

Doktori értekezés tézisei

Hatékony fotoautotróf H₂-termelés megvalósítása *Chlamydomonas reinhardtii* zöldalgában

Podmaniczki Anna

Témavezető: Dr. Tóth Szilvia Zita



Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológiai Doktori Iskola

Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Növénybiológiai Intézet
Molekuláris Fotobioenergetikai Csoport

Szeged
2022

Bevezetés

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. Mindezekhez hozzáadódik, hogy az energiaigény világszerte megnőtt a népesség növekedésnek köszönhetően. Az energiaellátás biztosításának problémáján túl a fosszilis üzemanyagok használata a saját egészségünket is veszélyezteti a velük járó kémiai- és részecskeszennyezés révén. 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.

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 kapcsolatosan igen nagy hatékonysággal képesek H_2 -t előállítani.

Célkitűzések

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 hossza és hatékonysága laboratóriumi körülmények között kénmegvonás segítségével megnövelhető, amely azonban számos negatív hatással 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 tűztem 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 H₂-termeléssel rendelkező mutáns törzsek azonosítása, jellemzése.

Alkalmazott módszerek

1. *Chlamydomonas reinhardtii* törzsek fenntartása és nevelése

A kísérleteink során 5 különböző *Chlamydomonas reinhardtii* törzs, nevezetesen a CC-124, a CC-409, az L159I-N230Y, a *pgr11* és a *pgr5* H₂-termelését vizsgáltuk és hasonlítottuk össze. Az algasejteket Tris-acetát-foszfát (TAP) tartalmú szilárd táptalajon vagy tápoldatban, alganevelő kamrában neveltük. A 3 napos nevelést követően a kultúrákat lecentrifugáltuk és Sueoka's high salt medium (HS) tápoldatba helyeztük. A 100 ml-es szérumüvegekben folytatott kísérletekben a klorofilltartalmat 50 µg/ml chl (a+b)-re állítottuk be és 30 ml kultúrát helyeztünk el bennük. 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 el az üvegekben. Az üvegek légterébe a lezárásukat megelőzően O₂ abszorbenst helyeztünk el speciális tartókban. A kultúrákat 4 órára sötétbe helyeztük, és a gázterükből az O₂-t és CO₂-ot 20 perces N₂-fúvatással eltávolítottuk.

A 4 órás sötét, anaerob indukciót követően a kultúrák 350 vagy 1000 µmol/m²/s fotonáram-sűrűsége, 23-25°C hőmérsékletre kerültek és 130 rpm sebességgel rázattuk őket.

2. Kémiai kezelések

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

3. O₂ abszorbensek

A kísérleteink során a légtérből történő O₂ eltávolításához használt abszorbensek nátrium-klorid és vas keverékek. Az 504B 100CC Loose (Oxyfree, Tianhua Tech. CO., Ltd. Nanjing, Kína) keveréket a szérumüvegben végzett kísérletek során alkalmaztunk. Az 50CC Loose (O₂Zero, Global Reach Ltd, London, UK) abszorbenst a Thin-Cell-Layer Photobioreactor (TCL-PBR) üvegekben végzett kísérletek folyamán használtunk fel. A szérumüvegekbe 1,3 g O₂ abszorbenst tettünk, míg a TCL-PBR üvegekben 20 g O₂ abszorbenst helyeztünk el.

Mérési módszerek:

- A klorofilltartalom meghatározása spektrofotométerrel
- O₂ és H₂ mennyiségének meghatározása gázkromatográfiával
- Gyors klorofill-a fluoreszcencia (OJIP) mérés
- Western blot analízis
- Sejtszám meghatározása
- *In vitro* hidrogenáz aktivitás mérések

Eredmények

1. A folyamatos H₂ termelés fenntartásához szükséges kulcslépések felderítése

A hidrogenáz expressziójának indukálásához egy úgynevezett sötét anaerob indukciós kezelést alkalmaztunk. Modellorganizmusként a *Chlamydomonas reinhardtii* CC-124-es törzset választottuk. Erről a törzsről már ismert volt korábbi adatok alapján, hogy hatékony H₂-termelő és eltérő kísérleti körülmények között is képes a H₂-termelésre. A zöldalgák H₂-termelése redukáló erőket és anoxikus körülményeket igényel. A redukáló erők származhatnak a fotoszintetikus elektrontranszportból, keményítő lebontásából és az azt követő glikolízisből. A H₂-termelésnek azonban osztoznia kell a redukálószer készleten a kompetitív reakciókkal. A legfőbb kompetitor az elektronokért folytatott versengésben a CO₂-asszimiláció. Az anaerobiózis biztosításához használt N₂ atmoszféra eltávolítja a Calvin-Benson-Bassham (CBB) ciklus szubsztrátját jelentő CO₂-ot is, ezáltal gátolva annak elektronfelvételét, így pedig fokozottabb elektronáramlást tesz lehetővé a HydA felé.

A keményítő felhalmozódásához szükséges az acetát jelenléte, ám anyagcseréje CO₂-képződéshez vezet, ami részlegesen képes helyreállítani a CBB ciklus aktivitását. Ennek elkerülése érdekében a kísérletek során az acetátot kihagytuk a tápoldatokból. Így acetát és megfelelő mennyiségű keményítő hiányában a PSII-függő fotoszintetikus elektrontranszport szolgálhat elektronforrásként a H₂-termelés számára. A vízbontáson alapuló lineáris elektrontranszport hatékonyabb elektronforrás, mint a keményítő bontása, azonban O₂ fejlődés kíséri, mely akadályozza az anoxiás körülmények kialakulását. Ezért a lineáris elektrontranszport fenntartható elektronforrásként való kihasználása érdekében a felszabaduló O₂ gyors és hatékony eltávolítása mellett döntöttünk, ahelyett, hogy a PSII-t kénmegvonással inaktíváltuk volna. Erre a célra vas-só alapú O₂ abszorbenst alkalmaztunk, amely 0,1% alá csökkentette az O₂ koncentrációt a kultúrák légtérében.

2. Új H₂ termeltetési módszer kifejlesztése, optimalizálása

Az általunk kialakított módszer alapvető előnyökkel rendelkezik a korábbi módszerekhez képest, mégpedig: néhány óra anaerob sötét inkubációt követő megvilágítás hatására a H₂-termelés azonnal megkezdődik. A kénmegvonással szemben nem igényli a tápoldat cseréjét. Nem függ a keményítő lebomlásától és nem igényel acetátot. Mivel nincs szükség szerves szénforrásra, a bakteriális szennyeződés kockázata is jóval alacsonyabb. A kultúrák fotoszintetikusan aktívak maradnak a H₂-termelés alatt és utána könnyen regenerálhatóak. Lineáris elektrontranszporton alapul, az elektronok elsősorban a PSII vízbontó aktivitásából származnak, és viszonylag magas fény-H₂ energiaátalakítási hatékonysággal rendelkezik. A növekedési fázisban a CO₂, ami egy ipari melléktermék, felhasználható. Viszonylag nagy fényerősség használható a H₂-termelés során (320 μmol foton/m²/s).

3. A rendszer fenntarthatóságának tesztelése

Az általunk felállított rendszer fenntarthatóságát a fotoszintetikus apparátus állapotával 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 O₂ abszorbenst tartalmazó minták esetében. A PsbA (a PSII reakciócentrum egyik fő fehérjéje), a PetP (a cytb₆/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 O₂ abszorbenst tartalmazó minták esetében. Mivel a kísérletünk során a sejtek fotoszintetikusán aktívak maradtak, a H₂-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 H₂-termelés hozama az első ciklusban mértékhez hasonló volt.

4. H₂ termeltetés hatékonyságának fokozása egy új típusú fotobioreaktor kialakításával

Úgy gondoltuk, hogy a H₂-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.

Munkánk során vékony folyadékrétegű, vízszintesen elhelyezett, 1 literes Roux üvegekkel (TCL-PBR) dolgoztunk. A sejtuszpenzió vastagsága körülbelül 5 mm volt az 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) a szérüművegekhez képest.

5. Fotoszintézisben érintett, fokozott H₂ termeléssel rendelkező mutánsok azonosítása, jellemzése

Nagy potenciál rejlik a különböző fotoszintetikus mutánsok esetében az általunk fejlesztett protokollnak az alkalmazásában.

A fotobioreaktor optimalizálását követően három fotoszintetikus mutánst teszteltünk, amelyek a PSII-ben (L159I-N230Y) és a PSI ciklikus elektrontranszportban (*pgr5* és *pgr11*) érintettek. Kísérleteinkben napfény intenzitást (1000 µmol foton/m²/s) és magas klorofilltartalmat (150 µg/ml) használtunk.

Mindhárom törzs H₂-termelése az első 24 órában nagyon hasonló volt, ám ezt követően a vad típusú CC-124 és a CC-409-es törzs H₂-termelése folyamatos csökkenést mutatott, míg az L159I-N230Y mutánsé meglehetősen stabil maradt, csak a hatodik napra csökkent. Az L159I-N230Y törzs 30%-al több H₂-t termelt, mint a CC-409, annak ellenére, hogy a fotoszintetikus apparátusuk állapota és a teljesítménye hasonló volt.

Ezt követően *pgr5* és *pgr11* mutáns törzseket vizsgáltuk meg az általunk kifejlesztett protokoll során. A *pgr5* mutáns esetében a H₂-termelés többszörös volt a vad típusú CC-124-es törzshöz képest. A *pgr5* mutáns fotoszintetikus apparátusa nem károsodott

jelentősen még a napfény intenzitásán sem, valamint a hidrogenáz enzim mennyisége is megőrződött.

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 H₂-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 kialakított körülmények között a *pgr5* mutáns bizonyult a leghatékonyabb H₂-termelőnek.

Napjaink egyre égetőbb problémája a fosszilis tüzelőanyagok helyettesítése oly módon, amely biztosítja a fenntarthatóságot és nem jár környezet-illetve egészségkárosító hatással. Ezeknek az ismereteknek a révén hosszabb távon, ipari méretekben is lehetőség nyílna a zöldalgák általi H₂-termelésének felhasználására.

Publikációk

MTMT azonosító: 10055188

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 H₂ production in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant J. 94: 548-561.

Impakt faktor: 5,726

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

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, *pgr11* and *pgr5* mutants perform enhanced hydrogen production at sunlight intensity. Biores. Technol. 333: 125217

Impakt faktor: 11,889

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: 5,081

Széles E., Nagy K., Ábrahám Á., Kovács S., Podmaniczki A., Nagy V., Kovács László., Galajda P., Tóth SZ. (2022) Microfluidic platforms designed for morphological and photosynthetic investigations of *Chlamydomonas reinhardtii* on a single-cell level. Cells: 11: 285

Impakt faktor: 7,666

* megosztott első szerzőség

Összesített IF: 35,814

Nyilatkozat

Mint az alábbi közlemények felelős szerzője igazolom, hogy Podmaniczki Anna Ph.D. jelölt jelentős mértékben hozzájárult az alábbi tudományos publikáció létrehozásához, és tézisében közölt eredményeit más Ph.D. értekezésben nem használjuk fel.

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

Nagy Valéria
tudományos munkatárs
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Növénybiológia Intézet

Dr. Tóth Szilvia Zita
tudományos főmunkatárs
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Növénybiológia Intézet

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, *pgr11* and *pgr5* mutants perform enhanced hydrogen production at sunlight intensity. *Biores. Technol.* 333: 125217

Nagy Valéria
tudományos munkatárs
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Növénybiológia Intézet

Dr. Tóth Szilvia Zita
tudományos főmunkatárs
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Növénybiológia Intézet