

TALLINNA ÜLIKOOL
LOODUSTEADUSTE DISSERTATSIOONID

TALLINN UNIVERSITY
DISSERTATIONS ON NATURAL SCIENCES

19



TALLINNA ÜLIKOOL

Rando Tuvikene

**KEEMILISE KOOSTISE JA
STRUKTUURIDE
FUNKTSIONAALSÕLTUVUSED
LÄÄNEMERE VETIKAKOOSLUSTES**

Analüütiline ülevaade

TALLINN 2009

TALLINNA ÜLIKOO
LOODUSTEADUSTE DISSERTATSIOONID

TALLINN UNIVERSITY
DISSERTATIONS ON NATURAL SCIENCES

19

Rando Tuvikene

**KEEMILISE KOOSTISE JA STRUKTUURIDE FUNKTSIONAALSÕLTUVUSED
LÄÄNEMERE VETIKAKOOSLUSTES**

Analüütiline ülevaade

Matemaatika ja Loodusteaduste Instituut, Tallinna Ülikool, Tallinn, Eesti.

Dissertatsioon on lubatud kaitsmisele *Doctor philosophiae* kraadi taotlemiseks ökoloogia alal 26. mail 2009. aastal Tallinna Ülikooli loodusteaduste doktorinõukogu poolt.

Juhendaja: Kalle Truus, *PhD* (keemia), Matemaatika ja Loodusteaduste Instituut, Tallinna Ülikool, Tallinn, Eesti

Oponendid: William Helbert, *PhD* (keemia), Roscoff'i Bioloogiajaam, Pierre ja Marie Curie Ülikool-CNRS, Roscoff, Prantsusmaa
Katrin Laos, *PhD* (loodusteadused), Toiduainete Instituut, Tallinna Tehnikaülikool, Tallinn, Eesti

Kaitsmine toimub 25. augustil 2009. aastal kell 14.00 Tallinna Ülikooli auditooriumis 223, Narva mnt 25, Tallinn.

Autoriõigus: Rando Tuvikene, 2009

Autoriõigus: Tallinna Ülikool, 2009

ISSN 1736-3659 (analüütiline ülevaade, *online*, PDF)

ISBN 978-9985-58-650-1 (analüütiline ülevaade, *online*, PDF)

ISSN 1736-3659 (*abstract*, *online*, PDF)

ISBN 978-9985-58-647-1 (*abstract*, *online*, PDF)

ISSN 1736-3616 (*doctoral thesis*)

ISBN 978-9985-58-646-4 (*doctoral thesis*)

KEEMILISE KOOSTISE JA STRUKTUURIDE FUNKTSIONAALSÕLTUVUSED LÄÄNEMERE VETIKAKOOSLUSTES

Resümee

Töös uuriti Läänemere punavetikatest *Furcellaria lumbricalis* ja *Coccotylus truncatus* pärinevate sulfaaditud polüsahhariidide keemilist koostist ja struktuuri. Võrdlusainetena kasutati troopilisest vetikaliigist *Eucheuma cottonii* ja Kaug-Ida punavetikast *Ahnfeltia tobuchiensis* eraldatud galaktaane ning karraginaanide ja agarite kommertspreparaate. Polüsahhariide iseloomustati ^{13}C -tuumamagnetresonantspektroskoopia, Fourier' infrapun-spektroskoopia, spektrofotomeetria, induktiivsidedestunud plasma optilise emissioonspektromeetria, elektrotermilise aatomabsorptsioonspektromeetria ja eksklusioonikromatograafia meetoditega. *F. lumbricalis* kinnitumata vormi polüsahhariidide keemilise koostise, molekulaarstruktuuri ning geelistumisvõime vahelisi seoseid uuriti sõltuvalt ekstraktsiooni ja keemilise töötuse tingimustest. Potentsiaalse töendusliku väärtusega vetikaliigi *C. truncatus* galaktaanide puhul hinnati ka nende polüsahhariidide termostabiilsust. Võrreldi erinevate spektroskoopiliste meetodite rakendusvõimalusi tüüpiliste saastelementide sisalduste määramiseks Läänemere riimvees ja vetikates. Polüsahhariidgeelide mikrostruktuuri uuriti skaneeriva elektronmikroskoopia vahendusel preparaatide krüofikseerimise ja lüofiliseerimise kaasabil. Töötati välja uudne struktuure säilitav prepeerimistehnika punavetikagalaktaanide geelistumisprotsesside mikroskoopiliseks uurimiseks.

F. lumbricalis galaktaanide põhikomponendid on β -D-galaktoos ($15 \pm 1\%$), β -D-galaktoos-4-sulfaat ($36 \pm 1,5\%$), 3,6-anhüdro- α -D-galaktoos ($29 \pm 1\%$), α -D-galaktoos-6-sulfaat ($6 \pm 0,5\%$), β -D-galaktoos-6-sulfaat ja 6-O-metüül- β -D-galaktoos. *C. truncatus* polüsahhariidide peamised komponendid on β -D-galaktoos-4-sulfaat ($44 \pm 2\%$), 3,6-anhüdro- α -D-galaktoos-2-sulfaat ($30 \pm 1,5\%$), α -D-galaktoos-2,6-disulfaat ($12 \pm 2\%$) ning 4',6'-püruvaaditud karrabioos-2-sulfaat (1,4%). Kaug-Ida vetikaliigi *A. tobuchiensis* galaktaanide koostisse kuuluvad β -D-galaktoos (58%), 3,6-anhüdro- α -L-galaktoos ($30 \pm 3,5\%$), 2-O-metüül-3,6-anhüdro- α -L-galaktoos ($8 \pm 1\%$) ja β -D-galaktoos-6-sulfaat.

F. lumbricalis galaktaanide maksimaalne geelitugevus 970 g/cm^2 (1,5% geelide puhul) on saavutatav optimaalsete ekstraktsioonitingimuste juures Rb^+ -ioone sisaldavas leeliselises keskkonnas. *C. truncatus* polüsahhariidide geelimumodustumisvõime on väike (geelitugevus $30\text{--}40 \text{ g/cm}^2$ 2% geelide korral) ning ei sõltu oluliselt ekstraktsioonitingimustest.

Furtsellaraani ekstraktsioonil erinevates leelismetallhüdroksiidide vesilahustes saadavad produktid sisaldavad lähedase koguse orgaanikat, mineraalse komponendi osakaal aga varieerub oluliselt, sõltudes peamiselt preparaadi koostisse viidud leelismetalli aatommassist. Mikroelementide määramiseks vetikaproovides on võrd-

selt hästi rakendatavad induktiivsidestunud plasma optilise emissioonspektromeetria ja aatomabsorptsioonspektromeetria meetodid.

Sõltuvalt galaktaani makromolekulaarse ahela koostises esineva 3,6-anhüdrolaktoosi ruumilisest konfiguratsioonist (D- või L-isomeer) toimub vetikapolüsahhariidide geelistumine põhimõtteliselt erinevalt. Geelistumist soodustavate kationide (K^+ , Rb^+ , Cs^+) esinemine κ -tüüpi karraginaanide kuumades vesilahustes indutseerib niitjate, geeli mikrostruktuuri tihendavate lisaelementide moodustumise geelistumisprotsessi käigus.

FUNCTIONAL DEPENDENCIES OF THE CHEMICAL COMPOSITION AND STRUCTURES IN THE BALTIC SEA ALGAL COMMUNITIES

Abstract

The composition and structure of galactans from the red algae species *Furcellaria lumbricalis* and *Coccotylus truncatus* (the Baltic Sea, Estonia) were studied. As reference material, the galactans from Far-Eastern species *Ahnfeltia tobuchiensis* and *Eucheuma cottonii* were investigated. The complex polysaccharides were characterized by carbon nuclear magnetic resonance spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, chemical analysis, inductively coupled plasma optical emission spectrometry, electrothermal atomic absorption spectrometry and size exclusion chromatography methods in comparison with well known commercial galactan preparations. Special attention has been given to the polysaccharides originating from *F. lumbricalis*, their molecular structure, composition and gelling properties in connection with the extraction and chemical treatment conditions. For *C. truncatus*, also the thermal stability characteristics of its native polysaccharides were studied. The possibilities for the determination of micro- and ultramicro elements in the Baltic seawater and in seaweeds were investigated by various spectroscopic methods. The microstructure of galactan gels was studied using a cryofixation method in combination with freeze-drying and scanning electron microscopy (SEM) techniques. To achieve reliability of SEM investigations and to study the gel-forming processes of red algal galactans, a novel structure-preserving preparation technique was developed.

The main components of galactan from *F. lumbricalis* of the Baltic Sea are β -D-galactopyranose ($15 \pm 1\%$), β -D-galactopyranose-4-sulfate ($36 \pm 1.5\%$), 3,6-anhydro- α -D-galactopyranose ($29 \pm 1\%$), α -D-galactopyranose-6-sulfate ($6 \pm 0.5\%$), β -D-galactopyranose-6-sulfate and 6-O-methyl- β -D-galactopyranose residues. Polysaccharides from *C. truncatus* were found to contain β -D-galactopyranose-4-sulfate ($44 \pm 2\%$), 3,6-anhydro- α -D-galactopyranose-2-sulfate ($30 \pm 1.5\%$), α -D-galactopyranose-2,6-disulfate ($12 \pm 2\%$) and 4',6'-pyruvated β -D-galactopyranose (1.4%) units. The galactans from Far-Eastern species *A. tobuchiensis* are characterized by the main constituents of β -D-galactopyranose (58%), 3,6-anhydro- α -L-galactopyranose ($30 \pm 3.5\%$), 2-O-methyl-3,6-anhydro- α -L-galactopyranose ($8 \pm 1\%$) and β -D-galactopyranose-6-sulfate residues.

For *F. lumbricalis* galactans, the maximum gel strength value of 970 g/cm^2 (for 1.5% gels) is attainable in the case of optimal extraction conditions in the alkaline medium containing Rb^+ -ions. The thermally labile galactans from *C. truncatus* are characterized by a weak gelling ability (gel strength of $30\text{--}40 \text{ g/cm}^2$ for 2% gels) that does not depend notably on the conditions of extraction.

Extraction of furcellaran in the presence of various alkali metal hydroxides yields products with similar amounts of organic matter; the quota of inorganics varies con-

siderably and is primarily connected with the atomic weight of the introduced alkali metal. The microelement composition of seaweed samples may be elucidated equally well by atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma optical emission spectrometry methods.

Depending on the configuration of 3,6-anhydrogalactose (D- or L-isomer) in the macromolecular chain, the gelation process of algal galactans follows different pathways. The presence of gel promoting cations (K^+ , Rb^+ , Cs^+) in κ -type carrageenan sols induces the formation of specific subtle tentacle-like structure units responsible for the tightening of the final gel structure.

SISUKORD

EESSÕNA	12
1. SISSEJUHATUS	13
1.1. Läänemere punavetikad	13
1.2. Vetikagalaktaanid	15
1.2.1. Molekulaarstruktuur	15
1.2.2. Mineraalsed ja minoorsed komponendid	18
1.2.3. Molekulmassi jaotus ja struktuurne stabiilsus	19
1.2.4. Geelistumisprotsess ja reoloogia	20
2. EESMÄRGID	24
3. MATERJALID JA METOODIKA	25
3.1. Galaktaan- ja vetikapreparaadid	25
3.2. Ekstraktsioon, modifikatsioon ja puhastusprotsess	26
3.3. Keemiline analüüs	27
3.4. Spektroskoopilised meetodid	27
3.5. Eksklusioonikromatograafia	28
3.6. Geeli uurimine	28
3.7. Skaneeriv elektronmikroskoopia	29
4. TULEMUSED JA ARUTELU	30
4.1. Saagised ja ekstraktsioonidünaamika	30
4.2. Keemiline koostis ja molekulaarstruktuur	32
4.2.1. Kassari vetikakoosluse galaktaanide struktuur	33
4.2.2. Mineraalne komponent	37
4.3. Struktuurne stabiilsus	40
4.3.1. Karraginaanide termostabiilsus	40
4.3.2. ι-Karraginaani laguproduktid	41
4.4. Reoloogilised omadused ja geeli struktuur	43
4.4.1. Punavetikagalaktaanide geelistumismehhanism	43
4.4.2. Ekstraktsiooniparameetrite mõju	46
4.4.3. Vastasioonide mõju	48
5. KOKKUVÕTE	50
TÄNUAVALDUSED	52
FUNCTIONAL DEPENDENCIES OF THE CHEMICAL COMPOSITION AND STRUCTURES IN THE BALTIC SEA ALGAL COMMUNITIES. Conclusions	53
VIITEALLIKAD	55

PUBLIKATSIOONIDE LOETELU

Dissertatsioon põhineb järgmistel, tekstis rooma numbritega viidatud teadusartiklitel:

- I. **R. Tuvikene**, K. Truus, M. Robal, O. Volobujeva, E. Mellikov, T. Pehk, A. Kollist, T. Kailas, M. Vaher 2009. The extraction, structure, and gelling properties of hybrid galactan from the red alga *Furcellaria lumbricalis* (Baltic Sea, Estonia). – *Journal of Applied Phycology*. (doi: 10.1007/s10811-009-9425-x).
- II. **R. Tuvikene**, K. Truus, M. Robal, T. Pehk, T. Kailas, M. Vaher, T. Paalme 2009. Structure and thermal stability of pyruvated carrageenans from the red alga *Coccolytus truncatus*. – *Carbohydrate Research*, 344, 788–794.
- III. **R. Tuvikene**, K. Truus, A. Kollist, O. Volobujeva, E. Mellikov, T. Pehk 2008. Gel-forming structures and stages of red algal galactans of different sulfation levels. – *Journal of Applied Phycology*, 20, 527–535.
- IV. K. Truus, A. Viitak, M. Vaher, I. Muinasmaa, K. Paasrand, **R. Tuvikene**, T. Levandi 2007. Comparative determination of microelements in Baltic seawater and brown algae samples by atomic absorption spectrometric and inductively coupled plasma methods. – *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences, Chemistry*, 56, 122–133.
- V. K. Truus, **R. Tuvikene**, M. Vaher, T. Kailas, P. Toomik, T. Pehk 2006. Structural and compositional characteristics of gelling galactan from the red alga *Ahnfeltia tobuchiensis* (Ahnfeltiales, the Sea of Japan). – *Carbohydrate Polymers*, 63, 130–135.
- VI. **R. Tuvikene**, K. Truus, M. Vaher, T. Kailas, G. Martin, P. Kersen 2006. 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*, 55, 40–53.

AUTORI PANUS PUBLIKATSIOONIDESSE

Publikatsioon I: Autor viis läbi ekstraktsioonid, reoloogilised ja kolorimeetrised mõõtmised, kromatograafilised analüüsid, valmistas elektronmikroskoopia preparaadid ning interpreteeris FTIR ja ¹³C-NMR spektreid. Ta interpreteeris katseandmeid, kirjutas käsikirja ning esitles tulemusi teadusnõupidamistel *14th European Carbohydrate Symposium* (2.–7. september 2007 Lüübek, Saksamaa) ja *42nd IUPAC World Polymer Congress, MACRO 2008* (29. juuni – 4. juuli 2008 Taibei, Taiwan).

Publikatsioon II: Autor viis läbi ekstraktsioonid, reoloogilised ja kolorimeetrised mõõtmised, kromatograafilised analüüsid ning interpreteeris FTIR ja ¹³C-NMR spektreid. Ta interpreteeris katseandmeid, kirjutas käsikirja ning esitles tulemusi teadusnõupidamistel *9th International Hydrocolloids Conference* (15.–19. juuni 2008 Singapur) ja *4th International Symposium on the Separation and Characterization of Natural and Synthetic Macromolecules, SCM-4* (28.–30. jaanuar 2009 Amsterdam, Holland).

Publikatsioon III: Autor viis läbi reoloogilised mõõtmised, spektrofotomeetrisel analüüsid, valmistas elektronmikroskoopia preparaadid ning interpreteeris ¹³C-NMR spektreid. Ta interpreteeris katseandmeid, kirjutas käsikirja ning esitles tulemusi teadusnõupidamistel *World Polymer Congress, 41st International Symposium on Macromolecules, MACRO 2006* (16.–21. juuli 2006 Rio de Janeiro, Brasiilia) ja *19th International Seaweed Symposium* (26.–31. märts 2007 Kobe, Jaapan).

Publikatsioonid IV ja V: Autor teostas osa eksperimentaaltööst, interpreteeris tulemusi ning osales käsikirja koostamisel.

Publikatsioon VI: Autor viis läbi ekstraktsioonid, reoloogilised mõõtmised, keemilised analüüsid ning interpreteeris FTIR spektreid. Ta interpreteeris katseandmeid, kirjutas käsikirja ning esitles tulemusi teadusnõupidamisel *Sustainability of the Agri-Food Chain 2006 EFFoST Annual Meeting* (7.–9. november 2006 Haag, Holland).

Lisaks on dissertatsioonis kasutatud mõningaid varem avaldamata andmeid.

LÜHENDITE LOETELU

AAS	aatomabsorptsioonspektromeetria
AG	3,6-anhüdrogalaktoos
¹³ C-NMR	süsiniku tuumamagnetresonantspektroskoopia
DSS	2,2-dimetüül-2-silapentaan-3,3,4,4,5,5-d ₆ -5-sulfoonhape naatriumsool
EEO	elektroendoosmoos
ETAAS	elektrotermiline aatomabsorptsioonspektromeetria
FAAS	leek-aatomabsorptsioonspektromeetria
FTIR	Fourier' infrapunaspektroskoopia
HPLC	kõrgefektiivne vedelikkromatograafia
ICP-MS	induktiivsidestunud plasma massispektromeetria
ICP-OES	induktiivsidestunud plasma optiline emissioonspektromeetria
M _w	keskmine molekulmass
SEC	eksklusioonikromatograafia
SEM	skaneeriv elektronmikroskoopia
psu	praktiline soolsuse ühik
D2S,6S	4-seotud α-D-galaktopüraanoos-2,6-disulfaat
D6S	4-seotud α-D-galaktopüraanoos-6-sulfaat
DA	4-seotud 3,6-anhüdro-α-D-galaktopüraanoos
DA2S	4-seotud 3,6-anhüdro-α-D-galaktopüraanoos-2-sulfaat
G	3-seotud β-D-galaktopüraanoos
G4S	3-seotud β-D-galaktopüraanoos-4-sulfaat
G6S	3-seotud β-D-galaktopüraanoos-6-sulfaat
G6M	3-seotud 6-O-metüül-β-D-galaktopüraanoos
G6M,4S	3-seotud 6-O-metüül-β-D-galaktopüraanoos-4-sulfaat
GP	3-seotud 4',6'-püruvaaditud β-D-galaktopüraanoos
L	4-seotud α-L-galaktopüraanoos
LA	4-seotud 3,6-anhüdro-α-L-galaktopüraanoos
LA2M	4-seotud 2-O-metüül-3,6-anhüdro-α-L-galaktopüraanoos

EESSÕNA

Läänemeri on unikaalne ökosüsteem, mille riimveeline keskkond avaldab seal elavatele organismidele tugevat survet. Elu vee madalast soolsusest tingitud keskkonnastressi tingimustes võib punavetikate puhul ilmnedä muutustena nende morfoloogias, arengutsükliks või polüsahhariidkoostises. Vetikapolüsahhariidide geelistumisvõime on punavetikate elutegevuse aluseks, aga ka eelduseks nende looduslike makromolekulide kasutamisele toiduainetööstuses ja mikrobioloogias. Geelide võrkjaid hüdraatunud struktuure kasutavad punavetikad oma elutegevuses omapärase molekulaar-sõelana, samuti annavad need taimetele vesikeskkonnas toimimiseks vajaliku elastsuse. Seega võivad nimetatud polüsahhariidide struktuur-omadus sõltuvused huvi pakkuda nii teaduslikust kui ka töõnduslikust aspektist.

Käesoleva töö põhilise loodusliku objektina on Kassari lahe vetikakooslus tüüpiline näide iseloomustamaks ökoloogilisi tingimusi Läänemeres. Selle nimetatud riimveekoogu üks suuremaid kompaktsid punavetikakooslusi on küllalt selgelt piiritletud liigilise koosseisuga ning kujutab endast piirkonna ainsat töõndusliku väärtusega loodusvara.

Töõs uuriti Läänemere punavetikatest *Furcellaria lumbricalis* (I) ja *Coccolytus truncatus* (II) pärinevate sulfaaditud polüsahhariidide keemilist koostist ja struktuuri. Võrdlusainetena kasutati troopilisest vetikaliigist *Eucheuma cottonii* (I) ja Kaug-Ida punavetikast *Ahnfeltia tobuchiensis* (V) eraldatud galaktaane ning karraginaanide ja agarite kommertspreparaate. Polüsahhariidide iseloomustati keemilise analüüsi, ¹³C-NMR, FTIR, ICP-OES, ETAAS ja SEC meetoditega. *F. lumbricalis* polüsahhariidide keemilise koostise, molekulaarstruktuuri ning geelistumisvõime vahelisi seoseid uuriti sõltuvalt ekstraktsiooni ja keemilise töõtluse tingimustest (I, VI). Potentsiaalse töõndusliku väärtusega vetikaliigi *C. truncatus* galaktaanide puhul hinnati ka nende polüsahhariidide termostabiilsust (II).

Võrreldi ETAAS, FAAS, ICP-MS ja ICP-OES meetodite rakendusvõimalusi tüüpiliste saastelementide sisalduste määramiseks Läänemere riimvees ja vetikates (IV).

Polüsahhariidgeelide mikrostruktuuri uuriti SEM vahendusel preparaatide krüofikseerimise ja lüofiliseerimise kaasabil (I, III). Töõtati välja uudne struktuure säilitav prepareerimistehnika punavetikagalaktaanide geelistumisprotsesside mikroskoopliseks uurimiseks (III).

Doktoriväitekirja põhieesmärgiks oli välja selgitada seoseid Läänemere punavetikatest pärinevate galaktaanide molekulaarstruktuuri, keemilise koostise, geelide mikrostruktuuri ja reoloogiliste näitajate vahel.

1. SISSEJUHATUS

1.1. Läänemere punavetikad

Läänemerele on iseloomulik vee soolsuse suur varieeruvus selle riimveekogu erinevate piirkondade vahel. Nii vahelduvad Taani väinade merelised tingimused veekogu siseosade praktiliselt mageveeliste ökosüsteemidega. Nagu teistelegi merevetikatele, põhjustab vee madal soolsus punavetikatele tugevat hüpoosmootset stressi. Vetikate puhul võivad sellised tingimused mõjutada taime morfoloogiat või avaldada negatiivset toimet reproduktsioonile (Kirst 1990). Kui Kattegati põhjapoolsetest piirkondadest on leitud 318 liiki makrovetikaid, siis Botnia lahe põhjaosas esineb vaid 42 liiki (Nielsen et al. 1995). Samuti võib vetikaliikide levikut Läänemere põhjaosas mõjutada talvekuude regulaarne jääkate ja sellest tingitud valguse vähesus. Veestammast läbiva valguse hulka mõjutab ka eutrofeerumine, mis koos suurenenud settimismääraga võib avaldada olulist mõju makrovetikate liikide levikule ning nende arengustaadiumite vaheldumisele Läänemeres (Eriksson, Johansson 2005).

Töõnduslike vetikaliikide kasvuks ebasobivate tingimuste tõttu on Läänemere osatähtsus vetikavarude kasutamise seisukohast suhteliselt väike. Ligi 160 Läänemeres esineva punavetikaliigi hulgas (Nielsen et al. 1995) on piirkonnas laialdast kasutust leidnud üksnes *F. lumbricalis* (Schramm 1998). Kuigi Läänemere potentsiaalse töõndusliku väärtusega liikide hulka on arvatud mitu *Rhodophyta* hõimkonna esindajat, nt *Ahnfeltia plicata*, *Ceramium nodulosum*, *C. truncatus*, *Phycodrys rubens*, *Polysiphonia fucoides*, *Rhodomela confervoides*, ei esine ükski nimetatud liikidest piirkonnas kaubanduslikuks rakendamiseks vajalikes kogustes (Briand 1991).

Furcellaria lumbricalis

Punavetikas *F. lumbricalis* (Hudson) J. V. Lamouroux (varasem nimetus *F. Fastigiata*) on levinud Atlandi ookeani ida- ja lääneosas, Barentsi merest Biskaia laheni ning eriti arvukalt riimveelises Läänemeres. Kuni 1960. aastateni paiknesid maailma ühed suurimad *F. lumbricalis* varud Taanis Kattegatis (Schramm 1998). Lääne-Atlandil esineb *F. lumbricalis* St. Lawrence'i lahe madalamates osades ning Nova Scotia põhjaosa rannikul. Kui Põhja-Ameerikas on levinud peamiselt nimetatud vetikaliigi kinnitumata vorm, siis Euroopas (nt Läänemeres) võivad kinnitunud ja kinnitumata vormid esineda koos (Chapman, Chapman 1980; Holmsgaard et al. 1981).

Kuigi *F. lumbricalis* on Põhja-Atlandil laialdaselt levinud, paiknevad selle varud üldjuhul töõnduslikuks rakendamiseks liialt hajutatult. Rikkalike varude tõttu on *F. lumbricalis* Läänemere ainsaks töõndusliku väärtusega vetikaliigiks. Ajalooliselt on vetikast *F. lumbricalis* pärineva galaktaansegu näol tegemist ühe esimese hüdrokolloidiga, mida punavetikast töõnduslikus mastaabis tootma hakati. Varajased katsed furtsellaraani (nn Taani agari) tootmiseks viidi läbi Taanis juba 1917. aastal

(Christiansen 1959). Saadavat eriliste omadustega produkti kasutati Euroopa toiduainetööstuses edukalt aastakümnete vältel (Bird et al. 1991; Briand 1991).

Nimetatud vetikaliigi laiaulatuslik töenduslik rakendamine algas 1940. aastatel Kattegati varude baasil, kuid seiskus peatselt seoses II maailmasõja puhkemisega. 1950. aastatel jätkus furtsellaraani tootmine kiirenevas tempos. Kattegati varude üha intensiivsem kasutamine (2000 tonnilt märgmassilt 1946. aastal 20 000–30 000 tonnini 1960. aastate keskpaigas) ning üleekspluuteerimine viis 1960. aastate lõpus *F. lumbricalis* töenduslike varude lõppemiseni. Sellest tulenevalt toodeti hiljem Taanis furtsellaraani Kanada vetest pärinevast vetikatoormest (Briand 1991).

Tänapäeval esineb *F. lumbricalis* rikkalikult nt Poola, Leedu, Läti, Soome, Rootsi ja Norra rannikuvetes (Schramm 1998). Kuigi 1950. aastatel leidis seda liiki rohkesti (märgmass hinnanguliselt 11 500 tonni) ka Gdanski lahes Pucki laguunis (Läänemeri, Poola), oli *F. lumbricalis* 1987. aastaks sellest piirkonnast reostuse ja eutrofeerumise tõttu praktiliselt kadunud (Kruk-Dowgiałło 1991; Ciszewski et al. 1992). Seega on kõnealuse vetikaliigi varud maailmas vähenemas või täielikult hävinud.

Punavetika *F. lumbricalis* üks rikkalikumaid esinemiskohti (tiheda vetikamati kujul) asub Läänemeres Eesti territoriaalvetes ning on tuntud Kassari vetikaplasti nime all (Chapman, Chapman 1980; Martin et al. 1996; Truus et al. 1997). Vetika-koosluse paiknemine (joonis 1) ning biomass (märgmass ligikaudu 140 000 tonni 2005. aastal) varieerub mõnevõrra aastate lõikes (Martin et al. 2006). Kõva substraadi puudumise ning liivase põhja tõttu esinevad mõlemad Kassari vetikaplasti dominantliigid (*F. lumbricalis* ja *C. truncatus*) koosluses kinnitumata vormidena. Nimetatud vetikaliikide väiksemaid kooslusi on leitud Soome rannikult Turu lähistelt (Mäkinen et al. 1988). Ka Prints Edwardi saare lähistel esineb vetikat *F. lumbricalis* suhteliselt suurtes kogustes, kuid koos teise punavetikaliigiga *Chondrus crispus* (Chopin 1998).

Läänemere põhjaosa madala soolsusega (3,6 psu) keskkonnas ei esine vetika *F. lumbricalis* arengutsüklis diplohaploidset staadiumi (Kostamo, Mäkinen 2006). Niisugustel tingimustel on populatsiooni peamiseks taastootmise viisiks talluse vegetatiivne fragmentatsioon (Kostamo, Mäkinen 2006; Kostamo 2008). On täheldatud, et merevee soolsuse ja läbipaistvuse suurenedes ning valgusperioodi pikkuse ja vee temperatuuri vähenedes kasvab tõenäosus leida tetrasporangiumeid kandvaid *F. lumbricalis* isendeid (Kostamo, Mäkinen 2006).

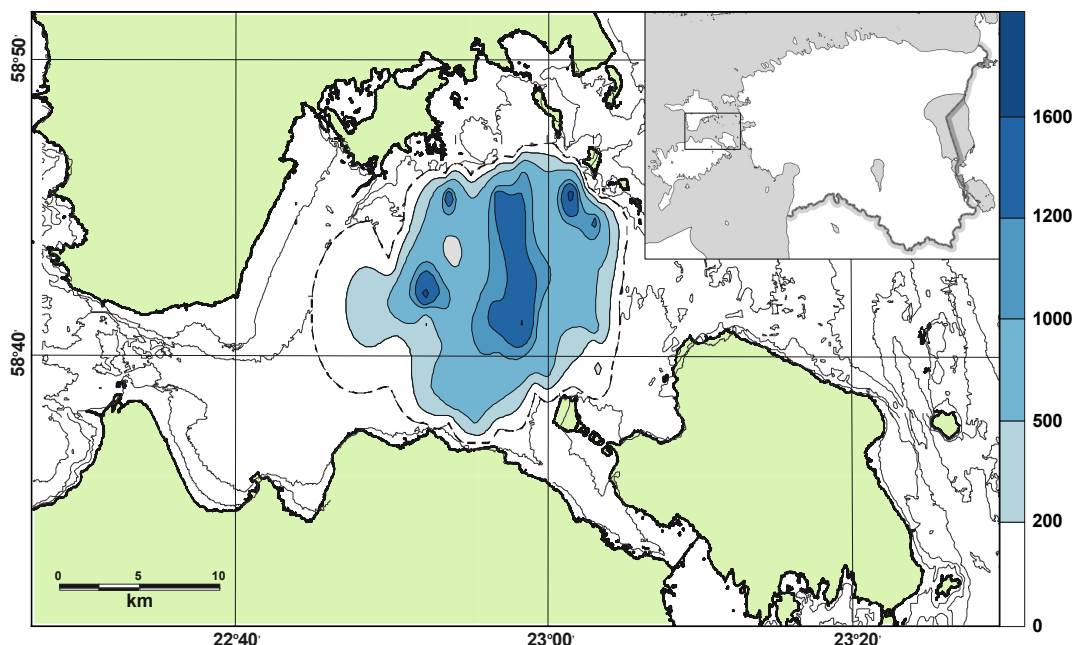
Coccotylus truncatus

Punavetikas *C. truncatus* (Pallas) M. J. Wynne ja J. N. Heine (varasemad nimetused *Phyllophora truncata* ja *Phyllophora brodiaei*) on levinud Atlandi ja Vaikse ookeani põhjaosas, Põhja-Jäämeres ning Valges ja Mustas meres (Lüning 1990). See on üks vähestest Läänemerd asustavatest punavetikaliikidest, esinedes selles riimveekogus sügaval kasvava käabusvormina. Kassari vetikaplasti teise dominant-

liigina moodustab see punavetikas keskmiselt 30–35% koosluse märgmassist (Martin et al. 2006).

1960. aastatel oli *C. truncatus* laialt levinud Mustas meres Karakinitski lahes ning koos liikidega *Phyllophora crista* ja *Phyllophora pseudoceranoides* mere loodeosas mahuka vetikaplastina, mis on tuntud nimede “Zernovi *Phyllophora* väli” ning “*Phyllophora* aas” all. 1980. aastateks oli see, kunagine maailma suurim (märgmass 5 miljonit tonni) punavetikaplast (Lüning 1990) eutrofeerumise tõttu praktiliselt kadunud; tänapäevaks on kõnealune kooslus siiski teatud määral taastunud (Minicheva 2007).

Seoses asjaoluga, et paljusid punavetikaga *C. truncatus* lähedalt suguluses olevaid liike rakendatakse karraginaanide tootmiseks, on ka kõnealust liiki käsitletud potentsiaalse töendusliku väärtusega karraginofüüdina (Bonotto 1979; Mathieson et al. 1984; Usov, Shashkov 1985).



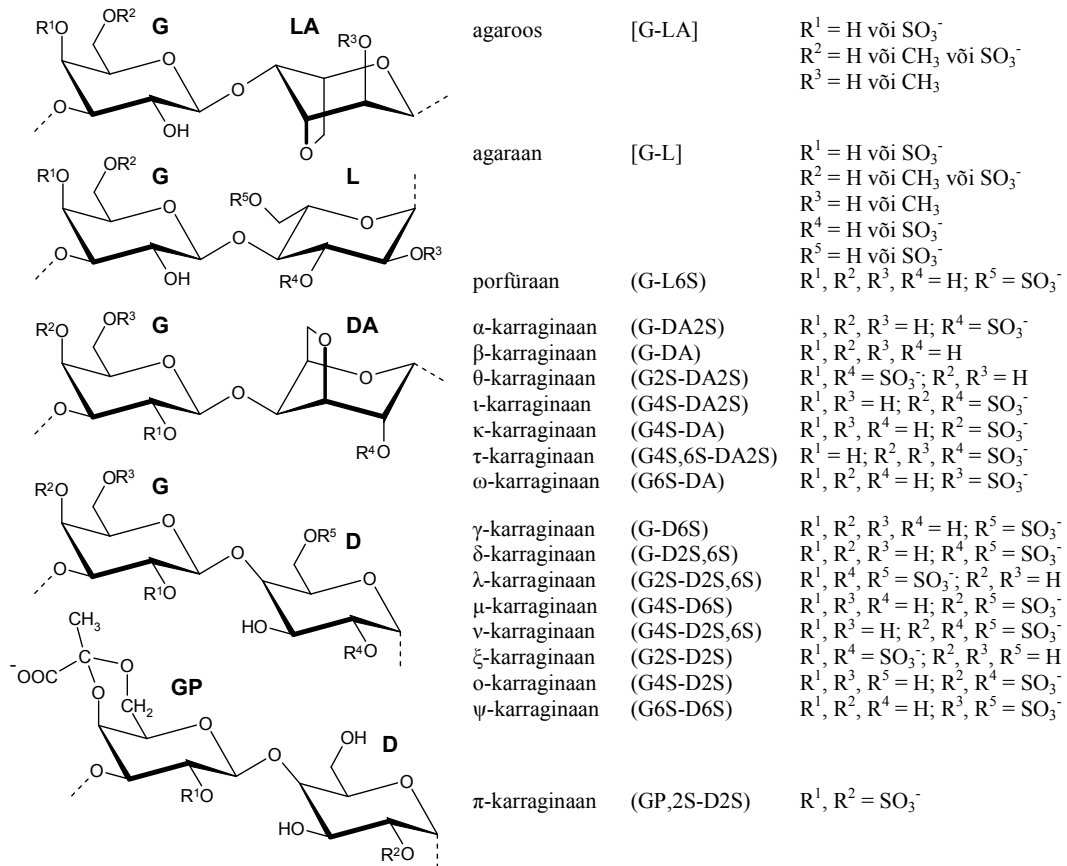
Joonis 1. Kassari vetikaplasti biomassi jaotus (parempoolne skaala, g/m^2) ja paiknemine Läänemeres (suvi 2004).

1.2. Vetikagalaktaanid

1.2.1. Molekulaarstruktuur

Punavetikagalaktaanideks nimetatakse lineaarseid sulfaaditud polüsahhariide, mille üldjuhul lineaarse ahela moodustavad järjestikku vahelduvad 3-seotud β -D-galaktopüraanoosi ja 4-seotud α -galaktopüraanoosi jäägid. Kui β -galaktoosi jäägid esinevad nimetatud polümeerides alati D-isomeerina, siis α -galaktoos esineb karraginaanides

D-vormis, agarites aga L-isomeerina. Suur osa α -galaktoosist võib esineda ka 3,6-anhüdroderivaadina (joonis 2). Molekuli mitu hüdroksüülrühma võivad olla asendatud sulfaatester- või metüülrühmade ja mõnikord ka täiendavate monosahhariidjääkidega (Painter 1983; Usov 1998). Agarite ja paljude keeruka ehitusega karraginaanide koostises võib sisalduda ka püroviinamarihapet. Viimane esineb tsüklilise atsetaalina 3-seotud galaktoosjääkide O-4 ja O-6 asendis ning on seotud π -karraginaani idealiseeritud struktuuritüübiga (DiNinno et al. 1979). Lisaks võib püroviinamarihappe atsetaali leiduda α - ja θ -karraginaani struktuuritüübile lähedastes segmentides (van de Velde et al. 2002a).



Joonis 2. Karraginaanide ja agarite idealiseeritud disahhariidsete korduslülide struktuurid. Sulgudes esitatud tähekkoodid viitavad Knutsen et al. (1994) poolt esitatud alternatiivsele nomenklatuurile.

Karraginaanide ligikaudu 15 struktuuritüübist (Knutsen et al. 1994) esineb vetikates kõige sagedamini κ -, τ - ja λ -karraginaane. Viimased leiavad stabiliseerivate, paksendavate ja geelistavate omaduste tõttu kasutust toiduainetööstuses (Stanley 1990). Agarite ja karraginaanide struktuur ning reoloogilised omadused sõltuvad peamiselt vetikate liigist, kasvukeskkonnast ning arengustaadiumist, kuid samuti ka galaktaanide eraldamise ja keemilise tötluse protseduuridest (Therkelsen 1993).

Enamasti esinevad vetikapolüsahhariidid keerukate looduslike segudena, mille hübriidse makromolekulaarse ahela moodustavad erineva struktuuritüübiga sulfaaditud galaktaanid. Seetõttu erinevad niisugused heteropolümeersed segud oluliselt vetikagalaktaanide idealiseeritud struktuuritüüpidest. Kirjeldatud on mitmesuguseid hübriidseid polüsahhariide, sealhulgas D/L-galaktaanide kopolümeere (karraginaanide ja agarite hübriidid), κ/ι -, κ/β -, κ/μ -, ι/ν -, ξ/θ -karraginaanide hübriidstruktuure ning metüül- ja püruvaatrüümi sisaldavaid keerukaid korduslülisid (Estevez et al. 2001; Viana et al. 2004; Villanueva et al. 2004; van de Velde 2008). Erinevate struktuurifragmentide lokaliseerimine niisugustes hübriidsetes molekulahelates jääb sageli selgusetuks. κ/ι -Karraginaanide puhul võivad ι -struktuurid peamiselt κ -karraginaani sisaldavas ahelas paikneda erineva pikkusega juhuslike plokkide või üksikute segmentidena (Guibet et al. 2006; Wichmann et al. 2006).

Kuna μ - ja ν -karraginaanid on vastavalt κ - ja ι -karraginaanide bioloogilised prekursorid (Anderson et al. 1968; Stancioff, Stanley 1969), ei ole κ/μ - ning ι/ν -karraginaanide hübriidset olemust kahtluse alla seatud. Siiski on ebaselged κ/ι -karraginaanide hübriidstruktuuride tekkeni viivad biosünteesi rajad (van de Velde 2008) ning nimetatud hübriidide molekulaarstruktuuri küsimustes puudub tänapäeval ühtne seisukoht.

***Furcellaria lumbricalis* galaktaanid (furtsellaraan).** Furtsellaraani on kirjeldatud kui κ/β -karraginaani hübriidset kompleksi (Painter 1966; Truus et al. 1997), milles sisaldub väike kogus ω -karraginaani (Craigie 1990). Samuti on täheldatud α - ja ι -karraginaanide esinemist erineva päritoluga preparaatides (Yarotsky et al. 1978; Usov, Arkhipova 1981; Bird et al. 1991). Erinevalt *Gigartinales* sugukonna esindajatest, mille puhul gametofüüdid toodavad κ -karraginaani, sporofüüdid aga λ -tüüpi struktuure, ei sõltu punavetika *F. lumbricalis* produtseeritava karraginaani tüüp vetika arengustaadiumist (Bird et al. 1991). Üldlevinud seisukoha põhjal esinevad furtsellaraani molekulis erinevad karraginaani segmendid seotuna ühte makromolekulaarsesse ahelasse, milles domineerib κ -karraginaan (Knutsen, Grasdalen 1987). Seda kinnitavad ka *F. lumbricalis* polüsahhariidide röntgendifraktsioonanalüüsi tulemused. Furtsellaraani sekundaarstruktuur, kaksikheeliks kordusperioodiga $2,5 \pm 0,02$ nm, on sarnane stöhhiomeetriliselt sulfaaditud κ -karraginaaniga, molekuli alasulfaaditus tingib aga ahelatevahelise aksiaalse nihke keskasendist 0,83 nm (Cairns et al. 1991).

***Coccotylus truncatus* galaktaanid.** *C. truncatus* polüsahhariide ei ole varem põhjalikult uuritud. Küll on aga teada, et nimetatud vetikaliigi galaktaanide põhikomponent kuulub ι -tüüpi karraginaanide hulka (Usov, Shashkov 1985; Truus et al. 1997). Nagu on iseloomulik paljudele *Phyllophoraceae* sugukonna esindajatele, sõltub ka *C. truncatus* karraginaanide keemiline koostis vetika arengustaadiumist. Immuunosadestamise ja FTIR-uuringute põhjal on leitud, et nimetatud vetikaliigi gametofüüdid produtseerivad ι -tüüpi karraginaane, sporofüüdid aga sisaldavad üheaegselt nii ι - kui ka λ -struktuure (McCandless et al. 1981; McCandless et al. 1982). *C. truncatus* polüsahhariidide detailne keemiline koostis ning peenstruktuur on jäänud veel tuvastamata.

***Ahnfeltia tobuchiensis* galaktaanid.** Sõltuvalt kliimaatilistest tingimustest võivad mõned *Ahnfeltia* perekonna esindajad produtseerida agari või karraginaani tüüpi galaktaane (Levring et al. 1969). Kuigi punavetikast *A. tobuchiensis* pärinevaid galaktaane on sageli nimetatud agariks või agarooksiks ning kasutatud geelistavate vahenditena, ei ole nimetatud polüsahhariidide molekulaarstruktuuri detailselt uuritud.

***Eucheuma cottonii* galaktaanid.** Troopilist punavetikat *E. cottonii* (teine nimetus *Kappaphycus alvarezii*) rakendatakse ulatuslikult κ -karraginaani töenduslikuks tootmiseks (Glicksman 1983). Sellest tulenevalt on nimetatud vetikaliigi polüsahhariidide keemilist koostist laialdaselt uuritud. *E. cottonii* hübriidsete galaktaanide põhikomponendiks on κ -karraginaan, väikeses koguses leidub aga ka ι -struktuure (Aguilan et al. 2003). Lisaks on kõnealustes polümeerpreparaatides täheldatud μ - ja ν -karraginaanide ning **G**, **L** ja **G6M,4S** jääkide esinemist minoorse lisandina (Estevez et al. 2000; Estevez et al. 2004).

1.2.2. Mineraalsed ja minoorse komponendid

Töendusliku väärtusega punavetikate galaktaanisisaldus vetika kuivmassis jääb üldjuhul vahemikku 30–60%, kuid leidub ka kuni 80%-lise fükokolloidisisaldusega liike (Therkelsen 1993). Preparatiivselt saadud polüsahhariidide keemiline koostis, puhtusaste ning mineraalse osa spetsiifika sõltuvad oluliselt galaktaanide eraldamisprotsessist.

Karraginaanide näol on reeglina tegemist kõrgsulfaaditud polüsahhariididega, mille väävlisisaldus ületab 5%. Agarite puhul jääb see näitaja tüüpiliselt alla 1,5% (Matsushashi 1990). Kui agari tüüpi polüsahhariidide vähemlaetud fraktsiooni (defineeritud kui agaros) väävlisisaldus jääb enamasti alla 0,05%, siis kõrgema sulfaadisisaldusega fraktsioonis (agaropektiinis, defineeritud kui üle 0,2%-lise väävlisisaldusega fraktsioon) võib aga väävlit olla kuni 2,5% (Armisen, Galatas 2000). Erandlikult kõrgeid väävlisisaldusi (üle 6%) on leitud punavetikast *Gelidium vittatum* pärinevatest agaritest, nimetatud polüsahhariidide mittegeelistuvas fraktsioonis on selle elemendi sisalduseks määratud koguni 15,5% (Furieux, Miller 1986). Suuri väävlisisaldusi (6,8%) on tuvastatud ka mõnede kaubanduslike agarite kõrglaetud fraktsioonides (Izumi 1971).

Levinumate karraginaanide väävlisisaldus jääb tüüpiliselt vahemikku 7–10% κ -karraginaani, 9,5–11,5% ι -karraginaani ning 11–13% λ -karraginaani puhul. Furtsellaraani kui κ/β -karraginaani hübriidi väävlisisaldus on üldjuhul 5,5–6,5% (Armisen, Galatas 2000), puhas β -karraginaan aga sulfaatühmi ei sisalda. Karraginaani idealiseeritud struktuuritüübist lähtuv teoreetiline (arvutuslikult leitud) väävlisisaldus jääb tegelikust mõnevõrra kõrgemaks: 8,3% κ -karraginaani, 13,8% ι -karraginaani ja 17,1% λ -karraginaani puhul.

Agarite tuhasisaldus varieerub 1,3%-st kõrgpuhaste proovide puhul töenduslike preparaate tüüpilise väärtuse 3–4%-ni (Humm 1947; Matsushashi 1990) ning ei ületa enamasti 6,5%. Karraginaanide tuhasus jääb tüüpiliselt vahemikku 15–40%.

Punavetikagalaktaanide mineraalse osa koostise määravad ära ioonsed sidemed negatiivse laenguga sulfaatrühmade ja teatud metallioonide vahel. Levinuimad polüsahhariidmaatriksiga seonduvad katioonid on Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ ja NH_4^+ . Lisaks võivad erineva päritoluga preparaadid sisaldada märkimisväärtes kogustes rauda, alumiiniumi ja räni (Matsushashi 1990). Tulenevalt karraginaanide omadusest siduda suhteliselt suurtes kogustes metallioone, on raskmetallide Pb, As, Cd ja Hg sisaldused toiduainetööstuses kasutatavates karraginaanpreparaatides normeeritud (piirnormid vastavalt 5, 3, 2 ja 1 mg/kg). Suhteliselt suurtes kogustes esineb sageli ka vaske ja tsinki. Vetikagalaktaanide üheks tähelepanuväärseks minoorseks komponendiks on boor, mille sisaldus agarites ületab siiski harva 100 mg/kg (Matsushashi 1990). Nimetatud element esineb punavetikates vaba boraadina või sahhariidkomplekside koosseisus (Dembitsky et al. 2002).

Märgatav osa vetikates sisalduvast biogeensest lämmastikust seondub polüsahhariidkomponendiga; selle elemendi täielik eraldamine galaktaanmaatriksist on sageli problemaatiline. Kirjanduses on andmeid, et suurem osa raskesti eraldatavast lämmastikust esineb valguliste substantsidena ning on galaktaanmaatriksis tugevasti absorbeerunud või sellega kovalentselt seotud (Matulewicz, Cerezo 1980; King, Lauterbach 1987). Furtsellaraani puhul ei ole nimetatud valgulisi ühendeid võimalik polüsahhariidist täielikult eraldada ümbersadestamise, geelfiltratsiooni ega elektroforeesi teel (Krasil'nikova, Medvedeva 1975).

Sageli võib puhastamata galaktaanpreparaatides leida märkimisväärtes kogustes punavetikate peamist varuainet, floriideetärklist (Yu et al. 2002; Knutsen, Grasdalen 1987; Estevez et al. 2008). Ka on paljudes proovides täheldatud ksüloosi olemasolu. Nimetatud suhkur võib preparaadis esineda vaba ksülaanina (Turvey, Williams 1970; Myslabodski 1990) või seotuna polüsahhariidahelas (Furneaux et al. 1990; Duarte et al. 2004). Seevastu sisaldavad toiduainetööstuse toormena kasutatavad karraginaanpreparaadid sageli mitmesuguseid standardiseerimislisandeid, nt sahharoosi, dekstroosi, kaaliumkloriidi ja puhversoolasid (Therkelsen 1993).

1.2.3. Molekulmassi jaotus ja struktuurne stabiilsus

Looduslik furtsellaraan ja teised karraginaanid on polüdispersed, kõrgpolümeersed ühendid. Vetikagalaktaanide molekulmassi jaotuse uurimisel on laialdast kasutust leidnud valgushajumise ja/või refraktomeetrilise detekteerimissüsteemiga kombineeritud eksklusioonikromatograafia (SEC) meetodid (Lecacheux et al. 1985; Sloommaekers et al. 1991). Sageli rakendavad nimetatud uuringud kaliibrimist madala polüdisperssusega dekstraani, pullulaani või polü(etüleenoksiidi) standarditega (Villanueva et al. 2004) ning mõnikord ka karraginaani markeritega (Spichtig, Austin 2008). Nimetatud uuringutes on edukalt rakendatud ka kapillaargeelektroforeesi ning liikumisväljas fraktsioneerimise tehnikaid (Roberts et al. 1998; Viebke, Williams 2000). Molekulmassi hindamine võib κ -tüüpi karraginaanide puhul osutada komplitseeritaks seoses polüsahhariidiosakeste agregateerumisega, seda eriti vastas- ja kaasioonide esinemisel lahuses. Kõrgete temperatuuride ning madalate galaktaani kontsentratsioonide rakendamine võimaldab agregateerumist vältida ning

hoida molekule lahuses väikseima hüdrodünaamilise raadiusega juhuslike ahelate vormis. Vetikagalaktaanide polümeerisatsiooniate varieerub suuresti ning sõltub olulisel määral ekstraktsioonitingimustest. Keskmise molekulmassi furtsellaraani puhul jääb sarnaselt paljude teiste geelistuvate karraginaanidega 500 kDa juurde (Yu et al. 2007). Kirjandusandmete põhjal on κ -karraginaani vastav näitaja tüüpiliselt vahemikus 300–1900 kDa (Abad et al. 2004; Spichtig, Austin 2008), siiski on täheldatud ka molekulmassi väärtusi kuni 8000 kDa (Montolalu et al. 2008).

Toiduainetööstuse toormena kasutatavate vetikagalaktaanide üheks oluliseks omaduseks on nende struktuurne stabiilsus, mis tuleneb AG konfiguratsioonist (D- või L-isomeer) ning asendusrühmade spetsiifikast. Happelise keskkonna destruktiivset toimet karraginaanidele on ulatuslikult uuritud (Karlsson, Singh 1999), mitu uurin-gut on avaldatud ka ultraheli ning radiatsiooni mõjust vetikapolüsahhariididele (Lii et al. 1999; Relleve et al. 2005). Karraginaanide termostabiilsust on uuritud nii kuivade preparaatide kui ka vesilahuste puhul (Bradley, Mitchell 1988; Friedenthal et al. 2000; Lai et al. 2000). On leitud, et furtsellaraani korral algab polümeerahelate intensiivne lagunemine temperatuuridel üle 115 °C (Friedenthal et al. 2000).

Vetikagalaktaanide tundlikkus kõrgete temperatuuride, ultraheli ning happelise keskkonna suhtes on seotud polümeerahelate jäikuse ja väävlisisaldusega ning see väheneb üldjuhul reas agaros > κ -karraginaan > ι -karraginaan (Lii et al. 1999). Mõnevõrra erinev on karraginaanide radiatsioonitundlikkus, mis väheneb reas λ -karraginaan > ι -karraginaan > κ -karraginaan ning tuleneb nende galaktaanide konformatsioonilistest iseärasustest (Relleve et al. 2005). Kõige püsivamad on karraginaanid pH 9 juures, kiire lagunemine leiab aset pH väärtustel alla 3–4. Vetikagalaktaanide happelise hüdrolyüsi käigus lagunevad peamiselt α -1,3-glükosiidsidemed; degradatsiooni määra suurendavad pingestatud AG jäägid, sulfaat-rühmad α -galaktopüranosüüride O-2 asendis seevastu suurendavad polüsahhariidi vastupidavust hüdrolyütilisele destruktsioonile (Therkelsen 1993).

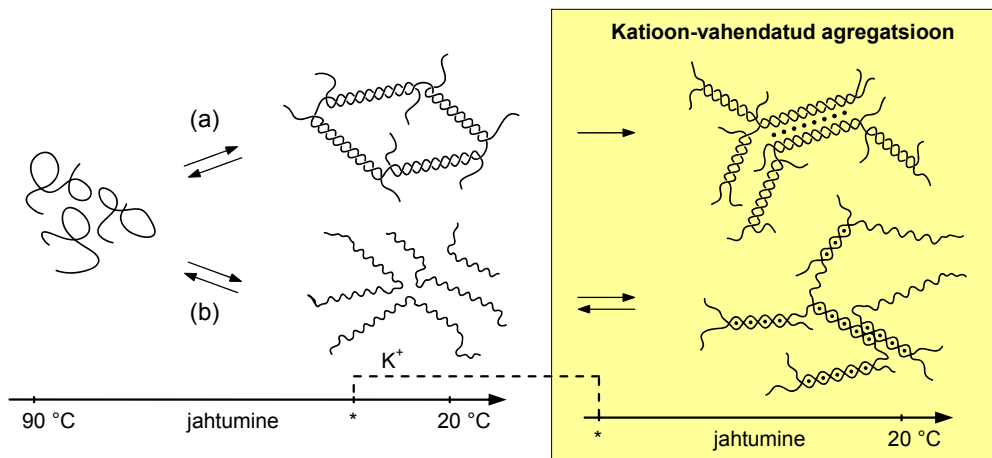
Vetikagalaktaanide degradatsiooniastme hindamine on eriti oluline karraginaanide puhul. Seoses asjaoluga, et alla 50 kDa molekulmassiga karraginaanid (nn poliginaanid) võivad olla tervisele kahjulikud (Spichtig, Austin 2008), on aktuaalne poliginaanide tuvastamine erinevates toiduainetes ning toiduainetööstuse toormena kasutatavates karraginaanpreparaatides.

1.2.4. Geelistumisprotsess ja reoloogia

Paljude vetikagalaktaanide üheks iseloomulikuks omaduseks on geelistumisvõime, s.o võime moodustada kuuma sooli jahtumisel korrastunud kolmemõõtmelisi struktuure. Nende polümeeride geelistumisvõime on punavetikate elutegevuse aluseks ning see on loonud ka eelduse vetikagalaktaanide laialdaseks kasutamiseks toiduainetööstuses ja mikrobioloogias. Enam kui 5000 tänapäeval tuntud punavetika (*Rhodophyta*) liigist (Graham, Wilcox 2000) kasutatakse geelistuvate galaktaanide töenduslikuks tootmiseks üksnes 70–80 liiki.

Geeli moodustumine on keerukas protsess, mida mõjutab polüsahhariidi struktuur, polümeeri kontsentratsioon ning temperatuur, aga ka vastas- ja kaasioonide esinemine lahuses (Morris et al. 1980; Meunier et al. 2001). On leitud, et teatud katioonid (nt K^+ -ioonid κ -karraginaani ja furtsellaraani puhul, Ca^{2+} -ioonid ι -karraginaani korral) indutseerivad polümeeri konformatsioonimuutusi – üksikahel-heeliksi üleminekuid, millele võib järgneda nende heeliksiste agregatsioon ja geeli teke (Rochas, Rinaudo 1984; Paoletti et al. 1985). Lõplik geeli struktuur sõltub erinevate protsesside (konformatsiooniüleminekud, molekulidevaheliste ühendussildade teke, faaside eraldumine) keerukast vastastikusest toimest.

Üldlevinud seisukoha järgi toimub agarite ja karraginaanide geelistumine põhimõtteliselt erinevalt. Polümeerahelate ühinemisprotsesse on laialdaselt uuritud alates Reesi tuntud töödest (Rees 1969; Rees 1972). Sellest ajast alates on karraginaanide ja agarite geelistumise alased tööd olnud suunatud peamiselt geeli moodustumisel osalevate elementaarkomponentide vaheliste ühendussildade uurimisele (Morris 1986; Piculell 1995) ning on esitatud mitu geelistumisprotsessi üldistavat mudelit (joonis 3). Anderson'i et al. (1969) järgi on ühendussildadeks omavahel läbipõimunud kaksikheeliksid, Morris et al. (1980) ja Robinson et al. (1980) kirjeldasid teineteisest sõltumatult nimetatud ühendussildu kui kation-vahendatud kaksikheeliksiste agregaatide. Smidsrødi ja Grasdalen (1982) esitatud karraginaane käsitleva mudeli järgi kujutavad ühendussillad endast kation-spetsiifilisi soolasildu korrastunud ahelaosade vahel. Ka tänapäevaks ei ole kujunenud ühtset seisukohata geelistumisega kaasnevate protsesside järjestuse ja konformatsiooniüleminekute tüübi (üksikahel-heeliks või üksikahel-kaksikheeliks) küsimustes.



Joonis 3. Vetikagalaktaanide geelistumise mudelid: (a) Morris et al. (1980) ja Robinson et al. (1980) poolt väljapakutud domeeni mudel ning (b) Smidsrødi ja Grasdalen (1982) loodud “pesastatud” üksikheeliksi mudel. Punktid tähistavad geelistumist soodustavaid katioone.

Looduslikest polümeeridest annab tugevaimaid termoreversiivseid hüdrogeele agar-roos. Kui kõrgekvaliteetsed (madala väävlisisaldusega) agarid võivad manipuleeritavaid geele moodustada juba kontsentratsioonil 0,15%, siis mõõdetava tuge-

vusega κ -karraginaani geelide tekkeks on üldjuhul vajalik polümeeri sisaldus vesilahuste puhul üle 0,5% ning vähemalt 0,1% mõnede bikolloidsüsteemide korral (Therkelsen 1993). Agari tüüpi polüsahhariidide geelistumine leiab üldjuhul aset 35–50 °C juures (1% soolide korral), geeli sulamine toimub aga tüüpiliselt temperatuuridel üle 80 °C. Geelistumistemperatuuri mõjutab polüsahhariidi kontsentratsioon, samuti ka metoksurühmade sisaldus agaris. On kindlaks tehtud, et metoksurühmad C-6 asendis tõstavad geelistumistemperatuuri, teistes asendites aga üldjuhul langetavad seda ning vähendavad geelitugevust (Guisseley 1970; Armisén, Galatas 2000).

Karraginaangeelide sulamis- ja geelistumistemperatuurile avaldavad mõju teatud katioonid – geelistumist soodustavad metallioonid tõstavad mõlema nimetatud karakteristiku väärtusi märgatavalt. Sõltuvalt mineraalse osa koostisest leiab κ -karraginaani soolide geelistumine aset 30–60 °C juures, geelide sulamine toimub aga 5–20 °C võrra kõrgemal temperatuuril. See nn hüstereesinäitaja (geelistumise ja geeli sulamistemperatuuride vahe) on ι -karraginaani puhul oluliselt väiksem, ligikaudu 5 °C. Lisaks esineb positiivne korrelatsioon geelistumistemperatuuri ning karraginaani molekulmassi vahel.

Vastasioonid võivad karraginaanide geelistumist mõjutada väga spetsiifiliselt. Teoreetiliste ja eksperimentaalsete uuringute alusel on leitud, et teatud katioonid (nt K^+ , Rb^+) seonduvad kindlal viisil karraginaani heeliksiitega, neutraliseerivad ahelate negatiivseid laenguid ning soodustavad geelistumist (Nilsson, Piculell 1991). κ -Tüüpi karraginaanide geelistumisvõimet soodustavad katioonid reas Li^+ , Na^+ , $NR_4^+ \ll Ca^{2+}$, Cu^{2+} , $NH_4^+ < K^+$, $Cs^+ < Rb^+$ (Ciancia et al. 1997b; Michel et al. 1997). On uuritud ka anioonide mõju galaktaanangeelide formeerumisele (Takemasa, Nishinari 2004). κ -Karraginaani puhul stabiliseerivad polümeerahelate heelikskonformatsioone anioonid reas $Cl^- < NO_3^- < Br^- < SCN^- < I^-$; seejuures takistavad jodiid- ja tiotsüanaatioonid heeliksiite agregateerumist ning iseloomuliku geelivõrgustiku teket (Zhang et al. 1991).

AG jääkide esinemine galaktaanmaatriksis suurendab polümeerahelate liikumisvabadust ning võimaldab juhuslike ahelate tihedamat pakkimust lahustes (Therkelsen 1993). Samuti loob see eeldused geelimumodustumiseks vajaliku algse helikaalse sekundaarstruktuuri tekkeks. Seega tingib AG sisalduse tõus nii agarite kui ka karraginaanide geelistumisvõime suurenemise. Looduslike galaktaansegude AG sisalduse tõstmiseks rakendatakse seetõttu sageli polüsahhariidide töötlust tugevate leelistega, mille käigus O-6 asendis sulfaaditud ning O-3 asendis hüdroksüülrühma kandvad (või *vice versa*) α -galaktoosjäägid tsüklistuvad vastavateks anhüdroduerivaatideks (Ciancia et al. 1993; Ciancia et al. 1997a; Viana et al. 2004).

Agarid geelistuvad üksnes oma agaroosisisalduse arvel (Armisén, Galatas 2000), andes tugevaid, kuid samas rabedaid suure sünereesinäitajaga geele. Karraginaanidest võimaldavad tugevaimaid geele κ -tüüpi karraginaanid K^+ - ja Ca^{2+} -ioonide üheaegsel manulusel; nimetatud polüsahhariidi puhas K^+ -vorm annab seevastu väiksema tugevuse ning elastsemate omadustega geele (Stanley 1990; Chen et al. 2002). ι -Karraginaani geelistumist soodustab enim Ca^{2+} -ioonide juuresolek, mis viib elastsete tiksotroopsete omadustega geelide formeerumiseni. Kuna sulfaat-

rühma esinemisel β -galaktopüraanoosjäägi *O*-2 asendis on helikaalse konformatsioonitüübi teke steeriliselt takistatud, λ -karraginaan geele ei moodusta.

Galaktaanide sageliesinev molekulaarne hübriidsus põhjustab võrreldes nende polüsahhariidide homopolümeersete segudega märgatavaid muutusi nii polümeerahelate konformatsioonis kui ka preparaatide reoloogilistes omadustes. Juba väike prekursorstruktuuride (nt μ - ja ν -segmendid) sisaldus galaktaanmaatriksis võib viia geelitugevuse ulatusliku languseni. On näidatud, et ι -karraginaan kaotab geelistumisvõime täielikult üle 20 moolprotsendilise ν -struktuuride lisandi korral (van de Velde et al. 2002b).

κ -Segmentide kõrge sisalduse tõttu on furtsellaraani geelistumisvõime ning sellest tulenevad polüsahhariidi kasutusvaldkonnad sarnased κ -karraginaani omadega. Furtsellaraani omadus interakteeruda piimavalkudega annab selle polüsahhariidi piimageelidele siiski mõnevõrra elastsemad ning pehmema tekstuuriga omadused (Laos 2005; Laos et al. 2007). Furtsellaraani sisaldavate piimatoodete meeldiv tekstuur teeb selle galaktaani eriti hinnatuks toiduainetööstuse toormena. Erinevalt κ -karraginaanist ei toimu furtsellaraani puhul galaktaani sünergilist interaktsiooni jaanikaunakummiga ning sellega kaasnevat tugevama ning süneresikindlama geelivõrgustiku teket (Glicksman 1983; Chen et al. 2001). Nimetatu vähendab mõnevõrra furtsellaraani kasutusvõimalusi teatud toiduainetööstuse valdkondades. Kuna furtsellaraan sisaldab κ -karraginaaniga võrreldes vähem laetud rühmi, sadestub see vesilahustest oluliselt madalamate KCl kontsentratsioonide juures. Samuti on furtsellaraanmaatriksi küllastamiseks vaja vähem leelismetallioone, mistõttu polümeeri optimaalne geelitugevus saavutatakse väiksema soola või leelise kuluga (Bird et al. 1991).

2. EESMÄRGID

Töö põhieesmärgiks on punavetikatest *F. lumbricalis* ja *C. truncatus* pärinevate galaktaanide struktuur-omadus sõltuvuste väljaselgitamine. Dissertatsiooni peamised eesmärgid on esitatud alljärgnevalt.

- Uurida Läänemere punavetikatest *F. lumbricalis* (kinnitunud ja kinnitumata vormid) ja *C. truncatus* (kinnitumata vorm) pärinevate geelistuvate galaktaanide keemilist koostist ja molekulaarstruktuuri võrdlevalt tuntud galaktaanpreparaatidega ning punavetikate *A. tobuchiensis* ja *E. cottonii* polüsahhariididega.
- Uurida ekstraktsioonitingimuste mõju Kassari punavetikakoosluse biomassist pärinevate polüsahhariidide molekulaarstruktuurile, mineraalse osa koostisele, molekulmassi jaotusele ja reoloogilistele omadustele ning välja selgitada nende galaktaanide termostabiilsuse karakteristikud.
- Välja selgitada punavetikagalaktaanide (karraginaanide ja agarite) makroskoopilise geelimumodustumise peamised etapid ning uurida vastasioonide mõju furtsellaraangelide struktuurile.
- Uurida spektroskoopiliste meetodite rakendusvõimalusi tüüpiliste saasteelementide määramiseks Läänemere riimvees ning vetikates.

3. MATERJALID JA METOODIKA

3.1. Galaktaan- ja vetikapreparaadid

Galaktaanid eraldati punavetikatest *F. lumbricalis*, *C. truncatus* ja *E. cottonii* punktis 3.2 kirjeldatud metoodika alusel. κ -Karraginaani võrdluspreparaadid pärinesid firmadelt Sigma (**I**, **VI**) ja Fluka (**I**, **III**); ι -karraginaani kommerspreparaadid olid samuti Sigma (**VI**) ja Fluka (**II**) päritolu. Agarooosi võrdluspreparaadid hangiti firmadelt Serva (standard EEO, Heidelberg, Saksamaa) (**III**), LKB (keskmine EEO) ja Sigma (tüüp I-A, madal EEO) (**V**). Agarooos punavetikast *A. tobuchiensis* (**V**) oli Eesti Teaduste Akadeemia Keemia Instituudi katsetehase toodang.

Polüsahhariidide ekstraksiooniks kasutatud vetikaliikide päritolust ja mõnedest karakteristikutest annab ülevaate tabel 1. Kassari lahe (Läänemeri, Eesti) vetikaproovid koguti sukeldumistehnikat kasutades, kinnitunud *F. lumbricalis* korjati tormiheitega Läänemerest, *E. cottonii* pärines vetikafarmist Bali saare (India ookean, Indoneesia) lõunarannikul. Punavetikas *C. truncatus* eraldati hoolikalt dominantliiki *F. lumbricalis* sisaldavast vetikasegust (*C. truncatus* osakaal 38% märgmassist). Üldjuhul pesti vetikad hoolikalt kraaniveega, seejärel destilleeritud veega ning kuivatati toatemperatuuril. 2004. aastal (**VI**) kogutud vetikamass pesti kraaniveega ning kuivatati välisõhu temperatuuril. Kui ei ole märgitud teisiti, pärines furtsellaraan vetikaliigi *F. lumbricalis* kinnitumata vormist.

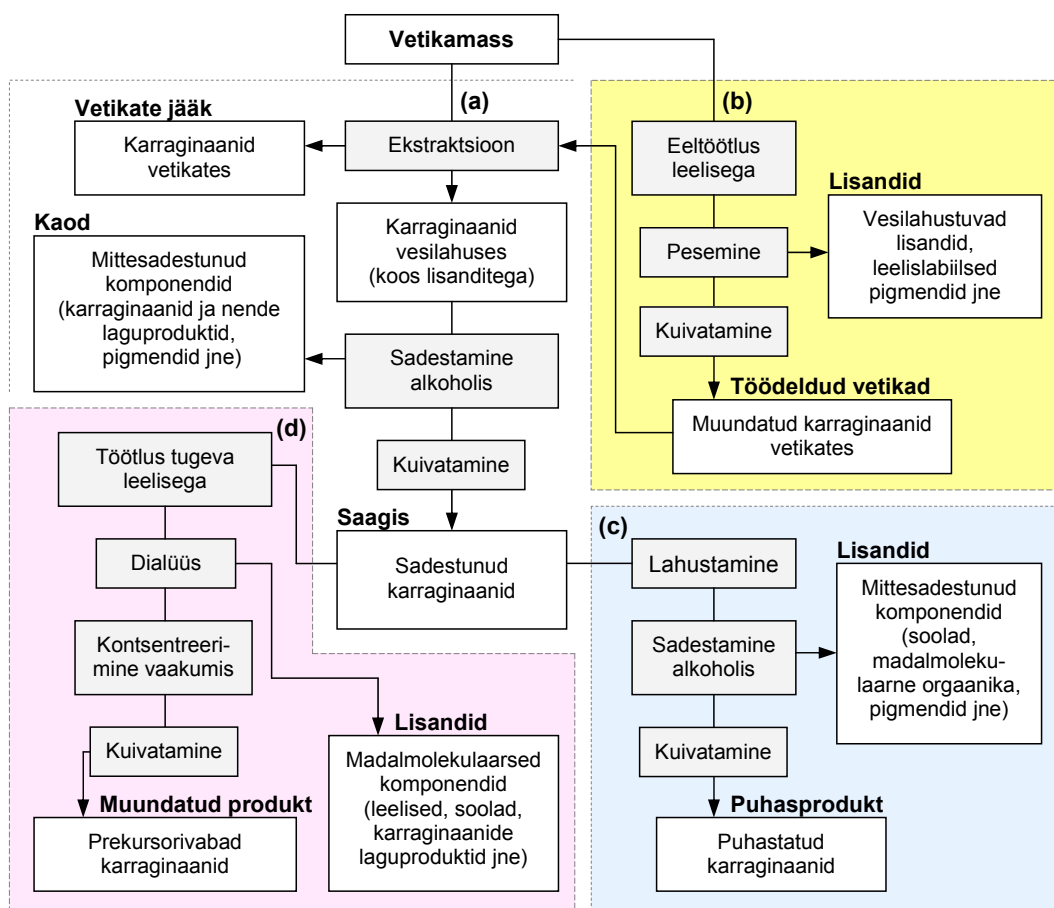
Tabel 1. Karraginaanide ekstraksiooniks kasutatud vetikapreparaatide karakteristikud

Vetikas	Vorm*	Päritolu	Kogumispaik	Kogumise aeg	Sügavus	Viide	
<i>F. lumbricalis</i>	L	Kassari laht	58°40,40' N; 23°01,56' E	August	2004	6–8 m	VI
<i>F. lumbricalis</i>	L	Kassari laht	58°41,60' N; 22°52,00' E	Juuli	2005	8 m	I, III
<i>F. lumbricalis</i>	K	Kakumäe	59°27,72' N; 24°34,44' E	Juuli	2006	rannik	I
<i>C. truncatus</i>	L	Kassari laht	58°41,08' N; 22°50,16' E	August	2007	8 m	II
<i>E. cottonii</i>	K	Bali rannik	8°50,12' S; 115°12,98' E	Juuni	2006	1–3 m	I

* L – kinnitumata vegetatiivne vorm, K – kinnitunud vorm.

3.2. Ekstraktsioon, modifikatsioon ja puhastusprotsess

Galaktaanide eraldamise ja keemilise muundamise etappe illustreerib joonis 4. Kõrgtemperatuurset ekstraktsiooni/modifikatsiooni (joonis 4a) rakendati publikatsioonides I–III ja VI. Reeglina keedeti õhkuiva vetikamassi tagasihajuti all 33-kordses (I–III) massiosas ekstrahendis (destilleeritud vesi, erineva kontsentratsiooniga LiOH, NaOH, KOH, RbOH ja CsOH lahused), kuid kasutati ka vetikate ja ekstrahendi masside suhteid 1:20 ning 1:27 (VI). Suure viskoossusega ekstrakte moodustava *E. cottonii* puhul rakendati masside suhet 1:100. Ekstraktsiooni kestust arvestati keemamineku hetkest. Kuum ekstrakt filtriti läbi poorse klaasfiltri (poorsus P2) külma (7 °C) etanooli (95 mahu-%) või isopropanooli (mõlema puhul 3-kordne ruumala ekstrakti suhtes), kus toimus polüsahhariidi sadestumine. Suurem osa vedelikust eraldati segu filtrimisel läbi paksu nailonkanga (I–III). Seejärel eraldati sadestunud galaktaanid alkoholi ja vee segust filtrimisel läbi poorse klaasfiltri (poorsus P3) ning pesti filtril külma (7 °C) etanooli (95 mahu-%) või isopropanooliga. Eraldatud polüsahhariidide segu kuivatati õhktermostaadis püsiva massini (60 °C, reeglina 2 päeva) ning jahvatati.



Joonis 4. Karraginaanide eraldamisprotsess vetikate biomassist: (a) kõrgtemperatuurset ekstraktsiooni/modifikatsiooni, (b) pikaajalise toatemperatuurset modifikatsiooni, (c) täiendava puhastamise ja homogeniseerimise ning (d) prekursorite eemaldamise etapp.

Preparaatide puhastamiseks ja homogeniseerimiseks (joonis 4c) sadestati (**I**) furtellaraan vajadusel täiendavalt isopropanoolis (3-kordne ruumala 2%-lise polümeerilahuse suhtes), kuivatati seejärel taas 2 päeva 60 °C juures ning jahvatati.

Galaktaaniga seondunud leelislabiilsete valguliste ainete osakaalu vähendamiseks lõpp-produktis viidi läbi (**I**, **VI**) polüsahhariidide pikaajaline toatemperatuurine modifikatsioon (joonis 4b). Selleks hoiti õhkuiva vetikamassi 7 päeva vältel toatemperatuuril 33-kordses (või 25-kordses) leeliselahuses (0,1–0,6 M NaOH või KOH). Seejärel eraldati vetikad lahusest, pesti hoolikalt kraaniveega, seejärel destilleeritud veega ning kuivatati toatemperatuuril. Töödeldud vetikasegu kasutati karraginaanide ekstraktsiooniks (puhtas vees).

Leelislabiilsete karraginaani prekursorstruktuuride (**D2S,6S** ja **D6S** jäägid) osakaalu hindamiseks viidi läbi polüsahhariidide keemiline modifikatsioon (**II**, joonis 4d). Selleks kuumutati polüsahhariidilahust 3 tundi 80 °C juures 1 M NaOH vesilahuses, mis sisaldas 0,5% NaBH₄ ja 0,25% galaktaani. Pärast jahutamist lahus dialüüsiti (molekulmassi läbilaskepiir 12 kDa) bidestilleeritud vees, kontsentreeriti vaakumis ja lüofiliseeriti.

3.3. Keemiline analüüs

AG sisaldus proovides määrati (**I**, **II**, **V**, **VI**) kolorimeetriliselt resortsinool-atsetaal meetodi põhjal, kasutades standardainena fruktoosi (Yaphe, Arsenault 1965). Galaktoosi sisalduse hindamiseks (**II**) kasutati antroonreagenti (Yaphe 1960), suhkru üldsisaldus tuvastati (**I**, **V**) polüsahhariidi eelneva lõhustamiseta fenoolväävelhappe meetodil (DuBois et al. 1956). Püruvaatatsetaali substitutsiooni osakaal määrati (**II**) püroviinamarihappe 2,4-dinitrofenüülhüdrasoonderivaadina (Sloneker, Orentas 1962), väärtust täpsustati Duckworth'i ja Yaphe poolt väljatöötatud meetodi alusel (Duckworth, Yaphe 1970). Metoksürühmade sisaldused tuvastati (**V**) klassikalisel meetodil (Cheronis, Ma 1964) mikrokeemilise aparatuuri abil (Steyermark et al. 1956). Lämmastiku sisaldused proovides määrati (**I**, **II**) Kjeldahli protseduuri järgi. Teiste elementide sisaldused tuvastati (**I**, **II**, **IV**) ICP-OES, ICP-MS, ETAAS ja FAAS meetoditel. Degradatsiooniprotsessil galaktaanmaatriksist vabanenud väavli kogus leiti (**II**) kromatograafiliselt (Karlsson, Singh 1999). Tuhasus määrati eelnevalt kuivatatud preparaate kaalutistest pärast kuumutamist muhvelahjus 6 tunni vältel 550 °C juures.

3.4. Spektroskoopilised meetodid

Karraginaanide FTIR spektrid võeti (**I**, **II**, **V**, **VI**) PerkinElmer FTIR System Spectrum BX spektromeetriga (12 skaneeringut spektri kohta; nominaalne resolutsioon 4 cm⁻¹) õhukestest (ligikaudu 0,015 mm) polümeerikiledest, mis saadi vee aeglasel aurumisel 1%-listest galaktaanlahustest polüstüreenist Petri tassidel toatemperatuuril. Spektrid salvestati piirkonnas 4000–370 cm⁻¹.

^{13}C -NMR analüüsid teostati firma Bruker spektromeetriga sagedusel 500 MHz (**III**, **V**) või 800 MHz (**I**, **II**). Spektrid võeti 2–4% karraginaanilahusest (lahusti D_2O) temperatuuril 40–85 °C, enne Fourier' transformatsiooni koguti kuni 100 000 skaneeringut. Keemilised nihked teisendati tetrametüülsilaani skaalale (**II**, **III**, **V**) galaktoostsükli C-6 süsiniku signaali järgi, kasutades sellele süsiniku aatomile vastavat nihkeväärtust 61,3 ppm (Usov, Shashkov 1985) või DSS skaalale (**I**) C-6 süsiniku signaali 63,49 ppm alusel (van de Velde et al. 2004). Dissertatsioonis on spektrid esitatud DSS skaalal.

Optilised tihedused mõõdeti (**III**) termostateeritud Shimadzu UV-1601 spektrofotomeetriga lainepikkusel 260 või 400 nm vee suhtes. Kuum (≈ 90 °C) galaktaansool sisestati 2-mm läbimõõduga küvetti, küvett suleti ja hoiti proovi stabiliseerumiseks termostateeritud küvetihoidjas 5 min 95 °C juures. Seejärel, neelduvust pidevalt mõõtes, alandati temperatuur aeglaselt (0,5 °C/min) 20 °C juurde ning hoiti sellel temperatuuril 50 min.

3.5. Eksklusioonikromatograafia

Karraginaanide SEC analüüsiks (**I**, **II**) kasutati kromatograafi süsteemi, mis koosnes PerkinElmer Series 200 pumbast, Knauer Smartline 2300 refraktomeetrilisest detektorist, Knauer Smartline kolonnitermostaadist, kahest järjestikku ühendatud Shodex OHpak SB-806MHQ kolonnist ning Shodex OHpak SB-G eelkolonnist. Eluendina kasutati 0,1 M NaNO_3 vesilahust voolukiirusel 0,8 ml/min. Kaliibrimiskõver koostati dekstraani (668, 410, 273, 148, 80,9, 48,6, 23,8, 11,6, 5,2, 1,3 kDa) või pullulaani (788, 404, 212, 112, 47,3, 22,8, 11,8, 5,9, 1,32, 0,342 kDa) standardite põhjal, retentsiooniruumalad parandati sisestandardina kasutatud etüleen-glükooli (0,01% sisaldus proovis) vastava väärtuse (22,89 ml) järgi. Kaliibrimiskõverate võrrandid olid järgmised: $\log M_w = 0,02 x^2 - 1,3503 x + 22,361$ dekstraani ($R^2 = 0,9987$) ning $M_w = -0,0205 x^2 + 0,1981 x + 7,5575$ pullulaani ($R^2 = 0,9995$) standardite puhul (M_w , keskmine molekulmass; x , retentsiooniruumala). Uuritava karraginaanproovi protsendilisus oli 0,07% ning süsteruumala 100 μl . Dissertatsioonis esitatud M_w väärtused on antud pullulaani suhtes.

Usaldusväärsemate tulemuste saamiseks kasutati proovi lahustamiseks sama eluenti (0,1 M NaNO_3), mida rakendati SEC süsteemis. Polümeerpreparaatide paremaks lahustamiseks hoiti soole üleöö 35 °C juures loksutusinkubaatoris. Proovide lõplikuks lahustamiseks kuumutati neid 10 min tugevalt segades keeval vesivannil. Seejärel kuum (60 °C) sool filtriti läbi 0,45 μm poorsusega membraani (Spartan 30/0,45RC), lasti jahtuda ning süstiti HPLC süsteemi.

3.6. Geeli uurimine

Geelitugevuse hindamiseks konstrueeriti poolkerakujulise otsikuga (ristlõike pindala 1 cm^2) varustatud seade. Mõõtmised teostati (**I–III** ja **VI**) 1–2% geelide puhul, mis saadi kuiva galaktaani lahustamisel kuumas vees (või soolalahuses) 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; geeli pinda rõhuva raskuse ühtlane suurenemine (350 g/min) tagati vee juurdevoolu abil. Kui ei ole märgitud teisiti, vastavad geelitugevused 1,5% geelidele. Üldjuhul tähistavad disertatsiooni protsendilisused massiprotsente.

1,5% geeli sulamistemperatuur (geelistunud 4 tundi 20 °C juures) defineeriti (**I**, **III**) kui minimaalne temperatuur, mille juures 4 mm läbimõõduga tinahelms (mass 0,22 g) langes läbi suletud katseklaasis (9x100 mm) oleva sulava geelisamba. Selleks kuumutati katseklaasi aeglaselt (1,0 °C/min) vesivannil. Seejärel jahutati sulanud geeli aeglaselt (1,0 °C/min) ning katseklaasi pöörati vesivannilt eemaldamata korra minutis horisontaalasendisse. Geelistumistemperatuur defineeriti (**I**, **III**) kui temperatuur, mille juures geel katseklaasis enam ei voolanud. Geeli sulamis- ja geelistumistemperatuuride määramiseks teostati kaks paralleelkatset.

Sünereesi hindamiseks (**I**) eraldati geelist vabanenud vesi Hettich ROTINA 38R tsentrifuugi abil. Tsentrifugitopsid täideti kuuma 1,5% galaktaansooliga, anumatel lasti 2 tundi avatult seista, misjärel topsid suleti ning hoiti 7 päeva 25 °C juures. Seejärel tsentrifuugiti geele 4500 p/min juures 15 min. Eraldunud vesi kaaluti ning väljendati protsendilise suhtena geelis sisalduva vee koguse suhtes.

3.7. Skaneeriv elektronmikroskoopia

Elektronmikroskoopia uuringud viidi läbi (**I**, **III**) kõrglahutusliku LEO Supra 35 elektronmikroskoobi abil, mis oli varustatud Röntec EDX XFlash 3001 detektori ja Thermo Noran Maxray ER Parallel Beam spektromeetriga. Preparaatide valmistamiseks sukeldati eelkuumutatud (90–95 °C) roostevabast terasest või vasest kapillaartorud (sisediameetrid vastavalt 2,0 mm ja 1,2 mm, pikkus 60 mm) kuuma (90–95 °C) 1,5–2% galaktaansooli ning lasti neil vedelikuga täituda. Pärast lahuse geelistumist (temperatuuril 20 °C 4 tundi) suleti toru otsad tihedalt. Seejärel kuumutati eelmainitud viisil töödeldud torusid vesivannil 98 °C juures 30 min ning jahutati aeglaselt (0,5 °C/min) 20 °C juurde. Jahutamise käigus eemaldati preparaadid soovitud temperatuuril vesivannilt ning külmutati vedelas lämmastikus geeli formeerumise erinevatel etappidel (temperatuuridel 90–20 °C). Torud murti külmunud olekus (krüomurre) kahest kohast ning saadud väikeste 5 mm pikkuste avatud otstega ja külmunud geeliga täidetud preparaadid lüofiliseeriti –60 °C juures. Formeerunud krüogeensed geelide murdepinnad kaeti umbes 1 nm paksuse plaatinakihi (Polaron High Resolution Sputter Coater SC7640) ning preparaate uuriti elektronvoo kiirenduspingel kuni 2,47 kV.

4. TULEMUSED JA ARUTELU

4.1. Saagised ja ekstraktsioonidünaamika

Ekstraktsioonisaagised ja karraginaanide omadused sõltuvad olulisel määral kasutatud vetikatoormest, vetika arengustaadiumist, galaktaanide eraldamismeetoditest, ekstraktsiooni kestusest ja ekstrahendist. Kuigi puhas vesi võimaldab furtsellaraani vetika kudedest efektiivselt eraldada (VI), on galaktaanide lahutamine alkoholi ja vee segust problemaatiline seoses madala katioonide sisalduse tingimustes formee-ruva halvasti filtreeruva polüsahhariidheljumi tekkega.

Punavetika *F. lumbricalis* biomassist eraldatud karraginaanide kogusaagised (8-tunnise protsessi puhul) jäid reeglina 30% juurde (VI). Juba esimese kahe tunni jooksul oli vetikatoormest ekstraheerunud küllaltki suur osa galaktaanidest (enamasti rohkem kui 50% kogusaagisest). Suhteliselt suuri saagiseid võivad anda ka lühemad kui 4-tunnised ekstraktsiooniajad, kui seejuures on välditud polüsahhariidahelate olulist destruktiooni.

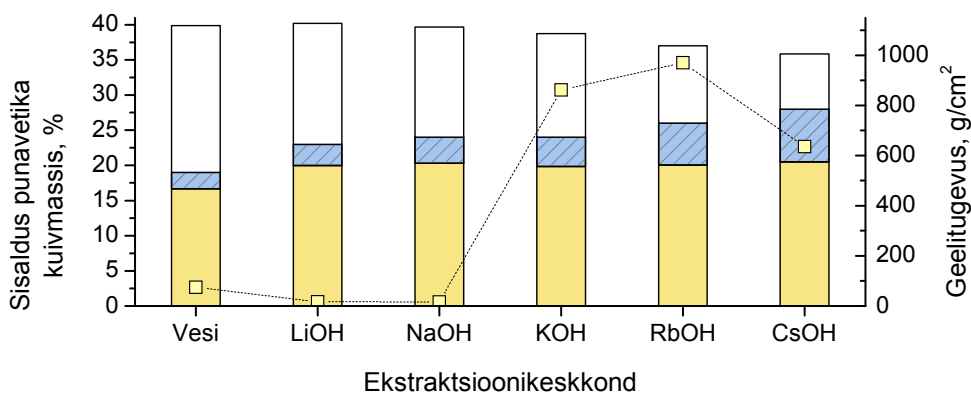
Kuna ekstraktsioon 0,02 M leelisekontsentratsiooniga ekstraktsioonikeskkonnas andis suurima geelitugevusegaprodukte (VI), kasutati peamiselt seda leelise kontsentratsiooni karraginaanide kõrgtemperatuurseks eraldamiseks vetikamassist. Sõltuvalt sel kontsentratsioonil ekstraktsioonikeskkonnas esinevast leelismetallhüd- roksiidist kasvasid furtsellaraani saagised reas Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ ja Cs^+ vastavate väärtustega 23%, 24%, 24%, 26% ja 28% (ekstraktsiooni kestusel 4 tundi). Märkatav erinevus ekstraktsioonisaagistes ei tulene mitte üksnes tugevama leelise paremast ekstraktsioonivõimest, vaid on seotud ka erinevate vetikamassi ning polü- sahhariidi tasemel toimuvate protsessidega. Geelistumist soodustavate katioonide esinemine ekstraktsioonikeskkonnas viib alkoholsadestamisel kergesti eraldatava mahuka sademe tekkeni, mis võimaldab vähendada ekstraktsioonikadusid (joonis 5).

Karraginaanide saagiseid mõjutab oluliselt ka ekstraktsiooniprotsessil polüsahha- riidmaatriksiga seondunud anorgaaniliste katioonide osakaal. Furtsellaraanmaatriksi puhul, mille negatiivne kogulaeng seob K^+ -ioone 5% ulatuses ning polüsahhariidi K^+ -vormi saagis on 24%, omaksid saagised täieliku ionvahetuse korral järgmisi väärtusi: 23,0% (Li^+ -vorm), 23,5% (Na^+ -vorm), 25,4% (Rb^+ -vorm) ja 26,9% (Cs^+ - vorm). See on kooskõlas nende preparaatide tuhasustega (vt punkt 4.2.2). Li^+ , Na^+ , K^+ ja Rb^+ puhul esineb hea positiivne sõltuvus ($R^2 = 0,9997$) tuhasuse ja arvu- tuslikult leitud (teoreetiliste) saagiste vahel, polüsahhariidi Cs^+ -vormile vastavad väärtused aga vähendavad nimetatud korrelatsiooni märgatavalt ($R^2 = 0,9903$). Viimane annab tunnistust asjaolust, et furtsellaraanmaatriksi võime siduda Cs^+ - ioone on teoreetilisest mõnevõrra väiksem.

Tegelike ekstraktsioonisaagiste väärtustest selgub, et suuremad saagised raskemate leelismetallioonide juuresolekul on peamiselt tingitud viimaste suuremast aatom- massist. Seega annab vetikate ekstraktsioon erinevates madala kontsentratsiooniga leeliselahustes lähedase orgaanika sisaldusega produkte (joonis 5). Samuti on mada-

lamate ekstraktsioonikadude esinemine tugevamate leeliste kasutamisel selgitatav raskemate leelismetallioonide absorptsiooniga vetikate jääkmassis.

Galaktaanide sisaldusele võib olulist mõju avaldada vetika arengustaadium. Furt-sellaraanile lähedase struktuuriga Kaug-Ida punavetika *Tichocarpus crinitus* polüsahhariidide puhul on täheldatud nende sisalduse olulist erinevust taime vegetatiivses (21%) ja reproduktiivses (37%) vormis (Barabanova et al. 2005). Vee madala soolsuse tõttu esineb Eesti territoriaalvetes peamiselt *F. lumbricalis* vegetatiivne vorm.



Joonis 5. Karraginaanide ekstraktsiooni punavetikast *F. lumbricalis* iseloomustavad karakteristikud. Galaktaane ekstraheeriti 4 tundi 0,02 M leelismetallhüdrosiidi lahuses või puhtas vees. (■) A, eraldatud polüsahhariidi tuhasus; (■) B, arvutuslikult leitud orgaanika sisaldus ($B = S - A$; S, saagis); (□) C, ekstraktsioonikaod ($C = 100 - R - S$; R, vetikate jääkmassi protsent pärast ekstraktsiooni); (- □ -) 1,5% galaktaangeelide geelitugevus (parempoolne skaala).

Leiti, et punavetika *F. lumbricalis* kinnitunud ja kinnitumata vormi iseloomustavad märgatavalt erinevad ekstraktsioonisaagised. Kui kinnitumata vorm annab 4 tundi kestva ekstraktsiooni korral polüsahhariidide saagiseks kõigest 19%, siis kinnitunud vormi puhul on see näitaja 32% (I). *F. lumbricalis* kinnitunud vormi korral on kirjeldatud suhteliselt kõrgeid saagise väärtusi, mis võivad ületada ka 50% (Knut-sen, Grasdalen 1987; Yu et al. 2007). Nimetatud vetikaliigi puhul ei ole aga täheldatud saagise sesoonset varieeruvust (Knut-sen, Grasdalen 1987).

Kassari vetikaplasti teist dominantliiki, punavetikat *C. truncatus*, iseloomustab suhteliselt madal galaktaanide sisaldus. Selle vetikaliigi puhul annab suurimaid saagiseid (17%) ekstraktsioon puhtas vees, väiksemad saagised (12%) esinevad ekstraktsioonil kuumas leeliselahuses (0,02 M KOH, ekstraktsiooni kestus 4 tundi) (II). Vesiekstraheeritud polüsahhariidide sadestamiseks kasutatud alkoholi ja vee segu aurutamine näitas, et filtrimisjärgselt jäi eraldamata märgatav kogus (4% kasutatud vetikasegu massist) kuumas vees lahustuvatest komponentidest. Seega võib eeldada, et kõnealuse vetikaliigi galaktaanide sisaldus on ligikaudu 20%.

On täheldatud punavetika *C. truncatus* galaktaanide sisalduse sesoonset varieeruvust; kirjanduse andmetel jäävad ekstraktsioonisaagised selle liigi puhul 11–20% juurde, kuid külmal aastaajal kogutud vetikapreparaatide puhul on kirjeldatud ka saagiseid 1–2% (Mathieson et al. 1984; Truus et al. 1997). *C. truncatus* madalaid ekstraktsioonisaagiseid on selgitatud selle vetikaliigi morfoloogiliste iseärasustega (nt paks koorkiht) (Truus et al. 1997). Käesoleva töö tulemused seda aga ei kinnita, sest polüsahhariidide eraldamiseks kasutatud vetikate jääkmassi täiendav ekstraktsioon andis madalaid saagiseid (0,2–0,3%) (II).

Suure töendusliku väärtusega karraginofüüt *E. cottonii* annab märkimisväärselt kõrgeid saagiseid, mis üldjuhul ületavad Kassari koosluse punavetikate vastavaid näitajaid enam kui kaks korda. Nimetatud punavetikaliik annab karraginaanide saagiseks 61% ekstraktsioonil 4 tundi puhtas vees, mõnevõrra väiksem saagis (57%) esineb 0,02 M KOH lahuse kasutamisel ekstraktsioonikeskkonnana. Madalamaid saagiseid leeliselise ekstraktsioonikeskkonna kasutamisel on kirjeldatud ka teiste *Eucheuma* liikide puhul (Freile-Peegrín et al. 2006).

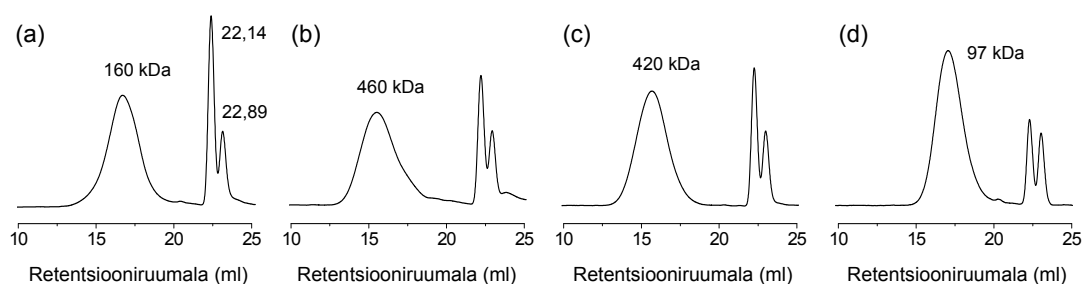
4.2. Keemiline koostis ja molekulaarstruktuur

Vetikagalaktaanide struktuuri uuriti ¹³C-NMR ja FTIR spektroskoopia vahendusel. Polüsahhariide iseloomustati ICP-OES, ETAAS ja keemiliste meetoditega võrdluses tuntud karraginaani ja agarooosi preparaatidega.

FTIR uuringud (I, II, VI) kinnitasid, et mõlemast Kassari vetikaplasti dominantliigist pärinevad galaktaanid kuuluvad sulfaaditud polüsahhariidide rühma. Kolorimeetrilise analüüsi tulemused näitavad, et galaktoosi sisaldus mõlema vetikaliigi polüsahhariidides on sarnane ($40 \pm 1\%$ furtsellaraanis ning $38 \pm 1,5\%$ *C. truncatus* galaktaanide koostises), AG sisaldus aga küllaltki erinev (väärtused vastavalt $29 \pm 1\%$ ja $20 \pm 1,5\%$). Lisaks tuvastati *C. truncatus* polüsahhariidide koostises püruvaadi esinemine, mille 0,5%-line sisaldus näitab, et tegemist on mõõdukalt püruvaaditud galaktaaniga. Suhkru üldsisalduseks määrati (koos sulfaadiga) furtsellaraani puhul $90 \pm 3\%$, *C. truncatus* galaktaanide puhul oli see näitaja mõnevõrra väiksem ($86 \pm 3\%$). Lisaks sahhariidsetele komponentidele esines mõlema galaktaanpreparaadi koostises rikkalik mineraalne osa (vt punkt 4.2.2).

Leelislabiilsete prekursorstruktuuride esinemisest andis kinnitust suurem AG sisaldus 0,02 M KOH lahuses ekstraheeritud preparaatide puhul (võrreldes puhtas vees ekstraheeritud preparaadiga 1,6% võrra suurem furtsellaraani ning 2,1% võrra suurem *C. truncatus* galaktaanide korral). Prekursorstruktuuride osakaalu määramiseks rakendati galaktaanide leelismodifikatsiooni NaBH₄ juuresolekul. Sellisel viisil modifitseeritud polüsahhariide iseloomustas oluliselt suurenenud AG sisaldus, mis ületas esialgset väärtust furtsellaraani puhul 3,6% võrra ning *C. truncatus* polüsahhariidide korral 4,8–6,7% võrra. Modifitseeritud preparaatide AG sisaldused olid lähedased vastavates Sigma (κ-karraginaan, 32,3% AG; ι-karraginaan, 26,5% AG) ja Fluka (ι-karraginaan, 28,3% AG) kommertspreparaatides leituga.

Joonisel 6 on esitatud töös uuritud vesiekstraheeritud galaktaanide molekulmassi jaotused. Galaktaanide M_w väärtused jäid pullulaani kalibratsiooni kasutades oluliselt madalamaks võrreldes vastavate dekstraani alusel väljendatud M_w näitajatega. Kuna see on tõenäoliselt tingitud dekstraani molekulide hargnenud ehitusest, mis ei vasta uuritud karraginaanide struktuuritüübile, siis esitati töös M_w väärtused lineaarse ahelaga pullulaani järgi. Punavetikate *C. truncatus* ja *E. cottonii* galaktaanide M_w väärtused olid sarnased, furtsellaraani polümerisatsiooniate jäi aga eelmainitute ligi kaks korda väiksemaks ning oli lähedasem *A. tobuchiensis* polüsahhariidide vastavale näitajale (joonis 6). Kui furtsellaraani M_w väärtusi võivad oluliselt mõjutada ekstraktsiooniparameetrid, siis *C. truncatus* galaktaanide puhul sellist sõltuvust ei täheldatud (vt punkt 4.4.2).



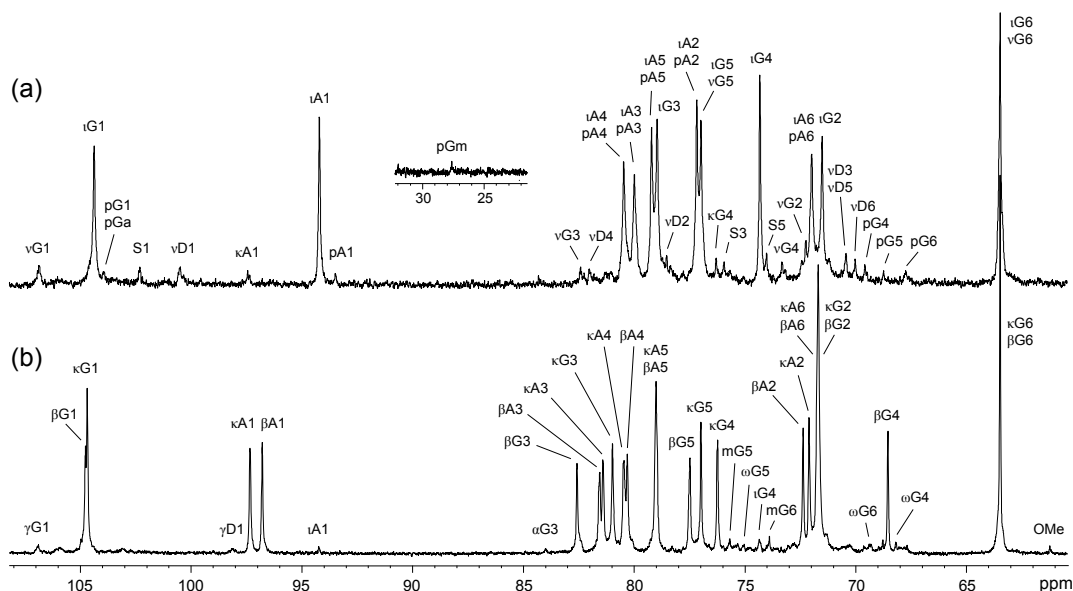
Joonis 6. Vesiekstraheeritud galaktaanide eksklusioonikromatograafia profiilid. Polüsahhariidide allikas: (a) *F. lumbricalis*, (b) *C. truncatus*, (c) *E. cottonii* ja (d) *A. tobuchiensis*. Piik retentsiooniruumalal 22,89 ml vastab sisestandardina kasutatud etüleen-glükoolile. Piik 22,14 ml juures tuleneb NaNO_3 kontsentratsiooni väikesest erinevusest süstelahuse ja HPLC eluendi vahel.

4.2.1. Kassari vetikakoosluse galaktaanide struktuur

Kassari vetikakoosluse dominantliikidest pärinevate galaktaanide ^{13}C -NMR spektrid on esitatud joonisel 7 ning nende peamiste signaalide nihkeväärtused on toodud joonisel 8.

Läänemere *F. lumbricalis* galaktaanide põhikomponendid on **G** ($15 \pm 1\%$), **G4S** ($36 \pm 1,5\%$) ja **DA** ($29 \pm 1\%$) jäägid, mis annab tunnistust κ/β -karraginaani (**G4S-DA/G-DA**) esinemise kohta. Väiksemas koguses esines γ -karraginaanile (**G-D6S**) iseloomulikke **D6S** ($6 \pm 0,5\%$) jääke, minoorse komponendina tuvastati ω -karraginaanist (**G6S-DA**) pärinevaid **G6S** jääke ning **G6M** segmente. ^{13}C -NMR spektrid viitasid ka võimalikule α -karraginaani segmentide (**G-DA2S**) esinemisele proovis. Samuti näitasid spektrid väikese koguse ι -karraginaani olemasolu. Viimane pärines tõenäoliselt Kassari vetikaplasi teisest dominantliigist *C. truncatus*, mis moodustab punavetika *F. lumbricalis* biomassiga läbipõimunult raskesti eraldatavaid segusid. Seda oletust kinnitab ka asjaolu, et ι -karraginaani segmente ei leitud kinnitunud *F. lumbricalis* vormi galaktaanidest.

F. lumbricalis kinnitunud ja kinnitumata vormi galaktaanides esines prekursorstruktuure (**D6S**) ligikaudu võrdsetes kogustes. Oluliselt suuremaid γ -karraginaani sisaldusi on aga leitud soolasema veega keskkondadest pärinevate kinnitunud *F. lumbricalis* vormide polüsahhariididest (Knutzen, Grasdalen 1987). Uuritud erineva päritoluga furtsellaraanpreparaatide ainsaks arvestatavaks struktuurierinevuseks oli märgatavalt kõrgem **G6S** jääkide sisaldus vetika kinnitunud vormi galaktaanides (**I**).

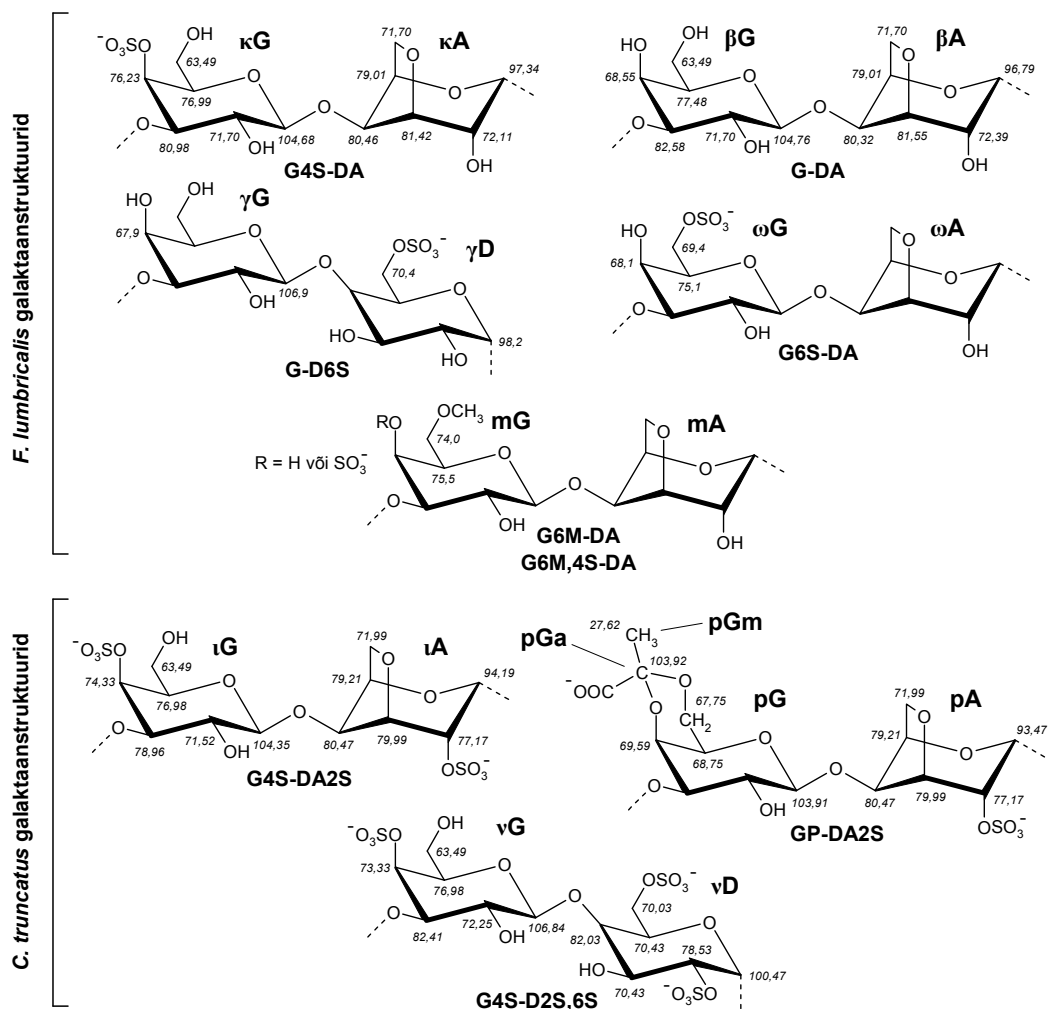


Joonis 7. Kassari vetikakooslusest pärinevate vesiekstraheeritud galaktaanide ^{13}C -NMR spektrid. (a) *C. truncatus* galaktaanid, 38 000 skaneeringut, mõõdetud 40 °C juures; (b) *F. lumbricalis* galaktaanid, 100 000 skaneeringut, mõõdetud 50 °C juures. S – florideetärklisest pärinevad glükoosijäägid. Teised tähised ja signaalide nihkeväärtused on esitatud joonisel 8.

C. truncatus polüsahhariidide põhikomponendid on **G4S** ($44 \pm 2\%$) ja **DA2S** ($30 \pm 1,5\%$) jäägid, mis annab tunnistust ι -karraginaani (**G4S-DA2S**) esinemise kohta. Väiksemates kogustes esines ν -karraginaani (**G4S-D2S,6S**) iseloomulikke leelislabiilseid **D2S,6S** ($12 \pm 2\%$) jääke ning püruvaaditud α -karraginaanist (**GP-DA2S**) pärinevaid **GP** (1,4%) segmente. Kuigi **GP** jäägid esinevad sagedamini agari tüüpi polüsahhariidide koostises, võib neid väikestes kogustes sisalduda ka paljudes keeruka koostisega karraginaansegudes (Stevenson, Furneaux 1991). Lisaks näitas ^{13}C -NMR spekter ka punavetikast *F. lumbricalis* pärinevate κ - ja β -karraginaanide (**G4S-DA**; **G-DA**) olemasolu preparaadis.

Võrdlusemärgil tuvastati ka mõnede teiste galaktaanpreparaatide struktuurid (**I**, **III**, **V**). *E. cottonii* polüsahhariidide ^{13}C -NMR spektrid kinnitasid, et selle galaktaani põhikomponendiks on κ -karraginaan (**G4S-DA**), väiksemates kogustes esines ka **DA2S**, **D6S**, **D2S,6S** ja **G6M** jääke (**I**). Sigma κ -karraginaani komertspreparaat ei sisaldanud prekursorstruktuure, kuid selles esinesid minoorse

lisandina **DA2S** ja **G6M** jäägid (**I**). *A. tobuchiensis* galaktaanid olid keemiliselt ehituselt agarid, mis sisaldasid **G** (58%), **LA** ($30 \pm 3,5\%$), **LA2M** ($8 \pm 1\%$) ning **G6S** jääke (**V**). Teiste uuritud agarospreparaatide puhul esinesid metoksurühmad peamiselt galaktoostsükli C-6 asendis (**G6M** jäägid) (**III**, **V**).



Joonis 8. Galaktaanstruktuurid Kassari vetikaplasi dominantliikides. Kaldkirjas esitatud numbrid tähistavad ^{13}C -NMR nihkeväärtusi.

Kassari vetikakooslusest pärineva punavetika *F. lumbricalis* galaktaane iseloomustab furtsellaraani kohta suhteliselt kõrge väävlisisaldus (keskmiselt $5,3\%$ S). Seega on uuritud furtsellaraani molekuli iga neljas monosahhariidjääk sulfaaditud (**I**). Kirjandusandmete põhjal jääb selle vetikaliigi galaktaanide väävlisisaldus üldjuhul vahemikku $2,7$ – $6,3\%$ (Bird et al. 1991). Varasemad uuringud Kassari vetikaplasi karraginaanide alal on andnud tunnistust furtsellaraani suhteliselt madalast väävlisisaldusest ($2,7$ – $3,3\%$) (Truus et al. 1997), hiljem on samast toormest pärineva

polüsahhariidsegu puhul leitud aga selle elemendi sisaldusi kuni 6,1% (Laos, Ring 2005).

C. truncatus galaktaanide väävlisisaldus (keskmiselt 8,6% S) jääb märgatavalt alla ι -tüüpi karraginaanide näitajale (**II**). Ka varem on selle elemendi madalaid sisaldusi (6,3–7,4%) leitud Läänemere *C. truncatus* galaktaanide koostisest (Truus et al. 1997; Mikulich, Kopytov 2002) ning nimetatud vetikaliigi gametofüütsetest polüsahhariididest (ligi 6% S) (McCandless et al. 1982). *C. truncatus* sporofüüt-vormide karraginaanides seevastu on tuvastatud väävlisisaldusi üle 10% (McCandless et al. 1982).

Mõlema Kassari vetikaplasti dominantliigi galaktaanide puhul täheldati väävlisisalduse mõningast sõltuvust nende polüsahhariidide eraldamiseks kasutatud keskkonnast. Üllatuslikult sisaldasid leeliselises keskkonnas ekstraheeritud preparaadid väävlit võrreldes vesiekstraheeritud proovidega mõnevõrra rohkem. Nimetatud nähtust käsitletakse detailsemalt punktis 4.2.2.

Vesiekstraheeritud *E. cottonii* galaktaanide väävlisisaldus jäi κ -karraginaani vastava teoreetilise karakteristiku lähedale ning oli Sigma κ -karraginaani kommertspreparaadi näitajast oluliselt kõrgem. Viimase väiksem väävlisisaldus on selgitatav selle preparaadi koostises esineva mineraalse komponendi suurema osakaaluga. Võrreldes karraginaanidega on liigi *A. tobuchiensis* galaktaanide väävlisisaldus väga väike (0,2%), samas on nimetatud väärtus agari tüüpi polüsahhariidide jaoks selle elemendi sisalduse ülemiseks piiriks (**V**).

Mõlema Kassari vetikaplasti dominantliigi galaktaanide suhteliselt kõrge lämmastikusisaldus näitab arvestatava koguse valguliste lisandite jäämist preparaatidesse (**I**, **II**). See on tõenäoliselt tingitud kõnealuste punavetikate kõrge proteiinisisaldusest, mis *F. umbricalis* puhul jääb üldjuhul vahemikku 13–25% vetika kuivmassist (Krasil'nikova et al. 1972; Indergaard, Knutsen 1990), *C. truncatus* korral on selleks näitajaks 16–20% (Mathieson et al. 1984). On viiteid, et nimetatud valgulisi lisandeid ei ole võimalik furtsellaraanmaatriksist eraldada polüsahhariidi ümbersadestamise, geelfiltratsiooni ega elektroforeesi teel (Krasil'nikova, Medvedeva 1975). *C. truncatus* galaktaanide kõrge lämmastikusisaldus viitab, et analoogne tendents võib esineda ka selle vetikaliigi polüsahhariidide puhul. Võrreldes furtsellaraaniga oli *E. cottonii* galaktaanide lämmastikusisaldus enam kui kaks korda madalam ning jäi lähemale Sigma κ -karraginaani kommertspreparaadi vastavale näitajale. Leiti, et galaktaanmaatriksiga seondunud lämmastiku kogus ei sõltu oluliselt ekstraktioonitingimustest (**I**, **II**).

Sageli võib puhastamata furtsellaraanpreparaatidest leida märkimisväärses koguses punavetikate peamist varuainet, florideetärklist (Knutsen, Grasdalen 1987). See on selgitatav nimetatud glükaani kõrge sisaldusega punavetika *F. lumbricalis* kudedes (Bird et al. 1991). Siiski ei tuvastatud florideetärklist furtsellaraanis ega ka vetikast *E. cottonii* eraldatud galaktaanpreparaatides (**I**). Kõnealust polüsahhariidi esines aga arvestatavas koguses punavetikast *C. truncatus* vesiekstraktsioonil eraldatud proovides (**II**), vähem leidus seda leelisekstraheeritud preparaadis ning Sigma κ -karraginaani kommertspreparaadis.

4.2.2. Mineraalne komponent

Karraginaanide mineraalse osa spetsiifika sõltub suuresti negatiivse laenguga sulfaatrühmade ja teatud metallioonide vastastikusest interaktsioonist. Vesiekstraheeritud furtsellaraani iseloomustab κ -tüüpi karraginaani kohta suhteliselt madal tuhasus (12,3%). Furtsellaraani puhul andis ekstraktsioonikeskkonnana madala kontsentratsiooniga (0,02 mol/l) leelismetallhüdrosiidi vesilahuste kasutamine produkte, mille tuhasused kasvasid Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ ja Cs^+ -vormi puhul vastavalt reas 13,2, 15,4, 17,3, 22,9 ja 26,8%. Sigma κ -karraginaani kommertspreparaadi tuhasuse väärtus (24,9%) jäi seda tüüpi galaktaanide jaoks tüüpilisse piirkonda.

Kassari vetikaplasti mõlemat dominantliiki iseloomustab madal Na^+ ja K^+ sisaldus, nende kationide kontsentratsioon troopilise punavetika *E. cottonii* kudedes on seevastu oluliselt kõrgem (**I**, **II**). Vastupidine olukord esineb kahevalentsete kationide Mg^{2+} ja Ca^{2+} puhul, mida leidub rohkem Läänemere punavetikates *F. lumbricalis* ja *C. truncatus*. Eelmainitud elementidest leidub Läänemere riimveelises keskkonnas karraginaanide geelistumist soodustavaid K^+ - ja Ca^{2+} -ioone mõnevõrra madalamates kontsentratsioonides (**IV**) (tabel 2).

Punavetikate *F. lumbricalis* ja *C. truncatus* koostisse kuulub rikkalik mineraalne komponent. Mõlemad liigid sisaldavad märkimisväärtes kogustes rauda ja mangaani, mille sisaldused ületavad *E. cottonii* biomassis määratud väärtusi 50–80 korda (tabel 3). Mikroelementide sisaldusele avaldab olulist mõju vetika kasvukoht. Hoolimata nimetatud elementide kontsentratsioonide suurest varieeruvusest vetika kudedes on nende määramiseks võrdselt hästi rakendatavad nii AAS kui ka ICP-OES meetodid (**IV**). Kuna merevee ja vetikate mikroelementide sisalduse vahel esineb halb korrelatsioon, on merekeskkonna usaldusväärne iseloomustamine vetikamassi alusel problemaatiline (**IV**).

Galaktaanmaatriksi võime siduda teatud katioone selgub elemendi sisalduste suhtest vetikas ja vesiekstraheeritud polüsahhariidis (rikastusfaktor üleminekul vetikast polüsahhariidi). Samuti annab see mõningast infot elementide lokaliseerimise kohta vetikas (kas peamiselt polüsahhariidkomponendis või mujal). Galaktaanmaatriksi katioonne afiinsus sõltub olulisel määral konkreetse polüsahhariidi struktuurist. Liikide *F. lumbricalis* ja *E. cottonii* galaktaanide puhul on märgatav polüsahhariidi rikastumine K^+ -ioonidega, punavetika *C. truncatus* ι -tüüpi karraginaane iseloomustab märgatav afiinsus kahevalentsete kationide Mg^{2+} , Ca^{2+} ning Ba^{2+} suhtes (tabelid 2 ja 3). Teisest küljest on vetikapolüsahhariidide afiinsus mõnede tüüpiliste toksiliste saastelementide (nt kaadmium ja arseen) suhtes väga väike; *E. cottonii* biomassis leidub ligi 60 korda rohkem arseeni kui samast vetikast eraldatud galaktaanides, vetika *F. lumbricalis* puhul on selleks näitajaks 8,8. Selle väärtusega võrreldes leidis troopilise vetikaliigi *E. cottonii* biomassis mõningaid mikroelemente oluliselt väiksemates kontsentratsioonides. Nimetatu on tõenäoliselt tingitud mineraalse osa ebaühtlasest jaotusest nimetatud vetikamassis.

Tabel 2. Mõnede elementide sisaldused uuritud vetikate, karraginaanide ja merevee proovides

Preparaat	Elemendi sisaldus (%)						
	Na	K	Mg	Ca	N	P	S
<i>F. lumbricalis</i> *	0,050	0,32	0,76	1,73	4,18	0,23	4,09
<i>C. truncatus</i> *	0,020	0,09	0,55	3,44	3,23	0,09	4,99
<i>E. cottonii</i> *	1,04	3,40	0,66	0,89	1,32	0,08	5,95
GW <i>F. lumbricalis</i> **	0,045	0,62	0,87	1,82	0,70	0,07	5,22
GA <i>F. lumbricalis</i> **	0,049	4,98	0,24	0,83	0,66	0,03	5,37
GL <i>F. lumbricalis</i>	0,040	0,72	0,55	3,32	0,76	0,02	5,26
GW <i>C. truncatus</i>	0,021	0,11	0,87	4,33	0,73	0,11	8,44
GA <i>C. truncatus</i>	0,041	6,19	0,22	2,86	0,82	0,09	8,66
GW <i>E. cottonii</i>	1,10	4,11	0,75	0,94	0,32	0,02	7,50
GA <i>E. cottonii</i>	0,55	10,37	0,10	0,66	0,50	0,02	8,24
κ-karraginaan (Sigma)	0,59	6,15	0,16	2,71	0,10	0,01	7,19
Elemendi sisaldus (mg/l)							
Merevesi***	1571	64	210	83	x	x	x

Tähistused on toodud tabelis 3.

Polüsahhariidi väävlisisalduse põhjal võib hinnata, et juba 0,02 M KOH kontsentratsioon ekstraktsioonikeskkonnas küllastab furtsellaraanmaatriksi K⁺-ioonidega maksimaalselt 80% ning liigi *C. truncatus* polüsahhariidid kuni 60% ulatuses (**I**, **II**). Samuti avaldab leelistöötlus mõju karraginaanide mineraalsele heterogeensusele. Mõlema uuritud Läänemere vetikaliigi puhul annab leelisekstraktsioon (võrreldes vesiekstraktsiooniga) kõrgema nikli, vase ja kaadmiumi sisaldusega galaktaanpreparaate, vastupidine tendents esineb aga magneesiumi, kaltsiumi ja mangaani puhul, mille sisaldused on märgatavalt suuremad puhtas vees eraldatud preparaatide puhul. Samuti sisaldas furtsellaraani vesiekstraheeritud preparaat rohkem rauda; leelisekstraheeritud *C. truncatus* galaktaanides esines aga enam naatriumi, koobaltit, tsinki ja molübdeeni.

Üllatuslikult oli leeliselises keskkonnas ekstraheeritud *F. lumbricalis* ja *C. truncatus* galaktaanide väävlisisaldus nende vesiekstraheeritud preparaatidega võrreldes märgatavalt kõrgem (**I**, **II**). Üldiselt väheneb **D6S** või **D2S,6S** jääke sisaldavate karraginaanide väävlisisaldus töötlusel kuumas leeliselahuses seoses nimetatud prekursorstruktuuride muundumisega (tsüklistumisega) vastavateks väiksema väävlisisaldusega **DA** või **DA2S** jääkideks (Ciancia et al. 1993). Karraginaanide eraldamiseks kasutatud ekstraktsiooniaeg (4 tundi) ja kasutatud leelise madal kontsentratsioon ei võimaldanud prekursorstruktuuride täielikku tsüklistumist (Ciancia et al. 1997a). Leelisekstraheeritud preparaatide suurem väävlisisaldus on tõenäoliselt tingitud kõrge prekursorstruktuuride osakaaluga polümeerahelate paremast

lahustuvusest vee ja alkoholi segus K^+ -ioonide juuresolekul. Nimetatud asjaolu raskendab nende molekulide eraldamist sadestamisel. Samuti võib nimetatud nähtust põhjustada väävlirikkamate (suurema κ -karraginaani sisaldusega) galaktaanahelate eelistatum vabanemine vetikamassist leeliselises keskkonnas. Nimetatud hüpoteesid on vastuolus furtsellaraani molekuli hübrüidsuse käsitlustega. Siiski on andmeid furtsellaraani edukast fraktsioneerimisest väävlirikkamaks ja suurema sulfaatimata β -karraginaani osakaaluga komponendiks (Yu et al. 2007). Seega on *F. lumbricalis* galaktaanide näol tõenäoliselt tegemist suhteliselt heterogeense polümeerseguga, milles κ/β -karraginaani segmentide vahekord erinevates polüsahhariidahelates teatud piirides varieerub (Knutsen, Grasdalen 1987). Nimetatud asjaolu võimaldab ekstraktsioonitingimusi varieerides saada mõnevõrra erineva väävlisisaldusega furtsellaraanpreparaate.

Tabel 3. Mõnede minoorsete elementide sisaldused uuritud vetikate, karraginaanide ja merevee proovides

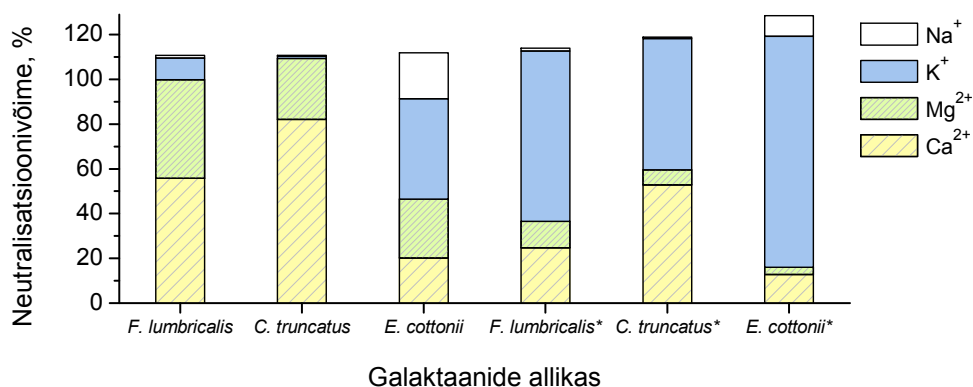
Preparaat	Elemendi sisaldus (mg/kg)									
	Fe	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	Mo	Ba	Cd	As
<i>F. lumbricalis</i> *	2465	3448	2,22	20,73	20,4	37,5	<0,5	34,6	0,343	6,25
<i>C. truncatus</i> *	1744	493	2,29	9,43	25,2	28,4	0,64	50,0	0,21	<0,06
<i>E. cottonii</i> *	32	4,2	0,18	<0,1	0,6	2,80	0,22	x	0,902	11,8
GW <i>F. lumbricalis</i> **	903	2317	1,05	3,27	3,69	14,9	<0,5	31,4	<0,05	0,71
GA <i>F. lumbricalis</i> **	481	352	0,67	5,74	14,6	14,8	<0,5	30,2	0,244	0,30
GL <i>F. lumbricalis</i>	509	592	0,71	6,11	10	9,68	<0,1	x	0,015	0,69
GW <i>C. truncatus</i>	1506	577	1,45	1,30	4,3	9,2	1,52	73,3	<0,05	<0,06
GA <i>C. truncatus</i>	1600	162	2,35	6,05	29,2	16,8	2,07	88,1	0,37	<0,06
GW <i>E. cottonii</i>	50	7,3	0,73	0,88	3,1	8,86	0,12	x	0,063	0,20
GA <i>E. cottonii</i>	68	1,6	0,50	0,48	3,2	3,67	<0,5	5,8	1,307	x
κ -karraginaan (Sigma)	166	9,5	0,40	0,19	10	4,97	0,20	x	0,114	0,68
Elemendi sisaldus ($\mu\text{g/l}$)										
Merevesi***	172,1	16	0,23	2,2	14	12	1,3	24	0,1	1,3

* Vetikad pesti hoolikalt kraaniveega, seejärel destilleeritud veega; ** täiendavalt puhastatud ümbersadestamisega alkoholis; *** seitsmest Tallinna ümbruse rannikupiirkonnast kogutud proovide keskmine. GW – vesiekstraheeritud (4 tundi) galaktaan; GA – leelisekstraheeritud (0,02 M KOH lahuses, 4 tundi) galaktaan; GL – vetikaid töödeldi 7 päeva 0,4 M KOH lahuses, ekstraheeriti 4 tundi vees; x – mõõtmist ei teostatud.

Pikaajaline toatemperatuurne leelismodifikatsioon (0,4 M KOH lahuses) suurendas oluliselt Ca^{2+} -ioonide mobiilsust ning andis algse vetikamassiga võrreldes enam kui

2 korda kõrgema kaltsiumisisaldusega polüsahhariidpreparaate (I). Seejuures aga ei täheldatud olulist kaaliumi kontsentratsiooni tõusu.

Vabade soolade esinemisest proovides annab tunnistust asjaolu, et galaktaanpreparaatides leidub katioone polüsahhariidmaatriksi negatiivse laengu neutraliseerimiseks vajaminevast kogusest mõnevõrra rohkem (joonis 9). Kui vesiekstraheeritud preparaate puhul jäävad selle, nn neutralisatsioonivõime väärtused küllaltki kitsasse vahemikku (111–112%), siis leelisekstraheeritud proovidele vastavad nimetatud karakteristiku mõnevõrra kõrgemad väärtused (114–129%). Selgub, et suhteliselt suur on vabade soolade sisaldus (neutralisatsioonivõime 141%) pikaajalise toatemperatuurse modifikatsiooni (0,4 M KOH lahuses) rakendamisel saadud furtsellaraanpreparaatides ning on peamiselt seotud nimetatud proovide kõrge kaltsiumisisaldusega. Ka Sigma κ-karraginaani kommertspreparaat sisaldas märkimisväärses koguses, tõenäoliselt standardiseerimise eesmärgil proovi lisatud vabu sooli (neutralisatsioonivõime 148%). Kuna Na⁺ ja K⁺ sisaldused Kassari vetikaplasi dominantliikides on suhteliselt madalad, baseerub nendest punavetikatest pärinevate galaktaanide neutralisatsioonivõime peamiselt Mg²⁺- ja Ca²⁺-ioonidel. *E. cottonii* polüsahhariidide puhul on neutralisatsioonivõime tingitud aga eeskätt ühevalentsete leelismetallioonide esinemisest.



Joonis 9. Erinevat päritolu galaktaanpreparaatidega seondunud peamiste katioonide võime neutraliseerida polüsahhariidi sulfaatrühmade negatiivseid laenguid. Galaktaanid eraldati ekstraksioonil 4 tundi puhtas vees või * 0,02 M KOH lahuses.

4.3. Struktuurne stabiilsus

4.3.1. Karraginaanide termostabiilsus

Võrdlvalt uuriti vesiekstraheeritud *C. truncatus* galaktaanide ja Fluka ι-karraginaani kommertspreparaadi termilisi stabiilsusi kuivas olekus (II). Samuti jälgiti polüsahhariidahelate lagunemist kõrgendatud temperatuuri tingimustes Sigma κ-karraginaani kommertspreparaadi ja vesiekstraheeritud furtsellaraani puhul. Galaktaanide degradatsiooni ulatust hinnati AG jääkide lagunemise ning SEC pro-

fiilide põhjal. Lisaks polüsahhariidi M_w jaotusele annab SEC meetod refrakto-meetrilise detektori kasutamisel infot preparaadis esinevate anioonsete lisandite (nt vaba sulfaadi) esinemise kohta (Karlsson, Singh 1999). Nimetatud meetod on seetõttu hästi rakendatav sulfaaditud polüsahhariidide laguproduktide uurimisel.

Ilmneb, et väavli vabanemine galaktaanmaatriksist on seotud poliginaanfraktsiooni formeerumisega (II). Sulfaatrühmade eraldumine polüsahhariidmaatriksist algab ι -karraginaani korral 110 °C juures, κ -karraginaani ja furtsellaraani puhul temperatuuril 100 °C. Punavetika *C. truncatus* galaktaanid on tunduvalt labiilsemad. Väavli vabanemine nimetatud polüsahhariidide struktuurist algab juba 80 °C juures; temperatuuril 85 °C lagundatud preparaadi puhul on eraldunud juba ligikaudu 15% polüsahhariidis esinevast väävlist. Selgub, et vetikagalaktaanide kuumtöötlemisel kuivas olekus muundub polümeerist vabanev väävel happelisteks produktideks (tõenäoliselt NaHSO_4 ja KHSO_4), mis kiirendavad autokatalüütiliselt polüsahhariidi edasist degradatsiooni. Laguproduktide happelisi omadusi kinnitasid nende vesilahuste madalad pH väärtused (II). Seega on ilmne, et heterogeensete polüsahhariidpreparaatide (galaktaansegude ja hübriidstruktuuride) üldise termostabiilsuse määravad ära nendes proovides esinevad kõige labiilsemad sulfaaditud struktuuriühikud.

Sulfaatrühmade intensiivne eraldumine galaktaanmaatriksist on seotud ka AG jääkide lagunemisega polümeeris. Kui *C. truncatus* galaktaanide puhul algavad need kaks protsessi ühesugusel lagundamistemperatuuril (85 °C), siis ι -karraginaani korral algab väavli vabanemine veidi enne AG jääkide olulise lagunemise etappi (II). Märgatavalt oli AG sisaldus vähenenud 120 °C juures lagundatud ι -karraginaani preparaadis; lisaks oli sellel temperatuuril lagununud praktiliselt kogu polümeeri kõrgmolekulaarne komponent. Furtsellaraani ja κ -karraginaani kõrgmolekulaarse komponendi täielik kadumine leidis aset oluliselt kõrgematel lagundamistemperatuuridel (150–160 °C).

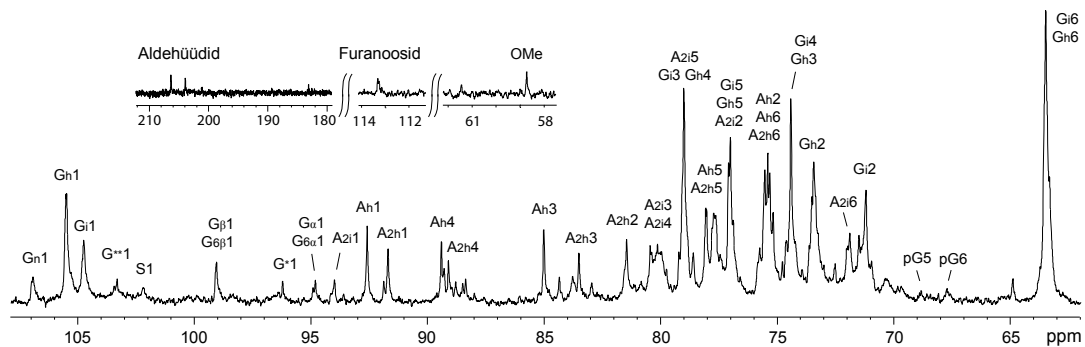
Punavetika *C. truncatus* galaktaanide väiksem termostabiilsus väljendub ka lagundatud preparaatide värvumises. Karraginaanpulbri märgatav tumenemine oli selgesti jälgitav 85 °C ning ι -karraginaani kommertspreparaadi korral 110 °C juures lagundatud proovis. *C. truncatus* galaktaanide suurem termolabiilsus tuleneb nende polüsahhariidide struktuursetest iseärasustest (püruvaatatsetaali esinemine molekulis, galaktaaniga seondunud glükoproteiinid), mineraalse osa spetsiifikast ning molekulide väiksemast polümerisatsiooniastmest.

4.3.2. ι -Karraginaani laguproduktid

^{13}C -NMR vahendusel uuriti vesiekstraheeritud *C. truncatus* galaktaane, mida hoiti eelnevalt kuivas olekus seitse päeva temperatuuril 85 °C (II). Valitud lagundamistemperatuur võimaldas galaktaanahelate märgatavat destruktsiooni, monosahhariidjääke seejuures oluliselt lagundamata.

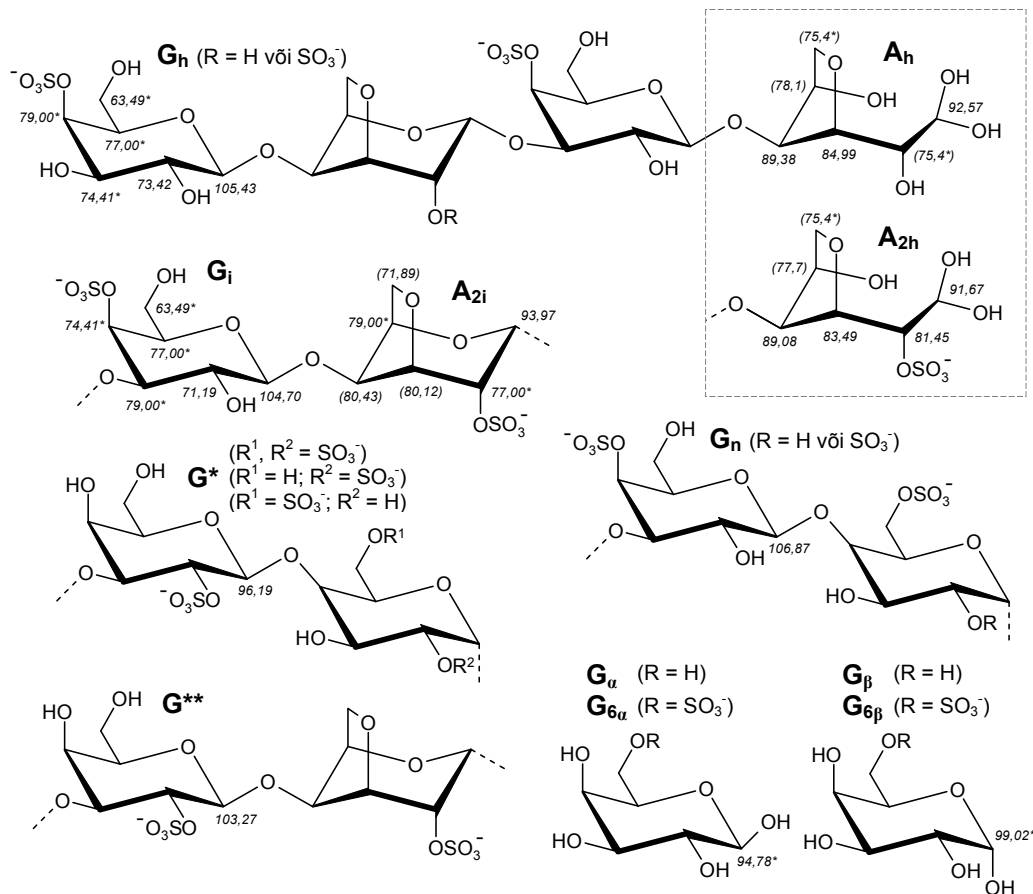
Selgus, et termotöötlus avaldab olulist mõju karraginaanide lahustuvusele. Kuigi kõnealuse lagundatud preparaadi 2%-lised vesilahused olid homogeenised, sadestus

nendest seismisel (10 tundi 4 °C juures) täielikult üle 10 kDa M_w väärtusega komponent. Saadud väheviskoosse selge lahuse edasine uurimine ^{13}C -NMR vahendusel võimaldas detailsemalt tuvastada karraginaani madalmolekulaarsete laguproduktide struktuuri (joonis 10). Halvenenud vesilahustuvust täheldati ka 130–150 °C juures lagundatud agarospreparaatide (Serva) puhul.



Joonis 10. Termotöödeldud (7 päeva 85 °C juures) vesiekstraheeritud *C. truncatus* galaktaanide ^{13}C -NMR spekter (26 000 skaneeringut, mõõdetud 40 °C juures). Tähisted ja peamiste signaalide nihkeväärtused on esitatud joonisel 11.

Termotöödeldud *C. truncatus* galaktaanide ^{13}C -NMR spektrist selgub, et lagunemisega kaasnevad peamised muutused polüsahhariidi struktuuris tulenevad eeskätt polümeerahelate desulfaatumisest. Põhiliste laguproduktide struktuurist annab ülevaate joonis 11. Selgub, et termotöötuse käigus katkevad kiiremini α -1,3-seotud glükosiidsidemed ning tekivad terminaalsete AG jääkidega produktid. Kõrgendatud temperatuuri tingimustel tekkiv madalmolekulaarne fraktsioon koosneb peamiselt karrabioosi disahhariididest **G-DA** ja **G-DA2S**; tetrasahhariidide ja pikemate oligosahhariidide osakaal on oluliselt väiksem (hinnatud seesmiste ja terminaalsete **G** jääkide signaalide suhte alusel). Märkatava koguse monosahhariidide (galaktoos või galaktoos-6-sulfaat) esinemine lagundatud proovis annab tunnistust ka β -1,4-seotud glükosiidsidemete katkemisest. **D2S,6S** ja **GP** jääkide olemasolu kõrgmolekulaarses fraktsioonis kinnitab, et nimetatud monomeeride esinemine proovis ei põhjusta otseselt uuritud galaktaanpreparaadi termolabiilseid omadusi. Monosahhariidjääkide lagunemisest annavad tunnistust minoorse komponendina preparaadis tuvastatud aldehüüdjäägid ning AG jääkidest pärinevad furanoosid.



Joonis 11. Termotöödeldud (7 päeva 85 °C juures) vesiekstraheeritud *C. truncatus* galaktaanpreparaadi madalmolekulaarsed laguproduktid. Kalkkirjas esitatud numbrid tähistavad ¹³C-NMR signaalide nihkeväärtusi; tärn väärtuse taga viitab signaalide kattumisele; sulud tähistavad ligikaudseid väärtusi.

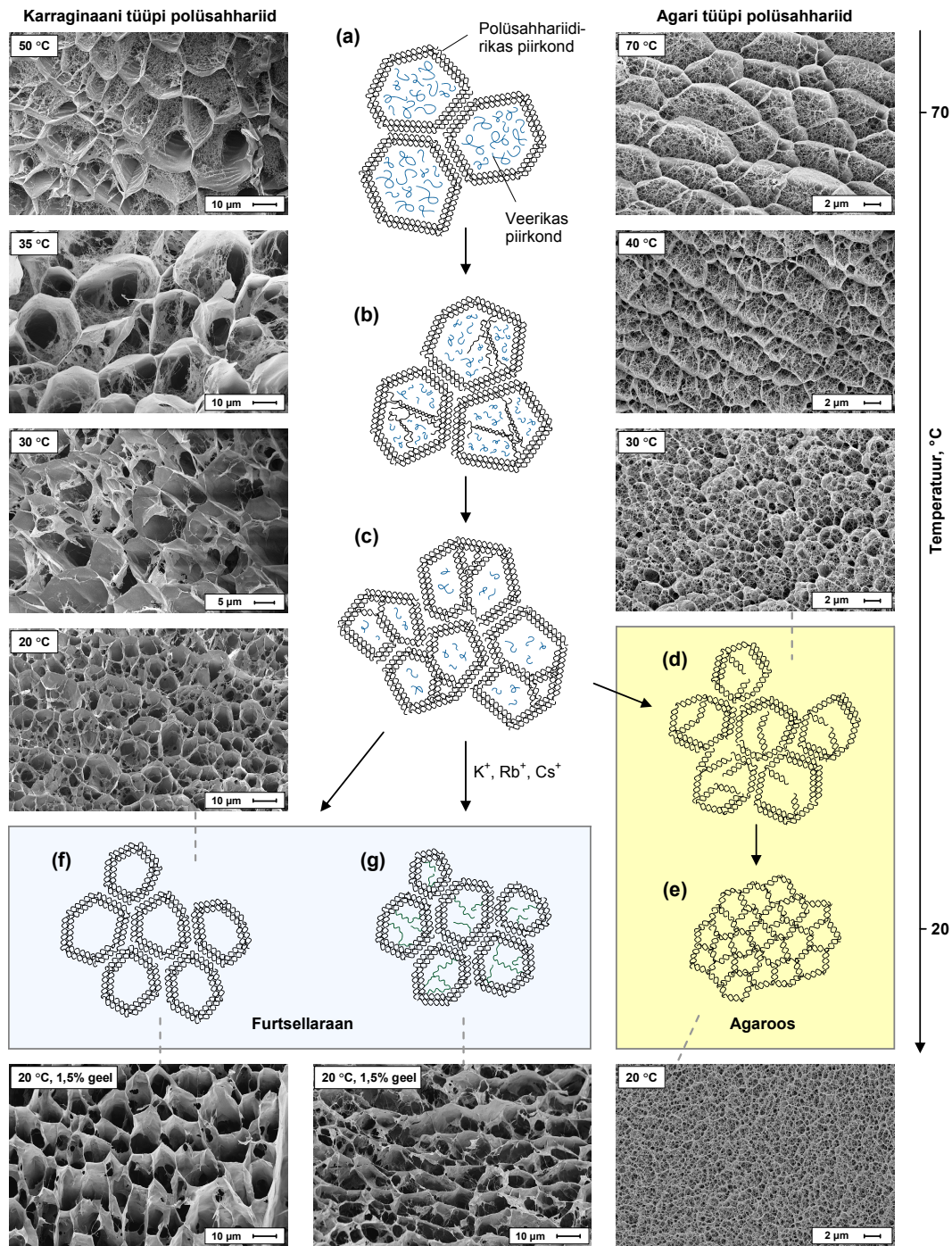
4.4. Reoloogilised omadused ja geeli struktuur

4.4.1. Punavetikagalaktaani geelistumismehhanism

Furtsellaraani ja agarooosi sool-geel üleminekuprotsesse uuriti võrdlevalt SEM meetodil preparaate krüofikseerimise ja lüofiliseerimise kaasabil (III). Selleks vaadeldi geeli formeerumise erinevatel etappidel (temperatuuridel) kinnikülmutatud geelstruktuure SEM vahendusel. Vältimaks õrnade SEM preparaatide kahjustumist järsu külmumisprotsessi käigus, suleti galaktaansoolid enne krüofikseerimist metallist kapillaartorudesse. Leiti, et väljatöötatud prepeareerimistehnika puhul ei sõltu tulemused kasutatud kapillaartorude materjalist (roostevaba teras või vask).

SEM vaatlused võimaldasid galaktaani geelistumisprotsessi kohta teha mõningaid järeldusi. Geeli lõpliku formeerumiseni viivates protsessides võib eristada mitut staadiumit, mida kirjeldatakse alljärgnevalt (väljapakutud “kompartimentide mudel”, joonis 12).

- (a) Kõrgel temperatuuril on galaktaanahelad mõõduka polüsahhariidide sisaldusega (2%-listes) soolides küllaltki suure vee defitsiidis. Sellistel tingimustel esinevad polümeerahelad soolides väikeste dünaamiliste kämpudena (“kompartimentidena”), mida iseloomustab polüsahhariidirikas väliskiht. Krüofikseeritud SEM preparaatides on nimetatud kämbud vaadeldavad tiheda polüsahhariidvõrgustikuga täidetud kargjate struktuuriühikutena. Võrkstruktuuride ning geeli mikrostruktuuri üldine tihedus sõltuvad oluliselt geelistumisstaadiumist (temperatuurist). Mikrofotodel ilmneb kargstruktuuride seinte kahekihilisus, mis on tingitud polümeerikämpude kokkukleepumisest SEM preparaatide lüofiliseerimise käigus (I, III). Lõpliku geelivõrgustiku eelstruktuuridena peegeldavad dünaamilised kargjad moodustised kõnealust tüüpi makromolekulide varjatud assotsiatsioonitendentse soolides.
- (b) Jahtumisprotsessil suureneb polüsahhariidahelate vee defitsiit veelgi. See viib ahelate edasise agregateerumiseni kompartmentide sees.
- (c) Sooli geelistumistemperatuuri lähedal leiab aset intensiivne uute seinte moodustumine kargstruktuuride sees ning sellega kaasnev geeli mikrostruktuuri üldine tihenemine. Nagu selgub SEM uuringutest, saadab nimetatud protsessi võrkstruktuuride osakaalu vähenemine. Struktuuriühikute tihedam pakkumus on seotud galaktaansoolide optilise tiheduse tõusuga (III). Viimane leiab aset juba geelistumistemperatuurist märgatavalt kõrgematel temperatuuridel.
- (d) Agari tüüpi polüsahhariidide puhul põhjustab kargstruktuuride seinte õhene mine geelistruktuuri täiendava tihenemise, struktuuriühikute ühtlasema jaotumise ning uute ühendussildade tekke. Protsessi saadab optilise tiheduse järsk tõus, mis langeb hästi kokku nende galaktaansoolide geelistumistemperatuuriga.
- (e) Agaroosgeelide lõplik struktuur on 70 °C juures vaadeldud geelistumisstaadiumiga võrreldes ligi kümme korda tihedam (hinnatud SEM preparaatide poorsuste alusel).
- (f) Furtcellaraangeelide puhul on lõplikult formeerunud geelides vaadeldav tihe kargstruktuur, mida iseloomustab 70 °C juures esineva geelistumisstaadiumiga võrreldes ligikaudu kaks korda suurem tihedus.
- (g) Geelistumist soodustavate katioonide esinemine furtcellaraansoolis indutseerib lõplikku geeli struktuuri tihendavate niitjate struktuuriühikute teket geelistumisprotsessi käigus. Nimetatud õrnade struktuuride kujule ning paiknemisele avaldavad mõju ka proovis esinevad anioonsed lisandid (I). Kui soolalahuses geelistunud preparaatide puhul iseloomustab niitjaid moodustisi õrn tekstuur ning ebakorrapärane paigutus, siis leelisekstraheeritud furtcellaraani geelides on nendel struktuuriühikutel selgemini väljendunud ehituslik funktsioon.

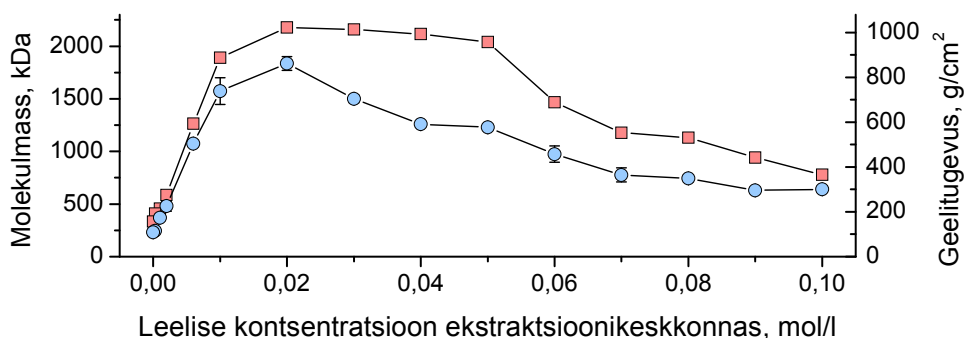


Joonis 12. Punavetikagalaktaanide geelistumisprotsessi skemaatiline mudel ning SEM fotod 2%-liste agarooosi (Serva) ja vesiekstraheeritud furtsellaraanile krüofikseeritud preparaatidest. Mikrofoto katioon-vahendatud geelistumisstaadiumist vastab 0,01 M RbCl lahuses geelistunud 1,5%-lisele vesiekstraheeritud furtsellaraanile. Tähepäikide tähendused on esitatud tekstis.

4.4.2. Ekstraktsiooniparameetrite mõju

Ekstraktsiooniparameetrid võivad avaldada olulist mõju galaktaanahelate molekulmassile, preparaatide mineraalse osa koostisele ja produktide üldisele puhtusastmele ning selle kaudu suunata vetikagalaktaanide reoloogiliste omaduste spetsiifikat. Prekursorstruktuure (nt μ -, ν - ja γ -karraginaani jääke) sisaldavate karraginaanide puhul indutseerib töötlus tugevalt leeliselises keskkonnas muutusi polüsahhariidide struktuuris, mis avaldub nende polümeeride suurenenud geelitugevuse näitajates.

Andes iseloomulikult tugevaid geele K^+ -ioonide juuresolekul, on furtsellaraani geelistumisvõime üldiselt sarnane κ -tüüpi karraginaanide vastava näitajaga. Võrreldes ekstraktsiooniga puhtas vees, andis vetikate (*F. lumbricalis*) kuum leelisekstraktsioon 0,02 M KOH lahuses ligi 11 korda suurema geelitugevusega produkt (geelitugevuse tõus 1,5%-liste geelide puhul väärtuselt 75 g/cm² kuni 862 g/cm²) (I). Selgus, et leelisekstraheritud preparaatide suurem geelitugevus ei tulenenud mitte üksnes geelistumist soodustavate kationide kõrgemast sisaldusest galaktaanmaatriksis, vaid oli seotud ka nimetatud proovide suuremate M_w väärtustega (joonis 13). Märkatav galaktaanahelate destruktsioon ekstraktsioonikeskkonna madalamate leelisesisalduste korral (KOH kontsentratsioon alla 0,01 mol/l) on seotud tunduvalt alla furtsellaraani stabiilsusmaksimumi jäävate ekstrahendi pH väärtustega. Leelise kontsentratsioonidel 0,02–0,05 mol/l kaasnes KOH sisalduse suurenemisega preparaatide geelitugevuse märkatav langus. Kuna seejuures ei täheldatud olulisi muutusi nimetatud polüsahhariidide M_w väärtustes, tulenesid proovide erinevad reoloogilised näitajad eelkõige galaktaanmaatriksiga seondunud mineraalse osa spetsiifikast. Kõrged leelise sisaldused ekstraktsioonikeskkonnas viisid aga nii produktide geelistumisvõime kui ka M_w väärtuste olulise alanemiseni.



Joonis 13. Furtsellaraani (○) geelitugevuse ja (■) molekulmassi karakteristiku sõltuvus KOH kontsentratsioonist ekstraktsioonikeskkonnas.

Erinevalt furtsellaraanist ei avaldanud *C. truncatus* galaktaanide puhul ekstraktsoonikeskkonna madalamad pH väärtused polüsahhariidide M_w karakteristikutele olulist mõju (II). See on tingitud sulfaatühemete esinemisest DA jääkide 2. asendis, mis teadaolevalt suurendab polüsahhariidi vastupidavust hüdrofüütilise degradatsiooni suhtes. Seega ei sõltu kõnealusest punavetikaliigist pärinevate galaktaanide geelistumise võime (geelitugevus 2%-liste geelide puhul 30–40 g/cm²) oluliselt ekstraktsoonitingimustest (II). Ekstraktsoonil pehmetes tingimustes (0,02 M NaOH lahuses) ei lagunenu furtsellaraan oluliselt isegi üheksa tunni pikkuse eraldamisprotsessi käigus (I); nimetatud keskkonnas eraldatud produktide M_w väärtused ühe- ja üheksatunnise kestusega ekstraktsoonide puhul olid vastavalt 2400 kDa ja 1920 kDa.

Pikaajalise toatemperatuurse leelistöötuse ning sellele järgneva vesiekstraktiooni rakendamisel saadud furtsellaraanpreparaate iseloomustas võrreldes tavapärase vesiekstraktiooni teel saadud proovidega ligi kaks korda kõrgem geelitugevus ning geelide optilise tiheduse märgatavalt vähenenud näitajad. Kuna kaaliumi sisaldused proovides jäävad sarnastesse piiridesse (tabel 2), on töödeldud furtsellaraani suurem geelitugevus selgitatav peamiselt Ca²⁺-ioonide kõrgema sisalduse ning galaktaani suurema polümeerisatsiooniastmega (M_w 870 kDa).

Ekstraktsoonikeskkond avaldab olulist mõju ka eraldatud galaktaanpreparaatide vesilahuste ja geelide läbipaistvusele (I). Kuigi vesiekstraheeritud furtsellaraani optiline tihedus jäi tunduvalt alla leeliselises keskkonnas eraldatud preparaadi vastavale näitajale, iseloomustas mõlemat preparaati ligikaudu võrdne lämmastikusisaldus (tabel 2). Seega on preparaate värvumise peamiseks põhjuseks mõlemas preparaadis ligikaudu võrdsetes kogustes esinevate valguliste lisandite tumenemine leelismodifikatsiooni käigus.

Geelide reoloogilised omadused peegelduvad ka SEM vahendusel vaadeldud geelide struktuursetes iseärasustes. Geelistumisejärgselt prevaleerivad struktuuritüüp määrab otseselt galaktaangeeli reoloogilised omadused. Agari tüüpi polüsahhariidide homogeenne ja tihedam mikrostruktuur suurendab geeli mehaanilist vastupidavust, rabedust ning optilist tihedust. Kõrgstruktuurid seevastu annavad karraginaangeelidele omase elastsuse. Erineva molekulaarstruktuuriga agaroside puhul võivad geelide struktuurid oluliselt varieeruda isegi ühesuguste geelistumistingimuste korral; madalama geelitugevusega polüsahhariidide (nt *A. tobuchiensis* galaktaanid) iseloomustab geeli hõredam mikrostruktuur (III). Karraginaanide geelstruktuuride iseärasused tulenevad peamiselt geelistumisprotsessi mõjutavate erinevate vastastsoonide esinemisest preparaatides.

4.4.3. Vastasioonide mõju

Ioonsed lisandid avaldavad mõju galaktaanide lahustuvusele ning põhjustavad märgatavaid muutusi geelide füüsikalistes omadustes (Villanueva et al. 2004). Käesolevas töös uuriti erinevate leelismetallioonide mõju furtsellaraangeelide reoloogiale (**I, VI**). Katioonid pärinesid geelistumisele eelnevalt vesiekstraheeritud polüsahhariidide soolidesse lisatud leelismetallkloriididest või vetikate kuuma leelisekstraktsiooni käigus galaktaaniga absorbeerunud leelismetallhüdrosiidide koostisest.

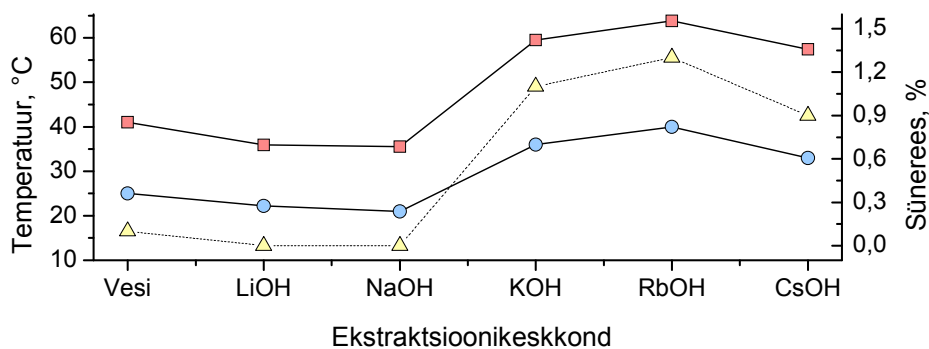
Kui geelistumist soodustavate katioonide (K^+ , Cs^+ , Rb^+) korral avaldas geelitugevusele soodsaimat mõju ligi 0,05 mol/l soola kontsentratsioon soolides, siis mitteselektiivse toimega metallioonide (Li^+ , Na^+) puhul esines uuritud kontsentratsioonivahemikus positiivne korrelatsioon geelitugevuse ja soola sisalduse vahel (**I**). Vesiekstraheeritud furtsellaraani suhteliselt madalat geelistumisvõimet (geelitugevus 75 g/cm^2) oli RbCl lisamisega võimalik suurendada enam kui seitse korda (maksimaalne geelitugevus 490 g/cm^2); KCl või CsCl manulus soolis võimaldas mõnevõrra väiksemaid geelitugevusi (380 g/cm^2). Mitteselektiivse toimega leelismetallide (Li^+ , Na^+) kloriide sisaldavate geelide tugevused jäid uuritud soolakontsentratsioonide piirkonnas alla 170 g/cm^2 .

Võrreldes soolalahuses geelistatud preparaatidega olid leelisekstraktsioonil (KOH, RbOH või CsOH lahustes) eraldatud furtsellaraanide geelitugevuse näitajad ligi kaks korda kõrgemad. See on tingitud peamiselt vesiekstraheeritud galaktaanide väiksematest M_w väärtustest (joonis 13), kahevalentsete katioonide (Mg^{2+} , Ca^{2+}) suuremast sisaldusest nendes preparaatides (joonis 9) ning kloriidioonide negatiivsest mõjust geelitugevusele.

Uuritud furtsellaraani puhul andis suurimaid geelitugevusi (970 g/cm^2) vetikate ekstraktsioon 0,02 M RbOH lahuses. κ -Tüüpi karraginaanile omaselt ei soodusta Li^+ - ja Na^+ -ioonid iseloomuliku geelivõrgustiku teket (joonis 5). Kui vesiekstraheeritud furtsellaraani geelistumisvõimele avaldasid KCl ja CsCl sarnast mõju, siis vetikate leeliselise ekstraktsiooni CsOH lahuses andis võrreldes ekstraktsioonikeskkonnana KOH lahuse kasutamisega märgatavalt väiksema geelitugevusegaprodukte. See on tõenäoliselt tingitud furtsellaraani Cs^+ -vormi väiksemast orgaanikasisaldusest (joonis 5). Seega võib prognoosida, et ühesuguse orgaanika sisaldusega furtsellaraani K^+ - ja Cs^+ -vormid on tõenäoliselt lähedasema geelistumisvõimega. Nimetatud tulemustest selgub, et erinevad leelismetallioonid soodustavad furtsellaraani geelistumist reas, mis on iseloomulik ka κ -karraginaanile: Li^+ , Na^+ \ll K^+ , Cs^+ $<$ Rb^+ .

Geelistumist soodustavaid katioone sisaldavatele κ -karraginaani geelidele on omane sünereesinähtus (Dunstan et al. 2000). Erinevaid leelismetallhüdrosiide (LiOH, NaOH, KOH, RbOH, CsOH) sisaldavates keskkondades ekstraheeritud furtsellaraanpreparaatide puhul esineb hea positiivne korrelatsioon sünereesinäitajate ning järgmiste karakteristikute vahel: geelitugevus ($r = 0,9981$), geeli sulamistemperatuur ($r = 0,9974$) ja geelistumistemperatuur ($r = 0,9963$) (joonis 14). Vesiekstraheeritud furtsellaraani iseloomustas võrreldes leelisekstraheeritud preparaadiga

väga väike süneresinäitaja (0,1%); κ -karraginaani kommertspreparaatide näitajad olid aga oluliselt kõrgemad (väärtused vastavalt 1,1% Sigma ja 0,4% Fluka preparaate korral) (I). Furtsellaraangeele iseloomustab κ -tüüpi karraginaani kohta suhteliselt kõrge hüsteresinäitaja (13,7–24,4 °C), mis galaktaani erinevate ionsete vormide korral kasvab reas Li^+ -, Na^+ -, K^+ -, Rb^+ -, Cs^+ -vorm (joonis 14).



Joonis 14. 1,5%-liste furtsellaraangeelide karakteristikud erinevate vastasioonide juuresolekul. Galaktaanid eraldati ekstraktsioonil 4 tunni vältel 0,02 M leelismetallhüdrosiidi lahuses või puhtas vees. (■) Geeli sulamistemperatuur; (●) geelistumistemperatuur; (△) süneresinäitaja.

5. KOKKUVÕTE

Doktoritöös uuriti seoseid Läänemere punavetikatest pärinevate galaktaanide molekulaarstruktuuri, keemilise koostise, geelide mikrostruktuuri ja reoloogiliste näitajate vahel võrdlevalt mõnede teiste galaktaanpreparaatidega. Erilise tähelepanuga käsitleti Läänemere ainsast töendusliku väärtusega punavetikast *F. lumbricalis* pärinevaid polüsahhariide, mille puhul hinnati ka nende galaktaanide mõningaid struktuur-omadusi sõltuvusi seoses ekstraktsioonitingimuste ja keemilise töötuse eripäradega.

Järgnevalt on esitatud doktoritöö põhitulemused.

- *F. lumbricalis* galaktaanide (molekulmass 160 kDa) põhikomponendid on β -D-galaktoos ($15 \pm 1\%$), β -D-galaktoos-4-sulfaat ($36 \pm 1,5\%$) ja 3,6-anhüdro- α -D-galaktoos ($29 \pm 1\%$), väiksemates kogustes esinevad α -D-galaktoos-6-sulfaat ($6 \pm 0,5\%$), β -D-galaktoos-6-sulfaat ja 6-O-metüül- β -D-galaktoos. *C. truncatus* galaktaanide (molekulmass 460 kDa) peamised komponendid on β -D-galaktoos-4-sulfaat ($44 \pm 2\%$) ja 3,6-anhüdro- α -D-galaktoos-2-sulfaat ($30 \pm 1,5\%$), minoorsete komponentidena leiduvad α -D-galaktoos-2,6-disulfaat ($12 \pm 2\%$) ja 4',6'-püruvaaditud karrabioos-2-sulfaat (1,4%). Punavetika *F. lumbricalis* uuritud lahtise ja kinnitunud vormi galaktaanide ainsaks arvestatavaks struktuurierinevuseks on viimaste mõnevõrra suurem β -D-galaktoos-6-sulfaadi sisaldus. Kaug-Ida vetikaliigi *A. tobuchiensis* galaktaanid (molekulmass 97 kDa) on keemiliselt ehituselt agarid, mille koostisse kuuluvad β -D-galaktoos (58%), 3,6-anhüdro- α -L-galaktoos ($30 \pm 3,5\%$), 2-O-metüül-3,6-anhüdro- α -L-galaktoos ($8 \pm 1\%$) ning β -D-galaktoos-6-sulfaat.
- Kõrge väävlisisaldusega galaktaanahelate intensiivne lagunemine võib kuivas olekus aset leida suhteliselt madalatel temperatuuridel; heterogeensete omadustega polüsahhariidpreparaatide struktuurine stabiilsus on suuresti määratud polümeeri kõige labiilsemate sulfaaditud struktuurifragmentide poolt. Termolabiilsete *C. truncatus* galaktaanide märgatav depolümerisatsioon algab juba 80 °C juures. Karraginaanide termilise kuivlagunemise esmased produktid on sarnased happelisel hüdroolüüsil tekkivatega. ι -Karraginaani puhul on nendeks α -1,3-glükosiidsidemete katkemise tulemusel moodustunud terminaalsete 3,6-anhüdrogalaktoosi jääkidega oligosahhariidid. Kuumtöödeldud galaktaanide lahustuvus vees sõltub nende lagunemisastmest; see asjaolu võimaldab nende täiendavat fraksioneerimist. Termilist depolümerisatsiooni saab teatud juhtudel rakendada abivahendina galaktaanide detailsema struktuuri uurimisel.
- Ekstraktsiooniparameetrite mõju vetikapolüsahhariidide geelistumisvõimele on seotud peamiselt muutustega eraldatud produktide molekulmassides ning anorgaanilise osa koostises. *F. lumbricalis* galaktaanide maksimaalne geelitugevus 970 g/cm^2 (1,5% geelide puhul) on saavutatav optimaalsete ekstraktsioonitingimuste juures Rb^+ -ioone sisaldavas leeliselises keskkonnas (ekstraktsioonil 4 tundi 0,02 M RbOH vesilahuses). *C. truncatus* polüsahhariidide geelimumodus-

tumisvõime on väike (geelitugevus 30–40 g/cm² 2% geelide korral) ning ei sõltu oluliselt ekstraktsioonitingimustest.

- Looduslikust vetikamassist ekstraktsiooni käigus eraldatud galaktaanpreparaadid sisaldavad katioonseid lisandeid (peamiselt leelismetallioone) kogustes, mis ületavad polümeeri negatiivsete sulfaatrühmade laengu tasakaalustamiseks vajaliku hulga küllaltki konstantses ulatuses (positiivse laengu ülehulk vesiekstraheeritud preparaatide puhul 11–12%, leelisekstraktsiooni korral 14–29%). Furtsellaraani ekstraktsioonil erinevates leelismetallhüdroksiidide vesilahustes saadavad produktid sisaldavad lähedase koguse orgaanikat, anorgaanilise komponendi osakaal aga varieerub oluliselt, sõltudes peamiselt preparaadi koostisest viidud leelismetalli aatommassist. Mikroelementide määramiseks vetikaproovides on võrdselt hästi rakendatavad induktiivsidesunud plasma optilise emissioonspektroskoopia ja aatomabsorptsioonspektroskoopia meetodid.
- Sõltuvalt galaktaani makromolekulaarse ahela koostises esineva 3,6-anhüdrogalaktoosi ruumilisest konfiguratsioonist (D- või L-isomeer), toimub vetikapolüsahhariidide geelistumine põhimõtteliselt erinevaid radu mööda. Agarite (anhüdrogalaktoos L-vormis) puhul saadab geelistumist iseloomuliku kargstruktuuri kadumine ning võrkjate struktuuritüüpide tihenemine; karraginaanide (anhüdrogalaktoos D-vormis) geelimumodustamisprotsess seisneb aga võrkstruktuuride kadumises ning kargstruktuuri üldises tihenemises. Geelistumist soodustavate kationide (K⁺, Rb⁺, Cs⁺) esinemine κ-tüüpi karraginaanide kuumades vesilahustes indutseerib niitjate, geeli mikrostruktuuri tihendavate lisaelementide moodustumise geelistumisprotsessi käigus.

TÄNUAVALDUSED

Täna oma doktoritöö juhendajat Dr. Kalle Truusi kriitiliste märkuste ja abi eest teadustöö sooritamisel. Avaldan tänu Dr. Georg Martinile ja Dr. Tiina Paalmele vetikaproovide kogumisel osutatud abi eest. Samuti täna emeritprofessor Henn Kukke vetikasegu liigilise koosseisu määramise ning kasulike nõuannete eest ning Dr. Andres Kollistit väärtuslike ideede ja soovitude eest galaktaanide geelistumisprotsessi puudutavates küsimustes.

Avaldan tänu Ökoloogia ja keskkonnateaduste doktorikoolile ning Sihtasutus Archimedesele toetuste eest (Kristjan Jaagu ning DoRa stipendiumid). Tööd finantseeriti ka Eesti Vabariigi sihtfinantseeritava teadusteema nr. 0132723s06 vahenditest.

FUNCTIONAL DEPENDENCIES OF THE CHEMICAL COMPOSITION AND STRUCTURES IN THE BALTIC SEA ALGAL COMMUNITIES

Conclusions

In this thesis the relationships between polysaccharide structures from the seaweeds of the Baltic Sea origin, their chemical composition, rheology and gel microstructures were studied in comparison with some other galactan preparations. Special attention was given to the polysaccharides originating from *F. lumbricalis*, the only algal species of economic value in the Baltic Sea, in which cases some structure-property relations were investigated in connection with the extraction and chemical treatment conditions.

The primary results of this thesis can be summarized as follows.

- The main components of galactan from *F. lumbricalis* of the Baltic Sea (M_w of 160 kDa) are **G** ($15 \pm 1\%$), **G4S** ($36 \pm 1.5\%$) and **DA** ($29 \pm 1\%$), **D6S** ($6 \pm 0.5\%$), **G6S** and **G6M** residues. Polysaccharides from *C. truncatus* (M_w of 460 kDa) were found to contain **G4S** ($44 \pm 2\%$), **DA2S** ($30 \pm 1.5\%$), **D2S,6S** ($12 \pm 2\%$) and **GP** (1.4%) units. The main structural difference between the galactans originating from the loose-lying and attached forms of *F. lumbricalis* is the higher **G6S** content of the latter. The galactans from Far-Eastern species *A. tobuchiensis* (M_w of 97 kDa) belong to the agar family and are characterized by the main constituents of **G** (58%), **LA** ($30 \pm 3.5\%$), **LA2M** ($8 \pm 1\%$) and **G6S** residues.
- Even relatively low temperatures can induce the cleavage of galactan chains in dry state; the overall stability of the heterogeneous polysaccharide preparations is determined by the most labile sulfate bearing structural units present in the polymer. In the case of the thermally labile *C. truncatus* polysaccharides, the intensive depolymerization process begins already at 80 °C. The low-molecular degradation products initially formed during the thermal treatment of carrageenans in dry state were found (after solubilization) to be similar to those obtained by the acid hydrolysis of these polysaccharides; for ι-carrageenan the favourable cleavage of 1,3-linked glycosidic bonds leads to the formation of oligosaccharides with the terminal AG residues. The solubility properties of algal galactans depend notably on the extent of polysaccharide cleavage, allowing the fractionation of samples on the basis of thermal stability of their constituents. In some cases it is possible to employ the thermal depolymerization as an aid for the structure elucidation of the minor constituents of red algal galactans.
- The extraction parameters have a marked effect on the gelling ability of red algal galactans mainly by influencing the composition of their inorganic part and molecular weight distribution. For *F. lumbricalis* galactans, the maximum gel

strength value of 970 g/cm^2 (for 1.5% gels) is attainable in the case of optimal extraction conditions in the alkaline medium containing Rb^+ -ions (duration of 4 hours in 0.02 M RbOH solution). The galactans from *C. truncatus* are characterized by a weak gelling ability that does not depend notably on the conditions of extraction.

- Unpurified carrageenan preparations isolated from the natural seaweed sources usually contain cationic substances (primarily alkali metal ions) in relatively constant levels considerably exceeding the amount needed for the neutralization of the negative charge of the sulfate ester groups of the polysaccharide (excess positive charge of 11–12% for water-extracted preparations and 14–29% in the case of alkali-extracted samples). Extraction of furcellaran in the presence of various alkali metal hydroxides yields products with similar amounts of organics; the quota of inorganics varies considerably and is primarily connected with the atomic weight of the introduced alkali metal. The microelement composition of seaweed samples may be elucidated equally well by AAS and ICP-OES methods.
- Depending on the configuration of AG (D- or L-isomer) in the macromolecular chain, the gelation process of algal galactans follows different pathways. Carrageenans (AG in D configuration) form gels mainly by tightening of the characteristic honeycomb network; the subtle structure units disappear in the course of the final gel formation. In contrast, agar-type galactans (AG in L configuration) gradually lose their honeycomb structure during gelation, resulting in tight and homogeneous spongy gel networks. The presence of gel promoting cations (K^+ , Rb^+ , Cs^+) in κ -type carrageenan sols induces the formation of specific subtle tentacle-like structure units responsible for the tightening of the final gel structure.

VIITEALLIKAD

- ABAD, L. V., NASIMOVA, I. R., RELLEVE, L. S., ARANILLA, C. T., DE LA ROSA, A. M., SHIBAYAMA, M. 2004. Dynamic light scattering studies of irradiated kappa carrageenan. – *International Journal of Biological Macromolecules*, 34, 81–88.
- AGUILAN, J. T., BROOM, J. E., HEMMINGSON, J. A., DAYRIT, F. M., MONTAÑO, M. N. E., DANCEL, M. C. A., NIÑONUEVO, M. R., FURNEAUX, R. H. 2003. Structural analysis of carrageenan from farmed varieties of Philippine seaweed. – *Botanica Marina*, 46, 179–192.
- ANDERSON, N. S., CAMPBELL, J. W., HARDING, M. M., REES, D. A., SAMUEL, J. W. B. 1969. X-ray diffraction studies of polysaccharide sulphates: double helix models for κ - and ι -carrageenans. – *Journal of Molecular Biology*, 45, 85–88.
- ANDERSON, N. S., DOLAN, T. C. S., LAWSON, C. J., PENMAN, A., REES, D. A. 1968. Carrageenans: part V. The masked repeating structures of λ - and μ -carrageenans. – *Carbohydrate Research*, 7, 468–473.
- ARMISÉN, R., GALATAS, F. 2000. Agar. – G. O. Phillips, P. A. Williams (toim). *Handbook of hydrocolloids*. Boca Raton: CRC Press, 21–40.
- BARABANOVA, A. O., YERMAK, I. M., GLAZUNOV, V. P., ISAKOV, V. V., TITLYANOV, E. A., SOLOV'EVA, T. F. 2005. Comparative study of carrageenans from reproductive and sterile forms of *Tichocarpus crinitus* (Gmel.) Rupr (Rhodophyta, Tichocarpaceae). – *Biochemistry (Moscow)*, 70, 350–356.
- BIRD, C., SAUNDERS, G., MCLACHLAN, J. 1991. Biology of *Furcellaria lumbricalis* (Hudson) Lamouroux (Rhodophyta: Gigartinales), a commercial carrageenophyte. – *Journal of Applied Phycology*, 3, 61–82.
- BONOTTO, S. 1979. List of multicellular algae of commercial use. – H. A. Hoppe, T. Levring, Y. Tanaka (toim). *Marine algae in pharmaceutical science*. Berlin: Walter de Gruyter, 121–137.
- BRADLEY, T. D., MITCHELL, J. R. 1988. The determination of the kinetics of polysaccharide thermal degradation using high temperature viscosity measurements. – *Carbohydrate Polymers*, 9, 257–267.
- BRIAND, X. 1991. Seaweed resources in Europe. – M. D. Guiry, G. Blunden (toim). *Seaweed resources in Europe: uses and potential*. Chichester: John Wiley & Sons, 259–308.
- CAIRNS, P., ATKINS, E. D. T., MILES, M. J., MORRIS, V. J. 1991. Molecular transforms of kappa carrageenan and furcellaran from mixed gel systems. – *International Journal of Biological Macromolecules*, 13, 65–68.
- CHAPMAN, V. J., CHAPMAN, D. J. 1980. *Seaweeds and their uses*, 3rd ed. London: Chapman and Hall.
- CHEN, Y., LIAO, M.-L., DUNSTAN, D. E. 2002. The rheology of K^+ - κ -carrageenan as a weak gel. – *Carbohydrate Polymers*, 50, 109–116.
- CHEN, Y., LIAO, M. L., BOGER, D. V., DUNSTAN, D. E. 2001. Rheological characterisation of κ -carrageenan/locust bean gum mixtures. – *Carbohydrate Polymers*, 46, 117–124.
- CHERONIS, N. D., MA, T. S. 1964. *Organic functional group analysis by micro and semi-micro methods*. New York: Interscience.

- CHOPIN, T. 1998. Seaweed resources of Eastern Canada. – A. T. Critchley, M. Ohno (toim). *Seaweed resources of the world*. Japan: Japan International Cooperation Agency, 273–302.
- CHRISTIANSEN, E. 1959. Danish agar. – R. L. Whistler (toim). *Industrial gums*. New York: Academic Press, 51–54.
- CIANCIA, M., MATULEWICZ, M. C., CERESO, A. S. 1997a. Alkaline modification of carrageenans. Part III. Use of mild alkaline media and high ionic strengths. – *Carbohydrate Polymers*, 32, 293–295.
- CIANCIA, M., MILAS, M., RINAUDO, M. 1997b. On the specific role of coions and counterions on κ -carrageenan conformation. – *International Journal of Biological Macromolecules*, 20, 35–41.
- CIANCIA, M., NOSEDA, M. D., MATULEWICZ, M. C., CERESO, A. S. 1993. Alkali-modification of carrageenans: mechanism and kinetics in the kappa/iota-, mu/nu- and lambda-series. – *Carbohydrate Polymers*, 20, 95–98.
- CISZEWSKI, P., KRUK-DOWGIALŁO, L., ZMUDZINSKI, L. 1992. Deterioration of the Puck Bay and biotechnical approaches to its reclamation. – E. Bjørnstad, L. Hagerman, K. Jensen (toim). *Proceedings of the 12th Baltic marine biologists symposium*. Fredensborg: Olsen & Olsen, 43–46.
- CRAIGIE, J. S. 1990. Cell walls. – K. M. Cole, R. G. Sheath (toim). *Biology of the red algae*. Cambridge: Cambridge University Press, 221–257.
- DEMBITSKY, V. M., SMOUM, R., AL-QUNTAR, A. A., ALI, H. A., PERGAMENT, I., SREBNIK, M. 2002. Natural occurrence of boron-containing compounds in plants, algae and microorganisms. – *Plant Science*, 163, 931–942.
- DININNO, V., MCCANDLESS, E. L., BELL, R. A. 1979. Pyruvic acid derivative of a carrageenan from a marine red alga (*Petrocelis* species). – *Carbohydrate Research*, 71, C1–C4.
- DUARTE, M. E. R., CAUDURO, J. P., NOSEDA, D. G., NOSEDA, M. D., GONÇALVES, A. G., PUJOL, C. A., DAMONTE, E. B., CERESO, A. S. 2004. The structure of the agaran sulfate from *Acanthophora spicifera* (Rhodomelaceae, Ceramiales) and its antiviral activity. Relation between structure and antiviral activity in agarans. – *Carbohydrate Research*, 339, 335–347.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. – *Analytical Chemistry*, 28, 350–356.
- DUCKWORTH, M., YAPHE, W. 1970. Definitive assay for pyruvic acid in agar and other algal polysaccharides. – *Chemistry and Industry (London)*, 23, 747–748.
- DUNSTAN, D. E., SALVATORE, R., JONSSON, M., LIAO, M.-L. 2000. Syneresis of κ -carrageenan gels at different KCl and LBG concentrations. – P. A. Williams, G. O. Phillips (toim). *Gums and stabilizers for the food industry*. Vol. 10. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 137–148.
- ERIKSSON, B. K., JOHANSSON, G. 2005. Effects of sedimentation on macroalgae: species-specific responses are related to reproductive traits. – *Oecologia*, 143, 438–448.
- ESTEVEZ, J. M., CIANCIA, M., CERESO, A. S. 2000. The system of low-molecular-weight carrageenans and agaroids from the room-temperature-extracted fraction of *Kappaphycus alvarezii*. – *Carbohydrate Research*, 325, 287–299.

- ESTEVEZ, J. M., CIANCIA, M., CEREZO, A. S. 2001. DL-Galactan hybrids and agarans from gametophytes of the red seaweed *Gymnogongrus torulosus*. – *Carbohydrate Research*, 331, 27–41.
- ESTEVEZ, J. M., CIANCIA, M., CEREZO, A. S. 2004. The system of galactans of the red seaweed, *Kappaphycus alvarezii*, with emphasis on its minor constituents. – *Carbohydrate Research*, 339, 2575–2592.
- ESTEVEZ, J. M., CIANCIA, M., CEREZO, A. S. (2008). The system of sulfated galactans from the red seaweed *Gymnogongrus torulosus* (Phyllophoraceae, Rhodophyta): location and structural analysis. – *Carbohydrate Polymers*, 73, 594–605.
- FREILE-PELEGRÍN, Y., ROBLEDO, D., AZAMAR, J. A. 2006. Carrageenan of *Eucheuma isiforme* (Solieriaceae, Rhodophyta) from Yucatán, Mexico. I. Effect of extraction conditions. – *Botanica Marina*, 49, 65–71.
- FRIEDENTHAL, M., EHA, K., VIITAK, A., LUKAS, A., SIIMER, E. 2000. Effects of drying on the gel strength and cation mobility of furcellaran. – *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1, 275–279.
- FURNEAUX, R. H., MILLER, I. J. 1986. Isolation and ¹³C-NMR spectral study of the water soluble polysaccharides from four South African red algae. – *Botanica Marina*, 29, 3–10.
- FURNEAUX, R. H., MILLER, I. J., STEVENSON, T. T. 1990. Agaroids from New Zealand members of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) – a novel dimethylated agar. – *Hydrobiologia*, 204–205: 645–654.
- GLICKSMAN, M. 1983. Red seaweed extracts. – M. Glicksman (toim). *Food hydrocolloids*. Vol. 2. Boca Raton: CRC Press, 73–113.
- GRAHAM, L. E., WILCOX, L. W. 2000. *Algae*. London: Prentice-Hall.
- GUIBET, M., KERVAREC, N., BOULENGUER, P., MAZOYER, J., CRITCHLEY, A., HELBERT, W. 2006. Enzymatic analysis of κ/ι-hybrid carrageenan. – P. A. Williams, G. O. Phillips (toim). *Gums and stabilisers for the food industry*. Vol. 13. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 52–60.
- GUISELEY, K. B. 1970. The relationship between methoxyl content and gelling temperature of agarose. – *Carbohydrate Research*, 13, 247–256.
- HOLMSGAARD, J. E., GREENWELL, M., MCLACHLAN, J. 1981. Biomass and vertical distribution of *Furcellaria lumbricalis* and associated algae. – T. Levring (toim). *Proceedings of the Xth international seaweed symposium*. Berlin: Walter de Gruyter, 309–314.
- HUMM, H. J. 1947. Agar – A pre-war Japanese monopoly. – *Economic Botany*, 1, 317–329.
- INDERGAARD, M., KNUTSEN, S. H. 1990. Seasonal differences in ash, carbon, fibre and nitrogen components of *Furcellaria lumbricalis* (Gigartinales, Rhodophyceae), Norway. – *Botanica Marina*, 33, 327–334.
- IZUMI, K. 1971. Chemical heterogeneity of the agar from *Gelidium amansii*. – *Carbohydrate Research*, 17, 227–230.
- KARLSSON, A., SINGH, S. K. 1999. Acid hydrolysis of sulphated polysaccharides. Desulphation and the effect on molecular mass. – *Carbohydrate Polymers*, 38, 7–15.
- KING, G. M., LAUTERBACH, G. E. 1987. Characterization of carrageenan nitrogen content and its susceptibility to enzymatic hydrolysis. – *Botanica Marina*, 30, 33–39.

- KIRST, G. O. 1990. Salinity tolerance of eukaryotic marine algae. – *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 41, 21–53.
- KNUTSEN, S. H., GRASDALEN, H. 1987. Characterization of water-extractable polysaccharides from Norwegian *Furcellaria lumbricalis* (Huds.) Lamour. (Gigartinales, Rhodophyceae) by IR and NMR spectroscopy. – *Botanica Marina*, 30, 497–505.
- KNUTSEN, S. H., MYSLABODSKI, D. E., LARSEN, B., USOV, A. I. 1994. A modified system of nomenclature for red algal galactans. – *Botanica Marina*, 37, 163–169.
- KOSTAMO, K. 2008. *The life cycle and genetic structure of the red alga Furcellaria lumbricalis on a salinity gradient. Doctoral thesis.* Finland: University of Helsinki.
- KOSTAMO, K., MÄKINEN, A. 2006. Observations on the mode and seasonality of reproduction in *Furcellaria lumbricalis* (Gigartinales, Rhodophyta) populations in the northern Baltic Sea. – *Botanica Marina*, 49, 304–309.
- KRASIL'NIKOVA, S. V., BOIKO, L. I., PETRENKO, E. B., PANCHENKO, K. A., MEDVEDEVA, E. I., LAPIN, V. R., ARGUS, K. Y. 1972. Study of nitrogenous substances of the red alga *Furcellaria fastigiata*. – *Biologicheskie Nauki*, 15, 90–93. (vene keeles).
- KRASIL'NIKOVA, S. V., MEDVEDEVA, E. I. 1975. Some characteristics of the alkali-soluble protein from the red alga *Furcellaria fastigiata*. – *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, 11, 400–404. (vene keeles).
- KRUK-DOWGIALŁO, L. 1991. Long-term changes in the structure of underwater meadows of the Puck Lagoon. – *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 21, 77–84.
- LAI, V. M.-F., LII, C.-Y., HUNG, W.-L., LU, T.-J. 2000. Kinetic compensation effect in depolymerisation of food polysaccharides. – *Food Chemistry*, 68, 319–325.
- LAOS, K. 2005. *Interactions between furcellaran and the globular proteins (bovine serum albumin, β -lactoglobulin). Doctoral thesis.* Estonia: Tallinn University of Technology.
- LAOS, K., BROWNSEY, G. J., RING, S. G. (2007). Interactions between furcellaran and the globular proteins bovine serum albumin and β -lactoglobulin. – *Carbohydrate Polymers*, 67, 116–123.
- LAOS, K., RING, S. 2005. Characterisation of furcellaran samples from Estonian *Furcellaria lumbricalis* (Rhodophyta). – *Journal of Applied Phycology*, 17, 461–464.
- LECACHEUX, D., PANARAS, R., BRIGAND, G., MARTIN, G. 1985. Molecular weight distribution of carrageenans by size exclusion chromatography and low angle laser light scattering. – *Carbohydrate Polymers*, 5, 423–440.
- LEVRING, T., HOPPE, H. A., SCHMID, O. J. 1969. *Marine algae. A survey of research and utilization.* Hamburg: De Gruyter and Co.
- LII, C.-Y., CHEN, C.-H., YEH, A.-I., LAI, V. M. F. 1999. Preliminary study on the degradation kinetics of agarose and carrageenans by ultrasound. – *Food Hydrocolloids*, 13, 477–481.
- LÜNING, K. 1990. *Seaweeds: their environment, biogeography, and ecophysiology.* New York: John Wiley & Sons.
- MARTIN, G., PAALME, T., KUKK, H. 1996. Long-term dynamics of the commercially useable *Furcellaria lumbricalis*-*Coccotylus truncatus* community in Kassari Bay, West Estonian Archipelago, the Baltic Sea. – *Proceedings of Polish-Swedish symposium on Baltic coastal fisheries. Resources and management.* 2–3 April 1996, Gdynia, Poland. Gdynia: Sea Fisheries Institute, 121–129.

- MARTIN, G., PAALME, T., TORN, K. 2006. Seasonality pattern of biomass accumulation in a drifting *Furcellaria lumbricalis* community in the waters of the West Estonian Archipelago, Baltic Sea. – *Journal of Applied Phycology*, 18, 557–563.
- MATHIESON, A. C., EMERICH PENNIMAN, C., TVETER-GALLAGHER, E. 1984. Phyco-colloid ecology of underutilized economic red algae. – *Hydrobiologia*, 116–117, 542–546.
- MATSUHASHI, T. 1990. Agar. – P. Harris (toim). *Food gels*. London: Elsevier, 1–51.
- MATULEWICZ, M. C., CEREZO, A. S. 1980. The carrageenan from *Iridaea undulosa* B.; Analysis, fractionation and alkaline treatment. – *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 31, 203–213.
- MCCANDLESS, E. L., WEST, J. A., GUIRY, M. D. 1982. Carrageenan patterns in the Phyllophoraceae. – *Biochemical Systematics and Ecology*, 10, 275–284.
- MCCANDLESS, E. L., WEST, J. A., VOLLMER, C. M. 1981. Carrageenans of species in the genus *Phyllophora*. –T. Levring (toim). *Proceedings of the Xth international seaweed symposium*. Berlin: Walter de Gruyter & Co, 473–478.
- MEUNIER, V., NICOLAI, T., DURAND, D. 2001. Structure of aggregating κ -carrageenan fractions studied by light scattering. – *International Journal of Biological Macromolecules*, 28, 157–165.
- MICHEL, A.-S., MESTDAGH, M. M., AXELOS, M. A. V. 1997. Physico-chemical properties of carrageenan gels in presence of various cations. – *International Journal of Biological Macromolecules*, 21, 195–200.
- MIKULICH, D. V., KOPYTOV, Y. P. 2002. Carbohydrate composition and some technological properties of Baltic *Rhodophyta*. – *International Journal of Algae*, 4, 11–19.
- MINICHEVA, G. G. 2007. Contemporary morpho-functional transformation of seaweed communities of the Zernov phyllophora field (Black Sea). – *International Journal on Algae*, 9, 1–21.
- MONTOLALU, R. I., TASHIRO, Y., MATSUKAWA, S., OGAWA, H. 2008. Effects of extraction parameters on gel properties of carrageenan from *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta). – *Journal of Applied Phycology*, 20, 521–526.
- MORRIS, E. R., REES, D. A., ROBINSON, G. 1980. Cation-specific aggregation of carrageenan helices: domain model of polymer gel structure. – *Journal of Molecular Biology*, 138, 349–362.
- MORRIS, V. J. 1986. Gelation of polysaccharides. – J. R. Mitchell, D. A. Ledward (toim). *Functional properties of food macromolecules*. London: Elsevier, 121–170.
- MÄKINEN, A., KÄÄRIÄ, J., RAJASILTA, M. 1988. Factors controlling the occurrence of *Furcellaria lumbricalis* (Huds.) Lamour. and *Phyllophora truncata* (Pallas) Zinova in the upper littoral of the archipelago of SW Finland. – *Kieler Meeresforsch Sonderheft*, 6, 140–146.
- MYSLABODSKI, D. E. 1990. *Red-algae galactans: isolation and recovery procedures – effects on the structure and rheology*. Doctoral Thesis. Norway: Norwegian Institute of Technology.
- NIELSEN, R., KRISTIANSEN, A., MATHIESEN, L., MATHIESEN, H. 1995. Distributional index of the benthic macroalgae of the Baltic Sea area. – *Acta Botanica Fennica*, 155, 1–51.

- NILSSON, S., PICULELL, L. 1991. Helix-coil transitions of ionic polysaccharides analyzed within the Poisson-Boltzmann cell model. 4. Effects of site-specific counterion binding. – *Macromolecules*, 24, 3804–3811.
- PAINTER, T. J. 1966. The location of the sulphate half-ester groups in furcellaran and κ -carrageenan. – G. E. Young, J. L. McLachlan (toim). *Proceedings of the Vth international seaweed symposium*. Oxford: Pergamon Press, 305–313.
- PAINTER, T. J. 1983. Algal polysaccharides. – G. O. Aspinall (toim). *The polysaccharides*. Vol. 2. New York: Academic Press, 195–285.
- PAOLETTI, S., DELBEN, F., CESÀRO, A., GRASDALEN, H. 1985. Conformational transition of κ -carrageenan in aqueous solution. – *Macromolecules*, 18, 1834–1841.
- PICULELL, L. 1995. Gelling carrageenans. – A. M. Stephen (toim). *Food polysaccharides and their applications*. New York: Marcel Dekker, 205–244.
- REES, D. A. 1969. Structure, conformation, and mechanism in the formation of polysaccharide gels and networks. – *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*. Vol. 24. Academic Press, 267–332.
- REES, D. A. 1972. Polysaccharide gels. A molecular view. – *Chemistry and Industry (London)*, 19, 630–636.
- RELLEVE, L., NAGASAWA, N., LUAN, L. Q., YAGI, T., ARANILLA, C., ABAD, L., KUME, T., YOSHII, F., DELA ROSA, A. 2005. Degradation of carrageenan by radiation. – *Polymer Degradation and Stability*, 87, 403–410.
- ROBERTS, M. A., ZHONG, H.-J., PRODOLLIET, J., GOODALL, D. M. 1998. Separation of high-molecular-mass carrageenan polysaccharides by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. – *Journal of Chromatography A*, 817, 353–366.
- ROBINSON, G., MORRIS, E. R., REES, D. A. 1980. Role of double helices in carrageenan gelation: the domain model. – *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 152–153.
- ROCHAS, C., RINAUDO, M. 1984. Mechanism of gel formation in κ -carrageenan. – *Biopolymers*, 23, 735–745.
- SCHRAMM, W. 1998. The seaweed resources of the Baltic Sea and the German coasts of the North Sea. – A. T. Critchley, M. Ohno (toim). *Seaweed resources of the world*. Japan: Japan International Cooperation Agency, 226–232.
- SLONEKER, J. H., ORENTAS, D. G. 1962. Pyruvic acid, a unique component of an extracellular bacterial polysaccharide. – *Nature*, 194, 478–479.
- SLOOTMAEKERS, D., VAN DIJK, J. A. P. P., VARKEVISSER, F. A., VAN TRESLONG, C. J. B., REYNAERS, H. 1991. Molecular characterisation of κ - and λ -carrageenan by gel permeation chromatography, light scattering, sedimentation analysis and osmometry. – *Biophysical Chemistry*, 41, 51–59.
- SMIDSRØD, O., GRASDALEN, H. 1982. Some physical properties of carrageenan in solution and gel state. – *Carbohydrate Polymers*, 2, 270–272.
- SPICHTIG, V., AUSTIN, S. 2008. Determination of the low molecular weight fraction of food-grade carrageenans. – *Journal of Chromatography B*, 861, 81–87.
- STANCIOFF, D. J., STANLEY, N. F. 1969. Infrared and chemical studies on algal polysaccharides. – R. Margalef (toim). *Proceedings of the VIth international seaweed symposium*. Madrid: Dirección General de Pesca Marítima, 595–609.

- STANLEY, N. F. 1990. Carrageenans. – P. Harris (toim). *Food gels*. London: Elsevier, 79–119.
- STEVENSON, T. T., FURNEAUX, R. H. 1991. Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. – *Carbohydrate Research*, 210, 277–298.
- STEYERMARK, A., ALBER, H. K., ALUISE, V. A., HUFFMAN, E. W. D., JOLLEY, E. L., KUCK, J. A., MORAN, J. J., OGG, C. L. 1956. Report on recommended specifications for microchemical apparatus. Alkoxy. – *Analytical Chemistry*, 28, 112–115.
- ZHANG, W., PICULELL, L., NILSSON, S. 1991. Salt dependence and ion specificity of the coil-helix transition of furcellaran. – *Biopolymers*, 31, 1727–1736.
- TAKEMASA, M., NISHINARI, K. 2004. The effect of the linear charge density of carrageenan on the ion binding investigated by differential scanning calorimetry, dc conductivity, and kHz dielectric relaxation. – *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 38, 231–240.
- THERKELSEN, G. H. 1993. Carrageenan. – R. L. Whistler, J. N. BeMiller (toim). *Industrial gums*. San Diego: Academic Press, 145–180.
- TRUUS, K., VAHER, M., USOV, A. I., PEHK, T., KOLLIST, A. 1997. Gelling galactans from the algal community of *Furcellaria lumbricalis* and *Coccolytus truncatus* (the Baltic Sea, Estonia): a structure-property study. – *International Journal of Biological Macromolecules*, 21, 89–96.
- TURVEY, J. R., WILLIAMS, E. L. 1970. The structure of some xylans from red algae. – *Phytochemistry*, 9, 2383–2388.
- USOV, A. I. 1998. Structural analysis of red seaweed galactans of agar and carrageenan groups. – *Food Hydrocolloids*, 12, 301–308.
- USOV, A. I., ARKHIPOVA, V. S. 1981. Polysaccharides of algae. XXX. Methylation of κ -carrageenan type polysaccharides of the red seaweeds *Tichocarpus crinitus* (Gmel.) Rupr., *Furcellaria fastigiata* (Huds.) Lam. and *Phyllophora nervosa* (De Cand.) Grev. – *Bioorganicheskaya Khimiya*, 7, 385–390.
- USOV, A. I., SHASHKOV, A. S. 1985. Polysaccharides of algae. XXXIV: Detection of iota-carrageenan in *Phyllophora brodiaei* (Turn.) J. Ag. (Rhodophyta) using ^{13}C -NMR spectroscopy. – *Botanica Marina*, 28, 367–373.
- VAN DE VELDE, F. 2008. Structure and function of hybrid carrageenans. – *Food Hydrocolloids*, 22, 727–734.
- VAN DE VELDE, F., KNUTSEN, S. H., USOV, A. I., ROLLEMA, H. S., CEREZO, A. S. 2002a. ^1H and ^{13}C high resolution NMR spectroscopy of carrageenans: application in research and industry. – *Trends in Food Science & Technology*, 13, 73–92.
- VAN DE VELDE, F., PEREIRA, L., ROLLEMA, H. S. 2004. The revised NMR chemical shift data of carrageenans. – *Carbohydrate Research*, 339, 2309–2313.
- VAN DE VELDE, F., ROLLEMA, H. S., GRINBERG, N. V., BUROVA, T. V., GRINBERG, V. Y., TROMP, R. H. 2002b. Coil-helix transition of iota-carrageenan as a function of chain regularity. – *Biopolymers*, 65, 299–312.
- VIANA, A. G., NOSEDA, M. D., DUARTE, M. E. R., CEREZO, A. S. 2004. Alkali modification of carrageenans. Part V. The iota- ν hybrid carrageenan from *Eucheuma denticulatum* and its cyclization to iota-carrageenan. – *Carbohydrate Polymers*, 58, 455–460.
- VIEBKE, C., WILLIAMS, P. A. 2000. Determination of molecular mass distribution of κ -carrageenan and xanthan using asymmetrical flow field-flow fractionation. – *Food Hydrocolloids*, 14, 265–270.

- VILLANUEVA, R. D., MENDOZA, W. G., RODRIGUEZA, M. R. C., ROMERO, J. B., MONTAÑO, M. N. E. 2004. Structure and functional performance of gigartinacean kappa-iota hybrid carrageenan and solieriacean kappa-iota carrageenan blends. – *Food Hydrocolloids*, 18, 283–292.
- WICHMANN, J., CHRISTENSEN, T. M. I. E., DE VRIES, J. 2006. Distribution of kappa- and iota-structures in hybrid carrageenans. – P. A. Williams, G. O. Phillips (toim). *Gums and stabilisers for the food industry*. Vol. 13. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 61–70.
- YAPHE, W. 1960. Colorimetric determination of 3,6-anhydrogalactose and galactose in marine algal polysaccharides. – *Analytical Chemistry*, 32, 1327–1330.
- YAPHE, W., ARSENAULT, G. P. 1965. Improved resorcinol reagent for the determination of fructose, and of 3,6-anhydrogalactose in polysaccharides. – *Analytical Biochemistry*, 13, 143–148.
- YAROTSKY, S. V., SHASHKOV, A. S., USOV, A. I. 1978. Polysaccharides of algae. XXV. Application of ^{13}C -NMR spectroscopy for structural analysis of κ -carrageenan group polysaccharides. – *Bioorganicheskaya Khimiya*, 4, 745–751.
- YU, G., YANG, B., REN, W., ZHAO, X., ZHANG, J., BARROW, C. 2007. A comparative analysis of four kinds of polysaccharides purified from *Furcellaria lumbricalis*. – *Journal of Ocean University of China (English Edition)*, 6, 16–20.
- YU, S. K., BLENNOW, A., BOJKO, M., MADSEN, F., OLSEN, C. E., ENGELSEN, S. B. 2002. Physico-chemical characterization of floridean starch of red algae. – *Starch-Starke*, 54, 66–74.

TALLINNA ÜLIKOOL

LOODUSTEADUSTE DISSERTATSIOONID

(Analüütilised ülevaated)

TALLINN UNIVERSITY

DISSERTATIONS ON NATURAL SCIENCES

(Abstracts)

1. ANDRES KRATOVITS. *Driving Forces of the Formation of Estonia's International Environmental Cooperation in the 1990-s.* Tallinn: University Press, 2003. 21 p. Tallinn University. Dissertations on Natural Sciences, 8. ISSN 1736-0749. ISBN 9985-58-290-X.
2. REIMO RIVIS. *Shoreline Dynamics in Estonia Associated with Climate Change.* Tallinn: University Press, 2005. 30 p. Tallinn University. Dissertations on Natural Sciences, 9. ISSN 1736-0749. ISBN 9985-58-360-4.
3. TIINA PAALME. *Nuisance Brown Macroalga *Pilayella Littoralis*: Primary Production, Decomposition and Formation of Drifting Algal Mats.* Tallinn: University Press, 2005. 25 p. Tallinn University. Dissertations on Natural Sciences, 10. ISSN 1736-0749. ISBN 9985-58-376-0.
4. JAANUS TERASMAA. *Seston Fluxes and Sedimentation Dynamics in Small Estonian Lakes.* Tallinn: University Press, 2005. 37 p. Tallinn University. Dissertations on Natural Sciences, 11. ISSN 1736-0730. ISBN 9985-58-383-3.
5. MIHKEL KANGUR. *Disturbances and Vegetation Patchiness Reflected in Pollen and Charcoal Profiles from Lacustrine Sediments.* Tallinn: University Press, 2005. 35 p. Tallinn University. Dissertations on Natural Sciences, 12. ISSN 1736-0730. ISBN 9985-58-385-X.
6. AKO SAUGA. *The Influence of Environmental Fluctuations on the Dynamics of Non-linear Systems.* Tallinn: University Press, 2006. 30 p. Tallinn University. Dissertations on Natural Sciences, 13. ISSN 1736-3659. ISBN 9985-58-426-0.
7. TENNO DREVS. *Ecology of Flounder, *Platichthys Flesus Trachurus* (Duncker) in the Eastern Baltic Sea.* Tallinn: University Press, 2006. 30 p. Tallinn University. Dissertations on Natural Sciences, 14. ISSN 1736-3659. ISBN 9985-58-446-0.
8. TIIT MARAN. *Conservation Biology of the European Mink, (Linnaeus 1761): Decline and Causes of Extinction.* Tallinn: University Press, 2007. 38 p. Tallinn University. Dissertations on Natural Sciences, 15. ISSN 1736-3659. ISBN 978-9985-58-468-2.
9. ANGELIKA PORTSMUTH. *Ecophysiological Mechanisms of Forest Plant Growth and Biomass Distribution.* Tallinn: University Press, 2008. 36 p. Tallinn University. Dissertations on Natural Sciences, 16. ISSN 1736-3659. ISBN 978-9985-58-538-2.
10. HANNES TÖNISSON. *Development of Spits on Gravel Beach Type in Changing Storminess and Sea Level Conditions.* Tallinn: University Press, 2008. 38 p. Tallinn University. Dissertations on Natural Sciences, 17. ISSN 1736-3659. ISBN 978-9985-58-569-6.
11. MARIAN PADUCH. *The Diagnostics Problems at Implementation of Plasma Focus Technique in Material and Environmental Sciences.* Tallinn: University Press, 2009. 35 p. Tallinn University. Dissertations on Natural Sciences, 18. ISSN 1736-3659. ISBN 978-9985-58-636-5.