

Nyomelemekkel dúsított mikroalga biomassa illetve kalcium-alginát előállítási körülményeinek optimalizálása

OTDK dolgozat

Készítette: Czikora Máté
Biológia Bsc. szakos hallgató

Témavezető: Dr. Forgó Péter, Molnár Szabolcs
EKF-TTK ÉLELMISZERKÉMIAI ÉS BIOKÉMIAI TANSZÉK



EGER, 2012

Table of Contents

1. Bevezetés.....	3
2. Célkitűzés.....	9
3. Anyag és módszer.....	10
3.1. Tápoldatok.....	10
3.2. Tenyésztés szakaszos működésű fotobioreaktorban.....	12
3.2. Alginát mikroelem megkötő képességének vizsgálata.....	13
3.3. Minta előkészítési módszer.....	14
3.4. A szorpció vizsgálatához alkalmazott műszer és beállítási paraméterei	15
4. Eredmények.....	19
4.1. Az algák biomassa gyarapodásának eredményei.....	19
4.2. Az algák bioszorpciók képességének eredményei.....	21
4.3. A mikroelemekkel dúsított kalcium-alginát gyöngyök vizsgálata.....	26
5. Összegzés.....	29
6. Köszönetnyilvánítás	31
7. Irodalomjegyzék.....	31

1. Bevezetés

Az egészséges táplálkozás alapvető fontosságú a mindennapi életben, magában foglalja rendszeres, kiegyensúlyozott étkezés során a megfelelő mikroelemek szervezetbe történő bevitelét. A hiánybetegségek kialakulásának a leggyakoribb oka a helytelen táplálkozás, amely elkerülhető az optimális táplálékarányok betartásával és esszenciális komponensek bevitelével. Az optimális táplálékarányok megtartása azért is kiemelkedő fontosságú, mivel általánosan elfogadott és globálisan ismert tény, hogy a tömegfogyasztás eredményeként az élelmiszerek tápértéke és jótékony hatású komponens tartalma jelentősen csökken.

A kutatások során célul tűztük ki olyan élelmiszertudományi vizsgálatok elvégzését, amelyek eredményeként az élelmiszer minőség szempontjából értékes mikroelemekkel dúsított funkcionális élelmiszer komponensek kifejlesztésére nyílik lehetőség. Az vizsgálatokhoz a jelentős mennyiségű algasavat tartalmazó *Spirulina platensis* és *Chlorella vulgaris* algákat választottuk.

A *Spirulina* algát már a korai időkben alkalmazták, táplálék kiegészítőként és gyógyszerként való használatukra Dél-Amerikában és Afrikában is találunk dokumentált nyomokat. A mikroalgák algasav tartalma a poliszacharid láncon karboxil csoportokat tartalmaz, amelyek alkalmasak fémionok komplex formában való megkötésére. A természetes algasavak ezáltal alkalmassá válnak a nyomelemek humán szervezetbe való bejuttatására.

Táplálkozástudományi szempontból a mikroalgák értékes komponenseket tartalmaznak, fehérje tartalmuk 50-70% szárazanyagra vonatkoztatva és tartalmazzák a humán szervezet számára szükséges esszenciális aminosavakat [1]. A szénhidrátokat tekintve cellulóz tartalmuk nem jelentős, viszont megtalálható bennük a murein (peptidoglikán) ami további aminosav bevitelt jelent élelmiszerként való alkalmazáskor [1,2,3,4]. A szárazanyagra vonatkoztatva a *Spirulina* szénhidrát tartalma 15-25% között változik [9]. A monoszacharidok aránya azonban alacsony, de megtalálhatók benne különböző cukoralkoholok (mannitol, szorbitol) és aminocukrok (glükózamin és ramnózamin), továbbá, jelentős inozitol tartalommal rendelkeznek [9]. A lipidek a *Spirulina* szárazanyag tartalmának 5.6-7.0 %-át teszik ki, azonban a korszerű extrakciós eljárásokkal meghatároztak már 11%-os lipid tartalmat is [2,3,5,7]. A lipid tartalom 17%-a egyszerű lipid és 83%-os összetett lipid

tartalommal rendelkeznek és kimutatható bennük a paraffin, különböző pigmentek, terpén alkoholok és szterolok. A szappanosítható lipidek legnagyobb része monogalaktozil és digalaktozil diglicerid és foszfatidil-glicerin. A foszfatidil-kolin, foszfatidil-etanolamin, és foszfatidil-inozitol mennyisége, illetve az esszenciális zsírsavak aránya (ω -3 és ω -6, linolénsavak) szintén magas nemzetségben, míg a trigliceridek előfordulása ritka [2,5]. Az esszenciális zsírsavak a prosztaglandinok, leukotriének, és tromboxánok prekursorai, amelyek az immunválasz legfontosabb mediátorai. A nem szappanosítható lipidjei közt jelentősek a szterolok, amelyek között található antimikrobiális hatású származék is [8]. A *Spirulina* platenis szárazanyagának maximális nukleinsav tartalma 4.2-6% közé tehető, ahol a DNS aránya harmada-negyede az RNS mennyiségének [1,5,6]. A *Spirulinákban* jelentős mennyiségű béta-karotinoid található, de kimutattak bennük fizoxantint és kriptoxantint is [25]. A *Spirulina* fajok szárazanyagának béta-karotintartalma 700-1700 mg-ra, kriptoxantin tartalma 100 mg-ra tehető kilogrammonként [2,5,8]. Provitamin tulajdonságaik miatt (a szervezetben A-vitaminná alakulnak) 1-2 gramm alga fogyasztása esetén fedezi a napi A-vitamin szükségletet [26]. Az alga E-vitamin tartalma szintén jelentős, száraz biomasszája 50-190 mg/kg E-vitamint tartalmaz, ami a búzacsíráéval mérhető össze [3,7]. Az E-vitamin ajánlott napi mennyisége 12 mg-ra tehető felnőtt emberi szervezetben [27]. B-vitamin tartalom terén a *Spirulina* fajok jelentősen elmaradnak az élesztőgombákhoz képest, de még így sincs olyan B-vitamin, amelynek mennyisége az algában ne tudná fedezni a napi szükségletet. A száraz *Spirulina* B₁ vitamintartalma átlagosan 34-50 mg/kg-ra, B₂ vitamintartalma 30-46 mg/kg-ra, B₆ vitamintartalma 5-8 mg/kg-ra, B₁₂ vitamintartalma 1.5-2.0 mg/kg-ra tehető. A *Spirulinák* szárazanyagában jelentős mennyiségben előforduló nyomelemek a kálium, kalcium, foszfor, vas, és magnézium. A vas átlagos mennyisége 580-1800 mg/kg, a kalciumé 1300-1400 mg/kg, a magnéziumé 2000-2900 mg/kg, a foszforé 6700-9000 mg/kg, a káliumé 6400-15400 mg/kg [28]. A magas vastartalom igen jelentős, mivel a vashiány meglehetősen gyakori jelenség, különösen terhes nők és gyermekek körében, a magas vastartalmú táplálékok pedig ritkák (a gabonafélék vastartalma például 150-250 mg/kg). A kalcium, foszfor és magnézium mennyisége egymással egyensúlyt mutat, ami kizárja a dekalifikáció veszélyét (nem csak a kalcium, de a foszfor túlsúlyának köszönhetően is). Magnézium hiány esetén előfordulhatnak kardiovaszkuláris és neurális rendellenességek. Érdemes kiemelni az alga magas kálium és jódtartalmát, utóbbi miatt tiroxinhiányos betegeknek is javasolják az alga fogyasztását. A jód nélkülözhetetlen a pajzsmirigy megfelelő működéséhez, hiányában a pajzsmirigy nem képes hormonszekrécióra, ami újszülött korban pajzsmirigytrópeséghez, felnőtt korban bőrszáradáshoz,

fáradékonysághoz, elhízáshoz vezet [34]. Az egyéb ionok, mint a réz vagy a cink mennyisége jóval alacsonyabbak. A réz átlagos mennyisége száraz *Spirulinában* 8-10 mg/kg, a cinké 21-40 mg/kg. Ha figyelembe vesszük viszont, hogy a réz napi szükséglete felnőtt szervezetben 1.5-3 mg, a cinké pedig 15 mg, akkor az algák jelentős mikroelem utánpótlást jelenthetnek a humán szervezet számára [28].

Az algák bioszorpciók képességét számos kutatás célozta. Spanyol és portugál kutatócsoport vizsgálta az algák vas-, és réz megkötő aktivitását *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis chuii*, *Chrysallida minutissima*, és *Rhodomonas salina* fajokon. Eredményeik szerint minden alga a vasat köti meg jobban, amely az *N. oculata*, és *C. minutissima* fajoknál érte el a legnagyobb értéket, 25-69%-ot. A réz megkötése szintén az *N. oculata* esetén bizonyult a legnagyobbaknak, hatékony megkötést mutattak ki a *Chrysallida minutissima* esetén is. A vas és a réz homeosztázisa igen jelentős, ugyanis ennek zavara fokozza a lipid-peroxidációt, ami a sejtek károsodásához vezet [10,11]. Brazil kutatók *Chaetophora elegans* esetén vizsgálták az ólom, nikkel, kadmium, és cink szorpciók kapacitását pH=5.5 esetén. A komplex képződési állandók közül a kadmium érte el a legnagyobb értéket, majd az ólom, cink és nikkel mutatott csökkenő komplex képzési hajlandóságot [12,13,14]. Lengyel kutatók *Spyrogira* fajban vizsgálták a réz, cink, és mangán felvételének dinamikáját, különböző koncentrációkban. Eredményeikből azt a megállapítást lehet leszűrni, hogy az algafaj már tíz perc után felveszi a környezetében lévő fémek 90-95%-át, ezt követő harminc perc után pedig a szorpció dinamikája egyensúlyi állapotot közelít meg. Az egyensúlyi állapot elérése függ a fémek koncentrációjától, amely minél magasabb, annál lassabban éri el az egyensúlyi állapotot. A szorpció egyébként a kadmium esetén bizonyult a leghatékonyabbnak [15]. Török kutatók néhány, a Fekete-tengerből származó algataxon nehézfém koncentrációját vizsgálták 1998 és 2000 között. A Sile kikötőből gyűjtött algafajok vasat, rézet, mangánt, és cinket abszorbeáltak jelentős mértékben, ám az évek során ezeknek a fémeknek a dúsulása csökkenő tendenciát mutatott. Az ólom, kadmium, króm, és kobalt megkötése elenyésző, 1998-1999-ben állandó értéket mutatott, bár a kadmiumnál esetenként megnövekedett, 2000-ben azonban folyamatos emelkedést tapasztaltak. Szinte ugyanez mondható el a Sinop kikötőjében gyűjtött algataxonok nehézfém tartalmáról is [21].

A fenti adatok alapján a bioszorpciót tehát számos tényező befolyásolja, jelentős hatással rendelkezik a pH, az oldatban levő ionok koncentrációja, vagy az ionerősség. Ez utóbbi jelentősen befolyásolja a fémek felvételének hatékonyságát, de a felvétel során az ionok között kialakuló versengés hátterében is az ionerősség áll [15, 16, 17, 18, 19, 20].

A növények számára a vas csak oldható formában hasznosítható. Tengerszikekben az oldott vas az egyik legfontosabb nyomelem, azonban olyan alacsony koncentrációban fordul elő, hogy limitáló tényezőnek számít. Felvehetőségét elsősorban a pH, az oxigén koncentrációja, és a vastartalmú komplexek molekuláris szerkezete határozza meg. Savas közegben a vas jól oldódik, könnyen felvehető, de lúgosabb tartomány felé haladva kicsapódik, nem hasznosítható. Az $\text{Fe}(\text{OH})_3$ például már 4-es pH-n is igen alacsony koncentrációban képes oldódni. Molekuláris szerkezetét illetően komplexek, kelátok formájában a legideálisabb a felvehetősége [32,33,35].

A cink Zn^{2+} , ZnCl^+ , és ZnOH^+ és ezek hidroxó komplex formáiban vehető fel. Felvételét elsősorban a pH, szervesanyag tartalom, hőmérséklet, foszfát tartalom, és bizonyos alkálifémek koncentrációja befolyásolja. A foszfát magas koncentrációja gátló hatású, mert ilyenkor a cink nehezen oldható formába alakul. A pH szempontjából inkább a savas közeg optimális a cink felvételére, de ilyenkor annak magas koncentrációja toxikus is lehet. Az alacsony hőmérséklet, vagy az olyan alkálifémek magas koncentrációja mint az Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , de főleg a Cu^{2+} kedvezőtlen hatással vannak a felvehetőségre. Általában a növények hidratált Zn^{2+} formájában veszik fel, de magasabb pH-n ZnOH^+ forma dominánsabb [32,33].

A molibdén igen alacsony koncentrációban fordul elő. Szemben a többi mikroelemmel, felvétele lúgos közegben kedvezőbb, mert a szorpciós komplexek molibdenátjai az OH^- ionokkal aktívan képesek kicserélődni. Molibdenát, illetve vas- és alumínium-oxidokhoz kötött formában hasznosítható. A növények leginkább molibdenát (MoO_4^{2-}) formájában veszik fel, de az SO_4^- ionok magas koncentrációja gátolja a felvételt [32,33].

A réz leginkább szerves vegyületekkel képzett komplexei segítségével vehető fel. Nagy affinitással kötődik karboxil és fenolos funkciós csoportokhoz. Kicserélhetősége azonban emiatt igen alacsony, bizonyos esetekben a kötődés annyira erős, hogy a növény nem tudja hasznosítani. Hasonlóan a legtöbb mikroelemhez, a magas pH (így a lúgos sók magas koncentrációja) csökkenti felvehetőségét. Szintén kedvezőtlen a rézfelvételre a cink magas koncentrációja, mivel a két nehézfém egymás kölcsönös versenytársa [32,33].

A foszfor felvételét legjelentősebben a pH befolyásolja. Savas pH-n a foszfor felvétele H_2PO_4^- formájában, lúgos vagy semleges közegben pedig HPO_4^{2-} formájában történik. Szárazföldön a foszfor kalciumfoszfát, vasfoszfát, vagy alumíniumfoszfát formában van jelen, tengerekben és édesvizekben oldott formában, a tengervizek négy fontos nyomelemének egyike. A foszfor vizekbe főleg a parti madarak ürülékén keresztül jut. Savas közegben a foszfátionok alumínium-hidroxidokhoz vagy vas-hidroxidokhoz kötődhetnek, de

agyagásványok, huminsavak felületéhez is kapcsolódhatnak, továbbá kicserélődhetnek a hidroxidionokkal. A szerves foszfát átalakul a sejtekben szerves foszforsav észterekké, viszont soha nem redukálódik. Az algák szempontjából igen fontos tényező a foszfát jelenléte, mivel édesvizekben és tengervizekben is nagyon gyorsan felveszik. A foszfor magas koncentrációja az algák túlszaporodását okozza [32,33,35].

A kálium talajokban kizárólag só formájában fordul elő, a tengervizekben igen alacsony az oldott kálium. A talajban abszorbeált, fixált, és oldatban levő formái lehetnek, amely felvehetőségét is befolyásolja (az abszorbeált kálium nem vehető fel). Az autotróf szervezetek általában K^+ ion csatornákon keresztül veszik fel a káliumot ionos formában. Számos enzim működéséhez elengedhetetlen elem, de a fehérjék hidratációjának optimalizálásában is fontos szerepet játszik [32,33].

A kalcium hozzáférhetősége az élő szervezetek számára más kationokkal szemben magasabb. Jelentősebb része ásványi anyagként, a talajrészecskékhez abszorbeáltan, illetve oldott állapotban fordul elő, tengervizekben igen alacsony koncentrációban található. Meszes talajokban főleg $CaCO_3$ formájában fordulnak elő, amely CO_2 hatására vízdékony Ca-hidrogénkarbonáttá alakul, amely talajokból könnyen kioldódik. Lúg hatására a kalcium karbonát formában kicsapódik, csökkentve ezáltal felvehetőségét. A kalcium felvétele Ca^{2+} ion formájában történik. A Ca^{2+} nélkülözhetetlen a sejtek normális működéséhez, a sejtek megnyúlásához, az ozmoregulációban, illetve mint másodlagos hírvivő [32,33,37,38].

A magnézium természetes körülmények között főleg szilikátok alkotójaként fordul elő, de agyagásványokban is megtalálható. Ezért az agyagos talajok magnéziumtartalma magasabb, mint a homoktalajok esetén. Tengervizekben más anionokhoz és kationokhoz képest magasabb koncentrációban található oldott magnézium. Felvétele Mg^{2+} formájában történik. Az alacsony pH, illetve a K^+ , Ca^{2+} , NH_4^+ , vagy az Mn^{2+} jelentősen csökkenti a magnézium felvételének sebességét. A magnézium a fotoszintézisben nélkülözhetetlen szerepet tölt be, a klorofill-a molekulának fő alkotóeleme a magnézium [32,33,37].

Az élő szervezetekben levő mikroelemek mennyiségi meghatározásának egyik módja az atomabszorpciós spektrofotometria (AAS). Az módszer gázfázisú koncentráció meghatározására alkalmas, az atomizálást a roncsolt minta lángba porlasztásával vagy elektrotermikus kemencébe való juttatásával lehet elérni. A gerjesztést a vizsgálandó elemet katódként tartalmazó speciális fényforrás (vájtkatód lámpa) segítségével lehet elvégezni. Az atomizált rendszeren áthaladó adott hullámhosszúságú fény intenzitás csökkenése arányos a mintatér atomkoncentrációjával, amely segítségével következtethetünk az adott elem mintabeli koncentrációjára (Lambert-Beer törvény). Mivel a lángban történő atomizálás során

a minta folyamatos porlasztását és lángba történő bejuttatását hajtjuk végre, az atomok folyamatos áramlása történik a vizsgálati módszer a ppm koncentráció tartományban alkalmas a meghatározásokra. Elektrotermikus atomizálás esetén az atomizáló grafit küvettába juttatott minta koncentrációja a mérés alatt állandó, ezért ezzel az atomizálási módszerrel a ppb koncentráció tartományban is végezhető meghatározások [29].

Az algák magas jótékony komponens tartalma elsősorban az élelmiszeriparban és a gyógyszeriparban hasznosítható. Manapság a világ szinte minden részén állítanak elő algakapszulákat, vagy tablettákat, amelyek hasznos táplálékkiegészítőként szolgálnak. Magas jódtartalmuk miatt bizonyítottan hatásosak tiroxinhiányos betegek kezelésére, magas kalcium- és fehérjetartalmuknak köszönhetően pedig sportolók számára is javasolt. Mivel antioxidánsokban is gazdagok, nagy szerepet játszanak az immunrendszer erősítésében. Magas pigmenttartalmuk miatt az élelmiszerekben természetes színezékként is hasznosíthatóak, a kozmetikai ipar is széleskörűen kezdi alkalmazni. A hatékony fémmegkötő képesség eredménye, hogy alkalmazásukkal elvégezhető a felszíni vizek tisztítása, amely minőségjavulást eredményez [30]. Környezetvédelmi jelentőségük abban is kifejeződik, hogy számos ország kísérletezik üzemanyagok, biodízelek algákból történő előállítására. Ökológiai jelentőségük elsősorban oxigéntermelésükben nyilvánul meg, biomassájuknak köszönhetően a világ oxigénkészletének jelentős részét algák állítják elő [30], de a biomassza megújuló energiaforrásként is hasznosítható. Ökológiai tűrőképességük fontos szerepet játszik a felszíni vizek biológiai állapotának meghatározásában, minősítésében, jelenlétükkel ugyanis indikálják a víz állapotát. Számos taxont használnak indikátorként, így a *Spirogyra*, *Closterium*, *Synura*, *Ulothrix*, *Euglena*, *Oscillatoria*, és számos egyéb taxonokat [36]. Az algák széleskörű jelentősége miatt manapság mesterséges körülmények közt is foglalkoznak algatenyésztéssel. A tenyésztés foto-bioreaktorokban, vagy tengeri "farmokban" történik, Kína, USA, Skócia, Norvégia, és Franciaország nagy mennyiségben termel algát. Magyarországon 2007-ben az Első Magyar Algatechnika kft. a KMOP támogatásával épített foto-bioreaktort, amellyel megalapozta hazánkban az alga biomassza nagyüzemű előállítását. Az algák egyik legismertebb, és széleskörben alkalmazott származéka az alginát, amely barnamoszatokban különösen nagy mennyiségben fordul elő. Az alginát lineáris poliszacharid polimer, amely β -D-mannuronát (M), és α -L-guluronát (G) monomerekből épül fel. A kettő egymással glikozidos észterkötéssel kapcsolódik, a kapcsolódott monomerek lánc formát vesznek fel. A láncokra jellemző, hogy M és G blokkok találhatók bennük. Az alginátokat általában nátrium-alginát formájában nyerik ki. A nátrium-alginát por szerkezetű, vízben

nehezen oldódó vegyület. Kalcium hatására viszont a nátrium-ionok kalciumra cserélődnek ki, amelyek kötéseket hoznak létre a monomerek között. Minden kalcium-ion két láncot köt össze, ami végül egy stabil, zselatinózus jellegű, ám belül üreges kalcium-alginát kialakulásához vezet. Mivel ez a szerkezet nagy mennyiségű vizet, és ionokat képes felvenni, így az élelmiszeripar, tejipar és gyógyszeripar is széleskörben hasznosítja. Yoghurtokban, tejben, gyümölcsökben gyakran alkalmazzák táplálékkiegészítőként, de számos alginátkapszulát is készítenek jótékony hatása miatt. Szintén magas víz és iontartalma, illetve stabilitása miatt a molekulát a növényi biotechnológiában is alkalmazzák, növények ivartalan szaporítására. A növényi embriót beültetik a kalcim-alginát burokba, amely mint mesterséges mag, biztosítja az embrió víz, és tápanyag ellátását [31]. Vízfelszívó képességének köszönhetően a textiliparban is alkalmazzák gyulladáscsökkentő, és gennyeseb gyógyítására alkalmas kötszerek előállítására. Elasztikus tulajdonságát a fogászatban használják foglenyomatok készítésére. A kozmetikában készített arcmaszkok is alginát segítségével készülnek. Az alginátok jelentősége tehát épp olyan széleskörű, mint az algáké, ami tovább növeli a fototróf mikroorganizmusok fontosságát.

2. Célkitűzés

1. A törzstenyészet mikrobiológia állapotának ellenőrzése.
2. Tenyésztési körülmények optimalizálása
3. Az alginát fémmegkötő képességének vizsgálata különböző pH-n
4. A két kiválasztott algafaj, a *Spirulina platensis* és *Chlorella vulgaris* bioszorpciós képességének „in vitro” vizsgálata
5. Az optimális biomassza gyarapodás paramétereinek vizsgálata

A két algafaj bioszorpciós képességének vizsgálata során az alábbi nyomelemeket választottuk ki.

Vas: A hemoglobin szerves alkotóeleme, nélkülözhetetlen az oxigénszállításban.

Réz: Az E-vitaminhoz vagy béta-karotinhoz hasonlóan antioxidáns szerepű.

Cink: A sejtmembrán integritásában, szövetek kialakításában nélkülözhetetlen.

Molibdén: Számos enzim alkotóeleme, a természetben csak ultranyomnyi mennyiségben fordul elő, és az élő szervezet is csupán ultranyomnyi mennyiségben hasznosítja.

3. Anyag és módszer

A vizsgálataink során felhasznált fémsókat, nátrium-alginátot illetve standardokat a Sigma-Aldrich-tól (St. Louis, Missouri) szereztük be.

A *Chlorella v.* alga-törzs (egy-fajú *Chlorella vulgaris* tenyészet) beszerzése Pest megyei Növényegészségügyi és Talajvédelmi Állomásról - Gödöllőről történt. A tenyészetet papírvattadugóval lezárt, steril kémcsőben, ferde agaron, alacsony hőmérsékleten tartottuk a kísérlet megkezdéséig.

A *Spirulina p.* alga-törzset a Soley Institute (El Sobrante, CA) magyarországi képviselőjétől szereztük be, tápoldatban, szuszpenzió formájában. A törzsoldat kézhezvételekor azonnal leoltást készítettünk a tenyésztés megkezdéséhez.

3.1. Tápoldatok

Az általunk kiválasztott algafajok a *Chlorella vulgaris* és *Spirulina platensis*. Előbbi faj a hazai vizekben széles körben elterjedt, az utóbbit pedig ősidők óta hasznosítják. A *Chlorella* kitenyésztéséhez szükséges táptalajt az OECD TG 201-es szabvány alapján, a *Spirulináét* a Zarrouk előírás alapján állítottuk elő.

Komponensek	Mennyiségük (g/l)
NaHCO ₃	18
NaNO ₃	2.5
K ₂ HPO ₄	0.5
K ₂ SO ₄	1
NaCl	1
CaCl ₂	0.04
Na ₂ EDTA	0.08
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.2
FeSO ₄ *7H ₂ O	0.01
Nyomelemek	3.3. illetve 3.4. táblázat szerint

3.1. táblázat. A Zarrouk tápoldat komponensei és mennyiségük

Komponensek	Mennyiségük
NaHCO ₃	15.00
NaNO ₃	12.16
CaCl ₂	4.41
MgSO ₄ *7H ₂ O	14.60
K ₂ HPO ₄	1.04
Na ₂ EDTA	0.30
Nyomelemek	3.3. illetve 3.4. táblázat szerint

3.2. táblázat. Az OECD TG 201 tápoldat komponensei és mennyiségük

Az előírásokban szereplő komponenseket 1000 ml desztillált vízben oldottuk, majd a fertőzés elkerülése érdekében membránszűrőn átszűrtük. (pórusméret = 0.22 µm). Az így előkészített tápoldatok 250 milliliterét öntöttük 500 milliliteres Erlenmeyer-lombikoba. A nyomelemek mennyiségét az alábbi 3.3. illetve 3.4. táblázatban foglaltak szerint állítottuk be mindkét tápoldat típusban.

Az első vonalon háromféle variáció szerint változtattuk a fémek koncentrációját. Az első variációban a négy fémiont 0.1 µmol/l koncentrációban adtuk a tápoldathoz, a második variációban 1 µmol/l koncentrációban, a harmadikban 10 µmol/l koncentrációban.

	Vas (µmol/l)	Réz (µmol/l)	Cink (µmol/l)	Molibdén (µmol/l)
1. variáció	0.1	0.1	0.1	0.1
2. variáció	1	1	1	1
3. variáció	10	10	10	10

3.3. táblázat. A vizsgált fémek módosított koncentrációi az első tenyésztési vonalban

A második vonalon négyféle variáció szerint változtattuk a fémek koncentrációját. Az első variációban a vas mennyiségét állítottuk 10 µmol/l-re, a másodikban a rézét, a harmadikban a cinkét, a negyedikben pedig a molbidénét, miközben a többi fém koncentrációját 1 µmol/l mennyiségben adtuk az oldathoz. Itt tehát minden verzióban csak három nyomelem mennyisége ekvimoláris, a negyediket tízszeresére növeltük.

	Vas ($\mu\text{mol/l}$)	Réz ($\mu\text{mol/l}$)	Cink ($\mu\text{mol/l}$)	Molibdén ($\mu\text{mol/l}$)
1. variáció	10	1	1	1
2. variáció	1	10	1	1
3. variáció	1	1	10	1
4. variáció	1	1	1	10

3.4. táblázat. A vizsgált fémek módosított koncentrációi a második tenyésztési vonalban

A tenyészet optikai denzitása minden esetben 11 McFarlandnak felelt meg az algatörzs hozzáadását követően. A tenyésztést két hetes periódusban végeztük, speciális megvilágítás és levegő átbuborékolatása mellett. Az összes variáció esetén három párhuzamos tenyésztést végeztünk azonos körülmények között.

3.2. Tenyésztés szakaszos működésű fotobioreaktorban

A fotobioreaktorok általánosságban olyan tenyésztő rendszerek, amelyek fototróf szervezetek életműködéséhez, és szaporodásához biztosítanak optimális feltételeket. A tápoldatokat tartalmazó Erlenmeyer lombikokat papírvatta dugóval lezártuk, ez a dugó tartalmazta a levegőztetésre használt csövet. A lombikok a fényforrás fölé elhelyezett üveglapra kerültek. A rendszer folyamatos buborékolatással oxigént juttatott a tápoldatokba, a kifejetten növények számára kifejlesztett fényforrást alkalmaztunk. (Aqua Medic GmbH Bissebdorf) 12 órás periódusonként sötét illetve fény szakaszt automatika biztosította. A lombikok ezen körülmények közt két héten keresztül maradtak a rendszerben, ezután lekerültek a fotobioreaktorról.



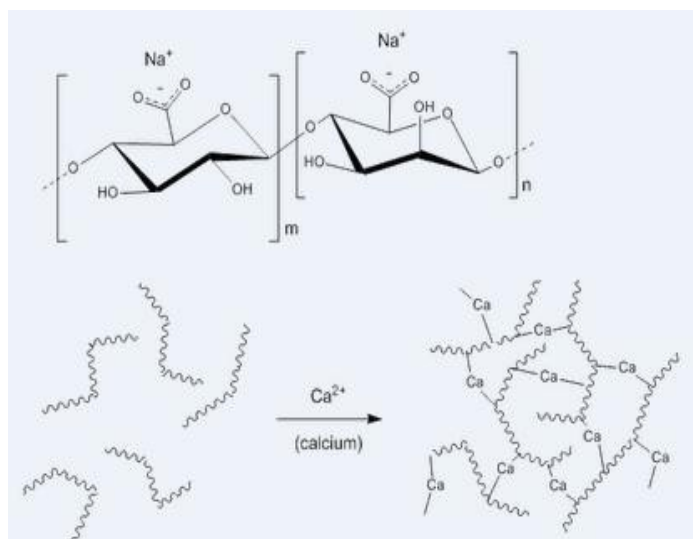
3.2. ábra. A fotobioreaktorra helyezett algatenyészet

3.2. Alginát mikroelem megkötő képességének vizsgálata

Az előkészítés során 10m% -os antrium-alginát szuszpenziót állítottunk elő, melynek kémhatását az alábbi értékekre állítottuk be: pH 5; pH 7; és pH 10. Az in vitro kísérletek során kiválasztott mikroelemeket (vas, réz, cink, molibdén) olyan koncentrációban adtuk az oldathoz, amely az RDA által előírt napi bevitel 20%-ának felel meg. Ezeket folyamatos kevertetés közben a szuszpenzióhoz adagoltuk, amelyet ezután Pasteur-pipettával 2 m%-os kalcium-klorid oldatba csepegtettük. Az eljárás során kalcium-alginát gyöngyöket állítottunk elő amelyek zselés burokba zárva tartalmazták az általunk bejuttatott mikroelemeket. A kísérletet háromszoros ismételtsben hajtottuk végre.



3.1.1. ábra. Kalcium-alginát gyöngyök



3.1.2. ábra. A kalcium-alginát gyöngyök előállítása

3.3. Minta előkészítési módszer

3.3.1. Algasav esetén

A centrifugált, átmosott szilárd fázist liofilizáltuk, majd hidrogén-peroxid és salétromsav jelenlétében mikrohullámú berendezés (MARS, CEM Corporation, Matthews, USA) segítségével roncsoltuk. A fémtartalmat (AAS Varian, Mulgrave, Austria) berendezés segítségével határoztuk meg.

3.3.2. Élő alga esetén

A két hetes tenyésztési periódust követően az algát centrifugáltuk, és desztillált vízben mostuk (elektromos vezetőképessége <0.055 mS). Ezt a mosást háromszor ismételtük, hogy a tápoldat esetleges maradékát eltávolítsuk a biomasszából. Az így előkészített algát liofilizáltuk, a száraz biomassza tömegének meghatározását követően hidrogén-peroxid és salétromsav jelenlétében mikrohullámú berendezés (MARS, CEM Corporation, Matthews, USA) segítségével roncsoltuk. A fémtartalmat (AAS Varian, Mulgrave, Austria) berendezés segítségével határoztuk meg.

3.4. A szorpció vizsgálatához alkalmazott műszer és beállítási paraméterei

A biomassza adott elemtartalmának meghatározásához használt Varian SpektrAA 50B atomabszorpciós spektrofotométer beállítási paraméterei az alábbiak voltak.

A vas koncentrációjának meghatározása:

Láng AAS módszerrel

Minta adagolásának módszere: manuális

Vizsgálat típusa: abszorbancia alapján

Láng típusa: levegő és acetilén

Gázáramlás: levegő esetén: 3.5 l/perc, acetilén esetén: 1.5 l/perc

Mérési paraméterei:

Mérés típusa: csúcsmagasság

Mérési idő: 5 s

Késleltetés: 5 s

Kalibráció: Koncentráció alapján

Mintavétel ismétlése: 3

Kalibráció ismétlése: 3

Optikai paraméterei:

Áramerősség (lámpa) 7,0 mA

Hullámhossz: 248,3 nm

Rés-szélesség: 0,2 nm

Háttérkorrekció: Deutérium lámpa aktív

Kalibráció:

Koncentrációk: 3 ppm; 1,5 ppm; 0,75 ppm; 0,375 ppm; 0,1875 ppm; calib.zero
(ultradesztillált víz)

Kalibráció algoritmus: Lineáris

A réz koncentrációjának meghatározása:

Láng AAS módszerrel

Minta adagolás módszere: Manuális

Vizsgálat típusa: Abszorbancia alapján

Láng típusa: Levegő és Acetilén

Gázáramlás: levegő esetén: 3.5 l/perc, acetilén esetén: 1.5 l/perc

Mérési paraméterei:

Mérés típusa: csúcsmagasság

Mérési idő: 5s

Késleltetés: 5s

Kalibráció: Koncentráció alapján

Mintavétel ismétlése: 3

Kalibráció ismétlése: 3

Optikai paraméterei:

Áramerősség (lámpa) 4,0 mA

Hullámhossz: 324,8 nm

Rés-szélesség: 0,5 nm

Háttérkorrekció: Deutérium lámpa aktív

Kalibráció:

Koncentrációk: 1 ppm; 0,5 ppm; 0,25 ppm; 0,125 ppm; calib.zero: (ultradesztillált víz)

Kalibráció algoritmus: Lineáris

A cink koncentrációjának meghatározása:

Láng AAS módszerrel

Minta adagolás módszere: Manuális

Vizsgálat típusa: Abszorbancia alapján

Láng típusa: Levegő és Acetilén

Gázáramlás: levegő esetén: 3.5 l/perc, acetilén esetén: 1.5 l/perc

Mérési paraméterei:

Mérés típusa: csúsmagasság

Mérési idő: 5s

Késleltetés: 10s

Kalibráció: Koncentráció alapján

Mintavétel ismétlése: 3

Kalibráció ismétlése: 3

Optikai paraméterei:

Áramerősség (lámpa) 5,0 mA

Hullámhossz: 213,9 nm

Rés-szélesség: 1,0 nm

Háttérkorrekció: Deutérium lámpa aktív

Kalibráció:

Koncentrációk: 2 ppm; 1,5 ppm; 1 ppm; 0,5 ppm; 0,25 ppm; 0,125 ppm; calib.zero:
(ultradesztillált víz)

Kalibráció algoritmus: Lineáris

A molibdén koncentrációjának meghatározása

Elektrotermikus AAS módszerrel

Minta adagolás módszere: Automatikus

Mérési paraméterei:

Mérés típusa: csúsmagasság

Mintavétel ismétlése: 3

Kalibráció ismétlése: 3

Optikai paraméterei:

Áramerősség (lámpa) 7,0 mA

Hullámhossz: 313,3 nm

Rés-szélesség: 0,5 nm

Háttérkorrekció: Deutérium lámpa aktív

Kalibráció:

Koncentrációk: 45 ppb; 30 ppb; 15 ppb; calib.zero: (ultradesztillált víz)

Kalibráció algoritmus: Lineáris

Az ET-AAS programot táblázatban tüntetem fel. A jel tárolása a 6.-9. lépésben történik, míg az olvasás a 7.-8. lépésben valósul meg.

Lépések	Hőmérséklet (C°)	Idő (s)	Áramlás (l/perc)	Művelet
1.	95	5	3	
2.	95	40	3	
3.	120	10	3	
4.	1000	5	3	
5.	1000	1	3	
6.	1000	2	0	Store signal
7.	2800	1	0	Read+Store
8.	2800	2	0	Read+Store
9.	2800	2	3	Store signal

3.4. táblázat. Az ET-AAS program

A műveletekben szereplő “Store signal” jelenti a jel tárolását, a “Read+store” pedig a jel beolvasását, és tárolását. Az ET-AAS módszer alkalmas az ultranyomnyi (ug/kg) mennyiségben előforduló molbidén mennyiségi meghatározására. Az FAAS módszert a nyomnyi mennyiségek (mg/kg) kimutatása és meghatározása során alkalmaztuk.

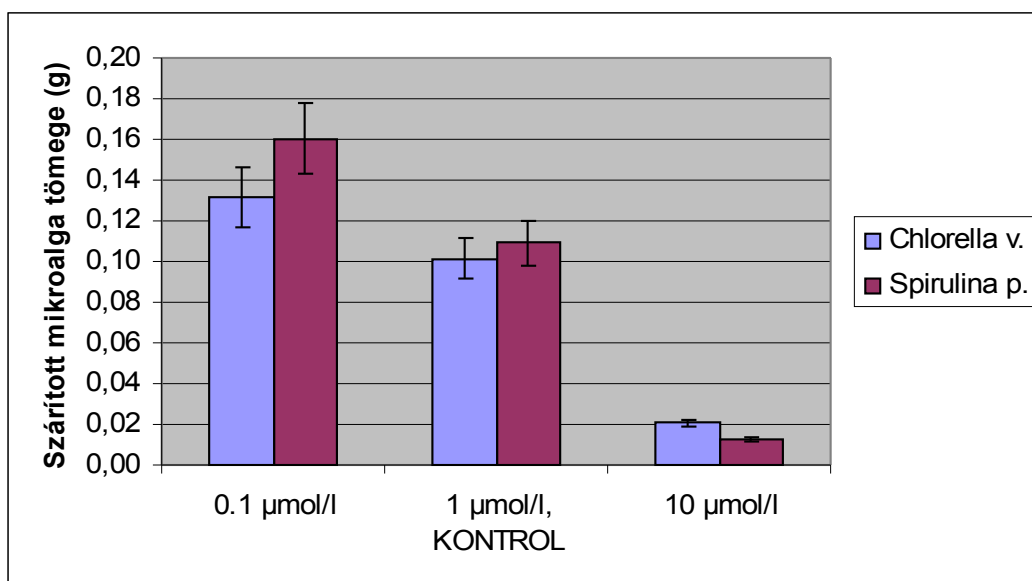


3.3. ábra. Az atomabszorpciós spektrofotométer

4. Eredmények

4.1. Az algák biomassza gyarapodásának eredményei

Az alábbi ábrák és táblázatok tartalmazzák a kéthetes tenyésztési periódust követően előállított biomasszára tömeggyarapodására vonatkozó eredményeket, a különböző tápoldatok esetén. A megadott értékek három párhuzamos tenyészet eredményeinek átlaga és a 250 ml tápoldatban előállított biomasszára vonatkoznak a szárítást követően.

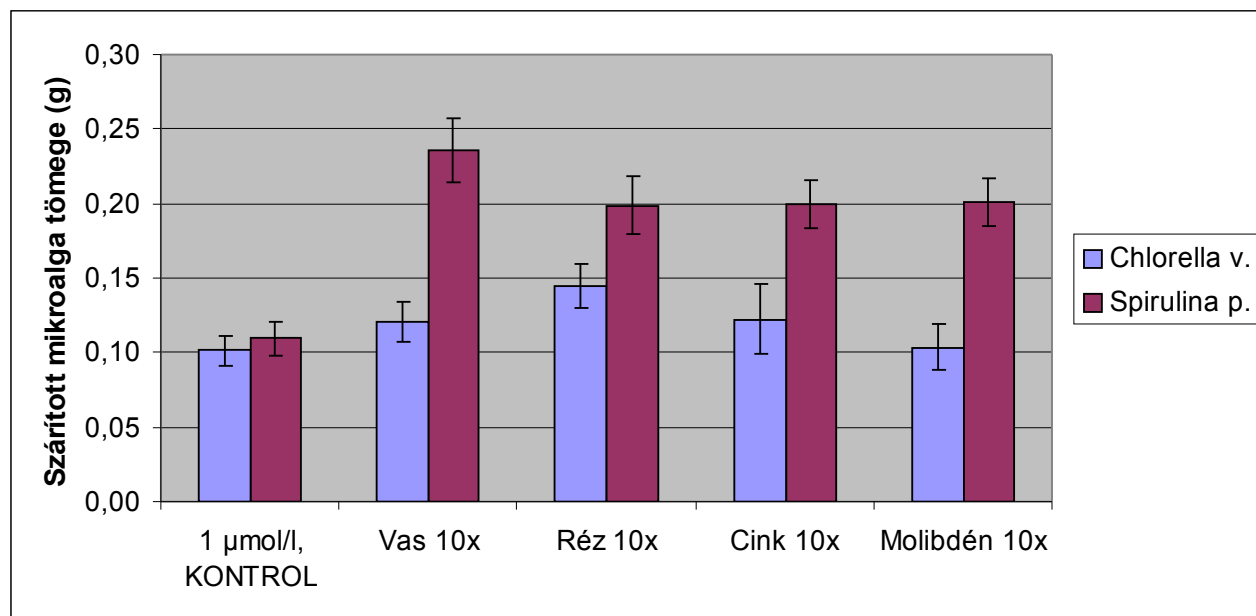


4.1.1. ábra. A két alga faj biomassza produktivitása két hét tenyésztési periódus után, az első tenyésztési vonalon,

Vizsgált nyomelemek koncentrációja	<i>Chlorella v.</i> száraz biomassa tömege (g)	Szórásértékek (<i>Chlorella v.</i>)	<i>Spirulina p.</i> száraz biomassa tömege (g)	Szórásértékek (<i>Spirulina p.</i>)
0.1 $\mu\text{mol/l}$	0.1319	0.0145	0.1603	0.0176
1 $\mu\text{mol/l}$ KONTROL	0.1012	0.0101	0.1093	0.0109
10 $\mu\text{mol/l}$	0.0209	0.0017	0.0125	0.0013

4.1.1. táblázat. A két alga faj biomassa produktivitása két hét tenyésztési periódus után, az első tenyésztési vonalon, három párhuzamos tenyésztet eredményeinek átlaga

Az első tenyésztési vonalon a négy vizsgált nyomelem koncentrációját ekvimolárisra állítottuk, három különböző verzióban. Az első verziónál a négy nyomelem koncentrációja 0.1 $\mu\text{mol/l}$, a második verziónál 1 $\mu\text{mol/l}$, a harmadiknál 10 $\mu\text{mol/l}$. A *Chlorella v.* száraz biomassa tömege 0.1 $\mu\text{mol/l}$ -es nyomelem koncentráció esetén több mint 0.12 g volt. 1 $\mu\text{mol/l}$ -es nyomelem koncentrációnál ez az érték 0.10 g volt, 10 $\mu\text{mol/l}$ -es nyomelem koncentráció esetén 0.02 g. Hasonló eredmény figyelhető meg a *Spirulina p.* esetén is. 0.1 $\mu\text{mol/l}$ -es fémion koncentrációnál az alga száraz biomassa tömege 0.16 g, 1 $\mu\text{mol/l}$ -es fémion koncentrációnál már a 0.11 g-ot sem éri el, 10 $\mu\text{mol/l}$ -es fémion koncentrációnál pedig alig több 0.01 g-nál.



4.1.2. ábra. A két alga faj biomassa produktivitása két hét tenyésztési periódus után, a második tenyésztési vonalon, három párhuzamos tenyésztet eredményeinek átlaga

Vizsgált nyomelemek koncentrációja	<i>Chlorella v.</i> száraz biomassa tömege (g)	Szórásértékek (<i>Chlorella v.</i>)	<i>Spirulina p.</i> száraz biomassa tömege (g)	Szórásértékek (<i>Spirulina p.</i>)
1 µmol/l KONTROL	0.1012	0.0101	0.1093	0.0109
Vas 10x	0.1206	0.0133	0.3261	0.0215
Réz 10x	0.1450	0.0145	0.1988	0.0199
Cink 10x	0.1222	0.0232	0.1999	0.0162
Molibdén 10x	0.1036	0.0155	0.2011	0.0163

4.1.2. táblázat. A két alga faj biomassa produktivitása két hét tenyésztési periódus után, az első tenyésztési vonalon, három párhuzamos tenyésztet eredményeinek átlaga

A második tenyésztési vonalon tehát négy verziót indítottunk, ahol három nyomelem koncentrációját 1 µmol/l-re állítottuk, egyet pedig 10 µmol/l-re emeltünk, viszont az egyes verzióknál mindig más fémion koncentrációját emeltük tízszeresre.

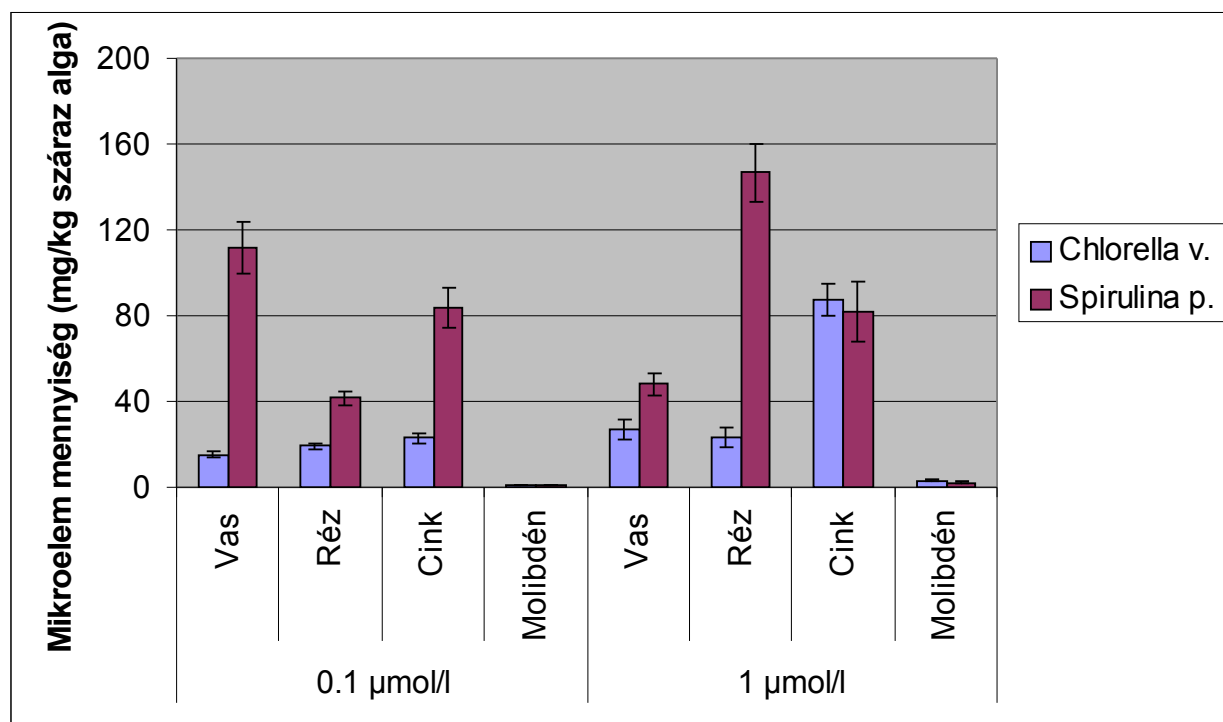
Az összehasonlíthatóság érdekében kontrolnak az első tenyésztési vonal azon verzióját használtuk, ahol az összes fémion koncentrációja 1 µmol/l.

A *Chlorella v.* esetén a száraz biomassa tömeg átlagosan 0.12 g értéket mutat. Biomassa gyarapodására a kontrolhoz viszonyítva, legkedvezőbben a tízszeresére emelt réz koncentrációja hatott, míg a tízszeresére emelt molibdén koncentrációja a legkevésbé. A tízszeresre növelt vas és cink koncentráció is pozitív hatású volt, mindkét esetben a biomassa értéke több mint 0.12 g.

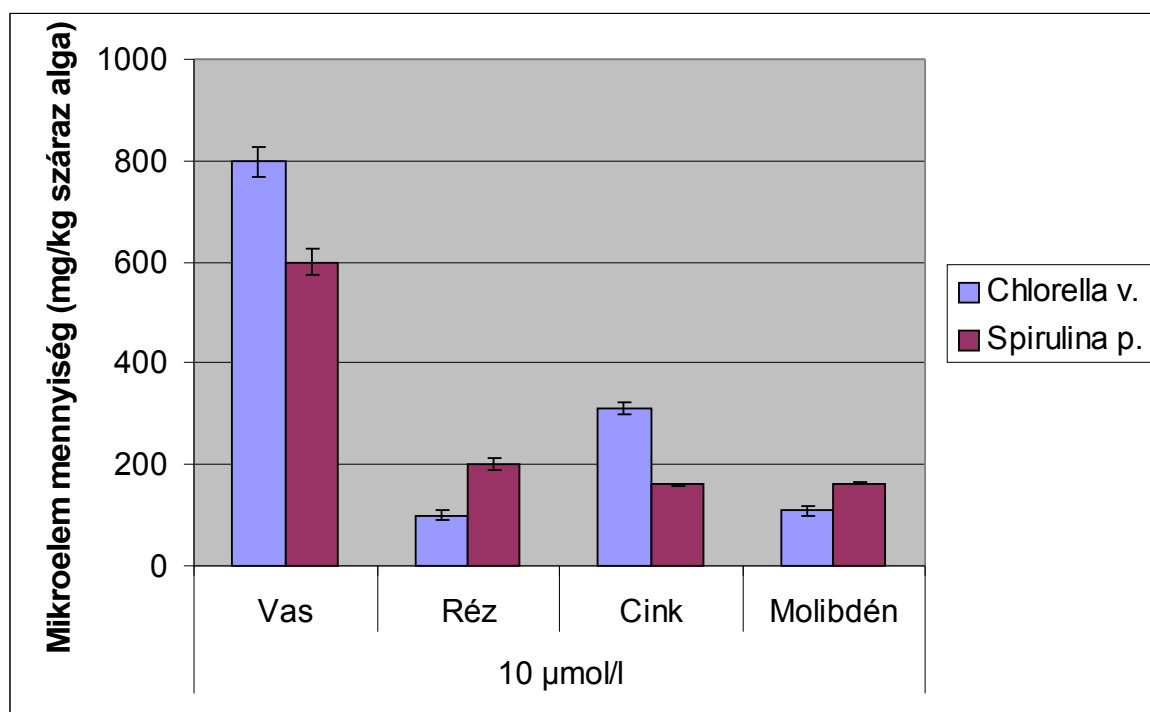
A *Spirulina p.* esetén a száraz tömeg átlagosan 0.20 g, ahol a tízszeresre növelt vas koncentrációja hatott legkedvezőbben a biomassa gyarapodására (itt a 0.30 g-ot is meghaladta). Ezt követően bármely fém koncentrációját emeltük tízszeresére, a biomassa tömege közel azonos értékeket mutatott, ám ezek az értékek jóval magasabbak a kontrolhoz képest. A kontrolnál a száraz tömeg 0.10 g, a tízszeres réz, cink, és molibdén esetén is több mint 0.19 g).

Összegezve a két tenyésztési vonal eredményeit megállapítható, hogy a *Chlorella v.* száraz tömege átlagosan 0.12 g, ahol legmagasabb értéket a tízszeresre növelt réz koncentrációnál ért el. A *Spirulina p.* száraz tömege átlagosan 0.20 g értéket mutatott, ahol legmagasabb értéket a tízszeresre növelt vas koncentrációnál ért el. Mindkét algánál elmondható, hogy ahol a négy vizsgált nyomelem koncentrációját 10 µmol/l-re állítottuk, ott a biomassa tömegek szignifikánsan alacsony értéket mutattak (*Chlorellánál* 0.02 g, *Spirulinánál* 0.01 g). Az alacsony értékek azzal magyarázhatók, hogy a nyomelemek túl magas koncentrációja már gátló tényezőként hatott az algák szaporodására.

4.2. Az algák bioszorpciós képességének eredményei



4.2.1. ábra. A biomassza mikroelem koncentrációja a két hetes tenyésztést követően az első tenyésztési vonalon – három párhuzamos tenyészet átlaga



4.2.2. ábra. A biomassza mikroelem koncentrációja a két hetes tenyésztést követően az első tenyésztési vonalon – három párhuzamos tenyészet átlaga

	Vizsgált nyomelemek	<i>Chlorella v.</i> száraz nyomelem tartalma (mg/kg)	Szórásértékek	<i>Spirulina p.</i> száraz nyomelem tartalma (mg/kg)	Szórásértékek
0.1 μmol/l	Vas	15.12	1.51	111.39	12.25
	Réz	19.18	1.17	41.41	3.35
	Cink	22.86	2.08	83.61	9.20
	Molibdén	0.91	0.11	1.00	0.02
1 μmol/ l	Vas	27.20	4.62	47.92	4.79
	Réz	23.48	4.70	146.65	13.35
	Cink	87.35	7.08	82.11	13.96
	Molibdén	2.93	0.47	2.26	0.09
10 μmol/l	Vas	798.24	29.82	599.32	25.93
	Réz	100.33	9.03	199.23	11.92
	Cink	310.26	11.03	160.33	1.92
	Molibdén	108.96	8.90	163.27	3.43

4.2.1. ábra. A biomassza mikroelem koncentrációja a két hetes tenyésztést követően az első tenyésztési vonalon – három párhuzamos tenyészet átlaga

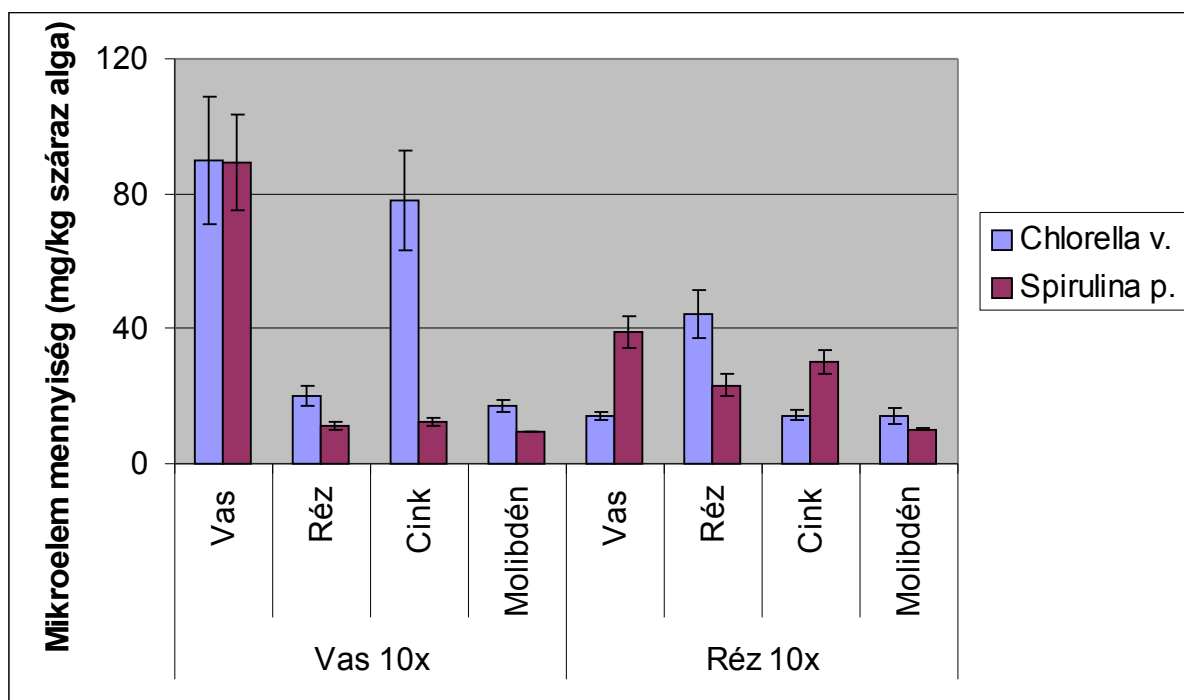
A *Chlorella v.* estén ahol a vizsgált nyomelemek koncentrációját 0.1 μmol/l-re állítottuk, ott a cink felvétele bizonyult leghatékonyabbnak (több mint 20 mg/kg), míg a molibdén dúsulása száraz biomasszájában elenyésző (1 mg/kg-ot sem ért el). A vas és a réz dúsulása is jelentős, előbbinél több mint 15 mg/kg-ot, utóbbinál több mint 19 mg/kg-ot ért el.

1 μmol/l-es nyomelem koncentrációnál a cink dúsulása négyszeresére emelkedett az algában (több mint 87 mg/kg), de a vas és réz dúsulása is jelentős (vasnál több mint 27 mg/kg, réznél 23 mg/kg). A molibdén felvétele is több mint kétszeresére növekedett (majdnem 3 mg/kg).

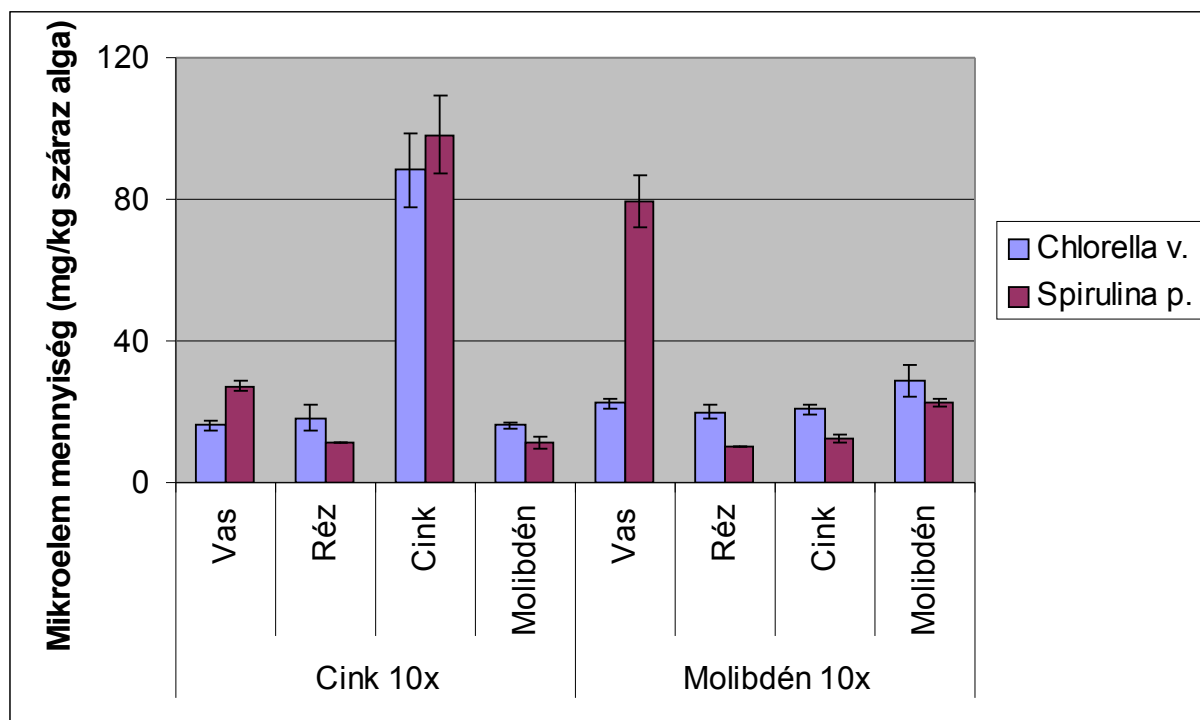
A *Spirulina p.* esetén a nyomelemek dúsulása már akkor is jóval nagyobb a *Chlorellához* képest, amikor azok koncentrációját 0.1 μmol/l-re állítottuk. A vas mennyisége a száraz algában több mint 111 mg/kg, a rézé több mint 41 mg/kg, a cinké meghaladja a 83 mg/kg-ot, a molibdéné pedig eléri az 1 mg/kg-ot. Vagyis a legnagyobb mértékben felvett fém itt a vas.

Az 1 μmol/l-es nyomelem koncentráció a réz dúsulására hatott legkedvezőbben, ahol a réz mennyisége az előzőhöz képest több mint háromszorosára emelkedett. A molibdén továbbra is a legkevésbé felvett nyomelem, ám annak dúsulása itt is duplájára emelkedett az előzőhöz képest.

Mindkét algánál elmondható, hogy a 10 μmol/l-es nyomelem koncentráció esetén abszorbeálták a legtöbb fémeket, alacsony biomassza produktivitásuk ellenére. A vas mennyisége száraz *Chlorellában* majdnem 800 mg/kg, *Spirulina* esetén majdnem 600 mg/kg, de a többi fémion felvétele is jelentős. Ebben az esetben a *Chlorella* a vasat és a cinket, a *Spirulina* pedig a rézet és molibdént abszorbeálta hatékonyabban.



4.2.3. ábra. A biomassa mikroelem koncentrációja a két hetes tenyésztést követően az második tenyésztési vonalon – három párhuzamos tenyészet átlaga



4.2.4. ábra. A biomassa mikroelem koncentrációja a két hetes tenyésztést követően a második tenyésztési vonalon – három párhuzamos tenyészet átlaga

	Vizsgált nyomeleme k	Chlorella v. száraz nyomelemtartalma (mg/kg)	Szórásértékek	Spirulina p. száraz nyomelemtartalma (mg/kg)	Szórásértékek
Vas 10x	Vas	89.99	18.90	89.22	14.28
	Réz	20.21	3.03	11.25	1.35
	Cink	77.79	14.78	12.46	1.37
	Molibdén	17.24	1.72	9.33	0.10
Réz 10x	Vas	14.23	1.42	39.11	4.69
	Réz	44.22	7.07	23.20	3.25
	Cink	14.33	1.43	30.26	3.63
	Molibdén	14.24	2.14	10.24	0.19
Cink 10x	Vas	16.24	1.32	27.12	1.38
	Réz	18.23	3.46	11.24	0.21
	Cink	88.20	10.58	98.21	10.80
	Molibdén	16.33	0.83	11.02	1.65
Molibdén 10x	Vas	22.29	1.58	79.29	7.22
	Réz	20.00	2.20	10.21	0.15
	Cink	20.57	1.46	12.55	1.02
	Molibdén	28.88	4.62	22.59	1.15

4.2.2. táblázat. A biomassza mikroelem koncentrációja a két hetes tenyésztést követően a második tenyésztési vonalon – három párhuzamos tenyészet átlaga

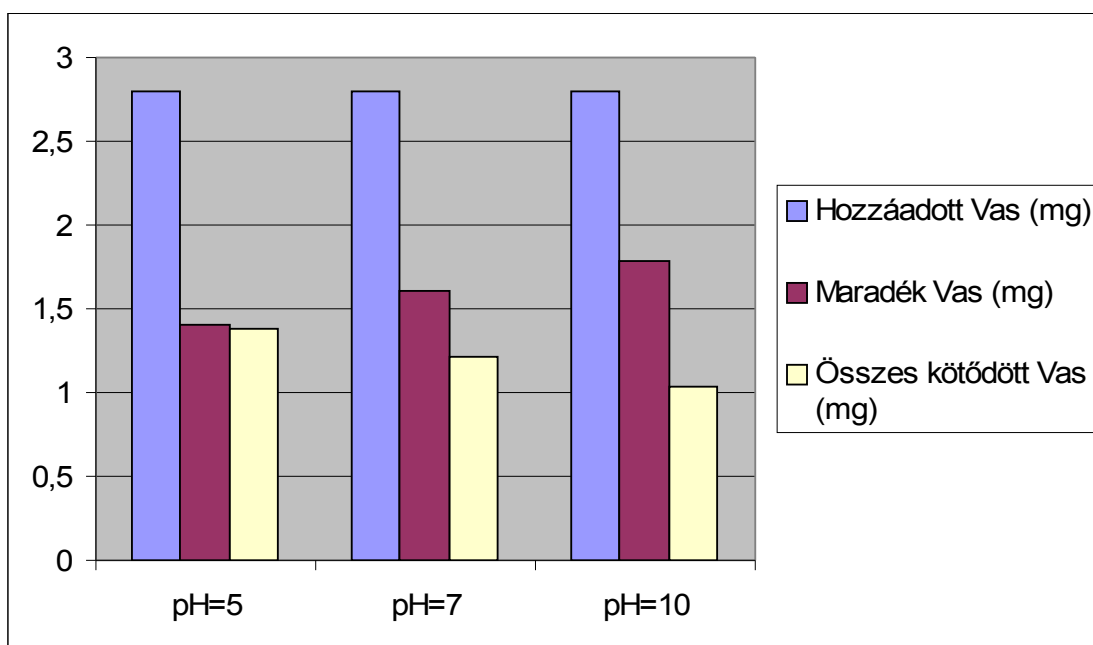
A *Chlorella v.* esetén a tízszeresre növelt vas kedvezően hatott a vas, és a cink felvételére is. A vas mennyisége a száraz algában majdnem 90 mg/kg-ot, a cink több mint 77 mg/10 g-ot ért el. A réz és a molibdén abszorpciója közel azonos értékű, előbbi esetén a száraz alga réztartalma több mint 20 mg/kg, utóbbinál több mint 17 mg/kg. A tízszeresére növelt réz csupán a réz abszorpciójára hatott kedvezően, a többi fém nagyjából azonos mértékben dúsult. A száraz alga réztartalma itt közel 45 mg/kg, a többi nyomelem mennyisége 14 mg/kg körüli értéket mutat. A tízszeresre emelt cink koncentrációja is legjobban a cink felvételére hatott kedvezően, a száraz alga cinktartalma közel 90 mg/kg, a többi fémion dúsulása ehhez képest elenyésző, 16-18 mg/kg körüli értékeket mutatnak. A tízszeresre növelt molibdén esetén a molibdén dúsulása volt a legnagyobb az algában, a száraz biomassza molibdén tartalma közel 29 mg/kg, de a többi fém dúsulása is hasonló mértékű, 20-22 mg/kg körüli.

A *Spirulina p.* esetén a tízszeresre növelt vas csupán a vas abszorpciójára hatott kedvezően, amelynek mennyisége a száraz algában közel 90 mg/kg értéket mutat. A többi fém dúsulása a *Chlorellához* képest jelentősen elmarad, 9-12 mg/kg értékeket mutatnak. A tízszeresre növelt réz esetén meglepő módon a vas és a cink mennyisége száraz algában több mint 30 mg/kg, viszont a réz mennyisége alig több 23 mg/kg-nál. A *Chlorellához* képest az abszorpció itt a vas és a cink esetén bizonyult hatékonyabbnak. A tízszeresre növelt cink esetén a cink dúsulása

száraz algában közel 100 mg/kg, a réz és molibdén dúsulása közel azonos, 11 mg/kg körüli értékű, míg a vas dúsulása több mint 27 mg/kg. A *Chlorellához* képest itt a vas és a cink felvétele bizonyult hatékonyabbnak. A tízszeresre emelt molibdén esetén a molibdén mellett a vas abszorpciója is jelentősnek bizonyult, a száraz alga vastartalma ebben az esetben közel 80 mg/kg, a molibdéné 22.59 mg/kg. A *Chlorellához* képest itt csupán a vas felvétele bizonyult hatékonyabbnak.

Összegezve az eredményeket a biomaszra gyarapodások eredményeivel megállapítható, hogy a *Chlorella v.* esetén legjobb eredmények a tízszeresére növelt réz, a *Spirulina p.* esetén pedig a tízszeresére növelt vas bizonyult, mivel a két alga biomaszra gyarapodása és nyomelemfelvétele is itt ért el jelentős értékeket.

4.3. A mikroelemekkel dúsított kalcium-alginát gyöngyök vizsgálata

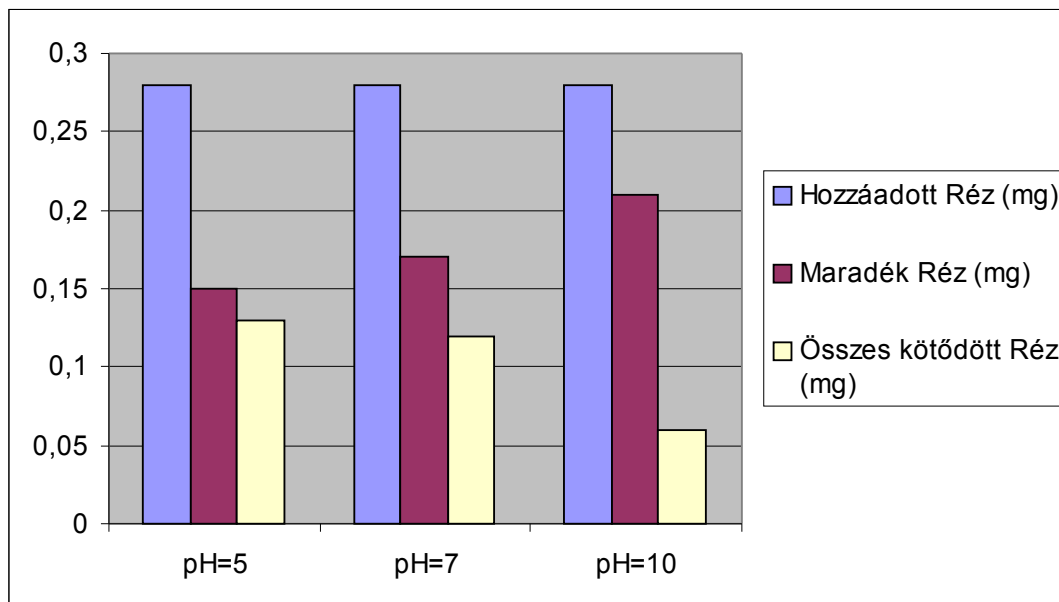


4.3.1. ábra. A kalcium-alginát vas tartalma a kezelést követően

	Hozzáadott vas (mg/kg)	Maradék vas (mg/kg)	Szórásértékek	Összes kötődött vas (mg/kg)	Szórásértékek
pH=5	2.8	1.41	0.15	1.38	0.12
pH=7	2.8	1.61	0.11	1.21	0.09
pH=10	2.8	1.21	0.12	1.03	0.11

4.3.1. táblázat. A kalcium-alginát vaskötő képessége eltérő pH-n

Savas pH-n a kalcium-alginát a vasnak közel felét megkötötte. A pH emelésével ugyan a kötés hatékonysága csökkent, a kötött vas mennyisége végig 1 mg felett maradt.

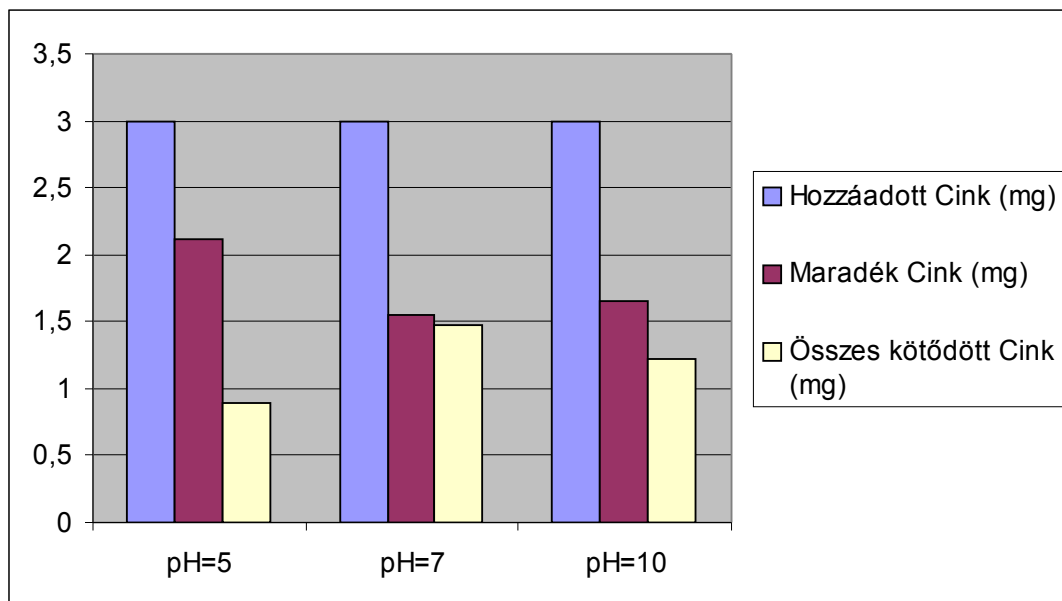


4.3.2. ábra. A kalcium-alginát vas tartalma a kezelést követően

	Hozzáadott réz (mg/kg)	Maradék réz (mg/kg)	Szórásértékek	Összes kötődött réz (mg/kg)	Szórásértékek
pH=5	0.28	0.15	0.01	0.13	0.02
pH=7	0.28	0.17	0.03	0.12	0.04
pH=10	0.28	0.21	0.06	0.06	0.09

4.3.2. táblázat. A kalcium-alginát rézkötő képessége eltérő pH-n

A réz réztartalom a vashoz hasonlóan alakult. A pH emelkedésével itt is csökkent az alginát által megkötött, mikroelem mennyisége viszont savas, és semleges pH-n a réz közel felét megkötötte (savas pH-n 0.13 g-ot, semleges pH-n 0.12 g-ot).

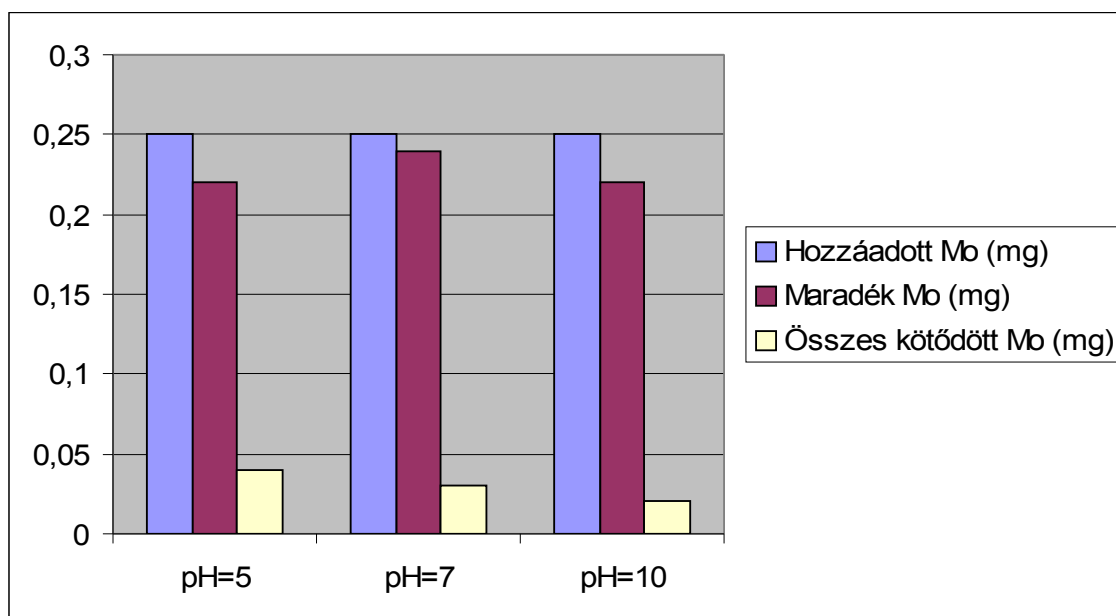


4.3.3. ábra. A kalcium-alginát cinkkötő képessége

	Hozzáadott cink (mg/kg)	Maradék cink (mg/kg)	Szórásértékek	Összes kötődött cink (mg/kg)	Szórásértékek
pH=5	3	2.11	0.12	0.9	0.17
pH=7	3	1.55	0.18	1.47	0.18
pH=10	3	1.65	0.16	1.22	0.19

4.3.3. táblázat. A kalcium-alginát cink tartalma a kezelést követően

A cink mennyisége a többi nyomelemekhez képest eltérően alakul. A cink felvétele savas pH-n bizonyult a leggyengébbnek, ahol 1 g-ot sem ért el. A cink közel felét, 1.47 g-ot a kalcium-alginát semleges pH-n kötötte meg, de lúgos pH-n is jelentős a kötés, ahol a felvett cink mennyisége több mint 1.20 g.



4.3.4. ábra. A kalcium-alginát molibdén tartalma a kezelést követően

	Hozzáadott molibdén (mg/kg)	Maradék molibdén (mg/kg)	Szórásértékek	Összes kötődött molibdén (mg/kg)	Szórásértékek
pH=5	0.25	0.22	0.03	0.04	0.01
pH=7	0.25	0.24	0.01	0.03	0.02
pH=10	0.25	0.22	0.02	0.02	0.02

4.3.4. táblázat. A kalcium-alginát molibdén tartalma a kezelést követően

A molibdén kötése is savas pH-n bizonyult a leghatékonyabbnak, az alginát ebben az esetben 0.04 g molibdént kötött, lúgosnál pedig a leggyengébbnek, ahol csupán 0.02 g-ot.

Összességében megállapítható, hogy a legtöbb esetben a pH emelésével a kötött fémek mennyisége a kalcium-alginátban csökkent, viszont a kötés hatékonysága olyan jelentősnek bizonyult, hogy a nyomelemekkel dúsított kalcium-alginát alkalmazható élelmiszeripari használatra.

A kalcium-alginát szorpciós vizsgálatát háromszori ismétléssel végeztük el.

5. Összegzés

A magas beltartalmi értékkel bíró élelmiszerek iránti igény világszerte növekvő tendenciát mutat. Napjainkban a korszerű élelmiszeripar, a különböző termékeket ásványi anyagokkal, vitaminokkal és antioxidánsokkal egészíti ki. A vásárlók, fogyasztók egyre inkább keresik az ilyen készítményeket. Érdemes megfontolni a *Spirulina p.* illetve *Chlorella v.* biomassza felhasználását a közvetlen módon túl, az élelmiszer ágazat különböző területein, mikroelem-tartalom növelésére. Fontos hangsúlyozni, hogy a termék a mikroalgák további beltartalmi értékeit (antioxidáns kapacitás, esszenciális aminosavak, vitaminok) is tartalmazni fogja, növelve a hozzáadott értéket.

Vizsgálataim során arra kerestem a választ, hogy az algasav illetve a tenyészetek bioszorpciók képessége serkenthető-e a mikroelemek dúsításával.

Kísérleteim kezdetén törzstenyészetet állítottam össze, a szaporítás alapját ezen tenyészetek adták.

A tenyésztési körülményeket úgy optimalizáltam, hogy a berendezés megfelelő (hőmérséklet, fény, napszakok váltakozása a megvilágítás programozásával) és azonos körülményeket biztosítson a kísérlet alatt.

A *Spirulina platensis* és *Chlorella vulgaris* fajok bioszorpciók képességét „in vitro” körülmények között vizsgáltam.

Megállapítható, hogy mindkét faj képes mikroelemek dúsítására amennyiben a tápoldat mikroelem tartalmát növeljük. A dúsítás mértéke különböző az egyes mikroelemekre, illetve a fajokra nézve: *Chlorella v.* esetén például amikor a négy fém 0.1 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban volt jelen a tápoldatban, a vas dúsulása az algában 15.12 mg/kg volt, de ha csak a vas koncentráció növekedett tízszeresére, annak dúsulása 110 mg/kg-nál is nagyobbra növekedett. Ha a négy fém koncentrációja 1 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban volt jelen a tápoldatban, a cink dúsulása az algában 87 mg/kg-nál is több volt, viszont ha csak a cink koncentrációja emelkedett tízszeresére, annak dúsulása már nem volt jelentős, 88 mg/kg-ot ért el. *Spirulina p.* esetén a vas dúsulása már akkor is meghaladta a 110 mg/kg-ot, amikor a négy nyomelem koncentrációja 0.1 $\mu\text{mol/l}$ volt a tápoldatban. Ha viszont a vas koncentrációja megemelkedett a többi fémhez képest, annak dúsulása nem tudott tovább emelkedni, sőt, 89 mg/kg-ra csökkent.

Az alginát megkötő képességét a pH jelentősen befolyásolta: Savas és semleges pH-n a réznek közel fele megkötődött, de hasonló eredmény jegyezhető meg a vas példáján is. A cink

kötődése az előző két fémhez képest inkább semleges és lúgos pH-n kötődött jelentős mértékben (semleges pH-n az alginát közel 1.5 g-ot, lúgos pH-n több mint 1.2 g-ot kötött), míg savas pH-n kevésbé bizonyult eredményesnek (1 g-ot sem ért el).

A vas élettani szempontból különösen jelentős. Erre vonatkozó eredményeim értékelését követően megállapítható, hogy mindkét faj eredményesen köti meg a vasat. A *Spirulina p.* hatékonyabbnak mondható annak ellenére, hogy telítődése elmarad a *Chlorella v.*-től, hiszen nagyobb biomasszát képez azonos tenyésztési kondíciók mellett. Fontos, megjegyezni hogy a mikroelemek egy része ráadásul szerves formában, található meg, így a biológiai hasznosulás még ideálisabb.

Összességében megállapítható, hogy az általam vizsgált mikroalga fajok beltartalmi értékükkel és nyomelem-dúsító hatásukkal az emberi szervezetre igen kedvező hatással vannak. A nők és gyermekek számára kiemelten fontos vas bevitel szempontjából szerves forrásnak tekinthetők. A módosított tápoldatban előállított biomassza élelmiszeripari nyersanyagként alapja lehet természetes formában jelenlévő mikroelemekkel dúsított funkcionális élelmiszereknek.

6. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném nyilvánítani Dr. Kiss Attila intézetigazgató és tanszékvezetőnek, aki engedélyezte és támogatta kutatásaimat az Egerfood Regionális Tudásközpontjában. Köszönet illeti továbbá Dr. Forgó Péter főiskolai docenst, és Molnár Szabolcs tudományos segédmunaktársat, akik több éves szakmai tapasztalatukkal segítették, és nyomon követték kutatásaimat.

7. Irodalomjegyzék

- [1] Association française pour l'algologie appliquée (AFAA) (1982), Actes du premier symposium sur la spiruline *Spirulina Platensis* (Gom.) Geitler de l'AFAA.
- [2] Bujard E., Braco U., Mauron J., Mottu F., Nabholz A., Wuhrmann J.J., Clément G. (1970), Composition and Nutritive Value of Blue Green Algae (*Spirulina*) and their Possible Use in Food Formulations. 3rd. International Congress of Food Science and Technology, Washington 1970.
- [3] Challem J.J., Passwater R.A., Mindell E.M. (1981): *Spirulina*. Keats Publishing, Inc. New Canaan, Connecticut
- [4] Furst P.T. (1978), *Spirulina*. Human Nature 1, 60-65
- [5] Santillan C. (1974), Cultivation of *Spirulina* for human consumption and for animal feed. International Congress of Food Science and Technology, Madrid, September 1974
- [6] Ciferri O. (1983), *Spirulina*, the Edible Microorganism. Microbiol. Rev. 47, 551-578
- [7] Earthrise Farms *Spirulina* (1986), Product Typical Analysis. San Rafael, USA
- [8] Clément G., Giddey C., Menzi R. (1967), Amino Acid Composition and Nutritive Value of the Alga *Spirulina* Maxima. J. Sci. Fd. Agric. 18, 497-501
- [9] Quillet M. (1975), Recherches sur les substances glucidiques élaborées par les spirulines. Ann. Nutr. Aliment. 29, 553-561
- [10] Custódio L., Justo T., Silvestre L., Barradas A., Duarte C. V., Pereira H., Barriera L., Rauter A. P., Alberício F., Varela J. (2012), Microalgae of different phyla display antioxidant, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities. Food Chemistry 131, 134-140
- [11] Gaeta A., Hider, R. C. (2005): The crucial role of metal ions in neurodegeneration: The basis for a promising therapeutic strategy. British Journal of Pharmacology 146, 1041-1059.

- [12] Andrade A.D., Rollemberg M.C.E., Nóbrega J.A. (2005), Proton and metal binding capacity of the green freshwater alga *Chaetophora elegans*. *Process Biochemistry* 40, 1931-1936
- [13] Ramelow G.J., Fralick D., Zhao Y. (1992), Factors affecting the uptake of aqueous metal ions by dried seaweed biomass. *Microbios* 72, 81-93.
- [14] Greene B., McPherson R., Darnall D. (1987), Algal sorbents for selective metal ion recovery. In: Patterson J.W., Pasino R., editors. *Metals speciation, separation and recovery*. Chelsea: Lewis; p. 315–38.
- [15] Rajfur M., Klos A., Waclawek M. (2010), Sorption properties of algae *Spirogyra* sp. and their use for determination of heavy metal ions concentrations in surface water. *Bioelectrochemistry* 80, 81-86
- [16] Ali M.B., Tripathi R.D., Rai U.N., Pal A., Singh S.P. (1999), Physico-chemical characteristics and pollution level of lake Nainital (U.P., India): Role of macrophytes and phytoplankton in biomonitoring and phytoremediation of toxic metal ions. *Chemosphere* 39, 2171-82.
- [17] Matheickal J.T., Yu Q. (1999) Biosorption of lead(II) and copper(II) from aqueous solutions by pre-treated biomass of Australian marine algae. *Bioresource Technology* 69, 223-229
- [18] Harris P.O., Ramelow G.J. (1990), Binding of metal ions by particulate biomass derived from *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda*. *Environment Science & Technology* 24, 220-228.
- [19] Apiratikul R., Pavasant P. (2008), Batch and column studies of biosorption of heavy metals by *Caulerpa lentillifera*. *Bioresour. Technol.* 99, 2766–2777.

- [20] Pavasant P., Apiratikul R., Sungkhum V., Suthiparinyanont P., Wattanachira S., Marhaba T.F. (2006), Biosorption of Cu²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, and Zn²⁺ using dried marine green macroalga *Caulerpa lentillifera*. *Bioresour. Technol.* 97, 2321–2329.
- [21] Topcuoglu S., Güven K.C., Balkis N., Kirbasoglu C. (2003), Heavy metal monitoring of marine algae from the Turkish Coast of the Black Sea, 1998-2000. *Chemosphere* 52, 1683-1688
- [22] Bagni, M., Romano, N., Finola, M.G., Abelli, L., Scapigliati, G., Tiscar, P.G., Sarti, M., Marino, G. (2005), Short- and long-term effects of a dietary yeast β -glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Fish & Shellfish Immunology*, 18: 311-325-immun
- [23] Rodriguez-Garcia, I., Guil-Guerrero, J.L. (2008), Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food Chemistry*, 108: 1023-1026.-immun
- [24] Volesky, B., 1990. Biosorption of Heavy Metals. CRC Press, Boca Raton, FL.-környezet
- [25] Palla J.C., Busson F. (1969), Etude des carotinoides de *Spirulina platensis* (GOM.) Geitler (Cyanophycées). *C.R. Acad. Sc. Paris*, t.269 p.1704-1707
- [26] Evets L., et. Al. (1994), Means to normalise the levels of immunoglobulin E, using the food supplement *Spirulina*. Grodenski State Medical University Russian Federation Committee of Patents and Trade. Patent (19) RU (11) 2005486. Jan. 15, 1994. Russia.
- [27] Guyton A.C. (1986), Textbook of Medical Physiology, 7th editin. W.B. Saunders Company
- [28] National Research Council (1980), Recommended Dietary Allowance. 9th ed. Washington, D.C.: Academy Press
- [29] Záray Gy. (2006): Az elemanalitika korszerű módszerei. – Akadémiai Kiadó, Budapest, 139-178.

- [30] Tuba Z., Szerdahelyi T., Engloner A., Nagy J. (2007): Botanika II. – Nemzeti Tankönyvkiadó, 174-175
- [31] Dudits D., Heszky L. (2000): Növényi biotechnológia és géntechnológia. – Agroinform kiadó, Budapest, 113-120
- [32] Böddi B., Cseh E., Fodor F., Király I., Láng F., Lásztity D., Nyitrai P., Rácz I., Sárvári É., Szigeti Z., Vágújfalvi D., Zsoldos F. (2007): Növényélettan, A növényi anyagcsere I., szerk.: Láng Ferenc. – ELTE Eötvös Kiadó, Budapest, 145-168
- [33] Dr. Haraszty Á., Dr. Hortobágyi T., Dr. Fridvalszky L., Dr. Kiss I., Dr. Pólya L. (2004): Növényyszervezetten és növényélettan. – Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest, 440-445
- [34] Fonyó A., Ligeti E. (2008): Az Orvosi Élettan Tankönyve. – Medicina Kiadó, Budapest, 492
- [35] Regős J. (1996): Bevezetés a tengerökológiába. – Eszterházy Károly Tanárképző Főiskola, Eger, 36-37
- [36] Heinrich D., Hergt M. (1990): SH atlasz, Ökológia. – Springer Hungarica kiadó Kft., Budapest, 184
- [37] Boross L., Sajgó M. (2003): A Biokémia Alapjai. – Mezőgazda Kiadó, Budapest, 292-293, 413
- [38] Darvas Zs., László V. (2005): Sejtbiológia. – Semmelweis Kiadó, Budapest, 164-167