



ORSZÁGOS TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

Politejsav-alapú bioműanyag evőeszköz biológiai bontásának vizsgálata mikrobiális konzorciumokkal

Research of the biodegradation of polylactic acid based bioplastic cutlery with microbial consortia

Készítette: **Harcza Viktória Zita**
LAHCPM
Biomérnöki alapképzés
nappali tagozat
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék
Budai Campus

Témavezető: Kilin Ákos, PhD hallgató, kutatási munkatárs,
MATE, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet, Biomérnök és
Erjedéssipari Technológia Tanszék, Budai Campus

OTDK szekció: „Agrártudományi szekció”

**Budapest
2023.**

Tartalom

1.	Bevezetés	4
2.	Célkitűzések	5
3.	Irodalmi áttekintés	6
3.1.	Műanyagok	6
3.2.	Bioműanyagok	7
3.3.	Politejsav	8
3.3.1.	Előállítása	8
3.3.2.	Tulajdonságai.....	9
3.3.3.	Alkalmazása	10
3.3.4.	Enzimatis biodegradáció	10
3.3.5.	Politejsav alapú biokompozitok	11
3.4.	Termofil és termotoleráns baktériumok	13
3.4.1.	<i>Sphingobacterium</i>	13
3.4.2.	<i>Bacillus</i>	14
3.4.3.	<i>Thermobifida</i>	14
4.	Anyagok és módszerek.....	15
4.1.	Felhasznált anyagok.....	15
4.1.1.	Alkalmazott mikroorganizmusok	15
4.1.2.	Tápközegek	15
4.1.3.	Politejsav alapú bioműanyag evőeszközök.....	18
4.1.4.	Kísérletek során alkalmazott reagensek, pufferek	18
4.1.5.	Alkalmazott induktorok.....	19
4.2.	Módszerek	20
4.2.1.	Törzsfenntartás.....	20
4.2.2.	Törzsszelekció	20
4.2.3.	Politejsav alapú bioműanyagok biodegradálásának modellezése szubmerz körülmények között.....	21
4.2.4.	pH mérés	21
4.2.5.	Enzimaktivitás mérés	21
4.2.6.	Tömegváltozás követése mérleggel	24
5.	Kísérleti eredmények és értékelésük.....	25
5.1.	Törzsszelekció	25
5.1.1.	Tejsavhasznosítás	25
5.1.2.	Proteolitikus enzimkészlet kimutatása	26
5.1.3.	Észteráz típusú enzimkészlet kimutatása	27
5.2.	Szubmerz degradálás	28

5.2.1.	PLA-sörtörköly biokompozit biológiai bontása szubmerz körülmények között glükóz kiegészítéssel	28
5.2.2.	PLA-sörtörköly biokompozit biológiai bontása szubmerz körülmények között induktorok segítségével.....	31
5.2.3.	PLA-sörtörköly biokompozit biológiai bontása szubmerz körülmények között eltérő koncentrációjú olíva olaj és cellulóz tartalom jelenlétében.....	37
5.2.4.	PLA-sörtörköly biokompozit biológiai bontása szubmerz körülmények között fizikai paraméterek változtatásával.....	41
6.	A kutatómunka összefoglalása	45
7.	Irodalomjegyzék	46

1. Bevezetés

A XXI. század egyik lefoglalkoztatottabb témájává vált a környezetszennyezés és környezetvédelem fogalma. A Föld nyersanyag lelőhelyei és teherbíró képessége véges, így egyre több kutató, szervezet és ország foglalkozik azzal, hogy a bolygónkat a legjobb állapotában őrizhessük meg. Manapság az egyik legnagyobb csatát a petróleum alapú műanyagokkal szemben vívjuk. Ezek az anyagok nem, vagy csak rendkívül hosszú idő alatt képesek lebomlani. A műanyagok az élet minden területén jelen vannak a gyors és olcsó előállíthatóságuk okán. Találkozhatunk velük a háztartásokban, textil-, élelmiszer-, gyógyszeriparban, orvostudományban, vendéglátásban stb. Azonban a legégetőbb problémát az egyszer használatos polimerek okozzák. Ilyen termékek például a csomagolóanyagok, szívószálak, tányérok, evőeszközök, nylon zacskó. Amellett, hogy ellenállnak a biológiai bontásnak, nagy problémát idéz elő az is, hogy ezek a készítmények nem csak a személtlerakóhelyekre kerülnek, hanem sok esetben az óceánok és tengerek vízébe is eljutnak. Ez a szennyezés már olyan súlyossá vált, hogy valóságos szemétszigetek alakultak ki a vizek felszínén, melyek mérgezik az ott megtalálható ökoszisztémát. Ez nem csak esztétikai, de egészségügyi problémákat is maga után vonhat. Az itt megtalálható műanyagok bizonyos idő után darabolódnak, ezáltal az ott élő állatok már képesek elfogyasztani azokat, mely így nem csak az ő, de az mi szervezetünkre egyaránt káros hatással lehet.

Ezek alkalmazásának visszaszorítására különböző rendeleteket (301/2021. VI.1. Kormányrendelet, 2019/904 EU irányelv) hoztak létre, ezáltal már hazánkban is tilos az egyszerhasználatos petróleum alapú műanyagok forgalmazása. Az intenzív kutatásoknak köszönhetően, manapság már szinte mindegyik hagyományos műanyagnak, adott alkalmazási területnek megfelelően, rendelkezésre áll alternatív változata. Ezek a bioműanyagok és biológiailag lebomló műanyagok, melyeket megújuló növényi és állati eredetű forrásokból állítanak elő, sőt akár komposztálhatóak is, így megoldást kínálnak a környezetterhelés csökkentésére is.

A környezetünk megóvása érdekében és egy fenntarthatóbb világ reményében választottam a kutatásomnak a PLA alapú bioműanyagok biológiai bontásának vizsgálatát.

2. Célkitűzések

A kutatásom a PLA alapú biopolimerek biodegradációjának vizsgálatára irányul. A kísérletek magvalósításához, az alábbi részfeladatokat foglalmaztam meg:

1. Termofil és termotoleráns baktériumok szelektálása
 - Tejsavhasznosítás
 - Depolimeráz enzimkészletének feltérképezése
2. Biológiai bontásra alkalmas mikrobiális konzorciumok kialakítása
3. Biodegradáció hatékonyságának fokozása különböző indukálószerekkel
4. Fizikai paraméterek vizsgálata a biológiai bontás során
5. Biológiai bontás hatékonyságának megállapítása

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Műanyagok

A műanyagok szintetikus vagy félszintetikus, nagy molekulatömegű szerves vegyületek, amelyek hosszú láncú polimer molekulákból épülnek fel. Általában tartalmaznak egy szerves fő láncot, oldalsó kapcsolt molekulacsoportokat és néhány szerves és szervetlen részt, amelyeket adalékanyagként, lágyítóként adnak hozzá. Szén, hidrogén, nitrogén, oxigén, klór és bróm elemekből állnak. Az élet szinte minden területén előfordul az alkalmazásuk, ilyen például az egészségügy, az építőipar, a közlekedés. A műanyagok ellenállnak a lebomlásnak, de a könnyű súlyuk és az alakíthatóságuk miatt igen tartósak, emellett az előállításuk viszonylag kis költséggel jár (Bahl *et al.*, 2020). Az első megjelenése óta ezek a kőolaj alapú szintetikus polimerek uralják a műanyagok világszintű gyártását, amelyek túlnyomó többsége ipari hulladékként végzi (Nair *et al.*, 2017). Ezek súlyos problémákhoz vezethetnek, hiszen a fosszilis alapú műanyagok többsége egyáltalán, vagy nagyon kis mértékben bomlik le rövid időn belül, így károsíthatja az ökoszisztémákat (Polman *et al.*, 2020). A legtöbb hagyományos műanyag, mint például a polietilén, a polivinil-klorid, a polipropilén, a polisztirol és a polietilén-tereftalát (PET) ellenáll a mikrobiális támadásoknak, mivel a mikroorganizmusok nem tudtak olyan enzimszerkezeteket kialakítani, amelyek képesek lettek volna lebontani az ilyen szintetikus polimereket (Nair *et al.*, 2017).

Világszerte átlagosan 140 millió tonna műanyagot állítanak elő, és évente 57 millió tonna műanyag hulladék halmozódik fel (Nair *et al.* 2017). Ezek a tengerek, óceánok, folyók vizeibe is bekerülhetnek és aggregálódhatnak, komoly veszélynek kitéve az ott előforduló élővilágot. Az Egyesült Nemzetek biológiai sokféleségről szóló egyezményének felülvizsgálata több mint 600 fajt dokumentál, a mikroorganizmusoktól a bálnákig, amelyeket a tengeri műanyag hulladék elfogyasztása miatt kerülnek veszélybe (Bahl *et al.*, 2020). A műanyagok túlzott használata növeli a hulladékok ártalmatlanításával és kezelésével foglalkozó problémákat. A környezetkárosodás miatt kialakult aggodalmakra, olyan kutatásokba fogtak, amelyek „biológiailag lebomló” vagy „komposztálható” műanyagok kifejlesztésére alapulnak (Kalita *et al.*, 2019). Ahogy egyre több ország és állam követi az úgynevezett „fehér szennyezésért” felelős műanyag élelmiszer-zacsók betiltását világszerte, a bioműanyagok biológiailag lebomló helyettesítőként kiemelkedő szerepet fognak játszani (Nair *et al.*, 2017).

3.2. Bioműanyagok

A biológiailag lebomló műanyagok új lehetőségeket tártak fel a hulladékgazdálkodási stratégiákban, hiszen ezek az anyagok különböző körülmények között képesek lebomlani. A petróleum alapú műanyagok helyett kutatásokat végeznek alternatív megoldások után, melyeknek köszönhetően már a hétköznapi életben is megtalálhatóak ezek bioműanyagok. A biopolimerek, olyan polimerek, melyeket élő szervezetek szintetizálnak, a bioműanyagok pedig a biológiailag lebomló polimerek felhasználásával előállított műanyagok. Megújuló vagy nem megújuló erőforrásokból készülhetnek (Nair *et al.*, 2017). Ezek lehetnek mezőgazdasági termékek, például: kukorica, gyapotszálak vagy lenrostok, valamint élelmiszeripari melléktermékek, például: sörtörköly vagy almatörköly (Polman *et al.*, 2020). A természeti erőforrásokból kinyert vagy eltávolított polimerek különböző környezeti feltételek és különféle mikroorganizmusok hatására lebomlanak és átalakulhatnak (Nair *et al.*, 2017). Jelenleg ezek a biológiailag lebomló műanyagok érdekes alternatívát nyújtanak a kőolaj alapú szintetikus műanyagok helyettesítésére (Bubpach *et al.*, 2018).

A polimerek osztályozása az előállítás módja vagy forrása szerint is megtörtént:

- **Közvetlenül növényi vagy állati biomasszából származó polimerek:** Poliszacharidok és fehérjék (Nair *et al.*, 2017). Ebbe a csoportba sorolhatók a műanyagok keményítővel alkotott keverékei, valamint a keményítő fermentációjából előállított polimerek is. Ez a bioműanyagok piacának körülbelül 50%-át öleli fel. Emellett jellemző tagjai a csoportnak még a cellulóz alapú bioműanyagok (Nandakumar *et al.*, 2021).
- **Klasszikus kémiai szintézissel előállított polimerek megújuló bioalapú monomerek:** politejsav (PLA) nyersanyag felhasználásával.
- **Mikroorganizmusok által szintetizált polimerek:** polihidroxi-alkanoátok (PHA-k)
- **Petrolkémiai úton előállított polimerek:** polikaprolaktánok, poliészteramidok, alifás és aromás ko-poliészterek (Nair *et al.*, 2017).

A poliészterek az egyik legkiemelkedőbbnek bizonyulnak biológiailag lebomló műanyagokként a hidrolizálható észterkötéseik miatt. A kereskedelemben előállított és fejlesztés alatt álló biológiailag lebomló poliészterek többek között a polihidroxi-hexanoát (PHA), poli(3-hidroxi-butirát) (PHB), polihidroxi-valerát (PHV), politejsav (PLA), polikaprolakton (PCL), polibutilén-szukcinát, polibutilén-szukcinát-adipátsav (PBSA), kopoliészterek, polietilén-tereftalát, polibutilén-adipát/tereftalát (PBAT). A PCL és a polibutilén-szukcinát ugyan kőolaj alapú, azonban mikroorganizmusok által szintetizálhatók.

Az alifás poliészterek és polikarbonátok egyik fontos jellemzője, hogy érzékenyek a lipolitikus enzimekre és a mikrobiális lebomlásra (Nair *et al.*, 2017)-

3.3. Politejsav

A politejsav (PLA) az első biológiailag lebomló polimer, amelyet megújuló erőforrásokból állítanak elő, és kereskedelmi forgalomban kapható. Az alifás poliészterek közé sorolható. A PLA jó tulajdonságai keltették fel globálisan a figyelmet, mivel nagy a rugalmassági modulusa és merevsége, hőre lágyuló viselkedése, biokompatibilitása van, valamint jó alakítási és öntési képességgel rendelkezik (El-Meihy *et al.*, 2016). A PLA, egy lineáris alifás, hőre lágyuló poliészter. Olyan erőforrásokból származik, mint a kukoricakeményítő, cukornád és más megújuló biomassa termékek, hulladékok és élelmiszeripari melléktermékek (Nofar *et al.*, 2018). Az előállítása viszonylag gazdaságos, illetve a figyelemre méltó tulajdonságai alkalmassá teszik az élet számos területén való használatára (Avérous, 2008). A legnagyobb jelentősége, hogy nagy potenciállal rendelkezik a hagyományos kőolaj alapú műanyagok helyettesítésére (Kalita *et al.*, 2019).

3.3.1. Előállítása

A PLA szintézise egy többlépéses folyamat, amely a tejsav előállításával kezdődik és annak polimerizációjával ér véget (Avérous, 2008). A tejsav ($C_3H_6O_3$) olyan vegyület, amely számos biokémiai folyamatban kulcsfontosságú. Folyamatosan termelődik és eliminálódik a normál anyagcsere és a testmozgás során, ezenkívül a PLA monomer prekursora. Kukoricakeményítóből vagy répacukorból fermentációval vagy általános kémiai szintézissel nyerhető ki. A tejsav a legegyszerűbb hidroxilsav, amely aszimmetrikus szénatommal és két optikailag aktív konfigurációval, az L- és D-izomerekkel rendelkezik. Ezek bakteriális rendszerekben állíthatók elő, míg emlős szervezetek csak az L izomert termelik, amely az anyagcsere során könnyen asszimilálódik (Avérous, 2008). A PLA szintézise tejsav monomerek polimerizációján keresztül megy végbe. A szintézis eljárásai a polikondenzáció és elsődleges lánc addíciós polimerizációja, amely kis molekulatömegű intermediereket eredményez, amelyeket később feldolgozva PLA állítható elő (DeStefano *et al.*, 2020).

3.3.1.1. Gyűrűnyitó polimerizáció – Ring Opening Polymerization

A gyűrűnyitó polimerizációs technikákat (ROP) általában PLA előállítására használják kis molekulatömegű előpolimerből, mely folyamatban a depolimerizáció tejsav molekulát eredményez (DeStefano *et al.*, 2020). Ez az eljárás nagy molekulatömegű termékek

előállítására szolgál, amelyben a nagy tisztaságú tejsav használata elengedhetetlen. A prekursor molekula dekompressziós eljárással állítható elő, amelynek során a vizet elválasztják a rendszerből. Ezután a tejsav kinyitja a gyűrűjét a polimerizációhoz (Cheng *et al.*, 2009). A gyűrűnyitás helye PLA képződését eredményezi. A gyűrűnyitás által elősegített polimerizációnak köszönhetően nagyobb molekulatömegű termékek képződnek. Mivel az eljárás nagy tisztaságú tejsav- és nehézfém-katalizátorokat igényel, amelyek növelik az előállítási költségeket, így csak olyan esetekben alkalmazzák, melyek megigénylik ezt a magasfokú tisztaságot (DeStefano *et al.*, 2020). Általánosságban a gyűrűnyító megközelítést a kereskedelemben alkalmazzák oldószermentes, nagy molekulatömegű PLA előállítására, mivel a másik megközelítésben víz is keletkezik nemkívánatos melléktermékként a polimerizáció során (Nofar *et al.*, 2018).

3.3.1.2. Polikondenzáció

A közvetlen polimerizációt azeotróp dehidratációs polikondenzációval vagy enzimikus polimerizációval lehet végrehajtani. Ezek az eljárások elősegítik a PLA közvetlen előállítását tejsav monomerekből (DeStefano *et al.*, 2020). Ezzel az eljárással nagy lánc hosszúságokat lehet elérni lánc hosszabbítók és az ezekhez kapcsolódó hátrányok alkalmazása nélkül. A tejsav csökkentett nyomású desztillációja 2-3 órán keresztül, 130°C-on történik a kondenzvíz nagy részének eltávolítása érdekében. Ezután a katalizátor, a difenil-éter hozzáadása következik. Az oldószert 30-40 óra alatt 130°C-on kell az edénybe visszavezetni. Végül a keletkező PLA megtisztításra kerül (Avérous, 2008).

3.3.2. Tulajdonságai

Kiváló filmképző, a jó termikus, permszelektív, mechanikai és feldolgozási tulajdonságaik, a csomagolástechnika területén is felhasználhatók (Cheng *et al.*, 2009). Emellett biológiai lebonthatósága, átlátszósága, nagy rugalmassági modulusa és szilárdsága keltette fel a figyelmet más alkalmazási területeken is. Azonban a korlátozott olvadási szilárdsága, alacsony hőtorzulási hőmérséklete, nagy ridegsége és alacsony rugalmassága korlátozó tényező a használatában. A PLA tulajdonságainak javítására az egyik kifejlesztett stratégia a természetes szálak, például cellulózzrostok erősítőanyagként történő hozzáadása (Ruz-Cruz *et al.*, 2022).

3.3.3. Alkalmazása

A PLA-t a kedvező tulajdonságai miatt sok területen kezdték el alkalmazni, ilyen például a modern ipar, ideértve a textíliákat és a csomagolóanyagokat. Az egészségügy számos területén is előtérbe került a használatuk, mint például a szövetfejlesztés, regeneratív gyógyászat, szív- és érrendszeri implantátumok, gyógyszerhordozók, ortopédiai beavatkozások, rákterápia, bőr- és íngyógyászat. Így a PLA lehetővé teszi a gyors prototípus-készítést és a hatékony gyártást 3D nyomtatott konstrukciókban (DeStefano V., 2020).

3.3.4. Enzimatikus biodegradáció

A PLA polimerek lebomlási mechanizmusa függ, az őt körülvevő biológiai környezettől is (Prema *et al.*, 2015). A műanyagok lebomlása különböző tényezők hatására megy végbe, beleértve a rájuk jellemző tulajdonságokat, mint a mobilitás, kristályosság, molekulatömeg, és a polimerekhez adott funkciók csoportok és adalékanyagok fajtája (Bahl *et al.*, 2020). Az alifás poliészterek hidrolízissel történő enzimatikus lebontása az enzimnek a szubsztrát felületén a felületi kötődőmenen keresztül történő adszorpcióján, majd az észterkötés hidrolíziséen keresztül megy végbe (Prema *et al.*, 2015). A bioműanyagok biológiai lebomlása során első lépésként a felületen lévő mikroorganizmusok általi kolonizáció, megtelepedés következik be (Bahl *et al.*, 2020). A lebomlás következő lépése a fragmentáció, mikor a polimereket az extracelluláris enzimek kisebb, rövid láncokra, oligomerekre bontják. Ezek elég kicsik ahhoz, hogy áthaladjanak a félig áteresztő külső bakteriális membránokon, majd szén- és energiaforrásként hasznosuljanak. Ha a termék elsősorban a monomer, akkor ezt a folyamatot depolimerizációnak nevezik. Míg a folyamatot mineralizációnak nevezik, ha a keletkező termékek, például szén-dioxid, metán vagy víz (El- Meihy *et al.*, 2016).

A PLA bontása során az extra- és intracelluláris depolimerázok, illetve az észterázok, foszfatázok és lipázok vesznek részt (Nair *et al.*, 2017). Az enzimek jelentős szerepet játszanak a polimerek lebontásában, azonban nem csak ők felelősek a polimerek hidrolíziséért. (Prema *et al.*, 2015).

3.3.4.1. Kutináz

A kutináz egy többfunkciós enzim, amely számos szubsztrátot hidrolizál, beleértve a poliésztereket, a vízben oldhatatlan triglicerideket és az oldható észtereket. Az észterezést és az átészterezést is képes katalizálni. Ezért nagy potenciállal rendelkezik a textil-, mosószer-, észterszintézis- és környezetvédelmi iparban (Su *et al.*, 2015). A kutin a szárazföldön

előforduló növények kutikulájának fő összetevője, sok zsírsavláncból álló polimer. A kutinázok sokoldalúan felhasználhatók, fontos szerepe van az, amid típusú kötések felszakításában a műanyagszálak hidrolízisében. Ezenkívül a PET polimerekre és a polietilén (PE) gyantákra is befolyással van a kutinázok hatása. A kőolaj alapú műanyagok hőstabilitásától függően a termofil környezet döntő szerepet játszik a biológiai lebomlási folyamatban (Flores-Castañón *et al.*, 2022).

3.3.4.2. Proteáz

A kis molekulatömegű PLA enzimatis lebontása észteráz típusú enzimek, például proteázok használatával történik. A proteázok katalizálják a peptidkötések hidrolízisét és az ehhez kapcsolódó észterkötések hidrolízisét (El-Meihy *et al.*, 2016). A proteázokat savas, semleges és lúgos proteázok közé sorolják a maximális aktivitást mutató pH-érték alapján. A mikroorganizmusok, például a baktériumok, gombák és proteáztermelők (Radha *et al.*, 2012). A enzimek egyetlen osztályát alkotják, amelyek kereskedelmi és fiziológiai felhasználásuk szempontjából kulcsfontosságú szerepet töltenek be. A proteázok az ipari enzimek három legnagyobb csoportjának egyikét alkotják (amelynek 95%-a hidrolitikus enzim), és a világ teljes enzimtermelésének és értékesítésének körülbelül 30-65%-át teszik ki. Széles körben alkalmazhatók különböző ipari folyamatokban az élelmiszer-, gyógyszer-, mosó-, bőr- és selyemiparban, valamint az ezüst kinyerésében röntgenfilmekből (Ire *et al.*, 2011).

3.3.5. Politejsav alapú biokompozitok

A PLA alapú bioműanyagok alkalmazását néhány hátrány korlátozza, például az alacsony hőstabilitás és a kőolajból származó polimerekhez képest rossz záró tulajdonságok magas hőmérsékletű környezetben. E kihívások leküzdésére folyik néhány kutatás a biológiailag lebomló polimerek kompozitjainak fejlesztése terén, mint például a megújuló erőforrásokból származó töltőanyagokkal, például lignocellulóz szálakkal és szerves agyagokkal megerősített PLA után (Lima *et al.*, 2021).

3.3.5.1. Cellulóz

A cellulóz a legelterjedtebb természeti erőforrás a Földön, mivel a növényi sejtfalak fő alkotóeleme. A legtöbb cellulóz nagyfokú polimerizációval rendelkezik mind a fajtól, mind az izolálási és tisztítási eljárásuktól függően. Ez utóbbi műveletek gyakran más funkciós csoportokat, például karbonil- és karboxilcsoportokat visznek be a makromolekuláris vázba. A cellulóz glikozidos kötése erősek, így ez a polimer sokféle reakciókörülmény között stabil. A

módosított cellulóz volt az első polimer, amelyet a modern szintetikus műanyagipar fejlődése előtt fejlesztettek ki. A nitrocellulózból származó celluloid volt az első hőre lágyuló anyag, amelyet a 19. században találtak fel (Sharif *et al.*, 2019). A nanocellulóz méretének csökkenése miatt nagyobb felülettel, kristályossággal, jobb optikai átlátszósággal, jobb mechanikai, termikus tulajdonságokkal rendelkezik. Ezenkívül a nanocellulóz megújuló, biológiailag lebomló, biológiailag kompatibilis és nem mérgező. Ezek az előnyös tulajdonságok a nanocellulózt ígéretes erőforrássá teszik a polimer nanokompozit megerősítéséhez. Felületi hidroxilcsoportjaik lehetőséget adnak továbbá a felület módosítására, hogy javítsák a polimer mátrixokkal való kompatibilitásukat, és speciális funkciókat biztosítsanak az orvosbiológiai, vízkezelési, elektronikai, energetikai és egyéb alkalmazásokhoz (Ruz-Cruz *et al.*, 2022).

3.3.5.2. Keményítő

A keményítő potenciálisan hasznos anyag a biológiailag lebomló műanyagokhoz. A keményítő a fő szénhidrát a növényi részekben és a magvak endospermiumában, ahol granulátum formájában található meg. Amilopektin molekulákat és nagyobb számú kisebb amilóz molekulát tartalmaz. A keményítő legnagyobb forrása a kukorica, a többi gyakran használt forrás pedig a búza, a burgonya és a rizs. A keményítő biológiailag lebontható anyagokban való alkalmazására tett első kísérletek során szintetikus polimerekben, például polietilénben töltőanyagként, vagy zselatinnal alkotott formában vízdíszítható vagy vízben diszpergálható polimerekkel alkotott keverékek komponenseként használták. A keményítő az egyik legolcsóbb biológiailag lebomló anyag, amelyet számos nem élelmiszeripari cikkhez használnak, például papírgyártáshoz, kartonpapírhoz, textil- és ragasztóanyagokhoz. A közelmúltban a keményítőt hőre lágyuló kompozíciók fő polimereként használták, evőeszközökké és filmgyártáshoz használt anyagokká dolgozták fel. A hőre lágyuló anyaggá alakított keményítő érdekes alternatívát kínál a szintetikus polimerek számára, ahol nincs szükség hosszú távú tartósságra, és a gyors lebomlás előnyt jelent (Cañigüeral *et al.*, 2009).

3.3.5.3. Mangó mag

A mangó az egyik legtöbbet fogyasztott gyümölcs a világon, amely nagy mennyiségű hulladékot eredményez, így potenciális nyersanyag a biológiailag lebomló anyagok előállításához. Az agráriparból származó mangómag környezeti problémát jelent az előállított melléktermékek mennyisége miatt. A mangómagok két fő részre oszthatók: kültakaró (a mag külső része, fala) és a mag (a mag belső része). Cellulóz és hemicellulóz is jelen van a mangómag héjában és magjában. A lignocellulóz polimerek erősítő képességüknek és biológiai

lebonthatóságuknak köszönhetően keltették fel a figyelmet. Ezenkívül a hemicellulózok alacsony molekulatömegű polimerek. A mangómagból származó keményítő volt az alapja a PLA-keményítőből öntött glicerint tartalmazó biokompozitok kifejlesztésének. Ezenkívül mangómag-kivonatot adtak a biopolimerekhez, hogy fokozzák azok antioxidáns tulajdonságait, mivel összetételükben karotinoidokat, aszkorbinsavat és fenolos vegyületeket tartalmaznak, amelyek a biológiai környezetben antioxidáns funkcióval rendelkező molekulák. Az extrudált PLA kompozitokhoz hozzáadott mangó melléktermékek hatásait már vizsgálják mind mechanikai, mind gátlási tulajdonságok alapján, így akár potenciális anyaggá is válhat a merev csomagolások tekintetében (Lima *et al.*, 2021).

3.4. Termofil és termotoleráns baktériumok

A termofil baktériumokból származó enzimek számos előnnyel rendelkeznek a mezofil baktériumokból származó enzimekhez képest, például hosszabb eltarthatóságot, kevesebb szennyeződési problémát vet fel az enzimreakciónál alkalmazott magas hőmérséklet miatt, így a vegyszerállóság is megnövekszik. Ezek az extracelluláris enzimek jobban ellenállnak a szélsőséges pH-értéknek és a kémiai reagenseknek, mint a mezofil mikroorganizmusok által szintetizáltak (Msarah *et al.*, 2020).

3.4.1. *Sphingobacterium*

A *Sphingobacterium* nemzetség a *Phylum Bacteroidetes*, a *Sphingobacteriace* családból származik, a nevét a sejtfalukban lévő szfingolipidekre utalva kapta. (Satti *et al.*, 2017) A nemzetségbe tartozó mikroorganizmusok Gram-negatív, nem laktóz fermentatívak, és pozitívok a kataláz és oxidáz tesztekre. Fontos jellemzőjük, hogy sejtmembránjukban nagy koncentrációban vannak jelen a szfingofoszfolipidek. A természetben mindenütt jelen vannak, de ritkán vesznek részt emberi fertőzésekben. A *Sphingobacterium* megtalálható a talajban, a növényeken, az élelmiszerekben és a vízforrásokban (Barahona *et al.*, 2015). A komposztból izolált *Sphingobacterium* sp. mezofil hőmérsékleten képes bontani a PLA-t. A xenobiotikus és aromás vegyületek biológiai lebontására szolgáló katabolikus géneket a mikroorganizmus genomvázlatán azonosították. Emellett a biofilm létrejöttének és szabályozásának tulajdonítható génekkel is rendelkezik. Potenciális szerepet játszanak a különböző szennyező anyagok biológiai lebontásában, beleértve a kevert műanyag hulladékot, a policiklusos aromás szénhidrogéneket (PAH), az olajok és a peszticidek biológiai lebontását (Satti *et al.*, 2017).

3.4.2. *Bacillus*

A termofil *Bacillus* jelentősége megnőtt, mivel biotechnológiai jelentőségük hőstabil enzimforrásként van jelen. A termofil mikroorganizmusokból származó enzimekre rendkívül nagy az igény az iparban, mint például a biokatalizátorok, a biotranszformáció és a biológiai lebontás. A hőstabil enzimek jellemzően nehezen denaturálódnak, emelt hőmérsékleten (>60°C), míg a hőmérséklet emelésével az aktív hely alakja felborul, ami csökkenti az enzim aktivitását (Msarah *et al.*, 2020).

3.4.3. *Thermobifida*

A *Thermobifida* fajokra jellemző tulajdonságok, hogy termofil és aerob mikroorganizmusok, illetve képesek a lignocellulózt bontani. A nemzetségen belül négy fajjal találkozhatunk: *T. fusca*, *T. alba*, *T. cellulosilytica* és *T. halotolerans*. Ezek a mikroorganizmusok eltérő endoglukanázokat termelnek (Tóth *et al.*, 2016).

A *Thermobifida fusca* egy fonalas talajbaktérium, amely 55°C-on, meghatározott táptalajban legfőképpen cellulózon, mint szénforráson növekszik. A felmelegített szerves anyagokban, például a komposzthalmokban és a rothadó szénában a növényi sejtfalakat jelentős mértékben képes bontani. Aktív extracelluláris proteázt termel (Wilson *et al.*, 2004). A cellulolitikus mikrobák közül az egyik legkiválóbb fiziológiai és cellulolitikus tulajdonságokkal rendelkezik, ilyen például termosztabilitás, nagy aktivitás és tolerancia a széles pH-tartományhoz (pH 4-10). Hatékonyan képes lebontani a cellulóz biomasszát specifikus cellulolitikus enzimek, és szénhidrátkötő fehérjék segítségével (Gomez del Pulgar *et al.* 2013).

A *Thermobifida cellulosilytica* is szintén termofil körülmények között képes szaporodni csak úgy, mint a nemzetség többi tagja. Jelentős kutináz termelő, azonban a vad és mutáns típusa között felmerülő különbségek az elektrosztatikus és hidrofób felületi elektrosztatikus és hidrofób tulajdonságaiban erősen befolyásolták PET-re gyakorolt aktivitásukat (Ribitsch *et al.*, 2017). Emellett érdekes jellegzetessége, hogy ugyanazt a celluláz enzimkészletet kódolja, mint a *Thermobifida fusca* (Tóth *et al.*, 2016).

4. Anyagok és módszerek

4.1. Felhasznált anyagok

4.1.1. Alkalmazott mikroorganizmusok

A kísérletek során termofil és termotoleráns baktériumtörzseket alkalmaztam, amiket a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (NCAIM Budapest) biztosított.

1. táblázat: Alkalmazott termofil és termotoleráns mikroorganizmusok

Termofil mikroorganizmusok
<i>Thermobifida cellulosilytica</i> B1997
<i>Thermobifida fusca</i> B2355
<i>Thermus composti</i> B2340
Termotoleráns mikroorganizmusok
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B01704
<i>Sphingobium aquiterrea</i> B2634
<i>Sphingobacterium</i> sp. B2638
<i>Sphingobacterium</i> sp. B2636
<i>Bacillus coagulans</i> B1139
<i>Bacillus coagulans</i> 200B/9

4.1.2. Tápközegek

Törzsfenntartáshoz alkalmazott tápközegek

Nutrient tápleves - *Bacillus amyloliquefaciens* törzsfenntartásához alkalmazott tápközeg

2. táblázat: Nutrient tápleves összetevői

Összetevő	Mennyiség
Pepton	5g/l
Húskivonat	3g/l
Desztillált víz	1000 ml

LB tápleves (Lysogeny broth) - *Sphingobacterium* sp. törzsfenntartásához alkalmazott tápközeg

3. táblázat: LB tápleves összetevői

Összetevő	Mennyiség
Tripton	10g/l
Élesztőkivonat (YE)	5g/l
NaCl	9g/l
Desztillált víz	1000 ml

R2 tápleves - *Sphingium aquiterrea*, *Thermus composti* törzsfenntartásához alkalmazott tápközeg

4. táblázat: R2 tápleves összetevői

Összetevő	Mennyiség
Élesztőkivonat (YE)	0,5g/l
Proteose peptone	0,5g/l
Casamino acids	0,5g/l
Glükóz	0,5g/l
Keményítő	0,5g/l
K ₂ HPO ₄	0,3g/l
Desztillált víz	1000 ml

Czapex-pepton tápleves - *Thermobifida cellulosilytica*, *Thermobifida fusca* törzsfenntartásához alkalmazott tápközeg

5. táblázat: Czapex-pepton tápleves összetevői

Összetevő	Mennyiség
Szacharóz	30 g/l
NaNO ₃	3 g/l
K ₂ HPO ₄	1g/l
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,5 g/l
KCl	0,5 g/l
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,01 g/l
Élesztőkivonat (YE)	2g/l
Pepton	5 g/l
Desztillált víz	1000 ml

A tápközégeket autokláv segítségével csíramentesítettem 120°C-on, 15 percig.

Szelekcióhoz alkalmazott szilárdtápközeg

Tejsavhasznosítás vizsgálathoz használt agar alaptápközeg

6. táblázat: Alaptápközeg összetevői

Összetevő	Mennyiség
NaH ₂ PO ₄	2 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2g/l
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,5g/l
Élesztőkivonat	1 g/l
Agar	15g/l
Desztillált víz	1000 ml

Proteolitikus enzim kimutatásra alkalmazott kazein-agar (Radha *et al.*, 2012)

7. táblázat: Kazein-agar összetevői

Összetevő	Mennyiség
Kazein	10 g/l
Agar	15 g/l
Desztillált víz	1000 ml

Észteráz típusú enzim kimutatására módosított Tween 80 agar (Kumar *et al.*, 2012)

8. táblázat: Tween 80 agar összetevői

Összetevő	Mennyiség
Pepton	5 g/l
Élesztőkivonat	3 g/l
Tween 80	0,1 %
Kongó vörös	0,5g/l
Agar	15 g/l
Desztillált víz	1000 ml

Politejsav alapú bioműanyag bontási modellezéshez alkalmazott tápközeg

9. táblázat: TPY (Trypticase-Phytone peptone-Yeast extract) tápközeg összetevői:

Összetevő	Mennyiség
Triptikáz pepton	10 g/l
Fiton pepton	5 g/l
Glükóz	5g/l
Tween 80	1 ml
Cisztein-HCl	0,5 g/l
K ₂ HPO ₄	2 g/l
MgCl ₂ *6H ₂ O	0,5 g/l
ZnSO ₄ * 76H ₂ O	0,25 g/l
CaCl ₂	0,25 g/l
FeCl ₃	0,03 g/l
Desztillált víz	1000 ml

A tápközegeket autokláv segítségével csíramentesítettem 120°C-on, 15 percig.

4.1.3. Politejsav alapú bioműanyag evőeszközök

A kísérletek során a NatureWorks Ltd., USA által gyártott Ingeo 3251D PLA biopolimerből készült, 5%-os sörtörköly tartalommal rendelkező biokompozit evőeszközöket használtam, melyet a Piringer Kft (Budapest) öntött.



1. ábra: PLA-sörtörköly biokompozit (saját kép)

4.1.4. Kísérletek során alkalmazott reagensek, pufferek

Kazein oldat

A proteolitikus aktivitás mérése során 1,5 (m/v) % koncentrációjú kazein oldatot használtam, melyet pufferben oldottam fel, aminek a pH értékét mindig az adott minta kémhatása befolyásolta (pH3-9). A jobb feloldás érdekében 80 °C-on inkubáltam az oldatot 30 percig.

Triklór-ecetsav oldat

A proteáz aktivitás mérésénél az enzim reakciót 5(m/V) %-os triklór-ecetsav (TCA) oldattal állítottam le. A táramérlegen kimért kristályos TCA-t desztillált vízben oldottam fel. A proteolitikus enzimreakció színképzéséhez 0,5 M Na₂CO₃ oldatot és háromszoros hígítású Folin-Ciocalteu reagenst alkalmaztam.

50 mM para-nitrofenil-butirát szubsztrátum

Kutináz enzim aktivitásának meghatározására 50 mM para-nitrofenil-butirát (PNPB) mesterséges szubsztrátumot alkalmaztam 96%-os etanolban oldva.

McIlvaine (citrát-foszfát) puffer

Az enzimreakciók elvégzéséhez McIlvane puffert használtam. A kutináz enzimaktivitás méréshez pH 4,5 kémhatású puffert készítettem, míg a proteáz enzimaktivitásnál alkalmazott kazein szubsztrátumhoz pH 3,0, 4,5 és 7,0 kémhatású citrát-foszfát puffert használtam. A citromsav és Na₂HPO₄*2H₂O oldatokat a kívánt pH értékű puffer oldat eléréséhez megfelelő arányban elegyítettem. A kémhatást pH-mérő segítségével ellenőriztem, és szükség esetén a hozzávalók további adagolásával módosítottam.

Na-foszfát puffer pH

A kutináz enzimreakció leállításához hideg Na-foszfát pH 7,0 puffert alkalmaztam, a proteáz enzimaktivitáshoz adott esetben a kazein szubsztrátumot pH 9,0 Na-foszfát pufferben oldottam fel. A Na₂HPO₄*2 H₂O és NaOH oldatokat kívánt pH értékű puffer oldat eléréséhez megfelelő arányban elegyítettem és egészítettem ki 1000 ml-re desztillált vízzel, hűtőben tároltam.

4.1.5. Alkalmazott induktorok

Egyes kísérletek alkalmával kiegészítő induktorokat használtam. Ezeket különböző mennyiségekben és egymással kombinálva alkalmaztam.

10. táblázat: A kísérletek során alkalmazott induktorok

Induktor	Mennyiség
Olaj	2,5%, 5%, 7,5%, 10%
Cellulóz	0%, 0,5%, 0,75%, 1,0%
L-alanin	0,5 g/l
Fenilalanin	0,5 g/l
Keményítő	5 g/l
Laktóz	5 g/l
Tejsav	0,1%
Casamino acid	5 g/l
Zselatatin	5 g/l
Glükóz	5 g/l

4.2. Módszerek

4.2.1. Törzsfenntartás

Az alkalmazott mikroorganizmusok törzsfenntartásához időnként átoltásra volt szükség. A felhasznált baktériumtörzseket steril körülmények között átoltottam pipetta segítségével az elkészített csíramentes táplevesekbe.

4.2.2. Törzsszelekció

Ezzel a módszerrel megállapítottam, hogy a mikroorganizmusok rendelkeznek tejsav hasznosító képességgel, illetve proteolitikus és észteráz típusú enzimkészlettel. A csíramentesített, folyékony (45-50°C) szelekcióra alkalmas tápközegekkel lemezöntést végeztem.

Mindhárom vizsgálatot agardiffúziós módszerrel hajtottam végre. A lemezöntést követően a megszilárdult agarlemezekbe kb. 0,2 cm átmérőjű zsebeket vágtam, majd ezekbe is 50 µl-t pipettáztam a mikroorganizmusokból. Ezek végeztével a lemezeket 45°C-on inkubáltam 3 napig. A proteolitikus enzimkészlet kimutatásához brómkrezol zöld indikátort (0,56% borostyánkősav, 0,1% NaOH, 0,028% brómkrezolzöld) használtam.

Ezek az előzetesen elvégzett gyorsmódszerek szelekcióra és rangsorolásra is alkalmasak, így ezek segítségével az ígéretes eredményt mutató baktériumokkal folytattam a politejsav alapú bioműanyagok szubmerz biodegradálásának vizsgálatát.

4.2.3. Politejsav alapú bioműanyagok biodegradálásának modellezése szubmerz körülmények között

A gyorsesztek alapján kiválasztott törzsekkel szubmerz biodegradálást végeztem a PLA darabokon. A vizsgálat során ismert tömegű, 1%-nyi, kb. 0,1 x 0,1 cm-re darabolt PLA alapú, sőtörkölyel kiegészített bioműanyagot alkalmaztam (2. ábra), amiket aszeptikus körülmények között, lamináris boxban 96%-os etanollal, majd steril vízzel átmostam és a TPY táplevesekbe helyeztem. A beoltást 3%-os inokulum tenyésztettel indítottam el. A lombikokat 21 napon át 45°C-on, 140 rpm-en inkubáltam. A fizikai paraméterek megfigyelésekor 60°C-on, rázatást és álló tenyészetet is alkalmaztam. Adott időpontokban mintát vettem az enzimaktivitás megfigyelése és pH mérés céljából.



2. ábra: Kiindulási PLA alapú bioműanyag darabok

4.2.4. pH mérés

A kísérletek során a minták kémhatás változását a Mettler Toledo pH mérő segítségével követtem nyomon.

4.2.5. Enzimaktivitás mérés

Az irodalmi hivatkozások alapján a kutináz és a proteáz enzimeknek tulajdonítanak fontos szerepet a polimerlánc bontásában. Ezért is a kísérleteim során a proteáz és a kutináz enzimaktivitásokat figyeltem meg spektrofotometriás módszerrel.

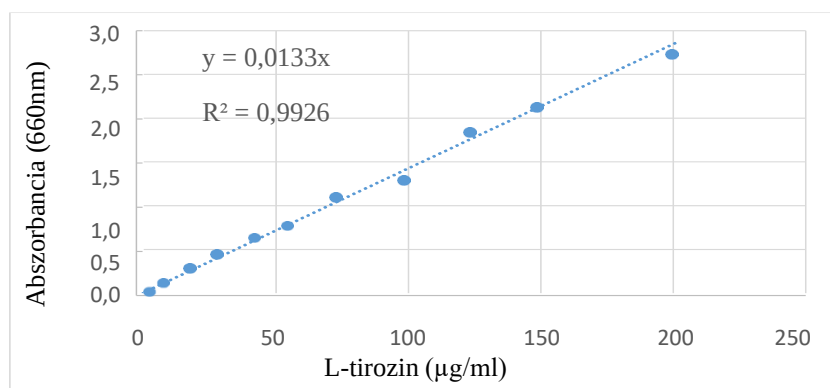
4.2.5.1. Proteázaktivitás mérése:

Elve: A proteáz enzim a kazein szubsztrátumból L-tirozint szabadít fel, amelyet a Folin reagens kék színváltozással jelez. A felszabadult L-tirozin mennyisége 660 nm-en, spektrofotometriásan meghatározható.

A méréshez 1,5 (m/v) %-os kazein oldatot használtam. A reakció indításához 0,25 ml mintát pipettáztam a kémcsövekbe, majd 45°C, illetve az utolsó kísérletben 60°C-on inkubáltam néhány percre. A vakmintákhoz 1,5 ml 5 (m/v) %-os TCA oldatot adtam, hogy a reakciót leállítsam. Pár perc inkubálást követően a kémcsövek tartalmához 0,25 ml kazein oldatot adagoltam és 30 percen át az adott hőmérsékleten inkubáltam vízfürdőben. A mintákban az enzimreakciót szintén 1,5 ml 5 (m/v) %-os TCA (triklór-ecetsav) oldattal állítottam le, és 10 percen át a vízfürdőben tartottam. Ezt követően 1,5 ml mennyiségeket Eppendorf-csövekben 14000 fordulat/perc sebességen, 5 percen át centrifugáltam. A következő lépésben az Eppendorf-csövekből 0,5 ml felülúszót pipettáztam ki, amelyhez 1,5 ml 0,5 M Na₂CO₃ oldatot, valamint 0,5 ml háromszoros hígítású Folin reagenst adtam. A reakcióelegyet ismét 30 percre, 45°C, 60°C-os vízfürdőbe helyeztem. A reakció végén a mintákat küvettákba tettem, és az abszorbancia értékeiket 660 nm-en mértem meg spektrofotométer segítségével. (Ire et al. 2011)

Kalibráció

A kalibrációhoz 1,1 mM L-tirozin törzsoldatot használtam, amit desztillált vízzel végeztem a hígítási sor elkészítéséhez. A hígított mintákhoz 1,5 ml 0,5 M Na₂CO₃ oldatot, valamint 0,5 ml háromszoros hígítású Folin reagenst adtam. Az oldatok abszorbanciáját 660 nm-en, spektrofotometriásan mértem meg. Az abszorbancia értékeket a koncentrációk függvényében ábrázoltam, majd a kapott pontokra regressziós egyenest illesztettem. A függvény által ismerjük a meredekséget, amelynek köszönhetően már számíthatóak az enzimaktivitások.



3. ábra: Kalibrációs egyenes

4.2.5.2. Kutináz enzimaktivitás meghatározása:

Elve: A kutináz a p-nitrofenol-butirát mesterséges, kromogén szubsztrátumot hasítja, aminek hatására termékként p-nitrofenol szabadul fel. A reakciót sárga színváltozás jelzi, ami 405 nm-en spektrofotometriásan mérhető.

Elsőként 50 µl mintához kémcsövekbe 400 µl McIlvane (pH 4,5) puffert adtam. A vakmintákhoz szubsztrátum helyett 50 µl desztillált vizet pipettáztam. A reakciót 50 µl p-nitrofenol-butirát szubsztrátummal indítottam el, majd 10 percig vízfürdőben inkubáltam 45°C, illetve 60°C-on. Az enzim reakciót 500 µl hideg foszfát pufferrel (pH 7) állítottam le. A minták abszorbanációját 405 nm-en spektrofotometriásan mértem meg. (Yang *et al.*, 2012 & Oda *et al.*, 2020)

11. táblázat: Kutináz enzimaktivitás mérés során alkalmazott reakcióelegy

	Desztillált víz	Szubsztrátum	Enzim (µl)	Puffer
Műszervak	100	-	-	400
Szubsztrátvak	50	50	-	400
Enzimvak	50	-	50	400
Minta	-	50	50	400

Az alábbi egyenlet alapján számítható ki az aktivitás értékek mintánként, mind a kutináz, mind a proteáz esetében:

$$Aktivitás (ml) = \frac{(A_{minta} - A_{enzimvak} - A_{szubsztrátumvak}) * V_{reakció} * h}{x * t_{reakció} * V_{minta}}$$

ahol,

$V_{reakció}$: a reakcióelegy térfogata (ml)

x : a felszabadított termék (p-nitrofenol) kalibrációs egyenesének meredeksége

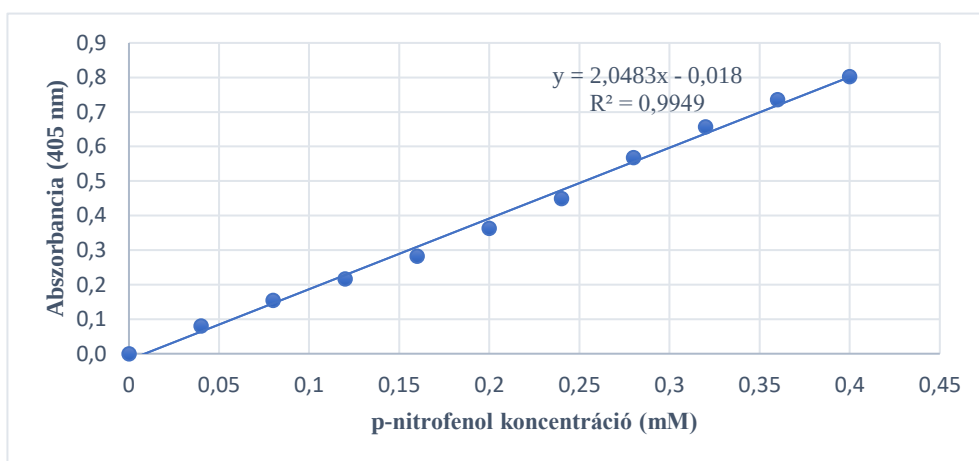
$t_{reakció}$: a reakció időtartama (perc)

V_{minta} : a minta (enzimoldat) térfogata (ml)

h : a minta hígítási faktora

Kalibráció

A 0,4 mM-os p-nitrofenol törzsoldatból hígítási sorozatot készítettem (a táblázat alapján). A törzsoldat és a desztillált víz mennyiségeit microplate lemez mélyedéseibe pipettáztam. Az adott, ismert koncentrációjú oldatok abszorbanciáját 405 nm-en, spektrofotometriásan mértem le. Grafikusan, diagramban ábrázoltam az abszorbancia értékeket a koncentrációk függvényében, a pontokra regressziós egyenest illesztettem. A kapott függvény meredekségének ismeretében az enzimaktivitások már számítható váltak.



4. ábra: Kalibrációs egyenes

4.2.6. Tömegváltozás követése mérleggel

Minden kísérlet végeztével szűrőpapír segítségével elválasztottam a vizsgálandó anyagot a közegtől, majd szárítás után megmértem a PLA darabok tömegét. A kiindulási tömegükhöz viszonyítva kiszámítottam, hogy történt-e tömegváltozás.

5. Kísérleti eredmények és értékelésük

5.1. Törzsszelekció

A PLA biológiai bontásának vizsgálatának megkezdése előtt törzsszelekciót végeztem, annak érdekében, hogy a célnak legalkalmasabb baktériumokat alkalmazhassam. A vizsgálatok közé tartozott a baktériumok tejsavhasznosítása, illetve a proteolitikus és észteráz típusú enzimkészlet kimutatása.

5.1.1. Tejsavhasznosítás



Thermobifida cellulosilytica B1997

Thermobifida fusca B2355

Sphingobacterium sp. B2638

5. ábra: A tejsavhasznosítás vizsgálat eredményei

Az eljárás során az agardiffúzióval képzett lyukakba adagoltam az inokulum tenyészetből a mikroorganizmusokat. A 0,1 % tejsav tartalmú szilárd tápközegen megjelenő telepképződés arra utal, hogy az adott baktérium képes a környezetben megtalálható tejsavat hasznosítani. Ilyen baktériumok többek között a *Thermobifida fusca* B 2355, *Thermobifida cellulosilytica* B1997, *Sphingobacterium* sp. B2638, és *Bacillus coagulans* B1139, *Bacillus coagulans* 200B/9. Az 5. ábra alapján jól látható az alkalmazott tápközegen az adott baktérium törzsek telepképződése. A legnagyobb mértékű sejtszaporodást a *Thermobifida cellulosilytica* B1997 mutatta.

5.1.2. Proteolitikus enzimkészlet kimutatása



Thermobifida cellulosilytica B1997

Thermobifida fusca B2355

Sphingobacterium sp. B2638

6. ábra: A proteolitikus enzimkészlet kimutatásának eredményei

Ennél a szelekciós módszernél a mikroorganizmusok proteolitikus enzimkészletének a jelenlétét figyeltem meg. Az agarlemezeket brómkrezol zöld indikátorral (0,56% borostyánkősav, 0,1% NaOH, 0,028% brómkrezolzöld) árasztottam el, majd 20-30 perc elteltével leöntöttem róla. A feltisztulási zóna a proteáz enzim jelenlétét jelzi, míg ennek a mérete az aktivitás mértékét jelöli, míg az alkalmazott brómkrezol zöld indikátor színváltozása a proteáz kémhatására utal. A legnagyobb feltisztulási zóna a *Thermobifida cellulosilytica* B1997 esetében látható, illetve a telep zöldes színe pH 4,0 körüli kémhatást jelez. A *Thermobifida fusca* B2355 erős sötétkék színt mutat, ami pH 5,0-ös, míg a *Sphingobacterium* sp. B2638 által tapasztalt türkizkék színváltozás pH 6,0-os kémhatásra utal. Emellett jelentős eredményeket mutatott még a *Sphingobacterium* sp. B2636, *Sphingobacterium* sp. B2638, *Bacillus coagulans* B1139, *Bacillus coagulans* 200B/9.

5.1.3. Észteráz típusú enzimkészlet kimutatása



Thermobifida cellulosilytica B1997

Thermobifida fusca B2355

Sphingobacterium sp. B2638

7. ábra: Az észteráz típusú enzimkészlet eredményei

Észteráz típusú enzimkészlet kimutatására módosított Tween 80 agarat alkalmaztam, mely polioxietilén-szorbitán zsírsavésztert tartalmaz, melyet az észteráz és a lipáz enzimtermelő mikroorganizmusok képesek, mint szubsztrátumot hasznosítani. Ennek eredményeképpen észlelhető az agarokon kisebb, illetve nagyobb telepképződés. Ezek alapján feltételezhető, az adott mikroorganizmusok rendelkeznek észteráz típusú enzimkészlettel. Ilyen az összes általam vizsgált törzs.

A törzsszelekcióval az általam legalkalmasabbnak ítélt törzsek a *Thermobifida cellulosilytica* B1997, *Thermobifida fusca* B2355, *Sphingobacterium* sp. B2638, *Sphingobacterium* sp. B2636, *Bacillus coagulans* B1139, *Bacillus coagulans* 200B/9. Így a továbbiakban ezekkel a baktériumtörzsek által kialakított konzorciumokkal folytattam a kutatásomat a biológiai bontás tekintetében.

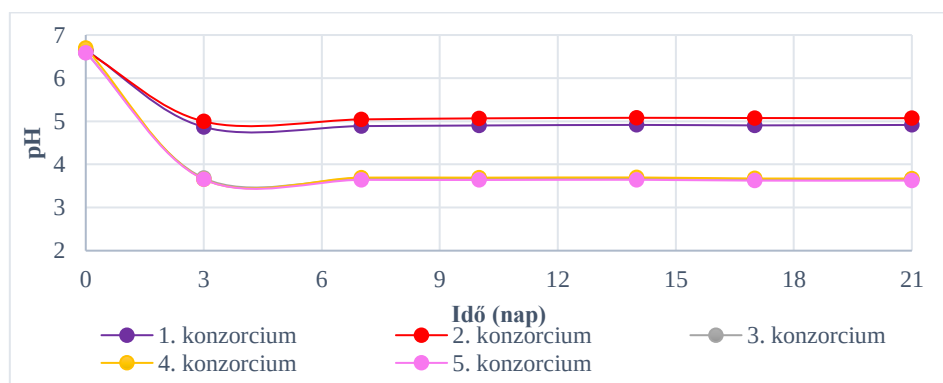
5.2. Szubmerz degradálás

5.2.1. PLA-sörtörköly biokompozit biológiai bontása szubmerz körülmények között glükóz kiegészítéssel

A kísérlet során 5%-kal megnövelt glükóz, illetve csökkentett triptikáz pepton és fiton pepton tartalommal módosított TPY tápközegekben vizsgáltam a PLA alapú bioműanyagok degradációját. A mintákat 45°C-on, 140 RPM rázatási sebesség mellett inkubáltam 21 napig. A törzsszelekció által nyert eredmények alapján az alábbi konzorciumokat alakítottam ki.

1. Konzorcium: *Sphingobacterium sp.* B2638 és *Sphingobacterium sp.* B2636
2. Konzorcium: *Thermobifida cellulosilytica* B1997 és *Thermobifida fusca* B2355
3. Konzorcium: *Bacillus coagulans* B1139 és *Bacillus coagulans* 200B/9
4. Konzorcium: *Sphingobacterium sp.* B2638, *Thermobifida cellulosilytica* B1997, *Bacillus coagulans* B1139
5. Konzorcium: *Sphingobacterium sp.* B2638, *Thermobifida fusca* B2355, *Bacillus coagulans* 200B/9

5.2.1.1. Kémhatás változás

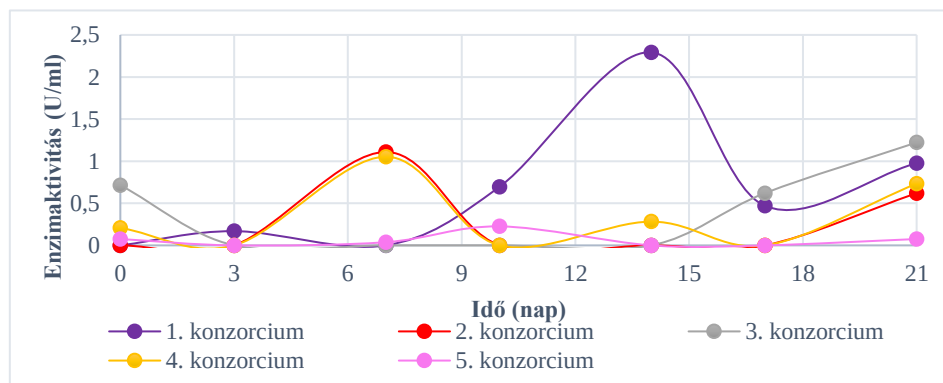


8. ábra: A vizsgált konzorciumok kémhatása glükózzal kiegészített tápközegekben

A 8. ábrán látható, hogy a kezdeti semleges kémhatáshoz közelítő értékek a 3. naptól kezdve már savas pH tartományban mozogtak, amely azzal is magyarázható, hogy a tápközegekben lévő mikroorganizmusok szerves savakat, zsírokat termeltek másodlagos anyagcsere termékként. A 4. és az 5. konzorcium, melyek egyaránt tartalmaztak *Thermobifida*, *Sphingobacterium* és *Bacillus* törzseket is, pH 3-4, míg a többi konzorcium pH 5,0 körüli értékeket vettek fel. A tápközegek kémhatása határozza meg, hogy az enzimaktivitás mérésekhez elvégzéséhez milyen pH-val rendelkező puffert alkalmazzak a kazein szubsztrátumfeloldásához.

5.2.1.2. Proteáz enzimaktivitás

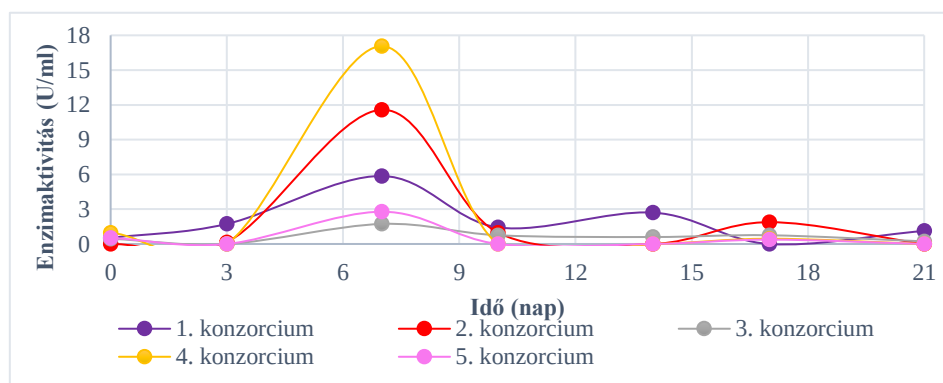
A 8. ábrán látható értékek alapján az enzimaktivitás méréshez a kiindulási napon pH 7, míg az általam vizsgált reakció idő fennmaradó részében pH 4,5-es kémhatású oldattal dolgoztam.



9. ábra: A vizsgált konzorciumok proteáz enzimaktivitása glükózzal kiegészített tápközegben

Az összes általam vizsgált konzorcium a kísérlet bizonyos szakaszain mutatott proteáz enzimaktivitást. Az 9. ábrán látható, hogy a 2. (*Thermobifida* mikroorganizmusokat tartalmazó) konzorcium és a 4. (*Sphingobacterium* sp. B2638, *Thermobifida cellulosilytica* B1997, *Bacillus coagulans* B1139) konzorcium lefutása közel azonos. A legkiemelkedőbb eredményt a *Sphingobacterium* törzseket tartalmazó, 1. konzorcium mutatta, 2,3 U/ml-t a 14. napon. Emellett az is megfigyelhető, hogy az 5. konzorcium proteáz enzimkészlete nem számottevő. Az általam alkalmazott reakció idő utolsó mintavételi napján újabb növekedést tapasztaltam az enzimtermelésben.

5.2.1.3. Kutináz enzimaktivitás



10. ábra: A vizsgált konzorciumok kutináz enzimaktivitása glükózzal kiegészített tápközegben

A kutináz enzimaktivitásnál az összes vizsgált konzorcium a 7. napon érte el a legnagyobb mértékű enzimtermelést. Ezek közül is a legkiemelkedőbb értéket a 4. konzorcium érte el, 17,07 U/ml-t. A 10. naptól kezdve a konzorciumok enzimtermelése lecsökkent és a vizsgált időtartam alatt már nem mutattak növekedést.

5.2.1.4. Tömegváltozás

12. táblázat: A vizsgált PLA alapú biopolimer darabok tömegváltozása a glükózzal kiegészített tápközegben

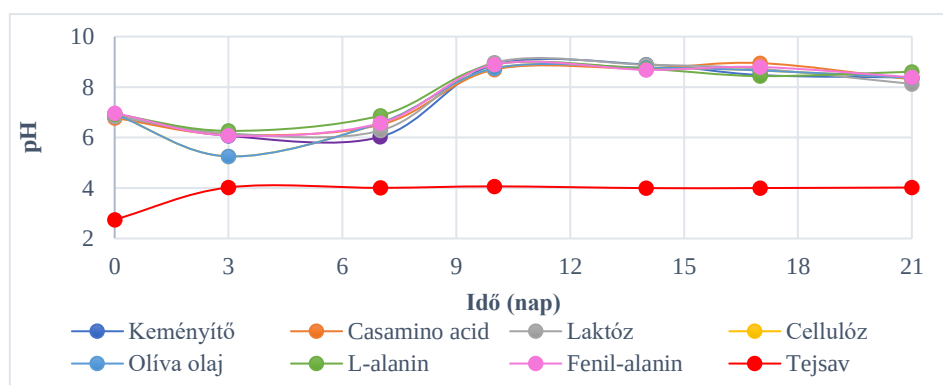
Törzsek	Degradáció (%)
1. konzorcium	1
2. konzorcium	2
3. konzorcium	2
4. konzorcium	2,5
5. konzorcium	2

A kísérlet leállításkor a vizsgálandó PLA-sörtörköly biokompozit darabokat elválasztottam a közegtől és kiszáritottam, majd visszamértem a tömegüket. A leghatékonyabb bontást a 4. konzorcium mutatta, mely 2,5%-os tömegcsökkenést eredményezett. Összevetve az enzimaktivitás eredményekkel, mindkét esetben kiemelkedő értékeket vett fel. A legmagasabb kutináz enzimmennyiséggel ez a konzorcium rendelkezett, míg a proteáz enzimmennyiség tekintetében a 2. legmagasabbat produkálta. Így tehát a 3 vizsgálat alátámasztja az eredményeket.

5.2.2. PLA-sörtörköly biokompozit biológiai bontása szubmerz körülmények között induktorok segítségével

A glükóz kiegészítéssel vizsgált kísérletekben kiemelkedő kutináz és proteáz enzimaktivitás mellett, nagyfokú biológiai bontást is produkált a 2. (*Thermobifida cellulosilytica* B1997 és *Thermobifida fusca* B2355), illetve a 4. (*Sphingobacterium sp.* B2638, *Thermobifida cellulosilytica* B1997, *Bacillus coagulans* B1139) konzorcium, ezért ezekkel folytattam tovább a biológiai bontást. Ebben a kísérletben különböző induktorokat különböző koncentrációban (5 g/l keményítő, 5 g/l casamino acid, 5 g/l laktóz, 0,5% cellulóz, 5% olaj, 0, 5 g/l L-alanin, 0,5 g/l fenil-alanin, 0,1% tejsav) alkalmaztam, azt vizsgálva, hogy milyen hatást fejtenek ki az enzim szintézisre és a biológiai bontásra. A biológiai bontás 45°C és 140 fordulat/perc-es rázatás környezeti paraméterek között zajlott.

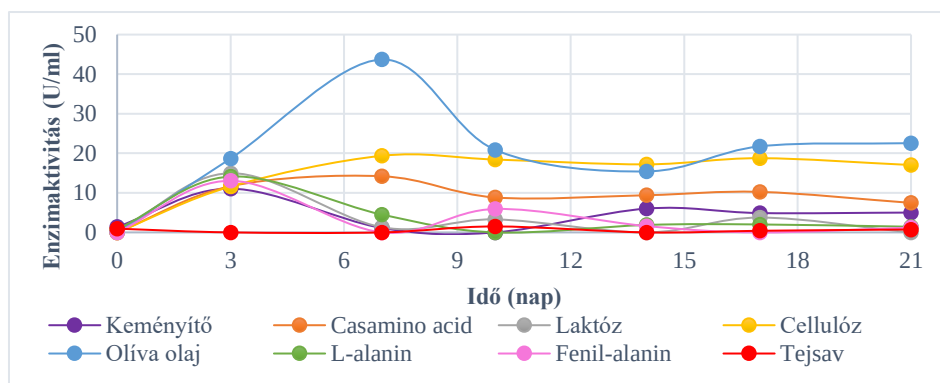
5.2.2.1. Kémhatás változás a 2. konzorcium esetében



11. ábra: A 2. konzorcium kémhatása az alkalmazott induktorokkal kiegészített tápközegben

A kezdeti semleges pH-ról savas majd a 10. naptól kezdve pedig bázikus jelleget mutatnak a minták, a tejsavas induktor jelenlét kivételével, amely az egész időtartam alatt savas kémhatású volt. A lúgos pH utalhat arra, hogy a jelenlévő mikroorganizmusok kezdik hasznosítani az adott tápanyagokat, illetve, hogy a különböző induktorok hatására más metabolitokat termeltek a törzsek, melyek alakították a kémhatást. Ennek tudatában választottam ki a proteáz enzimaktivitás méréshez a puffer pH-ját.

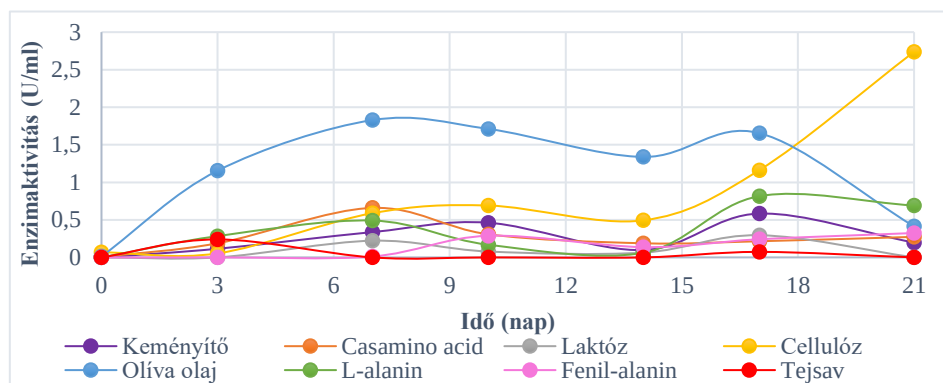
5.2.2.2. Proteáz aktivitás a 2. konzorcium esetén



12. ábra: A 2. konzorcium proteáz enzimaktivitása az alkalmazott induktorokkal kiegészített tápközegben

Az eddig elvégzett kísérletekhez képest az induktorok alkalmazásakor nagyságrendileg nagyobb proteáz enzimaktivitás értékeket vett fel az adott konzorcium. Az olíva olaj jelenlétében a konzorcium által termelt proteáz enzimmennyiség a 7. napig szinte lineáris növekedést mutat, ahol eléri a maximális **43,7 U/ml**-es értéket. Az enzimaktivitás a 10. napos mintavételre már csökkenésnek indul, de a vizsgált időtartam lejártáig végig stabil értékek voltak észlelhetők. Ezenfelül a cellulóz és a casamino acid jelenlétében meghatározott proteáz enzimmennyiség is kiemelkedő és csökkenést nem, vagy csak elhanyagolható mértékben mutatott a kísérleti idő végére, ezek alapján indukálószernek tekinthetők. A cellulóz induktor esetében **19,36 U/ml**-es maximális aktivitás volt detektálható. A tejsav kiegészítésnél tapasztaltak alapján nem tekinthető indukálószernek ezen konzorcium és körülmények esetében. Az eredmények alapján a kazeinhez alkalmazott puffer kémhatása megfelelőnek bizonyult. Mivel a minták többsége még az utolsó mintavételi napon is jó aktivitással rendelkezett, ezért érdemes lehetne hosszabb ideig vizsgálni az induktorok hatását. A szintetizált enzimmennyiség stabilitása a vizsgált kísérleti idő alatt jelzi, hogy az adott kiegészítések megfelelő koncentrációban vannak jelen.

5.2.2.3. Kutináz aktivitás a 2. konzorcium eseté



13. ábra: A 2. konzorcium kutináz enzimaktivitása az alkalmazott induktorokkal kiegészített tápközegben

A kutináz enzimaktivitási értékek a 3. naptól kezdve indultak növekedésnek. A cellulóz induktor esetében a kísérlet első részében stabil kutináz mennyiség szintetizálódott akárcsak a többi induktor jelenlétében, azonban míg a minták nagy része a vizsgált időtartam végére csökkenő tendenciát mutattak, a cellulózzal kiegészített tápközegben meredek növekedésnek indult a kutináz termelődés. Az utolsó mintavételi napra a vizsgálat elejéhez képest háromszor több, azaz **2,7 U/ml** mennyiséget határoztam meg. Emellett magas és egyben stabil enzimaktivitás az olíva olaj jelenlétében volt tapasztalható, mely az utolsó előtti vizsgált napig szinte végig ugyanabban a tartományban maradt, majd a 21. napra rohamosan lecsökkent. A legnagyobb enzimmennyiséget a 7. napon mértem, ami **1,8 U/ml** volt. A tejsav valószínűleg az adott vizsgált paraméterek során, úgy, mint a proteáz enzim esetében nem tekinthető indukálószernek, hiszen kutináz termelés nem, vagy csak elhanyagolható mértékben volt észlelhető. Összeségében ezek az értékek a glükóz kiegészítésnél vizsgáltakhoz képest alacsonyabbnak mutatkoztak, azonban maximum 3 napig volt észlelhető, míg ez esetben az olíva olaj és a cellulóz jelenlétében sokkal hosszabb ideig volt tapasztalható stabil enzimmennyiség.

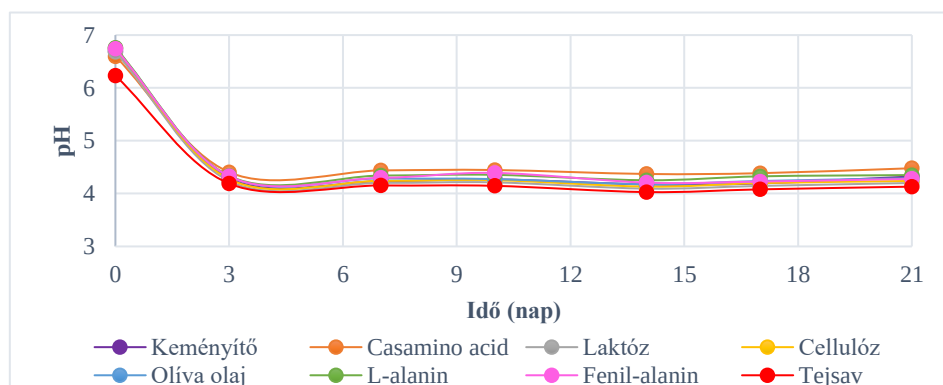
5.2.2.4. Tömegváltozás a 2. konzorcium esetén

13. táblázat: A vizsgált PLA-sörtörköly biokompozit tömegváltozása induktorok jelenlétében

Minták (induktorok)	Tömegcsökkenés (%)
Keményítő	3
Casamino acid	8
Laktóz	5
Cellulóz	20,5
Olíva olaj	27,5
L-alanin	6,5
Fenil-alanin	4
Tejsav	0

Az enzimaktivitás és a tömegcsökkenés értékeket összevetve egyértelmű eredményt kapunk. Mindhárom vizsgálat esetében az olíva olaj és a cellulóz induktor jelenlétében volt detektálható a legkiemelkedőbb enzim aktivitás értékek. Ezek **27,5 %** és **20,5%** PLA tömegcsökkenést. A tejsav kivételével az összes induktor pozitívan befolyásolta a biológiai bontást, így elmondható, hogy ez a kiegészítés a kialakított konzorcium és paraméterek között nem indukálta a folyamatot.

5.2.2.5. Kémhatás változás a 4. konzorcium esetén

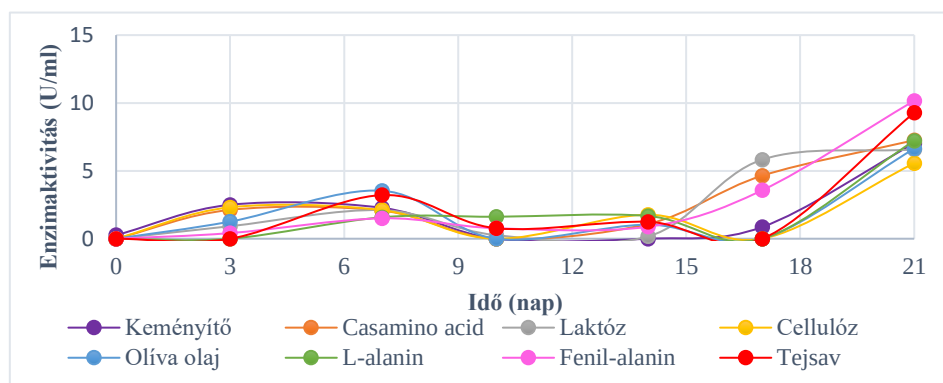


14. ábra: A 4. konzorcium kémhatása alkalmazott induktorokkal kiegészített tápközegben

A kémhatás változás nyomon követésekor megfigyelhető, hogy amíg a 2. konzorcium esetében szinte végig bázikus jelleget mutattak a mintát, a 4. konzorciumot vizsgálva a 3. naptól kezdve erősen savas tartomány volt jellemző. Ezt befolyásolhatta az is, hogy a 2. konzorciumnál kizárólag *Thermobifida* mikroorganizmusok voltak jelen, míg a 4. konzorcium *Thermobifida*, *Sphingobacterium* és *Bacillus* törzseket is tartalmazott. Az egyes mikroorganizmusok

önmagukban mutathatnak más kémhatást, így az egyik, amely dominánsabb hatással lehet a pH értékre, így eltolódhat más tartományba. Emellett a vizsgált törzsek termelhetnek olyan másodlagos metabolitokat, melyek savas jelleget teremtenek.

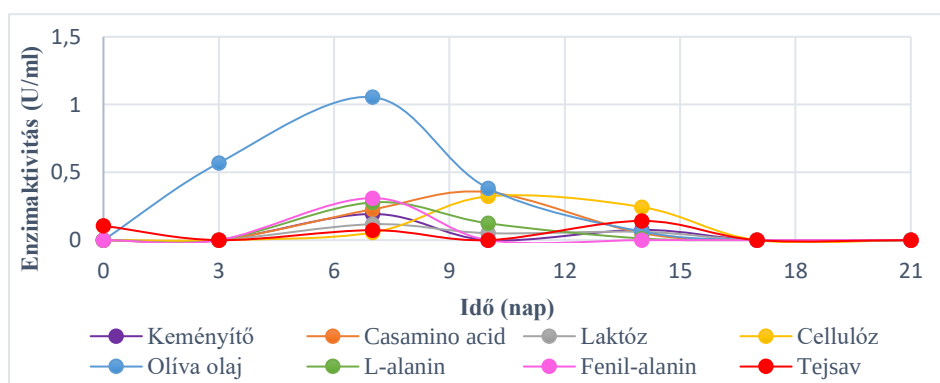
5.2.2.6. Proteáz aktivitás a 4. konzorcium esetén



15. ábra: A 4. konzorcium proteáz enzimaktivitása

Az aktivitás értékek az összes minta esetében nagyon hasonlóan alakultak. Kezdetben alacsony proteáz enzimmennyiséget mutattak, ezekben a napokban valószínűleg a környezethez és az induktorokhoz alkalmazkodtak a mikroorganizmusok. A 3. és 7. nap között kisebb növekedés észlelhető. A legmagasabb szintetizált enzimmennyiség, **10,17 U/ml** a fenil-alanin jelenlétében mutatkozott az utolsó vizsgálati napon. A nagy különbség a két vizsgált konzorcium között, hogy a 4. konzorcium tagjai már képesek voltak tejsavat hasznosítani proteáz enzimszintézisre. A 17. naptól a 21. napig lineáris növekedés volt megfigyelhető a proteáz enzimtermelést illetően. Emiatt érdemes lenne tovább vizsgálni a mintákat a későbbi enzimaktivitás növekedés reményében.

5.2.2.7. Kutináz aktivitás a 4. konzorcium esetén



16. ábra: A 4. konzorcium kutináz enzimaktivitása

A kutináz enzimaktivitás mérésnél az előző kísérlethez hasonlóan ennél a vizsgálatnál is az olíva olaj induktort tartalmazó minta emelkedik ki a többi közül, azonban a 2. konzorcium

estében magasabb értékek voltak detektálhatóak. A 3. és a 17. nap között volt észlelhető a kutináz enzim jelenléte, míg a 17. naptól kezdve már egyik kiegészítést tartalmazó mintából sem tudtam kutináz aktivitást meghatározni. Valószínűsíthető, hogy addigra már felhasználódott az összes tápanyag, így a továbbiakban már nem tudták indukálni az enzimtermelést.

5.2.2.8. Tömegváltozás a 4. konzorcium esetén

14. táblázat A vizsgált PLA-sörtörköly biokompozit tömegváltozása az alkalmazott induktorok jelenlétében

Minták (induktorok)	Tömegcsökkenés (%)
Keményítő	1,5
Casamino acid	2
Laktóz	1
Cellulóz	4
Olíva olaj	2,5
L-alanin	5,5
Fenil-alanin	1
Tejsav	1
Zselatin	0,5

Az adott körülmények között 5,5%-os tömegcsökkenés volt a legmagasabb, melyet az L-alanin által kiegészített minta mutatott. A 2. konzorciumnál tapasztalt eredmények hatékonyabb biodegradációt értek el, azonban mindkét esetben az olíva olaj és a cellulóz indukálta a legjobb mértékben a bontást.

Az eddig megfigyelt mérések alapján a *Thermobifida cellulosilytica* B1997 és *Thermobifida fusca* B2355 mikroorganizmusokat tartalmazó 2. konzorciummal, illetve az olíva olaj és a cellulóz induktorokkal folytatom a kutatásomat.

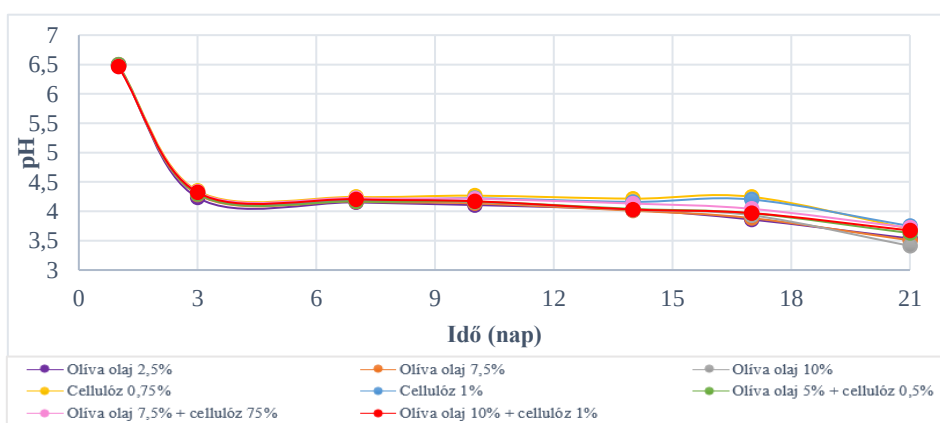
5.2.3. PLA-sörtörköly biokompozit biológiai bontása szubmerz körülmények között eltérő koncentrációjú olíva olaj és cellulóz tartalom jelenlétében

Az eddigi tapasztaltok alapján folytattam a politejsav alapú bioműanyagok biodegradációját. Az előző kísérletekben 5 és 0,5%-ban voltak jelen ezek az olíva olaj és cellulóz induktorok önállóan, így ezeket különböző koncentrációban (15. táblázat szemlélteti), külön és együttesen is alkalmaztam figyelve a hatásukat a biológiai bontás modellezésében. Ebben a kísérletben a 2. konzorciummal (*Thermobifida cellulosilytica* B1997 és *Thermobifida fusca* B2355) dolgoztam. A kísérletet 45°C és 140 RPM paraméter mellett végeztem.

15. táblázat: Tápközegek induktoros kiegészítése

	Olíva olaj kiegészítés	Cellulóz kiegészítés	Olíva olaj + cellulóz kiegészítés
1. Tápközeg	2,5%	-	-
2. Tápközeg	7,5%	-	-
3. Tápközeg	10%	-	-
4. Tápközeg	-	0,75%	-
5. Tápközeg	-	1%	-
6. Tápközeg	-	-	5% + 0,5%
7. Tápközeg	-	-	7,5% + 0,75%
8. Tápközeg	-	-	10% + 1%

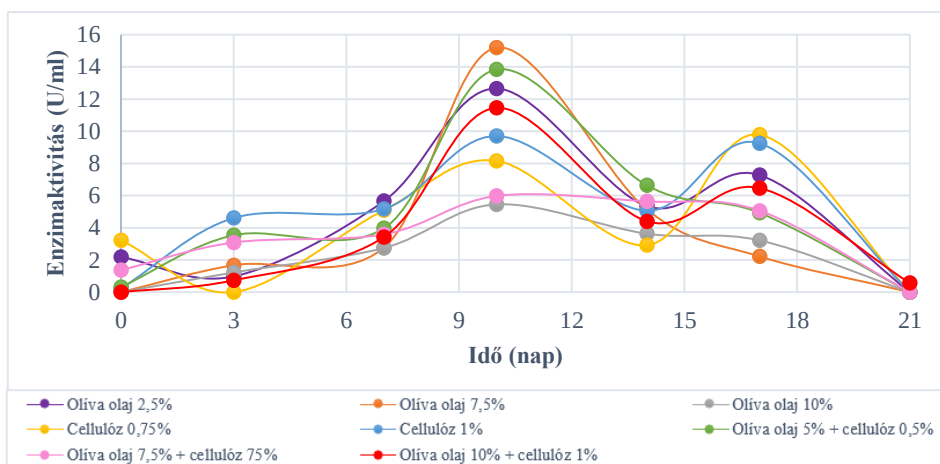
5.2.3.1. Kémhatás változás



17. ábra: A vizsgált konzorcium kémhatása olíva olajjal és cellulózzal kiegészített tápközegekben

A kezdeti semleges pH érték a 3. naptól kezdve már savas jelleget mutatott. A vizsgált időtartam alatt egy lassú csökkenés is megfigyelhető. Ez a savas kémhatás a konzorcium által termelt különböző metabolitok által is kialakulhat.

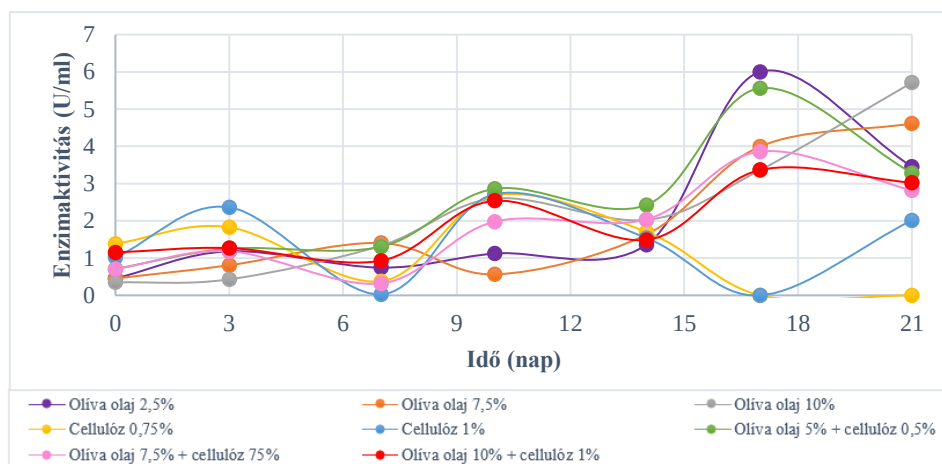
5.2.3.2. Proteáz enzimaktivitás



18. ábra: Proteáz enzimaktivitási diagram olíva olajjal és cellulózzal kiegészített tápközegben

A legnagyobb proteáz enzimaktivitást az a minta mutatta, mely 7,5% olíva olajat tartalmazott. Ez a 15,18 U/ml-es érték, ezen körülmények között a legkiemelkedőbb, azonban az előző kísérletekhez viszonyítva az 5%-os olíva olaj által indukált aktivitás ennek majdnem a háromszorosa. Az olíva olaj induktort tartalmazó minták közül a 10%-ot tartalmazónál volt észlelhető a legalacsonyabb enzimtermelés, mely arra is utalhat, hogy a megnövelt koncentrációjú szubsztrátumot már nehezebben bontja, így e fölé már nem érdemes menni. A cellulóz esetében a két különböző koncentrációt tartalmazó tápközeg közel azonos lefutású volt. A vegyes induktorok esetében, a legkisebb koncentráció jelenlétében állapítottam meg kiemelkedő enzimtermelést. A proteáz enzimmennyiséget vizsgálva az tapasztalható, hogy az olíva olajnak, mint induktor előnyösebb és nagyobb hatása van, mint a cellulóznak, az adott konzorcium és beállítások alkalmazása mellett.

5.2.3.3. Kutináz enzimaktivitás



19. ábra: Kutináz enzimaktivitási diagram olíva olajjal és cellulózzal kiegészített tápközegekben

A legnagyobb kutináz enzimaktivitás értéket, 6 U/ml-t a 2,5%-os koncentrációban jelen lévő olíva olaj indukálta. Ez az érték nagyobb, mint az előző kísérletben elért 1,8 U/ml, amit az 5% olíva olaj jelenlétében mértem. A minták többsége az általam vizsgált reakcióidő teljes szakaszán mutatott enzimaktivitást. A 2 eltérő koncentrációban alkalmazott cellulózt tartalmazó mintát leszámítva hasonló lefutást mutattak a tápközegek. Az általam vizsgált kísérleti idő végére a kiinduláshoz képest kisebb növekedés lépett fel az enzimtermelés tekintetében, míg a 0,75% és 1% cellulózt tartalmazó mintáknál csökkenés mutatkozott. Mind a proteáz, mind a kutináz enzimaktivitás mérésnél az 5% olajat és 0,5% cellulózt tartalmazó minta a kísérlet egész ideje alatt az egyik legnagyobb enzimmennyiség termelést mutatta.

5.2.3.4. Tömegváltozás

16. táblázat: A vizsgált PLA-sörtörköly biokompozitok tömegváltozás olíva olaj és cellulóz jelenlétében

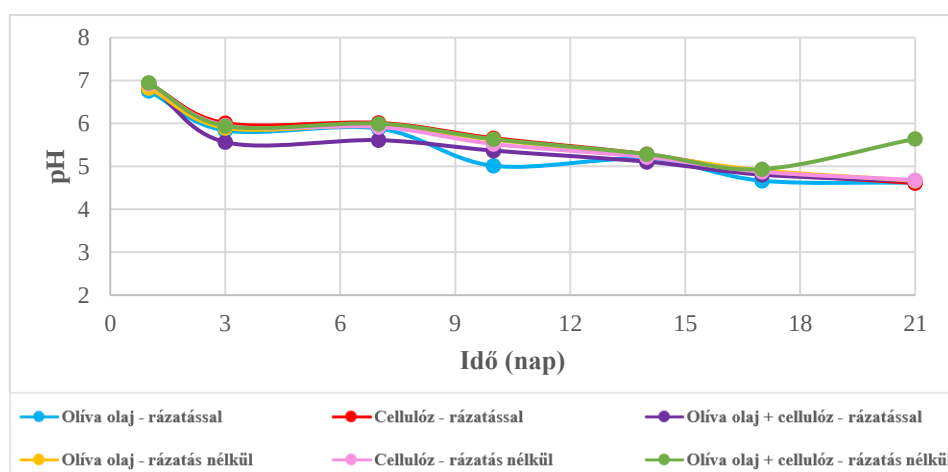
Minták (induktorok)	Tömegcsökkenés (%)
Olíva olaj: 2,5%	3
Olíva olaj: 7,5%	9,5
Olíva olaj: 10%	7,5
Cellulóz: 0,75%	7,5
Cellulóz: 1%	6,5
Olíva olaj: 5% + cellulóz: 0,5%	11
Olíva olaj: 7,5% + cellulóz: 0,75%	7
Olíva olaj: 10% + cellulóz: 1%	8

A legkiemelkedőbb tömegcsökkenést az 5% olajat és 0,5 % cellulózt tartalmazó rendszer mutatta. A kizárólag olíva olajat tartalmazó minták közül a 7,5%-os koncentrációjú serkentette a legjobban a degradációt, mely 9,5%-os tömegcsökkenést eredményezett. 7,5%-os bontás volt megfigyelhető a 0,75%-os cellulóz koncentráció jelenlétében. Az előző kísérletekkel összevetve, nagyságrendileg kisebb tömegváltozást figyeltem meg, hiszen az 5%-os olíva olaj kiegészítéssel 27,5%-os PLA tömegcsökkenést értem el. Így az mondható el az eddigi tapasztalatok alapján, hogy mind az olíva olaj, mind a cellulóz esetében az 5%, illetve 0,5%-os koncentráció bizonyult a leghatékonyabb induktor koncentráció beállításnak az adott körülmények között. Ezért a továbbiakban szintén a 2. konzorciummal, illetve ezen induktorokkal, ezen koncentrációkban végeztem a kutatást a fizikai paraméterek változtatásával.

5.2.4. PLA-sörtörköly biokompozit biológiai bontása szubmerz körülmények között fizikai paraméterek változtatásával

Az összes eddigi kísérlet tapasztalatai és eredményei alapján indítottnam el egy újabb vizsgálatot. A vizsgált konzorciumok közül a 2. konzorcium - mely *Thermobifida cellulosilytica* B1997 és *Thermobifida fusca* B2355 mikroorganizmusokat tartalmazta - bizonyult a leghatékonyabbnak, így ezzel folytattam a bioműanyagok biológiai bontásának nyomon követését. Az induktorok esetében, ahogy az előző kísérletben, most is olíva olaj és cellulóz által indukált tápközegeket használtam 5, és 0,5%-os koncentrációban külön-külön, illetve együttesen is. A fizikai paraméterek hatását vizsgálva 45°C helyett 60°C-on, 140 RPM-en és rázatás nélkül is megvizsgáltam a mintákat. A reakcióidő ezúttal is 21 napos volt.

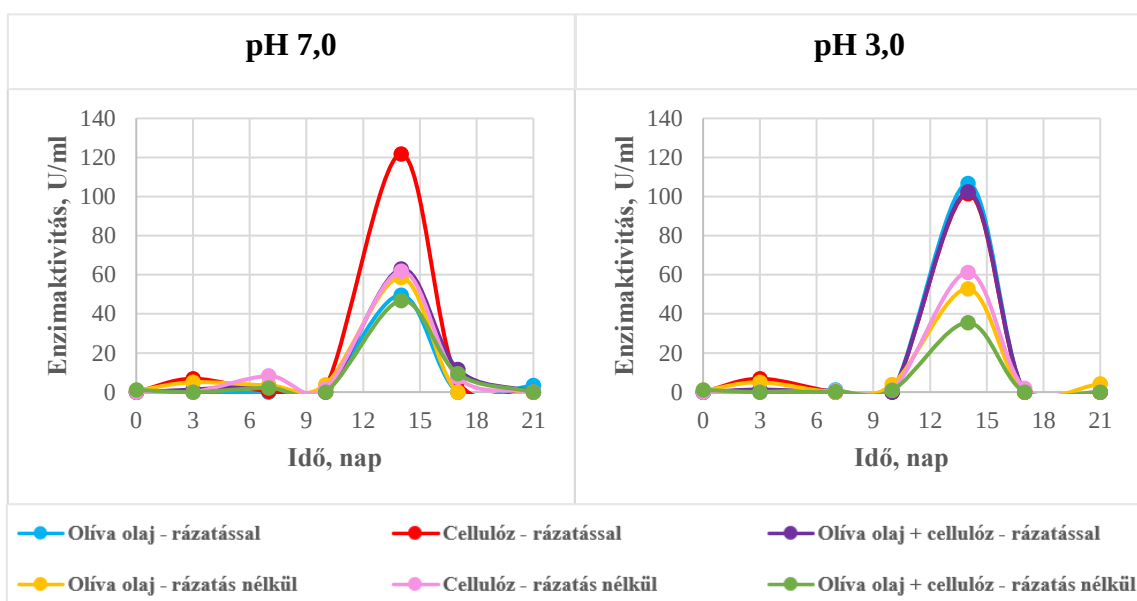
5.2.4.1. Kémhatás változás



20. ábra: A vizsgált minták kémhatás változása az alkalmazott tápközegben

A pH értékek nagyon hasonlóan alakultak a lefutás tekintetében az előző kísérlethez képest, annyi különbséggel, hogy pH 3 körüli tartomány helyett pH 4-6 között mozgott. Mivel a kazein oldhatósága gyengén savas közegben nem olyan hatékony, így a mintákat pH 7,0 és pH 3,0 kémhatású puffer alkalmazásával is megfigyeltem.

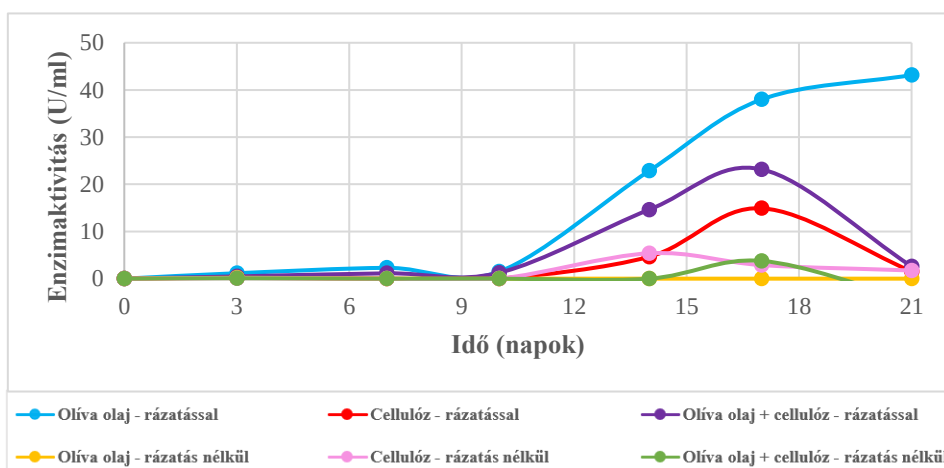
5.2.4.2. Proteáz enzimaktivitás



21. ábra: Proteáz enzimaktivitások küéőnböző kémhatáson vizsgálva

A minták enzimaktivitásának a lefutása teljesen megegyezik mindkét kémhatáson vizsgálva. Elhanyagolható aktivitás mutatkozott a kísérlet első felében, míg a 13. és 17. nap között igen magas, kiugró eredményeket adtak. A legkiemelkedőbb értéket, **121,8 U/ml**-t a cellulóz tartalmú minta érte el rázás mellett. A másik legintenzívebb enzintermelést, **106,77 U/ml**-t, ebben az esetben is az olíva olaj indukálta rázás mellett, azzal a különbséggel, hogy pH 3,0-as puffer jelenlétében érte el. Ezek mellett az olíva olaj és cellulóz együttes indukálása, rázás mellett, hasonlóan jó **102,44 U/ml**-es aktivitást mutatott. A kísérleti idő utolsó napjaira szinte teljesen lecsökkent a szintetizált enzimmennyiség az összes vizsgált minta esetében.

5.2.4.3. Kutináz enzimaktivitás



22. ábra: Kutináz enzimaktivitások

A vizsgálat első 10 napjában elhanyagolható aktivitás figyelhető meg, ami a környezethez való alkalmazkodás miatt lehetett. A 13. naptól kezdve azonban, egy hirtelen növekedés figyelhető meg a legtöbb mintánál. A legkiemelkedőbb érték az olíva olaj jelenlétében, rázás mellett volt észlelhető, **43,15 U/ml**. Ez a maximális érték, mely az egész kutatás alatt mért legmagasabb kutináz aktivitás, az általam vizsgált időtartam utolsó napján volt mérhető. E minta esetében a 10. naptól kezdve egy folyamatos növekedés figyelhető meg, míg a maradék mintáknál a szintetizált enzimmennyiség a 21. napra szinte teljesen lecsökkent. Akárcsak a proteáz enzimaktivitásnál, ez esetben is másik két jelentősebb enzimmennyiség a cellulóz kiegészítés által, rázás mellett, illetve az olíva olaj és cellulóz együttes jelenlétekor, rázás mellett jelentkezett.

5.2.4.4. Tömegváltozás

17. táblázat: A vizsgált PLA-sörtörköly biokompozit darabok tömegváltozása fizikai paraméter változások mellett

Minta	Tömegcsökkenés %
Olíva olaj -rázatással	14,5
Cellulóz- rázatással	10
Olíva olaj + cellulóz- rázatással	15
Olíva olaj – rázatás nélkül	10
Cellulóz – rázatás nélkül	9,5
Olíva olaj + cellulóz – rázatás nélkül	14

Az adott körülmények között az olíva olaj egyedüli és a cellulózzal együttes jelenlétében, rázatás mellett volt a legnagyobb hatékonyságú **15%** és **14,5%-os** bontás észlelhető. Az enzimaktivitásokkal együtt figyelve az eredmények alátámasztják egymást. Habár ezen kísérletben az enzimaktivitás értékek számottevően magasabbak voltak, azonban sokkal rövidebb ideig volt észlelhető, mely erős befolyással lehet a bontás hatékonyságára. Az enzimaktivitásokat és a tömegcsökkenést is figyelve a rázatás fontos tényezőnek bizonyult, minden esetben jobb eredményeket mutattak a vizsgált minták, mint álló tenyészetben.

6. A kutatómunka összefoglalása

A kutatómunkám során termofil és termotoleráns mikroorganizmusok felhasználásával PLA-sörtörköly biokompozit darabok biológiai bontásának modellezését figyeltem meg szubmerz körülmények között, 21 napos intervallumokban. Törzsszelekcióval mikrobiális konzorciumokat alakítottam ki, melyek depolimeráz enzim termelését, és ezeknek a termékeknek a szerepét követtem nyomon a biodegradáció hatékonyságában. Emellett megvizsgáltam a bontást induktorok jelenlétében, és a környezeti tényezők változtatásai mellett. Összességében a leghatékonyabb, 27,5%-os bontást, a *Thermobifida cellulosilytica* B1997 és *Thermobifida fusca* B2355 törzseket tartalmazó konzorcium mutatta, 5%-os olíva olaj kiegészítéssel, 45°C-on, 140 RPM-es rázatás mellett. Az ekkor tapasztalt legmagasabb proteáz enzimaktivitási érték 43,7 U/ml, míg a kutináz esetében 1,83 U/ml volt. Azonban a kutatását egészét nézve detektálható volt ennél kiugróbb értékek is, azonban abban az esetben a biodegradáció mértéke nem mutatott akkora hatékonyságot. Ezt több tényező is befolyásolhatja, mint például, hogy ezek az enzimaktivitási értékek csak igen csekély ideig, mindössze 1-3 napig voltak kimutathatóak, míg a hatékonyabb biodegradációt mutató kísérlet esetén ugyan, alacsonyabb enzim szintézis volt tapasztalható, de az szinte végig a 21 napos vizsgálat alatt észlelhető volt. Ebből feltételezhető az, hogy a bontás tekintetében jelentősebb szereppel bír az enzimek hatásának ideje is. Emellett nem elhanyagolható befolyásoló tényező a hőmérséklet és a kémhatás sem. Míg 45°C-os inkubálás alatt nagyobb fokú tömegesökkenés volt tapasztalható, az enzimtermelés tekintetében a 60°C ideálisabbnak bizonyult. A pH értékek szempontjából nem állapítható meg egy bizonyos tartomány, mely egyértelműen növeli a bontás hatékonyságát azonban hatással lehet rá és az enzimtermelésre is. Az olíva olaj és cellulóz együttes alkalmazásakor azt tapasztaltam, hogy a savasabb kémhatás jobban elősegíti az enzimtermelést, míg ezek egyedüli jelenlétekor ez nem állapítható meg. A bontás hatékonyságát illetően a savas és bázikus jelleg hullámozó váltakozása az általam vizsgált körülmények között jobb eredményt mutatott, ellenben azokkal az esetekkel mikor a kémhatás, vagy csak savas vagy lúgos pH értékeket mutatott.

Így ezekből a tapasztalatokból valószínűsíthető, hogy ezek a paraméterek befolyással bírnak a bontás hatékonyságában, azonban ezek konkretizálásának és optimalizálása érdekében további kísérletekre van szükség. A jövőben az eddig elért eredmények alapján lehetne folytatni a kutatást, akár hosszabb kísérleti idő alkalmazásával is.

7. Irodalomjegyzék

Avérous, L. (2008). Polylactic Acid: Synthesis, Properties and Applications. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. 433–450. DOI:10.1016/B978-0-08-045316-3.00021-1

Bahl, S., Dolma, J., Singh, J. J., Sehgal, S. (2020): Biodegradation of plastics: A state of the art review. *Materials Today: Proceedings*: DOI: 10.1016/j.matpr.2020.06.096

Bubpachat, T., Sombatsompop, N., Prapagdee, B. (2018): Isolation and role of polylactic acid-degrading bacteria on degrading enzymes productions and PLA biodegradability at mesophilic conditions. *Polymer Degradation and Stability*. 152: 75-85. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2018.03.023

Cañigüeral, N., Vilaseca, F., Méndez, J.A., López, J.P., Barberà, L., Puig, J., Pèlach, M. A., Mutjé, P. (2009): Behavior of biocomposite materials from flax strands and starch-based biopolymer. *Chemical Engineering Science*. 64(11): 2651 – 2658. DOI: 10.1016/j.ces.2009.02.006

Cheng, Y., Deng, S., Chen, P., Ruan, R. (2009): Polylactic acid (PLA) synthesis and modifications: a review. *Frontiers of Chemistry in China*. 4(3): 259–264. DOI:10.1007/s11458-009-0092-x

DeStefano, V., Khan, S., Tabada, A. (2020): Applications of PLA in modern medicine. *Engineered Regeneration*. 1: 76-87. DOI: 10.1016/j.engreg.2020.08.002

Dr. Barahona, F., Dr. Slim, J. (2015): Sphingobacterium multivorum: a case report and literature review. *New Microbes and New Infections*. 7: 33–36. DOI: 10.1016/j.nmni.2015.04.006

El-Meihy, R. M. (2016): Biodegradation of Polylactic Acid by Proteolytic and Lipolytic Bacteria. *Middle East Journal of Applied Sciences*. 6(4): 900-910.

Flores-Castañón, N., Sarkar, S., Banerjee, A. (2022): Structural, functional, and molecular docking analyses of microbial cutinase enzymes against polyurethane monomers. *Journal of Hazardous Materials Letters*. 3. DOI: 10.1016/j.hazl.2022.100063

Gomez del Pulgar, E. M., Saadeddin, A. (2013): The cellulolytic system of Thermobifida fusca. *Critical Reviews in Microbiology*. 40(3): 236–247. DOI:10.3109/1040841x.2013.776512

Ire, F. S., Okolo, B. N., Moneke, A. N., Odibo, F. J. C. (2011): Influence of cultivation conditions on the production of a protease from *Aspergillus carbonarius* using submerged fermentation. *African Journal of Food Science*. 5(6): 353-365.

Kalita, N. K., Nagar, M. K., Mudenura, C., Kalamdhad, A., Katiyara, V. (2019): Biodegradation of modified Poly(lactic acid) based biocomposite films under thermophilic composting conditions. *Polymer Testing*. 76: 522-536. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2019.02.021

Kumar, D., Kumar, L., Nagar, S., Raina, C., Parshad, R., Gupta, V. K. (2012): Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. *Archives of Applied Science Research*. 4 (4):1763-1770.

Lima, E. M. B., Pereira, J. F., Dr. de Freitas, S. C., Dr. Penteado, M. S., Lima, A. M., Minguita, A. P. da S., Mattos, M. da C., Teixeira, A. da S., Pereira, I. C. S, Rojas dos Santos, N. R. (2021): Biocomposites of PLA and Mango Seed Waste: Potential Material for Food Packaging and a Technological Alternative to Reduce Environmental Impact. *Starch*. 73(5-6) DOI: 10.1002/star.202000118

Msarah, M. J., Ibrahim, I., Hamid, A. A., Aqma, W. S. (2020): Optimisation and production of alpha amylase from thermophilic *Bacillus* spp. and its application in food waste biodegradation. *Heliyon*. 6(6), DOI: 10.1016/j.heliyon. 2020.e04183

Nair, N.R., Sekhar, V.C., Nampoothiri, K.M., Pandey, A. (2017): Biodegradation of Biopolymers. DOI: 10.1016/B978-0-444-63662-1.00032-4

Nandakumar, A., Chuah, J-A., Sudesh, K. (2021): Bioplastics: A boon or bane? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 147. DOI: 10.1016/j.rser.2021.111237

Nofar, M., Sacligil, D., Carreau, P.J., Kamal, M.R., Heuzey, M-C. (2018): Poly (lactic acid) blends: Processing, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 125: 307-360. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.002

Oda, M., Numoto, N., Bekker, G.-J., Kamiya, N., Kawaia, F. (2021): Cutinases from thermophilic bacteria (actinomycetes): From identification to functional and structural characterization. *Enzymatic Plastic Degradation*. 159–185. DOI: 10.1016/bs.mie.2020.12.031

- Polman, E. M. N, Gruter, G-J. M., Parsons, J. R., Tietema, A. (2020): Comparison of the aerobic biodegradation of biopolymers and the corresponding bioplastics: A review. *Science of the Total Environment*. 753. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.141953
- Prema, S., Palempalli, U. M. D. (2015): Degradation of Polylactide Plastic by PLA Depolymerase isolated From Thermophilic Bacillus. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 4(12): 645-654.
- Radha, S., Sridevi, A., Nithya, V. J., Prasad, N.B.L., Narasimha, G. (2012): Isolation and screening of proteolytic fungal cultures from soil contaminated with abattoir waste. *Biochemistry*. 6(7): 226-230.
- Ribitsch, D., Hromic, A., Zitzenbacher, S., Zartl, B., Gamerith, C., Pellis, A., Jungbauer, A., Łyskowski, A., Steinkellner, G., Gruber, K., Tscheliessnig, R., Acero, E. H., Guebitz, G. M. (2017): Small cause, large effect: Structural characterization of cutinases from *Thermobifida cellulositica*. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(11): 2481–2488. DOI: 10.1002/bit.26372
- Ruz-Cruz, M. A, Herrera-Franco, P.J., Flores-Johnson, E.A., Moreno-Chulim, M.V., Galera-Manzano, L.M, Valadez-Gonzalez, A. (2022): Thermal and mechanical properties of PLA-based multiscale cellulosic biocomposites. *Journal of Materials Research and Technology*. 18: 485-495. DOI: 10.1016/j.jmrt.2022.02.072
- Satti, S. M., Shah, A. A., Auras, R., Marsh, T. L. (2017): Isolation and characterization of bacteria capable of degrading poly(lactic acid) at ambient temperature. *Polymer Degradation and Stability*. 144: 392–400. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2017.08.023
- Sharif, A., Hoque, M. E. (2019): Renewable Resource-Based Polymers. *Bio-Based Polymers and Nanocomposites*. 1–28. DOI:10.1007/978-3-030-05825-8_1
- Su, L., Hong, R., Wua, J. (2015): Enhanced extracellular expression of gene-optimized *Thermobifida fusca* cutinase in *Escherichia coli* by optimization of induction strategy. *Process Biochemistry*. 50(7): 1039–1046. DOI: 10.1016/j.procbio.2015.03.023
- Tóth Á., Baka E., Luzics Sz., Bata-Vidács I., Nagy I., Bálint B., Herczeg R., Olasz F., Wilk T., Nagy T., Kriszt B., Nagy I., Kukolya J. (2016): Plant Polysaccharide Degrading Enzyme System Of *Thermobifida Cellulositica* Tb100t Revealed by De Novo Genome Project Data. *Acta Alimentaria*, 46(3): 323–335. Doi:10.1556/066.2016.0014

Wilson, D. B. (2004): Studies of *Thermobifida fusca* Plant Cell Wall Degrading Enzymes. *The Chemical Record*.

Yang, S., Xu, H., Yan, Q., Liu, Y., Zhou, P., Jiang, Z. (2012): A low molecular mass cutinase of *Thielavia terrestris* efficiently hydrolyzes poly(esters). *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 40(2): 217–226. DOI:10.1007/s10295-012-1222-x