

**Biogáz termelés lignocellulózból gazdag  
biomasszákból bioaugmentációval és  
előkezeléssel**

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**Strang Orsolya**

Témavezetők:

**Prof. Dr. Kovács L. Kornél, professzor  
Emeritus**

**Dr. Bagi Zoltán, egyetemi adjunktus**

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem,

Természettudományi és

Informatikai Kar

Biotechnológiai Tanszék

Szeged

2020

## Bevezetés

A mai társadalmunk nagyban függ az energiától, ezért az energiaválságnak komoly hatása van a gazdaságra is. Az utóbbi években, a szükséges energiamennyiség gyorsan emelkedett a világ növekvő népességének és jómódjának köszönhetően. 1990 és 2016 között több mint kétszeresére emelkedett a világ energia fogyasztása, 10901,84 TWh-ról 23106,86 TWh-ra (IEA – International Energy Agency World Energy Balances 2018 - <https://webstore.iea.org/world-energy-balances-2018>). A világ teljes energiaigényének nagy részét (több mint 84%) a nem megújuló fosszilis energiahordozók látják el, mint például a szén, kőolaj és földgáz. Ezeknek korlátozottak a kitermelhető készleteik és káros hatással vannak a környezetre, mivel felhasználásuk során üvegházhatású gázokat juttatunk a légkörbe (Sawatdeenarunat et al., 2015). Megoldást jelenthet az atomenergia és megújuló energiahordozók használata. Az atomenergia ugyan a káros anyag kibocsátás szempontjából tisztának számít, de az alkalmazásához szükséges hasadó anyag készletek is kimerülőben vannak és a radioaktív hulladék biztonságos elhelyezése, ártalmatlanítása nem megoldott. Világszerte majdnem minden ország érdekelt az új, tiszta és megújuló energia utánpótlás keresésében. Az elmúlt évtizedekben a

kutatási törekvések főként a szélenergiára, fotovoltaikus energiára és biomassza átalakításra (biodízel és bioetanol) összpontosítottak, kisebb érdeklődés kísérte a biogáz technológiákat. Az első generációs biomassza eredetű „zöld energia” élelmiszernövényekből készül, mint például a kukorica, cukornád és pálmaolaj, ezek lehetséges alternatívának tűntek a világ benzin és dízel függőségének enyhítésére. Azonban közvetve az élelmiszer árak növekedését okozták és így hozzájárultak a globális élelmiszer válsághoz. Ezért a második generációs bioüzemanyagok előállítására, ahol lehetőleg az egész biomasszát átalakítjuk, elengedhetetlen ahhoz, hogy jelentősen növeljük a fenntartható, megújuló energia részarányát (Guo et al., 2010).

A megújuló szerves anyagok anaerob lebontása során keletkező biogáz az egyik nagyon ígéretes alternatívája lehet a fosszilis-eredetű energiának. Az utóbbi időben, a lignocellulóz tartalmú biomassza, azaz a mezőgazdasági hulladékok és melléktermékek, egyre több figyelmet kapnak. A növényi biomasszából előállított metánban lévő energia végső soron a fotoszintézis során megkötött és mikroorganizmusok által biogázzá átalakított napenergia. Az így keletkező metán ezért szén-dioxid neutrálisnak tekinthető. A lignocellulóz tartalmú biomassza fő komponensei a cellulóz, a hemicellulóz és a lignin, amelyek együttesen egy nagyon ellenálló szerkezetet

hoznak létre. Ezért a lignocellulóz hidrolízise gyakran válik sebességmeghatározó lépéssé az anaerob lebontás folyamán. Az anaerob fermentáció folyamán, egy komplex, baktériumokat, gombákat, protozoákat és metanogén archeákat tartalmazó mikrobiális közösség a szerves anyagokat egy összetett mikrobiológiai táplálékláncban biogázzá alakítja. A biogázból tisztított biometán betáplálható a földgáz hálózatba, sűrítve vagy cseppfolyósítva pedig üzemanyagként hasznosítható (Holmes & Smith, 2016), a biometán minden területen kiválthatja a fosszilis földgázt.

Munkám során célul tűztem ki a lignocellulóz tartalmú biomasszák anaerob lebontásának vizsgálatát, hatékonyságának fokozását.

## Alkalmazott módszerek

Vizsgálataim során termofil biogáz termelő konzorciumokat adaptáltam cellulóz szubsztráthoz 0,5 liter térfogatú szakaszos üzemű fermentorokban. A keletkező biogáz mennyiségét vízkiszorításos módszerrel követtem. A keletkezett biogáz metán tartalmát gázkromatográf segítségével állapítottam meg. A fermentációs elegy pH-ját pH mérő segítségével mértem. A  $\beta$ -glükózidáz vagy exoglükánáz enzimek aktivitását spektrofotométer használatával határoztam meg. A fermentáció során keletkező illékony szerves savak mennyiségét nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC) vizsgáltam. A cellulózbontó mikrobákkal feldúsított konzorciumokat a nagy mennyiségben keletkező, lignocellulózban gazdag mezőgazdasági hulladékok (kukoricaszár és napraforgószár) anaerob lebontásának bioaugmentációjához használtam fel. A cellulózbontó kevert kultúrák mikroba összetételét új generációs szekvenálás és metagenomikai módszerekkel határoztuk meg. Megvizsgáltam a cellulolitikus kultúrák fenntarthatóságának stabilitását: miután felhasználás során többször átoltottam és  $-80^{\circ}\text{C}$ -ra lefagyasztottam a kultúrákat, az eredeti dúsítást követő 4. évben megismételtük a szekvenálást és az adatokat genom és read-alapon végzett metagenomikai kiértékeléssel is megvizsgáltuk.

A cellulózbontó konzorciumok bioaugmentációs képességét összehasonlítottam a konzorciumokban legnagyobb gyakorisággal előforduló baktériumok tiszta kultúráinak augmentációs képességével. Vizsgáltam mindkét lignocellulózból gazdag biomassza cellulózbontó mikroorganizmusokkal végzett előkezelésének, illetve bioaugmentációjának anaerob fermentációkra gyakorolt hatásait. Statisztikai és irodalmi adatok alapján összegeztem a Magyarországon éves szinten elérhető és biogáz alapanyagként felhasználható kukorica- és napraforgószár biomassza mennyiségét és kiszámítottam, hogy ezekből mennyi metán nyerhető ki, annak mennyi az energiatartalma, azaz milyen mértékben járulhatnának ezek a mezőgazdasági melléktermékek a hazai megújuló energiatermeléshez.

## Eredmények

1. Sikeresen adaptáltam termofil anaerob biogáz fermentorban működő mikroba közösséget  $\alpha$ -cellulóz szubsztráthoz. A hatékony cellulóz hidrolízist a  $\beta$ -glükózidáz enzimaktivitásának nyomon követésével igazoltam. A dúsítás sikerességét a csoportunk által korábban igazolt bioaugmentációs képességgel rendelkező cellulolitikus törzs (*Caldicellulosiruptor saccharolyticus*) segítségével bizonyítottam: a dúsított konzorciumok közel azonos mértékben fokozták a biogáz hozamot (14%), mint a *Ca. saccharolyticus* (11%). Az adaptációs folyamat első szakaszához képest a második szakaszban 52%-kal emelkedett a cellulóz 1 gramm szerves szárazanyagra vonatkoztatott biogáz hozama.
2. Két, egymástól függetlenül izolált cellulózbontó konzorciumot hoztam létre. Ezek mikrobiológiai összeételének meghatározása érdekében újgenerációs szekvenálást végeztünk a közösségekből származó teljes genomi DNS-en. A feldúsított konzorciumok tagjainak és relatív abundanciájának meghatározását MG-RAST programcsomag és az NCBI M5nR adatbázis használatával végeztük. A konzorciumokat meghatározó rendek a *Thermoanaerobacterales* és *Clostridiales* voltak. A 4

legabundánsabb fajt *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Caldanaerobacter subterraneus*, *Thermoanaerobacter pseudethanolicus* és *Ruminiclostridium cellulolyticum*-ként azonosítottuk. A cellulózbontó közösségek összetételének hosszabb ideig való megőrzését 4 évnyi használatukat követő újbóli szekvenálással ellenőriztem. Ekkor a read alapú kiértékelést a Kraken programcsomagjával és a RefSeq adatbázis felhasználásával végeztük. Az eltérő bioinformatikai eljárások, illetve adatbázisok potenciális hibáinak kiküszöbölésére az első szekvenálás adatait is újra kiértékeljük. Az eredmények alapján a közösségeket felépítő rendek továbbra is a *Thermoanaerobacteriales* és *Clostridiales* voltak, a legnagyobb abundanciával jelen lévő faj is megegyezett a korábbi eredménnyel, a *T. thermosaccharolyticummal*. Viszont az alacsonyabb abundanciájú törzsek *Thermoanaerobacterium xylanolyticum*, *Hungateiclostridium clariflavum*, *Hungateiclostridium thermocellum* és *Thermoclostridium stercorarium* voltak. Ekkor az eredmények megerősítése és alátámasztása érdekében genom alapú kiértékelést alkalmaztunk. 10 bint sikerült összeilleszteni, ezek között volt a *T. thermosaccharolyticum*, *H. clariflavum* és *H.*



*thermocellum* is. A kétféle megközelítés igazolta egymást és bizonyította, hogy a konzorciumok stabilan fenntarthatók.

3. A kukoricaszár mellett a szintén mezőgazdasági mellékterméknek számító napraforgószár biometán potenciáljának vizsgálatát is elvégeztem mezofil és termofil körülmények között egyaránt. A kukoricaszár metán potenciálja mindkét hőmérsékleten meghaladta a napraforgószár értékeit. A metántermelés intenzifikálása érdekében összehasonlítottam az előkezelés vagy bioaugmentáció hatását mezofil illetve termofil cellulózbontó baktériumok segítségével. Nem tapasztaltam szignifikáns különbséget a két módszer között egyik szubsztrát esetén sem: mezofil körülmények között a kukoricaszár kumulatív metán hozama a bioaugmentációval, illetve előkezeléssel 6-9%-kal emelkedett, míg a napraforgószár esetén ezek az értékek 9-12% voltak; termofil körülmények esetén 8-12%-kal, illetve 26% és 21%-kal emelkedett a hozam.
4. A sikeresen azonosított cellulózbontó konzorciumokat bioaugmentációs kísérletekben teszteltem. Vizsgáltam a lignocellulóz tartalmú kukoricaszár mezőgazdasági melléktermék anaerob fermentációjára gyakorolt hatásukat. A mikrobák a nem adaptált természetes biogáz termelő rendszerhez adva 22-24%-kal fokozták a biogáz és metán hozamot, melynek mértéke meghaladta az adaptációval elért

eredményt. Ezzel igazoltam, hogy az adaptációt kiválthatjuk bioaugmentációval.

5. Összehasonlítottam a cellulózbontó konzorciumokban talált leggyakoribb baktériumok tiszta kultúráinak bioaugmentációs képességét a két kevert kultúrával. Az általam izolált konzorciumok hatásfoka meghaladta a tiszta kultúrákét, illetve keverékükét. A konzorciumok 22-24%-kal fokozták a metán hozamot, míg ezzel szemben a tiszta kultúrák és keverékük 11%-kal. Ez arra utal, hogy a feldúsított közösségek kevésbé abundáns tagjai is számottevően hozzájárulnak a biológiai aktivitáshoz.
6. Kiszámítottam, hogy Magyarországon éves szinten mekkora mennyiségű kukorica- és napraforgószár keletkezik, amelyet fel lehetne használni biogáz előállításához. Megbecsültem az ezekből a szubsztátokból kinyerhető metán mennyiségét, illetve ennek az energiatartalmát (13 084 GWh), amely képes lenne fedezni a magyarországi háztartások éves energiafelhasználását, tehát nagyban hozzájárulhatna a hazai megújuló energiatermeléshez.

## Tudományos közlemények

A doktori eljárás alapját képező közlemények:

1) Orsolya Strang, Norbert Ács, Roland Wirth, Gergely Maróti, Zoltán Bagi, Gábor Rákhely, Kornél L Kovács: Bioaugmentation of the thermophilic anaerobic biodegradation of cellulose and corn stover, *Anaerobe* 46 pp. 104-113., 10 p. (2017) IF: 2,742

2) Zoltán Bagi, Norbert Ács, Tamás Böjti, Balázs Kakuk, Gábor Rákhely, Orsolya Strang, Márk Szuhaj, Roland Wirth, Kornél L Kovács: Biomethane: The energy storage, platform chemical and greenhouse gas mitigation target, *Anaerobe* 46 pp. 13-22., 10 p. (2017) IF: 2,742

Referált folyóiratban megjelent közlemények:

1) Orsolya Strang, Norbert Ács, Roland Wirth, Gergely Maróti, Zoltán Bagi, Gábor Rákhely, Kornél L Kovács: Bioaugmentation of the thermophilic anaerobic biodegradation of cellulose and corn stover, *Anaerobe* 46 pp. 104-113., 10 p. (2017) IF: 2,742

2) Zoltán Bagi, Norbert Ács, Tamás Böjti, Balázs Kakuk, Gábor Rákhely, Orsolya Strang, Márk Szuhaj, Roland Wirth, Kornél L Kovács: Biomethane: The energy storage, platform chemical

and greenhouse gas mitigation target, Anaerobe 46 pp. 13-22.,  
10 p. (2017) IF: 2,742

3) Kornél L Kovács, Norbert Ács, Etelka Kovács, Roland Wirth, Gábor Rákhely, Orsolya Strang, Zsófia Herbel, Zoltán Bagi: Improvement of Biogas Production by Bioaugmentation, BioMed Research International 2013 Paper: 482653, 7 p. (2013) IF: 2,880

4) Norbert Ács, Etelka Kovács, Roland Wirth, Zoltán Bagi, Orsolya Strang, Zsófia Herbel, Gábor Rákhely, Kornél L Kovács: Changes in the Archaea microbial community when the biogas fermenters are fed with protein-rich substrates, Bioresource Technology 131 pp. 121-127., 7 p. (2013) IF: 5,039

**Összesített IF: 13,403**

MTMT azonosító: 10035941

Egyéb szakmai anyagok:

1) Kornél L Kovács, Roland Wirth, Balázs Kakuk, Tamás Böjti, Orsolya Strang, Etelka Kovács, Gábor Rákhely, Zoltán Bagi: Novel substrates and process management approaches for efficient biogas production, In: Biogas Science 2018: International Conference on Anaerobic Digestion (2018) p. 58

2) Orsolya Strang, Zoltán Bagi, Gábor Rákhely, Kornél L Kovács: Bioaugmentation of the anaerobic degradation of corn stover and sunflower stalk with cellulolytic microorganisms , Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 64: Suppl. 1. pp. 169-170., 2 p. (2017)

3) Orsolya Strang, Norbert Ács, Roland Wirth, Zoltán Bagi, Gábor Rákhely, Kornél L Kovács: Enhancement of the thermophilic anaerobic biodegradation of lignocellulose-rich substrates, In: Biogas, Science 2016 (szerk.) Biogas Science 2016 Conference (2016) pp. 66-66., 1 p.

4) Orsolya Strang, Norbert Ács, Roland Wirth, Gergely Maróti, Zoltán Bagi, Gábor Rákhely, Kornél L Kovács: Potential candidates for improvement of anaerobic degradation of lignocellulosic biomass pp. 153-154., In: Jörgen Held, Frank Scholwin (szerk.) Conference Proceedings 2nd International Conference on Renewable Energy Gas Technology, Lund, Svédország: Renewable Energy Technology International AB, (2015) p. 164

5) Orsolya Strang, Norbert Ács, Roland Wirth, Gergely Maróti, Zoltán Bagi, Kornél L Kovács: Potential candidates for improvement of anaerobic degradation of lignocellulosic

biomass, *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 62: Suppl. 1. pp. 101-102., 2 p. (2015)

6) Kornél L Kovács, Norbert Ács, Tamás Böjti, Etelka Kovács, Orsolya Strang, Roland Wirth, Zoltán Bagi: Biogas Producing Microbes and Biomolecules, In: Xuefeng Lu (szerk.) *Biofuels: From Microbes to Molecules*, London, Egyesült Királyság / Anglia: Caister Academic Press, (2014) pp. 47-92., 46 p.

7) Zoltán Bagi, Norbert Ács, Tamás Böjti, Balázs Kakuk, Etelka Kovács, Orsolya Strang, Roland Wirth, Kornél L Kovács: Example Strategy: Smart specialisation in the Field of Agribusiness/biomass (2013), Mission of the Four Motors within the Framework of the EU Strategy for the Danube Region, konferencia előadás, 2013.07.02. Novi Sad,

8) Balázs Kakuk, Orsolya Strang, Norbert Ács, Etelka Kovács, Gábor Rákhely, Kornél L Kovács, Zoltán Bagi: Biogas fermentation from high cellulose content biomass (2013), Straub Napok: Szeged, MTA Szegedi Biológiai Központ, 2013. május 29–30.,

9) Balázs Kakuk, Orsolya Strang, Norbert Ács, Etelka Kovács, Gábor Rákhely, Kornél L Kovács, Zoltán Bagi: The impact of bacterial pretreatment on corn stover for biogas production,

Buletinul Agir / Agir Scientific Bulletin 18: Suppl. 1. pp. 9-12.,  
4 p. (2013)

10) Balázs Kakuk, Orsolya Strang, Norbert Ács, Etelka Kovács,  
Gábor Rákhely, Kornél L Kovács, Zoltán Bagi: The impact of  
bacterial pretreatment on corn stover for biogas production, In:  
Conference on Advances in Environmental Sciences (2013) pp.  
93-96., 4 p.

11) Orsolya Strang, Zoltán Bagi, Kornél L Kovács: Biogas  
production from cellulose rich substrates, Buletinul Agir / Agir  
Scientific Bulletin 18: Suppl. 1. pp. 134-137. (2013)

12) Orsolya Strang, Zoltán Bagi, Kornél L Kovács: Anaerobic  
biodegradation of cellulose-rich substrates, Acta  
Microbiologica et Immunologica Hungarica 60: Suppl. 1. p. 234  
(2013)

13) Orsolya Strang, Zoltán Bagi, Norbert Ács, Etelka Kovács,  
Roland Wirth, Kornél L Kovács: Biogas production from  
cellulosic substrates, Acta Microbiologica et Immunologica  
Hungarica 60: Suppl. 1. pp. 80-81., 2 p. (2013)

14) Orsolya Strang, Zoltán Bagi, Kornél L Kovács: Biogas  
production from cellulose rich substrates, In: Conference on  
Advances in Environmental Sciences (2013) pp. 83-87., 5 p.

15) Zoltán Bagi, Etelka Kovács, Roland Wirth, Norbert Ács, Tamás Böjti, Orsolya Strang, Balázs Kakuk, Kornél L Kovács: Microbiology and Biotechnology of Biogas Production, In: Frece, J; Kos, B; Mrša, V (szerk.) Power of Microbes in Industry and Environment, Zágráb, Horvátország: Croatian Microbiological Society, (2013) pp. 18-18., 1 p.

## Köszönetnyilvánítás

A dolgozatban bemutatott munka az NKFIH GOP-1.1.1-11-2012-0128, GINOP-2.2.1-15-2017-00081 projektek és az EU Horizon 2020 research and innovation program, BIOSURF project (contract number 646533) anyagi támogatásával készült.