



TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

2024. november 20.

Szervetlen nitrogénforrások hatása a *Scenedesmus obtusiusculus* édesvízi zöldalga izolátum bioaktív komponenseire

**Effect of inorganic nitrogen sources on bioactive components of freshwater
green algae isolate *Scenedesmus obtusiusculus***

Készítette: **Bilik Petra Bernadett**
UQMSHR
Biomérnök BSc.
nappali tagozat
Budai Campus

Témavezető: **Dr. Kohári-Farkas Csilla**
egyetemi adjunktus
Biomérnök és Erjedésipari Technológia Tanszék
Élelmiszertudományi és Technológiai Intézet
Budai Campus

Lehetséges OTDK szekció: Agrártudományi

**Budapest
2024.**

TARTALOMJEGYZÉK

1	BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK.....	1
2	IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	3
2.1	Általános leírás az algákról.....	3
2.2	Mikroalgák ipari alkalmazhatósága	4
2.3	Mikroalga reaktorok	7
2.4	Bioaktív alga-komponensek.....	8
2.4.1	Polifenolok és flavonoidok.....	10
2.4.2	Pigmentek.....	11
2.4.3	Fehérjék.....	12
3	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	15
3.1	Anyagok.....	15
3.1.1	Mikroalga törzs.....	15
3.1.2	Tápközegek	15
3.2	Módszerek	16
3.2.1	A mikroalga laboratóriumi tenyésztése	16
3.2.2	Algasejtszám meghatározása.....	16
3.2.3	Liofilizálás	17
3.2.4	Sejtfeltárási és extrakciós módszerek.....	17
3.2.5	Fehérjetartalom mérése (Bradford-módszer).....	0
3.2.6	Teljes polifenol tartalom meghatározása	2
3.2.7	Teljes flavonoid tartalom meghatározása	2
3.2.8	Antioxidáns aktivitás vizsgálata	3
3.2.9	Klorofill tartalom meghatározása	3
3.2.10	Statisztikai kísérlettervezés	3
4	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSŰK.....	5
4.1	Sejtfeltárási és extrakciós technikák vizsgálata.....	5
4.2	Mikrohullámmal közvetített szerves oldószeres extrakció hatékonyságának növelése	9
4.3	Néhány szervesetlen nitrogénforrás hatása a mikroalga tenyésztésére a bioaktív komponensek termelésére.....	14
4.4	Különböző KNO₃ koncentrációk hatása a bioaktív komponensek termelésére.....	18
5	ÖSSZEFOGLALÁS	21
6	IRODALOMJEGYZÉK	23

1 BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

A Föld jelenlegi erőforrásai végesek, és olyan új erőforrások szükségesek, amelyek nem szennyezik Földünket és mindennapjainkat hosszabb távon fenntarthatóvá teszik. A mikroalgák számos területen nyújthatnak segítséget ennek a célnak a megvalósításában. A mikroalgák sokoldalú felhasználhatósága a bennük található sok értékes komponens miatt lehetséges. Az intenzív algakutatásoknak köszönhetően ma már több iparág is széleskörűen alkalmaz néhány algafajt, mind az energetikai, az élelmiszeripari és takarmányozási, környezetvédelmi (bioremediáció), gyógyászati és kozmetikai ágazat, sőt akár biopolimerek előállításánál is hasznosíthatók. A magas lipid és szénhidrát tartalom megújuló energiaforrásokként a fosszilis energiahordozók kiváltására tesz alkalmassá egyes algafajokat. A bioenergetikai szerepük mellett szól, hogy karbonsemlegesek, tenyésztésük zárt rendszerekben könnyen és gyorsan kivitelezhető, ezáltal nagy mennyiségű értékes algabiomassza állítható elő rövid idő alatt. Az élelmiszeriparban az éhínség elleni küzdelemben és funkcionális élelmiszerek fejlesztésében a mikroalgákra szintén igen nagy figyelem irányult. A mikroalgákat jellemzően táplálékkiegészítőként hasznosítják a bennük rejlő mikrotápanyagok (polifenol, flavonoid, vitamin és ásványi anyagok) valamint makrotápanyagok (fehérje) miatt. A mikroalgák bioaktív komponensei, amelyek lehetnek elsődleges (poliszacharidok) és másodlagos metabolitok (polifenolok, flavonoidok, pigmentek) jellemzően az emberi szervezetre egészségre jótékony hatást (többek között gátolják a szabadgyökök képződését, gyulladáscsökkentő és antimikrobiális hatással rendelkezhetnek) fejtenek ki.

A TDK munkám során arra kerestem a választ, hogy a különböző sejtfeltárási és extrakciós technikák milyen hatással vannak az édesvízi *Scenedesmus obtusiusculus* zöldalga izolátum bioaktív komponenseinek kinyerésére, valamint a tenyésztés során különböző szervesetlen nitrogénforrások hogyan befolyásolják az algabiomassza hozamot és a bioaktív komponensek sejten belüli felhalmozódását. Kutatómunkám során az alábbi részfeladatokat tűztem ki célul:

1. Egylépéses szerves oldószeres és besugárzási technikákkal egybekötött szerves oldószeres sejtfeltárási és extrakció hatásának a vizsgálata.

- a. A kivonatok bioaktív komponenseinek összehasonlítása, a szerves oldószerek (víz, metanol, etanol, propanol) hatásának rangsorolása polifenol (TPC), flavonoid (TFC), pigment (klorofill-a és klorofill-b) tartalom, valamint antioxidáns kapacitás (DPPH gátlási %) alapján.

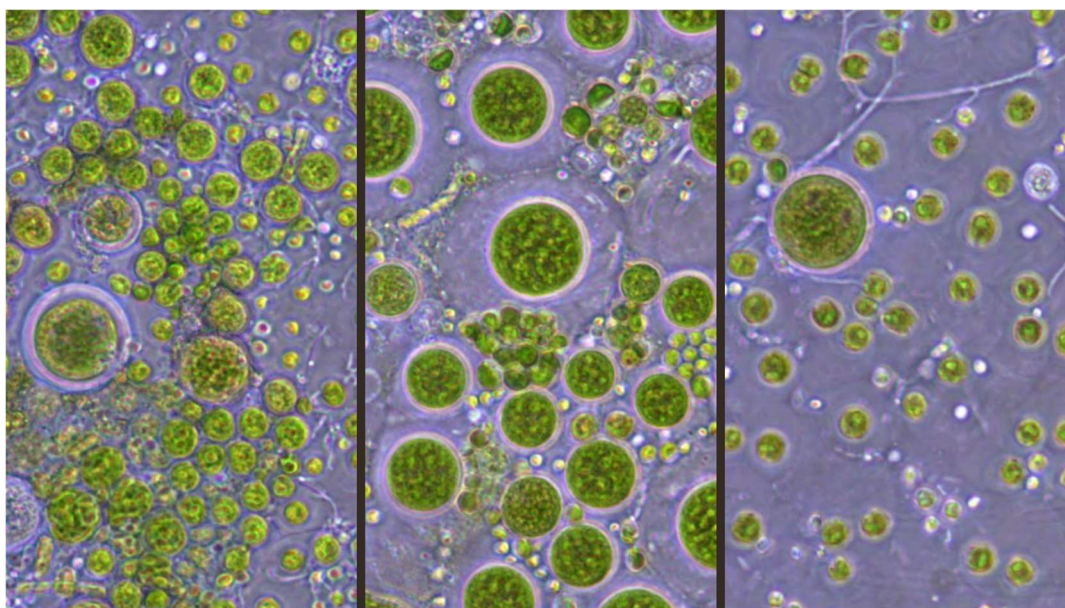
- b. A kivonatok bioaktív komponenseinek összehasonlítása, a besugárzásos technikákkal (ultrahang és mikrohullám) egybekötött szerves oldószeres kezelés hatásának rangsorolása polifenol (TPC), flavonoid (TFC), pigment (klorofill-a és klorofill-b) tartalom, antioxidáns kapacitás (DPPH gátlási %) alapján.
- 2. A mikrohullámmal egybekötött szerves oldószeres kezelés hatékonyságának fokozása, a bioaktív komponensek kinyerésének optimálása Box-Behnken (BB) statisztikai kísérlettervezéssel és válaszfelület analízissel.**
- 3. A különböző szervetlen nitrogénforrások (KNO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , NaNO_3) hatása a bioaktív komponensek termelésére.**
- 4. A KNO_3 koncentráció (0,5-5 g/l) hatása a bioaktív komponensek termelésére.**

A TDK kutatómunkámat a MATE Budai Campus, Élelmiszertudományi és Technológiai Intézetének Biomérnök és Erjedéssipari Technológia Tanszék Fermentációs Laboratóriumában végeztem.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

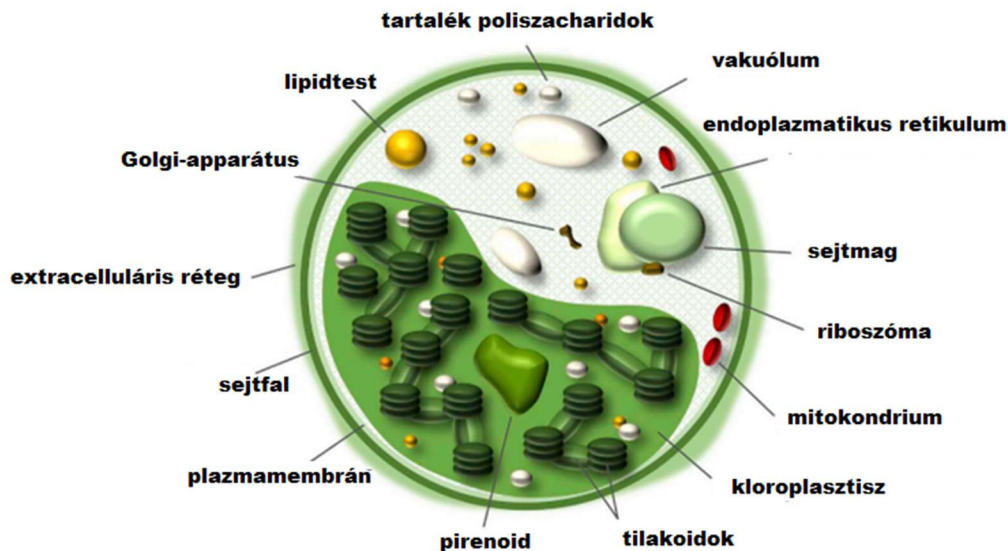
2.1 Általános leírás az algákról

Az algák megjelenése a Föld korai időszakára, mintegy 3,5 milliárd évvel ezelőttre tehető. Az óceánban élő kékeszöld algák (cianobaktériumok) jelentős mennyiségben termeltek oxigént, amelynek köszönhetően a légkörben lassan emelkedni kezdett az oxigénszint. Az oxigén jelenléte lehetővé tette az összetettebb életformák kialakulását (Kump 2008).



1. ábra: Mikroalgák fénymikroszkópos felvétele
(saját fénykép, Albitech Kft., Budapest)

Az algák nem alkotnak természetes, önálló rendszertani egységet. Az algák tartozhatnak a prokarióták (sejtmag nélküli egysejtűek, nem rendelkeznek jól differenciált sejtszervecskével - cianobaktériumok) és az eukarióták (sejtmaggal és sejtszervecskével rendelkeznek) közé is. A rendszerezésük történhet a testfelépítésük, a tartaléktápanyaguk, a szaporodásmódjuk, valamint a színanyaguk szerint. Méretük igen nagy változatosságot mutat, ugyanis lehetnek egysejtűek és többsejtűek, valamint mikroszkópikus méretűek és nagyobb, több méteres teleptest szerveződésűek is. A magasabb rendű élőlényektől eltérően a fejlettebb algák nem rendelkeznek igazi szövetekkel, továbbá nem rendelkeznek valódi gyökerekkel, szárakkal és levelekkel sem. Színüket tekintve megkülönböztetünk zöld (zöld moszatok), sárgás és aranybarna (sárgás moszatok, barnamoszatok), sőt vörös árnyalatúakat (vörös moszatok) is stb. Az algasejt általános felépítését az alábbi (2. ábra) szemlélteti.



2.ábra: Az algasejt általános felépítése (Bernaerts *et al.* 2019)

A fotoszintézis során a napfény energiájának segítségével vízből és szén-dioxidból anyagcserefolyamataik fenntartásához szükséges szénhidrát molekulákat (glükózt) állítanak elő. A fotoszintézis melléktermékeként oxigén keletkezik. A fotoszintézis a kloroplasztiszban (zöld színtestben) megy végbe (Chapman 2010).

Az algák jellemzően vízi organizmusok, azonban az élővilág szinte minden területén (ubikvisták), mind a kertben, a medencékben, a tavakban és tengerekben, jégfelületen, sivatagokban stb. is előfordulhatnak. Egyes algák szélsőséges környezeti körülményekhez is igen jól alkalmazkodnak (Getachew *et al.* 2020). Különleges tulajdonságuknak köszönhetően a környezeti stressz hatásokat inaktív állapotban (kiszáradástól védő burok védelme) vészelik át, amelyet követően az algasejtek ismételt aktiv szaporodási szakaszba tudnak lépni (Nayaka *et al.* 2017).

2.2 Mikroalgák ipari alkalmazhatósága

Napjainkban a mikroalgáknak sokféle, mintegy 200 000 faja ismert, azonban az ipari potenciáljukat csak töredéküknek tárták eddig fel (Andersen és Lewin 2024). Becslések alapján a Föld lakossága 2050-re elérheti a 10 milliárd főt, mindemellett a vízkészleteink és más energiaforrásaink csökkenése is szükségessé teszi, hogy átalakítsuk a mindennapjaink szerkezetét. Gazdasági szempontból az algák (az általuk termelt értékes komponenseknek köszönhetően) számos iparág fenntarthatóbb alapanyagforrásaként szolgálhatnak. Egyes algafajokat humán élelmiszerekben, állati takarmányokban, gyógyszerekben,

kozmetikumokban, sőt biopolimerek és bioüzemanyagok forrásaként is hasznosítani lehet. A mikroalgák hasznosítási lehetőségeinek kutatására és az algatermékek fejlesztésére, a gyártástechnológiák kidolgozására az Európai Unió egyre nagyobb energiát fektet be (Vigani *et al.* 2015).

Azon mikroalgák (mint például a *Haematococcus pluvialis*, *Chlorella vulgaris*, *Arthrospira platensis*, stb.), amelyek az Amerikai Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (FDA) állami fennhatósága alá tartozó GRAS (általánosan biztonságosnak ismert) státusz minősítéssel rendelkeznek, azok a forgalomba hozatalhoz szükséges feltételek figyelembevételével biztonságosnak tekinthetők (Molino *et al.* 2018; Ammar *et al.* 2020). Az algák a piacon már megtalálhatóak szilárd és folyékony halmazállapotban, továbbá a mindennapos étkezések kiegészítőiként vagy helyettesítőként cukorkákban, gumicukrokban, sütőipari termékekben, továbbá üdítőkben és alkoholt tartalmazó italokban is (Pulz és Gross 2004; Ramaraj *et al.* 2019). A mikroalga-biomasszával, mint új élelmiszer-összetevővel dúsított funkcionális élelmiszerek egyre népszerűbbek, ráadásul ezek a termékek érzékszervileg is igen kedvezőnek és változatosnak bizonyulnak, mindemellett fogyasztásuk egészségügyi előnyökkel - többek között magas vitamin, nyomelem és fehérjetartalom (valamennyi esszenciális aminosavat tartalmazzák) stb.- is jár. Az alga-alapú készítmények azok számára is beilleszthető a táplálkozásba, akik vegetáriánus vagy növényi alapú étrendet követnek (van Vliet *et al.* 2015). A mikroalgák fehérjetartalmának élelmezési és takarmányozási célú hasznosítása már az 1950-es évektől kezdetét vette, elsőként Ázsiában, majd később az Amerikai Egyesült Államokban, Ausztráliában, Izraelben és Indiában is (Vigani *et al.* 2015). A szív- és érrendszeri betegségek ma már civilizációs problémának számítanak, amelynek kiváltó oka a magas kalória tartalmú ételek fogyasztásában és a rendszertelen életvitelben (testmozgás hiányában) keresendő (Ramaraj *et al.* 2019). Az egészséges táplálkozás során szükség van a megfelelő energiabevitelen túl vitaminokra (riboflavin, tiamin, kobalamin, retinol, tokoferol, aszkorbinsav stb.), antioxidánsokra (polifenolok, flavonoidok) és többszörösen telítetlen zsírsavakra (PUFA) is. A mikroalga készítmények a tápanyagok pótlására kiváló lehetőséget nyújthatnak (Becker 2013; Ramaraj *et al.* 2019). A kereskedelmi forgalomban elérhető termékek körében említhetők a *Spirulina* és a *Chlorella* készítmények (Andersen és Lewin 2024). A magas tápanyagtartalmú étrendkiegészítők előállítására terén a Kínában található Hainan Simai Pharmacy Co. vállalat tevékenysége igen kiemelkedő, ugyanis évente 3.000 tonna mennyiségű *Spirulina* alapú terméket (kivonat, por, tabletta, italok, sütőipari termékek formájában) gyártanak le (Viskari és Colyer 2003; Pulz és Gross 2004; Spolaore *et al.* 2006; Khatoon és Pal 2015). Egy 2019-es

tanulmányban az Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Világszervezet (FAO) a mikroalga termékek statisztikai adatait összegezte, amelyben láthatóvá vált, hogy a mikroalgák iránti igény lényegesen növekedett. A becslések alapján napjainkban több mint 10^7 tonna algát takarítanak be évente a világ nagyvállalatai különböző célokkal. Egy 2021-es becslés alapján a mikroalga-alapú árucikkek szektora 2028-ra akár elérheti a 2,811 millió USD-t (Globenewswire, 2021, Nagappan *et al.* (2021). A mikroalgák a vízi és szárazföldi állatok (mint halak, sertések stb.) takarmányaként, valamint takarmánykiegészítőként is szolgálhatnak (Benemann 1992; Khatoon és Pal 2015).

A mikroalgákat az oxidatív stresszel szembeni védelem és a kollagén szintézisben betöltött szerepük miatt a kozmetikai iparban is alkalmazzák (Stolz és Obermayer 2005).

A mikroalgák a szennyezett vizekben öntisztító folyamatot indítanak el. A mikroalgák ezen tulajdonsága vizeink kármentesítésére, mint például nehézfémek akkumulálására is hasznosítható (Han *et al.* 2019). A szennyvizek kezelése, tisztítása igen nagy költségű folyamat, ami a mikroalgák segítségével fenntarthatóbbá és környezetkímélőbbé tehető (Peter *et al.* 2021).

Az ipari termelési folyamatok során a légkörbe kibocsájtott szén-dioxid és egyéb gázok nagymértékben hozzájárulnak az üvegházhatás és következményeinek (szélsőséges időjárási viszonyok, élővilág biodiverzitásának csökkenés stb.) erősödéséért. A bioenergetikai termékek generációinál az első generáció alapanyagforrásai a mezőgazdasági kultúrnövények (cukrokban és keményítőben gazdagok), a második generáció alapanyagforrása a lignocellulóz biomassa, míg a harmadik generáció alapanyagforrásai közé jellemzően az algák tartoznak (Alalwan *et al.* 2019). A megújuló energiaforrások körében a mikroalgák igen nagy alapanyag potenciált (bioetanol, biodízel, biogáz, bioolaj, biohidrogén stb.) mutatnak (Khan *et al.* 2018; Raheem *et al.* 2018). Az algák bioenergetikai szerepét a szénhidrát és lipid tartalmuk határozza meg (Getachew *et al.* 2020). Az újabb generációs termékeknel genetikailag manipulált termelő szervezeteket (baktériumokat, algákat, stb.) alkalmaznak (Chowdhury és Loganathan 2019; Yap *et al.* 2021).

2.3 Mikroalga reaktorok

A mikroalgák tenyésztése történhet nyitott (medencés) és zárt (fotobioreaktor) rendszerben (Singh és Sharma 2012). A nyitott rendszerek előnye, hogy könnyen kezelhetők és alacsony költségűek, viszont a levegőből könnyen kontaminációba kerülhet a mikroalga más nem kívánt mikroorganizmusokkal. A zárt rendszerű bioreaktorok, mint például az oszlopos, lapos- lemezes, csöves kialakításúak használatával a technológiai paraméterek (mint pH, hőmérséklet, oldott oxigénszint, fényintenzitás, szén-dioxid mennyisége, stb.) szabályozhatóbbak, ezáltal nagyobb hozamok és magasabb minőségű algabiomassza állítható elő (Carvalho *et al.* 2006; Ugwu *et al.* 2008; Chang *et al.* 2017). Napjainkban a fotobioreaktorok alkalmazása terjedt el. Lényegesen kevesebb idő alatt és kisebb helyigény mellett hatékony és gazdaságos termelés érhető el (Carvalho *et al.* 2014).



3. ábra: Laboratóriumi fotobioreaktor (bal) és paneles kialakítású fotobioreaktor (jobb)
(saját fénykép, Albitech Kft., Budapest)

A fotobioreaktorok anyaga lehet üveg, rozsdamentes acél, valamint jó optikai tulajdonságokkal, hő- és ütésállóképességgel rendelkező műanyag (polikarbonát) is. A reaktor funkciója, mindamelllett, hogy ideális körülményeket biztosítson a mikroalga szaporodásának, a fényforrást, amennyiben külső megvilágítás kerül alkalmazásra, a reaktor anyaga kellően engedje át. A reaktor fejlesztések körében ismertek belső megvilágításúak is (Daneshvar *et al.* 2021). A fotobioreaktorok körében elterjedtek a paneles kialakításúak. A 3. ábra egy vízszintes elhelyezkedésű, plexiből készült négy elemes panel elrendezés egy egységét szemlélteti. A nagy felületet a LED fénypanel egységesen tudja megvilágítani, ezáltal nagyobb biomassza termelés érhető el (Hu *et al.* 1998; Gupta *et al.* 2015). A mikroalga tenyészet mozgatása,

kevertetésének sebessége, az alulról bevezetett oxigén áramlása egy rotaméterrel kerülhet szabályozásra (Albitech Kft., 2024).

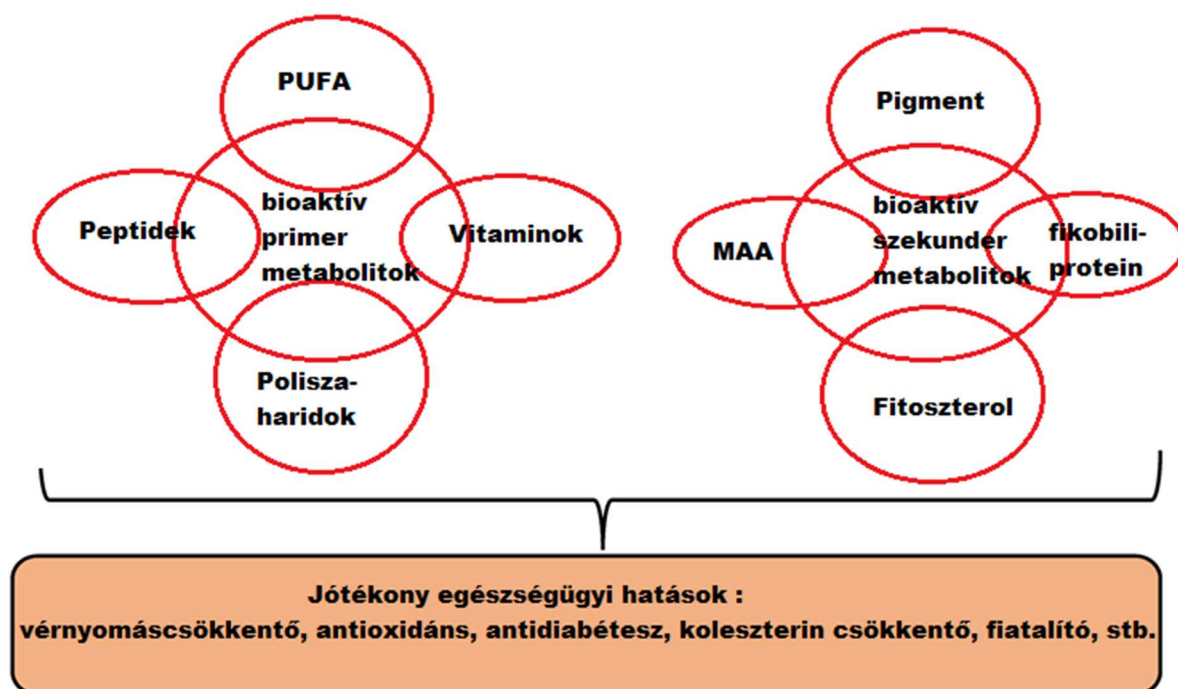
A hibrid bioreaktorok kialakítása során ötvözik a nyílt és zárt reaktorok előnyeit. Ennek a célja a gyártási költségek további csökkentése és az algabiomassza hozam növelése. A hibrid rendszereket elsősorban szennyvizek tisztításánál, modern hulladékkezelésnél alkalmazzák (Bhatia *et al.* 2021).

Az alga tenyésztés során a szakaszos technika mellett még gyakran alkalmaznak rátáplálós technikát. A rátáplálós fermentáció előnye, hogy elkerülhető a szubsztrátum gátlás, és a tápanyag szint optimális koncentrációban tartható. A mikroalgák növekedésére számos technológiai tényező fejt ki lényegi hatást, amelyek optimalásával létrehozhatjuk a kívánt tenyésztési és termékképzési környezetet. A fotoautotróf és fotoheterotróf tenyésztésnél energiaforrásként elengedhetetlen az algareaktorok mesterséges megvilágítása, a megfelelő fénymennyiség biztosítása. A fotoheterotróf mikroalgák fény jelenlétében, míg a heterotróf mikroalgák fény igény nélkül képesek a szerves szénforrást hasznosítani. Szénforrásként elterjedt a könnyen hasznosítható glükóz alkalmazása, amely mellett még gyakori a glicerín, a nátrium-acetát (szennyvíz modellközegek szubsztrátuma), az ecetsav és egyéb savaknak, alkoholoknak, ipari maradványoknak, melléktermékeknek a használata is. A szénforrások mellett a szerves és szervetlen nitrogénforrások, foszfor- és kénforrások, valamint ásványi anyagok, nyomelemek is hatást fejthetnek ki a mikroalgák tenyésztésére. A környezet kémhatása lúgos tartományban, a hőmérséklet pedig 15-25 °C között kedvezőbb (Gonçalves *et al.* 2016).

2.4 Bioaktív alga-komponensek

A mikroalgák beltartalmi sajátosságai körében a bioaktív anyagtartalmukra irányuló kutatások egyre nagyobb figyelemben részesülnek. A mikroalgák sokféleségüknek köszönhetően bioaktív anyagokban igen gazdag szervezetek. A növényekkel szembeni előnyük, hogy a sejtfal szerkezet kevésbé összetett, ezért az algabiomassza készítmények könnyen emészthetők és a bioaktív anyagok is könnyebben hozzáférhetők. Ampofo és Abbey (2022) tanulmányában is leírásra kerül, hogy a bioaktív anyagok két csoportba, az elsődleges és a másodlagos anyagcseretermékek körébe sorolhatók. Az elsődleges anyagcseretermékek közvetlenül részt vesznek az algasejtek életfolyamataiban, míg a másodlagos metabolitok a biológiai funkciókban közvetlenül nem vesznek részt. A bioaktív anyagok hozzájárulhatnak az

emberi szervezet egészségének megőrzéséhez, továbbá betegségek etiológia (ok-okozati) mechanizmusainak szabályozásában.



4. ábra: Az elsődleges és másodlagos bioaktív anyagok (Ampofo és Abbey 2022)

A mikroalgákból izolált bioaktív anyagok ma már számos alapvető és fontos területen hasznosításra kerülnek. Az alga-termékekben található vitaminok (A, B, C, E), lipidek és zsírsavak, fehérjék, karotinoidok (β -karotin, lutein, astaxantin, stb.), klorofilok, pigment-fehérje komplexek (fikocianin, fikoeritrin, stb.), polifenolok és a poliszacharidok számos lehetséges gyógyászati alkalmazásban, mint az Alzheimer-kór, a HIV és SARS-CoV-2 kezelésében jótékony hatást fejtenek ki (Ramaraj *et al.* 2019). A zsírsavak (omega-3 és omega-6) részt vesznek az agy, a szív- és érrendszer egészségének fenntartásában, emellett a vércukor szint szabályozásában, ami segít a cukorbetegség kialakulásának kockázatát csökkenteni (Buckley *et al.* 2017; Ferreira *et al.* 2019). Az édesvízi *Scenedesmus* mikroalga által termelt zeaxanthin esetén kimutatásra került, hogy a kék fény okozta sugárzástól védi a retinát, továbbá a degeneratív szembetegségek kialakulását is csökkenti (Ravi *et al.* 2014; Ampofo és Abbey 2022). A bioaktív fehérjék és peptidek többek között a vérnyomás csökkentésében is részt vesznek (Ko *et al.* 2012). Az antioxidáns hatású anyagok a környezeti behatásokra (mint ultraibolya sugárzás, lég- és vízszennyezés, stb.) keletkező oxidatív stressz okozta szabadgyökök keletkezését akadályozzák, ezáltal a sejteknek bizonyos mértékben védelmet biztosítanak (Dai és Mumper 2010). Az antioxidánsok természetes gyulladáscsökkentő és

antimikrobiális hatású alternatívát nyújthatnak a gyógyászatban, a kozmetikában, az élelmiszeriparban stb. (Matsui *et al.* 2003; Fu *et al.* 2017).

2.4.1 Polifenolok és flavonoidok

A mikroalgák olyan típusú antioxidáns hatású vegyületeket képesek exogén módon (ex-situ) szintetizálni, amelyeket az emberi szervezet nem képes endogén módon előállítani, viszont igen fontos szerepet töltenek be az egészség védelmében (Koyande *et al.* 2019). A szintetikus antioxidánsokat, mint a butil-hidroxi-toluol (BHT) és a butil-hidroxi-anizol (BHA) – elsősorban élelmiszerekben alkalmazzák az oxigén hatására fellépő szín- és ízromlás (mint avasodás folyamat) gátlására - ma már egyre nagyobb mértékben természetes forrásokból származó antioxidánsokkal helyettesítenek (Goiris *et al.* 2012).

A fenolok vagy polifenolok olyan másodlagos anyagcseretermékek, amelyekben a hidroxilcsoport (—OH-csoport) az aromás gyűrű szénatomjához kapcsolódik (Dai és Mumper 2010). A fenolos vegyületek elsősorban két csoportba sorolhatók, ezek a fenolsavak (mint a gallusz-, catechin-, kávé-, klorogén-, vanillin-, szalicilsav, stb.) és a flavonoidok (flavonolok, flavanonok, izoflavonok, dihidrokalkonok, antociánok) (D'Archivio *et al.* 2007; Goiris *et al.* 2012). A fenolsavakat (fenol-karbonsavak) a karboxilcsoportot (—COOH-csoport) tartalmazó lánc hossza alapján osztályozzák, és ennek alapján azokat hidroxibenzoésavakra és hidroxifahéjsavakra osztják. A flavonoidok a legnagyobb mennyiségben előforduló fenolos vegyületek, szerkezetükben a két aromás fenilgyűrű heterociklusos pirángyűrűn keresztül kapcsolódik (D'Archivio *et al.* 2007).

1.táblázat: Néhány mikroalga antioxidáns tartalmú vegyületei

Mikroalga fajok	Fenolos vegyületek	Források
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	fukoxantin, galluszsav	Foo <i>et al.</i> 2017
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	galluszsav, epigallokatechin	Machu <i>et al.</i> 2015
<i>Eisenia bicyclis</i>	epikatechin, catechin, galluszsav	Machu <i>et al.</i> 2015
<i>Haematococcus pluvialis</i>	astaxanthin	Goiris <i>et al.</i> 2012
<i>Isochrysis galbana</i>	fukoxantin, galluszsav	Foo <i>et al.</i> 2017
<i>Nannochloris sp.</i>	catechin, dimetoxiflavon, kaempferol	Haoujar <i>et al.</i> 2019
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	protokatechinsav, kávésav, kvercetin, feruloil-glukársav	Haoujar <i>et al.</i> 2019
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	kávésav, dimetoxiflavon, protokatekin sav,	Haoujar <i>et al.</i> 2019

<i>Porphyra tenera</i>	galluszsav, katechin, epikatechin, flavonoidok	Machu <i>et al.</i> 2015
<i>Halimeda monile</i>	kávésav, fahéjsav, galluszsav	del Mondo <i>et al.</i> 2021
<i>Spirulina platensis</i>	katechin, epikatechin, pirokatechin	Machu <i>et al.</i> 2015
<i>Tetraselmis suecica</i>	kávésav, dimetoxiflavon, p-kumaril-tirozin, apigenin-O-rutinozid	Haoujar <i>et al.</i> 2019
<i>Undaria pinnatifida</i>	epikatechin, katechin, epigallokatechin	Machu <i>et al.</i> 2015

Az algasejtekben az antioxidáns hatású vegyületek jellemzően stressz hatására (mint például tápanyagmegvonás) halmozódnak fel nagyobb mennyiségben. A természetes élőhelyeiken a mikroalgák fenolos vegyületeinek koncentrációja így az évszaktól, az élőhelytől, továbbá az UV-sugárzástól, a fénymennyiségtől, a tápanyagok elérhetőségétől, sótartalomtól nagyban függ (D'Archivio *et al.* 2007; Machu *et al.* 2015).

2.4.2 Pigmentek

A mikroalgák színei a kloroplasztiszban termelt pigmenteknek, úgy mint a klorofiloknak (zöld), karotinoidoknak (sárga és piros), fikobiliproteineknek (piros és kék) köszönhető (Mulders *et al.* 2014; Koller *et al.* 2014; Begum *et al.* 2016).

A **klorofillok** (görög eredet, *chloros* zöld és *phyllon* levél) a kloroplasztiszban található zöld pigmentek. A kék és a vörös tartományban erőteljes a pigmentek elnyelése, ezért zöld árnyalatúak. A fotoszintézis fotoreceptoraként működnek, a fényforrás energiáját elnyelik és kémiai energiává alakítják át. Szerkezetük fő részét a porfirinváz alkotja, és ennek a gyűrűs szerkezetnek (tetrapirrol gyűrű) a központjában egy magnézium atom helyezkedik el, amelyhez további négy nitrogén atom kötődik (Begum *et al.* 2016). A klorofill négyféle formában van jelen a természetben: klorofill-a (kékeszöld), klorofill-b (sárgászöld), klorofill-c és klorofill-d. A klorofill-c kizárólag barna algákban van jelen. Az algákban jellemzően a klorofill-a háromszor nagyobb mennyiségben van jelen, mint a klorofill-b (Ampofo és Abbey 2022).

2.táblázat: A klorofill pigmentek közti különbségek (Dunne 1999; Begum *et al.* 2016).

Pigment típusa	Oldallánc különbségei	Abszorbancia
Klorofill- a	metil- csoport (-CH ₃)	420-437 [nm]
Klorofill- b	formil- csoport (HCHO)	453-470 [nm]
Klorofill- c	nincs fitol-lánc	443-453 [nm]

A klorofill pigmentek kémiai szerkezetükben eltéréseket mutatnak. A funkciós csoportok hatására funkciójukban különböznek egymástól, továbbá fényelnyelésük is különböző hullámhosszon található (2. táblázat). A klorofill-a és klorofill-b erősen lipofil (zsiroidékony) természetű a porfirin gyűrűhöz kapcsolódó hidrofób fitol-oldallánc miatt (Humphrey 2004; Mulders *et al.* 2014). A klorofill-c és klorofill-d a fitol-oldallánc hiánya és a polárosabb telítetlen oldallancok miatt kevésbé lipofilek, inkább vízben oldódnak (Becker 2013).

A **karotinoidok** izoprén egységekből felépülő terpenoid vegyületek, 40 szénatomos vázszerkezettel rendelkeznek, a szerkezetükben több kettős kötés is található. A kettős kötések a fényelnyelés szempontjából is kulcsfontosságúak (Matos 2017). A karotinoidokat szén- és hidrogénatomokból álló karotinok, és oxigénatomokat tartalmazó xantofilok alkotják (Hu *et al.* 2018). A karotinoidok a mikroalgáknak védelmet biztosítanak a környezeti hatásokkal (UV-sugárzás) és a képződő instabil molekulák (ROS) kialakulásával szemben (Pangestuti és Kim 2011; Koller *et al.* 2014)

A fikobiliproteinek a fikobiliszómákban elhelyezkedő vízzoldékony fehérjék, amelyek a fikobilinekkel együtt **pigment-fehérje komplexet** alkotnak (Mulders *et al.* 2014). A rendezett struktúrájú fikobiliszómákban különböző fényelnyelésű fikobilinek fordulnak elő: a fikoeritrinek (vörös), a fikocianinek (kék), az allofikocianinok (zöld és kék) és a fikoeritrocianinek (narancsárga), amelyek az elnyelt fény energiáját az elsődleges pigmenteknek, a klorofilloknak adják át (Glazer 1989; Basheva *et al.* 2018). A fényelnyelési spektrum különbözőségét a polipeptidláncok kötőhelyeinek eltérő kémiai természete okozza. A pigment-fehérje komplexek nagyobb mértékben a vörösalgákban és cianobaktériumokban találhatók (Begum *et al.* 2016; Ampofo és Abbey 2022).

2.4.3 Fehérjék

A fehérjék építőelemei az aminosavak (esszenciális és nem esszenciális), amelyek peptidkötésekkel kapcsolódnak össze és alakítanak ki polipeptidláncot. A fehérjék szerkezete

(elsődleges, másodlagos, harmadlagos és negyedleges) határozza meg a funkciójukat és biológiai aktivitásukat. A mikroalgákból kinyerhető fehérjék, a sejtben kívülről befelé haladva, tehát a sejtfaltól a sejtmagig mindenhol megtalálhatók. A fehérjék szerepet töltenek be az algasejtek működésében, a biológiai információk hordozásában, az anyagcserefolyamatok irányításában, a transzportfolyamatokban, stb. (Amorim *et al.* 2021).

A mikroalgák rendkívül gazdag fehérjeforrások. A fehérjetartalom az össztömeg 40-70 százalékát is elérheti és akár 40-60 százalékban tartalmazhatnak esszenciális aminosavakat (mint lizin, leucin, izoleucin, valin és triptofán) (Eilam *et al.* 2023). A mikroalga fehérjék jól emészthetőek, magas tápértékkel rendelkeznek és aminosav-mintázatuk igen nagy hasonlóságot mutat számos élelmiszer fehérje-mintázatához. Az egyes mikroalgák azonban (mint a *Chlorella*, a *Spirulina* és a *Nannochloropsis*) évente 2,5-7,5 tonna/hektár fehérjét is termelhetnek, ami igen magas termelési hozam, más fehérjében gazdag állati és növényi fehérjeforrásokhoz (pl. tojás, hús, tej, szójabab, lencse stb.) képest (Ahmad *et al.* 2022).

Az alga-fehérjék kinyerésénél, mint minden más intracelluláris (vagy sejtmembránhoz rögzített formában található) értékes metabolit esetén a sejtek feltárása és a termék extrahálása többlépéses technológiai folyamatot igényel. Az édesvízi *Scenedesmus* mikroalgákra jellemző, hogy vastag, szénhidrát alapú hemicellulózban gazdag sejtfallal rendelkeznek, amely rendkívül ellenálló a külső hatásokkal szemben. A sejtfeltárás körében ismertek mechanikai (homogenizátor, gyöngymalom, besugárzás - ultrahang és mikrohullám, termolízis), nem mechanikai módszerek (enzimes, kémiai), valamint a kedvező tulajdonságokat egyesítő kombinált (kettő vagy annál több módszer) technikák. Általánosan elmondható, hogy a faji jellegek miatt, továbbá a tenyésztési körülmények is befolyásolják a sejtfal vastagságot, így univerzális sejtfeltérési módszert nem lehet alkalmazni (Günerken *et al.* 2015; Amorim *et al.* 2021) (3. táblázat). A mikroalgák fehérjetartalmának kinyerésére irányuló kutatások körében többek között a hőkezelés, az ultrahangos kezelés (szonikálás) és a mikrohullámmal történő kezelés bizonyult eredményesnek.

A sejtfeltérési technikák megválasztása során minden esetben az értékes anyagok biológiai értékének megtartását és a megfelelő kinyerési hatékonysága elérését szükséges szem előtt tartanunk.

3.táblázat: Néhány mikroalga faj esetén tanulmányozott fehérje kinyerési módszer

Mikroalga faj	Fehérjetartalom (% szárazanyagban)	Sejtfeltárási technika	Forrás
<i>Chlorella protothecoides</i>	90,0	hőkezelés	Soto-Sierra <i>et al.</i> 2018
<i>Chlorella sp.</i>	31,4	levegőn szárítás	Chronakis és Madsen 2011
<i>Haematococcus pluvialis</i>	10,0	ultrahangos kezelés	Coustets <i>et al.</i> 2015
<i>Nannochloropsis gadicana</i>	35,0	enzimes sejtfalbontás	Safi <i>et al.</i> 2017
<i>Nannochloropsis gadicana</i>	50,0	gyöngymalom	Safi <i>et al.</i> 2017
<i>Nannochloropsis sp.</i>	20,0–50,0	ultrahangos kezelés	Soto-Sierra <i>et al.</i> 2018
<i>Scenedesmus obliquus</i>	67,3	dobszárítás	Chronakis és Madsen 2011
<i>Scenedesmus obliquus</i>	70,0	gyöngymalom	Soto-Sierra <i>et al.</i> 2018
<i>Spirulina sp.</i>	65,0	fagyasztva szárítás	Chronakis és Madsen 2011

A sejtfal bontását követően a fehérjék elválasztása, koncentrációja és tisztítása történhet durva fehérje kicsapással (mint ammónium-szulfáttal), kromatográfiás technikákkal, fagyasztva szárítással (liofilizálás) is, a fehérje tisztaságának ellenőrzése, fiziko-kémiai tulajdonságainak vizsgálata (molekulaméret, izoelektromos pont) pedig gélelektroforézissel alkalmazásával (Day 2007; Gerde *et al.* 2012).

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Anyagok

3.1.1 Mikroalga törzs

A kutatásomhoz az édesvízi *Scenedesmus obtusiusculus* zöldalga izolátumot a MATE Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézete (Gödöllő) biztosította.

3.1.2 Tápközegek

A mikroalga tenyésztése és a szervesetlen nitrogénforrások hatásvizsgálata BG-11 ásványi oldatban történt. A szervesetlen természetű tápoldat összetételét az alábbi 4. táblázat szemlélteti.

4. táblázat: BG-11 ásványi oldat összetétele

Komponens	[mg]
KH ₂ PO ₄	40
CaCl ₂ * 2H ₂ O	36
MgSO ₄ * 7H ₂ O	75
ammónium-vas (III)-citrát	6
citromsav-monohidrát	6
Na ₂ EDTA	1
Na ₂ CO ₃	20
mikroelem (A5) oldat	1 ml
desztillált víz	1000 ml
Mikroelem (A5) törzsoldat	[mg]
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	222
MnCl ₂ * 4H ₂ O	1810
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	390
CuSO ₄ * 5H ₂ O	80
Co (NO ₃) ₂ * 6H ₂ O	49,4
H ₃ BO ₃	2860
desztillált víz	1000 ml

A tápoldatok kémhatását pH= 7- re 0,1 n NaOH segítségével állítottam be. A tápoldatokat 500 ml-es Erlenmeyer lombikokban, lombikonként 300 ml-ként osztottam szét. A

lombikok száját vattadugóval és fóliával zártam le. A sterilizálás 121 °C-on, 15 percen keresztül történt autoklávban. A szerves nitrogénforrások körében a NaNO_3 , a KNO_3 , a NH_4NO_3 , az $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ és a NH_4Cl hatását 1,5 g/l koncentrációban követtem nyomon. A nitrogénforrásokat az algasejtek szaporodására és bioaktív komponensekre kifejtett hatásuk alapján rangsoroltam és a kiemelkedő nitrogénforrást csökkentett (0,5 g/l és 1 g/l) és növelt (2,5 g/l és 5 g/l) mennyiségben is teszteltem.

3.2 Módszerek

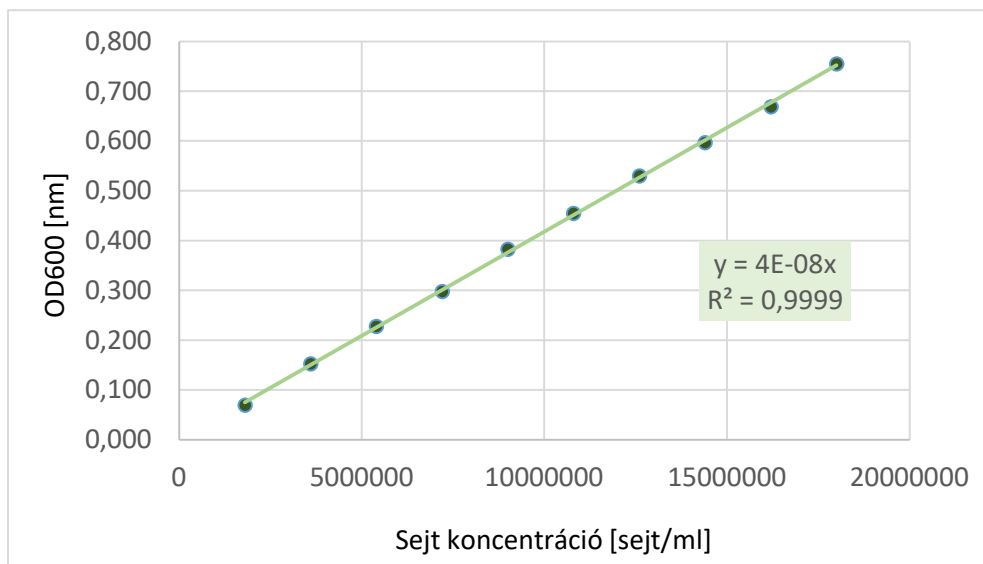
3.2.1 A mikroalga laboratóriumi tenyésztése

A *Scenedesmus obtusiusculus* izolátum tenyésztése laboratóriumi léptékben, különböző nitrogénforrást tartalmazó BG-11 tápoldatba történt. Az aerob fermentációt minden esetben körülbelül 10^7 sejt/ml sejtkoncentrációról indítottam el. A tápoldat leoltása steril körülmények között, lamináris fülke alatt történt. A tenyésztés állandó megvilágítás (1400 lumen, meleg fehér fényű LED lámpa) mellett, szakaszos rázatással, szobahőmérsékleten 14, 28 és 56 napon át tartott. A mintavételt időközönként (3-4 naponta) lamináris fülke alatt végeztem. A mintáknál a sejtszám időbeni alakulását követtem nyomon. A tenyésztési ciklusokat követően az algabiomasszát 10 000 fordulat/perc sebességen 10 percen át centrifugáltam és mivel a nedves algabiomasszában visszamaradnak tápoldat komponensek, amelyek az értékes alga-metabolitok mérésének pontosságát rontják, ezért a tápoldat komponensek maradéktalan eltávolítását az algabiomassza desztillált vízzel történő többszöri átmosásával és centrifugálásával biztosítottam. A nedves algabiomasszát az utolsó mosási lépést követően kevés desztillált vízzel (10-15 ml) elegyítettem és 50 ml-es Falcon csövekben osztottam szét. Az alga szuszpenziókat fagyasztottam és a liofilizálást megelőzően -18 °C-on tároltam.

3.2.2 Algasejtszám meghatározása

A mikroalga sejtszám mérése Bürker-kamrás módszerrel, fénymikroszkóp 40-szeres objektíve alatt, valamint optikai denzitás (sejttömeg) méréssel, spektrofotometriás úton, 600 nm hullámhosszon történt.

A sejtszám és az optikai denzitás közötti összefüggésre kalibrációt készítettem. Az algaszuszpenzió hígítási tagjainak sejtszámát (sejt/ml) és a hozzájuk tartozó mért abszorbancia értékeket ábrázoltam és a pontokra lineáris trendvonalat illesztettem. A felállított kalibrációt az alábbi 5. ábra szemlélteti.



5. ábra: Az algasejtszám és OD₆₀₀ közötti összefüggés

3.2.3 Liofilizálás

Az értékes alga-metabolitok minőségi és mennyiségi vizsgálatát minden esetben víztelenített (fagyasztva szárított), száraz algabiomassán végeztem el. A liofilizálás -18 °C-on történt, fagyasztott algabiomassán történt. Az alga biomassza liofilizálásánál a Christ Alpha LSC Plus (Martin Christ GmbH, Németország) típusú berendezést használtam. A szárítókamra hőmérséklete 18 °C volt. A fagyasztott algabiomassza kíméletes szárítása vákuummal (0,25 mbar) történt. A fagyasztva szárítás ideje, a minta mennyiségétől függően, esetemben 48 órát igényelt.

3.2.4 Sejtfeltárási és extrakciós módszerek

Az édesvízi zöldalga izolátumok bioaktív anyagait (fehérje, polifenol és flavonoid, pigment) szerves oldószeres, valamint mikrohullámmal vagy ultrahanggal közvetített (besugárzásos) szerves oldószeres módszerrel vizsgáltam.

Az értékes anyagok kinyerése során az alábbi 5. és 6. táblázatban összegzett technikákat alkalmaztam. A szerves oldószeres körében a korábbi tanszéki kutatásoknál is eredményesnek bizonyuló metanol és etanol (Kotz 2023) mellett a propanol hatását is teszteltem. A metanolt, etanolt és propanolt vizes oldatokként (a szerves oldószer és a víz aránya 1:1 és 3:1) alkalmaztam. A liofilizátumokból analitikai mérlegen 5 mg mennyiségeket mértem ki Eppendorf csövekbe és azokat adott szerves oldószer 500 µl vizes oldatában szuszpendáltam. Az Eppendorf csöveket, annak érdekében, hogy a kezelések során ne nyíljanak ki és ne lépjen fel párolgási veszteség, parafilmmel zártam le. A mintákat összeráztam és az egylépéses

technikák esetében azokat 15 percen át jégágyon tároltam. A kombinált technikák esetében az előkészített mintákat jégágyba helyeztem és besugárzásnak vettem alá. A mikrohullámú kezelés 270 W, 630 W és 1000 W teljesítményen, szerves oldószer jelenlétében 2, 4 és 6 percen át tartott. Az ultrahangos kezelés (Cole-Palmer 8890) 47kHz frekvencián 15 percen át történt. A kezelések alatt törekedni kellett arra, hogy az értékes anyagok biológiai aktivitásukat megtartsák, ezért szükség esetén az elolvadt jeget cseréltem.

A mikrohullámú és ultrahangos kezelés során a termikus (hő) hatás helyett (a hőmérséklet emelkedése a bioaktív komponensek részbeni inaktiválódását is okozná) a nem termikus hatások kerültek előtérbe. A mikrohullámú kezelésnél az elektromágneses sugárzás hatással van a sejtekre, elsősorban a sejtmembránokra, amely a sejtek feltárását segítheti (Günerken *et al.* 2015). Az ultrahang hullámokkal besugárzott algaszuszpenziókban kialakuló nem termikus folyamatok között igen fontos szerepet tölt be a kavitáció, ami során a keletkező apró gázbuborékok gyorsan összeomlanak, így egy nagy energiájú lökeshullám alakul ki. A kavitáció a nyomás emelkedést és ennek hatására a sejtfallszerkezet károsodását eredményezi (Günerken *et al.* 2015).

5.táblázat: A szerves oldószerek és besugárzásos technikák hatásvizsgálata

Mintakód	Fizikai sejtfeltárás	Szerves oldószer (és víz aránya)
S0_1	-	víz
S0_2		metanol (3:1)
S0_3		etanol (3:1)
S0_4		1-propanol (3:1)
S0_5	mikrohullám (4*30 másodperc, jégágyon)	víz
S0_6		metanol (3:1)
S0_7		etanol (3:1)
S0_8		1-propanol (3:1)
S0_9	ultrahang (15 perc, jégágyon)	víz
S0_10		metanol (3:1)
S0_11		etanol (3:1)
S0_12		1-propanol (3:1)

6. táblázat: A mikrohullámmal közvetített propanolos kezelés Box-Behnken kísérletterve

Mintakód	Teljesítmény	Idő	Szerves oldószer (propanol és víz aránya)
S0_13	270 W	4*30 másodperc	1:1
S0_14	270 W	8*30 másodperc	1:3
S0_15	270 W	12*30 másodperc	1:1
S0_16	270 W	8*30 másodperc	3:1
S0_17	630 W	4*30 másodperc	1:3
S0_18	630 W	4*30 másodperc	3:1
S0_19	630 W	8*30 másodperc	1:1
S0_20	630 W	12*30 másodperc	3:1
S0_21	630 W	12*30 másodperc	1:3
S0_22	1000 W	4*30 másodperc	1:1
S0_23	1000 W	8*30 másodperc	1:3
S0_24	1000 W	12*30 másodperc	1:1
S0_25	1000 W	8*30 másodperc	3:1

A kezelt mintákat 10 000 fordulat/perc sebességen 5 percen keresztül centrifugáltam. A továbbiakban az algakivonatokat (felülúszókat) használtam az értékes komponensek mérésénél.

3.2.5 Fehérjetartalom mérése (Bradford-módszer)

A fehérjetartalom meghatározására festék megkötődésen alapuló módszert alkalmaztam. A festék az arginin- és lizin-oldalláncokhoz kötődve a fehérjével komplexet alkot. A kialakult komplex maximális abszorbanciája 595 nm hullámhosszon mérhető (Spencer és Davie 2003).

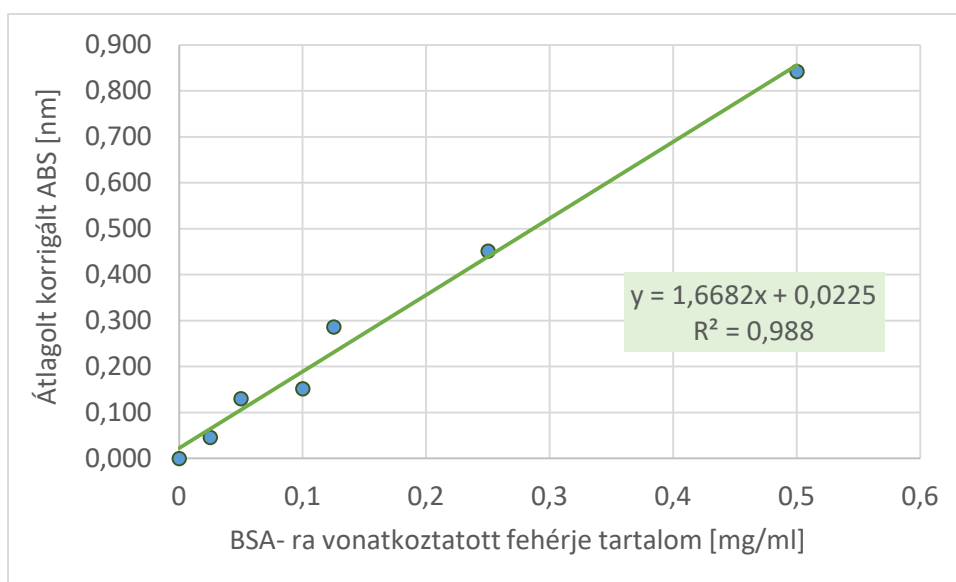
Kalibráció készítése

A minta fehérjetartalmának mennyiségi meghatározásához első lépésben ismert koncentrációjú (5 mg/ml) marhaszérum albumin (BSA) törzsoldat segítségével kalibrációs egyenest készítettem.

7.táblázat: Algakivonatok fehérjetartalmának mérésére készített marhasérum albumin (BSA) hígítási sorozat

Hígítási sorozat	1. vakminta	2.	3.	4.	5.	6.	7.
BSA [μl]	0	5	10	20	25	50	100
Desztillált víz [μl]	100	95	90	80	75	50	0

A hígítási sorozatot a 7. táblázat szemlélteti. A törzsoldatot használat előtt 10-szeresére hígítottam. A hígítási tagokat 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe készítettem elő és ezt követően a mikroplate lemez mélyedéseibe a hígítási tagonként 20 μl-t és 200 μl színező Bradford reagenst pipettáztam. Az inkubálás szobahőmérsékleten 5 percen át tartott. A minták abszorbanciáját spektrofotometriás úton, 595 nm hullámhosszon mértem le.



6.ábra: BSA kalibrációs egyenese

A továbbiakban a felállított kalibrációs egyenes segítségével határoztam meg az algakivonatok ismeretlen mennyiségű fehérjetartalmát (6.ábra).

Az algakivonatok fehérjetartalmának számítása

$$\text{fehérjetartalom (mg/ml)} = [(A_m - A_v) \cdot h] / a$$

ahol,

A_m: a minta abszorbanciája

A_v: a vak minta abszorbanciája

h: a hígítás

a: a kalibrációs egyenes meredeksége

3.2.6 Teljes polifenol tartalom meghatározása

A mérés lényege, hogy a Folin-Ciocalteu reagens és az algakivonatok polifenol tartalma (elektron donor) között elektronátvitelen alapuló redoxireakció játszódik le, amelynek eredményeként a reagensben található Mo^{6+} ionból (sárga szín) (elektronakceptor) Mo^{5+} ion (kék szín) keletkezik. A színváltozás spektrofotometriás úton, 760 nm hullámhosszon mérhető (Pérez *et al.* 2023). A mérés során 100 μl algakivonatot (felülúszó) Eppendorf csőbe pipettáztam és 400 μl 10-szeresen hígított Folin-Ciocalteu reagenssel elegyítettem. Enyhe összerázást követően a mintákat 5 percen át pihentettem szobahőmérsékleten, majd azokhoz 500 μl 7,5 %-os Na_2CO_3 oldatot pipettáztam. A Na_2CO_3 oldat hozzáadása biztosítja a lúgos környezetet, ahol a polifenol a reagenssel képes reakcióba lépni (Pérez *et al.* 2023). A mintákat fénytől védett helyen 1,5 órán keresztül pihentettem. A minták reaktivitását mg GAE/g algabiomassza egységben (GAE, galluszsav-egyenérték, gallic acids equivalents) állapítottam meg. A polifenol tartalom mennyiségi meghatározása galluszsavra felállított kalibráció segítségével történt.

3.2.7 Teljes flavonoid tartalom meghatározása

Az algakivonatok teljes flavonoid tartalmát AlCl_3 -oldat segítségével határoztam meg. A reakció során a flavonoidok az AlCl_3 -oldat Al^{3+} ionokkal komplexet hoznak létre nitrálószer (NaNO_2) jelenlétében. A színváltozás spektrofotometriás úton, 510 nm hullámhosszon mérhető (Shraim *et al.* 2021). A mérés során a felülúszókból 100 μl -t pipettáztam ki Eppendorf csövekbe és azokat 400 μl desztillált vízzel és 30 μl 5%-os NaNO_2 oldattal elegyítettem. Enyhe összerázás után a mintákat 5 percen át pihentettem szobahőmérsékleten, majd 30 μl 10%-os AlCl_3 oldat hozzáadását követően ismételen enyhén összeráztam és ismételtam a pihentetést. A mintákhoz a mérés kezdete előtt 200 μl 1M-os NaOH oldatot és 240 μl desztillált vizet adtam. A minták reaktivitását mg QE/g algabiomassza egységben (QE, kvercetin-egyenérték, quercetin equivalents) határoztam meg. A flavonoid tartalom mennyiségi meghatározása kvercetinre felállított kalibráció segítségével történt.

3.2.8 Antioxidáns aktivitás vizsgálata

A kísérlet során 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) szerves vegyületet használtam az antioxidáns kapacitás kimutatására. A gyökfogó kötődésen alapuló reakció során a stabil szabadgyököt tartalmazó DPPH és az algakivonatban található antioxidáns hatású anyagok között protonátvitel történik. Így az oldat eredeti lila színe halványodni kezd a reakció ideje alatt, és ennek mértékét spektrofotometriás úton, 517 nm hullámhosszon tudjuk detektálni (Nemes *et al.* 2015). A DPPH oldat fényérzékeny, így azt minden mérési alkalom előtt frissen készítettem el. A szerves vegyületből ekkor 0,00142 g-ot mértem ki analitikai mérlegen és 100 ml metanolban oldottam fel. Az oldatból 1,85 ml-t kémcsőbe pipettáztam ki és 100 µl algakivonattal elegyítettem. A kémcsöveket kupakkal láttam el és 30 percre fénytől elzárt helyen pihentettem a mintákat. A gátlás mértékét százalékos értékben az alábbi egyenlet segítségével számítottam.

$$\text{Gátlási \%} = [(A_v - A_m) / A_v] * 100$$

ahol,

A_m : a minta abszorbanciája

A_v : a vak minta abszorbanciája

3.2.9 Klorofill tartalom meghatározása

A klorofill-a és klorofill-b tartalom mérése spektrofotometriás úton, Lichtenthaler és Buschmann (2001) leírása alapján történt.

$$c_a: [\mu\text{g/g algabiomassza}] = 16,72 * A_{665} - 9,16 * A_{652}, \text{ és}$$

$$c_b: [\mu\text{g/g algabiomassza}] = 34,09 * A_{652} - 15,28 * A_{665}$$

Az algakivonatok klorofill artalmát a továbbiakban mg klorofill/ g algabiomassza egységben számítottam át.

3.2.10 Statisztikai kísérlettervezés

A kísérlettervezési módszerek közül a Box-Behnken (BB) kísérlettervezést alkalmaztam a liofilizált algaminták mikrohullámmal közvetített propanolos sejtfeltárási és extrahálásának optimalizálása érdekében. A statisztikai módszer során az optimalizálandó paraméter (y) az adott bioaktív komponens (fehérje, polifenol, flavonoid, pigment), a független tényezők (faktorok) pedig a mikrohullám teljesítménye (x1) (Watt), a behatási időtartam (x2)

(másodperc) és a propanol és víz aránya (x3) volt. A faktorokat és faktorkombinációk hatását három szinten (-1, 0, +1) vizsgáltam.

8.táblázat: Box-Behnken részfaktoriális kísérletterv beállításai (faktorok és szintek)

Faktorok	Szintek		
	-1	0	+1
x1	270 W	630 W	1000 W
x2	4*30 másodperc	8*30 másodperc	12*30 másodperc
x3	25:75	50:50	75:25

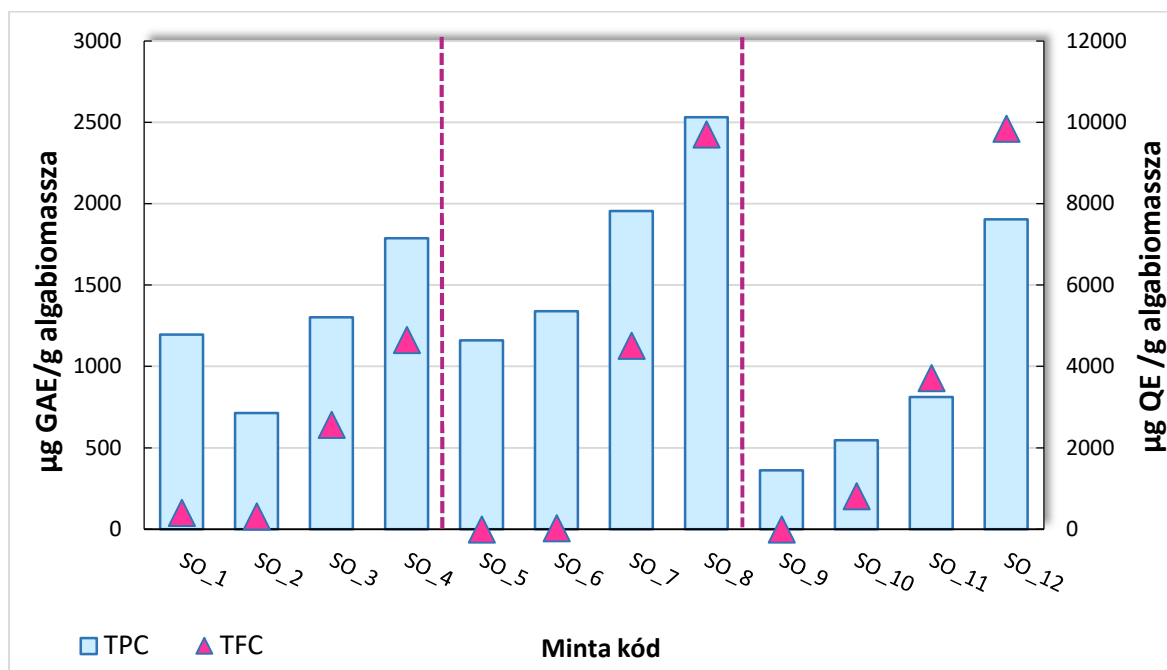
A mérési eredmények statisztikai értékelése varianciaanalízissel (ANOVA) és válaszfelület elemzéssel (RSM, response surface methology) történt.

4 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

4.1 Sejtfeltárási és extrakciós technikák vizsgálata

A kísérlet során az édesvízi *Scenedesmus obtusiusculus* zöldalga izolátum sejtfeltárási hatékonyságát és az értékes anyagok kinyerhetőségét hasonlítottam össze szerves oldószerek (metanol, etanol, propanol és víz) jelenlétében, valamint fizikai, besugárzásos technikákkal - ultrahang (47kHz, 15 perc, jégágyon) és mikrohullám (1000 W, 4*30 másodperc, jégágyon) - egybekötött szerves oldószeres kezelés során. A mikroalga liofilizátum kivonataiban a polifenol tartalmat (TPC), a flavonoid tartalmat (TFC), az antioxidáns kapacitást (DPPH), a klorofill tartalmat (klorofill-a, és klorofill-b), valamint a fehérjetartalmat mértem és követtem nyomon a kezelési technikák profiljainak alakulását.

Az alábbi 7. ábra az alga kivonatokban mért TPC és TFC tartalmat szemlélteti.

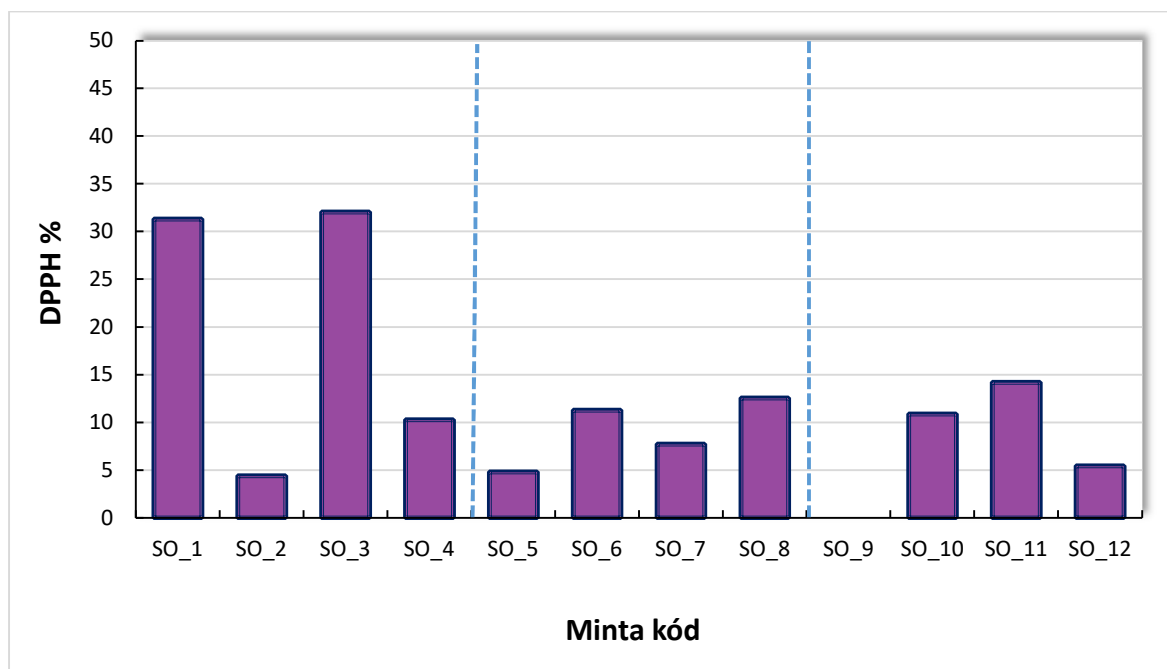


7.ábra: Különböző sejtfeltárási és extrakciós technikák hatása a polifenol (TPC) és flavonoid (TFC) tartalom alakulására

SO_1-SO_4: szerves oldószeres kezelés, SO_5-SO_8: mikrohullámmal egybekötött szerves oldószeres kezelés, SO_9-SO_12: ultrahanggal egybekötött szerves oldószeres kezelés

A szerves oldószerek hatását tekintve, látható, hogy a nagyobb polaritással rendelkező oldószerek, tehát a víz (polaritási index 10,2) és a metanol (polaritási index 5,1) eredményezett alacsonyabb kivonatolási hatékonyságot. A fizikai behatás nélküli, vizes extrakció esetében a TPC tartalomnál 1196 $\mu\text{g GAE/g algabiomassza}$ értéket (SO_1) mértem, aminek valószínűsíthető oka, hogy a liofilizálás során a sejt szerkezet károsodott, amely a fenolos

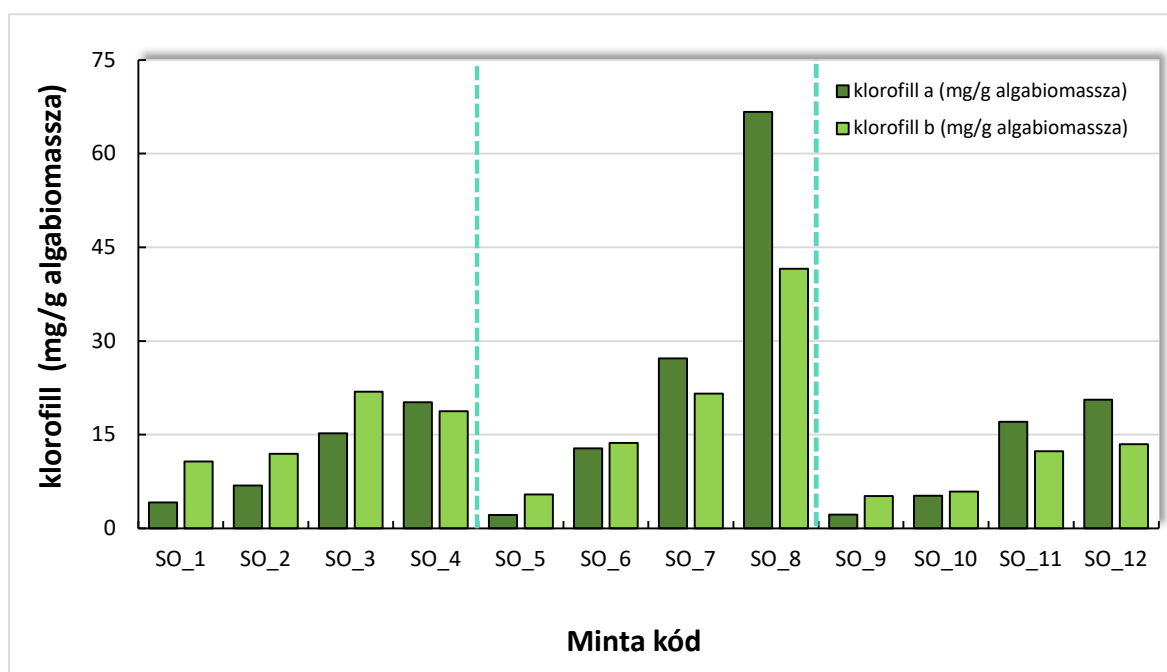
vegyületek vízzel történő részbeni felszabadítását okozta. A mikrohullámmal egybekötött vizes extrakciónál a TPC tartalom hasonlóan alakult (1159 μg GAE/g algabiomassza, SO_5), ami megerősíti, hogy az algabiomassza szárítása a sejtszerkezetet módosította, másrészt pedig a vizes extrakció és mikrohullámú kezelés együttes alkalmazása nem fejtett ki lényegi hatást a TPC és TFC tartalom alakulására. Az ultrahanggal közvetített vizes extrakció, valamint a további szerves oldószerek esetében is a kivonatok TPC tartalma jellemzően csökkent, ami a fenolos vegyületek érzékenysége és a rendszer időközönkénti hőmérséklet ingadozásának (növekedésének) tudható. A szerves oldószereknél mind a három sejtfeltárási és extrakciós módszercsoport esetén hatásosabbnak a propanol bizonyult (polaritási index 3,9), amely önmagában 1788 μg GAE/g algabiomassza és 4655 μg QE/g algabiomassza értéket (SO_4) eredményezett, míg mikrohullámmal kombináltan a 2530 μg GAE/g algabiomassza és 9704 QE/g algabiomassza értéket (SO_8) érttem el. Az ultrahangos kezeléssel egybekötött szerves oldószeres kezeléskor egyedül a propanol esetében tapasztaltam kisebb mértékű csökkenést a TPC tartalomban, míg a TFC tartalom közel azonos értéket mutatott. A kivonatok TPC és TFC tartalma alapján megállapítottam, hogy az alkalmazott kezelések körében a mikrohullámmal egybekötött szerves oldószeres extrakció kedvezőbb TPC és TFC profilt mutatott, a szerves oldószerek közül, pedig a propanol fejtett ki erősebb hatást a bioaktív vegyületek kinyerésére, amelyet sorrendben az etanol (polaritási index 4,3), a metanol és a víz követett.



8. ábra: Különböző sejtfeltárási és extrakciós technikák hatása az antioxidáns kapacitásra
 SO_1-SO_4: szerves oldószeres kezelés, SO_5-SO_8: mikrohullámmal egybekötött szerves
 oldószeres kezelés, SO_9-SO_12: ultrahanggal egybekötött szerves oldószeres kezelés

Az antioxidáns kapacitás mérésének eredményeit a 8.ábra szemlélteti. A gyökfogó hatást mind a mikrohullám, mind pedig az ultrahang lényegesen csökkentette. A besugárzásos technikák valószínűsíthetően inaktíválhatták azon bioaktív komponensek egy részét, amelyek a kémiai vegyülettel (DPPH) képesek reakcióba lépni. A vizes és az etanolos extrakciónál tapasztaltam nagyobb hatást, ekkor a gátlás mértéke százalékos értékben meghaladta a 30 %-ot (SO_1 és SO_3). A gyökfogó hatás a propanolos extrakció esetében 15 %-ot (SO_4), a metanolos extrakció esetében pedig csupán 5 %-ot (SO_2) ért el. Stoica és munkatársai (2013) *Scenedesmus opoliensis* izolátum tanulmányozása során hasonlóan a vizes és az etanolos rendszerben mutattak ki nagyobb antioxidáns kapacitást.

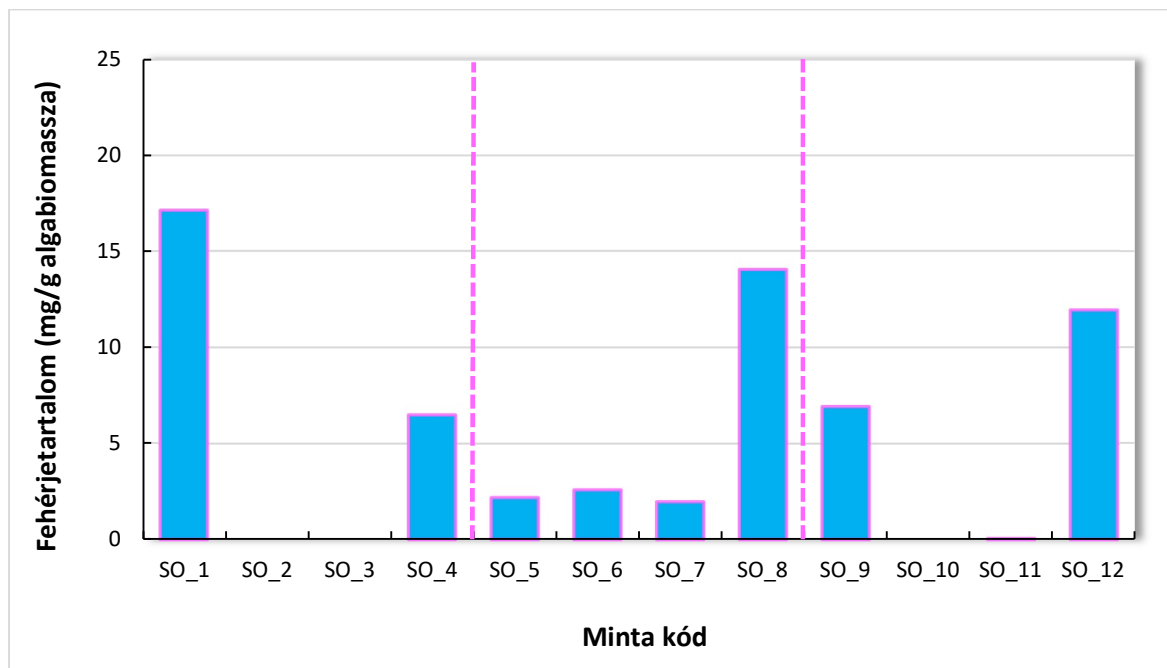
Az alábbi 9. ábra a mikroalga kivonatok klorofill tartalmát szemlélteti. Az édesvízi zöldalga liofilizátum egylépéses, szerves oldószerrel történő kezelése során a víz, a metanol és az etanol a klorofill-b pigmentek, míg a propanol a klorofill-a és klorofill-b pigmentek kinyerésére kedvezőbb hatást fejtett ki. A vizes extrakció mikrohullámmal, valamint ultrahanggal történő együttes alkalmazása nem növelte a kivonatok klorofill (2,2-4,2 mg klorofill-a/g algabiomassza, 5,2-10,7 mg klorofill-b/g algabiomassza, SO_1, SO_5, SO_9) tartalmát.



9. ábra: Különböző sejtfeltárási és extrakciós technikák hatása a pigment tartalomra (klorofill-a és klorofill-b)

SO_1-SO_4: szerves oldószeres kezelés, SO_5-SO_8: mikrohullámmal egybekötött szerves oldószeres kezelés, SO_9-SO_12: ultrahanggal egybekötött szerves oldószeres kezelés

A mikrohullám és az etanol együttes alkalmazása a klorofill-a tartalmat növelte, amely elérte a 27,3 mg/g algabiomassza (SO_7) értéket. A mikrohullámú kezelés és a propanol együttes alkalmazása több mint kétszer nagyobb klorofill-a (66,7 mg/g algabiomassza) hozamot eredményezett. Ezzel párhuzamosan a kivonat klorofill-b tartalma (41,6 mg/g algabiomassza) (SO_8) is nőtt. Az ultrahang hatására, hasonlóan a bioaktív komponenseknél korábban tapasztaltakhoz, a klorofill-a és klorofill-b tartalom lényegesen csökkent, az értékek a fizikai behatás nélküli szerves oldószeres extrakció értékeit közelítették.



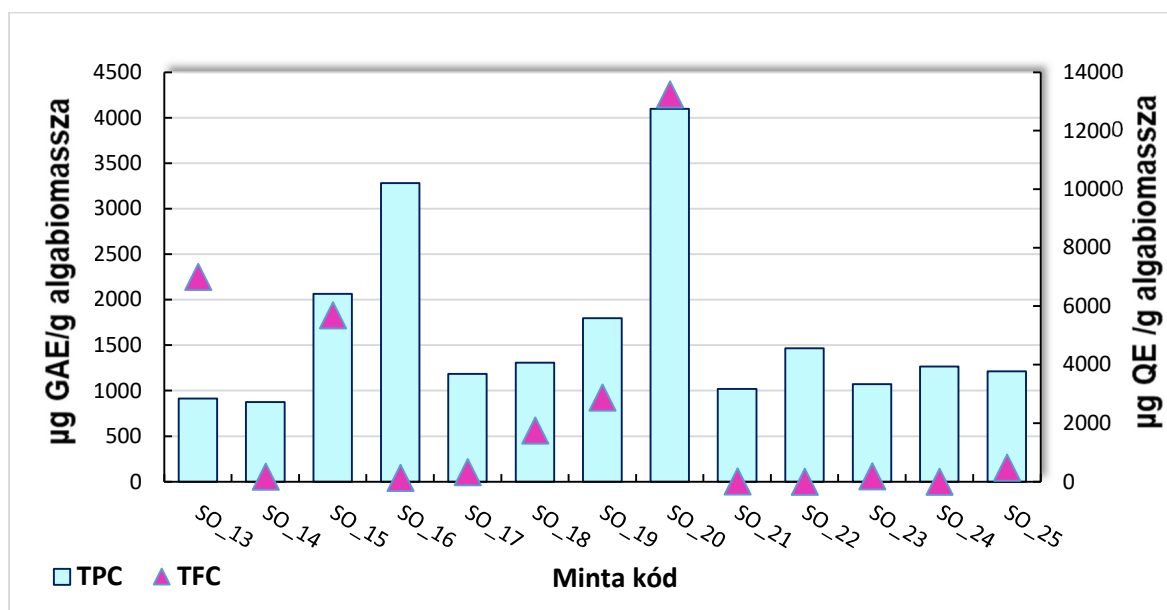
10.ábra: Különböző sejtfeltárási és extrakciós technikák hatása a fehérjetartalomra
 SO_1-SO_4: szerves oldószeres kezelés, SO_5-SO_8: mikrohullámmal egybekötött szerves oldószeres kezelés, SO_9-SO_12: ultrahanggal egybekötött szerves oldószeres kezelés

A fehérjék kinyerésénél a fizikai behatás nélküli vizes extrakció alkalmazásánál szembetűnően magas 17,1 mg/g algabiomassza fehérjetartalmat (SO_1) mértem, amelyet a propanolos extrakció (6,5 mg fehérje/g algabiomassza, SO_4) követett, míg a metanol (SO_2) és az etanol (SO_3) jelenlétében a kivonatokból fehérjéket nem mutattam ki. A fehérjék polaritását tekintve, amennyiben a fehérje poláros természetű aminosavakat tartalmaz, úgy az nagyobb hatékonysággal oldódik polárosabb oldószerekben. A propanol polaritása kisebb, mint a vize, tehát a kevésbé polárosabb fehérjékre fejthetett ki lényegibb hatást. A mikrohullámmal és ultrahanggal egybekötött szerves oldószeres kezeléseknél a propanol (14 és 12 mg fehérje/g algabiomassza) (SO_8, SO_12) esetében mutatkozott a kivonatokban nagyobb fehérje tartalom, de ez sem érte el az egyszerűbb, vizes extrakció hatékonyságát. Phong és munkatársai (2016)

Chlamydomonas sp. Tai-03 liofilizátum esetében szintén a vizes extrakció eredményezett nagyobb fehérje kinyerést, amelyet a propanol, etanol és a víz követett.

4.2 Mikrohullámmal közvetített szerves oldószeres extrakció hatékonyságának növelése

A mikrohullámmal közvetített szerves oldószeres extrakció részletesebb megismerése és az egyes tényezők hatásainak és kölcsönhatásainak feltérképezése érdekében statisztikai kísérlettervezést alkalmaztam. A Box-Behnken (BB) részfaktorális kísérlettervezés (6. táblázat) során a mikrohullám teljesítményét (x1) (270 W, 630 W, 1000 W), a szerves oldószer (propanol) koncentrációt (x2) (propanol és víz aránya 1:3, 2:2, 3:1) és a kezelés időtartamát (x3) (4*30, 8*30, 12*30 másodperc) három szinten vizsgáltam. A faktorkombinációk hatását a kivonatok TPC és TFC tartalmára vonatkozóan az alábbi 11. ábra szemlélteti.

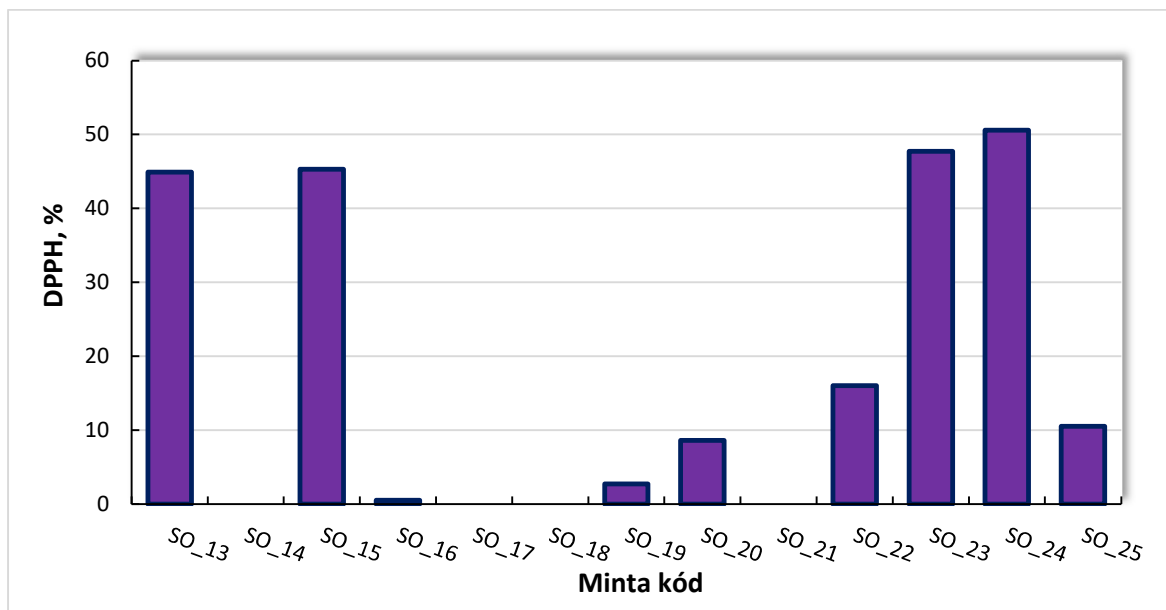


11. ábra: A BB kísérletterv faktorkombinációinak hatása a mikroalga kivonatok polifenol (TPC) és flavonoid (TFC) tartalmára

Azon mintáknál, ahol 270 W teljesítményen indítottam el a liofilizátumok kezelését, a szerves oldószer arányának növelése a kivonatok polifenol tartalmát lényegesen növelte. A propanol és víz 1:3 aránya esetén 876 µg GAE/g algabiomassza (SO_14), míg 3:1 aránya esetén 3281 µg GAE/g algabiomassza (SO_16) értéket mértem 4 perces kezelést követően. A propanol és víz 2:2 arányú elegyénél (SO_13) látható, hogy a kezelési időtartam csökkentése (2 perc) az 1:3 arányú elegy hatását közelítette, míg az időtartam növelése (6 perc) már segítette (2063 µg GAE/g algabiomassza) (SO_15) a fenolos vegyületek kinyerését. A mikrohullámú kezelés

teljesítményének csupán bizonyos mértékű növelése eredményezett kedvezőbb hatást. A 630 W teljesítményen indított kivonatolás során, hasonlóan az előzőekben tapasztaltakhoz, a propanol és víz 1:3 aránya esetén mértem alacsonyabb TPC tartalmat (1018 µg GAE/g algabiomassza) (SO_21), míg a propanol arányának növelése (3:1) 4098 µg GAE/g algabiomassza (SO_20) értéket eredményezett 6 perces kezelést követően. A propanol arányának növelése mellett a kezelési időtartam növelése is hozzájárult a kivonatolás hatékonyságának fokozásához. A mikrohullámú kezelés teljesítményének növelése lényegi növekedést nem eredményezett a kivonatok TPC tartalmában, ekkor 1000 W teljesítményen a faktorkombinációknál mérhető fenolos vegyületek mennyisége 1072 és 1466 µg GAE/g algabiomassza érték (SO_22, SO_23, SO_24, SO_25) között ingadoztak. A kivonatok flavonoid tartalma nem mutatott hasonló tendenciát. A kivonatok között nagyobb flavonoid tartalmat (SO_20) értem el abban az esetben, ahol a propanol és víz 3:1 arányú elegyében 6 percen át 630 W teljesítményen kezeltem a liofilizátumot. A flavonoid tartalom ekkor elérte 13246 µg QE/g algabiomassza értéket.

A kivonatok antioxidáns kapacitását (DPPH) az alábbi 12. ábra szemlélteti.

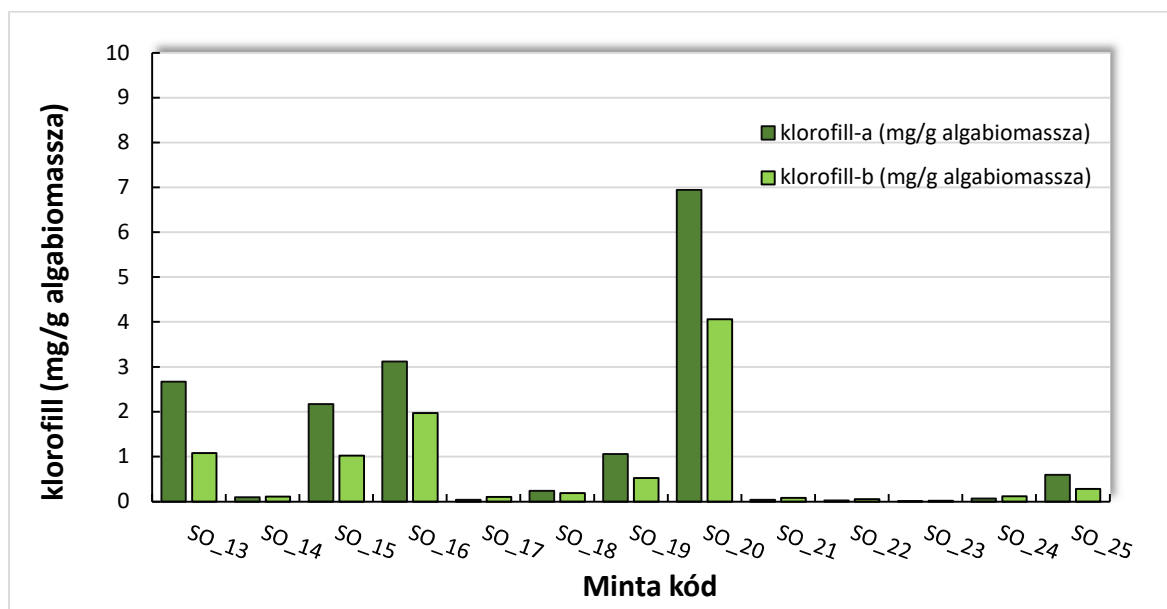


12. ábra: A BB kísérletterv faktorkombinációinak hatása az antioxidáns kapacitás alakulására

Kedvezőbb antioxidáns kapacitást azoknál a kivonatoknál mértem, ahol az extrakció során a propanol és víz azonos arányú elegyét (SO_13, SO_15), valamint csökkentett propanol tartalmú vizes oldószert (1:3) (SO_23, SO_24) alkalmaztam. A gátlási érték ekkor meghaladta a 40 %-ot. A propanol és víz azonos arányú elegyénél, 270 W teljesítményen, 2 és 6 perces kezelést követően a gátlási érték 45 % körül alakult, míg a propanol és víz azonos arányú elegyénél és a propanol csökkentett jelenlétében (1:3), 1000 W teljesítményen, 4 és 6 perces

kezelést követően közelítette az 50 %-ot. Az antioxidáns kapacitás (DPPH) mérésénél a csökkentett propanol tartalmú vizes rendszerek, a magasabb intenzitású, 1000 W teljesítményen bizonyultak kedvezőbbnek.

A kivonatok klorofill-a és klorofill-b tartalmát az alábbi 13. ábra szemlélteti.

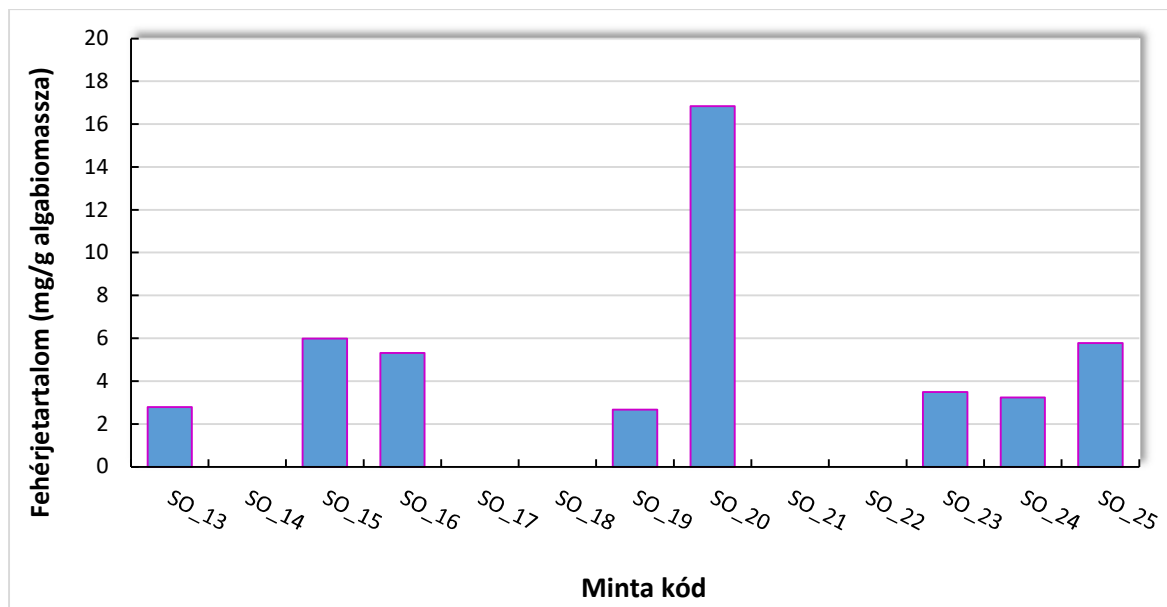


13. ábra: A BB kísérletterv faktorkombinációinak hatása a klorofill-a és klorofill-b tartalomra

A faktorkombinációk tesztelése során a kivonatokban jellemzően a klorofill-a tartalom nagyobb értékeket mutatott, mint a klorofill-b, amelyet valószínűsíthetően – a korábbi kísérlet tapasztalatai alapján - a propanol hatása eredményezett. A klorofill tartalom alakulása részben a TPC profilt követte (11. ábra), ugyanis a propanol és víz 3:1 arányú elegye esetén, 270 W teljesítményen (SO_16) és 630 W teljesítményen (SO_20) értem el nagyobb klorofill-a és klorofill-b tartalmat. Ezekben az esetekben a kivonatok klorofill-a tartalma 3,11 és 6,94 mg/g algabiomassza értéket, míg a klorofill-b tartalma 1,97 és 4,06 µg/g algabiomassza értéket mutatott. Ezt követte a propanol és víz 2:2 arányú elegyében, 270 W teljesítményen 3 és 6 percen át tartó kezelés (SO_13, SO_15), amely közel hasonló klorofill-a és klorofill-b értékeket adott. A mikrohullámú kezelés teljesítményének növelése lényegesen csökkentette a kivonatokban mérhető pigmentek mennyiségét, amelyet valószínűsíthetően a mikrohullám kedvezőtlen hatása, a rendszer gyors melegedése okozta degradáció okozott.

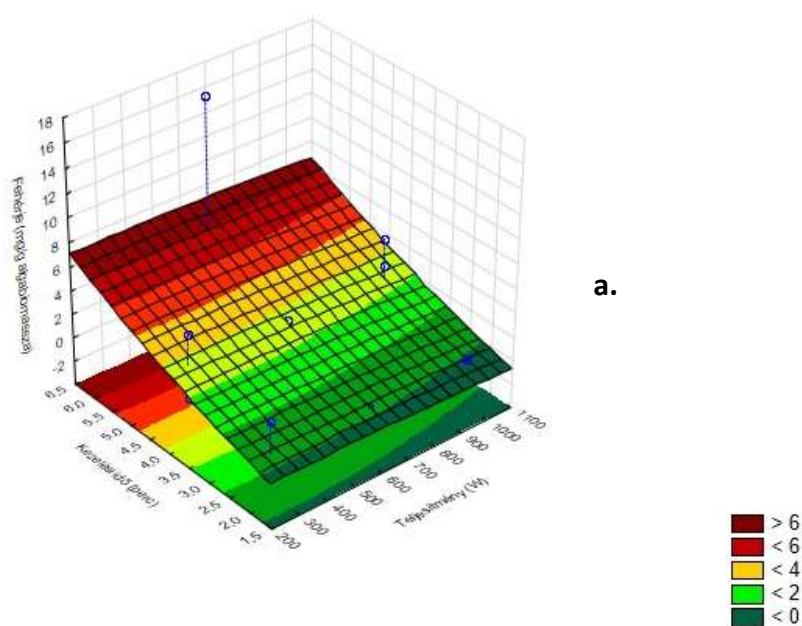
Az alábbi 14. ábra a kivonatok fehérjetartalmát szemlélteti. A fehérje kinyerés szempontjából a propanol és víz 3:1 arányú elegyénél, 630 W teljesítményen indított, 6 percen át tartó mikrohullámú kezelés során messzemenőleg nagyobb fehérje tartalmat (SO_20) értem el. A kivonat fehérjetartalma ekkor 16,84 mg/g algabiomassza értéket mutatott, amely

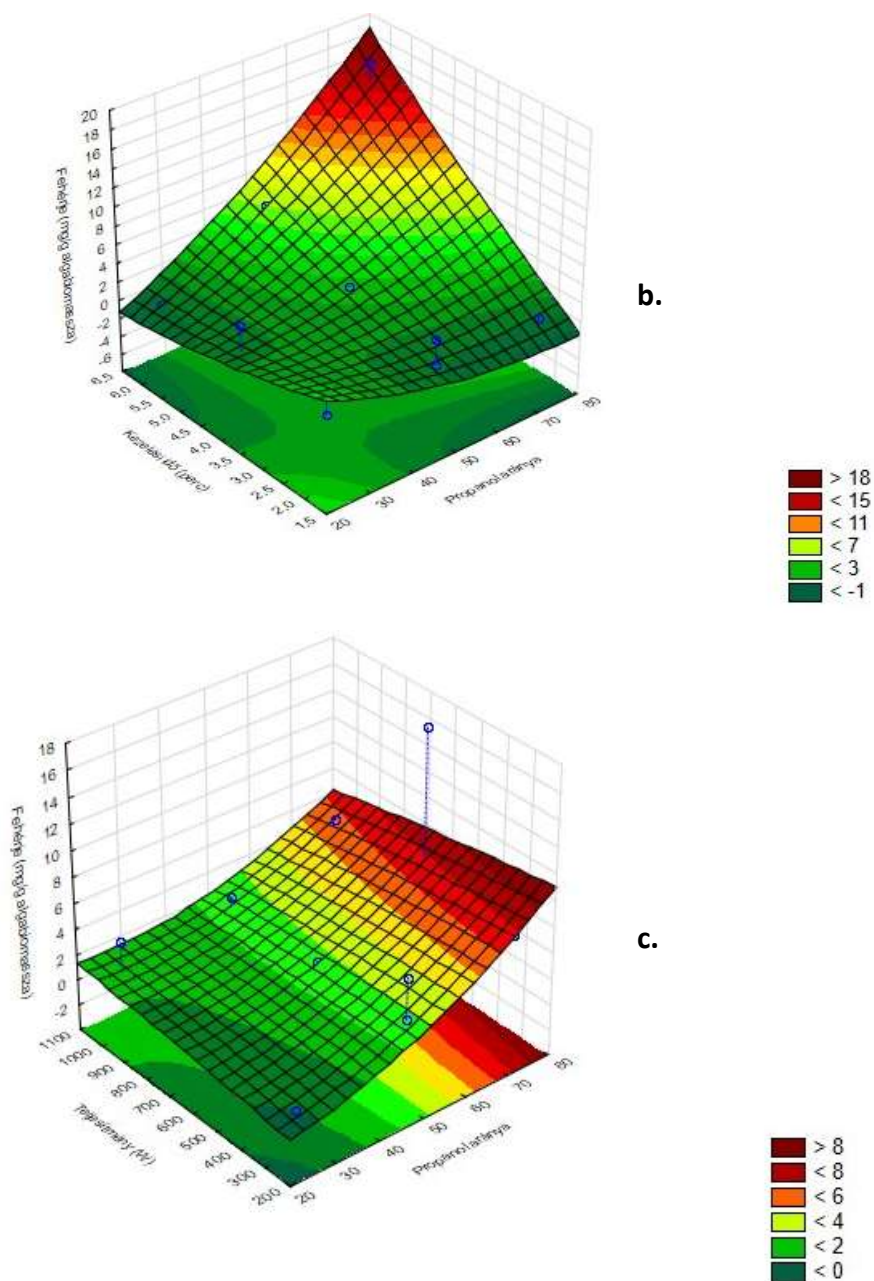
közelítette az előző kísérletsorozatban (10. ábra) mért értéket. A további faktorkombinációk a liofilizátumból kinyerhető fehérje mennyiségét nem növelték.



14. ábra: A BB kísérletterv faktorkombinációinak hatása a fehérjetartalom alakulására

A statisztikai elemzés során a bioaktív komponensek kivonatolására a faktorok és faktorkombinációk nem mutattak statisztikailag alátámasztható hatást 95 % szignifikancia szinten. A mikroalgák, mint minden más élő szervezet esetén is, a környezeti hatások eltérő bioszintézis vonalakat erősíthetnek. Ez az algasejtek összetételének eltérését okozza, ami a bioaktív komponensekben is érzékelhető.





15.ábra: A BB kísérletterv mért fehérjetartalomértékeire illesztett válaszfelületi ábrák

a: a kezelési idő és a teljesítmény hatása, b: a kezelési idő és a propanol arányának hatása,
c: a mikrohullám teljesítményének és a propanol arányának hatása a fehérjekinyerésre

A statisztikai elemzésnél a kivonatolási technikák fehérjetartalomra gyakorolt hatása esetén tapasztaltam erősebb összefüggéseket. Ezen esetben a felállított modell is csupán 61 %-ban írja le a faktorok és faktorkombinációk fehérjetartalomra kifejtett hatását. A propanol aránya és a kezelési időtartam növelése lényegi hatást mutatott, a kivonatolás hatékonyság növelését segítette (15. ábra). A további kísérletek során így az alga liofilizátumok kezelési paramétereinek a propanol és víz 3:1 arányú elegyét, 630 W teljesítményt és 6 percet választottam.

4.3 Néhány szervesetlen nitrogénforrás hatása a mikroalga tenyésztésére a bioaktív komponensek termelésére

A következő kísérletsorozatban a BG-11 ásványi sóoldat szervesetlen nitrogénforrását, a 1,5 g/L koncentrációban használt NaNO_3 -ot, azonos mennyiségben váltottam ki KNO_3 -ra, NH_4NO_3 -ra, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ra, valamint NH_4Cl -ra és hasonlítottam össze azok hatását az édesvízi *Scenedesmus obtusiusculus* zöldalga izolátum sejtszám alakulására és a 28 napos tenyészetek liofilizátumainak bioaktív komponens tartalmára nézve. Az alábbi 9. táblázat a tenyészetek kiindulási (beoltási) sejtszámát és a 28. napon mért sejtszámokat szemlélteti.

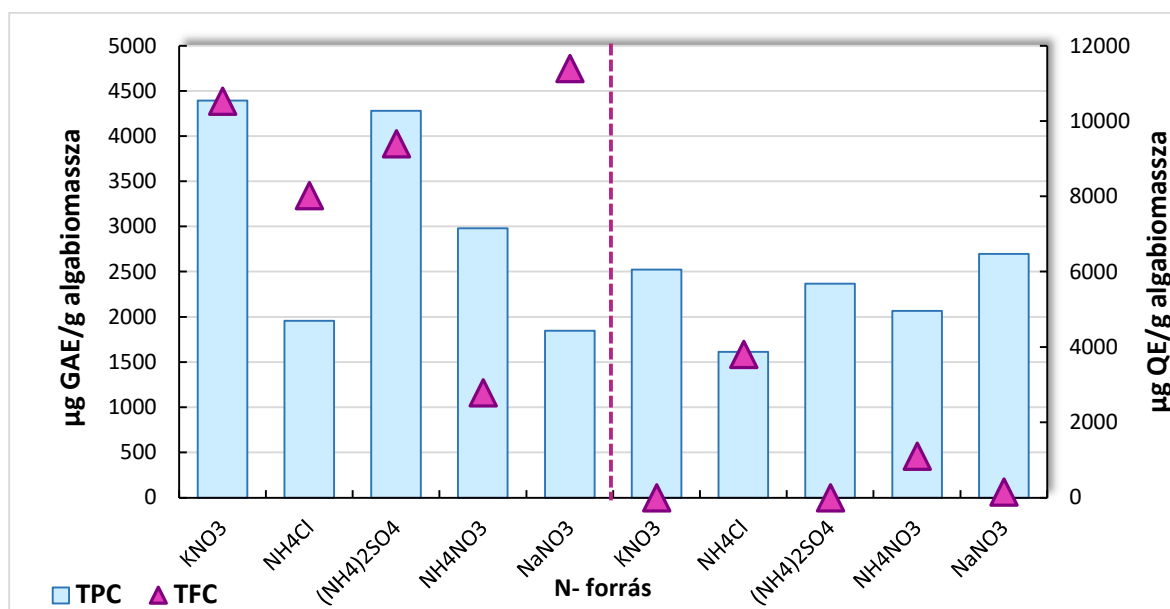
9.táblázat: A különböző szervesetlen nitrogénforrás (1,5 g/l) hatása az algasejtszám alakulására

Szervesetlen N-forrás	Kiindulási sejtszám (sejt/ml)	Tenyészet sejtszáma (28. nap) (sejt/ml)
NaNO_3	$1,53 \cdot 10^6$	$5,1 \cdot 10^6$
KNO_3	$5,5 \cdot 10^5$	$3,68 \cdot 10^6$
NH_4NO_3	$9 \cdot 10^5$	$4,18 \cdot 10^6$
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$1,35 \cdot 10^6$	$4,8 \cdot 10^6$
NH_4Cl	$1,08 \cdot 10^6$	$2,86 \cdot 10^6$

A szakaszosan rázatott reaktorokban kezdetben az algasejtek a tenyésztési körülményekhez adaptálódtak, az algasejtek fotoautotróf anyagcserefolyamatuk során energiát állítottak elő és kezdetét vette az algabiomassa növekedése. A szervesetlen nitrogénforrások eltérő hatást fejtettek ki a sejtszám alakulására a 28 napos tenyésztési időtartam alatt. Kedvezőbbnek a KNO_3 bizonyult, ekkor a sejtszám több, mint hatszorosára emelkedett. A sorrendben ezt követte az NH_4NO_3 és az $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ahol a sejtszám közel négyszeresére nőtt, míg a NaNO_3 és a NH_4Cl esetében közel háromszoros sejtszám növekedést mértem. Az algakutatások körében Coban és munkatársai (2021) a *Scenedesmus acutus* mikroalga szaporodását követték nyomon különböző nitrogénforrások jelenlétében, amely során a KNO_3 hasonlóan kedvezőbb hatást fejtett ki az algasejtszám alakulására, mint a NaNO_3 .

A továbbiakban a BB kísérletterv eredményeinek analízise során az algasejtek feltárására és a bioaktív komponensek kinyerésére kedvezőbb hatást kifejtett paramétereket (propanol és víz aránya 3:1, 630 W, 6 perc) alkalmaztam a 28 napos tenyészetek liofilizátumainak mikrohullámmal egybekötött propanolos kezelése során.

Az alábbi 16. ábra a kivonatok TPC és TFC tartalmát szemlélteti. Látható, hogy a vizes rendszerekben jellemzően nagyobb TPC és TFC tartalmat mértem, mint propanol és víz 3:1 arányú elegyében, amelyet valószínűsíthetően az okozhatott, hogy az algasejtek a tenyésztési körülmények hatására (szervetlen nitrogénforrások hatására), esetleg a külső behatások, stresszfaktorok hatására (hőmérséklet ingadozása, egyenetlen megvilágítás) eltérő összetételben termeltek fenolos vegyületeket, valamint flavonoidokat. A bioaktív komponensek a korábbiaktól eltérően a polárosabb oldószerben, tehát a vízben oldódtak ki nagyobb mértékben. Ettől függetlenül azonban igen jól kivehető, hogy a KNO_3 -tal és az $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -tal dúsított ásványi sóoldatban tenyésztett algabiomassza nagyobb TPC tartalmat (4393 és 4279 $\mu\text{g GAE/g}$ algabiomassza) eredményezett, mint az NaNO_3 , ahol csupán közel a felét mértem a korábbi kivonatolási eredményeknek (11. ábra).

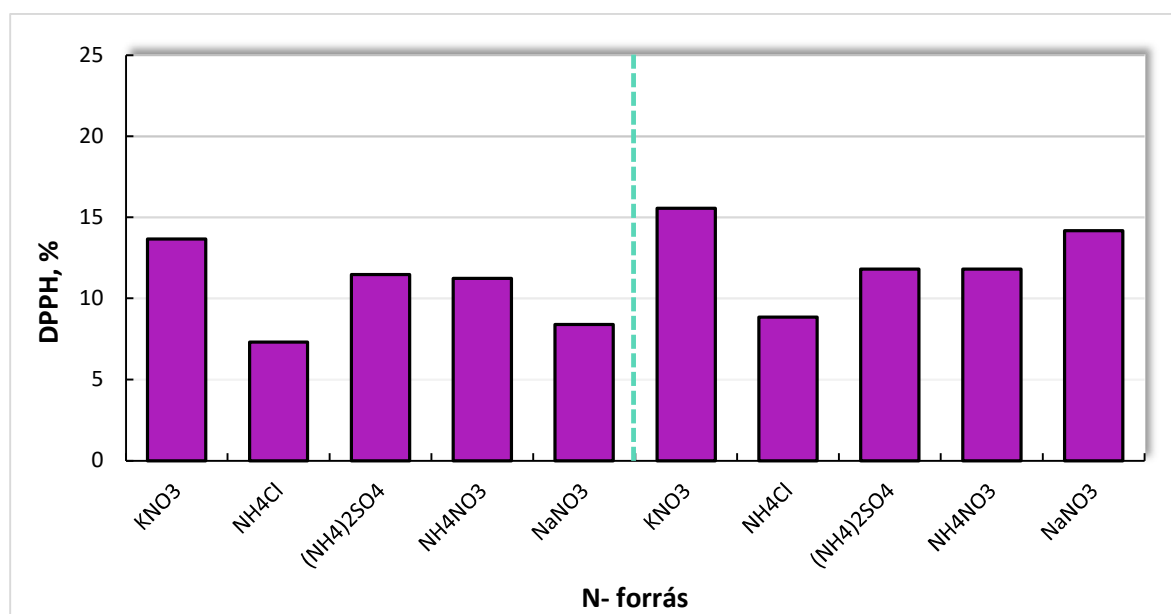


16. ábra: A különböző szervetlen nitrogénforrások hatása az algabiomassza polifenol (TPC) és a flavonoid (TFC) tartalmára

Balról az első 5 kivonat sima desztillált vízben (kontroll), a következő 5 kivonat propanol és víz 3:1 arányú elegyében történt a mikrohullámmal közvetített extrakció.

A NaNO_3 -tal dúsított ásványi sóoldatban tenyésztett algabiomassza esetén tapasztaltam egyedül, hogy a propanol és víz 3:1 arányú elegyénél a TPC tartalom (2696 $\mu\text{g GAE/g}$ algabiomassza) magasabb értéket ért el, mint azt a vizes extrakció esetében mértem. A TFC tartalom kivétel nélkül a vizes rendszerekben mutatott nagyobb értékeket. A szervetlen nitrogénforrások körében a NaNO_3 és a KNO_3 esetében értem el 11405 és 10531 $\mu\text{g QE/g}$ algabiomassza értéket, amelyet sorrendben az $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , és az NH_4NO_3 követett.

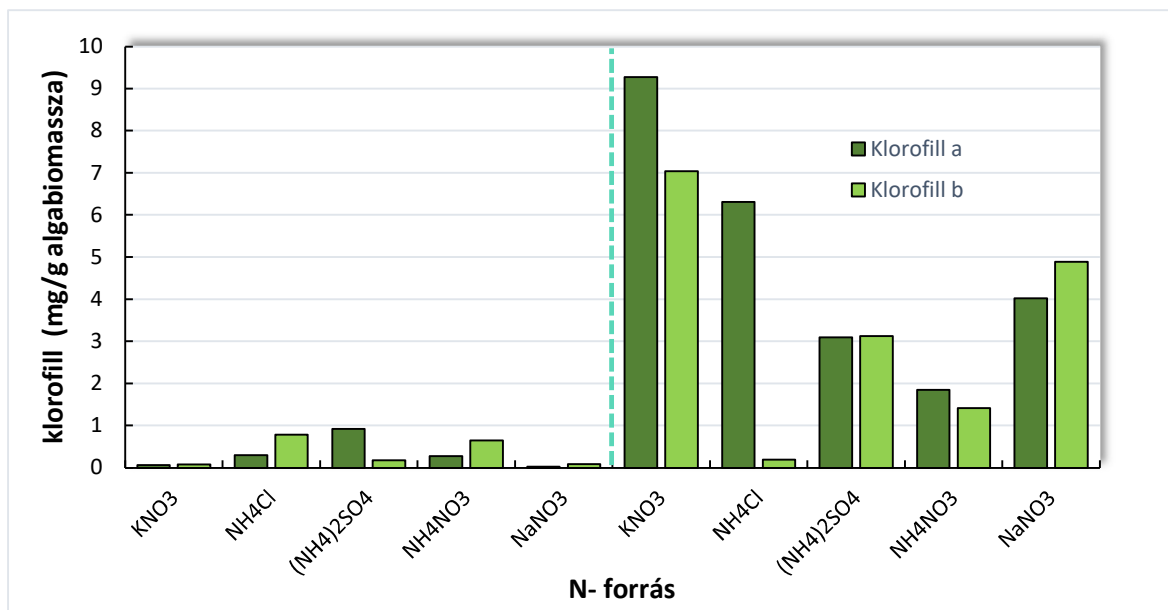
A 17. ábra a kivonatokban mért antioxidáns kapacitásokat szemlélteti. A vizes és a propanolos algakivonatokban mért antioxidáns kapacitás értékek közel hasonló profilt mutattak. Mind a két esetben a KNO_3 -tal dúsított ásványi sóoldatban tenyésztett algabiomassza esetén értem el kedvezőbb antioxidáns kapacitást, amely a vizes extrakció esetében 13,7 %, míg a propanolos extrakciónál 15,5 % volt. Az antioxidáns kapacitás szempontjából a propanol és víz 3:1 arányú elegye részben növelte a mikrohullámú kezelés hatékonyságát. A gátlási értékben a KNO_3 -ot a NaNO_3 (14,2 %), az $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ és az NH_4NO_3 (11,8 %), a NH_4Cl (8,8 %) követte.



17. ábra: A különböző szervesetlen nitrogénforrások hatása az antioxidáns kapacitás (DPPH) alakulására.

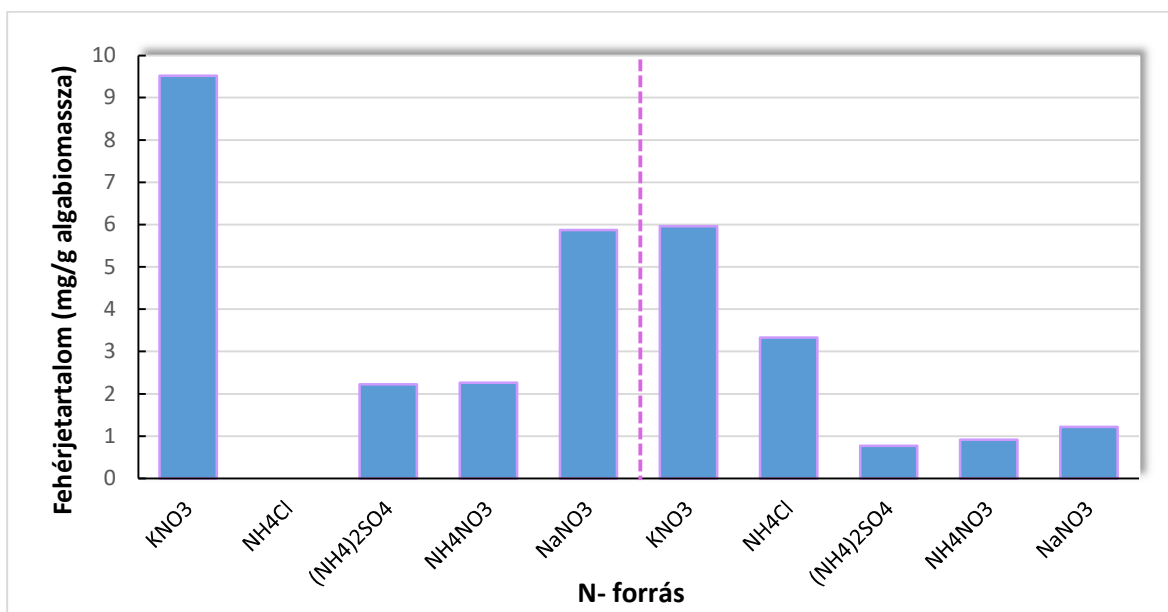
Balról az első 5 kivonat sima desztillált vízben (kontroll), a következő 5 kivonat propanol és víz 3:1 arányú elegyében történt a mikrohullámmal közvetített extrakció.

Az alábbi 18. ábra a kivonatok klorofill-a és klorofill-b tartalmát szemlélteti. A pigment kinyerés szempontjából a propanolos extrakció lényegesen nagyobb értékeket adott, mint a vizes extrakció. A klorofill-a tartalom a KNO_3 -tal dúsított tenyésztés esetén elérte a 9,27 mg/g algabiomassza értéket, a klorofill-b tartalom pedig a 7,04 mg/g algabiomassza értéket. Ezt a kivonatok klorofill-a tartalmának sorrendjében az NH_4Cl 6,31 mg/g algabiomassza értékkel, NaNO_3 4,02 mg/g algabiomassza értékkel, az $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,09 mg/g algabiomassza értékkel és az NH_4NO_3 1,85 mg/g algabiomassza értékkel követte.



18. ábra: A különböző szervesetlen nitrogénforrások hatása a pigmentek (klorofill-a és klorofill-b) termelésére

Balról az első 5 kivonat sima desztillált vízben (kontroll), a következő 5 kivonat propanol és víz 3:1 arányú elegyében történt a mikrohullámmal közvetített extrakció.



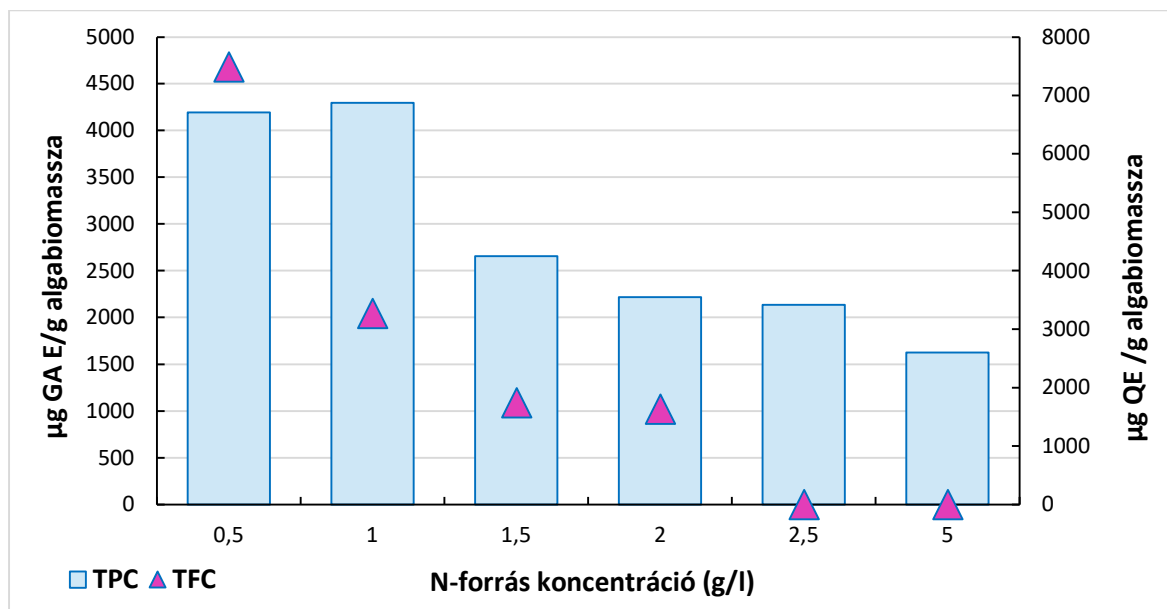
19. ábra: A különböző szervesetlen nitrogénforrások hatása az algabiomassza fehérjetartalmára
Balról az első 5 kivonat sima desztillált vízben (kontroll), a következő 5 kivonat propanol és víz 3:1 arányú elegyében történt a mikrohullámmal közvetített extrakció.

A 19. ábra a kivonatok fehérjetartalmát szemlélteti. Az algakivonatok fehérjetartalma, a korábban tapasztaltakkal megegyezően a polárosabb oldószerben, a vizes rendszerekben adott nagyobb értékeket. A szervesetlen nitrogénforrások közül a KNO₃ emelkedett ki, amely vizes

rendszerben 9,52 mg fehérje/g algabiomassza értéket, míg a propanol és víz 3:1 arányú elegyében 5,96 mg fehérje/ g algabiomassza értéket kaptam.

4.4 Különböző KNO₃ koncentrációk hatása a bioaktív komponensek termelésére

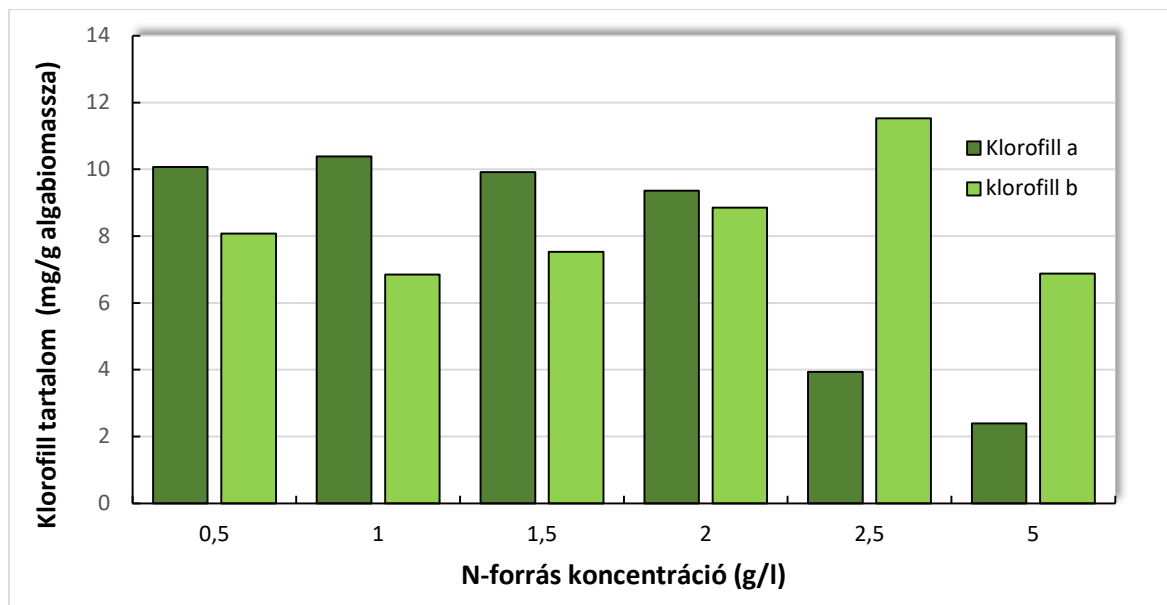
A kutatómunkám során végeztem a különböző KNO₃ tartalmú (0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 és 5 g/l) ásványi sóoldatban tenyésztett *Scenedesmus obtusiusculus* izolátum liofilizátumainak bioaktív komponens tartalmát vizsgáltam. A tenyésztés az előző kísérlettel azonos módon, 28 napon át történt. A tenyészetek liofilizátumainak kezelése mikrohullámmal egybekötött propanolos extrakcióval (propanol és víz 3:1 arányú elegyében) történt, 630 W teljesítményen, 6 percen át.



20. ábra: A különböző KNO₃ koncentráció hatása az algabiomassza polifenol (TPC) és flavonoid (TFC) tartalmára

A 20. ábra a kivonatokban mért TPC és TFC tartalmat szemlélteti. A mikroalga különböző KNO₃ koncentrációjú ásványi oldatokban történő szaporítása eltérően hatott a bioaktív komponensek sejten belüli termelésére. A kivonatokban mért TPC és TFC tartalom csökkentett N-tartalom mellett, a 0,5 g/l és 1 g/l koncentrációban KNO₃-ot tartalmazó oldatokban történő tenyésztés esetén, nagyobb értékeket mutatott, mint növelt (1,5 g/l koncentrációnál nagyobb) N-tartalom rendszerben. A N-forrás limitált alkalmazása stresszfaktorként hatott az algasejtekre, amely bizonyos anyagcseretermékek sejten belüli felhalmozódását eredményezte. A kivonat TPC tartalma 0,5 g/l és 1 g/l KNO₃ 4193 és 4296 µg GAE/g algabiomassza értéket ért el, míg 1,5 g/l és annál nagyobb KNO₃ koncentráció esetén a TPC tartalom közel a felére

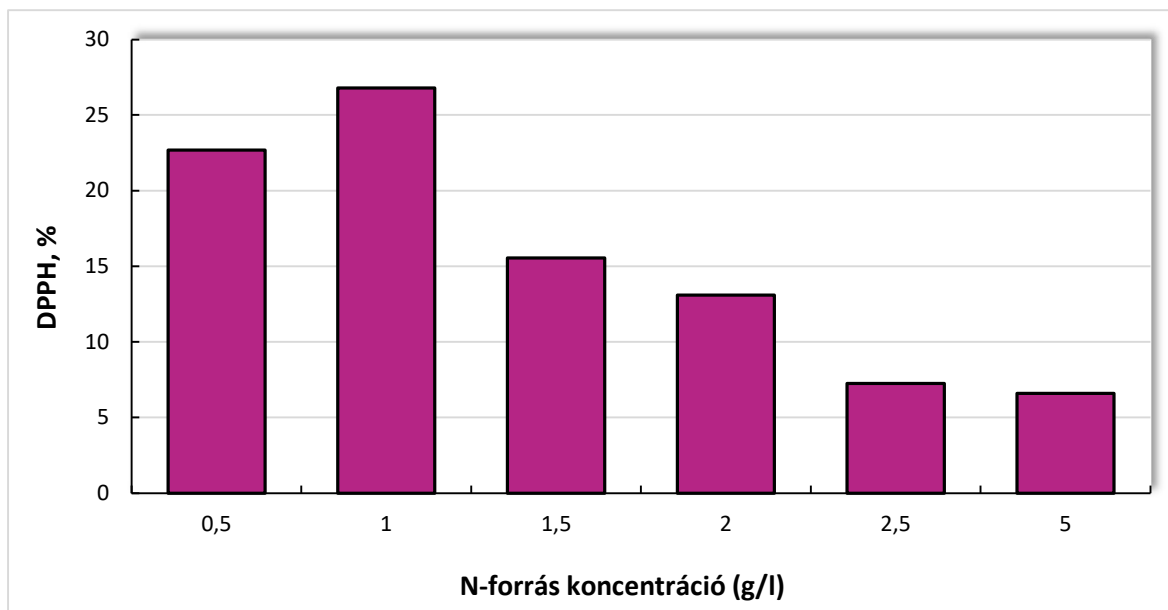
csökkent. A kivonatok TFC tartalma a 0,5 g/l KNO_3 esetén tetőzött, ekkor 7487 μg QE/g algabiomassza értéket mértem. A KNO_3 további növelése a TFC tartalmat csökkentette.



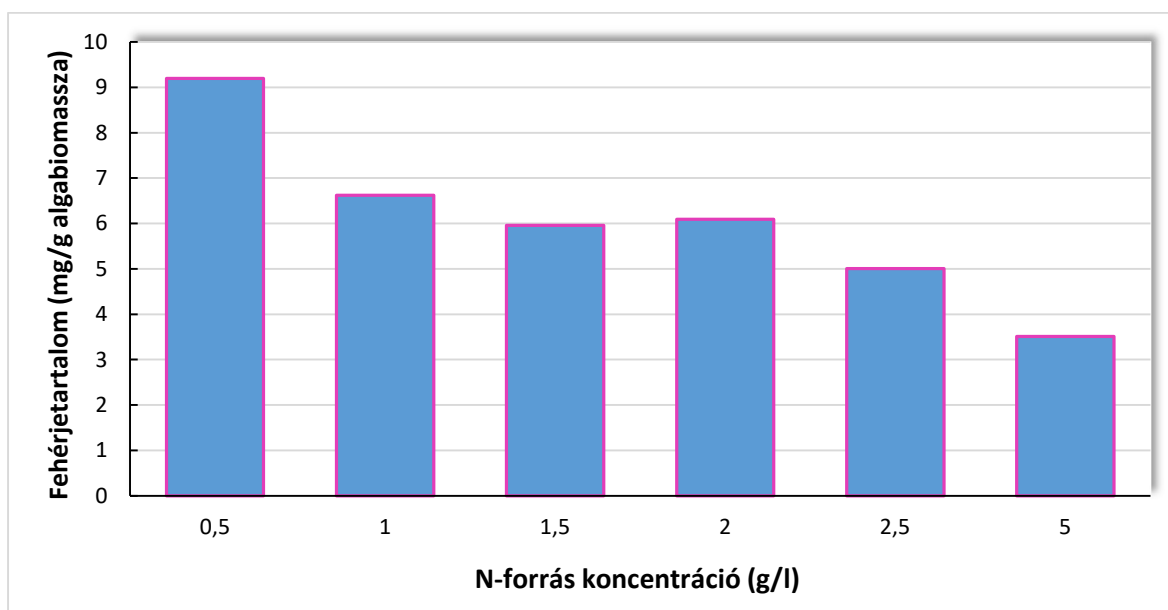
21. ábra: A különböző KNO_3 koncentráció hatása az algabiomassza pigment tartalmára

A kivonatok pigment tartalmában 0,5 g/l és 1,5 g/l KNO_3 koncentráció alkalmazása esetén lényegi változást nem tapasztaltam, ekkor a klorofill-a tartalom elérte a 10 mg/ g algabiomassza értéket, míg a klorofill-b tartalom pedig 6,85 és 8,07 mg/g algabiomassza között alakult (21. ábra). Látható, hogy 2 g/l KNO_3 koncentráció felett, a kivonatokban a mért klorofill-b tartalom elkezdett növekedni, amely 2,5 g/l KNO_3 koncentrációnál már elérte 11,53 mg/g algabiomassza értéket. Az 5 g/l KNO_3 koncentráció esetén pedig mind a klorofill-a, mind a klorofill-b értéke nagyobb mértékben csökkent.

A 22. ábra a kivonatok antioxidáns kapacitását szemlélteti. Az antioxidáns kapacitás kinyerése szempontjából is a 0,5 g/l és 1 g/l KNO_3 koncentráció esetén értem el nagyobb gátlási százalékokat, amely 22,7 % és 26,8 % között alakult. A KNO_3 koncentráció növelése a DPPH gyökfogó hatását csökkentette, amely a kivonatokban található antioxidáns hatású vegyületek kisebb mértékű jelenlétére utalt.



22. ábra: A különböző KNO_3 koncentráció hatása az antioxidáns kapacitásra



23. ábra: A különböző KNO_3 koncentráció hatása az algabiomassza fehérjetartalmára

A 23. ábra a kivonatok fehérjetartalmát szemlélteti. A fehérje kinyerés szempontjából, hasonlóan az előzőekben tapasztaltakhoz, a tenyésztés során alkalmazott N-forrás csökkentés eredményezett (0,5 g/l KNO_3 koncentráció) nagyobb fehérjetartalmat. Ekkor a kivonatban 9,2 mg fehérje/g algabiomassza értéket mértem. Az ennél nagyobb KNO_3 koncentráció az algasejtekben a fehérje termelést és felhalmozódást csökkentette.

5 ÖSSZEFOGLALÁS

A TDK munkám az algakutatásokhoz kapcsolódott, amely során célul tűztem ki az édesvízi *Scenedesmus obtusiusculus* zöldalga izolátum sejtfeltárási és a bioaktív komponensek kivonatolási technikáinak összehasonlítását és optimalizálását, valamint a tenyésztés során használt ásványi sóoldat szervesetlen nitrogénforrás tartalmának bioaktív komponensekre kifejtett hatásának elemzését. A bioaktív alga-komponensek körében a kivonatok fehérjetartalmát, teljes polifenol (TPC) és teljes flavonoid (TFC) tartalmát, valamint pigment tartalmát (klorofill-a és klorofill-b) követtem nyomon. A kísérleteim során az alábbi fő eredményeket értem el.

1. Az egy lépéses szerves oldószeres, valamint a besugárzással (ultrahang, mikrohullám) egybekötött szerves oldószeres sejtfeltárási és kivonatolási technikák közül eredményesebbnek a **mikrohullámmal egybekötött propanolos kezelés** bizonyult, ahol a mikroalga liofilizátum kezelése propanol és víz 3:1 arányú elegyében, 1000 W teljesítményen, 2 percen át (jégágyon) történt. A kivonatok TPC tartalma 2530 µg GAE/g algabiomassza, a TFC tartalma 9704 QE/g algabiomassza értéket, az antioxidáns kapacitása (DPPH) 12,6 %-ot, a klorofill-a tartalma 66,7 mg/g algabiomassza értéket, a klorofill-b tartalma 41,6 mg/g algabiomassza értéket, a fehérje tartalma pedig 14 mg/g algabiomassza értéket mutatott.
2. A mikroalga liofilizátum mikrohullámmal egybekötött propanolos kezelésének optimalizálásánál a **Box-Behnken (BB) részfaktorális kísérlettervezés és válaszfelület analízis** a faktorokra (x1: mikrohullám teljesítménye, W, x2: propanol és víz aránya, x3: mikrohullámú kezelés időtartama, perc) és faktorkombinációkra nem mutatott statisztikailag alátámasztható hatást 95 % szignifikancia szinten. Egyes beállításoknál azonban lényegi hatást megállapítottam, ugyanis a faktorkombinációk közül jellemzően a 630 W teljesítményen, propanol és víz 3:1 arányú elegyében indított, 6 percen át (jégágyon) tartó kezelés eredményezett kedvezőbb kivonatolási hatékonyságot. A TPC tartalom 4098 µg GAE/g algabiomassza értéket, a TFC tartalom 13246 QE/g algabiomassza értéket, a fehérjetartalom 16,8 mg/g algabiomassza értéket ért el, míg az antioxidáns kapacitás (DPPH) (8,6 %), valamint a klorofill-a (6,94 mg/g algabiomassza) és klorofill-b (4,1 mg/g algabiomassza) tartalom esetében növekedést nem értem el.
3. A **különböző szervesetlen nitrogénforrások** közül a KNO₃, mind a mikroalga izolátum tenyésztésre, mind a bioaktív komponensek termelésére kedvezőbb hatást fejtett ki, mint a gyakorlatban elterjedtebben használt NaNO₃. Feltételezhetően a környezeti hatások

(hőmérséklet ingadozása, egyenletlen megvilágítás, eltérő nitrogénforrás) okozhatták az algasejtek összetételének eltérését, ugyanis a liofilizátumok jellemzően a TPC (4393 µg GAE/g algabiomassza) és TFC tartalom (10531 µg QE/g algabiomassza), az antioxidáns kapacitás (DPPH) (13,7 %) és a fehérjetartalom (9,5 mg/g algabiomassza) tekintetében a polárosabb természetű vizes rendszerben adott kedvezőbb értéket, mint a propanol és víz 3:1 arányú elegye esetén. A propanol és víz 3:1 arányú elegyében csupán a klorofill-a tartalom (9,3 mg/g algabiomassza) és a klorofill-b (7,04 mg/g algabiomassza) mutatott nagyobb értéket.

4. A mikroalga szakaszosan rázatott tenyésztése során a KNO₃ csökkentett jelenléte (0,5 g/l és 1 g/l között) a bioaktív komponensek mennyiségét részben növelte. Az alga liofilizátumok kezelését követően a kivonatokban a TPC tartalom 4296 µg GAE/g algabiomassza értéket, a TFC tartalom 7487 µg QE/g algabiomassza értéket, az antioxidáns kapacitás (DPPH) 26,8 %-ot, a klorofill-a tartalom 10,1 mg/g algabiomassza értéket, a klorofill-b tartalom 8,07 mg/g algabiomassza értéket, a fehérjetartalom pedig 9,2 mg/g algabiomassza értéket mutatott.

A kísérletek során elért eredmények a mikroalgák értékes komponenseiről és a kivonatolási technikákról szerzett ismereteket bővíthetik és ezen a téren alapot adhatnak a további algakutatások tervezéséhez.

6 IRODALOMJEGYZÉK

- Ahmad A, W Hassan S, Banat F (2022) An overview of microalgae biomass as a sustainable aquaculture feed ingredient: food security and circular economy. *Bioengineered* 13:9521–9547. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2061148>
- Alalwan HA, Alminshid AH, Aljaafari HAS (2019) Promising evolution of biofuel generations. *Subject review. Renew Energy Focus* 28:127–139. <https://doi.org/10.1016/j.ref.2018.12.006>
- Ammar EM, Arora N, Philippidis GP (2020) The prospects of agricultural and food residue hydrolysates for sustainable production of algal products. *Energies* 13:6427. <https://doi.org/10.3390/en13236427>
- Amorim ML, Soares J, Coimbra JSJR, et al (2021) Microalgae proteins: production, separation, isolation, quantification, and application in food and feed. *Crit Rev Food Sci Nutr* 61:1976–2002. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1768046>
- Ampofo J, Abbey, Lord (2022) Microalgae: Bioactive composition, health benefits, safety and prospects as potential high-value ingredients for the functional food industry. *Foods* 11:1744. <https://doi.org/10.3390/foods11121744>
- Andersen RA, Lewin RA (2024) algae. *Encyclopedia Britannica*
- Basheva D, Moten D, Stoyanov P, et al (2018) Content of phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin and phycoerythrocyanin in some cyanobacterial strains: Applications. *Eng Life Sci* 18:861–866. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800035>
- Becker EW (2013) Microalgae for Human and Animal Nutrition. In: *Handbook of Microalgal Culture*. John Wiley & Sons, Ltd, Oxford, UK, pp 461–503
- Begum H, Yusoff FM, Banerjee S, et al (2016) Availability and utilization of pigments from microalgae. *Crit Rev Food Sci Nutr* 56:2209–2222. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.764841>
- Benemann JR (1992) Microalgae aquaculture feeds. *J Appl Phycol* 4:233–245. <https://doi.org/10.1007/bf02161209>
- Bernaerts TMM, Gheysen L, Foubert I, et al (2019) The potential of microalgae and their biopolymers as structuring ingredients in food: A review. *Biotechnol Adv* 37:107419. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107419>
- Bhatia SK, Mehariya S, Bhatia RK, et al (2021) Wastewater based microalgal biorefinery for bioenergy production: Progress and challenges. *Sci Total Environ* 751:141599. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141599>

- Buckley MT, Racimo F, Allentoft ME, et al (2017) Selection in Europeans on fatty acid desaturases associated with dietary changes. *Mol Biol Evol* 34:1307–1318. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx103>
- Carvalho AP, Meireles LA, Malcata FX (2006) Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol Prog* 22:1490–1506. <https://doi.org/10.1021/bp060065r>
- Carvalho JCM, Matsudo MC, Bezerra RP, et al (2014) Microalgae Bioreactors. In: *Algal Biorefineries*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 83–126
- Chang J-S, Show P-L, Ling T-C, et al (2017) Photobioreactors. In: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, pp 313–352
- Chapman RL (2010) Algae: the world’s most important “plants”—an introduction. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 18(1), 5–12. <https://doi.org/10.1007/s11027-010-9255-9>
- Chowdhury H, Loganathan B (2019) Third-generation biofuels from microalgae: a review. *Curr Opin Green Sustain Chem* 20:39–44. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2019.09.003>
- Chronakis IS, Madsen M (2011) Algal proteins. In: *Handbook of Food Proteins*. Elsevier, pp 353–394
- Çoban {ahmet, Şimşek GK, Kadri ÇETİN} A (2021) Effect of Nitrogen Source on Growth and Protein and Lipid Amounts of a Freshwater Microalga *Scenedesmus acutus*. *Turkish Journal of Science & Technology*
- Coustets M, Joubert-Durigneux V, Hérault J, et al (2015) Optimization of protein electroextraction from microalgae by a flow process. *Bioelectrochemistry* 103:74–81. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2014.08.022>
- Dai J, Mumper RJ (2010) Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15:7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Daneshvar E, Sik Ok Y, Tavakoli S, et al (2021) Insights into upstream processing of microalgae: A review. *Bioresour Technol* 329:124870. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124870>
- D’Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, et al (2007) Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita* 43:348–361
- Day JG (2007) Cryopreservation of Microalgae and Cyanobacteria. In: *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 141–151

- Del Mondo A, Smerilli A, Ambrosino L, et al (2021) Insights into phenolic compounds from microalgae: structural variety and complex beneficial activities from health to nutraceuticals. *Crit Rev Biotechnol* 41:155–171. <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1874284>
- Dunne RP (1999) Spectrophotometric measurement of chlorophyll pigments: a comparison of conventional monochromators and a reverse optic diode array design. *Mar Chem* 66:245–251. [https://doi.org/10.1016/s0304-4203\(99\)00035-3](https://doi.org/10.1016/s0304-4203(99)00035-3)
- Eilam Y, Khattib H, Pintel N, Avni D (2023) Microalgae-sustainable source for alternative proteins and functional ingredients promoting gut and liver health. *Global Chall* 7:2200177. <https://doi.org/10.1002/gch2.202200177>
- Ferreira GF, Ríos Pinto LF, Maciel Filho R, Fregolente LV (2019) A review on lipid production from microalgae: Association between cultivation using waste streams and fatty acid profiles. *Renew Sustain Energy Rev* 109:448–466. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.04.052>
- Foo SC, Yusoff FM, Ismail M, et al (2017) Antioxidant capacities of fucoxanthin-producing algae as influenced by their carotenoid and phenolic contents. *J Biotechnol* 241:175–183. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.11.026>
- Fu W, Nelson DR, Yi Z, et al (2017) Bioactive compounds from microalgae: Current development and prospects. In: *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, pp 199–225
- Gerde JA, Montalbo-Lomboy M, Yao L, et al (2012) Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. *Bioresour Technol* 125:175–181. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.110>
- Getachew D, Mulugeta K, Gemechu G, Murugesan K (2020) Values and drawbacks of biofuel production from microalgae. *J appl biotechnol Rep* 7(1):1–6. <https://doi.org/10.30491/JABR.2020.105917>
- Glazer AN (1989) Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *J Biol Chem* 264:1–4
- Goiris K, Muylaert K, Fraeye I, et al (2012) Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. *J Appl Phycol* 24:1477–1486. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9804-6>
- Gonçalves AL, Pires JCM, Simões M (2016) The effects of light and temperature on microalgal growth and nutrient removal: an experimental and mathematical approach. *RSC Adv* 6:22896–22907. <https://doi.org/10.1039/c5ra26117a>

- Günerken E, D'Hondt E, Eppink MHM, et al (2015) Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnol Adv* 33:243–260. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008>
- Gupta PL, Lee S-M, Choi H-J (2015) A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation. *World J Microbiol Biotechnol* 31:1409–1417. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1892-4>
- Han P, Lu Q, Fan L, Zhou W (2019) A review on the use of microalgae for sustainable aquaculture. *Appl Sci (Basel)* 9:2377. <https://doi.org/10.3390/app9112377>
- Haoujar I, Cacciola F, Abrini J, et al (2019) The contribution of carotenoids, phenolic compounds, and flavonoids to the antioxidative properties of marine microalgae isolated from Mediterranean Morocco. *Molecules* 24:4037. <https://doi.org/10.3390/molecules24224037>
- Hu J, Nagarajan D, Zhang Q, et al (2018) Heterotrophic cultivation of microalgae for pigment production: A review. *Biotechnol Adv* 36:54–67. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.009>
- Hu Q, Kurano N, Kawachi M, et al (1998) Ultrahigh-cell-density culture of a marine green alga *Chlorococcum littorale* in a flat-plate photobioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:655–662. <https://doi.org/10.1007/s002530051228>
- Humphrey AM (2004) Chlorophyll as a color and functional ingredient. *J Food Sci* 69:C422–C425. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10710.x>
- Khan MI, Shin JH, Kim JD (2018) The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microb Cell Fact* 17:36. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Khatoon N, Pal R (2015) Microalgae in Biotechnological Application: A Commercial Approach. In: *Plant Biology and Biotechnology*. Springer India, New Delhi, pp 27–47
- Ko S-C, Kang N, Kim E-A, et al (2012) A novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptide from a marine *Chlorella ellipsoidea* and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Process Biochem* 47:2005–2011. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.07.015>
- Koller M, Muhr A, Braunegg G (2014) Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Res* 6:52–63. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.002>

- Koyande AK, Chew KW, Rambabu K, et al (2019) Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. *Food Sci Hum Wellness* 8:16–24. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2019.03.001>
- Kump LR (2008) The rise of atmospheric oxygen. *Nature* 451:277–278. <https://doi.org/10.1038/nature06587>
- Machu L, Misurcova L, Ambrozova JV, et al (2015) Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Molecules* 20:1118–1133. <https://doi.org/10.3390/molecules20011118>
- Matos ÂP (2017) The impact of microalgae in food science and technology. *J Am Oil Chem Soc* 94:1333–1350. <https://doi.org/10.1007/s11746-017-3050-7>
- Matsui MS, Muizzuddin N, Arad S, Marenus K (2003) Sulfated polysaccharides from red microalgae have antiinflammatory properties in vitro and in vivo. *Appl Biochem Biotechnol* 104:13–22. <https://doi.org/10.1385/abab:104:1:13>
- Molino A, Iovine A, Casella P, et al (2018) Microalgae characterization for consolidated and new application in human food, animal feed and nutraceuticals. *Int J Environ Res Public Health* 15:2436. <https://doi.org/10.3390/ijerph15112436>
- Mulders KJM, Lamers PP, Martens DE, Wijffels RH (2014) Phototrophic pigment production with microalgae: biological constraints and opportunities. *J Phycol* 50:229–242. <https://doi.org/10.1111/jpy.12173>
- Nagappan S, Das P, AbdulQuadir M, et al (2021) Potential of microalgae as a sustainable feed ingredient for aquaculture. *J Biotechnol* 341:1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.09.003>
- Nayaka S, Toppo K, Verma S (2017) Adaptation in algae to environmental stress and ecological conditions. In: *Plant Adaptation Strategies in Changing Environment*. Springer Singapore, Singapore, pp 103–115
- Nemes A, Stefanovitsné Bányi É, Remenyik J (2015) Development of a new measurement method to determine plant antioxidant status. *Agrártud közlemények* 105–112. <https://doi.org/10.34101/actaagrar/63/1844>
- Pangestuti R, Kim S-K (2011) Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *J Funct Foods* 3:255–266. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.07.001>
- Pérez M, Dominguez-López I, Lamuela-Raventós RM (2023) The chemistry behind the Folin-Ciocalteu method for the estimation of (poly)phenol content in food: Total phenolic

- intake in a Mediterranean dietary pattern. *J Agric Food Chem* 71:17543–17553. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04022>
- Peter AP, Khoo KS, Chew KW, et al (2021) Microalgae for biofuels, wastewater treatment and environmental monitoring. *Environ Chem Lett* 19:2891–2904. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01219-6>
- Phong WN, Le CF, Show PL, et al (2016) Evaluation of Different Solvent Types on the Extraction of Proteins from Microalgae. *Chemical Engineering Transactions*. <https://doi.org/10.3303/CET1652178>
- Pulz O, Gross W (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 65:635–648. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1647-x>
- Raheem A, Prinsen P, Vuppaladadiyam AK, et al (2018) A review on sustainable microalgae based biofuel and bioenergy production: Recent developments. *J Clean Prod* 181:42–59. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.125>
- Ramaraj S, Ramalingam R, Abeer H, Elsayed F AA (2019) Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi J Biol Sci* 26:709–722. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.11.003>
- Ravi KB, Raghunatha Reddy KR, Shankaranarayanan J, et al (2014) Safety evaluation of zeaxanthin concentrate (OmniXanTM): acute, subchronic toxicity and mutagenicity studies. *Food Chem Toxicol* 72:30–39. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.06.015>
- Safi C, Cabas Rodriguez L, Mulder WJ, et al (2017) Energy consumption and water-soluble protein release by cell wall disruption of *Nannochloropsis gaditana*. *Bioresour Technol* 239:204–210. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.012>
- Shraim AM, Ahmed TA, Rahman MM, Hijji YM (2021) Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *Lebenson Wiss Technol* 150:111932. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111932>
- Singh RN, Sharma S (2012) Development of suitable photobioreactor for algae production – A review. *Renew Sustain Energy Rev* 16:2347–2353. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.026>
- Soto-Sierra L, Stoykova P, Nikolov ZL (2018) Extraction and fractionation of microalgae-based protein products. *Algal Res* 36:175–192. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.10.023>
- Spencer VA, Davie JR (2003) Isolation of proteins cross-linked to DNA by cisplatin. In: *Protein Protocols Handbook*, The Humana Press, New Jersey, pp 747–752

- Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A (2006) Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* 101:87–96. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>
- Stoica R, Velea S, Ilie L, et al (2013) The Influence of Ethanol Concentration on the Total Phenolics and Antioxidant Activity of *Scenedesmus Opoliensis* Algal Biomass Extracts. *Revista de Chimie*
- Stolz P, Obermayer B (2005) Manufacturing microalgae for skin care. *Cosmet Toilet* 99–106:120
- Ugwu CU, Aoyagi H, Uchiyama H (2008) Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresour Technol* 99:4021–4028. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.046>
- Vigani M, Parisi C, Rodríguez-Cerezo E, et al (2015) Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU. *Trends Food Sci Technol* 42:81–92. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.12.004>
- Viskari PJ, Colyer CL (2003) Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. *Anal Biochem* 319:263–271. [https://doi.org/10.1016/s0003-2697\(03\)00294-x](https://doi.org/10.1016/s0003-2697(03)00294-x)
- Yap JK, Sankaran R, Chew KW, et al (2021) Advancement of green technologies: A comprehensive review on the potential application of microalgae biomass. *Chemosphere* 281:130886. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130886>

Internetes források

<https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>

<https://archimer.ifremer.fr/doc/00705/81738/86385.pdf>

Globenewswire, 2021. Microalgae-Based Products Market Forecast to 2028. <https://www.globenewswire.com/> (accesed 27 August 2021)