



**BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM
VEGYÉSZMÉRNÖKI ÉS BIOMÉRNÖKI KAR
OLÁH GYÖRGY DOKTORI ISKOLA**

**FONALASGOMBÁK ÁLTAL TERMELT ÚJSZERŰ CELLULÁZ ÉS
HEMICELLULÁZ ENZIMEK ELŐÁLLÍTÁSA ÉS VIZSGÁLATA**

PhD értekezés tézisei

Szerző: Tóth Karolina

Témavezető: Dr. Szakács György

**Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék
Ipari Mikrobiológia Kutatócsoport**

2014

1. Bevezetés

A nem megújuló (fosszilis) szénforrások mennyiségének drasztikus csökkenése illetve a használatuk során keletkező káros anyagok felhalmozódása a környezetben egyre inkább növelik az alternatív megoldásokra való igényt. Így nagyon fontossá vált, hogy olyan alternatív anyag- és energiaforrásokat találjanak, amelyek maradandóak lesznek, megújuló energiát fejlesszenek vagy tároljanak a Napból, a szélből, a vízből és a növényekből (Ragauskas és mtsa., 2006). A növényi biomasszára, mint megújuló anyag és energiaforrásra és az enzimes eljárások alkalmazása ezen belül egyre inkább fontossá vált (pl. bioetanol, vagy más fontos vegyszerek előállítása a biomasszából, az u.n. „biorefinery” egyre szélesebb körű alkalmazása) (Sims és mtsa., 2010). Mind a biomassza lebontásához, mind pedig a keletkezett egyszerű cukrok bioetanollá alakításához felhasznált enzimek készítmények jelenleg döntően különböző fonalgombákból származnak.

Az EU 7. Keretprogramon belül kutatócsoportunk részt vett a DISCO projektben ('Targeted DISCOvery of novel cellulases and hemicellulases and their reaction mechanisms for hydrolysis of lignocellulosic biomass', www.disco-project.eu). A projekt célja volt, hogy olyan hatékony enzimek készítményt fejlesszünk, melyek segítségével eredményesebben lehet a biomasszát bioetanollá alakítani.

Kutatómunkám során 950 különböző fonalgombát vizsgáltam rázatott fermentációs kísérletekben, mely során kiválasztottam a legeredményesebb celluláz és hemicelluláz enzimtermelő törzseket további vizsgálatokra. A kísérletekben néztem az enzimek aktivitását különböző lignocellulóz hidrolízise során, továbbá teszteltem az enzim készítményeket többféle szénforráson, különböző pH-n és hőmérsékleten valamint tanulmányoztam lignin jelenlétében az enzimek szenzitivitását. További kísérletek történtek tisztított enzim fehérjékkel. A munka nemzetközi együttműködésben folyt, főleg a holland Wageningen University és a finn VTT kutatóival végeztünk közös kutatást.

Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, Britovsek G, Cairney J, Eckert CA, Frederick Jr WJ, Hallett JP, Leak DJ, Liotta CL, Mielenz JR, Murphy R, Templar R, Tschaplinski T 2006. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* 311 (5760):484-489

Sims REH, Mabee W, Saddler JN, Taylor M. 2010. An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technol.* 101:1570-158

2. Célkitűzések

- Újszerű celluláz/hemicelluláz enzimeket termelő fonalagombák izolása, melyek képesek a növényi biomasszát eredményesen lebontani. A munkához elsősorban a TUB mikrobiológiai törzsgyűjteményt és talajminta gyűjteményt használtuk (www.tub-collection.com).
- Egy olyan szűrővizsgálati („screening”) rendszer kifejlesztése, mely segítségével azonosíthatóak a különböző xilán lebontó enzimek a fermentációs felülúszókban.
- Majd e szűrővizsgálat segítségével a különböző fermentációs felülúszók lebontó képességének összehasonlítása mind oldható és mind oldhatatlan magas xilán tartalmú szubsztrátot tartalmazó hidrolízis kísérletekben.
- Továbbá a *Trichoderma Longibrachiatum* csoportba tartozó 15 törzs hidrolitikus aktivitásának tesztelése az új szűrővizsgálati rendszerben, összehasonlítva az ugyanezen csoportba tartozó *Trichoderma reesei* törzsek hasonló képességével.
- Végül új *Penicillium* és gyors növekedést mutató *Trichoderma* törzsek által termelt celluláz enzimek vizsgálata és összehasonlítása a jól ismert *Trichoderma reesei* törzs celluláz enzimeivel hidrolízis kísérletekben.

3. Irodalmi háttér

A lignocellulóz alapú biomassza potenciális nyersanyagforrást jelenthet a második generációs bioetanol gyártáshoz. A mezőgazdaságból, faiparból és a háztartásból (pl. papír hulladék) származó melléktermékek és hulladékok újrahasznosításával alapanyagot biztosíthatunk a bioetanol gyártáshoz. A biomassza komplex szerkezetű, három fő komponensből épül fel: cellulózból, hemicellulózból és ligninből, továbbá kisebb mennyiségben egyéb komponensek is fellelhetők (pl. keményítő, pektin, ásványi anyagok, hamu, stb.) (Gomez és mtsa., 2008).

A lignocellulózok lebontásában számos enzim együttes működésére szükség van, bár ez idáig senkinek nem sikerült feltérképezni a lebontásban szerepet játszó valamennyi enzimet. A celluláz és hemicelluláz enzimek együttes használata így lehetséges megoldást jelenthet az igen ellenálló lignocellulóz alapú biomassza lebontásában (Henrissat és mtsa., 1997).

A növényi sejtfal lebontásában résztvevő mikrobiális enzimek főként fonalgombákból származnak, habár más gombák, baktériumok, algák, csigák, rovarok, stb. is képesek ilyen enzimeket kiválasztani. Számos tanulmány született lignocellulózok fonalgombák segítségével történő lebontásáról. A leginkább tanulmányozott lebontó enzimek mégis cellulázok, hemicellulázok és az ezekhez kapcsolódó glikozid hidrolázok (Himmel és mtsa., 2010).

Egész idáig sajnos még nem sikerült eléggé hatékony, az ipar számára is olcsón hasznosítható enzim keveréket előállítani lignocellulózok lebontására, de folyamatosan jobbnál jobb készítményekkel állnak elő a piacon (Kristensen és mtsa., 2008).

A cellulázok és hemicellulázok számos ipari alkalmazása ismert: élelmiszeripar és állattakarmányozás, papír- és textilipar, sütőipar, hulladékkezelés, és bioalkohol gyártás.

- Gomez LD, Steele-King CG, McQueen-Mason SJ. 2008. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. *New Phytologist* 178: 473–485
- Henrissat B, Davies G. 1997. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*. 7(5): 637–644
- Himmel ME, Xu Q, Luo Y, Ding SY, Lamed R, Bayer EA. 2010. Microbial enzyme systems for biomass conversion: emerging paradigms. *Biofuels*. 1(2): 323-341.
- Kristensen JB, Thygesen LG, Felby C, Jørgensen H, ElderNydetzky T. 2008. Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. *Biotechnol Biofuels*. 1:5

Igen sok cellulolítikus enzimtermelő fonalagombát vizsgáltak már, melyek kiválasztják az enzimeket a sejten kívülre, így hatásosan tudják lebontani növényi sejtfalet egyszerű cukrokra és egyéb komponensekre (Polizeli és mtsa., 2005). Ezek a gombák annak megfelelően, hogy a növény mely részét bontják le, három csoportba sorolhatók: fehér-, lág- és barna-rothasztó gombák. Az első csoport a lignin rész képes lebontani, a második a cellulóz/hemicellulóz részt, míg az utolsó csoport a növény minden részét le tudja bontani (Kirk és mtsa., 1983).

A *Trichoderma* fajok az egyik leggyakrabban előforduló talaj- és korhadéklakó fonalagombák a Földön. Ezeket a gombákat az utóbbi időben egyre alaposabban tanulmányozták és osztályozták rendszertani szempontból, és sok új fajt fedeztek fel. A barna-rothasztó Ascomycéták csoportjába sorolták, melyek megtalálhatóak a talajban, rothadó fákban és növényi hulladékokban. Ezen fajok anamorf formája a *Hypocrea*, telemorf formája pedig csak a fákban és egyéb gombákon létezik. *Trichoderma* fajok egy csoportja okozza egyes növények megbetegedését (Bailey és mtsa., 1998).

A *Penicillium* fajok által termelt celluláz enzimeket szintén kiemelten tanulmányozták dán, az elmúlt években (Liu és mtsa., 2013). Néhány *Penicillium* eredetű celluláz enzim komplexről bebizonyosodott, hogy versenyképes a *Trichoderma* cellulázokkal.

Bailey BA, Lumsden RD. 1998. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium* on plant growth and resistance to pathogens, in *Trichoderma & Gliocladium—Enzymes*, G. F. Harman and C. P. Kubicek, Eds., vol. 2 of *Biological Control and Commercial Applications*, Taylor & Francis, London, UK. 327–342

Kirk TK. 1983. Degradation and Conversion of Lignocelluloses. In: Smith JE, Berry DR, Kristiansen B. *The filamentous fungi*, version 4, Fungal technology. London: Edward Arnold. 266-295

Liu G, Qui Y, Li Z, Qu Y. 2013. Improving lignocellulolytic enzyme production with *Penicillium*: from strain screening to systems biology. *Biofuels*. 4 (5): 523-534

Polizeli MLTM, Rizzatti ACS, Monti R, Terenzi HF, Jorge JA, Amorim DS. 2005. Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 67: 577-591

4. Anyagok és módszerek

Mikroorganizmusok

A szűrővizsgálat során körülbelül 950 mezofil fonalgombát vizsgáltunk meg rázatott lombikos fermentációban, Ezek döntő többsége általunk szelektált talaj izolátum, kisebb részük saját és külföldi törzsgyűjteményekből származik. A fonalgombák nagy részét cellulóz port vagy búzaszalma örleményt tartalmazó Petri csészés agaron izoláltuk, majd különböző lignocellulózt tartalmazó fermentációs szénforráson is tanulmányoztuk. Kiemelkedő eredményt értünk el a *Trichoderma Longibrachiatum* csoportba tartozó 2-3 törzzsel, valamint két gyorsan növekedő más *Trichoderma* izolátummal is. Továbbá két *Penicillium* törzs (*P. cf. simplicissimum* és *P. pulvillorum*) szintén érdekessé vált a szűrővizsgálat során. Kontrol mikroorganizmusokként (enzim termelőként) a nemzetközi szakirodalomban jól ismert *Trichoderma reesei* QM 6a és RUT C30 törzseket használtam.

Enzimtermelés, hidrolízis kísérletek

750 mL-es Erlenmeyer lombikokban végzett rázatott lombikos fermentációban valósítottuk meg a celluláz/hemicelluláz enzimtermelést. A fermentáció körkörös típusú rázógépen, 150 ml hasznos térfogat mellett 30°C-on, 5 napig, 220 fordulat/perc paraméterek mellett történt. A fermentáció végén centrifugálási felülúszókból mértünk enzim aktivitásokat (sejten kívüli, u.n. extracelluláris enzimek), majd ezekkel a felülúszókkal végeztünk hidrolízis kísérleteket lignocellulóz tartalmú szubsztrátokon.

Műszeres analitikai vizsgálatok

A xilánban gazdag modell szubsztrátok (búza arabino-xilán, eukaliptusz xilán hidrolizátum, kukorica rost alkohol oldhatatlan része, búzaszalma vízdoldhatatlan része) hidrolízise során keletkezett termékek (mono- és oligocukrok) minőségét és mennyiségét műszeres analitikai módszerekkel mértük. A mono- és oligoszacharidok mennyiségi és minőségi meghatározását nagyhatékonyságú anion cserés kromatográfiás módszerrel (HPAEC), nagyhatékonyságú méretkizárásos kromatográfiás módszerrel (HPSEC) valamint tömegspektroszkópiás módszerrel (MALDI-TOF MS) végeztük. A keletkezett ecetsav koncentrációt HPLC-vel mértük. Fentiek mellett természetesen használtuk a hagyományosnak tekinthető kolorimetriás módszereket is a celluláz és xilánáz aktivitások meghatározásához.

5. Eredmények

Xilán lebontó enzimek vizsgálata komplex rázatott lombikos fermentációs felülúszókban vízoldható xilán-gazdag szubsztrátok felhasználásával (1. publikáció)

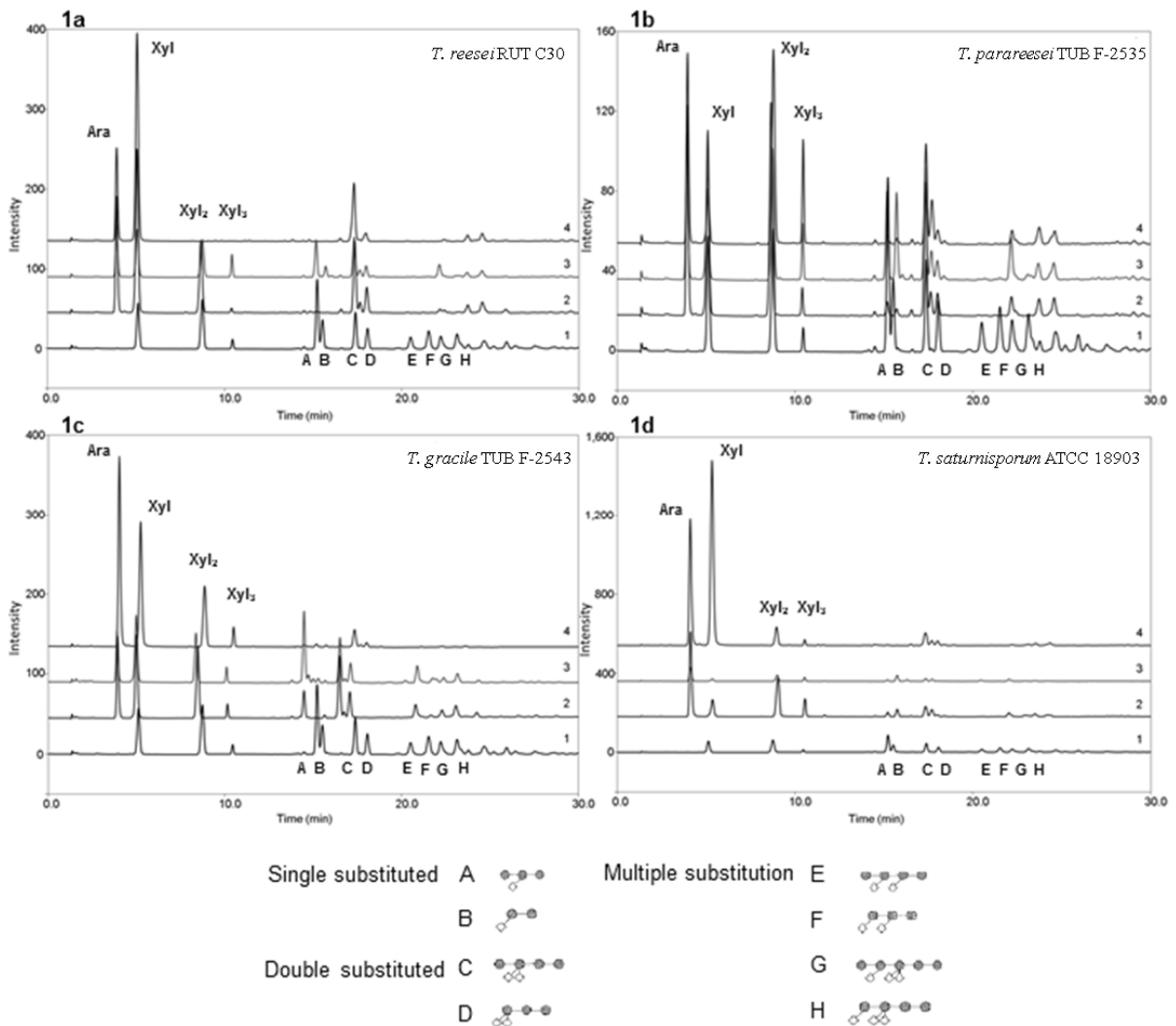
A kolorimetriás enzimaktivitás mérési módszereket kombinálva a műszeres analitikai eljárásokkal (HPLC, HPAEC and MALDI-TOF MS) képesek vagyunk megállapítani a fermentációs felülúszókban lévő enzimek specifikus hatását (xilanáz, arabinoxilán hidroláz, acetyl xilán hidroláz és glükuronidáz). A fermentáció során előállított felülúszókat teszteltük oldható xilánban gazdag szubsztrátok (WAX, EXH) hidrolízise során. Meglepő volt, hogy különböző gombákkal előállított 78 fermentációs felülúszót megvizsgálva, csupán néhány fonalagomba volt képes többféle enzim komponens nagyarányú termelésére is egy adott szubsztráton. Egyik fonalagomba felülúszó sem volt képes teljes mértékben lebontani a hidrolízis szubsztrátokat, ami azt jelentette, hogy a xilán főláncról nem sikerült teljesen lebontani a szubsztituenseket. Ez azt mutatja, hogy a természetben a xilán hasznosítása igen komplex, fajok sokasága vesz benne részt.

Fermentációs felülúszókban található hemicellulolitikus enzimek lebontó képességének vizsgálata oldhatatlan búzaszalma és kukorica rost frakciókon (2. publikáció)

A fermentáció során előállított enzim készítményeket teszteltük oldhatatlan búzaszalma és kukoricarost frakciók (WS WUS és CF AIS) hidrolízise során. A búzaszalma szénhidrát tartalmának 14%, míg a kukoricarost szénhidrát tartalmának 34% voltak képesek lebontani az enzimek. Megállapítható, hogy a lignocellulitikus enzimekkészítmények csupán akkor hatékonyak, ha megfelelő szubsztráton használjuk őket és a hidrolízis mértéke az enzim készítmény eredetétől is függ. A leghatékonyabb enzim komplexeket *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* és nem identifikált fajok produkálták.

Trichoderma Longibrachiatum csoportba tartozó fajok xilán lebontó enzim aktivitásainak vizsgálata (3. publikáció)

Trichoderma Longibrachiatum csoportból 15 törzssel termeltünk xilán lebontó enzimeket búzaszalmán, kukoricaroston és eukaliptusz fán, mint fermentációs szénforráson. Az enzimek készítmények hatékonyságát vizsgáltuk hidrolízis kísérletekben. Az 1. ábrán a hidrolízis után, a hidrolizátumban mért mono- és oligocukrok HPAEC-profilja látható, *T. reesei*, *T. parareesei*, *T. gracile* és *T. saturnisporum* felülűszóival hidrolizálva.



1. ábra WAX hidrolízise során keletkezett termékek HPAEC profiljai, négy különböző *Trichoderma* törzs felülűszóival lebontva, melyet három különböző szénforráson fermentáltunk. 1. kromatogram: Referencia: endo-xilanáz-I; 2. kromatogram: búzaszalmán fermentált felülűszó; 3. kromatogram: eukaliptusz fán fermentált felülűszó; 4. kromatogram: kukoricaroston fermentált felülűszó. Ara: arabinóz; Xyl: xilóz; Xyl2: xilobióz; Xyl3: xilotrióz.

Összehasonlítva az intenzitásokat a *Trichoderma reesei* xilán lebontó enzimei mellett a *T.saturnisporum*, *T.parareesei* és *T.gracile* fajok ilyen enzimei is érdekesek lehetnek. A fermentációs szénforrásokat tekintve a búzaszalma és a kukoricarost nagymértékben indukálták az enzimtermelést, míg az eukaliptusz fa kevésbé. Számos fermentációs felülúszó képes volt bizonyos mértékig felszabadítani az acetyl-csoportot az EXH szubsztrátról. A két oldhatatlan modell szubsztrát szerkezete nagyon ellenállónak bizonyult a felülúszókkal szemben a hidrolízis során, összehasonlítva az eredményeket a vízoldható WAX szubsztrát hidrolízis értékeivel. A *T. reesei*, *T. parareesei*, *T. gracile* és *T. saturnisporum* felülúszó viszonylag nagyobb mértékben hidrolizálták a szintén vízoldhatatlan CF AIS szubsztrátot.

Újszerű *Penicillium* cellulázokkal végzett hidrolízis kísérletek (4. publikáció)

A két új *Penicillium* faj (*P.pulvillorum* TUB F-2220 és *P.cf.simplicissimum* TUB F-2378) kimagaslóan hatékony celluláz/hemicelluláz enzim komplexet termel. Összehasonlítva a jól ismert *T. reesei* RUT C30 mutánsal specifikus celluláz aktivitásban kétszer magasabb értékeket kaptunk *P. pulvillorummal*, ezért ez a törzs egy jó kiindulási „biológiai nyersanyag” lehet a törzsféjlesztéshez. Az F-2220 enzim készítmény rendkívül nagy lebontó aktivitást mutatott mikrokristályos cellulózon (Avicel). A cellulázok a különböző tisztított ligninek által kiváltott inhibíciós tesztjei jelentősebb hőmérséklet- és ligninfüggést mutattak, ezért a *P. pulvillorum* celluláz enzimeket SSF (párhuzamos cukrosítás és fermentáció) kísérletekben érdemes alkalmazni, alacsonyabb hőmérsékleten (35°C). A *Penicillium* cellulázok előkezelt egynyári növények lignocellulózain (pl.búzaszalma) jeleskedtek, míg a *Trichoderma reesei* cellulázok előkezelt faféléken (pl.fenyőfa). További kísérletek történtek tisztított enzim fehérjékkel.

6. Tézisek

1. Új szűrővizsgálati módszert fejlesztettünk ki, amely segítségével információt nyerhetünk a fermentációs felülúszókban lévő hemicelluláz (elsősorban xilanáz) enzimek aktivitásáról. A módszer a klasszikus szűrővizsgálatokat ötvözi a műszeres mérésekkel, úgy mint a nagy teljesítményű folyadékkromatográfia és a tömegspektrometria. (1.sz. közlemény)
2. A szűrővizsgálati módszerünk csak akkor elég hatékony, ha megfelelő hidrolízis szubsztrátokat használjuk. Xilán bontó enzimek vizsgálatához xilánban gazdag szubsztrátokat használtunk, nevezetesen búza arabino-xilánt (wheat arabinoxylan, WAX), eukaliptusz xilán hidrolizátumot (eucalyptus xylan hydrolysate, EXH), búzaszalma vízdoldhatatlan részét (wheat straw water unextractable solids, WS WUS) és kukorica rost alkohol oldhatatlan részét (corn fiber alcohol insoluble solids, CF AIS). Az enzimaktivitás hatékonyabb volt oldható szubsztrátok esetében (1.sz. és 2. sz. közlemények)
3. A 78 rázólabdikos fermentációs felülúszó szűrővizsgálata során, a legjobb lebontó enzim aktivitással különböző *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* és nem identifikált fajok bírtak. Ez azt mutatja, hogy az enzim aktivitása annak eredetétől is függ. Az eredmények alapján választékbővítésre nyílik lehetőség a gomba eredetű xilán bontó enzimek témakörében. (1.sz és 2.sz. közlemények)
4. Az új szűrővizsgálati rendszert alkalmazva a *Trichoderma Longibrachiatum* csoport 15 törzsén megállapítható, hogy léteznek hasonlóan jó vagy jobb enzimtermelők, mint a csoportba tartozó, jól ismert *T. reesei* RUT C30 és QM 6a izolátumok. Ezek elsősorban a *T. reesei*-hez genetikailag közel álló *T. parareesei* TUB F-2535 és *T. gracile* TUB F-2543 fajok, amelyek akár az ipar számára is hasznosak lehetnek. (3.sz. közlemény).
5. Az újszerű *Penicillium* cellulázok hasonlóan hatékonyak vagy jobbak specifikus celluláz aktivitásban, mint a *T. reesei* RUT C30 celluláz. A *Penicillium* celluláz komplexben magasabb a β -glükozidáz aktivitás, ami további előny. Továbbá a *Penicillium* cellulázok aktivitása megfelelő. 35°C-on, lágyszárú növényi lignin jelenlétében, így alkalmas lehet párhuzamos cukrosítási és fermentációs eljárások során alacsonyabb hőmérsékleten. A két ígéretes törzs *P.pulvillorum* TUB F-2220 és *P.cf. simplicissimum* TUB F-2378 izoláltunk. (4.sz. közlemény).

7. Alkalmazási lehetőségek

Kísérleti eredmények számos utat nyitnak meg az ipari alkalmazásokhoz:

- Új típusú xilán bontó enzimek kiválasztására nyílik mód a kidolgozott innovatív komplex analitikai szűrővizsgálati módszerek alkalmazásával.
- *Trichoderma reesei*-vel genetikailag rokon u.n. nővér-fajok („sister-species”) vizsgálata új lehetőségeket nyújt celluláz és xilanáz termelésre még nem tesztelt izolátumok felkutatására.
- A gyorsan nöövő és hatékony celluláz termelő *Trichoderma* törzsek izolálása ipari szemszögből sokkal gazdaságosabb celluláz/hemicelluláz enzimtermelést tehetnek lehetővé, viszont ezeket az eredményeket még nem publikáltuk, gondolva a témakör esetleges szabadalmaztathatóságra.
- Újszerű *Penicillium* cellulázok alkalmazása elsősorban az alacsony hőmérsékleten megvalósított párhuzamos cukrosítási és fermentációs folyamatokban lehet fontos, pl. fűfélék és más egy-nyári növények vagy azok melléktermékeinek ilyen irányú hasznosítása.

8. Közlemények

Disszertációm a következő publikációkon alapszik:

1. Van Gool, M.P., Vancso, I., Schols, H.A., Szakacs, G., **Toth, K.**, Gruppen, H.: Screening for distinct xylan degrading enzymes in complex shake flask fermentation supernatants *Bioresource Technology* 102: 6039-6047 (2011) IF: 4.253
2. Van Gool, M.P., **Toth, K.**, Schols, H.A., Szakacs, G., Gruppen, H.: Performance of hemicellulolytic enzymes in a wide range of fermentation supernatants depends on substrate choice *Bioresource Technology* 114: 523-528 (2012) IF: 4.253
3. **Toth K.**, Van Gool M.P., Schols H.A., Samuels G.J., Gruppen H., Szakacs G.: Diversity in production of xylan degrading enzymes among species belonging to the *Trichoderma* section *Longibrachiatum*. *Bioenergy Research* 6(2): 631-643 (2013) IF: 3.562
4. Marjamaa K., **Toth K.**, Bromann P.A., Szakacs G., Kruus K.: Novel *Penicillium* cellulases for total hydrolysis of lignocellulosics. *Enzyme and Microbial Technology*. 52:358-369 (2013) IF: 2.367

Prezentációk

1. **Toth K.**, Van Gool M.P., Schols H.A., Samuels G.J., Gruppen H., Szakacs G.: Diversity in production of xylan degrading enzymes among species belonging to the *Trichoderma* section *Longibrachiatum*. 15th European Congress on Biotechnology, 23-26 September 2012, Istanbul, Turkey (poszter prezentáció)
2. **Toth K.**, Van Gool M.P., Schols H.A., Szakacs G.: Hemicellulóz lebontó enzimek termelése és vizsgálata *Trichoderma* fonalagomba fajokkal. XXXV. Kémiai Előadói Napok (KEN), 29-31 October 2012, Szeged, Hungary (prezentáció)
3. **Toth K.**, Van Gool M.P., Schols H.A., Szakacs G.: Xilanáz enzimek termelése és vizsgálata *Trichoderma* fonalagomba fajokkal. MTA Természetes Polimerek Munkabizottsági Ülés, 28 November 2012, Budapest, Hungary (prezentáció)
4. **Toth K.**, Van Gool M.P., Schols H.A., Samuels G.J., Gruppen H., Szakacs G.: Xilán lebontó enzimek termelése és vizsgálata *Trichoderma* fonalagomba fajokkal. X. Jubileumi Oláh György Doktori Konferencia, 07 February 2013, Budapest, Hungary (poszter prezentáció)