

MŰSZAKI SZEMLE
59. szám, 2012.

Szerkesztőbizottság elnöke /
President of Editing Committee

Dr. Köllő Gábor

Szerkesztőbizottság tagjai /
Editing Committee

Dr. Balázs L. György – HU,
Dr. Biró Károly Ágoston – RO,
Dr. Csibi Vencel-József – RO,
Dr. Fedák László – UA,
Dr. Karácsony János – RO,
Dr. Kása Zoltán – RO,
Dr. Kászonyi Gábor – HU,
Dr. Majdik Kornélia – RO,
Dr. Nagy László – RO,
Dr. Péics Hajnalka – RS
Dr. Puskás Ferenc – RO,
Dr. Szalay György – SK,
Dr. Turchany Guy – CH
Dr. Sebestyén-Pál György – RO

Kiadja / Editor

Erdélyi Magyar Műszaki
Tudományos Társaság – EMT
Societatea Maghiară Tehnico-Științifică
din Transilvania
Ungarische Technisch-Wissenschaftliche
Gesellschaft in Siebenbürgen
Hungarian Technical Scientific Society
of Transylvania

Felelős kiadó / Managing Editor

Dr. Köllő Gábor

A szerkesztőség címe / Address

Romania
400604 Cluj, Kolozsvár
B-dul 21. Decembrie 1989., nr. 116.
Tel/fax: 40-264-590825, 594042
Levélcím: RO – 400750 Cluj, C.P. 1-140.

Nyomda / Printing

Incitato Kft.

ISSN 1454-0746

www.emt.ro

emt@emt.ro

Content – Tartalomjegyzék – Cuprins

A réz ionok hatása a módosított Zöld Fluoreszcens Fehérjére

Effect of copper ions on modified Green Fluorescent Protein

Efectul ionilor de cupru

asupra Proteinei Fluorescente Verzi modificate

BÁLINT Emese-Éva, KERESZTES Előd, FUNKENHAUZER Bernadett,
DEMETER Erika, LÁNYI Szabolcs

4

Fermentációs folyamatokból visszamaradt élesztősejtek
bioszorpciós tulajdonságainak vizsgálata

Biosorption and characteristics of residual beer yeast cells
from fermentation processes

Utilizarea în biosorbție a celulelor de drojdie de bere reziduală
rezultate din procese de fermentație

MAJDIK Kornélia, TONK Szende,
INDOLEAN Cerasella, NAGY Boldizsár

11

Baktériumos biopreparátumok tanulmányozása

és jellemzése a biomasza megközelítő növekedési görbéje alapján

Study and Characterization of Bacterial Bio-preparates Using the Approximated
Biomass Growth Curves

Studiul și caracterizarea biopreparatelor bacteriene
folosind curbe de aproximare a creșterii biomase

MÉSZÁROS Sándor, LASLO Éva,
SZILÁGYI József, LÁNYI Szabolcs

16

Az ember sokrétű tevékenységből származó

léggöri vízgőz a földi felmelegedés fő oka

Az elmélet további bizonyítékai

The main cause of global warming is the atmospheric water
vapor originating from the manifold man's activity

Additional important evidences for the justification of this theory

Cauza principală a încălzirii globale este

vaporul atmosferic de apă rezultat din activitatea multiplă a omului

Dovezi noi ale teoriei

MUZNAY Csaba

28

Glicerinkoncentráció meghatározása bakteriális táplevesből,
refraktometriás módszerrel

Glycerol Concentration Determination

from Bacterial Media Based on Refractometric Method

Determinarea concentrației glicerolului

din mediu bacterian prin metode refractometrice

ORBÁN K. Csongor, ANDRÁS Csaba,
ÁBRAHÁM Beáta, LÁNYI Szabolcs

37

A réz ionok hatása a módosított Zöld Fluoreszcens Fehérjére

Effect of cooper ions on modified Green Fluorescent Protein

Efectul ionilor de cupru asupra Proteinei Fluorescente Verzi modificate

BÁLINT Emese-Éva^{1,2}, KERESZTES Előd², FUNKENHAUZER Bernadett²,
DEMETER Erika¹, LÁNYI Szabolcs²

¹Bukaresti Műszaki Egyetem, Alkalmazott Kémia és Anyagtudományok Kar,
RO-060042, Bukarest, Splaiul Independenței 313,
tel.: 4021-402 96 24, fax 4021-402 39 34, email: balintemese@sapientia.siculorum.ro, www.upb.ro

²Sapientia EMTE, Műszaki és Társadalomtudományi Kar, Biomérnöki Tanszék,
Csíkszereda, RO-530104, Szabadság tér 1., Tel.: 40-266-31 71 21, Fax 40-266-37 20 99

ABSTRACT

*The Green Fluorescent Protein (GFP) was isolated from the jellyfish *Aequorea victoria*, and it is used in biology and biotechnology for monitoring the proliferation of cancer cells and stem cells, and also it is often used as a biosensor for qualitative and quantitative determination of metals. Different metals have different impact on the protein's fluorescence, some metals reduce the intensity (Cu, Fe, Mg), while others increase (Zn) the fluorescence intensity emitted by the protein.*

The gene encoding the wild-type protein and the two histidine mutant (Q204H-S202H) was introduced in Escherichia coli BL21 (DE3) Star cells. After cell disruption proteins were isolated by immobilized metal ion affinity chromatography.

Sensitivity of these proteins toward metal ions was investigated at different concentrations of Cu²⁺ ions varying the pH (6.5-8) and the incubation temperature (20-45°C).

ÖSSZEFOGLALÓ

*A zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) az *Aequorea victoria* medúzából izolálták, és elsősorattal alkalmazzák a biológia és biotechnológia területén egyaránt rákos sejtek terjedésének és őssejtek osztódásának nyomonkövetésére, valamint bioszenzorként is használják a fémek minőségi és mennyiségi meghatározására. Különböző fémek különbözőképpen hatnak a fehérje fluoreszcenciájára, egyesek csökkentik (Cu, Fe, Mg), míg mások növelik (Zn) a fluoreszcencia intenzitását.*

A vad típusú és a két mutációt (S202H-Q204H) tartalmazó módosított zöld fluoreszcens fehérje génjét tartalmazó plazmidot Escherichia coli BL21(DE3) Star sejtekbe transzformáltuk, sejteltárás után a termelt összfehérje extraktumból affinitás kromatográfiával izoláltuk a fehérjéket.

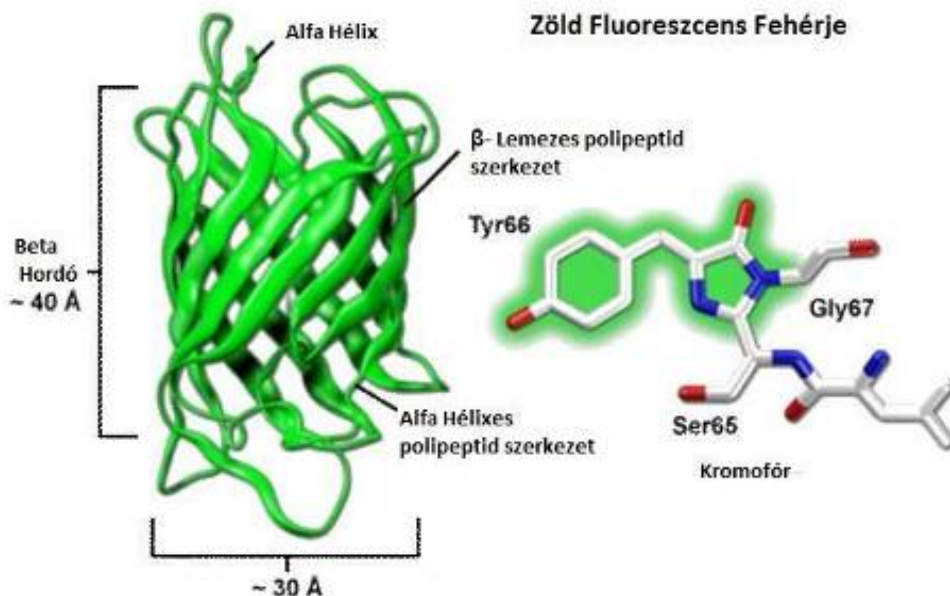
Az így előállított vad típusú és mutáns zöld fluoreszcens fehérjék érzékenységét vizsgáltuk különböző koncentrációjú Cu²⁺ ionokkal szemben változó pH (6.5-8) és hőmérséklet (20-45°C) hatására.

Kulcsszavak: EGFP, bioszenzor, fluoreszcencia intenzitás, mutáns EGFP, transzformálás.

1. BEVEZETŐ

Egyes szerves vegyületek magasabb energiájú (gerjesztett) állapotba kerülnek, ha nagy energiájú fényel sugározzák be őket. A többletenergiát később úgy adják le, hogy közben fényt sugároznak ki (emittálnak). Fluoreszcenciát bocsájthatnak ki különböző baktériumok, egysejtűek, rovarok, hidrák és medúzák egyaránt [1].

A fehérjét O. Shimomura 1962-ben izolálta az *Aequorea victoria* nevű medúzából. A medúza kék fényt bocsájt ki védekező mechanizmusként, amely fény egy részét a GFP elnyeli és zöld fényt emittál.



1.1 ábra

A zöld fluoreszcens fehérje (GFP), valamint a fehérje fluoreszcenciájáért felelős kromofór csoport szerkezete

A fehérje molekulatömege 27 kDa, 238 aminosavból áll, és hordós szerkezetét 11 β -lemez alkotja, melynek közepén található a fluoreszcenciáért felelős fluorofór (kromofór) csoport, amint az az 1.1.-es ábrán is látható. Ez a hordós szerkezet védelmet biztosít a kromofór csoport számára a környezeti hatásokkal szemben [2]. A GFP-nek gerjesztési maximuma van 395 és 475 nm-en valamint emissziós maximuma 508 nm-en. Egy spontán posztranszlációs modifikáció során képződik a kromofór csoport, amelyet három aminosav alkot: a 65-ös pozícióban egy szerin, a 66-os pozícióban treonin, míg a 67-es pozícióban egy glicin aminosav található (Ser65, Thyr66, Gly67). A fehérje csak a natív, három dimenziós szerkezet kialakulása után fluoreszkál.

Ha a kromofór csoport szerkezetét megváltoztatjuk, tehát az azt alkotó három aminosav valamelyikét kicseréljük más aminosavra, megváltozik a fehérje tulajdonsága, például a színe. Így lehet kéken (BFP), sárgán (EYFP) vagy pirosan (RFP) fluoreszkáló fehérjét kapni, mely variációk jelentősen megnövelik a fehérje felhasználási tartományát [3].

A GFP kromofór csoportjában kicserélve a 65. pozícióban található szerint treoninra egy stabilabb és ellenállóbb fehérje kapható, az EGFP. Ahhoz, hogy az EGFP fényt bocsásson ki, a hordó belsejében található három egymást követő aminosavnak ciklizálódnia kell, mely során kialakul egy konjugált imidazolinon gyűrű [4].

A zöld és egyéb színű fluoreszcens fehérjék alkalmazási területe igen elterjedt, mivel a fluoreszcens fehérjék egy sejt jelölése során nem módosítják a molekulák eredeti funkcióját. A zöld fluoreszcens fehérje széles körben alkalmazott mind a biológia, mind a biotechnológia területén egyaránt: a sejtbiológiában alkalmaznak biomolekulák jelölésére, mivel a GFP könnyen bejuttatható a célsejtbe úgy, hogy a molekulát kódoló DNS szakaszhoz hozzáépítik a fluoreszcens fehérjét kódoló génszakaszt, így a célsejtek vagy enzimek funkciója és helye is meghatározható, viszont lipidek és cukrok nem jelölhetők vele [5]. Az igen figyelemreméltó FUCCI eljárás is a többszínű fluoreszcens fehérjéken alapszik (Fluorescent, ubiquitination-based cell cycle indicator) [6]. Továbbá a rákos sejtek terjedésének nyomon követésére, őssejt kutatásban (követni tudják, hogy az őssejt mely részéből alakulnak ki bizonyos szövetek) és bioszenzorként is alkalmazható fémek kimutatására vízből és vérből egyaránt [7]. A nehézfémek a kromofór csoport melletti fémkötő helyekre bekapcsolódva növelhetik (Zn^{2+}) vagy csökkenthetik (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+}) a fehérje fluoreszcenciáját a koncentráció függvényében.

Mivel ezen fehérjék térszerkezete már ismert, molekulamodellezéssel kideríthető, hogy melyek a fehérje struktúrájában azok a helyek, ahol mutációt kialakítva új fémkötő helyeket lehet létrehozni, növelve ezáltal a fehérje érzékenységét a fém ionokkal szemben. A kutatásunk során használt EGFP fehérjén mutációt hajtottunk végre, a 202-es pozícióban levő szerint és a 204-es pozícióban levő glutamint hisztidinre cseréltük ki [8]. Az így létrejött mutáns fehérje (Mut2, mivel az eredeti fehérjéhez képest két hisztidinnel több található benne) fluoreszcenciájának csökkenését vizsgáltuk különböző koncentrációjú Cu^{2+} ionokra, párhuzamot vonva a vad típusú (WT, eredeti EGFP) fehérje fluoreszcenciájának csökkenése között.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

A zöld fluoreszcens fehérjével végzett kísérletekhez első lépésben szükségünk volt a fehérjére oldott, tiszta formában, lehetőleg minél nagyobb mennyiségben, figyelmebe véve, hogy a méréseket négy különböző pH-n és öt különböző hőmérsékleten végeztük. Ezen okból kifolyólag a bakteriális expressziós rendszert (*Escherichia coli*) választottuk fehérjetermelésre, mely rendszer által nagy mennyiségben és viszonylag tisztán, extrém körülmények nélkül, olcsó táptalajon megfelelő minőségű és mennyiségű fehérjét lehet termeltetni.

A fehérje termelést megelőzően szükségünk van egy rekombináns vektorra, mely tartalmazza a termeltetni kívánt fehérje genetikai kódját, esetünkben az EGFP-t kódoló szekvenciát tartalmazó plazmid vektor a Budapesti ELTE Biokémia tanszék kegyes ajándéka volt, a fehérjén végzett mutáció már a Sapiencia BIBIRC laboratóriumaiban valósult meg.

2.1. Kompetens sejt kultúra készítése, transzformálása

A használt sejt vonalak kiválasztásánál figyelembe kell venni a különböző sejt vonalak rendeltetését. A klónozó sejt vonal fő célja, hogy a baktériumba bejuttatott plazmidot minél több példányban másolja le. A hangsúly a replikációs folyamatokon van, ezért kevesebb a fehérjetermelésért felelős enzim a klónozó sejt vonalakban, akkor alkalmazkodik leginkább, mikor a plazmid szaporítása a fő cél.

Ezzel szemben az expressziós sejt vonal elsődleges célja a fehérjetermelés. Ennek érdekében a baktérium genomjából kivették az RNáz enzimek egy részét, melyek a mRNS lebontásáért felelnek, így a mRNS sokkal stabilabb, és több fehérje tud róluk szintetizálódni. Az expressziós sejt vonal esetében a replikációért felelős gének vannak háttérbe szorítva, sok más fehérjebontó enzim génjével együtt azért, hogy a baktérium által megtermelt fehérjét a saját enzime ne bontsa le.

Kutatásunk során klónozó sejt vonalként DH5 α -t használtunk, expressziós sejt vonalként pedig a B121(DE3) STAR sejt vonalat, mivel kompatibilis a pET-rendszerrel, amelyikben az általunk használt gén található (pET15b-EGFP).

Az *E. coli* B121(DE3)STAR sejt vonalat szélesztjük LB táp agarra (Luria Bertani:1000 ml-re: 10g tripton, 5g élesztő kivonat, 5g NaCl, pH 7.5), mivel a megfelelő kompetencia kialakításához friss folyadék kultúrákra van szükség. Egy különálló teleppel beoltunk 3 ml LB levest, majd 16 órán keresztül rázó inkubátorban, 150 rpm sebességgel rázatjuk. A tenyészetet 100-szorosára hígítjuk 50 ml végtérfogatban LB tápoldattal, és 37°C-on inkubáljuk a log szakasz eléréséig, figyelemmel követve a sejtsűrűség növekedését a 600 nm-en mért elnyelés által. A sejteknek logaritmusos szaporodási fázisban kell lenniük, ez a feltétel a használt *E. coli* törzseknel $OD_{600}=0.5$ értéknél valósul meg. A sejtsűrűség nyomonkövetését CamSpec spektrofotométerrel végeztük.

A növekedési szakasz logaritmusos fázisának közepét elérve az összes művelet jégen kell végezni a megfelelő hatékonyság biztosítása érdekében.

A tenyészetet (50 ml sejtsuszpenzió) centrifugáljuk, az ülepedett sejteket 10 ml 0°C-os, steril 100 mM-os MgCl₂-oldatban óvatos pipettázással szuszpendáljuk, majd 20 percig jégen inkubáljuk. A MgCl₂ elősegíti a plazmid sejt falhoz való kötődését, mivel hozzátapad a sejt fal pozitív töltésű glikokálix rétegéhez.

Az inkubálás letelte után a szuszpenziót ismét lecentrifugáljuk. A sejteket 1 ml jég hideg, 100 mM-os CaCl₂-oldatban óvatos rázással szuszpendáljuk, majd egy órát inkubáljuk jégen. Ez a szuszpenzió már kémiailag kompetens sejteket tartalmaz. Hosszabb távú tárolás esetén 200 μ L 80%-os steril glicerint adunk a kompetens sejtekhez, 100 μ L-ként szétosztjuk, majd -80°C-on tároljuk őket felhasználásig. Hősokkal való transzformálás során kihasználjuk a plazmamembrán azon tulajdonságát, hogy fluiditását növelve lehetővé válik idegen plazmid bejutása a sejtbe. 1-2 μ L pET15bEGFP-WT, valamint pET15bEGFP-Mut2 plazmid preparátumot adunk 100 μ L kompetens sejtsuszpenzióhoz, majd 20 percig jégen inkubáljuk, mely idő alatt a negatív töltésű plazmidok a Ca²⁺ ionokkal körülvett sejtek falához tapadnak. A hősokk során a kompetens sejteket és a plazmidot tartalmazó tubust 42°C-on tartjuk 1 percet, mely idő alatt a plazmamembránt alkotó foszfolipid réteg elfolyósodik, és a sejt falhoz tapadt plazmidok be tudnak jutni a sejtekbe, majd visszatesszük jégre 2 percre. A sejtekre 0.9 ml szobahőmérsékletű LB tápoldatot töltünk, majd inkubáljuk rázatva. Ez az inkubálási idő az antibiotikum-rezisztencia kifejezését teszi lehetővé. A transzformálási mixből 100 μ L-ert szélesztünk ampicillint tartalmazó LB táp agarra, és inkubáljuk.

2.2. Heterológ expresszió (fehérje termelés)

2.2.1. Starter kultúrák előállítása

A megfelelő mennyiségű és minőségű fehérje előállításához szükséges, hogy genetikailag homogén sejt kultúrát állítsunk elő. Ezért 3 ml folyékony LB, 100 µg/ml ampicillint tartalmazó táptalajt egyetlen transzformált teleppel beoltva indítjuk el a starter kultúrát. Inkubáljuk rázó inkubátorban 12-16 órát.

2.2.2. Termelő kultúra, fehérje expresszió

A starter kultúra elkészítése után egy 1000 ml-es Erlenmeyer lombikba lévő, 100 µg/ml ampicillint tartalmazó LB tápoldatba öntjük a kémcsőben található baktérium-szuszpenziót, majd a sejt kultúrát tovább inkubáljuk 37°C-on, rázó inkubátorban 16 órán át, mely folyamat során az ampicillin jelenlétének köszönhetően folytonos marad a szelekció, Csakis azon sejtek maradnak életben, amelyek képesek az ampicillint bontani, mellette viszont a plazmival bevitt gén (EGFP vad típusú, illetve a mutáns verzió) is termelődni fog (nagy mennyiségben).

2.3. Nyers sejt kivonat előállítása

A heterológ expresszióval termelt fehérje izolálásának első lépése a sejt falak roncsolása. Az erre alkalmazható módszerek igen sokfélék, az ultrahanggal történő sejt fal- és sejt membrán roncsolás az egyik legegyszerűbb és leghatékonyabb sejt feltárási módszer. Az ultrahangos kezelés során vigyáznunk kell a termelődtől hőmérséklet megfelelő elvezetésére, annak érdekében, hogy a lokálisan kialakult magas hőmérsékletű részekben ne denaturálódjon a fehérjénk. A sejt kivonat és a sejt törmelék elválasztása centrifugálással történik, amelyből származó felülúszó tartalmazza az oldott formában jelen lévő célfehérjét a sejt összes fehérjéivel együtt.

A fehérjetermelés után a baktérium szuszpenziót lecentrifugáljuk, majd a sejt pelletet reszuszpendáljuk 10 ml 10 mM MOPS pufferrel, hogy biztosítsuk a megfelelő pH-t (7.5), majd 1 órán keresztül inkubáljuk, végül -80°C-ra tesszük.

A sejt szuszpenziót kiolvasztva szonikáljuk 3X1 percig, majd centrifugáljuk. A felülúszót, mely oldott formában tartalmazza a fehérjét, egy tiszta Falcon-tubusba öntjük, majd tisztítjuk.

2.4. Affinitáskromatográfias tisztítás

Az affinitáskromatográfia működési elve a Ni-NTA-t tartalmazó gyantán alapul. A vektor konstrukció összeállításánál a zöld fluoreszcens fehérje génjét oly módon klónozták bele a pET15b vektorba, hogy az tartalmazzon egy hat hisztidinből álló rövid láncot, mely megkönnyíti a fehérje izolálását az *Escherichia coli* által termelt össz-fehérjék közül. A gyantára pipettázott fehérje His-tag része kapcsolódik a Ni-NTA-hoz, megtapad rajta, a gyengén- vagy nem kötődött fehérjéket mosás következtében eltávolítjuk egy imidazol tartalmú oldattal. Magasabb koncentrációjú imidazol oldatot használva (300 mM), eluálhatjuk a specifikusan kötött fehérjéket a nikkel-oszlopról. A lecsepegett minta tartalmazza a fehérjénket, melyet egy Falcon tubusba összegyűjtünk.

A kolonnába 100 µl Ni-NTA gyöngyöt teszünk, az így megtöltött kolonnát átmoszuk kiegyenlítő pufferrel (7.5 pH 10 mM MOPS puffer, 300 mM NaCl). A fehérjénket rápipettázuk a kolonnára, az átfolyt mintát pedig összegyűjtjük. Ezen folyamat során a 6XHis-taget tartalmazó fehérjék megkötődnek a gyanta felületén, a többi fehérje pedig változatlanul átfolyik az oszlopon. A töltetet ismét átmoszuk kiegyenlítő pufferrel, hogy a mechanikusan, nem kémiai kötéssel megtapadt nem specifikus fehérjéket távolítsuk el. Ezt a műveletet többször megismételjük, az átfolyt oldatot pedig összegyűjtjük külön Falcon tubusba. A többszöri mosást követően a töltetre pipettázuk az eluáló oldatot (300 mM imidazol, 7.5 pH 10 mM MOPS puffer, 300 mM NaCl), amely az imidazol-tartalmának köszönhetően leoldja a specifikusan megkötött fehérjéket a Ni-oszlopról. Az átfolyt mintát összegyűjtjük, ellenőrizzük a tisztítás sikerességét SDS-gélen, majd dialízisnek vetjük alá.

2.5. Gélelektroforézis 15%-os SDS-poliakrilamid-gélben

Az expresszált fehérjéket ellenőrizzük és szétválasztjuk molekulatömegük alapján. A gél tartalmaz SDS-t (Na dodecil szulfátot), mely biztosítja a fehérjének a negatív töltést, így feszültség alá helyezve a fehérjék a pozitív pórus felé kezdenek vándorolni a térhálós szerkezetű gélmátrixban.

A gél két részből áll: az alsó (futtató) és a felső (koncentráló) gél. A felső gélen koncentrálnak a fehérjék, hogy megnövelve a feszültséget egyszerre induljon a molekulatömeg szerinti elválasztás, az alsó gélen pedig szétváltnak a fehérje molekulák molekulatömegük alapján.

A minta előkészítése során azokat 5 percig főzzük 95°C-on β -merkaptóetanol-glicerinnel oldatban, így a fehérjék denaturálódnak. Ezután 10 μ l-t fölviszünk a géltre, 20 percig futtatjuk 50V-on, majd pedig 150V-on 100 percig.

Futtatás után az alsó gélt kivesszük a két üveglap közül és megfestjük Comassie Brilliant Blue festéket tartalmazó oldattal. A felesleges festéket kimossuk színtelenítő oldattal, majd desztillált vízben tároljuk. Ezek után elkülöníthetőek lesznek a különböző méretű fehérjemolekulák a molekulatömeg-markerhez viszonyítva, melyet a GelDoc (BioRad) transziluminátor segítségével fényképezünk le.

2.6. Dialízis

A nikkel-oszlopos tisztítás után következik a dialízis, melynek szerepe a fémek és az imidazol eltávolítása a fehérje oldatból. Az imidazol az eluáló oldat által kerül kapcsolatba a fehérjével. A tisztított, imidazol tartalmú fehérje oldatot egy 12.4 kDa átmérőjű dialízis membránba helyezünk, mely a pórusain keresztül a 12.4 kDa-nál kisebb méretű molekulákat engedi átdiffundálni a koncentrációgradiensnek megfelelően. A 2X1 liter 10 mM MOPS-ot és Amberlite CG50 kationcserélő gyantát tartalmazó dialízis pufferbe helyezve a fehérjét 48 órán keresztül kevertettük 4°C-on. A kationcserélő gyanta megkötözi az oldatban nyomnyi mennyiségben található nehézfémeket, amelyek esetlegesen zavarnák a fluoreszcencia méréseket, míg az imidazol a dialízis membrán pórusain keresztül átdiffundál a dialízis pufferbe. Az így megtisztított fehérje kerül további feldolgozásra.

2.7. Fluoreszcencia csökkenés vizsgálata

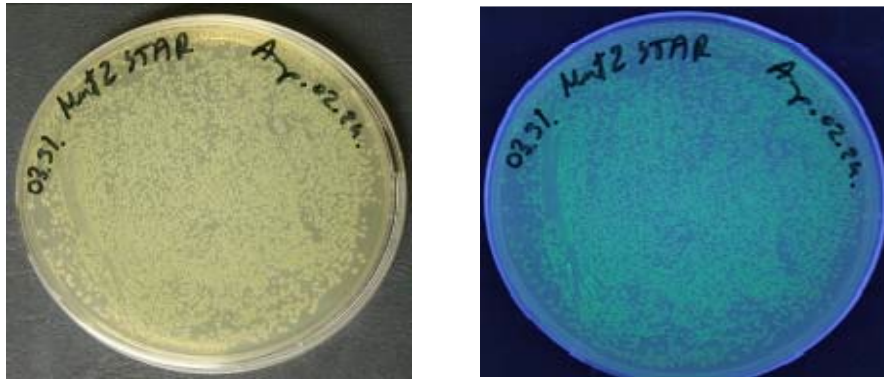
A két típusú (vad típusú és a mutáns) fehérjét 10 μ g/ml koncentrációra hígítottuk 10 mM MOPS pufferrel 6.5-, 7-7.5-, 8 pH-ra. Ezen fehérje oldatokhoz különböző koncentrációban adtunk réz-oldatot, és készítettünk belőlük 0; 0.05; 0.1; 0.25; 0.4; 0.6; 0.8; 1; 2.5; 5; 10; 20; 30 μ M-os végkoncentrációjú fehérje-Cu²⁺- oldatot. Az így elkészített oldatokat 20 percen keresztül vízfürdőben inkubáltuk egyenként 20°C; 30°C; 35°C; 40°C; 45°C-on, míg a fehérje-fém komplex stabilizálódott. A hőkezelés után mindenik mintából két párhuzamos mérést készítettünk, és átlagot számoltunk belőle. A mikrotitráló lemezt behelyeztük a fluoriméterbe (Fluostar Optima fluoriméterrel), és mivel a fluoriméter termosztát funkcióval is rendelkezik, 10 percet hagytuk ugyanazon a hőfokon, amelyen a vízfürdőben volt, majd lemértük a különböző koncentrációjú vad típusú és mutáns fehérje oldatok fluoreszcenciáját, 485 nm gerjesztési valamint 520 nm elnyelési szűrőket használva. A gerjesztési és elnyelési spektrumot a módosított zöld fluoreszcencia fehérje esetén kísérleti úton határoztuk meg, felvéve a fehérje teljes spektrumát [7]

A különböző pH-n hígított fehérjét lemértük rézkoncentráción, és mind az öt különböző hőfokon. Az eredményeket átlagoltuk és kiszámítottuk azt is, százalékban, hogy mennyit veszít a fluoreszcenciájából. Ezeket az adatokat táblázatba rögzítettük, csoportosítottuk három paraméter szerint és ábráztuk.

3. EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉS

3.1. Transzformálás

A pET15b plazmidok rendelkeznek ampicillin rezisztens tulajdonsággal, azaz kódolják a β -laktamáz enzimet, mely az ampicillin laktám gyűrűjét bontja. Ezen enzim termelése esetén ellenőrizhetjük a transzformálás eredményességét, ha a sejtek felveszi a plazmidot, ő is rendelkezni fog ezzel a tulajdonsággal, s így kinő az antibiotikumot tartalmazó speciális táptalajon, mivel hatástalanítani tudja az antibiotikumot a plazmidon található gén által. Az anyag és módszerben leírtak alapján elvégeztük a transzformálást, majd 100 μ l transzformált baktérium szuszpenziót pipettáztunk ampicillines táptalajra. A transzformálás sikeresnek bizonyult, mivel a sejtek kinőttek az ampicillint tartalmazó táptalajon. UV fény alatt ezek a fehérjék világítanak (3.1 ábra).

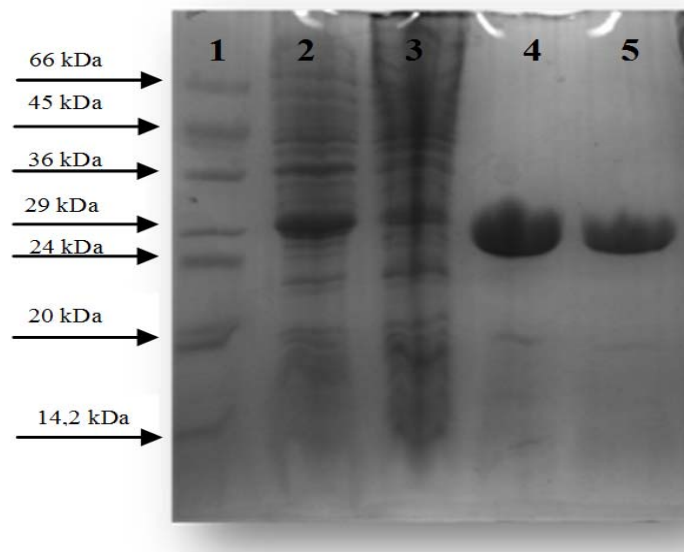


3.1. ábra

Transzformálás után ampicillines agaron kifejlődött EGFP-Mutáns2 telepek természetes fényben, illetve UV fény alatt

3.2. Fehérje expresszió és tisztítás

A 3.2.ábrán látható, hogy a fehérje affinitás kromatográfiás tisztítása sikeres volt, mivel a zöld fluoreszcens fehérje a méretének megfelelő molekulásúly marker mellett fut, 29 kDa-nál. Ugyanakkor kijelenthetjük, hogy a fehérje oldat nem tartalmaz egyéb fehérjéket, ezáltal alkalmassá válik a további vizsgálatok lebonyolítására.



3.2. ábra

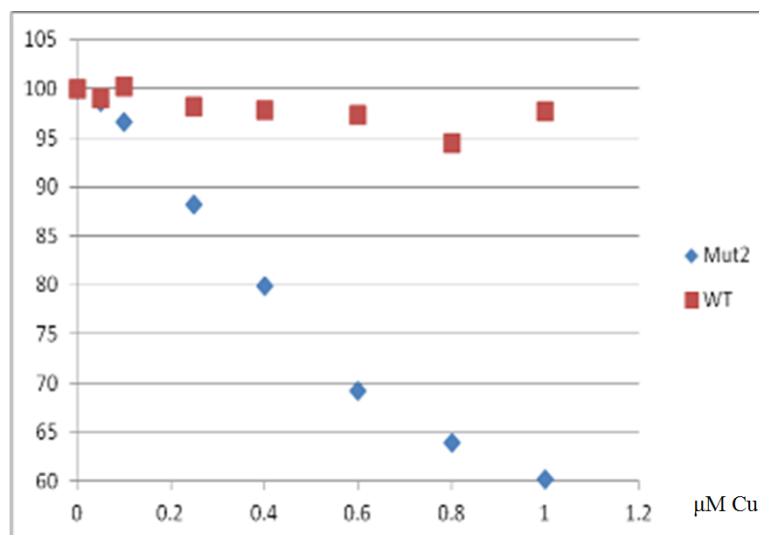
Fehérje tisztítás eredménye:

1. Oszlop: molekulásúly marker (Sigma), 2. Oszlop: össz sejtek,
3. Oszlop: Ni-oszlopon átfolyt fehérjék, 4. Oszlop: Ni-oszlopról eluált WT fehérje,
5. Oszlop: Ni-oszlopról eluált Mut2 fehérje

3.3. Fluoreszcencia csökkenés

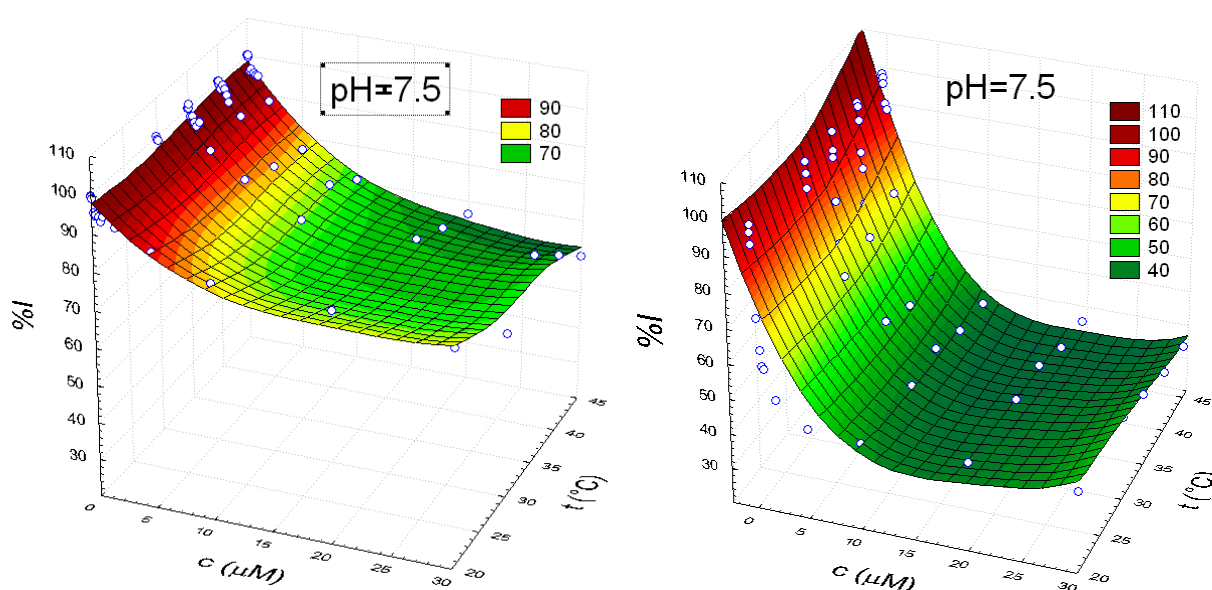
A fluoreszcencia változást mértük a Wt és Mut2 típusú fehérjéken egyaránt, különböző pH, Cu^{2+} koncentráció és hőmérséklet függvényében.

0-30 μM -os Cu^{2+} koncentráció intervallumban a fluoreszcencia 0.5 μM -nál hirtelen lecsökken, majd nagyon kis változást mutat. Ezen észrevétel után a méréseinket a 0-1 μM -os Cu^{2+} tartományban folytattuk. Azt tapasztaltuk, hogy ebben a tartományban jobban csökken a fehérjénk fluoreszcenciája, s ezen belül is a Mut2 zöld fehérje mutat nagyobb változást. Alacsonyabb Cu^{2+} koncentráció esetén a Mut2 nagyobb fluoreszcencia csökkenést mutat mint a Wt típusú fehérje, azaz a mutáció megnövelte a fehérje érzékenységi tartományát, kisebb koncentráció esetén erőteljesebb csökkenést mutat (3.3. ábra).



3.3. ábra
A Wt és Mut2 fehérje érzékenységi tartománya

A fluoreszcencia csökkenésének vizsgálata során a 7.5 pH tartomány bizonyult a legjobbnak, a 3.4.-es ábrán a vad és mutáns típusú zöld fluoreszcens fehérje fluoreszcenciájának csökkenése figyelhető meg a Cu^{2+} koncentráció (c), hőmérséklet (t) és százalékban megadott fluoreszcencia változás (I%) függvényében (a felületek a Statistica szoftver felhasználásával készültek). Az ábrán látható, hogy a Mut2 típusú fehérje nagyobb érzékenységet mutatott a Cu^{2+} ionokra nézve, mint a Wt típusú. A két fehérje közti különbség abban nyilvánul meg, hogy a Wt fehérje 202-es pozíciójában levő szerint és a 204-es pozícióban levő glutamint hisztidinnre cserélték a Mut2-ben. A hisztidin új fémkötő helyeket alakít ki a kromofór csoport mellett, ezzel segítve elő a fluoreszcencia kioltását. Ahogy az ábrán is jól látható, a Wt típusú fehérje fluoreszcenciája százalékban kifejezve 100-ról 70%-ra csökkent a Cu^{2+} koncentráció függvényében, míg a 2 hisztidinnel mutált fehérje fluoreszcenciája 100-ról 40%-ra.



3.4. ábra
A Wt és Mut2 fehérje fluoreszcenciájának (I%) csökkenése Cu^{2+} koncentráció(c) és hőmérséklet(t) függvényében

4. KÖVETKEZTETÉS

Munkánk során a vad típusú és a két mutációt (S202H-Q204H) tartalmazó módosított zöld fluoreszcens fehérje génjét tartalmazó plazmidot *Escherichia coli* BI21(DE3) Star sejtekbe transzformáltuk, sejteltérés után a termelt össz-fehérje extraktumból affinitás kromatográfiával izoláltuk a vad típusú és a mutáns fehérjéket.

Az így előállított vad típusú és mutáns zöld fluoreszcens fehérjék érzékenységét vizsgáltuk különböző koncentrációjú Cu^{2+} ionokkal szemben változó pH (6.5-8) és hőmérséklet (20-45°C) hatására.

A vizsgálatok során megbizonyosodtunk, hogy a mutáns fehérje magasabb érzékenységet mutat minden körülmények között a Cu^{2+} ionok koncentrációjának változására, amely lehetővé teszi bioszenzorként való alkalmazását a jövőben ivóvizek nehézfém tartalmának kimutatására.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetünket fejezzük ki a Sectorial Operational Programme Human Resources Development 2007-2013 of the Romanian Ministry of Labour, Family and Social Protection through the Financial Agreement POSDRU/88/1.5/S/60203 programnak, valamint a Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem Biomérnöki Tanszékének az anyagok és a kísérletek elvégzésének biztosításáért.

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- [1.] Skoog, D.A., F.J. Holler, and S.R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*. 2007: Thomson Brooks/Cole.
- [2.] Cubitt, A.B., et al., *Understanding, improving and using green fluorescent proteins*. Trends Biochem Sci, 1995. **20**(11): p. 448-55.
- [3.] Olenych, S.G., et al., *The fluorescent protein color palette*. Curr Protoc Cell Biol, 2007. **Chapter 21**: p. Unit 21 5.
- [4.] Wachter, R.M., et al., *Crystal structure and photodynamic behavior of the blue emission variant Y66H/Y145F of green fluorescent protein*. Biochemistry, 1997. **36**(32): p. 9759-65.
- [5.] Komorowski, M., B. Finkenstädt, and D. Rand, *Using a Single Fluorescent Reporter Gene to Infer Half-Life of Extrinsic Noise and Other Parameters of Gene Expression*. Biophysical Journal, 2010. **98**(12): p. 2759-2769.
- [6.] Holmes, D.S., S.K. Dubey, and S. Gangolli, *Development of biosensors for the detection of mercury and copper ions*. Environmental Geochemistry and Health, 1994. **16**(3): p. 229-233.
- [7.] Sakaue-Sawano, A., et al., *Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression*. Cell, 2008. **132**(3): p. 487-98.
- [8.] Palfi, M., Kovacs, E., Miklossy, I., Szilagyi, L., Abraham, B., Lanyi, Sz., *Comparative study of Green Fluorescent Protein mutants*. Studia Universitatis Babeş-Bolyai Chemia, 2011(Special Issue): p. 35-45.

Fermentációs folyamatokból visszamaradt élesztősejtek bioszorpció tulajdonságainak vizsgálata

Biosorption and characteristics of residual beer yeast cells from fermentation processes

Utilizarea în biosorbție a celulelor de drojdie de bere reziduală rezultate din procese de fermentație

MAJDIK Kornélia¹, TONK² Szende, INDOLEAN Cerasella¹, NAGY Boldizsár¹

¹ Babes-Bolyai University, Faculty of Chemistry and Engineering Chemistry,
11 Arany Janos st., RO-400028, Cluj-Napoca, Romania

² Sapientia University, Department of Environmental Sciences, Cluj-Napoca, Romania

ABSTRACT

The biosorption is an alternative method for the removal of heavy metal ions from wastewaters. The living yeast culture are largely used for biosorption processes to accumulate heavy metals. The residual beer yeast cells result from fermentation processes, show a great adsorption capacity which propose this material for industrial applications.

ÖSSZEFOGLALÓ

A bioszorpció alternatív lehetőség a nehézfémek eltávolítására a szennyvizekből. Az élesztősejtek különböző típusai alkalmasak a nehézfémek megkötésére. A fermentációs folyamatokból visszamaradt sörélesztősejtek magas adszorpció kapacitást mutatnak s így alkalmassá válnak ipari alkalmazásra.

Kulcsszavak: *Saccharomyces Cerevisiae*, immobilizálás, nehézfémek, adszorpció kapacitás

BEVEZETŐ

Az utóbbi évtizedek környezeti felmérései (monitoring) igazolták, hogy az ipari létesítmények közelében, városokban, közlekedési főútvonalak mentén, és sok esetben a szennyvizek, szennyvíziszapok mezőgazdasági területeken történő elhelyezésével kritikus mértékben megemelkedett a talaj nehézfém tartalma.

A toxikus nehézfémek felhalmozódása humán egészségügyi, ökológiai, biológiai jelentőséggel bír. Az EU-ban 2000. XII. 22-én hatályba lépett az EU vízpolitikáról szóló ún. Víz Keretirányelv (<http://www.euvki.hu/>), amely szabályozza a vizek nehézfémkoncentrációinak megengedett határértékét, ehhez kapcsolódnak az egyes országok kormányrendeletei, melyek szabályozzák a természetes vizek minőségi követelményeit.

A környezetbe különböző módon kikerülő nehézfémek eltávolítása feltétlenül szükséges, visszanyerésük és újrahasznosításuk fontos mind környezetvédelmi, mind gazdasági szempontból.

Napjainkban az új bioeljárások egyre nagyobb jelentőségűek a víztisztítás területén is.

A bioremediációs technikák egyik alternatív lehetősége a bioszorpció folyamatokon alapuló víztisztítás. Az alkalmazott biomassza alapján valamint a víztisztítási eljárás paramétereinek függvényében a módszer gazdasági vonatkozásban is versenyképes lehet.

BIOLÓGIAI MÓDSZEREK ALKALMAZÁSA A NEHÉZFÉMEK MEGKÖTÉSÉBEN

A nehézfémek eltávolítása a környezetből jelenleg általában fizika-kémiai eljárásokon alapuló technikákkal történik, mint például precipitációval, koagulációval, redukcióval, adszorpcióval, ioncserés eljárással és különböző membrántechnikákkal. Ezen technikák mellett egyre jelentősebbek a biotechnológiai eljárásokon alapuló módszerek.

A mikroorganizmusok alkalmazása történhet az élő, élettelen vagy kezelt sejtek direkt felhasználásával, vagy a sejtek különböző rögzítési eljárásokkal történő immobilizált formájában.

Oldatban levő fémionok eltávolítására háromféle biológiai folyamat alkalmas:

- bioszorpció (adszorpció), melynek során a fémionok a mikroorganizmusok felületén kötődnek meg;
- fémionok intracelluláris felvétele, akkumulációja
- fémionok kémiai átalakulása mikroorganizmusok hatására.

A lehetséges mechanizmusok közül a bioszorpció a legáltalánosabb és leggyorsabb mechanizmus, ezért ennek van legnagyobb szerepe a szennyvízből történő fémszorpcióban. A bioszorpció kifejezés fémeknek élő vagy holt biomasszához való kötődésének passzív, nem anyagcsere által közvetített folyamatára utal.

A mikroorganizmusok sejtfalát alkotó poliszacharidok, fehérjék és lipidek biztosítják a nehézfémek megkötését. A bioszorpció folyamatban fontos szerepük van a sejtfalban levő funkcionális csoportoknak (amino-, karboxil-, szulf-hidril-, foszfát- és tiol). A sejtfal jellege és összetétele különböző az egyes mikroorganizmusok esetében, így nagy eltérés tapasztalható az adszorpció hatékonysága szempontjából a mikroorganizmusok különböző típusainál.

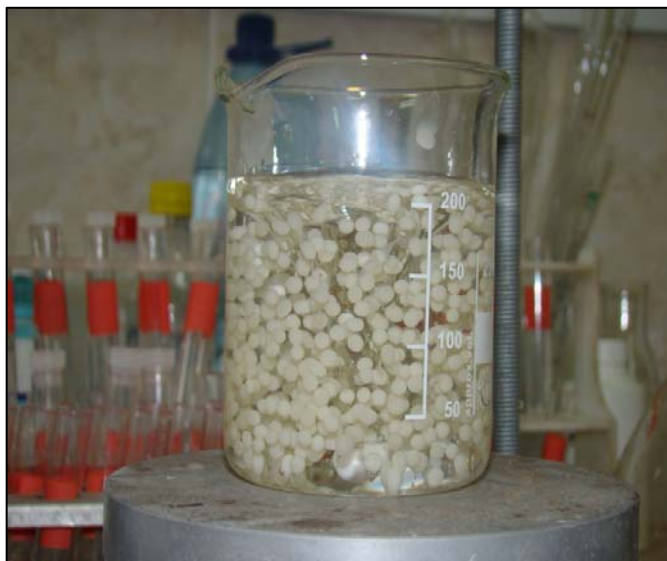
IMMOBILIZÁCIÓ

A mikroorganizmusok a környezeti változásokhoz történő alkalmazásának egyik formája a különböző felületekhez történő tapadás, vagy az egymáshoz tapadás. Ezt a természetes jelenséget fejlesztették tovább a kutatók, különböző rögzítési technológiákat kidolgozva.

A rögzítő eljárások elterjedtek a biotechnológiai eljárásokban. Az immobilizációs technikák előnye, hogy nagy sejtsűrűséget biztosítanak a lebontó vagy átalakító folyamatokban, és a művelet végén olcsón és hatékonyan el lehet távolítani a sejteket.

A sejtek rögzítése négy alapelv szerint történhet:

- Adszorpció előformázott hordozóhoz
- Kovalens kötés előformázott hordozóhoz
- A sejtek egymással való keresztkötése bi- vagy multifunkcionális reagensekkel
- Bezárás részecskébe, rostokba vagy mikrokapszulába



Rögzítés adszorpcióval

A sejtek természetétől és a környezettől függően használhatunk szilárd hordozókat (pl.: granulátumokat: zeolit, üveggyöngy, égetett agyag, stb.) a sejtek adhéziójára, vagy adszorpciójára. A módszer egyszerű, de függ az oldat pH-jától, a sejt típusától illetve az oldat természetétől.

Rögzítés kovalens kötéssel

A sejt hordozóhoz történő rögzítése kovalens kötéssel lehetséges a matrixon található csoporton keresztül vagy egy vegyület segítségével, ami a sejtet a hordozóhoz köti

Rögzítés keresztkötéssel

A mikroorganizmusok sejtfala szabad amino- és/vagy karboxil-csoportokkal rendelkezik. A keresztkötés könnyen kialakítható ezek között olyan bi- vagy multifunkcionális reagensekkel, mint a glutáraldehid vagy a toulén diizocianát.

Rögzítés gélbezárással

Egyszerűsége és kiváló sejtvisszatartó képessége miatt az egyik legalkalmasabb rögzítés típus olyan gél kialakítása, melybe a sejteket különböző polimerek *in situ* térhálósítása segítségével zárjuk. Az ilyen térhálós polimerek egyaránt lehetnek egy- és többkomponensűek. Természetes gélek (mint pl.: az agar, agaróz, alginát, karrageenan, kollagén, glükán, zselatin), kémiailag módosított természetes polimerek (pl.: cellulóz acetát), szintetikus gélek és polimerek (poliakrilamid, poliazetidin, polihidroxi-etilmetakrilát, stb.) mind alkalmazhatók sejtek immobilizálására.

A bioszorpció folyamatok tanulmányozására sikerrel alkalmaznak immobilizált sejteket.

Az immobilizálási technikák közül az egyik lehetőség a nátrium algináttal történő megkötés. Számos természetes és szintetikus polimer képes arra, hogy hidrofil mátrixxá gélesedjen és olyan kíméletes körülmények között tegye ezt, ami a lehető legkisebb sejtkárosodással jár.

Az immobilizált sejtekkel végzett bioszorpció alkalmas ipari megvalósításra, folytonos eljárások kidolgozására.

Az immobilizálás számos előnyt biztosít a biotechnológiai folyamatokban:

- a). A rögzített élő sejtek képesek a hordozó anyagban vagy annak felületén szaporodni.
- b). Fokozott biológiai stabilitással rendelkeznek
- c). Ellenállóbbak a pH változással szemben.
- d). Nagy sejtkoncentrációt biztosítanak
- e). A rögzített sejteket egyszerű elválasztani a reakcióközegetől.

Az előnyök mellett hátrányokkal is számolnunk kell :

- a). A szaporodó sejtek kiszabadulhatnak az immobilizáló anyagból
- b). A diffúziós barrier a mátrix, vagy a nagy sejtsűrűség miatt növekedhet.
- c). Gazdaságossági szempontok figyelembevétele.

A legtöbb rögzítési módszer túl költséges ahhoz, hogy nagyléptékű feldolgozásban alkalmazzák

A KÁDMIUM MINT TOXIKUS ELEM

Napjainkban a nehézfém kifejezés köznapí szóhasználatban összekapcsolódott a toxikus elem fogalmával. Toxikus elemek olyan fémek vagy félfémek, melyek biológiai hatása bizonyos koncentráció-tartományban, illetve a fölött negatív. Azonban e mellett néhányuk kis koncentrációban való jelenléte elengedhetetlen az élő szervezetek zavartalan működéséhez.

Nehézfémeknek nevezzük azokat a fémeket, amelyek sűrűsége 5 g/cm^3 -nél, rendszáma 20-nál nagyobb. Legveszélyesebb nehézfém szennyezők közé sorolható a kutatás során vizsgált kádmiium elem is. A talaj-növény rendszerben a kádmiium nagyon mobilis. A növények kádmiium felvétele leggyakrabban a gyökéren keresztül történik, de bekövetkezhet a levelek felületére került porból is. A növények sokáig elviselik a magas kádmiium tartalmat, így a kádmiium könnyen bekerülhet az állati és emberi táplálékláncba jóval azelőtt, hogy maguk a növények láthatóan károsodnának. Az emberi és állati szervezetben a kádmiium felhalmozódik, így erős toxicitást fejt ki. A kádmiium legfőbb veszélye, hogy képes helyettesíteni az esszenciális cinket, annak jótékony élettani hatása nélkül. A krónikus kádmiium toxicitás tünetei közül megemlíthető a szív- és veseelégtelenség, a magas vérnyomás, rákkeltő hatás, csontelváltozások, tüdőkárosodás.

A bioszorpciós folyamatok tanulmányozására sikerrel alkalmaznak immobilizált sejteket.

Az immobilizált sejtekkel végzett bioszorpció alkalmas ipari megvalósításra, folyamatos eljárások kidolgozására.

GYAKORLATI RÉSZ

Fermentációs eljárásokból visszamaradt élesztősejtek alkalmazása

Cd ionok megkötésére vizes oldatokból.

A sörgyártás hulladéka a fermentációs folyamatból visszamaradt kifáradt sörélesztő. Kutatásaink célja bioszorpciós eljárások kidolgozása a sörgyártásból visszamaradt élesztősejtek esetében, valamint az abszorpciós kapacitások meghatározása és összehasonlítása a kereskedelmi valamint tenyésztett élesztősejtekkel. A víztisztítási alkalmazás céljából vizsgáltuk az immobilizálási lehetőségeket is. A kísérleteket szuszpenziós rendszerekben illetve adszorpciós oszlopokon végeztük, optimalizálva a technológiai paramétereket.

A sörgyári élesztősejtek immobilizálása gélbezárással történt, Na algináttal.

A gélgyöngyök készítéséhez a hagyományos csepegtetős módszert alkalmaztuk.

Anyagok és Módszerek

Bioszorbens:

- Kereskedelmi élesztő
- Sörgyártás során a fermentációs folyamatokból visszamaradt élesztő
- Tenyésztett élesztő

Immobilizálás: nátrium-alginát

Kádmiium oldatok: $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$:- 5 mg/L Cd^{2+} ; 15 mg/L Cd^{2+} ; 30 mg/L Cd^{2+}

Analitikai meghatározás

- Kádmiium szelektív *Consort Lead Combination Electrode PB21508-003B* elektróddal
- Atomabszorpciós spektrometriás módszer
- FTIR meghatározások
- Elektronmikroszkópos vizsgálatok

BIOSZORPCIÓS FOLYAMATOK KÍSÉRLETI VIZSGÁLATA

1. Szuszpenziós rendszerben

A megvalósítás egyszerű és könnyen kivitelezhető. A különböző koncentrációjú Cd ionok vizes oldatából a megfelelő élesztősejtekkel vizes szuszpenziót állítunk elő, megfelelő keverés mellett.

2. Adszorpciós oszlopok segítségével

Az adszorpciós oszlopok esetében immobilizált élesztősejtek megkötési kapacitásának vizsgálata történt. Az immobilizálás nátrium-algináttal történt, csepegtetős módszerrel. Az alginát gyöngyöket a homogenizált élesztő szuszpenzióját 1 M-os CaCl₂ oldatba csöpögtetve kaptuk.

Vizsgált paraméterek:

- Kádmiium ionok koncentráció csökkenése az idő függvényében
- Adszorpciós kapacitások meghatározása
- Bioszorpciós egyensúlyok paramétereinek meghatározása. Izotermák számítása
- Hőmérséklet hatása a bioszorpciós kapacitásra
- Termodinamikai és kinetikai állandók számítása
- Sejtfelületi megkötési mechanizmusok
- Kémiai kezelések alkalmazása a bioszorbensekre

KÖVETKEZTETÉSEK

A kísérleti eredmények igazolják, hogy a *Saccharomyces cerevisiae* sejtek alkalmasak nehézfémek megkötésére, és így alkalmazhatóak a szennyvíztisztításban. A vizsgált bioszorbensek, a különböző típusú élesztősejtek, élő szuszpenzió formájában, vagy immobilizált formában képesek a nehézfémek felületi illetve intarcelluláris akkumulációjára.

A szorpciós folyamatok vizsgálata az idő függvényében igazolta, hogy a folyamat az első 5-10 percben gyors, majd lassú folyamat során 1-2 óra alatt éri el az adszorpciós egyensúly feltételeit. Az adszorpciós egyensúly a Freundlich és Langmuir izotermával jellemezhető. A számított korrelációs együtthatók igazolják, hogy a Langmuir izoterma alkalmasabb az egyensúlyi folyamat leírására, mint a Freundlich izoterma

A kezdeti nehézfém koncentráció befolyásolja az adszorpciós kapacitást, a koncentráció növelésével, nő az adszorpciós kapacitás.

A kinetikai számítások igazolták, hogy a bioszoprció egy pseudo másodrendű folyamat kinetikája szerint megy végbe.

A számított korrelációs együtthatók igazolják, hogy a Langmuir-izoterma alkalmasabb az egyensúlyi folyamat leírására, mint a Freundlich-izoterma.

A kémiai kezelések alkalmazása igazolta, hogy a sejtfal felületén levő funkciócsoportoknak alapvető szerepük van a bioszorpciós folyamatban. A vizsgált FTIR spektrumok alátámasztják, hogy a kémiai felületkezelések nagymértékben befolyásolják az élesztősejtek adszorpciós kapacitását.

A különböző típusú élesztősejtek összehasonlítása bebizonyította, hogy a sörgyári hulladék élesztősejtek adszorpciós kapacitása nagyobb mint a kereskedelmi és a tenyésztett élesztősejteké.

A kémiai kezelések közül kiemelkedő eredmények kellektek a nátrium-hidroxidos kezelés során, amely nagymértékben megnövelte az adszorpciós kapacitást, minden típusú élesztősejt esetében.

A fermentációból visszamaradt élesztősejtek bioszorpciós tulajdonságainak vizsgálati eredményei igazolják az ipari alkalmazás lehetőségét a szennyvíztisztításban.



IRODALOMJEGYZÉK

- [1]. K. Vijayaraghavan, Yeoung-Sang Yun: Bacterial biosorbents and biosorption, *Biotechnology Advances* 26 (2008) 266–291.
- [2]. Runping Hana, Hongkui Li, Yanhu Li, Jinghua Zhang, Huijun Xiao, Jie Shi: Biosorption of copper and lead ions by waste beer yeast, *Journal of Hazardous Materials B137* (2006) 1569–1576.
- [3]. Jianliang Yu, Xu Zhang, Tianwei Tan: An novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production, *Journal of Biotechnology* 129 (2007) 415–420.
- [4]. Cornelia Majdik^a, Cerasella Indolean^a, **Tonk Szende**^a, Andrada Măicăneanu^a, Pernyeszi Timea^c, Tóthmérsz Béla^d: Removal Of Zn²⁺ From Some Synthetic Wastewaters By Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Cells, *STUDIA UNIVERSITATIS BABEȘ-BOLYAI, CHEMIA*, LIII, 3, 2008; pp. 71-76.
- [5]. Szende Tonk¹, Andrada Măicăneanu², Cerasella Indolean², Silvia Burcă², Cornelia Majdik²: Application of immobilized waste brewery yeast cells for Cd²⁺ removal. Equilibrium and Kinetics, *JOURNAL OF CHEMICAL SERBIAN SOCIETY*, Vol. 76, No.3, pp. 363-373.
- [6]. Cornelia Majdik^a, Cerasella Indolean^a, **Tonk Szende**^b, Andrada Măicăneanu^a, Maria Stanca^a, Paul Mezey^c: Suspended and immobilized brewery waste biomass and commercial yeast biosorbents for Cd(II) removal. A thermodynamic study. *REVUE ROUMAIN DE CHIMIE*, Vol. 55, No. 11-12, pp. 871-877.
- [7]. **Tonk Szende**^a, Cerasella Indolean^b, Silvia Burcă^b, Andrada Maicaneanu^b, Kocsis Bela^c, Majdik Cornelia^{*b}: Biosorption of Cd²⁺ Ions By Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae*. Adsorption Equilibrium and Kinetic Studies, *STUDIA UNIVERSITATIS BABEȘ-BOLYAI, CHEMIA*, LV, 3, 2010, pp. 129-137.

Baktériumos biopreparátumok tanulmányozása és jellemzése a biomassza megközelítő növekedési görbéje alapján

Study and Characterization of Bacterial Bio-preparates Using the Approximated Biomass Growth Curves

Studiul și caracterizarea biopreparatelor bacteriene folosind curbe de aproximare a creșterii biomasei

MÉSZÁROS Sándor¹, LASLO Éva¹, SZILÁGYI József², LÁNYI Szabolcs¹

¹Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Műszaki és Társadalomtudományok Kar, Biomérnöki Tanszék, Csíkszereda,
²Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Műszaki és Társadalomtudományok Kar, Élelmiszermérnöki Tanszék, Csíkszereda,
Szabadság tér 1. sz, tel: 0266317121, fax: 0266372099,
meszarossandor@sapientia.siculorum.ro, www.csik.sapientia.ro

ABSTRACT

In our study we examined at laboratory stage the growth of the biomass of bacterial strains, individually or in the presence of each other, on various media in order to improve the fields of agricultural production, since this strains constitute the basis of agricultural biopreparates. To process the experimental data we used a computational method based on a function with six coefficients, determined by nonlinear regression analysis.

ÖSSZEFOGLALÓ

Tanulmányunkban laboratóriumi fázisban vizsgáltuk a mezőgazdasági termelési hozamok növelését elősegíteni hivatott biopreparátumok előállításához felhasználandó baktériumtörzsek biomasszájának növekedését különböző táptalajokon, egyenként, vagy egymás jelenlétében. A kísérleti eredmények feldolgozásához egy hat együtthatós, regressziós számítással meghatározott egyenletet használtunk fel.

1. Bevezető

A mezőgazdasági termelési hozamok növelését elősegíteni hivatott biopreparátumokat már az előkészítési fázisban, közvetlenül a megtervezést követően laboratóriumi teszteknek indokolt alávetni. E preparátumok aktív komponensei általában talajokból izolált baktériumok, melyek valamilyen módon elősegítik a kultúrnövények növekedését, a tápanyagfelvételt pl. nitrogén, foszfor, megfelelő táptalajban, valamilyen inert hordozón rögzítve.

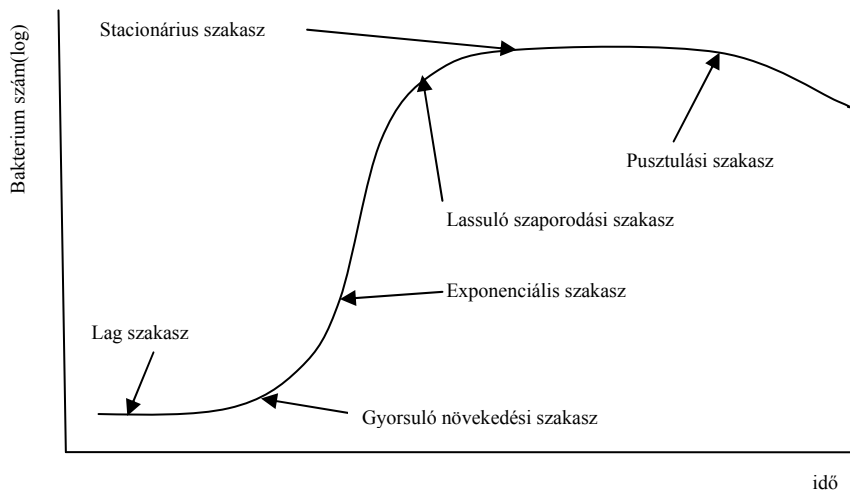
A tanulmány célja laboratóriumi fázisban vizsgálni e biopreparátumok előállításához felhasználandó baktériumtörzsek biomasszájának növekedését különböző táptalajokon, egyenként, vagy egymás jelenlétében.

A biopreparátumokkal kapcsolatosan a következő kérdésekre keresünk válaszokat:

- A. A mikroorganizmusok életképességét illetően:
- Életképes-e a megfigyelt baktérium az adott táptalajon?
 - Milyen maximális növekedési sebességet ér el a baktériumtenyészet?
 - Az adott körülmények között mekkora a populáció elérhető nagysága?
- B. A mikroorganizmusok kompatibilitását illetően:
- Hogyan változik a tenyészet növekedési sebessége más mikroorganizmusok jelenlétében?
- A feltett kérdések megválaszolására a mikroorganizmusok növekedésének kinetikájáról szerzett elméleti eredmények és gyakorlati tapasztalatok felhasználását tartottuk célszerűnek.

Egy megfelelő környezetbe juttatott baktériumsejt bizonyos adaptációs idő elteltével osztódni, szaporodni kezd. Az így keletkező biomassza növekedése, a sejtek számát értve, egyre gyorsul, egy maximális sebességet elérve, majd lassulni kezd, majd növekedése megáll. A biomassza mennyiségének időbeni függvénye

ábrázolását nevezzük a továbbiakban növekedési görbének (1. ábra). A növekedési görbe különböző szakasza-
it a Monod-féle kinetikai modell nomenklatúrája szerint neveztük meg. Így a következő szakaszokat külön-
bözöttjük meg: lag vagy lappangási, gyorsuló növekedési, exponenciális, lassuló szaporodási, stacionárius és
pusztulási szakaszokat. A baktérium-populáció nagy egyedszáma miatt a gyakorlatban célszerűbb az egyedek
számának logaritmusát ábrázolni az abszcisszán. Így egy fél logaritmikus koordináta rendszerben való ábrázo-
lást használunk.



1. ábra
Mikroorganizmusok szaporodási görbéje

A baktériumtenyészet viselkedésének leírására alkalmazott különböző modellek legtöbbször a mikroor-
ganizmus tenyészetet jellemző növekedési sebességet, vagy az ezzel összefüggő osztódási rátát, generációs
időt írják le, adott körülmények között, kisebb-nagyobb sikerrel. A lag fázis modellezésében gyengébb sikere-
ket értek el (Bárányi, J., 2002).

Az 1. ábrán leírt növekedési dinamika egy idealizált eset, amely megközelítőleg matematikailag model-
lezhető egy módosított Gompertz logisztikai függvénnyel.

Kiindulva a populációk növekedésének kinetikai egyenletéből, a növekedési sebesség dN/dt kifejezhető
egy differenciál egyenlet segítségével:

$$\frac{dN}{dt} = rN \left(1 - \frac{N}{N_{max}} \right) \quad (1)$$

ahol N az egyedek száma adott időpontban, r a sebességállandó, vagyis a maximális növekedési sebesség,
 N_{max} az egyedek elérhető maximális száma a stacionárius szakaszban.

Az N_{max} paramétert gyakran a tenyészet külső körülményeinek eltartó képességéhez kötik. N értéke
aszimptotikusan közeledik az N_{max} paraméter értékéhez, így a logisztikai függvény ebben a formában nem
tudja leírni a hanyatlási vagy pusztulási szakaszt.

Hutchinson (1948) és később Gibson (1984) egy négy paraméteres egyenletet javasolnak:

$$\log N = A + \frac{C}{1 + e^{-B(t-M)}} \quad (2)$$

Ahol A , B , C , M , az egyenlet paraméterei, t pedig az idő, mint független változó. A (2) egyenletben már
az egyedek számának logaritmus, valamint $t-M$ módosított idő szerepel, ami a fél logaritmikus ábrázolást
engedi meg (Fujikawa et al, 2004).

A Monod-féle kinetikai modelltől kiindulva különböző egyszerűsítő feltételek mellett – pl. állandó
külső paraméterek megtartása – több modell-formát dolgoztak ki, pl. Hills–Wright, vagy Bárányi–Roberts,
melyek több-kevesebb sikerrel használhatóak a prediktív mikrobiológiában (Bárányi et al. 1995; López, et al.
2004).

A tenyészet maximális növekedési sebességének meghatározására a növekedési görbe inflexiós pontjá-
nak koordinátáit használják, a lag fázis tartamára pedig az inflexiós ponton átmenő érintő és a $t=0$ pontban
érintő vízszintes vonal metszéspontjából lehet következtetni (Perni et al. 2005).

Az (1) egyenletből kiindulva, egy inflexiós pont van, melynek koordinátái:

$$\frac{N_i}{N_\infty} = \left(\frac{1}{1+\theta}\right)^{1/\theta}, \text{ és } t_i = \frac{1}{\lambda\theta} \ln \left(\frac{(N_\infty/N_0)^\theta - 1}{(N_\infty/N_i)^\theta - 1}\right)$$

Mivel a rendelkezésre álló kísérleti eredmények szerint az inflexiós pont koordinátái eltérnek a fenti értékektől, egy nyílt végű logisztikai egyenletet javasoltak, ahol az N_{max} paramétert már változónak tekintik. Így a logisztikai egyenlet a következő formájú lesz:

$$\frac{dN}{dt} = \lambda N \left[1 - \left(\frac{N}{N_\infty}\right)^\theta\right] \quad (3)$$

A (3) egyenletben a következő változások történtek az (1) egyenlethez képest:

Bevezetődött egy növekedést határoló tényezőt f_{limD} :

$$\lambda = r \cdot f_{limD}$$

Valamint az θ exponenciális tényező és a N_∞ egyedek számának aszimptotikus értéke. Így az inflexiós pont koordinátái a következők lesznek (Thornley et al, 2007):

$$\frac{N_i}{N_\infty} = \left(\frac{1}{1+\theta}\right)^{1/\theta}, \text{ és } t_i = \frac{1}{\lambda\theta} \ln \left(\frac{(N_\infty/N_0)^\theta - 1}{(N_\infty/N_i)^\theta - 1}\right)$$

Ebben az esetben is 4 paraméterre van szükség az inflexiós pont meghatározásához.

Mivel a determinisztikus modellek nem voltak alkalmasak a tenyészetek növekedési dinamikájának leírására, biotechnológiai alkalmazásokra inkább a sztochasztikus modellek különböző formáját használják. (Bárányi, J., 2002; Kutalik et al, 2005).

A neoklasszikus modellek számba veszik a nagyon bonyolult metabolikus folyamatokat és a sejtek kölcsönhatását a környezetükkel. Ebben az esetben a kvadratikus illesztés módszerének alkalmazása gyakorlati szempontból ajánlott. Ezek a modellek az exponenciális vagy logaritmikus szakasz inflexiós pontjának helyzetét és a lag szakaszt az exponenciális szakasszal összekötő gyorsuló növekedési szakasz illesztésére helyezik a hangsúlyt. A felépített modell egy másodrendű differenciál egyenletrendszer, mely lebontható bizonyos egyszerűsítő körülmények között egy első rendű egyenletrendszerre. Két peremfeltételre van szükség az egyenletrendszer megoldásához: a kezdeti sejt-koncentrációra valamint a tenyészet kezdeti növekedési sebességére (Vadasz et Vadasz, 2005).

Ha a mikroorganizmus tenyészetek modellezésénél a környezet terhelésbíró képessége is beszámítódik, akkor többlépcsős, lassan változó együtthatós egyenlettel modellezhető a stacionárius és az ezt követő fázis, amely hanyatlás után oszcilláló tendenciát mutat (Grozdanovski et al, 2009; Idlango et al, 2012).

ANYAG ÉS MÓDSZER

Három baktériumtörzs, *Pseudomonas brassicacearum*, *Variovorax paradoxus* és *Ensifer sp.* és két táptalaj segítségével végeztünk kísérleteket. A *Pseudomonas brassicacearum*, *Variovorax paradoxus* és *Ensifer adherens* baktérium törzsek növekedési görbéjének felvételéhez a törzsek 24 órás tenyészeiből fiziológiás oldatba 0.3 turbiditású inokulumot készítettünk. Az optikai sűrűséget Biolog Turbidiméterrel állítottuk be. Majd 5 mL Nutrient (pepton 5g/L, húskivonat 1g/L, élesztőkivonat 2g/L, NaCl 5g/L illetve komplex (pepton 10 g/L, glükóz 40 g/L, élesztőkivonat 10 g/L) tápleveseket 25 µL inokulummal oltottuk be, majd mikrotitráló lemezre pipetáztunk 250 µL-t 5-szörös ismétlésbe. 48 órán keresztül 15 perces időközönként mértük 584 nm hullámhosszon az abszorbanciát FluostarOptima fluoriméter segítségével. Az abszorbanciát mint optikai sűrűséget is tekinthetjük.

A Lambert-Buguer-Beer törvényt alkalmazva, az abszorbancia:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (4)$$

Ahol A az abszorbancia értéke, ε a fajlagos abszorbancia, c a fényt elnyelő komponens töménysége, l az optikai út hossza. Tekintve, hogy a fényt elnyelő komponens a mikroorganizmusok alkotják, ezeknek a koncentrációját vesszük számításba:

$$c = \frac{N}{V} = \frac{4N}{\pi \cdot d^2 \cdot l} \quad (5)$$

Ahol V a minta térfogata, d a minta átmérője, l pedig ennek a magassága. Behelyettesítve:

$$A = \frac{4\varepsilon}{\pi \cdot d^2} \cdot N = K \cdot N \quad (6)$$

Itt K a módszer állandójának tekinthető. Ennek értéke meghatározható, ha ismert N_0 yedszámú tenyészetnek az A_0 abszorbanciáját meghatározzuk:

$$K = \frac{A_0}{N_0} \quad (7)$$

A mikroorganizmusok szaporodási sebességét (egyedszám/óra) meghatározhatjuk, ha az optikai sűrűség növekedési sebességét megszorozzuk a K állandóval.

A mikroorganizmus tenyészeteket két értékkel jellemeztük: a maximális növekedési sebességgel (h^{-1}) és a tenyészet maximális sejtszámával. A lag fázis hosszát nem tekinthettük a tenyészet jellemzőjének, mivel a kísérletek során ebben a fázisban a párhuzamosan meghatározott értékek között számottevő eltérések voltak.

A mért abszorbancia értékek segítségével egy 6 együtthatós függvény együtthatóit határoztunk meg, nemlineáris regresszióval, MATLAB környezetben:

$$A = \frac{b_1 + b_2 \cdot e^{b_3 \cdot t}}{b_4/t + b_5 \cdot e^{b_6 \cdot t}} \quad (8)$$

Ahol A az optikai sűrűség (abszorbancia), b_1, \dots, b_6 a regressziós függvény együtthatói, t a táptalajra való leoltástól eltelt idő, órában mérve.

A (8) függvény segítségével, numerikus deriválással meghatároztuk az optikai sűrűség növekedési sebességét (dA/dt), meghatároztuk az optikai sűrűség maximális növekedési sebességét, majd ebből kiszámítottuk a maximális sejtszám-növekedési sebességet (h^{-1}).

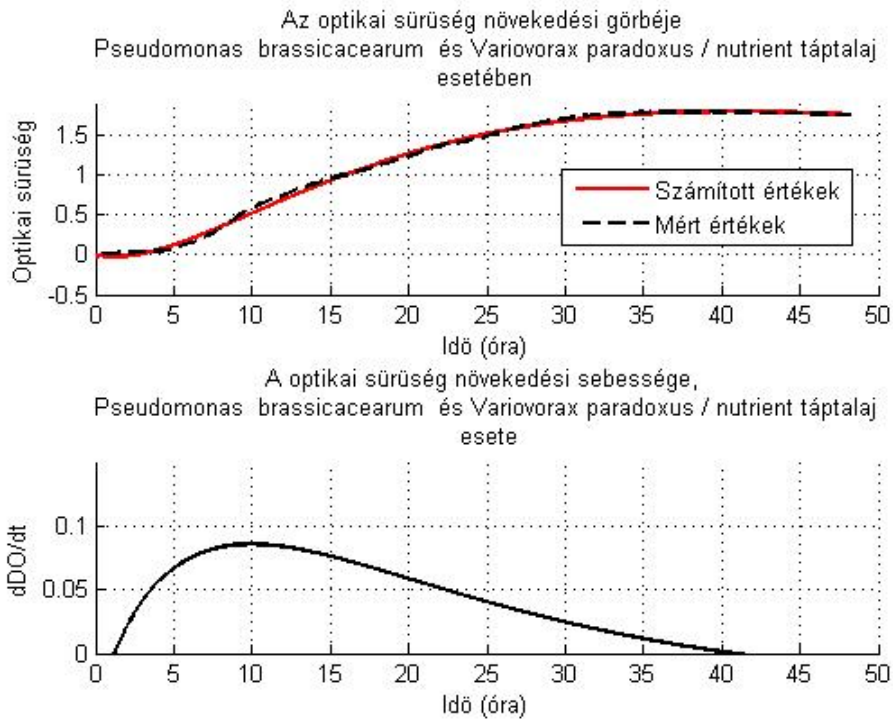
1. Eredmények

A különböző esetekre meghatározott együtthatókat az 1.sz. táblázat tartalmazza:

1. sz. táblázat: A (8) regressziós függvény kísérleti eredmények alapján kiszámított együtthatói

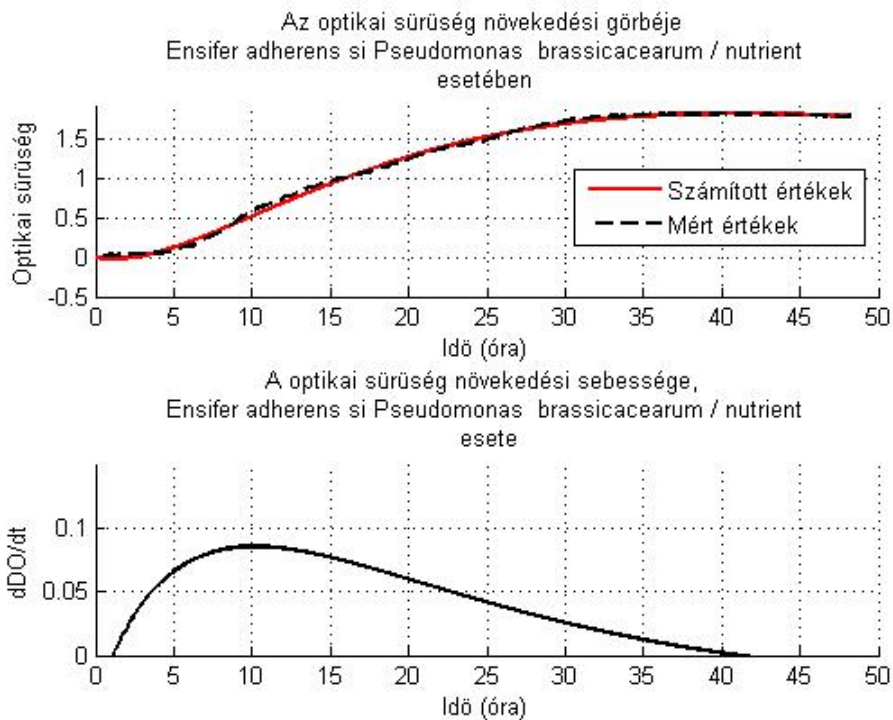
Tenyészet megnevezése	b1	b2	b3	b4	b5	b6
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> és <i>Variovorax paradoxus</i> / nutrient	-2.182E+00	2.228E+00	-8.410E-03	-1.188E+00	-1.023E-01	2.667E-02
<i>Ensifer adherens</i> és <i>Pseudomonas brassicacearum</i> / nutrient	-2.190E+00	2.235E+00	-8.878E-03	-1.345E+00	-1.064E-01	2.644E-02
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> / nutrient	-2.169E+00	2.169E+00	4.787E-06	3.438E-04	6.388E-05	2.881E-02
<i>Variovorax paradoxus</i> és <i>Ensifer adherens</i> / nutrient	1.186E+03	3.890E-01	4.029E-01	5.387E+04	3.798E-01	3.893E-01
<i>Variovorax paradoxus</i> / nutrient	2.169E+03	6.098E-01	4.197E-01	1.253E+05	5.498E-01	4.090E-01
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> és <i>Variovorax paradoxus</i> / komplex	1.582E+00	8.296E-01	1.313E-01	1.339E+02	4.238E-01	1.275E-01
<i>Ensifer adherens</i> / nutrient	-1.112E+00	4.912E-01	1.717E-01	1.488E+02	8.875E-01	1.600E-01
<i>Ensifer adherens</i> és <i>Pseudomonas brassicacearum</i> / komplex	-4.562E-01	1.229E+00	9.041E-02	8.535E+01	4.519E-01	9.352E-02
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> / komplex	-2.029E+00	1.640E+00	5.590E-02	2.588E+01	4.095E-01	6.460E-02
<i>Variovorax paradoxus</i> és <i>Ensifer adherens</i> / komplex	1.714E+07	1.893E-05	1.298E+00	2.557E+09	1.405E-04	1.248E+00
<i>Variovorax paradoxus</i> / komplex	-3.977E-01	1.155E-01	1.135E-01	1.545E+01	1.705E+00	4.733E-02
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> , <i>Variovorax paradoxus</i> és <i>Ensifer adherens</i> / nutrient	-1.544E+00	8.240E-01	1.876E-01	2.883E+01	6.560E-01	1.787E-01
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> , <i>Variovorax paradoxus</i> és <i>Ensifer adherens</i> / komplex	4.020E-01	1.099E+00	1.009E-01	1.234E+02	4.270E-01	1.029E-01

A regressziós függvényeket és a mért eredményeket valamint a regressziós függvények numerikus deriválásával számított optikai sűrűség növekedési sebességét a 2-14. ábrákon mutatjuk be.



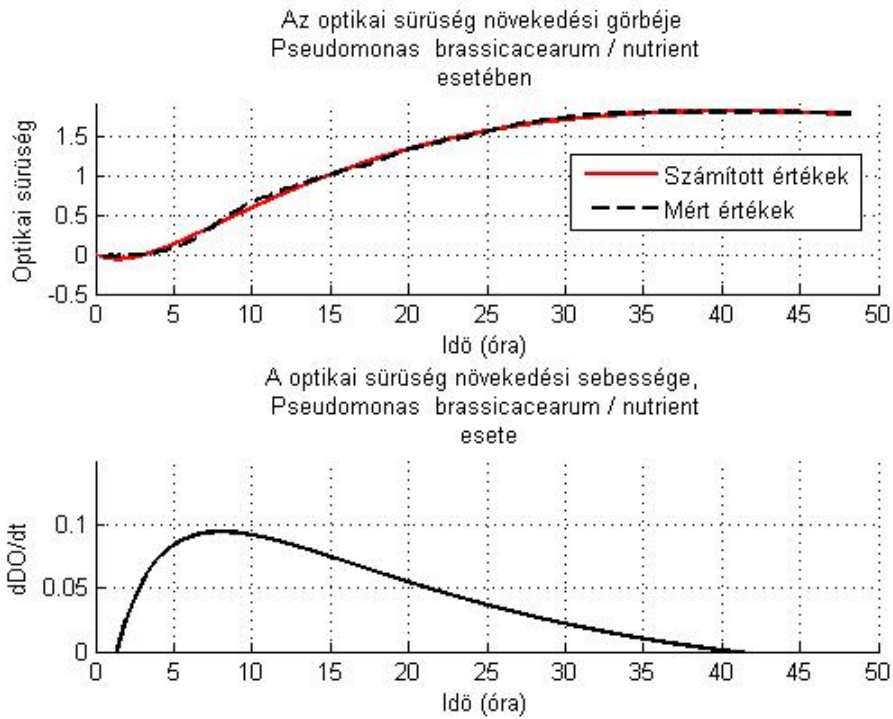
2. ábra

*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai növekedési sűrűség sebessége
Pseudomonas brassicacearum és Variovorax paradoxus nutrient táptalajon*

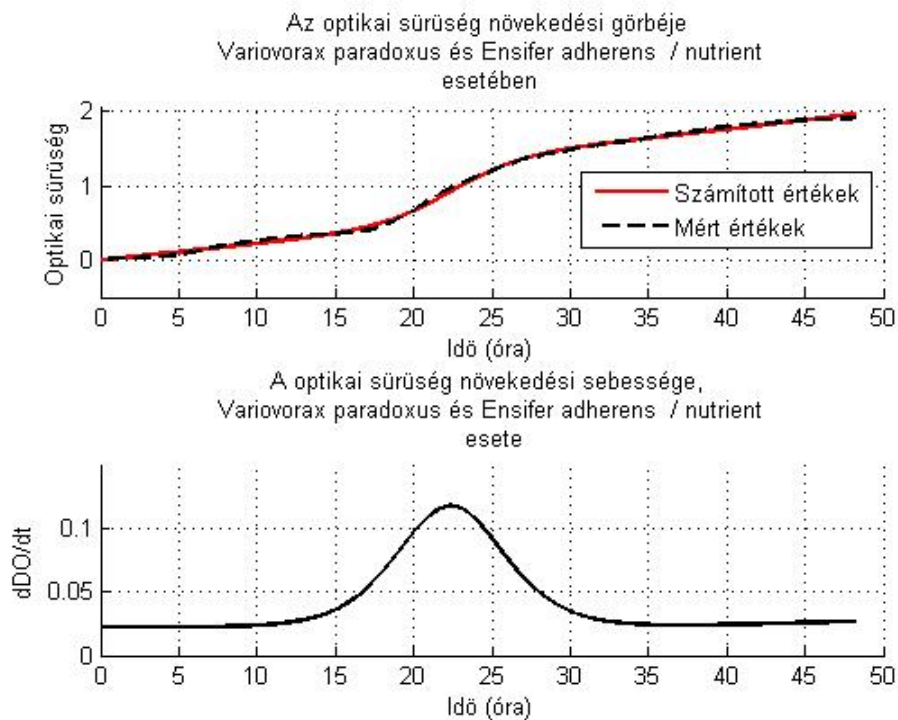


3. ábra

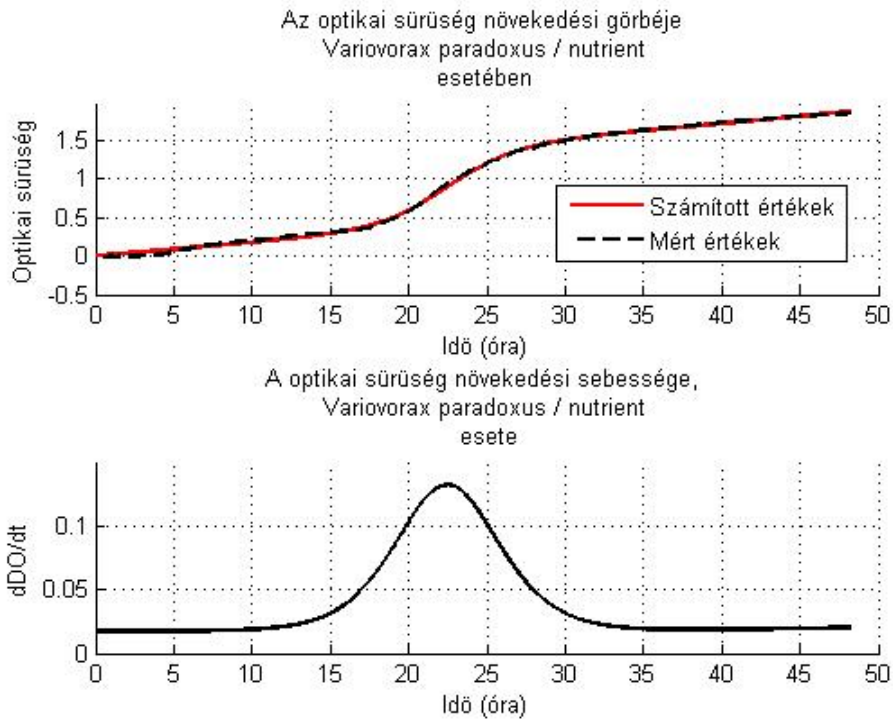
*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai sűrűség növekedési sebessége
Ensifer adherens és Pseudomonas brassicacearum nutrient táptalajon*



4. ábra
*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai sűrűség növekedési sebessége
Pseudomonas brassicacearum nutrient táptalajon*

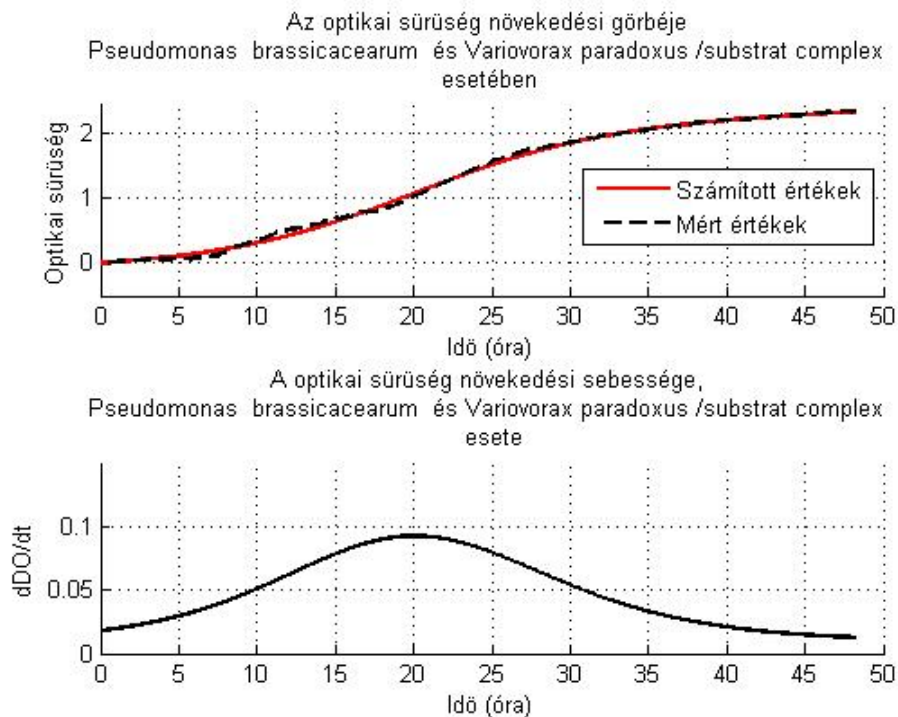


5. ábra
*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai sűrűség növekedési sebessége
Variovorax paradoxus és Ensifer adherens nutrient táptalajon*



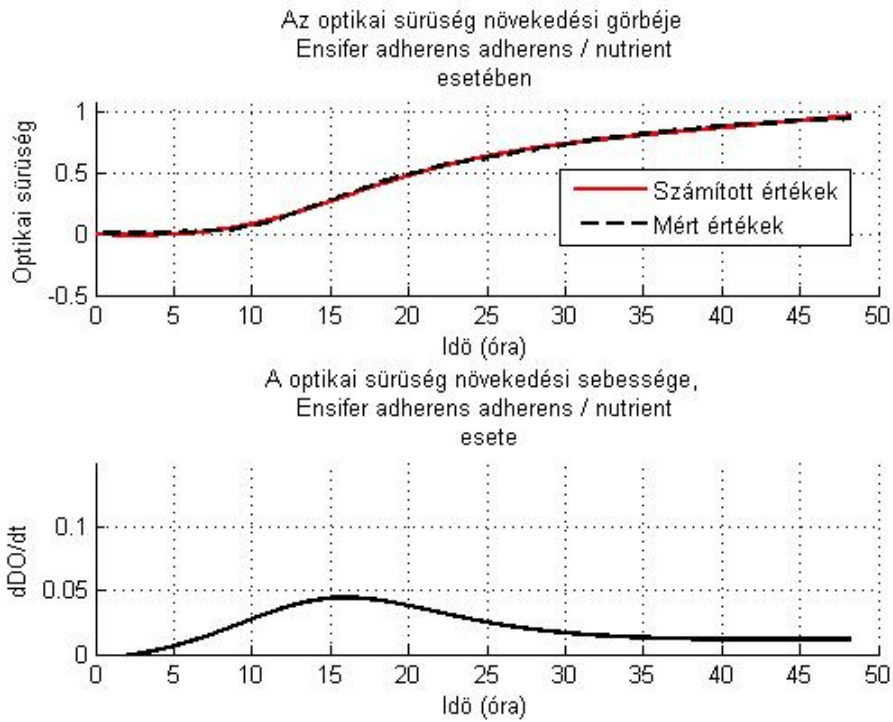
6. ábra

*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai sűrűség növekedési sebessége
Variovorax paradoxus nutrient táptalajon*



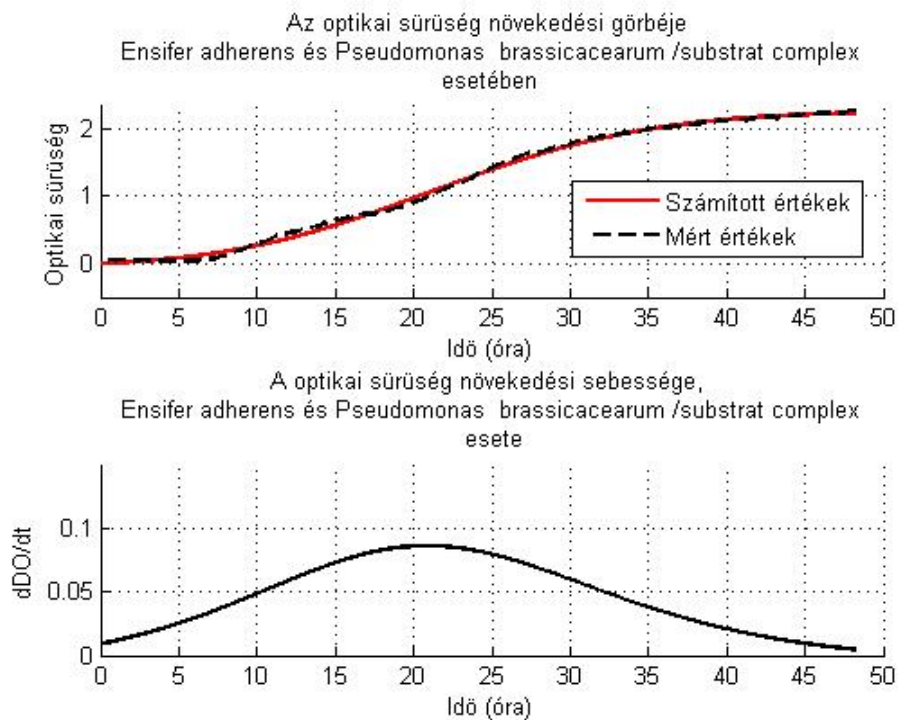
7. ábra

*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai sűrűség növekedési sebessége
Pseudomonas brassicacearum és Variovorax paradoxus komplex táptalajon*



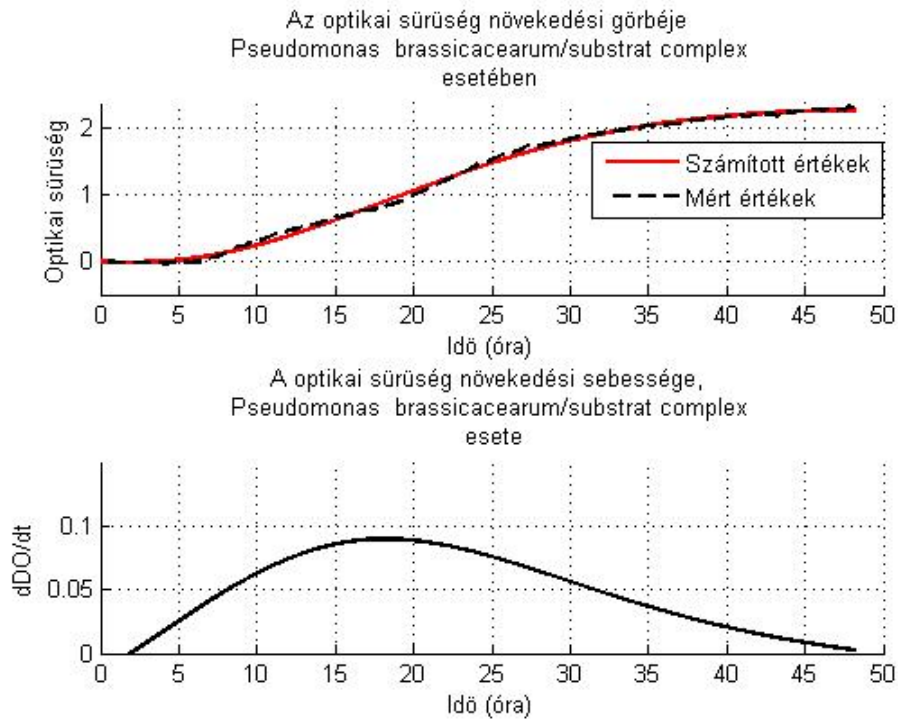
8. ábra

*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai sűrűség növekedési sebessége
Ensifer adherens nutrient táptalajon*



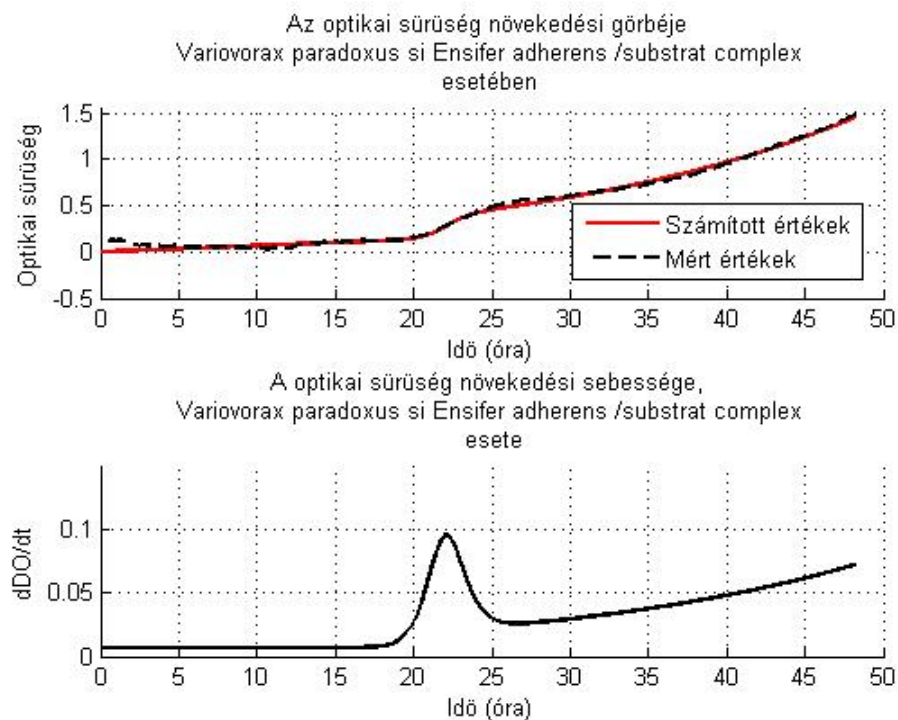
9. ábra

*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai sűrűség növekedési sebessége
Ensifer adherens és Pseudomonas brassicacearum komplex táptalajon*



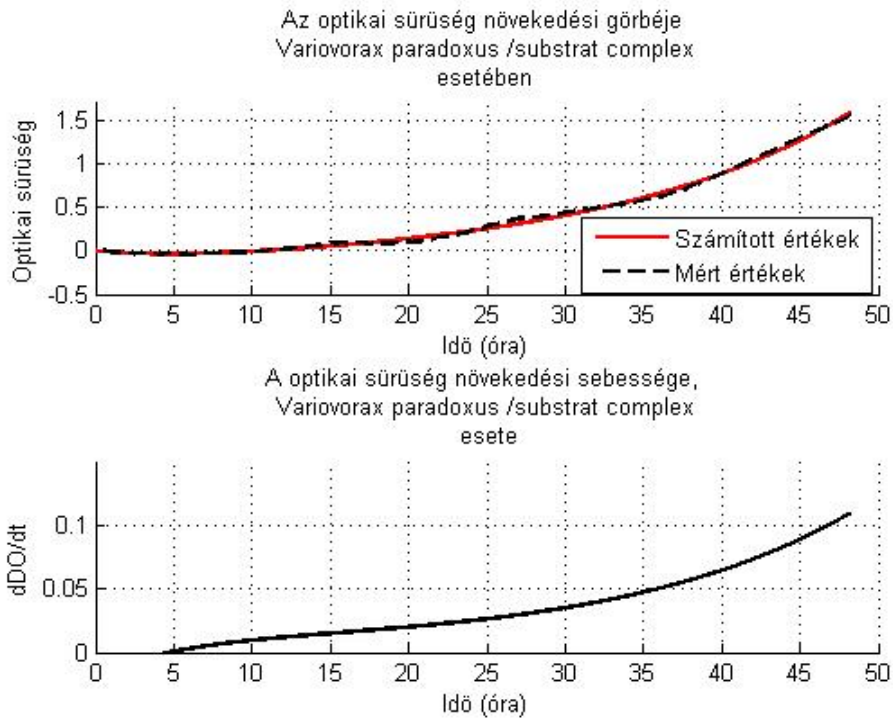
10. ábra

*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai sűrűség növekedési sebessége
Pseudomonas brassicacearum komplex táptalajon*



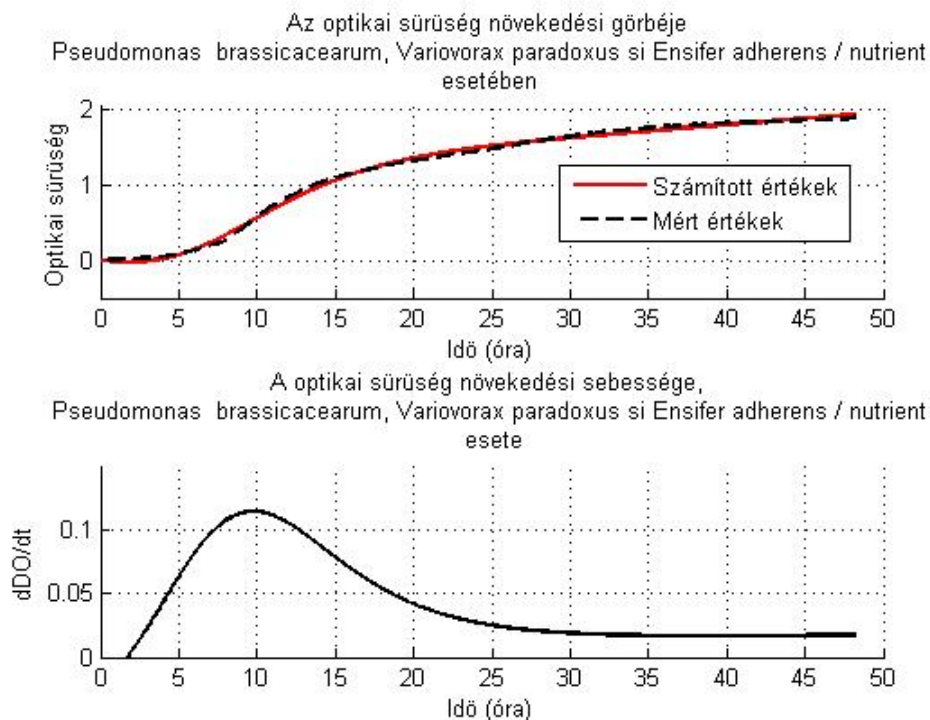
11. ábra

*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai sűrűség növekedési sebessége
Variovorax paradoxus és Ensifer adherens komplex táptalajon*



12. ábra

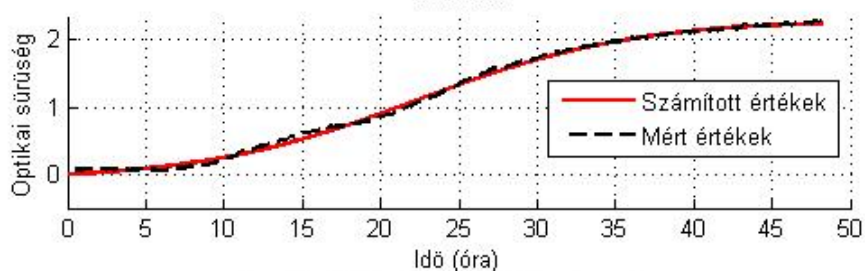
*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai sűrűség növekedési sebessége
Variovorax paradoxus komplex táptalajon*



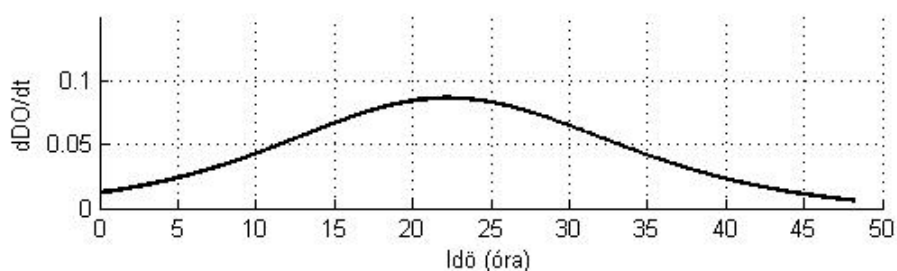
13. ábra

*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai sűrűség növekedési sebessége
Pseudomonas brassicacearum, Variovorax paradoxus és Ensifer adherens nutrient táptalajon*

Az optikai sűrűség növekedési görbéje
Pseudomonas brassicacearum, *Variovorax paradoxus* si *Ensifer adherens* /substrat complex
 esetében



A optikai sűrűség növekedési sebessége,
Pseudomonas brassicacearum, *Variovorax paradoxus* si *Ensifer adherens* /substrat complex
 esete



14. ábra

*Az optikai sűrűség növekedése és az optikai sűrűség növekedési sebessége
Pseudomonas brassicacearum, Variovorax paradoxus és Ensifer adherens komplex táptalajon*

A tenyészetekre jellemző maximális sejtszám-növekedési sebességeket valamint a tenyészetekben elért maximális sejtszámokat, mint a tenyészeteket jellemző paramétereket, a 2. sz. táblázatban foglaltuk össze.

2. sz. táblázat: A mikroorganizmus tenyészetek maximális növekedési sebessége és a tenyészetenként elért maximális sejtszámok

Tenyészet megnevezése	Maximális növekedési sebesség (h ⁻¹)	Maximális sejtszám
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> és <i>Variovorax paradoxus</i> / nutrient	3.598E+08	7.579E+09
<i>Ensifer adherens</i> és <i>Pseudomonas brassicacearum</i> / nutrient	2.710E+08	5.811E+09
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> / nutrient	2.618E+09	5.043E+10
<i>Variovorax paradoxus</i> és <i>Ensifer adherens</i> / nutrient	4.136E+08	6.938E+09
<i>Variovorax paradoxus</i> / nutrient	1.998E+09	2.816E+10
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> és <i>Variovorax paradoxus</i> / komplex	3.467E+08	8.727E+09
<i>Ensifer adherens</i> / nutrient	9.668E+07	2.121E+09
<i>Ensifer adherens</i> és <i>Pseudomonas brassicacearum</i> / komplex	1.860E+08	4.824E+09
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> / komplex	4.624E+08	1.175E+10
<i>Variovorax paradoxus</i> és <i>Ensifer adherens</i> / komplex	9.793E+07	1.503E+09
<i>Variovorax paradoxus</i> / komplex	3.382E+08	4.898E+09
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> , <i>Variovorax paradoxus</i> és <i>Ensifer adherens</i> / nutrient	6.956E+08	1.174E+10
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> , <i>Variovorax paradoxus</i> és <i>Ensifer adherens</i> / komplex	1.119E+08	2.914E+09

KÖVETKEZTETÉSEK

A kísérleti növekedési görbék (2-14. ábrák) nagyban eltérnek a Monod-elmélet által leírtaktól (1. ábra), így az egyszerűbb, 3-4 együtthatós egyenletek segítségével nem lehetett elfogadhatóan megközelíteni ezeket. Annak ellenére, hogy jelen tanulmányban alkalmazott regressziós egyenlet hat együtthatójának kiszámítása nehezebb, a számítással kapott növekedési görbék jól megközelítik a kísérleti eredmények segítségével felrajzolt növekedési görbéket.

A tenyészeteket jellemző maximális növekedési sebességekből következtetünk arra, hogy az *Ensifer adherens* lassan fejlődik a Nutrient táptalajon. Ugyanakkor észrevehető az *Ensifer adherens* és a *Variovorax paradoxus* kölcsönös inhibíciója. Ez a kölcsönös inhibíció nem volt észlelhető az *Ensifer adherens* és a *Pseudomonas brassicacearum* esetében. A legnagyobb életképességet a *Pseudomonas brassicacearum* esetében észleltük, mindkét típusú táptalajon, az *Ensifer adherens* és a *Variovorax paradoxus* jelenlétében.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozat elkészítéséhez anyagi támogatást nyújtott a Gazdasági versenyképesség növelése és a tudásalapú gazdaság fejlesztése program keretében támogatott POS-CEE 469/11817 „Mikrobiális oltóanyagok előállítása a haszonnövények védelme és produktivitásának növelése érdekében – BIOPREP” pályázat. (The laboratory experiments were prepared with the financial support from the “BIOPREP – Microbial biopreparates for increasing the productivity and crop protection” research funded by Sectorial Operational Programme, Increase of Economic Competitiveness Operation 2.1.1. of the Romanian Ministry of Labour, Family and Social Protection, through financial agreement POSCEE No. 469/11817.)

IRODALOM

- Bárányi, J., Roberts, T., A., Mathematics of predictive food microbiology, International Journal of Food Microbiology, 26(1995) p.199-218
- Bárányi, J., Stochastic modelling of bacterial lag phase, International Journal of Food Microbiology, 73(2002) p. 203-206
- Fujikawa, H., Kai, A., Morozumi, S., A new logistic model for *Escherichia coli* growth at constant and dynamic temperatures, Food Microbiology, 21(2004) p. 201-209
- Grozdanovski, T., Shepherd, J., J., Stacey, A., Multi-scaling analysis of a logistic model with slowly varying coefficients, Applied Mathematics Letters, 22(2009) p. 1091-1095
- Idlango, M., A., Shepherd, J., J., Nguyen L., Gear, J., A., Harvesting a logistic population in a slowly varying environment, Applied Mathematics Letters, 25(2012) p.81-87
- Kutalik, Zsófia Razaz, M., Bárányi, J., Connection between stochastic and deterministic modelling of microbial growth, Journal of Theoretical Biology, 232(2005) p. 285-299
- López, S., Prieto, M., Dijkstra, J., Dhanoa, M., S., France, J., Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth, International Journal of Food Microbiology, 96(2004) p. 289-300
- Perni, S., Andrew, P., W., Shama, G., Estimating the maximum growth rate from microbial growth curves: definition is everything, Food Microbiology, 22(2005) p. 491-495
- Thornley, J., H., M., Shepherd, J., J., France, J., An open-ended logistic-based growth function: Analytical solutions and the power-law logistic model, Ecological Modelling 204(2007) p. 531-534
- Vadasz, P., Vadasz, A., S., Predictive modeling of microorganisms: LAG and LIP in monotonic growth, International Journal of Food Microbiology, 102(2005) p. 257-275

**Az ember sokrétű tevékenységéből származó
légköri vízgőz a földi felmelegedés fő oka
– az elmélet további bizonyítékai –**

**The main cause of global warming is the atmospheric water
vapor originating from the manifold man's activity
Additional important evidences for the justification of this theory**

**Cauza principală a încălzirii globale este
vaporul atmosferic de apă rezultat din activitatea multiplă a omului
Dovezi noi ale teoriei**

MUZSNAY Csaba

Ny. egy. előadótanár
Babeş-Bolyai TE, Kolozsvár,
Arany J. u. 11/113, cmuzsnay@chem.ubbcluj.ro/0264484970

ABSTRACT

Based on data from the last two decades, global warming has become an incontestable fact and for the six levels development of greenhouse effect of the water vapor has been obtained a number of demonstrations. In warm seasons the warming effect of anthropogenic water vapor is significant.

ÖSSZEFOGLALÓ

Az utolsó két évtized adatai alapján a globális felmelegedés(GFL) ténye vitathatatlaná vált és a vízgőz(VG) üvegházhatás(ÜGH) ának hat szintes kibontakozása számos bizonyítást nyert. Meleg évszakokban az emberi eredetű VG GFL-t okozó hatása jelentős.

Kulcsszavak: a légköri (LK_i) VG okozta GFL, a VG ÜGH-ának hat szintje, felmelegedést elfogadók (warmists) és tagadók (skeptics), üvegházgázok (ÜGH), IPCC eredmények, a Föld SUMAFET (SUgárázása Mint Abszolút FEkete Test), a Föld hosszuhullámú (HHÚ), ún. hőszugárzás(HS)-a, a NapSUMAFET, a VG széles elnyelési szinképe, vízdimer, víztrimer, hidrát-klaszterek, aeroszólók, felhők fényelnyelése, elmélet az emberi eredetű VG GFL-t okozó hatásáról (ELEMERVG GFLHAT), emberi eredetű VGforrások (EMERVGFO), LK_iVG különleges sajátosságai, LK gázok fázisdiagramja (LK_iGÁFÁDI), a víz hármaspontja (V3P), L_G_i csapadék-képződés(CSAKÉ), L_G_i nedvesség szállítás (NESZÁ), ÉFT és DFT közötti eltérés, a jégfelületek csökkenése, pozitív visszacsatolás, alsó troposzféra átlaghőmérséklete(TLT), a VG gyors LK_i-i cserélődése, rezgési, forgási sávok.

Az időjárás jellemzése és előrejelzése a mindenkori ember fontos elfoglaltságát képezte. Tette ezt nagyon kevés adat birtokában és mind többnek az ismeretében is. Nyilván ennek a tevékenységnek a sikere arányban állt az emberi tájékozottság mértékével. A XX. század második felének és XXI. század első 12 évének a klímakutatás szempontjából legfontosabb jellemzője a rendelkezésünkre álló és felhasználható adatok mind nagyobb száma és megbízhatósága. Soha ennyi mérési adat nem került a tudósok asztalára a földi ellenőrző pontokról és a mind specializáltabb mérőholdakról, csupán fel kell őket dolgozni a legkülönbözőbb szempontok szerint, valamint helyesen, objektíven és tudományosan értékelni. Az értékelések alapján megállapítást nyert, hogy az utóbbi majdnem másfél évszázadban, de különösen a múlt század nyolcvanas éveitől a légkörnek és Föld felszínének átlaghőmérséklete állandóan emelkedett.

Nem csak a globális felmelegedés ténye, de különösen annak eredete vitatott. Az emberi tevékenységből származó szén-dioxid által okozott GFL ádag viták keresztüzébe került. Napjainkban elsősorban két tábor állt egymással szemben: a felmelegedést bizonyítók illetve elfogadók (Warmists) és az ezt tagadók, a kételkedők (Skeptics) csoportja. Ez utóbbiak közül nyolc szerző, Dr. Tim Ball vezetésével megjelentették 2011-ben

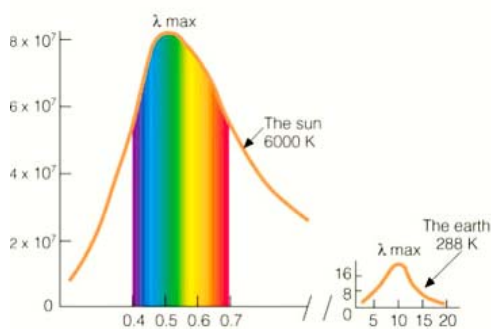
az Égi sárkány megölése – „Slaying the Sky Dragon” – című vaskos könyvet [1], melyben a CO₂ és más üvegházgáz (ÜHG)-ok szerepének megkérdőjelezésével és az emberi tevékenység eredményeként bekövetkező légköri széndioxid-tartalom növekedésének melegegést kiváltó hatását tagadják tudományos érvek alapján. Támadják az IPCC kutatók eredményeit és módszereit is [2].

Dr D.W. Allen vitázott a „Slaying the Sky Dragon” szerzőivel és 2012 októberében vitaanyagot jelentett meg, „Is the Greenhouse Effect a Sky Dragon Myth?” – Az ÜHH egy égi sárkány mítosz? címmel [3]. D. W. Allen hasznosnak tartotta a vitát és reméli, hogy gyümölcsöző is lesz, a szkeptikusok kijelentéseinek egy részét helyesnek találta. Sok állításuk viszont megalapozatlannak bizonyult.

A VÍZGŐZ GLOBÁLIS FELMELEGEDÉSBEN JÁTSZOTT SZEREPÉNEK ELLENTMONDÁSOS ÉRTELMEZÉSÉRŐL

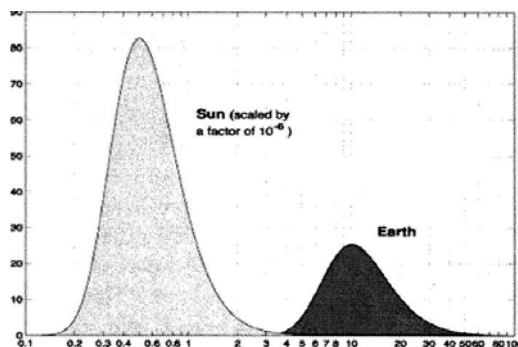
Az ÜHG-ok között elsősorban a CO₂, CH₄, NO_x, SO_x, O₃ légkört felmelegítő hatásával számolnak, a felsorolás csökkenő sorrendjében. A légköri VG az előbb felsoroltaknál sokkal nagyobb átlagtöménységgel fordul elő és a legnagyobb ÜHH-al tűnik ki, de ennek dacára nem veszik figyelembe a GFL-ben játszott szerepét.

A levegő szimmetrikus elektron- vagy molekulaszervezetű fő összetevői (N₂, O₂, Ar, Ne,) egy vagy két-atomosak, nem nyelik el és nem is sugározzák ki, sem a Nap sem a Földfelszín kis energiájú, HHU sugárzását. A viszonylag kis mennyiségben előforduló ÜHG-ok három vagy még több atomosak és aszimmetrikusak, legalább is gerjesztett állapotukban. A lineáris *szén-dioxid* molekula alapállapotban nem poláris, egyes rezgése során azonban polárisává válik, és így kölcsönhatásba lép a HS-akkal, elnyelve a Föld által abszolút fekete testként kisugárzott hosszú hullámú energiájának egy részét (1. és 2. ábra jobb oldali része) A Nap SUMAFET maximuma a rövidebb hullámhosszú látható színek tartományában található (1. és 2. ábra baloldali része).



1. ábra

A Nap és a Föld fekete test sugárzása



2. ábra

A Nap és a Föld fekete test sugárzási görbéi és ezek részleges egymásra tevődése. Az ÜHG-ok (főleg a VG és CO₂ – 1. 3. ábra) nemcsak a földi de a Nap sugárzásból is nyelhet el 3-5 μm-él (kettős ÜGH)

Source:

http://www.atmos.ucla.edu/~liougst/Lecture/Lecture_3.pdf

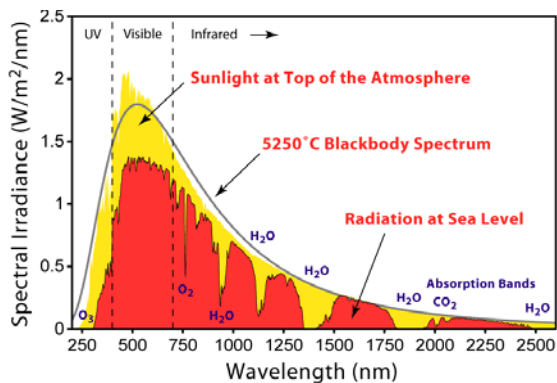
A háromatomos víz, a hatatomos vízdimer és a kilencatomos víztrimer mint a légköri VG fő alkotórészei aszimmetrikus szerkezetűek, és nagymértékben abszorbeálják (3-5. ábra) illetve ki is sugározzák a Föld HHU ún. HS-át, felmelegítve ezáltal a legalsóbb levegőréteget [4].

A VG különleges szerepe az ÜHH-ban elsősorban annak tulajdonítható, hogy az aszimmetrikus szerkezetű víz- és asszociált vízmolekulák jellemző dipólus nyomatékokkal rendelkeznek. Ezáltal kölcsönhatásba léphetnek az elektromágneses sugárzásnak mind a látható, mind a mikrohullámú, illetve infravörös összetevőivel (6. ábra). A víz az egyetlen olyan szabálytalan szerkezetű molekula, amely viszonylag jelentős töménységben van jelen a légkörben, nagy tartalékokkal rendelkezik (pl. az óceánok, tavak, eljegesedett tengerek és földrészek vize), és a légkörben is képes halmazállapot-váltás (HÁV)-okra. Színképe nagyon bonyolult szerkezetű. A HHU sugárzással kölcsönhatásba lépve gerjesztődik és azt elnyeli.

A földi sugárzások elnyelésének 65-70%-áért a VG a felelős (1. táblázat és a 7. ábra vízre vonatkozó része). A felhők VG-tartalmának figyelembevételével valójában ennél nagyobb mértékű elnyelésről van szó. A szén-dioxid viszont csak 20-24%-os elnyelést biztosít (sőt még kevesebbet) ugyancsak a vörösön inneni tartományban annak ellenére, hogy a legjelentősebb antropogén gáznak tekintik, az ózon 6-8%-os elnyelésért, a

metán és nitrogén-oxidok további 6-8%-ért felelősek (7. és 8. ábra). A napsugárzás légköri színeképének vizsgálata alapján megállapítható, hogy a VG-nek nagyon széles abszorpciós színeke van, de ezen belül jóval szélesebb az IR-ben való elnyelése mint a CO₂-é.

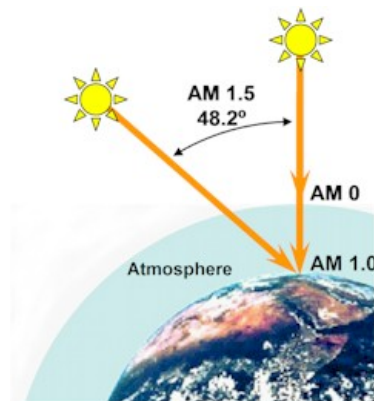
Az ÜHH semmiképp sem tekinthető kiküszöbölendő csapásként, hiszen nélküle a Földi élettér mintegy 33 °C-al lenne hidegebb és valószínű, hogy képtelen volna az élet fenntartására [5b, 6a]. Az eddig elfogadott álláspont az, hogy a globális VG-tartalom az elmúlt századokban nem változott jelentős mértékben, s ezért a felmelegedési folyamathoz nem járult hozzá [7a, 4]. A VG-t nem tekintik antropogén eredetűnek és fő forrásként csak a természetes párolgást veszik számításba [8b, 4/474 o.].



http://en.wikipedia.org/wiki/File:Solar_Spectrum.png

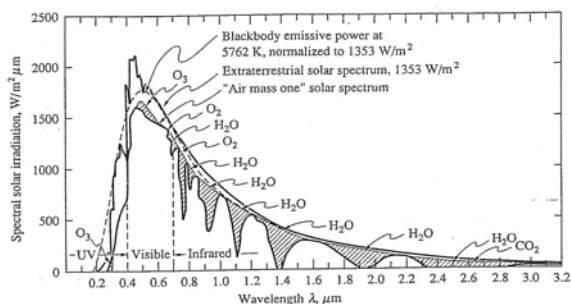
3. ábra

A Nap sugárzási színeke a légkör tetején (sárga) és a tenger szintjén (piros). Szembetűnő a vízmolekulákhoz köthető színek részletek gyakorisága.



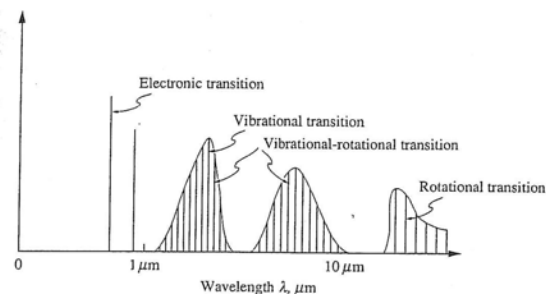
4. ábra

AM0, AM1 és AM1.5 Egy levegő tömeg vagy AM1 nem más mint a földi légkör vastagsága. Zérus levegőtömeg, vagy AM0 a légkörtől nem befolyásolt űrbeli napkisugárzás. Az AM1.5 fénynek a teljesítmény sűrűsége 1000W/m² körüli, míg az AM0 fénynek teljesítmény sűrűsége kb. 1360 W/m² s mint ilyet naprendszeri állandónak tekintenek.



5. ábra

A Nap sugárzási színeke Földön kívüli és légköri színek



6. ábra

A gázmolekulák elektron, rezgési és forgási energia átmeneteinek megfelelő színekvonalak

Az elektron energia-átmenetek nagy értéket képviselnek, elvileg diszkrét vonalokból állnak a színekép UV és látható tartományában. A rezgési energia-átmenet már kisebb energiához kötődik, ezért a közeli és közbülső IR tartományban észlelhető. A forgási energia változása még kisebb energia hatására történik, vonalai a közbülső és távoli IR-ben észlelhetők. A rezgési átmenethez tartozó forgási vonalak közel esnek egymáshoz, szinte egymásra tevődnek, rezgési forgási sávot hoznak létre (az ábrán a két első sáv). A rezgési átmenethez nem kapcsolódó nagyon kis energiájú forgási színek vonalak sávjai nagyobb hullámhosszaknál jelentkeznek (ezen elvi ábrázolás utolsó sávja). Az asszociált és magányos vízmolekulákra a sávos színek a jellemzőek.

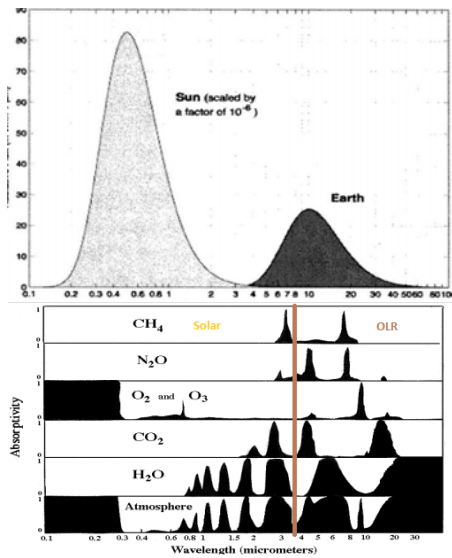
A felhők részben visszaverik a Naptól érkező rövidhullámú sugárzást (albedo), de az ÜHG- és a VG-höz hasonlóan, a Földről érkező HHÚ sugárzást is elnyelik, és részben visszasugározzák.

1. Táblázat. A H₂O erős elnyelési hullámhosszai (sávközpontjai) - $\lambda/\mu\text{m}$ [18].

Sávjel	A	B	$\rho\sigma\tau$	Φ	Ψ	Ω	$\omega 1$	$\Omega 2$	X	–	Y
Sávközpont	0.72	0.82	0.93	1.13	1.38	1.86	2.01	2.05	2.86	3.2-4	4-4.9

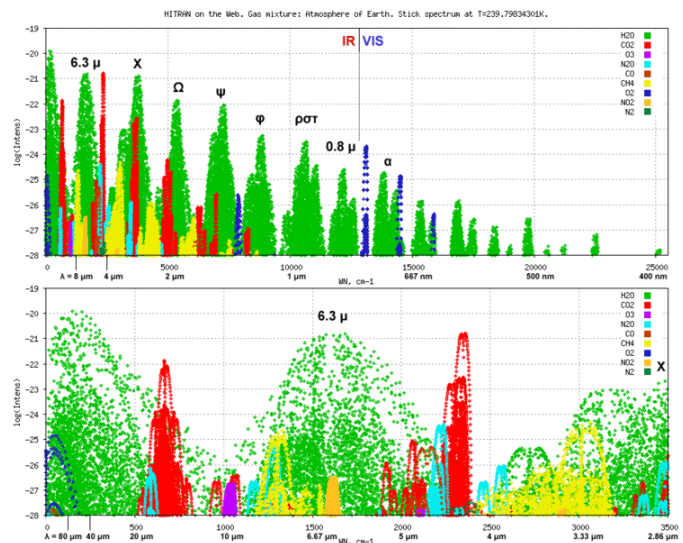
Ezen dolgozat keretében az emberi tevékenységből közvetlenül és közvetve származó VG GFL-t okozó és időjárást befolyásoló hatásának további bizonyítására fordítjuk figyelmünket a nemrég több részletben ismertett elméletünk alapján [10a-m, 11].

Az elmélet abból az alapvető megállapításból indul ki, hogy a Föld felszínén és a légkörben tízmilliárdnál is több emberi tevékenységhez kapcsolható vízgőzforrás működik, melyek folyamatosan és mind nagyobb mennyiségben ontják a vízgőzt környezetükbe [10a-c].



7. ábra

Az alsó légkör gázainak Nap és Földi sugárzásának elnyelése



8. ábra

Kilenc féle gáz légköri összetételű szintetikus keverékének abszorpciós színeke (Stickspectrum) $T=264\text{ K-en} - \log \text{fényerősség} = f$ (hullámhossz, illetve hullámszám) – durvább ($0-25000\text{ cm}^{-1}$, illetve $> 0.4\text{ }\mu\text{m}$) és finomabb ($0-3500\text{ cm}^{-1}$ illetve $> 2\text{ }\mu\text{m}$) ábrázolásban

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Synthetic_atmosphere_absorption_spectrum_2.gif

ÉRTHETETLEN, HOGY A GFL KAPCSÁN MIÉRT HANYAGOLJÁK/HALLGATJÁK EL AZ EMBERI EREDETŰ LÉGKÖRI VG MELEGÍTŐ HATÁSÁT

Két főérvet szoktak ezzel kapcsolatban megfogalmazni.

Az egyik abban áll, hogy az emberi tevékenységből származó VG nagyon kis mennyiséget képvisel a légkörben és nem módosítja észrevehetően a természetes forrásokból eredő VG mennyiségét. Ez az állítás azonban nem állja meg helyét, mivel:

1). Rengeteg (több mint 10 milliárd) közvetlen és közvetett fizikai, kémiai vagy biológiai folyamatokon alapuló, emberi eredetű VG forrás működik a Föld felszínén és a légkörben [10 a-c] pl. A). közvetlen eredetű biológiai folyamat eredményeként több mint 7 milliárd ember valamint az ipari állattenyésztés állatállományának VG kibocsátása (kilégzése és párologtatása), B). közvetlen eredetű kémiai folyamat által a nagyszámú gépkocsi, repülőgép, rakéta és más, tüzelőanyagot felhasználó erőgép kipufogása, különböző vegyi gyárak VG kibocsátása, C1). közvetlen eredetű fizikai folyamat, mint emberi szárítkozás, ruhanemű szárítás, és ipari szárítás, C2). közvetett jellegű fizikai folyamat mint az élelmiszer termelésre irányuló korszerű öntözéses mezőgazdaság víz párologtatása. Az IPCC 2007-es jelentésének 2.5.6. szakasza szól a troposzférán belül, emberi

forrásokból származó VG-ről [2f]. Azt kivéve, hogy az öntözést tekintik ennek egyik fő forrásaként semmilyen következtetésre nem jutnak, kijelentve, hogy az öntözésből származó VG légkörbe áramlásának megállapítása szerfölött bizonytalan.

2). A CO₂-nál sokkal nagyobb mennyiségű VG jut a légkörbe. Évente ≈0.40 ppm-el nő a CO₂ légköri töménysége. Jelenleg ez az érték ≈ 390 ppm. Az emberi tevékenységből eredő VG-nek betáplálása a légkörbe évente eléri a 80-100 ppm-et, viszont az emberi tevékenységek fő színhelyein ez az érték kitehet 2000 ppm-et is.

3). Több kutatói munkacsoport 1980-2011 között, az ÜHG-ok melegítő szerepének számításakor bebizonyította, hogy elsősorban (legalább 65%-nyira) a VG hatására magasabb a Föld felületének a hőmérséklete 33 fokkal és nem a többi ÜHG miatt. [12-15].

A másik fő ellenérv szerint a VG nem marad túl hosszú ideig a légkörben, átlagban 9-12 napig, ≈ 2 hétig. Ez egy helyes és figyelembeveendő megállapítás, de a VG állandóan újratermelődik mindkét úton, mind a természetes párolgás, mind az emberi tevékenységek révén. E szerint kéthetenként az emberi tevékenységek fő színhelyein folyamatosan átlagban ≈ 80 ppm emberi eredetű VG kerül a légkörbe és közel ugyanilyen mennyiség távozik folyamatosan a légkörből.

A VG szerepének háttérbe szorítása mögött politikai és nagy tőkés érdekek is meghúzódhatnak.

A LÉGKÖRI VÍZGŐZ KÜLÖNLEGES SZEREPE A GLOBÁLIS FELMELEGEDÉSBEN

Közismert, hogy a víz molekula, de a különböző halmazállapotban előforduló víz is rendkívül különleges sajátságú [pl. 16, 17], mely a Földi élet kialakulásának lehetőségét és tartós fennmaradásának biztosítékát képezi. A légköri VG is rendelkezik néhány különleges sajátsággal, amelynek alaposabb megvizsgálása és szükségszerű kihangsúlyozása közelebb visz a légkör általános felmelegedésében játszott szerepének megértéséhez.

A légköri VG különleges és rendkívüli viselkedésének valamint a GFL kialakulásának a következő hat szintje különböztethető meg [az első öt szintről l. még [10] és [11]:

- I.) gázhalmazállapothoz köthető molekuláris, és molekulaasszociációs szint,
- II.) fázisátalakulásokkal járó kondenzációs szint,
- III.) általában a légkörben, de főleg a felhőkben fázisátalakuláshoz kapcsolható csapadékképződés szintje,
- IV.) a légkörben zajló, elsősorban a felhők által megvalósuló, nedvességszállítás szintje,
- V.) az északi és déli félteke közötti, az emberi tevékenységek hatására kihangsúlyozódó, különbségek szintje.
- VI.) a felmelegedést fokozó pozitív visszacsatolások szintje.

A szinteket molekulászerkezetek, energiaállapotok, fázisátalakulások emberi agglomerációk és tevékenységek, valamint földrajzi helyzetbeli különbségek alakítják.

I.) A felmelegedés első, molekuláris szintje, a három- és többatomos molekuláknak az ÜHH-ban és a légkör hőháztartásában betöltött különleges szerepét bizonyítja. Az előzőekben erről már elég sok szó esett

Elsősorban a H₂O, CO₂ és O₃ (3 három atomos molekula) átlátszatlanok és átengedik a rövidhullámú napsugárzást, nagy mértékben elnyelik a HHÚ/IR sugárzást és ki is bocsátják azt. Még érdeklődésre tarthat számot az egyszerű molekulák közül a metán, nitrogénoxidok és kénoxidok ilyenszerű viselkedése is.

A víz szinte minden légköri alkotóval (még a CO₂-dal is) vegyi kölcsönhatásba lép, H-kötések kialakítása közben asszociátumokat, víztartalmú képződményeket, ún. klasztereket képez, amelyek alacsonyabb hőmérsékleten állandóbbak, magasabb hőmérsékleteken összetevő molekuláikra esnek szét. Ezen víztartalmú képződmények homo és vegyes H-kötésrendszerei főleg a földfelületről kisugárzott HHÚ fényenergiát nyelik el. Elterjedtek a víz-víz asszociátumok (asszociációs szám: n, 7>n>1), a kénsav-víz klaszterek, és pl. a HNO₃+HCl tartalmú hidrátok.

A kolloidális, makromolekuláris rendszerek viselkedése ezekétől különbözik. Így pl. a víztartalmú aeroszólók elnyelik a rövid és HHÚ sugárzásokat, visszaverik a rövidhullámú sugárakat.

A felhők elnyelik és kibocsátják a HHÚ, elnyelik és visszaverik rövidhullámú sugárzásokat.

II.) A légköri VG a hőmérséklet és nyomás csökkenésével kondenzálódhat, a fázisátalakulás során cseppfolyósodhat, illetve szilárd halmazállapotba mehet át. A légkörre vonatkozó nyomás-hőmérséklet függés, az ún. $p = f(t)$ függvényt vagy fázisdiagramot már [a 10h és 11b-nél] tárgyaltuk. Az olvadási párolgási, és szublimációs görbéknek illetve dér-, jég- és gőzvonalaknak találkozási pontjában található az egyes anyagokra jellemző hármaspontok. Alsó légkörünkre jellemző nyomás-hőmérséklet tartományban (≤ 1.1 bar, -70° - 100° C) csak a víz hármas-pontja található (0.006° C = 273.156 K hőmérsékleten és 6.11 mb gőznyomáson), amelyben ennek a kü-

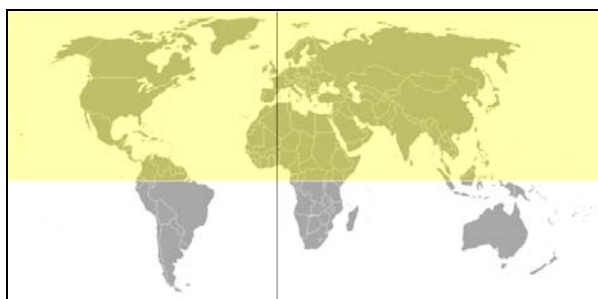
lönleges és jelentős folyadéknak, a víznek, mindhárom fázisa (vízgőz, víz, jég) egyensúlyban van egymással [V.ö. 10h és 11/II-t].

Földünk azért az élet bolygója, mivel a felszín közeli légköre olyan jól körülhatárolt hőmérséklet- és nyomástartománnyal bír, melyben a többi összetevő hármass pontja nem valósul meg – a CO₂-é sem. A légkörben gyakorlati szempontból érzékelhetően, hatalmas anyagmennyiségek megmozgatásával csak a vízgőz megy át fázisátalakulásokon, az ezekkel kapcsolatos latens energiák felszabadításával vagy elnyelésével illetve térfogatváltozásokkal. A napfény szolgáltatja energiaadagok mellett a légkör fő mozgatórugói a víz fázisátalakulásából származnak. Indokolatlan a légköri CO₂-ot különlegesebbnél különlegesebb sajátságokkal felruházni.

III.) A víznek a csapadékképződés szintjén a légkörben megmutatkozó egyedi sajátságai, a Föld időjárási folyamataiban és az éghajlati viszonyok kialakításában meghatározó szerepet játszanak. Több más Földfelszíni sajátság mellett ezért is érdemli ki Földünk a vízbolygó elnevezést [10h, 11/II].

IV.) A hőmérséklet- és nyomáskülönbségek miatt kialakuló függőleges és vízszintes nedvesség-szállítás mindhárom halmazállapotra, és az egész földi légkörre kiterjed, a globális légköri mérlegfeltételek teljesülésével összhangban [V.ö. 10h és 11/II-t].

V.) A Föld két féltekéje között a különbségek alapvetők (L.pl. [10h] 1. táblázatát), s főleg az a körülmény hogy az északi félteke (ÉFT) szárazföld (SzF)-jei több mint kétszer nagyobbak a déli féltekénél (DFK) – l. 9. ábrát – az emberiség létrejöttét, fejlődését és tevékenységének alakulását nagymértékben meghatározták, olyan mélyrehatókká váltak, hogy ma már Földünk éghajlati viszonyait is befolyásolják. A SzF-ek nagyobb és kompaktabb jellege az ÉFT-n, a DFT fokozott szétdaraboltságával szemben, meghatározza az emberiség olymértékűen aszimmetrikus megoszlását, hogy a lakosság 88 %-a és a munkaképesek 90%-a az ÉFT-n található. Következésképpen, az emberi tevékenységből származó VG első közelítésben az ÉFT légkörébe, s annak is 2/5-ét kitevő SzF feletti terébe kerül, ezáltal csupán egyszerű földrajzi körülmények figyelembevételével ötszörös töményedésével lehet számolni. Az emberiség eloszlása a SzF-n is rendkívül változatos (10. ábra). Vannak nagyon sűrűn és igen ritkán lakott területek, amelyek az emberi VG-kibocsátásban is hatalmas különbségeket hoznak létre.

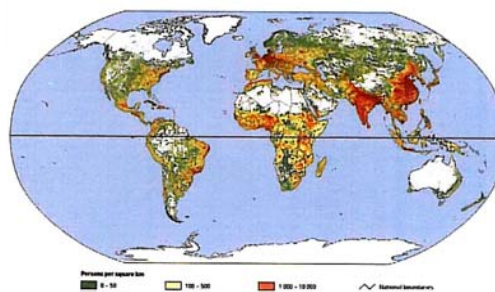


http://en.wikipedia.org/wiki/File:Hemisferio_Norte.png

9. ábra

A kiterített Földgömb két féltekéjének szárazföldi országai és tengerei.

Az ÉFT-n elterülő SzF-ek sárga színnel több mint 2-szer nagyobbak a DFT SzF-jeinél



10. ábra

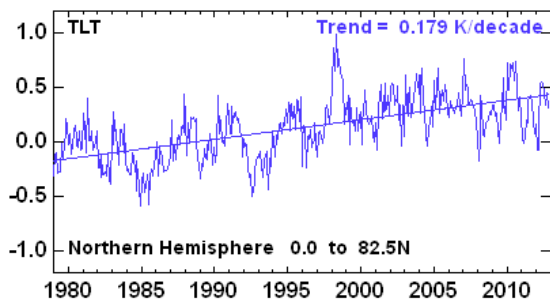
Az EMI népesség megoszlása, zömük az ÉFT-n él. Legnagyobb népsűrűségű India, Kína és Európa.

A XX. század végén Rákóczi Ferenc az ELTE Meteorológiai Tanszékén vizsgálta a LK VG-tartalmát (TT-t) havi felbontásban a két féltekén külön-külön [8d]. A VG-TT mindig az ÉFT-én magasabb, a kettő közötti különbség a nyári hónapokban a legnagyobb. Főleg az emberi tevékenység által termelt VG megemeli az ÉFT LK-ének NETT-t, melegebbre változtatva az ÉFT-ét, olvadásra kényszerítve, a nyári esők miatt az ÉS jégtartalékát. Augusztusban ~25%-a az ÉFT VG-TT-nak EMER többlet, de ez meg kell találja a helyét, pl. eső alakjában az ÉS-ra kerül. A hideg hónapokban, főleg januárban kicsapódik/kifagy az EMERVG, és a DFT-vel szembeni többlet 0%-ra csökken.

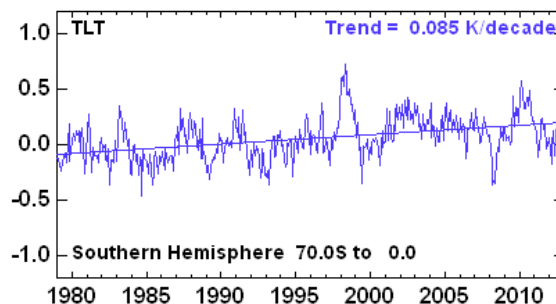
A LK alsó troposzféra átlaghőmérséklete (TLT) 1905-től állandó növekedést mutat. Kivételt az 1945-1980-as időszak képez, amikor a kísérleti atombomba robbantások miatt bekövetkező hőmérséklet csökkené-

sért és stagnálásért [10j, k, l] nehéz helyzetbe kerültek a GFL elméletének támogatói. 1980-tól – az atombomba kísérletek befejezésétől napjainkig – az ÉFT LG-nek a hőmérséklete mind gyorsabb növekedésnek indult (11. ábra). Az ÉFT felmelegedése és VG-többlete folyamatosan áttevődik a DFT-re, ott is kisebb mértékű hőmérsékletnövekedést okozva (12. ábra).

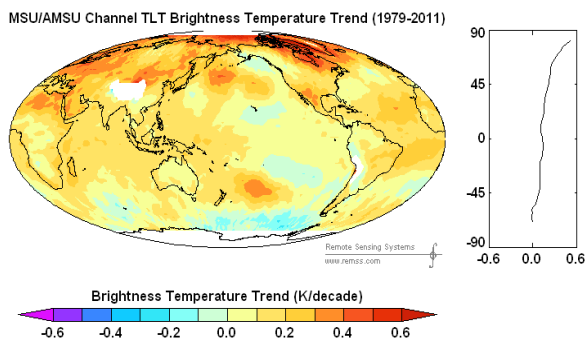
A 13. ábra az egész földgömb átlaghőmérséklet emelkedését mutatja be 1979-2011 között. Látható, hogy az ÉS melegedik legjobban és legkevésbé a DS. Nagyobb óceáni területen enyhe lehülési tendencia érvényesült még az ÉFT-n is. Az 1980-as évektől bizonyított felmelegedésnek két vetülete van. Egyrészt a növekvő párolgás miatt, melyet a magasabb átlaghőmérséklet okoz, növekszik a levegő páratartalma, másrészt az emberi tevékenységből származó növekvő VG mennyiség is lassan de biztosan növeli a LK VGTT-t. Tehát mindkét tényező a légkör VGTT-nek enyhe növekedését eredményezi, nem feledkezve meg arról, hogy 9-12 naponként nagyjából megújul a LK VGTT. A 14. ábra ezt a gondolatmenetet erősíti, anélkül, hogy egyelőre a két összetevőt külön lehetne választani.



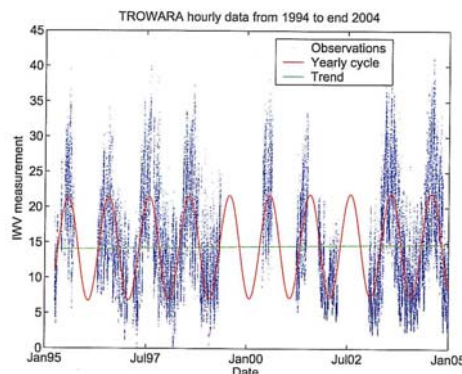
11. ábra
Az ÉFT TLT növekedése



12. ábra
A DFT TLT növekedése 1980-2012 között



13. ábra
A TLT változása 1979-2011 között
K/dekád színhőmérséklet alapján



14. ábra
1994-2004 közötti időszakra vonatkozó óránként
összesített VG (integrated watervapor)
mennyiségének változása kg/m²-ben, az évi ciklus
és az átlagolt értékek iránya/trendje alapján

A GFL erőteljesebben jelentkezik az ÉFT-n, de annak is az északi részén és nagyon kifejezetten az ÉS-on (V. ö. 13. ábrát), ami többek között az ÉS jegének és gleccsereinek a gyors olvadását, felületének csökkenését (15. a és c ábra), valamint a tengerszint emelkedését eredményezi. Ehhez az emelkedéshez még hozzájárul a hegyvidék hó-tartalékának olvadása, mely az átlag hó-szint magasságának emelkedésével is jár. A DS jegének globális olvadása még nem figyelhető meg, sőt összfelületének enyhe növekedése észlelhető (15 b ábra).

- gyar változat (<http://www.atmosphere.mpg.de/enid/2640>): I) Légkör/Alsó légkör; <http://www.espere.net/> a) alsólégkör, alapfok, 3. komponensek (forrás: NASA vízgőz project NVAP alapján <http://www.cira.colostate.edu/climate/NVAP/nvapcira.htm>). b) alsólégkör, haladó, 4. Gázok a légkörben 1. Eloszlás & Koncentráció, c) alsólégkör, haladó, 2. Sugárzás & Üvegház-gázok Vízgőz és a felhők. d) Óceánok
- [8] Rákóczi Ferenc (1998): "Életterünk a légkör", Mundus Magyar Egyetemi Kiadó, Budapest. a) 41 o., b) 40 o., c) 32-38 o., d) 50 o. [8e] Rákóczi Ferenc (1974), *Időjárás*, V. 78 (5) 300-1 o. [8f] Rákóczi Ferenc (1979), *J. Hung. Meteorol. Sc.* V. 83 (2), p.79-93 o. [8g] Rákóczi Ferenc (1989), *Z. Meteorol.* V. 39 (4), p. 193-201. [8h] Rákóczi F., *Vízügyi Közl.* a) (1989) V. 71, 512-520 o., b) (1995), V. 77, 199-204 o.
- [9] M. Hantel, volume editor (2005): *Observed Global Climate in Landolt-Börnstein, New Series, Group V. Geophysics*, Vol. 6, Springer-Verlag, Berlin, a) p. 5-4, b) p. 5-12.
- [10] a) Muzsnay Cs. (2010) *Műszaki Szemle (EMT)* V. 49, 29-35 old., b) Muzsnay Cs. (2009) XV. Nemzet-közi Vegyészkonferencia, november 14., Marosvásárhely, 59. old., c) Muzsnay Cs és ifj. Muzsnay Cs (2009) XV. Nemzetközi Vegyészkonferencia, november 14, Marosvásárhely, 77. old. d) Muzsnay Cs. (2009), A Magyar Tudomány Napja Erdélyben, Őszi Természettudományi Konferencia, Kolozsvár, 34 old. e) Muzsnay Csaba – összegyűjtött előadások, dolgozatok: Önkéntes Műnyilvántartási szám: 001277/2010 – Magyar Szabadalmi Hivatal, f) Muzsnay Cs. (2010) „A fenntartható fejlődés, valamint a környezet- és természetvédelem összefüggései a Kárpát-medencében” Konferencia, Pécs előadás, szeptember 15, g) Muzsnay Cs. (2010) XVI. Nemzetközi Vegyészkonferencia, november 11., Kolozsvár, 63. old., h) Muzsnay Cs. (2010) *Műszaki Szemle (EMT)* V. 52. 32-39 old., i) Muzsnay Cs. (2011) EME felolvasóülés, Kolozsvár, január 28. j) Muzsnay Cs. (2011), XVII. Nemzetközi Vegyészkonferencia, november 5., Kolozsvár, 62 old., k) Muzsnay Cs (2011) Intern. Conf. Environment&Progress, 11th November, Cluj-Napoca, p. 56-57, l) Muzsnay Cs. (2011) *Műszaki Szemle (EMT)*, V. 56, 21-28 old., m) Muzsnay Cs. (2012), XVIII. Nemzetközi Vegyész Konferencia, nov.24., 78 old.
- [11] Muzsnay Csaba (2011): "A földi felmelegedésnek és nem várt éghajlatváltozásainak egyik fő oka lehet az emberi tevékenységből származó légköri vízgőz" I. és II. rész, *Magy. Kém. Lapja* V.66(9) p. 265-271, (10) p. 301-306.
- [12] Chr.,D.,Schönwiese und B. Diekman .(1989):"Der Treibhauseffekt. Der Mensch Ändert Das Klima Rowohlrt, rororo, Publ, és in *Die Bodenkultur* 1997 V48 (4), p. 261-9.
- [13] Schroeder, David (2000): "Thermal Physics", Addison Wesley Longman.
- [14] Ojo Claudette (2008): "Haloev2_0upper tropospheric water vapor climatology" 9 oldal egyetemi közlemény.
- [15] Schmidt, G. A., R. A. Ruedy, R. L. Miller, and A. A. Lacis (2010):"The attribution of the present-day total greenhouse effect", *J. Geophys. Res.*, 115, D20106, doi:10.1029/2010JD014287.
- [16] M. Chaplin, „Water Structure and Behavior”; <http://www.lsbu.ac.uk/water/molecule.html>; (<http://www.lsbu.ac.uk/water/chaplin.html>) - rendszeresen és gyakran felújított fejezetekkel.
- [17] Cs. Muzsnay (1984) a) *Stud. Univ. Babeş Bolyai, Ser. Chem.* 29, 49. b) *Magy. Kém. Foly.* 93 (2) 54, (1987).
- [18] D. Borşan (1981): *Fizica atmosferei. Univ. Bucureşti, Bucureşti*, p- 125.

Glicerinkoncentráció meghatározása bakteriális táplevesből refraktometriás módszerrel

Glycerol Concentration Determination from Bacterial Media Based on Refractometric Method

Determinarea concentrației glicerolului din mediu bacterian prin metode refractometrice

ORBÁN K. Csongor^{1,3}, ANDRÁS Csaba², ÁBRAHÁM Beáta³, LÁNYI Szabolcs³

¹Bukaresti Műszaki Egyetem, Alkalmazott kémia és Anyagtudományok Kar, RO-060042, Bukarest, Splaiul Independenței 313, tel. 4021-402 96 24, fax 4021-402 39 34, orbancsongor@sapientia.sicilorum.ro

²Sapientia EMTE, Műszaki és Társadalomtudományi Kar, Élelmiszertudományi Tanszék, Csíkszereda, RO-530104, Szabadság tér 1, tel. 40-266-31 71 21, fax 40-266-37 20 99

³Sapientia EMTE, Műszaki és Társadalomtudományi Kar, Biomérnöki Tanszék, Csíkszereda, RO-530104, Szabadság tér 1, tel. 40-266-31 71 21, fax 40-266-37 20 99

ABSTRACT

In industrial fermentation processes the most used main nutrient component is glycerol. For the control of these processes the monitoring of the carbon source is essential. In most cases this is done by an expensive and time-consuming gas chromatographic method. In this study we present a refractometric method for the detection of glycerol concentrations from bacterial media, considering the interference of protein concentrations in the measurements.

ÖSSZEFOGLALÓ

Az ipari fermentációs folyamatoknál a leggyakrabban használt szénforrás a glicerin. Ezen folyamatok irányításához szükséges a glicerinkoncentráció monitorizálása. A legtöbb esetben ezt egy költséges és időigényes gázkromatográfiás módszerrel végzik. Ebben a tanulmányban egy refraktometriás mérésen alapuló módszert dolgoztunk ki a glicerinkoncentráció meghatározására bakteriális táplevesből, figyelembe véve a fehérjekoncentráció interferenciáját a refraktometriás mérésekben.

Kulcsszavak: refraktométer, glicerin, tápleves

1. BEVEZETŐ

A glicerin strukturális összetevője a lipideknek, ezért a természetben bőségesen megtalálható. Többnyire mikrobiális fermentációval vagy kémiai szintézissel állítják elő petrokémiai alapanyagokból. Visszanyerhető a szappangyártásnál a zsírok hidrolízise során keletkező melléktermékből [1]. Néhány Európai országban a glicerin termelés jelentősen megnőtt a biodízel gyártásának köszönhetően, ugyanis a biodízelt növényi olajokból állítják elő transzészterezéssel, amelynek következtében a melléktermék 10% (v/v)-a glicerin [2].

A glicerint széleskörűen alkalmazzák a kozmetikában, festékiparban, élelmiszeriparban, dohányiparban, papírgyártásnál, textil és bőriparban is. Mindezzel együtt nyersanyagként is szolgál különböző kémiai anyagok gyártásánál [1]. A természetben való gyakorisága miatt sok ismert mikroorganizmus tudja egyedüli szén és energiaforrásként hasznosítani a glicerint. Ezeket a mikroorganizmusokat potenciális kandidátusoknak tekintik a biodízelgyártásból származó glicerin biokonverziójára. A glicerin helyettesítheti a hagyományos, szukróz, glükóz és keményítő szénhidrogéneket néhány fermentációs folyamatban [3]. Ezen kívül az egyik legígéretesebb alkalmazása a mikrobiológiai úton történő biokonverziója magas értékű összetevőkké, mint például redukált kémiai anyagok: szukcinát, etanol, xilit, propionát, hidrogén, stb. [4]. Többek közt citromsav és tejsavtermelésre is alkalmas a glicerin, amelyet rendre *Yarrowia lipolytica* és *Escherichia coli* AC-521 törzsek segítségével valósítottak meg fermentációk során [5].

A fermentációs módszerek és eljárások tökéletesítése és optimalizálása érdekében fontos a mikroorganizmusok által elfogyasztott szubsztrát koncentrációjának követése. A legelterjedtebben használt módszerek a glicerín koncentrációjának meghatározására a gáz és folyadékkromatográfiai módszerek [6-10]. Ezek a módszerek, annak ellenére, hogy pontos eredményekkel szolgálnak, anyagilag nehezen elérhetőek, és kivitelezésük is időigényes. Ezzel szemben a piacon található enzimatikus reakciókra alapuló kolorimetriás és fluorometriás módszerek is elterjedtek [11-13], ezek könnyebben elérhetőek, viszont kivitelezésük szintén több időt és pontosságot vesz igénybe.

A refraktometria az anyagok törésmutatójának mérésén alapuló minőségi és mennyiségi analitikai vizsgálati módszer. Ebben a tanulmányban egy refraktometriás módszerrel alapuló glicerínkoncentráció meghatározást mutatunk be bakteriális táplevesből. Az előbbieken felsorolt módszerek nagymértékben lecsökkentik a mintában található más komponensek interferálását. A mi esetünkben, mivel bakteriális táplevesből határozzuk meg a glicerín mennyiségét, a fehérjék, mint mellék- és főtermékek interferálhatnak a refraktometriás mérésekben. Ennek a problémának a megoldására egy függvényt határoztunk meg grafikus módszerrel, amely leírja a glicerín törésmutatóját a glicerín és fehérjekoncentráció függvényében.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

A fehérje koncentrációk beállítására Bovine serum albumin-t (BSA) és a glicerínkoncentrációk beállítására pedig 100%-os tisztaságú glicerint használtunk. A fehérjekoncentrációk 0-tól 0.2 mg/ml-ig terjedtek minden glicerínkoncentrációban, amely 1-től 8% (v/v)-ig változott. Az előkészített minták törésmutatójának mérésére egy RFM330 refraktométert (Bellingham & Stanley Ltd.) használtunk. Az adatokat Matlab® R2010b verzió 7.11 szoftverrel dolgoztuk fel. A függvény grafikus meghatározására és a grafikus felület adatokra való illesztését a Surface Fitting Toolbox (Matlab programcsomagból) segítségével végeztük.

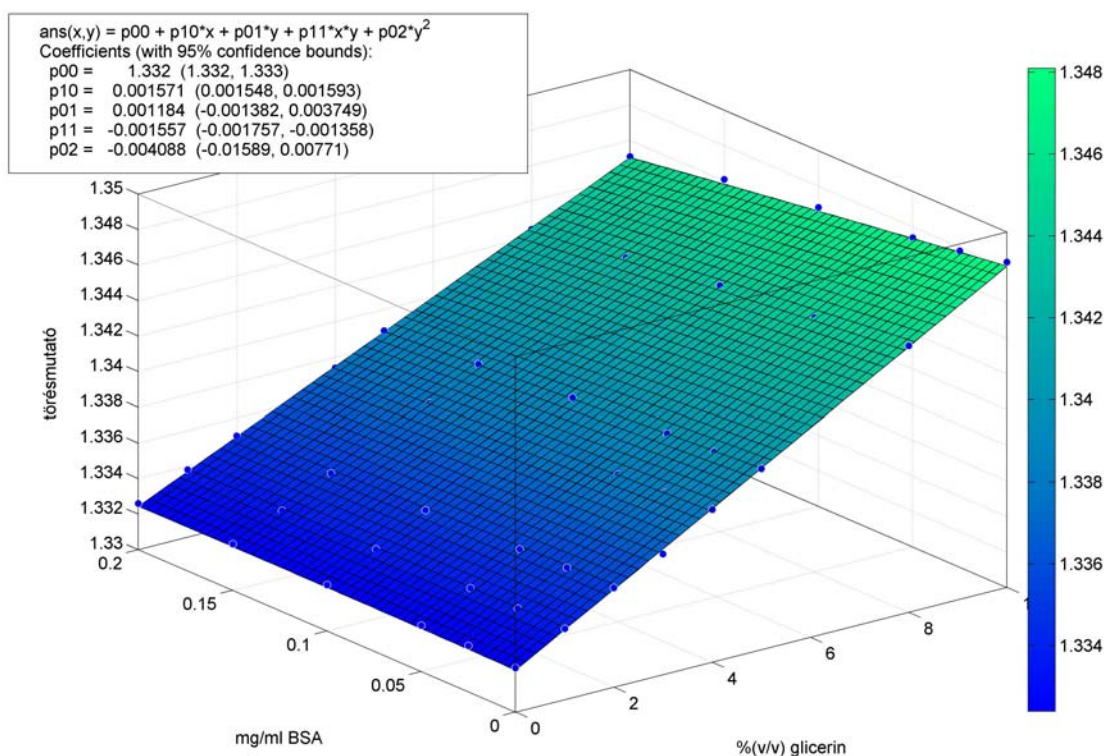
3. EREDMÉNYEK ÉS TÁRGYALÁS

A leghatékonyabb módszer a glicerín koncentrációjának offline meghatározására az illető minta törésmutatójának a megmérése. Mivel mikrobiológiai táplevesekben egy fermentáció során a fehérje mennyisége megnő, és ez a módszer a fehérje mennyiségi meghatározására is szolgál [14, 15], a két komponens törésmutatója interferálhat. Ennek a kijavítására egy standard glicerín-görbét állítottunk fel fehérjekoncentrációk függvényében. A különböző glicerín és fehérjekoncentrációjú standard minták törésmutatójának méréseit az 1. Táblázat tartalmazza.

1. Táblázat. Glicerín-fehérje standard törésmutatói

mg/ml BSA	0.000	0.025	0.050	0.100	0.150	0.200
% v/v glicerín						
0	1.3325	1.3326	1.3326	1.3326	1.3326	1.3326
1	1.3340	1.3340	1.3340	1.3339	1.3338	1.3338
2	1.3356	1.3356	1.3355	1.3354	1.3352	1.3350
3	1.3368	1.3367	1.3366	1.3364	1.3362	1.3360
4	1.3386	1.3384	1.3383	1.3379	1.3377	1.3374
5	1.3402	1.3400	1.3399	1.3396	1.3392	1.3388
8	1.3450	1.3445	1.3443	1.3438	1.3431	1.3424
10	1.3483	1.3478	1.3474	1.3468	1.3461	1.3451

A Matlab Surface Fitting Toolbox segítségével, egy felületet illesztettünk az adatokra és grafikusán meghatároztuk azt a másodfokú függvényt, amely leírja az összefüggést a törésmutató, és a glicerín-fehérje koncentrációváltozásai között. A 1. ábrán látható a felület illesztése.



1. ábra
 Felület illesztés a glicerín-fehérje standard törésmutatóira

A felületet leíró függvény:

$$Ri = 1.332 + 0.00157 * V_{gli} + 0.00118 * V_{pro} - 0.00155 * V_{gli} * V_{pro} - 0.00408 * V_{pro}^2 \quad (1)$$

Az 1. összefüggésből a V_{gli} kifejezhető az alábbi módon:

$$V_{gli} = \frac{Ri - 1.332 + 0.00118 * V_{pro} - 0.00408 * V_{pro}^2}{0.00157 - 0.00155 * V_{pro}} \quad , \text{ ahol} \quad (2)$$

Ri – a minta törésmutatója,
 V_{gli} – glicerinkoncentráció (% v/v),
 V_{pro} – fehérjekoncentráció (mg/ml).

Egy fermentáció során nem csak a kiinduló anyag, a szubsztrát fogyásának változását kell követnünk, hanem ezzel párhuzamosan a termék képződését, amely általában fehérje. Ellenkező esetekben a fehérje, mint melléktermék van jelen a fermentációs táptalajban. Az összfehérje meghatározása egyszerű kolorimetriás vagy spektrofotometriás mérésekkel elvégezhető. Az összfehérje mennyiséget és a minta törésmutatóját behelyettesítve a 2. egyenletbe, megkapjuk a glicerín koncentrációját mg/ml-ben kifejezve.

4. KÖVETKEZTETÉSEK

Munkánk során egy refraktometriás módszert dolgoztunk ki glicerinkoncentráció meghatározására bakteriális táptalajból, figyelembe véve a fehérjekoncentráció változását. Ezáltal kiküszöböltük a mérésekből a fehérje interferenciáját.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetünket fejezzük ki a „Sectoral Operational Programme Human Resources Development 2007-2013 of the Romanian Ministry of Labour, Family and Social Protection through the Financial Agreement POSDRU/88/1.5/S/60203.” programnak az anyagiak biztosításáért, valamint a Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem, Műszaki és Társadalomtudományi Kar, Biokémia Tanszékének az anyagok biztosításáért és a kísérletek elvégzésének lehetőségéért.

IRODALMI HIVATKOZÁSOK

- [1.] Wang Z. X. Zhuge J., Fang H., Prior B. A., Glycerol production by microbial fermentation: a review, *Biotechnol Adv*, **2001**, 19 (3), 201-23.
- [2.] Gervásio Paulo da Silva Matthias Mack, Jonas Contiero, Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology, *Biotechnol Adv*, **2009**, 27 (1), 30-9.
- [3.] Barbirato F. Chedaille D., Bories A., Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates, *Appl Microbiol Biotechnol*, **1997**, 47, 441-446.
- [4.] Dharmadi Y. Murarka A., Gonzalez R., Anaerobic fermentation of glycerol by *Escherichia coli*: a new platform for metabolic engineering, *Biotechnol Bioeng*, **2006**, 94, 821-829.
- [5.] Xiaohu Fan Rachel Burton, Yongchang Zhou, Blycerol (Byproduct of Biodiesel Production) as a Source for Fuels and Chemicals - Mini Review, *The Open Fuels & Energy Science Journal*, **2010**, 3, 17-22.
- [6.] Paul J. Flakoll Mu Zheng, Susan Vaughan, Myfanwy J. Borel, Determination of stable isotopic enrichment and concentration of glycerol in plasma via gas chromatography–mass spectrometry for the estimation of lipolysis in vivo, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **2000**, 744 (1), 47-54.
- [7.] Wang Lili Qian Jie, Hu Zhongce, Zheng Yuguo, Hu Wei, Determination of dihydroxyacetone and glycerol in fermentation broth by pyrolytic methylation/gas chromatography, *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 557 (1-2), 262-266.
- [8.] Christina Plank Eberhard Lorbeer, Simultaneous determination of glycerol, and mono-, di- and triglycerides in vegetable oil methyl esters by capillary gas chromatography, *Journal of Chromatography A*, **1995**, 697 (1-2), 461-468.
- [9.] Akiko Kiyoshima Keiko Kudo, Naoki Nishida, Noriaki Ikeda, HPLC simultaneous determination of glycerol and mannitol in human tissues for forensic analysis, *Forensic Science International*, **2002**, 125 (2-3), 127-133.
- [10.] Ryan A. Frieler Dane J. Mitteness, Mikhail Y. Golovko, Heidi M. Gienger, Thad A. Rosenberger, Quantitative determination of free glycerol and myo-inositol from plasma and tissue by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **2009**, 877 (29), 3667-3672.
- [11.] António O.S.S. Rangel Ildikó V. Tóth, Enzymatic determination of ethanol and glycerol by flow injection parallel multi-site detection, *Analytica Chimica Acta*, **2000**, 416 (2), 205-210.
- [12.] Elizabeth Nunes Fernandes Mariele Nair de Campos Moura, José Luis F Costa Lima, Boaventura F Reis, Automatic flow procedure for the determination of glycerol in wine using enzymatic reaction and spectrophotometry, *Microchemical Journal*, **2004**, 77 (2), 107-112.
- [13.] Leslie H. Boobis Ronald J. Maughan, A simple one-step enzymatic fluorometric method for the determination of glycerol in 20 µl of plasma, *Clinica Chimica Acta*, **1983**, 132 (2), 173-179.
- [14.] R. Barers S. Tkaczyk, Refractive Index of Concentrated Protein Solutions, *Nature*, **1954**, 173, 821-822.
- [15.] Jorge Babul Earle Stellwagen, Measurement of protein concentration with interferences optics, *Analytical Biochemistry*, **1969**, 28, 216-221.