

SZAKDOLGOZAT

Oszlánszki Martin Szakdolgozat

Oszlánszki Martin

2023

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élelmiszertudományi és Technológia Intézet
Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék



Politejsav-alapú bioműanyag evőeszköz biológiai
bontásának vizsgálata mikrobiális konzorciumokkal

Oszlánszki Martin

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

Szakdolgozat készítés helye: Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Hallgató: Oszlánszki Martin

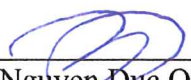
A szakdolgozat címe: Politejsav-alapú bioműanyag evőeszköz biológiai bontásának vizsgálata mikrobiális konzorciumokkal

Konzulens: Kilin Ákos PhD hallgató, tanszéki mérnök
Dr. Kohári-Farkas Csilla egyetemi adjunktus

Beadás dátuma: 2023. 04. 26.


szakdolgozat készítés helyének vezetője
Dr. Nguyen Duc Quang


konzulens
Kilin Ákos
Dr. Kohári-Farkas Csilla


Dr. Nguyen Duc Quang
modul szerinti tanszék vezetője

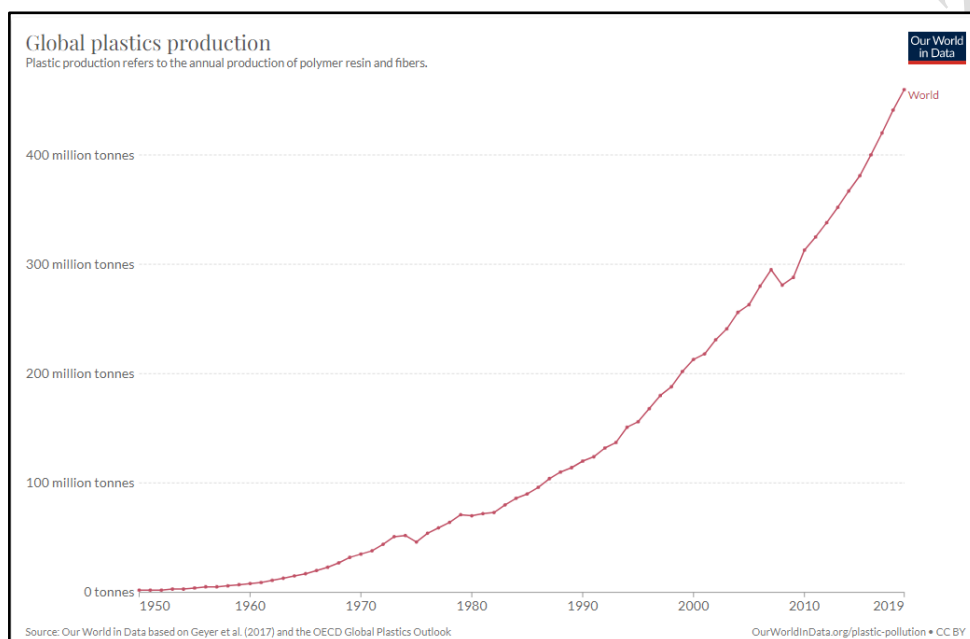
TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	1
2. A MUNKA CÉLJA.....	3
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
3.1. Bioműanyagok	4
3.2. Politejsav.....	5
3.2.1. Politejsav jellemzői	5
3.2.2. Politejsav előállítása.....	6
3.2.3. Politejsav alkalmazása	8
3.2.4. Politejsav bontási lehetőségei	9
3.3. Mezofil baktériumok.....	12
3.3.1. A <i>Bacillus subtilis</i> jellemzése.....	12
3.3.2. A <i>Pseudomonas putida</i> jellemzése.....	12
3.4. Mezofil élesztőgombák.....	13
3.4.1. A <i>Yarrowia</i> nemzetség és a <i>Y. yakushimensis</i> jellemzése	13
3.5. Mezofil penészgombák	14
3.5.1. Az <i>Aspergillus niger</i> jellemzése.....	14
3.5.2. A <i>Penicillium chrysogenum</i> jellemzése	15
3.6. A polimerbontásban résztvevő enzimek	16
3.6.1. A kutináz enzim	16
3.6.2. A proteáz enzim	17
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	18
4.1. Felhasznált mikroorganizmusok	18
4.2. Felhasznált anyagok.....	18
4.3. Alkalmazott módszerek	22
4.3.1. Törzsszelekció screeneléssel.....	22
4.3.2. A szubmerz biodegradáció mezofil mikroorganizmusokkal.....	22
4.3.3. pH mérés	22
4.3.4. A proteáz enzimaktivitás mérése	22
4.3.5. A kutináz enzimaktivitás mérése	25
4.3.6. Tömegmérés.....	27
5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK	28
5.1. A proteáz screenelés eredményei.....	28
5.2. Az észteráz típusú screenelés pozitív eredményei.....	30

5.3. A konzorciumok kialakítása	33
5.4. A pH változások eredményei	34
5.5. A proteáz aktivitás eredményei zselatin kiegészítést alkalmazva.....	36
5.6. A proteáz aktivitás eredményei napraforgóolaj kiegészítést alkalmazva	37
5.7. A kutináz aktivitás eredményei zselatin kiegészítést alkalmazva.....	39
5.8. A kutináz aktivitás eredményei napraforgóolaj kiegészítést alkalmazva	40
5.9. A tömegváltozások eredményei.....	42
6. ÖSSZEFOGLALÁS	44
7. IRODALMI HIVATKOZÁS	46

1. BEVEZETÉS

A 21. század egyik legnagyobb kérdése, hogy mit fogunk kezdeni azzal a hatalmas mennyiségű műanyag hulladékkal, amit a modern iparosodott társadalmak kitermelnek. Az éves műanyag termelés 2019-ben 459,75 millió tonna volt, és éves szinten 3-4%-kal növekszik; ennek következtében 1950 óta kb. 9000 millió tonna műanyag hulladék keletkezett, ennek nagyjából a 10%-a került újrahasznosításra. (Rosenboom és munkatársai, 2022) Az 1. ábrán látható a műanyagtermelés alakulása az elmúlt 70 évben.



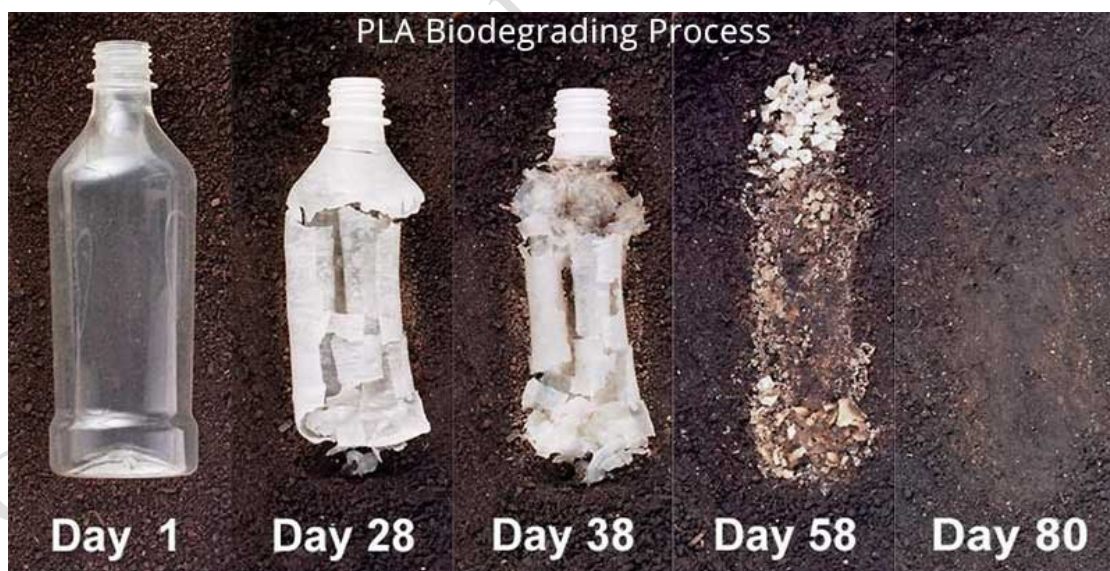
1. Ábra:
Globális műanyag termelés (Internetes forrás 1.)

A műanyagok a fenntarthatóság számos aspektusában nélkülözhetetlenek: a könnyű műanyagok javítják az autók és repülőgépek üzemanyag-hatékonyságát, a műanyag szigetelők növelhetik az energiamegtakarítást, a műanyag élelmiszer-csomagolás pedig növeli az eltarthatóságot, ami csökkentheti az élelmiszer-pazarlást. A műanyag hulladék környezeti hatásai és a műanyaggal kapcsolatos üvegházhatású gázok kibocsátásával kapcsolatos növekvő aggodalom motiválja a „körkörös műanyag gazdaság” felé való áttérést. A körkörös gazdaságban a nem-megújuló erőforrások felhasználása és a hulladéktermelés minimálisra csökken, miközben az újrahasználat és az újrahasznosítás uralja az anyagok életciklusát. (Rosenboom és munkatársai, 2022)

A környezetünk műanyagokkal történő szennyezése az elmúlt évtizedben jelentős társadalmi figyelmet vont magára, népszerű kampányok indultak a műanyagszennyezés

csökkentése érdekében és az egyszerhasználatos műanyagok ellen, csak a legfrissebbeket említve, pl. National Geographic „Planet or Plastic” azaz a bolygónk vagy a műanyag. Sokak által megnézett dokumentumfilmek jelentek meg, mint pl. a Kék Bolygó vagy David Attenborough: Egy élet a bolygónkon című alkotása. Sőt a politikai döntéshozók is elkezdtek tevékenykedni, az Európai Unió 2021. július 3-tól az egyszer használatos műanyag eszközök (tányérok, evőeszközök, szívószálak stb.) forgalomba hozatalát betiltotta a tagállamaiban. Számos cég tett fogadalmat a műanyagszennyezés csökkentésére, vagy megújuló/újrahasznosítható alternatívákra azonban ezekkel a hangzatos kijelentésekkel, PR kampányokkal és kisebb-nagyok sikerű korlátozásokkal nem fogjuk megoldani a műanyagszennyezés kérdését. (Rosenboom és munkatársai, 2022)

Szakedolgozatomban az egyik ígéretes alternatívát fogom részletezni, a biológiailag lebontható műanyagok alkalmazását. Az egyik terv a fentebb részletezett célok megvalósítására, hogy olyan műanyagokat vezessünk be a gazdaságba, amelyek később lebonthatóak, mikroorganizmusok segítségével, így a hosszútávon nem halmozódnak fel, ezzel is csökkentve a műanyagszennyezést. Az egyik ilyen műanyag a PLA (politejsav) aminek a bontásának optimalizálásával foglalkoztam szakdolgozatom készítése során, a 2. ábrán egy illusztráció látható a bomlásról.



2. Ábra:
PLA biológiai bomlása (Internetes forrás 2.)

2. A MUNKA CÉLJA

A kutatásom során célul tűztem ki olyan mezofil mikroorganizmusok szelektálását és konzorciumok kialakítását, amelyek alkalmazásával szubmerz környezetben hatékony biológiai bontás modellezhető. Ezek megvalósításához az alábbi részfeladatokat foglalmaztam meg:

- 1. Törzsszelekció:** mezofil baktérium, penészgomba és élesztőgomba törzsek screeneléses módszerrel a politejsav-depolimeráz (proteolitikus, illetve észteráz típusú) enzimaktivitás vizsgálatával.
- 2. Mikrobiális konzorciumok:** kialakítása a biológiai bontásra alkalmas szelektált mikroba törzsekből.
- 3. Biológiai bontás:** politejsav alapú bioműanyag szubmerz biodegradálása mikrobiális konzorciumokkal.
- 4. A biológiai bontás hatékonyságának nyomonkövetése:** a degradációban résztvevő depolimeráz enzimaktivitás és a politejsav alapú bioműanyag tömegváltozásának meghatározásával.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. Bioműanyagok

A bioplasztikok, olyan anyagok, amelyeket biológiai alapú polimerekből gyártanak, megoldást nyújthatnak egy fenttarthatóbb műanyag életciklusra, egy körforgásos gazdaság részeként, amelyben a kiindulási polimerek megújuló vagy újrahasznosított nyersanyagból állnak. Karbonsemleges energiát alkalmazva a gyártáshoz és a termékek újrafelhasználásra vagy újrahasznosításra kerülnek az életciklusuk végén. (Rosenboom és munkatársai, 2022)

A 'bio' előtag több dolgot is jelenthet: a monomerek megújuló formából származnak (például biomasszából) és kémiai mechanizmusokkal polimerizálják őket; a polimereket biomasszából nyerték ki; a polimer vagy a plasztik biológiailag lebomló; az anyag biológiai eljárással készült vagy ezek kombinációja. (Albertsson és munkatársai, 2017)

A biopolimerek többféle típusra oszthatók. A biopolimereket származásuk alapján fosszilis vagy bioalapúnak osztályozzák. Mikroorganizmusokat, állatokat és növényeket használnak bioalapú polimerek előállításához. A lebonthatóság alapján ezeket a biopolimereket tovább osztályozzák biológiailag lebontható és biológiailag nem lebontható kategóriába. A poli-hidroxi-butirát (PHB), a politejsav (PLA), a cellulóz-acetát (CA) és a cellulóz-nitrát (CN) a biológiai alapú és biológiailag lebomló polimerek példái. (P.R. Yaashikaa és munkatársai, 2022)

A fosszilis anyag alapú műanyagokkal összevetve sokkal kisebb a bioplasztikok karbon lábnyoma, előnyös anyagtulajdonságokat mutatnak, kompatibilisek lehetnek a meglévő újrahasznosítási folyamatokkal, és egyesek biológiai lebomlást kínálnak EOL (End of Life – életciklus végi) forgatókönyvként, ha ellenőrzött vagy kiszámítható környezetben hajtják végre a bontásukat. Ezek az előnyök azonban kompromisszumokkal járhatnak, beleértve a negatív mezőgazdasági hatásokat, az élelmiszertermeléssel való versenyt, a nem egyértelmű EOL-kezelést és a magasabb költségeket. A feltörekvő kémiai és biológiai módszerek lehetővé teszik az egyre növekvő mennyiségű heterogén műanyag és bioműanyag hulladék jobb minőségű anyagokká történő „újrahasznosítását”. Az egyértelműbb szabályozás és a pénzügyi ösztönzések továbbra is elengedhetetlenek ahhoz, hogy a niche-polimerektől a valóban fenntartható bioműanyag piaci alkalmazásához jussunk el. (Rosenboom és munkatársai, 2022)

3.2. Politejsav

A politejsav (angolul: Polylactic acid, PLA) egyfajta tejsav (Lactic acid, LA) származék, amelyet megújuló erőforrásokból, elsősorban magas keményítőtartalmú növényekből például búzából, szalmából, kukoricából és cirokból állítanak elő, és biológiailag teljesen lebomlik. Környezetbarát, a mikrobák vízzé és szén-dioxiddá bonthatják. Ez az egyik legígéretesebb biológiailag lebomló polimer anyag a piacon. (Li és munkatársai, 2020)

3.2.1. Politejsav jellemzői

A politejsav nagyon jó piaci kilátásokkal, kiváló kereskedelmi értékkel és számos alkalmazási területtel rendelkezik az ipartól a polgári felhasználásig. A tömeggyártás iránti érdeklődés a jó teljesítményéből fakad; például a politejsav jó fizikai tulajdonságokkal rendelkezik, és különféle műanyag termékek, például gyorséttermi dobozok, valamint szövetek előállítására használható. Jó szakítószilárdsága és hajlékonysága alkalmassá teszi különféle feldolgozási eszközökhöz, mint például olvadék-extrudálás, fröccsöntés, fúvott fóliaöntés, haböntés és vákuumöntés. (Li és munkatársai, 2020)

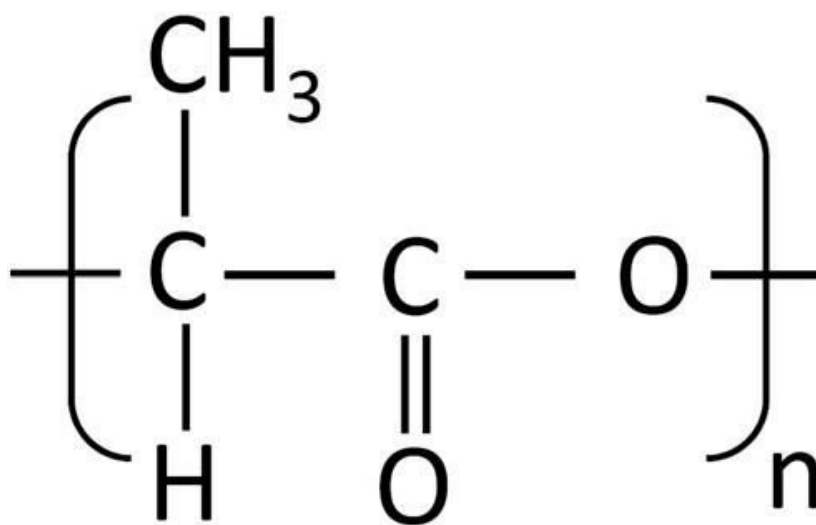
A PLA egy alifás homopolimer, és a leginkább versenyképes szintetikus bioműanyag, évi 250 ezer tonna gyártási kapacitással. A nem-aromás (alifás) poliészterek lebonthatók, mivel a gerincükben lévő észtercsoportok hidrolízissel vagy enzimatis aktivitással könnyen lehasíthatók. A PLA optikailag átlátszó lehet, és a poliolefin fóliák vagy polisztirolhabok alternatívájaként hasznosítják, beleértve az egyszer használatos fogyasztási cikkekbe való beépítést is. (Rosenboom és munkatársai, 2022)

Jó tulajdonságokkal rendelkezik a fényesség, az átlátszóság, a kézi tapintás és a hőállóság tekintetében. A PLA oldódása a kristályosság fokától függ. Az amorf polimerek különböző szerves oldószerekben, például acetonban, acetonitrilben és metilén-kloridban oldódnak. Ezenkívül a kristályos PLA csak magas hőmérsékleten oldható fel diklór-metánban vagy benzolban. A mechanikai tulajdonságok és a kristályosodási viselkedés szorosan összefügg a főlánc molekulatömegével és sztereokémiai összetételével. (Li és munkatársai, 2020)

Bár a tejsav jó biokompatibilitással és nyújthatósággal rendelkezik, ennek az ígéretesnek tűnő polimernek a tulajdonságai sem tökéletesek. Például a PLA rendkívül hidrofób és csekély az ütésállósága. Bizonyos módszerek azonban alkalmazhatók a tejsav fenti hiányosságainak hatékony javítására és alkalmasabbá tételére. Nanokompozitként a PLA

tulajdonságai javíthatók a szintézis során módosított adalékok hozzáadásával, vagy más polimerekkel való közvetlen keveréssel, például a poliglíkol savval. (Li és munkatársai, 2020)

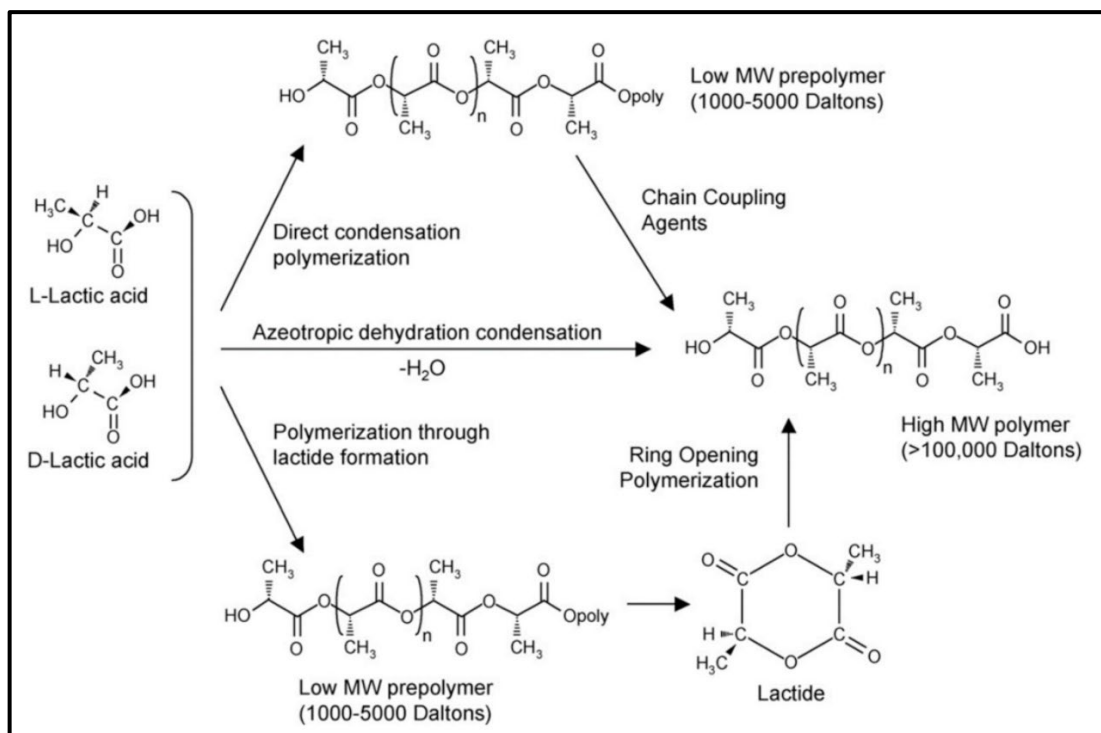
Természetes szempontból a politejsav jó hőre lágyuló képességgel rendelkezik, és felhasználható műanyagok előállítására és feldolgozására, például filmek és szálak készítésére. (Li és munkatársai, 2020) A 3. ábrán a politejsav szerkezeti képlete látható.



3. Ábra:
PLA szerkezeti képlete (Internetes forrás 3.)

3.2.2. Politejsav előállítása

Mivel a tejsav egy királis molekula, D és L típusú izomerekkel, 3 formája fordul elő a politejsavnak: poli-L-tejsav (PLLA), poli-D-tejsav (PDLA) és poli-L,D-tejsav (PDLLA). A PLA három formában kristályosítható: α , β és γ . 1954-ben a DuPont (egy amerikai multinacionális vegyipari vállalat) egy nagyobb molekulatömegű tejsavat állított elő, rögtön szabadalmaztatta is. Háromféle polimer szintézis eljárása van a PLA-nak: közvetlen kondenzációs eljárás, azeotróp dehidratációs kondenzáció és laktidnak a gyűrűnyitó polymerizáció. (Li és munkatársai, 2020) A három eljárás egyszerűsített folyamatábrája a 4. ábrán láthatóak.



4. Ábra:
PLA szintézise L- és D-tejsavból (Auras et al., 2004)

Bár a tejsav, a politejsav monomerje könnyen megtalálható a természetben, hagyományosan cukrok fermentálásával és hidrolízis után monomerekké alakításával állítják elő. Míg azonban számos szintetikus módszert tanulmányoztak ipari és kereskedelmi felhasználásra, ezek egyike sem egyszerű, könnyen kezelhető vagy gazdaságos. Szigorú követelmények vonatkoznak a szintézis folyamatában használt katalizátorokra, szintézislépésekre és tisztítóberendezésekre. Szerencsére jó alternatívát biztosítanak az enzimkatalizált szintéziseljárásokat alkalmazó biológiai módszerek, amelyek a kémiai reakcióknál könnyebben hozzáférhetővé teszik a biokompatibilis anyagokat. (Li és munkatársai, 2020)

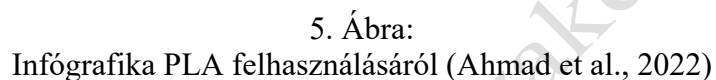
3.2.3. Politejsav alkalmazása

A Total Corbion PLA nemrégiben bejelentette, hogy a PLA-bevonatú papírpoharak újrapépesíthetők, és így újrahasznosíthatók, míg a hagyományosan PE-bevonatú papírpoharak nem. (Rosenboom és munkatársai, 2022)

Jó biokompatibilitása miatt széles körben alkalmazzák a biokémiai gyógyászatban. A nagy molekulatömegű PLA-t nem szétszedhető sebészeti varratok és alacsony molekulatömegű PLA-k előállítására használták lassú hatóanyag-felszabadulású gyógyszer-csomagoló szerként. (Li és munkatársai, 2020)

A PLA fő felhasználási területe a csomagolóipar. A PLA egy kedvező „zöld” élelmiszer-csomagolás, amely széles körben elterjedt a friss termékek területén, a legjobb választássá válik a gyümölcs-, zöldség- és salátatartók számára a kiskereskedelmi piacokon. A gyorséttermek és cukrászdák biológiailag lebomló polimerekből készült evőeszközöket, poharakat és tányérokat használnak, mint tálalási alternatívák. Ezek a termékek különböző savas és magas koleszterintartalmú élelmiszerekkel és eltérő tárolási hőmérséklettel ($-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ és $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ közötti) érintkeznek. Így a PLA mechanikai, fizikai és optikai tulajdonságait a csomagolási alkalmazásokra kell szabni. (Rosenboom és munkatársai, 2022)

A jó biokompatibilitás fontos oka a PLA széles körű használatának az orvosi-biológia (biomedicina) területén. A köztes tejsavtermék az emberi szervezetben metabolizálható, nem mérgező és ártalmatlan. Lebontása felhasználható gyógyszerfelszabadulásra. A hordozó anyagcsere sebességének szabályozásával a szervezetben biztosítható a gyógyszer hatékony koncentrációja a mellékhatások csökkentése mellett, ami nyilvánvaló előnyöket biztosít mind a gyógyszeradagolásban, mind az implantátumok anyagaként. A jó biokompatibilitás azt is biztosítja, hogy a környező szövetekben ne legyen gyulladásoz reakció a kilökődés miatt, miután az emberi szervezetbe kerül. (Li és munkatársai, 2020) Az 5. ábrán egy infógrafika látható a PLA felhasználásáról.



Mechanikai újrahasznosítás:

9

Vegyi újrahasznosítás:

A mechanikai újrahasznosítással ellentétben a kémiai újrahasznosítás lehetőséget kínál a hulladékból kiváló minőségű polimerek előállítására – ezt „értéknövelő újrahasznosításnak” nevezik. A műanyag termékeket monomer alegységeikre depolimerizálják, amelyek ezután szabályozott polimerizációs mechanizmusok révén kívánt minőségű (például szabályozott molekulatömegű) polimerekké repolimerizálhatók. Például a kis molekulatömegű szálaspoliészterek depolimerizálhatók monomerekké, amelyek azután hosszabb láncú polieszterekké polimerizálhatók, amelyek a palackokhoz szükségesek. A szennyeződések és a színek is eltávolíthatók. A kémiai újrahasznosítás főként szolvólízissel vagy termolízissel történik. Az alifás polieszterek, mint például a PLA, PBS vagy PHA-k, jobban hidrolizálhatók, mint az aromás polieszterek. Például a PLA 95%-os tejsavvá hidrolizálható katalizátor nélkül 160–180 °C-on, 2 órán keresztül, négyszer kisebb energiaigénnyel, mint a tejsav előállításánál, vagy 6 óra használat után visszapolimerizálható ~90%-os ciklikus laktid monomerekké Zn átészterező katalizátorok használatával. A keletkező monomerek hasznos alapanyagot jelentenek a kiváló minőségű műanyagok előállításához. A vegyszerek és az összetettebb elválasztó rendszerek iránti igény azonban drágábbá teszi a vegyi újrahasznosítást, és ezért jelenleg gazdaságilag kevésbé versenyképes, mint a mechanikai újrahasznosítás. (Rosenboom és munkatársai, 2022)

Biológiai lebontás és komposztálás:

A biológiai lebontás és a komposztálás a polimer anyagok mikrobiális emésztését és metabolikus átalakulását jelentik CO_2 -á, H_2O -vá és más szervesen vegyületekké különböző fajok által. Ezt a folyamatot jellemzően fizikai folyamatok segítik, különösen azok, amelyek a töredeződést és a szemcseméret csökkentését segítik. Például a tipikusan félkristályos műanyagok kristályos szerkezeteinek mikronizálással vagy extrudálással történő amorfizálása érzékenyebbé teheti őket az enzimes lebomlásra. A hidrolízis a polimer hozzáférhető amorf régiókban felhasítja az érzékeny kötéseket, jellemzően alifás észtereket, és a mikrobiális enzimek és savak vagy bázisok fokozhatják a hidrolízist. Az UV-fény segítségével történő fotodegradáció megszakítja a terciár és aromás C–C kötéseket, és jellemzően törékeny és elszíneződött anyagot hagy maga után. Ez a folyamat fokozható fémkatalizátorok polimerbe ágyazásával. Hasonlóképpen, az oxo-lebomlást (vagyis az oxidációval történő bomlást) kiválthatják a fémek; ez azonban mikroműanyagokra való

széttöredezéshez és elégtelen emésztéshez vezethet. Így az oxo-degradációt korlátozták az EU-ban és Svájcban. A korábbi remények ellenére a biológiai lebomlás nem triviális, mivel a biológiai lebomlás sebessége nagymértékben függ a polimer kémiai szerkezetétől, a stabilizáló adalékanyagoktól, a környező körülményektől (például a H₂O és O₂ jelenléte) és az esetlegesen használt mikroorganizmusoktól. Ezek a feltételek gyakran nem teljesülnek az otthoni komposztban, a nyílt vízben vagy akár az ipari komposztáló létesítményekben. A komposztálók gyakran elutasítják a biológiailag lebomló műanyagokat, például a PLA bevásárlótáskákat és edényeket, mivel a szükséges bomlási idő meghaladja a tipikus 6-8 hetes komposztálási időt. (Rosenboom és munkatársai, 2021.)

3.3. Mezofil baktériumok

A mezofil organizmus olyan életforma, amely mérsékelt hőmérsékleti körülmények között szaporodik a legoptimálisabban. Általában mezofil baktériumokról beszélünk, ha 20 °C és 40 °C közötti hőmérsékleten van az optimumuk. A mezofil kifejezés a görög mesos: közepes (itt középhőmérsékletet jelent); és philos: aki szereti (legideálisabb körülménye). (Schiraldi és munkatársai, 2014.)

3.3.1. *A Bacillus subtilis* jellemzése

A *Bacillus subtilis* egy Gram-pozitív baktérium, pálcika alakú és kataláz-pozitív. Sejtjei jellemzően rúd alakúak, körülbelül 4–10 mikrométer (μm) hosszúak és 0,25–1,0 μm átmérőjűek. A *Bacillus* nemzetség többi tagjához hasonlóan endospórát képezhet, hogy túlélje a szélsőséges hőmérsékleti és kiszáradási környezeti feltételeket. A *B. subtilis* egy fakultatív anaerob. Erősen flagellált, ami lehetővé teszi, hogy gyorsan mozogjon folyadékokban. Rendkívül alkalmasnak bizonyult a genetikai manipulációra, és széles körben elterjedt modellszervezetként laboratóriumi vizsgálatokhoz, különösen a sporulációhoz, amely a sejtdifferenciálódás leegyszerűsített példája. Laboratóriumi modellszervezetként való népszerűsége szempontjából a *B. subtilis*-t gyakran az *Escherichia coli* Gram-pozitív megfelelőjének tekintik, amely egy alaposan tanulmányozott Gram-negatív baktérium. A szekretált enzimtermelés egyik bakteriális bajnoka, és ipari méretekben használják a biotechnológiai cégek. (Euzéby JP et al, 1997.)

3.3.2. *A Pseudomonas putida* jellemzése

A *Pseudomonas putida* egy Gram-negatív, rúd alakú, nem fermentáló baktérium, amely mindenütt megtalálható a környezetben. Metabolikus enzimek széles spektrumával rendelkezik, lehetővé téve, hogy a különféle a talajhoz és a vízhez kapcsolódó élőhelyekhez alkalmazkodjon. (Peter S. és munkatársai, 2017.)

A *Pseudomonas putida* szaprotróf talajbaktérium. A *P. putida* vad típusú törzseinek változatos metabolizmusa felhasználható bioremediációra; például laboratóriumban kimutatták, hogy talajoltószerként funkcionál a naftalinnal szennyezett talajok orvoslására. Képes a sztirololajat biológiailag lebomló műanyag polihidroxi savvá (PHA - Polyhydroxy Acid) alakítani. Ez hasznos lehet az egyébként biológiailag nem lebontható polisztirolhab hatékony újrahasznosításában. (Keshavarz-Tohid és munkatársai, 2019.)

3.4. Mezofil élesztőgombák

3.4.1. A *Yarrowia* nemzetség és a *Y. yakushimensis* jellemzése

A *Yarrowia* a Dipodascaceae családjába tartozó gombanemzetség. Egy ideig a nemzetség monotipikus volt, egyetlen fajtát, a *Yarrowia lipolyticát* tartalmazta. A *Y. lipolytica* egy nem hagyományos élesztő, amely nagy figyelmet kapott, mivel képes szokatlan szénforrásokon, például szénhidrogénekben szaporodni, heterológ fehérjék expressziójának gazdasejtjeként, valamint élesztő és hifás forma közötti váltóképessége miatt. Felkeltette az ipari mikrobiológia figyelmét, különösen a speciális lipidek előállításánál. (Papanikolaou S. és munkatársai, 2010.)

A *Yarrowia lipolytica*-t különböző helyekről izolálták (például őrölt kukoricaszál-zagyok vagy párizsi csatornák). Ezek a környezetek gyakran feleslegben tartalmaznak lipideket, amelyeket az *Y. lipolytica* szén- és energiaforrásként hatékonyan tud hasznosítani. (Kurtzman és munkatársai, 2011)

Mivel a *Y. lipolytica* egy obligát aerob szervezet, minden szénforrás katabolizmusa áthalad a trikarbonsav cikluson. Ez jelentős különbség az olyan fermentációs élesztőkkel szemben, mint a *Saccharomyces cerevisiae*, amelyekben a glükóz és más cukrok katabolizmusa számos körülmény között megy végbe, főleg fermentáció útján. (Flores Carmen-Lisset és Carlos Gancedo et al, 2005.)

A *Y. yakushimensis*, korábbi nevén *Candida yakushimensis*, a szintén a *Yarrowia* filogenetikai kládjába tartozó fajt is tanulmányozták és a *Yarrowia* új fajaként írták le. (Groenewald és munkatársai, 2013)

3.5. Mezofil penészgombák

3.5.1. Az *Aspergillus niger* jellemzése

Az *Aspergillus niger* egy penészgomba, és az *Aspergillus* nemzetség egyik leggyakoribb faja. Az *A. niger* obligát aerob; növekedéséhez oxigénre van szükség. A gomba számos környezeti körülmény között növekedhet; 6 °C – 47 °C közötti hőmérsékleten nőhet. Mezofilként optimális hőmérsékleti tartománya 35 °C – 37 °C. 1,5 és 9,8 közötti pH-értéket képes elviselni. Az *A. niger* xerofil, szárazságtűrő, ami azt jelenti, hogy nagyon kevés vizet tartalmazó környezetben képes növekedni és szaporodni. Nedves körülmények között is nőhet, még 90-100% relatív páratartalmú környezetben is. (Internetes forrás 4. INSPQ)

Az *A. niger* kozmopolita és nagyon gyakori: szerves anyagokon aerob módon növekszik. Ez a faj gyakori szennyezőanyag különféle szubsztrátumokon, megtalálható a talajban és az alomban, a komposztban és a korhadó növényi anyagokon; még jeges környezetben és tengeri környezetben is megtalálható, de általában a száraz és meleg talajokat kedveli. Gyakran izolálják a házi portól, a talajtól, a szárított dióféléktől, a gyümölcsöktől és a magvaktól, valamint a különféle típusú kezeletlen textilanyagoktól, például juta kendertől és pamut fellevelektől; innen ered e faj gyakran bőséges jelenléte a textiliparban. Az *A. niger* a húst és a tojást is megfertőzheti, fokozatosan romlást okozva; a fűszerek és a szárított gyümölcsök is tartalmazhatnak *A. niger*-t. Másrészt az *Aspergillus niger* a biotechnológiában használt egyik legfontosabb mikroorganizmus, így óriási gazdasági jelentőséggel bír. Annak ellenére, hogy az *Aspergillus niger* mindenütt előforduló ártalmatlan szennyezőnek számít, különleges ritka körülmények között oportunista emberi betegségeket okozhat, pl. aspergillózis (Costa CP és munkatársai, 2016)

Az *Aspergillus niger*-t számos anyag ipari előállításának elősegítésére tenyésztik. Az *A. niger* különböző törzseit használják a citromsav (E330) és a glükonsav (E574) ipari előállításához. (Cairns CT és munkatársai, 2018)

Számos hasznos enzimet termel, amelynek egyre növekvő az ipari felhasználása. Például az *A. niger* glükoamilázt a magas fruktóztartalmú kukoricaszirup, a pektinázokat pedig az almabor és bor derítésében használják. Az alfa-galaktozidáz, egy enzim, amely bizonyos összetett cukrokat lebont, a Beano és számos más, puffadást csökkentő termék összetevője. (Di Stefano et al. 2007)

Az *Aspergillus niger* a glükóz bioszenzorok tervezésében használt glükóz-oxidáz enzim extrahálására is tenyésztik, mivel nagy affinitása a β -D-glükózhoz. (Staiano M. és munkatársai, 2005.)

Egyes *A. niger* törzsek ochratoxin A-t termelnek, a mikotoxinok súlyos egészségkárosodást okozhatnak. (Samson RA. és munkatársai, 2001.)

3.5.2. A *Penicillium chrysogenum* jellemzése

A *Penicillium chrysogenum* (korábbi nevén *Penicillium notatum*) a *Penicillium* nemzetségbe tartozó gombafaj. A mérsékelt és szubtrópusi övezetekben gyakori, és megtalálható a sózott élelmiszereken, de leginkább beltéri környezetben, különösen nedves vagy vízkárosodott épületekben fordul elő. (Andersen B. és munkatársai, 2011)

Számos β -laktám antibiotikum, legfőképpen a penicillin forrása. A *P. chrysogenum* egyéb másodlagos metabolitjai közé tartozik a roquefortin C és a meleagrin. (Ali H et al. 2013)

A *Penicillium* nemzetség sok más fajához hasonlóan a *P. chrysogenum* általában úgy szaporodik, hogy ecset alakú konidioforokból száraz spóraláncokat (vagy konídiumokat) képez. A konídiumokat jellemzően légáramlatok szállítják új kolonizációs helyekre. A *P. chrysogenum*-ban a konídiumok kéktől kékeszöldig terjednek, és a penész néha sárga pigmentet bocsát ki. A *P. chrysogenum* azonban nem azonosítható pusztán szín alapján. A morfológia és a mikroszkópikus jellemzők megfigyelése szükséges az azonosságának megerősítéséhez, és a DNS-szekvenálás elengedhetetlen ahhoz, hogy megkülönböztessük az olyan közeli rokon fajoktól, mint a *P. rubens*. A *P. chrysogenum* ivaros stádiumát 2013-ban fedezték fel biotinnal kiegészített zabpehely agaron, sötétben párosított tenyészetekkel, miután a törzsek párosodási típusát PCR amplifikációval meghatározták. (Böhm J. et al. 2013)

A *P. chrysogenum*-ot iparilag penicillin és xantocillin X előállítására, cellulózgyári hulladék kezelésére, valamint a poliamin-oxidáz, foszfoglükonát-dehidrogenáz és glükóz-oxidáz enzimek előállítására használják. (de Hoog GS et al. 2000.)

3.6. A polimerbontásban résztvevő enzimek

3.6.1. A kutináz enzim

A kutináz egy egyedülálló hidroláz, amelyet a vízben oldhatatlan kutint lebontó képességéről neveztek el. A kutináz gombákban és baktériumokban egyaránt megtalálható. A kutin mellett a kutináz oldható észtereket (észterázoknak is szokták nevezni az ilyen típusú enzimeket), oldhatatlan triglicerideket és különböző típusú poliésztereket is képes hidrolizálni. Ezenkívül a kutináz képes katalizálni az észterezési reakciót és az átészterezési reakciót. A kutináz ezen változatos tulajdonságai széles körben kiterjesztették alkalmazását az élelmiszeriparban, a vegyiparban, a mosószeriparban és a mezőgazdaságban. (Sheng Chen et al. 2011.)

A kutin a növényi kutikula fő alkotóeleme. Ez egy oldhatatlan lipid-poliészter, amely elsősorban 16 és 18 szénatomos hidroxil- és epoxi zsírsavakból képződik. Bár a kutin pontos összetétele fajoként változik, minden kutin tartalmaz hidroxil-zsírsavakat alapegységként. A kutinázok mikroorganizmusok által kiválasztott, indukálható extracelluláris enzimek, amelyek képesek lebontani a növényi sejtfalakat. Ezek katalizálják a kutin észter kötéseinek hasadását, ami kutin monomerek felszabadulását eredményezi. (Sheng Chen és munkatársai, 2008)

A kutinázokat gombákban és baktériumokban is megtalálták; a vizsgálatok azonban a gombás kutinázokra összpontosítottak, beleértve a *Fusarium solani pisi*-t, a *Monilinia fructicola*-t, a *Botrytis cinerea*-t és az *Aspergillus oryzae*-t. A *F. solani pisi*-ből származó kutináz például alaposan vizsgálták biokémiai és szerkezeti szempontokból. A *F. solani pisi* kutináz röntgendiffrakciós vizsgálatai kimutatták, hogy a hidroláz redős szupercsaládba tartozik, és tartalmazza a jellegzetes GX SXG motívumot, valamint egy Ser-His-Asp katalitikus triádot. Érdekes módon a gombás kutinázok nemcsak a kutint hidrolizálják, hanem az oldhatatlan triglicerideket és az oldható észtereket is, például a p-nitro-fenil-butirátot (pNPB). Így a gombás kutinázokat a lipázok és az észterázok közötti intermediereknek tekintik. Nemrég azt fedezték fel, hogy a *F. solani pisi* kutináz környezetbarát módon képes hidrolizálni, és ezáltal javítani a szintetikus szálak, például a polietilén-tereftalát szálak felületi tulajdonságait. A kutinázok ilyen sokoldalú hidrolitikus aktivitásai arra utalnak, hogy ígéretes alkalmazásaik lehetnek a vegyiparban, a textiliparban és más iparágakban. A gombákból származó kutinázokkal ellentétben keveset tudunk a bakteriális forrásokból származó kutinázokról. Néhány kutatás készült a *Streptomyces*

scabies, *Thermobifida fusca* és *Pseudomonas putida* bakteriális kutinázairól; ezek a vizsgálatok azonban az enzimtermelő törzsek szűrésére és a nyers enzimkészítmények kezdeti jellemzésére korlátozódtak. A legkritikusabb, hogy baktériumokban nem azonosítottak kutináz nyitott leolvasási keretet, így lehetetlen elegendő mennyiségű tiszta rekombináns enzimet előállítani mélyreható vizsgálatokhoz. (Sheng Chen és munkatársai, 2008)

3.6.2. A proteáz enzim

A proteázok nem egyetlen enzimre utalnak, hanem olyan enzimek keverékére, amelyek magukban foglalják a proteinázokat, peptidázokat és amidázokat. A proteinázok az érintetlen fehérjemolekulákat proteázokká, peptonokká és néhány aminosavvá hidrolizálják. A peptidázok a peptonokat aminosavakká hidrolizálják, míg az amidázok az aminosavakat hidrolizálják és ammóniát szabadítanak fel. A proteázok az ipari enzimek legfontosabb osztályát alkotják, és a globális ipari enzimpiac legnagyobb termékszegmensét alkotják, mivel a teljes enzimpiac mintegy 60%-át teszik ki. (Chidi-Onuorah et al. 2015)

A proteázok az enzimek egyetlen osztálya, amely kulcsfontosságú szerepet tölt be a mosó-, gyógyszer-, fénykép-, bőr-, élelmiszer- és mezőgazdasági iparban való széles körű alkalmazásuk miatt. A proteáz fontos biotechnológiai alkalmazása a bioremediációs folyamatokban van. A különféle proteázok közül a bakteriális proteázok a legjelentősebbek, összehasonlítva az állati és gombás proteázokkal. A baktériumok közül pedig a *Bacillus* fajok az extracelluláris proteázok specifikus termelői. A hőstabil biokatalizátorok globális igényei sokkal nagyobbak, mint a mezofilek, amelyek kétharmadát a proteázok adják. A hőstabil proteázok bizonyos alkalmazásokban előnyösek, mivel magasabb feldolgozási hőmérsékletek alkalmazhatók, ami gyorsabb reakciósebességet, a nem gáznemű reaktánsok és termékek oldhatóságának növekedését, valamint a mezofil organizmusok általi mikrobiális szennyeződések előfordulásának csökkenését eredményezi. A *Bacillus subtilis* az egyik legszélesebb körben használt baktérium specifikus vegyszerek és ipari enzimek előállítására, valamint az amiláz és proteáz enzimek fő forrása. (Gitishree Das és M P, Prasad, 2009)

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Felhasznált mikroorganizmusok

A kísérletek során mezofil mikroorganizmus törzseket alkalmaztam, amiket a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye (NCAIM Budapest) és a Biomérnöki és Erjedézipari Technológia Tanszék biztosított.

Mezofil baktériumtörzsek:

Bacillus subtilis B1162

Bacillus subtilis CU150

Bacillus subtilis B1212

Rhodococcus opacus B1215

Pseudomonas putida B1167

Pseudomonas putida B1522

Mezofil penészgomba törzsek:

Aspergillus niger 735

Rhizopus sp 2036

Penicillium chrysogenum 874

Mezofil élesztőgomba törzsek:

Yarrowia yakushimensis 2049

Yarrowia yakushimensis 2050

Yarrowia yakushimensis 2052

4.2. Felhasznált anyagok

A törzsfenntartáshoz szükséges táplevesek típusa és összetétele: A tápleveseket 121°C-on, 15 percig, autoklávval csíramentesítettem.

Nutrient tápleves-t használtam a *Bacillus* és a *Pseudomonas* törzsek kitenyésztéséhez, melynek az összetétele az alább olvasható:

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

A *Rhodococcus* törzs kitenyésztéséhez a Trypticase Soy Broth (TSB) táplevest alkalmaztam, az összetétele alábbi:

TSB	30 g/l
Desztillált víz	1000 ml

Az *Aspergillus*, *Penicillium* és *Rhizopus* törzsek kitenyésztéséhez Potato Dextrose Agar (PDA) használtam, melynek alábbi az összetétele:

PDA	24 g/l
Desztillált víz	1000 ml

Depolimeráz aktivitások screeneléséhez szükséges táptalajok: Sterilizés 121°C-on, 15 percig, autoklávval.

Előzetes vizsgálatokra volt szükség, hogy megállapítsam az alkalmazott törzsekről, rendelkeznek-e politejsav-depolimeráz (proteolitikus, illetve észteráz típusú) enzimaktivitással. Ezekhez a következő gyors screeneléses tápagarokat alkalmaztam:

Proteáz termelés kimutatása kazein-tartalmú agarlemezen (Radha *et al.* 2012)

Kazein	10 g/l
Bakteriológiai agar	15 g/l
Desztillált víz	1000 ml

Észteráz termelés kimutatása módosított Tween 80-tartalmú agarlemezen (Kumar *et al.* 2012)

Pepton	5 g/l
Élesztőkivonat	3 g/l
Tween 80	0,1 % (m/v)
Kongó vörös	0,5 g/l
Bakteriológiai gar	15 g/l
Desztillált víz	1000 ml

Biodegradáció modellezése során alkalmazott táplevesek:

A biológiai bontáshoz alap táplevest alkalmaztam (Basal medium) a közeg összetétele:

glükóz	5	g/l
NH ₄ NO ₃	5	g/l
KH ₂ PO ₄	1	g/l
NaCl	1	g/l
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,6	g/l
CaCl ₂	0,1	g/l
FeCl ₃	0,01	g/l
Desztillált víz	1000	ml

Az alaptápközeget zselatinnal (5%) és napraforgóolajjal (5%) egészítettem ki, hogy megvizsgáljam, hogyan képesek befolyásolni az enzimszintézist, illetve a bontási mechanizmust. Ugyanis a szakirodalomban megtalálható, hogy egyes szén- illetve nitrogén források képesek indukálni a polimerlánc bontását. (Tokiwa és Calabria et al., 2006) Ezen két elrendezést hasonlítottam össze a kísérlet végén.

Pufferek, reagensek:

A proteáz enzim kimutatásában a reakcióelegy részei:

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

Az enzim reakció leállításához 5% triklór-ecetsav (TCA) vizes oldatát használtam.

A színeképzéshez a 0,5 M Na₂CO₃ oldatot és a háromszorosra hígított Folin-Ciocalteu reagenst alkalmaztam.

A kutizán enzim kimutatásában a reakcióelegy részei:

A kutináz enzimaktivitás méréshez pH 4,5 McIlvane puffert készítettem, citromsav és dinátrium-hidrogén-foszfát oldatokból.

Törzsoldatok:

A. oldat: 0,1 M C₆H₈O₇ • H₂O (citromsav) 21,008 g/l

B. oldat: 0,2 M Na₂HPO₄ • 2H₂O 35,630 g/l

A törzsoldatokat a kívánt pH értékű puffer oldat eléréséhez megfelelő arányban elegyítettem. A kémhatást pH-mérő segítségével ellenőriztem, és szükség esetén a hozzávalók további adagolásával módosítottam.

pH 4,5 McIlvane puffer 45,4 ml Na_2HPO_4 + 54,6 ml citromsav.

50 mM-os p-nitrofenol-butirát szubsztrátum 96%-os etanolban feloldva.

A kutináz enzimreakció leállításához hideg Na-foszfát, pH 7,0 puffert alkalmaztam.

A törzsoldatokat a kívánt pH értékű puffer oldat eléréséhez megfelelő arányban elegyítettem és egészítettem ki 1000 ml-re desztillált vízzel, hűtőben tároltam. A kémhatást pH-mérő segítségével ellenőriztem.

Törzsoldatok: pH 7,0 – 57,7 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ + 43,3 ml NaH_2PO_4

A 6. ábrán láthatóak a PLA „gyöngyök”, ezekből készülnek a 7. ábrán látható evőeszközök, melyek felaprítás után biológiai bontás alá kerültek.



6. Ábra: PLA gyöngyök



7. Ábra: PLA evőeszközök

4.3. Alkalmazott módszerek

4.3.1. Törzsszelekció screeneléssel

A módszerrel megállapítottam, hogy a mikroorganizmusok rendelkeznek depolimeráz enzimaktivitással. A kazein-tartalmú és Tween80 tápagarak sterilizését követően (121°C-on 15 percig, autoklávvval) lemezöntést végeztem. A proteolitikus és észteráz típusú enzimaktivitás kimutatásához agardiffúziós módszert alkalmaztam, amely során a megszilárdult agarba kb. 0,2 cm átmérőjű zsebeket lyukasztottam, és 50 µl mikrobatenyészetet pipettáztam bele, majd 3 napig 30 °C-on inkubáltam. Az aktivitást mutató mikroorganizmusokból konzorciumokat alakítottam ki, mindegyikből kettő párhuzamost véve, ezek elrendezését az 5.3 fejezetben részletezem.

4.3.2. A szubmerz biodegradáció mezofil mikroorganizmusokkal

A politejsav alapú bioműanyagok (PLA-keményítő 95:5 tartalmú biokompozit) biodegradálásának vizsgálatára szubmerz körülmények között valósult meg. Ehhez az ásványi anyagot biztosító steril táplevesbe 1 (m/V)%-nyi steril (96%-os etanollal és steril vízzel áthígított), durván aprított (0,2-0,5 mm hosszúságú) evőeszköz mintát tettem, majd a kísérletet a szelektált mikroorganizmusokból kialakított konzorciumok, 10%-os ösztérfogatóval beoltásával indítom el, 100 fordulat/perc rázatás, 28±2 °C hőmérsékleten, a biodegradációs idő 28 napig tartott. A kísérletet párhuzamos méréssel végzem. Rendszeres mintavételezés pH mérés és depolimeráz enzimaktivitás (proteáz és kutináz) meghatározás céljából.

4.3.3. pH mérés

A kísérlet során mindkét párhuzamostból hetente kétszer mintát vettem és Mettler Toledo Multi Seven pH mérő segítségével megmértem azok kémhatását, az erről készült táblázatok az 5.2. fejezetben láthatók.

4.3.4. A proteáz enzimaktivitás mérése

A reakció elve, hogy a proteáz enzim a kazein szubsztátumból L-tirozint szabadít fel, amelyet a Folin reagens kék színváltozással jelez. A felszabadult L-tirozin mennyisége 660 nm-en spektrofotometriásan meghatározható.

Az enzimaktivitás méréshez 1,5 (m/v) %-os kazein oldatot készítettem. A kazeint Na-foszfát pufferben (minta kémhatásától függ) oldottam fel. A kazein oldódása érdekében az oldatot 30 percen át 80 °C-os vízfürdőben inkubáltam.

Vak minta esetén 0,25 ml mintát inkubáltam, majd 1,5 ml TCA (triklór-ecetsav) oldat hozzáadásával leállítottam. Az enzimreakció indításánál 0,25 ml enzimet inkubáltam 30 °C-on, majd az enzimoldathoz és a vakmintához is 0,25 ml kazeinoldatot pipettáztam a reakció indításakor. A reakcióidő 30 perc, majd az enzim minta TCA-val történő leállítása után 10 percig még inkubálás történik.

Ezt követően 1,5 ml mennyiségeket Eppendorf-csövekben 14000 fordulat/perc sebességen, 5 percen át centrifugáltam.

A lecentrifugált felülúszóból 0,5 ml-t kémcsövekbe pipettáztam, majd 1,5 ml, 0,5 M Na₂CO₃ oldatot, valamint 0,5 ml háromszoros hígítású Folin-Ciocalteu reagenst adtam. A kémcsöveket ismét 30 percre vízfürdőbe helyeztem. A reakció végén a mintákat küvetkába tettem, és az abszorbancia értékeiket 660 nm-en megmértem.

Az alábbi egyenlet alapján számítható ki az aktivitás értékek mintánként:

$$\text{Aktivitás (U/ml)} = \frac{(A_{\text{Minta}} - A_{\text{Enzimvak}} - A_{\text{Szubsztrátumvak}}) \cdot V_{\text{reakció}} \cdot h}{x \cdot t_{\text{reakció}} \cdot V_{\text{minta}}}$$

ahol,

V reakció: a reakcióelegy térfogata (ml)

x: a felszabadított termék (L-tirozin) kalibrációs egyenesének meredeksége

t reakció: reakció időtartama (perc)

V minta: a minta (enzimoldat) térfogata (ml)

h= a minta hígítási faktora

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

Kalibráció:

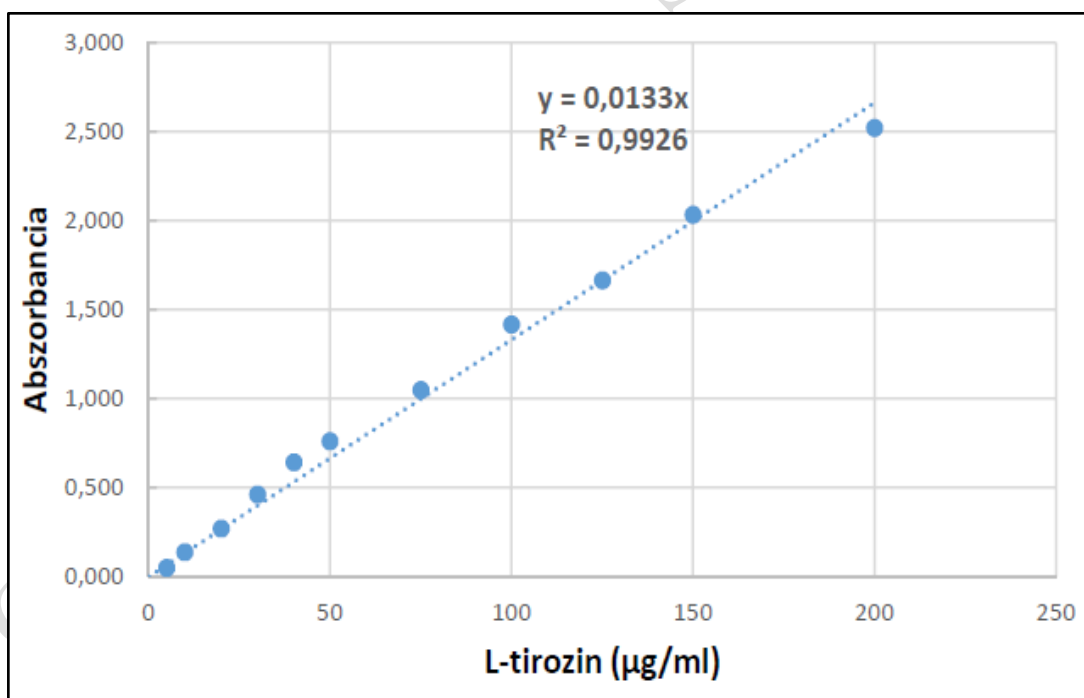
A kalibráció felállításához 1,1 mM L-tirozin törzsoldatot használtam. A törzsoldat desztillált vízzel hígítottam. A hígított mintákhoz 1,5 ml 0,5 M Na₂CO₃ oldatot, valamint 0,5 ml háromszoros hígítású Folin reagenst adtam.

Az oldatok abszorbanciáját 660 nm-en, spektrofotometriásan mértem. A koncentrációk függvényében ábrázolt abszorbancia értékekre regressziós egyenest illesztettem. A függvény meredekségének ismeretében az enzimaktivitásokat számolhatóak. A kalibráció összetétele az 1. táblázatban, míg a kalibrációs egyenes a 8. ábrán láthatóak.

1. Táblázat:

A proteáz enzimaktivitás mérés kalibráció összetétele

Koncentráció ($\mu\text{g/ml}$)	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



8. Ábra:

A proteáz enzimaktivitás mérés kalibrációs egyenese

4.3.5. A kutináz enzimaktivitás mérése

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

2. Táblázat:
A kutináz enzimaktivitás mérés reakcióelegy összetétele

	DV (μl)	Szubsztrátum (μl)	Enzim (μl)	Puffer (μl)
Műszervak	100	–	–	400
Szubsztrátvak	50	50	–	400
Enzimvak	50	–	50	400
Minta	–	50	50	400

A kutináz enzimaktivitás mérésénél kémcsövekbe összemértem a reakcióelegy összetevőit, a 2. táblázat alapján; a 0,1 M McIlvane pH 4,5 puffert és az enzimet, a reakciót a szerves oldószerben (96 %-os etanolban) oldott p-nitrofenol-butirát szubsztrátum hozzáadásával (0,15 mM) indítottam 10 percig. A reakciót 0,5 ml hideg 0,3 M Na-foszfát pufferrel (pH 7,0) állítottam le. A reakció végén a minták abszorbanciáját 405 nm-en spektrofotométerrel mértem meg. Az alábbi egyenlet alapján számoltam ki az aktivitás értékeket mintánként:

$$\text{Aktivitás (U/ml)} = \frac{(A_{\text{Minta}} - A_{\text{Enzimvak}} - A_{\text{Szubsztrátumvak}}) \cdot V_{\text{reakció}} \cdot h}{x \cdot t_{\text{reakció}} \cdot V_{\text{minta}}}$$

ahol,

V reakció: a reakcióelegy térfogata (ml);

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

t reakció: a reakció időtartama (perc);

V minta: a minta (enzimoldat) térfogata (ml);

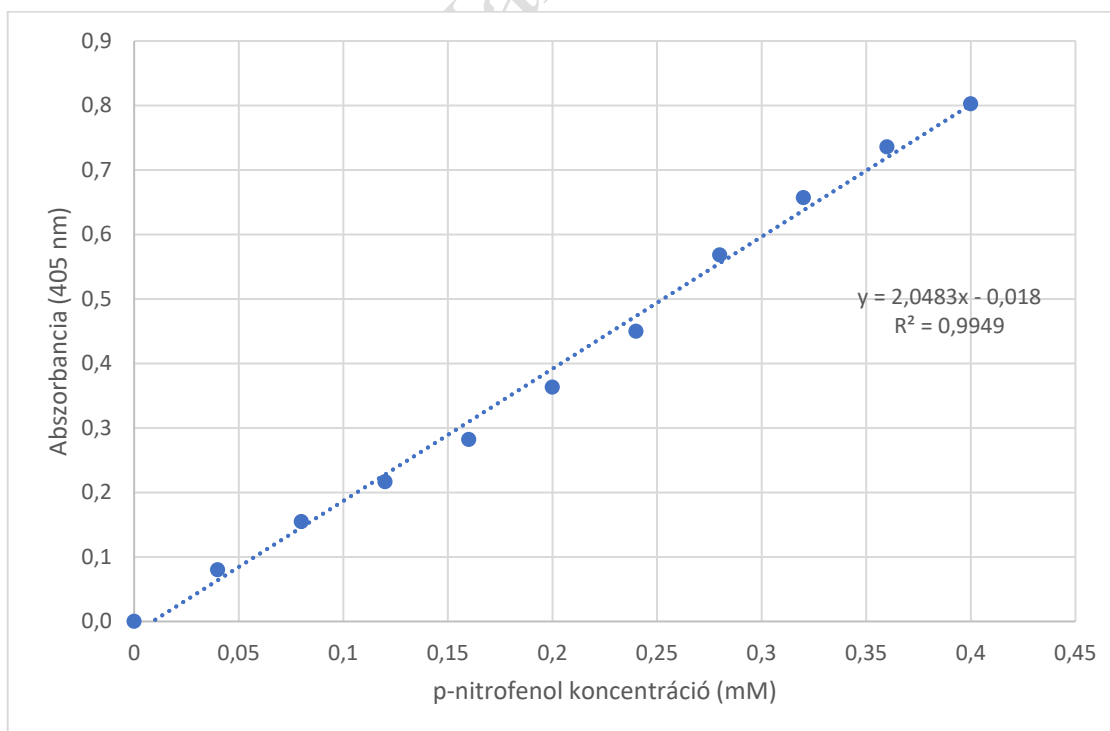
h= a minta hígítási faktora.

Kalibráció:

A 0,4 mM-os p-nitrofenol törzsoldatból hígítási sorozatot készítettem. A törzsoldatot és a desztillált vizet microplate lemez mélyedéseibe mértem. A különböző ismert koncentrációjú oldatok abszorbanciáját 405 nm-en mértem le. A koncentrációk függvényében az abszorbancia értékeket ábrázoltam, a pontokra regressziós egyenest illesztettem. A függvény meredekségének ismeretében az enzimaktivitásokat számolni lehet. A kalibráció összetétele a 3. táblázatban, a kalibrációs egyenes a 9. ábrán látható.

3. Táblázat:
Kutináz enzimaktivitás mérés kalibráció összetétele

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



9. Ábra:
Kutináz enzimaktivitás mérés kalibrációs egyenes

4.3.6. Tömegmérés

A kísérlet indításakor 1,00g durvára (kb. 0,2-0,5 cm méretre) felaprított PLA darabok kerültek minden mintába – a felaprított darabok a 10. ábrán láthatóak – majd a biodegradációs modellezési idő lejártakor ezek a vizsgálati közegtől elválasztva, alkoholos majd desztillált vizes mosás után, 3 napig, 30 °C-on szárítás következett. Ezután lemértem a PLA darabok tömegét, a politejsav darabok tömegváltozását a következő egyenlettel határoztam meg:

$$\text{PLA tömeg csökkenés (\%)} = ((M_k - M_v) / M_k) \cdot 100$$

ahol,

M_k : kezdeti/kiindulási PLA tömeg;

M_v : a kezelés, tisztítás és szárítás után megmért végső PLA tömeg.



10. Ábra: Felaprított PLA evőeszköz darabok bontás előtt

5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

5.1. A proteáz screenelés eredményei

Vizuális detektálás történt. A proteáz enzim termelés kimutatásánál a feltisztulási zóna jelezte az enzim jelenlétét, aminek a könnyebb detektálásához brómkrezol zöld indikátort alkalmaztam. Inkubálás után az indikátorral 30 percig elárasztottam a tápközeget, fontos, hogy jól ellepje, majd 24 óráig szobahőmérsékleten tartottam. (Vijayaraghavan et al. 2013) A 4. táblázatban olvashatóak a proteáz screenelés eredményei. A pozitív eredmények, azaz a kiválasztott mikroorganizmusok az 11. és a 12. ábrán láthatóak.

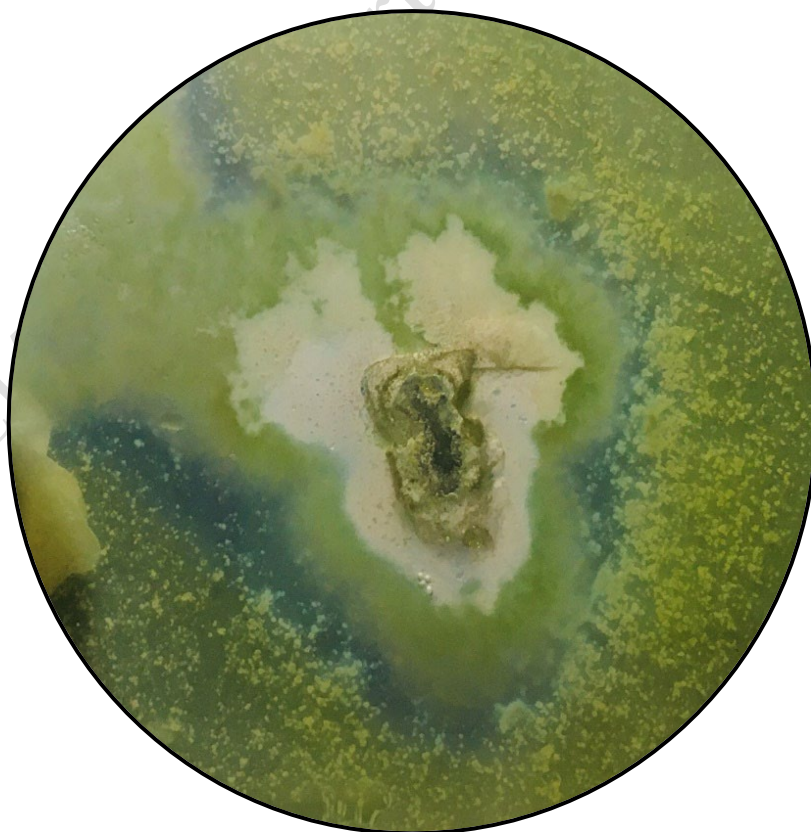
Jelmagyarázat: + jól látható feltisztulási zóna, – nem látható feltisztulási zóna.

4. Táblázat: A proteáz screenelés eredményei

Proteáz screenelés:		Feltisztulási zóna:
1.	<i>Aspergillus niger</i> F735	+
2.	<i>Bacillus subtilis</i> B1162	–
3.	<i>Bacillus subtilis</i> B1212	–
4.	<i>Bacillus subtilis</i> CU150	–
5.	<i>Penicillium chrysogenum</i> 874	–
6.	<i>Pseudomonas putida</i> B1167	+
7.	<i>Pseudomonas putida</i> B1522	–
8.	<i>Rhizopus sp.</i> 2036	–
9.	<i>Rhodococcus opacus</i> B1215	–
10.	<i>Yarrowia yakusimensis</i> 2049	–
11.	<i>Yarrowia yakusimensis</i> 2050	–
12.	<i>Yarrowia yakusimensis</i> 2052	–



11. Ábra: *Pseudomonas Putida* B1167



12. Ábra *Aspergillus niger* F735

5.2. Az észteráz típusú screenelés pozitív eredményei

Szintén vizuális detektálás történt az észteráz enzim termelés kimutatásánál. A Tween80 adalékanyagban lévő polioxietilén-szorbitán zsírsav észtert az észteráz/lipáz enzim termelő mikroorganizmusok képesek szubsztrátumként hasznosítani, amit az agaron megjelenő telepképződések mutatnak. Az 5. táblázatban olvashatóak az észteráz screenelés eredményei, a pozitív eredményekről mellékelt képek a 13.-16. ábrán láthatóak, a vörös színt a Kongó-vörös adalékanyag adja.

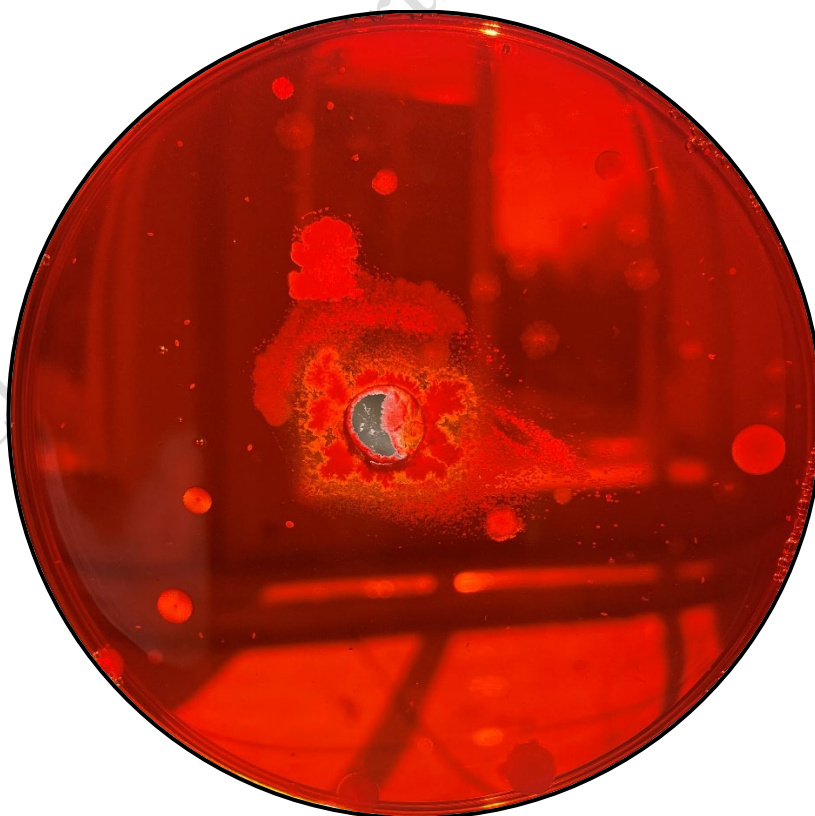
Jelmagyarázat: + jól látható telepképződés, – nincs / nem jól látható telepképződés.

5. Táblázat: A kutináz screenelés eredményei

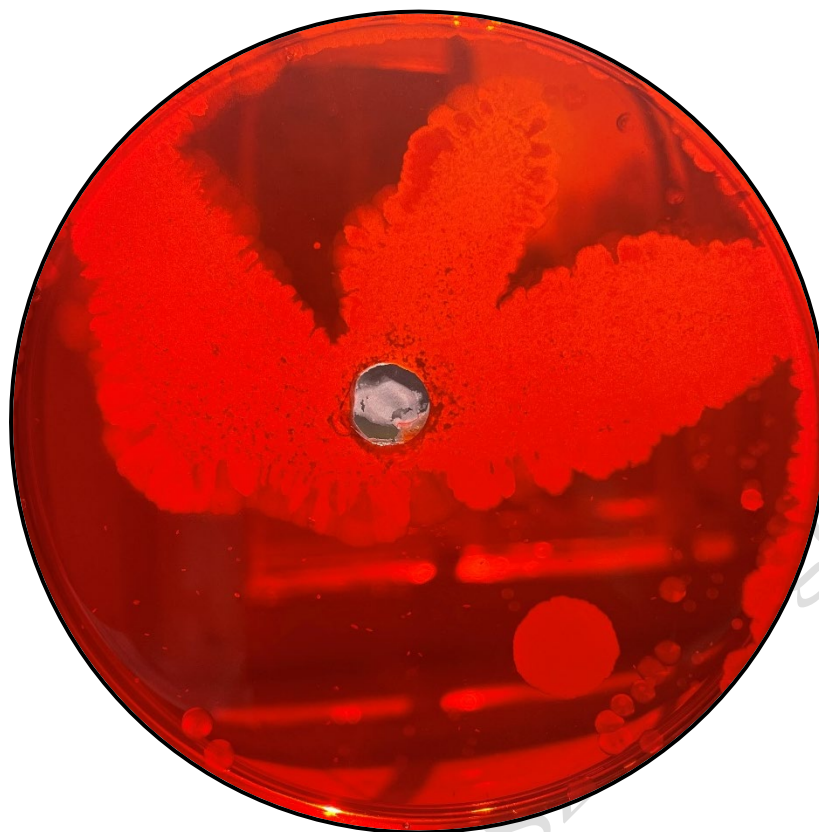
Kutináz screenelés:		Telepképződés:
1.	<i>Aspergillus niger</i> F735	–
2.	<i>Bacillus subtilis</i> B1162	+
3.	<i>Bacillus subtilis</i> B1212	–
4.	<i>Bacillus subtilis</i> CUI50	–
5.	<i>Penicillium chrysogenum</i> 874	+
6.	<i>Pseudomonas putida</i> B1167	+
7.	<i>Pseudomonas putida</i> B1522	–
8.	<i>Rhizopus</i> sp. 2036	–
9.	<i>Rhodococcus opacus</i> B1215	–
10.	<i>Yarrowia yakushimensis</i> 2049	+
11.	<i>Yarrowia yakushimensis</i> 2050	–
12.	<i>Yarrowia yakushimensis</i> 2052	–



3. Ábra: *Bacillus subtilis* B1162



4. Ábra: *Penicillium chrysogenum* 874



5. Ábra: *Pseudomonas putida* B1167



6. Ábra: *Yarrowia yakushimensis* 2049

5.3. A konzorciumok kialakítása

Nem volt feltétel, hogy csak a mindkét enzim termelés szempontjából pozitív értékek kerüljenek bele a kiválasztott konzorciumokba. Az előszelekció eredményei alapján a kiválasztásra került mikroorganizmusok az 6. táblázatban találhatóak. A belőlük kialakított mikrobiális konzorciumok, összetételük és jelölésük a 7. táblázatban láthatóak.

6. Táblázat: Kiválasztásra került mikroorganizmusok

Kiválasztásra került mikroorganizmusok	
Baktériumok	<i>Bacillus subtilis</i> B1162
	<i>Bacillus subtilis</i> B1212
	<i>Pseudomonas putida</i> B1167
Penészgombák	<i>Aspergillus niger</i> 735
	<i>Penicillium chrysogenum</i> 874
Élesztőgomba	<i>Yarrowia yakushimensis</i> 2049

Jelmagyarázat: B – baktérium, F – penészgomba, Y – élesztőgomba.

7. Táblázat: Mikroorganizmus konzorciumok

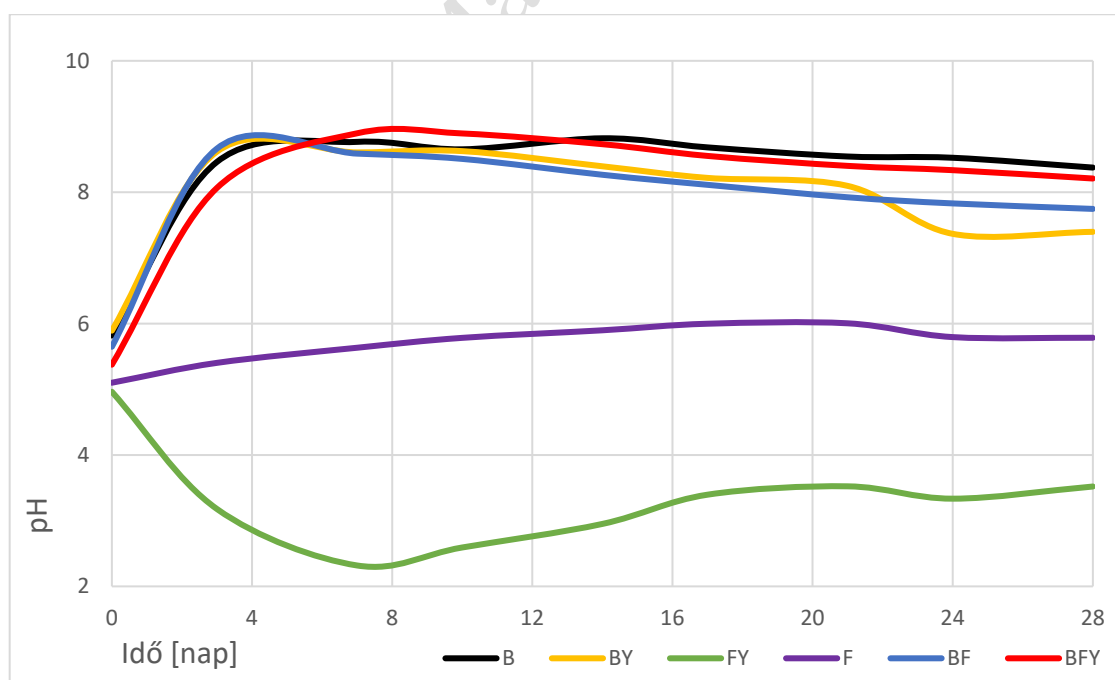
Mikroorganizmus konzorciumok			
B	<i>Bacillus subtilis</i> B1162	BF	<i>Bacillus subtilis</i> B1162
	<i>Bacillus subtilis</i> B1212		<i>Bacillus subtilis</i> B1212
	<i>Pseudomonas putida</i> B1167		<i>Pseudomonas putida</i> B1167
BY	<i>Bacillus subtilis</i> B1162	BFY	<i>Aspergillus niger</i> 735
	<i>Bacillus subtilis</i> B1212		<i>Penicillium chrysogenum</i> 874
	<i>Pseudomonas putida</i> B1167		<i>Bacillus subtilis</i> B1162
FY	<i>Yarrowia yakushimensis</i> 2049	BFY	<i>Bacillus subtilis</i> B1212
	<i>Aspergillus niger</i> 735		<i>Pseudomonas putida</i> B1167
	<i>Penicillium chrysogenum</i> 874		<i>Aspergillus niger</i> 735
F	<i>Yarrowia yakushimensis</i> 2049	BFY	<i>Penicillium chrysogenum</i> 874
	<i>Aspergillus niger</i> 735		<i>Yarrowia yakushimensis</i> 2049
	<i>Penicillium chrysogenum</i> 874		

5.4. A pH változások eredményei

A zselatint tartalmazó vizsgálati közegben megmért pH eredményeinek ismertetése következik, az eredmények a 17. ábrán láthatóak. 5-6 közötti pH-ról indul mind a 6 konzorcium. A penészgombákat tartalmazó konzorcium végig ebben a tartományban maradt. A penészgomba-élesztőgomba tartalmú konzorcium a savas tartományba mozdult el – feltételezhetően amiatt, hogy az *Aspergillus*-ok (penészgomba) ismert citromsav termelők, ugyanakkor az élesztő is tud savas metabolitot termelni az anyagcsere folyamata során – egészen a 7. napig, ezeket hasznosították az ezt követő napokban, így a minimum 2,3 pH értékről a kísérlet végére 3-4 pH közötti érték állt be a konzorciumnál.

Ebben a kísérleti elrendezésben, négy konzorcium kémhatása hasonló lefutású. Ezek a baktérium, baktérium-élesztőgomba, baktérium-penészgomba és a baktérium-penészgomba-élesztőgomba konzorciumok. A kezdeti 5-6 pH értékről a lúgos tartományba mozdult el a kémhatásuk.

A maximumok 8,5-9 pH értéken állnak be az 5.-8. napon. Innentől a kísérlet végéig egyenletes csökkenés látható az enyhén lúgos 7,5-8 pH érték felé. A baktériumok is termelnek szerves savakat, azonban itt valószínűsíthető, hogy az erős kompetíció miatt a tápanyag gyorsan elfogyott, és inkább szerves N₂-ből, ammónia képződött.



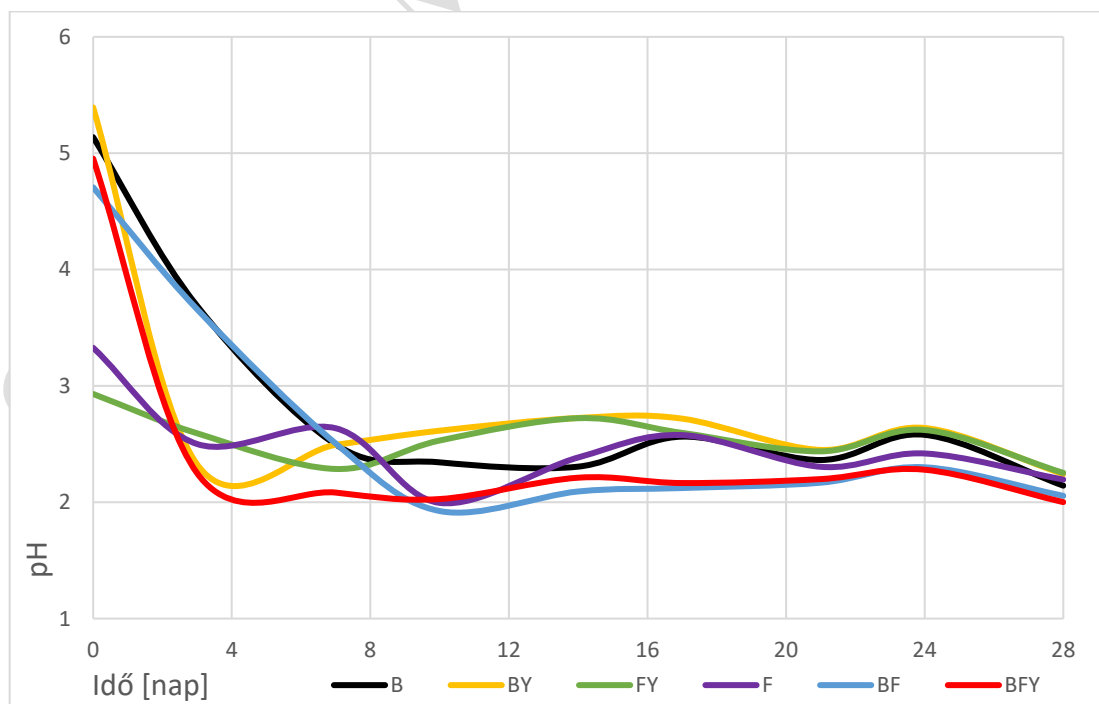
17. Ábra:
pH értékek zselatin kiegészítést alkalmazva

A napraforgóolajos kiegészítést tartalmazó táplevest alkalmazó kísérlet pH eredményeinek ismertetése következik, az eredmények a 18. ábrán láthatóak. Ebben az elrendezésben mind a hat konzorcium kémhatása hasonló lefutású, a kiindulási és az első napok pH értékeiben vannak a legjelentősebb eltérések.

A penészgomba és a penészgomba-élesztőgomba konzorciumok alacsonyabb 3 körüli pH-ról indulnak, mint a többi, azaz a baktérium, baktérium-élesztőgomba, baktérium-penészgomba és a baktérium-penészgomba-élesztőgomba konzorciumok; amelyek 5 körüli pH értéket adtak a 0. napon. Ezekről az értékekről tovább csökkennek a 2,0-2,5-ös kémhatás felé.

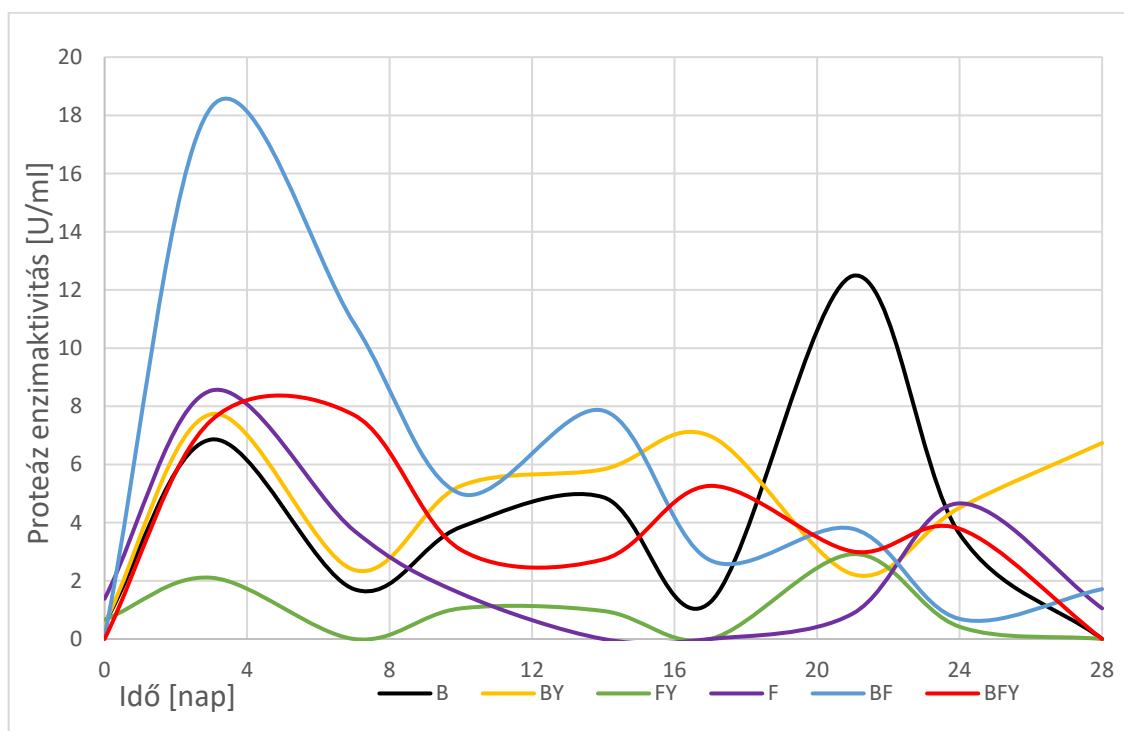
A baktérium-élesztőgomba és a baktérium-penészgomba-élesztőgomba konzorcium meredekebben csökkennek, mint a baktérium és baktérium-penészgombát tartalmazóak. Előbbiek már a 3. napon elérik pH 2,0 értéket, míg a baktérium-penészgomba és a penészgomba konzorcium ezt a 10. napon éri el. A baktérium és penészgomba-élesztőgomba konzorcium a minimum értéküket a mérés végére éri el. A 16. naptól mind a 6 konzorcium nagyjából azonos kémhatást és lefutást mutat.

A savas pH oka a szerves sav termelés lehetett, amely mind a 6 konzorciumnál jelentős, valószínűsíthető, hogy a keletkezett szerves savakat nem olyan mértékben hasznosították, hogy az összes elfogyjon, azonban az is lehet, hogy folyamatosan termelődött.



18. Ábra:
pH értékek napraforgóolaj kiegészítést alkalmazva

5.5. A proteáz aktivitás eredményei zselatin kiegészítést alkalmazva



19. Ábra:
Proteáz enzimaktivitás zselatin kiegészítést alkalmazva

A B, BY, F és BFY konzorciumok a 3. napig hasonló ütemű enzim szintézist mutatnak, az FY és a BF konzorciumok jelentősen eltérnek a többitől a proteáz enzimaktivitásban ez első napokban. A mintavétel további napjaiban jelentősen eltérő értékeket kaptam. A 19. ábrán láthatók a proteáz enzim aktivitás értékei zselatin induktor alkalmazásával.

B – A baktérium konzorcium proteáz enzimtermelése kezdeti napokban növekedést mutatott, majd változó értékeket mértem egészen a 21. napig ahol eléri maximumát, ami 12,48 U/ml volt.

BY – A baktérium-élesztőgomba konzorcium enzim szintézis maximuma a 3. napon volt, 7,73 U/ml-es értékkel, innentől változó, csökkenő majd kissé növekvő értéket mutat, egészen a 21. napig, ami után növekedést tapasztaltam.

FY – A penészgomba-élesztőgomba konzorciumnál a legkisebb enzimaktivitási értéket tapasztaltam. Maximuma a 21. napon 2,92 U/ml-es értékkel.

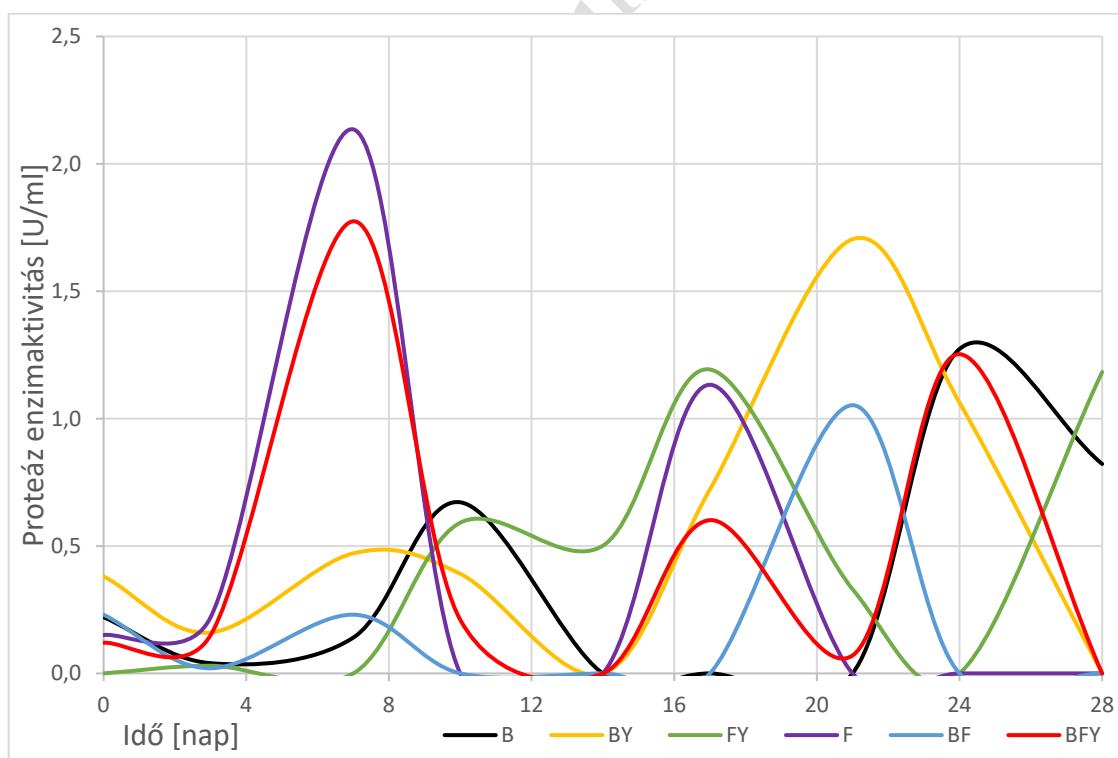
F – A penészgomba konzorcium enzimaktivitás maximuma a 3. napon volt, 8,54 U/ml-es értékkel. Ezután csökkenő tendenciát mutat az aktivitás értéke a 17. napig majd növekszik az aktivitás a 24. napig, aztán az utolsó mintavételre megint lecsökken.

BF – A baktérium-penészgomba konzorciumnál mértem a legmagasabb proteáz enzimaktivitást, amely a 3. napon 18,29 U/ml értéknek adódott, ezután csökkenő tendenciát mutatott.

BFY – A baktérium-penészgomba-élesztőgomba konzorcium maximuma proteáz mennyisége 7,70 U/ml volt a 7. napon innentől csökkenő majd kissé növekvő és megint csökkenő értéket mutat.

5.6. A proteáz aktivitás eredményei napraforgóolaj kiegészítést alkalmazva

A 20. ábrán láthatóak a proteáz enzim aktivitás értékei zselatin kiegészítés alkalmazásával.



20. Ábra:
Proteáz enzimaktivitás napraforgóolaj kiegészítést alkalmazva

Az F és a BFY konzorcium aktivitása a kezdeti napokban meredeken emelkedik, és a 7. napon eléri a maximumukat majd hirtelen lecsökken kisebb emelkedésekkel ez a tendencia folytatódik a kísérlet végéig. Ezzel ellentétesen a másik 4 konzorcium kisebb ütemben növekszik az első hetekben, majd a 16.-24. napon éri el maximumukat, ami után mutatnak csökkenést, kivéve az FY konzorcium, ami a 24. naptól növekvő aktivitást mutat. Összeségében közel egy nagyságrenddel kisebb aktivitás értéket mértem ezen kiegészítés jelenlétében, mint a zselatin kiegészítés alkalmazásánál.

B – A baktérium konzorcium proteáz enzimaktivitása a kezdeti napokban növekvő tendenciát mutat, majd csökken és ismét nő a maximumáig, ami 1,23 U/ml volt. Az előző, zselatin kiegészítést tartalmazó konzorciumnál 10x nagyobb enzimaktivitási maximumot tudtam meghatározni.

BY – A baktérium-élesztőgomba konzorcium proteáz enzimaktivitása a 21. napon érte el a maximumát, ami 1,70 U/ml volt. Eddig a napig növekvő tendenciát mutat egy csökkenéssel a 10. nap után. A zselatin kiegészítés 4,5x nagyobb enzimaktivitási maximumot mutatott.

FY – A penészgomba-élesztőgomba konzorcium maximuma a 17. napon volt 1,19 U/ml-es értékkel, eddig növekvő tendenciát mutat, majd csökken és a 24. naptól hirtelen emelkedik az enzimaktivitása. A zselatin kiegészítést alkalmazott konzorcium több mint 2x nagyobb maximumot ért el.

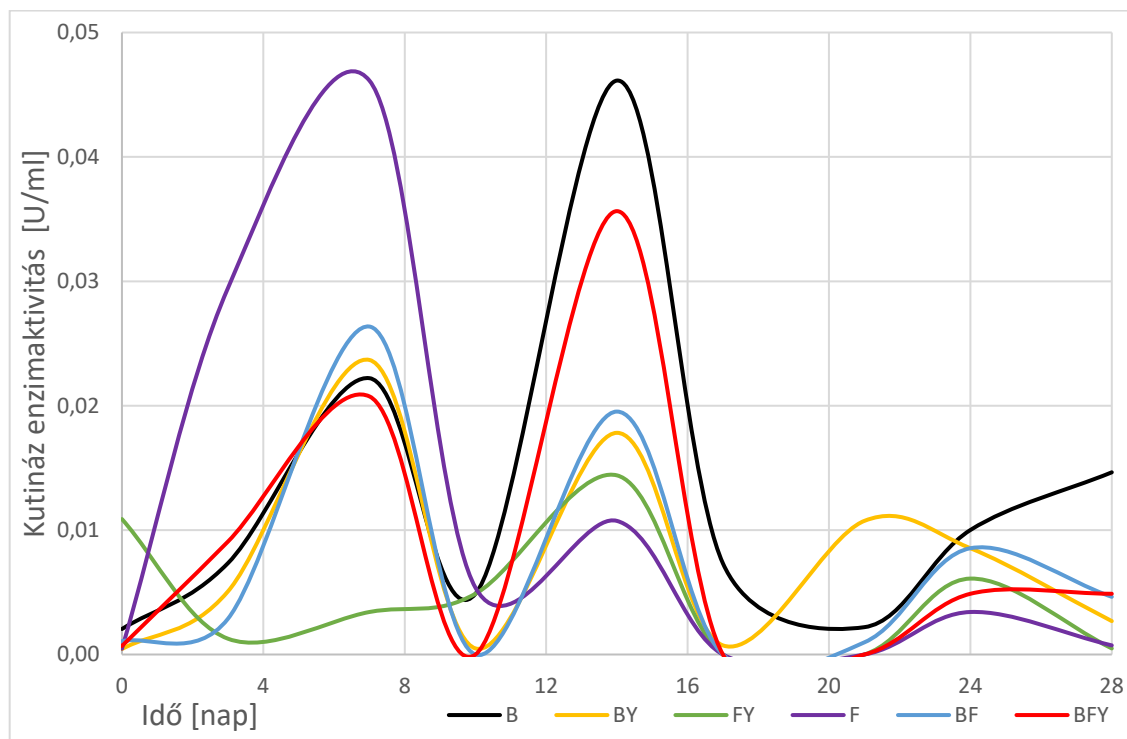
F – A penészgomba konzorcium maximuma a 3. napon volt, 2,13 U/ml-es értékkel, ez egyben a legmagasabb enzimaktivitás a hat konzorcium közül. Ezután csökkenő tendenciát mutat az aktivitás értéke. A zselatin kiegészítés 4x nagyobb enzimaktivitási maximumot mutatott.

BF – A baktérium-penészgomba konzorcium proteáz enzimaktivitás maximuma a 21. napon 1,05 U/ml, ezután csökkenő tendenciát mutat. A zselatin kiegészítés több mint 17x nagyobb enzimaktivitási maximumot mutatott. Feljegyzendő, hogy míg a zselatin kiegészítésnél a legnagyobb enzimaktivitás értéket a BF konzorcium adta, addig a napraforgóolaj kiegészítéssel itt a legalacsonyabb értéket mértem.

BFY – A baktérium-penészgomba-élesztőgomba konzorcium maximuma 1,77 U/ml volt a 7. napon innentől csökkenő aktivitást mutat a 21. napig, amiután kisebb mértékű emelkedést mértem, majd újabb csökkenést. Ez a maximum 4x nagyobb a zselatin kiegészítést alkalmazva.

5.7. A kutináz aktivitás eredményei zselatin kiegészítést alkalmazva

Az 21. ábrán láthatóak a proteáz enzim aktivitás értékei zselatin kiegészítés alkalmazásával.



21. Ábra:
Kutináz enzimaktivitás zselatin kiegészítést alkalmazva

Hasonló tendencia mutatható a B, BY, BF és BFY konzorciumoknál. Összességében elmondható a hat konzorciumból, ötről, hogy az enzimaktivitási maximumukat a 14. napon érték el, a kivétel a penészgomba (F) ami már a 7. napon elérte a maximumát.

B – A baktérium konzorcium kezdetben növekvő majd csökkenő tendenciát ad, aztán erős emelkedést mutat és a 14. napon eléri a kutináz enzimtermelési maximumát, 0,046 U/ml-es értékkel, majd meredeken csökken. A kísérlet végére az egyetlen, ami növekvő tendenciát mutat. A legmagasabb enzimaktivitási érték (a szintén ugyanilyen értéket mutató penészgomba konzorciummal megegyezően).

BY – A baktérium-élesztőgomba konzorcium kutináz enzimtermelése a 7. napon érte el a maximumát 0,024 U/ml-es értékkel. Innentől csökkenő értéket mutat egy kiugró értékkel a 14. napon.

FY – A penészgomba-élesztőgomba konzorcium maximuma a 14. napon 0,014 U/ml-es értékkel, eddig a pontig növekvő tendenciát mutat, majd csökken.

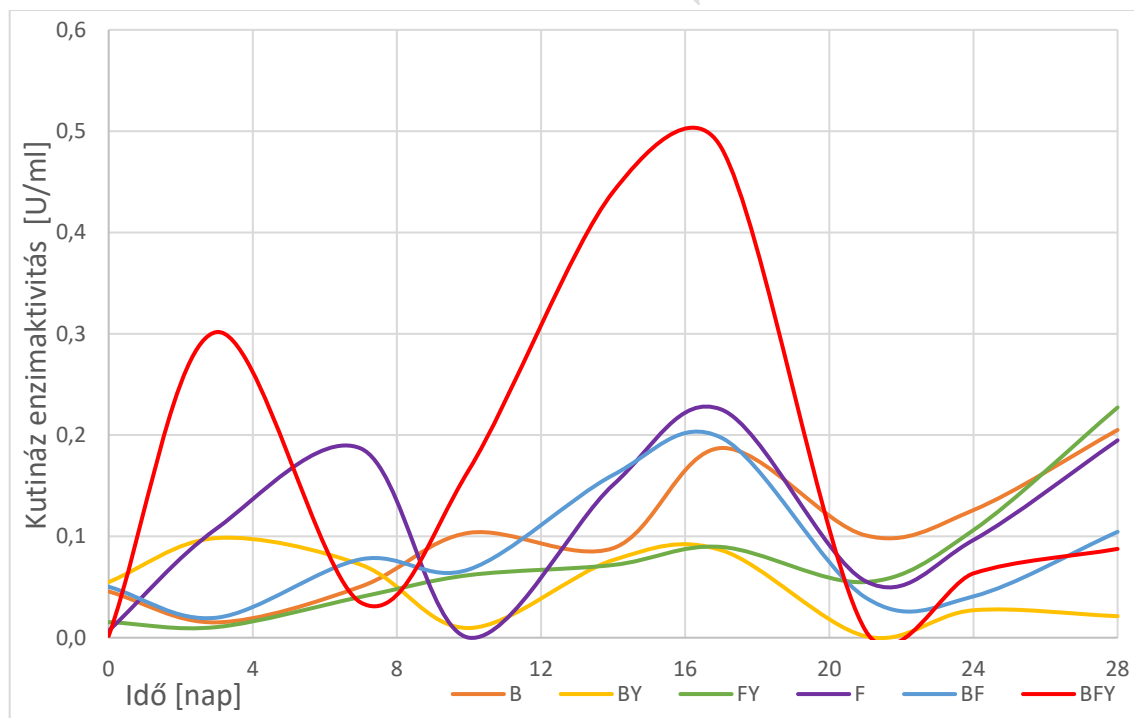
F – A penészgomba konzorcium maximuma a 7. napon 0,046 U/ml. Ezután csökkenő tendenciát mutat.

BF – A baktérium-penészgomba konzorcium növekvő tendenciát mutat a 14. napig ahol eléri a maximumát, ami 0,019 U/ml, innentől csökkenő tendenciát mutat.

BFY – A baktérium-penészgomba-élesztőgomba konzorcium maximumáig, ami a 14. napon 0,035 U/ml, növekvő tendenciát mutat, majd pedig csökkenőt.

5.8. A kutináz aktivitás eredményei napraforgóolaj kiegészítést alkalmazva

A 22. ábrán láthatóak a proteáz enzim aktivitás értékei napraforgóolaj hozzáadás alkalmazásával.



22. Ábra:
Kutináz enzimaktivitás napraforgóolaj kiegészítést alkalmazva

Ezzel a kiegészítéssel, a legtöbb konzorciumnál egy nagyságrenddel nagyobb enzimaktivitás értékeket mértem. Hasonló lefutást mutat mindegyik konzorcium

enzimaktivitási görbéje, a BFY az egyetlen kivétel. A vizsgált konzorciumok a 16. napon érik el a maximumukat, vagy a kísérlet végére. A legtöbb növekvő tendenciát mutat az vizsgált időszakban, kivétel a BY. A 17. naptól mindegyik konzorciumnál csökkenés tapasztalható.

B – A baktérium konzorcium kutináz enzimtermelése növekvő tendenciát mutat, egészen a kísérlet végéig, 28. napon éri el a maximumát 0,205 U/ml értékkel. Több mint 4x nagyobb a maximuma, mint a zselatin kiegészítést alkalmazott konzorciumnál.

BY – A baktérium-élesztőgomba konzorcium kutináz enzimtermelése a 3. napon eléri a maximumát 0,098 U/ml értékkel, az egyetlen, ami ezután csökkenő tendenciát mutat. Maximuma 4x nagyobb, mint a zselatin kiegészítést alkalmazva.

FY – A penészgomba-élesztőgomba konzorcium növekvő enzimszintézis tendenciát mutat egészen a kísérlet végéig, a 28. napon eléri a maximumát 0,227 U/ml-es értékkel. Több mint 16x nagyobb enzimtermelési maximum, mint a zselatin kiegészítést tartalmazó konzorciumnál.

F – A penészgomba konzorciumnál tapasztalt kutináz termelés a kísérlet kezdeti napjaiban növekszik, majd hirtelen lecsökken, ezután eléri maximumát a 17. napon, 0,225 U/ml értékkel, majd csökken a 22. napig. Innentől megint növekvő tendenciát mutat. Közel 5x akkora enzimaktivitási maximum, mint zselatin kiegészítést alkalmazva.

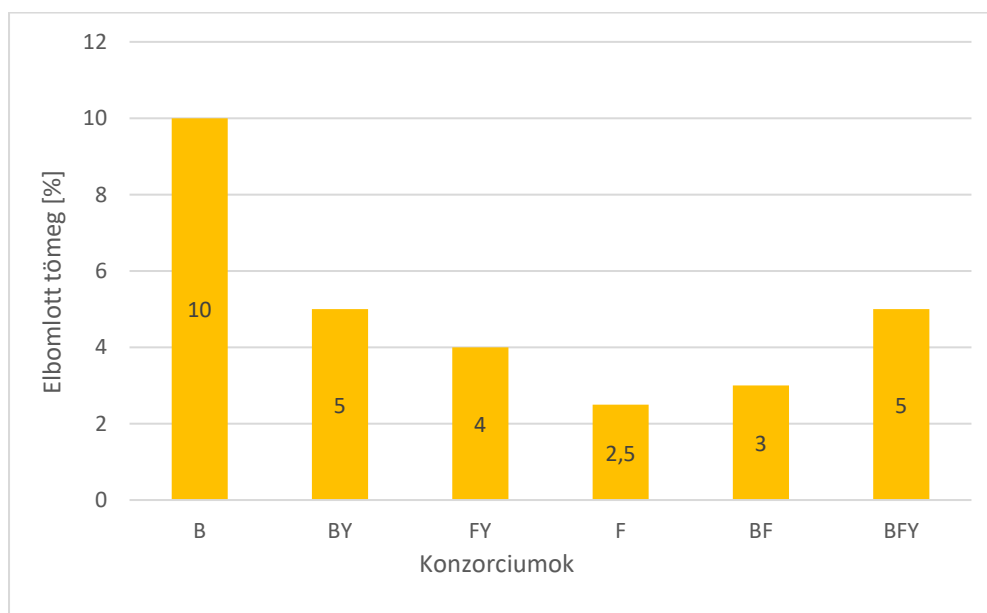
BF – A baktérium-penészgomba konzorcium jelenlétében a kutináz termelődés növekvő tendenciát mutat, egészen a maximumáig, ami a 17. napon volt 0,197 U/ml értékkel. Ezután csökken a kísérlet végéig, ahol újra emelkedésnek indul. Több mint 10x-es enzimtermelési maximum, mint a zselatin kiegészítést tartalmazó konzorciumnál.

BFY – A baktérium-penészgomba-élesztőgomba konzorcium enzimaktivitása a legmagasabb. A 3. meredeken emelkedik, majd lecsökken, ezután ismét növekszik a maximumáig, ami a 17. napon 0,484 U/ml volt, ezután hirtelen lecsökken, de a mérési időszak végére emelkedésnek indult. Közel 14x-es enzimaktivitási maximum, a zselatin kiegészítéshez képest.

5.9. A tömegváltozások eredményei

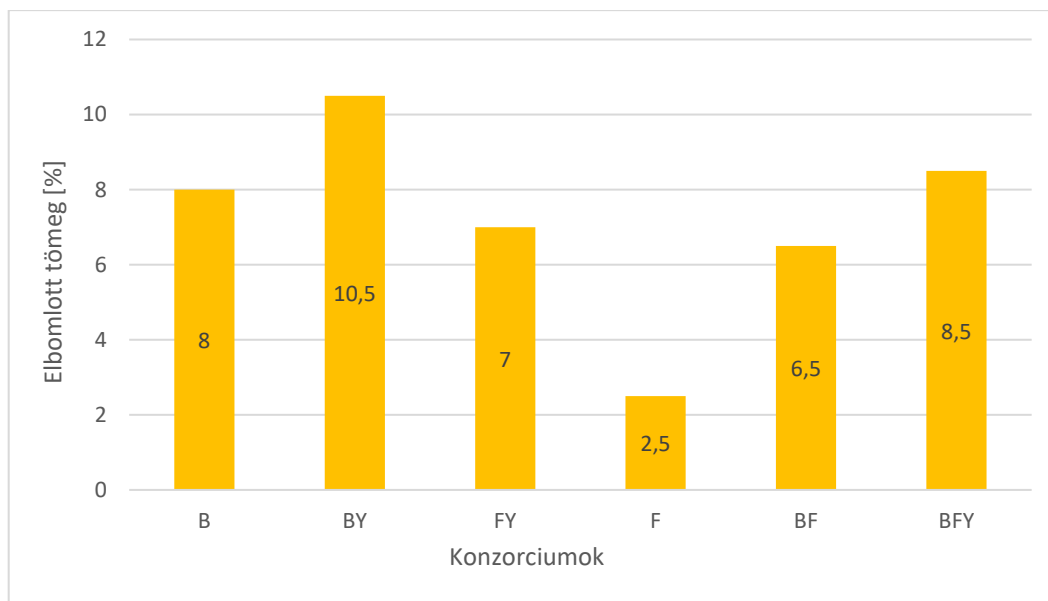
Ebben az alfejezetben a tömegváltozás eredményeinek ismertetése történik. Ahogy azt a kísérlet célja fejezetben már megfogalmaztam, a cél a PLA minél hatékonyabb bontása.

A zselatin kiegészítést alkalmazott konzorciumok közül a legeredményesebb bontás a csak baktérium törzset tartalmazó (B) érte el, itt 10%-a bomlott le a biopolimernek, a többinél ez 3-5% közé esett. A tömeg csökkenés százalékos [%] értékei a 23. ábrán láthatóak.



23. Ábra:
Tömegváltozások eredményei zselatin kiegészítést alkalmazva

A napraforgóolaj kiegészítést alkalmazó konzorciumoknál a bontás eredményei minimálisan, de magasabb értékek adtak, mint a zselatin kiegészítést alkalmazó konzorciumok, a tömeg csökkenés százalékos [%] értékei a 24. ábrán olvashatóak. A legtöbb konzorcium a 6% vagy a feletti bontási értékkel, kivétel az F ahol a biopolimer 2,5%-a bomlott le. A konzorciumok közül BY volt a legeredményesebb 10,5%-os bontást ért el.



24. Ábra:
Tömegváltozások eredményei napraforgóolaj kiegészítést alkalmazva

Az enzimaktivitási értékeket figyelembe véve a zselatin jelenléte a proteáz enzimszintézist mindenképpen fokozta. Ebben az esetben a magasabb proteáz enzim aktivitás legtöbbször korrelál a vizsgált konzorciumok politejsav bontásának eredményével. A kutináz enzim termelésre pedig a napraforgóolaj jelenléte kedvezőbben hat, ugyanis egy nagyságrenddel nagyobb enzimaktivitásokat határoztam meg, ezek az eredmények tükrözik az alkalmazott konzorciumok bontásiképességének hatékonyságát. A 25. ábrán bontás után láthatóak PLA darabok.



25. Ábra PLA darabok bontás után

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatómunkám a politejsav-alapú bioműanyag evőeszközök szubmerz mezofil mikroorganizmusokkal való biológia bontás modellezésének vizsgálata volt.

A szelektálást követően alkalmazott mikroorganizmusokból kialakított konzorciumok zselatint és napraforgó olajat tartalmazó közegben, proteáz és kutináz enzim aktivitásuk szerint kerültek vizsgálatra. A napraforgóolaj jelenétében a kialakított mikrobiális konzorciumok kutináz aktivitása egy nagyságrenddel volt magasabb, mint a zselatin jelenléteben. Ezzel ellentétben, a proteáz aktivitás a zselatin alkalmazásával hatékonyabbnak bizonyult.

A vizsgált mikroorganizmus konzorciumok proteáz enzimaktivitás szempontjából a zselatin kiegészítésben alkalmazott baktérium-penészgomba, azaz a *Bacillus subtilis* B1162, B1212; a *Pseudomonas putida* B1167; *Aspergillus niger* 735 és a *Penicillium chrysogenum* 874 konzorcium adta a legmagasabb értéket, ami 18,29 U/ml volt, és a vizsgált időszak végére is növekvő tendenciát mutattak.

A kutináz aktivitás szempontjából a napraforgó olaj kiegészítést tartalmazó BFY, azaz a fentihez hasonló, de még *Yarrowia yakushimensis* 2049 élesztőgombát is tartalmazó konzorciumé volt a legmagasabb aktivitás, ami 0,484 U/ml volt, szintén növekvő tendenciát mutatva a vizsgált időszak végén.

Bontási hatékonyság szempontjából azonban a napraforgóolaj kiegészítés bizonyult a leghatékonyabbnak. Összességében kimondható, hogy a napraforgóolaj használata előnyösebb, mint a zselatiné az adott vizsgálatban, ugyanis a végcél a biopolimernek bontása volt, és ezt eredményesebben teljesítette. Viszont, a legnagyobb mértékű bontás mindkét kiegészítés esetén, a baktérium törzseket és a baktérium-élesztőgomba törzseket tartalmazó mikrobiális konzorcium volt a leghatékonyabb. Azaz a *Bacillus subtilis* B1162, B1212; a *Pseudomonas putida* B1167 és a *Yarrowia yakushimensis* 2049 mikrobák bizonyultak a leghatékonyabbnak a bontás szempontjából. A *Yarrowia* lipáz enzimet is termel, amely termelését ebben a kísérletben nem vizsgáltam. Valószínűsíthető, hogy ez is hozzájárulhatott a hatékonyabb bontáshoz.

További kísérleti elrendezéseket mindenképpen olaj kiegészítést alkalmazva folytatnék, ügyelve arra, hogy az olajos közeg miatti összetapadást elkerüljem, főleg a kísérlet elején így a mintavételi nehézségeket kiküszöbölném, mert szemmel történő megfigyelés alapján

ez okozhatott mintavételi hibákat. Másik fontos megállapítás a feltételezhető lipáz enzim termelés, és annak a bontás elősegítő képessége. Egy következő kísérlet során a lipáz enzim termelést is vizsgálnám, akár több ismert lipáz enzimet termelő törzset is bevonnék a kísérletbe. A baktérium-élesztőgomba konzorciumokkal folytatnék további kísérletek, mindenképpen 28 napot meghaladó vizsgálati időszak során.

Összességében a szakdolgozatom ígéretes eredményeket produkált, mind a felhasználni kívánt mikroorganizmus konzorcium, mind a tápközeg kiegészítés tekintetében. Ezen eredményekkel a teljsav-alapú biopolimerek szubmerz biológia bontása tovább optimalizálható, javítva a technológia hatékonyságát ezzel is hozzájárulva a minél előbbi ipari szintű felhasználásához, amivel pedig egy lépéssel közelebb kerülhetünk egy körkörös gazdaság felé.

7. IRODALMI HIVATKOZÁS

Ahmad, A., Banat, F., Alsafar, H. et al. An overview of biodegradable poly (lactic acid) production from fermentative lactic acid for biomedical and bioplastic applications. *Biomass Conv. Bioref.* (2022). <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02581-3>

Ali H, Ries MI, Nijland JG, Lankhorst PP, Hankemeier T, Bovenberg RA, Vreeken RJ, Driessen AJ (2013-06-12). "A branched biosynthetic pathway is involved in production of roquefortine and related compounds in *Penicillium chrysogenum*". *PLOS ONE*. 8 (6): e65328. doi:10.1371/journal.pone.0065328.

Andersen B, Frisvad JC, Søndergaard I, Rasmussen IS, Larsen LS (June 2011). "Associations between fungal species and water-damaged building materials". *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (12): 4180–8. doi:10.1128/AEM.02513-10

Ann-Christine Albertsson, Minna Hakkarainen. Designed to degrade. *Science*, Vol 358, Issue 6365, Page 872-873, 2017 DOI: 10.1126/science.aap8115

Auras, R.;Harte, B.; Selke, S.An overviewof polylactides as packagingmaterials.*Macromol. Biosci.* 2004, 4, 835–864. <https://doi.org/10.1002/mabi.200400043>

Böhm J, Hoff B, O'Gorman CM, Wolfers S, Klix V, Binger D, Zadra I, Kürnsteiner H, Pöggeler S, Dyer PS, Kück U (January 2013). "Sexual reproduction and mating-type-mediated strain development in the penicillin-producing fungus *Penicillium chrysogenum*". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110 (4): 1476–81. doi:10.1073/pnas.1217943110

Cairns TC, Nai C, Meyer V (2018). "How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research". *Fungal Biology and Biotechnology*. 5: 13. DOI: 10.1186/s40694-018-0054-5.

Chen S, Liu Z, Chen J, Wu J. Study on improvement of extracellular production of recombinant *Thermobifida fusca* cutinase by *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2011 Sep;165(2):666-75. doi: 10.1007/s12010-011-9286-z. Epub 2011 May 19. PMID: 21594592.

Chidi-Onuorah, Lilian & AU, Onunkwo & C, Agu & M, Ogbue & Kyrian-Ogbonna, Evelyn & Awah, Nsikak & CB, Okeke & GU, Nweke. (2015). Optimization of Reaction Time for the Assay of Protease Activity in a Local Strain of *Aspergillus niger*. *International Journal*

of Research Studies in Biosciences (IJRSB). 3. 1-5.
https://www.researchgate.net/publication/281292275_Optimization_of_Reaction_Time_for_the_Assay_of_Protease_Activity_in_a_Local_Strain_of_Aspergillus_niger

Costa CP, Gonçalves Silva D, Rudnitskaya A, Almeida A, Rocha SM (June 2016). "Shedding light on *Aspergillus niger* volatile exometabolome". Scientific Reports 6 (1): 27441 DOI: 10.1038/srep27441

de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras F (2000), Atlas of Clinical Fungi - 2nd Edition, Centraalbureau voor Schimmelcultures (Utrecht) ISBN: 9070351439 Record Number : 20013005530 Publisher : Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)

Di Stefano M, Miceli E, Gotti S, Missanelli A, Mazzocchi S, Corazza GR (January 2007). "The effect of oral alpha-galactosidase on intestinal gas production and gas-related symptoms". Digestive Diseases and Sciences. 52 (1): 78–83. DOI:10.1007/s10620-006-9296-9.

Euzéby, J.P. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. International Journal of Systematic Bacteriology, 47, 590-592; DOI: 10.1099/00207713-47-2-590

Flores Carmen-Lisset, Gancedo Carlos et al. *Yarrowia lipolytica* Mutants Devoid of Pyruvate Carboxylase Activity Show an Unusual Growth Phenotype. American Society for Microbiology Vol. 4, No. 2: 356-364 DOI: <https://doi.org/10.1128/EC.4.2.356-364.2005>

Gitishree Das, & M P, Prasad. (2009). Isolation, purification and mass production of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. International Research Journals of microbiology Vol. 1(2) pp.026-031

https://www.researchgate.net/publication/267303044_Isolation_purification_and_mass_production_of_protease_enzyme_from_Bacillus_subtilis

Groenewald, M., Smith, M.T. The teleomorph state of *Candida deformans* Langeron & Guerra and description of *Yarrowia yakushimensis* comb. nov..Antonie van Leeuwenhoek 103, 1023–1028 (2013). DOI: <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9882-8>

Jennifer L. Lavers, Alexander L. Bond, Charles Rolsky, Far from a distraction: Plastic pollution and the planetary emergency, Biological Conservation, Volume 272, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2022.109655>.

Keshavarz-Tohid, Vahid; Vacheron, Jordan; Dubost, Audrey; Prigent-Combaret, Claire; Taheri, Parissa; Tarighi, Saeed; Taghavi, Seyed Mohsen; Moënné-Loccoz, Yvan; Muller, Daniel (2019). Genomic, phylogenetic and catabolic re-assessment of the *Pseudomonas putida* clade supports the delineation of *Pseudomonas alloputida* sp. nov., *Pseudomonas inefficax* sp. nov., *Pseudomonas persica* sp. nov., and *Pseudomonas shirazica* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*. 42 (4): 468–480. DOI:10.1016/j.syapm.2019.04.004. ISSN 0723-2020

Kumar, Davender, Lalit Kumar, Sushil Nagar, Raina, Rajinder Parshad and Vijay K. Gupta. "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 (2012): 1763-1770.

Kurtzman, Cletus P. (2011), Kurtzman, Cletus P.; Fell, Jack W.; Boekhout, Teun (eds.), "Chapter 82 - *Yarrowia* van der Walt & von Arx (1980)", *The Yeasts* (Fifth Edition), London: Elsevier, pp. 927–929, ISBN 978-0-444-52149-1, DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00082-3>

Li, Ge, Menghui Zhao, Fei Xu, Bo Yang, Xiangyu Li, Xiangxue Meng, Lesheng Teng, Fengying Sun, and Youxin Li. 2020. "Synthesis and Biological Application of Polylactic Acid" *Molecules* 25, no. 21: 5023. <https://doi.org/10.3390/molecules25215023>

Nikfarjam, N., Ghomi, M., Agarwal, T., Hassanpour, M., Sharifi, E., Khorsandi, D., Ali, M., Rossi, F., Rossetti, A., Nazarzadeh, E., Rabiee, N., Afshar, D., Vosough, M., Kumar, T., Mattoli, V., Lichtfouse, E., Tay, F. R., Makvandi, P., *Antimicrobial Ionic Liquid-Based Materials for Biomedical Applications*. *Adv. Funct. Mater.* 2021, 31, 2104148. DOI: <https://doi.org/10.1002/adfm.202104148>

P.R. Yaashikaa, P. Senthil Kumar, S. Karishma, Review on biopolymers and composites – Evolving material as adsorbents in removal of environmental pollutants, *Environmental Research*, Volume 212, Part A, 2022, 113114, ISSN 0013-9351, <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113114>.

Papanikolaou S, Aggelis G (2010). "*Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids". *European Journal of Lipid Science and Technology*. 112 (6): 639–654. doi:10.1002/ejlt.200900197

Peter, S., Oberhettinger, P., Schuele, L. et al. Genomic characterisation of clinical and environmental *Pseudomonas putida* group strains and determination of their role in the transfer of antimicrobial resistance genes to *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Genomics* 18, 859 (2017). DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4216-2>

Radha, Siti & Babu, R.H. & Sridevi, A. & Prasad, N B L & Golla, Narasimha. (2012). Development of mutant fungal strains of *Aspergillus niger* for enhanced production of acid protease in submerged and solid state fermentation. *Eur. J. Exp. Biol.* 2. 1517-1528.

Rosenboom, JG., Langer, R. & Traverso, G. Bioplastics for a circular economy. *Nat Rev Mater* 7, 117–137 (2022). DOI: <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00407-8>

Samson RA, Houbraken J, Summerbell RC, Flannigan B, Miller JD (2001). Common and important species of fungi and actinomycetes in indoor environments. *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments*. CRC. pp. 287–292. DOI: <https://doi.org/10.1201/9780203302934>

Schiraldi, C., De Rosa, M. (2014). Mesophilic Organisms. In: Drioli, E., Giorno, L. (eds) *Encyclopedia of Membranes*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-40872-4_1610-2

Sheng Chen, Xing Tong, Ronald W. Woodard, Guocheng Du, Jing Wu, and Jian Chen. Identification and Characterization of Bacterial Cutinase. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 283, NO. 38, pp. 25854 –25862, September 19, 2008 DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M800848200>

Staiano M, Bazzicalupo P, Rossi M, D'Auria S (December 2005). "Glucose biosensors as models for the development of advanced protein-based biosensors". *Molecular BioSystems*. 1 (5–6): 354–362. DOI: 10.1039/b513385h

Tokiwa Y, Calabia BP. Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006 Sep;72(2):244-51. doi: 10.1007/s00253-006-0488-1. Epub 2006 Jul 6. PMID: 16823551.

Vijayaraghavan, Ponnuswamy; VINCENT, Samuel Gnana Prakash. A simple method for the detection of protease activity on agar plates using bromocresolgreen dye. *Journal of Biochemical Technology*, 2013, 4.3: 628-630.

Willey JM Sherwood L Woolverton CJ Prescott LM. Prescott Harley and Klein's Microbiology. 7th ed. New York: McGraw-Hill Higher Education; 2008.

Internetes források:

1. <https://ourworldindata.org/grapher/global-plastics-production?time=earliest..latest>
2. <https://2016.igem.org/Team:Evry/HP/Gobelets>
<https://static.igem.org/mediawiki/2016/b/b0/T--Evry--PLA80.jpg>
3. https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-polylactic-acid_fig1_322920139
4. INSPQ, <https://www.inspq.qc.ca/es/node/484>

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet

Szerzői nyilatkozat

Alulírott Oszlánszki Martin, BSc Biomérnöki szak, kijelentem, hogy a Politejsav-alapú bioműanyag evőeszköz biológiai bontásának vizsgálata mikrobiális konzorciumokkal című szakdolgozat a saját munkám eredménye. 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 záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

Budapest, 2023. 04. 26.

Oszlánszki Martin
a hallgató aláírása

NYILATKOZAT

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréséről és eredetiségéről

A szerző neve: Oszlánszki Martin

A dolgozat címe: Politejsav-alapú bioműanyag evőeszköz biológiai bontásának vizsgálata mikrobiális konzorciumokkal

A megjelenés éve: 2023

A tanszék neve: Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom.

A leadott dolgozat, mely védett, a szerző nevének vízjelével ellátott pdf dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a SZIE Budai Campus Igazgatóság Entz Ferenc Könyvtár és Levéltár szakdolgozat archívumába.

A dolgozat bibliográfiai leírása az Entz Ferenc Könyvtár és Levéltár elektronikus katalógusából érhető el: <http://opac.szie.hu/entzferenc/>. A teljes szöveg kizárólag a Budai Campus számítógépeiről tekinthető meg.

Tudomásul veszem, hogy a vízjel nélkül leadott dokumentum szerzői jogai sérülhetnek.

A Nyilatkozat a dolgozat adatainak megadásával érvényes, melyet az elektronikus hordozóval együtt leadok.

Budapest, 2023. 04. 26.



a szerző aláírása

KONZULTÁCIÓS NYILATKOZAT

Az Oszlászki Martin (hallgató Neptun azonosítója: G5HVQ7) 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 04. hó 26. nap



Belső konzulens
Kilin Ákos