

DOKTORI ÉRTEKEZÉS (Ph.D.) TÉZISEI

**A POLIHIDROXI-ALKÁNSAVAK ÉS A HIDROGÉN METABOLIZMUS
KAPCSOLATA EGY FOTOTRÓF BÍBOR KÉNBAKTÉRIUMBAN**

Fülöp András

Témavezetők:

Prof. Kovács L. Kornél
egyetemi tanár

Dr. Rákhely Gábor
egyetemi docens

Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biotechnológiai Tanszék



Szeged

2012

Bevezetés

Az emberiség nagy energiaéhségét a Föld kimerülő fosszilis energia készletei lassan nem képesek fedezni. A napenergia, - mint kifogyhatatlan energiaforrás - hasznosítása az egyik legígéretesebb lehetőség, ha átalakítjuk környezetbarát, tárolható energiahordozóvá, (mint pl. biohidrogén, biogáz vagy bioetanol), és az ebből történő energiafelszabadítás kevés károsanyag kibocsátással jár.

A hidrogén igen környezetbarát energiahordozó, melynek oxidációja során csak víz keletkezik.

A hidrogén előállítható kémiai és biológiai módszerekkel.

A hidrogén biológiai úton történő előállításának kulcsenzimeit a hidrogenázok és nitrogenázok.

A hidrogenáz enzimek olyan ősi fehérjék, amelyek a természetben előforduló legegyszerűbb molekula, a H_2 képződését vagy elbontását katalizálják, vagyis kizárólag a hidrogén-metabolizmusra specializálódtak.

A hidrogén termelésére a másik lehetőséget a nitrogenázok jelentik. A nitrogénfixáló mikroorganizmusok a légköri N_2 -t, a saját és végülis a többi élőlény számára is elérhető nitrogén forrássá, ammóniává alakítják, mely során jelentős mennyiségű H_2 képződik.

A fototróf baktériumok a növekedési körülmények függvényében többféle tartalék tápanyagot képesek raktározni (elemi ként, glikogént, polihidroxi-alkánsavakat (PHA-kat) és polifoszfátokat). A raktározott PHA-k a sejtek számára könnyen elérhető szén- és redukálóerő forrást jelentenek.

A PHA-nak sejten belül fontos szerepe van a stressztűrésben, a növény-mikróba kölcsönhatásban, illetve a bennük raktározott redukálóerő és energia számos metabolikus folyamat szükségleteit elégíthetik ki.

A PHA-k, mint biológiailag lebontható műanyagoknak az ipari felhasználása is jelentős (csomagolóanyagipar, orvosi alkalmazások stb) mivel jó néhány alkalmazásban képesek kiváltani a szintetikus polimereket.

A *Thiocapsa roseopersicina* BBS fototróf bíbor kénbaktériumot a metabolikus sokszínűség jellemzi, képes számos szubsztrátot felhasználni, illetve többféle tartalék tápanyagot tud elraktározni.

Csoportunk korábbi és jelenleg is folyó kutatásaiból kiderül(t), hogy a *T. roseopersicina* hidrogén metabolizmusa kapcsolatban áll(hat) a kén-, glikogén-, glükóz, acetát stb.metabolizmussal és így az ezekből származó elektronokat képes (lehet) hidrogén termelésére is felhasználni.

Célkitűzések

A fototróf baktériumban raktározott PHA-k elsősorban szén és energia forrást jelentenek a sejtek számára, de megfelelő körülmények között hidrogén termelésére is felhasználhatóak

A polihidroxi-alkánsavak raktározása általában valamilyen tápanyagkomponens - pl nitrogén vagy foszfor – hiányában indul be. A dolgozatban olyan nitrogén limitált körülményeket alkalmaztunk, ahol a nitrogénáz működésbe lép és hidrogént termel. Ilyen körülmények között a hidrogenázok a hidrogén oxidációját katalizálják, ezért kísérleteimhez egy aktív hidrogenázokat nem tartalmazó *T. roseopersicina* törzset (DC12B) választottam.

Munkám során legfőbb célom volt, hogy:

- megtaláljam, a poliészter raktározásához optimális szénforrást és körülményeket

- a *T. roseopersicina*-ban azonosítsam a polihidroxi-alkánok szintézisében és lebontásban részt vevő géneket.
- megvizsgáljam a polihidroxi-alkánok szerepét a nitrogénáz katalizálta hidrogén termelésben.
- valamint megnézzem a külső elektrondonorok (tioszulfát és/vagy szukcinát) hatását a hidrogén termelésre a poliészterek jelenlétében/ vagy hiányában.

Módszerek

Számos szubsztrátot (szén- és nitrogén forrást) teszteltem, hogy megtaláljam a *T. roseopersicina* számára, PHA-k raktározására optimális szén és nitrogénforrást. A *T. roseopersicina* genomi szekvenciájából származó adatokat felhasználva, bioinformatikai módszerekkel azonosítottam és jellemeztem a PHA-k bioszintézisében (*phaBPRACE*) és lebontásában (*phaZ*) részt vevő géneket. Az általánosan elfogadott DNS manipulációs eljárások segítségével egy a PHA-k bioszintézisében mutáns törzset (PH12B) hoztam létre aktív hidrogenázt nem tartalmazó törzsben (DC12B).

A plazmidokat *Escherichia coli* –ba kémiai transzformációval, *T. roseopersicina*-ba konjugációval jutattam be. A DC12B és PH12B hidrogén termelését, illetve a poliészterek mennyiségi változását gázkromatográfiával követtem nyomon. A tioszulfát és borostyánkősav mennyiség változásait spektrofotométerrel, illetve HPLC-vel követtem a hidrogén termelés során.

A nitrogénáz aktivitást acetilén redukciós módszerrel vizsgáltam.

Eredmények

Munkám során a *Thiocapsa roseopersicina* polihidroxi-alkánsav metabolizmusát, vizsgáltam. Továbbá tanulmányoztam a poliészterek szerepét a nitrogénázhhoz kapcsolt hidrogén termelésben. Ezen vizsgálatok során a következő eredményeket értem el:

- I. Számos szén forrást tesztelve (ecetsav, piroszőlősav, borostyánkősav) az ecetsav bizonyult a PHA-k raktározásához optimális szubsztrátnak, illetve az általam vizsgált körülmények között a raktározásához ideális C/N arányt (122:1) a 10 g l^{-1} acetát és $0,17 \text{ g l}^{-1}$ glutamát biztosította. Ezen körülmények között a sejtek száraz tömegének kb. 31%-t polihidroxi-alkánsavak alkották.
- II. A *T. roseopersicina* genom adatbázisában azonosítottam és jellemeztem a PHA-k bioszintézisében (*phaBPRACE*) és lebontásában (*phaZ*) részt vevő két genomi régiót.
- III. A PhaC és PhaZ fehérjék filogenetikai törzsfáit összehasonlítva jelentős eltérést találtam, mely a PHA-k szintézisében és degradációjában részt vevő enzim(ek) egymástól független evolúciójára és egy lehetséges horizontális géntranszferre utal.
- IV. A PHA-k hidrogén anyagcserében betöltött szerepének vizsgálatához egy PHA-k bioszintézisében mutáns törzset (PH12B) hoztam létre aktív hidrogenázt nem tartalmazó törzsben, mely sejtvonal nem volt képes poliésztereket felhalmozni.

V. A PHA-k raktározást és a hidrogén termelést elkülönítve sikerült egy hatékony kétlépcsős hidrogén termelő rendszert optimalizálnom.

VI. Külső szén-, nitrogén- és elektronforrás hiányában a DC12B és PH12B törzsek hidrogén termelését összehasonlítva, a poliésztert tartalmazó sejtekben (DC12B) jelentősen magasabb hidrogén termelést figyeltem meg. A hidrogén termelésben tapasztalt számszerű különbség a poliészterek degradációjából származtatható, amit a poliészterek mennyiségének csökkenése is alátámaszt.

VII. Kimutattam, hogy a tápoldat kiegészítése tioszulfáttal (a CO₂ asszimiláció elsődleges elektron forrása) mindkét törzsben fokozza a hidrogén termelést. Ez a hatás a tioszulfát többirányú szerepének tulajdonítható: i) elektronokkal látja el a nitrogénázt a quinon raktáron keresztül, ii) fokozza az *in vitro* nitrogénáz aktivitást, iii) eddig ismeretlen mechanizmus révén fokozza a poliészterek bomlását.

Közlemények

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények

Fülöp, A., Béres, R., Tengölics, R., Rákhely, G., Kovács, K.L. (2012) Relationship between PHA and hydrogen metabolism in the purple sulfur phototrophic bacterium *Thiocapsa roseopersicina* BBS. Közlésre elfogadva: *Int J Hydrogen Energy*.

IF: 4,053

Fülöp, A., Rákhely, G., Kovács, K.L. Polyhydroxyalkanoates role in hydrogen production in a purple sulphur bacteria. Poszter közlemény: 7th European Workshop on Bacterial Respiratory Chains, 2011 Május 11-15, Backagarden, Svédország.

Rákhely, G., Béres, R., **Fülöp, A.**, Latinovics, D. and Kovács, K.L. Connection between hydrogen metabolism and biopolymer storage materials in purple photosynthetic bacteria. Poszter közlemény: Biotechnical Functionalisation of Renewable Polymeric Materials COST 868 meeting. 2008 Április 17-18, Pozsony, Szlovákia.

A dolgozathoz nem kapcsolódó, egyéb közlemények

Kiss, I., Oskolás, H., Tóth, R., Bouillet, P., Tóth, K., **Fülöp, A.**, Scholtz, B., Ledent, C.A., Fésüs, L. and Szondy, Z. (2006) Adenosine _{A2A} receptor-mediated cell death of mouse thymocytes involves adenylate cyclase and Bim and is negatively regulated by Nur77. *Eur J Immunol* **36**:1559-71.

IF: 5,005

Kovács, Á.T., Rákhely, G., Browning, D.F., **Fülöp, A.**, Maróti, G., Busby, S.J.W., Kovács, K.L. (2005). An FNR-type regulator controls the anaerobic expression of Hyn hydrogenase in *Thiocapsa roseopersicina*. *J Bacteriol* **187**(8):2618-27.

IF: 4,175

Kovács, Á.T, Rákhely, G., Balogh, J., Maróti, G., **Fülöp, A.**, Kovács, K.L. (2005) Anaerobic regulation of hydrogenase transcription in different bacteria. *Biochem Soc Trans* **33**(1):36-8.

IF: 2,579

Kovács, K.L., Kovács, Á.T., Maróti, G., Mészáros, L.S., Balogh, J., Latinovics, D., **Fülöp, A.**, Dávid, R., Dorogházi, E., Rákhely, G. (2005) The hydrogenases of *Thiocapsa roseopersicina*. *Biochem Soc Trans* **33(1)**:61-3.

IF: 2,579

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**:321–30.

IF: 0,876

Kovács, K.L., **Fülöp, A.**, Herbel, Z., Nyilasi, A., Rákhely, G. (2010) Tiszta, megújuló energia a biohidrogén, *Környezetvédelem XVIII.(2)*:20-21

Poszterek

Béres, R., **Fülöp, A.**, Szász, I., Kovács, L.K., Zinn, M. & **Rákhely, G.** *Biopolymers in phototrophic bacteria: special bioplastics and source of biofuels*. 7th International Conference on Polymer and Textile Biotechnology, 2011 Március 02-04, Milánó, **Olaszország**.

Rákhely, G., Balogh, J., Balogh, T., **Fülöp, A.**, Győri, E., Latinovics, D., Palágyi-Mészáros, L.S., Novák, J., Tengölics, R. & Kovács, K.L. *Synthesis and utilization of biopolymers in purple photosynthetic bacteria*. First annual workshop of the COST 868 Action on Biotechnical functionalisation of renewable polymeric materials, 2007 Szeptember 12-14, Grác, **Ausztria**.

Fülöp, A., Kovács, Á.T., Klem, J., Rákhely, G., Kovács, K.L. *The function and regulation of the fnrt gene in the purple sulfur photosynthetic Thiocapsa roseopersicina BBS*. Modern Trends in Biological Sciences: Seeking an Integrative approach 1st ITC Alumni Meeting, Szegedi Biológiai Központ, 2006 Október 19-20, Szeged, **Magyarország**.

Fülöp, A., Kovács, Á.T., Klem, J., Rákhely, G., Kovács, K.L. *The function and regulation of the fnrt gene in the purple sulfur photosynthetic bacterium*. Straub Napok, Szegedi Biológiai Központ, 2006 November 15-17, Szeged, **Magyarország**.

Maróti, G., Bagi, Z., Rákhely, G., Takács, M., Tóth, A., Kovács, Á.T., Bálint, B., Mészáros, L.S., Balogh, J., **Fülöp, A.**, Latinovics, D., Dávid, R., Dorogházi, E., Nyilasi, A., Kovács, K.L. Biohydrogen, biogas. Biovision, 2005 Április 11-15, Lyon, **Franciaország**.

Kovács, Á.T, Rákhely, G., Browning, D.F., **Fülöp, A.**, Maróti, G., Busby, S.J.W., Kovács, K.L. *An FNR-type regulator controls the anaerobic expression of Hyn hydrogenase in Thiocapsa roseopersicina*. Straub Napok, Szegedi Biológiai Központ, 2004 December 7-9, Szeged, **Magyarország**.

Kovács, Á.T., Rákhely, G., Browning, D.F., **Fülöp, A.**, Maróti, G., Busby, S.J.W., Kovács, K.L. *An FNR-type regulator controls the anaerobic expression of Hyn hydrogenase in Thiocapsa roseopersicina*. International Hydrogenase Conference, 2004 Augusztus 24-29, Reading, **Nagy Britannia**.

Kovács, Á.T, Rákhely, G., **Fülöp, A.**, Browning, D.F., Busby, S.J.W., Kornél, K.L. *FNR, anaerob regulátor egy fototóf baktériumban*. Magyar Biokémiai Egyesület Kongresszusa, 2004 Május 10-13, Sopron, **Magyarország**.

Kovács, Á.T., Rákhely, G., Maróti, G., Balogh, J., Latinovics, D., **Fülöp, A.**, Busby, S., Kovács, K.L. *Regulation by light, oxygen and hydrogen in a purple sulfur photosynthetic bacterium*. Conference on Molecular Microbiology: Exploring Prokaryotic Diversity, 2004 Április 22-26, Heidelberg, **Németország**.

Összesített impakt faktor: 19,267