

SZAKDOLGOZAT

Bajzák Emma Klára - Szakdolgozat

Bajzák Emma Klára

2023



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék

**Komposztból izolált baktériumok celluláz, xilanáz és pektináz
aktivitásprofiljának vizsgálata**

Bajzák Emma Klára

Budapest

2023

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Szak neve: BSc Biomérnöki

Modul neve: Alkalmazott biotechnológiai

Modul szerinti tanszék: Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

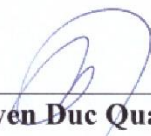
Szakedolgozat készítés helye: Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Hallgató: Bajzák Emma Klára

A szakedolgozat címe: **Komposztból izolált baktériumok celluláz, xilanáz és pektináz aktivitásprofiljának vizsgálata**

Konzulens: Dr. Kohári-Farkas Csilla egyetemi adjunktus

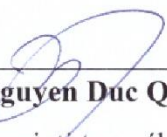
Beadás dátuma: 2023.05.08.



Dr. Nguyen Duc Quang
tanszékvezető



Dr. Kohári-Farkas Csilla
konzulens



Dr. Nguyen Duc Quang
modul szerinti tanszék vezetője

TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETÉS	6
2	CÉLKITŰZÉSEK	7
3	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
3.1	A komposztálás definíciója.....	8
3.2	A komposztálás folyamata.....	8
3.3	A komposztálás gazdasági jelentősége	9
3.4	A növényi sejtfal szerkezete és összetétele.....	9
3.4.1	A cellulóz	10
3.4.2	A xilán	11
3.4.3	A pektin	12
3.5	A növényi rostok enzimes bontása	13
3.5.1	Cellulázok szerepe.....	13
3.5.2	A xilanáz szerepe	16
3.5.3	A pektináz szerepe	16
4	ANYAG ÉS MÓDSZER.....	20
4.1	Felhasznált anyagok.....	20
4.1.1	Mikroorganizmusok	20
4.1.2	Tápagarak és tápközegek	20
4.1.3	Oldatok és pufferek	22
4.2	Alkalmazott módszerek	22
4.2.1	Gyors screenelés.....	22
4.2.2	Mikrobiális rostbontás és enzimfermentáció.....	23
4.2.3	Extracelluláris enzimaktivitás mérési módszerek	24
4.2.4	Redukáló cukortartalom meghatározása	25
5	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	27
5.1	Törzsek előszelektálása.....	27
5.2	Az előszelektált baktérium törzsek teljesítménye.....	29
5.2.1	Beoltási technikák hatása a törzsek aktivitásprofiljára	29
5.2.2	Mikrobiális rostbontás hatékonysága	34
5.3	A növelt rostállomány és hőmérséklet hatása a <i>Thermobifida fusca</i> B.02355 törzs enzimtermelésére	35
5.3.1	Celluláz/xilanáz/pektináz aktivitásprofil.....	35
5.3.2	A redukáló cukortartalom alakulása.....	38

5.4	<i>Thermobifida fusca</i> B.02355 törzs enzimtermelése különböző kémhatású szubmerz rendszerekben.....	39
5.4.1	Celluláz/xilanáz/pektináz aktivitásprofilok alakulása	40
5.4.2	A redukáló cukortartalom alakulása.....	42
6	ÖSSZEFOGLALÁS.....	43
7	IRODALOMJEGYZÉK.....	45

Bajzák Emma Klára - Szakdolgozat

1 BEVEZETÉS

A kísérlet témáját a fogyasztói társadalmunkat érintő, egyik legkritikusabb ügy inspirálta, mely nem más, mint a hulladékgazdálkodás kihívásai és lehetőségei. A kontinensen évente termelődő több száz millió tonna hulladéknak csak egy része biohulladék, melynek még csekélyebb része hasznosul. Az Európai Unió hulladékról szóló keretirányelve a biohulladék fogalmát úgy határozza meg, hogy beletartoznak a kertekből, parkokból származó zöldlomok, a háztartásokban keletkező élelmiszer- és konyhai hulladékok, valamint az ezekhez hasonló, a kereskedelemben és élelmiszeriparban felhalmozódó hulladékok. A definíció nem tartalmazza a mezőgazdasági és erdőgazdálkodási tevékenységek során előálló hulladékokat, továbbá nem összekeverendő a biodegradábilis hulladék kifejezéssel sem, ami egy szélesebb meghatározás lévén, más biológiailag lebomló anyagokat is magába foglal (pl.: fa, papír, szennyvíziszap).

Az Európai Unió országai által évente termelt biohulladék mennyisége 118 és 138 millió tonna között van (Internet 1). Ennek körülbelül 40%-a az, ami újrahasznosításra kerül komposztálás vagy anaerob rothasztásos, enzimatikus biokonverzió által. Ez az összes Európa-szerte keletkező hulladéknak csupán 17%-a (Eurostat, 2023). Európai Környezetvédelmi Ügynökség jelentése szerint, míg az üveg, a papír, a fém és a műanyag természetű hulladékok újrahasznosítási rátája az elmúlt években növekedett, addig a biohulladékok helyzete nem változott (EEA, 2013). A biohulladékok kontrollált konverziója során értékes mellék- és végtermékek, valamint energia termelődik, azonban kezeletlenül hagyva üvegházhatású gázok emissziójával még a ki nem aknázott lehetőségek elhalasztásán túl is okoz károkat. A fosszilis energiaforrások kinyerésének és elégetésének környezetszennyező hatásának, valamint lelőhelyeik egyenetlen eloszlásából származó geopolitikai konfliktusok elkerülése egyre sürgetőbb igény a világon.

A növényi biomassa alapú bioüzemanyag közvetlenül is felválthatja a fosszilis (primer) energiaforrásokat, nem csupán közvetetten, a biokonverziós folyamatok során termelődő hőenergia kihasználásával. Érdekes tehát összehangoltan keresni az energiakrízis és a hulladéktermelés problémájának megoldását, hiszen *ami az egyiknek szemét, a másiknak kápráztatja a szemét.*

2 CÉLKITŰZÉSEK

A szakdolgozati kutatómunkám komposzt mintákból izolált termofil és termotoleráns baktériumok aktivitásprofiljának és degradációs teljesítményének megismerésére irányul szénhidrátokban gazdag gyümölcs és zöldség maradványokat (szár, levél, héj stb.) tartalmazó szubmerz, rázatott rendszerekben.

Kísérleteim az alábbi feladatokra irányulnak:

1. Törzsszelekció: celluláz, xilanáz és pektináz aktivitás gyors screenelése egyedüli szénforrásként karboxi-metil cellulózt, bükkfa eredetű xilánt és almapektint tartalmazó agarlemezekben.
2. Előkísérletek a mikrobiális rostbontás és enzimfermentáció tanulmányozására szubmerz, rázatott rendszerekben.
3. A szelektált törzsek hatékonyságának nyomon követése néhány technológiai tényező függvényében.
 - a. Beoltási technikák hatása
 - b. Hőmérséklet és pH hatása
 - c. A növényi rostállomány mennyiségének növelése

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A komposztálás definíciója

Kémiaiailag a komposztálás növényi hulladék aerob bomlásaként határozható meg. A komposztálás eredményeként homogén fázisú, mikrobiológiailag stabil biomassza (humusz) keletkezik víz, szén-dioxid, és energia felszabadulásának kíséretében. A humusz értékes agráripari alapanyag, a mezőgazdasági talaj termékenysége növelhető vele. A sikeres konverzióhoz azonban biztosítani kell bizonyos feltételeket, mint az oxigénellátottság, mert levegőtlen körülmények között a komposztálás szempontjából nemkívánatos anaerob jelenségek (rothadás, erjedés) következnek be. Anoxikus környezetben metanogén mikrobiom szaporodik el, jelentős mennyiségű metánt felszabadítva. Ennek elkerülése érdekében a rendszert levegőztetni kell. Szakaszos öntözéssel a mikroorganizmusok által igényelt szabad víztartalom állítható be. A biokonverziót időben egymást váltó mikrobaközösségek végzik, melyek összetétele és mennyisége folyamatosan változik a komposzt tápanyagarányának, oxigénellátottságának, hőmérsékletének, nedvességtartalmának, kémhatásának, és az egyéb paraméterek (mikrobák közötti kölcsönhatások, toxikus metabolitok felhalmozódása, alapanyag porozitása stb.) alakulásától függően (Fésüs *et al.*, 2005).

3.2 A komposztálás folyamata

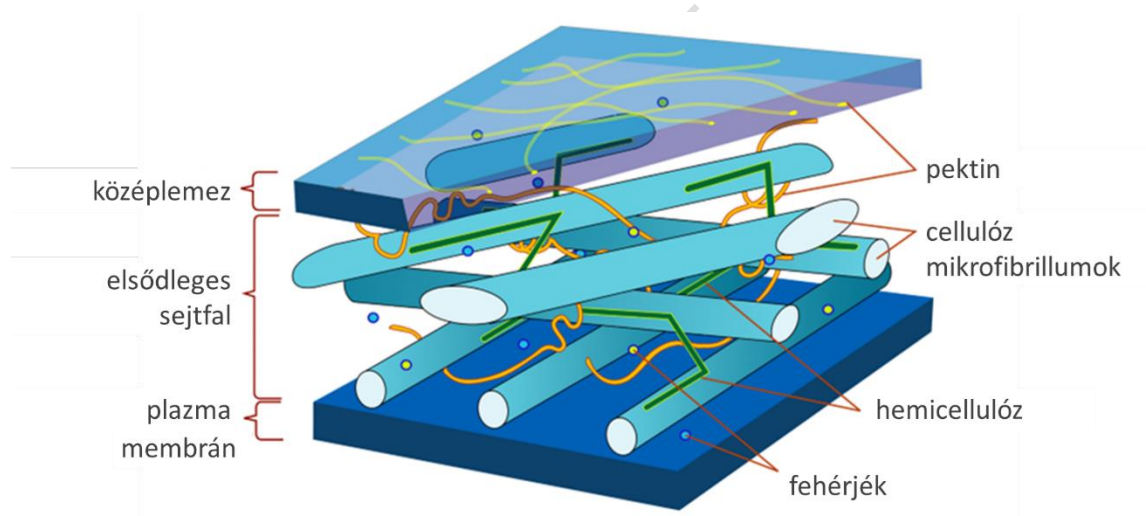
Kezdetben mezofil mikroorganizmusok szaporodnak el, melyek nem igényelnek szélsőséges környezeti tényezőket szaporodásukhoz és enzimtermelésükhöz, optimális paramétereik az atmoszferikus nyomás és kb. 35°C-os hőmérséklet. E mikrobák hidrolitikus tevékenységének következtében jelentős mennyiségű hő keletkezik, mivel metabolizmusuk exoterm folyamatok sorozata. A hőmérséklet emelkedésével termofil mikroorganizmusok (főként *Bacillus*, *Thermobifida*- és *Thermus* fajok) szaporodnak el, további hőmérséklet-emelkedést okozva tevékenységükkel. Ekkor a 80°C-ot is elérheti a komposzt hőmérséklete, mely a mezofil flóra pusztulását eredményezi a patogén mikrobákkal és a mechanikus bontást végző gerinctelen állatokkal együtt. Ezután fokozatosan 60-40°C-ra csökken a hőmérséklet, amely már alkalmas termofil gombák (mint *Aspergillus* és *Chetomium* fajok) számára, melyek ezután felváltják a termofil baktériumflórát. Végül egy másodlagos mezofil flóra szaporodik el a komposztban, mely ebben az állapotban stabilizálódik és a végtermék hasznosítható a mezőgazdaságban (Fésüs *et al.*, 2005).

3.3 A komposztálás gazdasági jelentősége

A komposztálás haszna többérté, hiszen hulladéktól való megszabadulás mellett energia termelhető, továbbá a végtermékben értékes metabolitok lehetnek, melyek önmagukban hasznosíthatók vagy további biokonverziós folyamatok kiindulási anyagaként (pl. másodgenerációs bioenergetikai termékek) szolgálhatnak, valamint maga a sejtbiomassza is alkalmazható a továbbiakban akár bioremediációs célokra is (Fésüs *et al.*, 2005).

3.4 A növényi sejtfal szerkezete és összetétele

A komposztálási folyamat kiindulási anyaga jellemzően a háztartásokban keletkezett élelmiszer- (fogyasztási célokra már nem használt zöldség- és gyümölcsmaradványokat) és zöldhulladékokat (metszési hulladékot) foglalja magába. Ezek a növényi részek szén- és nitrogénforrást jelentenek a lebontó szervezetek anyagcserefolyamataihoz. A növényi sejtfalat legnagyobb mennyiségben poliszacharid jellegű, hosszú szénláncú, külső hatásoknak ellenálló biopolimerek mátrixa alkotja (Pérez és Mackie, 2001).



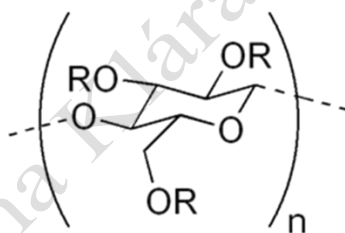
1. ábra: A növényi sejtfal szerkezete (Internet 2)

A növényi sejtfal egyszerre hivatott facilitálni a növekedést a szerkezeti szilárdságot. Ellent kell a plazmamembránt belülről feszítő víznyomásnak, mindeközben rugalmasnak maradni a víztartalom dinamikus változására reagálva (Pérez és Mackie, 2001). Az 1. ábrán látható a növényi sejtfal szerkezete és összetétele. Kívülről befele haladva először a középlemezzel találkozunk, mely a sejtek összetapadását garantálja és amely a pektin fő lelőhelye. Az elsődleges sejtfalban cellulóz- és hemicellulóz rostokkal, továbbá fehérjékkel találkozunk. A sejtfal különböző karakterű molekulái azon túl, hogy térben bonyolult

hálózatot hoznak létre, egymással másodlagos kölcsönhatásokat létesíthetnek. A cellulóz vízben nem oldódó biopolimer, szerkezeti integritást ad a sejtnak. A hemicellulóz feladata a cellulóz szálak rögzítése. A pektin a sejtek összetapadásán túl a sejtfa átjárhatóságát limitálja a pórusok összehúzásával, míg magát a cellulóz-hemicellulóz mátrix által lefektetett szerkezeti integritást nem befolyásolja (McCann és Roberts, 1996).

3.4.1 A cellulóz

A fotoszintetizáló szervezetek, azaz a szövetes növények, moszatok és egyes baktériumok anyagcserefolyamataik során rengeteg szén-dioxidot kötnek meg biopolimereik felépítéséhez. Az így keletkezett biomassa több, mint fele csak cellulóz. Növényekben a cellulóz együtt jelenik meg ligninnel és hemicellulózzal lignocellulóz mátrixot alkotva (Hallac és Ragauskas, 2011). A cellulóz egy szénhidrát jellegű vázalkotó makromolekula, mely kifejezetten a növényi sejtfa jellemző, és annak strukturális integritásáért felelős (Pérez és Mackie, 2001). Kémiaiilag homopolimer; β -térállású, az első és negyedik szénatom között létrejött O-glikozidos kötással kapcsolódó D-glükopiranoz gyűrűk lineáris, elágazásoktól mentes lánc alkotja (2. ábra).



2. ábra: A β -D-glükóz lehetséges oldalláncai cellulózban, illetve CMC molekulában (n: polimerizáció foka) (Internet 3)

Két glükózmonomerből álló, ismétlődő diszacharid szerkezeti egysége a cellobióz. A molekula polimerizációs foka eredetétől függ, szervezetre és szervre jellemző; hossza pár száztól több tízezer glükopiranoz egységig terjedhet (Blanco *et al.*, 2018). Intermolekulárisan H-kötések jönnek létre a mikrofibrillum rostokba rendeződött cellulózláncok között, mely limitálja az oldhatóságot.

A vízben nem oldódó cellulózzrostok felhasználása széleskörű és régóta nyúlik vissza az emberiség történetében. Hagyományosan a papírgyártás és az organikus textilek (lenvászon, pamut) alapanyaga, ezen kívül csomagolóanyagok és egyes élelmiszeripari adalékanyagok

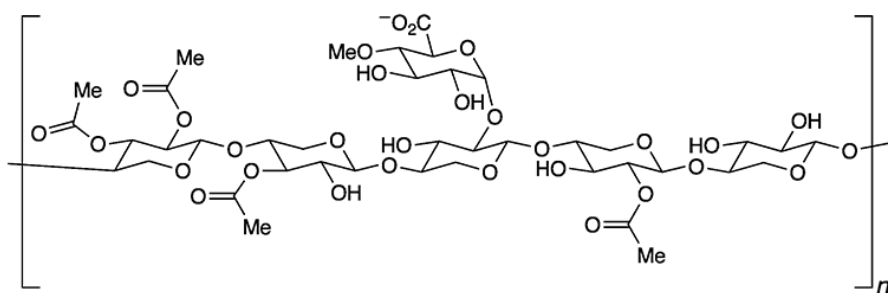
kiindulási anyaga. A humán táplálkozásban a cellulóz fontos ételmi rost; mivel a bontására nem épült ki hatékony emésztőenzim rendszer, a tápcsatornán felszívódás nélkül halad át, mely tulajdonságát származékain keresztül terápiás céllal (hashajtók, étvágycsökkentők) alkalmazzák (Cummings, 1984).

A karboxi-metil-cellulóz (továbbiakban CMC) a cellulóz szintetikus előállított származéka. Kémiaiilag a növényi sejtfa alkotó cellulóz karboximetil-étere, tehát a cukorgyűrűk hidroxilcsoportjaiban lévő hidrogéneket karboximetilek szubsztituálják (2. ábra). Mivel a cellulóz β -D-glükóz molekulák alkotta homopolimer, benne monomerenként maximális telítettség esetén legfeljebb három hidroxilcsoport cserélődhet ki karboximetilre. Az oldalláncokon így keletkező sok-sok karboxilcsoport jócskán megnöveli a CMC oldhatóságát a cellulózhoz képest (a H-hidak részleges vagy teljes elvesztése miatt), mely tulajdonságát az élelmiszeripar is kihasználja. Vízmegkötő képességének köszönhetően olyan többfázisú, viszkózus rendszerek, mint a jégkrémek és a fogkrémek mikrostruktúrájának stabilizálásában (gyakran E466 néven) igen nagy szerepe van (Philip, 2018).

3.4.2 A xilán

A xilán, a hemicellulóz részeként a növények országának egyik leggyakoribb poliszacharid biopolimere (a cellulóz után). A xilán a kétszikűek összes szárazanyagtartalmának 20-30%-át teszi ki, míg a perjefélék szárazanyagának 50%-át adja. (Scheller és Ulvskov, 2010). A növényi sejtfa és szállítórendszer szövetének fontos alkotóeleme. A hemicellulóz megnevezés a xilánon kívül magába foglal mannán, galaktán és arabinán heteropolimereket. Ezeket D konformációjú xilóz, mannóz, galaktóz, illetve L konformációjú arabinóz építi fel. A hemicellulózok polimerizációs foka jóval alacsonyabb a cellulóznál; legfeljebb pár száz monomerig terjed láncösszeük (Puls és Poutanen, 1989).

A xilán molekuláját β -(1,4)-kötéssel kapcsolódó xilóz egységek (öt szénatomos furanóz gyűrűk) alkotják, ezen kívül változó arányban tartalmaz α -arabinofuranóz és α -glükuronsav oldalláncokat (3. ábra). Homopolimer formájában is előfordul, ám ezek izolálása nehezebb a természetben ennél jóval gyakoribb, 2-4 féle pentóz monomerből felépülő heterogén xilánokénál (Bastawde, 1992).

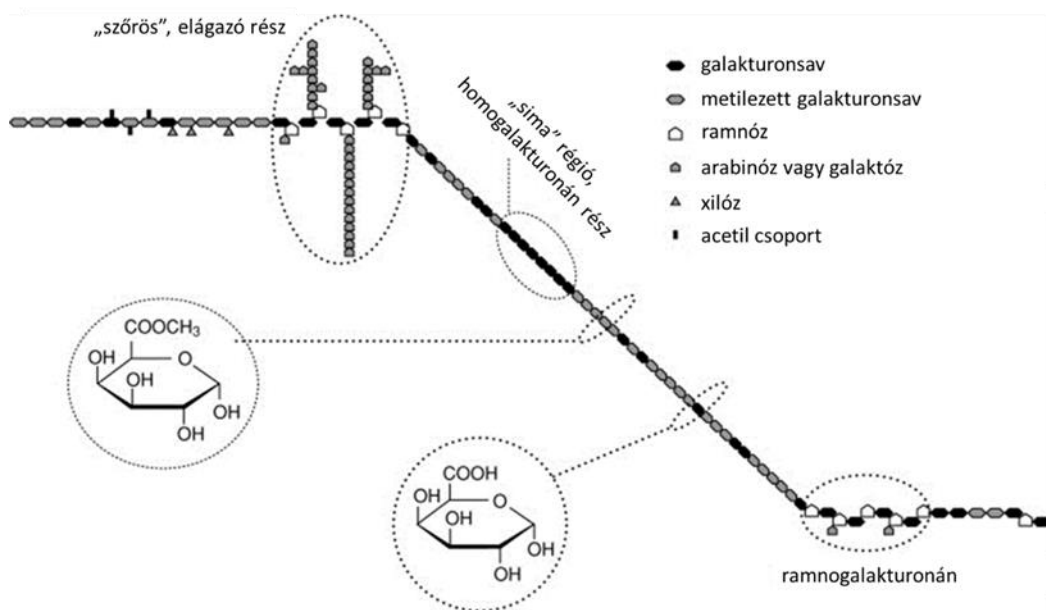


3. ábra: A xilán szerkezete (Internet 4)

Az oldalláncok minősége és mennyisége az adott növényi részre, illetve fajra jellemző (Curry *et al.*, 2023). A keményfa eredetű xilán erősen acetilezett, míg a puhafából származók kevésbé és polimerizációs fokuk is kisebb (Beg *et al.*, 2001). A xilán a növényi részekben zselésítő rost funkciót tölt be (Mellerowicz és Gorshkova, 2012). Feszességet kölcsönöz a növénynek, mely ezt helyzetváltoztatásra képes használni, valamint szerkezeti stabilitást ad, tulajdonképpen az állatok vázizmával analóg funkciót látva el.

3.4.3 A pektin

A pektin főleg a növényi sejteket elhatároló középlemezben található. Biztosítja a sejtek összetapadását Ca^{2+} közvetítette intermolekuláris kötések által (McCann és Roberts, 1996). Több, különböző molekulatömegű és térszerkezetű vegyület sorolható a pektin megnevezés alá. Általánosságban igaz, hogy nagy molekulatömegű (25-360 kDa), savas karakterű vegyületek, melyek lineáris gerincét α -1,4-glikozidos kötéssel kapcsolódó galakturonsavak alkotják. A lánc karboxilcsoportjait részben vagy egészen metanol észteresíti. Az észterezettség mértéke jellemezhető DE (*degree of esterification*) értékkel, mely 50% fölött magas, ezalatt pedig alacsony metoxi-pektin osztályokba sorolja az egyes pektinkészítményeket (Larsen *et al.*, 2019). Acetilezés is előfordulhat ezeken a csoportokon, különösen cukorrépában. A pektin esetében a heteropolimer megnevezés indokolt amiatt, hogy egyes galakturonsav egységeket ramnóz vagy xilóz (különösen almában) helyettesítheti a láncban (4. ábra). Továbbá galaktóz és arabinóz láncok is ágazhatnak el róla (Flutto, 2003).



4. ábra: Egy heteropolimer pektin elsődleges és másodlagos szerkezete (Flutto, 2003)

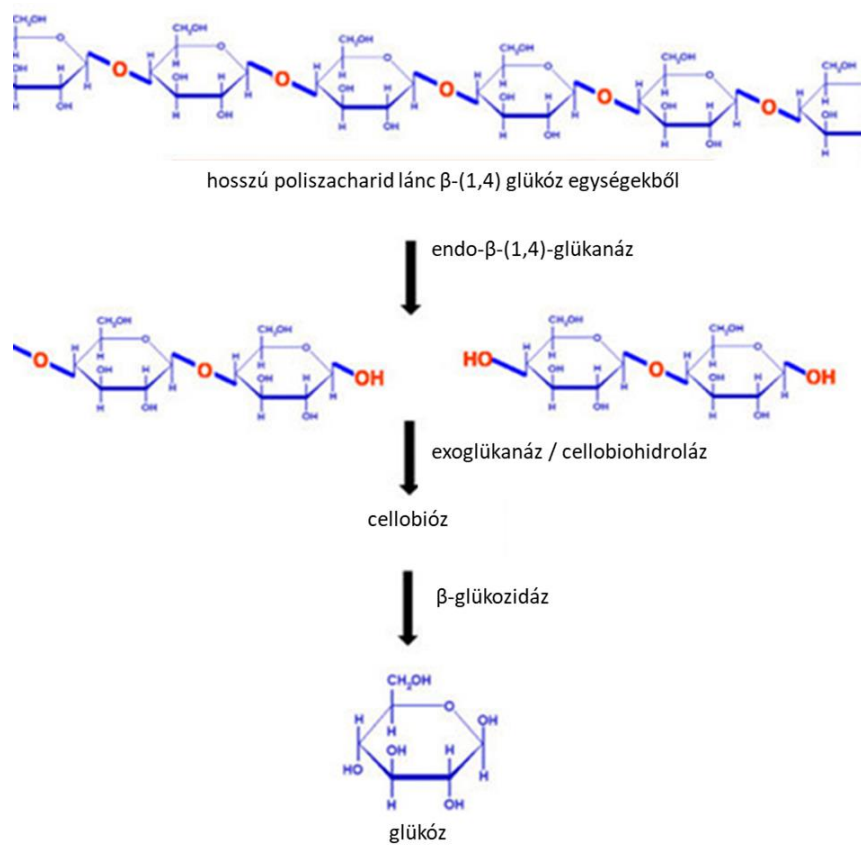
Vízoldékony élelmirost lévén, a pektin enzimatisz degradációját humán szervezetben a vékonybél mikroflórája végzi (Mugdil, 2017). Élelmiszeripari adalékként (E440) való alkalmazásakor százalékosan adják meg a pektin galakturonsav tartalmát, mely ekkor minimum 65%. Lekvárok zselésítésére, gyógyszerkészítményekben emulgeálószerként, továbbá egyes diétás ételek rosttartalmának növelésére is használják (Thakur, 1997).

3.5 A növényi rostok enzimes bontása

3.5.1 Cellulázok szerepe

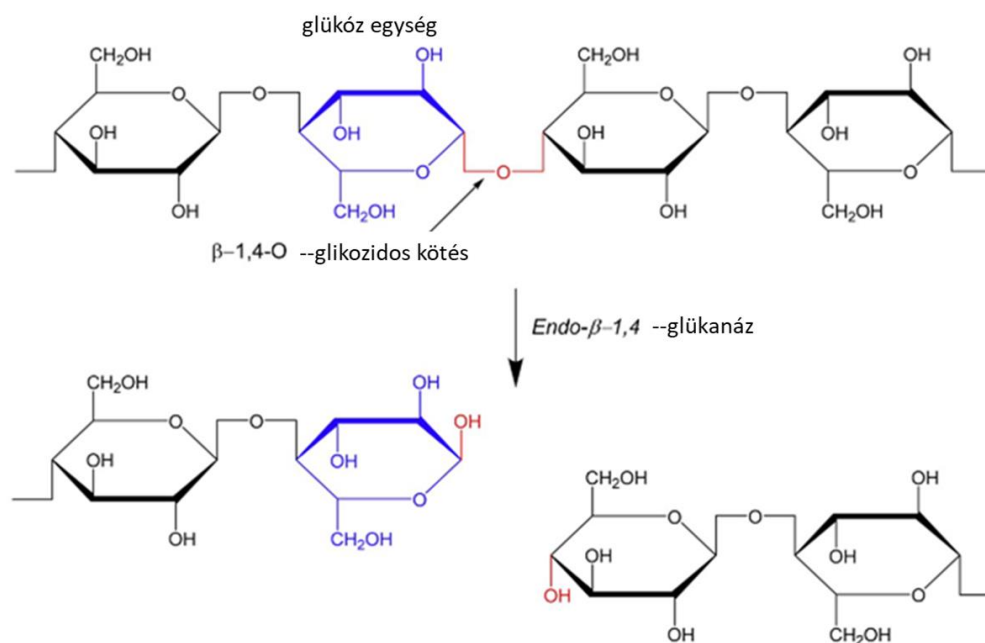
A cellulázok olyan glikozid hidroláz enzimek, melyek vízigényes bontótevékenységük elvégeztével kisebb oligoszacharidokat és monoszacharidokat hagynak maguk után. Mikrobiális termelő szervezetük lehet baktérium és gomba is, ugyan a mindezidáig nagyobb népszerűségnek örvendő gomba eredetű cellulolitikus enzimeket kezdik felváltani a kedvezőbb tulajdonságú, bakteriális cellulázok. Fókuszba került a növényi biomasszát bontani képes, új baktériumok izolálása, mert ezek a degradáció szempontjából előnyös multienzim-koktélok termelnek a gombák magas hozamú, de homogén enzimszintézisével szemben. A heterogén enzimkeverék résztvevői egymás katalitikus aktivitását erősítik, szinergiában vannak. Ezen kívül a baktériumok növekedési rátája sokkal magasabb a gombákénál, továbbá a termelő törzstől függően különböző, akár extrém reakciókörülmények között is stabilak az (acidofil/termofil/halofil, stb.) enzimeik (Gomez és Saaeddin, 2014).

A cellulázoknak láncon való támadáspontjuk szerint léteznek a lánc közepét célzó endogén, és a lánc végét támadó exogén képviselőik. A cellulolitikus enzimek tevékenykedésekor (5. ábra) először az endoglükánázok darabolják a molekulát redukáló és nem-redukáló végű egységekre. Ezeken a felszabaduló végeken kezdi meg munkáját az exoglükánáz (cellobiohidroláz), melynek nyomán cellobióz és rövidebb oligoszacharid darabkák keletkeznek, melyek szubsztrátjai a cukrosító tevékenységet végző β -glükózidáznak.



5. ábra: A cellulóz enzimikus degradációjának lépései (Lakhundi *et al.*, 2015)

Az endo- β -(1,4)-glükánáz, ahogyan a nevezék is utal rá, β -térállású, láncközi monomerek (1,4)-O-glikozidos hidroxilkötéseit hidrolizálja (Linton, 2020). Igen szűk szubsztrátspecifitással rendelkező enzim, mely csak azokat az (1,4) kötések hidrolizálja, amelyek szomszédosak egy (1,3) kötéssel. Termotabilis enzimek, katalitikus aktivitásuk hőoptimuma 45-55°C. Semleges közeli, pH 6,0-7,5 körüli intervallumon mozog a működéséhez szükséges optimális kémhatás.



6. ábra: Az endo- β -glükánáz működési mechanizmusa (Linton, 2020)

A β -glükozidáz elsősorban a β -térállású, O-glikozidos kötést tartalmazó molekulákat hidrolizálja. Széles szubsztrátspecifitással rendelkező enzim; kisebb enzimaktivitással ugyan, de képes a β -(1,4)-kötés mellett más, glükóz dimereket összekapcsoló, pl.: β -(1,3)-, β -(1,6)- és β -(1,2)-kötéseket is hasítani. Mindezt a szubsztrát nem-redukáló végén kezdi meg (Wiesman, 1975). Általánosságban igaz, hogy a jelenlévő oligoszacharidok láncainak hosszával fordítottan arányos a β -glükozidáz enzimaktivitása (Day és Withers, 1986). Ezutóbbi felfedezés egybevág azzal a jelenséggel, hogy a celluláz enzimek a természetben szinergens módon működnek együtt, termelésük összehangoltan történik. A cellobióz diszacharid molekulájában található β -(1,4)-glikozidos kötés elhasításával két glükóz molekula keletkezik. Ez a folyamat cukrosítás, mely a fermentálható cukrok felszaporítását jelenti, és további biokonverziós folyamatoknak (pl. bioetanol szintézisnek) ágyaz meg.

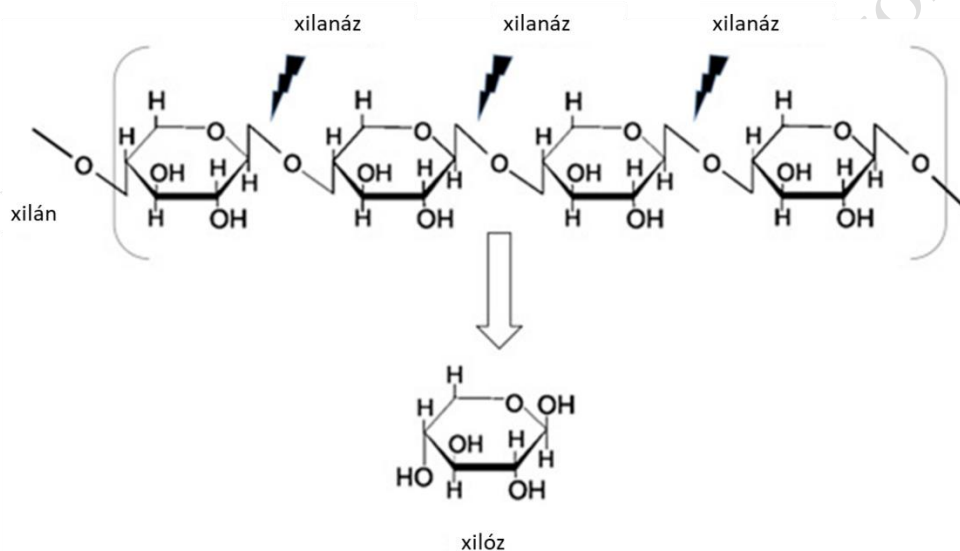
A β -glükozidáz pH optimuma függ a termelő szervezettől, annak élőhelyétől és a szubsztrát típusától. Az enzim optimális kémhatásának intervalluma ezen paraméterektől függően pH 7,0 és 3,0 között húzódik, tehát savtűrőnek mondható. Ugyancsak a termelő szervezet saját hőmérsékleti igénye határozza meg az enzim hőoptimumát, mely ezáltal egy széles, 20 és 85°C között húzódó intervallumon mozog (Woodward és Wiseman, 1982).

A cellulázok széleskörűen alkalmazott ipari enzimek; a textilipar, a mosószergyártás, a papíripar, a szeszipar és a bioüzemanyag gyártás egyaránt használja őket. Ismert még

mezőgazdasági hasznuk is, ugyanis állati takarmány „előemésztésére” is alkalmazzák, a tápanyagok felszívódásának, így az etetés hatékonyságának fokozása érdekében. Továbbá ugyanezen ágazat a talaj termékenységének növelését is enzimatikus úton végzi.

3.5.2 A xilanáz szerepe

A xilanáz enzim bontómechanizmusa szerint endogén enzim, polixilóz molekulák láncközi β -(1,4)-glikozidos kötéseit hidrolizálja véletlenszerűen. A bontás eredményeképpen xilo-oligoszacharidok és redukáló tulajdonságú, xilóz monoszacharidok maradnak a rendszerben (Bajpai, 2009).



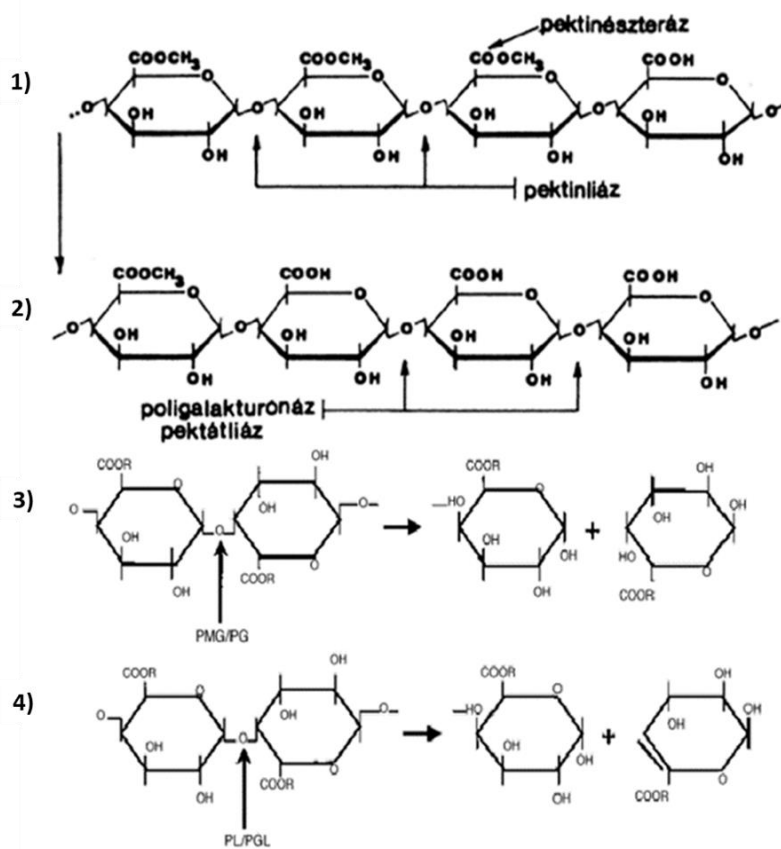
7. ábra: A xilanáz működési mechanizmusa (Bajpai, 2009)

Katalitikus aktivitásának optimuma pH 2 és pH 9 között van, ám a bakteriális eredetű xilanázok ezen intervallum jobb szélé felé húznak (Bajpai, 2009). Mezofil és termofil tulajdonságú xilanázokat is leírtak már. Bakteriális tenyészet alkalmazása esetén – a nagy vízigény miatt – minden esetben szubmerz zajlik a fermentáció, de egyes gombák szilárd fázison is képesek a xilanáz hatékony szintézisére (Walia *et al.* 2017). Az iparban termelt xilanáz mintegy 90%-át szubmerz körülmények között állítják elő (Bhardwaj, 2019).

3.5.3 A pektináz szerepe

A pektináz gyűjtőfogalma három, hatásmechanizmusában különböző enzimsaládnak: észteráznak, hidrolázoknak és a liázoknak. Az pektin-metil-észteráz a pektin metoxil csoportjait támadva katalizálja a molekula pektinsavvá alakulását. A hidrolázok (poligalakturonáz és poli-metil-galakturonáz) a pektinsav és a pektin α -1,4-glikozidos

kötéseit hasítják galakturonátokat és metil-galakturánokat hagyva. A liázok (pektinen: endo- és exo-poli-galakturán-liáz; pektinsavon: endo- és exo-poli-metil-galakturán-liáz) transzeliminációs reakció keretein belül, víz belépése nélkül, kettős kötés létrehozásával hasítják a láncot (Bedő, 2020).



8. ábra: A pektin észteráz (1), -hidroláz (2, 3) és -liáz (1, 2, 4) enzimek hatásmechanizmusa (Bedő, 2020)

Valamennyi kereskedelmi forgalomban lévő pektinolitikus enzimek készítmény ugyanazon fonalgombá-, nevezetesen *Aspergillus niger* eredetű, és változó arányban tartalmaznak poligalakturonázt és pektinészterázt. Ezeket az enzimek készítményeket elsősorban magas észterezettségi fokú pektint tartalmazó almalé derítésére (zavarosság csökkentése) és viszkozitásának vékonyítására használják (Haile és Ayele, 2022).

Nemzetközi kísérletekben szereplő, különböző mikrobiális eredetű cellulolitikus, xilanolitikus és pektinolitikus enzimek aktivitására a következő táblázat hoz példákat:

1. táblázat. Nemzetközi példák különböző növényi sejtfa degradáló, mikrobiális enzimek aktivitására:

Enzim	Mikroorganizmus	Enzimfermentáció optimuma				Aktivitás [U/mL]	Forrás
		Eljárás	T [°C]	pH	Idő [h]		
celluláz	<i>Bacillus</i> sp.	SmF*	35	6	96	0,641	Kaur et al., 2016
poligalak-turonát liáz	<i>Bacillus</i> sp.	SmF	34	8,5	60	27,0	Guo et al., 2019
poligalak-turonáz	<i>Bacillus</i> sp.	SmF	34	8,5	60	40,0	Guo et al., 2019
pektináz	<i>Bacillus subtilis</i> BK-3	SmF	50	5	24	43,46	Prajapati et al., 2021
pektináz	<i>Streptomyces fumigatiscleroticus</i>	SmF	35	6	48	45,93 – 98,65 citrushéjon	Govindaraji és Vuppu, 2020
pektináz	<i>Bacillus licheniformis</i>	SmF	37	9,5	120	39 – 219	Bibi et al., 2016
pektináz	<i>Bacillus subtilis</i> Btk27	SmF	37	6,5	48	66,3±1,2	Oumer és Abate, 2018
pektináz	<i>Bacillus tequilensis</i> CAS-MEI-2-33	SmF	40	7	40	1370	Zhang et al., 2019
endo-β-(1,4)-glükanáz	<i>Micromonospora</i> L5	SmF	37	8,0	–	1,946	Ramírez et al., 2016
cellobiohidroláz			37	8,0		1,114	
β-glükózidáz			37	8,0		1,611	
endo-β-(1,4)-glükanáz	<i>Penicillium echinulatum</i> 9A02S1	SSF**	30	5,5	–	4,0 zabdarán	Todero Ritter et al., 2013
celluláz	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	SmF	40	10	24	0,7	Sethi et al., 2013
CMCáz	<i>Bacillus cereus</i> JD0404	SmF	50	7,0	–	1,778 CMC-n	Chantarasiri, 2015
β-glükózidáz			50	7,0	–	0,048 CMC-n	
endo-β-(1,4)-xilanáz	<i>Aspergillus japonicus</i> 4371	SmF	31	5,5	120	7,17	Samanta et al., 2011
	<i>Aspergillus oryzae</i> 4010					11,67	
	<i>Penicillium citrinum</i> 4009					3,02	
	<i>Penicillium purpurogenum</i> 4248					6,76	
	<i>Penicillium purpurogenum</i> 5252					7,23	
	<i>Aspergillus oryzae</i> 2398					14,89	
	<i>Aspergillus oryzae</i> 4712					6,89	
	<i>Penicillium purpurogenum</i> 2029					4,10	
	<i>Penicillium purpurogenum</i> 2433					5,07	
	<i>Aspergillus oryzae</i> 4714					6,05	

	<i>Aspergillus oryzae</i> 4964					11,36	
xilanáz	<i>Bacillus pumilus</i> izolátumok	SmF	45	10,0	24	3,983	Duarte et al., 1999
						2,981	
						2,659	
						1,228	
CMCáz	<i>Paenibacillus terrae</i>	SmF	50	5,5	72	2,08	Liang et al., 2014
endo- β -(1,4)- xilanáz	<i>Pseudomonas sp.</i> WLUN024	SmF	37	7,2 – 8,0	24	1245	Xu et al., 2005
xilanáz	<i>Acinetobacter junii</i> F6-02	SmF	35	7,0	72	317	Lo et al., 2010
xilanáz	<i>Jonesia denitrificans</i> BN-13	SmF	50	7,0	48	10,81	Nawel et al., 2011
*SmF: szubmerz fermentáció							
**SSF: szilárd fázisú fermentáció							

4 ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1 Felhasznált anyagok

4.1.1 Mikroorganizmusok

A kísérletek során összesen 10 termofil/termotoleráns baktérium enzimtermelését követtem nyomon. A komposzt mintákból izolált baktérium törzseket Dr. Tóth Ákos és a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (NCAIM, Budapest) biztosította.

A komposzt mintákból izolált baktérium törzsek az alábbiak:

Bacillus subtilis B.01162

Bacillus cereus B.00076, B.01718

Bacillus coagulans B.01123, B.01139

Thermobifida fusca B.02355

Thermobifida cellulosilytica B.01997

Thermus composti B.02340

Rhodococcus erythropolis B.01659

Sphingobacterium sp. B.02636

4.1.2 Tápagarok és tápközegek

Az enzimaktivitások gyors screeneléséhez

2. táblázat. Celluláz, xilanáz és pektináz aktivitás kimutatásához szükséges agarlemezek összetétele

Komponens	Mennyiség [g/L]
CMC/pektin/	10,00
xilán	5,00
NaNO ₃	3,00
K ₂ HPO ₄	1,00
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,50
KCl	0,50
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,01
élesztőkivonat	2,00
pepton	5,00
agar	15,00
desztillált víz	1000,00

Inokulum tenyészet és fermentációs rendszerek készítéséhez

Az alaptápleves (Czapek-Pepton, továbbiakban CP) minden olyan esszenciális biomolekulát és mikroelemet tartalmaz (a Nutrient tápközeghez hasonlóan), ami a vizsgált baktériumoknak kedvező feltételeket biztosít a növekedéshez. A módosított CP 3 (m/V)%-ban tartalmazott gyümölcs és zöldség rostállományt. A növényi rostállományt laboratóriumi prés gép segítségével állítottam elő. A rostállomány előkészítése során kommunális hulladékot: szárazakat, leveleket, megbarnult, hibás terményeket hasznosítottam. .

3. táblázat. CP és módosított CP tápleves összetétele.

Komponens	Mennyiség [g/L]
szacharóz (CP-előtenyészet)	30,00
növényi rost (MCP-előtenyészet)	30,00
növényi rost (MCP-fermentáció)	100,00
NaNO ₃	3,00
K ₂ HPO ₄	1,00
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,50
KCl	0,50
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,01
élesztőkivonat	2,00
pepton	5,00
desztillált víz	1000,00

A kísérletek során nagyobb mennyiségben készítettem elő a növényi rostállományt, amelyet fagyasztóban (-18 °C-on) tároltam használat előtt. A fagyasztás-olvasztás lépése előroncsolta a stabil szerkezetű növényi rostokat, így megkönnyítve az enzimek munkáját. A mechanikai előkezelés (préselés), majd a fagyasztás-olvasztás hatása az értékes szénhidrát polimerek (cellulóz, hemicellulóz) hozzáférhetőségét segíti elő a baktériumok és enzimeik számára. Az inokulum tenyészetek és a fermentációs rendszerek tápközegeit 250 mL-es Erlenmeyer lombikokba 100 mL-ként öntöttem szét. A lombikok tartalmát 121 °C-on 15 percen át autoklávoztam.

4.1.3 Oldatok és pufferek

Az alábbi 4. táblázat foglalja össze a mérések során használt oldatokat és puffereket.

4. táblázat. Felhasznált oldatok és pufferek összetétele.

Oldat/puffer megnevezése	Összetétel	
	Komponens	Mennyiség
jód oldat (0,1 n)	I ₂	6,5 g
	KI	12,5 g
	desztillált víz	100 ml
kongóvörös oldat (0,5 %)	kongóvörös indikátor	0,5 g
	desztillált víz	100 ml
nátrium-klorid oldat (1 M)	NaCl	29,22 g
	desztillált víz	500 mL
citrát-foszfát puffer (pH 4)	0,1 M citromsav-monohidrát	4,8 g
	desztillált víz	250 mL
	0,2 M Na ₂ HPO ₄	8,8995 g
	desztillált víz	250 mL
Tris-HCl puffer (pH 9)	0,1 M Tris-Base	1,21 g
	desztillált víz	100 mL
	0,1 M cc. HCl	1 mL
	desztillált víz	100 mL
Somogyi I. oldat	vízmentes nátrium-szulfát	288 g
	kálium-nátrium tartarát	24 g
	nátrium-karbonát	48 g
	nátrium-hidrogén-karbonát	32 g
	desztillált víz	400 mL
Somogyi II. oldat	vízmentes nátrium-szulfát	72 g
	réz-szulfát-heptahidrát	8 g
	desztillált víz	1600 mL
Nelson reagens	ammónium-molibdát	100 g
	nátrium-hidrogén-arsenát	12 g
	cc. kénsav	84 mL
pNGP oldat (0,15 mM)	p-nitrofenil-glükopiranozid	0,00113 g
	desztillált víz	25 ml

4.2 Alkalmazott módszerek

4.2.1 Gyors screenelés

Az enzimaktivitások kimutatása egyedüli szénforrásként karboximetil-cellulózt, bükkfa eredetű xilánt és almapektint tartalmazó agarlemezeken, agardiffúziós módszerrel történt. Az agarlemezeket öt részre osztottam, a mélyedésekbe törzsenként 50 µl CP táplevesben tenyésztett sejtszuspenziót pipettáztam. Az agarlemezek leoltását követően

azokat 37°C-on 48 órán át inkubáltam. Az agarlemezek festését követően, amennyiben a törzs az adott polimert bontotta, úgy a növekedési zóna körül feltisztulás jelentkezett.

A xilanáz és a pektináz aktivitás jelenlétét igazoló feltisztulás „előhívásához” az agarlemezeket 0,1 n-os jód oldattal öntöttem le, majd azokat 30 perces behatási időt követően desztillált vízzel mostam le. A celluláz aktivitás kimutatása 0,5 %-os kongóvörös oldattal történt, amelyet 30 percet követően 1 M nátrium-klorid oldattal mostam le az agarlemezekről (Kaur *et al.*, 2011). Ahol a szubsztrátum (részben) elbomlott, ott nem tudott bekötni festékanyag, így az a terület nem színeződött el.

4.2.2 Mikrobiális rostbontás és enzimermentáció

A növényi maradványok biofeldolgozása során első lépésben az inokulum tenyészet hatását követtem nyomon, ahol az előszelektált baktérium törzseket az alaptáplevesben (CP), valamint szacharóz helyett egyedüli szénforrásként 3 (m/V) %-ban gyümölcs- és zöldségmaradványok rostállományát tartalmazó, módosított CP táplevesben tenyésztettem. Az „on-site” enzimermentációt a két különböző tenyészettel indítottam el és hasonlítottam össze a 10 (m/V) % növényi rost tartalmazó szubmerz rendszerek hatékonyságát 37 °C-on, 160 rpm rázatási sebességen 168 órán át. A baktériumtenyészetek beoltási rátája 10 (V/V) % volt.

A továbbiakban a növényi rostok bontásához nélkülözhetetlen enzimeket (celluláz, xilanáz és pektináz) termelő törzzsel folytattam a kísérleteimet növelt rostállományt tartalmazó szubmerz rendszerekben. A növényi rostállomány 10 és 30(m/V)% alakult, 5 (m/V)%léptékekkel. A kísérletsorozatban kontrollként teszteltem, hogy milyen hatást fejt ki önmagában a növényi rostállomány (10m/V%) egyéb tápanyag jelenléte nélkül. Az enzimermentáció MCP táplevesben tenyésztett baktérium törzzsel indítottam el, a beoltási ráta szintén 10 (V/V) % volt. A kísérlet 55 °C-on, 160 rpm rázatási sebességen és 72 órán át tartott.

A harmadik kísérlet során a szubmerz rendszerek kiindulási pH értékének: enyhén savas (pH 5), neutrális (pH 7) és alkalikus (pH 9), hatását vizsgáltam.

Az enzimertermelés és mikrobiális rostbontás hatékonyságának nyomonkövetése érdekében időközönként (24 óránként) 5 ml mintát vettem. A minták előkészítését követően enzimaktivitást, kémhatást és oldott cukortartalmat mértem.

4.2.3 Extracelluláris enzimaktivitás mérési módszerek

Az endo- β -glükánáz, endo- β -xilanáz és pektináz aktivitása mérése a mintákat 10 percen át 14000 rpm sebességen centrifugáltam, ezáltal a sejteket és rostokat választottam le a folyadékfázistól. Az extracelluláris enzimaktivitások méréséhez az így kapott felülúszót használtam.

4.2.3.1 β -glükozidáz aktivitásának meghatározása

A reakcióelegy összeállításához szükséges komponensek arányát az 5. táblázat tartalmazza:

5. táblázat. β -glükozidáz aktivitásának méréséhez szükséges reakcióelegyek összetétele

	Puffer* [mL]	Minta [mL]	Szubsztrátum** [mL]	Desztillált víz [mL]
Minta	0,3	0,2	0,5	-
Enzimvak	0,3	0,2	-	0,5
Szubsztrátvak	0,3	-	0,5	0,2
Műszervak	0,3	-	-	0,7
* citrát-foszfát (pH 4) vagy Tris-HCl (pH 9)				
** 0,15 mM p-nitrofenil- β -D-glükopiranozid (pNGP)				

Az enzimreakció 55°C-on, 5 percig zajlott és 5 ml, 0,1 M töménységű Na_2CO_3 oldat hozzáadása állította le. A β -glükozidáz széles szubsztrátspecifitással bíró enzim, így képes az analitikai célokra használt szintetikus, kromogén szubsztrátkészítmény, a paranitrofenil- β -D-glükopiranozid hasítására. Az enzim hidrolitikus tevékenysége révén paranitrofenol (PNP) szabadul fel, mely pozitív reakcióban sárga színt ad. UV-VIS spektrofotométerrel (UNICAM, Alpha Helios), 405 nm hullámhosszú fény elnyelődésének vizsgálatával lehet következtetni az enzimaktivitás mértékére.

$$\text{Enzimaktivitás} \left(\frac{U}{L} \right) = \frac{\bar{A} - A_{ev} - A_{szv} \cdot h \cdot V_r}{V_m \cdot t \cdot a} \cdot 1000$$

ahol $\bar{A}$: párhuzamos minták abszorbanciájának átlaga,

A_{ev} : enzimvak abszorbanciája,

A_{szv} : szubsztrátvak abszorbanciája,

h: hígítás mértéke,

V_r : reakcióelegy térfogata [2 ml],

V_m : minta térfogata [0,2 ml],

t : reakcióidő [5 min],

a : 0,4 mM pNGP oldat hígítási sorára állított kalibrációs egyenes meredeksége [0,9815]

4.2.3.2 CMCáz (endo- β -glükanáz), endo- β -xilanáz és pektináz aktivitás mérése

Az enzimaktivitások mérése azonos módszer szerint történt. 1,8 ml 1%-os CMC-oldatot, 1 %-os almapektin oldatot, vagy 0,5 %-os xilán (bükkfa eredetű) oldatot mértem ki kémcsövekbe, majd azokat az enzimfermentáció hőmérsékletétől függően 37 °C-on vagy 55 °C-on 2-3 percen át termosztáltam. Az enzimreakciókat mindkét esetben 0,2 ml felülúszó hozzáadásával indítottam el. Az enzimreakciókat 10 percet követően forralással állítottam le, a mintákat 15 percre 100 °C-os vízfürdő helyeztem. A továbbiakban a mintákban kivált pelyhes csapadékot 10 percig tartó, 14000 rpm fordulatszámú centrifugálással üleptettem le. Az enzimaktivitás mérése a továbbiakban a Somogyi-Nelson redukáló cukortartalom mérése szerint alakult. Egy enzimaktivitási egység (U) egyenlő 1 μ mol felszabadított redukáló cukorral (xilóz, galakturonsav, glükóz) percenként (Attri et al., 2014). Az enzimaktivitást az alábbi egyenlet segítségével számítottam:

$$\text{Enzimaktivitás} \frac{U}{L} = \frac{\bar{A} \cdot h \cdot V_r}{V_m \cdot t \cdot M \cdot a} \cdot 1000$$

ahol $\bar{A}$: párhuzamos minták abszorbanciájának átlaga,

h : hígítás mértéke,

V_r : reakcióelegy térfogata [2 ml],

V_m : reakcióelegy térfogata [0,2 ml],

t : reakcióidő [10 perc],

M : végtermék moláris tömege [$M_{\text{glükóz}} = 180,15$ g/mol; $M_{\text{xilóz}} = 150,13$ g/mol,

$M_{\text{pektin}} = 194,1394$ g/mol],

a : hígítási sorra állított kalibrációs egyenes meredeksége [$a_{\text{glükóz}} = 6,7879$; $a_{\text{xilóz}} = 9,0011$,
 $a_{\text{galakturonsav}} = 7,064$].

4.2.4 Redukáló cukortartalom meghatározása

A mikrobiális rostbontás során felszabadított redukáló cukrok mennyiségi meghatározása Somogyi-Nelson-módszerrel történt. A módszer alapelve egy redoxi reakció: a Cu(II)-ionok réz(I)oxidokká redukálódnak, míg a szabad glikozidos hidroxilcsoportok oxidálódnak. A reakciót lúgos közeg és a redukáló cukrok jelenléte katalizálja, s nyomán

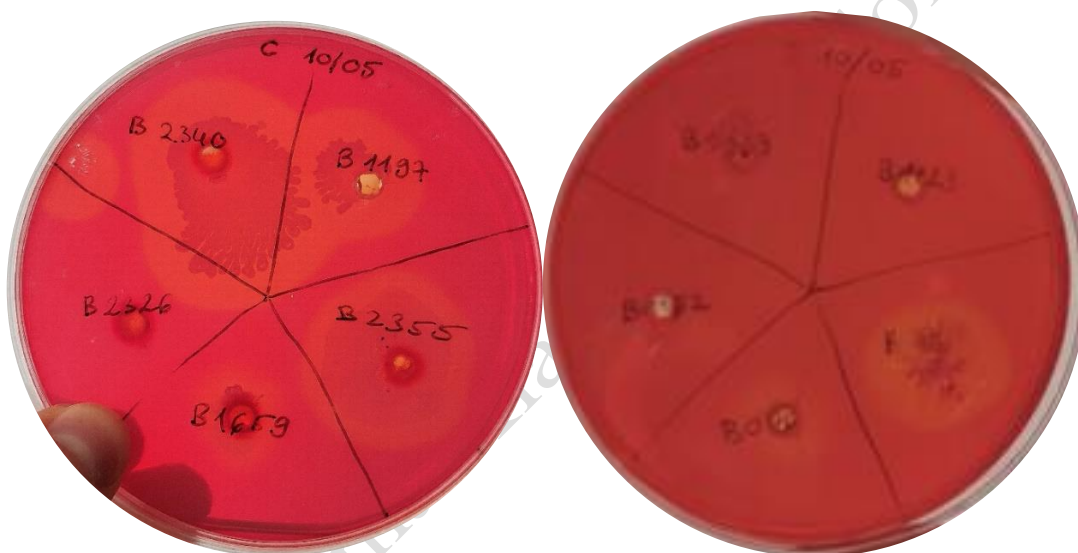
vörös csapadék keletkezik. A réz(I)oxid kék színű, stabil komplexet képez a Somogyi-Nelson reagens arzenomolibdenát komponensével. A színváltozás mögötti pontos redukálócukor-koncentráció az oldat abszorbanciájának ismeretében meghatározható, 540 nm hullámhosszúságú fény elnyelésének vizsgálatával (Somogyi, 1945, 1951, Nelson, 1944).

A 0,5(m/v)%-os glükóz törzsoldatra állítottam kalibrációt. A törzsoldatok elkészítéséhez 0,50 g glükózt mértem ki analitikai mérlegen, melyet maradéktalanul 100 ml-es mérőlombikba mostam át és a feloldódást követően desztillált vízzel jelre töltöttem. A törzsoldatból először 100-szoros hígítást készítettem, majd ebből 0 ml-től 2,0 ml-ig haladva 0,2 ml léptékkal több oldatot pipettáztam a kémcsövekbe. A hígítási tagok térfogatát 2 ml-re desztillált vízzel egészítettem ki. A tagokhoz ezután 2 ml 4:1 arányú Somogyi I. és II. oldatot adtam és azokat 15 percre 100°C vízfürdőbe helyeztem. A minták lehűtést követően további 2 ml Nelson reagenst és 4 ml desztillált vizet pipettáztam a kémcsövekbe. A reakció nyomán CO₂ fejlődött és mivel felszabaduló buborékok fénytörése mérési hibát okoz, ezért ultrahangos rázatással vagy manuális kikocogtatással eltávolítandók a rendszerből. A 10 kalibrációs oldat abszorbanciája spektrofotométerrel 540 nm hullámhosszon határozható meg. Az oldatok ismert cukortalmának és a mért abszorbancia értékek pontjaira felállított lineáris trendvonal egyenlete segítségével a minták ismeretlen cukortartalma könnyen és gyorsan számítható.

5 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESÜK

5.1 Törzsek előszelektálása

A komposzt mintákból korábban izolált törzsek aktivitásprofiljai részben már ismertek. A gyors screenelési technika segítségével a törzsek enzimtermelése könnyen kimutatható és összehasonlítható. Az előszelektálás során az egyedüli szénforrásként karboximetil-cellulózt (CMC), bükkfa eredetű xilánt és almapektint tartalmazó agarlemezen tesztelt baktérium törzsek eltérő aktivitást mutattak 37 °C-on 48 órát követően. Az alábbi ábra szemlélteti a baktériumok növekedését és a feltisztulási zónák méretét karboximetil-cellulózt tartalmazó agarlemezeken.

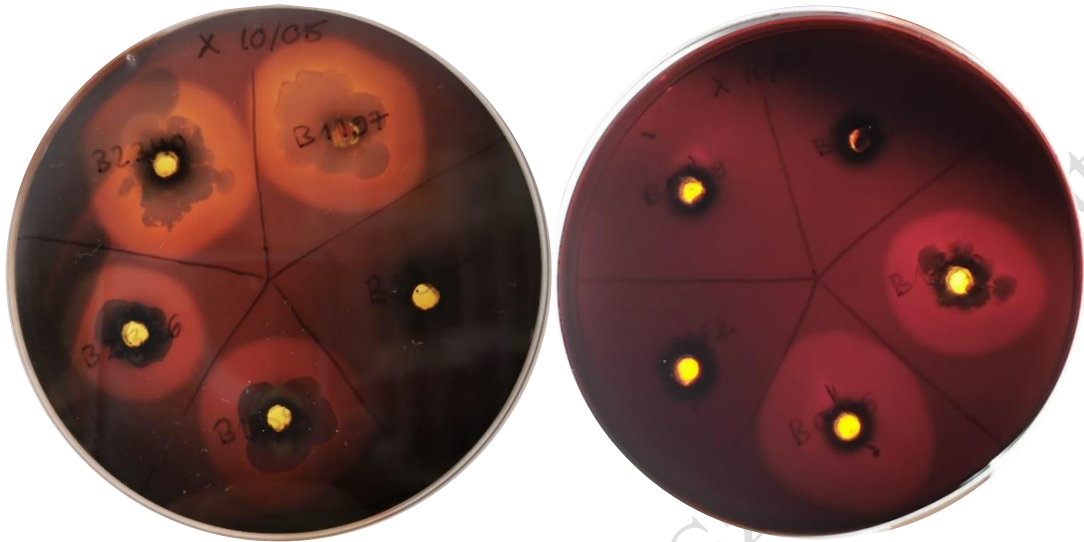


10. ábra: A baktérium törzsek karboximetil-celluláz (CMC-áz) aktivitásának gyors screenelése

A CMC agarlemezen nagyobb feltisztulási zónát, ezáltal nagyobb CMC-áz aktivitást sorrendben a *Thermus composti* B.02340, a *Thermobifida fusca* B.02355, a *Bacillus cereus* B.01718 és a *Thermobifida cellulosilytica* B.01997 törzs mutatott 37 °C-on 48 órát követően. A *B. cereus* B.00076, a *B. coagulans* B.01139 és a *Rhodococcus erythropolis* B.01659 törzset kisebb enzimaktivitás jellemezte, míg a *B. coagulans* B.01123, a *B. subtilis* B.01162 és a *Sphingobacterium* sp. B.02636 egyáltalán nem mutattak növekedést CMC szénforráson.

A törzsek xilanáz aktivitásának jelenlétét a 11. szemlélteti. A bükkfa eredetű xilánt tartalmazó agarlemezeken a *Thermobifida fusca* B.02355 törzs kivételével, a törzsek sorrendje közel hasonlóan alakult. A gyors screenelés során kedvezőbb aktivitást a *Thermus composti* B.02340 és a *Thermobifida cellulosilytica* B.01997 mutatott, amelyet a *Bacillus*

cereus B.00076, a *B. cereus* B.01718 és a *Rhodococcus erythropolis* B.01659, végül a *Sphingobacterium* sp. B.02636 követett. A *B. coagulans* B.01123, a *B. coagulans* B.01139 és a *B. subtilis* B.01162 törzsek nem növekedtek adott körülmények között.



11. ábra: A baktérium törzsek xilánáz aktivitásának gyors screenelése



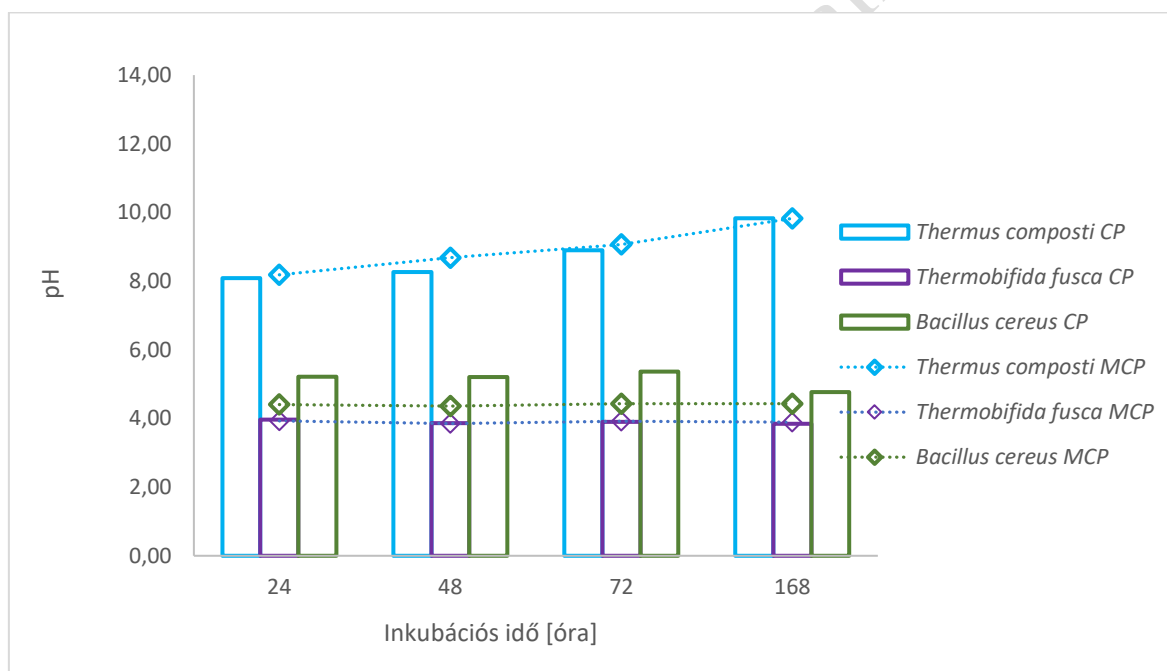
12. ábra: A *Thermobifida fusca* B.02355 törzs pektináz aktivitásának kimutatása

A baktérium törzsek körében egyedül a *Thermobifida fusca* B.02355 törzs esetén tapasztaltam pektinbontó képességet. A továbbiakban növényi rost jelenlétében követtem nyomon a *Thermobifida fusca* B.02355, valamint további két törzs: a *Thermus composti* B.02340 és a *Bacillus cereus* B.00076 extracelluláris enzimtermelését és degradációs teljesítményét szubmerz, rázatott rendszerekben.

5.2 Az előszelektált baktérium törzsek teljesítménye

5.2.1 Beoltási technikák hatása a törzsek aktivitásprofiljára

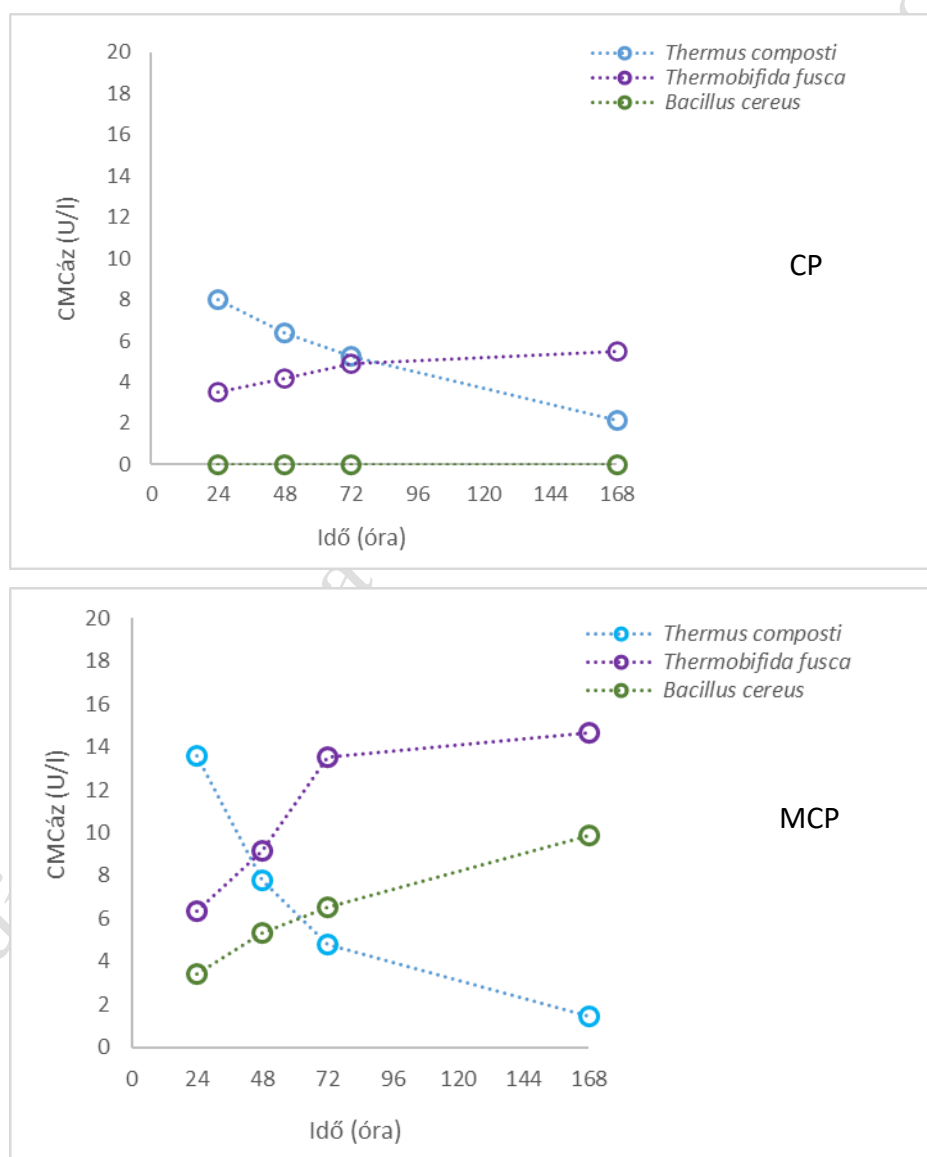
Az alábbi kísérletsorozatban arra kerestem a választ, hogy milyen hatást fejt ki a baktérium törzsek előtenyésztésének módosítása az enzimtermelésre és a növényi rostok bontására. Az előtenyésztés során alaptáplevesben (Czapek-Pepton, továbbiakban CP), és 3 (m/V) %-ban növényi rostokat tartalmazó, módosított alaptáplevesben (továbbiakban MCP) történt a törzsek szaporítása 37 °C-on, 180 rpm rázatási sebességen. A 10 (m/V)%-ban növényi rostokat tartalmazó fermentációs rendszerek leoltását követően a kémhatás mind a két esetben hasonlóan alakult. A *Thermus composti* B.02340 törzsnél a közegek kezdeti pH 7 érték alkalikus irányba, míg a másik két törzs esetén pedig savas irányba tolódott. A *Bacillus cereus* B.01718 törzsnél a 168. órában a kémhatás pH 4,4 és 5,1 értékre, míg a *Thermobifida fusca* B.02355 törzsnél pH 3,9 körüli értékre csökkent.



13. ábra: Beoltási technika hatása a szubmerz, rázatott rendszerek kémhatásának alakulására

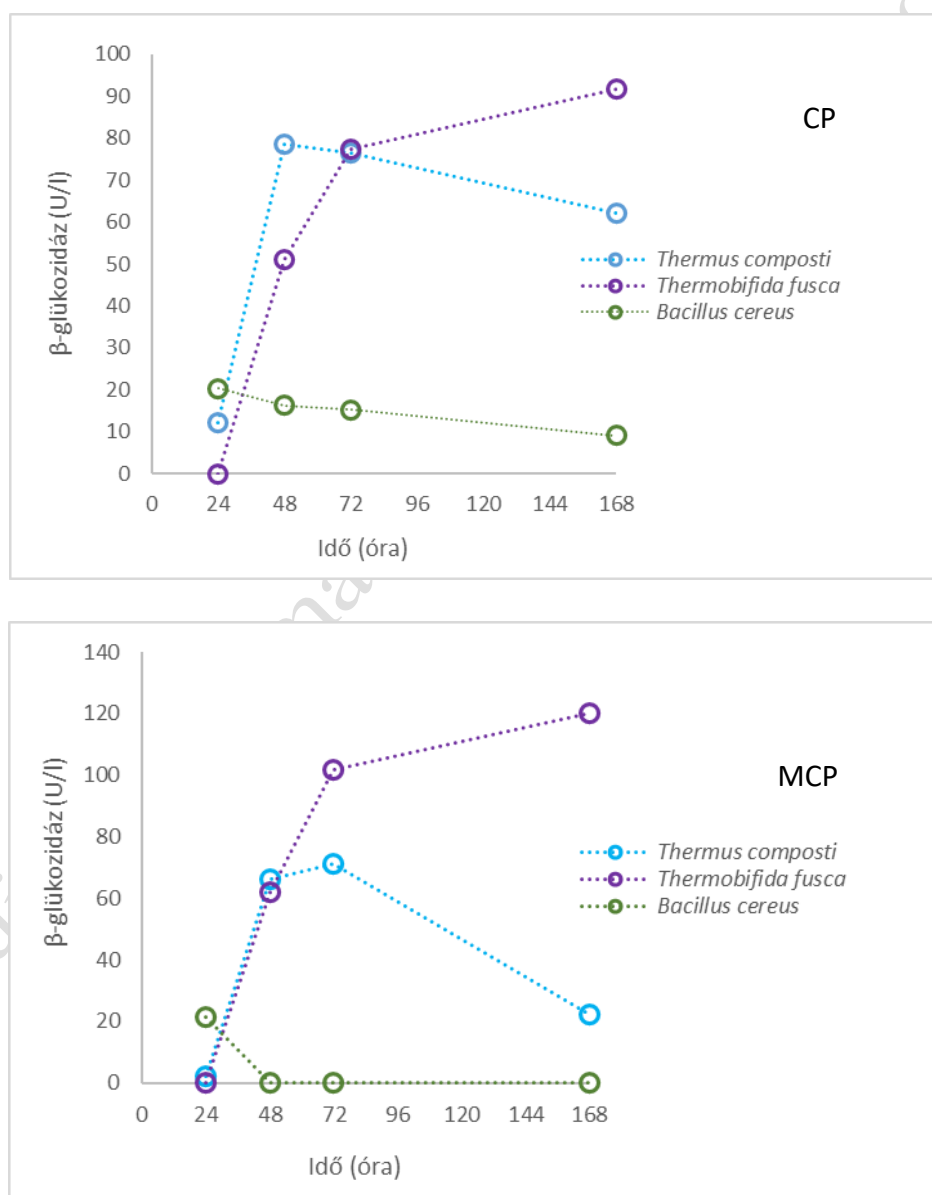
A szubmerz rendszerek savasodása, valamint lúgosodása az aktivitásprofilokon is jól látható, ugyanis a *Thermus composti* B.02340 törzset az első 24 órában nagyobb CMC-áz aktivitás jellemezte, ami pH 8 érték felett, a 48. órától jelentősen csökkent (13. és 14. ábra). A CMC-áz aktivitás ekkor 6 és 8 U/L között alakult, előtenyésztettől függően. Ezzel szemben savas tartományban a CMC-áz aktivitás fokozatos növekedését tapasztaltam. Ebben az

esetben a *Bacillus cereus* B. 01718 törzs CP táplevesen történő előtenyésztésének leoltása nem eredményezett CMC-áz aktivitást a növényi rostot tartalmazó fermentációs rendszerben, azonban az MCP-ben történő előtenyésztet alkalmazásával már lényegesen javult az enzintermelés. Az MCP tenyésztet leoltása mellett már az első 24 órában az aktivitás 3,4 U/L volt, amely a 168. órára 9,9 U/l értékre nőtt. A *Thermobifida fusca* B.02355 törzs esetén CP tenyésztet esetén 4,9 U/L értéket, míg MCP tenyésztet esetén 13,5 U/L értéket mértem a fermentáció 72. órájában, amelyet követően már csak lassabb növekedést mutatott a törzs.



14. ábra: Beoltási technika hatása a baktérium törzsek CMC-áz aktivitására (U/L)

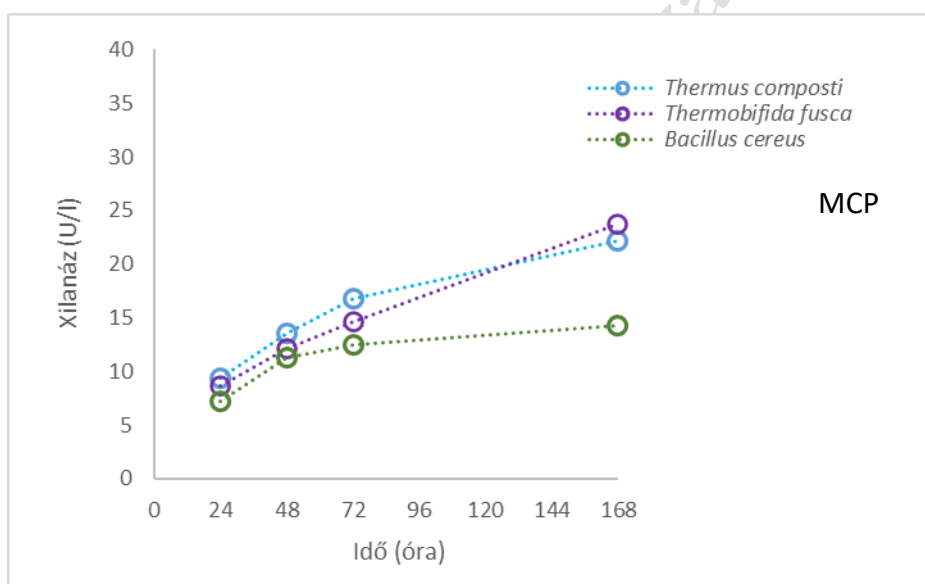
A törzsek CMC-áz és β -glükózidáz aktivitásprofilja eltérően alakult. A *Bacillus cereus* B.1718 törzs esetén mind a CP, mind az MCP táplevesben történő előtenyésztés nem eredményezett kedvező β -glükózidáz aktivitás értékeket. A szubmerz rendszerekben az első 24 órában 20,4 U/L értéket mértem, amelyet követően lényegesen csökkentek az aktivitás értékek. A *Thermus composti* B.02340 törzs β -glükózidáz aktivitása a CP előtenyésztett beoltási technika esetén a 48. órában tetőzött és a 72. órától csökkenésnek indult, míg a módosított tápoldatban előtenyésztett párja csak a 72. órára érte el aktivitásának maximumát. A maximális enzimaktivitás CP előtenyésztéssel indított fermentációs rendszerben 78,5 U/L, az MCP előtenyésztéssel indított fermentációs rendszerben pedig 71,3 U/L volt.



15. ábra: Beoltási technika hatása a baktérium törzsek β -glükózidáz aktivitására (U/L)

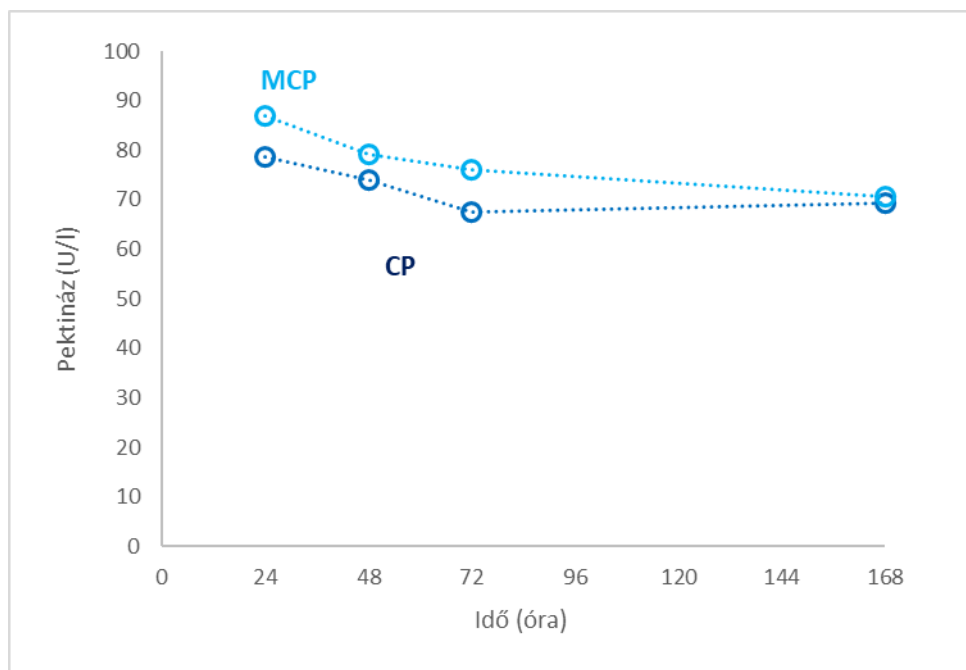
A legfokozottab enzิมaktivitást mutató törzs a *Thermobifida fusca* B.02355 volt. A CP előtenyésztéssel történő leoltás esetén az aktivitás elérte a 91,7 U/L értéket, míg az MCP előtenyésztéssel történő leoltás hatására az aktivitás 120,2 U/L értékre nőtt a fermentáció 168. órájában.

A törzsek endo- β -xilanáz szintéziséből általánosságban elmondható volt, hogy feltétele volt a komplex szénforrás jelenléte. Abban az esetben, amikor a törzsek tenyésztése CP táplevesben történt, a növényi rostot tartalmazó fermentációs rendszerekben egyáltalán nem termeltek enzimet. Az előindukált MCP tenyészetek viszont közel azonos ütemben és mennyiségben állították elő az endo- β -xilanázt. Nagyobb enzımaktivitást szintén a *Thermobifida fusca* B.02355 törzs produkált. Az aktivitás a fermentáció 168. órájában 23,7 U/L értékre tetőzött. A *Thermus composti* B.02340 törzs esetén ekkor 22,1 U/L értéket, a *Bacillus cereus* B.01718 törzsnél pedig 14,3 U/L értéket mértem.



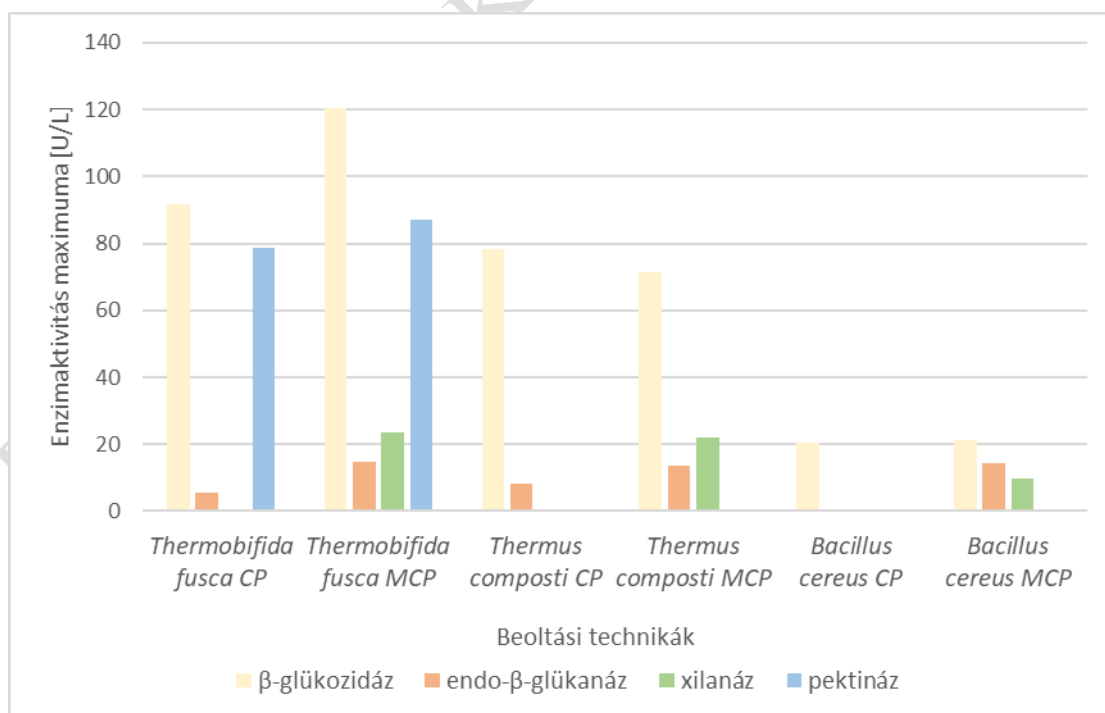
16. ábra: Beoltási technika hatása a baktérium törzsek endo- β -xilanáz aktivitására (U/L)

Egyedülként a *Thermobifida fusca* B.02355 törzs mutatott pektináz aktivitást, és azt a beoltási technikától függetlenül. Ugyan a növényi roston előtenyésztett törzsnél itt is magasabb aktivitás volt megfigyelhető, ez lényegesen nem haladta meg az alaptáplevesben tenyésztett törzs teljesítményét. Az első napon realizált maximuma az MCP tápközegben előtenyésztett törzsnek 86,92 U/L, a CP táplevesben előtenyésztett törzsnek 78,5 U/L volt. A 168. óráig mindkét esetben kis meredekségű csökkenést mutattak.



17. ábra: Beoltási technika hatása a *Thermobifida fusca* B.02355 törzs pektináz aktivitására (U/L)

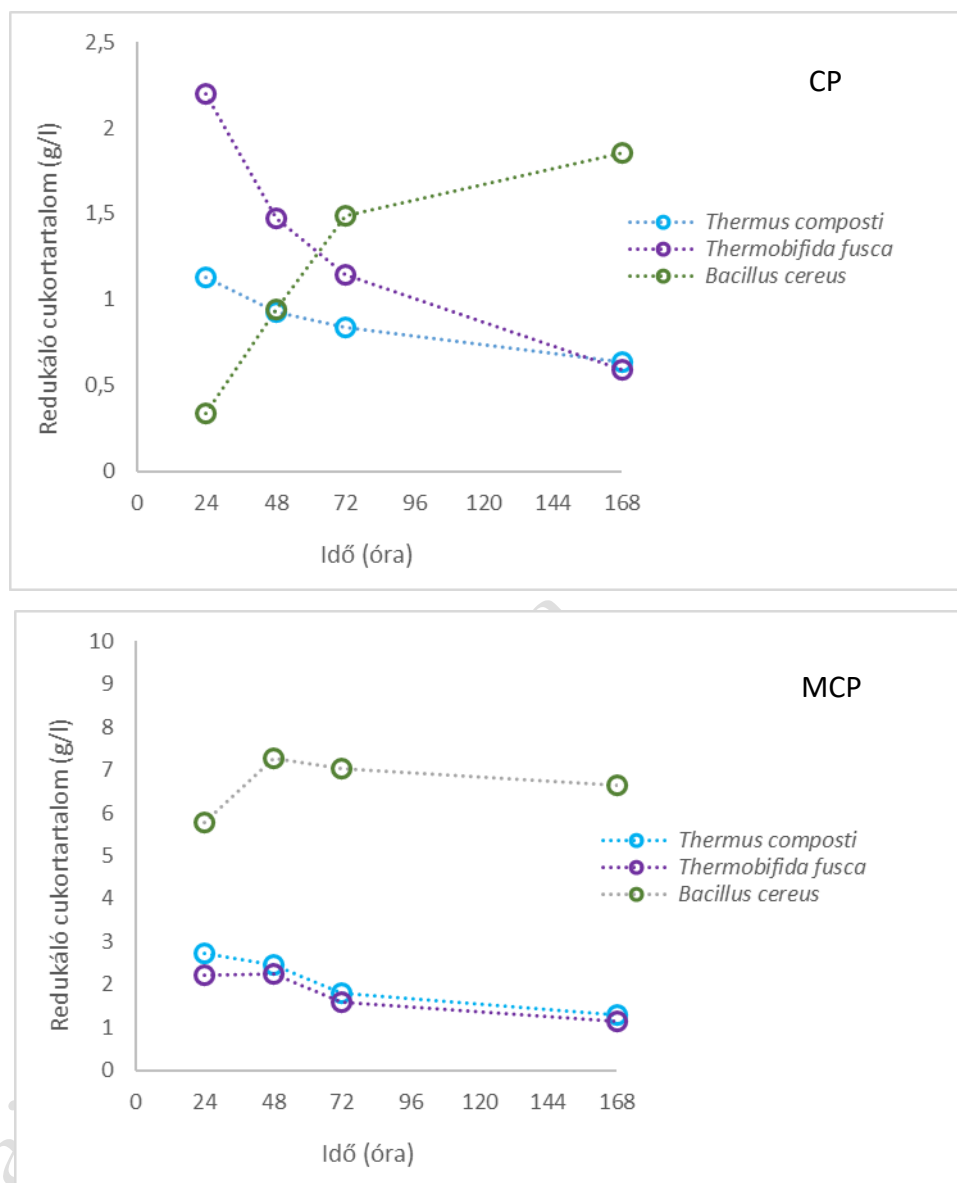
Az előkísérletek eredményei alapján elmondható, hogy az előindukált tenyészetekkel, a törzsek tulajdonságaitól függően, kedvezően befolyásolható az enzimtermelés hatékonysága. Az alábbi (18.) ábra a törzsekkel elért enzimaktivitásokat összesíti.



18. ábra. A CP és MCP baktérium tenyészetekkel indított szubmerz rendszerek enzimaktivitás értékeinek (U/L) összehasonlítása

5.2.2 Mikrobiális rostbontás hatékonysága

A törzsek teljesítményét az aktivitásprofilok és az oldatba vitt szénhidrátok szerint értékeltem. A redukáló cukortartalom alakulását az alábbi 19. ábra szemlélteti.



19. ábra: Beoltási technika hatása a redukáló cukortartalom (g/L) alakulására

A beoltási technikák hatást fejtettek ki a mért cukortartalomra, ugyanis míg a *Thermobifida fusca* B.02355 törzs CP és MCP típusú előtenyészetével indított fermentációs közegekben az első 24 órában értem el nagyobb cukorhozamot, ami 2 és 2,5 g/L körül alakult, addig a *Bacillus cereus* B.01718 törzs MCP tenyészetével az első 24-48 órában több, mint kétszeres cukorhozamot eredményezett. Aktivitásprofilban ugyan a *Thermobifida fusca*

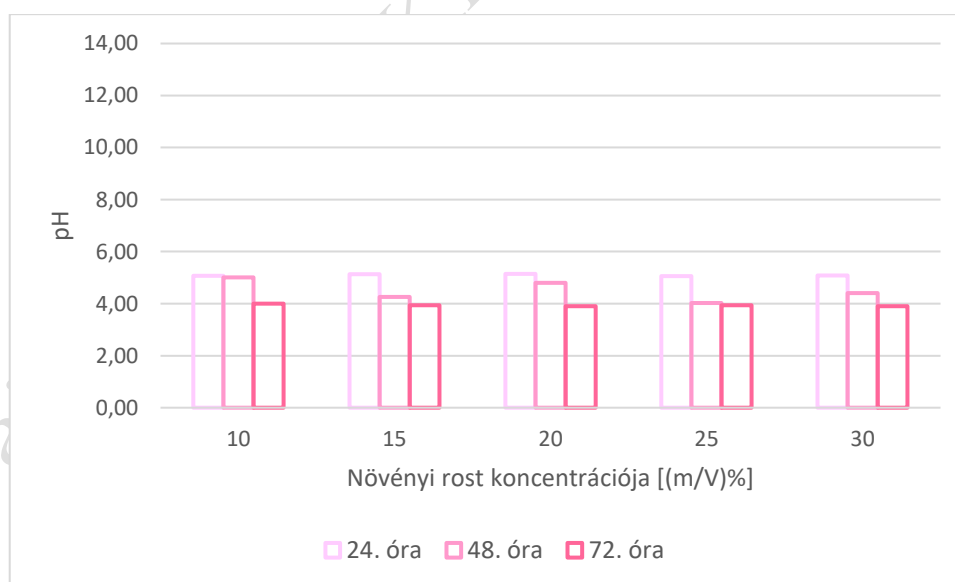
B.02355 törzs emelkedett ki, így feltételezhetően a törzs anyagcserefolyamatainak fenntartásához gyorsabban fogyasztotta el a könnyen elérhető cukrokat (elsősorban glükózt), ami lényeges cukorvesztést idézett elő. Ugyanez a jelenség okozhatta a *Thermus composti* B.02340 törzs esetén mért alacsonyabb cukorhozamot, ahol szintén az első 24-48 órát követően a rendszerben mért redukáló cukortartalom csökkenésnek indult.

Az enzimaktivitások és a mikrobiális rostbontás eredményei alapján a továbbiakban a szubmerz rendszerek néhány technológiai paraméterének: növényi rosttartalom, valamint a hőmérséklet és a pH hatását követtem nyomon a *Thermobifida fusca* B.02355 törzs esetén. Az előindukált tenyészet sikerességét követően a továbbiakban MCP táplevesben tenyésztettem a törzset.

5.3 A növelt rostállomány és hőmérséklet hatása a *Thermobifida fusca* B.02355 törzs enzimtermelésére

5.3.1 Celluláz/xilanáz/pektináz aktivitásprofil

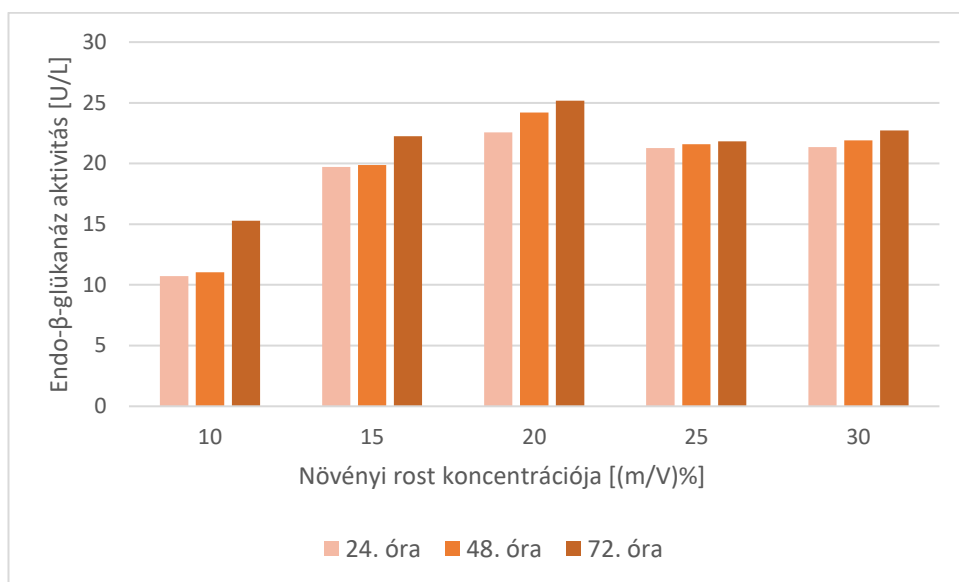
A növelt rosttartalmú szubmerz rendszerekben a kémhatás közel hasonlóan alakult, mint a kontroll, 10 (m/v) %-os rendszerekben. A korábbi tapasztalokhoz hasonlóan a kémhatás a savas tartományba tolódott, amelyet az alábbi 20. ábra szemléltet



20. ábra: A szubmerz rendszerek kémhatásának alakulása

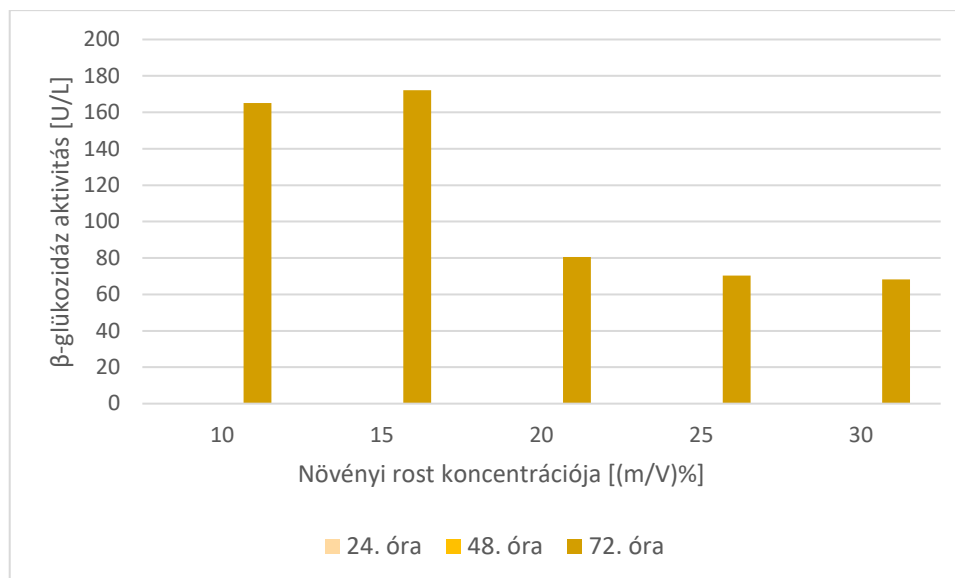
Amennyiben a szubmerz rendszer csak 10 (m/V) % növényi rosttartalommal rendelkezett, abban az esetben a pH lassabban csökkent a kezelés időtartama alatt. A 48. órában pH 5,6, a 72. órában pedig pH 4,4 értéket mértem.

Az endo- β -glükanáz az első mintavételtől kezdve fokozatos növekedést mutatott (21. ábra). Optimuma 20 (m/v) % növényi rosttartalomnál jelentkezett, ahol a mintavételezés 72. órájára 25,19 U/L enzimaktivitást ért el. A csupán 10 (m/v) %-os növényi rostot tartalmazó vizes rendszerekben hasonló ütemben termelődött az endo- β -glükanáz, azonban maximuma a 72. órában 10,63 U/L volt, ami nem haladta meg a 10 (m/v) %-os módosított CP tápközegeben mért értéket.



21. ábra: *Thermobifida fusca* B.02355 az endo- β -glükanáz aktivitásának (U/L) alakulása

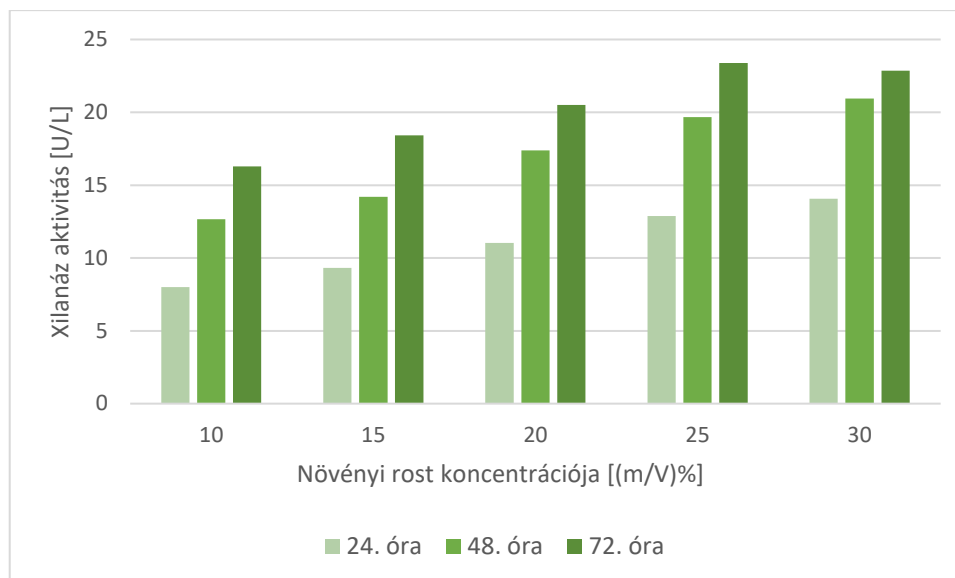
A β -glükózidáz a növényi rost koncentrációjától függetlenül a 72.órás mintavételig nem mutatott aktivitást (22. ábra). Maximumát a 15 (m/V) %-os tápközegeben érte el, ahonnan a növényi rostállomány további növekedésével lényeges csökkenést mutatott. Ennek oka lehet a hosszú polimer láncok mennyiségének növekedése, ami nem kedvező az elsősorban cukrosításért felelős enzim aktivitásának. A csupán növényi rostot (10 m/V %) tartalmazó tápközegeben jelentős enzimtermelés volt mérhető szintén a 72. órában. Az aktivitás ekkor közel hasonlóan alakult, mint a 10 (m/v) %-os módosított CP tápközegeben, amely 152,9-165,1 U/L között mozgott.



22. ábra: *Thermobifida fusca* B.02355 β -glükózidáz aktivitásának (U/L) alakulása

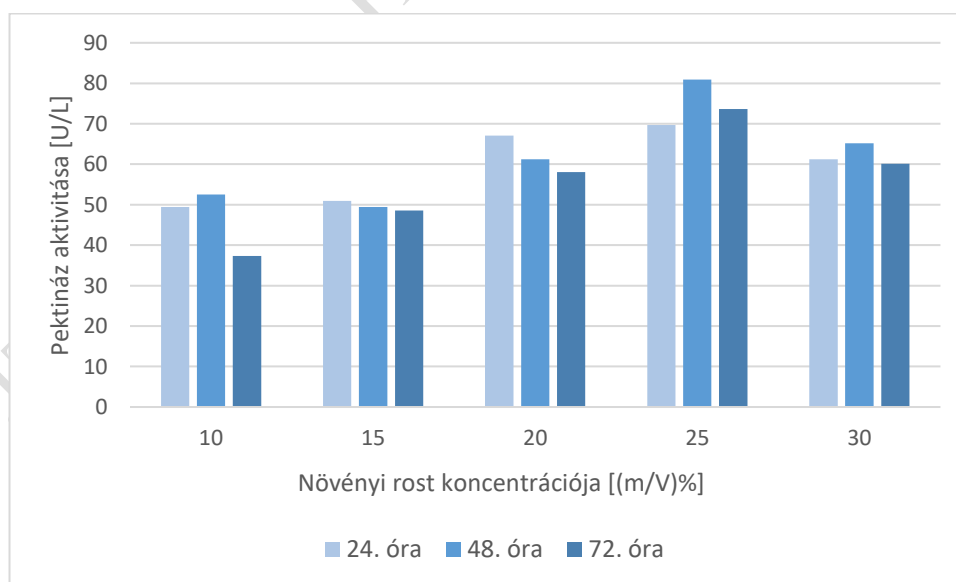
A csupán növényi rostot (10 m/V %) és desztillált vizet tartalmazó, a költségek csökkentésének céljával bevezetett tápközegeben is magasfokú enzimtermelés volt mérhető szintén a 72. órán. Ebben a szegényesebb összetételű közegben jobb eredményt produkált (152,83 U/L) a β -glükózidáz, mint a Czapek-Pepton egyéb összetevőit is tartalmazó, magasabb növényi rost koncentrációjú tenyészetek. Belátható, hogy a kiegészítő tápanyagok és nyomelemek hiánya kevésbé negatívan befolyásolta az enzimtermelést, mint a komplex polimer szénforrás koncentrációjának növelése.

Az endo- β -xilanáz enzim aktivitása bizonyos mértékig a növelt növényi rost tartalommal együtt arányosan növekedett. Ebben az esetben az aktivitás a 25 (m/V) % és 30 (m/V) % rost tartalom jelenlétében mutatkozott, ahol az aktivitás elérte 23,4 U/L és 22,9 U/L értéket (23. ábra). A baktérium törzs aktivitása a 10 %-os csökkentett tápanyagtartalmú közegben jelentősen lecsökkent, amely a 72. órán is csupán 9,91 U/L volt.



23. ábra: *Thermobifida fusca* B.02355 endo- β -xilanáz aktivitásának (U/L) alakulása

A *Thermobifida fusca* B.02355 pektináz enzim termeléséhez szükséges rosttartalom optimuma a xilanázhoz hasonlóan 25% volt. A tápanyagforrás ezen koncentrációja mellett 80,94 U/L aktivitás értéket értem el a kezelés 48. órájában. Az aktivitás többnyire a 24-48 óra között tetőzött, amelyet követően csökkenésnek indult. A pusztán desztillált vizet és növényi rostot 10 (m/V)%-ban tartalmazó tápközegben a pektináz aktivitás szintén alacsony értéken tetőzött, amely a 48. órában 45,06 U/L volt.

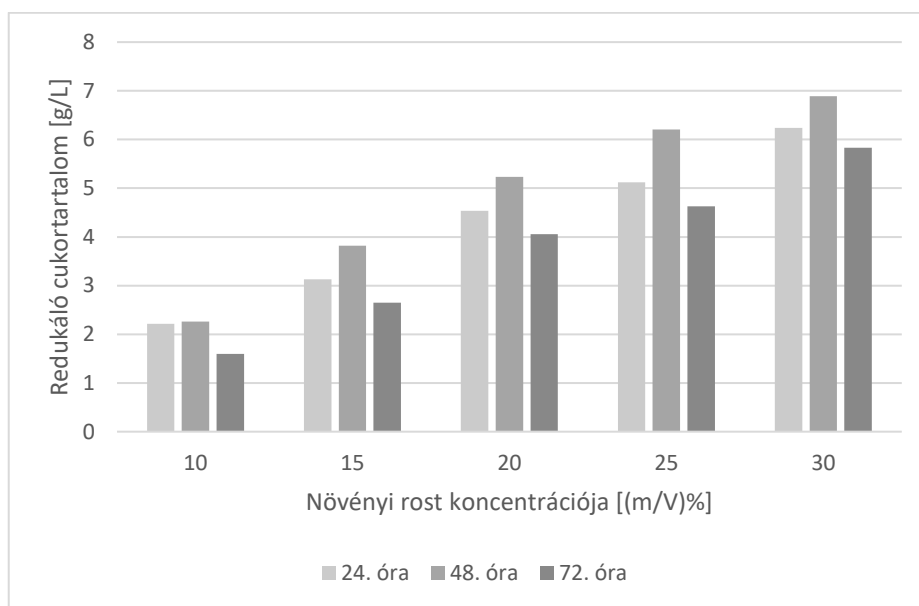


24. ábra: *Thermobifida fusca* B.02355 pektináz aktivitásának (U/L) alakulása

5.3.2 A redukáló cukortartalom alakulása

A *Thermobifida fusca* B.02355 törzs enzimatisz aktivitása nyomán a rendszerben felszabaduló redukáló cukortartalom (elsősorban glükóz) a 24. ábra szerint alakult. A

növényi rosttartalom növelésével a redukáló cukrok mennyisége fokozatosan halmozódott és 30 (m/v) % rosttartalomnál tetőzött. A cukrok egyidejű felszabadítása és hasznosítása közel azonos mintázatot hozott létre a különböző rosttartalmú tápközegekben. Jellemzően a mintavétel 48. órájában mértem nagyobb cukortartalmat, amely 6,8 g/L érték volt. Ezt követően a baktérium anyagcserefolyamatainak hatására lényeges cukorvesztés következett be.



25. ábra: A redukáló cukortartalom (g/L) alakulása

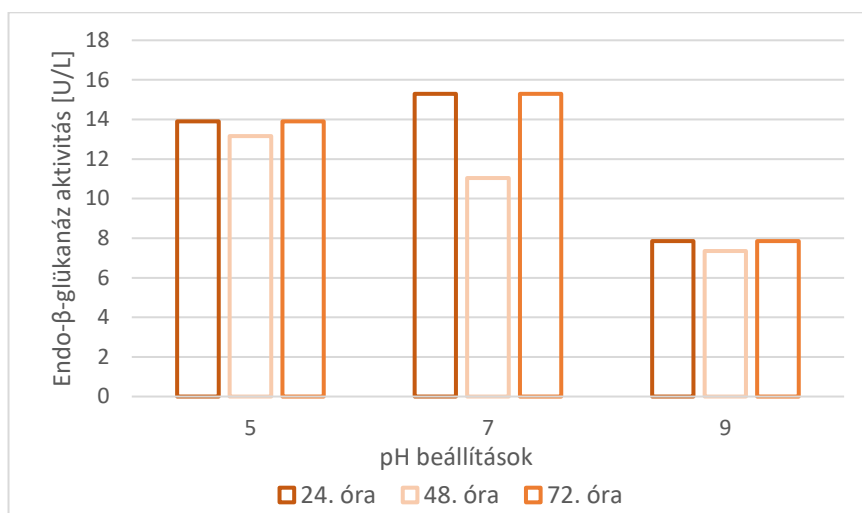
A korábbi tapasztalatokra alapozott elvárásoknak megfelelően a csökkentett tápanyagösszetételű, 10 (m/V)% növényi rostot tartalmazó tápoldatban halmozódott fel kisebb mennyiségben redukáló cukortartalom. Ebben az esetben a 24. órában mért 1,70 g/L érték növekedést nem mutatott az előkezelés előrehaladtával.

Érdeemes még olyan további kísérleti beállításokon gondolkodni, ahol a kizárólag növényi hulladék tápanyagot tartalmazó tápközeg koncentrációját növeljük. Hiszen a gazdaságos termelés és hulladékfeldolgozás szempontjából ez lenne a kedvező, és bebizonyosodott, hogy képes rajta enzimtermelésre és cukrosításra a szelektált baktérium törzs. A technológiai tényezők körében kérdéses lehet a kiindulási pH enzimfermentációra és mikrobiális rostbontásra kifejtette hatása, mely a következő kísérletsorozatban kifejtésre kerül.

5.4 *Thermobifida fusca* B.02355 törzs enzimtermelése különböző kémhatású szubmerz rendszerekben

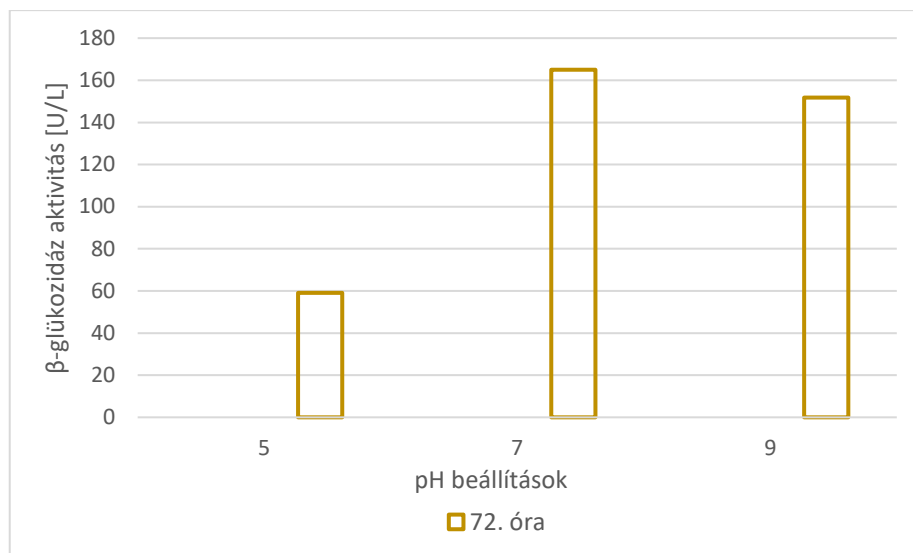
5.4.1 Celluláz/xilanáz/pektináz aktivitásprofilok alakulása

A CMCáz aktivitásra kedvezőbb hatással a semleges kémhatású (pH 7) környezet volt. A savas tartományban indított enzimermentáció során kisebb mértékű csökkenést, a lúgos tartományban pedig az aktivitás feleződését tapasztaltam (25. ábra).



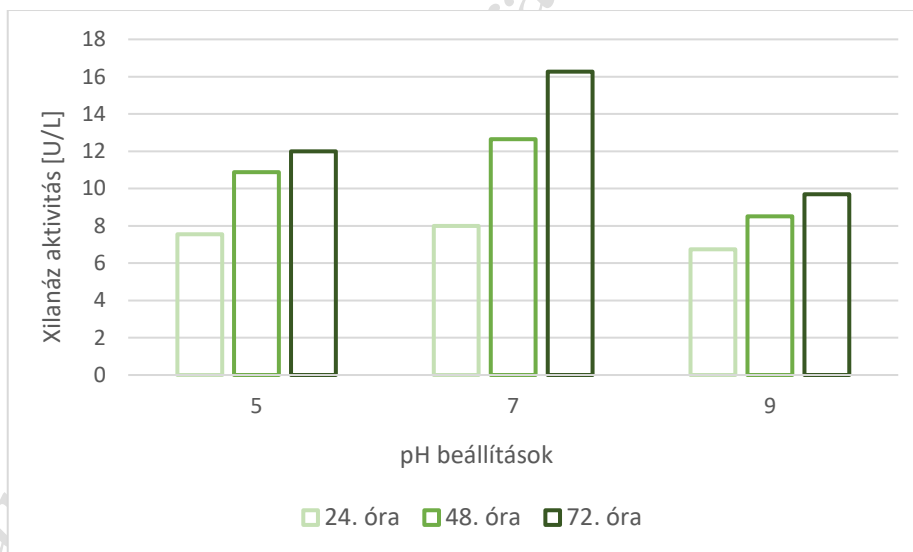
26. ábra: Az endo-β-glükanáz aktivitás (U/L) alakulása a különböző pH beállításokon, 10 (m/V)% növényi rosttartalom mellett

A β-glükózidáz aktivitása az előző kísérletben már ismertetett, pH 7 kiindulási kémhatású tápközegeben magasabb volt, mint a savasabb és lúgosabb környezetben. A kísérleti beállítás mindkét irányba való eltolása aktivitásbeli visszaesést okozott a semleges körülményekhez képest, ám nagyon különböző mértékben. Az eddig tapasztalatokkal egyezően, csak a 72. órára lett mérhető enzimertermelés a rendszerben. A β-glükózidáz aktivitás enyhén savas tartományban a semleges körülményeknél mért aktivitáshoz képest, 1/3-ára (59,09 U/L) csökkent. Az enyhén lúgos beállítás ezzel szemben csak minimális enzimaktivitásbeli visszaesést okozott (151,81 U/L) (26. ábra).



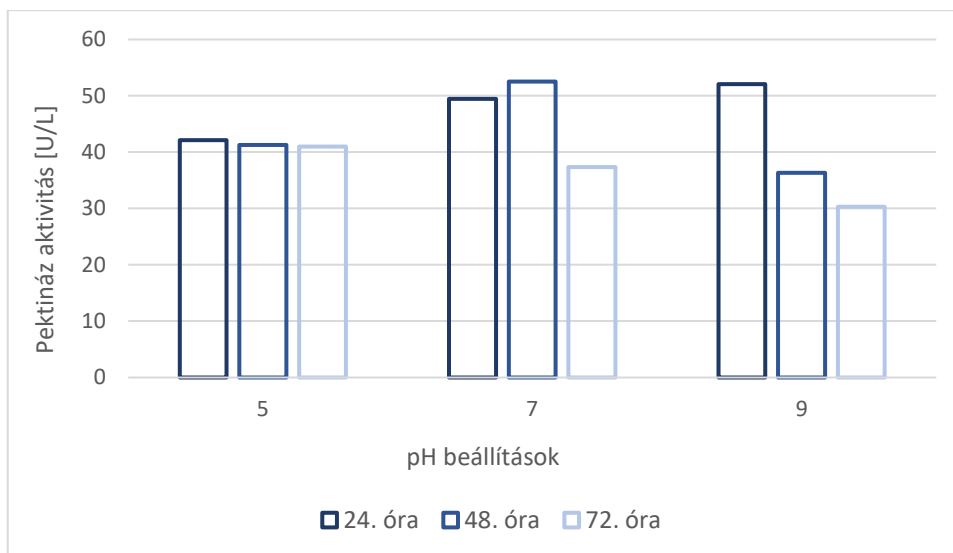
27. ábra: Az β -glükozidáz aktivitás (U/L) alakulása a különböző pH beállításokon, 10 (m/V)% növényi rosttartalom mellett

Nagyobb endo- β -xilanáz aktivitás továbbra is az eredeti, semleges körülmények között jelentkezett, ahol az egyes mintavételek közötti növekedés üteme is fokozottabb volt. A savas beállítás ezt kisebb mértékben szorította vissza, mint a lúgos (27. ábra).



28. ábra: Az endo- β -xilanáz aktivitás (U/L) alakulása a különböző pH beállításokon, 10 (m/V)% növényi rosttartalom mellett

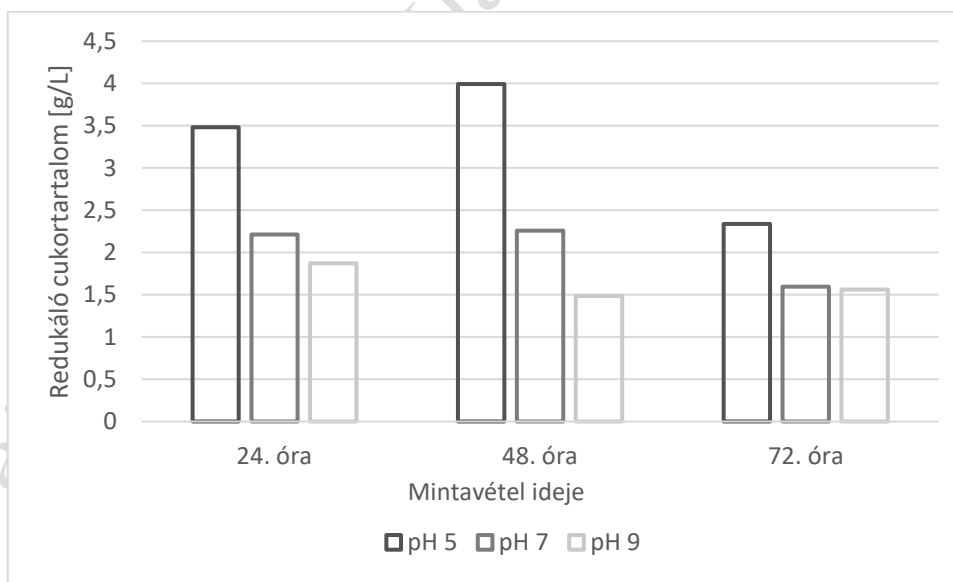
A kémhatás szintjének eltolása a pektináz aktivitásnak részben kedvezett. Míg semleges tartományban az aktivitás 52,50 U/L a kezelés 48. órájában, addig a lúgos tartományban már a kezelés 24. órájában közel azonos aktivitást mértem. A savas közegben az aktivitás a 24. és 72. óra között lényegi eltérést nem mutatott, az aktivitás értéke 40 U/L érték körül stagnált (28. ábra).



29. ábra: A pektináz aktivitás (U/L) alakulása a különböző pH beállításokon, 10(m/V)% növényi rosttartalom mellett

5.4.2 A redukáló cukortartalom alakulása

A redukáló cukortartalom alakulását a 29. ábra szemlélteti. A savas közeg kedvezett a cukorfelhalmozásnak. Maximumát (4,0 g/L) 5-ös pH-jú közegben a 48. órai mintavétel idejére érte el.



30. ábra: A redukáló cukortartalom (g/L) alakulása a különböző pH beállításokon, 10(m/V)% növényi rosttartalom mellett

Általánosságban elmondható a vizsgált enzimekről, hogy semleges közeli pH-ról indított enzimfermentáció során mutattak nagyobb aktivitásokat.

6 ÖSSZEFOGLALÁS

A komposztból izolált baktérium törzsek enzimaktivitásainak gyors screenelése során megállapítottam, hogy azok igen eltérő cellulolitikus, xilanolitikus és pektinolitikus enzimaktivitással rendelkeznek. A törzsek rangsorolása során a *Bacillus cereus* B.01718, a *Thermobifida fusca* B.02355 és a *Thermus composti* B.02340 törzs emelkedett ki, amelyek között egyedül a *Thermobifida fusca* B.02355 mutatott pektin bontó képességet 37 °C-on, 48 órát követően.

A szubmerz, rázatott rendszerekben a technológiai tényezők – névlegesen a különböző beoltási technikák (alaptáplevesbeni és módosított táplevesbeni előtenyésztés), a növényi rosttartalom növelése, a kémhatás és a hőmérséklet – jól összehasonlíthatóvá tették a szelektált törzsek növényi sejtfalat degradáló enzimtermelési tulajdonságait. A növényi roston való előtenyésztés – mikroorganizmustól függetlenül – pozitívan befolyásolta az enzimtermelést és a rostok bontását, ezáltal az oldatba vitt értékes cukorhozamot.

A növényi rosttartalom növelése során megállapítottam, hogy a *Thermobifida fusca* B.02355 törzs CMCáz szintézisének optimuma 20 (m/V)%, a β -glükozidáz szintézis optimuma 15 (m/V)%, a xilanáz és a pektináz szintézis optimuma pedig 25 (m/V)% volt. A redukáló cukortartalom a hozzáadott növényi rostok mennyiségével arányosan növekedett, tehát nem kizárható, hogy a szubsztrát koncentrációjának további növelésével a cukorkihozatal még növelhető.

Az enzimek szintézisének minden esetben a semleges pH-n indított szubmerz fermentáció kedvezett, a kiindulási kémhatás savas és lúgos irányba történő eltolása az enzimek aktivitását eltérő mértékben, de csökkentette. A *Thermobifida fusca* B.02355 törzs celluláz és xilanáz aktivitása a 72. órában, míg a pektináz aktivitása a 48. órában tetőzött.

Bizonyítást nyert továbbá, hogy a növényi rostállomány kellően gazdag tápanyagokban ahhoz, hogy más tápanyag jelenléte nem elengedhetetlen a *Thermobifida fusca* B.02355 enzimszintéziséhez. A növényi rostok önmagában, egyéb tápanyagkiegészítés nélkül azonban nem minden esetben segítették elő az enzimek termelését. Érdekes ebben az egyszerűsített tápközegben rejlő további lehetőségeket keresni a növényi rostállomány koncentrációjának növelésével. Mivel a mikroorganizmusok alapvetően egy konzorciumot alkotva vannak jelen a komposztban, a szinergens

kölcsönhatások reményében érdemes lehet együtt alkalmazni az egy időben jelenlévő, hasonló tápanyagigényű és optimumú baktériumokat (akár gombákkal együtt). A költségek további csökkentésének érdekében vizsgálendő az enzimfermentáció hatékony működéséhez szükséges minimális hőmérsékleti érték, hogy alacsonyabb energiaszükségletet jelentsen a biokonverzió paramétereinek biztosítása.

6. táblázat. A *Thermobifida fusca* B.02355 enzimtermelésének kedvező beállítások

Termelő törzs	Enzim	SmF enzimfermentáció paramétereinek optimális értékei				Beoltási technika	Aktivitás [U/L]
		T [°C]	pH	t* [h]	c** [(m/V)%]		
<i>Thermobifida fusca</i> B.02355	endo-β-glükanáz	55	7	72	20	MCP	25,17
	β-glükózidáz	55	7	72	15		172,19
	xilanáz	55	7	72	25		23,38
	pektináz	37	7	48	25		80,94
t*: inkubáció időtartama							
c**: növényi rostállomány koncentrációja							

Az elért eredmények igen ígéretesek, a tápanyagban gazdag növényi maradványok potenciális alapanyagforrásként szolgálhatnak biofeldolgozási folyamatok során.

7 IRODALOMJEGYZÉK

1. Attri, S., Garg, G. (2014). Isolation of microorganisms simultaneously producing xylanase, pectinase and cellulase enzymes using cost effective substrates. *Journal of Innovative Biology*. 1. DOI: 045-050.
2. Bastawde, K.B., (1992): Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World J Microbiol Biotechnol* 8, 353–368 DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01198746>
3. Bedő S. (2020): Pektinek és pektinázok Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Enzimológia előadás
http://oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/abet/Enzimologia/2020/Pektin_pektinaz%20BS.pdf
4. Capozzi, V. (ed.) (2019): Potential of Pectins to Beneficially Modulate the Gut Microbiota Depends on Their Structural Properties. *Frontiers in Microbiology*, Volume 10 DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00223>
5. Chantarasiri, A. (2015). Aquatic *Bacillus cereus* JD0404 isolated from the muddy sediments of mangrove swamps in Thailand and characterization of its cellulolytic activity, *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, Volume 41, Issue 3, Pages 257-264, ISSN 1687-4285, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2015.08.003>.
6. Cummings JH., (1984): Cellulose and the human gut. *Gut*. 1984 Aug ;25(8):805-10. DOI: <https://www.doi.org/10.1136/gut.25.8.805>
7. Duarte, M.C.T., Portugal, E.P., Ponezi, A.N., Bim, M.A., Tagliari, C.V., Franco, T.T. (1999). Production and purification of alkaline xylanases, *Bioresource Technology*, Volume 68, Issue 1, 49-53, ISSN 0960-8524, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00079-0](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00079-0).
8. European Environment Agency (2013): Managing municipal solid waste - a review of achievements in 32 European countries European Environment Agency, Copenhagen, ISBN: 978-92-9213-355-9
<https://www.eea.europa.eu/publications/managing-municipal-solid-waste>
9. Eurostat (2023): Municipal Waste Statistics. Municipal Waste Generation.
https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Municipal_waste_statistics#Municipal_waste_generation
10. Fésüs L., Heszky L., Hornok L. (2005): *Mezőgazdasági Biotechnológia*, Agroiinform Kiadó, Budapest. ISBN: 9789635028375.
11. Gomez del Pulgar, E.M., Saadeddin A., (2014): The cellulolytic system of *Thermobifida fusca* *Critical Reviews in Microbiology*, Volume 40 236-247, DOI: <https://www.doi.org/10.3109/1040841X.2013.776512>
12. Govindaraji, P. K., Vuppu, S. (2020). Characterisation of pectin and optimization of pectinase enzyme from novel *Streptomyces fumigatiscleroticus* VIT-SP4 for drug delivery and concrete crack-healing applications: An eco-friendly approach, *Saudi Journal of Biological Sciences*, Volume 27, Issue 12, Pages 3529-3540, ISSN 1319-562X, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.07.024>
13. Guo, F., Li, X., Zhao, J., Li, G., Gao, P., Han, X. (2019). Optimizing Culture Conditions by Statistical Approach to Enhance Production of Pectinase from *Bacillus* sp. Y1. *Biomed Res Int*. 2019 Feb 20;2019:8146948. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/8146948>

14. Haile, S., Ayele, A. (2022): Pectinase from Microorganisms and Its Industrial Applications. *The Scientific World Journal* DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/1881305>
15. Hussain, C.M. (ed.) (2018): Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications, Part 1 Chapter 5. Nanocellulose for Industrial Use: Cellulose Nanofibers (CNF), Cellulose Nanocrystals (CNC), and Bacterial Cellulose (BC), 74-126, Elsevier, ISBN: 978-0-12-813351-4 DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813351-4.00005-5>
16. Internet 1: Gilbert, J., Siebert, S. (2022): Compost and digestate for a circular bioeconomy. European Compost Network ECN e.V., Bochum, ISBN: 978-3-9820825-1-6
<https://www.compostnetwork.info/wordpress/wp-content/uploads/ECN-rapport-2022.pdf>
17. Internet 2: Bailey, R., (2019): The Structure and Function of a Cell Wall
<https://www.thoughtco.com/cell-wall-373613>
18. Internet 3: Wikipedia, (2008): Carboxymethyl cellulose
https://en.wikipedia.org/wiki/Carboxymethyl_cellulose#/media/File:Carboxymethyl_cellulose.png
19. Internet 4: American Chemical Society, (2022): Xylan Molecule of the Week
<https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/x/xylan.html>
20. Kaur, A., Mahajan, R., Singh, A., Garg, G., Sharma, J. (2011) Application of cellulase free xylano-pectinolytic enzymes from the same bacterial isolate in biobleaching of kraft pulp. *Bioresour Technol* DOI: 101:9150-9155
21. Lakhundi, S., Siddiqui, R., & Khan, N. A. (2015): Cellulose degradation: a therapeutic strategy in the improved treatment of Acanthamoeba infections. *Parasites & Vectors BioMed Central*. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0642-7>
22. Liang, Y., Zhang, Z., Wu M., Wu Y., Feng, J., (2014). Isolation, Screening, and Identification of Cellulolytic Bacteria from Natural Reserves in the Subtropical Region of China and Optimization of Cellulase Production by *Paenibacillus terrae* ME27-1, *BioMed Research International*, DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/512497>
23. Lo, Y., Lu, W., Chen, C., Chen, W., Chang, J., (2010). Characterization and high-level production of xylanase from an indigenous cellulolytic bacterium *Acinetobacter junii* F6-02 from southern Taiwan soil, *Biochemical Engineering Journal*, Volume 53, Issue 1, 77-84, ISSN: 1369-703X, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.09.011>
24. Nawaz, M. A., Bibi, Z., Karim, A., Rehman, H. U., Jamal, M., Jan, T., Aman, A., & Qader, S. A. (2017). Production of α -1,4-glucosidase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB4 by utilizing sweet potato peel. *Environmental science and pollution research international*, 24(4), 4058–4066. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8168-x>
25. Nawel, B., Said, B., Estelle, C., Hakim, H., Duchiron, F., (2011). Production and partial characterization of xylanase produced by *Jonesia denitrificans* isolated in Algerian soil, *Process Biochemistry*, Volume 46, Issue 2, Pages 519-525, ISSN: 1359-5113, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.10.003>
26. Nelson, N. (1944) A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of Glucose. *The Journal of Biological Chemistry*, 153, 375-380.

27. Oumer, O. J., & Abate, D. (2018). Comparative Studies of Pectinase Production by *Bacillus subtilis* strain Btk 27 in Submerged and Solid-State Fermentations. *BioMed research international*, 2018, 1514795. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/1514795>
28. Perez, S., Mackie, W., (2001): Structure and morphology of cellulose. A virtual review article.
29. Philip, K. (2018): Polysaccharide Ingredients, Reference Module in Food Science, Elsevier, ISBN 9780081005965, DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22367-6>.
30. Prajapati, J., Dudhagara, P., Patel, K. (2021). Production of thermal and acid-stable pectinase from *Bacillus subtilis* strain BK-3: Optimization, characterization, and application for fruit juice clarification, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Volume 35, 102063, ISSN 1878-8181, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102063>.
31. Ramírez, M., Calzadiaz Ramirez, L. (2016). Industrial Enzymes and Metabolites from Actinobacteria in Food and Medicine Industry. DOI: <https://doi.org/10.5772/61286>
32. Samaan, A.R. (ed.) (2017): Dietary Fiber for the Prevention of Cardiovascular Disease, Chapter 3 - The Interaction Between Insoluble and Soluble Fiber, 35-59, Elsevier , ISBN: 978-0-12-805130-6 DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805130-6.00003-3>
33. Samanta, A. K., Kolte, A. P., Senani, S., Sridhar, M., & Jayapal, N. (2011). A simple and efficient diffusion technique for assay of endo β -1,4-xylanase activity. *Brazilian journal of microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology], 42(4), 1349–1353. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-838220110004000016>
34. Sethi, S., Datta, A., Gupta, B. L., & Gupta, S. (2013). Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. *ISRN biotechnology*, 2013, 985685. DOI: <https://doi.org/10.5402/2013/985685>
35. Somogyi M. 1951. Notes on sugar determination. *J Biol Chem* 195:19–23.
36. Somogyi, M. (1945). A New Reagent for the Determination of Sugars. *Journal of Biological Chemistry*, 160(1), 61–68. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)43097-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)43097-9)
37. Thakur, B. R., Singh, R. K., & Handa, A. K. (1997). Chemistry and uses of pectin--a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 37(1), 47–73., DOI: <https://doi.org/10.1080/10408399709527767>.
38. Todero Ritter, C. E., Camassola, M., Zampieri, D., Silveira, M. M., & Dillon, A. J. (2013). Cellulase and Xylanase Production by *Penicillium echinulatum* in Submerged Media Containing Cellulose Amended with Sorbitol. *Enzyme research*, 2013, 240219. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/240219>
39. Wilson, D.B. (2004): Studies of *Thermobifida fusca* plant cell wall degrading enzymes. *The Chemical Record Volume 4* 72-82. DOI: <https://doi.org/10.1002/tcr.20002>
40. Woodward, J., Wiseman A. (1982): Fungal and other β -d-glucosidases — Their properties and applications, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol.4, 2, 73-79., ISSN: 0141-0229 DOI: [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(82\)90084-9](https://doi.org/10.1016/0141-0229(82)90084-9)
41. Xu, Z., Bai, Y., Xu, X., Shi, J., Tao, W. (2005). Production of alkali-tolerant cellulase-free xylanase by *Pseudomonas* sp. WLUN024 with wheat bran as the main

- substrate. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 21. 575-581. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-004-3491-7>
42. Zhang, G., Li, S., Xu, Y., Wang, J., Wang, F., Xin, Y., Shen, Z., Zhang, H., Ma, M., & Liu, H. (2019). Production of alkaline pectinase: a case study investigating the use of tobacco stalk with the newly isolated strain *Bacillus tequilensis* CAS-MEI-2-33. BMC biotechnology, 19(1), 45. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0526-6>

Bajzák Emma Klára - Szakdolgozat

NYILATKOZAT

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A hallgató neve: Bajzák Emma Klára
A Hallgató Neptun kódja: JJHYIF
A dolgozat címe: Komposztból izolált baktériumok celluláz, xilanáz és pektináz aktivitásprofiljának vizsgálata
A megjelenés éve: 2023
A konzulens tanszék 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, s az irodalomjegyzékben szerepeltettem.

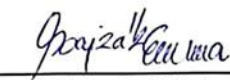
Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a Záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

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

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

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

Kelt: 2023. május 8.


Hallgató aláírása

KONZULTÁCIÓS NYILATKOZAT

Bajzák Emma Klára (hallgató Neptun azonosítója: JJHYIF) 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. május 8.



Belső konzulens