

# **SZAKDOLGOZAT**

KOCSIS ESZTER SZAKDOLGOZAT

**Kocsis Eszter**

**2023**



**Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem**

**Budai Campus**

**Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet**

**Biomérnöki alapképzési szak**

**Keményítővel kiegészített politejsav alapú biokompozit  
biodegradálásának modellezése termofil baktériumtörzsekből  
kialakított konzorcium felhasználásával**

**Belső konzulens:** Kilin Ákos  
PhD hallgató

Dr. Kohári-Farkas Csilla  
Egyetemi adjunktus

**Belső konzulens  
Intézete/tanszéke:** Élelmiszertudományi és  
Technológiai Intézet,  
Biomérnöki és Erjedésipari  
Technológia Tanszék

**Készítette:** Kocsis Eszter

**Budapest**

**2023**

# Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	4
2. Célkitűzések .....	5
3. Irodalmi áttekintés.....	6
3.1. Bioműanyagok.....	6
3.2. Politejsav .....	8
3.2.1. Tejsav.....	8
3.2.2. Tejsav előállítása.....	9
3.2.3. Tejsav polimerizációja .....	10
3.2.4. A PLA felhasználása.....	11
3.2.5. Politejsav mátrixú biokompozit .....	12
3.2.6. PLA enzimatis biodegradációja.....	13
3.3. Termofil baktériumok.....	15
3.3.1. <i>Thermobifida</i> nemzetség.....	15
3.3.2. <i>Thermus</i> nemzetség.....	16
4. Anyagok és módszerek.....	18
4.1. Vizsgált mikroorganizmusok.....	18
4.2. Tápközegek.....	18
4.2.1. A törzsfenntartást biztosító tápközegek .....	18
4.2.2. Screenelési módszerek elvégzéséhez alkalmazott szilárd tápközegek .....	19
4.2.3. Folyékony tápközegek a politejsav alapú evőeszköz darabok biodegradálási modellezésének vizsgálatához .....	20
4.3. Politejsav alapú, keményítő kiegészítésű bioműanyag evőeszköz.....	20
4.4. Alkalmazott módszerek és a hozzájuk felhasznált pufferek és reagensek .....	21
4.4.1. Törzsfenntartás.....	21
4.4.2. Törzsszelekció a screenelés módszerével .....	21

4.4.3. A PLA alapú bioműanyag evőeszköz biológiai bontásának modellezése .....	21
4.4.4. A kémhatás meghatározása .....	21
4.4.5. A proteáz enzimaktivitás meghatározásához szükséges kísérlet .....	22
4.4.6. Az enzimaktivitás meghatározásához szükséges kalibráció .....	22
4.4.7. A kutináz enzimaktivitás meghatározásához szükséges kísérlet .....	23
4.4.8. Az enzimaktivitás meghatározásához szükséges kalibráció .....	24
4.4.9. Tejsav mennyiség meghatározása .....	25
4.4.10. Sejtkoncentráció meghatározása Optikai Denzitással .....	26
4.4.11. A PLA alapú műanyag evőeszköz darabok tömegváltozásának mérése táramérleggel.....	26
5. Kísérleti eredmények és értékelésük .....	27
5.1. Törzsszelekció .....	27
5.1.1. Tejsavhasznosítás kimutatásának eredménye .....	27
5.1.2. Proteolitikus enzimkészlet screenelésének eredménye.....	28
5.1.3. Észteráz típusú enzimkészlet screenelésének eredménye.....	29
5.2. 25- és 30%-os keményítő-PLA biopolimer biodegradálásának modellezése szubmerz körülmények között, kétféle tápleves alkalmazásával.....	30
5.2.1. Kémhatás változás nyomon követése .....	30
5.2.2. LAPTg és TPY tápközegben vizsgált konzorcium kutináz enzimkészletének alakulása 25- és 30%-os keményítő tartalmú PLA jelenlétében.....	31
5.2.3. LAPTg és TPY tápközegben vizsgált konzorcium proteáz enzimkészletének alakulása 25- és 30%-os keményítő tartalmú PLA jelenlétében.....	31
5.2.4. LAPTg és TPY tápközegbe helyezett 25- és 30%-os keményítő tartalmú evőeszköz darabok tömegcsökkenése .....	32
5.3. Eltérő keményítő tartalmú politejsav biológiai bonthatóságának modellezése szubmerz körülmények között, keményítő és olívaolaj tápközeg kiegészítéssel .....	33
5.3.1. Kémhatás változás nyomon követése .....	33
5.3.2. Tejsav koncentráció meghatározása .....	34

5.3.3. Optikai denzitás mérésének eredményei.....	37
5.3.4. Kutináz enzimaktivitás vizsgálata.....	38
5.3.5. Proteáz enzimaktivitás vizsgálata .....	40
5.3.6. A kísérleti periódus végén meghatározott tömegváltozása a keményítő-PLA biokompozit daraboknak.....	41
5.4. PLA-keményítő biokompozit biodegradálásának modellezése szubmerz körülmények között 0,75% és 1% keményítő tápközeg kiegészítéssel.....	42
5.4.1. Kémhatás nyomon követése .....	42
5.4.2. Tejsav koncentráció meghatározása .....	43
5.4.3. Optikai denzitás mérésének eredményei.....	44
5.4.4. Kutináz enzimaktivitás vizsgálata.....	44
5.4.5. Proteáz enzimaktivitás vizsgálata .....	45
5.4.6. A kísérleti periódus végén meghatározott tömegváltozása a 30%-os keményítő-PLA biokompozit daraboknak .....	46
6. Következtetések és javaslatok.....	47
7. Összefoglalás.....	48
8. Irodalomjegyzék.....	49
9. Ábrajegyzék .....	57
10. Táblázatjegyzék.....	59

# 1. Bevezetés

Napjainkban a Föld fenntarthatóságát leginkább fenyegető veszélyt, a petrokémiai eredetű műanyagok környezetre gyakorolt hatása jelenti. Az 1950-es évek óta a műanyagok iránti kereslet jelentős növekedést mutatott, köszönhetően az olcsó, tartós és könnyű tulajdonságainak. A háztartási felhasználás mellett, szinte minden szektorban alkalmazzák, mint például élelmiszer-, csomagolás-, és gyógyszeripar. Azonban amellet, hogy kényelmi és praktikussági szempontból könnyíti meg az emberi életet, nagy mennyiségű hulladékot is termel, aminek csak elenyésző része kerül újrahasznosításra. A legjelentősebb problémát az egyszer használatos műanyagok okozzák, amelyek használati élettartama csupán néhány perc/óra, de ennek ellenére hulladékként a környezetben több száz évig is fennmaradhatnak. Többségük nem bomlik le, csak szabad szemmel nem látható mikroműanyagokra darabolódik, amely a folyókba, óceánokba, talajba, és a levegőbe bekerülve komoly egészségügyi kockázatot jelent az élővilágra és emberekre egyaránt. Továbbá szakértők szerint 2050-re a műanyagok felelnek majd az üvegházhatást okozó gázok kibocsátásának 5-10 százalékáért is.

A világ országai aktívan foglalkoznak a műanyagszennyezés problémájával, és különféle intézkedéseket hajtanak végre a műanyaghasználat csökkentése és az újrahasznosítás növelése érdekében. 2021-ben Magyarország kormánya betiltotta számos egyszer használatos műanyag forgalmazását, mint a fültisztítópálcika, szívószál, evőeszközök stb. Az Európai Bizottság 2022. november 30.-án bejelentette a „csomagolásokról és csomagolási hulladékokról szóló irányelv” (PPWD) frissítését. A kezdeményezés célja, hogy a fogyasztók számára újrafelhasználható csomagolási lehetőségeket biztosítsanak, korlátozzák a túlcsomagolást, és egyértelmű címkéket írjanak elő a megfelelő újrafeldolgozás megvalósításának érdekében.

Mindemellett a kutatók is jelentős eredményeket érnek el a kőolaj alapú műanyagok alternatíváinak előállításában. A kifejlesztett új anyagok közé tartoznak a biopolimerek, melyek közül a politejsav számít az egyik legígéretesebb biológiailag lebomló polimernek, kiváló biokompatibilitása, biológiai lebonthatósága, könnyű feldolgozhatósága és nagy szilárdsága révén. A kutató munkám ezen biopolimer biológiai bonthatóságának modellezésére irányul, amellyel én is szeretnék hozzájárulni a PLA termékek enzimátikus degradálási módszereinek vizsgálatához, egy zöldebb jövő reményében.

## 2. Célkitűzések

A fenntarthatóság kérdése központi szerepet játszik a globális környezetvédelem és a társadalmi felelősségvállalás területein. A környezetet sújtotta antropogén eredetű csapások és a természeti erőforrások kimerülésének veszélyei miatt egyértelművé vált napjainkra, hogy a hagyományos fogyasztási szokások változtatására és környezetbarát alternatívák felkutatására van szükség.

A szakdolgozatomban a fosszilis eredetű műanyagok egyik legígéretesebb potenciális helyettesítőjét, a természetes forrásból származó politejsav biológiai bonthatóságát vizsgálom, amelynek az elvégzéséhez az alábbi célokat fogalmaztam meg:

1. Termofil baktériumtörzsek alávetése törzsszelekciós vizsgálatoknak:
  - Tejsav hasznosítás feltérképezése
  - Proteolitikus enzimkészlet meglétének screenelése
  - Észteráz típusú enzimkészlet jelenlétének vizsgálata
2. A mikrobiális konzorcium kialakítása, a törzsszelekciós módszerek eredményei alapján.
3. A keményítő tartalmú politejsav alapú biopolimer biológiai bontásának modellezése szubmerz környezetben.
4. A biodegradáció hatékonyságának megfigyelése, a politejsav-depolimeráz enzim termelődését fokozó tápközeg kiegészítések jelenlétében.
5. A politejsav mátrixú biokompozit tömegváltozásának meghatározása.

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1. Bioműanyagok

A biopolimereket egyre nagyobb mennyiségben alkalmazzák a gazdaság minden területén. Használatuk fő mozgatórugója az ipar és a lakosság fokozott környezettudatossága, a fosszilis energiaforrások kimerülése, a műanyag hulladékok kezelésének egyre nehezebbé válása, valamint a természetes vizek mikroműanyag-szennyezése. (Hegyesi *et al.*, 2019).

Azon anyagokat nevezzük bioműanyagoknak, amelyek megújuló forrásból származnak, biológiailag lebonthatók, vagy a felsoroltak közül mind a két feltétel igaz rájuk. (Niaounakis *et al.*, 2015) Emellett létezik olyan meghatározás is, miszerint olyan polimerek, amelyek széndioxidra, vízre, szervesetlen vegyületekre vagy biomasszára bonthatóak, mikroorganizmusok enzimikus hatásának segítségével. (Ibrahim *et al.*, 2021)

A biológiailag degradálható polimereket az alábbi négy csoportba sorolhatjuk eredetük szerint:

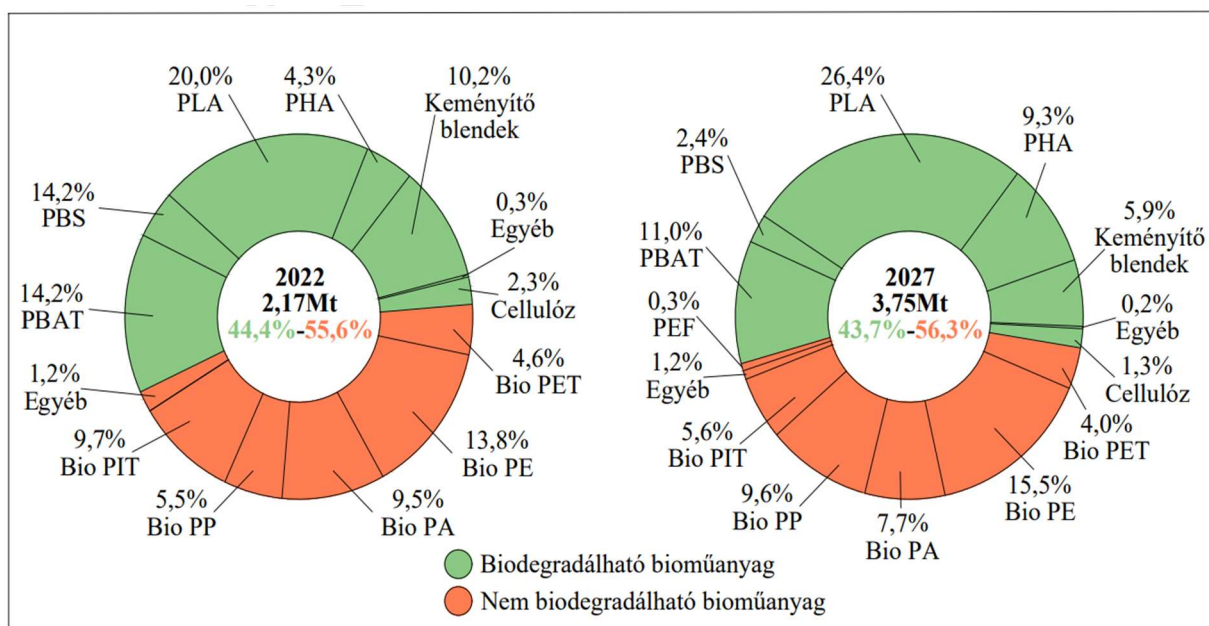
- Biomasszából származó (poliszacharidok; fehérjék; lipidek): A biomassza a legszélesebb körben hozzáférhető alapanyagok közé sorolható. Forrásai közé tartoznak a mezőgazdaságból, erdőgazdálkodásból, feldolgozóiparból és állattenyésztésből származó melléktermékek. (Yang *et al.*, 2023)
- Mikroorganizmusok által szintetizált (PHA; PHB; PHBV): Szélsőséges körülmények között végbemenő (oxigén-, nitrogénhiányos vagy többlet szénrel rendelkező környezetben), baktériumos fermentáció során, a sejten belül keletkező lineáris biopoliészterek. (Ali *et al.*, 2022)
- Biológiai eredetű monomerekből kémiai úton szintetizált (PLA): Biohulladékokból például burgonyából, kukoricából, cukorrépából, cukornádból és melaszból származó cukrok fermentálásával történhet előállításuk. (Trivedi *et al.*, 2023)
- Fosszilis eredetű (PCL; poliészteramidok; alifás kopoliészterek): Ebbe a csoportba tartoznak a különböző méretű monomerekkel rendelkező alifás poliészterek vagy ko-poliészterek. (Goel *et al.*, 2021)

A bioműanyagok folyamatos térhódítása lakossági és ipari alkalmazások terén környezeti, gazdasági és társadalmi hatással is bír. Habár elterjedésük vitathatatlanul mérsékli a kibocsátott üvegházhatású gázok mennyiségét, (~80%-kal (Sudhakar *et al.*, 2023)) és fosszilis energiahordozók használatát, valamint a tőlük való függésünket, azonban alapanyagaik



előállításához víz és művelhető talaj szükséges. Mindemellett a felhasznált rovarirtó szerek és műtrágya túlzott használata eutrofizációhoz és a talaj savasságához vezethet. (Samuel, 2022) Egy 2013-as tanulmány szerint, az akkori 250Mt össz-műanyag termelés biopolimerekkel történő kiváltásához a Földön található termőföldek mintegy 5%-át erre a célra kellett volna fordítani (2022-es adatokkal: 390.7Mt és ~7.8%. (Internetes forrás 1; Reddy *et al.*, 2013) Az is tényként kezelendő továbbá, hogy a növekvő gyártási kapacitás, az élelmiszeripar és mezőgazdaság oldalán, növekvő nyersanyag igényként jelenik meg. (Samuel, 2022) Alacsony termelékenységük, drága alapanyaguk és a technológiába fektetett tőke következtében előállításuk a kőolaj alapú műanyagokhoz képest jelenleg kétszer-háromszor magasabb költséggel jár. (Filho *et al.*, 2022) Napjainkban egyre jelentősebb a társadalmi szerepvállalás a környezeti terhek minimalizálása érdekében, azonban a fogyasztók egy, például bioműanyag csomagolással ellátott egyenértékű termékért 10-20%-kal hajlandóak több pénzt kiadni. (Findrik *et al.*, 2023) Jelen állapotban nem létezik globálisan egységesített jogi- vagy szabvány rendszer a bioműanyagok bevezetésére, alkalmazására és újrahasznosítására vonatkozóan annak ellenére, hogy 2022-ben világviszonylatban összesen 2,17 millió tonna biopolimer került legyártásra. Ez 44,4% nem biodegradálható-, 55,6% biodegradálható biopolimerből állt össze. 2027-re IfBB (Hannoveri Tudományegyetem Bioműanyagok és Biokompozitok Tanszék) tanulmánya szerint ez az arány megmarad, míg az össztermelés közel kétszeresére fog növekedni. Az 1. ábrán látható, hogy a legszélesebb körben felhasznált biopolimer a PLA, amely 2027-re is megőrzi vezető szerepét. (Sudhakar *et al.*, 2023; IfBB, 2023)

**1. ábra:** Egyes bioműanyag típusok eloszlása a globális termelésben  
(Forrás: Internetes forrás 2.)



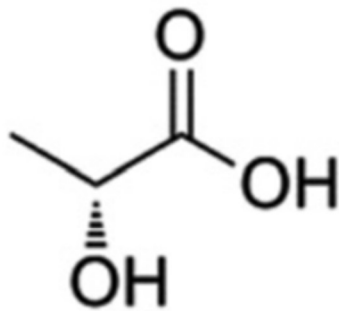
## 3.2. Politejsav

A politejsav egy termoplasztikus alifás poliészter, a legtöbbet vizsgált és a kereskedelemben leginkább alkalmazott biopolimer. (de Souza Vandenberghe *et al.*, 2023) Számos vonzó tulajdonsággal rendelkezik, mint például biokompatibilitás, nagy szilárdság, merevség és hőre lágyuló képlékenysége. (Elsawy *et al.*, 2017) Tiszta, színtelen, fényes bioműanyag, amelynek tulajdonságai hasonlóak a kőolaj alapú műanyagokhoz, mint a polietilén, polipropilén vagy a polisztirol. Ezen hasonlósága miatt nagy keresletnek örvend ipari léptékben, ugyanis kedvező tulajdonságai mellett, a már meglévő gépeken is feldolgozható, adaptációk nélkül. (de Souza Vandenberghe *et al.*, 2023) Továbbá a PLA a fosszilis tüzelőanyag-alapú polimerek előállításához szükséges erőforrások kétharmadát takarítja meg. Nagyjából 70%-kal kevesebb üvegházhatású gázt bocsát ki a hulladéklerakókban történő lebontása során, mint a hagyományos műanyagok. (Yadav *et al.*, 2022) Azonban vannak hátrányai is, a feldolgozása során nagyon érzékeny a vízre, lassan kristályosodik, mindemellett a fizikai öregedése viszonylag gyors, ami tovább csökkenti a törésállóságát. Sok kísérlet zajlott ezen hiányosságok kiküszöbölésére. A lágyítás és a keverés javítja a deformálhatóságát, míg a töltőanyagok és megerősítések használata növeli a merevségét. (Hegyesi *et al.*, 2019)

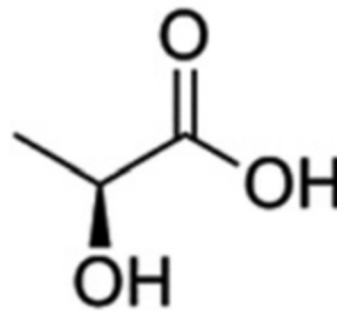
### 3.2.1. Tejsav

A PLA monomer egysége a tejsav (2-hidroxi-propionsav), két sztereoizomerrel rendelkező királis molekula, ahogyan azt a 2. ábra is mutatja. (Lasprilla *et al.*, 2012) A mikroorganizmusok tevékenységének termékeként a természetben is előfordul mindkétféle típusa. A leggyakrabban megfigyelt forma az L-típusú, amelynek a termelésére az ember és más emlősök is képesek, és az anyagcsere-folyamatok során könnyen asszimilálódik. (Teixeira *et al.*, 2021; Avérous, 2008) A tejsav gyártás világszerte nagy keresletet élvez, sokoldalú felhasználása miatt az élelmiszeriparban, a gyógyszeriparban, a textiliparban, a bőrparban és a vegyiparban, valamint a biológiailag lebomló polimerek (PLA) előállításához alkalmazzák. (Nampoothiri *et al.*, 2010)

**2. ábra:** Tejsav-sztereoizomerek kémiai szerkezete: Az L-(+) -tejsav és D-(-) -tejsav  
(Forrás: Teixeira et al., 2021)



L- (+) -Tejsav



D- (-) -Tejsav

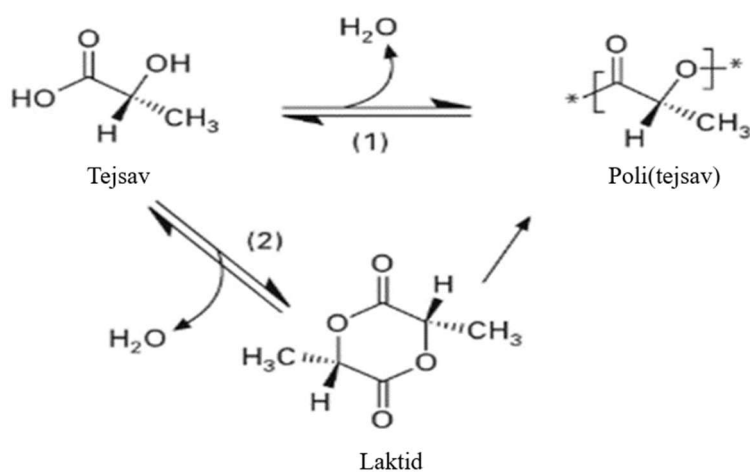
### 3.2.2. Tejsav előállítása

A tejsav előállítása kétféle úton valósítható meg, mikrobiális erjesztéssel vagy kémiai szintézissel. Az utóbbi eljárás főként a laktonitril erős savval történő hidrolízisén alapszik, ahol a két vegyület racém keveréke, D (-) és L (+) tejsav keletkezik. Ez a nagy optikai tisztaságot (pl. ~99% L-LA és ~1% D-LA) igénylő PLA ipar számára nem kifejezetten ideális. (Lasprilla et al., 2012; Jem & Tan, 2020) A kémiai szintézishez képest a tejsav előállítására szolgáló biotechnológiai eljárás számos előnnyel jár, mint például az alacsony szubsztrát költségek, csökkentett előállítási hőmérséklet és a kisebb energiafogyasztás. (Singhvi & Gokhale, 2013) A világszerte előállított tejsav mintegy 90%-a baktériumos fermentáció révén keletkezik. (Lasprilla et al., 2012) Az ehhez szükséges legalkalmasabb alapanyagoknak a kukorica, rizs, burgonya és édesburgonya számít, magas keményítő tartalmuknak köszönhetően. (Yu et al., 2023) Számos mikroba képes a termelésére, de egy versenyképes kereskedelmi folyamathoz robusztus, gyorsan növekvő törzsre van szükség, alacsony költségű tápanyagigénnyel. Manapság génmanipulált *E. coli* törzseket is használnak optikailag tiszta tejsav előállítására érdekében. (Jem & Tan, 2020)

### 3.2.3. Tejsav polimerizációja

A politejsav előállítása tejsav monomerből, történhet közvetlen polikondenzációval, vagy a tejsav ciklikus köztes dimerjének, a laktidnak a gyűrűnyitási reakciójával. (Farrington *et al.*, 2005) Mindkét módszer nagy tisztaságú tejsavra vagy laktidra támaszkodik, annak érdekében, hogy jó minőségű, nagy molekulatömegű PLA-t állítsanak elő belőle. (Jem & Tan, 2020)

**3. ábra:** A politejsav lehetséges polimerizációs útvonalai  
(Johansson *et al.*, 2012)



#### 3.2.3.1. Közvetlen polikondenzáció

A tejsav monomer egyik lehetséges polimerizálási útvonala a közvetlen polikondenzációs eljárás, amely magában foglalja a monomerek összekapcsolását az -OH és -COOH csoportok közötti reakciók révén, illetve a melléktermékek, víz és alkoholok eltávolításával a rendszerből. A víz eltávolítása kondenzációval és oldószer használatával, nagy vákuumban és magas hőmérsékleten megy végbe. Mivel a keverék viszkozitása a reakció során jelentősen megnő, az eltávolítás megnehezedik, ami kis molekulatömegű termék képződését eredményezi. (Hamad *et al.*, 2018) A közvetlen kondenzációval megvalósuló folyamat egyszerűbben kivitelezhető, mint a gyűrűnyitáson alapuló módszer. Azonban a kis molekulatömegűen kívül az útvonal további hátránya a viszonylag nagy reaktor és a bepárlás szükségessége, az oldószer visszanyerése, a fokozott színeződés és racemizáció. (Jyotishkumar *et al.*, 2022)

### 3.2.3.2. Gyűrűnyitó polimerizáció

A gyűrűnyitó polimerizációs technika (ROP módszer), nagy molekulatömegű termékek előállítására alkalmas, amelynek elvégzéséhez nagy tisztaságú tejsav használatára van szükség. (Cheng *et al.*, 2009) A tejsavat dehidratálják és oligomerjeivé polikondenzálják magas hőmérsékleten és vákuum alatt, a nedvesség eltávolításának céljából. Az így kapott rövid politejsav-láncok katalitikus depolimerizálásával nyerik ki a laktidot. Az optikailag tiszta D- vagy L- formájú laktidból a maradék nedvességet, a tejsavat és a mezo-laktidot különféle módon, például desztillációval vagy kristályosítással távolítják el. A tisztított laktidot gyűrűnyitási reakcióval polimerizálják PLA-vá, a laktid olvadáspontja feletti és a PLA lebomlási hőmérséklete alatti hőmérsékleten. (Jem & Tan, 2020) A laktid gyűrűnyítéséhez nehézfém alapú katalizátorok, például Zn- és Sn-oxidok, kloridok alkalmazására van szükség. Azonban ezek a nehézfémek szennyezik a kapott polimert és korlátozzák bizonyos területeken való felhasználását, mint például az élelmiszeripar vagy az egészségügy. A kutatók már dolgoznak nem toxikus katalizátorok használatán. (Cheng *et al.*, 2009) A tartózkodási idő és a hőmérséklet szabályozásának, a katalizátor paramétereivel (típus, koncentráció) való kombinálásával, lehetővé válik a D- és L-tejsavegységek arányának és sorrendjének a szabályozása a végtermék polimerben. (Lasprilla *et al.*, 2012)

### 3.2.4. A PLA felhasználása

A fenntartható jövő érdekében, a biológiailag lebomló PLA piaci versenyképessége egyre növekszik. A globális termelési volumenét 2019-ben körülbelül 190 000 tonnára becsülték, és várhatóan minden 3-4. évben meg fog duplázódni ennek a mennyisége. Alkalmazása három fő csoportba sorolható: élelmiszeripari/csomagolási, gyógyszeripari/orvosi és műszaki felhasználás. (Sin *et al.*, 2019; Naser *et al.*, 2021)

Az élelmiszeriparban lebomló, egyszer használatos csomagolás, pohár, palack, evőeszköz, és frissen tartó edény készül belőle. (Sin *et al.*, 2019) A Dán Műszaki Egyetem tanulmányt végzett a vaj, margarin és sajtok PLA-val történő csomagolása terén, ahol megállapították, hogy nagyon jó mechanikai védelemmel, nedvesség-, fény-, zsír- és gázzáró képességgel rendelkezik. Ezen tulajdonságai miatt tehát kiválóan alkalmazható könnyű, átlátszó csomagolások gyártására. (Jiménez *et al.*, 2019)

Továbbá kiemelkedő szerepet játszik egészségügyi termékek innovációjában. Alkalmazzák például gyógyszerhordozó eszközökben, felszívódó varratokban, valamint orvosi implantátumok és egyéb anyagok, mint varratok, csavarok alapanyagaként. (Tokiwa & Calabia, 2006) Ebben az iparágban főleg az L-tejsavból készült polimert használják fel, ugyanis az ebből készült implantátumok könnyen lebomlanak és felszívódnak a szervezetben az enzimek hatására. A PLA-ból készült gyógyszerhordozók pedig olyan aktív hatóanyagokat tartalmaznak, amelyek hatékonyan a célsejtekbe juttathatók, majd ezt követően kontrolláltan szabadulnak fel. (Sin *et al.*, 2019)

Ezen kívül a fő felhasználási területe a 3D nyomtatással történő additív gyártás. Ennek az oka, hogy könnyen feldolgozható és nyomtatható polimer, azonban a nyomtatási folyamatot követően hajlamos a zsugorodásra. További előnye, hogy nincs szükség fűtött platformra a felhasználásával történő gyártás során, így a PLA alacsony, 190-230 °C közötti hőmérsékleten is nyomtatható. Nem igényel bonyolult utókezelést sem, acetonnal kezelhető vagy csiszolható. (Ilyas *et al.*, 2021)

### 3.2.5. Politejsav mátrixú biokompozit

Általánosságban, a polimerek töltőanyagokkal való kombinálása, lehetőséget nyújt a fizikai, reológiai, optikai tulajdonságok javítására, illetve hatékony módja lehet a költségcsökkentésnek. (Murariu & Dubois, 2016)

A keményítő olcsó, környezetre nem káros és megújuló forrásból származó opció a PLA tulajdonságainak módosítására. (Mayekar *et al.*, 2023) A direkt módon hidrofób PLA-hoz kevert, száraz por állagú hidrofil keményítő egy olcsóbb előállítási költségű, jobban biodegradálható, azonban alacsonyabb szívósságú és keménységű kompozitot eredményez. (Visakh *et al.*, 2015) A mechanikai tulajdonságok nemkívánatos romlására, a keményítőhöz kevert lágyító adalékok, a hővel történő kezelés és a mechanikai feszültség kínál megoldást. Az így kapott elnyírható, homogén masszát nevezzük termoplasztikus keményítőnek (TPS- ThermoPlastic Starch), mely valójában nem hőre, hanem hőre és nyírásra együttesen lágyuló tulajdonsággal bír (termo-mechano-plasztikus). A TPS ebben a formában hatékonyabban használható fel keverékképzésre, így a létrejövő PLA-TPS keverék jobb biodegradációs képessége mellett, a mechanikai tulajdonságok is javulnak a PLA-val szemben. (Mayekar *et al.*, 2023)

Egy 2018-ban végzett tanulmány során (1. táblázat) különböző tömegarányú PLA- TPS kompozit biodegradációját követték nyomon 45°C és 55°C hőmérsékleten, 14 és 28 napos intervallumban, lipáz enzim hozzáadásával, valamint anélkül. A táblázatot vizsgálva, egyértelműen megállapítható, hogy a kompozit keményítőtartalom arányának növelésével a bomlási folyamat hatékonyabbá vált. (Wilfred *et al.*, 2018)

**1. táblázat:** PLA-TPS kompozitok biodegradációjának vizsgálata  
(Forrás: Wilfred *et al.*, 2018)

	PLA	PLA-TPS 90:10	PLA-TPS 75:25	PLA-TPS 50:50	PLA-TPS 25:75	PLA-TPS 10:90
Tömegszázalék	%	%	%	%	%	%
Lipáz nélkül 45 °C 14 napig	0,7	3,7	4,3	14,9	24,5	44,8
10 mg lipáz 55 °C 28 napig	1,6	5,8	7,6	16,7	30	56,1
20 mg lipáz 55 °C 28 napig	-	6,3	-	25,9	-	64,3

### 3.2.6. PLA enzimatis biodegradációja

A PLA olyan biopolimer, amelynek a lebomlása különböző mechanizmusok révén képes végbemenni úgy, hogy a keletkező végtermék nem szennyezi a környezetet. Megkülönböztetünk hidrolitikus-, oxidatív-, termikus-, mikrobiális-, enzimatis-, kémiai- és foto- polimer degradációkat. (Zaaba & Jaafar, 2020)

Általánosságban az alifás poliészterek hidrolízissel történő enzimatis degradációja során a bontó enzim a szubsztrát felületkötő doménján keresztül adszorbeálódik, majd hidrolizálja az észterkötéseket. (Tokiwa & Calabria, 2006) A bioműanyagok biológiai lebomlásának első lépése a mikrobiális biofilm kialakulása a polimer felületén, ahol a mikroorganizmusok a kiválasztott extracelluláris enzimek segítségével katalizálják a polimerlánc depolimerizációját oligomerekre, dimerekre vagy monomerekre. Az így képződött alacsony molekulatömegű vegyületek már képesek asszimilálódni a mikrobiális sejtbe, ahol szén- és energiaforrásként hasznosulnak, és megkezdődik az elsődleges- és másodlagos metabolitok termelése. Végezetül ezek az anyagcsere termékek mineralizálódnak és szén-dioxid, metán, víz vagy nitrogén keletkezik belőlük. (Haider *et al.*, 2018)

Különböző mikroorganizmusok képesek a PLA hidrolitikus bomlástermékeinek a megemésztésére, ezek döntő többsége az aktinomicéták közé sorolható, töredéküket pedig a baktériumok és gombák csoportjából izolálták. (Jiménez et al., 2019) Számos tanulmány a depolimerizációban kulcsfontosságú szerepet játszó enzimeként írta le a karboxil-észterázt, kutinázt, lipázt és a szerin proteázt. (Butbunchu & Pathom-Aree, 2019) Az olyan környezeti tényezők, mint a páratartalom, a hőmérséklet, a pH, a sótartalom, az oxigén jelenléte vagy hiánya, a különböző tápanyagokkal való ellátottság, valamint láncok sztereokémiája és az anyag kristályossága, mind-mind befolyásolják a PLA lebontásában résztvevő mikrobiális enzimek aktivitását. (Teixeira et al., 2021; Zaaba & Jaafar, 2020)

#### 3.2.6.1. Kutináz

A kutin a növényi kutikula egyik fő összetevője, amely hatékony gátat képez a kiszáradás és a kórokozók ellen. A kutinázok olyan mikroorganizmusok által kiválasztott, indukálható extracelluláris enzimek, amelyek képesek katalizálni a kutinban lévő észterkötések hasítását. Hidrolitikus aktivitást mutatnak nemcsak a kutin felé, hanem különféle oldható szintetikus észterek, oldhatatlan trigliceridek, szintetikus szálak és műanyagok felé is. Ezért a kutinázok sokoldalú lipolitikus enzimeként ismertek a mosó- és mosogatószer-készítményekben, valamint más textilipari alkalmazásokban, élelmiszer- és vegyiparban. (Chen et al., 2010) A kutatók számos erőfeszítést tettek a bakteriális kutinázok azonosítására és jellemzésére, mivel eddig a legtöbbet tanulmányozott kutinázok gombákból származtak. A *Thermobifida fusca* törzset kutináz enzim termelőként írták le. A törzset a Müller 14-es csoportja izolálta és azonosította, amelynek egyik fontos tulajdonsága, hogy figyelemre méltó lebontási képességet mutat az alifás-aromás kopoliészterek tekintetében. (Silva et al., 2011)

#### 3.2.6.2. Proteáz

A proteáz enzimek a földi élet szerves részét képezik, a környezetben szinte mindenhol megtalálhatók, növényekben, állatokban és a mikrobákban egyaránt. Az aminosavak polipeptid láncában lévő peptid kötést hidrolizálják. Fermentációs eljárással viszonylag rövid idő alatt izolálhatók és tisztíthatók, nagy szubsztrát specifitással és katalitikus aktivitással rendelkeznek. (Razzaq et al., 2019) A proteázok az ipari enzimek legfontosabb osztályába sorolandók, és a globálisan értékesített összes enzim közel 60%-át teszik ki, melynek a kétharmada mikrobiális



eredetű. (Masi *et al.*, 2021; Razzaq *et al.*, 2019) Széles körben felhasználható enzimek, alkalmazzák őket az élelmiszer-, gyógyszer-, mosó-, sütő-, hús- és bőriparban. (Trehan, 2018) A *Bacillus sp.* a legaktívabb és legdinamikusabb extracelluláris lúgos proteáz termelő az ipari szektorban. (Matter *et al.*, 2023)

A legtöbb kereskedelmi forgalomban rendelkezésre álló mikrobiális (proteínáz K és szubtilizin) és emlős eredetű proteáz ( $\alpha$ -kimotripszin, tripszin és elasztáz) képes katalizálni a PLA hidrolízisét, azonban a növényiek nem. (Kawai, 2010) A politejsavat depolimerizáló proteázokról kimutatták, hogy a poli(L-tejsav) (PLLA) és poli(D-tejsav) (PDLA) irányában eltérő enantioszelektivitással rendelkeznek a lipáz típusú hidrolázokhoz képest, ugyanis csak a PLLA-t képesek hidrolizálni, azonban a lipáz típusú enzimek (beleértve a kutináz-szerű enzimeket is) elsősorban a PDLA-t hidrolizálják. (Rosato *et al.*, 2022)

### 3.3. Termofil baktériumok

A termofil mikroorganizmusok optimális növekedési hőmérséklete 50°C vagy annál magasabb. Kiemelt figyelmet kapnak az extremofilok között, mivel termostabilis enzimek (például amilázok, cellulázok, kutinázok, pektinázok, xilanázok, proteázok, lipázok és DNS-polimerázok) előállítására képesek. Az enzimek hőállóságát, a szerkezetükben található számos hidrogén- és diszulfid kötés, valamint sóhidak és hidrofób kölcsönhatások jelenléte eredményezi. (Mane & Nadaf, 2021) Ezen enzimek olyan egyedi tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek alkalmasak lehetnek biotechnológiai folyamatok elvégzésére magas hőmérsékleten, ezáltal pedig kisebb valószínűséggel lép fel a szennyeződés veszélye. Továbbá csökken a reakcióközeg viszkozitása, a szerves vegyületek biológiai hozzáférhetősége és oldhatósága pedig növekszik, ami nagyobb reakciósebességet eredményez. (Kumar & Nussinov, 2001) Ezenfelül számos oldószerrel, mosószerrel, valamint savas és lúgos pH-val szemben stabilabbak. (Mohammad *et al.*, 2017)

#### 3.3.1. *Thermobifida* nemzetség

A thermobifidák termofil, aerob, lignocellulózt bontani képes aktinomicéták. A *Thermobifida* nemzetség négy fajt foglal magában: *T. fusca*, *T. alba*, *T. cellulosilytica* és *T. halotolerans* fajokat. (Tóth *et al.*, 2017)

A *Thermobifida fusca* egy mérsékelten termofil, fonalas talajbaktérium. 50-55°C-on növekszik, és széles pH-tartományban, 4-10 pH között él. Nem rendelkezik flagellummal vagy pílussal, és általában légneműként nő hifák formájában, amely segíti a szervezetet a diffúzióban és az oldhatatlan szubsztrátok, például a lignocellulóz lebontásában. A *T. fusca* hatékonyan képes lebontani a cellulóz biomasszát specifikus cellulolitikus enzimek, mint például a cellulázok, 1,3-b-glükánáz, xilanázok, mannanáz, mannozidáz és szénhidrátkötő fehérjék segítségével. (Gomez de Pulgar & Saadeddin 2014)

A *Thermobifida cellulosilytica* egy túlhevített trágyakomposztból izolált Gram-pozitív termofil aktinobaktérium, melynek az optimális növekedési hőmérséklete 40-65 °C közé esik. A lignocellulóz szubsztrátumon tenyésztett kultúrák endoglükánáz, cellobiohidroláz, endoxilánáz enzimeket termelnek, és képesek a lignocellulóz szolubilizálására. (Kukolya *et al.*, 2002) A Biotechnológiai Információk Nemzeti Központja (NCBI) található bioinformatikai adatok kutináz enzimtermelőként írják le *Thermobifida cellulosilytica*-t. (Usman *et al.*, 2023) A polietilén-tereftalát (PET) lebontásában nagy szerepet tulajdonítanak neki. A magasabb enzimaktivitás és a hatékonyabb biodegradáció elérése érdekében a tudósok mutálták a *Thermobifida cellulosilytica* kutináz 1 (*ThcCut1*) szubsztrátkötő helyének releváns részeit. A mutációval kialakított, szélesebb szubsztrátkötő zsebek megkönnyítik az enzim hozzáférését a szubsztráthoz. A kétértékű fémkötő helyeket diszulfid kötésekkel helyettesítették azzal a céllal, hogy javítsák a mutáns *ThcCut1* termostabilitását. Ennek eredményeként az elő emésztett PET-palack részecskék 96,2%-a sikeresen lebonthatóvá vált 96 órás hidrolízis után, *ThcCut1*-AICCG alkalmazásával, ami 87,5-szerese volt a vad típusú *ThcCut1*-nél tapasztaltaknak. (Zhang *et al.*, 2022)

### 3.3.2. *Thermus* nemzetség

A *Thermus* nemzetség tagjait világszerte izolálták, szárazföldi hidrotermális területekről, mélységi geotermikus területekről, sőt mesterséges termikus környezetből is. A tagjai Gram-negatív pálcika alakú vagy fonalas sejteket képeznek. (Da Costa *et al.*, 2006) A nemzetség valamennyi képviselője sárgapigmentált, kivéve a *Thermus composti* DSM 21686T, *Thermus scotoductus* DSM 8553T és *Thermus tenuipunicus* YIM 76954T törzseket. A növekedésükhöz szükséges optimális hőmérséklet 65-70°C körül van, ezért a nemzetség tagjai, a leírásuk óta kiemelkedő szerepet játszanak a termofil mikrobákat alkalmazó kutatásokban. (Li *et al.*, 2022)

A *Thermus composti* egy Gram-negatív, pálcika alakú baktérium (K-39(T) törzs), melyet az osztrigagomba-szubsztrátum előállításához használt komposztálási folyamat termofil fázisából izoláltak. A polifázisos megközelítést alkalmazó rendszertani vizsgálat alapján a K-39 (T) törzs a *Thermus* nemzetség új fajának tekinthető, amelyre a *Thermus composti* sp. nov. nevet javasolták a tudósok. A törzs 40-80°C-on, pH 5-9 között, legfeljebb 1,5% (w/v) NaCl-t tartalmazó táptalajon szaporodott. A 16S rRNS génszekvenciákon alapuló filogenetikai elemzés azt mutatta, hogy a K-39 (T) törzs a *Thermus* nemzetségen belül egy különálló törzset alkot. Legközelebbi tenyésztett rokona a *Thermus islandicus* PRI 3838(T) (96,8%-os hasonlóságot mutat). Az új törzset az különböztette meg a rokon taxonoktól, hogy nem képes keményítő hidrolizálására. (Vajna *et al.*, 2012)

KOCSIS ESZTER SZAKDOLGOZAT

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Vizsgált mikroorganizmusok

A laboratóriumi kísérleteim elvégzéséhez háromféle termofil mikrobatörzset használtam, amelyek beszerzési helyeül a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (NCAIM Budapest), illetve a Biomérnöki és Erjedéssipari Technológia Tanszék szolgált.

**2. táblázat:** Alkalmazott termofil baktériumtörzsek  
(Forrás: saját munka)

Termofil mikroorganizmusok
<i>Thermobifida fusca</i> II Cell
<i>Thermus composti</i> B2340
<i>Thermobifida cellulosilytica</i> B1997

### 4.2. Tápközegek

#### 4.2.1. A törzsfenntartást biztosító tápközegek

**3. táblázat:** R2 tápleves összetétele  
(Forrás: Internetes forrás 3.)

Összetevő	Bemért mennyiség
Élesztőkivonat (YE)	0,5 g/l
Proteáz pepton	0,5 g/l
Casamino acid	0,5 g/l
Glükóz	0,5 g/l
Keményítő	0,5 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,3 g/l
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,05 g/l
Nátrium-piruvát	0,3 g/l
Desztillált víz	1000 ml

R2 táplevesben biztosítottam a *Thermus composti* B2340 törzsfenntartását. (3. táblázat)

**4. táblázat:** Czapek-pepton tápleves összetétele  
(Forrás: Internetes forrás 4.)

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

Czapex-pepton táplevesben biztosítottam a *Thermobifida cellulositytica* B1997 és a *Thermobifida fusca* II Cell törzsfenntartását. (4. táblázat)

A folyékony tápközeg csíramentesítése autokláv segítségével valósult meg, 120°C-on, 15 percen keresztül.

#### 4.2.2. Screenelési módszerek elvégzéséhez alkalmazott szilárd tápközeg

A háromféle baktériumtörzs tejsavhasznosításának vizsgálatát 0,1% tejsavval kiegészített szilárd tápközegen végeztem el.

**5. táblázat:** A tejsav hasznosítására alkalmazott szilárd tápközeg összetétele  
(Forrás: Kitamoto et al., 2011)

Összetevő	Bemért mennyiség
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g/l
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,5 g/l
Élesztőkivonat	1 g/l
Agar	15 g/l
Desztillált víz	1000 ml
Tejsav kiegészítés	0,1%

Proteolitikus enzim jelenlétének detektálása kazein-agar felületen valósult meg. (Radha et al., 2012)

**6. táblázat:** Proteolitikus enzimrendszer kimutatására alkalmazott szilárd tápközeg összetétele  
(Forrás: Radha et al., 2012)

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

Észteráz típusú enzim kimutatásához módosított Tween 80 agart használtam fel. (Kumar et al., 2012)

**7. táblázat:** Észteráz típusú enzimrendszer kimutatására alkalmazott szilárd tápközeg összetétele  
(Forrás: Kumar et al., 2012)

Összetevő	Bemért mennyiség
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. Folyékony tápközegek a politejsav alapú evőeszköz darabok biodegradálási modellezésének vizsgálatához

**8. táblázat:** TPY (Trypticase-Phytone peptone-Yeast extract) tápközeg összetétele  
(Forrás: Internetes forrás 5.)

Összetevő	Bemért mennyiség
Triptikáz pepton	10 g/l
Fiton pepton	5 g/l
Glükóz	5 g/l
Tween 80	1 ml
Cisztein-HCl	0,5 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g/l
MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,5 g/l
ZnSO <sub>4</sub> *76H <sub>2</sub> O	0,25 g/l
CaCl <sub>2</sub>	0,15 g/l
FeCl <sub>3</sub>	0,03 g/l
Desztillált víz	1000 ml

**9. táblázat:** LAPTg tápközeg összetétele  
(Forrás: Tomás et al., 2003)

Összetevő	Bemért mennyiség
Pepton	10 g/l
Tripton	10 g/l
Glükóz	10 g/l
Élesztőkivonat	10 g/l
Tween 80	1 ml
Desztillált víz	1000 ml

A folyékony tápközegek csíramentesítése autokláv segítségével valósult meg, 120°C-on, 15 percen keresztül.

#### 4.3. Politejsav alapú, keményítő kiegészítésű bioműanyag evőeszköz

**4. ábra:** Keményítő tartalmú politejsav biokompozit evőeszköz  
(Forrás: saját fotó)



A biodegradáció modellezési kísérleteimhez a NatureWorks Ltd., USA által gyártott Ingeo 3251D PLA biopolimerből készült, 25- és 30%-os keményítő tartalmú biokompozit kész állt rendelkezésemre, melyet a Piringer Kft. (Budapest) öntött. (4. ábra)

#### 4.4. Alkalmazott módszerek és a hozzájuk felhasznált pufferek és reagensek

##### 4.4.1. Törzsfenntartás

A termofil baktériumok törzsfenntartása érdekében időszakos átoltást végeztem a csíramentesített folyékony tápvevesekbe, steril körülmények között, lamináris box alatt.

##### 4.4.2. Törzsszelekció a screenelés módszerével

A screenelés módszere a proteolitikus és észteráz típusú enzimek jelenlétének kimutatására szolgál, illetve annak a megállapítására, hogy az általam vizsgált mikroorganizmusok rendelkeznek-e tejsavhasznosító képességgel.

Az agardiffúziós módszert alkalmaztam a törzsszelekciós kísérleteknél. A csíramentesített tápoldatokból a Petri-csészékbe agarlemezt öntöttem, és a megdermedése után kb. 0,2 cm átmérőjű lyukat fúrtam bele. A törzstenyészetekből 50 µl-t pipettáztam a zsebekbe, majd inkubáltam azokat három napon keresztül, 45°C-on. A proteolitikus enzim termelésének kimutatására brómkrezol zöld (0,56% borostyánkősav; 0,1% NaOH; 0,028% brómkrezolzöld) reagenssel árasztottam el a szilárd tápközegeket.

##### 4.4.3. A PLA alapú bioműanyag evőeszköz biológiai bontásának modellezése

Szubmerz körülmények között vizsgáltam a keményítővel kiegészített politejsav alapú vizsgálati anyag biodegradálhatóságát. A tápközegbe 96%-os etil-alkohollal átmosott, majd desztillált vízzel leöblített, ismert tömegű keményítő-PLA biokompozit darabokat helyeztem, aseptikus környezetben. A termofil baktériumtörzsekből kialakított inokulum tenyészet beoltásával indítottam el a kísérletem. A lombikok inkubálása 21 napos periódusban, 45°C hőmérsékleten, 140 rpm-en zajlott. Meghatározott időpontokban vettem mintát a rázatott lombikokból a depolimeráz enzimaktivitás, optikai denzitás, tejsav tartalom meghatározás, illetve a pH mérésének céljából.

##### 4.4.4. A kémhatás meghatározása

A mintáim kémhatását a Mettler Toledo pH mérő készülék segítségével határoztam meg, majd rögzítettem azokat.

#### 4.4.5. A proteáz enzimaktivitás meghatározásához szükséges kísérlet

A proteáz enzim kimutatásának az alapja, hogy ezen enzim L-tirozin felszabadítására képes kazein szubsztrátumból. Az L-tirozin jelenléte a Folin reagens kék színváltozásával detektálható, mennyisége pedig meghatározható spektrofotometriai módszerrel, 660 nm hullámhosszon.

Az enzimaktivitás meghatározásához szubsztrátumként 1,5 (m/V) %-os kazein oldatot használtam, amelyet pufferrel egészítettem ki. A vizsgált mintáim kémhatása befolyásolta azt, hogy kazeinhez hányas pH értékű puffert adagoltam. A kísérleti eredményeim a pH 5- és 7 kémhatású McIlvane puffer használatát indokolták. Az így keletkezett proteáz enzimaktivitáshoz használt szubsztrátumot az oldódás elősegítése érdekében 70-80°C hőmérsékletű vízfürdőbe helyeztem.

A proteáz enzimaktivitás meghatározásához szükséges reakcióelegy összetétele a következő: a mintáimból 0,25 ml-nyi mennyiséget kémcsövekbe mértem, a vak mintáim reakcióját 1,5 ml 5 (m/V) %-os triklór-ecetsavval állítottam le. 45°C hőmérsékletű vízfürdőbe helyeztem az enzim- és a vak mintákat tartalmazó kémcsöveim, majd 0,25 ml kazein szubsztrátumot adtam hozzájuk, és 30 percen keresztül inkubáltam azokat. A fél óra leteltével 5%-os triklór-ecetsav oldattal (TCA) a mintáim enzimreakcióit is leállítottam, és még 10 percen keresztül hagytam azokat a vízfürdőben. Ezt követően 1,5 ml mennyiségeket Eppendorf-csővekbe pipettáztam, és 10 percen át centrifugáltam 10000 fordulat/perc sebességen. Az így kapott felülúszókból 0,5 ml-t pipettáztam ki kémcsövekbe, és 0,5 ml háromszoros hígítású Folin-Ciocalteu reagenst, továbbá 1,5 ml 0,5 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  oldatot mértem hozzájuk, majd szintén 30 percre 45°C hőmérsékletű vízfürdőbe helyeztem azokat. A reakcióidő leteltével a minták abszorbanciáját, spektrofotométerrel 660 nm hullámhosszon mértem. (Ire *et al.*, 2011)

#### 4.4.6. Az enzimaktivitás meghatározásához szükséges kalibráció

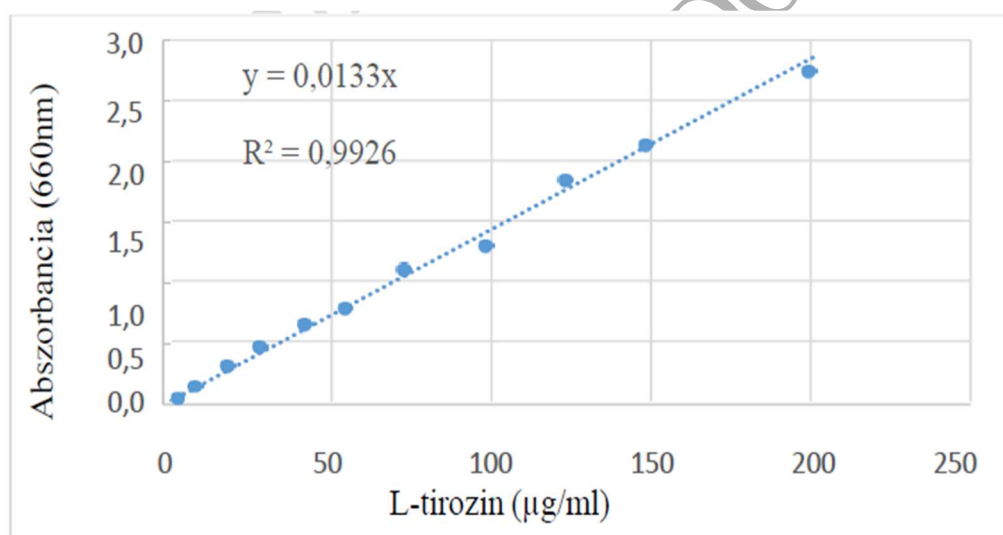
1,1 mM L-tirozin törzsoldatot desztillált vízzel elegyítettem a hígítási sor elkészítéséhez, a 10. táblázatban foglalt adatok szerint. Az így kapott mintákhoz 0,5 ml háromszoros hígítású Folin reagenst és 1,5 ml 0,5 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  oldatot pipettáztam, majd mértem az abszorbanciát 660 nm-en spektrofotometrián. A mért abszorbancia értékeim az L-tirozin koncentráció függvényében ábrázoltam, majd a kapott pontokra regressziós egyenest illesztettem, amely a 5. ábrán látható.



**10. táblázat:** L-tirozin hígítási sor összetétele kalibrációhoz  
(Forrás: saját munka)

Koncentráció [µg/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

**5. ábra:** Kalibrációs egyenes proteáz enzimaktivitás meghatározásához  
(Forrás: saját munka)



#### 4.4.7. A kulináz enzimaktivitás meghatározásához szükséges kísérlet

A kulináz enzimaktivitás meghatározásának az elve, hogy 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.

Az enzimaktivitás meghatározásához szükséges reakcióelegy összemérési adatait az 11. táblázat tartalmazza: A mintáimból 100 µl-nyi mennyiséget kémcsövekbe pipettáztam, majd az enzim-, és a vak mintáim is 800 µl Na-foszfát (pH 7) pufferrel egészítettem ki. A vak mintákhoz és a szubsztrát vakhoz még 100 µl desztillált vizet is adtam. A reakció elindításához szükséges

szubsztrátum a p-nitrofenil-butirát volt, melynek elkészítéséhez 0,1 g 50 mM para-nitrofenil-butirát (PNPB) mesterséges szubsztrátumot, 50 cm<sup>3</sup> 96%-os etanolban oldottam fel.

Ezt követően vízfürdőbe helyeztem az enzim- és a vakmintáim, és 10 percen keresztül, 45 °C-ra beállított vízfürdőben inkubáltam azokat. A reakció leállítása 1 ml hideg pH 9,0 Na-foszfát pufferrel történt. Centrifugáltam a mintákat, majd spektrofotométer segítségével 405 nm-en vizsgáltam és rögzítettem a mért abszorbancia értékeket. (Yang *et al.*, 2012; Oda *et al.*, 2021)

**11. táblázat:** Kutináz enzimaktivitás mérése során alkalmazott reakcióelegy  
(Forrás: Yang *et al.*, 2012)

	Desztillált víz [μl]	50 mM p-nitrofenil-butirát szubsztrátum [μl]	Enzim [μl]	Puffer [μl]
<b>Műszervak</b>	200	-	-	800
<b>Szubsztrátvak</b>	100	100	-	800
<b>Enzimvak</b>	100	-	100	800
<b>Minta</b>	-	100	100	800

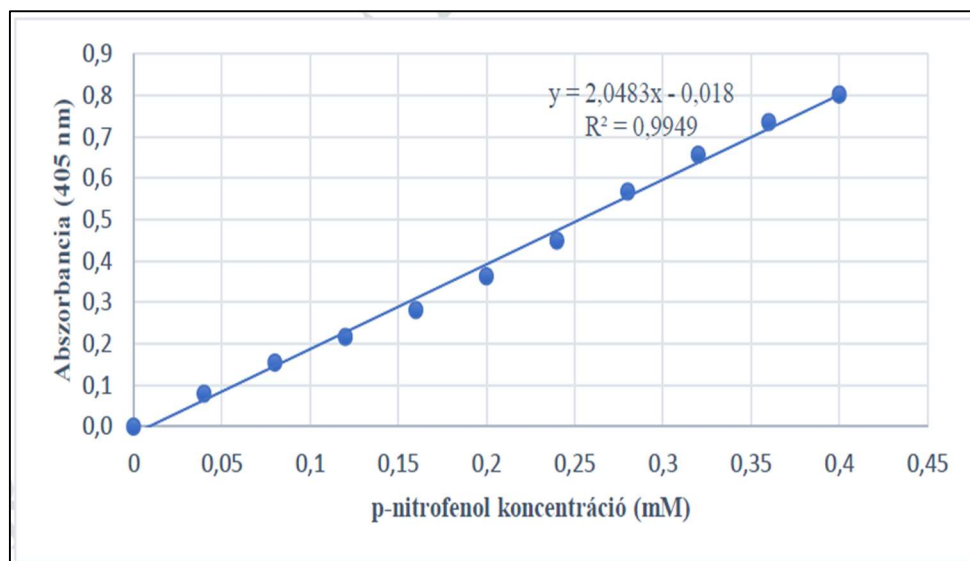
#### 4.4.8. Az enzimaktivitás meghatározásához szükséges kalibráció

0,4 mM-os p-nitrofenol törzssoldatot desztillált vízzel elegyítettem a hígítási sor elkészítéséhez, az alábbi táblázat szerint (12. táblázat). Az így kapott, ismert koncentrációjú oldatok abszorbanciáját 405 nm-en spektrofotometriásan mértem. A diagramon regressziós egyenest illesztettem a koncentráció függvényében ábrázolt abszorbancia értékekre. (6. ábra)

**12. táblázat:** p-nitrofenol hígítási sor összetétele kalibrációhoz  
(Forrás: saját munka)

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
0,20	75	75
0,15	56	94
0,10	37	113
0,05	19	131
0	0	150

**6. ábra:** Kalibrációs egyenes kutináz enzimaktivitás meghatározásához  
(Forrás: saját munka)



A kapott függvények meredekségének ismeretében számolhatóak az enzimaktivitások az alábbi egyenlet segítségével, a kutináz és a proteáz enzim esetében is:

$$\text{Aktivitás} \left[ \frac{\text{U}}{\text{ml}} \right] = \frac{(A_{\text{minta}} - A_{\text{enzimvak}} - A_{\text{szubsztrátumvak}}) \cdot V_{\text{reakció}} \cdot h}{x \cdot t_{\text{reakció}} \cdot V_{\text{minta}}}$$

ahol,

$A_{\text{minta}}$ : Minta abszorbanciája

$A_{\text{enzimvak}}$ : Enzimvak abszorbanciája

$A_{\text{szubsztrátumvak}}$ : Szubsztrátumvak abszorbanciája

$V_{\text{reakció}}$ : a reakcióelegy térfogata [ml]

$x$ : a felszabadított termék (L-tirozin) kalibrációs egyenesének meredeksége [1]

$t_{\text{reakció}}$ : reakció időtartama [perc]

$V_{\text{minta}}$ : a minta (enzimoldat) térfogata [ml]

$h$ : a minta hígítási faktora [1]

#### 4.4.9. Tejsav mennyiség meghatározása

A vizsgálat a laktát ion vas (III)-kloriddal történő színváltozásán alapszik. A tejsav mennyiségének meghatározása érdekében 0,15 g vas (III)-klorid port 50 ml desztillált vízben feloldottam. A mintáimból 0,2 ml mennyiségeket pipettáztam ki kémcsövekbe és 4 ml vas (III)-klorid oldatot adagoltam hozzájuk, aminek 390 nm hullámhosszon mértem az abszorbancia értékeit. (Borshchevskaya *et al.*, 2016)

#### 4.4.10. Sejtkoncentráció meghatározása Optikai Denzitással

Az OD 600 értékek mérése lehetővé teszi a sejtnövekedés nyomon követését és a sejtszuspenzió koncentrációjának meghatározását.

A mérés előtt gondosan homogenizáltam a mintáim, hogy a sejtek ülepedéséből származó pontatlanságot minimálisra csökkentsem. Küvettába töltöttem a vizsgálandó mintáimat és 600 nm hullámhosszon mértem az optikai denzitásuk. A mintáim szükség szerint olyan mértékben hígítottam, hogy a kapott abszorbancia értékek 0,7 alá essenek, ezáltal volt megbízható a mérési eredményem. A kapott értékeket diagramon ábrázoltam az idő függvényében.

#### 4.4.11. A PLA alapú műanyag evőeszköz darabok tömegváltozásának mérése táramérleggel

A kutatómunkám során három kísérletet indítottam el, melyek végeztével az összes esetben meghatároztam a PLA műanyag darabok tömegét a kiindulási tömeghez viszonyítva. A 21 napos vizsgálati idő lejártával szűrőpapír segítségével választottam el a PLA darabokat a folyékony tápközegtől, majd öblítettem 96%-os etil-alkohollal és desztillált vízzel. Ezt követően szárítószekrénybe helyeztem azokat 3 napra, 40 °C hőmérsékleten, majd a kiszáradt darabokat táramérleggel mértem.

$$\text{PLA tömegcsökkenés [\%]} = \left( \frac{M_k - M_v}{M_k} \right) \cdot 100$$

ahol,

$M_k$ : kezdeti/kiindulási PLA tömeg [g]

$M_v$ : a kezelés, tisztítás és szárítás után megmért végső PLA tömeg [g]

## 5. Kísérleti eredmények és értékelésük

### 5.1. Törzsszelekció

A PLA műanyag evőeszköz biodegradálásának modellezéséhez háromféle termofil baktériumot -*Thermobifida cellulosylitica* B1997, *Thermobifida fusca* II Cell, *Thermus composti* B2340-, vettem alá törzsszelekciónak, melynek célja a tejsavhasznosításuk, illetve a proteolitikus és észteráz típusú enzimszintézisük kimutatása volt.

#### 5.1.1. Tejsavhasznosítás kimutatásának eredménye

**7. ábra:** A tejsavhasznosítás screenelési módszer eredménye  
(Forrás: saját munka)



*Thermobifida cellulosylitica* B1997

*Thermobifida fusca* II Cell

*Thermus composti* B2340

Az elvégzett kísérletben az általam vizsgált baktériumtörzsek tejsavhasznosító képességét vizsgáltam. A screenelés során a termofil mikrobátörzseket külön-külön, a 0,1%-os tejsav tartalmú szilárd tápközegen agardiffúzió módszerével kialakított lyukba pipettáztam. A tápközegen megjelenő telepképződés jelezi, hogy a vizsgált baktériumok képesek a környezetben található tejsav hasznosítására. A *Thermobifida cellulosylitica* B1997, *Thermobifida fusca* II Cell és *Thermus composti* B2340 is szabad szemmel jól detektálható telepet képzett, ahogyan azt a 7. ábra is mutatja. A legjelentősebb sejtszaporodást a *Thermobifida fusca* II Cell törzsnél figyelhettem meg.

### 5.1.2. Proteolitikus enzimek szelése eredménye

**8. ábra:** A proteolitikus enzimek szelése eredménye  
(Forrás: saját munka)



*Thermobifida cellulosylitica* B1997    *Thermobifida fusca* II Cell    *Thermus composti* B2340

A proteolitikus enzimek szeléséhez alkalmazott szelés során első lépésként agaröntést végeztem. A megszilárdult agarba fűrt mélyedésbe pipettáztam külön-külön a vizsgált mikroorganizmusaim. Az enzim jelenlétének egyértelmű detektálására brómkrezol zöld indikátort (0,56% borostyánkősav; 0,1% NaOH; 0,028% brómkrezolzöld) használtam fel. Az inkubálást követően elárasztottam az agarlemezeket az indikátorral, és 30 percen keresztül hagytam hatni. Ezután pedig leöntöttem a felszínéről, és a lemezeket egy éjszakán át szobahőmérsékleten szárítottam.

A feltisztulási zóna a savas proteáz aktivitás jelenlétét jelzi, a mérete pedig az aktivitás mértékét jelöli. Az indikátor színváltozásából a savas, bázikus, vagy neutrális proteázok jelenlétére lehet következtetni. A *Thermus composti* B2340-nél kaptam a legnagyobb, illetve legerőteljesebb feltisztulási zónát, de a másik két törzsem esetében is szabad szemmel látható volt, ahogyan azt a 8. ábra is mutatja. Mind a három tápközegen megjelenő telep színe zöldes-, sötét zöldes színt vett fel, ami pH 4-4,5 körüli kémhatásra utal.

### 5.1.3. Észteráz típusú enzimkészlet screenelésének eredménye

9. ábra: Az észteráz típusú enzimkészlet screenelésének eredménye  
(Forrás: saját munka)



*Thermobifida cellulosylitica* B1997    *Thermobifida fusca* II Cell    *Thermus composti* B2340

Az észteráz típusú enzim kimutatása polioxietilén-szorbitán zsírsavészter tartalmú, módosított Tween 80 agar felületén valósult meg. A screenelési módszer elve, hogy az észteráz és lipáz enzimtermelő mikroorganizmusok a polioxietilén-szorbitán zsírsav szubsztrátumként való hasznosítására képesek. Az agaron ez a folyamat telepképződés formájában figyelhető meg. Ahogyan az a 9. ábrán is látható, a törzsszelekciónak alávetett mikorbatörzseimnél ez megjelent, tehát feltételezhető, hogy rendelkeznek észteráz típusú enzimkészlettel.

Összegezve az elvégzett törzsszelekción vizsgálatokat, mind a három termofil mikorbatörzsem esetében pozitív eredményeket kaptam, így a további kutató munkámat az ezekből kialakított konzorciummal végeztem el.

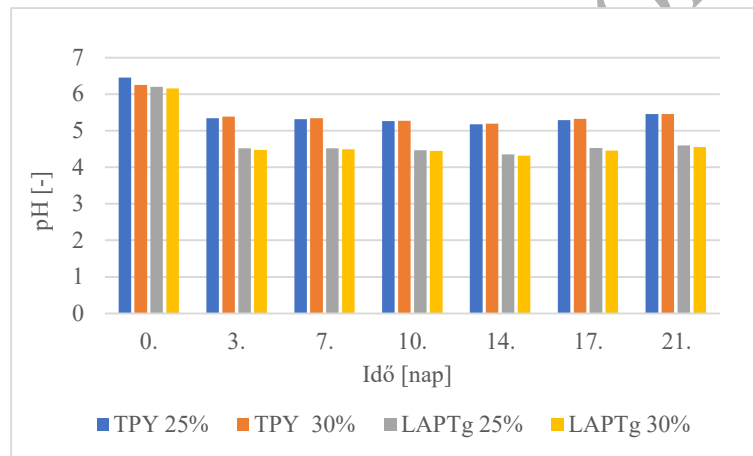


## 5.2. 25- és 30%-os keményítő-PLA biopolimer biodegradálásának modellezése szubmerz körülmények között, kétféle tápleves alkalmazásával

Az első kísérletem során LAPTg és TPY tápközegben vizsgáltam a 25- és 30%-os keményítő tartalmú PLA biokompozit evőeszköz darabok biológiai bonthatóságát. A modellezést 21 napon keresztül, 45°C-on, 140 rpm rázástási sebességgel követtem nyomon. Ezen kísérlet előzetes vizsgálatként szolgált ahhoz, hogy eldönthessem, a továbbiakban melyik tápközeget érdemes használnom a biodegradálások modellezéséhez.

### 5.2.1. Kémhatás változás nyomon követése

**10. ábra:** A 25-és 30%-os keményítővel kiegészített PLA jelenlétében vizsgált LAPTg és TPY tápleves kémhatása  
(Forrás: saját munka)



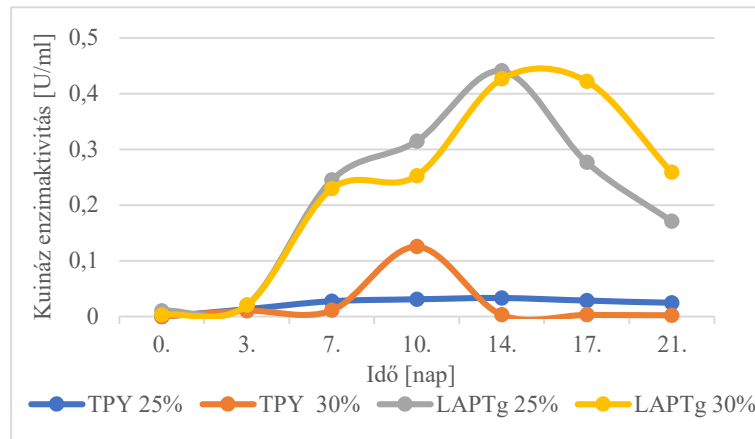
A 10. ábrán látható, hogy a LAPTg és a TPY táplevesek kémhatása a harmadik napra a savas tartományban mozgott. A pH értékek a LAPTg tápközegben nagyobb mértékben csökkentek, mind a 25-, mind pedig a 30%-os keményítő kiegészítésű biokompozit evőeszközök jelenlétében. (4,3-4,6 pH).

A jelenség lehetséges magyarázata, hogy a kísérlet során a mikroorganizmusok, a PLA-t és a komplex, növekedést biztosító tápközegben található ásványi anyagokat, illetve kiegészítéseket tápanyagként kezdték el hasznosítani. A lebontás során metabolikus reakciók zajlottak, amelyek fermentációs folyamatokat is magukba foglalhattak. Ennek eredményeként számos szerves sav képződhetett, mely a kémhatást a savas irányba toltta el.



### 5.2.2. LAPTg és TPY tápközegben vizsgált konzorcium kutináz enzimkészletének alakulása 25-és 30%-os keményítő tartalmú PLA jelenlétében

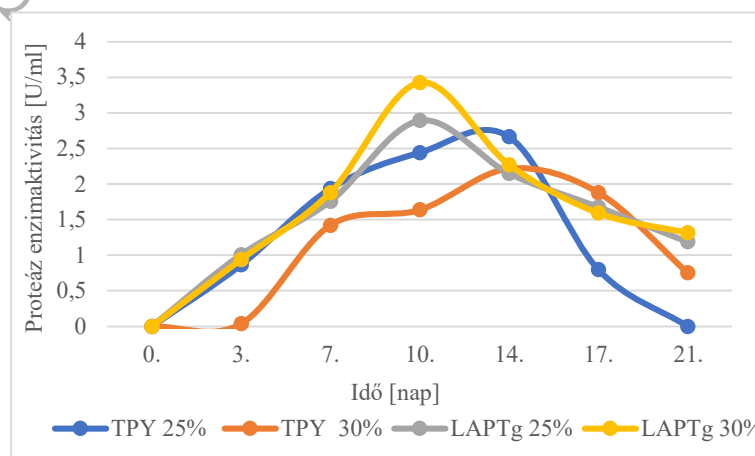
11. ábra: Kétféle tápközegben vizsgált konzorcium kutináz enzimkészletének alakulása  
(Forrás: saját munka)



Az 11. ábrán látható diagramon a kutináz enzimaktivitásának az értékeit vettem fel az idő függvényében. A TPY táplevesbe helyezett 25- és 30%-os vizsgálati szubsztrátum darabok jelenlétében jelentősen alacsonyabb kutináz aktivitást mutatott a konzorcium, összehasonlítva a LAPTg tápközegben megfigyelttel. A legmagasabb értéket a 25%-os keményítő-PLA evőeszközt tartalmazó LAPTg táplevesnél, a 14. napon határoztam meg, **0,44 U/ml**-t. Alapvetően nem kaptam kiemelkedően magas enzimaktivitás értékeket, de elmondható, hogy a vizsgálati periódusom bizonyos pontjain az összes kísérleti beállításom rendelkezett kutináz aktivitással.

### 5.2.3. LAPTg és TPY tápközegben vizsgált konzorcium proteáz enzimkészletének alakulása 25- és 30%-os keményítő tartalmú PLA jelenlétében

12. ábra: Kétféle tápközegben vizsgált konzorcium proteáz enzimkészletének alakulása  
(Forrás: saját munka)



Az adott beállításoknál már a nulladik naptól növekvő proteáz enzimaktivitás mutatkozott, amely a LAPTg táplevesbe beoltott konzorcium esetében a 10. napig, a TPY táplevesben pedig a 14. napig tartott. Kivéve a 30%-os keményítőt tartalmazó PLA biopolimer darabokat magába foglaló TPY tápközegnél, ahol az enzimaktivitás értékei csak a harmadik naptól kezdtek emelkedni. A 21. napra a proteáz aktivitások értékei csökkenni kezdtek.

A LAPTg tápközegben vizsgált 25- és 30%-os keményítő-PLA darabokat tartalmazó mintáimmál, a proteáz mennyisége magasabb értéken maximalizálódott, mint a TPY táplevesből származó mintáknál megfigyelt eredmények. A legkiemelkedőbb proteáz aktivitást a 21 napos vizsgálati periódus alatt, a LAPTg táplevesbe oltott konzorcium mutatta, 30%-os keményítő-PLA szubsztrátum jelenlétében, amely **3,43 U/ml** volt. (12. ábra)

#### 5.2.4. LAPTg és TPY tápközegbe helyezett 25- és 30%-os keményítő tartalmú evőeszköz darabok tömegcsökkenése

**13. táblázat:** A 25- és 30%-os keményítő-PLA biokompozit tömegváltozása  
(Forrás: saját munka)

Alkalmazott tápközeg + hozzáadott keményítő-PLA biopolimer	Tömegcsökkenés [%]
TPY + 25% keményítő tartalmú biokompozit	2
TPY + 30% keményítő tartalmú biokompozit	2
LAPTg + 25% keményítő tartalmú biokompozit	4,5
LAPTg + 30% keményítő tartalmú biokompozit	5

A kísérletem során mért enzimaktivitás értékei, a proteáz és a kutináz mennyiség tekintetében is a LAPTg tápleves esetében voltak kedvezőbbek, ezen eredményeimet a vizsgálat végén meghatározott tömegcsökkenés is alátámasztja. Az 13. táblázatban foglaltak alapján látható, hogy a LAPTg tápközegben fermentált 30%-os keményítő-PLA evőeszköz darabok **5%-ot** csökkentek, a 25%-os keményítő-PLA szubsztrátum darabjaim pedig **4,5%-ot**, mely eredmények a TPY táplevesben vizsgált biokompozit darabok tömegcsökkenésének több, mint a dupláját jelentik.

Ezen előzetes kísérlet alapján a további vizsgálataimat a LAPTg táplevesben fogom elvégezni, különböző kiegészítésekkel.

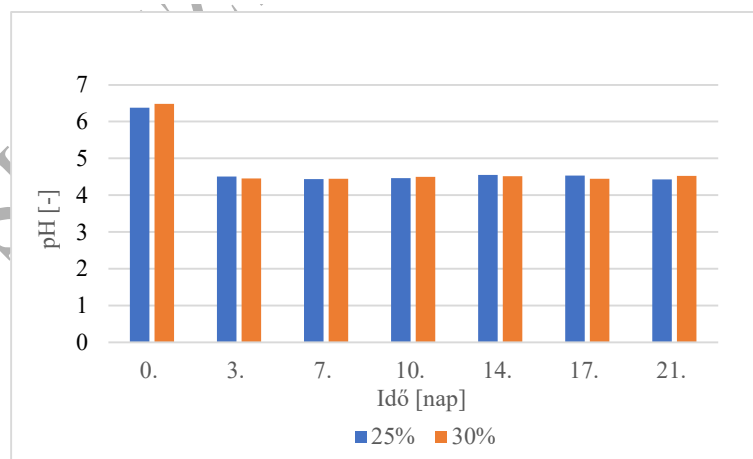
### 5.3. Eltérő keményítő tartalmú politejsav biológiai bonthatóságának modellezése szubmerz körülmények között, keményítő és olívaolaj tápközeg kiegészítéssel

A kísérletem elvégzéséhez nitrogén forrásban gazdag LAPTg táplevesnek két változatát alkalmaztam, az egyiket 0,5% keményítővel, a másikat pedig 5% olívaolajjal egészítettem ki. Ezekben a tápközegekben modelleztem a 25- és 30%-os keményítő tartalmú PLA darabok biológiai bonthatóságát. A vizsgálat 21 napos periódusban zajlott, amely során meghatározott időközönként mintát vettem a 45°C-on, 140 rpm rázatási sebességen inkubált lombikjaimból. A pH, valamint a proteáz- és kutináz enzimaktivitás nyomon követése mellett, a továbbiakban meghatároztam a tejsav tartalom, sejtkoncentráció változását is.

#### 5.3.1. Kémhatás változás nyomon követése

Az oszlopdiagramon ábrázolt pH értékek alapján (13. és 14. ábra) megfigyelhető, hogy a kémhatás mind a két tápközeg kiegészítés esetén közel semleges tartományból indult és a harmadik napra savas kémhatás felé tolódott el.

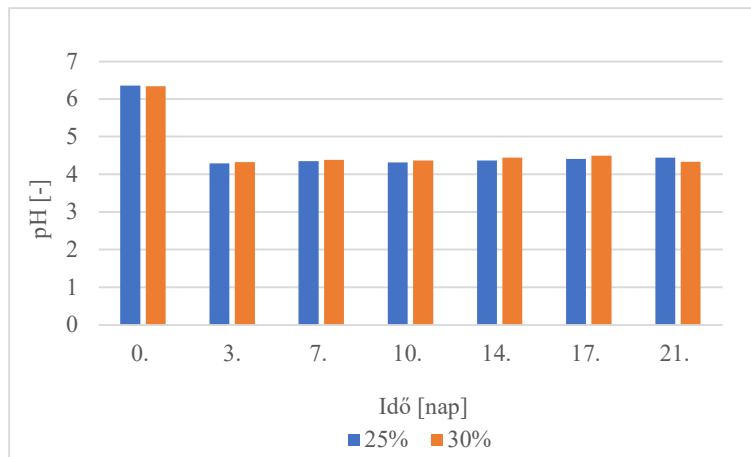
**13. ábra:** Keményítővel kiegészített tápközeg kémhatás változása  
(Forrás: saját munka)



A 30%-os keményítő-PLA biokompozit darabokat tartalmazó 0,5% keményítő kiegészítésű tápleves kémhatása a 0. napon magasabb pH-ról indult (**pH 6,48**), mint a 25 % keményítőt

tartalmazó PLA evőeszközök jelenlétében mért érték (**pH 6,37**). A 3. naptól viszont szinte megegyezik a pH értékek alakulása, és a 21. napig savas kémhatás volt megfigyelhető.

**14. ábra:** Olívaolajjal kiegészített tápközeg kémhatás változása  
(Forrás: saját munka)



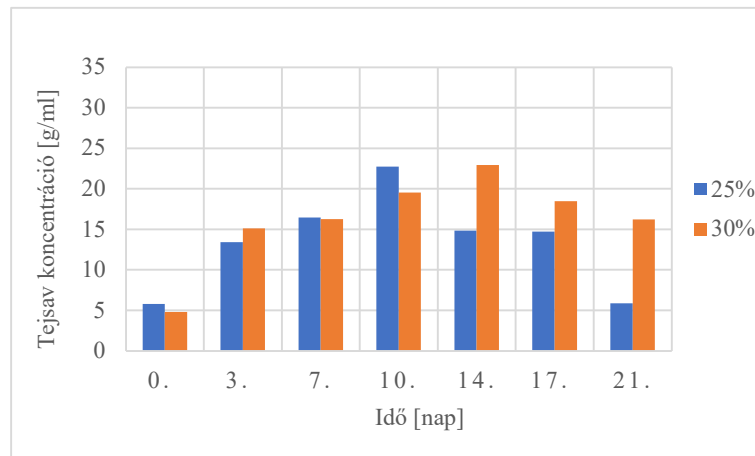
Az 1% olívaolaj kiegészítés esetében a 25- és 30%-os keményítő-PLA biokompozit darabokat magába foglaló vizsgálati közegben a kiindulási kémhatás közel semleges értékről csökkent le a savas tartományba, és a 21. napig ez nem is változott. A levett mintáim mind a kétféle biokompozit esetében szinte megegyező pH értékeken mozogtak, nem volt közöttük jelentős különbség.

Összegezve, hasonló eredményt adott az olívaolaj és a keményítő tápközeg kiegészítés is, a 25- és 30%-os keményítő tartalmú PLA darabok jelenlétében. Az olívaolajat tartalmazó tápleves esetében valamivel alacsonyabb kémhatás volt megfigyelhető, de nem jelentős az eltérés a kétféle kiegészítésű tápközegben, ugyanis a 3. naptól kezdve **pH 4,3-4,5** között alakultak a kémhatás értékei.

### 5.3.2. Tejsav koncentráció meghatározása

Az idő múlásával a sejtszaporodás során keletkezett szerves savak mellett, a tejsav koncentráció növekedése a vizsgált rendszerben arról ad háttér információt, hogy a politejsav láncok elkezdnek lebomlani tejsav monomerré, ami a biológia folyamat hatékonyságát jelzi.

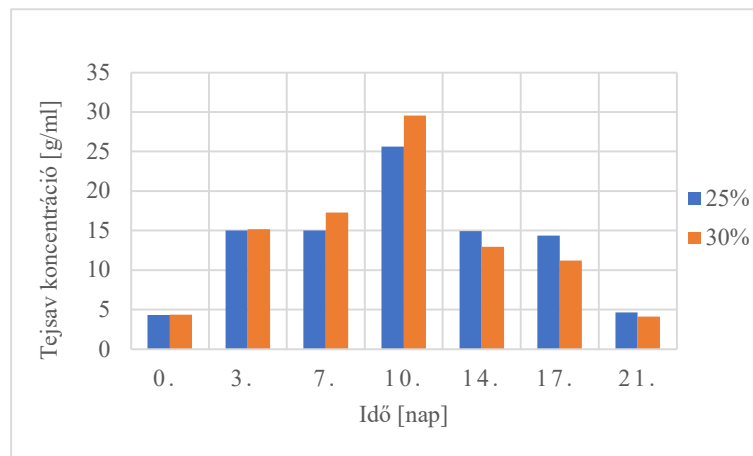
**15. ábra:** Keményítővel kiegészített tápközegben meghatározott tejsav tartalom változása  
(Forrás: saját munka)



A 25%-os keményítő-PLA evőeszközt tartalmazó, 0,5% keményítővel kiegészített vizsgálati közegben a tejsav koncentrációja a kiindulási napon **5,78 g/ml** volt, melynek a mennyisége a 10. napig folyamatosan növekedett, ott pedig elérte a vizsgálati idő alatti mért maximális értéket, **22,75 g/ml**-t. Az ezt követő napokban csökkenési tendenciát figyeltem meg, a 14. és 17. napon közel azonos tejsav tartalmat mértem. A vizsgálati periódusom alatt a 21. napra újra lecsökkent a tejsav mennyisége a 25%-os keményítő-politejsav darabok jelenlétében, **5,87 g/ml**-re.

Ugyanebben a kiegészítésben, a 30%-os keményítő-PLA biokompozit darabok jelenlétében a kiindulási tejsav tartalom alacsonyabb volt, összehasonlítva a 25%-os keményítő kiegészítésű evőeszköz daraboknál mért eredménnyel, ebben az esetben **4,79 g/ml**-ről indult és a 14. napig növekvő tendenciát mutatott, mely napon elérte a **22,93 g/ml**-t. A kétféle összetételű politejsav evőeszköz szubsztrátumok esetében a tejsav tartalom hasonló értéknél maximalizálódott, annyi különbséggel, hogy a 25%-os keményítő tartalmú vizsgálati szubsztrátumnál korábbi időpontban volt ez detektálható. A 17. naptól kezdve folyamatos csökkenés volt megfigyelhető a 30%-os keményítő-PLA biokompozit kiegészítés jelenlétében, ahol is a 21. napon volt a legalacsonyabb a mérhető tejsav mennyisége. Összevetve a 25%-os keményítő tartalmú vizsgálati darabokat magába foglaló LAPTg táplevesben meghatározott eredményekkel, a 30%-os esetében, a kísérleti periódus utolsó napján **16,22 g/ml** tejsav volt meghatározható a vizsgálati rendszerben, ami **2,8-szor** több a 25%-nál mért **5,87 g/ml**-nél. (15. ábra)

**16. ábra:** Olívaolajjal kiegészített tápközegben meghatározott tejsav tartalom változása  
(Forrás: saját munka)



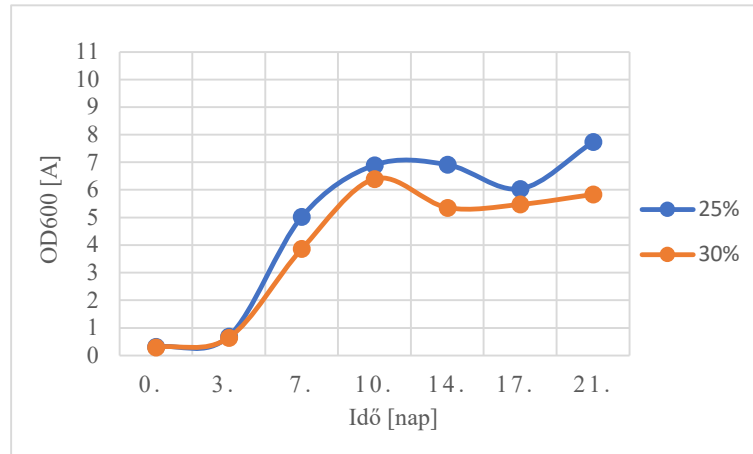
Megvizsgálva az olívaolaj kiegészítésnél mért értékekből felvett diagramot, a 25% keményítőt tartalmazó PLA evőeszköz jelenlétében intenzív tejsav koncentráció növekedésnek voltam tanúja, a kiindulási **4,32 g/ml**-ről a 3. napon **15,01 g/ml**-re változott a mennyiség, és ezt az értéket tartotta a 7. napon is. Az ezt követő mérési időpontban, a 10. napon kapott értékek bizonyulnak a legmagasabbnak, ezen a pontján a kísérletemnek **25,6 g/ml** volt a vizsgálati közeg tejsav tartalma. Innen elkezdtek csökkenni az eredmények, a 21. napon már csak **4,65 g/ml**-t határoztam meg.

A 30%-os keményítő-PLA biokompozitot tartalmazó LAPTg táplevesben detektált eredmények a kiindulási, és 3. napon szinte megegyeztek a 25%-os keményítőt tartalmazó vizsgálati evőeszköz jelenlétében meghatározott tejsav koncentrációval, és ahhoz hasonlóan szintén a 10. napon határoztam meg a legmagasabb értéket **29,54 g/ml**-t. Ettől a ponttól visszaesést állapítottam meg, az utolsó mérési időpontban megfigyelt tejsav tartalom **4,11 g/ml** volt. A 21. naponra mind a kettő típusú biokompozitot tartalmazó mintáim tejsav koncentrációi hasonlóan alakultak. (16. ábra)

Összevetve a két diagramot (15. és 16. ábra), érdekesnek találom, hogy mind a kétféle tápközeg kiegészítés esetén a 10. napon kaptam magasabb eredményeket. Emiatt feltételezem, hogy ezen a pontján a kísérletemnek, már a bomlás termékeket tudtam lemérni.

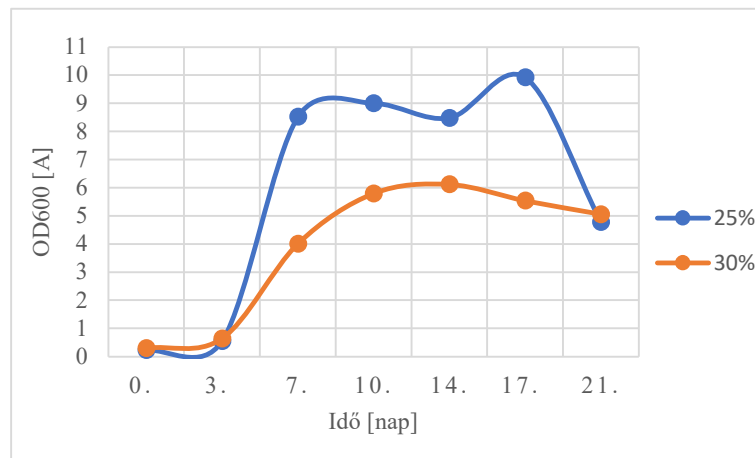
### 5.3.3. Optikai denzitás mérésének eredményei

**17. ábra:** Keményítővel kiegészített tápközegben meghatározott optikai denzitás nyomon követése  
(Forrás: saját munka)



A keményítővel kiegészített LAPTg tápközegben mért kezdeti alacsony abszorbancia értékekből leolvasható, hogy a minták sejtkoncentrációja eredetileg alacsony volt, feltételezéseim szerint a rendszerben levő mikroorganizmusok a harmadik napra adaptálódtak a kialakított környezetükhöz. Megfigyelhető, hogy az optikai denzitás értékei ettől a ponttól kezdve szignifikánsan emelkedni kezdtek, melyből arra tudok következtetni, hogy a jelen levő baktériumok energiaforrásként kezdték el hasznosítani a táplevesben található ásványi anyagokat és tápközeg kiegészítését, valamint magát a PLA darabokat is. A 10. és 17. nap közötti periódusban az optikai denzitás értékeit vizsgálva enyhe visszaesést tapasztaltam, a 25%-os keményítő-PLA biokompozit jelenlétében a 17. napon, a 30%-osnál pedig a 14. napon. A vizsgálati időszakom utolsó napjához közeledve, mind a 25-, mind a 30%-os keményítővel kiegészített vizsgálati szubsztrátumot magába foglaló táplevesben is nőtt a sejtkoncentráció mennyisége. (17. ábra)

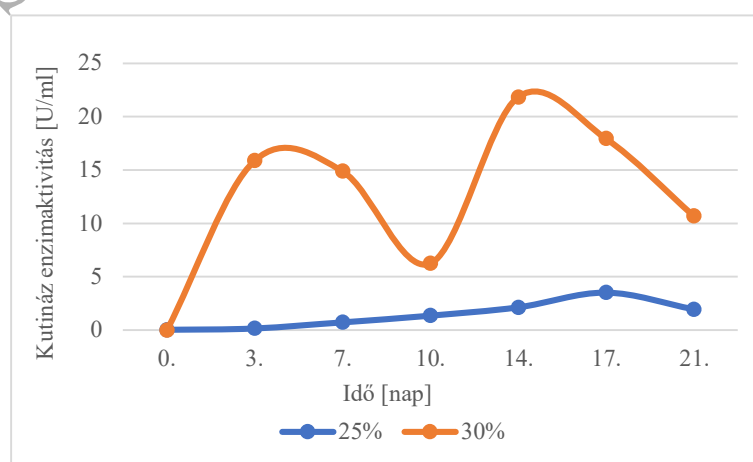
**18. ábra:** Olívaolajjal kiegészített tápközegben meghatározott optikai denzitás nyomon követése  
(Forrás: saját munka)



Az olívaolaj kiegészítésű tápközegben megfigyelt első szembetűnő különbség, hogy a 25%-os vizsgálati eszközt esetében a sejtkoncentráció eredményei magasabb görbét vettek fel a 30%-oshoz képest. A kiindulási értékek ezen tápleves kiegészítés esetében is alacsonyak voltak, és a harmadik naptól figyeltem meg jelentősebb optikai denzitás növekedést, aminek a lefutása a 7. naponál kezd el eltérni egymástól. A 25%-os politejsav szubsztrátum jelenlétében az abszorbancia duplája volt a 30%-osnál mért értékeknek. A 21. napra csökkenő tendenciát mutatott mind a kétféle összetételű politejsav evőeszköz szubsztrátum tartalmú tápközeg optikai denzitása. (18. ábra)

### 5.3.4. Kutináz enzimaktivitás vizsgálata

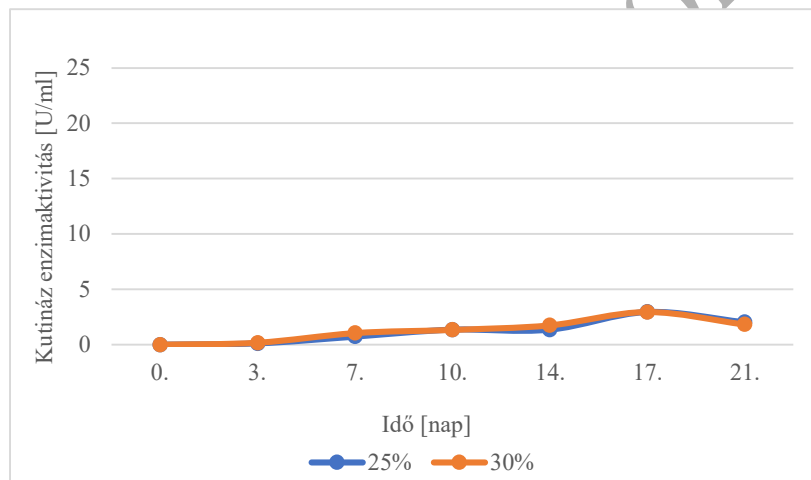
**19. ábra:** Keményítővel kiegészített tápközegben vizsgált konzorcium kutináz enzimkészletének alakulása  
(Forrás: saját munka)





A 19 ábrán megfigyelhető, hogy a 25%-os keményítő-PLA biokompozit darabokat tartalmazó keményítő kiegészítésű tápközegbe beoltott konzorcium jelentősen alacsonyabb kutináz enzimaktivitást mutatott, a 30%-os biopolimer darabok jelenlétében meghatározotthoz képest. Ezen mintáimnál a kutináz mennyisége a nulladik naptól kezdve növekedésnek indult és egészen a 17. napig folytatta ezt a tendenciát, ahol elérte a **3,53 U/ml**-t. A 30%-os keményítő-PLA darabokat magukba foglaló minták kutináz mennyisége már a nulladik naptól meredeken emelkedett és a harmadik napra elérte a **15,89 U/ml**-t, majd a 10. napon visszaesést tapasztaltam, de ezt követően felvette a vizsgálati időszakomban mért maximális kutináz enzimaktivitás értéket **21,85 U/ml**-t.

**20. ábra:** Olívaolajjal kiegészített tápközegben vizsgált konzorcium kutináz enzimkészletének alakulása  
(Forrás: saját munka)



A 20. ábrán látható, hogy a 25- és 30%-os keményítő-PLA darabokat magába foglaló, olívaolaj kiegészítésű LAPTg táplevesben lévő konzorcium által termelt kutináz mennyiségek hasonló lefutást mutattak, ahogyan az a 20. ábrán is megfigyelhető. A 17. napon elérték a **2,9 U/ml**-t, majd a 21. napig csökkenést figyeltem meg.

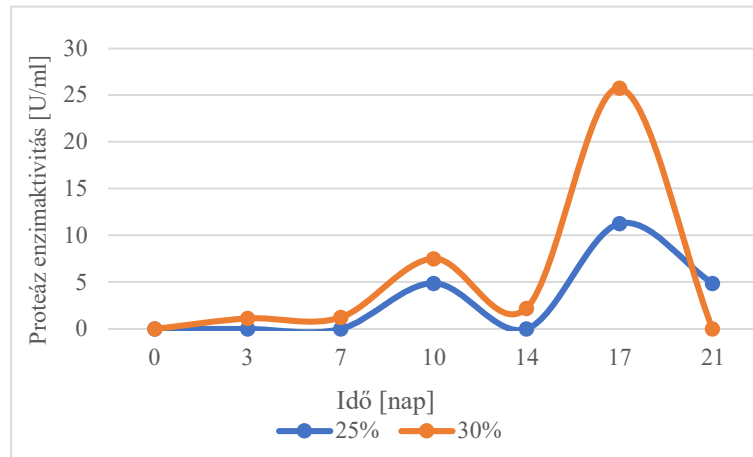
A keményítő kiegészítéssel összehasonlítva a kapott enzimaktivitás értékeim, az olívaolaj kiegészítésnél gyengébb eredményeket figyeltem meg. A 30%-os keményítő-PLA evőeszköz darabokat tartalmazó keményítő kiegészítésű LAPTg tápleveshez adott konzorcium kutináz aktivitása volt szignifikánsan a legkiemelkedőbb.

Bizonyos szakirodalmak alapján az olajos anyagok jelenléte fokozza a kutináz enzimszintézist, de összevetve a kapott eredményeim, feltehetőleg, az általam alkalmazott konzorcium és tápközeg számára ezen kiegészítés nem kedvezett annyira, mint a keményítő jelenléte.

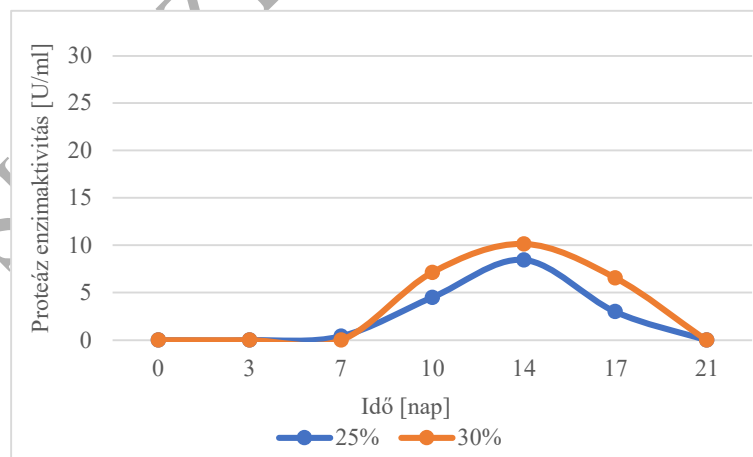
### 5.3.5. Proteáz enzimaktivitás vizsgálata

Az 21. és a 22. ábrán található mérési eredmények alapján megfigyelhető, hogy mind a kétféle kiegészítéssel rendelkező tápközegben található konzorcium rendelkezett proteáz aktivitással a 21 napos kísérleti idő során.

**21. ábra:** Keményítővel kiegészített tápközegben vizsgált konzorcium proteáz enzimkészletének alakulása  
(Forrás: saját munka)



**22. ábra:** Olívaolajjal kiegészített tápközegben vizsgált konzorcium proteáz enzimkészletének alakulása  
(Forrás: saját munka)



A keményítőt tartalmazó kiegészítésnél a 25%- és 30%-os politejsav szubsztrátum mintáim esetében két kiugró értéket figyelhettem meg, az egyiket a 10., a másikat pedig a 17. napnál. A 30%-os keményítőt tartalmazó táplevesbe oltott konzorcium proteáz enzimaktivitása a 17. napra érte el a megfigyelt maximum aktivitás értéket, **25,75 U/ml**-t. Az utolsó mintavételezési

időpontban meghatározott eredmény azt mutatta, hogy a kísérleti periódusom végére már csak a 25%-os keményítő-PLA biokompozit darabok jelenlétében rendelkezett a konzorcium proteáz aktivitással.

A kétféle típusú biokompozitot tartalmazó, olívaolaj kiegészítésű tápközeghez adott konzorciumok esetében csak a 7. naptól kezdve ugrott meg az enzimaktivitás szintje, és a 14. napig növekedett is. Ettől a ponttól folyamatos csökkenés volt detektálható. A 30%-os evőeszköz darabot tartalmazó tápleves konzorciumának tagjai mutatták a legmagasabb enzimaktivitást az olívaolaj kiegészítés esetében, **10,15 U/ml-t**.

A proteáz enzimaktivitás, csak úgy, mint a kutináz enzimek vizsgálatát, azt az eredményt mutatta, hogy a LAPTg táplevesben fermentált 30%-os biopolimer evőeszköz darabok jelenléte és a keményítő kiegészítés indukálta a legmagasabb proteáz aktivitást a 21 napos periódus alatt.

### 5.3.6. A kísérleti periódus végén meghatározott tömegváltozása a keményítő-PLA biokompozit daraboknak

A kísérletem elindításakor 1,5 g összemennyiségű PLA darabokat mértem be. Az alábbi táblázat (14. és 15. táblázat) mutatja a tömegváltozásaim eredményeit %-os értékben megadva.

**14. táblázat:** 0,5% keményítő kiegészítésű tápközegben vizsgált politejsav tömegváltozása  
(Forrás: saját munka)

PLA keményítő tartalma	Tömegcsökkenés [%]
25%	6,7
30%	33,2

**15. táblázat:** 5% olívaolaj kiegészítésű tápközegben vizsgált politejsav tömegváltozása  
(Forrás: saját munka)

PLA keményítő tartalma	Tömegcsökkenés [%]
25%	6,3
30%	7,3

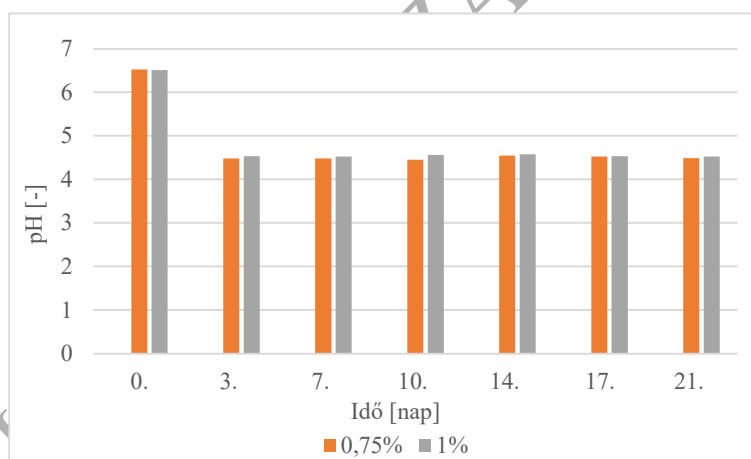
A legkiemelkedőbb eredményt a 30 %-os keményítő tartalmú PLA biodegradálási modellezése mutatta, 0,5 % keményítő kiegészítésű LAPTg táplevesben.

#### 5.4. PLA-keményítő biokompozit biodegradálásának modellezése szubmerz körülmények között 0,75% és 1% keményítő tápközeg kiegészítéssel

Az 5.2. fejezetben taglalt kísérletemben, a 0,5 % keményítővel kiegészített LAPTg táplevesben, a 30 %-os PLA-keményítő biokompozit darabok biológiai bontása volt a leghatékonyabb, **33,23** %-os tömegcsökkenést tapasztaltam. Ezen eredményt alapul véve, a további kutató munkámban az előző vizsgálathoz képest megnövelt keményítő koncentráció jelenlétében vizsgáltam a biodegradálási folyamatokat. 0,75% és 1% keményítőt adagoltam a LAPTg szubmerz tápközeghez külön-külön. A 21 napos vizsgálati időszak alatt, meghatározott időnként mintát vettem, a 45°C-on, 140 rpm rázatási sebességen inkubált lombikjaimból.

##### 5.4.1. Kémhatás nyomon követése

**23. ábra:** 0,75- és 1% keményítővel kiegészített tápközeg kémhatás változása  
(Forrás: saját munka)

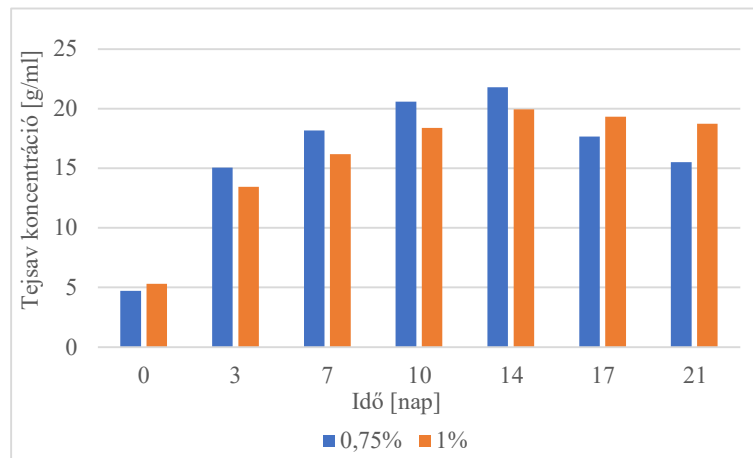


A 23. ábrán található diagramról leolvasható, hogy a tápközegek kiindulási kémhatása **pH 6,5** volt, majd a harmadik napra ez az érték lecsökkent a savas tartományba. A 0,75%-os és az 1%-os keményítővel kiegészített LAPTg táplevesek kémhatás változása között nem volt jelentős különbség megfigyelhető. A 3. naptól kezdve az összes mintám kémhatása **pH 4,5** közeli értéken stabilizálódott. A savas kémhatás megjelenése arra enged következtetni, hogy a tápközegbe oltott termofil baktériumok a PLA darabokat, illetve a tápközeg ásványi anyag tartalmát hasznosították az anyagcsere-folyamataik révén.

#### 5.4.2. Tejsav koncentráció meghatározása

**24. ábra:** 0,75- és 1% keményítővel kiegészített tápközegben meghatározott tejsav tartalom változása

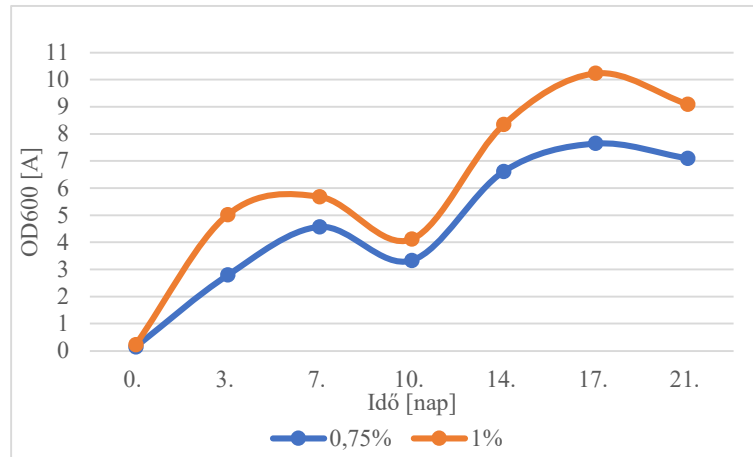
(Forrás: saját munka)



A 0,75 - és 1 % keményítővel kiegészített tápközéget vizsgálva megfigyelhető, hogy a tejsav koncentrációja a kísérlet 14. napjáig emelkedett, majd ettől a ponttól enyhe visszaesés következett be. Az 1 %-os keményítővel kiegészített LAPTg táplevesben a tejsav koncentráció a 3. és 14. nap között ~ **2 g/ml**-el alacsonyabb volt, összehasonlítva a 0,75%-os keményítő kiegészítésű táplevesben meghatározott eredményekkel. Ebből arra tudok következtetni, hogy a 0,75 %-os keményítő tartalmú LAPTg-ben modellezett 30 % keményítőt-PLA vizsgálati darabokat jelenlétében jobban hasznosult a rendelkezésre álló tápanyagforrás. Azonban a 17. és 21. nap között az 1 % keményítő tartalmú táplevesben detektáltam magasabb tejsav tartalmat, a 17. napon ~ **2 g/ml**-el, míg a vizsgálati periódus utolsó napján ~ **3 g/ml**-el többet. (24. ábra)

### 5.4.3. Optikai denzitás mérésének eredményei

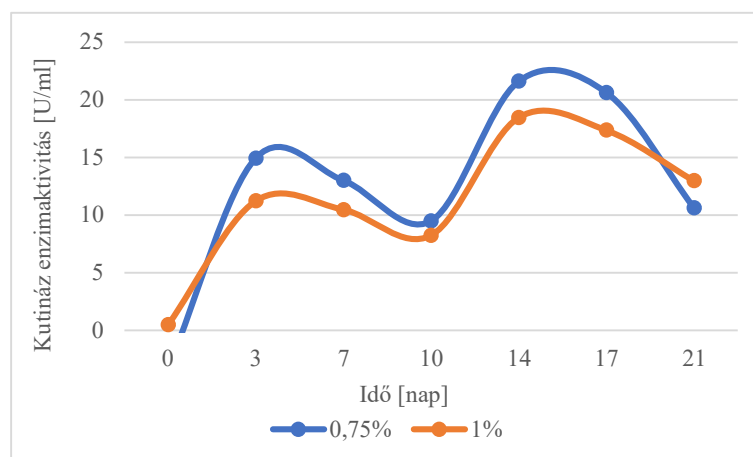
**25. ábra:** 0,75- és 1% keményítővel kiegészített tápközegben meghatározott optikai denzitás nyomon követése  
(Forrás: saját munka)



A vizsgálati periódusban kapott eredményeimnél szembevetve, hogy a görbék lefutása szinte megegyezik. A 7. napig mind a kétféle keményítővel kiegészített táplevesben meghatározott optikai denzitás emelkedett, majd a 10. napon lecsökkent, amit aztán újra egy intenzív növekedés követett a 17. napig. A különbséget a 0,75 %-os és 1%-os keményítő kiegészítésű táplevesben meghatározott értékeknél az jelenti, hogy az 1% keményítő jelenlétében a kísérletem során végig magasabb sejtkoncentráció volt megfigyelhető, ami a 17. napon érte el a maximum értéket. (25. ábra)

### 5.4.4. Kutináz enzimaktivitás vizsgálata

**26. ábra:** 0,75- és 1% keményítővel kiegészített tápközegben vizsgált konzorcium kutináz enzimkészletének alakulása  
(Forrás: saját munka)

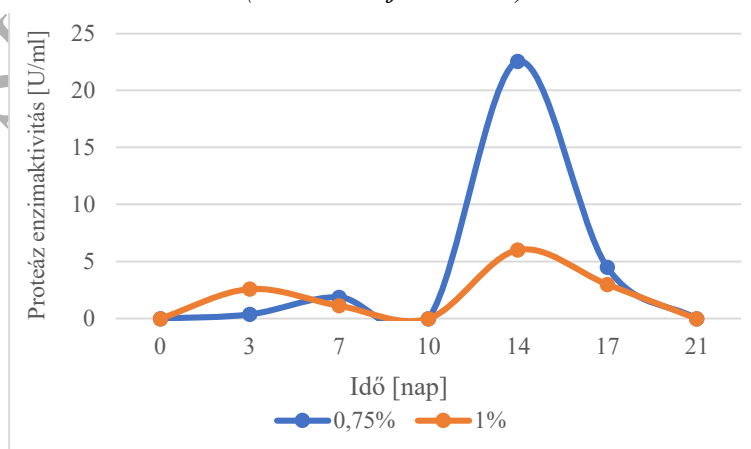


A kutináz enzimaktivitás vizsgálat eredményeit diagramon ábrázolva megfigyelhető, hogy a különböző koncentrációjú tápközeg kiegészítések jelenlétében a vizsgálati közegbe oltott konzorciumok a kísérlet kiindulási időpillanatában nem rendelkeztek enzimaktivitással, majd a harmadik naptól kezdve már detektálható volt a kutináz enzimek jelenléte. A 10. napon visszaesést tapasztaltam, majd megint elkezdtek növekedni a kapott enzimaktivitások. A legkimagaslóbb kutináz enzim mennyiséget a 0,75%-os keményítő tartalmú tápleveshez adott konzorcium mutatta, itt **21,62 U/ml**-t mértem. Összehasonlítva a két tápközeg, a 0,75%-os keményítővel kiegészített LAPTg tápközegből meghatározott kutináz enzimaktivitása a kísérleti periódus során (a 21. nap kivételével), magasabb volt. (26. ábra)

Az 5.3.4. fejezetben taglalt kísérletemben, a 30%-os keményítő- PLA darabok jelenlétében a 0,5%-os keményítővel kiegészített LAPTg tápközegben található konzorcium kutináz aktivitás értékeinek lefutása hasonló az 26. ábrán látható diagramon felvett eredményekhez. Összehasonlítva a kutináz mennyiségeket, a legmagasabb értéket a 0,5%-os keményítő kiegészítésnél mértem, **21,85 U/ml**-t, azonban a 0,75%-os keményítőt tartalmazó táplevesben meghatározott maximális enzimaktivitása (**21,62 U/ml**) sem tér el jelentősen ettől az eredménytől. Az 1%-os keményítőt tartalmazó LAPTg tápleves alkalmazásánál **18,47 U/ml** volt a megfigyelt maximum kutináz aktivitás.

#### 5.4.5. Proteáz enzimaktivitás vizsgálata

**27. ábra:** 0,75- és 1% keményítővel kiegészített tápközegben vizsgált konzorcium proteáz enzimaktivitásának alakulása  
(Forrás: saját munka)



A proteáz enzimaktivitást a harmadik naptól tudtam meghatározni, és még a hetedik napon is detektálható volt, azonban a 10. napon alacsonyabb eredményeket figyelhettem meg. Az OD

600 és a kutináz enzimaktivitás vizsgálatakor is a 10. napon volt csökkenés megfigyelhető, emiatt elképzelhetőnek tartom, hogy ebben az időpillanatban nagyobb mértékben következett be sejthalál. A 0,75%-os keményítő tápközeg kiegészítés a proteáz aktivitás tekintetében a 14. napon szemmel láthatóan kiemelkedőbb eredményt produkált, az 1%-os kiegészítéshez képest. A kísérlet ezen pontján **22,56 U/ml** proteáz aktivitást mértem. (27. ábra)

Az eredményeimet összehasonlítva az 5.3.5. fejezetben található, 21. ábrán látható 30%-os keményítő-PLA keveréket tartalmazó, 0,5% keményítővel kiegészített tápközegben meghatározott proteáz aktivitással, az első szembetűnő különbség, hogy a mintáim a 17. napra érték el a maximális proteáz értéket (**25,75 U/ml**), míg az 0,75- és 1%-os keményítő kiegészítés jelenlétében már a 14. napon. A 0,75- és 0,5%-os keményítő kiegészítés esetében hasonló eredmény volt mérhető.

#### 5.4.6. A kísérleti periódus végén meghatározott tömegváltozása a 30%-os keményítő-PLA biokompozit daraboknak

**16. táblázat:** Kétféle keményítő kiegészítésű táplevesbe helyezett 30%-os biokompozit darabok tömegváltozása  
(Forrás: saját munka)

Tápközeg keményítő kiegészítése	Tömegcsökkenés [%]
0,75%	38,6
1%	34,2

A 0,75% keményítőt tartalmazó LAPTg tápközegbe helyezett evőeszköz darabok tömegcsökkenése kiemelkedő volt, elérte a **38,6%-ot**, ami magasabb, mint az előző kísérletem során tapasztalt 0,5 % keményítővel kiegészített LAPTg tápközegből vett 30 %-os keményítő-PLA vizsgálati eszköz tömegcsökkenés (**33,23%**). Ezen eredmények alapján a 0,75% keményítő kiegészítésű LAPTg tápközeg hatékonyabb lehet a PLA darabok biológiai bontásának modellezéséhez. (16. táblázat)



## 6. Következtetések és javaslatok

A kísérleteim elvégzése során különböző tápközegekhez adott kiegészítések hatását vizsgáltam az enzim szintézisének és a biológiai bontás hatékonyságának vonatkozásában. Összességében arra a következtetésre jutottam, hogy az alkalmazott táplevesem keményítő kiegészítése jelentős kutináz és proteáz enzim mennyiség termelődését indukálta, a biológiai folyamatok és a kialakított környezet eredményeképpen. Mindemellett az olajos kiegészítés jelenlétében, az általam beállított hőmérséklet, tápközeg összetétel és konzorcium nem segítette az enzimtermelés serkentését, annak ellenére, hogy bizonyos szakirodalmak az olajos anyagok/lipidek kutináz szintézist fokozó tulajdonságairól számolnak be. (Castro-Ochoa *et al.*, 2012) Ahhoz, hogy a kapott eredményeimben biztos lehessenek, a kísérlet megismétlésére és további vizsgálatok elvégzésére lenne szükség.

A PLA bioműanyagok biodegradációjának mélyebb megértése és hatékonyabbá tétele érdekében számos különböző irányvonalon lehetne elindulni a jövőben történő kutató munkám során. Az egyik ilyen lehetőség a konzorciumok összetételének bővítése vagy változtatása lenne, amelyet nem feltétlenül csak termofil baktériumok bevonásával, hanem egyéb mikroorganizmusok, például penészgombák hozzáadásával alakítanék ki. Továbbá a szén források mellett, nitrogén források vizsgálatát is fontolóra venném tápközeg kiegészítésként, többféle koncentrációban, például aminosavakat, kazeint, kollagént vagy pedig elasztint, használnék fel, a szakirodalmak javaslatai alapján. Ezen kívül úgy gondolom fontos figyelembe venni azt a tényt, hogy a kutinázon és a proteázon kívül más kísérő enzimaktivitások (celluláz és lipáz) is befolyásolhatják a bontási folyamatokat. Az eddigiekben említett aspektusok mellett, a fizikai paraméterek optimalizálása is hatással van a bontásban részt vevő enzimek szintézisére, ilyen a hőmérséklet, pH, rázatási sebesség. A termofil baktériumokkal végzett munka esetében például lehetőség nyílna a hőmérséklet fokozatos emelésére, kezdve 45°C-tól egészen 60-80°C-ig, különböző körülmények között.

A biológiai folyamatok hatékonyságának nyomon követése céljából HPLC analitikai módszer használatát is fontolóra venném, amely a vizsgálati rendszerben keletkező szénhidrátok és szerves savak összetételéről szolgálna bővebb információval számomra.

Abban az esetben pedig, ha sikerülne egy hatékony bontást és enzimszintézist megállapítani, lehetőség adódna a lépték növelésre is.

## 7. Összefoglalás

A politejsav (PLA) egy biopolimer, amely potenciálisan kiválthatja a petrokémiai eredetű műanyagokat, amik a környezetbe kerülve évtizedekig fennmaradhatnak, ezúton hozzájárulva a környezeti szennyezéshez és az ökológiai károkhoz. Az enzimatis biológiai lebomlásának megértésével hatékonyabbá válik a politejsav alapú termékek tervezése és hulladékként való kezelése, ami a környezetterhelés csökkenéséhez vezethet természetes és fenntartható módon. A szakdolgozatomban a keményítő tartalmú politejsav biopolimer evőeszközök biodegradálhatóságának modellezését vizsgáltam, szubmerz, rázatott körülmények között. A bontást végző, termofil baktériumokból álló konzorciumot a *Thermobifida cellulosylitica* B1997, *Thermobifida fusca* II Cell, és *Thermus composti* B2340 törzsekből alakítottam ki. Az alkalmazott mikroorganizmusok proteolitikus- és észteráz típusú enzimkészletének meglétéről, illetve a tejsav hasznosítási képességeikről előzetesen elvégzett törzsszelekciós módszerekkel bizonyosodtam meg. Az első kísérletem során kétféle táplevesben, a TPY- és a LAPTg-ben követtem nyomon a 25- és 30%-os keményítő-PLA szubsztrátumok biológiai bonthatóságát, mely során a LAPTg tápközegben magasabb bontási százalékot sikerült elérnem. Emiatt a kutató munkámat ezen nitrogén forrásban gazdag tápleves két változatának kialakításával folytattam, ahol az egyiket 0,5% keményítővel, a másikat pedig 5% olívaolajjal egészítettem ki, mind az enzimtermelés, mind a biodegradáció fokozásának céljából. Keményítő jelenlétében, az olívaolaj kiegészítéshez képest jelentősebb politejsav-depolimeráz enzimaktivitást és szubsztrátum tömegcsökkenést detektáltam. A 30%-os keményítő-PLA vizsgálati darabok tömege **33,2%** -al csökkent, amelyhez kiemelkedő, **21,85 U/ml** kutináz és **25,75 U/ml** proteáz enzimaktivitás társult. Mivel a táplevesben a keményítő kedvezőbb enzimaktivitás és bontási eredményeket adott, az utolsó kísérletemben a közeget megnövelt keményítő koncentráció jelenlétében vizsgáltam (0,75% és 1% keményítő kiegészítés). A 0,75%-os keményítő kiegészítést tartalmazó LAPTg táplevest felhasználva figyeltem meg a legjelentősebb tömegváltozást, amelyben a 30%-os keményítő-PLA biokompozit darabok **38,6%**-os tömegcsökkenését tapasztaltam, 45°C-on, 140 rpm-es rázatás mellett. Ezen eredményemet alátámasztja, a kutináz és proteáz enzimkészletek alakulása a 21 napon keresztül tartó vizsgálati időm során. Ebben az esetben a legmagasabb kutináz aktivitás **21,62 U/ml**, míg a proteáz aktivitás csúcsa **22,56 U/ml** volt. Úgy hiszem, hogy az elvégzett munkám eredményei jó alapként szolgálhatnak a további politejsav keverékek biológiai bontásának kutatásához.

## 8. Irodalomjegyzék

Ali, S. S., Elsamahy, T., Abdelkarim, E. A., Al-Tohamy, R., Kornaros, M., Ruiz, H. A., ... & Sun, J. (2022). Biowastes for biodegradable bioplastics production and end-of-life scenarios in circular bioeconomy and biorefinery concept. *Bioresource Technology*, 127869. DOI: 10.1016/j.biortech.2022.127869

Avérous, L. (2008). Polylactic acid: synthesis, properties and applications. In *Monomers, polymers and composites from renewable resources* (pp. 433-450). Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-08-045316-3.00021-1

Borshchevskaya, L. N., Gordeeva, T. L., Kalinina, A. N., & Sineokii, S. P. (2016). Spectrophotometric determination of lactic acid. *Journal of analytical chemistry*, 71, 755-758. DOI: 10.1134/S1061934816080037

Butbunchu, N., & Pathom-Aree, W. (2019). Actinobacteria as promising candidate for polylactic acid type bioplastic degradation. *Frontiers in microbiology*, 10, 2834. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02834

Castro-Ochoa, D., Peña-Montes, C., González-Canto, A., Alva-Gasca, A., Esquivel-Bautista, R., Navarro-Ocaña, A., & Farrés, A. (2012). ANCUT2, an extracellular cutinase from *Aspergillus nidulans* induced by olive oil. *Applied biochemistry and biotechnology*, 166, 1275-1290. DOI: 10.1007/s12010-011-9513-7

Chen, S., Su, L., Billig, S., Zimmermann, W., Chen, J., & Wu, J. (2010). Biochemical characterization of the cutinases from *Thermobifida fusca*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 63(3-4), 121-127. DOI: 10.1016/j.molcatb.2010.01.001

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

Da Costa, M. S., Rainey, F. A., & Nobre, M. F. (2006). The genus *Thermus* and relatives. *The prokaryotes*, 7, 797-812. DOI: 10.1007/0-387-30747-8\_32

de Souza Vandenberghe, L. P., Pandey, A., Sirohi, R., & Soccol, C. R. (Eds.). (2023). *Second and Third Generation Bioplastics: Production, Application, and Innovation*. CRC Press. DOI: 10.1201/9781003344018-1

- Elsawy, M. A., Kim, K. H., Park, J. W., & Deep, A. (2017). Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 79, 1346-1352. DOI: 10.1016/j.rser.2017.05.143
- Farrington, D. W., Lunt, J., Davies, S., & Blackburn, R. S. (2005). Poly (lactic acid) fibers. *Biodegradable and sustainable fibres*, 6, 191-220. DOI: 10.1533/9781845690991.191
- Filho, W. L., Barbir, J., Abubakar, I. R., Paço, A., Stasiskiene, Z., Hornbogen, M., ... & Klõga, M. (2022). Consumer attitudes and concerns with bioplastics use: An international study. *PLoS One*, 17(4), e0266918. DOI: 10.1371/journal.pone.0266918
- Findrik, E., & Meixner, O. (2023). Drivers and barriers for consumers purchasing bioplastics—A systematic literature review. *Journal of Cleaner Production*, 137311. DOI: 10.1016/j.jclepro.2023.137311
- Goel, V., Luthra, P., Kapur, G. S., & Ramakumar, S. S. V. (2021). Biodegradable/bioplastics: myths and realities. *Journal of Polymers and the Environment*, 29, 3079-3104. DOI:10.1007/s10924-021-02099-1
- Gomez del Pulgar, E. M., & Saadeddin, A. (2014). The cellulolytic system of *Thermobifida fusca*. *Critical reviews in microbiology*, 40(3), 236-247. DOI: 10.3109/1040841X.2013.776512
- Haider, T. P., Völker, C., Kramm, J., Landfester, K., & Wurm, F. R. (2019). Plastics of the future? The impact of biodegradable polymers on the environment and on society. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(1), 50-62. DOI: 10.1002/anie.201805766
- Hamad, K., Kaseem, M., Ayyoob, M., Joo, J., & Deri, F. (2018). Polylactic acid blends: The future of green, light and tough. *Progress in Polymer Science*, 85, 83-127. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2018.07.001
- Hegyesi, N., Zhang, Y., Kohári, A., Polyák, P., Sui, X., & Pukánszky, B. (2019). Enzymatic degradation of PLA/cellulose nanocrystal composites. *Industrial Crops and Products*, 141, 111799. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.111799
- Ibrahim, N. I., Shahar, F. S., Sultan, M. T. H., Shah, A. U. M., Safri, S. N. A., & Mat Yazik, M. H. (2021). Overview of Bioplastic Introduction and Its Applications in Product Packaging. *Coatings*, 11(11), 1423. DOI:10.3390/coatings11111423
- Ilyas, R. A., Sapuan, S. M., Harussani, M. M., Hakimi, M. Y. A. Y., Haziq, M. Z. M., Atikah, M. S. N., ... & Asrofı, M. (2021). Polylactic acid (PLA) biocomposite: Processing, additive

manufacturing and advanced applications. *Polymers*, 13(8), DOI: 1326.10.3390/polym13081326

Institute for Bioplastics and Biocomposites, (2022) Hannover University of Applied Sciences and Arts, Biopolymers facts and statistics ISSN (Print) 2363-8559, ISSN (Online) 2510-3431

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.

Jem, K. J., & Tan, B. (2020). The development and challenges of poly (lactic acid) and poly (glycolic acid). *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, 3(2), 60-70. DOI: 10.1016/j.aiepr.2020.01.002

Jiménez, L., Mena, M. J., Prendiz, J., Salas, L., & Vega-Baudrit, J. (2019). Polylactic acid (PLA) as a bioplastic and its possible applications in the food industry. *J Food Sci Nutr*, 5(2), 2-6. DOI: 10.24966/FSN-1076/100048

Jiménez, L., Mena, M. J., Prendiz, J., Salas, L., & Vega-Baudrit, J. (2019). Polylactic acid (PLA) as a bioplastic and its possible applications in the food industry. *J Food Sci Nutr*, 5(2), 2-6. DOI: 10.24966/FSN-1076/100048

Johansson, C., Bras, J., Mondragon, L., Nechita, P., Plackett, D., Simon, P., ... & Aucejo, S. (2012). Renewable fibers and bio-based materials for packaging applications—a review of recent developments. *BioResources*, 7(2), 2506-2552. DOI: 10.15376/biores.7.2.Johansson

Jyotishkumar Parameswaranpillai, Suchart Siengchin, Nisa V. Salim, Jinu Jacob George, Aishwarya Poulose - *Polylactic Acid-Based Nanocellulose and Cellulose Composites*-CRC Press (2022)

Kawai, F. (2010). Polylactic acid (PLA)-degrading microorganisms and PLA depolymerases. In *Green Polymer Chemistry: Biocatalysis and Biomaterials* (pp. 405-414). American Chemical Society. DOI: 10.1021/bk-2010-1043.ch027

"Kitamoto H.K., Shinozaki Y., Cao X.H., Morita T., Konishi M., Tago K., Kajiwara H., Koitabashi M., Yoshida S., Watanabe T., Sameshima-Yamashita Y., Nakajima-Kambe T., Tsushima S. (2011) Phyllosphere yeasts rapidly break down biodegradable plastics. *AMB Express*. 1:44.

doi: 10.1186/2191-0855-1-44."

- Kukolya, J., Nagy, I., Ládai, M., Tóth, E., Oravec, O., Márialigeti, K., & Hornok, L. (2002). *Thermobifida cellulolytica* sp. nov., a novel lignocellulose-decomposing actinomycete. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(4), 1193-1199. DOI: 10.1099/00207713-52-4-1193
- 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.
- Kumar, S., & Nussinov, R. (2001). How do thermophilic proteins deal with heat? *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58, 1216-1233. DOI: 10.1007/PL00000935
- Lasprilla, A. J., Martinez, G. A., Lunelli, B. H., Jardini, A. L., & Maciel Filho, R. (2012). Polylactic acid synthesis for application in biomedical devices—A review. *Biotechnology advances*, 30(1), 321-328. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.06.019
- Li, M. M., Lv, A. P., Zhao, Z. Y., Xian, W. D., Lian, Z. H., OuYang, Y. T., ... & Li, W. J. (2022). Description of five novel thermophilic species of the genus *Thermus*: *Thermus hydrothermalis* sp. nov., *Thermus neutrinimicus* sp. nov., *Thermus thalpophilus* sp. nov., *Thermus albus* sp. nov., and *Thermus altitudinis* sp. nov., isolated from hot spring sediments. *Systematic and Applied Microbiology*, 45(6), 126361. DOI: 10.1016/j.syapm.2022.126361
- MANE, R. S., & NADAF, A. (2022). BRIEF REVIEW ON THERMOPHILIC BACTERIA AND THEIR APPLICATIONS. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 14(1), 15–19. DOI: 10.22159/ijcpr.2022v14i1.44107
- Masi, C., Gemechu, G., & Tafesse, M. (2021). Isolation, screening, characterization, and identification of alkaline protease-producing bacteria from leather industry effluent. *Annals of Microbiology*, 71, 1-11. DOI: 10.1186/s13213-021-01631-x
- Matter, I. R., Al-Omari, A. W., & Mohammed, N. (2023). Industrial Applications of Microbial Protease: A Review. *Academic Science Journal*, 1(3), 141-160. DOI:10.24237/ASJ.01.03.721CC
- Mayekar, P. C., Limsukon, W., Bher, A., & Auras, R. (2023). Breaking It Down: How Thermoplastic Starch Enhances Poly (lactic acid) Biodegradation in Compost— A Comparative Analysis of Reactive Blends. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2023, 11, 9729-9737. DOI: 10.1021/acssuschemeng.3c01676

- Mohammad, B. T., Al Daghistani, H. I., Jaouani, A., Abdel-Latif, S., & Kennes, C. (2017). Isolation and characterization of thermophilic bacteria from Jordanian hot springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* isolates as potential producers of thermostable enzymes. *International journal of microbiology*, 2017. DOI:10.1155/2017/6943952
- Murariu, M., & Dubois, P. (2016). PLA composites: From production to properties. *Advanced drug delivery reviews*, 107, 17-46. DOI: 10.1016/j.addr.2016.04.003
- Nampoothiri, K. M., Nair, N. R., & John, R. P. (2010). An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource technology*, 101(22), 8493-8501. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.05.092
- Naser, A. Z., Deiab, I., & Darras, B. M. (2021). Poly (lactic acid) (PLA) and polyhydroxyalkanoates (PHAs), green alternatives to petroleum-based plastics: A review. *RSC advances*, 11(28), 17151-17196. DOI: 10.1039/D1RA02390J
- Niaounakis, M. (2015). *Biopolymers: applications and trends*. William Andrew. ISBN: 978-0-323-35399-1
- 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
- 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.
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial proteases applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 110. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00110
- Reddy, R. L., Reddy, V. S., & Gupta, G. A. (2013). Study of bio-plastics as green and sustainable alternative to plastics. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, 3(5), 76-81. ISSN 2250-2459
- Rosato, A., Romano, A., Totaro, G., Celli, A., Fava, F., Zanaroli, G., & Sisti, L. (2022). Enzymatic degradation of the most common aliphatic bio-polyesters and evaluation of the mechanisms involved: an extended study. *Polymers*, 14(9), 1850. DOI: 10.3390/polym14091850

- Samuel, R. (2022). Bioplastics and their Impact on Environment. Department of Pharmacy, University Health Sciences and Pharmacy. DOI:10.4172/J Med.Orgnichem.9.4.002
- Silva, C., Da, S., Silva, N., Matamá, T., Araújo, R., Martins, M., ... & Cavaco-Paulo, A. (2011). Engineered *Thermobifida fusca* cutinase with increased activity on polyester substrates. *Biotechnology Journal*, 6(10), 1230-1239. DOI: 10.1002/biot.201000391
- Sin, L. T., & Tuen, B. S. (2019). Polylactic acid: a practical guide for the processing, manufacturing, and applications of PLA. William Andrew. DOI: 10.1016/C2017-0-01057-1
- Singhvi, M., & Gokhale, D. (2013). Biomass to biodegradable polymer (PLA). *Rsc Advances*, 3(33), 13558-13568. DOI:10.1039/C3RA41592A
- Sudhakar, M. P., Maurya, R., Mehariya, S., Karthikeyan, O. P., Dharani, G., Arunkumar, K.,... & Pugazhendhi, A. (2023). Feasibility of bioplastic production using micro and macro algae-A review. *Environmental Research*, 117465. DOI: 10.1016/j.envres.2023.117465
- Teixeira, S., Eblagon, K. M., Miranda, F., R. Pereira, M. F., & Figueiredo, J. L. (2021). Towards controlled degradation of poly (lactic) acid in technical applications. *C*, 7(2), 42. DOI: 10.3390/c7020042
- Tokiwa, Y., & Calabia, B. P. (2006). Biodegradability and biodegradation of poly (lactide). *Applied microbiology and biotechnology*, 72, 244-251. DOI: 10.1007/s00253-006-0488-1
- Tokiwa, Y., & Calabia, B. P. (2006). Biodegradability and biodegradation of poly (lactide). *Applied microbiology and biotechnology*, 72, 244-251. DOI:10.1007/s00253-006-0488-1
- Tomás, M. S. J., Bru, E., & Nader-Macías, M. E. (2003). Comparison of the growth and hydrogen peroxide production by vaginal probiotic lactobacilli under different culture conditions. *American journal of obstetrics and gynecology*, 188(1), 35-44. DOI:10.1067/mob.2003.123
- Tóth, Á., Baka, E., Luzics, S., Bata-Vidács, I., Nagy, I., Bálint, B., ... & Kukolya, J. (2017). Plant polysaccharide degrading enzyme system of *Thermobifida cellulositica* TB100 T revealed by de novo genome project data. *Acta Alimentaria*, 46(3), 323-335. DOI: 10.1556/066.2016.0014
- Trehan, N. (2018). Microbial proteases: a review. DOI: 10.20959/wjpr20191-12524



- Trivedi, A. K., Gupta, M. K., & Singh, H. (2023). PLA Based Biocomposites for Sustainable Products: A Review. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*. DOI: 10.1016/j.aiepr.2023.02.00
- Usman, N. J., Rodrid, K., Tuncharoen, N., Meegnoen, K., Pason, P., & Jongruja, N. (2023). Characterization of recombinant cutinase from *Thermobifida cellulositytica* and its application in tomato cutin degradation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 47, 102603. DOI: 10.1016/j.bcab.2023.102603
- Vajna, B., Kanizsai, S., Keki, Z., Márialigeti, K., Schumann, P., & Toth, E. M. (2012). *Thermus composti* sp. nov., isolated from oyster mushroom compost. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(Pt\_7), 1486-1490. DOI: 10.1099/ijs.0.030866-0
- Visakh, P. M., & Yu, L. (Eds.). (2015). *Starch-based blends, composites and nanocomposites*. Royal Society of Chemistry. DOI: 10.1039/9781782622796-FP001
- Wilfred, O., Tai, H., Marriott, R., Liu, Q., Tverezovskiy, V., Curling, S., Fan, Z., & Wang, W. (2018). Biodegradation of Polyactic Acid and starch composites in compost and soil. *International Journal of Nano Research*, 1(2), 1-11. ISSN: 2581-6608
- Yadav, D., Srivastava, A., Yadav, A., Mehla, B., & Srivastava, M. (2022). Development and sustainability of bioplastics: A review. *Asian Journal of Green Chemistry*, 6(2), 112-128. DOI: 10.22034/ajgc.2022.2.2
- Yang, C., Wu, H., Cai, M., Zhou, Y., Guo, C., Han, Y., & Zhang, L. (2023). Valorization of Biomass-Derived Polymers to Functional Biochar Materials for Supercapacitor Applications via Pyrolysis: Advances and Perspectives. *Polymers*, 15(12), 2741. DOI:10.3390/polym15122741
- 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
- Yu, J., Xu, S., Liu, B., Wang, H., Qiao, F., Ren, X., & Wei, Q. (2023). PLA bioplastic production: from monomer to the polymer. *European Polymer Journal*, 112076. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2023.112076

Zaaba, N. F., & Jaafar, M. (2020). A review on degradation mechanisms of polylactic acid: Hydrolytic, photodegradative, microbial, and enzymatic degradation. *Polymer Engineering & Science*, 60(9), 2061-2075. DOI: 10.1002/pen.25511

"Zhang, Z., Huang, S., Cai, D., Shao, C., Zhang, C., Zhou, J., ... & Tan, T. (2022). Depolymerization of post-consumer PET bottles with engineered cutinase 1 from *Thermobifida cellulositica*. *Green Chemistry*, 24(15), 5998-6007.

DOI: 10.1039/D2GC01834A"

Internetes forrás 1.:

Plastics Europe AISBL, (2022) *Plastics – The Facts* <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/>

Internetes forrás 2.:

IfBB - Institute for Bioplastics and Biocomposites (ed.): *Biopolymers – Facts and statistics 2022*, Hanover 2023. ISSN (Print) 2363-8559; ISSN (Online) 2510-3431"

Internetes forrás 3.:

[https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium830.pdf](https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium830.pdf)

Internetes forrás 4.:

[https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium83.pdf](https://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium83.pdf)

Internetes forrás 5.:

<https://www.atcc.org/-/media/product-assets/documents/microbial-media-formulations/7/1/5/atcc-medium-715.pdf>

## 9. Ábrajegyzék

1. ábra: Egyes bioműanyag típusok eloszlása a globális termelésben .....	7
2. ábra: Tejsav-sztereoizomerek kémiai szerkezete: Az L-(+) -tejsav és D-(-) -tejsav .....	9
3. ábra: A politejsav lehetséges polimerizációs útvonalai.....	10
4. ábra: Keményítő tartalmú politejsav biokompozit evőeszköz .....	20
5. ábra: Kalibrációs egyenes proteáz enzimaktivitás meghatározásához .....	23
6. ábra: Kalibrációs egyenes kutináz enzimaktivitás meghatározásához.....	25
7. ábra: A tejsavhasznosítás screenelési módszer eredménye.....	27
8. ábra: A proteolitikus enzimműködés screenelésének eredménye .....	28
9. ábra: Az észteráz típusú enzimműködés screenelésének eredménye .....	29
10. ábra: A 25-és 30%-os keményítővel kiegészített PLA jelenlétében vizsgált LAPTg és TPY tápleves kémhatása.....	30
11. ábra: Kétféle tápközegben vizsgált konzorcium kutináz enzimműködésének alakulása ....	31
12. ábra: Kétféle tápközegben vizsgált konzorcium proteáz enzimműködésének alakulása .....	31
13. ábra: Keményítővel kiegészített tápközeg kémhatás változása.....	33
14. ábra: Olívaolajjal kiegészített tápközeg kémhatás változása .....	34
15. ábra: Keményítővel kiegészített tápközegben meghatározott tejsav tartalom változása ...	35
16. ábra: Olívaolajjal kiegészített tápközegben meghatározott tejsav tartalom változása .....	36
17. ábra: Keményítővel kiegészített tápközegben meghatározott optikai denzitás nyomon követése.....	37
18. ábra: Olívaolajjal kiegészített tápközegben meghatározott optikai denzitás nyomon követése.....	38
19. ábra: Keményítővel kiegészített tápközegben vizsgált konzorcium kutináz enzimműködésének alakulása .....	38
20. ábra: Olívaolajjal kiegészített tápközegben vizsgált konzorcium kutináz enzimműködésének alakulása.....	39
21. ábra: Keményítővel kiegészített tápközegben vizsgált konzorcium proteáz enzimműködésének alakulása .....	40
22. ábra: Olívaolajjal kiegészített tápközegben vizsgált konzorcium proteáz enzimműködésének alakulása.....	40
23. ábra: 0,75- és 1% keményítővel kiegészített tápközeg kémhatás változása .....	42
24. ábra: 0,75- és 1% keményítővel kiegészített tápközegben meghatározott tejsav tartalom változása.....	43

25. ábra: 0,75- és 1% keményítővel kiegészített tápközegben meghatározott optikai denzitás nyomon követése .....	44
26. ábra: 0,75- és 1% keményítővel kiegészített tápközegben vizsgált konzorcium kutináz enzimkészletének alakulása .....	44
27. ábra: 0,75- és 1% keményítővel kiegészített tápközegben vizsgált konzorcium proteáz enzimaktivitásának alakulása.....	45

KOCSIS ESZTER SZAKDOLGOZAT

## 10. Táblázatjegyzék

1. táblázat: PLA-TPS kompozitok biodegradációjának vizsgálata .....	13
2. táblázat: Alkalmazott termofil baktériumtörzsek .....	18
3. táblázat: R2 tápleves összetétele .....	18
4. táblázat: Czapex-pepton tápleves összetétele.....	18
5. táblázat: A tejsav hasznosítására alkalmazott szilárd tápközeg összetétele.....	19
6. táblázat: Proteolitikus enzimrendszer kimutatására alkalmazott szilárd tápközeg összetétele .....	19
7. táblázat: Észteráz típusú enzimrendszer kimutatására alkalmazott szilárd tápközeg összetétele .....	19
8. táblázat: TPY (Trypticase-Phytone peptone-Yeast extract) tápközeg összetétele .....	20
9. táblázat: LAPTg tápközeg összetétele.....	20
10. táblázat: L-tirozin hígítási sor összetétele kalibrációhoz .....	23
11. táblázat: Kutináz enzimaktivitás mérése során alkalmazott reakcióelegy .....	24
12. táblázat: p-nitrofenol hígítási sor összetétele kalibrációhoz .....	24
13. táblázat: A 25- és 30%-os keményítő-PLA biokompozit tömegváltozása.....	32
14. táblázat: 0,5% keményítő kiegészítésű tápközegben vizsgált politejsav tömegváltozása .	41
15. táblázat: 5% olívaolaj kiegészítésű tápközegben vizsgált politejsav tömegváltozása .....	41
16. táblázat: Kétféle keményítő kiegészítésű táplevesbe helyezett 30%-os biokompozit darabok tömegváltozása.....	46

## NYILATKOZAT

### a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Kocsis Eszter

A Hallgató Neptun kódja: DGXLUC

A dolgozat címe: Keményítővel kiegészített politejsav alapú biokompozit biodegradálásának modellezése termofil baktériumtörzsekből kialakított konzorcium felhasználásával

A megjelenés éve: 2023

A konzulens intézetének neve: Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

A konzulens tanszékének a neve: Biomérnöki és Erjedéssipari Technológia Tanszék

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

Ha a fenti nyilatkozattal valótlant 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 mindenkor szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

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

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelté után nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: 2023 év november hó 13 nap

*Kocsis Eszter*

Hallgató aláírása

## NYILATKOZAT

Kocsis Eszter (név) (hallgató Neptun azonosítója: DGXLUC) konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A szakdolgozatot a záróvizsgán történő védeésre javaslom / nem javaslom.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem

Kelt: 2023 év november hó 13 nap



---

belső konzulens