

# **Egy izolált és egy ismert zöld mikroalga törzs biotechnológiai potenciálja és biofilm rendszerekben való növesztése**

Sebestyén Petra

PhD értekezés tézisei

Témavezető: Dr Kesserű Péter

Környezettudományi Doktori Iskola

Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közhasznú Nonprofit Kft

Biotechnológiai Divízió (BAY-BIO)

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar



**bay-bio**

Szeged

2016

## Bevezetés

A mikroalgák egy nagyon diverz és számos fotoszintetizáló mikroorganizmust magába foglaló csoport, ideértve prokarióta és eukarióta élőlényeket is. Fontos szerepet játszanak a légköri oxigén előállításában és a CO<sub>2</sub> megkötésében, emellett elsődleges termelők, így alapvető fontosságúak a táplálékláncban is. Számos élőhelyen megtalálhatóak, mint mélytengeri, trópusi régiókban, a sarkkörüi jég és hó alatt, extrém pH-n és hőmérsékleten, sós környezetben, szabadon úszó és telepes formában is. Ez a sokféleség jó lehetőséget nyújt arra, hogy számos biotechnológiai célra használják fel a biomasszát és/vagy az általuk termelt anyagokat akár az élelmiszer vagy takarmányiparban, gyógyszergyártásban, mezőgazdaságban, energia előállításánál bio-üzemanyagként felhasználva vagy biogáz alapanyagként, illetve szennyvízkezelésnél és tápanyag kinyerésnél.

Az utóbbi évtizedekben, a kutatók figyelmé a biodízel előállításra fordult, melyet a mikroalga biomasszában felhalmozott lipidekből hoznak létre. Ez az érdeklődés annak volt köszönhető, hogy a fosszilis üzemanyag árak drasztikusan megemelkedtek és ezzel egy időben felismerték az összefüggést az ipari tevékenységek és klímaváltozás között. Noha, a mikroalgák nem csak biodízel előállításra használhatóak, hanem egyéb biotechnológiai fontosságú másodlagos metabolitokat is termelnek. Ezek közül néhány, a többszörösen telítetlen zsírsavak, mint EPA, DHA, illetve karotenoidok, mint az asztaxantin és  $\beta$ -karotin a legkeresettebb humán táplálék kiegészítők közé tartoznak. Ennek ellenére, a valós, nagy léptékű, ipari termelése a mikroalgákból származó termékeknek még korlátozott és gyakran rendkívül költséges. Többek között, az alacsony sejt denzitás a tápoldatokban, ennek következtében magas sűrítési költségek miatt, továbbá a fentebb említett molekulák, általában valamilyen sejtosztódást limitáló körülmény esetén halmozódnak csak fel a biomasszában, ami így alacsony termelékenységet okoz.

A jelenleg ismert, kereskedelmi célú mikroalga termelő technológiák szinte kizárólag szabadon-úszó folyadék-termelésen alapulnak, melyek nagy energia és munkaerő igényes, nagytérfogatú downstream biomassza koncentráció folyamatokat igényelnek, mint pl. a flokkulálás, centrifugálás, szűrés és ülepítés. A folyadékok alacsony biomassza tartalma miatt, a víz eltávolításának költsége akár a teljes termelési költség 20-30%-át is kiteheti, ami jelentősen lecsökkenti a mikroalga alapú termékek versenyképességét. Ezzel ellentétben, a biofilm alapú technológiák megkerülik ezt a problémát. Az egyik legmeghatározóbb paramétere ezeknek a rendszereknek, a sejtek immobilizálása, így elkülönítve a biomasszát a tápoldattól. Annak ellenére, hogy nagyon eltérő felépítésű és működésű biofilm rendszerek ismertek, a biomassza sűrűsége mindig magas, 37 g száraz anyag kg<sup>-1</sup> nedves anyag -tól 200 g kg<sup>-1</sup>-ig, az eddigi irodalmi adatok alapján.

Számos publikáció található a különböző rendszerekről, melyeket különféle algák termesztésére használnak, viszont a számuk még így is elmaradt a folyadék alapú rendszerekről fellelhető adatoktól és tudástól. Továbbá, sok közülük, még nem alkalmas nagy léptékű alkalmazásra, így valós hatékonysági értékek még hiányoznak és gyakran az összehasonlításuk más rendszerekkel is problémás.

## Célkitűzések

A jelen doktori munka elsősorban két biofilm alapú termesztési rendszer összehasonlítását célozza meg, figyelembe véve a biotechnológiai szempontból értékes termékek előállítását. A tanulmány során izolált és ismert mikroalga törzsek biotechnológiai potenciálját és biomassza növekedési kapacitásukat vizsgáltuk a labor méretű Algadisk és Twin Layer reaktorokban.

A szakirodalmi eredmények alapján a következő célkitűzéseket határoztuk meg:

1. Olyan mikroalga törzsek izolálása, melyek képesek a felületi növekedésre, gyors szaporodás és nagy biomassza hozam, illetve egy értékes anyagcsere termék nagy mennyiségű termelése, pl. zsírsavak. Természetes vizes élőhelyeket választottunk Közép-Európában mintavételi helyeknek.
2. A kiválasztott törzs és más, elérhető törzsek, mint a *Chlorella sorokiniana* és *Haematococcus pluvialis* felületi kitapadás és növekedés vizsgálata egy speciálisan kifejlesztett rendszerben. A kísérletben különböző anyagokat használtunk, melyeket polielektrolit rétegek borítanak, eltérő kombinációban, negatív vagy pozitív külső töltéssel. Ez lehetőséget ad arra is, hogy megvizsgáljuk a kapcsolatot a felület anyaga és a sejt kitapadása között.
3. Az újonnan tervezett, labor méretű Algadisk reaktort az izolált törzs, *Chlorella* sp #34 üzemeltettük, és vizsgáltuk a biomassza és lipid hozamát különböző növekedési körülmények között, úgymint alacsony és magas fényintenzitás, optimalizált tápoldat és ennek helyettesítése műtrágyával. A biomassza mennyiségi és minőségi vizsgálatán kívül, a rendszer stabilitását is nyomon követtük, különös tekintettel a fertőzésekre, mechanikai problémákra, tartósságra folyamatos üzem esetén és hogyan befolyásolja a szüretelés és újranovesztés a biofilm képződést.
4. A Twin Layer rendszer vizsgálata annak fényében folyt, hogy a fényintenzitás és a tápoldat eredetű stressz hogyan hat a *H. pluvialis* algára, annak asztaxantin termelésére, mely biotechnológia szempontból különösen fontos molekula.
5. Végül a két biofilm alapú technológia elemzése és összehasonlítása egymással és más publikált rendszerekkel.

## Alkalmazott módszerek

1. A mintavételezés után, a mikroalga konzorciumokat kétféle gazdag, Sueoka és A9 tápfolyadékban, dúsítottuk fel. Ezután a mintákat azonos tápoldatot tartalmazó agar lemezekre oltottuk és egyedi sejtek kiválogatásával, létrehoztuk a monokultúrákat.
2. A szelekció első lépéseként folyadékkultúrákat indítottunk, melyek optikai denzitását 550nm hullámhosszon rendszeresen mértük, kb. két héten keresztül spektrofotométer segítségével. Ezenkívül, a törzsek lipid tartalmát is vizsgáltuk fluoreszcens mikroszkópban Nile red festékkel történő kezelés után.
3. A legjobban teljesítő törzset molekuláris módszerekkel azonosítottuk, az 5.8S rRNS, 18S rRNS, 28S rRNS gének és az ITS1 és ITS2 genom szekvenciákat alapul véve.
4. Az elsődleges kitapadási vizsgálatokhoz számos felületi anyaggal és polielektrolit réteggel, egy speciális, zárt rendszert készítettünk. A vizsgált algák biomassza hozamát a különböző felületeken gravimetriás módszerrel határoztuk meg.
5. Az Algadisk reaktorban a *Chlorella* sp #34 algát M8-a tápoldaton növesztettük. A termelt biomassza meghatározása a biofilm korongokról való lekaparásával történt egy fém késsel. Az összegyűjtött nedves biomasszát lemérés után szárítottuk, majd újra mérés következett. A lemért értékeket használtuk a produktivitás, biomassza hozam, fényhasznosítás és sűrűség meghatározására.
6. A teljes zsírtartalmat és a zsírsav összetételt GC-MS segítségével analizáltuk, miután a száraz biomasszából a zsírsavakat kiextraháltuk és azok további metilezésen estek át.
7. A teljes nitrogén tartalom mérés előtt a tápoldatból centrifugálással eltávolítottuk a sejteket és egyéb alakos elemeket, majd TOC Combustion Analyzer-ben lemértük.
8. A Twin Layer rendszer esetén, a *H. pluvialis* biomassza hozam meghatározásához, eltávolítottunk adott számú polikarbonát szűrőkorongokat, majd azokat fagyasztva szárítottuk. A lemért száraztömeget használtuk a hozam, produktivitás és fényhasznosítás kiszámolására.
9. A *H. pluvialis* biofilm asztaxantin tartalmát DMSO extrakció után spektrofotometriával határoztuk meg. Az asztaxantin tartalom megnöveléséhez módosított tápoldatot adtunk a rendszerekhez, a következő összetétellel: nitrogén-mentes BBM tápoldat, teljes BBM tápoldat NaCl só hozzáadásával, 0,05%; 0,2% és 0,4% koncentrációban.

## Eredmények

1. A mintavételezési stratégiának köszönhetően, nagyobb valószínűséggel tudtunk biofilmet képező mikroalgákat izolálni és nagyobb sejtszámot tudtunk az adott helyről gyűjteni. Összesen 58 mintát vettünk, amiből 158 monokultúrát sikerült létrehozni. Noha, idővel ezeknek csak mintegy 50%-át tudtunk tartósan fenntartani. A növekedési vizsgálatok során, ezért 102 izolált törzset vizsgáltunk, melyek változatos eredményeket adtak,  $OD_{550nm}$  0,1-től 3,8-ig. Néhány a legjobb eredményeket elérő minták közül:  $OD_{550nm} > 3$ : A9-17a; A9-25b; A9-26; A9-44b; A9-45;  $OD_{550nm} \sim 1,5$ : SH-25a és SH-34. Emellett, a Nile red festés lehetővé tette, hogy kimutassuk a zsírok jelenlétét a sejtekben. Néhány esetben, jól megfigyelhetőek voltak a zsírcseppek, míg más esetekben az egész sejt sárgán jelent meg. Viszont ez az eljárás nem alkalmas a zsírok mennyiségi meghatározására, így néhány mintát GC-MS módszerrel is megvizsgáltunk. Ennek eredményeképpen a teljes zsírsavtartalom a szárazanyagra vonatkoztatva 0,8 és 14,9% között volt. A legmagasabb értéket az SH-34-es törzsnél tapasztaltuk,  $149 \text{ mg g}^{-1}$ , ezért ezzel a törzssel folytattuk tovább a biofilm kísérleteket. A molekuláris azonosítás alapján a törzs a *Chlorellales* rendbe tartozik, így elnevezését *Chlorella* sp #34-re változtattuk.
2. Az elsődleges kitapadási mérések azt mutatták, hogy a *Chlorella* sp #34 esetében a felületi töltések nagyban befolyásolják a kitapadt biomassza mennyiségét. A negatív töltésű anyagokon, kb. kétszer annyi biomasszát mértünk, mint a pozitív töltésűeken vagy polielektrolit borítást nem hordozó felületeken. A legnagyobb értéket  $2,2 \text{ g m}^{-2}$  7 nap után, a PS felület adta 3. borítással kombinálva. Ezzel ellentétben, *C. sorokiniana* minden felületen alacsonyabb hozamot mutatott, mint a fenti törzs. A legmagasabb mért érték  $1,2 \text{ g m}^{-2}$  volt, PET felületen, 1. borítással, mely pozitív töltésű. Ezeket mind felülmúlta a *H. pluvialis*, mely  $8,5 \text{ g m}^{-2}$  ért el, PET felületen 3. borítással. Más mintákat is figyelembe véve, a biomassza hozam 3,5-szer magasabb volt, mint a *Chlorella* sp #34 esetén, és hétszer nagyobb, mint a *C. sorokiniana* esetén. Ennek ellenére, egyértelmű összefüggéseket nem tudtunk levonni az eredményekből a felületi tulajdonságok és a sejtek kitapadása között. Noha néhány borítást és felületet ki tudtunk zárni a további vizsgálatokból, pl. a 2. borítás a kísérlet alatt levált a felületről.
3. A labor méretű Algidisk reaktor, alacsony fényintenzitás mellett, teljes tápoldatot használva, folyamatosan üzemelt 98 napig, ami alatt 7 szüret-újranövekedés történt, eltérő időközönként. Az első biofilm kialakulása hosszabb időt vett igénybe, pontosan 18 napot, a sejtek lassú kitapadásának következtében, ezután viszont a biofilm 7-8 nap után szüretelhető vastagságúra növekedett. Ennek a rendszeres szüretelésnek köszönhetően a biomassza produktivitás növekedő tendenciát mutatott,  $2,28 \text{ g (m}^2\text{nap)}^{-1}$ -ból indulva

3,23 g (m<sup>2</sup>nap)<sup>-1</sup>-ig emelkedett. Az átlagos biomassza hozam 17 g m<sup>-2</sup> volt és a biomassza sűrűsége 200 g kg<sup>-1</sup> érték körül stabilizálódott.

4. Az Algadisk reaktor második kísérleti összeállításában megnöveltük a fényintenzitást és teljes M8-a tápoldattal 43 napig üzemeltettük a rendszert, miközben 4 szüretelés történt. A biomassza termelésének rátája itt is növekedett a szüretnek során, viszont az értékek alacsonyabbak voltak, mint a korábbi esetben, 1-1,5 g (m<sup>2</sup>nap)<sup>-1</sup> között változott. Ehhez hasonlóan az átlagos biomassza sűrűség is csak 100 g kg<sup>-1</sup> körül mozgott, ami fele annak, amit alacsony fényintenzitás mellett tapasztaltunk. A kétféle vizsgált koronganyag, PVC és PP, nagyon hasonló eredményeket produkáltak, noha néhány esetben a biofilm hozam, fényhasznosítás nagyobb értékeket ért el. Annak az oka, hogy magasabb fényintenzitáson miért voltak alacsonyabbak a biomassza növekedések az alacsonyabb fényintenzitáshoz képest, még nem ismert és további kutatásra lenne szükség ennek a felderítésére.
5. Mútrágya használata, mint tápoldat, alacsony fényintenzitás mellett alkalmasnak bizonyult arra, hogy kiváltsa a költséges és munkaerő igényes standard tápoldatot. Az alga növekedése csak kis mértékben maradt a gazdag tápoldat értékei alatt, habár problémák merültek fel a pH szabályozásában. A legmagasabb biomassza produktivitás és sűrűség 1,7 g (m<sup>2</sup>nap)<sup>-1</sup> és 130 g kg<sup>-1</sup> volt.
6. A biomassza teljes zsírtartalmát és a zsír termelés hatékonyságát minden fentebb említett kísérlet esetén meghatároztuk, alacsony (Szüret #5, 6, 7) és magas fényintenzitáson, PVC és PP korongokon és mútrágya használatakor is, minden szüret esetében. A teljes zsírsavtartalma alacsony volt mind a teljes tápoldaton, mind a mútrágyán nőtt biomasszának, 4 % alacsony fényintenzitás, 5,5 % magas fényintenzitás mellett és 6,5% mútrágya esetén. A zsírsav hozam legmagasabb értéke 100 mg (m<sup>2</sup> nap)<sup>-1</sup> volt alacsony megvilágításnál, ami a magas biomassza hozamnak köszönhető. Annak érdekében, hogy tovább növeljük a zsírsavtartalmat, egy kétlépcsős kísérletet terveztünk, melyben először teljes tápoldattal támogatjuk a biofilm kialakulását és növekedését, majd a tápoldatot N-mentesre cseréljük. A N megvonása a rendszerből pozitívan hatott a sejtek lipid felhalmozására, ugyanis duplájára nőtt az értéke a kiindulási mennyiséghez képest elérve a 9,5%-ot. Noha, a folyamat igen lassú és a stressz hatására a szüret után nem volt biofilm újraképződés, ami komoly problémát jelent az Algadisk rendszer folyamatos üzemelésében.
7. A zsírsavak összetételét tekintve, a palmitinsav, metil-palmitát, olajsav, linolsav és α-linolénsav voltak a dominánsak, kisebb különbségekkel a kísérletek között. A biomassza zsírsav tartalmának biodízelre való felhasználása is lehetséges lenne a zsírsav összetétel alapján, mivel nagy arányban vannak jelen közepesen hosszú szénláncú, egyszeresen

vagy kétszeresen telítetlen zsírsavak. Egyéb értékes zsírsavak, mint az omega-3 és omega-6 többszörösen telítetlen zsírsavak is kimutathatóak voltak, viszont elhanyagolható mennyiségben. Az alacsony zsírsavtermelés miatt megállapíthatjuk, hogy a *Chlorella* sp #34 nem ideális biodízel előállítására.

8. A *H. pluvialis* biofilm formában történő növesztése sikeres volt a Twin Layer reaktorban, míg a hasonló próbálkozások az Algadisk rendszerben nem valósultak meg, nagy valószínűséggel a sejtek ülepedése miatt. A biofilm technológiának köszönhetően a *H. pluvialis* sejtek növekedését nem limitálta az egyébként stresszorként számon tartott 219  $\mu\text{mol foton (m}^2\text{s)}^{-1}$  erősségű fényintenzitás, hanem még fokozta is. A biomassza hozam és az alkalmazott fényerősségek között szoros kapcsolat van, 26  $\mu\text{mol foton (m}^2\text{s)}^{-1}$  esetén 31 g  $\text{m}^{-2}$  volt a maximális biofilm hozam, míg 219  $\mu\text{mol foton (m}^2\text{s)}^{-1}$  mellett ez megemelkedett 109 g  $\text{m}^{-2}$ -re. A biomassza növekedése minden esetben lineáris volt a 18 napos kísérlet során, így a biomassza produktivitást lineáris regresszióval számoltuk ( $R^2 > 0,93$ ), ami 5,8 g  $(\text{m}^2 \text{ nap})^{-1}$  maximális értéket ért el 219  $\mu\text{mol foton (m}^2 \text{ s)}^{-1}$  megvilágításnál.
9. Az asztaxantin termelést a magas fényintenzitás (219  $\mu\text{mol foton (m}^2 \text{ s)}^{-1}$ ) és a N megvonás kombinációja indukálta, ami így 0,5%-ról megemelkedett 3,5%-ra. A többi alkalmazott stressz, NaCl só eltérő koncentrációban, nem változtatta meg az biofilm asztaxantin tartalmát a vizsgált időszakon belül, ami így 1% alatt maradt, a kontrollal együtt. Annak ellenére, hogy a stressz faktorokat a 8. napon adtuk a rendszerhez, a biomassza növekedése lineáris maradt, és a biomassza produktívások 5,13 és 6,7 g  $(\text{m}^2 \text{ nap})^{-1}$  tartományban voltak. Ennek következtében, magas asztaxantin produktivitást kaptunk a N-mentes mintáknál, 300 mg  $(\text{m}^2 \text{ nap})^{-1}$ . Ez az érték hasonló a többi publikált eredményhez és ígéretes lehet piaci termelés esetén.
10. Összegezve a megfigyeléseket a két itt bemutatott biofilm rendszerről, elmondható, hogy az Algadisk technológia alkalmas hosszú távú, folyamatos üzemelésre rendszeres szüret-újránövekedési ciklusokkal. A működés során, csak kisebb problémák merültek fel, úgymint a korongok rövid idejű leállása és pH kiegyensúlyozatlanságok. Jelentős fertőzés nem volt észlelhető. A Twin Layer rendszer is problémák nélkül működött, noha meg kell említeni, hogy az Algadisk technológia már sokkal közelebb áll a nagyméretű és folyamatos alkalmazáshoz, köszönhetően a rendszeres szüreteléseknek és a biofilm újránövekedésének, a részben automatizálható szüretelési módszernek és a lépték növelhető, versenyképes korong anyagának. A növekedési körülmények és az értékes termékek indukálásának további optimalizálását követően, mindkét rendszerben nagy lehetőségek rejlenek a hatékony, nagy üzemi biomassza termesztés területén. Ez főleg a biofilm alapú technológiák főbb előnyeinek köszönhető, melyek a magas biomassza



denzítás, jobb fényhasznosítás, csökkentett vízhasználat, megemelkedett terület alapú produktivitás és a stressz indukció egyszerűsége.

## Tudományos publikációk

\***Sebestyén P**, Blanken W, Bacsa I, Tóth G, Martin A, Bhajji T, Dergez Á, Kesserű P, Koós Á, Kiss I (2016) **Upscale of a laboratory rotating disk biofilm reactor and evaluation of its performance over a half-year operation period in outdoor conditions.** *Algal Research*, Vol. 18, 266-272.

IF: 5.014

Kiperstok A C, **Sebestyén P**, Podola B, Melkonian M (2016) **Biofilm cultivation of *Haematococcus pluvialis* enables a highly productive one-phase process for astaxanthin production using high light intensities.** *Algal Research*, közlés alatt

IF: 5.014

**Sebestyén P**, Bhajji T, Salimbeni A, Blanken W, Bacsa I, Tóth G, Pomáz N, Molnár D, Kozák M, Kesserű P, Zhang Q, Libor Zs, Janssen M (2014) **ALGADISK-Novel algae-based solution for CO<sub>2</sub> capture and biomass production.** *European Biomass Conference and Exhibition Online Proceedings*.

Wootsch A, Bulkai A, Tóth G, Molnár D, Kozák M, Kesserű P, Koós A, **Sebestyén P**, Zhang Q, Libor Z, Blanken W, Cuaresma Franco M, Janssen M, Wijffels RH (2012) **Increasing the Competitiveness of European Non-Energy Algal Sector by a Novel Solution for Biomass Production.** *20th European Biomass Conference and Exhibition*, Session: 1CV.3.27; p. 440 – 449, DOI: 10.5071/20thEUBCE2012-1CV.3.27.

Dergez Á, Füvesi H, Koós Á, **Sebestyén P** (2014) **Inhibition of exopolysaccharide biopolymer and pyocyanin virulence factors produced by *Pseudomonas aurigosa* 1604 by salicylic compounds.** *Periodica Polytechnica Chemical Engineering* 58 (1) p. 75-80.

IF: 0.296

Összesített impakt faktor: 10.324

\*- a doktori disszertáció alapjául szolgált

## Szabadalom

Prof Dr Michael Melkonian, Dr Björn Podola, Alice Kiperstok, **Petra Sebestyén**: **A method of culturing *Haematococcus* species for manufacturing of astaxanthin**. PCT/EP2016/071270; 2016. szeptember 11.

## Poszterek

**Sebestyén P**, Dergez Á, Koós Á, Wootsch A, Kesserű P, Kiss I: ALGADISK- Introduction of a starting FP7 project (28687). *Proceeding of the 17<sup>th</sup> International Symposium on Analytical and Environmental Problems*, 2011. szeptember 19., Magyarország, Szeged, ISBN: 978-963-315-066-5.

**Sebestyén P**, Kesserű P, Koós Á, Dergez Á, Antal P, Tolmacsov P, Kiss I: Isolation of thermo-tolerant green microalgae for the new ALGADISK system and characterization of their lipid composition and productivity. *3rd International Conference on Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts*, 2013. június 16-18 Kanada, Toronto.

**Sebestyén P**, Dergez Á, Antal P, Koós Á, Dr. Kesserű P, Kozák M, Bacsa I, Dr. Kiss I: Biomass and lipid production by microalgae in a new biofilm based photobioreactor. *Fiatál Biotechnológusok Országos Konferenciája*, 2014. március 7., Magyarország, Szeged.

**Sebestyén P**, Dergez Á, Szabó Zs, Dr. Kesserű P: Development of an algal biomass production system. *Fiatál Biotechnológusok Országos Konferenciája*, 2014. március 7., Magyarország, Szeged.