



**XXXII. OTDK
2015**

Kémia és Vegyipar Szekció



Különböző paraméterek hatása a mikroalga aminosav tartalmára

Készítette:

Gorgosilits Kata Krisztina

Vegyészmérnöki B. Sc., IV. évfolyam

Témavezetők:

Rippelné Dr. Pethő Dóra

Intézeti tanszékvezető adjunktus

Bocsi Róbert

PhD hallgató

Vegyipari Műveleti Intézeti Tanszék, Vegyészmérnöki és Folyamatmérnöki

Intézet

Mérnöki Kar

Pannon Egyetem

Veszprém

Absztrakt

A mikroalgák jelentős szerepet játszottak az atmoszféra kialakításában, Földünk oxigénkészletének mintegy 90 %-át ma is az algák termelik. Emellett egyre gyakrabban alkalmazzák őket táplálék kiegészítőként, hiszen nagyon sok tápanyagot tartalmaznak, melyek nélkülözhetetlenek számunkra (esszenciális zsírsavak, aminosavak, vitaminok, ásványok, flavonoidok). Különböző algafajokban más-más ezen tápanyagok aránya, mennyiségüket számos tényező befolyásolja.

Munkám során különböző tápoldattal kezelt különféle algafajok aminosav tartalmát vizsgáltam. Ehhez a leszüretelt algákat szárítás és őrlés után savas hidrolízisnek vetettem alá, hogy a fehérjetartalma aminosavakra bomoljon. Ezután megmértem az aminosav tartalmakat a különböző mintában, így meg tudtam vizsgálni a különböző tápoldatok és szüretelési időpontok aminosav-tartalomra való hatását.

Tartalomjegyzék

1. Irodalmi összefoglaló.....	1
1.1. Mikroalgák	1
1.2. Aminosavak.....	2
1.3. Aminosav-analízis.....	4
1.3.1. Ioncserés kromatográfia	4
1.3.2. Automatikus aminosav-analizátorok.....	6
2. Felhasznált anyagok és módszerek	9
2.1. Felhasznált algaminták	9
2.1.1. Tápanyagok:	10
2.1.2. Fényforrás:	10
2.1.3. Szén-dioxid forrás:	11
2.2. Mérés menete	12
2.3. Aminosav-analízis	13
2.4. Regisztrátumok kiértékelése	15
3. Eredmények, kiértékelés.....	17
3.1. Heterotróf termesztés hatása	19
3.2. Nyílt és zárt téri termesztés összehasonlítása.....	20
3.3. Tápoldat koncentrációjának hatása	21
3.4.. Az aminosav-tartalom függése az alga fajától	22
3.5. A <i>Chlorella vulgaris</i> minták eszenciális aminosav-tartalma	23
4. Összefoglalás	25

1. Irodalmi összefoglaló

1.1. Mikroalgák

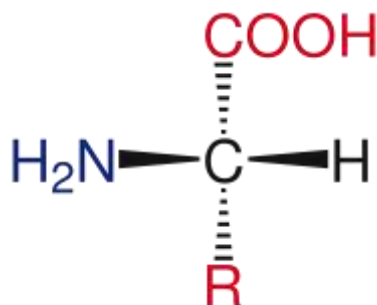
Bolygónk legősibb birtokosai, az algák, fő szerepet játszottak az atmoszféra kialakításában, a diverzifikált törzsek változatossága miatt napjainkban új biokémiai utak nyíltak és továbbra is nyílnak, mely termékeinek segítségével bioüzemanyagot, kozmetikai és élelmiszeripari termékeket állíthatunk elő. Tudósok, kutatók, vállalkozók és befektetők sokasága dolgozik azon, hogy a mikroalgákat mindennapi életünkbe hozzák. [1][2]

Az algákat a földi „élet megteremtőinek” is nevezik, hiszen Földünk oxigénkészletének 90 százalékát termelik és a tengerek öntisztulását is nagymértékben segítik. Az algák egy nagyon nagy és változatos csoportja az autotróf élőlényeknek, melyek fotoszintetizálásra képesek. Létezik egysejtű és többsejtű formája, így megkülönböztetjük a mikro- és makroalgák csoportját.

A mikroalgák a világon a legnagyobb mikroszerkezetű növényi élő állománynak tekinthetők. Autotróf élőlények, mivel sem növekedésükhöz, sem szaporodásukhoz nincs szükségük szerves szubsztrátok felvételére a környezetből, hiszen képesek napfényből nyert fényenergia felhasználásával valamint a légkörből nyert szén-dioxidból saját szerves molekulákat előállítani. Ilyen módon fotoszintézissel képesek a szerves CO₂ megkötésére, ezáltal a szén szerves kötésbe kerül, mely a későbbiekben biomassa forrásként szolgál. A mikroalgák számunkra előnyös tulajdonsága, hogy gyorsan növekednek és szaporodnak a hazai klimatikus körülmények között is. Egy nap alatt képesek megduplázni saját tömegüket. Egy kilogramm algatömeg előállításához a mikroalgák 1,8-2 kg szén-dioxidot használnak fel. Növekedésükhöz nincs szükségük friss vízre, szennyvízben vagy tengervízben is képesek fejlődni. Mikroalgák fotoszintetikus, szabadon lebegő mikroorganizmusok, melyek képesek összefüggő szálakat és kolóniákat alkotni, így alkalmazkodni tudnak még az extrém ökológiai élőhelyekhez is. Különleges tulajdonságuk, hogy a fényenergiát akár sokkal nagyobb hatásfokkal képesek felhasználni a szárazföldi növényekhez képest. Celluláris képességüknek köszönhetően képesek fényenergiából és szén-dioxidból különböző kémiai vegyületeket alkotni, mint a szénhidrátok, fehérjék, lipidek, vitaminok vagy pigmentek. A mikroalgák termelése függ attól, hogy mely területen kívánják őket felhasználni. A különböző típusú mikroalgák alkalmazhatók a kozmetikaiparban, étrend kiegészítőként az élelmiszeriparban, valamint a gyógyszer-és vegyiparban is. [1][3][4][5][6]

1.2. Aminosavak

Az aminosavak a fehérjék alkotóelemei. A fehérjék az élő szervezetekben lejátszódó kémiai folyamatok (enzim) katalízését végzik. Az élő anyagokban lévő szabályozási rendszerért, azaz a hormonrendszerért is a fehérjék a felelősek. Emellett a szervezeten belüli anyagtranszportot és a membránok, izmok szerkezetépítését is a fehérjék végzik. A fehérjékben az őket alkotó α -aminosavak peptidkötéssel kapcsolódnak össze egyenes, el nem ágazó polimerláncot képezve. Az aminosavaknak a karboxilcsoporthoz viszonyított helyzete alapján α -, β -, γ -stb. aminosavakról beszélünk, ám a fehérjék kizárólag α -aminosavakból épülnek fel, így ezekkel foglalkozom részletesebben. Az α -aminosavak közös szerkezeti jellemvonása, hogy molekuláikban egy aminocsoport és egy karboxilcsoport kapcsolódik ugyanahhoz a szénatomhoz. Az α -aminosavak általános szerkezetét a 1. ábra mutatja.



1. ábra: α -aminosav általános szerkezeti képlete

20 féle α -aminosavat különböztetünk meg, ezek közül 9 esszenciális, azaz az emberi szervezet nem képes magától előállítani, külső forrásból kell azt pótolni. Az emberi szervezet számára esszenciális aminosavak (ábécé-sorrendben): fenil-alanin, hisztidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, treonin, triptofán, valin. Szervezetünkben 14-16% a fehérje-, és hozzávetőlegesen 0,1% a szabad aminosavtartalom. Az aminosavak ún. ikerionos szerkezettel rendelkeznek, mely azt jelenti, hogy nem egyszerű aminocsoportot és karboxilcsoportot tartalmaznak, hanem pozitív töltésű ammónium- és negatív töltésű karboxilátssoportot, a savas karboxilcsoport és a bázikus aminocsoport kölcsönhatása következtében. Ezzel magyarázható az, hogy szilárd anyagok és nagyon magas az olvadáspontjuk. Poláros közegben jól, apoláros közegben rosszul oldódnak.

Az α -szénatom abban az esetben szimmetrikus, ha az R csoport H (glicin). Az asszimmetrikus α -aminosavak optikailag aktívak, két tükörképi izomerjük (enantiomerjük) lehetséges. Az optikai aktivitás azt jelenti, hogy vizes oldatban a poláros fény rezgési síkját elforgatják. A fehérjeépítő α -aminosavak a jobbra forgató, de L-sorozatbeli tejsavval azonos

térszerkezetűek, tehát az L(-)-sorozatba tartoznak. A C.I.P. konverzió szerint valamennyi aminosav (S)-konfigurációjú, kivéve a kén tartalmú ciszteint, mely (R)-konfigurációjú.

Nemzetközi megállapodás alapján az aminosavakat nevük hárombetűs rövidítésével, bonyolultabb esetekben az ábécé nagybetűivel jelöljük. A 20 fehérjealkotó α -aminosav nevét és szerkezeti képlete a 2. ábrán látható.[7][8][9]

$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O}^- \end{array} \\ \\ (\text{CH}_2)_3 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C}=\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Arginine (Arg / R)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Glutamine (Gln / Q)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ Phenylalanine (Phe / F)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array}$ Tyrosine (Tyr / Y)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2 \end{array}$ Tryptophan (Trp, W)
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O}^- \end{array} \\ \\ (\text{CH}_2)_4 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Lysine (Lys / K)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{H} \end{array}$ Glycine (Gly / G)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ Alanine (Ala / A)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_4\text{H}_3\text{N}_3 \end{array}$ Histidine (His / H)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$ Serine (Ser / S)
$\begin{array}{c} \text{H}_2 \\ \\ \text{C} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_2\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O}^- \end{array} \end{array}$ Proline (Pro / P)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$ Glutamic Acid (Glu / E)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COOH} \end{array}$ Aspartic Acid (Asp / D)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ Threonine (Thr / T)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array}$ Cysteine (Cys / C)
$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ Methionine (Met / M)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$ Leucine (Leu / L)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ Asparagine (Asn / N)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{HC} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ Isoleucine (Ile / I)	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \alpha\text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{O}^- \end{array} \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$ Valine (Val / V)

2. ábra: α -aminosavak szerkezeti képlete[8]

Minden aminosav tulajdonságát a benne lévő R csoport határozza meg. Ez alapján az α -aminosavakat négy nagy csoportra oszthatjuk:

1. apoláris, hidrofób: Ala, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val
2. poláris, töltéssel nem rendelkező: Asn, Cys, Gln, Ser, Thr, Tyr
3. poláris, pozitív töltésű (bázikus): Arg, His, Lys
4. Poláris, negatív töltésű (savas): Asp, Glu[9]

1.3. Aminosav-analízis

A szabad aminosavak minőségi és mennyiségi elemzésére több lehetőség is van:

- papírelektroforézis (aminosavak futtatása, majd színreakció ninhidrinnel)
- gázkromatográfiás elemzés [10]
- folyadékkromatográfiás elválasztás királis oszlopon
- nagynyomású folyadékkromatográfiás analízis
- ioncserés oszlopkromatográfiás elemzés

Ezek közül a leggyakrabban alkalmazott módszer az ioncserés oszlopkromatográfia.[11]

1.3.1. Ioncserés kromatográfia

A kromatográfia olyan elválasztástechnikai eljárás, amelynél a vizsgálandó minta komponensei egy állófázis (helyhez kötött) és azzal érintkező mozgófázis közötti anyagátmeneten, valamint az egyes komponensek a két fázissal (állófázis-mozgófázis) való eltérő kölcsönhatásán alapszik.

A fázisok közötti anyagátmenet hajtóerejét az biztosítja, hogy a komponensek kémiai potenciálja különböző a két fázisban. Az elválasztandó minta komponensei (molekulák, vagy ionok) az állófázissal és a mozgófázissal különböző típusú és mértékű kölcsönhatásokat tudnak kialakítani, és ennek következtében az állófázisban eltérő ideig tartózkodnak (retenció). Az eltérő retenció miatt a vizsgálandó minta alkotóinak az átlagos előrehaladási sebessége különböző lesz, amely azt eredményezi, hogy az állófázist eltérő időben hagyják el.

Az állófázis halmazállapotát tekintve lehet szilárd vagy folyékony, de fő jellegzetessége a helyhez kötöttség, valamint az, hogy kölcsönhatások jöhetnek létre a felületén.

A mozgófázis halmazállapotától függően csoportosíthatók a különböző kromatográfiás módszerek, melyeket az 1. táblázat szemléltet.

1. táblázat: Kromatográfiai módszerek csoportosítása

Csoportosítás	Állófázis	Elválasztástechnikai módszer
Gázkromatográfia (GC) mozgófázis: gáz	- szilárd - szilárd fázison megkötött folyadék	Gáz-szilárd kromatográfia (GSC) Gáz-folyadék kromatográfia (GLC)
Szuperkritikus fluid kromatográfia (SFC) mozgófázis: szuperkritikus fluidum	- szilárd	Szuperkritikus fluid kromatográfia (SFC)
Folyadékkromatográfia (LC) mozgófázis: folyadék	- szilárd fázison megkötött folyadék - szilárd - szilárd - szilárd - szilárd - folyadék	Folyadék-szilárd kromatográfia (LSC) Papírkromatográfia (PC) Vékonyréteg kromatográfia (TLC) Ionkromatográfia (IC) Gélkromatográfia (SEC, GPC) Folyadék-folyadék kromatográfia (LLC)

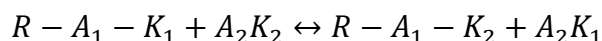
Az aminosavak analízisét az ioncserés kromatográfiai módszerrel végeztem, így erre térek ki részletesebben.

Az ioncserés kromatográfia álló fázisa olyan polimer szerkezetű szerves vagy szervetlen anyag, amelyen aktív csoportok vannak. Az aktív csoportok olyan ionok lehetnek, melyek nem tudnak leszakadni a vázról. Az aktív csoportokhoz minden esetben tartoznak ellenionok, melyek a mozgó fázis hasonló jellegű ionjaival kicserélődhetnek a kromatográfiai elemzés során. Az elválasztás alapja, hogy több oldott ion esetén a gyanta az ionokat különböző mértékben köti meg, tehát a folyamat szelektív elválasztást tesz lehetővé. Az elválasztás sikerét nagymértékben befolyásolja a hőmérséklet.

Az ioncserélő polimerek két fő típusát különböztetjük meg, a kationcserélő, illetve az anioncserélő polimereket. Az aminosav-analízis a kationcsere elve alapján működik, így ezt vizsgálom meg alaposabban.

A kationcserélő polimerek aromás gyűrűhöz kötött protonleadó csoportot tartalmaznak (szulfo, karbonil, foszfát vagy fenolos hidroxid csoport). A kationcserélőben a kicserélhető kation nem csak hidrogén-ion, hanem nátrium-ion is lehet. A kationcserélő műgyanták szilárd váza a legtöbb esetben vinil-benzol, divinil-benzol kopolimer.

A kationcsere elve:



ahol :

R = ioncserélő szerves vagy szervetlen polimerváz

A₁ = az el nem mozgítható aktív anioncsoport

A₂ = a mozgó fázis anionja

K₁ = a polimerváz eredeti kationja

K₂ = a mozgó fázisban kicserélt kation

Az ionok reverzibilis kicserélődésének, vagyis az ioncserének a hajtóereje az ionok között fellépő Coulomb-erők. A folyamat sztöchiometrikus, a tömeghatás törvénye alapján játszódik le. A kationcserélő kicserélődési állandóját (k_A) az alábbi egyenlettel írhatjuk le.

$$k_A = \frac{(R - A_1 - K_2) * (A_2K_1)}{(R - A_1 - K_1) * (A_2K_2)}$$

Ahhoz, hogy két (vagy több) ion jól elválasztható legyen egymástól, az ionok kicserélődési állandók értékeinek legalább 20%-kal el kell térnie egymástól.[12]

1.3.2. Automatikus aminosav-analizátorok

Szükség volt olyan automatikus elemzőberendezés kialakítására, mely képes egyes vegyületcsoportokon belüli különböző komponensek gyors szétválasztására, valamint mennyiségüknek pontos meghatározására. Az első ioncserélő gyantával töltött készüléket, illetve készülékcsaládot az automatikus aminosav-analizátorok képezték. Mivel az aminosavak meghatározására a korábban használt papír- és rétegekromatográfiás módszerek időigényesek és pontatlanok, ezért ezen készülékek használata gyorsan elterjedt azokon a területeken, ahol szükség volt a fehérjék felépítésében résztvevő aminosavak minőségének és mennyiségének megismerésére (egészségügy, élelmiszeripar). A berendezések alkalmasak minden természetes növényi és állati eredetű szabad aminosav analitikai vizsgálatára. A mintákat olyan mértékben kell feligítani, hogy a detektor mérési határain belülre essenek az aminosav koncentrációkkal arányos csúcsok. Nagyon fontos a mérés során a megfelelő pH beállítása, a szabad aminosavakat tartalmazó oldat pH-ját kb. 2,2-re kell beállítani, mert ennél az értéknél optimális az aminosavak kationos formájának az oszlophoz való kötődése. Az első készülékek esetében a mérési idő 6-8 óra volt, melyet igyekeztek minél jobban redukálni.

O=C1C(=O)c2ccccc2C1(O)O.O=C(O)C(R)N>>O=C1C(=O)c2ccccc2C1=NC(=O)c3ccccc3O.O=C(O)C(R)N>>O=C1C(=O)c2ccccc2C1=NC(=O)c3ccccc3O

7

A Lamebert-Beer törvény képletben:

$$A = \lg(I_0 / I) = \varepsilon * c * l$$

ahol:

- I_0 – a beesó fénysugár intenzitása
- I – a kilépő fénysugár intenzitása
- ε – a vizsgált komponens abszorpciós együtthatója
- c – a vizsgált komponens koncentrációja
- l – az abszorbeáló közeg átlagos vastagsága (abszorpciós úthossz)

A fényelnyelés jellemzésére szolgál továbbá a transzmittancia (T), amely azt fejezi ki, hogy a beesó elektromágneses sugárzásból mennyi halad át a mintán: $T = I_0 / I$

[13][14]

2. Felhasznált anyagok és módszerek

A mérést két fő lépésben végeztem. Először egy savas hidrlízist hajtottam végre, hogy a fehérjékben lévő peptidkötések felbomoljanak, majd az így kapott szabad aminosavakat egy erre a célra kifejlesztett nagynyomású aminosav analízátorral vizsgáltam.

2.1. Felhasznált algaminták

A mintákat a tanszéken termesztett algakultúrák adták. A kultúrákat különböző módon kezelték, nevelték, szüretelték. A dolgozat célja, hogy ezen hatásokat vizsgáljam meg a későbbi nitrogén- illetve aminosav-tartalomra vonatkoztatva. A leszüretelt algaszuszpenziót sűrítés és szárítás után megőrölték, ezt a por állagú anyagot használtam a hidrozis kiindulási anyagaként.

A használt minták jelölése

- G10
- VGK
- P5BM
- T8
- T3
- 05BM
- P7BM

A 2. táblázatban láthatók a felhasznált anyagminták tulajdonságai.

2. táblázat: A felhasznált minták csoportosítása

	Táplálkozás szerint		Tápoldat szerint		Szaporítás módja szerint		Algafaj(ok) szerint		
	Autotróf	Heterotróf	5BM tápoldat	7BM tápoldat	Szabadtéri tartás	Zárt fotobioreaktor	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Scenedesmus species</i>	Vegyes
G10		X	X			X	X		
VGK		X	X			X	X		
P5BM	X		X			X	X		
T8	X		X		X			X	X
T3	X		X		X		X		X
05BM	X		X			X		X	
P7BM	X			X		X	X		

Megjegyzés: A T3 minta eleinte tiszta *Chlorella vulgaris*, a T8 minta pedig tiszta *Scenedesmus species* volt, ám a szabadtéri tartás miatt más algafajok is elszaporodhattak, ezért ezen mintáknál a vegyes algakultúra is megjelenhet.

2.1.1. Tápanyagok:

Fontos követelmény a tápoldattal szemben, hogy tartalmazza az algák fejlődéséhez szükséges makro- és mikroelemeket. A gazdasági szempontok megkövetelik, hogy a tápoldat olyan mennyiségben és arányban tartalmazza az alga számára szükséges mikro-, és makroelemeket, hogy növekedésük optimális legyen, de a tápoldat-felesleg a minimum legyen.

Tápoldatként a Vegyipari Műveleti Intézeti Tanszéken a BG-11-es tápoldatot, illetve ennek megfelelő arányban valahányszorosát használják. A BG-11 tápoldat összetételét a 3. táblázat mutatja. A nyomelemek közt találunk mangán, cink, réz, nátrium és kobalt sókat és bór tartalmú vegyületet is.

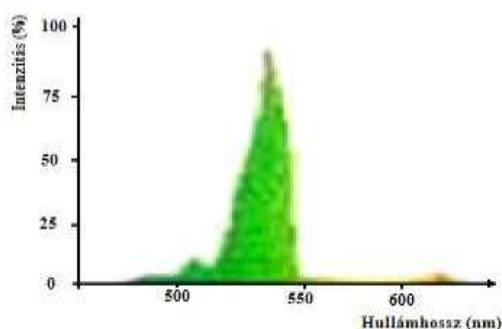
3. táblázat: BG-11 tápoldat összetétele

Komponens	Alap oldat [g/l dH ₂ O]	Használt mennyiség	Tápoldat végső koncentrációja [M]
Fe-citrát oldat		1 ml	
citromsav	6	1 ml	3.12×10^{-5}
vas-ammónium-citrát	6	1 ml	$\sim 3 \times 10^{-5}$
NaNO ₃	-	1.5 g	1.76×10^{-2}
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	40	1 ml	1.75×10^{-4}
MgSO ₄ ·7H ₂ O	75	1 ml	3.04×10^{-4}
CaCl ₂ ·2H ₂ O	36	1 ml	2.45×10^{-4}
Na ₂ CO ₃	20	1 ml	1.89×10^{-4}
MgNa ₂ EDTA·H ₂ O	1.0	1 ml	2.79×10^{-6}
nyomelemek		1 ml	-

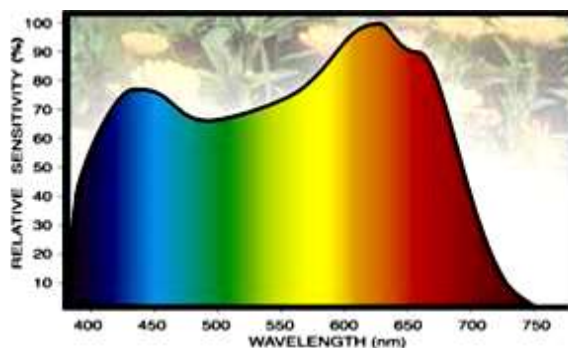
2.1.2. Fényforrás:

A fotoszintetizáló élőlények a napfény energiájából a 400-800 nm hullámhossztartományba eső fényt hasznosítják, ebből is leginkább a kék (420-490 nm) és a vörös (650-750 nm) fény tartományát, ezért célszerű ilyen hullámhossztartományokban nagy intenzitással sugárzó fényforrás biztosítása.

A szabadtéri berendezésnél a fény biztosítható napsugárzás által, zárt téri berendezésnél azonban gondoskodni kell megfelelő megvilágításról. Az általunk végzett kísérletek során „cool white” fénycsöveket használtunk, melyek igen elterjedtek, többnyire ezeket használják az otthonokban is. A „cool white” fénycsövek színeképét a 3. ábra szemlélteti. A fotoszintézis szempontjából optimális fényforrás a „Sylvania Aquastar T8” fénycső is, mely kimondottan vízi növények szaporodását hivatott segíteni kiemelkedően magas kék és vörös spektrumával. Az általam vizsgált mintáknál a megvilágítás megoszlása egy napon belül 16 óra időtartamú fényszakaszra és 8 óra időtartamú sötétszakaszra volt osztható.



3. ábra: A „cool white” fénycső színeképe



4. ábra: A fotoszintetikus aktivitás a látható fény hullámhossztartományán

2.1.3. Szén-dioxid forrás:

Természetes körülmények között, szabad ég alatti tavaknál az algák fennmaradásához és szaporodásához elegendő mennyiségű CO_2 oldódik a vízbe a fölötté levő légtömegből, azonban nagy mennyiségű alga gyorsan történő előállításához ez kevés. Ebben az esetben nem elég a légkörben lévő szén-dioxid koncentráció, mely csupán 0,04%, algatermesztéshez 1-15%-ban vezetjük be a szén-dioxidot. A szén-dioxid arányának pontos meghatározása az egyéb körülményektől függ.

A zárt fotobioreaktorokba CO₂-levegő=8:92 arányú gázkeverék került bevezetésre. A bevezetett gázkeverék szerepe az alga táplálásán kívül az algaoldat keverése, az ülepedés megakadályozása, közel homogén állapotának megtartása.

2.2. Mérés menete

A fehérjeminták hidrolízisekor a savas hidrolízis a legtöbbször alkalmazott módszer, ám mint mint minden módszernek, ennek is vannak hátrányai. A savas hidrolízis során a triptofán teljesen, a szerin és a treonin részlegesen elbomlik, cisztin lesz a mitában a cisztein helyett, a metionin pedig oxidálódhat. Ha olyan analitikai módszert választunk, melyeknél nem lépnek fel ezek a nem kívánt változások, abban az esetben más aminosavak fognak elbomlani vagy átalakulni. Ebben az esetben sajnos nincsen tökéletes, egyértelműen jó megoldás, így a cél függvényében fontos mérlegelmünk a hidrolízis fajtájának előnyeit és hátrányait, hogy nagyobb biztonsággal tudjuk kiválasztani a számunkra jlegmegfelelőbb módszert. A részlegesen elbomlott vagy lassan lehasadó aminosavak kezdeti koncentrációjának megállapítására gyakran vizsgálják a bomlás időfüggését (vagyis 24, 48 és 72 órás savas hidrolízis után végeznek aminosav-analízist). Ha a bomlékony aminosavak (pl. szerin, treonin) koncentrációját az idő függvényében követjük és a kapott értékeket ábrázoljuk, a görbét a kiindulási pontig extrapolálhatjuk és így meghatározhatjuk ezeknek az aminosavaknak a kezdeti koncentrációját. [15]

A kinetikai vizsgálatokat lassan lehasadó aminosavak (pl. izoleucin, valin) esetében is gyakran elvégzik. A hidrolízis időbeli lefolyását követve, ilyen esetekben egy vízszintes szakaszt (platót) fognak észlelni. Ez esetben a plató magasságát tekintik az adott aminosav-egység koncentrációjának. Ha a hidrolízis ideje túl hosszú, a mintában csökkenni kezd az aminosav-egység koncentrációja, jelezve a hidrolízis körülményei miatt bekövetkező bomlást. A kinetikai tanulmányoknak elfogadható alternatívája, hogy az aminosav kalibráló-standardot ugyanolyan hidrolízis körülmények közé helyezzük, mint a vizsgálati mintát. Nem biztos, hogy a szabad aminosav ugyanolyan sebességgel bomlik, mint a fehérjében/peptidben kötött bomlékony aminosav a hidrolízis folyamán. Ez különösen érvényes a lassan hasadó peptidkötésekre (pl. Ile-Val kötések). Mégis, ez a módszer teszi lehetővé, hogy számításba tudjuk venni az aminosav-egységek bomlását. [15]

A fenti okok miatt a savas hidrolízist választottam. Korábban végzetem kísérleteket enyhén lúgos és lúgos hidrolízisre is, ám nem volt teljes a hidrolízis folyamata, így a szabad aminosav-koncentráció igen kicsi volt. Kísérleteim során használtam kénsavat, illetve

salétromsavat is, ám ezen méréseim sem vezettek eredményre, így a sósavas mérési módszert preferáltam a következőkben.

A hidrolízis analitikai előírás szerint végeztem: 0,1 g mintához 5 ml 6 mol/dm³ koncentrációjú sósavat adtam a mintához, majd 21 órán keresztül 100 °C-on végeztem a minták hidrolízisét. Mivel kis mennyiségű anyagokkal dolgoztam, ezért nagyon fontos volt, hogy a felhasznált eszközök tiszták legyenek. Minden mérési esetben ugyanezeket a körülményeket alkalmaztam.

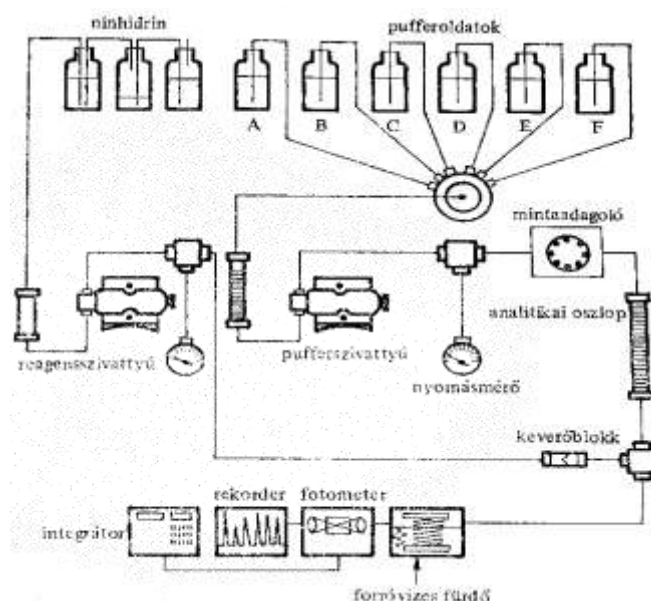
Mivel a kromatográfiás mérés viszonylag hosszú időt vesz igénybe (egy mérés 100 percig tart), ezért először vékonyréteg kromatográfiával vizsgáltam meg a mintákat, hogy egyáltalán van-e benne érdemi mennyiségben szabad aminosav. Az oldószer propanol:víz=7:3 elegy volt, a másik esetben pedig butanol:ecetsav:víz=4:1:1 arányú elegye. A mérések során két féle ninhidrines előhívószert alkalmaztam. Az első esetben 0,35 g ninhidrin, 100 ml butanol és 3 ml ecetsav alkotta az előhívószert, a második mérésnél pedig 0,2 g ninhidrinből, 80 ml metanoból, 20 ml 96%-os ecetsavból és 0,5 g kristályvizes réz-szulfátból készítettem az előhívószert. A minta futtatását szilikagél lapokon végeztem. A felfutást követően a szilikagél lapra rápermeteztem az előhívószert, majd szárítószekrényben 10 perc alatt 100%-on rászárítottam. Ebből a mérésből állapítottam meg, hogy érdemes-e a pontosabb, aminosav-analízissel is megvizsgálni az adott mintát. A mérés során azt tapasztaltam, hogy sem a lúggal (1%-os, illetve 5%-os nátrium-hidroxid oldat), sem pedig a híg savakkal (0,5%-os, 1%-os, 2,5%-os, 5%-os sósav-oldat, 1%-os salétromsav-oldat, 1%-os kénsav-oldat) végzett hidrolízis nem volt megfelelő mértékű, csak a 6 mol/dm³ koncentrációjú sósav-oldattal végzett hidrolízis, így az így feltárt mintákkal végeztem a további vizsgálatokat.

2.3. Aminosav-analízis

A mennyiségi aminosav-analízisre alkalmazott módszerek közül a legelterjedtebbek egyike az oszlop utáni ninhidrines származékképzéssel összekapcsolt ioncserés kromatográfia. Szabály, hogy a litium alapú kationcserélő rendszert a bonyolultabb, fiziológiai minták vizsgálatához, míg a gyorsabb, nátrium alapú kationcserélő rendszert a fehérjehidrolizátumokból nyert, egyszerűbb – jellemzően 17 aminosavat tartalmazó – aminosav-elegyek vizsgálatához alkalmazzuk. Ioncserélő oszlopon az aminosavak elválasztását a pH és a kationerősség egyidejű változtatásával végezzük. Az elválasztás javítása érdekében hőmérséklet-grádiens is gyakran alkalmazunk, ezt az analízátor programozásával tudjuk szabályozni.

A legtöbb aminosav-származék kimutatási határa 10 pmol-nak, míg a proliné 50 pmol-nak bizonyult. A válasz a 20–500 pmol tartományban lineáris, és a korrelációs együtthatók

meghaladják a 0,999-et. Ahhoz, hogy a fehérjék/peptidek összetételére helyes eredményeket kapjunk, a legmegfelelőbb, ha az ilyen aminosav-analízishez a hidrolízis előtti mintaméret 1 µg-nál nagyobb.[15]



5. ábra: A nagynyomású aminosav-analizátor felépítése[12]

Az előkészített hidrolizátumokat, valamint a standardokat azonos térfogatú bemérőhurkokba mértem. be. A ninhidrint levegőtől elzárt tartályban kell tartani. Az érzékenységet minden mérési sorozat esetében standard bemérésével ellenőrizzük, hogy a mérési hibát minimalizáljuk.

A puffer-és regeneráló oldatok összetételét a 4. táblázat mutatja.

4. táblázat: Regeneráló és puffer oldatok összetétele

Vegyület	Pufferoldatok			Regeneráló oldat
	A	B	C	
Kristályvizes nátrium-citrát (g)	5,1	9,8	14,7	-
Citromsav (g)	-	7,0	-	-
Citromsav-monohidrát (g)	9,8	-	-	-
Bórsav (g)	2,0	2,0	2,0	-
Nátrium-klorid (g)	2,8	2,9	-	-
Metanol (cm ³)	20	-	-	50
Oktánsav (µl)	125	125	125	-
Nátrium-hidroxid (g)	-	-	1,1	10
EDTA (g)	-	-	0,3	0,3
pH érték	3,59	4,35	10,0	
Készített mennyiség	1l	1l	1l	0,5l

A szabad aminosavak a ninhidrinnel színreakciót adnak. Ahhoz, hogy ez a reakció végbemenjen megfelelő koncentrációban kell jelen lennie a ninhidrinnek a rendszerben, így szükséges egy ninhidrin-oldatot készíteni. Ehhez először 10 g ninhidrint ultrahangos fürdőben 500 cm³ metanolban oldunk fel. Az oldódás után hozzáadunk 0,4 g hidrindantint és azt is feloldjuk. Ezután hozzáadunk 225 cm³ etilénlikolt és 225 cm³ acetát-puffert, végül az egészet leszűrjük. A felhasznált acetát-puffert az alábbiak szerint készítjük: 123 g vízmentes nátrium-acetátot feloldunk desztillált vízben, 10 cm³ jégecetet adunk hozzá, majd a pH beállítása után 1000 cm³-re hígítjuk.

Az aminosav analízis hátom hőmérsékleten végezzük: 52°C, 60°C, illetve 80°C-on a mérési programnak megfelelően.

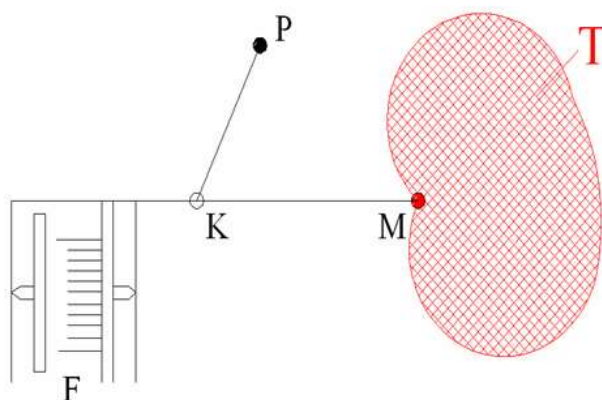
Az alkalmazott aminosav-analizátor programját az 5. táblázat mutatja.

5. táblázat: Az aminosav-analizátor méréshez használt programja

Lépés	Időtartam (perc)	Puffer/regeneráló oldat típusa	Hőmérséklet (°C)
1.	5	Regeneráló	80
2.	24	A	52
3.	21	A	52
4.	16	B	60
5.	3	Regeneráló	80
6.	29	C	80

2.4. Regisztrátumok kiértékelése

A kromatogrammon a csúcs alatti terület meghatározásához planimétert használtam. A planimétert grafikus területméréshez használjuk, ezért integrátornak is szokás nevezni. A 6. ábra egy poláris planiméter sematikus ábrája látható.



6. ábra: Területmérés poláris planiméterrel

A területmérés lényege az, hogy a planiméter mérőcsúcsát a meghatározandó terület kerületén végigvezetjük, és a mérőcsúcs mozgását egy számlálómű regisztrálja. A fordulatszámológóról a körbejárás megkezdését megelőzően (n_1) és annak befejezésekor (n_2) értékeket olvasunk le. Természetesen a méréseket nem egyszer, hanem többször (minimum háromszor) meg szoktuk ismételni a nélkülözhetetlen ellenőrzés miatt, sőt még a körbejárás irányát is változtatjuk, hogy a mérési hibát minimalizáljuk. Ha az ($n_2 - n_1$) különbségek közel megegyeznek, akkor azok beátlagolhatók és az alábbi összefüggéssel számítható a kérdéses terület:

$$T = C * (\overline{n_2 - n_1})$$

A képletben C a planiméter állandóját jelenti, amelyet előzetes kísérleti mérések útján határoznak meg. Ehhez az adott méretarányú térképen egy ismert nagyságú területet használnak fel. Ez lehet például egy tetszőleges négyzet, amelyet négy őrkereszt határoz meg. A már ismertetettek szerint többször is végigvezetve ennek a négyzetnek a kerületén a planiméter mérőcsúcsát az aktuális mérőkarhossznak megfelelően levezethető a beátlagolt különbség, amelyet a fordulatszámológó segítségével határoztunk meg. Ez alapján pedig már C értéke a következőképpen számítható:

$$C = \frac{T_{ismert}}{(\overline{n_2 - n_1})}$$

A planiméterek két típusát használták/ják. Ezek a poláris és az ortogonális planiméterek. A poláris planiméter poláris koordináta-rendszerben dolgozik, az ortogonális planiméter viszont derékszögű síkkordináta-rendszerben végzi a területmérést. A gyakorlatban inkább a poláris planiméterek használata terjedt el. Az ortogonális planiméternek nincs a mérés közben rögzített pólusa, az a térképlapon gördülő hengereivel képes elmozdulni. A mérőorsó – a poláris planiméterrel ellentétben – nem érintkezik közvetlenül a térképlappal, hanem csak más szerkezeti elemek útján, ezért a megméréendő területtel csak közvetve függ össze. [16]

3. Eredmények, kiértékelés

A mérések eredményeiből az összes aminosav-tartalom volt számunkra jelentős, de ha szükséges, ezekből az algaminta fehérjetartalmát is meghatározhatjuk a következő eredményanalizáló eljárás alapján. A visszanyert aminosavak mikrogrammban kifejezett, egyedi tömegének kiszámítására a következő kifejezést használjuk: $mMr / 1000$, ahol m a vizsgált aminosav visszanyert mennyisége nanomólban és Mr ezen aminosav átlagos molekulatömege, korrigálva a peptidkötés létrejöttkor kilépő vízmolekula tömegével. A visszanyert aminosavak tömegének összege – a részben elbomlott és a teljesen elbomlott aminosavak megfelelő figyelembevételével – becslést ad a vizsgált fehérje össztömegére. Amennyiben az ismeretlen fehérje molekulatömege ismert (pl. SDS-PAGE analízis vagy tömegspektroszkópia révén), aminosav-összetétele megjósolható. Az aminosav-egységek számának kiszámítására a következő kifejezést használjuk: $m / (1000 M / M_r)$, ahol m a vizsgált aminosav visszanyert mennyisége nanomólban, M a fehérje össztömege mikrogrammban és M_r az ismeretlen fehérje molekulatömege.[15]

A kapott értékeket összesítve a 6. táblázatban és a 7. táblázatban foglaltam össze:

6. táblázat: A vizsgált minták aminosav-tartalma $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ koncentrációban

Aminosav jele	Minta jelölése										
	Standard	P7BM/1	P7BM/2	P5BM/1	P5BM/2	05BM	VGK/1	VGK/2	G10	T8	T3
CYSO3H	84,5	18,9	2178,2	445,1	84,5	415,0	0,0	0,0	1478,8	3346,2	2158,2
ASP	66,5	37,3	129,6	316,2	659,7	339,5	394,8	384,1	100,2	85,1	165,0
METOD	37,25	24,7	380,8	204,3	477,0	198,1	60,7	117,3	260,8	293,1	579,4
THR	59,5	56,5	488,2	312,0	269,5	304,6	144,0	140,0	479,3	39,7	610,3
SER	52,5	111,3	123,9	240,9	515,9	275,8	580,5	564,5	62,0	197,2	94,7
GLU	73,5	207,7	603,5	328,5	83,8	341,6	48,3	47,0	245,0	726,4	603,5
PRO	57,5	4492,2	1132,3	359,4	233,6	449,2	82,9	79,6	583,8	575,0	1273,8
GLY	37,5	202,1	159,1	189,2	513,0	157,5	216,0	210,2	127,8	380,3	264,2
ALA	44,5	200,3	19,8	202,2	669,9	191,8	386,4	375,8	11,9	467,8	19,8
CYS	30,25	149,5	52,5	147,4	234,4	104,4	70,1	136,3	31,5	191,4	52,5
VAL	58,5	329,1	300,9	234,8	42,0	192,4	14,1	13,8	167,1	35,0	307,1
MET	74,5	571,4	59,4	262,4	3,2	171,4	163,0	158,4	24,8	4,8	89,1
ILE	65,5	332,2	203,0	340,6	6,0	322,4	556,0	540,6	73,8	32,6	230,6
LEU	65,5	320,1	1361,3	375,3	109,8	321,1	3,3	3,2	135,8	267,8	95,1
TYR	90,5	443,5	1706,8	503,4	83,3	441,0	245,4	238,8	97,2	90,5	2429,2
PHE	82,5	532,2	353,6	467,4	258,0	426,7	73,0	71,0	99,7	185,9	495,0
HIS	77,5	429,3	0,0	338,5	912,8	305,5	65,3	63,5	23,5	86,1	9,8
LYS	73	362,6	17,5	203,2	345,6	290,8	170,8	166,4	32,1	113,6	48,2
Összes:	1131	8820,7	9270,2	5471,0	5501,9	5248,8	3274,4	3310,5	4035,1	7118,5	9525,4

7. táblázat: A miért értékekből számított adatok

	Minta jelölése									
	P7BM/1	P7BM/2	P5BM/1	P5BM/2	05BM	VGK/1	VGK/2	G10	T8	T3
Összes aminosav (µg/cm ³)	8820,7	9270,2	5471,0	5501,9	5248,8	3274,4	3310,5	4035,1	7118,5	9525,4
Összes aminosav g/g alga	0,441	0,464	0,274	0,275	0,262	0,164	0,166	0,202	0,356	0,476
Aminosav%	44,1	46,4	27,4	27,5	26,2	16,4	16,6	20,2	35,6	47,6

Az adatok ebben a formában még nem sokat árulnak el arról, hogy a termesztési paraméterek milyen hatást gyakorolnak a minta aminosav-tartalmára, ezért részenként vizsgálom meg őket. Látható, hogy azoknál a mintáknál, melyekből dupla mérést végeztem az adatok nem térnek el jelentősen egymástól, így a két mérés átlagértékével számolok.

Így a kapott értékek:

8. táblázat: A vizsgált minták átlagolt aminosav tartalmai

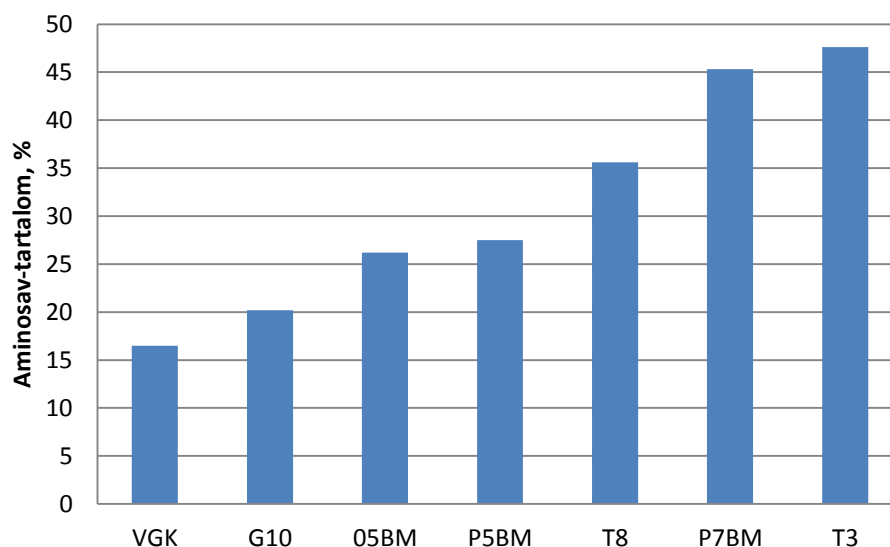
	Minta jelölése						
	P7BM	P5BM	05BM	VGK	G10	T8	T3
Aminosav%	45,3	27,5	26,2	16,5	20,2	35,6	47,6

A mérések kiértékelését öt szempont alapján végzem:

1. Heterotróf termesztés hatása
2. Nyílt és zárt téri termesztés összehasonlítása
3. Tápoldat koncentrációjának hatása
4. Az aminosav-tartalom függése az alga fajától
5. A *Chlorella vulgaris* minták eszenciális aminosav-tartalma

3.1. Heterotróf termesztés hatása

A heterotróf termesztés esetében glükózt adagoltunk az algák mellé a termesztés során maximum 1 g/l koncentrációban. (G10 és VGK) minta, a többi esetben autotróf módon szaporodtak az algák. A 7. ábra a vizsgált minták aminosav-tartalmát mutatja növekvő sorrendben.

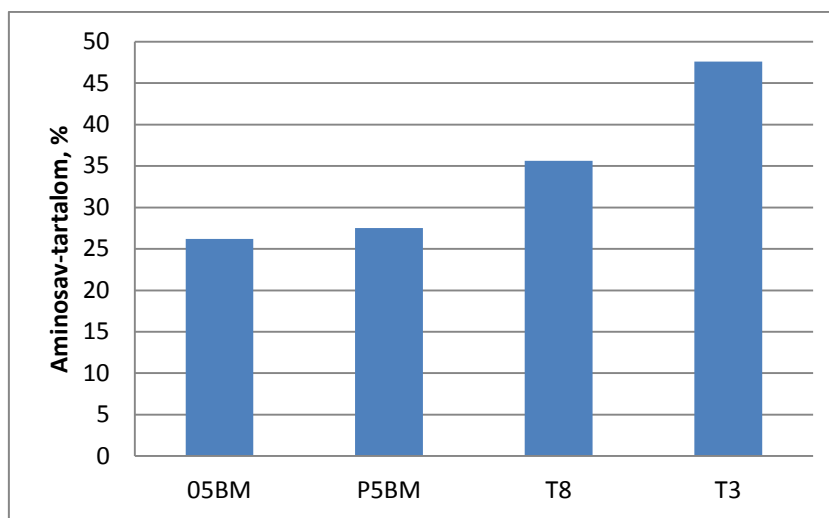


7. ábra: Vizsgált minták aminosav-tartalma

Az ábráról leolvasható, hogy a két legkisebb értéket a heterotróf módon szaporodott algaminta érte el. A heterotróf módon szaporodott minták átlagos aminosav tartalma 18,4% volt, míg az autotróf módon szaporodott algamintáké 36,4%, vagyis szinte a duplája. Ez a nagy különbség azzal magyarázható, hogy a bevitt glükóz hatására csökken a proteintermelés. Valószínűsíthető, hogy ezekben a mintákban a lipidtartalom sokkal magasabb lenne, mint a többi esetben, hiszen a glükóz adagolása elősegíti a lipidek képződését.

3.2. Nyílt és zárt téri termesztés összehasonlítása

Nyílt térben csupán két mintát termesztettünk, a T3 és T8 jelűeket. Ezeknél a mintáknál az 5BM tápoldatot használtuk, így csupán azokkal a mintákat fogom a továbbiakban összehasonlítani, ahol szintén 5BM-es tápoldatot alkalmaztunk (P5BM és 05BM). A T3 és P5BM mintákat *Chlorella vulgaris*, míg a T8 és 05BM mintákat *Scenedesmus spinosus* termesztésével kaptuk.



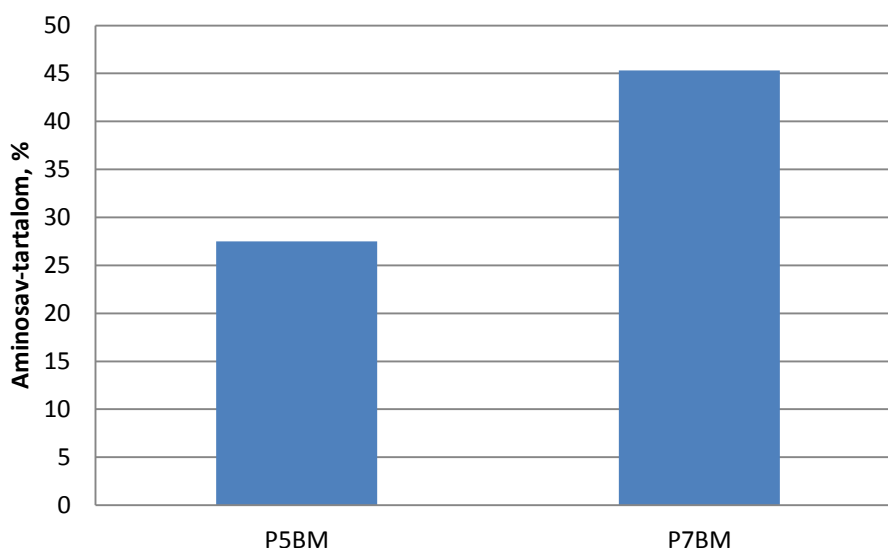
8. ábra: Az összehasonlításban részt vevő minták aminosav-tartalma

Látható, hogy-algafajtól függetlenül- magasabb aminosav-tartalom érhető el nyílt téri termesztés esetében. Ennek az lehet a magyarázata, hogy a zárt térben nem volt olyan nagy mértékű a nitrogén-felvétel, mint szabad térben. Ez esetben a tápoldatban beadagolt azonos mennyiségű nitrátból a szabadtéri termesztés esetében többet tudtak hasznosítani az algák.

3.3. Tápoldat koncentrációjának hatása

A tápoldatokat két koncentrációban adagoltuk a mintákhoz. Az első esetben 5BM tápoldatot kaptak, mely azt jelenti, hogy a 3. táblázatban bemutatott BG-11-es alap tápoldatban lévő vegyületek a BG-11 tápoldathoz képest ötszörös mennyiségben vannak jelen. A 7BM tápoldat ugyanezt a gondolatot követve hétszeres koncentrációban tartalmazza a tápoldatban lévő vegyületeket a BG-11-es alap tápoldathoz képest. Ezen összehasonlítás azt hivatott eldönteni, hogy a nagyobb koncentrációban beadagolt tápoanyagok hatására valóban magasabb lesz-e az aminosav tartalom, illetve, hogy mennyivel. Ezt azért fontos tudnunk, mert ipari méretekben a gazdaságosság a döntő szempont, így fontos optimalni a bevitt tápanyagok mennyiségét.

Ennél az összehasonlításnál csupán két mintát vizsgálók, a P5BM-et és a P7BM-et.

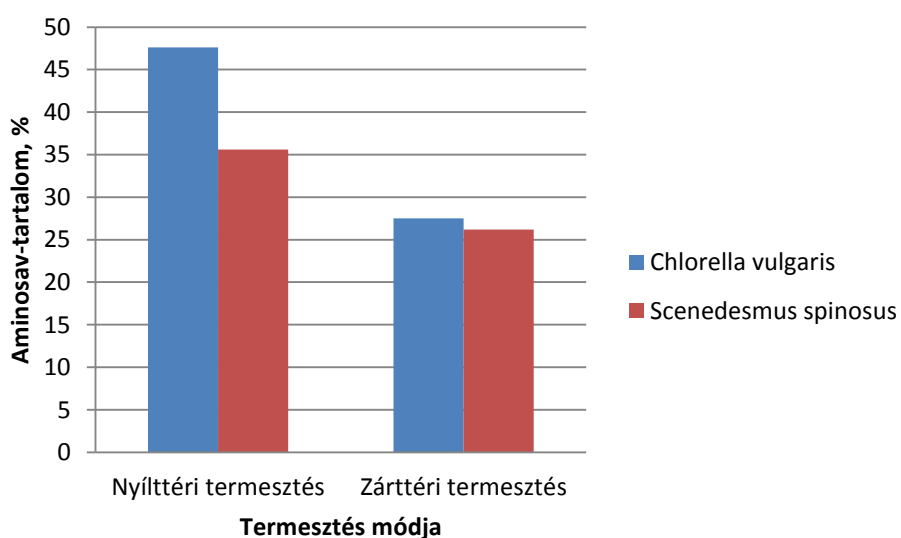


9. ábra: A tápoldat koncentrációja alapján összehasonlított minták aminosav-tartalma

Az oszlopdiagramról könnyen leolvashatjuk, hogy a 7BM tápoldattal termesztett algák aminosav-tartalma jóval nagyobb, mint azoknál a mintáknál, melyek termesztéséhez az alacsonyabb koncentrációjú, 5Bm-es tápoldatot alkalmaztuk. A 7BM tápoldat 40%-kal több tápanyagot tartalmaz az 5BM tápoldatban lévő oldott tápanyagok mennyiségéhez képest, ám a 7BM tápoldattal kezelt minta aminosav tartalma 64,75%-kal nagyobb az 5BM tápoldattal szaporított mintáknál. Ennek az lehet a magyarázata, hogy a töményebb tápoldatból nagyobb hatásfokkal képesek az algák a növekedésükhöz elengedhetetlen nitrát-ionokat megkötni. Ez azt bizonyítja nekünk, hogy gazdaságilag is megéri a magasabb koncentrációjú tápoldatot adagolni az algatermesztés során.

3.4.. Az aminosav-tartalom függése az alga fajától

A szakirodalmak is csak közelítő becslést tudnak adni az algák átlagos összetételéről, hiszen ezt rengeteg tényező befolyásolja. Ezek közül a legmeghatározóbb az alga fajtája. Természetesen egy fajon belül is lehetnek eltérések, melyek a körülményektől alakulnak ki, ám az alga fajtájának ismeretében már könnyebben tudjuk meghatározni az átlagos összetételt. Esetünkben kizárólag a már feltárt minta szabad aminosav-tartalmát vizsgáljuk a két rendelkezésre álló faj esetében. Az algafajok összetételével foglalkozó szakirodalmak alapján azt várjuk, hogy a *Chlorella vulgaris* aminosav-tartalma lesz a magasabb.



10. ábra: A vizsgált fajok mintájának szabad aminosav-tartalma

A 1. ábra10. ábra megmutatja számunkra, hogy a várakozásaink beigazolódtak, ez esetben is magasab volt az aminosav- tartalom a *Chlorella vulgaris* esetében. Az ábráról az is leolvasható, hogy milyen mértékű a különbség az algafajok között. Látható, hogy a nyílt téri termesztés esetében a különbség jóval szignifikánsabb, míg a zárt térben termesztett algák esetében a különbség a fajok között már kevésbé szembetűnő. Ennek magyarázata a külső tényezőkben keresendő.

3.5. A *Chlorella vulgaris* minták esszenciális aminosav-tartalma

A szervezet nem képes minden aminosavat megfelelő mennyiségben előállítani, így ezeket táplálkozás útján kell bevennünk. Napjainkban a *Chlorella vulgaris*-t egyre elterjedtebben alkalmazzák táplálék-kiegészítőként, hiszen számos jótékony hatása van az emberi szervezetre. A *Chlorella* nagy mennyiségben tartalmaz értékes növényi fehérjét, tartalmazza az összes aminosavat, a 8 esszenciális aminosavat egyaránt. Ezen kívül megtalálhatók benne a szervezet számára nélkülözhetetlen ásványi anyagok, nyomelemek (pl. magnézium, kálium, mangán, vas, cink, kalcium, szelén) vitaminok (C- és E-vitamin, niacin, B-vitaminok (B12) aktív formában, K-vitamin, pantoténsav, folsav), antioxidáns hatású vegyületek, telítetlen zsírsavak (pl. alfa-linolénsav és linolsav). Tartalmaz még immunrendszert stimuláló poliszaharidokat, omega-3 zsírsavat, mely a gyulladáscsökkentő és érvédő hatásáról ismert, nagy mennyiségben klorofillt, melynek fertőtlenítő, károsanyag megkötő hatás, szagtalanító, sebgyógyító, vastagbél-daganat-megelőző, antioxidáns hatása van a szervezetre. A *Chlorella vulgaris* táplálékkiegészítőként való fogyasztása elősegíti a sebgyógyulást, az egészséges bélműködést, gondoskodik a helyes bélflóráról, és segíti a máj működését. [17]

Mindezek miatt érdemes megvizsgálni hidrolizált minták esszenciális aminosav-tartalmát. Az esszenciális-aminosav-tartalmat hasonlóan számítottam, mint a mérés kiértékelésének kezdetén, ám eze esetben csak az esszenciális aminosavakat vettem figyelembe. Az így kapott eredményeket a ban foglaltam össze.

9. táblázat: A vizsgált minták átlagolt esszenciális aminosav tartalma

	Minta jelölése				
	P7BM	P5BM	VGK	G10	T3
Összes aminosav, %	45,3	27,5	16,5	20,2	47,6
Esszenciális aminosav%	14,3	11,2	5,8	5,2	9,4
Esszenciális aminosavak aránya, %	31,6	40,7	35,0	25,7	19,8

Az eredményekből kiderül, hogy a fajlagosan legnagyobb esszenciális-aminosavat az 5BM tápoldat alkalmazásával érhetjük el, zárttéri termesztés esetén, így ennél a vizsgálatnál már nem igazak a korábbi megállapításaink. Ha táplálékkiegészítőként vagy annak alapanyagaként szeretnénk eladni a termesztett alát, akkor már nem érdemes a töményebb, 7BM tápoldatot használni, mert gazdaságilag nem éri meg. Ugyan nagyobb a keletkezett esszenciális aminosav mennyisége, de a különbség jóval 40% alatt van, ez esetben csupán 27,7%.

A vizsgálat alapján kitűnik, hogy a glükóz hozzáadásval termesztett minták esetében relatív magas az esszenciális aminosavak aránya, de az összes aminosav-tartalom alacsony, ezért nem éri meg az élelmiszercélú termesztéshez a heterotróf szaporodási utat választani.

Az is észrevehető, hogy míg az összes aminosav-tartalom vizsgálatakor a szabad téren szaporodott algamintának jóval nagyobb volt az aminosav tartalma, ez esetben ez megfordul. Erre az lehet a magyarázat, hogy a növekedés során az alakultúrát érő külső hatások jelentős befolyással vannak a keletkezett peptidek minőségére is.

4. Összefoglalás

Kutatásom során különböző forrásból származó algaminták savas hidrolízisét hajtottam végre, majd az így kapott mintákat nagynyomású aminosav-analizátorral vizsgáltam. A mérés során kapott adatok alapján meghatároztam a minták összes szabad aminosav tartalmát. Ezen értékeket hasonlítottam össze több szempont alapján. Vizsgáltam a heterotróf termelés hatását, ahol megállapítottam, hogy a termesztés során az algakultúrához adagolt glükóz kedvezőtlen hatással van az aminosav, illetve a fehérjetartalomra. Ez után összehasonlítottam a nyílttéri és zárttéri mintákat, ahol azt a következtetést vontam le, hogy a magas aminosav-tartalom eléréséhez kedvez a szabadtéri termesztés. Mivel két külön algafajjal dolgoztam, fontos volt tudnom, hogy melyik fajnak magasabb az aminosav-tartalma. Az eredmények igazolták a szakirodalmakat, a *Chlorella vulgaris*-nak magasabb a fehérjetartalma. Végezetül a táplálékkiegészítőként is alkalmazott *Chlorella vulgaris* esszenciális aminosav tartalmát vizsgáltam meg a különböző minták esetén.

- [1] **Suphi S. Oncel:** *Microalgae for a macroenergy world*, Renewable and Sustainable Energy Reviews 26, pp:241–264, **2013**
- [2] **Marcin Dębowski, Marcin Zieliński, Anna Grala, Magda Dudek:** *Algae biomass as an alternative substrate in biogas production technologies*, Renewable and Sustainable Energy Reviews 27, p: 596–604, **2013**
- [3] **Wang, B., Y. Li, N. Wu, C. Q. Lan:** *CO₂ bio-mitigation using microalgae*. Applied Microbiology and Biotechnology, **2008**
- [4] **Chisti, Y.:** *Biodiesel from microalgae*. Biotechnology Advances, **2007**
- [5] **Doucha, J., F. Straka, K. Lívanský:** *Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (Chlorella sp.) in an outdoor open thin-layer photobioreactor*. Journal of Applied Phycology, **2005**
- [6] **Olaizola, M.:** *Microalgal removal of CO₂ from flue gases: changes in medium pH and flue gas composition do not appear to affect the photochemical yield of microalgal cultures*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, **2003**
- [7] **Kajtár Márton:** *Változatok négy elemre felújított, újra kiadás: Eötvös Kiadó*, **2009**
- [8] **Felszeghy Ödön, Ábrahám Sándor:** *A biokémia alapjai*, Dacia könyvkiadó, Kolozsvár, **1976**
- [9] **Sarkadi Livia:** *Biokémia mérnök szemmel*, Typotex kiadó, Budapest, **2011**
- [10] **Gehrke C. W., Kuo C.T.K., Zumwalt R.W:** *Amino Acid Analysis by Gas Chromatography* Volume II, CRC Press, **1987**
- [11] **Spackman D.H, Stein W. H., Moore S.:** *Anal. Chem*, 30, 1190, **1958**
- [12] **Dr. László Radomir, Dr. Törley dezső:** *Az élelmiszer analitika elméleti alapjai*, Mezőgazdasági kiadó, Budapest, **1987**
- [13] **Pungor Ernő:** *Analitikai Kémia*, Budapest, **1988**
- [14] **Dr. Kristóf János:** *Kémiai analízis II.*, Veszprémi Egyetemi Kiadó, Veszprém, **2000**
- [15] **Aminosav analízis**, 01/2010:20256, Ph.Hg.VIII. – Ph.Eur.6.6 – 1, **2010**
- [16] **Bartha Gábor, Havasi István:** *Térinformatikai alapismeretek*, Miskolci Egyetem Földtudományi Kar, **2011**
- [17] http://www.spirulina-mikroalga.hu/index-a_mikroalgakrol-hu, letöltve: 2014.11.05.