

KIVONAT**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY****Vörös és szürke elemi szelén nanogömbök és technológia előállításukra**

A találmány tárgya eljárás elemi szelén nanogömbök előállítására, ahol a nanogömbök méretének eloszlása az átlagos méret 5-20%-os szórása, oly módon, hogy az eljárást *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* nemzetséghez tartozó mikroorganizmussal, vagy *Streptococcus thermophilus* mikroorganizmussal végezzük. Előnyösen a mikroorganizmus a *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum* fajokat tartalmazó csoportból van kiválasztva.

A jellemző ábra a 2. kép.

Vörös és szürke elemi szelén nanogömbök és technológia előállításukra

A modern anyagtudomány igényli a nagy tisztaságú, homogén szemcseméret-eloszlású, 50-500 nanométer mérettartományú fémek előállítását. Az egységes méret és forma, a gömb alak különlegesen előnyös a mikroelektronikai- és a gyógyszeripari technológiák számára.

Ezek között jelentős szerepet játszik az elemi szelén, amelynek több allotróp módosulata is ismert: a vörös színű amorf és kristályos szelén, valamint a fémes szürke szelén. A szürke szelén elektromos vezetése megvilágítás hatására ezerszeresére nő, így pl. a fényérzékelő detektorok, fénymásolók anyagaként széleskörben alkalmazzák.

Hátrányos, hogy a kémiai úton előállított fémszemcsék szabálytalan alakúak, kristályaik rendszerint éllel határoltak, a szemcsék mérete széles tartományban változik.

Baktériumok elemi szelént előállító képességét eddeig csak anaerob, geológiai és környezeti mintákban mutatták ki.

Szulfátredukáló baktériumok által végzett szelenit fém szelénig történő redukciójáról először 1990-es években jelentek meg közlemények. (Tomei, F.A., Barton, L.L., Lemanski, C.L., Zocco, T.G., Fink, N.H., Sillerud, L.O., 1995. Transformation of selenate and selenite to elemental selenium by *Desulfovibrio desulfuricans*. *J. Ind. Microbiol.* 14, 329–336.) A vizsgált baktériumok ipari felhasználásának lehetőségét nem vizsgálták, a jelenség ipari alkalmazásának lehetősége fel sem merült.

1999-ben J. Kessi és munkatársai (J. KESSI, M. RAMUZ, E. WEHRLI, M. SPYCHER, AND R. BACHOFEN (1999) Reduction of Selenite and Detoxification of Elemental Selenium by the Phototrophic Bacterium *Rhodospirillum rubrum* *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, Nov. 1999, Vol. 65, No. 11. p. 4734–4740) a kísérleteikben *Rhodospirillum rubrum* nevű, anaerob, fototrof bíbor nemkén baktériumot használtak, amely a természetben állóvizekben és mocsarakban fordul elő és a levegő elemi nitrogénjének megkötésére is képes. CO₂-t, H₂-t és NH₃-t hasznosít anaerob körülmények között, míg a szulfátot kénforrásként használja. A kísérletekben alkalmazott tápközeg 40-120 mg/l-es koncentrációban tartalmazott szelént nátrium-szelenit formájában. A redukációs folyamat anaerob körülmények között 60-80 órát vett igénybe. A folyamatban narancsvörös színű amorf szelén képződött. Hátrányos, hogy a képződött szelén gömbök mérete a körülményektől függően széles tartományban, 50-200 nm között változott egyetlen mintán belül is.

- R.S. Oremland és munkatársai 2003-ban 3 anaerob baktérium (*Sulfurospirillum barnesii*, *Bacillus selenitireducens* és a *Selenihalanaerobacter shrifti*) elemi szelént előállító képességét vizsgálták (Ronald S. Oremland, Mitchell J. Herbel, Jodi Switzer Blum, Sean Langley, Terry J. Beveridge, Pulickel M. Ajayan, Thomas Sutto, Amanda V. Ellis, Seamus Curran (2003) Structural and Spectral Features of Selenium Nanospheres Produced by Se-Respiring Bacteria APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Vol. 70, No. 1 Jan. 2004, p. 52–60.). A kísérletekben tanulmányozott baktériumok anaerob, vízi környezetben előforduló szervezetek voltak. Megállapították, hogy a vizsgált fajok vörös színű, S8 illetve S6 molekulaképlettel jellemezhető szelénformák voltak. A módszer hátránya, hogy csak a vörös módosulat előállítására alkalmas és az alkalmazott szervezetek ipari alkalmazására még nincs kialakult gyakorlat és tapasztalat.
- G. Sarret és munkatársai 2004-ben egy talajbaktérium, a *Ralstonia metallidurans* baktérium szelén előállítását értékelték (Geraldine Sarret, Laure Avoscan, Marie Carrie`re, Richard Collins, Nicolas Geoffroy, Francine Carrot, Jacques Cove`s, Barbara Gouget (2004) Chemical Forms of Selenium in the Metal-Resistant Bacterium *Ralstonia metallidurans* CH34 Exposed to Selenite and Selenate APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Vol. 71, No. 5 May 2005, p. 2331–2337.). Megállapítják, hogy a fém szelén előállításához 100-120 órára volt szükség a 160 mg/l szelént nátrium-szelenit formájában tartalmazó tápközegben, amely jelentős időtartam.
- Klonowska és munkatársai a *Shewanella* baktérium szelenit redukáló képességéről már 2005-ben beszámoltak (Klonowska, A., Heulin, T., Vermeglio, A., 2005. Selenite and tellurite reduction by *Shewanella oneidensis*. Appl. Environ. Microbiol. 71, 5607–5609.). A *Shewanella*, számos hasonló mikroorganizmustól eltérően, nem oxigén és tápanyagok segítségével tartja fenn magát, hanem fémeket bont le, s szabad elektronokat választ ki melléktermékként. A baktérium földben, vízben egyaránt megél, s többféle anyagból is képes kiválasztani a számára energiát biztosító anyagokat. A baktérium alkalmazásának hátránya, hogy ipari felhasználásának nincs kialakult gyakorlata, s szaporodása sokkal lassabb az élelmiszeripar fermentációs eljárásaiban alkalmazott törzsekénél.
- Lee és munkatársai a 2007-ben megjelenő közleményükben a hőmérséklet és az oldott oxigén hatását vizsgálták a *Shewanella* sp. strain HN-41 baktérium szelénelőállító mechanizmusára (Ji-Hoon Lee, Jaehong Han, Heechul Choi, Hor-Gil Hur (2007) Effects of temperature and dissolved oxygen on Se(IV) removal and Se(0) precipitation by *Shewanella* sp. HN-41 Chemosphere, doi:10.1016/j.chemosphere.2007.02.062 in press). A baktérium által előállított

vörös szelén gömbök 150-200 nm méretűek voltak és a méret nem volt szabályozható az oxigénellátottsággal.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy a korábbi munkák valamennyien talajban, vízben vagy geológiai mintákban előforduló anaerob baktériumok fém szelén előállító képességét vizsgálták. Nem tekintették célnak a fém szelén előállítását és az ipari előállítás kidolgozását. A cikkekben ismertetett törzseket ipari termelésre nem alkalmazzák, bevezetésük számos nehézségbe ütközne, mivel a patogén mikroorganizmusok kezelése különleges körülményeket és engedélyeket igényel.

Az előállított szelén minden esetben vörös szelén volt a szürke módosulat előállítása nem szerepel a szakirodalomban. Az elemi szelén előállítása minden esetben 80-200 órát igényelt, általában a tápközeg 100-200 mg/l-es koncentrációban tartalmazott szelént nátrium-szelenit formájában.

A találmány kidolgozásánál a kitűzött feladat az volt, hogy szelén nanogömböket állítsunk elő, melyek a szelén megfelelő allotróp módosulatát (vörös vagy szürke) nagy tisztaságú formában tartalmazzák. A feladatot az élelmiszeriparban, a joghurtok előállításához is használt probiotikus hatású baktériumok (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*) segítségével kidolgozott fermentációs technológiával oldottuk meg oly módon, hogy a tápoldathoz 1-100 mg/l-es koncentrációban szelént adtunk célszerűen nátrium-szelenit formában. A baktériumok számára az 1-2 mg/l-nél nagyobb szelenit koncentráció méregtelenítési folyamatot indít el, melyben a baktérium a szelenitet redukálja és a szelént elemi formában a sejten belül kiválasztja. Az így létrehozott elemi szelén nagy tisztaságú, gömb alakú, méretét és kristályformáját pedig a baktériumfaj határozza meg.

A kitűzött feladatot, a vörös és szürke elemi szelén nanogömbök előállítását fermentációs eljárással oldottuk meg.

A találmány azon a felismerésen alapszik, hogy tejsavbaktériumok (Pl. *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*) az 1 mg/l-nél nagyobb koncentrációban szelént szelenitként tartalmazó, célszerűen agar nélküli *Lactobacillus* tápleves (MRS, De Man, Rogosa és Sharpe szerint) tápközegben a szelenitet elemi szelénre redukálják és a sejten belül tárolják. Tápleves helyett tápoldatként akár tej is alkalmazható. A 200 mg/l feletti szelént szelenitként tartalmazó tápközegben a baktériumok szaporodása gátolt.

Találmányunk lehetővé teszi élelmiszeriparban alkalmazott mikroorganizmusok segítségével történő nagytisztaságú vörös és szürke elemi szelén előállítását. A nanoméretű (50-500 nm) és gömb formájú szemcsék mérete és kristályformája a választott mikroorganizmusra jellemző és az által meghatározott. Ez a genetikai meghatározás jól reprodukálható gyártást és különleges tulajdonságú anyagot eredményez, amely az ipar és a kutatás számos területén alkalmazható.

Az eljáráshoz például az alábbi deponált törzsek használhatók:

<i>Bifidobacterium bifidum</i>	NCAIM B 02021
<i>Bifidobacterium longum</i>	ATCC 15707
<i>Bifidobacterium infantis</i>	ATCC 15697
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NCAIM B 02085
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	NCAIM B 02206
<i>Lactobacillus casei</i>	NCAIM B 1147
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC 8014
<i>Streptococcus thermophilus</i>	CNCM I-1670

Az NCAIM szám a Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményében letétbe helyezett, a CNCM szám az Institut Pasteur (Párizs) letétbe helyezett törzset jelöl.

Az így létrehozott elemi szelén gömb alakú, méretét és kristályformáját pedig a baktériumfaj határozza meg. A folyamathoz nincs szükség levegő kizárására, sem levegő bevezetésére. A nanoméretű (50-500 nm) és gömb formájú szemcsék mérete és kristályformája a választott mikroorganizmusra jellemző és az által meghatározott.

A technológia egyszerűsége, gyorsasága és az alkalmazott törzsek veszélytelensége jelentős előrelépést jelent a szelén nanogolyók előállításában. Más technológiával, kémiai reakciók eredményeként előállított elemi szelén nanorészecskék alakjának és méretének egyenmősége, minősége nem közelíti meg a tejsavbaktériumokat alkalmazó fermentációs technológiával előállított anyag jellemzőit.

A találmányunk tárgya vörös és szürke elemi szelén 50-500 nm méretű nanogömbök, melyeknél a nanogömbök méretének eloszlása az átlagos méret 5-20%-os szórásával jellemezhető.

Találmányunk további tárgya vörös és szürke elemi szelén 50-500 nm méretű nanogömbök, ahol a nanogömbök méretének eloszlása az átlagos méret 5-20%-os szórásával jellemezhető, amelyek mikrobiológiai eljárással készültek.

A találmányunk szerinti eljárás 50-500 nm méretű elemi szelén nanogömbök előállítására szolgál, ahol a nanogömbök méretének eloszlása az átlagos méret 5-20%-os szórása, úgy hogy az eljárást *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* nemzetséghez tartozó mikroorganizmussal, vagy *Streptococcus thermophilus* mikroorganizmussal végezzük.

A mikroorganizmus a *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum* fajokat tartalmazó csoportból lehet célszerűen kiválasztva.

A *Bifidobacterium*, nemzetséghez tartozó mikroorganizmussal 400-500 nm méretű nanogolyókat tartalmazó szürke szelént állíthatunk elő.

Előnyösen a *Bifidobacterium bifidum* vagy *Bifidobacterium longum* fajhoz tartozó mikroorganizmussal 400-500 nm méretű nanogolyókat tartalmazó szürke szelént állítunk elő.

A *Lactobacillus* nemzetséghez tartozó mikroorganizmussal 100-300 nm méretű nanogolyókat tartalmazó vörös szelént állíthatunk elő.

Célszerűen a *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* fajhoz tartozó mikroorganizmussal 100-300 nm méretű nanogolyókat tartalmazó vörös szelént állítunk elő.

A találmányunk szerinti további előnyös megoldással *Streptococcus thermophilus* fajhoz tartozó mikroorganizmussal 50-100 nm méretű nanogolyókat tartalmazó vörös szelént állítunk elő.

Az eljárást szén és/vagy nitrogénforrásokat, szerves ionokat és szükség szerint más szerves anyagokat tartalmazó tápoldattal végezzük.

A tápoldat szelenit-sót tartalmaz, előnyösen 5-100 mg/l-es koncentrációban, nátrium-szelenit formában.

A fermentáció ideje célszerűen 4-24 óra közötti.

A fermentációból a szelént a mikroorganizmusok enzimes úton való emésztésével nyerhetjük ki.

Egy további előnyös megoldás szerint a fermentációból a szelént szerves vagy szerves savas vagy lúgos kezeléssel nyerjük ki.

A fermentációból a szelént fizikai eljárással, előnyösen fagyasztással, szárítással, ozmózissal is kinyerhetjük.

Ezután a kinyerést a kapott szuszpenzió vizes mosásával, ülepitésével vagy centrifugálással végezhetjük.

A keletkezett vörös szelént hőkezeléssel szürke módosulatú szeléné is alakíthatjuk.

A találmány szerinti eljárás főbb lépései a következők:

1. Tápközeg összeállítása és beoltása:

A mikroorganizmus tenyésztésére alkalmazott tenyésztáptalaj szénforrást, nitrogénforrást, szerves ionokat és szükség szerint más szerves anyagokat tartalmazhat. Az alkalmazható szénforrásokra például szolgálhatnak a cukrok, mint például glükóz, laktóz, galaktóz, fruktóz és keményítőhidrolizátum; alkoholok, mint például glicerín és szorbitol; szerves savak, mint például fumársav, citromsav és borostyánkősav.

Az alkalmazható nitrogénforrásokra például szolgálhatnak szerves ammóniumsók, mint például ammónium-szulfát, ammónium-klorid és ammónium-foszfát; kukoricalekvár, élesztőkivonat, pepton, húskivonat, kazein, tripcasin, szójabab-hidrolizátum; ammóniagáz és vizes ammóniaoldat. Az alkalmazható szerves mikrotápanyag-forrás előnyösen megfelelő mennyiséget tartalmaz a kívánt anyagból, mint például B1-vitamin vagy L-izoleucin, vagy élesztőkivonatot alkalmazunk. Továbbá kálium-foszfátot, magnézium-szulfátot, vasionokat és mangánionokat is adagolhatunk. A táptalaj puffert és habzástgátlót is tartalmazhat.

A tenyésztést anaerob módon végezzük 4-8 órán keresztül.

A fermentáció ismert módokon végezhető, így például lehet felületi vagy alámerült kultúras.

Az inkubálási hőmérséklet célszerűen 35-45 °C között lehet az alkalmazott törzstől függően.

A pH-t 5 és 8 közé állítjuk be a tenyésztés időtartamára. A pH beállítására szerves sav vagy bázikus anyag, továbbá ammóniagáz alkalmazható.

Egy célszerű kiviteli forma szerint a sterilizált agar nélküli tápleves (MRS vagy M17, Scharlau GmbH, Hamburg) sterilizált oldatához hozzáadjuk a megfelelő szelénkoncentráció biztosításához szükséges nátrium-szelenitet steril oldatban.

2. **Fermentáció:** A táplevest a tejsavbaktériumok hőmérsékleti optimumán 37 °C-on illetve *S. thermophilus* esetén 42 °C-on inkubáljuk 24 órán keresztül

3. **A szelén kinyerése és tisztítása:** A szelén tápközegből történő kinyeréséhez a baktériumokat enzimes úton emésztjük, vagy kémiai (sósav vagy nátrium-hidroxid, illetve fizikai módszerrel (fagyasztás, szárítás vagy ozmózis) elpusztítjuk, hogy a sejtek tartalma hozzáférhető legyen. Ezután vizes mosással, ülepitéssel vagy centrifugálással a fém szelén tisztán kinyerhető. Az 1M-os savval, majd ionmentesített vízzel mosott elemi szelén por vagy vizes szuszpenzió formájában is forgalomba hozható.

A technológia megvalósítható folyamatos üzemű fermentáló berendezésben is.

A találmányunk szerinti megoldás előnyös tulajdonságai a következők.

Az alkalmazott technológia rövid időn (4-24 órán) belül formában és méretben homogén szelén nanogolyók előállítását teszi lehetővé.

Ipari célú, élelmiszeripari baktériumokat alkalmazó fermentációs úton korábban nem állítottak elő fémekeket. Az így előállított szelén homogén szemcseméret eloszlása és szemcsék szabályos formája miatt különlegesen jó alapanyag nanorétegek kialakítására.

A különböző méretű és kristályformájú szelén-golyók, illetve a belőlük előállított szuszpenziók színe különböző, a szemcseméret és a kristályforma által meghatározott.

A találmány alkalmazásának lehetőségei.

A technológia egy gyártási eljárás, amelynek eredményeként értékes, különleges tulajdonságú szelén golyókat tartalmazó szuszpenzió illetve por jön létre.

Az így előállított anyag az orvosi kutatásban, mint potenciális daganatellenes szer, a mikroelektronikában mint speciális félvezető találhat piacot.

Az alkalmazott technológia viszonylagos egyszerűsége jelentős árcsökkentést tesz lehetővé s ez tovább szélesítheti az anyag felhasználásának területeit.

A találmányt az alábbi példákban részletezzük, anélkül, hogy oltalmi igényünket arra korlátoznánk.

1. példa**Szürke kristályos szelén előállítása****Tápközeg összeállítása és beoltása:**

Tápközeg: MRS (DeMan, Rogosa and Sharpe, Scharlau Chemie, Barcelona, Spain, De Man, J. C., Rogosa, M. and Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl Bacteriol. 23: 30–35.). 52g anyagot 1 liter vízben melegítés közben oldva az alábbi összetételű táplevest kapjuk:

Összetevők	g/l
Peptone	10,0
Húskivonat	8,00
Élesztőkivonat	4,00
D(+)-Glukóz	20,0
Nátrium-acetát	5,00
Triammónium-citrát	2,00
Dikálium-hidrogén-foszfát	2,00
Magnézium-szulfát (MgSO ₄)	0.20
Mangán- szulfát (MnSO ₄)	0.05
Poliszorbát 80	1 ml
pH 6,2±0,2	

A táplevest 121 °C-on 15 percen keresztül sterilizáltuk.

A tápleveshez 1000 mg/l-es oldatból nátrium-szelenitet adtunk, olyan mennyiségben, hogy a tápközeg szelénre nézve 20 mg/l koncentrációjú legyen, azaz 980 ml tápleveshez 20 ml 1000 mg/l-es nátrium-szelenit oldatot adtunk.

Beoltás:

Az így elkészített és keveréssel homogenizált oldatot beoltottuk 30 ml aktivált *Bifidobacterium bifidum* NCAIM B 02021 törzssel. Az aktiváláshoz háromszor aktivált, eredetileg liofilizált formában levő, a Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből (BUDAPEST, Somlói út 14-16 1118) származó törzset használtunk. Az aktiválás után az oldat abszorbanciája $1,5 \pm 0,1$ 650 nm-es hullámhosszon.

Fermentáció:

37 °C-on rázás nélkül, sterilen lezárt edényben inkubáltuk 24 órán keresztül

A folyamat végére sötét színű szuszpenziót kaptunk, amely az 1 ábrán bekeretezve található meg.

A szuszpenzióban található baktériumok egy részét lizozim enzimmal elemésztve a sejtek közötti térbe kijutó fém szelén nanogolyók pásztázó elektronmikroszkóppal megfigyelhetők és vizsgálhatók, ahogy ezt a 2. ábra mutatja.

A képen látható 500 nm méretű, erősen világító golyók az elemi szelén szemcsék. Az egyes golyók mérete között nincs jelentős különbség, a 3. ábrán láthatóan.

A szemcsék összetételének meghatározásához röntgenfluoreszcencia analízist használva a 4. ábrán ábrázolt spektrumot kapjuk.

A szemcse röntgenfluoreszcens spektruma bizonyítja, hogy a szemcse elemi szelén. Az arany a mintára a mintaelőkészítés során rápárolgatott rétegből, a szén, nitrogén és oxigén a körüllevő szerves mátrixból, a nátrium és a szilícium jele pedig a mintatartó üvegből származik.

A szelén kinyerése és tisztítása:

A 24-órás inkubálás után a mintát centrifugáltuk 4500 g-n, 10 °C-on 20 percig. A felülúszót leöntöttük, a sejttömeget háromszor mostuk 50 mM Tris-HCl 7,5 pH-jú pufferrel. A mosott sejttömeg szárazanyag tömege $1,3 \pm 0,3$ g. Ehhez a nedves mintához 500 μ l 0,5 mg/ml koncentrációjú lizozim enzimet adtunk, ami 10 mM Tris-HCl pH=8 pufferben feloldva. 12 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk.

A lizozimmal emésztett mintát inkubálás után centrifugáltuk 4500 g-n, 20 percig 10 °C-on, háromszor mostuk ionmentesített vízzel. Ezután 40 °C-on megszáritva szürke színű port kaptunk, melynek röntgendiffrakciós elemzése igazolta, hogy a szelén hexagonális, szürke módosulatát tartalmazza.

2. példa

Szürke szelén előállítás a vörös szelén köztiterméken keresztül

Tápközeg összeállítása és beoltása:

Tápközeg: MRS

A táplevest 121 °C-on 15 perc alatt sterilizáltuk, majd a tápleveshez 1000 mg/l-es oldatból nátrium-szelenitet adtunk, olyan mennyiségben, hogy az oldat szelénre nézve 20 mg/l koncentrációjú legyen, azaz 980 ml tápleveshez 20 ml 1000 mg/l-es nátrium-szelenit oldatot adtunk.

Beoltás:

Az így elkészített és keveréssel homogenizált oldatot beoltottuk 30 ml, aktivált *Lactobacillus acidophilus* NCAIM B 02085 törzssel. Az aktiváláshoz háromszor aktivált, eredetileg liofilizált formában levő, a Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből (BUDAPEST Somlói út 14-16 1118) származó törzset használtunk. Az aktiválás után az oldat abszorbanciája $1,5 \pm 0,1$ 650 nm-es hullámhosszon.

Fermentáció: 37 °C-on inkubálva 24 órán keresztül

A folyamat végére egy vörös színű szuszpenziót kaptunk. Az előállított szelengolyók mérete 200 ± 20 nm. A szuszpenzió 1000 ml-éhez 100 ml cc. HCl-ot adtunk és visszafolyóhűtő segítségével 30 percig forraltuk. A lehült elegy 100 ml-es részleteit centrifugáltuk 4500 g-n, 10 °C-on 20 percig. A felülúszót leöntve a sejttömeget háromszor mostuk ionmentesített vízzel. Ezután 40 °C-on megszáritva vörös színű port kaptunk, melynek röntgendiffrakciós elemzése igazolta, hogy a szelén vörös amorf módosulatát tartalmazza. A megszáritott mintát 1 órán át 105 °C-on tartva a vörös módosulat átalakult a szürke módosulattá.

3. példa

Monoklin vörös szelén előállítása

Tápközeg összeállítása és beoltása:

Tápközeg: M17 szelektív tápleves (Shankar, P. A. and Davies, F. L. (1977). A note on the suppression of *Lactobacillus bulgaricus* in media containing glycerophosphate and application of the media to selective isolation of *Streptococcus thermophilus* from yoghurt. J. Soc. Dairy Technol. 30 (1): 28.) *Streptococcus thermophilus*-hoz. 37 g por 1 liter vízben történő feloldásával a következő összetételt kaptuk:

Összetevők	g/l
Tripton	2,50
Húspepton	2,50
Szójapepton	5,00
Élesztőkivonat	2,50
Húskivonat	5,00
Nátrium-glicerofoszfát	19,0
Magnézium-szulfát (MgSO ₄)	0.25
Aszkorbinsav	0.50
pH 6.5	

A tápleveshez 121 °C-on 15 perc alatt sterilizáltuk.

A tápleveshez 1000 mg/l-es oldatból nátrium-szelenitet adtunk, olyan mennyiségben, hogy az oldat szelénre nézve 20 mg/l koncentrációjú legyen, azaz 980 ml tápleveshez 20 ml 1000 mg/l-es nátrium-szelenit oldatot adtunk.

Beoltás Az így elkészített és keveréssel homogenizált oldatot beoltottuk 30 ml, aktivált *Streptococcus thermophilus* törzssel. Az aktiváláshoz háromszor aktivált, eredetileg liofilizált formában hozzáférhető, a Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteményéből (BUDAPEST Somlói út 14-16 1118) származó törzset használtunk. Az aktiválás után az oldat abszorbanciája $1,5 \pm 0,1$ 650 nm-es hullámhosszon.

Fermentáció: 42 °C-on inkubálva 24 órán keresztül

A folyamat végére vörös színű szuszpenziót kaptunk.

A szuszpenzió 1000 ml-éhez 100 ml 1M-os NaOH oldatot adtunk és visszafolyó hűtő segítségével 30 percig forraltuk. A lehűlt elegy 100 ml-es részleteit centrifugáltuk 4500 g-n, 10°C-on 20 percig. A felülúszót leöntve a sejttömeget háromszor mostuk ionmentesített vízzel. Ezután 40 °C-on megszáritva vörös színű port kaptunk, melynek kristályformáját a röntgendiffrakciós elemzés igazolta. Az előállított szelégolyók mérete 100 nm, az elemi szelén vörös monoklin allotróp módosulata keletkezett.

Az 1-3 példa során előállított anyagok kristályformájuk különbözősége miatt látványosan eltérnek egymástól.

Az 5. képen a *Bifidobacterium bifidum* NCAIM B 02021, a *Lactobacillus acidophilus* NCAIM B 02085, a *Lactobacillus casei* NCAIM B 1147 és a *Streptococcus thermophilus* törzsek által előállított szelén nanogolyók oldatát mutatjuk be:

Az eltérő szín az eltérő allotróp módosulatra utal.

A szelén kinyerése és tisztítása:

A szelén tápközegből történő kinyerése független lehet az alkalmazott törzstől. A szelén nanogolyók por illetve szuszpenzió formában hozhatók forgalomba. Ehhez a fermentáció után kapott mintát 105 °C-on megszáritjuk, vagy a baktériumokat enzimes úton emésztjük, vagy kémiai (sósav vagy nátrium-hidroxid, illetve fizikai módszerrel (fagyasztás, szárítás vagy ozmózis) elpusztítjuk, hogy a sejtek tartalma hozzáférhető legyen. Ezután (pH állítás-t követő) vizes mosással, ülepítéssel és centrifugálással a fém szelén tisztán kinyerhető. Az 1M-os sósavval, majd ionmentesített vízzel mosott elemi szelén por vagy vizes szuszpenzió formájában tekinthető a technológia célszerű végtermékének. A vörös szelén golyók hőkezeléssel 75 °C felett, célszerűen a 100-200 °C-os tartományban 1-2 óra alatt a szürke módosulattá alakíthatók.



Szabadalmi igénypontok

1. Vörös és szürke elemi szelén 50-500 nm méretű nanogömbök, azzal jellemezve, hogy a nanogömbök méretének eloszlása az átlagos méret 5-20%-os szórásával jellemezhető.
2. Vörös és szürke elemi szelén 50-500 nm méretű nanogömbök, ahol a nanogömbök méretének eloszlása az átlagos méret 5-20%-os szórásával jellemezhető, azzal jellemezve, hogy mikrobiológiai eljárással készültek.
3. Eljárás 50-500 nm méretű elemi szelén nanogömbök előállítására, ahol a nanogömbök méretének eloszlása az átlagos méret 5-20%-os szórása, azzal jellemezve, hogy az eljárást *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* nemzetséghez tartozó mikroorganizmussal, vagy *Streptococcus thermophilus* mikroorganizmussal végezzük.
4. A 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a mikroorganizmus a *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum* fajokat tartalmazó csoportból van kiválasztva.
5. A 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy *Bifidobacterium*, nemzetséghez tartozó mikroorganizmussal 400-500 nm méretű nanogolyókat tartalmazó szürke szelént állítunk elő.
6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy *Bifidobacterium bifidum* vagy *Bifidobacterium longum* fajhoz tartozó mikroorganizmussal 400-500 nm méretű nanogolyókat tartalmazó szürke szelént állítunk elő.
7. A 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy *Lactobacillus* nemzetséghez tartozó mikroorganizmussal 100-300 nm méretű nanogolyókat tartalmazó vörös szelént állítunk elő.
8. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* fajhoz tartozó mikroorganizmussal 100-300 nm méretű nanogolyókat tartalmazó vörös szelént állítunk elő.

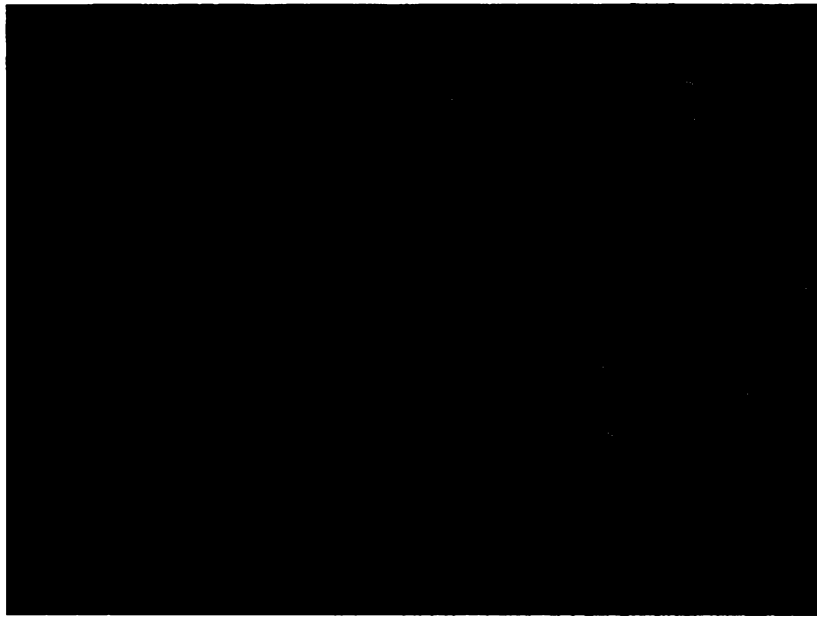
9. A 3. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy *Streptococcus thermophilus* fajhoz tartozó mikroorganizmussal 50-100 nm méretű nanogolyókat tartalmazó vörös szelént állítunk elő.
10. A 3.-9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az eljárást szén és/vagy nitrogénforrásokat, szervesetlen ionokat és szükség szerint más szerves anyagokat tartalmazó tápoldattal végezzük.
11. A 3-10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a tápoldat 5-100 mg/l-es koncentrációban szelént tartalmaz szelenit só formában.
12. A 3-10. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a tápoldat 5-100 mg/l-es koncentrációban szelént tartalmaz nátrium-szelenit formában.
13. A 3.-12. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a fermentáció ideje 4-24 óra.
14. A 3.-13. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a fermentációból a szelént a mikroorganizmusok enzimes úton való emésztésével nyerjük ki.
15. A 3.-13. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a fermentációból a szelént szerves vagy szervesetlen savas vagy lúgos kezeléssel nyerjük ki.
16. A 3.-13. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a fermentációból a szelént fizikai eljárással, előnyösen fagyasztással, szárítással, ozmózissal nyerjük ki.
17. A 14.-16. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kinyerést a kapott szuszpenzió vizes mosásával, ülepitésével vagy centrifugálással végezzük.
18. A 3.-17. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a keletkezett vörös szelént hőkezeléssel szürke módosulatú szeléné alakítjuk.



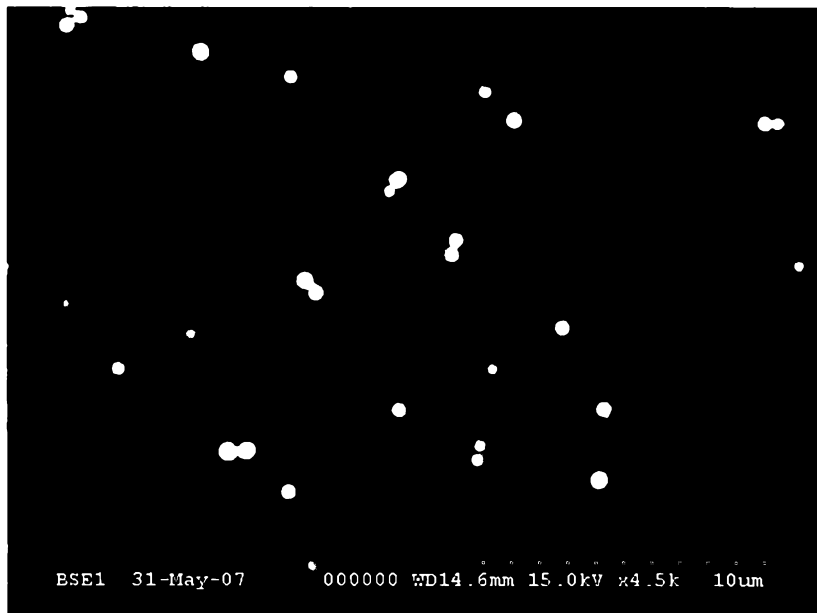
Dr. Aliment ©

Funkcionális Élelmiszerkutató- gyártó és Kereskedelmi Kft.
6000 Kecskemét, Ág u. 22.
Adószám: 13720928-2-03; HU 13720928
Cg.: 03-09-113525

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



1. ábra



2. ábra