

**Magas fehérjetartalmú ipari hulladékok anaerob  
fermentációjának fokozása adaptált mikrobaközösség  
segítségével**

Ph.D. Tézisek

*Készítette:*

**Kovács Etelka**

*Témavezetők:*

**Prof. Kovács Kornél  
Dr. Bagi Zoltán**

**Biológus Doktori Iskola**

Szegedi Tudományegyetem, Természettudományi és  
Informatikai Kar  
Biotechnológiai Tanszék

Szeged  
2014

## Bevezetés

A XXI. századi jóléti társadalmunk energiafogyasztása rohamosan növekszik és ezzel egyidejűleg a környezet szennyezése kritikus méreteket öltött, amelyek megoldásán, illetve jelentős csökkentésén komolyan el kell gondolkodnunk. A világ energiafelhasználása jelenleg éves szinten mintegy 220 EJ körülire tehető (DOE/EIA-0484, 2013). Ennek a hatalmas energiamentiségnek napjainkban 78%-át fosszilis energiahordozók felhasználásával fedezzük. A gazdaságosan kitermelhető készletek kimerülése azonban belátható időn belül bekövetkezik, ezért új lehetőségek után kell néznünk (Energia a Napból, 2013). A megújuló energia előre láthatóan közel 50%-kal fog növekedni a következő 35 évben, azonban a jóslatok szerint ebből a biomassza-eredetű energia csupán 3 EJ/év lesz (DOE/EIA-0484, 2013). Napjainkban a biomassza-növények és a növényi alapú anyagok használata kerül előtérbe, amelyek ha nem is csökkentik a légkörbe jutó CO<sub>2</sub> -ot, de legalább nem növelik a körforgásban lévő szén mennyiségét (Reményi, 2007). A biomassza-felhasználás jelentősen segíthet csökkenteni – azonban jelenlegi tudásunk alapján – nem tudja teljesen kiváltani a fosszilis energiahordozókat (Biomass Program, 2008). Az utóbbi húsz évben jelentősen csökkent ugyan a szén-dioxid kibocsátás, de a bázisévekhez képest a csökkenés éppen csak eléri a 6%-ot (Reményi, 2007). Az Európai Unió 2020-ra előírta az üvegházhatást okozó gázok 20%-kal történő csökkentését, mindeközben a megtermelt energia szintén 20%-t megújuló forrásokból kívánja fedezni (Federal waste management plan, 2006). Magyarország 14,65% csökkentést vállalt, jelenleg ez a szám 7% körül mozog, tehát sok tennivaló vár ránk a következő években.

Az oxigéntől elzárt körülmények között zajló lebontás és az ehhez kapcsolódó biogáz előállítás egy, a környezetvédelem szempontjából kifejezetten vonzó módja a szerves hulladékok ártalmatlanításának. A biogáz előállítása számos környezetvédelmi problémában nyújthat segítséget, így a hulladékkezelésben,

## Magyar nyelvű közlemények

Kovács KL, Kovács E, Ács N, Bagi Z (2009) Mikrobák a biogáz fermentorokban. Környezetvédelem. 17, 10-11.

Kovács KL, Kovács E, Ács N, Wirth R, Bagi Z (2010) Egy különösen hasznos megújuló energiahordozó: a biogáz. Energetika, 11, 5-8.

Kovács E, Wirth R, Bagi Z, Kovács KL (2013) Szabadalom a biogáztermelésben. ZIP Magazin, 3, 14.

## Konferencia kiadványokban megjelent közlemények

Kovács KL, Bagi Z, Ács N, Kovács E, Wirth R, Rákhely G (2011) Biohydrogen and Biogas Biotechnology. Proc. The Bioenergy Question: Reality or Wishful Thinking. Tulln, Austria, pp. 11-13.

Kovács KL, Bagi Z, Ács N, Kovács E, Wirth R, Maróti G, Rákhely G (2011) Engineering biogas microbial communities. Proc. 1<sup>st</sup> Int. Conf. on Biogas Microbiology. Leipzig, Germany. p. 46.

Ács N, Bagi Z, Kovács E, Wirth R, Rákhely G, Kovács KL (2011) Monitoring archaea and selected strains of bacteria in a biogas producing system via their unique genes. Proc. 1<sup>st</sup> Int. Conf. on Biogas Microbiology. Leipzig, Germany. p. 66.

Bagi Z, Ács N, Kovács E, Kovács KL (2011) Anaerobic fermentation of distillery thin stillage. Proc. 1<sup>st</sup> Int. Conf. on Biogas Microbiology. Leipzig, Germany. p. 68.

Bagi Z, Kovács E, Wirth R, Ács N, Böjti T, Strang O, Kakuk B, Kovács KL (2013) Microbiology and biotechnology of biogas production. In: Teparic, R., Frice, J., Mrsa, V (eds). Power of Microbes in industry and Environment. Zagreb: Croatian Microbiological Society ISBN: 978-953-7778-06-4. pp. 18.

Bagi Z, Ács N, Kovács E, Kovács KL (2013) Anaerobic fermentation of distillery thin stillage. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 60:3. IF(2013): 0,787

Strang O, Bagi Z, Ács N, Kovács E, Wirth R, Kovács KL (2013) Biogas production from cellulosic substrates. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 60:80-81. IF(2013): 0,787

Wirth R, Kovács E, Maróti G, Bagi Z, Rákhely G, Kovács KL (2013) Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 60:108. IF(2013): 0,787

**Összesített IF: 3,683**

a környezetszennyezés csökkentésében, valamint a széndioxid-semleges megújuló energia előállításában és a mezőgazdasági gyakorlatban a tápanyagok talajba való visszajuttatását tudja elősegíteni (Tafdrup, 1995). Az így előállított nyers biogáz – amelynek 1 m<sup>3</sup>-e megközelítőleg 0,5 liter gázolajjal egyenértékű – tisztítás és dúsítás után számos felhasználási lehetőséget kínál, például használhatjuk fűtésre, elégethetjük gázmotorban és ezáltal elektromos áramot és hőt termelhetünk, vagy tisztítás után földgázhálózatba vezethetjük, ezt követően pedig közlekedési járműveinket tankolhatjuk vele, vagy bármely olyan célra felhasználhatjuk, amire ma földgázt használnak.

## Célkitűzés

Felismerve az óriási mennyiségben keletkező, hasznosításra váró fehérjében gazdag ipari és mezőgazdasági melléktermékek biogáz formájában történő ártalmatlanításának és hasznosításának szükségességét célul tűztem ki:

1. Olyan eljárás kidolgozását, amely – az anaerob lebontást végző mikroba közösség összetételének megváltoztatásával – a biogáz termelő rendszert fokozatosan hozzászoktatja a szakmai irodalomban ismert határok többszörösét meghaladó fehérje-alapanyagokhoz.
2. Az ismert megoldások továbbfejlesztésével eljárást dolgoztunk ki fehérjében gazdag alapanyagok fokozott mennyiségben való adagolására és ilyen melléktermékek monoszubsztrátokként történő (pl. sertés vér, kazein) ártalmatlanítására biogáz termelő rendszerekben.
3. Metagenom-vizsgálattal tanulmányozzuk a mikrobaközösség összetételében bekövetkező változásokat a fehérjeadaptáció során.
4. A metagenom-analízis alapján kiválasztott törzsek tiszta tenyészeit visszajuttatjuk a rendszerbe a feltételezett előnyös hatásuk tesztelése érdekében.
5. Összehasonlító vizsgálatokban meghatározzuk az adaptált fehérje hasznosító mikrobaközösségek hatékonyságát, a biogáztermelés fenntarthatóságát.

Kovács E, Bagi Z, Kovács KL (2013) Relationship between the substrate C/N ratio and the composition of microbial community in biogas reactors. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 60:162. IF(2013): 0,787

**Összesített IF: 20,690**

## Szabadalmi bejelentés

Kovács E, Kovács KL, Maróti G, Wirth R, Rákhely G, Bagi Z, Ács N (2013) Production of biogas from protein rich resources. P1100510 sz. magyar szabadalmi bejelentésből származó PCT/HU2012/000092 sz. nemzetközi bejelentésnek megfelelő 12805746.0 alapszámú európai bejelentés.

## További közlemények

Herbel Zs, Rákhely G, Bagi Z, Ivanova G, Ács N, Kovács E, Kovács KL (2010): Exploitation of the extremely thermophilic *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* in hydrogen and biogas production from biomasses. Environmental Technology 31:(8-9): 1017-1024. IF(2010): 1.007.

Ács N, Rákhely G, Bagi Z, Kovács E, Kovács KL (2011) The usage of real-timePCR to monitor specific eubacteria in biogas producing systems. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 58:1-2. IF(2011): 0,551

Kovács KL, Bagi Z, Kovács E, Maróti G, Szögi-Dorogházi E, Ács N, Wirth R, Tengölics R, Fülöp A, Rákhely G (2011) Industrial microbiology for the production of biohydrogen and biogas. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 58:171-172. IF(2011): 0,551

Kakuk B, Strang O, Ács N, Kovács E, Rákhely G, Kovács KL, Bagi Z (2013) The impact of bacterial pretreatment on corn stover for biogas production. Bul. AGIR, 1:9-12.

## A dolgozat témájához szorosan kapcsolódó közlemények

Kovács E, Wirth R, Maróti G, Bagi Z, Rákhely G, Kovács KL (2013): Biogas production from protein-rich biomass: fed-batch anaerobic fermentation of casein and of pig blood and associated changes in microbial community composition. Plos One, 8:(10) e77265; IF(2013):3,730

Ács N, Kovács E, Wirth R, Bagi Z, Strang O, Herbel Zs, Rákhely G, Kovács, KL (2013): Changes in the Archaea microbial community when the biogas fermenters are fed with protein-rich substrates. Bioresource Technology 131: 121-127. IF(2013): 4,750

Kovács KL, Ács N, Kovács E, Wirth R, Rákhely G, Strang O, Herbel Z, Bagi Z (2013): Improvement of biogas production by bioaugmentation. BioMed Research International, ArticleID482653, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/482653> IF(2013): 2,880

Wirth R, Kovács E, Maróti G, Bagi Z, Rákhely G, Kovács KL (2012): Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. Biotechnology for Biofuels 5:1-16. IF(2012): 5,552

Kovács E, Bagi Z, Ács N, Kovács KL (2011) Biogas production from protein rich substrates. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 58:54-55. IF(2011): 0,551

Bagi Z, Ács N, Kovács E, Kovács KL (2011) Improvement of biogas production via microbiology. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 58:3-4. IF(2011): 0,551

Wirth R, Kovács E, Maróti G, Bagi Z, Rákhely G, Kovács KL (2013) Characterization of a biogas producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. Bul. AGIR, 1:5-8. IF(2011): 0,551

Kovács E, Wirth R, Maróti G, Bagi Z, Ács N, Kovács KL (2013) Changes in microbial community metagenome upon adaptation to protein substrate. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 60:36-37. IF(2011): 0,551

Ács N, Bagi Z, Kovács E, Wirth R, Kovács KL (2013) Monitoring the biogas producing archaea community via molecular biological methods. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 60:1. IF(2013): 0,787

## Módszerek

Vizsgálataim során fehérjéhez akklimatizált mikroba-inokulumot állítottam elő, ez különböző típusú 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. Az enzimaktivitás vizsgálatát spektrofotometriás méréssel végeztem. A keletkezett biogáz minőségi összetételét gázkromatográf segítségével határoztam meg. A fermentációs folyamat során keletkező intermediereket nagy pontosságú folyadék kromatográfia (HPLC) alkalmazásával követtem nyomon. A fermentor mikroba összetételének megállapítása metagenom szekvenálás útján történt. A lebontási hatékonyság fokozására, illetve a biogáz termelés növelése érdekében bejuttatott mikrobák mennyiségének alakulását kvantitatív PCR technika segítségével követtem nyomon. A mikrobák szaporítását, fenntartását az általános gyakorlatnak megfelelően végeztem.

## Eredmények

1. A dolgozatban bemutattam, hogy kidolgoztam egy olyan eljárást, amely során a biogáz termelő rendszer hozzászokott a magasabb fehérje- és így a magasabb nitrogén-bevitelhez. Így jelentősen magasabb ammóniakoncentrációt is képesek elviselni a mikrobák, mint az a korábbi szakirodalom alapján várható volt. Az adaptáció alapja a rendszerben élő mikrobák proteáz aktivitásának követése volt.

2. A dolgozatomban bemutattam, hogy a biogáz termelő rendszer megfelelő adaptációs időszakot követően képes a fehérjében gazdag alapanyagok

fokozott lebontására és ilyen melléktermékek monoszubsztrátokként történő (pl. sertés vér, kazein) ártalmatlanítására anaerob körülmények között. A fehérjében gazdag alapanyagok, hulladékok anaerob fermentációval történő ártalmatlanítására korábban csak olyan eljárásokat dolgoztak ki és alkalmaztak, amelyek ilyen anyagokat kis arányban való adagolását javasolták. Eredményeink megdöntötték azt a biogáz termelésben alkalmazott dogmát, mi szerint a szerves anyagok anaerob lebontását végző reaktorokban megbízhatóan csak 20-30 körüli szén/nitrogén aránnyal rendelkező szubsztrátok kezelhetők.

3. Sikeresen igazoltuk metagenom-vizsgálattal, hogy a mikrobaközösség összetételében jelentős változások történtek a fehérjeadaptáció során. Új generációs DNS szekvenálással nyert adataink segítségével részletes, nemzetség illetve faj szintre kiterjesztett képet nyertünk a biogáz fermentorokban tevékenykedő mikroba közösség összetételéről, az egyes mikroba csoportok relatív előfordulási gyakoriságáról. Eredményeink jó egyezést mutattak más, hasonló metagenomikai vizsgálatok következtetéseivel. Általánosításként megállapíthattuk, hogy a biogáz fermentorokban eltérő működtetési paraméterek mellett is egyrészt kialakul egy hasonló összetételű, csaknem állandó összetételű „törzs” közösség, másrészt ehhez társulva olyan mikrobák jelennek meg, amelyek egyedi, az adott környezetre és alapanyagra jellemző csoportot alkotnak. Ezek a megfigyelések hozzájárulnak a biogáz termelő mikroba közösségek szerkezetének tudatos, a helyi igényekhez alkalmazkodó kialakításához, az anaerob fermentáció hatékonyságának biotechnológiai eszközökkel megvalósítható javításához.

4. A metagenom-analízis alapján kiválasztottam a *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, valamint a *Pseudomonas fluorescens* törzseket, amelyek

tiszta tenyészeit visszajuttatva a fermentorokba sikerült intenzifikálni a rendszert. A kiválasztott baktériumok tiszta tenyészeinek keveréke a metántermelés 50% körüli növekedését érte el előzetes adaptáció nélkül. Ezzel bizonyítottuk, hogy megfelelő mikroba konzorcium összeállításával valóban lehet stabil, jelentősen megnövekedett biogáz termelést megvalósítani a szubsztrát összetétel hirtelen megváltozása esetén is, ami a „természetes” közösségeket tartalmazó biogáz fermentorokban igen gyakran üzemeltetési zavarokat, akár az egész anaerob lebontási folyamat leállítását eredményezi. Figyelemre méltó, hogy a kiválasztott baktérium törzsek korábban is jelen voltak a biogáz termelő közösségben, a tiszta kultúrák adásával csak az előfordulási arányukat változtattam meg a rendszerben.

5. Összehasonlító vizsgálatok során meghatároztam az adaptált fehérje hasznosító mikrobaközösségek hatékonyságát, a biogáz termelés fenntarthatóságát. Kvantitatív PCR-rel nyomon követtem a baktériumtörzsek mennyiségi változását a fermentorokban. A baktériumok leoltását követő 3 hónapban mennyiségük a reaktorokban hamar beállt egy egyensúlyi szintre, amelyet a fermentáció végéig megtartottak. Ezzel támasztottam kísérletesen alá, hogy a tapasztalt változásokért és biogáz hozam növekedésért valóban a hozzáadott baktérium törzsek voltak felelősek.