



XXXI. OTDK Biológia Szekció

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Biotechnológiai Tanszék

Cellulózban gazdag biomassza anaerob fermentációja

Kakuk Balázs

II. éves Biológus Msc. hallgató

Témavezetők:

Prof. Dr. Kovács L. Kornél

Dr. Bagi Zoltán

2012

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	7
3. Célkitűzés	14
4. Anyagok és módszerek	15
4.1. Felhasznált mikroorganizmusok	15
4.1.1. <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> (DSM 7461)	15
4.1.2. <i>Isoptericola variabilis</i> (DSM 10177)	15
4.1.3. <i>Cellulomonas fimi</i> (DSM 20114)	16
4.1.4. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (DSM 7)	16
4.1.5. <i>Acetivibrio cellulolyticus</i> (DSM 1870)	16
4.2. Törzsgyűjtemény készítése	17
4.3. Tápoldatok	18
4.3.1. M92. TRYPTICASE SOY YEAST EXTRACT MEDIUM	18
4.3.2. M220. CASO MEDIUM	18
4.3.3. M53. CORYNEBACTERIUM MEDIUM	18
4.3.4. M165. ACETIVIBRIO CELLULOLYTICUS MEDIUM	19
4.3.5. M1. NUTRIENT MEDIUM	20
4.4. Sejtszám meghatározás	21
4.4.1. Bürker-kamrás sejtszámlálás	21
4.4.2. Spektrofotometriás mérés	21
4.5. Glükóz meghatározás folyadékkromatográfiával	22
4.6. Batch-fermentáció	22
4.7. Szárazanyag tartalom meghatározás	23
4.8. Szervesanyag tartalom meghatározás	23

4.9. Silókukorica szubsztrát aerob előkezelése.....	23
4.10. Szubsztrát biomassa	23
5. Eredmények és kiértékelésük	24
5.1. A baktérium törzsek növekedésének oxigénfüggése	24
5.1.1. <i>Isoptericola variabilis</i> növekedésének oxigén függése:	24
5.1.2. <i>Cellulomonas fimi</i> növekedésének oxigén függése:	25
5.1.3. <i>Cellulosimicrobium cellulans</i> növekedésének oxigén függése:	26
5.1.4. <i>Acetivibrio cellulolyticus</i> növekedésének oxigén függése:	27
5.1.5. <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> növekedésének oxigén függése	28
5.2. A cellulózbontás figyelemmel kísérése	29
5.2.1. Fakultatív anaerob törzsek celluláz aktivitásának vizsgálata	29
5.2.2. Anaerob törzs cellulózbontó aktivitása	31
5.3. Batch fermentációk.....	34
5.3.2. Száraz kukoricaszár és levél fermentációja	35
Összegzés.....	40
Felhasznált irodalom.....	42
Köszönetnyilvánítás.....	46

1. Bevezetés

Napjainkban az emberiség igen felgyorsult ütemben termeli ki és hasznosítja a Föld fosszilis energiaforrásait. Ezen tüzelőanyagok elégetésekor különböző üvegházhatású gázok kerülnek kibocsájtásra a légterbe (a legfontosabb a CO_2), melyek hatására emelkedik a föld középhőmérséklete. Természetesen az üvegházhatás nélkülözhetetlen az élet kialakulásához illetve fennmaradásához, azonban ennek mértékét és emiatt a hőmérsékletnövekedést is, az antropogén behatások az elmúlt körülbelül egy évszázadban abnormálisan megnövelték. Az IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change – Éghajlat-változási Kormányközi Testület*) 2007-es közleménye szerint, 1905 és 2005 között ez az emelkedés $0,78 \pm 0,18$ °C volt ("Summary for Policymakers" - Climate Change 2007), melynek már napjainkban is vannak érezhető hatásai. Ilyen például az El Niño jelenség gyakoribb és pusztítóbb esetei, a gleccserek és a sarki jégsapkák olvadása, az óceánok savasságának és szintjének emelkedése, számtalan állat illetve növényfaj élőhelyének beszűkülése. Azonban még ezek a jelentős problémák is eltörpülnek a jövőbeliektől, ugyanis hasonló ütem mellett 2100-ra elérhetjük a +6 °C -os hőmérsékletemelkedést, amely beláthatatlan környezeti és társadalmi katasztrófákat okozna („Climate change 2001: Impacts, adaptation, and vulnerability”. *Figure SPM-2: Reasons for concern about projected climate change impact.*)

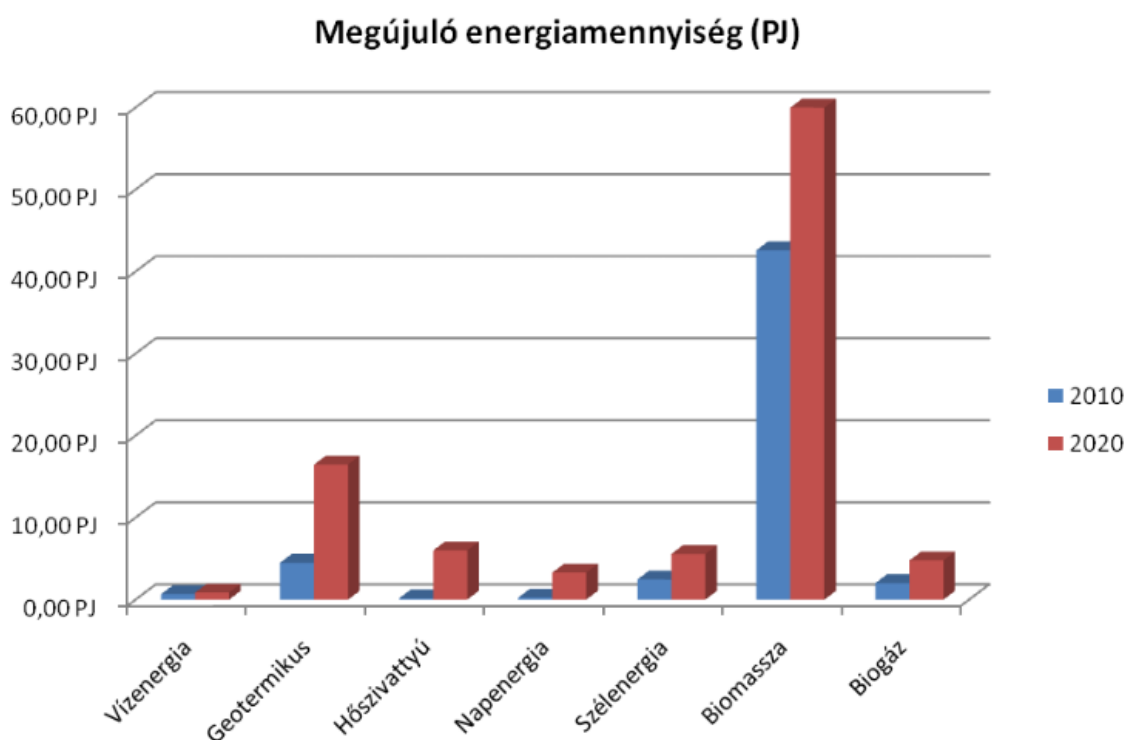
Amellett, hogy a fosszilis energiahordozók a környezetet ilyen súlyosan károsítják, nem nyújtanak hosszú távú megoldást a Föld népességének robbanásszerűen növekedő energiaigényére. Ez 2008-ban 474 EJ volt, melynek 80-90%-a származott fosszilis tüzelőanyagokból. A kőolaj napi felhasználása 2009-ben 84 millió hordó volt, a számítások szerint 2057-re ilyen ütemű kitermelés mellett teljesen kimerülnek a tartalékok (BP Statistical Review of World Energy 2010).

A nukleáris energia hasznosítása lehetne esetleg megoldás, azonban a hasadóanyagok készlete sem végtelen, a radioaktív hulladékok elhelyezése problémás, illetve a balesetek kockázata sem elhanyagolható. A jövőben valószínűleg a magfúziós erőművek fognak nagy szerepet kapni, hiszen elvileg óriási mennyiségű környezetbarát energiát szolgáltatnak, káros mellékanyag nem keletkezik, alapanyaga egyszerű esetben a

hidrogén izotópjai, amely lényegében kimeríthetetlen mennyiségben áll rendelkezésre. Ezek technológiai megvalósítása azonban jelentős akadályokba ütközik, ez okból felhasználásukra a közeljövőben bizonyára nem kerül sor (European Commission, Fusion Research 2007).

Ezzel szemben a megújuló energiaforrások megoldást jelenthetnek mind a jelen, mind a jövő energiaproblémái számára. Számos technológia létezik ezek kiaknázására, melyek közül némelyik még egészen gyerekcipőben jár, mások pedig már szinte teljesen kiforrtak (Renewables 2012 Global Status Report [Paris: REN21 Secretariat]). A lehetőségek tárháza igen széles, függően a természeti adottságoktól, egyes országoknak a napenergia, másoknak a hullám, vagy árapály energia lehet jó választás. Magyarország mezőgazdasági adottságai különösen jók, ezért biogáz előállításra képes fermentorok létesítését jobban kellene szorgalmazni.

A Megújuló Energia Hasznosítási Cselekvési Terv az új magyar energiapolitika fontos alapidokumentuma, amelyet a magyar kormány 2010. december 22-i ülésén tárgyalta meg, és hagyta jóvá. A dokumentum a különböző megújuló energiafajtákra 2020-ig a következő előrejelzést adta:



1. ábra - A Nemzeti Cselekvési Terv megújuló energiákra vonatkozó előrejelzése

Az előrejelzésben a biogáz a 7 megújuló energia közül mindössze a 6. helyet foglalja el, de jelentősége a környezetvédelmi, és vidékfejlesztési járulékos hozadékok miatt jóval nagyobb. A dokumentum alapján sajnos elmondható, hogy hazánk messze nem fogja kihasználni a rendelkezésre álló lehetőségeket biogáz fermentáció terén. Az 1. ábrán bemutatott diagramm ráadásul félrevezető, hiszen a "biomassza" jelzésű oszlopok, amelyek alatt a szerzők biomassza égetést értenek, valójában sok olyan biomasszát is tartalmaznak, amelyet a biogáz technológiában is lehet hasznosítani.

Magyarországon 2010 év végén 17 mezőgazdasági, állattartási és élelmiszeripari biogázüzem, 13 szennyvíztisztító és 8 kommunális szemétkerakó telepre épülő biogázüzem működött. Az üzemek döntő többségében kapcsolt áram- és hőtermelés folyik, leggyakrabban gázmotoros egységekkel, néhány üzem pedig csupán hőt termel. Ennél hazánkban megközelítőleg hússzor több üzem létesítésére is volna lehetőség.

A biogáz technológia elterjedésének korlátai Magyarországon egy összetett problémát képeznek, amelynek alkotóelemei szorosan összefüggnek egymással. Megoldásukhoz komplex, állami finanszírozású pénzügyi-szabályozási programok szükségesek.

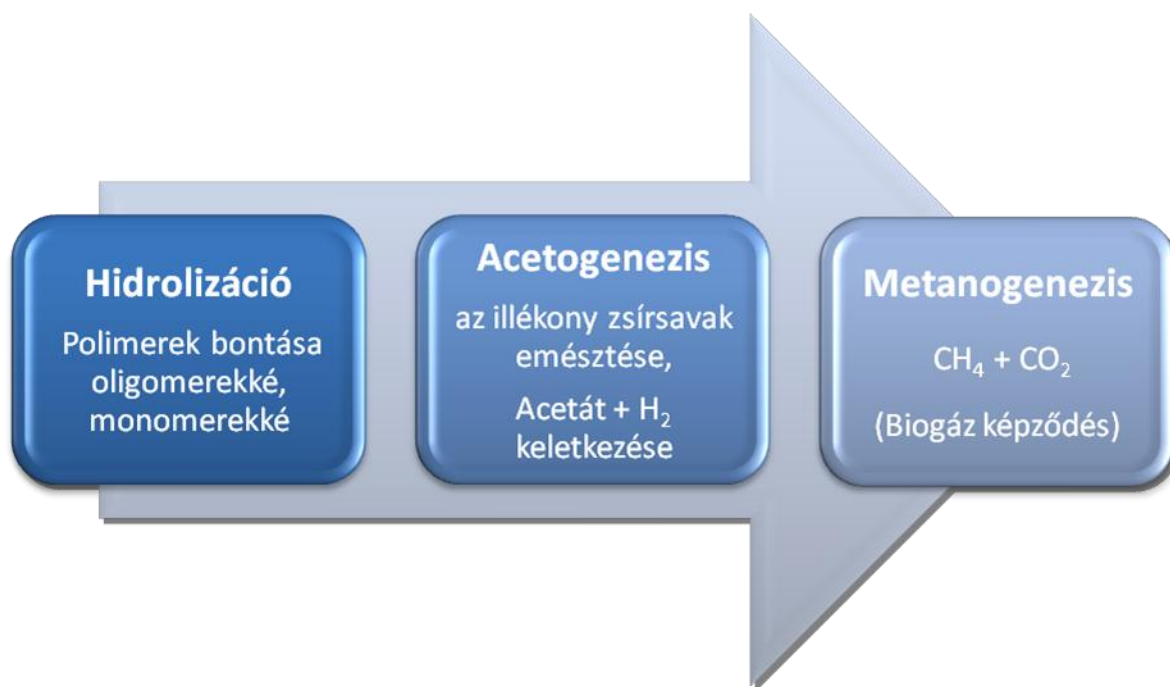
A kutatás-fejlesztésnek köszönhető a biogáz-technológia folyamatos fejlődése, amelynek eredményei kellő támogatással megvalósíthatók a gyakorlatban is. Az együttműködés profitálhatóságára kitűnő példa a SZTE Biotechnológia Tanszék kutatási eredményeit is integráló, idén tavasszal átadott Zöldforrás Biogáz Erőmű létrejötte.

2. Irodalmi áttekintés

A biogáz képződéséhez vezető folyamat természetes úton is végbemegy mélyvízi tengeröblökben, mocsarakban, és hulladéktároló telepeken is.

A megfelelő környezetben összetett mikrobaközösségek alakulnak ki, tagjai szintropikus kapcsolatban állnak egymással. A résztvevő baktériumok anyagcseréje összefonódik egy folyamattá, ezt nevezzük anaerob fermentációnak. A konzorcium a túlélésre optimalizálódott, a biogáz képződés tulajdonképpen a rendszer működésének mellékterméke (Dublein 2008).

Mesterséges beavatkozással azonban a gázhozam mennyiségét, képződésének gyorsaságát, vagy metántartalmát képesek lehetünk nagymértékben növelni. A konzorcium összetettsége miatt az intervenció kimenetelét azonban sokszor nehéz megjósolni. Az anaerob lebontás igen összetett folyamat, több tucat mikroorganizmus faj vesz benne részt, az anyagcsere utak elágazásai is igen sokfélék, ezeket teljes mértékben ma még nem ismerjük. Az anaerob fermentációnak a három kulcslépése mindenestre meghatározó (Weiland 2010). Az első lépés a hidrolízis, ebben a hidrolizáló mikroorganizmusok a komplex szerves makromolekulákat bontják alkotóelemeivé exoenzimjeik segítségével. Így a cellulózt a cellulázok, cukor mono- és oligomerekké hidrolizálják, hasonlóképpen a lipázok a zsírokat bontják le rövidebb szénláncú zsírsavakká, a proteázok pedig a fehérjéket darabolják fel aminosavaikra. Ezeket aztán már saját maguk illetve a környezetükben élő más mikroorganizmusok is fel tudják használni saját anyagcsere folyamataikban, miközben szerves savakat termelnek. Ezt acidogenezisnek hívjuk, és megkülönböztethetjük külön lépésként is. A második, acetogenezis lépésben az acetogén baktériumok a hidrolizáló mikroorganizmusok által fel nem használt oligo- és monomereket, de főként a rengeteg illó szerves savat acetáttá és hidrogénné alakítják tovább. A harmadik lépés a metanogenezis, itt a metanogének hasznosítják az acetátot és a hidrogént, miközben szén-dioxid és metán képződik, vagyis biogáz keletkezik. Annak érdekében, hogy a biogáz fermentáció technológiát fejlesszük, a gázképződést maximalizáljuk, a mikrobiológiai folyamatok pontosabb megismerésére van szükség. (Gerardi 2003).



2. ábra - Az anaerob fermentáció kulcslépései

A biogáz tehát az anaerob fermentáció folyamatának eredményeképpen fejlődő gáz, az egyik legígéretesebb megújuló energia. Összetétele a felhasznált szubsztráttól függ, 50-70%-ban éghető metánt, 27-42%-ban széndioxidot, és 1-2%-ban egyéb gázokat, főként kénhidrogént, vízgőzt és nitrogént tartalmaz. A képződött gázt forrása alapján alapvetően háromféle csoportba oszthatjuk, az EU Biogas Barometer alapján. Biogáz képződik ipari és kommunális szennyvizek tisztítása során, itt a begyűjtés csak lehetőség, hiszen ezen üzemek fő célja a szennyvizek megtisztítása. Hasonlóképpen a szilárd hulladéklerakók esetében a depóniagáz begyűjtésére szintén adott a lehetőség, sok helyen élnek is vele. Az Egyesült Királyságban, amely második az EU országai közül a biogáz termelésében a depóniagáz részesedése az éves biogáz összmenyiségéből 2009-ben több mint 90% volt: 1723,9 ktoe-ből 1474,4 ktoe származott ebből a forrásból (Biogas Barometer – Euroobserver 2010). A harmadik csoport az egyéb forrásból származó biogáz, itt a céltudatosan biogáz termeltetésére szolgáló fermentortelepek működésére kell gondolni. A biogáz e fajtájának termelésében abszolút előjáró az EU-ban Németország. Az éves összes biogáz termelése (2009-ben) 4213,4 ktoe volt, amelyből 3561,2 ktoe származott mezőgazdasági alapanyagokat hasznosító fermentorok működéséből, köszönhetően a 10 év alatt 139-ről, összesen 7000-re emelkedett biogáztelepek óriási számának (Fachverband Biogas e.V.). Összehasonlításképpen Magyarországon abban az évben 30 ktoe biogázt termeltek a Biogas

Barometer statisztikái szerint, ami a 16. helyet jelenti az EU országai közül. Azon országok sorába, ahol az egyéb kategóriába tartozó szubsztrát források teszik ki az összes biogáz termelés nagyrésztét, még Hollandia, Ausztria, Csehország, Belgium és Dánia, tartozik. Ezen államok – és legfőképpen Németország, szabályozási-támogatási rendszerét volna érdemes Magyarországnak is részletesebben tanulmányozni.

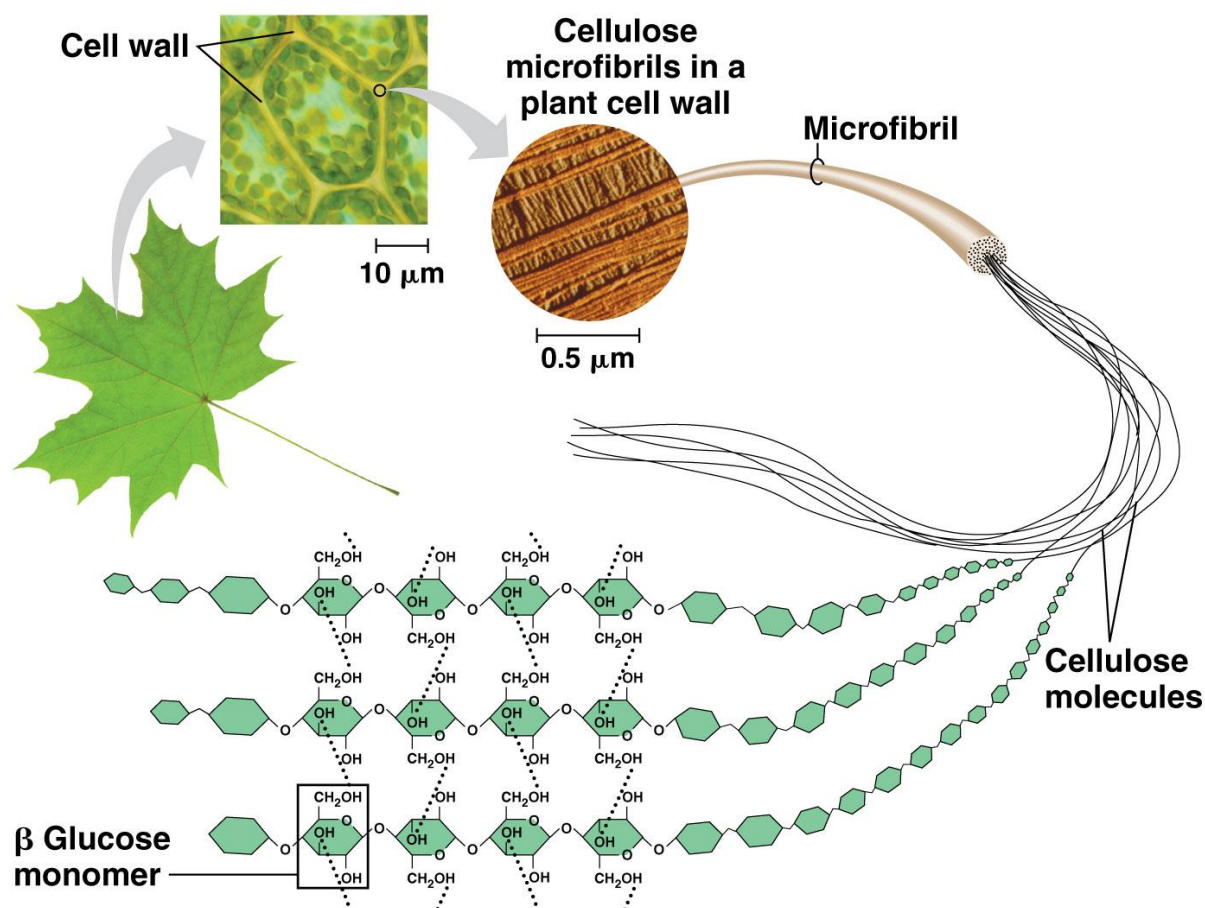
Ezek a biogáz fermentorok többnyire az élelmiszer-gazdaságban és a kommunális szférában képződött hulladékot használják alapanyagként: szalmás-és hígtrágyát, növénytermesztési melléktermékeket (gyümölcsnyesedék, gabonaszalma). Emellett magas nedvességtartalmuk miatt jó szubsztrátumok a silókukorica, a cukorrépa, az élelmezési, vagy takarmányozási célra nem felhasználható növényi részek. Léteznek tudatosan erre a célra termesztett energianövények, ezek közül a C4-es fotoszintézist folytató lágyszárúak kiemelendők (energiafű, energianád), melyek nagy energiatartalommal rendelkeznek, ugyanakkor termesztési költségük a legalacsonyabb. A kofermentáció, vagyis a különböző biomasszák keverése (trágya, növényi biomassza, csatornaiszap) és ezek együttes fermentációja sokszor a legeredményesebb (Reeve 1992).

Ha az üzemet úgy tervezzük, hogy néhány gazdasági kritérium is megvalósuljon (például olyan alapanyagokat használjunk fel, amelyek helyben állnak rendelkezésre), akkor az eddig csak gondot jelentő hulladékok illetve melléktermékek feldolgozásának olyan környezetbarát módját valósíthatjuk meg, amely nemcsak annyi bioenergiát termel, amennyi saját működéséhez elég, hanem még többet is, ezáltal jelentős anyagi forrássá, vagy megtakarítássá válhat (Fogarassy 2007).

A keletkező termékek sokoldalú felhasználása lehetséges. Legfőképpen a biogázt hasznosíthatjuk közvetlenül, vagy tisztítás után fűtésre, hűtésre, gázmotorok meghajtására, vagy bármely olyan technológiában, amely földgázt vagy PB gázt használ. Átalakíthatjuk elektromos árammá saját fogyasztás céljából, illetve értékesítésre, mivel az MVM (Magyar Villamos Művek Zrt.) ezt hatósági áron átveszi, ha a megfelelő kritériumoknak eleget teszünk [389/2007. (XII. 23.) Korm. rendelet]. Emellett a visszamaradt biomasszát biotrágyaként hasznosíthatjuk, amely jóval értékesebb a felhasznált szerves trágyánál. Dúsíthatjuk is a biotrágyát, így akár ezt is értékesíthetjük virágföldként, illetve humuszképző anyagként, például biogazdálkodások részére. A biogáz tisztítása után fennmaradó CO₂-ot pedig üvegházakban használhatjuk fel (Bai et al., 2007).

A képződött biogáz széndioxidtól való megtisztítása után már biometánról beszélhetünk, amely tulajdonképpen megegyezik a földgázzal; kivéve néhány nyomokban előforduló elemet, amelyet csak laboratóriumi körülmények között lehet kimutatni, tehát az eltérés elhanyagolható (Martensson 2007). A biometán betáplálható a már meglévő földgáz hálózatba, illetve felhasználható gépjárművekben bioüzemanyagként.

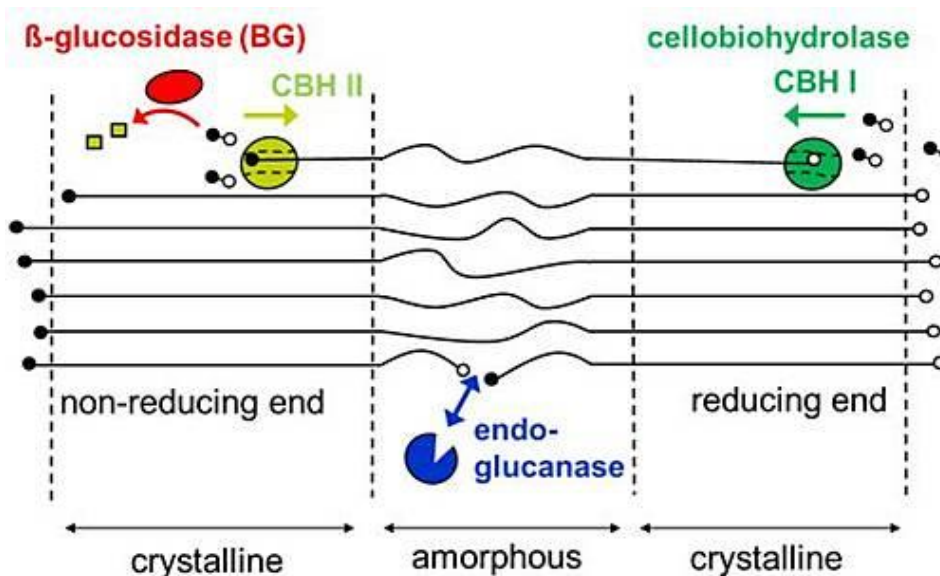
Azokban a biogáz fermentorokban, ahol a fő alapanyag növényi biomassza a cellulóz adja a bevitt szubsztrátum jelentős hányadát. A cellulóz Földünk legnagyobb tömegben előforduló bio-makromolekulája, ugyanis a növényi sejtfal fő alkotóeleme. Egyik legősibb kultúrnövényünknek, a gyapotnak a magházát burkoló finom szőrzete, a természetben legnagyobb tisztaságban előforduló cellulózforrás; mintegy 90%-át teszi ki ez az igen stabil szerkezetű polimer (Leppanen et al. 2009). A belőle készült pamut az emberiség történetében nagyon fontos szerepet játszik, több ezer éve használjuk ruhakészítés alapanyagaként. Napjainkban a cellulóz felhasználási köre még inkább kiszélesedett. A cellulózt több, mint százötven éve izolálták először; szerkezetét, tulajdonságait azóta is sokan kutatják, de a felfedezéseknek még mindig nincs vége.



3. ábra - A cellulóz: lokalizáció, makromolekuláris szerkezet

Ennek az igen ellenálló homopoliszacharid felépítésében *D*-glükóz monomerek vesznek részt, hemiacetál csoportjaiknál $\beta(1-4)$ -es glikozidos kötéssel kapcsolódnak egymáshoz, néhány száztól több ezres hosszúságban. A szintén poliszacharid keményítőben található $\alpha(1-6)$ és $\alpha(1-4)$ kovalens kötéseknel a váltakozó térállást eredményező $\beta(1-4)$ -es a kötés szöge miatt erősebb. A cellulóz degradációjának nehézségét azonban nem itt, hanem a láncok között formálódó hidrogénhidaknak köszönhetően kialakuló rostok, nagyon stabil és szabályos kristályos szerkezetében kell keresnünk. Ez a kristályos szerkezet olyan szoros, hogy a még a vízmolekulák sem képesek bejutni a láncok közé; ez a magyarázata annak, hogy a cellulóz miért nem oldódik vízben. A cellulóz felvehet egy ún. amorf struktúrát is, ami nagyobb rendezetlensége miatt könnyebben hozzáférhető. A kétféle szerkezet váltakozva fordul elő, emiatt eltérések lehetnek a degradáció hatékonyságában a cellulózt tartalmazó növényi minták között (Nishiyama et al. 2003). A cellulózrostokat körülveszi a főként xilánból álló hemicellulóz, köztük pedig ligninmolekulák találhatóak (Sjöström 1993). A cellulóz enzimatisz degradációja, nem meglepő módon igencsak nehéz, háromféle enzim is

szükséges hozzá. Az endoglükanázok (endo- β -1,4-glükanáz) random helyeken hasítják a cellulóz láncot, főként az amorf régióknál, a struktúra felnyílik, különböző hosszúságú oligomerek, cellotreózok, cellotetrózok keletkeznek. A cellobiohidrolázok (CBH) számára hozzáférhetővé válnak a hasítóhelyek. Az 1-es típusú CBH-k a redukáló végről, míg a 2-es típusúak a nem redukáló végről hidrolizálják le a cellobiózt. A keletkezett dimereket azután a β -glükózidáz hasítja két glükóz molekulává (Gilbert and Hazlewo 1993).



4. ábra – A cellulózbontó enzimek

Mivel a cellulóz glükóz monomerekből épül fel energiatartalma kifejezetten magas (10-16 MJ/kg), de a lebontásához szükséges energiabefektetés, a degradáció nehézsége miatt csak részben térül meg. Sokféle élőlény azonban ezen cellulázok segítségével megtalálta a módját a cellulóz hasznosítására. Főként lebontó életmódot folytató organizmusokban, baktériumokban, gombákban, protistákban találkozhatunk cellulózbontó fajokkal. Sokuk magasabb rendűek bélrendszerében, velük szimbiózisban élve juttatják hozzá gazdáikat a cellulóz (és más nehezen emészthető anyagok) lebontásának képességéhez. A kérődző állatok négyrészes gyomra is így alkalmazkodott, gasztrointesztinális rendszerük mikroflórájának segítségével, nagy hatékonysággal képesek a növényi biomasszát megemészteni (Béguin P. 1994).

Napjaink egyik nagy biotechnológiai kihívásai közé tartozik, hogy míg a szarvasmarhák egy adott növényi biomasszát képesek 2-3 nap alatt megemészteni, addig ugyanehhez egy

biogáz fermentor mikróbáinak legalább 10-15 nap is szükséges. Ez körülbelül ötszörös hatékonyságú bioprocesszálást jelent (Kutasi 2007).

Mint láthatjuk tehát, a növényi biomassa felhasználhatósága korántsem éri el azt a szintet, mint amekorra potenciált valóban jelent, ennek eléréséhez még sok kutatásra van szükség. Jelen dolgozat elkészítésével szerettem volna hozzájárulni a növényi biomassa biogázzá való fermentációjának hatékonyságának növeléséhez.

Aszályos időszakokban előfordul, hogy a biogáz termeltetés szubsztrátjaként felhasználni kívánt silókukorica szárazanyag tartalma megnő. A fermentorba belekerülve aztán az elegy tetejére úszik, és ott egy szilárd réteget képezve megakadályozza, vagy legalábbis gátolja a biogáz felszabadulását. Egyéb problémákat is okozhat, pl. a keverési rendszert is megakadályozhatja a megfelelő működésben. Ez a cellulózban gazdag réteg sok kellemetlenséget okozhat az üzem működtetőinek. A probléma megoldásához olyan mikrobára lenne szükség, amely anaerob körülmények között is nagy hatékonysággal képes a cellulózt lebontani. Ilyen baktérium hozzáadása a fermentációs elegyhez elősegítheti a cellulózban gazdag biomassa degradációját, ami a biogáz képződés hatékonyságát növelheti.

Dolgozatomban szerettem volna arra a kérdésre választ találni, hogy egy ilyen biológiai beavatkozással képesek lehetünk-e a cellulózban gazdag biomassa fermentációját eredményesebbé tenni. Irodalmi adatok alapján öt cellulózbontó aktivitással rendelkező törzsre esett a választásunk, amelyeket a német DSMZ törzsgyűjteményből rendeltünk meg, a dolgozat keretében ezek vizsgálatát végeztem el. Céлом volt meghatározni, hogy e baktérium törzsek valamelyike képes-e sikeresen felgyorsítani az anaerob reaktorban a cellulóz degradációjának sebességét, így a biogáz képződésének ütemét.

3. Célkitűzés

Munkám során célul tűztem ki, hogy megvizsgálom, lehetséges-e egy anaerob biogáz reaktorban a cellulóz bontás hatékonyságát megnövelni celluláz aktivitással rendelkező baktérium törzs bevitelével. Dolgozatomban öt mikroba törzs viselkedését tanulmányozva meg kívántam találni közülük azt, amelyik képes lehet egy biogáz fermentorban lévő környezetet túlélni és a konzorcium aktív tagjaként segíteni tudja a cellulózban gazdag biomassza lebontását. Ennek érdekében vizsgálataim során célom volt meghatározni, hogy mely törzsek képesek megfelelő ütemben szaporodni teljesen anaerob környezetben, e mellett mekkora celluláz aktivitással rendelkeznek. Ezt követően megvizsgáltam, hogy batch reaktorokban, aktív konzorciumban is képesek-e aktivitásukat kifejteni.

Méréseim során silókukoricát, valamint a kukorica betakarítását követően megmaradt száraz kukoricaszárat és levelet használtam szubsztrátként, melyek cellulózban gazdag, mikrobiális enzimeknek ellenálló alapanyagok.

4. Anyagok és módszerek

4.1. Felhasznált mikroorganizmusok

A Gram-pozitív, Actinomycetales rendbe tartozó, magas GC aránnyal rendelkező, pálcika alakú baktériumokat magába foglaló *Cellulosimicrobium* genus, a *Cellulomonas cellulans* reklasszifikációjával, mint *Cellulosimicrobium cellulans* (Schumann et al., 2001) jött létre. Később két másik *Cellulosimicrobium* nemzetségbe tartozó fajt is leírtak, a *Cellulosimicrobium variable*-t (Bakalidou et al., 2002), és a *Cellulosimicrobium funkei*-t (Brown et al., 2006). Azonban a *Cellulosimicrobium variable*-t szintén reklasszifikálták *Isoptericola variabilis*-ként (Stackebrandt et al., 2004). A *Cellulomonas fimi*-vel együtt a három faj közeli rokonságban áll egymással (Yoon et al. 2007).

4.1.1. *Cellulosimicrobium cellulans* (DSM 7461)

A fent említett *Cellulosimicrobium* genus típusfajáról, a *Cellulosimicrobium cellulans*-ról leírták, hogy meghatározott közegben egy sor növényi sejtfal bontó enzimet termel (Ferrer 2006). Emellett fontos gomba degradáló, ugyanis különböző gomba-sejtfal lizáló enzimeket: endo- β -1,3-glükanázt, proteázokat és mannánázokat is termel.

Optimális növesztési hőmérséklet:	28 °C
Alkalmazott tápoldat:	M220

4.1.2. *Isoptericola variabilis* (DSM 10177)

Az Actinomycetalesek rendjébe tartozó organizmust, a *Mastotermes darwiniensis* termeszfaj bélrendszeréből izolálták. Cellulolitikus és xilanolitikus képességekkel is rendelkező faj (Bakalidou et al., 2002). A *Cellulosimicrobium cellulans* közeli rokona, gram pozitív, pálcika alakú, fakultatív anaerob baktérium.

Optimális növesztési hőmérséklet:	28 °C
Alkalmazott tápoldat:	M92

4.1.3. *Cellulomonas fimi* (DSM 20114)

A szintén gram pozitív, Actinomycetalesek rendjébe tartozó, a fakultatív anaerob, pálcika alakú *Cellulomonas fimi* polimerbontó mikroorganizmus, a xylanáz, celluláz, amiláz enzimek széles skáláját szintetizálja. A kristályos cellulóz lebontása sem jelent számára problémát, glükánázok egész hadát termeli, hogy hasznosítani tudja a nehezen emészthető szénforrást (Chaudhary et al. 1997).

Optimális növesztési hőmérséklet:	30 °C
Alkalmazott tápoldat:	M53

4.1.4. *Bacillus amyloliquefaciens* (DSM 7)

Felfedezése a japán Fukumotohoz kötődik, az elnevezést is tőle kapta: mivel folyósító (*lique*) amilázt (*amylo*) termel (*faciens*) [Fukumoto 1943]. Aerob, Gram pozitív, pálcika alakú organizmus. A baktérium a *Bacillus subtilis* közeli rokona, néhányan még alfajának is tekintették (Priest 1987).

Optimális növesztési hőmérséklet:	30 °C
Alkalmazott tápoldat:	M1

4.1.5. *Acetivibrio cellulolyticus* (DSM 1870)

A cellulolitikus aktivitással rendelkező anaerob mikroorganizmust kommunális szennyvíztisztító iszapjából izolálták. Ez a gram negatív, monotrich pálcika alakú szervezet ecetsavat, hidrogént, és széndioxidot termel cellulózból, cellobiózból és szalicinből. Más szénforráson nem sikerült növesztetni. A faj az *Acetivibrio cellulolyticus* nevet kapta (Patel 1980). A szaccharifikáló képessége összemérhető az elterjedt cellulózbontó *Aspergillus niger* és *Trichoderma viride* gombafajokkal (Khan 1980).

Optimális növesztési hőmérséklet:	30 °C
Alkalmazott tápoldat:	M53

4.2. Törzsgyűjtemény készítése

A DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) egy németországi, non-profit intézet, melynek célja különböző mikroorganizmusok, sejt kultúrák, és vírusok összegyűjtése, jellemzése, megőrzése, és terjesztése. A katalógusukból rendelt törzsek egy üvegcsében érkeztek, liofilizálva. Steril körülmények között dolgozva oxigéntűrésüknek megfelelően, a megadott tápoldatot tartalmazó steril lombikba, vagy lezárt, nitrogén gázzal átfúvatott hypovial (légmentesen zárható) üvegekben növesztettem a törzseket.

Egy, vagy kétnapnyi növesztés után a baktériumok készen álltak a fagyasztásra, amit a következőképpen végeztem: steril eppendorf csövekbe 200 μ l glicerint és 800 μ l baktériumtenyészetet pipettáztam. A glicerint megakadályozza a jégkristályok képződését, így a sejtek nem szakadnak szét a nagy hőmérsékletcsökkenés hatására. Vortexelés után folyékony nitrogénbe dobva fagyasztottam le őket. További felhasználásig -80°C -os hűtőszekrényben tároltam őket.

4.3. Tápoldatok

A tápoldatokat a mikróbák számára a DSMZ katalógusában található leírások alapján készítettem el.

4.3.1. **M92**. TRYPTICASE SOY YEAST EXTRACT MEDIUM

Összetevők 1000 ml-hez:

- Élesztő extraktum: 3,000 g
- Pepton: 30,00 g

A hozzávalókat 800 ml vizet tartalmazó főzőpohárba tettem és elkevertem, a pH-t beállítottam 7 és 7,2 közötti értékre, majd mérőhenger segítségével kiegészítettem 1 l-re. Végül autoklávval sterilizáltam.

4.3.2. **M220**. CASO MEDIUM

Összetevők 1000 ml-hez:

- Pepton: 20,00 g
- NaCl: 5,000 g

A hozzávalókat 800 ml vizet tartalmazó főzőpohárba tettem, és elkevertem, a pH-t beállítottam 7,3-ra, majd mérőhenger segítségével kiegészítettem 1 l-re. Végül autoklávval sterilizáltam.

4.3.3. **M53**. CORYNEBACTERIUM MEDIUM

Összetevők 1000 ml-hez:

- Pepton: 10,00 g
- Élesztő extraktum: 5,000 g
- Glükóz: 5,000 g
- NaCl: 5,000 g

A hozzávalókat 800 ml vizet tartalmazó főzőpohárba tettem, és elkevertem, a pH-t beállítottam 7,2 és 7,4 közötti értékre, majd mérőhenger segítségével kiegészítettem 1 l-re. Végül autoklávval sterilizáltam.

4.3.4. **M165.** ACETIVIBRIO CELLULOLYTICUS MEDIUM

Összetevők 1000 ml-hez:

1. Folyékony összetevők:

• Mineral solution 1	75,00 ml
▪ K ₂ HPO ₄	3,900 g/l
• Mineral solution 2	75,00 ml
▪ KH ₂ PO ₄	2,400 g/l
▪ (NH ₄) ₂ SO ₄	6,000 g/l
▪ NaCl	0,590 g/l
▪ MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,200 g/l
▪ CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,720 g/l
• Vitamin solution	10,00 ml
• SL-10	10,00 ml

A folyékony összetevőket egy főzőpohárban összemértem, majd 800 ml-re kiegészítettem desztillált vízzel.

2. Szilárd összetevők:

• FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,002 g
• Resazurin	0,001 g
• NaHCO ₃	2,000 g
• Cysteine-HCl x H ₂ O	0,250 g
• Cellobiose v. cellulose	3.000 g

A szilárd összetevőket belemértem az elegybe, a pH-t 7,2-re állítottam be. majd kiegészítettem 1000 ml-re desztillált vízzel. Végül steril szűrővel (0,2um pórusátmérő) sterilizáltam.

4.3.5. **M1.** NUTRIENT MEDIUM

Összetevők 1000 ml-hez:

- | | | |
|--|------|---|
| • Pepton: | 5,00 | g |
| • Hús extraktum extract | 3,00 | g |
| • MnSO ₄ x H ₂ O | 0,01 | g |

A hozzávalókat 800 ml vizet tartalmazó főzőpohárba tettem, és elkevertem, a pH-t beállítottam 7,0-ra, majd mérőhenger segítségével kiegészítettem 1 l-re. Végül autoklávval sterilizáltam.

4.4. Sejtszám meghatározás

A lombikokból, vagy hypovial üvegekből steril fecskendővel 1ml mintát eppendorf csőbe vettem. A tenyészetek növekedését kétféleképpen határoztam meg:

4.4.1. Bürker-kamrás sejtszámolás

Ezzel a módszerrel egy adott térfogatú minta sejtszámát a kamrák segítségével meghatározhatjuk.

Szükség esetén a mintát hígítottam 10-szeres, vagy 100-szoros mértékben. Összerázás után 10 μ l-t a Bürker-kamrába pipettáztam, majd fáziskontraszt mikroszkóppal vizsgáltam, 400 szoros nagyításban. A sejtszámolás során a legkisebb kamrákat használtam. A kamrák szegélyének bal és felső oldalát érintő sejteket beleszámoltam, a jobb és alsó oldalukat érintőket nem. A méréshez 3x3x3, vagyis 27 kis cellát számoltam meg. Egy ilyen kis cella méretei a következők:

- $a = 0,05 \text{ mm}$
- $h = 0,1 \text{ mm}$
- $T = a \times a = 0,0025 \text{ mm}^2$
- $V = h \times T = 0,00025 \text{ mm}^3 = 0,25 \text{ nl}$

A sejtek számát az alábbi képlet alapján kaphatjuk meg:

$$n = \frac{x \times d}{c} \times 4000$$

– Ahol:

- n = sejtszám, db / μ l
- x = hígítás mértéke
- d = a c számú cellában lévő sejtek összege
- c = megszámlált cellák száma

4.4.2. Spektrofotometriás mérés

A sejtek növekedésének mérését spektrofotométerrel is elvégeztem. 1 ml mintát egy tiszta küvettába pipettáztam, majd az optikai denzitást (**OD**) 600 nm-en mértem. Kontrollnak desztillált vizet használtam.

4.5. Glükóz meghatározás folyadékkromatográfiával

A High-performance liquid chromatography; vagyis a nagy teljesítményű folyékony kromatográfia egy olyan elválasztási módszer, mellyel könnyen és gyorsan határozhatjuk meg a minták analitikai összetevőit. A japán Hitachi cég Chromaster típusú eszközével végeztem a celluláz enzimek aktivitásának eredményeként keletkező glükóz mennyiségi meghatározását. Az eredmények leolvasása és kiértékelése EZChrome Elite programmal történt. Oldószerként 0,01M kénsavoldatot használtam, melynek áramlási sebessége 0,8ml/perc volt. A minták elválasztása ICsep ICE-COREGAL 64H oszloppal történt, azonosításuk L-2490 refraktív index detektorral. Mérés előtt a mintákat először szűrőpapíron, majd 0,2µm pórusátmérővel rendelkező fecskendőszűrőn leszűrtem, annak elkerülése érdekében, hogy a szennyeződések, bakteriális sejteket felvigyük az oszlopra.

4.6. Batch-fermentáció

A biomassa biogázzá való alakíthatóságát légmentesen zárható, 500 és 125 ml-es térfogatú laboratóriumi fermentorokban végeztem. A fermentorokat feltöltöttem a vizsgálandó biomasszával, majd légmentesen lezártam. A fermentorok gázterét nitrogénre cseréltem ki, hogy biztosítsam az anaerob körülményeket. A fermentációt kevert természetes kultúrával (oltóiszap) indítottam el, mely egy már működő biogáz fermentorból származott. A fermentorokat 37°C-os inkubátorba helyeztem. Ezen fermentáció típust „batch” fermentációnak nevezzük, mely azt jelenti, hogy a vizsgálni kívánt biomasszát a fermentorban elhelyezzük, majd a rendszert lezárjuk. A biogáz keletkezése a fermentorban lévő biomassa elfogyását követően leáll, ellentétben az úgynevezett folyamatos üzemű fermentációval, ahol folyamatos a tápanyag utánpótlás.

A keletkezett biogáz mennyiségi meghatározása vízkiszorításos rendszerrel történt. Az eljárás lényege, hogy a biomasszát, és az esetlegesen hozzáadott baktériumokat tartalmazó lezárt, anaerobbá tett üveghez egy vízzel teli második üveget kötünk, így a gáz szabadon áramolhat a második üvegbe. A beáramló gáz a saját térfogatával ekvivalens mennyiségű vizet szorít ki a harmadik üvegbe, melynek mennyiségét mérőhengerrel mértem, így naponta figyelemmel követhető a keletkezett biogáz mennyisége. Figyelembe kell vennünk, hogy a gázok térfogata különböző hőmérsékleteken eltérő. Ahhoz, hogy a

keletkező gáztérfogatok összehasonlíthatóak legyenek normálállapotra határozta (0°C, 1 bar) meg a kapott értékeket Gay-Lussac 2. törvénye alapján, minden fermentációnál.

4.7. Szárazanyag tartalom meghatározás

A szubsztrátként felhasznált biomassa szárazanyag tartalmának meghatározásához 105°C-os szárítószekrényben a mintákat egy éjszakán keresztül szárítottam, majd a visszamaradt tömeg alapján következtettem azok szárazanyag tartalmára.

4.8. Szervesanyag tartalom meghatározás

A szárazanyag tartalom meghatározás során keletkezett mintákat 550°C-on hevítettem tömegállandóságig, a visszamaradt tömegből következtettem azok szervesanyag tartalmára.

4.9. Silókukorica szubsztrát aerob előkezelése

A silókukoricát max. 1 cm-es darabokra felaprítottam, erlenmeyer lombikba raktam, majd desztillált vizet adtam hozzá úgy, hogy 10m/m%-ban tartalmazza a kukoricát. Ezt követően az előzőleg, gazdag tápoldatban felnövesztett sejteket 1V%-os arányban adtam hozzá, majd 5 napig inkubáltam 37 °C-n. A lombikokat 180 rpm-en rázattam.

4.10. Szubsztrát biomassa

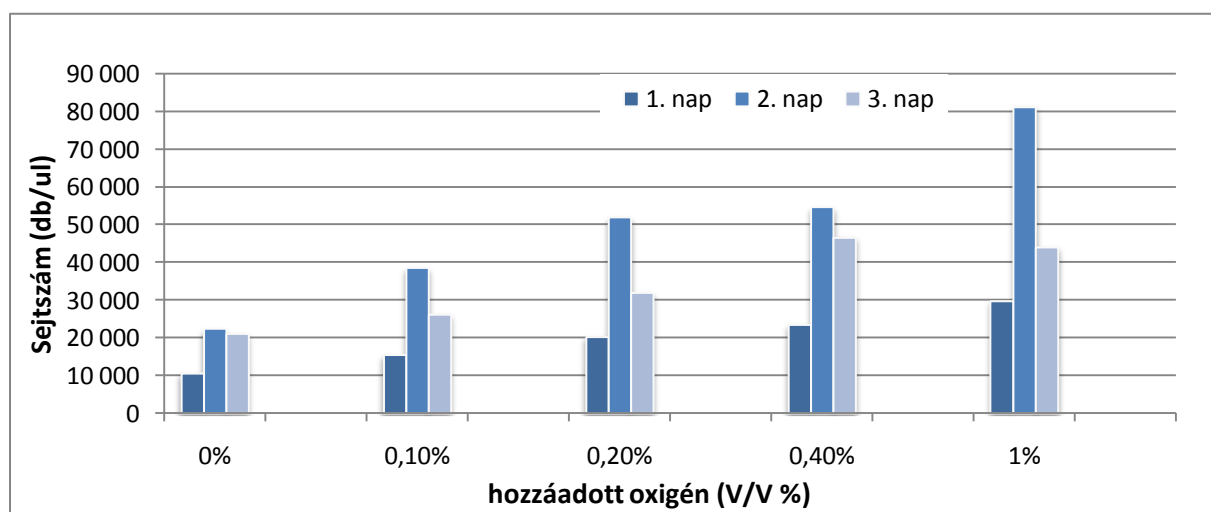
A fermentorokba kétféle kukorica szubsztrátot alkalmaztam lebontandó biomasszaként: silókukoricát, valamint a kukorica betakarítását követően megmaradt száraz szárat és levelet. A silókukorica szárazanyag tartalma 35%, volt, ebből a szerves szárazanyagtartalom 95%. A száraz kukoricaszár és levél szárazanyag tartalma 86%, szerves szárazanyag tartalma 72% volt.

5. Eredmények és kiértékelésük

5.1. A baktérium törzsek növekedésének oxigénfüggése

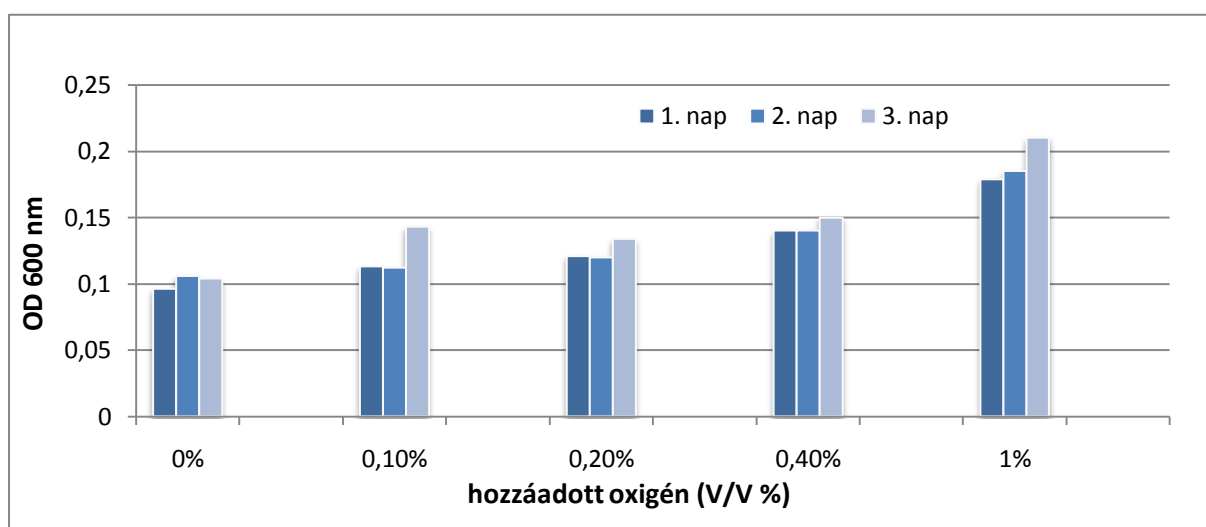
A kísérletsorozatban arra kerestem a választ, hogy milyen mértékben képesek a baktériumok oxigénmentes környezetben szaporodni, amely a biogáz fermentorokra is jellemző. A három fakultatív anaerob törzset öt különböző oxigénkoncentráció mellett növesztettem. Növekedésük ütemét Bürker-kamrás sejtszámolással és spektrofotométerrel követtem nyomon.

5.1.1. *Isoptericola variabilis* növekedésének oxigén függése:



5. ábra – *I. variabilis* növekedésének oxigén függése (sejtszámlálás Bürker kamrával)

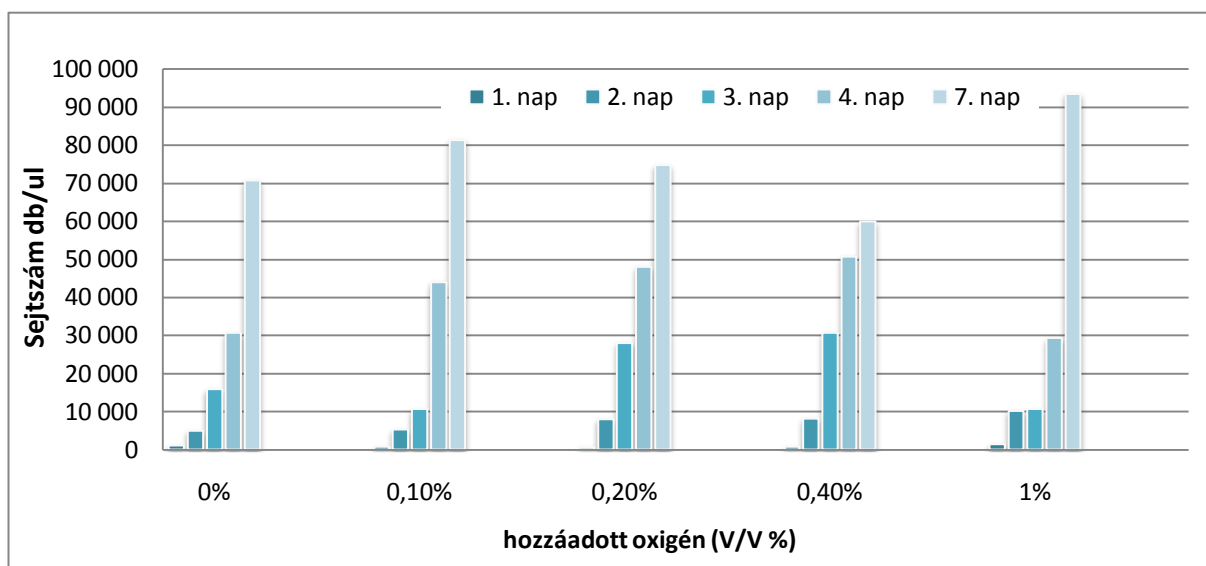
A sejtek igen gyorsan nőttek, már a leoltást követő napon jelentős sejtszám



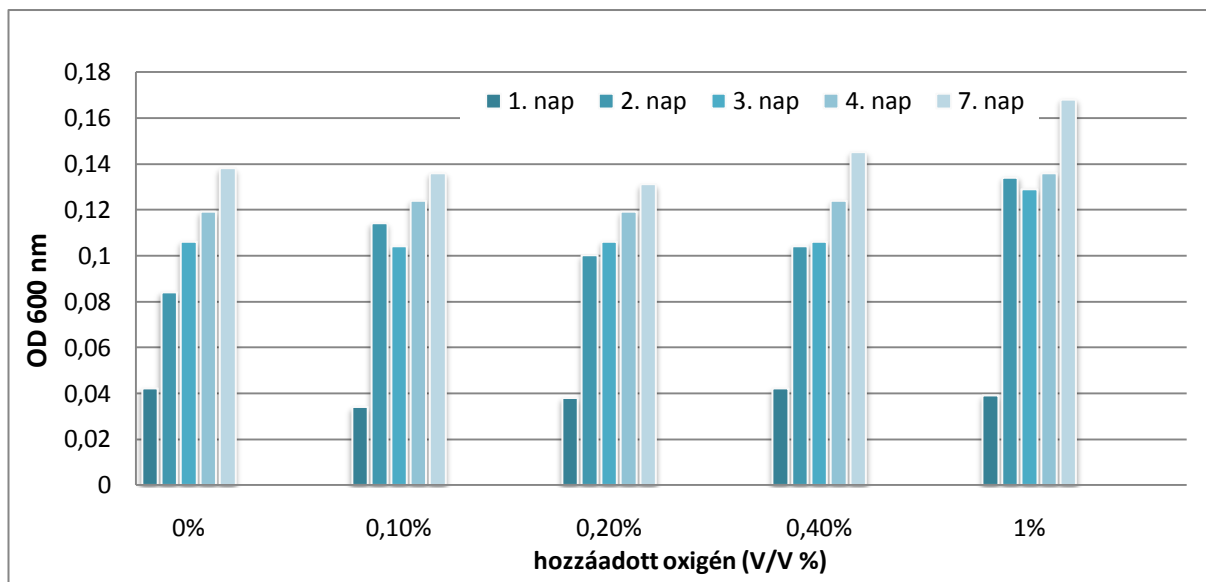
6. ábra – *I. variabilis* növekedésének oxigén függése (OD mérés fotométerrel)

gyarapodást tapasztaltam. A Bürker kamrával mért sejtszám a harmadik napra lecsökkent (5. ábra), míg az OD mérésnél növekedett (6. ábra). A különbség oka, hogy a Bürker kamrával csak az élő sejteket számoltam, míg a fotometriás mérés a nem élő sejteket is figyelembe veszi. Az eredmények alapján elmondható, hogy a fakultatív anaerob faj képes jelentős különbségek nélkül, az összes megfigyelt oxigénkoncentráció mellett növekedni.

5.1.2. *Cellulomonas fimi* növekedésének oxigén függése:



7. ábra—*C.fimi* növekedésének oxigén függése (sejtszámlálás Bürker kamrával)

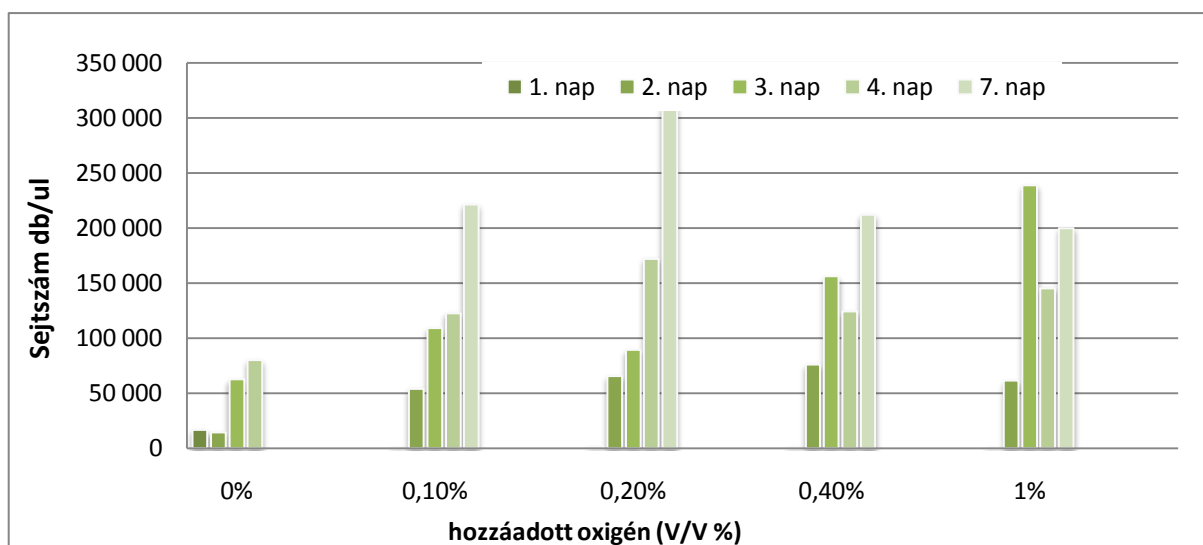


8. ábra – *C.fimi* növekedésének oxigén függése (OD mérés fotométerrel)

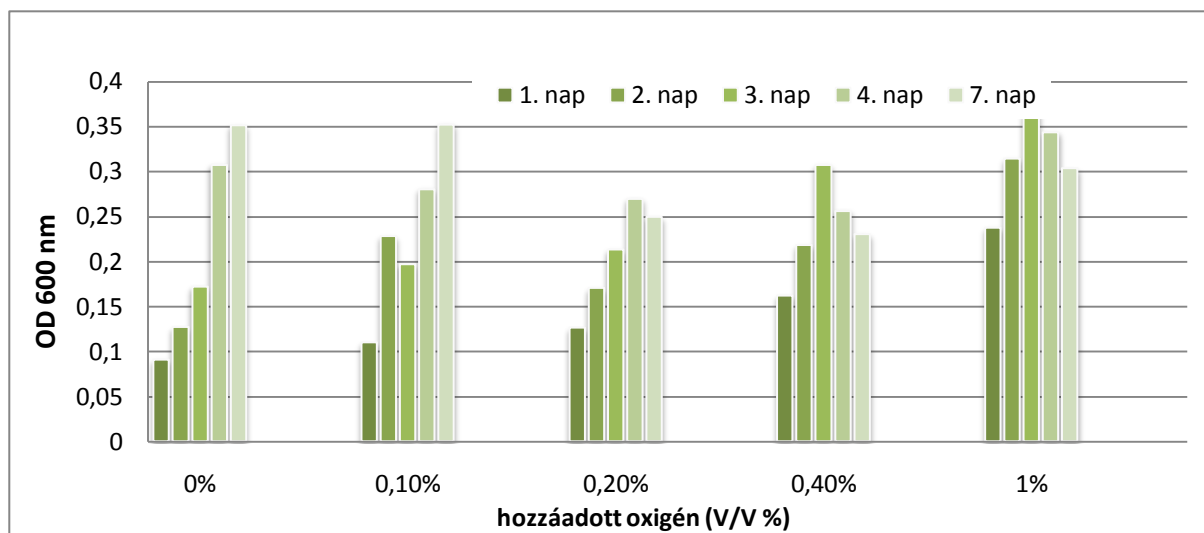
A *C. fimi* növekedési grafikonján szintén látszódik a baktérium fakultatív anaerob volta. A fényelnyelés (8. ábra) és a Bürker kamrával mért sejtszámok (7. ábra) azonos

eredményt adtak. 7 napig követtem nyomon a sejtek növekedését, a különböző oxigén koncentrációk nem voltak arra hatással. A 7. napon a különböző oxigén koncentrációk mellett közel azonos sejtszámokat mértem

5.1.3. *Cellulosimicrobium cellulans* növekedésének oxigén függése:



9. ábra - *C. cellulans* növekedésének oxigén függése (sejtszámlálás bürker kamrával)



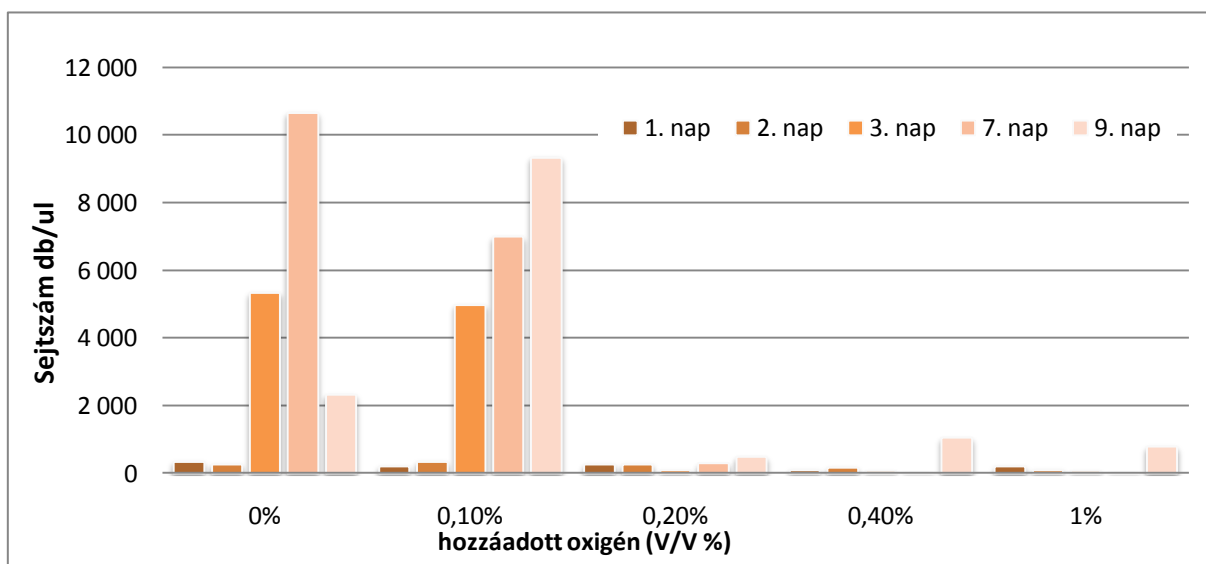
10. ábra - *C. cellulans* növekedésének oxigén függése (OD mérés fotométerrel)

A *C. cellulans* szintén képes volt 0% oxigénkoncentráció mellett (9. ábra és 10. ábra), növekedni. A Bürker kamrás mérés 0,2% oxigénkoncentráció mellett adta a legnagyobb sejtszámot, itt még a 4. napon is sejtszámgyarapodást regisztráltam. Ennél nagyobb oxigénkoncentráció mellett a 3. és 4. napon már nem volt érdemi biomassza növekedés.

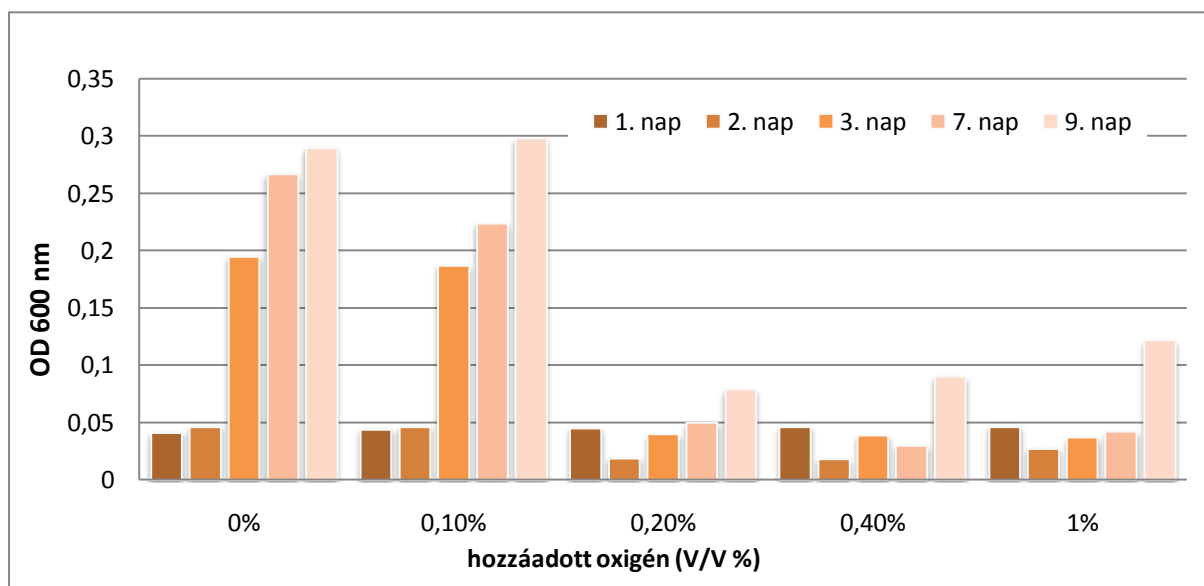
Az elvégzett mérések eredményei azt mutatták, hogy a vizsgált fakultatív anaerob baktériumok számára mind az aerob, mind az anaerob környezet megfelelő a növekedéshez. Mivel teljesen anaerob körülmények között is képesek voltak szaporodni, ezért ebből a szempontból alkalmasnak tűnnek arra, hogy a biogáz fermentorban lévő környezetet túléljék, ott celluláz aktivitásukat kifejtsék.

5.1.4. *Acetivibrio cellulolyticus* növekedésének oxigén függése:

Ezt követően az obligát anaerob törzs, az *A. cellulolyticus* oxigéntűrését vizsgáltam. A méréseim alapján ezek a szervezetek nem viselik el az oxigén jelenlétét, 0,1%-os, vagy a fölötti hozzáadott oxigén koncentrációnál már nem voltak képesek növekedni, melyet mint a Bürker kamrás, mind a fotometriás mérések igazoltak. (11. ábra és 12. ábra).



11. ábra - *A. cellulolyticus* oxigén függése (sejtszámlálás Bürker kamrával)



12. ábra - *A.cellulolyticus* növekedésének oxigén függése (OD mérés fotométerrel)

5.1.5. *Bacillus amyloliquecafiens* növekedésének oxigén függése

A *B. amyloliquecafiens* aerob mikroorganizmus oxigénmentes környezetben nem képes szaporodni. A törzset a szubsztrát biomassa aerob előkezelésre használtam, tehát nem a biogáz fermentorban került leoltásra, így nem volt szükség meghatározni növekedésének oxigén függését.

5.2. A cellulózbontás figyelemmel kísérése

A celluláz enzimek működése során glükóz szabadul fel, ezért ahhoz, hogy képet kapjak a különböző törzsek celluláz aktivitásáról HPLC berendezéssel vizsgáltam a tápoldatban jelenlévő cellulóz hasítása eredményeként keletkező glükóz molekulákat.

5.2.1. Fakultatív anaerob törzsek celluláz aktivitásának vizsgálata

Az első mérésorozatotban az *I. variabilis*, és a *C. fimi* cellulóz bontását követtem nyomon. Különböző összetételű tápoldatokat készítettem a baktériumok számára, mellyel azt vizsgáltam, hogy mi az a minimál tápoldat összetétel, amin a sejtek még növekedni képesek. A cellulóz mellett egyéb szén tartalmú komponenseket igyekeztem mellőzni, mivel a celluláz aktivitás mérésekor a felszabaduló glükóz molekulákat mérem, így az egyéb, esetlegesen más forrásból jelen lévő glükóz hamis eredményt adhat. Nitrogén forrásként peptont alkalmaztam, szénforrásként különböző szubsztrátokat: élesztő extraktumot,

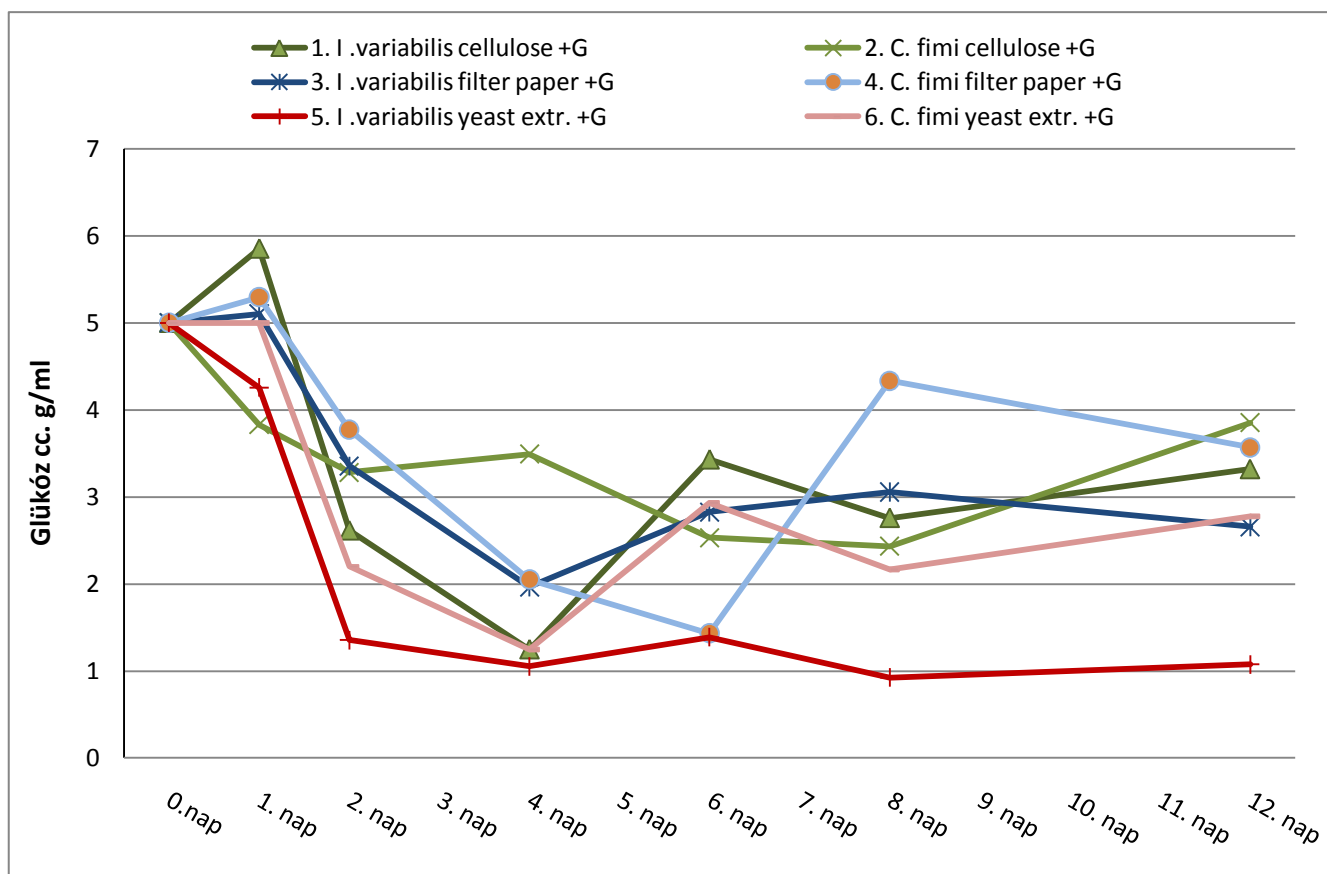
Baktérium	Minta	Összetevők		
<i>Isopterciola variabilis</i>	1	Pepton	Kristályos cellulóz	
	2		Szűrőpapír	
	3		Élesztő extraktum	
	4			Glükóz
	5		Kristályos cellulóz	
	6		Szűrőpapír	
	7		Élesztő extraktum	
<i>Cellulomonas fimi</i>	8	Pepton	Kristályos cellulóz	
	9		Szűrőpapír	
	10		Élesztő extraktum	
	11		NaCl	Glükóz
	12		Kristályos cellulóz	
	13		Szűrőpapír	
	14		Élesztő extraktum	

1. táblázat - A sejtek növesztéséhez használt tápoldatok összetevői

kristályos cellulózt, szűrőpapírt, apró (max. 0,5 cm-es) darabokra vágva (1. táblázat). A cellulózt nem tartalmazó minta negatív kontrollként szerepelt.

A tápoldatok fele, vagyis az egyestől a hármasig, valamint a nyolcastól a tizesig nem tartalmazott hozzáadott glükózt, a többi viszont igen. A glükóz hozzáadása a minél gyorsabb biomassza növekedés érdekében történt, meg kívántam határozni, hogy a baktérium sejtek könnyebben kezdik-e el a cellulózt lebontani, ha már elszaporodtak a kedvező életkörülményeknek köszönhetően. A *C. fimi*-t tartalmazó tápoldatot hasonló módon állítottam össze, a különbség mindössze annyi, hogy ez nátrium-kloridot is tartalmazott, mivel ez a sejtek növekedéséhez nélkülözhetetlen. Mivel a sejtek növekedése aerob és anaerob körülmények között közel azonos volt a könnyebb kezelhetőség miatt az aerob növesztést választottam. A tápoldatokat Erlenmeyer-lombikokban állítottam össze, és végig sterilen kezeltem. Az inkubáció 37°C-n történt, rázatással. A tenyészeteket 12 napon keresztül vizsgáltam, ez alatt 2 naponta 6 alkalommal vettem mintát, steril fecskendő segítségével.

Az alábbi ábrán (13. ábra) a mérésorozat eredményei láthatóak. Az 1-6. tápoldatban történő növesztés eredményeit tüntettem fel, ezek 5g/l koncentrációban tartalmaztak



13. ábra – fakultatív anaerobok glükóz metabolizmusának mérése HPLC-vel

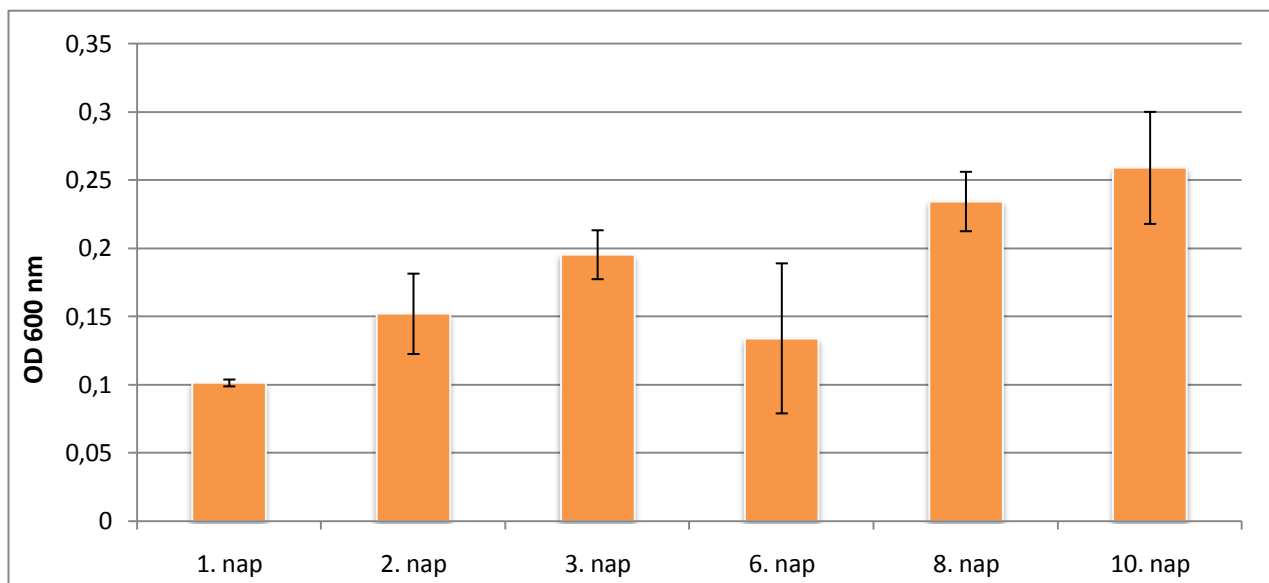
hozzáadott glükózt. A diagramon látható, hogy a glükózt a baktériumok azonnal elkezdték felhasználni, mindegyik mintában drasztikus csökkenés tapasztalható az első néhány napban. A tápoldatban lévő glükóz koncentrációja függ annak felhasználási sebességétől, illetve a baktériumok celluláz aktivitásától. A glükóz egyik minta esetében sem fogyott el teljesen a tápoldatból, mely arra enged következtetni, hogy a sejtek képesek voltak a cellulóz hasítására, az ennek eredményeként keletkező glükózt pedig felhasználni a biomassza növelésére.

A hozzáadott glükózt nem tartalmazó minták egyikében sem tudtam glükózt kimutatni a mérőszorozat ideje alatt, ezek ábrázolását ezért nem végeztem el. Mivel a tápoldatok zavarossá váltak, ebből arra következtettem, hogy a sejtek növekedni képesek voltak, azonban a cellulózból felszabadított glükózt azonnal fel is használták növekedésükhöz. A kezdeti időpontban hozzáadott glükóz tehát valóban segített gyorsan megnövelni a biomasszát, mely már elegendő celluláz enzimet termelt ahhoz, hogy a cellulózt olyan ütemben legyen képes bontani, hogy az kimutatható a tápoldatban. A glükózt nem tartalmazó tápoldatokban a celluláz aktivitás révén felszabaduló glükóz volt a limitáló faktor a sejtek növekedésében. Az eredmények alapján arra a következtetésre jutottam, hogy mindkét törzs képes volt a cellulóz hasítására. Aktivitásuk mértéke között különbséget nem tudtam kimutatni, mivel a felszabaduló glükóz döntő többségét a sejtek szaporodásukhoz felhasználták.

A harmadik fakultatív anaerob törzs (*C. cellulans*) cellulóz bontó aktivitásának vizsgálata jelenleg folyamatban van, így az eredményeket ezen dolgozat keretein belül még nem tudom bemutatni.

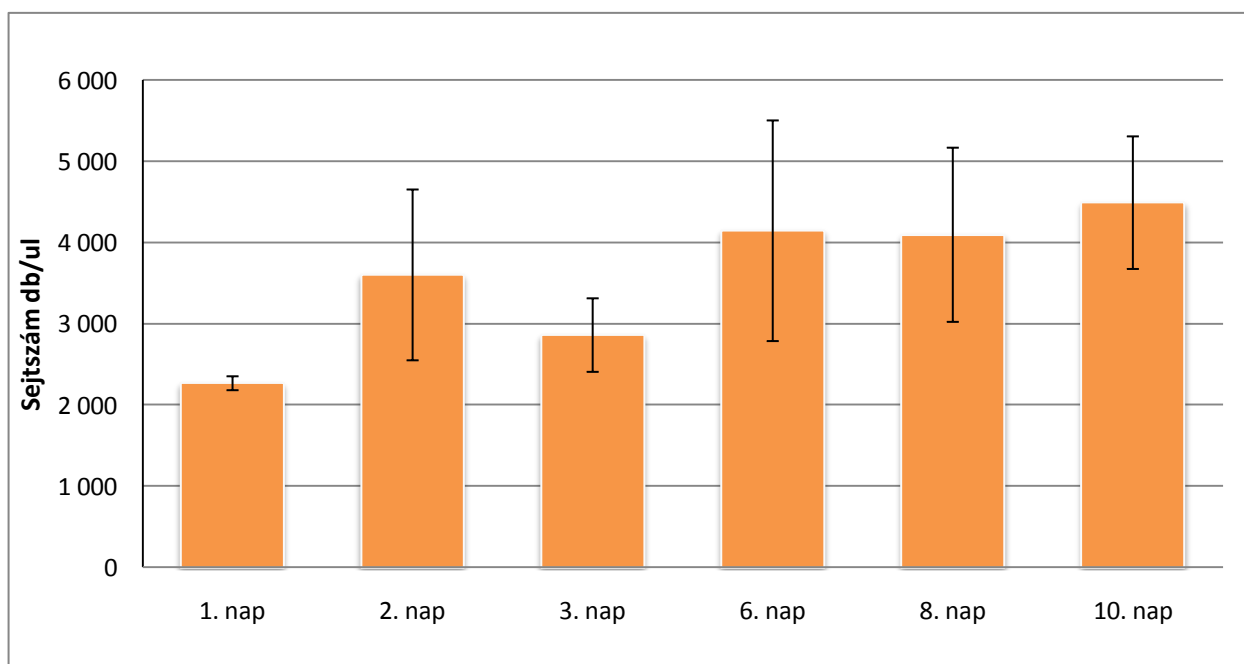
5.2.2. Anaerob törzs cellulózbontó aktivitása

A következő mérőszorozatban az *A. cellulolyticus*-t vizsgáltam, hogy az anaerob körülmények közti cellulóz degradációról is képet kapjak. A tápoldat a DSMZ által meghatározott M165 volt, mely sókat, nyomelemeket, vitaminokat tartalmaz, ezek hiányában a sejtek nem képesek növekedni. A tápoldat szénforrásként kizárólag cellulózt tartalmazott. Az inkubációt 37 °C-n végeztem, a sejtek növekedését 10 napon keresztül figyeltem, ez idő alatt hat alkalommal vettem mintát, amiből ezúttal a glükóz tartalom mérése mellett elvégeztem a sejtszámlálást is, mind Bürker kamrával (14. ábra), mind spektrofotométerrel (15. ábra), hogy pontosabb képet kapjak a sejtszámok alakulásáról.



14. ábra – *A. cellulolyticus* növekedésének mérése fotométerrel

A sejtek képesek voltak növekedni cellulózon, mint kizárólagos szénforráson. Mind a Bürker kamrás, mind a spektrofotometriás mérések eredményei azt mutatták, hogy a 10. napig folyamatos volt a sejtek szaporodása.

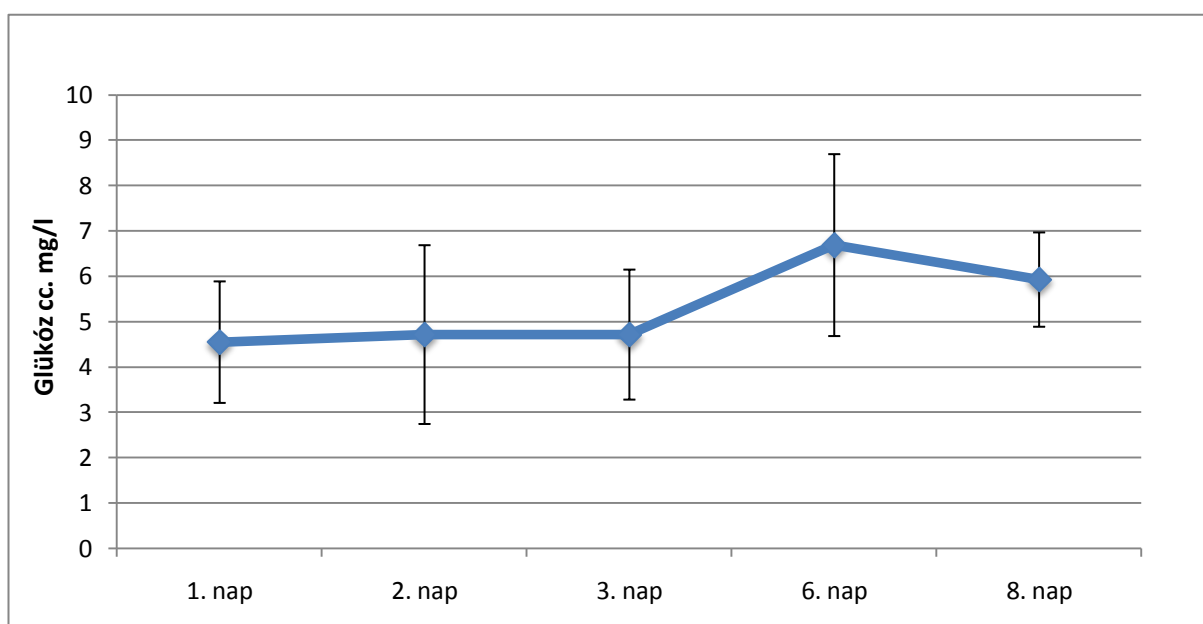


15. ábra- *A. cellulolyticus* növekedésének mérése Bürker kamrával

A 16. ábraán a HPLC-val mért glükóz koncentrációk láthatóak. A tápoldat nem tartalmazott hozzáadott glükózt. Ennek oka, hogy a glükóz hozzáadása nélkül is gyors biomassza szaporodás volt tapasztalható. Az eredmények azt mutatták, hogy több mint 4

mg/l koncentrációban volt kimutatható glükóz a tápoldatban, mely megerősíti, hogy a sejtek képesek voltak felhasználni a cellulózt szénforrásként.

A folyadékkromatográfiás mérésekkel sikerült igazolni, hogy a vizsgált baktérium törzsek képesek a cellulózt, mint szénforrást hasznosítani, tehát celluláz aktivitásuk révén alkalmasak lehetnek a biomassa fermentációját is elősegíteni. Az egyes fakultatív anaerob törzsek közötti aktivitás különbségek meghatározására ez a módszer nem bizonyult alkalmasnak, ugyanis abban az esetben, ha a tápoldat nem tartalmaz hozzáadott glükózt a sejtek felhasználják az összes felszabaduló glükóz molekulát. A biogáz fermentorban való felhasználhatóság szempontjából a leginkább alkalmas törzsnek az obligát anaerob *A. cellulolyticus* bizonyult, ugyanis cellulózon, mint kizárólagos szénforráson ez volt képes leginkább növekedni, valamint a növesztése során a tápoldatból ebben az esetben tudtunk csak glükózt kimutatni, mely arra enged következtetni, hogy a celluláz aktivitása révén nagyobb mennyiségű glükózt képes felszabadítani, mint azt a sejtek növekedésük során felhasználják.



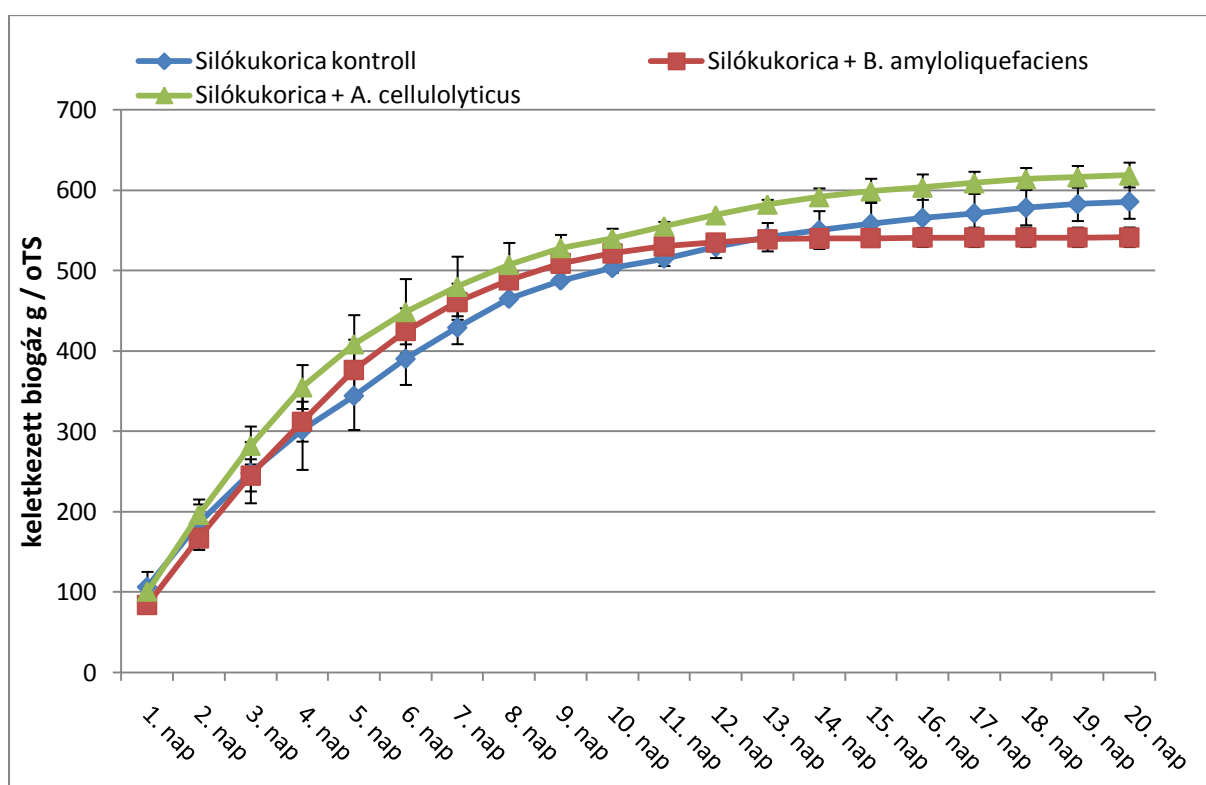
16. ábra – felszabaduló glükóz meghatározása HPLC-vel

5.3. Batch fermentációk

A következőkben megvizsgáltam, hogy a baktérium törzsek képesek-e kifejteni cellulózbontó aktivitásukat anaerob biogáz reaktorokban, ezáltal pozitívan hozzájárulni a biogáz képződéshez. Batch reaktorokat indítottam, elsőként silókukorica szubsztráttal. A fermentorokat az 4. *Anyagok és módszerek* fejezet; 4.6. *Batch-fermentáció* részénél leírtak szerint állítottam össze. A hozzáadott kukorica mennyiségét a VDI [Verein Deutscher Ingenieure (Német Mérnökök Egyesülete)] 4630-as szabvány szerint számoltam ki (DIN 11734). A fermentációkat 37 °C-n végeztem.

5.3.1. Silókukorica fermentáció

A kísérlet célja az volt, hogy megtudjuk, a silókukorica biológiai előkezelése az aerob *B. amyloliquefaciens*-el, valamint az anaerob *A. cellulolyticus* reaktorban való leoltása milyen hatást gyakorol a fermentációra, illetve a biogáz termelődés mértékére. Három, különböző összetételű fermentort indítottam, a következők szerint:



17. ábra – Silókukorica batch fermentációja

1. Baktériumos kezelés nélküli silókukoricát tartalmazó batch-fermentáció
2. Aerob módon, *B. amyloliquefaciens*-el előkezelt silókukoricát, mint szubsztrátot tartalmazó batch reaktor
3. Anaerob módon, *A. cellulolyticus*-al leoltott batch reaktor, a celluláz kezelés a reaktorban a fermentációval egyidejűleg zajlik

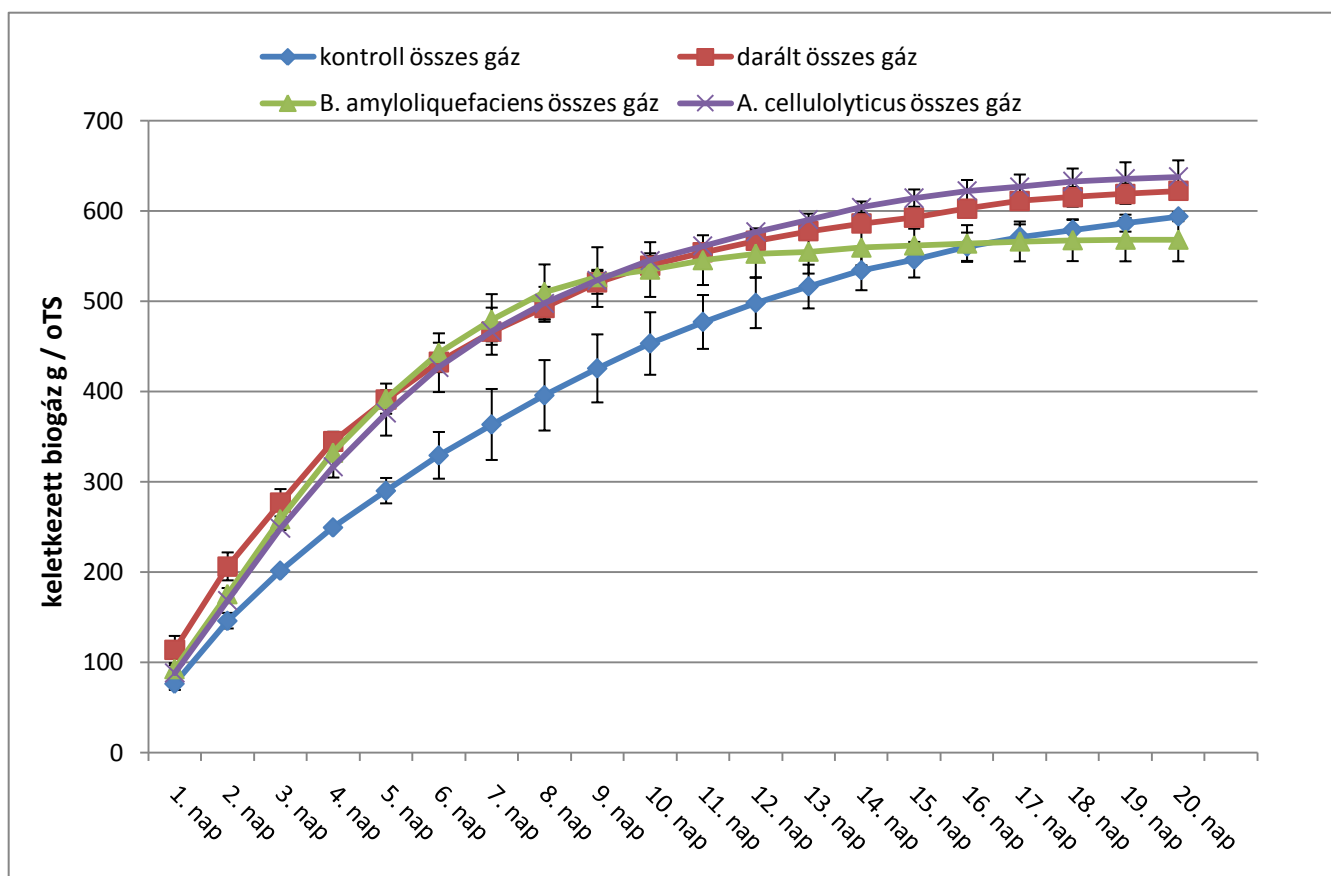
A fermentáció eredményét mutatja be a 17. ábra. A különböző fermentorokban tapasztalt gázhozamok között nem volt jelentős különbség. A *B. amyloliquefaciens*-el előkezelt mintában a biogáz képződés gyorsabb ütemben zajlott a fermentáció kezdeti szakaszában a kontrollal összehasonlítva, de az összes biogáz termelés kevesebb lett. Ennek oka, hogy a fellazított cellulóz molekulákat a sejtek könnyebben voltak képesek hasznosítani, azonban a *B. amyloliquefaciens*-nek az előkezelés során energiára volt szüksége a növekedéshez, ezt pedig a szubsztrát biomasszából, vagyis a silókukoricából fedezte, melynek így csökkentette energiatartalmát. Az *A. cellulolyticus*-al együtt fermentált, silókukoricát tartalmazó fermentorban a biogáz képződés üteme, valamint a termelt összes gázmennyiség is valamelyest nagyobb volt, mint a kontroll reaktorban.

5.3.2. Száraz kukoricaszár és levél fermentációja

A következő batch fermentáció során a szubsztrátot bakteriális, és fizikai előkezelésnek is alávettem. Biogáz fermentorokban az egyik legnehezebben bontható alapanyag a száraz formában jelenlévő cellulóz. Jelen kísérlet sorozatban ezért a betakarítás után visszamaradt kukoricaszárát és levelet használtam szubsztrát biomasszaként. Ebben az esetben is felhasználtam a két baktérium törzset a cellulóz lebontásának elősegítése érdekében, valamint a biomasszát ledaráltam <0,5 mm átmérőjű szemcseméretűre. A nagyobb felület következtében könnyebben hozzáférnek a sejtek a biomasszához, mely előnyös lehet annak lebontásában. Mintánként két párhuzamos fermentort készítettem, az alábbi összeállítás szerint:

- darálatlan kukoricaszárát tartalmazó kontroll
- darált kukoricaszárát tartalmazó, bakteriálisan nem kezelt kontroll
- aerob előkezelés *B. amyloliquefaciens*-el
- anaerob, *A. cellulolyticus*-al együttes fermentálás

A 20 napig tartó méréssorozat eredményei a 18. ábrán láthatóak. Mindkét bakteriálisan kezelt, valamint a darált szubsztrátot tartalmazó reaktorban a gázképződés a fermentáció első szakaszában intenzívebb volt a kontrollhoz képest, azonban az egyes reaktorokban keletkezett összes gázmennyiségek között nem tapasztaltam jelentős különbséget. A szubsztrát felaprítása igen hasonló eredményt adott, mint a bakteriális kezelés. A *B. liquefaciens*-el előkezelt minta esetében valamelyest kisebb összes gázhozam értéket mértem, mely a sejtek által az előkezelés időtartalma alatt felhasznált szénmennyiségnek tudható be. Az eredmények alapján az mondható el, hogy a bakteriális előkezelések, valamint a biomassa felaprítása az összes biogáz hozamokra nem volt jelentős pozitív hatással, azonban a fermentáció sebességét számottevően felgyorsította. Ráadásul fontos megjegyezni, hogy a *B. liquefaciens*-el kezelt biomassa elfolyósodott, tehát a felúszással és kéregképződéssel járó üzemeltetési problémák ilyen bakteriális kezeléssel csökkenthetők. Ennek folyamatos üzemű



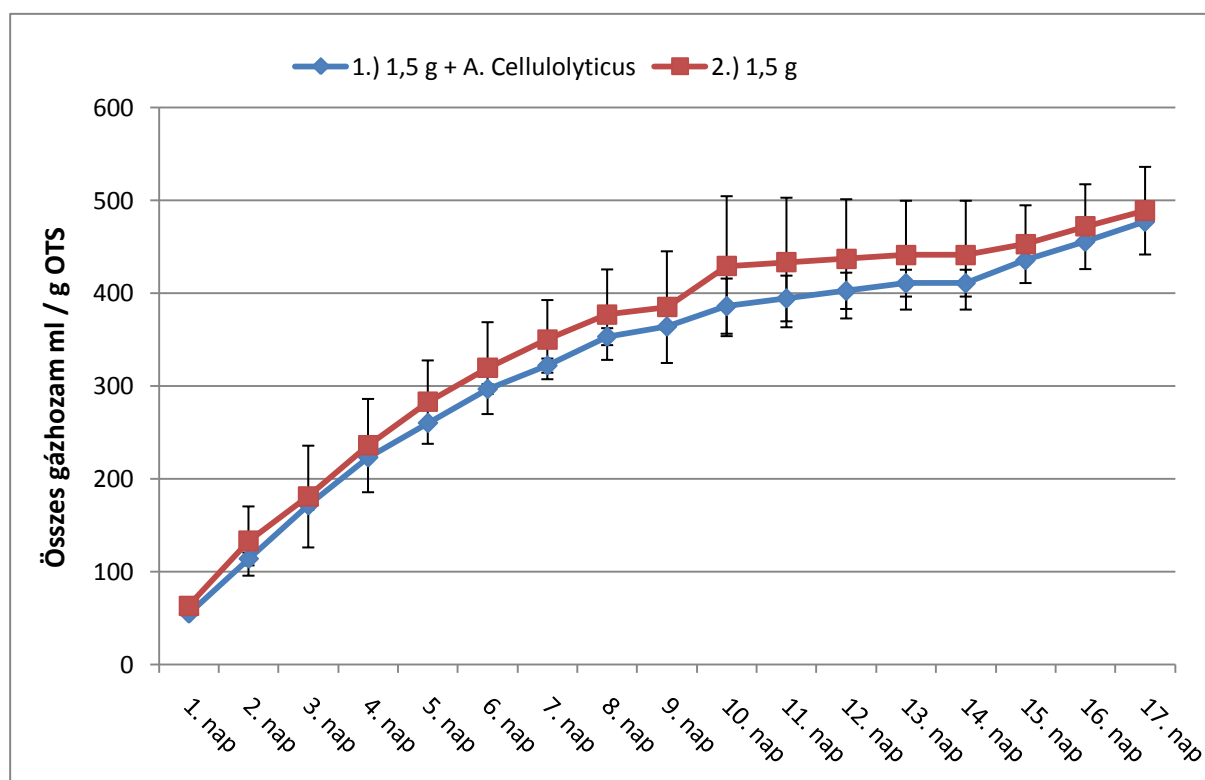
18. ábra – Száraz kukoricaszár és levél fermentációja

fermentáció esetén lehet jelentősége, ugyanis a beadagolt biomassa gyorsabb lebontása esetében a reaktorok térterhelését növelni lehet, mely adott mennyiségű biomassa gyorsabb elgázosítását teszi lehetővé.

5.3.3. Fermentáció hatékonyságának vizsgálata bakteriális kezelés mellett

Ezt követően meg kívántam határozni, hogy a különböző mennyiségben hozzáadott szubsztrát esetében van-e érdemi hatása az anaerob mikrobiális kezelésnek. Az előző mérésorozatban ugyanis előfordulhatott, hogy a bevitt biomassa olyan kis mennyiségű volt, hogy azt a természetes mikroba konzorcium is képes volt hatékonyan felhasználni, így a fermentáció javítása érdekében elvégzett aprítás, illetve bakteriális kezelések nem voltak hatással. Három különböző koncentrációban kukoricaszárát és levelet tartalmazó reaktort indítottam, mind a háromból két párhuzamost. Ezek összeállítása az alábbiak szerint történt

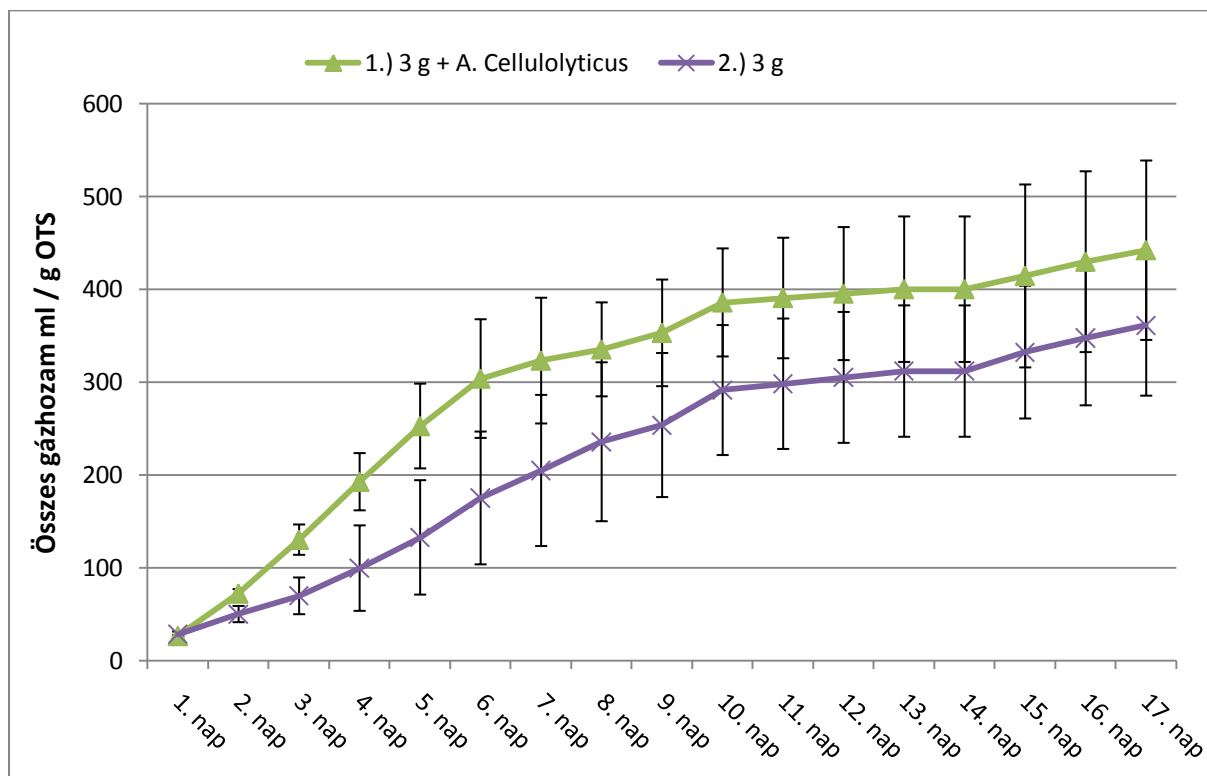
- 60 ml oltóiszap
- 1,5 g; 3 g; illetve 4,5 g kukoricaszár és levél (a VDI szabványtár által meghatározott biomassa, illetve annak fele és 2-szeres mennyisége)
- anaerob cellulózbontó törzs leoltása 10V/V%-ban



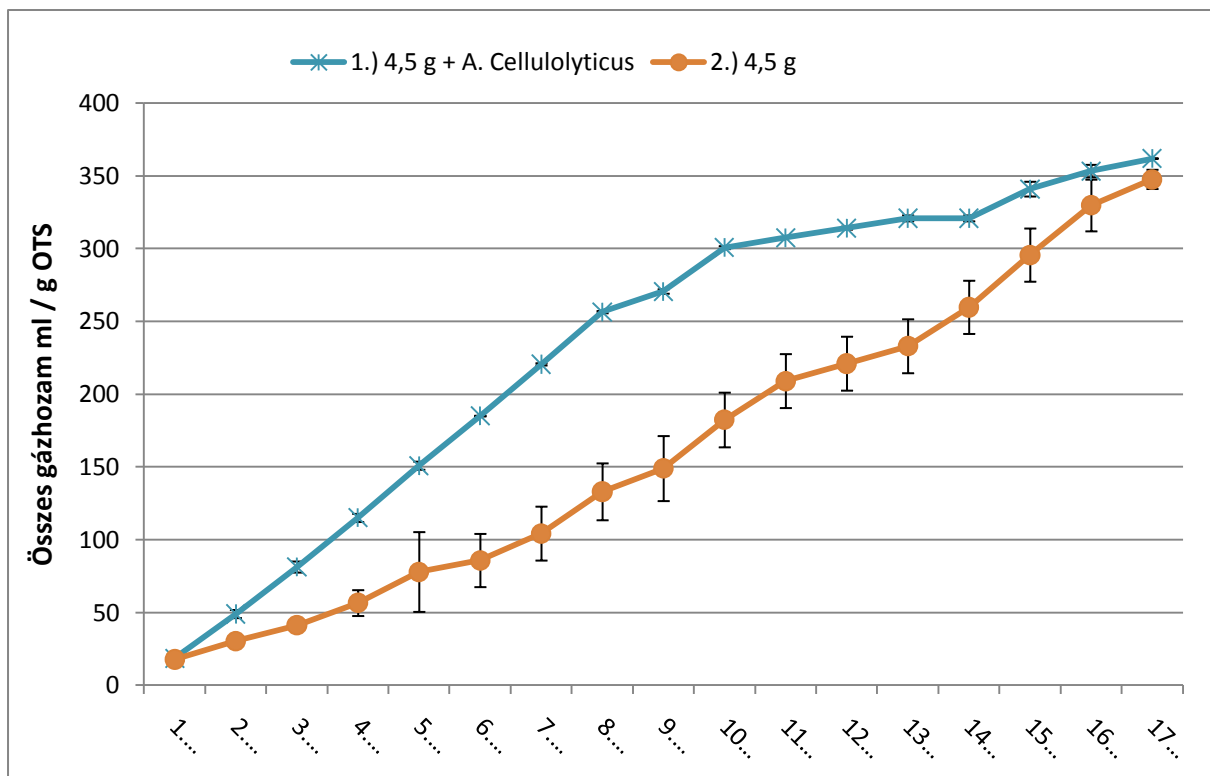
19. ábra – 1,5 g –ot tartalmazó kukoricaszár és levél fermentációja, anaerob kezeléssel

Az eredmények alapján elmondható, hogy a legkisebb mennyiségű kukoricaszárat tartalmazó reaktor dolgozott a leghatékonyabban (19. ábra), melyet a legnagyobb relatív gázhozam jelez. Ebben az esetben a cellulózbontó baktériumot tartalmazó reaktor és a kontroll reaktor gázhozama között jelentős különbség nem tapasztalható. A szubsztrát mennyiségének növelésével (20. ábra és 21. ábra) a fermentáció kezdeti szakaszában gyorsabb ütemű biogáz képződés volt tapasztalható, az összes biogáz hozamokban azonban itt sem volt értékelhető különbség. A 4,5 g kukoricát tartalmazó fermentorok esetében tapasztalhattuk a legnagyobb eltérést a biogáz felszabadulásának ütemében: a cellulóz bontó törzset tartalmazó reaktor gyorsabban fermentálta a szubsztrátot.

Ezek alapján ismét elmondható, hogy a bakteriális kezelés a keletkező összes biogáz mennyiségre nincs érdemi hatással, azonban a szubsztrát lebontás sebességét képes megnövelni.



20. ábra 3 g –ot tartalmazó kukoricaszár és levél fermentációja, anaerob kezeléssel



21. ábra - 4,5 g –ot tartalmazó kukoricaszár és levél fermentációja, anaerob kezeléssel

Összegzés

- Dolgozatom keretein belül megvizsgáltam, hogy lehetséges-e a biogáz reaktorban nagy cellulóz tartalmú biomaszra fermentációja. Anaerob, illetve aerob baktérium törzsek által kezelt biomaszra fermentációját vizsgáltam, célom volt meghatározni, hogy ezek képesek-e a fermentáció hatékonyságán javítani.

- Vizsgáltam a fakultatív anaerob törzsek növekedésének oxigén függését. Megállapítottam, hogy az általam vizsgált mindhárom törzs (*Isoptericola variabilis*; *Cellulomonas fimi*; *Cellulosimicrobium cellulans*) képes növekedni teljesen anaerob környezetben, 0% oxigéntartalom mellett.

- Meghatároztam, hogy az anaerob cellulózbontó törzs (*Acetivibrio cellulolyticus*) legfeljebb 0,1% oxigén koncentráció mellett képes növekedni.

- Megvizsgáltam, hogy a törzsek képesek-e cellulózon, mint egyedüli szénforráson növekedni. Megállapítottam, hogy a (*Isoptericola variabilis*; *Cellulomonas fimi*) törzsek képesek ugyan cellulózon növekedni, azonban szaporodásuk igen lassú. A sejtek jóval nagyobb ütemű növekedésre képesek abban az esetben, ha a tápoldat glükózt is tartalmaz.

- HPLC mérésekkel kimutattam, hogy a cellulóz biodegradációjából származó glükóz csak abban az esetben mutatható ki a sejtek növesztésére szolgáló tápoldatból, ha az a növesztés kezdetekor tartalmazott hozzáadott glükózt. Ekkor a sejtszám képes olyan nagyságot elérni, amely már elegendő ahhoz, hogy celluláz aktivitásuk révén a cellulóz hasításakor keletkező glükóz kimutatható a tápoldatból, a sejtek nem használják fel azt teljes mértékben.

- Az anaerob *Acetivibrio cellulolyticus* képes cellulózon, mint egyedüli szénforráson gyors ütemben szaporodni, jelentős biomaszát elérni. Kimutattam a glükóz jelenlétét olyan tápoldatból is, ami a növesztés kezdetekor nem tartalmazott hozzáadott glükózt.

- A biogáz fermentorban való cellulóz bontásra a legalkalmasabb jelöltnek az *A. cellulolyticus*-t találtam.

- A szubsztrát aerob előkezelése nem javítja az abból nyerhető biogáz mennyiséget, sőt ellenkezőleg, kisebb gázhozamokat detektáltam. Ennek valószínű oka az, hogy a sejtek a növekedésükhöz szükséges energiát abból fedezik, így az kisebb gázpotenciállal fog rendelkezni.

- A szubsztrát fermentálása *A. cellulolyticus*-al nem javítja a biogáz hozamot, azonban a biogáz képződés sebességét felgyorsítja. Ez folyamatos üzemű fermentáció esetében lehet hasznos, a reaktor alkalmassá válhat egységnyi mennyiségű biomassza gyorsabb feldolgozására.

- A szubsztrát biomassza mechanikai előkezelése hasonló eredményt adott, vagyis az összes biogáz mennyiség nem növekedett, viszont a fermentáció sebessége felgyorsult.

Felhasznált irodalom

- Bai A. et al. (2007). A Biogáz. Budapest: Száz magyar falu könyvesháza Kht; ISBN 978-963-7024-30-6
- Bakalidou A., Kuhnigk T., Kampfer P., Wenzel M., Berchtold M., König H. (2002). *Cellulosimicrobium variable* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the hindgut of the termite *Mastotermes darwiniensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:1185±1192.
- Béguin P.; Aubert J.P (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*. 13:25–58.
- BP (2010) Statistical Review of World Energy 2010. www.bp.com/statisticalreview
- Chaudhary P., Kumar N. N., Deobagkar D. N. (1997). The glucanases of cellulomonas. *Biotechnology Advances*, 15:315-331.
- Csete J., Szunyog I. (2011). A biogázok elterjedése előtt álló akadályok és korlátok Magyarországon 2011-ben. *Magyar Energetika*, 5:40–44.
- Ding S., Xu Q., Crowley M., Zeng Y., Nimlos M, Lamed R., Bayer A. E., Himmel E. M. (2008). A biophysical perspective on the cellulosome: new opportunities for biomass conversion. *Current Opinion in Biotechnology*, 19:218–227.
- Deublein D., Steinhauser A. (2008) Biogas from Waste and Renewable Resources. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim ISBN: 978-3-527-31841-4.
- Eurobserv'er (2010) Biogas Barometer <http://www.eurobserv-er.org/pdf/baro200b.pdf>
- European Commission Fusion Research (2007). An Energy Option for Europe's Future. Directorate-General for Research; Fusion energy research
- Ferrer P. (2006). Revisiting the *Cellulosimicrobium cellulans* yeast-lytic β -1,3-glucanases toolbox: A review. *Microbial Cell Factories* 5:10.

Fogarassy Cs. (2007) A biomassza-biometán termékpálya energia- és klímahatékony rendszerhasználati struktúrájának szakértői programalapú kidolgozása. *MTA-SZIE Biomassza Gazdaságtani Kutatócsoport*, Gödöllő, Jedlik Pályázati előtanulmány,

Gémesi Zs. (2009). Anaerob fermentációval előállított biogáz megtisztítása - metán leválasztás és gázellátó vezetékhálózatba való betáplálás, vagy motorhajtóanyagként való felhasználás *OBEKK Zrt. TUDOMÁNYOS SZAKMAI KIADVÁNYOK SOROZATA (4/12)*

G. B. Patel, A. W. Khan, B. J. Agnew, J. R. Colvin (1980) Isolation and Characterization of an anaerobic, cellulolytic microorganism, *Acetivibrio cellulolyticus* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30: 179-185.

Gilbert H. J., Hazlewo G. P. (1993). Bacterial cellulases and xylanases *Journal of General Microbiology* 139:187-194.

Gupta P., Samant K., Sahu A. (2012). Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *International Journal of Microbiology*, Article ID 578925

IPCC (2001). Climate change 2001: Impacts, adaptation, and vulnerability *Figure SPM-2: Reasons for concern about projected climate change impacts.*]

IPCC (2007). "Summary for Policymakers" Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. <http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar4/wg1/ar4-wg1-spm.pdf>

Jian-Min Song, Dong-Zhi Wei (2010). Production and characterization of cellulases and xylanases of *Cellulosimicrobium cellulans* grown in pretreated and extracted bagasse and minimal nutrient medium M9. *Biomass and Bioenergy*, 34:1930–1934.

Jung-Hoon Yoon, So-Jung Kang, Schumann P., Tae-Kwang Oh (2007). *Cellulosimicrobium terreum* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57:2493–2497

Langsford M. L., Gilkes N. R., Wakarchuk W. W., Kilburn D. G., Miller R. C. Jr., Warren R. A. J. (1984). The Cellulase System of *Cellulomonas fimi*. *Journal of General Microbiology* 130:1367-1376.

Leppanen K., Seppo A., Andersson A., Torkkeli M., Matti A., Knaapila A, Kotelnikova N., Serimaa R.(2009). Structure of cellulose and microcrystalline cellulose from various wood species, cotton and flax studied by X-ray scattering. *Cellulose* 16:999–1015.

Kutasi, J. (2007) Fermentációs biotechnológia.

Leschine S. B. (1995). Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annual Review of Microbiology*. 49: 399-426.

Magyarország megújuló energia hasznosítási cselekvési terve, 2010–2020; A 2020-ig terjedő megújuló energiahordozó felhasználás alakulásáról. Nemzeti Fejlesztési Minisztérium, Budapest, 2010.

Martensson E. (2007) Biogas as vehicle fuel in the Stockholm region – Scenario 2020. Master degree thesis. *Royal Institute of Technology*

Mountfort D. O., Asher R. A., Bauchop T. (1982). Fermentation of Cellulose to Methane and Carbon Dioxide by a Rumen Anaerobic Fungus in a Triculture with *Methanobrevibacter* sp. Strain RA1 and *Methanosarcina barkeri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 44: 128-134

Nishiyama Y., Langan P., Chanzy H. (2002). Crystal Structure and Hydrogen-Bonding System in Cellulose I β from Synchrotron X-ray and Neutron Fiber Diffraction. *J. Am. Chem Soc.* 124:9074-9082.

O'sullivan A. C. (1997). Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose* 4:173-207.

Persson M., Jönsson Ö., Wellinger A. (2006). Biogas upgrading to vehicle fuel standards and grid injection. *IEA Bioenergy Task 37*.

Reeve J. N. (1992): Molecular biology of methanogens; *Annual Review of Microbiology*, 46: 165-91.

REN 21(2012). Renewables 2012 Global Status Report (Paris: REN21 Secretariat).

Schumann P., Weiss N., Stackebrandt E. (2001). Reclassification of *Cellulomonas cellulans* (Stackebrandt and Kiedis 1986) as *Cellulosimicrobium cellulans* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:1007-1010.

Sjöström E. (1993) Wood chemistry, fundamentals and applications, 2nd edn. Academic Press, San Diego

Stackebrandt E., Schumann P. and Xiao-Long Cu (2004). Reclassification of *Cellulosimicrobium variable* (Bakalidou et al. 2002) as *Isoptericola variabilis* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:685–688.

Tihanyi L., Csete J., Szunyog I., Horánszky B. (2012). Helyzetjelentés a biogázról és biometánról 2012 elején. *Műszaki Földtudományi Közlemények*, 83: 237–248.

Weiland P. (2010). Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology, Biotechnology* 85:849–860.

Ye Chen, Jay J. Cheng, Kurt S. (2007). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. University of North Carolina, Raleigh. (folyóirat, kötet és oldalszámok kellenek!)

Yung-Chung Lo, G. D. Saratale, Wen-Ming Chen, Ming-Der Bai, Jo-Shu Chang (2009). Isolation of cellulose-hydrolytic bacteria and applications of the cellulolytic enzymes for cellulosic biohydrogen production. *Enzyme and Microbial Technology*, 44: 44:417-425.

Yung-Chung Lo, Yi-Chen Su, Chun-Yen Chen, Wen-Ming Chen, Kuo-Shing Lee, Jo-Shu Chang (2009). Biohydrogen production from cellulosic hydrolysate produced via temperature-shift-enhanced bacterial cellulose hydrolysis. *Bioresource Technology*, 100:5802–5807.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom dolgozatom elkészítésében nyújtott segítségéért témavezetőimnek, Dr. Bagi Zoltán egyetemi adjunktusnak és Dr. Kovács L. Kornél professzornak, valamint az SZTE Biotechnológiai Tanszék vezetőjének Dr. Rákhely Gábor egyetemi docensnek, aki lehetővé tette, hogy munkámat a tanszéken végezzem, és a Biotechnológia Tanszék összes munkatársának. Nélkülük ez a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott Kakuk Balázs, Biológia MSc szakos hallgató, kijelentem, hogy a diplomadolgozatban foglaltak saját munkám eredményei, és csak a hivatkozott forrásokat (szakirodalom, eszközök, stb.) használtam fel.

Dátum: 2012. november 4.

.....
Aláírás