

# Biogáz fermentáló rendszerek hatékonyságának mikrobiológiai fokozása

Ph.D. Tézisek

*Készítette:*

Bagi Zoltán

*Témavezető:*

Prof. Kovács Kornél

Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszék

Szeged  
2008



## Bevezetés

Az emberiségnek két jelentős problémával kell belátható időn belül szembenéznie, a fosszilis energiakészleteink által okozott, globális felmelegedésként emlegetett környezeti katasztrófákkal és a készletek kimerülésével. A mai adatok szerint energiafelhasználásunk 80%-át teszik ki a nem megújuló energiaforrások (földgáz, kőolaj és szén). Az energiafelhasználás növekedésért egyaránt felelős a népesség gyarapodása, valamint az egyre nagyobb ipari igények. A jelen tendencia mellett 30-40 év múlva ugyanezeket az energiahordozókat használva a termelés nem lesz képes kielégíteni a fogyasztók igényét. Már évek, évtizedek óta foglalkoztatja a kutatókat, hogy a növekvő energiaigények mellett szükségünk lesz alternatív, megújuló energiaforrásokra. Széles körben használt megújuló energiahordozó a biomassza, mely a biológiai folyamatokban átalakított szerves anyagok összessége. A biomassza az egyik legjelentősebb hasznosítási módja a biogáz termelés. A biogáz anaerob fermentáció során keletkezik, a keletkező termékek sokrétűen felhasználhatóak, hiszen a biogázt elégethetjük hőtermelés céljából, gázmotorban hasznosítva egyszerre termelhetünk hőt és elektromos energiát, vagy tisztítást követően üzemanyagként használhatjuk földgáz helyett, illetve a keletkező fermentmaradék alkalmazható műtrágya kiváltására.

A biogáz képződési folyamat csak anaerob körülmények között zajlik le, azonban a fermentatív szakasz mikrobái között léteznek fakultatív anaerobok is. A lebontás során a biokémiai folyamatokat az erjesztésre kerülő anyag összetételétől, minőségétől függően meghatározott mikroorganizmusok segítségével lehet végrehajtani. A baktériumok tevékenysége szigorú rendben követi egymást, minden lépést más speciális mikroszervezet hajt végre. A különböző típusú mikrobák egymásra utaltak és egymással összehangoltan működnek, egy-egy specializált törzs csak meghatározott molekulatípusokat dolgoz fel. A komplex szerves molekulák metánná történő átalakítása csak akkor lehet sikeres, ha kialakul a baktériumok speciális közössége, amelyben mindegyik faj meg tud élni, hátrahagyva egy olyan terméket, amelyet a következő baktérium csoport hasznosítani tud. A nagy szerves molekulák megbontásával nagy mennyiségű energiát nyerhetnek a mikroszervezetek, melyért először több baktérium faj verseng, a versengésből győztesen kikerülő faj dominánssá válik. A lebomlás során

egyszerűbb vegyületek jönnek létre, ezek energiatartalma is alacsonyabb, így már kevesebb baktérium törzs számára nyújt táplálékforrást. A folyamat végén már csak a metanogének számára lesz hasznosítható, elegendő energiatartalmú a keletkező intermedier.

Biogáz fermentáció termodinamikailag csak abban az esetben mehet végbe, ha a hidrogén koncentrációja a rendszerben a küszöbérték alatti, ezért hidrogén a biogázban igen kis mennyiségben van jelen. Ugyanakkor bizonyos metanogén törzsek (hidrogenotróf metanogének) redox reakcióihoz nélkülözhetetlen a megfelelő hidrogén utánpótlás. Az anaerob lebontási folyamatokban szerepet játszó mikrobák közötti szintropikus együttműködés pontos megismerése igen fontos előnyt jelent a biogáz termelési folyamat megértésében. A metanogén és acetogén törzsek szintropikus kölcsönhatásban állnak egymással, mely a sejtek közötti közvetlen hidrogén transzfer révén valósul meg.

A biogáz legnagyobb hányadát (55-75%) a metán teszi ki, ezen kívül 28-48% szén-dioxidot és 1-2% egyéb gázt (kénhidrogén, szén-monoxid és nitrogén) tartalmaz. A földgázban több mint 90% a metán, ez részarányától függően a földgáz fűtőértékének 70%-át teszi ki. Ezt az értéket a biogáz esetén is elérhetjük, a szén-dioxid eltávolításával, illetve sűrítéssel. A tisztítás után a biogáz a földgázzal gyakorlatilag megegyező fűtőértéket képvisel. Legmagasabb metántartalma a szennyvíziszapból erjesztett biogáznak van (60-75%), ezt követi a sertés hígtrágyából nyerhető, majd a mezőgazdasági melléktermékekből, végül pedig a szilárd települési hulladékból nyerhető gáz metántartalma.

## **Célkitűzés**

Munkám során célul tűztem ki, hogy a biogáz termelő rendszerek mikrobiológiai hátterét megismerve egy olyan eljárást dolgozzak ki, mely a jelenleg alkalmazott technológiák mellett hatékonyabb biomassa felhasználást, és ezáltal magasabb biogáz hozamokat tesz lehetővé. A folyamatban részt vevő mikroba konzorciumban lejátszódó anyagcsere folyamatok tanulmányozása során felismertem, hogy a hidrogén a folyamat egyik fő sebesség meghatározó faktora. Megvizsgáltam annak a lehetőségét, hogy lehetséges-e a metanogén mikrobák aktivitását fokozni egy, a rendszer szempontjából megfelelően választott, tiszta kultúrában felnevelt baktérium törzs segítségével, mely az általa termelt hidrogén segítségével a biogáz fermentációt hatékonyabbá tudja tenni. Célom volt meghatározni, hogy a hidrogén termelő sejtek alkalmazása során milyen anyagcsere változások zajlanak le a rendszerben. Meg kívántam vizsgálni, hogy a technológia megfelelően használható-e laboratóriumi léptékben, batch rendszerű és folyamatos üzemű fermentorokban, illetve kisüzemi körülmények között. Fontosnak tartottam bemutatni, hogy nagyobb léptékben is alkalmazható az eljárás, mivel a kifejlesztett új technológia a gyakorlati életben csak ekkor tudja megállni a helyét.

## **Módszerek**

Az anaerob lebontási rendszerben szerepet játszó metanogén mikrobák aktivitásában szerepet játszó faktorok meghatározása anaerob fermentorokban történt. A vizsgálatokat elvégeztem 0,5 literes térfogatú szakaszos üzemű, valamint laboratóriumunk számára egyedileg tervezett, teljesen automatikus vezérlésű 5 literes térfogatú folyamatos üzemű fermentorokban. A keletkezett biogáz minőségi összetételét gázkromatográf segítségével határoztam meg. A fermentációs folyamat során keletkező intermediereket nagy pontosságú folyadék kromatográfia (HPLC) alkalmazásával követtem nyomon. A hidrogén termelő sejtek mennyiségének alakulását hagyományos PCR, illetve Real-Time PCR technika segítségével követtem nyomon. Az alkalmazott biomasszák beltartalmi értékeinek meghatározását automata szerves szén és nitrogén

mérő berendezés, valamint spektrofotometriás elven működő analitikai munkaállomás segítségével végeztem el. A mikrobák szaporítását, fenntartását az általános gyakorlatnak megfelelően végeztem.

## **Eredmények**

1. A dolgozatban bemutattam, hogy a hidrogén jelentős szerepet játszik az anaerob biogáz fermentációban. A hidrogén koncentráció, valamint a sejtek közötti hidrogén transzfer fontos szabályozó hatással rendelkezik a mikrobiális anyagcsere folyamatok során.

2. A dolgozatomban bemutattam, hogy szignifikáns növekedés tapasztalható a természetes kevert metanogén konzorcium által előállított biogáz mennyiségében, ha a rendszerbe egy megfelelően kiválasztott hidrogén termelő törzset juttatok be, mely igaz mezofil és termofil hőmérsékletre is. A mérések eredményei egyértelműen igazolták, hogy ez a pozitív hatás csak abban az esetben jön létre, ha a hidrogén termelő törzsek direkt kölcsönhatásba kerülnek metanogén partnereikkel. Az intenzifikáció nem szubsztrát függő, számos, egymástól alapvető összetételében igen eltérő alapanyagon, vagyis különböző metanogén konzorciumokon igazoltam annak létrejöttét.

3. A dolgozatban bemutatott eredmények azt bizonyítják, hogy csak abban az esetben lehetséges az intenzifikáció, ha a biogáz fermentációért felelős konzorcium, valamint a hidrogén termelő törzs szoros kontaktusban áll egymással. Külső forrásból adagolt hidrogén gáz nem volt hatással a fermentációra. Hővel inaktivált, valamint hidrogén termelésre képtelen sejtek szintén hatástalannak bizonyultak.

4. A dolgozatomban leírt kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a hidrogén termelés növekedése, valamint annak sejtek közötti megfelelő átadása a szintropikus kapcsolatban álló fajok között a biogáz termelést növeli. Felismertem, hogy a heterotróf fermentációt

folytató szintropikus partnerek által *in situ* termelt hidrogén segíti a metanogenezis komplex folyamatának fokozását.

5. A hidrogén termelő törzsek biogáz fermentációra gyakorolt serkentő hatását bemutattam mind batch, mind folyamatos üzemű fermentorokban. Az általunk használt folyamatos üzemű laboratóriumi fermentorokban a hatás csak ideiglenes, ott a sejtek tartósan nem életképesek, kihígnak a rendszerből. Bemutattam, hogy az eltérő C/N aránnyal rendelkező szubsztrátokon eltérő az intenzifikáció mértéke, a nagyobb C/N aránnyal rendelkező biomassza alkalmazásakor a serkentő hatás mértéke nagyobb. Az alkalmazott két hidrogén termelő törzs esetében azt találtam, hogy adott szubsztrát esetében mezofil hőmérsékleten a hidrogén termelő törzs alkalmazása nagyobb biogáz hozam többletet eredményez, mint termofil hőmérsékleten.

6. A méréseket termofil hőmérsékleten kisüzemi léptékben, 5m<sup>3</sup>-es térfogatú folyamatos üzemű fermentorokban is elvégeztem. Ebben az esetben az intenzifikáció 4 hónapig folyamatosan kimutatható volt. PCR reakció segítségével igazoltam, hogy a kísérletben alkalmazott technológia mellett a termofil hidrogén termelő törzs életképes a rendszerben, 4 hónap elteltével a sejtek jelenléte egyértelműen igazolható volt.

7. *Escherichia coli hypF* mutáns törzse segítségével kimutattam, hogy a biogáz képződésre gyakorolt pozitív hatás csak az aktív hidrogenáz enzimet tartalmazó Eubacteriaceae törzs esetében tapasztalható. A *hypF* mutáció blokkolja az aktív hidrogenázok bioszintézisét, de a fermentatív folyamatban szerepet játszó egyéb enzimek funkciója lényegesen nem változik.

8. Az eljárás ipari léptékben való alkalmazásához szükséges a hidrogén termelő törzsek minél gazdaságosabb tenyésztése, ez olcsó ipari tápoldatokon valósítható meg. Munkám során meghatároztam, hogy a *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* esetében a szójaliszt, míg az *Enterobacter cloacae* esetében a melasz bizonyult a legmegfelelőbb olcsó ipari tápnek.

## A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények

**Bagi Z.**, Ács N., Bálint B., Horváth L., Dobó K., Perei KR., Rákhely G., Kovács K.L. (2007) Biotechnological intensification of biogas production. *Appl Microbiol Biotechnol.* **76**:473-482

Kovács K.L., **Bagi Z.** (2007) A biogáz keletkezése. (Bai A. szerk.: A biogáz) Száz Magyar falu könyvesháza Kht., Budapest pp.37-48.  
ISBN 978-963-7024-30-6

**Bagi Z.**, Perei K., Kovács K.L. Towards an efficient and integrated biogas technology. *Acta Microbiol Immunol Hung*, **53**:241

Ács N., **Bagi Z.**, Kovács K.L. (2006) Intensification of biogas production from sewage sludge. *Acta Microbiol Immunol Hung*, **53**(3):237

Kovács K., **Bagi Z.** (2005) Biogáz biotechnológia. *Energia hírek*, **23**:7-8

**Bagi Z.** Towards an efficient and integrated biogas technology (2004) *Acta Biologica Szegedienses*, **48**(1-4):47,

**Bagi, Z.**, Perei, K., Kovács, K.L.. (2004) Towards an efficient and integrated biogas technology. In: Environmental Biotechnology (Ed. W. Verstraete) Taylor and Francis, London. pp. 535-536.



## További közlemények

Bíró T., Mézes L., Petis M., Kovács K.L., **Bagi Z.**, Hunyadi G., Tamás J. (2008) A baromfi toll biogáz-alapanyagként történő hasznosítása. *Bio Energia*, **1**:18-21

**Bagi Z.**, Kovács K.L., Perei K. (2008) Keratin tartalmú hulladékok mikrobiológiai lebontása. *Bio Energia*, **1**:15-17

Herbel Zs., Bálint B., **Bagi Z.**, Perei K., Rákhely G., Kovács K.L. (2005) Biodegradation of keratin containing wastes: a molecular approach. *Acta Microbiol Immunol Hung*, **52**:56-57.

Balint B., **Bagi Z.**, Tóth A., Rákhely G., Perei K., Kovacs K.L. (2005) Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen. *Appl Microbiol Biotechnol*, **69**:404-410.

Perei K., **Bagi Z.**, Bálint B., Csanádi Gy., Hofner P., Horváth L., Kardos Gy., Magony M., Rákhely G., Román Gy., Tóth A., Kovács K.L. (2004) Mikrobák környezetvédelmi biotechnológiai hasznosításra. *Biokémia*, **28**:54-58.

Kovács K. L., **Bagi Z.**, Bálint B., Balogh J., Dávid R., Fodor B.D., Csanádi Gy., Hanczár T., Kovács Á.T., Latinovics D., Maróti G., Mészáros L., Perei K., Tóth A., Rákhely G. (2004) Microbial hydrogen metabolism and environmental biotechnology. In: Environmental Biotechnology (Ed. W. Verstraete) Taylor and Francis, London. pp. 155-158.

Kovács K.L., Kovács Á.T., Maróti G., **Bagi Z.**, Csanádi Gy., Perei K., Bálint B., Balogh J., Fülöp A., Mészáros L. S., Tóth A., Dávid R., Latinovics D., Varga A., Rákhely G. (2004) Improvement of biohydrogen production and intensification of biogas formation. *Rev Environ Sci Biotechnol*, **3**(3):321-330.

**Bagi Z.**, Magony M., Perei K., Rákhely G., Kovács K.L. (2002) Méregfaló mikróbák. Szennyező anyagok biotechnológiai lebontása. *Élet és Tudomány*

Perei K., **Bagi Z.**, Kovács K. L. (2000) Keratin tartalmú hulladékok hatékony mikrobiológiai lebontása. [Fast and Efficient Microbiological Degradation of Keratin Waste] *Acta Biol Debrecina*, **22**:65-68

Kovács K. L., **Bagi Z.**, Bagyinka Cs., Bodrossy L., Csáki R., Fodor B., Hanczár T., Tusz J., Kálmán M., Klem J., Kovács Á., Jian L., Magony M., Maróti G., Perei K., Polyák B., Arvani S., Takács M., Tóth A., Rákhely G. (2000) Biohidrogén, biogáz, bioremediáció. *Acta Biol Debrecina*, **22**:47-54

### **Magyarországon bejelentett szabadalom**

Bálint B., **Bagi Z.**, Tóth A., Rákhely G., Perei K., Pónya B., Kovács K.L. Mikrobiológiai eljárás keratintartalmú hulladékok lebontására, az eljárással előállított biomassza hidrogén termelése, és a biomassza alkalmazása mikroorganizmusok tápközegeként. Lajstromszám: P0203998/2004

Perei K., **Bagi Z.**, Takács J., Kovács K.L. Mikrobiológiai keratinbontó eljárás, az eljárással előállított biomassza, valamint keratinbontó baktérium és extracelluláris proteáz. Lajstromszám: P0004865/2001

### **Nemzetközi szabadalom**

Kovács K.L., **Bagi Z.**, Rákhelyné Perei K., Rákhely G., (2006) Production of methane-containing biogas, useful e.g. in heating, by fermenting biomass comprising polymer-degrading microorganisms, acetogenic microorganisms and methanogenic microorganisms, under anaerobic conditions. Szabadalom száma: WO2006056819-A1, HU200402444-A1, EP1828065-A1, NO200703270-A, US2008124775-A1

## Társszerzői nyilatkozat

Alulírott kijelentem, hogy tisztában vagyok a jelen tézispontokban megfogalmazott tudományos eredményekkel, azokat az eddigiekben nem használtam fel semmilyen tudományos fokozat megszerzéséhez, és azokat a jövőben sem fogom felhasználni.

Szeged, 2008. 10. 01.

Prof. Kovács L. Kornél

Dr. Rákhely Gábor

Ács Norbert

Bálint Balázs

Horváth Lenke

Dobó Krisztina

Perei Katalin