

**MIKROLEVIEN ANTIMIKROBISET OMINAISUUDET  
JA NIIDEN HYÖDYNTÄMINEN KOSMETIIKASSA**



Ammattikorkeakoulututkinnon opinnäytetyö

Forssa, Kestävä kehitys

Syksy, 2019

Anna Vesanen

Kestävä kehitys

Forssa

---

<b>Tekijä</b>	Anna Vesanen	<b>Vuosi</b> 2019
<b>Työn nimi</b>	Mikrolevien antimikrobiset ominaisuudet ja niiden hyödyntäminen kosmetiikassa	
<b>Työn ohjaaja</b>	Maria Lehtimäki	

---

## TIIVISTELMÄ

Levien hyödyntämistä eri sovelluksissa, kuten bioenergiana, elintarvikkeina sekä jätevedenpuhdistuksessa on tutkittu jo pitkään. Myös lääke- ja kosmetiikkateollisuudessa levät ovat herättäneet kiinnostusta niiden sisältämien eri yhdisteiden, esimerkiksi pigmenttien ja rasvahappojen, vuoksi. Levälajeilla on aiemmissa tutkimuksissa todettu olevan antimikrobisia vaikutuksia eri mikrobien kasvuun. Kosmetiikka-alalla on tällä hetkellä trendinä luonnonmukaisuus ja kestävä kehitys, joten levien eri ominaisuuksien, muun muassa antimikrobisuuden, hyödyntäminen kosmetiikassa on kiinnostava ja lisää tutkimusta tarvitseva aihepiiri. Tässä opinnäytetyössä, jossa tilaajana toimi Levätehdas-projekti (4/2018-9/2019), tutkittiin silmäleviin kuuluvan *Euglena gracilis* -levästä uutettujen erilaisten uutteen vaikutusta kolmen eri ihmisen iholla esiintyvän, iho-ongelmia aiheuttavien mikrobin kasvuun.

Opinnäytetyössä toteutetussa kokeessa käytetyt mikrobit olivat bakteerit *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* sekä hiiva *Malassezia furfur*. Levästä käytettiin neljää erilaista uutetta: pimeä- sekä valokasvatetun levän ASE-uutetta, paramylon-uutetta sekä SFE-uutetta. Mikrobien kasvua inhiboi sekä paramylon-uute että SFE-uute. Paramylon-uute inhiboi *S. aureuksen* kasvua osassa replikaateissa. Selkeä mikrobikasvua inhiboiva vaikutus kokeissa saatiin SFE-uutteella, joka vaikutti *E. coli* kasvuun jokaisella neljällä replikaatilla.

Jos *E. gracilis* -levän antimikrobisia ominaisuuksia aiotaan hyödyntää kosmetiikan ainesosana, tulisi tutkimusta jatkaa keskittyen muun muassa kasvun vaiheiden ja kasvatusolojen vaikutuksiin leväsolun tuottamiin yhdisteisiin. Kasvuolosuhteiden optimointi on erityisen tärkeää, jotta haluttuja yhdisteitä kuten tiettyjä rasvahappoja tai paramylonia saadaan tuotettua halutuissa määrissä.

**Avainsanat** mikrolevä, euglena, antimikrobisuus, antibakteerisuus, kosmetiikka

**Sivut** 32 sivua, joista liitteitä 1 sivu

Degree programme in Sustainable Development  
Forssa

---

<b>Author</b>	Anna Vesanen	<b>Year</b> 2019
<b>Subject</b>	Antimicrobial Properties of Microalgae and Their Potential Applications in Cosmetic Industry	
<b>Supervisor</b>	Maria Lehtimäki	

---

ABSTRACT

The use of microalgae in different applications, for example in biofuel and wastewater treatment, has gained more interest in applied algology research recently. Different microalgae species have several characteristic and valuable compounds and molecules that could be used by different industries, including cosmetic industry. As cosmetic industry is a globally growing industry and the interest towards more natural and sustainable cosmetics keep growing, might the use of algae based products be one option.

In this thesis commissioned by Levätehdas-project (4/2018-9/2019), four different extracts of microalgae species *Euglena gracilis* were tested against three microbes that live on human skin and sometimes cause skin problems of different types. Two of the tested microbes were bacteria, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, and one fungi *Malassezia furfur*. Two of the used extracts had an impact on the growth of microbes; paramylon-extract inhibited the growth of *S. aureus* in two replicates out of four and SFE-extract inhibited the growth of *E. coli* in all four replicates.

In conclusion, more research should be done in order to use algae as an active compound in cosmetics, as now most of the antimicrobial studies done with algae extracts focus mainly on other applications rather than cosmeceuticals. If algae, especially *E. gracilis*, are to be utilized as an antimicrobial ingredient in cosmetics, research regarding the growth stages and conditions should be carried out; the cultivation conditions should be optimized so that the desired compounds, such as paramylon or certain fatty acids, can be produced in desired amounts.

**Keywords** microalgae, euglena, antimicrobial, antibacterial, cosmetics

**Pages** 32 pages including appendix 1 page

# SISÄLLYS

## TERMIT JA LYHENTEET

1	JOHDANTO.....	1
2	LEVÄT JA NIIDEN ANTIMIKROBISUUS.....	2
2.1	Levät ja niiden hyödyntäminen.....	2
2.1.1	Silmälevät.....	3
2.1.2	Soveltava tutkimus ja mikrolevien hyödyntäminen eri aloilla.....	5
2.2	Levien antimikrobisuus ja vaikutus taudinaiheuttajiin.....	6
2.2.1	Antimikrobisuuden mittaaminen ja aiempi tutkimus.....	7
2.2.2	Rasvahapot.....	7
2.2.3	Hiilihydraatit.....	8
2.2.4	Muut yhdisteet.....	8
2.3	Levät kosmetiikassa.....	9
2.3.1	Mikrobit iholla ja taudinaiheuttajina.....	9
2.3.2	Kosmetiikka ja levät.....	9
3	AINEISTO JA MENETELMÄT.....	12
3.1	Levän kasvatus.....	12
3.1.1	Kasvatuskaapissa kasvatus ja harvestointi.....	12
3.1.2	Sentrifugointi.....	14
3.1.3	Kuivaus.....	14
3.2	Leväuutteen valmistus.....	14
3.2.1	Rasvauutto.....	14
3.2.2	Haihdutus ja kuivamassan punnitus.....	14
3.2.3	Paramylon-uutto.....	14
3.3	Mikrobien kasvatus ja uutteen testaus.....	15
3.3.1	Mikrobien kasvatusliuosten ja -alustojen valmistus.....	15
3.3.2	Mikrobien esikasvatus.....	16
3.3.3	Leväuutteen testaus mikrobialjoilla.....	16
3.3.4	Antimikrobisuuden mittaaminen.....	18
3.4	Rasvahappoanalyysi.....	18
3.4.1	Analysoitavien näytteen valmistus.....	18
3.4.2	Rasvahaponäytteen ajo kaasukromatografilla.....	19
4	TULOKSET.....	19
4.1	Rasvauuttotesti.....	19
4.2	Paramylonuuttotesti.....	19
4.3	SFE-uuttotesti.....	20
4.4	Rasvahappoanalyysi.....	20
4.5	Virhelähteet.....	22
5	TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINTA.....	23
	LÄHTEET.....	25

Liitteet

Liite 1      Hutner-kasvatusliuos

## TERMIT JA LYHENTEET

**Harvestointi:** leväkasvatuksen keräys kasvatusliuoksesta esimerkiksi sentrifugoimalla ja uuttamalla (tässä opinnäytetyössä)

**Inhibitio:** tietyn aineen aiheuttama mikrobien kasvun esto/heikentäminen

**Kultivointi:** levien kasvatus (valvotuissa olosuhteissa)

**PUFA:** polyunsaturated fatty acid; monityydyttymättömät rasvahapot

**Puulaus:** usean eri näytteen yhdistäminen yhdeksi kokoomänäytteeksi, tässä opinnäytetyössä usean leväkasvatuspullon yhdistäminen yhdeksi näytteeksi, jota kokeissa käytettiin

**Ympäri:** kasvatuksen alussa kasvuliuokseen lisätty leväviljelmä, jonka sisältämät leväsolut kasvavat uudessa kasvuliuoksessa (tässä opinnäytetyössä)

## 1 JOHDANTO

Leviin liittyvä ensimmäinen mielikuva on usein negatiivinen muun muassa niiden aiheuttamien lähes jokakesäisten, medioissakin esiintuotujen ”leväkukintojen” eli levien massaesiintymien takia. Levistä on kuitenkin myös paljon hyötyä, niin järvi- ja meriekosysteemeissä, joissa ne toimivat tärkeimpinä perustuottajina, kuin erilaisissa sovelluksissa eri tieteen- ja teollisuudenaloilla, joissa levien hyötykäyttöön liittyvä tutkimus on koko ajan kasvava tutkimusalue. Varsinkin tulevaisuudessa, jossa kiertotalous ja suljetut kierrot ovat kestävän elämän perustana, levien mahdollinen hyödyntäminen voi olla varteenotettava vaihtoehto.

Suomessa ja EU:ssa biotalous on ollut kärkiteemoja jo useamman vuoden ajan. EU:ssa käynnistettiin vuonna 2012 biotalousstrategia, jonka tarkoituksena on luoda uusia toimintamalleja huomioon ottaen nykyiset globaalit haasteet ja ongelmat (European Commission, 2012). Suomessa muutamaa vuotta myöhemmin, vuonna 2014 lanseerattu biotalousstrategia ennustaa biotalousliiketoiminnan kasvua 100 miljardiin euroon vuoteen 2025 mennessä. Suomen biotalousstrategian pääkohtiin luetellaan muun muassa uuden biotalousliiketoiminnan luominen sekä biomassojen kestävä käyttäminen (Työ- ja elinkeinoministeriö, 2014). Näitäkin strategisia kohtia mietittäessä levien hyödyntäminen eri teollisuudenaloilla sopii niin biotalousliiketoiminnan kasvattamiseen kuin kiertotalousajatteluunkin, jota Suomessa ajetaan eteenpäin. Jätevesien hyödyntäminen levän kasvattamisessa levien samalla puhdistuessa poistovedet ja edelleen levien hyödyntäminen eri käyttötarkoituksissa on kiertotalouden sekä kestävän liiketoiminnan näkökulmasta hyödyllistä.

Opinnäytetyö ja siihen liittyvä tutkimus suoritettiin osana Helsingin Yliopiston TUTLI-rahoitettua Levätehdas-tutkimusprojektia (4/2018 - 9/2019). Levätehdas-tutkimushankkeen tarkoituksena oli kartoittaa mikrolevien kasvatuksen kaupallistamista. Kasvatusta testattiin erilaisissa kasvatusalustoissa ja erilaisilla levillä. Kiertotalousnäkökulmaa tuotiin hankkeeseen kasvattamalla levää eri teollisuudenalojen jäte- ja poistovesissä. Hankkeessa tutkittiin myös eri kasvatusalustoissa kasvatettujen levien rasvahappo- ja pigmenttikoostumuksia. Leväkasvatuksen kaupallistamista hankkeessa tutkittiin vertailemalla eri teollisuudenalojen mahdollisilla levään liittyvillä sovelluksilla, ja kuinka kannattavia eri toimintamallit levänkasvatuksen kannalta ovat.

Tässä tutkimuspainotteisessa opinnäytetyössä tarkoituksena on tarkastella mikrolevien, erityisesti silmäleviin kuuluvan *Euglena gracilis*-levän (CCAP 1224/5Z) mahdollisia antimikrobisia ominaisuuksia eri kasvatusolosuhteissa ja eri uuttomenetelmillä, sekä antimikrobisten ominaisuuksien hyödyntämistä kosmetiikassa. Levien antimikrobisuuden yhdistämistä kosmetiikkaan

opinnäytetyössä pohditaan kirjallisuuden ja kosmetiikka-alan tulevaisuudennäkymien kannalta sekä kokeellisesti tutkimalla levä uutteen antimikrobisuutta. Tutkimuksessa pyrittiin selvittämään, onko *E. gracilis* -silmälevällä antimikrobista vaikutusta erilaisiin iholla eläviin mikrobeihin, ja miten levän kasvatusolosuhteet vaikuttavat mikrobikasvun inhibitioon. Myös *E. gracilis* -silmälevän saatavan polysakkaridin, paramylonin, antimikrobisuutta testattiin kokeellisesti. Samalla tutkittiin eri kasvatusolojen vaikutusta levä uutteen rasvahappokoostumukseen. Opinnäytetyötä varten tutustuttiin aikaisempiin eri leviin sekä uuttomenetelmiin perustuviin antimikrobisuustutkimuksiin ja niiden tuloksiin. Työssä päädyttiin käyttämään uutoissa etanolia ja saadussa SFE-uutteesta uutteenä oli ollut hiilidioksidi. Näihin uuttomenetelmiin päädyttiin, koska jos tuloksia saadaan, ovat uutteet relevantteja käyttää kosmetiikassa. Aikaisemmissa tutkimuksissa (Chiheb ym., 2009; del Val ym., 2001) uutteenä on käytetty metanolia, ja lähtökohtaisesti etanoli tai hiilidioksidi levän uuttamiseen olisi kosmetiikassa parempi vaihtoehto metanolille.

Kosmetiikka-alalla on tällä hetkellä kasvavina trendeinä luonnonmukaisuus, synteettisten ainesosien vähentäminen sekä kestävä kehitys (McKeon, 2019; Bom, Jorge, Ribeiro, & Marto, 2019). Asiakaskunta laajenee ja valveutuu myös kosmetiikkaa koskevista asioista, koska kestävä kehitys sekä muut ympäristöasiat, kuten ilmastonmuutos, ovat laajalti mediassa esillä. Kestävästi tuotetuista levistä saatujen uutteen ja ainesosien hyödyntäminen sopii täten alan kasvaviin trendeihin.

## 2 LEVÄT JA NIIDEN ANTIMIKROBISUUS

Levät ovat kiinnostava tutkimuskohde niiden eri ominaisuuksien takia. Seuraavissa luvuissa tarkastellaan levien antimikrobisia ominaisuuksia sekä levien hyödyntämistä eri sovelluksissa, erityisesti kosmetiikassa.

### 2.1 Levät ja niiden hyödyntäminen

Levät voidaan jakaa karkeasti mikro- ja makroleviin. Mikrolevillä tarkoitetaan mikroskooppisen pieniä leviä. Ne voivat esiintyä yksisoluisina tai yhdyskuntina, sekä yhteyttävinä eliöinä että heterotrofisina, eli toisenvaraisina eliöinä, jotka hankkivat energian muuten kuin yhteyttämällä. Makrolevät ovat suurempia, yhteyttäviä monisoluisia leviä, jotka voivat kasvaa jopa usean kymmenen metrin mittaiseksi (Campbell ym., 2018). Levät elävät monenlaisissa elinympäristöissä, niitä voi esiintyä akvaattisten elinympäristöjen lisäksi myös maaekosysteemeissä, samoin kuin makeassa sekä suolaisessa vedessä.

Leviin lukeutuu monien eri pääjaksojen lajeja, niin prokaryootteja (esitumalliset, yksisoluiset eliöt), kuin eukaryootteja (aitotumalliset eliöt). Proka-



ryoottisia leviin luokiteltavia eliöitä ovat esimerkiksi syanobakteerit (Cyanophyta), joita kansankielisesti saatetaan kutsua myös sinileviksi. Eukariot-tisia leviä ovat muun muassa viherlevät (Chlorophyta), punalevät (Rhodophyta), ruskolevät (Phaeophyta) sekä piilevät (Bacillariophyta). (Campbell ym., 2018) Levien luokittelun tekee melko hankalaksi ryhmän monimuotoisuus ja siitä seuraava alati päivittyvä taksonomia.

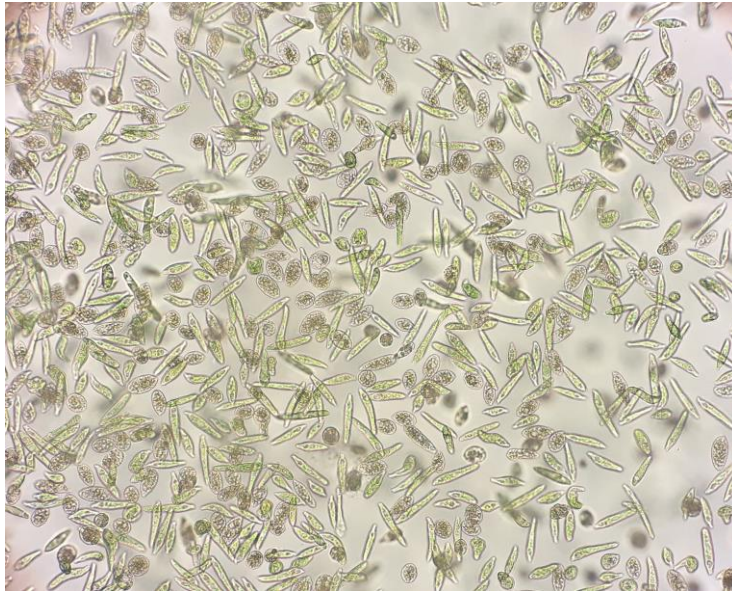
Levät ovat tärkeä osa ekosysteemejä, koska esimerkiksi akvaattisissa ympäristöissä ne ovat suurin yhteyttävä ryhmä tuottaen happea ja energiaa muille eliöille käytettäväksi. On arvioitu, että eukariotitiset levät ja syanobakteerit ovat vastuussa jopa puolesta koko maapallolla tapahtuvasta yhteyttämisestä. Yhteyttämisen lisäksi levät ovat tärkeä osa vesiekosysteemien ravintoverkkoja. Levien tärkeys vesistöissä on kiistämätön, mutta jos vesistöjen ravinnepitoisuudet nousevat esimerkiksi lannoittamisen vuoksi, voi ylimäärä ravinteita johtaa vesistöjen rehevöitymiseen levien massaesiintymien vuoksi. (Campbell ym., 2018)

### 2.1.1 Silmälevät

Silmälevät (pääjakso *Euglenozoa*) ovat monofyleettinen ryhmä siimallisia, lähinnä makean veden mikrolevälajeja lukuun ottamatta muutamia mereisiä lajeja. Endosymbioositeorian mukaan silmälevät ovat syntyneet sekundaarisessa endosymbiosissa, jossa heterotrofinen eukariotti otti sisäänsä viherlevän. (Campbell ym., 2018)

Silmälevillä on solulimassa silmäpiste, jossa fotoreseptorit tunnistavat valoa ja sitä kautta vaikuttavat solun liikkumiseen. Silmälevillä on erilaisia elomuotoja kuten fotoautotrofia (saavat energiansa auringon valosta yhteyttämällä), heterotrofia sekä miksotrofia (vaihtelevasti hetero- ja fotoautotrofiaa riippuen olosuhteista). (Campbell ym., 2018)

*Euglena gracilis* (kuva 1, s. 4) on *Euglena*-sukuun kuuluva silmälevä. *E. gracilis* on laajalti tutkimuksissa käytetty levä sen helpon kultivoinnin ja laajan ympäristömuutosten sietokyvyn vuoksi. Sen eri ominaisuuksia ja hyödyntämismahdollisuuksia (kuva 2, s. 5) on tutkittu verrattain paljon, muun muassa poistovesien ravinteiden pidättämisessä ja puhdistamisessa (Tossavainen, 2018, 27-30), biopolttoaineen raaka-aineena (Mahapatra, Chanakya, & Ramachandra, 2013), sekä bioaktiivisten aineenvaihduntatuotteiden kannalta (Kottuparambil, Thankamony & Agusti, 2019).



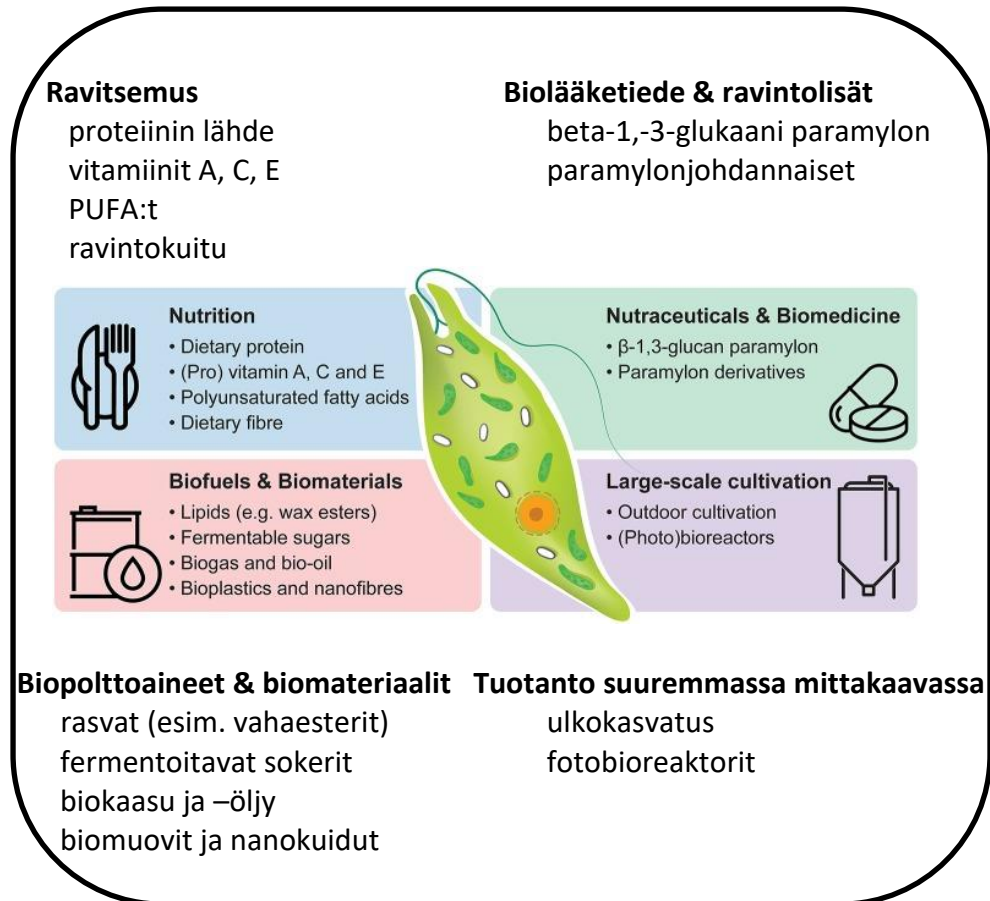
Kuva 1. *E. gracilis* -levää mikroskoopilla tarkasteltuna. Pitkänmalliset solut ovat eläviä aktiivisia soluja. Solujen vihertävä väri johtuu silmälevien pääpigmentistä, klorofyllistä (kuva: Anna Vesanen)

Leväsolut koostuvat erilaisista molekyyleistä ja metaboliatuotteista kuten proteiineista, lipideistä ja hiilihydraateista (Kim ym., 2015, 684). Mikrolevien proteiinipitoisuus vaihtelee muutamasta prosentista jopa 71 prosenttiin. *E. gracilixen* proteiinipitoisuuden on mitattu olevan 39–61 % (Becker, 2007). Levät tuottavat myös erilaisia hiilihydraatteja; *Euglena*-suvun yhtenä tutkituimpana hiilihydraattina on varastohiilihydraatti beeta-1,-3,-glukaani paramyilon.

*E. gracilis*-levän kuivapainosta 14–20 % on erilaisia lipidejä (Mata, Martins & Caetano, 2010). Lipidien tuotanto *E. gracilixella* vaihtelee eri kasvatusolosuhteissa; erilaiset kasvatusolot vaikuttavat sekä rasvahappojen määrään, että rasvahappojen tyyppiin. *E. gracilixen* tuottamista rasvahapoista osa on pitkäketjuisia monityydyttymättömiä rasvahappoja, muun muassa EPA:ta (C20:5 n-3) ja DHA:ta (C22:6 n-3) (Tossavainen, 2018, 35-41). *Euglenan* on tutkittu tuottavan myös vahaestereitä, varsinkin anaerobisesti kultivoituna (Tucci ym., 2010), tosin Wangin, Seppänen-Laakson, Rischerin & Wieben (2018) tutkimuksessa todetaan vahaestereitä löytyvän myös aerobisesti kasvatetusta levästä. Monityydyttymättömät rasvahapot ovat tärkeitä rasvoja sydän- ja verisuonisairauksien ehkäisemisessä ja vahaestereitä voidaan käyttää muun muassa biopolttoaineiden tuotannossa (Gissibl ym., 2019).

Kuten muutkin mikrolevät, *Euglena*-suvun levät tuottavat myös paljon erilaisia sekundaarisia aineenvaihdunnan tuotteita kuten vitamiineja, pigmenttejä sekä fenoliyhdisteitä (Kim ym., 2015, 684.). *E. gracilixen* on tutkittu tuottavan huomattavan pitoisuuden  $\alpha$ -tokoferolia, tutummin E-vitamiinia (Tani & Tsumura 1989), joka on tärkeä antioksidantti. Antioksidantit estävät

vapaiden radikaalien aiheuttamaa solujen molekyylien hapettumista (Wang, Chen, Huynh & Chang, 2015). *Euglena*-suvun levät tuottavat myös karotenoideja, kuten astaksantiinia (Kottuparambil ym., 2019), joka toimii myös antioksidanttina ja voi suojata ihon soluja UV-säteilyltä (Hama ym., 2012).



Kuva 2. *E. gracilis*-levän potentiaaliset käyttö- ja tuotantomahdollisuudet eri teollisuudenaloilla (Gissibl ym., 2019, muokattu)

### 2.1.2 Soveltava tutkimus ja mikrolevien hyödyntäminen eri aloilla

Mikrolevien erilainen koostumus ja erilaiset molekyylit tuovat leville useita eri hyödyntämismahdollisuuksia eri teollisuudenaloilla. Yleisiä tutkittuja sovellettuja levien hyödyntämiseen on esimerkiksi bioenergiana, jätevedenpuhdistuksessa, rehuna sekä lääke- ja kosmetiikkateollisuudessa. Leviä voidaan kasvattaa erilaisissa kasvatusolosuhteissa, esimerkiksi suljetuissa (esimerkiksi fotobioreaktorit) ja avoimissa (esimerkiksi avoimet altaat) kasvatusjärjestelmissä (Lunkka-Hytönen, Lohtander-Buckbee & Ruohonen-Lehto, 2013). Kasvatus eri kasvualustoilla tuo myös oman etunsa levien kaupalliseen kasvatukseen, koska niitä voidaan kasvattaa puhtaan veden lisäksi myös erilaisissa poisto- ja jätevesissä sekä suolaisessa vedessä. Tämä mahdollistaa niiden kasvatuksen myös sellaisilla alueilla, jossa puhdasta vettä ei välttämättä ole koko ajan saatavilla tai maa-ala ei sovellu kasvinviljelyyn (Lunkka-Hytönen ym., 2013).

Elintarvikkeissa leviä on hyödynnetty pitkään. Eri makroleviä, muun muassa *Laminaria*-, *Porphyra*- ja *Undaria*-sukujen lajeja käytetään ympäri Aasiaa ravintona (Fitzgerald, Gallagher, Tasdemir & Hayes, 2011). Mikroleviä kuten *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) ja *Chlorella vulgaris* voidaan käyttää esimerkiksi ravintolisinä korkeiden proteiinipitoisuuksien johdosta (Bleakley & Hayes, 2017). Uusimpia sovelluksia levien hyödyntämisestä ruuantuotannossa on esimerkiksi rehukäyttö, jossa levien käyttö rehuna voisi korvata esimerkiksi paljon käytettyä soijaa (Bleakley ym., 2017). Suuri proteiini- ja rasvahappopitoisuus tekee levistä hyödyllistä ravintoa niin ihmisille kuin myös tuotantoeläimille.

Energiatuotannossa leviä voi hyödyntää esimerkiksi polttoaineena. Levien öljypitoisuus ja saanto (rasvahappoa/hehtaari/vuosi) on tutkimuksen mukaan parempi kuin esimerkiksi soijapavuilla tai rypsilä (Lam & Lee, 2012). Levän kasvatuksessa polttoainetarkoitukseen tulee kuitenkin huomioida kannattavuus, joka useimmissa tutkimuksissa jää vielä tämän päivän teknologialla melko pieneksi (Gissibl ym., 2019; Singh & Gu, 2010; Lam & Lee, 2012). Japanilainen Euglena Co Ltd. on tosin vuoden 2018 lopulla aloittanut *E. gracilis*-levän massatuotannon lentokoneiden polttoaineeksi, ja yrittää saada leväpolttoaineen hinnan ajettua alas 100 Japanin jeniä (JPY)/l (noin 0,92 USD/l), kun tällä hetkellä fossiilisesti tuotettu lentopolttoaine maksaa noin 70 JPY litralta (noin 0,64 USD/l) vuoteen 2025 mennessä (Okatsu, 2018).

Biotalousnäkökulmasta voisi olla mahdollista yhdistää levien kaupallinen kasvatustaloudellisiin kiertoihin, esimerkiksi levien kasvatuksen kasvihuoneiden yhteydessä, sekä kiertotaloudellisiin ratkaisuihin, esimerkiksi teollisuuden sivu- ja poistovirtoja hyödyntäen. Levät sitovat yhteyttäessään hiilidioksidia ja käyttävät kasvuunsa ravinteita, jolloin sivuvirtojen hyödyntäminen edesauttaisi levien kasvatusta niin taloudellisesti kuin kiertotalouden näkökulmastaakin. Tietyt rajoitteet resurssien hyödyntämiseen liittyen tosin tulee ottaa huomioon pohdittaessa levien kannattavaa kasvatusta. Tällaisia rajoitteita ovat muun muassa ravinteiden käyttökelpoisuus poistovesissä sekä hiilidioksidin saatavuus. (McGinn, 2011.) Tossavaisen (2018) tutkimuksessa todetaan leviä voitavan hyödyntää kiertotaloudellisesti suljetussa kierrossa osana kierto- ja poistovesien puhdistusta.

Mikrolevien taloudellinen potentiaali riippuu käyttökohteesta; korkeimman kilohinnan mikrolevälopputuotteesta saa lääke- ja kosmetiikkatuotteista ja alhaisimman polttoainetuotannosta (Barsanti & Gualtieri, 2018). Tämä huomioon ottaen kaupallisessa mielessä levien tuotanto kosmetiikkateollisuuden tarpeisiin voisi olla kannattavaa.

## 2.2 Levien antimikrobisuus ja vaikutus taudinaiheuttajiin

Tässä luvussa tarkastellaan levien eri biomolekyylien antimikrobisuutta. Mikrolevien osalta tutkimusta eri komponenttien osalta ei juuri löydy, joten vertailuun on otettu myös makroleviin lukeutuvien levien antimikrobisia

ominaisuuksia. Kirjallisuuskatsauksen perusteella varsinkin rusko- ja punalevien antimikrobisuutta on tutkittu verrattain paljon.

### 2.2.1 Antimikrobisuuden mittaaminen ja aiempi tutkimus

Antimikrobisuudella tarkoitetaan tietyn aineen mikrobeja tappavaa tai niiden kasvuun vaikuttavaa ominaisuutta (The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2016). Eri molekyylien ja kemiallisten yhdisteiden antimikrobisuutta voidaan tutkia eri keinoin. Yleisimpiä antimikrobisuustestimenetelmiä ovat esimerkiksi mikrolaimennusmenetelmä (broth microdilution susceptibility test), jossa valmistetaan eri pitoisuuksia olevia antimikrobisuusliuoksia ja näihin lisätään haluttua mikrobia tietyssä pitoisuudessa. Toinen käytetty menetelmä on antimikrobisuusgradienttimenetelmä (antimicrobial gradient method), jossa eri pitoisuuksien avulla saadaan kasvatusmaljalla tutkittua MIC-arvoa, eli pienintä inhibitiota aiheuttavaa konsentraatiota. Myös kiekkodiffuusiotestiä (disk diffusion test) käytetään yleisesti antimikrobistauksessa; menetelmässä testattava aine pipetoidaan filterikiekoille, joista se diffundoituu kasvatusmaljalle ja sitä kautta voi vaikuttaa mikrobien kasvun inhibitioon. Testitavan valintaan vaikuttaa muun muassa testattavat mikrobit. Yhdisteen antimikrobisuutta voidaan mitata kvalitatiivisesti tai kvantitatiivisesti. (Reller, Weinstein, Jorgensen & Ferraro, 2009) Antimikrobisuustestejä voidaan tehdä lähes millä vaan taudinaiheuttajalla, huomioon ottaen riskiluokitukset ja saatavuuden. Samoin tutkittava yhdiste ja tutkimuksen intressit vaikuttavat testattavien mikrobien valintaan.

Levien antimikrobisuutta on tutkittu jonkun verran luonnosta harvestoiduilla makrolevilla, lähinnä viher-, puna- sekä ruskolevilla (del Val ym. 2001; Goecke, Labes, Wiese & Imhoff, 2012; Chiheb ym., 2009). Myös laboratorioissa kultivoitujen levien antimikrobisuutta on tutkittu (Ördög ym., 2004). Karkeasti jaoteltuna mikrolevien antimikrobisuuden tutkimus tapahtuu laboratorioissa kultivoiduilla levillä, ja makrolevien antimikrobisuuden tutkimus on yleensä luonnosta harvestoitujen levien tutkimusta.

Levien antimikrobisuuden tutkimus voidaan toteuttaa esimerkiksi kiekkodiffuusiotestein, joissa filterille pipetoidaan haluttua levää esimerkiksi uutteen muodossa (Ördög ym., 2004). Ördög ym. (2004) tutkimuksessa antimikrobisuustestausta toteutettiin myös MIC-testillä, jossa leväuute ja bakteeriliuosta lisättiin putkiin eri konsentraatioissa ja bakteerikasvua seurattiin tietyin väliajoin. Testausta on tehty myös levän suoralla pipetoinnilla kasvualustalle (del Val ym., 2001).

### 2.2.2 Rasvahapot

Levät tuottavat metaboliassaan erilaisia rasvahappoja. Desbois, Means-Spagg & Smith (2009) tutkimuksessa todetaan *Phaeodactylum tricornutum*-piilevästä uutetun eikosapentaeenihapon (EPA) vaikuttavan antimikrobisesti eri mikrobien, muun muassa *S. aureus*-bakteerin kasvuun. Myös viherlevä

*Chlorella vulgariksella* on tutkittu hetero- ja miksotrofisissa kasvuoloissa olevan antimikrobista vaikutusta tiettyihin mikrobeihin, ja sen on päätelty johtuvan solujen korkeasta rasvahappopitoisuudesta (Mashhadinejad, Hojjatolah & Jannat, 2016). El-Baroty, Ibrahim & El Baz (2014) tutkimuksessa eri makrolevistä uutetuilla rasvahappouutteilla oli antimikrobista vaikutusta gram-negatiiviseen bakteeriin *E. coliin*, *Aspergillus niger*-sieneen sekä *Candida albicans*-hiivaan. Yllämainituissa tutkimuksissa käy tosin ilmi, että rasvahappojen yksinomaista antimikrobisuutta voi olla vaikea määritellä, ja antimikrobisuuteen voivat vaikuttaa myös muut leväsolussa esiintyvät molekyylit kuten esimerkiksi pigmentit, fenolit sekä vitamiinit.

### 2.2.3 Hiilihydraatit

*E. gracilis*, samoin kuin muut *Euglena*-suvun lajit tuottavat aineenvaihdunnassaan  $\beta$ -1,3-glukaani-varastohiilihydraattia, jota *Euglenalla* kutsutaan paramyloniksi.  $\beta$ -1,3-glukaania esiintyy muillakin eliöillä, esimerkiksi hiivoissa ja kasvisoluissa, ja se on ihmiselle tärkeä ravintokuitu ja sen on tutkittu alentavan tulehdusreaktioita (Russo ym., 2017). Euglenen tuottama paramylon ei ole vesiliukoinen, toisin kuin useimmat esimerkiksi viljakasvien tuottamat  $\beta$ -1,3-glukaanit. Paramylonia eristi ensimmäisenä J. Gottlieb, joka totesi paramylonin olevan jodilla värjäytymätöntä tärkkelystä (Kiss, Vasconcelos & Triemer (1987), viitaten Gottlieb (1890) artikkeliin). Paramylon esiintyy soluissa sen korkean kristallisoitumisasteen vuoksi kiinteinä kiekkoina, jotka voidaan eristää soluista uuttamalla (Barsanti, Vismara, Passarelli & Gualtieri, 2001). *Euglena* voi tuottaa huomattavia määriä paramylonia; Barsanti ym. (2001) saivat tutkimuksessaan tuotettua geenimuunnellulla *Euglenalla* jopa 90 % paramylonia koko solun kuivapainosta. Paramylonin antimikrobisia ja tulehduksia vähentäviä ominaisuuksia on tutkittu muun muassa Sugiyama ym. (2010) tutkimuksessa, joissa suun kautta syötetty paramylon vähensi atooppisen ihottuman esiintymistä hiirillä. Samoin paramylonin on tutkittu vähentävän suolistosyöpää aiheuttavan karsinogeenin esiintymistä hiirten suolistossa paramylon-ruokavaliolla (Watanabe, 2013). Koizumi ym. (1993) tutkimuksessa muokatulla paramylonilla oli inhiboiva vaikutus HIV-1-viruksen toimintaan.

Muita antimikrobisia ominaisuuksia omaavia hiilihydraatteja on todettu olevan muun muassa *Chaetomorpha aerea*-viherlevästä eristetyllä galaktanilla, joka vaikutti Pierre, Sopena, Juin, Mastouri, Graber & Maugard (2011) tutkimuksen mukaan inhiboivasti *S. aureus*-bakteerin kasvuun.

### 2.2.4 Muut yhdisteet

Ruskolevästä eristettävien fenolien (molekyyli, jossa bentseenirenkaaseen on kiinnittynyt ainakin yksi hydroksyyliiryhmä (Whitmore, 1951)), florotanniinien, on tutkittu in vitro-kokeissa alentavan tulehdusreaktioita (Kim ym. 2015, 459.) Myös Eom, Kang & Kim (2008) tutkimuksessa todetaan *Ecklonia*

*stolonifera*-ruskolevästä eristettyjen florotanniinien vaikuttavan sekä normaalin *S. aureus*-bakteerikannan että MRSA-kannan kasvuun inhihoivasti. Florotanniinien osuus niitä sisältävästä leväsolun kuivapainosta voi vaihdella viidestä prosentista jopa 30 prosenttiin (Chojnacka, Michalak, Schroeder & Wieczorek, 2018), joten niillä voisi olla korkean pitoisuuden vuoksi potentiaalia antimikrobisena ainesosana käyttöön.

## 2.3 Levät kosmetiikassa

Tässä luvussa perehdytään ihmisen ihon mikrobistoon ja taudinaiheuttajiin, sekä käydään läpi levien käyttöä kosmetiikassa jo olemassa olevissa soveluksissa, samalla tutkien levien hyödyntämismahdollisuuksia kosmetiikalla.

### 2.3.1 Mikrobit iholla ja taudinaiheuttajina

Iho on ihmisen suurin elin. Sen pinnalla ja pintaosissa elää suuri määrä erilaisia mikrobeja. Tätä ulkopuolista mikrobistoa iholla kutsutaan mikrobiomiksi. Mikrobiomi koostuu pääosin viruksista, bakteereista, sienistä sekä parasiiteista. (Sanford, 2013)

Suuri osa ihon mikrobeista elää mutualistisessa suhteessa kehon solujen kanssa, eli niistä on hyötyä ihmiselle muun muassa ulkopuolisten mikrobien torjunnassa ja osana ihmiskehon immuunijärjestelmää (Sanford, 2013). Kuitenkin tiettyjen, normaalisti hyödyllisten, ihon mikrobien prosentuaalinen lisääntyminen tai muutokset metaboliassa voivat aiheuttaa iho-ongelmia; tällaisia ovat esimerkiksi bakteereihin kuuluvat *Cutibacterium* (*Propionibacterium*), *Staphylococcus* sekä *Streptococcus* ja sieniin kuuluvat *Candida* ja hiiva *Malassezia*. Mikrobien aiheuttamiin iho-ongelmiin kuuluvat esimerkiksi akne (*Cutibacterium acnes*), atooppinen ihottuma (*Staphylococcus aureus*) sekä savipuoli (*Malassezia furfur*) (Goering, Dockrell, Zuckerman & Chiodini, 2018). *S. aureus* on myös osille antibiooteille resistentti, ja toimii niin sanottuna MRSA-sairaalabakteerina (Desbois ym., 2009). Bakteerien antibioottiresistenssi aiheuttaa ongelmia, ja vaihtoehtoisten antimikrobisten aineiden löytäminen olisikin tärkeää.

### 2.3.2 Kosmetiikka ja levät

Kauneus- ja ihonhoitokosmetiikan markkinakoko on huomattava. Yleisesti kosmetiikka-alan globaaliksi markkinaksi ennustetaan vuoteen 2023 mennessä 805,61 miljardia Yhdysvaltain dollaria (USD) (Reuters, 2018) ja erikseen ihonhoitokosmetiikka-alan markkinaksi ennustetaan vuoteen 2026 mennessä 205 miljardia USD (Global Newswire, 2019). Samoin pelkästään luonnonmukaisen kosmetiikan markkinakoon ennuste vuoteen 2025 mennessä on 48,04 miljardia USD (Grand View Research, 2019).

Tällä hetkellä kosmetiikassa nousevina trendeinä ovat kestävä kehitys, luonnonmukaiset ainesosat ja pienemmät synteettiset kemikaalimäärät (McKeon, 2019; Bom ym., 2019). Myös ihon oman mikrobiomin huomioonottaminen ja ylläpito on nouseva trendi kosmetiikka-alalla (CEW, 2019), vaikka varsinaista tutkimusta kosmetiikan ja ihon mikrobiomin yhteydestä on verrattain vähän. Joitakin luonnollisia ainesosia käytetään jollain mitta-kaavalla lähes kaikessa kosmetiikassa, ja markkinakoon sekä trendit huomioidaan ottaen levien hyödyntäminen kosmetiikassa on potentiaalinen markkina-alue, jos tuotanto on kestävä ja kannattavaa.

Leviä voidaan hyödyntää kosmetiikassa esimerkiksi niiden pigmenttien ja rasvahappojen takia. Pigmentit toimivat kasvi- ja leväsoluissa mm. fotosynteesissä keräämällä energiaa valon eri aallonpituuksista (Roy, Egeland, Johnsen & Llewellyn, 2011). Astaksantiinin (karotenoidipigmentin) on todettu vaikuttavan kaikkiin ihokerroksiin ja lisäävän esimerkiksi ihon kosteutta Tominaga, Hongo, Karato & Yamashita (2012) tutkimuksessa. Levien on myös todettu voitavan käyttää kosmetiikassa esimerkiksi ihon valkaisuun sekä ihon ryppyntymistä ja ikääntymistä vastaan (Wang ym., 2015). *Alaria esculenta*-uutteen (ruskolevä) todettiin Verdy, Branka & Mekideche (2011) tutkimuksessa vaikuttavan alentavasti solujen ikääntymistä aiheuttavan progerinin tuotantoon, ja näin toimivan ihon ikääntymistä vastaan. Levien on tutkittu myös toimivan kosmetiikassa antioksidanttisina ainesosina tuoden tuotteeseen esimerkiksi UV-suojaa (Hama ym., 2012). Esitettyjen tutkimustulosten valossa levien käyttö kosmetiikassa on mahdollista ja luonnollisuutensa vuoksi myös suotavaa, vaikka tosin levästä saatavien komponenttien, kuten pigmenttien, hinta on melko korkea verrattuna synteettisiin yhdisteisiin. (Wang ym., 2015).

Eri yritykset mainostavat levätuotteitaan eri lailla; esimerkiksi levän mainitseminen tuotteen ainesosana tai levän tuominen esiin pääainesosana on tapana joissain tuotteissa. L'oreal Paris –kosmetiikkajätin Pure-Clay Maskissa käytetään punalevää ainesosana kasvonaamiossa, jossa sen luvataan toimivan antioksidanttina ja suojaavan ihon solukkoa (L'oreal Paris, n.d.). Punaleväuutteen käyttöä perustellaan sen ominaisuuksilla, mutta ei erikseen eritellä mikä olisi mahdollinen UV-suojaan vaikuttava molekyyli tai yhdiste. Toinen suuri kosmetiikkayritys, Nivea, mainostaa käyttävänsä ”ocean algae” – ainesosaa (rakkohauru *Fucus vesiculosus*) tietyissä tuotteissaan, joissa leväainesosan luvataan rauhoittavan, vahvistavan sekä vähentävän tulehduksia (Nivea, n.d.). Japanilainen Euglena Co Ltd. on ensimmäisiä pelkästään *Euglena*-levään keskittynyt yritys, ja yrityksellä on eri tuotteita ja tuoteryhmiä, jotka sisältävät *Euglena*-levää. Yrityksellä on monen tuotteen ihonhoitotuotesarja, jossa kaikissa on *Euglena*-leväuutetta. Aktiivisena ainesosana kerrotaan olevan uutteen 59 eri yhdistettä. Yrityksen verkkosivuilla luetellaan mittava määrä eri *Euglena*-liittyviä tutkimusartikkeleita eri julkaisuissa kymmenen vuoden ajalta. (Euglena Co Ltd., n.d.) Luonnonkosmetiikkayrityksistä esimerkiksi Algenist sekä Seed to Skin myyvät tuotteita, joissa levää on käytetty aktiivisena ainesosana. Algenist –kosmetiikkayrityksen tuotteissa käytetään muun muassa *Chlorella*-suvun mikroleviä (Algenist,



n.d.). Seed to Skin kertoo käyttävänsä ”The Awakening Salt Scrub” -tuotteessaan *Spirulina*-levää antioksidanttisen vaikutuksen takia, tosin ainesosalistassa käytettävänä levänä mainitaan rakkohauru (*Fucus vesiculosus*) (Seed to Skin, n.d.). Molempien edellä mainittujen yritysten tuotteiden hinnat nousivat usean sadan, jopa tuhannen euron litrahintaan.

Tietoa levien käytöstä antimikrobisena ainesosana kosmetiikassa ei juuri löydy, niin tutkimuksista kuin leväkosmetiikan tuotetiedoistakaan. Vaikka kosmetiikkalainsäädäntö on hieman löyhempää kuin esimerkiksi lääkelainsäädäntö, sitoo sitä kuitenkin tietyt säädökset ja asetukset. Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksessa (EY) N:o 1223/2009 kosmeettisista valmisteista, joka Suomessakin pätee, todetaan luvussa III, 11 artiklassa kohdassa d) tuotetietojen sisällettävän ”todisteet kosmeettisen valmisteen väitetystä vaikutuksesta, jos se on valmisteen luonteen tai vaikutuksen kannalta perusteltua”. Tuotteiden mainostamiseen sekä terveystietämiin pitää siis olla perusteluina tutkittua tietoa, joka voi osaltaan vaikuttaa leväaineesien antimikrobisuuden ilmoittamiseen; leväkomponentin ehkä ennemmin todetaan olevan vain vaikuttava osa liittyen johonkin tiettyyn ominaisuuteen, ei niinkään suoraan antimikrobisuuden.

### 3 AINEISTO JA MENETELMÄT

Tämän opinnäytetyön tutkimusosuuden aineisto tuotettiin ja kerättiin Helsingin yliopiston Lahden kampuksella Bio- ja ympäristötieteellisen tiedekunnan tiloissa. Tutkimusosuus ja siihen liittyvät työt toteutettiin Levätehdas-projektin yhteydessä, ja työtä ohjasi Marika Tossavainen ja avustivat muut projektin jäsenet. Rasvahappoanalyysi toteutettiin Helsingin yliopiston Viikin kampuksella elintarvike- ja ravitsemustieteiden osaston Minnamari Edelmannin avustuksella.

Opinnäytetyön tutkimusosuus toteutettiin kesä-elokuussa 2019.

#### 3.1 Levän kasvatus

Opinnäytetyön tutkimusosuudessa kasvatettiin *E. gracilis*-levää antimikrobisuuskokeita varten. Tässä luvussa esitellään levän kasvatukseen liittyvät menetelmät, joita opinnäytetyössä käytettiin.

##### 3.1.1 Kasvatuskaapissa kasvatus ja harvestointi

*E. gracilis*-levää kasvatettiin kahdessa eri olosuhteessa, valossa sekä pimeässä. Kasvatukseen käytettiin ymppeä, jota oli kasvatettu 4 x 200 ml kasvatuspulloissa valossa. Kasvatusalustana käytettiin Hutnerin kasvatusalustaa (liite 1). Neljä kasvatuspulloa puulattiin ensin yhteen, ja tämän jälkeen ymppeä siirrostettiin 60 ml varsinaisiin 600 ml kasvatuspulloihin, joissa oli 500 ml kasvatusalustaa (Hutner). Alkuperäisen ympin osuus 600 ml kasvatuspullostani oli siis 10,7 %.

Ympin kuivapaino mitattiin suodattamalla leväkasvatusta filtterille. Kuivapainoksi mitattiin 5,31 mg 3 ml:ssa eli levän kuivapaino ympissä oli 1,77 g/l.

Valokasvatuksessa levää (kuva 3, s. 13) kasvatettiin kuudessa pullossa (600 ml) valointensiteetillä  $153,2 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  16 h valo/8 h pimeä –syklillä 20°C lämpötilassa. Kasvatus kesti 7 vuorokautta. 6 kpl valokasvatuspulloja puulattiin yhteen, jotta levämassasta saatiin tasalaatuinen biomassa. Tästä puulattusta leväkasvatuksesta mitattiin suodattamalla levämassan kuivapaino, 2,546 g/l.

Pimeäkasvatuksessa levää (kuva 4, s. 13) kasvatettiin ilman valoa 20 °C:n lämpötilassa 8 vuorokautta. Myös pimeäkasvatuspullot puulattiin yhdeksi tilavuudeksi, ja tämän kasvatuksen suodatettu kuivapaino oli 0,88 g/l.



Kuva 3. Valossa kasvatettu *E. gracilis*-levä ennen puulausta. Leväbiomassan väriero on huomattava verrattuna pimeässä kasvaneeseen levään (ks. kuva 4) (Kuva: Anna Vesanen)



Kuva 4. Pimeässä kasvatettu *E. gracilis*-levä puulauksen jälkeen. Väritään pimeäkasvatettu levä on melko erilainen valossa kasvaneeseen levään verrattuna (ks. kuva 3) (Kuva: Anna Vesanen)

### 3.1.2 Sentrifugointi

Harvestoitu leväkasvatus sentrifugoituihin, jotta kasvatettu leväbiomassa saatiin eroteltua nestefaasista. Heraeus Multifuge 1 S-R –sentrifugilla asetuksilla 10 minuuttia, 3500xG, 15°C lämpötilassa. Tämä toistettiin molemmille näytteille (pimeä & valo). Sentrifugointia jatkettiin, kunnes jäljelle jäi vain leväpelletti, minkä jälkeen ylimääräinen neste poistettiin pipetoimalla.

### 3.1.3 Kuivaus

Sentrifugoitu levämassa jäädytettiin ensin -80 °C pakastimessa ja sen jälkeen kylmäkuivattiin Christ Alpha 1-4 LOC-1M –kylmäkuivurilla kaksi vuorokautta. Kylmäkuivaus suoritettiin, jotta levämassasta saatiin poistettua kaikki ylimääräinen neste uuttoa varten.

## 3.2 Levä uutteen valmistus

Tämän opinnäytetyön antimikrobisuuskokeissa käytettiin levä uutteita, joista osa tuotettiin tuoreesta leväbiomassasta itse. Levä uutteita voidaan tuottaa eri tavoin; tässä opinnäytetyössä uuttomenetelmänä käytettiin ASE- uuttoa (etanoli). Pimeäkasvatuslevästä uutettiin erikseen myös paramylyonia.

### 3.2.1 Rasvauutto

Kylmäkuivattu levämassa homogenoitiin morttelissa jauhamalla. Uuttosoluihin punnittiin 150 mg (valo) ja 150,1 mg (pimeä) levää ja nämä uutettiin Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ Accelerated Solvent Extraction -uuttolaitteella. Uuttoliuoksena käytettiin etanolia. Uutto tehtiin lämpötilassa 110 °C, kesto 15 minuuttia.

### 3.2.2 Haihdutus ja kuivamassan punnitus

Uutetut levät haihdutettiin typpihaihduttimella kuiviksi lämpöhauteen avulla. Kuivaksi haihdutetut uutteen punnittiin, jotta saatiin mitattua lopullinen levän määrä testattavassa uutteen. Valossa kasvatetun haihdutetun levä uutteen paino oli 40 mg. Pimeäkasvatetun levä uutteen paino haihdutuksen jälkeen oli 60 mg.

### 3.2.3 Paramylyon-uutto

Kummastakin kylmäkuivatusta levästä tehtiin myös paramylyon-uutto. Pimeäkasvatuslevästä paramylyonin saanto oli huomattava. Koska paramylyon-uutto oli haasteellista tehdä kvantitatiivisesti, ei saatuja määriä punnittu, vaan paramylyon-uutossa keskityttiin enemmän kvalitatiiviseen puoleen.

Valokasvatuslevästä ei tullut lainkaan paramylon-saantoa, johtuen luultavimmin rasvahappojen ja varastohiilihydraattien erilaisesta koostumuksesta ja suhteesta riippuen kasvatusolosuhteesta. *E. gracilixen* on tutkittu tuottavan enemmän paramylonia, kun sitä on kasvatettu heterotrofisissa olosuhteissa (Grimm, 2015).

Paramylonin uutto toteutettiin Barsanti ym. (2001) julkaisussa käytetyllä Schwartzbach ym. (1975) menetelmällä. Paramylon eristettiin soluista liuottamalla tislattua vedellä kasteltua kylmäkuivattua levämassaa liuokseen, jossa oli 1% SDS ja 5 % Na<sub>2</sub>EDTA (100 ml dH<sub>2</sub>O, 1 g SDS, 5 g Na<sub>2</sub>EDTA). Sekoitettu liuos pidettiin vesihauteessa lämpötilassa 37 °C 30 minuutin ajan. Tämän jälkeen liuos sentrifugoitiin 10 minuuttia 1000xG. Edelliset toimenpiteet toistettiin kolme kertaa, jotta jäljelle jäävä paramylon olisi mahdollisimman puhdasta. Näiden jälkeen jäljellä oleva liuos pestiin 70 °C tislattua vedellä kahdesti. Pesty paramylon kaadettiin alumiiniselle kupille kuivumaan vuorokaudeksi.

Kuivunut, valkoinen jauhemainen paramylon irrotettiin kupista ja sitä punnittiin korkilliseen lasiputkeen 10 mg. Tähän lisättiin 500 µl 0,5 M KOH-liuosta. Liuos sekoitettiin voimakkaasti, jotta paramylon sekoittui täydellisesti KOH-liuokseen. Valmiin liuoksen annettiin olla jääkaapissa kaksi vuorokautta, jonka jälkeen paramylon oli geelinytynyt. Valmiin paramylongeeelin pitoisuus oli 20 g/l. Kokeessa valmistettiin myös toinen paramylongeeeli, jonka pitoisuus oli 100 g/l, mutta tämän pipetointi filtereille oli mahdotonta, minkä vuoksi se jätettiin pois varsinaisesta kokeesta.

### 3.3 Mikrobien kasvatus ja uutteen testaus

Opinnäytetyön antimikrobisuuskokeissa käytettiin kolmea ihmisen mikrobiin kuuluvaa mikrobia. Tässä luvussa käsitellään mikrobien kasvatukseen ja käsittelyyn liittyvät työvaiheet ja leväutteen antimikrobisuuden testaus.

#### 3.3.1 Mikrobien kasvatusliuosten ja -alustojen valmistus

Työssä käytettiin kahta eri bakteeria, *Escherichia coli* ja *Staphylococcus aureus*. Lisäksi käytettiin yhtä hiivaa, *Malassezia furfur*. Mikrobeille valmistettiin ensin kasvatusliuokset ja kasvatusmaljat. *E. Colille* käytettiin kasvatusliuoksena Luria-Bertani -liuosta: 1 000 ml dH<sub>2</sub>O, 10 g Tryptone, 5 g yeast extract ja 10 g NaCl. Samalla metodilla valmistettiin myös kasvatusmaljojen agar-liuos valmistamalla edellä mainittu liuos ja lisäämällä siihen 15 g agaria. Liuokset autoklavoitiin 121 °C:ssa 20 minuuttia.

*S. aureuksen* kasvatusliuoksena käytettiin TGY –liuosta, joka sisälsi 1 000 ml dH<sub>2</sub>O, 5 g Tryptone, 5 g yeast extract, 1 g glukoosi ja 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Kasvatusmaljojen agar-liuos valmistettiin lisäämällä samanlaiseen liuokseen 20 g agar-ia. Liuokset autoklavoitiin 121 °C:ssa 20 minuuttia.

*M. furfurin* kasvatusliuoksena käytettiin 472 Pityrosporium –liuosta, joka sisälsi 1 000 ml dH<sub>2</sub>O, 40 g malt extract, 20 g ox-bile, 10 g Tween40, 2,5 g glycerol mono-oleate. Kuten edellä, samanlaiseen liuokseen lisättiin 15 g agar-ia, jotta saatiin kasvatusalustan agar-liuos valmistettua. Liuokset autoklavoitiin 121 °C:ssa 20 minuuttia.

Autoklavoidut agar-liuokset kaadettiin petrimaljoille laminaari-ilmavirtauskaapissa (ESCO Class II BSC), jossa työtila säilyy ilmavirtauksen vuoksi steriilinä ja näin minimoidaan kontaminaatioiden syntyminen. Valmistetut maljat säilytettiin jääkaapissa kannet alaspäin, jottei maljojen pinnoille kertynyt kosteutta.

### 3.3.2 Mikrobien esikasvatus

Kylmäkuivattu *S. aureus* (HAMBI 2638) herätettiin laminaarissa kasvatusliuoksessa lisäämällä 0,5 ml kasvatusliuosta kylmäkuivattuun bakteerimassaan, minkä jälkeen massan annettiin kostua 30 minuuttia. 30 minuutin jälkeen noin puolet bakteeriliuoksesta siirrostettiin 5 ml kasvatusliuokseen ja liuosta sekoitettiin Pasteur-pipetillä. Loput jäljelle jääneestä liuoksesta levitettiin steriilillä puikolla kasvatusmaljalle. Esikasvatusmalja siirrettiin kasvatuskaappiin lämpötilaan 37 °C. Bakteeriesikasvatusta tehtiin kasvatuskaapissa 2 vuorokautta.

Kylmäkuivattu *M. furfur* (DSM6170) herätettiin samalla kaavalla kuin edellä mainittu *S. aureus*. Bakteeriliuosta levitettiin kasvatusmaljalle puikolla ja malja siirrettiin kasvatuskaappiin 30 °C lämpötilaan. Hiivojen hitaamman kasvun vuoksi *M. furfur* esikasvatettiin kasvatuskaapissa noin 7 vuorokautta.

*E. coli* –kantana käytettiin pakastettua kantaa (apatogeeninen ympäristö-mikrobiologian kurssikanta, Helsingin Yliopisto), joka herätettiin lisäämällä pakastettua kantaliuosmassaa 2 ml kasvatusliuokseen. Liuos sekoitettiin ja sitä levitettiin maljalle. Malja siirrettiin kasvatuskaappiin 37 °C. *E. Colia* esikasvatettiin kasvatuskaapissa 2 vuorokautta.

### 3.3.3 Leväutteen testaus mikrobimaljoilla

Uutteina käytettiin valo- ja pimeäkasvatuksesta ASE-utolla tehtyä uutetta, paramylon-uutetta sekä SFE-utolla (supercritical fluid extraction) uutettua *E. gracilis*-uutetta. SFE-uttomenetelmässä levä uutettiin hiilidioksidilla. SFE-uute saatiin valmiina opinnäytetyön ohjaajalta Marika Tossavaiselta, uutteen pitoisuutena 104,18 mg (Aromtech 2 uute + 1 ml EtOH). Testaus

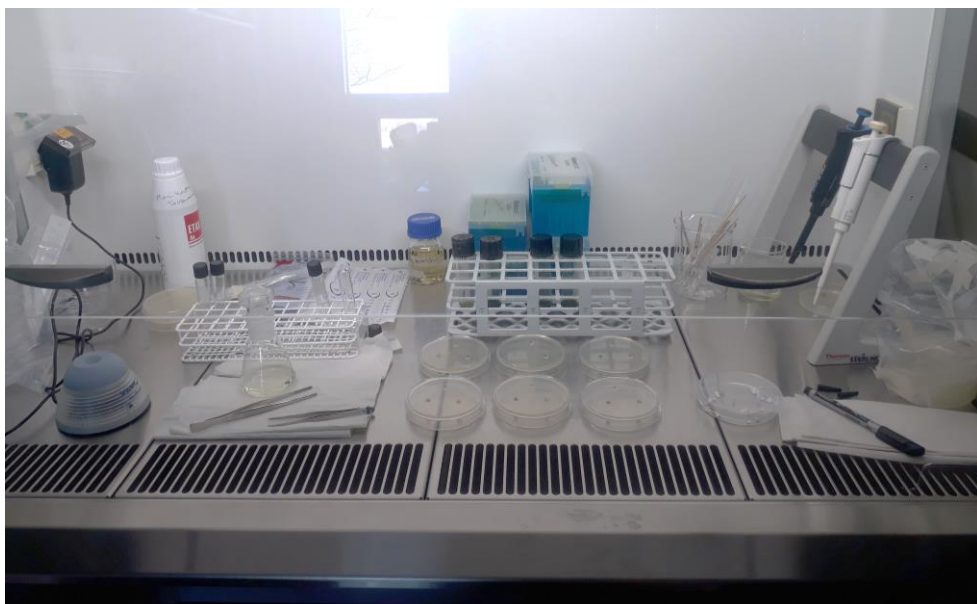
suoritettiin kiekko-diffuusiotestinä Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol (Hudzicki, 2009 viitaten Bauer ym., 1961) mukaan.

Varsinainen koemaljaus tehtiin laminaarissa kontaminaatioiden välttämiseksi (kuva 5). Esikasvatetuilta maljoilta siirrostettiin steriilillä silmukalla bakteerikasvatusta noin viidestä eri kasvupesäkkeestä koeputkeen, jossa 2 ml kasvatusliuosta. Tämän jälkeen liuos sekoitettiin. Steriili vanupuikko kas-tettiin bakteeriliuoksessa, ja sillä valettiin uusi kasvusmalja koko pinta-alalta. Tämä toistettiin kaikilla kolmella mikrobilla (*S. aureus*, *M. furfur* ja *E. coli*), yksi kanta kerrallaan laminaarissa.

**Rasvauute:** *Euglena*-rasvauuttoa, erikseen sekä pimeä että valo, pipetoitiin Finnpietillä filterille (Whatman® Antibiotic Assay Discs diameter 6mm) 10 µl ja filteri asetettiin maljalle pinseteillä. Rinnakkaisfiltereitä tehtiin yhteensä neljä kappaletta maljalle. Näiden lisäksi maljalle lisättiin myös nollanäytteenä filteri, johon pipetoitiin 10 µl etanolia. Tämä koeasetelma toistettiin *S. aureukselle*, *E. colille* ja *M. furfurille*.

**Paramylon-uute:** Paramylon-uutetta (20 g/l) pipetoitiin 20 µl filterille ja filteri asetettiin pinseteillä bakteerimaljalle. Rinnakkaisfiltereitä tehtiin yhteensä neljä kappaletta, ja nollanäytteenä filteri, johon pipetoitiin 20 µl 0,5 M KOH-liuosta. Tämä koe toistettiin *S. Aureukselle*, *E. colille* ja *M. furfurille*.

**SFE-uute:** Ylikriittisellä hiilidioksiduuttomenetelmällä uutettua *E. gracilis*-uutetta testattiin *E. colilla*, *S. aureuksella* sekä *M. furfurilla*. Uutetta pipetoitiin filterille Finnpietillä 20 µl. Pipetoitu filteri asetettiin maljalle pinsettien avulla. Tämä toistettiin yhteensä neljä kertaa, jotta saatiin neljä rinnakkaisnäytettä. Nollanäytefilterille pipetoitiin 20 µl etanolia.



Kuva 5. Testiuutteiden lisäys mikrobikasvatusmaljoille laminaarissa (Kuva: Anna Vesänen)

Valmiit kasvatusmaljat asetettiin kasvatuskaappiin kunkin mikrobin vaatimaan lämpötilaan (*M. furfur* 30 °C, *S. aureus* 37 °C, *E. coli* 37 °C) ja kasvua seurattiin vuorokauden välein (24 h, 48 h, 72 h, sekä paramylon-uutteen kanssa vielä 6 vuorokauden jälkeen).

#### 3.3.4 Antimikrobisuuden mittaaminen

Leväuutteiden aiheuttama mikrobikasvun inhibitio mitattiin kasvatusmaljalta filtterin ympärillä olevan halon, eli mikrobikasvustottoman alueen, perusteella. Vaikuttavuus mitattiin kolmella eri tasolla perustuen Chiheb ym. (2009) leväuutteiden antimikrobisuustesteissä käytettyyn menetelmään: - ei vaikutusta (< 10 mm halon halkaisija), + keskiasteinen vaikutus (halon halkaisija  $\geq$  10 mm ja < 16 mm) sekä ++ selkeä vaikutus (halon halkaisija  $\geq$  16mm).

### 3.4 Rasvahappoanalyysi

Rasvahappoanalyysi toteutettiin Minnamari Edelmännin ohjauksessa Helsingin yliopiston Viikin kampuksella. Rasvahappoanalyysi tehtiin kaasukromatografilla, jonka avulla leväuutteiden eri rasvahapot pystyttiin tunnistamaan.

#### 3.4.1 Analysoitavien näytteiden valmistus

Valo- sekä pimeäkasvatusnäytteille tehtiin rasvahappoanalyysi. Kummastakin näytteestä tehtiin kolme rinnakkaista analyysiä. Näytteitä punnittiin 50 mg 10 ml lasiputkeen ja näytteeseen lisättiin 0,5 ml sisäistä standardia 19:0 (pitoisuus 2,5 mg/l). Tämän jälkeen näytteet haihdutettiin kuivaksi typpihaihduttimella.

Haihdutuksen jälkeen näytteisiin lisättiin 0,5 ml tolueenia ja 2 ml 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (kuivassa metanolissa). Näytteet sekoitettiin hyvin. Näyteputket pidettiin 85 °C:ssa noin 60 minuuttia välillä sekoittaen.

Lämpöhauteen jälkeen näyteputket jäähdytettiin ja niihin lisättiin 2 ml heptanaa ja 2 ml kylläistä NaCl:in vesiliuosta. Putkia käännettiin noin yhden minuutin ajan. Tämän jälkeen korkkeja raotettiin ja faasien annettiin erottua. Ylempi faasi siirrettiin uuteen näyteputkeen, jonka pohjalle oli laitettu kuivausaineksi vedetöntä Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Näytteiden annettiin kuivua noin 30 minuuttia.



### 3.4.2 Rasvahaponäytteiden ajo kaasukromatografilla

Kaasukromatografiajo suoritettiin Agilent Technologies 6850 Series Auto Samplerilla. Kantajakaasuna käytettiin heliumia (1,1 ml/min). Ensimmäiseksi ajettiin standardiseokset GLC-63A ja GLC-68D rasvahappojen tunnistamista varten. Tämän jälkeen ajettiin analysoitavat näytteet. Kaasukromatografilta saatiin ajosta kuvaajat, joista rasvahappoanalyysi voitiin toteuttaa tunnistamalla eri rasvahapot retentioaikojen, eli näytteen kulkemiseen kolonnin läpi kuluvan ajan perusteella.

## 4 TULOKSET

Tässä luvussa tarkastellaan kokeista saatuja tuloksia. Mikrobin kasvua inhiboivia leväuutteita kokeissa olivat paramylon-uute sekä SFE-uute (taulukko 1).

Taulukko 1. Eri uutteen eri mikrobeille aiheuttama kasvun inhibitio määritettynä Chiheb ym. (2009) menetelmällä (- ei vaikutusta, + 10 mm  $\geq$  ja < 16 mm, ++ > 16 mm)

Mikrobikasvun inhibi- tio	<i>S. aureus</i>	<i>M. furfur</i>	<i>E. coli</i>
Euglena (SFE)	-	-	+
Paramylon	++	-	-
Euglena (ASE/valo)	-	-	-
Euglena (ASE/pimeä)	-	-	-

### 4.1 Rasvauuttotesti

Kokeeseen kasvatetut leväuutteet (valo ja pimeä) eivät aiheuttaneet kasvatusaljoilla inhibitiota *S. Aureuksen*, *E. Colin* tai *M. Furfurin* kasvussa.

### 4.2 Paramylonuuttotesti

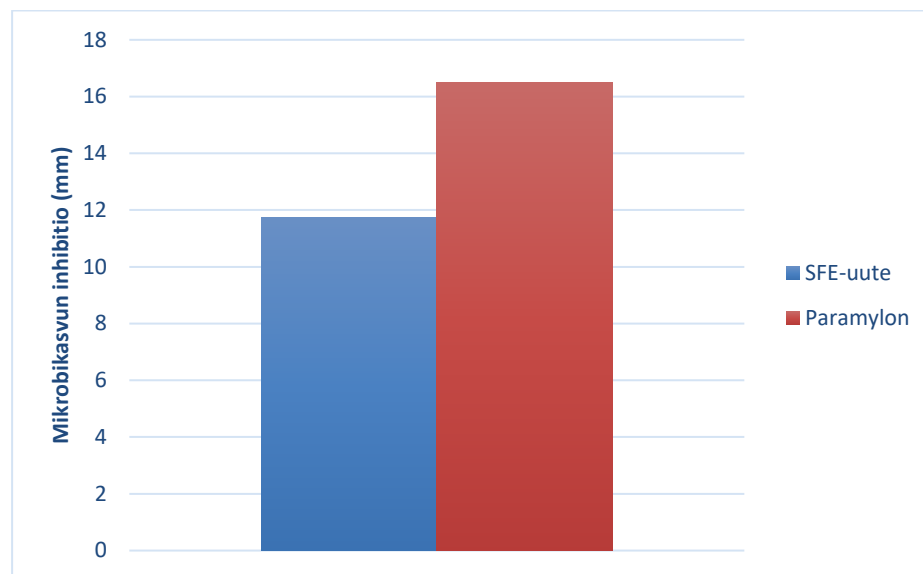
*M. furfur* ei tuottanut paramylon-kokeessa merkitsevää tulosta, koska nollanäytteessä oli myös kasvun inhibitiota. Maljoilla myös nollanäyte (0,5 M KOH) tuotti halon filttarin ympärille, eli paramylon ei aiheuttanut hiivan kasvun inhibitiota vaan KOH.

Paramylon aiheutti *S. Aureuksen* kasvun inhibition kahdessa rinnakkaisnäytteessä neljästä. Halon koot näissä kahdessa oli 16 mm ja 17 mm (taulukko 1,

s. 19). Kahden muun filtterin ympärille haloa ei tullut, vaan mikrobit kasvoivat normaalisti.

#### 4.3 SFE-uuttotesti

Ylikriittisellä uutolla saatiin tuloksia *E. Colin* kasvun inhibitiossa. Ylikriittinen uute inhiboi *E. colin* kasvua kaikilla neljällä rinnakkaisella testillä. Halon koko leväuutefilttereiden ympärillä oli eri replikaateissa 11 mm, 13 mm, 11 mm ja 12 mm (taulukko 1, s. 19). Kuvassa 6 esitetään bakteerikasvun inhibitio filtterin ympärillä millimetreissä. Kuvaajaan on laskettu keskiarvot filttereistä, joilla inhibitiota esiintyi.



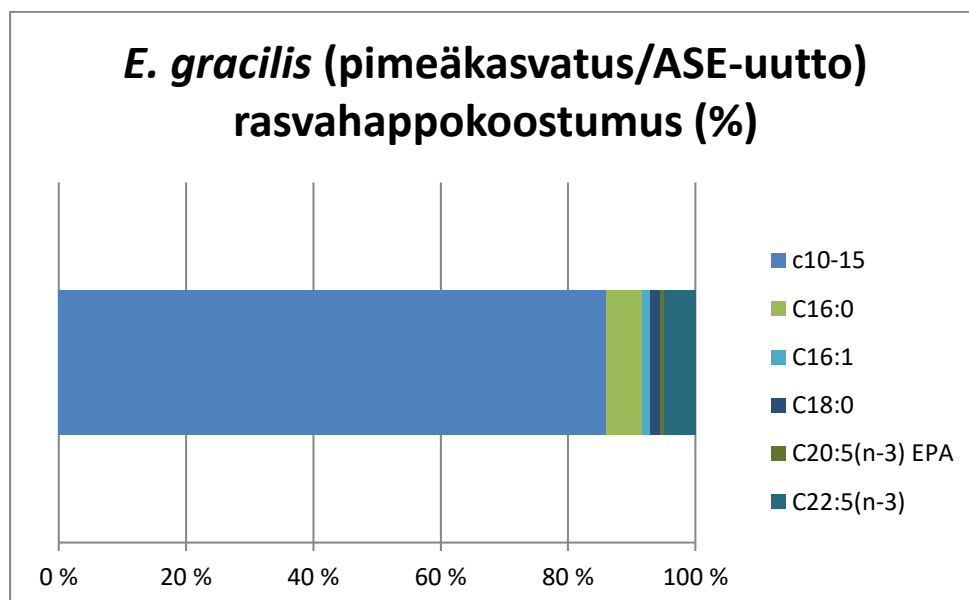
Kuva 6. Saatujen mikrobikasvuinhibitioiden koko (mm) kasvatusmaljalla filtterin ympärillä.

#### 4.4 Rasvahappoanalyysi

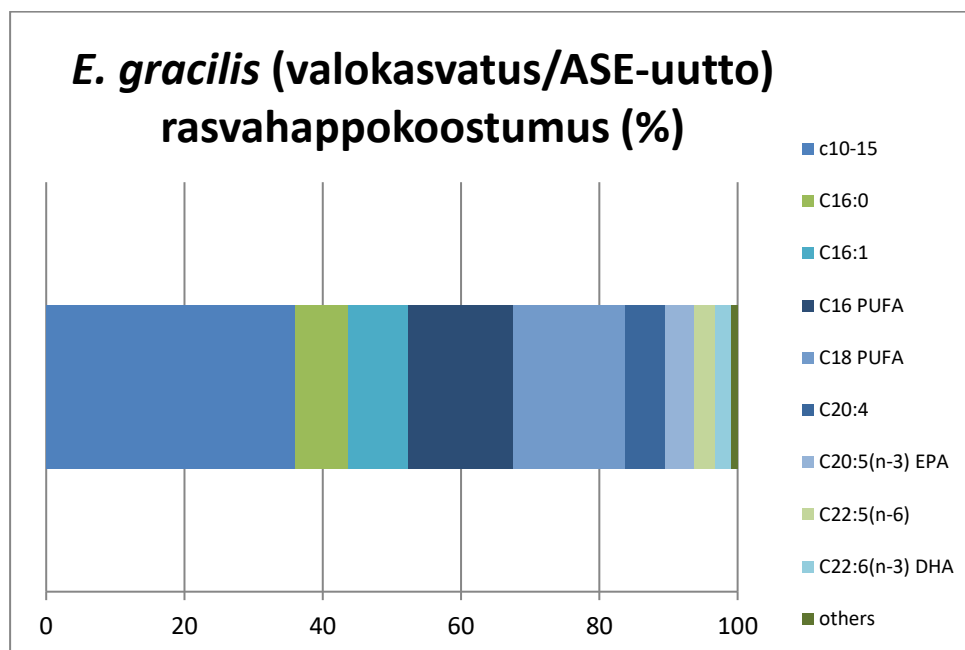
Kaikista kolmesta kokeesta käytetystä leväuutteesta tehtiin rasvahappoanalyysit kaasukromatografisesti. Pimeässä kasvaneessa *E. gracilis*-levästä tehdyssä uutuksessa lyhytketjuisten rasvahappojen osuus oli huomattavasti korkeampi kuin valokasvatus- sekä SFE-uutteessa (kokonaisprosenttiosuus kaikista rasvahapoista yli 80%) (kuvat 7–9, s. 21–22). Pimeäkasvatuslevässä oli myös C22:5(n-3) (DPA) rasvahappoa prosentuaalisesti enemmän kuin muissa analysoiduissa uutteissa. DPA on monityydyttynyt rasvahappo, joka voi metaboliassa muuntua pienissä määrin EPA:ksi (Drouin, Rioux & Legrand 2019).

Valossa kasvatetussa levässä oli rasvahappoanalyysin perusteella suhteellisesti eniten EPA- ja DHA-rasvahappoja eniten kolmessa analysoidussa näytteessä, joskaan niiden pitoisuudet eivät olleet missään näytteessä kovin suuret (kuvat 7–9, s. 21–22). C:16- ja C:18-rasvahappojen monityydyttyneitä (PUFA) muotoja esiintyi samoin eniten valokasvatusleväuutteessa (kuva 8, s. 21), jossa niiden osuus koko rasvahappokoostumuksesta oli yhteensä noin 30 %, kun SFE-uutteessa näiden PUFA-yhdisteiden yhteenlaskettu osuus oli noin 10 % (kuva 9, s. 22). Eniten erilaisia rasvahappoja oli SFE-uutteessa (kuva 9, s. 22).

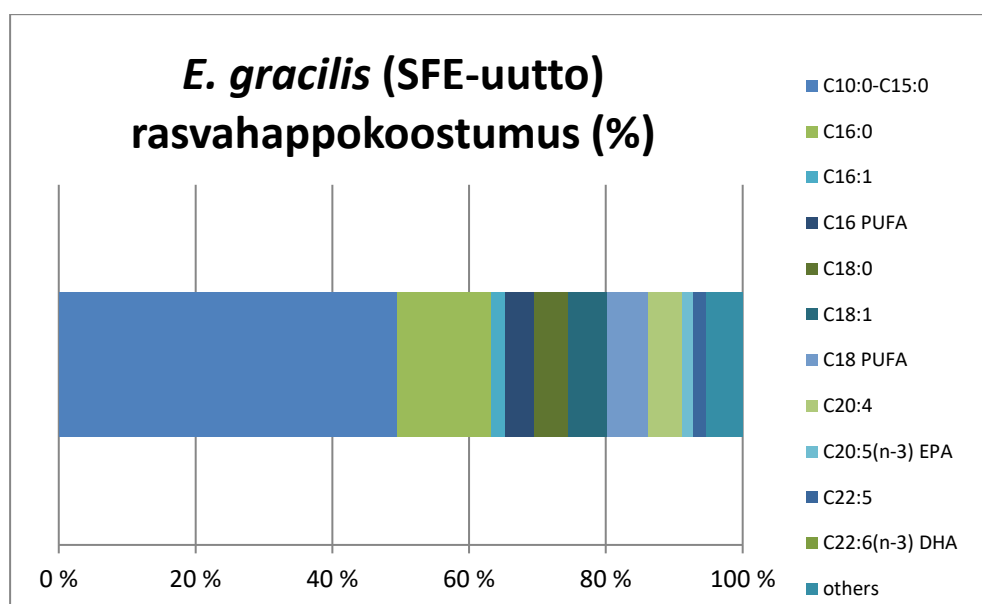
Rasvahappojen osuus koko uutteesta oli selkeästi korkein SFE-leväuutteella (300 mg/g). Pimeäkasvatetulla levällä rasvojen osuus koko uutteesta oli 54 mg/g ja valokasvatuslevällä vielä pienempi, 24 mg/g.



Kuva 7. Pimeä uutteen rasvahappokoostumus. Selkeästi eniten C10-C15-rasvahappoja, ja verrattuna valokasvatus sekä SFE-uutteeseen, rasvahappokoostumus on huomattavasti suppeampi.



Kuva 8. Valouutteen rasvahappokoostumus. Valossa kasvatetun *E. gracilis*-uute on monipuolisempi ja sisältää enemmän PUFA-yhdisteitä kuin pimeässä kasvatettu leväuute



Kuva 9. SFE-uutteen rasvahappokoostumus. Selkeästi eniten erilaisia rasvahappoja, tosin esimerkiksi EPA- ja DHA-rasvahappojen prosentuaaliset osuudet pienemmät kuin valokasvatusuutteessa

#### 4.5 Virhelähteet

Testattavat leväutteen eivätkä välttämättä liuenneet kokeessa käytetyiltä filteriltä tarpeeksi hyvin kasvatusmaljalle, jolloin uute ei mahdollisesti päässyt

vaikuttamaan maljalla olevien mikrobien kasvuun. Tämä voi olla syy siihen, miksi paramylon vaikutti niin pitkällä viiveellä.

## 5 TULOSTEN TARKASTELU JA POHDINTA

Työssä haluttiin tutkia *E. gracilis*-silmälevän mahdollisia antimikrobisia vaikutuksia ja niiden hyödyntämismahdollisuuksia. Aikaisemmissa tutkimuksissa on todettu, että silmälevillä antimikrobisia ominaisuuksia olisi (Sugiyama ym., 2010; Kottuparambil ym., 2019; Gissibl ym., 2019).

Opinnäytetyön tutkimuksessa osalla testatuista uutteista mikrobien inhibitiota aiheuttavaa vaikutusta saatiin, joten tutkimusta olisi hyvä jatkaa. Ylikriittisellä uutolla tuotettu leväuute tuotti inhibition *E. Colin* kasvussa kaikissa neljässä replikaatissa +-vaikutuksella (keskinkertainen vaikutus). Samoin paramylonuute inhiboi *S. Aureuksen* kasvua kahdessa replikaatissa neljästä ++-vaikutuksella (selkeä vaikutus). Kosmetiikka-alaa pohdittaessa oli kiinnostavaa, että SFE-uutteella saatiin tuloksia; uute tuotettiin ylikriittisellä hiilidioksiduutolla ja valmiissa uutteessa käytettiin etanolia, jotta se saatiin liukoiseen muotoon. Verrattuna muihin aikaisempiin kirjallisuudesta löydettyihin tutkimuksiin (Chiheb ym., 2009; del Val ym., 2001), joissa liuottimena on käytetty metanolia, olisi etanoli kosmetiikassa mitä luultavimmin metanolia suositeltavampi ainesosa leväuutteessa.

Jotta antimikrobisia ominaisuuksia voitaisiin hyödyntää kosmetiikka-alalla tehokkaasti, tulisi aihetta tutkia vielä lisää. Suurin osa levien antimikrobisuuden tutkimuksesta keskittyy lähinnä antimikrobisten yhdisteiden lääketieteelliseen käyttöön (Ördog ym., 2004; Watanabe, 2013; Russo ym., 2017; Pierre ym., 2011; Mashhadinejad ym., 2016; Koizumi ym., 1993; Eom ym., 2008), ja kosmetiikkaan ja kosmeettisiin ominaisuuksiin liittyvä tutkimus voi jäädä verrattain suppeaksi. Kosmetiikka-alalla levien antimikrobisten ominaisuuksien käyttö voisi olla mielekästä ja mahdollista, koska säätely ei ole yhtä tiukkaa kuin elintarvike- ja lääketieteellisyydessä, ja myös levästä saatava hinta voidaan saada taloudellisesti kannattavaksi tuottajan kannalta. (Barsanti & Guaaltieri, 2018). Toisaalta levien sisältämien ainesosien, kuten antioksidanttien, toisinaan huomattavankin korkeiden pitoisuuksien vuoksi levien käyttö kosmetiikassa tulee optimoida oikealle tasolle, jotta liian korkeilta vaikuttavien aineiden pitoisuuksilta vältytään.

Levien kasvattamisessa tulee huomioida niiden kasvatusolosuhteet sekä kasvuaika ja sen vaikutus levän eri yhdisteiden muodostumiseen. Kokeeseen kultivoitujen levien (pimeässä kasvatetun sekä valossa kasvatetun) toimimattomuus voi mahdollisesti johtua biomassan koostumuksesta siinä kasvun vaiheessa, kun levämassa kerättiin. Myös rasvahappojen prosentuaalisella osuudella leväuutteen kokonaismassasta voi olla vaikutusta sen antimikrobisiin vaikutuksiin. Uutteiden rasvahappokoostumus sekä -pitoisuus

voi mahdollisesti selittää osaltaan pimeä- ja valouutteiden toimimattomuutta. Rasvahappoanalyysin perusteella voidaan todeta kokeeseen kasvatettujen (pimeä ja valo) ja etanolilla uutettujen *E. gracilis*-uutteiden sisältäneen suppeammin erilaisia rasvahappoja kuin SFE-uutolla valmistetun *E. gracilis*-leväuutteen. Toisaalta pimeä- ja valokasvatuslevien rasvahappokoostumukset eroavat toisistaan melko suuresti, eikä kummallakaan ollut vaikutusta mikrobien inhibitioon. Valokasvatuslevässä PUFA-yhdisteitä löytyi enemmän kuin muissa testatuissa uutteissa, toisaalta rasvojen kokonaisuus uutteesta oli selkeästi pienempi kuin SFE-uutteessa. SFE-uutolla tuotettu leväuute saatiin valmiina, eikä sen kasvun vaihetta tiedetä, kuten ei myöskään kokeeseen tuotettujen uutteiden, koska kasvua ja sen vaiheita ei erikseen tässä tutkimuksessa seurattu. Tämän perusteella on vaikea päätellä, johtuiko koeuutteiden toimimattomuus rasvahappokoostumuksesta vai kasvuvaiheesta.

Jos antimikrobisuutta aiheuttava yhdiste olisi jokin rasvahappo, voisi aiheen tutkimista jatkaa keskittymällä levän kasvatuksessa optimoimaan PUFA-yhdisteiden tuotantoa, samoin kuin solujen rasvahappojen korkean pitoisuuden tuotannon. Samoin paramylonin antimikrobisuuden tutkimisessa tulisi jatkossa varmistaa uutteen liukeneminen kasvatusmaljalle käyttämällä esimerkiksi erilaista testausmenetelmää.

Verrattuna muihin antimikrobisuusominaisuuksiltaan tutkittuihin levälajeihin, *E. gracilis* on useita eri kasvatusolosuhteita sietävä makean veden mikrolevälaji ja sen on todettu olevan verrattain helppo kultivoida erilaisissa kasvatussysteemeissä (Wang ym., 2018; Gissibl ym., 2019). Tämä tuo edun lajin käyttämiseen kosmetiikan antimikrobisten ainesosien raaka-aineena. Kun levä tuotetaan valvotuissa olosuhteissa kasvatusreaktoreissa, pystytään varmistamaan biomassan saatavuus sekä laatu. Myöskään luonnontilaiset ekosysteemit eivät kärsi levien keräämisestä, kun teollisuuteen vaadittavat levät kasvatetaan valvotuissa kasvatussysteemeissä. Jos tämän lisäksi kasvatusta pystytään toteuttamaan hyödyntäen esimerkiksi teollisuuden sivuvirtoja kasvatusalustana tai osana sitä, saadaan levien kasvatuksesta kosmetiikkaan tehtyä myös kiertotalousajattelun ja kestävän kehityksen näkökulmasta järkevää.

## LÄHTEET

Algenist, (n.d.), GENIUS Liquid Collagen™. Haettu 10.10.2019 osoitteesta <https://www.algenist.com/collections/serums-oils/products/genius-liquid-collagen>

Barsanti, L., Vismara, R., Passarelli, V. & Guaaltieri, P. (2001). Paramylon ( $\beta$ -1,3-glucan) content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. Effects of growth conditions. *Journal of Applied Phycology*, 13(1), ss. 59-65. Haettu 6.8.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.1023/A:1008105416065>

Barsanti, L. & Guaaltieri, P. (2018). Is exploitation of microalgae economically and energetically sustainable? *Algal Research*, 31, ss. 107-115. Haettu 6.8.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.001>

Becker, E. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 25(2), ss. 207-210. Haettu 10.10.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>

Bleakley, S. & Hayes, M. (2017). Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production. *Foods*, 6(5), s. 33. Haettu 22.09.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.3390/foods6050033>

Bom, S., Jorge, J., Ribeiro, H. M. & Marto, J. (2019). A step forward on sustainability in the cosmetics industry: A review. *Journal of Cleaner Production*, 225, ss. 270-290. Haettu 22.9.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.03.255>

Campbell, N. A., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., Reece, J. B. & Urry, L. A. (2018). *Biology: A global approach (Global edition. Eleventh edition.)*. New York, NY: Pearson. ISBN 978-1-292-17043-5

CEW (Cosmetic executive women inc.) (2019). The Buzz Behind Skin Care's Latest Trend, Microbiomes, päivitetty 25.03.2019. Haettu 10.10.2019 osoitteesta [https://www.cew.org/beauty\\_news/the-buzz-behind-skin-cares-latest-trend-microbiomes/](https://www.cew.org/beauty_news/the-buzz-behind-skin-cares-latest-trend-microbiomes/)

Chiheb, I., Riadi, H., Martinez-Lopez, J., Dominguez, F., Gomez, V., Bouziane, H. & Kadiri, M. (2009). Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco. *African Journal of Biotechnology*, 8(7), ss. 1258-1262. Haettu 6.8.2019

Chojnacka, K., Michalak, I., Schroeder, G. & Wieczorek, P. (2018). Algae biomass: Characteristics and applications: towards algae-based products. *Cham: Springer*. s. 89. Haettu 6.8.2019

del Val, A., Platas, G., Basilio, A., Cabello, A., Gorrochategui, J., Suay, I., Vicente, F., Portillo, E., Río, M., Reina, G. & Peláez, F. (2001). Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *International Microbiology*, 4(1), ss. 35-40. Haettu 6.8.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.1007/s101230100006>

Drouin, G., Rioux, V. & Legrand, P. (2019). The n-3 docosapentaenoic acid (DPA): A new player in the n-3 long chain polyunsaturated fatty acid family. *Biochimie*, 159, ss. 36-48. Haettu 22.09.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.01.022>

Desbois, A., Means-Spargg, A. & Smith, V. (2009). A Fatty Acid from the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* is Antibacterial Against Diverse Bacteria Including Multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Marine Biotechnology*, 11(1), ss. 45-52. Haettu 22.09.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.1007/s10126-008-9118-5>

El-Baroty, G., Ibrahim, A. & El Baz, F. (2014). Cytotoxicity, Antioxidants and Antimicrobial Activities of Lipids Extracted from Some Marine Algae. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 5(7), s. 1. Haettu 6.8.2019 osoitteesta <https://www.longdom.org/abstract/cytotoxicity-antioxidants-and-antimicrobial-activities-of-lipids-extracted-from-some-marine-algae-28680.html>

Eom, S., Kang, M. & Kim, Y. (2008). Antibacterial Activity of the Phaeophyta *Ecklonia stolonifera* on Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of the Fisheries Science and Technology*, 11(1), ss. 1-6. Haettu 15.09.2019 osoitteesta <https://doi:10.5657/fas.2008.11.1.001>

Euglena Co Ltd. n.d., Product/Service Euglena Beautycare. Haettu 10.10.2019 osoitteesta <https://www.euglena.jp/product/#beautycore>

Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1223/2009 kosmeettisista valmisteista, luku III, 11 artikla, kohta d. Haettu 10.10.2019 osoitteesta <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FI/TXT/PDF/?uri=CELEX:02009R1223-20180801&from=EN>

European Commission (2012) Innovating for Sustainable Growth, A Bioeconomy for Europe, Luxembourg: Publications Office of the European Union. Haettu 15.09.2019 osoitteesta <https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/1f0d8515-8dc0-4435-ba53-9570e47dbd51>



Fitzgerald, C., Gallagher, E., Tasdemir, D. & Hayes, M. (2011). Heart Health Peptides from Macroalgae and Their Potential Use in Functional Foods. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 59(13), ss. 6829-6836. Haettu 13.10.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.1021/jf201114d>

Gissibl, A., Sun, A., Care, A., Nevalainen, H. & Sunna, A. (2019). Bioproducts From: *Euglena gracilis* Synthesis and Applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, s. 108. Haettu 10.09.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00108>

Globe Newswire (2019). Cosmetic Skin Care Market Size to Reach US\$ 205 Bn by 2026, päivitetty 15.05.2019. Haettu 10.10.2019 osoitteesta <https://www.globenewswire.com/news-release/2019/05/15/1825405/0/en/Cosmetic-Skin-Care-Market-Size-to-Reach-US-205-Bn-by-2026.html>

Goecke, F., Labes, A., Wiese, J. & Imhoff, J. (2012). Dual effect of macroalgal extracts on growth of bacteria in Western Baltic Sea. *Revista de biología marina y oceanografía*, 47(1), ss. 75-86. Haettu 07.09.2019 osoitteesta [https://www.researchgate.net/publication/232701299\\_Dual\\_effect\\_of\\_macroalgal\\_extract\\_s\\_on\\_growth\\_of\\_bacteria\\_in\\_Western\\_Baltic\\_Sea](https://www.researchgate.net/publication/232701299_Dual_effect_of_macroalgal_extract_s_on_growth_of_bacteria_in_Western_Baltic_Sea)

Goering, R. V., Dockrell, H. M., Zuckerman, M., & Chiodini, P. L. (2018). Mims' Medical Microbiology E-Book (Vol. Sixth edition). Elsevier. Haettu 10.09.2019

Grand View Research (2019). Natural Cosmetics Market Worth \$48.04 Billion by 2025 | CAGR 5.01%. Haettu 10.10.2019 osoitteesta <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-natural-cosmetics-market>

Grimm, P. (2015). Applicability of *Euglena gracilis* for biorefineries demonstrated by the production of  $\alpha$ -tocopherol and paramylon followed by anaerobic digestion. *Journal of Biotechnology*, 215, ss. 72-79. Haettu 10.10.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.04.004>

Hama, S., Takahashi, K., Inai, Y., Shiota, K., Sakamoto, R., Yamada, A., Tsuchiya, H., Kanamura, K., Yamashita, E. & Kogure, K. (2012). Protective Effects of Topical Application of a Poorly Soluble Antioxidant Astaxanthin Liposomal Formulation on Ultraviolet-Induced Skin Damage. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(8), ss. 2909-2916. Haettu 14.09.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.1002/jps.23216>

Hudzicki, J. (2009) Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol, *American Society of Microbiology*, viitaten Bauer, A. W., W. M. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 36:493-496. Haettu 14.09.2019

osoitteesta <https://www.asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf>

Kim, S., Fabrowska, J., Boguslaw, L., Schroeder, G., Messyasz., B. & Pikosz, M. (2015). *Marine algae extracts: Processes, products, and applications*. ss. 681, 684 Haettu 6.8.2019

Kiss, J., Vasconcelos, A., & Triemer, R. (1987). Structure of the Euglenoid Storage Carbohydrate, Paramylon. *American Journal of Botany*, 74(6), ss. 877-882. Haettu 07.09.2019 osoitteesta <http://www.jstor.org/stable/2443868>

Koizumi, N., Sakagami, H., Utsumi, A., Fujinaga, S., Takeda, M., Asano, K., Sugawara, I., Ichikawa, S., Kondo, H., Mori, S., Miyatake, K., Nakano, Y., Nakashima, H., Murakami, T., Miyano, T. & Yamamoto, N. (1993). Anti-HIV (human immunodeficiency virus) activity of sulfated paramylon. *Antiviral Research*, 21(1), ss. 1-14. Haettu 13.09.2019 osoitteesta [https://doi.org/10.1016/0166-3542\(93\)90063-O](https://doi.org/10.1016/0166-3542(93)90063-O)

Kottuparambil, S., Thankamony, R. & Agusti, S. (2019). Euglena as a potential natural source of value-added metabolites. A review. *Algal Research*, 37, ss. 154-159. Haettu 14.09.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.11.024>

Lam, M. K. & Lee, K. T. (2012). Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances*, 30(3), ss. 673-690. Haettu 08.10.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.11.008>

L'oreal Paris (n.d.). How to Use Our Clay Mask Formulated with Red Algae Extract. Haettu 10.10.2019 osoitteesta <https://www.lorealparisusa.com/beauty-magazine/skin-care/skin-care-essentials/red-algae-face-mask.aspx>

Lunkka-Hytönen, M., Lohtander-Buckbee, K. & Ruohonen-Lehto, M. (2013). Biotekniikan neuvottelukunta, Biotekniikan mahdollisuuksia ja sovelluksia – tapaustutkimus levistä, Helsinki. Haettu 14.09.2019 osoitteesta [http://www.btnk.fi/files/pdf/Julkaisu/BTNK\\_levaselvitys.pdf](http://www.btnk.fi/files/pdf/Julkaisu/BTNK_levaselvitys.pdf)

Mata, T., Martins, A. & Caetano, N. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), ss. 217-232. Haettu 14.09.2019 doi:10.1016/j.rser.2009.07.020  
Mahapatra, D., Chanakya, H. & Ramachandra, T. (2013). Euglena sp. as a suitable source of lipids for potential use as biofuel and sustainable wastewater treatment. *Journal of Applied Phycology*, 25(3), ss. 855-865. Haettu 19.09.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9979-5>

Mashhadinejad, A., Hojjatolah, Z. & Jannat, S. (2016). Effect of growth conditions and extraction solvents on enhancement of antimicrobial activity of the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Pharmaceutical and Biomedical Research*, 2(4), ss. 65-73. Haettu 14.09.2019 osoitteesta [https://www.researchgate.net/publication/317713410\\_Effect\\_of\\_growth\\_conditions\\_and\\_extraction\\_solvents\\_on\\_enhancement\\_of\\_antimicrobial\\_activity\\_of\\_the\\_microalgae\\_Chlorella\\_vulgaris](https://www.researchgate.net/publication/317713410_Effect_of_growth_conditions_and_extraction_solvents_on_enhancement_of_antimicrobial_activity_of_the_microalgae_Chlorella_vulgaris)

McGinn, P. (2011). Integration of microalgae cultivation with industrial waste remediation for biofuel and bioenergy production: Opportunities and limitations. *Photosynthesis Research*, 109(1-3), ss. 231-247. Haettu 14.09.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.1007/s11120-011-9638-0>

McKeon, R. (2019). The Organic Cosmetics Market Is Growing – Naturally, *The Beauty Business Journal*, päivitetty 30.05.2019. Haettu 10.10.2019 osoitteesta <https://beautybusinessjournal.com/the-organic-cosmetics-market-is-growing-naturally/>

Nivea (n.d.) Ocean Algae. Haettu 10.10.2019 osoitteesta <https://www.nivea.com.au/advice/ingredients/ocean-algae>

Okatsu, A. (2018). Jet biofuel mass production begin in Japan, *Nikkei Asian Review*, päivitetty 02.11.2018. Haettu 10.10.2019 osoitteesta <https://asia.nikkei.com/Business/Companies/Jet-biofuel-mass-production-to-begin-in-Japan>

Pierre, G., Sopena, V., Juin, C., Mastouri, A., Graber, N. & Maugard, T. (2011). Antibacterial activity of a sulfated galactan extracted from the marine alga *Chaetomorpha aerea* against *Staphylococcus aureus*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 16(5), ss. 937-945. Haettu 13.09.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.1007/s12257-011-0224-2>

Reller, B., Weinstein, M., Jorgensen, J. & Ferraro, M. (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 49, Issue 11, ss. 1749–1755. Haettu 14.09.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.1086/647952>

Reuters (2018). Global Cosmetics Products Market expected to reach USD 805.61 billion by 2023 – Industry Size & Share Analysis, Reuters Editorial News, päivitetty 13.03.2018. Haettu 10.10.2019 osoitteesta <https://www.reuters.com/brandfeatures/venture-capital/article?id=30351>

Roy S., Egeland, E. S., Johnsen, G. & Llewellyn, C. (2011) Phytoplankton Pigments : Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography. *Cambridge: Cambridge University Press*. Haettu 26.11.2019

Russo, R., Barsanti, L., Evangelista, V., Frassanito, A., Longo, V., Pucci, L., Penno, G. & Gualtieri, P. (2017). *Euglena gracilis* paramylon activates human

lymphocytes by upregulating pro-inflammatory factors. *Food Science & Nutrition*, 5(2), ss. 205-214. Haettu 13.09.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.1002/fsn3.383>

Sanford, J. A. (2013). Functions of the skin microbiota in health and disease. *Seminars in Immunology*, 25(5), ss. 370-377. Haettu 19.09.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.09.005>

Seed to Skin (n.d.), The Awakening Detoxifying Algae Marine Salt Scrub. Haettu 10.10.2019 osoitteesta <https://seedtoskin.com/the-awakening-salt-body-exfoliator/?v=f0aa03aaca95>

Singh, J. & Gu, S. (2010). Commercialization potential of microalgae for bio-fuels production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(9), ss. 2596-2610. Haettu 13.09.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.06.014>

Sugiyama, A., Hata, S., Suzuki, K., Yoshida, E., Nakano, R. & Mitra, S. (2010). Oral administration of paramylon, a  $\beta$ -1,3-D-glucan isolated from *Euglena gracilis* Z inhibits development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *J. Vet. Med. Sci.* 72, ss. 755–763. Haettu 09.09.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.1292/jvms.09-0526>

Tani, Y. & Tsumura, H. (1989) Screening for Tocopherol-producing Microorganisms and  $\alpha$ -Tocopherol Production by *Euglena gracilis* Z, *Agricultural and Biological Chemistry*, 53:2, s. 305-312. Haettu 09.09.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.1080/00021369.1989.10869324>

The Editors of Encyclopaedia Britannica, 05.02.2016, Antimicrobial agent, *Encyclopaedia Britannica, inc.* Haettu 10.10.2019 osoitteesta <https://www.britannica.com/science/antimicrobial-agent>

Tominaga, K., Hongo, N., Karato, M. & Yamashita, E. (2012). Cosmetic benefits of astaxanthin on humans subjects. *Acta biochimica Polonica*, 59(1), s. 43. Haettu 14.09.2019 osoitteesta [http://www.actabp.pl/pdf/1\\_2012/43.pdf](http://www.actabp.pl/pdf/1_2012/43.pdf)

Tossavainen, M. (2018). *Microalgae: Platform for conversion of waste to high value products*. Väitöskirja. University of Helsinki. Haettu 10.10.2019 osoitteesta <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/243959/Microalg.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

Tucci, S., Vacula, R., Krajcovic, J., Proksch, P. & Martin, W. (2010). Variability of Wax Ester Fermentation in Natural and Bleached *Euglena gracilis* Strains in Response to Oxygen and the Elongase Inhibitor Flufenacet. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57(1), ss. 63-69. Haettu 15.09.2019 doi:10.1111/j.1550-7408.2009.00452.x

Työ- ja elinkeinoministeriö (2014), *Kestävää kasvua biotaloudesta: Suomen Biotalousstrategia*, Edita Prima Oy. Haettu 10.09.2019 osoitteesta [https://www.biotalous.fi/wp-content/uploads/2015/01/Suomen\\_biotalousstrategia\\_2014.pdf](https://www.biotalous.fi/wp-content/uploads/2015/01/Suomen_biotalousstrategia_2014.pdf)

Verdy, C., Branka. J.-E. & Mekideche, N. (2011). Quantitative assessment of lactate and progerin production in normal human cutaneous cells during normal ageing: Effect of an *Alaria esculenta* extract. *International Journal of Cosmetic Science*, 33(5), ss. 462-466. Haettu 13.09.2019 osoitteesta [https://www.researchgate.net/publication/51091505\\_Quantitative\\_assessment\\_of\\_lactate\\_and\\_progerin\\_production\\_in\\_normal\\_human\\_cutaneous\\_cells\\_during\\_normal\\_ageing\\_Effect\\_of\\_an\\_Alaria\\_esculenta\\_extract](https://www.researchgate.net/publication/51091505_Quantitative_assessment_of_lactate_and_progerin_production_in_normal_human_cutaneous_cells_during_normal_ageing_Effect_of_an_Alaria_esculenta_extract)

Wang, H-M., Chen, C-C., Huynh, P. & Chang, J-S. (2015) Exploring the potential of using algae in cosmetics, *Bioresource Technology*, Volume 184, s. 355-362. Haettu 13.09.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.001>

Wang, Y., Seppänen-Laakso, T., Rischer, H. & Wiebe, M. (2018) *Euglena gracilis* growth and cell composition under different temperature, light and trophic conditions, *PLoS ONE*, 13(4): e0195329. Haettu 12.09.2019 osoitteesta <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195329>

Watanabe, T. (2013). Antitumor activity of the  $\beta$ -glucan paramylon from *Euglena* against preneoplastic colonic aberrant crypt foci in mice. *Food & function*, 4(11), ss. 1685-1690. Haettu 12.09.2019 doi: 10.1039/c3fo60256g.

Whitmore, F. (1951). *Organic Chemistry, Volume 2 (2nd Edition) - 9.1 Monohydric Phenols*. s. 664. Dover Publications. Haettu 26.11.2019 osoitteesta <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00C8URZ7/organic-chemistry-volume/monohydric-phenols>

Ördög, V., Stirk. W., Lenobel, R., Bancířová, M., Strnad, M., van Staden, J., Sziget, J. & Németh, L. (2004). Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. *Journal of Applied Phycology*, 16(4), ss. 309-314. Haettu 10.10.2019 osoitteesta <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FB%3AJAPH.0000047789.34883.aa.pdf>

## Hutner-kasvatusliuos

aine	pitoisuus g/l
$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$	0,2
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,4
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,0
$\text{MgSO}_4 * 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5
$\text{CaCl}_2$	0,2
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,0144
vit B <sub>1</sub>	0,0025
vit B <sub>12</sub>	0,00002
Glukoosi	5,0
<b>Trace elements solution (in g 100 ml dH<sub>2</sub>O)</b>	<b>1 ml/l</b>
$\text{ZnSO}_4 * 7 \text{H}_2\text{O}$	4,4
$\text{MnSO}_4 \text{H}_2\text{O}$	1,16
$\text{NaMoO}_4 * 2 \text{H}_2\text{O}$	0,3
$\text{CuSO}_4 * 5 \text{H}_2\text{O}$	0,32
$\text{CoCl}_2 * 6 \text{H}_2\text{O}$	0,28
<b>Fe-solution (in g 100 ml dH<sub>2</sub>O)</b>	<b>1 ml/l</b>
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{Fe}(\text{SO}_4)_2 * 6 \text{H}_2\text{O}$	1,14
EDTA	1,0