



Politejsav alapú bioplasztik mikrobiális bontásának modellezése

Szakdolgozat

Tóth Emese

Budapest

2022

**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet**

Szak neve: BSc Biomérnök

Modul neve: Alkalmazott biotechnológiai

Modul szerinti tanszék: Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Szakkolgozat készítés helye: Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

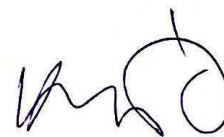
Hallgató: Tóth Emese

A szakkolgozat címe: Politejsav alapú bioplasztik mikrobiális bontásának modellezése

Konzulens: Kilin Ákos PhD hallgató, kutatási munkatárs
Dr. Nguyen Duc Quang, egyetemi tanár

Beadás dátuma: 2022. 11. 02.

szakkolgozat készítés helyének vezetője
Dr. Nguyen Duc Quang



konzulens
Kilin Ákos

modul szerinti tanszék vezetője
Dr. Nguyen Duc Quang

Tartalom

1. Bevezetés	5
2. Célkitűzés	6
3 Irodalmi áttekintés.....	7
3.1 Polimerek	7
3.1.1 Biopolimer	8
3.2 Tejsav	9
3.3 Politejsav	10
3.3.1 Politejsav előállítása.....	12
3.3.2 Politejsav alkalmazási területei.....	13
3.3.3 Politejsav lebontásának lehetőségei	14
3.4.1 Depolimeráz enzimek	14
3.4.2 <i>Bacillus</i> törzsek jellemzése	16
3.4.3 <i>Rhodococcus</i> törzsek jellemezése	16
4 Anyagok és módszerek	18
4.1 PLA alapú bioműanyag	18
4.2 Tápközegek.....	20
4.3 Az enzimaktivitás méréshez szükséges anyagok	23
4.4 Alkalmazott módszerek	23
4.4.1 pH mérés	23
4.4.2 Tömegmérés.....	24
4.4.3 Enzimaktivitás mérés	24
4.4.5 PLA-keményítő biokompozit biodegradációja szubmerz körülmények között.....	29
5 Eredmények	30
5.1 Screenelés.....	30
5.2 PLA-keményítő biokompozit biodegradációja szubmerz körülmények között <i>Bacillus</i> törzsek alkalmazásával.....	33
5.2.2 Proteáz enzimaktivitás eredmények.....	36
5.2.3 Kutináz enzimaktivitás eredmények	38
5.2.4 Tömegváltozás nyomon követése	39
5.3 PLA-keményítő biokompozit biodegradációja szubmerz körülmények között <i>Rhodococcus</i> törzsek alkalmazásával.....	40
5.3.1 Biodegradáció során tapasztalt pH változás nyomon követése	41
5.3.2 Enzimaktivitás mérése rhodokokkusoknál.....	43
5.3.3 Proteáz enzimaktivitás eredmények.....	43
5.3.4 Kutináz enzimaktivitás eredmények	45

5.3.5 Tömegmérés.....	47
6 Összefoglalás	49
Köszönetnyilvánítás	50
7 Irodalomjegyzék	51
8 Nyilatkozatok	55

1. Bevezetés

Annak ellenére, hogy még csak 180 éve fedezték fel a szintetikus műanyagokat, napjainkra olyan szinten teret hódítottak, hogy nélkülük elképzelhetetlen a mindennapi életünk. Léteznek olyan iparágak, amelyek más alternatívával már nem is tudnának működni. Az élelmiszeripart azon belül is a csomagolás, aminek élelmiszerbiztonsági szempontból óriási szerepe van, az orvosi-, kutatás-fejlesztési szektort vagy a vendéglátást, mind-mind elképzelhetetlen műanyag felhasználása nélkül. Ezeknek az anyagoknak a népszerűsége talán abban rejthető, hogy nagyon jó fizikai tulajdonságokkal rendelkeznek, tartósak, rendkívül olcsón és gyorsan előállíthatóak. A műanyagok formájának, színének és felhasználási területének egyedül csak az adalékanyagok és a képzeletünk szabhatnak határt.

A műanyag termékek nagy százalékát egyszer használatos evőeszközök, tálak, palackok, csomagolóanyagok, zacskók teszik ki (Cordier & Uehara, 2019) és ennek csak egy csekély százaléka jut el a szelektív hulladékgyűjtőbe. (AMI, 2022) A természetbe kerülő plasztikok óriási veszélyforrás az ott élő állatokra nézve, továbbá akár lebegő szemét szigetként is szennyezhetik a tengereket, óceánokat. Jelenleg a 6 legnagyobb szemétsziget az észak-atlanti, a dél-atlanti, a keleti-csendes-óceáni, az északi-csendes-óceáni, a dél-csendes-óceáni és az indiai-óceáni, amelyeknek a 80%-a műanyag. A csendes-óceáni a világ legnagyobb szemétszigete, amely a Csendes-óceán északi részén található. A sziget becült területe 1,6 millió km². Ez nagyjából háromszor akkora, mint Franciaország. Az óceánok ilyen mértékű szennyezése a túlhalászat, és a globális felmelegedés mind-mind hozzájárul az egyre növekvő fajpusztuláshoz. (Leberton, és mtsai., 2018)

A problémát elsősorban nem abban kell keresni, hogy maga a műanyag létezik, hiszen rengeteg jó tulajdonságával megkönnyíti mindennapi életünket. Véleményem szerint, a gond inkább abban az emberi mentalitásban keresendő, amit Aldous Huxley már 1982-ben megfogalmazott: „Ha megunjuk, el vele, így jutunk csak felfele!”. A folyamatosan újabb és újabb termékek vásárlásáért és a régi dolgok nem megbecsüléséből fakadhat ez a globális probléma.

2. Célkitűzés

Munkám céljául tűztem ki a politejsav alapú műanyag megismerését és biológiai lebonthatóságának a kutatását. Ehhez a következő részfeladatokat tűztem ki célul:

1. Törzsszelekció céljából az alkalmazott baktérium törzsek tejsavhasznosítása, illetve annak megállapítása és kimutatása, hogy rendelkeznek politejsav depolimeráz enzimaktivitással.
2. PLA-keményítő biokompozit biodegradálása szubmerz környezetben a szelektált baktériumokkal, illetve a különböző tápanyagkiegészítés hatása a bontásra nézve
3. Mikrobiális konzorcium alkalmazása a PLA-keményítő biokompozit bontására
4. A depolimeráz enzimmennyiség és a biodegradáció hatékonyságának meghatározása

3 Irodalmi áttekintés

3.1 Polimerek

A polimereknek (görög eredetű szó melynek jelentése: sok) nevezzük az ismétlődő egységekből (monomerekből) felépülő nagyméretű molekulákat, melyekben a monomereket kovalens kötések kapcsolják össze. Nagy molekulatömeg jellemzi őket (10000-1000000 g/mol). A polimereket kémiai reakcióval nyerik, megfelelő körülmények között a több mint 100 monomer képes összekapcsolódni és létrehozni egy polimer láncot (Tábi, 2019).

Csoportosíthatjuk őket kialakulásuk szerint: ez esetben vannak a természetben is előforduló, mint például a cellulóz, fehérje vagy a keményítő, és vannak a szintetikus polimerek, mint a polietilén (PE), polipropilén (PP), polietilén-tereftalát (PET), polikarbonát (PC), polivinil-klorid (PVC), poliamid (PA) (Namazi, 2017, Tábi, 2020).

A természetes polimereket az ember már ősidők óta alkalmazza, mint például bőröket, fákat vagy akár a gyantákat és mézgákat. Viszont az a felismerés, hogy ezek az anyagok óriásmolekulákból állnak, csak az 1920-as évek elején fedezte fel Hermann Staudinger (Nobel Díjas, német kémikus). Ő volt az, aki először kimondta, hogy a makromolekulák léteznek. Staudinger azt állította, hogy az olyan kolloidális anyagok, mint a kaucsuk, a keményítő vagy a cellulóz valójában változó hosszúságú, fonal alakú makromolekulák vagy polimerek, amelyek kovalens kötésekkel összekapcsolt, jól meghatározott kis egységekből állnak (Pukánszky és Zsuga, 2011).

A műanyagról pedig akkor beszélünk, hogy ha több polimerből és különböző adalékanyagból (adalék- és társítóanyagokból) áll és előállításánál emberi beavatkozásra is szükség van (Majdik és Kakes, 2009). A műanyag tulajdonságát az adalékanyagokkal tudják befolyásolni, hogy az adott területre, ahova készítik, megfelelő legyen. Az adalékanyagok körében népszerűek a stabilizátorok, csúsztatók, formaelválasztók, színezékek (festékek és pigmentek), lágyítók, gócképzők, égésgátlók, antisztatikumok. Gyakran társító anyagokat is felhasználnak a műanyagok gyártása során, ilyenek lehetnek az ütészálló adalékok, a töltőanyagok, a vezetőképességet biztosító anyagok, valamint az erősítőanyagok is (Tábi, 2020). A stabilizátorok alkalmazása révén meggátolják az UV-fényből, oxidációból és egyéb folyamatokból történő lebomlást. Ez által a műanyag szerkezete rendkívül stabil lesz, tehát ebből következik, hogy a bomlási ideje is igen hosszú, akár évszázadokig is elhúzódhat.

A már nem használt műanyagok, folyamatosan gyűlnek, mint hulladék, ami egy igen égető globális problémává nőtte ki magát. Mivel égetésük törvényileg tiltott (A műanyagok égetése – a 21/2001. számú kormányrendelet értelmében – nyílt színen, vagy bármilyen

tüzelőberendezésben tilos!) ugyanis toxikus gázok keletkeznek, ezért nem tudjuk megsemmisíteni őket. Ezért is fontos, hogy a szelektív hulladékgyűjtés által visszakerüljön a körforgásba az elhasznált műanyag. A műanyag többszöri újrafeldolgozása során veszít kedvező fizikai tulajdonságaiból, emiatt nem tudjuk a végtelenségig új műanyagok hozzáadása nélkül újra feldolgozni.

A műanyag termékek nagy százalékát egyszer használatos evőeszközök, tálak, palackok, csomagolóanyagok, zacskók teszik ki és csak egy csekély százaléka jut el a szelektív hulladékgyűjtőbe. A természetbe kikerülő plasztikok óriási veszélyforrás az ott élő állatokra nézve. Aprózódásuk révén mikroműanyagként könnyen bekerülhetnek a táplálékláncba, így az emberben is olyan károkat okozva, amikről még pontos adataink nincsenek (Tábi, 2020).

3.1.1 Biopolimer

A műanyagipar nagy változások elé néz hiszen, az államok folyamatos intézkedéseket tesznek a környezetvédelem szempontjából, továbbá az emberek igénye is nő az öko-, bio- és fenntartható termékek iránt. 2020 májusában megemelték a környezetvédelmi termékdíjat, egyes műanyag csomagolószerek díja 57 forintról 1900 forintra emelték, tehát a 33-szorosára. Továbbá ebben az évben vezették be a „biológiailag lebomló műanyag” fogalmát is. A következő évben 2021 júliusától a 301/2021. (VI. 1.) Kormány rendelet értelmében nem lehet forgalomba hozni az alábbi egyszer használatos műanyag termékeket: Fültisztító pálcikát, evőeszközöket (villa, kés, kanál, evőpálcika); tányérokat; szívószálakat; italkeverő pálcikákat; léggömböket, ételtároló edényeket, italtárolót, italtartó poharat, műanyag hordtasakot (melynek falvastagsága 15 mikron feletti) és az oxidatív úton lebomló műanyagtermékek (ezek olyan adalékanyagokat tartalmazó műanyagok, amelyek oxidáció révén a műanyag mikroméretű részecskékre történő széttöredezését vagy kémiai lebontását idézik elő).

Az előbb említett indokok miatt jó alternatív megoldás lehet a nem kőolajszármazékból álló bioműanyagok, melyek lehetnek bioalapú (kukorica, cukorrépa, cellulóz), biológiailag lebomló vagy esetleg mindkettő. A biológiai úton lebomló műanyag környezetvédelmi termékdíjról szóló 2011. évi LXXXV. törvénymódosítás 4. § „5a. alapján: olyan műanyag, amely fizikai és biológiai bomlásra képes úgy, hogy végül széndioxidá (CO₂), biomasszává és vízzé bomoljon le, és amely a csomagolásra vonatkozó európai szabványokkal összhangban komposztálás és anaerob lebontás útján hasznosítható;”

A polimerek egyik fajtája a biopolimer ez egy olyan polimer, melynek a láncait egy élő szervezet állítja elő vagy magát az építőegységeket biztosítja, ilyen például a keményítő. A keményítő egy glükóz polimer, de a cellulóz, glikogén és dextransok is azok, a monomerek kapcsolódási módja adja a molekulák közötti különbséget (Nelson és Cox, 2017). A

biopolimerek előállítása megvalósulhat mikroorganizmusok segítségével, biotechnológiai vagy petrokémiai úton (Ashter, 2016). Lebontásuk fő mechanizmusa a hidrolízis, amely kémiai vagy biológiai úton történhet, az így keletkezett végtermékek a humusz, a szén-dioxid, a víz és a metán, ez utóbbi biogázként hasznosítható. A lebontásuk sebességét különféle természeti tényezők befolyásolják, mint: a hőmérséklet, a páratartalom, a napfény, az oxidáció, valamint a polimer molekulaszervezete (Tábi, 2019).

Jelenleg a bioműanyagok adják az évente előállított 368 millió tonna műanyag hozzávetőleg egy százalékát (Internet 1.). A biopolimer kutatás területén vezető szervezeteknek számító Európai Bioplasztics és a Nova-Institute Research Institute (Hürth, Németország) legfrissebb adatai szerint a globális bioműanyag-termelési kapacitás a 2021. évi mintegy 2,421 millió tonnáról körülbelül 7,59 millióra fog nőni 2026-ban (Internet 2.). Ezek közül a legígéretesebb biopolimer a politejsav (PLA-polylactic acid), mely mozaikszó, a fő alapanyagára utal a tejsavra (Tábi, 2019).

3.2 Tejsav

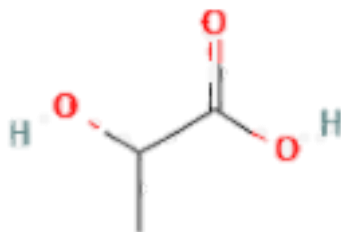
A tejsavat sok egyéb sav mellett (citromsav, glicerin) 1780-ban Scheele (német származású svéd kémikus) izolálta aludttejből (Datta és Henry, 2006).

Kémiai megnevezése: 2-hidroxi-propionsav, 2-hidroxi-propánsav, alfa-oxi propionsav, etilidén-tejsav. Környezetben gyakran előforduló szerves sav, mely számos biokémiai folyamatban szerepet játszik.

Összegképlete: $C_3H_6O_3$

Molekulatömege: $90,08 \frac{g}{mol}$.

Szerkezeti képlete az **1. ábrán** látható.



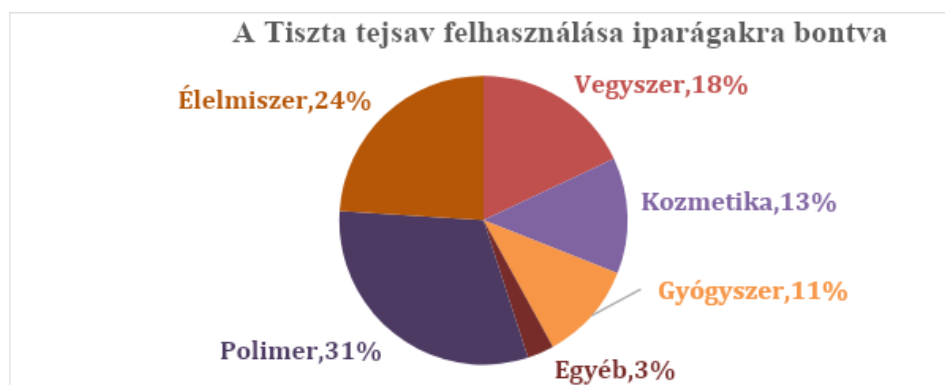
1. ábra: tejsav szerkezeti képlete (Internet 3.).

A tejsav hidroxil karbonsavak közé tartozik. A molekula egy karboxil csoportból és egy hidroxilcsoportból áll. Királis vegyület, aszimmetrikus. Két különböző optikai hatású sztereoisomerje létezik, amelyek az erjesztéstől függően képződnek. Teljesen tiszta tejsav

színtelen (alkalmanként sárgás színű), erősen nedvszívó kristályokat alkot. Hidroszkópos, vízzel vagy etanollal könnyen elegyet képez. Kloroformban oldhatatlan. L-(+)-tejsav fiziológiai alkotórésze a szervezetek, a glikolízis melléktermékeként számos szövetben, de főleg az izomban van jelen. Kémiaailag kötött alakban murein tartalmazza (Internet 4.).

A tejsav aszimmetrikus szén atomjából kifolyólag két eltérő enantiomerrel rendelkezik, tehát a fényt ellentétes irányba forgatják. A tejsav D-tejsav (0,05%) illetve L-tejsav (99,5%) formában van jelen a természetben (Halász, 2014). Biológiai erjedés útján szénhidrátokból (cukrokból) tejsavat állít elő többek között a *Lactobacillus* nemzetség (tejsavas erjedés során). Ezen nemzetség képviselői, mint a *Lactobacillus acidophilus*, *L. amylophilus*, *L. bulgaricus* stb. (Deák et al., 2006).

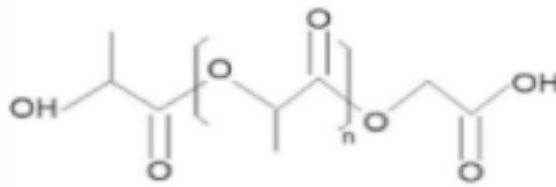
A tejsav az első, ipari léptékekben termelt szerves sav. Industriális szempontból a hetero- és homofermentatív tejsavbaktériumokat alkalmazzák tejsav előállítására. Élelmiszerekben elsősorban savanyú káposztában, kefirben, sajtokban, fermentált húsokban előfordulhat. Savanyúságot szabályozó anyagként vagy tartósítószerként alkalmazzák E270 néven. A tejsavat sok más iparág már eddig is felhasználta zöld oldószerként festékekbe és fémek tisztítására, illetve gyógyszeripar világában, mint a kapszulák bevonatrétege. A tiszta tejsav felhasználásának százalékos arányát a **2. ábra** mutatja be.



2. ábra Az iparban felhasznált tiszta tejsav százalékos aránya, 2020-ban (Rawoof, et al., 2020)

3.3 Politejsav

A tejsav monomerekből felépülő politejsav (PLA) a polilaktidok csoportjába tartozik, nem aromás poliészter. Merev, hőre lágyuló polimer. A politejsav szerkezeti képletét az **3. ábra** mutatja.



3. ábra: a politejsav szerkezeti képlete (López et al., 2012).

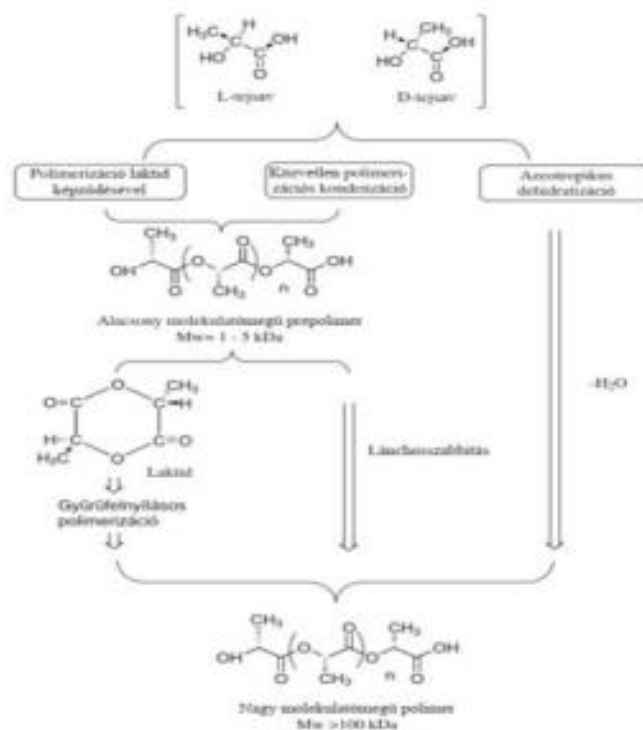
A gyártás hatalmas költségei miatt a PLA-t 1980-as évekig nem alkalmazták máshol csak a gyógyszergyártásnál és implantátumok alapanyagjaként. A nagy előrelépést egy új technológia bevezetése jelentette, mely a tejsavat magas cukortartalmú takarmánynövényekből nyert szénhidrátok baktériumokkal végzett fermentációjával nyerte ki. Ez jelentős fejlődést indított el ezen a területen, és lehetővé tette mind a monomer tejsav, mind a politejsav nagyüzemi gyártását (Internet 5.). A PLA-t megújuló mezőgazdasági forrásokból állítják elő, kőolaj származékok helyett, ezért sokkal kisebb biológiai lábnyommal rendelkezik, mint a sima műanyagok. A NatureWorks által kukoricából történő tömegtermeléshez alkalmazott technológián túl a cukornádat is használják a tejsav előállításának alapanyagaként. A Purac fejlesztette a cukornád alapú tejsav-termelést Thaiföldön kereskedelmi tejsav üzem létesítésével (Ficai és Grumezescu, 2017).

A mechanikai tulajdonságokat alapvetően négy tényező határozza meg a politejsav esetén:

1. A reakcióparaméterek szabályozása (katalizátor koncentrációja, polimerizáció hőfoka, tartózkodási idő, kiindulási anyag tisztasága, reaktor típusa, stb.)
2. Egyéb monomerekkel kopolimerek előállítása: ugyanis a tejsav rész biológiai lebonthatósága és biokompatibilitása a kopolimernél is megmarad (komonomer pl. ϵ -kaprolakton, hidroxisavak).
3. Kompozitok előállítása, ahol a politejsav és az alkotó anyagok között csak fizikai kölcsönhatás van és nincs kémiai kapcsolat.
4. Adalékanyagok (csúsztatók, töltőanyagok, lágyítók, színezőanyagok, stb.) hozzáadásával a kedvező tulajdonságok elérése (pl. az üvegesedési hőmérséklet adalékanyagokkal befolyásolható, az irodalomban triacetil-n-butilcitrát növekvő aránya mellett az üvegesedési hőmérséklet csökkenését tapasztalták, valamint a reológiai tulajdonságok is javíthatók térhálósítók (pl. peroxidok) alkalmazásával). (Bognár, 1999)

3.3.1 Politejsav előállítása

Az előállításának első lépése a magas keményítő tartalmú növényből (kukoricából, cukornádból, burgonyából) kivonják a keményítőt és azt tejsavvá fermentálják. A tejsav leggyakrabban előforduló formája az L forma, mint L-PLA, azonban a D formája, mikroorganizmusok segítségével előállítható, aminek a tulajdonságai már szinte azonosak a mesterséges műanyagokéhoz legyen az PET vagy PE. A politejsav előállításának sematikus ábráját az **4. ábra** mutatja be. Általában a PLA-t közvetlen polikondenzációs reakció (PC) és gyűrűnyitási polimerizációs (ROP) módszerek alkalmazásával állítják elő. (Internet 6.)



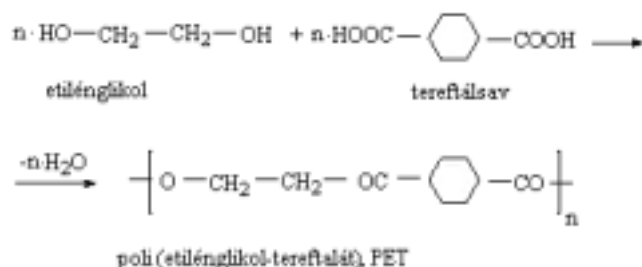
4. ábra A politejsav előállítása. (Castro-Aguirre et al., 2016)

3.3.1.1 Gyűrűfelnýtásos polimerizáció

A ROP (Ring Opening Polymerization), azaz gyűrűfelnýtásos módszer alkalmazása során nagy molekulatömegű polimer előállítására van lehetőség, enyhe reakciókörülmények között és rövid reakcióidővel. A technika az iniciátorok, továbbá a reakciómechanizmus szerint lehet anionos, kationos, enzimátikus és koordinációs polimerizáció. A kationos és anionos polimerizáció során az iniciátorként protonsavakat, alkilezőszereket, alkálifém-alkoxidokat alkalmaznak, 100-120°C-on. Nagy reaktivitás és szelektivitás jellemzi a polimerizációnak ezt a formáját, illetve alacsony racemizálódási és szennyezési szint. A reakció eredménye az optikailag tiszta polimer. (Ghalia és Dahman, 2017)

3.3.1.2 Termikus polikondenzáció

Lassú, energiabefektetést igénylő folyamat. A polikondenzáció során legalább bifunkciós monomerekre van szükségünk, melyeknek a kondenzációra képes csoportjukból minimum kettő van. Melléktermék kilépésével járó reakció. A folyamat reakcióképletét a **5. ábrán** látható (Czvikovszky et al., 2007).



5. ábra: termikus polikondenzációs folyamat. (Czvikovszky, et al., 2007)

A tejsav termikus polikondenzációja fejlesztések alatt álló terület, ugyanis problémát jelent, hogy a módszer során a dehidratációs egyensúlyt nehéz szabályozni. Általánosságban elmondható, hogy az ipari termelésben a ROP módszert szívesebben alkalmazzák, ugyanis a folyamat egyszerűbben szabályozható, annak ellenére, hogy több lépésből áll, illetve végeredményben nagyobb molekula tömegű politejsavat lehet előállítani.

3.3.2 Politejsav alkalmazási területei

Termékek széles körét lehet előállítani PLA alapanyagból, mivel a műanyagiparban alkalmazott technológiákkal feldolgozható. Az orvostudomány és gyógyszergyártás területéről lassan betör a hétköznapi életünkbe is. Mivel még nem annyira elterjedt, mint a kőolajszármazékból származó műanyag, így az ára ahhoz képest magasabb, mintegy 30 százalékkal drágább is lehet.

Viszont tovább népszerűsítheti a PLA-t az a tény, hogy a belőlük készült palackok, csomagolóanyagok után nem kell környezetvédelmi termékdíjat fizetni (Kovács et al., 2017).

Az Európai Unió környezetvédelmi szempontból fokozatosan szigorítja irányelveit. Az egyszer használatos műanyag evőeszközöket és hordtasakok betiltásával keletkező piaci űrt a PLA-ból készült bioműanyagok, Ezek mellett még szerepet kap mind az autóiparban (padlószőnyeg, burkolatok), mezőgazdaságban (hálók, zsinórok), fontos megemlíteni a 3D nyomtatás területét is, hiszen ott egy fő alapanyagként szolgál, mint nyomtató szál.

3.3.3 Politejsav lebontásának lehetőségei

A biológiai úton lebomló műanyag környezetvédelmi termékdíjról szóló 2011. évi LXXXV. törvénymódosítás 4. § „5a. alapján: olyan műanyag, amely fizikai és biológiai bomlásra képes úgy, hogy végül széndioxiddá (CO₂), biomasszává és vízzé bomoljon le, és amely a csomagolásra vonatkozó európai szabványokkal összhangban komposztálás és anaerob lebontás útján hasznosítható;”

A lebomlásnak több típusát különbözteti meg a szakirodalom: termikus aktiválás, fotolízis, radioaktív lebomlás, oxidáció, hidrolízis (enzimatis, nem enzimatis). Mi az enzimatis hidrolízissel foglalkozunk a munkánk során (Ikada és Tsuji, 2000).

3.4 Baktérium eredetű biodegradáció

3.4.1 Depolimeráz enzimek

Ahhoz, hogy egy mikroorganizmus képes legyen a polimert lebontani, először a hosszú polimerláncnak depolimerizálódniuk kell kisebb egységekre (oligomerekre, dimerekre, és monomerekre). A lebontás egyik módja az enzimatis hidrolízis, mely során az enzimek megtámadják a polimert és alhidrikusan hasítják azt. A katalitikus domén által végzett hidrolízis előtt az enzimek hidrofób doménjei tapadnak szilárd hordozók hidrofób részeihez. A polimer láncok monomerekké való bontását depolimerizációnak nevezzük. Az enzimek aktivitása nagyban függenek a mikroorganizmus fajtájától (Bahl *et al.*, 2020).

Fontos enzimes család lehet a PLA lebontása során a hidrolázok. Ide tartozik a kutináz és a proteáz. Az enzimek szignifikáns szerepet játszanak a polimerek lebontásában. Williams 1981-ben számolt be először arról, hogy laboratóriumi körülmények között biológiai lebontás során a *Tritirachium album* eredtű proteináz K-nak sikerült lebontania a PLA-t (Williams, 1981).

3.4.1.1 Kutináz

A növényi kutikula egy olyan legkülső véd réteg, mely bevonja a leveleket hajtásokat és a növény föld feletti epidermiszét. A növények szárazföldre való kilépésének egyik fontos tényezője volt a kutikula kialakulása, amely már a mohák egy részénél megfigyelhető.

Viaszokból és lipidpolimerekből áll, ami megvédi a növényt a kiszáradástól és a fertőzésektől.

A kutikula fő alkotóeleme a kutin, mely egy lipid poliészter, mely észter kötések révén kapcsolódnak egymáshoz. Tehát hosszú szénláncú zsírsavak és alkoholok észterei. A kutinmonomerek az endoplazmatikus retikulumban képződnek és innen szállítódnak a sejtmembránhoz. Az észterképződés a zsírsavláncok karboxilcsoportja és egy másik zsírsav közbenső hidroxilcsoportja között is végbemegy, így egy hálószerű szerkezet alakul ki.

Ezeket az észter kötések képesek elsősorban gombák vagy baktériumok a kutináz nevű enzimükkel hidrolizálni (Chen et al., 2013, Pálfia és Kristóf, 2013). A sokoldalú kutinázt vagy más néven kutin-hidrolázt, 1960-ban fedezték fel. Az α/β -hidroláz szupercsaládba tartozik (Panda és Gowrishankar, 2005). A kutinázok katalizálják az észterezési reakciókat. Két szubsztráttal rendelkezik a kutinnal és a vízzel. Ezek az enzimek is képesek a szintetikus észterek (például p-nitrofenil-észtereket) és triacil-glicerineket hidrolizálni (Chen et al., 2013).

Az élelmiszeriparban, és mint aromagyártásnál, gyógyszeriparban, finom- és mezőgazdasági vegyszerek előállításában, bioszenzorokban és biodízel előállítására is használják (Castro-ochoa et al., 2012).

3.4.1.2 Proteáz

A proteázok fehérjebontó enzimek. Minden élő sejt számára elengedhetetlen. A proteázok a fehérjékben lévő peptid kötések bontják le. Azokat a proteázokat, amelyek a fehérjelánc belsejét kezdik el bontani, endoproteázoknak nevezzük, míg a lánc végén bontókat exoproteázoknak (Stefanovitsné, 1996).

Ha az aktív centrumuk felépítése szerint osztályozunk, akkor megkülönböztetünk többek között szerin-proteázokat, cink-proteázokat, cisztein- és karboxil-proteázokat. A proteázokat a szerin is csoportosíthatjuk, hogy helyileg hol funkcionálnak. Az exogén proteázok a szervezet belső állományán kívül, például a tápcsatornában működnek. Inaktív proenzim (zimogén) formájában képződnek, és csak a tápcsatornában aktiválódnak, proteolitikus hasítás révén. Ilyenek például a pepszinogének, tripszinogének.

Az endogén proteázokat is további két csoportra tudjuk bontani: extracelluláris (kollagenáz, metalloproteáz, elasztáz) és intracelluláris proteázokra. Az előbbieket az extracelluláris mátrix fehérjéit, az utóbbiak a sejten belüli fehérjéket bontják. Az endogén proteázok szerepe elsősorban a kötőszövetek (pl. porcszövet, szalagszövet) átrendezésében vagy a fehérvérsejtek sejtek közötti mozgásának elősegítésében van. Az intracelluláris proteázok két különböző útvonalon működhetnek. Az egyik típus a liszoszómákban van, és a receptor mediált endocitózis, vagyis autofágia során bekebelezett, majd a liszoszómába került proteineket bontja.

A másik típus a proteaszóma komplexben van: a sejten belüli, lebontásra ítélt fehérjék lizin oldalláncon egy kis jelölő-fehérjével (ubiquitin) megjelölődnek (ubikvitinálódnak), majd poliubikvitinálódnak; ez a jel a proteaszómába kerülésükre és ottani degradációjukra.

E két útvonalon kívül érdemes megemlíteni még a programozott sejthalált (apoptózist) vagy immunsejtek érése során speciális proteázok, ún. kaszpázok aktiválódnak, melyek a lebontandó fehérjéket hasítják (Lívius és Szarka, 2014). A folyamat során a sejt kisebb darabokra esik, amelyeket más sejtek felvehetnek és újrahasználhatnak. (Internet 8.)

3.4.2 *Bacillus* törzsek jellemzése

A PLA biodegradálásában szerepet játszó baktérium eredetű enzimszintézisben szerepet játszhatnak egyes *Bacillus* törzsek. A szénabacillus néven is ismert *Bacillus subtilis* általánosságban mindenhol fellelhető Gram-pozitív, pálcá alakú baktérium talajjavító baktériumként is alkalmazhatják a mezőgazdaságban és a kertészetben, de jelen lehet a lisztben, de fertőzheti a sajtolt élesztőt (Madigan, 2015).

A *Bacillus coagulans* egy Gram-pozitív, fakultatív anaerob, nem patogén, spóráképző, tejsavat termelő baktérium. Hőálló; a *B. coagulans* optimális növekedési hőmérséklete: 35-50 °C. Az optimális növekedési pH: 5,5-6,5 [4,15]. A probiotikumként használt mikroorganizmusok jellemzőivel rendelkezik (Majeed et al., 2016).

Bacillus licheniformis egy Gram-pozitív mezofil baktérium. Optimális hőmérséklete 37 °C. Általánosságban megtalálható a talajban, szaprofitikus életmódja van, amely a biopolimereket lebontó enzim szekrécióján alapul (Wiegand et al., 2013).

Bacillus cereus is szintén Gram-pozitív pálcá alakú baktérium. Megtalálható talajban és az zöldségekben, de akár hústermékekben is egyaránt. Egyes törzsek toxikus hatásúak lehetnek az emberre (Jong és Sanford, 2016).

3.4.3 *Rhodococcus* törzsek jellemezése

A rhodokokkuszokat széles körben kutatják, mint potenciális biodegradáló mikroorganizmus. Mivel a természetben sokféle környezeti körülmények között is megtalálhatóak és képesek a szénhidrogéneket metabolizálni (Alvarez, 2010).

Ezeknek a baktériumoknak is tulajdonítható a biodegradálásban résztvevő enzim szintézis. *Rhodococcus species* aerob, Gram-pozitív, részben saválló, kataláz pozitív, nem endospórák baktérium. A baktérium különböző forrásokból izolálható és jól szaporodik nem szelektív közegben (Alvarez, 2010).

Rhodococcus erythropolis földből izolált Gram-pozitív mikroorganizmus. A sejtek

nagyszámú enzimeket tartalmaznak, amelyek lehetővé teszik számukra a hatalmas számú biokonverziót és lebontás végrehajtását (Pacwa-Plociniczak et al., 2019).

Rhodococcus fascians 1984-ig *Corynebacterium fascians* néven ismerték. Gram pozitív, aerob, baktérium fitopatogén, amely a növények kórokozói lehet, fertőzött növényeknek jellegzetes tüneteket mutatnak, mint például a levél deformációja. (Goethals et al., 2001).

Rhodococcus opacus fenol-toleráns, ligninből származó aromás anyagokat termel, és ígéretes lipid felhalmozódási törzs, amely olyan vegyületeket állít elő, mint például a triacil glicerint (TAG) (KyuShin et al., 2019).

4 Anyagok és módszerek

A munkám során a mezofil baktériumok biodegradáló képességét vizsgáltam. A bacillusokat és rhodokokkusokat alkalmaztam a munkám során.

Alkalmazott *Bacillus* törzsek:

- *Bacillus subtilis* B1212
- *Bacillus subtilis* B1162
- *Bacillus subtilis* CU 150
- *Bacillus coagulans* B1139
- *Bacillus coagulans* B1123
- *Bacillus coagulans* 200B/9
- *Bacillus licheniformis* B1231
- *Bacillus licheniformis* B1223
- *Bacillus cereus* B0076
- *Bacillus cereus* B1718

Alkalmazott *Rhodococcus* törzsek:

- *Rhodococcus erythropolis* NCAIM B01914
- *Rhodococcus erythropolis* NCAIM B01952
- *Rhodococcus fascians* NCAIM B01608
- *Rhodococcus fascians* NCAIM B01614
- *Rhodococcus opacus* NCAIM B01915
- *Rhodococcus species* NCAIM B01916

A törzsek az NCAIM Budapest törzsgyűjteményből és a Biomérnök és Erjedésiipari Technológia Tanszéktől származnak.

4.1 PLA alapú bioműanyag

A vizsgálatok során NatureWorks LLC (USA) által gyártott Ingeo™ 3251D PLA Biopolymerből és keményítő keverékből (95:5) készített (a Piringer Kft. által) evőeszközöket használtam (**6. ábra**), a bontási vizsgálathoz a bioműanyag evőeszközök 1 %-át kb. 0,1x0,1 cm hosszúra vágtam. A biopolimer alapanyag fizikai és mechanikai tulajdonságait a **1. táblázatban** foglaltam össze.

1. táblázat: 3251D Biopolymer tulajdonságai (NatureWorks, 2020)

Relatív viszkozitás	2,5
Kristály szerkezet olvadási hőfoka	155-170 °C
Színe	átlátszó
Szakító szilárdság	9,000 Mpa
Nyúlási képesség	3,5 %
Ütésállóság	0,3
Hajlító szilárdság	15,700 Mpa
Hőtorzulás	55 °C



6. ábra PLA-keményítő (95:5) bikompozit evőeszköz (saját kép)

4.2 Tápközegek

4.2.1 Táplevesek törzsfenntartáshoz

A *Bacillus* törzsfenntartáshoz **nutrient táplevest** alkalmaztam összetétele:

- Pepton 5g/l
- Húskivonat 3g/l
- Desztillált víz 1000 ml

A *Rhodococcus* törzsfenntartásához TSB (Trypticase Soy Broth) táplevest alkalmaztam:

- TSB 30 g/l
- Desztillált víz 1000 ml

4.2.2 Szelekcióhoz alkalmazott szilárd tápközegek

Az előzetes vizsgálatok céljából, hogy megállapítsam az alkalmazott *Bacillus* és *Rhodococcus* törzsekről, hogy képesek a tejsavat hasznosítani, mint tápanyagot a screeneléses vizsgálathoz a 0,1% (w/w) tejsavval kiegészített agart tartalmazó alaptáplevest alkalmaztam (2. táblázat).

2. táblázat: A tejsavhasznosításra alkalmazott agar összetétele

Basal medium (Penkhrue et al., 2015)	Koncentráció (g/l)
(NH ₄) ₂ SO ₄	4
K ₂ HPO ₄	2
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ X 7H ₂ O	0,5
Élesztőkivonat	1
Agar	15
Desztillált víz	1000 ml

Proteolitikus enzimaktivitás vizsgálat szempontjából kazein agart (Radha *et al.*, 2012) alkalmaztam, aminek az összetételét a **3. táblázatban** foglaltam össze.

3. táblázat: Proteolitikus enzim aktivitás kimutatására alkalmazott agar összetétele

Kazein-agar	Koncentráció (g/l)
Kazein	10
Agar	15
Desztillált víz	1000 ml

Módosított Tween 80 agart (Kumar *et al.*, 2012) alkalmaztam a észteráz típusú enzimaktivitás kimutatására, az agar összetételét a **4. táblázatban** foglaltam össze.

4. táblázat: A lipolitikus enzimaktivitás vizsgálatára alkalmazott módosított Tween 80 agar összetétele

Módosított Tween 80 agar	Koncentráció (g/l)
Pepton	5 (g/l)
Élesztőkivonat	3 (g/l)
Tween 80	0,1%
Kongó vörös	0,5 (g/l)
Agar	15 (g/l)
Desztillált víz	1000 ml

4.2.3 Biológiai bontás modellezéshez alkalmazott táplevesek

A szubmerz körülmények között vizsgált biológiai bontáshoz kétféle vizsgálati közeget alkalmaztam, TPY téplevest és alaptáplevest. A TPY összetétele az 5. táblázatban az alaptápleves a 6. táblázatban található.

5. táblázat: TPY (trypticase pepton -phytone pepton - élesztő kivonat) összetétele

	Koncentráció g/l
Trypticase pepton	10 g
phytone pepton	5 g
glükóz	5 g
élesztőkivonat	2,5 g
Tween 80	1 ml
cisztein HCl	0,5 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgCl ₂ * 6H ₂ O	0,5 g
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,25 g
CaCl ₂	0,15 g
FeCl ₃	0,03
Desztillált víz	1000 ml

6. táblázat: Alaptápleves (Penkhrue *et al.*, 2015) összetétele és kiegészítései

	Koncentráció g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	4 (g/l)
K ₂ HPO ₄	2 (g/l)
KH ₂ PO ₄	1 (g/l)
MgSO ₄ X 7H ₂ O	0,5 (g/l)
Élesztőkivonat	1 (g/l)
Desztillált víz	1000 ml

Kiegészítések	
Glükóz	0,5%
Keményítő	0,5 %
Tejsav	0,1%

A tápközegeket csiramentesítés céljából autoklávval 121 °C-on 15 percig sterilizáltam.

4.3 Az enzimaktivitás méréshez szükséges anyagok

A kutináz enzimaktivitás méréshez **0,1 M Na-foszfát pH 5,8 puffert** alkalmaztam, az ehhez szükséges törzsoldatokat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ és NaH_2PO_4) a kívánt pH értékű puffer oldat eléréséhez megfelelő arányban elegyítettem és egészítettem ki 1000 ml-re desztillált vízzel, hűtőben tároltam, a kémhatást pH-mérő segítségével ellenőriztem.

A **Triton-X oldat** a reakcióelegy összetevője, amit 1g/250 ml koncentrációban, desztillált vízzel készítettem el.

A (0,15mM) **para-nitrofenil-butirát** szubsztrátumot analitikai mérlegen mértem ki, majd 96 %-os etanolban oldottam fel.

A proteáz enzim meghatározásához **1,5%-os kazein szubsztrátumot** használtam, amit 5,8 pH Na-foszfát pufferben oldottam fel.

Az enzimreakció leállításához 5% **triklór-ecetsav (TCA)** vizes oldatát használtam

A színképzéshez a 0,5 M Na_2CO_3 oldatot és a háromszorosra hígított Folin-Ciocalteu reagenst alkalmaztam

4.4 Alkalmazott módszerek

4.4.1 pH mérés

A pH mérés az egyik legelterjedtebb módszer, aminek segítségével következtetéseket tudunk levonni, hogy a tápközegünkben milyen mikrobiális folyamatok történnek. A kísérletben a mintavételezések során, nyomon követtem ezen értékeket, hogy figyelemmel kísérjem a biodegradáció során végbemenő kémhatásváltozást a műszer a **7. ábrán** látható. A pH mérés az érzékeny üvegelektroda és a referencia potenciál különbségén alapszik.



7. ábra: Mettler-Toledo (Seven Multi) pH mérő

4.4.2 Tömegmérés

A biodegradáció mennyiségének meghatározásához először a reakció indítása előtt a kiindulási PLA tömeget analitikai mérlegen lemértem, majd az adott biodegradálási idő lejárta után, a tápközegeket leszűrtem szűrőpapírral, majd kiszáritottam szobahőmérsékleten, és visszamértem a tömegüket analitikai mérlegen.

4.4.3 Enzimaktivitás mérés

4.4.3.1 Kutináz enzimaktivitás mérése

A kutináz a p-nitrofenil-butirát mesterséges kromogén szubsztrátumot hasítja, aminek hatására termékként p-nitrofenol szabadul fel. A reakciót sárga színváltozás jelzi, ami 405 nm-en spektrofotometriásan mérhető. A kutináz enzimaktivitás méréshez szükséges reakcióelegy összeállítása az 7. táblázatban látható.

7. táblázat Kutináz enzimaktivitásához szükséges reakcióelegy összetétele

	Desztillált víz	Triton-X	p-nitrofenil-butirát	Na-foszfát (pH 5,8) puffer	Enzim (minta)
Műszer vak	120 µl	20 µl		160 µl	
Szubsztrát vak	20 µl	20 µl	100 µl	160 µl	
Enzim vak	100 µl	20 µl		160 µl	20 µl
Minta		20 µl	100 µl	160 µl	20 µl

A kutináz aktivitás meghatározásához összemértem a reakcióhoz szükséges összetevőket, a puffert, a Triton-X- oldatot, a szerves oldószerben oldott p-nitrofenil-butirátot,

és a desztillált vizet. Ez után 30°C-on 1-2 percen át termosztáltam, majd a reakciót a minták hozzáadásával indítottam el. A reakció időtartama 10 perc volt, a reakció végén a minták abszorbanciáját 405 nm-en mértem meg.

A kutináz enzim mennyisége az egyenlet alapján számítható ki:

$$\text{Aktivitás} \left(\frac{U}{ml} \right) = \frac{(A_{\text{minta}} - A_{\text{Enzimvak}} - A_{\text{szubsztrátvak}}) * V_{\text{reakció}} * h}{x * t_{\text{reakció}} * V_{\text{minta}}}$$

Egy Unit mennyiség az az enzimmennyiség, amely 1 perc alatt adott körülmények között (30° C pH 5,8) 1 mM szubsztrátumot alakít át terméké képezve. A képletben szereplő jelölések nevét és mértékegységét a **8. táblázat**ban foglaltam össze.

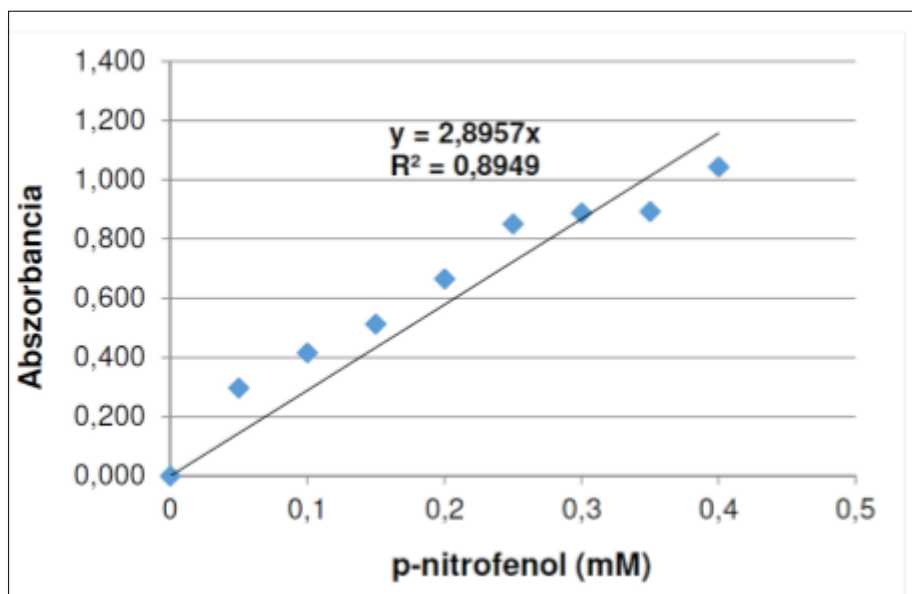
8. táblázat: kutináz aktivitás kiszámításához alkalmazott egyenletben használt jelölések és jelentésük

Jel	Jelentés	Mértékegység
$V_{\text{reakció}}$	a reakcióelegy térfogata	ml
x	kalibrációs egyenesnek a meredeksége	
$t_{\text{reakció}}$	reakció időtartama	perc
V_{minta}	a minta (enzimoldat) térfogata	ml
h	a minta hígítási faktora	

A kutináz enzimmennyiség meghatározásához szükséges kalibráció, amihez a p-nitrofenol törzsoldatból hígítási sorozatot készítettem (**9. táblázat**). A törzsoldatot és a desztillált vizet microplatelemez mélyedéseibe mértem. A különböző ismert koncentrációjú oldatok abszorbanciáját 405 nm-en mértem spektrofotometriás módszerrel. A koncentrációk függvényében az abszorbancia értékeket ábrázoltam, mely a **8. ábrán** látható, és a pontokra regressziós egyenest illesztettem. A függvény meredekségének ismeretében az enzimaktivitások számolhatóak. (Tamaskó 2021)

9. táblázat: 0,4 mM p-nitrofenol hígítási sorozat összeállítása

Koncentráció (mM)	0,4 mM p-nitrofenol (μl)	Desztillált víz (μl)
0,4	150	0
0,35	131	19
0,3	113	37
0,25	94	56
0,2	75	75
0,15	56	94
0,1	37	113
0,05	19	131
0	0	150



8. ábra: p-nitrofenol kalibrációs egyenes

4.4.3.2 Proteáz aktivitás mérés

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. Az enzimaktivitás méréshez $1,5 \frac{m}{v}$ %-os kazein oldatot készítettem. A kazeint Na-foszfát pufferben (pH 5,8) oldottam fel. A kazein jobb oldódása érdekében a kazein oldatot 30 percen át 80 °C-os vízfürdőbe tettem.

A reakciót a kazein oldathoz adott enzimoldattal indítottam. A vakminta esetén a

kazeinhez $5 \frac{W}{W}\%$ triklór-ecetsav (TCA) oldatot adtam, így leállítva a reakciót, majd ehhez a mintát adtam. A reakció 30 percen át 40°C -os vízfürdőben inkubálódik. A reakcióidő lejártakor az elegyekhez 5%-os TCA oldatot adtam, és vízfürdőben pihentettem 10 percen át. Ezután lecentrifugáltam az elegyeket 14000 fordulat/perc sebességen, 5 percen keresztül. A lecentrifugált 0,5 ml felülúszóhoz Na_2CO_3 oldatot, valamint (3:1 hígított) Folin-Ciocalteu reagenst adtam. Az elegyeket 30 percre, 40°C -os vízfürdőben termosztáltam. A reakcióidő lejártakor a minták abszorbanciaértékeit 660 nm-en spektrofotométer segítségével határoztam meg. A proteáz enzim mennyisége az alábbi egyenlet alapján számítható ki az aktivitás értékek

$$U/ml\text{-re megadva: } Aktivitás \left(\frac{U}{ml} \right) = \frac{(A_{minta} - A_{Enzimvak} - A_{szubsztrátvak}) * V_{reakció} * h}{x * t_{reakció} * V_{minta}}$$

A képletben szereplő jelölések nevét és mértékegységét a **10. táblázat**ban foglaltam össze.

10. táblázat proteáz aktivitás kiszámításához alkalmazott egyenletben használt jelölések és jelentésük

Jel	Jelentés	Mértékegység
$V_{reakció}$	a reakcióelegy térfogata	ml
x	kalibrációs egyenes meredeksége	
$t_{reakció}$	reakció időtartama	perc
V_{minta}	a minta (enzimoldat) térfogata	ml
h	a minta hígítási faktora	

Egy enzimegység (Unit) az az enzimmennyiség, amely 1 perc alatt adott körülmények között (30°C pH 5,8) 1 mM szubsztrátot alakít át/terméket képez. Mértékegysége: U/l.

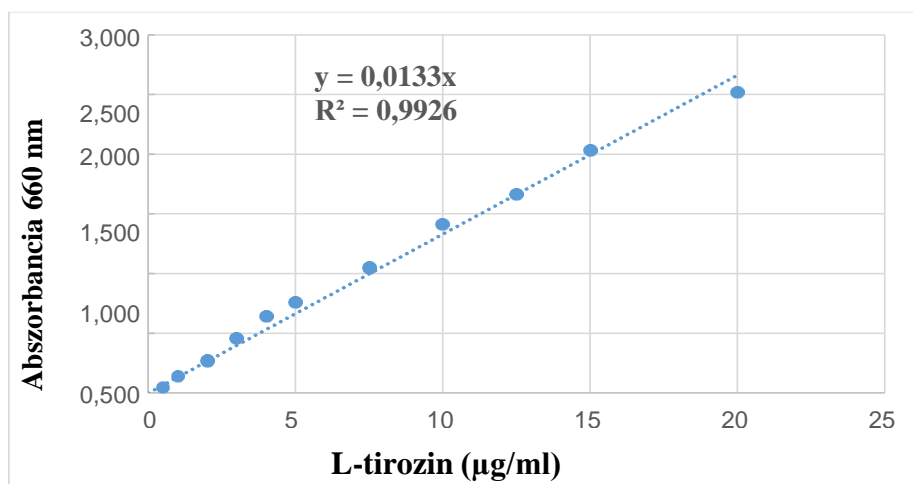


9. ábra Unicam, Hexios α spektrofotométer

A proteáz enzim mennyiség meghatározásához szükséges kalibráció felállításához 1,1 mM L-tirozin törzsoldatot használtam. A törzsoldat hígítását desztillált vízzel végeztem (**11. táblázat**). A hígított mintákhoz Na₂CO₃ oldatot, valamint háromszoros hígítású Folin-Ciocalteu reagenst adtam. Az oldatok abszorbanciáját 660 nm-en, spektrofotometriásan határoztam meg. A koncentrációk függvényében ábrázolt abszorbancia értékekre regressziós egyenest illesztettem (**10. ábra**). A függvény meredekségének ismeretében az enzimaktivitásokat ki tudtam számolni (Tamaskó, 2021).

11. táblázat: Proteáz enzim meghatározásához szükséges kalibrációs elegy összetétele

Koncentráció $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$	1,1 mM L-tirozin (ml)	Desztillált víz (ml)
0	0	1000
5	25	975
10	50	950
20	100	900
30	150	850
40	200	800
50	250	750
75	375	625
100	500	500
125	625	375
150	750	250
200	1000	0



10. ábra Proteáz enzim aktivitás meghatározásához szükséges kalibráció

4.4.4 Screenelés

A törzsszelekció érdekében szkrínelő módszereket végeztem el. Sterilizést követően a folyékony (kb. 40°C) agarral lemezöntést végeztem. A tápközeg megszilárdulását követően agardiffúziós módszerrel határoztam meg a tejsavhasznosítást (0,1% tejsav agaron), illetve a proteolitikus (kazein agaron) és a lipolitikus (módosított Tween 80 agaron) enzimek jelenlétét. Az agardiffúzió során agarlyukasztóval készített zsebekbe pipettával injektáltam be a baktériumtenyészeteket (50 µl). A tápközegben oldott anyagok diffúzió révén bejutnak a baktériumokba, amennyiben képesek a tápközegben oldott anyagokat alkalmazni az életműködésükhöz, feltisztulási zónával vagy a mikroorganizmus növekedésével jelzi. A szkrínelést kettő párhuzamosban végeztem.

4.4.5 PLA-keményítő biokompozit biodegradációja szubmerz körülmények között

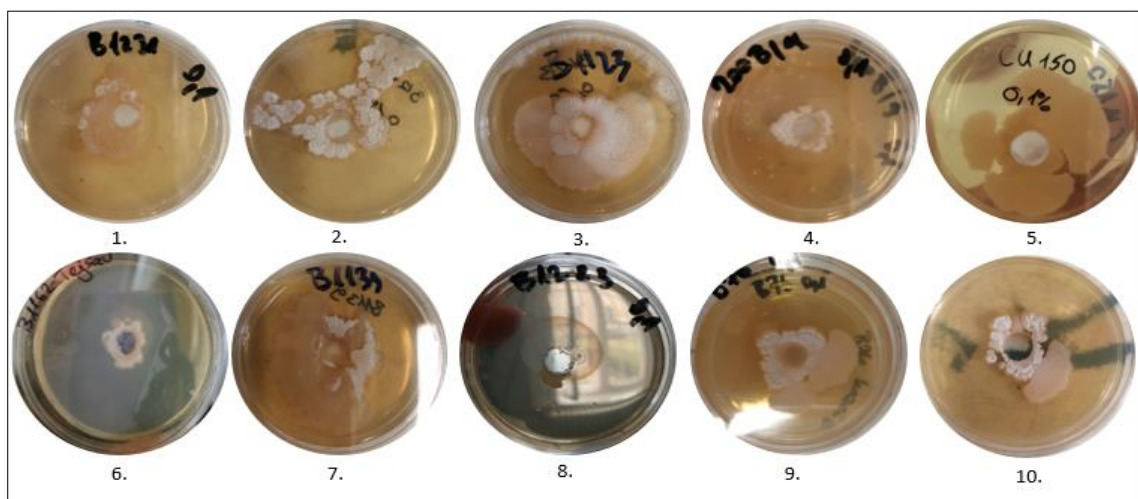
A törzsszelekciót követően a kiválasztott törzsekből 2 párhuzamos vizsgálatot végeztem. A biodegradációhoz 4 különböző tápleveszt alkalmaztam, amelyből háromnak Basal (alap) tápleves volt az alapja a következő kiegészítésekkel: 0,5% glükóz, 0,5% keményítő, 0,1% tejsav, a negyedik táplevesnek a TPY szolgált. Sterilizést követően 100 ml tápleveshez 1 % apróra vágott (kb. 0,1x0,1 cm) és 96%-os etanollal és steril vízzel tisztítva, aszeptikus körülmények között PLA-keményítő biokompozitot adtam. Majd ezek után beoltottam 1 $\frac{V}{V}$ % baktériumtenyészetrel és 30°C és 100 RPM paraméterek beállítása mellett rázóinkubátorba helyeztem őket. Meghatározott időnként 49 napon keresztül mintát vettem pH mérés, enzimaktivitás meghatározás céljából.

5 Eredmények

5.1 Screenelés

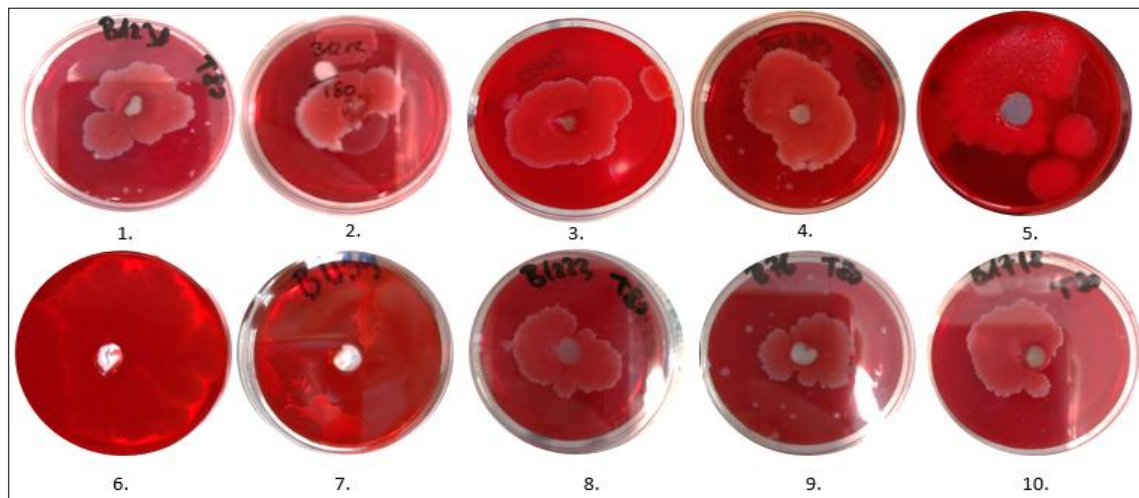
Első lépésben elővizsgálatokat végeztem agardiffúziós módszerrel, hogy meggyőződjem arról, hogy az alkalmazott *Bacillus* és *Rhodococcus* törzsek képesek a tejsavat hasznosítani, illetve rendelkeznek politejsav-depolimeráz (proteolitikus, illetve lipolitikus) enzimaktivitással, amit telepképződéssel, illetve feltisztulási zónával jelezhetnek.

A kísérletben alkalmazott *Bacillus* törzsek a tejsavhasznosítás vizsgálata során az összes alkalmazott baktérium eltérő mértékben, de szaporodott a 0,1% tejsavat tartalmazó alaptápközegen. Az alkalmazott bacillusok a szilárd tápközegen látványos telepképződéssel jelezték, hogy képesek a tejsavat, mint tápanyagot hasznosítani, ez az **11. ábrán** látható.



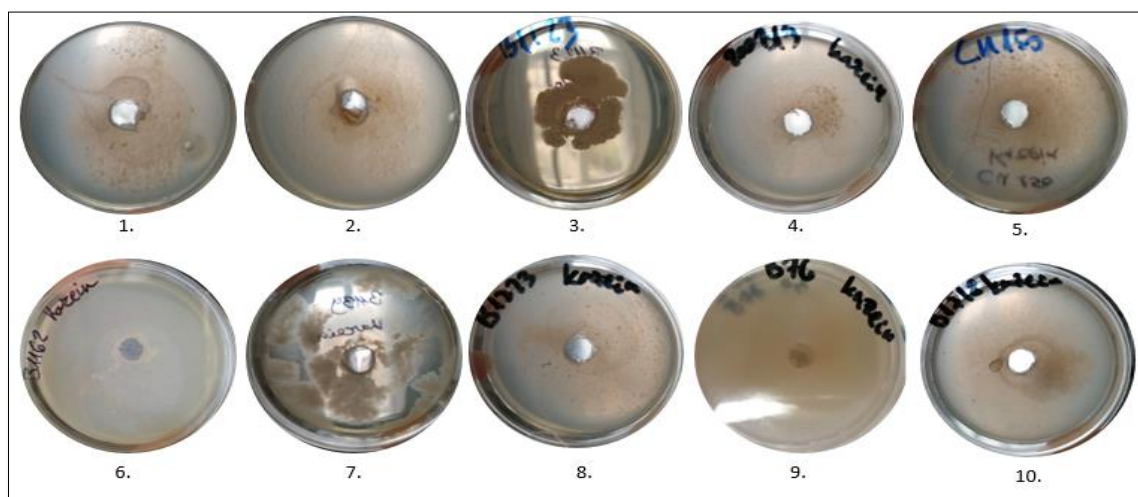
11. ábra: Tejsavhasznosítás vizsgálat 0,1% tejsav agaron *B. licheniformis* B1231 (1.), *B. subtilis* B1212 (2.), *B. coagulans* B1123 (3.), *B. coagulans* 200B/9 (4.), *B. subtilis* CU150 (5.), *B. subtilis* B1162 (6.), *B. coagulans* B1139 (7.), *B. licheniformis* B1223 (8.), *B. cereus* B0076 (9.), *B. cereus* B1718 (10.)

A *B. subtilis* B1212, *B. coagulans* B1123, *B. subtilis* CU150 törzseken észlelt telepképződésekből, arra következtettem, hogy ezek a baktériumtörzsek képesek a leginkább hasznosítani a 0,1%-os tejsavat. A lipolitikus enzimszkrineléses módszer eredménye alapján, a Tween 80 tápagon is eredményesen szaporodtak az alkalmazott *Bacillus* törzsek, ami a **12. ábrán** látható. Az eredményekből arra következtettem, hogy az alkalmazott bacillus törzsek feltehetőleg rendelkeznek lipolitikus enzimaktivitással, mivel a Tween 80 az egy polioxietilén-szorbitán zsírsavészter, amit csak az észteráz enzimkészlettel rendelkező mikroorganizmusok képesek hasznosítani. Megfigyelhető a kapott eredmények alapján a *B. licheniformis* B1231, *B. subtilis* CU150, *B. subtilis* B1162, *B. coagulans* B1139 törzsek mutatták a legintenzívebb telepképződést.



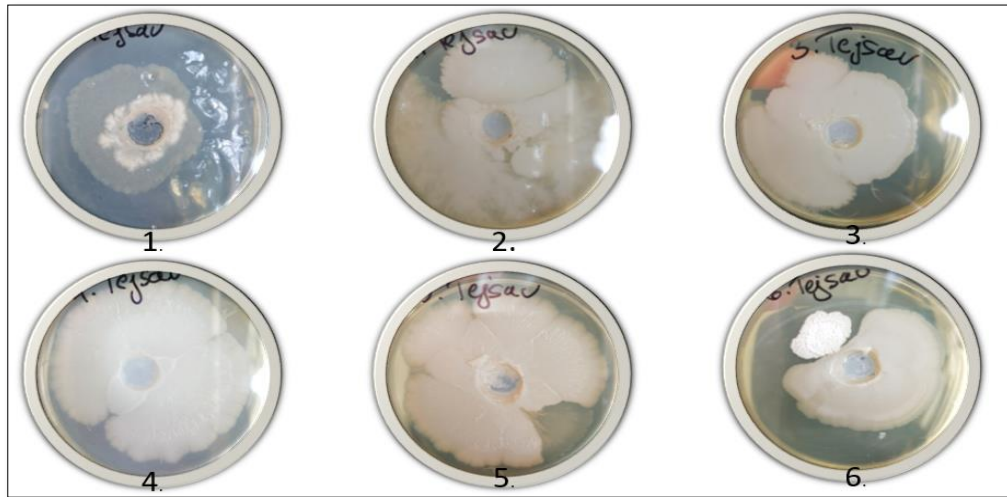
12. ábra: Lipolitikus enzimszkrínélés Tween 80-as agaron *B. licheniformis* B1231 (1.), *B. subtilis* B1212 (2.), *B. coagulans* B1123 (3.), *B. coagulans* 200B/9 (4.), *B. subtilis* CU150 (5.), *B. subtilis* B1162 (6.), *B. coagulans* B1139 (7.), *B. licheniformis* B1223 (8.), *B. cereus* B0076 (9.), *B. cereus* B1718 (10.).

A proteolitikus enzimszkrínélés eltérő eredményeket mutatott. Akkor tekinthetem sikeresnek egy tesztet, ha az feltisztulási zónát mutatott. Ebből arra a konklúzióra jutottam, hogy az alkalmazott bacillusz törzsek feltehetőleg eltérő proteolitikus enzimaktivitással rendelkeznek. Feltisztulási zónát nem tapasztaltam a *B. coagulans* B1123 és a *B. subtilis* B1162-nél. Továbbá megállapítottam, hogy a *B. subtilis* B1212, *B. coagulans* B1123, *B. coagulans* B1139 telepképződése volt az alkalmazott bacilluszok közül a leglátványosabb. Az eredmények a **13. ábrán** láthatóak.



13. ábra: screeneléses vizsgálat kazein agaron *B. licheniformis* B1231 (1.), *B. subtilis* B1212 (2.), *B. coagulans* B1123 (3.), *B. coagulans* 200B/9 (4.), *B. subtilis* CU150 (5.), *B. subtilis* B1162 (6.), *B. coagulans* B1139 (7.), *B. licheniformis* B1223 (8.), *B. cereus* B0076 (9.), *B. cereus* B1718 (10.).

Az alkalmazott *Rhodococcus* törzsek tejsavhasznosítás vizsgálata a *Bacillus* törzseknél alkalmazott módszerrel és szilárd alaptápközegen történt. Az eredmény jól látható az **14. ábrán**, amelyből a telepképződésekből megállapítottam, hogy az összes alkalmazott rhodokokkus kiválóan képes hasznosítani a tejsavat.



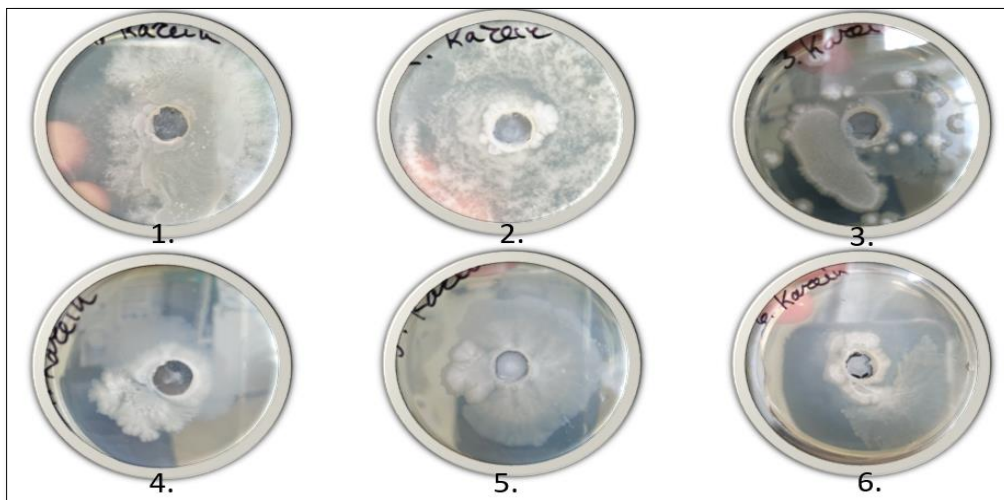
14. ábra: Tejsavhasznosítás vizsgálat 0,1% tejsav agaron *R. erythropolis* B01914 (1.), *R. erythropolis* B01952 (2.), *R. fascians* B01608 (3.), *R. fascians* B01614 (4.), *R. opacus* B01915 (5.), *R. species* B01916 (6.)

A tejsavhasznosítás után megvizsgáltam a rhodokokkus törzsek depolimeráz enzimaktivitását is. Elsőként a lipolitikus enzim szkrínélést végeztem el Tween 80 agaron. Az eredményeket az **15. ábrán** mutatom be, ami a tejsavhasznosításhoz hasonlóan itt is látványos telepképződésekben mutatkozik meg. Ebből kiindulva azt a következtetést tudtam levonni, hogy az összes alkalmazott *Rhodococcus* törzs feltehetőleg rendelkezik lipolitikus enzimaktivitással.



15. ábra: Lipolitikus enzimszkrínélés Tween 80-as agaron *R. erythropolis* B01914 (1.), *R. erythropolis* B01952 (2.), *R. fascians* B01608 (3.), *R. fascians* B01614 (4.), *R. opacus* B01915 (5.), *R. species* B01916 (6.)

Következő lépésben, ahogy a bacilluszoknál, így a rhodokokkuszoknál is elvégeztem a proteolitikus enzimszkrínélést. Az eredményeket az **16. ábrán** mutatom be.



16. ábra: Proteolitikus enzimszkrínélés Tween 80-as agaron *R. erythropolis* B01914 (1.), *R. erythropolis* B01952 (2.), *R. fascians* B01608 (3.), *R. fascians* B01614 (4.), *R. opacus* B01915 (5.), *R. species* B01916 (6.)

Az eredményekből megállapítottam, hogy az alkalmazott *Rhodococcus* törzsek, feltisztulási zónát csak csekély százalékban, de szaporodást eltérő módon mutattak a kazein agaron. Intenzív telepképződés figyelhető meg a *R. erythropolis* B01914 és a *R. erythropolis* B01952 esetén. Ebből azt tudtam megállapítani, hogy a kazeint, mint szubsztrátumot képesek hasznosítani, de azt nem, hogy rendelkeznek proteolitikus enzimmésszel.

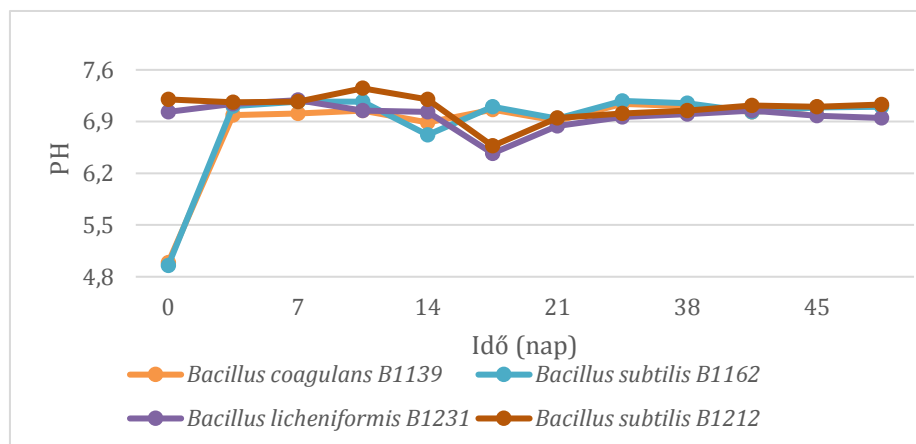
5.2 PLA-keményítő biokompozit biodegradációja szubmerz körülmények között *Bacillus* törzsek alkalmazásával

Az előszelekciós kísérletek eredményének ismeretében kiválasztottam a *Bacillus subtilis* B1162, a *Bacillus coagulans* B1139, a *Bacillus licheniformis* B1231 és a *Bacillus subtilis* B1212 törzset részletes vizsgálatra. A kísérlet során 3 különböző tápközeget alkalmaztam, amelyek alapja egy Basal medium (alaptápleves) volt 3 fajta szénhidrát kiegészítéssel: 0,5% glükózzal, 0,5% keményítővel, 0,1% tejsavval. A reakcióidő 49 napig tartott rázóinkubátorban 100 RPM és 30°C mellett, 2 párhuzamos vizsgálatban.

Ezek mellett megvizsgáltam a PLA biodegradációját *Bacillus* eredetű mikrobiális konzorciumot is alkalmazva, amelyet a *Bacillus subtilis* CU150, *Bacillus coagulans* 200B/9 és a *Bacillus coagulans* B1139 törzsek 1:1:1 arányban alkották. A kísérletet két eltérő tápközegben végeztem, amely az alaptápleves és a TPY szolgált. Ez a biodegradáció is a fentebb említett paraméterek szerint zajlott. A biodegradálás ideje alatt hetente 1 alkalommal mintát vettem, pH és enzimaktivitás meghatározás céljából. A kapott pH eredményeket a napok függvényében tápközeg kiegészítésenként külön a **17-20. ábrákon** szemléltettem.

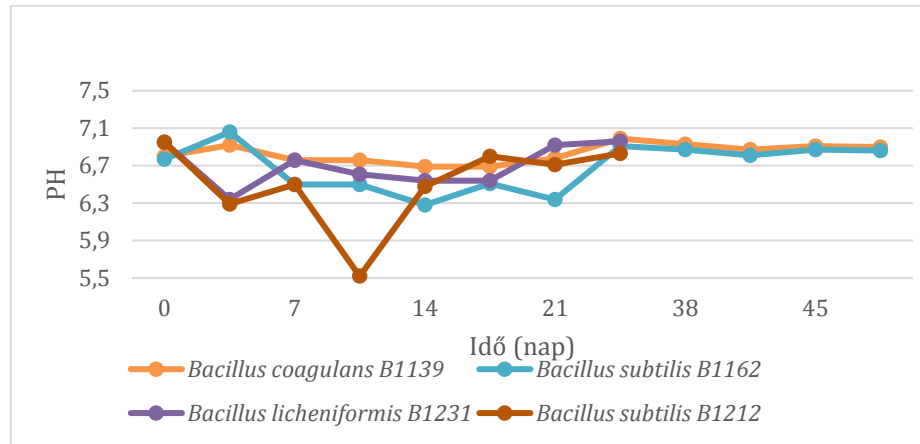
5.2.1 Biodegradáció során tapasztalt pH változás nyomon követése

A munkám során felhasznált *Bacillusok* feltehetőleg felhasználták a tápközegben lévő szerves anyagokat és az anyagcseréjükből kifolyólag történhetett a pH változás diagrammokon szemléltettem. Először a **17. ábrán** a 0,1%-os tejsav kiegészítéses tápközégek láthatóak, ebben az esetben a 3. nap után a pH értékek közel a semleges érték körül mozogtak. Ebből azt a következtetést vontam le, hogy a mikrobiális aktivitás végig egyenletesen zajlott a kísérlet folyamán. Mind a három tápközeg esetében megállapíthatjuk, hogy, a pH szempontjából a *B. coagulans*-nak nem volt optimális a környezet növekedés szempontjából, míg a *B. subtilis* és *B. licheniformis*-nak igen.



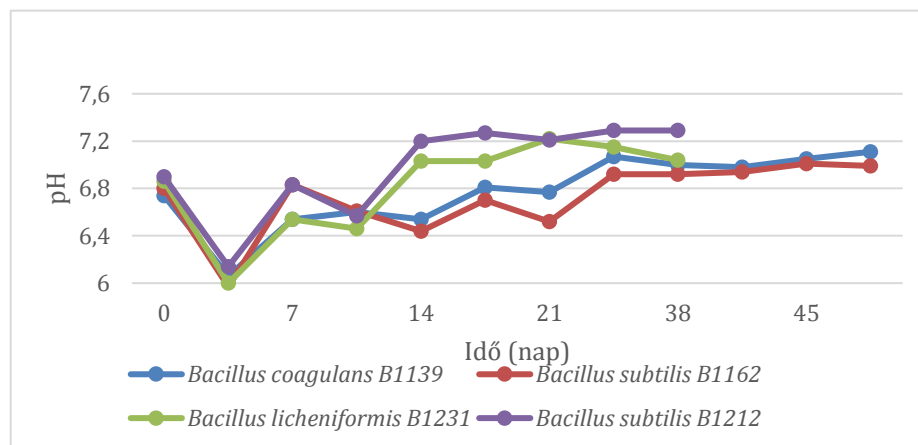
17. ábra: Bacilluszok pH mérés eredményei 0,1%-os tejsavval kiegészített tápközegben

A 0,5% keményítővel kiegészített tápközégek kismértékben ingadozóbb eredményeket mértem. Ebben az esetben a pH értékek 7,06-5,52-ig mozogtak, tehát szélesebb skálán mint a 0,1% tejsavval kiegészített tápközegnél. A legváltozékonyabb törzs a *B. subtilis* B1212 volt, ezt a **18. ábrán** látható. Amelynek a 10. nap körül lecsökkent a pH-ja 5,5 értékre, feltehetőleg másodlagos anyagcseretermékek szintetizálódtak.



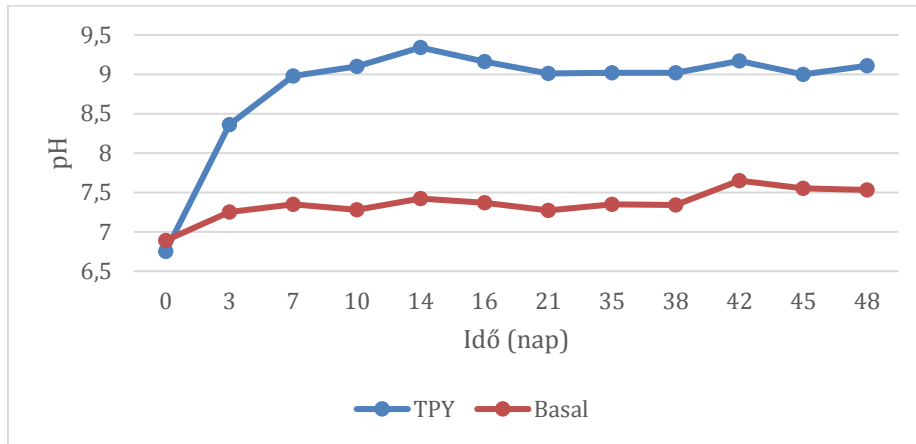
18. ábra Bacilluszok pH mérés eredményei 0,5%-os keményítővel kiegészített tápközegben

A 0,5%-os glükózzal kiegészített tápközegben a bacillusz törzsek pH értékeik, párhuzamosan mozogtak (19. ábra). A 3. napon észrevettem egy nagyobb mértékű csökkenést, ahol feltehetőleg szerves savak képződtek szaporodásuk során, ez későbbiekben eltolódott a semleges érték felé.



19. ábra Bacilluszok pH mérés eredményei 0,5%-os glükózzal kiegészített tápközegben

A konzorciumok (*Bacillus subtilis* CU150, *Bacillus coagulans* 200B/9 és a *Bacillus coagulans* B1139 törzsek 1:1:1 arányban) bontóképeségét kétféle táplevesben vizsgáltam, ezek pH értékeit is nyomon követtem. A TPY tápközegben alkalmazott konzorcium pH értéke a 7. naptól enyhén lúgos értéket vett fel. Az alap tápközegben lévő konzorcium, viszont semleges értékek között mozgott. (20. ábra) Mivel a TPY –t tartalmazó táplevesnek a pH már a 3. napon átlépte a *B. coagulans*ok pH optimumát, így nem feltételezhető ott *B. coagulans* aktivitás.



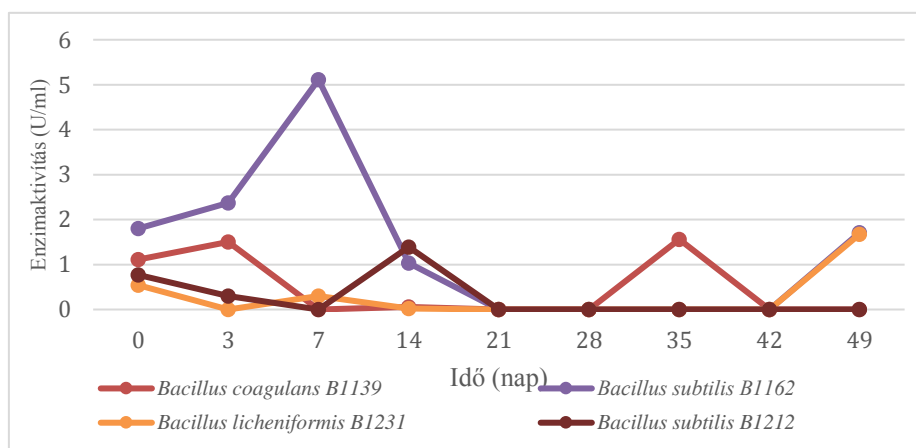
20. ábra Konzorcium pH mérés eredményei

5.2.2 Proteáz enzimaktivitás eredmények

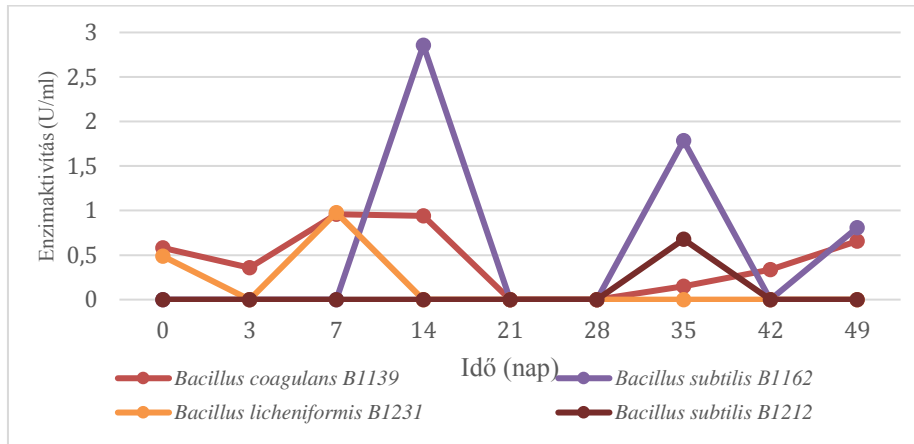
A mintavételezés során enzimaktivitási méréseket is elvégeztem. Ilyen volt a proteáz enzimmennyiségnek a meghatározása is. Az eredményeket külön ábrákon ábrázoltam a tápközegek kiegészítése alapján kapott eredményeket a **21-24. ábrán** prezentálom.

A 0,1%-os tejsavval kiegészített tápközegben lévő bacillusok közül a *B. subtilis* B01162, ami nagyobb proteáz enzimaktivitást mutatott a 7. napon (5,11 U/ml) (**21. ábra**). A három tápközegkiegészítés közül, ez volt a legmagasabb érték.

A **22. ábrán** látható, hogy 0,5%-os keményítővel kiegészített tápközegen a legmagasabb enzimaktivitás $2,86 \frac{U}{ml}$ volt, amit a *B. subtilis* B1212 törzs szintetizált, a 14. napon, majd az enzimmennyiség csökkenésnek indult az idő előrehaladtával, viszont a 35. napra egy újabb enzimaktivitás növekedést mutatott.

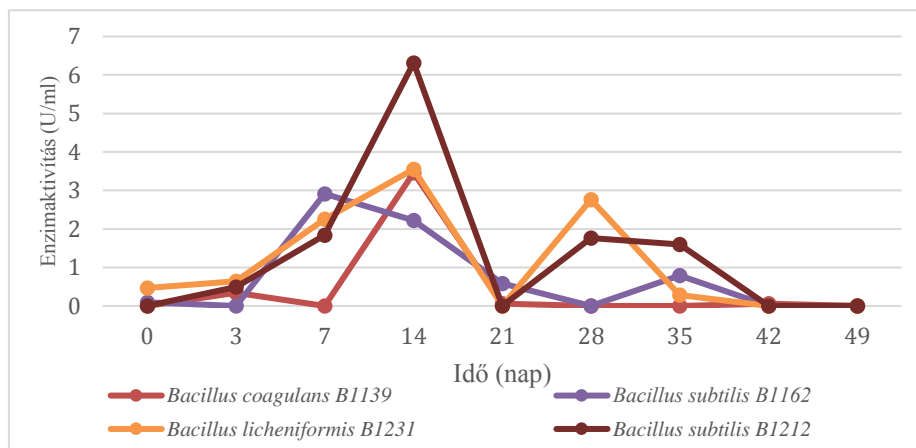


21. ábra: Proteáz enzimaktivitás 0,1%-os tejsavas tápközeg kiegészítéssel.



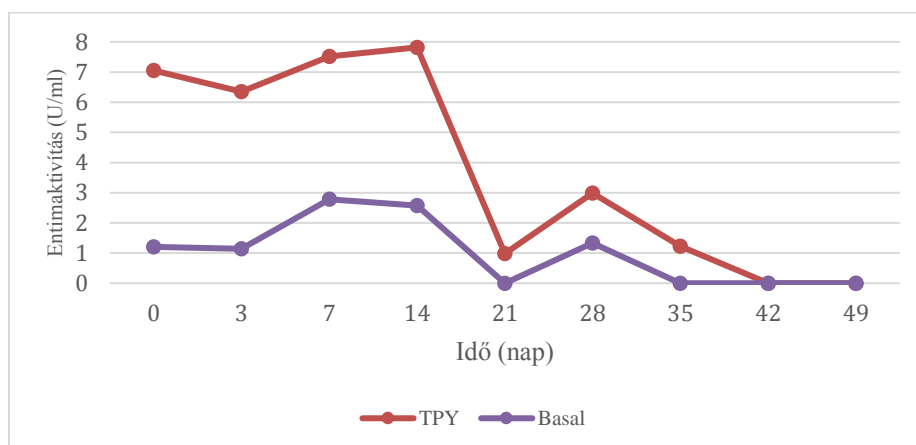
22. ábra: Proteáz enzimaktivitás 0,5%-os keményítővel kiegészített tápközegben.

A 23. ábrán leolvasható hogy mindegyik bacillusz törzs mutatott enzimaktivitást. Az összes törzs szintetizált legalább $2,9 \frac{U}{ml}$ -es mennyiségű proteáz enzimet, ez jellemzően a 7. nap körül történt meg. Megfigyelhető, hogy itt is a *B. subtilis* B1212 szintetizálta a biodegradáció ideje alatt a legnagyobb mennyiségben a proteáz enzimet, ami $6,3 \frac{U}{ml}$ volt.



23. ábra: Proteáz enzimaktivitás 0,5%-os glükózzal kiegészített tápközegben.

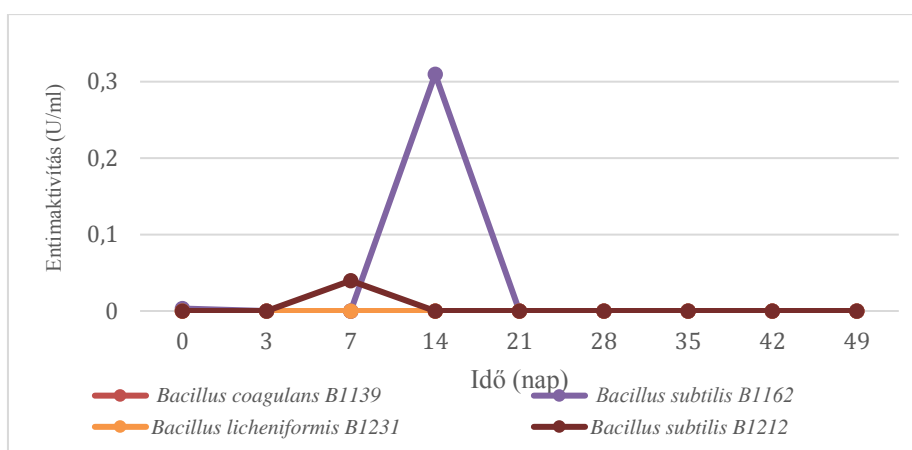
A konzorciumok esetén a két tápközeg közötti enzimaktivitási különbségek jelentősek lettek. A TPY-ben fenntartott konzorciumnak jellemzően sokkal nagyobb volt a proteáz aktivitása, már az első mintavétel után is. A 42 nap után viszont az enzimaktivitás az adott körülmények között teljesen megszűnt mindkét konzorciumnál. A 24. ábrán megfigyelhető, hogy a TPY tápközegben zajló kísérlet során a konzorcium $7,8 \frac{U}{ml}$ proteáz enzimet szintetizált, ami a 14. napra tehető. Az alaptápközegben pedig $2,8 \frac{U}{ml}$ volt a legmagasabb enzimszintézis mennyisége.



24. ábra: Proteáz enzimaktivitás mérés bacillusz konzorcium esetén.

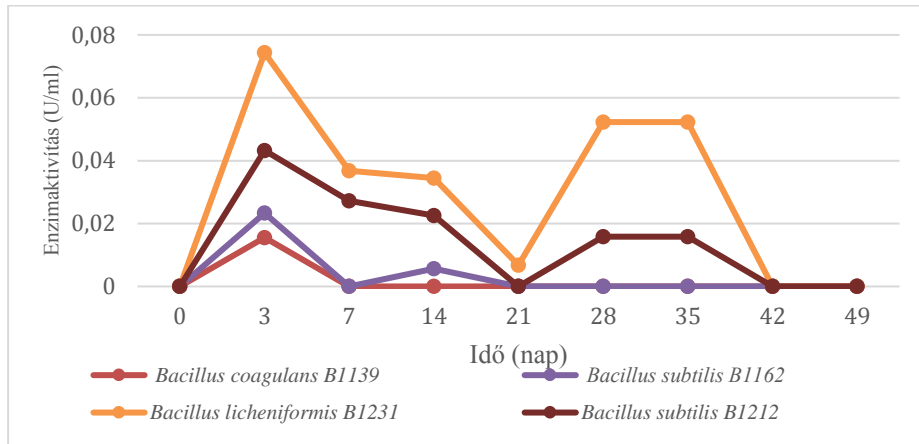
5.2.3 Kutináz enzimaktivitás eredmények

A proteázaktivitás után a kutináz enzimaktivitást is megvizsgáltam. Az eredményeket külön ábrákon ábrázoltam a tápközegek kiegészítése alapján. A bacilluszok a kutináz enzimaktivitás 0,1%-os tejsavval kiegészített tápközegben, nem mutattak magas kutináz aktivitást, egyedül a *B. subtilis* B1162, ami a többi vizsgált bacilluszhoz képest kiemelkedőbb értéket tudott mutatni a 14 napon (0,31 U/ml). A *B. coagulans* B1139 a 7. napon szintén mutatott egy kisebb kiemelkedő értéket 0,04 U/ml-t, a többi törzs viszont végig stagnáló 0 értékeket vettek fel. Mind a három tápleves esetében alacsony enzimaktivitást tapasztaltam, így megállapítható az, hogy a kutináz enzimaktivitást semelyik kiegészítés sem segítette. Az eredményeket a 25. ábrán mutatom be.



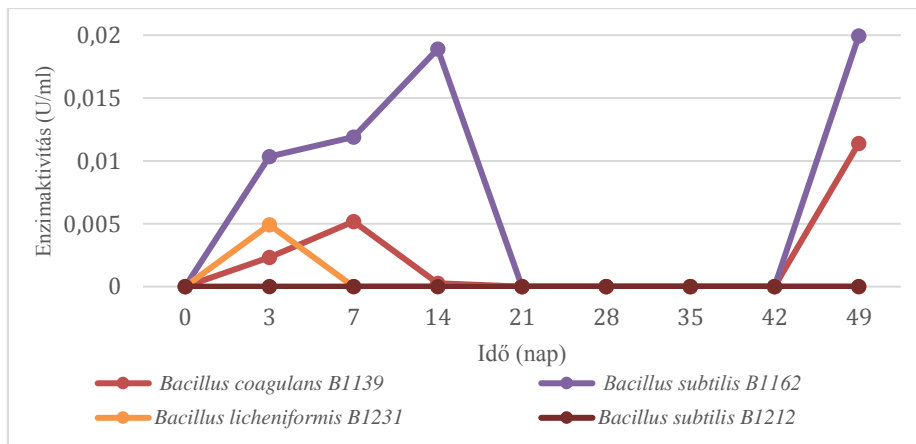
25. ábra: Kutináz enzimaktivitás 0,1%-os tejsavval kiegészített tápközegben

A 0,5%-os keményítővel kiegészített tápközegben az enzimaktivitás szintén alacsony volt. Ebben az esetben a legmagasabb érték mindösszesen a 3. napon 0,0743 U/ml volt, amit a *B. licheniformis* B1231 törzs szintetizált. A *B. licheniformis*hoz hasonló módon, de kisebb léptékben volt a *B. subtilis* B1212 lefutása. (26. ábra)



26. ábra Kutináz enzimaktivitás 0,5%-os keményítővel kiegészített tápközegben

27. ábrán látható, hogy a 0,5%-os glükózzal kiegészített tápközegben a *B. subtilis* B1212 egyáltalán nem tapasztaltunk kutináz enzimaktivitást, míg a többi törzs is inkább csak a kísérlet elején mutatott csekély (*B. licheniformis* B1231: 0,0049 U/ml, *B. coagulans* B1139 0,005 U/ml és *B. subtilis* B1162: 0,019 U/ml.) enzimaktivitást. A 49. napnál a két *B. subtilis* B1162 és a *B. coagulans* B1139 enzimaktivitása megugrott 0,0199 U/ml-re és 0,0114 U/ml-re.



27. ábra: Kutináz enzimaktivitás 0,5%-os glükózzal kiegészített tápközegben

5.2.4 Tömegváltozás nyomon követése

A munkám utolsó lépéseként a biodegradáció leállítása után szűréssel tudtam elválasztani a PLA-keményítő biokompozit darabokat a reakcióközegtől, majd tisztítás után 1 nap szárítást követően a tömegüket analitikai mérlegen megmértem. A mérési eredményeket egy táblázatban foglaltam össze összehasonlításképpen. (12. táblázat)

12. táblázat *Bacillus* törzsek tömegmérésének eredményei

<i>Bacillus</i> törzsek	Kiegészített tápleves	Tömegcsökkenés [g]
<i>Bacillus coagulans</i> B1139	0,1% tejsav	0,02
	0,5% glükóz	0,005
	0,5% keményítő	0
<i>Bacillus subtilis</i> B1162	0,1% tejsav	0
	0,5% glükóz	0,025
	0,5% keményítő	0,005
<i>Bacillus licheniformis</i> B1231	0,1% tejsav	0,045
	0,5% glükóz	0
	0,5% keményítő	0,005
<i>Bacillus subtilis</i> B1212	0,1% tejsav	0,04
	0,5% glükóz	0,005
	0,5% keményítő	0,005
Konzorcium	TPY	0,185
	Basal	0,015

Az 12. táblázatból leolvasható, hogy az egyes *Bacillus* törzsek alkalmazása a különböző táplevesen eltérő tömegváltozást eredményezett. A *B. coagulans* B1139 törzssel 0,1% tejsav kiegészítés mellett 2%-os PLA tömegcsökkenést értem el, míg a keményítő jelenléte nem befolyásolta számottevően a biodegradációt. A *B. subtilis* B1162 törzs alkalmazása 0,5%-os glükóz jelenlétében 2,5%-os PLA tömegcsökkenést eredményezett, viszont a tejsav kiegészítés nem segítette a biodegradáció hatékonyságát. A *B. licheniformis* B1231 alkalmazása 0,1% tejsav tartalmú táplevesben 4,5%-os PLA tömegcsökkenést eredményezett, illetve a *B. subtilis* B1212 törzs esetén szintén a tejsav kiegészíténel figyelhető meg a legnagyobb PLA tömegcsökkenés. A konzorciumok alkalmazása is eltérő eredményt mutatott a tömegváltozás szempontjából. A TPY tápközegben működő *Bacillus* konzorcium 18,5%-os PLA-keményítő biokompozit tömegcsökkenést mutatott, míg ugyanez a konzorcium alaptáplevesben, csak 1,5% volt a tömegcsökkenés.

Megállapítható, ha csak az egy törzsből álló táplevest nézzük, akkor a tejsavas tápközeg kiegészítés, illetve a *B. licheniformis* B1231 alkalmazása a legcélravezetőbb a biodegradálás alkalmazására. A konzorcium esetén pedig a TPY tápleves mutatkozott hatékonyabb tápközegnek.

5.3 PLA-keményítő biokompozit biodegradációja szubmerz körülmények között *Rhodococcus* törzsek alkalmazásával

Az előszelekciós kísérletek a tejsavhasznosítás és depolimeráz enzimmészlet szkrínelés eredményének ismeretében mind a hat törzset kiválasztottam részletes vizsgálatra. A kísérlet során 3 különböző tápközeg alkalmaztam, amelyek alapja egy basal medium (alaptápleves) volt 3 fajta szénhidrát kiegészítéssel: 0,5% glükózzal, 0,5% keményítővel, 0,1% tejsavval.

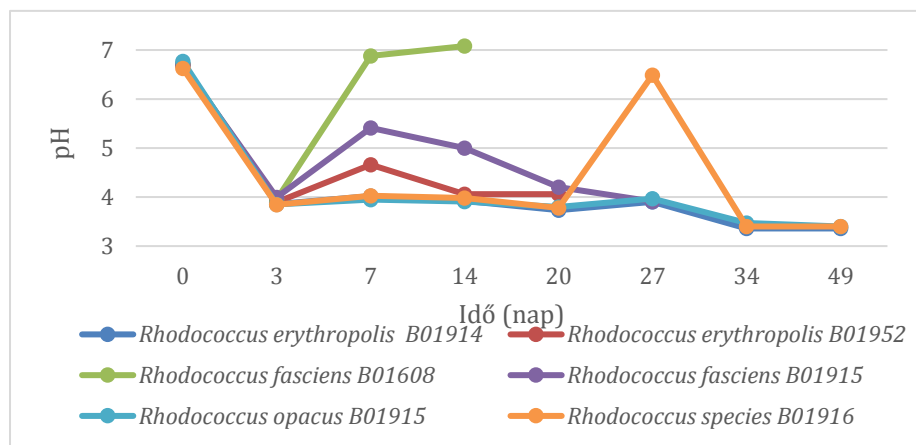
Továbbá kettő darab, két törzsből álló konzorciumot is készítettem alap (basal medium) táplevesben, mely a *R. erythropolis* B1914 és a B1952-t, míg a másik a *R. fascians* B1608 és a B1614-et tartalmazta. A reakcióidő 49 napig tartott rázóinkubátorban 100 RPM és 30°C mellett, 2 párhuzamos vizsgálatban.

A biodegradálás ideje alatt hetente 1 alkalommal mintát vettem, pH és enzimaktivitás meghatározás céljából. A kapott pH eredményeket a napok függvényében tápközeg kiegészítésenként külön a **28-31 ábrákon** szemléltettem.

A glükózzal kiegészített táplevesek közül a *Rhodococcus fasciens* B01915 a 7. napon, míg a *Rhodococcus fasciens* B01608 a 14. napon befertőződött, így azokkal befejeztem a vizsgálatot.

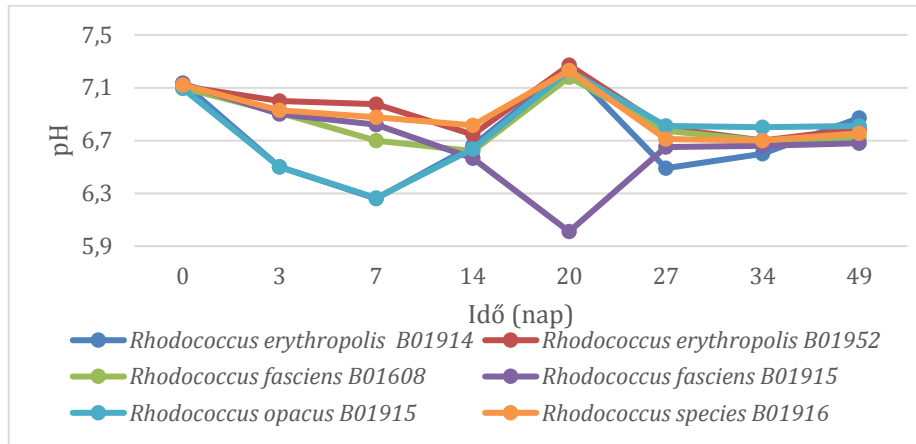
5.3.1 Biodegradáció során tapasztalt pH változás nyomon követése

A bacilluszokhoz hasonlóképpen végeztem el a kísérletet és a kiértékelést is egyaránt. A **28. ábrán** megfigyelhető, hogy az összes *Rhodococcus* törzssel beoltott tápleves kezdeti kémhatása közel semleges pH-jú. A 7. npra savas tartományba kerültek.



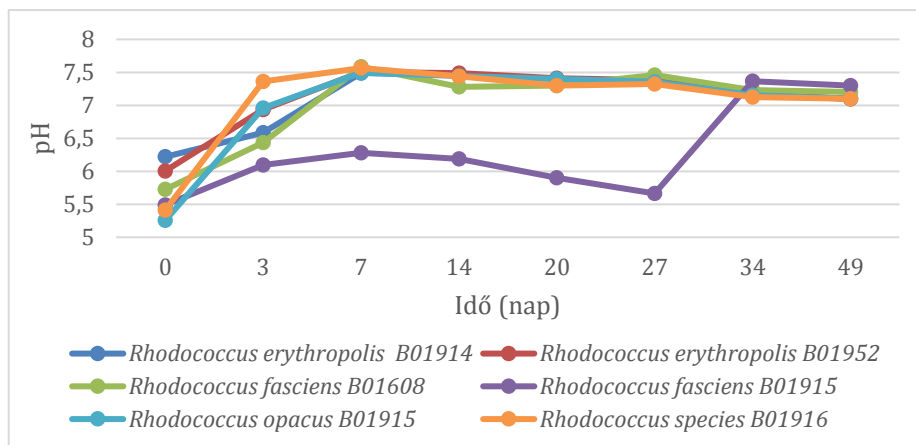
28. ábra A rhodokokkusz törzsek pH mérési eredményi 0,5%-os glükózzal kiegészített táplevesben

A pH mérés eredményei 0,5%-os keményítővel kiegészített tápközeg esetében megfigyelhetjük, hogy a kiindulási pH közel azonosak voltak. A rhodokokkusz törzsek kémhatása csökkenő tendenciát mutattak az idő előrehaladtával. A 20. napon a legtöbb törzs kémhatása emelkedett, míg a *R. fasciens* B01915 kémhatása tovább csökkent. (pH 6). (**29. ábra**)



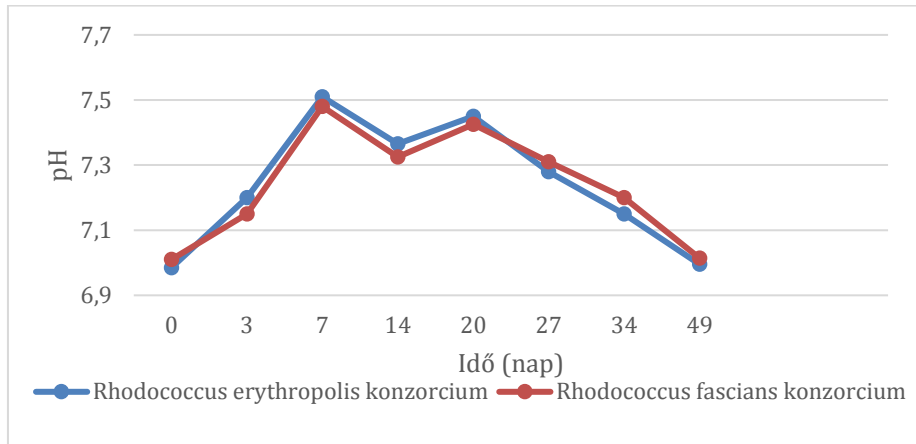
29. ábra A *Rhodococcus* törzsek pH mérési eredményi 0,5%-os keményítővel kiegészített táplevesben

A **30. ábráról** leolvasható, hogy a kiindulási pH eredmények kis mértékben, eltértek egymástól, de a 7. nap után a 7,5-ös érték körül mozogtak. Egyedüli kivételnek a *R. fasciens* B01915 volt, 5,41-7,365-es pH értékeket vett fel.



30. ábra A *Rhodococcus* törzsek pH mérési eredményi 0,1%-os tejsavval kiegészített táplevesben

A **31. ábráról** leolvasható, hogy a két konzorcium párhuzamosan vették fel az idő elteltével a pH értékeket a *R. erythropolis* konzorcium átlagosan 0,0363-al volt magasabb a 27. napig.

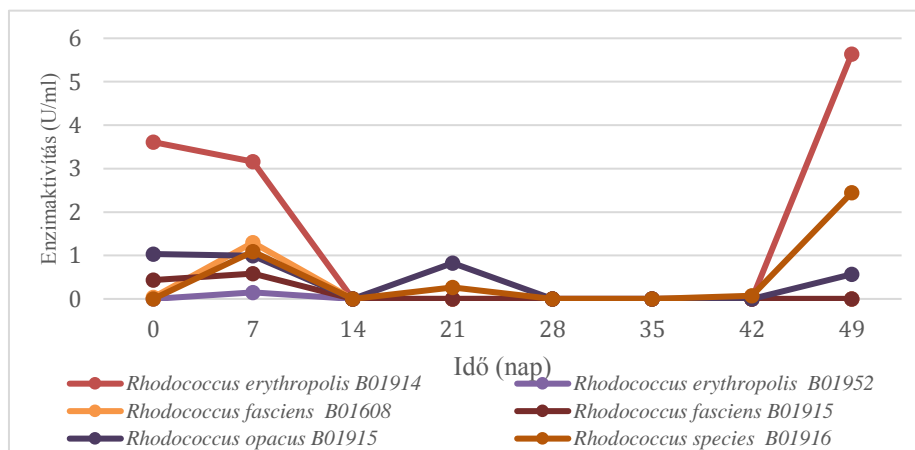


31. ábra *Rhodococcus* konzorciumok pH mérés eredményei

5.3.2 Enzimaktivitás mérése rhodokokkusznál

5.3.3 Proteáz enzimaktivitás eredmények

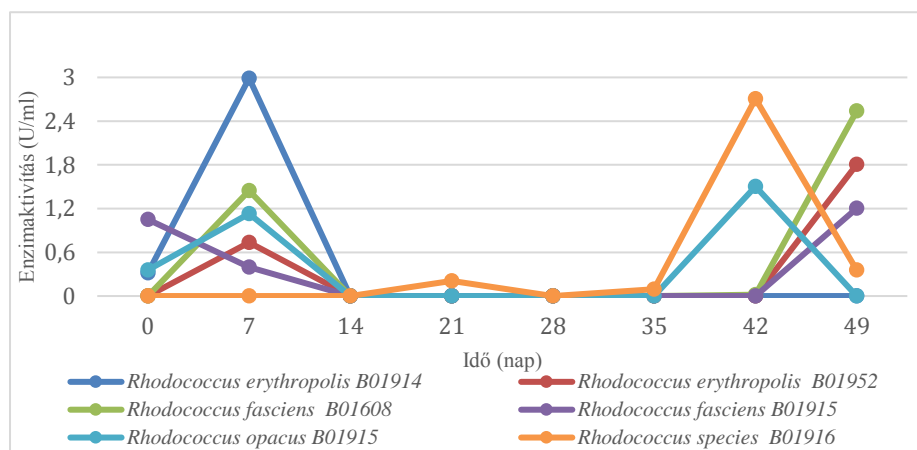
A rhodokokkusztörzsekénél is elvégeztem az enzimaktivitás vizsgálatot a bacillusokéhoz hasonlóan. Az eredményeket a 32-35. ábrán ábrázoltam. A 32-es ábráról leolvasható, hogy 0,5% glükóz tartalmú alaptápközegben a 49. nap *R. fascians* B01915 kivételével a vizsgált törzsek enzimaktivitása megugrott *R. opacus* B01915 0,564 $\frac{U}{ml}$, *R. species* B01916 2,444 $\frac{U}{ml}$ és a legnagyobb proteáz enzimaktivitással rendelkező törzs a *R. erythropolis* B01914 volt 5,639 $\frac{U}{ml}$ (szintén a 49. napon).



32. ábra Proteáz enzimaktivitás mérés *Rhodococcus* törzseknél 0,5%-os glükózos tápközeg kiegészítéssel

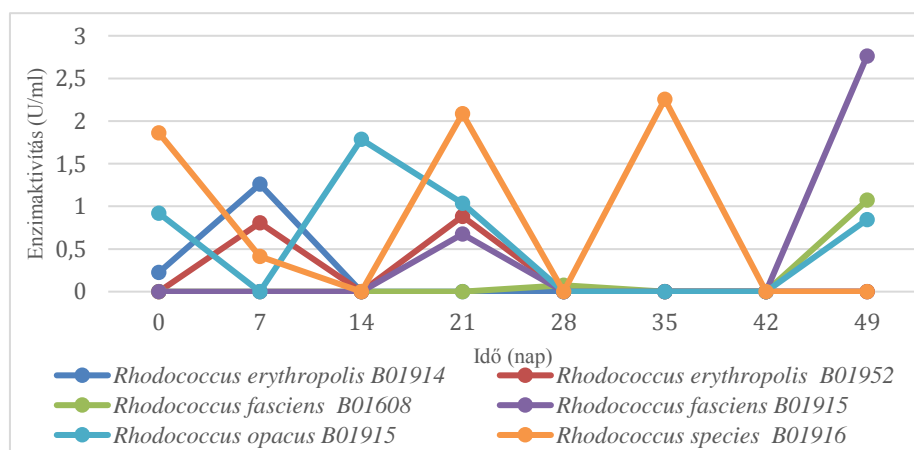
A 0,5%-os keményítővel kiegészített alaptápközegen vizsgált rhodokokkusztörzsek proteáz aktivitás mérése során megállapítható, hogy a vizsgált törzsek a 7. és a 49. napon a *R. fascians* B01915 kivételével egy kiugró értéket vettek fel. A legmagasabb értéket ebben az esetben is a *R. erythropolis* B01914 mutatta a 7. napon 2,989 $\frac{U}{ml}$ -t. A 14-35. napon az enzimaktivitás

stagnáló volt, ami a 42. és 49. napon megugrott. A 42. napon a *R. species* B01916 $2,7 \frac{U}{ml}$ enzimaktivitást mutatott. (33. ábra)



33. ábra Proteáz enzimaktivitás mérés *Rhodococcus* törzseknél 0,5%-os keményítős tápközeg kiegészítéssel

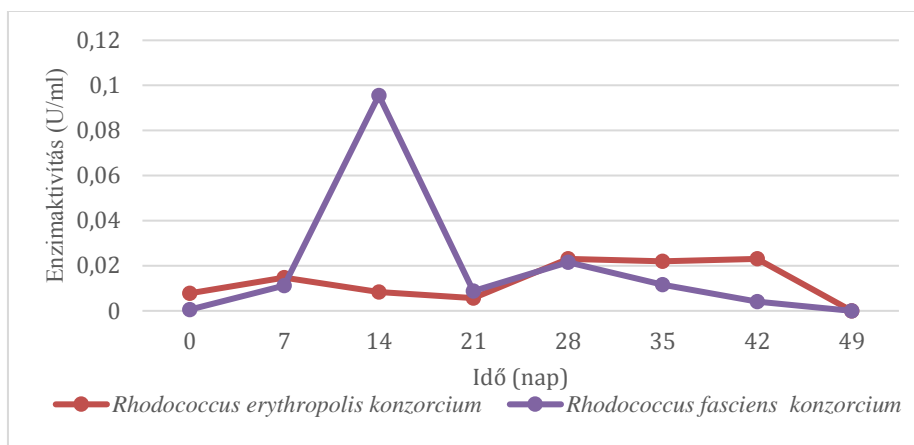
A 34. ábráról leolvasható, hogy mindegyik rhodokokkus törzs mutatott proteáz enzimaktivitást a 0,1%-os tejsavval kiegészített tápközegben. A legnagyobb aktivitási értéket a *R. fasciens* B01915 mutatta 2,76 U/ml a 49. napon. A mérés során sorozatosan a legkisebb proteáz aktivitást pedig a *R. fasciens* B01608 vette fel.



34. ábra Proteáz enzimaktivitás mérés *Rhodococcus* törzseknél 0,1%-os tejsavas tápközeg kiegészítéssel

A konzorciumok proteáz aktivitása a 35. ábrán látható. A *R. fasciens* konzorcium a 14. napon egy kiugró értéket vett fel, ami 0,096 U/ml, a 21. naptól pedig mindkét konzorcium 0-0,023

U/ml közötti értékeket vettek fel. A *R. erythropolis* konzorcium legmagasabb aktivitása a 42. napon volt 0,023 U/ml.

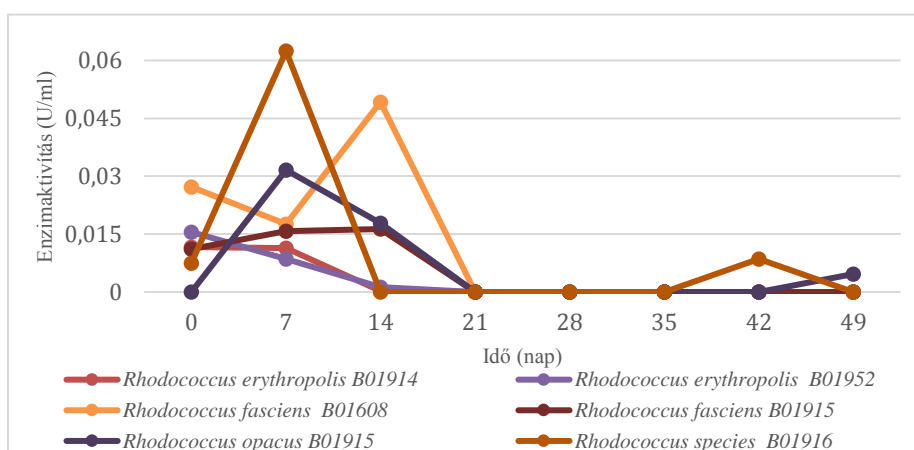


35. ábra: 41. ábra: a *Rhodococcus* konzorciumok proteáz enzimaktivitás eredményei

5.3.4 Kutináz enzimaktivitás eredmények

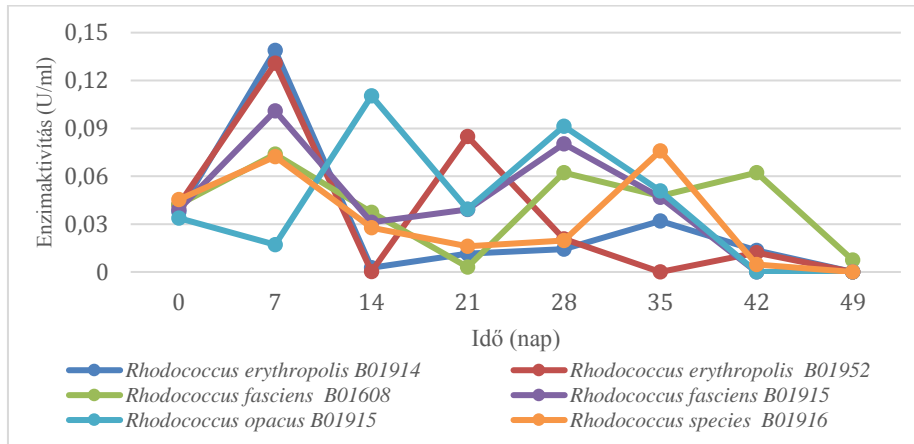
A proteázaktivitás után a kutináz enzimaktivitást is megvizsgáltam. Az eredményeket külön ábrákon ábrázoltam a tápközegek kiegészítése alapján ezeket a **36-39 ábrán** mutatom be.

A kutináz enzim aktivitás a 0,5%-os glükózzal kiegészített tápközegben a rhodokokkusok esetében nem mutatott nagy értékeket. A legkiemelkedőbb enzimmennyiséget a *R. species* B01916 tapasztaltam, ami 0,0624 U/ml mutatkozott a 7. napon. A 21. naptól pedig az alkalmazott törzsek enzimaktivitási értéke stagnált. (36. ábra)



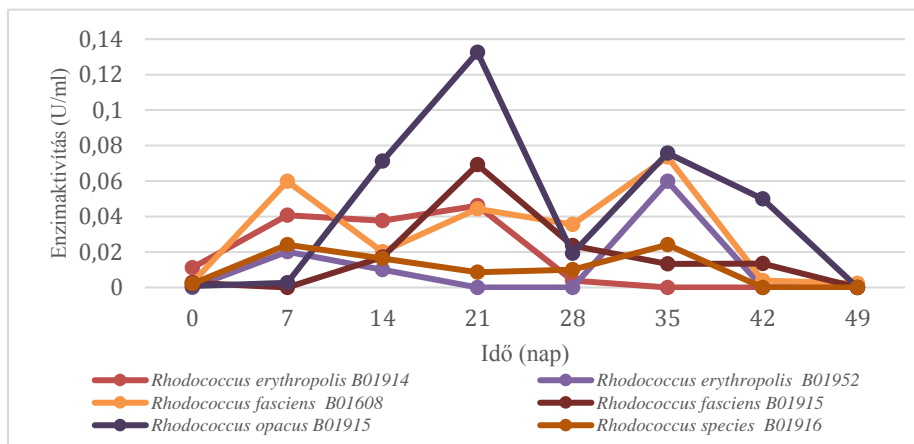
36. ábra Kutináz enzimaktivitás rhodokokkus törzseknél 0,5%-os glükózzal kiegészített tápközegben

A **37. ábrán** a 0,5%-os keményítővel kiegészített tápközeg alkalmazásánál az kutináz aktivitást minden mintavételezésnél megfigyeltem. Ebben az esetben a *R. erythropolis* B01914 mutatta a legnagyobb enzimmennyiséget a 7. napon, ami 0,14 U/ml tehető.



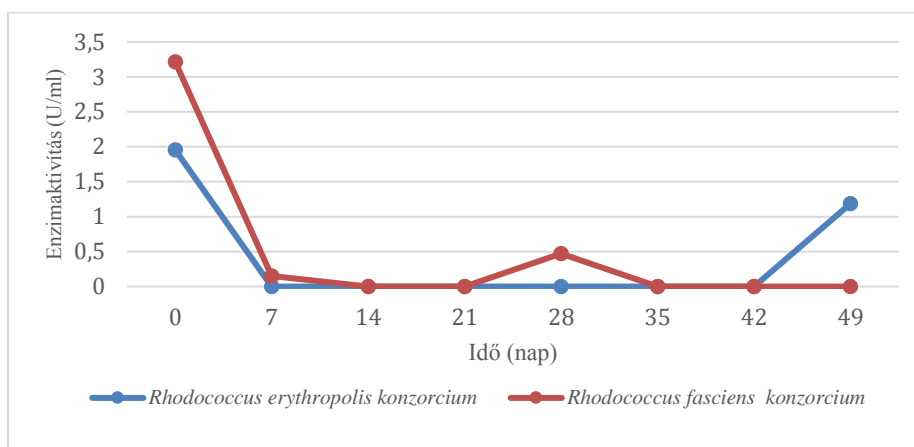
37. ábra Kutináz enzimaktivitás rhodokokkus törzseknél 0,5%-os keményítővel kiegészített tápközegben

A 0,1%-os tejsavval kiegészített tápközegben is alacsony kutináz aktivitást mutattak a *Rhodococcus* törzsek. A legkiemelkedőbb a *R. opacus* B01915 lett, ami a 21. napon 0,133 U/ml enzimaktivitást mutatott. Az enzimaktivitási értékek végig ingadozóak voltak 0-0,076 U/ml között vették fel a törzsek az értékeiket (**38. ábra**).



38. ábra Kutináz enzimaktivitás *Rhodococcus* törzseknél 0,1%-os tejsavval kiegészített tápközegben

A konzorciumok kutináz aktivitása a **39. ábrán** látható, hogy mind a *R. fasciens* (3,214 U/ml) és a *R. erythropolis* konzorcium (1,955 U/ml) magas enzimaktivitási értékkel indítottak a 0. napon. A 7. nap után viszont az értékek leestek 0-ra és csak a 28. napon volt a *R. fasciens* konzorciumnál egy kisebb mértékű aktivitás 0,47 U/ml, míg a *R. erythropolis* konzorcium esetében a 49. napon volt egy ugrásszerű emelkedés 1,184 U/ml.



39. ábra a *Rhodococcus* konzorciumok kutináz enzimaktivitás eredményei

5.3.5 Tömegmérés

A biodegradáció leállítását követően a bacilluszoknál alkalmazott módon végeztem el a tömegmérést. A mérési eredményeket egy táblázatban (**13. táblázat**) foglaltam össze. A rhodokokkusok közül 3 törzs mindkét párhuzamosa befertőződött, így releváns bontási tevékenységet nem tudtam megállapítani róluk. Leolvasható, hogy az egyes *Rhodococcus* törzsek alkalmazása a különböző táplevesben eltérő tömegváltozást eredményezett. A *Rhodococcus erythropolis* B1914 törzs esetében 0,5% glükóz kiegészítés mellett 5%-os PLA tömegcsökkenést értem el, míg a tejsav és a keményítő jelenléte nem befolyásolta számottevően a biodegradációt. A *R. erythropolis* B1952 törzs alkalmazása során a 0,1%-os tejsav jelenlétében 1,5%-os PLA tömegcsökkenést eredményezett, viszont a keményítő kiegészítés nem segítette a biodegradáció hatékonyságát. A *R. fasciens* B1608 alkalmazása 0,1% tejsav és 0,5% keményítő tartalmú táplevesben 0,5%-os PLA tömegcsökkenést eredményezett. *R. fasciens* B1614 esetében semelyik tápközeg esetében nem tapasztaltam PLA tömegcsökkenést. *R. opacus* B1915 esetében a 0,1%-os tejsav jelenlétében 4,5%-os, míg a glükóz jelenlétében 6%-os PLA tömegcsökkenést tapasztaltam a keményítő nem befolyásolta a biodegradációt. A *R. species* B1916 esetében csak a 0,5%-os keményítő jelenlétében mutatott 2% tömegcsökkenést. A konzorciumok esetében a *R. erythropolis* konzorciumnál tapasztaltam 1,5%-os tömegcsökkenést.

13. táblázat rhodokokkuszok tömegmérésének eredményei

Rhodokokkuszok	Kiegészítés	Különbség átlag (g)
<i>R. erythropolis</i> B1914	0,1% tejsav	0
	0,5% glükóz	0,05
	0,5% keményítő	0
<i>R. erythropolis</i> B1952	0,1% tejsav	0,015
	0,5% glükóz	befertözött
	0,5% keményítő	0
<i>R. fasciens</i> B1608	0,1% tejsav	0,005
	0,5% glükóz	befertözött
	0,5% keményítő	0,005
<i>R. fasciens</i> B1614	0,1% tejsav	0
	0,5% glükóz	befertözött
	0,5% keményítő	0
<i>R. opacus</i> B1915	0,1% tejsav	0,045
	0,5% glükóz	0,06
	0,5% keményítő	0
<i>R. species</i> B1916	0,1% tejsav	0
	0,5% glükóz	0
	0,5% keményítő	0,02
Konzorcium	<i>R. erythropolis</i> konzorcium	0,015
	<i>R. fasciens</i> konzorcium	0

Az eredmények alapján megállapítható, ha csak az egy törzsből álló rendszert nézzük, akkor a tejsavas tápközeg kiegészítés, illetve a *Rhodococcus opacus* B1915 alkalmazása a legcélravezetőbb, míg konzorciumok esetében a *R. erythropolis* konzorcium bizonyult a jobb biodegradálás alkalmazására.

6 Összefoglalás

A kutatómunkám során célul tűztem ki, hogy olyan baktérium törzset vagy konzorciumot találjak, mely képes a PLA-t bontani. Továbbá olyan tápközeget vagy annak további kiegészítését találjak, mely további kutatások során segítséget nyújthatnak a megfelelő körülmények kialakítására a biodegradációért. Ezeken felül célul tűztem ki, hogy a kiválasztott baktérium törzsekről megállapítsam, hogy rendelkeznek-e politejsav-depolimeráz (proteolitikus, illetve lipolitikus) enzimaktivitással, illetve a depolimeráz enzimmennyiségének meghatározását.

A munkám során megállapítottam, hogy ha csak az egy törzsből álló táplevest vizsgálunk, akkor az alkalmazott törzsek közül a *Bacillus licheniformis* B1231 és a *Rhodococcus opacus* B1915 a legalkalmasabb. Mindkét esetben megfelelő tápközeg kiegészítésnek bizonyult a 0,1%-os tejsav. A két kiemelt törzs esetében a 0,1%-os tejsav kiegészítéssel 4,5%-os PLA tömegcsökkenést, eredményezett, az előbbi törzs ezt a biodegradálást 69 nap alatt, míg az utóbbi 63 nap alatt végezte el.

A *R. opacus* B1915 esetében még eredményesebbnek bizonyult a 0,5%-os glükóz kiegészítéses tápleves ez esetben 6%-os PLA termékcsökkenést eredményezett szintén 63 nap lefolyása alatt.

Bacillus licheniformis B1231 esetében a 0,1% tejsavval kiegészített tápközeg pH vizsgálata során a pH értékek 6,47-7,2 körül mozgott. Az előbb említett tápközegben kutináz enzimaktivitást nem tapasztaltam és a legmagasabb proteáz aktivitása is igen alacsonynak bizonyult a 49. napon emelkedett meg 1,673 U/ml-re. *R. opacus* B1915 0,5% glükózzal kiegészített táplevesben a pH értékei 6,625-3,395-között mozgott. Az enzimaktivitás legmagasabb értékei kutináz esetében 0,0179 U/ml, míg a proteáz aktivitás esetében $1,504 \frac{U}{ml}$ volt.

A konzorcium vizsgálata esetében, melyet a *Bacillus subtilis* CU150, *Bacillus coagulans* 200B/9 és a *Bacillus coagulans* B1139 törzsek alkották a TPY tápközegben működő *Bacillus* konzorcium 18,5%-os, míg ugyanez a konzorcium alaptáplevesben (Basal medium) csak 1,5% volt a tömegcsökkenés mutatott 69 nap alatt. A *Rhodococcus* konzorciumoknál a *R. erythropolis* konzorcium volt egyedül, mely mutatott tömegcsökkenést (1,5%-ot). A konzorciumok pH mérési eredményei alapján a TPY tápközegben fenntartott konzorcium pH értéke a 7. naptól 9-es tehát enyhén lúgos értéket vett fel. A pH értékei 6,89-9,16 között mozgott. Az enzimaktivitás legmagasabb értékei kutináz esetében 0,17 U/ml, míg a proteáz aktivitás esetében $7,82 \frac{U}{ml}$ volt.

Az eredményeimet figyelembe véve úgy vélem, hogy a kutatómunkám sikeresnek bizonyult. Azon kívül, hogy sok törzs nem mutatott a PLA biodegradálhatóságban aktivitást, még is sikerült egy konzorciumot összeállítanom, mely 63 nap alatt 18,55%-os PLA tömegcsökkenést eredményezett. További kutatási célból a további konzorciumokat állítanék össze és őket TPY táplevesben vizsgálnám. Továbbá a *Bacillus subtilis* CU150, *Bacillus coagulans* 200B/9 és a *Bacillus coagulans* B1139 törzseket tartalmazó konzorciummal megismételném a kísérletet és különböző tápközeg kiegészítésekkel és rázatógépen kívül is megvizsgálnám a PLA biodegradálhatósági aktivitást.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném megköszönni a témavezetőmnek, Kilin Ákosnak a munkámban nyújtott sok segítséget és tanácsokat.

Köszönöm a Piringer Kft-nek az alapanyagul szolgáló PLA evőeszközöket és a törzseket az NCAIM Budapestnek.

Köszönöm az intézet vezetőségének, hogy helyszínt, eszközöket és alapanyagokat is biztosítottak a kutatásom elvégzéséhez.

7 Irodalomjegyzék

Alvarez, H. (2010): Biology of *Rhodococcus*.. *Springer Science & Business Media*, 231-256 o.

Ashter, A. S. (2016): Types of biodegradable polymers.. *Introduction to Bioplastics*, 82-92(DOI: 10.1016/b978-0-323-39396-6.00005-1), 114-117 o.

Bahl, S., Dolma, J., Singh, J. J. & Sehgal, S. (2020): Biodegradation of plastics: A state of the art review. *Materials Today: Proceedings*, 39: 31-34.

Bódi M. (2008): *A mikroorganizmusok felosztása, a mikroorganizmusok életjelenségei*. Budapest: Nemzeti Szakképzési és Felnőttképzési Intézet.

Bodnár I. (2002): *Potenciálisan biodegradábilis, politejsav bázisú*, Debrecen

Bognár I. (1999): *Biodegradábilis uretánok szintézise*. Veszprém: ismeretlen szerző

Borbély E., Vágó K. (1992): *Műanyagok fizikája és kémiája, műanyagok feldolgozása*.. Budapest: KMF Sokszorosító.

Borsodi A., Felföldi T., Jáger K., Makk J., Márialigeti K., Romsics Cs., Tóth E., Bánfi R., Pohner Zs., Vajna B. (2013): *Bevezetés a prokarióták világába*. hely nélkül.: Eötvös Loránd Tudományegyetem. <https://tk.elte.hu/dstore/document/854/book.pdf>

Castro-Aguirre, E., Iniguez-franco F., Samsudin, H., fang X., Auras R. (2016): Poly(lactic acid)—Mass production, processing, industrial applications, and end of life. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 335-338 o.

Castro-ochoa, D., Pena-Montes C., Gonzalez-Canto A., Alva- Gasca, A., Esquivel-Bautista, R., Navarro-Ocana A., Farré A. (2012): AN CUT2, an Extracellular Cutinase from *Aspergillus*. *Springer Science+Business Media*, 166: 1275-1290.

Chen, S., Su, L., Chen, J. & Wu, J. (2013): Cutinase: Characteristics, preparation, and application. *Biotechnology Advances*, 8(31): 1754-1767.

Czvikoszky , T., Nagy, P. & Gaál , J., (2007): *A polimertechnika alapjai*, hely nélkül.: Kempelen Farkas Hallgatói Információs Központ.

Czvikovszky T., Nagy P., Gaál J., (2007): *A polimertechnika alapjai*. hely nélkül.:Kempelen Farkas Hallgatói Információs Központ.

Datta, R., Henry, M. (2006): Lactic acid: recent advances in products, processes and

technologies— a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1119-1129 o.

Deák T., Kiskó G. M. A., Mohácsiné F. C. (2006): *Élelmiszer-mikrobiológia*. hely nélkül.:Mezőgazda Kiadó.

Dernovics M. (2020): *Analitika biomérnököknek*. Budapest

Ficai, D., Grumezescu , A. M. (2017): *Biopolymer Composites in Electronics*. Amsterdam: Elsevier.

Ghalia, M. A., Dahman, Y. (2017): Biodegradable poly(lactic acid)-based scaffolds: synthesis and biomedical applications. *Journal of Polymer Research*, 4-5 o. DOI: 10.1007/s10965-017-1227-2.

Goethals, K., Vereecke D., Jaziri M., Montagu, M.V., Holsters M. (2001): *Leafy Gall Formation by Rhodococcus fascians*, 39:27-5.

Halász K. (2014): Montmorillonit nanolemez, valamint cellulóz mikro- és nanokristály erősítőanyagok hatása a politejsavmátrix tulajdonságaira. 135 o.

Ikada, Y. & Tsuji, H. (2000): Biodegradable polyesters for medical and ecological applications. *Macromolecular Rapid Communications*, 117-132 o.

Jong, E., Sanford, C., (2016): Food poisoning: toxic syndromes. In: *The travel and tropical medicine manual* :Elsevier, 469 o.

Kovács L., Csupor D., Lente G., Gunda, T. (2017): *Száz kémiai mítosz*. Budapest: Akadémiai kiadó.

KyuShin, S., JinKo, Y., EunHyeon, J. & Sung, O. (2019): *Studies of advanced lignin valorization based on various types of lignolytic enzymes and microbes*

Leberton, L., Slat, B., Ferrari, F., Sainte Rose, B., Aitken, J., Marthouse , R., . . . Reisser, J. (2018): *Evidence that the Great Pacific Garbage Patch is rapidly accumulating plastic*. Scientific Reports, 8.

Lívius W., Szarka, A. (2014): *A biokémia alapjai*. Typotex Kiadó.

López, L., Jongbloed, A. U., Parodi, A. (2012): Determination of biochemical and physical conditions of plastics denominated as "biodegradable" subjected to anaerobic conditions. *Journal of the Colombian School of Engineering* , 45-54 o.

Madigan M, M. J. (2015): *Brock Biology of Microorganisms*. hely nélkül.:ismeretlen

- szerző Majdik K., Kakes M., (2009): *Tejsav alapú polimérek*, Kolozsvár
- Majeed, M., Natarajan S., Sivakumar A., Furquan A., Pande A., Majeed S, Karri K. S. (2016): *Evaluation of anti-diarrhoeal activity of Bacillus coagulans MTCC 5856*, 7(1):311-316
- Mohee, R., Unmar, G. (2007): Determining biodegradability of plastic materials under controlled and natural composting environments. *Waste Management*, 11(27): 1486-1493.
- Namazi, H. (2017): Polymers in our daily life. *Bioimpacts*, 7(2): 73-74. Nelson, D. L., Cox, M. M. (2017): *Principles of Biochemistry*. W.H.Freeman & Co Ltd.
- Pacwa-Plociniczak, M., Czapla, J., Plociniczak, T. & Piotrowska-Seget, Z. (2019): The effect of bioaugmentation of petroleum-contaminated soil with *Rhodococcus erythropolis* strains on removal of petroleum from soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 169: 615-622.
- Pálfia, Z., Kristóf Z. (2013): *A sejtbiológia alapjai*: Eötvös Loránd Tudományegyetem.
- Panda, T., Gowrishankar, B. S. (2005): Production and applications of esterases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 67:160-169.
- Pukánszky B., Zsuga M. (2011): *Műanyagok*. Budapest: Typotex.
- Rawoof, S. A. A., Kumar S. P., Vo D. N., Devaraj K., Mani Y., Devaraj T., Subramanian S. (2020): Production of optically pure lactic acid by microbial fermentation: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19: 539-556.
- Stefanovitsné É. B. (1996): *Biokémiai alapismeretek*. Budapest: Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem.
- Tábi T. (2020): Tények és tévhitek a biopolimerekkel kapcsolatban I. rész Biohulladék. 21-26 o.
- Tábi T. (2019): *Biopolimerek, polimer kompozitok*. hely nélkül.:Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem.
- Tin Sin, L., Rahmat, A. R., Wan, A. W. & Rahman, A. (2012): *Polylactic acid : PLA biopolymer technology and applications*. Burlington : Elsevier Science.
- Wiegand, S., Dietrich S., Hertel R., Bongaerts J., Evers, S., Volland S., Daniel R., Liesegang H. (2013): RNA-Seq of *Bacillus licheniformis*: active regulatory RNA features expressed

within a productive fermentation. *BMC Genomics*, 14:667 DOI: 10.1186/1471-2164-14-667.

Williams, D. F., (1981): Enzymic Hydrolysis of Polylactic Acid. *Department of Dental Sciences, School of Dental Surgery, University of Liverpool*, 10:5-7.

Elektronikus források:

– 2021. évi 301/2021. (VI. 1.) Korm. rendelet az egyes egyszer használatos, valamint egyes egyéb műanyagtermékek forgalomba hozatalának korlátozásáról.

<https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=a2100301.kor>

– 2011. évi LXXXV. törvény módosítása (2020) A környezetvédelmi termékdíjról szóló.

<https://mkvkok.hu/kevesebb-muanyag-elhetobb-vilag---avagy-amit-kornyezetvedelmi-termekdij-valtozasai-kapcsan-tudni-kell>

– 21/2001. számú kormányrendelet a levegő védelmével kapcsolatos egyes szabályokról.

<https://net.jogtar.hu/jogszabaly?docid=A0100021.KOR&txreferer=99500053.TV> –

Internet 1. Shutterstock: Polyethylene molecular structure-Polyethylene

<https://www.shutterstock.com/search/polyethylene+molecular+structure> – Internet 2.

Internet 2. European-bioplastics: Bioplastics market data

<https://www.european-bioplastics.org/market/>

Internet 3. PubChem. Lactic acid.

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lactic-acid>

Internet 4. IFA. Lactic acid.

<https://gestis.dguv.de/data?name=013000&lang=en>

Internet 5. Hockstock Áron-Politejsav történelme

<https://sites.google.com/site/hockaron/politejsav-toertenelme>

Internet 6. Sawakinome. Különbség a termikus bomlás és a termikus disszociáció között

<https://hu.sawakinome.com/articles/science--nature/difference-between-thermal-decomposition-and-thermal-dissociation-2.html>

Internet 7. Khan Academy. A sejtciklus szabályozása, a rák és az őssejtek: Az apoptózis.

<https://hu.khanacademy.org/science/biology/cellular-molecular-biology/stem-cells-and-cancer/a/apoptosis>

8 Nyilatkozatok


KONZULTÁCIÓS NYILATKOZAT

Tóth Emese (Neptun azonosítója: YHKP1A) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekinttem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védésre javaslom / nem javaslom¹.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*2}

Kelt: Budapest, 2022. november 2.


Belső konzulens

¹ A megfelelő aláhúzendő.

² A megfelelő aláhúzendő.

NYILATKOZAT

a záródolgozat/szakdolgozat/diplomadolgozat/portfólió¹ nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: TÓTH EMESE
A Hallgató Neptun kódja: YHKP1A
A dolgozat címe: Posztéjsav alapú bioplasztik mikrobiális bontásának modellezése
A megjelenés éve: 2022
A konzulens tanszék neve: Biomérnök és Élelmiszeripari tudományok

Kijelentem, hogy az általam benyújtott záródolgozat/szakdolgozat/diplomadolgozat/portfólió² egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, s az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a Záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkori szellemi tulajdonkezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe.

Kelt: 2022 év 11 hó 02 nap

Tóth Emese
Hallgató aláírása

¹ A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.

² A megfelelő dolgozattípus meghagyása mellett a többi típus törlendő.