



Tuomo Isopahkala

Mikrolevien kasvattaminen

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja kemiantekniikka

Insinöörityö

5.5.2021

Tekijä:	Tuomo Isopahkala
Otsikko:	Mikrolevien kasvattaminen
Sivumäärä:	28 sivua + 2 liitettä
Aika:	5.5.2021
Tutkinto:	Insinööri (AMK)
Tutkinto-ohjelma:	Bio- ja kemiantekniikka
Ammatillinen pääaine:	Bio- ja elintarviketekniikka
Ohjaaja:	Lehtori Carola Fortelius-Sarén

Opinnäytetyön tilaajana oli Metropolia Ammattikorkeakoulu. Aiheeksi valikoitui yhden silmälevän (*Euglena gracilis*) ja kahden viherlevän (*Auxenochlorella protothecoides* ja *Haematococcus pluvialis*) kasvattaminen, jotka Metropolia Ammattikorkeakoulun mikrobiologian laboratoriosta jo löytyivät. Tarkoituksena oli suorittaa biotekniikan laboratorioon hankitun fotobioreaktorin käyttöönotto ja koeajot edellä mainituilla mikrolevillä, mutta vallitseva pandemiatilanne ei antanut myöden opinnäytetyön aikataulun puitteissa. Työ on tehty Metropolian Myyrmäen kampuksella bioprosessilaboratoriossa, mikrolevien viljelylle varatussa tilassa.

Työn aikana tutustuttiin mikroleviin ja niiden viljelyyn liittyviin asioihin pääsääntöisesti käytössä olleiden lajien kautta ja teoriaosiossa pyrittiin tuomaan kirjallisuudesta esille aihealueita, joita nähtiin tärkeäksi työn suorittamisen kannalta. Koska alkupeäinen ajatus oli tuottaa aineistoa fotobioreaktorin tuleville käyttäjille, tässä työssä on keskitytty antamaan kuvaa mikrolevistä ja niiden viljelystä yleisellä tasolla. Suomenkielistä kirjallisuutta on hyvin vähän aiheesta saatavilla, joten koettiin tärkeäksi tuoda vaikeaselkoisia asioita helpommin lähestyttäviksi. On tärkeää ymmärtää periaatteissaan levien erilaiset kasvutavat, sillä ne vaikuttavat radikaalisti muodostuviin ainesosiin.

Työssä viljeltiin kolmea leväkantaa, ja tarkoituksena saada tuotettua kaikista resursseja tulevia kokeita varten. Työ oli siinä mielessä onnistunut, että kaikki lajit saatiin kasvamaan niille sopivissa ravinneliuoksissa.

Avainsanat

Euglena gracilis, *Auxenochlorella protothecoides*, *Haematococcus pluvialis*, mikrolevien viljely

Author: Tuomo Isopahkala
Title: Microalgae cultivation
Number of Pages: 28 pages + 2 appendices
Date: 5 May 2021

Degree: Bachelor of engineering
Degree Programme: Biotechnology and Chemical Engineering
Professional Major: Biotechnology and Food Engineering
Instructor: Carola Fortelius-Sarén, Head of Biotechnology and Food Engineering Department

This thesis was commissioned by Metropolia University of Applied Sciences. The topic of the thesis was the cultivation of one Euglenid algae (*Euglena gracilis*) and two green algae (*Auxenochlorella protothecoides* and *Haematococcus pluvialis*), which were already found in the Metropolia UAS laboratory of microbiology. The intention was to carry out the commissioning and test runs of the photobioreactor acquired for the laboratory of biotechnology with the above-mentioned microalgae, but the prevailing situation did not yield within the framework of the thesis schedule. The work has been done on Metropolia's Myyrmäki campus in a bio-process laboratory, in a space reserved for the cultivation of microalgae.

During the work was looked onto the cultivation and specifics of microalgae mainly through the strains used in the work. In the theory part was focused on bringing up the most important matters related completing the work. Since the original idea was to produce material for future users of the photobioreactor, this work has focused on giving a picture of microalgae and their cultivation in general. There is very little literature available in Finnish on the subject, so it was important to make difficult-to-understand things easier to approach. It is important to understand in their main principles the different growth methods of algae, as they radically affect the ingredients produced.

Three algal strains were cultivated in the work, with the aim of producing resources from all of them for future experiments. The work was successful in the sense that all species were made to grow in nutrient solutions suitable for them.

Keywords *Euglena gracilis*, *Auxenochlorella protothecoides*, *Haematococcus pluvialis*, cultivation of microalgae

Sisällys

1	Johdanto	1
2	Yleistä mikroleivistä	1
3	Mikrolevien solubiologia ja aineenvaihdunta	2
4	Mikrolevien viljely	5
4.1	Mikrolevien kasvatuksesta	5
4.2	Kuvia erilaisista kasvatusmetodeista ja -laitteista	7
5	Mikrolevien käyttösovellukset	13
5.1	Superfood	13
5.2	Muita mikrolevien käyttösovelluksia	14
6	Työssä kasvatettujen levälajien ominaisuuksia	15
6.1	<i>Euglena gracilis</i>	15
6.2	<i>Haematococcus pluvialis</i>	16
6.3	<i>Auxenochlorella protothecoides</i>	17
7	Materiaalit ja menetelmät	19
7.1	Materiaalit	19
7.2	Viljelyt	19
7.2.1	Valmistelut	19
7.2.2	Koe 1, EG- ja JM-ravinneliuoksien valmistus ja viljelyn aloitus	20
7.2.3	Koe 2, hiilidioksidin lisääminen JM-ravinneliuoksissa oleviin viljelmiin	21
7.2.4	Koe 3, NPK-liuoksen valmistaminen ja viljelyn aloitus	22
7.2.5	Koe 4, EG:JM-ravinneliuoksen valmistaminen ja viljelyn aloitus	23
7.2.6	Koe 5, koeputkissa olevien mikrolevänäytteiden kuormittaminen	23
8	Tulokset ja tulosten tarkastelu	24
8.1	Koe 1, EG- ja JM-ravinneliuoksien valmistus ja viljelyn aloitus	24
8.2	Koe 2, hiilidioksidin lisääminen JM-ravinneliuoksissa oleviin viljelmiin	25
8.3	Koe 3, NPK-liuoksen valmistaminen ja viljelyn aloitus	25
8.4	Koe 4, EG:JM-ravinneliuoksen valmistaminen ja viljelyn aloitus	25

8.5	Koe 5, koeputkissa olevien mikrolevänyytteiden kuormittaminen	27
9	Yhteenveto	27
	Lähteet	29

Liitteet

Liite 1. Levälajien tiedot ja kasvatusohjeet.

Liite 2. NPK-ravinneliuoksen resepti

Lyhenteet

- ALA: *alpha-Linolenic acid* eli alfa-linoleenihappo. 9,12,15-oktadekatrieenihappo.
- ARA: *Arachidonic acid* eli arakidonihappo. Omega-6-rasvahappo.
- ATP: *Adenosine triphosphate* eli adenosiinitrifosfaatti.
- DHA: *Docosahexaenoic acid* eli dokosaheksaeenihappo. Omega-3-rasvahappo.
- DNA: *Deoxyribonucleic acid* eli deoksiribonukleiinihappo.
- EG: *Euglena gracilis Medium*. *E. gracilis* -levän kasvattamiseen tarkoitettu ravinneliuos.
- EPA: *Eicosapentaenoic acid* eli eikosapentaeenihappo. Omega-3-rasvahappo.
- JM: *Jaworski's Medium*. Ravinneliuos makeanveden mikrolevien kasvatusta varten.
- NFI: *Novel Food Ingredient* eli uuselintarvike.
- NPK: *Nitrogen-Phosphorous-Kalium*. Ravinneliuos, joka sisältää typpeä, fosforia ja kaliumia.
- PBR: *Photobioreactor* eli fotobioreaktori.
- PUFA: *Polyunsaturated fatty acid* eli monitydyttämätön rasvahappo.

1 Johdanto

Työ tehtiin Metropolia ammattikorkeakoulun toimeksiannosta Myyrmäen kampuksella bioprosessitekniikan laboratoriossa. Työn tarkoituksena oli kasvattaa mikroleviä myöhempää käyttöä varten, sekä selvittää mikroleväviljelyn pääperiaatteita tulevia projekteja varten.

2 Yleistä mikrolevistä

Mikrolevät ovat muutamasta mikrometristä muutamiin satoihin mikrometreihin kokoisia pääosin yksisoluisia organismeja, joita arvellaan olevan 200 000 - 800 000 eri lajia. Tärkeimpinä pääryhminä ovat piilevät (*Bacillariophyceae*), viherlevät (*Chlorophyceae*), kultalevät (*Chrysophyceae*) sekä syanobakteerit (*Cyanophyceae*) eli sinilevät, jotka myös luetaan mikroleviksi, vaikka ne eivät ole leviä. [1.] Vaikka yleisesti puhutaan yksisoluisista levistä, jotka helposti mielletään kasviplanktoniksi, mikroleviin kuitenkin luetaan kuuluvan prokaryootteja, eukaryootteja sekä mesokaryootteja, joita on hankala sijoittaa täysin kumpaankaan edeltävään ryhmään. Osa mikrolevistä on autotrofisia, osa heterotrofisia sekä osa miksotrofisia lajeja, jotka saavat energiansa sekä yhteyttämällä että kuluttamalla muita organismeja. [2.]

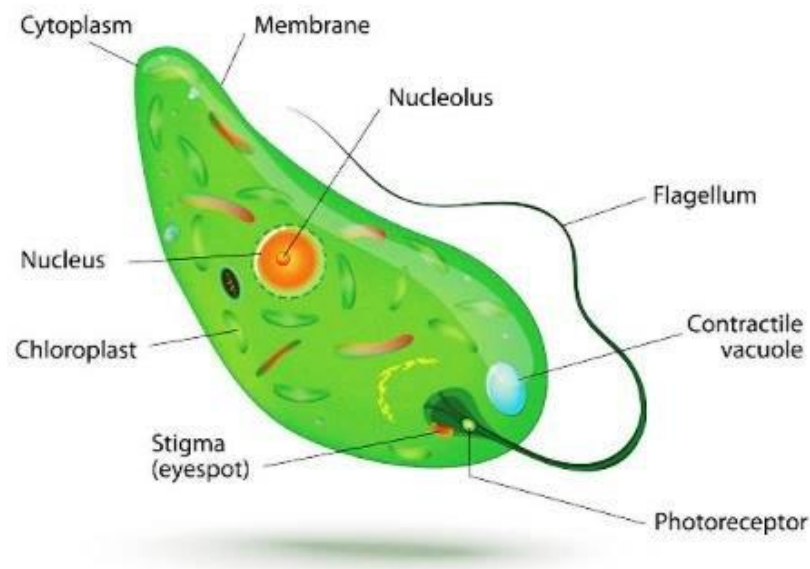
Tärkeimpien ryhmien lisäksi mikroleviä jaetaan yli kymmeneen erilaiseen ryhmään niiden rakenteen, koostumuksen, elinolosuhteiden, värin tai muiden ominaisuuksien mukaan. Niitä voi kasvaa merten lisäksi esimerkiksi järvissä, maaperässä, talojen rakenteissa, eläinten turkeissa tai jäkälien seuralaisena. Lajeja voi olla useita miljoonia. Koska mikroleviä kasvaa kovin erilaisissa ympäristöissä ja ne ovat kovin erilaisia, voidaan niitä hyödyntää monilla eri tavoilla, ja niiden sisältämille ainesosille onkin monenlaista käyttöä. [2.]

Mikrolevät voivat sisältää erilaisia vitamiineja, hivenaineita, antioksidantteja, hiilihydraatteja, rasvoja, happoja tai muita hyödyllisiä aineita, minkä vuoksi niitä tutkitaan ahkerasti. Käyttösovelluksia löytyy muun muassa ihmisten ja eläinten ravinnosta kosmetiikka- ja lääketeollisuuden tarpeeseen sekä jätevedenpuhdistuksesta aina bioenergian tuottoon.

3 Mikrolevien solubiologia ja aineenvaihdunta

Mikrolevien rakenne

Mikrolevät ovat alkueliöitä, joita esiintyy kaikenlaisissa vedellisissä ympäristöissä. Joillakin levillä voi olla juuria muistuttavia tukirankoja, mutta mikrolevillä ei ole juuria, varsia tai lehtiä (kuvassa 1 *E. graciliksella* näkyy siima, jonka avulla se voi liikkua). Leväsoluilla on kalvoon sitoutuneita soluelimiä. Suurin osa mikrolevistä on fotoautotrofisia ja sisältää viherhiukkasia. Viherhiukkaset sisältävät klorofyllimolekyylin, joka monimutkaisten biokemiallisten reaktioiden kautta käyttää hiilidioksidia ja valoenergiaa sokeriglukoosin valmistamiseen. [2.]



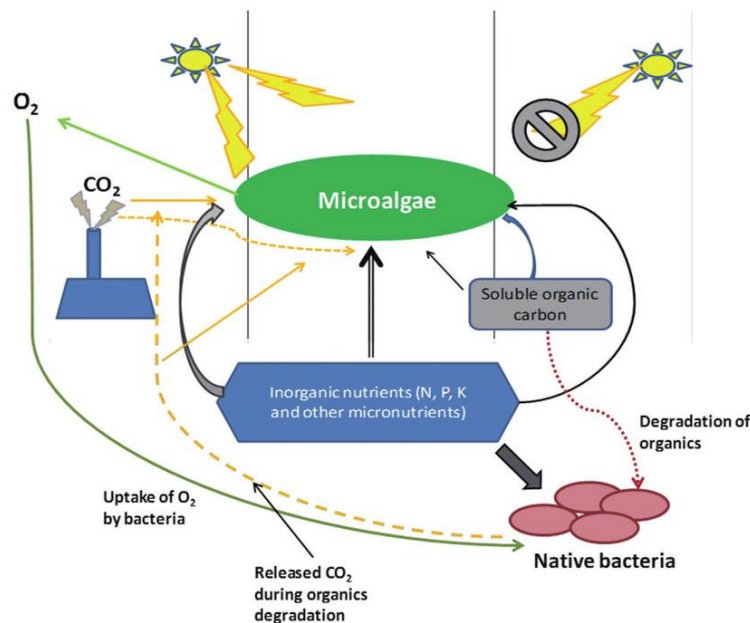
Kuva 1. *Euglena graciliks*en anatomiaa havainnollistavassa piirroksessa on nähtävissä silmäleville tyypillinen siima [3].

Jäykän polysakkarideista koostuvan soluseinän vuoksi mikrolevä pärjää yksinään. Soluseinämembraani toimii selektiivisenä esteenä ja päästää biokemiallisen koostumuksensa vuoksi tarvittavat materiaalit läpi. Mikrolevillä on myös lipidirunkoja, jotka ovat fotosynteesillä tuotetun energian varastoja. Ydin on suurin soluelin, ja jokaisella solulla on yksi ydin. Se sisältää solun geneettisen tiedon eli deoksiribonukleiinihapon (DNA), joka koordinoi monia monimutkaisia solutoimintoja. Solulimakalvosto on monimutkainen sisäkalvorakenne, jonka tehtävänä on proteiinien ja muiden tärkeiden rakennusaineiden jatkuva synteesi ja kuljetus. Ribosomit ovat pieniä soluelimiä, jotka ovat aktiivisia proteiinisynteessissä ja yleensä kiinnittyneinä solulimakalvostoon. Kaikilla solulla on Golgin laite, joka tarjoaa materiaalia solun ja soluseinämembraanin rakentamiseen. Mitokondriot ovat solun voimalaitoksia ja polttavat aineita käyttämällä happea ja tuottamalla adenosiniitriposfaattia (ATP). ATP on solun metabolinen kantaja, joka tarjoaa kemiallisen energian soluprosessin suorittamiseen. Vakuoli on suuri organelli, joka hävittää solun jätteitä ja voi viedä suuren osan solun tilavuudesta. Vakuoli myös auttaa solua pitämään muotonsa. Levillä ei ole putkimaisia rakenteita ravinteiden kuljettamiseen, kuten kasveilla, ja toisin kuin kasvit, suurin osa levistä lisääntyy aseksuaalisesti tai solunjakautumisen avulla. Koska levien ei tarvitse tuottaa monimutkaisia tuki- tai lisääntymisrakenteita, ne voivat käyttää enemmän energiaa valoenergian ja hiilidioksidin keräämiseen sekä niiden muuttamiseen biomassaksi. [2, s.15–16.]

Mikrolevien kasvuun vaikuttavia tekijöitä

Hiilenlähteiden saanti on usein tärkein tekijä mikrolevien kasvulle. Koska levät voivat kasvaa fotoautotrofisissa, heteroautotrofisissa ja miksotrofisissa muodoissa (kaavio kuvassa 2), ne voivat käyttää moninaisia hiilenlähteitä, kuten hiilidioksidia, metanolia, asetaattia, glukoosia tai muita orgaanisia komponentteja. Fotoautotrofisessa muodossa levä käyttää epäorgaanisia hiilenlähteitä kuten hiilidioksidia tai vetykarbonaattia muodostaakseen energiaa fotosynteesillä. Jotkut mikrolevät voivat käyttää valon puutteen vuoksi suoraan epäorgaanisia hiilenlähteitä, ja näitä leviä kutsutaan heterotrofisiksi. Mikrolevien yhteyttämisaste

voi olla kymmenestä viiteenkymmeneen kertaa suurempi kuin maan päällä kasvavilla kasveilla. [5, s. 226.]



Kuva 2. Vasemmalta oikealle fotoautotrofisen, miksotrofisen ja heterotrofisen kasvun periaatteet. Auringonvalon läsnäolo mahdollistaa mikrolevän yhteyttämisen. Kun auringonvaloa ei ole saatavilla, levä joutuu käyttämään toissijaisia hiilenlähteitä. [4.]

Mikrolevien rasva-aineiden muodostumista vauhdittaa usein kuormittavat kasvuolosuhteet (stressi) kuten esimerkiksi typen tai ravinteiden vähyys tai pH:n heittelyt. Näistä tekijöistä typen saannin rajoittamisen on huomattu toimivan hyvin mikrolevän tuottamien lipidien määrään. Sen säätelyllä voidaan vauhdittaa tai rajoittaa rasva-aineiden muodostumisen määrää. Typen puutteessa mikrolevän proteiinit alkavat hajota ja muuttuvat energiapitoisiksi rasva-aineiksi. Mikrolevien kasvun aikana levän ajatellaan tuottavan energiavarastokseen tärkkelystä ja että stressiympäristössä se tuottaisi lipidejä pitkäaikaisvarastoiksi.

Epäorgaanisen typen lähteinä voi olla nitraattisuolat, nitriitti ja ammoniumioni, ja orgaanisen typen lähteenä käytetään usein ureaa ja aminohappoja. Taloudellisenä ratkaisuna tuotannossa nähdään jätevesien hyödyntämistä mikrolevien kasvatuksessa. [5, s. 227.]

Valonlähteellä on suuri merkitys mikroleville. Aallonpituuksien vaihtelut ja valon voimakkuus ovat olennaisia osia levien kasvun kannalta. Suurin osa mikrolevistä käyttää fotosynteesiä ravinnonhankkimiskeinonaan. Osalla levistä voi olla juurentapaisia solurunkoa tukevia rakenteita tai lehtiä, mutta niitä ei pidetä kuitenkaan kasveina. Suurin osa levistä on autotrofisia, ja ne saavat energiansa auringonvalosta fotosynteesillä. Heterotrofiset levät käyttävät ruoakseen muita organismeja kuten bakteereita, ja miksotrofisilla levillä on käytössään molemmat ominaisuudet. Mikrolevät voivat tuottaa ja kerätä suuria määriä hiilihydraattibiomassaa niiden hyvän fotonikonversiotehokkuuden vuoksi. Toisin kuin maaperässä kasvavat kasvit, mikrolevät eivät sisällä biopolymeerejä kuten hemiseluloosaa tai ligniiniä. Mikrolevät voivat tuottaa noin 6 % kaikesta tulevasta säteilyenergiasta tuoreeksi biomassaksi. [2, s.15.]

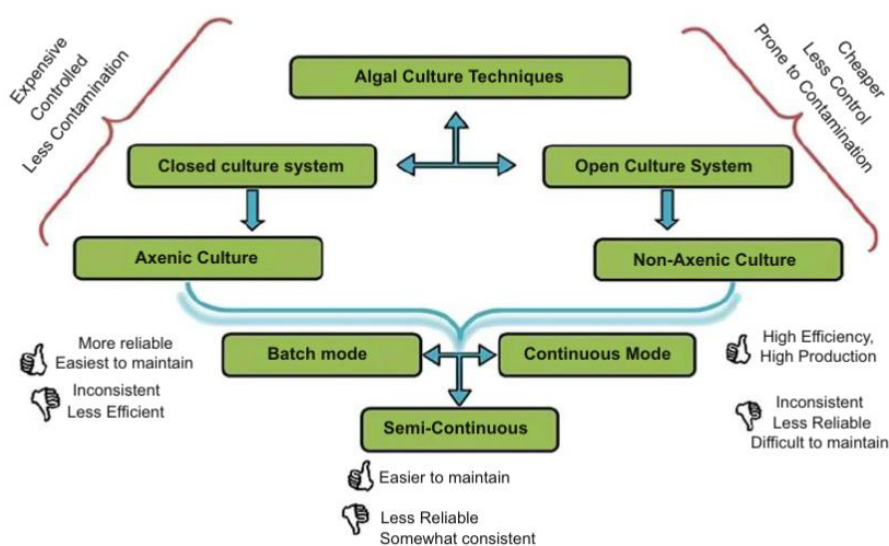
4 Mikrolevien viljely

4.1 Mikrolevien kasvatuksesta

Mikrolevien ominaisuudet ja toivottava lopputuote määräävät pitkälle kasvatusmenetelmän käyttöä. Pääpiirteenä kasvatukselle on luoda lajille luonnolliset kasvuolosuhteet laboratoriossa. Koska toivotun lopputuotteen saamiseen vaikuttavat monet tekijät kuten pH, veden suolaisuus ja lämpötila, on tunnettava lajityypilliset tarpeet, jotka voivat vaihdella hyvinkin paljon riippuen lajista. On tärkeää tietää alkuperäisen ympäristön (vesi; järvi, joki, meri jne.) koostumus hyvin, koska mikrolevät voivat elää luonnossa hyvin erilaisissa olosuhteissa. Tärkeitä tekijöitä ovat pH:n, suolaisuuden ja lämpötilan lisäksi veden happi-, hiilidioksidi- ja ravinnepitoisuus sekä vedessä elävät patogeenit ja mahdolliset kilpailijat tai kanssaeläjät. [6.]

Mikrolevien eristäminen petrimaljalla ei eroa juurikaan bakteerien kasvattamisesta. Piileville, maaperän mikroleville, pienille sinileville sekä monille muille lajeille 0,8–2-prosenttisella agarmaljalla kasvattaminen soveltuu hyvin. Eri levien vaatimukset ravinteille voivat vaihdella erittäin paljon, koska mikrolevien kirjoon mahtuu paljon fysiologialtaan poikkeavia lajeja. Kasvutarpeita voidaan toteuttaa lisäämällä mediumiin esimerkiksi tarvittavia hivenaineita, nitraatteja, fosfaatteja tai muita lajityypille tarvittavia ravinteita. pH:n säätäminen vaikuttaa olennaisesti kasvatusalustan pitämiseen puhtaana haitallisista bakteereista. Inkubointiaika voi riippuen levälajista vaihdella muutamista päivistä kuukausiin. [6.]

Mikrolevien kasvatus voidaan järjestää avoimissa tai suljetuissa systeemeissä (fotobioreaktori, PBR), joiden hyviä ja huonoja puolia on tarkasteltu kuvassa 3.



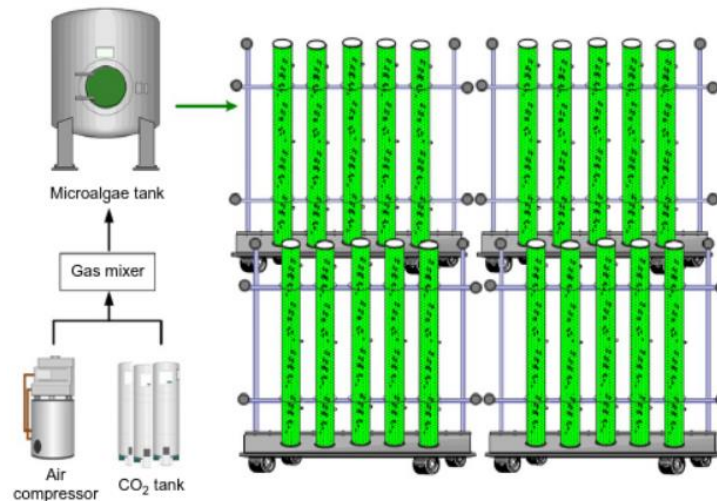
Kuva 3. Mikrolevien kasvatus suljetuissa ja avoimissa systeemeissä. Suljetun systeemin etuja ovat kontaminaation estäminen ja helppo hallittavuus, kun avoimessa systeemissä kasvaa useita organismeja yhtä aikaa. Avoimen systeemin etuja ovat suuri tuottavuus ja alhaiset käyttökustannukset verrattuna suljettuun systeemiin, jonka operointi vaatii paljon enemmän työtä ja on siten kalliimpaa. [6]

Avoimina systeemeinä voivat toimia esimerkiksi järvet, poukammat tai lammet. Avoimen systeemin hyvinä puolina ovat skaalautuvuus, järjestelmän yksinkertaisuus, suuri tuotantokapasiteetti ja pienet huolto- ja operointikulut. Sen haittapuolina voidaan pitää ainakin suurta mikrobikontaminaation riskiä bakteerien, virusten, parasiittien ja ei toivottujen levälajien muodossa, huonoa hiilidioksidin siirtyvyyttä systeemiin, vaihtelevia luonnonolosuhteita, alhaista tuottavuutta sekä kasvatettavaksi soveltuvien lajien rajoitettua määrää. Suljetussa systeemissä pystytään hyvin huolehtimaan avoimen systeemin heikkouksien minimoimisesta. Kun järjestelmä sulkee ulkopuolelle luonnonolosuhteet, systeemin tasapainoa voidaan muokata säätämällä ja annostelemalla valoa, ravinteita, hiilidioksidipitoisuutta ja muita tekijöitä, kuten kasvatusliuoksen virtausnopeutta järjestelmässä. Haittapuoliksi jää kalliit kustannukset operointikuluista ja systeemin huoltamisesta. [6.]

4.2 Kuvia erilaisista kasvatusmetodeista ja -laitteista

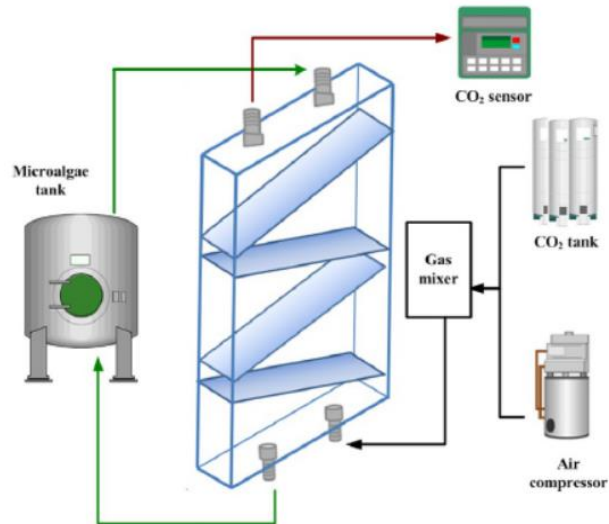
Oikeanlaisen valon saanti on avainasemassa kasvatusympäristön rakentamisessa niin laboratorio-olosuhteissa kuin suurissa avoimissa systeemeissäkin. Myös biomassan konsentraation säätely pidempikestoisissa kasvatuksissa on tärkeässä roolissa, varsinkin suuren mittakaavan viljelyissä usein suositaan semi-batch-kasvatusmetodia, jolloin mikrolevän sopivassa kasvuvaiheessa osa kasvustosta korjataan ja tilalle lisätään tuoretta ravinneliuosta. [5.]

Vertikaalisessa putkifotoreaktorissa (kuva 4) lasiset tai akryyliset putket läpäisevät valoa kasvustolle ja putkien alaosasta syötettävä hiilidioksidin ja ilman seos sekoittaa kasvustoa. Kasvuston liikkeellä pitäminen mahdollistaa soluille tasaisen valonsaannin. [5.]



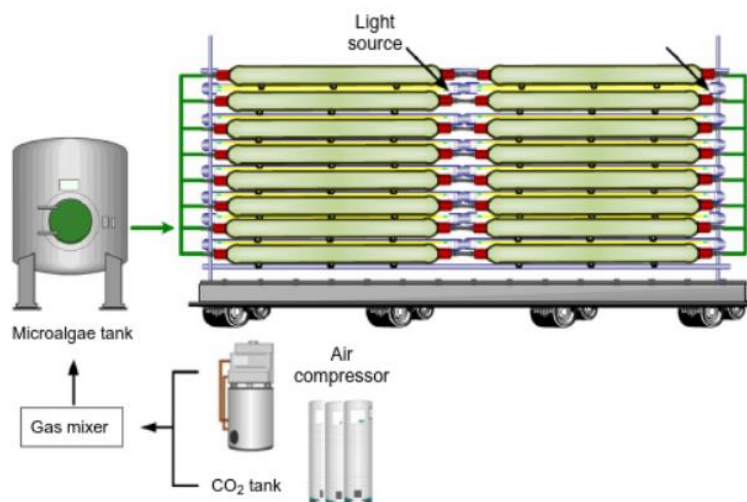
Kuva 4. Vertikaalisessa putkifotobioreaktorissa viljelyn etuja ovat sen korkea ai-neensiirto, viljelmän sekoitus ilman suuria leikkausvoimia, pieni energi-ankulutus, suuri potentiaali järjestelmän skaalautuvuuteen, steriloinnin ja temperoinnin helppous sekä soveltuvuus hyvin kasvuston immobilisoi-tiin. [5.]

Levyfotobioreaktorissa (kuva 5) kasvustoa pumpataan valoa läpäisevien levyjen kautta uudelleen reaktoriin. Matkalla viljelmä sekoittuu ikään kuin vesiputouk-sessa ja saa alaosasta syötetystä kaasusta hiilidioksidia. [5.]



Kuva 5. Levyfotobioreaktorin etuja ovat suuri valaistuspinta-ala ja valon jakautuminen, soveltuvuus ulkoilmasysteemeihin ja kasvuston immobilisointiin, hyvä biomassan tuotto, helppo puhdistettavuus ja temperoitavuus sekä vähäinen hapen kerääntyminen [5].

Horisontaaliset putkifotobioreaktorit (kuva 6) ovat paljon käytettyjä kaupallisen mittakaavan tuotannossa. Putket on yleensä tehty ohuesta läpinäkyvästä polypropeeniakryylistä tai polyvinyylidikloridista mahdollisimman hyvän valonläpäisyn saamiseksi. Ilmapumppu pyörittää viljelmää putkistossa, mikä mahdollistaa hiilidioksidin suuremman määrän vastaaviin järjestelmiin verrattuna. [5.]



Kuva 6. Horisontaalisen putkifotobioreaktorin etuja ovat suuri valaistuspinta-ala, sopivuus ulkoilmakäyttöön, hyvät biomassantuotanto-ominaisuudet sekä alhaiset kustannukset [5].

Algenol-nimisen yrityksen innovaatioissa (kuva 7) geneettisesti modifioiduista sinileivistä saadaan tuotettua suoraan tappamatta tai korjaamatta itse viljeltävää kantaa. Taipuisasta muovista tehdyissä paneeleissa on sisäänrakennettuina putket, jotka kuljettavat hiilidioksidia sisään hiilenlähteeksi ja poistavat happea ulos systeemistä. [5.]



Kuva 7. Lumian AGS4000-viljelyraitkaisussa etanoli/vesi kondensoituu fotobio-reaktorin seinille ja valuu poistoputkia pitkin talteen [5].

Solzymen heterotrofisten levien kasvatusjärjestelmässä (kuva 8) kasvatetaan mikroleviä pimeässä syöttämällä niille kasvisokereita. Koska käytettävänä sokeina voivat olla esimerkiksi sokeriruoko, puubiomassa tai muut selluloosamateriaalit, saadaan viljelyn materiaalikustannukset suhteellisen alhaisiksi. [5.]



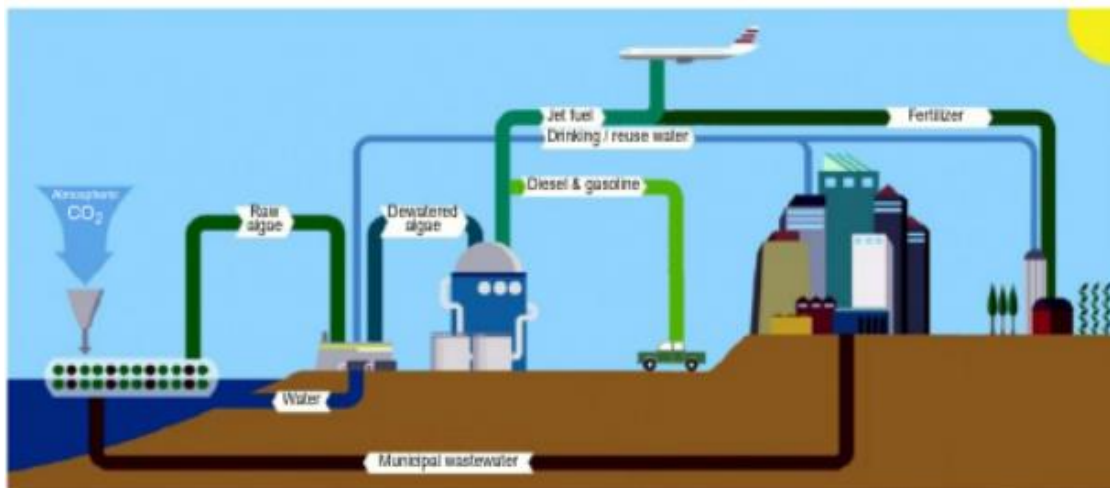
Kuva 8. Solazyme-nimisen yrityksen kasvatuslaitteella heterotrofisille leville voidaan tuottaa soluja, joiden öljypitoisuus ylittää 80% [5].

Raceway pond -kasvatusjärjestelmässä (kuva 9) kasvatetaan mikroleviä avoimissa altaissa jatkuvakasvatteisesti ainoastaan auringonvalolla ja hiilidioksidilla. Jätevedenpuhdistukseen liittyviä sovelluksia on myös kehitetty kasvavalla vauhdilla. [5.]



Kuva 9. Sapphire Energyn avoin raceway pond -kasvatusjärjestelmä [5].

Kuvassa 10 on nähtävillä jätevedenpuhdistuslaitos, jossa olennaisena osana kiertoa on biomassan kasvattaminen jätevedellä ja biomassan muuntaminen raakaöljyksi tai biohiileksi, joita käytetään uusiutuvana energiana [5].



Kuva 10. Algae Systems LCC -yrityksen mikroleväbiomassa lähtöinen yhdistetty jätevedenpuhdistus sekä pyrolyysiin perustuva raakabioöljyn tuotantolaitos [5].

5 Mikrolevien käyttösovellukset

Monet mikrolevien sisältämistä komponenteista soveltuvat samaan aikaan monen teollisuudenalan käyttöön. Esimerkiksi useat mikrolevistä saatavat pigmentit ovat tärkeitä elintarvike-, lääke ja kosmetiikkateollisuuden käytössä.

5.1 Superfood

Levien sisältämät erilaiset öljyt, tärkkelys, proteiinit, antioksidantit ja vitamiinit ovat haluttuja ainesosia terveydenhuollon kannalta. Kaupoista ja luonnontuote-liikkeistä saa jo monenlaisia jauheita ja valmisteita. Yleisimpinä muotoina niitä myydäänkin tabletteina tai kuivattuna jauheena (esim. *Spirulina*), jota voidaan sekoittaa itse esimerkiksi viherpirtelöihin tai smoothieihin. Mikrolevät sisältävät myös runsaasti omega-3 ja omega-6 rasvahappoja, jotka ovat terveellisiä.

Muita mikrolevien elintarvikesovelluksia

Helsingin yliopistolla kuten monessa muussa oppilaitoksessa Suomessa on tutkittu mikroleviä jo pidemmän aikaa. Rehuna levillä on paljon etuja niiden ravinnerikkaudesta, mutta koska asiat eivät ole aina niin yksiselitteisiä niin aihetta tutkitaan yhä enemmän. Esimerkiksi Helsingin yliopiston tutkimuksen mukaan mikroleviä voidaan käyttää lehmien valkuaisrehuna, koska sille ole fysiologisia tai biologisia esteitä. [7.]

5.2 Muita mikrolevien käyttösovelluksia

Mikroleviä voidaan käyttää jätevedenpuhdistuksessa poistamassa jätevedestä ravinteita, kuten typpeä ja fosforia. Kun maailman energiankäytöstä 2 % kuluu pelkästään typen tuotantoon, on mikrolevillä nähty olevan hyviä ominaisuuksia ravinteiden talteenoton suhteen. Nykyisellään jätevedenpuhdistusprosesseissa typpi poistetaan kaasuna ilmaan ja fosfori jää kasvien kannalta edulliseen muotoon. Mikrolevät tarjoavat biomassan muodossa hyvän mahdollisuuden palauttaa ravinteet takaisin kiertoon lannoitteena. Suomessa on käynnissä Leväsieppari-hanke, joka ympäristöministeriön rahoittamana tutkii mikrolevien käytön mahdollisuuksia jätevedenpuhdistuksessa. [8.]

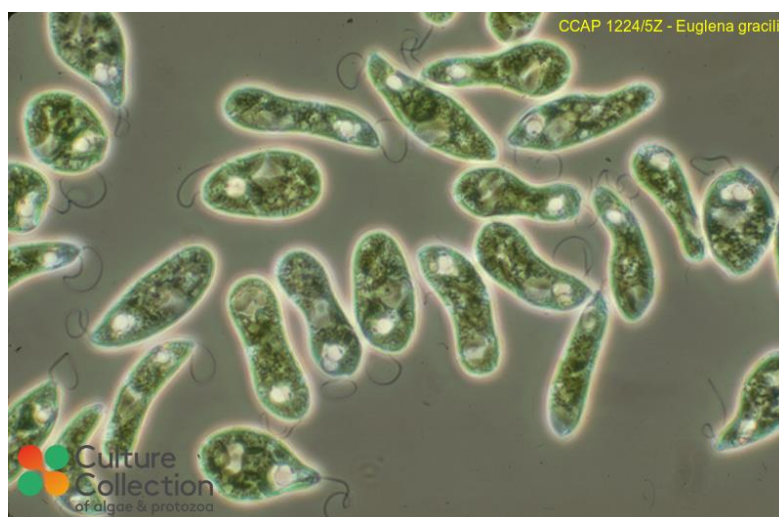
Mikrolevistä voidaan valmistaa monenlaisia polttoaineita ja kemikaaleja, kuten biobutanolia, asetonia, biodieseliä, bioetanolia ja biometaania. Monen lajien korkeat proteiini-, hiilihydraatti- ja lipidipitoisuudet tekevät mikrolevistä potentiaalisen lähteen bioöljyn tuotannolle. [2.]

Ylen artikkelissa mainittiin sarjan Prisma: Levä – tulevaisuuden raaka-aine, josta tutkijat toivovat öljyn korvaajaa -jakso, jossa sivuttiin myös mielenkiintoista lääketieteellistä sovellusta, jossa mikrolevien ominaisuuksia voitaisiin valjastaa joissakin tapauksissa sokeuden parantamiseen. [9.]

6 Työssä kasvatettujen levälajien ominaisuuksia

6.1 *Euglena gracilis*

Alla olevassa kuvassa 11 on työssä käytetty mikroleväkanta mikroskoopilla nähtynä.



Kuva 11. Mikroleväkannan keräämistiedot: 1224/5Z - Freshwater; Pringsheim (1950) [10].

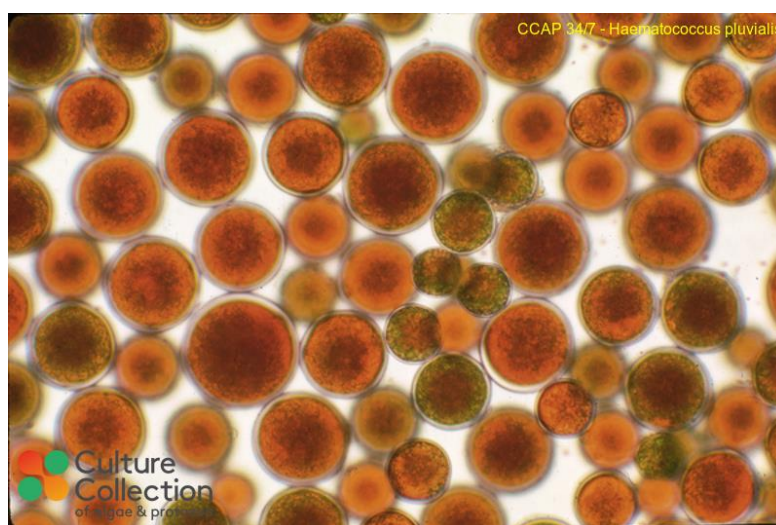
Fotosynteettinen alkueliö *E. gracilis* on silmälevä (*Euglenoidea*), joka kasvaa makeassa vedessä kuten lammissa tai järvissä. Se tuottaa proteiinia, vahaestereitä, rasvahappoja (alfalinoleenihappo), vahaestereitä ja β -1,3-glukaanin eli paramylonin. Glukoosilla kasvatettuna paramylonin (jopa 50 %) ja alfa-linoleenihappoa (5-18 mg g⁻¹) on saatu fotoautotrofisesti kasvatetuilla soluilla 23 - 30 °C:ssa. Paramylonin lisäksi solut sisälsivät laskevassa järjestyksessä proteiinia, lipofiilisiä yhdisteitä sekä rasvahappoja, joista suurin osa tyydyttymättömiä. Valon saanti on ollut tärkeää myös E-vitamiinin ja fytolin tuotannossa. Pimeässä kasvatetuissa soluissa (mikso- ja heterotrofisissa olosuhteissa) paramylonin saanti voi olla yli 80 % solun kuivapainosta. Anaerobisessa ympäristössä vahaestereistä tulee solujen päätuote. [11.]

Sen rasvahappoprofiilista yli 50 % muodostuu monityydyttymättömistä rasvapoista (PUFA) kuten ALA, ARA, EPA ja DHA. Fotosynteettisenä organismina se sisältää fytolia, joka on E-vitamiinin rakennusaine. Sen soluseinän koostuminen osittain proteiineista tekee siitä helpommin ihmisille ja eläimille metabolisoituvan, kuin polysakkaridisoluseinäiset solut. *E. gracilista* on myös yleisesti käytetty B₁₂-vitamiinin biomäärityksessä. [11.]

E. gracilis on elintarvikekelpoinen mikrolevä, ja sillä on EU:n alueella uuselintarvikelupa [12].

6.2 *Haematococcus pluvialis*

Alla olevassa kuvassa 12 on työssä käytetty mikroleväkanta mikroskoopilla nähtynä.



Kuva 12. Mikroleväkannan keräämistiedot: 34/7 - Freshwater; Ostpicken Island, Tvärminne, Finland; Droop (1953) [13].

Astaksantiinin muodostumista voidaan saada aikaan rajoittamalla *H.pluvialiksen* suotuisia kasvuolosuhteita. Esimerkiksi korkea määrä valoa, ravinteiden vähyys (erityisesti typen), korkea lämpötila, ympäristön korkea suolaisuus tai ionien kuten Fe²⁺ esiintyminen kasvuliuoksessa ovat tällaisia tekijöitä. [14.]

Euroopan unionissa Euroopan elintarviketurvallisuusviraston (2014b) NDA-paneeli (The Panel of Nutrition, Novel Foods and Food Allergens) on arvioinut *Haematococcus pluvialis* soveltuvaksi uuselintarvikkeeksi (NFI). Paneeli on todennut, ettei sen turvallisuutta ehdotetuilla käyttötasoilla ole varmistettu. [15.]

Asetuksessa (EC) no 889/2008 astaksantaanin käyttö luonnonmukaisesti viljelylle lohelle ja taimenelle on säädösteltyä. Luonnollisesti kalojen ympäristössä esiintyviä elimellisiä astaksantiinin lähteitä kuten äyriäisiä voidaan käyttää rajoituksetta viljeltävien kalojen ruoaksi. Jos ensisijaista ravintoa ei ole saatavilla, muita luonnollisia lähteitä kuten *Phaffia* -hiivaa voidaan käyttää. Synteettisten väriaineiden käyttö ei ole sallittua. [15.]

Kuvan 13 kuvaajissa nähdään, kuinka biomassan tuotannossa on lähes kaksinkertainen ero 10000 luxin ja 2000 luxin kasvatustehon välillä. Korkeammilla luxmäärillä solujen kasvu lähtee aiemmin laskuun.

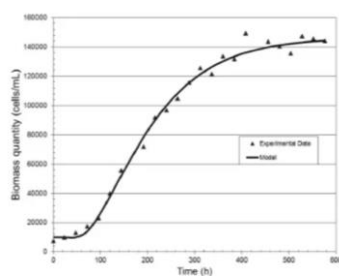


Figure 2. Biomass quantity (cells/mL) versus time (h) for the light intensity of 2000 lux.

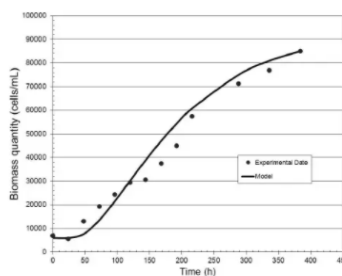


Figure 3. Biomass quantity (cells/mL) versus time (h) for the light intensity of 6000 lux.

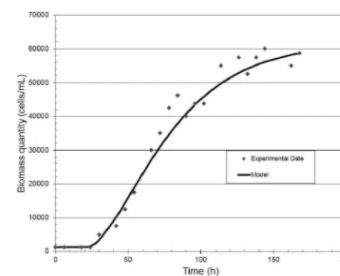
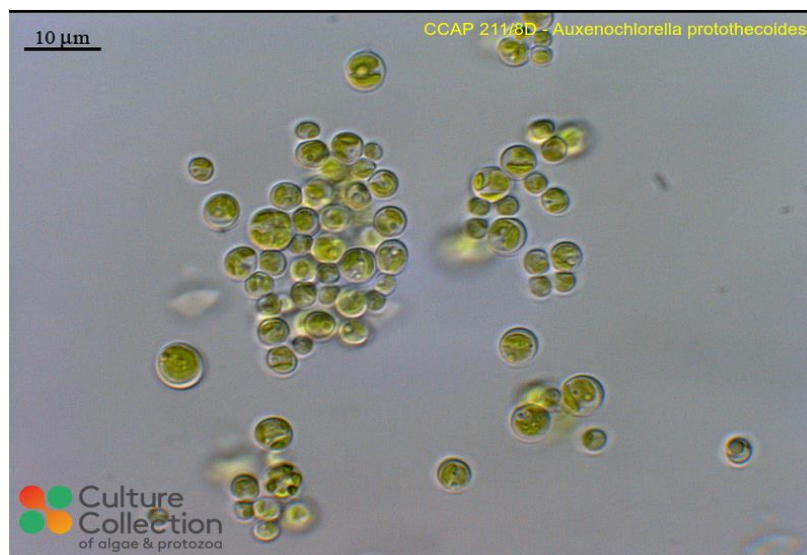


Figure 4. Biomass quantity (cells/mL) versus time (h) for the light intensity of 10,000 lux.

Kuva 13. Kuvaajat 2, 3 ja 4 kertovat, miten *H. pluvialis* autotrofinen kasvu paranee lähestyessä 2000 luxia [16].

6.3 *Auxenochlorella protothecoides*

Alla olevassa kuvassa 14 on työssä käytetty mikroleväkanta mikroskoopilla nähtynä.



Kuva 14. Mikroleväkannan keräämistiedot: 211/8D - Plant/Lichen; Cambridge, England, UK; Pringsheim (1947) [17].

Auxenochlorella protothecoides (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) on yksisoluisen viherlevien suku. Sitä pidetään yhtenä parhaista biopolttoaineiden tuotantoon soveltuvista mikrolevistä, koska se kykenee keräämään suuren määrän biomassaa ja rasvahappoja. *A. protothecoides* on halkaisijaltaan 2-10 μm, pallomainen ja vapaasti elävä. Se sisältää useita mitokondrioita, yhden kupinmuotoisen kloroplastin, jäykän soluseinän muttei siimaa. Toisin kuin useimmat autotrofiset vihreät levät, *A. protothecoides* ei elä vain autotrofisesti käyttämällä auringon energiaa fotosynteesin avulla, vaan voivat myös käyttää orgaanisia komponentteja suoraan ympäristöstä heterotrofiseen kasvuun. Autotrofisiin so-luihin verrattuna solunsisäinen rakenne ja koostumus käyvät läpi suuria muutoksia heterotrofisissa soluissa. Heterotrofiset solut soveltuvat paremmin biodieselin tuotantoon, koska sekä biomassasaanto (51,2 g / l) että öljypitoisuus (55,2%) kasvavat. Siten *A. protothecoides* voi toimia mallina tutkia suuren öljyn kertymisen mekanismia ja löytää tapoja vähentää edelleen biodieselin kustannuksia. *A. protothecoides* on tavattu niin makeasta kuin suolaisesta vedestä. [18.]

Sokeriteollisuuden sivuvirroista saatavat melassit sopivat hyvin hiilenlähteeksi *A. protothecoideelle*, ja tällä on saatu bioöljyn tuotannon hintaa laskemaan huomattavasti. Myös biodieselistä saatava raakaglyseroli sopii hyvin hiilenlähteeksi heterotrofisille leville [19].

7 Materiaalit ja menetelmät

7.1 Materiaalit

Työssä käytettiin seuraavia välineitä, sekä muita saatavilla olevia tarvittavia materiaaleja:

- *E. gracilis* (CCAP 1224/5Z), *H. pluvialis* (CCAP 34/7) sekä *A. protothecoides* (CCAP 211/8D) leväkannat, kylmästä. Ostettu: Scottish Marine Institute
- ravistelijainkubaattori: New Brunswick, Innova 4000
- kasvatusliuosten raaka-aineet (EG ja JM) [liite 1]
- autoklaavi ravinneliuosten sterilointia varten
- pipettejä, 250 ml:n Erlenmeyer-pulloja, koeputkia, vorteksointilaite
- lämpökaappi
- luxmittari: Konica Minolta, CL-500A
- valo ja ohjainlaitteet: Photon Systems Instruments (PSI), SL 3500-580 (447 nm, 627 nm, 735 nm). Ohjain Light Controller LC100 sekä led-paneelin virtalähde.

7.2 Viljelyt

7.2.1 Valmistelut

Bioprosessitekniikan laboratorioon järjestettiin valmiudet levien kasvattamiselle. Ravistelija sijoitettiin keskeiselle paikalle ja siihen asennettiin paikkoja 250 ml:n

erlenmeyer-pulloille. Ravistelijaan asetettiin lämpötilaksi 24 °C ja sekoitusnopeudeksi 140 rpm. Asennettiin kasvatusvalo noin 20 cm:n päähän ravistelijasta ja ohjelmoitiin valolle levien kasvatusta tukevat asetukset.

PSI LC100 -ohjaimella säädettiin punaiselle ja siniselle valolle tehoksi 5 % ja vihreän ja FAR-valon tehoiksi 4 %, kun virtalähteessä tehoksi kaikille valoille oli asetettu 50%, niin päästiin ravistelijan kuvun sisäpuolella lähelle 2000 luxia. Valon intensiteetti mitattiin valotekniikan laboratoriosta lainatulla lux mittarilla. 2000 luxia vastaa normaalia päivänvalon määrää ja sopii levien autotrofiselle kasvulle. Ohjaimesta myös määritettiin valo-pimeäsykli, joksi määritettiin 13 h valoa ja 11 h pimeää siten, että ulkoa tuli hieman luonnonvaloa kaksi tuntia ennen valon aktivoitumista. Valo-pimeäsyklin suhde sijoittui näin suositeltujen 12h:12h ja 16h:8h vaihtoehtojen välille.

7.2.2 Koe 1, EG- ja JM-ravinneliuoksien valmistus ja viljelyn aloitus

Valmistetaan EG-ravinneliuos *E. gracilis* mikrolevän kasvatusta varten. Punnitetaan 0,25 g natriumasetaatitrihydraattia, 0,25 g ”Lab-Lemco”-jauhetta, 0,5 g tryptonia, 0,5 g ravinnehiivaa sekä mitataan 2,5 ml CaCl₂ -liuosta yhteen 250 ml:n erlenmeyer-pulloon. Lisätään astiaan loput tilavuudesta ionivaihdettua vettä.

Valmistetaan JM-ravinneliuosta *A. protothecoideksen* ja *H. pluvialiksen* kasvatusta varten. Mitataan kahteen erlenmeyer-pulloon kuvan 15 mukaisessa järjestyksessä valmiit reagenssiliuokset 0,25 ml molempiin astioihin. Täytetään loput tilavuudesta 250 ml:iin asti ionivaihdetulla vedellä.

Stocks

- (1) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- (2) KH_2PO_4
- (3) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- (4) NaHCO_3
- (5) EDTAFeNa
EDTANa₂
- (6) H_3BO_3
 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- (7) Cyanocobalamin
Thiamine HCl
Biotin
- (8) NaNO_3
- (9) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

Kuva 15. JM-ravinneliuoksen reagenssit kasvatusohjeesta [liite 1].

Valmistetut ravinneliuokset steriloidaan autoklaavissa, minkä jälkeen pulloit jäädytetään huoneenlämpöiseksi. Mikroleväviljelmiä siirrostetaan kutakin 5 ml niille tarkoitettuihin pulloihin, EG-liuokseen *E. gracilis* ja JM-liuokseen *A. protothecoides* ja *H. pluvialis*. Pullojen suut suljetaan foliopaperilla ja asetetaan ravistelijaan kasvamaan valmiiksi valmistettuihin olosuhteisiin. Kasvatusvalo ohjelmoidaan kahdeksan päivän jaksolle. Jakson päätyttyä tarkastellaan, onko ravinneliuoksissa kasvua havaittavissa.

7.2.3 Koe 2, hiilidioksidin lisääminen JM-ravinneliuoksissa oleviin viljelmiin

Pyritään edistämään JM-ravinneliuoksessa kasvatettujen *A. protothecoideksen* sekä *H. pluviaksen* kasvua lisäämällä kasvualustaan hiilidioksidia. Mitataan molemmista pulloista 50 ml kasvatusliuosta pois ja siirretään merkittyihin koeputkiin. Lisätään 5 ml viljelmää alkuperäisen lisäksi ja täytetään tilavuus kuvan 16 mukaisella suolattomalla kivennäisvedellä 250 ml:n merkkiin asti. Pulloit suljetaan foliopaperilla ja asetetaan ravistelijaan kahdeksan päivän jaksolle inkuboitumaan.



Kuva 16. Suolaton kivennäisvesi ei sisällä natriumia.

7.2.4 Koe 3, NPK-liuoksen valmistaminen ja viljelyn aloitus

Valmistetaan 1000 ml NPK-ravinneliuosta *A. protothecoides* ja *H. pluvialis* -levien kasvattamista varten. Lasketaan kuvan 17 ohjeen mukaiset tarvittavat määrät fosforia (1,2 g/l), kaliumia (8,3 g/l) ja typpeä (10 g/l) käytössä olevista reagensseista. Punnitaan ohjeeseen nähden kymmenkertainen määrä tiamiinia, pyridoksiinia, B12-vitamiinia ja biotiinia 20 ml steriiliin kierrekorkilliseen pulloon, johon lisätään 10 ml merkkiin asti ionivaihdettua vettä. Tästä mitataan 1 ml yhtä litraa ravinneliuosta kohden. Punnitaan kierrekorkilliseen 1000 ml:n astiaan ammoniumdivetyfosfaattia 4,45 g, kaliumnitraattia 21,7 g, ureaa 2,1 g, täytetään astia ionivaihdetulla vedellä litran merkkiin asti, siirretään astia vetokaappiin ja mitataan sekaan 24 ml ammoniakkia. Tarkistetaan että pH asettuu 7 ja 9 välille, sekä tarvittaessa titrataan laimealla HCl-liuoksella. Autoklavoidaan ravinneliuokset 250 ml:n erlenmeyer-pulloissa, jäädytetään pulloet huoneenlämpöiseksi ja siirrostetaan kahteen pulloon mikroleväviljelmää. Toiseen pulloon siirrostetaan 5 ml *A. protothecoidesta* ja toiseen 5 ml *H. pluvialista*, suljetaan foliopaperilla ja merkitään pulloet, siirretään ravistelijaan kahdeksan päivän ohjelmalle valmiiksi asetetuille säädöille (140 rpm, 24°C, 2000 lux, 13h:11h valo-pimeäsykli).

Constituents	NPK (g/L)
P ₂ O ₅	2.5
K ₂ O	10
N	10
P	-
C	-
Mn	-
Mg	-
Fe	-
K	-
Ca	-
Cu	-
NaEDTA	-
KH ₂ PO ₄	-
Trisaminomethane	-
Thiamine (B ₁)	0.007
Vit B ₂	0.007
Vit B ₆	0.005
Vit B ₁₂	33 µg
Vit H	0.01 mg

Kuva 17. Kuvaan liittyvä resepti näkyy liitteestä 2.

7.2.5 Koe 4, EG:JM-ravinneliuoksen valmistaminen ja viljelyn aloitus

Valmistetaan 1000 ml EG:JM-ravinneliuosta *A. protothecoides* ja *H. pluvialis* levien viljelemistä varten. Molemmat ravinneliuokset valmistetaan kokeessa 1 mainitulla tavalla, minkä jälkeen sekoitetaan suhteessa 1:1, autoklavoidaan kahdessa 250 ml:n erlenmeyer-pullossa, jäädytetään huoneenlämpöiseksi ja siirrostetaan toiseen 5 ml *A. protothecoidesta* ja toiseen 5 ml *H. pluvialista*. Suljetaan foliopaperilla ja merkitään pullot. Siirretään pullot ravistelijaan edellisten kokeiden mukaisiin olosuhteisiin kahdeksan päivän syklillä.

7.2.6 Koe 5, koeputkissa olevien mikrolevänäytteiden kuormittaminen

Huoneenlämpöön siirrettyjä viljelmiä koeputkissa kuormitetaan siirtämällä kolmeksi päiväksi viikossa kirkaaseen valoon 15-asteiseen kylmäkaappiin. Koe-

putket vorteksoidaan huoneenlämmössä neljänä päivänä viikossa ja tarkkailaan kasvua. *E. gracilis* on kasvamassa EG-ravinneliuksessa ja *A. protothecoides* sekä *H. pluvialis* kasvamassa JM-ravinneliuksessa.

8 Tulokset ja tulosten tarkastelu

8.1 Koe 1, EG- ja JM-ravinneliuksien valmistus ja viljelyn aloitus

Kolmen päivän jälkeen *E. gracilis* muuttunut jo kirkkaanvihreäksi ja kahdeksan päivän syklin päätteeksi pullo on jo tummanvihreä. *A. protothecoides* ja *H. pluvialis* levillä ei huomattavaa kasvua syklin päätyttyä. Kuvassa 18 näkyy lopputilanne.



Kuva 18. JM-ravinneliuksessa kasvaneet levät eivät ole silmin nähden lähteneet kasvamaan ollenkaan, mutta EG-ravinneliuos nimensä mukaisesti näyttää sopivan hyvin *E. graciliks*en kasvattamiselle.

Ilmeisesti JM-ravinneliuos ei ollut ideaali kasvualusta viherlevien kasvulle, Mutta *E. graciliks*en kasvu oli onnistunutta ja viljelmä siirrettiin kylmään myöhempää käyttöä varten.

8.2 Koe 2, hiilidioksidin lisääminen JM-ravinneliuoksissa oleviin viljelmiin

Syklin alussa levät näyttivät kasvavan, *H. pluvialiksessa* kasvusto oli kertynyt palloksi, joka kasvoi kooltaan noin senttimetrin kokoiseksi ja *A. protothecoides* -viljelmä myös hieman sai vihertävää sävyä. Kuitenkin jo puolessa välissä sykliä kasvu näytti tyrehtyvän molemmilla levillä. *H. pluvialiksen* ravinneliuoksen rajapintaan syntyi myös punainen biofilmi, joka voisi kertoa kivennäisveden mukana tulleen ehkä jonkun patogeenin, kuten hiivan. Kasvusto rajapinnassa voi myös kertoa sekoituksen seurauksena sinne joutuneiden leväsolujen siirtymisestä heterotrofiseen muotoon stressitilan seurauksena. Molemmat viljelmät laitettiin kylmään mahdollista myöhempää tarkastelua varten.

8.3 Koe 3, NPK-liuoksen valmistaminen ja viljelyn aloitus

NPK-ravinneliuoksen keho tulos hämmensi aluksi pitkään, mutta kun selvisi, että pH:n määrittäminen ja asettaminen kasvulle suotuisalle välille oli täysin unohtunut, olikin tulokset järkeviä. Molempien viljelmien solut flokkautuivat ravinneliuoksissa ja muuttuivat asteittain vaaleammiksi ja lopulta täysin valkoisiksi. Todennäköisesti liian emäksinen ympäristö alkoi hajottaa soluja. Viljelmät vietiin hävitettäväksi.

Kokeen uusimisessa voisi olla potentiaalia oikein meneteltynä, koska ajatuksena oli halvempien ravinneliuosten käyttö viljelyssä.

8.4 Koe 4, EG:JM-ravinneliuoksen valmistaminen ja viljelyn aloitus

EG:JM-ravinneliuoksen käyttö valikoitujen viherlevien kasvulle oli onnistunut valinta. Neljän päivän jälkeen syklin aloittamisesta *A. protothecoides* oli jo silminnähtävien vihreä, ja koska ravinneliuos oli ainoa, jossa *H. pluvialiksessa* näkyi kasvua ilman solujen flokkautumista, kasvatusaika sen suhteen nostettiin kaksinkertaiseksi. *A. protothecoides* oli syklin päätyttyä tumman vihreä (kuva 19) ja kahden viikon päästä *H. pluvialiksessa* (kuva 20) oli kasvu jo edennyt pitkälle.



Kuva 19. EG:JM-ravinneliuoksessa menestynyt *A. protothecoides*

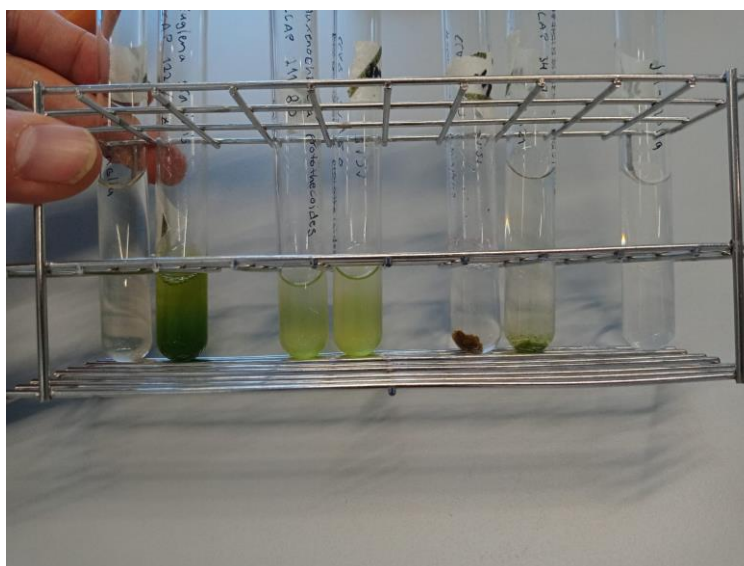
Molemmat viljelmät laitettiin kylmään myöhempää käyttöä varten.



Kuva 20. Kuvassa toisena vasemmalta *H. pluvialiksen* kasvu on silminnähtävää.

8.5 Koe 5, koeputkissa olevien mikrolevänäytteiden kuormittaminen

Puolentoista kuukauden jälkeen toinen *H. pluvialis* (kuvassa 21 kolmas oikealta) jossa oli vähemmän ravinneliuosta, oli siirtynyt punaiseen heterotrofiseen muotoon. Koeputket säilöttiin kylmään myöhempää käyttöä ja tutkimista varten.



Kuva 21. Kuvassa vasemmalta oikealle EG-nolla, *E. gracilis* (EG), kaksi *A. protothecoidea* (JM), kaksi *H. pluvialis* (JM), JM-nolla.

9 Yhteenveto

Opinnäytetyö oli todella mielenkiintoinen ja haastava, sillä koko aihealue oli teki-jälleen jokseenkin uusi. Alkuperäisen opinnäytetyön aiheen oli tarkoitus liittyä Metropolian biotekniikan laboratorioon tilatun fotobioreaktorin käyttöönottoon ja valikoituneiden mikrolevien koeajoihin systeemissä, mutta vallitseva pandemia-tilanne maailmalla mutkisti asiaa, eikä reaktorin asennusta ole saatu vielä kukaan järjestettyä. Saksasta tilattua asennusta ei haluttu järjestää, koska kahden viikon koronakaranteeni olisi ollut tiedossa asentajalle sekä Suomessa että Saksassa. Tästä syystä opinnäytetyö keskittyi viljelmien kasvattamiseen, jotta tulevaisuudessa olisi resursseja viljelmistä erilaisten ajojen helpompaa suorittamista varten reaktorilla.

Mikrolevien kasvattaminen osoittautui heikoilla lähtötiedoilla suhteellisen hankalaksi. Suomenkielisen kirjallisuuden puuttuessa oli tieto hankittava jättimäisistä englanninkielisistä tietokirjoista, ja asioiden sisäistäminen vaati aktiivista opiskelua. Asiantuntijoista koostuvien tutkijaryhmien kokoamien kompaktien tietoisuuksien referoiminen suomeksi osoittautui myös hyvin haastavaksi, joten pyrittiin kokoamaan vain määrätietoisesti joitakin tärkeimpiä asioita hyvine lähteineen teoriaosaan seuraavia aiheeseen tutustujia varten.

Haematococcus pluvialis kasvatamiseen liittyneet epäilykset sen hitaan lisäämisen vuoksi saivat keskittymään paljon sen heterotrofiseen luonteeseen, ja eräs artikkeli [20] sai miettimään lennokkaita ajatuksia mikrolevien tulevaisuuden käyttösovelluksista. Jospa vuosisatoja sitten kuvatut luonnonmukaisesti Pohjois-Amerikassa eläneet punanahkaisiksi kuvatut ihmiset olivatkin saaneet henkeensä kyseistä viherlevää, joka keuhkoissa eläessä toi astaksantiinin lähteen elimistölle ja näin vaikutti ihon punertavaan väriin. Heterotrofien bakteereja saalistava bakteeri voisikin olla astmalääkkeen tavoin käytettynä vastaus kaikenlaisiin keuhkokuumeisiin ja keuhkoputkentulehduksiin. Mikrolevää voitaisiin viljellä keuhkoja simuloivissa olosuhteissa ja tutkia, minkälaiset patogeenit levälle maistuvat. Myös tieto siitä, että kyseisen opinnäytetyössä viljellyn levän kanta (CCAP 34/7) on kerätty Suomesta, elävöitti mielikuvitusta. Siinä missä lämpimissä maissa viljellään ulkona *O. spirulinaa*, voisi Suomessa viljellä tänne luontaista lajia. Olisi esimerkiksi mielenkiintoista tutkia, millä tavoin kylmässä vedessä typen liukoisuus vähenee ja miten se vaikuttaa *H. pluvialis* muuntautumiseen heterotrofiseen tilaan järvissä tai lammissa, kun tiedetään levän tyypensäannilla olevan tähän muutokseen suuri vaikutus.

Lähteet

- 1 Jayachandran Venkatesan, Panchanathan Manivasagan, Se-Kwon Kim. Marine Microalgae biotechnology: Present trends and future advances. Teoksessa: Kim, S-K. (toim.) Handbook of marine microalgae. Academic Press, 2015. ISBN 9780128007761. Verkkoaineisto. Saatavilla: <<https://ebookcentral.proquest.com/lib/metropolia-ebooks/reader.action?docID=2038911>> Luettu: 26.01.2021.
- 2 Jasvinder Singh, Rakesh Chandra Saxena. An introduction to microalgae: Diversity and significance. Teoksessa: Kim, S-K. (toim.) Handbook of marine microalgae. Academic Press, 2015. ISBN 9780128007761. Verkkoaineisto. Saatavilla: <<https://ebookcentral.proquest.com/lib/metropolia-ebooks/reader.action?docID=2038911>> Luettu: 26.01.2021.
- 3 Morotti, A.L.M. Síntese de análogos de âncora de GPI: uma contribuição para a descoberta de novos alvos moleculares de Trypanosoma cruzi. Verkkoaineisto. Saatavilla: <<https://bv.fapesp.br/en/dissertacoes-teses/169526/synthesis-of-gpi-anchor-analogues-to-support-the-discovery-o>> Luettu 16.4.2021.
- 4 Hamed, A.M., Prajapati, S.K., Simsek, S., Simsek, H., Hamed, A.M., Prajapati, S.K., Simsek, S. and Simsek, H. (2016). Growth regime and environmental remediation of microalgae. Verkkoaineisto. Saatavilla: <<https://www.e-algae.org/journal/view.php?number=2792>> Luettu 16.4.2021.
- 5 Biomass, Biofuels, Biochemicals: Biofuels from Algae, (toim.) Ashok Pandey, et al., Elsevier, 2018. Verkkoaineisto. Saatavilla: <<http://ebookcentral.proquest.com/lib/metropolia-ebooks/detail.action?docID=5841232>> Luettu 16.4.2021.
- 6 Singh, P. & Gupta, S. K. & Guldhe, A. & Rawat, I. & Bux, F. Microalgae isolation and basic culturing techniques. Teoksessa: Kim, S-K. (toim.) Handbook of marine microalgae. Academic Press, 2015. ISBN 9780128007761. Verkkoaineisto. Saatavilla: <<https://ebookcentral.proquest.com/lib/metropolia-ebooks/reader.action?docID=2038911>> Luettu: 31.1.2021.
- 7 Helsingin yliopisto. (2019). Mikrolevät soveltuvat korvaamaan soijaa tai härkäpapua lypsylehmien ruokinnassa. Verkkoaineisto. Saatavilla: <<https://www2.helsinki.fi/fi/uutiset/elamantieteet/mikrolevat-soveltuvat-korvaamaan-soijaa-tai-har-kapapua-lypsylehmien-ruokinnassa>> Luettu 18.4.2021.
- 8 Uusi uutiset. (2019). Jätevesien ravinteet kiertoon levien avulla. Verkkoaineisto. Saatavilla: <<https://www.uusi uutiset.fi/jatevesien-ravinteet-kiertoon-levien-avulla/>> Luettu 31. 3.2021.
- 9 yle.fi. Prisma: Levä – tulevaisuuden raaka-aine, josta tutkijat toivovat öljyn korvaajaa. Verkkoaineisto. Saatavilla: <<https://yle.fi/aihe/artikkeli/2020/10/05/prisma-leva-tulevaisuuden-raaka-aine-josta-tutkijat-toivovat-oljyn-korvaajaa>> Luettu 18.4.2021.

- 10 [www.algaebase.org](https://www.algaebase.org/pub/speciescultures/?tc=accept&species_id=30510). Algaebase. Verkkoaineisto. Saatavilla: <https://www.algaebase.org/pub/speciescultures/?tc=accept&species_id=30510> Luettu 15.4.2021.
- 11 Wang, Y., Seppänen-Laakso, T., Rischer, H. and Wiebe, M.G. (2018). *Euglena gracilis* growth and cell composition under different temperature, light and trophic conditions. Verkkoaineisto. Saatavilla: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5896972/>> Luettu 15.4.2021.
- 12 Loppuraportti, J., Nummela, M., Kymäläinen, S., Kivimäki, R., Malin, Hamk, A., Pihlanto, M., Nurmi, P., Marnila, Luke, S., Taskila, V.-H., Sotaniemi, J., Ahola and Yliopisto, O. Alueellinen biokiertomalli ravinnekierätyksen tehostamiseksi - BioKierto. Verkkoaineisto. Saatavilla: <https://www.hamk.fi/wp-content/uploads/2020/09/BioKierto_loppuraportti_2020.pdf> Luettu 21.4.2021
- 13 [www.algaebase.org](https://www.algaebase.org/pub/speciescultures/?species_id=Gfed195e5691114f4). Algaebase. Verkkoaineisto. Saatavilla: <https://www.algaebase.org/pub/speciescultures/?species_id=Gfed195e5691114f4> Luettu 21.4.2021.
- 14 *Biology of Microalgae*. Michael A. Borowitzka, in *Microalgae in Health and Disease Prevention*, 2018. Verkkoaineisto. Saatavilla: <<https://ebookcentral.proquest.com/lib/metropolia-ebooks/reader.action?docID=5439786&query=Microalgae+in+Health+and+Disease+Prevention>> Luettu 15.4.2021.
- 15 *Feed Additives for Influencing the Color of Fish and Crustaceans*. J. Oehlschläger, U. Ostermeyer, in *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages*, 2016. Verkkoaineisto. Saatavilla: <<https://ebookcentral.proquest.com/lib/metropolia-ebooks/reader.action?docID=4512082&query=Handbook+on+Natural+Pigments+in+Food+and+Beverages>> Luettu 15.4.2021.
- 16 Galvão, R.M., Santana, T.S., Fontes, C.H.O. and Sales, E.A. Modeling of Biomass Production of *Haematococcus pluvialis*. *Applied Mathematics*, Verkkoaineisto. Saatavilla: <https://www.academia.edu/32247047/Modeling_of_Biomass_Production_of_Haematococcus_pluvialis> Luettu 15.4.2021.
- 17 [www.algaebase.org](https://www.algaebase.org/pub/speciescultures/?species_id=41407). Algaebase. Verkkoaineisto. Saatavilla: <https://www.algaebase.org/pub/speciescultures/?species_id=41407> Luettu 15.4.2021.
- 18 phycocosm.jgi.doe.gov. Home - *Auxenochlorella protothecoides*. Verkkoaineisto. Saatavilla: <<https://phycocosm.jgi.doe.gov/Auxeprot1/Auxeprot1.home.html>> Luettu 25.5.2021.
- 19 *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Biofuels from Algae*, (toim.) Ashok Pandey, et al., Elsevier, 2018. Verkkoaineisto. Saatavilla: <<http://ebookcentral.proquest.com/lib/metropolia-ebooks/detail.action?docID=5841232>> Luettu 15.4.2021.
- 20 Kangasniemi, T. Biologien shokkilöytö: Viherlevät eivät olekaan pelkkiä kasveja vaan mikroskooppisia petoja, jotka alkavat aktiivisesti saalistaa ravinteiden loppuessa. Verkkoaineisto. Saatavilla: <<https://www.tekniikkatalous.fi/uutiset/biologien-shokkiloyto-viherlevat-eivat-olekaan-pelkkia-kasveja-vaan-mikroskooppisia-petoja-jotka-alkavat-aktiivisesti-saalistaa-ravinteiden-loppuessa/096048aa-f68c-4aa1-a713-e92ae39a6584>> Luettu 18.4.2021.

Liitteet

Liite 1. Levälajien tiedot ja kasvatusohjeet.

Levälajien tiedot ja kasvatusohjeet lähetysilmoitu

Delivery Note No: 511352/1	
Delivery Note Date:	02/12/2019
CCAP Order Number:	511352
Customer ID:	9121
Your VAT Number:	FI 20945511
Your Purchase Order:	BioK/Fortelius
Delivery To: Metropolia University of Applied Sciences Leiritie 1 Vantaa 01600 Finland Attn: Carola Fortelius	


culturecollection
of algae and protozoa
SAMS Limited
Scottish Marine Institute
Dunbeg, OBAN
Argyll PA37 1QA
Scotland

Tel: +44 (0)1631 559000
Fax: +44 (0)1631 559001
Email: ccap@sams.ac.uk

VAT Reg No: GB 828 9579 61

Item	Description	Quantity
L1	CCAP 1224/5Z Euglena gracilis	1
L2	CCAP 34/7 Haematococcus pluvialis	1
L3	CCAP 211/8D Auxenochlorella protothecoides	1
✓ 4	EG:JM Non-sterile stocks for 5L EG:JM edium	2

Delivery Comments:

If any culture arrives in unsatisfactory condition it will be replaced free of charge if CCAP is informed within 14 days of receipt.

Please note our payment terms are 30 days.

Intrastat Details for Cultures only:
Commodity Code : 30029050
Delivery Terms : CIF
Net mass : approx 60g
Mode of Transport : air
Country of Origin : United Kingdom

Checked: 

The Scottish Association of Marine Science (SAMS) is registered in Scotland as a Company Limited by Guarantee (SC009292) its registered office is Scottish Marine Institute, Oban, Argyll PA37 1QA. SAMS is a charity registered in Scotland (9206).

ksen mukana

Hazard Group 1 Safety data sheet
To accompany organisms not assigned to hazard groups 2-4

Date of issue: March 1999

Information on supplied Cultures as required under COSHH regulations and HSW Acts 6(4)(c)

The culture(s) supplied (as listed on the enclosed Delivery Note) are not categorised as Risk Group 2, 3 or 4 under EU Directive 90/679/EEC; Classification of Biological Agents, and implemented in the UK through The Advisory Committee on Dangerous Pathogens, and therefore fall into Risk Group 1, i.e. a biological agent that is most unlikely to cause human disease. However, all microorganisms should be handled with care.

- Avoid all contact with the organism, growth media or materials on which they have grown.

To avoid these possible hazards and reduce the risk in handling, normal aseptic microbiological techniques should be employed.

All parcels containing microorganisms should be opened in a laboratory with Containment Level 1 as described by the Advisory Committee on Dangerous Pathogens (*Categorisation of pathogens according to hazard and categories of containment*, 4 edition London HMSO) and summarised below.

CONTAINMENT LEVEL 1

Containment level 1 is suitable for work with organisms of hazard group 1. Laboratory personnel must have received instruction in the procedures conducted in the laboratory.

1. The laboratory should be easy to clean. Bench surfaces should be impervious to water and resistant to acids, alkalis, solvents and disinfectants.
2. If the laboratory is mechanically ventilated, it is preferable to maintain an inward airflow into the laboratory by extracting room air to the atmosphere.
3. The laboratory must contain a wash-basin or sink that can be used for hand washing.
4. The laboratory door should be closed when work is in progress.
5. Laboratory coats or gowns should be worn in the laboratory and removed when leaving the laboratory suite.
6. Eating, chewing, drinking, smoking, storing of food and applying cosmetics must not take place in the laboratory.
7. Mouth pipetting must not take place.
8. Hands must be disinfected or washed immediately when contamination is suspected, after handling viable materials, and also before leaving the laboratory.
9. All procedures must be performed so as to minimise the production of aerosols.
10. Effective disinfectants must be available for immediate use in the event of spillage.
11. Bench tops should be cleaned regularly after use.
12. Used laboratory glassware and other materials awaiting sterilisation must be stored in a safe manner. Pipettes if placed in disinfectant, must be totally immersed.

13. All waste material which is not to be incinerated should be rendered non-infective before disposal.
14. Materials for disposal must be transported in robust containers without spillage.
15. All accidents and incidents must be reported.

Opening cultures and ampoules : all parcels containing microorganisms must be opened in a laboratory by trained personnel and, ideally, in a cabinet that will prevent inhalation of aerosols.

Details of suitable media, incubation temperatures for the growth of the strains and any known special hazard are given with the strain(s) supplied.

Transport : if the materials are to be transported to another laboratory they should be packaged with enough absorptive material to absorb all contents of the containers in case of breakage. They should be placed in containers that will prevent breakage and all postal regulations of the recipient country must be followed

Disposal : all cultures, media and containers should be sterilised by autoclaving at 121°C for 15 min before disposal by suitable means such as incineration.

Procedures in case of spillage : if the culture is spilt or its container broken, thoroughly wet with a disinfectant, such as 4% sodium hypochlorite, and allow 30 min before swabbing up and transferring into a container for autoclaving.

Freshwater Green Algae

Note: The culturing conditions below are not necessarily the optimal growth conditions for each strain, as much variation is found between strains, and cultures are not always kept in optimal growth conditions at CCAP for practical reasons. There may be more info in the individual strain data on the website.

On receipt of culture: cultures should be subcultured into fresh sterile medium as described below, ideally within a few days of receipt. If the culture vessel is very full on receipt and subculturing cannot be done immediately, we advise transferring half of the culture to a sterile container to provide air space. Cultures on agar do not need subculturing immediately, and any culture remaining on the slope after subculturing will continue to grow.

Culture Medium: 3N-BBM+V (EG:JM if axenic)

Lighting: Mix of cool and warm white fluorescent lighting

Light Cycle: 12h light : 12h dark (for faster growth try 16h:8h)

Temperature: 15 degrees C

Sub Interval: 3 months (at CCAP, may vary depending on environment)

Culture Vessel: Glass tubes or glass flasks.

Culture Method:

Liquid cultures:

Subculture by inoculating culture into fresh sterile medium in the ratio of 1:10, e.g. 5mls culture into no more than 50mls medium. If the culture is not in optimal condition or bacteria are obvious then 1:5 may be necessary. Particularly dense cultures can be added to slightly larger volumes of medium. Culture can be transferred by pouring or pipetting.

Agar/solid cultures:

Use a sterile loop to collect cells from the existing culture and draw the loop over the fresh agar being careful not to break the surface. If subculturing into liquid, use a sterile loop to collect cells from the agar surface and resuspend into a small volume of liquid medium.

Use strict aseptic techniques throughout and if possible carry out all subculturing within a laminar flow cabinet (particularly for axenic strains).

ACDP Hazard Gp: 1 - Non pathogenic / non hazardous. Unlikely to cause human disease.

EG:JM

Medium

1:1 mixture

See separate recipes. Mix then autoclave at 15 psi for 15 minutes.

EG (Euglena gracilis Medium)

Freshwater algae and protozoa

Stock	per litre
(1) CaCl ₂ stock solution:	
CaCl ₂	1.0 g
Medium	per litre
Sodium acetate trihydrate	1.0 g
"Lab-Lemco" powder (Oxoid L29) *	1.0 g
Tryptone (Oxoid L42) *	2.0 g
Yeast extract (Oxoid L21)*	2.0 g
CaCl ₂ stock solution (1)	10.0 ml

Add constituents above and make up to 1 litre with deionized water. For agar add 15 g per litre Bacteriological Agar (Oxoid L11)*. Autoclave at 15 psi for 15 minutes.

Supply

* Unipath Ltd, Wade Road, Basingstoke, Hants RG24 0PW, UK

JM (Jaworski's Medium)

Freshwater algae

Stocks	per 200 ml
(1) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4.0 g
(2) KH_2PO_4	2.48 g
(3) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10.0 g
(4) NaHCO_3	3.18 g
(5) EDTAFeNa	0.45 g
EDTANa_2	0.45 g
(6) H_3BO_3	0.496 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.278 g
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.20 g
(7) Cyanocobalamin	0.008 g
Thiamine HCl	0.008 g
Biotin	0.008 g
(8) NaNO_3	16.0 g
(9) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	7.2 g

Medium	per litre
Stock solutions 1 - 9	1 ml each

Make up to 1 litre with deionized water. For agar, add 15.0 g per litre of Bacteriological Agar (Oxoid L11)*. Autoclave at 15 psi for 15 minutes.

Supply

* Unipath Ltd, Wade Road, Basingstoke, Hants, RG24 0PW, UK

Liite 2. NPK-ravinneliuksen resepti

Ravinneliuksen ohje ja lopullinen resepti

Table 1. Nutrients composition of different culture media: NPK; WC and M+NPK.

Constituents	NPK (g/L)	WC (g/L)	*M+NPK (g/L)
P ₂ O ₅	2.5	-	-
K ₂ O	10	-	-
N	10	-	0.095
P	-	-	0.091
C	-	-	0.199
Mn	-	-	0.06
Mg	-	-	0.003
Fe	-	-	2.13
K	-	-	0.056
Ca	-	-	0.001
Cu	-	-	0.05 mg
NaEDTA	-	0.004	-
KH ₂ PO ₄	-	0.005	-
Trisaminomethane	-	0.115 mg	-
Thiamine (B ₁)	0.007	100 µg	0.007
Vit B ₂	0.007	-	0.007
Vit B ₆	0.005	0.5 µg	0.005
Vit B ₁₂	33 µg	-	33 µg
Vit H	0.01 mg	-	0.01 mg
NaNO ₃	-	0.042	-
FeCl ₃ ·6H ₂ O	-	0.031	-
CaCl ₂ ·6H ₂ O	-	0.036	-
MnCl ₂ ·4H ₂ O	-	0.018 mg	-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	-	10 µg	-
ZnCl ₂	-	22 µg	-
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	-	6 µg	-
H ₃ BO ₃	-	0.001	-
NaHCO ₃	-	0.012	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-	0.037	-
CoCl ₂ ·2H ₂ O	-	10 µg	-

*The Composition of macrophyte extract (*E. crassipes*) plus NPK fertilizer was based according Sipaíba-Tavares et al. (2009).

AMMONIUM DIHYDROGEN PHOSPHATE	115 g/mol	4.45g
NH ₄ H ₂ PO ₄	115 g/mol	4.45g
POTASSIUM NITRATE	102 g/mol	2.17g
KNO ₃	102 g/mol	2.17g
25% NH ₃	(17 g/mol)	2.2g
UREA	60 g/mol	2.1g
CH ₄ N ₂ O	60 g/mol	2.1g
THIAMINE		0,007g
RIBOFLAVINE		0,007g
PYRIDOXINE		0,005g
B12		33 µg
BIOTINE		0,01 mg