

# **Fehérjékben gazdag állati hulladékok felhasználása biohidrogén termelésére**

Ph.D. téziszfüzet

*Készítette:*

Bálint Balázs

*Témavezetők:*

Prof. Kovács L. Kornél

Dr. Rákhely Gábor

Biológia Doktori Iskola

SZTE TTIK Biotechnológiai Tanszék

MTA SZBK Biofizikai intézet

Szeged,

2008

## Bevezetés

Napjainkban az elektromos áram előállítása, a fűtés és közlekedés mind elsősorban a fosszilis energiahordozóktól függ. A földgáz, kőolaj és szén elégetésével óriási mennyiségű szén-dioxid kerül az Föld légterébe, ami nagyban hozzájárul a bolygónkon tapasztalható klímaváltozáshoz. Ráadásul a rendelkezésünkre álló fosszilis tüzelőanyag készletek néhány évtizeden belül kimerülhetnek, mivel képződésük üteme lényegesen lassabb, mint kitermelésük sebessége. Mindezek a problémák arra ösztönzik a kutatókat, hogy alternatív, környezetbarát energiahordozókat találjanak, amelyek megújuló energiaforrásokból is előállíthatóak. A hidrogén egyike a legígéretesebb jelölteknek, hiszen elégetése során kizárólag tiszta víz keletkezik. Számos megújuló energiaforrás alkalmas hidrogén előállítására, köztük a napenergia, szélenergia, vízi energia vagy éppen a biomassa.

Az elmúlt években a biológiai hidrogéntermelés egy igen intenzíven kutatott tudományterületté vált. A fotoszintetizáló cianobaktériumok, zöldalgák, bíbor baktériumok segítségével fényenergia felhasználásával termeltethető hidrogén, míg más baktériumok, archaebaktériumok - fermentatív anyagcsere útvonalaik révén - kiválóan használhatóak arra, hogy olcsó szerves anyagokból termeljenek hidrogént.

A mezőgazdaság és a húsipar révén hatalmas mennyiségben keletkeznek különféle szénhidrátokban és fehérjékben gazdag hulladékok, melyek környezetbarát ártalmatlanítása jelenleg igen költséges. Ugyanakkor ezek a szerves hulladékok alkalmasak lehetnek arra, hogy hidrogéntermelő mikrobák táplálékául szolgáljanak. A biológiai hulladékkezelés és a sötét fermentáción alapuló biohidrogén-termelés kombinációja egyidejűleg két problémára is megoldást jelenthet. Egy kombinált eljárás révén olcsó, környezetbarát módon bonthatóak le különféle mezőgazdasági hulladékok és egyidejűleg alternatív energiahordozó, hidrogén is előállítható.

# Célkitűzés

Munkám célja az volt, hogy létrehozzak egy hulladékhasznosító rendszert, amely a fehérjékben gazdag állati eredetű hulladékokból (toll, szőr, húsliszt) hasznos terméket, hidrogént képes előállítani. Ezen célok elérése érdekében a következő kérdésekre próbáltam választ kapni:

## **1. Kétlépéses, keratin hulladékot hasznosító fermentációs rendszer kidolgozása.**

- Felhasználható-e a *Bacillus licheniformis* KK1 törzssel bontott toll oldata hidrogéntermelő mikroorganizmusok tápanyagaként? Több potenciális jelölt közül melyik hidrogéntermelő törzs használható a kétlépéses rendszerben?
- Melyek a hidrogéntermelés szempontjából optimális tollbontási körülmények?
- Megoldható-e a hidrogéntermelő lépés léptéknövelése?
- A csirketollon kívül más keratin tartalmú hulladékkal (disznószőrrel, libatollal) is működtethető-e a rendszer?.
- Milyen hidrogén kihozatal érhető el a különféle keratin hulladékok felhasználása során?

## **2. A kétlépéses rendszer módosítása húsliszt hasznosítására.**

- Felhasználható-e a húsliszt hidrogéntermelő mikroorganizmusok tápanyagaként?
- Megoldható-e a hidrogéntermelő lépés léptéknövelése?
- Milyen hidrogén kihozatal érhető el húsliszt felhasználása során?

### 3. A hulladék bontás felgyorsítása molekuláris biológiai eszközökkel

- Mi a *B. licheniformis* keratinázt kódoló génjének a nukleotidsorrendje?
- Lehetséges-e a *Bacillus* keratinázt működőképes formában túltermeltetni *E. coli* gazdasejtben.

## Módszerek

Mind Erlenmeyer-lombikban, mind egy Braun Biostat DCU 3 típusú fermentor 1 literes üvegedényében bontottam a csirketollat *B. licheniformis* KK1 törzs felhasználásával. A sejtmentes tápoldatok fehérjetartalmának és fehérjemintázatának időbeni változását megfigyelve nyomon követtem a tollbontási folyamatokat. A toll bakteriális kezeléséből származó hidrolizátumokon több potenciális hidrogéntermelő mikroorganizmust (*Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, *Escherichia coli* K12, *Thermococcus litoralis* és *Pyrococcus furiosus*) növesztettem, valamint meghatároztam a törzsek hidrogéntermelését gázkromatográfiás módszer segítségével. A csirketollon kívül egyéb keratin hulladékok (sertésszőr, libatoll, húsliszt) bakteriális bontásából származó peptid oldatokat is kipróbáltam *T. litoralis* tápanyagforrásaként. A hidrogéntermelő lépés léptéknövelő kísérleteit egy 6,9 liter térfogatú szakaszos üzemű (batch) fermentorban végeztem el.

A *B. licheniformis* KK1 törzs keratinázának klónozásához nagy pontosságú PCR reakciót végeztem. A DNS munkák során standard DNS manipulációs technikákat alkalmaztam, valamint követtem a felhasznált anyagok, enzimek, eszközök gyártóinak útmutatásait. A keratináz *E. coli*-ban történő heterológ túltermeltetéséhez egy pBAD/gIII alapú túltermelő konstrukciót készítettem el. A keratináz aktivitást spektrofotométer segítségével, kromogén peptid (N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA) felhasználásával detektáltam.

## Eredmények

Eredményeim a következő pontokban foglalhatóak össze:

1. Kifejlesztettem egy minimál tápoldatot (CMSY) és egy mérési módszert annak eldöntésére, hogy különféle szerves anyagok alkalmazhatóak-e hipertermofil hidrogéntermelő mikroorganizmusok tápanyagaként.
2. *Bacillus licheniformis* KK1 törzs felhasználásával, Erlenmeyer-lombikban 84 óra alatt sikerült egész csirketollat lebontatnom. Igazoltam, hogy hidrolízis során a tápoldatban kisméretű peptidek halmozódnak fel. Megállapítottam a hidrogéntermelés szempontjából legkedvezőbb keratinbontási időtartamot.
3. Több hidrogéntermelő mikroorganizmus (*Escherichia coli*, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, *Thermococcus litoralis* és *Pyrococcus furiosus*) összehasonlítását követően megállapítottam, hogy a *T. litoralis* a legalkalmasabb jelölt a keratin hidrolizátumon történő hidrogéntermelésre.
4. Megállapítottam, hogy a csirketoll kevertetési fermentációjához a szubsztrátot előzetesen őrölni kell. Megvalósítottam a keratin bontó lépés 3,5-szeres léptéknövelését szabályozott, fermentoros körülmények között. Bizonyítottam, hogy a fermentáció 138. órájára a toll dara elbomlik, miközben kisméretű peptidekben gazdag tápoldat keletkezik.

5. Bizonyítottam, hogy a toll bontásából kapott tápoldat a költséges Bacto- Peptone-hoz hasonlóan használható *T. litoralis* tápanyagforrásaként.
6. Egy magas hőmérsékletű fermentorban megvalósítottam a keratin hidrolizátumon végzett hidrogén termelés 125-szörös léptéknövelését. A hidrogéntermelő fermentációt fermentorban elvégezve az addigi legmagasabb hidrogén koncentrációt és hidrogén kihozataalt tapasztaltam.
7. A kétlépéses fermentációs eljárást sertésszőr és húsliszt hasznosítására adaptáltam. Megmutattam, hogy a fermentációs eljárás révén számos állati eredetű hulladékból hidrogéngáz termeltethető.
8. Izoláltam a *B. licheniformis* KK1 keratinázát kódoló *kerA* gént, majd meghatároztam annak nukleotidsorrendjét.
9. A keratináz *E. coli*-ban történő túltermeltetéséhez létrehoztam egy fehérje túltermelő konstrukciót. A pBLK-BAD vektorral transzformált, indukált *E. coli* sejtek periplazmájában aktív keratináz jelenlétét mutattam ki.

## **A dolgozat témájához szorosan kapcsolódó közlemények**

Balázs Bálint, Zoltán Bagi, András Tóth, Gábor Rákhely, Katalin Perei, and Kornél L. Kovács Utilization of keratin-containing biowaste to produce biohydrogen. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, 69:404-410

Balázs Bálint: Biohydrogen production from keratin-containing animal wastes, *Acta Biol Szeged* 2006, 50(3-4):137

K. Bélafi-Bakó D. Búcsú. Z. Pientka, B. Bálint, Zs. Herbel, K.L. Kovács, M. Wessling Integration of biohydrogen fermentation and gas separation processes to recover and enrich hydrogen. *Int J Hydrogen Energ*, 2006, 31:1490-1495

B. Bálint, Z. Bagi, A. Tóth, K. Perei, K. L. Kovács and G. Rákhely Biohydrogen production from keratin-containing wastes Proceedings of HYPOTHESIS VI (Hydrogen Power Theoretical and Engineering Solutions International Symposium p. 411-422 (2005).

Bálint B., Tóth A., Rákhely G., Perei K., Bagi Z., Pónya B., Kovács L. K.: Hogyan lesz a tollból tiszta hidrogén?, Műszaki Kémiai Napok, Veszprém, 2004

## **A dolgozat témájához szorosan kapcsolódó, Magyarországon bejelentett szabadalmak**

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, P0500581, 2005

Bálint B., Tóth A., Rákhely G., Perei K., Bagi Z., Pónya B., Kovács L. K.

Mikrobiológiai eljárás keratintartalmú hulladékok lebontására, az eljárással előállított biomassza, és a biomassza alkalmazása mikroorganizmusok tápközegeként, P0203998, 2002

## **További közlemények**

Zoltán Bagi, Norbert Ács, Balázs Bálint, Lenke Horváth, Krisztina Dobó, Katalin R. Perei, Gábor Rákhely and Kornél L. Kovács: Biotechnological intensification of biogas production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76:473-482

R. Horváth, T. Orosz B. Bálint, M. Wessling, G. H. Koops, G. C. Kapantaidakis, K. Bélafi-Bakó: Application of gas separation to recover biohydrogen produced by *Thiocapsa roseopersicina*, *Desalination*, 2004, 163:261-265

K. L. Kovács, Á. T. Kovács, G. Maróti, Z. Bagi, G. Csanádi, K. Perei, B. Bálint, J. Balogh, A. Fülöp, L. S. Mészáros, A. Tóth, R. Dávid, D. Latinovics, A. Varga and G. Rákhely: Improvement of biohydrogen production and intensification of biogas formation. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol*, 2004, 3:321-330

Perei Katalin, Bagi Zoltán, Bálint Balázs, Csanádi Gyula, Hofner Péter, Horváth Lenke, Kardos Győző, Magony Mónika, Rákhely Gábor, Román György, Tóth András, Zsíros Szilvia és Kovács L. Kornél: Mikrobák környezetvédelmi biotechnológiai hasznosításra, *Biokémia*, 2004, 28:54-58.

# Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani

témavezetőimnek,

**Prof. Kovács L. Kornélnak és Dr. Rákhely Gábornak,**

Csoportunk minden tagjának, különösképpen

**Dr. Tóth Andrásnak, Dr. Perei Katalinnak, Bagi Zoltánnak,  
Herbel Zsófiának,**

valamint

**Dr. Takács Máriának, Dr. Galgóczi Lászlónak és  
Dr. Rui Miguel Mamede Branca -nak**

Hálás vagyok **szüleimnek és bátyámnak**  
feltétel nélküli támogatásukért, biztatásukért.

Szeretném megköszönni feleségemnek, **Boglárkának,**  
hogy a doktori disszertáció írásának feszült időszakában  
kitartott mellettem.