

**HIDROGÉN TERMELÉS BIOLÓGIAI ALAPANYAGOKBÓL
AZ EXTRÉM TERMOFIL *CALDICELLULOSIRUPTOR*
SACCHAROLYTICUS SEGÍTSÉGÉVEL**

Doktori értekezés

Készítette:

Ivanova Galina

Témavezető:

Prof. Kovács L. Kornél

Szegedi Tudományegyetem Biotechnológiai Tanszék

Szeged
2008

Bevezetés

A fosszilis energiahordozók felhasználásának ugrásszerű megnövekedése energia válságot okoz az 1970-es évek óta. Ehhez járult az 1990-es évektől a globális felmelegedés jelenségének és mechanizmusának felismerése. Mindezek eredményeként a hidrogén, mint energia hordozó népszerűsége jelentősen megnőtt környezetvédelmi és energetikai szempontból egyaránt. Amikor hidrogént használunk energia hordozóként, az elégetéskor vízzé alakul át, a víz pedig ismét felhasználható a körfolyamatban. Ma a felhasznált hidrogén túlnyomó többségét fosszilis forrásokból nyeri az emberiség gőz reformálással.

Hidrogént megújuló forrásokból (biomassza, szerves hulladékok) is előállíthatunk fermentációs biotechnológiai úton, vagy a fotoszintetikus vízbontással kapcsolt reakcióban fotobiológiai úton. A terméket egységesen "biohidrogén"-nek szokás nevezni. A biológiai hidrogén a feleslegben termelődött elektronokból bizonyos mikroorganizmusokban található hidrogenáz enzim segítségével keletkezik. A hidrogenázok redox metalloenzimek, élettani szerepük, alegység szerkezetük és a sejten belüli elhelyezkedésük eltérő és többféle lehet. Az aktív centrumuk felépítése alapján három csoportjukat szokás megkülönböztetni: a [FeFe], [NiFe] és "redox aktív fémet nem tartalmazó" hidrogenázokról beszélhetünk.

A biohidrogén termelése vagy közvetlen fény hatására történő vízbontás, vagy közvetett vízbontás, vagy fotofermentáció, vagy sötét fermentáció útján történhet. A dolgozatban alkalmazott sötét fermentációs eljárást is két típusú mikroorganizmussal lehet kivitelezni: a fakultatív anaerobok (ilyenek például az *Escherichia coli*, különféle *Enterobacter* és *Citrobacter* fajok) vagy obligát anaerobok (például a *Clostridium*, metilotróf metanogének és a kérődzők összetett gyomrában élő fajok) vesznek részt a folyamatban. A vizsgálataimban használt *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* a *Clostridium*ok rokona. A *Clostridium*ok hidrogén anyagcseréjét alaposan tanulmányozták korábban és megállapították, hogy a változatos anyagcserével rendelkező baktériumok csoportjában található olyanok, amelyek a fehérjéket, keményítőt, állati trágyát és szennyvíziszapot is jól tudnak tápanyagként

hasznosítani. Annak ellenére, hogy a korábbi próbálkozások viszonylag gyenge átalakítási hatásfokkal dolgoztak a fermentatív hidrogén termelési eljárásoknak ígéretes jövőt jósolnak elsősorban a H₂ termelésben szereplő hidrogenázok sebessége és a felhasználható alapanyagok széles skálája miatt.

A biomassa a fotoszintetikus folyamatok terméke, változatos összetételű megújuló energiahordozó, melynek végső forrása a napenergia. Az alacsony nedvességtartalmú biomasszák, mint például a fa maradvány, fűrészpor, kommunális szilárd hulladék egy részét égetéssel alakítják át hőenergiává. A magasabb nedvességtartalmú biomasszából, mint például a szennyvíziszap, állati híg- vagy almos trágya, fermentációs folyamatokkal lehet felszabadítani a bennük levő kémiai energiát. A Földön legnagyobb mennyiségben keletkező biomassa féleség a lignocellulóz, amely főként cellulózból, hemicellulózból, ligninből áll. A cellulóz és hemicellulóz frakciót tudják felhasználni a mikróbák miután ezeket a cukor polimereket elhidrolizálták. A hidrolízist több módon is el lehet érni, például magas hőmérsékleten, komoly nyomáskülönbség alkalmazásakor is végbemegy a folyamat, de ezek a fiziko-kémiai eljárások sok energiát igényelnek. Vannak olyan mikroorganizmusok, amelyek termelnek celluláz enzimeket, amelyek az enzimatikus hidrolízist végzik el környezetbarát módon hasítva el ezeket a polimereket cukrokká. Megfelelő hidrolizáló enzimek és mikroorganizmusok segítségével számos biomassa féleség alakítható át különféle bioüzemanyagokká, amelyek a fosszilis eredetű hajtóanyagokat (benzin, diesel olaj, földgáz) válthatják fel a környezetszennyezéshez, globális felmelegedéshez, legnagyobb mértékben hozzájáruló közlekedésben. Speciálisan energianyerésre termesztett, ún. energianövények mellett az élelmiszertermelésre már nem alkalmas növényi biomassa maradványokból biogázt, bioetanolt vagy biohidrogént állítanak elő, ipari technológiává az első két megoldás fejlődött egyenlőre.

Vizsgálataim fő célja az volt, hogy megvizsgáljam, milyen biomasszából és milyen körülmények között lehet eredményesen biohidrogént termeltetni a *C. saccharolyticus* baktériummal. Választásunk azért erre a baktérium törzsre esett, mert egyrészt extrém termofil körülmények között is megél, ami biotechnológiai szempontból előnyös tulajdonság, másrészt az irodalomban leírták, hogy cellulózbontó képességgel rendelkezik (bár ezek a

megfigyelések nem voltak egyértelműek), harmadrészt és a Clostridiumok nemzetségének tagjaihoz hasonlóan jó hidrogén termelő hidrogenáz enzimet tartalmaz. A mikroorganizmus életképességének növelése és tárolhatóságának javítása érdekében a sejteket immobilizáltam egyszerű és lehetőleg olcsó hordozókon. Ez a jövőbeli ipari felhasználásukat segíti elő.

Módszerek

A *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* ú.n. batch (nem folyamatos fermentálás) kultúráit a DSMZ 640 jelű tápközegben neveltem és tartottam fenn. Az életképes sejtszámot lemezeléssel anaerob körülmények között 70 °C hőmérsékleten határoztam meg. A magas hőmérséklet miatt gelrite szilárdító anyagot használtam agar helyett. A biomassza tömegét a sejtek száraz súlyának mérésével határoztam meg. A termelt hidrogén kimutatását és mennyiségének mérését hővezetőképességi detektorral és molekulaszűrő oszloppal felszerelt gázkoromatográfban végeztem. A minták teljes szerves széntartalmának mérésére TOC analizáló berendezést használtam. A sejtek felületi immobilizálására és a hordozó felülethez való kötődés meghatározására eljárást fejlesztettem ki. A fehérje összetétel változását egy dimenziós SDS-PAGE módszerrel detektáltam. A cukor koncentrációt a DNSA módszerrel mértem.

Eredmények

1. Kimutattam, hogy *C. saccharolyticus* agaróz bontó aktivitással rendelkezik cellobióz jelenlétében. A baktérium eddig ismeretlen, szén- és energiaforrásként szolgáló szubsztrátja viszonylag olcsó biopolimer hasznosítási lehetőséget kínál.
2. Az agaróz jelenlétében nevelt sejtekben a protein összetétel változását mutattam ki,

ami arra utal, hogy az agaróz bontásában szerepet játszó enzimek indukálható természetűek, azaz bioszintézisüket a szubsztrát szabályozza.

3. Hasonlóan az agarózhoz a *C. saccharolyticus* képes a güluronsav hasznosítására és a természetben nagy mennyiségben előforduló alginátok bontására. Az alginátok cukorsav polimerek, amelyekből a *C. saccharolyticus* hidrogént termel.
4. Kísérleti eredményeim megerősítették, hogy a *C. saccharolyticus* cellulóz is bont és hasznosít. Kimutattam, hogy a sejtek a magas cellulóz és hemicellulóz tartalmú puha fát igen, a kemény fát nem tudják elhidrolizálni.
5. A tároláskor, szállításkor érzékeny sejtek biológiai aktivitásukat gyorsan elvesztik. Életképességük fokozására olcsó, nem-toxikus és széles körben megtalálható immobilizálási matrixokat azonosítottam, meghatároztam az immobilizálás optimális körülményeit.
6. A legjobb hordozónak a *C. saccharolyticus* sejtek immobilizálására a puhafa forgács bizonyult, amely olcsó anyag, a sejtek túlélő képességét és a térfogategységre jutó sejtszámot megnöveli, tehát a rendszer hatékonyságát javítja. Ugyanakkor a cellulóz és hemicellulóz szubsztrátként való hasznosításával a sejtek számára az életképességük megtartását biztosító szén és energia forrásként szolgál.
7. Kidolgoztam a *C. saccharolyticus* sejtek optimális tárolási körülményeit különféle felületi immobilizációs rendszerekben. Az eljárással a sejtek hidrogéntermelő képességét a folyadékkultúrákban mérhető 8 napos élettartamról 30 napra sikerült növelni.
8. Kimutattam, hogy energia növények, többféle mezőgazdasági hulladék féleség is használható alapanyag a *C. saccharolyticus* segítségével végrehajtott hidrogén termelés számára.

Az elvégzett vizsgálatok eredményei megerősítették, hogy a *C. saccharolyticus* extrém termofil baktérium kiválóan alkalmas fermentatív úton történő biohidrogén előállítására. A gyakorlati alkalmazás szempontjából meghatározó jelentőségű, hogy számos, olcsó, sőt szerves hulladékként keletkező biomassza féleség szolgálhat a biohidrogén termelés alapanyagául. Ugyanilyen fontos a rendszer életképességének növelése azzal, hogy a sejteket megfelelő és költségkímélő módszerrel sikerült hatékonyan immobilizálni, életképességüket és biológiai aktivitásuk megőrzését jelentősen megnövelve.