

**ISSN 0355-1180**

**HELSINGIN YLIOPISTO**

**Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos**

**EKT-sarja 1780**

**Ylikriittinen hiilidioksiduutto mikrolevien lipidien  
eristysmenetelmänä**

**Mikko Immonen**

**Helsinki 2017**

Tiedekunta Maatalous-metsätieteellinen		Laitos Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos	
Tekijä Mikko Immonen			
Työn nimi Ylikriittinen hiilidioksiduutto mikrolevien lipidien eristysmenetelmänä			
Oppiaine Elintarvikekemia			
Työn laji Maisterin tutkielma		Aika Helmikuu 2017	Sivumäärä 74
Tiivistelmä <p>Mikrolevät ovat lähinnä vesistöissä eläviä yksisoluisia tai yksinkertaisia monisoluisia kasveja, syanobakteereja tai alkueliöitä. Kyseessä on uusiutuva luonnonvara, jota parhaillaan hyödynnetään muun muassa elintarvikkeina, rehuna ja arvokkaiden biomolekyylien sekä monenlaisten lipidien tuottamisessa. Ylikriittinen hiilidioksiduutto on potentiaalinen lipidien eristysmenetelmä, jossa ei tarvita ihmisille ja ympäristölle myrkyllisiä liuottimia. Uuton tehoa ja selektiivisyyttä voidaan optimoida vaihtelemalla uuttolämpötilaa ja painetta sekä uuton kestoa ja hiilidioksidin virtausnopeutta.</p> <p>Tutkielman kirjallisuuskatsauksen tavoitteena oli tarkastella teoreettisesti lipidien uuttomenetelmiä, erityisesti ylikriittistä uuttoa, sekä käydä läpi kirjallisuudessa jo esiintyvää aineistoa mikrolevien lipidien laadusta, määrästä ja näihin vaikuttavista tekijöistä. Erityistä huomiota oli tarkoitus kiinnittää kirjallisuuteen koskien kokeellisessa osassa käytettäviä levälajeja. Lisäksi tavoitteena oli tarkastella mikrolevien lipidien mahdollisia käyttösovelluksia. Tutkimuksen kokeellisen osan tavoitteena oli selvittää ylikriittisen hiilidioksiduuton (SFE) käyttökelpoisuutta mikrolevien lipidien uuttamisessa verrattuna aiemmin käytössä olleeseen ja mikroleviä varten optimoituun kiihdytettyyn liuotinuuttoon (ASE). Tarkoituksena oli myös selvittää ylikriittisen hiilidioksiduuton uuttoparametrien ja näytekoon vaikutusta uuton tehokkuuteen ja selektiivisyyteen sekä tutkia mikrolevien lipidikoostumusta.</p> <p>Kaikkien tutkittujen lipidikomponenttien SFE-uutolla saavutettu suhteellinen saanto oli poikkeuksetta pienempi verrattuna ASE-uuton saantoon. Kuitenkin vaihtelua oli runsaasti käytettäessä erilaisia uuttoolosuhteita ja etenkin levälajien välillä. Suurin osa lipidisaannosta uuttui SFE:llä jo ensimmäisen 10 minuutin aikana, jonka jälkeen uuttuminen oli vähäistä. Eikosapentaenihapon (EPA) saanto SFE-uutolla oli suhteellisesti jonkin verran pienempää ASE-uuttoon verrattuna, mikä viittaa siihen, että EPA on kiinnittynyt lähinnä poolisiin lipideihin, kuten fosfolipideihin tai glykolipideihin. Tutkittavien mikrolevien lipidipitoisuudet olivat melko pieniä moniin kirjallisuudessa esitettyihin lukuihin verrattuna, joten poolisten lipidien osuus kokonaislipideistä on luultavasti kohtalaisen suuri. Toisaalta vertailussa tulee huomioida se, että monissa kirjallisuudessa esitetyissä tuloksissa levät on kasvatettu lipidien kertymistä suosivissa olosuhteissa ja/tai lipidipitoisuus on määritetty gravimetrisesti eikä rasvahappojen summana. SFE-uutto vaikuttaa tehoavan paremmin neutraalilipideihin ja sellaisiin mikroleviin, joiden soluseinä ei ole erityisen vahva.</p>			
Avainsanat Mikrolevä, ylikriittinen uutto, kiihdytetty liuotinuutto, lipidisaanto			
Säilytyspaikka Helsingin yliopiston digitaalinen arkisto, Helda			
Muuta tietoa EKT-sarja 1780			

Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Department Department of Food and Environmental Sciences	
Author Mikko Immonen			
Title Supercritical Carbon Dioxide Extraction as a Separation Method for Microalgal Lipids			
Subject Food Chemistry			
Level M. Sc. Thesis	Month and year February 2017	Number of pages 74	
Abstract <p>Microalgae are microscopic unicellular or filamentous organisms that belong to the groups of cyanobacteria, plants or protozoa. As a rapidly multiplying source of renewable biomass, microalgae are currently cultivated for food, feed valuable bioactive compound production, and increasingly for biofuels. Supercritical fluid extraction (SFE) using CO<sub>2</sub> as solvent is a potential method for separating lipid fraction from algal biomass without the use of toxic organic solvents. The efficiency and selectivity of the extraction can be optimized by modifying the extraction temperature and pressure as well as the length of the extraction and CO<sub>2</sub> flow rate.</p> <p>The objective of the literature review in this thesis was to theoretically contemplate lipid extraction methods, especially SFE, as well as to review the existing knowledge over the quantity and quality of microalgal lipids and the factors affecting to the lipid content. The aim was also to review the potential applications for microalgal lipids. The objective of the experimental part was to research the possibilities of SFE as a separation method for microalgal lipids, especially compared to accelerated solvent extraction (ASE). The ASE-method had been optimized to completely extract microalgal lipids for analytical purposes and used previously within the research group. The aim was also to explore the impacts of SFE parameters to the efficiency and selectivity of the extraction as well as to study microalgal lipid composition.</p> <p>The SFE yield was invariably smaller compared to ASE regarding all measured lipid components. However, a lot of variation could be observed when different extraction parameters were used and especially between different algae species. The majority of lipid yield was extracted already during the first 10 minutes of SFE. After that the extraction yield was relatively low. The SFE yield of EPA is relatively somewhat smaller compared to ASE, which refers to the assumption, that EPA was mainly bound to polar lipids, such as phospho- and glycolipids. The overall lipid contents of investigated microalgae species were quite low compared to those appearing in the literature, so presumably the portion of polar lipids was relatively high in the samples. However, in many studies found in the literature the algae have been cultivated specifically to accumulate lipids and/or gravimetric methods have been used for lipid quantification. These factors should be observed in the comparison. The SFE appears to be a more efficient extraction method for neutral lipids and for those microalgae species that don't possess very thick cell walls.</p>			
Keywords Microalgae, Supercritical Extraction, Accelerated Solvent Extraction, Lipid Yield			
Where deposited The Digital Repository of University of Helsinki, Helda			
Additional information EKT-series 1780			

## Esipuhe

Tämä maisterin tutkielma kuuluu ALGOMEG- ja LEVARBIO -projekteihin, joissa Helsingin yliopisto on osallisena. Projekteissa pyrittiin selvittämään mikroleivissä esiintyvien terveyttä edistävien aineiden tuottamis- ja prosessointimenetelmiä sekä hyödyntämiskohteita elintarvikkeissa ja rehuissa. Tutkielman suunnitteleminen aloitettiin kesällä 2015 ja kokeellinen osio suoritettiin Helsingin yliopiston Viikin kampuksella elintarvikekemian osaston laboratoriotiloissa lokakuun 2015 ja huhtikuun 2016 välillä. Tutkielman ohjaajina toimivat professori Vieno Piironen, dosentti Anna-Maija Lampi sekä tohtori Minnamari Edelmann.

Helsingin yliopisto tarjosi minulle hyvät puitteet ja viihtyisän työympäristön tutkimuksen kirjallisen ja kokeellisen osan tekoa varten mutta ennen kaikkea mielenkiintoisen ja inspiroivan aiheen tutkittavaksi. Mikroleviin liittyvä tutkimus on tulevaisuuteen suuntaavaa ja parhaillaan vahvasti kiinnostuksen kohteena ympäri maailman. Olemassa oleva ja tuleva tutkimustieto yhdistettynä tahtoon panostaa kestävään ja kokonaisvaltaiseen ruoantuotantoon tulee olemaan avainasemassa ympäristön monimuotoisuuden ja ihmisten terveyden säilyttämisessä ja edistämässä.

Lämpimät kiitokset ohjaajilleni sujuvasta yhteistyöstä sekä asiantuntevasta ja määrätietoista ohjauksesta tutkielman taustalla ja toteuttamisessa. Kiitokset myös laboratorion teknikoille Kati Hakalalle ja Miikka Olinille, jotka auttoivat aina tarvittaessa kokeellisen työn teknisten seikkojen ratkaisemisessa. Lisäksi kiitokset kuuluvat hyvälle ystäväilleni, tohtorikoulutettava Zhen Yang'lle ja opiskelijakollegoille Otto Mustoselle ja Niklas Rennerille, joiden kanssa käytyt lukuisat oppimista stimuloivat keskustelut olivat elintärkeitä koko opintojeni ajan. Haluan samalla kiittää perheenjäseniäni ja kaikkia ystäviä osallistumisesta ja taustatuesta tähän pisteeseen johtaneen opintopolun aikana.

Mikko Immonen

# Sisällysluettelo

## Tiivistelmä

## Abstract

## Esipuhe

## 1 Johdanto

## 2 Kirjallisuuskatsaus

### 2.1 Ylikriittinen hiilidioksiduutto

#### 2.1.1 Teoriaa

#### 2.1.2 Käyttö elintarvikematriisien uuttoprosesseissa

### 2.2 Mikrolevien lipidit

#### 2.2.1 Yleistä mikrolevistä

#### 2.2.2 Lipidifraktiot

#### 2.2.3 Lipidien käyttösovellukset

## 3 Kokeellinen tutkimus

### 3.1 Materiaalit ja menetelmät

#### 3.1.1 Tutkimuksen kulku

#### 3.1.2 Näytemateriaalit

#### 3.1.3 Reagenssit ja liuottimet

#### 3.1.4 Kiihdytetty liuotinuutto (ASE)

#### 3.1.5 Ylikriittinen uutto (SFE)

#### 3.1.6 Tokolimääritys

#### 3.1.7 Rasvahappojen metylointi ja määritys

#### 3.1.8 Neutraalilipidien määritys

#### 3.1.9 Pigmenttien analysointi

### 3.2 Tulokset

#### 3.2.1 Näytekkoon vaikutus

#### 3.2.2 SFE-uuton optimointi

#### 3.2.3 Tutkittujen mikrolevien lipidikoostumus

#### 3.2.4 SFE vs. ASE

### 3.3 Pohdinta

## 4 Päätelmät

## Lähdeluettelo

# 1 Johdanto

Mikrolevät ovat lähinnä vesistöissä eläviä yksisoluisia tai hyvin yksinkertaisia monisoluisia kasveja, syanobakteereja tai alkueliöitä. Kyseessä on uusiutuva luonnonvara, jonka avulla voidaan kehittää ympäristöystävällisiä, kestäviä menetelmiä muun muassa ravinnon, rehun, biopolttoaineiden ja bioaktiivisten aineiden tuotantoon, maakaasun ja jätevesien puhdistamiseen sekä maaperän rikastamiseen (Chisti 2007; Plaza ym. 2009; Yaakob ym. 2014; Rothlisberger-Lewis ym. 2016). Teoreettiset mahdollisuudet mikrolevien hyödyntämiseen osana kokonaisvaltaista aineiden kiertoa ovat valtavat. Pitkällä aikavälillä mikrolevien avulla voidaan mahdollisesti vähentää aliravitsemusta, fossiilisten polttoaineiden kulutusta ja vesistöjen saastumista sekä tarjota luonnollisia ja laadukkaita raaka-aineita muun muassa funktionaalisiin elintarvikkeisiin, terveyttä edistäviin ravintolisiin ja kosmetiikkatuotteisiin. Tutkittavana oleva ylikriittinen hiilidioksidiuutto on mahdollinen vaihtoehto käytetyille liuotinuutoille tutkimus- ja teollisuuslaitoksissa, jolloin puolestaan pystytään vähentämään ihmisille ja ympäristölle haitallisten liuottimien, kuten heksaanin ja kloroformin, käyttöä.

Mikrolevien kasvatuksen, ominaisuuksien sekä koostumuksen tutkimus on ollut viimeisen noin kymmenen vuoden aikana hyvin intensiivistä lisääntyen koko ajan. Kuitenkin sovellusten kaupallistaminen ja käyttöönotto on ollut suhteellisen vähäistä. Parhailtaan merkittävimpana rajoittimena mikroleväperäisen biomassan tuotannolle on viljelyn ja biomassan käsittelyn hinta (Uduman ym. 2010; Chisti 2013a; Zhang ym. 2016). Toisaalta leväperäisten biopolttoaineiden tuotannon käyttöönottoa ja tutkimuksen rahoitusta on viime vuosina rajoittanut osaltaan poikkeuksellisen matala maaöljyn hinta. Näin ollen viljely-, harvestointi- ja prosessointisektorilla kaivattaisiin kipeästi teknologisia edistysaskeleita vastaamaan taloudellisiin vaatimuksiin.

Tähän mennessä on pystytty kartoittamaan laaja kirjo erilaisia levien sisältämiä biomolekyylejä, joista lipidit ovat olleet viime aikoina erityisen suuren mielenkiinnon kohteena (Kumari ym. 2013). Juuri lipidien tuotantonsa johdosta mikrolevät tarjoavat potentiaalisen mahdollisuuden toimia tehokkaina biopolttoaineiden, kuten uusiutuvan biodieselin, mutta myös elintarvikkeeksi kelpaavan öljyn lähteenä (Chisti 2007; Harun ym. 2010). Lisäksi mikrolevät tarjoavat runsaasti bioteknologisia vaihtoehtoja muun muassa rasvahappojen, karotenoidien, proteiinin, ruoan ja rehun tuotannossa (Milledge 2011). Tunnetusta mikrolevien lajikirjosta vain pienen osan kemiallinen koostumus on kartoitettu.

Levien käyttöönotto voi tapahtua montaa eri reittiä. Kasvatus voisi teoriassa olla osa teollisen mittakaavan prosesseja, joissa ravinteita, kuten typpeä ja fosforia, halutaan suodattaa pois tai ottaa talteen jätevesistä, maatalouden valumavesistä tai teollisuuden lämpimistä lauhdevesistä. Toisaalta ruoaksi kasvatettavien levien kasvuolosuhteiden tulee olla tarkoin kontrolloituja sekä hygieeniseltä laadultaan valvottuja. Biopolttoaineiden tuotantoa varten kasvatusalustan kontaminoituminen ei sinänsä ole ongelma, mikäli leväbiomassan lisääntyminen ja koostumus ovat toivotulla tasolla. Tehokkaiden uuttomenetelmien kehittäminen teolliseen mittakaavaan on hyvin oleellista ja mahdollistaa biomassan lipidifraktion hyödyntämisen erillisenä tuotteena. Toimivan uuton on toteuduttava toistettavasti ja parhaimmillaan ilman työntekijöille ja ympäristölle myrkyllisiä orgaanisia liuottimia. Lipidien uuttamisen seurauksena jäljelle jäävä uuttojäännös sisältää levälajista riippuen vaihtelevassa suhteessa proteiinia ja hiilihydraatteja mutta myös muun muassa vesiliukoisia vitamiineja ja joitakin mineraaleja. Uuttojäännöksen hyödyntäminen on tärkeää, jotta kallis tuotantoprosessi voitaisiin saada taloudellisesti kannattavaksi. Eräs hyvin merkittävä teknologinen haaste mikroleväbiomassan tuotannossa on leväsolujen eristäminen niiden kasvualustasta (vedestä). Tämä haaste vaatii teknologisia innovaatioita, jotta koko tuotantoprosessi saadaan taloudellisesti tarkoituksenmukaiseksi, erityisesti biopolttoaineiden tuotantoa ajatellen (Uduman ym. 2010).

Lipidien uuttaminen elintarvikematriiseista on tehty perinteisesti puristamalla tuotteesta öljyä ja lähihistoriassa täydellisemmin erilaisilla liuotinuutoilla. Liuotinuutoilla pystytään eristämään tuotteesta lipidit hyvin perusteellisesti, mutta menetelmän käytön ongelma suuressa mittakaavassa on liuottimien verrattain kallis hinta ja myrkyllisyys ihmiselle ja ympäristölle (Machado ym. 2013). Tämä on johtanut korvaavien uuttomenetelmien kehitykseen, joista lupaavimmalta vaikuttaa ylikriittinen hiilidioksidiuutto (Brunner 2005). Kaasut kuten hiilidioksidi voidaan saattaa ylikriittiseen tilaan, kun systeemin painetta ja lämpötilaa nostetaan riittävästi, yli kyseisen kaasun kriittisen pisteen. Kriittisessä tilassa olevan ”fluidin” fysikaaliset ominaisuudet, kuten tiheys, viskositeetti ja diffuusiivisuus muuttuvat parantaen monilta osin aineen liuotinominaisuuksia. Uuttoliuottimena oleva hiilidioksidi palaa normaaliin olotilaansa, kaasuksi, kun uuttolaitteiston paine palautetaan normaaliksi ilmanpaineeksi. Siten varsinaiseen uutteeeseen ei jää jäämiä uuttoliuottimesta ja hiilidioksidi voidaan mahdollisesti kierrättää uusiokäyttöön tai vaikkapa johtaa mikroleväkasvustojen fotosynteesin raaka-aineeksi. Ylikriittisen uuton tehokkuutta ja selektiivisyyttä voidaan muokata vaihtelemalla uuttoparametreja, joita ovat esimerkiksi paine, lämpötila ja ylikriittisen fluidin virtausnopeus (Palavra ym. 2011; Taher ym. 2014). Kokonaistuoton isotermin

laatimisen avulla puolestaan pystytään arvioimaan menetelmän taloudellisuutta saannon ja kaasun kulutuksen suhteen (Meireles 2013).

Tutkimuksen tavoitteena oli selvittää ylikriittisen hiilidioksidiuuton käyttökelpoisuutta mikrolevien lipidien uuttamisessa verrattuna aiemmin tutkimusryhmässä käytössä olleeseen ASE-uuttoon (Accelerated Solvent Extraction). Tarkoituksena oli myös selvittää ylikriittisen hiilidioksidiuuton uuttoparametrien, kuten paineen, lämpötilan ja virtausnopeuden sekä staattisen vaiheen ja näytekoon vaikutusta uuton tehokkuuteen ja selektiivisyyteen sekä tutkia viiden mikrolevälajin (*Euglena gracilis*, *Selenastrum* sp, *Nannochloropsis gaditana*, *Chlorella vulgaris* ja *Spirulina platensis*) lipidikoostumusta. Laajemmin koko projektissa pyrittiin muun muassa selvittämään erilaisten kasvatusalustojen ja kasvuolosuhteiden mahdollista vaikutusta mikrolevien kasvuun ja lipidiprofiiliin sekä kartoittamaan mikroleväbiomassan prosessointi- ja käyttömahdollisuuksia. Kirjallisuuskatsauksen tavoitteena oli tarkastella teoreettisesti lipidien uuttomenetelmiä, erityisesti ylikriittistä uuttoa, sekä käydä läpi kirjallisuudessa jo esiintyvää aineistoa mikrolevien lipidien laadusta, määrästä ja näihin vaikuttavista tekijöistä. Erityistä huomiota oli tarkoitus kiinnittää kirjallisuuteen koskien kokeellisessa osassa käytettäviä lajeja. Lisäksi tavoitteena oli tarkastella mikrolevien lipidien mahdollisia käyttösovelluksia.

## 2 Kirjallisuuskatsaus

### 2.1 Ylikriittinen hiilidioksidiuutto (Supercritical Fluid Extraction, SFE)

#### 2.1.1 Teoriaa

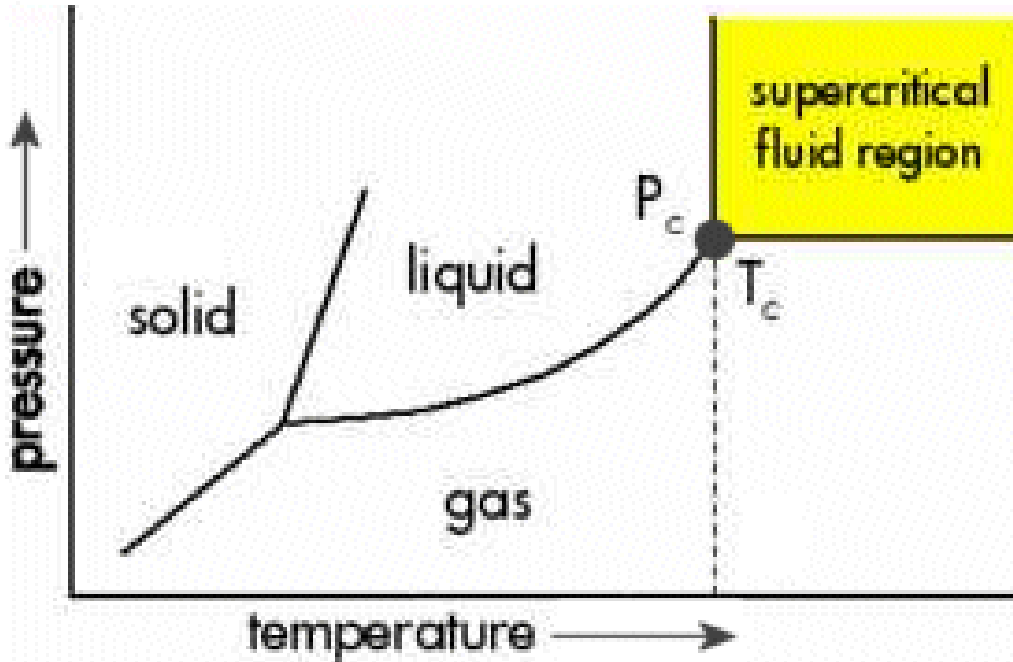
Ylikriittisellä fluidilla tarkoitetaan ainetta, joka on saatettu kaasusta ylikriittiseen tilaan eli kaasun lämpötila ja paine ovat kyseisen aineen kriittisiä arvoja suuremmat (Kuva 1). Tämä muuttaa aineen fysikaalisia ominaisuuksia. Aineella on silloin sekä nesteen että kaasun ominaisuuksia. Aineen tiheys, viskositeetti ja diffuusiivisuus lisääntyvät kaasun vastaaviin verrattuna samalla kun sen läpäisevyys kiinteässä tai puolikiinteässä aineessa paranee (Machado ym. 2013). Kriittisessä pisteessä olevan fluidin neste- ja kaasufaasien tiheys on täsmälleen sama. Liuottimen nestefaasiin verrattuna ylikriittisen fluidin



pintajännitys ja viskositeetti ovat matalampia, minkä vuoksi ylikriittinen fluidi pystyy tunkeutumaan näytteessä olevien kapeiden kanavien läpi tehokkaammin ja siten saavuttamaan hienojakoisenkin matriisin osat, joihin nestemäiset liuottimet eivät mahdollisesti pääsisi. Kuitenkin nestefaasiin verrattuna fluidin liuotusominaisuudet ja kyky kuljettaa aineita, erityisesti suurikokoisia molekyyliä, voivat päinvastoin heikentyä. Käytännössä uuttoa toteutettaessa korkea uuttopaine osaltaan auttaa uutettavien aineiden kuljettamisessa.

### **Ylikriittisen uuton liuottimet**

Hiilidioksidi on ylivoimaisesti eniten käytetty kaasu ylikriittisessä uutossa. Sen etuihin lukeutuvat edullinen hinta, turvallisuus, helppo saatavuus, helposti saavutettava korkea puhtausaste ja hiilidioksidin verrattain matalat lämpötilan ja paineen kriittiset arvot (31,1 °C ja 73,8 bar) (Güçlü-Üstündag ja Temelli 2000; Temelli 2009; Machado ym. 2013; Goto ym. 2015). Esimerkiksi etanolin kriittisen pisteen lämpötila ja paine ovat 240,9 °C ja 61,4 bar ja veden 374,1 °C ja 220,6 bar (Brunner 1994). Teoriassa siis lämpöherkkiä yhdisteitä, kuten monitydyttymättömiä rasvahappoja ja rasvaliukoisia vitamiineja, voidaan uuttaa hyvinkin matalissa lämpötiloissa ylikriittisen hiilidioksidin avulla. Hiilidioksidin tiheys kaasusta ylikriittiseen fluidiin kasvaa vähintään yli 200-kertaisesti. Hiilidioksidikaasun tiheys ilmakehän paineessa ja 25 °C:een lämpötilassa on noin 1,98 kg/m<sup>3</sup>, mutta saturoituneen nestemäisen hiilidioksidin tiheys kriittisessä pisteessä on 417,2 kg/m<sup>3</sup> (Meireles 2013). Vastaavasti paineen ollessa 500 bar ja lämpötilan 80 °C ylikriittisen hiilidioksidin tiheys on noin 876 kg/m<sup>3</sup>. Ylikriittinen etaani ja propaani voisivat toimia tehokkaampina liuottimina vain poolittomille yhdisteille, mutta merkittävänä ongelmana laajemmassa käytössä on näiden aineiden syttymisherkkyys. Lähtökohtaisesti ylikriittisessä tilassa poolittomana liuottimena hiilidioksidi ei uuta tehokkaasti poolisia lipidejä, kuten fosfolipidejä ja glykolipidejä. Kuitenkin uuton paine ja lämpötila vaikuttavat hiilidioksidin poolisuus-käyttäytymiseen, sillä lämpötilan ja paineen kasvaessa runsaasti yli kriittisen pisteen arvojen hiilidioksidi saa poolisempia ominaisuuksia (Meireles 2013). Matalassa paineessa, esimerkiksi 100 bar, ylikriittinen hiilidioksidi uuttaa helposti massaltaan pieniä ja haihtuvia yhdisteitä, kuten elintarvikkeiden aromiaineita (King 2002). Hiilidioksidin ohella uutossa on myös mahdollista käyttää niin kutsuttuna oheisliuottimena poolisia liuottimia, kuten etanolia tai isopropanolia, jolloin pystytään perusteellisemmin eristämään näytteen pooliset lipidifraktiot (Meireles 2013). Oheisliuotinta valitessa on syytä ottaa huomioon menetelmälle mahdollisesti tavoiteltavan ”Puhtaan teknologian” tai ”Vihreän teknologian” termien käytön lainsäädännölliset edellytykset.



Kuva 1. Hiilidioksidin faasikaavio (NASA 2003)

## Uuttoparametrit

Ylikriittisessä uutossa merkittävimmät uuttoparametrit ovat virtausnopeus, lämpötila, paine ja uuton kesto. Näitä parametreja muuttamalla voidaan vaikuttaa lipidien uuton tehokkuuteen ja selektiivisyyteen, ja siten optimoida menetelmä tarkoituksenmukaiseksi (King 2002). Optimoinnissa tulee tavallisesti ottaa huomioon uuton hinta liuottimen kulutuksen, laitteiston ja uuton keston osalta sekä uutettavan tuotteen saanto ja haluttu puhtaus. Uuton tehokkuutta kuvaavat erityisesti diffuusiivisuus ja liukenevuus. Liuotinhiilidioksidin diffuusiivisuus näytematriisiin paranee, kun lämpötilaa nostetaan ja kun kiinteä näyte on mahdollisimman hienojakoista. Liuotettavien aineiden liukoisuus hiilidioksidiin puolestaan kasvaa, kun uuttohylsyn painetta nostetaan.

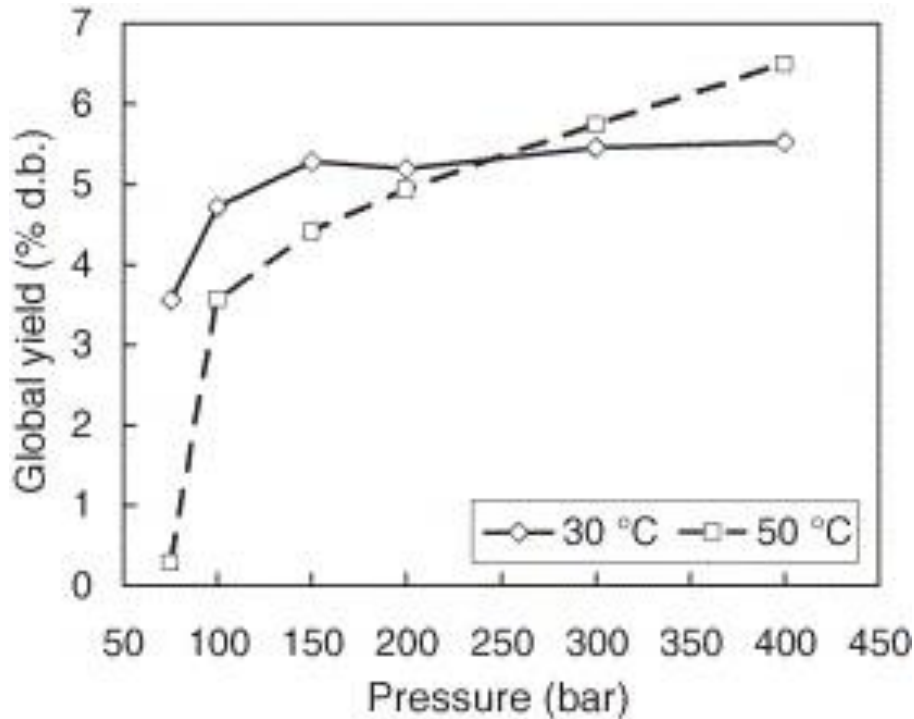
Uutto voidaan myös suorittaa staattisena tai dynaamisena. Staattisessa uutossa näytematriisiin painetaan aluksi uuttoluotinta ja virtaus pysäytetään halutuksi ajaksi (staattinen vaihe). Tämän jälkeen aloitetaan uuttoluotimen jatkuva virtaus (dynaaminen vaihe). Dynaamisessa uutossa uuttoluotin virtaa näyteen läpi koko uuton ajan. Staattisen vaiheen aikana on oletettavaa, että uuttopatruunan sisällä paineistettu hiilidioksidi tunkeutuu näytematriisiin sisään perusteellisemmin kuin virratessaan ainoastaan näyteen läpi. Näin ollen staattinen vaihe voi lisätä saantoa sekä lisäksi vähentää hiilidioksidin kulutusta

korvatessaan aikaa dynaamiselta uutolta. Staattisen vaiheen aikana liuotin ei virtaa näytepatruunasta ulos, joten liuotinta ei myöskään kulu vaiheen aikana. Uutettavan kiinteän aineen ollessa jokin elintarvikematriisi, kuten mikroleväjauhe, se sisältää vaihtelevan määrän hiilidioksidiin liukenemattomia aineita, erityisesti polysakkarideja, proteiineja sekä mineraaleja. Uutettavien aineiden liukoisuus hiilidioksidiin vaihtelee ja siten uuttoparametreja muuttamalla voidaan vaikuttaa eri yhdisteiden uututumiseen (Meireles 2013). Näytematriisin lipidien uuttamista voidaan tehostaa nostamalla uuttopainetta. Kuitenkin uuttopaineen vaikutus uuton tehoon vähentyy, kun painetta kasvatetaan yli 300 baarin. Erään tutkimuksen mukaan paineen nostaminen 300 bar:n ja 700 bar:n välillä 50–70 °C:ssa tehostaa näytteen lipidien uuttumista vain hieman (King 2002).

Paineen lasku alle aineen kriittisen pisteen aiheuttaa ylikriittisen fluidin palautumisen kaasuksi, jolloin se menettää liuotinominaisuutensa ja liuotetut yhdisteet saostuvat. Samanaikainen paineen ja lämpötilan nousu lisää aineen liukoisuutta.

Uuton saannon optimointiin käytetään niin kutsuttua kokonaistuoton ( $X_0$ ) isotermiä (Global Yield Isotherm, GYI), joka määritetään tavallisesti paineen ja saadun tuoton suhteen vähintään kahdessa eri lämpötilassa (Kuva 2) (Quispe-Condori ym. 2005; Meireles 2013). Kokonaistuoton isotermiä määritettäessä käytetään valittua liuotin/näyte-massasuhdetta (Solvent mass to Feed mass, S/F), jonka tulisi olla vähintään 17 (Meireles 2013). Liuottimen kulutuksen massa puolestaan lasketaan käytetyn virtausnopeuden (kg/s) ja uuton keston avulla. Siten esimerkiksi 1 g näytteen uutaminen 1 h ajan edellyttää vähintään hiilidioksidivirtauksen  $4,72 \times 10^{-6}$  kg/s, jotta S/F-arvoksi saadaan 17. Oheisliuottimen käyttö uuton yhteydessä voi tosin sekoittaa kokonaistuoton tuloksia (Meireles 2013).

Uuttokäyrillä (Overall Extraction Curves, OEC) kuvataan uuton kulkua useimmiten saannon ja hiilidioksidin kulutuksen suhteen. Käyrät tehdään erikseen eri lämpötiloissa ja virtausnopeuksissa, ja uuttojen aikana näytettä kerätään tietyissä pisteissä saannon määrittämistä varten.



Kuva 2. Kokonaistuoton isotermi *Artemisia annua* -lehtien uuttamiseen ylikriittisellä hiilidioksidilla (Quispe-Condori ym. 2005)

Ylikriittisiä fluideja varten vaaditaan turvalliset, painetta ja lämpötilaa kestävät laitteistot. Tällä hetkellä laitteistot ovat merkittävästi kalliimpia perinteisiin uuttolaitteistoihin verrattuna, mikä osaltaan hidastaa menetelmän käyttöönottoa teollisessa mittakaavassa. Erilaisten lipidiluokkien liukoisuus ylikriittiseen hiilidioksidiin vaihtelee ja on riippuvainen etenkin lämpötilasta ja paineesta. Aineiden liukoisuutta on pyritty kuvaamaan laskennallisesti Chrastilin yhtälön avulla (Güçlü-Üstündag ja Temelli 2000; Güçlü-Üstündag ja Temelli 2004).

### Muut lipidien uuttomenetelmät

Ylikriittisellä hiilidioksidiuutolla on mahdollista korvata joitain perinteisempiä liuotinuuttoja, neste-neste-uuttoja sekä mahdollisesti mekaanisia uuttoja. Mekaaniset uutot tapahtuvat usein puristamalla, jolloin mikrolevien lipidisaanto jää jonkin verran liuotinuuttoja pienemmäksi. Lisäksi mekaaninen puristus voi olla kohtalaisen hidaskäyttöinen menetelmänä (Harun ym. 2010). Kemiallisessa analytiikassa ASE-uutto (Accelerated Solvent Extraction), Folchin menetelmä (Folch ym. 1957) ja Bligh ja Dyerin menetelmä (Bligh ja Dyer 1959) sekä Soxhlet-uutto ovat olleet laajalti käytössä mikrolevien kokonaislipidien uutossa. Kaikki edellä mainitut menetelmät uuttavat tehokkaasti leväsolujen lipidit, osittain riippuen esikäsittelystä, mutta sisältävät orgaanisia liuottimia, jotka ovat enemmän tai vähemmän haitallisia ihmisille. Eräessä tutkimuksessa kloroformin ja metanolin seos (1:1, v:v) osoittautui

tehokkaimmaksi uuttoluottimeksi *Chlorellan* lipidien uutamisessa (Choi ym. 2014). ASE-uutolla saadaan erittäin tehokkaasti uutettua näytematriisiin lipidit käyttäen liuottimena esimerkiksi pelkkää etanolia (Herrero ym. 2005). ASE-uutto muiden orgaanisia liuottimia hyödyntävien menetelmien ohella ei kuitenkaan suoraan sovellu teollisen mittakaavan uuttoon, jossa uutteesta on tarkoitus suoraan tuottaa esimerkiksi elintarvikekelpoista materiaalia. Tämä johtuu siitä, että uutetut lipidit ovat liuenneena suureen määrään liuotinta. Sen sijaan SFE-uutossa uute ei sisällä liuotinta käytännössä ollenkaan. Teollisen mittakaavan uuttojen lisäksi SFE-uuttoa voidaan soveltaa myös moniin muihin kemiallisiin analyyseihin, kuten esikäsitelymenetelmänä ennen nestekromatografiaa tai osana proteiinien puhdistusta (Careri ym. 2001).

## 2.1.2 Käyttö elintarvikematriisien uuttoprosesseissa

Ylikriittinen hiilidioksidiuutto ympäristö- ja käyttäjäystävällisenä menetelmänä tarjoaa runsaasti mahdollisuuksia erilaisten elintarvikematriisien käsittelyyn sekä tutkimustarkoituksessa että teollisessa mittakaavassa. Menetelmän tärkeimpänä etuna voidaan pitää juuri toimimista niin kutsuttuna vihreänä teknologiana. Muita merkittäviä etuja ovat kuitenkin myös edullinen ja puhdas liuotin, mahdollisuus uuttoa tarvittaessa verrattain matalissa lämpötiloissa ja sopivan optimoinnin seurauksena saavutettava uutto selektiivisyys.

### **Tunnetut käyttökohteet**

Toistaiseksi ylikriittistä hiilidioksidiuuttoa on käytetty monipuolisesti erilaisissa elintarvikkeiden uuttoprosesseissa. Tällaisia ovat esimerkiksi erilaisten öljyjen tai muiden lipidifraktioiden uutaminen elintarvikkeista, kuten siemenistä ja lehdistä, ja proteiinien tai muiden polymeerien puhdistaminen (Ayas ja Yilmaz 2014; Ma ym. 2014). Menetelmää on käytetty lisäksi muun muassa öljyjen uuttamiseen mekaanisen kylmäpuristuksen seurauksena syntyvästä siemenjäännöksestä sekä useiden fenolisten aineiden ja makuaineiden eristykseen (Pyo ja Kim 2014; Aladic ym. 2014; Garmus ym. 2015). Myös raskasmetallien poistaminen elintarvikematriisista voi onnistua ylikriittisellä hiilidioksidiuutolla (Lin ym. 2014). Mikrolevien lipidien ja bioaktiivisten aineiden uutamisessa ylikriittinen hiilidioksidiuutto vaikuttaa lupaavalta vaihtoehdolta (Meireles 2013; Goto ym. 2015). Poolittomien lipidien, kuten triasyyliglyserolien (TAG) ja eräiden pigmenttien eristäminen, voi olla tehokasta juuri ylikriittisen uutto

avulla (Goto ym. 2015). Esimerkiksi *C. vulgaris* -viherlevän pigmenttejä on onnistuttu uuttamaan hiilidioksidilla (Kitada ym. 2009). TAG:en tiedetään liukenevan ylikriittiseen hiilidioksidein melko huonosti matalissa lämpötiloissa, mutta lämpötilan noustessa yli 60 °C:n lisääntyy liukoisuus merkittävästi. Tämä edellyttää kuitenkin samalla yli 800 bar:n paineen. Toisaalta 80 °C:ssa TAG:en liukoisuus lisääntyy merkittävästi, kun paine on yli 700 bar:a (King 2002).

Levämatriisin esikäsitteily voi vaikuttaa merkittävästi lipidien erottumiseen mikrolevämatriisista, sillä erilaiset uutettavat aineet voivat sijaita mikroleväsoluissa solukalvolla, lipidipisaroissa solulimassa tai vaikka kloroplastien kalvoilla. Siten muun muassa solujen hajotusaste vaikuttaa eri lipidiluokkien irtoamiseen levämatriisista ja liukenemiseen ylikriittiseen hiilidioksidein. *Botryococcus braunii* -mikrolevä puolestaan on ainoa tunnettu laji, joka tuottaa lipidejä pisaroina solujen ulkopuolelle (Largeau ym. 1980). Mikrolevänäytteille tehdään useimmiten kylmäkuivaus (lyofilisaatio) ennen uuttoa, jotta näytteen vesipitoisuus saadaan lämpöherkkiä aineita hajottamatta mahdollisimman pieneksi. Joidenkin potentiaalisten mikrolevälajien lipidien hyödyntämistä hankaloittaa vahva soluseinä, joka estää lipidien tehokkaan uuttumisen (Lee ym. 2012). Esimerkiksi karotenoidien saannon on todettu olevan hyvin erilainen, jos uutto on tehty perusteellisesti hienonnetulle levänäytteelle verrattuna vain osittain hienonnettuun levänäytteeseen. Saanto nimenomaan kasvaa silloin, kun solurakenteet on saatu hajotettua ennen ylikriittistä uuttoa. Kyseinen karotenoidien uuttokoe suoritettiin 40 °C:n lämpötilassa ja 300 bar:n paineessa käyttäen 0,04 kg/h uuttovirtausta (Palavra ym. 2011). Samassa tutkimuksessa tutkittiin uuttopaineen vaikutusta *Botryococcus braunii* -mikrolevän hiilivetyjen uuttumiseen 40 °C:n lämpötilassa. Käytetyt uuttopaineet olivat 125 bar, 200 bar ja 300 bar, joiden perusteella voitiin huomata saannon kasvavan paineen kasvaessa. Kaikkiaan hiilivetyjen saanto oli noin 60 % suurempi 300 bar:n paineessa verrattuna 125 bar:n uuttoon (Palavra ym. 2011).

Eräässä toisessa tutkimuksessa *B. braunii* -mikrolevän lipidejä uutettiin 200–250 bar:n paineessa ja 50–80 °C:n lämpötilassa. Tällöin suurin saanto rasvahappoina laskettuna saavutettiin 250 bar:n paineessa ja 50 °C lämpötilassa. Rasvahappojen saanto oli vain noin 3,4 % pienempi verrattuna Blighn ja Dyerin menetelmällä suoritettua uuttoa saantoon (Santana ym. 2012). Myös Mendes ym. (1995) totesivat tutkimuksessaan, että uuttopaineen kasvattaminen lisää lipidien saantoa. Lisäksi korkeamman lämpötilan (55 °C verrattuna 40 °C) todettiin lisäävän hieman saantoa korkeassa paineessa (350 bar verrattuna 200 bar), mutta vähentävän saantoa matalammassa paineessa (Mendes ym. 1995). Tämä johtuu oletettavasti siitä, että lämpötilan noustessa fluidin tiheys pienenee siten, että lipidien liukoisuus vähenee. Uuton

tehokkuutta ja hiilidioksidin kulutusta tulee arvioida tarkoituksenmukaisesti esimerkiksi kokonaistuottoisotermin (GYI) ja uuttokäyrien (OEC) avulla (Quispe-Condori ym. 2005; Taher ym. 2014).

### **Mahdollisia käyttökohteita**

On oletettavaa, että uutun alkuvaiheessa levämatriisista erottuu solujen ulkopuolella mahdollisesti olevat lipidit (mikäli sellaisia näytteessä on) ja vasta tämän jälkeen solun sisäiset ja solukalvon lipidit. Tosin on mahdollista, että tehokkaassa uutossa lähes kaikki uuttuvat aineet irtoavat näytteestä samaan aikaan pian uutun aloittamisen jälkeen. Voimakkaasti poolisia osia sisältävien lipidien, kuten fosfolipidien ja glykolipidien uuttaminen ylikriittisellä hiilidioksidilla on usein epätäydellisempää verrattuna poolisiin lipideihin ilman oheisliuottimien käyttöä, johtuen juuri hiilidioksidin poolisesta luonteesta. Tämä on kuitenkin vahvasti riippuvaista levälajista ja esimerkiksi levän soluseinän koostumuksesta. Muun muassa piimän lipidien uuttaminen SFE:lla poistaa näytteestä suhteessa enemmän poolittomia lipidejä (Astaire ym. 2003). Myös *Nannochloropsis oculata* -mikrolevän lipidien uuttaminen SFE:lla tuotti uutteen, jossa TAG:a oli noin 94 % lipideistä (Mouahid ym. 2013). Monilla mikrolevälajeilla on voimakkaat soluseinät, jotka voivat sisältää useana kerroksena esimerkiksi selluloosaa, mannoosia sisältäviä tai muita hyvin kompleksisia polysakkarideja. Solurakenteiden hajottaminen ennen uuttoa esimerkiksi mikroaaltokäsittelyllä voi parantaa SFE-uuton lipidisaantoa (Dejoye ym. 2011). Solurakenteiden hajotukseen on käytetty muun muassa liuottimia, happokäsittelyä, ultraääntä, mikroaaltokäsittelyä tai näiden yhdistelmiä. Myös ylikriittinen hiilidioksidi pystyy teoriassa hajottamaan solurakenteita jonkin verran (Kim ym. 2015). Erityisesti elintarvikesovelluksissa esikäsittelymenetelmiä valitessa tulee ottaa huomioon mahdollisesti herkästi tuhoutuvien yhdisteiden käyttäytyminen.

Ylikriittisen uutun jälkeen eristetystä uutteesta voidaan tehdä paljon kemiallisia määryksiä. Tavanomaisia uutteesta tutkittavia aineita ja mahdollisia määrytysmenetelmiä ovat muun muassa seuraavat: lipidiluokkien osuudet ja koostumus (esim. nestekromatografisesti tai ohutlevykromatografisesti), rasvahappokoostumus kaasukromatografialla käyttäen liekki-ionisaatiodektoria, karotenoidien laatu ja pitoisuudet nestekromatografialla (käänteisfaasi) käyttäen UV/VIS-detektoria, kokonaiskarotenoidit ja klorofyllit spektrofotometrillä, sterolien määrä ja laatu kaasukromatografisesti sekä rasvaliukoisten vitamiinien, kuten alfa-tokoferolin määrä nestekromatografisesti (Palavra ym. 2011).

## 2.2 Mikrolevien lipidit

### 2.2.1 Yleistä mikrolevistä

Mikrolevät ovat hyvin monimuotoinen joukko yksisoluisia tai yksinkertaisia monisoluisia, usein fotosyntetioivia eliöitä. Taksonomisesti määriteltynä suurin osa mikrolevistä on kasveja, kuten viherlevät (*Chlorophyta*) ja punalevät (*Rhodophyta*), mutta myös osa alkueliöistä, kuten Excavaatit (*Excavata*) ja Kromalveolaatit (*Chromalveolata*) luokitellaan käyttäytymisen ja morfologiansa perusteella mikroleviin. Lisäksi prokaryooteista syanobakteerit (*Cyanophyta*) katsotaan usein osaksi mikrolevien joukkoa. Useimmat mikrolevälajit ovat fotoautotrofeja, mutta myös mikсотrofisia ja heterotrofisia tai energian saannin osalta joustavia lajeja tunnetaan. Mikrolevät ovat vesistöjen merkittävin perustuottajien joukko, eli ne palauttavat ilmakehästä veteen liukenevaa hiilidioksidia orgaaniseen muotoon ja siten ylempien trofiatasojen eliöiden käytettäväksi. Mikrolevien tehokasta epäorgaanisen hiilen, typen ja fosforin käsittelyä olisi hyvin toivottavaa saada hyödynnettyä suuressa mittakaavassa vastapainoksi vallitsevalle fossiilisten polttoaineiden ja synteettisten lannoitteiden käytölle, joiden seurauksena hallitsemattomia määriä hiilidioksidia vapautuu ilmakehään ja ravinteita valuu vesistöihin.

Mikroleviä hyödynnetään parhaillaan mm. elintarvikkeina, rehuna, arvokkaiden biomolekyylien tuottamisessa sekä enenevässä määrin biopolttoaineiden tuottamisessa. Teoreettisesti tarkasteltuna mahdollisuudet mikrolevien hyödyntämisessä ovat valtavat. Nopea uusiutuvan biomassan tuotanto alueilla, joilla se ei vie tilaa viljelysmaalta, houkuttelee biopolttoaineiden tuotantoon (Chisti 2007). Uusien antimikrobisten tai farmakologisesti aktiivisten aineiden löytyminen mikrolevien tuottamina kiinnostaa useita tutkijoita (Milledge 2011). Lisäksi mikrolevät sisältävät kuivapainoonsa nähden valtavasti proteiinia, vitamiineja, kivennäisaineita sekä joissakin tapauksissa monia muita arvokkaita biomolekyyliä, kuten antioksidanteja, karotenoideja ja pitkäketjuisia monityydyttymättömiä rasvahappoja (Chu 2011; Guedes ym. 2011; Christaki ym. 2013).

Kiinnostava metabolinen piirre mikrolevissä on niiden kyky sopeuttaa aineenvaihduntaansa vallitseviin ympäristön olosuhteisiin. Kasvu ympäristön abioottiset tekijät, kuten säteilyn voimakkuus, ravinteiden saatavuus, lämpötila ja pH vaikuttavat olennaisesti mikroleväsolujen kasvuun ja syntetioimien yhdisteiden laatuun (Christaki ym. 2011; Takaichi 2011; Skjånes ym. 2013). Jotkin levälajit reagoivat



stressiolosuhteisiin tuottamalla suojakseen tiettyjä aineita, kuten sekundaarisia karotenoideja (He ym. 2007). Mikäli tällaiset aineet ovat kiinnostuksen kohteena, tulee tunnettuja stressitekijöitä hyödyntää kasvatuksen vaiheissa. Eri mikrolevälajeilla on myös hyvin erilaisia vaatimuksia optimaalisista kasvuolosuhteista. Esimerkiksi viherlevä *Dunaliella salina* kasvaa erinomaisesti hyvin suolapitoisessa (jopa 21 % NaCl) vedessä (Marín ym. 1998).

### 2.2.2 Lipidifraktiot

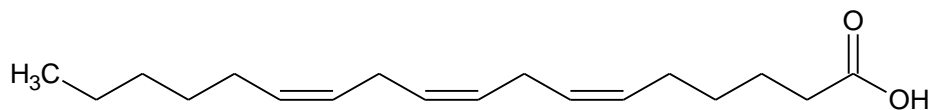
Triasyyliglyseroleja esiintyy mikrolevissä laajasti, mutta niiden määrä ja osuus kokonaislipideistä vaihtelee huomattavasti lajin ja kasvuolosuhteiden mukaan. Hyvin merkittävä tekijä mikrolevien TAG-pitoisuudelle on elinympäristön typpi- ja fosforipitoisuus. Rungas typen ja fosforin määrä edistää mikrolevien proteiinisynteesiä ja siten kasvua ja lisääntymistä. Samalla muun muassa proteiinisynteesissä tarvittavien vitamiinien, erityisesti B-vitamiinien, pitoisuus on oletettavasti suurimmillaan. Vähäinen typen määrä vastaavasti ohjaa solujen metaboliaa proteiinisynteesin sijaan lipidisynteesiin ja siten johtaa TAG:en kertymiseen pisaroiksi soluihin (Guedes ym. 2011). Lisäksi levien kasvu voimakkaassa säteilyn intensiteetissä tai muutoin yhteyttämisen kannalta otollisissa olosuhteissa voi aiheuttaa soluihin energiaylijäämää, joka kanavoituu lipidisynteesiin samalla kun aminohappojen tuotanto on maksimissaan. Kasvuolosuhteet ja kasvun vaihe voivat edelleen vaikuttaa levien rasvahappoprofiiliin. Esimerkiksi pitkäketjuisten monityydyttymättömien rasvahappojen osuus kokonaisrasvahapoista vaihtelee merkittävästi eri kasvuvaiheissa (Tonon ym. 2002). Neutraalilipideistä suurin luokka mikrolevissä on tavallisesti juuri TAG:t niiden toimiessa tiiviinä energian varastointimuotona (Kumari ym. 2013).

Mikrolevistä etenkin *Chromalveolata*-kuntaan kuuluvat suvut, kuten *Nannochloropsis*, sisältävät usein pitkäketjuisia monityydyttymättömiä rasvahappoja (PUFA), joita ei esiinny maalla viljeltävissä kasveissa. Viherlevät, kuten *Chlorella*, punalevät sekä syanobakteerit, kuten *spirulina*, sisältävät hyvin vähän yli 18 hiiltä pitkiä tyydyttymättömiä rasvahappoja, mutta voivat sisältää jonkin verran öljyhappoa, linoli-, alfa-linoleeni-, ja gamma-linoleenihappoa (Lang ym. 2011). Monityydyttymättömistä rasvahapoista pitkäketjuiset arakidonihappo (AA), eikosapentaeenihappo (EPA) ja dokosaheksaeenihappo (DHA, Kuvat 3 ja 4), ovat tunnusomaisia eräille merissä eläville

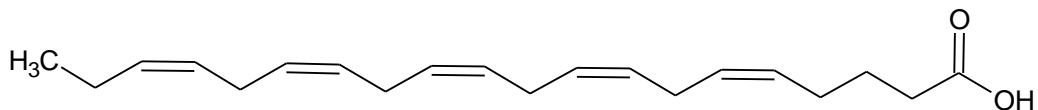
mikrolevälajeille, kun taas makean veden levissä esiintyy pääasiassa linolihappoa, gamma-linoleenihappoa ja alfa-linoleenihappoa (Kumari ym. 2013). PUFA:n osuus kokonaisrasvahappomäärästä vaihtelee kaikkiaan 10 ja 70 %:n välillä. Monia muita maakasveissa harvinaisia rasvahappoja esiintyy vaihtelevasti pieniä määriä mikrolevissä. Esimerkiksi *dinoflagellata*-leviin kuuluvissa suvuissa *Karenia*, *Karlodinium* ja *Takayama* on havaittu pieniä määriä (alle 1 %) erittäin pitkäketjuisia 28:7 (n-6)- ja 28:8 (n-3)-rasvahappoja sekä useita muita harvinaisia rasvahappoja (Mooney ym. 2007). Rasvahapot ovat leväsoluissa kiinnittyneinä pääasiassa triasyyliglyseroleihin, fosfolipideihin, vahoihin, glykolipideihin ja sfingolipideihin, joskin näiden lipidiluokkien osuudet ovat useimpien levien osalta selvittämättä. Monityydyttymättömien rasvahappojen hapettua soluihin voi myös muodostua hapettumistuotteita oksilipiinejä (Kumari ym. 2013).

Muun muassa *Nannochloropsis oceanica* (*Eustigmatophyceae*)- ja *Phaeodactylum tricornutum* (*Bacillariophyceae*)-mikrolevien on todettu kerryttävän itseensä EPA:a 2,8 % ja 2,3 % kuivapainostaan, kun taas *Isochrysis galbana* ja *Pavlova* sp. (*Prymnesiophyceae*) voivat sisältää huomattavia määriä DHA:a (1,6 % ja 1,3 % kuivapainostaan) (Patil ym. 2007; Khozin-Goldberg ja Boussiba 2011). Normaaleissa kasvuolosuhteissa näiden pitkäketjuisten monityydyttymättömien rasvahappojen katsotaan enimmäkseen olevan liittyneenä mikrolevien poolisiin lipideihin, kuten fosfolipideihin, kun taas tyydyttyneet ja kertatyydyttymättömät rasvahapot ovat enemmistönä TAG:eissa (Mitra ym. 2015).

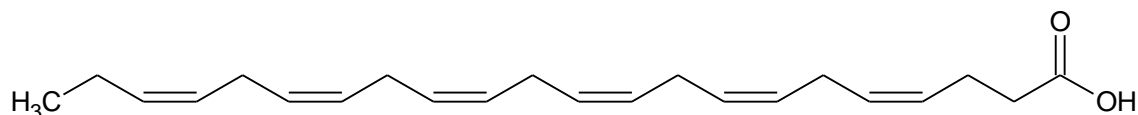
Ihmisen elimistö tarvitsee EPA:a ja DHA:a ja pystyy itse tuottamaan näitä rasvahappoja ravinnosta saatavasta alfa-linoleenihaposta (C18:3 n-3). Elimistössä EPA toimii lähtöaineena eräille kudoshormoneille, kuten leukotrieeneille, prostaglandiineille ja tromboksaaneille (Poorani ym. 2016). DHA puolestaan toimii muuna muassa rakenteellisena osana eräille lipideille muun muassa silmissä ja aivoissa (Horrocks ja Yeo 1999). EPA:n ja DHA:n merkitystä ihmisen terveydelle on tutkittu runsaasti, ja niiden vaikutus esimerkiksi normaaliin sikiönkehitykseen, sydän- ja verisuoniterveyteen sekä kognitiiviseen toimintakykyyn on pystytty tutkitusti osoittamaan (Swanson ym. 2012). Lisäksi kyseisten rasvahappojen toiminta tulehdusta alentavina aineina on merkille pantava ominaisuus (Siriwardhana ym. 2012).



Kuva 3. Gamma-linoleenihapon (C18:3 n-6) rakennekaava.



Kuva 4. Eikosapentaeenihapon (C20:5 n-3) rakennekaava.



Kuva 5. Dokosaheksaeenihapon (C22:6 n-3) rakennekaava.

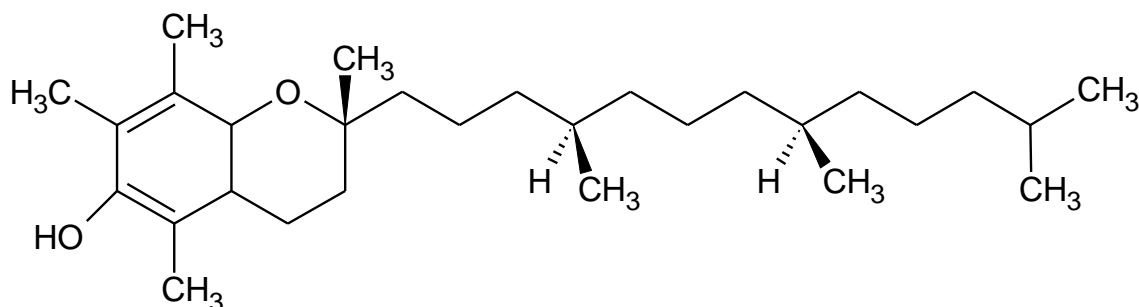
Fosfolipidit muodostavat bipolaarisen luonteensa vuoksi soluissa yleisesti esiintyviä kaksoiskalvorakenteita, liposomeja ja misellejä. Siten niitä esiintyy jonkin verran kaikissa mikrolevissä eikä niiden pitoisuus vaihtele kasvuolosuhteiden vuoksi yhtä paljon kuin TAG:en. Tavallisimpia mikrolevien sisältämiä fosfolipidejä ovat fosfatidyylikoliini (PC, jopa yli 60 % fosfolipideistä punalevissä), fosfatidyylietanolamiini (PE), fosfatidyyliglyseroli (PG, 20–47 % fosfolipideistä viherlevissä), fosfatidyyliiseriini (PS), fosfatidyyli-inositoli (PI) ja fosfatidihappo (PA), mutta pieniä määriä sfingolipidejäkin esiintyy levissä, erityisesti punalevissä (Khotimchenko ym. 2000; Kumari ym. 2013).

Glykolipidejä, eli hiilihydraattiosan sisältäviä lipidejä, esiintyy laajasti mikrolevien yhteyttämiskalvoilla. Näistä yleisimpiä ovat monogalaktosyylidiasyyliglyseroli (MGDG), digalaktosyylidiasyyliglyseroli (DGDG) sekä sulfoniryhmän sisältävä sulfokinovosyylidiasyyliglyseroli (SQDG). Myös joitakin betaiinilipidityyppejä on havaittu esiintyvän muun muassa viherlevissä ja ruskolevissä. Sterolit ovat tärkeitä solukalvojen komponentteja eukaryoottisille mikroleville siinä missä maakasveille ja eläimillekin. Steroleja solut tarvitsevat esimerkiksi lipidikalvojen juoksevuuden säätelyyn ja siten niitä esiintyy laajasti mikrolevissä. Näiden lisäksi levissä esiintyy vaihtelevasti pieniä määriä harvinaisempia lipidikomponentteja (Kumari ym. 2013).

Mikrolevät tuottavat myös runsaasti pigmenttejä, joista osa on ominaisia vain leville. Yhteyttämispigmenttejä ovat esimerkiksi klorofyllit, fykobiliproteiinit ja niin kutsutut primäärikarotenoidit (Pulz ja Gross 2004). Lisäksi mikrolevät tuottavat ympäristön olosuhteista riippuen

vaihtelevan määrän sekundaarikarotenoideja, joiden merkitys on suojata solua muun muassa lämmön ja säteilyn aiheuttamalta stressiltä. Esimerkiksi astaksantiini toimii tärkeänä suojaavana sekundaarikarotenoidina monille lajeille, kuten *Haematococcus pluvialis* -viherlevälle, joka pystyy sopivissa kasvuolosuhteissa tuottamaan tätä karotenoidia jopa 3 % kuivapanostaan (Christaki ym. 2011).

Alfa-tokoferoli eli tuttavallisemmin E-vitamiini on lipidiantioksidantti, jota esiintyy laajasti eliökunnassa. Alfa-tokoferoli koostuu kromanolirenkaasta, jossa on kiinnittyneenä yksi hydroksyyli-ryhmä, sekä alifaattisesta hiilivetyketjusta (Kuva 5). Rakenteensa vuoksi alfa-tokoferoli sijoittuu soluissa pääsääntöisesti lipidikalvoille, etenkin solukalvolle, joissa se toimii antioksidanttina suojaen hapettumiselta kalvojen muita lipidejä, kuten monityydyttymättömiä rasvahappoja. Tutkimusryhmän aiempien kokeiden perusteella monet mikrolevät näyttävät sisältävän jonkin verran alfa-tokoferolia. Myös kirjallisuudessa on esitetty eräiden mikrolevien sisältävän merkittäviä määriä alfa-tokoferolia (Mudimu ym. 2015). Eräässä tutkimuksessa *N. oculata* -mikrolevän todettiin sisältävän parhaimmillaan noin 2300 µg/g alfa-tokoferolia (Durmaz 2007). Useimmissa mikrolevien lipidejä koskevissa tutkimuksissa on keskitytty määrittämään kokonaislipidipitoisuutta, rasvahappoja tai pigmenttejä, mutta vain harvoin tokoleita. Kuitenkin tokolipitoisuuksien tunteminen on hyvin olennaista niiden ravitsemuksellisen ja antioksidatiivisen vaikutuksensa vuoksi, mikäli tavoitteena on tuottaa elintarvikkeeksi tarkoitettuja tuotteita.



Kuva 6. Alfa-tokoferolin rakennekaava

## *Euglena*

Alkueliöihin kuuluvien *Euglena* (*Euglenophyceae*, *Excavata*) -mikrolevien, kuten *E. gracilis*, sisällä olevissa plastideissa elää endosymbioosissa viherleväsoluja (Ahmadinejad ym. 2007). Nämä metaboliaaltaan joustavat levät voivat tuottaa tarvitsemansa energian yhteyttämällä, mikсотrofisesti tai heterotrofisesti käyttämällä orgaanista hiilen lähdettä (Krajcovic ym. 2015). Lisäksi ne pystyvät kasvamaan hyvin laajalla pH-alueella (Yamane ym. 2001). *Euglena*-levät voivat kerryttää itseensä merkittävän määrän lipidejä kasvaessaan typen puutteessa. *Euglenojen* tuottamiin lipideihin kuuluu muun muassa steroleja, vahaestereitä (tyydyttyneiden rasvahappojen ja rasva-alkoholien estereitä), rasvahapoista etenkin palmitiini-, alfa-linoleeni- ja linolihappoa sekä tokoleja, joista erityisesti alfa-tokoferolia (Mahapatra ym. 2013; Krajcovic ym. 2015). Myös laaja kirjo pitkäketjuisia monityydyttymättömiä rasvahappoja on määritetty *euglena* -soluista (Korn 1964). Kiinnostusta on herättänyt erityisesti euglenojen mahdollinen käyttö jätevesien käsittelyssä ja biopolttoaineiden tuotannossa, mutta myös oivallisena rehuna tuotantoeläimille vesiviljelyyn (Das ym. 2009; Mahapatra ym. 2013). Tutkimuksessaan Mahapatra ym. (2013) kasvattivat *Euglena* sp. -mikrolevää jätevedessä, jolloin levämassaan kertyi lähes 25 % lipidejä kuivapainosta. Rasvahapoista noin 49 % oli tyydyttyneitä, 47 % monityydyttymättömiä ja kaikkiaan noin 97 % oli rungoltaan 16–18-hiilisiä. Eräässä tutkimuksessa *E. gracilis* kerrytti itseensä lipidejä 20 % kuivapainostaan kasvaessaan valossa (fotoheterotrofisesti) ja 11 % kuivapainostaan kasvaessaan pimeässä (heterotrofisesti). Näissä lipideissä rasvahapoista esiintyi eniten myristiini-, palmitiini- ja arakidonihappoa sekä hieman myös DHA:a (Schwarzthans ym. 2014).

## *Selenastrum*

Makean veden viherlevä *Selenastrum* on lipidikoostumuksensa osalta toistaiseksi melko vähän tutkittu mikrolevä, vaikkakin sitä on käytetty maailmanlaajuisesti runsaasti muun muassa kemiallisen toksisuuden biomarkkerilajina. Eräässä tutkimuksessa mitattiin *Selenastrum* sp.:n kokonaislipidipitoisuudeksi keskiarvona 12,5 % kuivapainosta (Yan ym. 2011). *S. capricornutum*-lajin tiedetään sisältävän normaalikasvuolosuhteissa rasvahapoista eniten palmitiinihappoa ja öljyhappoa (20–30 % kumpaakin) sekä 5–10 % 16:1-, 16:4-, 18:2-, 18:3- ja 18:4-rasvahappoja (McLarnon-Riches ym. 1998). *S. minutum* -lajin rasvahappokoostumus puolestaan sisältää lähes 40 % linoleenihappoa, 24 % palmitiinihappoa ja 20 % öljyhappoa (Axelsson ja Gentili 2014).

### ***Nannochloropsis***

Ruskolevä *Nannochloropsis* (*Eustigmatophyceae*, *Chromalveolata*) -suvun lajit, kuten aiemmin todettu, voivat tuottaa kuivapainostaan merkittävän määrän arvokasta EPA:a. *Nannochloropsis* sp. -levästä mitattiin eräässä tutkimuksessa 1,6 ja 3,8 %:n välillä vaihtelevia pitoisuuksia EPA:a (Sukenik ym. 1993). Merissä elävää *N. oculata* -levää pidetään myös potentiaalisena biomassan ja lipidien tuottajana biopolttoaineiden valmistusta varten. Kasvuolosuhteita muokkaamalla *N. oculata*- ja *Nannochloropsis* sp. -lajien kokonaisrasvahappopitoisuus kuivapainosta voi nousta sopivissa olosuhteissa lähelle 50 %:a (Van Vooren ym. 2012; Mitra ym. 2015). *N. gaditana* -laji tuotti kuivapainostaan 5–13 % lipidejä kasvaessaan eri väkevyyden suolaliuoksissa (Matos ym. 2015). Lisäksi *N. gaditana* voi olla jopa *N. oculataa* lupaavampi EPA:n tuotannossa, kuten taulukosta 1 käy ilmi. Tosin eräässä tutkimuksessa yleisen jäteveden ja paperintuotannon jäteveden seoksessa kasvatetun *N. oculata* -levän rasvahapoista jopa 40 % osoittautui olevan EPA:a. Samassa tutkimuksessa todettiin suurimman osan mikrolevän rasvahapoista olevan peräisin fosfolipideistä (46–65 %) ja loput TAG:sta (11–37 %), glykolipideistä (12–19 %) ja kolesteroliestereistä (5–6 %) kasvatusalustasta riippuen (Polishchuk ym. 2015). *Nannochloropsis* sp.-levän rasvahapot jakautuvat pääasiassa neutraalilipideihin (erityisesti TAG), fosfolipideihin ja glykolipideihin, joista neutraalilipidien määrän on todettu olevan suurin, kun kasvu tapahtuu korkeassa valon intensiteetissä (100  $\mu\text{mol fotoneja/m}^2/\text{s}$ ). Alemmassa valon intensiteetissä kasvaessa fosfolipidien osuus on lipidiluokista suurin (Mitra ym. 2015). Tällöin on oletettavaa, että lipidien osuus kokonaisuudessaan kuivapainosta on pienempi kuin korkeassa valon intensiteetissä kasvatettuna.

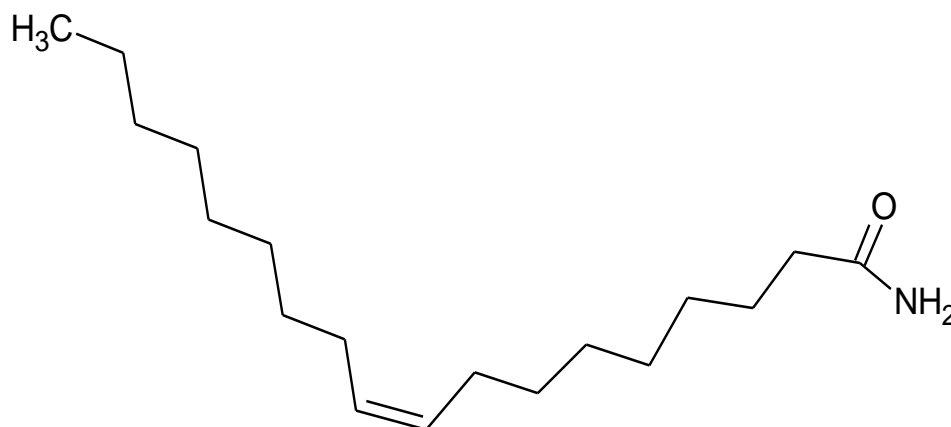
### ***Chlorella***

Runsaasti tutkitun mikroviherlevä *Chlorellan* lajeista *C. vulgaris*, *C. pyrenoidosa* ja *C. luteoviridis* ovat EU:n alueella hyväksytyt käytettäväksi elintarvikkeena, koska ne ovat olleet käytössä ennen vuoden 1996 uusielintarvikeasetusta (EC Novel Food Catalogue 2016). *Chlorellan* rasvahappokoostumus vaihtelee huomattavasti lajin ja kannan mukaan, kuten taulukosta 1 huomataan, mutta pääsääntöisesti se sisältää rungoltaan 16–18-hiilisiä rasvahappoja (Lang ym. 2011). *Chlorella* sisältää kuivapainostaan tavallisesti yli 4 % klorofyllejä sekä huomattavan määrän luteiinia, joka on lajissa eniten esiintyvä karotenoidi (Miazek ja Ledakowicz 2013; Fu ym. 2014). *Chlorella*-biomassan vuosittaisen tuotannon on arvioitu olevan noin 2000 tonnia ja arvo keskimäärin noin 36 USD/kg (Brennan ja Owende 2010).

## *Spirulina*

*Spirulinalla* tarkoitetaan pääasiassa kahta laajalti viljeltyä syanobakteerilajia *Spirulina (Arthrospira) platensis* ja *Spirulina maxima*. Näistä lajeista vain *S. platensis* on EU:ssa hyväksytty uuselintarvikkeeksi (EC Novel Food Catalogue 2016). Tämä sinivihreä mikrolevä sisältää kuivapainostaan selvästi suurimman osan proteiinia. Lipidien osuus on tavallisesti 5–10 % kuivapainosta (Mendes ym. 2006; Sajilata ym. 2008). Sinivihreä väri itsessään on peräisin vesiliukoisesta fykobiliproteiinista fykosyaniinista (Borowitzka 2013). *Spirulinan* lipideissä mielenkiintoista on suuri gamma-linoleenihappopitoisuus (GLA, C18:3 n-6), joka voi olla jopa 35 % kaikista rasvahapoista (Mendes ym. 2006). Ylikriittistä hiilidioksiduuttua on jo tutkittu *Spirulinan* lipidien uuttamisessa. Mendes ym. (2006) raportoivat parhaimmillaan 40 % lipidisaannon SFE-utolla Blighn ja Dyerin menetelmään verrattuna. Toisaalta Sajilata ym. (2008) pystyivät uuttamaan *Spirulinan* lipidit täydellisesti 60 minuutin SFE-utolla käytettäessä 400 bar:n painetta ja etanolia oheisliuottimena niin ikään Blighn ja Dyerin menetelmään verrattuna.

Taulukossa 1 on esitetty kirjallisuusarvoina Langin ym. (2011) tutkimuksessa määritettyjen, tässä tutkielmassa kiinnostuksen kohteena olevien mikrolevien eräiden rasvahappojen pitoisuudet. Joidenkin mikrolevien, kuten *N. oculatan*, on todettu sisältävän myös runsaasti 9-oktadekeeniamidia (Kuva 6). Lang ym. (2011) tunnistivat 9-oktadekeeniamidin GC-MS (kaasukromatografiamassaspektrometria) -laitteistolla ja määrittivät GC-FID (kaasukromatografialiekki-ionisaatiodektori) -laitteistolla.



Kuva 7. 9-Oktadekeeniamidin rakennekaava

Taulukko 1. Taulukossa on esitettyä joidenkin kiinnostuksen kohteena olevien mikrolevien rasvahappokoostumukset prosentteina (%) kokonaisrasvahapoista (Lang ym. 2011). Selenastrum -suvun lajeja ei tutkittu kyseisessä rasvahappoprofiilien kartoituksessa. \*Kyseisen lajin useita eri kantoja oli tutkittu ja rasvahappoprofiilit saattoivat vaihdella huomattavasti. Erityisen suuri vaihtelu on *E. gracilis* -levän kahden hyvin erilaisen kannan välillä.

Mikrolevälaji-> Rasvahappo	<i>C. vulgaris</i> (211-11b)*	<i>C. luteoviridis</i> (211-2b)*	<i>E. gracilis</i> (1224-5/15)*	<i>E. gracilis</i> (1224-5/1f)*	<i>N. gaditana</i>	<i>N. oculata</i>
C14:0	0	0	1,8	79,2	0	0
C16:0	10	11,9	4,1	13,2	14,8	8,5
C16:1	10,8	1,5	4,9	0	29,3	13
C18:1	4,4	1,9	0	7,6	5,1	0
C18:2	19,5	38,3	4,2	0	0	0
C18:3	26,6	7,1	3,5	0	8,9	0
C20:4	0	0	11,7	0	3,8	0
C20:5	0	0	0	0	34,1	20,5
C22:6	0	0	2	0	0	0
9-oktadekeeniamidi	7,6	19,6	20,9	0	3,1	58
Muut rasvahapot	21,1	19,7	46,9	0	0,9	0
Yhteensä	100	100	100	100	100	100

### 2.2.3 Lipidien käyttösovellukset

#### Elintarvikkeet ja rehut

Mikrolevien muodostamaa biomassaa on mahdollista käyttää monella nykyaikaisen yhteiskunnan osa-alueella. Mahdollisuuksia mikrolevistä peräisin olevien aineiden hyödyntämiseen on arvioitava laajasti ottaen huomioon viljelyn vaikutukset ympäristöön verrattuna kilpailevan tuotantomenetelmän vaikutuksiin. Elintarviketeollisuuden näkökulmasta mikrolevät herättävät mielenkiintoa erityisesti suuren proteiinipitoisuutensa ja sisältämiensä rasvahappojen ja vitamiinien ansiosta (Plaza ym. 2009; Yaakob ym. 2014). Mikrolevistä peräisin oleva öljy voi toimia kasviperäisenä lähteenä pitkäketjuisille monityydyttymättömille rasvahapoille. Kuten aiemmin todettiin, monet levälajit pystyvät tuottamaan merkittäviä määriä EPA:a ja DHA:a. Karotenoidien tuottaminen mikrolevien avulla on jo osoittanut kaupallisen potentiaalinsa, jota on mahdollista uusien lajien kartoittamisella ja uusilla viljelytekniikoilla lisätä (Borowitzka 2013). Mikroleviä, lähinnä *Chlorellaa* ja *Spirulinaa*, myydään parhaillaan syötäväksi tarkoitettuna muun muassa jauheena ja puristeina. Lisäksi leviä voidaan lisätä esimerkiksi smoothieihin,



mehuihin, patukoihin ym. tuotteisiin antamaan väriä tai kohottamaan proteiini- tai rautapitoisuutta. Mikrolevistä peräisin olevien, terveyttä edistävien aineiden myyminen ravintolisinä on myös potentiaalinen keino hyödyntää tiettyjä leväbiomassan fraktioita. Mikrolevien elintarvikekäytölle saattaisi etenkin olla tarvetta monissa kehitysmaissa. Monin paikoin ruokavaliosta puuttuu proteiinia, rautaa, n-3-rasvahappoja ja/tai A-vitamiinia. Mikrolevien tuotannon ja elintarvikesovellusten avulla voitaisiin tarjota mahdollisuuksia täydentää näitä ruokavalion puutteita. Vain joitain mikrolevälajeja on toistaiseksi EU:n sisällä hyväksytty elintarvikekäyttöön (EC Novel Food Catalogue 2016), mutta tiedon lisääntyminen lajien turvallisuudesta varmasti ennen pitkään lisää myös käytettävien lajien määrää.

Elintarvikkeiden lisäksi mikroleviä voidaan hyödyntää rehuna vesiviljelyssä tai tuotantoeläimille. Mikrolevät ovat merkittävä ravinnon lähde luontaisesti eläinplanktonille, kuten myös äyriäisille, katkaravuille ja useille kalalajeille. Kasvatettua mikrolevää käytetäänkin runsaasti rehuna vesiviljelyssä. Monet merenelävien väriaineista ja pitkäketjuiset rasvahapot ovat peräisin niiden ravintonaan käyttämistä mikrolevistä (Patil ym. 2007). Mikäli vesiviljelyssä tuotettujen elintarvikkeiden väri ja rasvahappokoostumus halutaan pitää lähellä luonnollista, täytyy mikroleviä tai niistä eristettyjä aineita käyttää vähintään osana rehusta. Vastaavasti on mahdollista lisätä muista lähteistä peräisin olevia kyseisiä aineita rehuun, mutta tämä tuo osaltaan lisää kustannuksia tuotantoon. Vesiviljelyn lisäksi mikrolevien käyttö maaeläinten rehuna on mahdollista tai jopa hyödyllistä korkean proteiinipitoisuutensa sekä rasvahappokoostumuksensa ansiosta (Yaakob ym. 2014). Lipidien uuttaminen mikroleväbiomassasta tuottaa aina uuttojäännöksen, joka sisältää pääsääntöisesti proteiinia ja jonkin verran hiilihydraatteja. Näin ollen uuttojäännökselle on mahdollista löytää käyttökohteita rehuna, viljelysmaahan sekoitettuna lannoitteena tai biopolttoaineiden tuotannossa.

### **Mikrolevät biopolttoaineiden tuotannossa**

Viljeltävistä organismeista mikrolevät ovat ainoa potentiaalinen vaihtoehto tuottamaan suuressa mittakaavassa korvaavaa biodieseliä maaöljystä peräisin olevan polttoaineen tilalle (Chisti 2007). Tämä johtuu ennen kaikkea mikrolevien maakasveja korkeammasta yhteyttämistehokkuudesta sekä nopeammasta biomassan tuotannosta (Zhu ym. 2008; Chisti 2013b). Tuotannon kaupallinen kilpailukyky muiden tarjolla olevien polttoainevaihtoehtojen kanssa on tällä hetkellä rajoittava tekijä käytännön yleistymiselle. Hiljattain julkaistussa kirjallisuuskatsauksessa on kartoitettu laajasti mikrolevien mahdollista hyödyntämistä biodieselin tuotannossa ja teoreettisia keinoja tuotannon taloudellisen kilpailukykyyn parantamiseksi (Dickinson ym. 2016). Mikrolevien lipideistä voidaan melko vaivattomasti

tuottaa biodieseliä polttoaineeksi muun muassa liikenteen käyttöön. Levistä uutetut TAG:t muutetaan biodieseliksi uudelleen esteröimällä ne rasvahappojen metyyliestereiksi (trans-esteröinti). Reaktiota varten TAG:en joukkoon lisätään runsaasti metanolia sekä happoa, emästä tai lipaasi-entsyymejä katalysoimaan reaktiota (Fukuda ym. 2001). Jäljelle jäänyt glyseroli ja metanoli pestään tuotteesta vedellä (Chisti 2007).

Mikrolevien lipidien uuttaminen biodieselin tuotantoa varten tuottaa aina sivutuotteita, joista proteiinien ja hiilihyaattien osuus on tavallisesti suurin. Sivutuotteiden hyödyntäminen on oleellista ekologisesta näkökulmasta, mutta lähes välttämätöntä taloudellisesti, koska mikroleväperäinen biopolttoaine ei toistaiseksi ole hinnaltaan kovin kilpailukykyinen markkinoilla olevien vaihtoehtojen, fossiilisen polttoaineen tai öljykasveista tuotetun biopolttoaineen kanssa (Chisti 2007). Itse lipidien uutto on varsin kallis vaihe biopolttoaineiden tuotannossa. Mikrolevien uuttojäännöstä voidaan muun muassa käyttää tuotantoeläinten tai vesiviljelyn rehuna tai siitä voidaan tuottaa metaania anaerobisen fermentaation kautta (Chisti 2007; Kröger ja Müller-Langer 2012). Hiilihyaattipitoisen biomassan uuttojäännös voidaan puolestaan prosessoida bioetanoliksi polttoainekäyttöön. Lisäksi uuttojäännöstä on mahdollista lisätä köyhtyvään maaperään, jolloin maa-aineksen orgaanisen hiilen ja typen määrää voidaan kasvattaa ilman epäorgaanisia lannoitteita (Rothlisberger-Lewis ym. 2016). Kokonaisvaltainen tuotetun biomassan hyödyntäminen voi olla avainasemassa mikroleväperäisten biopolttoaineiden kaupallisessa tuotannossa (Zhang ym. 2016). Sopivilla ympäristön stressitekijöillä voidaan maksimoida solujen lipidien tuotanto ja samalla on kartoitettava keinoja hyödyntää olemassa olevia valmiita tai osittain valmiita kasvatusalustoja, kuten jätevesiä ja lämpimiä lauhdevesiä.

### **Viljelyn yhdistäminen teollisuuden ja maatalouden sivuvirtoihin sekä jäteveden puhdistukseen**

Nykyinen teollisuus ja maatalous tuottavat runsaasti niin kutsuttuja sivuvirtoja varsinaisen kaupallisen tuotteen ohella. Sivuvirtojen hyödyntäminen kaupallisesti on sekä prosessin taloudellisen kannattavuuden että ympäristövaikutusten osalta kannatettavaa. Jotta voidaan välttyä suurilta määriltä jätteitä, täytyy sivuvirtojen aineet saada tehokkaasti kiertoon, missä apuna voidaan hyödyntää esimerkiksi mikroleviä ja/tai tarvittaessa muita mikrobeja. Mikrolevät ovat erityisen tehokkaita käyttämään ravinteita vesiliuoksista samaan aikaan voimakkaan yhteyttämisen kanssa. Teollisuuden lauhdevedet saattaisivat olla ennalta lämpimiä sisältäen osan tai mahdollisesti kaiken levien tarvitsemista ravinteista. Myös jätevedet sisältävät ennalta suuren määrän ravinteita, joita mikrolevät pystyvät hyödyntämään. Mikrolevien kasvuunsa käyttämät ravinteet, kuten fosfaatit ja nitraatit, ovat juuri niitä,

jotka suurina määrinä aiheuttavat vesistöjen rehevöitymistä ja horjuttavat vesiekosysteemien tasapainoa (Smolders ym. 2010; Kundu ym. 2015). Näin ollen mikrolevien kasvattaminen vesissä ennen niiden pääsyä luonnollisiin vesistöihin tuottaa ympäristöllisen hyödyn sekä hyödyllistä biomassaa käytettäväksi esimerkiksi energiaksi, polttoaineeksi tai rehuksi. Useissa tutkimuksissa on jo saatu viitteitä jätevesien ja maatalousjätteiden soveltuvuudesta mikrolevien kasvatusalustoina (Aida ym. 2016; Onome Tighiri ja Ahmet Erkurt 2016; Zuliani ym. 2016). Mikrolevien kasvattaminen avoimissa altaissa sitoo ilmakehästä pois hiilidioksidia, joka palaa takaisin ilmakehään myöhemmin, mikäli levästä valmistetaan esimerkiksi biopolttoaineita. Tällöin tuotanto on ”hiilineutraalia”, jos itse viljely, levämassan käsittely ja kuljetus eivät merkittävässä määrin kuluta fossiilisia polttoaineita. Levien kasvuun tarvittava hiilidioksidi on teoriassa mahdollista ohjata suoraan teollisuuden polttoprosesseissa syntyvistä päästökaasuista, jotka muutoin vapautuisivat suoraan ilmakehään. Päästökaasut sisältävät usein hiilidioksidin lisäksi typen ja rikin oksideja. Typen oksidit liuetessaan veteen toimivat ravinteina mikroleville, mutta rikin oksidit suurina määrinä voivat alentaa kasvualustan pH:ta ja siten inhiboida leväsolujen kasvua (Yen ym. 2015).

### 3 Kokeellinen tutkimus

Tutkimuksen kokeellisen osan tavoitteena oli selvittää ylikriittisen hiilidioksidiuuton käyttökelpoisuutta viiden mikrolevälajin (*E. gracilis*, *Selenastrum* sp, *N. gaditana*, *C. vulgaris* ja *S. platensis*) lipidien uuttamisessa verrattuna aiemmin tutkimusryhmässä käytössä olleeseen ASE-uuttoon (Accelerated Solvent Extraction). Tarkoituksena oli myös selvittää ylikriittisen hiilidioksidiuuton uuttoparametrien, kuten paineen, lämpötilan ja virtausnopeuden sekä staattisen vaiheen ja näytekuon vaikutusta uuton tehokkuuteen ja selektiivisyyteen sekä tutkia levälajien lipidikoostumusta. Ylikriittinen uutto menetelmänä oli kiinnostuksen kohteena ensisijaisesti ajatellen juuri teollisen mittakaavan uuttoa eikä niinkään lipidianalytiikkaa. Tavoitteellisena käyttöalueena ylikriittiselle uutolle ovat juuri sellaiset suuren mittakaavan uutot, joissa pystyttäisiin tuottamaan mikroleväperäisiä lipidejä jatkokäyttöön esimerkiksi elintarvikesovelluksissa. ASE-uuton puolestaan tiedettiin toimivan oivallisesti juuri lipidianalytiikkaa varten ja sopivan siten hyvin vertailumenetelmäksi ylikriittiselle uutolle. Laajemmin koko projektissa pyrittiin muun muassa selvittämään erilaisten kasvatusalustojen ja kasvuolosuhteiden mahdollista vaikutusta mikrolevien kasvuun ja lipidiprofiiliin, sekä kartoittamaan mikroleväbiomassan prosessointi- ja käyttömahdollisuuksia.

## 3.1 Materiaalit ja menetelmät

### 3.1.1 Tutkimuksen kulku

Tutkimuksen kokeellisen osan suorittaminen alkoi lokakuun loppupuolella 2015 ja viimeiset uutot ja määritykset tehtiin huhtikuussa 2016. Alla on esitetty karkeasti, kuinka kokeellinen osuus jakautui kronologisesti vaiheittain. Varsinaisen kiinnostuksen kohteena oleva tutkimusaineisto tuotettiin vaiheiden II, III ja IV aikana.

- Vaihe I** *N. gaditana*-näytteen tarkistus ASE-uutolla ja metylointimenetelmien (rikkihappokatalysoitu ja booritrifluorireagenssi menetelmä) vertailu.
- Vaihe II** Ylikriittisen hiilidioksidiuuton kokeilu ja parametrien testaus ja optimointi *N. gaditana*-mikrolevällä.
- Vaihe III** Muiden mikrolevälajien (*Euglena gracilis*, *Selenastrum* sp, *Chlorella* ja *Spirulina*) lipidikoostumuksen tutkiminen ASE-uutolla.
- Vaihe IV** Muiden mikrolevälajien tutkiminen ylikriittisellä uutolla
- Vaihe V** Tulosten taulukointi ja käsittely

### 3.1.2 Näyttemateriaalit

*N. gaditana* -näytettä saatiin Helsingin yliopiston Maataloustieteen laitokselta, jossa sitä oli käytetty kokeiluissa muun muassa lypsylehmien ruokintaan ja säilytetty kylmähuoneessa noin 4 °C:n lämpötilassa jo yli vuoden ajan. Samaa näytettä oli hankinnan jälkeen säilytetty pieni erä myös pakastimessa. Alun perin näyte oli kasvatettu Hollannissa ja hankittu Helsingin yliopistolle Duplaco-yrityksen kautta (Duplaco BV, Hengelo, Hollanti). Ennen tutkimuksen aloittamista *N. gaditana* -näyte tarkistettiin vertaamalla näytteen lipidiprofiilia näytteeseen, jota oli koko ajan säilytetty kylmähuoneen

sijaan pakastimessa (-18°C). Vertailu suoritettiin tekemällä kolme ASE-uuttosarjaa, joissa kaikissa oli kolme rinnakkaista molempia näytteitä. Näistä uutteista määritettiin tokolipitoisuudet ja rasvahappopitoisuudet, joiden perusteella tehtiin päätös näytemateriaalin kelpuuttamisesta. Alfa-tokoferolipitoisuudet olivat pakastimessa säilytetyssä näytteessä 28–70 % ja rasvahappopitoisuudet 16–25 % suurempia verrattuna kylmähuoneessa säilytettyyn levään. Selvästikin siis näytteessä oli tapahtunut säilytyksen aikana hapettumista ja rasvojen pilkkoutumista jonkin verran. Kylmähuoneessa säilytetty *N. gaditana* -näyte päätettiin kuitenkin kelpuuttaa tutkimukseen SFE-uuton optimointia varten, missä käsitellään pääasiassa suhteellisia lipidien pitoisuuksia ja melko suuria näytemääriä.

*Spirulina*- ja *Chlorella* -näytteet oli hankittu vähittäiskaupasta pääkaupunkiseudulta. *Spirulina* -näyte oli tarkemmin *Spirulina Pacifica*, joka on kauppanimi eräälle *S. platensis* -lajin kannalle (Puhdistamo, alkuperämaa: Taiwan). *Chlorella* -näyte oli puolestaan *Chlorella vulgaris* -lajia (Cocovi, alkuperämaa: Intia). Valmistajan ilmoittama *Spirulinan* rasvapitoisuus oli 5 g/100 g, GLA-pitoisuus 1067 mg/100 g ja beetakaroteenipitoisuus 375 mg/100 g. *Chlorellan* rasvapitoisuudeksi valmistaja oli ilmoittanut 2,3 g/100 g, josta tyydyttyneitä rasvahappoja 0,6 g, ja E-vitamiinipitoisuudeksi 18 mg/100 g.

*E. gracilis* ja *Selenastrum* sp. olivat Helsingin yliopiston ympäristötieteiden laitoksen Lahden kampuksella kasvatettuja mikroleviä. Levät kasvatettiin kolmessa rinnakkaisessa 200 l:n fotobioreaktorissa, joihin syötettiin ilmaa 70 l/min. Molempien levien kasvatuksessa valo:pimeä-rytmi ja hiilidioksidinsyöttörytmi oli sama 16 h/vrk. *E. gracilis* kasvatettiin ohran mallastusprosessissa syntyvässä likovedessä, johon lisättiin typenlähteeksi natriumnitraattia 0,5 g/l. *Selenastrum* sp. puolestaan kasvatettiin modifioidussa COMBO-liuoksessa, jonka natriumnitraatti- ja kaliumvetyfosfaattipitoisuutta kasvatettiin normaalista 10- ja 14-kertaiseksi. Levämassa erotettiin kasvatusalustasta sentrifugoimalla ja pakastettiin välittömästi. Tämän jälkeen massa pakkaskuivattiin ja murennettiin/hienonnettiin käsin pussin sisällä. *E. gracilis*- ja *Selenastrum* sp. -näytteet eivät olleet lopulta yhtä hienojakoisia jauheita kuin kaupalliset levät, vaan seassa oli jonkin verran suurempia huokoisia partikkeleita. Kaikki näytteet säilöttiin tutkimuksen ajan minigrip-pusseissa pakastimessa (-18°C).

### 3.1.3 Reagenssit ja liuottimet

Ellei ole toisin ilmoitettu, kokeellisessa tutkimuksessa käytössä olleet reagenssit ja liuottimet olivat seuraavat:

Heptaani:	HPLC-laatu, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanoli:	HPLC-laatu, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kuiva metanoli:	≥ 99,8 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dioksaani:	Fisher Scientific, Loughborough, UK
Tolueeni:	Fisher Scientific, Loughborough, UK
BF <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> OH-reagenssi:	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Vesi:	MilliQ
Vedetön Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> :	Merck, Darmstadt, Saksa
NaCl:	Merck, Darmstadt, Saksa

### 3.1.4 Kiihdytetty liotinuutto (ASE)

ASE-uutto eli kiihdytetty liotinuutto on tehokas tapa uuttaa nopeasti näytteen ainesosia. Tätä uuttomenetelmää käytettiin vertailumenetelmänä ylikriittiselle uutolle. ASE-uuttoja tehtiin aluksi *N. gaditana* -levälle ja myöhemmin myös muille tutkittaville mikrolevälajeille. Liuottimena käytettiin etanolia (Etax A, Altia Oyj, Rajamäki, Suomi), joka oli tutkimusryhmän aiemmissa kokeissa osoittautunut parhaaksi liuottimeksi. Myös käytetty uuttomenetelmä oli optimoitu mikrolevien lipidien mahdollisimman täydellistä uuttamista varten. Menetelmässä uuttolämpötila oli 125 °C, paine 1500 psi (103,42 bar) ja ajoaika 18 min/näyte, josta varsinaista liotinuuttoa oli 11 minuuttia.

#### Uuton toteutus

Uutot tehtiin pääsääntöisesti jokaisesta näytteestä kolmena rinnakkaisena siten, että näytteet jätettiin uutumaan yön yli ja seuraavana aamuna jatkettiin uutteen käsittelyä. Teräksisten ASE-patruunoiden

pohjalle tampattiin selluloosasuodatin (ASE 200 Cell, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), jonka päälle punnittiin tarkasti noin 0,1 g näytettä. Näytteen joukkoon sekoitettiin noin näytteen määrän verran kuivattua hiekkaa ja patruuna täytettiin lopuksi kuivatulla hiekalla ja suljettiin tiiviisti. Itse uutto suoritettiin ASE-200-laitteistolla (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA), jolloin etanoliin uuttuneet näytteen aineet päätyivät 40 ml:n keräysvialeihin. Keräysvialista etanoliuute siirrettiin kvantitatiivisesti pyörökolviin ja etanoli haihdutettiin pyöröhaihduttimella (Heidolph WB 2000, Labexchange, Burladingen, Saksa) noin 37 °C:n lämpöisessä vesihauteessa. Tämän jälkeen näyte liuotettiin pyörökolvissa heptaani-isopropanoliin (3:2; v:v) ja siirrettiin kvantitatiivisesti 10 ml:n mittapulloon. Mittapullo täytettiin merkkiviivaan heptaani-isopropanoli-seoksella ja näytteet säilytettiin kylmähuoneessa (4 °C) tokolimääritystä ja rasvahappomääritystä varten. Näiden määritysten jälkeen loppunäytteet siirrettiin kierrekorkillisiin vialeihin, jotka säilytettiin pakastimessa (-18 °C) pigmenttimäärityksiä ja neutraalilipidimäärityksiä varten.

### 3.1.5 Ylikriittinen uutto (SFE)

#### **Uuton aloittaminen**

Ylikriittinen uutto toteutettiin Spe-ed SFE 2/4 -laitteistolla (Applied Separations, Inc., Allentown, PA, USA). Uuttoliuottimena käytettiin hiilidioksidikaasua (puhtaus  $\geq 99,8$  %, AGA, Espoo, Suomi), joka paineistettiin ja lämmitettiin ylikriittiseen tilaan uuttopatruneiden sisällä. Uuttolinjoja oli kaikkiaan neljä, joten yhdestä näytteestä saatiin kerralla parhaimmillaan neljä rinnakkaista uutetta. Uuttopatruneina käytettiin teräksisiä, tilavuudeltaan 10 ml:n hylsyjä, joiden pohjalle tampattiin ensin teflonfritti (Applied Separations, Allentown, PA, USA) ja sen jälkeen joko polypropyleenivilla (Spe-ed™ Wool, Applied Separations, Allentown, PA, USA) tai tavallista puuvillaa. Suoraan patruunaan, villan päälle, punnittiin vaa'alla (Mettler PE360, Mettler Toledo International Inc., Langacher Greifensee, Sveitsi) levänäytettä tarkasti haluttu massa, joka tampattiin tiiviiksi patruunan sisällä. Patruunan tyhjäksi jäänyt osa täytettiin kuivatulla hiekalla (Ottawa, Fisher Scientific, Loughborough, UK) ja ylimmäksi tuli ohut kerros polypropyleenivillaa tai puuvillaa. Patruunat pakattiin siten, että levänäyte asettui lähemmäksi liuottimen ulosmenopäätä ja täytehiekka lähemmäksi liuottimen sisääntulopäätä. Ennen varsinaisen uuton aloittamista säädettiin laitteiston ulostuloventtiilien ja uunin lämpötilat haluttuun arvoon ja odotettiin lämpötilojen tasaantumista. Patruunoiden lämpötilaa mitattiin

erillisellä lämpömittarilla, joka asetettiin kiinni yhteen uunissa olevista patruunoista. Lämpötilan tasaantumisen jälkeen uuttopatruneet paineistettiin pikkuhiljaa haluttuun paineeseen, jolloin myös tarkkailtiin paineen pysyvyyttä mahdollisten vuotojen varalta. Joissakin uutoista yksi tai jopa kaksi patruuna vuotivat, jolloin ne yritettiin sulkea tiukemmin tai kyseiset linjat suljettiin ja uutto suoritettiin kolmella tai kahdella rinnakkaisella linjalla. Lämpötilan ja paineen ollessa halutuissa lukemissa avattiin patruunoiden ulostulolinjat yksitellen ja säädettiin virtausnopeus käsin haluttuun arvoon. Virtausnopeutta jouduttiin uuton aikana säätämään useaan kertaan, sillä virtaus saattoi laskea tai ajoittain jopa nousta halutusta lukemasta, ja linjojen välille syntyi välillä eroja, koska jokaisen linjan virtaus säädettiin erikseen.

### **Eri uuttoajat ja näytekoot**

Pääsääntöisesti uuttoa jatkettiin aina 60 minuutin ajan ja aika mitattiin sekuntikellolla, joka käynnistettiin, kun kaikki uuttolinjat oli avattu. Käytettäessä staattista vaihetta uuttoaika laskettiin alkavaksi silloin, kun uuttopatruneiden paine nostettiin halutulle tasolle. Tällöin kokonaisuuttoajaksi tuli myös 60 minuuttia ja se jakautui siten, että 15 minuuttia patruunat pidettiin paineistettuna, mutta hiilidioksidi ei päässyt virtaamaan ulos patruunoista, ja 45 minuuttia suoritettiin dynaamista uuttoa, jossa hiilidioksidi virtasi normaalisti näytteen läpi keräysvialeihin. Tutkimuksessa tehtiin myös kolme eri pituista koe-uuttoa, joissa selvitettiin uuttoajan vaikutusta lipidien saantoon. Nämä koe-uutot tehtiin seuraavasti:

1. 10 minuuttia dynaamista uuttoa–uutteen keräys–10 minuuttia dynaamista uuttoa uudestaan
2. 30 minuuttia dynaamista uuttoa–uutteen keräys–10 minuuttia dynaamista uuttoa uudestaan
3. 60 minuuttia dynaamista uuttoa

Näissä koe-uutoissa uuttopaine oli 500 bar ja lämpötila 105 °C. Uutteen keräys uuton kesken edellytti sitä, että uuttolinjat huuhdellaan 10 ml:lla heptaani-isopropanoli-seosta (3:2; v:v). Ennen huuhtelua uuttopatruneet täytyi poistaa laitteistosta, jolloin ne jäähtyivät jonkin verran. Tämän jälkeen patruunat kiinnitettiin uudestaan ja lämmitettiin uudelleen haluttuun lämpötilaan, minkä jälkeen uuttoa pystyttiin jatkamaan.

Kokeellisen tutkimuksen alkuvaiheessa vertailtiin myös eri näytemäärien vaikutusta lipidisaantoon. Käytössä olevat vertailtavat näytemäärät olivat 1 g ja 3 g ja käytetyt olosuhteet 500 bar, 85 °C, CO<sub>2</sub>-virtaus 4 l/min ja uuttoaika 60 minuuttia. Myöhemmin tutkimuksen kuluessa näytemääränä käytettiin aina 1 g:a.



## Uuton lopettaminen

Halutun uuttoaajan kuluttua laitteiston pumppu pysäytettiin ja paineen annettiin laskea patruunoista. Ennen patruunoiden poistamista laitteistosta loppu paine vapautettiin takaventtiilien kautta tai suoraan keräysvialeihin. Patruunat poistettiin laitteistosta ja uuttolinjat huuhdeltiin samoihin keräysvialeihin noin 10 ml:lla heptaani-isopropanoli-seosta (3:2; v:v). Liuotettu uute siirrettiin keräysvialeista 20 ml:n mittapulloihin ja vialeita huuhdellen mittapullot täytettiin merkkiin heptaani-isopropanolilla. Uutteita säilytettiin suljetuissa 20 ml mittapulloissa kylmähuoneessa tokolimääryksiä ja rasvahappomääryksiä varten. Näiden määritysten jälkeen uutteen loppuosat siirrettiin kierrekorkillisiin vialeihin säilytykseen pakastimeen (-18 °C) odottamaan pigmentti- ja neutraalilipidimääryksiä.

### 3.1.6 Tokolimäärytys

#### Esikäsitely

Tokolimäärytystä varten koeputkeen otettiin heptaani-isopropanoliin (3:2; v:v) liuotettua SFE- tai ASE-uutetta täyspipetillä 1 ml ja näyte haihdutettiin typpivirralla kuivaksi noin 37 °C:ssa. Kuiva näyte liuotettiin uudelleen näytekoosta riippuen 1 tai 2 ml:aan heptaania ja putkea ravisteltiin koeputkiravistelijalla kevyesti. Tämän jälkeen näytettä suodatettiin ruiskulla membraanisuolettimen (0,45 µm, Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA) läpi HPLC-vialiin (Clean Pack, La-Pha-Pack GmbH, Saksa), jotka suljettiin tiiviisti.

#### Analysointi

Tokolien analysointi suoritettiin HPLC-laitteistolla (näytteensyöttäjä: Waters 717plus Autosampler, pumppu: Waters 515, fluoresenssidetektor: Waters 2475, Waters Corporation, Milford, MA, USA) käyttäen normaalifaasikolonnia (Inertsil 5 SI, 5 µm, 30 cm x 3,9 mm, Varian Inc., Palo Alto, CA, USA), silika-esikolonnia (4,0 x 3,0 mm, Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) ja tulosten käsittelyyn Empower 2 -kromatografiaohjelmistoa. Näytteensyöttäjässä pidettiin lämpötilana 8 °C ja kolonniuunissa 30 °C. Itse ajo tehtiin isokraattisena käyttäen ajoliuoksena heptaanin ja dioksaanin 97:3 (v:v) -seosta ja virtausnopeutena 2 ml/min. Detektorin viritusaallonpituus ( $\lambda_{ex}$ ) oli 292 nm ja emissioaallonpituus puolestaan ( $\lambda_{em}$ ) 325 nm. HPLC-ajoissa käytettiin laboratorion sisäisenä referenssimateriaalina

pakastimessa (-18 °C) säilytettyä rypsiöljyä, jota oli liuotettu tunnettu määrä (noin 50 mg) 10 ml:aan heptaania. Tokoferolien standardisuora laadittiin itse valmistetusta tokoferolien seoksesta. Seoksia valmistettaessa tokoferolien kantaliuosten tarkka pitoisuus tarkistettiin spektrofotometrisesti, ja uusi seos tehtiin kerran kuukaudessa. Standardisuoraa varten injektioitiin sarja standardiseosta seitsemällä eri injektioilavuudella (2–100 µl, pitoisuus esim. 1,88 µg/ml), joissa tokoferolien määrät olivat noin 3–200 ng. Sarja ajettiin aina ennen näytteitä sekä näytteiden jälkeen ja näytteen tokoferolit kvantitoitiin standardisuoran mukaan.

Tokolimääritys tehtiin pääsääntöisesti välittömästi uuton jälkeen, mutta tutkimuksen aikana tehtiin koe, jossa saman näytteen uutetta säilöttiin HPLC-vialeissa -18°C:ssa kolmen vuorokauden ajan ja tehtiin tokolimääritys heti uuton jälkeen ja kolmen vuorokauden säilytyksen jälkeen. Säilytyksen aikana ei pystytty havaitsemaan merkittävää tokolien tuhoutumista, joten myöhemmin tutkimuksen edetessä peräkkäisten päivien (maksimissaan kolmen päivän) aikana tehtyjen SFE-uuttojen tokolit säilytettiin HPLC-vialeissa pakastimessa ja määritettiin kromatografisesti viimeisen uuton jälkeen.

### 3.1.7 Rasvahappojen metylointi ja määrittäminen

#### **Esikäsittely**

Rasvahappojen määrittämistä varten heptaanii-isopropanoliin (3:2; v:v) liuotettua uutetta pipetoitiin täyspipetillä 5 ml:n koeputkeen, johon lisättiin sisäisenä standardina heptaaniiin liuotettua C19:0-rasvahapon metyyliesteriä (pitoisuus 2,5 mg/ml) 1 ml. Uute haihdutettiin kuivaksi typpivirralla noin 37 °C:ssa.

Booritrifluorimetanoli-menetelmää käytettäessä:

Tämän jälkeen putkeen lisättiin 1 ml natriumhydroksidi-metanoli-liuosta, suljettiin putki korkilla ja keitettiin kiehuva vesihauteessa 5 minuutin ajan. Koeputki jäähdytettiin jäiden avulla, minkä jälkeen siihen lisättiin 2 ml BF<sub>3</sub>-CH<sub>3</sub>-OH-metylointireagenssia. Putki suljettiin uudestaan ja sitä keitettiin kiehuva vesihauteessa 5 minuutin ajan. Keiton jälkeen putki jäähdytettiin jäiden avulla.

Rikkihappokatalysoitua menetelmää käytettäessä:

Koeputkeen lisättiin 0,5 ml tolueenia sekä 2 ml 1-prosenttista rikkihappoa metanolissa. Putkea vorteksoitiin kevyesti ja sitä lämmitettiin lämpöblokkissa 85 °C:ssa 60 minuutin ajan. Tämän jälkeen putken annettiin jäähtyä hetki.

Jäähtyneeseen putkeen lisättiin ensin 2 ml heptaania ja sen jälkeen 2 ml NaCl:lla kyllästettyä vesiliuosta. Koeputkea ravisteltiin noin 1 minuutin ajan ja nestefaasien annettiin erottua hetken ajan. Ylempi heptaanifaasi siirrettiin pasteur-pipetillä uuteen koeputkeen, johon oli lisätty pohjalle kuivausaineena hieman vedetöntä Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-jauhetta. Näytettä pidettiin kuivauksessa vähintään 30 minuutin ajan, minkä jälkeen näytettä siirrettiin noin 1 ml GC-vialeihin (Clean Pack, La-Pha-Pack GmbH, Saksa).

### **Analysointi**

Näytteen rasvahappojen metyyliesterit analysoitiin kaasukromatografisesti (laitteisto: 6890N Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, injektor: HP6890 Series, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA, kolonni: Omegawax 320, 30 m x 0,32 mm ID, 0,25 µm, Supelco, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) käyttäen liekki-ionisaatiodetektorita (FID). Näytteen ajossa injektorin lämpötila oli 240 °C, uunin lämpötila alussa 160 °C nousten 240 °C:een 4 °C/min ja pysyen siinä 5 minuuttia, ja detektorin lämpötila oli 260 °C. Rasvahappojen metyyliesterit tunnistettiin GLC-63- ja GLC-484-standardien retentioaikojen perusteella ja kvantitoitiin sisäisen standardin tunnetun pitoisuuden ja ohjelman laskeman pinta-alan mukaan. Osa näytteiden sisältämistä harvinaisemmista rasvahapoista tunnistettiin kaasukromatografia-massaspektrometrialla. Kokonaisrasvahappopitoisuus saatiin laskemalla yhteen tunnistettujen rasvahappojen pitoisuudet.

## **3.1.8 Neutraalilipidien määrittäminen**

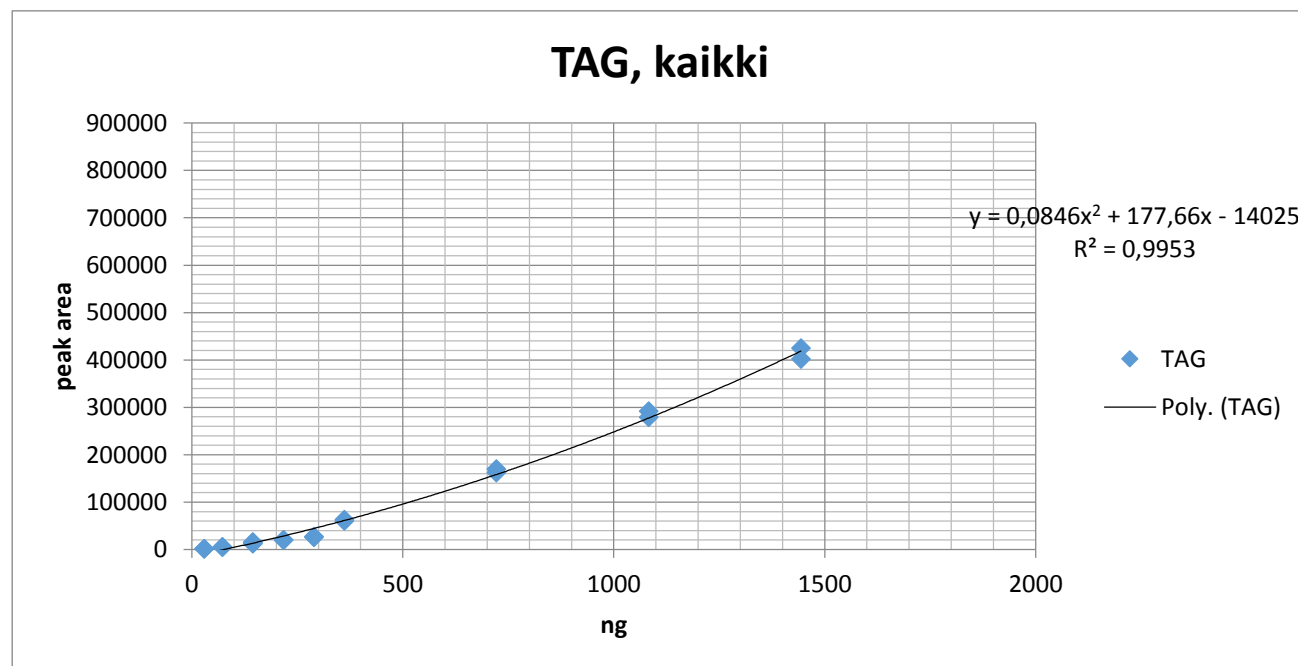
### **Esikäsittely**

Neutraalilipidien määrittämisessä pyrittiin selvittämään näytteiden TAG-, diasyyloglyseroli (DAG)-, monoasyyloglyserolien (MAG)- sekä vapaiden rasvahappojen (FFA) pitoisuudet. Määrittäminen tehtiin kerralla suuremmasta määrästä heptaani-isopropanoliin (3:2) liuotettuja uutteenä, joita oli säilytetty kierrekorkillisissa vialleissa pakastimessa (-18 °C). Uutteista tehtiin 1:10 laimennokset heptaaniin ja

laimennosta suodatettiin ruiskulla 0,45 µm:n membraanisuolettimen läpi (Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA) kierrekorkillisiin LC-vialeihin (Clean Pack, La-Pha-Pack GmbH, Saksa).

## Analysointi

Neutraalilipidien analysointi toteutettiin HPLC:lla (Waters 2690, Waters Corporation, Milford, MA, USA) käyttäen normaalifaasi-diolikolonnia (LiChrosorb Diol, 5 µm, 3 x 100 mm, VDS optilab Chromatographietechnik GmbH, Berliini, Saksa) ja detektorina ELS-detektoria (Evaporative Light Scattering Detector, Waters 2420, Waters Corporation, Milford, MA, USA). Analysoinnissa käytettiin kahta ajoliuosta; heptania jossa 0,1 % etikkahappoa (liuos A) ja heptania jossa 2 % isopropanolia ja 0,1 % etikkahappoa (liuos B). Ajoliuosten virtausnopeus oli 0,5 ml/min. Kolonniuunin lämpötilana pidettiin 25 °C, detektorin sisääntulolämpötilana 60 °C ja sumutuslämpötilana 42 °C. Eri neutraalilipidien retentioajat tunnistettiin TLC-18-6 A-standardin (Nu-Chek Prep, Elysian, MN, USA) mukaan. Kvantitointia varten sarjan yhteydessä ajettiin kaksi kertaa viisi eri tilavuutta standardiseosta, joka sisälsi öljyhappoa, palmitiinihappoa sekä palmitiinihapon mono-, di-, ja triasyyliglyseroleja. Standardien tulosten mukaan piirrettiin ELSD-vastekäyrä, joka mukailee toisen asteen yhtälöä (Kuva 7). Yhtälö tehtiin erikseen eri neutraalilipidiluokille ja niiden mukaan kvantitoitiin pitoisuudet näytteissä.



Kuva 8. Esimerkki ELS-detektorin vastekäyrästä ajettujen TAG-standardien mukaan.

### 3.1.9 Pigmenttien analysointi

Karotenoidien ja klorofyllien määrittämistä varten heptaani-isopropanoliin (3:2; v:v) liuotetuista, pakastimessa (-18 °C) säilytettyistä leväuutteista tehtiin laimennos (1:10) heptaaniin. Laimennosta suodatettiin ruiskulla 0,45 µm:n membraanisuodattimen (Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA) läpi kertakäyttökyyvetteihin (PS 1,5 ml, Brand GmbH, Wertheim, Saksa) ja mitattiin liuosten absorbanssi spektrofotometrillä (Lambda 25 UV/VIS Spectrometer, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) 450 nm:n aallonpituudella. Yhteen kyvettiin lisättiin pelkkää heptaania ja sitä käytettiin nollausnäytteenä ennen sarjan määrittämistä. Näytteen karotenoidipitoisuus lasketaan absorbansseista Lambert Beerin lain mukaisesti käyttäen apuna β-karoteenin spesifistä absorptiviteettiä ( $E^{1\%}_{1\text{cm}} = 2592$ ) kaavoista:

$c$  (pitoisuus liuoksessa, g karotenoideja/100 ml liuosta) =  $A/E^{1\%}$

Pitoisuus öljyssä (g karotenoideja/g öljyä) =  $\frac{c}{V \times a}$ , jossa  $V = 10$  ml ja  $a$  näytteen paino, g

Klorofyllien määrittämistä varten laite nollattiin uudelleen heptaanikyvetillä ja absorbanssit mitattiin aallonpituuksilla 630 nm, 670 nm ja 710 nm. Pitoisuus laskettiin kaavasta:

(µg klorofylliä/g öljyä) =  $\frac{A_{670} - 0,5(A_{630} + A_{710})}{0,1016} \times \left(\frac{V}{a}\right)$ , jossa  $V = 10$  ml ja  $a =$  näytteen paino, g

## 3.2 Tulokset

Tuloksissa määritetyt aineiden pitoisuudet levämassassa ovat esitettynä aina levämassan kuivapainoa kohden (µg/g tai mg/g). Kaikki taulukoissa ja kuvissa esitetyt pitoisuudet ovat saman uuttosarjan rinnakkaisten näytteiden ( $n = 2-6$ ) keskiarvoja. Saman uuton rinnakkaisten tulosten keskihajonnat on ilmoitettu SFE- ja ASE-uuttojen vertailua käsittelevissä kuvissa ja lopussa eri uuttomenetelmien hajontoja vertaillaan taulukossa 5 variaatiokertoimien avulla.

### 3.2.1 Näytekoon vaikutus

Tutkimuksen aikana tehtiin ylikriittisiä uuttoa kokeillen näytekojoja 1 g ja 3 g, joista 1 g:n näytekojo oli käytössä uuton optimoinnissa sekä tehtäessä uuttoa eri mikrolevälajeilla. Näin ollen kaikki vertailevat uutot on suoritettu 1 g:n näytekojoilla. Taulukossa 2 on esitetty viisi uuttoa, jotka on tehty kolmen gramman tai yhden gramman näytekojoilla käyttäen kokonaan dynaamista uuttoa tai aluksi staattista vaihetta. Osassa uuttoista rinnakkaisten lukumäärä on vähemmän kuin neljä, koska etenkin tutkimuksen alkuvaiheessa laitteistossa esiintyi vuotoja, minkä vuoksi uutto suoritettiin kahdella tai kolmella linjalla. Kaikkien taulukossa esitettyjen uuttojen näytemäärään suhteutetut alfa-tokoferoli- ja rasvahapposaannot ovat hyvin lähellä toisiaan ja keskihajontojen perusteella rinnakkaisten välillä ei ole suurta vaihtelua. Itse lipidisaanto oli siis 3 g:n näytemäärästä noin kolme kertaa suurempi kuin 1 g:n näytemäärästä. 15 minuutin staattinen vaihe uuton alussa näytti hieman lisäävän sekä alfa-tokoferoli- että rasvahapposaantoa 3 g:n näytekojoilla, mutta 1 g:n näytekojoilla alfa-tokoferolisaanto hieman väheni ja rasvahapposaanto pysyi samana. Kuitenkin kaikki uuttojen väliset saantoerot olivat äärimmäisen pieniä ja näin ollen yleisesti voidaan todeta, että näytekojoilla 1 g tai 3 g ei ole näytemäärään suhteutetun saannon suhteen merkittävää eroa, eli SFE-uuton teho pysyy samana näytemäärän kasvaessa 3 g:aan.

*Taulukko 2. Näytekoon vaikutus *N. gaditana* -uutteen alfa-tokoferoli- ja rasvahappopitoisuuteen. Taulukossa esitetyt uutot on tehty olosuhteissa: 500 bar, 85 °C ja CO<sub>2</sub>-virtauksella 4 l/min. Sarake CO<sub>2</sub> viittaa uuton teoreettiseen hiilidioksidinkulutukseen, kg näytegrammaa kohden, m = massa, n = rinnakkaisten uuttolinjojen määrä, Alfa-T = alfa-tokoferoli, KA = keskiarvo, KH = keskihajonta, D = dynaaminen uutto ja S = staattinen vaihe. Esitetyt pitoisuudet ovat määrä/g uuttopatruunassa olevaa näytettä.*

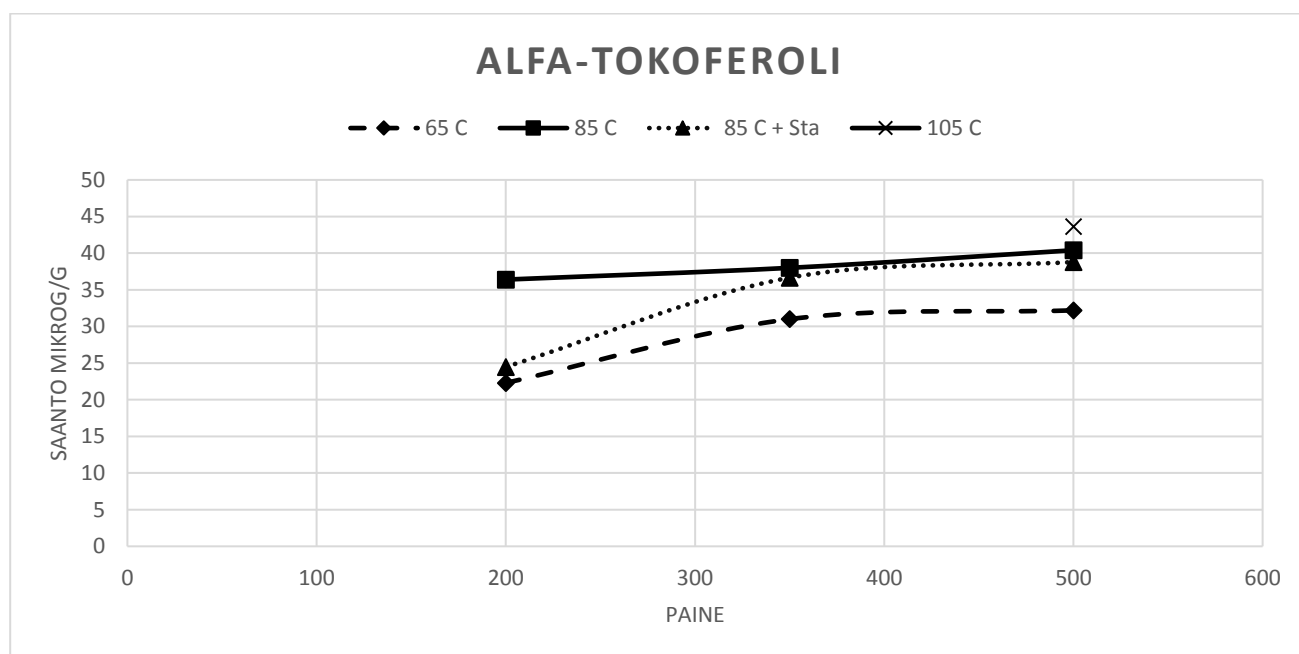
Näyte	m (g)	Ajo	CO <sub>2</sub> (kg/g)	n	Alfa-T (µg/g)	KA	KH	FA (mg/g)	KA	KH
<i>N. gaditana</i>	3	60 min D	0,1584	3	40,6	0,7	16,7	0,3		
<i>N. gaditana</i>	3	15 min S + 45 min D	0,1188	2	42,7	0,6	17,7	0,4		
<i>N. gaditana</i>	1	60 min D	0,4752	3	39,4	0,3	18,0	0,2		
<i>N. gaditana</i>	1	60 min D	0,4752	4	40,4	0,8	17,7	0,5		
<i>N. gaditana</i>	1	15 min S + 45 min D	0,3564	4	38,8	1,3	17,9	0,5		

### 3.2.2 SFE-uuton optimointi

SFE-uuton optimoinnissa keskityttiin tutkimaan uuttolämpötilan ja -paineen sekä staattisen vaiheen ja dynaamisen uuton keston vaikutusta tutkittavien merkkiaineiden (alfa-tokoferoli, rasvahapot, klorofyllit, karotenoidit ja neutraalilipidit) saantoon. Optimoinnissa käytettiin *N. gaditana* -näytettä.

## Alfa-tokoferoli

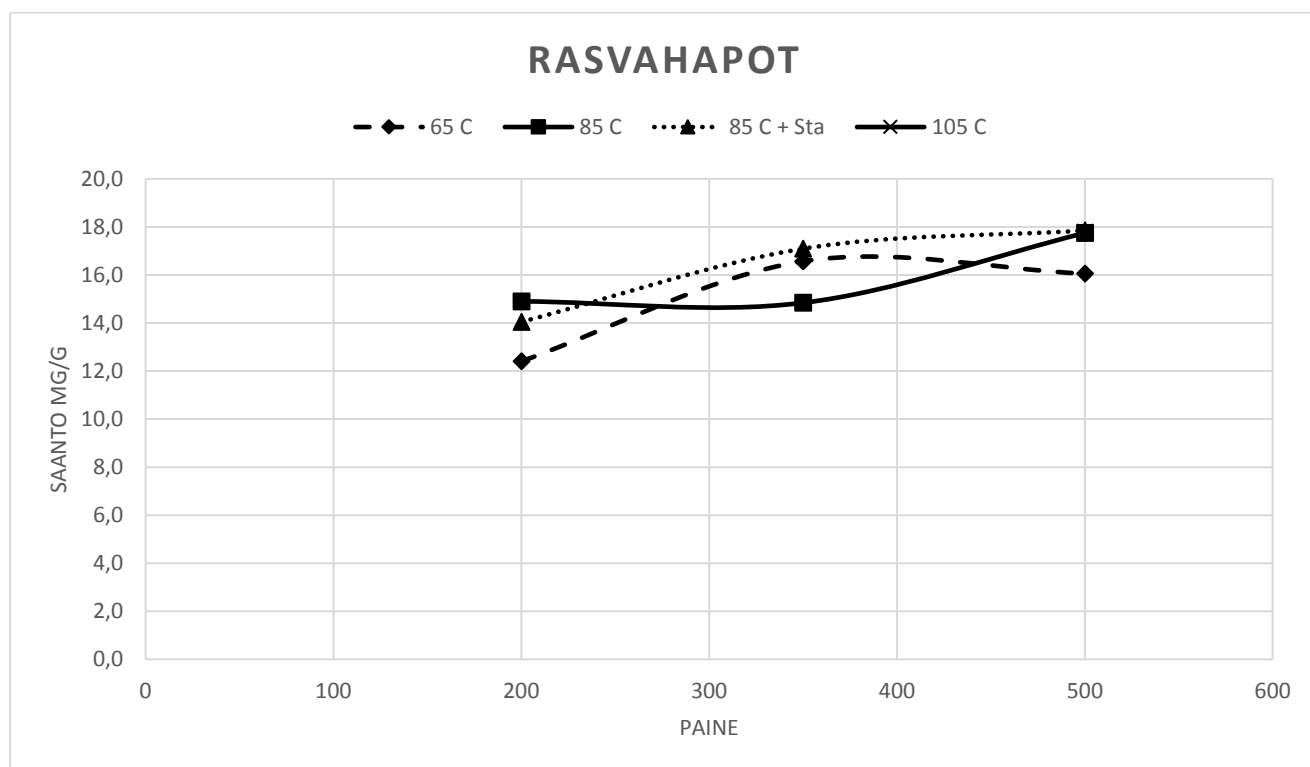
Alla olevassa kuvaajassa (Kuva 8) on esitetty alfa-tokoferolin saanto *N. gaditana* -levästä tutkituissa olosuhteissa. Parhaimmillaan saanto oli vajaa 45 µg/g ja se saatiin korkeimmassa käytetyssä paineessa ja lämpötilassa. Lämpötilan nosto tutkitulla alueella (65–105 °C) lisäsi selvästi saantoa. Myös paineen lisääminen tutkitulla alueella (200–500 bar) lisäsi saantoa jonkin verran, mutta 85 °C:ssa paineen vaikutus oli pienempi kuin 65 °C:ssa. 15 min pituisen staattisen vaiheen käyttö uuton alussa ei lisännyt saantoa vaan pikemminkin vähensi sitä, etenkin 200 bar:n uuttopaineessa.



Kuva 9. Alfa-tokoferolin uuttokäyrä saannon ja paineen suhteen tutkituissa lämpötiloissa ja 15 min staattisen vaiheen kanssa (Sta). 105 °C:ssa uutto tehtiin vain 500 bar:n paineessa, joten kuvassa kyseisessä lämpötilassa on vain yksi piste.

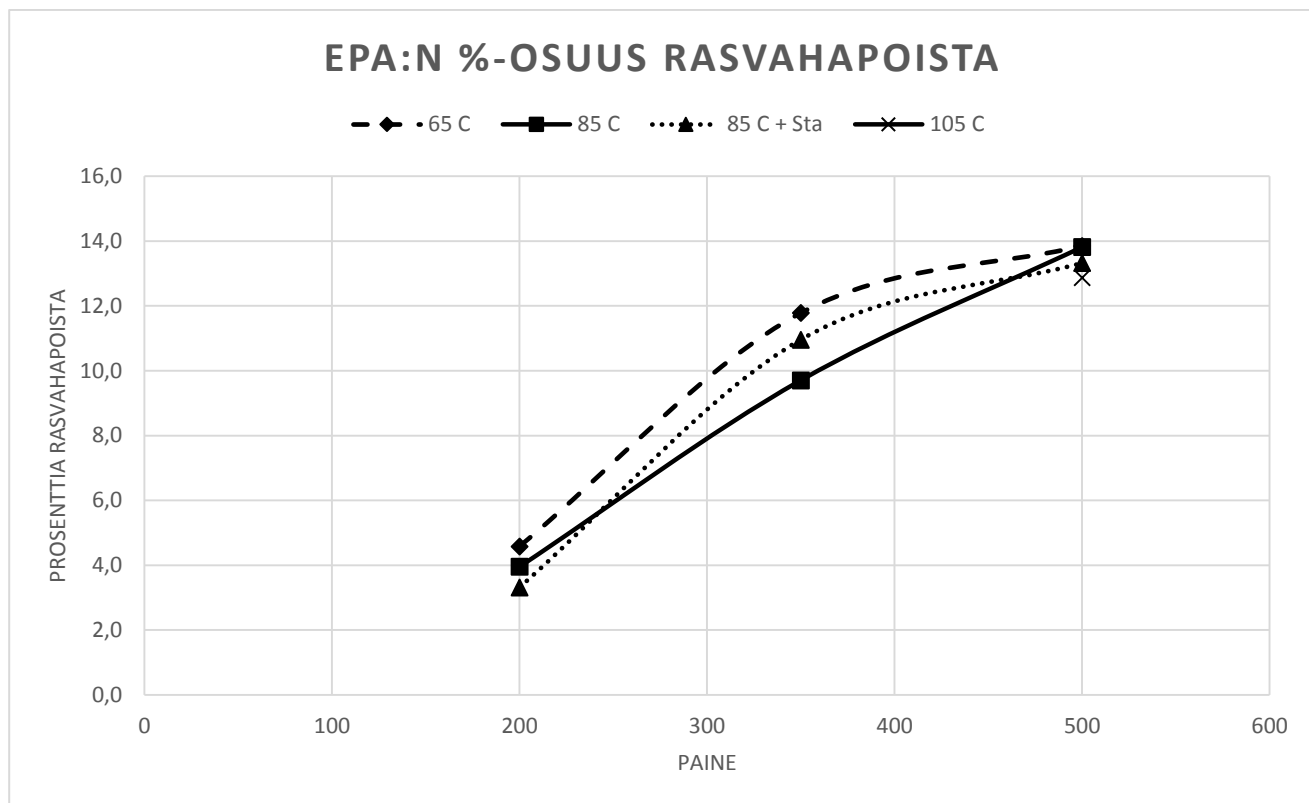
## Rasvahapot

Rasvahappojen saannon kuvaajasta (Kuva 9) voidaan huomata, että saanto ei ollut aivan säännönmukainen paineen ja lämpötilan suhteen toisin kuin alfa-tokoferolin saanto. Paras rasvahapposaanto kuitenkin saatiin 500 bar:n paineessa lämpötilan ollessa 85 °C tai 105 °C. Tällöin saanto oli noin 18 mg/g. Uutto 500 bar:n ja 65 °C:n olosuhteissa tuotti noin 10 % pienemmän saannon verrattuna samassa paineessa ja korkeammissa lämpötiloissa tehtyihin uuttoiin. Joidenkin rasvahappojen suhteellinen osuus saannosta muuttui olosuhteiden muuttuessa. Tämä muutos näkyi erityisen selvästi EPA:n kohdalla (Kuva 11), jonka suhteellinen osuus selvästi kasvoi uuttopaineen kasvaessa. Toisaalta uuttolämpötila ei juurikaan vaikuttanut EPA:n suhteelliseen saantoon. Suurimmillaan EPA:n osuus SFE-uutteen rasvahapoista oli noin 14 %, joka saatiin 500 bar:n paineessa. Vastaavasti 200 bar:n uuttopaineessa EPA:n saanto oli vain noin 4 % rasvahapoista. Staattinen vaihe uutun alussa ei vaikuta parantavan EPA:n suhteellista saantoa.



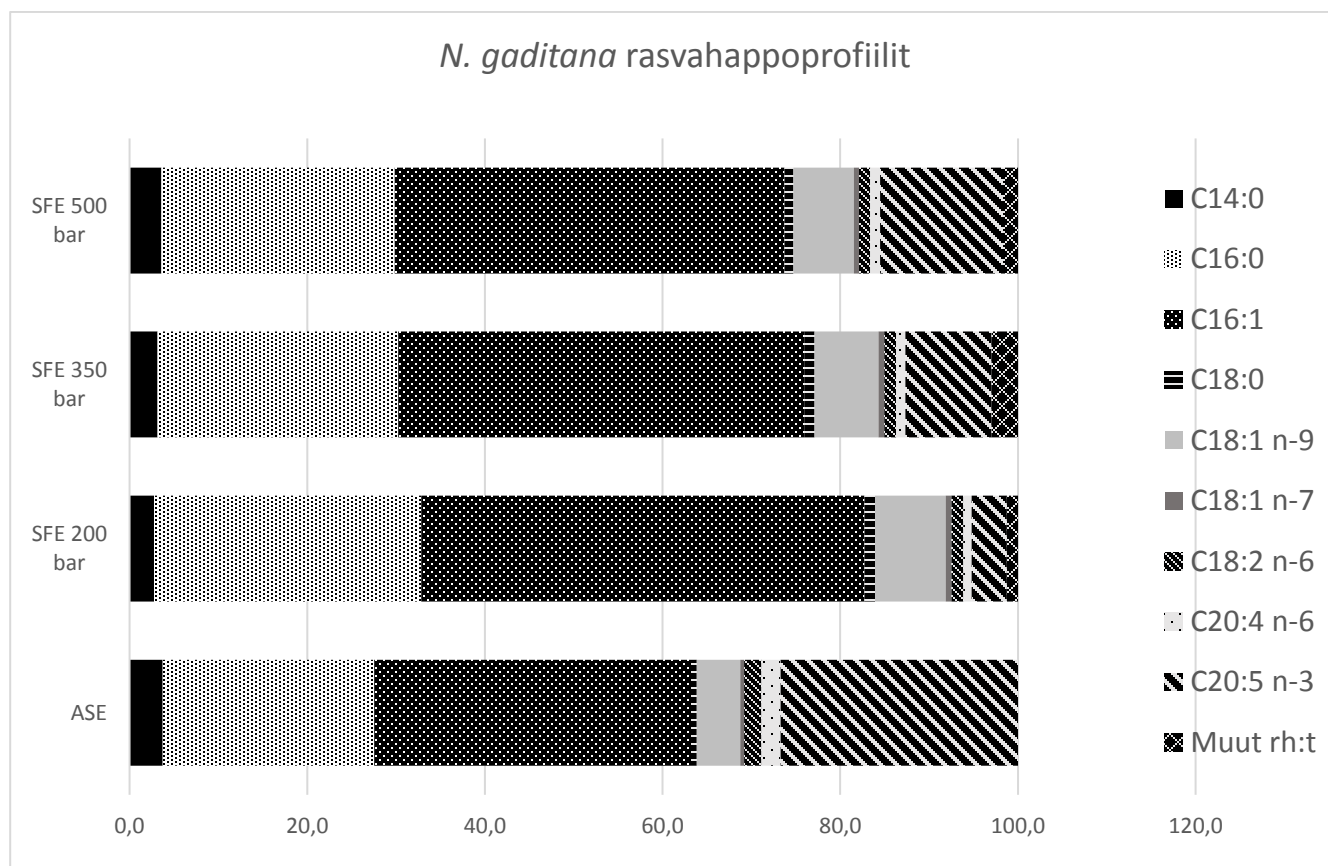
Kuva 10. Rasvahappojen saantojen uuttokäyrät tutkituissa olosuhteissa ja 15 min staattisen vaiheen kanssa (Sta). 105 °C:ssa uutto tehtiin vain 500 bar:n paineessa, joten kuvassa kyseisessä lämpötilassa on vain yksi piste. 500 bar:n paineessa 85 °C:ssa, 85 °C:ssa + Sta ja 105 °C:ssa saanto oli lähes sama, joten pisteet ovat kuvaajassa päällekkäin.





Kuva 11. Eikosapentaenihapon (EPA) %-osuuskien (kaikista rasvahapoista) uuttokäyrät tutkituissa olosuhteissa ja 15 min staattisen vaiheen kanssa (Sta). 105 °C:ssa uutto tehtiin vain 500 bar:n paineessa, joten kuvassa kyseisessä lämpötilassa on vain yksi piste.

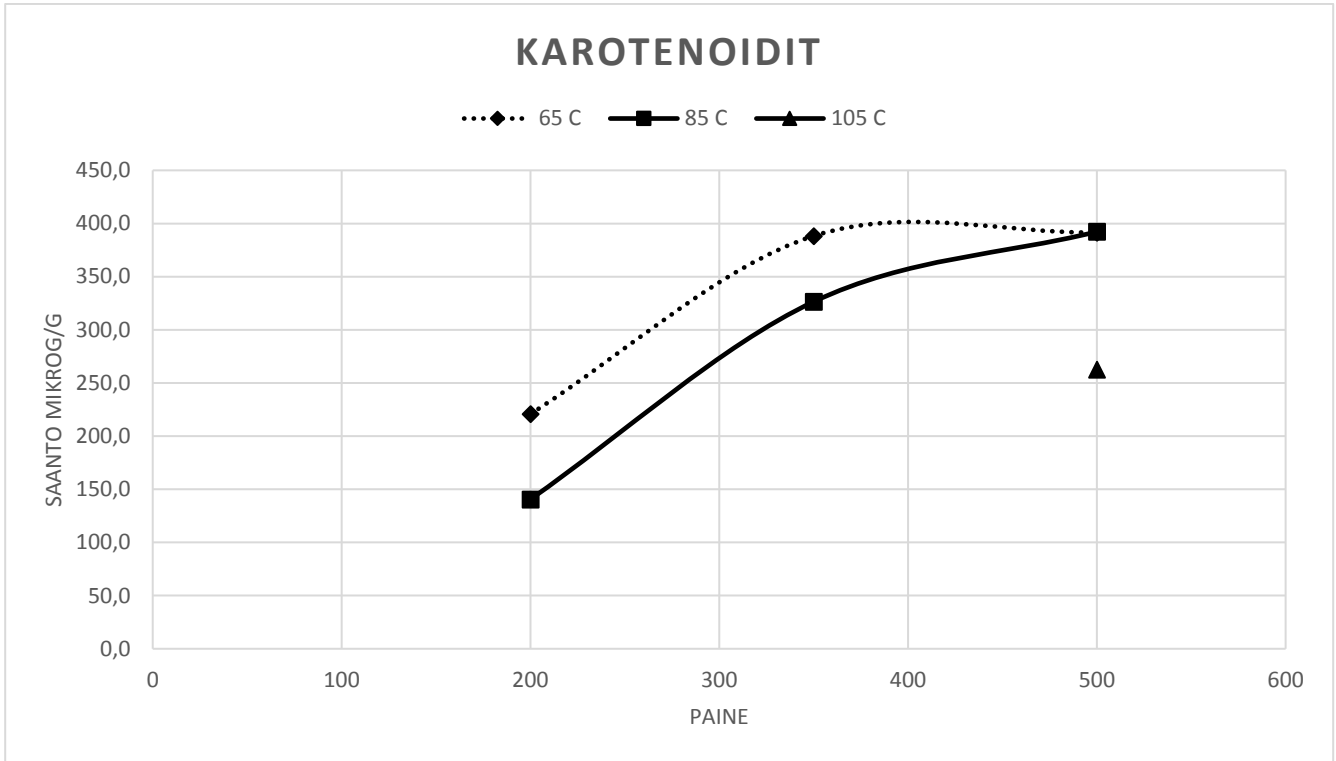
EPA:n suhteellinen saanto kasvoi uuttopaineen kasvaessa, jolloin vastaavasti palmitiinihapon (C16:0) ja palmitoleiinihapon (C16:1) suhteelliset saannot pienenevät. Alla olevassa kuvassa (Kuva 11) esitetyissä pylväsdiagrammeissa on esitetty *N. gaditana* -levän rasvahappoprofiilit eri SFE-uuttopaineissa sekä ASE-uutossa saaduissa uutteissa. Parhaimmillaan *N. gaditanasta* pystyttiin tunnistamaan 18 eri rasvahappoa, joista palmitiinihappo (C16:0), palmitoleiinihappo (C16:1) ja EPA muodostavat valtaosan. Suurin ero ASE- ja SFE-uutteiden rasvahappoprofiilien välillä on juuri EPA:n osuus, joka oli ASE-uutteissa jopa 27 % mutta SFE-uutteissa vain 4–14 %. ASE-uutteessa vastaavasti palmitoleiinihapon ja öljyhapon osuudet olivat suhteellisesti pienempiä.



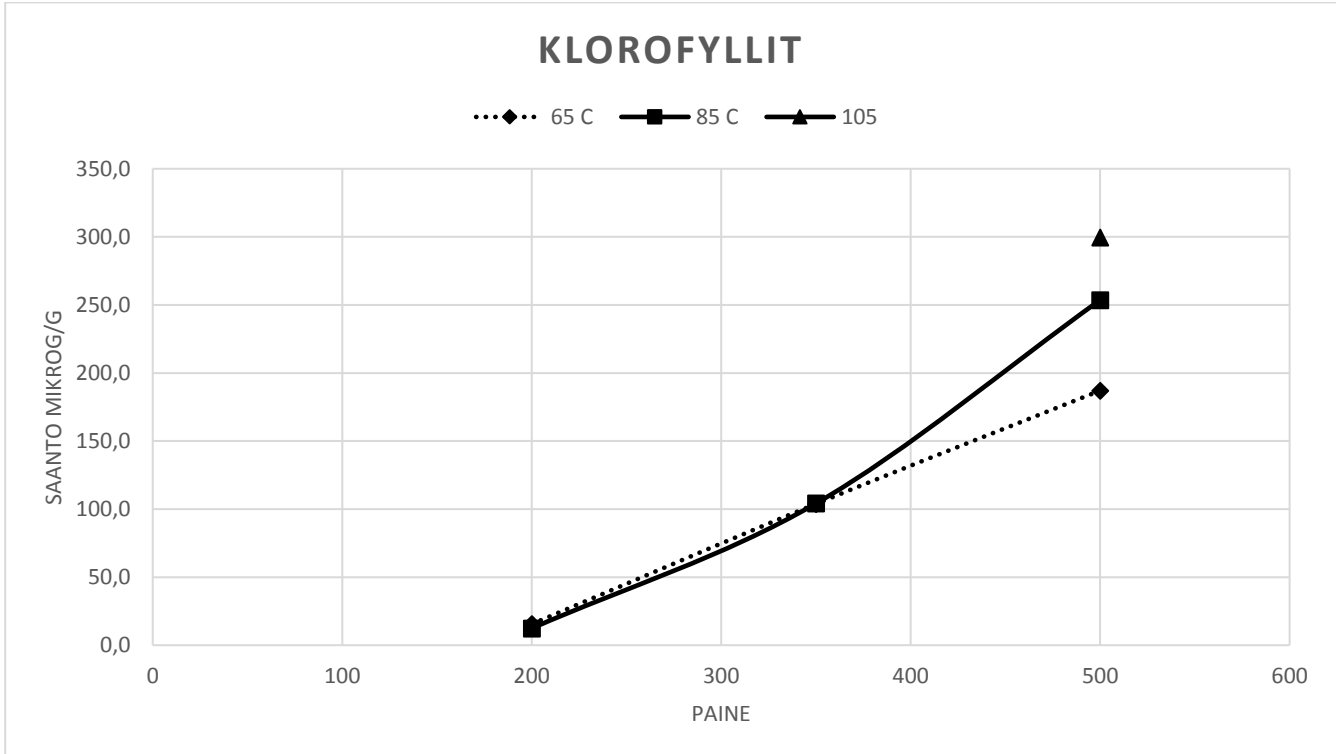
Kuva 12. *N. gaditana*n rasvahappoprofiilin muutos uutteessa eri SFE-uuttopaineissa ja verrattuna ASE-uuttoon. X-akselilla lukuarvot 0,0–100,0 kuvaavat rasvahappojen prosenttiosuutta kaikista rasvahapoista.

## Pigmentit

Uuttoparametreilla näytti olevan vaikutusta myös pigmenttien, karotenoidien ja klorofyllien uuttumiseen. Karotenoidien osalta saanto oli suurin, vajaa 400 µg/g, 500 bar:n paineessa ja 85 °C:n lämpötilassa mutta lähes yhtä suuri 350 bar:n paineessa ja 65 °C:n lämpötilassa (Kuva 12). Uuttuvuus oli 200 bar:n paineessa vain noin 150–225 µg/g. Lisäksi 105 °C:n lämpötilassa saanto putosi reiluun 250 µg:aan/g vaikka paine oli 500 bar:a. Klorofyllien saanto kasvoi tutkitulla alueella sitä mukaa, kun painetta ja lämpötilaa kasvatettiin, kuten alla olevasta kuvasta (Kuva 13) voidaan huomata. 200 bar:n uuttopaineessa saanto oli lähes olematonta, vain 10–15 µg/g, jolloin myös saatu uute oli väriltään kellertävää. 350 bar:n uuttopaineessa uutteen klorofyllipitoisuus oli noin 100 µg/g ja 500 bar paineessa 185–300 µg/g. Liuotetun uutteen väri oli vaalean vihreää 350 bar:n ja tummemman vihreää 500 bar:n paineessa saaduissa uutteissa. Uuttolämpötilalla oli vaikutusta klorofyllien uuttuvuuteen vasta 500 bar:n paineessa, jolloin korkeampi lämpötila tuotti suuremman saannon.



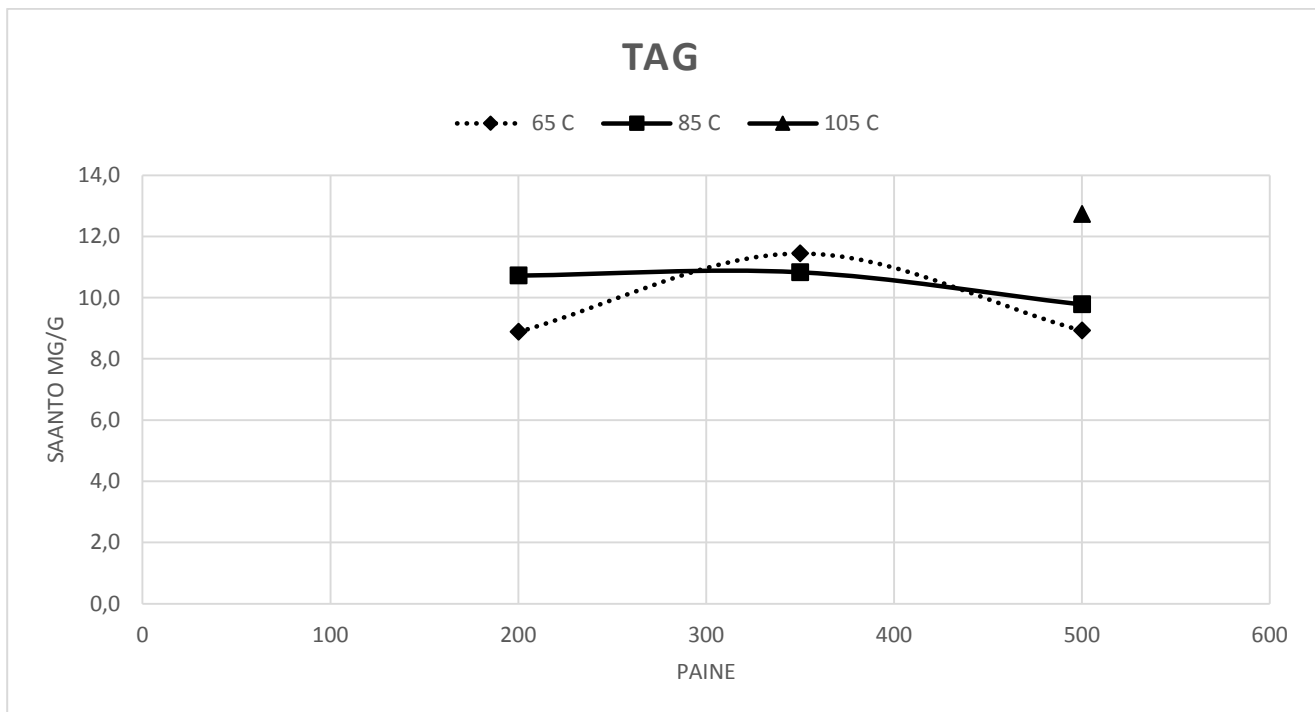
Kuva 13. Karotenoidien saantojen uuttokäyrät tutkituissa olosuhteissa. 105 °C:ssa uutto tehtiin vain 500 bar:n paineessa, joten kuvassa kyseisessä lämpötilassa on vain yksi piste.



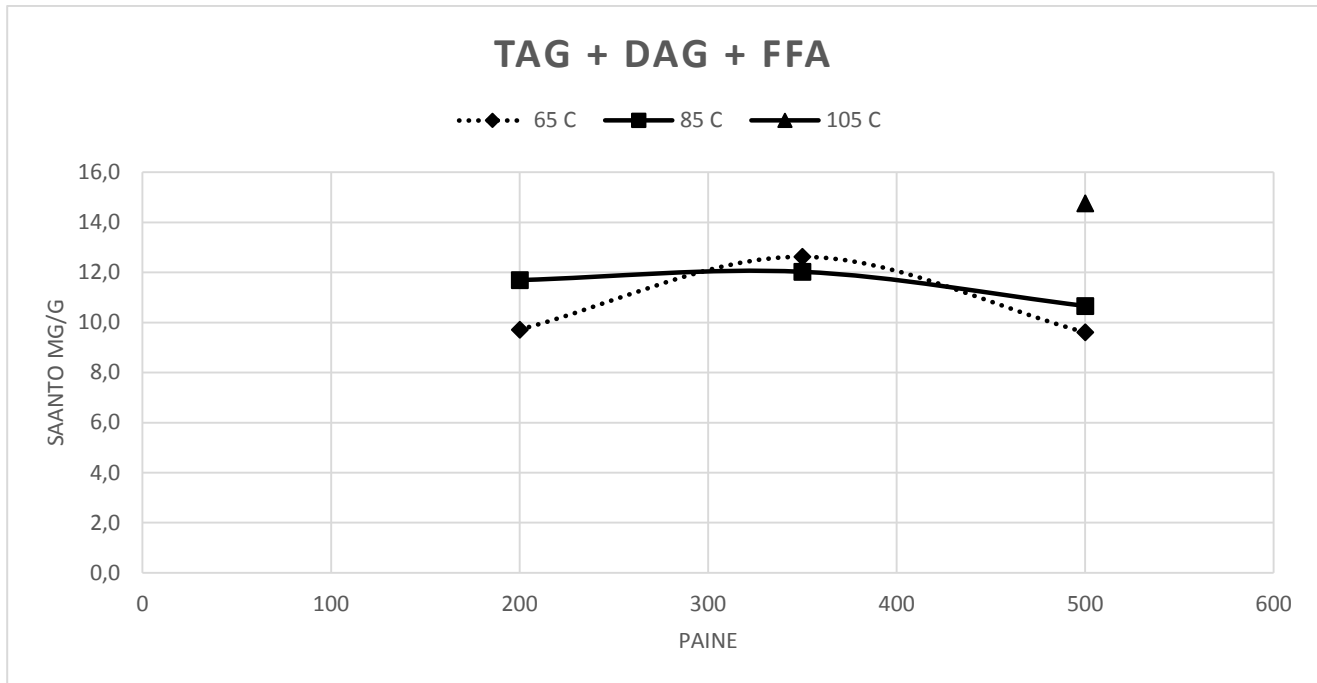
Kuva 14. Klorofyllien saantojen uuttokäyrät tutkituissa olosuhteissa. 105 °C:ssa uutto tehtiin vain 500 bar:n paineessa, joten kuvassa kyseisessä lämpötilassa on vain yksi piste.

## Neutraalilipidit

SFE-uutossa käytetyllä lämpötilan ja paineen alueella ei havaittu kovin suurta vaihtelua uutteen neutraalilipidisaannossa. Neutraalilipidien uuttuvuus ei ollut suoraan suhteutettavissa paineeseen tai lämpötilaan, mutta suurin saanto, lähes 15 mg/g, saatiin kuitenkin 500 bar:n paineessa ja 105 °C:n lämpötilassa. Alla olevassa kuvassa (Kuva 14) on esitetty TAG:en uuttokäyrät. TAG:t muodostavat selvästi suurimman osan, 85–93 %, *N. gaditana* -näytteessä havaituista neutraalilipideistä. Loput neutraalilipideistä ovat lähinnä DAG:a ja hieman vapaita rasvahappoja (FFA). Alla olevassa kuvassa (Kuva 15) on puolestaan esitetty TAG:en, DAG:en ja FFA:n summien uuttokäyrät, jotka mukailevat melko tarkasti TAG:en saantojen käyriä. Suurimmillaan TAG:en saanto oli 12,7 mg/g ja pienimmillään 8,9 mg/g. TAG + DAG + FFA saantojen summa puolestaan oli suurimmillaan 14,8 mg/g ja pienimmillään 9,6 mg/g.



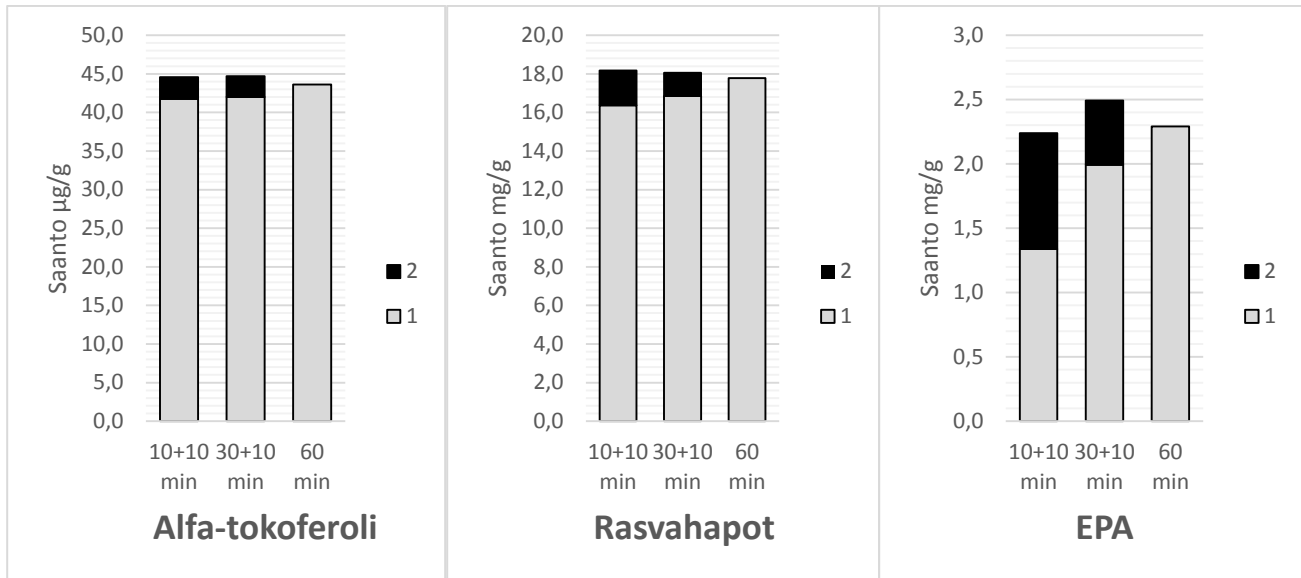
Kuva 15. Triasyyliglyserolien (TAG) saannon uuttokäyrät tutkituissa olosuhteissa. 105 °C:ssa uutto tehtiin vain 500 bar:n paineessa, joten kuvassa kyseisessä lämpötilassa on vain yksi piste.



Kuva 16. Triasyyliglyserolien (TAG), diasyyliglyserolien (DAG) ja vapaiden rasvahappojen (FFA) summan uuttokäyrät tutkituissa olosuhteissa. 105 °C:ssa uutto tehtiin vain 500 bar:n paineessa, joten kuvassa kyseisessä lämpötilassa on vain yksi piste.

### Uuttoajan vaikutus saantoon

SFE-uuttoja tutkimuksen aikana tehtäessä käytettiin uuttoaikana pääasiassa yhtä tuntia, joka oli aiemmissa kokeissa osoittautunut käyttökelpoiseksi vaihtoehdoksi. Kuitenkin myös uuttoajan vaikutusta saantoon testattiin. Alla olevissa pylväsdiagrammeissa (Kuva 16) on esitetty alfa-tokoferolin, kokonaisrasvahappojen ja EPA:n SFE-uuttojen saannot eri pituisissa uutoissa. Kaikki kyseiset uutot tehtiin 500 bar:n paineessa ja 105 °C:n lämpötilassa. Alfa-tokoferolin ja rasvahappojen uuttuvuusdiagrammit olivat lähes samanlaisia. Niissä uuttoajalla 10 minuutin ja 60 minuutin välillä ei ollut juurikaan vaikutusta, vaan saanto oli lähes sama. Kuitenkin kun 10 minuutin ja 30 minuutin jälkeen uuttoa jatkettiin 10 minuuttia, pystyttiin näytteestä saamaan saantoa vielä 6–11 % lisää, jolloin yhteissaanto jopa ylitti hieman 60 minuutin uuton saannon. Näin ollen voidaan todeta, että SFE-uutossa vähintään noin 90 % näytteen alfa-tokoferolisaannosta ja rasvahapposaannosta uuttui ensimmäisen 10 minuutin aikana. EPA:n saannon suhteen *N. gaditana* -näyte toimi SFE-uutossa hieman eri tavoin. Ensimmäisten keräysten jälkeen EPA:n saanto oli selvästi suurin 60 minuutin jälkeen (2,3 mg/g) ja pienin 10 minuutin uuton jälkeen (1,3 mg/g). Suurimmilleen (2,5 mg/g) saanto nousi, kun 30 minuutin uuton jälkeen uuttoa jatkettiin vielä 10 minuutilla.



Kuva 17. Uuttoajan vaikutus alfa-tokoferoli-, rasvahappo- ja EPA-saantoon. Palkin alempi osa on keräys 10 min, 30 min ja 60 min uuttoa jälkeen. Palkin ylempi, musta osa kuvaa saantoa, joka on saatu, kun uuttoa on jatkettu 10 min keräyksen jälkeen. 60 min uuttoa jälkeen ei tehty enää 10 min jatkouuttoa. Sarja 1 on saanto ensimmäisen keräyksen jälkeen ja sarja 2 mahdollisen toisen keräyksen jälkeen.

### 3.2.3 ASE-uutolla tutkittu mikrolevien lipidikoostumus

Eri tokolityypeistä alfa-tokoferoli oli kaikissa tutkituissa levissä vallitseva, joskin *N. gaditanassa* oli delta-tokoferolia alle 10 % alfa-tokoferolin määrästä sekä hyvin vähän beeta- ja gamma-tokoferoleja. Ympäristötieteiden laitoksen Lahden kampuksella kasvatettujen *E. gracilis* -levien eri kasvatusten ja myös rinnakkaisten kasvatusten välillä oli huomattavia eroja, ei vain alfa-tokoferolin vaan myös muiden tutkittujen lipidien pitoisuuksissa. Juuri *E. gracilis* sisälsi tutkituista lajeista eniten alfa-tokoferolia, jopa yli 1000 µg/g (yli 100 mg/100 g). *Selenastrum* sisälsi puolestaan alfa-tokoferolia lähes 400 µg/g, *N. gaditana* noin 150 µg/g, *Chlorella* noin 110 µg/g, mutta *Spirulina* vain 55 µg/g. Rasvahapposaantoa käytettiin viitteenä siitä, kuinka paljon lipidejä levä kokonaisuudessaan sisältää. Tutkituista lajeista *Selenastrum* sisälsi eniten rasvahappoja, lähes 100 mg/g (lähes 10 % kuivapainosta). Vastaavasti vähiten rasvahappoja sisälsi *Spirulina*, vain noin 54 mg/g. *N. gaditana*, *E. gracilis* ja *Chlorella* puolestaan kaikki sisälsivät 60–80 mg/g rasvahappoja. Niin ikään pigmenttien pitoisuuksissa levälajien välillä oli suuria eroja. Eniten sekä karotenoideja että klorofyllejä löytyi *Selenastrumista*, molempia vajaa 17000 µg/g (1,7 % kuivapainosta). *Selenastrumissa* oli jopa enemmän klorofyllejä kuin *Chlorellassa*, joka on saanut

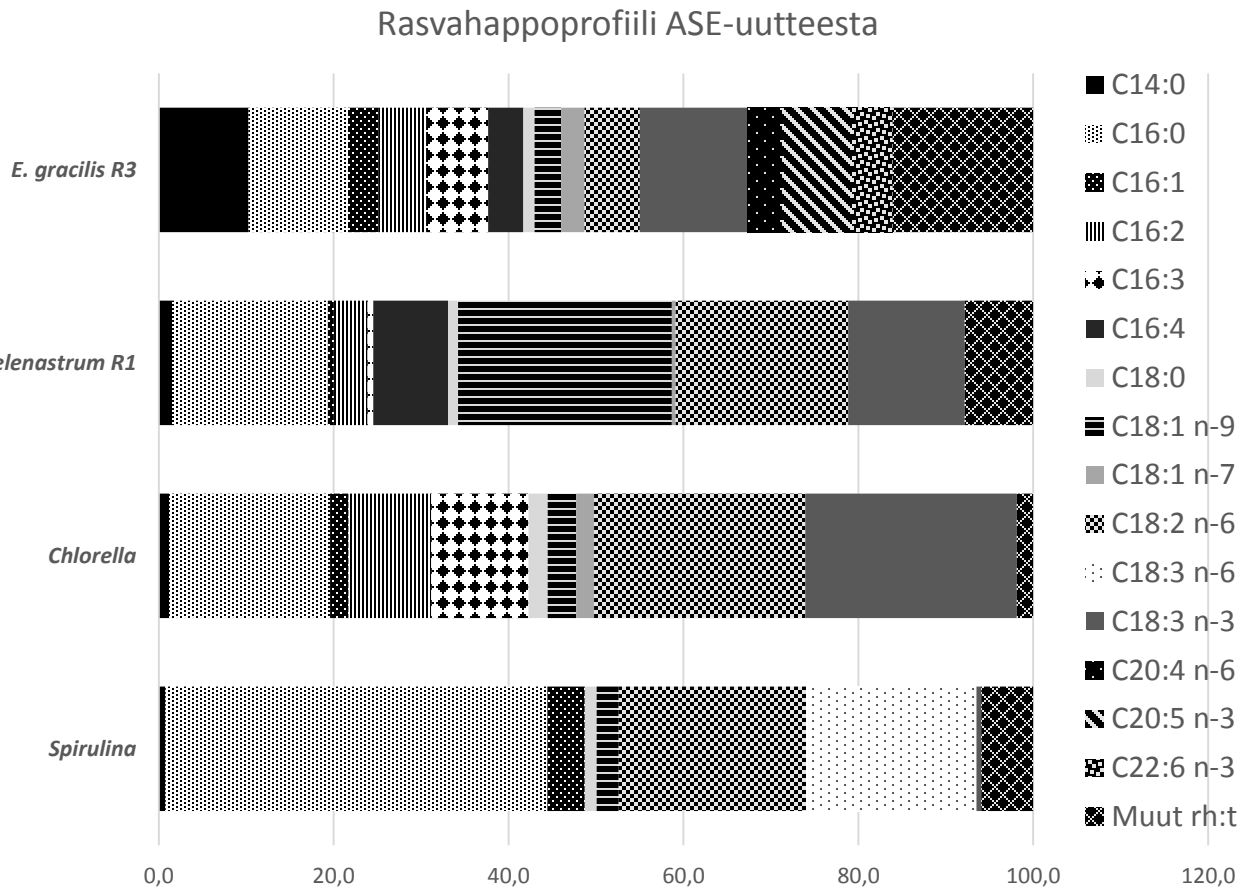
nimensä juuri lehtivihreän mukaan. Kaikissa muissa lajeissa klorofyllejä oli noin kaksi kertaa suurempi pitoisuus kuin karotenoideja. *N. gaditanassa* oli selvästi vähiten molempia tutkittuja pigmenttejä, vain noin 1500 µg/g karotenoideja ja noin 2500 µg/g klorofyllejä. Alla olevassa taulukossa (Taulukko 3) on esitetty tutkittujen levälajien ASE-uutteiden lipidipitoisuudet.

*Taulukko 3. Tutkittujen mikrolevälajien lipidikoostumus ASE-uutteista määritettynä. Taulukossa esitetyt pitoisuudet ovat saman uuttosarjan rinnakkaisten määritysten keskiarvoja (n = 3, paitsi Selenastrumin uutossa n = 6). Alfa-T = alfa-tokoferoli, RH:t = rasvahapot, Kar = karotenoidit ja Klor = klorofyllit. \*Saadut tulokset on mitattu saman kasvatuksen kahdesta rinnakkaisesta reaktorista kerätyistä näytteistä.*

Laji	Alfa-T (µg/g)	RH:t (mg/g)	Kar (µg/g)	Klor (µg/g)
<i>N. gaditana</i>	154	71,7	1460	2530
<i>E. gracilis</i> *	521–1050	64,1–73,5	2690–4550	6400–9360
<i>Selenastrum</i>	394	99,1	16600	16700
<i>Chlorella</i>	114	78,6	5070	11900
<i>Spirulina</i>	55,0	54,2	3390	7880

Tutkittujen levälajien rasvahappoprofiilit määritettiin kaikista saaduista uutteista. Alla olevassa pylväsdiagrammissa (Kuva 17) on esitetty eri lajien ASE-uutteesta määritetyt rasvahappoprofiilit. *N. gaditanan* rasvahappoprofiili on esitetty jo aiemmin tuloksissa (Kuva 11). *E. gracilis* -näytteestä pystyttiin tunnistamaan kaikkiaan 21, *Selenastrumista* 15, *Chlorellasta* 13 ja *Spirulinasta* 10 eri rasvahappoa. *N. gadinasta* tunnistettiin parhaimmillaan 18 eri rasvahappoa, joista C16:0, C16:1 ja C20:5 kuitenkin muodostavat yli 85 % rasvahapoista. EPA:n (C20:5 n-3) osuus oli *N. gaditanassa* kaikkiaan 25–27 % kaikista rasvahapoista vastaten määrältään 18–19 mg/g kuivattua levämassaa. Muista lajeista ainoastaan *E. gracilis* sisälsi EPA:a, kaikkiaan 8 % rasvahapoista, ja samalla ainoana lajina DHA:a (dokosaheksaenihappoa, C22:6 n-3), kaikkiaan 4,6 % rasvahapoista. Muutenkin *E. gracilis* -uutteen rasvahappoprofiili jakautuu melko tasaisesti useiden rasvahappojen kesken eikä vallitsevia rasvahappoja ollut havaittavissa. Uutteessa merkittävänä määrinä esiintyviä rasvahappoja olivat pitkäketjuisten monityydyttymättömien EPA:n ja DHA:n lisäksi muun muassa C14:0, C16:0, C16:1, C16:2, C16:3, C16:4, C18:1 n-9, C18:2 n-6, C18:3 n-3 ja C20:4 n-6. *Selenastrumissa* rasvahapoista eniten oli öljyhappoa (C18:1 n-9) ja muita vallitsevia rasvahappoja olivat C16:0, C16:2, C16:4, C18:2 n-6 ja C18:3 n-3. *Chlorellan* rasvahapot olivat pääasiassa C16:0, C16:2, C16:3, C18:2 n-6 ja C18:3 n-3 happoja. Muita rasvahappoja oli vain pieniä määriä. *Spirulinassa* tunnistettiin vähiten erilaisia rasvahappoja. Näistä yli 40 % on palmitiinihappoa (C16:0) ja noin 20 % kumpaakin linolihappoa (C18:2 n-6) ja gamma-linoleenihappoa (GLA, C18:3 n-6). Itse asiassa *Spirulina* oli tutkituista lajeista ainoa, joka sisälsi GLA:a.

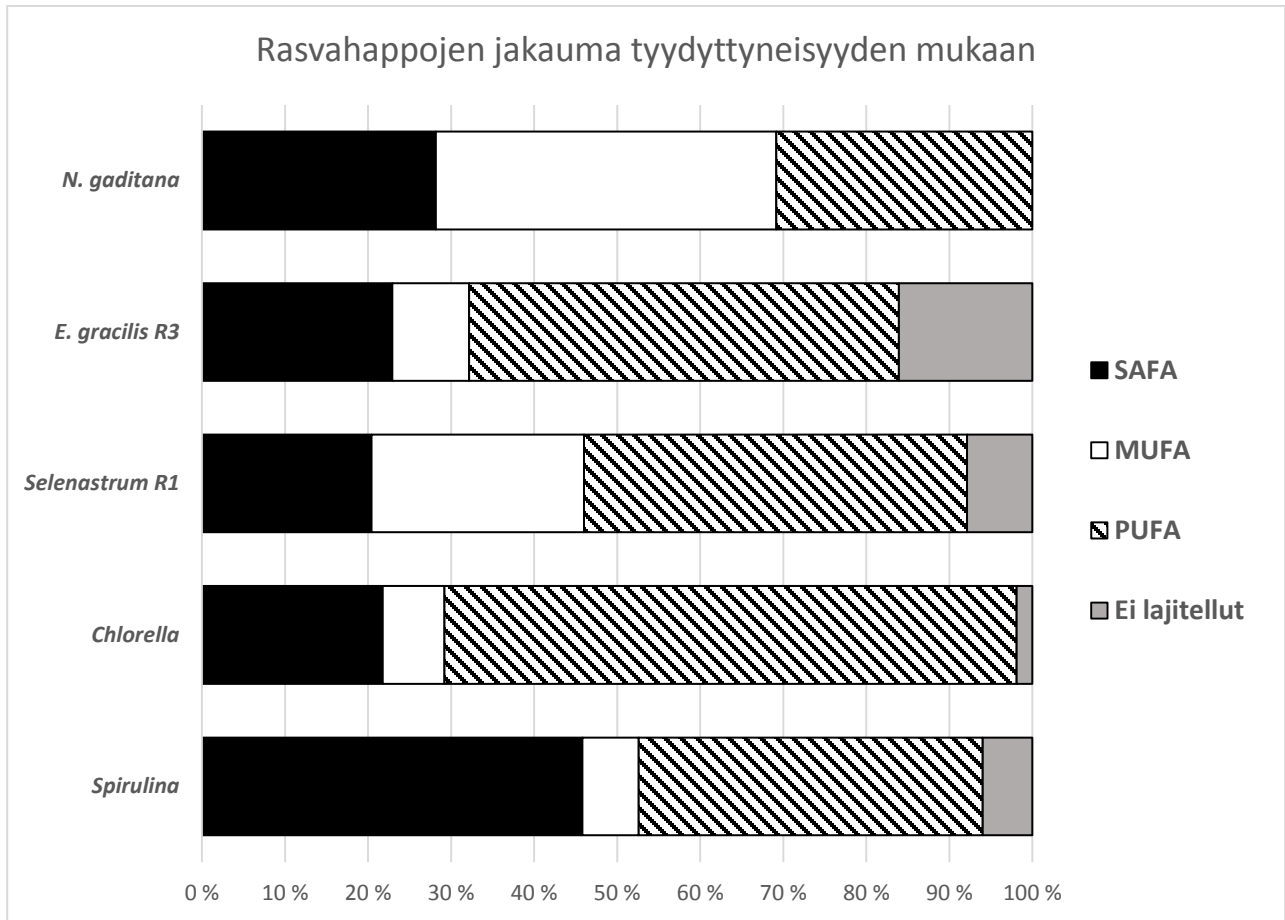
Kuten pylväsdiagrammista voidaan huomata, eri levälajien rasvahappoprofiilit ovat hyvin omalaatuisia. Vain C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1 n-9 ja C18:2 n-6 rasvahappoja esiintyy kaikissa lajeissa, tosin hyvin vaihtelevia määriä.



Kuva 18. Tutkittujen mikrolevälajien rasvahappoprofiilit ASE:lla uutetuissa näytteissä. X-akselilla lukuarvot 0,0–100,0 kuvaavat rasvahappojen prosenttiosuutta kaikista rasvahapoista.

Mikrolevien välillä oli myös jonkin verran eroavaisuuksia niiden sisältämien rasvahappojen kokonaisytydyttyneisyyden mukaan, kuten pylväsdiagrammista (Kuva 19) voidaan todeta. Suhteellisesti eniten tyydyttyneitä rasvahappoja oli *Spirulinassa*, jonka rasvahapoista noin 45 % oli tyydyttyneitä, hieman yli 40 % monityydyttymättömiä ja vain 7 % kertatytydyttymättömiä. *Chlorella*ssa oli lähes 70 % monityydyttymättömiä rasvahappoja, noin 20 % tyydyttyneitä rasvahappoja ja niin ikään vain noin 7 % kertatytydyttymättömiä rasvahappoja. Myös *Selenastrum*- ja *E. gracilis* -näytteissä rasvahapot ovat lähinnä tyydyttymättömiä, mutta *Selenastrum*issa kertatytydyttymättömien osuus oli jonkin verran suurempi. *N. gaditanan* rasvahapot jakautuivat melko tasaisesti kaikkiin kolmeen luokkaan, mutta kertatytydyttymättömiä oli hieman muita enemmän.





Kuva 19. Tutkittujen mikrolevälajien rasvahappojen jakautuminen tyydyttyneisiin (SAFA), kertatyydyttymättömiin (MUFA) ja monityydyttymättömiin (PUFA) rasvahappoihin. Joitakin tunnistettuja rasvahappoja esiintyi uutteisissa pieniä määriä eikä niiden prosentiosuuksia laskettu. Näin ollen nämä rasvahapot on taulukossa esitetty ”Ei lajitellut” -osiossa.

### 3.2.4 Ylikriittinen uutto (SFE) vs. kiihdytetty liuotinuutto (ASE)

Alla olevassa taulukossa on esitetty rinnakkain eri lipidi-komponenttien saatuja pitoisuuksia samoista levänäytteistä eri menetelmillä sekä SFE-uuton saannon prosenttiosuus ASE-uuton saannosta. Vertailussa olevat SFE-uuton olosuhteet olivat ne, jotka uuton optimointivaiheessa valittiin käytettäväksi muille levälajeille, eli  $p = 500$  bar,  $T = 105$  °C, virtaus = 4 l/min ja uuttoaika 1 h.

Taulukko 4. SFE-uuton teho suhteessa ASE-uuttoon. Uuttojen tulokset ovat pitoisuuksina alfa-tokoferolin, rasvahappojen, karotenoidien ja klorofyllien osalta sekä SFE-uuton saantoprosentti suhteessa ASE-uuttoon. Pitoisuudet ovat saman uuttosarjan rinnakkaisten määritysten keskiarvoja ( $n = 3$ , paitsi *Selenastrum*in ASE-uutossa  $n = 6$  ja SFE-uutossa  $n = 4$  sekä *Spirulina*in SFE-uutossa  $n = 4$ ).

Laji	Alfa-tokoferoli (µg/g)			Rasvahapot (mg/g)		
	ASE	SFE	%	ASE	SFE	%
<i>N. gaditana</i>	154	43,6	28,4	71,7	17,8	24,8
<i>E. gracilis</i>	1050	843	80,3	73,5	30,2	41,1
<i>Selenastrum</i>	394	250	63,3	99,1	21,1	21,3
<i>Chlorella</i>	114	19,4	17,0	78,6	7,74	9,8
<i>Spirulina</i>	55,0	32,5	59,2	54,2	6,51	12,0

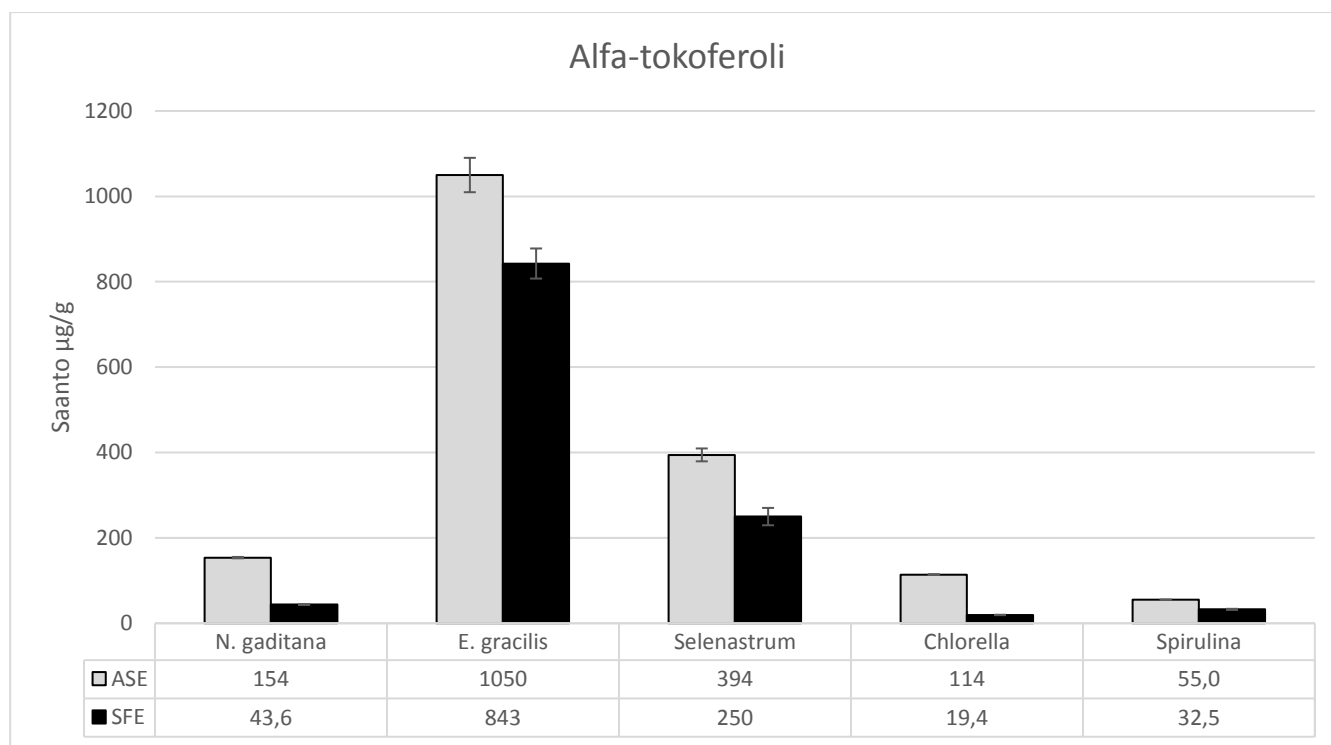
  

Laji	Karotenoidit (µg/g)			Klorofyllit (µg/g)		
	ASE	SFE	%	ASE	SFE	%
<i>N. gaditana</i>	1460	263	18,0	2530	300	11,8
<i>E. gracilis</i>	4550	2400	52,7	9360	2630	28,1
<i>Selenastrum</i>	16600	3150	19,0	16700	1290	7,7
<i>Chlorella</i>	5070	411	8,1	11900	1380	11,6
<i>Spirulina</i>	3390	1080	31,9	7880	421	5,3

Taulukosta 4 nähdään, kuinka SFE-uutolla saadut lipidi-komponenttien pitoisuudet olivat poikkeuksetta pienempiä verrattuna ASE-uutolla saatuihin tuloksiin. Vaihtelua SFE:n tehossa oli eri lipidi-komponenttien välillä, mutta myös levälajien välillä. Alfa-tokoferoli näytti uuttuvan täydellisimmin eri lipideistä. Myös muista tutkituista lipideistä SFE-saanto oli suhteellisesti paras *E. graciliksesta*. Pigmenteistä karotenoidit uuttuivat SFE-uutolla paremmin kuin klorofyllit. Poikkeuksena oli *Chlorella*, jonka klorofylleista pystyttiin uuttamaan SFE-uutolla suurempi osa kuin karotenoideista. Tutkituista levälajeista *Selenastrum* sisälsi eniten rasvahappoja, karotenoideja ja klorofyllejä. *Spirulinassa* puolestaan oli vähiten rasvahappoja ja *N. gaditanassa* vähiten karotenoideja ja klorofyllejä.

## Alfa-tokoferoli

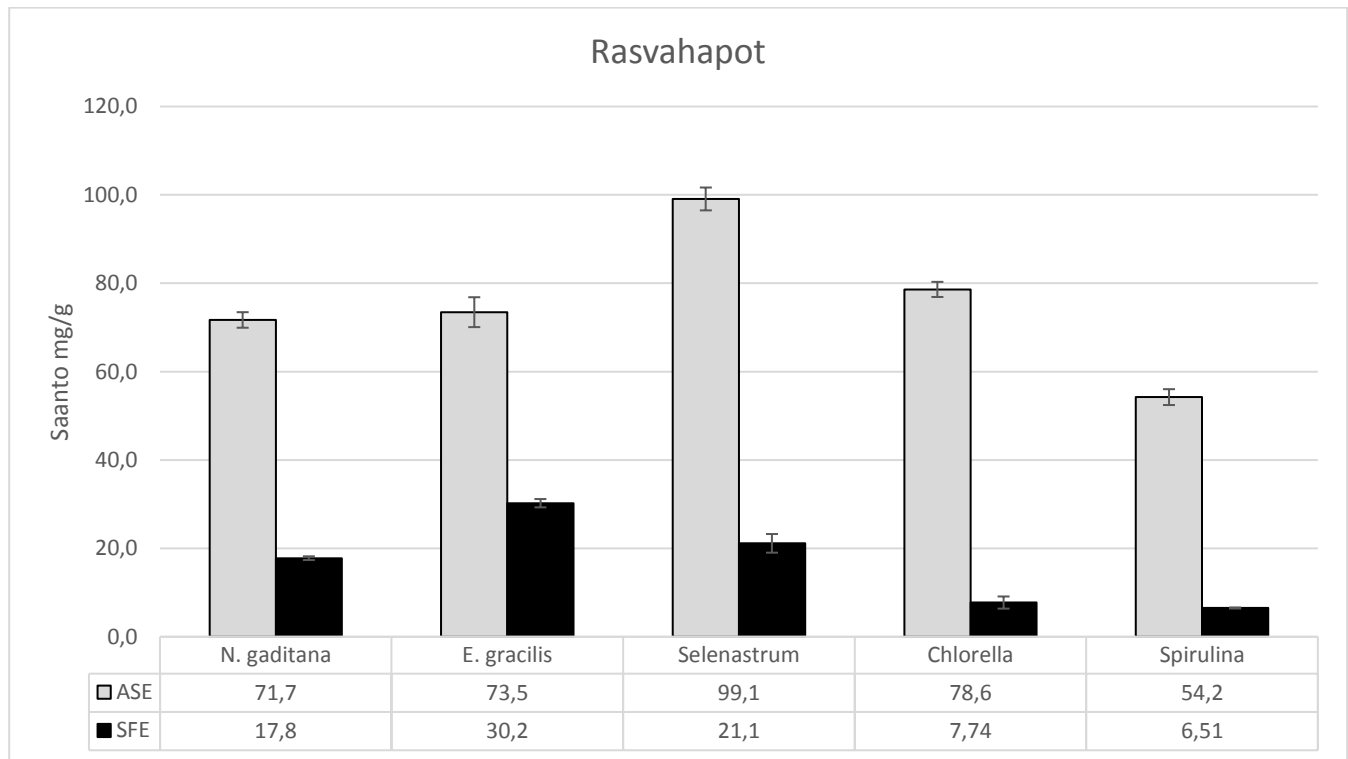
SFE-uutolla ei päästy ASE-uuton alfa-tokoferolisaantojen tasolle. Kuitenkin *E. gracilis* -näytteestä SFE-uutolla saatu saanto oli jopa yli 80 %, *Selenastrumista* yli 63 % ja *Spirulinasta* yli 59 % ASE-uuttojen saantoihin verrattuna. Toisaalta *N. gaditanan* saanto oli vain noin 28 % ja *Chlorellan* vain 17 %. *E. graciliksessä* oli myös suurin pitoisuus alfa-tokoferolia ja vastaavasti *Spirulinassa* pitoisuus oli pienin. Määrällisesti eniten SFE:lla uuttumatonta alfa-tokoferolia jäi *E. gracilikseen* (noin 200 µg) ja vähiten *Spirulinaan* (reilu 20 µg). Alla olevassa kuvaajassa (Kuva 19) on esitetty pylväinä määritetyt alfa-tokoferolipitoisuudet ASE- ja SFE-uutteissa. Samasta uutosta määritettyjen rinnakkaisten tulosten keskihajonta oli suurimmillaan *Selenastrumin* SFE-uutteessa, noin 8 %. Muiden uutteen osalta keskihajonnat olivat noin 4 % tai vähemmän.



Kuva 20. Alfa-tokoferolin pitoisuudet ja saman uuttosarjan rinnakkaisten näytteiden ( $n = 3$ , paitsi *Selenastrumin* ASE-uutossa  $n = 6$  ja SFE-uutossa  $n = 4$  sekä *Spirulinan* SFE-uutossa  $n = 4$ ) pitoisuuksien keskihajonnat eri mikrolevistä ASE:lla ja SFE:lla.

## Rasvahapot

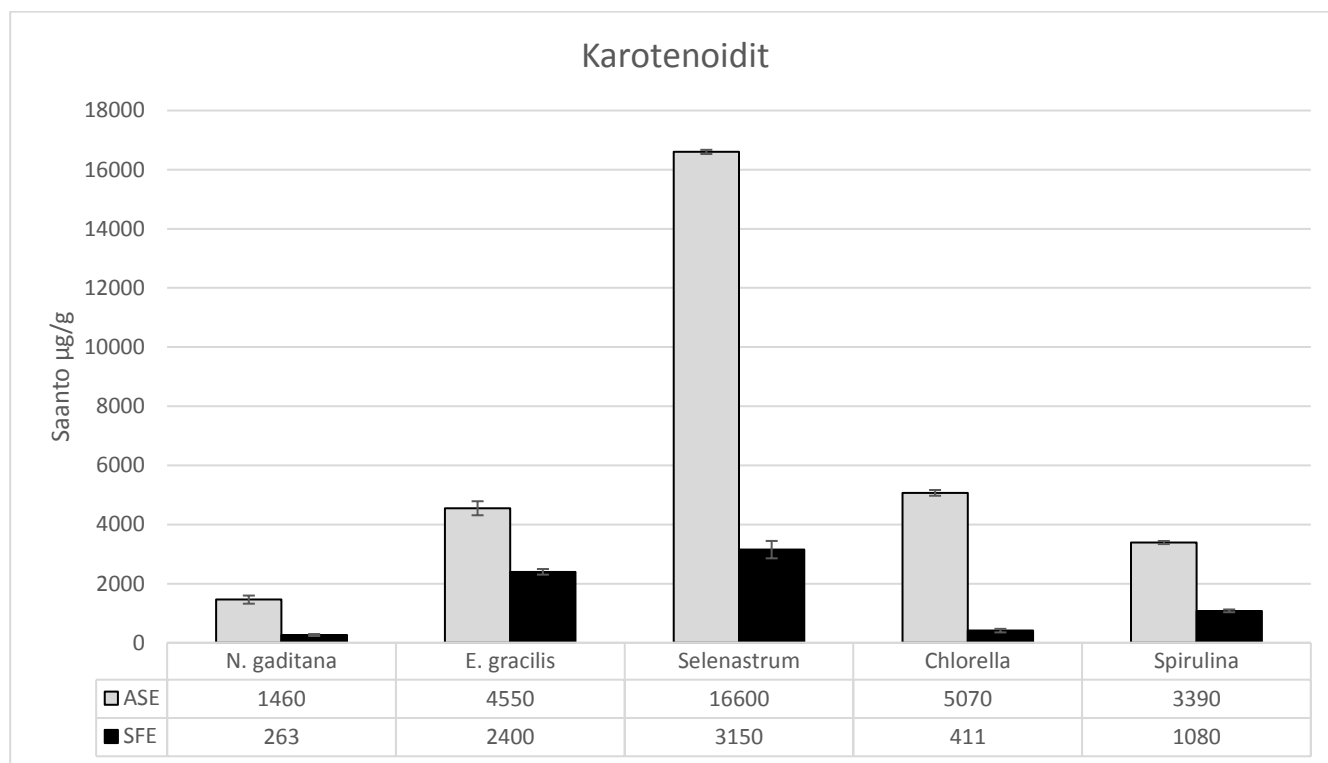
Rasvahappojen suhteellinen pitoisuus SFE-utolla jäi parhaimmillaan noin 41 %:iin (*E. gracilis*) ASE-utteen pitoisuudesta (Kuva 20). Kaikista levälajeista suhteessa vähiten rasvahappoja pystyttiin uuttamaan *Chlorellasta*, vain alle 10 %. Myös *Spirulinasta* saanto oli vain 12 %. Määrällisesti eniten uuttumattomia rasvahappoja jäi *Selenastrumiin*, jonka rasvahappopitoisuus oli suurin ja toisaalta lähes yhtä paljon *Chlorellaan*. Vähiten rasvahappoja puolestaan jäi *E. gracilis* -näytteeseen. Rinnakkaisten määritysten keskihajonta oli suurin *Chlorellan* SFE-utuksessa, noin 18 %. Kaikissa muissa näytteissä keskihajonta oli alle 10 % pitoisuudesta.



Kuva 21. Rasvahappojen pitoisuudet ja saman uuttosarjan rinnakkaisten näytteiden ( $n = 3$ , paitsi *Selenastrumin* ASE-utossa  $n = 6$  ja SFE-utossa  $n = 4$  sekä *Spirulinan* SFE-utossa  $n = 4$ ) pitoisuuksien keskihajonnat eri mikrolevistä ASE:lla ja SFE:lla.

## Karotenoidit

Myös karotenoidien SFE-uutto oli epätäydellistä (Kuva 21). Parhaimmillaan karotenoideja uutui *E. gracilis* -näytteestä noin 53 %, mutta *Chlorellasta* vain noin 8 %. *Selenastrumista*, jossa karotenoideja oli selvästi eniten, SFE:lla saatiin irti vain 19 %, joten noin 13 500 µg/g karotenoideista jäi näytteeseen. *N. gaditanassa* karotenoideja oli kokonaisuudessaan melko vähän, 1460 µg/g, joista 18 % uutui SFE:lla.

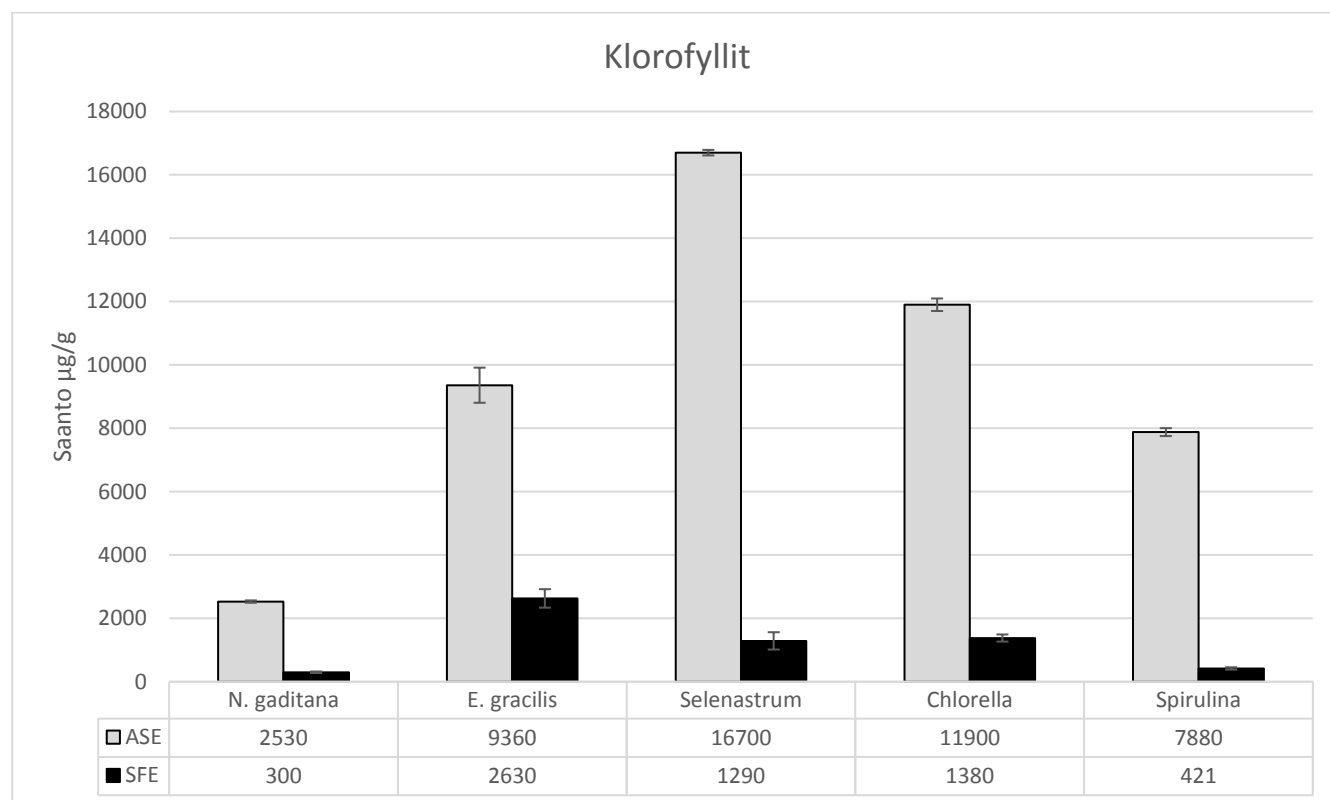


Kuva 22. Karotenoidien pitoisuudet ja saman uuttosarjan rinnakkaisten näytteiden ( $n = 3$ , paitsi *Selenastrumin* ASE-uutossa  $n = 6$  ja SFE-uutossa  $n = 4$  sekä *Spirulinan* SFE-uutossa  $n = 4$ ) pitoisuuksien keskihajonnat eri mikrolevistä ASE:lla ja SFE:lla.

## Klorofyllit

*E. gracilis* -näytteen klorofylleistä SFE-uutolla saatiin parhaimmillaan noin 28 % talteen ja *Spirulinasta* vain noin 5 % (Kuva 22). Tutkituista lipidikomponenteista juuri klorofylleistä saatiin SFE-uutolla eristettyä keskimäärin pienin osuus. *N. gaditana* sisälsi vain noin 2500 µg/g klorofyllejä, kun taas muut lajit sisälsivät vähintään kolme kertaa suuremman pitoisuuden (vähintään noin 8000 µg/g, mutta *Selenastrumissa* jopa lähes 17 000 µg/g). Suurin määrä klorofyllejä jäi uuttumatta *Selenastrumista* ja vastaavasti pienin määrä *N. gaditanasta*, jossa kyseistä ainetta on huomattavasti muita näytteitä

vähemmän. SFE-uteteista määritettyjen rinnakkaisten klorofyllitulosten keskihajonnat, vaihdellen 8 %:sta ja 21 %:iin, olivat hieman suuremmat kuin muiden tutkittujen lipidikomponenttien. ASE-uteteiden rinnakkaisten klorofyllimääritysten keskihajonnat olivat kaikki hyvin pieniä, *E. gracilis*-uteteissa noin 6 % ja muiden lajien osalta alle 2 %.



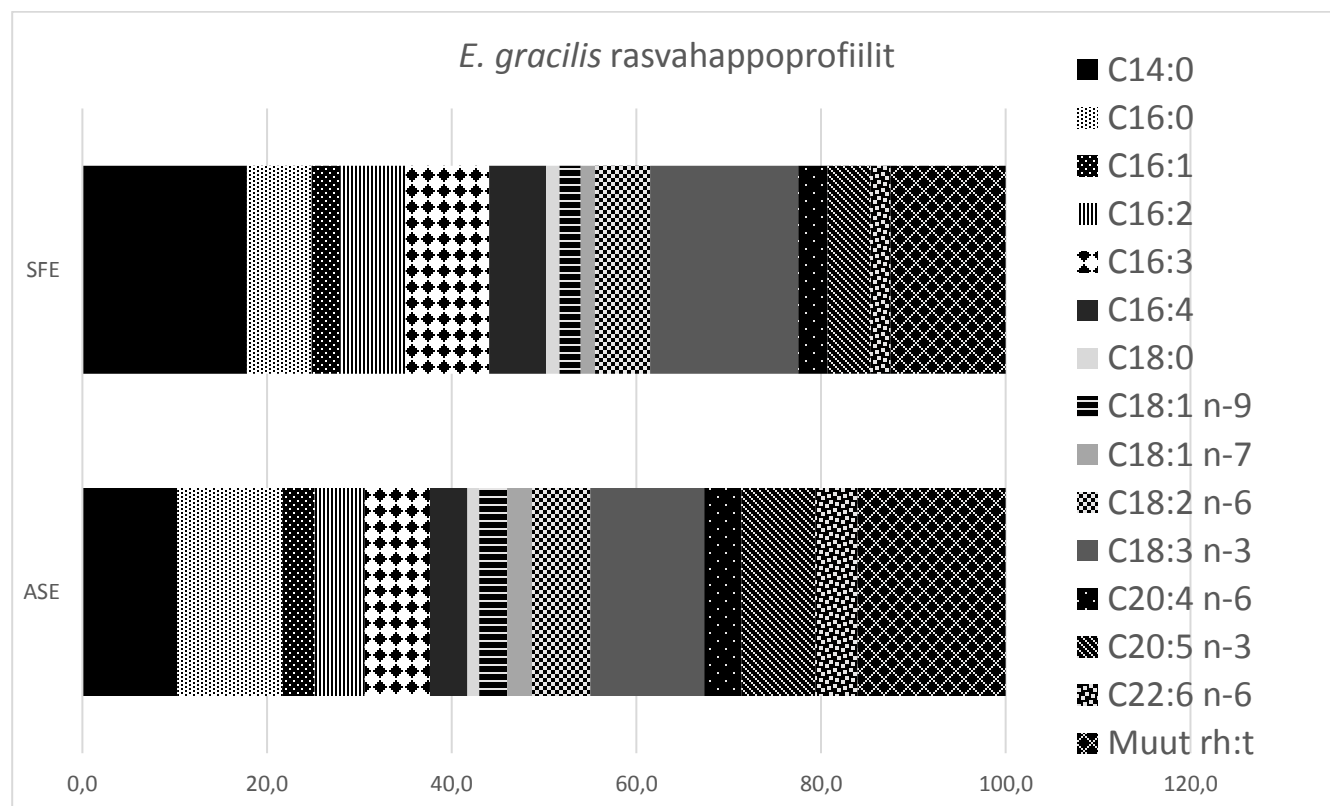
Kuva 23. Klorofyllien pitoisuudet ja saman uuttosarjan rinnakkaisten näytteiden ( $n = 3$ , paitsi Selenastrumin ASE-uutossa  $n = 6$  ja SFE-uutossa  $n = 4$  sekä Spirulinan SFE-uutossa  $n = 4$ ) pitoisuuksien keskihajonnat eri mikrolevistä ASE:lla ja SFE:lla.

Samasta näytteestä tehtyjen SFE-uteteiden määritysten keskihajonnat olivat pääsääntöisesti suhteellisesti suurempia kuin ASE-uteteiden, kuten alla olevasta taulukosta (Taulukko 5) ilmenee. Eri lajien määritysten variaatiokertoimien keskiarvot olivat ASE-uteteissa kaikkien tutkittujen lipidikomponenttien osalta selvästi pienempiä kuin SFE-uteteiden. Alfa-tokoferolimäärityksissä variaatiokertoimet olivat keskimäärin pienimpiä. Suurimmat variaatiokertoimet puolestaan olivat SFE-uteteiden klorofyllimäärityksissä ja ASE-uteteista karotenoidimäärityksissä.

Taulukko 5. ASE- ja SFE-utteen rinnakkaisten lipidikomponenttimäärittelysten variaatiokertoimet (v %) ja niiden keskiarvot. Toisessa sarakkeessa n = rinnakkaisten määrittelysten lukumäärä.

Laji	n	Alfa-tokoferoli		Rasvahapot		Karotenoidit		Klorofyllit		
		ASE/SFE	ASE-v %	SFE-v %	ASE-v %	SFE-v %	ASE-v %	SFE-v %	ASE-v %	SFE-v %
<i>N. gaditana</i>	3/3		1,0	1,2	2,5	2,4	9,4	12,6	1,5	8,1
<i>E. gracilis</i>	3/3		3,8	4,2	4,6	3,1	5,2	4,0	5,9	11,1
<i>Selenastrum</i>	6/4		3,8	8,1	2,6	10,0	0,4	9,3	0,5	21,2
<i>Chlorella</i>	3/3		0,6	2,3	2,2	17,8	1,9	14,6	1,7	8,2
<i>Spirulina</i>	3/4		0,1	3,8	3,3	1,7	1,5	4,3	1,6	8,7
Keskiarvo			1,9	3,9	3,0	7,0	3,7	9,0	2,2	11,5

Myös muiden levälajien kuin *N. gaditanan* rasvahappoprofiileissa oli eroa ASE- ja SFE-utteen välillä, kuten alla olevasta kuvaajasta (Kuva 23) *E. gracilis* -näytteen osalta selviää. *E. gracilis* -utteen havaittiin kaikista lajeista monipuolisin rasvahappoprofiili. Kaikki rasvahapot pystyttiin erottamaan sekä ASE- että SFE-utteen, joskin ASE-utteen EPA:n ja DHA:n osuudet olivat lähes kaksi kertaa suuremmat. Vastaavasti SFE-utteen erityisesti myristiinihappoa ja alfa-linoleenihappoa oli suhteessa enemmän.



Kuva 24. *E. gracilis*-levän rasvahappoprofiili SFE- ja ASE-utteen. X-akselilla lukuarvot 0,0–100,0 kuvaavat rasvahappojen prosenttiosuutta kaikista rasvahapoista.

## Neutraalilipidit

*N. gaditana* -näytteen ASE-uutteesta määritettiin myös neutraalilipidien pitoisuudet vertailuksi SFE-uutteille. Taulukossa 6 on esitetty allekkain molemmilla uuttomenetelmällä tuotettujen uutteen TAG-DAG- ja FFA-pitoisuudet. ASE-uutetusta näytteestä määritettiin TAG-pitoisuudeksi 20,1 mg/g näytettä ja SFE-uutolla pitoisuus oli 12,7 mg/g. Eli SFE-uutolla pystyttiin eristämään TAG:sta noin 63 % ASE-uuttoon verrattuna. DAG:a oli ASE-uutetussa näytteessä 13,4 mg/g, mutta SFE-uutolla pitoisuudeksi saatiin vain 1,8 mg/g. FFA:a pystyttiin toteamaan hieman vain SFE-uutetusta näytteestä. Neutraalilipidien summana mitattuna SFE-uutolla pystyttiin eristämään ASE-uuttoon verrattuna noin 44 % neutraalilipideistä, joista noin 86 % oli TAG:a.

*Taulukko 6. Neutraalilipidien uuttuminen N. gaditana -näytteestä ASE-uutolla verrattuna SFE-uuttoon. Pitoisuudet ovat saman uuttosarjan rinnakkaisten määritysten keskiarvoja (n = 3). SFE-uuton olosuhteet olivat 500 bar ja 105 °C. TAG = triasyyliglyserolit, DAG = diasyyliglyserolit, FFA = vapaat rasvahapot, KH = keskihajonta. TAG + DAG + FFA-sarake kuvaa kaikkien neutraalilipidien summaa.*

Näyte	Uutto	TAG (mg/g)	KH	DAG (mg/g)	KH	FFA (mg/g)	KH	TAG+DAG+FFA (mg/g)
<i>N. gaditana</i>	ASE	20,1	0,8	13,4	1,0	-	-	33,5
<i>N. gaditana</i>	SFE	12,7	2,2	1,8	0,4	0,3	0,0	14,8

## 3.3 Pohdinta

Tutkimuksen kokeellinen osa tuotti tulosaineistoa, jonka perusteella voidaan pohtia ja osaltaan lisätä tietämystä SFE-uuton soveltuvuudesta mikrolevien lipidien uutossa sekä tutkittujen levien lipidikoostumuksen perusteella arvioida raaka-aineille mahdollisia käyttökohteita ja jatkotutkimuksen tarvetta. Tässä tutkielman osiossa kokeellisen tutkimuksen tuloksia pohditaan ensin osiin jaoteltuna ja lopuksi yhdessä. Tutkimuksen kokeellisen osan kuluessa oli kokonaisuudessaan melko yllättävää, kuinka pienen lipidisaannon SFE-uutto tuotti suhteutettuna ASE-uuttoon, vaikka samalla tiedostettiin SFE-uuton rajallinen teho poolisten lipidien uuttamisessa (Machado ym. 2013). Toisaalta mielenkiintoisia seikkoja olivat myös *Selenastrumin* suuri pigmenttipitoisuus ja *E. gracilixen* suuri, mutta vaihteleva alfa-tokoferolipitoisuus.

### SFE-uuton optimointi

Staattinen vaihe lyhensi dynaamisen uuton kestoa ja luultavasti sen vuoksi pienensi joidenkin tutkittavien merkkiaineiden, etenkin matalassa paineessa alfa-tokoferolin saantoa. Erot uuttojen välillä olivat



kuitenkin hyvin pieniä. Rasvahappojen saanto näytti jopa hieman lisääntyvän silloin, kun staattinen vaihe oli mukana uutossa. Myös eräissä aiemmissa tutkimuksissa on todettu lyhyen staattisen vaiheen parantavan uuton tehoa ja mekanismina tälle sitä, että staattinen vaihe mahdollistaa liuottimen tunkeutumisen perusteellisemmin näytematriisin rakenteisiin, jolloin liuotinvirta kulkee kattavammin näytteen mikrorakenteen läpi, eikä vain näytematriisiin muodostuvia liuotinväyliä pitkin (Careri ym. 2001; Rezaee ym. 2010).

Näytekojen 1 g ja 3 g vertailussa SFE-uuton teho pysyi samana molemmilla näytemäärillä. Sekä alfa-tokoferolia että rasvahappoja uuttui lähes saman verran näytegrammaa kohden. Suurempi näytemäärä siis tuottaa myös määrällisesti suuremman saannon. Käytetyt näytekooot ovat kuitenkin vielä hyvin pieniä pilotti- ja teollisen mittakaavan uuttoihiin verrattuna, joten suuremman mittakaavan uuttoa varten tarvitaan lisää alustavia kokeita suurilla näytemäärillä. Näytekoon kasvaessa hiilidioksidin kulutus näytegrammaa kohden vähenee.

Eri pituisten SFE-uuttojen perusteella voitiin havaita, että suurin osa ylikriittisellä hiilidioksidilla uutettavissa olevista lipideistä uuttui hyvinkin uuton alkuvaiheessa. Näytteen SFE-uuttuvasta alfa-tokoferolista ja kokonaisrasvahapoista yli 90 % uuttui ensimmäisen 10 minuutin aikana. Tämä viittaa siihen, että näytteen hiilidioksidiin liukenevat lipidit uuttuivat hyvin nopeasti ja liikkuivat keräysvialiin lähes välittömästi, kun hiilidioksidivirtaus patruunoista vapautettiin. Tutkituista lipidikomponenteista EPA muodosti tässä suhteessa poikkeuksen, koska sen tehokas uuttuminen vaati pidemmän ajan. Nämä tulokset SFE-uuton uuttonopeudesta antavat viitteitä uuton kinetiikasta käytetyllä näytemäärällä, mutta jotta tuloksia voitaisiin soveltaa teollisen mittakaavan uuttoon, tulisi uuttopatruunoiden olla tilavuudeltaan vähintään 50 ml käytössä olleen 10 ml:n uuttopatruunoiden sijaan (Meireles 2013). Myös staattisen vaiheen vaikutus uuttoon tulisi todentaa suuremman näytemäärän uutolla.

SFE-uutteiden rinnakkaisten määritysten toistettavuus oli jonkin verran huonompi ASE-uutteisiin verrattuna, mikä näkyi rinnakkaisten määritysten keskihajontojen eroina. SFE-uutto ei analyttisenä eristysmenetelmänä yllä ASE-uuton tasolle monella osa-alueella mitattuna. Kuitenkin monet SFE-uuton edut voidaan saada esiin suuremman, teollisen mittakaavan uuttoiminnassa (Brunner 2005).

SFE-uutteen rasvahappoprofiilin muutos erilaisissa uutto-olosuhteissa viittaa siihen, että tietyt rasvahapot ovat tyypillisemmin kiinnittyneinä joko neutraalilipideihin, erityisesti TAG:iin, tai polaarisiin lipideihin, kuten fosfo- ja glykolipideihin. Neutraalilipidejä, erityisesti TAG:a, todettiin olevan *N. gaditanassa* jonkin verran. Polaariset lipidit muodostavat solujen solukalvon sekä soluelinten

kaksoiskalvoja. Näin ollen mikrolevien tiedetään aina sisältävän jonkin verran polaarisia lipidejä (Kumari ym. 2013). EPA:n uuttuminen tehokkaasti vasta korkeissa uuttopaineissa viittaa siihen, että EPA:sta suurin osa on kiinnittyneenä polaarisiin lipideihin, joiden ennalta tiedetään olevan huonosti hiilidioksidiin liukenevia (Machado ym. 2013). Tätä epäilyä tukee myös se havainto, että juuri EPA:n tehokas uuttuminen vaati pidemmän uuttoajan verrattuna alfa-tokoferoliin ja kokonaisrasvahappoihin. Näin ollen voidaan olettaa, että EPA on merkittävä rasvahappo *N. gaditana* -solujen kalvolipideissä. Kuitenkin rasvahappojen sijainti solussa tulee varmistaa kemiallisin, todennetuin menetelmin, ennen kuin pidemmälle meneviä johtopäätöksiä voidaan tehdä.

Karotenoidit ovat ainoa lipidiluokka, joiden saanto pienentyi, kun lämpötila oli 105 °C. Tämä viittaa siihen, että kyseisessä lämpötilassa karotenoidien tuhoutuminen ylittää lämpötilan nousun aiheuttaman uutun tehostumisen. Lämmön tiedetään olosuhteista riippuen lisäävän karotenoidien hapettumista ja hajoamista, joten on hyvin mahdollista, että uuttolämpötilan nosto 85 °C:sta 105 °C:een lisää ratkaisevasti lämpötilan aiheuttamaa karotenoidien hajoamista (Boon ym. 2010). Klorofyllien uuttuminen 200 bar:n paineessa oli lähes olematonta, vaikka samalla näytteestä saatiin uutettua huomattava määrä muita lipidejä. Klorofyllien epäillään lisäävän valon aiheuttamaa lipidien hapettumista, joten öljyjen ja rasvojen klorofyllipitoisuus on usein edullista pitää mahdollisimman pienenä (Rukmini ja Raharjo 2010). Uuttolämpötilan ja paineen nosto molemmat lisäsivät klorofyllien saantoa näytteestä.

### **SFE vs. ASE**

Samoista näytteistä tehtyjen SFE- ja ASE-uuttojen perusteella saatiin tuloksia, joiden avulla voidaan arvioida SFE-uuton tehoa verrattuna ASE-uuttoon. ASE-uuton (etanoli liuottimena) on jo aiemmissa tutkimuksissa osoitettu olevan oivallinen keino eristää perusteellisesti mikrolevien lipidi-fraktio (Herrero ym. 2005). SFE-uuton käyttökelpoisuutta on tutkittu melko runsaasti esimerkiksi mikrolevien karotenoidien ja muiden bioaktiivisten aineiden sekä TAG:en eristysmenetelmänä (Mendes ym. 1995; Santana ym. 2012; Mouahid ym. 2013; Meireles 2013). Toisaalta tutkittua tietoa SFE-uuton soveltuvuudesta mikrolevien kaikkien lipidien uuttamiseen on hyvin rajoitetusti, joten tässä tutkimuksessa tehdyt kokeet valottavat asiaa omalta osaltaan (Meireles 2013).

Ylikriittinen uutto ei tutkimuksessa osoittautunut ASE-uuton veroiseksi menetelmäksi mikrolevien kaikkien lipidien uuttamisessa. ASE-uutto käyttäen etanolia liuottimena on verrattain nopea ja erittäin tehokas keino uuttaa mikrolevien lipidit kemiallista analytiikkaa ja koostumuksellista profilointia varten,

mutta ei sellaisenaan sovellu prosessiin, jossa uutetut lipidit halutaan esimerkiksi elintarvikekäyttöön, koska itse uute on liuenneena verrattain suureen määrään etanolia (Sun ym. 2012). Kuitenkin SFE-uutolla pystyttiin eristämään suurin osa esimerkiksi monen levänäytteen alfa-tokoferolista. SFE-uutto näyttää toimivan tutkituista levälajeista tehokkaimmin *E. gracilikselle* ja vähiten tehokkaasti *Chlorellalle*. Etenkin klorofyllien uuttaminen oli hyvin epätehokasta. Lisäksi näytteiden rasvahapoista saatiin parhaimmillaankin uutettua SFE-uutolla vain 41 %. *N. gaditana* -näytteessä todettiin ASE-uutolla olevan neutraalilipidejä 33,5 mg/g, joista 20,1 mg/g oli TAG:a ja loput DAG:a. Samassa näytteessä oli kuitenkin rasvahappoja kaikkiaan 71,7 mg/g, joten suuri osa rasvahapoista on peräisin muista lipideistä, oletettavasti muun muassa fosfo- ja glykolipideistä. TAG:sta pystyttiin SFE-uutolla eristämään noin 63 %, mutta saman näytteen rasvahapoista vain noin 25 %. Tämä viittaa vahvasti siihen, että TAG:t uuttuvat SFE-uutolla huomattavasti muita lipidiluokkia tehokkaammin, mutta eivät kuitenkaan täydellisesti ainakaan *N. gaditanasta*. SFE-uutteessa todettiin pieni määrä vapaita rasvahappoja, joita ASE-uutteessa ei ollut lainkaan. On toki mahdollista, että pieni määrä rasvahappoja irtoaa muista lipideistä korkeassa paineessa ja lämpötilassa SFE-uuton aikana.

Uuton optimointia on hyvinkin mahdollista kehittää lisää muun muassa käyttämällä poolista oheisliuotinta, kuten etanolia ja kokeilemalla lisää vaiheittaisia uuttoja, jolloin saatetaan päästä uuttuvuuden osalta lähemmäs ASE-uuton tehoa (Machado ym. 2013). Esimerkiksi *Spirulinan* lipidien SFE-uuttamisen on osoitettu tehostuvan, kun etanolia käytetään uutossa oheisliuottimena. Samassa tutkimuksessa vertailtiin eri uuttomenetelmien tehoa *Spirulinan* lipidien uuttamiseen ja tuloksena SFE-uutolla saatiin parhaimmillaan eristettyä 40 % näytteen kokonaislipideistä, kun vertailumenetelmänä oli Blighn ja Dyerin menetelmä (Mendes ym. 2006). Oheisliuottimen käyttö kuitenkin aiheuttaa sen, että myös itse uute sisältää liuotinta. Tämä voi olla ongelma silloin kun uutetta halutaan käyttää mahdollisimman suoraan elintarvikekelpoisiin tuotteisiin. Pelkkää ylikriittistä hiilidioksidia käytettäessä liuotin haihtuu uutteesta silloin kun se virtaa ulos uuttopatruunasta ja ympäristön paine laskee alle kriittisen pisteen (Machado ym. 2013). Lisäksi kirjallisuudessa on esitetty erilaisten näytteen esikäsitelymenetelmien, kuten mikroaalto- tai ultraäänikäsitelyn lisäävän SFE-uuton tehoa (Dejoye ym. 2011; Da Porto ym. 2015). Tutkimustulokset myös puoltavat sitä, että näytteen jauhausasteella ja siten näytemateriaalin liuotinkosketukseen joutuvan pinta-alan määrällä on merkitystä uuton tehokkuuteen. Suurempi näytemateriaalin pinta-ala lisää SFE-uutolla saatavaa lipidisaantoa (Taher ym. 2014).

## Tutkittujen levien koostumus

Kaikki tutkitut lajit sisälsivät rasvahappoja 5–10 % kuivapainostaan, mikä on melko tavallinen määrä useille mikroleville (Kumari ym. 2013). Tosin kirjallisuudessa on esitetty usein paljon suurempia lipidipitoisuuksia joillekin levälajeille, kuten *E. gracilikselle* ja *Selenastrumille* (Yan ym. 2011; Mahapatra ym. 2013). Suuremmat pitoisuudet selittynevät erityisesti sillä, että kyseiset näytteet on kasvatettu olosuhteissa, jotka suosivat lipidien kertymistä soluihin. Toisaalta lipidipitoisuudet on usein määritetty gravimetrisesti, jolloin tulos sisältää rasvahappojen lisäksi lipidien glyserolin, fosfolipidien poolisen osan sekä monia muita uutossa irronneita yhdisteitä. Siten gravimetrisesti määritetty tulos on poikkeuksetta suurempi kuin rasvahappojen summana ilmoitettu pitoisuus. Erään maisterin tutkielman kokeellisessa osassa määritettiin *E. gracilis* -näytteistä lipidipitoisuudet gravimetrisesti sekä rasvahappopitoisuudet kaasukromatografisesti. Kyseisessä tutkimuksessa rasvahappojen pitoisuudet olivat noin 7–12 % näytteiden kuivapainosta, mutta gravimetrisesti määritetyt lipidipitoisuudet noin 22–27 % näytteiden kuivapainosta (Ilyass 2015). Alla olevassa taulukossa (Taulukko 7) on esitetty rinnakkain joitakin tutkimuksessa saatuja tuloksia ja kirjallisuudessa ilmenneitä tai valmistajan ilmoittamia verrattavia arvoja. *Spirulinasta* määritetyt pitoisuudet ovat hyvin linjassa valmistajan ilmoittamien arvojen kanssa. Toisaalta *Chlorellan* rasvahappopitoisuudesta saatiin noin kolme kertaa suurempi ja alfa-tokoferolipitoisuudesta kolmanneksen pienempi tulos, kuin minkä valmistaja ilmoittaa. Määritetty tyydyttyneiden rasvahappojen suhteellinen osuus kaikista rasvahapoista on samassa suhteessa valmistajan arvojen kanssa. Muiden lajien kohdalla rasvahappopitoisuuksissa ja joidenkin rasvahappojen suhteellisissa osuuksissa huomattava vaihtelu kirjallisuusarvoihin nähden on selitettävissä saman lajin eri kantojen ja kasvatusolosuhteiden vaihtelulla sekä käytetyllä määritysmenetelmällä.

*N. gaditana* sisältää merkittävän osuuden EPA:a, jota pidetään terveyttä monilta osin edistävänä rasvahappona ja yhdessä DHA:n kanssa vastuullisena kalaöljyjen terveyshyötyjen takana (Swanson ym. 2012; Poorani ym. 2016). Näin ollen *N. gaditanasta* eristetty öljy voisi toimia kasviperäisenä EPA:n lähteenä. Kuitenkin öljyn tuottamista varten olisi toivottavaa pyrkiä kasvattamaan levämassan lipidipitoisuutta, joka *N. gaditanan* kohdalla oli tässä tutkimuksessa vain noin 7,2 % kuivapainosta. Sopivilla kasvuolosuhteiden muutoksilla olisi teoriassa mahdollista lisätä leväsolujen lipidipitoisuutta, mutta mikäli EPA sijaitsee soluissa lähinnä kalvoilla, eikä juurikaan varastorasvoissa, voi EPA:n määrän lisääminen olla haastavaa (Khozin-Goldberg ja Cohen 2006; Seyfabadi ym. 2011; Ördög ym. 2012).

*Selenastrum* sisälsi lajeista eniten pigmenttejä ollen samalla ainoa laji, jossa oli klorofyllejä ja karotenoideja suunnilleen yhtä paljon, noin 1,7 % kumpaakin kuivapainostaan. Erityisen mielenkiintoista olisi selvittää tarkemmin karotenoidiprofiili sekä mahdollisuudet kasvuolosuhteiden avulla saada leväsolut tuottamaan jopa enemmän sekundaarikarotenoideja (Bar ym. 1995; Boussiba ym. 1999; Fu ym. 2013). Muut lajit sisälsivät selvästi vähemmän pigmenttejä, joskin *E. gracilis* ja *Chlorella* sisälsivät klorofyllejä noin 0,9 % ja 1,2 %. Yleisesti ottaen määrityksien perusteella voidaan todeta kaikkien levien sisältävän runsaasti pigmenttejä useimpiin elintarvikkeisiin verrattuna. *E. gracilis* sisälsi eniten alfa-tokoferolia. Parhaimmillaan pitoisuus oli noin 100 mg/100 g kuivapainoa kohden, mikä on enemmän kuin missään Finelin esittämässä elintarvikkeessa luontaisesti.

*Taulukko 7. Eräitä tutkimuksessa määritettyjä näytteiden lipidipitoisuuksia ja kirjallisuudessa esiintyviä verrattavia tuloksia. \* Näytteen lipidipitoisuus määritetty gravimetrisesti; kokonaislipidipitoisuus. Vaihtelu johtuu koeasetelmassa testatuista erilaisista kasvatusolosuhteista. # Tulos ei erottele beetakaroteenia vaan kertoo näytteen kokonaiskarotenoidipitoisuuden. Toisaalta valmistaja on ilmoittanut vain beetakaroteenipitoisuuden.*

Laji	Tutkittu yhdiste	Määritetty pitoisuus (ASE)	Kirjallisuusarvo	Lähde
<i>N. gaditana</i>	Rasvahapot	7,2 %	5-12,6 % *	Matos ym. 2015
	EPA	27 % rasvahapoista	0,2-12,2 % rasvahapoista* 34,1 % rasvahapoista	Matos ym. 2015 Lang ym. 2011
<i>E. gracilis</i>	Rasvahapot	6,4-7,4 %	9-24,6 % * 11-20 %*	Mahapatra ym. 2013 Schwarzahans ym. 2104
	DHA	2,3-4,6 % rasvahapoista	0-6,6 % rasvahapoista * 0-2 % rasvahapoista *	Schwarzahans ym. 2104 Lang ym. 2011
<i>Selenastrum</i>	Rasvahapot	9,9 %	12,5-18,2 % *	Yan ym. 2011
<i>Chlorella</i>	Rasvahapot	7,9 %	2,3 %	Valmistaja (Cocovi)
	SAFA	1,72 %	0,60 %	Valmistaja (Cocovi)
	Alfa-tokoferoli	11,4 mg/100 g	18 mg/100 g	Valmistaja (Cocovi)
<i>Spirulina</i>	Rasvahapot	5,40 %	5 %	Valmistaja (Puhdistamo)
	GLA	1047 mg/ 100 g	1067 mg/100 g	Valmistaja (Puhdistamo)
	Beetakaroteeni	340 mg/ 100 g #	375 mg/100 g	Valmistaja (Puhdistamo)

### Tutkimuksen haasteita ja mahdollisia virhelähteitä

Levänäytteiden oletettiin olevan homogeenisiä eikä niitä erikseen homogenisoitu vaan pakkauksen sisältöä sekoitettiin karkeasti ennen punnitusta. Tosin on mahdollista, että näytepakkausten osien välillä olisi pieniä eroavaisuuksia lipidien osalta. Esimerkiksi jauheen ilman kanssa kosketuksissa oleva osa on voinut kärsiä hapettumisesta muuta näytettä enemmän. Ympäristötieteiden laitoksen Lahden kampuksella kasvatettujen levien näyte-erien ja rinnakkaisten kasvatusten väliset erot olivat ajoittain

hyvinkin suuria. Mikrolevät punnittiin suoraan uuttopatruunoihin, koska hienojakoista leväjauhetta tarttuu punnitusastioihin ja näin ollen punnitusta näytemäärästä menetettäisiin osa. Käytössä olevalla vaa'alla saatiin punnittua näytteiden painot milligramman tarkkuudella. Hienojakoiset leväjauheet olivat punnittaessa yleensä hyvin sähköisiä, mikä aiheutti ajoittain näytteen joutumista pienissä määrin muuallekin kuin patruunan sisälle. Lisäksi levää tampatessa ja patruunaa pakatessa oli aina riski vähäiselle näytteen menetykselle. Oletettavasti kuitenkin punnituksen ja patruunan pakkaamisen aikana tapahtunut näytteen menetys oli aina hyvin vähäistä ja kokoluokaltaan alle prosentin näytteen koko painosta.

SFE-uuton uuttopatruunoissa havaittiin ajoittain vuotoja, jolloin kyseinen patruuna kiristettiin tiukemmin tai linja lopulta suljettiin ja uutto suoritettiin vähemmällä kuin neljällä uuttolinjalla. Vuotavien patruunoiden uuttaminen kiristämisen jälkeen oletettavasti aiheuttaa pienen tappion näytemäärässä, koska liuennaita aineita joutuu uuttolinjan ulkopuolelle. Tämä on yksi seikka, joka mahdollisesti lisäsi tulosten hajontaa ja osaltaan vähensi tulosten oikeellisuutta.

SFE-uuton liuotinvirtauksen säätö tapahtui manuaalisesti. Virtausnopeus, virtauksen tasaisuus ja pysyvyys olivat jonkin verran riippuvaisia näytemateriaalista, erityisesti näytemateriaalin hienojakoisuudesta. Erittäin hienojakoiset näytteet pakkautuivat tiiviisti patruunaan aiheuttaen erilaisen vastuksen hiilidioksidivirrälle verrattuna karkeampiin näytteisiin. Joidenkin näytteiden partikkelit myös tarttuivat toisiinsa tiukemmin muodostaen tiiviimmän patsaan patruunaan. Lisäksi eri näytemäärä patruunassa näytti vaikuttavan hieman virtauksen vastukseen.

SFE-uuttolinjat huuhdeltiin heptaani-isopropanolilla jokaisen uuton jälkeen, koska osa uuttuneesta aineksesta ei kulkeutunut keräysvialeihin asti. Ylikriittisen hiilidioksidin verrattain heikko kyky kuljettaa lipidejä saattaa tuottaa haasteita suuremman mittakaavan uutoissa, mikäli linjoja täytyy ajoittain huuhdella orgaanisilla liuottimilla. Oheisliuottimen käyttö voi helpottaa linjojen huuhtelemisen tarvetta mutta tällöin tulee arvioida oheisliuottimen käytön tuottama hyöty siihen nähden, minkälaisia tuotteita uutteesta ollaan jalostamassa. Teollisessa tuotannossa voisi myös harkita oheisliuottimen käyttöä vuoroittain pelkän ylikriittisen liuotinuuton kanssa, jos käytössä ei ole pitkäkestoinen jatkuva uutto.

Monilla mikrolevälajeilla tiedetään olevan vahva soluseinä, joka voi estää liuottimen virtauksen perusteellisesti näytteen läpi (Lee ym. 2012). Esimerkiksi juuri *Nannochloropsis* -suvun levillä on kaksikerroksinen soluseinä, joka koostuu sisemmästä kerroksesta selluloosaa ja ulommasta kerroksesta algaenan -biopolymeeriä (Scholz ym. 2014). Eräässä tutkimuksessa pystyttiin osoittamaan soluseinää

pilkkovan entsyymaattisen käsittelyn parantavan *Nannochloropsis* -mikrolevän lipidiuuton saantoa (Zuorro ym. 2016). Mahdollisia soluseiniä hajottavia mekaanisia, fysikaalisia, kemiallisia ja entsyymaattisia esikäsittelymenetelmiä on siten syytä harkita ja tutkia käytettäväksi myös ennen SFE-uuttoa (Lee ym. 2012).

### **Tulosten hyödyntäminen**

Tutkimuksen tulosten perusteella voidaan tehdä alustavia arvioita SFE-uuton soveltuvuudesta mikrolevien uuttomenetelmänä sekä pohtia potentiaalisia käyttömahdollisuuksia.

SFE-uuton tehon kartoittamiseen liittyen tämän tutkimuksen tuloksia tarkasteltaessa täytyy tiedostaa se, että käytettyjä levänäytteitä ei oltu kasvatettu erityisesti tuottamaan lipidejä, jolloin niiden TAG-pitoisuus oli verrattain pieni. Vastaavasti näytematriisien muiden lipidikomponenttien, kuten polaaristen fosfo- ja glykolipidien, osuuksien voidaan arvella olevan suhteellisen suuri. On hyvin todennäköistä, että näiden polaaristen lipidien uuttuminen tavanomaisissa SFE-olosuhteissa on useimmiten marginaalista (Machado ym. 2013). Siten SFE-uuton todellinen teho öljypitoisen (TAG-pitoisen) mikrolevämangan uuttomenetelmänä jää vielä osittain selvittämättä, eikä saatujen tulosten perusteella voida poissulkea monia käyttömahdollisuuksia. Ylikriittinen hiilidioksiduutto voi olla käyttökelpoinen vaihtoehto toisille uuttomenetelmille, jotka edellyttävät arvokkaiden ja/tai myrkyllisten liuottimien käyttöä, joista puuttuu mahdollisuus uuton selektiivisyyden muokkaamiseen tai joiden avulla tuotettu uute ei ole helposti otettavissa esimerkiksi elintarvikekäyttöön.

Mikrolevistä eristetyt EPA-, DHA-, ja GLA-pitoiset öljyt voivat hyvinkin olla tuotteina haluttuja tämän hetkiselä kuluttajakunnalle. Erityisesti kasviperäiset EPA ja DHA täyttävät parhaillaan markkinoilla olevan aukon. Leväuutteet sisältävät myös luonnostaan melko runsaasti esimerkiksi karotenoideja ja alfa-tokoferolia, jotka saattavat käyttösovelluksesta riippuen olla toivottuja yhdisteitä (Christaki ym. 2013; Mudimu ym. 2015). Esimerkiksi mikrolevistä peräisin olevalle astaksantiini -karotenoidille on ravintolisänä nautittuna esitetty useita mahdollisia terveyshyötyjä (Barros ym. 2011). Yksi levälaji ei välttämättä itsessään sisällä optimaalista suhdetta rasvahappoja ja lipidiantioksidantteja, mutta samalla mahdollisimman vähän klorofyllejä. Kuitenkin öljyjen oikeanlainen prosessointi, sopivalla tavalla selektiivisesti toteutettu uutto ja/tai eri levälajeista uutettujen öljyjen yhdisteleminen voi edesauttaa erittäin mielenkiintoisten ja tarpeellisten tuotteiden kehittämisessä.

Pohdinnan arvoinen seikka on myös SFE-uuton käyttäminen kuivaamattomalle levämassalle. Teoreettisesti on mahdollista käyttää SFE-uuttoa kostean mikrolevänaytteen kuivaamiseen ja samalla (tai veden poistumisen jälkeen) lipidien uuttamiseen. Toimiessaan tällä tekniikalla voitaisiin toteuttaa kaksi hintavaa prosessia samaan aikaan, edellyttäen, että kyseinen prosessointi tapahtuu lähellä levän kasvatusta, jolloin vältetään painavan levämassan kuljettamiseen ja säilömiseen liittyviltä lisäkustannuksilta. Kaikkia luovia ratkaisuja on syytä tarkastella, jotta sekä raaka-aineen että uuttomenetelmän edut pystytään hyödyntämään. Tutkielman kokeellisen osan tulosten ja kirjallisuudessa esiintyvän aineiston perusteella tiedetään, että eri lipidiluokat uuttuvat osittain eri uutto-olosuhteissa tai uuton eri vaiheissa. Siten on syytä pohtia myös vaiheittaisten uuttojen hyötyjä. Teoriassa vaiheittainen uutto voisi toimia esimerkiksi siten, että samaa näytemateriaalia uutetaan aluksi melko matalassa paineessa ja lämpötilassa, jolloin uutteeseen saadaan lähinnä TAG:a ja joitain lipidipienkomponentteja. Uutteen keräyksen jälkeen uuttoa jatkettaisiin korkeammassa paineessa ja lämpötilassa, jolloin loput TAG:t sekä osa polaarisisista lipideistä ja pigmenteistä saadaan kerättyä talteen. Lopuksi uuttoon voisi lisätä oheisliuottimena esimerkiksi etanolia, jolloin lisää polaarisia lipidejä ja pigmenttejä uuttuu ja samalla uuttolaitteiston linjat puhdistuvat luonnostaan. Näille samasta näytteestä uutetuille fraktioille tulisi suunnitella jatkokäsittelyt käyttökohteen mukaan. Toki vaiheittaisen uuton hyödyt tulee tarkoin vertailla jatkuvan uuton etuihin nähden.

## 4 Päätelmät

Mikrolevien kasvatuksen ja koostumuksen tutkiminen on kiehtova, runsaasti uusia mahdollisuuksia tarjoava keino etsiä ympäristöystävällisiä ratkaisuja tulevaisuuden ruoan, energian, rehun, lannoitteiden ja erillisten bioaktiivisten aineiden tuotantoa varten. Ylikriittinen hiilidioksiduutto puolestaan tarjoaa turvallisen ja optimoituina selektiivisen keinon eristää mikrolevien lipidejä muun muassa tutkimus-, elintarvike- tai polttoainekäyttöön. Ylikriittisen uuton optimointi on oleellista saannon maksimoimiseksi sekä selektiivisyyden ja hiilidioksidin kulutuksen arvioimiseksi tarkoituksenmukaiseksi. Potentiaalisuudestaan huolimatta mikrolevien viljelyssä on huomattavan paljon teknologisia haasteita, kuten biomassan kerääminen kasvatusalustasta, joiden voittamiseksi vaaditaan erityisesti taloudellisempia ratkaisuja.



Tämän tutkimuksen kokeellisessa osassa SFE-uutto osoittautui kokonaisuudessaan verrattain epätehokkaaksi mikrolevien lipidien uuttomenetelmäksi. Kuitenkin eri levälajien sekä eri lipidikomponenttien välillä oli huomattavaa vaihtelua saannon suhteen. Uuttopaine näyttää ainakin 500 bar:in asti lisäävän lipidien saantoa *N. gaditana* -näytteestä. 200 bar ei riitä uuttamaan klorofyllejä eikä EPA:a juuri lainkaan. Suurin saanto saatiin niin ikään 105 °C:n lämpötilassa. Tosin kyseisessä lämpötilassa karotenoidien saanto alkaa vähentyä. Uuton staattisella vaiheella ei vaikuta olevan suurta merkitystä saantoon, mutta tulosten perusteella melko lyhyt uuttoaika, jopa vain 10 minuuttia, riittää suurimman osan näytteen SFE-uuttuvien lipidien uuttamiseen käytetyllä 1 g:n näytemäärällä. Kaikki tutkitavat mikrolevälajit sisälsivät rasvahappoja 5–10 % kuivapainostaan, *Selenastrum* eniten ja *Spirulina* vähiten. *E. gracilis* sisälsi laajimman kirjon tunnistettuja rasvahappoja, ainoana tutkituista lajeista DHA:a ja eniten alfa-tokoferolia (jopa noin 1 mg/g). *Selenastrum* puolestaan sisälsi eniten karotenoideja ja klorofyllejä (lähes 17 mg/g kumpaakin). *E. gracilis* vaikuttaa olevan tutkituista lajeista parhaiten soveltuva SFE-uuttoon, koska tutkituista lajeista sen lipideistä pystyttiin SFE-uutolla eristämään suhteellisesti suurin osa. Vastaavasti *Chlorella* ja *Spirulina* näyttävät sellaisinaan soveltuvan erityisen huonosti käsiteltäväksi SFE-uutolla. TAG:n uuttuvuus oli SFE-uutolla melko tehokasta (noin 63 %) *N. gaditana* -näytteestä verrattuna muihin lipidiluokkiin.

Kaikki tutkitut levänäytteet sisälsivät verrattain vähän lipidejä kokonaisuudessaan suhteutettuna kirjallisuudessa esitettyihin lipidipitoisuuksiin, mikä johtuu lähinnä siitä, että kyseisiä näytteitä ei oltu kasvatettu erityisesti lipidien synteesiä suosivissa olosuhteissa. Poikkeuksena oli kaupallinen *Chlorella*, joka sisälsi noin kolme kertaa enemmän rasvahappoja valmistajan ilmoittamaan arvoon verrattuna. Erityisesti TAG:n vähäinen pitoisuus näytteissä jättää lisätutkimukselle tarvetta SFE-uuton soveltuvuudesta TAG-rikkaiden mikrolevien uuttomenetelmänä. SFE-uutto voi olla hyvin käyttökelpoinen mikrolevien lipidien eristysmenetelmä pilotti- ja teollisen mittakaavan prosesseissa edellyttäen tarkoin harkittua ja optimoitua uuttoa. Parhaimmillaan tällä liuotinvapaalla uutolla pystytään eristämään näytteestä haluttuja aineita selektiivisesti ja melko tehokkaasti sekä hiilidioksidia kierrättämällä hyvin ympäristöystävällisesti. Runsaasti tutkimusta edellytetään mikrolevien koostumuksen selvittämiseksi sekä kiinnostuksen kohteena olevien aineiden eristysmenetelmien kehittämiseksi. Vain johdonmukaisen tutkimuksen avulla voidaan luoda perusteet tämän monipuolisen luonnonvaran hyödyntämiseksi suuremmissa mittakaavassa.

## Lähdeluettelo

- Ahmadinejad N, Dagan T, Martin W. 2007. Genome history in the symbiotic hybrid *Euglena gracilis*. *Gene* 402(1-2):35-9.
- Aida TM, Nonaka T, Fukuda S, Kujiraoka H, Kumagai Y, Maruta R, Ota M, Suzuki I, Watanabe MM, Inomata H, Smith RL. 2016. Nutrient recovery from municipal sludge for microalgae cultivation with two-step hydrothermal liquefaction. *Algal Res* 1861-8.
- Aladic K, Jokic S, Moslavac T, Tomas S, Vidovic S, Vladic J, Šubaric D. 2014. Cold pressing and supercritical CO<sub>2</sub> extraction of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil. *Chem Biochem Eng Q* 28(4):481-90.
- Astaire JC, Ward R, German JB, Jiménez-Flores R. 2003. Concentration of polar MFGM lipids from buttermilk by microfiltration and supercritical fluid extraction. *J Dairy Sci* 86(7):2297-307.
- Axelsson M, Gentili F. 2014. A single-step method for rapid extraction of total lipids from green microalgae. *PLoS ONE* 9(2):
- Ayas N, Yilmaz O. 2014. A shrinking core model and empirical kinetic approaches in supercritical CO<sub>2</sub> extraction of safflower seed oil. *J Supercritical Fluids* 9481-90.
- Bar E, Rise M, Vishkautsan M, Arad S. 1995. Pigment and structural changes in *Chlorella zofingiensis* upon light and nitrogen stress. *J Plant Physiol* 146(4):527-34.
- Barros MP, Poppe SC, Souza-Junior TP. 2011. Putative benefits of microalgal astaxanthin on exercise and human health. *Braz J Pharamacogn* 21(2):283-9.
- Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37(8):911-7.
- Boon CS, McClements DJ, Weiss J, Decker EA. 2010. Factors influencing the chemical stability of carotenoids in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 50(6):515-32.
- Borowitzka MA. 2013. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *J Appl Phycol* 25(3):743-56.
- Boussiba S, Bing W, Yuan J-, Zarka A, Chen F. 1999. Changes in pigments profile in the green alga *Haeamtooccus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnol Lett* 21(7):601-4.
- Brennan L, Owende P. 2010. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable Sustainable Energy Rev* 14(2):557-77.
- Brunner G, toim. 1994. Gas Extraction. An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes. Heidelberg: Steinkopff-Verlag. 387 s.

- Brunner G. 2005. Supercritical fluids: Technology and application to food processing. *J Food Eng* 67(1-2):21-33.
- Careri M, Furlattini L, Mangia A, Musci M, Anklam E, Theobald A, Von Holst C. 2001. Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina Pacifica* algae: A chemometric approach. *J Chromatogr A* 912(1):61-71.
- Chisti Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25(3):294-306.
- Chisti Y. 2013a. Constraints to commercialization of algal fuels. *J Biotechnol* 167(3):201-14.
- Chisti Y. 2013b. Raceways-based production of algal crude oil. *Green* 3(3-4):195-216.
- Choi S-, Oh Y-, Jeong M-, Kim SW, Lee J-, Park J-. 2014. Effects of ionic liquid mixtures on lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. *Renew Energy* 65:169-74.
- Christaki E, Bonos E, Giannenas I, Florou-Paneria P. 2013. Functional properties of carotenoids originating from algae. *J Sci Food Agric* 93(1):5-11.
- Christaki E, Florou-Paneri P, Bonos E. 2011. Microalgae: A novel ingredient in nutrition. *Int J Food Sci Nutr* 62(8):794-9.
- Chu W-. 2011. Potential applications of antioxidant compounds derived from algae. *Curr Top Nutraceutical Res* 9(3):83-98.
- Da Porto C, Natolino A, Decorti D. 2015. Effect of ultrasound pre-treatment of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed on supercritical CO<sub>2</sub> extraction of oil. *J Food Sci Technol* 52(3):1748-53.
- Das BK, Pradhan J, Sahu S. 2009. The effect of *Euglena viridis* on immune response of rohu, *Labeo rohita* (Ham.). *Fish Shellfish Immunol* 26(6):871-6.
- Dejoye C, Vian MA, Lumia G, Bouscarle C, Charton F, Chemat F. 2011. Combined extraction processes of lipid from *Chlorella vulgaris* microalgae: Microwave prior to supercritical carbon dioxide extraction. *Int J Mol Sci* 12(12):9332-41.
- Dickinson S, Mientus M, Frey D, Amini-Hajibashi A, Ozturk S, Shaikh F, Sengupta D, El-Halwagi MM. 2016. A review of biodiesel production from microalgae. *Clean Technol Environ Policy* 1-32.
- Durmaz Y. 2007. Vitamin E (α-tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. *Aquaculture* 272(1-4):717-22.
- EC Novel Food Catalogue. Food - European Commission. 2016. Saatavilla: [http://ec.europa.eu/food/safety/novel\\_food/catalogue/search/public/index.cfm#](http://ec.europa.eu/food/safety/novel_food/catalogue/search/public/index.cfm#). Tulostettu: 9/1/2016.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226(1):497-509.

- Fu W, Guomundsson O, Paglia G, Herjólfsson G, Andrésón OS, Pálsson BO, Brynjólfsson S. 2013. Enhancement of carotenoid biosynthesis in the green microalga *Dunaliella salina* with light-emitting diodes and adaptive laboratory evolution. *Appl Microbiol Biotechnol* 97(6):2395-403.
- Fu W, Paglia G, Magnúsdóttir M, Steinarsdóttir EA, Guðmundsson S, Pálsson BT, Andrésón TS, Brynjólfsson S. 2014. Effects of abiotic stressors on lutein production in the green microalga *Dunaliella salina*. *Microb Cell Fact* 13(1):
- Fukuda H, Kondo A, Noda H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J Biosci Bioeng* 92(5):405-16.
- Garmus TT, Paviani LC, Queiroga CL, Cabral FA. 2015. Extraction of phenolic compounds from pepper-rosmarin (*Lippia sidoides* Cham.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water as solvents. *J Supercritical Fluids* 9968-75.
- Goto M, Kanda H, Wahyudiono, Machmudah S. 2015. Extraction of carotenoids and lipids from algae by supercritical CO<sub>2</sub> and subcritical dimethyl ether. *J Supercritical Fluids* 96245-51.
- Güçlü-Üstündağ Ö, Temelli F. 2000. Correlating the solubility behavior of fatty acids, mono-, di-, and triglycerides, and fatty acid esters in supercritical carbon dioxide. *Ind Eng Chem Res* 39(12):4756-66.
- Güçlü-Üstündağ Ö, Temelli F. 2004. Correlating the solubility behavior of minor lipid components in supercritical carbon dioxide. *J Supercritical Fluids* 31(3):235-53.
- Guedes AC, Amaro HM, Malcata FX. 2011. Microalgae as sources of high added-value compounds-a brief review of recent work. *Biotechnol Prog* 27(3):597-613.
- Harun R, Singh M, Forde GM, Danquah MK. 2010. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable Sustainable Energy Rev* 14(3):1037-47.
- He P, Duncan J, Barber J. 2007. Astaxanthin accumulation in the green alga *haematococcus pluvialis*: Effects of cultivation parameters. *J Integr Plant Biol* 49(4):447-51.
- Herrero M, Martín-Álvarez PJ, Señoráns FJ, Cifuentes A, Ibáñez E. 2005. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. *Food Chem* 93(3):417-23.
- Horrocks LA, Yeo YK. 1999. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol Res* 40(3):211-25.
- Ilyass U. 2015. Lipid Production and Fatty Acid Composition of *Euglena gracilis* in Nitrogen Deficient and Enriched Cultures.
- Khotimchenko SV, Kulikova IV, Vas'kovskii VE. 2000. Distribution of ceramidephosphoinositol in red seaweeds. *Russ J Mar Biol* 26(4):286-8.
- Khozín-Goldberg I, Boussiba S. 2011. Concerns over the reporting of inconsistent data on fatty acid composition for microalgae of the genus *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae). *J Appl Phycol* 23(5):933-4.

- Khozin-Goldberg I, Cohen Z. 2006. The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry* 67(7):696-701.
- Kim D-, Vijayan D, Praveenkumar R, Han J-, Lee K, Park J-, Chang W-, Lee J-, Oh Y-. 2015. Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. *Bioresour Technol*
- King JW. 2002. *Supercritical Fluid Technology for Lipid Extraction, Fractionation, and Reactions*. Teoksessa: Kuo, TM, Gardner, HW, toim. *Lipid Biotechnology*. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Kitada K, Machmudah S, Sasaki M, Goto M, Nakashima Y, Kumamoto S, Hasegawa T. 2009. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of pigment components with pharmaceutical importance from *Chlorella vulgaris*. *J Chem Technol Biotechnol* 84(5):657-61.
- Korn ED. 1964. The fatty acids of *Euglena gracilis*. *J Lipid Res* 5(3):352-62.
- Krajcovic J, Matej Vesteg, Schwartzbach SD. 2015. Euglenoid flagellates: A multifaceted biotechnology platform. *J Biotechnol* 202135-45.
- Kröger M, Müller-Langer F. 2012. Review on possible algal-biofuel production processes. *Biofuels* 3(3):333-49.
- Kumari P, Kumar M, Reddy CRK, Jha B. 2013. Algal lipids, fatty acids and sterols. *Funct Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals* 87-134.
- Kundu S, Vassanda Coumar M, Rajendiran S, Ajay, Subba Rao A. 2015. Phosphates from detergents and eutrophication of surface water ecosystem in India. *Curr Sci* 108(7):1320-5.
- Lang I, Hodac L, Friedl T, Feussner I. 2011. Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: A comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC Plant Biol* 11
- Largeau C, Casadevall E, Berkaloff C, Dhamelinourt P. 1980. Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in *Botryococcus braunii*. *Phytochemistry* 19(6):1043-51.
- Lee AK, Lewis DM, Ashman PJ. 2012. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. *Biomass Bioenergy* 4689-101.
- Lin F, Liu D, Das SM, Prempeh N, Hua Y, Lu J. 2014. Recent progress in heavy metal extraction by supercritical CO<sub>2</sub> fluids. *Ind Eng Chem Res* 53(5):1866-77.
- Ma X, Song Y, Zhu F, Wu M. 2014. Technology research on lycium barbarum seed oil with supercritical CO<sub>2</sub> extraction. *J Chin Cereals Oils Assoc* 29(8):80,84 and 89.
- Machado BAS, Pereira CG, Nunes SB, Padilha FF, Umsza-Guez MA. 2013. Supercritical Fluid Extraction Using CO<sub>2</sub>: Main Applications and Future Perspectives. *Sep Sci Technol* 48(18):2741-60.
- Mahapatra DM, Chanakya HN, Ramachandra TV. 2013. *Euglena* sp. as a suitable source of lipids for potential use as biofuel and sustainable wastewater treatment. *J Appl Phycol* 25(3):855-65.

- Marín N, Morales F, Lodeiros C, Tamigneaux E. 1998. Effect of nitrate concentration on growth and pigment synthesis of *Dunaliella salina* cultivated under low illumination and preadapted to different salinities. *J Appl Phycol* 10(4):405-11.
- Matos TP, Feller R, Moecke EHS, Sant'Anna ES. 2015. Biomass, lipid productivities and fatty acids composition of marine *Nannochloropsis gaditana* cultured in desalination concentrate. *Bioresour Technol* 19748-55.
- McLarnon-Riches CJ, Rolph CE, Greenway DLA, Robinson PK. 1998. Effects of environmental factors and metals on *Selenastrum capricornutum* lipids. *Phytochemistry* 49(5):1241-7.
- Meireles MAA. 2013. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of bioactive components from algae. *Funct Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals* 561-84.
- Mendes RL, Fernandes HL, Coelho J, Reis EC, Cabral JMS, Novais JM, Palavra AF. 1995. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. *Food Chem* 53(1):99-103.
- Mendes RL, Reis AD, Palavra AF. 2006. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of  $\gamma$ -linolenic acid and other lipids from *Arthrospira (Spirulina) maxima*: Comparison with organic solvent extraction. *Food Chem* 99(1):57-63.
- Miazek K, Ledakowicz S. 2013. Chlorophyll extraction from leaves, needles and microalgae: A kinetic approach. *Int J Agric Biol Eng* 6(2):
- Milledge JJ. 2011. Commercial application of microalgae other than as biofuels: A brief review. *Rev Environ Sci Biotechnol* 10(1):31-41.
- Mitra M, Patidar SK, Mishra S. 2015. Integrated process of two stage cultivation of *Nannochloropsis* sp. for nutraceutically valuable eicosapentaenoic acid along with biodiesel. *Bioresour Technol* 193363-9.
- Mooney BD, Nichols PD, De Salas MF, Hallegraef GM. 2007. Lipid, fatty acid, and sterol composition of eight species of *Karenia* (dinophyta): Chemotaxonomy and putative lipid phycotoxins. *J Phycol* 43(1):101-11.
- Mouahid A, Crampon C, Toudji S-A, Badens E. 2013. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of neutral lipids from microalgae: Experiments and modelling. *J Supercritical Fluids* 777-16.
- Mudimu O, Rybalka N, Bauersachs T, Friedl T, Schulz R. 2015. Influence of Different CO<sub>2</sub> Concentrations on Microalgae Growth,  $\alpha$ -Tocopherol Content and Fatty Acid Composition. *Geomicrobiol J* 32(3-4):291-303.
- NASA. NASA - Harvesting Mars. 2003. Saatavilla: [http://www.nasa.gov/vision/earth/technologies/harvestingmars\\_prt.htm](http://www.nasa.gov/vision/earth/technologies/harvestingmars_prt.htm). Tulostettu: 9/30/2015.
- Onome Tighiri H, Ahmet Erkurt E. 2016. Integrated microalgae cultivation, nutrient removal and product utilization bio-processes. *Desalin Water Treat* 57(47):22329-40.
- Ördög V, Stirk WA, Bálint P, van Staden J, Lovász C. 2012. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed *Chlorella minutissima* cultures. *J Appl Phycol* 24(4):907-14.

Palavra AMF, Coelho JP, Barroso JG, Rauter AP, Fareleira JMNA, Mainar A, Urieta JS, Nobre BP, Gouveia L, Mendes RL, Cabral JMS, Novais JM. 2011. Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive compounds from microalgae and volatile oils from aromatic plants. *J Supercritical Fluids* 60:21-7.

Patil V, Källqvist T, Olsen E, Vogt G, Gislerød HR. 2007. Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. *Aquac Int* 15(1):1-9.

Plaza M, Herrero M, Alejandro Cifuentes A, Ibáñez E. 2009. Innovative natural functional ingredients from microalgae. *J Agric Food Chem* 57(16):7159-70.

Polishchuk A, Valev D, Tarvainen M, Mishra S, Kinnunen V, Antal T, Yang B, Rintala J, Tyystjärvi E. 2015. Cultivation of *Nannochloropsis* for eicosapentaenoic acid production in wastewaters of pulp and paper industry. *Bioresour Technol* 193:469-76.

Poorani R, Bhatt AN, Dwarakanath BS, Das UN. 2016. COX-2, aspirin and metabolism of arachidonic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their physiological and clinical significance. *Eur J Pharmacol* 785:116-32.

Pulz O, Gross W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 65(6):635-48.

Pyo D, Kim E. 2014. Rapid and efficient extraction of curcumins from curry powder using supercritical CO<sub>2</sub>. *Bull Korean Chem Soc* 35(10):3107-10.

Quispe-Condori S, Sánchez D, Foglio MA, Rosa PTV, Zetzel C, Brunner G, Meireles MAA. 2005. Global yield isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L leaves using supercritical carbon dioxide. *J Supercritical Fluids* 36(1):40-8.

Rezaee M, Yamini Y, Moradi M, Saleh A, Faraji M, Naeeni MH. 2010. Supercritical fluid extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction as a sensitive and efficient sample preparation method for determination of organic compounds in solid samples. *J Supercritical Fluids* 55(1):161-8.

Rothlisberger-Lewis KL, Foster JL, Hons FM. 2016. Soil carbon and nitrogen dynamics as affected by lipid-extracted algae application. *Geoderma* 262:140-6.

Rukmini A, Raharjo S. 2010. Pattern of peroxide value changes in virgin coconut oil (VCO) due to photo-oxidation sensitized by chlorophyll. *JAOCS J Am Oil Chem Soc* 87(12):1407-12.

Sajilata MG, Singhal RS, Kamat MY. 2008. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of  $\gamma$ -linolenic acid (GLA) from *Spirulina platensis* ARM 740 using response surface methodology. *J Food Eng* 84(2):321-6.

Santana A, Jesus S, Larrayoz MA, Filho RM. 2012. Supercritical carbon dioxide extraction of algal lipids for the biodiesel production. *Teoksessa: 20th International Congress of Chemical and Process Engineering, CHISA 2012. Prague* p. s. 1755-61.

Scholz MJ, Weiss TL, Jinkerson RE, Jing J, Roth R, Goodenough U, Posewitz MC, Gerken HG. 2014. Ultrastructure and composition of the *Nannochloropsis gaditana* cell wall. *Eukaryotic Cell* 13(11):1450-64.

- Schwarzhans J-, Cholewa D, Grimm P, Beshay U, Risse J-, Friehs K, Flaschel E. 2014. Dependency of the fatty acid composition of *Euglena gracilis* on growth phase and culture conditions. *J Appl Phycol*
- Seyfabadi J, Ramezanpour Z, Khoeyi ZA. 2011. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. *J Appl Phycol* 23(4):721-6.
- Siriwardhana N, Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N. 2012. Health Benefits of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid. *Adv Food Nutr Res* 65:211-22.
- Skjånes K, Rebours C, Lindblad P. 2013. Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Crit Rev Biotechnol* 33(2):172-215.
- Smolders AJP, Lucassen ECHET, Bobbink R, Roelofs JGM, Lamers LPM. 2010. How nitrate leaching from agricultural lands provokes phosphate eutrophication in groundwater fed wetlands: The sulphur bridge. *Biogeochemistry* 98(1-3):1-7.
- Sukenik A, Zmora O, Carmeli Y. 1993. Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II. *Nannochloropsis* sp. *Aquaculture* 117(3-4):313-26.
- Sun H, Ge X, Lv Y, Wang A. 2012. Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed. *J Chromatogr A* 12371-23.
- Swanson D, Block R, Mousa SA. 2012. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: Health benefits throughout life. *Adv Nutr* 3(1):1-7.
- Taher H, Al-Zuhair S, Al-Marzouqi AH, Haik Y, Farid M, Tariq S. 2014. Supercritical carbon dioxide extraction of microalgae lipid: Process optimization and laboratory scale-up. *J Supercritical Fluids* 86:57-66.
- Takaichi S. 2011. Carotenoids in algae: Distributions, biosyntheses and functions. *Mar Drugs* 9(6):1101-18.
- Temelli F. 2009. Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils. *J Supercritical Fluids* 47(3):583-90.
- Tonon T, Harvey D, Larson TR, Graham IA. 2002. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. *Phytochemistry* 61(1):15-24.
- Uduman N, Qi Y, Danquah MK, Forde GM, Hoadley A. 2010. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *J Renewable Sustainable Energy* 2(1):
- Van Vooren G, Le Grand F, Legrand J, Cuiné S, Peltier G, Pruvost J. 2012. Investigation of fatty acids accumulation in *Nannochloropsis oculata* for biodiesel application. *Bioresour Technol* 124:421-32.
- Yaakob Z, Ali E, Zainal A, Mohamad M, Takriff MS. 2014. An overview: Biomolecules from microalgae for animal feed and aquaculture. *J Biol Res* 21(1):
- Yamane Y-, Utsunomiya T, Watanabe M, Sasaki K. 2001. Biomass production in mixotrophic culture of *Euglena gracilis* under acidic condition and its growth energetics. *Biotechnol Lett* 23(15):1223-8.



- Yan J-, Huang X-, Ma S-, Huang Z-, Lü W-. 2011. Culture condition and cellular biochemical composition of two microalgae *Oocystis solitaria* and *Selenastrum* sp. *Chinese J Ecol* 30(12):2761-6.
- Yen H-, Ho S-, Chen C-, Chang J-. 2015. CO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub> and SO<sub>x</sub> removal from flue gas via microalgae cultivation: A critical review. *Biotechnol J* 10(6):829-39.
- Zhang T-, Hu H-, Wu Y-, Zhuang L-, Xu X-, Wang X-, Dao G-. 2016. Promising solutions to solve the bottlenecks in the large-scale cultivation of microalgae for biomass/bioenergy production. *Renewable Sustainable Energy Rev* 60:1602-14.
- Zhu X-, Long SP, Ort DR. 2008. What is the maximum efficiency with which photosynthesis can convert solar energy into biomass? *Curr Opin Biotechnol* 19(2):153-9.
- Zuliani L, Frison N, Jelic A, Fatone F, Bolzonella D, Ballottari M. 2016. Microalgae cultivation on anaerobic digestate of municipalwastewater, sewage sludge and agro-waste. *Int J Mol Sci* 17(10):
- Zuorro A, Miglietta S, Familiari G, Lavecchia R. 2016. Enhanced lipid recovery from *Nannochloropsis* microalgae by treatment with optimized cell wall degrading enzyme mixtures. *Bioresour Technol* 212:35-41.

**”Paras lääke leväperäisyyteen on kriittisyys,  
mieluiten ylikriittisyys.”**