

TALLINNA ÜLIKOOL
Matemaatika ja Loodusteaduste Instituut
Loodusteaduste osakond

**Polüsahhariidide eraldamine punavetikate
Furcellaria lumbricalis ja *Coccotylus truncatus*
looduslikust segust**

Aruanne

Rando Tuvikene ja Marju Robal

Tallinn 2015



Toetab Euroopa Liit

Töö on teostatud Tartu Ülikooli Eesti mereinstituudi kalanduse teabekeskuse tellimusel.

Eksperimentaaltöö on teostatud Tallinna Ülikooli Matemaatika ja Loodusteaduste Instituudi Loodusteaduste osakonna teaduslaboris ajavahemikul 18.07.2014 – 26.01.2015.

Töö teostajad: Rando Tuvikene, *PhD*
Marju Robal, *MSc*

Sisukord

Sissejuhatus	4
1. Vetikapolüsahhariidid.....	5
1.1 Agarid ja karraginaanid.....	5
1.2 Karraginaanide struktuur-omadus seosed	6
1.3 Furtsellaraan.....	7
1.4. Kasutusala	7
2 Materjalid ja meetodika	8
2.1 Uuritud vetikasegu	8
2.2 Polüsahhariidide eraldamine vetikatest.....	8
2.3 Ekstraktsioonieelne leelistöötlus.....	9
2.4 Polüsahhariidmassi pleegitamine.....	9
2.5 Molekulmassi ja anorgaanika sisalduse määramine	9
2.6 Geelitugevuse määramine	9
3. Karraginaanide eraldamine vetikatest	10
3.1 Üldpõhimõtted	10
3.2 Ekstraktsioon normaalrõhul	11
3.3 Ekstraktsioon ülerõhul.....	13
3.4 Leelistöötlus	14
3.4.1 Ekstraktsioonieelne toatemperatuurine leelistöötlus	16
3.4.2 Kuum ekstraktsioonieelne leelistöötlus	18
3.5 Vetikapolüsahhariidide eraldamine lahusest	18
3.6 Produkti kuivatamine	21
3.7 Pleegitamine.....	21
3.8 Vetikamassi päritolu, korjamisaja ja vetika <i>C. truncatus</i> mõju tardaine kvaliteedile	23
4. Karraginaanide eraldamise tehnoloogilised aspektid	23
Kokkuvõte.....	25
Kirjandusviited.....	26

Sissejuhatus

Läänemeri on unikaalne ökosüsteem, mille riimveeline keskkond on elupaigaks paljudele mageveelist ja merelist päritolu organismidele. Punavetikad kui valdavalt merelise eluviisiga organismid võivad sellises keskkonnas küll levida, kuid elu madalast soolsusest tingitud hüpoosmootse stressi tingimustes põhjustab muutusi nende liikide morfoloogias, arengutsüklite vaheldumises või polüsahhariidkoostises.

Töõnduslike vetikaliikide levikuks ebasobivate tingimuste tõttu on Läänemere tähtsus vetikavarude kasutamise seisukohast suhteliselt väike. Ligi 160 Läänemere punavetikaliigist on töõnduslikku kasutust leidnud vaid *Furcellaria lumbricalis*. Riimvees hästi kohastunud esineb see vetikaliik Läänemeres nii merepõhjale kinnitunud kui ka kinnitumata vormina. Viimast esineb laialdaselt ka Eesti territoriaalvetes, eriti massiliselt aga Väinameres, kus moodustab koos teise punavetikaliigi *Coccolytus truncatus* kinnitumata vormiga omapärase koosluse, nn Kassari vetikaplasti. Suure biomassi tõttu on see vetikakooslus üheks oluliseks Eesti taastuvaks loodusvaraks.

Juba aastast 1967 toodetakse Kassari vetikakoosluse baasil tardainet, mis keemiliselt kujutab endast teatud sulfaaditud polüsahhariidide (karraginaanide) segu. Seda tüüpi polüsahhariidid on maailmas levinud toidulisainetena (E-407), mida kasutatakse paljudes valdkondades, eriti laialdaselt aga toiduaine-, kosmeetika- ja farmaatsiatööstuses. Kuigi vetikatest pärinevaid polüsahhariide toodetakse maailmas suurtes kogustes, sisaldab *F. lumbricalis* unikaalse keemilise koostise ja omadustega karraginaane (furtsellaraani), mida mujal maailmas ei toodeta. See on tingitud asjaolust, et selle vetikaliigi töõnduslikult kasutatavad varud on väga piiratud.

Puhas furtsellaraan on kvaliteetne, suure geelistumisvõimega looduslik materjal. Siiski on selle polümeeri efektiivne eraldamine vetikast problemaatiline, sest kvaliteetse produkti saamiseks on vajalik konkreetsest toormest ja selle iseärasustest lähtuva tehnoloogilise protsessi kasutamine. Sobivate eraldamismeetodite valik eeldab aga sageli väga mahukaid eksperimentaaluringuid ning ka katsetootmist. Paraku ei ole Eestis käesoleval hetkel rakenduses sobivat mastaapset tehnoloogilist lahendust, mis võimaldaks punavetikat *F. lumbricalis* sisaldavast biomassist toota kõrgekvaliteetset suure geelistumisvõimega tardainet. Selline olukord on kohati tinginud toorvetikate eksporti ning viinud Eesti ühe unikaalseima loodusvara ebaefektiivse kasutamiseni.

Käesolevas töös vaadeldakse optimaalseid meetodeid kõrgekvaliteetse ja suure geelitugevusega polüsahhariidmassi eraldamiseks vetikate *F. lumbricalis* ja *C. truncatus* looduslikust segust. Uuritakse polüsahhariidide efektiivseid pleegitamisevõimalusi ning tardaine töõndusliku kvaliteedi näitajaid – geelitugevus, värvus, molekulmass. Hinnatakse, kuidas mõjutab punavetika *C. truncatus* sisaldus nende vetikate segust eraldatud polüsahhariidmassi töõnduslikku kvaliteeti. Samuti uuritakse sesoonsuse ja vetikate kasvusügavuse mõju nendest eraldatud polüsahhariidide koostisele.

1. Vetikapolüsahhariidid

1.1 Agarid ja karraginaanid

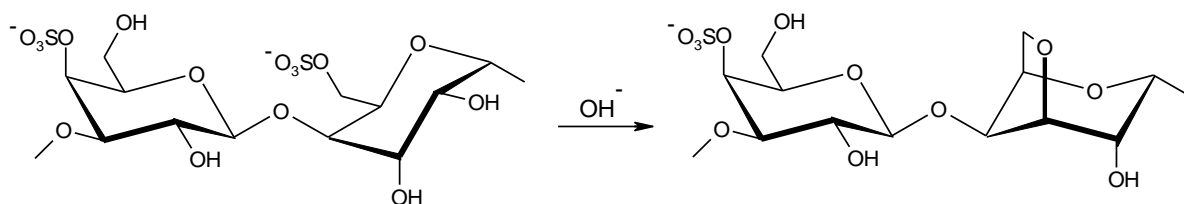
Loodus on polüsahhariidide poolest väga rikas. Kuigi nad moodustavad ligi 70% Maa biomassist, ei osata neid tänapäeval laboritingimustes sünteesida ning ka nende detailne struktuur ahela ulatuses (primaarstruktuur) ei ole kaasajal veel määratav. Samas on suur hulk polüsahhariide olulised paljudes eluvaldkondades, eriti aga toiduainetööstuses, kus neid kasutatakse laialdaselt paksendavate, emulgeerivate ja konsistentsi andvate omaduste tõttu.

Üheks oluliseks töendusliku tähtsusega polüsahhariidide rühmaks on punavetikate rakuseintes esinevad sulfaaditud galaktaanid. Need on kõrgmolekulaarsed ained, mis põhimõttelise struktuuritüübi alusel jagatakse agariteks ja karraginaanideks [1]. Vastavalt nimetatakse ka neid polüsahhariide sisaldavaid punavetikaliike agarofüütideks ja karraginofüütideks.

Vetikapolüsahhariidid on valged või kergelt värvunud amorfsed lõhnatud ained molekulmassiga mõnesaja tuhandest kuni mõne miljonini. Nii karraginaanides kui agarites moodustavad makromolekulaarse, üldiselt lineaarse ahela galaktoosjäägid või nende derivaadid (nt anhüdrogalaktoosjäägid), mis on seotud järjestikku vahelduvate 1,3- ja 1,4-sidemetega. Fundamentaalne struktuurierinevus nende polüsahhariidide vahel seisneb asjaolus, et agarites on üskteisele järgnevad galaktoosjäägid ahelas erineva ruumilise konfiguratsiooniga (D- ja L-isomeerid), karraginaani tüüpi polüsahhariidides on nad aga kõik ühesugused (D-isomeerid).

Karraginaane iseloomustab suur struktuurne varieeruvus ning neid klassifitseeritakse peamiselt vastavalt sulfaatrühmade arvule ja asendile polüsahhariidses ahelas. Klassikaliselt eristatakse ligi 17 karraginaanide peamist struktuuritüüpi, mida traditsiooniliselt tähistatakse kreeka tähtedega [2]. Karraginaanide koostis ja struktuur varieerub olulisel määral vetikaliikide lõikes, kuid võib sõltuda ka liigisisest keskkonnatingimustest, kasvukohast, aastaajast ning isendite arenemisjärgust [3]. Kõiki nimetatud muutusi kajastab otseselt vetikate rakuseinte keemiline koostis ja struktuur.

Ühegi tänapäeval tuntud keemilise meetodiga ei ole võimalik muuta karraginaani agariks, küll on aga võimalik mõnel juhul ühest karraginaani tüübist saada teine. Nii näiteks muutub μ -karraginaan leelistöötuse tulemusena κ -karraginaaniks (joonis 1). Tootmistehnoloogiliselt on tegemist olulise protsessiga, sest sellisel viisil on võimalik vetikatest eraldatud tardaine töenduslikku kvaliteeti (geelitugevust) sageli märgatavalt tõsta [4, 5].



Joonis 1. 3,6-anhüdrogalaktoosi teke leelistöötuse tagajärjel, mil geelistumisvõimet mitteomav μ -karraginaani muundub tugevaid geele andvaks κ -karraginaaniks.

Merevetikad on rikka ja ebahariliku mineraalkoostisega elusorganismid. Karraginaanide struktuuriahela elektrilise laetuse tõttu on paljud anorgaanilised katioonid polüsahhariidmaatriksiga tugevasti seotud. Sellest tulenevalt on anorgaanilise komponendi osakaal karraginaanides kõrge (tavaliselt 10–30%). Lisaks sisaldavad polüsahhariidproovid tavaliselt 10–15% absorbeerunud õhuniiskust ning väiksemas koguses ka teisi komponente, sh vetikapigmente ja nende laguprodukte.

1.2 Karraginaanide struktuur-omadus seosed

Punavetikagalaktaanide kõige olulisemaks omaduseks on nende geelistumisvõime, st võime moodustada nende polüsahhariidide kuuma sooli jahtumisel korrastunud kolmemõõtmelisi struktuure [6]. Geeli formeerumine vesilahustes on keeruline protsess, sõltudes polüsahhariidi struktuurist, kontsentratsioonist ja temperatuurist, aga ka anorgaaniliste ionide ning teiste sahhariidide esinemisest lahuses [7].

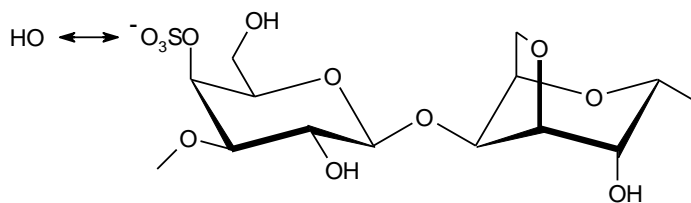
Geeli formeerumiseks on vajalik ka 3,6-anhüdrogalaktoosi jääkide esinemine struktuuris, mis soodustavad geelivõrgustiku moodustumiseks vajaliku sekundaarstruktuuri teket [8]. Vesikeskkonnas tõstavad 3,6-anhüdrogalaktoosi jäägid polümeeri elastsust ja leelismetalliioonide juuresolekul võimaldavad nad tugevate termopööratavate geelide teket juba väga madalatel polüsahhariidi kontsentratsioonidel. Näiteks võib κ -karraginaan geeli moodustada juba 0,5% sisaldusel vesilahuses ning 0,1–0,2% sisaldusel biokolloidsüsteemides [9].

Tööstuslikult toodetakse maailmas peamiselt vaid 3 tüüpi karraginaane: κ -, ι - ja λ -karraginaani. Need vetikapolüsahhariidid erinevad üksteisest sulfaatühmade arvu poolest molekulis kui ka nende poolt moodustavate tardainete omadustelt. κ -Karraginaan sisaldab disahhariidse korduslüli kohta üht sulfaatühma ning annab võrreldes teiste karraginaanitüüpidega suurima tugevusega geele, seda eriti kaalium- ja kaltsiumioonide esinemisel proovis. Lisaks geelitugevusele avaldavad need spetsiifilised katioonid mõju ka geeli teistele omadustele – kaaliumioonid suurendavad geeli elastsust, kaltsiumioonid viivad aga rabeledama geeli tekkeni. Kaalium- ja kaltsiumioonide üheaegsel manulusel avaldub nende ionide sünergistlik mõju, mis viib eriti tugeva, kuid samas ka rabeleda geeli formeerumiseni. ι -Karraginaan sisaldab disahhariidse korduslüli kohta kaks sulfaatühma, moodustab elastseid, pehmeid, tiksotroopsete omadustega (eriti kaltsiumioonide juuresolekul) ja hea külmumise/sulamise stabiilsusega geele. λ -karraginaani korduslülis esineb kolm sulfaatühma, see polüsahhariid tüüpiliselt geele ei moodusta, kuid annab iseloomulikke, väga viskoosseid vesilahuseid.

Seega on karraginaani tüüpi vetikapolüsahhariidide omadused olulisel määral mõjutatud erinevate metalliioonide esinemisest proovis [10]. Lisaks anorgaanilisele komponendile mõjutab nende polümeeride geelistumisvõimet ka molekulmass – mida suurem see on, seda tugevamad on saadavad geelid [11]. Tehnoloogilises plaanis pööratakse karraginaanide tootmisprotsessis põhitähelepanu just kahele karakteristikule – lõpp-produkt peab sisaldama märkimisväärtes kogustes kaalium- ja kaltsiumioone ning polüsahhariidide eraldamine peab toimuma võimalikult pehmetes tingimustes, et vältida galaktaanahelate degradatsiooni ja molekulmassi langemist.

1.3 Furtsellaraan

Furtsellaraaniks nimetatakse punavetikast *F. lumbricalis* saadavat tardainet, mis keemiliselt ehituselt on hübriidne κ/β -karraginaan (joonis 2) [6, 12, 13]. Kuna selle polümeeri peamiseks komponendiks on κ -karraginaan, siis sarnaneb furtsellaraan κ -karraginaanile nii oma geelistumisomaduste kui ka kasutusvaldkondade poolest. Piimas annab aga furtsellaraan κ -karraginaanist pehmema ja väiksema haprusega geeli. Furtsellaraani interaktsiooni tõttu piimaproteiinidega tundub piimatoodete suus meeldivam [14]. See asjaolu teeb furtsellaraanist väärtusliku toormaterjali toiduainetööstuses.



Joonis 2. Furtsellaraani disahhariidse korduslülis struktuur.

Optimaalse geelitugevuse saavutamiseks vajab furtsellaraan väiksemat anorgaaniliste kationide kontsentratsiooni, kuna furtsellaraani molekulis on palju vähem laetud rühmi. Samal põhjusel kulub palju vähem ka leelismetallide ioone furtsellaraani galaktaanmaatriksi küllastamiseks.

Eesti territoriaalvetes kasvab töenduslikes kogustes kättesaadav kinnitumata *F. lumbricalis* vorm tihedalt läbipõimunult koos teise punavetikaliigiga *C. truncatus* (sisaldus enamasti kuni 35% koosluse biomassist). Kuna nimetatud vetikaliike ei ole füüsiliselt töenduslikes mahtudes võimalik teineteisest eraldada, sisaldab Eesti vetest pärinev furtsellaraan enamasti ka väikses koguses polüsahhariide, mis tulenevad *C. truncatus* biomassist. On teada, et *C. truncatus* sisaldab põhikomponendina ι -karraginaani ja minoorse lisandina püruvaaditud korduslülisid [15, 16]. Nii võib vetikas *C. truncatus* sisalduvate polüsahhariidide lisand mõnevõrra langetada furtsellaraani geelistumisvõimet, kuid samas suurendab ι -karraginaanile iseloomulikult tardaine elastsust ja vähendab selle rabedust.

1.4. Kasutusvaldkonnad

Kõige rohkem kasutatakse karraginaane lisaainetena toiduainetööstuses, eesmärgiga parandada toidu struktuuri ja stabiilsust. Põhiliselt kasutatakse karraginaane viskoossuse suurendamiseks, emulgaatorina, stabilisaatorina [17], niiskusekao vähendamiseks, toote massi, ruumala ja värsket väljanägemise säilitamiseks, külmutatud toiduainetes jää- (või laktoosi) kristallide tekke takistamiseks, õlle selitamisprotsessis, tekstuuri parandamiseks, aseainena, maitseainete või mahukate toidukomponentide paremaks fikseerimiseks [9]. Lisaks vähendavad karraginaanid toituainete (nt makaronide) kuumtöötlemisel teatud komponentide (eriti valkude) lagunemist ning niiskusekadusid, mistõttu need tooted

muutuvad vastupidavamaks üleküpsemise ja kõrbemamineku suhtes. Ka aitavad karraginaanid hoida toote maitset ning aroomi.

Euroopas kasutatakse toiduainete koostises nii rafineeritud (tähistus E407) kui poolrafineeritud karraginaani (tähistus E407a). Põhiliselt erineb poolrafineeritud karraginaan rafineeritud karraginaanist oma tselluloosi sisalduse poolest, mida rafineeritud karraginaan ei sisalda. Tselluloosi sisalduse tõttu annab poolrafineeritud karraginaan häguse lahuse ning seda kasutatakse peamiselt valdkondades, kus toote läbipaistvus ei ole oluline.

Karraginaanide kasutamine nn hapudes magustoitudes (puuviljadesserdid, millel enamasti pH \approx 3,8) on mõnevõrra komplitseeritud sool-olekus karraginaanide ebapüsivuse tõttu happelises keskkonnas. Seetõttu lisatakse karraginaani lagunemise vältimiseks happeline komponent poolfabrikaadile võimalikult hilja (vahetult enne külmutamist, geelistumist).

Karraginaanide kasutusala ei piirdu ainult toiduainetööstusega. Tiksotroopsete omaduste suurendamise tõttu lisatakse karraginaane näiteks hambapastade ja kingaholduskreemide koostisse. Karraginaanide juuresolek aitab ära hoida pastade kõvastumise, rabedaks muutumise, kuivamise ning ensümaatilise degradatsiooni. Polüoolidega vastastoime tõttu kasutatakse karraginaane erinevates kosmeetikatoodetes. Karraginaane kasutatakse ka sellistes toodetes nagu õhuvärskendusgeelid, tulekustutusvahud, tööstuslikud vedelsegud, värvid ja antifriisid.

Üldiselt on karraginaanid inimesele ohutud ja toiteväärtust mitteomavad looduslikud toidulisandid, kuid nende degradatsioonil võivad tekkida tervist kahjustavad ühendid – poliginaanid (molekulmass alla 50 kDa) [18]. Õige karraginaani tüübi ja koguse valimiseks on oluline tunda lisaks polüsahhariidi keemilisele koostisele ka selle kasutamise eripärasid [17].

2 Materjalid ja meetodika

2.1 Uuritud vetikasegu

Käesolevas töös uuritud punavetikasegu pärines Läänemerest ning sisaldas kuivmassilt 85–100% ulatuses *F. lumbricalis* ning 0–15% ulatuses *C. truncatus* kinnitumata vorme. Vetikamass koguti perioodil märts – september 2014, pesti peale korjamist koheselt kraaniveega, seejärel demineraliseeritud veega ning kuivatati toatemperatuuril pideva õhuvoolu tingimustes.

2.2 Polüsahhariidide eraldamine vetikatest

30 g õhkuiva vetikamassi asetati 2 liitri suurusesse ümarkolbi, lisati 1 liiter ekstrahenti (erineva kontsentratsiooniga NaOH ja KOH lahused või puhas vesi) ning keedeti tagasijahuti all 0,5–9 tundi. Alternatiivselt toimus vetikasegu kuumutamine ekstrahendis normaalrõhul 95 °C juures vesivannil või ülerõhu tingimustes autoklaavis 100°C, 110 °C või 121 °C juures puhtas vees või 20 mM fosfaatpuhvril (pH 7...11) 15 min kuni 1 tunni jooksul. Seejärel segu tsentrifugeeriti 50 °C juures ning saadud selgele ekstraktile lisati 3-kordne mahuosa etanooli. Sadestunud polüsahhariidid eraldati lahusest tsentrifugeerimisel 20 °C juures ning kuivatati õhuvoolus 30 °C juures.

2.3 Ekstraktsiooneelne leelistöötus

Õhkuiva vetikamassi hoiti 7 päeva vältel toatemperatuuril leeliselahuses (0,02–0,6 M NaOH või KOH). 30 g vetikate töötlemiseks kasutati 150 ml leeliselahust. Seejärel pesti vetikad hoolikalt kraaniveega, destilleeritud veega ning kasutati polüsahhariidide ekstraktsiooniks punktis 2.2 kirjeldatud meetodil.

2.4 Polüsahhariidmassi pleegitamine

Vetikamassi ekstraheeriti 20 mM kaaliumfosfaatpuhvril 121 °C juures autoklaavis 30 min hüdro mooduliga 33 (30 g vetikate kohta 1 liiter vedelikku). Ekstrakt tsentrifuugiti ning saadud selgele kuumale 1,5% lahusele lisati 30%-list vesinikperoksiidi ekstrakti ja peroksiidi erinevates massivahekordades. Lahusel lasti geelistuda ning hoiti 15 tundi 4 °C juures. Seejärel geel sulatati ning polüsahhariidid sadestati kolmekordse mahuosa etanooliga. Sadestunud polüsahhariidid eraldati lahusest tsentrifuugimise teel ning kuivatati 30 °C juures õhuvoos. Saadud produktide heleduse hindamiseks valmistati nendest 1,5%-lised lahused ning mõõdeti spektrofotomeetriga nende neelduvused 460 nm juures 1 cm paksustes kvartsküvettes.

2.5 Molekulmassi ja anorgaanika sisalduse määramine

Polüsahhariidide molekulmasside ja anorgaanika sisalduse määramiseks kasutati eksklusioonikromatograafi süsteemi, mis koosnes Shimadzu Nexera X2 LC-30AD pumbast, Nexera X2 SIL-30AC autosamplerist, Prominence CTO-20AC kolonnitermostaadist, RID-10A refraktomeetrisest detektorist, kahest järjestikku ühendatud Shodex OHPak SB-806MHQ kolonnist ning Shodex OHPak SB-G eelkolonnist. Eluendina kasutati 0,1 M NaNO₃ vesilahust voolukiirusel 0,8 ml/min. Kaliibrimiskõver koostati pullulaani (788, 404, 212, 112, 47,3, 22,8, 11,8, 5,9, 1,32, 0,342 kDa) standardite põhjal. Uuritava polüsahhariidproovi protsendilisus oli 0,05% ning süsteruumala 100 µl. Usaldusväärsemate tulemuste saamiseks kasutati proovi lahustamiseks sama eluenti (0,1 M NaNO₃), mida rakendati eksklusioonikromatograafi süsteemis. Polümeerpreparaatide lõplikuks lahustamiseks lasti neil lahuses 30 min punduda, seejärel kuumutati neid 4 min tugevalt segades keeval vesivannil. Kuum (60 °C) sool filtriti läbi 0,45 µm poorsusega regenereeritud tselluloosist membraani, lasti jahtuda ning sisestati kromatograafilisse süsteemi.

2.6 Geelitugevuse määramine

Geelitugevuse määramiseks konstrueeriti poolkerakujulise otsikuga (ristlõikepindala 1 cm²) varustatud seade. Mõõtmised teostati 1,5%-liste geelide puhul, mis saadi kuiva polüsahhariidi lahustamisel kuumas vees ning sellele järgneval geelistumisel õhktermostaadis 20 °C juures 4 tundi. Iga uuritava prooviga teostati kolm paralleelkatset. Silindrikujuliste proovide läbimõõt oli 35 mm. Geeli rebestamiseks vajaminevat jõudu väljendati ühikutes g/cm² ja geeli pinda rõhuva raskuse ühtlane suurenemine (350 g/min) tagati vee juurdevoolu abil.

3. Karraginaanide eraldamine vetikatest

3.1 Üldpõhimõtted

Järgnevalt selgitatakse läbivaid mõisteid, mis on olulised uuringu sisulise osa mõistmisel ja annavad esmase ülevaate mõistet hõlmavast metoodikast.

Vetikasegu – töös polüsahhariidide eraldamiseks kasutatud vetikate biomass, mis koosneb 85–100% ulatuses punavetikast *F. lumbricalis* ja 0–15% ulatuses vetikast *C. truncatus*. Tuleb märkida, et sõltuvalt vetikasegu kogumiskohast ja ajast võib nimetatud kahe liigi massivahekord olla küllaltki muutlik, kuid käesolevas uuringus kasutatud biomassi puhul ei ületanud *C. truncatus* sisaldus segu kuivmassist 15%.

Ekstraktsioon – vetikasegus esinevate polüsahhariidide viimine lahusesse, hoides vetikaid ekstrahendis kõrgetel temperatuuridel normaal- või ülerõhu tingimustes. Ekstrahendiks võib olla puhas vesi või kindla pH väärtusega fosfaate või leelist sisaldav vesilahus. Kõige lihtsamal kujul on ekstraktsioon vetikasegu keetmine vees. Ekstraktsiooni tulemusel tekib polüsahhariidide ja muid vetikatest pärinevaid lisandeid sisaldav vedel **ekstrakt**. Ekstraktsioon polüsahhariidide eraldamiseks vetikatest tuleb läbi viia nii, et võimalikult maksimaalselt kätte saada väärtuslik komponent (geelistumisvõimet omavad ained). Ekstraktsioon peab olema minimaalse kestvusega, et võimalikult säilitada polümeerahela natiivset olekut ning hoida kokku energiat.

Hüdro moodul – ekstrahendi massi ja ekstraktsiooniks kasutatavate vetikate kuivmasside suhe. Hüdro moodul on oluline ekstraktsiooni iseloomustav karakteristik, mida suurem on selle väärtus, seda efektiivsem on ekstraktsioon, kuid seda energiamahukam ja tehniliselt keerulisem on hiljem ekstraktist polüsahhariide sadestada.

Saagis – kogu polüsahhariidide eraldamisprotsessi efektiivsust iseloomustav karakteristik. Antud töös käsitletakse saagist eraldamise käigus saadud polüsahhariidi kuivmassi ja ekstraktsiooniks võetud vetikate kuivmassi suhte protsendilise väljendusena.

Leelistöötlus – vetikate või mõnel juhul neist juba eraldatud polüsahhariidide hoidmine kontaktis leeliselega. Tüüpiliselt kasutatakse leelistöötlust polüsahhariidide struktuuri modifitseerimise eesmärgil, mil teatud juhtudel on võimalik 3,6-anhüdrogalaktoosi juurdeteke polüsahhariidmaatriksisse ning seeläbi geelitugevuse suurenemine. Lisaks polüsahhariidide struktuuri modifitseerimisele võimaldab leelistöötlus polüsahhariidide tõhusamat ekstraktsiooni vetika tallusest, mis läbi suurenevad ekstraktsionisaagised. Leelistöötlus võib toimuda paralleelselt ekstraktsiooniga kõrgel temperatuuril (modifitseeriv aine, nt KOH või NaOH, lisatakse ekstrahendi hulka) või ekstraktsioonile eelnevalt vetikate hoidmisel leeliselahuses. Leelismodifitseerimine peab olema võimalikult efektiivne, kuid ei tohi seejuures veel põhjustada polüsahhariidi olulist destruktiooni.

Polüsahhariid – antud töös nimetatakse polüsahhariidideks punavetikates *F. lumbricalis* ja *C. truncatus* esinevaid geelistumisvõimelisi sulfaaditud galaktaane.

Natiivne polüsahhariid – natiivsetena võib vaadelda selliseid vetikate biomassist eraldatud polüsahhariidide, mille keemiline struktuur ja molekulmass on väga lähedased polüsahhariididele, mida vetikad oma elutegevusprotsessides kasutavad. Siiski tuleb tähele panna, et täielikult natiivsel kujul saavad polüsahhariidid esineda üksnes elusvetikates ning kõik vetikatest tehistingimustes eraldatud polüsahhariidid on rohkemal või vähemal määral

modifitseerunud. Sageli käsitletakse natiivsetena puhtas vees ekstraheeritud polüsahhariide, kuid uurimuse autoritele teadaolevatel andmetel ei saa selliseid polüsahhariide pidada natiivseteks märkimisväärselt vähenenud molekulmassi tõttu.

Karraginaan – paljudes punavetikates esinev galaktaan, mida sageli iseloomustab suur väävlisisaldus ning geelistumisvõime. Tuntakse ligi 17 karraginaanide põhitüüpi, mis erinevad sulfaatühemete paiknemise ja arvu poolest galaktaanahelas ning geelistumisvõime osas.

Furtsellaraan – punavetikas *F. lumbricalis* esinev sulfaaditud galaktaan, suure molekulmassiga polüsahhariid, mille molekulid koosnevad κ - ja β -karraginaani kordusühemetest ning mida iseloomustab hea geelistumisvõime.

3,6-anhüdrolaktoos – paljude karraginaanide koostises esinev monosahhariid, mille sisalduse tõus molekulis tõstab üldjuhul karraginaani geelistumisvõimet.

Geelistumine – polüsahhariidi kuuma vesilahuse jahtumisel moodustuv tahke aine (geel ehk tarre), mille põhiosa moodustab vesi (sageli üle 97%). Geelistumisega kaasneb iseloomuliku mikroskoopilise polüsahhariidvõrgustiku teke, geele iseloomustavad olulisemad parameetrid on läbipaistvus, tugevus ja sulamistemperatuur.

Geelitugevus – geelistuvate polüsahhariidide oluline töenduslik kvaliteedinäitaja. Antud töös väljendatakse geelitugevust ühikuga g/cm^2 , mis näitab minimaalset massi, mis tuleb asetada 1 cm^2 geeli pinnale, et geeli pind rabestuks.

Polüsahhariidide töenduslik kvaliteet – peegeldab ekstraktsiooniprotsessi käigus eraldatud polüsahhariidide sobivust toiduainetööstuse toormeks. Töenduslikku kvaliteeti väljendavad järgmised polümeeri karakteristikud: geelitugevus, molekulmass (liiga madala molekulmassiga vetikapolüsahhariidide kasutamine toiduainetööstuses ei ole lubatud), värvus, lõhn, lisandite esinemine (sh raskmetallid), disperseerumisvõime vees (st võime lahustuda ilma kimpide moodustamata, on seotud muuhulgas polümeeripulbri osakeste suuruse ja eripäraga).

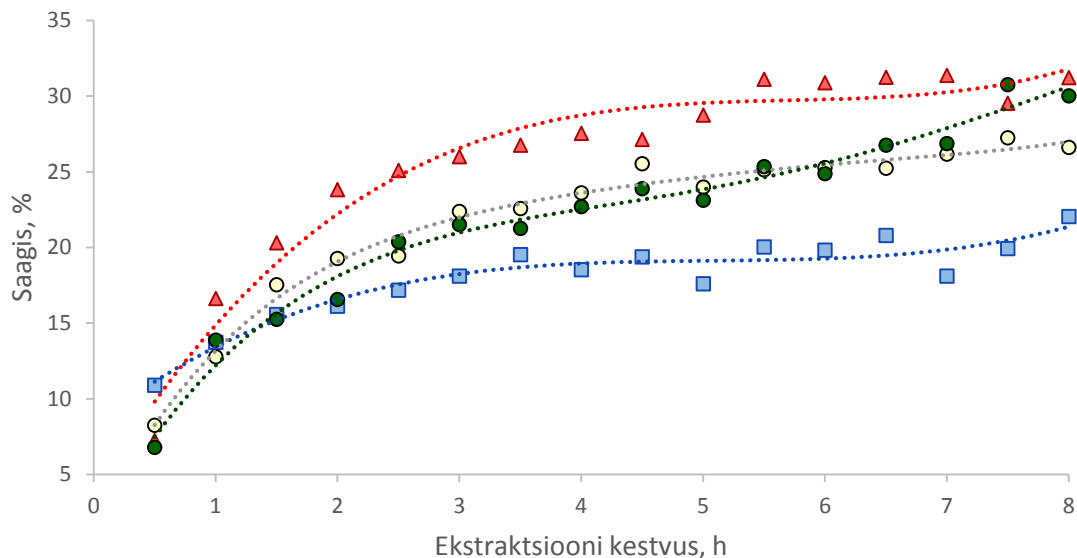
3.2 Ekstraktsioon normaalrõhul

Ekstraktsiooniparameetrite valikul on oluline välja selgitada uuritava vetikaliigi eripärasid arvestav hüdromoodul. Punavetika *F. lumbricalis* puhul on sobivaks hüdromooduliks 33 (st. $\approx 30\text{ g}$ kuivatatud vetikamassi 1 liitri ekstrahendi kohta), mil vetikad on parajasti ekstrahendiga kaetud. Liiga kõrge hüdromoodul küll rikastab ekstrakti polüsahhariididega kiiremini, kuid hilisem polüsahhariidide sadestamine on oluliselt keerulisem ja energiamahukam. Madala hüdromooduli puhul ei ole kogu vetikamass ekstrahendiga kontaktis, mistõttu on protsess ebaefektiivne ning õhuga kokkupuutuvas vetikamassis võib toimuda polüsahhariidide liigne degradeerumine, mis alandab ühtlasi ka polüsahhariidide töenduslikku kvaliteeti.

Õhkuiva vetikamassi keedeti erinevates keskkondades (NaOH ja KOH lahustes ning puhtas vees) 0,5–9 tunni jooksul hüdromooduliga 33 tagasihajuti all, et vältida vedelikukadusid ekstraktsiooni vältel. Kuumal ekstraktsioonil KOH või NaOH lahuses toimub leelistöötlus ekstraktsiooniprotsessi käigus. Leelistöötluse ja ekstraktsiooni ühildamine hoiab kokku aega ja energiat ning lihtsustab tehnoloogiat. Sobivalt valitud tingimused peavad kindlustama 3,6-anhüdrolaktoosi optimaalse sisalduse produktis ning sellega ka soovitatavalt suuremad geelitugevuse näitajad.

Ekstraktsiooniprotsessi optimaalse kestvuse väljaselgitamiseks võeti vaatluse alla järgmised ekstrahendid: puhas vesi ning 0,02 M NaOH, 0,15 M NaOH ja 0,15 M KOH vesilahused. Katsetulemused näitavad (joonis 3) polüsahhariidide saagise suurt sõltuvust nii valitud ekstrahendist kui ka ekstraktsioonijast. Antud katseseerias andis suurimaid saagiseid ekstraktsioon puhtas vees, väga madal leelise sisaldus ekstrahendis (0,02 M NaOH) aga viib saagiste märgatava vähenemiseni. Mõnevõrra kõrgemad leelise sisaldused ekstrahendis (0,15 M) suurendavad saagiseid, seejuures ei sõltu saagised oluliselt kasutatud leelise tüübist (NaOH või KOH).

Peamine osa polüsahhariididest ekstraheerub esimese nelja tunni jooksul, mistõttu ei ole pikemad ekstraktsiooniajad energaetiliselt mõttes otstarbekad ning sobivaimaks tuleb vetikate keetmist rakendades lugeda ekstraktsiooniprotsessi kestvusega 3–4 tundi. Mõningane polüsahhariidi jäämine vetikate ekstraktsioonijääki võib osutada soodsaks kui seda jääki kasutatakse väetise tootmise toorainena, sest seda tüüpi polüsahhariididel on tuvastatud taimede kasvu soodustavaid omadusi.

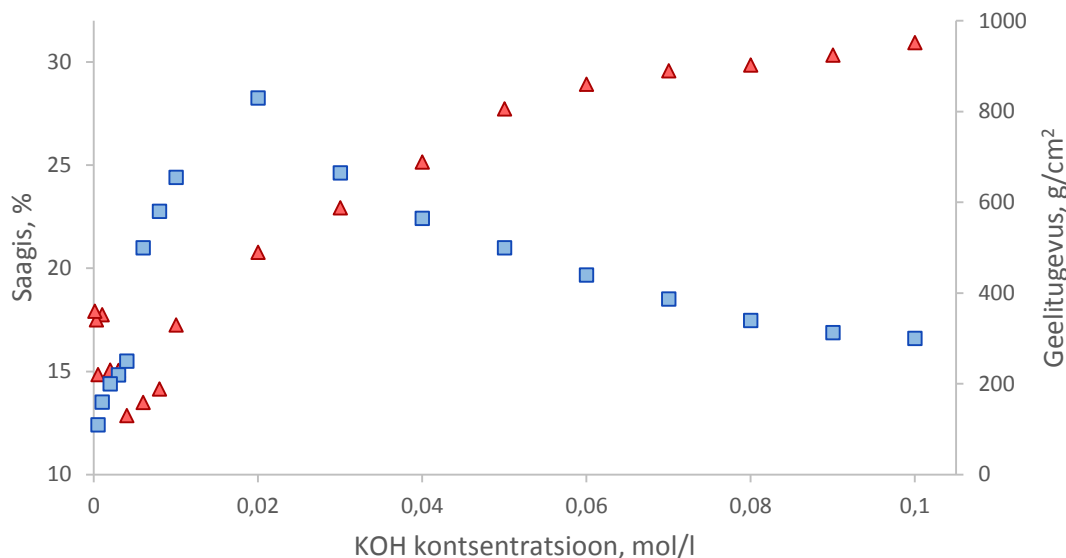


Joonis 3. Saagise sõltuvus ekstraktsioonijast vetikamassi keetmisel vees (▲), 0,02 M NaOH (■), 0,15 M NaOH (○) ja 0,15 M KOH (●) lahuses.

Selgitamiseks optimaalse saagise saamiseks vajalik leelisisaldus ekstrahendis, ekstraheeriti vetikaid 4 tunni vältel erineva kontsentratsiooniga KOH lahustes. Katsetulemused näitavad (joonis 4), et KOH sisaldus ekstrahendis mõjutab oluliselt saagist, eriti madalatel (0,0001–0,01 mol/l) leelise kontsentratsioonidel, mil juba väike leelisisalduse varieeruvus põhjustab olulisi muutusi saagise näitajates. Saagise seisukohast ei ole otstarbekas kasutada 0,04 mol/l ületavaid KOH kontsentratsioone.

Ekstraktsioonil puhtas vees saadava produkti geelitugevus on madal, vaid 75 g/cm² 1,5% polüsahhariidi sisalduse juures. Kõrgevaliteetsete κ-karraginaani tüüpi polüsahhariidide (sh furtsellaraani) geelitugevus ületab kaaliumioonide juuresolekul enamasti 1,5% geelide puhul 700 g/cm² ning võib ulatuda 1000 g/cm² väärtusteni. Väga madalaks tuleb lugeda

geelitugevuse väärtusi, mis jäävad alla 200 g/cm^2 ; sellised näitajad viitavad polüsahhariidide tugevale degradatsioonile, kuid võivad olla tingitud ka kaaliumioonide puudumisest polüsahhariidpreparaadis. Selline olukord on võimalik juhtudel, kus ekstraktsiooniprotsess viiakse läbi suures koguses naatriumioone sisaldavas lahuses või puhtas vees. Üldiselt aga on märgatava koguse kaaliumioonide esinemine κ -karraginaani kommertspreparaatides reeglits ning tehnoloogilise protsessi mingis etapis (ekstraktsioonile eelnevalt, ekstraktsiooni vältel, sadestamisprotsessi käigus või hilisemal standardiseerimisel) toimub siiski proovi rikastamine kaaliumioonidega.



Joonis 4. Furtsellaraani saagise (▲) ja 1.5% geeli tugevuse (■) sõltuvus KOH kontsentratsioonist ekstrahendis keetmisajal 4 tundi.

Katsetulemused näitavad (joonis 4), et uuritud vetikamassi puhul annab suurima geelitugevuse (830 g/cm^2) vetikate ekstraktsioon $0,02 \text{ M}$ KOH lahuses. Madalamate leelise kontsentratsioonide kasutamisel langevad geelitugevused hüppeliselt, omandades väikseima väärtuse $0,0005 \text{ M}$ KOH korral (110 g/cm^2). KOH kontsentratsioonid ekstrahendis, mis on kõrgemad kui $0,02 \text{ mol/L}$, viivad geelitugevuse järk-järgulise vähenemiseni. See on tingitud polüsahhariidahelate degradeerumisest kangete leeliselahuste toimel. Kuigi saagised KOH sisalduste piirkonnas $0,02\text{--}0,1 \text{ mol/l}$ pidevalt tõusevad, tuleb tehnoloogilises plaanis siiski optimaalseimaks lugeda vetikamassi ekstraktsiooni $0,02 \text{ M}$ KOH lahuses, mil geelitugevus on oluliselt kõrgem.

3.3 Ekstraktsioon ülerõhul

Polüsahhariidide ekstraktsioon ülerõhu tingimustes võib mõnevõrra suurendada polüsahhariidide saagist, kuid võib mastaapse rakenduse korral osutada tehnoloogiliselt keeruliseks. Oluline ekstraktsiooniprotsessi iseloomustav ja lõpp-produkti kvaliteeti määrav näitaja on ekstrahendi pH väärtus. Kirjanduse andmetel on karraginaani tüüpi polüsahhariidid

kõige püsivamad pH 9 juures. Kuna polümeeri lagunemisega kaasneb geelitugevuse oluline langus, siis on oluline välja selgitada optimaalsed pH tingimused kõrgekvaliteetse lõpp-produkti saamiseks.

Käesolevas uuringus ekstraheeriti vetikasegu puhtas vees ja 20 mM Na-fosfaatpuhvis (pH 7...11) erinevatel ekstraktsioonikestustel ning temperatuuridel autoklaavis (ülerõhul). Võrdluseks teostati eksperiment ka normaalarõhul 95 °C juures vesivannil. Katsetulemused näitavad (joonis 5a), et ekstraktsoon ülerõhul 110–121 °C juures annab oluliselt suuremaid saagiseid (18–30%) kui ekstraktsoon 95 °C juures vesivannil või 100 °C juures autoklaavis. Kuigi suurimad saagised ja heledaimad lõpp-produktid saavutatakse ekstrakttsioonil pH 7 juures, on sellises keskkonnas ekstraheeritud tardaine tugevalt degradeerunud (joonis 5b) ning seetõttu halva töendusliku kvaliteediga.

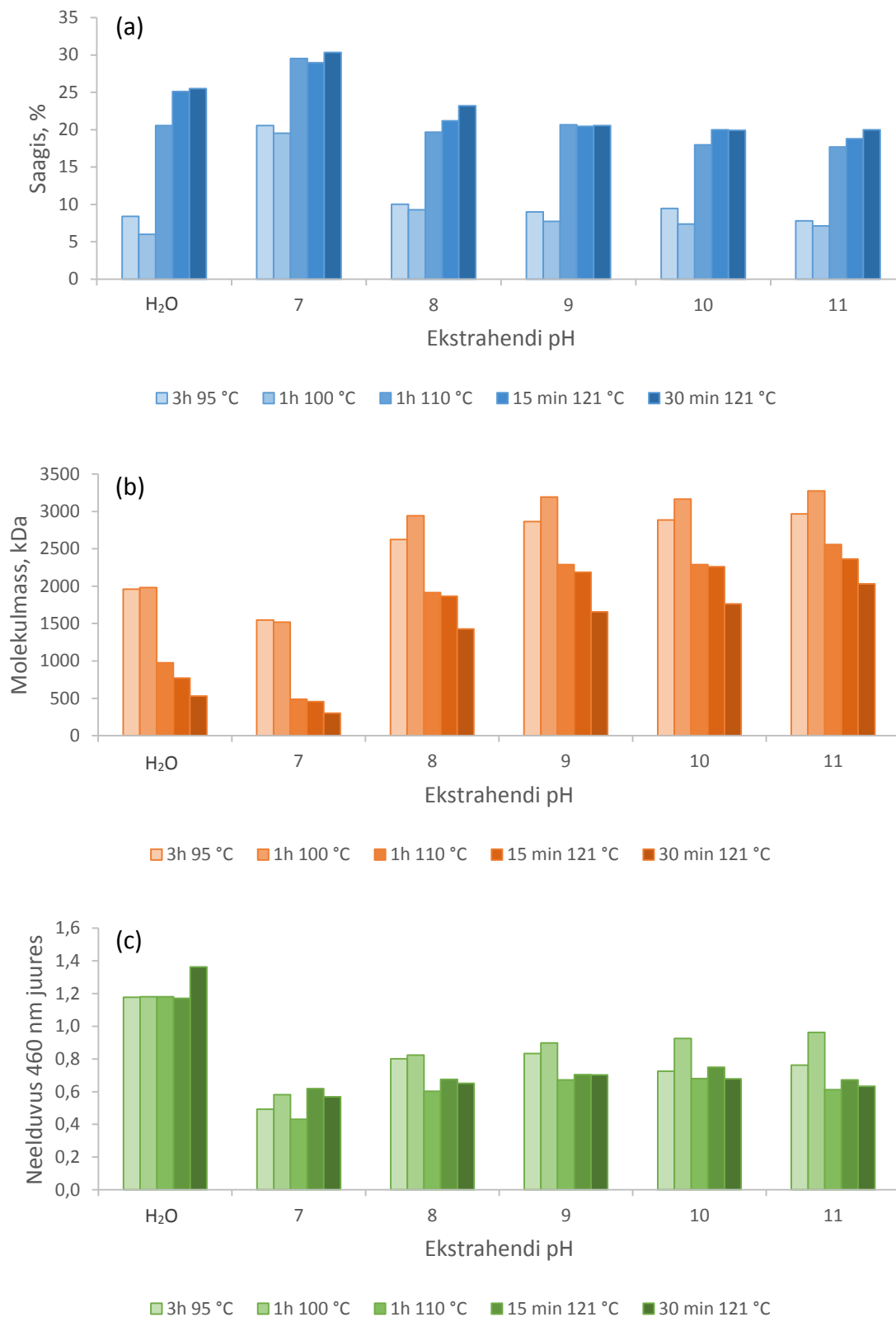
Puhas vesi on samuti polüsahhariidide degradatsiooni tõttu furtsellaraani eraldamiseks ebasobiv ekstrahent, kuigi ka sellel juhul on saagised kõrged ning produkt suhteliselt hele. Ehkki puhtas vees ekstraheeritud proovid on värvuselt heledamad, täheldati nende suurt hägusust, mistõttu on ka nende proovide 1,5% geelide neelduvused kõrged (joonis 5c). pH väärtustel 8...11 saagised mõnevõrra langevad ning furtsellaraani molekulmassid kasvavad. Otstarbekaks võib lugeda furtsellaraani ekstrakttsiooni pH 9...11 juures.

Katseseerias andsid madalaimaid saagised ekstrakttsioon 3 tundi 95 °C juures vesivannil ja 1 tund 100 °C juures autoklaavis. Oluline on märkida, et käesolevas uuringus ei kasutatud vetikate mehaanilist segamist ekstrakttsiooni ajal. Segamine võib furtsellaraani ekstrakttsiooni mõnevõrra kiirendada ja suurendada saagiseid. Vetikate keetmisel toimub mõningane segamine iseeneslikult ning seetõttu võib keetmine 100 °C juures anda suuremaid saagiseid kui samal temperatuuril autoklaavimine, mil olulist mehaanilist segamist ei toimu.

Üldiselt võib sobivaimaks pidada vetikate ekstrakttsiooni ülerõhul 121 °C juures 15 min, mil saagised on suhteliselt kõrged ning polüsahhariidid ei ole jõudnud veel pH 9...11 juures oluliselt degradeeruda. Tuleb märkida, et kuigi autoklaavis püsis ekstrakttsiooni vältel temperatuur 121 °C 15 min, siis lahuse soojenemise ja jahtumise arvel püsis vetikasegu temperatuuril üle 100 °C 45 min ning kogu protseduur on teostatav 80 minutiga (toatemperatuurilt 121 °C juurde, hoidmine 121 °C juures ja hilisem jahtumine 80 °C juurde).

3.4 Leelistöötlus

Polüsahhariidide tootmisel kasutatakse sageli leelistöötlust, sest see ühtlustab erinevatesse partiidesse kuuluvate vetikate ekstraheerimisel saadud produktide kvaliteeti ning suurendab tihti ka geelitugevust. Geelitugevuse tõus leelistöötluse käigus seostub otseselt 3,6-anhüdrogalaktoosi juurdetekkega polüsahhariidahelas. See on võimalik siiski vaid juhtudel, mil polüsahhariidahelad sisaldavad teatud prekursorlülisid, mis 3,6-anhüdrogalaktoosi juurdeteket võimaldavad. Paljud töendusliku väärtusega punavetikad sisaldavad oma koostises polüsahhariide, mille molekulides esineb märgatavas koguses prekursorstruktuure. Siiski leidub paljusid merevetikaid, mille koostises prekursorstruktuurid puuduvad või esineb neid sellistes väikestes kogustes, et nende muundamine 3,6-anhüdrogalaktoosiks polüsahhariidi geelistumisvõimele olulist mõju ei avalda.



Joonis 5. Furtcellaraani saagise, molekulmassi ja 1,5% geelide neelduvuse (proovikihi paksus 1 cm) sõltuvus ekstrahendina kasutatud 20 mM Na-fosfaatpuhvri pH väärtusest, ekstraktsiooniajast (3 h, 1 h, 15 min, 30 min) ja temperatuurist (95 °C juures vesivannil; 100, 110 või 121 °C juures autoklaavis).

Niisiis tuleb leelistöötuse otstarbekuse seisukohast vaatluse alla võtta, milline on 3,6-anhüdrogalaktoosi juurdeteket võimaldavate prekursorstruktuuride sisaldus uuritavast vetikasegust pärinevates polüsahhariidides.

Meie varasemad uuringud on näidanud, et punavetika *F. lumbricalis* polüsahhariidide puhul on leelistöötusega võimalik suurendada 3,6-anhüdrogalaktoosi sisaldust polüsahhariidpreparaadis 3,6% võrra, *C. truncatus* puhul on sama näitaja aga 4,8–6,7% [12, 15]. Samuti on teada, et mõlema nimetatud vetikaliigi segu (vahekorras 1:1) ekstraktsioonil tekib geel, mis kaaliumioonide juuresolekul moodustab 85–90% puhta *F. lumbricalis* ekstraktsioonil saadud polüsahhariidide geelitugevusest. Seetõttu on ebaoluline arvestada *C. truncatus* polüsahhariidide suhteliselt keskpärasest prekursorstruktuuride sisaldust. Prekursorstruktuuride sisaldus *F. lumbricalis* polüsahhariidides on pigem väike, mistõttu ainuüksi geelitugevuse tõstmise seisukohast ei ole otstarbekas uuritud vetikasegu puhul leelistöötlust rakendada.

Lisaks geelitugevuse tõstmisele mõjutab leelistöötlus oluliselt ka saadava tardaine värvust. Uuritud punavetikad on väga tumeda värvusega neis esinevate eriliste punaste (fükoerütriinid) ja siniste (fükotsüaniinid) fotosünteesipigmentide, fükobiliinide rohkuse tõttu. Nimetatud pigmentidel on omadus tugevalt seonduda polüsahhariidmaatriksiga, mistõttu on vetikasegust eraldatud produkt tüüpiliselt pruunika värvusega. Polüsahhariidide ekstraktsioon leeliselahustes annab tüüpiliselt tumedamaidprodukte, seejuures kaasneb leelise sisalduse tõusuga ekstrakti märgatav tumenemine. Polüsahhariidproovide värvuse valastamiseks võib kasutada pleegitamist, kuid tugevalt tumenenudprodukte ilma polümeeri olulise degradatsioonita väga heledaks saada ei ole tüüpiliselt võimalik.

Leeliste toimel vetika tallus pehmeneb, mistõttu on polüsahhariidide ekstraktsioon efektiivsem ning saagised suurenevad. Lisaks polüsahhariididele liigub pehmenenud kudedest ekstrakti aga ka rohkem lisandeid, millest mitmed annavad lõpp-produktile tumedama värvuse.

On teada, et kõige püsivamad on karraginaanid pH 9 juures, kiire lagunemine leiab aset pH väärtustel alla 3–4. Seetõttu on leelistöötlus (leeliselise keskkonna saavutamine) protsessi ühes või teises etapis obligatoorne, sest degradeerunud (madala molekulmassiga) vetikapolüsahhariide peetakse tervistkahjustavaks [18].

3.4.1 Ekstraktsiooniaelne toatemperatuurine leelistöötlus

Leelistöötlust on võimalik rakendada enne vetikate kuumeekstraktsiooni, seda peamiselt kahel eesmärgil:

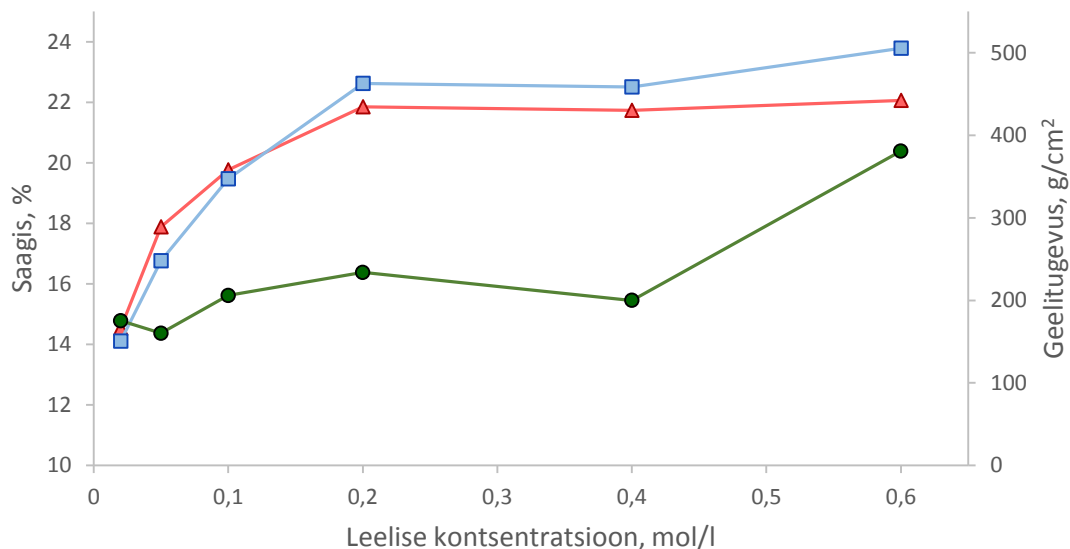
- 1) ebasoovitavate värvainete lõhustamine, mis võimaldab neid ja teisi lisandeid enne kuumeekstraktsiooni välja pesta;
- 2) leelismodifitseerimine ja kaaliumioonide sidumine polüsahhariidmaatriksiga pikaajalises protsessis (nt laos seismisel), et vähendada leelise kulu.

Peale leeliselist eeltöötlust vetikad pestakse. Seejuures eraldub suur osa pigmentidest ja muudest lisanditest, mis vastasel juhul kanduksid lõpp-produkti koostisse. Klassikaliselt rakendatav eeltöötlus on pikaajaline protsess, mis võib kesta kuni 3 nädalat. Selle käigus vetikad tüüpiliselt märjastatakse leelise lahusega ja jäetakse lattu seisma [19]. Pika

mõjumisaja tõttu võib leelise kontsentratsioon olla suhteliselt madal ja seda kulub seetõttu oluliselt vähem kui vetikate kiirel kuumeekstraktsioonil leeliselahuses. Sõltuvalt punavetikaliigist ja selles sisalduvate polüsahhariidide struktuuriisearasustest võib leeliseline eeltötlus olla väga efektiivne [20].

Antud töös viidi vetikate pikaajaline leelistötlus läbi järgmiselt. Õhkuiva vetikamassi hoiti 7 päeva vältel toatemperatuuril leeliselahuses (0,02–0,6 M NaOH või KOH). Otstarbekas on kasutada vetikate töötlemiseks hüdro moodulit 3–5 (iseloomustab kasutatava vedelikuhulga ja vetikate massisuhet), mis tagab kogu kasutatud vedelikuhulga imendumise vetikamassi. Järgnevalt pesti vetikad hoolikalt kraaniveega, seejärel destilleeritud veega. Pesemisest hoolimata jääb osa leelist vetikate biomassi pidama, mistõttu kasutati töödeldud vetikasegu polüsahhariidide ekstraktsiooniks puhtas vees. Kuna leelise lahusel on tugev puhastav toime, siis eralduvad vetikatest töötamise toimetel ka liiv, muda jm lisandid. Seetõttu ei ole tehnoloogiliselt otstarbekas vetikaid enne leelistöetlust pesta.

Pikaajalise leelistöetluse ning sellele järgneva vesiekstraktsiooni rakendamisel saadud polüsahhariidpreparaate iseloomustavad võrreldes tavapärase vesiekstraktsiooni teel saadud proovidega 2–5 korda kõrgemad geelitugevused ning geelide optilise tiheduse märgatavalt vähenenud näitajad. Kasutatud leelise kontsentratsioonide vahemikus andis suurima geelitugevuse (380 g/cm²) vetikate eeltötlus 7 päeva vältel 0,6 M KOH lahuses (joonis 6). Selle kontsentratsiooni kasutamine andis ka suurimaid ekstraktsioonisaagiseid (24% KOH ja 22% NaOH puhul). Kui leelistöetlus viiakse läbi NaOH lahusega, on otstarbekas kaaliumioonide juurutamiseks polüsahhariidmaatriksisse (produkti hea geelistumise tagamiseks on vajalik kaaliumioonide esinemine proovis) ekstraheerida vetikaid leelistöetlusele järgnevalt lahjas (nt 0,05 mol/l) KCl lahuses.



Joonis 6. Furtsellaraani saagise (■, KOH töötlus ja ▲, NaOH töötlus) ja 1.5% geeli tugevuse (●, KOH töötlus) sõltuvus pikaajalisel (7 päeva) leelistöetlusele leelise kontsentratsioonist ekstrahendis keetmisajal 4 tundi vees.

Niisiis ei ole ainuüksi geelitugevuse ja saagise seisukohast pikaajset leelistöötlust uuritud vetikasegu puhul otstarbekas kasutada. Siiski annab selle etapi rakendamine puhtama produkti ning võimaldab säästlikumalt kasutada leelist. Tuleb tähele panna, et kui leelistöödeldud vetikad jäävad enne ekstraktsiooni liiga kauaks seisma, siis hakkab neis sisalduvate polüsahhariidide geelitugevus kiiresti langema. Seetõttu on oluline tehnoloogilisi tsükleid mahuliselt õigesti ajastada.

3.4.2 Kuum ekstraktsioonieelne leelistöötlus

Kirjandusandmete põhjal kasutatakse vetikapolüsahhariidide modifitseerimiseks laialdaselt leelistöötlust kõrgetel temperatuuridel, kasutades erinevaid tööstustemperatuure ning leeliste (enamasti $\text{Ca}(\text{OH})_2$, NaOH või KOH) kontsentratsioone. Temperatuuri tõstmine ja leelise sisalduse suurenemine vähendavad oluliselt töötuse kestust, mis on tehnoloogilises plaanis hinnatav tulemus.

Kuuma ekstraktsioonieelse leelistöötluse peamiseks puuduseks on suur leelisekulu. Eeltötluse puhul esineb kompromiss lõpp-produkti kvaliteedi ja kadude vahel – heledam värvus ja suuremad geelitugevused saadakse saagise vähenemise arvel. Teiste võrdsete tingimuste korral saadakse NaOH kasutamisel heledam produkt kui KOH puhul.

Läänemere *F. lumbricalis* biomassi puhul on sobivaimaks vetikate eeltötluse vormiks pikaajne toatemperatuurine leelistöötlus, mis vähendab polüsahhariidihelate degradatsiooni ning annab oluliselt puhtama lõpp-produkti. Alternatiivseks eeltötluse variandiks võib olla vetikate 30 min pikkune töötus $60\text{ }^\circ\text{C}$ juures $0,1\text{ M}$ KOH lahusega.

3.5 Vetikapolüsahhariidide eraldamine lahusest

Polüsahhariidide eraldamine ekstraktist on põhimõtteliselt võimalik 3 viisil: vee väljaauturamisel, külmutamisel ja sellele järgneva sulatamisega, sadestamisel alkoholi või soolalahusega.

Külmutamise meetod on efektiivne ja suure puhastava toimega. Seda on ajalooliselt kasutatud agaritööstuses ning põhineb galaktaangeelidele omasel faaside eraldumise nähtusel külmumise ja sulamise protsessis. Meetod ei ole siiski rakendatav kõikide vetikapolüsahhariidide puhul, vaid on sobilik peamiselt madalatel temperatuuridel vees halvasti lahustuvate ja suurt geelitugevust omavate galaktaanide puhastamiseks. Oluline on, et polüsahhariidlahus moodustaks enne külmutamist tugeva geeli. κ -Karraginaani tüüpi polüsahhariidide (sh furtsellaraani) puhul on võimalik külmumis-sulamis meetodit rakendada kui ekstrakti geelistumisvõime on suur. Vajadusel võib ekstrakti hulka geelistumisvõime suurendamiseks lisada KCl -i. Tehnoloogilises mastaabis iseloomustab külmumis-sulamis meetodit aga suur energiakulu, geelide külmutamiseks vajaliku seadmestiku kõrge hind ning kohmakus, vähene tootlikkus ning halb mehhaniseeritavus.

Eelkirjeldatud puuduste tõttu kasutatakse tänapäevases karraginaanitööstuses tardaine eraldamiseks lahusest peamiselt alkoholsadestust. Maailmapraktikas kasutatakse polüsahhariidide tööstuslikus mastaabis sadestamiseks etanooli või isopropanooli. Alkohol regenereeritakse hilisemas protsessis rektifikatsiooni teel ning kasutatakse korduvalt.

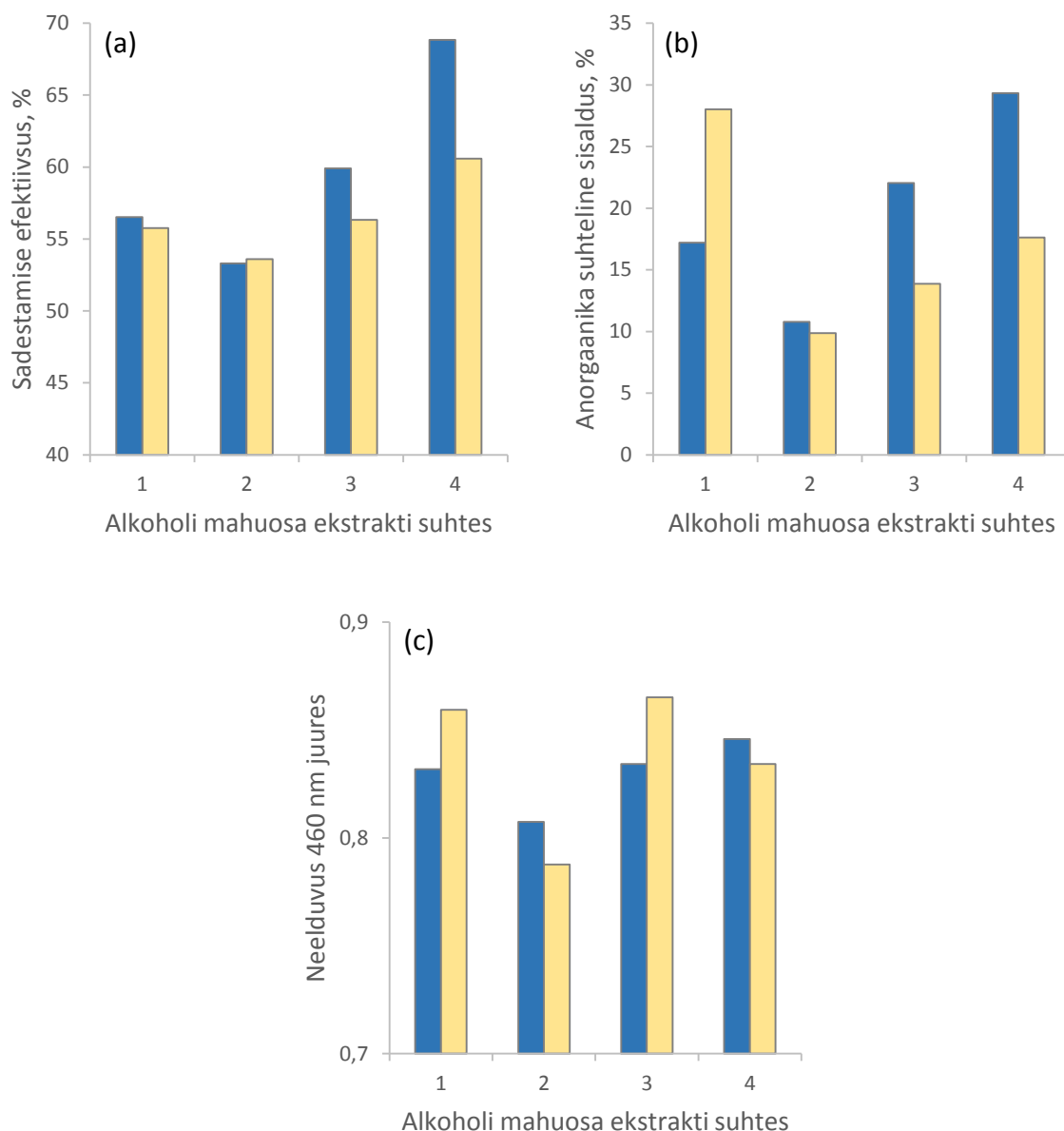
Meetodi peamiseks puudusteks on aga suurte rektifikatsioonikolonni vajadus, vältimatud alkoholi kaod ning kondensatsioonisoojuse otstarbeka kasutamisega seotud raskused. Alkoholsadestusel on ka lõpp-produkti puhastav toime, sest osa pigmente ja muid ebasoovitavaid lisandeid jääb polüsahhariidide sadestumisel lahusesse. Tehnoloogilises plaanis on meetod mõnevõrra komplitseeritud, sest tardaine täielikuks sadestamiseks vajalik alkoholi kogus peab olema küllaltki suur, ületades mitmekordselt ekstrakti mahu.

Kuigi energeetiliselt on kasulik võimalikult väikeste alkoholikoguste kasutamine sadestamisel, siis väiksema alkoholi koguse korral sadestuvad polüsahhariidid ebatäielikult ning suurenevad kaod. Seevastu liiga suure alkoholikoguse kasutamine sadestamisel suurendab küll saagist, kuid samas põhjustab ka ekstraktis esinevate lisandite sadestumise, mistõttu lõpp-produkti puhtusaste väheneb. Kuna sadestamiseks vajalike suurte alkoholikoguste regenereerimine moodustab peamise osa polüsahhariidide tootmise energeetilistest kuludest, siis moodustavad need ka kõige olulisema osa tardaine omahinnast.

Võimalik on ka kasutada ekstrakti osalist kokkuaurutamist alarõhul, mis vähendab alkoholi kulusid. Siiski tuleb silmas pidada, et vee aurustumissoojus on väga suur ning ka seda, et ekstrakti kontsentreerimisel võib lisandite hulk lõpp-produktis tõusta. Ilmselt võib otstarbekaks pidada ekstrakti mahu kahekordset vähendamist enne sadestamist.

Iga kasutatava vetikaliigi puhul on oluline välja selgitada optimaalne ekstrakti ja kasutatava alkoholi mahtude suhe. Uuritud vetikasegu puhul selgitati optimaalne sadestamiseks vajalik alkoholi kogus välja järgmiselt. Vetikasegu ekstraheeriti 20 mM kaaliumfosfaatpuhvril 121 °C juures autoklaavis 30 min hüdro mooduliga 33. Ekstrakt tsentrifuugiti ning saadud selgele 1,5% lahusele lisati isopropanooli või 96% etanooli ekstrakti ja alkoholi mahtude vahekorras 1:1, 1:2, 1:3 ja 1:4. Sadestunud polüsahhariidid eraldati lahusest tsentrifuugimise teel ning kuivatati 30 °C juures õhuvoolus (produkti geelitugevus 520 g/cm²).

Katsetulemused näitavad (joonis 7a), et isopropanool sadestab ekstraktis leiduvaid aineid efektiivsemalt kui etanool, seda eriti kolme ja neljakordse mahuosa alkoholi kasutamisel. Tuleb aga tähele panna, et sadestamise efektiivsuse tõus ei näita otseselt polüsahhariidide suuremat saagikust, sest ekstraktist võivad alkoholi toimel sadestuda ka lisandid (joonis 7b), sh ekstrahenti lisatud puhvrissoolad (nt kloriidid, fosfaadid jms). Seetõttu on oluline vaadelda ka produkti sadestamisjärgselt jäänud soolade sisaldusi. Soolad võivad lõpp-produkti kanduda kahel peamisel põhjusel. Esiteks väheneb soolade lahustuvus tüüpiliselt lahuse hüdrofoobsuse kasvades, mistõttu 3 ja 4 mahuosa alkoholiga sadestatud produktid sisaldavad rohkem sooli, eriti isopropanooli kasutamisel (isopropanool on võrreldes etanooliga hüdrofoobsem). Teiseks on väikeste alkoholikoguste kasutamisel tekkinud polüsahhariidide sade sültjam ning sisaldab endas seetõttu ka osa lahustunud kujul esinevatest sooladest, mistõttu lõpp-produkti kandub rohkem anorgaanikat. Seejuures on sültjama sademe edasine kuivatamine energiamahukam, suurendab alkoholikadusid ning selle eraldamine ekstraktist on problemaatilisem. Nimetatud puudusi aitab vältida täiendav vedeliku väljapressimine sültjast sademest. Oluline on leida kompromiss sadestamise efektiivsuse ja proovi anorgaanika sisalduse vahel; teatud juhtudel võib soolade jäämine produkti olla isegi soovitatav (nt KCl puhul), sest siis ei lähe väärtuslikud ioonid raisku ning võivad ühtlasi suurendada geelitugevusi.



Joonis 7. Polüsahhariidide sadestamise efektiivsuse, produkti anorgaanika suhtelise sisalduse ja 1,5%-lise lahuse neelduvuse (460 nm, lahusekihi paksus 1 cm) sõltuvus kasutatud alkoholi ja ekstrakti mahusuhtest. Alkohol: isopropanool (■), etanool (□).

Furtsellaraani on võimalik lahusest sadestada ka suhteliselt suurte koguste KCl lisamisega ekstraktile (nt 4% KCl lahuse lisamine võrdsele mahuosale ekstraktile). Seejuures tekkiv sültjas sade on otstarbekas täiendavalt kuivemaks pressida mehaaniliselt, kuid ka sellisel juhul satub lõpp-produkti suurtes kogustes KCl-i, mis küll soodustab polüsahhariidi geelistumist, kuid vähendab mõru maitse tõttu produkti kasutamise võimalusi toiduainetööstuses.

Oluline lõpp-produkti iseloomustav karakteristik on tardaine värvus ja sellest valmistatud geeli läbipaistvus. Katsetulemused näitavad (joonis 7c), et suurim geeli heledus ja läbipaistvus (madalaim neelduvuse väärtus) saavutatakse kui polüsahhariidide sadestamiseks kasutatakse

2 mahuosa alkoholi. Teiste ekstrakti ja alkoholi mahuvahekordade puhul saadakse küllaltki sarnase heledusega produkt.

Kui vetikaid ekstraheerida hüdro mooduliga 33, tekib ekstraktsioonil $\approx 1,5\%$ -line polüsahhariidlahus. Katseseerias selgus et sobivaks ekstrakti ja alkoholi vahekorraks sadestamisel sellise polüsahhariidide kontsentratsiooni juures on 1:3. Sellise vahekorra puhul sadestub oluline osa lahuses olevatest polüsahhariididest. Kui aga eesmärgiks on lõpp-produkti suurem puhtus, tuleks alkoholina eelistada etanooli ning kasutada ekstrakti ja alkoholi suhet 1:2.

3.6 Produkti kuivatamine

On teada, et polüsahhariidid kõrgetel temperatuuridel lagunevad, mis omakorda tingib tardaine geelitugevuse languse. Juba $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures kuivatamisel võib furtsellaraan märkimisväärselt degradeeruda. Üldiselt põhjustab kuivatustemperatuur $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ polümeerahela olulise lagunemise kümnete tundidega, temperatuuril $130\text{--}135\text{ }^{\circ}\text{C}$ on lagunemine aga sedavõrd kiire, et produkti geelitugevus võib langeda $\approx 20\%$ võrra juba 15 minutiga.

Vastupidavus kõrgete temperatuuride destruktiivsele toimele ei sõltu siiski mitte ainult polüsahhariidi molekulaarstruktuurist, vaid see on otseselt seotud ka produktis esinevate kationide (nt Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) hulgast, st seda mõjutab teatud määral ka ekstraktsioonitingimuste valik. Üldiselt võib tehnoloogilises plaanis lugeda otstarbekaks produkti kuivatamist temperatuurigradiendis $95\text{--}80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tunnelkuivatis, kus märjem sade siseneb kõrgema temperatuuri piirkonda ning kõrgema temperatuuri ala läbitakse 1 tunni jooksul või kiiremini.

3.7 Pleegitamine

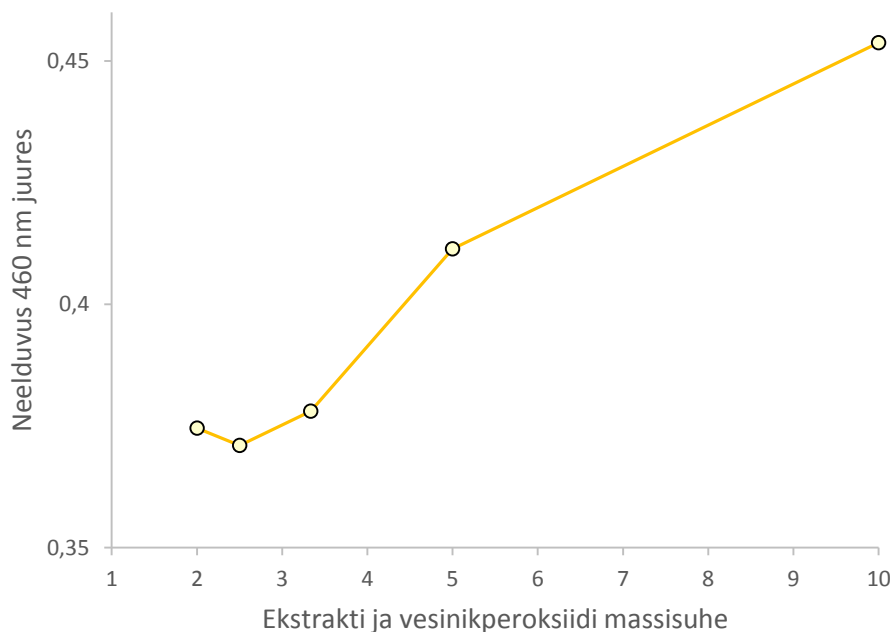
Polüsahhariidide ekstraktsioon paljudest troopilistest punavetikatest annab heleda produkti, mida sageli ei ole vaja täiendavalt pleegitada. Vetikas *F. lumbricalis* seevastu annab pigmentide suure sisalduse tõttu tumedamaid produkte ning seetõttu on aktuaalne pleegitamise rakendamine mõnes protsessi etapis.

Polüsahhariidide puhul tuleb praktilises plaanis kõne alla vaid pleegitamine kloorlubja või vesinikperoksiidiga. Elementaarmehhanismilt on praktikas kasutatavad pleegitusmeetodid redutseerivad reaktsioonid lahuses formeerunud monohapniku ja värvunud orgaaniliste ainete vahel, millega kaasneb viimaste lagunemine vähevärvunud ühenditeks.

Kloorlubja kasutamine viib polüsahhariidmaatriksisse täiendavalt kaltsiumioone, mis avaldab positiivset mõju produkti geelitugevusele, kuid halvendab tunduvalt furtsellaraani lahustuvust ning vähendab geelide läbipaistvust. Uuringud on näidanud, et kloorlubja kasutamine ei võimalda pruunika värvusega ekstraktsiooniprodukti värvuse täielikku valastamist. Seetõttu kasutati käesolevas uuringus polüsahhariidide pleegitamiseks vesinikperoksiidi. Selleks ekstraheeriti vetikasegu 20 mM kaaliumfosfaatpuhvris $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures autoklaavis 30 min hüdro mooduliga 33. Ekstrakt tsentrifuugiti ning saadud selgele kuumale $1,5\%$ lahusele lisati 30% -list vesinikperoksiidi ekstrakti ja peroksiidi erinevates massivahekordades. Lahusel lasti

geelistuda ning hoiti 15 tundi 4 °C juures. Seejärel geel sulatati ning polüsahhariidid sadestati kolmekordse mahuosa etanooliga. Sadestunud polüsahhariidid eraldati lahusest tsentrifugimise teel ning kuivatati 30 °C juures õhuvoolus.

Ekstrakti ja vesinikperoksiidi massisuhte piirkonnas 1...10 täheldati polüsahhariidide molekulmassi (≈ 1000 kDa) ligi 2,5-kordset vähenemist võrreldes pleegitamata produktide vastavate näitajatega (≈ 2500 kDa). Seejuures aga ei täheldatud töös kasutatud vesinikperoksiidi koguste puhul pleegitatud produktide molekulmassi olulist varieeruvust. Produktide 1,5% geelide läbipaistvuse näitajad aga tõusid oluliselt vesinikperoksiidi suuremate koguste kasutamisel. Furtsellaraani värvuse valastumist vesinikperoksiidiga pleegitamisel kirjeldab valgusneeldumise vähenemine iseloomulikel lainepikkustel (joonis 8).



Joonis 8. Erineva ekstrakti ja vesinikperoksiidi massisuhte juures pleegitatud furtsellaraani 1,5% geeli neelduvus 460 nm juures (temperatuur 20 °C, lahusekihi paksus 1 cm).

Seega on võimalik pleegitamisprotsessi rakendamisel *F. lumbricalis* baasil saada vähevärvunud produkte, mille geele iseloomustab hea läbipaistvus. See toimub aga polüsahhariidide molekulmassi vähenemise arvel, mis oma korda põhjustab geelistumisvõime alanemise. Furtsellaraani pleegitamisel tuleb eelistada vesinikperoksiidi kasutamist kloorlubja asemel. See annab heledamaid, suurema geelitugevusega ja kergemini lahustuvaid produkte. Lisaks on vesinikperoksiidi ökoloogiliselt ohutum.

3.8 Vetikamassi päritolu, korjamisaja ja vetika *C. truncatus* mõju tardaine kvaliteedile

On teada, et vetikate arengujärk võib oluliselt mõjutada neis sisalduvate polüsahhariidide molekulaarstruktuuri ning seeläbi ka tardaine füüsikalisi omadusi. Erinevalt *Gigartinaceae* sugukonna esindajatest, mille puhul gametofüüdid toodavad κ -karraginaani, sporofüüdid aga λ -tüüpi struktuure, ei sõltu punavetika *F. lumbricalis* produtseeritava karraginaani tüüp vetika arengustaadiumist. Käesoleva uuringu käigus märts – september 2014 kogutud vetikaproovide puhul ei täheldatud muutusi polüsahhariidide struktuuris ega töenduslikes näitajates. Seetõttu ei ole vetikate korjamisaeg polüsahhariidide töendusliku kvaliteedi osas oluline.

Kuna aga punavetikate *F. lumbricalis* ja *C. truncatus* osakaal erinevatest piirkondadest ja sügavustelt kogutud vetikasegus varieerub üsna suurtes piirides, siis on esmalt oluline vaadelda mõlemast vetikaliigist eraldatud polüsahhariidide omadusi eraldi. Kuigi mõlemast vetikaliigist eraldatud polüsahhariidide saagised ekstraktsioonil puhtas vees jäävad vahemikku 17–19%, on *C. truncatus* polüsahhariidide mõju produkti üldisele geelitugevusele aga väike. Vahekorras 1:1 annavad need vetikaliigid ekstraktsioonil geeli, mis kaaliumioonide juuresolekul moodustab 85–90% puhta *F. lumbricalis* ekstraktsioonil saadud polüsahhariidide geelitugevusest. Tüüpiliselt jääb aga *C. truncatus* sisaldus looduslikus vetikasegus alla 35%; käesolevas uuringus kasutatud vetikamassi puhul ei ületanud *C. truncatus* sisaldus segu kuivmassist 15%. Sellest tulenevalt on *C. truncatus* mõju vetikasegust eraldatud tardaine töenduslikule kvaliteedile tühine. Ka ei täheldatud polüsahhariidide kvaliteedi sõltuvust vetikate kasvamise sügavusest (3–8 m).

Tuleb siiski märkida, et kinnitunud *F. lumbricalis* vormi polüsahhariidide sisaldus on sama vetikaliigi kinnitumata vormiga võrreldes oluliselt suurem (saagis vesiekstraktsioonil 32%). Töenduslikult kasutatav *F. lumbricalis* esineb Eesti territoriaalvetes peamiselt kinnitumata vormina. Leidub ka teist vormi, mis on kividele kinnitunult töenduslikes kogustes enamasti kättesaamatu, kuid seda võib siiski esineda randa uhutud vetikate tormiheidise koosseisus.

4. Karraginaanide eraldamise tehnoloogilised aspektid

Järgnevalt on esitatud tehnoloogiline skeem polüsahhariidide efektiivseks eraldamiseks uuritud vetikamassist (tabel 1). Lisatud on erinevate protsessi etappide rakendatavust lihtsustavad või raskendavad asjaolud, millele tuleks tardaine eraldamisel suuremat tähelepanu pöörata.

Tabel 1. Furtsellaraani eraldamise tehnoloogiline skeem

Nr	Etapi nimetus	Sobivad lahendused	Raskendavad asjaolud
1.	Vetikate eeltöötlus	Eelistatult külm leelistöötlus KOH või NaOH lahusega.	
2.	Vetikate pesemine	Pesemine puhta veega, mille käigus eemaldub liigne leelis, pigmentide laguproduktid, liiv jm tahked osakesed.	
3.	Ekstraktsioon	Keetmine 3 tunni vältel või kuumutamine ülerõhul 115–121 °C juures 30 min. Ekstrahendi pH peab olema eelistatult 10–11.	Ekstrahendi pH väärtustel alla 8 langeb oluliselt polüsahhariidi molekulmass ja väheneb geelitugevus.
4.	Filtrimine	Ekstraktist eemaldatakse suuremad vetikaosakesed filtrides läbi roostevabast terasest võrgu, ava läbimõõduga 0,4 mm.	Sõltuvalt ekstraktsioonikeskkonnast võib vetikate ekstraktsioonijääk olla filtrit kergesti ummistava konsistentsiga.
5.	Kokkuaurutamine	Eelistatult 2-kordse ruumalani alarõhul keemistemperatuuril 80 °C.	Kokkuaurutamine on energiamahukas protsess.
6.	Pleegitamine	Vesinikperoksiidiga temperatuuril ≈50 °C.	Pleegitamise käigus vähenevad oluliselt polüsahhariidi molekulmass ja geelitugevus.
7.	Tsentrifugimine	Vetikaekstrakti lõplikuks selgendamiseks võimalikult suure kesktõmbekiirenduse tingimustes.	Suurte vedelikukoguste tsentrifugimine võib olla tehnoloogiliselt keeruline.
8.	Alkoholsadestus	Eelistatult ekstrakti suhtes 3-kordses mahuosas etanoolis.	Sõltuvalt kasutatavast ekstrahendist võib produkti jääda teatud osa anorgaanikat.
9.	Sademe pressimine	Alkoholi kadude vähendamise ja produkti puhastamise eesmärgil. Alkohol regenereeritakse.	Sõltuvalt sademe konsistentsist võib pressimine olla raskendatud.
10.	Produkti kuivatamine	Eelistatult tunnelkuivatis võimalikult madalatel temperatuuridel.	Kõrgetel temperatuuridel on võimalik produkti molekulmassi langus.
11.	Peenestamine	Eelistatult tiivikveskis või desintegraatoris.	Raskendatud pulbri elektriseerumise tõttu.
12.	Kvaliteedikontroll	Määratakse peamised produkti iseloomustavad näitajad: geelitugevus, niiskuse- ja tuhasisaldus, värvus, hägusus, reoloogilised näitajad ja raskmetallide sisaldused.	Eeldab spetsialiseeritud laboriaparatuuri olemasolu.
13.	Standardiseerimine	Segatakse erinevate partiide toodangut selliselt, et lõpp-produkti karakteristikud jäävad soovitasse vahemikku.	
14.	Pakkimine	Eelistatult niiskuskindlatesse konteineritesse.	

Kokkuvõte

Käesoleva töö käigus selgitati välja optimaalsed meetodid kõrgekvaliteetsete polüsahhariidide saamiseks vetikate *F. lumbricalis* ja *C. truncatus* looduslikust segust. Hinnati punavetika *C. truncatus* sisalduse mõju vetikasegus sellest eraldatud polüsahhariidsegu tööduslikule kvaliteedile, uuriti sesoonsuse ja kasvusügavuse mõju vetika polüsahhariidkoostisele ja sisaldusele.

Töö põhitulemused võib formuleerida järgmiselt:

- Puhtas vees keetmisel eraldatud vetikapolüsahhariidide geelitugevus on madal (75 g/cm² 1,5% geelide puhul). Suurima geelitugevuse (830 g/cm² 1,5% geelide puhul) annab vetikate 3 tunni pikkune keetmine 0,02 M KOH lahuses.
- Ülerõhu tingimustes on sobivaim polüsahhariidid vetikasegust ekstraheerida 15 minuti pikkusel autoklaavimisel 121 °C juures ekstrahendi pH väärtustel 9...11.
- Sobiva eeltötluse kasutamisel (vetikaid hoitakse 7 päeva toatemperatuuril 0,6 M KOH lahuses) võib arvestatava kvaliteediga lõpp-produkti saada vetikate ekstraktsioonil puhtas vees.
- Sobivaimaks ekstrakti ja alkoholi vahekorraks polüsahhariidide sadestamisel on 1:3, mis annab hea saagise ning küllaltki puhta produkti. Kui eesmärgiks on võimalikult suur lõpp-produkti puhtus, tuleks alkoholina eelistada etanooli ning kasutada ekstrakti ja alkoholi suhet 1:2.
- Märts – september 2014 kogutud vetikamassi polüsahhariidide struktuuris ega tööduslikus kvaliteedis ei täheldatud varieeruvust. Samuti ei muutu polüsahhariidide omadused sõltuvalt vetika kasvusügavusest (3–8 m).
- Vetikaliikide *F. lumbricalis* ja *C. truncatus* massivahekorras 1:1 annavad need vetikaliigid ekstraktsioonil geeli, mille tugevus on 85–90% puhta *F. lumbricalis* ekstraheerimisel saadud tardaine geelitugevusest.
- Vetikasegust eraldatud tardaine on pruunika värvusega. Vesinikperoksiidiga pleegitades on võimalik polüsahhariidmassi oluliselt heledamaks muuta, kuid see toimub molekulmassi ja geelitugevuse vähenemise arvel. Puhtas vees eraldatud polüsahhariidid on küll heledama värvusega kui leeliste juuresolekul eraldatud produktid, kuid moodustavad seevastu halva läbipaistvusega häguseid geele.

Eesti territoriaalvetes esinev punavetikate *F. lumbricalis* ja *C. truncatus* looduslik segu on hea tooraine geelistuvate polüsahhariidide tootmiseks ning annab sobivate eraldamismeetodite kasutamisel väga kõrge töödusliku kvaliteediga lõpp-produkti.

Kirjandusviited

1. Usov, A.I., S.V. Yarotsky, A.S. Shashkov, *¹³C-nmr spectroscopy of red algal galactans*. Biopolymers, 1980. **19**(5): p. 977-990.
2. Knutsen, S.H., D.E. Myslabodski, B. Larsen, A.I. Usov, *A modified system of nomenclature for red algal galactans*. Botanica Marina, 1994. **37**(2): p. 163-169.
3. McCandless, E.L., J.A. West, M.D. Guiry, *Carrageenan patterns in the Phyllophoraceae*. Biochemical Systematics and Ecology, 1982. **10**(4): p. 275-284.
4. Ciancia, M., M.D. Nosedà, M.C. Matulewicz, A.S. Cerezo, *Alkali-modification of carrageenans: mechanism and kinetics in the kappa/iota-, mu/nu- and lambda-series*. Carbohydrate Polymers, 1993. **20**(2): p. 95-98.
5. Ciancia, M., M.C. Matulewicz, A.S. Cerezo, *Alkaline modification of carrageenans. Part III. Use of mild alkaline media and high ionic strengths*. Carbohydrate Polymers, 1997. **32**(3-4): p. 293-295.
6. Tuvikene, R., K. Truus, A. Kollist, O. Volobujeva, E. Mellikov, T. Pehk, *Gel-forming structures and stages of red algal galactans of different sulfation levels*. Journal of Applied Phycology, 2008. **20**(5): p. 527-535.
7. Morris, E.R., D.A. Rees, G. Robinson, *Cation-specific aggregation of carrageenan helices: domain model of polymer gel structure*. Journal of Molecular Biology, 1980. **138**(2): p. 349-362.
8. Usov, A.I., *Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups*. Food Hydrocolloids, 1998. **12**(3): p. 301-308.
9. Therkelsen, G.H., *Carrageenan*, in *Industrial gums*, R.L. Whistler, J.N. BeMiller, Editors. 1993, Academic Press: San Diego. p. 145-180.
10. Yuguchi, Y., H. Urakawa, K. Kajiwara, *Structural characteristics of carrageenan gels: various types of counter ions*. Food Hydrocolloids, 2003. **17**(4): p. 481-485.
11. Watase, M., K. Nishinari, *Rheological properties of agarose gels with different molecular weights*. Rheologica Acta, 1983. **22**: p. 580-587.
12. Tuvikene, R., K. Truus, M. Robal, O. Volobujeva, E. Mellikov, T. Pehk, A. Kollist, T. Kailas, M. Vaher, *The extraction, structure, and gelling properties of hybrid galactan from the red alga *Furcellaria lumbricalis* (Baltic Sea, Estonia)*. Journal of Applied Phycology, 2010. **22**(1): p. 51-63.
13. Tuvikene, R., K. Truus, M. Vaher, T. Kailas, G. Martin, P. Kersen, *Extraction and quantification of hybrid carrageenans from the biomass of the red algae *Furcellaria lumbricalis* and *Coccolytus truncatus**. Proceedings of the Estonian Academy of Sciences, Chemistry, 2006. **55**(1): p. 40-53.

14. Laos, K., G.J. Brownsey, S.G. Ring, *Interactions between furcellaran and the globular proteins bovine serum albumin and β -lactoglobulin*. Carbohydrate Polymers, 2007. **67**(1): p. 116-123.
15. Tuvikene, R., K. Truus, M. Robal, T. Pehk, T. Kailas, M. Vaher, T. Paalme, *Structure and thermal stability of pyruvated carrageenans from the red alga *Coccotylus truncatus**. Carbohydrate Research, 2009. **344**(6): p. 788-794.
16. Truus, K., M. Vaher, A.I. Usov, T. Pehk, A. Kollist, *Gelling galactans from the algal community of *Furcellaria lumbricalis* and *Coccotylus truncatus* (the Baltic Sea, Estonia): a structure-property study*. International Journal of Biological Macromolecules, 1997. **21**(1-2): p. 89-96.
17. Stanley, N.F., *Carrageenans*, in *Food gels*, P. Harris, Editor. 1990, Elsevier: London. p. 79-119.
18. Spichtig, V., S. Austin, *Determination of the low molecular weight fraction of food-grade carrageenans*. Journal of Chromatography B, 2008. **861**(1): p. 81-87.
19. Bjerre-Petersen, E., J. Christensen, P. Hemmingsen, *Furcellaran*, in *Industrial Gums. Polysaccharides and Their Derivatives*, R.L. Whistler, J.N. BeMiller, Editors. 1973, Academic Press: New York. p. 123-136.
20. Myslabodski, D.E., *Red-algae galactans: isolation and recovery procedures - effects on the structure and rheology*. 1990, Norwegian Institute of Technology: Norway.