

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Szarvasmarha bendőből izolált, a cellulóz bontására képes mikroorganizmusok vizsgálata

Szerző:

Szilágyi Árpád

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológus MSc

Témavezetők:

Dr. Perei Katalin
Dr. Rákhely Gábor

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar
Biotechnológiai Tanszék



Szeged
2012

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések	3
I. Bevezetés.....	4
II. Irodalmi áttekintés	5
I. 1 A cellulóz	5
I. 1. 1. A cellulóz összetételének általános jellemzői	5
I. 2. Néhány cellulóz bontására képes mikroorganizmus bemutatása	7
I. 3. A kérődzők fermentációja	9
I. 3. 1. A szarvasmarha, mint hatékony „cellulóz átalakító rendszer”	9
I. 3. 2. A bendő és a benne zajló folyamatok.....	9
I. 4. A cellulóz lebontására alkalmas enzimrendszerek.....	10
II. Célkitűzéseim.....	14
III. Anyagok és módszerek.....	15
III. 1. Anyagok.....	15
III. 1. 1. Tápoldatok, táptalajok	15
III. 2. Módszerek	18
III. 2. 1. Cellulóz-bontó baktériumok szelektálása, enzimatis aktivitásuk és anyagcseréjük igazolása	18
III. 2. 2. A fajok azonosítása 16S rDNS szekvencia analízissel.....	19
III. 2. 3. DNS izolálása gélből	21
III. 2. 4. Szerves savak meghatározása HPLC segítségével	21
IV. Eredmények.....	22
IV. 1. Szarvasmarha bendőtartalom mikroflórájának feltérképezése.....	22
IV. 2. Cellulóz-bontó törzs izolálása bendőtartalomból	24
IV. 3. Az izolált törzs optimális életfeltételeinek meghatározása	25
IV. 3. Az izolált törzs fiziológiás körülményeinek vizsgálata.....	25
IV. 4. Az izolált törzsek azonosítása	26
IV. 4. 1. Vajon valóban képes-e a <i>Paracoccus pantotrophus</i> a cellulóz biomassza biodegradációjára?.....	26
IV. 4. 2. A nitrogénforrás lecserélésének hatása a cellulóz biodegradáció hatékonyságára	28
IV. 5. <i>P. panthotrophus</i> mentes környezetben végzett kísérletek a cellulóz-bontó izolátummal	29
IV. 5. 1. A cellulóz-bontó törzs anyagcsere aktivitása szűrőpapír szénforráson	30
IV. 5. 1. 1. A cellulóz bontó izolátum anyagcsere folyamatainak vizsgálata különböző hőmérsékleteken	31
IV. 5. 1. 2. A cellulóz (szűrőpapír) mennyiségének hatása az izolátum anyagcseréjére.....	34
V. Eredmények értékelése	36
VI. Összefoglalás.....	38
Köszönetnyilvánítás.....	39
VII. Irodalomjegyzék.....	40
Nyilatkozat.....	41

Rövidítések

CI= cellulózbontó izolátum

CL= cellulóz

Glü = glükóz

DNS = dezoxiribonukleinsav

EDTA = etiléndiamin-tetraecetsav

LB = Luria Broth

MQ = ioncserélt víz

MT = minimál tápoldat

PCR= polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)

GC = gázkromatográf

HPLC = Magas nyomású folyadék kromatográfia (High Pressure Liquid Chromatography)

I. Bevezetés

Az elmúlt évek, hónapok politikai eseményei, és az a tény, hogy a fosszilis energiahordozó készletek kimerülőben vannak, arra ösztönzik a kutató- és fejlesztő laboratóriumokat, hogy alternatív megoldásokat találjanak energiaigényünk kielégítésére.

Több megoldás is formálódóban van, pl. a cellulóz alapú eljárások kifejlesztése, melyek során folyékony vagy gáznemű energiahordozók nyerhetők. Cellulóz alapú biomassza hatalmas mennyiségben keletkezik a mezőgazdaságban, iparban és a háztartásokban is, ezért adott a lehetőség, hogy ezt hasznos célokra fordítsuk.

A cellulóz a Földön legnagyobb mennyiségben előforduló szerves vegyület. Megtalálható a növények sejtfalában lignin és hemicellulóz közé ágyazva vagy akár a baktériumok sejtfalában. A cellulóz glükóz monomerekből felépülő, nem elágazó homopolimer, melynek lebontására számos mikroorganizmus képes aerob és anaerob körülmények között is. Ám a legtöbb leírt cellulózbontó mikroorganizmus anaerob körülmények között képes eme vízben oldhatatlan vegyület átalakítására, végeredményként például szerves savakat, H_2 -t előállítva. A szerves savak tovább alakíthatók acetogének segítségével acetáttá, amit metanogén törzsek metánná konvertálnak. A CH_4 és a H_2 energiahordozóként szolgálhatnak a fosszilis eredetű tüzelőanyagok helyett, melyek környezetszennyező hatásuk mellett kimerülő félben vannak, tehát már csak rövid ideig képesek az emberiség energiaigényének kielégítésére.

II. Irodalmi áttekintés

I. 1 A cellulóz

I. 1. 1. A cellulóz összetételének általános jellemzői

A földi élet egyik legmeghatározóbb biológiai folyamata a növények fotoszintézise, melynek során szervesetlen vegyületekből - elsősorban vízből és szén-dioxidból – nagy mennyiségű növényi biomassa keletkezik. Ezen szerves anyagok túlnyomó többségét a növényi sejtfal egyik fő komponense a cellulóz adja. Arányait tekintve a növényi primer sejtfal körülbelül 20%-a, míg a szekunder sejtfal körülbelül 30-40%-a cellulóz [1]. Ezáltal ez, a poliszacharidok családjába tartozó polimer a Földön előforduló leggyakoribb szerves anyag.

A cellulóznak két típusú struktúrája létezik [1], az I és a II szerkezetű biopolimer, melyekből az I-es a natív állapotban előforduló, a II-es pedig az erős lúggal való kezelés során kialakuló cellulózt jelöli.

Szintézise monoszacharidokból történik. A több száz vagy akár több ezer β -D-Glükóz molekula β -1,4-glikozidos kötéssel kapcsolódik össze először cellobiózzá, ami egy diszacharid, majd ezen molekulák további kapcsolódása révén alakul ki a cellulózra jellemző lineáris szerkezet. Több cellulóz molekula összekapcsolódásával jönnek létre a protofibrillumok, melyek tovább rendeződve makrofibrillumokat képeznek. A szerkezetet az erős kovalens kötés mellett intra- és intermolekuláris H-híd kötések, valamint gyenge van der Waals kötések is stabilizálják [1]. A mikrofibrillumok kristályos és amorf régiókból tevődnek össze, tehát nem homogének [5].

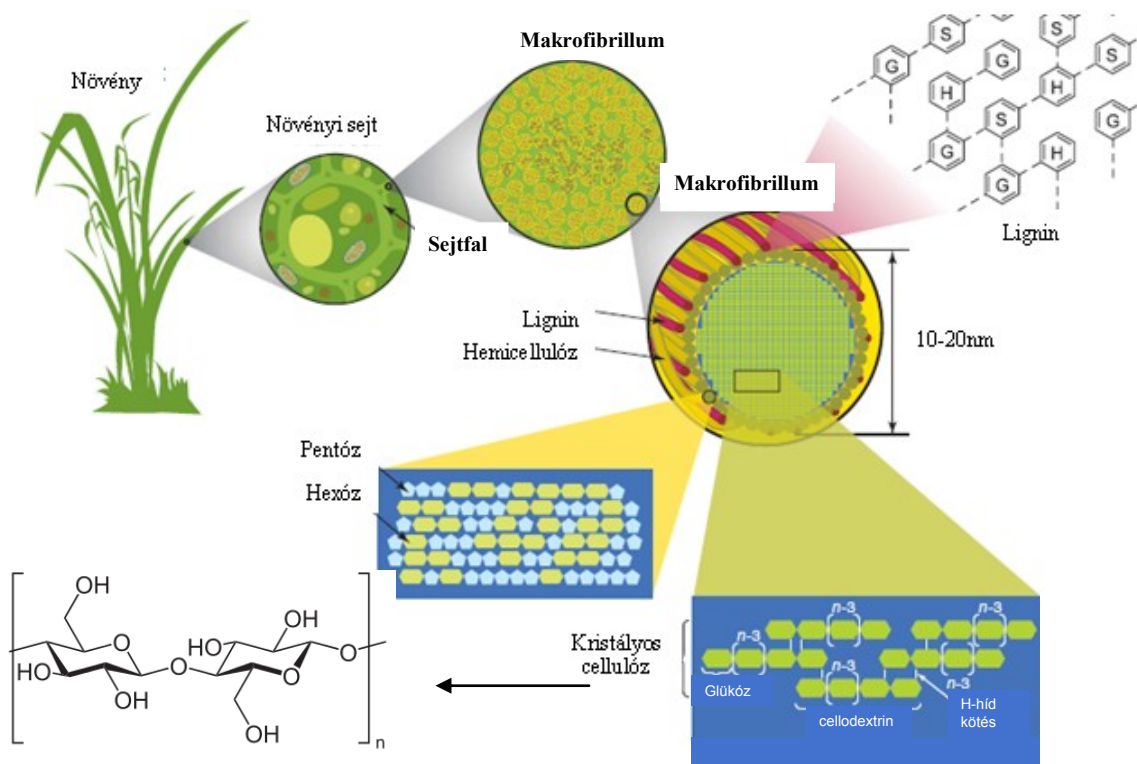
A növényi sejtfalban (1. ábra) a cellulózhoz lignin, hemicellulóz, kallóz, továbbá kutin is kapcsolódik, melynek révén kialakul a másodlagos növényi sejtfal [1], ez megnehezíti a cellulóz szabaddá tételét.

Laboratóriumi kísérletekhez leggyakrabban tisztított cellulózt használnak, melynek több fajtája ismert. Ilyen pl.:

- holocellulóz, melyet a fák delignifikálása során nyerünk,
- vízdékony karboximetil cellulóz (CMC), melyet a cellulózból szintetikus úton állítanak elő úgy, hogy a hidroxil csoportokban (-OH) található hidrogént karboximetil (-CH₂COOH) csoporttal helyettesítik.

- mikrokristályos cellulóz, amely szinte teljesen megegyezik a természetes cellulózzal [2].

Napjainkban az egyik legfontosabb feladat alternatív energiaforrások, és az abból előállítható energiahordozók keresése a fosszilis energiahordozók helyett. A cellulóz alapú biomassa alkalmas arra, hogy bioüzemanyagot állítsunk elő belőle [3]. A bioüzemanyagok előállításához a cellulóz tartalmú biomasszát elő kell kezelni, mely többféle módszerrel történhet. Beszélhetünk fizikai, kémiai és biológiai kezeléstről. Fizikai például a gőzrobbantás, kémiai a savas hidrolízis, biológiai pedig a mikrobiális bontás, melyre számos mikroorganizmus képes hidrolitikus enzimek segítségével aerob és anaerob körülmények között egyaránt.



1. ábra

A cellulóz szerkezeti felépítése [3]

I. 2. Néhány cellulóz bontására képes mikroorganizmus bemutatása

Hidrolitikus enzimekkel számos mikroorganizmus rendelkezik, de csupán néhány törzs képes a ligninnel és hemicellulózzal körbevett cellulóz bontására. A bontás történhet aerob és anaerob környezetben, ám a bioüzemanyagok előállításában általában anaerob környezetet kell biztosítani a mikroorganizmusok számára. Ennek megfelelően a cellulóz biomassza előkezelésére is célszerű anaerob mikroorganizmusokat alkalmazni a költséghatékonyság szempontjából. A teljesség igénye nélkül néhány mikroorganizmust jellemeznék, melyek anaerob körülmények között képesek a cellulóz hidrolízisére.

Bacteria, Divisio: Firmicutes, Classis: Clostridia, Ordo: Clostridiales, Familia: Clostridiaceae [11]

A clostridiumok többségében szigorúan anaerob szervezetek, ám néhány faj aerotoleráns. Az utóbbiak szaporodni is képesek oxigén jelenlétében, de a spórázásukat az oxigén mindkét esetben gátolja. Anaerob közegben viszont igen jól spóráznak. Kataláz negatív szervezetek. Egyenes pálcák, mozgók (peritrich flagellumokkal), vagy nem mozgékony fajok tartoznak ide. Morfológiai alapon a *Bacillus* fajoktól nem különíthetők el. Sejtfalukban mezo-diaminopimelinsavat tartalmaznak. Változatos az erjedési termékeik skálája. Vajsavas erjedés jellemző rájuk, amely a vajsav mellett, etanolt és alkoholokat, például n-butanolt, i-propanolt, vagy acetont eredményez, melyek szerves oldószerként jól alkalmazhatóak. A *Clostridium* fajok erjesztési képességét ipari mértékű oldószer előállítására is felhasználták (pl. *C. acetobutyricum*). Extracelluláris enzimeket termelnek, melyek révén fontos szerepet játszanak a biodegradációs folyamatokban. A clostridiumok képesek kioldani a cellulóz rostok közül a könnyen emészthető növényi anyagokat. [10]

Cellulózbontó fajok közül megemlítendő a *C. thermocellum* és a *C. cellulolitycum*, melyek közül az első egy termofil, a második pedig egy mezofil faj. Komplex celluláz rendszerrel rendelkeznek, ami többnyire a sejthez kötött. Ezen kívül pedig flagellumuk is van [2]. E két faj közül a *C. cellulolitycum* a növényevők gyomrában is előfordul.

**Bacteria, Divisio: Firmicutes, Classis: Clostridia, Ordo: Clostridiales,
Familia: Lachnospiraceae [11]**

Kizárólag anaerob szervezetek, több fajuk is, például a *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens* fontos szerepet töltenek be a növényevők gyomrában történő növényi rostok fermentációjában. Legjobban leírt, ismert fajok a fent említett két faj, melyek coccus alakú, mezofil (optimális növekedési hőmérsékletük 39°C.), nem spórázó, nem mozgékony törzsek [12]. Komplex, sejtkötött celluláz rendszerrel rendelkeznek [2]. A *R. albus* fibrolitikus rendszerében a különböző cellulázok mellett megfigyelhetők xilanázok illetve észterázok is [13].

A fent említett fajok enzimei celluloszómába rendeződnek, mely révén a baktérium sejtek kitapadnak a rostokra, és úgy kezdik meg a cellulóz emésztését. Kívülről ezt a komplexet egy glikokalyx réteg borítja [14], melynek védelmi funkciója van.

**Bacteria, Divisio: Fibrobacteres, Classis: Fibrobacteres, Ordo: Fibrobacterales,
Familia: Fibrobacteraceae Species: Fibrobacter succinogenes [11]**

Nem mozgékony, pálca alakú, mezofil baktérium, melynek az optimális szaporodási hőmérséklete 38°C. Obligát anaerob, spórát nem képez [2].

A *Ruminococcus* fajok mellett a második legfontosabb, növényevők gyomrában fellelhető fibrolitikus mikroorganizmus, mely a ruminococcusokhoz hasonlóan komplex, sejtkötött celluláz rendszerrel rendelkezik [2]. Molekuláris és biokémiai vizsgálatokkal többféle cellulolitikus aktivitású enzimet azonosítottak benne, mint például, xilanázokat, acetilxilán észteráz, α -arabinofuranozidáz, α -glükuronidáz [14].

Mágneses rezonancia spektroszkópiai vizsgálatokkal igazolták azt, hogy a *F. succinogenes* S85 törzs a cellulóz degradációja közben nem válogat sem az amorf, sem a kristályos régiók, sem a cellulóz és sem pedig a hemicellulóz között, hanem az enzimatis emésztés párhuzamosan zajlik [14].

I. 3. A kérődzők fermentációja

I. 3. 1. A szarvasmarha, mint hatékony „cellulóz átalakító rendszer”

A cellulóz alapú biomasza átalakítása üzemanyaggá manapság nagy érdeklődés tárgyát képezi, ugyanis nagy mennyiségben áll a rendelkezésünkre.

A fűfélék megjelenését és elterjedését követően nem sokkal megjelentek a kérődző állatok, melyek mára a világ domináns növényevő állataivá váltak.

Már az ókorban is felismerték az ide tartozó állatok azon tulajdonságát, hogy fűből tejet, húst, bőrt illetve gyapjút képesek előállítani. Ezáltal szervezetük erős fermentációs folyamatra enged következtetni, melynek során etanol, metán és illékony zsírsavak keletkeznek. Ezen alternatív melléktermékeknek is igen magas az energiatartalma, ezért a cél az lenne, hogy ezeket a melléktermékeket is közvetve üzemanyagként hasznosítsuk.

Kísérleteink során több okból is a szarvasmarhát választottuk modellállatként. Egyrészt ők termelik az emberiség számára a legtöbb húst illetve tejet, másrészt pedig, mint a legelterjedtebb állatok, ők képviselik a cellulóz biomasza átalakítás csúcspontját.

Továbbá a szarvasmarhának nagy az állkapocsszélessége, így képtelen arra, hogy válogasson a különböző szénafajták között, ezáltal jóval több takarmányrostot képes bevinni a szervezetébe, mint bármely másik kérődző állat. Az elfogyasztott táplálék a bendőbe kerül, ahol a mikroorganizmusok megkezdik a „kérődző fermentációt”.

I. 3. 2. A bendő és a benne zajló folyamatok

Az állat által elfogyasztott, rágással előkezelt növényi rostok a bendőbe kerülnek. A gyomor az állat össztömegének 1/10 része. Egy 600 kg-os állatban kb. 80 liter térfogatot tesz ki [8].

A kérődzők nem termelnek a növényi anyagok lebontására alkalmas enzimeket, hanem baktériumokkal, gombákkal és protozoákkal élnek szimbiózisban, melyek képesek azt emésztetni. A gazda biztosítja a mikróbák növekedéséhez szükséges optimális környezetet, a mikroorganizmusok pedig fehérjét, vitamint illetve rövid szénláncú zsírsavakat (ecetsav, propionsav, vajsav) biztosítanak a gazda számára [7].

Maga az emésztő traktus ideális hely a cellulóz mikrobiális fermentációjára. A fermentáció megfelelő működéséhez elengedhetetlenek a környezeti feltételek. Ilyenek például az anaerob környezet, 39 °C, - 0,4 körüli redoxpotenciál és a közel semleges pH [8]. Ilyen

körülmények között a bendőben előforduló konzorcium igen magas számú baktériumot tartalmaz ($>10^{10}$ -en sejt/g gyomortartalom) [7].

A közel 30féle bendő baktérium mellett, körülbelül 40 fajta protozoa és öt gombafaj alkotja a bendő mikroflóráját.

A bendőben fellelhető baktériumok öt csoportba oszthatók. A folyadék fázisban szabad baktériumok, a szubsztráthoz „lazán” vagy szorosan kapcsolódó, a rumen epitéliumhoz rögzülő, illetve a protozoákhoz vagy gombaspórákhoz kapcsolódó baktériumok.

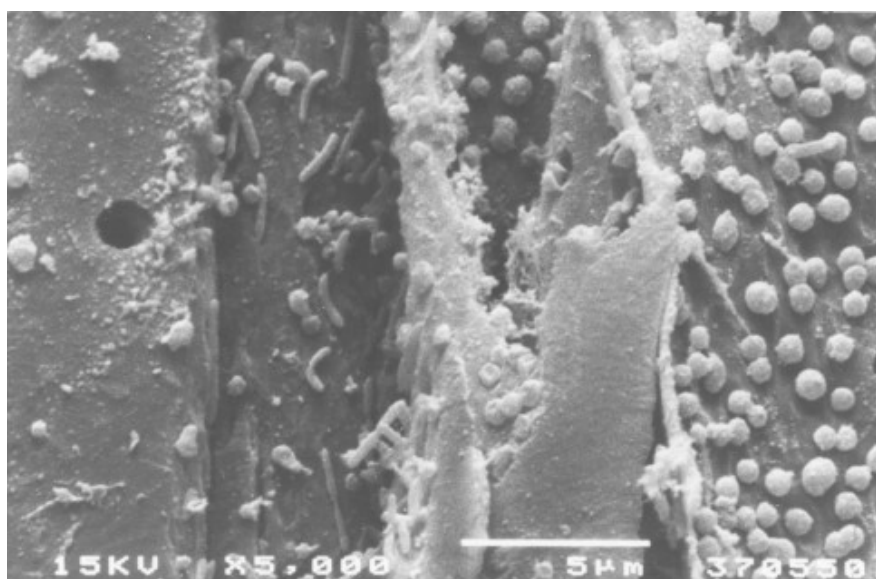
I. 4. A cellulóz lebontására alkalmas enzimrendszerek

A cellulóz (elsősorban növényi sejtanyagok) különböző mértékben összecsavarodott poliszacharid láncokból áll és ligninbe és hemicellulózba van beágyazva, amely megnehezíti az enzimek cellulózhoz való hozzáférhetőségét [2].

A mikroorganizmusok összetett enzimeket termelnek ezen anyag lebontására [2]. A bakteriális és gomba eredetű enzimek hatására a növényi sejtfalbontás eredményeként a cellulóz komplex struktúrája alkotórészeire bomlik, amely más élőlények számára is felhasználható, ezáltal visszakerül a biológiai körforgásba [5]. Ezek az enzimek lehetnek sejtkötöttek vagy „szabadok” [2].

A „szabad” celluláz enzimek nem képeznek nagy molekulású komplexet, így ezeket „nem komplex” rendszereknek hívjuk [2], az extracelluláris térben találjuk meg ezeket.

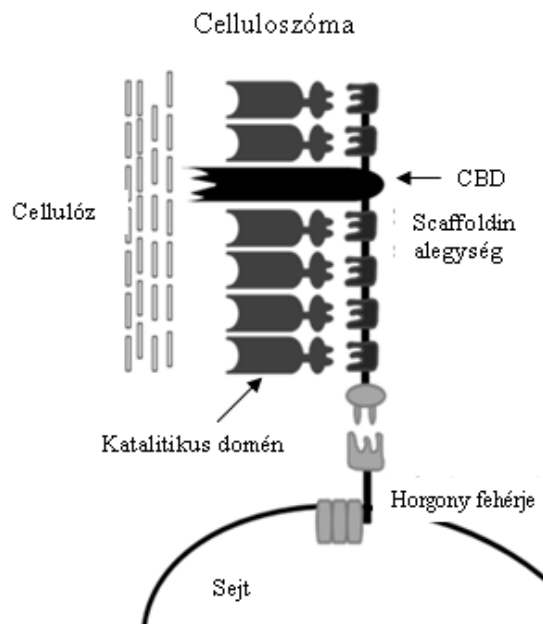
A mikroorganizmusok másik csoportja komplex celluláz rendszereket termel (celluloszóma). Ez az aggregálódott enzimrendszer a cellulózlánchoz kapcsolja a mikróbát, ezáltal hatékony cellulózbontásra képes a sejt. A sejtek rosthoz való tapadása (2. ábra) egy igen bonyolult folyamat, mely specifikus és nem specifikus részekre tagolható. Maga a folyamat pedig négy fázisra osztható: 1. fázis: A mikroorganizmusok transzportja a szubsztráthoz, ugyanis az elsődleges cellulózbontó törzsek nem mozgékonyak, nem rendelkeznek sem csillóval, sem flagellummal. 2. fázis: Kezdeti nem specifikus kapcsolódás a szubsztrát megfelelő helyeihez. Ebben a fázisban alakul ki a glikokalix réteg a sejtek körül, amely poliszacharidokból, glikoproteinekből, glikolipidekből egyes esetekben peptidoglükánból áll. Feladata, hogy megvédi a sejtet a külső behatásoktól, mint például a fagocitózistól. 3. fázis: Specifikus kapcsolódás a sejt és az emésztendő anyag között. 4. fázis: A kapcsolódó mikroorganizmusok elszaporodása a növényi szövet specifikus helyen, azaz a kolóniaképzés [5].



2. ábra

A cellulóz rostra kitapadt mikroorganizmusok scanning elektron mikroszkópos képe [9]

A celluloszómában (3. ábra) elsősorban a cellulóz bontására alkalmas enzimfehérjéket találunk, de előfordulnak xilanázok és szénhidrát kötő doménnel rendelkező fehérjék is. A baktérium sejt a cellulózkötő domén (CBD) segítségével kapcsolódik a cellulóz rostokhoz. A CBD és a többi enzimatis aktivitással rendelkező fehérje a celluloszómában a scaffoldin fehérjéhez kapcsolódik, mely pedig a horgony fehérjén keresztül rögzül a baktérium sejthez. Celluloszómával rendelkezik például a *Clostridium thermocellum*, a *Ruminococcus albus* (eddiggi ismeretek szerint az elsődleges cellulózbontó bendőben) vagy a gombák közé tartozó *Neocallimastix* fajok [5]. A sejtkötött enzimek előnyösebbek a szabad enzimeknél, mert koncentrált aktivitásuk van a szubsztrát felszínén, valamint jobban ellenállnak a proteolízisnek [6]. Tipikusan anaerob környezetben fordulnak elő, és együtt élnek más cellulolitikus és nem cellulolitikus mikróbákkal [2].



3. ábra

A celluloszóma általános felépítése [4]

A cellulózbontó mikroorganizmusok specifikus enzimeik segítségével (4. ábra) képesek hidrolizálni, majd metabolizálni a vízben oldhatatlan cellulózt. Az elmúlt két évtizedben átfogó tanulmányok készültek eme enzimszisztemek vizsgálataiból aerob és anaerob körülmények között, mind a baktériumok, mind a gombák körében. A vizsgálatok alapján három nagy csoportot különíthetünk el az enzimaktivitás alapján:

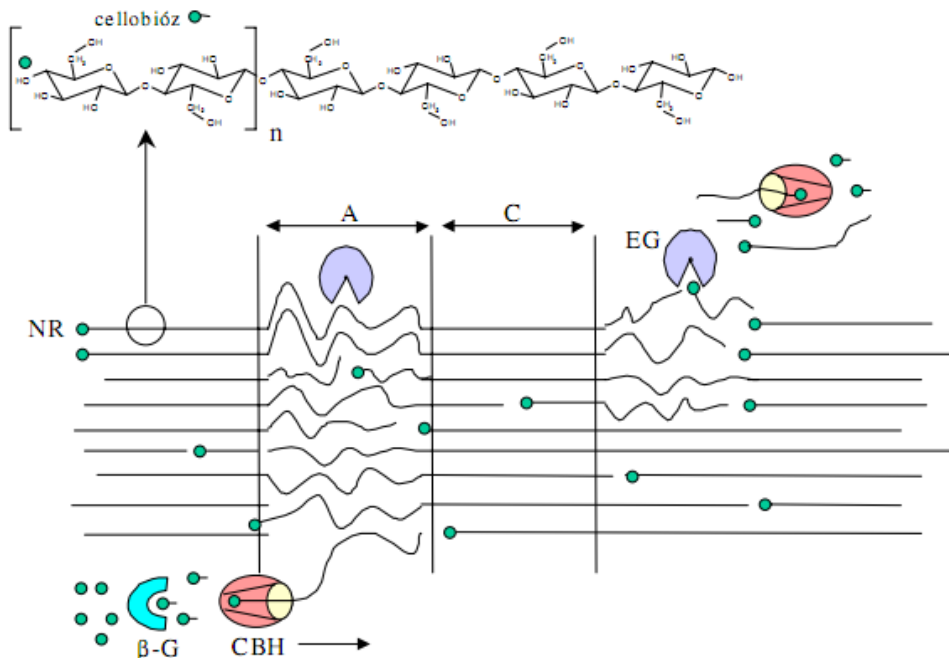
1, Endoglükánázok vagy más néven 1,4- β -D-glükán-4-glükánhidrolázok (EC 3.2.1.4), melyek találmásra hasítanak a poliszacharid lánc belső amorf helyein, ezáltal különböző hosszúságú oligoszacharidokat és új láncvégeket eredményeznek [2]. Ezek az enzimek nem képesek a kristályos régióban hasítani, de az amorf régióban történő hasítást követően képesek a kristályos részben is folytatni a cellulóz hasítását [5].

2, Exoglükánázok, beleértve a

- 1,4- β -D glükán glükohidrolázokat, azaz a cellodextrinázokat (EC 3.2.1.74) valamint a
- 1,4- β -D-glükán cellobiohidrolázokat, más néven a cellobiohidrolázokat (EC 3.2.1.91),

melyek a redukáló és nem redukáló cukorvégeit bontják a láncoknak. A hasítás eredményeként glükózt (glükánhidrolázok) és cellobiózt (cellobiohidrolázok) szabadítanak fel. Tehát képesek a mikrokristályos cellulóz megbontására.

3, β -glükózidázok vagy **β -glükózid glükohidrolázok** (EC 3.2.1.21) amelyek hidrolizálják a cellodextrint és a cellobiózt, így a folyamat során két glükózt szabadítanak fel, mely minden életforma számára felhasználható energiaforrás [2, 5].



4. ábra

A cellulóz bontására képes enzimek és hasítási helyeik [5]

Ábramagyarázat: NR: nem redukáló vég, A: amorf régió, C: kristályos régió,
EG: endo- β -1,4-glukanázok, CBH: cellobiohidroláz, β -G: β -glükózidázok

II. Célkitűzéseim

A kimerülő fosszilis tüzelőanyagok helyett (kőolaj, földgáz, kőszén, stb.), amelyek eleve súlyos környezeti problémákat okoznak, pl.: levegőszennyezés, üvegházhatás, vízszennyezés, új, megújuló energiaforrások keresése a cél, melyeknek használata eleget tesz a fenntartható fejlődés elveinek, így alkalmazásuk nem károsítja a környezetet.

A cellulóz biomassa átalakítása üzemanyaggá, manapság nagy érdeklődés tárgyát képezi. Munkám megkezdésekor azt tűztem ki célomul, hogy olyan mikroorganizmust találjak, amely nagy hatékonysággal, gazdaságosan bontja a cellulózt.

Az irodalom már számos olyan mikroorganizmust leírt, amelyek igen nagy hatékonysággal képesek a cellulóz biomassa átalakítására. Ezen baktériumok illetve gombák különböző területekről származtak.

Kutatásaim megkezdésekor azért tűztem ki célul szarvasmarha gyomortartalomból izolálni cellulózt átalakító mikroorganizmust, mert – bár a szarvasmarhák anyagszerkezetéről sok tanulmány látott napvilágot - Magyarországon a szarvasmarha gyomor tartalmát ebből a szempontból még alig vizsgálták. A szarvasmarha bendő mikroflóráját molekuláris biológiai módszerek segítségével már feltérképezték, melynek eredményeképpen igen sok cellulózbontó faj volt kimutatható. Ám valószínűleg e fajszinten azonosított törzsek nem mindegyike tartható fent laboratóriumi körülmények között, illetve az aktivitásuk megőrzéséhez szükséges körülmények biztosítása olyan plusz költségeket jelenthet, melyek az adott törzs ipari alkalmazását gazdaságtalanná teszik.

Ennek megfelelően olyan szelekciós kísérletet terveztem, melynek során ipari célokra hatékonyan felhasználható, könnyen kezelhető törzset/törzseket tudok izolálni. Célom volt megvizsgálni, hogy cellulózon, mint egyedüli szénforráson mely törzsek képesek laboratóriumi körülmények között szaporodni.

Azon túl, hogy a cellulóz hasznos biomassa, és hidrolizisével glükóz állítható elő, mely az alkohol fermentáció kiindulási vegyülete, gáznemű energiahordozó előállításával is kapcsolható a bontása. A kérődzők bendőjében a cellulózbontók által képzett glükózból savképzők szervessavakat, abból metanogének metánt is képeznek, így céljaim között szerepelt, hogy a szarvasmarha gyomorból izolált cellulózbontó mikroorganizmussal a biogáz fermentorok CH_4 termelését is elősegítsem, amely a H_2 mellett szintén jelentős alternatív energiahordozóként szerepel a XXI. században.

III. Anyagok és módszerek

A kísérleteim során felhasznált laboratóriumi anyagokat a Biocenter, Merck, Reanal, Sigma, VWR cégek által forgalmazott termékek szolgáltatták.

A kísérleteimhez felhasznált mikroorganizmus törzset Gorzsai Húsüzemből (Hódmezővásárhely, Tanya 3076) származó szarvasmarha bendőtartalomból izoláltam szelekciós eljárással. Az általam használt (kontroll) törzsek: *Ruminococcus albus* DSMZ 20455, és *Paracoccus pantotrophus* DSMZ 2944.

III. 1. Anyagok

III. 1. 1. Tápoldatok, táptalajok

1. Minimál tápoldat (MT) (pH= 6,8):

A törzsoldat: 100 mM KH_2PO_4 ,
100 mM K_2HPO_4 ,
200 mM NaCl

B törzsoldat: 10 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
6 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

C törzsoldat: adott szénforrás (cellulózt és/vagy glükózt használtam) változó koncentrációban az adott kísérlettől függően

D törzsoldat: 0,1 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
0,03 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$,
0,3 g H_3BO_3 ,
0,2 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,
0,01 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,
0,02 g $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,
0,03 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 liter desztillált vízben oldva

E törzsoldat (pH=7,0): 14 mg/ml FeSO_4 ,
7 mg/ml $\text{Na}_2\text{-EDTA}$

F törzsoldat: 1,5 M NH_4NO_3

F'' törzsoldat: 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

A fenti sterilizett törzsoldatok lent említett arányának összemérésével, 100 ml-re kiegészítve steril desztillált vízzel kapjuk a minimál tápoldatot:

5 ml A oldat,
5 ml B oldat,
szénforrás az adott kísérletnek megfelelően (Cellulóz, 1%, Glükóz, 2%),
0,2 ml D oldat,
0,1 ml E oldat,
1 ml F oldat

2. LB (Luria Broth) tápoldat: 1 liter desztillált vízben oldva, pH=7,0-re NaOH-val beállítva

10 g tripton,
5 g élesztő kivonat,
10 g NaCl

3. LB táptalaj, agar lemezek: LB tápoldat 1,5 % Bacto agar tartalommal

4. Minimál táptalaj+mikrokristályos Cellulóz: minimál tápoldat 1,5 % Bacto agar tartalommal +1 (m/V)% mikrokristályos Cellulóz

5. Minimál táptalaj+glükóz: minimál tápoldat 1,5 % Bacto agar tartalommal+ 2 (m/V)% sterilre szűrt glükóz oldat

6. Fiziológiás sóoldat: 8,6 g NaCl 1 liter desztillált vízben oldva

7. Ruminococcus albus tápoldat:

Tripton	5,0 g
Élesztő kivonat	2,0 g
Glükóz	3,0 g
Cellobióz	2,0 g
Tápoldat 1	40,0 ml
Tápoldat 2	40,0 ml
Resazurin	1 mg
Desztillált víz	920,0 ml

Na ₂ CO ₃	4,0 g
Zsírsav keverék	1,0 ml
Cisztein-HCl x H ₂ O	500,0 mg

Melyből a tápoldat 1, 2 és zsírsav mix összetétele:

Tápoldat 1

K_2HPO_4	0,6 %
------------	-------

Tápoldat 2

KH_2PO_4	0,6%
$(NH_4)_2SO_4$	2,0%
NaCl	1,2%
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	0,25%
$CaCl_2 \times 7 H_2O$	0,16%

Zsírsav keverék:

Vajsav	10,0 ml
Izovaleriánsav	10,0 ml
2-metil vajsav	10,0 ml
Desztillált víz	70,0 ml

A fenti oldatok sterilizés utáni összemérésével kapom meg a *Ruminococcus albus* tápfolyadékát.

III. 2. Módszerek

III. 2. 1. Cellulózbontó baktériumok szelektálása, enzimatisuk aktivitásuk és anyagcseréjük igazolása

1. Baktériumok szelektálása cellulózbontásuk alapján:

A Gorzsai Húsüzemből származó mintákat mintavétel után 2,5 l térfogatú anaerob tárolóedénybe helyeztem és azonnal lezártam. Az edénybe oxigén katalizátort helyeztem (OXOID, cikkszám: AN0025A)

Ezt követően fiziológiás sóoldatban felvettem a bendőtartalmat, majd 1 órán keresztül ráztam a szuszpenziót. A ráztatás után nuccson szűrtem le a folyadékot, melyre előzetesen 0,2 µm-s Millipore szűrőt helyeztem. A szűrőn fennmaradt növényi törmelékét szélesztettem csak 1 (m/V) % mikrokristályos cellulózt, valamint 1,5 % Bacto agart tartalmazó táplemezre, anaerob körülmények között.

2. Congo vörös próba:

A mikroorganizmusok endoglükozidáz aktivitásának detektálására egyszerűen alkalmazható eljárás, melynek során a csak cellulózt, mint szénforrást tartalmazó lemezekre előzetesen leoltott baktérium telepeket inkubáció után 10ml 10mg/ml-es Congo vörössel leöntjük, majd egy órán keresztül ráztatjuk. Ezt követően a felesleges festéket leöntjük, majd 10ml 1M-os NaCl oldattal további 1 órán keresztül ráztatjuk a lemezeket. A folyamat befejeztével a felesleges NaCl oldatot leöntjük és szabad szemmel is meg tudjuk figyelni a vörös háttér alatt az endoglükozidáz aktivitással rendelkező telepek körül a feltisztulást (elbontott cellulóz esetén nem festődik az agar lemez azon a ponton). A bontási zóna átmérője arányos az endoglükozidáz aktivitással.

3. Légtéráanalízis gázkromatográffal:

A gáztereket gázkromatográffal analizáltam (Agilent, Shimadzu). A műszer műszaki adatai a következők:

Teljes légtéráanalízis:

GC: Shimadzu GC 2010

Detektor: hővezetőképességi detektor (150 °C)

Detektorvédőgázáram: 14,3 ml/perc

Vivőgáz: Nitrogén (5.0)
Inlet üzemmód: Split (0,5:1)
Inlet hőmérséklet: 200°C
Purge Flow: 3.0ml/perc
Kolonna: HP PlotQ (30m x 0,5 x 40 µm)
Kolonnatér hőmérséklete: 90 °C
Lineáris áramlási sebesség: 76,4 cm/perc

A H₂ jelenlétét igazoló analízis:

GC: Agilent 6890
Detektor: hővezetőképességi detektor (160 °C)
Vivőgáz: Argon (5.0)
Inlet üzemmód: Split (0,2:1)
Inlet hőmérséklet: 150°C
Constans Flow: 17,0 ml/perc
Kolonna: HP Molesieve 5 A (30m x 0,53mm x 25 µm)
Kályhahőmérséklet: 60 °C
Lineáris áramlási sebesség: 76,4 cm/perc

A gázmintákat Hamilton fecskendővel injektáltam a készülékekbe. Mennyiségi meghatározáshoz kalibrációt végeztem, az adatokra függvényt lineáris regresszióval illesztettem.

III. 2. 2. A fajok azonosítása 16S rDNS szekvencia analízissel

Ha szeretnénk meghatározni az általunk izolált törzset, akkor szükséges a genomi DNS előzetes kinyerése a sejtekből és azt követően egy specifikus szakaszának felszorzása, melyhez PCR-t használunk, univerzális primerekkel (f27, r1492) a 16S rRNS génre, mely alapján jó közelítéssel meghatározható az izolált faj.

Munkám során, mivel ismeretlen mintával dolgoztam, ezért kétféle tesztrendszerrel (Gram+ és Gram- baktériumok tisztítására alkalmas recept) próbáltam a genomi DNS-t kitisztítani. Munkám során a DNS kivonására a Sigma GenElute™ Bacterial Genomic DNA kitet (baktériumi genomi DNS izoláló kit, NA2110-1KT) használtam. A tisztítást a protokoll megváltoztatása nélkül végeztem.

A riboszómális 16S rNS génjének részleges szekvencia analízise a baktériumok specifikus azonosítását teszi lehetővé. A 16S rNS az élővilágban univerzálisan előfordul. Az ezt kódoló géneknek léteznek olyan régiói, amelyek nagyon hasonlóak a baktériumok körében, a köztük levő szekvencia viszont az adott baktérium fajra specifikusan jellemző. A folyamat során a köztes régióról készítünk PCR terméket, melynek szekvencia analíziséből viszonylag pontosan meg tudjuk adni az izolált faj nevét. A polimeráz láncreakció során minden baktériumra univerzális primerekkel biztosítjuk az adott szakasz sokszorosítását. Az általam is használt univerzális primerek a következők:

f27 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')

r1492 (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')

A primerek a 16S rNS gén 27-es, illetve 1492-es pozíciójánál kezdődnek. (A szekvenciában lévő M jelentése A vagy C; az Y pedig T-t vagy C-t jelöl.)

Az általam használt PCR reakció az alábbi:

1 ciklus:

95 °C-on 5 perc lízis, abban az esetben, ha kolónia PCR végzünk. Célja a sejtek lízise, melyet követően a mintákhoz adunk 0,5 µl DyNAzyme termotabil DNS polimeráz enzimet. Ha genomi DNS-ből indulunk ki, akkor ez a ciklus kimarad.

A reakciókat Hybaid PCRExpress készülékben végeztem.

30 ciklus:

95 °C, 1 perc (denaturáció- a templátként szolgáló szálak szétválása)

52°C, 1 perc (anelláció- a primerek kötődése a templát szálakhoz)

72 °C, 1 perc (elongáció- az új DNS szál szintézise)

1 ciklus:

72 °C, 5 perc (utópolimerizáció, hogy az enzim befejezze a szintézist)

A PCR reakcióhoz felhasznált reakcióelegy - Master Mix:

10x DyNAzyme puffer,

10x dNTP-mix (2,5-2,5mM koncentráció nukleotidonként),

10x f27 primer (10 µM),

10x r1492 primer (10 µM),

Steril MQ víz.

Ebből a Master Mixből a PCR csövekbe 29 µl-t helyeztem, majd hozzámértem 1-1 µl templátot (olyan genomi DNS-t, melyet előzőleg kivontam a sejtekből), majd 0,5 µl DyNAzyme polimeráz enzimet (Finnzymes, F-501-L). Ezt követően pedig a PCR készülékbe helyeztem a mintáimat.

A kapott PCR termékeket 1 %-os agaróz gélen ellenőriztük. A PCR termék szekvenciáját meghatároztuk, majd a kapott DNS szekvenciát BLASTN programmal hasonlítottuk az NCBI GenBank adatbázisban szereplő szekvenciákhoz.

III. 2. 3. DNS izolálása gélből

A PCR termék teljes mennyiségét megfuttattam 1%-os agaróz gélen Tris-acetát-EDTA pufferben (80V, 30perc). Méretének meghatározásához 1 kb-os Fermentas SM0311 GeneRuler-t használtam.

A gélből a PCR terméket futtatás után izoláltam úgy, hogy a géldarabot, ahol a DNS elhelyezkedik kivágtam a gélből UV-fény alatt. A fragment izolálásához a Fermentas DNA Extraction Kit-et (DNS elválasztó kit, #K0513) alkalmaztam.

III. 2. 4. Szerves savak meghatározása HPLC segítségével

A mintákban jelen levő szerves savak mennyiségét nagynyomású folyadék kromatográfia (Hitachi Elite LaChrom HPLC) segítségével határoztam meg. Az eredmények leolvasását és kiértékelését pedig EZChrome Elite programmal végeztem el. Oldószerként 0,01 M kénsavoldatot használtam, melynek áramlási sebessége 0,8 ml/perc volt. A minták elválasztása ICsep ICE-COREGAL 64H oszloppal történt, azonosításuk L-2490 refraktív index detektorral. Mérés előtt a mintáimat 0,2 µm pórusátmérővel rendelkező fecskendőszűrőn átszűrtem azért, hogy a szennyeződések, bakteriális sejteket ne vigyem fel az oszlopra.

IV. Eredmények

IV. 1. Szarvasmarha bendőtartalom mikroflórájának feltérképezése

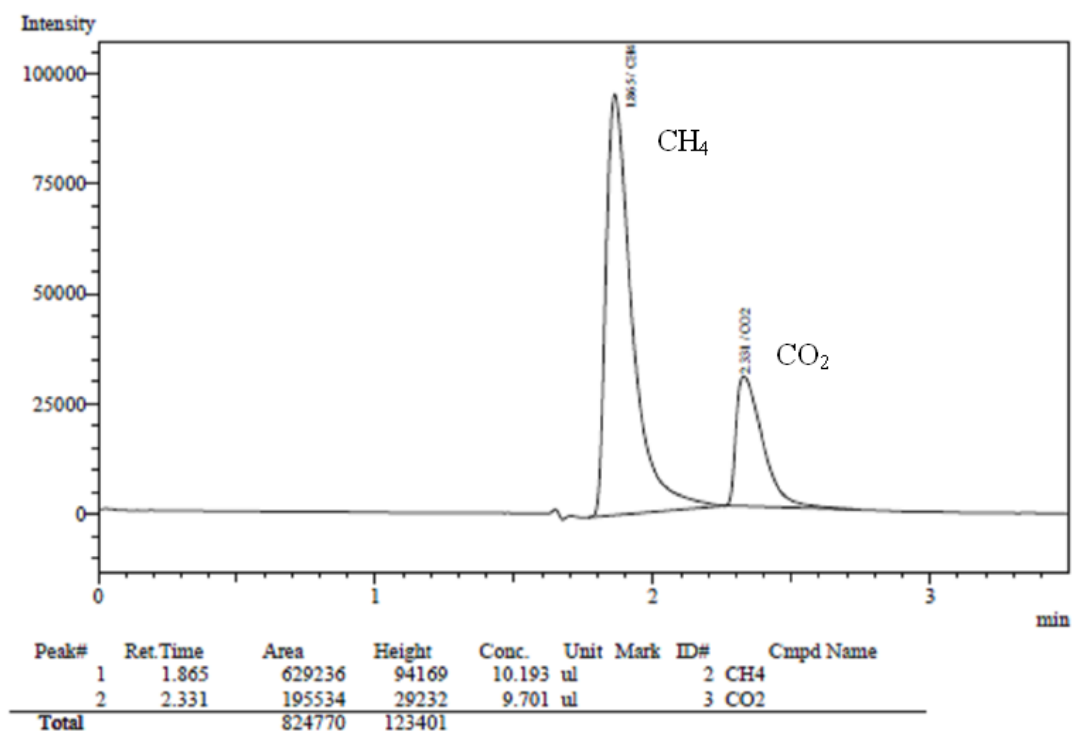
Munkám megkezdésekor céljaim között szerepelt, hogy szarvasmarha gyomortartalomból olyan cellulózbontó baktériumokat szelektáljak, amelyek megfelelő hatékonysággal képesek a cellulóz biomasszát átalakítani, elsősorban könnyen felvehető egyszerű cukrokká, valamint hidrogénné.

Ennek megfelelően a Gorzsai húsüzemből származó bendőtartalmat kezdtem el vizsgálni, hogy laboratóriumi körülmények között, a gyomortartalom fiziológiás sóoldatban történő felvétele után, anaerob körülmények között milyen mikroorganizmusok szaporodnak cellulóz tartalmú tápagaron.

A bendőtartalom mikroszkópos vizsgálata alapján igen gazdag mikroflóra van jelen a szarvasmarhák gyomrában. Megfigyeltem hosszú és apró pálcákat, kicsi görbült pálcákat, kokkuszoikat, illetve spórázó törzseket is.

Kezdeti kísérleteimet a teljes bendőtartalommal végeztem, melyhez a cellulózbontó kontrollként *Ruminococcus albus* DSMZ 2944 törzset használtam, és ennek tápfolyadékát alkalmaztam annyi módosítással, hogy nem tartalmazott a tápfolyadék tripton és cellobióz szervesanyagot, csupán 0,06 % glükózt (mely arra elegendő, hogy a sejtek anyagcseréje, illetve szaporodása valamelyest meginduljon). Szénforrásként 1 % mikrokristályos cellulózt alkalmaztam. A sejteket több napon keresztül inkubáltam. Az inkubációs hőmérsékletet az irodalmi adatok alapján 37°C-ra állítottam be.

A cellulóz szubsztráton nevelt marha bendőből származó kevert kultúra gáztermelését gázkromatográffal ellenőriztem:



5. ábra

A bendőkonzorcium gáztermelésének kromatogramja, 6 napos inkubáció végén.

Az 5. ábra kromatogramján metán és széndioxid azonosítható, hidrogén nem. Ez a mérési eredmény nem okozott meglepetést, ugyanis az irodalom alapján a bendő mikroflórájának fontos tagjai a metanogének, melyek képesek a cellulóz hidrolízise során felszabaduló egyszerű cukrokból keletkező ecetsavból és hidrogénből metánt képezni. Másik csoportjuk pedig H_2 -ből és CO_2 -ből képes CH_4 -t előállítani. Azt feltételeztük tehát, hogy a cellulózbontók termelnek hidrogént, és azt a jelen levő metanogének aktívan felveszik, és metántermelésre fordítják. Eme feltételezést az is alátámasztotta, hogy míg a metántermelés napról-napra növekedett, addig a CO_2 mennyisége jelentősen nem változott. Tehát a jelen levő metanogének a cellulózbontó mikroorganizmusok anyagcseréje során felszabadult H_2 -t és CO_2 -t folyamatosan metánná alakították. A fentiek alapján levonhatjuk azt a következtetést, hogy a gáztermelés szempontjából számunkra fontos mikroorganizmusok aktív anyagcserére képesek laboratóriumi körülmények között is. Vizsgálataim igazolták, hogy a bendőben vannak cellulóz bontó törzsek melyek szelekciójáról a következő alfejezetben számolok be.

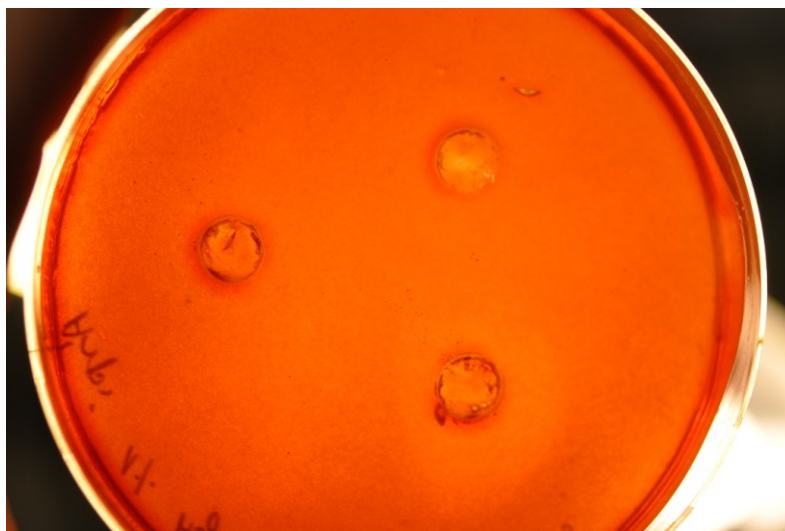
IV. 2. Cellulózbontó törzs izolálása bendőtartalomból

Számos kutatás eredménye igazolja, hogy a növényevő állatok gyomrában sok más mikroorganizmus mellett fontos szerepet játszanak a felvett tápanyagok átalakításában a cellulózbontó mikroorganizmusok.

Szelekciós kísérleteim célja az volt, hogy a bendőtartalomból tiszta, önálló telepeket kapjak, melyet több lépcsőben tudok megvalósítani. Ehhez szigorúan anaerob körülmények között, szénforrásként csak mikrokristályos cellulózt (1 m/V %) tartalmazó minimál agar lemezen izoláltam a célbaktériumokat. Az inkubációs hőmérséklet 37°C volt.

Az utolsó lépésben (amikor az agar lemezen az önálló telepek tiszta tenyészeteknek látszottak) nyert lemezekről egy telepet kiválasztottam, melyet a továbbiakban cellulózbontó izolátumnak (CI) nevezek.

A cellulózbontó képességet Congo vörös próbával is megerősítettem (6. ábra).



6. ábra

A cellulózbontó izolátum Congo vörös próbával igazolt cellulózbontása, 5 napos inkubáció végén.
A leoltási pont körül az agar halványabban festődik a cellulóz koncentráció csökkenése következtében.

IV. 3. Az izolált törzs optimális életfeltételeinek meghatározása

IV. 3. Az izolált törzs fiziológiás körülményeinek vizsgálata

A bendő mikroflórájából szelektált cellulózbontó törzs életfeltételeinek optimalizálása azért volt fontos, mert a konzorcium szélesebb hőmérsékleti és egyéb optimummal rendelkezhet. Noha az izolált törzs a bendő mikroflóra fontos tagja, ez nem jelenti azt, hogy 37°C-on dolgozik a legjobban. Ezen következtetésből kiindulva a bendőben mérhető hőmérsékletnél alacsonyabb és magasabb hőmérsékleteket alkalmaztam a minták inkubálása során. Ezen kísérletekben is szénforrásként 1 m/V % mikrokristályos cellulózt használtam minimál tápoldatban (MT).

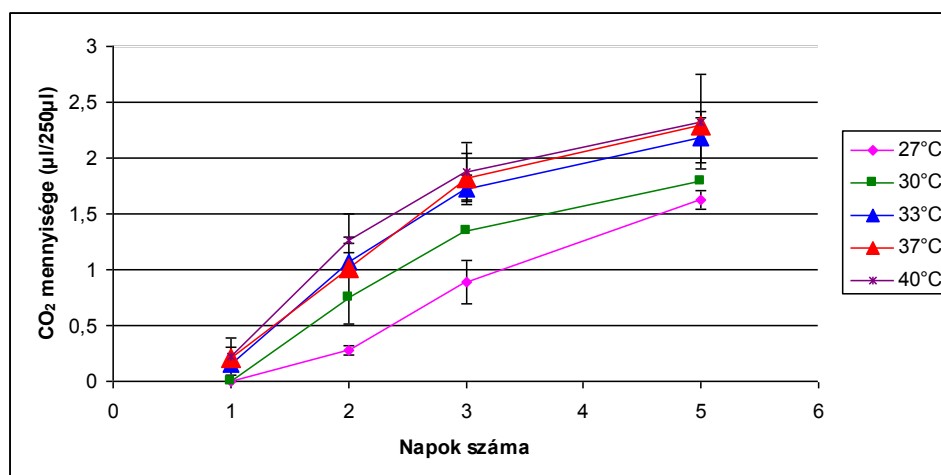
Előzetes kísérletekből tapasztaltam, hogy a kizárólagos szénforrásként csak cellulózt tartalmazó tápoldatban a cellulózbontó törzs szaporodása elmarad a könnyen felvehető, pl. glükózt tartalmazó tápoldaton szaporított sejtektől, ezért tovább kell inkubálni a kultúrát, hogy elérjük a kellő sejtszámot.

Az eredmények alapján úgy tűnik, hogy a CI hőmérsékleti optimuma a mezofil tartományba esik, hiszen magas hőmérsékleten (>50°C) nem szaporodott jól (ezekről ábrát a hely szűke miatt nem mutatok be).

A következő kísérletekben további inkubációs hőmérsékleteket alkalmaztunk, hogy pontosítsuk a tartományt. Az 5 napos inkubáció során a következő hőmérsékleteket használtam: 27- 30- 33- 37- 40°C.

Az inkubáció során naponta vettem mintát a kultúra légteréből és GC segítségével határoztam meg annak CO₂ tartalmát, melyből következtetni lehet arra, mely hőmérsékleten a leghatékonyabb a sejtek anyagcseréje, ugyanis a cellulózbontás eredményeképpen (glikolízis, anaerob fermentáció) CO₂ szabadul fel.

A kapott eredményeket a következő ábra mutatja:



7. ábra

A cellulózbontó izolátum CO₂ termelése a hőmérséklet függvényében cellulóz szénforráson

A 7. ábrán jól látszik, hogy a CI anyagcsere aktivitása 30 és 40 °C között hasonló mértékű, ezért a további kísérleteimet az irodalmi adatokra támaszkodva 37°C végeztem.

IV. 4. Az izolált törzsek azonosítása

Miután megbizonyosodtam a kiválasztott izolátumom cellulózbontó képességéről, szükségessé vált az addig még ismeretlen CI azonosítása.

A szénforrásként csak cellulózt tartalmazó tápagarról izolált törzset kívántam azonosítani. A cellulózbontó kultúra folyadékfázisából izolált CI törzset *Paracoccus pantotrophus*-ként azonosítottam 16S rDNS szekvencia alapján. Ez igen nagy meglepetést okozott, hiszen a *Paracoccus pantotrophus* egy nitrogén asszimilációjában résztvevő, fakultatív anaerob faj, melyről még senki nem írta le, hogy képes a cellulózt, mint szénforrást felhasználni.

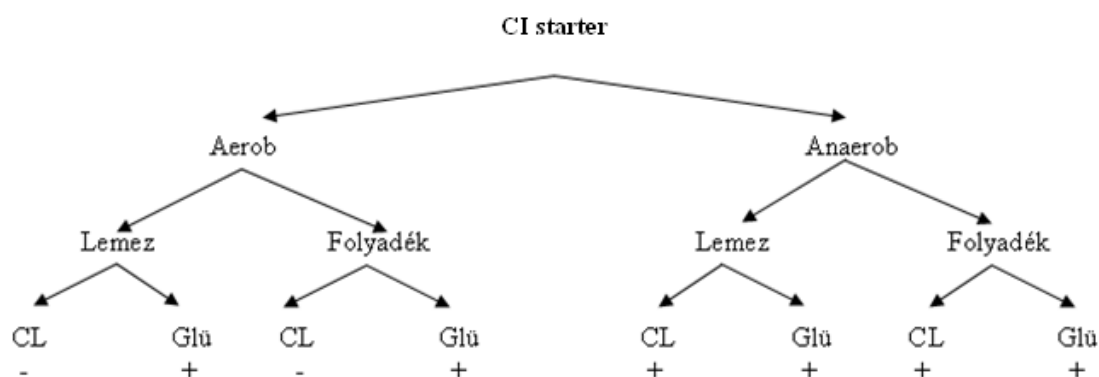
Ezért a következő kísérleteket eme meglepő adat igazolására végeztük el, melyekhez, mint pozitív kontroll a *Paracoccus pantotrophus* DSMZ 2944 törzset használtam.

IV. 4. 1. Vajon valóban képes-e a *Paracoccus pantotrophus* a cellulóz biomassza biodegradációjára?

Az azonosítást követően olyan kísérletet terveztünk, mely megerősíti, hogy az általunk izolált törzs tényleg *Paracoccus pantotrophus*, és képes a cellulóz biomassza átalakítására.

A kísérlet megtervezésénél az irodalmi adatokat tartottuk szem előtt, melyek szerint a *P. pantotrophus* közel semleges pH-n, 37°C-on, aerob és anaerob körülmények között is képes anyagcserét folytatni.

Ennek megfelelően az általam izolált törzset leoltottam szénforrásként vagy csak cellulózt, vagy csak glükózt tartalmazó, minimál tápoldatra aerob, illetve anaerob körülmények között. A vizsgálatokat szilárd fázison illetve folyadékkultúrában is elvégeztem, mert az irodalmi adatok alapján ez egy nem mozgékony baktérium. Az inkubációs hőmérséklet minden esetben 37°C volt. A baktérium számára anaerob körülmények között emelt nitrát koncentrációt biztosítottunk, mint alternatív elektronakceptort.



8. ábra

A *Paracoccus pantotrophus* cellulózbontó képességének igazolására tett kísérlet felépítése

Jelmagyarázat: '+' : szaporodik, '-' : nem szaporodik, Glü : glükóz, CL : cellulóz

A különböző feltételek mellett nevelt kultúra csak anaerob körülmények között volt képes a mikrokristályos cellulóz bontására, aerob környezetben csupán glükózon volt képes növekedni, cellulózon nem (8. ábra). Aerob körülmények között csak glükózon volt tapasztalható szaporodás, ami azt engedi feltételezni, hogy a cellulóz bontó törzs obligát anaerob, aerob körülmények között nem aktív, viszont mellette megbújik a *Paracoccus*, amely mind aerob, mind anaerob képes anyagcserét folytatni. Továbbá megfigyeléseink alapján a *Paracoccus* jelenléte pozitív hatással van a cellulóz hidrolízisére.

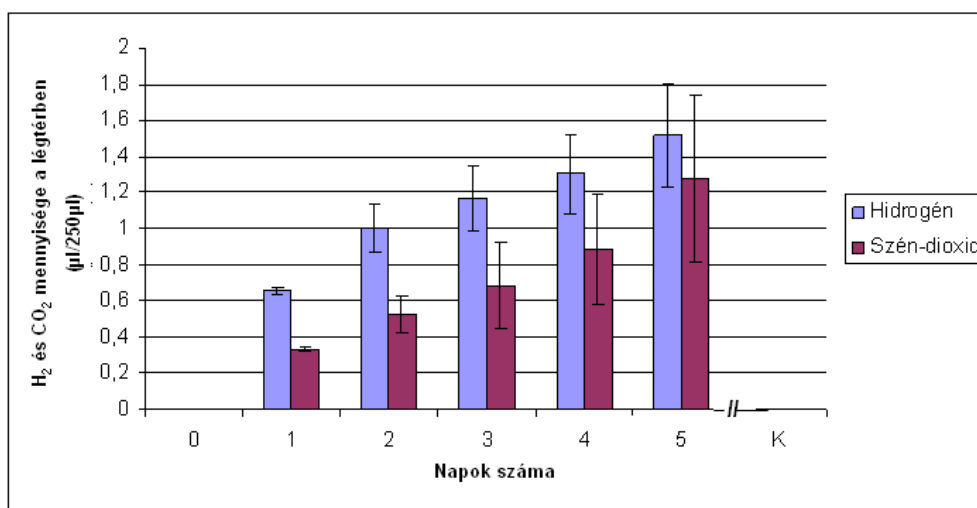
A következő kísérletben, hogy kiküszöböljem a *P. pantotrophus* „fertőzést”, a MT-ban az NH_4NO_3 -ot kicseréltem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ra, ugyanis feltételeztem, hogy a *P. pantotrophus* a

cellulózbontó törzs mellett azért volt képes anaerob körülmények között szaporodni, mert az NH_4NO_3 -ot, mint végső elektronakceptort használta.

Amennyiben a *P. pantotrophus*, mint nitrátlégző nitrát elektronakceptor hiányában képtelen fennmaradni anaerob körülmények között, akkor a cellulózbontó mellől kisselektálódik.

IV. 4. 2. A nitrogénforrás lecserélésének hatása a cellulóz biodegradáció hatékonyságára

Az NH_4NO_3 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ra való cseréje mellett a cellulózbontó izolátumomat különböző pH értékű (pH= 6.4, 7.0, 7.4, 8.0) minimál tápoldatra oltottam le, amely kizárólagos szénforrásként csak mikrokristályos cellulózt tartalmazott (1 m/V %). Az eltérő pH értékeket K_2HPO_4 és KH_2PO_4 arányának változtatásával állítottam be. A kémhatás változtatásával arra szerettem volna fényt deríteni, hogy a cellulózbontó izolátumomnak mi az optimális környezeti pH-értéke, ugyanis lehetséges, hogy a fertőzés befolyásolta az eddigi vizsgálataimat a pH optimumra nézve. Az inkubációs hőmérséklet ebben az esetben is 37°C volt. (Kontroll törzsként a *P. pantotrophus* DSMZ 2944 törzset ebben az esetben is felhasználtam az előző eredmény megerősítése céljából). A kultúrák anyagsere-folyamatait, a termelődő gázok mennyiségét GC segítségével ellenőriztem.



9. ábra

A 37°C -on inkubált kultúra (pH=7.0) légterében a H_2 és CO_2 mennyiségének változása a napok múlásával. K= kontroll (*P. pantotrophus* DSMZ 2944 törzs)

A különböző pH értékekre beállított kultúrák közül a semleges kémhatású mutatta a legjobb anyagcserét, ezért ezt a grafikont mutatom be (9. ábra). A grafikonon jól látszik, hogy a CI törzs képes a cellulóz bontására és anyagcsere végtermékként H_2 -t és CO_2 -t bocsát ki a környezetbe. A kontrollként használt *P. pantotrophus* törzs sehol sem mutatott anyagcsere aktivitást, és nem is szaporodott az alkalmazott tápoldatokban, ami megerősíti feltételezésünket, hogy cellulóz bontó izolátumunk mellett csupán segéderőként játszik szerepet. (A cellulóz bontó törzs azonosítása folyamatban van.)

IV. 5. *P. panthotrophus* mentes környezetben végzett kísérletek a cellulózbontó izolátummal

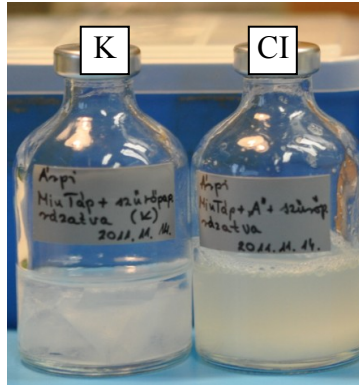
Az irodalmi adatokra támaszkodva azt gondoljuk, hogy a bendőben a cellulózbontó mikroorganizmusok egy csoportja úgy képes a leghatékonyabb módon cellulóz biomasszát átalakítani, hogy kitapad a növényi rostokra és glikokalix réteget képez maga köré. Ezzel elkerülve a fagocitózist, káros környezeti behatásokat.

Elképzelésünk szerint a mikrokristályos cellulóz nem ad megfelelő felületet a kitapadáshoz. Ezért elvégeztem egy olyan kísérletet melyben a mikrokristályos cellulózt szűrőpapírral helyettesítettem (a szűrőpapír lényegében tiszta cellulóz). Ugyanis a szűrőpapír jóval nagyobb felületet biztosít ezen mikroorganizmusok számára a kitapadáshoz.

Törzseim aktivitását megvizsgáltam rázatott, és nem rázatott körülmények között is arra keresve választ, hogy a rázás hatással van-e a sejtek „működőképességére”, azaz a szűrőpapírra (cellulóz) tapadásra, és bontására. A rázás következtében egyrészt homogénebb a tápanyageloszlás, másrészt pedig valamelyest a rázás hozzájárul a bendőben zajló folyamatok (a bendő keverő funkciója) valóságosabb rekonstrukciójához. Ugyanakkor zavarhatja a sejtek kitapadási folyamatát, ami hátráltatja azok anyagcseréjét.

IV. 5. 1. A cellulóz bontó törzs anyagcsere aktivitása szűrőpapír szénforráson

A cellulóz bontó izolátum tisztítását követően leoltottam csak szűrőpapírt tartalmazó minimál tápfolyadékra. Az inkubáció 37°C-on történt. A fent említett okok miatt pedig az egyik sorozatot rázatott körülmények között 150 rpm sebességgel mozgattam. Kontrollként sejtmentes mintát alkalmaztam.

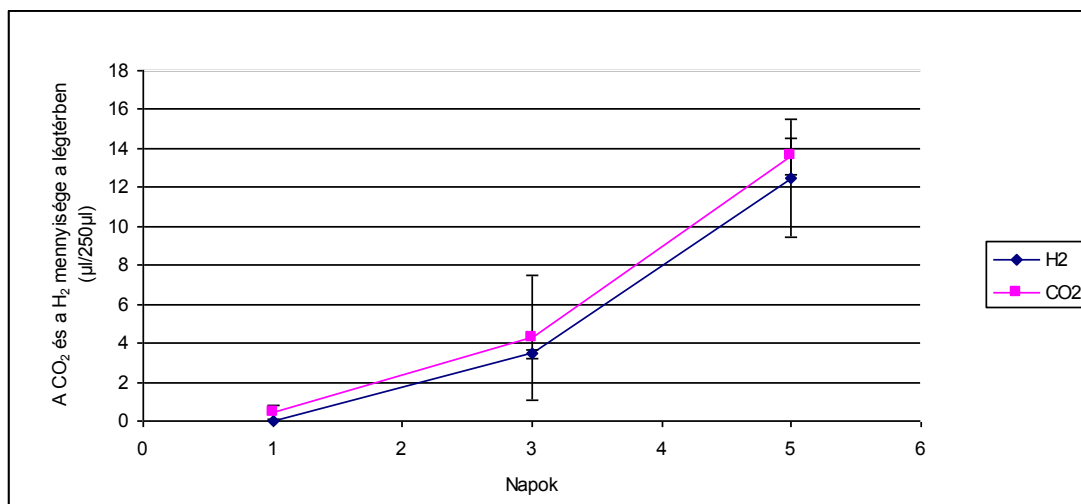


10. ábra

Szénforrásként csak szűrőpapírt tartalmazó MT tápoldaton növesztett CI kultúra, és a sejtmentes kontrol (K), 6 napi inkubáció után. Az inkubációs hőmérséklet 37°C volt.

Az 10. ábrán jól látszik, hogy az izolátum képes volt a szűrőpapíron szaporodni, megkezdte annak lebontását. A szűrőpapír szétbomlása minden bizonnyal a mikroorganizmus aktivitásának következménye, nem pedig a rázatásé, ugyanis a sejtmentes kontrollban a szűrőpapír egyben maradt.

A következő kísérletet arra terveztem, hogy megállapítsam, hogy az izolátumom képes-e H_2 -t előállítani szűrőpapír szénforráson. A leoltást követően vizsgáltam a légtér gázösszetételének változását a napok múlásával Shimadzu GC segítségével. A kapott eredményeket az alábbi grafikon szemlélteti (11. ábra).



11. ábra

A cellulózbontó izolátum CO₂ és H₂ termelése szűrőpapír szénforráson.

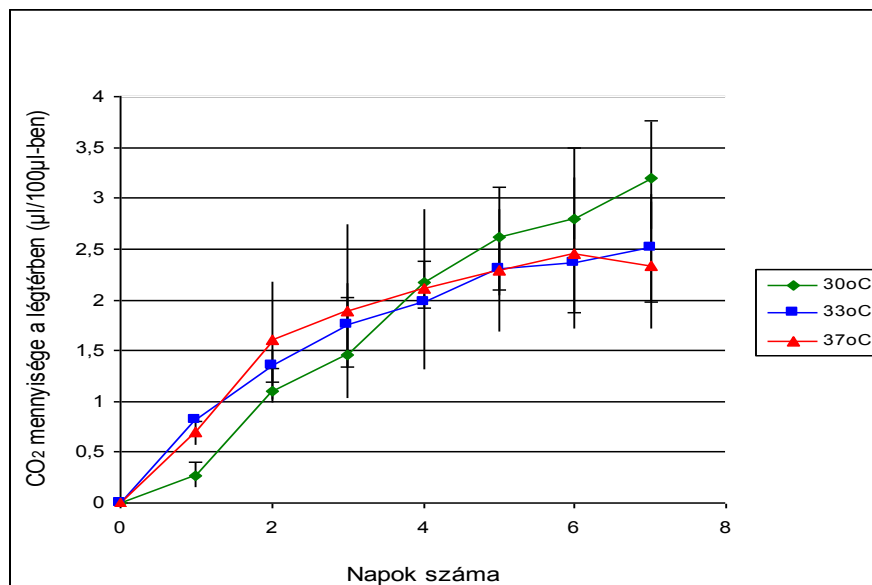
A 11. ábrán jól látszik, hogy az izolátum képes a szűrőpapírt, mint szénforrást hasznosítani, anyagcsere melléktermékként CO₂ –ot és H₂-t előállítva.

Összehasonlítva a 9. és a 11. ábrát, megállapítható, hogy a CI jóval hatékonyabb anyagcserét folytat szűrőpapíron, mint mikrokristályos cellulózon.

IV. 5. 1. 1. A cellulóz bontó izolátum anyagcsere folyamatainak vizsgálata különböző hőmérsékleteken

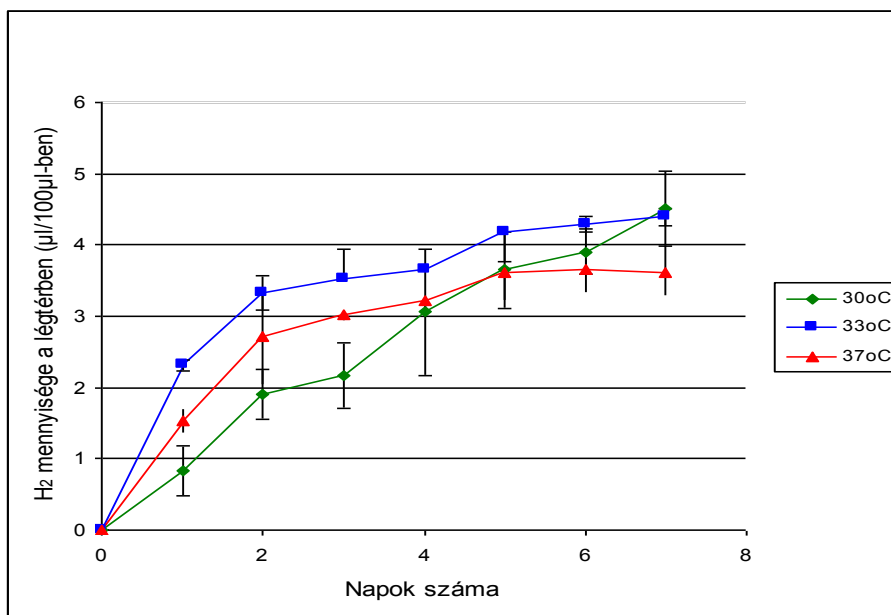
Az irodalmi adatok alapján a cellulózbontó törzsek a hidrolízis eredményeként felszabaduló glükózból szerves savakat képesek előállítani, mint például ecetsavat, propionsavat, vajsavat. Ennek megfelelően olyan kísérletet állítottam össze, melyben vizsgáltam a CI anyagcsere aktiviását különböző hőmérsékleteken. Az anyagcsere jellemzésére a CO₂ és H₂ felszabadulás mellett szerves savakat is vizsgáltam. A IV.3. alfejezetben tárgyaltak alapján a CI 40°C felett jelentősen veszít az anyagcsere aktivitásából, ezért ezen kísérletben 30, 33 és 37°C-ot alkalmaztam, szénforrásként pedig 1(m/V)% cellulózt (szűrőpapír) minimál tápfolyadékban, 150 rpm-en rázatva, szigorúan anaerob körülmények között.

A kapott eredményeket a következő ábrák mutatják:



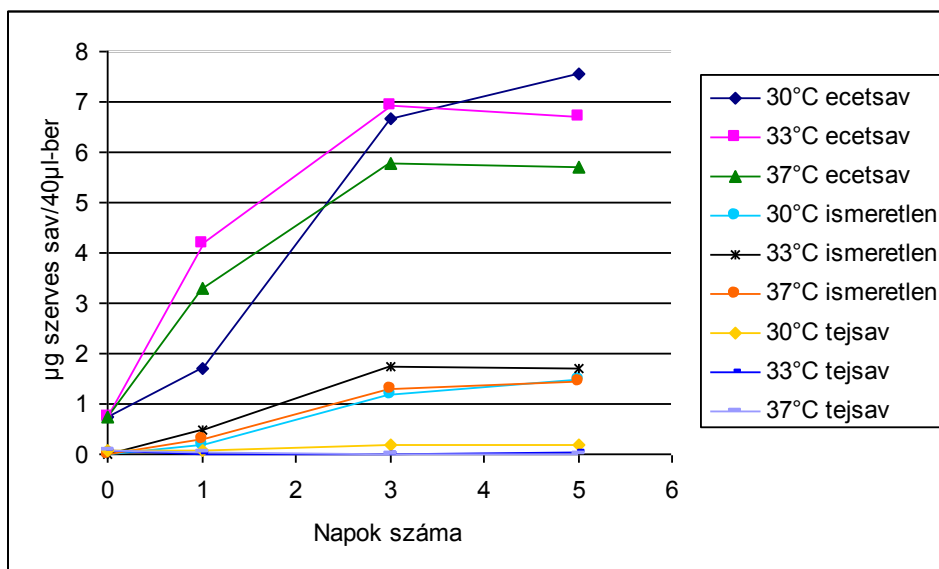
12. ábra

A CI anyagcsere folyamatai során felszabaduló CO₂ mennyiségének változása a napok múlásával, 30, 33 és 37 °C-on, szűrőpapír szénforráson.



13. ábra

A CI H₂ termelése 30, 33 és 37 °C-on, szűrőpapír szénforráson.



14. ábra

A CI anyagcseréje során felszabaduló szerves savak mennyiségének változása a napok múlásával.

A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a CI 30, 33 és 37°C-on szinte azonos mértékben folytat anyagcserét. A CI 30°C-on valamelyest lassabban adaptálódik az adott körülményekhez, viszont a 3.- 4. napon eléri, sőt le is hagyja a 33, 37°C-on inkubált mintákat.

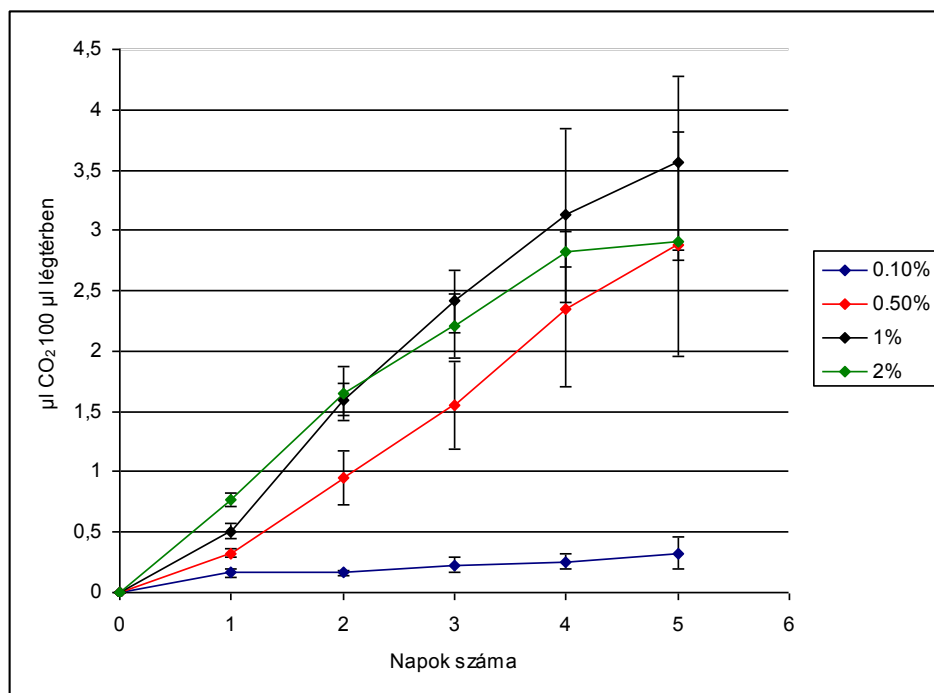
Irodalmi adatok alapján a mintákban ecetsav mellett megjelenhet a tejsav is, mint anyagcsere melléktermék, de csak kis koncentrációban, ugyanis azt a sejtek rögtön tovább is alakítják. A 14. ábrán ez jól megfigyelhető, hiszen csak igen kis koncentrációban van jelen a mintákban a tejsav. A 30°C-on inkubált mintákban talán azért lehet magasabb a tejsav koncentrációja, mert ezen hőmérsékleten, a tejsav, mint intermedier átalakítását katalizáló enzimek működése nem annyira összehangolt a savat képző enzimek működésével. A 33 és 37°C-on inkubált mintákban az ötödik napra csökkent az ecetsav koncentrációja, ami magyarázható azzal, hogy az izolátum az anyagcsere során keletkező ecetsavat képes továbbalakítani. Ekkorra beáll egy egyensúly a savtermelés és savátalakítás között, ugyanis a túlzott szerves sav tartalom a tápoldatot túlzottan lesavanyíthatja, mely az anyagcsere folyamatok lassulásához, esetleges leállásához vezethet.

Összességében megállapítható, hogy a CI cellulóz bontásából származó anyagcsere termékeinek mennyisége között 30, 33 és 37°C-on nincs jelentős eltérés.

IV. 5. 1. 2. A cellulóz (szűrőpapír) mennyiségének hatása az izolátum anyagcseréjére

Az irodalmi leírások alapján a cellulóz bontására képes mikroorganizmusok többsége úgy képes a leghatékonyabban a cellulóz biomaszra átalakítására, hogy kitapad a rostok felszínére. Erre az ismeretre, illetve méréseink eredményeire támaszkodva (IV. 5. 1. fejezet) megvizsgáltuk, hogy a szűrőpapír mennyiségének növelésével, ezáltal a kitapadásra alkalmas felületek növelésével, milyen mértékben fokozható a cellulózbontás. Ezen kérdés megválaszolására olyan kísérletet állítottam össze, melyben minimál tápfolyadékban különböző mennyiségben alkalmaztam a szűrőpapírt, mint szénforrást. A kísérlet során a következő cellulóz mennyiségekkel dolgoztam: 0,1; 0,5; 1,0 és 2,0 (m/V) %. Az inkubáció körülményei: szigorúan anaerob környezet, 150 rpm, 37°C.

A kapott eredményt az alábbi grafikon szemlélteti:



15. ábra

A CI anyagcseréje során felszabaduló CO₂ mennyiségének változása az idő múlásával, különböző koncentrációjú szűrőpapír szénforráson.

A 0,1 (m/V) % cellulózt tartalmazó minták jelentősen elmaradtak a több szubsztrátot tartalmazó mintáktól, amely annak lehet a következménye, hogy ez kevés szénforrás a CI számára, és igen kicsi felületet biztosít a sejtek kitapadásához. A 2,0 (m/V) % cellulóz tartalmú minta esetén viszont a CO₂ felszabadulás elmarad az 1,0 (m/V) %-os mintáktól, ami több tényező eredménye is lehet. Egyrészt a magas cellulóz tartalom által biztosított nagy felületre eső mikroorganizmusok száma alacsony, tehát az inokulummal bevitt

mikroorganizmus mennyiség kitapadásához szükséges felületet már az 1,0 (m/V) % mennyiségű cellulóz is biztosítja, így a cellulóz mennyiségének növelése nem párosul nagyobb mértékű cellulóz bontással. Másrészt a 2,0 (m/V) % cellulóz tartalom olyan sok szűrőpapír tartalmat jelent, hogy szinte szilárd fázisú fermentációról beszélhetünk.

A mért eredmények (15. ábra) alapján megállapítható, hogy a szubsztrát mennyiségének növelése egy bizonyos mértékig fokozza az anyagcsere aktivitását (1,0 (m/V) %), viszont az ettől magasabb cellulóztartalom már nem eredményez hatékonyabb cellulózbontást.

V. Eredmények értékelése

A cellulóz bontás optimális körülményeinek meghatározásához elvégzett kísérletek eredményeit összevetve - amelyek az anyagcserére (CO_2 termelés) vonatkoztak - megállapítható, hogy az általam izolált CI törzs szélesebb hőmérséklettartományban ($27 - 40^\circ\text{C}$) képes szaporodni. $30-37^\circ\text{C}$ között hasonló aktivitással bontja a cellulózt (IV.3. fejezet 7. ábra), ezért az irodalmi adatokra támaszkodva a további kísérleteimhez 37°C -ot alkalmaztam.

Meghatároztam, hogy a cellulózbontó törzs milyen kiindulási pH esetén szaporodik optimálisan. Különböző pH értékű tápfolyadékokra oltottam le a CI-ot, és a semleges kémhatás mellett tapasztaltam a legintenzívebb anyagcserét. Így a továbbiakban a semleges kémhatású tápoldatot tekintettem a CI számára optimálisnak (IV.4.2. 9. ábra).

A pontos és hatékony munkához elengedhetetlen a cellulózbontó törzs fajsztípus meghatározása, melyet a 16S rDNS szekvencia analízise alapján határoztam meg. Az első eredmények szerint az általam izolált CI *Paracoccus pantotrophus*, ami egy nitrogén asszimilációjában résztvevő, fakultatív anaerob faj, melyről még senki nem írta le, hogy képes a cellulózt, mint szénforrást felhasználni. Ezért eme meglepő eredményt kétkedve fogadtam, és egy kísérlet összeállításával (IV. 4. 1-es pont 8-as ábrájának megfelelően) ellenőriztem valóban képes-e ez a törzs cellulóz bontásra. A kísérlet eredményei alapján megállapítható, hogy a *P. pantotrophus* önmagában nem képes a cellulózt bontani, hiszen ha valóban a cellulózon, mint egyedi szénforráson megélő mikroorganizmus lett volna, akkor képes lett volna a cellulózon szaporodni egyéb szénforrás hiányában. Ugyanezt az eredményt erősítette meg a pozitív kontrollal elvégzett kísérlet is, a *P. pantotrophus* DSMZ 2944 törzs nem volt képes sem aerob, sem anaerob körülmények között a cellulóz bontására. Anaerob módon, csak cellulóz szénforrást tartalmazó tápon a *P. pantotrophus* minden bizonnyal a valódi cellulózbontó által termelt metabolitokon tudott túlélni. Aerob körülmények között, a glükózt tartalmazó tápoldatban a *P. pantotrophus* szaporodott, a cellulózbontó törzs pedig inaktív volt, vagy elpusztult. A fenti kísérlet eredménye alapján szükséges a cellulózbontó törzs további vizsgálata, melynek során nemcsak a folyadékfázisból, hanem a szűrőpapír felszínéről is veszek mintát az azonosításhoz. Annak érdekében, hogy a *P. pantotrophus* mentes körülmények között jellemezzem a cellulóz bontó törzset, a nitrogénforrást NH_4NO_3 -ról $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ra cseréltem, melyet a *P. pantotrophus* nem képes végső elektronakceptorként felhasználni. Semleges kémhatású minimál tápfolyadékban 37°C -on inkubált minták GC segítségével végrehajtott légtéranalízisének eredménye szerint az 5. napra a teljes légtér csupán 0,5 V/V %-a volt

CO₂ és 0,5 V/V%-a volt H₂. A kontrollként használt *P. pantotrophus* törzs sehol sem mutatott anyagcsere aktivitást, és nem is szaporodott az alkalmazott tápoldatokban. A fentiek alapján tehát kijelenthető, hogy a CI törzs nem *Paracoccus sp.*, viszont a cellulóz bontását elősegíti a *Paracoccus sp.*

A cellulózbontó izolátumomat többször átoltottam NH₄NO₃ helyett (NH₄)₂SO₄ –ot tartalmazó tápfolyadékra (melyet a *P. pantotrophus* nem képes felhasználni, mint végső elektronakceptor), ezzel reményeink szerint sikerült tiszta cellulózbontó tenyészetet előállítanom. Ennek azonosítása folyamatban van.

Az irodalmi adatokra támaszkodva a bendőben a cellulózbontó mikroorganizmusok egy csoportja úgy képes a leghatékonyabb módon a cellulóz biomasszát átalakítani, hogy kitapad a növényi rostokra és glikokalyx réteget képez maga köré. Ehhez viszont megfelelő nagyságú felület szükséges. A mikrokristályos cellulóz szűrőpapírra cserélése következtében a dolgozat IV.5.1. fejezetének 11-es ábráján jól látszik, hogy az izolátum képes volt a szűrőpapírt, mint szénforrást hasznosítani, anyagcsere melléktermékként CO₂ –ot és H₂-t előállítva. 5 napos inkubációt követően a légtér közel 5,0 (V/V) %-a H₂ és 5,5 (V/V) %-a pedig CO₂ volt. Ezek az értékek jelentősen meghaladták a mikrokristályos cellulózon mért értékeket (IV.5.1. fejezet 9. ábra: Az 5. napra a teljes légtérnek csupán 0,5 (V/V) %-a volt CO₂ és 0,5 % (V/V) % volt H₂) tehát a feltételezésünk beigazolódott, a jobb anyagcseréhez szükséges a mikroorganizmusok számára a nagyobb felület, melyre ki tudnak tapadni.

A sejtek anyagcseréjük folyamán a cellulózt hidrolizálják, intermediereként glükózt szabadítanak fel, melyből szerves savakat képesek előállítani. A szerves savtermelést igazoló kísérleteim eredményei alapján megállapítottam, hogy 30, 33, illetve 37°C-on is képes a CI ecetsavat, tejsavat, illetve egy eddig nem meghatározott szerves savat termelni (IV.5.1.1. 14. ábra). A HPLC mérés alapján, az ecetsav már 30°C-on is megjelenik a mintákban, viszont magasabb hőmérsékleten (33, 37°C) hamarabb beindul az ecetsav termelése. a tejsav koncentrációja 30°C-on magasabb, mint 33 és 37°C-on, ami valószínűleg az alacsonyabb hőmérséklet következtében később beinduló anyagcsere eredménye.

A cellulóz (szűrőpapír) és ezáltal a felület nagysága hatással van a CI anyagcseréjére. Az eredmények alapján megállapítható (IV.5.1.2. fejezet 15. ábra), hogy a szubsztrát koncentrációjának növelése egy bizonyos mértékig fokozza a cellulóz bontás mértékét (1(m/V)%), viszont az ettől magasabb koncentráció, már nem eredményez hatékonyabb cellulóz bontást.

VI. Összefoglalás

- A Gorzsai húszüzemből származó szarvasmarha gyomortartalom fiziológiás sóoldatban történő felvétele után mikroszkóp és GC segítségével igazoltam, hogy a bendő mikroflórája laboratóriumi körülmények között fenntartható.
- A szarvasmarha gyomortartalomból többlépcsős szelekciót követően sikeresen izoláltam olyan baktériumot, mely képes kizárólagos szénforrásként csak cellulózt tartalmazó minimál táptalajt tartalmazó agarlemezen és tápfolyadékon fennmaradni, és szaporodni.
- Mikrokristályos cellulózt (1m/V %) tartalmazó minimál tápfolyadékon a törzsem 30 és 40°C között közel azonos módon viselkedik.
- Kimutattam, hogy a törzsem képes a mikrokristályos cellulóz bontása során H₂-t termelni.
- Fajszíntén meghatároztam a 16S rDNS génszekvencia alapján a cellulózbontó izolátumot, melynek eredményeképpen azt kaptam, hogy az általam izolált törzs *Paracoccus pantotrophus*. Az utólagos kísérletekből kiderült, hogy a *P. pantotrophus* önmagában nem képes a cellulóz bontására, viszont jelenléte fokozza a CI cellulóz bontó hatékonyságát.
- Minimál tápoldatomban az NH₄NO₃ (NH₄)₂SO₄-ra történő cseréjének köszönhetően sikeresen növesztettem *P. pantotrophus* mentes cellulózbontó kultúrát.
- Kimutattam, hogy a CI cellulózbontó törzs képes H₂-t előállítani a szűrőpapír bontása során is jóval nagyobb mennyiségben, mint mikrokristályos cellulóz szénforráson. Ez a kísérlet megerősíti azt a feltételezésünket, hogy a paraméterek (esetünkben a kitapadási felület) megfelelő beállítása jelentősen befolyásolja a sejtek anyagcseréjét.
- Igazoltam, hogy 30-37°C között az izolált törzs nem mutat jelentős eltérést az anyagcsere folyamatok során felszabaduló termékek tekintetében szűrőpapír szénforráson. A különböző hőmérsékleteken csak az anyagcsere fellendülésében tapasztalható különbség.
- A cellulózmennyiség növelésének eredményeként elmondható, hogy egy bizonyos mértékig - 1 (m/V) % - növelve a szubsztrát koncentrációt, fokozható az anyagcsere, viszont ezen értéken felül csupán a cellulóz koncentrációjának növelése nem eredményez hatékonyabb cellulózbontást.

Köszönetnyilvánítás

Prof.Dr. Kovács Kornélnak, hogy lehetőségem volt a Biotechnológiai Tanszéken dolgozni.

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, Dr. Perei Katalinnak, illetve Dr. Rákhely Gábornak, hogy tudásukkal és tapasztalatukkal segítették eme dolgozat létrejöttét.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani a technikai segítségért Zsiros Szilviának, aki munkám során mindig odaadóan nyújtott segítséget számomra.

Ezen kívül külön szeretnék köszönetet mondani a Biotechnológiai Tanszék minden dolgozójának, akiktől szintén rengeteg tanácsot és segítséget kaptam a munkám során.

VII. Irodalomjegyzék

1. Láng Ferenc, (2007) Növényélettan, A növényi anyagcsere I., ELTE Eötvös Kiadó, ISBN 963 463 567 9
2. Lynd L. R., P. J. Weimer, W. H. van Zyl, I. S. Pretorius (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiol and Mol Biol Rev. Vol. 66: 506-577.
3. Rubin E. M., (2008) Genomics of cellulosic biofuels, Nature, Vol. 454: 841-45.
4. Maki M., K. T. Leung, W. Qin, (2009) The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass, *Int J Biol Sci.* Vol. 5:500-516
5. Szabó Loránd, (2006) Enzim analízis technikák a géndózis változásától a térszerkezet meghatározásáig, avagy a tioészteráz enzim Bacitracin bioszintézisében betöltött szerepének meghatározása, illetve növényi sejtfalbontásban résztvevő enzimek vizsgálata, Doktori értekezés, Szent István Egyetem Gödöllő
6. Weimer P. J., (1996) Why Don't Ruminant Bacteria Digest Cellulose Faster, Journal of Dairy Science, 79:1496-1502
7. Russel J. B., J. L. Rychlik, (2001) Factors That Alter Rumen Microbial Ecology, Science, Vol 292, 1119-1122
8. Weimer P. J., J. B. Russel, R. E. Muck, (2009) Lessons from the cow: What the ruminant animal can teach us about consolidated bioprocessing of cellulosic biomass, Bioresource Technology, Vol 100, Issue: 100, 5323-5331
9. Miron J., D. Ben-Ghedalia, M. Morrison, (2001) Adhesion Mechanisms of Rumen Cellulolytic Bacteria J. Dairy Sci. 84:1294–1309
10. Kevei Ferenc, Kucsera Judit (2010) Mikrobiológia I. JATEPress, Szeged
11. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2001) Editor-in-chief: G. M. Garrity, ISBN 978-0-387-98771-2
12. Weimer P. J., R. G. Koegel, L. F. Lorenz, C. R. Frihart, W. R. Kenealy, (2005) Wood adhesives prepared from lucerne fiber fermentation residues of *Ruminococcus albus* and *Clostridium thermocellum*, Appl Microbiol Biotechnol 66: 635–640
13. Weimer P. J., N. P. J. Price, O. Kroukamp, Lydia-Marie Joubert, G. M. Wolfaardt, W. H. Van Zyl, (2006) Studies of the Extracellular Glycocalyx of the Anaerobic Cellulolytic Bacterium *Ruminococcus albus* 7, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 72, No. 12. p. 7559-7566,
14. Matulova M., R. Nouaille, P. Capek, M. Pe'an, E. Forano, A.-M. Delort, (2005) Degradation of Wheat Straw by *Fibrobacter succinogenes* S85: a Liquidand Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Study, Applied and Environmental Microbiology, Vol 71, No. 3, p. 1247–1253
15. Béki Emese, (2004) Celluláz és hemicelluláz gének izolálása a *Thermobifida fusca* TM51 törzsből. Doktori értekezés. Szent István Egyetem Gödöllő

Nyilatkozat

Alulírott Szilágyi Árpád a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- tápoldatok, táptalajok készítését,
- a bendőtartalomból történő izolációt, kultúrák tisztítását,
- celluláz aktivitás vizsgálatát Kongó vörös próbával,
- légtéranalízist gázkromatográffal (Agilent GC, Shimadzu GC),
- bakteriális genomi DNS tisztítást,
- PCR reakciókat,
- agaróz gélelektroforézist,
- DNS izolálást gélből,
- HPLC analízist végeztem el.

Dátum: 2013. január 20.

.....
aláírás