Nina Keinänen

Syanobakteerien bioaktiivisten yhdisteiden puhdistus nestekromatografisesti

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Insinööri (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Insinöörityö

11.1.2013

Metropolia

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Nina Keinänen Syanobakteerien bioaktiivisten yhdisteiden puhdistus nestekromatografisesti 39 sivua + 2 liitettä 11.1.2013
Tutkinto	Insinööri (AMK)
Koulutusohjelma	Bio- ja elintarviketekniikka
Suuntautumisvaihtoehto	Bioprosessien suunnittelu ja -käyttö
Ohjaaja(t)	Koulutusvastaava Carola Fortelius FT Jouni Jokela

Tämän insinöörityön tarkoituksena oli kasvattaa syanobakteerikantoja, joiden on todettu tuottavan bioaktiivisia yhdisteitä, ja optimoida näiden yhdisteiden puhdistusmenetelmiä. Tavoitteena oli löytää sellaiset parametrit, joilla yhdisteet erottuvat hyvin eivätkä retentioajat kasva liian suuriksi. Tutkimukset koostuivat syanobakteerikantojen kasvatuksesta, biomassasta tehtyjen uutteiden nestekromatografisista määrityksistä ja yhdisteiden puhdistuksesta.

Aluksi UK2a1m1 -kantaa kasvatettiin Z8 -alustalla kolmen viikon ajan, jonka jälkeen solut kerättiin talteen ja pakastettiin. XPORK 5A -kannan solut saatiin valmiiksi kuivattuina yliopiston kantakokoelmasta. Kuivatut solut uutettiin metanolilla ja hajotettiin homogenisaattorilla. Liuos sentrifugoitiin, jonka jälkeen kirkas faasi kuivattiin paineilmalla. Syke 748A- ja FSN -kantojen solut olivat valmiiksi esikäsiteltyjä. Kuivatut näytteet liuotettiin eluenttiin ja ajettiin korkean erotuskyvyn nestekromatografilla. Ajo-olosuhteita muutettiin sen mukaan, miten hyvin piikit erottuivat toisistaan.

Yhdisteiden retentioajat saatiin optimoitua välille 7.2 – 22.0 min ja piikit erottuivat hyvin. Epäpuhtauksia tarkasteltiin 3D -kuvaajan avulla. Osa epäpuhtauksista eluoitui samaan aikaan yhdisteen kanssa, eikä niitä kaikkia saatu täydellisesti puhdistettua. Todettiin, että kuivattuja soluja olisi tullut punnita uuttoa varten enemmän, sillä yhdistettä ei saatu puhdistettua riittävästi LC-UV-MS -analyysiä varten.

Avainsanat	syanobakteerit, bioaktiivinen yhdiste, HPLC

Author(s) Title Number of Pages Date	Nina Keinänen The Purification of the Cyanobacterial Bioactive Compounds with High Performance Liquid Chromatography 39 pages + 2 appendices 11 January 2013
Degree	Bachelor of Engineering
Degree Programme	Biotechnology and Food Engineering
Specialisation option	Bioprocess planning and usage
Instructor(s)	Carola Fortelius, Head of Degree Programme Jouni Jokela, PhD

The aim of this Thesis was to cultivate cyanobacterial strains, which have been proved to produce bioactive compounds, and then optimize the purification methods. The purpose of the optimization was to find the most suitable parameters so that the compounds are separate and retention times do not grow too high. The investigations consisted of cultivation, HPLC analysis of the extracted biomass and the purification.

First, the UK2a1m1 strain was grown three weeks in Z8 base. After that the cells were collected and stored in a freezer. The dried cells from the XPORK 5A strain were taken from the University's strain collection. The cells were then eluted with methanol and lysed with homogenizer. The solution was centrifuged and the clear phase was dried with compressed air. The samples from the strains Syke 748A and FSN were already pretreated. The dried samples were dissolved with eluent and then analyzed with high performance liquid chromatography (HPLC).

The retention times of the bioactive compounds were optimized between 7.2 – 22.0 minutes and the peaks were clearly seen. The impurities were observed with 3D chart. Some impurities were eluted at the same time with the bioactive compounds and were not removed perfectly. It was also found that more dried cells should have been weighted for the analysis in order to get better results with LC-UV-MS.

Keywords	cyanobacteria, bioactive compound, HPLC

Sisällys

KIRJALLINEN OSA

1 Johdanto 1

2 Syanobakteerit 2

2.1 Luokittelu ja taksonomia 2
2.2 Fotosynteesi ja kasvu 4
2.3 Heterosyytit 5
2.4 Akineetit 6
2.5 Toksiinit 7
2.6 Jäkälät 10

3 Biotekniset sovellukset 11

3.1 Lääketieteelliset sovellukset 11
3.2 Biomassasta polttoainetta 13
3.3 Jäteveden käsittely 16
3.4 Ravitsemus 16

KOKEELLINEN OSA

4 Työn tausta ja tavoitteet 18

5 Materiaalit ja menetelmät 20

5.1 Kannat ja kasvatus 20
5.2 Näytteiden esikäsittely 21
5.3 Yhdisteiden puhdistus 23
5.3.1 HPLC 23
5.3.2 LC-UV-MS 23
5.3.3 XPORK 5A 24
5.3.4 Syke 748A 24
5.3.5 FSN 26

6 Tulokset ja tulosten tarkastelu 26

6.1 Kasvatus 26
6.2 Puhdistus ja optimointi 27
6.2.1 XPORK 5A 27
6.2.2 Syke 748A 31

6.2.3 FSN 35

7 Yhteenveto 37

Lähteet 38

Liitteet

Liite 1. Z8 -kantaliuosten valmistus

Liite 2. Hivenaineliuoksen valmistus, Z8 -alustan valmistus

1 Johdanto

Syanobakteerit tuottavat lukuisia erilaisia sekundaarisia metaboliatuotteita, joista suurin osa on toksisia. Joillakin yhdisteillä on havaittu olevan bioaktiivisia ominaisuuksia, kuten syöpäsoluihin vaikuttavaa sytotoksisuutta, minkä johdosta niillä on paljon potentiaalia syöpähoitotutkimuksissa sekä erilaisissa antimikrobisissa sovelluksissa.

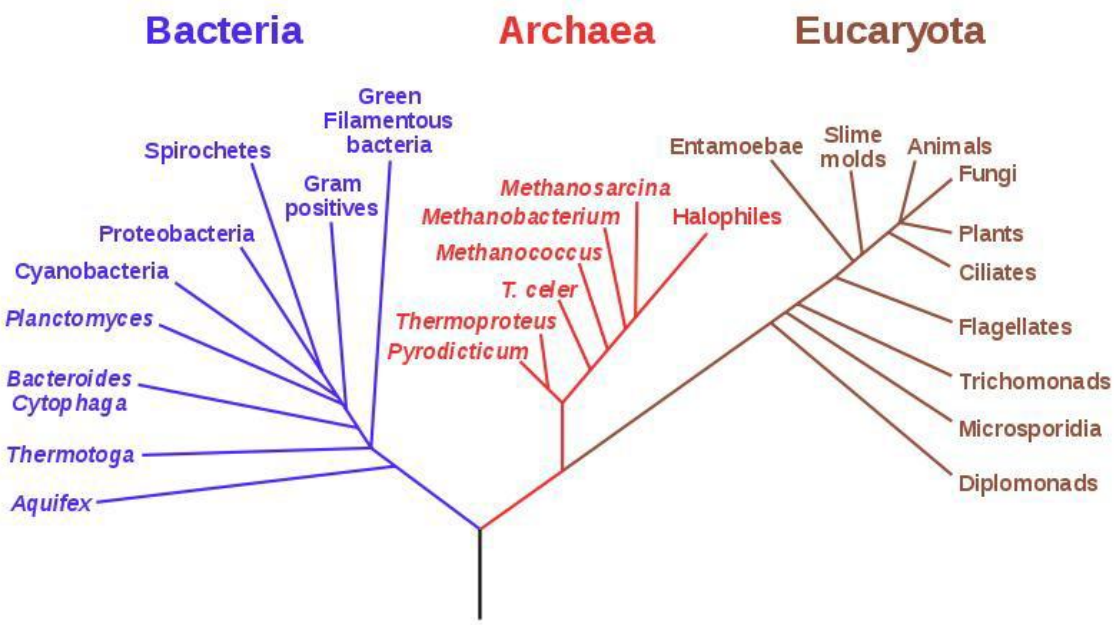
Työn tarkoituksena oli kasvattaa syanobakteerikantoja, joiden on todettu tuottavan bioaktiivisia yhdisteitä, sekä puhdistaa näitä yhdisteitä nestekromatografisesti. Tavoitteena oli löytää sellaiset parametrit, joilla yhdisteet erottuvat hyvin eivätkä retentioajat kasva liian suuriksi. Tutkimukset koostuivat syanobakteerikantojen massakasvatuksesta, biomassasta tehtyjen uutteiden nestekromatografisista määrityksistä sekä yhdisteiden puhdistuksesta.

Työ tehtiin Helsingin Yliopiston Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitoksen syanobakteeritutkimusryhmässä, jonka johtajana toimii professori Kaarina Sivonen. Tutkimusryhmän toiminnan eräänä tarkoituksena on löytää uusia syanobakteerien sekundaarisia metaboliatuotteita. Tätä varten syanobakteerikantoja eristetään erilaisista ympäristöistä, kasvatetaan sekä testataan niiden mahdollista biologista aktiivisuutta.

2 Syanobakteerit

2.1 Luokittelu ja taksonomia

Syanobakteerit ovat nimensä mukaisesti bakteereja. Ne kuuluvat siten prokaryootteihin (kuvio 1), mutta eroavat muista bakteereista tuottamalla *a* -klorofylliä (Humm & Wicks 1980: 6.) Levät ovat ryhmä erilaisia fotosynteettisiä, ei-johtojänteisiä kasveja, jotka sisältävät *a* -klorofyllia ja voivat esiintyä sekä yksi- että monisoluisissa mikroskooppisissa muodoissa, kuten myös suurissa monisoluisissa muodoissa (merilevät). Toiminnallisesti syanobakteerit muistuttavat planktonleviä ja tuottavat yhteyttäessään happea. Soluseinän koostumuksen ja solun sisällön rakenteen puolesta ne muistuttavat kuitenkin enemmän bakteereita. Syanobakteereille on tyypillistä alkeellinen solunjakautuminen. (Kerby & Stewart 1988: 319, Rissanen 1999: 11.)

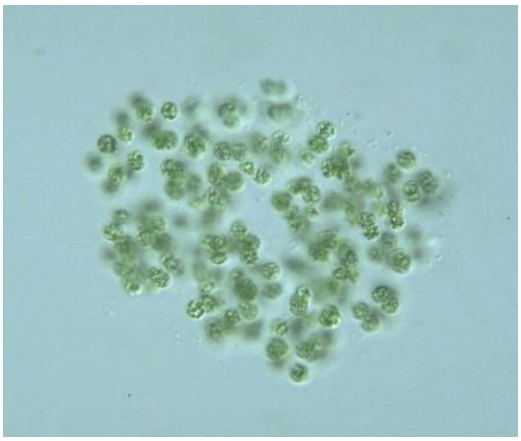


Kuvio 1. Eliökunnan sukupuu (Biocyclopedia 2012).

Syanobakteerit (*Cyanophyta*) kuuluvat luokkaan *Cyanophyceae*, jossa on neljä lahkoa, joista kolme on planktisia: *Chroococcales*, *Oscillatoriales* ja *Nostocales* (Suomen ympäristökeskus 2012). Planktoniset levät ovat vapaasti vedessä keijuvia leviä, jotka eivät elä alustaan kiinnittyneinä (Rissanen 1999: 11).

Croococcales -lahkon solut esiintyvät yksittäin tai muodostavat yksinkertaisia yhdyskuntia. Soluseinät ovat ohuita, eikä erilaissoluja, kuten heterosyyttejä, muodostu. *Mic-*

rocystis -suku (kuvio 2) muodostaa veden pinnalle myrkyllisiä massaesiintymiä. (Suomen ympäristökeskus 2012.)



Kuvio 2. *Microcystis* sp. (Microcystis).

Oscillatoriales -lahkon solut esiintyvät yksittäisinä, päästä päähän tasapaksuina monisoluisina rihmoina (kuvio 3) ja ne lisääntyvät jakorihmojen eli hormogonioiden avulla. Planktiset muodot ovat haarattomia eikä rihmoissa ole erilaistuneita soluja. (Suomen ympäristökeskus 2012.)

Kuvio 3. *Phormidium* sp. (CCALA 2012).

Oscillatoria limosa saattaa muodostaa joen pohjalle laajoja tummanvihreitä leväkasvustoja, jotka kohoavat veden pinnalle, kun niiden alle kertyy metaanikaasua. (Suomen ympäristökeskus 2012.)

Nostocales -lahkon solurihmat muistuttavat helminauhaa ja rihmat voivat olla suoria tai kierteisiä (kuvio 4). Rihmat voivat esiintyä yksittäin tai muodostaa vyyhtimäisiä ka-

saumia. Kasvumuotoisista soluista kehittyy erilaistuneita soluja (heterosyytit ja akineetit). *Anabaena* -suku on yleisin massaesiintymien aiheuttaja suomalaisissa järvissä ja siihen kuuluu sekä hermo- että maksamyrkyllisiä lajeja. (Suomen ympäristökeskus 2012.)

2.2 Fotosynteesi ja kasvu

Syanobakteerit ovat yleensä obligaatteja fotoautotrofeja, eli ne tarvitsevat valoa energian lähteeksi ja hiilidioksidia hiilen lähteeksi (Humm & Wicks 1980: 13). Fotosynteesireaktion ensisijaisia tuotteita ovat sokerit, pelkistimet, ATP sekä molekulaarinen happi. Kaikilla fotoautotrofeilla nämä tuotteet toimivat substraatteina biosynteettisille reaktioille. Monien välttämättömien solukomponenttien, kuten nukleiinihappojen, lipidien, fotosynteettisten pigmenttien sekä entsyymien prosteettisten ryhmien, tuotantoon tarvitaan hiilen, vedyn ja hapen lisäksi myös muita alkuaineita. Tärkeimpiä ovat fosfori ja typpi, jonka hapettunut muoto NO_3^- täytyy pelkistää ammoniumiksi NH_4^+, jotta se toimisi biosynteettisissä reaktioissa. (Falkowski & Raven 2007: 278.)

Muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta fotoautotrofinen biomassa lisääntyy vesiekosysteemissä niin kauan, kunnes jostakin ravintoaineesta tulee kasvua rajoittava tekijä. Ravinteiden rajoittaminen voi hidastaa kasvua tai aiheuttaa muutoksia proteiinin määrässä suhteessa hiilihydraatin ja lipidien määrään, mikä puolestaan voi johtaa solujen epätasapainoiseen kasvuun. (Falkowski & Raven 2007: 308, 376.)

Mikrolevät ja syanobakteerit voivat elää vesi- ja maaympäristöjen lisäksi myös ääriolosuhteissa, kuten jäässä. Jotkin syanobakteerit elävät symbioosissa kasvien, eläinten ja sienien kanssa. (Rissanen 1999: 11.)

Syanobakteerit vaativat vain vähän energiaa solutoimintojen ja rakenteen ylläpitoon, mistä johtuen ne pystyvät ylläpitämään suhteellisen korkeaa kasvunopeutta verrattuna muihin fytoplanktonisiin organismeihin. Syanobakteereilla on siten kilpailuetu muiden fytoplanktonien suhteen. (Chorus & Bartram 1999: 25.) Sinileväkukintoja esiintyy yleensä rehevöityneissä järvissä, joiden fosfori- ja typpipitoisuudet ovat korkeat. Myös yli 25 °C lämpötila parantaa syanobakteerien kasvua. Lämpötilan laskiessa fotosynteesi nopeutuu soluhengitykseen verrattuna, jolloin hiilihydraattivarastot eivät kulu. Tällöin syanobakteeriyhdyskunnat vajoavat pohjaan, jossa ne selviytyvät talven yli kuluttamalla

hiilihydraattivarastoja vähitellen soluhengityksen tai fermentaation avulla. (Chorus & Bartram 1999: 28 – 30.)

Joillakin rihmamaisilla lajeilla on taipumus jakautua lyhyisiin osiin, joita kutsutaan hormogonioiksi. Ne ovat yleensä muutaman solun pituisia liikkuvia filamentteja, jotka erilaistuvat vegetatiivisista eli kasvumuotoisista soluista epäsuotuisissa olosuhteissa. Niiden ei kuitenkaan ole havaittu parantaneen syanobakteerien sietokykyä muuttuneissa olosuhteissa vegetatiivisoluihin verrattuna. (Humm & Wicks 1980: 26.)

Monet planktoniset syanobakteerit sisältävät kaasuvakuoleja eli vesikkeleitä, joiden solukalvo läpäisee hyvin kaasuja. Niiden tiheys on noin kymmenesosa veden tiheydestä, ja ne saavat levän keijumaan veden pinnalla. Kaasuvakuolien sisältämä kaasu on yleensä ilmaa, jonka syanobakteerit ottavat vedestä. Vakuolit myös mahdollisesti suojaavat solujen tylakoideja liialliselta auringon säteilyltä. (Chorus & Bartram 1999: 27, Humm & Wicks 1980: 30.)

2.3 Heterosyytit

Heterosyytit ovat soluja, joiden avulla syanobakteeri voi sitoa veteen liuennutta molekulaarista typpeä. Aerobisesti kasvaneissa soluissa nitrogenaasiaktiivisuutta esiintyy ainoastaan heterosyyteissä, mutta mikroaerofiilisissa olosuhteissa myös vegetatiiviset solut hyödyntävät aktiivista nitrogenaasia. (Fogg *et al.* 1973: 192.)

Heterosyyteillä on paksu läpinäkyvä soluseinä (kuvio 4). Ne ovat tyypillisiä *Nostocales*- ja *Stigonematales* -lahkon rihmamaisille syanobakteereille. Ne ovat erilaistuneet tavallisista vegetatiivisista soluista ja kasvavat yleensä suuremmiksi kuin vierekkäiset vegetatiivisolut. Heterosyytit ovat väriltään keltavihreitä, mikä johtuu klorofylli *a*:sta ja karotenoidipigmenteistä. Muodoltaan ne muistuttavat yleensä niitä soluja, joista ne ovat erilaistuneet. (Fogg *et al.* 1973: 19.)

Kuvio 4. *Anabaena* sp. syanobakteerin 400 -kertainen suurennos, jossa heterosyytit näkyvät vegetatiivisoluja suurempina soluina (Wahlsten 2012).

Heterosyytit esiintyvät yleensä yksittäin, melko säännöllisin välein pitkin filamenttia tai joissain tietyissä paikoissa, kuten filamentin tyvessä. Esimerkiksi *Anabaenopsis circulariksen* rihma koostuu kahdeksasta vegetatiivisesta solusta, jonka kummassakin päässä on heterosyytti. Rihman kaksi keskimmäistä solua jakautuvat, ja samalla muodostuu kaksi proheterosyyttiä kumpaankin reunaan. Alkuperäinen rihma katkeaa näiden välistä ja proheterosyytit kehittyvät heterosyyteiksi. Vegetatiivisolujen jakautuminen jatkuu heterosyyttien välissä kunnes kaikki kahdeksan vegetatiivista solua ovat muodostuneet. (Fogg *et al.* 1973: 20 – 21.)

2.4 Akineetit

Joidenkin *Nostocaceae*- ja *Scytonemataceae* -suvun syanobakteerien vegetatiivisolut saattavat kehittyä leposoluiksi eli akineeteiksi (kuvio 5). Tällöin solu kasvaa suuremmaksi, sen soluseinä muuttuu paksummaksi ja soluun varastoituu ravinteita. Näillä leposoluilla on vegetatiivisoluja suurempi kyky vastustaa ympäristön epäsuotuisia olosuhteita. Joidenkin lajien akineetit sijaitsevat aina heterosyytin vieressä tai filamentin päässä. Joillakin lajeilla ne ovat jakautuneet satunnaisesti. Akineetit esiintyvät yleensä yksittäin, mutta joillakin *Nodularia* levillä ne voivat esiintyä ketjuissa. Akineetit ovat ylei-

siä makean veden lajeilla, mutta harvinaisia mereisillä lajeilla, luultavasti koska merivesiympäristö on paljon stabiilimpi. (Humm & Wicks 1980: 26.)

Kuvio 5. *Anabaena sp.* syanobakteerin 400 -kertainen suurennos, jossa akineetit näkyvät hieman rakeisina ja vegetatiivisoluja suurempina soluina (Wahlsten 2012).

Akineettien muodostumista säätelee saatavilla olevan typen ja hiilihydraattien määrä. Glukoosin läsnä ollessa kaikki *Anabaena doliolum* -syanobakteerin vegetatiivisolut muodostavat akineetteja alkaen soluista, jotka sijaitsevat heterosyyteista kauimpina. Ammoniumkloridin ja kaliumnitraatin läsnä ollessa akineettien muodostuminen estyy. (Humm & Wicks 1980: 27.)

2.5 Toksiinit

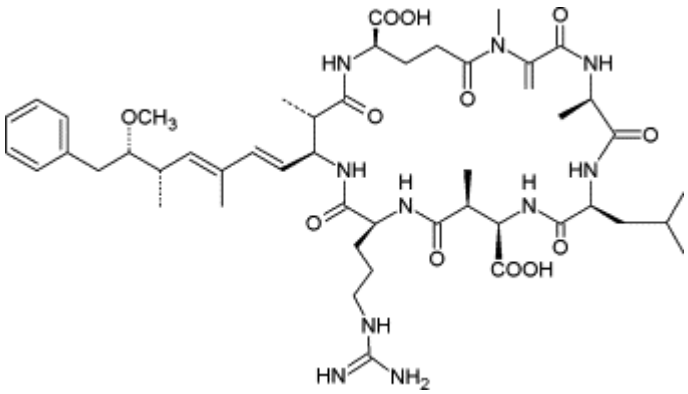
Syanobakteerit tuottavat monia bioaktiivisia yhdisteitä. Näistä monet ovat hermo- tai maksamyrkkyjä sekä ihoa ärsyttäviä yhdisteitä. Ihoärsytys ilmenee kutinana ja kirvelynä. Maksaan vaikuttavia hepatotoksiineja ovat mikrokystiinit tai nodulariinit. Yhdisteet ovat erittäin myrkyllisiä. Ne vaurioittavat maksasoluja ja saattavat edistää kasvainten muodostumista. Neurotoksiinit, kuten anatoksiini-a, voivat vaurioittaa hermoston toimintaa. (Namikoshi & Rinehart 1996; Jokela 2012.)

Syanobakteerien toksiinit jaetaan niiden kemiallisen rakenteen perusteella kolmeen ryhmään: sykliset peptidit, alkaloidit ja lipopolysakkaridit (Chorus & Bartram 1999: 42).

Maailmanlaajuisesti yleisimmät makeanveden leväkukinnoista löydetyt hepatotoksiinit ovat mikrokystiinejä. Nodulariinit puolestaan esiintyvät tavallisemmin murtovesissä.

(Sivonen & Börner 2008: 160.) Mikrokystiinit ovat kaikkein yleisin syy syanobakteerien aiheuttamiin myrkytyksiin. Ne eristettiin ensimmäisen kerran *Microcystis aeruginosa* -syanobakteerista, mistä johtuen yhdisteet nimettiin mikrokystiineiksi. (Chorus & Bartram 1999: 44.) Niitä esiintyy tyypillisesti makean veden sinileväkukinnoissa, mutta niitä on löydetty myös rannikko- ja murtovesistä (Charpy & Larkum 1999: 488). Mikrokystiinit ovat syklisiä heptapeptidejä (kuvio 6), ja niiden rakenteellisia variaatioita on löydetty neljästä eri syanobakteerisuvusta yli 80. Mikrokystiinien ja nodulariinien toksisuus ilmenee proteiinifosfataasi 1:n ja 2A:n toimintaa inhiboivana aktiivisuutena. Rakenteellisten modifikaatioiden ja toksisuuden välillä on havaittu joitakin yhteyksiä. Mikrokystiinien syklinen rakenne vaikuttaa olevan olennainen sen toksisuudelle, sillä saman yhdisteen lineaarisen rakenteen ei ole havaittu aiheuttaneen myrkytystä hiirille. Mikrokystiineja tuottavia lajeja ovat muun muassa *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc* ja *Oscillatoria*. (Namikoshi & Rinehart 1996; Sivonen & Börner 2008: 160.)

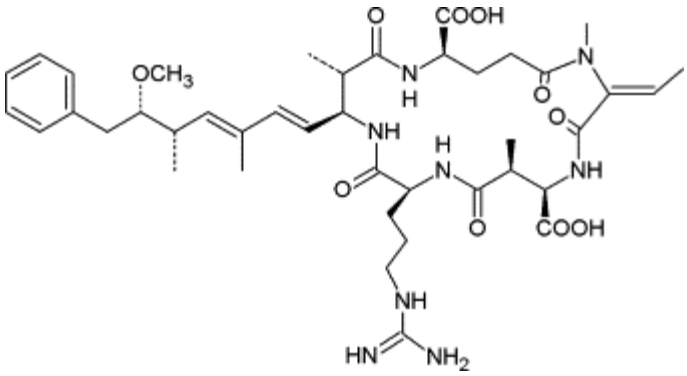
Mikrokystiinit ovat hydrofiilisiä ja läpäisevät huonosti selkärankaisten solukalvon. Ne tarvitsevat aktiivisen soluun kuljetuksen. Eläinkokeissa tällainen multispesifinen kuljetussysteemi on löydetty maksasta, jonne kuljetetaan sappihappoja. Tästä syystä maksa toimii mikrokystiinien ensisijaisena kohteena, ja toksiineja kutsutaan siksi hepatotoksiineiksi. (Zegura *et al*. 2011.)



Kuvio 6. Mikrokystiini-LR:n rakenne (Zegura *et al*. 2011).

Nodulariinit ovat toinen yleinen maksatoksiiniryhmä, ja niitä tuottaa ainoastaan *Nodularia spumigena* -laji (Chorus & Bartram 1999: 42). Se on filamenttinen typpeä sitova syanobakteeri, joka muodostaa myrkyllisiä kukintoja murtovesistöihin. Nodulariinit ovat rakenteeltaan syklisiä pentapeptidejä (kuvio 7). Nodulariinit toimivat eukaryoottisina proteiinifosfataasi-inhibiittoreina. Ne ovat suuria entsyymikomplekseja, jotka sisältävät

non-ribosomaalisen peptidisyntetaasin sekä polyketidisyntetaasin. (Fewer *et al*. 2009; Sivonen & Börner 2008: 160.)



Kuvio 7. Nodulariinin rakenne (Zegura *et al*. 2011).

Sykliset peptidit ovat verrattain suuria molekyylejä. Ne sisältävät joko viisi (nodulariinit) tai seitsemän (mikrokystiinit) aminohappoa. Näistä kaksi on terminaalisia aminohappoja, jotka saavat aikaan lineaarisen peptidin kondensoitumisen ja syklisen rakenteen muodostumisen. Vesiympäristössä toksiinit ovat yleensä syanobakteerisolujen sisällä ja vapautuvat ympäristöön solujen hajottua. Koska toksiinit ovat veteen liukenevia ja kemiallisesti stabiileja, pintavesistöjen leväkukintojen hillitsemisellä on merkittäviä vaikutuksia ympäristön ja ihmisten toksiineille altistumiseen. (Chorus & Bartram 1999: 42 – 43.)

Neurotoksiinit ovat mikrokystiinien ja nodulariinien ohella verrattain yleinen syanobakteerien tuottama toksiiniryhmä. Näistä parhaiten tunnettuja ovat saksitoksiinit sekä *Anabaena*- ja *Oscillatoria* -sukujen tuottama anatoksiini-a. Molemmat ovat neurotoksisia alkaloideja, jotka estävät lihashermojen toimintaa. Anatoksiini-a(S) on postsynaptinen asetyylikoliiniesteraasin toimintaa inhiboiva aine. S-kirjain tarkoittaa syljeneritystä (salivation), mikä on myrkyn aiheuttama tyypillinen oire selkärankaisissa. Saksitoksiinit estävät hermosolujen natriumpumppujen toimintaa. Saksitoksiineja on löydetty laajalti rannikkovesistöistä sekä myös merieläimistä. (Zegura *et al*. 2011; Namikoshi & Rinehart 1996; Charpy & Larkum 1999: 489; Patockaa & Stredab 2002.)

Lipopolysakkaridit (LPS) eristettiin ensimmäisen kerran *Anacystis nidulans* -syanobakteerista (Chorus & Bartram 1999: 54). Sittemmin niitä on löydetty myös *Microcystis*-, *Anabaena-, Spirulina*- ja *Oscillatoria* -suvuista. Lipopolysakkaridit luokitellaan yleisesti endotoksiineiksi. Ne sijaitsevat ulommalla solukalvolla ja rakentuvat hiilihyd-

raattipolymeerista, oligosakkaridiytimestä sekä asetyloituneesta glykolipidistä. Lipopolysakkaridit on yhdistetty ihoärsytykseen sekä moniin suoliston- ja hengityselinten sairauksiin. Nisäkkäille niiden tiedetään aiheuttavan myös kuumetta. (Rastogi & Sinha 2009.)

Sinilevämyrkytys voi syntyä nieltäessä runsaasti myrkyllistä sinilevää. Oireet ja niiden voimakkuus riippuvat ihmisen tai eläimen koosta sekä juodun syanobakteerimyrkyn määrästä. Yleensä vasta useampien desilitrojen juominen aiheuttaa aikuiselle myrkytysoireita. Oireet voivat muistuttaa vatsatautia tai flunssaa, ja niitä ovat esimerkiksi ihon ja silmien kutina ja kirvely, nuha, pahoinvointi ja lihaskivut. (Namikoshi & Rinehart 1996; Rissanen 1999: 59 – 61.)

Syanobakteerit eivät ole aina myrkyllistä, ja jotkin lajit muodostavat sekä myrkyllisiä että myrkyttömiä kantoja. Yleisimmät myrkylliset syanobakteerisuvut ovat *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* ja *Planktothrix*. (Rissanen 1999: 57.) Planktoniset syanobakteerit, kuten *Trichodesmium* ja *Oscillatoria*, ovat aiheuttaneet selkärangattomien, lintujen ja kalojen kuolemia sekä rannikko- että merivesissä Eläinten kuolemat voivat johtua syanobakteeritoksiinien ohella myös muista tekijöistä, kuten botuliinitoksiinista, tai kalojen tapauksessa veden happikadosta. (Charpy & Larkum 1999: 489; Humm & Wicks 1980: 39.)

2.6 Jäkälät

Jäkälät on symbioottinen eliöryhmä, joka koostuu sieniosasta sekä viherlevistä tai syanobakteereista. Näiden kahden erilaisen osan yhdistyessä sekovarsi muodostaa erillisen, kestävän organismin, joka vaikuttaa selkeästi kasvilta muistuttamatta sen enempää levää kuin sientäkään. Levä- ja sieniosat voidaan erottaa toisistaan vain mikroskoopilla tarkasteltuna. (Hale 1983: 1.)

Jäkälän sieniosan soluseinä koostuu vähintään kahdesta kerroksesta. Näitä ympäröi solunulkoinen, säikeinen polysakkaridikerros, joka on paksumpi kuin niillä sienillä, jotka eivät elä jäkäläsymbioosissa. Jäkälän leväosan soluseinä koostuu kahdesta polysakkaridikerroksesta, joka on sekovarressa sienirihmaston ympäröimänä. Ne ovat usein kerrostuneet erillisiin 10 – 30 µm:n paksuisiin kerroksiin ytimen ja ylemmän kuorikerroksen väliin. (Hale 1983: 1, 8.)

Syanobakteerin ja sienen symbioosin hyödyt eivät ole vielä täysin selviä tutkijoille. Oletuksena on, että fotosynteettinen osapuoli parantaa sieniosan ravintoaineiden saantia ja sieniosa edistää leväosassa tapahtuvaa fotosynteesiä. Syanobakteeri myös hyötyy mineraaleista, jotka ovat kertyneet jäkälän sekovarteen. (Hale 1983: 69.)

3 Biotekniset sovellukset

Levistä saatavia aineita käytetään paljon elintarvike- ja lääketeollisuudessa. Muita sovelluksia ovat jäteveden käsittely, kaupallisten kemikaalien ja polttoaineiden tuotto, kosmetiikka sekä terveysvaikutteiset elintarvikkeet. Syanobakteerien laaja-alainen kaupallinen tuotanto on verrattain uusi ilmiö. Syanobakteereita voidaan kasvattaa joko jatkuvina eräviljelminä tankeissa tai puolijatkuvina ulkoaltaissa. (Kerby & Stewart 1988: 319; Rissanen 1999: 18.)

Syanobakteereita voidaan hyödyntää jäteveden käsittelyssä, sillä ne pystyvät sitomaan joitakin metalleja, pääasiassa Pb, Zn, Cd, Cr, Cu ja Ni. Biomassa toimii kuten ioninvaihtaja, ja prosessi on hyvin nopea. Biomassaa voidaan käyttää myös maanparannusaineena, jolla pystytään osaksi korvaamaan fossiilisia polttoaineita. (Ahluwalia & Goyal 2005; Kerby & Stewart 1988: 319; Rissanen 1999: 18, Eur-lex.)

3.1 Lääketieteelliset sovellukset

Syanobakteerit tuottavat sekundaarisia metaboliatuotteita, joilla on paljon mahdollisuuksia niin syöpähoitotutkimuksissa kuten myös antimikrobisissa sovelluksissa (taulukko 1). Monet näistä sekundaarisista metaboliiteista voidaan luokitella peptideiksi, joko ribosomaalisen tai ei-ribosomaalisen biosynteettisen polun lopputuotteiksi. Ei-ribosomaaliset peptidit ovat hyvin kirjava ryhmä luonnontuotteita, joilla on laaja-alaista biologista aktiivisuutta sekä farmakologisia ominaisuuksia. (Fewer *et al.* 2009.)

Monet syanobakteerien tuottamista yhdisteistä, kuten mikropeptiinit, syanopeptoliinit, oscillapeptiinit ja aeruginosiinit, ovat proteaasi-inhibiittoreita. Yleisesti ottaen sykliset peptidit ovat rakenteellisesti yleisimpiä tyyppejä, mutta myös muunlaisia rakenteita, kuten lineaarisia peptideitä, guanidiineja, polyketidejä, alkaloideja, fosfonaatteja tai puriineja, on löydetty. (Namikoshi & Rinehart 1996.) Monia inhibiittoreita voidaan hyödyntää kaupallisesti biosideina eli torjunta-aineina hyönteisiä ja rikkakasveja vastaan.

Syanobakteeritoksiinit ovat epästabiilimpia kuin vastaavat synteettiset torjunta-aineet, eivätkä ne keräänny ympäristöön. (Rastogi & Sinha 2009.)

Chroococcales -ryhmän syanobakteerien metaboliatuotteet ovat potentiaalinen antibioottisten yhdisteiden lähde. Näillä yhdisteillä on inhiboivia ominaisuuksia prokaryoottisia soluja kohtaan ja apoptoottista aktiivisuutta eukaryoottisolulinjoihin, mikä korostaa näiden organismien merkitystä potentiaalisina farmakologisina aineina. Syanobakteerien antibakteerisen aktiivisuuden on huomattu kohdistuvan pääasiassa gram-positiivisiin bakteereihin. Suurin osa gram-negatiivisista bakteereista on vastustuskykyisiä ympäristön myrkyllisille aineille, johtuen niiden ulomman solukalvon lipopolysakkaridikerroksesta. (Rastogi & Sinha 2009.)

Suurin mielenkiinto kohdistuu tällä hetkellä syöpäsoluja tuhoaviin yhdisteisiin. Etenkin maalla elävät syanobakteerit, kuten *Nostoc* sp., näyttäisivät tuottavan antituumoriaalisia yhdisteitä. Näistä esimerkkinä depsipeptidi kryptofysiini, joka on paitsi antifungaalinen yhdiste (sienten kasvua estävä yhdiste), myös tehokas sytotoksiini. Kryptofysiinit ovat peptolideja, ja niistä on yli 25 eri varianttia sekä useita synteettisiä- tai puolisynteettisiä yhdisteitä. Kryptofysiini sitoutuu tubuliiniin (globulaarinen proteiini) ja häiritsee sen toimintaa, mikä johtaa syöpäsolun apoptoosiin. (Sivonen & Börner 2008.)

Useilla syanobakteerimetaboliiteilla on osoitettu olevan antiplasmodiaalista aktiivisuutta. *Oscillatoria* -suvusta eristetyt yhdisteet venturamidi A ja B ovat osoittaneet vähäistä mikromolaarista aktiivisuutta antimalariaalisissa analyyseissa. Myös *Symploca* -suvusta eristetty yhdiste Symplocamidi A toimii aktiivisesti malariaa aiheuttavaa parasiittia vastaan. Lisäksi Symplocamidi A on osoittanut korkeaa sytotoksisuutta syöpäsoluja kohtaan *in vitro* -kokeissa. (Rastogi & Sinha 2009.)

Nostoc -suvun syanobakteerista eristetty alkaloidi nostokarboliini on potentiaalinen koliiniesteraasi -inhibiittori. Tämä entsyymi on kohdistettu Alzheimerin taudin hoitoon. (Rastogi & Sinha 2009.)

Tutkimukset ovat osoittaneet, että syanobakteerit tuottavat monia lupaavia aineita biotekniseen lääketuotantoon tai lääkekandidaateiksi. Tosiasia on kuitenkin, että näiden aktiivisten yhdisteiden biotekninen tuotanto ei vielä ole taloudellisesti mahdollista ja lupaavampien tulosten saamiseksi tarvitaan kehittyneempiä toimintatapoja. (Rastogi & Sinha 2009.) Tulevaisuuden perusta nopeammalle uusien sekundaaristen metabo-

liatuotteiden löytämiselle riippuu myös laajemmasta syanobakteeritoksiinien roolien tunnistamisessa eläinten sekä ihmisten akuuteissa ja kroonisissa terveysongelmissa (Charpy & Larkum 1999: 483).

Taulukko 1. Joitakin yleisiä syanobakteerien sekundaarisia metaboliatuotteita ja niiden biotekniset sovellukset (Rastogi & Sinha 2009).

Yhdiste	Lähde	Biologinen aktiivisuus
Venturamidi A, B	*Oscillatoria* sp.	Antimalariaalinen
Nostokarboliini	*Nostoc* sp.	Antimalariaalinen, koliiniesteraasi-inhibiittori
Symplocamidi A	*Symploca* sp.	Antimalariaalinen, sytotoksinen
Sulfolipidit	*Lyngbya lagerhimii, Phormidium tenue*	Anti-HIV
Aeruginosiini	*Microcystis, Nodularia, Oscillatoria*	Seriiniproteaasi-inhibiittori
Nostocine A	*Nostoc spongiaeforme*	Antibioottinen
Cyanovirin	*Nostoc ellipsosporum*	Anti-HIV, antiviraalinen

3.2 Biomassasta polttoainetta

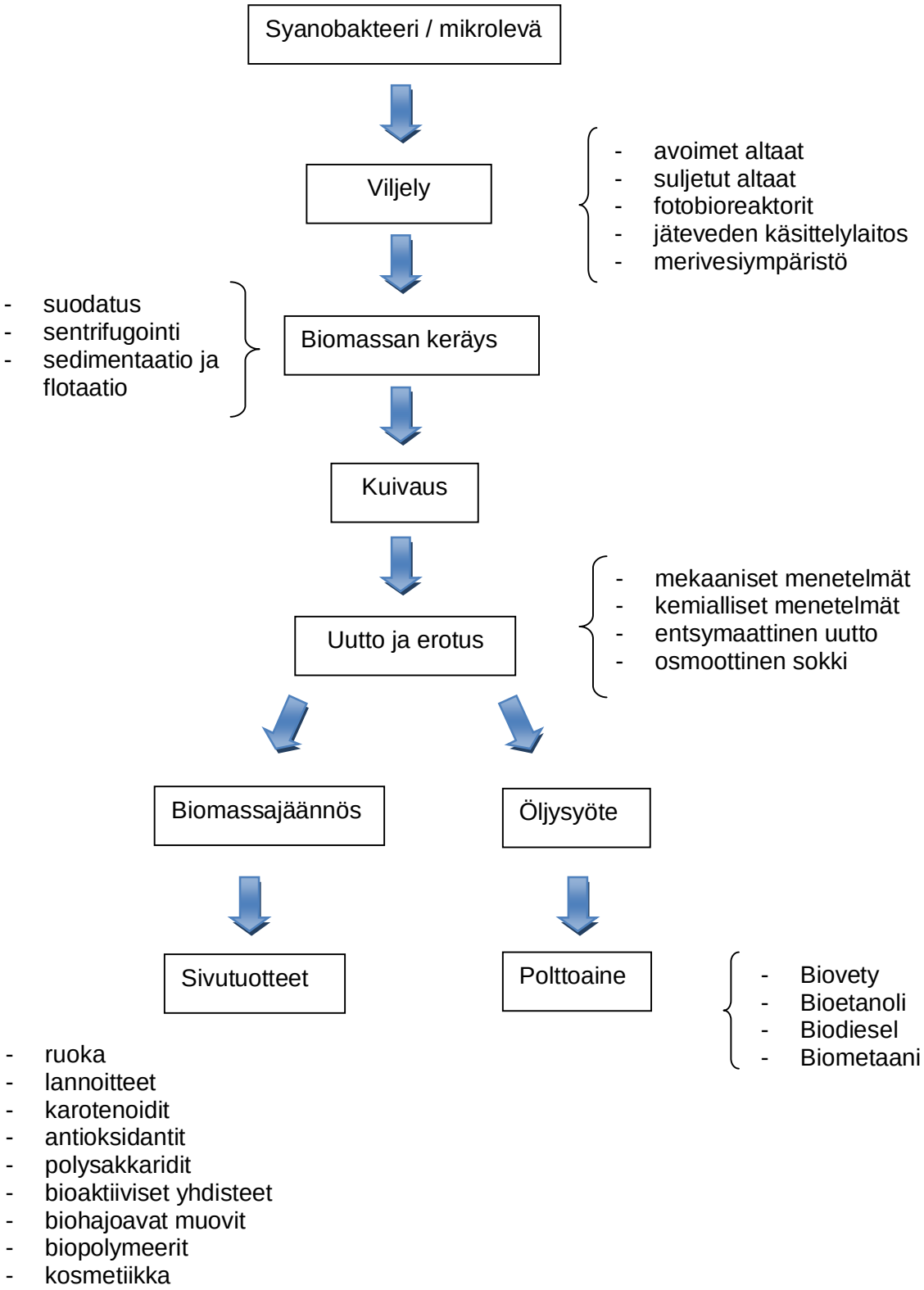
Biopolttoaineiden tutkimisessa ei ole kysymys vain oikeanlaisen biomassan löytämisestä ja sen muuntamisesta bioenergiaksi. Myös biopolttoainetuotannon sivutuotteille on löydettävä taloudelliset ja ympäristönäkökohdat täyttävä käyttötarkoitus. Monet tämänhetkisistä hiilidioksidivapaista energiantuotantosysteemeistä (ydinvoima, tuuli- ja vesivoima) on suunniteltu sähköntuotantoon, joten biopolttoaineet ovat suuren kiinnostuksen kohteena. (Parmar *et al.* 2011.)

Maissin, sokeriruo'on ja palmuöljyn käyttö biopolttoainetuotannossa on jossain määrin ongelmallista ekosysteemin kaventumisen ja ruoan hinnan nousun johdosta. Sen sijaan useilla mikro-organismeihin perustuvilla vaihtoehdoilla on mahdollista tuottaa suuria määriä uusiutuvaa energiaa ilman haittoja. Syanobakteerit voivat muuntaa jopa 10 % aurinkoenergiasta biomassaksi fotosynteesin avulla. Tavallisemmat energiaviljelykasvit sokeriruoko ja maissi, saavuttavat vain 1 % tuoton. Fotosynteettiset mikroorganismit, kuten syanobakteerit ja mikrolevät, voitaisiin mahdollisesti valjastaa biopolt-

toaineen tuotantoon sekä taloudelliset että ympäristönäkökohdat huomioon ottaen. (Parmar *et al.* 2011.)

Syanobakteereilla ja mikrolevillä on monia etuja perinteisiin energiaviljelykasveihin verrattuna. Syanobakteerit voivat käyttää vettä elektronin luovuttajana fotosynteesissä ja hyödyntää vedenlähteenä meri-, murto-, jäte- ja makeaa vettä. Lisäksi niiden kasvutiheys on suuri ja niiden tuottavuus eekkeriä kohden on huomattava verrattuna tavallisiin maakasveihin. Biopolttoaineen lisäksi ne tuottavat arvokkaita sivutuotteita, kuten lannoitteita, karotenoideja, antioksidantteja, biopolymeerejä sekä bioaktiivisia yhdisteitä. (Parmar *et al.* 2011.)

Syanobakteereista saatu biomassa voidaan käyttää suoraan syöteaineena. Biomassa voidaan muuntaa anaerobisesti metaaniksi (biokaasuksi). Syanobakteerit kykenevät anaerobisen fermentaation kautta erittämään myös glukoosia ja sakkaroosia, jotka voidaan muuntaa bioetanoliksi. Lipidit puolestaan voidaan muuntaa biodieseliksi. Biodieseliä on yleensä tuotettu öljykasveista, kuten rapsista ja soijapavuista. Mikrolevät ja syanobakteerit ovat kuitenkin maapallon tehokkaimpia biologisia öljyntuottajia ja monipuolinen biomassan lähde. Voidaan siis todeta, että syanobakteereilla on merkittävää potentiaalia tulevaisuuden vaihtoehtoisena energiamuotona. Biomassan muuntaminen biopolttoaineeksi on esitetty kuviossa 8. (Parmar *et al.* 2011.)



Kuvio 8. Biomassan muuntaminen biopolttoaineiksi (Parmar *et al.* 2011).

3.3 Jäteveden käsittely

Jäteveden käsittely on ollut ensimmäisiä biopuhdistukseen liittyviä sovelluksia ja edelleen tehokas menetelmä saasteiden hallinnassa. Mikrolevien, syanobakteerien ja jäteveden bakteereiden yhteistoiminta parantaa jätteen stabilointialtaiden toimintaa sekä orgaanisen materiaalin, ravinneaineiden ja patogeenien poistoa (taulukko 2). Syanobakteerit lisäävät myös hapen määrää jätevedessä, jolloin erillistä ilmastusta ei tarvita. (Subashchandrabose *et al*. 2011.)

Taulukko 2. Joidenkin syanobakteerien, mikrolevien ja bakteerien yhteistoiminnan tehokkuus ravinneaineiden poistoon jätevedestä (Subashchandrabose *et al*. 2011).

Syanobakteeri/ mikrolevä	Bakteeri	Jäteveden lähde	Ravinneaine ja sen poiston tehokkuus
Spirulina platensis	Sulfaattia pelkistävä bakteeri	Nahkatehtaan jätevesi	Sulfaatti 80 %
Chlorella vulgaris	*Azospirillum brasilense*	Synteettinen jätevesi	Ammoniakki 91 % Fosfori 75 %
C. vulgaris	Jäteveden bakteerit	Esikäsitelty jätevesi	Fosfori 86 % Typpi 99 %
C. vulgaris	*Alcaligenes* sp.	Polttoainetehtaan jätevesi	NH^+_4 45 % Fenoli 100 %
C. sorokiniana	Jäteveden bakteerit	Sikalan jätevesi	Fosfori 31.5 % Typpi 22 %

3.4 Ravitsemus

Mikrolevät ja syanobakteerit, kuten *Nostoc commune* ja *Spirulina* sp., ovat toimineet ravinnonlähteinä eri puolilla maailmaa, erityisesti Aasiassa ja Afrikassa. Levät sisältävät runsaasti proteiinia, kivennäisaineita ja vitamiineja. Niitä käytetään pääasiassa terveysvaikutteisina elintarvikkeina sekä ravintolisinä. Levistä valmistetaan myös muun muassa agaria ja karrageenia. Intiassa useita typpeä sitovia syanobakteereita kasvatetaan ja kerätään istutettaviksi riisiviljelmille typpilannoitteeksi. (Charpy & Larkum 1999: 507; Rissanen 1999: 18.)

Agar on yleisnimitys levistä eristettävälle polysakkaridille. Agarin laatu ja pitoisuus riippuvat etenkin sen fyysis-kemiallisista ominaisuuksista, mutta myös ympäristön rajoituksista. Matalalaatuista agaria käytetään elintarvikkeissa, kuten kuorrutteissa, hyytelöissä, makeisissa ja hedelmämehuissa. Teollisuuden sovelluksia ovat paperin päällystys, tekstiilien värjäys sekä liimat ja sideaineet. Laadultaan keskitasoista agaria käytetään biologisissa kasvualustoissa, tableteissa ja kapseleissa sekä antikoagulanttina. Kaikkein korkealaatuisinta agaria käytetään molekyylibiologisessa erottelussa, kuten elektroforeesissa ja geelikromatografiassa. (Cardozo *et al*. 2007.)

Karrageenit ovat sekalainen ryhmä erilaisia veteen liukenevia sulfatoituja polysakkarideja. Niitä käytetään agaria laajemmin emulgointi- ja stabilontiaineina monissa elintarvikkeissa, kuten vanukkaissa, jäätelöissä, hilloissa, salaatinkastikkeissa, hyytelöissä sekä lihatuotteissa ja lemmikkieläinten ruoissa. Karrageenilla on lisäksi potentiaalisia farmaseuttisia käyttömahdollisuuksia antikoagulanttina sekä lisäksi antituumoriaalisia- ja antiviraalisia ominaisuuksia. (Cardozo *et al*. 2007.)

4 Työn tausta ja tavoitteet

Helsingin Yliopiston syanobakteeritutkimusryhmän eräänä tavoitteena on löytää uusia syanobakteerien tuottamia sekundaarisia metaboliatuotteita. Tämän tavoitteen saavuttamiseksi ylläpidetään HUCC (Helsinki University Cyanobacterial Culture collection) -kantakokoelmaa sekä hankitaan uusia kantoja erityisesti Suomen luonnosta.

Näytteitä kerätään pintavesistä, merenpohjasta ja pinnoilta, kuten kalliolta. Näytteitä voidaan ottaa myös esimerkiksi kotiloiden kuorista. Näytteet siirrostetaan kahdelle erilaiselle maljalle, joista toisen viljelyolosuhteet vastaavat Itämeren ja toisen murtoveden olosuhteita. Maljoja viljellään huoneenlämmössä. Kasvatettuja näytteitä tarkastellaan mikroskoopilla, ja löydetyt syanobakteerit siirrostetaan uudelle maljalle. Näin saadaan aikaan puhdasviljelmä ja lopulta akseeninen (vieraista mikro-organismeista vapaa) viljelmä kantakokoelmaan. Puhdasviljelmää ylläpidetään nesteviljelmissä. Saadusta biomassasta tehdään uutteita, joista testataan, havaitaanko niissä biologista aktiivisuutta jossakin koeasetelmassa. Biologinen aktiivisuus voi olla esimerkiksi antifungaalinen eli sienten kasvua estävä vaikutus. Tämän jälkeen uutteen yhdisteet erotellaan korkean erotuskyvyn nestekromatografilla (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) ja näytteen yhdisteet kerätään erilleen fraktioina. Kerätyistä fraktioista selvitetään, onko niillä bioaktiivista vaikutusta. (Jokela 2012.)

Tämän työn tarkoituksena oli massakasvattaa syanobakteerikantoja, joiden on todettu tuottavan bioaktiivisia yhdisteitä, sekä puhdistaa näitä yhdisteitä. Tavoitteena oli löytää sellaiset parametrit, joilla puhdistettavat yhdisteet erottuvat toisista yhdisteistä, eivätkä retentioajat kasva liian suuriksi.

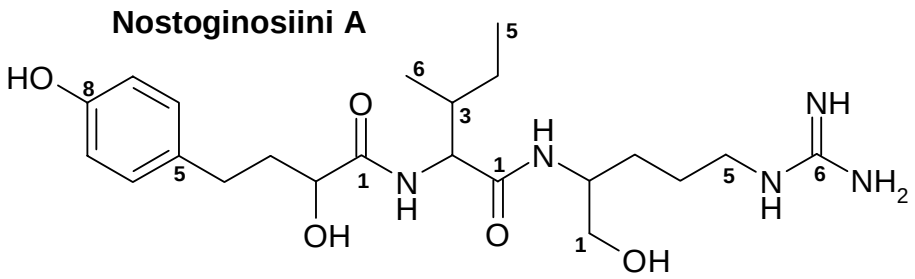
Syanobakteerikannasta XPORK 5A eristettävää yhdistettä kutsutaan nimellä L1. Sen rakenne on toistaiseksi tuntematon. L1 -yhdistettä puhdistetaan milligrammamittakaavassa NMR -analyysiä sekä bioaktiivisuustestejä varten. Yhdisteen monoisotooppinen massa on 1389 Da, joten NMR -analyysiä varten tarvitaan noin 5 – 10 mg mahdollisimman puhdasta yhdistettä. L1 on antifungaalinen yhdiste, josta voisi mahdollisesti kehittyä lähtöyhdiste (drug lead) lääkeainekehitykselle. (Jokela 2012.)

UK2a1m1 -kannasta eristettävä yhdistettä kutsutaan nimellä L2. Se on syklinen peptidi, joka sisältää metyyliproliinia. Yhdisteen monoisotoppinen massa on 1215 Da. Metyyli-

proliini on harvinainen aminohappo, ja tavoitteena on löytää sen avulla uusia sekundaarisia metaboliatuotteita. Yhdisteen antileukeemista ja anti-inflammatorista (tulehdusta estävä) aktiivisuutta on tutkittu, mutta toistaiseksi varsinaista bioaktiivisuutta ei ole ilmennyt. (Jokela 2012.)

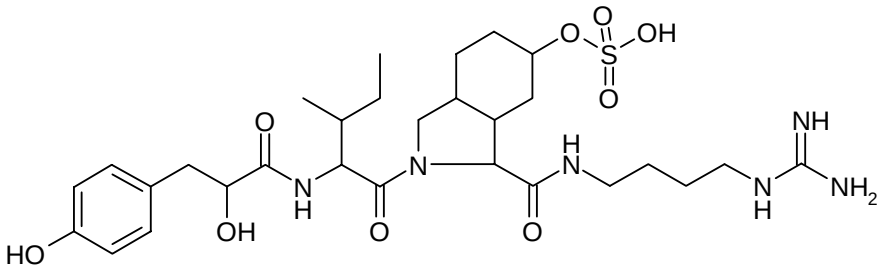
Syke 748A -kannasta eristettävä yhdiste kuuluu hassallidiinipeptideihin. Se on fungisidi, joka estää *Candida albicans* -hiivan kasvua. Tulevaisuudessa yhdiste voisi mahdollisesti toimia niin sanottuna drug lead -yhdisteenä. Yhdisteen rakennetta on selvitetty alustavasti Johanna Vestolan pro gradu - tutkielmassa (Vestola 2011). Yhdisteen tarkan rakenteen selvittämiseksi sitä tulisi puhdistaa noin 5 – 10 mg NMR -analyysiä varten. (Jokela 2012.)

FSN -kannasta tehty uute ei ollut tämän työn alkaessa enää raakauute, vaan se oli jo kerran puhdistettu nestekromatografi-massaspektrometrilla (LC-UV-MS). Kyseessä oli siis uudelleenpuhdistus, jonka tarkoituksena oli tuottaa mahdollisimman puhdas yhdiste, nostoginosiini A (kuvio 9), josta NMR -analyysin avulla voidaan mitata puuttuvat signaalit, jotka ovat välttämättömiä rakenteen ratkaisemisen kannalta. Aiemmin tutkittu näyte sisälsi epäpuhtauksia, jotka haluttiin poistaa.



Kuvio 9. Nostoginosiini A:n oletettu rakenne (Jokela 2012).

Nostoginosiini A:n rakenteen oletetaan olevan kuten aeruginosiinilla yhtä erikoisaminohappoa lukuun ottamatta (kuvio 10). Aeruginosiini on *Microcystis*- ja *Planktothrix* -lajien tuottama seriiniproteaasi-inhibiittori. Nostoginosiini A on yhtä tehokas trypsiini-inhibiittori kuin kaupallisesti saatavilla oleva leupeptiini, joten siitä voisi kehittyä joko drug lead molekyyli tai sitä voitaisiin käyttää tutkimusreagenssina. (Jokela 2012.)



Kuvio 10. Esimerkki aeruginosiinin rakenteesta (Aeruginosiini 2010).

5 Materiaalit ja menetelmät

5.1 Kannat ja kasvatus

Käytetyt syanobakteerikannat XPORK 5A ja UK2a1m1 saatiin Helsingin yliopiston Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitoksen syanobakteeritutkimusryhmän HUCC -kantakokoelmasta. XPORK 5A -kanta on eristetty näytteestä, joka on kerätty Itämerestä Porkkalanniemeltä. UK2a1m1 on eristetty jäkälästä. Syke 748A – näyte on saatu Suomen Ympäristökeskukselta ja *Nostoc* sp. FSN – kanta on eristetty Iranista saadusta ympäristönäytteestä, joka on kerätty riisipellolta Golestanin provinssista vuonna 2003. (Jokela 2012.)

XPORK 5A -kannan pakastekuivatut solut saatiin valmiina kantakokoelmasta. UK2a1m1 -kantaa kasvatettiin Z8 -alustalla, johon lisättiin hivenaineliuosta. Alustan ja hivenaineliuoksen koostumus on esitetty liitteissä 1 ja 2. Massakasvatukset tehtiin 5 litran erlenmeyerpulloissa, joihin alustaa lisättiin kuhunkin noin 2,7 litraa. Alustaa kuplitettiin hiilidioksidikaasulla 15 min ja steriloitiin autoklavoimalla 15 min 120 °C:ssa. Pulloihin asetettiin lisäksi steriloitu 5 ml:n pipetti, jossa silikoniletku sekä steriloitu suodin (Millipore Millex-FG Filter unit ø 0,2 µm) ilmastusta varten (kuvio 11). Autoklavoinnin jälkeen pulloihin siirrostettiin laminaarikaapissa noin 200 ml aiemmin kasvatettua UK2a1m1 – kannan nesteviljelmää. Viljelmiä kasvatettiin huoneenlämmössä noin kolmen viikon ajan ilmakuplituksella ilman ravistelua. Valonlähteenä toimivat loisteputkivalaisimet (Airam Daylight 5000 Deluxe, L 58 W – 950), joita ei sammutettu kasvatuksen aikana. UK2a1m1 -kantaa kasvatettiin yhteensä neljä 17 x 2,7 litran erää.

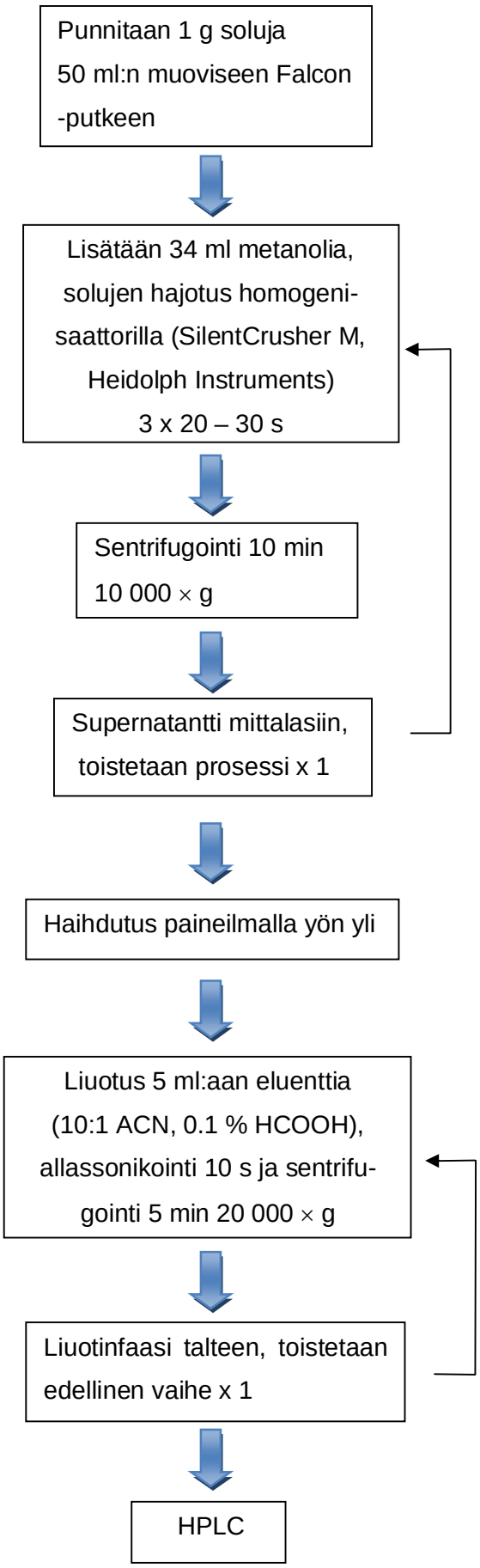
Syke 748A -kantaa viljeltiin 2,7 litraa Z8 -alustalla samoissa olosuhteissa kuin UK2a1m1 – kantaa.

Kuvio 11. Massakasvatusviljelmiä

Kasvatus päätettiin lopettamalla ilmastus ja yhdistämällä kahden erlenmeyer pullon sisältö yhteen pulloon. Pullot asetettiin kallelleen pöydälle ja biomassan annettiin laskeutua pullon pohjalle. Ensimmäisen erän solut kerättiin viikon kuluttua siitä, kun pullot oli jätetty pöydille. Toisen erän solut kerättiin kolmen tunnin kuluessa ja 3. ja 4. erän solut noin vuorokauden kuluttua. Aluksi biomassasta poistettiin suurin osa nesteestä lapolla. Sitten biomassa sentrifugoitiin 15 min 7000 × g ja ylimääräinen neste poistettiin dekantoimalla ja pipetoimalla. Biomassa siirrettiin muovirasiaan ja pakastettiin. Solut oli tarkoitus pakastekuivata, mutta näin ei tehty, koska pakastekuivain rikkoutui.

5.2 Näytteiden esikäsittely

XPORK 5A -kannan pakastekuivatut solut esikäsiteltiin kuvion 12 mukaisesti. Syke 748A- ja FSN -kantojen biomassat olivat valmiiksi esikäsiteltyjä uuttamalla ja haihduttamalla. Haihdutusjäännökset liuotettiin analyysia varten eluentilla.



Kuvio 12. XPORK 5A -kannan pakastekuivattujen solujen esikäsittely.

5.3 Yhdisteiden puhdistus

5.3.1 HPLC

Yhdisteiden puhdistus tehtiin korkean erotuskyvyn nestekromatografilla (HPLC), jonka avulla näytteen sisältämät yhdisteet eroteltiin toisistaan. Normaali- ja käänteisfaasinestekromatografiassa yhdisteiden poolisuus vaikuttaa siihen, kuinka voimakkaasti erotettavat yhdisteet tarttuvat stationääriseen faasiin. Stationäärifaasin ollessa pooliton poolittomat yhdisteet tarttuvat siihen voimakkaasti ja pooliset heikosti. (Jaarinen & Niiranen 2005: 140, 142; Jokela 2012)

Analyyseissä käytetyt kolonnit on pakattu poolittomalla silikaan sidotulla C18 -faasilla. Eluenttina käytetty asetonitriili (ACN) on vettä poolittomampi orgaaninen liuotin. Vähennettäessä orgaanisen liuoksen määrää eluentissa saadaan resoluutio paremmaksi, mutta tällöin myös retentioajat kasvavat. Resoluutio kuvaa piikkien erottumista toisistaan. Retentioaika on aika, joka kuluu mittauksen aloituksesta siihen, kun yhdiste päätyy detektorille. Mitä suurempi retentioaika, sitä kauemmin yhdiste viipyy kolonnissa ja sitä pidempi on analyysiaika. Jos retentioaika on liian lyhyt, yhdiste tulee ulos kolonnista nopeasti eikä yhdiste ehdi erottua kunnolla toisista yhdisteistä. Tämä ilmenee kromatogrammissa esimerkiksi kaksoispiikkeinä eli piikkeinä, jotka ovat sulautuneet osittain yhteen. Kromatogrammi kuvaa näytteen yhdisteiden aiheuttamia muutoksia mitattavassa signaalissa (UV/TIC, UltraViolet/Total Ion Chromatogram) ajan funktiona. Isokraattisessa ajossa eluentin koostumusta ei muuteta ajon aikana. Gradienttiajossa eluenttia muutetaan lineaarisesti tai portaittain. (Jaarinen & Niiranen 2005: 142 - 143, 154; Wahlsten 2012; Jokela 2012)

5.3.2 LC-UV-MS

Syke 748A -näyte analysoitiin HPLC:n lisäksi nestekromatografi-massaspektrometri -laitteistolla, jossa on UV -detektori (LC-UV-MS). Massaspektrometrin ionilähteessä yhdiste ionisoidaan joko positiiviseksi tai negatiiviseksi ioniksi. Pilkkomisvaiheessa ionisoituneen molekyylin sidokset katkeavat ja molekyyli-ioni pilkkoutuu neutraaleiksi ja ionisiksi fragmenteiksi. Varautuneet fragmentit ohjataan sähkö- ja magneettikenttään, jossa fragmentit erotellaan toisistaan niiden massa-varaussuhteen (*m/z*) mukaan. Tuoteionimassaspektrin piikkien sijainnista nähdään, minkä massaisiin osiin molekyyli on

hajonnut, ja piikkien korkeudesta käy ilmi niiden suhteellinen määrä. Tämän pohjalta voidaan päätellä yhdisteen rakenne. (Jaarinen & Niiranen 2005: 122; Jokela 2012.)

5.3.3 XPORK 5A

HILIC -kolonni (150 x 2 mm, partikkelikoko 5 µm, huokoskoko 200 Å, Phenomenex, USA) eluoitiin isokraattisesti 0.2 ml min^{-1} eluentilla, jonka koostumus oli 10 % ammoniumformiaatti (liuotin A) ja 90 % asetonitriili (liuotin B). Esikäsitelty näyte injektoitiin 100 µl:n erissä kolonniin. Puhdistetava yhdiste L1 kerättiin kolonnista retentioajalla 14.9 – 22.0 min (kuvio 13) ja kerätty liuos kuivattiin paineilmalla.

Osittain puhdistettu yhdiste L1 liuotettiin asetonitriiliin ja kolonni eluoitiin isokraattisesti 1 ml min^{-1} 62.5 % A -liuoksella ja 37.5 % B -liuoksella.

5.3.4 Syke 748A

Kuivattu näyte liuotettiin 1 ml:aan eluenttia (suhteessa 8:2 asetonitriiliä ja 0.1 % HCOOH:n vesiliuosta), sonikoitiin ja sentrifugoitiin 5 min 20 000 × g. Sentrifugoinnin jälkeen näyte siirrettiin lasiseen ampulliin. Luna C8(2) -kolonni (150 x 4.6 mm, partikkelikoko 5 µm, huokoskoko 100 Å, Phenomenex, USA) pestiin 95 % asetonitriilillä ja tasapainotettiin 80 % asetonitriilillä. Kolonni eluoitiin isokraattisesti 1:1 muurahaishapon 0.1 % vesiliuoksella (liuos A) ja 100 % asetonitriilillä (liuos B). Tämän jälkeen etsittiin sopivat parametrit, joilla piikit erottuvat hyvin (taulukko 3).

Taulukko 3. Näytteiden optimoidut HPLC -parametrit

NÄYTE	XPORK 5A	Syke 748A	FSN
Kolonni	HILIC	C8	C18
Injektiotilavuus	75 µl	100 µl	40 µl
Virtausnopeus	1 ml min^{-1}	5 ml min^{-1}	0.75 ml min^{-1}
Liuos A	62.5 % HCOOH (0.1 %)	60 % HCOOH (0.1 %)	82.5 % TFA (0.1 %)
Liuos B	37.5 % ACN	40 % ACN	17.5 % ACN

Tämän jälkeen kolonni vaihdettiin halkaisijaltaan suurempaan (ø 10 mm). Kolonni pestiin 95 % asetonitriilillä ja virtausnopeutta nostettiin 1 ml -> 5 ml aina 1 ml kerrallaan. Kolonni tasapainotettiin 40 % asetonitriilillä, jonka jälkeen ajettiin näyte. Näytteestä kerättiin fraktio retentioajalla 16.6 – 17.6 min (Kuvio 17).

Käänteisfaasiuuttopatruunan (Strata C18, Phenomenex, USA) hiiliketjut aktivoitiin ajamalla sen läpi 10 ml metanolia ja tasapainotettiin 10 ml:lla 20 % asetonitriiliä. C8 -kolonnista kerätyt fraktiot ja eluentti laimennettiin 1:1 Milli-Q -vedellä ja ajettiin kiinteäfaasiuuttopatruunan läpi. Lopuksi patruunan läpi ajettiin 10 ml 20 % asetonitriiliä ja kolonnia kuivattiin paineilmalla noin 30 min. Tämän jälkeen kolonnin läpi ajettiin 10 ml metanolia, joka kerättiin lasiseen koeputkeen. Näyte kuivattiin vakuumisentrifuugissa ja liuotettiin eluenttiin (suhteessa 40:60 ACN ja 0.1 % HCOOH:n vesiliuos), minkä jälkeen näyte ajettiin HPLC:llä käyttäen Luna C8(2) -käänteisfaasikolonnia (ø 10 mm, pituus 150 mm, 5 µm, 100 Å, Phenomenex, USA) ja taulukon 3 parametrejä. Fraktiot kerättiin talteen retentioajalla 16.6 – 17.6 min ja operaatiot toistettiin kunnes koko näyte oli käsitelty. Puhdistetun fraktion puhtaus analysoitiin LC-UV-MS -laitteella. Ajoparametrit on koottu taulukkoon 4.

Taulukko 4. *Anabaena* hassallidiini -yhdisteen LC-UV-MS -ajoparametrit

Ionivaraus	Positiivinen
Ionilähde	ESI (ElectroSpray Ionisation)
Kuivauskaasulämpötila	325 °C
Sumuttimen kaasunpaine	15 psi
Kuivauskaasun virtausnopeus	5 l min^{-1}
HV -kapillaari (High Voltage)	5000 V
Pyyhkäisyalue	300 – 2200 *m/z*
Injektionäytetilavuus	5 µl
Eluentin virtausnopeus	0.150 ml min^{-1}
Liuos A	70 % HCOOH (0.1 %)
Liuos B	30 % ACN
Pysäytysaika	49 min
Tasapainotusaika	11 min

Vakuumisentrifuugissa kuivattu näyte liuotettiin metanoliin, punnittiin ja kuivattiin uudelleen vakuumisentrifuugissa. Kuivauksen jälkeen näyte jälleen punnittiin. Tyhjälle kontrolliampullille suoritettiin samat operaatiot.

5.3.5 FSN

Kuivattu näyte liuotettiin eluenttiin (12.5 % ACN + 87.5 % trifluorietikkahapon 0.1 % vesiliuos), allassonikoitiin ja sentrifugoitiin 5 min 20 000 × g. Luna C18(2) -kolonni (150 x 4.6 mm, 5 µm, 100 Å, Phenomenex, USA) eluoitiin isokraattisesti 17.5 % ACN ja 82.5 % TFA (0.1 %). Etsittiin sopivat parametrit, jolla piikit erottuvat hyvin (taulukko 3). Fraktiot kerättiin talteen retentioajalla 13.4 – 16.0 min (kuvio 22).

6 Tulokset ja tulosten tarkastelu

6.1 Kasvatus

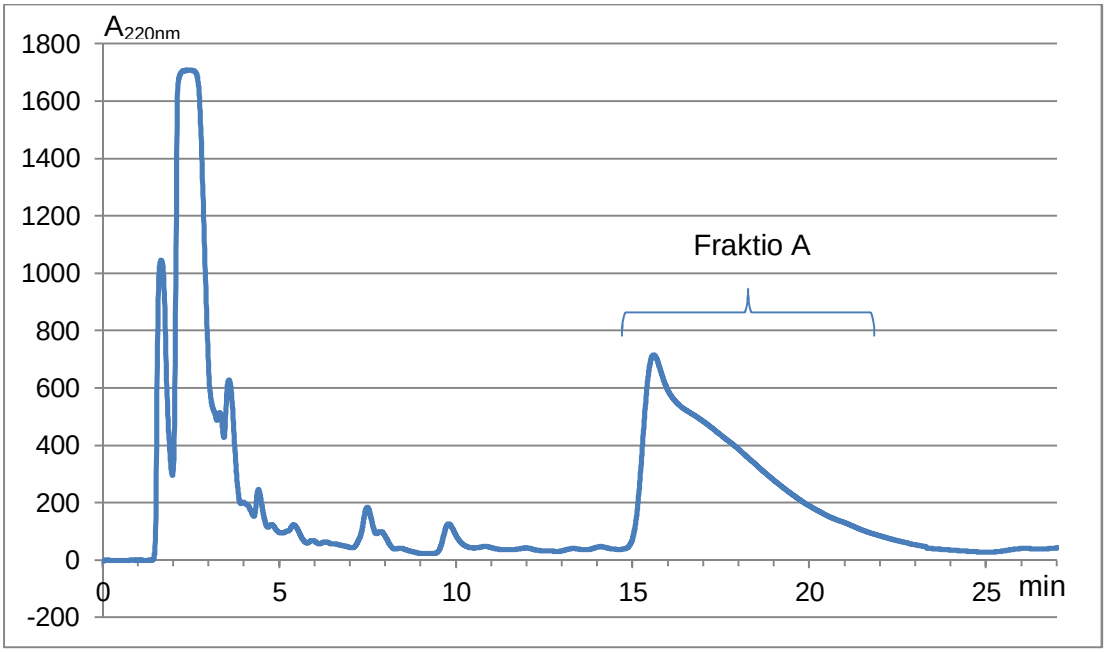
Neljästä viljellystä UK2a1m1 -erästä yksi menetettiin, sillä solut hajosivat, koska niitä ei kerätty riittävän nopeasti pullojen yhdistämisen ja ilmastuksen lopettamisen jälkeen. Solujen hajoaminen johtuu kasvatusolosuhteiden muutoksesta (ilmastuksen ja valaistuksen lopettaminen) sekä vieraiden mikro-organismien pääsystä kasvatusalustoihin. Solujen hajoaminen todettiin kasvatusalustan värjääntymisestä sinivioletiksi. Syanobakteerit sisältävät fykosyaniini -nimistä väriainetta, joka sitoo auringonvaloa syanobakteerien yhteyttäessä. Sininen väriaine vapautuu soluista niiden kuollessa ja värjää kasvatusalustan. (Rissanen 1999: 30.) Myös 3. ja 4. erän soluista osa ehti hajota, mutta biomassa kerättiin talteen siitä huolimatta.

Solujen hajoamisen vaikutuksia puhdistettavan yhdisteen saantoon ei voitu tutkia, sillä kylmäkuivain rikkoutui ennen kuin biomassa saatiin kuivattua. Samasta syystä myöskään Syke 748A -kannasta kasvatettua biomassaa ei voitu tutkia ja puhdistus tehtiin valmiiksi esikäsitellystä näytteestä.

6.2 Puhdistus ja optimointi

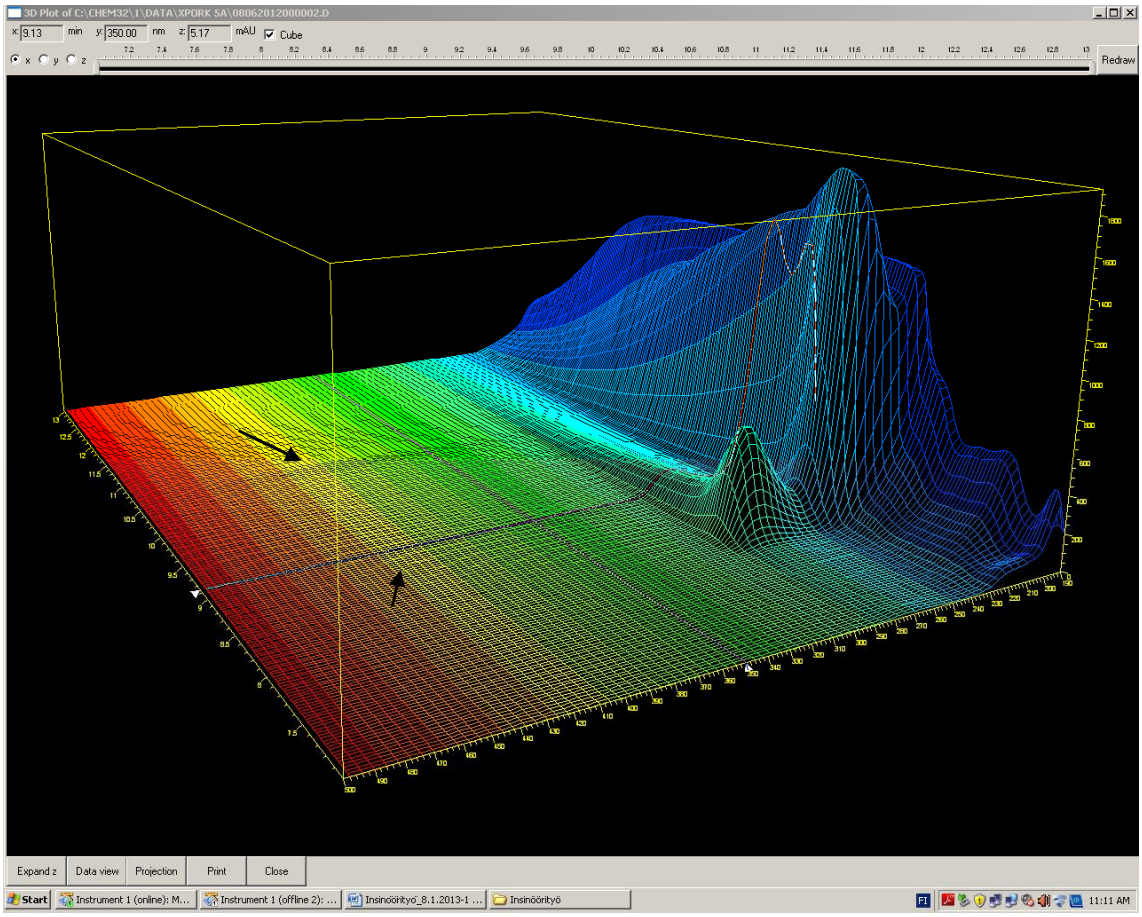
6.2.1 XPORK 5A

Puhdistettava yhdiste L1 kerättiin kolonnista retentioajalla 14.9 – 22.0 min (fraktio A, kuvio 13). Piikki oli poikkeuksellisen leveä ja epäsymmetrinen, joten yhdisteen oletettiin sisältävän epäpuhtauksia.



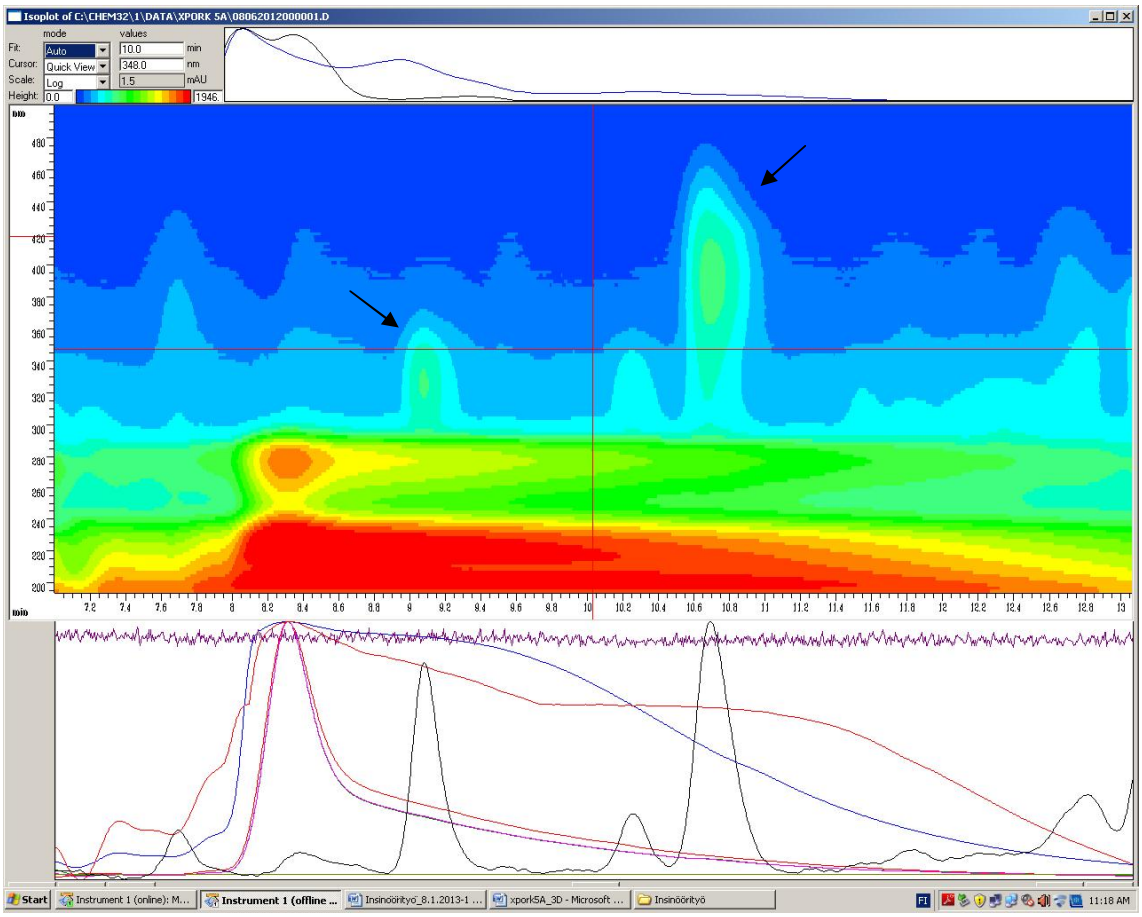
Kuvio 13. XPORK 5A:n metanoliuutteen HPLC-UV (220 nm) -kromatogrammi. Ajo-olosuhteet on kuvattu taulukossa 3.

Kerätty fraktio A ajettiin uudelleen HPLC:llä ja ensimmäisen injektoinnin (75 µl) jälkeen tarkasteltiin kromatogrammin 3D -kuvaajaa, josta selvitettiin epäpuhtauksien retentioajat (kuvio 14). 3D -kuvaajan (x = aika, y = absorbanssi, z = UV -ilmaisimen aallonpituus) avulla nähdään, onko yhdisteen mukana eluoitunut samaan aikaan pienemmän signaalin antavia yhdisteitä, jotka näkyvät varsinaisen yhdisteen takana.



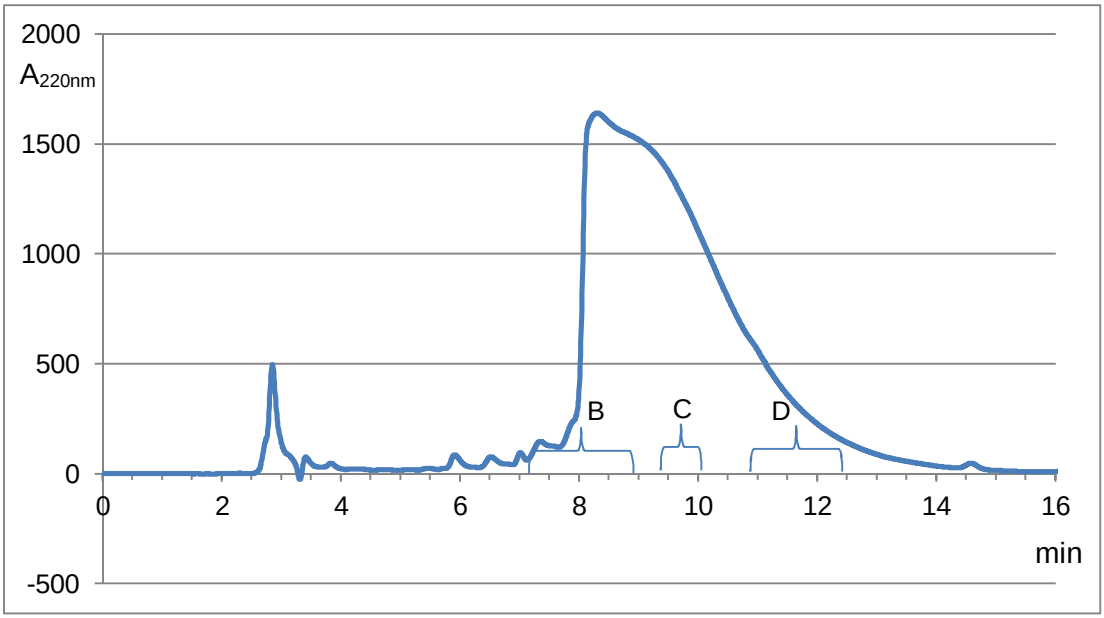
Kuvio 14. XPORK 5A:n kannasta puhdistetun L1 -yhdisteen 3D -kuvaaja, jossa epäpuhtaudet näkyvät yhdisteen antaman signaalin takana matalina kohoumina.

Mikäli epäpuhtauksien signaalit ovat heikosti havaittavissa, voidaan 3D -kuvaajan lisäksi tarkastella Isoplot -kuvaajaa (Kuvio 15). Isoplot -kuvaaja kuvaa piikkien intensiteettiä värien avulla. Mitä vahvemman signaalin yhdiste antaa, sitä tummemman punaisena alue näkyy.



Kuvio 15. XPORK 5A:n kannasta puhdistetun L1 -yhdisteen Isoplot -kuvaaja. Mitä vahvemman signaalin yhdiste antaa, sitä tummemman punaisena alue näkyy. Epäpuhtauksien signaalit on merkitty kuvaan nuolilla.

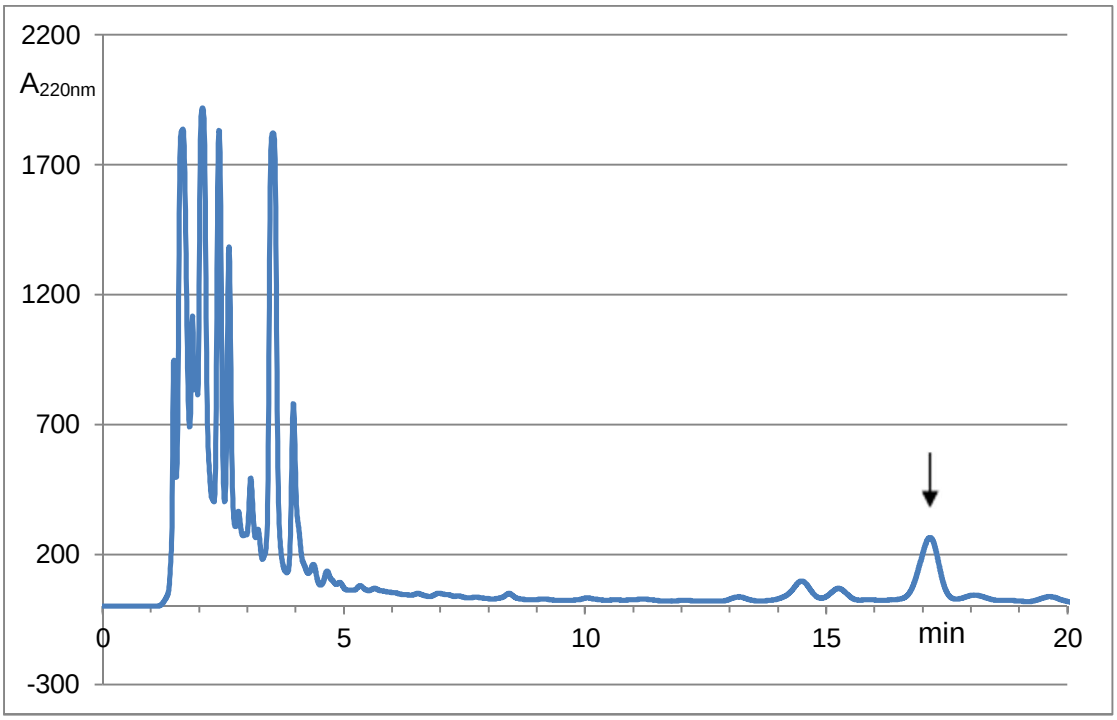
Seuraavista injektoinneista kerättiin fraktiot B, C ja D retentioajoilla 7.2 – 8.9 min, 9.4 – 10.1 min ja 10.9 – 12.4 min (kuvio 16). Fraktiot B, C ja D ovat tutkittavaa yhdistettä L1 ja epäpuhtaudet ovat fraktioiden väleissä.



Kuvio 16. Esipuhdistetun L1:n (fraktio A) HPLC -kromatogrammi. Uudet fraktiot B, C ja D kerättiin välttäen L1 piikin sisältämiä epäpuhtauksia 3D - ja Isoplot -kuvaajien avustuksella.

6.2.2 Syke 748A

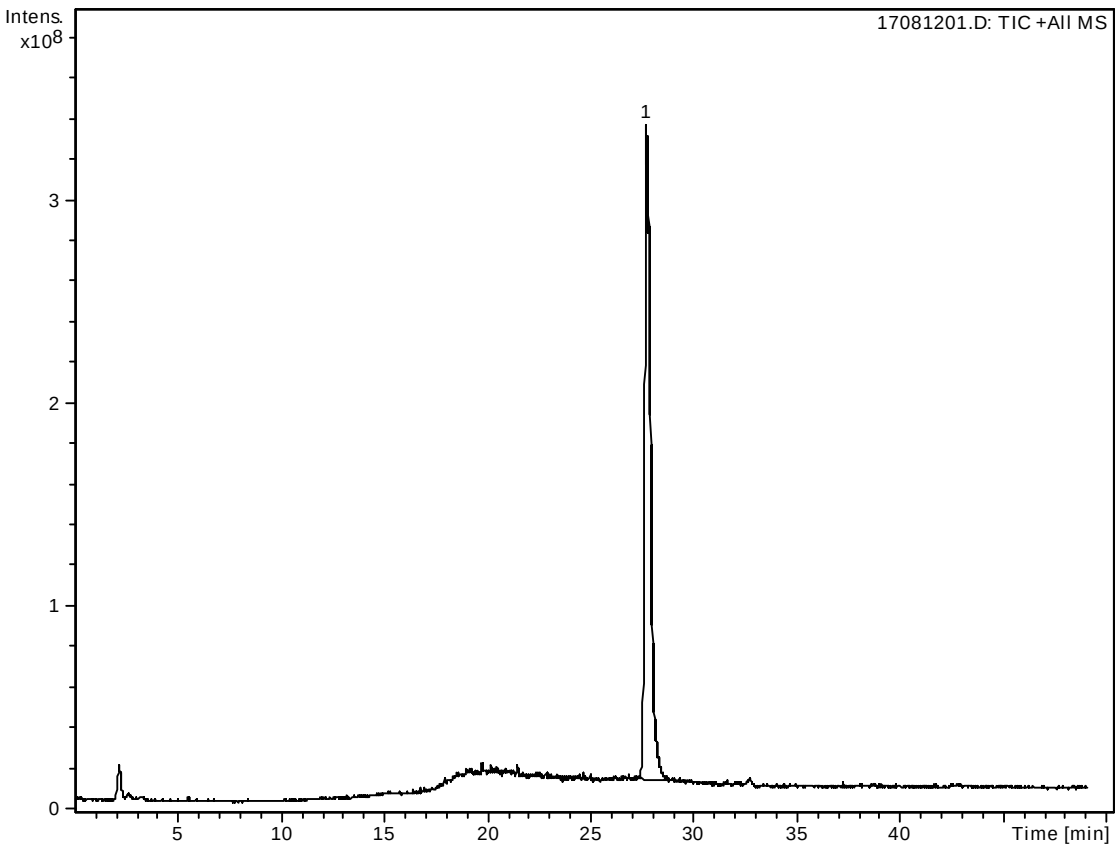
Uutteesta kerättiin hassallidiinin sisältävä fraktio retentioajalla 16.6 – 17.6 min (kuvio 17).



Kuvio 17. Syke 748A:n HPLC-UV -kromatogrammi. Nuoli osoittaa hassallidiinin *Anabaena* -varianttipiikin sijainnin kromatogrammissa. Ajo-olosuhteet on kuvattu taulukossa 3.

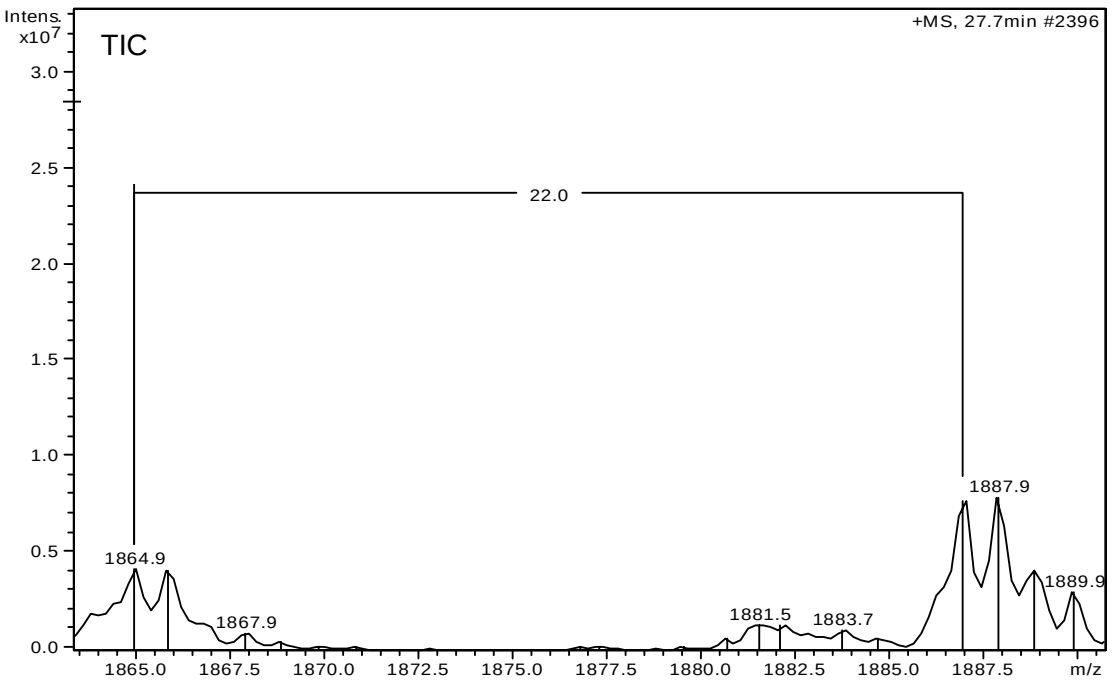
Syke 748A -näytteestä puhdistettua hassallidiinin *Anabaena* -varianttia saatiin 1.28 mg. Määrä on hieman liian pieni, jotta sen rakenne voitaisiin selvittää luotettavasti NMR -analyysillä. Tämä hassallidiinimolekyyli on kooltaan suuri (monoisotooppinen massa 1863 Da), joten tarkan rakenteen selvittämiseksi puhdasta yhdistettä tarvitaan 5 – 10 mg.

Puhdistetun hassallidiinin totaali-ionikromatogrammista (TIC) nähdään, että yhdisteen puhdistus HPLC:llä onnistui hyvin (kuvio 18). Spektrissä nähdään vain yhdisteen tuottama piikki eikä epäpuhtauksia ole havaittavissa.



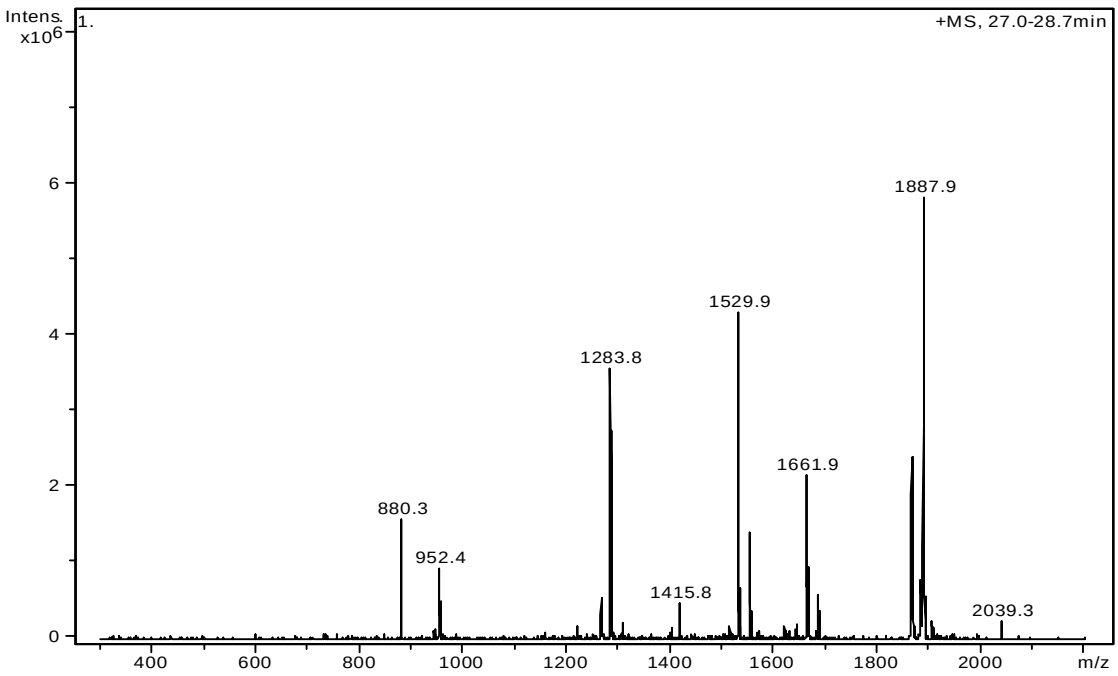
Kuvio 18. Hassallidiinin totaali-ioni (TIC) -kromatogrammi. Kromatogrammi sisältää vain aikavälillä 27 – 27.8 min eluoituvan hassallidiinin *Anabaena* -variantin piikin (1), joka osoittaa, että puhdistettu yhdiste ei sisällä käytetyissä olosuhteissa ionisoituvia epäpuhtauksia.

Massaspektriä tulkitessa haetaan ensin molekyyli-ionia vastaava piikki. Hassalidiinin protonoituneen molekyyli-ionin massa on *m/z* 1864.9 (kuvio 19). Spektrin suurimmalle piikille annetaan arvo 100 %, johon muiden piikkien koot suhteutetaan. Sen jälkeen pyritään löytämään sopiva neutraalin osan lohkeama, jolla suurin piikki voidaan selittää. Neutraalin osan massa on molekyyli-ionin massan ja suurimman piikin massan erotus. Samaan tapaan selvitetään muiden lohjenneiden ionien ja neutraalien kappaleiden massat. (Jaarinen & Niiranen 2005: 130; Jokela 2012.)



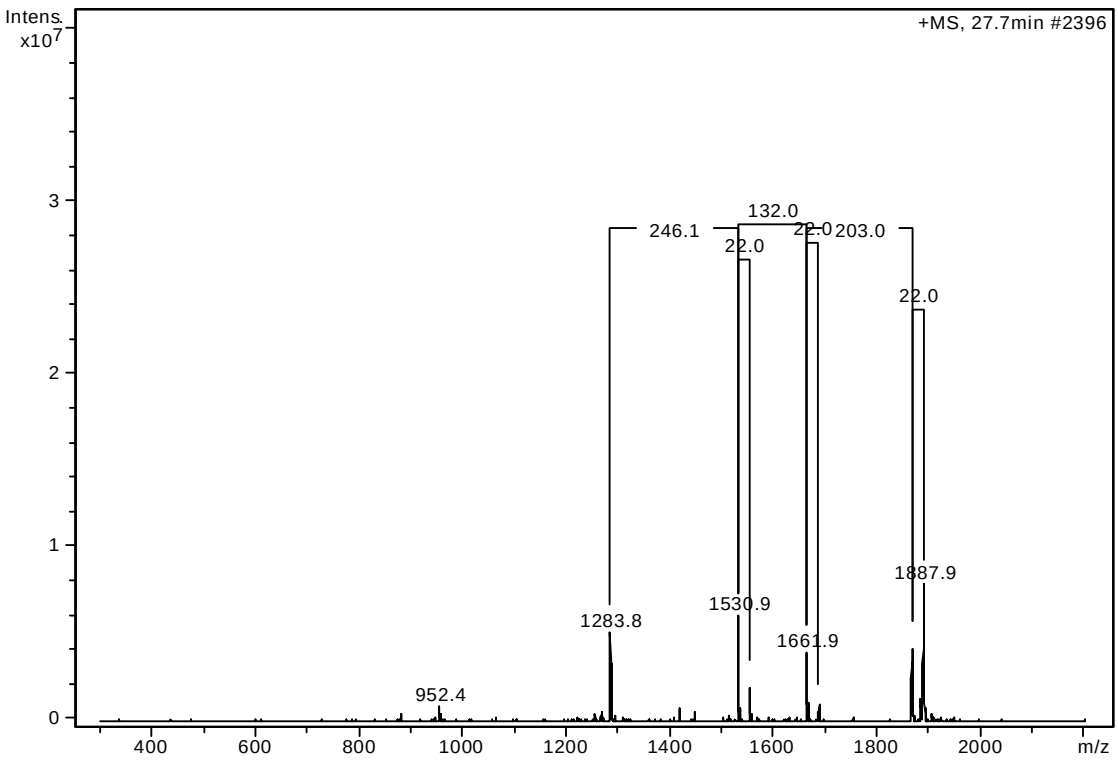
Kuvio 19. Hassallidiinin *Anabaena* -variantin protonoitunut molekyyli-ioni *m/z* 1864.9 ja natrium-addukti *m/z* 1886.9. Kuviossa esitetty spektri on laajennus alueella *m/z* 1863 – 1891 kuviossa 21 esitetystä massaspektristä.

Hassallidiinin *Anabaena* -variantin massaspektri on esitetty kuviossa 20. Siitä nähdään yhdisteen sisältämien glykosidiosien irtoaminen natiivimolekyylistä, ja seurauksena syntyvät ydinpeptidi-ioni *m/z* 1283.8, ionit *m/z* 1529.9 *ja m/z* 1661.9, vastaavat natrium-adduktit sekä muutamat muut hassallidiinin pilkkoutumisesta muodostuneet ionit. Tämä summaspektri edustaa koko puhdistettua hassallidiinin *Anabaena* -varianttipreparaatin aikaansaamaa kromatogrammipiikkiä 1 (kuvio 18). Koska spektrissä ei esiinny merkittäviä muista yhdisteistä peräisin olevia ioneja, se osoittaa, että yhdisteen puhtausaste on hyvä. (Jokela 2012.)



Kuvio 20. Hassallidiini *Anabaena* -variantin *m/z* 1864 MS^1 summamassaspektri aika-alueella *m/z* 27 – 28.7 min ja massa alueella *m/z* 1200 – 2000. Esitetty massaspektri edustaa kuviossa 18 esitetyn kromatogrammin hassallidiini *Anabaena* -variantin piikkiä 1. Ydinpeptidiä edustaa ioni *m/z* 1283.8. Ioni *m/z* 1529.9 edustaa ydinpeptidiä ja yhtä glykosidiyksikköä, diasetyyliheksoosia (*m/z* 1283.8 + 246.1 Da = *m/z* 1529.9). Ioni *m/z* 1661.9 edustaa ydinpeptidiä ja kahta glykosidiyksikköä, diasetyyliheksoosia ja pentoosia (*m/z* 1529.9 + 132 Da = *m/z* 1661.9). Ioni *m/z* 1864.9 edustaa ydinpeptidiä ja kolmea glykosidiyksikköä, diasetyyliheksoosia, pentoosia ja N-asetyyliheksosamiinia (*m/z* 1661.9 + 203 Da = *m/z* 1864.9).

Kuviosta 20 nähdään hassallidiini *Anabaena* -variantin *m/z* 1864 MS^1 summamassa-spektri aika-alueella *m/z* 27 – 28.7 min ja massa alueella *m/z* 1200 – 2000. Esitetty massaspektri edustaa kuviossa 18 esitetyn kromatogrammin hassallidiini *Anabaena* -variantin piikkiä 1. Ydinpeptidiä edustaa ioni *m/z* 1283.8. Ioni *m/z* 1529.9 edustaa ydin-peptidiä ja yhtä glykosidiyksikköä, diasetyyliheksoosia (*m/z* 1283.8 + 246.1 Da = *m/z* 1529.9). Ioni *m/z* 1661.9 edustaa ydinpeptidiä ja kahta glykosidiyksikköä, diasetyyli-heksoosia ja pentoosia (*m/z* 1529.9 + 132 Da = *m/z* 1661.9). Ioni *m/z* 1864.9 edustaa ydinpeptidiä ja kolmea glykosidiyksikköä, diasetyyliheksoosia, pentoosia ja N-asetyyliheksosamiinia (*m/z* 1661.9 + 203 Da = *m/z* 1864.9). (Jokela 2012.)

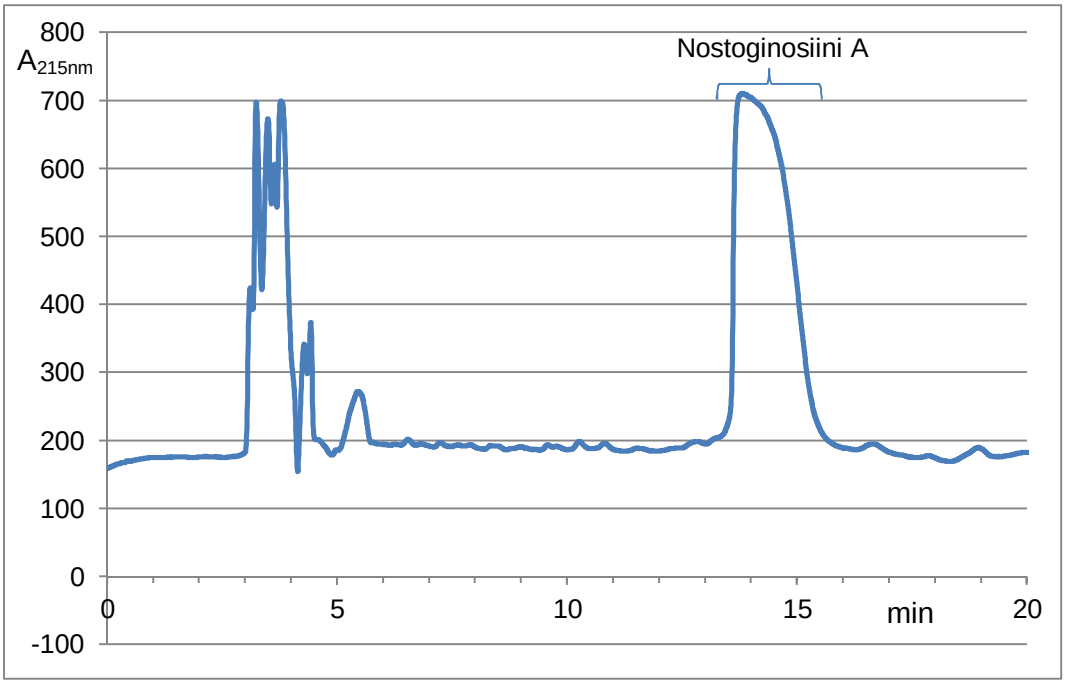


Kuvio 21. Hassallidiini *Anabaena* -variantin massaspektri MS^1 kuviossa 18 esitetyn kromatogrammipiikin 1 intensiteettimaksimista alueella *m/z* 1200 – 2000, johon on merkitty yhdisteen sisältämien glykosidiosien neutraalimassat 246 Da (diasetyyliheksoosi), 132 Da (pentoosi) ja 203 Da (N-asetyyliheksosamiini) sekä natriumadduktit.

Kuviossa 21 on esitetty hassallidiini *Anabaena* -variantin massaspektri MS^1 kromatogrammipiikin 1 (kuvio 18) intensiteettimaksimista alueella *m/z* 1200 – 2000, johon on merkitty yhdisteen sisältämien glykosidiosien neutraalimassat 246 Da (diasetyyliheksoosi), 132 Da (pentoosi) ja 203 Da (N-asetyyliheksosamiini) sekä natriumadduktit (protonoituneen ja natriumaddukti -ionin välinen massaero on 22 Da). (Jokela 2012.)

6.2.3 FSN

Esipuhdistettu nostoginosiini A uudelleenpuhdistettiin HPLC:llä. Nostoginosiini A eluoitui retentioajalla 13.4 – 16.0 min (kuvio 22). Piikin epäsymmetrinen muoto osoittaa erotuskolonnin ylikuormittumisen (piikki nousee kohtisuoraan ylös ja laskee loivemmin alas). Tämä ei kuitenkaan estänyt yhdisteen puhdistusta. Kromatografia-ajoista kerätyt fraktiot kerättiin yhteen, jotka tuottivat puhdistetun nostoginosiini A -yhdisteen.



Kuvio 22. FSN -näytteen HPLC-UV (215 nm) – kromatogrammi. Ajo-olosuhteet on kuvattu taulukossa 3.

Insinöörityön kokeellisen osuuden päätyttyä puhdistettua yhdistettä käytettiin nostoginosiini A:n NMR -analyysissä, jonka avulla yhdisteen lopullinen rakenne saatiin varmistettua kuviossa 9 esitetyn kaltaiseksi. Rakenteen varmistuttua tuloksista tehty käsikirjoitus lähetettiin joulukuussa 2012 arvioitavaksi kansainväliseen vertaisarvioituun Journal of Natural Products -lehteen.

7 Yhteenveto

Insinöörityössä puhdistettiin neljän syanobakteerikannan tuottamia bioaktiivisia yhdisteitä. Työn tarkoituksena oli löytää sellaiset parametrit, joilla yhdisteet erottuvat hyvin eivätkä retentioajat kasva liian suuriksi. Tulevaisuudessa bioaktiivisista yhdisteistä voidaan mahdollisesti kehittää lääkkeitä sekä tutkimuksen apuna käytettäviä solureagensseja.

Tutkimukset koostuivat syanobakteerikantojen kasvatuksesta, biomassasta tehtyjen uutteiden nestekromatografisista määrityksistä ja yhdisteiden puhdistuksesta.

Bioaktiivisia yhdisteitä oli tarkoitus puhdistaa milligrammamittakaavassa bioaktiivisuustestejä sekä NMR -analyysiä varten, jotta saataisiin selville yhdisteiden rakenne. Tätä varten UK2a1m1 -kantaa kasvatettiin Z8 -alustalla kolmen viikon ajan, jonka jälkeen solut kerättiin talteen ja pakastettiin. XPORK 5A -kannan solut saatiin valmiiksi kuivattuina yliopiston HUCC -kantakokoelmasta. Syke 748A- ja FSN -kantojen solut olivat valmiiksi esikäsiteltyjä. Näytteet ajettiin HPLC:llä, ja ajo-olosuhteita muutettiin sen mukaan, miten hyvin yhdisteet erottuivat toisistaan.

Yhdisteiden retentioajat saatiin optimoitua välille 7.2 – 22.0 min ja piikit erottuivat hyvin. Mahdollisten epäpuhtauksien retentioaikoja selvitettiin tarkastelemassa yhdisteen 3D -kuvaajaa. Osa epäpuhtauksista eluoitui samaan aikaan yhdisteen kanssa, eikä niitä kaikkia saatu täydellisesti puhdistettua. Todettiin, että kuivattuja soluja olisi pitänyt punnita uuttoa varten enemmän, sillä yhdistettä ei saatu puhdistettua riittävästi LC-UV-MS -analyysiä varten. UK2a1m1 -kannan tuottamaa yhdistettä ei voitu puhdistaa, sillä kylmäkuivain rikkoutui ennen kuin biomassa saatiin kuivattua.

Lähteet

Aeruginosiini. 2010. http://www.plant-expert.com/plant-1166.html. Luettu 20.12.2012.

Ahluwalia, S. S & Goyal, D. 2005. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852405005675

Biocyclopedia. 2012. Last Universal Ancestor. http://www.biocyclopedia.com/index/last_universal_ancestor.php. Luettu 13.11.2012.

Cardozo, K. H. M. – Guaratini, T. – Barros, M. P. – Falcão, V. R. – Tonon, A. P. – Lopes, N. P. – Campos, S. – Torres, M. A. – Souza, A. O. – Colepicolo, P. – Pinto, E. 2007. Metabolites from algae with economical impact. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1532045606001530

CCALA. 2012. Culture Collection of Autotrophic Organisms. http://ccala.butbn.cas.cz/col_images/850.jpg. Luettu 13.11.2012.

Charpy, L. & Larkum, A. W. D. 1999. Marine Cyanobacteria. Bulletin de l'Institut océanographique, Monaco.

Chorus, I. & Bartram, J. 1999. Toxic Cyanobacteria in Water. St Edmundsbury Press, Suffolk.

Eur-lex. Euroopan talous- ja sosiaalikomitean lausunto aiheesta Kestävä kehitys, teollisuuden muutosten liikkeelle paneva voima. http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:52006IE1142:FI:NOT

Falkowski, P. G & Raven, J. A. 2007. Aquatic Photosynthesis. 2nd Edition. Princeton University Press, New Jersey.

Fewer, David P. – Jokela, Jouni – Rouhiainen, Leo – Wahlsten, Matti – Koskenniemi, Kerttu – Stal, Lucas J. – Sivonen, Kaarina. 2009. The non-ribosomal assembly and frequent occurrence of the protease inhibitors spumigins in the bloom-forming cyanobacterium *Nodularia spumigena*. Molecular Microbiology, s. 924 – 937. Blackwell Publishing Ltd.

Fogg, G. E. – Stewart, W. D. P. – Fay, P. – Walsby, A. E. 1973. The Blue-green Algae. Academic Press Inc., London.

Hale, M. E. 1983. The Biology of Lichens. 3rd Edition. Edward Arnold Ltd, London.

Humm, H. J. & Wicks, S. R.1980. Introduction and Guide to the Marine Bluegreen Algae. John Wiley & Sons, New York.

Jaarinen, S. & Niiranen, J. 2005. Laboratorion analyysitekniikka. Edita. Helsinki.

Jokela, Jouni. 2012. Yliopistotutkija. Helsingin Yliopisto. Suullinen tieto 31.8.2012, 18.12.2012 ja 8.1.2013.

Kerby, N. W. & Stewart, W. D. P. 1988. The Biotechnology of Microalgae and Cyanobacteria. Biochemistry of the Algae and Cyanobacteria. Part 28. Edited by L. J Rogers and John R. Gallon. s. 319. Clarendon Press, Oxford.

Sivonen, K. & Börner, T. 2008. The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genetics and Evolution. Bioactive Compounds Produced by Cyanobacteria. Edited by Antonia Herrero and Enrique Flores. Caister Academic Press, Norfolk.

Parmar, Asha – Singh, Niraj Kumar – Pandey, Ashok – Gnansounou, Edgar – Madamwar, Datta . 2011. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. http://www.sciencedirect.com /science/article/pii/S090852411011187

Microcystis.
http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/prokaryotes/Chroococcaceae/Microcystis/Microcystis2b.html. Luettu 13.11.2012.

Namikoshi, M. & Rinehart, K. L. 1996. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. http://www.springerlink.com/content/q2l05517473124m2/fulltext.pdf.

Patockaa, J. & Stredab, L. 2002. Brief Review of Natural Nonprotein Neurotoxins. http://www.asanltr.com/newsletter/02-2/articles/Neurotoxins.htm.

Rastogi, Rajesh P. & Sinha, Rajeshwar P. 2009. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites.
http://www.sciencedirect.com /science/article/pii/S073497500900055X

Rissanen, Johanna. 1999. 100 kysymystä levistä – 100 frågor om alger. Erweko Painotuote Oy, Helsinki.

Subashchandrabose, S. R. – Ramakrishnan, B. – Megharaj, M. – Venkateswarlu, K. – Naidu, R. 2011. Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: Biotechnological potential.
http://www.sciencedirect.com /science/article/pii/S0734975011001194

Suomen ympäristökeskus. 2012. Sinilevien taksonomia.
http://www.ymparisto.fi/default.asp?node=14946&lan=fi. Luettu 13.11.2012.

Vestola, Johanna. 2011. *Anabaena* - suvun syanobakteerien tuottama hassallidiini ja sen biosynteesi. Pro gradu - tutkielma. Helsingin yliopisto. Elintarvike- ja ympäristötieteiden laitos.

Wahlsten, Matti. 2012. *Anabaena* sp. syanobakteerin 400 x suurennos.

Wahlsten, Matti. 2012. Tutkimusteknikko. Helsingin Yliopisto. Suullinen tieto 9.8.2012.

Zegura, Bojana – Straser, Alja – Filipic, Metka. 2011. Genotoxicity and potential carcinogenity of cyanobacterial toxins.
http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383574211000032

Z8 -kantaliuosten valmistus

Kantaliuos Z8I

$NaNO_3$	46.7 g
$Ca(NO_3)_2 \cdot 2\ H_2O$	3.7 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H2O$	2.5 g
H_2O	1 l

Kantaliuos Z8II

$K_2HPO_4 \cdot 3\ H_2O$	4.1 g
Na_2CO_3	2.1 g
H_2O	1 l

Kantaliuos Z8III

Fe – liuos:

$FeCl_3 \cdot 6\ H_2O$	2.8 g
0.1 N HCl	100 ml

EDTA – liuos:

EDTA	3.9 g
0.1 NaOH	100 ml

Sekoitetaan 10 ml Fe -liuosta noin 900 ml:aan deionisoitua vettä. Lisätään 9.5 ml EDTA -liuosta. Täytetään 1000 ml:aan deionisoidulla vedellä.

Hivenaineliuoksen valmistus

1.	$Na_2WO_4 \cdot 2\ H_2O$	0.33 g/ 100 ml
2.	$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 2\ H_2O$	0.88 “
3.	KBr	1.20 “
4.	KJ	0.83 “
5.	$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	2.87 ”
6.	$Cd(NO_3)_2 \cdot 6\ H_2O$	2.87 ”
7.	$Co(NO_3)_2 \cdot 6\ H_2O$	1.46 “
8.	$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	1.25 ”
9.	$(NH_4)_2Ni(SO_4)_2 \cdot 6\ H_2O$	1.98 ”
10.	$Cr(NO_3)_3 \cdot 9\ H_2O$	0.41 ”
11.	V_2O_5	0.089 ”
12.	$Al_2(SO_4)_3K_2SO_4 \cdot 24\ H_2O$	4.74 ”
13.	H_3BO_4	31.0 ”
14.	$MnSO_4 \cdot H_2O$	16.4 ”

Valmistetaan kantaliuokset. Sekoitetaan 1 ml liuoksia 1 – 10 ja 12 sekä 10 ml liuoksia 11 ja 13 noin 700 ml:aan deionisoitua vettä. Täytetään vedellä 1000 ml:aan. Säilytys valolta suojattuna, ruskeassa pullossa.

Z8 -alustan valmistus

Sekoitetaan kantaliuoksia Z8I – III 0.47 l kutakin noin 42 l:aan deionisoitua vettä. Lisätään hivenaineliuosta 0.047 l ja täytetään 47 l:aan deionisoidulla vedellä. Kuplitetaan alustaa hiilidioksidiaasulla noin 15 min ja steriloidaan autoklavoimalla 5 litran erlenmeyerpulloissa.