Hatékony fotoautotróf H_2-termelés megvalósítása *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalgával

Ph.D. értekezés

Podmaniczki Anna

Témavezető:

Dr. Tóth Szilvia Zita

Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Növénybiológiai Intézet

Biológia Doktori Iskola

2022

Szeged

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke ... 3

1. Bevezetés ... 6

1.1. Megújuló energiaforrások ... 6

1.2. Fotoszintézis ... 7

1.2.1. Zöldalgák és magasabbrendű növények fotoszintetikus elektrontranszport folyamatai ... 8

1.3. A H_2 felhasználási lehetőségei napjainkban ... 10

1.4. *Chlamydomonas reinhardtii* H_2-termelése ... 11

1.5. Hidrogenáz enzimek típusai ... 12

1.6. Hidrogenáz működése ... 14

1.7. A *Chlamydomonas reinhardtii* H_2-termelésének indukciója ... 15

1.7.1. Anaerob indukció ... 15

1.7.2. Kénmegvonás ... 15

1.7.3. Magnézium, nitrogén és foszfor hiányának hatása a H_2-termelésre ... 16

2. Célkitűzés ... 18

3. Anyagok és módszerek ... 19

3.1. *Chlamydomonas reinhardtii* törzsek fenntartása és nevelése ... 19

3.2. Kémiai kezelések ... 21

3.3. O_2 abszorbensek ... 21

3.4. Mérési módszerek ... 22

3.4.1. Klorofilltartalom meghatározása algakultúrákban ... 22

3.4.2. O_2 és H_2 mennyiségének meghatározása gázkromatográfiával ... 22

3.4.3. Gyors klorofill-a fluoreszcencia (OJIP) mérés ... 23

3.4.4. Fehérjeizolálás és western blot analízis ... 23

3.4.5. Sejtszám meghatározása ... 25

3.4.6. *In vitro* hidrogenázaktivitás-mérések ... 25

3.5. Statisztikai elemzés ... 26

4. Eredmények ... 27

4.1. Folyamatos H_2-termelés fenntartásához szükséges kulcslépések azonosítása ... 27

4.1.1. Acetátmentes tápoldat használata a H_2-termelés során ... 27

4.1.2. Acetátmentes tápoldatban nevelt kultúrák és a széles körben elterjedt kénmegvonásnak kitett kultúrák H_2-termelésének összehasonlítása ... 28

4.1.3. A H_2-termelés forrása és szabályozása ... 30

4.2. Az új H_2-termeltetési módszer optimalizálása ... 39

4.2.1. A hidrogenáz aktivitásának megőrzése Fe-NaCl alapú O_2-abszorbens segítségével 39

4.3. Az új rendszer fenntarthatóságának tesztelése ... 44

4.3.1. Fotoszintetikus aktivitás a H_2-termelés alatt ... 44

4.4. H_2-termeltetés hatékonyságának fokozása egy új típusú fotobioreaktor kialakításával ... 48

4.5. Fokozott H_2-termeléssel rendelkező mutáns törzsek azonosítása, jellemzése ... 52

4.5.1. A L159I-N230Y mutáns H_2-termelése TCL-PBR-ben, napfény intenzitásán ... 52

4.5.2. A *pgr5* és a *pgrl1* mutánsok H_2-termelése TCL-PBR-ben, a napfény intenzitásán .. 57

5. Diszkusszió ... 63

6. Köszönetnyilvánítás ... 68

7. Irodalomjegyzék ... 69

8. Összefoglalás ... 84

9. Summary ... 89

10. Saját közlemények ... 94

Rövidítések jegyzéke

A_0	a PSI elsődleges elektron akceptora
A_1	a PSII másodlagos elektron akceptora
Asc	aszkorbát
ATP	adenozin-trifoszfát
BSA	szarvasmarha szérum albumin
chl	klorofill
cit b_6/f	citokróm b_6/f
CBB	Calvin-Benson-Bassham ciklus
CP43, CP47	a második fotokémiai rendszer belső fénybegyűjtő antenna komplexei
D1, D2	a második fotokémiai rendszer reakciócentrum fehérjéi
DCMU	3- (3 ', 4′-diklór-fenil) -1,1-dimetil-karbamid
DTT	ditiotreitol, 1,4-bisz-(szulfanil)-bután-2,3-diol
F_A, F_B, F_X	a PSI Fe-S centrumot tartalmazó elektron akceptorai
FCCP	karbonil-cianid p-trifluor-metoxi-fenil-hidrazon
Fd	ferredoxin
F_0, F_m	a fluoreszcencia indukció kezdeti és maximális értéke
F_v	változó fluoreszcencia (F_m-F_0)
F_v/F_m	a PSII maximális kvantumhatásfoka
FNR	ferredoxin-NADP-oxidoreduktáz
GA	glikolaldehid
GC	gázkromatográf
Glu	glükóz
GO	glükóz-oxidáz
HS	Sueoka’s high salt medium
HSA	Sueoka’s high salt medium acetáttal
Hyda1, Hyda2	[FeFe]-típusú hidrogenáz enzimek
KCN	kálium-cianid
LHCI	a PSI klorofill a/b fénybegyűjtő pigment-protein komplexe
LHCII	a PSII fő klorofill a/b fénybegyűjtő pigment-protein komplexe
LHCSR3	tilakoid membrán fehérje

Mn-centrum	a PSII vízbontó komplexének aktív centruma, aminek felépítésében négy Mn-, egy Ca- és egy Cl-ion vesz részt
NADPH	nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát
OEC	vízbontó komplex
OJIP	gyors klorofill-a fluoreszcencia indukció
P_{680}	a második fotokémiai rendszer reakciócentruma
P_{700}	az első fotokémiai rendszer reakciócentruma
PBR	fotobioreaktor
PC	plasztocianin
PetB	citokróm b_6/f komplex fehérje
PetP	citokróm b_6/f komplex fehérje
PGRL1	Proton Gradient Regulator Like 1
PGR5	Proton Gradient Regulator
PQ	plasztokinon
PQH2	plasztokinol
PsaA	PSI reakciócentrum fehérjéje
PsbA	D1 fehérje
PsbB	CP47 fehérje
PsbC	CP43 fehérje
PsbD	D2 fehérje
PsbE	citokróm b_{559} α alegysége
PsbF	citokróm b_{559} β alegysége
PsbO	a vízbontó komplex 33 kDa-os külső fehérjéje
PsbP	a vízbontó komplex 23 kDa-os külső fehérjéje
PsbQ	a vízbontó komplex 16 kDa-os külső fehérjéje
PsbR	a vízbontó komplex 10 kDa-os külső fehérjéje
PSI	az első fotokémiai rendszer
PSI-CET	az első fotokémiai rendszer ciklikus elektrontranszportja
PSII	a második fotokémiai rendszer
PVDF	polivinilidén fluorid
Q_A	a PSII elsődleges kinon akceptora
Q_B	a PSII másodlagos kinon akceptora
RbcL	Ribulóz-1,5-biszfoszfát-karboxiláz-oxigenáz nagy egysége

SDS	nátrium-dodeciszulfát-poliakrilamid
SHAM	szalicil-hidroxámsav
TAP	Tris-acetát-foszfát tartalmú táptalaj vagy tápoldat
TAP-S	kénmentes tris-acetát-foszfát tartalmú táptalaj vagy tápoldat
TCD	hővezető-képességi detektor
TCL-PBR	Thin-Cell-Layer Photobioreaktor, vékony folyadékrétegű fotobioreaktor
TL	termolumineszcencia
TP	Tris-foszfát tartalmú táptalaj vagy tápoldat
TP-S	kénmentes tris-foszfát tartalmú táptalaj vagy tápoldat
Tyr_D	tirozin D, a PsbD fehérje tyr_{160} aminosav oldallánca
Try_Z	tirozin Z, a PsbD fehérje tyr_{161} aminosav oldallánca

1. Bevezetés

1.1. Megújuló energiaforrások

A XVII. században elkezdődött ipari forradalom óta a fosszilis tüzelőanyagok szén, olaj és földgáz formájában működtetik a társadalmunkat mozgató technológiai és szállítási hálózatokat. Ám a világ véges geológiai készletekkel rendelkező fosszilis tüzelőanyagokból történő ellátása veszélyezteti a hosszú távú energiaellátásunkat, és egyben hatalmas megterhelést jelent a környezet számára is (Crabtre és mtsai., 2004). Mindezek mellett az energiaigény világszerte fokozódik a népesség növekedésnek köszönhetően (Abdalla és mtsai., 2018). Az előrejelzések szerint a 2004-től 2050-ig tartó időszakra nézve az energiaigény megduplázódik, a további népességszám-emelkedés és a fejlődő országok iparosodásának következményeként (Hoffert és mtsai., 1998; Crabtre és mtsai., 2004). Az egyre növekvő kereslet mellett komoly probléma az is, hogy a fosszilis tüzelőanyagok kínálata meglehetősen korlátozott. Például a globális kőolaj- és gázkészletek csak a Föld néhány régiójában koncentrálódnak (Crabtre és mtsai., 2004; Yilmaz és mtsai., 2012), miközben a világ minden részén van rájuk igény. Ennek eredményeként a megbízható és folyamatos ellátás biztosítása egyre nagyobb kihívást jelent.

Az energiaellátás biztosításának problémáján túl a fosszilis üzemanyagok használata a saját egészségünket is veszélyezteti a velük járó kémiai és részecskeszennyezés révén (Crabtre és mtsai., 2004). De nem csak az egészségünkre nézve veszélyesek, ugyanis a szén-dioxid és más üvegházhatású gázok kibocsátása szorosan összekapcsolódik a globális felmelegedéssel, mely veszélyezteti a Föld éghajlati stabilitásának hosszú távú fenntartását.

A fosszilis energiahordozók helyettesítése azonban nem történhet meg egyik napról a másikra. Ezt bizonyítja az a tény, hogy egy új energiaellátó rendszer kialakításának igénye már az 1970-es években, az olajválság alatt felmerült (Ley és mtsai., 2014; Abdalla és mtsai., 2018). A figyelem ekkor fordult a megújuló energiaforrások felé.

Azon természeti forrásokat, melyekből az energia jelentősebb emberi beavatkozás nélkül kinyerhető és néhány éven belül újratermelődik, megújuló

energiaforrásnak nevezzük. Jelentőségük abból fakad, hogy nem okoznak jelentős környezetszennyezést, és összhangban vannak a fenntartható fejlődés alapelveivel. Ilyen alternatív energiafajták közé tartozik a szélenergia, a geotermikus energia, a víz-, biomassza-, és a napenergia.

A napenergia elsődleges formái a hő és a fény, mely sokféle módon képes átalakulni és elnyelődni a környezetben. Az átalakulások némelyike megújuló energiaforrást eredményez, mint például a biomassza és a szélenergia. A megújuló energia-technológiák alkalmazása kiváló lehetőséget nyújt az üvegházhatást okozó gázok kibocsátásának csökkentésére és a globális felmelegedés folyamatának lassítására a hagyományos energiaforrások helyettesítésével (Panwar és mtsai., 2011). Azonban széleskörű kutatásokra valamint fejlesztésekre van szükség ahhoz, hogy az alternatív források versenyképes mennyiségben és áron energiát szolgáltathassanak (Crabtre és mtsai., 2004).

A kutatások egy része a hidrogéngáz (H_2) minél szélesebb körű felhasználására irányul. A H_2 egy tiszta energiahordozó, amelynek elégetése során nem keletkezik szén-dioxid, csak víz. A H_2 kb. 99%-át azonban jelenleg fosszilis tüzelőanyagokból állítják elő, amely óriási légszennyezéssel jár, ezért szükség van megújuló energiaforrásokon alapuló H_2-termelési módszerek kidolgozására. Ennek egyik ígéretes módja a zöldalgák hasznosítása, melyek fotoszintézisükhöz kapcsoltan igen nagy hatékonysággal képesek H_2-t előállítani.

1.2. Fotoszintézis

A fotoszintézis elsőrendű fontosságú a földi élet szempontjából, mivel a napenergiát és a szervetlen tápanyagokat biomasszává alakítja. A fotoszintézisre képes élőlényeket két nagy csoportra oszthatjuk fel: a fotoszintézisük során O_2-t termelő szervezetekre, illetve anoxigenikus (azaz O_2-t nem termelő) szervezetekre (Blankenship 2001). A Föld biológiai történetének egyik legfontosabb mérföldköve az O_2-t termelő fotoszintetikus élőlények megjelenése (körülbelül 3,5 milliárd évvel ezelőtt) az evolúció során. Algákra, cianobaktériumokra és növényekre jellemző ez a típusú fotoszintézis.
Az anoxigénikus fotoszintézissel rendelkező organizmusoknak, tekintettel arra, hogy egyetlen fotokémiai rendszerük nem generál elég oxidáló potenciált a víz oxidációjához,

szükségük van szerves donormolekulákra, mint elektronforrásra. Az anoxigenikus fotoszintézis a bíbor- és a zöldbaktériumoknál figyelhető meg.

1.2.1. Zöldalgák és magasabbrendű növények fotoszintetikus elektrontranszport folyamatai

Habár a fotoszintézis általános egyenlete megtévesztően egyszerű, valójában a szénhidrátok szintéziséhez összehangolt módon fizikai és kémiai reakciók komplex csoportjának kell megtörténnie.

A növényekben és az algákban a fotoszintetikus folyamat a kloroplasztiszként ismert organellumokban megy végbe, amelyek a sejtek belsejében helyezkednek el. A fotoszintetikus reakciókat hagyományosan két szakaszra osztják: a fényreakció, amely elektron- és proton transzferreakcióból áll, és a sötét reakció, amely szénhidrátok bioszintézisét foglalja magába.

A fényreakció a kloroplasztiszok tilakoidmembránjaiban játszódik le. A folyamat végbemeneteléhez két fotokémiai rendszer, az első és a második fotokémiai rendszerek (PSI és PSII), valamint ezek fénybegyűjtő komplexei (LHCI és LHCII), a citokróm b_6/f komplex és az ATP-szintáz szükségesek.

Az O_2-fejlődésért a PSII vízbontó komplexe (OEC) felelős, amely a kloroplasztisz tilakoid membrán rendszerében, annak lumen felőli oldalán helyezkedik el. Az OEC központi eleme a Mn-komplex, amelyet négy Mn-ion, egy Ca^{2+} és egy Cl^- alkot, amelyet a lumen felőli oldalon fehérje alegységek (növényekben és zöldalgákban PsbO, PsbP, PsbQ, PsbR) vesznek körbe (Allahverdiyeva és mtsai., 2013; Pagliano és mtsai., 2013). A PSII reakciócentrumában lezajló töltésszeparációk hatására a Mn-komplex S_0 kiindulási állapotból S_1, S_2, S_3, S_4 oxidációs állapotba kerül (Kok és mtsai., 1970), ami a pozitív töltések összegyűjtését szolgálja a vízbontás számára. Az O_2 felszabadulása az S_4 állapotnál következik be, amely során az S_4 állapot S_0-ba alakul át, majd a vízbontó komplexbe két H_2O molekula kötődik be, és ezzel helyreáll a kiindulási állapot (Dau és mtsai., 2012, Vinyard és mtsai., 2013). A vízbontó komplexből az elektronok 0,1-0,8 ms alatt jutnak el az oxidált állapotú tirozin Z-re (Tyr_Z) (McEvoy és Brudvig, 2006; Barber, 2008), majd innen kb 20 ns alatt a PSII reakciócentrumába, pontosabban a $P680^+$-hoz.

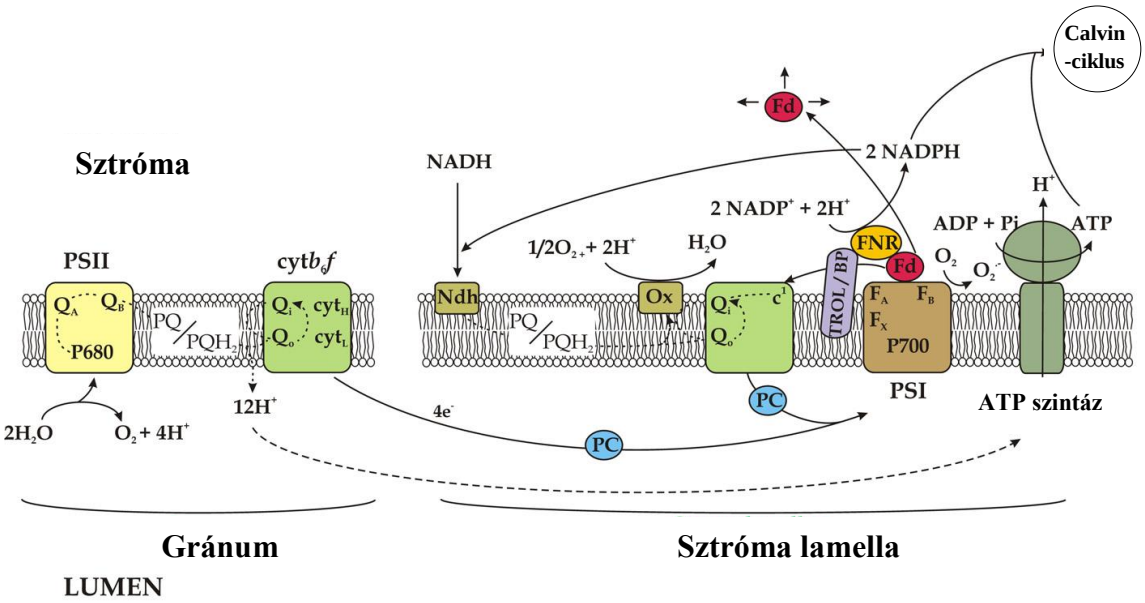
A PSII reakciócentrumot a D1 (PsbA) és a D2 (PsbD) fehérjék, valamint a citokróm b_{559} α (PsbE) és β (PsbF) alegysége alkotja. A D1 és D2 fehérjék tartalmazzák az elektronátadási folyamathoz szükséges különböző kofaktorokat (P680, feofitin, Q_A és a Q_B kinon, valamint a Tyr_Z és Tyr_D, illetve egy nem hemben lévő Fe-ion). A D1 és D2 fehérjéhez közvetlenül kapcsolódik a CP43 (PsbC) és CP47 (PsbB) protein, amelyek a PSII belső (proximális) fénybegyűjtő antennájaként működnek (Barber, 2008, Caffarri és mtsai., 2009; van Amerongen és Croce, 2013). A perifériális fénybegyűjtő antennakomplex (LHCII) hat különböző pigment-protein komplexből épül fel (Lhcb1-6). Az LHCII fehérjék a klorofill *a*/*b* mellett különböző xantofill-molekulákat is tartalmaznak, mint a lutein, neoxantin, violaxantin, anteraxantin, zeaxantin (Croce és mtsai., 2002; Liu és mtsai., 2004; Standfuss és mtsai., 2005).

A PSII antennarendszere által elnyelt fényenergia a reakciócentrumba jut, amelynek hatására a P_{680} gerjesztett állapotba kerül. A gerjesztett P_{680} képes egy elektront átadni a feofitin molekulának, amellyel mintegy 3 ps alatt lezajlik a primer töltésszeparáció. A redukált feofitinről 250-300 ps alatt átjut az elektron a Q_A-ra, majd a redukált Q_A-Q_B között 0,1-0,2 ms alatt történik meg az első, és 0,4-0,5 ms alatt a második elektronátadás. A Q_B a két elektron és két proton felvétele után leválik a PSII-ről, majd a mobilis plasztokinon (PQ) pool-ból újabb PQ kötődik be a D1 fehérjére (Nelson és Yocum, 2006; Barber, 2003, 2008).

A citokróm b_6/f komplex végzi a plasztokinol (PQH_2) oxidációját és a plasztocianin (PC) redukcióját, miközben protont pumpál a sztrómából a tilakoid lumenbe, ezáltal proton grádienst kialakítva a tilakoid membrán két oldala között (Kurisu és mtsai., 2003; Cramer és mtsai., 2006).

A PSI komplex végzi a plasztocianin (PC) oxidációját és a ferredoxin (Fd) redukcióját. A PSII-höz hasonlóan a PSI is reakciócentrumból és perifériás fénybegyűjtő komplexből (LHCI) áll, amely magasabb rendű növények és algák esetében monomer formában van jelen. A PsaA és PsaB, illetve kb. 20 kisebb fehérjealegység alkotja a PSI reakciócentrumot (Croce és van Amerongen, 2013). A pigmentmolekulák legnagyobb részét a PsaA és a PsaB alegységek kötik, így a PSI belső antennájaként funkcionálnak, míg a kisebb alegységek csak néhány klorofillmolekulát tartalmaznak (Jensen és mtsai., 2007; Fromme és mtsai., 2001; Amunts és mtsai., 2010).

Megvilágítás hatására a PSI-ben lévő P_{700} gerjesztett állapotba kerül, és átad egy elektront a reakciócentrumban elhelyezkedő primer akceptornak (A_0), majd az elektron a másodlagos akceptorra (A_1) kerül (40-200 ps), ahonnan a vas-ként tartalmazó komponenseken (F_X, F_B és az F_A) keresztül (15-500 µs), a ferredoxinra jut, végül pedig az Fd-NADP+ oxidoreduktáz (FNR) enzim segítségével NADPH keletkezik, amely a CBB ciklusban hasznosul (0,5-20 µs; Nelson és Yocum, 2006). Az elektronokat a PC felől a P_{700}^+ fogadja, mely folyamat 20-200 µs alatt megy végbe (1. ábra).



1. ábra A fotoszintetikus elektrontranszport (Musumeci és mtsai (2012) nyomán) PSII elsődleges elektron donora a P_{680}, Q_A és Q_B pedig az elsődleges és másodlagos kinon akceptora. PQ/PQH_2: a plasztokinon oxidált és redukált formája. PC: plasztocianin, Ndh: NADH/NADPH dehidrogenáz komplex, Ox: oxidáz, PSI elsődleges elektron donora a P_{700}. F_X, F_A, F_B: a PSI belső [4F-4S] centrumai. Fd: ferredoxin, FNR: ferredoxin-NADP-oxidoreduktáz

1.3. A H_2 felhasználási lehetőségei napjainkban

A fotoszintézis irányulhat az ipar szempontjából fontos biotermékek, így például H_2, lipidek és polimerek előállítására is. (Eroglu and Melis, 2011). Ezen termékek előállítása az utóbbi években egyre nagyobb figyelmet kapott.

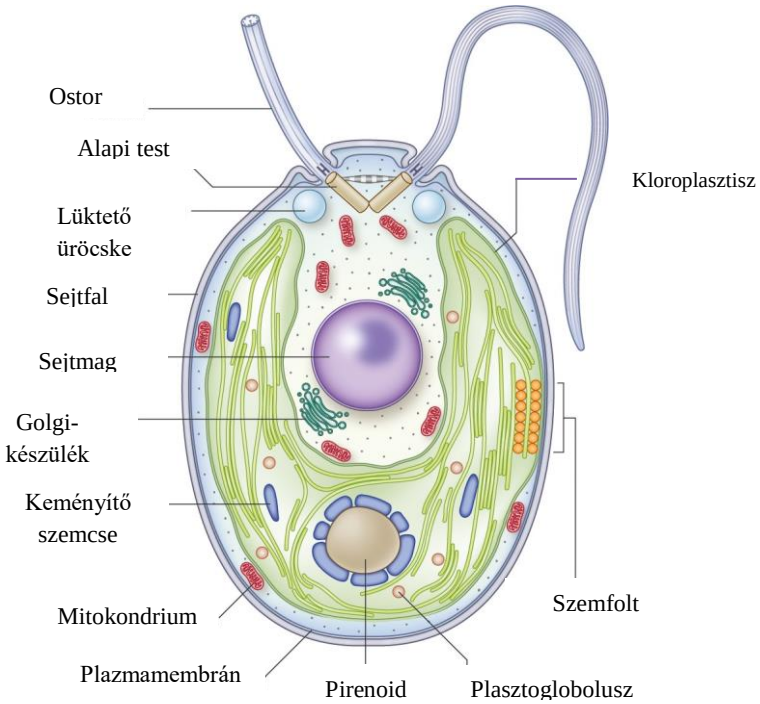
A H_2 felhasználásának lehetőségei igen szerteágazóak. Így például felhasználható üzemanyagként: az űrkutatásban elsősorban H_2 és O_2 keveréke a rakéták

hajtóanyaga, de egyre nő a hidrogénmeghajtású járművek száma is. Így például személyautókon kívül találunk még repülőgépet, autót, buszt, targoncát, tengeralattjárót, hajót és vonatot is, amik ma már hidrogénmeghajtással működnek. Számos más ipar is felhasználja, mint alapanyagot. Az olajiparban a kén és egyéb szennyeződések eltávolítására, valamint nagy szénatomszámú, telített szénhidrogének kisebb szénatomláncú szénhidrogénekre történő bontásához (ez az úgynevezett krakkolás) használják. A vegyiparban ammónia és etanol előállítására, élelmiszeriparban étkezési olajok átalakítására, vagy faggyú és a zsír állati takarmánnyá történő átalakításához, műanyagiparban nejlonok, poliészterek szintéziséhez használják. Fémiparban O_2 megkötésére vagy hőkezeléshez, üvegiparban üvegcsiszoláshoz, az elektromos energia iparban pedig hűtőközegként hasznosítják a H_2-t (Abdalla és mtsai., 2018; Yilmaz és mtsai., 2012). Mindezek mellett felhasználható tiszta és sokoldalú energiatároló közegként is.

1.4. *Chlamydomonas reinhardtii* H_2-termelése

A *Chlamydomonas reinhardtii* egyike a leggyakrabban használt fajoknak a H_2-termelés kutatásában. Egysejtű, haploid alga, mely a világon széles körben elterjedt, megtalálható talajban és vízben egyaránt (Harris, 2001). Képes fotoautotróf életmódot folytatni, de akár sötétben is életben marad amennyiben szerves szénforrás (acetát) áll a rendelkezésére (Spreitzer és Mets, 1981).

A *C. reinhardtii* sejt (2. ábra) átmérője átlagosan kb. 10 µm (a sejtciklus során azonban ez változik). Egyszerű életciklussal rendelkezik, a mutánsok izolálása is könnyen megoldható, valamint az egyre növekvő molekuláris biológiai eszközök és technikák sora pontos genetikai vizsgálatokat tesz lehetővé (Harris, 2001). Az e modellorganizmust használó jelenlegi vizsgálatok fő területei között megtalálhatjuk a flagelláris rendszer felépítését és funkcióját, az alapi testek (centriolák) genetikáját, a fotoszintézist, a fényérzékelést és a sejtciklus szabályozását is (Harris, 2001; Antal és mtsai., 2015). A nukleáris, kloroplasztikus és mitokondriális teljes genom szekvenciák a rendelkezésünkre állnak, amelyek nagyban megkönnyítik az algák anyagcseréjének átfogó vizsgálatát (Antal és mtsai., 2015; Gonzalez-Ballester és mtsai., 2015).



2. ábra Vegetatív Chlamydomonas sejt strukturális felépítése (Sasso és mtsai (2018) nyomán). A *C. reinhardtii* sejt általában 5-10 µm nagyságú. Elől két csilló található, melyek 9+2 felépítésű mikrotubulus szerkezettel rendelkeznek (Harris, 2001). Ez a felépítés általánosan jellemző az eukarióták mozgást biztosító csillóira. A sejt nagy részét az egyetlen, csésze alakú kloroplasztisz foglalja el. Itt található a pirenoid, melyben a Rubisco koncentrálódik (Mackinder és mtsai., 2016). A kloroplaszt és a sejtmembrán találkozásánál található a szemfolt, mely lehetővé teszi a sejtek fototaxisát. A sejt elülső részén található lüktető űröcskék segítenek hipoozmotikus körülmények között is fenntartani a citoplazmatikus víztartalmat (Komsic-Buchmann és mtsai., 2014). A csillók alapjánál találhatóak a bazális testek, melyek biztosítják a csillók felépülését/összeszerelését (Dutcher és O'Toole, 2016). A sejtben még ezen kívül megtalálható a központilag elhelyezkedő sejtmag, a Golgi-testek, és a mitokondriumok.

A fotoszintézishez kapcsolt H_2-termelésre az utóbbi évtizedekben egyre nagyobb figyelem összpontosult, és ezen kutatásokban a *C. reinhardtii* az egyik leggyakrabban használt modellszervezet. Ugyanis egyike azon kevés algáknak, melyek képes anoxia alatt is fenntartani hosszútávon a fény hajtotta H_2-termelésüket (Ghirardi, 2015).

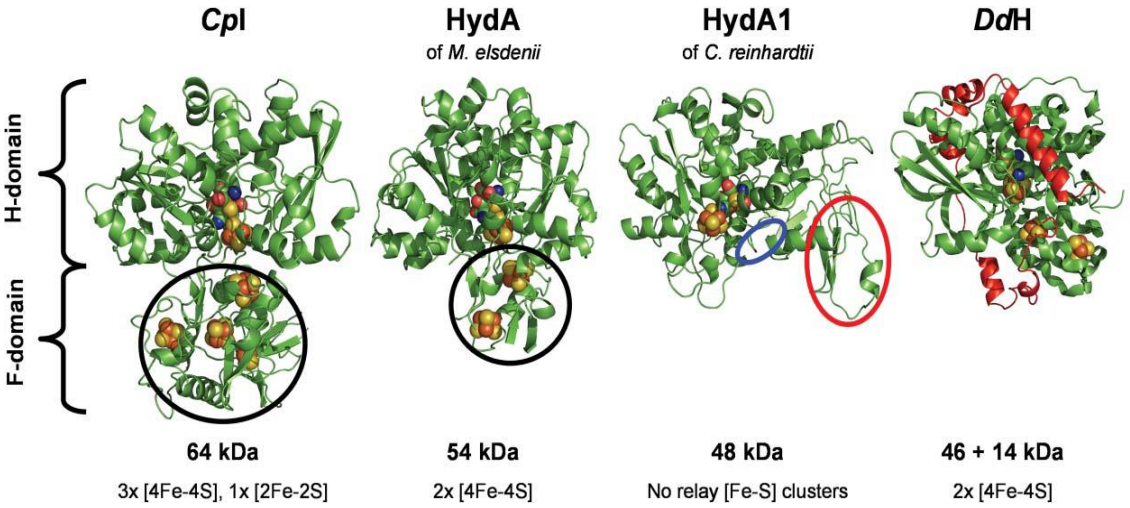
1.5. Hidrogenáz enzimek típusai

A hidrogenáz enzim képes katalizálni a H_2 reverzibilis oxidációját. Az aktív helyük fémtartalma alapján három különböző típusba csoportosítják őket:

[FeFe]-hidrogenázok, [NiFe]-hidrogenázok és [Fe]-hidrogenázok. Ez utóbbiak nem tartalmaznak Fe-S centrumot (Happe és Kaminski, 2002). Valamennyi hidrogenáz a reverzibilis H_2 felvételt katalizálja, de míg a [FeFe]- és [NiFe]-hidrogenázok valódi redox-katalizátorok, azaz a H_2 oxidációját és a proton (H^+) redukcióját hajtják végre, a [Fe]-hidrogenázok a H_2 reverzibilis heterolitikus hasítását katalizálják.

A [NiFe]- és [FeFe]-hidrogenázok szerkezetében van néhány közös jellemző: mindegyik enzimnek van egy aktív centruma és néhány Fe-S csoportja. Azokat a hidrogenázokat, amelyek egy di-Fe centrumot tartalmaznak egy áthidaló ditiolát-kofaktorral, [FeFe] -hidrogenázoknak nevezzük.

A *Chlamydomonas*-ban kétféle [FeFe]-típusú hidrogenáz enzim található meg, HydA1 (3. ábra) és HydA2, amelyek igen nagy aktivitással működnek a PSI akceptor oldalán (Gonzalez-Ballester és mtsai., 2015).



3. ábra [FeFe]-típusú hidrogenázok összehasonlítása (Stripp és Happe (2009) nyomán) CpI a *Clostridium pasteurianum*-ból izolált úgynevezett bakteriális-típusú FeFe-hidrogenáz. A felső H-domén tartalmazza a H-klasztert, a kiegészítő F-domén pedig három [4Fe-4S] és egy [2Fe-2S] klasztert tartalmaz. A *Megasphaera elsdenii-ben* található Hyda F-doménjának mérete kisebb, ez a bakteriális [FeFe]-hidrogenáz csak két [4Fe-4S] klasztert tartalmaz a H-domén prosztetikus csoportján kívül (Atta és Meyer, 2000). A *C. reinhardtii-ban* található HydA1 a klorofita-típusú hidrogenázok képviselője, az F-domén hiányzik belőle (Stripp és mtsai., 2009). A *Desulfovibrio desulfuricans*-ban található periplazmatikus *Dd*H szerkezete eltérő, mert heterodimer és két egyláncú alegységet alkot. Ellentétben az F-doménnal az alegység nem tartalmaz [Fe-S] klasztereket. A H-klaszter mellett azonban kettő [4Fe-4S] klaszter található 46 kDa alegységgel.

1.6. Hidrogenáz működése

A *Chlamydomonas* hidrogenáz enzimeinek működése a természetben is megfigyelhető, mikor az algák sötétről hirtelen fényre kerülnek (Fouchard és mtsai., 2005). Anaerob légkör alatt ugyanis a H_2-metabolizmus teszi lehetővé az algák számára, hogy elegendő ATP-t hozzanak létre, valamint a H_2-termelés lehetővé teszi a felesleges gerjesztési energia disszipációját, amely a stresszhelyzet túléléséhez szükséges (Happe és Kaminski, 2002). Azonban az enzim nagyfokú érzékenységet mutat az O_2-nel szemben, mely gátolja mind az expresszióját, mind az aktivitását, így a CBB ciklus és a lineáris elektrontranszport újraindulását követően – mely során O_2 is keletkezik – a H_2-termelés leáll a sejtekben (Fouchard és mtsai., 2005). Már alacsony O_2 koncentráció is (0.2%) elég ahhoz, hogy a H_2-termelés 50%-os csökkenést mutasson az algában (Zhang és mtsai., 2002).

A Fd természetes elektrondonorként működik, összekapcsolva a két hidrogenáz enzimet a fotoszintetikus elektrontranszportlánccal. A hidrogenáz három különböző útvonal felől kaphatja működéséhez az elektronokat: PSII-függő (I), PSII-független (II) és fermentációs metabolizmushoz (III) kapcsolt útvonalakról beszélhetünk.

I: A PSII-függő útvonalat közvetlen fotolízis útvonalnak is nevezik, ahol a H_2 víz bontásával és ezzel egyidejűleg O_2 felszabadulással együtt érhető el. A vízbontás során keletkezett elektronok a két fotokémiai rendszert magába foglaló lineáris elektrontranszporttal jutnak el a Fd-ra. A Fd a PSI felől kapja az elektronokat, melyek legtöbbje a megszokott fotoszintetikus körülmények között a ferredoxin $NADP^+$ oxidoreduktáz (FNR) működése révén NADPH formájában kerül felhasználásra a CO_2-fixáció során. Anaerob körülmények között azonban a Fd az elektronokat a HydA-hoz továbbítja. Ennek az útvonalnak a fő hátránya, hogy a H_2 felszabadulás mellett O_2 felszabadulás is történik, ami gátolni fogja a HydA aktivitását, így a H_2-termelés folyamata átmeneti, ez a természetben mindössze pár percig tart.

II: Ebben az esetben a NAD(P)H elektronjait használja fel a működéséhez a hidrogenáz enzim, amelyek közvetlenül a NADH reduktáz által a redukált PQ-pool-ra jutnak, majd innen érik el a PSI-et, Fd-t és végül a HydA-t. Ez az útvonal nem igényel PSII aktivitást, vagyis az O_2 és H_2-termelés kapcsolt. Ám ennek az útvonalnak a H_2-termelési hatékonysága jóval gyengébb, mint a PSII-függő útvonalé.

III: Ebben az esetben az elektronok a piruvát acetil-koenzim A-vá alakulásából származnak, amelyet a piruvát-ferredoxin reduktáz (PFR) végez el, amit a Fd redukál (Gonzalez-Ballester és mtsai., 2015).

1.7. A *Chlamydomonas reinhardtii* H_2-termelésének indukciója

1.7.1. Anaerob indukció

A zöldalgák fotobiológiai H_2-termelését évtizedek óta tanulmányozzák. A fő kihívást az enzim O_2 iránti érzékenysége okozza, mely megakadályozza az ipari hasznosítását. Így a kutatások egy része az O_2-re kevésbé érzékeny hidrogenázok megalkotására koncentrált, míg más kutatások arra törekedtek, hogy az O_2 meg se jelenhessen a rendszerben (például a kénmegvonás, nitrogénmegvonás, foszformegvonás protokollok használatával).

A *C. reinhardtii* zöldalgákban előforduló hidrogenáz enzim kifejeződését a sejtek anaerob adaptációja indukálja. Megfigyelték, hogy az anaerob körülmények kialakulása után már 10 perccel kimutatható volt a sejtekben a hidrogenáz fehérje mennyiségének emelkedése. Az enzimaktivitást tipikusan több órás sötét anaerob inkubációval indukálhatjuk (Happe és mtsai., 1994). Ez azonban csak átmeneti, pár percig tartó H_2-termelést eredményez, a CBB ciklus aktiválódása és az ezzel járó O_2 fejlődés következtében (Cournac és mtsai., 2002).

1.7.2. Kénmegvonás

A jelenleg legelterjedtebb H_2-termeltetési módszer a kénmegvonás (Melis és mtsai., 2000). Ennek hatására bekövetkező fő válaszreakciók magukba foglalják a vízbontás és a CO_2-fixálás inaktivációját, a sejtosztódás leállását és a fotoszintetikus apparátus részleges degradálódását (Melis és mtsai., 2000; Volgusheva és mtsai., 2017). Az így kialakult anaerob körülmények között kifejeződik a hidrogenáz és megindulhat a H_2-termelés, amely több napig tart. A sejtek ezen időszak alatt öt fiziológiás fázison mennek keresztül: O_2-termelési fázis (I), O_2-fogyasztási fázis (II), anaerobiózis fázis (III), H_2-termelés fázis (IV) és terminációs fázis (V). Megfigyelhető, hogy az algasejtek

az anaerob fázis alatt keményítőt halmoznak fel, és ezt bontják le a H_2-termelés szakaszában.

Azonban ennek az eljárásnak megvannak a maga hátrányai, például csak szerves szénforrás (acetát) jelenlétében működik hatékonyan. Súlyos stresszhatást jelent, mely a fotoszintetikus apparátus leépülésével jár együtt, ennek során a PSII inaktiválódik (Melis és mtsai, 2000). Ez utóbbi aktivitása azonban kulcsfontosságú, ugyanis a H_2-termelés 60-70%-a PSII-függő útvonalhoz kapcsolható, és csak 20-30% a PSII-független útvonalakhoz (Volgusheva és mtsai., 2017). Inaktiválódása esetén tehát a H_2-termelés hatékonysága jóval kisebb, illetve teljesen meg is szűnhet. A CBB ciklus enzimjei, például a Rubisco mennyisége jelentősen csökken a protokoll folyamán és a kultúra a kísérlet végén nehezen regeneráltatható.

1.7.3. Magnézium, nitrogén és foszfor hiányának hatása a H_2-termelésre

A kénmegvonás mellett más elemek hiánya is elősegítheti a kultúrák anaerobbá válását és a H_2-termelés megindulását.

A magnéziumnak (Mg) kulcsfontosságú szerepe van számos élettani folyamatban. Mint a klorofillmolekula alkotóeleme döntő szerepet tölt be a fotoszintetikus apparátusban. Így érthető, hogy hiánya jelentősen megváltoztatja a fotoszintetikus reakciókat és a fotoszintetikus rendszerek felépítését. Az anaerob körülmények kialakulását követően (mely hamarabb következik be, mint kénmegvonás esetében) néhány óra múlva H_2-termelés figyelhető meg ezeknél a kultúráknál is (Volgusheva és mtsai., 2015). A Mg-hiánynak kitett sejtek hosszabb időn át tudták fenntartani a H_2-termelést a kénmegvont kultúrákkal összehasonlítva. Ez annak köszönhető, hogy ebben az esetben a PSII aktivitás kisebb mértékben csökken, mindösszesen 30%-kal kevesebb a kontrollhoz képest és ezt a szintet a kísérlet végéig (168 h) fent is tudja tartani. Megfigyelték azt is, hogy a sejtek a teljes kísérlet alatt képesek a CO_2-fixáció aktivitását is megőrizni (Volgusheva és mtsai., 2017).

A nitrogén-hiány is képes kiváltani a H_2-termelést. Ebben az esetben is a fotoszintetikus aktivitás csökkenését tapasztaljuk, valamint keményítő- és lipidfelhalmozódás történik acetát jelenlétében. Itt azonban a kénmegvonással ellentétben nem tapasztaljuk a keményítő lebontását a H_2-termelés szakaszában.

Mindazonáltal sokkal lassabb csökkenés figyelhető meg a PSII aktivitásban, és a H_2-termelés hatékonysága is alacsonyabb, mint a kénmegvonás esetében.

Chlamydomonas-ban a foszforhiány a PSII aktivitásának és az antennaméret csökkenését okozza, ami a kultúra anaerobbá válását eredményezi acetát jelenlétében. A PSII centrumok inaktiválódása ebben az esetben sem olyan gyors, mint kénhiány esetén, az O_2-termelés is lassabban csökken. Ez esetben is megfigyelhető a keményítő felhalmozódása a sejtekben, melyet a sejtek a H_2-termelés szakaszában bontanak le (Gonzalez-Ballester és mtsai., 2015; Batyrova és mtsai., 2012).

Mindezek a technikák azonban hosszútávon és főként a későbbi ipari felhasználhatóságra nézve nem tekinthetőek hatékonynak. Időigényesek, drágák és az algasejtek a kísérletek végére akár irreverzibilis károsodásokat is szenvedhetnek, így a hosszútávon fenntartható H_2-termelés nem biztosított.

2. Célkitűzés

A természetben megfigyelhető, hogy a hosszabb időre sötétbe került algáknál megvilágítás hatására pár percig tartó H_2-termelés következik be. Ennek a rövid periódusnak a hosszát és hatékonyságát korábban kénmegvonás segítségével kívánták megnövelni, amely azonban számos negatív mellékhatással jár együtt, melyek az algák H_2-termelésének az ipari alkalmazását akadályozzák.
Munkám során egy hatékonyabb, és az algasejtekre nézve kevésbé káros, az anaerob indukción alapuló technika kifejlesztését és optimalizálást tűztük ki célul, amelynek elemei:

1, A folyamatos H_2-termelés fenntartásához szükséges kulcslépések felderítése
2, Ezek ismeretében egy új H_2-termeltetési módszer kifejlesztése, optimalizálása
3, A rendszer fenntarthatóságának tesztelése
4, H_2-termeltetés hatékonyságának fokozása egy új típusú fotobioreaktor kialakításával
5, Fotoszintézisben érintett, fokozott H_2-termeléssel rendelkező mutáns törzsek azonosítása, jellemzése.

3. Anyagok és módszerek

3.1. *Chlamydomonas reinhardtii* törzsek fenntartása és nevelése

A kísérleteink során 5 különböző *Chlamydomonas reinhardtii* törzs H_2-termelését vizsgáltuk és hasonlítottuk össze. A kontrollként használt CC-124-es és CC409-es törzset a Minnesota-i Egyetem *Chlamydomonas* gyűjteményéből (Chlamydomonas Resource Centre, University of Minnesota, USA) rendeltük, míg az L159I-N230Y törzset Dr. Alberto Scoma (Department of Biological and Chemical Engineering-Industrial Biotechnology, Universty of Aarhus, Dánia), a *pgrl1*-es és *pgr5*-ös törzset pedig Michael Hippler (Institute of Plant Biology and Biotechnology, University of Münster, Németország) bocsátotta a rendelkezésünkre.

Az algasejteket Tris-acetát-foszfát (TAP) tartalmú szilárd táptalajon vagy tápoldatban, 100 µmol foton/m^2/s fotonáram-sűrűségen, 120 rpm-es rázatás és 21-23°C mellett, alganevelő kamrában neveltük. A TAP tápoldat tartalmaz Tris-t (20 mM), foszfát puffert (K_2HPO_4 (108 mg/l), KH_2PO_4 (56 mg/l), víz), makroelemeket: (NH_4Cl (400 mg/l), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (100 mg/l), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (50 mg/l), (Gorman és Levine, 1965)) és mikroelemeket: (EDTA-Na_2 (50 µg/l), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (22 µg/l), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (5,06 µg/l), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (1,61 µg/l), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (1,57 µg/l), $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ (1,1 µg/l), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (4,09 µg/l) (Hutner és mtsai., 1950)), és ecetsavat (0,1% v/v).

A kísérletekhez a sejteket steril körülmények között a szilárd táptalajról 100 ml-es lombikokba oltottuk (melyek 50 ml TAP-oldatot tartalmaztak), majd a lombikokat alganevelő kamrába helyeztük. Az így nevelt előkultúrákból 3 nap múlva 1-5 ml-t oltottunk át, az egyes kísérletektől függően 500 ml-es (300 ml TAP-ot tartalmazó) vagy 250 ml-es (50 ml TAP-ot tartalmazó) lombikokba, melyeket ezek után újabb 3 napra visszahelyeztünk a nevelő körülmények közé.

A 3 napos nevelést követően a kultúrákat lecentrifugáltuk és Sueoka's high salt medium (HS) tápoldatba (Sueoka, 1960) helyeztük, mely szintén tartalmaz makroelemeket: (NH_4Cl (500 mg/l), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (20 mg/l), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (10 mg/l), K_2HPO_4 (1,44 g/l), KH_2PO_4 (0,72 g/l), és mikroelemeket: (EDTA-Na_2 (50 µg/l), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (22 µg/l), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (5,06 µg/l), $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (1,61 µg/l), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (1,57 µg/l), $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ (1,1 µg/l), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (4,09 µg/l), (Hutner és mtsai.,

1950)). A centrifugálási lépés Sorvall LYNX6000 centrifugával történt, 2900 rpm-en, 20°C-on, 10 percen át. A felülúszó eltávolítását követően kísérlettől függően a sejtek acetátmentes HS tápoldatban vagy kénmentes TAP (a fent leírt alkotók közül a kéntartalmúakat kloridtartalmúakra cseréltük: $MgCl_2$, $ZnCl_2$, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $FeCl_2 \cdot 4H_2O$) tápoldatban kerültek felszuszpendálásra.

A 100 ml-es hypovial (szérumüveg) üvegekben folytatott kísérletekben a klorofilltartalmat 50 µg/ml chl (a+b)-re állítottuk be, illetve egy kísérlet során 15 és 30 µg/ml chl (a+b) koncentrációt használtunk. A klorofilltartalom beállítását követően 30 ml kultúrát helyeztünk egy 100 ml-es szérumüvegbe, melyet gumiszeptummal és egy alumíniumgyűrűvel légmentesen, steril körülmények között lezártunk. A Roux-típusú fotobioreaktor (PBR) üvegekben történt kísérletekhez a klorofilltartalmat 50 vagy 150 µg/ml chl (a+b)-re állítottuk be, és 100 ml kultúrát helyeztünk az üvegbe.

Az üvegek légterébe a lezárásukat megelőzően O_2 abszorbenst (Oxyfree 504B 100 cc loose, Tianhua Tech. CO., Ltd. Nanjing, Kína, illetve O2Zero-50 cc loose; Global Reach Ltd, London, UK) helyeztünk el speciális tartókban, úgy hogy közvetlenül az algakultúrával ne érintkezhessenek. A kultúrákat 4 órára sötétbe helyeztük, és a gázterükből az O_2-t és CO_2-ot 20 perces N_2-fúvatással eltávolítottuk. Ezt az anaerobizáló lépést még egyszer megismételtük a kultúrák fényre kerülése előtt.

A 4 órás sötét, anaerob indukciót követően a kultúrák 350 vagy 1000 µmol/m^2/s fotonáram-sűrűségre, 23-25°C-ra kerültek és 130 rpm sebességgel rázattuk őket. Az algák által termelt H_2 mennyiségét bizonyos időközönként gázkromatográf készülékkel (GC) határoztuk meg.

A kénmegvonásos kísérletek alatt a sejteket lecentrifugáltuk és a felülúszó eltávolítása után kénmentes tápoldatban felszuszpendáltuk őket. Ezt a lépést még négyszer megismételtük. A klorofilltartalmat 30 µg/ml chl (a+b)-re állítottuk be.

A H_2-termelést követő regenerációs kísérlethez egy Multi-Cultivator MC 1000-OD (Photon Systems Instruments, Brno, Csehország) műszert használtunk. A kísérlet kezdetén 6 µg/ml chl (a+b)-t állítottunk be, és a sejteket friss HS tápoldatba helyeztük. 23 °C-on, 80 µmol foton /m^2/s folyamatos fotonáram-sűrűségen 72 órán át neveltük őket a Multi-Cultivator-ban. Ezalatt az időtartam alatt folyamatosan steril levegő és 1%-os CO_2 keverékkel buborékoltattuk őket. Ezt követően kerültek a sejtek egy új sötét anaerob indukciós kísérletbe, ahol a már korábban leírtak alapján vizsgáltuk a H_2-termelésüket.

3.2. Kémiai kezelések

Egyes vizsgálatokban 3 órával a kultúrák fényre kerülését követően, különböző kémiai kezeléseket alkalmaztunk.

A PSII gátlására és annak H_2-termelésre gyakorolt hatásának vizsgálatához 20 µM 3-(3',4′-diklór-fenil)-1,1-dimetil-karbamidot (DCMU) adtunk a kultúrákhoz, melyet dimetil-szulfoxidban (DMSO, 100 mM törzsoldat) oldottunk fel. Ezt követően mértük a kultúrák által termelt H_2, valamint O_2 mennyiségét. Ilyenkor a kontroll kultúrákhoz azonos térfogatú DMSO-t adtunk.

A terminális oxidáz gátlásához 1 mM kálium-cianidot (KCN), míg az alternatív oxidáz gátlásához 1 mM szalicil-hidroxámsavat (SHAM) adtunk a kultúrákhoz, és ezt követően mértük a kultúrák által termelt H_2 valamint O_2 mennyiségét.

Az aktív CBB ciklus H_2- és O_2-termelésre gyakorolt hatását olyan kultúrákban vizsgáltuk, melyekhez a kísérlet folyamán 2% v/v CO_2-t adtunk.

10 mM glikolaldehidet (GA), mely a CBB-ciklus inhibitora, adtunk a kultúrákhoz (1,5 M törzsoldat, vízben oldva) és ezt követően vizsgáltuk a H_2-termelésüket.

2 µM ionofór hatású karbonil-cianid p-trifluor-metoxi-fenol-hidrazont (FCCP) (20 mM törzsoldat, HS tápoldatban feloldva) adtuk a kultúrákhoz és vizsgáltuk ezután a H_2-és O_2 -termelésüket.

Az O_2 eltávolítására a kultúrákhoz még a sötét anaerob indukció megkezdése előtt 2 mM glükózt (1 M-os törzsoldatból), 0.2 mg/ml glükóz-oxidázt (GO, 30 mg/ml törzsoldat) és 1 mM aszkorbátot (Asc, 1 M törzsoldat) adtunk.

3.3. O_2 abszorbensek

A kísérleteink során a légtérből történő O_2 eltávolításához használt abszorbensek egy nátrium-klorid és vas keverékek: 504B 100CC Loose (Oxyfree, Tianhua Tech. CO., Ltd. Nanjing, Kína), melyet a hypovial üvegben végzett kísérletek során alkalmaztunk, és 50CC Loose (O2Zero, Global Reach Ltd, London, UK), melyet a Thin-Cell-Layer Photobioreactor (TCL-PBR) üvegekben végzett kísérletek folyamán használtunk fel. A szérumüvegekbe 1,3 g O_2 abszorbenst tettünk, míg a fotobioreaktorokba üvegenként

20 g O_2 abszorbenst használtunk fel. Előbbi esetén a légkör O_2 tartalmát 0,07%-ra, míg a PBR üveg esetében 0,05% alá sikerült csökkenteni a segítségükkel.

3.4. Mérési módszerek

3.4.1. Klorofilltartalom meghatározása algakultúrákban

C. reinhardtii kultúrák esetében a klorofilltartalom meghatározásához a sejteket 5 percen keresztül 80%-os acetonban, sötétben inkubáltuk. Egy centrifugálási lépést követően (3 perc, 13500 rpm) megmértük a felülúszó abszorpcióját 663 és 646 nm hullámhosszúságon NanoDrop 2000C (Thermo) spektrofotométerrel. A klorofillkoncentrációt Porra és munkatársainak módszere alapján számoltuk ki (Porra és mtsai., 1989, 2002).

3.4.2. O_2 és H_2 mennyiségének meghatározása gázkromatográfiával

A *C. reinhardtii* kultúrák által termelt O_2 és H_2 mennyiségének meghatározásához gázkromatográfiás méréseket végeztünk. A kultúrákat tartalmazó üvegek légteréből Hamilton 1725 SL típusú, zárható fecskendővel 100µl mintát vettünk és injektáltuk be a gázkromatográfba. A minta komponenseinek meghatározása egy hővezetőképességi detektorral (TCD) felszerelt Agilent 6890N típusú gázkromatográffal történt a hypovial üvegekben végzett kísérletek esetében, míg a fotobioreaktor üvegekkel végzett kísérletek során egy Hewlett Packard 5890 típusú gázkromatográfot használtunk. Az elválasztáshoz HP Molesieve (30m x 0,535 mm x 25) kolonnát használtunk, argon vivőgáz mellett. Az áramlás sebessége az Agilent GC esetében 16,9 ml/perc volt, míg a Hewlett Packard esetében 34 ml/perc. Mind a két műszernél a detektor hőmérséklete 160°C-ra, míg a kolonna hőmérséklete 60°C-ra volt állítva.

3.4.3. Gyors klorofill-a fluoreszcencia (OJIP) mérés

A fluoreszcencia méréseket Handy-PEA eszközzel mértük (Hansatech Instruments Ltd, UK). Az algakultúrákat mérés előtt 15 percig sötétadaptáltuk, majd ezt követően 60 µl-t pipettáztunk a korábban Handy-PEA csipeszekbe helyezett Whatmann (GF/C) szűrőpapírokra. A minta ezt követően folyamatos vörös fénnyel (3500 µmol $m^{-2}s^{-1}$ fotonáram-sűrűséggel, 650 nm hullámhossznál) került megvilágításra. Az első megbízható mérési pont a 20 µs-nál mért érték, ezt a pontot tekintjük F_0-nak. Az általunk végzett mérések hossza 3 s volt. A Handy-PEA készülék 0 és 0,3 ms között 10 µs-onként méri a fluoreszcencia intenzitását, míg 0,3 és 3 ms között már 100 µs-onként, 3 és 30 ms között 1 ms-ként, 30 és 300 ms között 10 ms-ként.

3.4.4. Fehérjeizolálás és western blot analízis

A HydA, PsaA, PsbA, RbcL, LHCSR3, CP43, PetB és a PSBO fehérjék mennyiségi meghatározásához western blot analízist használtunk. 2 ml mintát gyűjtöttünk a kontroll mintákból, melyek HS médiumban 2 órán át nevelő körülmények között voltak tartva. Majd a 4 órás sötét anaerob indukció alatt lévő kultúrákból, illetve a 24, 48, 72, 96, 120 és 144 órás kultúrákból is mintákat gyűjtöttünk a gázkromatográfiás méréseket követően. A mintákról egy centrifugálási lépést követően (3 perc, 13500 rpm) eltávolítottuk a felülúszót, és a pelletet folyékony nitrogénnel lefagyasztottuk. A felhasználásig -80 °C-on tároltuk őket.

A mintafeltárás során a lefagyasztott sejteket 500 µl feltáró pufferben (50 mM Tris/HCl (pH 8.3), 0.25% Triton X-100, 1 mM DTT és 1x Complete Proteinase Inhibitor) újra felszuszpendáltuk. Ezt egy 30 perces sötét inkubációs lépés követte folyamatos rázatás mellett. Egy újabb centrifugálási lépést (10 perc, 4°C, 20800 rpm) követően a felülúszót egy új Eppendorf csőbe helyeztük, majd meghatároztuk a klorofilltartalmat és fehérjekoncentrációt. A fehérjetartalom meghatározásához Bradford módszert használtunk (Bradford, 1976). Először egy kalibrációs oldatsorozatot készítettünk marha szérum albuminból (BSA), ahol 2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1,0 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,50 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,025 mg/ml, és 0,005 mg/ml

koncentrációkat használtunk. Ezt követően 5 µl mintát 1 ml 1x roti-quant bradford oldatban vettünk fel, kémcsőkeverővel homogenizáltuk és 595 nm hullámhossznál megmértük a fényabszorpcióját. A BSA standardokból szerkesztett kalibrációs egyenes alapján pedig meghatároztuk a minta fehérjetartalmát.

Western blot analízis alatt a fehérjéket SDS-gélelektroforézissel választottuk el egy Perfectblue Doppelsystem Twin L PEQLAB eszköz segítségével. 4 %-os gyűjtő (0,75 M Tris/HCl pH 8,45, 0,014% SDS) és 10 %-os szeparáló (1 M Tris/HCl pH 8,45, 0,1% SDS 10% glicerin) poliakrilamid gélt alkalmaztunk 32,5:1 akrilamid/bis-akrilamid arány mellett. A mintákat 1:5 arányban hígítottuk 6x-os töménységű mintapufferben (375 mM Tris-HCl, pH 6,8, 60% glicerin (v/v), 12,6% SDS (w/v), 600 mM DTT, 0.09% brómfenolkék (w/v)) és 30 percig 40°C-on inkubáltuk. A gélre 22-24 µl közötti végtérfogatokat vittünk fel. A kontroll mintából 4x-es, 2x-es és 1x-es hígítást vittünk fel a zsebekbe. Fehérjemarkerből (Seeblue Plus prestained Standard Invitrogen) 20 µl-t vittünk fel a gél mindkét oldalára. A futtatáshoz használt katód puffer 0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 0,1% SDS (pH 8.25), míg az anód puffer 0,2M Tris/HCl, pH 8.9 volt. A futtatást 35-45 V feszültségen kezdtük 1,5 órán át, és amikor a minták elérték a szeparáló gél határát, a feszültséget megemeltük 75-85 V-ra. A futtatás ezen a feszültségen egy éjszakán át tartott. A géleket végig 4-6°C-on tartottuk keringetős vízfürdővel. A futtatás után a fehérjéket PVDF membránra (Hybond, GE Healthcare Amersham) blottoltuk át TransBlott (Bio-Rad) blottoló készülékkel. A méretre vágott membránokat 100% metanolban nedvesítettük, majd 5 percen át desztillált vízben, majd újabb 5 percen át a transzfer pufferben (25 mM Tris, 192 mM Glicin pH 8.3) mostuk őket. A blottolás során 1 A áramerősséget alkalmaztunk 2 órán át, 10-16°C mellett. Ezt követően a membránokat kisebb darabokra vágtuk, majd 100 ml 1% BSA-t és 1% tejport tartalmazó TBS-T pufferbe (20 mM Tris/HCl pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween,) helyeztük őket egy órára közepes rázatás mellett. Ezt követően egyszer 15 percig majd kétszer 5 percig TBS-T pufferrel mostuk őket.

Hozzáadtuk az elsődleges ellenanyagot (50 ml) (PsaA, PsbA, RbcL, LHCSR3, CP43, PetB: Agrisera AB; PSBO: Antiprot) a membránokhoz és egy órán át lassú rázatás mellett inkubáltuk őket. Az egy óra lejártával a membránokról leöntöttük az elsődleges ellenanyagot, magukat a membránokat TBS-T pufferrel leöblítettük, majd először 15 percen át, végül kétszer 5 percen át ebben a pufferben inkubáltuk őket. Az utolsó mosási lépést követően hozzáadtuk a membránokhoz a másodlagos ellenanyagot

(Agrisera Antirabbit IGG AS09602) 1:40000-szeres hígításban, és egy éjszakán át inkubáltuk őket 4 °C-on. Ezt ismét mosási lépések követték, ahol TBS-T pufferrel először egy 15 perces, majd négyszer 5 perces időtartamban öblítettük le a membránokat.

A membránokat ezt követően egy fóliára helyeztük, és 1:1 arányú ECL oldatok keverékét (GE Healthcare Amersham ECL Prime Western Blotting detection reagent) pipettáztuk rá. Öt perces inkubációt követően a kemilumineszcenciát Fusion Fx géldokumentációs rendszerrel detektáltuk. A digitalizált képet pedig az ImageJ 1.52p programmal denzitometráltuk.

3.4.5. Sejtszám meghatározása

A kultúrákból 3 ml-t vettünk ki minden nap a GC méréseket követően, de még az anaerobizálást megelőzően. A 3 ml-ből 5 µl-t pipettáztunk egy mikrocentrifuga csőbe és 95 µl 0,4 % w/w-os Triton-X-100 oldatot adtunk hozzá. A mintákat 15 percen át szobahőmérsékleten inkubáltuk és időnként kémcsőkeverővel felráztuk, így elkerülve a sejtek leülepedését. Az inkubációs idő lejárta után 10 µl-t vettünk ki a mintákból és pipettáztunk rá a sejtszámláló lemezekre. A mérést LUNA-FL™ Dual Fluorescence Cell Counter készülékkel (Logos Biosystems, Anyang-si, Dél-Korea) végeztük.

3.4.6. *In vitro* hidrogenázaktivitás-mérések

Az *in vitro* hidrogenázaktivitás a 4 óra sötét anaerob inkubálást követően, illetve a H_2-termelés 144. órájában végeztük. A mérés 13 ml térfogatú szérumüvegben történt, ami 4 ml reakcióelegyet tartalmazott. Az 1,9 ml 100 mM-os foszfát puffert (pH 6,8; 100 mM K2HPO4 + 100 mM KH2PO4), 760 µl desztillált vizet, 100 µl 10%-os Triton X-100-at és 40 µl 1 M-os metilviologént tartalmazó üveg légterét nitrogén gázra cseréltük. Ezt követően fecskendő segítségével a szérumüvegbe jutattunk még 400 µl 1 M-os anaerob nátrium-ditionitot, amelynek hatására a reakcióelegy sötétlila színűre változott, majd a 200 µl anaerob sejtkultúra hozzáadása után ismételten az üveg légterét nitrogéngázzal átfúvattuk. A mintákat 37 °C-os vízfürdőbe helyeztük majd 20

percenként gázkromatográffal mértük a termelt H_2 mennyiségét (Scoma és mtsai., 2012).

3.5. Statisztikai elemzés

A bemutatott eredmények minden esetben legalább három független kísérlet méréseiből számolt átlagok, szórásként pedig az átlag szórás (SEM) van feltüntetve. A statisztikai elemzést Student-féle t-teszttel vagy vegyes elrendezésű kétutas ANOVA-val és Tukey post-hoc teszttel vizsgáltuk. A szignifikanciaszintet az alábbiak alapján állapítottuk meg: + $p<0,1$; * $p<0,05$; ** $p<0,01$;*** $p<0,001$.

4. Eredmények

4.1. Folyamatos H_2-termelés fenntartásához szükséges kulcslépések azonosítása

4.1.1. Acetátmentes tápoldat használata a H_2-termelés során

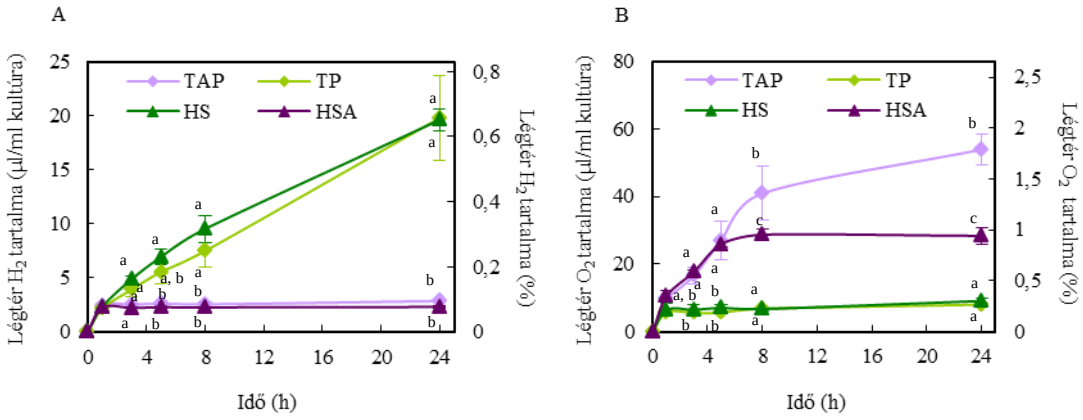
A hidrogenáz expressziójának indukálásához egy úgy nevezett sötét anaerob indukciós kezelést alkalmaztunk, melyhez modellorganizmusként a *C. reinhardtii* CC-124-es törzset választottuk. Erről a törzsről már ismert volt korábbi adatok alapján, hogy hatékony H_2-termelő, és eltérő kísérleti körülmény között is képes a H_2-termelését fenntartani (Kosourov és mtsai., 2009; Lakatos és mtsai., 201;, Oncel és mtsai., 2014; Steinbeck és mtsai., 2015).

Kísérleteink során az algasejteket három napon át TAP tápoldatban neveltük, majd ezt követően helyeztük át őket friss, acetáttartalmú (TAP és HSA), vagy éppen acetátmentes (TP és HS) tápoldatba, lezárt szérumüvegekbe. Azért teszteltük az acetátmentes tápoldatokat, hogy elkerüljük a CO_2 képződését a rendszerünkben, mely egyrészt a CBB ciklus működését indukálná, s ezáltal elvonná az elektronokat a hidrogenáztól, illetve szerettük volna elkerülni a CBB ciklus működése során keletkező O_2 mennyiségének felhalmozódását is. A kultúrák klorofilltartalmát 50 µg/ml chl (a+b)-re állítottuk be. A magas klorofill (a+b) tartalom megkönnyíti az anaerobiózis kialakulását, a PQ-pool redukálódását és a hidrogenázok minél magasabb expresszióját (Chochois és mtsai., 2009).

A hidrogenáz expresszióját 4 órás sötét anaerob indukcióval váltottuk ki, mely során a minták légterét háromszor tíz percen át N_2 gázzal fúvattuk, így biztosítva az O_2 és CO_2 eltávolítását a rendszerből. A legtöbb, korábban végzett kísérlettel ellentétben a kultúrákat viszonylag magas fényintenzitásnak (320 µmol foton/m^2/s, fehér fény) tettük ki az inkubációt követően.

Fény hatására a TAP tápoldatban lévő kultúráknál az első órában megfigyelhető H_2-termelés körülbelül 2 µl/ml kultúra volt. Az ezt követő hosszan tartó megvilágítás nem eredményezett további H_2-termelést, míg acetátmentes közegben (HS, TP) a H_2-termelés folytatódott az elkövetkező 24 órában is, ami végül kb. 20 µl H_2/ml kultúra mennyiséget eredményezett (4. ábra).

Megfigyelhető volt, hogy acetát jelenlétében a szérumüvegek légterében az O_2 gyorsan felhalmozódott, míg acetát hiányában az O_2 koncentrációja alacsony szinten maradt: kb. 9 µl O_2/ml kultúra termelődött. Ez megközelítőleg a légtér 0,3%-át teszi ki. Mivel a kísérletek során a HSA és TAP tápoldatban tartott kultúrák egyaránt alacsony H_2-hozammal bírtak, összehasonlítva a TP-ben és a HS-ben tartott sejtekkel, a H_2-termelés növekedését az acetát hiányának tulajdonítottuk. Ezért az ezt követő kísérletek során a HS tápoldat használata mellett döntöttünk. Ezt az ún. minimál tápoldatot általánosan használják az algák élettani vizsgálataihoz (Allorent és mtsai., 2013).



4. ábra Az acetát hatása a H_2 (A) és O_2 (B)-termelésre *Chlamydomonas reinhardti* CC-124-es törzsben. A kultúrák TAP, TP, HSA, HS tápoldatokban voltak, 50 µg/ml chl (a+b) koncentrációra beállítva. Az anaerob indukciót követően 320 µmol foton/m^2/s folyamatos fényerősséggel voltak megvilágítva. A gázok mennyiségének meghatározása lezárt kultúrák légteréből történt gázkromatográfiás méréssel 24 órán át. A jobb oldali ordináta tengelyen a légtér H_2 vagy O_2-tartalma látható, %-ban kifejezve. A 0 időpont a kultúrák fényre kerülését jelöli. Az átlagok értékei (± SEM) 6 biológiai ismétlésen alapulnak. A szignifikancia különbségek ANOVA-val és Tukey post-hoc teszttel kerültek meghatározásra. A különböző betűk a szignifikáns különbségeket jelzik, a szignifikancia *p<0,05-nek felel meg.

4.1.2. Acetátmentes tápoldatban nevelt kultúrák és a széles körben elterjedt kénmegvonásnak kitett kultúrák H_2-termelésének összehasonlítása

A megfelelő tápoldat kiválasztását követően összehasonlítottuk az általunk használt HS tápoldatban végzett sötét anaerob indukció és a klasszikus, acetát jelenlétében végzett kénmegvonásos módszer H_2-termelésének hatékonyságát. Ez

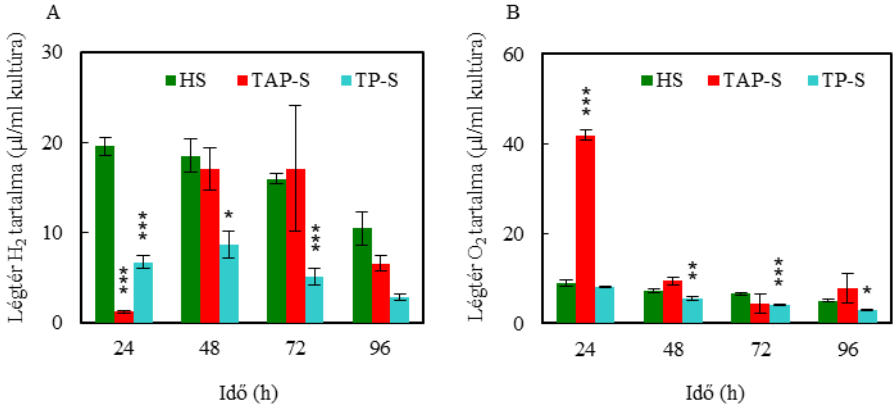
utóbbiról ismert, hogy csak acetát jelenlétében működik hatékonyan (Fouchard és mtsai., 2005; Kosourov és mtsai., 2007).

A HS tápoldatban, sötét anaerob indukción átesett kultúrákban 24 óra alatt 20 µl H_2/ml (ami 16,32 nmol H_2/µg chl (a+b)-nak felel meg) képződött (5. ábra). A kultúrák által termelt gázokat a méréseket követően minden nap N_2-fúvatással eltávolítottuk, így segítve elő a hipoxia fenntartását, illetve gátolva a H_2 magas parciális nyomásának (Kosourov és mtsai., 2012) és a légtér túlnyomásának kialakulását a rendszerünkben. E módszer alkalmazásával 96 óra alatt 65 µl H_2/ml kultúra képződött.

Kénmegvonás esetén az első 24 órában alacsony H_2-termelés volt megfigyelhető, a maximális értékeket 48, valamint 72 óránál mértük. Ebben az esetben az össztermelés 96 óra alatt 42 µl H_2/ml kultúra volt. Ez a H_2-termelő produktivitás összhangban van a korábban elvégzett kísérletekkel, amelyeket szintén zárható szérumüvegekben hajtottak végre (Steinbeck és mtsai., 2015; Nagy és mtsai., 2016). Ám ez a hozam jóval alacsonyabb, mint ugyanezen időtartam alatt, fotobioreaktorban (PBR) elért hozam, amely kb. 200 µl H_2/ml kultúra mennyiséget jelentett 96 óra alatt (Kosourov és mtsai., 2003).

Azon kísérleteknél, ahol az acetátot kihagytuk a kénmegvonásnak kitett kultúrák tápoldatából (TP-S), a termelt H_2 mennyisége igen alacsony volt, alátámasztva azt a korábbi megfigyelést, hogy a kénmegvonással indukált H_2-termelés acetát-függő (Fouchard és mtsai., 2005; Kosourov és mtsai., 2007). 24 óra megvilágítást követően 9 µl O_2/ml kultúra halmozódott fel a HS és a TP-S kultúrák esetén, míg 40 µl O_2/ml kultúra volt mérhető a kénmegvonáson átesett minták légterében.

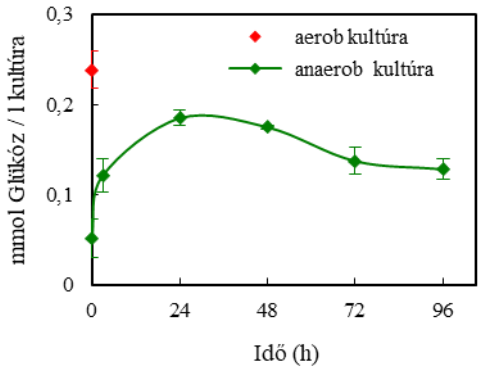
Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az anaerob indukció minimál tápoldatban (azaz acetátmentes tápoldatban) tartós H_2-termelődést eredményez, mely több napon át fenntartható és magasabb hozamú, mint a TAP-S tápoldatban.



5. ábra H_2 (A) és O_2 (B)-termelés összehasonlítása a kénmegvonásos, acetátmentes, illetve acetátmentes és kénmegvonásos módszer esetében *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124-es törzsben. A kultúrák HS, valamint kénmentes TAP és TP tápoldatban voltak, 50 µg/ml chl (a+b) koncentrációra beállítva. Az anaerob indukciót követően 320 µmol foton/m^2/s fényerősséggel voltak megvilágítva. Az átlagok értékei (± SEM) 6 biológiai ismétlésen alapulnak. Az azonos korú HS tápoldatban lévő kontrollhoz viszonyított szignifikánsan eltérő értékeket Student t-teszttel határoztuk meg, és $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$-nek felel meg.

4.1.3. A H_2-termelés forrása és szabályozása

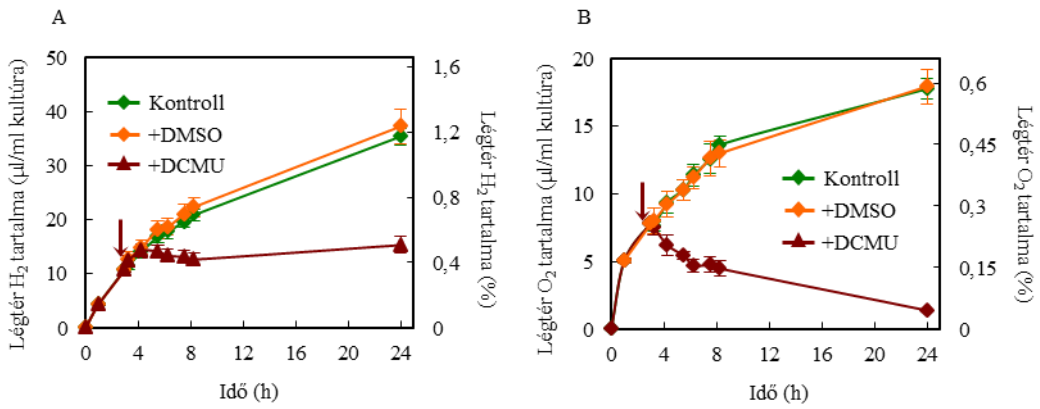
Az anaerob indukció által kiváltott H_2-termelést acetátmentes közegben végezzük kénmegvonás nélkül, ami a keményítő felhalmozódását eredményezné (Zhang és mtsai 2002). Feltételeztük, hogy a H_2-termelődését biztosító elektronok közvetlenül a vízből származnak. E hipotézisünk teszteléséhez először a kultúrák keményítőtartalmát vizsgáltuk meg. A kontrollként használt aerob minták keményítőtartalma 0,25 mmol/l glükózekvivalens volt, ami jellemző az aerob, normál körülmények kötött tartott mintákra (Tsygankov és mtsai., 2006). A 4 óra sötét inkubációt követően a keményítőtartalom 0,05 mmol/l glükózekvivalensre csökkent, míg a fényre helyezéskor (a H_2-termelés kezdetén) ismét növekedett, de már nem érte el a korábbi (kontroll) szintet. 24-96 óra közötti időszakban a kísérlet során nem tapasztaltunk jelentős változást a minták keményítőtartalmában, ami azt jelzi, hogy a keményítő lebomlása nem járult hozzá jelentősen a H_2-termeléshez (6. ábra).



6. ábra A keményítőtartalom változásának nyomonkövetése *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124-es törzsben a H-termelés során. A kultúrák HS tápoldatban, 50 µg/ml chl (a+b) koncentrációra voltak beállítva. Az anaerob indukciót követően 320 µmol foton/m^2/s folyamatos fényerősséggel voltak megvilágítva. A 0 időpont a kultúrák fényre kerülését jelöli. A kísérletek során meghatároztuk az aeorob kultúrák keményítőtartalmát, melyet kontrollként alkalmaztunk. Az átlagok értékei (± SEM) 3 biológiai ismétlésen alapulnak.

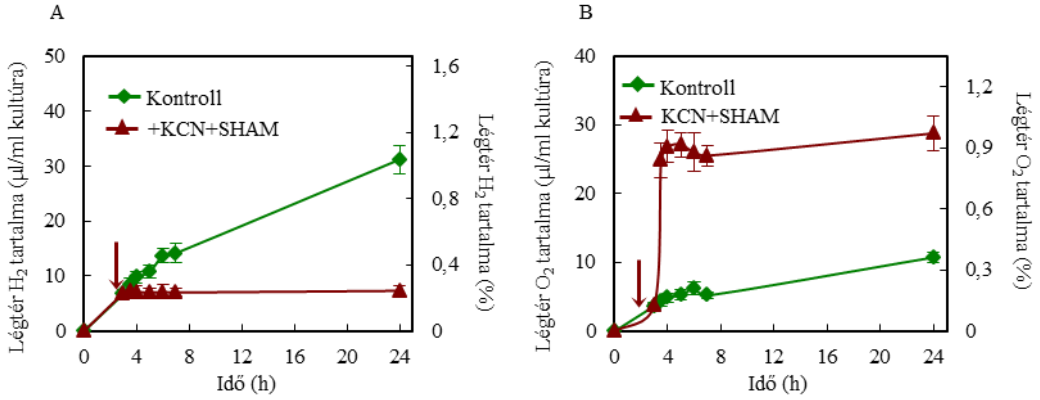
Ezt követően a sejteket 3-(3'-4'-diklorofenil)-1,1-dimetilureával (DCMU) kezeltük, mely képes irreverzibilisen kötődni a PSII Q_B kötőhelyéhez (Wraight, 1981). A DCMU alkalmazása során megfigyeltük (7. ábra), hogy a légtér O_2 tartalma csökkent, melyet a H_2-termelés megszűnése enyhe késéssel követett. Ez a kis késés valószínűleg annak tudható be, hogy a folyadékból a már megtermelt H_2 lassan diffundált át a légtérbe. Kontroll kezelésként DMSO-t használtunk, ami sem a H_2-, sem az O_2-termelésben nem eredményezett mérhető hatást a kezeletlen mintákhoz képest.

Eredményeink azt mutatják, hogy a H_2-termelés közvetlen módon függ a PSII elektrontranszportjától és a vízbontástól, valamint a sejtlégzés hozzájárulása a H_2-termeléshez valószínűleg igen csekély.



7. ábra DCMU hatása az anaerob indukciós H_2 (A) és O_2 (B)-termelésre *C. reinhardtii* CC-124-es törzsben. A kultúrák HS tápoldatban, 50 µg/ml chl (a+b) koncentrációra voltak beállítva. Az anaerob indukciót követően 320 µmol foton/m^2/s folyamatos fényerősséggel voltak megvilágítva. A jobb oldali ordináta tengelyen a légtér H_2 vagy O_2 tartalma látható %-ban kifejezve. A 0 időpont a kultúrák fényre kerülését jelöli. A nyíl a DMSO-ban oldott DCMU (20 µM), illetve DMSO hozzáadásának időpontját jelzi. Az átlagok értékei (± SEM) 4-5 biológiai ismétlésen alapulnak.

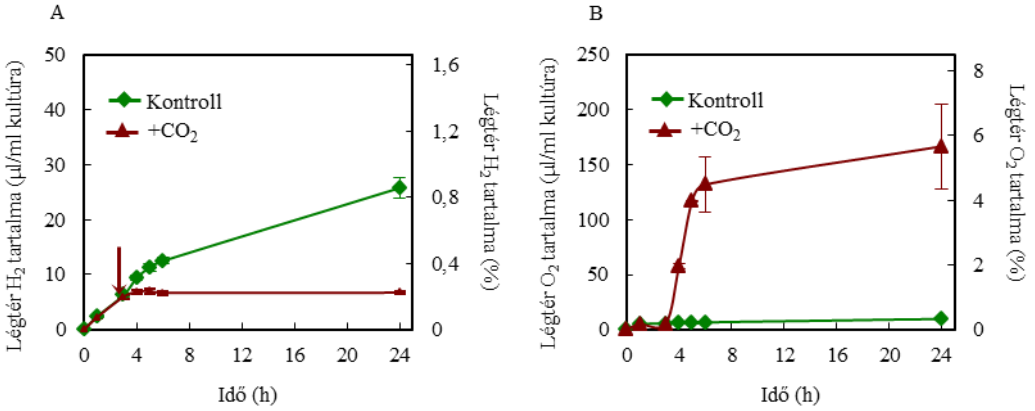
Annak vizsgálatára, hogy a légzés hozzájárul-e a hipoxiás állapotok kialakulásához, a kultúrákat a terminális oxidáz működését gátló kálium-cianiddal (KCN) és ezzel egyidejűleg az alternatív oxidáz működését gátló szalicil-hidroxámsavsal (SHAM) kezeltük. Ezen inhibitorok hatására (8. ábra) az O_2 koncentrációja a légtérben hirtelen 0,3%-ról 0,9%-ra ugrott. A légzésgátlók alkalmazásakor a H_2-termelés megszűnt, melynek valószínűleg a megemelkedett O_2 koncentráció az oka.



8. ábra H_2 (A) és O_2 (B)-termelés a légzésgátló kálium-cianid (KCN) és szalicil hidroxámsav (SHAM) hozzáadását követően *C. reinhardtii* CC-124-es törzsben. A kultúrák HS tápoldatban, 50 µg/ml chl (a+b) koncentrációra voltak beállítva. Az anaerob indukciót követően 320 µmol foton/m^2/s folyamatos fényerősséggel voltak megvilágítva. A jobb oldali ordináta tengelyen a légtér H_2 vagy O_2-tartalma (%) látható. A 0 időpont a kultúrák fényre kerülését jelöli. A nyíl a KCN (1mM) és SHAM (1mM) hozzáadásának időpontját jelzi. Az átlagok értékei (± SEM) 4-5 biológiai ismétlésen alapulnak.

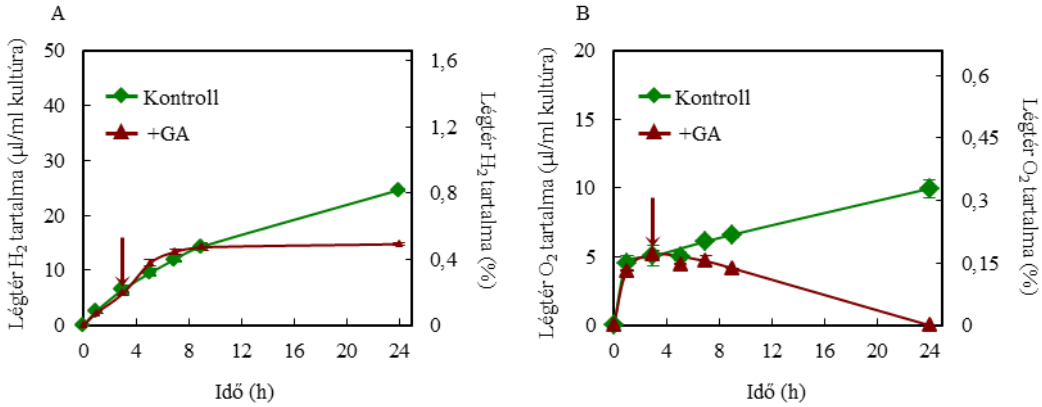
Chlamydomonas-ban acetát asszimiláció a trikarbonsav ciklusban és a glioxalát ciklusban valósulhat meg, melyek metabolikus utakon keresztül kapcsolódnak a glükoneogenezishez és az oxidatív pentóz-foszfát úthoz (Johnson és Alric, 2012; Plancke és mtsai., 2014). A felszabadult CO_2 és glicerát-3-foszfát szubsztrátként hasznosulhat a CBB-ciklusban, mely a fotoszintetikus elektrontranszport által generált redukáló erőket is felhasználja. Erre utal a különböző Rubisco-mutánsok rendkívüli fényérzékenysége is (Hemschemeier és mtsai., 2008; Pinto és mtsai., 2013).

Feltételeztük, hogy acetát és CO_2 hiányában a CBB-ciklus inaktív, a fotoszintetikus elektrontranszport-láncból származó elektronok pedig így a hidrogenázokhoz jutnak. Hogy erről a feltevésünkről megbizonyosodhassunk, a kultúrák légterébe 2% CO_2-ot (v/v) adtunk (9. ábra). Ennek eredményeként a H_2-termelés megszűnt, míg az O_2-termelés erősen megnőtt. A kultúrák légterébe bejuttatott CO_2 mennyisége gyorsan csökkent, 24 óra elteltével pedig már nem volt kimutatható.



9. ábra H_2 (A) és O_2 (B)-termelés 2% CO_2 hozzáadását követően *C. reinhardtii* CC-124-es törzsben. A kultúrák HS tápoldatban, 50 µg/ml chl (a+b) koncentrációra voltak beállítva. Az anaerob indukciót követően 320 µmol foton/m^2/s folyamatos fényerősséggel voltak megvilágítva. A jobb oldali ordináta tengelyen a légtér H_2 vagy O_2-tartalma látható %-ban kifejezve. A 0 időpont a kultúrák fényre kerülését jelöli. A nyíl a CO_2 (2%) hozzáadásának időpontját jelzi. Az átlagok értékei (± SEM) 4-5 biológiai ismétlésen alapulnak.

Amikor a CBB-ciklust gátló glikolaldehidet (GA) adtunk a mintákhoz (10. ábra), a kezdeti 9 óra alatt nem volt megfigyelhető változás a H_2-termelésben, míg a légtér O_2-koncentrációja csökkent. A 24. órában a H_2-termelés megszűnt és az O_2 jelenlétét már nem lehetett kimutatni, ami valószínűleg a GA fotoszintézisre gyakorolt negatív hatásának köszönhető (Rühle és mtsai., 2008).



10. ábra H_2 (A) és O_2 (B)-termelés a CBB ciklust gátló glikolaldehid (GA) hozzáadását követően *C. reinhardtii* CC-124-es törzsben. A kultúrák HS tápoldatban, 50 µg/ml chl (a+b) koncentrációra voltak beállítva. Az anaerob indukciót követően 320 µmol foton/m^2/s folyamatos fényerősséggel voltak megvilágítva. A jobb oldali ordináta tengelyen a légtér H_2 vagy O_2-tartalma látható %-ban kifejezve. A 0 időpont a kultúrák fényre kerülését jelöli. A nyíl a GA (1 mM) hozzáadásának időpontját jelzi. Az átlagok értékei (± SEM) 4-5 biológiai ismétlésen alapulnak.

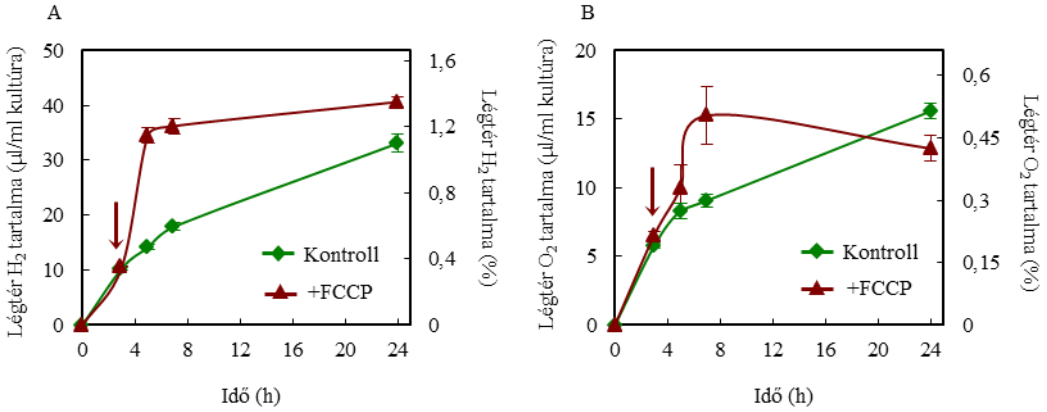
A hidrogenáz enzim kompetícióban áll a CBB-ciklussal a felvehető elektronokért. Ezért ha a CBB-ciklus aktivitását csökkentjük, ahogy az alábbi eredmények is mutatják, a hidrogenáz működése hosszabb időn keresztül fenntartható. Némi hidrogenáz aktivitás megfigyelhető a megvilágítás kezdetén, ami megmagyarázhatja a sötét anaerob inkubációt követő keményítőtartalom átmeneti növekedést is.

Amikor a CBB-ciklus szubsztrátokhoz való hozzáférése korlátozott, az ATP és NADPH fogyasztás csökken, kiváltva ezzel a fotoszintetikus elektrontranszport működésének csökkenését is, így előzve meg a fotoszintetikus apparátus károsodását. Ilyen körülmények között a PSI ciklikus elektrontranszport mértéke megnő, hozzájárulva ezzel a tilakoid lumen savasodásához, ami nem-fotokémiai kioltó mechanizmusokat vált ki a felesleges gerjesztési energia biztonságos eltávolítása érdekében (Erickson és mtsai., 2015). A lumen savasodása ugyanis lelassítja a plasztokinon oxidációját a citokróm b_6/f-komplexen keresztül. Ilyen körülmények között a PSII-ben növekszik a töltésrekombináció mértéke, míg az O_2-termelés mértéke csökken (Davis és mtsai., 2016). Ennek az ún. fotoszintetikus kontroll mechanizmusnak köszönhetően csökken a PSII-ből származó elektrontranszport, és mérsékelődik a káros fotooxidáció kockázata (Johnson és mtsai., 2014; Roach és Krieger-Liszkay, 2014; Chaux és mtsai., 2015).

Chlamydomonas-ban a fotoszintetikus elektrontranszport komponensek túlzott mértékű redukciójának elkerülésére különböző alternatív útvonalak szolgálnak. Ilyen például a Mehler-reakció, a malát-aszpartát transzfer, a plasztid terminális oxidáz és a flavodiiron-függő fotoredukciós útvonalak (Erickson és mtsai., 2015; Curien és mtsai., 2016). Ezek az utak azonban O_2-függőek, hipoxiás körülmények között az elektronok hidrogenázokra történő szállítása szolgálhat hatékony biztonsági szelepként.

Annak a lehetőségnek a tesztelésére, hogy a tilakoid lumen fényben történő savasodása korlátozhatja-e a lineáris elektrontranszportot és ezáltal az O_2 és H_2-termelést, a kultúrákat ionofór hatású karbonil-cianid-p-triflour-metoxi-fenil-hidrazonnal (FCCP) kezeltük (Heytler és Prichard, 1962; Tolleter és mtsai 2011). Az FCCP hozzáadását követően (11. ábra) azonnal megnőtt a H_2-termelés mértéke, amelyet az O_2-termelés átmeneti növekedése

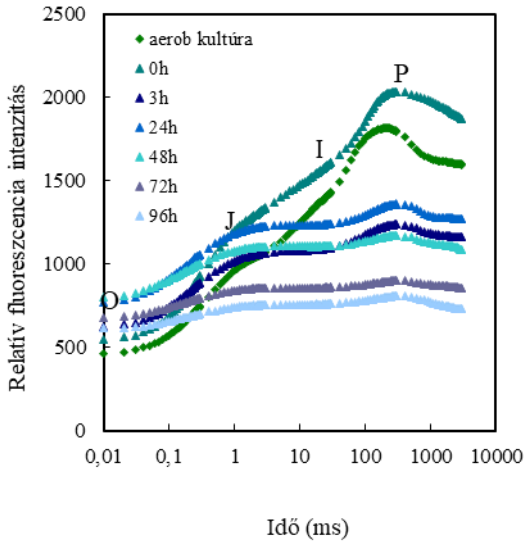
követett. Ez egyetértésben van azzal az elmélettel, hogy a magas ΔpH korlátozhatja a hidrogenázokhoz történő lineáris elektronáramlást (Antal és mtsai., 2009).



11. ábra H_2 (A) és O_2 (B)-termelés az ionofór karbonil-cianid p-trifluor-metoxi-fenol-hidrazon (FCCP) hozzáadását követően *C. reinhardtii* CC-124-es törzsben. A kultúrák HS tápoldatban, 50 µg/ml chl (a+b) koncentrációra voltak beállítva. Az anaerob indukciót követően 320 µmol foton/m^2/s folyamatos fényerősséggel voltak megvilágítva. A jobb oldali ordináta tengelyen a légtér H_2 vagy O_2-tartalma látható %-ban kifejezve. A 0 időpont a kultúrák fényre kerülését jelöli. A nyíl az FCCP (2 µM) hozzáadásának időpontját jelzi. Az átlagok értékei (± SEM) 4-5 biológiai ismétlésen alapulnak.

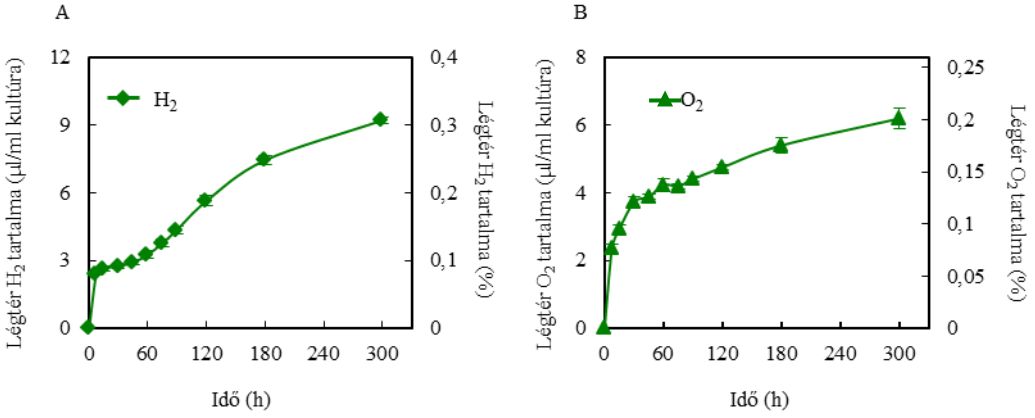
A gyors klorofill-a fluoreszcencia (OJIP) tranziensek a fotoszintetikus funkciók egy érzékeny és széles körben használt indikátorai (Schansker és mtsai., 2014). Az F_0 és F_J értékek felhasználhatóak a PQ-pool redox állapotának becslésére (Joët és mtsai., 2002; Tóth és mtsai., 2007).

Az F_0 és F_J értékek viszonylag magas értéket mutattak a H_2-termelés alatt (12. ábra), jelezve hogy a PQ-pool redukált állapotban volt. Ez az eredmény szintén megerősíti azt, hogy a „fotoszintetikus kontroll” egy, a H_2-termelést befolyásoló fontos tényező.



12. ábra Gyors klorofill-a fluoreszcencia tranziens (OJIP) változása a H_2-termelés során *C. reinhardtii* CC-124-es törzsben. A kultúrák HS tápoldatban, 50 µg/ml chl (a+b) koncentrációra voltak beállítva. Az anaerob indukciót követően 320 µmol foton/m^2/s folyamatos fényerőséggel voltak megvilágítva. A minták a zárt szérumüvegekből történő gyűjtést követően, 15 perc sötét adaptáció után lettek megmérve.

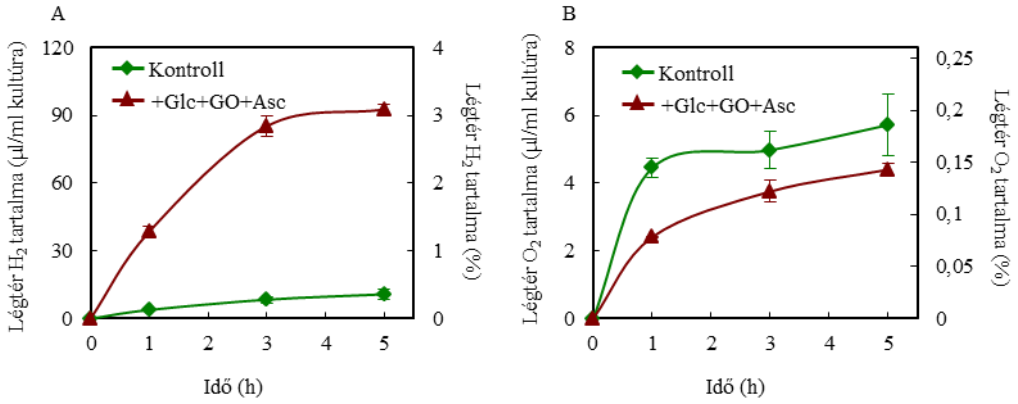
Amikor a H_2-termelés sebességét nagyobb időfelbontásban vizsgáltuk folyamatos fényben, egy átmeneti gyors emelkedést figyeltünk meg a H_2-termelést illetően (13. ábra), amely a sötét-fény átmenetek jellemzője (Boichenko és mtsai., 2004). Ebben az esetben körülbelül 2,3 µl H_2/ml kultúra termelődött 8 perc alatt, ami 15,76 µmol H_2/mg chl (a+b)/h sebességnek felel meg. Ezt egy alacsonyabb termelési sebességű szakasz követte (1,31 µmol H_2/mg chl (a+b)/h, 1 és 5 között), amely alatt 0,2% O_2 halmozódott fel a légtérben. Ezt az értéket azért fontos ismertetnünk, mert a *C. reinhardtii* [Fe-Fe]-típusú hidrogenázainak az inaktivációja már 0,3-0,4%-nyi O_2 koncentrációnál percek alatt bekövetkezik (Ghirardi és mtsai., 1997). Így a 0,2%-nyi O_2-nek való tartó kitettség jelentősen csökkentheti a H_2-termelés mértékét.



13. ábra H_2 (A) és O_2 (B)-termelés kezdeti szakaszának bemutatása nagyobb időfeloldással *C. reinhardtii* CC-124-es törzsben. A kultúrák HS tápoldatban, 50 µg/ml chl (a+b) koncentrációra voltak beállítva. Az anaerob indukciót követően 320 µmol foton/m^2/s folyamatos fényerősséggel voltak megvilágítva. A jobb oldali ordináta tengelyen a légtér H_2 vagy O_2-tartalma látható %-ban kifejezve. A 0 időpont a kultúrák fényre kerülést jelöli. Az átlagok értékei (± SEM) 4-8 biológiai ismétlésen alapulnak.

Tehát a hidrogenázok aktív állapotának fenntartását biztosítani kell a megtermelt O_2 eltávolítását a rendszerből (Reeves és Greenbaum, 1985). Első megközelítésként glükózt (Glu), glükóz-oxidázt (GO) és aszkorbátot (Asc) adtunk a kultúrákhoz annak érdekében, hogy eltávolítsuk az O_2-t (Joët és mtsai., 2002). Ha külön-külön adtuk őket a mintákhoz, akkor csak minimális hatást gyakoroltak mind az O_2, mind a H_2 mennyiségére. Azonban a kombinált kezelés után (14. ábra) csökkent a légtérben az O_2 mennyisége, ugyanakkor a 3 óra alatt termelt H_2 mennyisége a tízszeresére nőtt: 8 µl H_2/ml kultúra értékről 85-re (ami 1,36 µmol H_2/mg chl (a+b)/h értékről 23,13 µmol H_2/mg chl (a+b)/h -ra történő emelkedésnek felel meg). Ezek az értékek a Glu+GO+Asc hiányában 0,29 %-os, míg a jelenlétében 2,95 %-os fény-H_2 energiakonverziós hatékonyságnak felelnek meg.

Azonban ez a kezelés nem jelent reális lehetőséget a hosszú távú H_2-termelés fenntartásában, részben a glükóz folyamatos felhasználódása, részben a glükóz oxidációjával járó reaktív oxigénfajták kialakulása miatt. Ezért más lehetőséget kell keresni az O_2 eltávolítására.



14. ábra H_2 (A) és O_2 (B)-termelés glükóz (Glc, 2mM), glükóz-oxidáz (GO 0,2 mg/l) és aszkorbát (Asc, 1mM) hozzáadását követően *C. reinhardtii* CC-124-es törzsben. A kultúrák HS tápoldatban, 50 µg/ml chl (a+b) koncentrációra voltak beállítva. Az anaerob indukciót követően 320 µmol foton/m^2/s folyamatos fényerősséggel voltak megvilágítva. A jobb oldali ordináta tengelyen a légtér H_2 vagy O_2-tartalma látható %-ban kifejezve. A kultúrákhoz a sötét anaerob indukció megkezdése előtt glükózt (Glc, 2mM), glükóz-oxidázt (GO 0,2 mg/l) és aszkorbátot (Asc, 1mM) adtunk. A 0 időpont a kultúrák fényre kerülést jelzi. Az átlagok értékei (± SEM) 4-8 biológiai ismétlésen alapulnak.

4.2. Az új H_2-termeltetési módszer optimalizálása

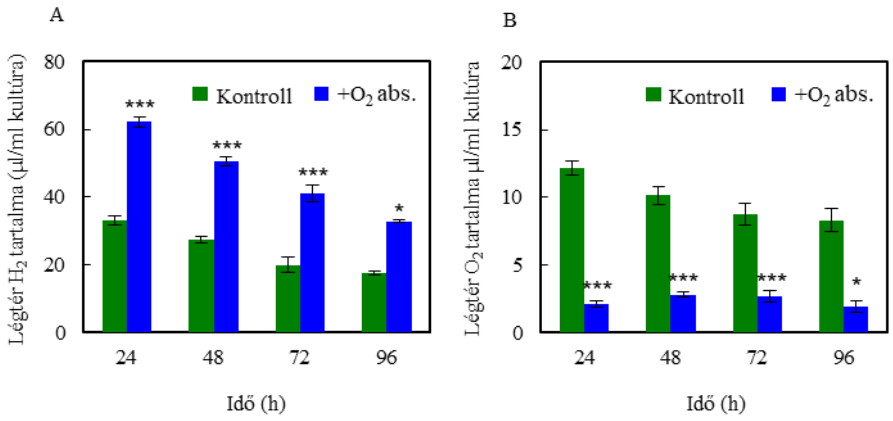
4.2.1. A hidrogenáz aktivitásának megőrzése Fe-NaCl alapú O_2-abszorbens segítségével

Az O_2 mennyiségének csökkentése a kultúrákban több úton is elérhető: 1, a PSII-aktivitás csökkentésével (Melis és mtsai., 2000; Surzycki és mtsai., 2007), amely szükségszerűen csökkenti a H_2-termeléshez rendelkezésre álló redukáló erőt. 2, A légzés-fotoszintézis arány növelésével (Scoma és mtsai., 2014), amely jelentős szubsztrátot igénnyel és alacsony energiakonverziós hatékonyságot eredményez. 3, Alga-baktérium konzorciumok létrehozásával (Lakatos és mtsai., 2014), azzal a hátránnyal, hogy a bakteriális légzéshez is acetátra vagy más szerves szénforrásra van szükség. 4, A légtér átfúvatásával, például héliummal (Reeves és Greenbaumz, 1985; Cinco és mtsai., 1993). 5, Az O_2 kémiai megkötésével; rövid távú kísérletek során hemoglobint, mioglobint és a kobalt kelátokat alkalmaztak korábban a keletkezett O_2 eltávolítására (Rosenkrans és Krasna, 1984).

Mi egy kémiai O_2 abszorbenst választottunk az O_2 megkötésére, mely vaspor és nátrium-klorid keverékéből áll, s amelyet széles körben használnak az élelmiszeriparban. Az abszorbens nagy hatékonyságú (1 g abszorbens képes akár 13 ml

O_2-t is megkötni szobahőmérsékleten (Braga és mtsai., 2010)), biológiai szempontból biztonságos és olcsó.

Kis mennyiségű (kb. 1,3 g) O_2 abszorbenst tettünk egy 2 ml-es Eppendorf csőbe, majd ezt a szérum üvegben lévő *Chlamydomonas* kultúra légterében rögzítettük. Ez a rendszer megközelítőleg kétszer nagyobb H_2-produkciót eredményezett, így elértük a 200 µl H_2/ml kultúra mennyiséget 96 óra alatt (15. ábra) (ami 163,3 µmol H_2/mg chl (a+b)/h mennyiségnek felel meg). Az O_2 koncentrációja a légtérben 24 óránál 2,1 µl O_2/ml kultúra volt, amely a légtér 0,07%-nak felel meg.

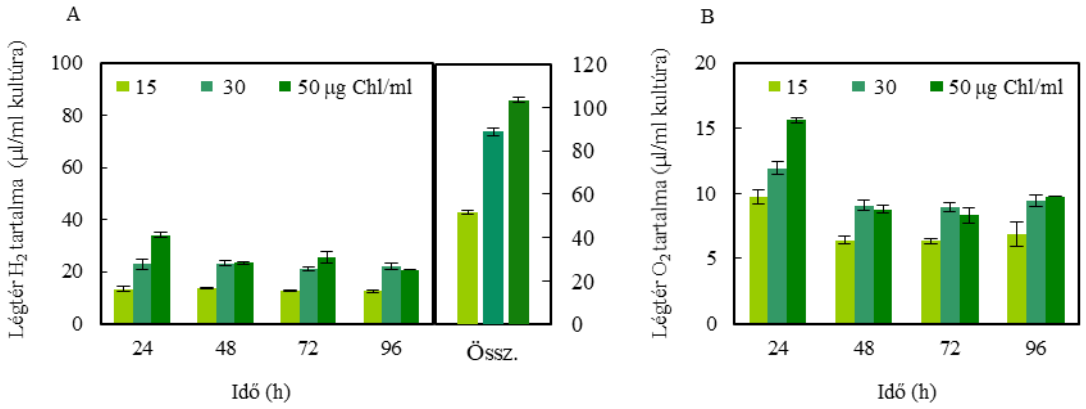


15. ábra H_2 (A) és O_2 (B)-termelés O_2 abszorbens használata mellett *C. reinhardtii* CC-124-es törzsben. A kultúrák HS tápoldatban, 50 µg/ml chl (a+b) koncentrációra voltak beállítva, az anaerob indukciót követően 320 µmol foton/m^2/s folyamatos voltak fényerősséggel. A 0 időpont a fényre kerülést jelzi. Az átlagok értékei (± SEM) 11-15 biológiai ismétlésen alapulnak. Az azonos korú HS tápoldatban lévő kontrollhoz viszonyított szignifikánsan eltérő értékeket Student t-teszttel határoztuk meg, és $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$-nek felel meg.

A fény-H_2 energiakonverzió hatékonysága a sötét anaerob indukciót majd a 15 perces megvilágítást követően mind az O_2 abszorbens hiányában, mind a jelenlétében kb. 1,5%. A 24 órás megvilágítás után azonban a fény-H_2 energiakonverzió hatékonysága 0,11%-os a kontroll mintákban, míg O_2 abszorbens jelenlétében ez több mint a kétszerese, mintegy 0,27%.

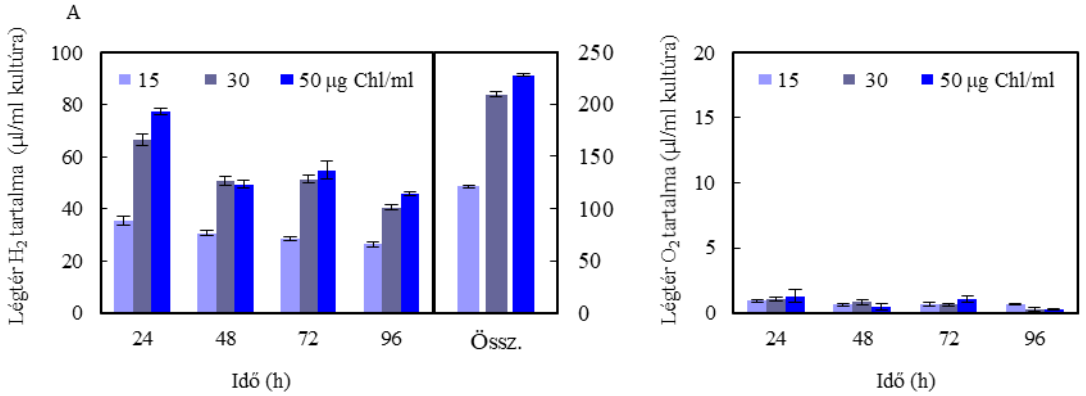
A korábbi kénmegvonásos kísérletek során, acetát jelenlétében a maximális fény-H_2 konverzió hatékonysága 0,13-3,22% között mozgott (Scoma és mtsai., 2014), míg a kénmegvonás nélkül ez a hatékonyság sokkal alacsonyabb, kb. 0,1% volt.

Kísérleteink során összehasonlítottuk a H_2-termelés hozamát három különböző klorofill koncentrációnál is (16. ábra). O_2 abszorbens hiányában az összesen megtermelt H_2 mennyisége 96 óra alatt a 15 µg chl (a+b)/ml kultúrában 50 µl H_2/ml, a 30 µg chl (a+b)/ml kultúrában 90 µl H_2/ml és az 50 µg chl (a+b)/ml kultúrában kb. 105 µl H_2/ml volt.



16. ábra H_2 (A) és O_2 (B)-termelés klorofill koncentráció függése *C. reinhardtii* CC-124-es törzsben. A kultúrák HS tápoldatban, 15, 30 és 50 µg/ml chl (a+b) koncentrációra voltak beállítva. Az anaerob indukciót követően 320 µmol foton/m^2/s folyamatos fényerősséggel voltak megvilágítva. Az átlagok értékei (± SEM) 5-6 biológiai ismétlésen alapulnak.

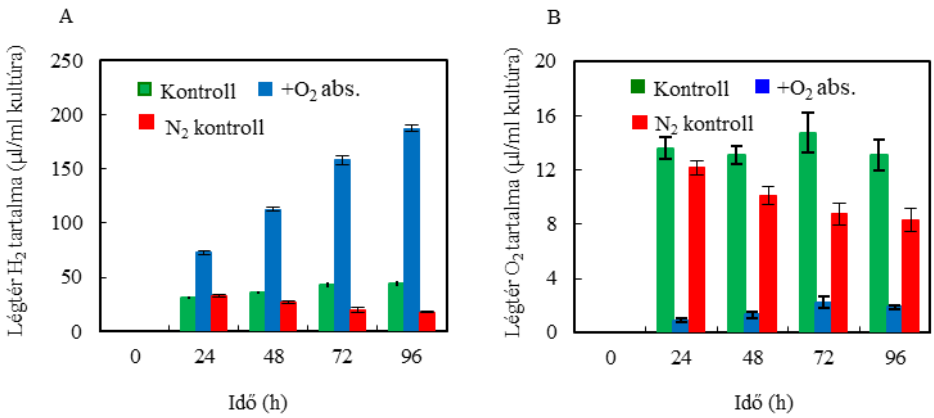
Az O_2 abszorbens jelenlétében (17. ábra) ezek a mennyiségek 120, 210 és 227 µl H_2/ml-re emelkedtek.



17. ábra H_2 (A) és O_2 (B) termelés klorofill koncentráció függése O_2 abszorbens jelenlétében *C. reinhardtii* CC-124-es törzsben. A kultúrák HS tápoldatban, 15, 30 és 50 µg/ml chl (a+b) koncentrációra voltak beállítva. Az anaerob indukciót követően 320 µmol foton/m^2/s folyamatos fényerősséggel voltak megvilágítva. Az átlagok értékei (± SEM) 5-6 biológiai ismétlésen alapulnak.

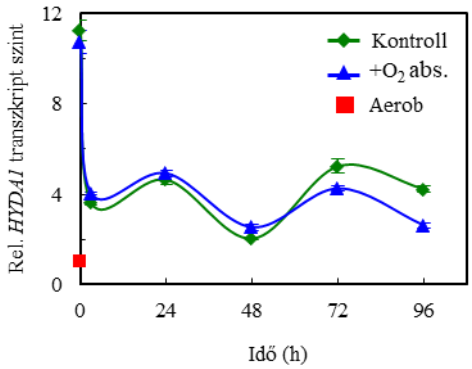
Ha klorofilltartalomra vonatkoztatunk, 50 µg chl (a+b)/ml-ről 15 µg chl (a+b)/ml-re történő csökkentése javulást eredményezett a H_2-termelésben még az O_2 abszorbens hiányában is (2,1 ml H_2/mg chl (a+b)-ről 3,3 ml H_2/mg chl (a+b)-re).

A kultúrák által megtermelt gázok légtérből történő eltávolításához minden nap N_2-fúvatást alkalmaztunk. Annak tesztelésére, hogy ez ténylegesen szükséges-e, a gázok eltávolítása nélkül is elvégeztük a kísérletet (18. ábra). Az O_2 abszorbens hiányában, átfúvatás nélkül a termelt H_2 mennyisége 50%-kal csökkent. O_2 abszorbens jelenlétében azonban a H_2 mennyisége változatlan volt, függetlenül a N_2-átfúvatástól, vagy annak hiányától.



18. ábra H_2 (A) és O_2 (B)-termelés N_2 fúvatás nélküli, illetve N_2 fúvásos kontroll minták esetében *C. reinhardtii* CC-124-es törzsben. A kultúrák HS tápoldatban, 50 µg chl (a+b) klorofilltartalomra voltak állítva. Az anaerob indukciót követően 320 µmol foton/m^2/s folyamatos fényerőséggel voltak megvilágítva. A 0 időpont a kultúrák fényre kerülését jelöli. Az átlagok értékei (± SEM) 5-6 biológiai ismétlésen alapulnak.

Ezután O_2 abszorbens jelenlétében, illetve hiányában megvizsgáltuk a hidrogenázok expresszióját és aktivitását. A 4 órás sötét anaerob indukció hatására a *HYDA1* transzkripciós szintje 11-szeresére emelkedett az aerob kontrollhoz képest (19. ábra). Ezt csökkenés követte, melyet az abszorbens hiányában és jelenlétében egyaránt megfigyeltünk. Valószínűsíthető, hogy ez az O_2 *HYDA1* expressziójára gyakorolt erős gátló hatása miatt következik be (Happe és Kaminski, 2002).



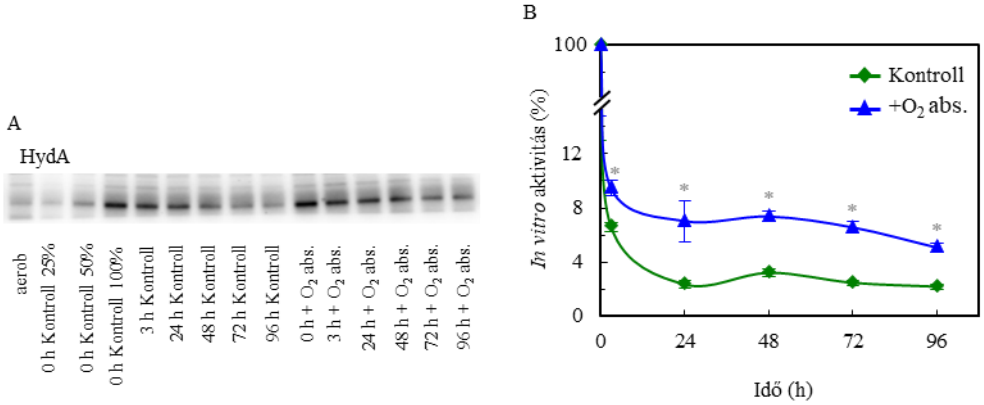
19. ábra A *HYDA1* expressziós szintje az O_2 abszorbens jelenlétében, illetve annak hiányában *C. reinhardtii* CC-124-es törzsben. A kultúrák HS tápoldatban, 50 µg/ml chl (a+b) koncentrációra voltak beállítva. Az anaerob indukciót követően 320 µmol foton/m^2/s folyamatos fényerősséggel voltak megvilágítva. A 0 időpont a kultúrák fényre kerülését jelöli. Az átlagok értékei (± SEM) 3-4 biológiai ismétlésen alapulnak. A kétutas ANOVA analízis nem mutatott szignifikáns különbséget a kontroll és az O_2 abszorbenst tartalmazó minták között.

A HydA enzim mennyiségét Western-blot analízissel, szemi-kvantitatív módon határoztuk meg (20. ábra). Itt szintén azt tapasztaltuk, hogy az enzim mennyisége jelentősen megnövekedett a 4 órás sötét anaerob inkubációs periódust követően. Később a HydA mennyisége csökkent, ám mérsékeltebb csökkenés volt megfigyelhető, amennyiben O_2 abszorbenst is alkalmaztunk a kísérlet alatt.

A sötét anaerob indukciót követően az *in vitro* hidrogenáz aktivitás kb. 500 µmol H_2/mg chl (a+b)/h volt, melyet redukált metilviológén – mint elektron donor – jelenlétében határoztunk meg. Ez az adat megfelel a korábbi irodalmi adatoknak (Hemschemeier és mtsai., 2009).

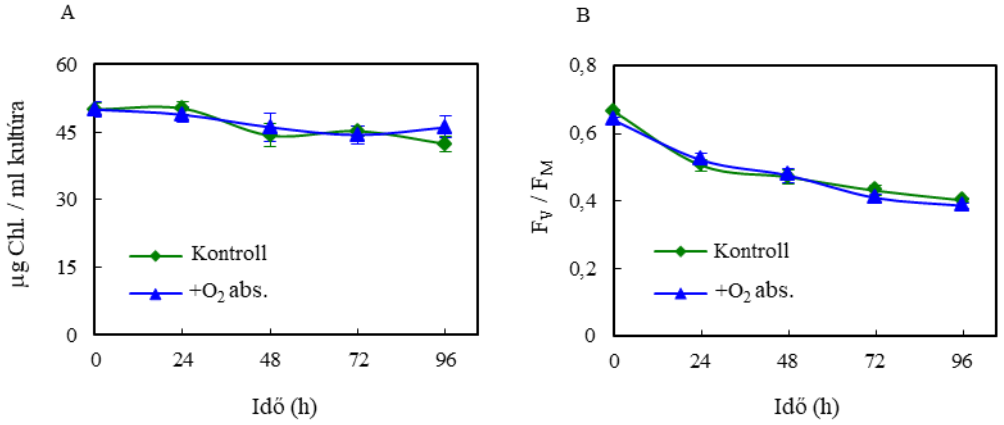
A 4 órás megvilágítás után az *in vitro* hidrogenáz aktivitás O_2 abszorbens nélkül az eredeti aktivitás 6%-ára, míg az O_2 abszorbens jelenlétében az eredeti aktivitás 9%-ára csökkent. Ez az erőteljes csökkenés is jelzi a hidrogenázok extrém O_2 érzékenységét (Ghirardi és mtsai., 1997).

Ezt a gyors csökkenést egy lassabb, inaktivációs fázis követi. Az eredeti aktivitásnak a kontroll mintákban csak a 2%-a, míg O_2 abszorbens jelenlétében az aktivitás 5%-a volt megfigyelhető a kísérlet végére.



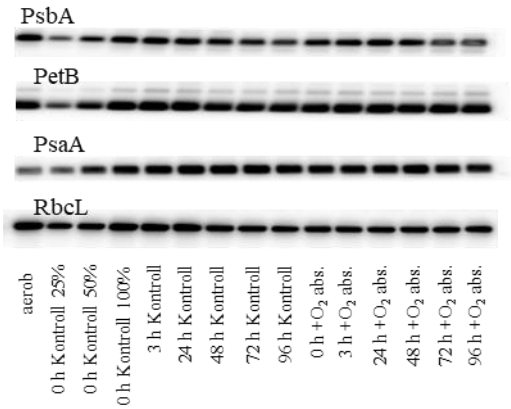
20. ábra A, Western-blot analízissel meghatározott HydA mennyisége az O_2 abszorbens jelenlétében és annak hiányában *C. reinhardtii* CC-124-es törzsben. 2 µg chl (a+b)-nek megfelelő mennyiségű mintát használtunk az analízishez. A 2-4. minták a 0 perces kontroll minta 25%-os, 50%-os, 100%-os mennyiségei. A 0 órás mintákat közvetlenül a 4 órás sötét anaerob indukció után gyűjtöttük. B, *In vitro* hidrogenáz aktivitás O_2-abszorbens jelenlétében, illetve annak hiányában. A 4 óra sötét anaerob indukciónak kitett sejtek %-ban kifejezve, amely körülbelül 500 µmol/H_2/mg chl (a+b) volt. Az átlagok értékei (± SEM) 3-4 biológiai ismétlésen alapulnak. A szignifikancia különbségek két utas ANOVA-val és Tukey post-hoc teszttel kerültek meghatározásra. A csillagok a szignifikáns különbségeket jelzik, *p<0,05-nek felel meg.

Az általunk felállított rendszer fenntarthatóságát a fotoszintetikus apparátus leírásával jellemeztük a 96 órás kísérlet folyamán. Azt tapasztaltuk, hogy a chl (a+b) tartalom csak 10%-ot csökkent a kísérlet során (21. ábra). Az F_v/F_m értéke – mely a PSII hatékonyságának mérője – lassú csökkenést mutatott a 96 órás időtartam alatt, de viszonylag magas értéken maradt (0,4 felett) mind a kontroll, mind az O_2 abszorbenst tartalmazó minták esetében (21. ábra).



21. ábra A klorofilltartalom (A) és az F_v/F_m (B) értékek változása O_2 abszorbens jelenlétében és annak hiányában *C. reinhardtii* CC-124-es törzsben. A kultúrák HS tápoldatban voltak, 50 µg/ml chl (a+b) koncentrációra beállítva, az anaerob indukciót követően 320 µmol foton/m^2/s folyamatos fényerősséggel megvilágítva. A 0 időpont a kultúrák fényre kerülését jelöli. Az átlagok értékei (± SEM) 3-6 biológiai ismétlésen alapulnak.

A PsbA (a PSII reakciócentrum egyik fő fehérjéje), a PetP (a cyt_{b6}/f komplex egyik alegysége) és a PsaA (a PSI reakciócentrum egyik fehérjéje) mennyisége – mely Western-blot analízissel került meghatározásra- nagyrészt változatlan maradt a kísérlet teljes időtartama alatt, mind a kontroll, mind az O_2 abszorbenst tartalmazó minták esetében (22. ábra).

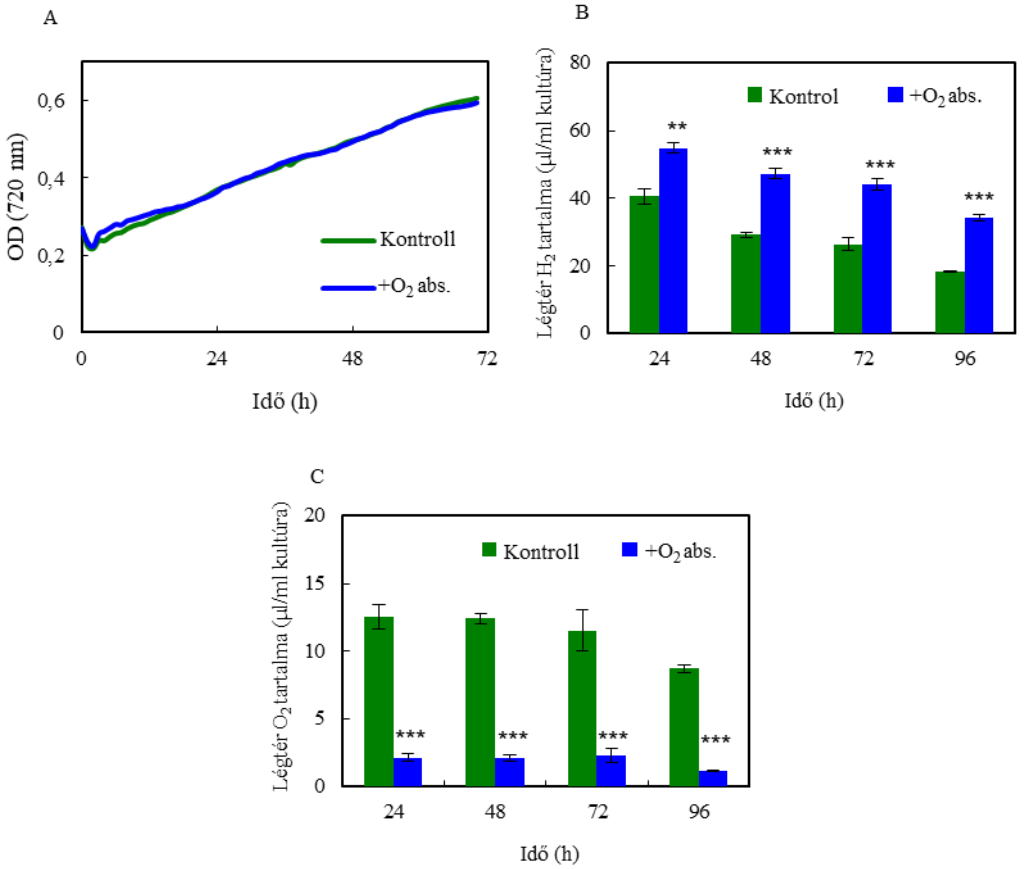


22. ábra Wesren-blot analízissel meghatározott PsbA, PetB, PsaA és RbcL mennyisége az O_2 abszorbens jelenlétében és annak hiányában *C. reinhardtii* CC-124-es törzsben. 2 µg chl (a+b)-nek megfelelő mennyiségű mintát használtunk az analízishez. A 2-4. minták a 0. perces kontroll minta 25%-os, 50%-os, 100%-os mennyiségei. A 0 órás mintákat közvetlenül a 4 órás sötét anaerob indukció után gyűjtöttük. Az átlagok értékei (± SEM) 3-6 biológiai ismétlésen alapulnak.

A Rubisco nagy alegysége, az RbcL mérsékelt csökkenést mutatott a 96 óra alatt (22. ábra). Ezek az eredmények éles ellentétben állnak a kénmegvonás alatt elért eredményekkel, ahol a Rubisco és a PsbA mennyisége már 48 óránál nagymértékű csökkenést mutat, és a 4-6 napos kísérlet végére a legtöbb fotoszintetikus komplex lebomlik, a sejtek pedig végül elpusztulnak (Melis és mtsai., 2000; Zhang és mtsai., 2002; Nagy és mtsai., 2016, 2018).

Mivel a kísérletünk során a sejtek fotoszintetikusan aktívak maradtak, a H_2-termeltetési időszak után megpróbáltuk őket regenerálni és egy új kísérlet során ismét felhasználni. A kultúrákat a regeneráció során 6 µg chl (a+b)-ra állítottuk be, friss HS oldattal hígítva őket. Ezután egy alganevelő berendezésbe (PSI Multicultivator) helyeztük a kultúrákat és 1%-os CO_2-tartalmú levegővel buborékoltattuk őket 72 órán át. Ez idő alatt a sejtszám gyarapodása volt megfigyelhető, ami már 24 óra alatt megduplázódott (23. ábra).

Amikor ezeket a regenerált sejteket egy második, sötét anaerob indukciós periódusnak vetettük alá HS tápoldatban, a H_2-termelés hozama az első ciklusban mértekhez hasonló volt.

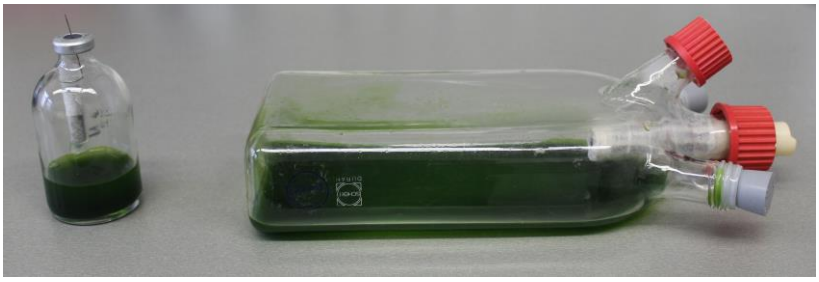


23. ábra A, 1%-os CO_2 tartalmú steril levegővel buborékoltatott kultúrák növekedésének követése 72 órán át *C. reinhardtii* CC-124-es törzsben. A sejtek növekedését 720 nm-en mért turbiditással követtünk, az első H_2-termelési kísérletet követően. A kultúrák friss HS tápoldatban voltak, 6 µg/ml chl (a+b) koncentrációra beállítva. A növekedési szakaszban nem volt jelen az O_2-abszorbens, csak az azt megelőző kísérletben. H_2 (B) és az O_2 (C)-termelés a második sötét anaerob inkubációt követően O_2 abszorbens jelenlétében, illetve annak hiányában *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124-es törzsben. A kultúrák HS tápoldatban, 50 µg/ml chl (a+b) koncentrációra voltak beállítva, az anaerob indukciót követően 320 µ foton/m^2/s folyamatos fényerősséggel voltak megvilágítva. Az átlagok értékei (± SEM) 4 biológiai ismétlésen alapulnak. Az azonos korú HS tápoldatban lévő kontrollhoz viszonyított szignifikánsan eltérő értékeket Student t-teszttel határoztuk meg, és $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$-nek felel meg.

4.4. H_2-termeltetés hatékonyságának fokozása egy új típusú fotobioreaktor kialakításával

Ahogy az már korábban említésre került, a HydA expresszióját és aktivitását gátolja a fotoszintézis során termelődő O_2 (Swanson és mtsai., 2015). De az O_2 gátlása mellett a H_2 magas parciális nyomása ugyancsak negatív hatással van az enzim működésére, ugyanis ebben az esetben H_2-felvételhez vezet (Kosourov és mtsai., 2012). Ennek fényében érthető, hogy elengedhetetlen az O_2 és a H_2 koncentrációjának csökkentése a H_2-termelés hatékonyságának növeléséhez. Erre nyújt lehetőséget az algakultúra felület/térfogat arányának növelése, mely elősegíti a sejtek által termelt gázok diffúziójának végbemenetelét a folyadék fázisból a gázfázisba. Ennek segítségével mérsékelhetők a H_2-termelésre gyakorolt gátló hatások. A vékony folyadékrétegű fotobioreaktorok (Thin-Cell-Layer Photobioreactor, TCL-PBR) olyan nevelésre alkalmas rendszerek, melyeket 10 mm-nél rövidebb fényút és nagy felület/térfogat arány jellemez. Ezek a tulajdonságok lehetővé teszik, hogy a TCL-PBR akár nagyon magas sejtsűrűséggel is működjön (1000 µg chl (a+b)/ml kultúra), és javuljon a besugárzott terület egységnyi felületére jutó fotoszintetikus hatékonyság (Masojídek és mtsai., 2011, 2015). Ha mindezt turbulens keveréssel kombináljuk, akkor a TCL-PBR-t jellemző nagy sejtsűrűség rövid fény/sötét ciklusok kialakulását is lehetővé teszi (Doucha és Lívanský, 1995; Masojídek és mtsai., 2011). A rövid fény/sötét ciklusok előnye abban rejlik, hogy javítják a fényhasznosítási hatékonyságot, mivel megakadályozzák a fotoszintetikus elektrontranszport-komponensek túlzott redukálódását (Matthijs és mtsaiz, 1996; Nedbal és mtsai., 1996), továbbá megakadályozzák a H_2-termeléssel versengő CBB-ciklus aktiválódását is (Kosourov és mtsai., 2018).

Munkánk során a H_2-termelést egy zárt TCL-PBR rendszer alkalmazásával próbáltuk fokozni. Ehhez első lépésként összehasonlítottuk a szérumüvegekben elhelyezett kultúrák, és vékony folyadékrétegű, vízszintesen elhelyezett, 1 literes Roux üvegekben (TCL-PBR) lévő algakultúrák által termelt H_2 mennyiségét. A sejtszuszpenzió vastagsága körülbelül 22 mm volt a szérum üvegekben, míg a PBR üvegekben 5 mm volt (24. ábra).



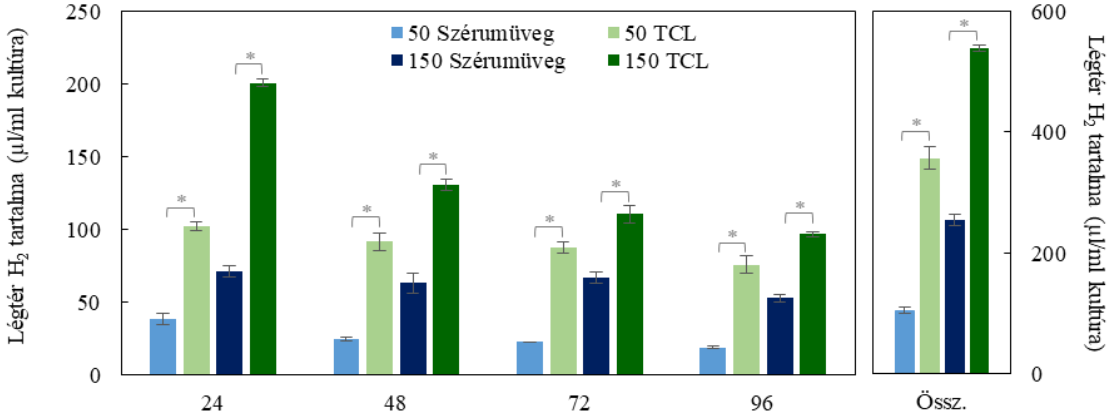
24. ábra: A kísérletek során felhasznált szérumüveg és vékony folyadékrétegű PBR üveg. A szérumüveg 120 ml-es térfogatú, melybe 30 ml alga kultúrát és 1,3 g O_2 abszorbenst helyeztünk el. A Roux-üveg 1 l-es térfogatú, melybe 100 ml kultúra és 20 g O_2 abszorbens került elhelyezésre. Az anaerob indukciót követően a sejtek kísérlettől függően 320 vagy 1000 µmol foton/m^2/s folyamatos fényerőséggel kerültek megvilágításra és a klorofiltartalom 50, vagy 150 µg/ml chl (a+b) koncentrációra volt beállítva.

A felület/térfogat arányt négyszeresére (0,059 cm^{-1}-ről 0,24 cm^{-1}-re) növeltük meg, hogy a gázok folyadékfázisból történő távozása hatékonyabb módon történhessen meg. A gáz/folyadék térfogat arányt is a háromszorosára növeltük (3-ról 9-re), ezáltal biztosítva az alacsony O_2 és H_2 parciális nyomást a kísérleti rendszerben.

Korábbi kutatásokban alkalmazott hagyományos lapos elrendezésű illetve a laboratóriumi léptékű PBR-ek (Gilbert és mtsai., 2011; Skjånes és mtsai., 2016) gázfázisa csekély, a gáz/folyadék arányuk 1,5 alatt van (Fedorov és mtsai., 2005, Tsygankov és mtsai., 2006).

Kísérleteink során összehasonlítottuk TCL és szérumüveg H_2-termelését 50 és 150 µg/ml chl (a+b) koncentrációk, valamint 350 és 1000 µmol foton/m^2/s fényintenzitások mellett. A kísérleteinkhez a széles körben elterjedt CC-124-es törzset használtuk.

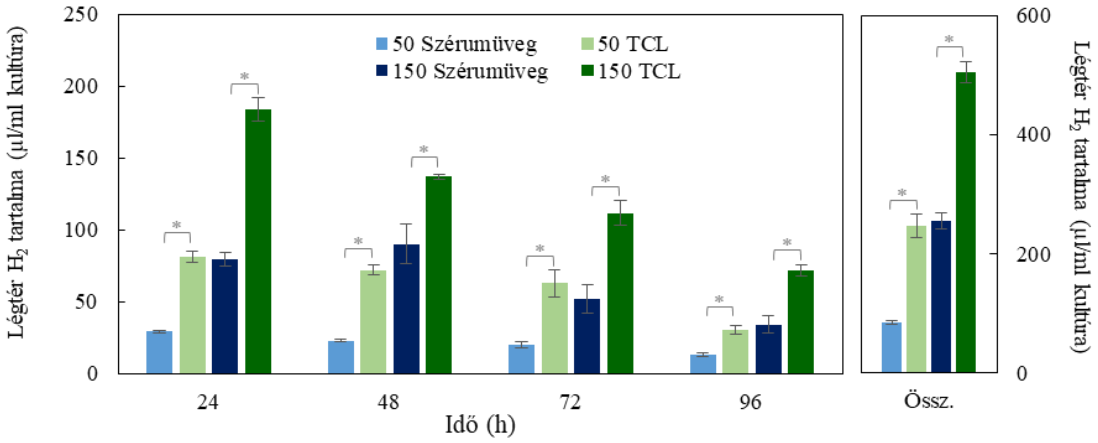
50 µg chl (a+b)/ml és 350 µmol foton/m^2/s fényintenzitás mellett a megtermelt H_2 mennyisége a TCL-PBR-ben 3,6-szorosára nőtt a szérumüvegben tartott kultúrákkal összehasonlítva (96 h alatt körülbelül 360 µl H_2/ml a 100 µl H_2/ml-rel szemben) (25. ábra).



25. ábra *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124-es törzs H_2 termelése 50 és 150 µg/ml chl (a+b) koncentráció és 320 µmol foton/m^2/s fényerősség mellett, PBR és szérumüvegben. A kultúrák HS tápoldatban voltak, és az anaerob indukciót követően kerültek folyamatos fényerősséggel történő megvilágítvás alá. A gázok mennyiségének meghatározása lezárt kultúrák légteréből történt gázkromatográfiás méréssel, minden 24. órában. Az Össz. a 96 óra alatt megtermelt H_2 összmennyiségét ábrázolja. Az átlagok értékei (± SEM) 3 biológiai ismétlésen alapulnak. A szérumüveg és a TCL-PBR azonos korú és azonos klorofillkoncentrációval rendelkező kultúrák szignifikánsan eltérő értékekeit Student t-teszttel határoztuk meg *p < 0,05-nek felel meg.

Amikor a klorofill koncentrációt megháromszoroztuk (50 µg/ml-ről 150 µg/ml-re) a szérumüvegben lévő kultúrák által termelt H_2 mennyisége 2,5-szeresére nőtt, míg a vékony sejtrétegű kultúrákban a növekedés kisebb mértékű volt, körülbelül 1,5-szeres. Ám még így is kétszer jobban teljesítettek a TCL-PBR üvegekben tartott kultúrák (539 µl H_2/ml), mint a szérumüvegben tartottak (254 µl H_2/ml) 150 µg chl (a+b)/ml koncentrációban.

Ezek után a H_2-termelés hatékonyságát a napfény intenzitásának megfelelő tartományban, azaz 1000 µmol foton/m^2/s-nál teszteltük. 50 µg chl (a+b)/ml koncentrációjú kultúráknál ez a fényintenzitás 20-30%-kal csökkentette a megtermelt H_2 mennyiségét, mind a szérumüvegben (86 µl H_2/ml), mind a TCL-PBR-ben (247 µl H_2/ml). Ez a csökkenés valószínűleg a fotoinhibíció hatásának tudható be. Amikor nagy sejtsűrűségű kultúrákat alkalmaztunk (150 µg chl (a+b)/ml) a megtermelt H_2 mennyisége lényegében ugyanaz maradt, mint amennyit a 350 µmol foton/m^2/s fényintenzitásnál figyelhettünk meg a szérumüvegben (255 µl H_2/ml) és a TCL-PBR-ekben (504 µl H_2/ml, 26. ábra).



26. ábra *C. reinhardtii* CC-124-es törzs H_2 termelése 50 és 150 µg/ml chl (a+b) koncentráció és 1000 µmol foton/m^2/s fényerősség mellett, PBR és szérumüvegben. A kultúrák HS tápoldatban voltak, és az anaerob indukciót követően kerültek folyamatos fényerősséggel történő megvilágítvás alá. A gázok mennyiségének meghatározása lezárt kultúrák légteréből történt gázkromatográfiás méréssel, minden 24. órában. Az Össz. a 96 óra alatt megtermelt H_2 összmennyiségét ábrázolja. Az átlagok értékei (± SEM) 3 biológiai ismétlésen alapulnak. A szérumüveg és a TCL-PBR azonos korú és azonos klorofill koncentrációval rendelkező kultúrák szignifikánsan eltérő értékekeit Student t-teszttel határoztuk meg $*p < 0{,}05$-nek felel meg.

A megtermelt H_2 mennyisége chl (a+b) tartalomra számolva azt sugallja, hogy kisebb sejtsűrűséggel nagyobb fényfelhasználási hatékonyság érhető el a TCL-PBR kultúráknál, 350 µmol foton/m^2/s fényintenzitásnál.

A szérumüvegek (körülbelül 2090 µl H_2/ mg chl (a+b)) és a vékony sejtrétegű kultúrák (7100 µl H_2/ mg chl (a+b)) között több mint háromszoros különbség volt megfigyelhető a 72 óra alatt megtermelt H_2 mennyiségében. Mindezek mellett az 50CC Loose (O2Zero, Global Reach Ltd, London, UK) O_2 abszorbens alkalmazása eredményeként a gázfázis O_2 koncentrációja mind a szérumüvegekben, mind a TCL-PBR esetében a kimutathatósági határ alá csökkent (körülbelül 0,05%-ra).

A legnagyobb H_2-termelést a TCL-PBR-ben értük el 150 µg chl (a+b)/ml koncentrációnál. Habár a H_2-termelés nem mutatott javulást a mérsékelt fényintenzitásról (350 µmol foton/m^2/s-ról) a napfény intenzitására (1000 µmol foton/m^2/s-ra) történő váltáskor, gátló hatást sem tapasztaltunk. Ez ellentétben áll a kénmegvonáson átesett kultúrák esetében tapasztaltakkal, melyek fotoszintetikus apparátusa intenzív fényen 2 napon belül degradálódott, és a termelt H_2 mennyisége 10-20%-ra esett vissza a mérsékelt fényintenzitáson tartott kultúrákéhoz

viszonyítva (Scoma és mtsai., 2012; Geier és mtsai., 2012). A fenti eredmények alapján tehát kijelenthető, hogy a TCL-PBR rendszerünk ígéretesnek tűnik a kültéri, nagyléptékű rendszerek megvalósításához.

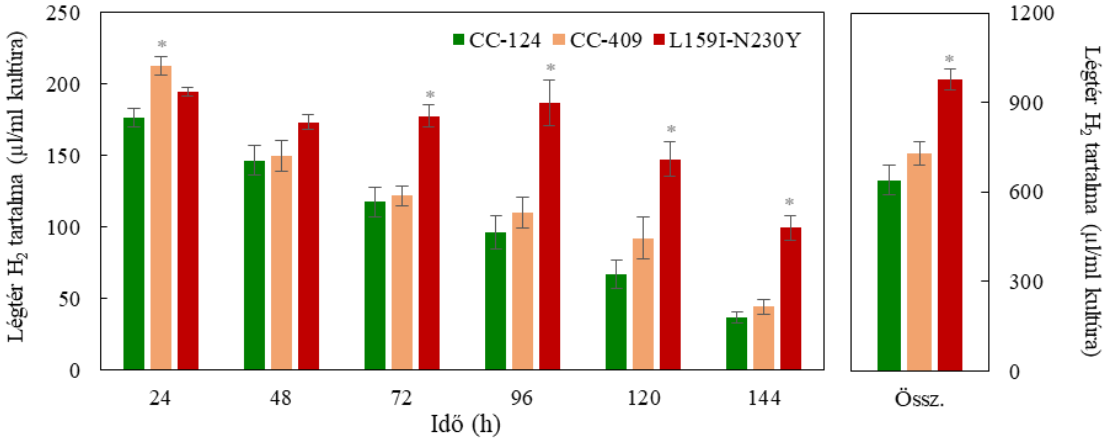
Fontos figyelembe venni azt a tényt, hogy a fényintenzitásnak körülbelül háromszorosára növelése nem eredményezett növekedést a H_2-termelésben, ami azt sugallja, hogy a H_2-termelést nem a gerjesztési energia korlátozza, hanem inkább a fotoszintetikus elektrontranszport, vagy a HydA aktivitása. A következő kísérletekben e hipotézis tesztelése érdekében három fotoszintetikus mutánst vizsgáltunk, amelyek a PSII és a PSI ciklikus elektrontranszport (PSI-CET) aktivitásában érintettek.

4.5. Fokozott H_2-termeléssel rendelkező mutáns törzsek azonosítása, jellemzése

4.5.1. A L159I-N230Y mutáns H_2-termelése TCL-PBR-ben, napfény intenzitásán

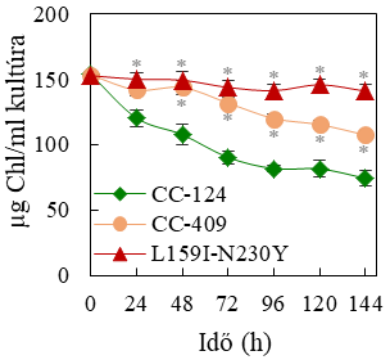
A *C. reinhardtii* L159I-N230Y mutáns kettős aminosav-szubsztitúciót hordoz a PsbA fehérjéjében: az L159 leucint izoleucin, míg az N230 aszparagint egy tirozin helyettesíti. Erre a törzsre jellemző, hogy alacsonyabb klorofilltartalommal rendelkezik szárazanyag-tartalomra számítva, megközelítőleg 20%-kal nagyobb a fotoszintetikus kapacitása és 40%-kal magasabb a respirációs aktivitása a vad típusú CC-409-es törzshöz viszonyítva (Torzillo és mtsai., 2009). Ezzel együtt az L159I-N230Y mutáns körülbelül kétszer annyi H_2-t termel, mint a kénmegvonáson átesett CC-124-es törzs, és sikeresen alkalmazták hosszú időtartamú, anaerobiózis által kiváltott H_2-termeltetési kísérleteknél is (Scoma és mtsai., 2012, 2014).

Kísérleteinkben összehasonlítottuk az L159I-N230Y mutáns H_2-termelését a CC-409-es hátterű és a CC-124-es kontroll törzsével TCL-PBR-ben, napfény intenzitás (1000 µmol foton/m^2/s) és magas klorofilltartalom (150 µg/ml) mellett. A kísérlet 6 napon keresztül tartott. Mindhárom törzs H_2-termelése az első 24 órában nagyon hasonló volt, körülbelül 200 µl/ml. A CC-124-es és a CC-409-es törzs H_2-termelése a második naptól kezdve folyamatos csökkenést mutatott, míg az L159I-N230Y mutánsé meglehetősen stabil maradt és csak a 6. napra csökkent. A teljes kísérlet alatt az L159I-N230Y törzs körülbelül 980 µl /ml H_2-t, míg a CC-124 és a CC-409 körülbelül 640 µl /ml H_2, illetve 730 µl /ml H_2-t termelt. Egyik kultúra gázterében sem volt kimutatható mennyiségű O_2 (27. ábra).



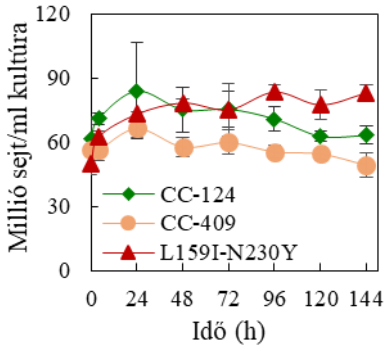
27. ábra CC-124, CC-409 és L159I-N230Y *C. reinhardtii* törzsek H_2-termelése, 150 µg chl (a+b) koncentráció és 1000 µmol foton/m^2/s fényerősség mellett, PBR üvegben.
A kultúrák HS tápoldatban voltak, és az anaerob indukciót követően kerültek folyamatos fényerősséggel történő megvilágítvás alá. A gázok mennyiségének meghatározása lezárt kultúrák légteréből történt gázkromatográfiás méréssel, minden 24. órában. Az Össz. a 144 óra alatt megtermelt H_2 összmennyiségét ábrázolja. Az átlagok értékei (± SEM) 7-8 biológiai ismétlésen alapulnak. A szignifikancia különbségek két utas ANOVA-val és Tukey post-hoc teszttel kerültek meghatározásra. A csillagok a szignifikáns különbségeket jelzik, *p<0,05-nek felel meg, és az azonos korú és azonos klorofill koncentrációval rendelkező CC-124-es mintákhoz viszonyítottuk az egyes pontokat.

Megvizsgáltuk a három törzsben a fotoszintetikus apparátus stabilitását a 6 napos H_2-termelés folyamán. Az L159I-N230Y-as törzsnél a klorofilltartalom a kezdeti szinten maradt, míg a CC-409-ben körülbelül 30%-os, a CC-124-es törzsben pedig 50%-os csökkenést figyeltünk meg (28. ábra).



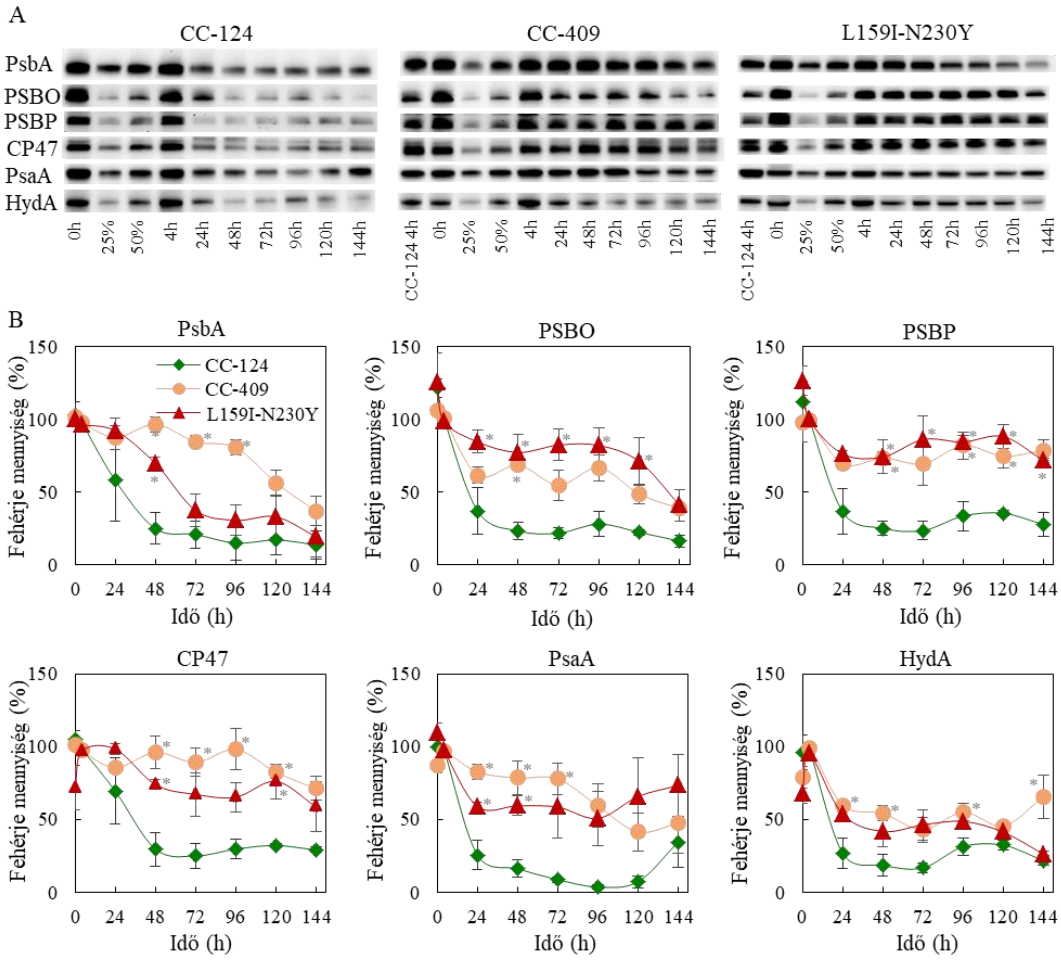
28. ábra Klorofilltartalom változása a H_2-termelés alatt CC-124, CC-409 és L159I-N230Y *C. reinhardtii* törzsekben, 150 µg/ml chl (a+b) koncentráció és 1000 µmol foton/m^2/s fényerősség mellett, PBR üvegben. A kultúrák HS tápoldatban voltak, és az anaerob indukciót követően kerültek folyamatos fényerősséggel történő megvilágítvás alá. Az átlagok értékei (± SEM) 7-8 biológiai ismétlésen alapulnak. A szignifikanciakülönbségek két utas ANOVA-val és Tukey post-hoc teszttel kerültek meghatározásra. A csillagok a szignifikáns különbségeket jelzik, *p<0,05-nek felel meg, és az azonos korú és azonos klorofillkoncentrációval rendelkező CC124-es mintákhoz viszonyítottuk az egyes pontokat.

Az első 24 órában a sejtszám kis mértékben megnőtt mind a három törzsnél, majd viszonylag stabil maradt a kísérlet időtartama alatt (29. ábra). Ezek az adatok azt mutatják, hogy jelentős sejtkárosodás, vagy lízis nem következett be, de a klorofilltartalom részben lebomlott a CC-409-es és CC-124-es törzsben.



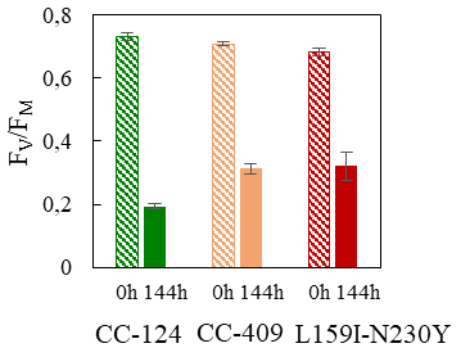
29. ábra Sejtszám változás a H_2-termelés alatt CC-124, CC-409 és L159I-N230Y *C. reinhardtii* törzsekben 150 µg/ml chl (a+b) koncentráció és 1000 µmol foton/m^2/s fényerősség mellett, PBR üvegben. A kultúrák HS tápoldatban voltak, és az anaerob indukciót követően kerültek folyamatos fényerősséggel történő megvilágítvás alá. Az átlagok értékei (± SEM) 7-8 biológiai ismétlésen alapulnak. A szignifikancia különbségek két utas ANOVA-val és Tukey post-hoc teszttel kerültek meghatározásra. A statisztikai analízis nem mutatott ki szignifikáns különbségeket a vizsgált minták között.

Western-blot analízissel meghatároztuk a PSII alegységek, köztük a PsbA, PsbB, PsbO és a PsbP mennyiségét, melyek gyors csökkenést mutattak a CC-124-es törzsben, míg sokkal stabilabbak voltak a CC-409-es és az L159I-N230Y törzsben. Hasonló tendencia volt megfigyelhető a PSI alegységénél, a PsaA esetében is. A HydA mennyisége a CC-124-es törzsben már 24 óra H_2-termelés után 70%-os csökkenést mutatott, míg a másik két törzsben sokkal stabilabb volt (30. ábra).



30. ábra. A, Western-blot analízissel meghatározott HydA és a főbb fotoszintetikus fehérjék mennyisége 144 h H_2 termelés alatt, 150 µg/ml chl (a+b) koncentráció és 1000 µmol foton/m^2/s folyamatos fényerősség mellett, PBR üvegben. Egymillió sejtnek megfelelő mennyiségű mintát használtunk az analízishez. A 2-4. minták a 0 perces kontroll minta 25%-os, 50%-os és 100%-os mennyiségei. A 0 órás mintákat közvetlenül a 4 órás anaerob indukció után gyűjtöttük. Összehasonlításképpen a CC-124 törzs 4 órás mintáját a CC-409 és az L159I-N230Y mutáns blotjaira is felvittük. B, A Western-blot analízis denzitometriás elemzése. Az egyes genotípusok 4 órás mintáját használtuk 100% -os referenciaként az elemzéshez. Az átlagok értékei (± SEM) 3-4 biológiai ismétlésen alapulnak. A szignifikancia különbségek két utas ANOVA-val és Tukey post-hoc teszttel kerültek meghatározásra. A csillagok a szignifikáns különbségeket jelzik, *p <0,05-nek felel meg, és az azonos korú és azonos klorofillkoncentrációval rendelkező CC-124-es mintákhoz viszonyítottuk az egyes pontokat.

Ezekkel az adatokkal egyetértésben az F_v/F_m paraméter- amely a fotoszintetikus hatékonyság egy lehetséges indikátora- is viszonylag magas a CC-409-es és az L159I-N230Y törzsekben (31. ábra). Ez jelzi, hogy ellenállóbbak a magas fény káros hatásával szemben az anaerobiózis által kiváltott H_2-termelés folyamán, mint a CC-124-es törzs.



31. ábra F_v/F_m paraméter értékének változása az aerob és a 144 órás H_2-termelő *Chlamydomonas reinhardtii* kultúrákban, 150 µg/ml chl (a+b) koncentráció mellett és 1000 µmol foton/m^2/s folyamatos fényerősség mellett, PBR üvegben. A kultúrák HS tápoldatban voltak, és az anaerob indukciót követően kerültek folyamatos fényerősséggel történő megvilágítvás alá. Az átlagok értékei (± SEM) 7-8 biológiai ismétlésen alapulnak. A szignifikanciakülönbségek két utas ANOVA-val és Tukey post-hoc teszttel kerültek meghatározásra. A csillagok a szignifikáns különbségeket jelzik, *p< 0,05-nek felel meg, és az azonos korú és azonos klorofill koncentrációval rendelkező CC-124-es mintákhoz viszonyítottuk az egyes pontokat.

Az L159I-N230Y törzs 30%-al több H_2-t termelt, mint a CC-409, bár a fotoszintetikus apparátusuk állapota 144 órát követően is hasonló.

Korábban viszont megfigyelték, hogy az L159I-N230Y mutáns sokkal érzékenyebb a magas fényre, mint a két másik törzs. Ezért valószínű, hogy a kísérleteink során az L159I-N230Y mutáns jobb H_2-termelése nem a megnövekedett fénytűréssel, hanem a magasabb légzési aktivitással függ össze (Torzillo és mtsai., 2009), ami táplálhatja az elektrontranszportot a HydA felé, és egyúttal minimalizálhatja az intracelluláris O_2 szintjét.

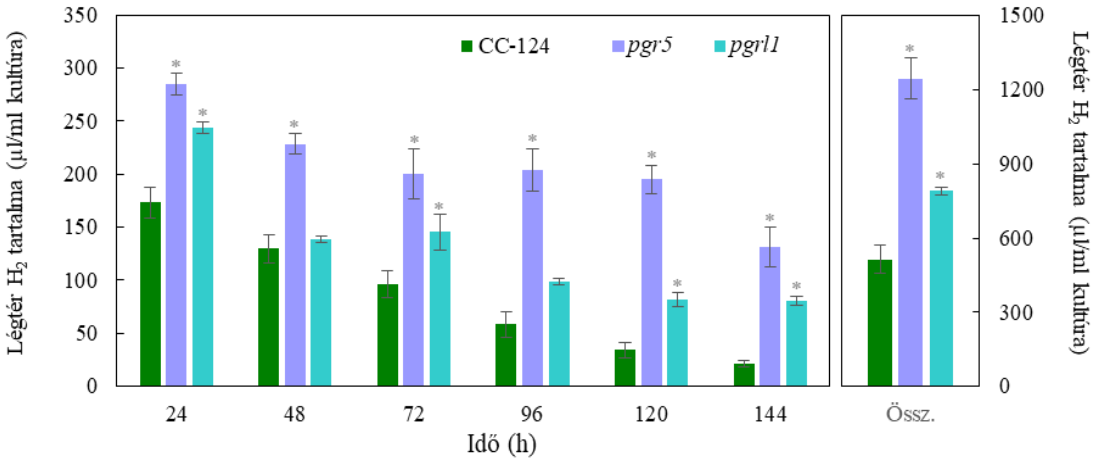
4.5.2. A *pgr5* és a *pgrl1* mutánsok H_2-termelése TCL-PBR-ben, a napfény intenzitásán

A PSI ciklikus elektrontranszportja (PSI-CET) olyan mechanizmus, amely lehetővé teszi az ATP és NADPH arányának szabályozását a kloroplasztisztban. Különösen a fotoszintézis indukciója során játszik fontos szerepet a fényvédelemben (Nawrocki és mtsai., 2019a). *Chlamydomonas reinhardtii*-ban anoxia alatt a PSI-CET elsődleges útvonala a ferredoxin-függő (Fd) PSI ciklikus elektrontranszport. A PSI-CET protonmotoros erőt generál, amellyel szabályozza a fotoszintetikus elektrontranszportot. A Proton Gradient Regulator Like 1 (PGRL1) és a Proton Gradient Regulator 5 (PGR5) fehérjék részt vesznek ennek a folyamatnak a szabályozásában (Tolleter és mtsai., 2011; Johnson és mtsai., 2014), bár valószínűleg nem közvetlenül a ferredoxinról a plasztokinonra (PQ) történő elektrontranszferben (Nawrocki és mtsai., 2019a, 2019b).

A PGRL1 egy transzmembrán fehérje, ami a tilakoidmembránban van, míg a PGR5 egy kis, a sztrómában elhelyezkedő fehérje, amely nem köt kofaktorokat, és a PGRL1 által képes kötődni a tilakoidokhoz (Shikanai, 2007; DalCorso és mtsai., 2008). *C. reinhardtii*-ban mindkettő egy szuperkomplex alkotóeleme, amely a PSI-CET kialakulásához szükséges, különösen anoxiás körülmények között (Godaux és mtsai., 2015; Steinbeck és mtsai., 2018). PSI-CET-re leginkább olyan körülmények között van szükség, amikor az Fd túlságosan redukált, és a PSI fotoinhibíciónak van kitéve. Ilyen eset lehet például a nagy fényintenzitás, a CBB-ciklus korlátozott aktivitása és az anoxia (Johnson és mtsai., 2014). A *C. reinhardtii* sejtekben a PGR5 és PGRL1 hiánya a transztilakoidális proton grádiens csökkenéséhez vezet, ehhez pedig kevésbé hatékony PSI-CET kapacitás és fokozott klororespiráció társul (Petroutsos és mtsai., 2009; Steinbeck és mtsai., 2015). A PGR5 hiánya fokozott fényérzékenységet is eredményez fotoautróf körülmények között (Johnson és mtsai., 2014). A protongrádiens korlátozza az elektrontranszportot a hidrogenáz enzim felé, mind kénmegvonás (Antal és mtsai., 2009; Tolleter és mtsai., 2011), mind az anaerobiózis által kiváltott H_2-termelés esetében (Nagy és mtsai., 2018). Ezért a PSI-CET csökkenése várhatóan a H_2-termelés fokozódását eredményezi. Ezen kívül mindkét mutáns megnövekedett mitokondriális légzési kapacitással rendelkezik, ami csökkent intracelluláris O_2-szinthez vezet, ez pedig tartósabb HydA aktivitást tesz lehetővé (Johnson és mtsai., 2014; Godaux és mtsai., 2015). A *pgr5* és *pgrl1* mutánsok jóval magasabb H_2-termelést mutatnak kénmegvonás alatt, acetáttartalmú közegben, alacsony fényintenzitásnál

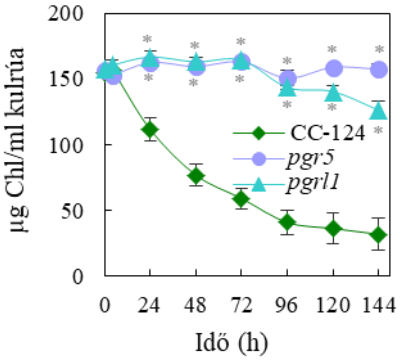
(60 µmol foton/m^2/s), mint a CC-124-es törzs (Steinbeck és mtsai., 2015). Közepes fényerősségen (200 µmol foton/m^2/s) a *pgrl1* mutáns több napon át termelt H_2-t, míg a *pgr5* mutáns által termelt H_2 összmennyisége csökkent a fotoinhibíció és a PSI degradációja miatt, míg a CC-124-es törzs gyakorlatilag nem termelt H_2-t (Steinbeck és mtsai., 2015).

A fotoautróf anaerobiózis által kiváltott H_2-termeltetési rendszerünkben 1000 µmol foton/m^2/s fényintenzitáson és 150 µg chl (a+b)/ml-re beállított klorofilltartalomnál a *pgr5* mutáns az első napon nagyon jól teljesített. Körülbelül 65%-al több H_2-t termelt, mint a CC-124-es törzs és a különbség a kísérlet végéhez közeledve tovább nőtt. A 4. és az 5. napon a *pgr5* mutáns körülbelül 5-ször annyi H_2-t termelt, mint a CC-124, a teljes termelt H_2 mennyisége pedig 2,5-szer nagyobb volt, mint a CC-124-es törzsé. A *pgrl1*-es mutánsnál hasonló tendencia figyelhető meg, de a növekedés csak körülbelül 50%-os volt a CC-124-es törzshöz képest (32. ábra).



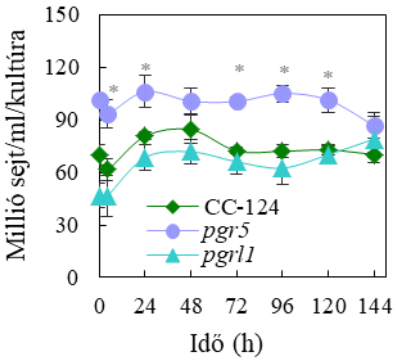
32. ábra CC-124, *pgr5* és a *pgrl1* mutáns *C. reinhardtii* törzsek H_2-termelése 150 µg/ml chl (a+b) koncentráció és 1000 µmol foton/m^2/s folyamatos fényerősség mellett, PBR üvegben. A kultúrák HS tápoldatban voltak, és az anaerob indukciót követően kerültek folyamatos fényerősséggel történő megvilágítvás alá. A gázok mennyiségének meghatározása lezárt kultúrák légteréből történt gázkromatográfiás méréssel, minden 24. órában. A SZUM a 144 óra alatt megtermelt H_2 összmennyiségét ábrázolja. Az átlagok értékei (± SEM) 3-4 biológiai ismétlésen alapulnak. A szignifikanciakülönbségek két utas ANOVA-val és Tukey post-hoc teszttel kerültek meghatározásra. A csillagok a szignifikáns különbségeket jelzik, *p<0,05-nek felel meg, és az azonos korú és azonos klorofill koncentrációval rendelkező CC-124-es mintákhoz viszonyítottuk az egyes pontokat.

Figyelemre méltó, hogy a *pgr5* mutáns klorofilltartalma változatlan maradt a 6 napos H_2-termelés időtartama alatt intenzív megvilágítás mellett is. A *pgrl1* mutánsé kissé csökkent, míg a CC-124-es törzs esetében pedig igen jelentős csökkenést figyeltünk meg (33. ábra).



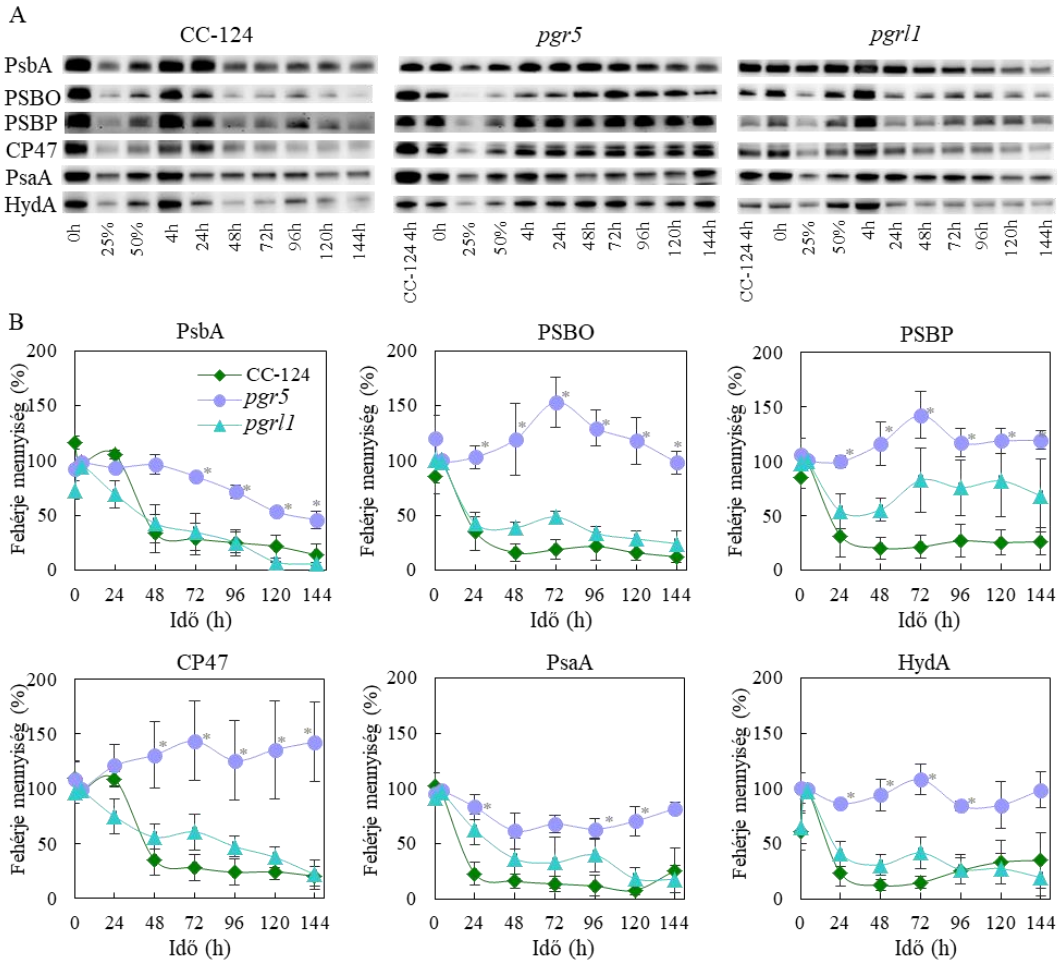
33. ábra Klorofilltartalom változása a H_2-termelés alatt CC-124, *pgr5* és a *pgrl1* mutáns *Chlamydomonas reinhardtii* törzsekben 150 µg/ml chl (a+b) koncentráció és 1000 µmol foton/m^2/s folyamatos fényerősség mellett, PBR üvegben A kultúrák HS tápoldatban voltak, és az anaerob indukciót követően kerültek folyamatos fényerősséggel történő megvilágítvás alá. Az átlagok értékei (± SEM) 3-4 biológiai ismétlésen alapulnak. A szignifikanciakülönbségek két utas ANOVA-val és Tukey post-hoc teszttel kerültek meghatározásra. A csillagok a szignifikáns különbségeket jelzik, *p <0,05-nek felel meg, és az azonos korú és azonos klorofill koncentrációval rendelkező CC-124-es mintákhoz viszonyítottuk az egyes pontokat.

A sejtsűrűség viszonylag stabil maradt mind a három törzs esetében, eltekintve az első 24 órában megfigyelhető mérsékelt növekedéstől (34. ábra).



34. ábra Sejtszám változás a H_2-termelés alatt CC124, *pgr5* és a *pgrl1* mutáns *C. reinhardtii* törzsekben, 150 µg/ml chl (a+b) koncentráció és 1000 µmol foton/m^2/s folyamatos fényerősség mellett, PBR üvegben. A kultúrák HS tápoldatban voltak, és az anaerob indukciót követően kerültek folyamatos fényerősséggel történő megvilágítvás alá. Az átlagok értékei (± SEM) 3-4 biológiai ismétlésen alapulnak. A szignifikanciakülönbségek két utas ANOVA-val és Tukey post-hoc teszttel kerültek meghatározásra. A csillagok a szignifikáns különbségeket jelzik, *p <0,05-nek felel meg, és az azonos korú és azonos klorofillkoncentrációval rendelkező CC-124-es mintákhoz viszonyítottuk az egyes pontokat.

A fotoszintetikus apparátus jelentős mértékben megőrződött a PSI-CET mutánsokban, különösképpen a *pgr5* mutánsban. A kísérlet végére a PsbA 50%-a volt detektálható és gyakorlatilag mind a PsbB, mind a PsbO és a PsbP alegység mennyisége változatlan maradt. A CC-124-ben és a *pgrl1* mutánsban a HydA nagy része (körülbelül 70%-a) lebomlott, ellentétben a *pgr5* mutánssal, ahol a HydA szinte 100%-a megmaradt a 6 napos kísérlet alatt (35. ábra).



35. ábra. A, Western-blot analízissel meghatározott HydA és a főbb fotoszintetikus fehérjék mennyisége a 144 h H_2-termelés alatt, 150 µg/ml chl (a+b) koncentráció és 1000 µmol foton/m^2/s folyamatos fényerősség mellett, PBR üvegben. 1 millió sejtnek megfelelő mennyiségű mintát használtunk az analízishez. A 2-4. minták a 0 perces kontroll minta 25%-os, 50% -os és 100% -os mennyiségei. A 0 órás mintákat közvetlenül a 4 órás anaerob indukció után gyűjtöttük. Összehasonlításképpen, a CC-124 törzs 4 órás mintáját a *pgrl1*és a *pgr5* mutáns blotjaira is felvittük. B, A Western-blot denzitometriás elemzése. Az egyes genotípusok 4 órás mintáját használtuk 100% -os referenciaként az elemzéshez. Az átlagok értékei (± SEM) 3-4 biológiai ismétlésen alapulnak. A szignifikanciakülönbségek kétutas ANOVA-val és Tukey post-hoc teszttel kerültek meghatározásra. A csillagok a szignifikáns különbségeket jelzik, $*p < 0{,}05$-nek felel meg, és az azonos korú és azonos klorofillkoncentrációval rendelkező CC-124-es mintákhoz viszonyítottuk az egyes pontokat.

A *pgrl1* mutáns *in vitro* H_2-termelési aktivitása sejtszámra vonatkoztatva majdnem háromszorosa volt a CC-124-es törzsének a kísérlet elején (a 4 órás sötét inkubációs periódust követően mérve). Ez összecseng a CC-124-hez képest nagyobb mennyiségű HydA jelenlétével. A *pgr5* mutánsnak kb. 60%-kal volt nagyobb az *in vitro* hidrogenáz aktivitása, mint a 4 órás sötét inkubáció alatt a CC-124-es törzsé. A 6 napos H_2-termelést követően mért *in vitro* hidrogenáz-aktivitás viszonylag magas maradt mind a három törzsben. A CC-124-ben a kezdeti *in vitro* aktivitás 34%-a, míg a *pgrl1* mutánsban 11%-a maradt meg. Figyelemre méltó, hogy a *pgr5* mutánsban az *in vitro* HydA aktivitás 44%-a őrződött meg a kísérlet végére (1. táblázat). Korábbi kísérletünkben a sötét-indukált HydA aktivitásnak csak körülbelül 7%-a maradt meg 24 óra után (Nagy és mtsai., 2018), és a korábbi tanulmányok is azt mutatták, hogy a HydA képes percek alatt inaktiválódni O_2 jelenlétében (Ghirardi és mtsai., 1997). A kezdeti magasabb *in vitro* hidrogenáz aktivitás a PSI-CET mutánsokban váratlan volt, bár a rendelkezésre álló adatok azt sugallják, hogy amikor a PSI-CET gátolt, más fotoprotektív mechanizmusok lépnek működésbe, beleértve a H_2-termelést. Szintén ismert volt, hogy ezek a mutánsoknak megnövekedett légzési aktivitással rendelkeznek, amely hozzájárul az alacsony intracelluláris O_2 szintek és ezáltal a HydA aktivitásának fenntartásához (Petroutsos és mtsai., 2009; Steinbeck és mtsai., 2015). A *pgr5* és a *pgrl1* mutánsok H_2-termelésében lévő nagy különbségek okai további vizsgálatot igényelnek.

	in vitro H_2-termelés			HydA1 mRNS szint
	µl H_2/millió sejt/h			rel. egység
	4 h	144 h	%	
CC-124	1,13 (0,15)	0,38 (0,14)	33,6 %	30,3 % (0,07)
pgr5	1,62 (0,17)	0,70 (0,22)	43,5 %	23,0 % (0,04)
pgrl1	3,10 (0,70)	0,34 (0,05)	11,0 %	10,0 % (0,02)

1. táblázat *C. reinhardti* CC-124-es, *pgr5* és *pgrl1* törzsek *in vitro* H_2-termelése és *HydA1* transzkript szintje 150 µg/ml chl (a+b) koncentráció és 1000 µmol foton/m^2/s folyamatos fényerősség mellett, PBR üvegben. A kultúrák HS tápoldatban voltak, és az anaerob indukciót követően kerültek folyamatos fényerősséggel történő megvilágítvás alá. A 4 h a sötét anaerob indukciót, a 144 h az ezt követő 144. órában mért értékeket jelenti. Az átlagok értékei (± SEM) 3-4 biológiai ismétlésen alapulnak. A 144. óra után megmaradt H_2-termelés mennyiségét is feltűntettük (%-ban).

5. Diszkusszió

A zöldalgák napfénytől a H_2-ig terjedő potenciális energiaátalakítási hatékonysága 10-13%-os tartományban van. A természetben azonban a H_2-termelés csak néhány percig tart, a hatékonysága pedig ennél nagyságrendekkel kisebb, a CBB-ciklus aktiválódása és megtermelt O_2 hidrogenázokat gátoló hatása következtében.

A H_2-termeltetés folyamatossá tételére az egyik lehetőség a sötét anaerob inkubáció, ám az ezzel kapcsolatos korai vizsgálatok során általában nem tudták fenntartani a H_2-termelést néhány óránál tovább, hacsak nem folyamodtak folyamatos héliummal történő öblítéshez. Később a kénmegvonás lett a hosszú távú H_2-termelés indukálására szolgáló módszer. Ám e metódus számos hátránnyal rendelkezik, amelyek akadályozzák az ipari alkalmazását: az eljárás több mosási lépést igényel, a H_2-termelés körülbelül két napos késéssel kezdődik, és nagymértékben függ az acetát jelenlététől (a H_2-termelés indukálható fotoautotróf körülmények között is, de sokkal alacsonyabb hatékonysággal), szükségessé teszi a PSII inaktiválását, és a kénhiány végül a fotoszintetikus apparátus lebomlását eredményezi. A H_2-termelés terminális fázisát követően a kén újbóli hozzáadásával a sejtek csak részlegesen állnak helyre és a H_2-termeltetés csak néhány alkalommal ismételhető (Ghirardi és mtsai., 2000).

Éppen ezért ennek a biotechnológiának a jövője olyan újszerű megközelítésen alapulhat, amely legalább olyan hatékony, mint a kénmegvonási eljárás, és ami a legtöbb jelenlegi problémát megoldaná, korlátozza az alkalmazhatóságát.

PhD munkám során egy fotoautotróf és fenntartható H_2-termelési rendszer kialakításán dolgoztam *C. reinhardtii* zöldalgában. Ez az új protokoll Gaffron és Rubbin (évszám) korai megközelítéséből indul ki, miszerint a hidrogenáz aktivitását sötét anaerob kezeléssel indukálják és a CBB-ciklust inaktívvá teszik a szubsztrát hozzáférhetőségének korlátozásával. Az eredményeink azt mutatják, hogy az elektronok nagy része a szénforrás hiányában a HydA-ra kerülnek. A kísérletek során a CO_2 és FCCP hozzáadása, valamint a viszonylag redukált PQ-pool azt jelzi, hogy a fotoszintetikus kontrollnak köszönhető a hipoxia kialakulása, amely elősegíti a H_2-termelés fenntarthatóságát. Mivel a hidrogenázok kevésbé hatékonyak az elektronok fogadásában, mint a CBB-ciklus, a lumen elsavanyodik és a fotoszintetikus elektrontranszport lelassul a citb_6f –komplexnél. Ez redukált PQ-pool kialakulását

eredményezi, ami csökkent O_2 fejlődést eredményez. A tartós H_2-termelés elérésének másik kulcsfontosságú tényezője a hidrogenázok védelme a maradék O_2-nel szemben, mely elmozdíthatja a fotoszintetikus kontroll által létrehozott O_2- és H_2-termelés egyensúlyát. Kísérleteinkben ennek elérése érdekében egy vas-só alapú O_2-abszorbenst alkalmaztunk, amely 0,1% alá csökkentette az O_2 koncentrációját a légtérben.

Az általunk megalkotott metódusnak alapvető előnyei vannak a korábbi módszerekhez képest, mégpedig: 1, néhány óra anaerob sötét inkubációt követő megvilágítás alatt a H_2-termelés azonnal megkezdődik. 2, A kénmegvonással szemben nem igényel tápoldat-cserét. 3, Nem függ a keményítő lebomlásától és nem igényel acetátot, így fotoautotróf. 4, Mivel nincs szükség szerves szénforrásra, a bakteriális szennyeződés kockázata alacsony. 5, A kultúrák fotoszintetikusan aktívak maradnak a H_2-termelés fázisában és utána könnyen helyreállíthatóak. 6, Lineáris elektrontranszporton alapul, az elektronok elsősorban a PSII vízbontó aktivitásából származnak, amint azt a DCMU-kezelés is bizonyítja és viszonylag magas fény-H_2 energiaátalakítási hatékonysággal rendelkezik. 7, a növekedési fázisban a CO_2, ami egy ipari melléktermék, felhasználható. 8, Viszonylag nagy fényerősség használható a kísérletek során (320 µmol foton/m^2/s).

A protokoll alkalmazásával elért maximális H_2-termelési hozam körülbelül 200 µl H_2/ml kultúra 96 óra alatt, ami majdnem négyszer nagyobb, mint a kénmegvonás során azonos klorofilltartalmú és azonos fényviszonyok mellett mért értékek.

Úgy gondoltuk, hogy a H_2-termelés hozama, melyet anaerob indukcióval minimális tápoldatban idéztünk elő, tovább javítható. Ennek eléréséhez olyan fotobioreaktor megalkotását terveztünk, amelyben optimalizálni kívántuk a gáz/folyadék arányt, a megvilágítást, az alga kevertetésének körülményeit, valamint az előállított gázok hatékony eltávolításának módját.

A mikroorganizmusok által termelt H_2 iparban történő felhasználásának egyik fő akadálya, hogy a termelés hatékonysága igencsak alacsony. A hatékonyság növelésének egyik lehetséges módja a megfelelő bioreaktor kialakítása. A reaktorok két fő típusba különíthetőek el: lehetnek nyitott rendszerűek, mint például tavi kultúrák, illetve zártak. Az utóbbiak, környezetüktől történő elszeparálódásuk révén sterilen tarthatók, illetve a környezeti tényezők (mint például a hőmérséklet, fényerősség) általunk szabályozhatóak. A zárt rendszerű fotobioreaktorok között is több típust tudunk elkülöníteni: függőleges oszlop reaktor, tubuláris és lapos panel. A megfelelő típus

kiválasztását nagyban meghatározza, hogy mi a legfőbb korlátozó tényező a nagyobb mértékű H_2-termelés elérésében. Ilyen gátló tényező lehet például a fény, mely nem ér el a mélyebben elhelyezkedő sejtekhez, a felület/térfogat arány, a megfelelő hőmérséklet biztosítása, a megtermelt gázok eltávolítása, vagy éppen az O_2-mentes környezet biztosítása. Mindezek mellett természetesen az is fontos szempont, hogy milyen anyagból és mekkora dimenzióban képzeljük el a fotobioreaktorunkat.

Mindezen szempontokat figyelembe véve, mi egy 1 literes Roux-üveget választottunk a laboratóriumi kísérleteinkhez. Méretéből és anyagából kifolyólag lehetővé teszi a könnyű tisztítást és a sterilezést is, ezáltal elkerülhetjük a kultúrák befertőződését a vizsgálatok alatt. A kísérletek során az üveget vízszintesen elfektetve helyeztük el egy rázógépen, ezáltal biztosítottuk az állandó kevertetést, valamint így vékony sejtréteget tudtunk kialakítani, ezzel biztosítva azt, hogy a fény eljusson a lentebb elhelyezkedő sejtekhez is. A fekvő elrendezésnek köszönhetően a felület/térfogat arányt és a gáz/folyadék arányt is optimalizálni tudtuk, ezáltal biztosítottuk a gázok hatékonyabb távozását a folyadékfázisból a gázfázisba, valamint az O_2 és a H_2 alacsony parciális nyomását a rendszerünkben. A megtermelt gázok eltávolítását a méréseket követően 20 perces N_2 átfúvatással biztosítottuk, melyet követően az üvegben keletkezett túlnyomást is leengedtük.

Az O_2-mentes környezetet a hidrogenáz megfelelő működéséhez a már korábban említett vas-só alapú O_2-abszorbenst alkalmaztuk, melyet az üveg légterében helyeztünk el.

Kezdetben csak a *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124-es törzset használtuk a kísérletekben annak érdekében, hogy optimalizálni tudjuk a fotobioreaktort. Két különböző klorofill koncentrációt és két különböző fényintenzitást teszteltünk, a TCL üvegek eredményeit pedig összevetettük a korábban már optimalizált szérumüveg rendszerrel. 50 µg chl (a+b)/ml és 350 µmol foton/m^2/s fényintenzitás mellett a megtermelt H_2 mennyisége a TCL-PBR-ben 3,6-szorosára nőtt a szérumüvegben tartott kultúrákhoz képest. Amikor a klorofillkoncentrációt megemeltük, a kultúrák által termelt H_2 mennyisége már kisebb növekedést mutatott, 1,5-szer nagyobb értéket kaptunk, mint az alacsonyabb klorofill koncentráció esetében.

50 µg chl (a+b)/ml koncentrációjú kultúráknál 1000 µmol foton/m^2/s fényintenzitás mellett csökkenő H_2 mennyiséget mértünk, úgy véljük ez a

fotoinhibíciónak köszönhető. Ezzel ellentétben, amikor nagy sejtsűrűségű kultúrákat alkalmaztuk, nem figyeltünk meg csökkenést.

Az adatok alapján a megtermelt H_2 mennyisége chl (a+b) tartalomra valószínűsíthető, hogy a kisebb sejtsűrűséggel nagyobb fényfelhasználási hatékonyság érhető el a TCL-PBR kultúráknál, 350 µmol foton/m^2/s fényintenzitás mellett. A legnagyobb H_2-termelést a TCL-PBR-ben 150 µg chl (a+b)/ml koncentrációnál értük el. Habár a H_2-termelés nem mutatott javulást a mérsékelt fényintenzitásról a napfény intenzitására történő váltáskor, gátló hatást sem tapasztaltunk. Ezért az a tény, hogy a fényintenzitásnak körülbelül háromszorosára növelése nem eredményezett növekedést a H_2-termelésben azt valószínűsíti, hogy a fő gátlóhatás nem a gerjesztési energia mennyisége, hanem inkább a fotoszintetikus elektronszállítás, vagy a HydA aktivitása körül keresendő.

Nagy potenciál rejlik a különböző fotoszintetikus mutánsok esetében ennek a protokollnak az alkalmazásában is, pl: a csonka fénygyűjtő antennákkal, vagy éppen a magas PsbA fehérjetartalommal rendelkező törzsek esetében. A fotobioreaktor optimalizálását követően három fotoszintetikus mutánst teszteltünk, amelyek a PSII és az első fotokémiai rendszer ciklikus elektrontranszport (PSI-CET) tevékenységben érintettek. Kísérleteinkben napfény-intenzitást és magas klorofilltartalmat használtunk.

Először a L159I-N230Y mutánst vizsgáltuk meg a vad típusú CC409-es törzzsel és a CC14-es törzzsel együtt. A kísérletek során az L159I-N230Y mutáns H_2-termelése meglehetősen stabil maradt, csak a 6. napra csökkent. Ezzel a csökkenéssel párhuzamosan PSII-t felépítő alegységek mennyisége is csökken. A fotoszintetikus apparátus teljes mennyiségének csökkenése vezethet a H_2-termelésben bekövetkező csökkenéshez. A fentebb említett degradáció az F_v/F_m értékekben is nyomon követhető. Mindezek mellett megfigyelhető volt a PSI fehérjetartalmának a csökkenése is.

További mutáns törzseket vizsgáltuk meg az általunk kialakított protokoll során, melyeket ismét a CC-124-es törzshöz hasonlítottunk. A PSI ciklikus elektrontranszportjában érintett mutáns törzseknél a protongrádiens csökkenés, illetve a megnövekedett mitokondriális légzési kapacitás miatt a hidrogenáz enzim tartósabb aktivitását és ezáltal hatékonyabb H_2-termelést vártunk. A *pgr5* mutáns esetében megfigyeltük, hogy már a kezdetekben is jóval magasabb H_2-termelést mutat, mint a korábban használt törzsek és ezzel párhuzamosan a degradációs folyamatok lassabban következnek be, melynek köszönhetően hosszabb ideig képes fenntartani a

H_2-termelést. Mindezek mellett a klorofilltartalma változatlan maradt a 6 napos H_2-termelés időtartama alatt, intenzív megvilágítás mellett is.

A H_2-termelés során a fotoszintetikus apparátus megőrződött a PSI-CET mutánsokban, de különösképpen a *pgr5* mutánsban. Mindezek mellett a *pgr5* mutánsnak nem csak hogy jóval nagyobb volt az *in vitro* hidrogenáz aktivitása, mint a CC-124-é, de a 6 napos kísérlet végére a hidrogenáz aktivitásának 44%-át megtartotta. Éppen ezért ígéretes a hosszabb távú, ipari méretekben történő H2-termelés megvalósításához. A *pgr5* mutáns mellett más lehetőségek is nyitva állnak, melyek a PBR üveggel és az általunk megalkotott módszerrel segíthetik a H_2-termelés hatékonyságának fokozását. Ezen lehetőségek közé tartozik más, H_2-termelésre képes mikroorganizmusok, mint például egyes *Scenedesmus, Chlorella,* vagy *Clostridium* fajok tesztelése. Egy másik lehetőség a különféle mutánsok vizsgálata. Így például a fénybegyűjtő antenna méretének csökkentése nagy előnyökkel járhat a H_2-termelés hatékonyságának növelésében. Az antennaméret csökkentésével lehetővé válik, hogy a nagy sejtsűrűségű kultúra felső rétegében elhelyezkedő sejtek fényelnyelése minimalizálódjon. Ezáltal a fény a mélyebben elhelyezkedő sejtekhez is eljuthatna, ezzel növelve a H_2-termelést hatékonyságát (Melis, 2009; Jeong és mtsai., 2017).

A fúziós mutánsokról sem szabad megfeledkeznünk. Andrey Kanygin és munkatársai létrehoztak egy PSI-HydA fúziós mutánst *C. reinhardtii*-ban (Kanygin és mtsai., 2020), melyben a két fehérjekomplex fúziójának segítségével növelik az elektronok áramlását a hidrogenáz enzim felé, így elősegítve a hosszantartó H_2-termelést. Így tehát még számos lehetőség áll előttünk, melyek tesztelése nagyban elősegítheti az alga-alapú H_2-termelés ipari méretekben történő megvalósítását.

6. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek, Dr. Tóth Szilvia Zitának, aki a csoportban töltött éveim alatt tanácsaival és útmutatásával segítette elő munkámat.
Külön köszönet illeti Dr. Nagy Valériát és Dr. Kovács Lászlót, akikhez bármikor fordulhattam, segítségükkel, szakmai tudásukkal, valamint bátorításukkal nagyban hozzájárultak az előrehaladásomhoz a munkák során.
Köszönettel tartozom Dr. André Vidal-Meireles-nek és Dr. Soujanya Kuntam-nak és a csoport többi tagjának a kísérletek során nyújtott segítségéért és a mindennapi munkák könnyebbé tételéért.
Köszönöm a Növénybiológia Intézet munkatársainak, hogy segítették a kutatásomat.
Köszönet illeti még Dr. Rákhely Gábort a Szegedi Tudományegyetem Biotechnológia Tanszék vezetőjének, hogy lehetővé tette a gázkromatográfiás méréseket, illetve Dr. Tengölics Rolandot a mérések során nyújtott segítségért.
Köszönet illet a CS-Smartlab Devices Kft. minden munkatársát, akik támogattak a dolgozat megírása alatt.
Végezetül hálás szívvel köszönöm a családomnak, akik támogattak a munkám során, valamint Széles Eszternek, Leviczky Bencének és Juhász Orsolyának, akik végig kísértek ezen az úton.

7. Irodalomjegyzék

Abdalla MA., Hossain S., Nisfindy OB., Azad AT., Dawood M., Azad AK. (2018) Hydrogen production, storage, transportation and key challenges with applications: A review. Energ. Convers. Manage. 165: 602-627

Allahverdiyeva Y., Suorsa M., Rossi F., Pavesi A., Kater MM., Antonacci A., Tadini L., Pribil M., Schneider A., Wanner G., Leister D., Aro E-A., Barbato R., Pesaresi P. (2013) Arabidopsis plants lacking PsbQ and PsbR subunits of theoxygen-evolving complex show altered PSII super-complexorganization and short-term adaptive mechanisms. Plant J. 75: 671-684

Allorent G., Tokutsu R., Roach T., Peers G., Cardol P., Girard-Bascou J., Seigneurin-Berny D., Petroutsos D., Kuntz M., Breyton C., Franck F., Wollman F-A., Niyogi K. K., Krieger-Liszkay A., Minagawa J., Finazzi G. (2013) A dual strategy to cope with high light in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Cell 25: 545-557

Amerongen H., Croce R. (2013) Light harvesting in photosystem II. Photosynth. Res. 116: 251-263

Amunts A., Toporik H., Borovikova A., Nelson N. (2010) Structure determination and improved model of plant photosystem I. J. Biol. Chem. 285: 3478-3486

Antal TK., Volgusheva AA., Kukarskih GP., Krendeleva TE., Rubin AB. (2009) Relationships between H_2 photoproduction and different electron transport pathways in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. Int. J. Hydrogen Energ. 34: 9087-9094

Antal TK., Krendeleva TE., Tyystjärvi E. (2015) Multiple regulatory mechanisms in the chloroplast of green algae: relation to hydrogen production. Photosynth. Res. 125: 357-381

Atta M., Meyer J. (2000) Characterization of the gene encoding the [Fe]-hydrogenase from *Megasphaera elsdenii*. Biochim. Biophys. Acta 1476: 368-371

Barber J. (2003) Photosystem II: the engine of life. Q. Rev. Biophys. 36: 71-89.

Barber J. (2008) Crystal structure of the oxygen-evolving complex of photosystem II. Inorg. Chem. 47: 6

Batyrova KA., Tysgankov AA., Kosourov SN. (2012) Sustained hydrogen photoproduction by phosphorus-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. Int. J. Hydrogen Energ. 37: 8834-8839

Batyrova K., Hallenbeck CP. (2015) Recent developments in light-driven H_2 production by the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. In: Hallenbeck PC, editor. Advances in enzymatic conversion of biomass to biofuels. London: Future Science Ltd; p. 82-95.

Blankenship RE. (2001) Molecular evidence for the evolution of photosynthesis. Trends Plant Sci. 6: 4-6

Boichenko VA., Greenbaum E., Seibert M. (2004) Hydrogen production by photosynthetic microorganisms. In: Archer MD, Barber J, editors. Photoconversion of solar energy: molecular to global photosynthesis, vol. 2. London: Imperial College Press; p. 397-452

Bradford MM. (1976) A Rapid and Sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254

Braga LR., Sarantópoulos CIGL., Peres L., Braga JWB. (2010) Evaluation of absorption kinetics of oxygen scavenger sachets using response surface methodology. Packag Technol Sci 23: 351-361

Caffarri S., Kouřil R., Kereïche S., Boekema EJ., Croce R. (2009) Functional architecture of higher plantphotosystem II supercomplexes. EMBO J. 28: 3052-3063

Chaux F., Peltier G., Johnson X. (2015) A security network in PSI photoprotection: regulation of photosynthetic control, NPQ and O_2 photoreduction by cyclic electron flow. Front. Plant Sci. 6: 875

Chochois V., Dauvillée D., Beyly A., Tolleter D., Cuiné S., Timpano S., Ball S., Cournac L., Peltier G. (2009) Hydrogen production in *Chlamydomonas*: photosystem II-dependent and -independent pathways differ in their requirement for starch metabolism. Plant Physiol. 151: 631-640

Cinco RM., MacInnis JM., Greenbaum E. (1993) The role of carbon dioxide in light-activated hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*. Photosynth. Res. 38: 27-33

Crabtre GW.,Dresselhaus MS., Buchanan MV. (2004) The Hydrogen Economy. Phys. Today 57: 39-44

Cramer WA., Zhang H., Yan J., Kurisu G., Smith JL. (2006) Transmembrane traffic in the cytochrome b_6f complex. Annu. Rev. Biochem. 75: 769-90

Croce R., Morosinotto T., Castelletti S., Breton J., Bassi R. (2002) The Lhca antenna complexes of higher plants photosystem I. Biochim. Biophys. Acta 1556: 29-40

Croce R., van Amerongen H. (2013) Light-harvesting in photosystem I. Photosynth. Res. 116: 153-166

Cournac L., Mus F., Bernard L., Guedeney G., Vignais P., Peltier G. (2002) Limiting steps of hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Synechocystis* PCC 6803 as analysed by light-induced gas exchange transients. Int. J. Hydrogen Energ. 27: 1229-1237

Curien G., Flori S., Villanova V., Magneschi L., Giustini C., Forti G., Matringe M., Petroutsos D., Kuntz M., Finazzi G. (2016) The water to water cycles in microalgae. Plant Cell Physiol. 57: 1354-1363

Dasgupta CN., Gilbert J., Lindblad P., Heidorn T., Borgvang SA., Skjanes K., Das D. (2010) Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. Int. J. Hydrogen Energ. 35: 10218-10238

Dau H., Zaharieva I., Haumann M. (2012) Recent developments in research on water oxidation by photosystem II. Curr. Opin. Chem. Biol. 16: 3-10

Davis GA., Kanazava A., Schöttler MA., Kohzuma K., Froehlich JE., Rutherford W. A., Satoh-Cruz M., Minhas D., Tietz S. Dhingra A., Kramer M. D. (2016) Limitations to photosnythesis by proton motive force-induced photosystem II photodamage. eLife 2016;5: e16921

Doucha, J., Lívanský, K. (1995) Novel outdoor thin-layer high density microalgal culture system: productivity and operation parameters. Algol. Stud. 76: 129-147

Dubini A., Ghirardi ML. (2015) Engineering photosnythetic organism for the production of biohydrogen. Photosynth. Res. 123: 241-253

Dutcher SK., O'Toole ET. (2016) The basal bodies of *Chlamydomonas reinhardtii*. Cilia 5: 18

Erickson E., Wakao S., Niyogi K.K. (2015) Light stress and photoprotection in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant J. 82: 449-465

Eroglu E., Melis A. (2011) Photobiological hydrogen production: Recent advances and state of the art. Biores. Technol. 102: 8403-8413

Fedorov AS., Kosourov SN., Ghirardi ML., Seibert M. (2005) Continuous hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii* Appl. Biochem. Biotech. 121: 403-412

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

Fromme P., Jordan P., Krauß N. (2001) Structure of photosystem I. Biochim. Biophys. Acta 1507: 5-31

Gaffron H., Rubin J. (1942) Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. J. Gen. Physiol. 26: 219-240

Geier SC., Huyer S., Praebst K., Husmann M., Walter C., Buchholz R. (2012) Outdoor cultivation of *Chlamydomonas reinhardtii* for photobiological hydrogen production. J. Appl. Phycol. 24: 319-327

Ghirardi ML., Togasaki RK., Seibert M. (1997) Oxygen sensitivity of algal H_2-production. Appl. Biochem. Biotech. 63: 141-151

Ghirardi ML., Zhang L., Lee JW., Flynn T., Seibert M., Greenbaum E., Melis A. (2000) Microalgae: a green source of renewable H_2. Trends Biotechnol. 18: 506-511

Ghirardi ML. (2015) Implementation of photobiological H_2 production: the O_2 sensitivity of hydrogenase. Photosynth. Res. 125: 383-393

Gilbert JJ., Ray S., Das D. (2011) Hydrogen production using *Rhodobacter sphaeroides* (O.U. 001) in a flat panel rocking photobioreactor. Int. J. Hydrogen Energ. 36: 3434-3441

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

Gorman DS.. Levine RP. (1965) Cytochrome f and plastocyanin: Their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 54: 1665-1669

Hallenbeck PC., Benemann JR. (2002) Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. Int. J. Hydrogen Energ. 27: 1185-1193

Happe T., Mosler B., Naber JD. (1994) Induction, localization, and metal content of hydrogenase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Eur. J. Biochem. 222: 769-774

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 EH. (2001) Chlamydomonas as a model organism. Annu. Rev. Plant Phys. 52: 363-406

Hemschemeier A., Fouchard S., Cournac L., Peltier G., Happe T. (2008) Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*: an elaborate interplay of electron sources and sinks. Planta 227: 397-407

Hemschemeier, A., Melis, A., Happe, T. (2009) Analytical approaches to photobiological hydrogen production in unicellular green algae. Photosynth. Res. 102: 523-540

Heytler PG., Prichard WW. (1962) A new class of uncoupling agents - carbonyl cyanide phenylhydrazones. Biochem. Biophys. Res. Co. 7: 272-275

Hoffert MI., Caldeira K., Jaun AK., Haites EF., Harvey D.DL., Potter SD., Schlesinger ME., Schneider SH., Watts WG., Wigley TML., Wuebbles DJ. (1998) Energy implications of future stabilization of atmospheric CO_2 content. Nature 395: 881-884

Hutner SH., Provasoli L., Schatz A., Haskins CP. (1950) Some approaches to the study of the role of metal sin the metabolism of microorganisms. Proc. Am. Philos. Soc. 94: 152-170

Jeong J., Baek K., Kirst H., Melis A., Jin E. (2017) Loss of CpSRP54 function leads to a truncated light-harvesting antenna size in *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochim. Biophys. Acta 1858: 45-55

Joët T., Genty B., Josse E.-M., Kuntz M., Cournac L., Peltier G. (2002) Involvement of a plastid terminal oxidase in plastoquinone oxidation as evidenced by expression of the *Arabidopsis thaliana* enzyme in tobacco. J. Biol. Chem. 277: 31623-31630

Jonhson X., Alric J. (2012) Interaction between starch breakdown, acetate assimilation, and photosynthetic cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Biol. Chem. 287: 26445-26452

Johnson X., Steinbeck J., Dent RM., Takahashi H., Richaud P., Ozawa S.-I., Houille-Vernes L., Petroutsos D., Rappaport F., Grossman AR., Niyogi KK., 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

Jensen PE., Bassi R., Boekema EJ., Dekker JP., Jansson S., Leister D., Robinson C., Scheller V. H. (2007) Structure, function and regulation of plant photosystem I. Biochim. Biophys. Acta 1767: 335-352

Kanygin, A., Milrad, Y., Thummala, C., Reifschneider, K., Baker, P., Marco, P., Yacoby, I., Redding, EK. (2020) Rewiring photosynthesis: A photosystem I-hydrogenase chimera that makes H_2: In vivo. Energy Environ. Sci. 13: 2903-2914

Kok B., Forbush B., McGloin M. (1970) Cooperation of charges in photosynthetic O_2 evolution - I. A linear four step mechanism. Photochem. Photobiol. 11: 457-475

Komsich-Buchmann K., Wöstehoff L., Becker B. (2014) The contractile vacuole as a key regulator of cellular water flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. Eukaryot. Cell 13: 1421-1430

Kosourov SN., Seibert M., Ghirardi ML. (2003) Effects of extracellular pH on the metabolic pathways in sulfur-deprived, H_2-producing *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. Plant Cell Physiol. 44: 146-155

Kosourov SN., Patrusheva E., Ghirardi ML., Seibert M., Tysgankov A. (2007) A comparison of hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under different growth conditions. J. Biotechnol. 128: 776-787

Kosourov SN., Seibert M. (2009) Hydrogen photoproduction by nutrient-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells immobilized within thin alginate films under aerobic and anaerobic conditions. Biotechnol. Bioeng. 102: 50-58

Kosourov SN., Ghirardi ML., Seibert M. (2011) A truncated antenna mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* can produce more hydrogen than the parental strain. Int. J. Hydrogen Energ. 36: 2044-2048

Kosourov SN., Batyrova KA., Petushkova EP., Tysgankov A.A., Ghirardi ML., Seibert M. (2012) Maximizing the hydrogen photoproduction yields in *Chlamydomonas reinhardtii* cultures: The effect of the H_2 partial pressure. Int. J. Hydrogen Energ. 37: 8850-8858

Kosourov SN., Jokel M., Aro EM., Allahverdiyeva Y. (2018) A new approach for sustained and efficient H_2 photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*. Energ. Environ Sci. 11: 1431-1436

Kurisu G., Zhang H., Smith L. J., Cramer WA. (2003) Structure of the cytochrome b_6f complex of oxygenic photosynthesis: Tuning the Cavity. Science 302: 1009-1014

Lakatos G., Deák Zs., Vass I., Rétfalvi T., Rozgonyi Sz., Rákhely G., Ördög V., Kondorosi É., Maróti G. (2014) Bacterial symbionts enhance photo-fermentative hydrogen evolution of *Chlamydomonas* algae. Green Chem. 16: 4716-4727

Ley MB., Jepsen LH., Lee Y-S, Cho WY., Bellosta von Colbe JM., Dornheim M., Rokni M., Jensen JO., Sloth M., Filinchuk Y., Jørgensen JE., Besenbacher F., Jensen TR. (2014) Complex hydrides for hydrogen storage – new perspetcives. Mater. Today 17: 122-128

Liu Z., Yan H., Wang K., Kuang T., Zhang J., Gui L., An X., Chang W. (2004) Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. Nature 428: 287-92

Mackinder M. LCM., Meyer MT., Mettler-Altmann T., Chen VK., Mitchell MC., Caspari O., Freeman Rosenzweig ES., Pallesen L., Reeves G., Itakura A., Roth R., Sommer F., Geimer S., Mühlhaus T., Schroda M., Goodenough U., Stitt M., Griffiths H., Jonikas MC. (2016) A repeat protein links Rubisco to form eukaryotic carbon-concentrating organelle. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 113: 5958-5963

Masojídek J., Kopecký J., Giannelli L., Torzillo G. (2011) Productivity correlated to photobiochemical performance of Chlorella mass cultures grown outdoors in thin-layer cascades. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 38: 307-317

Masojídek J., Sergejová M., Malapascua JR., Kopecký J. (2015) Thin-layer systems for mass cultivation of microalgae: Flat panels and sloping cascades. In: Prokop, A. (Ed.), Algal Biorefineries. Springer International Publishing, Switzerland, pp. 237-261

Matthijs HCP., Balke H., Van Hes UM., Kroom BMA., Mur LR, Binot RA. (1996) Application of light-emitting diodes in bioreactors: flashing light effects and energy economy in algal culture (*Chlorella pyrenoidosa*). Biotechnol. Bioeng. 50: 98-107

McEvoy JP., Brudvig GW. (2006) Water-splitting chemistry of photosystem II. Chem. Rev. 106: 4455-4483

Melis A., Zhang L., Forestier M., Ghirardi ML., Seibert M. (2000) Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. 122: 127-135

Melis A., (2009) Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: Minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. Plant Sci. 177: 272-280

Musumeci AM., Ceccarelli AE., Catalano-Dupuy LD. (2012) The plant–type ferredoxin-$NADP^+$ reductases. Advances in Photosynthesis - Fundamental Aspects, ed D. M. Najafpour (Rijeka: InTech), 539-562

Nagy V., Vidal-Meireles A., Tengölics R., Rákhely G., Garab G., Kovács L., Tóth SZ. (2016) Ascorbate accumulation during sulphur deprivation and its effects on photosystem II activity and H_2 production of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Cell Environ. 39: 1460-1472

Nagy V., Podmaniczki A., Vidal-Meireles A., Tengölics R., Kovács L., Rákhely G., Scoma A., Tóth SZ. (2018) Water-splitting-based, sustainable and efficient H_2

production in green alga as achieved by susbtrate limitation of the Calvin-Benson-Bassham cycle. Biotechnol. Biofuels 11: 69

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

Nawrocki WJ., Bailleul B., Picot D., Cardol P., Rappaport F., Wollman FA., Joliot P. (2019b) The mechanism of cyclic electron flow. Biochim. Biophys. Acta 1860: 433-438

Nedbal L., Tichý V., Xiong F., Grobbelaar JU. (1996) Microscopic green algae and cyanobacteria in high-frequency intermittent light. J. Appl. Phyco.l 8: 325-333

Nelson N., Yocum CF. (2006) Structure and function of photosystems I and II. Annu. Rev. Plant Biol. 57: 521-65

Oncel SS., Kose A., Faraloni C., Imamoglu E., Elibol M., Torzillo G., Vardar Sukan F. (2014) Biohydrogen production using mutant strains of *Chlamydomonas reinhardtii*: The effects of light intensity and illumination patterns. Biochem. Eng. J. 92: 47-52

Pagliano C., Saracco G., Barber J. (2013) Structural, functional andauxilary proteins of photosystem II. Photosynth. Res. 116: 167-188

Panwar LN., Kaushik CS., Kothari S. (2011) Role of renewable energy sources in environmental protection: A review. Renew. Sust. Energ. Rev. 15: 1513-1524

Petroutsos D., Terauchi AM., Busch A., Hirschmann I., Merchant SS., Finazzi G., Hippler M. (2009) PGRL1 participates in iron-induced remodeling of the photosynthetic apparatus and in energy metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Biol. Chem. 284: 32770-32781

Pinto TS., Malcata FX., Arabaça JD., Silva JM., Spreitzer RJ., Esquivel MG. (2013) Rubisco mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* enhance photosynthetic hydrogen production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97: 5635-5643

Plancke C., Vigeolas H., Höhner R., Roberty S., Emonds-Alt B., Larosa V., Willamme R., Duby F., Onga Dhali D., Thonart P., Hiligsmann S., Franck F., Eppe G., Cardol P., Hippler M., Remacle C. (2014) Lack of isocitrate lyase in *Chlamydomonas* leads to changes in carbon metabolism and int he response to oxidative stress under mixotrophic growth. Plant J. 77: 404-417

Porra JR., Thompson AW., Kriedermann EP. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for asssaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the contcentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. Biochim. Biophys. Acta 975: 384-394

Porra JR. (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

Reeves M., Greenbaum E. (1985) Long-term endurance and selection studies in hydrogen and oxygen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*. Enzyme Microb. Tech. 7: 169-174

Roach T., Krieger-Liszkay A. (2014) Regulation of photosynthetic electron transport and photoinhibition. Curr. Protein Pept. Sci. 15: 351-362

Rosenkrans AM., Krasna AI. (1984) Stimulation of hydrogen photoproduction in algae by removal of oxygen by reagents that combine reversibly with oxygen. Biotechnol. Bioeng. 26: 1334-1342

Rühle T., Hemschemeier A., Melis A., Happe T. (2008) A novel screening protocol for the isolation of hydrogen producing *Chlamydomonas reinhardtii* strains. BMC Plant Biol. 8: 107

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

Schansker G., Tóth SZ., Holzwarth AR., Garab G. (2014) Chlorophyll *a* fluorescence: beyond the limits of the Q_A model. Photosynth. Res. 120: 43-58

Scoma A., Krawietz D., Faraloni C., Giannelli L., Happe T., Torzillo G. (2012) Sustained H_2 production in a *Chlamydomonas reinhardtii* D1 protein mutant. J. Biotechnol. 157: 613-619

Scoma A., Durante L., Bertin L., Fava F. (2014) Acclimation to hypoxia in *Chlamydomonas reinhardtii*: can biophotolysis be the major trigger for longterm H_2 production? New Phytol. 204: 890-900

Skjånes K., Andersen U., Heidorn T., Borgvang AS. (2016) Design and construction of a photobioreactor for hydrogen production, including status in the field. J. Appl. Phycol. 28: 2205-2223

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

Standfuss J., van Scheltinga ACT., Lamborghini M., Kühlbrandt W. (2005) Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. EMBO J. 24: 919-928

Steinbeck J., Nikolova D., Weingarten R., Jonhson X., Richaud P., Peltier G., Hermann M., Magneschi L., Hippler M. (2015) Deletion of Proton Gradient Regulation 5 (PGR5) and PGR5-Like1 (PGRL-1) proteins promote sustainable light-driven hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii* due to increased PSII activity under sulfur deprivation. Front. Plant Sci. 6: 892

Stripp TS., Goldet G., Brandmayr C., Sanganas O., Vincent KA., Haumann M., Armstrong FA., Happe T. (2009) How oxygen attacks [FeFe] hydrogenases from photosynthetic organisms. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S..A 106: 17331-17336

Stripp TS., Happe T. (2009) How algae produce hydrogen-news from the photosynthetic hydrogenase. Dalton Trans. 45: 9960-9969

Sueoka N. (1960) Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 46: 83-91

Surzycki R., Cournac L., Peltier G., Rochaix J.-D. (2007) Potential for hydrogen production with inducible chloroplast gene expression in *Chlamydomonas*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104: 17548-17553

Swanson KD., Ratzloff MW., Mulder DW., Artz JH., Ghose S., Hoffman A., White S., Zadvornyy OA., Broderick JB., Bothner B., King PW., Peters JW. (2015) [FeFe]-hydrogenase oxygen inactivation is initiated at the H Cluster 2Fe subcluster. J. Am. Chem. Soc. 137: 1809-1816

Tamburic B., Zemichael FW., Crudge P., Maitland GC., Hellgardt K. (2011) Design of a novel flat-plate photobioreactor system for green algal hydrogen production. Int. J. Hydrogen Energ. 36: 6578-6591

Tolleter 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 IM., 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

Torzillo G., Scoma A., Faraloni C., Ena A., Johanningmeier U. (2009) Increased hydrogen photoproduction by means of a sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* D1 protein mutant. Int. J. Hydrogen Energ. 34: 4529-4536

Torzillo G., Scoma A., Faraloni C., Giannelli L. (2015) Advances in the biotechnology of hydrogen production with microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Crit. Rev. Biotechnol. 35: 485-496

Tóth SZ., Schansker G., Strasser RJ. (2007) A non-invasive method for the determination of the redox state of the PQ-pool. Photosynth. Res. 93: 193-203

Tysgankov AA., Kosourov SN., Tolstygina IV., Ghirardi ML., Seibert M. (2006) Hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under photoautotrophic conditions. Int. J. Hydrogen Energ. 31: 1574-1584

Vinyard DJ., Ananyev GM., Dismukes GC. (2013) Photosystem II: The reactioncenter of oxygenic photosynthesis. Annu. Rev. Biochem. 82: 577-606

Volgusheva AA., Kukarskikh GP., Krendeleva TE., Rubin A., Mamedov F. (2015) Hydrogen photoproduction in green algae *Chlamydomonas reinhardtii* under magnesium deprivation. RSC Adv. 5: 5633-5637

Volgusheva AA., Jokel M., Allahverdiyeva Y., Kukarskikh GP., Lukashev EP., Lambreva MD., Krendeleva TE., Antal TK. (2017) Comparative analyses of H_2 production in magnesium and sulfur starved *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. Physiol. Plantarum 161: 124-137

Wraight CA. (1981) Oxidation-reduction physical chemistry of the acceptor quinone complex in bacterial photosynthetic reaction centers: evidence for a new model of herbicide activity. Israel J. Chem. 21: 348-354

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

Zhang L., Happe T., Melis A. (2002) Biochemical and morpologichal characterization of sulfur-deprived and H_2-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). Planta 214: 552-56

8. Összefoglalás

A XVII. században elkezdődött ipari forradalom óta a fosszilis tüzelőanyagok szén, olaj és földgáz formájában működtetik a társadalmunkat mozgató technológiai és szállítási hálózatokat. Ám a világ véges geológiai készletekkel rendelkező fosszilis tüzelőanyagokból történő ellátása veszélyezteti a hosszú távú energiaellátásunkat és egyben hatalmas megterhelést jelent a környezet számára is (Crabtre és mtsai., 2004). Mindezekhez hozzáadódik, hogy az energiaigény világszerte megnőtt a népesség növekedésnek köszönhetően (Abdalla és mtsai., 2018). Az egyre növekvő kereslet mellett komoly probléma az is, hogy a fosszilis tüzelőanyagok kínálata meglehetősen korlátozott, miközben a világ minden részén van rájuk igény. Az energiaellátás biztosításának problémáján túl a fosszilis üzemanyagok használata a saját egészségünket is veszélyezteti a velük járó kémiai- és részecskeszennyezés révén (Crabtre és mtsai., 2004). De nem csak az egészségünkre nézve veszélyesek, ugyanis a szén-dioxid és más üvegházhatású gázok kibocsátása szorosan összekapcsolódik a globális felmelegedéssel, mely veszélyezteti a Föld hosszú távú éghajlati stabilitását. Ezért a figyelem a megújuló energiaforrások felé fordult.

Azon természeti forrásokat, melyekből az energia jelentősebb emberi beavatkozás nélkül kinyerhető és néhány éven belül újratermelődik, megújuló energiaforrásnak nevezzük. Jelentőségük abból fakad, hogy nem okoznak környezetszennyezést és összhangban vannak a fenntartható fejlődés alapelveivel. Ilyen alternatív energiafajták közé tartozik a szélenergia, a geotermikus energia, a víz-, biomassza-, és a napenergia. A megújuló energia-technológiák alkalmazása kiváló lehetőséget nyújt az üvegházhatást okozó gázok kibocsátásának csökkentésére és a globális felmelegedés folyamatának lassítására a hagyományos energiaforrások helyettesítésével (Panwar és mtsai., 2011). A kutatások egy része a H_2 minél szélesebb körű felhasználására fókuszál. A H_2 gáz egy tiszta energiahordozó, amelynek elégetése során nem keletkezik szén-dioxid, csak víz. A H_2 kb. 99%-át azonban jelenleg fosszilis tüzelőanyagokból állítják elő, amely óriási légszennyezéssel jár; ezért szükség van megújuló energiaforrásokon alapuló H_2-termelési módszerek kidolgozására. Ennek egyik ígéretes módja a zöldalgák hasznosítása, melyek fotoszintézisükhöz kapcsoltan igen nagy hatékonysággal képesek H_2-t előállítani.

A természetben is megfigyelhető, hogy a hosszabb időre sötétbe került algáknál megvilágítás hatására pár percig tartó H_2-termelés következik be. Ennek a rövid periódusnak a hosszát és hatékonyságát korábban kénmegvonás segítségével szerették volna megnövelni, amely számos negatív mellékhatással jár együtt, melyek az algák H_2-termelésének az ipari alkalmazását megakadályozzák.

Munkám során egy hatékonyabb és az algasejtekre nézve kevésbé káros, az anaerob indukción alapuló technika kifejlesztését és optimalizálást tűztem ki célul, amelynek elemei:

1. A Calvin-Benson-Bassham ciklus inaktív állapotban tartásával és O_2 abszorbens használatával hatékonyabb H_2-termelést értünk el

A hidrogenáz expressziójának indukálásához egy úgy nevezett sötét anaerob indukciós kezelést alkalmaztunk, melyhez modellorganizmusként a *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124-es törzset választottuk. Erről a törzsről már ismert volt korábbi adatok alapján, hogy hatékony H_2-termelő és eltérő kísérleti körülmény között is képes a H_2-termelését fenntartani (Kosourov és mtsai., 2009; Lakatos és mtsai., 2014; Oncel és mtsai., 2014; Steinbeck és mtsai., 2015). A zöldalgák H_2-termelése redukáló erőket és anoxikus körülményeket igényel. A redukáló erők származhatnak a keményítő lebontásából és az azt követő glikolízisből. A H_2-termelésnek azonban osztoznia kell a redukálószer készleten a kompetitív reakciókkal. A legfőbb kompetítor az elektronokért folytatott küzdelemben a CO_2-redukciója, mely a CBB cikluson (CBB) keresztül történik. Az anaerobiózis biztosításához használt N_2 atmoszféra eltávolítja a CBB ciklus szubsztrátját jelentő CO_2-ot is, ezáltal gátolva annak elektron elnyelését, így pedig nagyobb elektronáramlást tesz lehetővé a HydA felé. Bár a keményítő felhalmozódásához szükséges az acetát anyagcseréje, ám ez CO_2-képződéssel jár, ami részlegesen képes helyreállítani a CBB aktivitását. Ennek elkerülése érdekében a kísérletek során az acetátot kihagytuk a táptalajokból. Így acetát és megfelelő mennyiségű keményítő hiányában a PSII-függő fotoszintetikus elektrontranszport szolgálhat, mint elektronforrás. Bár a vízbontáson alapuló lineáris elektrontranszport hatékonyabb elektronforrás, mint a keményítő bontása, azonban O_2 fejlődés kíséri, mely gátolja az anoxiás körülmények kialakulását. A lineáris elektrontranszport fenntartható elektronforrásként való kihasználása érdekében a felszabaduló O_2 gyors és hatékony eltávolítása mellett döntöttünk, ahelyett, hogy a PSII-t kénmegvonással inaktiválnánk.

Erre a célra vas-só alapú O_2 abszorbenst alkalmaztunk, amely 0,1% alá csökkentette az O_2 koncentrációt a légtérben.

2. A sötét anaerob indukción alapuló H_2-termeltetési módszer használata előnyösebb a kénmegvonás eljárásánál

Az általunk kialakított módszer alapvető előnyökkel rendelkezik a korábbi módszerekhez képest, mégpedig: néhány óra anaerob sötét inkubációt követő megvilágítás hatására a H_2-termelés azonnal megkezdődik. A kénmegvonással szemben nem igényli a tápoldat cseréjét. Nem függ a keményítő lebomlásától és nem igényel acetátot, mivel fotoautotróf. Mivel nincs szükség szerves szénforrásra, a bakteriális szennyeződés kockázata is jóval alacsonyabb. A kultúrák fotoszintetikusan aktívak maradnak a H_2-termelés alatt és utána könnyen regeneráltathatók. Lineáris elektrontranszporton alapul, az elektronok elsősorban a PSII vízbontó aktivitásából származnak, amint azt a DCMU-kezelés is bizonyít, és viszonylag magas fény-H_2 energiaátalakítási hatékonysággal rendelkezik. A növekedési fázisban a CO_2, ami egy ipari melléktermék, felhasználható. Viszonylag nagy fényerősség használható a H_2-termelés során (320 μmol foton/m^2/s).

3. A sejtek fotoszintetikus aktivitásának megőrzése lehetővé tette a kísérlet végén a regenerációjukat

Az általunk felállított rendszer fenntarthatóságát a fotoszintetikus apparátus leírásával jellemeztük a 96 órás kísérlet folyamán. Azt tapasztaltuk, hogy a chl (a+b) tartalom csak 10%-ot csökkent a kísérlet során. Az F_v/F_m értéke – mely a PSII hatékonyságának mérője – lassú csökkenést mutatott a 96 órás időtartam alatt, de viszonylag magas értéken maradt (0,4 felett) mind a kontroll, mind az O_2 abszorbenst tartalmazó minták esetében. A PsbA (a PSII reakciócentrum egyik fő fehérjéje), a PetP (a $cytb_6/f$ komplex egyik alegysége) és a PsaA (a PSI reakciócentrum egyik fehérjéje) mennyisége nagyrészt változatlan maradt a kísérlet teljes időtartama alatt, mind a kontroll, mind az O_2 abszorbenst tartalmazó minták esetében. Mivel a kísérletünk során a sejtek fotoszintetikusan aktívak maradtak, a H_2-termeltetési időszak után megpróbáltuk őket regenerálni és egy új kísérlet során ismét felhasználni. Amikor ezeket a regenerált sejteket egy második, sötét anaerob indukciós periódusnak vetettük alá HS tápoldatban, a H_2-termelés hozama az első ciklusban mértekhez hasonló volt.

4. A vékony folyadékrétegű fotobioreaktor optimalizálása fokozta a H_2-termelés hatékonyságát

Úgy gondoltuk, hogy a H_2-termelés hozama, melyet anaerob indukcióval HS tápoldatban elértünk, tovább fokozható. Ennek eléréséhez fotobioreaktort használtunk, amelyben optimalizálni kívántuk a gáz-folyadék, valamint a kultúra térfogat-felület arányát, a megvilágítás és az alga kevertetésének körülményeit, valamint az előállított gázok hatékony eltávolításának módját. A vékony folyadékrétegű fotobioreaktorok (Thin-Cell-Layer Photobioreactor, TCL-PBR) olyan nevelésre alkalmas rendszerek, melyeket 10 mm-nél rövidebb fényút és nagy felület/térfogat arány jellemez. Ezek a tulajdonságok lehetővé teszik, hogy a TCL-PBR akár nagyon magas sejtsűrűséggel is működjön (1000 µg Chl (a+b)/ml kultúra), és javuljon a besugárzott terület egységnyi felületére jutó fotoszintetikus hatékonyság (Masojídek és mtsai., 2011, 2015).

Munkánk során vékony folyadékrétegű, vízszintesen elhelyezett, 1 literes Roux üvegekkel (TCL-PBR) dolgoztunk. A sejtszuszpenzió vastagsága körülbelül 5 mm volt a PBR üvegekben. A felület/térfogat arányt négyszeresére (0,059 cm^{-1}-ről 0,24 cm^{-1}-re) növeltük meg, míg a gáz/folyadék térfogat arányt a háromszorosára növeltük (3-ról 9-re).

5. Az általunk felállított rendszerben a fotoszintetikus mutánsok közül a *pgr5* H_2-termelése volt a legnagyobb

Nagy potenciál rejlik a különböző fotoszintetikus mutánsok esetében az általunk fejlesztett protokollnak az alkalmazásában - pl: a részleges fénybegyűjtő antennákkal (Kosourov és mtsai., 2011), vagy éppen a magas PsbA fehérjetartalommal rendelkező törzsek esetében (Scoma és mtsai., 2012).

A fotobioreaktor optimalizálását követően három fotoszintetikus mutánst teszteltünk, amelyek a PSII-ben és a PSI-CET-ben érintettek. Kísérleteinkben napfény intenzitást (1000 µmol foton/m2/s) és magas klorofill tartalmat (150 µg/ml) használtunk. Mindhárom törzs H_2-termelése az első 24 órában nagyon hasonló volt, ám ezt követően a CC-124 és a CC-409-es törzs H_2-termelése folyamatos csökkenést mutatott, míg az L159I-N230Y mutánsé meglehetősen stabil maradt, csak a 6. napra csökkent. Az L159I-N230Y törzs 30%-al több H_2-t termelt, mint a CC-409, bár a

fotoszintetikus apparátusuk állapota és a teljesítményük a 144 órát követően hasonló (Scoma és mtsai., 2012).

Ezt követően *pgr5* és *pgrl1* mutáns törzseket vizsgáltuk meg az általunk kialakított protokoll során, melyeket ismét a CC-124-es törzshöz hasonlítottunk. A *pgr5* mutáns esetében megfigyeltük, hogy már a kezdetekben is jóval magasabb H_2-termelést mutat, mint a korábban használt törzsek és ezzel párhuzamosan a degradációs folyamatok lassabban következnek be. Ezáltal képes hosszabb ideig fenntartani a H_2-termelést.

Összesítve tehát az eredményeinket megállapíthatjuk, hogy sikerült egy új, anaerob indukción alapuló eljárást kidolgozni, mely számos előnnyel rendelkezik a korábban használt kénmegvonáshoz képest. Ezzel az eljárással, illetve a későbbi kísérleteink során használt fotobioreaktornak köszönhetően sikeresen megnöveltük a H_2-termelés mennyiségét azáltal, hogy optimalizáltuk a gáz-folyadék arányt, a sejtréteg vastagságát és az előállított gázok hatékony eltávolításának módját.

A különböző *Chlamydomonas reinhardtii* fotoszintetikus mutáns törzsek tesztelése során megállapítottuk, hogy az általunk felállított körülmények között a *pgr5* mutáns bizonyult a leghatékonyabb H_2-termelőnek.

Napjaink egyre égetőbb problémája a fosszilis tüzelőanyagok helyettesítése oly módon, amely biztosítja a fenntarthatóságot és nem jár környezet-illetve egészségkárosító hatással. Épp ezért ezeknek az ismereteknek a révén nem csak laboratóriumi léptékben, de hosszabb távon, ipari méretekben is lehetőséget biztosít a zöldalgák általi H_2-termelés hatékonyságának fokozására.

9. Summary

Since the industrial revolution that began in the 17th century, fossil fuels has been operating the technological and transport networks that drive our society in the form of coal, oil and natural gas. But supplying the world with fossil fuels with finite geological reserves threatens our long-term energy supply and puts a huge strain on the environment (Crabtre et al. 2004). Additionally, the energy demand has increased worldwide due to population growth (Abdalla et al. 2018). Besides growing demand, a serious problem is that the supply of fossil fuels is quite limited, while there is a demand for them in all parts of the world. In addition to the problem of providing energy supply, the use of fossil fuels also compromises our own health through chemical and particle pollution (Crabtre et al. 2004). They are not only dangerous to our health, but emissions of carbon dioxide and other greenhouse gases are closely linked to global warming, they threaten the long-term sustainability of the Earth's climate as well. Therefore, more attention has to be paid to renewable energy sources.

Natural resources from which energy can be gained without major human intervention and is re-produced within a few years, is called renewable energy sources. Their importance comes from the fact that they do not cause significant pollution and are in line with the principles of sustainable development. Such alternative energy sources include wind energy, geothermal energy, hydro-, biomass- and solar energy. The use of renewable energy technologies offers an excellent opportunity to reduce greenhouse gas emissions and slow down the process of global warming by replacing conventional energy sources (Panwar et al. 2011). Some of the research focuses on the widest possible use of H_2. H_2 gas is a clean energy carrier, the combustion of which does not produce carbon dioxide, only water. However, about 99% of hydrogen is currently produced from fossil fuels, which cause enormous air pollution; therefore, there is a need to develop H_2 production methods based on renewable energy sources. One of the promising ways of doing this is the utilization of green algae, which can produce H_2 with high efficiency linked to their photosynthesis. It has been observed in nature that algae that have been darkened for a few hours produce hydrogen for a few minutes upon illumination. The length and efficiency of this short period were previously sought to be increased by sulfur removal, which is accompanied by a number

of negative side effects that prevent the industrial application of algae hydrogen production.

In the course of my work, I aimed to develop and optimize a technique based on anaerobic induction that is more efficient and less harmful to algal cells, the elements of which are:

1. More efficient H_2 production was achieved by keeping Calvin-Benson-Bassham cycle inactive and using an O_2 absorbent

To induce hydrogenase expression, a so-called dark anaerobic induction treatment was applied using *C. reinhardtii* strain CC-124 as the model organism. This strain was already known as an efficient H_2 producer that capable to maintain H_2 production under a wide variety of experimental conditions ((Kosourov et al. 2009, Lakatos et al. 2014, Oncel et al 2014, Steinbeck et al. 2015). H_2 production in green algae requires reducing agents and anoxic conditions. Reducing agents can be derived from starch breakdown and from the subsequent glycolysis. The H_2 production has to share the reducing agents pool with competitive reactions. The main competitor for electrons can be CO_2 reduction in the CBB cycle. The N_2 atmosphere used to ensure anaerobiosis also removes CO_2 the substrate of CBB cycle and so inhibits the competitor electron sink allowing higher electron flow towards HydA. Although, the acetate metabolism that is required for starch accumulation releases CO_2 restoring, at least partially, the CBB cycle activity. To avoid this, we omitted acetate from the medium. In the absence of acetate and so a sufficient amount of starch, the PSII-dependent photosynthetic electron transport could be used as electron source. Although, the water-splitting-based linear electron transport is a more efficient electron source than starch breakdown, it is accompanied by O_2 release that violates the anoxic demand. To exploit the linear electron transport as a source of sustainable electron source, we opted to remove the released O_2 fast and efficiently rather than deactivating the PSII by sulfur deprivation. For this purpose, an iron salt-based O_2 absorbent was applied, which reduced O_2 concentration below 0,1% in the airspace.

2. The use of the H_2 production method based on dark anaerobic induction is preferable to the method of sulfur deprivation

The method developed by us has fundamental advantages compared to previous methods, namely, under the influence of illumination after a few hours of anaerobic dark incubation, H_2 production begins immediately. In contrast to sulfur deprivation, it does not require the replacement of the nutrient solution. It does not depend on the degradation of starch and does not require acetate as it is a photoautotrophic process. Since there is no need for organic carbon sources, the risk of bacterial contamination is much lower. Cultures will remain photosynthetically active during H_2 production and can be easily regenerated. Based on linear electron transport, the electrons are derived primarily from the water-splitting activity of PSII, as evidenced by DCMU treatment, and have relatively high light-H_2 energy conversion efficiencies. In the growth phase, CO_2, which is an industrial by-product, can be used. Relatively high light intensity (320 μmol photon/m^2/s) can be used for the production of H_2.

3. Preservation of the photosynthetic activity of cells allowed their regeneration at the end of the experiment

The sustainability of our H2 production system was characterized by description of the photosynthetic apparatus during the 96-hour experiment. We found that the chl (a+b) content was reduced by only 10% during the experiment. The value of the F_v/F_m parameter showed a slow decrease in the efficacy of PSII during the 96-hour period but remained relatively high, above 0.4, both for control samples and in the presence of O_2 absorbent. The amounts of PsbA (a major protein of PSII), PetP (a subunit of the $cytb_6$/f complex), and PsaA (a PSI reaction center protein) remained largely unchanged throughout the experiment in both samples. Since the cells remained photosynthetically active in our experiment, we tried to regenerate them after the H_2 production period and use them again in a new experiment. When these regenerated cells were subjected to a second, dark anaerobic induction period, the yield of H_2 production was similar to that measured in the first cycle.

4. Optimization of Thin-Cell-Layer Photobioreactor increased the efficiency of H_2 production

We thought that the yield of H_2 production, achieved by anaerobic induction in HS nutrient solution, could be further improved. To achieve this, we used a photobioreactor in which we optimized the gas-liquid as well as the culture volume-surface ratio, the conditions for illumination and algae mixing, and the efficient removal of the produced gases. Thin-Cell-Layer Photobioreactors (TCL-PBRs) are culturing systems with a light path of less than 10 mm and a high surface area - volume ratio. These properties allow TCL-PBR to operate at very high cell densities (1000 µg Chl (a + b) / ml culture) and improve photosynthetic efficacy per unit surface of the irradiated area (Masojídek et al. 2011, 2015). In our work, to obtain a thin-cell-layer, we kept the alga cultures in a horizontally placed 1-liter Roux bottles (TCL-PBR). The thickness of the cell suspension was approximately 5 mm in the PBR vials. The surface area - volume ratio was increased fourfold (from 0,059 cm^{-1} to 0,24 cm^{-1}), while the gas-liquid volume ratio was increased threefold (from 3 to 9).

5. Among the photosynthetic mutants in the system we set up, the H_2 production of *pgr5* was the highest

There is great potential in the application of the protocol we have developed for various photosynthetic mutants - e.g., strains possessing partial light-harvesting antennae (Kosourov et al. 2011) or high PsbA protein content (Scoma et al. 2012). After optimization of the photobioreactor, three photosynthetic mutants were tested, which were affected in PSII and PSI-CET. In our experiments sunlight intensity (1000 µmol photon/m^2/s) and high chlorophyll content (150 µg/ml) were used. The H_2 production of all three strains was very similar in the first 24 hours, but the H_2 production of CC-124 and CC-409 strains showed a continuous decrease, while the L159I-N230Y mutant remained rather stable and it only decreased by day 6. Strain L159I-N230Y produced 30% more H_2 than CC-409, although the condition and performance of their photosynthetic apparatus after 144 h were similar. Next, we examined the *pgr5* and *pgrl1* mutant strains with the protocol we developed, which were again compared to the CC-124 strain. The *pgr5* mutant showed much higher H_2 production from the beginning than the other two strains, and in parallel, the

degradation processes occurred much more slowly. This allowed to maintain H_2 production for a longer period of time.

Summarizing our results, we can conclude that a new method based on anaerobic induction has been developed, which has several advantages over the previously used sulfur removal protocol. Due to this method and the photobioreactor used in our later experiments, we successfully increased the amount of H_2 production by optimizing the gas-liquid ratio, the cell layer thickness, and the efficient removal of the produced gases. Testing various photosynthetic mutant strains of *Chlamydomonas reinhardtii*, we found that the *pgr5* mutant proved to be the most efficient H_2 producer under the conditions we set up.

Replacing fossil fuels in a way that ensures sustainability and has no environmental or health impact is an increasingly urging problem today. The knowledge we gained provides an opportunity to use H_2 produced by green algae as an efficient energy source, not only on a laboratory scale but also in the longer term on an industrial scale.

10. Saját közlemények

A dolgozat alapját képező és egyéb közlemények

Nagy V., Vidal-Meireles A., Podmaniczki A., Szentmihályi K., Rákhely G., Zsigmond L., Kovács L., Tóth S. Z. (2018) The mechanism of photosystem-II inactivation during sulphur deprivation-induced H_2 production in *Chlamydomonas reinhardtii.* Plant J. 94: 548-561.
Impakt faktor: 6,002

Nagy V., Podmaniczki A., Vidal-Meireles A., Tengölics R., Kovács L., Rákhely G., Scoma A., Tóth SZ. (2018) Water-splitting-based, sustainable and efficient H_2 production in green alga as achieved by susbtrate limitation of the Calvin-Benson-Bassham cycle.
Biotechnol. Biofuels 11: 69
Impakt faktor: 5,452

Nagy V.* Podmaniczki A.*, Vidal-Meireles A., Kuntam S., Éva H., Kovács L., Tóth D., Scoma A., Tóth SZ. (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
Impakt faktor: 9,642

Podmaniczki A., Nagy V., Vidal-Meireles A., Tóth D., Patai R., Kovács L., Tóth SZ. (2021) Ascorbate inactivates the oxygen-evolving complex in prolonged darkness. Physiol. Plantarum 171: 232-245
Impakt faktor: 4,5

* megosztott első szerzőség

Egyéb, a dolgozat fő anyagát nem képező kutatómunkám

(Podmaniczki és mtsai., 2021)

Az aszkorbát (Asc, C-vitamin) esszenciális metabolit, mely a növények számos élettani folyamatában vesz részt, beleértve a környezeti stresszek kezelését és fejlődést. PhD munkám során az Asc sötét indukált levél szeneszcenciájában játszott szerepét is vizsgáltam *Arabidopsis thaliana* modellszervezet segítségével.

A hosszan tartó sötétség egyik legkorábbi hatása a vízbontó komplexek (OEC) inaktiválása, melyet a gyors klorofill *a* fluoreszcencia (OJIP) és a termolumineszcencia (TL) mérések is bizonyítanak. Megfigyeltük, hogy az Asc-hiányos *vtc2-4* mutánskevésbé érzékeny a hosszan tartó sötétségre, mint a vad típus. Azonban a *psbo1* OEC mutáns esetében, az inaktiváció súlyosabb volt 24 órás sötétkezelést követően. A *psbr* mutáns, amelyből hiányzik az OEC PSBR alegysége, normál növekedési körülmények között csak enyhén zavart fotoszintetikus aktivitást mutatott, ám sötétkezelés hatására nagy mértékű csökkenés volt megfigyelhető a B termolumineszcencia sávban.

Létrehoztunk egy kettős *psbo1 vtc2* mutánst, amely valamivel enyhébb fotoszintetikus fenotípust mutatott, mint a *psbo1* mutáns. Eredményeink alapján valószínű, hogy az Asc a Mn-komplex túlzott redukciójával az OEC inaktiválásához vezet hosszan tartó sötétségben, s amelyet valószínűleg a külső OEC alegységek sötét-indukálta disszociációja tesz lehetővé. Tanulmányunk egy példa arra, hogy az Asc negatívan is befolyásolhat bizonyos sejtfolyamatokat, ezért koncentrációja és lokalizációja a sejten belül szoros kontrollt igényel.