

BIOHIDROGÉN TERMELÉS CELLULÓZ BIOMASSZÁBÓL

Doktori értekezés tézisei

Herbel Zsófia



Témavezetők:

Dr. Rákhely Gábor
Prof. Dr. Kovács L. Kornél

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszék

Szeged
2013

Bevezetés

Földünk népességének növekedése az emberiség rohamos ütemben történő energiafelhasználására és a környezetünk szennyezésére is hatással van. Az energia előállítása jelenleg a legnagyobb mértékben fosszilis energiahordozókból történik, ami számos, közvetlenül, vagy közvetetten az életünkre gyakorolt negatív következménnyel jár. Egyrészt ezeket a készleteket teljesen kimerítjük, másrészt felhasználásuk következtében az üvegházhatású gázok tovább növekednek. Ezek legsúlyosabb velejárója pedig egy globális felmelegedés, amiből számos további következmény származtatható.

A hidrogén egy ígéretes energiahordozó, mivel felhasználása során teljes mértékben CO₂-emissziómentes. Biológiai úton is előállítható: egyrészt fotoszintetizáló mikroorganizmusokkal közvetlenül a napfény energiáját felhasználva, másrészt heterotróf, hidrogéntermelő élőlényekkel. Ez utóbbiak valamilyen külső szerves tápanyagforrásból (ami gyakran glükóz, keményítő, vagy cellulóz) fejlesztenek hidrogént. Poliszaharidokon kívül más típusú szerves hulladékok is használhatóak. A biomasszából történő mikrobiális hidrogéntermelés egyre intenzívebben tanulmányozott megközelítés az alternatív bioüzemanyagok előállítására. A növényi poliszaharidokból történő biohidrogén termelésre a hőkedvelő

mikroorganizmusok alkalmasabbak, mint mezofil társaik, mivel a magasabb hőmérsékletű, anaerob fermentációs folyamatok gyorsabbak.

Kutatásaim modellorganizmusa az anaerob, hőkedvelő *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* baktérium volt. 2007-ben megismert genomjának szekvenciája felfedte, hogy kiterjedt poliszacharid bontó enzimmal és nagyszámú – a keletkezett cukrok sejtbe való bejuttatásához szükséges – ABC transzporterrel rendelkezik. Továbbá két, a hidrogén termelésért felelős hidrogenáz enzime is van. Ezen tulajdonságai teszik kiváló jelöltté a CBP folyamatában megvalósuló szénhidrát polimerekből történő hidrogén előállítására. Az eljárás azonban a legtöbb esetben a biomassza fizikai, vagy kémiai előkezelését igényli.

Célkitűzés

A kutatási témám egyszerre két nagyon fontos szempontot foglal magába. Az egyik, hogy teljesen környezetbarát úton szabadulhatunk meg a feldolgozóipar (fa- és papíripar) nehezen lebomló melléktermékeitől, a másik, hogy ezen szerves anyagok hasznosítása során a mikroorganizmus a feleslegben keletkező redukáló erőből hidrogént termel.

Munkám elsődleges célja volt ezért, hogy megvizsgáljam termeltethető-e hidrogén növényi biomasszából biológiai úton anélkül, hogy azt előzetesen enzimatikusan előkezelnénk. Ha igen, akkor a konverzió hatékonysága fokozható-e. Céлом volt még, hogy a folyamat háttérében álló fehérje szintű változásokat is feltérképezzem molekuláris biológiai módszerekkel.

Fontosnak tartottam még, hogy a kidolgozott eljárás nagyobb léptékben is működőképes legyen, hiszen hosszú távon csak így állhatja meg a helyét a gyakorlati életben is.

Konkrét feladataim tehát a következők voltak:

1. Enzimekkel nem előkezelt, cellulóz biomassza hasznosítása *C. saccharolyticus*-szal hidrogén termelésre egy lépcsős rendszerben. A lebontás folyamata során mérhető paraméterek nyomonkövetése kis térfogatú szakaszos fermentációkban.
2. A glükóz jelenlétének vizsgálata a nem előkezelt cellulóz bontására.
3. További cukrok – xilóz, mannóz, fruktóz, ramnóz, laktóz, szacharóz – hatásának vizsgálata a cellulóz biodegradációjára.
4. A cellulóz biokonverziójának léptéknövelése.

5. A cellulóz hidrolíziséért és a hidrogén termelődéséért felelős gének expressziós szabályozásának vizsgálata egészszejtes transzkriptom analízissel és reverz transzkripció kapcsolt qPCR-rel.
6. Egy cellulóz alapú ipari hulladék hidrogénné történő biokonverziójának vizsgálata.

Anyagok és módszerek

Munkám során a két féle típusú cellulóz biomassza anaerob lebontását kis térfogatú hypovial üvegekben, valamint 5,9 literes végtérfogatú, szakaszos üzemű Biostat C fermentorokban végeztem. A kiindulási tápoldatként minden esetben csak sókat tartalmazó minimál tápdatot használtam. A lebontási folyamat során melléktermékként képződött hidrogén mennyiségét gázkromatográf segítségével mértem. Az alkalmazott törzs mennyiségének alakulását Bürker-kamrás számolással határoztam meg.

Az egész sejtes transzkriptom analízis új generációs szekvenálási technológián (NGS) alapuló SOLiD4 típusú készülékkel történt. A kapott eredmények egy részének validálását az Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System készülékkel végeztem. A

specifikus indító szekvenciák megtervezése az Applied Biosystem Primer Express 3.0 program segítségével történt.

A mikrobák szaporítását, fenntartását az általános gyakorlatnak megfelelően végeztem.

Eredmények

1. Eddigi kutatási eredményeim egyértelműen bebizonyították, hogy a *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* képes a kezeletlen szűrőpapírt, mint egyedüli szénforrást teljes mértékben lebontani. A kis térfogatú és a léptéknövelt fermentálásoknál egyaránt azt találtam, hogy a sejtszám-, a pH-változás és a hidrogéntermelés is jól korrelál egymáshoz. Amint megindul a sejtek szaporodása a szubsztráton, azzal egyidőben nagyon hasonló intenzitással keletkezik a hidrogén és tolódik el a pH a savas tartomány felé a sejtek metabolikus aktivitásának eredményeként.
2. Számos egyszerű és diszacharidnak (glükóz, fruktóz, cellobióz, laktóz, ramnóz) többféle koncentrációban tanulmányoztam a hatását a cellulózbontás maximális hatékonysága és sebessége tekintetében. Következtetésem,

hogy az összes eddig vizsgált cukor valamilyen mértékben segíti a papír degradációját, de a glükóz hatása a legfigyelemreméltóbb a megtermelt hidrogén mennyiségét illetően, valamint a legtöbb esetben elegendő az alacsonyabb cukorkoncentráció a gyorsabb és hatékonyabb átalakításhoz.

3. A glükózzal kiegészített cellulóz enzimatiskus hidrolízisének időtartama nem csak jelentős mértékben lerövidül, hanem ezen tápközeg esetén a csak cellulózt tartalmazó kultúrához képest kétszer annyi mennyiségű hidrogén termelődik.
4. Annak a kérdésnek a megválaszolására, hogy a cukor direkt, vagy indirekt hat a sejtek általi konverziós folyamatra egész sejtes transzkriptom analízist alkalmaztunk. A nagymennyiségű transzkriptomikai adatból kiválogattam azokat a géneket, melyek fehérje termékei a cellulóz lebontásában és a cellulózból történő hidrogén termelés hátterében állhatnak. A kapott expressziós értékeket valós idejű qPCR készülék segítségével validáltam. A transzkriptomikai vizsgálat megerősítette azt a feltételezésünket, hogy a glükóz pozitívan hat a celluláz enzimek termelődésére, illetve számos a cellulóz hasznosulásának folyamatába szerepet játszó gén kifejeződését is pozitívan, vagy negatívan befolyásolja. A

kvantitatív PCR alkalmazásával pedig sikerült egy, az eddigieknél pontosabb képet kapnunk a különféle fermentációk során mind a hidrogén termelésben, mind pedig a cellulóz lebontásában kulcsszerepet játszó fehérjék mennyiségi változásáról.

Eredményeim tehát arra engednek következtetni, hogy a glükóz elsődlegesen a sejtek szaporodására hat és ehhez transzkripciós változás is társul.

5. Munkám során a szűrőpapír mellett egy valós szubsztrátból, a dunaujvárosi Dunapack Zrt-ből származó, enzimatikusan nem előkezelt papíriszapból is sikeresen állítottam elő biohidrogént.
6. Összevetve a kísérleteimhez felhasznált kétféle cellulóz biomasszát, kijelenthetem, hogy a *C. saccharolyticus* 1 g szerves anyagra vonatkoztatva a szűrőpapírt kétszer olyan hatékonyan alakítja át hidrogénné, mint a papíriszapot. A komplex szubsztrát gyengébb hasznosítási hatásfokának okát további kísérletekben kell tisztázni.

Az értekezés témájához szorosan kapcsolódó közlemények

Zsófia Herbel, Gábor Rákhely, Zoltán Bagi, Galina Ivanova, Norbert Ács, Etelka Kovács and Kornél L. Kovács: *Exploitation of the extremely thermophilic Caldicellulosiruptor saccharolyticus in hydrogen and biogas production from biomasses* (Environmental Technology, Volume 31, Issue 8-9, 2010; IF(2010): 1.007)

Zsófia Herbel, András Tóth, Kornél L. Kovács, Zoltán Bagi, Gábor Rákhely: *Sugar facilitated hydrolyzation of untreated cellulosic waste* (Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica (60) pp.149, 2013; IF(2012): 0,645)

Zsófia Herbel, A. Tóth, K. L. Kovács, G. Rákhely: *Conversion of cellulose containing plant biomass to hydrogen by Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica (58) pp. 33-34, 2011; IF(2010): 0,625)

Zsófia Herbel: *Biohydrogen production using the cellulose containing plant biomass* (Acta Biologica Szegediensis 53:(1) p. 63, 2009)

További közlemények

K. Bélafi-Bakó, D. Búcsú, Z. Pientka, B. Bálint, **Z. Herbel**, K. L. Kovács, M. Wessling: *Integration of biohydrogen fermentation and gas separation processes to recover and enrich hydrogen* (International Journal of Hydrogen Energy 31 (2006) pp.1490-1495); IF(2006): 2,612)

K. L. Kovács, N. Ács, E. Kovács, R. Wirth, G. Rákhely, O. Strang, **Zs. Herbel**, and Z. Bagi: *Improvement of Biogas Production by Bioaugmentation* (Journal of Biomedicine and Biotechnology 2013: doi: 10.1155/2013/482653; IF(2013): 2.880)

Kornél L. Kovács, Z. Bagi, B. Bálint, J. Balogh, E. Dorogházi, **Zs. Herbel**, D. Latinovics, L. Mészáros, G. Maróti, K. Perei, A. Tóth, A. Varga, and G. Rákhely: *Biohydrogen and some biotechnological applications* (International Symposium on Environmental Biocatalysis, Cordoba, Spanyolország, 2006)

Herbel Zsófia, Bálint Balázs, Takács Mária, Tóth András, Perei Katalin, Bagi Zoltán, Rákhely Gábor, Kovács L. Kornél: *Állati eredetű hulladékok biológiai úton történő hasznosítása* (I. Nemzetközi és Környezettudományi Vízgazdálkodási Konferencia, Szarvas, Magyarország, 2007)

Zsófia Herbel, Balázs Bálint, Zoltán Bagi, Katalin Perei, Gábor Rákhely, Kornél L. Kovács: *Biodegradation of keratin-containing wastes: molecular approach* (Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 52: pp. 56-57, 2005)

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, Volume 131, pp. 121-127 (2013); IF(2013): 4,750)

Kovács Kornél, Fülöp András, **Herbel Zsófia**, Nyilasi Andrea, Rákhely Gábor: *Tiszta, megújuló energia a biohidrogén* (Környezetvédelem2010:(2) pp. 20-21.)

Posztterek

Zsófia Herbel, András Tóth, Norbert Ács, Kornél L. Kovács and Gábor Rákhely: *Glucose promoted cellulose hydrolysis by Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (Straub-napok Szeged, Magyarország 2013)

Zsófia Herbel, Balázs Bálint, Zoltán Bagi, Katalin Perei, Gábor Rákhely, Kornél L. Kovács: *Biodegradation of keratin-containing wastes:molecular approach* (1st Central European Forum for Microbiology, Keszthely, Magyarország 2005)

Zsófia Herbel, Balázs Bálint, Mária Takács, András Tóth, Katalin Perei, ZoltánBagi, Gábor Rákhely and Kornél L. Kovács : *Conversion of animal wastes to biohydrogen* (I.Nemzetközi és Környezettudományi Vízgyógyászati Konferencia, Szarvas, Magyarország, 2007)

Gyula Orosz, József Klem, Ildikó Rácz, Katalin F. Medzihradzsk, Zsuzsanna Darula, Emília Szájli, **Zsófia Herbel**, Gábor Rákhely and Kornél L. Kovács : Proteomes of the cellulose degrading hydrogen producing bacterium, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* grown on various sugars (Straub Napok, Szeged, Magyarország, 2010)

Előadások

Herbel Zsófia, Bálint Balázs, Rákhely Gábor, Kovács L. Kornél: *Környezetvédelem a makromolekulák szintjén: keratintartalmú hulladékok biotechnológiai hasznosítása* (X. OFKD, Alkalmazott ökológia, környezetvédelmi technológiák szekció, Eger, Magyarország, 2006)

Zsófia Herbel, Gábor Rákhely, Kornél L. Kovács: *Caldicellulosiruptor saccharolyticus, paper decomposition, genetic* (Hyvolution WP 2 meeting, Szeged, Magyarország 2009)

Zsófia Herbel, András Tóth, Kornél L. Kovács, Gábor Rákhely: *Cellulóz alapú biomassza Caldicellulosiruptor saccharolyticussal történő átalakítása hidrogénné* (A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2010. évi Nagygyűlése, Keszthely, Magyarország, 2010)

Zsófia Herbel, András Tóth, Kornél L. Kovács, Zoltán Bagi, Gábor Rákhely: *Sugar facilitated hydrolyzation of untreated cellulosic waste* (4th Central European Forum for Microbiology, Keszthely, Magyarország 2013)

Szabadalom

Bélafiné Bakó K., Gubicza L., Búcsú D., Molnár F.-né, Kiss L., Pientka Z., Kovács K., Rákhely G., Bálint B., **Herbel Zs.**: *Eljárás biológiai úton képződő hidrogén kinyerésére és dúsítására* (Lajstromszám: P 05 00581, Magyarország, 2005)

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a Biotechnológiai Tanszék minden dolgozójának a kutatásom során nyújtott segítséget és a nagyon kellemes, baráti légkört.

Köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek Dr. Rákhely Gábornak, hogy lehetővé tette, hogy befejezzem Ph.D tanulmányomat, a szakmai tanításáért, ötleteiért, türelméért és a sok éves támogatásáért.

Köszönetemet szeretném kifejezni prof. Dr. Kovács Kornélnak, hogy lehetőséget adott arra, hogy a Biotechnológiai Tanszéken végezzem kutatásaimat és Ph.D tanulmányokat kezdhessek. Köszönöm, hogy mindig bizalommal fordulhattam hozzá, szakmai tanácsait, segítőkészségét, emberségét és a személyes beszélgetéseket, melyek a nehéz pillanatokban erőt adtak.

Külön szeretném megköszönni Dr. Bálint Baláznak, hogy elvállalta és irányította szakdolgozati témámat, továbbá, hogy alapos,

körültekintő munkavégzésre tanított meg és aki mellett nem csak szakmailag, hanem emberileg is fejlődhettem.

Sok-sok köszönettel tartozom Dr. Bagi Zoltánnak, hogy mindig minden körülmény között számíthattam önzetlen segítségére, barátságára és akitől nagyon sok hasznos tanácsot kaptam a kísérleteim során.

Köszönöm Dr. Tóth Andrásnak a munkám során nyújtott együttműködését, értékes ötleteit.

Köszönöm továbbá Dr. Maróti Gergőnek a transzkriptomikai vizsgálatokhoz nyújtott segítségét.

Hálás szívvel köszönöm a testvéremnek Dr. Herbel Krisztinának, a nagymamámnak, az Édesanyámnak, a sógoromnak Csóti Ferencnek, és a kedvesemnek Boros Attilának a szeretetüket, hogy mindvégig mellettem álltak, támogattak és hogy hittek bennem.

Köszönöm Szűcs Attilának, Dr. Szőri-Dorogházi Emmának, Molnár Mártának, Kis Ágnesnek, Nyilasi Andreának, Latinovics Dórának, Dr. Sija Évának, Lengyel Mónikának, és minden kedves barátomnak a számtalan örömteli pillanatot, beszélgetést, segítséget, a sok erőt és biztatást amit kaptam a munkahelyen és a magánéletben egyaránt.