

TALLINNA ÜLIKOOL
Loodus- ja terviseteaduste instituut

Punavetika *Furcellaria lumbricalis* biomassi vääristamine: pigmentide eraldamine ja omadused

Aruanne

Mihkel Saluri ja Rando Tuvikene

Tallinn 2019



Töö on teostatud Tartu Ülikooli Eesti mereinstituudi kalanduse teabekeskuse tellimusel.

Eksperimentaaltöö on teostatud Tallinna Ülikooli Loodus- ja terviseteaduste instituudi molekulaarteaduste laboris ajavahemikul 01.03.2017–01.02.2019.

Töö teostajad: Mihkel Saluri, *MSc*
 Rando Tuvikene, *PhD*

Sisukord

Sissejuhatus	4
1. Punavetikad	5
2. Fükobilisoom ja fükobiliproteiinid.....	6
3. Materjal ja metoodika.....	11
3.1 Uuringuks kasutatud vetikamass	11
3.2 Fükobiliproteiinide eraldamine punavetikamassist.....	11
3.3 Fükobiliproteiinide kvantifitseerimine	11
3.4 Fükobiliproteiinide puhastamine ultrafiltrimise teel	12
3.5 Fükobiliproteiinide sisalduste selgitamine sõltuvalt vetika kasvusügavusest.....	12
3.6 Toorme säilitamise tingimuste selgitamine.....	12
3.7 Kollakas-pruunide pigmentainete omaduste selgitamine.....	13
4. Tulemused	14
4.1 Fükoeütriini saagise sõltuvus vetika purustusastmest.....	14
4.2 Fükoeütriini saagise sõltuvus ekstraktsiooniajast	14
4.3 Fükoeütriini saagis sõltuvalt ekstraktsioonikeskkonna pH-st ja soolade koostisest.....	15
4.4 Fükoeütriini saagise sõltuvus keskkonna temperatuurist ja lisatud ensüümidest	16
4.5 Ultrahelitöötlus ja allofükotsüaniini sisaldus	18
4.6 Fükobiliproteiinide puhastamine ultrafiltrimisega	18
4.7 R-fükoeütriini ja allofükotsüaniini sisaldus sõltuvalt vetika kasvukohast.....	20
4.8 Vetikatoorme säilitamise tingimused	22
4.9 Kollakas-pruunide pigmentainete bioaktiivsus ja stabiilsus	24
5. Kokkuvõte	28
Kasutatud kirjandus.....	29

Sissejuhatus

Punavetikate iseloomulik värvus tuleneb nende kloroplastides esinevatest spetsiifilistest valgulistest pigmentidest (fükobiliproteiinidest) – punastest fukoerütriinidest ja sinistest fükotsüaniinidest. Nende fotosünteesilistele abipigmentide tõttu suudavad punavetikad kasvada meresügavustes, kus valgusintensiivsus on nõrgem kui maapinnal.

Erinevate punavetikaliikide ja neis leiduvate valguliste pigmentide uurimine on tänapäeval aktuaalne seoses nimetatud ainete eriliste omadustega. Erksa värvuse tõttu rakendatakse fükobiliproteiine (punakat fukoerütriini ja sinakat fükotsüaniini) looduslike värvainetena toiduainetetööstuses, kuid tänu intensiivsele fluorestsentsile ka biokeemilistes uuringutes ning meditsiinidiagnostikas.

Fükobiliproteiinide sisaldus punavetikates varieerub kümnendikest promillidest mõne protsendini kuivmassist, sõltudes vetikaliigist ja kasvutingimustest. Läänemere ainsa tööstusliku väärtusega punavetikaliigi *Furcellaria lumbricalis* valguliste pigmentide saagise sõltuvust ekstraktsioonitingimustest varem põhjalikult uuritud ei ole. Käesolevas töös on vaatluse alla võetud optimaalseid ekstraktsiooniparameetreid fukoerütriini eraldamiseks punavetika *F. lumbricalis* biomassist. Hinnatakse ensüümide, ekstraktsioonaja, ekstraktsioonikeskkonna pH ja eraldamiseks valitud temperatuuri mõju pigmentide saagisele ning uuritakse, kas sellest punavetikaliigist on võimalik eraldada ka allofükotsüaniini.

Lisaks uuritakse, kas saagised sõltuvad vetika vormist (kinnitunud või lahtine), kasvusügavusest ning kuidas mõjutab toorme säilitamine valguliste pigmentide sisaldust vetika biomassis. Veel vaadatakse, kas ultrafiltrimisega on võimalik eraldada lahuses samaaegselt ekstraheeruvad fukoerütriin ja allofükotsüaniin ning kas madalmolekulaarsetel (molekulmass alla 10 kDa) kollakas-pruunidel pigmentidel on bioaktiivseid toimeid.

1. Punavetikad

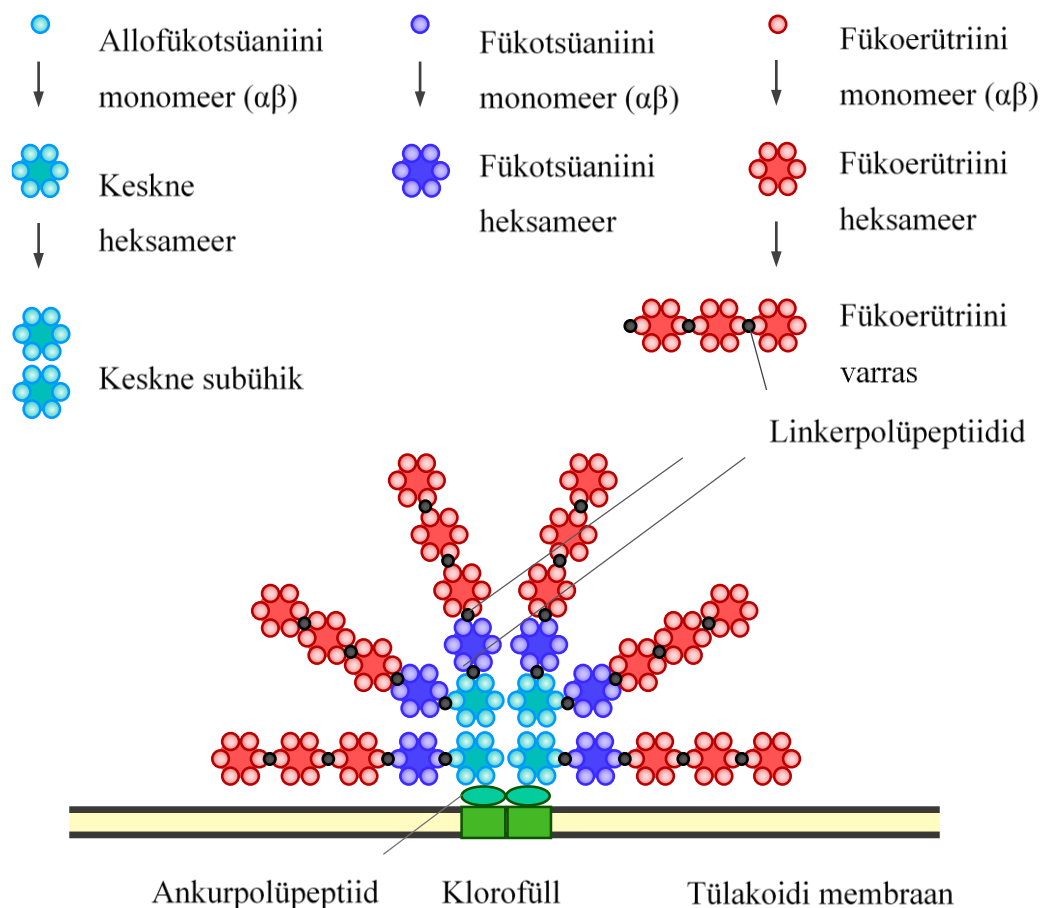
Punavetikad (Rhodophyta, vanakreeka keelest *ῥόδον* rhodon, "roos" ja *φυτόν* phyton, "taim") on ühed vanimad organismid Maal, mida on tänaseks määratletud kokku üle 7000 liigi. Enamik punavetikaid on hulkraksed ning ainult ~5% punavetikaliikidest elab magevees (lootilised – kasvavad ojades või jõgedes; lentilised – kasvavad tiikides või järvedes), suurem osa neist soojas kliimas.

Punavetikad on omaette rühm eukarüootseid organisme, kelle rakkudel ei ole vibureid, tsentrioole ning kloroplastidel puuduvad endoplasmaatne retiikulum ja kihistunud tülakoidid. Punavetikate värvus võib olla nii roheline, punakaspruun, erkpunane, sinine, lillakas-sinine või must. Värvuse põhjustavad klorofüll a, klorofüll d ning fükobiliproteiinide erinevad vahekorrad. Lisaks leidub punavetikates ksantofülle ning karotenoide. Punavetikad kasutavad fotosünteesi tõhustamiseks abipigmente, fükobiliproteiine, mis suurendavad valguse neeldumise efektiivsust ja annavad nendele taimedele ka tihti punaka värvuse. Fotosünteesi käigus seotud süsinik säilitatakse florideetärklisena (α -1,4 ja α -1,6 glükosiidsidemetega seotud glükoosi makromolekulid, mis on sarnased glükogeenile ja amülopektiinile) raku tsütoplasmas.

Enamik punavetikatest on makroskoopilised, merelise eluviisiga ja sugulise paljunemisega organismid. Punavetikaid (nt *Palmaria palmata*, *Pyropia yezoensis* ja *Pyropia tenera*) on kasutatud Euroopa ja Aasia kulinaarias sajandeid ning mõnedest liikidest (nt *Gelidium amansii*, *Gracilaria lichenoides*, *Kappaphycus alvarezii*, *Eucheuma denticulatum*) toodetakse agarit (E-aine koodiga E406), karraginaane (E407) ja teisi toidulisaineid. Viimasel paarikümnel aastal on aga tähelepanu hakatud pöörama ka punavetikates esinevate fükobiliproteiinide ekstraheerimisele, väärindades seeläbi bioressurssi.

2. Fükobilisoom ja fükobiliproteiinid

Fükobilisoomid (Joonis 1) on tsüanobakterites, liit- ja punavetikates leiduvad valgust absorbeerivad valgukompleksid, mis on kovalentselt fotosüsteem II kloroplastide stroomale kinnitunud. Fükobilisoom koosneb fükobiliproteiinidest, peamiselt punakast fukoerütriinist ja sinakatest fükotsüaniinist ja allofükotsüaniinist (Gantt, 1980; Ke, 2001). Fükobiliproteiinid on erksavärvilised, hüdrofiilsed ja tugeva fluorestsentsaktiivsusega fotosünteesi abipigmendid, mis absorbeerivad valgusenergiat, kandes selle edasi kesksele klorofüll a molekulile (Bryant, 1981; Glazer, 1994; Niu et al., 2010). Fükobiliproteiine, mis sisaldavad kromofoorset (valgusenergiat edasi kandvat) osa, eraldatakse tsüanobakteritest ja punavetikatest ning need koosnevad α - ja β -alaühikutest (fukoerütriini ja fükotsüaniini molekulidel võib leida ka γ alaühikut). Alaühikutest moodustuvad trimeersed $(\alpha\beta)_3$ või heksameersed $(\alpha\beta)_6$ kompleksid (Ke, 2001; Niu et al., 2006).



Joonis 1. Fükobilisoomi ehituse üldskeem (Lee, 2008).

Kromofoorsed fükobiliini (avatud ahelaga tetrapürrooli) molekulid on energia edasikandmiseks obligatoorsed (Joonis 2), olles ühe või kahe tsüsteinüül-tioeeter sidemega kovalentselt seotud valgulise osaga (Gonzales-Ramirez et al., 2014; Sun et al., 2009). Valgusenergia neeldub esimesena fukoerütriinis, kandub edasi fükotsüaniinile ja sealt omakorda allofükotsüaniinile väga kõrge kvantsaagisega (Bryant, 1981; Glazer, 1985). Allofükotsüaniinilt kandub energia edasi kesksele klorofüllil *a* molekulile fotosüsteemi kompleksis. Valgusenergia edasikandumine toimub Förster resonants energiaülekanne abil.

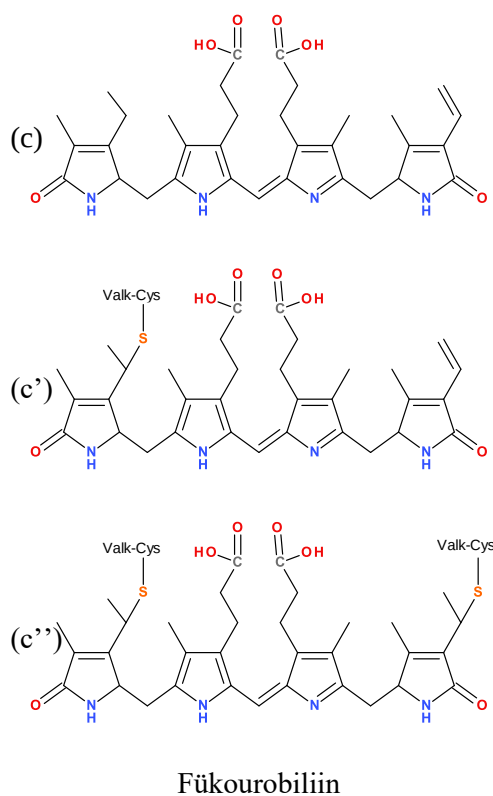
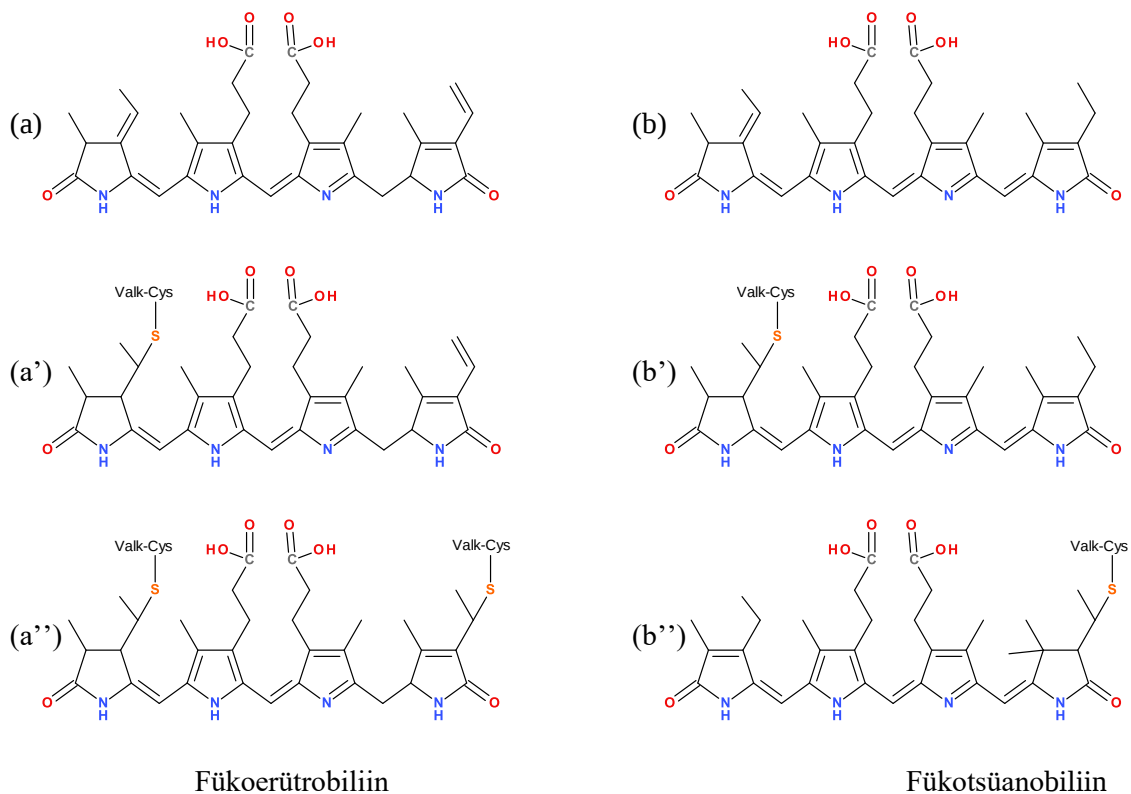
Fükobiliproteiinid, mis on vetikatest eraldatud, omavad väga intensiivset fluorestsentsiaktiivsust, sest neil ei ole energiaaktseptoreid, mis on olemas fükobilisoomides. B-fukoerütriin (B-PE, eraldatud esimest korda *Bangiales* punavetikatest), R-fukoerütriin (R-PE, eraldatud esimest korda *Rhodophyceae* punavetikatest), C-fükotsüaniin (C-PC, eraldatud esimest korda tsüanobakteritest) ja allofükotsüaniin on ühed suurimate fluorestsentsiaktiivsustega värvained, mis seni tuvastatud on (Baggerly et al., 2007; Brück et al., 2012; Ke, 2001).

Fükobiliproteiinidel on mitmeid unikaalseid kvalitatiivsed ja kvantitatiivseid omadusi:

- tugev valguse neeldumine nähtavas spektriosas ja suur ekstinktsioonitegur;
- intensiivne fluorestsentsiaktiivsus laias pH vahemikus;
- suhteliselt suur Stokes'i nihe;
- väike fluorestsentsi sumbumine fükobiliproteiinide kromofoores osa ja fükobiliproteiinide vahel (Glazer, 1985; Sun et al., 2009).

Nende omaduste tõttu on fükobiliproteiinid võrreldes sünteetiliste värvainetega sobilikumad valdkondades, kus vajatakse kõrget tundlikkust või samaaegset mitmevärvilist detektsiooni nagu näiteks rakkude sorteerimine ja analüüs, fluorestsentsmikroskoopia ja fluorestsentsimmunoanalüüs. B- ja R-PE abil konjugeeritud antikehadel on fluorestseini konjugaatidega võrreldes 5–10 korda suurem fluorestsentsi intensiivsus läbivoolutsütomeetrias ja immunoanalüüsides.

Fükobiliproteiine kasutatakse ka värvainetena kosmeetikas, toiduainetööstuses, värvides ja mänguasjades (Dumay et al., 2013; Sun et al., 2009). On leitud ka, et fukoerütriin on potentsiaalne vähki ära hoidev ravim tänu oma antioksüdantsetele omadustele (Pan et al., 2013).



Joonis 2. Vaba fäkoerütrobiliini (a), fükotsüanobiliini (b) ja fükourobiliini (c) molekulaarstruktuurid ning fäkoerütrobiliini (a', a''), fükotsüanobiliini (b', b'') ja fükourobiliini (c', c'') valguga seondunud vormid.

Fükobiliproteiinidel on kõrge fluorestsentsi aktiivsus, kuid nad on termolabiilsed, kaotades kõrgendatud temperatuuridel järkjärguliselt fluorestseerumisvõime. Valgulised pigmendid on stabiilsed vahemikus 4–40 °C, kuid kaotavad olulise osa oma fluorestseerumisvõimest 60 °C juures 1 h jooksul. Lisaks on fükobiliproteiinid stabiilseimad pH väärtuste 6–7 juures, suhteliselt happelistes (pH < 4) ja küllaltki leeliselistes (pH > 10) keskkondades väheneb aga oluliselt nende valguse neelamisvõime (Gonzales-Ramirez et al., 2014; Rastogi & Sonani, 2015).

Punavetikate valgusisaldus võib olla suhteliselt suur, mõnedel *Palmaria*, *Pyropia* ja *Porphyra* perekonna liikidel võib see ulatuda kuni 50% kuivmassist (Pangestuti & Kim, 2015; Pereira, 2011). Polüsahhariidid (ksülaanid, agarosid, karraginaanid) limiteerivad valkude kättesaadavust inimestele (Dumay et al., 2013). Vetikarakkudes võivad fükobiliproteiinid moodustada kuni 50% vesilahustuvatest valkudest (Ke, 2001), kuid olenevalt vetikast ja/või selle arengustaadiumist võivad külmas vees lahustuda ka polüsahhariidid, mis raskendavad fükobiliproteiinide ekstraktsiooni ja puhastamist.

Furcellaria lumbricalis on punavetikas, mis kasvab Kanada, Taani ja Eesti vetes kuni 20 m sügavusel (Pflugmacher et al., 2010). See punavetikaliik on ainus majandusliku potentsiaaliga vetikaliik Läänemeres ning selle biomass märgkaalus võib ainuüksi Kassari lahes ulatuda kuni 200 000 tonnini (Paalme et al., 2011). *F. lumbricalis* sisaldab polüsahhariididest peamiselt furtsellaraani, mis lahustub vaid soojas vees ning see muudab konkreetse punavetikaliigi potentsiaalselt huvipakkuvaks fükobiliproteiinide toormeks.

Fükoerütriini leidub peamiselt punavetikates, see koosneb vähemalt kolmest alaühikust, mille koostis varieerub sõltuvalt vetikaliigist. Fükobiliproteiinid koosnevad ($\alpha\beta$) monomeeridest, mis on üldjuhul kombineerunud trimeerseks ($\alpha\beta$)₃ või heksameerseks ($\alpha\beta$)₆ konfomatsiooniks, kuid fükoerütriinis võib lisaks esineda ka γ -alaühik. Kõige tavalisemaks R-fükoerütriini struktuuriks on ($\alpha\beta$)₆ γ , kus α -alaühikuga on seondunud 2 fükoerütrobiliini, β -alaühikuga 2 või 3 fükourubiliini ja γ -alaühikuga 1 või 2 fükoerütrobiliini ja 1 fükourubiliini molekuli. R-fükoerütriini neeldumismaksimumid esinevad ~495, ~540 ja ~565 nm juures, kiirgusmaksimum ~580 nm juures – R-fükoerütriin neelab sinakas-rohelist/kollakat valgust ja kiirgab oranž/kollakat valgust. Kvantsaagis (kiiratud footonite arv jagatud neeldunud footonite arvuga) on fükoerütriinidel väga kõrge – R-fükoerütriinil 0,84 ja B-fükoerütriinil 0,98.

Fükotsüaniin on helesinise värvusega fükobilisoomis olev keskne valguline pigment, mis võtab valguse vastu fukoerütriinilt ja kannab selle edasi allofükotsüaniinile (neeldumismaksimum ~620 nm juures, kiirgusmaksimum ~650 nm juures). Fükotsüaniini leidub tsüanobakterites ning seda on kasutatud maiustuste, sh jäätiste värvimisel. Valk koosneb α ja β alaühikutest, millele on kovalentselt seondunud 1 või 2 fükotsüanobiliini molekuli. Kuigi mõned tsüanobakterid on võimelised elama 70 °C kuumaveeallikates, säilitades seal ka fükotsüaniini spektroskoopilised omadused, mis on peaaegu identsed 20 °C juures elavate organismide omadega, kaotab see valk 50% oma tertsiaalstruktuurist *in vitro* 65 °C juures 1 min jooksul.

Allofükotsüaniin, mis on $(\alpha\beta)_3$ konformatsiooniga, on fükotsüaniiniga võrreldes teist tooni sinine ning seda saab eraldada punavetikatest ja tsüanobakteritest. Biokeemias kasutamiseks tuleb valk keemiliselt ristsiduda, kus 8 M karbamiidi lahusega allofükotsüaniini trimeer lahti voltub ning seejärel füsioloogilises lahuses taas seondub. Valgusenergia, mis tuleb fükotsüaniinilt absorbeeritakse (neeldumismaksimum ~651 nm, kiirgusmaksimum ~662 nm juures) ja kantakse edasi klorofüllile (neeldumismaksimum dietüületris ~665 nm juures), kus käivitub fotosünteesi järgmine etapp – vee molekulide lõhustamine.

3. Materjal ja metoodika

3.1 Uuringuks kasutatud vetikamass

Punavetika *F. lumbricalis* kinnitumata vorm pärines Kassari lahest ja korjati 20.07.2016. Punavetikaproov puhastati võõrkehade (teistest vetikatest, karpidest, sammalloomadest, liivast, kividest jms) kraanivees ning lüofiliseeriti. Külmuivatatud punavetikas uhmerdati kas käsitsi ja sõeluti (leidmaks sõltuvuse vetikamassi purustuse astmest) või homogeniseeriti krüojahvatis vedela lämmastiku abiga. Punavetikamassi hoiustati analüüsimiste vahel -80 °C juures. Analüüsimiseks kasutati seda punavetikat, kui pole märgitud teisiti.

3.2 Fükobiliproteiinide eraldamine punavetikamassist

Vetikamassist valmistati 0,5% suspensioonid 50 mM vesilahustes (atsetaadi-, tsitraadi- või fosfaadilahus; sisaldas ka 0,025% naatriumasiidi, et takistada mikroorganismide levikut) ning proove segati pimedas automaatsel roteerijal 20 °C juures 24 h, kui pole märgitud teisiti. Katsed teostati paralleelidena, kui pole märgitud teisiti. Tahked vetikaosad eemaldati lahusest tsentrifuugimise teel (1 min 2250 g toatemperatuuril). Võrdluseks ja kaliibrimiseks kasutati Sigma-Aldrich R-fükoerütriini (52412) ja allofükotsüaniini (A7472) standardeid.

3.3 Fükobiliproteiinide kvantifitseerimine

Fükobiliproteiinide kvantifitseerimiseks kasutati suuruseralduskromatograafiat, mis koosnes Shimadzu Nexera X2 LC-30AD pumbast, Nexera X2 SIL-30AC proovide automaatsisestajast, Prominence CTO-20AC kolonnitermostaadist, Prominence SPD-M20A diodrividetektorist, Prominence RF-20A fluorestsentsdetektorist ning kahest jadamisi ühendatud Shodex OHPak SB-804HQ kolonnist, mida hoiti analüüsides vahel 20 °C juures. Mobiilse faasina kasutati 300 mM NaCl, 50 mM fosfaatpuhvrit (pH 6,49), voolukiirusega 0,7 ml/min. Uuritavad proovid filtriti läbi 0,45 µm poorsusega RC membraanfiltrit ning analüüs kestis 45 minutit. Sisestusruumala oli 5 µl fükoerütriini ja 100 µl allofükotsüaniini analüüsimiseks.

Fükobiliproteiinide sisalduste määramiseks vajalik kaliibrimine teostati R-fükoerütriini ja allofükotsüaniini standardainete baasil spektrofotomeetriliselt. Kasutati ekstinktsioonitegureid $E_{566\text{nm}} = 1960000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ fükoerütriini ja $E_{652\text{nm}} = 700000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ allofükotsüaniini jaoks.

Fluorestsentsdetektori seadistustes kasutati fükoeütriini tuvastamiseks väärtusi $E_x = 542 \text{ nm}$, $E_m = 575 \text{ nm}$ ning allofükotsüaniini tuvastamiseks väärtusi $E_x = 652 \text{ nm}$, $E_m = 660 \text{ nm}$.

3.4 Fükobiliproteiinide puhastamine ultrafiltrimise teel

Optimaalsete ultrafiltrimise parameetrite leidmiseks testiti erineva poori suurusega (10, 50 ja 100 kDa) Vivaflo 200 polüetersulfoon membraane. Lüofiliseeritud, krüojahvatiga purustatud vetikamassist valmistati suspensioonid pH 6,0 tsitraatpuhvril (vaata ka punkt 3.2). Lahuseid ultrafiltriti kuni filtraat muutus värvituks. Nii retentaati kui filtraati analüüsiti spektrofotomeetriselt.

3.5 Fükobiliproteiinide sisalduste selgitamine sõltuvalt vetika kasvusügavusest

R-fükoeütriini ja allofükotsüaniini sisalduse sõltuvus sügavusest määrati 2016. aasta juulis Kassari lahest korjatud kinnitumata vormi vetikaproovide puhul. Kassari plastist koguti 49 proovi (puhastusmetoodika punktis 3.1), kust R-fükoeütriini suudeti määrata kõikidest ja allofükotsüaniini 45 proovist. Sügavuselt alla 6 meetri määrati R-fükoeütriini 8 ja allofükotsüaniini 6 proovist. Sügavuselt 6,1–7 meetrit määrati fükobiliproteiine 11 proovist. Sügavuselt 7,1–8 meetrit määrati valgulised pigmendid vastavalt 15 ja 13 ning üle 8,1 meetri sügavuselt 15 proovist.

Kinnitunud vetika vormide puhul korjati proove kahel korral – 26.11.2015 (4,5 m, 6,5 m ja 11 m sügavuselt) ning 17.6.2016 (4 m ja 8 m sügavuselt).

3.6 Toorme säilitamise tingimuste selgitamine

Optimaalsete toorme säilitamise tingimusteks koguti Kassari lahest 2018. aasta märtsis ~8 m sügavuselt vetikamass, mis laborisse tooduna säilitati nii märjalt kui kuivalt (lüofiliseeritult). Märjalt hoiustati proove nii -80°C kui -20°C juures. Kuivalt hoiustati proove -80°C , -20°C , 4°C ja 20°C juures pimedas. Fükobiliproteiinide stabiilsust säilitamistingimustest sõltuvalt testiti 2, 4,5 ja 7 kuu möödudes. Lüofiliseeritud, krüojahvatiga purustatud vetikamassist valmistati suspensioonid pH 6,0 tsitraatpuhvril (vaata ka punkt 3.2), mida analüüsiti vedelikkromatograafia meetodil (vaata ka punkt 3.3).

3.7 Kollakas-pruunide pigmentainete omaduste selgitamine

Madalmolekulaarsete pigmentainete (vaata ka punkte 3.2 ja 3.4) stabiilsust uuriti rakendades kuumutamist (10 min keeval vesivannil) ja ultrahelitöötlust (10 min, rakendatud energia ~510 kJ). Saadud proovidest valmistati lahjendused ning töötuse mõjusid mõõdeti spektrofotomeetriliselt.

Rakkude metaboolse aktiivsuse testimiseks kasutati kolorimeetrilist MTT (3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiidi) testi. Test põhineb rakkude ensüüm-aktiivsusel, mis MTT lahustumatuks lillakaks formasaaniks redutseerivad. Formasaani lahustamiseks lisatakse hapestatud SDSi lahust. Mida rohkem on lahuses elujõulisi rakke, seda tumedamaks muutub lahus. Kollakas-pruune pigmentained lisati HEK-293 rakkudele, et näha, kas lahuse lisamine muudab rakke elujõulisemaks või mitte. Rakke kasvatati algselt 18 h inkubaatoris standardtingimustel (37 °C, 5% CO₂) *Complete DMEM* meediumis, misjärel lisati rakkudele kas vett või kollakas-pruunide pigmentainete lahust 1, 5 või 10 µl. Seejärel kasvatati rakke lisaks 24 h, lisati MTT lahus ning hoiti toatemperatuuril pimedas 3 h. Järgmiseks lisati formasaani lahustamiseks 10% SDSi lahus, hoiti orbitaalsegajal 30 min ning mõõdeti neelduvus 580 nm juures.

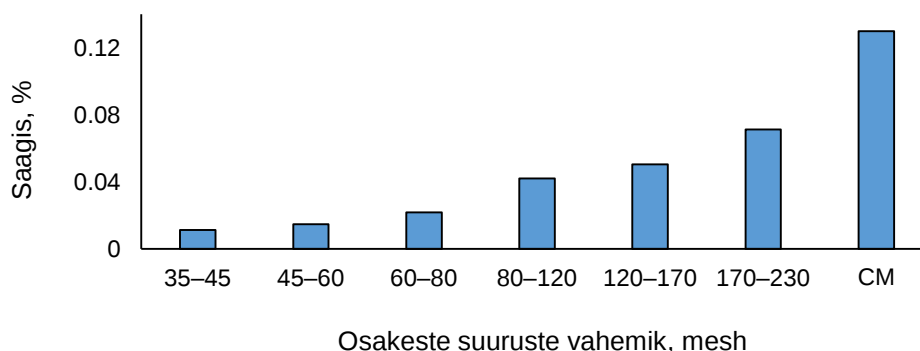
Antioksidantsete omaduste väljaselgitamiseks kasutati FRAP ja Folin-Ciocalteu meetodit, kus mõlema meetodi puhul tekitavad tugevad antioksidandid tumedad, sinakad lahused. FRAP meetodi puhul kasutati lõpplahuse saamiseks 0,75 ml uuritavat proovi ja 2,25 ml reagentlahust (300 mM pH 3,6 atsetaat, 10 mM 2,4,6-tripüridüül-s-triasiini lahus 40 mM vesinikkloriidhappes ja 20 mM raud(III)kloriidi lahused mahuvahekorras 10:1:1). Lahuseid inkubeeriti toatemperatuuril 2 h. Folin-Ciocalteu meetodi puhul kasutati 200 mM Folin-Ciocalteu reagentlahust 1,25 ml ja 0,25 ml uuritavat proovi. Lahused segati ning 30 s pärast lisati 1 ml 7,5% Na₂CO₃, misjärel inkubeeriti proove kaks tundi toatemperatuuril.

Antibakteriaalsust testiti disk-difusiooni meetodil, kus TSA agarsöötme plaatidel kasvatati *Escherichia coli* ATCC® 25922™, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 9027™ ja *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923™ rakke. Igale plaadile asetati kettad (diskid), kuhu pipeteeriti peale 10 µl uuritavat kollakat lahust. Võrdluseks kasutati vett ning erinevaid antibiootikume.

4. Tulemused

4.1 Füköerütriini saagise sõltuvus vetika purustusastmest

Purustusastmest sõltuvalt määrati füköerütriini saagis seitsmest erineva suurusega fraktsioonist (Joonis 3). Kõige efektiivsem on vetikamass võimalikult peeneks saada krüojahvati abiga (CM, saagis ~0,13%). Ülejäänud käsitsi uhmerdatud proovidel oli biomassi osakeste keskmine läbimõõt suurem ja saagis üle kahe korra väiksem (kõige madalam saagis ~0,01%).

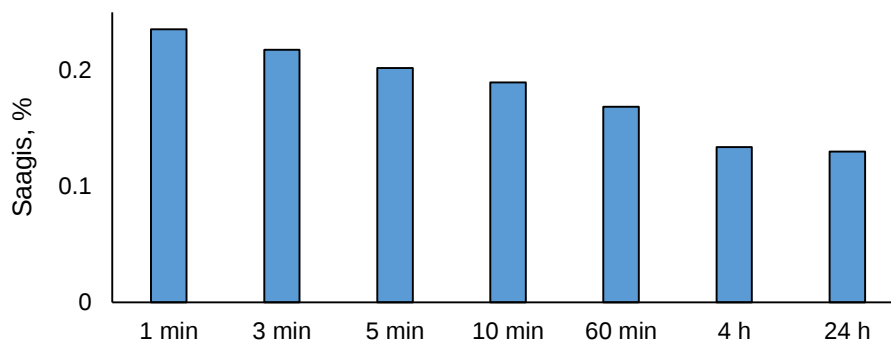


Joonis 3. Füköerütriini saagis sõltuvalt vetikamassi purustusastmest (CM – krüojahvatatud proov).

Suurima füköerütriini saagise saamiseks *F. lumbricalis* punavetikast oleks vaja biomass homogeniseerida. See aga tähendab, et tahked osakesed on hiljem vaja suspensioonist eraldada (näiteks tsentrifuugimisega), mis raskendab kogu ekstraheerimisprotsessi (eriti hilisemat filtrimist) ja suurendab kulusid.

4.2 Füköerütriini saagise sõltuvus ekstraktsioonist

Füköerütriini saagis ekstraktsioonist sõltuvalt on esitatud Joonisel 4. Selgus, et mida lühemat aega proovi segada (1 min juures saagis ~0,24%, 24 h juures 0,13%), seda suurem on saagis. Pärast vetikast fükobiliproteiinide eraldamist algab kohe ka nende fluorestsentsaktiivsuse vähenemine, mis kestab >4 h, mistõttu on lühemat aega ekstraheeritud proovidel näiliselt suurem saagis.

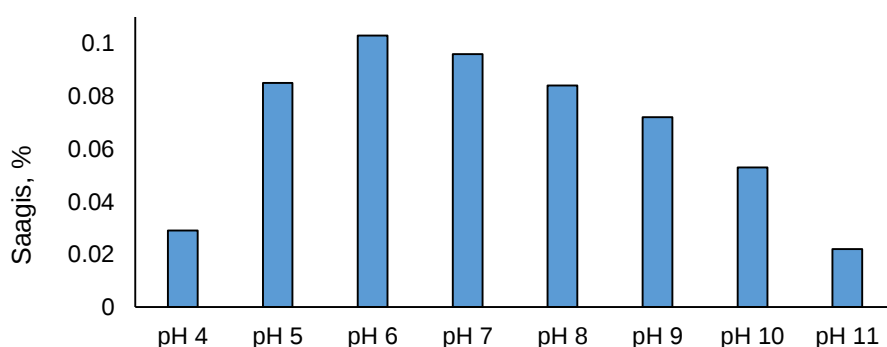


Joonis 4. Fükooerütriini saagise sõltuvus ekstraktsiooniajast.

Katsetest selgus, et fluorestsentsi stabiilne platoo saabub ~6 h pärast filtrimist. Kui ekstraktsiooniajaks võtta 4 või 24 h, on saagiste vahe minimaalne, viidates asjaolule, et ekstraheerimisajaks peaks jääma 4–24 h vahele. Kui saagise suurendamiseks soovitakse kasutada ensüüme, on otstarbekas valida pikem ekstraheerimisaeg, et ensüümid jõuaksid substraati piisavalt lagundada (vaata ka punkt 4.4).

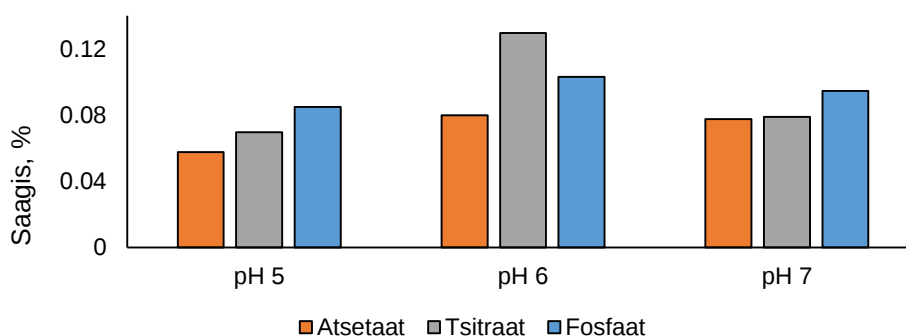
4.3 Fükooerütriini saagis sõltuvalt ekstraktsioonikeskkonna pH-st ja soolade koostisest

Fükooerütriini saagis sõltub ekstraktsiooniks kasutatavatest lahuste pH-st. Liiga happeline või aluseline keskkond vähendab fluorestsentsiaktiivsust, mille põhjustab valgulise pigmendi konformatsiooni pöördumatu muutus. Joonisel 5 on esitatud fükooerütriini saagiste sõltuvus Na-fosfaate sisaldavate lahuste pH väärtustest.



Joonis 5. Fükooerütriini saagise sõltuvus ekstraktsioonikeskkonna pH-st.

Ekstraktsioonikeskkondade pH väärtustel alla 5 ja üle 8 olid fukoerütriini sisaldused fluorestsentsi järgi madalad (alla 0,07%), mistõttu ei ole otstarbekas neid ekstraheerimiseks kasutada. pH 8 puhul aga ei toimi paljud ensüümid (sealhulgas ka tsellulaasid, ksülanaasid, galaktosidaasid), mis omavad suurimat aktiivsust pH 5 juures, ning allofükotsüaniini saagis on suurim kasutades lahust pH väärtusega 6. pH 7 korral on allofükotsüaniini saagis fluorestsentsdetektori järgi keskmiselt 3 korda madalam kui pH 6 korral. Joonisel 6 on ära toodud fukoerütriini saagised kõige potentsiaalsemate pH väärtuste korral.

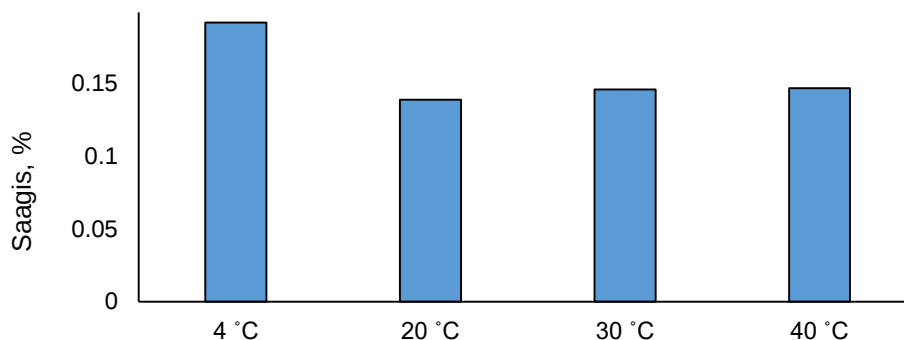


Joonis 6. Fukoerütriini saagis erinevate soolalahuste ja pH väärtuste korral.

Jooniselt selgub, et fosfaatpuhvrid kasutades on saagiste varieerumine pH lõikes väiksem ning fukoerütriini ekstraheerimiseks on sobivaim kasutada lahust, mille pH on 6 (saagis ~0,13%). pH 5 puhul on saagised väikseimad (alla 0,09%), pH 6 ja pH 7 vahel on erinevused väiksemad.

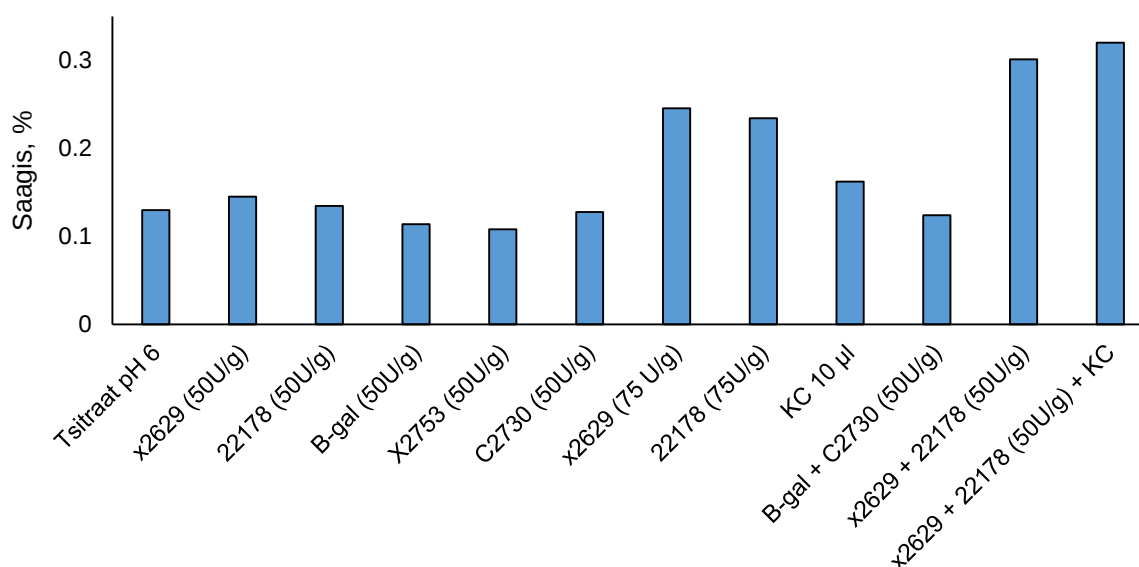
4.4 Fukoerütriini saagise sõltuvus keskkonna temperatuurist ja lisatud ensüümidest

Fukoerütriini saagise sõltuvus ekstraktsioonikeskkonna temperatuurist on esitatud Joonisel 7. Ekstraheerimiseks kasutati tsitraatpuhvrit pH 6. Selgub, et parimaks ekstraktsiooni-temperatuuriks on 4 °C (saagis ~0,19%), kuid saagis ei sõltu väga suurel määral ekstraktsioonikeskkonna temperatuurist 20–40 °C vahel, jäädes vahemikku 0,13–0,14%.



Joonis 7. Fūkoerūtriini saagise sõltuvus ekstraktsioonikeskkonna temperatuurist.

Fūkoerūtriini saagise sõltuvus lisatud ensüümidest on näidatud Joonisel 8. Ensüümi aktiivsusel 50 U/g ehk 50 ühikut (1 ühik = 1 µmol lagundatud substraati minutis) grammi kohta omasid aktiivsust 3 ensüümi – x2629 (endoksülanaas, saagis 0,14%), 22178 (tsellulaas, 0,13%) ja KC (kapa-karraginaas, 0,16%). Sama kontsentratsiooni juures galaktosidaasi (β-gal), ksülanaasi (X2753), tsellulaasi (C2730) lisamisel saagise tõusu ei täheldatud (fūkoerūtriini saagis oli madalam kui pH 6 tsitraatpuhvril).



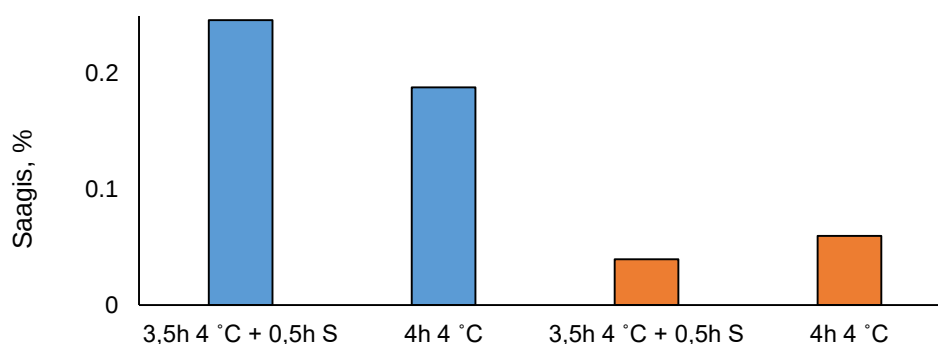
Joonis 8. Fūkoerūtriini saagise sõltuvus lisatud ensüümidest.

Endoksülanaasi (x2629) ja tsellulaasi (22178) testiti ka 75U/g juures, kus ensüümide toimel suurenes fūkoerūtriini saagis ~2 korda võrreldes pH 6 tsitraatpuhvriga. Ensüümide kombinatsioonid endoksülanaas (x2629) koos tsellulaasi (22178) ja endoksülanaas (x2629)

koos tsellulaasi (22178) ja kapa-karraginaasiga mõjusid fukoerütriini saagisele positiivselt, suurendades saagist üle 0,3%.

4.5 Ultrahelitöötlus ja allofükotsüaniini sisaldus

Ultrahelitöötuse mõju fukoerütriini ja allofükotsüaniini saagisele on esitatud Joonisel 9. Proove loksutati 4 °C juures 3,5 h, misjärel asetati need pooleks tunniks ultrahelivanni, mida jahutati pidevalt jääga, hoides vanni temperatuuri 0 °C ligikal.

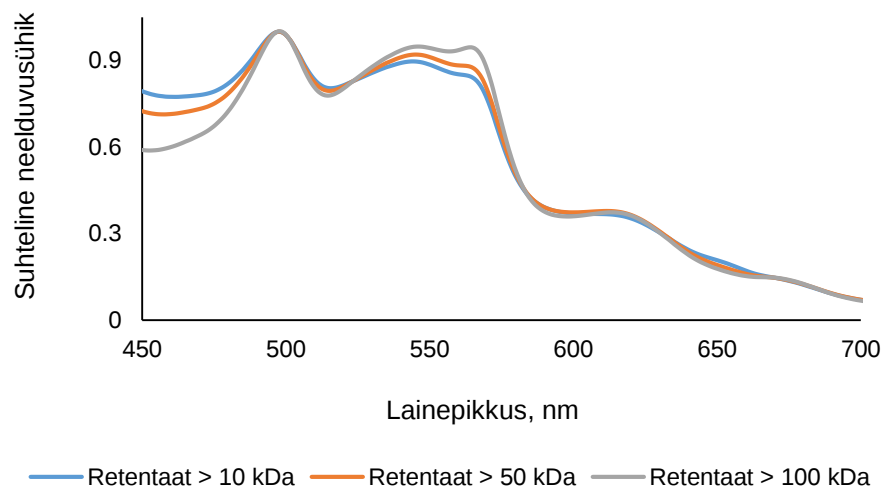


Joonis 9. Ultrahelitöötuse mõju fukoerütriini (sinised tulbad) ja allofükotsüaniini (oranžid tulbad) saagisele. S – sonikeerimine.

Sonikeerimine suurendas fukoerütriini saagist 0,25%-ni võrreldes katsetega, kus proove loksutati 4 h 4 °C juures (saagis 0,19%). Allofükotsüaniini sisaldus aga vähenes sellise ultrahelitöötuse tagajärjel kolmandiku võrra (~0,04%-ni võrreldes algse 0,06%-ga). Viimase saagis *F. lumbricalis* punavetikas jääb fluorestsentsdetektori järgi keskmiselt vahemikku 0,05–0,09%.

4.6 Fükobiliproteiinide puhastamine ultrafiltrimisega

Ultrafiltrimisega puhastatud fükobiliproteiinidest kogutud retentaatide spektrid on esitatud Joonisel 10.



Joonis 10. *Furcellaria lumbricalis* ekstrakti ultrafiltrimise retentaadid erinevate poorsustega membraanide puhul. Proovide neelduvused normaliseeriti 497 nm väärtuse juures.

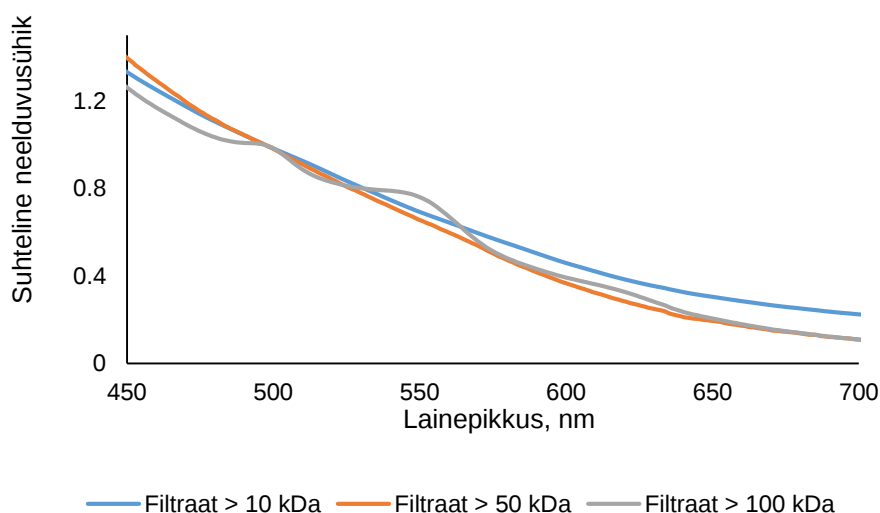
Selgus, et R-fükoerütriini suhtes saab kõige puhtama lahuse (neelduvusväärtuse jagatis A_{566}/A_{280} – mida suurem, seda suurem puhtus; A_{566}/A_{619} , A_{566}/A_{652} – mida väiksem, seda suurem puhtus), kui ultrafiltrimiseks kasutada 100 kDa poorsusega membraani (Tabel 1). Oluliseks erinevuseks on ka neelduvuse tõus 566 nm juures, mille tagajärjel tekib selgelt eristatav piigi maksimum ning spekter hakkab sarnanema puhta R-fükoerütriini omaga. Lisaks vähendab 100 kDa membraan allofükotsüaniini sisaldust võrreldes 10 kDa membraaniga ~20%.

Tabel 1. Ultrafiltrimismembraanidega puhastatud lahuste puhtusnäitajad

Ultrafiltrimismembraani MWCO*	Puhtusnäitajad			
	A_{566}/A_{280}	A_{566}/A_{498}	A_{619}/A_{566}	A_{652}/A_{566}
10 kDa	0,18	0,83	0,43	0,24
50 kDa	0,21	0,87	0,42	0,21
100 kDa	0,29	0,94	0,39	0,18
R-fükoerütriini standard (52412)	>4,6	<1,5	<0,03	<0,03

* MWCO – molekulmassi läbilaskepiir (*molecular weight cut-off*).

Ultrafiltrimisega puhastatud fükobiliproteiinidest kogutud filtraatide spektrid on esitatud Joonisel 11.

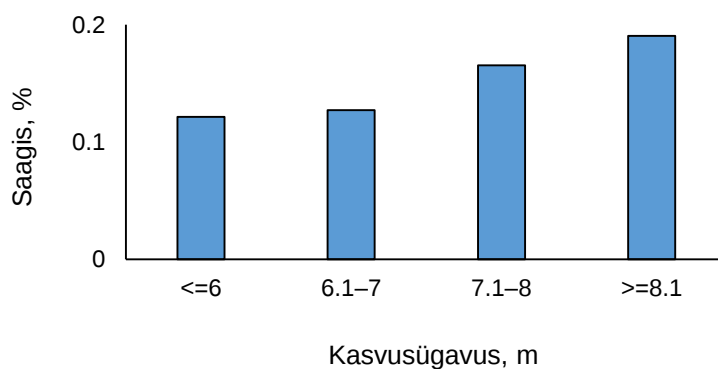


Joonis 11. *Furcellaria lumbricalis* ekstrakti ultrafiltrimise filtraadid erinevate poorsustega suurustega membraanide puhul. Proovide neelduvused normaliseeriti 497 nm väärtuse juures.

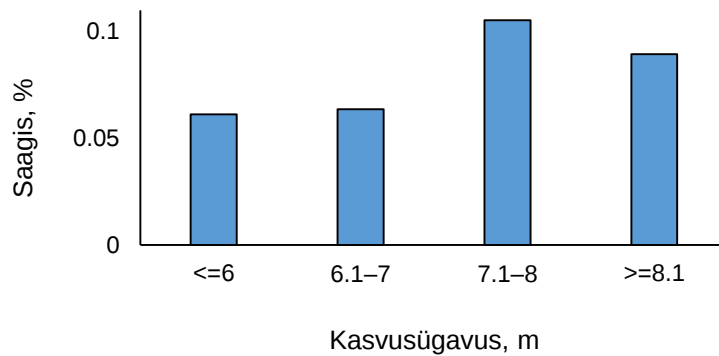
Filtraatide spektrid näitavad, et 100 kDa membraaniga eraldatakse fükobiliproteiinide lahusest ka ühendeid, mis omavad R-fükoerütriiniga võrreldes kaht peaaegu identset piigi maksimumi (497 ja 550 nm juures), suurendades seeläbi R-fükoerütriini puhtust. Allofükotsüaniinile iseloomulik piigi maksimum filtraatide spektrites puudub, kuid 100 kDa membraani filtraadis on tõus 619 nm juures, mis vastab fükotsüaniinile.

4.7 R-fükoerütriini ja allofükotsüaniini sisaldus sõltuvalt vetika kasvukohast

Kassari lahest kogutud kinnitumata *Furcellaria lumbricalis* proovidest eraldatud fükobiliproteiinide saagised on esitatud Joonistel 12 ja 13.



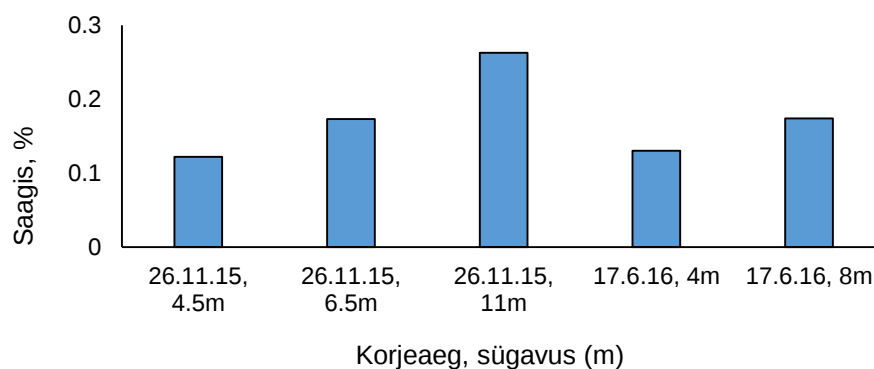
Joonis 12. Kassari lahest kogutud proovidest määratud R-fükoerütriini saagised sõltuvalt vetika kasvusügavusest.



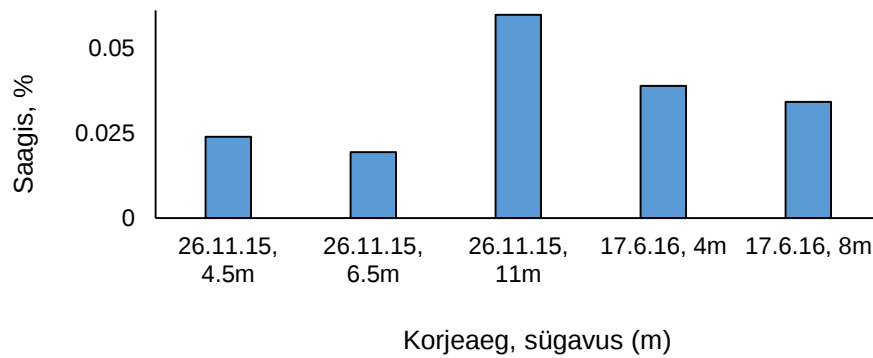
Joonis 13. Kassari lahest kogutud proovidest määratud allofukotsüaniini saagised sõltuvalt vetika kasvusügavusest.

Tulemustest selgub, et keskmine R-fükoerütriini sisaldus tõuseb kasvusügavuse suurenedes, kuid 15st uuritud proovist, mis kasvasid sügavamal kui 8,1m, varieerus saagis 0,15–0,23% vahel. Proovidel, mis korjati 7,1–8m sügavuselt, varieerus saagis 0,06–0,26% vahel. Allofukotsüaniini puhul samasugust trendi saagise ja kasvusügavuse vahel ei leitud, kuid proovidel, mis korjati rohkem kui 8,1 meetri sügavuselt, oli varieeruvus suurem (0,04–0,13%) kui neil, mis koguti 7,1–8m vahel (0,08–0,15%).

Kaugatomalt kogutud kinnitunud *Furcellaria lumbricalis* vormi proovidest eraldatud fükobiliproteiinide saagised on esitatud Joonistel 14 ja 15.



Joonis 14. Kaugatomalt kogutud proovidest määratud R-fükoerütriini saagised sõltuvalt vetika kasvusügavusest.

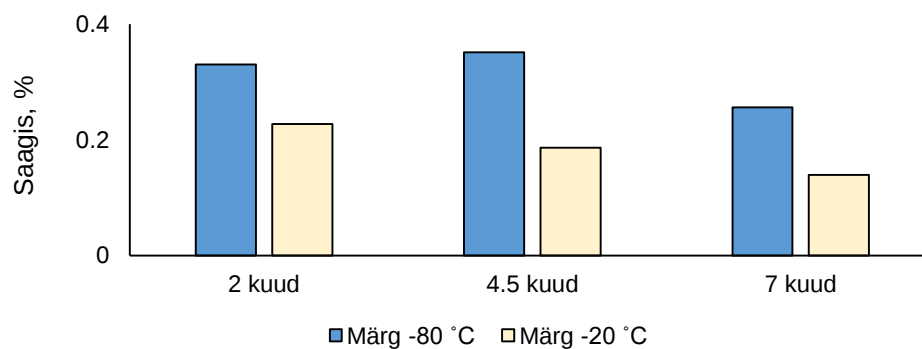


Joonis 15. Kaugatomalt kogutud proovidest määratud allofukotsüaniini saagised sõltuvalt vetika kasvusügavusest.

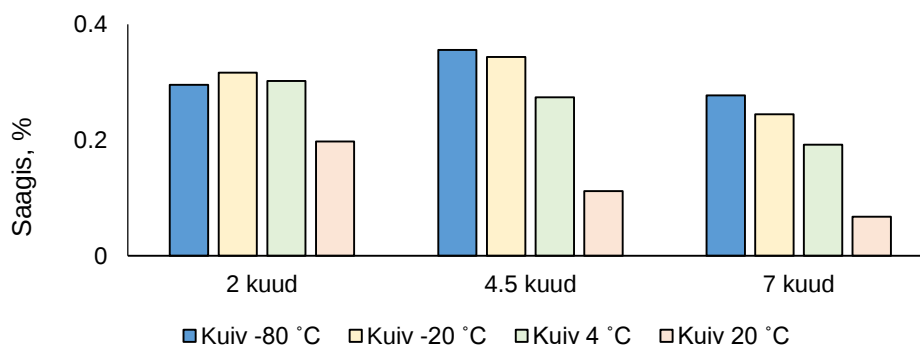
Tulemustest selgub, et analüüsitud kinnitunud vetikavormide proovide R-fükoerütriini saagis sõltub vetika kasvusügavusest. Analüüsitud proovidest määratud allofukotsüaniini sisaldused kõiguvad aga suurel määral ning selget trendi välja ei tule.

4.8 Vetikatoorme säilitamise tingimused

Fükoerütriini ja allofukotsüaniini saagised sõltuvalt Kassari lahe vetikamassi hoiustamistingimustest on esitatud Joonistel 16–19.

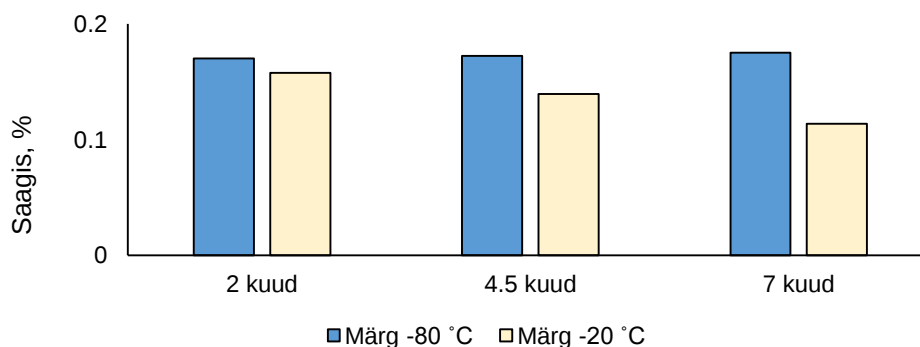


Joonis 16. Märjalt hoiustatud vetikamassist määratud R-fükoerütriini saagise sõltuvus hoiustamise ajast ja temperatuurist.

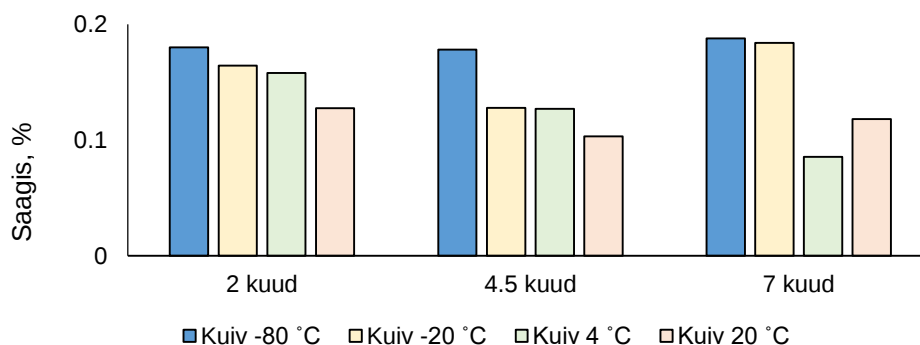


Joonis 17. Kuivalt hoiustatud vetikamassist määratud R-fükoerütriini saagise sõltuvus hoiustamise ajast ja temperatuurist.

R-fükoerütriini puhul selgub, et märjalt -20 °C juures säilitades on kahe kuu möödudes saagis langenud ~30% võrra (0,33% -80 °C puhul vs 0,23% -20 °C juures). Pikemaajalisel hoiustamisel (üle 5 kuu) langeb märjalt säilitades saagis mõlema temperatuuri korral. Kuivalt säilitades on võimalik proove hoida kuni 2 kuud ka 4 °C juures, ilma et saagis märgatavalt kahaneks. Küll aga vähendab 20 °C juures hoiustamine valgulise pigmendi saagist juba kahe kuu möödudes kolmandiku võrra ning pikemaajalisel säilitamisel langeb saagis enamgi.



Joonis 18. Märjalt hoiustatud vetikamassist määratud allofukotsüaniini saagise sõltuvus hoiustamise ajast ja temperatuurist.

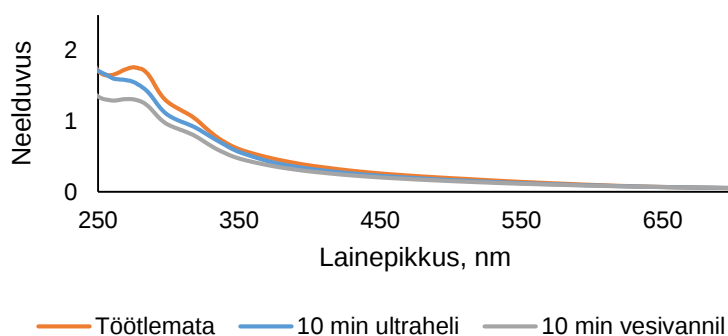


Joonis 19. Kuivalt hoiustatud vetikamassist määratud allofükotsüaniini saagise sõltuvus hoiustamise ajast ja temperatuurist.

Sarnaselt R-fükoerütriinile langeb allofükotsüaniini saagis, kui vetikamassi märjalt -20 °C juures säilitada. Pärast kahte kuud on saagis langenud ~6% võrra (0,17% -80 °C puhul vs 0,16% -20 °C juures). Pärast 4,5 kuud hoiustamist on pigmendi sisaldus vähenenud ~20% ja pikemaajalisel hoiustamisel (üle 5 kuu) juba ~35%. Kuivalt säilitades on soovitatav proove hoida -80 °C või -20 °C juures.

4.9 Kollakas-pruunide pigmentainete bioaktiivsus ja stabiilsus

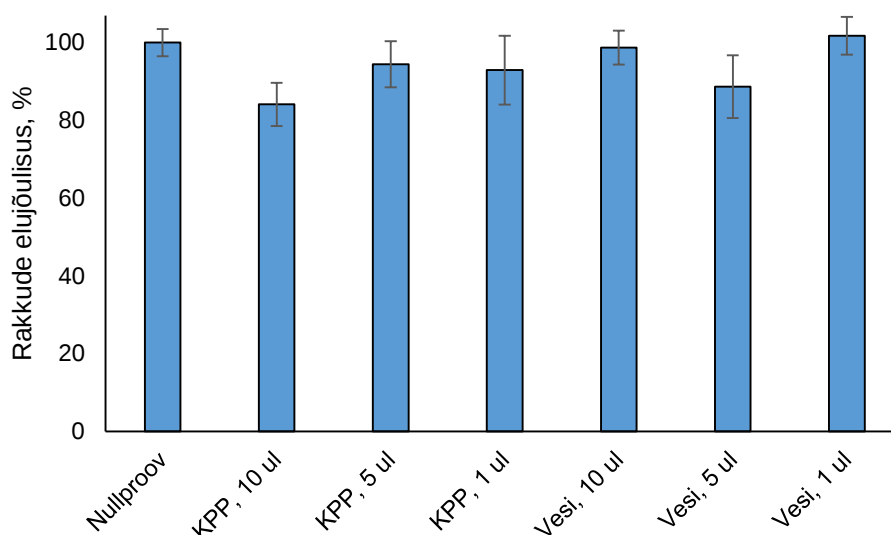
Valguliste pigmentide eraldamise ja puhastamise kõrvalproduktina saadavad kollakas-pruuni värvusega pigmentainete omaduste kohta kirjanduses teavet ei ole. Samas võivad need substantsid omada potentsiaalseid rakendusi eelkõige nende bioloogilise aktiivsuse seisukohast. Temperatuuri ja ultraheli mõju kollakas-pruunidele pigmentainetele (KPP) on esitatud Joonisel 20.



Joonis 20. Erinevate tötluste (ultrahelitöötlus, keev vesivann) mõju kollakas-pruunide pigmentainete lahjendatud vesilahuste spektroskoopilistele omadustele.

Tulemustest selgub, et kõige enam langeb keeval vesivannil 10 min hoitud proovi neelduvus, eriti UV piirkonnas. Vähem langeb ultrahelitöötusega proovi neelduvus, kuid mõlemal proovil puudub 280 nm juures selgesti eristatav piik. Bioaktiivsuste määramiseks kasutati töötlemata proovi.

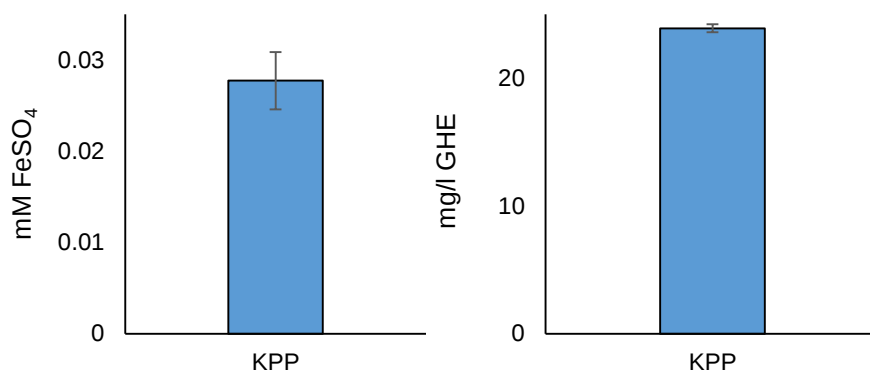
MTT testiga mõõdetud HEK-293 rakkude elujõulisus on esitatud Joonisel 21.



Joonis 21. MTT testi abil mõõdetud HEK-293 rakkude elujõulisus. KPP – kollakas-pruunid pigmentained.

Selgub, et kui KPP-d pärast 18 h inkubatsiooni lisada 10 µl, siis väheneb elulisus ~15%. Kuid võrreldes neid proovidega, kuhu lisati samadel tingimustel 5 µl vett, ei ole tulemused statistiliselt oluliselt erinevad (ühemõõtmeline dispersioonanalüüs; $p > 0,05$). Seetõttu võib järeldada, et KPP ei mõjuta lisatud kontsentratsioonides HEK-293 rakkude elulisust statistiliselt olulisel määral.

FRAP meetod põhineb raud(III)2,4,6-tripüridüül-s-triasiini redutseerimisel raud (II) 2,4,6-tripüridüül-s-triasiiniks. Mida tugevam on antioksidant, seda tugevama sinaka värvuse lahus saavutab. Võrdlusaineks on tavaliselt FeSO_4 .



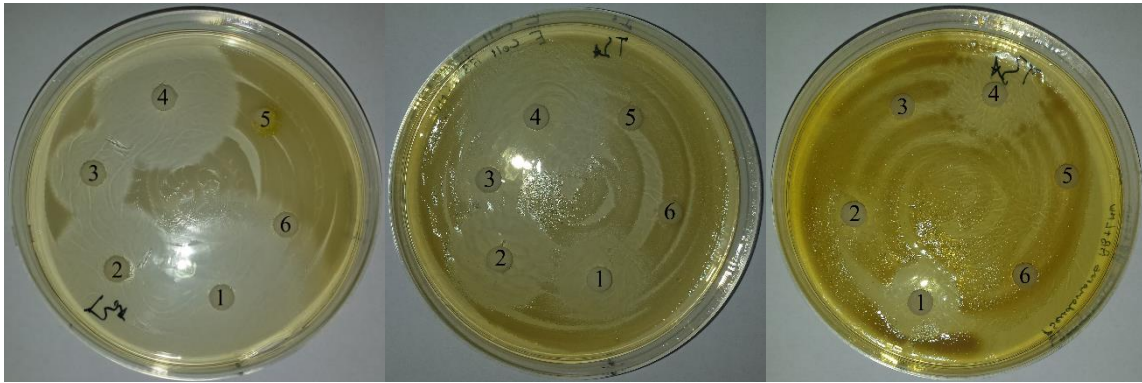
Joonis 22. Antioksidantsed omadused FRAP (vasakul) ja Folin-Ciocalteu meetodil (paremal). GHE – gallushappe ekvivalent.

Folin-Ciocalteu põhineb kollase värvuse põhjustavatest heksavalentsetest volframi- ja molübdeenisoolade redutseerimisel, mille tagajärjel muutub lahus siniseks. Tulemusi väljendatakse enamasti gallushappe ekvivalendina.

KPP lahusel on antioksidantne mõju, kuid oluline on meeles pidada, et nende pigmentide sekka kuuluvad ka puhvrissoolad, mida kasutati algselt fükobiliproteiinide eraldamiseks ning ka teised madalmolekulaarsed ioonid ja ühendid, mis ultrafiltrimismembraanist filtraadina eralduvad. Sooladest ei õnnestunud vabaneda vesinik/hüdroksiid amberliiti kasutades, sest uuritavad kollakas-pruunid pigmendid seondusid maatriksiga. Pigmentidega koos elueeruvad soolad võivad mõne meetodi puhul (eriti ABTS• testi korral) anda valepositiivsed tulemusi.

Antibakteriaalsuse testimiseks kasvatati baktereid mitteselektiivsel TSA söötmel (trüptoon soja agar) 24 h, misjärel tehti söötmetest pildid. Võrdluseks kasutati penitsilliin-streptomütsiini (10000 ühikut penitsilliini ja 10 mg streptomütsiini milliliitris), tetratsükliini (12,5 mg/ml), puromütsiini (10 mg/ml) ja klooramfenikooli (34 mg/ml).

Joonisel 23 on esitatud testitud antibiootikumide ja KPP mõju bakterite elulisusele.



Joonis 23. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ja *Pseudomonas aeruginosa* bakterid 24 h pärast disk-difusiooni testi. 1 – Penitsilliin-streptomütsiin, 2 – tetratsükliin, 3 – puromütsiin, 4 – klooramfenikool, 5 – vesi, 6 – kollakas-pruunid pigmentained.

Kasutatud kollakas-pruunide pigmentainete kontsentratsioonide juures ei omanud need testitud bakterite inhibeerimisele mõõdetavat mõju. Kuigi *S. aureus* puhul (vasakpoolne joonis) võib tunduda, et KPP juures on bakterikasvu inhibeeritud, on see tegelikult penitsilliin-streptomütsiini väga tugev antimikroobne toime stafülokokkide vastu. Sarnane olukord esineb *E. coli* puhul (keskmine joonis), kus puhta vee proovi ümbert on ühelt poolt bakterikasv peatunud.

5. Kokkuvõte

Soovides *F. lumbricalis* vetikamassist samaaegselt eraldada nii fukoerütriini kui allofükotsüaniini, on otstarbekas kasutada pH 6 puhverlahust, sest siis on fukoerütriini ja allofükotsüaniini saagised kõrgemad kui pH 5 või 7 puhul. Madalamate ja kõrgemate pH väärtuste korral on saagised veel madalamad. Kasutada tuleks kas fosfaat- või tsitraatpuhvrit, atsetaatpuhvri kasutamine andis väiksemaid saagised. Vetikamassi tuleks puhvris segada võimalikult madalal temperatuuril, vältides seeläbi valkude fluorestsentsiaktiivsuse vähenemist. Ensüümidest mõjutasid ekstraksiooni kulgu positiivselt endoksülanaas (x2629) ja tsellulaas (22178), kuid teised testitud ensüümid saagist märgatavalt ei suurendanud. Ultrahelilagundamine suurendas fukoerütriini saagist ~31%, kuid vähendas allofükotsüaniini saagist ~33%.

Ultrafiltrimine suurendab R-fukoerütriini suhtelist puhtust ning võimaldab ka lahust kontsentreerida, kuid edasiseks puhastamiseks (nii fükobiliproteiinidest kui ka teistest valkudest) tuleb lisaks kasutada kas sadestamist, kromatograafiat või mõnda muud meetodit. Uuritud proovide puhul selgus, et R-fukoerütriini saagis sõltub kasvusügavusest ning sügavamalt korjatud proovidest määratud saagised on suuremad, võrreldes madalamast veest korjatud proovidega. Allofükotsüaniini puhul sarnast seost ei täheldatud.

Toorme säilitamiseks tuleks kasutada madalaid temperatuure ning märjalt hoiustades on vajalik kasutada -80 °C, kuid lühiajaliselt (kuni 2 kuud) sobib kuivade proovide hoiustamiseks ka -20 °C. Kuivatatud vetikaproovidest, mida hoiustatakse toatemperatuuril, tuleks kuu aja jooksul fükobiliproteiinid eraldada.

Kollakas-pruune pigmente saab eraldada *F. lumbricalis* vesiekstraktidest kasutades ultrafiltrimise tehnikat. Koos pigmentidega filtreeruvad aga ka puhvri- ja meresoolad, mis võivad hilisemaid rakendusi takistada. Testitud elusrakkude HEK-293 puhul ei leitud märkimisväärset erinevust rakkude elulisuses kontrolli ja lisatud pigmentide vahel. Lisaks ei täheldatud testitud kontsentratsioonide puhul pigmentidel antibakteriaalset toimet *S. aureus*, *E. coli* ja *P. aeruginosa* vastu. Küll aga leiti kollakas-pruunidel pigmentidel antioksidantseid omadusi FRAP ja Folin-Ciocalteu meetodeid kasutades.

Kasutatud kirjandus

- Baggerly, K., Coombes, K., Morris, J.S. 2007. An introduction to high-throughput bioinformatics data. in: Bayesian Inference for Gene Expression and Proteomics, (Eds.) K.A. Do, P. Müller, M. Vanucci, Cambridge University Press. Cambridge.
- Brück, W.M., Reisse, S., Garbe, D., B., B.T. 2012. Industry potential of marine bioactive components: Downstream processing and vehicles for efficient delivery *in situ*. in: Marine Bioactive Compounds, (Ed.) M. Hayes, Springer US.
- Bryant, D.A. 1981. Phycoerythrocyanin and phycoerythrin: Properties and occurrence in Cyanobacteria. Journal of General Microbiology, 128, 835-844.
- Dumay, J., Clément, N., Morancáis, M., Fleurence, J. 2013. Optimization of hydrolysis conditions of *Palmaria palmata* to enhance R-phycoerythrin extraction. Bioresource Technology, 131, 21-27.
- Gantt, E. 1980. Structure and function of phycobilisomes: Light harvesting pigment complexes in red and blue-green algae. International Review of Cytology, 66, 45-80.
- Glazer, A.N. 1985. Light harvesting by phycobilisomes. Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry, 14, 47-77.
- Glazer, A.N. 1994. Phycobiliproteins – A family of valuable, widely used fluorophores. Journal of Applied Phycology, 6(2), 105-112.
- Gonzales-Ramirez, E., Andújar-Sánchez, M., Ortiz-Salmerón, E., Bacarizo, J., Cuadri, C., Mazzuca-Sobczuk, T., Ibáñez, J.M., Cámara-Artigas, A., Martínez-Rodríguez, S. 2014. Thermal and pH stability of the B-phycoerythrin from the red algae *Porphyridium cruentum*. Food Biophysics, 9, 184-192.
- Ke, B. 2001. Phycobiliproteins and phycobilisomes. in: Advances in Photosynthesis and Respiration, (Ed.) Govindjee, Vol. 10, Kluwer Academic Publishers. Walnut Creek, CA.
- Lee, R.E., Phycology. 4 ed. 2008, Cambridge: Cambridge University Press. Niu, J.-F., Chen, Z.-F., Wang, G.-C., Zhou, B.-C. 2010. Purification of phycoerythrin from *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) using expanded bed absorption. Journal of Applied Phycology, 22(1), 25-31.

- Niu, J.-F., Wang, G.-C., Tseng, C.-K. 2006. Method for large-scale isolation and purification of R-phycoerythrin from red alga *Polysiphonia urceolata* Grev. *Protein Expression and Purification*, 49(1), 23-31.
- Paalme, T., Kotta, J., Kersen, P., Martin, G., Kukk, H., Torn, K. 2011. Inter-annual variations in biomass of loose lying algae *Furcellaria-Coccotylus* community: The relative importance of local versus regional environmental factors in the West Estonian Archipelago. *Aquatic Botany*, 95(2), 146-152.
- Pan, Q., Chen, M., Li, J., Wu, Y., Zhen, C., Liang, B. 2013. Antitumor function and mechanism of phycoerythrin from *Porphyra haitanensis*. *Biological Research*, 46(1), 87-95.
- Pangestuti, R., Kim, S.-K. 2015. Seaweed proteins, peptides and amino acids. in: *Seaweed Sustainability. Food and Non-Food Applications*, Elsevier, pp. 125-140.
- Pereira, L. 2011. A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds. in: *Seaweed: Ecology, Nutrient Composition and Medicinal Uses*, (Ed.) N.S.P. Inc. New York, pp. 15-47.
- Pflugmacher, S., Olin, M., Kankaanpää, H. 2010. Oxidative stress response in the red alga *Furcellaria lumbricalis* (Huds.) Lamour. due to exposure and uptake of the cyanobacterial toxin nodularin from *Nodularia spumigena*. *Harmful Algae*, 10(1), 49-55.
- Rastogi, R.P., Sonani, R.R. 2015. Physico-chemical factors affecting the in vitro stability of phycobiliproteins from *Phormidium rubidum* A09DM. *Bioresource Technology*, 190, 219-226.
- Sun, L., Wang, S., Gong, X., Zhao, M., Fu, X., Wang, L. 2009. Isolation, purification and characteristics of R-phycoerythrin from a marine macroalga *Heterosiphonia japonica*. *Protein Expression and Purification*, 64(2), 146-154.
- Vernon, T., Glazer, A.N., Stryer, L. 1982. Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. *The Journal of Cell Biology*, 93, 981-986.