

VALOINTENSITEETIN VAIKUTUS MIKROLEVÄLAJIEN,
EUGLENA GRACILIS JA *SELENASTRUM SP.*
KASVUUN JA KAROTENOIDIKOOSTUMUKSEEN

RONJA LAUSALA

HELSINGIN YLIOPISTO
BIO- JA YMPÄRISTÖTIETEELLINEN TIEDEKUNTA
YMPÄRISTÖMUUTOKSEN JA GLOBAALIN KESTÄVYYDEN MAISTERIOHJELMA
YMPÄRISTÖMUUTOS
PRO GRADU -TUTKIELMA
01.06.2021

Tiedekunta - Fakultet - Faculty Bio- ja ympäristötieteellinen tiedekunta		Koulutusohjelma - Utbildningsprogram - Degree Programme Ympäristömuutoksen ja globaalin kestävyuden maisteriohjelma	
Tekijä - Författare - Author Ronja Lausala			
Työn nimi - Arbetets titel - Title Valointensiteetin vaikutus mikrolevälajien, <i>Euglena gracilis</i> ja <i>Selenastrum sp.</i> kasvuun ja karotenoidikoostumukseen			
Oppiaine/Opintosuunta - Läroämne/Studieänriktning - Subject/Study track Ympäristömuutos			
Työn laji -Arbetets art - Level Pro Gradu -tutkielma		Aika - Datum - Month and Year 06/2021	Sivumäärä - Sido antal - Pages 30 + Liitteet
Tiivistelmä - Referat - Abstract <p>Tutkielman tarkoitus oli selvittää kolmen eri valointensiteetin vaikutuksia mikrolevälajien, <i>E. gracilis</i> ja <i>Selenastrum sp.</i>, kasvuun ja karotenoidituotantoon. Käytetyt valointensiteetit olivat 0 (pimeä), 200 ja 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Levät kasvatettiin kiertovesikalankasvattamon jätevedessä, minkä vuoksi työssä tarkasteltiin myös ravinnepoistumaa. Kasvatukset havaittiin tyypirajoitteisiksi, mikä osaltaan heikensi levien kasvua ja siten karotenoidituotantoa. Jätevesi kasvualustana aiheutti <i>E. gracilis</i> -levän kasvatukseen kontaminaation vieraslevällä. Karotenoidit eristettiin kasvatuskokeen päätyttyä uuttamalla paineistetulla nesteuutolla (Accelerated Solvent Extraction, ASE) etanolin ja 2-metyylitetrahydrofuraanin liuotinyhdistelmällä. Karotenoidien jatkoanalyysiin käytettiin erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (UHPLC, Ultra-High Performance Liquid Chromatography) yhdistettynä sähkösumutus-ionisaatioon ja massaspektrometriin. Tunnistettujen karotenoidien määriä analysoitiin niiden signaalivahvuuksiin ja käytettävissä olleisiin malliaineisiin perustuen. Valointensiteeteillä havaittiin olevan vaikutus levien kasvuun, kokonaiskarotenoidi- ja klorofyllipitoisuuksiin sekä astaksantiiniin, luteiiniin ja neoksantiiniin. Kyseiset erikseen tunnistetut pigmentit olivat kaikki ksantofyllejä, joilla on liialta valointensiteetiltä suojaava tehtävä leväsoluissa. Valointensiteetin sietokyky poikkesi kuitenkin levälajeilla eivätkä sen vaikutukset olleet yksiselitteisiä. Pimeässä levien kasvu ja ravinnepoistuma olivat heikkoja. Pigmenttien säilymisen puolesta pimeä osoittautui jopa voimakkainta valointensiteettiä paremmaksi vaihtoehdoksi. Molempien levien ravinteiden kulutus oli tehokasta. Valointensiteetin lisäksi kasvuun ja karotenoidituotantoon vaikutti muutkin tekijät, kuten kokeen aikana saavutettu kasvuvaihe, jatkuva valotus, kontaminoituminen, ravinnerajoitteisuus sekä käytettyjen malliaineiden laatu. Jatkotutkimuksissa tulisi pyrkiä minimoimaan tai poissulkemaan näiden tekijöiden vaikutukset.</p> <p>In this study three different light intensities were examined by their effects on microalgae species, <i>E. gracilis</i> and <i>Selenastrum sp.</i>, their growth and carotenoid production. Used light intensities were 0 (dark), 200 and 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Both algae were cultured in wastewater of recirculating aquaculture system, so their nutrient removal was also observed. Both expressed efficient nutrient uptake from the wastewater. The cultures turned out to be nitrogen limited which might have impacted on growth rates and carotenoid production. Wastewater as a substrate caused a contamination by alien alga species in <i>E. gracilis</i> cultures. Carotenoids were isolated after growth exam by ASE with solvent combination of ethanol and 2-methyltetrahydrofuran. Further analysis was made with UHPLC combined to ESI and MS. Identified carotenoids were astaxanthin, lutein and neoxanthin. Their amounts were examined based on signal strengths and standard carotenoids. Light intensity seemed to have an impact on growth, total carotenoid content, total chlorophyll content and separate carotenoids. Identified pigments were xanthophylls that have light protective role in alga cells. However, the tolerance of light intensity was species dependent and equivocal. In dark conditions, the growth and nutrient removal were weak. Concerning the pigment production and growth, dark conditions was partly even better option than the highest light intensity. In addition to light intensity, there were other factors that impacted on growth and carotenoid content like growth phase, continuous light exposure, contamination, nutrient restriction and quality of available standard carotenoids. Future studies should minimize the impacts of these factors.</p>			
Avainsanat - Nyckelord - Keywords Mikrolevät, <i>E. gracilis</i> , <i>Selenastrum sp.</i> , valointensiteetti, pigmentit, astaksantiini, neoksantiini, luteiini, ASE, UHPLC, jätevesi			
Ohjaajat - Handledare - Supervisors Elina Peltomaa, Velimatti Ollilainen			
Säilytyspaikka - Förvarinställe - Where deposited Ympäristömuutoksen ja globaalin kestävyuden maisteriohjelma			
Muita tietoja - Övriga uppgifter - Additional information			

Sisällysluettelo

1 JOHDANTO.....	1
1.1 Työn tausta ja tarkoitus.....	1
1.2 Fotosynteesittiset mikrolevät.....	2
1.2.1 Karotenoidit: astaksantiini, neoksantiini ja luteiini.....	2
1.2.2 Karotenoidien biosynteesi.....	4
1.3 Valointensiteetin vaikutus fotosynteesiin.....	4
1.4 Valointensiteetin vaikutus pigmentteihin.....	5
1.5 Mikroleväpigmenttien potentiaali.....	5
2 AINEISTO JA MENETELMÄT.....	6
2.1 Käytetyt mikrolevät.....	6
2.2 Kasvatuskoe.....	7
2.2.1 Esikasvatus.....	7
2.2.2 Koekasvatus.....	7
2.2.3 Kasvun seuranta ja kasvunopeus.....	8
2.2.4 Biomassan keruu.....	9
2.3 Ravinnemääritykset.....	9
2.4 C:N -suhde.....	10
2.5 ASE-uutto	10
2.6 Kokonaiskarotenoidit ja -klorofylli.....	11
2.7 Karotenoidien analytiikka.....	11
2.7.1 Sisäisen standardin ja standardiseoksen valmistus.....	11
2.7.2 Karotenoidianalyysit.....	12
2.8 Tilastolliset testit.....	13
3 TULOKSET.....	14
3.1 Kasvu.....	14
3.2 Ravinnepoistuma.....	16
3.3 C:N -suhde.....	18
3.4 Kokonaiskarotenoidit ja -klorofyllit.....	19
3.5 Tunnistetut karotenoidit.....	21
4 TULOSTEN TARKASTELU.....	22
4.1 Kasvu.....	22
4.2 Ravinnepoistuma.....	23
4.3 Pigmenttituotanto.....	24
5 JOHTOPÄÄTÖKSET.....	25
KIITOKSET.....	26
LÄHTEET.....	27
LIITTEET.....	31

1 JOHDANTO

1.1 Työn tausta ja tarkoitus

Mikrolevät ovat monimuotoinen joukko luonnossa esiintyviä organismeja, jotka ihminen on oivaltanut itseään hyödyttäväksi eliöiksi. Mikrolevien soveltuminen uusiutuvan energian lähteeksi, raaka-aineeksi rehuteollisuudelle sekä funktionaaliseksi elintarvikkeiksi on todettu mahdolliseksi lukuisissa tutkimuksissa. Levätutkimus on sittemmin keskittynyt levien tuottamiin, ihmisen terveyttä hyödyttäviin yhdisteisiin, kuten pigmentteihin (karotenoidit ja klorofyllit). Levien kasvattamista on harjoitettu ja tutkittu jo pitkään. Japanilainen yritys, Nihon Chlorella onnistui ensimmäisessä laajan mittakaavan Chlorella-suvun leväviljelmässä 1960-luvulla, mikä myös käynnisti levätuotteiden kaupallistamisen (Mata ym. 2010). Levien kasvatusta voidaan nykyisin kytkeä osaksi teollisuuden sivuvirtoja, jolloin tuotantoprosessi hyödyttää samalla ympäristön terveyttä ja on lähempänä kestävä kehityksen periaatteita. Tehokkaan ravinteiden kulutuksen ansiosta, mikrolevät soveltuvat esimerkiksi jätevesien biologiseen puhdistamiseen (Mata ym. 2010). Levien kasvuun ja niiden tuottamiin yhdisteisiin voidaan vaikuttaa levälajista riippuvaisten kasvuolosuhteiden kautta. Kasvuolosuhteita keinotekoisesti muokkaamalla levät on saatu tuottamaan haluttuja yhdisteitä enemmän kuin normaaliolosuhteissa. Esimerkiksi valon, sen määrän ja laadun, tiedetään vaikuttavan yhteyttävien leväsolujen pigmenttikoostumukseen (Del Campo ym. 2004, Carvalho ym. 2010, Takaichi, 2011). Kasvatuksessa käytettävän valointensiteetin voimakkuutta säätämällä on mahdollista saada levä tuottamaan haluttua karotenoidia enemmän kuin jotain toista (Kato ym. 2017).

Tämän tutkielman tarkoituksena oli selvittää kolmen eri valointensiteetin vaikutuksia mikrolevälajien, *Euglena gracilis* ja *Selenastrum sp.*, kasvuun ja karotenoidien tuottokykyyn. Tutkimushypoteesina oli, että levän kasvu ja karotenoidikoostumus poikkeavat eri valointensiteeteissä toisistaan. Tutkimus rajautui kolmeen karotenoidiin; astaksantiiniin, luteiiniin ja neoksantiiniin. Tutkimusasetelma kytkeytyi kiertotaloudelliseen tuotantoketjuun, jossa hyödynnettiin kiertovesikalankasvatustalon (Clewer Aquaculture Oy) jätevettä ja lietettä levien kasvualustana. Levien karotenoidituotannon lisäksi työssä selvitettiin kasvualustan ravinnepoistuma, kemiallinen hapen kulutus (COD, Chemical Oxygen Demand) sekä leväsolujen hiilen ja typen suhde (C:N:(P) - suhde). Näin leväbiomassan laadusta saatiin kokonaisvaltaisempi käsitys. Tutkielma tehtiin osana Levätehdas-hanketta (Algae Factory), jota rahoitti Business Finland. Siinä päätavoitteena oli kaupallistaa mikrolevien kasvatusta. Hankkeessa mikroleväbiomassaa kasvatettiin erilaisissa ravinnerikkaissa teollisuuden sivuvirroissa, kuten tässä tutkimuksessa, kalankasvatustalon jätevedessä. Tavoitteena oli tuottaa elintarvike- ja kosmetiikkakäyttöön erilaisia arvokkaita bioaktiivisia yhdisteitä, kuten omega-3-rasvahappoja ja pigmenttejä. Pigmentit toimivat antioksidanteina sekä väriaineina kosmetiikkatuotteissa, funktionaalisten elintarvikkeiden ainesosina, lisäravinteina sekä farmaseuttisina tuotteina.

1.2 Fotosynteettiset mikrolevät

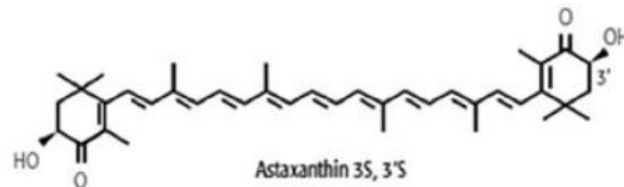
Fotosynteettiset eli yhteyttävät mikrolevät ovat esi- tai aitotumallisia mikro-organismeja, joita elää yksi- ja monisoluisina makeissa sekä suolaisissa vesissä (Takaichi, 2011). Ne kasvavat pääasiassa erilaisissa akvaattisissa ympäristöissä auto-, hetero- tai miksotrofisen ravinnonhankintastrategian avulla. Yhteyttääkseen levä tarvitsee valoa, vettä ja hiilidioksidia, joista se tuottaa itselleen hiilihydraatteja ja lisäksi happea ja vettä. Mikrolevät tuottavat luonnostaan monia ihmisille hyödyllisiä yhdisteitä, kuten lipidejä biopolttoaineisiin sekä β -1,3-glukaanina, α -tokoferolia (E-vitamiini) ja pigmenttejä terveysvaikutteisten elintarvikkeiden raaka-aineiksi, väriaineiksi tai rehujen lisäaineiksi. Lisäksi mikroleviä voidaan hyödyntää jätevesien biologisessa puhdistamisessa, koska ne käyttävät tehokkaasti kasvussaan hyödykseen typpeä ja fosforia ja kykenevät varastoimaan niitä myöhäisempää käyttöä varten (Mata ym. 2010, Shriwastav ja Purnendu, 2015). Fotosynteesin reaktiot tapahtuvat leväsolun kloroplastissa eli viherhiukkasessa, kuten kasveilla. Pigmentit eli karotenoidit ja klorofyllit, mahdollistavat levien fotosynteesin. Yhdessä muiden yhdisteiden kanssa ne muodostavat fotosysteemin (PSI ja PSII) (Wang ym. 2003, Chrisaki ym. 2012). Karotenoidien tehtävänä fotosynteesissä on laajentaa absorboitavissa olevan valon aallonpituusalueita ja sitoa peptidejä viherhiukkasen tylakoidi-kalvostoon pigmenttiproteiinikompleksiksi ts. valonkeruukompleksiin (LHC, Light Harvesting Complex) (Kopec ym. 2012).

1.2.1 Karotenoidit: astaksantiini, neoksantiini ja luteiini

Karotenoideja on löydetty luonnon organismeista yli 750 erilaista ja niiden tyypillinen pitoisuus leväsoluissa on 1-2 g/kg kuivapainosta (Takaichi, 2011). Ne koostuvat 40 hiilen mittaisista tyydyttymättömistä hiilivetyketjuista, ja jaetaan happea hiiliketjussaan sisältäviin ksantofylleihin ja happea sisältämättömiin karoteeneihin. Ksantofyllit ovat lipofiilisiä ja sisältävät hydroksyyliiryhmiä. (Chrisaki ym. 2012, Kopec ym. 2012.) Karotenoideja luokitellaan myös sen mukaan, onko kyseessä A-vitamiinin esiaste (mm. β -karoteeni tai β -kryptoksantiini) vai ei (luteiini ja lykopeeni) (Saini ja Keum, 2018). Ksantofyllit suojaavat fotosysteemiä liialta valoenergialta antioksidanttisten ominaisuuksiensa avulla. Ne taas voidaan edelleen jaotella α - ja β -karoteeni johdannaisiin. (Wang ym. 2003; Giossi ym. 2020.) Karotenoidien kaksoissidokset ovat konjugoituneita ja siten herkkiä reagoimaan näkyvän valon ja UV-valon vaikutuksesta hapellisissa olosuhteissa. Myös happamuus vaikuttaa muuntumisherkyyteen primäärisistä sekundaarisiksi karotenoideiksi (Kopec ym. 2012.) Muuntumisherkkyden vuoksi karotenoidien eristäminen leväsoluista on haastavaa.

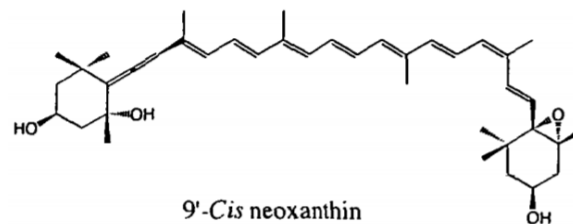
Astaksantiini (3,3'-dihydroksi- β,β -karoteeni-4,4'-dioni) on yksi tunnetuimmista mikrolevien ketokarotenoideista, ja se kuuluu ksantofylleihin. Sitä käytetään punaisena väriaineena mm. kalaviljelyn rehussa (Wang ym. 2003, Del Campo ym. 2004). Esimerkiksi ihmisen elimistössä astaksantiini läpäisee veri-aivoesteen ja siten vaikuttaa silmiin ja aivoihin (Milani ym. 2017.) Leväsolussa astaksantiini suojaa fotosynteesikoneistoa liialliselta valolta vaikuttaen LHC:n reaktiokeskuksen toiseen elektroninsiirtoketjuun (LHCII) (Kobayashi ym. 1997a; Wang ym. 2003). Levistä löydetty D1-proteiini ja sen määrä ovat tärkeässä roolissa fotosynteesiin sekä karotenoideihin liittyen. Proteiini on herkkä hajoamaan liikavalon vaikutuksesta, jolloin fotosynteesin tehokkuus kärsii (Wang ym. 2003). Astaksantiinin on havaittu ehkäisevän *Haematococcus pluvialis* -viherlevällä tämän proteiinin hajoaminen ja sen myötä fotosynteesikyky on säilynyt (Wang ym.

2003). Reaktiomekanisminsa puolesta astaksantiinia onkin pidetty luteiinia, zeaksantiinia ja β -karoteenia tehokkaampana valolta suojaavana yhdisteenä (Brotosudarmo ym. 2020). Lisäksi sen on havaittu kertyvän leväsoluihin täysin pimeissä kasvuolosuhteissa, joissa osatekijänä on ollut suolalle altistaminen (Kobayashi ym. 1997b). Myös voimakkaan valointensiteetin on havaittu kerryttävän sitä leväsoluihin (Takaichi, 2011).



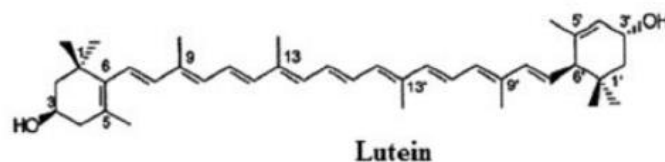
Kuva 1a. Astaksantiinin rakenne (Milani ym. 2017).

Neoksantiini on myös ksantofylleihin kuuluva karotenoidi, joka syntetisoi β -karoteenista. Levien neoksantiinista on löydetty kahta eri isomeerimuotoa; 9'-cis-neoksantiinia ja all-*trans*-neoksantiinia, joista ensimmäinen on havaittu viherlevillä (klorofylli *a*:ta ja *b*:tä sisältävät levät) pääasialliseksi ksantofylliksi (Takaichi ja Mirauro, 1998, Giossi ym. 2020). Se on myös yksi *E.gracilis* -levän yleisimmistä karotenoideista (Tamaki ym. 2019). Levillä 9'-cis-neoksantiinia on kloroplastin LHCII:ssa, mikä kertoo sen valolta suojaavasta roolista. Neoksantiini vaikuttaa olevan lopputuote omassa syntetisointi ketjussaan, eli siitä ei syntetisoida muita karotenoideja (Takaichi ja Mirauro, 1998.).



Kuva 1b. Neoksantiinin rakenne (Takaichi ja Mirauro, 1998).

Luteiini kuuluu myös ksantofylleihin ja sitä esiintyy yleensä yhdessä sen rakenneisomeerin, zeaksantiinin kanssa (Zhao ja Sweet, 2008). Leväsoluissa luteiini on osa valonkeräyskompleksia välittäen valoenergian klorofylli *a*:lle (Neale ym. 2013, Giossi ym. 2020). Luteiinia ja zeaksantiinia on ihmisen silmän keltatäplän pigmenttinä, ja ne muodostavat silmän sisäisen suojan UV-säteilyä vastaan (Zhao ja Sweet, 2008). Molemmat karotenoidit on yhdistetty silmänpohjan ikärappeuman ennaltaehkäisyyn. Niiden pitoisuudet on tutkimuksissa havaittu ikärappeumaa sairastavilla merkittävästi matalammiksi kuin terveillä (Zhao ja Sweet, 2008; Fernández-sevilla ym. 2010). Ruokavalion korkea luteiini- (ja zeaksantiini-) pitoisuus on yhdistetty myös ihosyövän ennaltaehkäisyyn (Milani ym. 2017).



Kuva 1c. Luteiinin rakenne (Milani ym. 2017).

1.2.2 Karotenoidien biosynteesi

Karotenoidien biosynteesiä (karotenogeneesi) mikroleväsoluissa ei vielä täysin tunneta, mutta synteesiin osallistuvia entsyymejä ja geenejä on pystytty tunnistamaan joiltain levälajeilta. Karotenoideihin kuuluvien ksantofyllien biosynteesi kulkee viisiportaisen ketjun kautta. Ensimmäinen vaihe on aktiivisen isopreenin muodostus. Tätä seuraa fytoeni -karotenoidin synteesi, jota katalysoi fytoeenisyntaasi. Sen jälkeen muodostuu lykopeeni, jonka loppupäästä syntyvät syklist karoteenit (α - ja β -karoteeni). Lopuksi molekulaarisen hapen reaktioissa syntetisoidaan muita ksantofyllejä (Giossi ym. 2020.). Suurin osa syntetisoiduista karotenoideista sitoutuu pigmenttiproteiinkompleksiin, kuten reaktiokeskukseen, valonkeräyskompleksiin (LHC) ja sytokromi-b6f -kompleksiin (Takaihci, 2011). Leväkarotenoidien kemiallinen rakenne viittaa biosynteesien kerrostuneisuuteen eli primäärisistä karotenoideista tuotetaan sekundaarisia. Vallitsevat kasvuolosuhteet ja lajityypilliset tekijät vaikuttavat pigmenttien syntetisoitumiseen. Esimerkiksi voimakkaassa valossa tai ravinnepuutteessa levien on todettu priorisoivan ketokarotenoidien tuotantoon, kuten jo mainittuun astaksantiiniin (Del Campo ym. 2004; Takaichi, 2011). Kasvuolosuhteet vaikuttavat mikrolevien vasteisiin ratkaisevasti, minkä vuoksi eri levälajien ja jopa eri kantojen vertailua keskenään on kuitenkin kritisoitu (Neale ym. 2013).

1.3 Valointensiteetin vaikutus fotosynteesiin

Valo ja sen ominaisuudet ovat olennaisia tekijöitä mikrolevien fotosynteesissä. Fotosynteettisesti aktiivinen säteily eli säteily, jota levä kykenee hyödyntämään yhteyttämisessä, sijoittuu 400-700 nanometrin aallonpituusalueelle. Alue tosin vaihtelee lajikohtaisesti (Martín ja Grossmann, 2014). Valon määrä luonnossa ei ole vakio, joten organismien on täytynyt kehittyä selviytyäkseen vallitsevissa valo-olosuhteissa, liian korkeassa tai matalassakin valointensiteetissä. Myös muut valon ominaisuudet, kuten aallonpituus ja valoisan ajan kesto, vaikuttavat (Carvalho ym. 2010). Mikrolevien kasvuun tyypillisesti vaadittu valointensiteetti on $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, mutta ajoittain käytettynä tätä voimakkaamman valon on todettu tehostavan fotosynteesiä (Cheirsilp ja Torpee, 2012). Esimerkiksi Shriwastav ja Purnendu (2015) havaitsivat kestävimmäksi leväviljelmäksi sellaisen, joka kasvoi $246 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ valointensiteetissä 12 tunnin valo/pimeä -syklissä. Valon voimakkuuden sietokyky on siis levälajista riippuvainen ominaisuus, johon liittyy kaksi ilmiötä, fotoakklimaatio ja -inhibitio. Fotoakklimaatio eli vallitsevaan säteilyvoimakkuuteen sopeutuminen on usein seurausta valonkeräyskompleksin, LHC:n, biokemiallisesta tai fysiologisesta muutoksesta. Osalla levistä on kehittynyt geneettinen sopeuma eli fotoadaptaatio joko korkeaan tai matalaan intensiteettiin. Matalassa valointensiteetissä levä minimoii solujensa energiankulutuksen ja maksimoi LHC:n rakenteen koon, kun taas korkeassa sen koko on pienempi (Neale, 2013). Fotoinhibitio on ilmiö, jossa fotosynteesi heikentyy valoenergian liiallisen määrän ts. levälle liian korkean säteilyvoimakkuuden vuoksi. Levä ei kykene muuntamaan valon tuottamaa liika energiaa lämmöksi tai fluoresenssiksi, jolloin vaikutukset alkavat näkyä fotosysteemin rakenteissa. Voimakas säteily tuottaa soluihin happiradikaaleja, jotka vaikuttavat tyypillisesti LHC:n toisessa elektroninsiirtäjäketjussa (Wang ym. 2003; Neale, 2013). Valosta voi tulla fotosynteesiä ja siten kasvua rajoittava tekijä myös silloin, kun valo ei enää läpäise tiheäksi kasvanutta leväviljelmää. Muita levien kasvua rajoittavia tekijöitä ovat ravinteet, lämpötila, happamuus (pH), happi, hiilidioksidi, suolaisuus sekä myrkylliset kemikaalit, patogeenit ja levälajien välinen kilpailu (Mata ym. 2010).

Liebigin ”law of the minimum” -periaatteen mukaisesti kasvua rajoittaa se tekijä, jolla on siihen suurin negatiivinen vaikutus (Shriwastav ja Purnendu, 2015).

1.4 Valointensiteetin vaikutus pigmentteihin

Karotenoidien yksi tärkeimmistä tehtävistä on suojata levien fotosynteesiä liialta valointensiteetiltä. Kuitenkin pitkäaikainen altistus foto-oksidatiiviselle stressille aiheuttaa fotoinhibitiota, jolloin suojaavat pigmentit ja klorofylli voivat hajota (Han ym. 2000; Powles 1984). Karotenoidien tyypillisiä mekanismeja torjua happiradikaalien negatiivisia vaikutuksia fotosynteesikoneistolle ovat elektronin siirto ($CAR^{\cdot} + ROO^{\cdot} \rightarrow CAR^{\cdot+} + ROO^{\cdot-}$), vetyatomien siirto ($CAR + ROO^{\cdot} \rightarrow CAR^{\cdot} + ROOH$) ja additioreaktiot ($CAR + ROO^{\cdot} \rightarrow ROO - CAR^{\cdot}$) (Milani ym. 2017). Korkeassa valointensiteetissä esimerkiksi astaksantiinia kertyy tuman ympärille ikään kuin suojaamaan jakautuvaa DNA:ta vaurioilta (Wang ym. 2003, Takaichi, 2011). Astaksantiini reagoi superoksidianioneista ($O_2^{\cdot-}$) peräisin olevien aktiivisten happiradikaalien kanssa (Kobayashi ym. 1997a), mikä on osa ksantofyllisyklin reaktioita ja toteutuu myös muilla ksantofylleillä (Giossi ym. 2020). Suojausmekanismien tunnistamisen myötä levät on mahdollista saada kerryttämään karotenoideja manipuloimalla valointensiteettiä. Kato ym. (2017) havaitsi, *E.gracilis* -levän kokonaiskarotenoidipitoisuuden kasvavan korkean valointensiteetin altistuksessa. Korkean valointensiteetin vaikutuksista on saatu kuitenkin ristiriitaisia tuloksia levätutkimuksissa, mikä todennäköisesti johtuu levälajien eroavaisuuksista ja vaihtelevista kasvatusolosuhteista. Esimerkiksi neoksantiinin on havaittu kertyvän soluun korkeassa ($1000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) valointensiteetissä Bryopsidales -lahkon viherlevällä (Giossi ym. 2020), kun taas Kato ym. (2017) havaitsi neoksantiinin määrän vähenevän *E.gracilis* -levällä jo yli $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ valointensiteetissä. Toinen fotosynteesille välttämätön pigmentti on vihreää väriä tuottava klorofylli. Shriwastav ja Purnendu (2015) havaitsivat, että jatkuvassa korkean ($347 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) valointensiteetin altistuksessa viherlevien (*Chlamydomonas reinhardtii* ja *Chlorella vulgaris*) kasvu hidastui ja lisäksi klorofylli *a*:n pitoisuus putosi rajusti ($<5 \text{ mg/g}$ levää). Myös matalampi, jatkuva valotus sai klorofyllipitoisuuden vähentymään, mikä viittaisi siihen, että jo pelkästään jatkuva valotus on leville haitallista fotosynteesin ja klorofyllin näkökulmasta.

1.5 Mikroleväpigmenttien potentiaali

Mikrolevät soveltuvat bioteknologiaan tarkoituksiin ja niitä voidaan kasvattaa suljetuissa tai avoimissa kasvatusjärjestelmissä. Suomen vaihtelevissa sääolosuhteissa hyvin kontrolloitava, suljettu fotobioreaktori on parhaaksi katsottu kasvatusmuoto (Ojanen ym. 2017). Levät tarjoavat varteenotettavan vaihtoehdon karotenoidien kaupalliseen tuotantoon, sillä niiden kasvatus on nopeaa, melko helppoa ja voidaan toteuttaa ekologisesti. Leväviljelmä kuluttaa hiilidioksidia ja on uudelleen hyödynnettävissä kasvatuksen jälkeen. Teollisuuden sivuvirtojen yhdistäminen tuotantoketjuun on myös mahdollista. Biomassan saanto on suuri suhteessa vastaavia metaboliatuotteita tuottaviin kasveihin ja niiden vaatimaan kasvatusalaan. Esimerkiksi kehäkukasta (*Calendula*) eristettyä luteiinia käytetään EU:ssa ravintolisänä ja rehuteollisuudessa. Mikrolevistä saatavan luteiinin määrä suhteutettuna kehäkukan vaatimaan kasvatusalaan olisi laskennallisesti satakertainen (Fernández-sevilla ym. 2010). Euglena CO. Oy ja Algaeon Oy ovat yrityksiä, jotka jo tuottavat *E.gracilis* -levästä hyödykkeitä (esimerkiksi paramylon) elintarvike- ja rehuteollisuudelle (Wang ym. 2018). Suomessa

käytettävät karotenoidivalmisteet ovat elintarvikevärejä. Ruokavirasto on listannut päivittäiset enimmäissaantisuositukset seuraaville karotenoideille: β -karoteeni, β -apo-8-karotenaali (E160e), lykopeeni (E160d) ja luteiini (E161b). Muissa maissa näiden lisäksi on listattu astaksantiini sekä pienemmissä määrin zeaksantiini, joita myös käytetään elintarvikeväreinä (Spolaore ym. 2006). Käyttöä on myös lisäravinteena kasvien vesiviljelyssä (Solovchenko ym. 2013). Elintarvikeväreinä luonnollisten karotenoidien ero keinotekoisiiin on se, että keinotekoiset ovat pysyvämpiä ja kirkkaampia eikä niitä löydä luonnosta. Keinotekoisien elintarvikevärien epäillään kuitenkin vaikuttavan lasten yleistyneeseen ADHD -käytöshäiriöön (Amchova ym. 2015.), minkä vuoksi on perusteltua etsiä luonnollisempia vaihtoehtoja niille.

Karotenoidien hyöty ihmiselimistölle välittyy niiden antioksidanttiominaisuuksien kautta. Ihminen ei itse näitä yhdisteitä kykene tuottamaan, jolloin ne on saatava ravinnosta. Ruokavaliosta, lähinnä kasvikkunnantuotteista, yleisimmin saatavia karotenoideja ovat α - ja β -karoteeni, β -kryptoksantiini, luteiiniin ja zeaksantiini sekä lykopeeni (Mayne ym. 1996). Ei voida kuitenkaan poissulkea, etteikö muilla karotenoideilla olisi samoja vaikutuksia. Yleisesti karotenoidit suojaavat soluja vapaiden happiradikaalien aiheuttamilta soluvaurioilta, joita mm. auringon UV-säteily, tupakan savu, jotkin lääkkeet ja alkoholi saavat ihmiselimistössä aikaan (Del Campo ym. 2004, Tamaki ym. 2019). Antioksidanteina ne lisäävät immuunipuolustusta ja vähentävät joidenkin sairauksien riskiä, tulehduksia ja ehkäisevät pahanlaatuista kasvainmuodostusta (Mayne ym. 1996, Galasso ym. 2017; Milani ym. 2017; Chrisaki ym. 2012.) A-vitamiinin esiasteena toimivien karotenoidien on havaittu vaikuttavan ihmisen ihon, limakalvojen ja silmien hyvinvointiin (Galasso ym. 2017, Milani ym. 2017). Esimerkiksi luteiini ja zeaksantiini vähensivät riskiä sairastua silmänpohjan ikärappeumaan (Zhao ja Sweet, 2008). Lisäksi luteiinin on havaittu myötävaikuttavan parantumiseen varhaisen vaiheen valtimonkovettumataudista (Del Campo ym. 2004).

2 AINEISTO JA MENETELMÄT

2.1 Käytetyt mikrolevät

Tutkielmassa käytettävä silmäleviin (Euglenophyta) kuuluva, yksisoluinen ja uintisiimallinen *Euglena gracilis* on metaboliaaltaan monipuolinen ja keinotekoisesti muokattavissa. Esimerkiksi sen solujen kasvu ei riipu kloroplastin toiminnasta toisin kuin monilla muilla lajeilla (Krajčovič ym. 2014). Solukooltaan se on 50 μm pitkä ja halkaisijaltaan 10 μm (Barsanti ja Gualtieri, 2020). *E. gracilis* sietää myös hyvin ympäristön stressitekijöitä, kuten happamuutta. Siksi sen on todettu soveltuvan moniin bioteknologiaan sovelluksiin, kuten jätevedenpuhdistukseen, biopolttoainetuotantoon sekä raaka-ainelähteeksi monityydyttymättömille rasvahapoille, biotiinille, E-vitamiinille ja tyrosiinille (O'Neill ym. 2015; Krajčovič ym. 2014). Levän tunnettuja karotenoideja ovat β -karoteeni, diadinoksantiini, diatoksantiini ja neoksantiini (Tamaki ym. 2019). Eksponentiaalisen kasvuvaiheen aikana sen on havaittu pääasiassa tuottavan klorofylli *a*:ta ja *b*:tä ja stationäärivaiheessa neoksantiinia, violaksantiinia ja fukoksantolia (Tolivia ym. 2013). Todisteita luteiinin tai astaksantiinin tuotolle ei ole (Krinsky & Goldsmith, 1960). Tässä työssä *E. gracilis* -

kasvatukseen käytettiin kantaa CCAP 1224/5Z. Kanta eristettiin 1950-luvulla ja on siten jo pitkään tutkittu.

Toinen tutkielmassa käytettävä levälaji, *Selenastrum sp.* (NIVA CCA K-1877), kuuluu aitoviherlevien (Chlorophyceae) luokkaan ja on metaboliaaltaan lähellä *Chlorella*-sukua. Sen on eristänyt vuonna 2008 Elina Peltomaa Iso-Ruuhijärveltä Suomesta (N 61.224227, E 25.067328). *Selenastrum sp.* -levän solukoko on pituudelta noin 20–25 µm ja halkaisijaltaan 2,5 µm (Tossavainen ym. 2017). Aikaisempaa tutkimusmateriaalia levälajista ei juuri ole, joten vertailuna on käytettävää sille läheisimpiä, *Chlorella*-suvun leviä. Esimerkiksi *C. zofingiensis* -lajin tunnetaan kerryttävän fotoautotrofisesti kasvatettuna primäärisenä karotenoidina luteiinia ja sekundaarisenä astaksantiinia (Del Campo ym. 2004), joita voitaisiin pitää mahdollisina löydöksinä myös *Selenastrum* -levällä.

2.2 Kasvatuskoe

2.2.1 Esikasvatus

Molempia levälajeja esikasvatettiin EG-kasvualustassa (liite) ennen varsinaista koetta. Kasvatusvälineistö ja kasvatusolosuhteet poikkesivat varsinaisesta kokeesta vain valointensiteetiltään, joka asetettiin valokaapeissa esikasvatuksille noin keskimääräisen koekasvatuksen (50%) tasolle. Esikasvatuksessa ei käytetty valo-pimeä -sykliä, vaan jatkuvaa valotusta. EG-liuokset sekä kasvatusvälineistö sterilisoitiin autoklavoimalla (121 °C, 51 min) mahdollisten epäpuhtauksien poistamiseksi, kuten myös varsinaisessa kokeessa käytetty välineistö. Laboratoriossa ylläpidettyä, puhdasviljelmistä peräisin olevaa levää siirrostettiin 10% nestetilavuudesta lasisiin viiden litran esikasvatuspulloihin. Levien siirrostukset tehtiin laminaari-ilmavirtauskaapissa ja muuten työvaiheet toteutettiin vetokaapissa. Kasvatus lämpötilat optimoitiin levälajikohtaisiksi, *E. gracilis* 24°C, *Selenastrum* 17°C. *E. gracilis* esikasvatus kesti 7 ja *Selenastrumin* neljä vuorokautta. Esikasvatuksen kesto perustui mikroskopoinnilla tehtyyn silmämääräiseen levätiheyden havainnointiin.

2.2.2 Koekasvatus

Varsinaiseen koekasvatukseen käytettiin kasvualustana kiertovesikalankasvattamon (Clewer Aquaculture Oy) jätevetä ja kasvattamon vedenpuhdistusjärjestelmässä laskeutettua kiintoainetta eli lietettä. Lietettä lisättiin kasvatukseen 7,7%. Kasvualustan vaihto tehtiin poistamalla ensin EG-kasvatusliuos (ks. LIITTEET) esikasvatuksista sentrifugoimalla (Heraeus Multifuge 1S-R, Kendro Laboratory Products, Osterode, Germany) 2600 rpm, 15 minuuttia ja yhdistämällä saman kannan levät ennen koekasvatukseen jakamista ja alkunäytteiden ottamista varten. Kasvatus tehtiin kahden litran lasipulloissa valo- ja lämpötila kontrolloiduissa valokaapeissa. Valokasvatusnäytteet kasvatettiin Friocell-kaapeissa ja pimeänäytteet Sanyo-kaapissa. Valon lähteenä oli valkoiset LED valopaneelit, joiden valon spektri oli 400-700 nanometriä (nm) eli näkyvän valon alue (*FRIOCELL EVO*, 05/2020, EN/PR). Mitatut spektrin huiput olivat 420-480 nm sinisen valon alueelta ja 580-680 nm punaisen. Kasvatukset altistettiin ensimmäisen vuorokauden ajan 200 µmol m⁻²s⁻¹

valointensiteetille vastaten kokeen 50% valointensiteettiä. Valointensiteetit asetettiin tämän jälkeen varsinaisen koeasetelman tasoille (Taulukko 1). Valo-pimeä -sykliä ei käytetty myöskään koekasvatuksessa. Voimakkain valointensiteettiä (100%) vastasi $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ja keskivoimakas (50%) $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ja pimeäkasvatusta (0%) $0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Intensiteetit mitattiin LI-COR 190R -sensorilla yhdistettynä LI-1400- tiedonkeruuyksikköön (Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA) vakio etäisyydeltä kasvatuspulloihin ja valonlähteeseen nähden. Koeasetelman kolmessa eri valo-olosuhteessa oli neljä biologista toistoa eli neljä kasvatuspulloa per valokaappi. Täten molempien levälajien esikasvatuksista (E.Esi ja S.Esi) tehtiin 12 koekasvatusta. Kasvatuspulloihin kiinnitettiin 2 ml lasipipetit, ilmastus-, näyttenotto- ja poistoilmaletku sekä suodattimet ilmakontaminaation ehkäisemiseksi. Pulloihin syötettiin jatkuvasti hiilidioksidin ja ilman seosta (2% CO₂) nopeudella 0,5 l/min kosteutuspullon kautta. Kasvatuskokeen eri levälajit kasvatettiin peräkkäisinä erinä, koska lajien rinnakkainen tarkastelu ei ollut pääasiallinen työntarkoitus. Kasvatuskokeen kesto määräytyi eksponentiaalisen kasvuvaiheen hidastumisen ja valorajoitteisuuden alkamisen perusteella. Nämä poikkesivat levälajeilla toisistaan. *E.gracilis* -kasvatus kesti 20 ja *Selenastrum* -kasvatus 14 vuorokautta.

Taulukko 1. Koeasetelma ja valointensiteetit

Valointensiteetti	Kasvatus 1.	Lyhenne	Toistot	Kasvatus 2.	Lyhenne	Toistot
$200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	Esikasvatus	E.Esi	1	Esikasvatus	S.Esi	1
$400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	<i>E.gracilis</i> 100%	E100	4	<i>Selenastrum sp.</i> 100%	S100	4
$200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	<i>E.gracilis</i> 50%	E50	4	<i>Selenastrum sp.</i> 50%	S50	4
$\sim 0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$	<i>E.gracilis</i> 0%	E0	4	<i>Selenastrum sp.</i> 0%	S0	4

2.2.3 Kasvun seuranta ja kasvunopeus

Kokeessa optinen tiheys (OD, optical density) ja biomassan kuivapaino (DW, Dry weight) toimivat yhdessä kasvun seurannan mittareina. Lisäksi kokeen alussa ja lopussa otettiin solunäytteet solumäärän laskemiseksi. Optista tiheyttä mitattiin UV2401PC-spektrofotometrillä aallonpituuksilla 550 ja 650 nm VIS-kertakäyttökyveteillä. Kuivapainomääritykset tehtiin suodattamalla näytettä 10 ml esikuivatuille ja punnituille suodattimille (GF/C, $\phi 47$ mm Whatman) alipainepumpun avustuksella. Suodattimia kuivattiin uunissa 16 tuntia (105°C) ennen punnitusta.

Solumäärien laskentaa varten näytteitä kerättiin aseptisesti 1 ml Eppendorf –putkiin vuorokauden kuluttua kasvatuskokeen alkamisesta sekä kokeen päättyessä. Näytteet säilöttiin kylmäkaapissa lisäämällä niihin 20 μl hapanta Lugolin liuosta. Näytteiden solumäärät laskettiin tutkimusmikroskoopilla (20 x suurennos, Leica, DM 1000, Saksa) Lundin kammiolla (Lund, 1959) käyttämällä 20 näkökentän satunnaistaktiikkaa. Solumäärien tihentyessä osaa näytteistä laimennettiin ennen solulaskentaa. Solusaanto (solua/ml) laskettiin seuraavasti:

$$\text{Solutiheys (ml}^{-1}\text{)} = ((Ns \times Ak)/Nnk) / \frac{Vk}{\pi r^2}$$

jossa

Ns= laskettu solumäärä
Ak= kammion pinta-ala (mm²)
Nnk= näkökenttien lukumäärä
Vk= kammion tilavuus
r= näkökentän säde

Mikrolevien kasvunopeudet laskettiin niiden maksimaalisen kasvunopeuden sekä koko kokeen osalta biomassaan perustuen. *E.gracilis* -kasvatuksista maksimaalinen kasvunopeus laskettiin kahden pisteen tarkkuudella ja *Selenastrum sp.* -kasvatuksista kolmen. Lisäksi laskettiin solumäärään (solua/ml) perustuva kasvunopeus, jonka laskenta toteutettiin seuraavasti:

$$Nt = NO \times 1 + r^t$$

jossa

Nt: Määrä ajan hetkellä t
NO: Määrä ajan hetkellä 0
r: Kasvuaste
t: Kulunut aika (d)

2.2.4 Biomassan keruu

Kokeen päätyttyä kasvatuspullojen sisältö tyhjennettiin etanolilla desinfioituihin muovipulloihin, ja sentrifugoitiin (2600 rpm, 15 min, 20°C, 1413 x g) pimennetyssä laboratorioissa. Saanto (Taulukko 3) kerättiin 50 ml Falcon-putkiin, jotka peitettiin foliolla ja säilöttiin jatkotutkimuksia ja kylmäkuivausta varten piihappogeeliä sisältävään ilmatiiviiseen ja kosteutta estävään eksikaattoriin. Karotenoidien hajoaminen valossa pyrittiin estämään pitämällä näytteet valolta suojassa koko käsittelyn ajan ja sen jälkeen. Kerätty leväbiomassa kylmäkuivattiin (Christ Loc 1m, B.Braun Biotech International, Alpha 1-4).

2.3 Ravinnemääritykset

Kokeessa analysoitiin kasvualustan ravinnepoistuma mittaamalla sen ravinteet, COD, happamuus ja lämpötila ennen kasvatusta kasvualustasta ja kokeen päätyttyä leväkasvatuksista. Ravinteet määritettiin ammoniumtyypen (NH₄-N), kokonaistypen (tot-N), fosfaattifosforin (PO₄-P) ja kokonaisfosforin (tot-P). Lisäksi mitattiin kemiallinen hapen kulutus (COD), pH ja lämpötila (T). Tuloksista laskettiin jäteveden ravinnepoistuma (%). Menetelmänä oli Hach Lange -ravinnemäärityskitit (Hach Lange, Düsseldorf, Germany) ja DR2800 spektrofotometri yhdistettynä kuumennus alustaan (Hach HT 200S Hight Temperature thermostat).

2.4 C:N -suhde

Hiili- ja typpipitoisuudet määritettiin Leco CNS-2000-analyysaattorilla (Leco Corporation, St Joseph, MI, USA) kylmäkuivatusta leväbiomassasta. Analyysillä selvitettiin levien C:N -suhde ja mahdollinen ravinnerajoitteisuus. Lisäksi kasvualustan lietenäyte analysoitiin vastaavasti ensin sentrifugoimalla näytettä (4000 rpm, 20 °C, 10 min). Jäljelle jäänyt kiintoaine kuivatettiin yön yli uunissa 50 °C ennen analyysia. Kontrolliaineena oli riisijauho (liite). Kylmäkuivatua biomassaa punnittiin ~ 0,05 g punnitusaluksi, jotka asetettiin analyysaattoriin. Konversiotekijäksi, muuntamaan solujen typpipitoisuus biomassan proteiiniksi, on laskuissa käytetty mikroleville soveltuvaa lukua 4.78 (Lourenco ym, 2004). C:N -suhde (Taulukko 2.) on laskettu seuraavasti:

$$\frac{n_C}{n_N} : \frac{m_C}{m_N} = \left(\frac{m_C}{M_C} \div \frac{m_N}{M_N} \right) : \left(\frac{m_C}{M_C} \div \frac{m_N}{M_N} \right)$$

jossa

n= ainemäärä (mol)

m=massa (g/g dw)

M= moolimassa (g/mol)

2.5 ASE-uutto

Pigmenttianalyysiin jatkaville levänäytteille tehtiin paineistetulla nesteuutolla (Accelerated Solvent Extraction) ASE-350-laitteella. Uuttolaitteistoja verratessa ASE on todettu karotenoidien selektiivisyydeltään ja saannolta sekä taloudellisestikin parhaaksi menetelmäksi (Saini & Keum, 2018). Etuina siinä oli suhteellisen lyhyt uuttoaika ja liuottimen vähäisempi kulutus. ASE-uutto tehtiin etanolin ja 2-metyylitetrahydrofuraanin (EtOH:MTHF, 50:50 (V:V)) liuotinyhdistelmällä. Kyseisen liuotinsuhteen ja liuottimien on havaittu mahdollistavan leväkarotenoidien 73%:sen erottelun (Damergi ym. 2017). Uuttolämpötila oli 110 °C ja optimaaliset uuttoajat levälajeille 10 min (*E.gracilis*) ja 15 min (*Selenastrum*), jotka valittiin testiuuton perusteella. Ruostumattomiin teräsuuttokammioihin pakattiin pohjalle suodatin ja piimaata (ks. liite) kevyesti tiivistäen. Kylmäkuivatua leväbiomassaa homogenisoitiin ensin huumareissa ja punnittiin noin 50 mg mikäli mahdollista. Osassa näytteitä biomassan saanto oli vähemmän kuin 50 mg (Taulukko 3). Levä sekoitettiin piimaan joukkoon ja lisättiin kammioon. Loput kammioista täytettiin piimaalla. Kaksi uuttokammioita täytettiin pelkällä piimaalla kontrollinäytteiksi. Uuton jälkeen keräysputkiin uuttunut näyte siirrettiin koeputkeen huuhtomalla keräysputkia vielä metanolilla. Liuottimet haihdutettiin tämän jälkeen näytteistä typpihaihduttimella (Teopal, Liebisch) 34 °C:n lämpötilassa. Haihdutettuihin näytteisiin lisättiin 10 ml metanolia annostelijalla (Dispensette, Easy Calibration brand, 0,5-5 ml) ja sekoitettiin Vortex-koeputkisekoittajalla.

2.6 Kokonaiskarotenoidit ja -klorofylli

Kokonaisklorofyllit ja -karotenoidit näytteistä mitattiin etanolissa UV-spektrofotometrillä (Shimadzu UV-2401PC). Uuton jälkeen metanolissa olevaa näytettä pipetoitiin 1 ml koeputkeen ja haihdutettiin, minkä jälkeen näytteeseen lisättiin 10 ml etanolia. Loput näytteestä säilöttiin pakastimeen (- 20 °C) karotenoidien jatkotutkimuksia varten. Pitoisuudet klorofyllille (Taulukko 3.) laskettiin American Oil Chemists Society (AOCS) menetelmällä Cc 13d-55 (AOCS 1981). Menetelmässä mitattiin aallonpituudet 630, 670 ja 710 nm. Pitoisuuksien laskenta tehtiin seuraavasti:

$$\text{Pitoisuus näytteessä } \left(\mu \frac{g}{g} \right) = \frac{A_{670} - 0,5(A_{630} + A_{710})}{0,1016 \text{ l}} \times \frac{V \times \text{laimennoskerroin}}{m}$$

jossa

A = mitattu absorbanssi kullakin aallonpituudella

l = kyvetin valotien pituus (cm)

V = levänäytteen tilavuus (ml)

m = punnitun levänäytteen paino (g)

0,1016 = menetelmässä käytetty vakiotermi

Kokonaiskarotenoidien pitoisuudet (Taulukko 4.) laskettiin Lambert Beerin lain mukaisesti ja käyttämällä β -karoteenin spesifistä absorbtiviteettia etanolissa ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2620$). Tuloksia testattiin vielä Dixonin ääriarvotestillä (Dixon's outlier test) (SFS-ISO 5725) poikkeavuuksien havaitsemiseksi. Pitoisuudet kokonaiskarotenoideille laskettiin seuraavasti:

$$\text{Pitoisuus } \mu \frac{g}{g} = \frac{\text{absorbanssi} \times \text{näytteen tilavuus (ml)} \times 10^4 \times \text{laimennoskerroin}}{2620 \times \text{näytemäärä (g)}}$$

2.7 Karotenoidien analytiikka

2.7.1 Sisäisen standardin ja standardiseoksen valmistus

Käytetyt karotenoidien malliaineet olivat diadinoksantiini, neoksantiini, zeaksantiini, luteiini, diatoksantiini, α -karoteeni, kantaksantiini ja astaksantiini. Käytettävissä oli myös β -karoteeni, jonka kromatogrammi jäi kuitenkin muodostumatta ja siitä syystä tunnistamatta. Malliaineista valmistettiin seos. Kaikkia mallikarotenoideja pipetoitiin samaan näyteputkeen siten, että niiden yksittäinen

pitoisuus (Taulukko 2a), pipetointi tarkkuus huomioiden, oli ~6 µg/ml. Kyseinen pitoisuus vastasi sisäisen standardin signaalin kokoa ja siten sen tunnettua pitoisuutta (5,6 µg/ml). Tämän jälkeen malliaineiden liuottimet haihdutettiin ja ne liuotettiin uudelleen 1 ml etanoliin. Valmistettu standardiseos analysoitiin erikseen signaalivahvuuksiltaan. Sisäisenä standardina (IS, internal standard) oli apo-karotenaali (8'-apo-β-karotenaali). Sitä punnittiin 25 mg ja liuotettiin 25 ml etanolia, jonka jälkeen se laimennettiin (c= 5,6 µg/ml). Standardiseoksesta ja sisäisestä standardista valmistettiin seitsemän eri laimennoksen laimennossarja (Taulukko 2b). Sisäistä standardia lisättiin sisäputkiin vaihteleva määrä, ja haihdutettiin typpivirrassa. Sen jälkeen sisäputkiin pipetoitiin standardiseosta vakiomäärä, 200 µl.

Taulukko 2a. Malliaineiden kantaliuoksista (c1) tehdyt laimennokset (c2) sekä laimennoksiin pipetoidun malliaineen tilavuus.

Malliaine	c1 (µg/ml)	c2 (µg/ml)	V _{pipetoitu} (µl)
Diadinoksantiini	73,89	5,9	80
Neoksantiini	27,21	5,9	220
Zeaksantiini	105,19	5,7	54
Luteiini	98,8	5,7	58
Diatoksantiini	56,47	5,7	101
α-Karoteeni	67,7	5,4	79
Kantaksantiini	59,4	5,6	94
Astaksantiini	77,71	5,9	77

Taulukko 2b. Laimennossarja (IS+standardiseos)

IS (µl)	Standardiseos (µl)	Laimennossuhde
550	200	10:1
275	200	5:1
165	200	3:1
55	200	1:1
18	200	1:3
11	200	1:5
5,5	200	1:10

2.7.2 Karotenoidianalyysit

UHPLC-QTOF-UV/VIS-MS-detektorin
ESI

Karotenoidien jatkoanalyysi tehtiin erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografialla (UHPLC). Näytteen ionisaatio tehtiin sähkösumutus-ionisaationa (ESI). Ionien erotteluun käytettiin massaspektrometria (MS). Sähkösumutus-ionisaation etuna oli soveltuminen eri yhdisteille. Analyyttisenä kolonnina oli C18- ja esikolonnina T3, HSS T3 -kolonnit (Waters, 150 x 2,1 mm Ø, 1,8 µm partikkelikoko, T3 20 mm). ESI-näyteajoja varten näytteet suodatettiin. Ensin metanolissa olleet

näytteet haihdutettiin typpivirrassa ja lisättiin 1 ml etanoliin. Siitä pipetoitiin 0,5 ml ruiskusuodatuksella suodattimen läpi uusiin näyteputkiin. Näytettä pipetoitiin 0,25 ml sisäputkiin laiteajoa varten. Putket säilöttiin pakastamalla ennen ajoja (-20°C). Ajoliuoksia oli kaksi; A (asetonitriili, 0,1% HCOOH) ja B (0,1% HCOOH). Injektiotilavuudet (Taulukko 3.) näyteajossa vaihtelivat näytteeseen punnituksen biomassan mukaan.

Taulukko 3. Näytteisiin punnittu biomassa (m) sekä injektio-tilavuus (V). E100=*E.gracilis* 100%, E50=*E.gracilis* 50%, E0=*E.gracilis* 0%, E.Esi= *E.gracilis* esikasvatus, S100=*Selenastrum sp.* 100%, S50=*Selenastrum sp* 50%, S0=*Selenastrum sp* 0%, S.Esi= *Selenastrum sp.* esikasvatus.

Näyte	m (mg)	V (µl)	Näyte	m (mg)	V (µl)
E100	50,48	0,5	S100	50,42	0,5
E100	50,21	0,5	S100	50,32	0,5
E100	50,79	0,5	S100	50,63	0,5
E100	50,08	0,5	S100	50,51	0,5
E50	50,51	0,5	S50	50,43	0,5
E50	50,88	0,5	S50	50,29	0,5
E50	50,49	0,5	S50	50,23	0,5
E50	50,8	0,5	S50	50,63	0,5
E0	17,63	1,5	S0	27,22	0,9
E0	17,41	1,5	S0	10,3	2,5
E0	5,6	5	S0	50,14	0,5
E0	10,54	2,5	S0	50,89	0,5
E.Esi	36,75	0,7	S.Esi	50,33	0,5

Karotenoidien tunnistus tehtiin diodirividetektorin signaalien perusteella (453 ja 650 nm) sekä tunnettujen malliainekarotenoidien retentioaikojen (Rt) eli viipymäaikojen perusteella. Tunnistettujen signaalien pinta-alat integroitiin MassLynx -ohjelmalla. Näytteitä vertailtiin niiden sisältämien karotenoidien signaalivahvuuksien mukaan sen sijaan, että olisi vertailtu pitoisuuksia, olettaen niiden spesifisten absorptiokertoimien olevan likimäärin samansuuruisia. Varianssien homogeenisyys ei täytynyt kaikkien näytteiden osalta. Ne karotenoiditunnistukset, joista tehtiin vain yksi signaalihavainto, jätettiin tarkastelun ulkopuolelle. Lisäksi ne näytteet, joissa oli vain kaksi neljästä signaalihavainnosta, kirjattiin epävarmoiksi tunnistuksiksi, mutta on otettu kuitenkin huomioon tilastotarkastelussa.

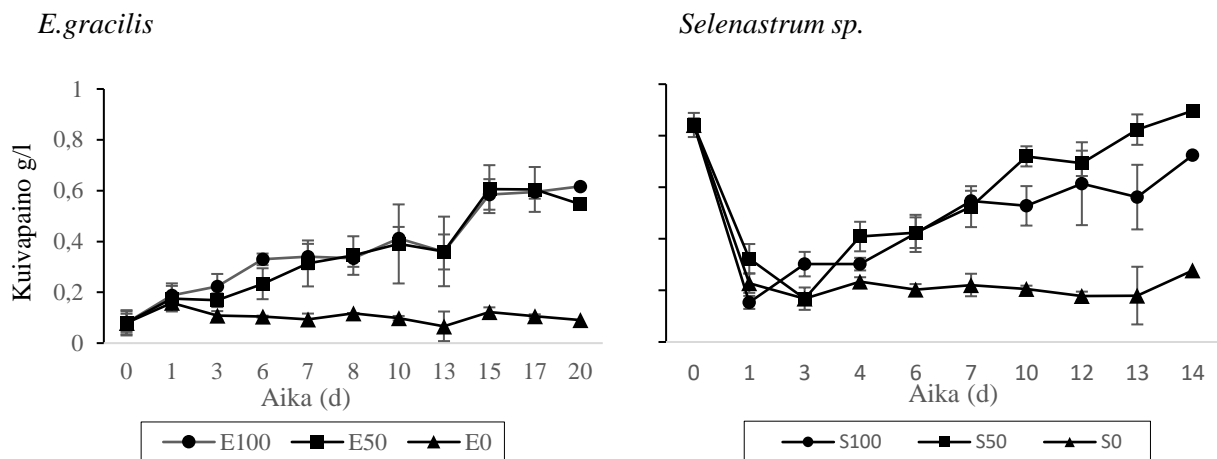
2.8 Tilastolliset testit

Tilastollinen tarkastelu tuloksille on toteutettu yksisuuntaisella varianssianalyysillä (ANOVA) Excell-tilastokolaskentaohjelmalla. Tulokset on pääasiallisesti esitetty rinnakkaismääritysten keskiarvoina ja keskihajontoina. Osaa mittaustuloksista on tarkistettu Dixonin ääriarvotestillä, jonka perusteella mittaustulos on päätetty hylätä.

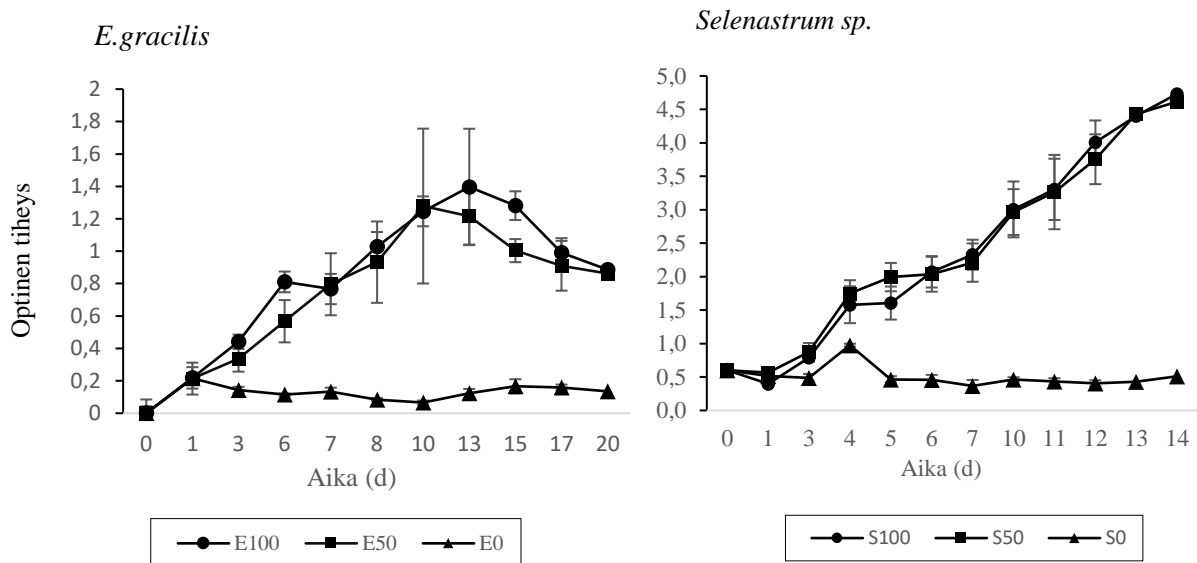
3 TULOKSET

3.1 Kasvu

E.gracilis -valokasvatusten, E100 ($400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ja E50 ($200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), eksponentiaalinen kasvuvaihe kuivapainon ja optisen tiheyden mukaan sijoittui seitsemännen ja 15:n päivän välille. Pimeäkasvatuksissa, E0 ja S0 ($0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), levien kasvu oli negatiivista molemmilla levälajeilla esikasvatukseen perustuvaan lähtötasoon verrattuna. *Selenastrum* -valokasvatusten, S100 ($400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ja S50 ($200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), eksponentiaalinen kasvuvaihe alkoi kuudennesta päivästä ja jatkui kokeen loppuun. Valointensiteettien, 200 ja $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, välillä ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa levien kasvuun kuivapainon ja optiseen tiheyteen perustuen. Levälajien välisiä eroja kasvussa ei vertailtu keskenään.



Kuva 2a. Leväkasvatusten kuivapainot (g/l). E100= *E.gracilis* 100%, E50=*E.gracilis* 50%, E0= *E.gracilis* 0%, S100= *Selenastrum sp.* 100%, S50= *Selenastrum sp.* 50%, S0= *Selenastrum sp.* 0%.



Kuva 2b. Optinen tiheys leväkasvatuksissa. E100= *E. gracilis* 100%, E50=*E. gracilis* 50%, E0=*E. gracilis* 0%, S100= *Selenastrum sp.* 100%, S50= *Selenastrum sp.* 50%, S0= *Selenastrum sp.* 0%

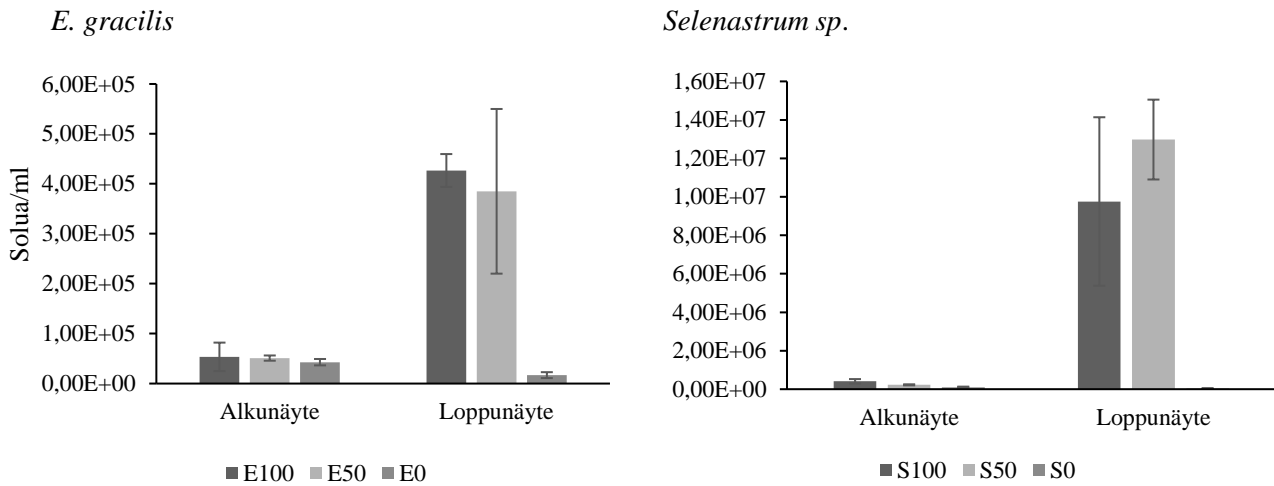
Kasvun seurannan lisäksi selvitetiin levien kasvunopeus. Taulukossa 4. on nähtävissä kasvunopeudet solumääriin sekä kuivapainoon perustuen ja lisäksi maksimaalinen kasvunopeus (g/l/d). Levien solumäärät eivät lisääntyneet kasvatuskokeen aikana pimeässä (E0 ja S0 negatiivinen kasvuaste). Valokasvatuksissa ne lisääntyivät. E100 ja E50 kasvatusten kasvunopeudet eivät eronneet toisistaan ja olivat saman suuntaiset solumääriin sekä kuivapainoon perustuvassa tarkastelussa. S100- ja S50 -kasvatusten solumääriin perustuva kasvunopeus (solua/d) oli S50 -näytteissä suurempi kuin S100 -kasvatuksissa. Kuivapainoon perustuen S100 -näytteissä kasvunopeus sen sijaan oli suurempi. Maksimaaliset kasvunopeudet levälajin sisällä tai välillä eivät eronneet tilastollisesti merkittävästi toisistaan.

Taulukko 4. Levien kasvunopeudet. E100= *E. gracilis* 100%, E50=*E. gracilis* 50%, E0= *E. gracilis* 0%, S100= *Selenastrum sp.* 100%, S50= *Selenastrum sp.* 50%, S0= *Selenastrum sp.* 0%.

Näyte	Kasvunopeus (solua/d)	Kasvunopeus (dw g/l/d)	Max.kasvunopeus (dw g/l/d)
E100	0,116	0,065	4,3
E50	0,112	0,062	5,3
E0	-0,048	-0,029	5,0
S100	0,276	0,126	2,8
S50	0,365	0,082	4,3
S0	-0,084	0,015	1,8

E. gracilis -solumäärät eivät alkutilanteessa eronneet keskenään ($P > 0,05$). Kokeen lopussa ne olivat kasvaneet valokasvatuksissa. E100 -näytteissä solumäärä kahdeksankertaistui, E50 -näytteissä 7,5-kertaistui ja E0 -näytteissä solumäärä väheni 2,5-kertaisesti lähtötasosta ($P < 0,05$). *E. gracilis* dominoi solumäärällisesti kokeen alussa kaikissa kasvatuksissa, mutta lopussa enää pimeänäytteessä (~90%). E100-näytteessä levän osuus oli 9% ja E50 -näytteessä 5%. Vierasleyälaji nousi näissä vallitsevaksi. *Selenastrum sp.* -näytteissä solumäärät poikkesivat toisistaan merkittävästi jo heti alussa (S100 > S50 > S0). S100 -näytteissä solumäärä 24-kertaistui ja S50 -näytteissä se kasvoi 57-kertaiseksi. S0 -

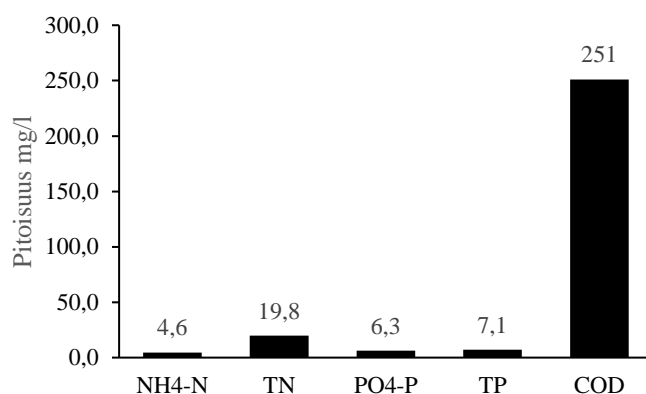
näytteissä solumäärä väheni 3-kertaisesti. Molempien levälajien kaikissa valokasvatusnäytteissä solumäärät olivat suurempia kokeen lopussa verrattuna alkuun.



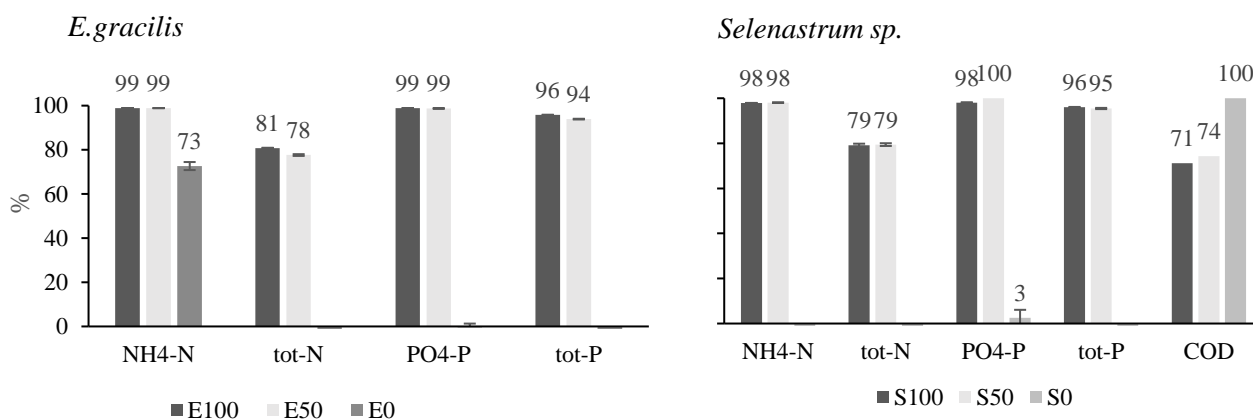
Kuva 3. Solumäärät (solua/ml) alussa ja lopussa. E100= *E.gracilis* 100%, E50=*E.gracilis* 50%, E0= *E.gracilis* 0%, S100= *Selenastrum sp.* 100%, S50= *Selenastrum sp.* 50%, S0= *Selenastrum sp.* 0%

3.2 Ravinnepoistuma

Kasvialustan happamuus ja lämpötila määritettiin sen ravinnepitoisuuksia (Kuva 4a.) mitattaessa. Happamuus oli 7 ja lämpötila 24 °C. Ravinnepitoisuudet laskivat voimakkaasti *E.gracilis* -valokasvatuksissa verrattuna kasvialustan alkumäärittelyyn. E0 -näytteessä ravinnepitoisuudet, paitsi ammoniumtyppi (NH₄-N), nousivat lähtötasosta. Fosforifosfaatti (PO₄-P) jäi E100 näytteessä alle määritysrajan (<LOQ). *Selenastrum* -kasvatuksissa ravinnepitoisuudet, paitsi PO₄-P, laskivat. PO₄-P jäi määrittämättä S50 -näytteistä, koska näytettä ei riittänyt analyysiin. S0 -näytteissä ravinnepitoisuudet nousivat lähtötasosta. Ammoniumtyypen poistuma *Selenastrum* -kasvatuksissa oli merkitsevästi suurempi kuin *E.gracilis* -kasvatuksissa.

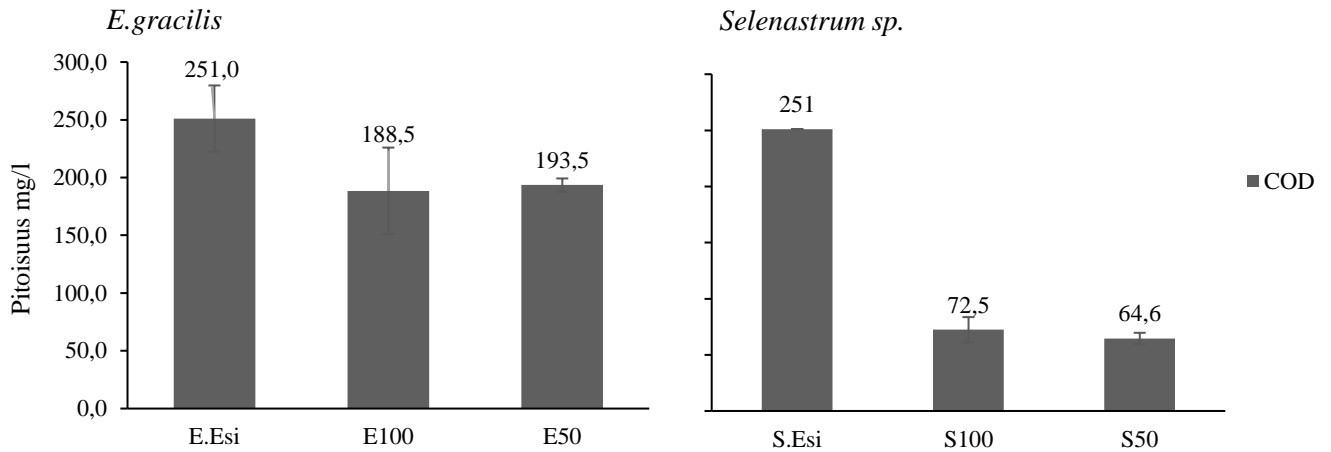


Kuva 4a. Kasvualustan ravinteet ja COD.



Kuva 4b. Leväkasvatusten ravinnepoistumat (%) kokeen lopussa verrattuna kasvualustan alkunäytteisiin. E100=*E.gracilis* 100%, E50=*E.gracilis* 50%, E0=*E.gracilis* 0%, S100=*Selenastrum sp.* 100%, S50=*Selenastrum sp.* 50%, S0=*Selenastrum sp.* 0%

Kemiallinen hapenkulutus (Kuva 5.) oli suurin molempien levälajien esikasvatuseräissä. Pimeäkasvatuksissa COD jäi alle määrittystason. Valokasvatuksissa erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. Kemiallisen hapen kulutus oli suurempaa *E.gracilis* -valokasvatuksissa.



Kuva 5. Leväkasvatusten kemiallinen hapenkulutus kokeen alussa ja lopussa. E.Esi=*E. gracilis* esikasvatus, E100=*E. gracilis* 100%, E50=*E. gracilis* 50%, S.Esi=*Selenastrum sp.* esikasvatus, S100=*Selenastrum sp.* 100%, S50=*Selenastrum sp.* 50%.

E. gracilis -kasvatuksissa pH oli alussa seitsemän ja kokeen keskivaiheilla nousi kahdeksaan. Lopussa se palasi takaisin. *Selenastrum* -kasvatuksissa pH oli alussa kahdeksan ja pysyi pimeässä vakiona. Valokasvatuksissa pH nousi yhdeksään, mutta laski takaisin S100-kasvatuksissa.

3.3 C:N -suhde

Näytteiden biomassassa ei riittänyt fosforimääritykseen tai pimeäkasvatusten osalta C:N-analyysiin. E100 -kasvatuksen hiilen ja typen suhde oli korkeampi kuin E50. Kasvatukset, S100- ja S50, eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi keskenään. Levänäytteiden punnittu massa, hiilen ja typen saanto (% ja g/g dw), proteiinisaanto (g/g ja %) sekä C:N -suhde on esitetty taulukossa 4. Hiilen ja typen suhde oli kaikissa näytteissä välillä 14-18.

Taulukko 4. Hiili-, typpi- ja proteiinipitoisuudet sekä C:N-suhde. E100=*E. gracilis* 100%, E50=*E. gracilis* 50%, S100=*Selenastrum sp.* 100%, S50=*Selenastrum sp.* 50%.

Näyte	m(g)	C-%	C $\frac{g}{g dw}$	N-%	N $\frac{g}{g dw}$	Prot $\frac{g}{g}$	Prot-%	Keskiarvo, prot-%	Keskihajonta, prot-%	C:N
E100	0,05	52,7	0,5	4,0	0,04	0,19	19	19	0,5	16:1
E100	0,05	53,4	0,5	4,1	0,04	0,19	19			15:1
E100	0,05	53,3	0,5	3,8	0,04	0,18	18			16:1
E100	0,05	53,4	0,5	4,0	0,04	0,19	19			15:1
E50	0,05	54,6	0,5	3,7	0,04	0,18	18	18	0,6	17:1
E50	0,05	54,0	0,5	3,8	0,04	0,18	18			17:1
E50	0,05	54,3	0,5	3,6	0,04	0,17	17			18:1
E50	0,05	53,7	0,5	3,9	0,04	0,19	19			16:1
S100	0,05	54,8	0,5	4,7	0,05	0,22	22	21	1,1	14:1
S100	0,05	55,6	0,6	4,4	0,04	0,21	21			15:1
S100	0,05	56,1	0,6	4,2	0,04	0,20	20			16:1
S100	0,05	56,2	0,6	4,2	0,04	0,20	20			16:1

S50	0,05	55,2	0,6	4,7	0,05	0,22	22	21	0,7	14:1
S50	0,05	56,0	0,6	4,5	0,04	0,21	21			15:1
S50	0,05	55,1	0,6	4,3	0,04	0,21	21			15:1
S50	0,05	54,5	0,5	4,5	0,04	0,21	21			14:1

Proteiinipitoisuudet *E.gracilis* -valokasvatuksissa poikkesivat toisistaan (P=0,01). E50-kasvatuksissa proteiinisaanto oli hieman suurempi. *Selenastrum* -valokasvatusten proteiinipitoisuudet eivät eronneet merkitsevästi toisistaan, mutta levälajien välisesti, S50 -kasvatuksissa pitoisuus oli suurempi (P<0,05) kuin E50-kasvatuksissa.

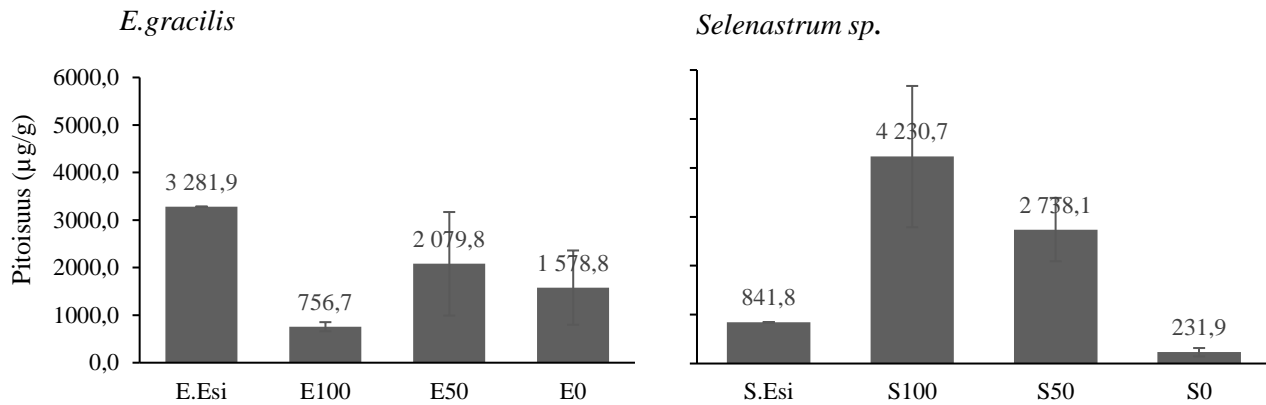
3.4 Kokonaiskarotenoidit ja -klorofyllit

Kokonaiskarotenoidipitoisuudet on esitetty taulukossa 5. *E.gracilis* -kasvatuksista yksi E100-näyte hylättiin sen poikkeavuuden sekä suoritettun Dixonin ääriarvotestin hylkäämisperusteena toimivan Q-arvon perusteella. Keskihajonta kokonaiskarotenoidinäytteiden pitoisuuksissa oli suurta.

Taulukko 5. Näytteiden punnitut massat (m), kokonaiskarotenoidipitoisuudet, niiden keskiarvot ja keskihajonnat sekä Dixonin-ääriarvotestin tulos. E.Esi= *E.gracilis* esikasvatus, E100= *E.gracilis* 100%, E50= *E.gracilis* 50%, E0= *E.gracilis* 0%, S.Esi= *Selenastrum sp.* esikasvatus, S100= *Selenastrum sp.* 100%, S50= *Selenastrum sp.* 50%, S0= *Selenastrum sp.* 0%.

Näyte	m (g)	Pitoisuus (µg/g)	Keskiarvo	Keskihajonta	Dixon-testitulokset	Q-arvo
E.Esi	0,037	3281,9	3281,92			
E100	0,050	650,3	756,7	96,5		
E100	0,050	hyl			0,850	>0,829
E100	0,051	781,5				
E100	0,050	838,4				
E50	0,051	2365,2	2079,8	1090,0		
E50	0,051	1605,3				
E50	0,050	3447,1				
E50	0,051	901,6			0,276	0,829
E0	0,018	476,3	1578,8	781,9	0,666	0,829
E0	0,017	1819,6				
E0	0,006	2317,3				
E0	0,011	1701,9				
S.Esi	0,050	841,8	841,8			
S100	0,050	2778,2	4230,7	1443,8		
S100	0,050	3200,9				
S100	0,050	5503,2				
S100	0,050	5440,7				
S50	0,050	3315,0	2738,1	648,0		
S50	0,050	2299,6				
S50	0,050	2066,8				
S50	0,051	3271,1				
S0	0,027	238,4	231,9	85,2		
S0	0,010	222,3				
S0	0,050	129,4				
S0	0,051	337,5				

E.gracilis -esikasvatuksessa pitoisuus (3281,9 µg/g) oli korkeampi kuin varsinaisen koekasvatuksen, E100 ja E0, näytteissä, mutta ei eronnut merkitsevästi E50 -kasvatuksesta. Valokäsittelyiden välillä ei tilastollisesti merkitseviä eroja havaittu (Kuva 6). *Selenastrum* -kasvatusten, S100 ja S50, kokonaiskarotenoidipitoisuudet kasvoivat esikasvatukseen verrattuna. Pimeässä pitoisuus väheni muihin kasvatuksiin verrattuna. Valokasvatusten, S100 ja S50, välillä ei ollut merkitsevää eroa (P=0,108). Sen sijaan keskihajonta tuloksissa oli suurta. Levälajien väliset erot kokonaispitoisuuksissa jätettiin tarkastelematta *E.gracilis* -kasvatusten kontaminaation vuoksi.



Kuva 6. Leväkasvatusten kokonaiskarotenoidipitoisuudet. E.Esi= *E.gracilis* esikasvatus, E100= *E.gracilis* 100%, E50= *E.gracilis* 50%, E0= *E.gracilis* 0%, S.Esi= *Selenastrum sp.* esikasvatus, S100= *Selenastrum sp.* 100%, S50= *Selenastrum sp.* 50%, S0= *Selenastrum sp.* 0%.

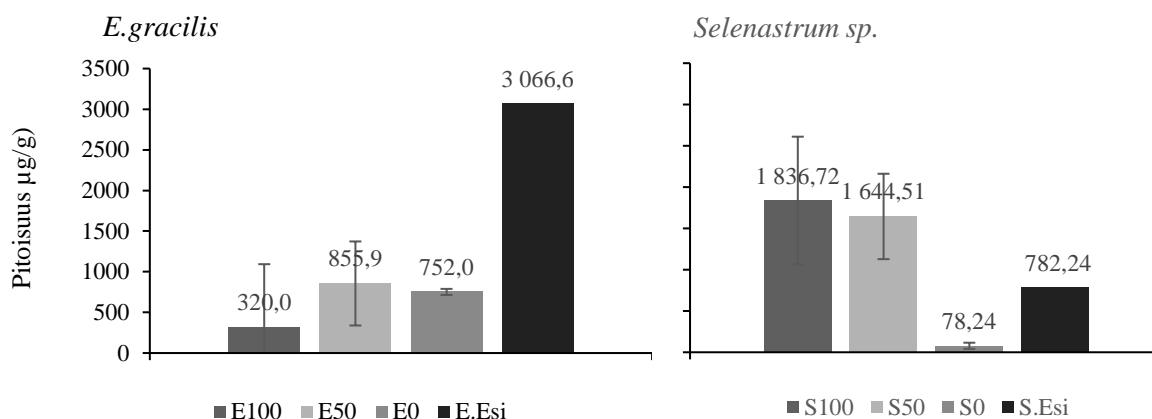
Kokonaisklorofyllipitoisuudet (Taulukko 6.) laskivat merkitsevästi kaikissa *E.gracilis* -kasvatuksissa esikasvatukseen (E.Esi) verrattuna. Kasvatukset eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi toisistaan. *Selenastrum* -kasvatusten, S100- ja S50, kokonaisklorofyllipitoisuudet kasvoivat, mutta eivät eronneet keskenään. Pimeässä pitoisuus laski merkitsevästi. Levälajien väliset erot kokonaispitoisuuksissa jätettiin tarkastelematta *E.gracilis* -kasvatusten kontaminaation vuoksi.

Taulukko 6. Näytteiden punnitut massat (m), kokonaisklorofyllipitoisuus, niiden keskiarvot ja keskihajonnat. E.Esi= *E.gracilis* esikasvatus, E100= *E.gracilis* 100%, E50= *E.gracilis* 50%, E0= *E.gracilis* 0%, S.Esi= *Selenastrum sp.* esikasvatus, S100= *Selenastrum sp.* 100%, S50= *Selenastrum sp.* 50%, S0= *Selenastrum sp.* 0%.

Näyte	massa (g)	Pitoisuus (µg/g)	Keskihajonta	Keskiarvo
E.Esi	0,037	3066,6		
E100	0,050	214,5	136,6	320,0
E100	0,050	519,5		
E100	0,051	290,7		
E100	0,050	255,5		
E50	0,051	1062,0	437,6	855,9
E50	0,051	512,6		
E50	0,050	1374,3		
E50	0,051	474,7		
E0	0,018	251,2	522,2	751,9
E0	0,017	1328,5		
E0	0,006	1054,6		

E0	0,011	373,5		
S.Esi	0,050	782,2		
S100	0,050	1132,2	773,4	1836,7
S100	0,050	1202,9		
S100	0,051	2527,2		
S100	0,051	2484,5		
S50	0,050	2273,8	517	1644,5
S50	0,050	1448,3		
S50	0,050	1058,1		
S50	0,051	1797,9		
S0	0,027	90,4	37,3	78,2
S0	0,010	47,78		
S0	0,050	49,08		
S0	0,051	125,72		

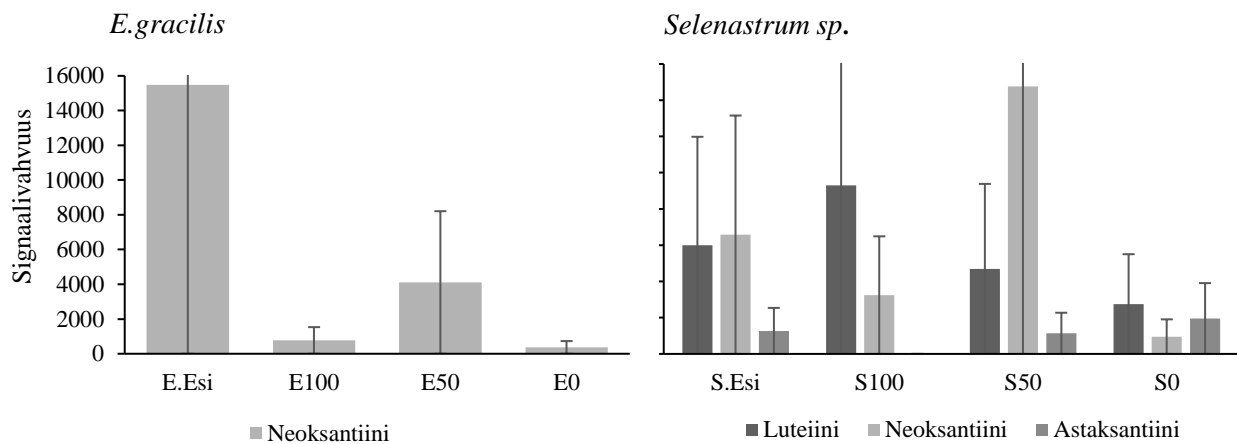
Kokonaisklorofyllipitoisuudet ($\mu\text{g/g}$) ja niiden keskihajonnat on esitetty kuvassa 7. Hajonta oli suurta.



Kuva 7. Leväkasvatusten kokonaisklorofyllipitoisuudet. E.Esi= *E. gracilis* esikasvatus, E100= *E. gracilis* 100%, E50= *E. gracilis* 50%, E0= *E. gracilis* 0%, S.Esi= *Selenastrum sp.* esikasvatus, S100= *Selenastrum sp.* 100%, S50= *Selenastrum sp.* 50%, S0= *Selenastrum sp.* 0%.

3.5 Tunnistetut karotenoidit

Levänäytteistä löytyi astaksantiinia, luteiinia ja neoksantiinia. Tunnistettujen karotenoidien signaalivahvuudet ja keskihajonnat on esitetty kuvassa 8. Keskihajonta tuloksissa oli suurta.



Kuva 8. Karotenoidien signaalivahvuudet ja keskihajonnat. E.Esi= *E.gracilis* esikasvatus, E100= *E.gracilis* 100%, E50= *E.gracilis* 50%, E0= *E.gracilis* 0%, S.Esi= *Selenastrum sp.* esikasvatus, S100= *Selenastrum sp.* 100%, S50= *Selenastrum sp.* 50%, S0= *Selenastrum sp.* 0%.

Selenastrum -kasvatuksissa luteiinia havaittiin kaikissa näytteissä. S100-, S50- ja S.Esi -näytteet eivät eronneet toisistaan tilastollisesti merkitsevästi. Pimeässä luteiinia havaittiin vähemmän kuin esikasvatuksessa ($P=0,001$) ja S100 -kasvatuksessa ($P=0,02$). *E.gracilis* -kasvatuksissa neoksantiinin signaalivahvuus oli suurin esikasvatuksessa. Signaalivahvuus oli suurempi E50- kuin E100- kasvatuksissa ($P=0,04$). Pimeäkasvatus jätettiin tarkastelun ulkopuolelle, koska vain yksi replikaateista sisälsi neoksantiinia. *Selenastrum* -kasvatuksen, S50, signaalivahvuus oli suurempi kuin S100 -kasvatuksessa ($P=0,006$) ja esikasvatuksessa ($P=0,017$). Näytteet, S100 ja S0 sekä S100 ja S.Esi, eivät eronneet merkitsevästi. Pimeäkasvatuksessa neoksantiinin signaali oli heikompi kuin esikasvatuksessa ($P=0,001$). Astaksantiinin signaalivahvuudet eivät eronneet *Selenastrum* -kasvatuksissa, S100 ja S50, S50 ja S0 tai S0 ja S.Esi, välillä. S50 -kasvatuksen astaksantiinin tunnistukseen liittyi epävarmuus, koska vain puolet näytteistä sisälsivät sitä. Pimeässä (S0) astaksantiinin signaalivahvuus oli suurempi kuin S100 -näytteissä ($P=0,019$).

4 TULOSTEN TARKASTELU

4.1 Kasvu

Valointensiteettien 400 ja $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ei havaittu eroavan levien kasvun suhteen toisistaan, mutta pimeä selvästi rajoitti kasvua. Kokeessa käytetty voimakas valointensiteetti ei vaikuttanut kummankaan levälajin solumääräiseen kasvuun, kuten havaitsi myös Kato ym. (2017). Valointensiteetin lisäksi kasvuun vaikutti lopulta moni muukin tekijä. Kasvun seurannan parametrit, OD ja DW, noudattivat melko hyvin toisiaan molempien levien kohdalla. Optisen tiheyden mukaan

E.gracilis -kasvatuksissa stationäärivaihe olisi jo ehtinyt kääntyä kasvun taantumiseksi, mutta kuivapainon mukaan taantumaa ei vielä havaittu. Siksi kasvatusta jatkettiin viisi päivää. *Selenastrum* -koekasvatuksessa eksponentiaalinen kasvuvaihe oli selkeämmin havaittavissa sekä OD- että DW-kuvaajista. Sen kohdalla stationäärivaiheen selkeämpi alkaminen olisi vaatinut muutaman vuorokauden pidemmän kasvatuksen. Toisaalta kokeessa pyrittiin välttämään kasvun tyrehtyminen, joten koe pysäytettiin. Kasvuvaiheita ja fotosynteesin tehoa kuvasti myös pH:n muutokset. Leväkasvatusten keskivaiheilla pH nousi emäksiseksi, jota selittää kasvun ja fotosynteesin kiihtymisvaihe ja runsaampi hiilidioksidin kulutus. Pimeäkasvatuksissa pH ei muuttunut kasvun vähäisyyden ja tasaisuuden vuoksi. *Selenastrum sp.* -kasvatusten pH oli emäksisempi kuin *E.gracilis* -levän, mikä voi kertoa sen tehokkaammasta fotosynteesitasosta tai levän ominaispiirteestä. Vierasleyvällä (*Scenedesmus*) kontaminoituminen aiheutti todennäköisesti resurssikilpailua ja heikensi täten *E.gracilis* -kasvatuksia, mikä on havaittu aiemmin usean levälajin kasvatustutkimuksissa (Mata ym. 2010). Mikroskopoinnilla tehdyn solumäärien laskennan perusteella saatiin kuitenkin tarkka kuva *E.gracilis* -solujen osuudesta näytteissä. Levälajien tarkempi keskinäinen vertailu jätettiin tekemättä kontaminoitumisen vuoksi. *Selenastrum* -kasvatuksissa solumäärien eroja toisistaan kokeen alussa selitti kasvatuksen ensimmäisenä päivänä havaittu voimakas lag-vaihe eli taantuma, josta levä alkoi toipua. Biomassan saanto (~1 g/l) ja kasvuaste (~0,1 g/l/vrk) kaikissa valokasvatuksissa jäi kauas optimaalisesta, mihin on voinut vaikuttaa leville heikkoravinteinen kasvualusta. Esikasvatuksissa käytetty EG-kasvatusliuos oli luultavasti ravinnetasoltaan kasvulle suotuisampi. Fotoautotrofinen leväviljelmä voisi parhaimmillaan tuottaa biomassaa 3 g/l ja kasvuaste voisi ylittää 1,1 g/l vuorokaudessa (Wang ym. 2018). Kasvun maksimointi ei tosin ollut tämän työn tavoite.

4.2 Ravinnepoistuma

Ravinnepoistuma oli kaikissa valokasvatusnäytteissä (400 ja 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) lähes 100-prosenttista. Sen sijaan pimeässä, molempien levälajien kohdalla, ravinteiden kulutus oli vähäistä. Pimeässä ravinnepitoisuudet olivat esikasvatusnäytteitä suuremmat, mitä selittää se, etteivät ravinteita kuluttavat levät kasvaneet varsinaisen kokeen aikana toisin kuin esikasvatuksissa. Mahdollista olisi myös leväsolujen hajoaminen ravinteiksi, mikä nostaisi ravinnepitoisuutta ja COD-arvoa. COD jäi kuitenkin matalaksi, mikä ei puolla teoriaa orgaanisen aineen lisääntymisestä näytteissä. Ravinnepoistumat levälajien välillä erosivat siten, että ammoniumtyypen poistuma *Selenastrum* -kasvatuksissa oli suurempi kuin *E.gracilis* -kasvatuksissa. Syy voi olla *Selenastrum* -levän pienempi solukoko. Pienemmän solukoon on havaittu tehostavan fotosynteesiä, ravinteiden kulutusta ja täten levän kasvua (Bouterfas ym. 2006). Molemmat levät osoittautuivat C:N-analyysiin perustuen tyypirajoitteisiksi, jolloin proteiinipitoisuus jäi tässä tutkimuksessa tavanomaista matalammaksi. *E.gracilis* ylsi 19 ja *Selenastrum* 21 prosenttiin. Proteiinipitoisuuden on havaittu laskevan heti eksponentiaalisen kasvuvaiheen jälkeen ja valorajoitteisuuden myötä erityisesti *E.gracilis* -levällä (Mata ym. 2010; Wang ym. 2018.), mikä puoltaisi sitä, että tässä kokeessa *E.gracilis* saavutti kasvun tasaantumisvaiheen toisin kuin *Selenastrum*. Leville tyypillinen C:N -optimi on 106:16 (~6,6) (Geider ja La Roche, 2002) ja tavanomainen proteiinipitoisuus kuivapainoa kohti vaihtelee 6-71% välillä. *E.gracilis* -levän tyypillinen proteiinipitoisuus on 39-61% ja *C. vulgaris* -levän 51-58% (Becker, 2007.). Tässä kokeessa valointensiteetit eivät vaikuttaneet merkittävästi C:N -suhteeseen, joka kaikissa näytteissä pysyi välillä 14-18.

4.3 Pigmenttituotanto

Kokonaiskarotenoidipitoisuuksien osalta *E. gracilis* -kasvatuksissa, keskimääräinen valointensiteetti ($200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) osoittautui voimakasta ja pimeää paremmaksi. Niissä kokonaispitoisuus laski, kun taas keskimääräisessä, levä säilytti lähtötason. Kato ym. (2017) totesi valostressin lisäävän *E. gracilis* -levän β -karoteenin, diadinoksantiinin ja diatoksantiinin määriä, mikä ei kuitenkaan toteutunut tässä tutkimuksessa käytetyissä intensiteeteissä. Kyseisiä karotenoideja ei myöskään tunnistettu näytteistä, mikä on voinut johtua niiden malliaineiden laadusta tai siitä, että kyseisiä karotenoideja ei tuotettu näissä olosuhteissa. *Selenastrum* -kasvatuksissa kokonaiskarotenoidipitoisuudet kasvoivat 200 ja 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ valointensiteeteissä ja laskivat pimeässä. Intensiteetit eivät kuitenkaan eronneet keskenään. Levälajien väliset erot pitoisuuksissa jätettiin tarkastelematta *E. gracilis* -kasvatusten kontaminoitumisen vuoksi. Typpirajoitteisuuden on havaittu vaikuttavan fotosynteettisiin pigmentteihin laskien kokonaiskarotenoidi- ja klorofyllipitoisuuksia jo lyhytkestoisen typpirajoitteisuuden aikana (García-Ferris ym. 1996, Tossavainen ym. 2019). Kaikki kasvatukset olivat typpirajoitteisuuden suhteen kuitenkin tasavertaisia, mikä vahvistaa valointensiteetistä itsestään koituvat eroavaisuudet. EG-kasvatusliuos oli luultavasti ravinnetasoltaan suotuisampi kuin jätevesi *E. gracilis* -levän kokonaiskarotenoidi ja -klorofyllituotannolle, koska esikasvatuksen pigmenttipitoisuudet olivat yllättävän paljon korkeammat kuin varsinaisessa kokeessa mitatut. Kokonaisklorofyllipitoisuudet laskivat esikasvatuksen tasosta kaikissa *E. gracilis* -kasvatuksissa. Kokeen voimakkain valointensiteetti on voinut olla klorofyllin kohdalla liiallinen, perustuen aikaisempiin havaintoihin (Kato ym. 2017). Kasvuvaihe on myös voinut vaikuttaa. Eksponentiaalisen kasvuvaiheen jälkeen klorofyllipitoisuuden on havaittu laskevan samalla, kun karotenoidipitoisuus on noussut. Tähän on esitetty syyksi pigmenttisynteetin keskinäistä kilpailua (Tolivia ym. 2013). *E. gracilis* -kasvatuksissa kasvuvaihe ja synteetin kilpailu valointensiteetin ohella, ovat kaikki voineet vaikuttaa klorofyllipitoisuuksien laskuun. *Selenastrum* -kasvatuksissa kokonaisklorofyllipitoisuus sen sijaan nousi 200 ja 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ valointensiteeteissä, mutta pimeässä väheni. Eroa valokasvatusten välillä ei kuitenkaan ollut. Levälajien väliset erot pitoisuuksissa jätettiin tarkastelematta *E. gracilis* -kasvatusten kontaminaation vuoksi.

Yksittäisistä karotenoideista tunnistettavissa olivat astaksantiini, luteiini ja neoksantiini. Astaksantiinia löytyi *Selenastrum* -kasvatuksista, lukuun ottamatta voimakkaan valointensiteetin kasvatuksia. Aikaisemmin astaksantiinin on havaittu kertyvän *C. zoofingensis* viherlevällä nimenomaan voimakkaassa valossa, tosin vasta kasvun myöhäisessä stationaarivaiheessa (Del Campo ym. 2004). Tässä kokeessa *Selenastrum* ei kyennyt ylläpitämään solujen astaksantiinitasoa 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ valointensiteetissä, saati tuottamaan karotenoidia lisää. Levä ei tosin saavuttanut vastaavaa kasvuvaihetta, jolloin aikaisempi havainto ei ole täysin vertailukelpoinen. Sen sijaan keskimääräisen intensiteetin lisäksi astaksantiinia oli myös *Selenastrum* -levän pimeäkasvatuksissa, mitä tukee myös aikaisempi Kobayashi ym. (1997b) tekemä havainto. Lisäksi Wang ym. (2003) havaitsi, että kokonaiskarotenoidipitoisuuden kasvaessa astaksantiini vähenee viherleviin kuuluvalla *H. pluvialis* -levällä 350 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ -valointensiteetissä. Sama havainto tehtiin myös tässä työssä, kun *Selenastrum* -levän kokonaiskarotenoidipitoisuus nousi ja astaksantiinin signaali heikkeni saman suuruusluokan, 200 ja 400 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, valointensiteetissä.

Astaksantiinia ja luteiinia löytyi myös *E. gracilis* -näytteistä, vaikka levän ei tunneta tuottavan näistä kumpaakaan. Niiden olemassaolo näytteissä on johtunut kontaminoitumisesta. Luteiinia havaittiin kaikissa *Selenastrum* -kasvatusten kolmessa eri valo-olosuhteessa ja lisäksi jo esikasvatusnäytteessä. Levä ei kuitenkaan tuottanut luteiinia lisää. Pimeäkasvatuksessa luteiinin signaali oli heikoin, mikä selittyy sillä, että viherlevien luteiinituotanto vaatii riittävästi valoa. Toisaalta liiallisen valon (>750

$\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) on todettu vähentävän sen pitoisuuksia (Ma ym. 2020.), mikä ei kuitenkaan riitä selittämään luteiinisignaalin heikkoutta tässä tutkimuksessa käytettyjen valointensiteettien mataluuden vuoksi.

Neoksantiinin havaittiin säilyneen *E.gracilis* -kasvatusten keskimääräisessä valointensiteetissä paremmin kuin voimakkaassa valointensiteetissä. Sen väheneminen yli $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ -valointensiteetissä on havaittu myös aiemmin (Kato ym. 2017). Neoksantiinin kertyminen soluun korkeassa valointensiteetissä ei kuitenkaan saanut tukea tässä tutkimuksessa. *Selenastrum* -kasvatuksissa tulos oli samansuuntainen ja levä jopa tuotti neoksantiinia keskimääräisessä valointensiteetissä lisää. Pimeässä neoksantiinin signaali heikkeni ja voimakkaassa se säilyi vain lähtötasolla.

5 JOHTOPÄÄTÖKSET

Työn tarkoituksena oli selvittää valointensiteetin vaikutuksia mikrolevien kasvuun ja pigmenttituotantoon. Tämä toteutui ja eroja valointensiteettien välillä havaittiin. Lisäksi tarkasteltiin ravinteiden kulutusta. Valointensiteetin vaikutukset olivat yksiselitteisiä pimeäkasvatusten osalta. Pimeässä kasvun heikkous selitti myös ravinnepoistuman heikkouden. Valointensiteetit 200 ja $400 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ eivät olleet niin yksiselitteisiä vaikutuksiltaan ja poikkesivat myös levälajien kesken. Tämä vahvistaa sen, että eri tekijöiden vaikutuksia on aina syytä tarkastella kokonaisvaltaiset kasvatusolosuhteet ja levälajien yksilöllisyys huomioiden. Yksittäisinä eroavaisuuksina nousi esiin *Selenastrum sp.* -levän kyky tuottaa karotenoideja valointensiteeteissä 400 ja $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ja ylläpitää niitä, kuten luteiinia ja astaksantiinia, jopa pimeässä. Levä lisäsi myös kokonaisklorofyllipitoisuuttaan, mikä viittaa kyseisiin valointensiteetteihin sopeutumiseen. *E.gracilis* -levä ei tuottanut karotenoideja lisää, vaan säilytti esikasvatuksissa saavuttamansa lähtötason, mikä viittaa enemmän kyseisten valointensiteettien sietämiseen kuin niihin sopeutumiseen. Levä joutui kuitenkin kilpailemaan resursseista vieraslevän kanssa, minkä voidaan jo yksin olettaa vaikuttaneen negatiivisesti sen kasvuun ja pigmenttituotantoon. Aikaisemmissa tutkimuksissa on käytetty voimakkaampia intensiteettejä kuin tässä työssä, mikä olisi voinut nostaa selkeämmin esiin eroja valointensiteetin vaikutuksista. Tässä työssä tunnistetut pigmentit olivat kaikki ksantofylleihin kuuluvia, fotosynteesiä liialta valointensiteetiltä suojaavia karotenoideja. Tämän perusteella voitaisiin tehdä oletus, että valointensiteettien voimakkuus on johtanut juuri näiden karotenoidien tuotantoon leväsoluissa. Tuloksen pitävyys on kuitenkin epävarma ja vaatisi malliaineiden laadun varmistuksen. On mahdollista, että muun laatuista karotenoideja ei kyetty tunnistamaan pelkästään malliaineiden puuttumisen vuoksi. Karotenoidien tunnistus kromatografian muodostamasta tulosaineistosta on haastavaa yhdisteiden samankaltaisuuksien vuoksi. Joillain karotenoideilla on sama molekyyli massa, jolloin niiden viipymäaikakin on sama ja täten tunnistus lähes mahdotonta ilman yhdisteelle selkeästi tyypillistä lohkeamistuotetta. Esimerkiksi luteiini voidaan tunnistaa kromatogrammista sen lohkeamistuotteen massan perusteella. Erilaisten lohkeamien tunnistus on kuitenkin työlästä ja aikaa vievää, jolloin malliaineisiin vertaamista voidaan pitää käytännöllisempänä tunnistuskeinona.

Kasvuun ja pigmenttikoostumukseen vaikuttivat tässä tutkimuksessa valointensiteetin lisäksi myös muut tekijät, kuten jo mainitut tahaton kontaminaatio ja malliaineiden laatu. Lisäksi ravinnerajoitteisuus, saavutetut kasvuvaiheet, kasvatuskokeen kokonaisuus sekä jatkuvan valotuksen mahdolliset vaikutukset pyrittiin ottamaan huomioon tulosten tarkastelussa. Teoria

kokonaiskarotenoidien ja -klorofyllin synteisien kilpailusta sai osittain tukea *E.gracilis* -levän havainnoista. Levän saavuttama kasvuvaihe jäi kuitenkin epäselväksi eikä levä varsinaisesti tuottanut karotenoideja lisää, mikä olisi selkeämmin viitannut kyseiseen teoriaan. Täten jatkotutkimuksia pigmenttisynteisien kilpailuun ja kasvuvaiheisiin liittyen tarvittaisiin. Luontainen jatkumo levälajien pigmenttitutkimuksessa olisi haluttujen karotenoidien kerryttäminen. Kontaminaatoriski huomioiden, *Selenastrum sp.* osoittautui tässä työssä immuunimmaksi kuin *E.gracilis*, jolloin sen käyttö jatkossa voisi olla turvatumpaa ainakin teollisuuden sivuvirtoja hyödyntävissä kasvatuksissa. Tämän osoittaminen varmaksi vaatii kuitenkin lisätutkimuksia. Valo/pimeä -syklin vaikutuksia ei tässä työssä tarkasteltu, mutta sillä on osoitettu olevan positiivinen vaikutus leväbiomassan kasvuun. Biomassan saanto tulisi jatkossa turvata kasvatuskokeessa tasolle, jolla kaikkien tarvittavien analyysien vaatima näytämäärä täyttyy. Vaikka biomassan saanto jäi pieneksi, kromatografian tulosaineisto pigmenteistä oli laaja ja täten tutkittavaa materiaalia *E.gracilis* ja *Selenastrum sp.* -levistä on vielä runsaasti.

KIITOKSET

Lopuksi kiitän ohjaajiani Elinaa ja Velimattia työni loppuun asti saattamisesta sekä kärsivällisestä ja opettavaisesta ohjauksesta. Lisäksi haluan kiittää Marika Tossavaista, joka ohjasi työni alkuun. Kiitän myös Leon Mercierää, joka työskenteli kanssani levätutkimuksen parissa ja antoi vertaistukea tutkielmani alkutaipaleella, sekä koko Niemen kampusta ja Viikkiä moitteettomasta työilmapiiristä ja avuliaasta laboratorion henkilökunnasta.

LÄHTEET

Amchova, P., Kotolova, H., Jana Ruda-Kucerova, 2015: Health safety issues of synthetic food colorants, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73:914-922, <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.026>.

Barsanti, L. & Gualtieri, P. 2020: Anatomy of *Euglena gracilis*. DOI:10.1016/b978-0-12-818305-2.00004-8.

Bouterfas R., Belkoura M., Dauta A. 2002: Light and temperature effects on the growth rate of three freshwater algae isolated from a eutrophic lake. — *Hydrobiologia* 489: 207–217.

Brotosudarmo, T., Limantara, L., Setiyono, E. ja Heriyanto 2020, Structures of Astaxanthin and Their Consequences for Therapeutic Application, *International Journal of Food Science*, 2020, <https://www.hindawi.com/journals/ijfs/2020/2156582/>

Carvalho A., Silva S., Baptista J., Maltaca F. 2011: Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. — *Applied Microbiology and Biotechnology* 89: 1275–1288.

Cheirsilp, B., & Torpee, S. 2012: Enhanced Growth and Lipid Production of Microalgae Under Mixotrophic Culture Condition: Effect of Light Intensity, Glucose Concentration and Fed-Batch Cultivation. *Bioresource technology* 110: 510–516.

Damergi, E., Schwitzguébel, J., Refardt, D., Sharma, S., Holliger, C. Ludwig, C. 2017: Extraction of carotenoids from *Chlorella vulgaris* using green solvents and syngas production from residual biomass, *Algal Research*, 25:488-495, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.05.003>.

Del Campo, J.A., Rodríguez, H., Moreno, J., Vargas, M. Á., Rivas, J., Guerrero, M. G. 2004: Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta), *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64: 848-854.

Fernández-sevilla, J.,M., Ación Fernández, ,F.G., & Molina Grima, E., 2010: Biotechnological production of lutein and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(1), 27-40. doi:<http://dx.doi.org.libproxy.helsinki.fi/10.1007/s00253-009-2420-y>

Giossi, C., Cartaxana, P., & Cruz, S. (2020). Photoprotective role of neoxanthin in plants and algae. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(20) doi:<http://dx.doi.org.libproxy.helsinki.fi/10.3390/molecules25204617>

Geider, R. & La Roche, J. 2002: Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis, *European Journal of Phycology*, 37:1, 1-17, DOI: 10.1017/S0967026201003456.

García-Ferris, C., De los Ríos, A., Ascaso, C. & Moreno, J. 1996: Correlated biochemical and ultrastructural changes in nitrogen-starved *Euglena gracilis*, *Journal of Phycology* 32(6):953-963, <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1996.00953.x>

Martín, M., & Grossmann, IE: 2014: Design of an Optimal Process for Enhanced Production of Bioethanol and Biodiesel from Algae Oil via Glycerol Fermentation. *Applied energy* 135: 108–114.

Han B.-P., Virtanen M., Koponen J. ja Straskraba M. 2000: Effect of photoinhibition on algal photosynthesis: a dynamic model. — *Journal of Plankton Research* 22: 865–885.)

Kato, S., Mika Soshino, Shinichi Takaichi, Takahiro Ishikawa, Noriko Nagata, Masashi Asahina & Tomoko Shinomura, 2017: Suppression of the phytoene synthase gene (EgertB) alters carotenoid content and intracellular structure of *Euglena gracilis*, *BMC Plant Biology*, 17:125, DOI 10.1186/s12870-017-1066-7

Kopec, R. and Cooperstone, J. and Cichon, M. and Schwartz, S., 2012: Analysis Methods of Carotenoids, *Analysis of Antioxidant Rich Phytochemicals* (pp.105-148). DOI:10.1002/9781118229378.ch4 (KIRJA)

Kobayashi, M., Kakizono, T., Nishio, N., Nagai, S., Krurimura, Y. & Tsuji, Y. 1997a. Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 351– 6.

Kobayashi, M., Kurimura, Y. & Tsuji, Y. 1997b. Light-independent, astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress. *Biotechnol. Lett.* 19: 507– 9.

Krinsky, N. ja Goldsmith, T., 1960: The carotenoids of the flagellated alga, *Euglena gracilis*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol 91, issue 2: p. 271-279, [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(60\)90501-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(60)90501-4)

Krajčovič, J., Vestega, M. ja Schwartzbach, S:D., 2014: Euglenoid flagellates: A multifaceted biotechnology platform, *Journal of Biotechnology* 202: 135–145.

Ma, R. Zhen Zhang, Shih-Hsin Ho, Chengxu Ruan, Jun Li, Youping Xie, Xinguo Shi, Lemian Liu, Jianfeng Chen, Two-stage bioprocess for hyper-production of lutein from microalga *Chlorella sorokiniana* FZU60: 2020: Effects of temperature, light intensity, and operation strategies, *Algal Research*, 52, <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102119>.

Mayne, S.T. 1996. Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. *FASEB Journal*. 10: 690–701. <https://doi-org.libproxy.helsinki.fi/10.1096/fasebj.10.7.8635686>

Mata, TM, Martins AA, Caetano NS. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 2010, 14: 217-232, <http://paginas.fe.up.pt/ceft/pdfs/Mata2009.pdf>

Milani A., Basirnejad, M., Shahbazi, S. & Bolhassani, A. 2017: Carotenoids: biochemistry, pharmacology and treatment, *British Journal of Pharmacology*, 174:1290–1324

Neale P. 2013: Species specific responses to combined thermal-irradiance stress in microalgae - "Each is to its Own". — *Photochemistry and Photobiology* 89: 822–823.

Ojanen, S., Tyystjärvi, E. ja Jokinen, K. 2017: Utilization of microalgae in industrial symbiosis, focus on Finland, LUKE, pdf, <http://jukuri.luke.fi/handle/10024/540187>, 32s.

O'Neill, E.C., Trick, M., Hill, L., Rejzek, M., Dusi, R.G., Hamilton, C.J., Zimba, P. V., Henrissat, B. ja Fielda, R.A. 2015: The transcriptome of *Euglena gracilis* reveals unexpected metabolic capabilities for carbohydrate and natural product biochemistry, *Molecular Biosystems* accepted manuscript, p.1-32.

Powles, S.B. (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 35, 15–44.

Richmond, A. 2004: Principles for Attaining Maximal Microalgal Productivity in Photobioreactors: An Overview." *Hydrobiologia* 512.1: 33–37.

Saini, Ramesh Kumar ; Keum, Young-Soo. Carotenoid Extraction Methods: A Review of Recent Developments." *Food chemistry* 240 (2018): 90–103.

<http://web.b.ebscohost.com.libproxy.helsinki.fi/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=77f9d3b1-180d-4350-8f5b-f9015187764f%40sessionmgr102>

Shriwastav, A. & Purnendu B. 2015: Algal Growth in Photo-Bioreactors: Impact of Illumination Strategy and Nutrient Availability." *Ecological engineering* 77: 202–215.

Solovchenko, A., Lukyanov, A., Vasilieva, S., Savanina, Ya., Solovchenko, O. ja Lobakova, E., 2013: Possibilities of bioconversion of agricultural waste with the use of microalgae. *Moscow Univ. Biol.Sci. Bull.* 68: 206–215, <https://doi-org.libproxy.helsinki.fi/10.3103/S0096392514010118>

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. ja Isambert, A., 2006: Commercial Applications of Microalgae, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2: 87–96, DOI: 10.1263/jbb.101.87

Takaichi S. & Mirauro M., 1998: Distribution and Geometric Isomerism of Neoxanthin in Oxygenic Phototrophs: 9'-Cis, a Sole Molecular Form. *Plant & Cell Physiology*.;39(9):968-977. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a029461

Takaichi, S. Carotenoids in Algae: Distributions, Biosyntheses and Functions. *Mar. Drugs* 2011, 9, 1101-1118. <https://doi.org/10.3390/md9061101>

Tamaki, S. Kato, S., Shinomura, T., Ishikawa, T. & Imaishi, H. 2019: Physiological role of β -carotene monohydroxylase (CYP97H1) in carotenoid biosynthesis in *Euglena gracilis*, *Plant Science*, 278: 80-87, <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.10.017>.

Tolivia, A., Conforti, V., Co'rdoba, O. & Flores, L., 2013: Chemical constituents and biological activity of *Euglena gracilis* extracts, *Journal of Pharmacy Research*, 209-214. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jopr.2013.03.019>

Tossavainen M, Ilyass U, Ollilainen V, Valkonen K, Ojala A, Romantschuk M. 2019: Influence of long term nitrogen limitation on lipid, protein and pigment production of *Euglena gracilis* in photoheterotrophic cultures. *PeerJ* 7:e6624 <https://doi.org/10.7717/peerj.6624>

Tossavainen , M , Nykänen , A , Valkonen , K S , Ojala , A , Silja , K & Romantschuk , M. 2017: Culturing of *Selenastrum* on Diluted Composting Fluids; Conversion of Waste to Valuable Algal Biomass in Presence of Bacteria, *Bioresource Technology*, 238:205-213. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.013>

Wang, B., Zarka, A., Trebst, A. ja Boussiba, S. 2003: Astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (CHLOROPHYCEAE) as an active photoprotective process under high irradiance, <https://doi-org.libproxy.helsinki.fi/10.1111/j.0022-3646.2003.03-043.x>

Wang, Y., Seppänen-Laakso, T., Rischer, H., & Wiebe, M. G. 2018: *Euglena gracilis* growth and cell composition under different temperature, light and trophic conditions. *PloS One*, 13(4), 1. doi: <http://dx.doi.org.libproxy.helsinki.fi/10.1371/journal.pone.0195329>

Zhao L, Sweet BV. 2008: Lutein and zeaxanthin for macular degeneration. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 2008;65(13):1232-1238. doi:10.2146/ahjp080052

LIITTEET

Välineistö:

Valokasvatuskaappi: Friocell CLC-E/FC 404, MMM Group, Germany, *FRIOCELL EVO*, 05/2020, EN/PR.
Pimeäkasvatuskaappi: Sanyo MLR-350, Sanyo Electric Co. Ltd, Japani.

Ruiskusuodattimet: Syringe filter 13mm WR International, 0,2µm PTFE membrane.
Näyteputket (UHPLC): Agilent technologies, Part nro 5182-0716, Vial, screw, 2ml, ambr, WrtOn, cert, 100PK, Made in PL, Batch/Lot No. 867-11-15/001

ASE-Uuttolaitteisto ja asetukset:

Laite: ASE-350; Dionex, Thermo scientific, Sunnyvale, CA, USA. (tempx, timex).
Uuttoliuotin: EtOH:MTHF 50:50
Uutto lämpötila: 110 °C
Uuttoaika: *E.gracilis* 10 ja *Selenastrum sp.* 15 min
Uuttokammio: Thermo Scientific, 10 ml.
Uuttokammion suodatin: Thermo scientifics, Product No 068093, ASE Extraction Filters, Cellulose, 1, 5, 10, 22 ml ASE 350/150 Cell, 100 filters, Lot No. 104500, Date of Mfg 02/17/2015).
Piimaa: Thermo Scientific S/O, Lot# 161, P/N 60-033854, Prod, chem, diatomaceous earth, ASE, 1kg, assembled in the USA.

ESI-MS -instrumenttiasetukset:

Laite: Waters Synapt G2-Si
Software version: MassLynx 4.1
RMS mass difference: 2.0 ppm (1.3 mDa)
Mean mass Difference: 0.3 ppm (~0.5 mDa)
Calibration profile: ESI_Sodium Formate + Ultramark standard material
Mass Range: 50-2000 Da
Mode: Resolution
Polarity: Positive
Detector setup (Leucine Enkephalin (556,277 Da))
Polarity: Positive
Lockspray profile: Leucine Enkephalin single point MS (556,277 Da)
Polarity: positive
Optic mode: Resolution
Mode: TOF MS
Trap collision energy: 4.0 V

EG-KASVATUSLIUOS

<u>Kemikaali</u>	<u>g/l</u>
Natrium asetaatti	
trihydraatti	1
Lab-Lemco (lihauute)	1
Tryptoni	2
Hiivauute	2
CaCl ₂ Stock-liuos	1