplex, PSII: a második fotokémiai rendszer, PQ-pool: plasztokinon-pool, cytb_6f : citokróm b_6f , PSI, PSII: első, második fotokémiai rendszer, pgr5 és Pgr11 : proton grádiens regulátor fehérjék, Fd: ferredoxin, HydA: hidrogenáz

A zöldalgák hidrogéntermelése természetes körülmények között akkor következik be, amikor sötét periódus után hirtelen fény éri őket (Fouchard és mtsai., 2005). Ilyenkor a hidrogenáz enzim biztonsági szelepként működik, megvédi a fotoszintetikus elektrontranszport-láncot a túlzott redukciótól, azáltal, hogy a Calvin-Benson ciklus aktiválódásáig az elektronok hidrogéntermelésre fordítódnak (Godaux és mtsai., 2015). Azonban ez a folyamat a természetben csak rövid ideig, mindössze néhány percig tart, mert a Calvin-Benson ciklus aktiválódása után az elektronok széndioxid megkötésére fordítódnak, illetve megindul az oxigéntermelés. A hidrogenáz enzim rendkívül érzékeny az oxigénre, jelenlétében a hidrogéntermelés gátolt (Fouchard és mtsai., 2005). Ez egy igen jelentős probléma, ami nagymértékben korlátozza a gazdasági hasznosítás lehetőségét.

1.3. Hidrogéntermelés indukciója

A fotobiológiai hidrogéntermelést évtizedek óta vizsgálják, számos kutatás koncentrált az oxigénre kevésbé érzékeny hidrogenázok kifejlesztésére. Míg más kutatások pedig az oxigén légzés általi, vagy egyéb módon történő eliminálására irányulnak.

Hosszú ideig a zöldalgák hidrogéntermelésének indukálására a kénmegvonást használták (Melis és mtsai., 2000), amelynek következtében az oxigéntermelésért felelős PSII nagyrészt inaktiválódik és az így kialakuló anaerob körülmények között megindul a hidrogéntermelés. Azonban e módszernek számos élettani és gazdasági hátránya van, pl. a kénmegvonás jelentős energiaigénye, a kénmegvonás hatására a hidrogéntermeléshez nélkülözhetetlen fotszintetikus apparátus gyors leépülése, valamint ez a rendszer szerves szénforrásként acetátot igényel, amely szintén jelentős költségtényező. Ezen okokból kifolyólag, e módszer ipari hasznosítás szempontjából zsákutcának tekinthető. Mostanában azonban két jóval hatékonyabb és fenntartható hidrogéntermelési módszert fejlesztettek ki. Az egyik módszer lényege, hogy rövid fényimpulzusok sorozatát hosszabb sötétszakaszok szakítják meg, ezzel megakadályozva, hogy a Calvin-Benson ciklus aktiválódjon és oxigén termelődjön (Kosourov és mtsai., 2018). A másik módszer egyedisége abban rejlik, hogy a hidrogéntermelés széndioxid hiányában és acetátmentes tápoldatban történik, annak érdekében, hogy a Calvin-Benson ciklus - ami a hidrogenázzal verseng az elektronokért, inaktív maradjon. Ezen módszerrel kiváltott hidrogéntermelés hatékonysága jelentősen növelhető vas-só típusú oxigénabszorbens használatával, amely a hidrogenázok aktivitását és kifejeződését gátló oxigént eltávolítja a légtérből (Nagy és mtsai., 2018, 2021).

Az újonnan kifejlesztett módszerek előnye, hogy a megvilágítást követően az algakultúra hidrogéntermelése azonnal megindul és napokig fenntartható. A felhasznált redukáló erők nagyrésze a vízbontásból származik, ahonnan az elektronok lineáris elektrontranszport révén jutnak el a hidrogenázhoz. A termelt hidrogén mennyisége kb. kétszeres (Kosourov és mtsai., 2018) és négyszeres (Nagy és mtsai., 2018) a kénmegvonáshoz képest. Mivel teljesen fotoautotróf a rendszer, alacsonyabb lesz a bakteriális fertőzés veszélye a jövőbeli ipari alkalmazás során, illetve ez költséghatékonyság szempontjából is igen kedvező, azonban a megtermelt hidrogén mennyisége még jóval alatta van az ipar által elvárt szinthez képest. Az ipari szintű és gazdaságosan történő termeléshez maximalizálni kell egyrészt az algák hidrogéntermelésének hatékonyságát, illetve szükség van léptéknövelésre is, amit úgy tudunk elérni, hogy a rendszert automatizáljuk, és a méretét megnöveljük. Az is fontos

szempont, hogy az újonnan kialakított rendszernek üvegházban és szabadföldön is működni kell.

2. Célkitűzés

Munkám során célul tűztük ki:

1) Egy olyan automata berendezés megépítését, amely folyamatosan monitorozni tudja az alga törzsek hidrogén- és oxigéntermelését, szabályozott körülmények között. Ez egy fontos közbülső lépés az ipari szintű hidrogéntermelés megvalósítása felé.

2) Az általunk kifejlesztett, teljesen automata rendszerben összehasonlítani a vad típusú (CC-124) és a hidrogéntermelés szempontjából ígéretes ciklikus elektrontranszport mutáns (*pgr5*) *C. reinhardtii* törzsek hidrogéntermelését és fotoszintetikus apparátusának állapotát állandó ($550 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$) és váltakozó intenzitású fényben ($100\text{-}1000 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$), amellyel a természetben előforduló napi fényerősség változást szimuláltuk. Az összehasonlítás célja az, hogy megnézzük, hogy a *pgr5* mutáns változó fényben is olyan hatékonyan tud-e működni vagy akár hatékonyabban, mint állandó megvilágítás esetén.

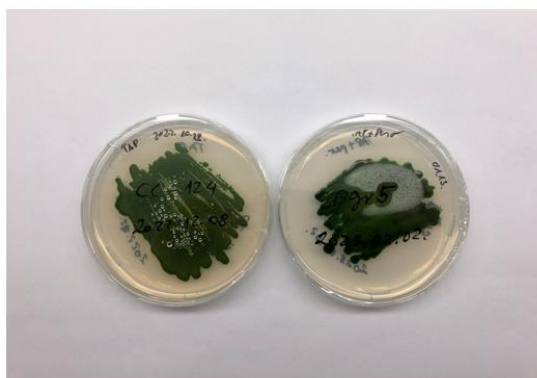
3. Anyagok és módszerek

3.1. *Chlamydomonas reinhardtii* törzsek nevelése és fenntartása

Kísérleteinkhez a vad típusként használt CC-124-es törzset a Minnesota-i Egyetem *Chlamydomonas* gyűjteményéből (*Chlamydomonas* Resource Centre, University of Minnesota, USA) rendeltük, míg a *pgr5*-ös törzset Michael Hippler (Institute of Plant Biology and Biotechnology, University of Münster, Németország) bocsájtotta rendelkezésünkre.

Az algatörzseket Tris-acetát-foszfát (TAP) tápoldatban (7,0 pH) és szilárd táptalajon (1,5% agar tartalmú) tartjuk (3. ábra). A tápoldat tartalmaz foszfát puffert (7,2 pH) (KH_2PO_4 (56 mg/l), K_2HPO_4 (108 mg/l), Milli-Q vizet), Tris-t (20mM), makro ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (50 mg/l), $(\text{NH}_4\text{Cl}$ (400 mg/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (100 mg/l), Gorman és Levine, 1965)) és mikro tápanyagokat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (1,57 $\mu\text{g/l}$), $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (4,09 $\mu\text{g/l}$), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (1,1 $\mu\text{g/l}$), $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (1,61 $\mu\text{g/l}$), (EDTA- Na_2 (50 $\mu\text{g/l}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (5,06 $\mu\text{g/l}$), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (22 $\mu\text{g/l}$) (Hutner és mtsai., 1950)), és ecetsavat (0,1% v/v)

A



B



3. ábra: *C. reinhardtii* algakultúrák (A) szilárd táptalajon és (B) tápoldatban.

A kísérletekhez az algasejteket steril körülmények között szilárd táptalajról (3A. ábra) 50 ml TAP tápoldatot tartalmazó 100 ml-es Erlenmeyer-lombikokba helyezjük, amelyet 85 μmol foton $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fotonáram-sűrűségen, folyamatos 130 rpm-es rázatással, 22-24°C hőmérsékleten, alganevelő kamrában tartottunk három napig.

A háromnapos CC-124-es folyadékkultúrából 3-5 ml-t tettünk át 300 ml TAP tápoldatot tartalmazó 500 ml-es Erlenmeyer-lombikokba (3B. ábra), amelyeket visszahelyeztünk az alganevelőbe a fent leírt körülmények közé. Majd újabb három nap eltelte után az algakultúrát lecentrifugáltuk. A centrifugálást Sorvall LYNX6000 centrifugával hajtottuk végre, 2900 rpm-en, 20°C-on, 10 percen keresztül. A felülúszó eltávolítása után Sueoka's high salt medium (HS) tápoldatban (6,8 pH) szuszpendáltuk fel a sejteket. Ez a tápoldat elengedhetetlen a szerves szén forrást nem tartalmazó környezet biztosításához. HS medium számos makro ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (10 mg/l), K_2HPO_4 (1,44 g/l), NH_4Cl (500 mg/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (20 mg/l), KH_2PO_4 (0,72 g/l)) és mikroelemet ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (4,09 $\mu\text{g/l}$), $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (1,61 $\mu\text{g/l}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (1,57 $\mu\text{g/l}$), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (1,1 $\mu\text{g/l}$), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (22 $\mu\text{g/l}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (5,06 $\mu\text{g/l}$), EDTA- Na_2 (50 $\mu\text{g/l}$), (Hutner és mtsai., 1950)) tartalmaz.

A klorofilltartalmat spektrofotométer segítségével 50 μg klorofill (a+b)/ ml-re állítottuk be. Az 1 literes Roux-típusú fotobioreaktor (PBR) üvegekbe 100 ml kultúrát tettünk, amelynek légterébe oxigén abszorbenst helyeztünk (Oxyfree 504B 100 cc loose, Tianhua Tech. CO., Ltd. Nanjing, Kína, illetve O2Zero-50 cc loose; Global Reach Ltd, London, UK) egy, ennek a tárolására alkalmas csőbe (4. ábra). Ezt követően az üvegeket sötétbe helyeztük és rákapcsoltuk az általunk kifejlesztett készülékre, amely egy program vezérlésével az üveg légterét nitrogéngázzal öblítette át. 4 órán át tartó sötét, anaerob inkubációt követően 16 óra fény/ 8 óra sötét periódusnak tettük ki az algatenyészeteket 5 napon át. A fényperiódus alatt kétóránként változott a fény intenzitása (100, 250, 500, 750, 1000, 750, 500, 250 μmol foton $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$); a váltás előtt az automata mintát vett az üveg légteréből és beinjektálta a gázkromatográfba. Voltak olyan kísérletek is, amelyekben a 16 óra fényperiódus alatt a fényintenzitás állandóan 550 μmol foton $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ volt. Rendszerünket folyamatosan, több napon át monitorozni tudtuk. A sejteket a sötétinkubáció és a hidrogéntermelés periódusa alatt 23-25°C-on tartottuk, folyamatos rázatás (130 rpm) mellett. A 16 órán át tartó fényperiódus után, a sötétperiódus kezdetén az üveg légterét minden nap nitrogéngázra cseréltük.



4. ábra: Vékony rétegű sejtszuszpenziót tartalmazó fotobioreaktor (PBR). A Roux-üveg 1 l-es térfogatú, melybe 100 ml algakultúra, a légtérbe egy erre kialakított csőben 20 g oxigén abszorbens került elhelyezésre (Nagy és mtsai., 2021).

3.2. Mérési módszerek

3.2.1. Klorofilltartalom meghatározása

A klorofilltartalom meghatározásához a *C. reinhardtii* sejt kultúrát 50-szeresére hígítottuk ki (800 μ l 100%-os aceton + 180 μ l Milli-Q víz + 20 μ l alga), majd pár percig sötétben inkubáltuk. Centrifugálást (3 perc, 13500 rpm) követően megmértük a felülúszó abszorbanciáját 646 és 663 nm hullámhosszon, NanoDrop 2000C (Thermo) segítségével. A klorofillkoncentrációt a Porra és mtsai. (1989, 2002) által kidolgozott módszer szerint számoltuk ki.

3.2.2. Hidrogén és oxigén mennyiségének meghatározása gázkromatográfia segítségével

Az alga törzsek által termelt hidrogén és oxigén mennyiségének meghatározásához gázkromatográfias módszert használtunk. Az általunk kifejlesztett automata készülék a PBR légtéréből 100 μ l mintát fecskendezett be egy Hewlett Packard 5890 típusú gázkromatográfba. A komponensek szétválasztásához egy HP Molesieve (30m x 0,535 mm x 25) kolonnát használtunk, a mozgó fázisunk pedig argon gáz volt. Az áramlási sebesség 34 ml/perc. A hővezetőképességi detektor (TCD) hőmérséklete 160°C, míg a kolonna hőmérséklete 60°C-ra volt beállítva.

3.2.3. Statisztikai elemzés

A bemutatott adatok minimum három független kísérleten alapulnak. Az ismételések pontos száma az ábrák leírásában látható; átlagokat és standard hibákat ($\pm$ SE) számoltunk. A CC-124 (vad típus) és *pgr5* mutáns közötti átlagok különbségének szignifikanciáját Student t-próbával vagy a kétirányú kevert ANOVA és a Tukey post-hoc tesztekkel határoztuk meg OriginPro 9.5 szoftver segítségével ($p < 0,1$).

3.2.4. *In vitro* hidrogenáz aktivitás meghatározása

A hidrogenáz aktivitását *in vitro* mértük 3 óra sötét anaerob indukció követően (0 h) és 85 óra váltakozó fényintenzitás után. A vizsgálatot 37°C-on, sötétben 16 ml-es barna szérumban végeztük. A reakcióelegy 1.9 ml 100 mM kálium-foszfát pufferből (pH 6,8), 560 μ l MiliQ vízből, 100 μ l 10%-os Triton X-100-ból, 40 μ l 1 M metilviologénből, 400 μ l 1 M nátrium-ditionitból és 400 μ l alga kultúrából állt. A szérumban lévő légterének hidrogénkoncentrációját gázkromatográffal mértük 20 percenként. Az *in vitro* hidrogenáz aktivitást μ mol H_2 /mg chl (a+b) h^{-1} adtuk meg.

3.2.5. Klorofill *a* fluoreszencia mérése

A klorofill *a* fluoreszencia méréseket Handy-PEA készülékkel végeztük. A *C. reinhardtii* kultúrákat körülbelül 15 percig sötétadaptáltuk, majd 60 μ l kultúrát (50 μ g chl (a+b)/ml) tettünk a levélszipeszben elhelyezett Whatman szűrőpapírra. A mintát 3 másodpercig vörös fényvel (3500 μ mol foton $m^{-2} sec^{-1}$) világítottuk meg. Három LED biztosította a fényforrást, amelyek 5 mm átmérőjű mintafelületre voltak fókuszálva.

3.2.6. Western blot analízis

Mintavételek során 2 ml mintát vettünk egy 2 ml-es Eppendorf csőbe. Ezután centrifugáltuk 5 percig 13500 rpm-en, majd eltávolítottuk a felülúszót és a mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk. A mintákat 500 μ l fehérje extrakciós pufferrel (50 mM Tris/HCL [pH 8,3], 0,25% Triton X-100, 1 mM ditionitrol és 1 cOmplete proteáz gátló mix [Roche]) szolubizáltuk, majd sötétben inkubáltuk 30 percig 4°C-on rázatás mellett. Ezt követően a mintákat 10 percig 20800 g és 4°C-on centrifugáltuk. Az így keletkezett felülúszót egy új Eppendorf csőbe gyűjtöttük össze és fehérjetartalmát Bradford módszerrel határoztuk meg. Minden minta körülbelül 1 millió sejtnél megfelelő sejtextraktumot tartalmazott, amihez 6 x

Laemmli puffert (375 mM Tris/HCL [pH 6,8], 60% [v/v] glicerin, 12,6% [w/v] nátrium dodecilszulfát, 600 mM ditiotritol, 0,09 % [w/v] brómfenol kék) adtunk.

Az elektrontranszportban résztvevő fehérjeegységek és a hidrogenáz enzim kimutatására az Agrisera AB következő specifikus poliklonális antitestjeit használtuk: PsbA (AS11-1786, hígítás: 1:2000), PSBO (AS06-142-33, hígítás: 1:1000), PetB (AS18-4169, hígítás: 1:10000); CP47 (AS04-038, hígítás: 1:2500); PsaA (AS06-172, hígítás: 1:2000), HydA (AS09-514, hígítás: 1:2000). A fehérjék beazonosításához a Thermo Scientific PageRuler Prestained fehérjelétrát használtunk.

4. Eredmények

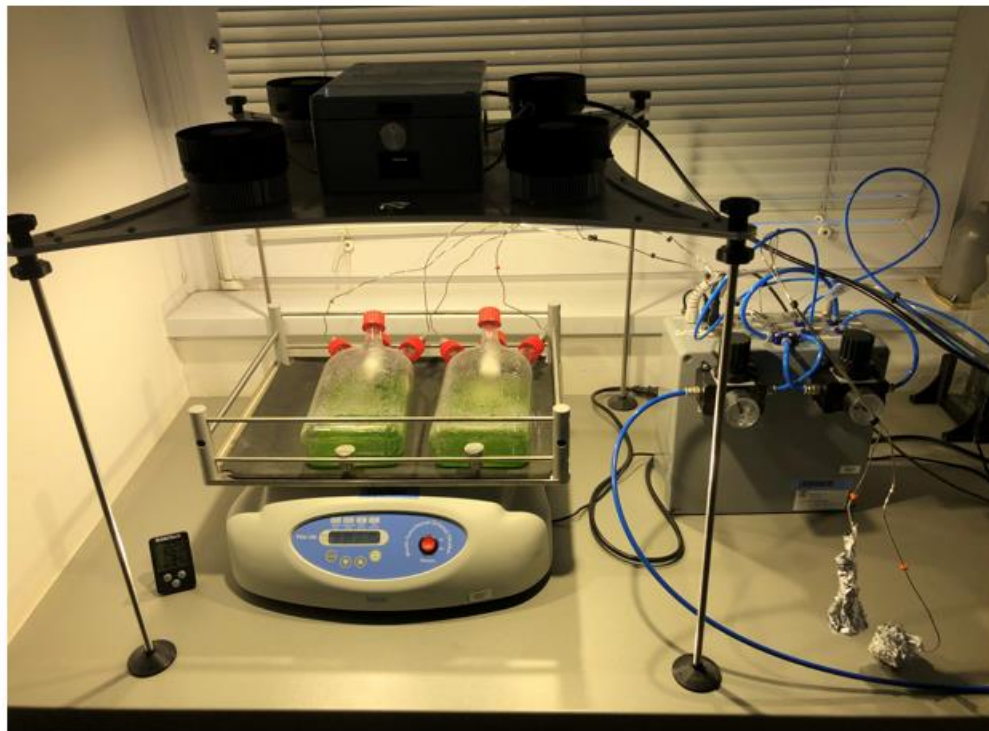
4.1. Gázkromatográfhoz kapcsolható automata mintavevő fejlesztése és tesztelése

4.1.1. Automata mintavevő műszaki felépítése és műszerezettsége

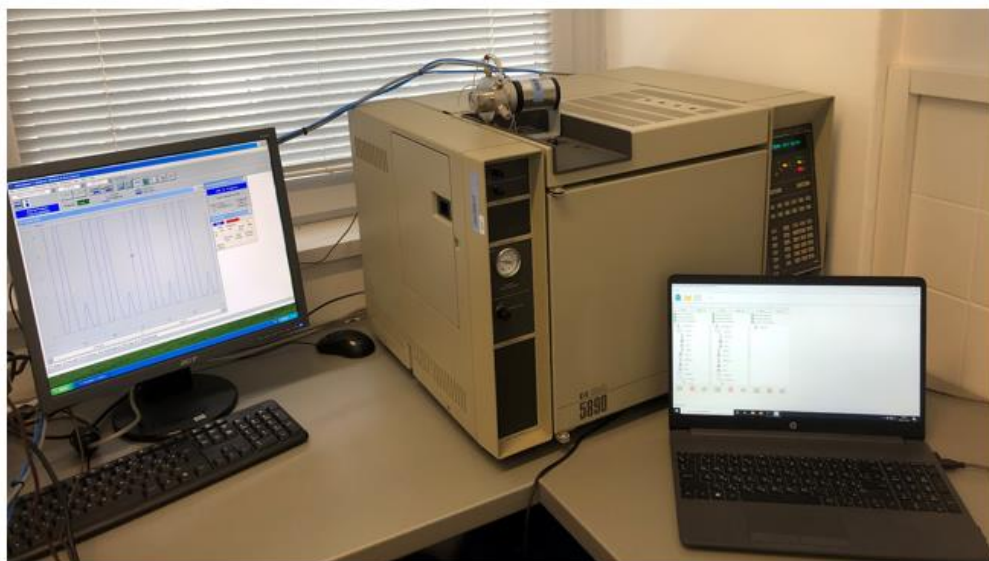
A kutatócsoport, ahol a szakdolgozatomat készítettem, kifejlesztett egy több napon át hatékonyan fenntartható hidrogéntermelő rendszert (Nagy és mtsai, 2018, 2021); jelenleg a módszer piacképes és gazdaságos hidrogéntermelési technológia irányába történő továbbfejlesztése zajlik. Ezen irányba fontos továbblépés a már kifejlesztett rendszer automatizálása, ami a BSc munkám egyik feladatát képezte. A CS-Smartlab Devices Kft-vel együttműködve megépítettünk egy automata mintavevő készüléket (5A. ábra), amely valós időben, párhuzamosan, három PBR gázteréből előre programozott módon mintát tud venni és egy gázkromatográfba injektálni (5B. ábra), valamint biztosítani tudja a PBR légterének nitrogéngázzal való rendszeres átöblítését, regisztrálja a hőmérsékletet és a reaktoronként egy-egy beépített nyomásmérő jeleit. Mindezt a rendszer vezérlőprogramja és a megfelelően kialakított elektronika teszi lehetővé.

Műszerünk tervezése során figyelembe kellett vennünk azt is, hogy a hidrogén a legkisebb molekula, így tömítetlenség esetén könnyen el tud szökni a bioreaktorból és az automata mintavevőből. A minta PBR-ből a gázkromatográfba való eljuttatására rozsdamentes acélkapillárisokat használtunk, amelyek kellően vastag és tömör falúak, illetve a kis belső átmérőjük kis holtterefogatot biztosít. Ráadásul ezek a csövek kellően flexibilisek is, ezáltal feszültségmentes csatlakozást tesznek lehetővé.

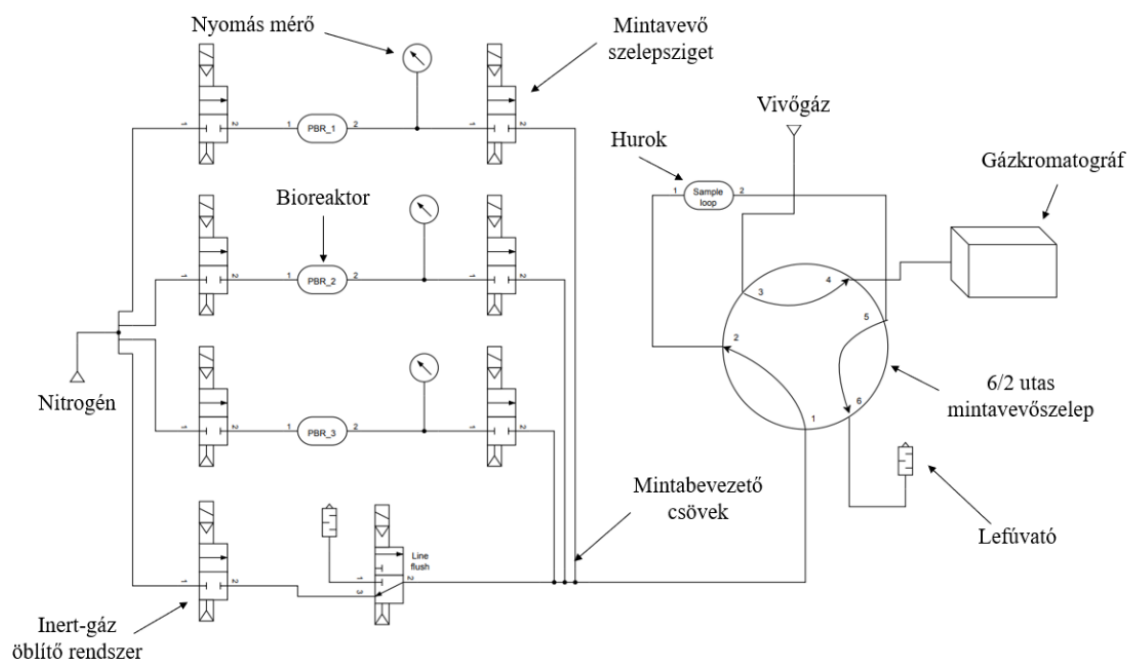
A



B



5. ábra: Az anaerob indukcióval kiváltott hidrogéntermelés kísérleti elrendezése. (A) Az automata mintavevő készülék és a hozzá kapcsolt algakultúrát tartalmazó PBR üvegek, LED panel alatt. (B) A gázkromatográf az automata mintavevő injektorával és a rendszert vezérlő számítógép.

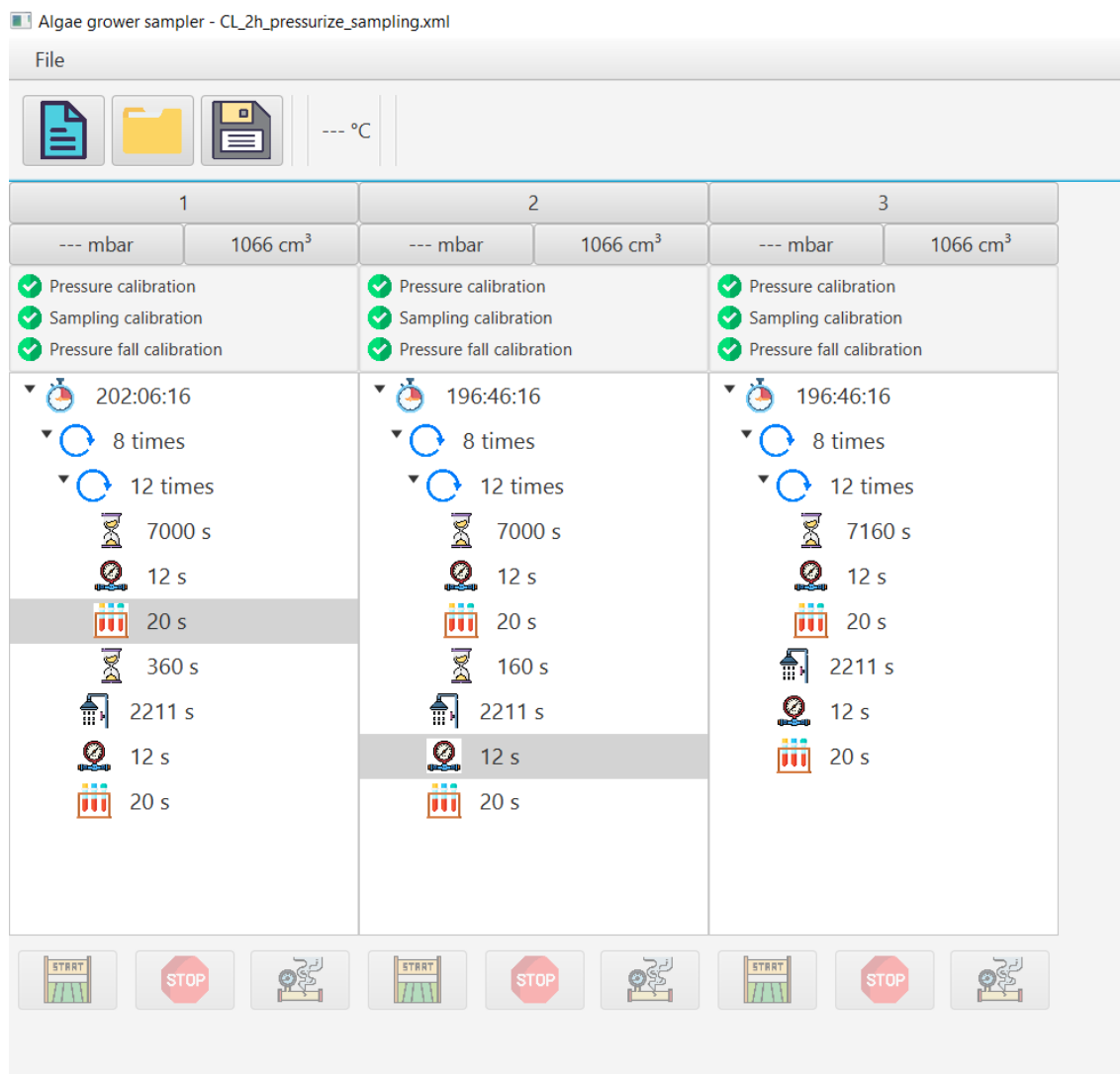


6. ábra: Automata mintavevő műszaki felépítése Az inert-gáz öblítő rendszer nitrogénnel átmossa a bioreaktor légterét. A túlnyomás megakadályozását a lefúvató teszi lehetővé. A mintavevő szelepsziget a gáztérből származó mintánkat a mintabevezető csőbe, majd a hurokba juttatja, ahonnan a mintánkat a 6/2 utas mintavevő szelep injektálja a gázkromatográfba. A bioreaktorba uralkodó nyomást a nyomásmérő regisztrálja.

Mivel a PBR-ből a minta passzívan, a gáztérben uralkodó nyomás hatására kerül a szelepeken és a mintabevezető csöveken keresztül a hurokba, fontos, hogy a PBR-ben kellő gáznyomás legyen a mintavevő csövek és hurok mintával való teljes gázcseréjéhez. Ugyanakkor a gáz nyomása ne legyen olyan magas, hogy negatívan befolyásolja az algák hidrogéntermelő képességét. Mindezek figyelembevételével minden mintavétel előtt 1300 mbar nyomást állítunk be a gáztérben, sűrített nitrogéngáz hozzáadásával.

4.1.2. Algae Grower Sampler – vezérlő program

Algae Grower Sampler az automata mintavevőhöz tartozó vezérlő program, amin számos beállítási lehetőség érhető el. Emellett online adatokkal is szolgál az operátornak, mint például a PBR-ben uralkodó nyomás, a környezet hőmérséklete, valamint, hogy az előre megírt mérési program melyik fázisnál jár (7. ábra).



7. ábra: A rendszert irányító program az általunk összeállított utasítások alapján. A program alapján a berendezés a 16 órás fényperiódus alatt 2 óránként mintát vesz a PBR légteréből és beinjektálja a gázkromatográfba. Minden mintavétel előtt beállítja a nyomást 1300 mbar-ra. A 8 órás sötétperiódus kezdetén lecseréli a PBR légterét nitrogéngázra, illetve e periódus végén, nyomás helyreállítást követően injektálás is történik.

Az online mintavevő készülékhez maximum három PBR csatlakoztatható egyidejűleg, amelyek egymástól függetlenül vezérelhetők. A vezérlőprogramokat a következő utasításokból állíthatjuk össze tetszőlegesen: anaerobizálás (légtér öblítése nitrogéngázzal), nyomáskiegyenlítés, mintavétel, várakozási idő, továbbá ezen lépések ismétlődő ciklusokba szervezhetők. Az így megírt programok külön fájlban eltárolhatók (7. ábra).

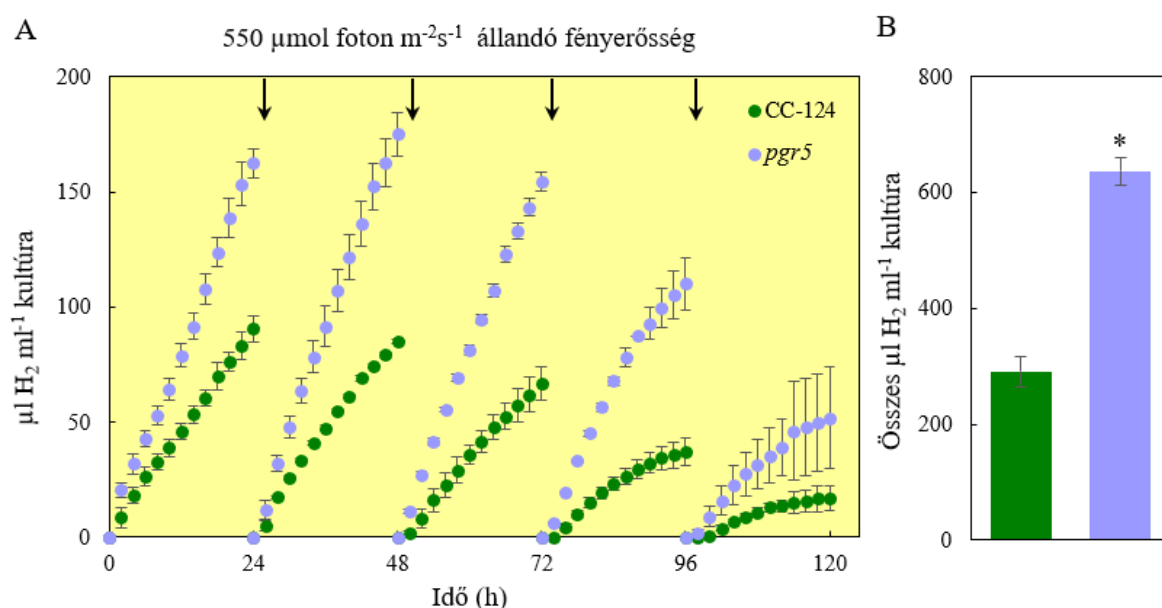
4.2. CC-124 és *pgr5* mutáns törzs hidrogéntermelésének összehasonlítása

Az első fotokémiai rendszerben a (PSI) ciklikus elektrontranszport (PSI-CET) egy olyan mechanizmus, amely az ATP és a NADPH arányát szabályozza a kloroplasztiszban. Fontos szerepet játszik a fotoszintézis során a fotoinhibíció elleni védelemben (Nawrocki és mtsai., 2019a). A PSI-CET hozzájárul a protonmotoros erő kialakításához, ami befolyásolja a fotoszintetikus elektrontranszportot. A Proton Grádiens Regulátor 5 (PGR5) fehérje részt vesz ennek a folyamatnak a szabályozásában (Tolter és mtsai., 2011; Johnson és mtsai., 2014). A PGR5 a sztrómában található, *C. reinhardtii*-ban a PSI fehérje-szuperkomplexnek alkotórészeként. Ez a szuperkomplex szükséges a PSI-CET kialakulásához, különösen, ha a sejtek oxigénhiányos környezetben vannak (Shikama, 2007; DalCorso és mtsai., 2008; Godaux és mtsai., 2015; Steinbeck és mtsai., 2018).

A *pgr5*-deficiens mutáns nagyfokú fényérzékenységet mutat fotoautotróf, aerob körülmények között (Johnson és mtsai., 2014), anaerob körülmények között azonban a fotoinhibíció kockázata csekélyebb. A ciklikus elektrontranszport csökkenti az elektrontranszport hatékonyságát a hidrogénáz enzim felé, mind a kénmegvonásos (Antal és mtsai., 2009; Tolter és mtsai., 2011), mind az anaerobiózis által indukált hidrogéntermelés esetében (Nagy és mtsai., 2018), ezért a PSI-CET mérséklődése a hidrogéntermelés javulását eredményezi. Ezen felül a *pgr5* mutáns törzs magasabb mitokondriális légzési kapacitással rendelkezik, amely alacsonyabb intracelluláris oxigénszintet eredményez, így a sejt hidrogénáz enzime hosszabb ideig maradhat aktív (Johnson és mtsai., 2014; Godaux és mtsai., 2015; Ho és mtsai., 2022; Elman és mtsai., 2022).

A *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124 törzse meglehetősen nagy hatékonysággal képes hidrogént termelni, ami miatt előszeretettel használják modellorganizmusként a hidrogéntermelési kutatásokban. A *pgr5* mutáns szülői vonala a CC-124-es törzs, ezért kontroll törzsként (vad típus) használtuk a mérések során.

A kutatócsoportunk korábbi eredményei azt mutatták, hogy az anaerob indukcióval kiváltott hidrogéntermelés során, vékony folyadékrétegű PBR-ben a *pgr5* mutáns hat nap alatt kb. 2,5-szer több hidrogént termelt, mint a vad típusként használt CC-124 törzs (Nagy és mtsai., 2018). Valamint rendkívül jól tűri a magas fényintenzitást is. Mindezek mellett a *pgr5* mutánsnak nem csak hogy jóval nagyobb volt az *in vitro* hidrogenáz aktivitása, mint a CC-124-é, de a hatnapos kísérlet végére a hidrogenáz aktivitásának 44%-át megtartotta (Nagy és mtsai., 2021). Mindezek alapján a *pgr5* törzs ígéretesnek tűnik a hosszabb távú, ipari méretekben történő hidrogéntermelés megvalósításához.



8. ábra: CC-124 és *pgr5* mutáns *C. reinhardtii* törzsek hidrogéntermelése 50 μg klorofill (a+b)/ ml és 550 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ állandó fényerősség mellett, PBR-ben. (A) A kultúrák HS tápoldatban voltak, és 4 óra sötét anaerob indukciót követően kerültek folyamatos megvilágítás alá. A gázok mennyiségének meghatározása lezárt kultúrák légteréből történt automata mintavevő segítségével, amely 2 óránként a légteréből mintát vett és a gázkromatográfbba injektálta, továbbá a készülék a PBR légterét 24 óránként nitrogéngázra cserélte, amit az A ábrán a nyilak jelölnek. (B) Az össz. a 120 óra alatt megtermelt hidrogéngáz összegét mutatja. Az ismertetett adatok öt független kísérletből származnak. A B ábrán a * jelöli a szignifikánsan különböző átlagokat, amelyeket a Student t-próbával határoztunk meg, p érték < 0,05.

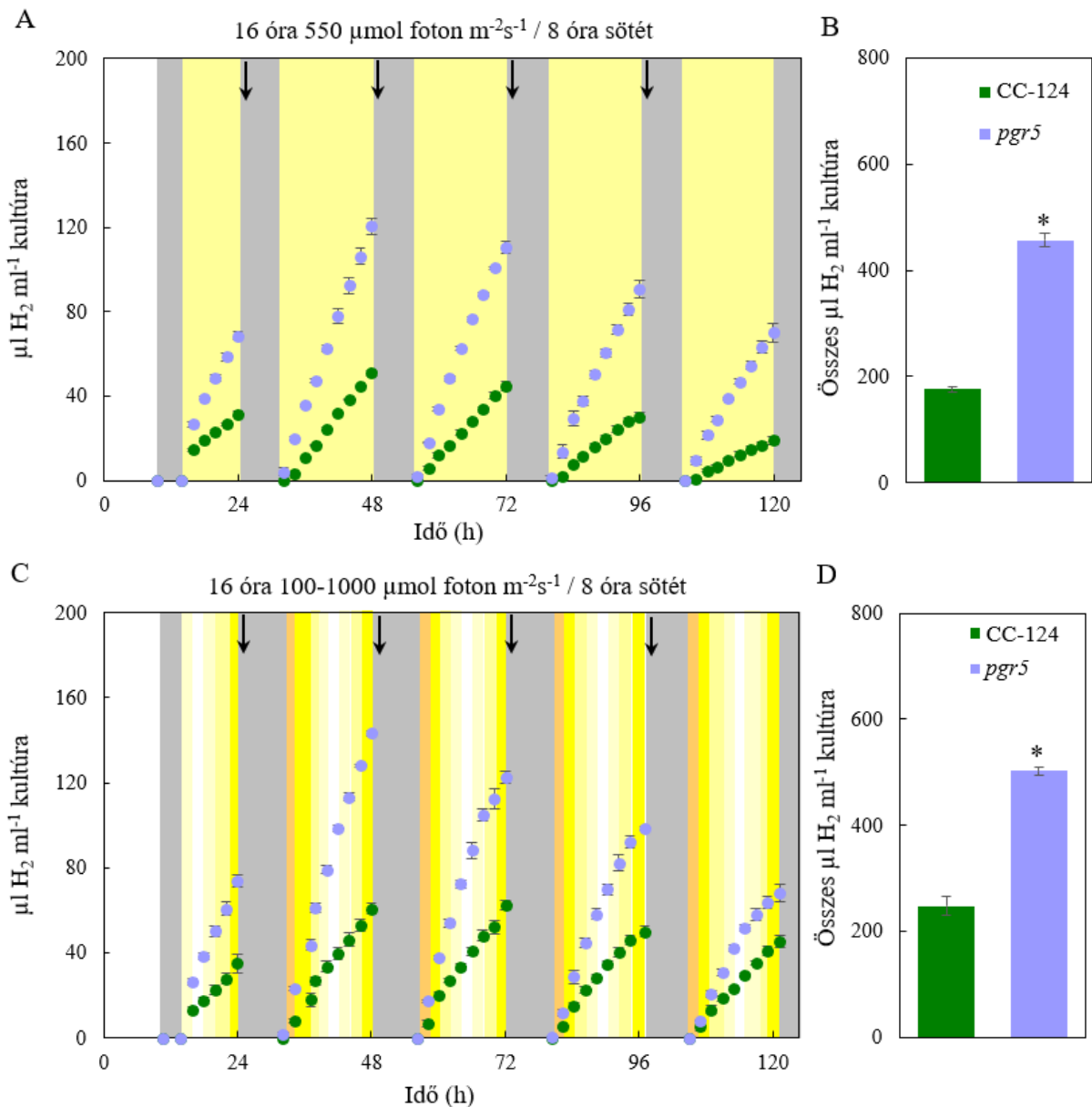
A vadtípusú CC-124 és *pgr5* mutáns algasejteket a 4.1. fejezetben bemutatott automata mintavevőhöz kapcsolt, vékony folyadékrétegben PBR-ben helyeztük el, amely HS tápoldatban, 100 ml folyadékkultúrát tartalmazott, a klorofillkoncentráció pedig 50 μg klorofill (a+b)/ ml-re volt beállítva. Először folyamatos, 550 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fényerősség mellett mértük és hasonlítottuk össze az alga törzsek hidrogéntermelését. Megfigyeltük, hogy már az

első 24 órában a *pgr5* mutáns kb. 40%-kal több hidrogént termelt, mint a CC-124 törzs (8A. ábra), és az idő előrehaladtával ez a különbség egyre fokozódott. Az öt nap alatt megtermelt hidrogén összes mennyisége körülbelül 2- 2,5- szer nagyobb volt, mint a CC-124 törzsé (8B. ábra). Az automata mintavevő által mért értékek összhangban vannak a kutatócsoport előző, vékonyrétegű fotobioreaktor alkalmazásával kapott eredményeivel (Nagy és mtsai., 2021).

Az eredmények alapján kijelenthető, hogy az automata mintavevő megbízhatóan működik és alkalmas az algák hidrogéntermelésének folyamatos monitorozására.

Ezt követően azt terveztük megvizsgálni, hogy az algák hidrogéntermelése természetes fényviszonyok között is megvalósítható-e. Ennek érdekében a természetben előforduló sötét- és fényviszonyokat szimuláltunk: a 4 órás sötét anaerob inkubációt követően napokon keresztül 16 óra fény/ 8 óra sötét periódusnak tettük ki az algatenyészeteket. A 9A. ábrán a fényperiódus alatt folyamatosan $550 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ volt, míg a 9C. ábrán kétóránként változtattuk a fényintenzitást (100, 250, 500, 750, 1000, 750, 500, $250 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Ez utóbbi értékeket úgy állítottuk be, hogy az átlagos fényintenzitás $550 \mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ legyen.

Látható, hogy mindkét esetben az öt napon át tartó hidrogéntermelés közel hasonlóan alakult, a *pgr5* mutáns kb. 2-2,5-szer több hidrogént termelt, mint a CC-124 (9B-D. ábra). Azonban, váltakozó intenzitású fényben a CC-124 hidrogéntermelése kb. 40 %-kal, míg a *pgr5* 10 %-kal növekedett az állandó intenzitású fény/ sötétperiódusban mérthez képest. Elképzelhető, hogy a folyamatos fény nagyobb stresszt jelent az algák számára, mint a váltakozó fényintenzitás és úgy tűnik, hogy a *pgr5* mutáns jobban ellenáll ezeknek a hatásoknak.



9. ábra: CC-124 és *pgr5* mutáns *C. reinhardtii* törzsek hidrogéntermelése 50 μg klorofill (a+b)/ ml és 16 óra fény/ 8 óra sötét mellett, PBR-ben. A kultúrák HS tápoldatban voltak, és 4 óra sötét anaerob indukciót követően kerültek megvilágítás alá. (A) A fényperiódus alatt a fényintenzitás 550 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$ volt. (C) A fényperiódus alatt kétóránként változott a fényintenzitás (100, 250, 500, 750, 1000, 750, 500, 250 $\mu\text{mol foton m}^{-2}\text{s}^{-1}$). A gázok mennyiségének meghatározása lezárt kultúrák légteréből történt automata mintavevő segítségével, amely 2 óránként a légteréből mintát vett és a gázkromatográfbba injektálta, továbbá a készülék a PBR légterét 24 óránként nitrogéngázra cserélte, amit az ábrákon a nyilak jelölnek. (B-D) Az Össz. a 120 óra alatt megtermelt hidrogéngáz össz mennyiségét ábrázolja. A B és a D ábrán a * jelöli a szignifikánsan különböző átlagokat, amelyeket a Student t-próbával határoztunk meg, p érték < 0,05.

4.3. A váltakozó fényviszonyok hatása a fotoszintetikus apparátusra és a HydA enzimre

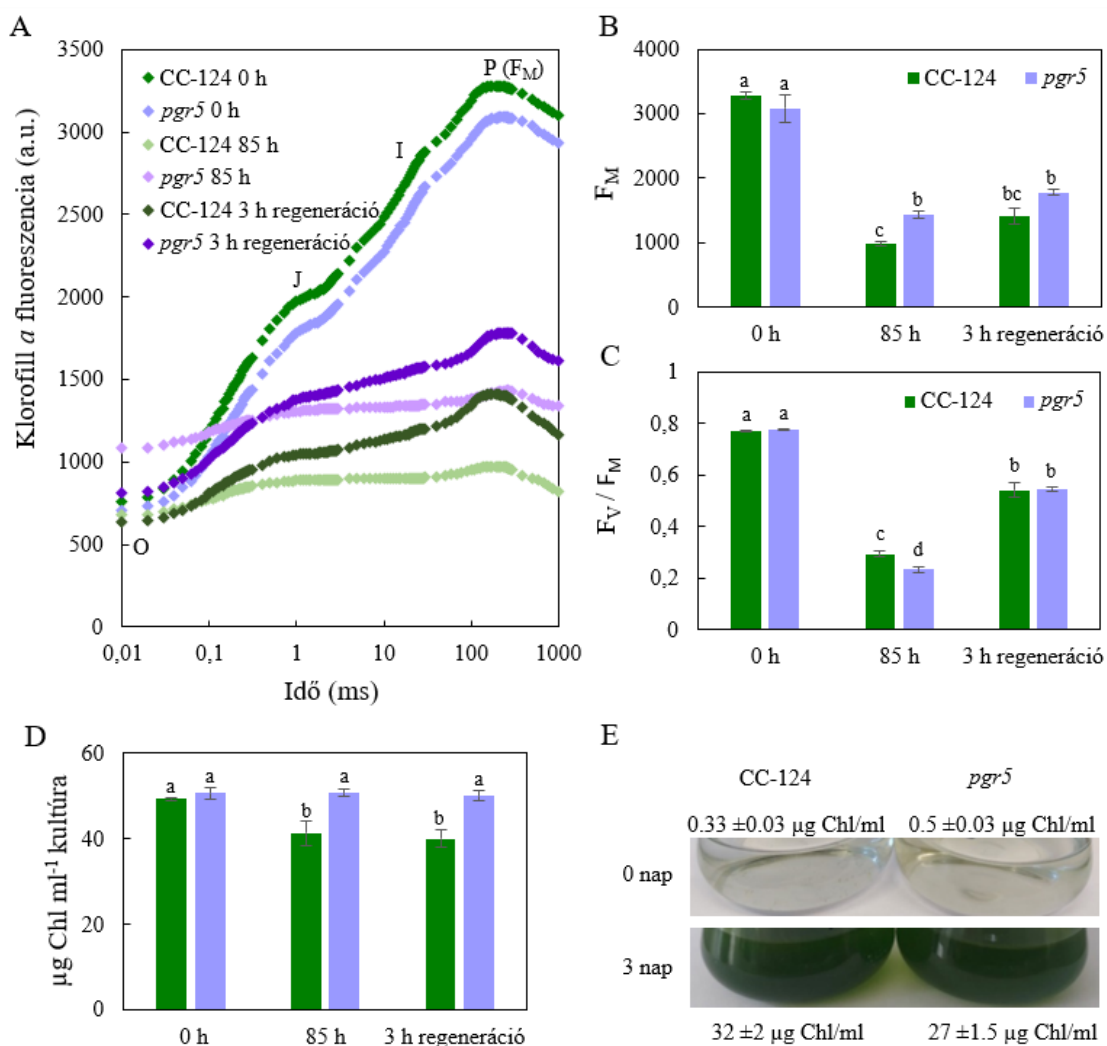
Megvizsgáltuk, hogy hogyan reagál a fotoszintetikus apparátus a szimulált napi fényviszonyokra a kísérlet során. A mintagyűjtés a kísérlet elején (0 h), a kísérlet végén (85 h) és 3 óra regeneráció után történt.

Először gyors klorofill *a* fluoreszcencia indukciót (OJIP) mértünk a sejteken, amely egy nagyon érzékeny és széles körben használt módszer a fotoszintetikus-elektrontranszport lánc működésében létrejövő változások kimutatására (lásd 3.2.5. fejezet). Azt kaptuk eredményül, hogy a kísérlet elején (0 h) összegyűjtött mintákban az egészséges kultúrákra jellemző értékeket mértünk, ahol a két törzs között nem volt jelentős különbség (10A. ábra). A 85 órás hidrogéntermelés után a klorofill-*a* fluoreszcencia amplitúdója csökkent, és kinetikája mind a két törzs esetében megváltozott. Azonban a maximális fluoreszcencia F_M , (10B. ábra) értékének a csökkenése a *pgr5* mutánsban kisebb volt, mint a CC-124 vad típusú törzsben. A kultúrák F_V/F_M értéke, amely a fotoszintetikus hatékonyság mutatója (Garab és mtsai., 2023), a vad típusban körülbelül 0,77-ről 0,3-ra, a *pgr5* mutánsban pedig 0,25-re csökkent (10C. ábra). Ezután a törzseket 3 órára nevelő fényre helyeztük regenerálás céljából. A regenerálódás következtében a klorofill *a* fluoreszcencia kinetikája részben helyreállt, az F_V/F_M értéke is körülbelül 0,55-re emelkedett mind a két törzsben (10C. ábra). Ezen adatok azt mutatják, hogy a fotoszintetikus elektrontranszport-lánc túlredukált és lelassul az elektrontranszport (Foyer és mtsai., 2012, Erickson és mtsai., 2015, Milrad és mtsai., 2023), nem pedig valamilyen visszafordíthatatlan károsodás történik. Megfigyeltük azt is, hogy a kísérlet végére (85 órára) a CC-124 törzs klorofill tartalma körülbelül 18%-kal csökkent, míg a *pgr5* mutánsban alig változott.

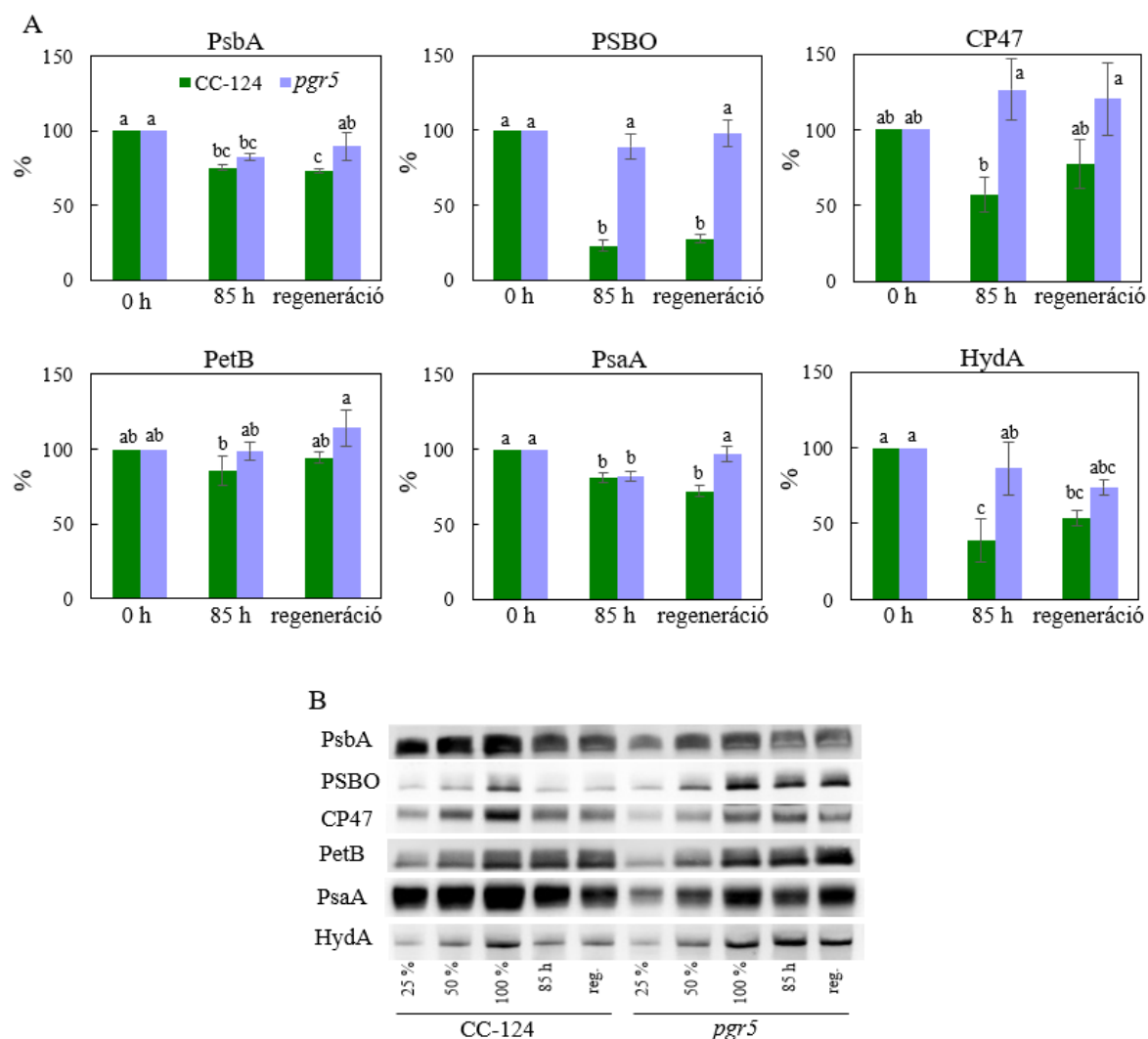
A fotoszintetikus apparátusok egyes alegységeinek mennyiségi meghatározására immunoblot analízist használtunk (11A, B. ábra). A vad típusú törzsben a PSII alegységek, a PSBO, PsbA és a CP47 mennyisége jelentősen csökkent (77, 25 és 43%-kal) a 85 órás hidrogéntermelési periódus alatt. A PetB mennyisége (amely a $cytb_6f$ egyik alegysége) a CC-124-ben enyhén csökkent, míg a PSI reakciócentrum alegysége, a PsaA körülbelül 20%-kal csökkent a kísérlet végére. Ezzel szemben a PSBO és a CP47 PSII alegységek szintje változatlan maradt a *pgr5* mutáns törzsben. A PsbA, PetB és a PsaA szintjének csökkenése a vad típusú törzshöz hasonló volt, körülbelül 20%. A sejtek 3 órás regenerálása után a legtöbb fotoszintetikus alegység szintje nem mutatott lényeges változást, ami alátámasztja azt, hogy a fotoszintetikus aktivitásnak a helyreállása (amit már az F_V/F_M értéke alapján is

megállapítottunk) nem a fotoszintetikus alegységek újratermelődésének, hanem a fotoszintetikus elektrontranszportlánc lelassulásának volt köszönhető.

A HydA szintje 60%-kal csökkent a CC-124 törzsben a 85 órás kísérlet végére (12. ábra). Ezzel szemben a *pgr5* mutánsban ez a csökkenés csak 24%-os volt. Ezután a HydA enzim *in vitro* aktivitását is megmértük, redukált metil-viologén hozzáadásával, amely a rendszerben elektron donorként funkcionál. Sötét anaerob indukciót követően az *in vitro* hidrogenáz aktivitás körülbelül 350 $\mu\text{mol H}_2/\text{mg Chl (a+b) h}^{-1}$ volt mind a két törzs esetében. A 85 órás hidrogéntermelés után az eredeti hidrogenáz aktivitásnak a vad típusú törzsben csak a 17% maradt meg, míg a mutánsban a 29%-a (12. ábra).



10. ábra. CC-124 és a *pgr5* mutáns fotoszintetikus apparátusának jellemzése, sötét anaerob indukcióval kiváltott hidrogéntermelés során, váltakozó (nappali fényviszonyokat szimuláló) fényintenzitáson, acetát mentes tápoldatban (HS). A méréseket 0 időpontban (kontroll), 85 óra hidrogéntermelési periódust követően, illetve 3 óra regeneráció (aerob körülmények, nevelőfény) után végeztük. A) Gyors klorofill-*a* fluoreszencia (OJIP) tranziens változása, B) F_M értékek; C) Az F_V/F_M értékek, amik az OJIP tranziensből származnak. D) Klorofill (*a*+*b*) tartalom. E) Kultúrák a 85 órás hidrogéntermelés után (körülbelül 100-szorosan hígítva) és a 3 napos regeneráció követően. Az adatok három független kísérletből származnak. A különbségek szignifikanciáját az ANOVA és a Tukey tesztek segítségével határoztuk meg. Az eltérő betűkkel jelölt átlagok jelentősen különböznek egymástól ($P < 0,1$).



11. ábra. Különböző fotoszintetikus alegységek és a HydA enzim mennyiségének változása a CC-124 vad típusú törzsben és a *pgr5* ciklikus elektrontranszport mutánsban váltakozó fényintenzitáson, acetátmentes környezetben, anaerobiózis által indukált hidrogéntermelés során. A) A PsbA, PSBO, CP47, PetB, PsaA és HydA denzitometriás analízise, amely értékek a B ábrán lévő mintákból lett meghatározva. Az adatok négy független mérésből származnak. Az átlagok különbségének szignifikanciáját az ANOVA és Tukey tesztekkel határoztuk meg. A különböző betűkkel jelölt átlagok szignifikáns eltérést mutatnak ($P < 0,1$). B) A PsbA, PSBO, CP47, PetB, PsaA és HydA reprezentatív immunoblotjai. A 0 órás minták (kontroll), amit 4 órás anaerob indukció után vettünk; a 25%, 50% és a 100% minták a fehérjék denzitometriás meghatározására szolgáltak. A 85 órás mintákat a kísérlet végén vettük. A 85 óra utáni mintákat (reg.) 3 órás nevelőfényen történő regeneráció elteltével gyűjtöttük.

<i>In vitro</i> aktivitás	CC-124	<i>pgr5</i>
3 óra sötét anaerobiozis	346.06 ±5.66	327.36±18.37
85 óra hidrogén termelés	58.55 ±5.48	94.53 ±5.17 *
Megmaradt aktivitás	17%	29%

12. ábra. A CC-124 vad típusú törzs és a *pgr5* ciklikus elektrontranszport mutáns *in vitro* hidrogenáz aktivitásának meghatározása váltakozó fényintenzitáson, acetátmentes környezetben, anaerobiózis által indukált hidrogéntermelés során. Mintavételezés a 3 órás anaerob indukció (kontroll) és a 85 órás hidrogéntermelés követően történt. Az adatok négy független biológiai ismétlésből származnak, az átlagokat a ± jelöli (Student t-próba, $p < 0,05$). A 85 órás hidrogéntermelés utáni maradék enzim aktivitást százalékban adtuk meg.

5. Következtetések

A hidrogéngáz egy tiszta energiahordozó, amelynek elégetése nem jár szén-dioxid kibocsátással. Az egyik ígéretes módszer a zöldalgák (*Chlamydomonas reinhardtii*) fotobiológiai hidrogéntermelése, amelyet hosszú ideje próbálják ipari szinten hasznosítani; ennek a legnagyobb akadálya, hogy a hidrogénáz nagyon érzékeny az oxigénre, jelenlétében a hidrogénáz expressziója és aktivitása gátolt. E probléma kiküszöbölésére egy lehetséges megoldás az anaerob indukció használata, majd az ezt követő folyamatos megvilágítás szén-dioxid- és acetátmentes körülmények között, oxigénabszorbens jelenlétében. A rendszer hatékonysága jelentősen fokozható vékony rétegű fotobioreaktor használatával (Nagy és mtsai., 2018, 2021).

Az ipari nagyságrendben való termeléshez azonban az algák hidrogéntermelésének hatékonyságát tovább kell fokozni, automatizálásra, valamint léptéknövelésre van szükség.

Munkám során sikerült kifejlesztenünk és megépítenünk egy teljesen automata rendszert, amellyel programozhatóvá vált az általunk újonnan kialakított fotobioreaktor légteréből történő gázmintavétel és a légter cseréje. Megvizsgáltuk továbbá a CC-124 és *pgr5* algakultúrák anaerobiózis által kiváltott fotoautotróf hidrogéntermelésének hatékonyságát a természetben előforduló nappali fényviszonyok mellett (16 óra fény, váltakozó és konstans fényintenzitással/ 8 óra sötét), amelyet LED fénypanellel szimuláltunk.

Eredményeink jelentős előrelépést jelenthetnek a zöldalgák hidrogéntermelésének megújuló energiaforrásként történő hasznosításához.

Publikáció:

Nagy V, **Dabosi Z**, Kuntam S, Csankó K, Kovács L, Tóth SZ (2024) Photoautotrophic and sustained H₂ production by the *pgr5* mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* in simulated daily light conditions. International Journal of Hydrogen Energy 53: 760-769, impakt faktor: 7,2.

6. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőimnek, Dr. Nagy Valériának és Dr. Tóth Szilvia Zitának, akik szakmai tapasztalatukkal, tudásukkal és tanácsaikkal segítették TDK dolgozatom létrejöttét és támogattak munkám elvégzése során.

Külön köszönet illeti Dr. Kovács Lászlót, akihez bátran fordulhattam bármilyen szakmai kérdéssel.

Köszönöm Dr. Csankó Krisztiánnak, aki az automata mintavevő műszaki felépítésének megértésében segített.

Köszönetet szeretnék mondani az egész Molekuláris Fotobioenergetikai Csoportnak, hogy támogattak a munkám elvégzése során.

Szeretném megköszönni Dr. Perei Katalinnak, aki tanácsaival hozzájárult a dolgozatom elkészüléséhez.

7. Irodalomjegyzék

Abdalla M.A., Hossain S., Nisfindy O.B., Azad A.T., Dawood M., Azad A.K. (2018) Hydrogen production, storage, transportation and key challenges with applications: A review. *Energ. Convers. Manage.* 165: 602-627

Antal T.K., Volgusheva A.A., Kukarskih G.P., Krendeleva T.E., Rubin A.B. (2009) Relationships between H₂ photoproduction and different electron transport pathways in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int. J. Hydrogen Energ.* 34: 9087-9094

Crabtree G.W., Dresselhaus M.S., Buchanan M.V. (2004) The Hydrogen Economy. *Phys. Today* 57: 39-44

DalCorso G., Pesaresi P., Masiero S., Aseeva E., Schünemann D., Finazzi G., Joliot P., Barbato R., Leister D. (2008) A complex containing PGRL1 and PGR5 is involved in the switch between linear and cyclic electron flow in *Arabidopsis*. *Cell* 132: 273-285

Dutcher S.K., O'Toole E.T. (2016) The basal bodies of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cilia* 5: 18

Elman T., Ho. T.T.H., Milrad Y., Hippler M., Yacoby I. (2022) Enhanced chloroplast-mitochondria crosstalk promotes ambient algal-H₂ production. *Cell Reports Physical Science* 3: 100828

Fouchard S., Hemschemeier A., Caruana A., Pruvost J., Legrand J., Happe T., Peltier G., Cournac L. (2005) Autotrophic and mixotrophic hydrogen photoproduction in sulfur-deprived *Chlamydomonas* cells. *Appl. Environ. Microb.* 71: 6199-6205

Godaux D., Bailleul B., Berne N., Cardol P. (2015) Induction of photosynthetic carbon fixation in anoxia relies on hydrogenase activity and proton-gradient regulation-like1-mediated cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 168: 648-658

Gonzalez-Ballester D., Jurado-Oller JL., Fernandez E. (2015) Relevance of nutrient media composition for hydrogen production in *Chlamydomonas*. *Photosynth. Res.* 125: 395-406

Happe T., Kaminski A. (2002) Differential regulation of the Fe-hydrogenase during anaerobic adaptation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* 269: 1022-1032

Harris E.H. (2001) *Chlamydomonas* as a model organism. Annu. Rev. Plant Phys. 52: 363-406

Ho T.T.H., Schwier C., Elman T., Fleuter V., Zinzius K., Scholz M., Yacoby I., Buchert F., Hippler M. (2022) Photosystem I light-harvesting proteins regulate photosynthetic electron transfer and hydrogen production. Plant Physiol. 189: 329-343

Hutner S.H., Provasoli L., Schatz A., Haskins C.P. (1950) Some approaches to the study of the role of metal in the metabolism of microorganisms. Proc. Am. Philos. Soc. 94: 152-170

Johnson X., Steinbeck J., Dent R.M., Takahashi H., Richaud P., Ozawa S.-I., Houille-Vernes L., Petroutsos D., Rappaport F., Grossman A.R., Niyogi K.K., Hippler M., Alric J. (2014) Proton gradient regulation 5-mediated cyclic electron flow under ATP- or redox-limited conditions: a study of Δ ATPase *pgr5* and Δ rbcL *pgr5* mutants in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. 16: 438-452

Kosourov S., Jokel M., Aro E.-M., Allahverdiyeva Y. (2018) A new approach for sustained and efficient H₂ photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*. Energ. Environ Sci. 11: 1431-1436

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

Meuser J.E., D'Adamo S., Jinkerson R.E., Mus F., Yang W., Ghirardi R.E., Seibert M., Grossman A.R., Posewitz M.C. (2012) Genetic disruption of both *Chlamydomonas reinhardtii* [FeFe]-hydrogenases: Insight into the role of HYDA2 in H₂ production. Biochem. Biophys. Res. Commun. 417: 704-709

Mulder D.W., Shepard E.M., Meuser J.E., Joshi N., King P.W., Posewitz M.C., Broderick J.B., Peters J.W. (2011) Insights into [FeFe]-hydrogenase structure, mechanism, and maturation. Cell Press 19: 1038-1052

Erickson E, Wakao S, Niyogi KK. (2015) Light stress and photoprotection in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant J. 82: 449–65.

Foyer CH, Neukermans J, Queval G, Noctor G, Harbinson J. (2012) Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. J. Exp. Bot. 63: 1637–61.

Garab G, Magyar M, Sipka G, Lambrev PH. (2023) New foundations for the physical mechanism of variable chlorophyll a fluorescence. Quantum efficiency versus the light-adapted state of photosystem II. J. Exp. Bot. 74(18): 5458–71.

Milrad Y, Nagy V, Elman T, Fadeeva M, Tóth S.Z., Yacoby Y. (2023) A PSII photosynthetic control is activated in anoxic cultures of green algae following illumination. *Commun. Biol.*; 6:514.

Nagy V., Podmaniczki A., Vidal-Meireles A., Tengölics R., Kovács L., Rákhely G., Scoma A., Tóth S.Z. (2018) Water-splitting-based, sustainable and efficient H₂ production in green alga as achieved by substrate limitation of the Calvin-Benson-Bassham cycle. *Biotechnol. Biofuels* 11: 69

Nagy V., Podmaniczki A., Vidal-Meireles A., Kuntam S., Herman É., Kovács L., Tóth D., Scoma A., Tóth S.Z. (2021) Thin cell layer cultures of *Chlamydomonas reinhardtii* L159I-N230Y, *pgrl1* and *pgr5* mutants perform enhanced hydrogen production at sunlight intensity. *Biores. Technol.* 333: 125217

Nawrocki W.J., Bailleul B., Cardol P., Rappaport F., Wollman F.-A., Joliot, P. (2019a) Maximal cyclic electron flow rate is independent of PGRL1 in *Chlamydomonas*. *Biochim. Biophys. Acta* 1860: 425-432

Porra R.J., Thompson A.W., Kriedermann E.P. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 975: 384-394

Porra R.J. (2002) The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. *Photosynth. Res.* 73: 149-156

Sasso S., Stibor H., Mittag M., Grossman A.R. (2018) The Natural History of Model Organisms: From molecular manipulation of domesticated *Chlamydomonas reinhardtii* to survival in nature. *eLife* 7: e39233

Shikanai T. (2007) Cyclic electron transport around photosystem I: genetic approaches. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 199-217

Spreitzer R.J., Mets L. (1981) Photosynthesis-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* with associated light-sensitive phenotypes. *Plant Physiol.* 67: 565-569

Steinbeck J., Ross I.L., Rothnagel R., Hankamer B. (2018) Structure of a PSI–LHCI–cyt b₆f supercomplex in *Chlamydomonas reinhardtii* promoting cyclic electron flow under anaerobic conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115: 10517-10522

Tollete D., Ghysels B., Alric J., Petroutsos D., Tolstygina I., Krawietz D., Happe T., Auroy P., Adriano J-M., Beyly A., Cuiné S., Plet J., Reiter I.M., Genty B., Cournac L., Hippler

M., Peltier G. (2011) Control of hydrogen photoproduction by the proton gradient generated by cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Cell 23: 2619-2630

Tóth S.Z., Yacoby I. (2019) Paradigm shift in algal H₂ production: bypassing competitive processes Cell 37: 1159-1163

Yilmaz I., Ilbas M., Tastan M., Tarhan C. (2012) Investigation of hydrogen usage in aviation industry. Energy Convers. Manag. 63: 63-69

8. Nyilatkozat

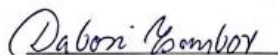
A 37. OTDK BIOLÓGIA SZEKCIÓ FELHÍVÁSÁNAK 2. SZÁMÚ MELLÉKLETE

TÉTELES SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Dabosi Zsombor** nyilatkozom, hogy a 37. OTDK-ra benyújtott **Fenntartható hidrogéntermelés megvalósítása váltakozó fényintenzitáson *pgr5* mutáns *Chlamydomonas* zöldalgával** című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

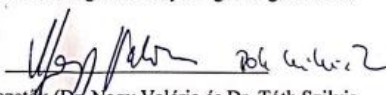
Részfeladat	A részvétel mértéke (öt fokozatú skálán jellemezve)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> törzsek nevelése és fenntartása	5
Klorofilltartalom meghatározása	5
Hidrogén és oxigén mennyiségének meghatározása gázkromatográfia segítségével	5
<i>In vitro</i> hidrogenáz enzim aktivitásának meghatározása	4
Az adatok statisztikai elemzése	1
A klorofill <i>a</i> fluoreszcencia mérése Handy-PEA készülék segítségével	3
Immunoblot analízis	2

Kelt: 2024.04.15.



Pályamunkát benyújtó hallgató (Dabosi Zsombor)
aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Témavezetők (Dr. Nagy Valéria és Dr. Tóth Szilvia)
Zita HUN-REN Szegedi biológiai kutatóközpont,
Növénybiológia Intézet)
aláírása

Nyilatkozat magyarázat:

A munkafolyamatokban való részvétel mértékét ötfokozatú skálán kérjük értékelni. A skála egyes értékeinek jelentése:

5 – Felkészítés után a feladat teljes egészét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

4 – Felkészítés után a feladat több mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

3 – Felkészítés után a részfeladat felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

2 – Felkészítés után a részfeladat kevesebb mint felét önállóan végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.

1 – A részfeladatot folyamatos segítséggel végeztem a pályamunkához szükséges mennyiségben.