

EGYSEJTŰ ALGÁK PIGMENT TARTALMÁRÓL

FELFÖLDY LAJOS, SZABÓ ERNŐ ÉS TÓTH LÁSZLÓ

Érkezett: 1962. március 14.

A tihanyi Biológiai Kutatóintézet élő algatörzs gyűjteményének tagjait rendszeresen vizsgáljuk élettani, alaktani tulajdonságaik (l. UHERKOVICH *et al.* 1962) és kémiai összetételük szempontjából (SZABÓ *et al.* 1961).

Ebben az évben tizenhárom törzs pigment-tartalmának mennyiségi analizisét végeztük el.

Az eddigi ilyen irányú irodalmi adatok elsősorban minőségi vizsgálatokról számolnak be, bár különösen a plankton-pigmentek kutatása során az a- és b-klorofill mennyiségi meghatározásáról nagyszámú ismertetés jelent meg (LUND és TALLING 1957). Ami az egysejtű algák polién festékeit illeti elsősorban a festékek minőségi azonosítása foglalkoztatta az eddigi kutatókat (STRAIN 1951, GOODWIN 1952, 1957, GOODWIN és GROSS 1958, TISCHER 1958) a karotinoidok bioszintézise és élettani szerepének kutatása mellett (BLINKS 1954, DROOP 1955, FUJIMORI és LIVINGSTON 1957, CLAES 1958, BLASS *et al.* 1959). Az alga fajok pigment tartalmának fontos szerep jutott modern rendszerük kidolgozása során is (SMITH 1951).

Az irodalom kvantitatív adatai (GEOGHEGAN 1953, HASKIN 1942, FISHER és BURLEW 1953, GOODWIN és JAMIKORN 1954, BLASS *et al.* 1959) nem egyértelműek és értékelésük nehézségekbe ütközik. Ennek egyik fő oka, hogy egysejtű algák karotinoid pigmentjeinek mennyiségi meghatározása elképzelhetetlen tisztatenyészetek és nagy mennyiséget adó tömegtenyésztés nélkül. Az egysejtű algák tömeges tenyésztésével foglalkozó irodalom gyakran utal az algák takarmányként való felhasználására. Rendkívül gazdag fehérjetartalmuk és kedvező amino-sav összetételük mellett vitamin-gazdagságuk teszi őket ebből a szempontból értékké (TAMIYA 1957).

Az alga tenyészet gyűjtemény ferde ágáron északi ablakban tartott törzseiből 10 literes lombikokban buborékoló kultúrákat állítottunk elő üvegházban, természetes megvilágítással. A szűrt csapvízből, kevés káliumnitrát, káliumdihidrofoszfát, vascitrát és nyomelemek hozzáadásával készült tápoldatot 1,5% széndioxidot tartalmazó levegővel buborékolattuk át. A szuszpenzió sűrűség változását szűrőpapíron mért szárazanyag meghatározással kísértük figyelemmel. Az analiziseket a tenyészet szaporodásának lassulásakor, azaz a növekedés logaritmikus szakasza után a lehető legrövidebb idő alatt végeztük el, tudva, hogy a kultúra kora és élettani állapota szerint a pigment tartalom a sejtek kémiai összetételével párhuzamosan lényegesen megváltozhat (CHODAT és MAYER 1927, SPOEHR 1953, 28, GOODWIN 1954). A tenyésztés 1961 szept. 26-tól okt. 25-ig, az analizisek nov. 15-ig tartottak.

A meghatározásokat két módszerrel végeztük. Az első gyors-módszerrel egyszerű acetón-kivonatban történt a fotometrikus mérés (v. ö. MacKINNEY 1941) (a-klorofil, b-klorofil, összes karotinoidák) a másikban a gyakorlatilag legfontosabb α - és β -karotint határoztuk meg oszlopon történő kromatografálás után. Mindkét módszerhez élő sejttömeget használtunk.

Az első eljárásnál az alगतenyészet aliquot részét Macherey-Nagel Nr. 640d 5,5 cm $\varnothing$ szűrőpapíron szűrtük át, majd kevés kvarchomokkal, kalcium-karbonáttal és acetonnal homogén péppé dörzsöltük. Körülbelül 10 ml 90% acetonban egy éjszakán át állni hagytuk. Másnap azbeszt-szűrőn kristálytiszttára szűrtük, a maradékot és a szűrőt 90% acetonnal utánamostuk, az extraktumot 50 ml-re feltöltve Beckman DU spektrofotométerrel 665,645 és 480 m μ hullámhosszakon spektrofotometráljuk.

Az eredmények kiszámításához RICHARDS és THOMPSON (BARNES 1959, 323, 44. táblázat) specifikus extinkció koefficienseit használtuk fel (az E_{1cm}^{1g} érték 1g/liter koncentrációjú pigment oldatra vonatkozik):

Hullámhossz. m μ	a-klorofil E_{1cm}^{1g}	b-klorofil E_{1cm}^{1g}	Nem asztacin típusú karotinoidák E_{1cm}^{SPU}
665	66,7	6,5	0
645	16,4	45,6	0
480	1,9	13,6	203

Ezekből az értékekből:

$$C_a = 1,554 A_{665} - 0,221 A_{645}$$

$$C_b = 2,273 A_{645} - 0,559 A_{665}$$

$$C_c = 0,4926 A_{480} - (0,0094 C_a + 0,0670 C_b), \text{ ahol}$$

C_a , C_b és C_c az a-, b-klorofil és az össz-karotinoida koncentrációja mg ill. mSPU/100 ml extraktum egységben, A_λ a kérdéses hullámhosszon mért abszorpció érték. (SPU = „specified pigment unit” pontosan meg nem határozott, de jellemző pigment mennyiség, kb. 1g: a karotin keverék mértékegysége). Az eredményeket a szuszpenzió szárazanyag tartalmának ismeretében szárazanyag %-ban adjuk meg. Minden szám legalább négy meghatározás átlaga (I. táblázat).

A másik módszer, melynek célja a pigment frakció két fontos alkotórészének, az α - és β -karotinnak meghatározása volt, GOODWIN (1955), BOOTH (1957) és TIEWS (1959) eljárásain alapul. Tekintve, hogy a módszer a kapott eredményeket bizonyos mértékig befolyásolja, részletesebben közöljük.

Az alga-szuszenzió alikvot részéből (20 ml) üveg centrifuga csőben centrifugálva eltávolítjuk a tápoldatot.

A visszamaradó sejttömegre 10 ml etanolt és 2 ml vizes 60% KOH oldatot pipetázunk. Üvegbottal keverve digeráljuk 5 percig 40–50 C°-ú víz-fürdőn. Kis fordulatszámmal centrifugáljuk, a fennúszó tisztáját az I. sz. választótölcsérbe dekantáljuk. Az alul maradt alगतömeget újabb 10 ml etanolal mossuk, centrifugáljuk, tisztáját az I. sz. választótölcsérbe, az algát kevés acetonnal kvantitatíve kisméretű porcelán dörzscsészébe visszük. Kvarchomokkal és acetonnal homogén péppé dörzsöljük, kb. 10 ml acetonnal extraháljuk és kristálytiszttára szűrjük jobb minőségű szűrőpapíron nyhe szívatással. A szűredéket az I. sz. választótölcsérbe gyűjtjük. Az eldörzsölést és szűrést addig folytatjuk, míg a szűrőn szárazra szívatott maradék fehér nem lesz. Az

I. táblázat : A vizsgált törzsek a- és b-klorofill illetve összkarotinoida tartalma (szárazanyag %, ill. SPU 100 g szárazanyagban, aceton extraktum)

Table 1. Chlorophyll a and b and total carotenoid content in strains investigated by the acetone extraction method

Törzs- szám Strain No	Alga	a-klorofill chlorophyll a per cent of dry matter	b-klorofill chlorophyll b per cent of dry matter	karotinoidák carotenoids SPU in 100 g of dry matter
3147	Chlorella pyrenoidosa Chick	3,0	0,8	0,607
7K	C. vulgaris Beijer.	2,8	1,6	0,588
12K	C. vulgaris Beijer. öreg — old	0,8	0,4	0,360
3153	Chlorochloster terrestris Pascher	3,6	1,4	0,769
3615	Chlorococcum botryoides Rabenh.	3,1	1,1	0,642
953	Coelastrum microporum Næg.	1,7	0,6	0,300
2257	C. microporum Næg.	3,4	1,4	0,612
3145	Oocystis sp.	3,9	1,5	0,649
2507	Scenedesmus acuminatus Chod.	1,8	0,7	0,414
2543	S. acuminatus Chod.	2,2	0,8	0,481
85	S. acutus Meyen	2,5	0,9	0,431
5618	S. obtusiusculus Chod.	4,2	1,0	0,747
3602	Indeterminata	2,8	1,0	0,689

I. választótölcsérben levő pigment kivonat el nem szappanosodott frakcióját kvantitatíve petroleum éterbe (60° f. p.) visszük át. Az alkohol-acetonos mintát vizezzük, hogy a festékek maradéktalanul a felső fázisba jussanak. Az esetleges emulziót tömény konyhasó oldattal törjük meg. A petroleum éteres fázist a II. sz. választótölcsérbe gyűjtjük és a kirázás befejezése után legalább négyszer mossuk vízzel az alkohol- és acetonyomok eltávolítása érdekében. Az extraktumot vízmentes nátriumszulfáttal szárítjuk és 5–10 ml-re pároljuk be széndioxid érában 40 fokot meg nem haladó hőmérsékleten, vákuumban. Minden műveletet lehetőleg gyorsan és erős fénytől óva végzünk.

A kromatografáláshoz magnéziumoxid és Hyphlo super cel 1 : 1 arányú keverékét használtuk, melyet 10 mm átmérőjű csőbe töltöttünk. Az extraktumot és az oldószert széndioxid bombából nyert enyhe nyomással mozgattuk az oszlopban. Az α -karotint tiszta petroleum éterrel futtattuk le, a β -karotint, ha szükségesnek látszott 4% acetont tartalmazó petroleum éterrel. Végeztünk kísérleteket a többi sárga festék azonosítására is, de eredményeink közlésre még nem értek meg, ezért a többi pigmentet „egyéb karotinoidák” név alatt összesítve adjuk.

Az oszlopról külön-külön lefuttatott három frakciót szárazra pároltuk és megfelelő mennyiségű (5–50 ml) analitikai tisztaságú hexánban vettük fel őket a spektrofotometrálishoz (Beckman DU).

Az α - és β -karotin azonosítására az oszlopon való viselkedésükön kívül teljes abszorpció spektrumuk felvételét is felhasználtuk, melyek jól egyeztek az irodalmi adatokkal (GOODWIN 1955, 297, TIEWS 1959).

A koncentráció kiszámításához az alábbi $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ értékeket használtuk fel:

	m μ	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$	oldószér	szerző
α -karotin	445—446	2720	hexán	Tiews 1959, 216
β -karotin	452	2600	hexán	Tiews 1959, 216
„egyéb karotinoidák”	445	2500	hexán	Goodwin 1955, 308

A kvantitatív meghatározás céljából eszközölt mérések során az abszorpciós maximumok táján (418—424, 434—438, 444—454, 470—482 m μ) 2 sőt 1 m μ -onként mértünk, hogy a maximum helyét érzékelhessük. Próbaként más szerzők más hullám hosszakon adott $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ értékeit is használtuk (l. GOODWIN 1955, 295). A végső mg% értékben ez a variálás még 5%-os eltéréseket sem okozott.

A pigment mennyiség (mg %) kiszámítását az alga szárazanyagára GOODWIN (1949) kissé módosított képletével végeztük.

$$\text{Pigment mg/100 g Sza} = \frac{y \cdot z \cdot 10^5}{100wdb}, \text{ ahol}$$

- y = a festék kivonat extinkció értéke a kérdéses hullámhosszon
 z = a festék kivonat térfogata (ml)
 w = az analízisre készült algamennyiség szárazanyagának súlya (g)
 d = a fotométer-küvetta rétegvastagsága (= 1 cm)
 b = a festék $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ értéke a kérdéses hullámhosszon.

A karotin analízisek eredményeit a 2. táblázatban közöljük.

2. táblázat : A vizsgált alga-törzsek α - és β -karotin, valamint más karotinoida tartalma magnézium oxid-Hyphlo super cel oszlopon elválasztott festékek mérése alapján (szárazanyag mg%)

Table 2. α - and β -carotenes and other carotenoids in some algal strains (mg% of dry matter), identified by column chromatography (MgO-Hyphlo super cel)

Törzsszám Strain N°	Alga	α -karotin α -carotene	β -karotin β -carotene	Egyéb karotinoidák other carotenoids
3147	Chlorella pyrenoidosa Chick.	32,2	42,3	369
7K	Chlorella vulgaris Beijer.	21,5	61,4	434
12K	Chlorella vulgaris Beijer. (öreg-old)	0,7	25,2	129
3153	Chlorocloster terrestris Pascher	26,2	38,1	516
3615	Chlorococcum botryoides Rabenh.	3,9	68,9	431
953	Coelastrum microporum Nág.	1,3	30,4	249
2257	Coelastrum microporum Nág.	14,0	26,2	221
3145	Oocystis sp.	20,4	52,4	479
2507	Scenedesmus acuminatus Chod.	5,6	59,9	370
2543	Scenedesmus acuminatus Chod.	2,4	40,5	353
85	Scenedesmus acutus Meyen.	3,7	27,0	272
5618	Scenedesmus obtusiusculus Chod.	30,5	81,6	482
3602	Indeterminata	2,8	54,2	360

A két módszerrel kapott eredmények között lényeges különbség van, amennyiben a 2. táblázatban szereplő értékek összeadása révén nyert összes sárga pigment mennyiség mindig kisebb, mint az 1. táblázat összes karotinoida értékei. Az eltérés 20—130% között ingadozik. Ennek oka az, hogy a gyorsmódszer csak önkényesen megállapított egységben (specified pigment unit) adja a „nem asztacin típusú” karotinoidák mennyiségét, így az csak egymás közötti összehasonlításra használható.

A karotinoida tartalom szerinti sorrend a két táblázatban lényegében hasonló. Minden esetre, ha a karotinoida-tartalom mennyiségi és minőségi kérdései a gyakorlati munka során problematikussá válnak, megfelelő gyorsmódszer kidolgozása lesz a további kutatások legfontosabb feladata.

Az eredményekből, részben metodikai elégtelenségek miatt nem lehet és nem is akarunk messzemenő következtetéseket levonni. Számunkra pillanatnyilag az a legfontosabb, hogy a törzsek között a pigment-tartalom szempontjából lényeges különbségek vannak. A táblázatban szereplő algák mindegyike többször kipróbált, erélyesen szaporodó, tömegtenyésztésre alkalmas törzs, tehát ha bármilyen ok miatt karotin, vagy karotinoida termelés céljával próbálunk alga-tömegtenyésztetet beállítani a törzsek egyedi tulajdonságait figyelembe kell vennünk. Határozottan pigment-szegénynek bizonyult a 953. *Coelastrum* és a 85, 2507, 2543 sz. *Scenedesmus*-ok, bár ez utóbbiak β -karotin tartalma nem rossz. Össz-pigment-tartalomban kiválnak a 3147 *Chlorella*, 3153 *Chlorocloster*, 3615 *Chlorococcum*, 2257 *Coelastrum*, 3145 *Oocystis* és az 5618 *Scenedesmus obtusiusculus*. Sok β -karotint tartalmaznak: 7K *Chlorella*, 3615 *Chlorococcum*, 3145 *Oocystis*, 2507 *Scenedesmus acuminatus*, a 3602 ismeretlen törzs és a 2518 *S. obtusiusculus*.

Az előregedett (4 hónapja tenyésztett) 12K *Chlorella* teljesen csökkent értékei figyelmeztetnek arra, hogy a tenyészet kora, élettani állapota milyen döntő ebben a kérdésben. Ez a tény arra a reményre jogosít, hogy a pigment-tartalmat megfelelő tenyésztési technikával változtatni, esetleg tartósan növelni lehet.

A klorofilok és karotinoida festékek fontos élettani szerepe és gyakorlati jelentősége miatt törzseink további tanulmányozása ebben az irányban feltétlenül érdemes.

Köszönetünket fejezzük ki F. KALKÓ ZSUZSA és SZ. SCHULCZE BRIGITTA asszisztenseknek az analízisek során nyújtott szakszerű munkájukért.

IRODALOM

- BARNES, H. (1959): Apparatus and methods of oceanography. Part 1: Chemical. — Allen and Unwin Ltd., London, 1—341.
- BLASS, U., J. M. ANDERSON and M. CALVIN (1959): Biosynthesis and possible functional relationships among the carotenoids and between chlorophyll a and chlorophyll b. — *Plant Physiol.* 34, 329—333.
- BLINKS, L. R. (1954): The photosynthetic function of pigments other than chlorophyll. — *Ann. Rev. Plant Physiol.* 5, 93—114.
- BOOTH, V. H. (1957): Carotene, its determination in biological materials. — Heffer and Sons Ltd., Cambridge, 1—119.
- BURLEW, J. S. (1953): Algal culture from laboratory to pilot plant. — *Carnegie Inst. Wash. Publ.* 600, 1—357.
- CHODAT, R. et F. MAYER (1927): Sur les conditions de la formation de la carotine chez les algues en culture pure. — *C. R. Soc. Phys. et Hist. Nat. Genève* 44, 107—110.
- CLAES, H. (1958): Biosynthese von Carotinoiden bei *Chlorella*. IV. Die Carotinsynthese einer *Chlorella*-Mutante bei anaerober Belichtung. — *Z. Naturforsch.* 13b, 222—224.
- DROOP, M. R. (1955): Carotenogenesis in *Haematococcus pluvialis*. — *Nature* 175, 42.
- FISCHER, A. W. jr. and J. S. BURLEW (1953): Nutritional value of microscopic algae. — In BURLEW 1953, 303—310.
- FUJIMORI, E. and R. LIVINGSTON (1957): Interactions of chlorophyll in its triplet state with oxygen, carotene, etc. — *Nature* 180, 1036—1038.
- GEOGHEGAN, M. J. (1953): Experiments with *Chlorella* at Jeallot's Hill. — In BURLEW 1953, 182—189.

- GOODWIN, T. W. (1952): The comparative biochemistry of the carotenoids. — Chapman and Hall Ltd., London, 1—356.
- GOODWIN, T. W. (1954): Some observations on carotenoid synthesis by the alga *Chlorella vulgaris*. — *Experientia* 10, 213—214.
- GOODWIN, T. W. (1955): Carotenoids. — In PAECH and TRACEY 1955, 272—311.
- GOODWIN, T. W. (1957): The nature and distribution of carotenoids in some blue-green algae. — *J. gen. Microbiol.* 17, 467—473.
- GOODWIN, T. W. (1949): The biochemistry of Locusts. 2. Carotenoid distribution in solitary and gregarious phases of the African migratory locust (*Locusta migratoria migratorioides* R. et F.) and the desert locust (*Schistocerca gregaria* Forsk.) — *Biochem. J.* 45, 472—479.
- GOODWIN, T. W. and J. A. GROSS (1958): Carotenoid distribution in bleached substrain of *Euglena gracilis*. — *J. Protozool.* (Utica, N. Y.) 5, 292—295.
- GOODWIN, T. W. and M. JAMIKORN (1954): Studies in carotenogenesis. Some observations on carotenoid synthesis in two varieties of *Euglena gracilis*. — *Z. Protozool.* 1, 216—219.
- HASKIN, H. H. (1942): A spectrophotometric method for the analysis of chloroplast pigments. — *J. Biol. Chem.* 144, 149—160.
- LUND, J. W. G. and J. F. TALLING (1957): Botanical limnological methods with special reference to algae. — *Bot. Rev.* 23, 489—583.
- MAC KINNEY, G. (1941): Absorption of light by chlorophyll solutions. — *J. biol. Chem.* 140, 315—320.
- PAECH, K. and M. V. TRACEY (1955): Modern methods of plant analysis. Vol. III. — Springer, Berlin, 1—761.
- SMITH, G. M. (1951): The classification of algae — In SMITH, G. M. (ed): Manual of phyecology, — *Chronica Botanica*, Waltham, Mass. 243—262.
- SPOEHR, H. A. (1953): The need for a new source of food. — In BURLEW 1953, 24—28.
- STRAIN, H. H. (1951): The pigments of algae. — In: Smith, G. M. (ed): Manual of phyecology. — *Chronica Bot.* Waltham, Mass. 243—262.
- SZABÓ E., RUFF F. és FELFÖLDY L. (1961): Egysejtű algák össz-szterin tartalmáról. — *Annal. Biol. Tihany* 28, 139—143.
- TAMIYA, H. (1957): Mass culture of algae. — *Ann. Rev. Plant Physiol.* 8, 309—334.
- TIEWS, J. (1959): Zur Analytik des Vitamins A. — *Vitamine u. Hormone* 8, 185—242.
- TISCHER, J. (1958): Carotinoide der Süßwasseralgen. XI. Über die Carotinoide aus *Oscillatoria amoena*. — *Hoppe-Seyler's Z.* 311, 140—147.
- UHERKOVICH G., F. KALKÓ Zs. és FELFÖLDY L. (1962): *Scenedesmus obtusiusculus* Chod. alaktani tulajdonságai különféle tenyésztési körülmények között. — *Annal. Biol. Tihany* 29, 287—295.

ON PIGMENT CONTENT IN SOME UNICELLULAR ALGAE

Lajos J. M. Felföldy, Ernő Szabó and László Tóth

Summary

Thirteen different pure cultured strains of unicellular green algae were grown in ten litre spherical flasks containing nutrient solution prepared from tap water by the addition of KNO_3 , KH_2PO_4 , ferric citrate and Hoagland's A-Z solution, under greenhouse conditions (from 26th September to 25th October)

Pigment analyses were carried out in two different ways. In the first quick method the spectrophotometric measurement performed in simple acetone extract (MAC KINNEY 1941) and the results obtained were computed by the specific extinction coefficients of RICHARD and THOMPSON (BARNES 1959, 323, Table 44) (C_a , C_b and C_c are a concentration of chlorophyll a and b and of the non astacin type carotenoids; A_λ = the absorption of acetone extract at wave length of λ m μ). Results in Table 1.

With the second method the practically more important α - and β -carotenes were determined by column adsorption chromatography (MgO—Hyphlo supercel 1:1 column, solvent: pure petroleum ether (α -carotene) and petroleum ether with 4 per cent acetone (β -carotene). The extinction coefficients are given on p. 103 in the Hungarian text. Results in Table 2.