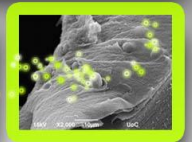


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ  
ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ  
ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ CHLAMYDOMONAS REINHARDTII**



**ΚΩΣΤΟΜΟΙΡΗ ΕΙΡΗΝΗ-ΔΑΦΝΗ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΑΝΩΤΑΚΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2010**

**UNIVERSITY OF CRETE  
DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
BIOCHEMISTRY LABORATORY**

**MASTER OF SCIENCE**

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION  
OF PHOTOSYNTHETIC COMPLEXES  
FROM THE ORGANISM  
CHLAMYDOMONAS REINHARDTII**

**KOSTOMIRI IRENE-DAFNI**

**SUPERVISOR PROFESSOR: GHANOTAKIS DEMETRIOS**

**HERAKLION 2010**

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	ΣΕΛΙΔΑ
<b>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	1
<b>1) <u>ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ</u></b>	
i. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
ii. ΔΟΜΗ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ.....	2
iii. ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ....	4
iv. ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΚΑΙ ΠΑΓΙΔΕΥΣΗ ΤΗΣ ΗΛΙΑΚΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ.....	5
v. ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΡΟΗ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ.....	7
vi. ΤΟ ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑ II.....	9
<b>2) <u>ΤΟ ΑΛΓΟΣ CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</u></b>	
i. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
ii. ΤΟ ΓΕΝΟΣ CHLAMYDOMONAS.....	13
iii. ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ.....	15
iv. ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	16
<b>3) <u>ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΜΗΤΡΑ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ</u></b>	
i. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	18
ii. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΑΛΓΙΝΙΚΩΝ.....	20
iii. ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ.....	21
iv. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΓΕΛΗΣ.....	22
v. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΑΛΓΙΝΙΚΩΝ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ.....	24
vi. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ.....	27
vii. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗ ΧΡΗΣΗ ΑΛΓΙΝΙΚΩΝ.....	29
<b>ΣΚΟΠΟΣ</b>	31

<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>32</b>
<b>1) <u>ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ</u></b>	
i. ΥΛΙΚΑ.....	32
➤ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	
➤ ΣΥΣΚΕΥΕΣ	
ii. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	33
➤ ΦΥΚΟΚΕΝΤΡΗΣΗ	33
➤ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ	34
➤ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ	35
➤ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ	36
➤ ΜΕΤΡΗΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ	37
➤ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗΣ	37
➤ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΚΛΥΣΗΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	38
<b>2) <u>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ</u></b>	
i. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΘΥΛΑΚΟΕΙΔΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΑΠΟ ΣΠΑΝΑΚΙ.....	40
ii. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ PSII ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΑΠΟ ΣΠΑΝΑΚΙ...	41
iii. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ OGP-CORE ΑΠΟ ΣΠΑΝΑΚΙ.....	41
iv. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΘΥΛΑΚΟΕΙΔΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΣΕ ΑΛΓΙΝΙΚΑ ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ.....	42
v. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΘΥΛΑΚΟΕΙΔΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ.....	44
vi. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> .....	46
vii. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΘΥΛΑΚΟΕΙΔΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> .....	47
viii. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> ΣΕ ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ ΚΑΙ ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ.....	48

<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	50
<b>1) <u>ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΑΠΟ ΣΠΑΝΑΚΙ</u></b>	50
i. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ.....	50
ii. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΚΛΥΣΗΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ.....	52
iii. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗΣ...	53
iv. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.....	53
<b>2) <u>ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΑΠΟ ΣΠΑΝΑΚΙ</u></b>	54
i. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ.....	54
ii. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΚΛΥΣΗΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ.....	59
iii. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗΣ...	59
iv. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΣΑΡΩΣΗΣ.....	60
v. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΜΕ ΤΟΝ ΧΡΟΝΟ....	63
<b>3) <u>ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i></u></b>	65
i. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ.....	65
ii. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΚΛΥΣΗΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ.....	66
iii. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗΣ...	66
iv. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.....	67
<b>4) <u>ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i></u></b>	68
i. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ.....	68
ii. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΚΛΥΣΗΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ.....	70
iii. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗΣ...	71

iv.	ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΣΑΡΩΣΗΣ.....	71
	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>77</b>
	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	

## **ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Δημήτριος Γανωτάκης**

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Επιβλέπων Καθηγητής

**Κυριάκος Κοτζαμπάσης**

Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

**Γεώργιος Τσιώτης**

Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

*στους γονείς μου...*



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε κατά το χρονικό διάστημα των ετών 2007-2010 στο εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Δημητρίου Γανωτάκη.

Καταρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για τη δυνατότητα που μου έδωσε να ολοκληρώσω τη μεταπτυχιακή μου εργασία στα πλαίσια του Γενικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος.

Θα ήταν παράλειψη μου να μην εκφράσω ευγνωμοσύνη στον Καθηγητή Δημήτριο Γανωτάκη, όχι μόνο διότι καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας μου, μου προσέφερε απλόχερα επιστημονική καθοδήγηση, αλλά και γιατί μαζί με τη σύζυγο του κ. Καβελάκη, σαν δεύτερη οικογένεια, μου συμπαραστάθηκαν σε δύσκολες προσωπικές μου στιγμές.

Ευχαριστώ επίσης τα έταιρα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής, τον Καθηγητή Κυριάκο Κοτζαμπάση και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γεώργιο Τσιώτη, που δέχτηκαν να αξιολογήσουν την παρούσα Μεταπτυχιακή Εργασία και με τις εύστοχες παρατηρήσεις τους οδήγησαν στην τελική διαμόρφωση του κειμένου της εργασίας.

Καθοριστικής σημασίας ήταν η συμβολή των μελών του εργαστηρίου Μικροσκοπίας 'Β.Γαλανόπουλος' του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και ιδιαιτέρως της κ. Σάντρας Σιάκουλη-Γαλανοπούλου, που με βοήθησε στη λήψη των εικόνων Μικροσκοπίας Σάρωσης.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου στο εργαστήριο του κ. Γανωτάκη και ιδιαιτέρως τον Μεταδιδακτορικό Ερευνητή Τουλουπάκη Ελευθέριο, τον Διδάκτορα Στεφανάκη Δημήτριο και τον Μεταπτυχιακό φοιτητή Αλεξανδρίδη Νικόλαο για την μεταλαμπάδευση των γνώσεων στο πεδίο της φωτοσύνθεσης και της ακινητοποίησης. Ακόμη ευχαριστώ την μεταπτυχιακό φοιτήτρια Παναγάκου Ιωάννα και τον προπτυχιακό φοιτητή Μίχογλου Αριστείδη για την άριστη συνεργασία που είχαμε και τους Τρικεριώτη Μάρκο, Ανυφαντάκη Ελίνα, Καλυκάκη Αγγελική, Παπαδάκη Αριάδνη και Νάζο Χάρη για το ευχάριστο κλίμα που υπήρχε στο εργαστήριο.

Ήταν επίσης χαρά μου να συνεργαστώ με τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας του κ. Τσιώτη και συγκεκριμένα τις Κουγιανού Κάλλια, Παπαδιώτη Τασούλα, Νικολάκη Αντιγόνη και Αρβανίτη Κατερίνα.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να αναφέρω μερικούς ανθρώπους, που κατά την παραμονή μου στο Ηράκλειο μπήκαν στη ζωή μου και παρέμειναν στην καρδιά μου. Αυτοί δεν είναι άλλοι από τους Μπατάκη Μανόλη, Ψαρούλη Αιμιλία, Κοκαράκη

Βέτα, Μπίνα Βασίλη, Ορφανάκη Ανδρέα, Ράπτη Χρήστο, Βαρούχα Δημήτρη, Πανέρα Αγγελική, Δασκαλάκη Νίκο, Καραθανάση Νέστορα, Κάργατζη Νίκο, Γαβαλάκη Όθωνα και Βασιλάκη Ελένη. Εξίσου σημαντικοί για μένα είναι οι φίλοι μου από τη Ρόδο Χατζηχριστοδούλου Σάββας, Βαρέλη Στέλα, Καταββενός Κώστας, Αντωνιάδης Σωτήρης, Γιαννακάκη Βούλα, Αργυρού Δέσποινα, Δημήτρας Γιώργος και Καφούρος Σάββας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κύριο Χατζηκωνσταντίνου Νικήτα, ο οποίος στάθηκε μέντορας και δάσκαλος σε όλα τα βήματα της σταδιοδρομίας μου. Ήταν εκείνος που με έκανε να αγαπήσω τη Χημεία και μου έμαθε τα πρώτα της μυστικά κατά τη διάρκεια των μαθητικών μου χρόνων.

Τέλος, μέσα απ'την καρδιά μου θα ήθελα να εκφράσω τις βαθιές μου ευχαριστίες στους γονείς μου Γιάννη και Ευαγγελία, τον αδερφό μου Γιώργο και την αγαπημένη μου γιαγιά Τσαμπίκα για την αδιάκοπη ηθική και οικονομική τους υποστήριξη καθ'όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

# ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

## ΚΩΣΤΟΜΟΙΡΗ ΕΙΡΗΝΗ-ΔΑΦΝΗ

### ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

**Ημερομηνία Γέννησης:** 2/12/1985  
**Εθνικότητα / Υπηκοότητα:** Ελληνική  
**Διεύθυνση:** Μαδρίτης 24, Ροδίσι, 85100, Ρόδος  
**Τηλέφωνο:** 2241061439, 6974704105  
**e-mail:** irenekostomiri@hotmail.com

### ΣΠΟΥΔΕΣ

- 2007-2010:** Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στον τομέα της Βιοχημείας, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Γανωτάκη Δ., με θέμα «Απομόνωση και χαρακτηρισμός φωτοσυνθετικών συμπλόκων του οργανισμού *Chlamydomonas r.*».
- 2003-2007:** Πτυχίο Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Βαθμός πτυχίου 7.43 (Λίαν Καλώς)
- 2000-2003:** 3<sup>ο</sup> Γενικό Λύκειο Ρόδου, Βαθμός απολυτηρίου 17 και 1/10.

### ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

#### Ερευνητική Εμπειρία

- 2006-2007:** Διπλωματική εργασία στο Εργαστήριο Βιοχημείας, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Γανωτάκη Δ., με θέμα «Ακινητοποίηση του Φωτοσυστήματος II σε βιοσυμβατά υλικά». Βαθμός διπλωματικής 9,5/10.
- 2006:** Πρακτική άσκηση με θέμα «Έλεγχος Ποιότητας Νερού», στη Χημική Υπηρεσία της Ρόδου του Γενικού Χημείου του Κράτους, υπό την επίβλεψη των Χημικών κ. Λαχανιάτη Μ. και Μάτση Β. . Βαθμός πρακτικής άσκησης 10/10.

### Διδακτική Εμπειρία

**Ακαδημαϊκό έτος 2008-2009:** Βοηθός εκπαιδευτής για τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν κατά την διάρκεια των μαθημάτων του εργαστηρίου της Βιοχημείας στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης με υπεύθυνη καθηγήτρια την κ.Καβελάκη Κ. .

### Διοικητική-Οργανωτική Εμπειρία

**10/2007-6/2008:** Μέλος της Οργανωτικής Επιτροπής του 1<sup>ου</sup> Συνεδρίου Μεταπτυχιακών Χημείας Ελλάδας-Κύπρου  
**10/2008-6/2009:** Γραμματέας της Οργανωτικής Επιτροπής του 2<sup>ου</sup> Συνεδρίου Μεταπτυχιακών Χημείας Ελλάδας-Κύπρου  
**2009-2010:** Γραμματέας του Συλλόγου Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης.  
**10/2007-6/2008:** Γραμματέας της Οργανωτικής Επιτροπής του 3<sup>ου</sup> Συνεδρίου Μεταπτυχιακών Χημείας Ελλάδας-Κύπρου

### ΣΥΜΜΕΤΟΧΕΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ ΚΑΙ SUMMER SCHOOL

**23-27 Μαΐου 2007:** Συμμετοχή στο 2<sup>nd</sup> Summer School on Protein Biotechnology. Φόδελε, Κρήτη.  
**04-07 Ιουνίου 2008:** Συμμετοχή στο 3<sup>rd</sup> Summer School on Protein Biotechnology. Φόδελε, Κρήτη.  
**30-6-2008:** 1<sup>ο</sup> Συνέδριο Μεταπτυχιακών Χημείας Ελλάδας-Κύπρου. *Ακινητοποίηση θυλακοειδών μεμβρανών σε βιοσυμβατά υλικά.* (προφορική εργασία).  
**2-4 Ιουλίου 2009:** 10<sup>ο</sup> Συνέδριο Χημείας Ελλάδας-Κύπρου, *Χημική Συνείδηση στον 21<sup>ο</sup> Αιώνα. Ακινητοποίηση φωτοσυνθετικών συμπλόκων σε βιοσυμβατά υλικά.* Ε. Kostomoiri, Ε. Touloupakis and D. Ghanotakis (αναρτημένη εργασία).  
**18-9-2008:** 2<sup>ο</sup> Συνέδριο Μεταπτυχιακών Χημείας Ελλάδας-Κύπρου. *Ακινητοποίηση Φωτοσυνθετικών συμπλόκων σε βιοσυμβατά υλικά.* (προφορική εργασία).

### ΆΛΛΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά: Εξαιρετική (Certificate of Proficiency in English)  
Γερμανικά: Βασική (Elementar Stufe)

## **Σεμινάρια**

Διαπίστευση Εργαστηριακών Δοκιμών σύμφωνα με το Πρότυπο ISO17025:2005

## **Υπολογιστές**

Καλή γνώση του λειτουργικού συστήματος Windows και των προγραμμάτων Microsoft Word, Excel, PowerPoint, Microcal Origin, Adobe Photoshop, Acrobat Reader, Internet Explorer.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε η απομόνωση φωτοσυνθετικών συμπλόκων από σπανάκι και από τα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii*. Τα απομονωμένα σύμπλοκα χαρακτηρίστηκαν πλήρως ποσοτικά και ποιοτικά και ακινητοποιήθηκαν σε μήτρα πολυμερούς αλγινικού ασβεστίου. Εκτός από τα σύμπλοκα ακινητοποιήθηκαν στο ίδιο υλικό και ολόκληρα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* (Vilchez, Garbayo, Markvicheva, Galván, & Leon, 2001).

Τα φωτοσυνθετικά σύμπλοκα ακινητοποιήθηκαν επιτυχώς σε μήτρα αλγινικού ασβεστίου και διαπιστώθηκε η διατήρηση της φωτοσυνθετικής λειτουργίας και αμέσως μετά την ακινητοποίηση αλλά και κατά τη διάρκεια ενός χρονικού διαστήματος ενός μήνα.

Η παγίδευση σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου είναι μια ευρέως διαδεδομένη μέθοδος και αρκετά ελπιδοφόρα που παρέχει ενισχυμένη σταθερότητα στα προσροφημένα πρωτεϊνικά σύμπλοκα και μεμβρανικά συστήματα (Ertesvåg & Valla, 1998). Τα αλγινικά είναι από τα πλέον χρησιμοποιημένα πολυμερή για την ακινητοποίηση πρωτεϊνών με την τεχνική της παγίδευσης, λόγω των ιδιοτήτων που παρουσιάζουν και του χαμηλού κόστους τους (Smidsrod, 1974). Αυτή η μέθοδος είναι ιδανική για την ακινητοποίηση φωτοσυνθετικών υλικών, αφού διατηρούν σε καλό επίπεδο την ενεργότητα των φωτοσυνθετικών συμπλόκων ενώ παράλληλα τους παρέχουν παράλληλα προστασία ενάντια στη γήρανση και τον ισχυρό φωτισμό.

## ABSTRACT

In the present study, it is performed the isolation of photosynthetic complexes from both spinach and *Chlamydomonas reinhardtii* cells. Those complexes were fully characterized and immobilized in a calcium alginate matrix. Besides, *Chlamydomonas reinhardtii* cells were entrapped in the same material (Vilchez, Garbayo, Markvicheva, Galván, & Leon, 2001).

The immobilization of the photosynthetic complexes was successful and it was also determined the photosynthetic function maintenance sharply after the immobilization and after one month's storage at 4°C.

One of the most common hydrogels for entrapment is sodium alginate, providing great stability to proteins and membrane systems (Ertesvåg & Valla, 1998). Alginate is quite promising and fulfills a great variety of requirements as safety to the enzyme, easy manufacturing, non-toxicity and low cost (Smidsrod, 1974). This method is ideal for photosynthetic complexes' immobilization as it preserves them against aging and damages caused from strong illumination.

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Å:	Angstroem
APS:	υπερθειϊκό Αμμώνιο
BSA:	Bovine Serum Albumin
Chl:	χλωροφύλλη
DCBQ:	2,6-διχλωρο-π-βενζοκινόνη
DCMU:	3-(3,4-διχλωροφαινυλο)-1,1-διμεθυλουρία
kDa:	kilodalton
MES:	2-μορφολινο-αιθανοσουλφονικό οξύ
PAGE:	ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου
PEG:	πολυαιθυλενογλυκόλη
Pheo:	φαιοφυτίνη
PMSF:	φαινυλο-μεθυλ-σουλφονυλο-φθορίδιο
PQ:	πλαστοκινόνη
PSI:	φωτοσύστημα I
PSII:	φωτοσύστημα II
PVP:	polyvinylpyrrolidone
RC:	κέντρο αντίδρασης
SDS:	δωδεκυλοθειϊκό νάτριο
SDS-PAGE:	ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS
TEMED:	N,N,N',N'-τετραμέθυλο-αίθυλο-διαμίνη
Tricine:	N-τρις (υδροξυμέθυλο-) μέθυλο-γλυκίνη
Tris:	τρις-υδροξυμέθυλο-αμινομεθάνιο
Triton X-100:	πολύ-αιθυλένο γλυκόλ οκτυλ-φαινόλικός αιθέρας



## ABBREVIATIONS

Å:	angstroem
APS:	ammonium persulfate
BSA:	bovine serum albumin
Chl:	chlorophyll
DCBQ:	2,6-dichloro- $\pi$ -benzoquinone
DCMU:	3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea
kDa:	kilodalton
MES:	2-( <i>N</i> -morpholino)ethanesulfonic acid
PAGE:	polyacrylamide gel electrophoresis
PEG:	polyethylene glycol
Pheo:	pheophytin
PMSF:	phenyl methyl sulfonyl fluoride
PQ:	plastoquinone
PSI:	photosystem I
PSII:	photosystem II
PVP:	polyvinylpyrrolidone
RC:	reaction center
SDS:	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE:	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED:	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylene-diamine
Tricine:	<i>N</i> -tris(hydroxymethyl)-methyl-glycine
Tris:	tris-(hydroxymethyl)-aminomethane
Triton X-100:	polyethylene glycol octylphenyl ether

## 1) ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ

### ι.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η φωτοσύνθεση είναι η πιο σημαντική βιοχημική διεργασία στη γη, κατά την οποία η φωτεινή ηλιακή ενέργεια μετατρέπεται σε διάφορες μορφές χημικής ενέργειας. Επίσης αποτελεί ένα μοναδικό χαρακτηριστικό των ανώτερων φυτών, ευκαρυωτικών φυκών, κυανοβακτηρίων και φωτοσυνθετικών βακτηρίων γεγονός που διαχωρίζει τους οργανισμούς αυτούς (εικόνα 1) από τους ζωικούς.

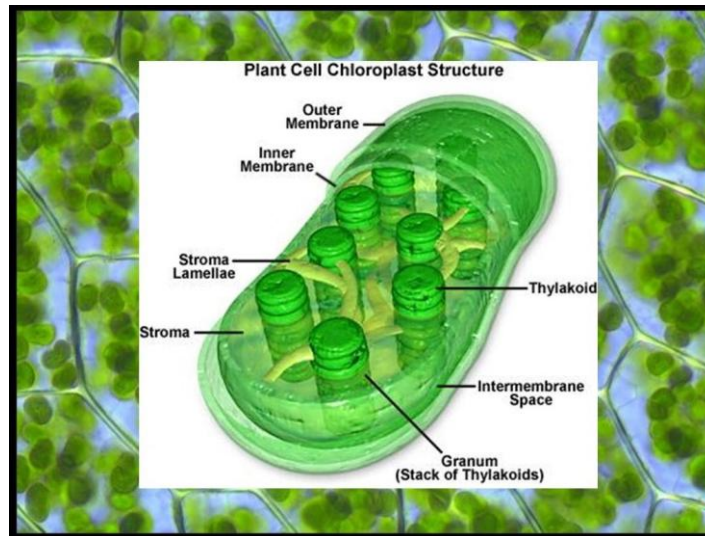


**Εικόνα 1. Παραδείγματα διάφορων φωτοσυνθετικών οργανισμών**

Η φωτοσυνθετική διαδικασία πιστεύεται ότι άρχισε στη θάλασσα πριν από 3 δισεκατομμύρια χρόνια. Η εμφάνιση της οξυγονικής φωτοσύνθεσης θεωρείται ότι έγινε όταν ένα πρωτόγονο κυανοβακτήριο άρχισε να χρησιμοποιεί το νερό σαν άμεσο ηλεκτρονιοδότη ελευθερώνοντας με τον τρόπο αυτό οξυγόνο. Κατά τη διάρκεια της Προκαμβριανής περιόδου αυτό είχε σαν αποτέλεσμα τη μετατροπή της πρωταρχικής αναγωγικής ατμόσφαιρας σε οξυγονική, την περαιτέρω δημιουργία του αερόβιου μεταβολισμού και συνεπώς την εξέλιξη των ανώτερων οργανισμών.

## ii. ΔΟΜΗ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΣΥΜΠΛΟΚΩΝ

Η φωτοσύνθεση είναι μια πολύπλοκη βιοχημική διαδικασία η οποία στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς πραγματοποιείται μέσα σε ειδικά μεμβρανικά σωματίδια τους χλωροπλάστες (εικόνα 2) που ποικίλουν στη μορφή και το μέγεθος ανάλογα με το είδος του οργανισμού που ανήκουν (Wellburn, 1982).



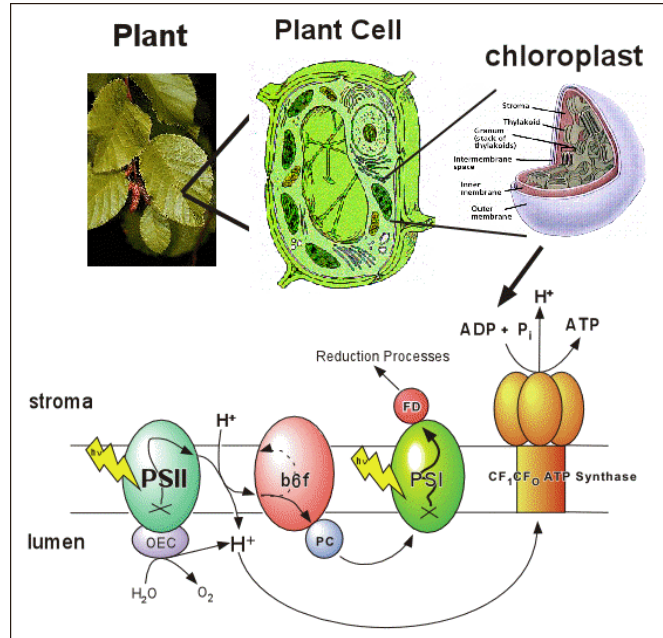
Εικόνα 2. Δομή του χλωροπλάστη

Ο χλωροπλάστης εξωτερικά περιβάλλεται από μια διπλή μεμβράνη (την εξωτερική και την εσωτερική). Ο χώρος μεταξύ εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης ονομάζεται διαμεμβρανικός χώρος. Η εσωτερική μεμβράνη περιβάλλει μια υδατική περιοχή που ονομάζεται στρώμα. Στη περιοχή του στρώματος υπάρχει ένα σύστημα μεμβρανών που σχηματίζουν αναδιπλώσεις και λέγονται lamellae. Κατά διαστήματα, τα lamellae διαπλατύνονται και δημιουργούν μεμβρανώδεις σάκους (τα θυλακοειδή), των οποίων ο εσωτερικός χώρος είναι γνωστός ως lumen. Τέλος, τα θυλακοειδή στοιβάζονται το ένα πάνω στο άλλο, δημιουργώντας τα grana.

Στα θυλακοειδή πραγματοποιούνται οι φωτεινές αντιδράσεις (οξείδωση του νερού, αναγωγή του NADP), των οποίων η πραγματοποίηση απαιτεί την απορρόφηση ηλιακής ενέργειας, ενώ στο στρώμα διεξάγονται οι σκοτεινές αντιδράσεις (αφομοίωση του CO<sub>2</sub>). Η οξείδωση και η δημιουργία του ATP και του NADPH μέσα στα θυλακοειδή απαιτεί τη συνεργατική δράση τεσσάρων πολυπεπτιδικών

## [ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ]

συστημάτων: των φωτοσυστημάτων I και II (PS I και PS II, αντίστοιχα), του κυτοχρώματος  $b_6f$  (cyt  $b_6f$ ) και του συμπλόκου της συνθετάσης του ATP ( $CF_0$ - $CF_1$ ).



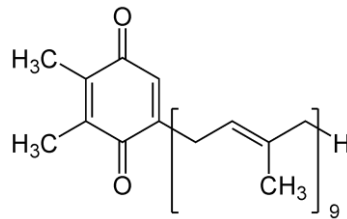
Εικόνα 3. Οργάνωση της θυλακοειδούς μεμβράνης

Το τελευταίο σύμπλοκο αποτελεί τη θέση σύνθεσης του ATP, ενώ τα άλλα τρία δρουν μαζί στη σειρά ώστε να γίνει δυνατή η γεφύρωση της μεγάλης οξειδοαναγωγικής διαφοράς μεταξύ του δυναμικού που απαιτείται για την οξείδωση του νερού από το PS II και αυτού που απαιτείται για την αναγωγή του  $NADP^+$  από το PS I, με τη χρήση της ηλιακής ενέργειας.

Τα δύο φωτοσυστήματα συνδέονται με μικρούς μεταφορείς ηλεκτρονίων, την πλαστοκινίνη (PQ) (εικόνα 4) και την πλαστοκυανίνη (PC), μέσω του cyt  $b_6f$  το οποίο δρα σαν αντλία πρωτονίων κατά τη διάρκεια της μεταφοράς των ηλεκτρονίων. Το PSII βρίσκεται κυρίως στα grana, ενώ το PSI και το σύμπλοκο  $CF_0$ - $CF_1$  εντοπίζεται στα lamellae και τις εκτεθειμένες στο στρώμα περιοχές των grana. Το cyt  $b_6f$  είναι ομοιόμορφα κατανομημένο και στις δύο περιοχές. Όλα αυτά τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα προσανατολίζονται στη μεμβράνη με τέτοιο τρόπο ώστε η επαγόμενη από το φως ηλεκτρονιακή μεταφορά να προκαλεί πρωτονιακή μεταφορά από το στρώμα στην περιοχή lumen. Η διαβαθμισμένη συγκέντρωση πρωτονίων κατά μήκος της

## [ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ]

θυλακοειδούς μεμβράνης χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του ενεργειακού μεταφορέα ATP από το ένζυμο ATP-συνθεάση.



**Εικόνα 4. Δομή της πλαστοκινόνης (ανηγμένη μορφή), ένα αρωματικό μόριο που μεταφέρει τα ηλεκτρόνια και τα πρωτόνια στους φωτοσυνθετικούς μεταφορείς ηλεκτρονίων.**

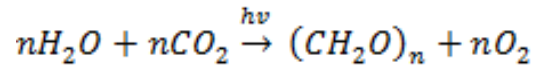
Τα φωτοσυστήματα αποτελούνται από το κέντρο αντίδρασης (Reaction Center, RC) και το σύμπλοκο συλλογής φωτός (Light Harvesting Complex, LHC). Το σύμπλοκο συλλογής φωτός αποτελείται από ένα σύστημα πρωτεϊνών που δεσμεύουν το μεγαλύτερο μέρος των χρωστικών και είναι συνδεδεμένο μη ομοιοπολικά με το ενεργό κέντρο. Στο ενεργό κέντρο του φωτοσυστήματος υπάρχουν μόρια που μετέχουν στη μεταφορά ηλεκτρονίων και ειδικά μόρια χλωροφύλλης. Στο ενεργό κέντρο του PSI το ειδικό μόριο χλωροφύλλης παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 700nm και συμβολίζεται ως P700. Στο ενεργό κέντρο του PSII από την άλλη το ειδικό μόριο χλωροφύλλης εμφανίζει το μέγιστο της απορρόφησης στα 680nm και ονομάζεται P680.

### iii.ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ

Η φωτοσύνθεση περιλαμβάνει τη δέσμευση του διοξειδίου του άνθρακα και την αναγωγή του σε υδατάνθρακες, που αξιοποιούνται στο μεταβολισμό των ετερότροφων οργανισμών. Συγκεκριμένα, κατά τις φωτεινές αντιδράσεις, η ηλιακή ενέργεια χρησιμοποιείται από τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς για τη μετατροπή του ADP σε ATP. Κατά τις σκοτεινές αντιδράσεις, η αποταμιευμένη στο ATP ενέργεια χρησιμοποιείται για να ανάγει το διοξείδιο του άνθρακα σε ένα απλό σάκχαρο (γλυκόζη). Με αυτό τον τρόπο η χημική ενέργεια που ήταν συσσωρευμένη στα μόρια του ATP μετατρέπεται σε μορφές κατάλληλες για μεταφορά και αποθήκευση, και την ίδια στιγμή σχηματίζεται ένας ανθρακικός σκελετός πάνω στον οποίο μπορούν να οικοδομηθούν άλλα οργανικά μόρια.

## [ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ ]

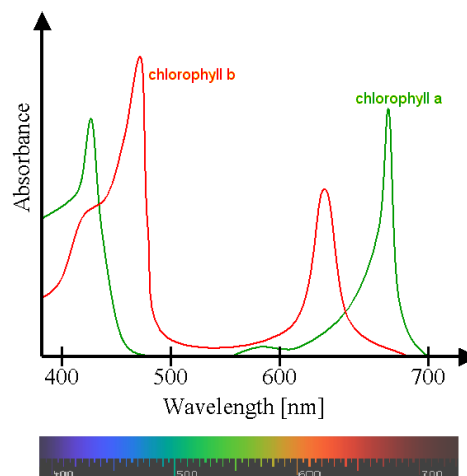
Η χημεία της φωτοσυνθετικής διεργασίας στους οξυγονικούς οργανισμούς (ανώτερα φυτά, φύκη, κυανοβακτήρια) μπορεί να αποδοθεί συνοπτικά με την παρακάτω αντίδραση:



Αυτή η φαινομενικά απλή αντίδραση πετυχαίνεται σε ένα μεγάλο αριθμό σταδίων που καταλύονται από διάφορα συστατικά του στρώματος και των θυλακοειδών. Τα ένζυμα του στρώματος καταλύουν την αφομοίωση του CO<sub>2</sub> σε υδατάνθρακες χρησιμοποιώντας την ενέργεια του αναγωγικού NADPH και του φωσφορικού δεσμού του ATP, τα οποία παράγονται κατά τις φωτεινές αντιδράσεις.

### iv. ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΚΑΙ ΠΑΓΙΔΕΥΣΗ ΤΗΣ ΗΛΙΑΚΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ

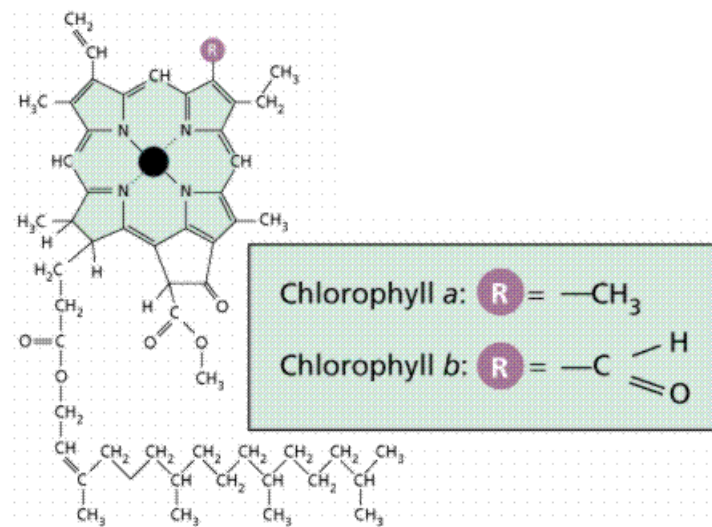
Η απορρόφηση της ηλιακής ενέργειας είναι το πρώτο στάδιο του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Αυτό πραγματοποιείται στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς με τη χρήση φωτοαπορροφητικών μορίων, όπως οι χρωστικές. Οι κυριότερες χρωστικές των ανώτερων φυτών, των φυκών και των κυανοβακτηρίων είναι η χλωροφύλλη a (Chl a) και η χλωροφύλλη b (Chl b). Η χλωροφύλλη a έχει μέγιστα απορρόφησης στα 430nm και 662nm περίπου, ενώ η χλωροφύλλη b έχει μέγιστα απορρόφησης στα 453nm και 642nm, όπως φαίνεται στην εικόνα 5 (Gross, 1991)



Εικόνα 5. Φάσμα απορρόφησης των χλωροφυλλών α και β.

## [ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ]

Η δομή της χλωροφύλλης (εικόνα 6) αποτελείται από έναν πορφυρινικό δακτύλιο, που περιέχει σύστημα π ηλεκτρονίων, που απορροφούν φως. Στο κέντρο του πορφυρινικού δακτυλίου υπάρχει ένα  $Mg^{2+}$  που εξισορροπεί τα 2 αρνητικά φορτία των τεσσάρων πυρρολικών αζώτων. Όλες οι χλωροφύλλες έχουν την ικανότητα να απορροφούν το φως αλλά μόνο οι χλωροφύλλες του ενεργού κέντρου συμμετέχουν στη μετατροπή της φωτοχημικής σε ηλεκτροχημική ενέργεια. Οι χρωστικές της κεραίας απορροφούν και μεταφέρουν την ηλιακή ενέργεια στις χλωροφύλλες του ενεργού κέντρου.



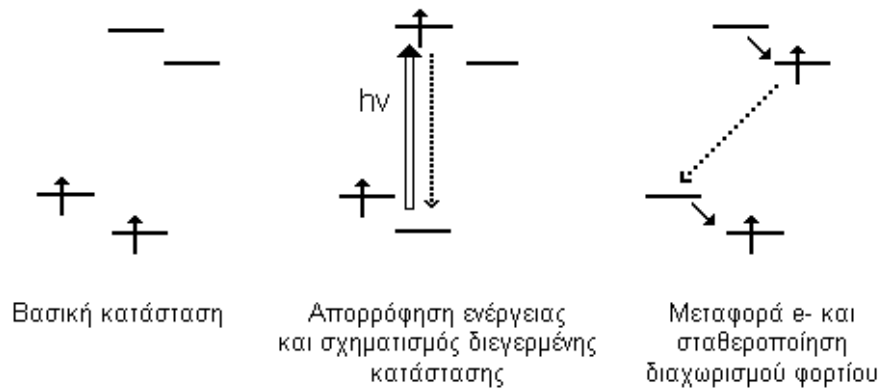
Εικόνα 6. Δομή των μορίων των χλωροφυλλών α και β.

Εκτός των χλωροφυλλών, στους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς υπάρχουν και άλλες χρωστικές όπως τα καροτενοειδή και οι φυκοβιλίνες. Οι χρωστικές αυτές οργανώνονται στα φωτοσυστήματα.

Κατά την έναρξη των φωτεινών αντιδράσεων δημιουργείται ένας διαχωρισμός φορτίου. Ένα ηλεκτρόνιο ενός χρωμοφόρου, με την απορρόφηση ηλιακής ενέργειας, διεγείρεται, και η διεγερμένη κατάσταση του αποτελεί ένα ισχυρό αλλά ασταθές αναγωγικό. Το κενό τροχιακό, από το οποίο προέρχεται το  $e^-$ , αποτελεί ισχυρό οξειδωτικό. Το  $e^-$  μεταφέρεται γρήγορα σε ένα κοντινό ηλεκτρονιοδέκτη με χαμηλότερο δυναμικό οξειδοαναγωγής και ο διαχωρισμός φορτίου σταθεροποιείται έναντι της επαναφοράς του ηλεκτρονίου στο αρχικό τροχιακό (εικόνα 7).



## [ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ]



Εικόνα 7. Αναπαράσταση διαχωρισμού φορτίου.

Το χρωμοφόρο, από το οποίο προέρχεται το  $e^-$ , αποτελεί τον πρωτοταγή ηλεκτρονιοδότη. Στα φυτά, ο πρωτοταγής ηλεκτρονιοδότης είναι το ειδικό μόριο της χλωροφύλλης P680. Το ενζυμικό σύμπλοκο που περιέχει τον πρωτοταγή ηλεκτρονιοδότη και όπου γίνεται ο πρωτοταγής διαχωρισμός φορτίου, λέγεται κέντρο αντίδρασης.

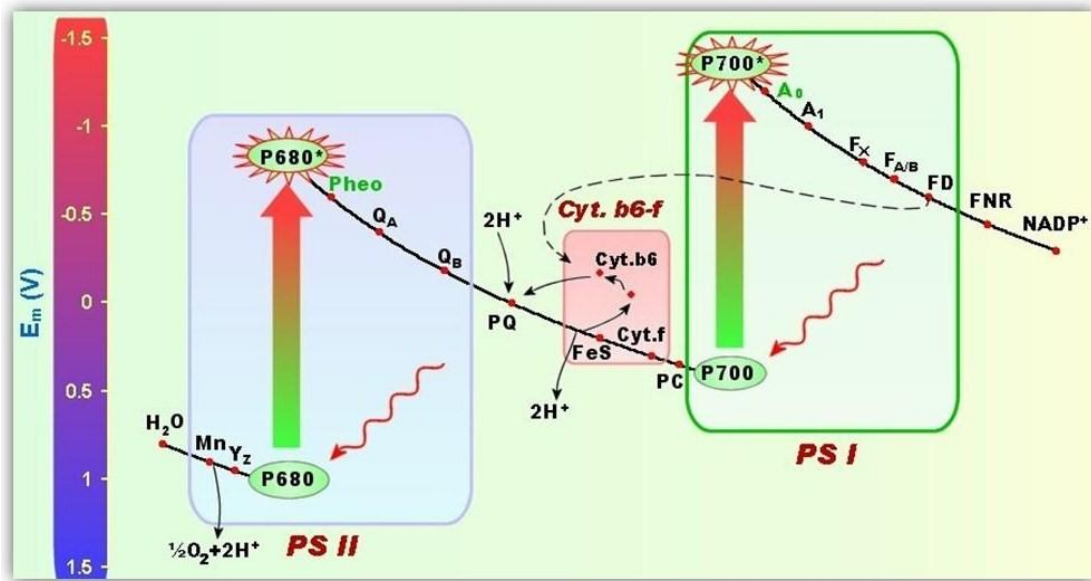
### ν.ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΡΟΗ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ

Στα φυτά, στα άλγη και στα κυανοβακτήρια, ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το  $H_2O$ , το οποίο οξειδώνεται παράγοντας  $O_2$ , προς τη φερρεδοξίνη (Fd), μια υδατοδιαλυτή οξειδοαναγωγική πρωτεΐνη, που ανάγει το συνένζυμο  $NADP^+$ . Επειδή το  $H_2O$  είναι εξαιρετικά ασθενές αναγωγικό, λειτουργούν τα δυο φωτοσυνθετικά σύμπλοκα για να υπερνικηθεί το δυναμικό οξειδοαναγωγής (1,2V) του  $H_2O$  και του  $NADP^+$ . Το περισσότερο αναγωγικό σύμπλοκο είναι το φωτοσύστημα I το οποίο δρα σαν οξειδοαναγωγάση πλαστοκυανίνης-φερρεδοξίνης (Mathis & Rutherford, 1987). Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων από το  $H_2O$  στη φερρεδοξίνη αναπαρίσταται με μια οξειδοαναγωγική κλίμακα δυναμικού η οποία είναι γνωστή ως σχήμα-Z (εικόνα 8). Το δυναμικό αναγωγής του P680 στο PSII είναι πιο θετικό από αυτό του P700 στο PSI. Παρόμοια, τα  $e^-$  δε μπορούν να μεταφερθούν από τη βασική κατάσταση του P700 στο  $NADP^+$ , γιατί το δυναμικό αναγωγής του P700 είναι πιο θετικό από αυτό του  $NADP^+$ . Έτσι κατά τη φωτοσύνθεση, με την απορρόφηση φωτός δημιουργείται η διεγερμένη κατάσταση του P680, η P680\*, της οποίας το δυναμικό αναγωγής είναι



## [ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ]

πιο αρνητικό από του P700. Στη συνέχεια, τα  $e^-$  μεταφέρονται μέσω μιας σειράς ηλεκτρόνιομεταφορέων από το P680 στο P700. Ανάλογα, η διεγερμένη κατάσταση του P700, η  $P700^*$  έχει πιο αρνητικό δυναμικό αναγωγής από το  $NADP^+$ , οπότε μέσω μιας σειράς ηλεκτρόνιομεταφορέων, τα  $e^-$  μεταφέρονται από το P700 στο  $NADP^+$ . Έτσι η ηλιακή ακτινοβολία παρέχει την ενέργεια που απαιτείται για να πραγματοποιηθούν διαδικασίες που δεν ευνοούνται θερμοδυναμικά.



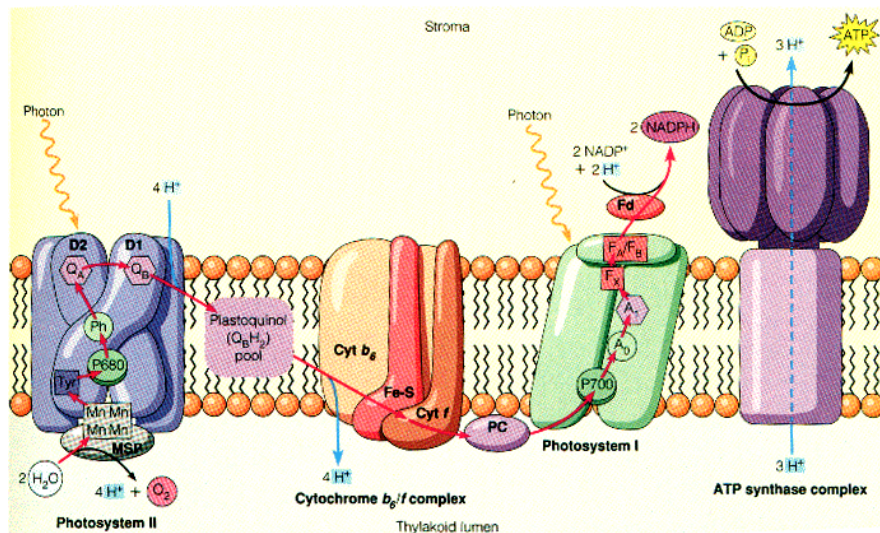
Εικόνα 8. Το σχήμα Z της φωτοσυνθετικής μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Πιο αναλυτικά, ο πρωτοταγής δότης  $e^-$  P680\* μεταφέρει ένα  $e^-$  στη φαιοφυτίνη α (Pheo a). Το P680 με την απώλεια ενός  $e^-$  μετατρέπεται σε ένα ισχυρό οξειδωτικό, το  $P680^+$ , ( $E_m = +1,1V$ ). Η απώλεια του  $e^-$ , καλύπτεται από το  $H_2O$ , το οποίο οξειδώνεται για να παραχθεί τελικά μοριακό  $O_2$  και να ελευθερωθούν  $4H^+$ . Τα  $4H^+$  που ελευθερώνονται στο lumen, συνεισφέρουν στην πρωτονιακή διαβάθμιση κατά μήκος της θυλακοειδούς μεμβράνης. Τα  $4e^-$  μεταφέρονται διαδοχικά στον μεταφορέα ενός  $e^-$ , TyrZ. Όταν το P680\* δώσει το  $e^-$  στη φαιοφυτίνη α και αποκτήσει θετικό φορτίο, τότε αυτό μεταφέρεται από την TyrZ στο P680<sup>+</sup>. Η οξείδωση της TyrZ παράγει μια ισχυρή οξειδωτική ρίζα, την TyrZ<sup>+</sup>, η οποία είναι αναγκαία για την οξείδωση του  $H_2O$ .

Η ανηγμένη φαιοφυτίνη α δίνει ένα  $e^-$  στην κινόνη  $Q_A$  που έχει το πιο αρνητικό δυναμικό αναγωγής από τις κινόνες της μεμβράνης (PQ-pool). Η κινόνη

## [ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ]

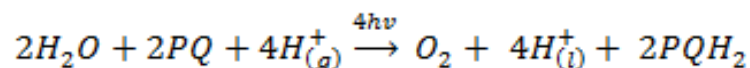
QA οξειδώνεται δίνοντας ένα ηλεκτρόνιο στην κινόνη QB. Η αναγωγή κατά ένα  $e^-$  μετατρέπει την κινόνη QB σε ημικινόνη,  $QB^-$ . Με την απορρόφηση ενός δευτέρου φωτονίου, δηλαδή μετά από ένα δεύτερο διαχωρισμό φορτίου, η μεταφορά ηλεκτρονίων προς την κινόνη QB επαναλαμβάνεται. Δύο πρωτόνια προσθέτονται ταυτόχρονα στην κινόνη QB, έτσι ώστε τελικά η κινόνη να δέχεται δύο  $e^-$  και δύο  $H^+$ , πριν αναχθεί πλήρως σε πλαστοκινόλη,  $PQH_2$ . Κατόπιν, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από το PSII στο σύμπλοκο κυτόχρωμα  $b_6f$  και τέλος, μεταφέρονται μέσω της πλαστοκυανίνης, στο PSI, απ' όπου μέσω μιας σειράς ηλεκτρονιομεταφορέων, των Fe-S πρωτεϊνών και φερρεδοξίνης, φθάνουν στο  $NADP^+$  (εικόνα 9).



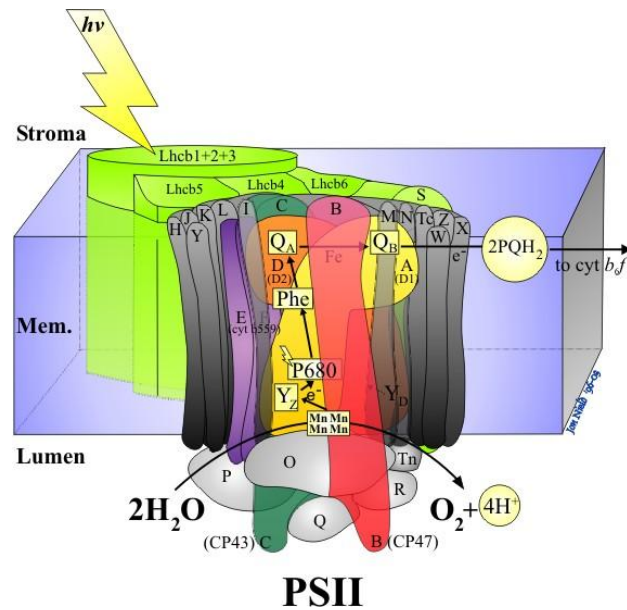
Εικόνα 9. Ηλεκτρονιακή μεταφορά στα σύμπλοκα της θυλακοειδούς μεμβράνης.

### vi. ΤΟ ΦΩΤΟΣΥΣΤΗΜΑ II

Το φωτοσύστημα II (PSII) είναι ένα μεμβρανικό πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο, το οποίο καταλύει μία από τις πιο σημαντικές και ενδιαφέρουσες βιοχημικές αντιδράσεις, την οξείδωση του  $H_2O$  σε μοριακό  $O_2$ .



Η σημασία της αντίδρασης αυτής είναι εμφανής αφού με τον τρόπο αυτό παράγεται όλο το οξυγόνο στο πλανήτη μας. Εντυπωσιακό είναι το γεγονός ότι η αντίδραση αυτή που απαιτεί τεράστια ενέργεια, λαμβάνει χώρα στο PSII (εικόνα 10).



Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση του φωτοσυστήματος των ανώτερων φυτών. Φαίνονται το κέντρο αντίδρασης, το σύμπλοκο συλλογής φωτός και το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου.

Το PSII το οποίο λειτουργεί ως φωτοεπαγόμενη οξειδοαναγωγή αποτελείται από τρία μέρη, το κέντρο αντίδρασης, το σύμπλοκο συλλογής φωτός και το σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου (Oxygen Evolving Complex, OEC) (Bricker & Ghanotakis, 1997). Η ηλιακή ενέργεια απορροφάται από το σύμπλοκο συλλογής φωτός, το οποίο αποτελεί την κεραία του φωτοσυστήματος και περιέχει και το μεγαλύτερο μέρος των χλωροφυλλών α και β. Η ενέργεια διέγερσης μεταφέρεται από την κεραία αυτή στο κέντρο αντίδρασης του PSII όπου λαμβάνουν χώρα οι φωτοχημικές αντιδράσεις (Ghanotakis & Yokum, 1990). Οι αντιδράσεις αυτές οδηγούν στη συσσώρευση οξειδωτικών ισοδυνάμων (Debus, 1992) στο σύμπλοκο έκλυσης οξυγόνου, τα οποία οξειδώνουν δύο μόρια  $H_2O$  σε  $O_2$ .

Το PSII έχει μία σύνθετη αρχιτεκτονική δομή αποτελούμενη από τουλάχιστον 20 πρωτεϊνικές υπομονάδες, οι περισσότερες από τις οποίες βρίσκονται στη θυλακοειδή μεμβράνη (πίνακας 1). Το κέντρο αντίδρασης του αποτελείται από δυο βασικές υπομονάδες, τις πρωτεΐνες D1 και D2. Το ετεροδιμερές D1/D2 δεσμεύεται με μια σειρά παραγόντων που συμμετέχουν στην ηλεκτρονιακή ροή, όπως τον πρωτοταγή δότη ηλεκτρονίων P680, τον ηλεκτρονιοδέκτη Pheo, τις κινόνες QA και QB, τον μη αιμικό σίδηρο  $Fe^{2+}$ , τις ρίζες  $TyrZ^+$  και  $TyrD^+$ , τέσσερις χλωροφύλλες, μια μη φωτοχημική φαιοφυτίνη και ένα έως δύο β-καροτένια. Τέλος οι πρωτεΐνες αυτές παρέχουν υποκαταστάτες στους ανόργανους συμπαραγόντες του συμπλόκου

**[ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗ]**

έκλυσης O<sub>2</sub>, καθώς, επίσης, παρέχουν θέσεις δέσμευσης για τις εξωτερικές πρωτεΐνες του PSII (Barber, Chapman, & Tefler, 1987) (Namba & Satoh, 1987).

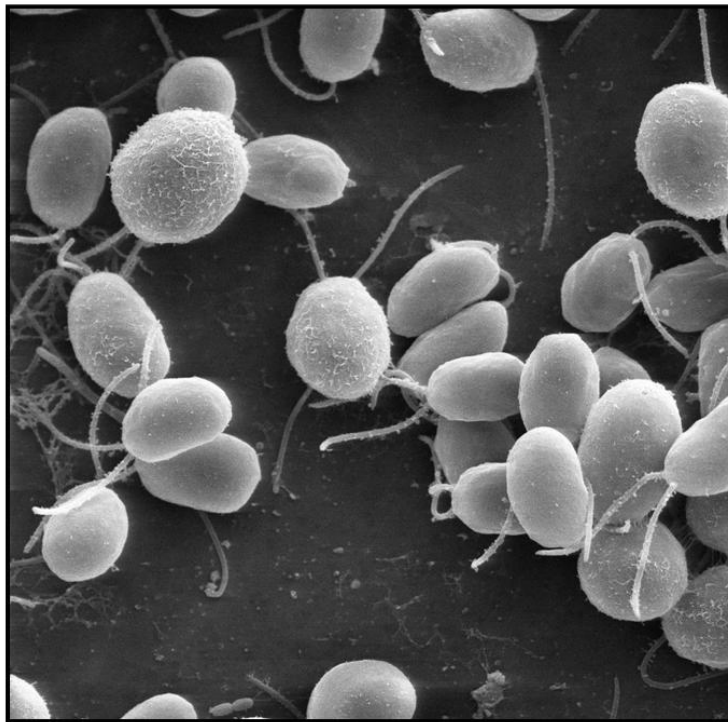
Πρωτεΐνη	Υπομονάδα	Μάζα (kDa)
PsbA	DI	38.021
PsbB	CP47	56.278
PsbC	CP43	50.066
PsbD	D2	39.418
PsbE	$\alpha$ -Cyt <i>b</i> 559	9.255
PsbF	$\beta$ -Cyt <i>b</i> 559	4.409
PsbH	H protein	7.697
PsbI	I protein	4.195
PsbJ	J protein	4.116
PsbK	K protein	4.283
PsbL	L protein	4.366
PsbM	M protein	3.755
PsbN	N protein	4.722
PsbO	33 kDa protein	26.539
PsbP	23 kDa protein	20.210
PsbQ	16 kDa protein	16.523
PsbR	10 kDa protein	10.236
PsbS	Lhc-like protein	21.705
PsbT	5 kDa protein	3.283

**Table 1.** Πρωτεϊνικές υπομονάδες του φωτοσυστήματος II.

## 2) ΤΟ ΑΛΓΟΣ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

### ι.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα *Chlamydomonas reinhardtii* είναι ευκαρυωτικά, μονοκύτταρα πράσινα άλγη που μπορούν να βρεθούν είτε στο χώμα είτε σε βιότοπους γλυκού νερού (Goodenough, Armbrust, Campbell, & Feris, 1995) (εικόνα 11). Τα άλγη αυτού του γένους έχουν κυτταρικό τοίχωμα, έναν χλωροπλάστη (Rochaix, Goldschmidt-Clermont, & Merchant, 1998), μία κεραία που δέχεται το φως και δύο μαστίγια με τα οποία μπορούν να κινούνται (εικόνα 12). Πάνω από 500 διαφορετικά είδη της οικογένειας *Chlamydomonas* έχουν περιγραφεί, αλλά οι περισσότεροι επιστήμονες δουλεύουν μόνο με λίγα από αυτά.



Εικόνα 11. Το μονοκύτταρο πράσινο άλγος *Chlamydomonas reinhardtii*.

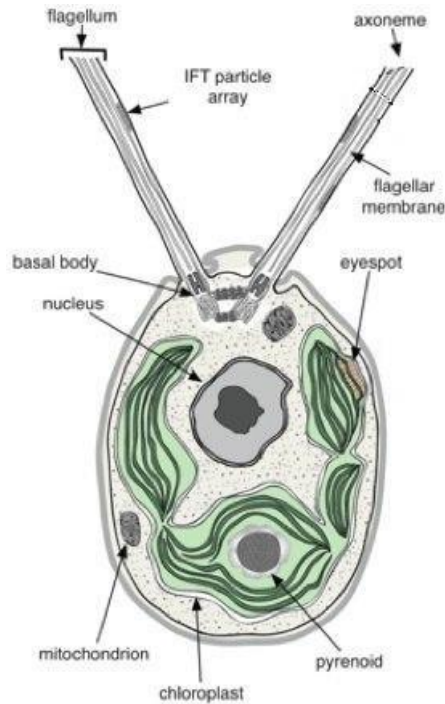
Το άλγος αυτό είναι ένας πρότυπος οργανισμός για την έρευνα από τη δεκαετία του '50 και δίνει απαντήσεις σε πολλά βασικά ερωτήματα που αφορούν τα



## [ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΤΟ ΑΛΓΟΣ CHLAMYDOMONAS REINHARDTII]

κύτταρα και τη μοριακή βιολογία: πώς κινούνται τα κύτταρα; πώς ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα του περιβάλλοντος όπως είναι το φως; πώς δουλεύει η φωτοσύνθεση; πώς τα κύτταρα αναγνωρίζουν το ένα το άλλο;

Αυτά τα άλγη είναι γενετικά και φυσιολογικά χαρακτηρισμένοι οργανισμοί. Είναι ένας ιδανικός οργανισμός για μελέτες μεταλλαξιγένεσης διότι το *Chlamydomonas* έχει έναν χλωροπλάστη ανά κύτταρο.



Εικόνα 12. Δομή κυττάρου *Chlamydomonas reinhardtii*.

Κύτταρα αυτού του είδους είναι απλοειδή και μπορούν να μεγαλώσουν σε ένα απλό θρεπτικό μέσο ανόργανων αλάτων, χρησιμοποιώντας τη φωτοσύνθεση για να εξασφαλίσουν ενέργεια. Μπορούν επίσης να μεγαλώσουν σε απόλυτο σκοτάδι αν τους παρέχεται οξικό ως εναλλακτική πηγή άνθρακα.

### ii.ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ

Το γένος *Chlamydomonas* (στα ελληνικά: *chlamys*, μανδύας· *monas*, μοναχικός, σήμερα χρησιμοποιείται ως ένας γενικός όρος για κάποια μονοκύτταρα μαστιγοφόρα) ονομάστηκε από τον C.G.Ehrenberg (1833,1838), και πιθανόν

## [ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΤΟ ΛΑΓΟΣ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*]

αναφέρεται στα μαστιγοφόρα *Monas* που περιγράφηκαν το 1786. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται περίπου 459 είδη του γένους *Chlamydomonas* και περιστασιακά έχουν υπάρξει διαφωνίες ανάμεσα στους επιστήμονες σχετικά με την ταξινόμηση τους.

Τα βασικά χαρακτηριστικά του γένους αυτού είναι δυο πρόσθια μαστίγια ίσου μήκους, ένα κυτταρικό τοίχωμα και ένας χλωροπλάστης ή χρωματοφόρο που περιέχει ένα ή περισσότερα πυρηνοειδή (pyrenoids).

Παρόλο που το σχήμα και το μέγεθος του σώματος του κυττάρου ποικίλει ανάμεσα στα είδη των *Chlamydomonas* (όπως ορίζεται από μορφολογικά κριτήρια), η γενική πολική δομή, με τα συνδυασμένα μαστίγια και τον χλωροπλάστη που περιβάλλει ένα ή περισσότερα πυρηνοειδή, είναι σταθερή. Τα κύτταρα συνήθως κολυμπούν ελεύθερα σε υγρό μέσο, αλλά μπορούν να αναπτυχθούν και σε στερεό υπόστρωμα όπου δεν χρησιμοποιούν τα μαστιγιά τους.

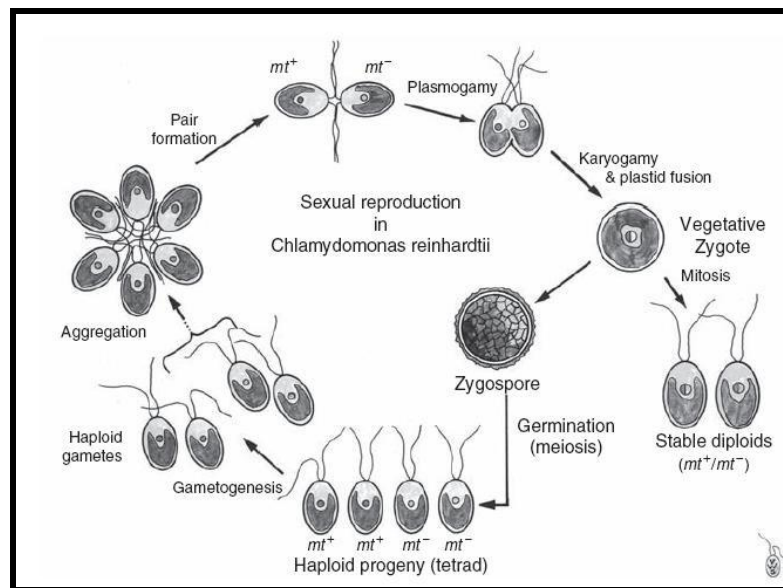
Το γένος *Chlamydomonas* εμφανίζει παγκόσμια κατανομή και μπορεί να βρεθεί σε μια ποικιλία από περιβάλλοντα. Τοποθεσίες συλλογής περιλαμβάνουν εύκρατες, τροπικές και πολικές περιοχές. Είδη του *Chlamydomonas* έχουν απομονωθεί από λίμνες γλυκού νερού, λιμνούλες βοθρολυμάτων, από θαλασσινά και υφάλμυρα νερά, από χιόνια, απόβλητα κήπων και γεωργικά απόβλητα, από δάση, ερήμους, βάλτους, τοίχους με υγρασία και από μια τεχνητή λίμνη ενός ηφαιστιογενούς νησιού (Harris, 2009).



Εικόνα 13. *Chlamydomonas reinhardtii* σε χιονισμένη περιοχή

### iii. ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Τα *C. reinhardtii* είναι ετεροθαλλικά και ισόγαμα (εικόνα 13). Δηλαδή, το φύλο (αναφερόμενο ως συν και πλην) είναι γενετικά προσδιορισμένο σε μία κυτταρική σειρά, και συμπεριφέρεται ως μία μεντελική περιοχή κατά τις διασταυρώσεις. Οι κατά αντιστοιχία με το φύλο συν και πλην γαμέτες είναι παραπλήσιοι στο μέγεθος και την εξωτερική εικόνα, αν και μπορεί να διαφέρουν στο επίπεδο της υπερδομής τους.



Εικόνα 14. Αναπαραγωγικός κύκλος στο άλγος *Chlamydomonas reinhardtii*

Μερικά από τα μοντέλα ζευγαρώματος που εμφανίζονται στην οικογένεια *Chlamydomonas* είναι ανισογαμία (μορφολογικά παρόμοιοι γαμέτες που διαφέρουν αξιοσημείωτα στο μέγεθος), διάφοροι βαθμοί ετερογαμίας (μορφολογικά διαφορετικοί γαμέτες, με μεγάλη διαφορά στο μέγεθος σε γενικές γραμμές) και ωογαμία (μικρά κινητά κύτταρα ‘σπέρματος’ και μεγάλα μη κινητά ‘αυγά’ χωρίς τοίχωμα. (Harris, 2009)



#### iv.ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Μέχρι τώρα έχουν αναφερθεί κυρίως τρεις συνθήκες ανάπτυξης για άλγη, κατά τις οποίες χρησιμοποιούνται οργανικές πηγές άνθρακα. Φωτοτροφική ή φωτοαυτοτροφική ανάπτυξη συνεπάγεται μια καλλιέργεια με φωτοσυνθετικά αφομοιωμένο CO<sub>2</sub> ως μοναδική πηγή άνθρακα. Ετεροτροφική (οργανοτροφική) ανάπτυξη σημαίνει καλλιέργεια στο σκοτάδι με μια οργανική πηγή άνθρακα (συνήθως οξικό στην περίπτωση των ειδών του *Chlamydomonas*). Τέλος η φωτοετεροτροφική ανάπτυξη που είναι καλλιέργεια στο φως με προστιθέμενο οξικό. Διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης απαιτούν την προσαρμογή των κυττάρων και την περαιτέρω αλλαγή στον μεταβολισμό τους.

Στη φύση, τα *C.reinhardtii* είναι οργανισμός που ζει στο χώμα, παρόλα αυτά μπορεί κάλλιστα να αναπτυχθεί στο εργαστήριο είτε σε υγρή καλλιέργεια, είτε σε στερεή καλλιέργεια με απλά μεταλλικά άλατα. Επίσης πολλές από τις συνταγές που έχουν προταθεί για άλγη γενικά αρκούν για την ανάπτυξη και αυτού του είδους. Ο πίνακας 1 παραθέτει την σύσταση των μέσων που χρησιμοποιούνται πιο συχνά στην έρευνα των *Chlamydomonas*. Από αυτά, το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο είναι πιθανά το μέσο TAP (tris-acetate-phosphate).

Προετοιμασία μιας καλής καλλιέργειας απαιτεί μια καλή πηγή νερού. Εργαστηριακό νερό καθαρισμένο με συστήματα απόσταξης ή αντίθετης ώσμωσης ίσως είναι αναγκαίο να περαστεί από μια ανιοανταλλακτική κολώνα πριν τη προετοιμασία του θρεπτικού. Το νερό μπορεί να συμβάλλει είτε στην μη ανάπτυξη των κυττάρων, είτε σε αλλαγές στον κύκλο γονιμοποίησης τους. (Harris, 2009)

**[ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΤΟ ΑΛΓΟΣ CHLAMYDOMONAS REINHARDTII ]**

Component	Sager-Granick	Eversole	Sueoka	Kuhl	Bold	TAP
<b>Major components (mM)</b>						
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	3.7	93.5	9.35	6 × 10 <sup>-5</sup>	-	7.48
K <sup>+</sup>	1.88	0.52	22.12	10.0	2.70	1.94
Na <sup>+</sup>	5.1	0.027	0.27	5.5	3.37	0.27
Ca <sup>2+</sup>	0.36	0.09	0.068	0.10	0.17	0.34
Mg <sup>2+</sup>	1.2	2.03	0.081	1.0	0.30	0.41
Fe <sup>3+</sup>	0.37	-	-	-	-	-
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	3.7	-	-	10.0	2.94	-
Cl <sup>-</sup>	1.83	112.9	9.55	0.20	0.78	8.22
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1.2	2.03	0.182	1.03	0.38	0.51
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	1.31	0.115	13.6	5.0	1.72	1.00
Tris	-	50.0	-	-	-	20.0
Citrate	1.7	-	-	-	-	-
Acetate	-	-	-	-	-	17.4
<b>Trace components (μM)</b>						
Fe <sup>2+</sup>	-	1.79	17.9	25	17.9	17.9
Zn <sup>2+</sup>	3.5	7.65	76.5	1.0	30.7	76.5
Cu <sup>2+</sup>	0.25	0.63	6.3	0.01	6.3	6.3
Co <sup>2+</sup>	0.84	0.68	6.8	-	1.7	6.8
Mn <sup>2+</sup>	2.0	2.56	25.6	1.0	7.3	25.6
Mo <sup>6+</sup>	0.82	0.62	6.2	0.07	4.9	6.2
BO <sub>3</sub> <sup>3-</sup>	16	18.4	184	1.0	184	184
EDTA	-	13.4	134	25	171.1	134

**Table 2. Μοριακή σύσταση του θρεπτικού μέσου**

### 3) ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΕ ΜΗΤΡΑ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ

#### i.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ακινητοποίηση αποτελεί αναμφισβήτητα μια μέθοδο ουσιαστικής σημασίας στη μελέτη της βιοχημείας. Το βασικότερο μειονέκτημα των βιολογικών υλικών, που εμποδίζει τη χρήση τους σε τεχνολογικές εφαρμογές, είναι η μειωμένη τους σταθερότητα. Η ανάγκη όμως για διατήρηση της ουσιαστικής βιολογικής δραστηριότητας των βιολογικών συστημάτων στην έρευνα καθιστά την ακινητοποίηση αποτελεσματική λύση. Η ακινητοποίηση μιας πρωτεΐνης, ενός ενζύμου ή ενός συμπλόκου μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στη σταθεροποίησή του. Ένα σωματίδιο θεωρείται ακινητοποιημένο όταν η κινητικότητα του περιορίζεται με τεχνητό τρόπο ενώ παράλληλα διατηρείται η δραστηριότητά του (Lalonde & Margolin, 2002). Οι μέθοδοι της ακινητοποίησης προσδιορίζονται είτε ως χημικές, είτε ως φυσικές, ανάλογα με το αν δημιουργούνται ή όχι ομοιοπολικοί δεσμοί. Η επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου ακινητοποίησης εξαρτάται από το είδος του βιολογικού υλικού. Το ακινητοποιημένο βιολογικό υλικό μπορεί να αναπαραχθεί και να επαναχρησιμοποιηθεί σε επαναλαμβανόμενες δοκιμές που θα επιτρέπουν συνεχείς ή πολλαπλάσιες δοκιμές.

Η παγίδευση, ως τεχνική ακινητοποίησης των πρωτεϊνών, ορίζεται ως ο φυσικός περιορισμός της πρωτεΐνης εντός καθορισμένου χώρου ή δικτύου. Το πλέγμα του υλικού θα πρέπει να είναι καλά οργανωμένο ώστε να πραγματοποιείται η συγκράτηση του ενζύμου, αλλά ταυτόχρονα να είναι διαπερατή από το υπόστρωμα και τα προϊόντα.

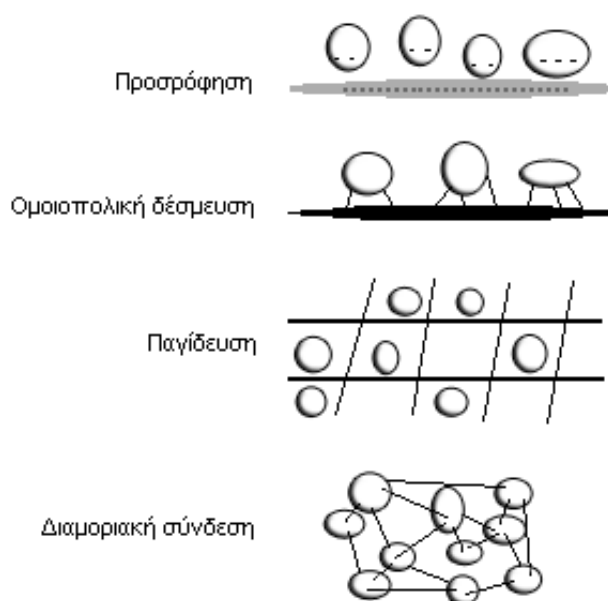
Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι ακινητοποίησης είναι:

(Α) **Προσρόφηση σε μια στερεή επιφάνεια.** Οι δεσμοί που αναπτύσσονται μεταξύ του υλικού στήριξης και του βιολογικού μορίου είναι μη-ομοιοπολικής φύσεως.

(Β) **Ομοιοπολική δέσμευση.** Οι δεσμοί σχηματίζονται μεταξύ δραστικών ομάδων (καρβοξυλομάδες, αμινομάδες) της επιφάνειας του υλικού και αντίστοιχων δραστικών ομάδων καταλοίπων αμινοξέων.

(Γ) **Παγίδευση.** Πραγματοποιείται μέσα σε μια μεμβράνη, ένα πολυμερές ή μια μικροκάψουλα.

(Δ) **Διαμοριακή σύνδεση.** Η ακινητοποίηση ενζύμων μέσω διαμοριακής σύνδεσης συντελεί στην παρασκευή ενζυμικών στρωμάτων που περιέχουν μεγάλη ποσότητα ενζύμου (εικόνα 14) .



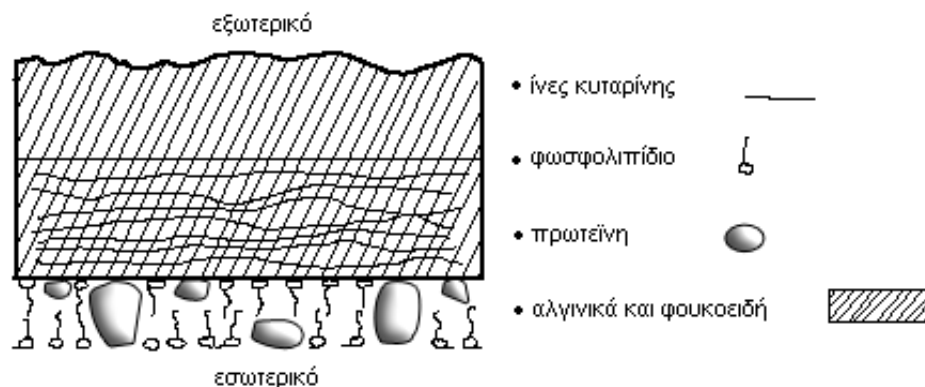
Εικόνα 15. Σχηματικό διάγραμμα των κύριων τεχνικών ακινητοποίησης. (Bardelletti, 1991)

Τα αλγινικά είναι από τα πλέον χρησιμοποιούμενα πολυμερή για την ακινητοποίηση πρωτεϊνών, με την τεχνική της παγίδευσης. Είναι φυσικά βιοπολυμερή και εμφανίζουν πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία φαρμάκων και τροφίμων. Στη βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιούνται ως πηκτικά, διογκωτικά, ως γαλακτωματοποιητικά μέσα και ως σταθεροποιητές. Επίσης, στη βιομηχανία φαρμάκων χρησιμοποιούνται αρκετά λόγω της απουσίας τοξικότητας, της απλής και ήπιας διαδικασίας σχηματισμού της υδρογέλης, καθώς και της βιοσυμβατότητα τους.

Αλγινικά σφαιρίδια έχουν χρησιμοποιηθεί για την παγίδευση πολλών πρωτεϊνών, λόγω των ιδιοτήτων που παρουσιάζουν, καθώς και του χαμηλού κόστους τους.

## ii.ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΑΛΓΙΝΙΚΩΝ

Σαν πηγή προέλευσης των αλγινικών αναφέρονται τρία είδη καφέ αλγών. Τα *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* και *Macrocystis pyrifera*. Μία άλλη πηγή αλγινικών αποτελούν τα είδη *Laminaria japonica*, *Eclonia maxima*, *Lesonia negerscens* και *Sargassum*. Σε όλα τα παραπάνω είδη, τα αλγινικά αποτελούν το 40% του συνολικού τους βάρους επί ξηρού. Εντοπίζονται στο ενδοκυττάριο υλικό των παραπάνω οργανισμών και απαντώνται με τη μορφή αλάτων κατιόντων μετάλλων που περιέχονται στο θαλασσινό νερό, όπως  $Mg^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Na^+$ .



Εικόνα 16. Δομή του κυτταρικού τοιχώματος στα καφέ άλγη

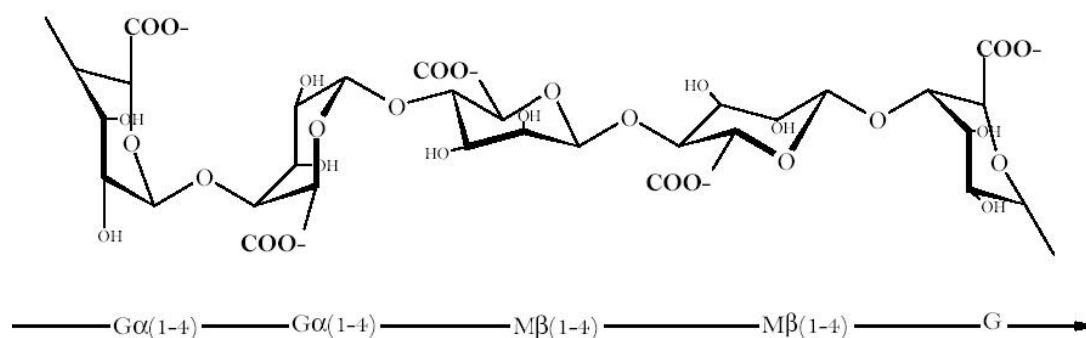
Τα αλγινικά απομονώνονται με εκχύλιση από τα ξερά άλγη, αφού κατεργαστούν με οξύ ώστε να απομακρυνθούν διάφοροι μη επιθυμητοί πολυσακχαρίτες και κάποια μεταλλικά κατιόντα στα οποία οφείλεται η έλλειψη διαλυτότητας τους. Στη συνέχεια ακολουθεί κατεργασία με υδροξείδιο του νατρίου, οπότε παράγεται ένα παχύρευστο μίγμα αλγινικών και κυτταρικών μεμβρανών οι οποίες περιέχουν και κυταρίνη. Κατόπιν το διάλυμα αυτό φιλτράρεται ώστε να απομακρυνθούν οι μεμβράνες και με περαιτέρω επεξεργασία αποχρωματίζεται. Το τελικό προϊόν είναι ένα καθαρό διάλυμα αλγινικών, τα οποία μπορούν να μετατραπούν σε άλας ή οξύ με την ανάλογη κατεργασία (Sutherland, 1991).

### iii. ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ

Τα αλγινικά πολυμερή, είναι γραμμικοί πολυσακχαρίτες σχηματιζόμενοι από β-D-μαννουρονικό (M) και α-L-γουλουρονικό οξύ (G), τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με α1-4 γλυκοζιτικό δεσμό. Σημειώνεται πως στην περίπτωση που ο πολυμερισμός λαμβάνει χώρα μεταξύ μανουρονικών οξέων (MM), ή μεταξύ μανουρονικού και γλουρονικού οξέος, η σύνδεση πραγματοποιείται με β1-4 γλυκοζιτικό δεσμό (Meera & Emilia, 2006).

Η σύσταση των πολυμερών αυτών ποικίλει, καθώς ο πολυμερισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί μεταξύ όμοιων G-G, M-M και διαφορετικών G-M, M-G σακχαρικών μονάδων. Λόγω του συγκεκριμένου σχήματος των μονομερών και του τρόπου σύνδεσής τους στα πολυμερή η γεωμετρία των G-G, M-M G-M και M-G περιοχών του πολυμερούς είναι διαφορετική (Haug, Larsen, & Smidsrod, 1967) (Haug & Larsen, 1962). Συγκεκριμένα οι περιοχές του πολυμερούς όπου υπάρχει α-L-γουλουρονικό οξύ (G-περιοχές) κάμπτονται σχηματίζοντας μία κοιλότητα, ενώ οι περιοχές όπου συναντώνται μονάδες β-D-μαννουρονικού οξέος (M-περιοχές) έχουν ευθύγραμμη διάταξη. Έτσι, όταν δύο G-περιοχές έρθουν σε επαφή μεταξύ τους σχηματίζεται μια κοιλότητα (εικόνα 16).

Οι διαστάσεις της κοιλότητας αυτής είναι ιδανικές για τη συνεργατική δέσμευση κατιόντων μετάλλων.

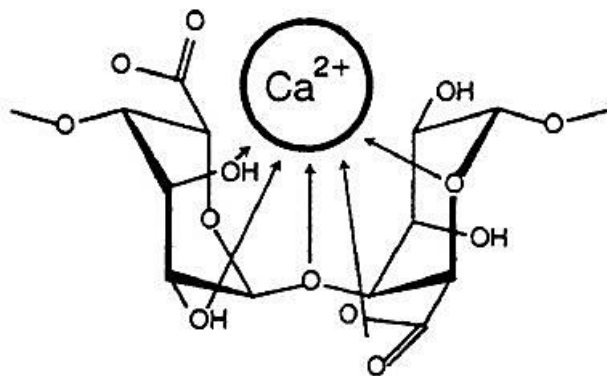


Εικόνα 17. Χημική δομή αλγινικών, διαμόρφωση GG μονάδων (αριστερά), MM μονάδων (κέντρο) και MG μονάδων (δεξιά).

Η σύνθεση και το μήκος της αλυσίδας και κατ' επέκταση το μοριακό βάρος τους, προσδιορίζουν τις φυσικές ιδιότητες των αλγινικών. Το ιζώδες του αλγινικού διαλύματος εξαρτάται πρωταρχικά από το μοριακό βάρος του υλικού. Το μοριακό βάρος διαφόρων δειγμάτων αλγινικών έχει προσδιοριστεί με light scattering και οι τιμές του καλύπτουν μια περιοχή μεταξύ 80 kDa και 290 kDa.

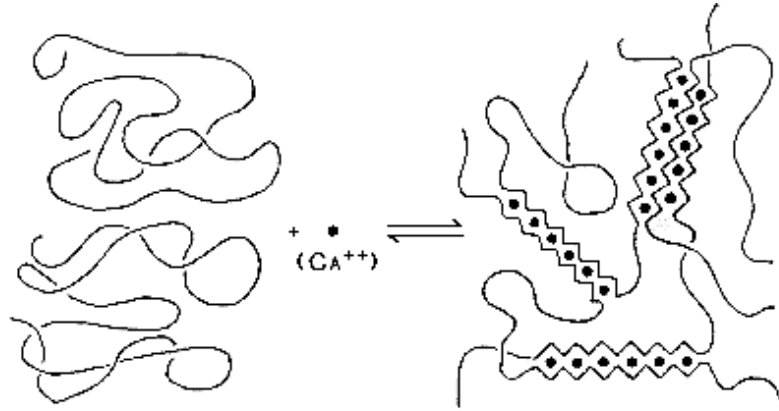
#### iv.ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΓΕΛΗΣ

Από τις πιο σημαντικές ιδιότητες των αλγινικών είναι η ικανότητα τους να σχηματίζουν γέλες (gels) κατά την αντίδραση τους με δισθενή κατιόντα. Ο σχηματισμός της γέλης πραγματοποιείται σε ήπιο περιβάλλον, απουσία τοξικών αντιδρώντων. Τα αλγινικά σφαιρίδια παρασκευάζονται προσθέτοντας διάλυμα αλγινικού νατρίου σε διάλυμα δισθενών κατιόντων όπως  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  ή  $\text{Ba}^{2+}$ . Δισθενή κατιόντα που μπορούν επίσης να σχηματίσουν γέλη είναι τα  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  και  $\text{Mn}^{2+}$ , αλλά η χρήση τους είναι περιορισμένη λόγω της τοξικότητάς τους. Τα μονοσθενή κατιόντα και τα ιόντα  $\text{Mg}^{2+}$  δεν επάγουν το σχηματισμό γέλης (Rees & Welsh, 1977). Η δημιουργία της γέλης και η διασύνδεση του πολυμερούς επιτυγχάνεται κυρίως με ανταλλαγή των ιόντων νατρίου του γουλουρονικού οξέος με τα παραπάνω δισθενή κατιόντα, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ιονοτροπικών γελών.

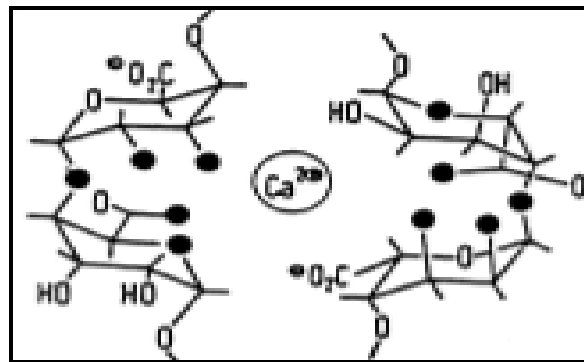


Εικόνα 18. Δέσμευση ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$

Οι G-περιοχές δύο διαφορετικών αλγινικών αλυσίδων συμπλοκοποιούνται με το κατιόν ασβεστίου με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας μακρομοριακής δομής, χαρακτηριστικής ως μοντέλο αυγού-θήκης (εικόνα 17, 18, 19, 20) (Rees, 1981).

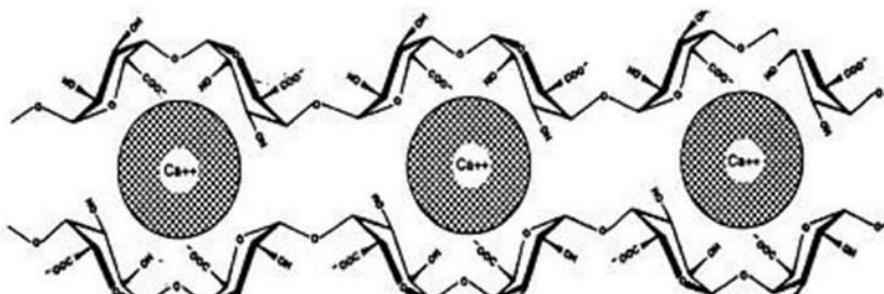


Εικόνα 19. Μηχανισμός σχηματισμού της γέλης



Εικόνα 20. Τρόπος σύνδεσης ιόντων  $Ca^{2+}$  σε  $\alpha$ -L-GulA-(1-4)-L-GulA, όπου GulA: γουλουρονικό οξύ

Η δέσμευση αυτών των κατιόντων και οι ιδιότητες της σχηματιζόμενης γέλης εξαρτάται κυρίως από τη σύσταση και την αλληλουχία του αλγινικού οξέος (Smidsrod, 1974) (Smidsrod, Haug, & Lian, 1972).



Εικόνα 21. Τρόπος σύνδεσης ιόντων  $Ca^{2+}$  σε  $\alpha$ -L-GulA-(1-4)-L-GulA. GulA: γουλουρονικό οξύ, μοντέλο αυγού-θήκης



## v.ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΑΛΓΙΝΙΚΩΝ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ

Το **μέγεθος** και το **σχήμα** των σφαιριδίων εξαρτάται κυρίως από το ιξώδες του διαλύματος του αλγινικού νατρίου, το μέγεθος της βελόνας που χρησιμοποιείται και το ύψος μεταξύ της βελόνας και του διαλύματος του  $\text{CaCl}_2$ . Χρησιμοποιώντας βελόνα μεγάλης διαμέτρου και διάλυμα αλγινικών υψηλού ιξώδους παράγονται σφαιρίδια μεγάλου μεγέθους. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του διαλύματος του αλγινικού νατρίου, τα σφαιρίδια εμφανίζονται περισσότερο ομοιόμορφα και σφαιρικά (Badwan, Abumalooch, Sallam, Abukalaf, & Jawan, 1985). Ωστόσο η παρασκευή τους καθίσταται δύσκολη πρακτικά, όταν αυξάνει η συγκέντρωση του αλγινικού νατρίου πάνω από 6% w/v, λόγω σημαντικής ανάλογης αύξησης του ιξώδους του διαλύματος (Thu, et al., 2000) (Stokke, Draget, Smidsrød, Yuguchi, Urakana, & Kajiwara, 2000) (Mikkelsen & Elgsaeter, 1995).

Οι **λειτουργικές και φυσικές ιδιότητες** των αλγινικών σφαιριδίων εξαρτώνται από τη σύνθεση, την αλληλουχία στη δομή και το μοριακό βάρος του πολυμερούς (Smidsrød, Glover, & Whittington, 1973) (Martinsen, Skjak-Braek, Smidsrod, Zanetti, & Paoletti, 1991). Η ευκαμψία των αλγινικών πολυμερών σε διάλυμα αυξάνει κατά τη σειρά  $\text{MG} > \text{MM} > \text{GG}$  (G :  $\alpha$ -L-γουλουρονικό οξύ, M:  $\beta$ -D-μανουρονικό οξύ).

Τα σφαιρίδια με τη μικρότερη παρατηρούμενη συρρίκνωση, μεγαλύτερη μηχανική αντοχή, μεγάλο πορώδες και μεγαλύτερη σταθερότητα προέρχονται από αλγινικά με περιεκτικότητα σε  $\alpha$ -L-γουλουρονικό οξύ πάνω από 70% και μέσο μήκος G-περιοχών, μεγαλύτερο από 15. Τα σφαιρίδια που προέρχονται από αλγινικά με υψηλό περιεχόμενο σε G-περιοχές εμφανίζουν χαρακτηριστική ακαμψία, ενώ αυτά που προκύπτουν από αλγινικά με χαμηλότερο ποσοστό σε G-περιοχών παρουσιάζουν μεγαλύτερη ελαστικότητα (Chapman & Chapman, 1980).

Καθοριστικός παράγοντας στη σκληρότητα των σφαιριδίων αποτελεί ο χρόνος παραμονής τους στο διάλυμα του  $\text{CaCl}_2$  (χρόνος σκλήρυνσης). Όσο αυξάνεται ο χρόνος σκλήρυνσης, λαμβάνει χώρα ισχυρότερη αλληλεπίδραση μεταξύ του διαλύματος των αλγινικών και του διαλύματος ασβεστίου, με αποτέλεσμα να παράγονται σφαιρίδια με μικρότερη ελαστικότητα και μεγάλη μηχανική αντοχή (Meera & Abraham, 2006).

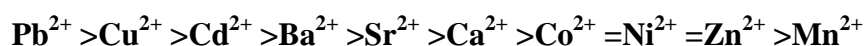
Η θολερότητα που παρατηρείται στα παραγόμενα σφαιρίδια είναι αντιστρόφως ανάλογη της αντοχής τους. Χρησιμοποιώντας αλγινικά με υψηλό περιεχόμενο σε G-περιοχές, επιτυγχάνεται σχηματισμός διάφανων γελών, τα οποία και παρουσιάζουν και μεγαλύτερη αντοχή.

Τα αλγινικά συνθέτουν θερμοσταθερές γέλες σε μια περιοχή θερμοκρασιών από 0°C ως 100°C. Ωστόσο ο συντελεστής σκληρότητας των γελών μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας, υποδεικνύοντας ότι οι φυσικές και οι μηχανικές ιδιότητες των αλγινικών γελών είναι συνάρτηση και της θερμοκρασίας (Gacesa, 1988). Οι γέλες δύναται να παρασκευασθούν τόσο σε ζεστό όσο και σε κρύο περιβάλλον (Charman & Charman, 1980).

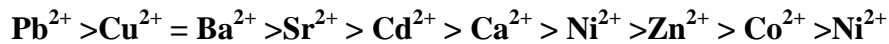
Για το σχηματισμό των γελών με χαρακτηριστική **χημική σταθερότητα**, ως καταλληλότερα επιλέγονται τα κατιόντα ασβεστίου, διότι πλεονεκτούν τόσο από πλευράς κόστους, όσο και από πλευράς τοξικότητας. Επίσης η ευαισθησία που παρουσιάζουν όσον αφορά τη σύνδεσή τους με χηλικές ενώσεις, όπως φωσφορικές και κιτρικές ή παρουσία κατιόντων που παρεμποδίζουν το σχηματισμό της γέλης, όπως τα κατιόντα  $\text{Na}^+$  και  $\text{Mg}^{2+}$ , καθιστά το ασβέστιο περιοριστικό αντιδραστήριο για τη δημιουργία γελών. Η απλούστερη μέθοδος προτείνει τη συντήρηση των παραγόμενων αλγινικών σφαιριδίων σε μέσο το οποίο περιέχει ελεύθερα κατιόντα ασβεστίου και τη διατήρηση της αναλογίας  $\text{Na}^+:\text{Ca}^{2+}$  σε τιμή που εξαρτάται από την σύσταση των αλγινικών. (Martinsen, Skjak-Braek, & Smidsrod, 1989) (Martinsen, Skjak-Braek, Smidsrod, Zanetti, & Paoletti, 1991)

Για την σταθεροποίηση αλγινικών γελών έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλα δισθενή κατιόντα πέραν του ασβεστίου, τα οποία παρουσιάζουν υψηλότερη συγγένεια με τα αλγινικά.

Η σειρά συγγένειας η οποία ωστόσο μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα με την πηγή προέλευσης των αλγινικών, ακολουθεί το παρακάτω σχήμα.



Ανάλογα με τη συγγένεια του κατιόντος ως προς τα αλγινικά, λαμβάνονται σφαιρίδια με διαφορετικές μηχανικές ιδιότητες (Smidsred, 1974). Κατιόντα με υψηλή συγγένεια οδηγούν σε άκαμπτα και σκληρά σφαιρίδια, με εξαίρεση τα κατιόντα  $\text{Ni}^{2+}$  και  $\text{Cd}^{2+}$ .



Λόγω της τοξικότητας που εμφανίζουν αρκετά από τα παραπάνω κατιόντα και ιδιαίτερα τα  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  και  $\text{Cd}^{2+}$  περιορίζεται η χρήση τους για τη δημιουργία μητρών ακινητοποίησης ζωντανών κυττάρων και πρωτεϊνών. Επίσης με την προσθήκη τρισθενών κατιόντων όπως  $\text{Ti}^{3+}$  και  $\text{Al}^{3+}$  μπορεί να πραγματοποιηθεί σταθεροποίηση γελών αλγινικού ασβεστίου (Martinsen, Skjak-Braek, Smidsrod, Zanetti, & Paoletti, 1991).

Η απελευθέρωση των ακινητοποιημένων πρωτεϊνών από τη μήτρα των αλγινικών μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο μηχανισμούς. Πραγματοποιείται είτε με **διάχυση** διαμέσου των πόρων του πολυμερούς, είτε με **αποικοδόμηση** του δικτύου του πολυμερούς. Το μέγεθος των πόρων των αλγινικών σφαιριδίων, το οποίο παίζει μείζονα ρόλο στην απελευθέρωση της πρωτεΐνης, εξαρτάται από την προέλευση του αλγινικού. Μελέτη με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο της μορφής δείγματος αλγινικών σφαιριδίων, συγκέντρωσης σε αλγινικό 2%, δείχνει ότι το μέγεθος των πόρων κυμαίνεται από 5nm σε 200 nm (Andresen, Skipnes, Smidsrod, Ostgaard, & Hemmer, 1977). Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι οι πόροι στην επιφάνεια των σφαιριδίων έχουν πιο πυκνή διαμόρφωση σε σχέση με τον πυρήνα του (Smidsred, 1973).

Η διάχυση μικρών μορίων όπως η γλυκόζη και η αιθανόλη επηρεάζεται ελάχιστα από τη μήτρα των αλγινικών, ενώ η διάχυση μεγάλων πρωτεϊνών φαίνεται να εξαρτάται σημαντικά από το μοριακό τους βάρος (Martinsen, Skjak-Braek, Smidsrod, Zanetti, & Paoletti, 1991). Έχουν αναφερθεί αρκετές πρωτεΐνες που υφίστανται διάχυση από τα αλγινικά σφαιρίδια, μεταξύ των οποίων είναι και η ανοσογλοβουλίνη (IgG), το ινωδογόνο και η ινσουλίνη. Ο ρυθμός διάχυσης των πρωτεϊνών από τα σφαιρίδια είναι δυνατόν να μειωθεί, με την αύξηση της συγκέντρωσης των αλγινικών.

Η γέλη που προέρχεται από αλγινικά με υψηλό περιεχόμενο σε α-L-γουλουρονικό οξύ, εμφανίζει δομή με μεγάλο άνοιγμα πόρων, που πιθανόν οφείλεται στη μικρότερη συρρίκνωση που υφίστανται οι γέλες αυτού του τύπου και προωθούν περισσότερο τη διάχυση των πρωτεϊνών (Martinsen, Skjak-Braek, Smidsrod, Zanetti, & Paoletti, 1991). Η απελευθέρωση της δραστικής ουσίας από τα αλγινικά σφαιρίδια μπορεί να μειωθεί σημαντικά ελέγχοντας το μέγεθος των πόρων, υποβάλλοντας τα

σφαιρίδια σε ρυθμιζόμενες συνθήκες ξήρανσης, ώστε να αποφευχθεί τυχόν διάρρηξη τους, με αποτέλεσμα την απώλεια της μεταφερόμενης πρωτεΐνης (Smidsred, 1973).

Επιπλέον, η μείωση του μεγέθους των πόρων μπορεί να επιτευχθεί εκθέτοντας τα σφαιρίδια σε συνθήκες χαμηλού pH. Στις συνθήκες αυτές παρατηρείται σημαντική μείωση της διαμέτρου των πόρων. Η μείωση της απελευθέρωσης των μακρομορίων από τα αλγινικά σφαιρίδια σε χαμηλό pH, (γαστρικό περιβάλλον) αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα για την ανάπτυξη και το σχεδιασμό συστημάτων μεταφοράς μορίων μέσω της στοματικής οδού. Στα γαστρικά υγρά όπου το pH είναι όξινο, τα ενυδατωμένα αλγινικά μετατρέπονται σε μια πορώδη και αδιάλυτη μορφή. Καθώς το pH αυξάνεται όπως συμβαίνει στην εντερική περιοχή του ανθρωπίνου οργανισμού, η αδιάλυτη αυτή πάστα μετατρέπεται σε μία διαλυτή και κολλώδη στοιβάδα (Kim & Lee, 1992) (Yotsuyanagi, Ohkubo, Ohhashi, & Ikeda, 1987) (Sugawara, Imai, & Otagiri, 1994) (Chen, Wu, Mi, Lin, Yu, & Sung, 2004). Αυτή η εξαρτώμενη απ' το pH συμπεριφορά των αλγινικών μπορεί να χρησιμοποιηθεί προκειμένου να ρυθμιστεί ο τρόπος και ο τόπος απελευθέρωσης του παγιδευμένου στα αλγινικά φαρμάκου.

Το φορτίο που εμφανίζει η πρωτεΐνη μπορεί επίσης να επηρεάσει το ρυθμό διάχυσης της από τη μήτρα. Στη περίπτωση που η παγιδευμένη πρωτεΐνη εμφανίζει θετικό φορτίο, αλληλεπιδρά με την αρνητικά φορτισμένη μήτρα των αλγινικών, εμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό τη διάχυση της. Αντίθετα στην περίπτωση αρνητικά φορτισμένης πρωτεΐνης η απελευθέρωση από τη μήτρα πραγματοποιείται γρηγορότερα.

## vi.ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Τα αλγινικά όντας φυσικά πολυμερή, δεν παρουσιάζουν τοξικότητα και χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων ως βοηθητικά πήξης, γαλακτωματοποιητές και σταθεροποιητές. Ανήκουν στην κατηγορία των ενώσεων που είναι εγκεκριμένα από τον FDA για τη χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων. Κατά τη χορήγηση τους δια της στοματικής οδού δεν παρατηρείται ανοσοαπόκριση, ενώ επίσης δεν παρουσιάζουν τοξικότητα και είναι βιοδιασπώμενα (Rees & Welsh, 1977).

➤ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ

Τα αλγινικά μεταξύ των άλλων χαρακτηριστικών, διαθέτουν την ικανότητα να προσκολλώνται σε βιολογικούς ιστούς, μια ιδιότητα που καθίσταται ιδιαίτερα χρήσιμη στην περίπτωση συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων. Ο τρόπος λειτουργίας των συστημάτων αυτών στηρίζεται στην αύξηση του χρόνου αντοχής του φάρμακου. Έχει αποδειχθεί ότι τα πολυμερή που παρουσιάζουν μεγάλη πυκνότητα φορτίου αποτελούν καλούς παράγοντες βιοπροσκόλλησης (Chickering & Mathiowitz, 1995) (Chang, Park, Kelly, & Robinson, 1985) (Kwok, Groves, & Burgess, 1989) (Kwok, Groves, & Burgess, 1991) και μάλιστα όσο αυξάνεται το φορτίο η προσκόλληση που πραγματοποιείται είναι μεγαλύτερη. Επιπρόσθετα τα ανιονικά πολυμερή είναι πιο αποτελεσματικά από τα κατιονικά ή τα μη ιονικά πολυμερή (Chickering & Mathiowitz, 1995). Τα αλγινικά, όντας ανιονικά πολυμερή, παρουσιάζουν αυξημένη την ικανότητα αυτή και η δύναμη της προσκόλλησης είναι μεγαλύτερη συγκρινόμενη με άλλα πολυμερή όπως το πολυστυρένιο, η χιτοζάνη, η κάρβοξυ-μεθυλο-κυτταρίνη και το πολύ-λακτικό οξύ (Chang, Park, Kelly, & Robinson, 1985) (Kwok, Groves, & Burgess, 1989).

Η ικανότητα βιοπροσκόλλησης των αλγινικών βρίσκει εφαρμογή στην περίπτωση μεταφοράς φαρμάκων σε βλεννώδεις ιστούς όπως η γαστροεντερική περιοχή (Gombotz & Wee, 1998). Η προσκόλληση των μικροσφαιριδίων στους βλεννώδεις ιστούς περιορίζει τοπικά το φάρμακο και καθυστερεί το χρόνο μεταφοράς της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να βελτιώνεται σημαντικά η αποτελεσματικότητα και η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου.

➤ ΙΔΑΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΛΓΙΝΙΚΩΝ ΣΦΑΙΡΙΔΙΩΝ

Οι διάφορες μελέτες ακινητοποίησης εμφανίζονται ιδιαίτερα απαιτητικές όσον αφορά τα χαρακτηριστικά των αλγινικών σφαιριδίων, όμως η παρασκευή ιδανικών αλγινικών παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες. Οι απαραίτητες ιδιότητες που θα πρέπει να παρουσιάζουν τα αλγινικά σφαιρίδια ώστε να θεωρηθούν κατάλληλα ως μήτρες ακινητοποίησης είναι η μεγάλη μηχανική και χημική σταθερότητα, οι ελεγχόμενες ιδιότητες διάγκωσης, το χαμηλό ποσοστό τοξικότητας, το καθορισμένο μέγεθος πόρων και η ομοιόμορφη κατανομή τους. Οι ιδιότητες αυτές μπορούν να επιτευχθούν λαμβάνοντας υπόψη τις παρακάτω παραμέτρους:

- επιλογή των αλγινικών
- καθαρότητα των αλγινικών
- επιλογή και ρύθμιση της διαδικασίας της γελοποίησης
- συνδυασμός με άλλα πολυμερή

## vii. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΗ ΧΡΗΣΗ ΑΛΓΙΝΙΚΩΝ

Τα αλγινικά σφαιρίδια αποτελούν κατάλληλα υλικά ακινητοποίησης καθώς σχηματίζονται με απλή και ήπια διαδικασία και προσφέρουν το κατάλληλο περιβάλλον για το ακινητοποιημένο υλικό. Ωστόσο, η τεχνική ακινητοποίησης σε αλγινικά σφαιρίδια παρουσιάζει κάποιους περιορισμούς.

### ➤ ΧΑΜΗΛΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Ουσίες όπως φωσφορικά ή κιτρικά, τα οποία παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για τα ιόντα  $\text{Ca}^{2+}$ , δεσμεύουν τα συνδεδεμένα ιόντα ασβεστίου, οδηγώντας στην καταστροφή της γέλης. Επιπλέον, η γέλη μπορεί να αποσταθεροποιηθεί από υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων τα οποία δεν προκαλούν γελοποίηση, όπως είναι τα  $\text{Na}^+$  και  $\text{Mg}^{2+}$ , λόγω της ιοντοανταλλαγής που λαμβάνει χώρα με τα  $\text{Ca}^{2+}$ .

### ➤ ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΟΡΩΝ

Ο κυριότερος περιορισμός της χρήσης των αλγινικών ως μήτρα ακινητοποίησης καθίσταται στο γεγονός ότι κατά τη διαδικασία σχηματισμού των σφαιριδίων παρατηρείται απώλεια της δραστικής ουσίας διαμέσου των πόρων των σφαιριδίων (Liu & Krishnan, 1999) (Torre, et al., 1998). Η απώλεια αυτή οφείλεται στην ανοιχτή δομή του πλέγματος των σφαιριδίων. Ωστόσο, έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές τροποποιήσεις των αλγινικών προκειμένου να αντιμετωπισθεί το πρόβλημα αυτό, όπως ο σχηματισμός συμπλόκων αλγινικών με κυστεΐνη (Schnurch, Kast, & Richter, 2001), ο σχηματισμός υδρόφοβων αλγινικών, καθώς και ο σχηματισμός συμπλόκων με άλλα πολυμερή. Ο συνδυασμός των αλγινικών με άλλα πολυμερή όπως η πηκτίνη, η χιτοζάνη (Sezer & Akbuga, 1999), η αιθυλο-κυτταρίνη (Bidmeier & Wang, 1993) επηρεάζει το μέγεθος των πόρων και τη μορφή του δικτύου με αποτέλεσμα να περιορίζεται η διάχυση.

Συγκεκριμένα, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα μικροσφαιρίδια που προκύπτουν από τον συνδυασμό αλγινικών και χιτοζάνης, ως συστήματα μεταφοράς πρωτεϊνών και φαρμάκων, καθώς και η ελεγχόμενη απελευθέρωση τους (Hari, Chandy, & Sharma, 1996) (Huguet, Groillot, Neufeld, Poncelet, & Dellacherie, 1994) (Mi, Sung, & Shyu, 2002) (Ramandas, Paul, Dileep, Anitha, & Sharma, 2000) (Vandenberg & Noue, 2001) (Wheatley, Chang, Park, & Langer, 1991). Τα σύμπλοκα αλγινικών-χιτοζάνης αποτελούν υδρογέλες ευαίσθητες στις μεταβολές του pH. Τα αλγινικά παρουσιάζουν την ιδιότητα να συρρικνώνονται σε χαμηλό pH και να διαλυτοποιούνται σε υψηλότερα pH. Αντίθετα, η χιτοζάνη διαλύεται σε χαμηλό pH και παραμένει αδιάλυτη σε περιοχές υψηλότερου. Επομένως, η διάλυση της χιτοζάνης σε χαμηλό pH παρεμποδίζεται από το δίκτυο του αλγινικού που είναι αδιάλυτο σε χαμηλό pH και αντίστοιχα η πιθανή διάλυση του αλγινικού σε υψηλό pH αποτρέπεται από την χιτοζάνη. Τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα παρουσιάζουν μειωμένο μέγεθος πόρων, οπότε παρεμποδίζεται η διαφυγή του ακινητοποιημένου δραστικού μορίου.

## ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός φωτοσυνθετικών συμπλόκων από το άλγος *Chlamydomonas reinhardtii*. Για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων μας όμως προχωρήσαμε στη δημιουργία ενός συστήματος αναφοράς από σπανάκι. Απομονώθηκαν λοιπόν εκ νέου φωτοσυνθετικά σύμπλοκα και από το φυτό σπανάκι.

Εν συνεχεία όλα τα απομονωμένα σύμπλοκα ακινητοποιήθηκαν σε μήτρα πολυμερούς αλγινικού ασβεστίου όπου ελέγχθηκε αν διατηρείται η φωτοσυνθετική δραστηριότητα των συμπλόκων σε ικανοποιητικά επίπεδα.

Εκτός των άλλων μελετήθηκε η διατήρηση της φωτοσυνθετικής λειτουργίας των συμπλόκων κατά τη διάρκεια ενός μήνα αποθήκευσης των ακινητοποιημένων συμπλόκων στους 7°C.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε ακινητοποίηση ολόκληρων κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* σε αλγινικό ασβέστιο διαφορετικής πυκνότητας και επιβεβαιώθηκε η ζωτικότητα των κυττάρων μετά την ακινητοποίηση.



## 1) ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

### i. ΥΛΙΚΑ

#### ➤ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα διάφορα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Merck, Serva, Sigma, ενώ τα απορρυπαντικά ήταν Sigma και Bio-Rad. Η ποιότητα των αντιδραστηρίων ήταν analytical grade. Το νερό ήταν απιονισμένο με στήλη ιονοανταλλακτικών ρητίνων.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής:

Διάλυμα αλέσεως: 20mM Tricine, 300mM Sucrose, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 0,2% BSA, 1mM PMSF (pH 7.8)

Διάλυμα επαναιώρησης 1: 20mM Tricine, 70mM Sucrose, 5mM CaCl<sub>2</sub> (pH 7.8).

Διάλυμα Triton: 25% Triton X-100 στο διάλυμα επαναιώρησης.

Διάλυμα SMN: 0,4M Sucrose, 15mM NaCl, 25mM MES (pH 6.0).

Διάλυμα επαναιώρησης 2: 1M Sucrose, 50mM MES, 0,4M NaCl, 5mM CaCl<sub>2</sub> (pH 6.0).

Διάλυμα MN: 15mM NaCl, 25mM MES

Διάλυμα PEG: 40% polyethylglycol (M.B.=6000) σε διάλυμα MN (pH 6.0).

Διάλυμα ακετόνης: 80% aceton σε νερό

Διάλυμα DCBQ: 56.5mM DCBQ σε MeOH

Διάλυμα DCMU: 1.5mM DCMU σε 50% MeOH-50% H<sub>2</sub>O

Διάλυμα K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>: 300mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> σε H<sub>2</sub>O

## [ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ- ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ]

### ➤ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν απαριθμούνται παρακάτω:

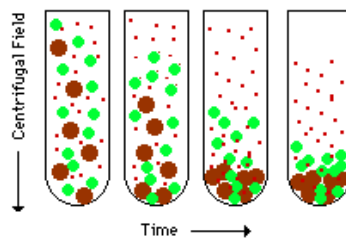
- Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού Sim Aminco DW-2000 και Perkin Elmer MBA 2000
- Φθορίμετρο Hansatech Handy Pea
- Φυγόκεντρος Heraeus Sepatech Suprafuge 22 (κεφαλή HFA 21.94 No. 5156) Sorvall RC 28S (κεφαλή F-28/13) και BHG Hermle 2930M
- Υπερφυγόκεντρος Sorvall Ultra Pro 80 (κεφαλή TFT 5038).

### ii. ΜΕΘΟΔΟΙ

Η απομόνωση των διαφόρων φωτοσυνθετικών πρωτεϊνικών συμπλόκων πραγματοποιήθηκε με μέθοδο της φυγοκέντρωσης, ενώ ο χαρακτηρισμός τους έγινε με τις μεθόδους της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα SDS-πολυακρυλαμιδίου, της φασματοσκοπίας απορρόφησης, του φθορισμού, της έκλυσης O<sub>2</sub> και της ανοσοανίχνευσης με τη μέθοδο του Western Blot.

### ➤ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ

Η φυγοκέντρωση είναι μία σημαντική και εύκολη μέθοδος διαχωρισμού και ανάλυσης βιομορίων. Τα σωματίδια μετακινούνται (καταβυθίζονται) ανάλογα με τη μάζα τους, γι' αυτό όσο μεγαλύτερο μοριακό βάρος έχει μια πρωτεΐνη τόσο πιο γρήγορα μετακινείται. Επίσης, γρηγορότερα μετακινούνται οι πρωτεΐνες με μεγαλύτερη πυκνότητα και πιο συμπαγή δομή. Τέλος, όσο λιγότερο πυκνό είναι το διάλυμα με το μείγμα των σωματιδίων, τόσο πιο εύκολη είναι η καταβύθισή τους.



Εικόνα 22. Τρόπος λειτουργίας φυγοκέντρωσης

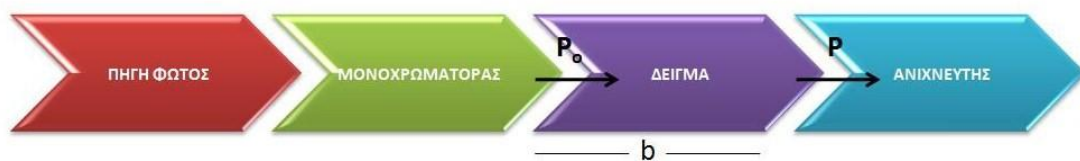
➤ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ

Η φασματοφωτομετρία αποτελεί αναμφίβολα μια από τις χρησιμότερες αναλυτικές τεχνικές στη χαρακτηρισμό βιολογικών δειγμάτων. Ένζυμα και πρωτεΐνες καθώς και υποσύμπλοκα τους απορροφούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Το τμήμα του μορίου που είναι υπεύθυνο για την απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας καλείται χρωμοφόρο και η εμφάνιση των χαρακτηριστικών ταινιών απορροφήσεως των διαφόρων χρωμοφόρων σε ένα φάσμα απορροφήσεως είναι ενδεικτική για την ύπαρξη των ομάδων αυτών στο μόριο. Η φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (~200-800nm) χρησιμοποιείται κυρίως για τον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών, με συσχέτιση του ποσοστού απορροφήσεως ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας προς τη συγκέντρωση της ουσίας που είναι υπεύθυνη για την απορρόφηση.

**Αρχή της μεθόδου**

Νόμος του Beer

Όταν μονοχρωματική ακτινοβολία διέρχεται από διάλυμα, που περιέχει την ουσία X, η οποία απορροφά, η ισχύς της ακτινοβολίας ελαττώνεται προοδευτικά κατά μήκος της διαδρομής, λόγω απορροφήσεως της από την ουσία X (εικόνα 23).



**Εικόνα 23. Διάταξη Φασματοφωτομετρίας**

Η ελάττωση της ισχύος ( $P < P_0$ ) εξαρτάται από την συγκέντρωση της ουσίας X και από την απόσταση που διένυσε η δέσμη μέσα στο διάλυμα. Οι σχέσεις αυτές εκφράζονται με το νόμο των Lambert-Beer, που συνήθως αναφέρεται ως νόμος του Beer και διατυπώνεται με τη μορφή

$$A = \log \frac{P_0}{P} = -\log T = \log \left( \frac{100}{\%T} \right) = abc_{g/L} = \epsilon bc_{mol/L}$$

## [ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ- ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ]

Όπου

**A** = απορρόφηση

**P<sub>0</sub>** = ισχύς της προσπίπτουσας ακτινοβολίας

**P** = ισχύς της εξερχόμενης ακτινοβολίας

**T** = διαπερατότητα

**a** = σταθερά αναλογίας

**b** = μήκος διαδρομής που διανύθηκε μέσα στο διάλυμα

**ε** = σταθερά αναλογίας

### ➤ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού φορτισμένων ουσιών, κυρίως πρωτεϊνών. Κατά την ηλεκτροφόρηση, ηλεκτρικά φορτισμένα μακρομόρια κινούνται προς τον έναν ή τον άλλο πόλο ενός ηλεκτρικού πεδίου. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται ευρύτατα για τον διαχωρισμό, την απομόνωση και την ανάλυση των πρωτεϊνικών μιγμάτων.

#### *Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση*

Η μέθοδος της αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (PAGE) παρουσία δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS). Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου, που προκύπτει από το ριζικό πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και του N-N'-μεθυλένο-δισ-ακρυλαμιδίου, χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών (Laemmli, 1970). Η χημική διάσπαση του υπερθειικού αμμωνίου δίνει τις ελεύθερες ρίζες που προκαλούν την έναρξη του πολυμερισμού:  $S_2O_8^{2-} \rightarrow 2SO_4^{\cdot-}$ . Η σταθεροποίηση των ριζών πραγματοποιείται με την προσθήκη τετραμέθυλο-αίθυλο-διαμίνης (TEMED).

Αρχικά, οι πρωτεΐνες διέρχονται από την πηκτή στοίβαξης περιεκτικότητας 8,5% w/v διαλύματος ακρυλαμιδίου όπου και συσσωρεύονται. Έπειτα, περνάνε στην πηκτή διαχωρισμού περιεκτικότητας 13% w/v διαλύματος ακρυλαμιδίου. Με την βοήθεια του ηλεκτρικού ρεύματος και της πηκτής οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση την μάζα τους.

## [ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ- ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ]

Τα δείγματα πριν την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE) αναμιγνύονται με ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος μετουσίωσης (Sample buffer) και θερμαίνονται στους 50°C για 30 λεπτά.

Οι συνθήκες ηλεκτροφόρησης ήταν: δυναμικό 150V και ένταση ρεύματος 30mA σε θερμοκρασία δωματίου. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν η TV100 Scie-Plas και το τροφοδοτικό Pharmacia LKB ECPS 3000/150.

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

	<u>Stacking</u>	<u>Running</u>	<u>Sample Buffer pH 7.0</u>	
<b>ABmix*</b>	1ml	6ml	<b>SDS</b>	12%
<b>Gel Buffer**</b>	3ml	10ml	<b>B-Mercapt</b>	6%
<b>Urea</b>	-	5,5gr	<b>Glycine</b>	30%
<b>Final Volume</b>	12ml	30ml	<b>Serva blue-G</b>	0,05%
<b>APS (10%)</b>	120μl	300μl	<b>Tris-HCl</b>	150mM
<b>TEMED</b>	20μl	30μl		

Table 3. Διαλύματα ηλεκτροφόρησης

\***ABmix**: 49,5% Acr , 3% Bis

\*\***Gel Buffer (3x)**: 3M Tris, 3% SDS pH 8.45

### ➤ ΦΘΟΡΙΣΜΟΜΕΤΡΙΑ

Όπως είναι γνωστό η ενέργεια που προσλαμβάνεται κατά τη φωτοδιέγερση ενός μορίου με απορρόφηση ενός φωτονίου δε διατηρείται στο διεγερμένο μόριο, αλλά αποβάλλεται με διάφορους τρόπους, συνήθως υπό τη μορφή θερμότητας, αλλά και με εκπομπή δευτερεύουσας ακτινοβολίας, η οποία χαρακτηρίζεται με το γενικό όρο φωταύγεια. Ειδικότερα, εάν η εκπομπή γίνει σε χρόνο  $10^{-9}$ - $10^{-6}$ s μετά τη διέγερση η φωταύγεια χαρακτηρίζεται ως φθορισμός.

## [ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ- ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ]

Σε δείγματα φωτοσυνθετικών συμπλόκων, ένα κβάντο φωτός απορροφάται από ένα μόριο χλωροφύλλης και προκαλεί τη διέγερση ενός ηλεκτρονίου από τη βασική σε μια διεγερμένη κατάσταση. Κατά την αποδιέγερση ένα μικρό κλάσμα ενέργειας εκλύεται σαν κόκκινος φθορισμός.

Κατά τις μετρήσεις φθορισμού παίρνουμε δεδομένα για τα παρακάτω μεγέθη:

- ↳  $F_0$  : τιμή φθορισμού για τη βασική κατάσταση
- ↳  $F_m$ : μέγιστη τιμή φθορισμού

$$F_v / F_m = \frac{F_m - F_0}{F_m}$$

- ↳ : μέγιστη αποδοτικότητα του PSII
- ↳  $F_t$  : σταθερή τιμή φθορισμού
- ↳ **Area**: είναι ανάλογη του μεγέθους της δεξαμενής των ηλεκτρουποδοχέων  $Q_A$  που βρίσκονται στη αναγωγική πλευρά του Φωτοσυστήματος II
- ↳  $P_i$  : είναι ένας ευαίσθητος δείκτης της ζωτικότητας των δειγμάτων

### ➤ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

Οι απομονωμένες φωτοσυνθετικές μεμβράνες είναι γνωστό ότι είναι ιδιαίτερα ευαίσθητες σε πολλούς εξωτερικούς παράγοντες (π.χ. θερμοκρασία, pH, φωτισμό). Για τον λόγο αυτό μελετάται άμεσα η ενεργότητά τους. Οι πιο σημαντικοί μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την μέτρηση της ενεργότητας είναι η φασματοφωτομετρική ανάλυση, ο προσδιορισμός έκλυσης οξυγόνου και ο προσδιορισμός φθορισμού χλωροφύλλης.

### ➤ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΗΣ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗΣ

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης των θυλακοειδών μεμβρανών έγινε φασματοσκοπικά παίρνοντας υπόψη τις μεθόδους του Porra και του Arnon (Porra, Thompson, & Kriedemann, 1989) (Arnon, 1949). Για τον

## [ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ- ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ]

προσδιορισμό της ολικής χλωροφύλλης κάθε δείγματος, προστέθηκαν 12,5μl δείγματος σε 5ml υδατικού διαλύματος 80% v/v ακετόνης, για να εκχυλίσουν οι χλωροφύλλες από τις πρωτεΐνες. Το αιώρημα φυγοκεντρήθηκε στα 10000g για 2 λεπτά για να ιζηματοποιηθούν οι πρωτεΐνες. Η απορρόφηση του διαλύματος χλωροφύλλης προσδιορίστηκε σε δύο μήκη κύματος, στα 645nm και 663nm. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης, οι συντελεστές απορρόφησης, που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 20,2 και 8,02 για τα 645nm και 663nm αντίστοιχα, και η σχέση που δίνει τη συγκέντρωση χλωροφύλλης σε mg/ml είναι  $\{[(A_{645} * 20,2) + (A_{663} * 8,02)] / 5\} * 2$ . Για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων των χλωροφυλλών a και b (μg/ml), χρησιμοποιήθηκαν οι σχέσεις:

- $[Chl a] = 12,25 * A_{663,6} - 2,55 * A_{646,6}$
- $[Chl b] = 20,31 * A_{646,6} - 2,55 * A_{663,6}$

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* έγινε παίρνοντας 100μl δείγματος στο οποίο προστέθηκαν 900μl ακετόνης. Έπειτα από ανάδευση το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στα 10000g για 2 λεπτά. Η απορρόφηση του διαλύματος χλωροφύλλης προσδιορίστηκε στα 652nm και η σχέση που δίνει τη συγκέντρωση χλωροφύλλης (mg/ml), είναι:  $(A_{652} * 10) / 34$ . Για τις φασματοσκοπικές μετρήσεις UV-ορατού χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο SLM-AMINCO DW2000.

### ➤ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΚΛΥΣΗΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

Η μέτρηση της έκλυσης οξυγόνου που χρησιμοποιεί ένα ηλεκτρόδιο οξυγόνου τύπου Clark είναι μια τυποποιημένη διαδικασία στον τομέα της έρευνας της φωτοσύνθεσης. Η μέτρηση είναι απλή και το ηλεκτρόδιο οξυγόνου αποτελεί μια ενδιαφέρουσα μέθοδο για την αξιολόγηση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας.

Η ταχύτητα έκλυσης οξυγόνου των θυλακοειδών μεμβρανών μετρήθηκε πολαρογραφικά με ηλεκτρόδιο τύπου Clark της εταιρείας YSI. Το ηλεκτρόδιο αποτελείται από κάθοδο λευκόχρυσου και άνοδο αργύρου με διαφορά δυναμικού 0,8V. Το ηλεκτρόδιο καλύπτεται από μια λεπτή μεμβράνη, εκλεκτικά διαπερατή σε μικρά μόρια και ιόντα. Όταν εφαρμοστεί κατάλληλη τάση, το οξυγόνο που παράγεται από την οξείδωση του H<sub>2</sub>O, αντιδρά στην κάθοδο, παράγοντας ηλεκτρικό ρεύμα. Το

## [ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ- ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ]

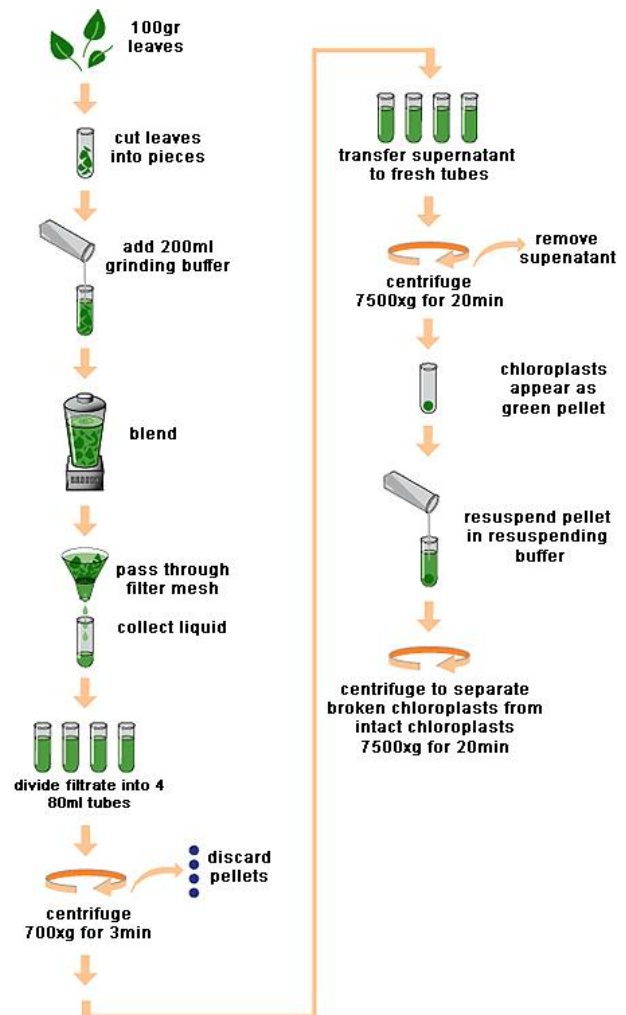
ρεύμα, αυτό είναι ανάλογο του ποσού του οξυγόνου, που διέρχεται από τη μεμβράνη. Αυτό που μετράται στην πραγματικότητα είναι η πίεση του παραγόμενου οξυγόνου. Το οξυγόνο, που παράγεται, καταναλώνεται γρήγορα στην κάθοδο, γι' αυτό μπορεί να θεωρηθεί ότι η πίεση του οξυγόνου μέσα στη μεμβράνη είναι μηδέν. Έτσι, η ταχύτητα διάχυσης του οξυγόνου μέσα στη μεμβράνη είναι ανάλογη με την απόλυτη πίεση του οξυγόνου, έξω από τη μεμβράνη. Η σχέση μεταξύ της εξωτερικής πίεσης του οξυγόνου και του ηλεκτρικού ρεύματος είναι γραμμική. Η ρύθμιση του ηλεκτροδίου έγινε στους 25°C με διάλυμα SMN (0,4mM σακχαρόζης, 15mM NaCl και 25mM MES, pH=6,0), το οποίο ήταν κορεσμένο σε οξυγόνο. Η κυψελίδα, που χρησιμοποιήθηκε ήταν γυάλινη με πρόσθετο γυάλινο περίβλημα, που επιτρέπει τη διέλευση H<sub>2</sub>O, προκειμένου να διατηρείται η θερμοκρασία στους 25°C. Το φως παραγόταν από 2 λάμπες βολφραμίου ισχύος 250W και εστιαζόταν στο δείγμα, έτσι ώστε να δημιουργούνται συνθήκες φωτοκορεσμού. Το φως πριν φθάσει στην κυψελίδα, διέρχεται πρώτα από μια γυάλινη φιάλη μήκους 5cm, που περιείχε διάλυμα 0,2%w/v θειϊκού χαλκού (CuSO<sub>4</sub>). Το διάλυμα αυτό απορροφώντας τα μεγάλα μήκη κύματος, προστάτευε το δείγμα από γρήγορη θέρμανση. Στη συνέχεια, το φως διερχόταν από ένα κόκκινο πλαστικό φίλτρο, για την απορρόφηση των μικρών μήκων κύματος. Έτσι, το φως, που διερχόταν στην κυψελίδα με το δείγμα, κυμαινόταν σε ένα εύρος μηκών κύματος 500-700nm. Για τις μετρήσεις έκλυσης οξυγόνου τοποθετούνταν στην κυψελίδα 3ml διαλύματος SMN, 50μM χλωροφύλλης του εξεταζόμενου δείγματος και 290μM DCBQ ως ηλεκτρονιοδέκτης. Η ταχύτητα έκλυσης οξυγόνου προσδιορίστηκε με μέτρηση της κλίσης της καμπύλης παραγωγής οξυγόνου, που καταγράφηκε σε καταγραφικό χαρτί και εκφράζεται σε  $\mu\text{moles O}_2/[(\text{mg Chl}) \text{ hr}]$ .



## 2) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ

### ι. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΘΥΛΑΚΟΕΙΔΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΑΠΟ ΣΠΑΝΑΚΙ

100 gr φρέσκων φύλλων σπανακιού πλύθηκαν με απιονισμένο νερό και αλέστηκαν σε μίξερ, με 200 ml ρυθμιστικού διαλύματος άλεσης (*grinding buffer*): 20 mM τρισίνη pH 7,8, 300 mM σακχαρόζη, 5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM EDTA, 0,2% BSA και 1mM PMSF. Το μείγμα διηθήθηκε από οκταπλό φύλλο γάζας και το διήθημα φυγοκεντρήθηκε στα 7500g για 20min. Το ίζημα (χλωροπλάστες) διαλυτοποιήθηκε στο διάλυμα επαναιώρησης 1 (*resuspending buffer*): 20 mM τρισίνη pH 7,8, 70 mM σακχαρόζη και 5 mM  $MgCl_2$ ) και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στα 7500g για 20min. Το ίζημα που καταβυθίστηκε (θυλακοειδή), διαλυτοποιήθηκε ξανά στο διάλυμα επαναιώρησης 1 (Berthold, Babcock, & Yocum, 1981) (εικόνα 24), ομογενοποιήθηκε με μηχανικό ομογενοποιητή και μετρήθηκε η περιεκτικότητά του σε χλωροφύλλη. Όλα τα βήματα πραγματοποιήθηκαν στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία 4°C. Τα παρασκευάσματα των θυλακοειδών μεμβρανών, πριν από κάθε βιοχημική επεξεργασία, ήταν αποθηκευμένα σε θερμοκρασία -80°C.



Εικόνα 24. Διαδικασία απομόνωσης θυλακοειδών μεμβρανών από φύλλα σπανακιού

## ii. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ PSII ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΑΠΟ ΣΠΑΝΑΚΙ

Οι PSII-μεμβράνες απομονώθηκαν από τις θυλακοειδείς μεμβράνες ως εξής: Στο ομογενοποιημένο διάλυμα θυλακοειδών προστέθηκε στάγδην το διάλυμα απορρυπαντικού Triton X-100 25% v/v (σε διάλυμα επαναιώρησης 2) υπολογίζοντας την ποσότητα όπως φαίνεται παρακάτω:

$$V_F (\text{final volume}) = [Chl, tot] / 2$$

$$V_T (\text{triton} - X, 25\%) = [Chl, tot] / 10$$

$$V_P = \text{thylakoids volume}$$

$$V_{IRB} = V_F - V_T - V_P$$

Το διάλυμα των θυλακοειδών μεμβρανών και απορρυπαντικού επώαστηκε για 30 min στο σκοτάδι υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C. Κατόπιν το δείγμα φυγοκεντρήθηκε σε 48000 g για 45 min. Το ίζημα που καταβυθίστηκε ήταν εμπλουτισμένο σε stacked PSII-μεμβράνες. Στη συνέχεια το ίζημα αυτό εκπλύθηκε με διάλυμα SMN και φυγοκεντρήθηκε στα 48000 g για 45 min. Το τελικό ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε όσο το δυνατόν μικρότερο όγκο διαλύματος SMN, ομογενοποιήθηκε, προσδιορίστηκε η περιεκτικότητά του σε χλωροφύλλη και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία -80°C.

## iii. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ OGP-CORE ΑΠΟ ΣΠΑΝΑΚΙ

Για την απομόνωση του συμπλόκου, V ml των PSII-μεμβρανών σε SMN με συγκέντρωση 2,5 mg Chl ml<sup>-1</sup>, αναμείχθηκαν με V ml διαλύματος 70 mM OGP. Το μείγμα επώαστηκε για 10 min σε πάγο, στο σκοτάδι και στη συνέχεια αραιώθηκε με 4V ml διαλύματος που περιείχε 1M sucrose, 50 mM MES (pH 6.0), 0,4M NaCl και 5mM CaCl<sub>2</sub>. Το μείγμα αυτό επώαστηκε για 5 min σε πάγο στο σκοτάδι και ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 48000 g για 90 min, οπότε και απομακρύνθηκε το LHC. Το πράσινο υπερκείμενο, που περιείχε τον πυρήνα του PSII, αναμείχθηκε με 3Vml διαλύματος PEG 40% (σε διάλυμα που περιείχε 15mM NaCl και 25mM MES pH6.0) και φυγοκεντρήθηκε στα 48000 g για 40 min προκειμένου να ιζηματοποιηθεί ο πυρήνας. Ακολούθησε έκπλυση του ιζήματος με διάλυμα SMN, φυγοκέντρηση

## [ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ- ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ]

48000 g για 30 min και το τελικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε όσο το δυνατόν μικρότερο όγκο διαλύματος SMN, ομογενοποιήθηκε, προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα του σε χλωροφύλλη και αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία  $-80^{\circ}\text{C}$ . Το δείγμα αυτό δεν περιείχε τις πρωτεΐνες 17 και 23kDa.

### iv. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΘΥΛΑΚΟΕΙΔΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΣΕ

#### ΑΛΓΙΝΙΚΑ ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ

##### ➤ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ

Το αλγινικό διάλυμα που χρησιμοποιείται στον σχηματισμό των σφαιριδίων παρασκευάζεται με διάλυση, κατόπιν ανάδευσης, του αλγινικού νατρίου σε διάλυμα MES 25mM. Η ανάδευση που πραγματοποιείται είναι ήπια προκειμένου να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες. Τα διαλύματα αλγινικού νατρίου που χρησιμοποιήθηκαν είναι συγκέντρωσης 1%.

##### ➤ ΑΝΑΜΙΞΗ ΤΟΥ ΘΥΛΑΚΟΕΙΔΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΜΕ ΤΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΤΟΥ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ

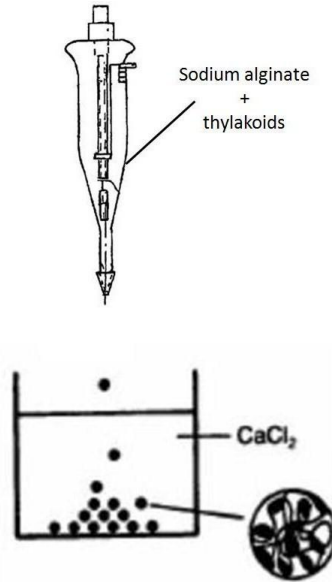
Στο διάλυμα που βρίσκονται οι θυλακοειδής μεμβράνες προστίθεται απιονισμένο νερό ούτως ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση χλωροφύλλης 1mg/ml. Κατόπιν το διάλυμα των θυλακοειδών μεμβρανών εισάγεται προσεκτικά στο παχύρρευστο διάλυμα του πολυμερούς και ακολουθεί ήπια ανάδευση για 10 λεπτά. Η ανάδευση πραγματοποιείται σε παγόλουτρο ώστε η θερμοκρασία να διατηρείται σταθερή στους  $4^{\circ}\text{C}$ .

##### ➤ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΘΥΛΑΚΟΕΙΔΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

Το μίγμα αλγινικού–θυλακοειδών εισάγεται στάγδην, με τη βοήθεια πιπέτας, σε 100 ml διαλύματος 2% w/v  $\text{CaCl}_2$  σε 25mM MES. Κατά την εισαγωγή εφαρμόζεται ήπια ανάδευση στο διάλυμα του ασβεστίου προκειμένου να αποφευχθεί η συγκόλληση των σφαιριδίων. Η διάμετρος εξόδου της πιπέτας είναι περίπου 0,5mm. Η πιπέτα τοποθετείται σε ύψος 20cm από την επιφάνεια του διαλύματος  $\text{CaCl}_2$  (εικόνα 25). Μόλις έρθει σε επαφή με το διάλυμα του ασβεστίου η σταγόνα, η

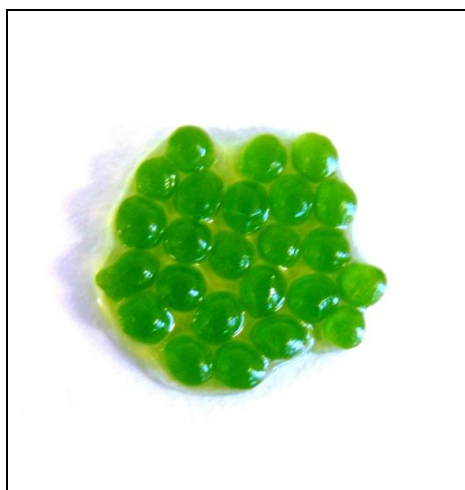
## [ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ- ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ]

οποία σχηματίζεται καθώς ελευθερώνεται μίγμα από το στόμιο της πιπέτας, πραγματοποιείται ο σχηματισμός του σφαιριδίου. Τα σχηματιζόμενα σφαιρίδια αφήνονται υπό ανάδευση για μισή ώρα ώστε να σκληρύνουν (φάση σκλήρυνσης).



Εικόνα 25. Διαδικασία ακινητοποίησης σε αλγινικά σφαιρίδια

Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία της σκλήρυνσης, τα σφαιρίδια ξεπλένονται με άφθονο νερό ώστε να απομακρυνθεί το ελεύθερο CaCl<sub>2</sub>, καθώς και η ποσότητα από τις θυλακοειδής μεμβράνες που δεν ακινητοποιήθηκαν στα αλγινικά σφαιρίδια. Ακολουθεί φύλαξη στους 4 °C, σε διάλυμα 25 mM Mes.



Εικόνα 26. Σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου με ακινητοποιημένες θυλακοειδής μεμβράνες.

\*Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την ακινητοποίηση του συμπλόκου PS II και PS II core.

ν.ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΘΥΛΑΚΟΕΙΔΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΣΕ  
ΜΕΜΒΡΑΝΕΣ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ

➤ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ

Το αλγινικό διάλυμα που χρησιμοποιείται στον σχηματισμό των σφαιριδίων παρασκευάζεται με διάλυση, κατόπιν ανάδευσης, του αλγινικού νατρίου σε διάλυμα MES 25mM. Η ανάδευση που πραγματοποιείται είναι ήπια προκειμένου να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες. Τα διαλύματα αλγινικού νατρίου που χρησιμοποιήθηκαν είναι συγκέντρωσης 1%.

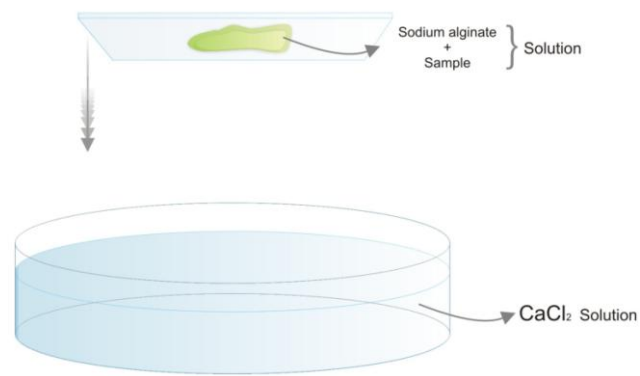
➤ ΑΝΑΜΙΞΗ ΤΟΥ ΘΥΛΑΚΟΕΙΔΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΜΕ ΤΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΤΟΥ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ

Στο διάλυμα που βρίσκονται οι θυλακοειδής μεμβράνες προστίθεται απιονισμένο νερό ούτως ώστε να επιτευχθεί συγκέντρωση χλωροφύλλης 1mg/ml. Κατόπιν το διάλυμα των θυλακοειδών μεμβρανών εισάγεται προσεκτικά στο παχύρρευστο διάλυμα του πολυμερούς και ακολουθεί ήπια ανάδευση για 10 λεπτά. Η ανάδευση πραγματοποιείται σε παγόλουτρο ώστε η θερμοκρασία να διατηρείται σταθερή στους 4<sup>0</sup>C.

➤ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΘΥΛΑΚΟΕΙΔΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ

1ml μίγματος αλγινικού–θυλακοειδών τοποθετείται πάνω σε τζαμάκι διαστάσεων 8x10cm<sup>2</sup>, με τη βοήθεια πιπέτας. Το μείγμα απλώνεται με μία σπάτουλα και στη συνέχεια αφήνεται με προσοχή στην επιφάνεια διαλύματος 2%w/v CaCl<sub>2</sub> σε 25mM MES. Εν συνεχεία αφήνεται να πέσει στον πάτο του λουτρού. Μόλις έρθει σε επαφή το τζαμάκι που φέρει στην επιφάνεια του το διάλυμα αλγινικού ασβεστίου, πραγματοποιείται ο σχηματισμός της μεμβράνης. Οι σχηματιζόμενες μεμβράνες αφήνονται για μισή ώρα στο διάλυμα CaCl<sub>2</sub> ώστε να σκληρύνουν.

**[ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ- ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ]**



**Εικόνα 27. Διαδικασία ακινητοποίησης σε μεμβράνες αλγινικού ασβεστίου**

Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία της σκλήρυνσης, οι μεμβράνες ξεπλένονται με άφθονο νερό ώστε να απομακρυνθεί το ελεύθερο  $\text{CaCl}_2$ , καθώς και η ποσότητα από τις θυλακοειδής μεμβράνες που δεν ακινητοποιήθηκαν στις μεμβράνες αλγινικού ασβεστίου. Κατόπιν φυλάσσονται στους  $4^{\circ}\text{C}$ , σε διάλυμα 25 mM Mes.



**Εικόνα 28. Μεμβράνες αλγινικού ασβεστίου με ακινητοποιημένες θυλακοειδής μεμβράνες.**

\*Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την ακινητοποίηση του συμπλόκου PS II και PS II core.

vi.ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *CHLAMYDOMONAS*  
*REINHARDTII*

Κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* καλλιεργήθηκαν σε υγρό θρεπτικό TAP (Tris-acetate-phosphate), υπο ανάδευση σε θερμοκρασία 25°C, κάτω από λευκές λάμπες φθορισμού (ένταση φωτισμού 100  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Harris (Harris, 1989) (πίνακας 9). Όταν χρειαζόταν καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό γινόταν προσθήκη 1,5 % agar (Gorman & Levine, 1965).



Εικόνα 29. Καλλιέργειες του άλγους *Chlamydomonas reinhardtii*

Τα στελέχη *Chlamydomonas reinhardtii* που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- 1) Το wild type (CC)
- 2) Το intronless (IL), είναι συγκρίσιμο με το wild type, το οποίο δεν περιέχει ιντρόνια στο γονίδιο psbA που είναι υπεύθυνο για την πρωτεΐνη D1.
- 3) Το στέλεχος HIS που έχει μια ουρά ιστιδίνης στην D1 πρωτεΐνη του πυρήνα του φωτοσυστήματος II.
- 4) Το στέλεχος S264K το οποίο είναι μια ανθεκτική μετάλλαξη ατραζίνης όπου η σερίνη (S), στη θέση 264 της πρωτεΐνης D1, έχει αλλάξει με μια λυσίνη (K).



TAP Media:		1L		Stock Solutions:			
1M Tris base pH=7,0	20ml	<b>Solution A</b>		<b>Hutner's Trace Metals</b>			
Phosphate Buffer	1ml	Ένωση:	Για 500ml	Ένωση:	Για 1L		
Hutner's Trace Metals	1ml	NH <sub>4</sub> Cl	20g	BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	11,4g		
Solution A	10ml	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5g	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	22,0g		
Acetic acid	1ml	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,5g	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	5,06g		
		<b>Phosphate Buffer</b>		FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,99g		
		Ένωση:	Για 100ml	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,61g		
		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,8g	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,57g		
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,6g	Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub>	1,1g		
				EDTA	50gr		

Table 4. Συνταγή υγρού θρεπτικού Tris-acetate-phosphate (TAP).

#### vii. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΘΥΛΑΚΟΕΙΔΩΝ ΜΕΜΒΡΑΝΩΝ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

Καλλιεργήθηκαν κύτταρα Chlamydomonas Reinhardtii σε θρεπτικό υλικό TAP και ρίχτηκαν με φυγοκέντρηση στα 400g για 5 λεπτά. Το ίζημα επαναιωρήθηκε στο ρυθμιστικό 1 και επαναφυγοκεντρήθηκε στα 400g για 5 λεπτά. Αυτό το βήμα πραγματοποιείται δις. Το ίζημα επαναιωρείται στο ρυθμιστικό 2 σε αναλογία 1:2 w/v και προστίθενται τα γυάλινα σφαιρίδια σε αναλογία 1:2 v/v. Σπάμε τα κύτταρα κάνοντας 15 επαναλήψεις των 30 δευτερολέπτων με 3-4 διαλείμματα των 2 λεπτών. Η διαδικασία γίνεται σε πάγο στο σκοτάδι. Τα beads εκπλύθηκαν τοποθετώντας 20ml ρυθμιστικού 2 τη φορά μέχρι το αιώρημα να αρχίσει να αποχρωματίζεται. Φυγοκεντρήσαμε το διάλυμα στα 3000g για 5 λεπτά. Επαναφυγοκεντρούμε το αιώρημα στα 12000g για 15 λεπτά. Επαναιωρούμε το ίζημα στο ρυθμιστικό 3 προσέχοντας να μην πάρουμε το άμυλο. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 25000g για 30 λεπτά. Το ίζημα που καταβυθίστηκε είναι οι θυλακοειδής μεμβράνες. Επαναιωρούμε σε όσο το δυνατόν λιγότερο όγκο από το ρυθμιστικό 3.



ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ 1	
Tricine-NaOH pH 7.5	0,07M
ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ 2	
Tricine-NaOH pH 7.5	0,07M
Sucrose	0,35M
MgCl <sub>2</sub>	5mM
Polyvinylpyrrolidone	2,5%
BSA	0,2%
Ascorbic Acid	0,4%
PMSF	1mM
EDTA	1mM
ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ 3	
Tricine-NaOH pH 7.5	0,07M
Sucrose	0,45M
MgCl <sub>2</sub>	1mM

Table 5. Ρυθμιστικά διαλύματα για την απομόνωση θυλακοειδών μεμβρανών από *Chlamydomonas reinhardtii*

### viii. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ CHLAMYDOMONAS

#### REINHARDTII ΣΕ ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ ΚΑΙ MEMBRANES ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ

##### ➤ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ

Το διάλυμα αλγινικού ασβεστίου που χρησιμοποιείται στον σχηματισμό των σφαιριδίων και των μεμβρανών παρασκευάζεται με διάλυση, κατόπιν ανάδευσης, του αλγινικού νατρίου σε διάλυμα 20 mM Tricine. Η ανάδευση που πραγματοποιήθηκε είναι ήπια προκειμένου να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες. Το διάλυμα αλγινικού νατρίου που χρησιμοποιήθηκε είναι συγκέντρωσης 6%.

##### ➤ ΑΝΑΜΕΙΞΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ CHLAMYDOMONAS REINHARDTII ΜΕ ΤΟ ΔΙΑΛΥΜΑ ΤΟΥ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ

Ποσότητα καλλιέργειας κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* φυγοκεντρήθηκε στα 400g για 5 λεπτά. Το ίζημα επαναιωρήθηκε σε διάλυμα 20 mM Tricine και εισάγεται προσεκτικά στο παχύρρευστο διάλυμα του πολυμερούς και

## [ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ- ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ]

ακολουθεί ήπια ανάδευση για 10 λεπτά. Η ανάδευση πραγματοποιείται σε παγόλουτρο ώστε η θερμοκρασία να διατηρείται σταθερή στους 4°C.

### ➤ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

Ακολουθήθηκε η προαναφερθείσα διαδικασία και πραγματοποιήθηκε ακινητοποίηση των κυττάρων σε σφαιρίδια και μεμβράνες αλγινικού. Το διάλυμα δισθενούς ιόντος που χρησιμοποιήθηκε ήταν  $\text{CaCl}_2$  σε 20 mM Tricine. Οι σχηματιζόμενες μεμβράνες αφήνονται για μισή ώρα στο διάλυμα  $\text{CaCl}_2$  ώστε να σκληρύνουν. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία της σκλήρυνσης οι μεμβράνες ξεπλένονται με άφθονο νερό ώστε να απομακρυνθεί το ελεύθερο  $\text{CaCl}_2$  καθώς και η ποσότητα κυττάρων που δεν ακινητοποιήθηκαν στις μεμβράνες αλγινικού ασβεστίου και κατόπιν φυλάσσονται στους 4°C σε διάλυμα 20 mM Tricine. Όλα τα διαλύματα και τα σκεύη αποστειρώθηκαν πριν την χρήση και όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε αποστειρωμένες συνθήκες παρουσία φλόγας μέσα στο Laminar Flow.

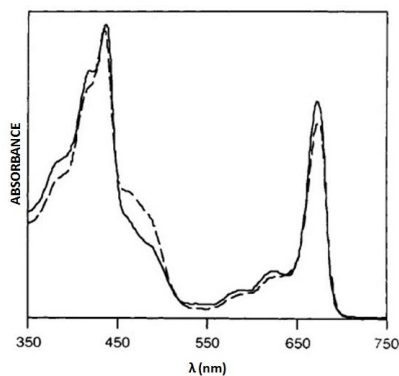
## 1) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΑΠΟ ΣΠΑΝΑΚΙ

Η απομόνωση των θυλακοειδών μεμβρανών από φρέσκα φύλλα σπανακιού (*Spinacea oleracea*) πραγματοποιήθηκε με χρήση υδατικών διαλυμάτων σε συνδυασμό με τη μέθοδο της φυγοκέντρησης. Οι χλωροπλάστες τοποθετήθηκαν σε ένα υποτονικό μέσο και αφού υπέστησαν όσμωση απελευθέρωσαν τις φωτοσυνθετικές μεμβράνες. Οι γυμνοί χλωροπλάστες επιστράφηκαν έπειτα σε ένα ισοτονικό μέσο. Αυτή η διαδικασία σπάει τους χλωροπλάστες απελευθερώνοντας το stroma με τα θυλακοειδή. Η απόδοση της απομόνωσης των θυλακοειδών μεμβρανών ανέρχεται σε 28mg χλωροφύλλης ανά 100gr φύλλων.

Οι PSII μεμβράνες απομονώθηκαν από τις θυλακοειδής με τη χρήση απορρυπαντικού και φυγοκέντρησης. Οι πυρήνες του PSII απομονώθηκαν με διαλυτοποίηση των PSII-μεμβρανών με απορρυπαντικά. Όλες οι παρασκευές πραγματοποιήθηκαν στο σκοτάδι, στους 4°C. Ο χαρακτηρισμός τους έγινε φασματοσκοπικά, με τη μέθοδο της πολαρογραφικής μέτρησης O<sub>2</sub> και με τη μέθοδο του φθορισμού χλωροφύλλης.

### ι. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

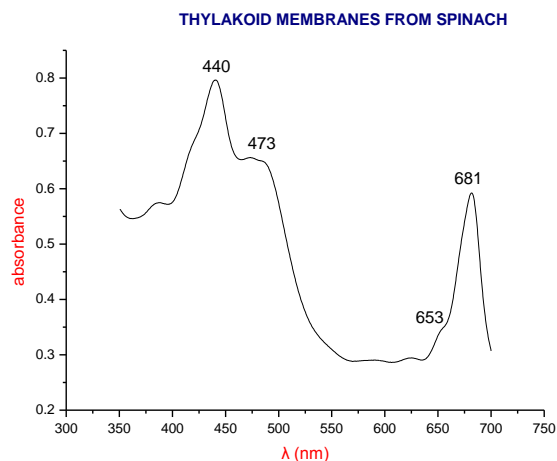
Η μορφή του φάσματος απορρόφησης για τις θυλακοειδής μεμβράνες και το φωτοσύστημα II είναι γνωστή από τη βιβλιογραφία. Παρακάτω δίνονται αυτά τα φάσματα και είναι εμφανείς οι χαρακτηριστικές κορυφές στα 440 και 470 nm καθώς και στα 650 και 680nm.



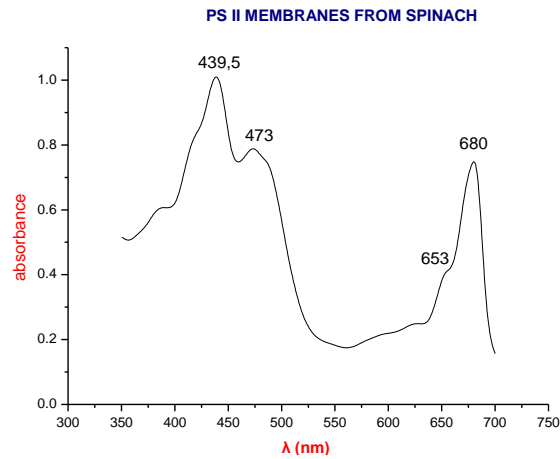
Εικόνα 30. Φάσμα απορρόφησης του PSII (- - -) και PSII core (—)

Ο λόγος των χλωροφυλλών a/b είναι ένας δείκτης για τον καθορισμό της απόδοσης του φωτοσυνθετικού συστήματος (Kathiresan & Kannan, 1985). Έχει αναφερθεί ότι στα φύλλα σπανακιού, όταν υπάρχει περιβαλλοντική πίεση, ο λόγος a/b αυξάνεται (Delfine, Alvino, Villiani, & Loreta, 1999). Η υψηλή τιμή του λόγου a/b δείχνει ότι η αναλογία μεταξύ των PSII και PSI αλλάζει στα φύλλα τα οποία έχουν υποστεί κάποιο είδος στρες (Anderson, 1986).

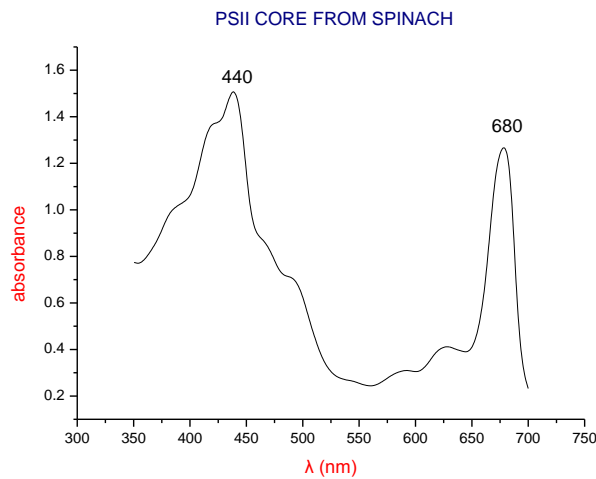
Δύο δείγματα από κάθε απομόνωση αναλύθηκαν. Τα ποσά χλωροφύλλης a, b και ο λόγος τους καθορίστηκαν φασματοφωτομετρικά, με την ανάγνωση της απορρόφησης στα μήκη κύματος 663,6 και 646,6 (εικόνα 29). Ο λόγος a/b που υπολογίστηκε ήταν  $2,2 \pm 0,1$ ,  $2,15 \pm 0,12$  και  $2,47 \pm 0,11$  για τις θυλακοειδής μεμβράνες, το PSII και το PSII core αντίστοιχα. Η τιμή του λόγου a/b είναι παραπλήσια σε αυτή που δίνουν οι Black και Mayne ( $2,828 \pm 0,277$ ) για τις απομονωμένες από σπανάκι ενεργές θυλακοειδής μεμβράνες (Black & Mayne, 1970).



Εικόνα 31. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό θυλακοειδών μεμβρανών από σπανάκι



Εικόνα 32. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό του φωτοσυστήματος II από σπανάκι



Εικόνα 33. Φάσμα απορρόφησης στο ορατό του πυρήνα του φωτοσυστήματος II από σπανάκι

## ii. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΚΛΥΣΗΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

Η ταχύτητα έκλυσης οξυγόνου των απομονωμένων θυλακοειδών μεμβρανών ήταν  $325 \mu\text{moles O}_2 / \text{mg}_{\text{Chl}} \text{ hr}$  (παρουσία  $300 \mu\text{M DCBQ}$ ), τιμή η οποία δείχνει ότι έχουμε ενεργές θυλακοειδείς μεμβράνες (Hardt & Bessel, 1978). Για το PSII και το PSII core ήταν  $857$  και  $652 \mu\text{moles O}_2 / \text{mg}_{\text{Chl}} \text{ hr}$  (παρουσία  $300 \mu\text{M DCBQ}$  και  $10 \text{mM CaCl}_2$ ) αντίστοιχα.

### iii. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗΣ

Ο λόγος  $F_v/F_m$  των απομονωμένων θυλακοειδών μεμβρανών (μέσος όρος δυο δειγμάτων) ήταν 0,703. Οι τιμή αυτή δείχνει ότι οι μεμβράνες βρίσκονται στην ενεργή τους μορφή. Ο λόγος για το PSII και το PSII core ήταν 0,615 και 0,403 αντίστοιχα.

Λοιπές παραμέτροι:

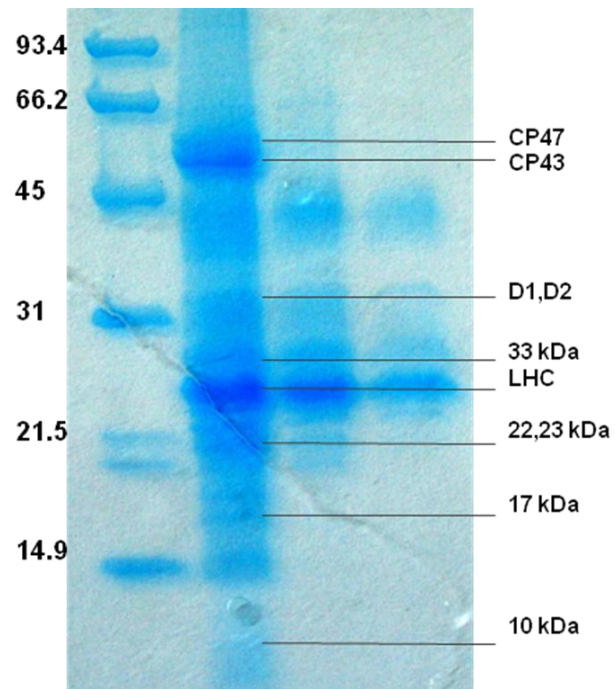
	$F_v/F_m$	Pi	Area
THYL spinach	0,703	2,751	9400
PSII spinach	0,615	2,2	8200
PSII CORE spinach	0,403	1,05	2500

### iv. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η πρωτεϊνική σύσταση των θυλακοειδών μεμβρανών, του φωτοσυστήματος II καθώς και του πυρήνα του που απομονώθηκαν με τις μεθόδους που περιγράφηκαν παραπάνω.

Το πήκτωμα πολυακριλαμίδης εμφάνισε ζώνες που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες D1 και D2 του πυρήνα του φωτοσυστήματος II, τις περιφερειακές 10, 22, 43 και 47 kDa, τις εξωτερικές 17, 23 και 33 kDa και την φωτοσυνθετική κεραία που είναι ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών 20-27 kDa.

**[ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΣΠΑΝΑΚΙ ]**



**Εικόνα 34. Ανάλυση της πρωτεϊνικής σύστασης δείγμα 1-marker, δείγμα 2-θυλακοειδή, δείγμα 3-PSII και δείγμα 4-PSII core**

## 2) ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΑΠΟ ΣΠΑΝΑΚΙ

### Συνθήκες ακινητοποίησης

Η μέθοδος ακινητοποίησης πρέπει να τηρεί διάφορα κριτήρια όπως να συντηρεί τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα, να βελτιώσει τη σταθερότητα αυτής της δραστηριότητας και να συντηρήσει συνολικά τη μορφολογική δομή των ακινητοποιημένων σωματιδίων. Η σταθερότητα της βιολογικής ενεργότητας επηρεάζεται από τις επιβαλλόμενες εξωτερικές συνθήκες, όπως της θερμοκρασίας, της ιοντικής ισχύος, του pH, του φωτός, απαραίτητες για την μέτρηση της φωτοσυνθετικής ενεργότητας.

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν δύο μορφές σταθερότητας: α) η ενεργότητα του φωτοσυνθετικού υλικού μετά την ακινητοποίηση, και β) η σταθερότητα της ενεργότητας του φωτοσυνθετικού υλικού που επηρεάζεται από τον χρόνο αποθήκευσης. Αξιολογήθηκαν οι ιδανικές λειτουργικές συνθήκες για την ενεργότητα του ακινητοποιημένου φωτοσυνθετικού υλικού και της σταθερότητας αποθήκευσής του. Για την μέτρηση της ενεργότητας στις διάφορες συνθήκες επιλέχθηκε ο φθορισμός που έχει αποδειχθεί ότι είναι μια γρήγορη, μη καταστρεπτική και αξιόπιστη μέθοδος και η έκλυση O<sub>2</sub>.

Αρχικά έγινε έρευνα του ρυθμιστικού ακινητοποίησης. Ήταν σημαντικό να βρεθεί ένα ρυθμιστικό που να μην καταστρέφει το ακινητοποιημένο υλικό και την ενεργότητά του, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και της μέτρησης.

Ως ρυθμιστικό ακινητοποίησης επιλέχθηκε το MES (2-(n-morpholino) ethane sulfonic acid). Έπειτα δοκιμάστηκαν διάφορες τιμές pH και συγκεντρώσεις και pH του ρυθμιστικού κατά την ακινητοποίηση.

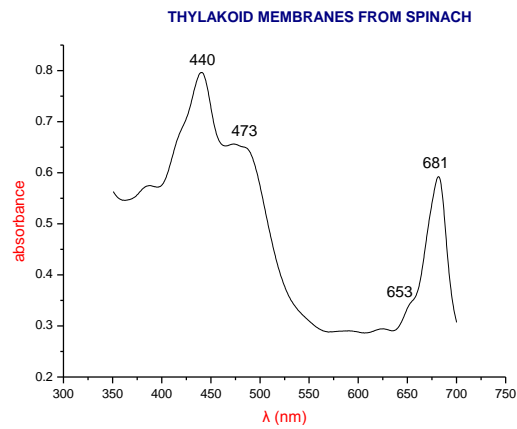
### ί.ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

Παρακάτω παρατίθενται φάσματα ελεύθερου και ακινητοποιημένου φωτοσυνθετικού υλικού. Η ομοιότητα των φασμάτων των ελεύθερων και των

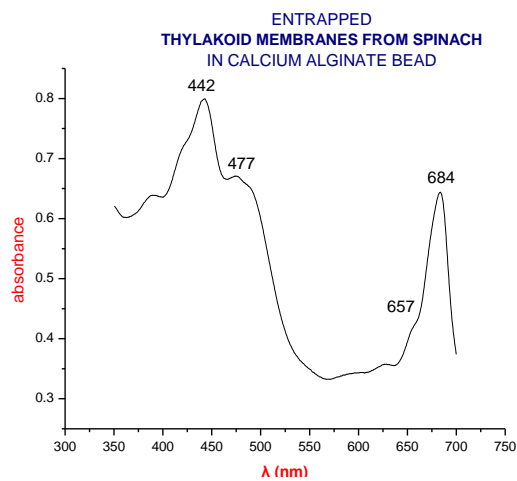


**[ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΣΠΑΝΑΚΙ ]**

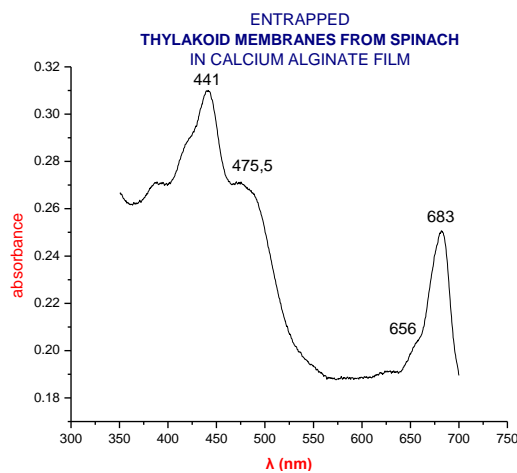
ακίνητοποιημένων συμπλόκων είναι απόδειξη εισχώρησης τους στη μήτρα αλγινικού ασβεστίου.



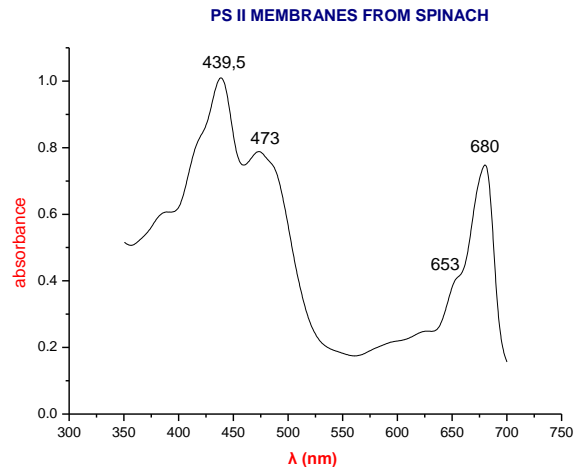
**Εικόνα 35. Φάσμα απορρόφησης ελεύθερων θυλακοειδών μεμβρανών**



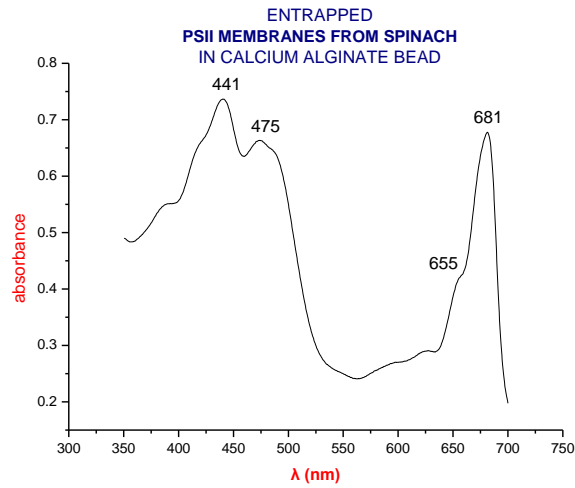
**Εικόνα 36. Φάσμα απορρόφησης ακίνητοποιημένων θυλακοειδών μεμβρανών σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου**



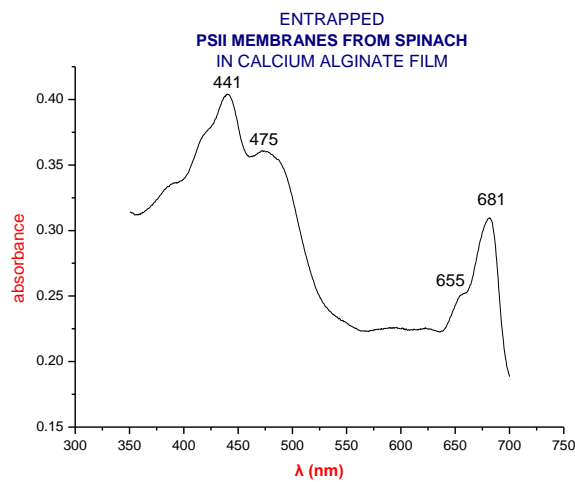
**Εικόνα 37. Φάσμα απορρόφησης ακίνητοποιημένων θυλακοειδών μεμβρανών σε μεμβράνες αλγινικού ασβεστίου**



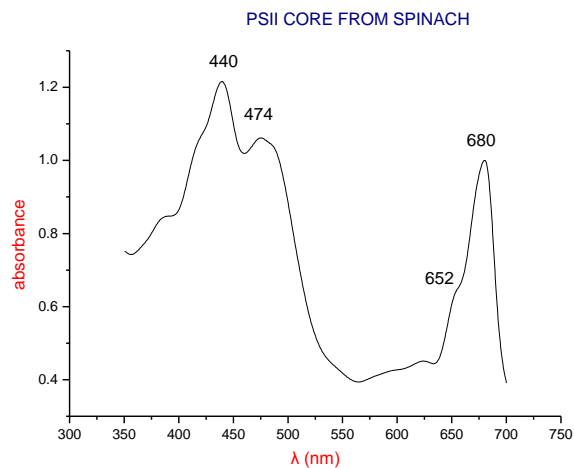
Εικόνα 38. Φάσμα απορρόφησης ελεύθερων psII μεμβρανών



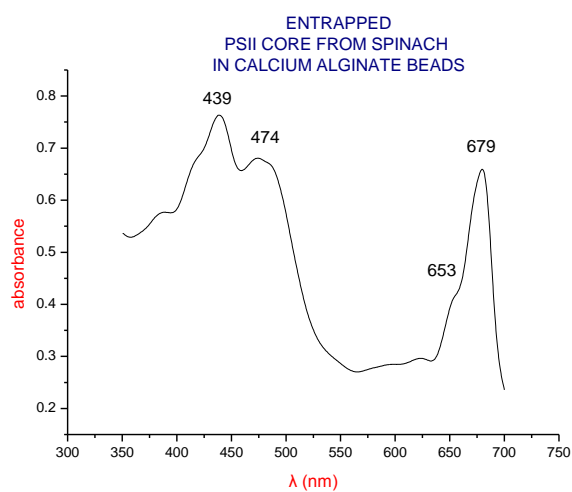
Εικόνα 39. Φάσμα απορρόφησης ακινητοποιημένων psII μεμβρανών σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου



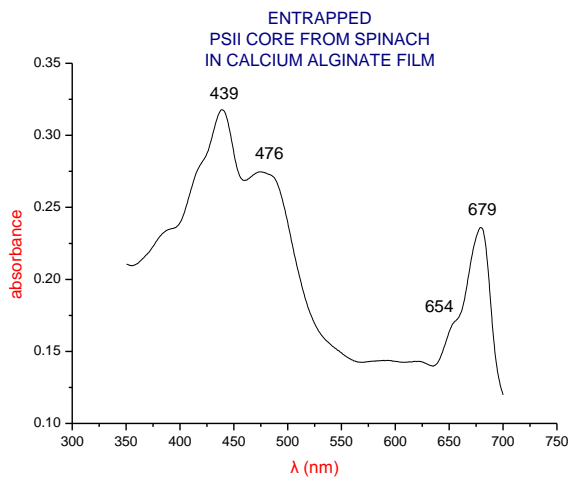
Εικόνα 40. Φάσμα απορρόφησης ακινητοποιημένων psII μεμβρανών σε μεμβράνες αλγινικού ασβεστίου



Εικόνα 41. Φάσμα απορρόφησης ελεύθερων πυρήνων φωτοσυστήματος II



Εικόνα 42. Φάσμα απορρόφησης ακινητοποιημένων πυρήνων φωτοσυστήματος II σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου



Εικόνα 43. Φάσμα απορρόφησης ακινητοποιημένων πυρήνων φωτοσυστήματος II σε μεμβράνες αλγινικού ασβεστίου

## ii.ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΚΚΛΥΣΗΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

Η ταχύτητα έκλυσης οξυγόνου των απομονωμένων θυλακοειδών μεμβρανών ήταν  $325 \pm 45 \mu\text{moles O}_2 / \text{mg}_{\text{Chl}} \text{ hr}$  (παρουσία  $300\mu\text{M DCBQ}$ ). Για τις ακινητοποιημένες θυλακοειδής μεμβράνες σε σφαιρίδια και μεμβράνες αλγινικού ασβεστίου η ταχύτητα ήταν  $58,8 \pm 3,06$  και  $51,43 \pm 1,43 \mu\text{moles O}_2 / \text{mg}_{\text{Chl}} \text{ hr}$  (παρουσία  $300\mu\text{M DCBQ}$  και  $10\text{mM CaCl}_2$ ) αντίστοιχα. Το αποτέλεσμα αυτών των μετρήσεων είναι πλασματικό γιατί υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που τις παρεμποδίζουν. Μερικές από αυτές είναι ότι ανταποκρίνονται κυρίως τα συστήματα που είναι ακινητοποιημένα στο εξωτερικό των σφαιριδίων και των μεμβρανών καθώς το δίκτυο του αλγινικού εμποδίζει το φως να εισχωρήσει. Επίσης για να είναι επιτυχημένη η μέτρηση το ηλεκτρόδιο τοποθετείται ελαφρώς πιο πάνω από την επιφάνεια του υγρού στο οποίο βρίσκονται τα σφαιρίδια και οι μεμβράνες και αυτό μπορεί να μειώνει τον θόρυβο αλλά σίγουρα μειώνει και το σήμα του οργάνου.

Η ταχύτητα έκλυσης οξυγόνου των απομονωμένων psII μεμβρανών ήταν  $406,95 \pm 5,04 \mu\text{moles O}_2 / \text{mg}_{\text{Chl}} \text{ hr}$  (παρουσία  $300\mu\text{M DCBQ}$ ). Για τις ακινητοποιημένες psII μεμβράνες σε σφαιρίδια και μεμβράνες αλγινικού ασβεστίου η ταχύτητα ήταν  $66,40 \pm 5,03$  και  $55,11 \pm 1,04 \mu\text{moles O}_2 / \text{mg}_{\text{Chl}} \text{ hr}$  (παρουσία  $300\mu\text{M DCBQ}$  και  $10\text{mM CaCl}_2$ ) αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα για τον πυρήνα του φωτοσυστήματος II εμφανίζουν την ίδια μορφή με τα προηγούμενα και παρατίθενται παρακάτω. Η ταχύτητα έκλυσης οξυγόνου του πυρήνα του φωτοσυστήματος II ήταν  $214,19 \pm 6,14 \mu\text{moles O}_2 / \text{mg}_{\text{Chl}} \text{ hr}$  (παρουσία  $300\mu\text{M DCBQ}$ ). Για τους ακινητοποιημένους πυρήνες σε σφαιρίδια και μεμβράνες αλγινικού ασβεστίου η ταχύτητα ήταν  $71,22 \pm 3,17$  και  $58,90 \pm 2,31 \mu\text{moles O}_2 / \text{mg}_{\text{Chl}} \text{ hr}$  (παρουσία  $300\mu\text{M DCBQ}$  και  $10\text{mM CaCl}_2$ ) αντίστοιχα.

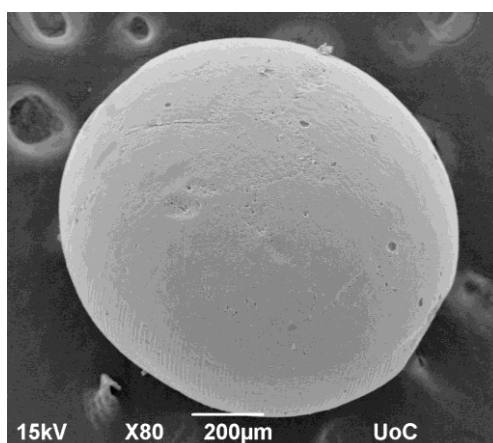
## iii.ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗΣ

Μετά από κάθε ακινητοποίηση, σε μορφή bead και film, μετρήθηκε ο λόγος φθορισμού  $F_v/F_m$  ο οποίος αντικατοπτρίζει την ενεργότητα του φωτοσυνθετικού υλικού.

	Θυλακοειδή	Φωτοσύστημα II	Πυρήνας Φωτοσυστήματος II
Ελεύθερα	0,703	0,615	0,403
Ακίνητοποιημένα σε σφαιρίδια	0,408	0,323	0,103
Ακίνητοποιημένα σε μεμβράνες	0,603	0,493	0,142

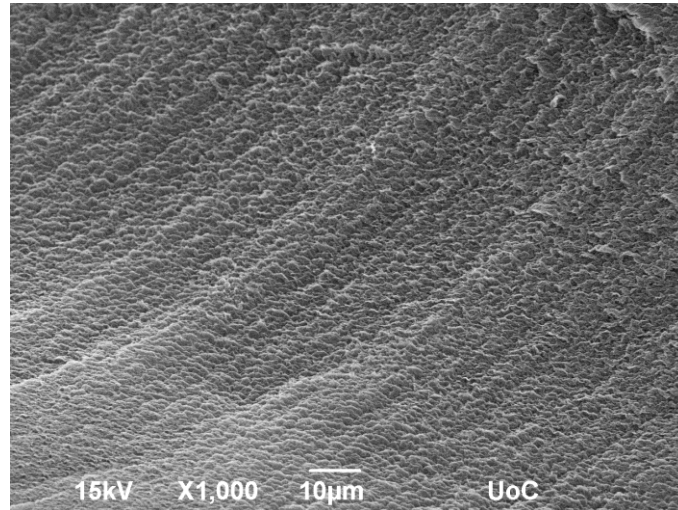
#### iv. ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΣΑΡΩΣΗΣ

Φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης έδειξαν ότι η επιφάνεια των σφαιριδίων είναι αρκετά ομοιόμορφη. Στην παρακάτω εικόνα εμφανίζεται η επιφάνεια ενός ολόκληρου σφαιριδίου αλγινικού ασβεστίου.



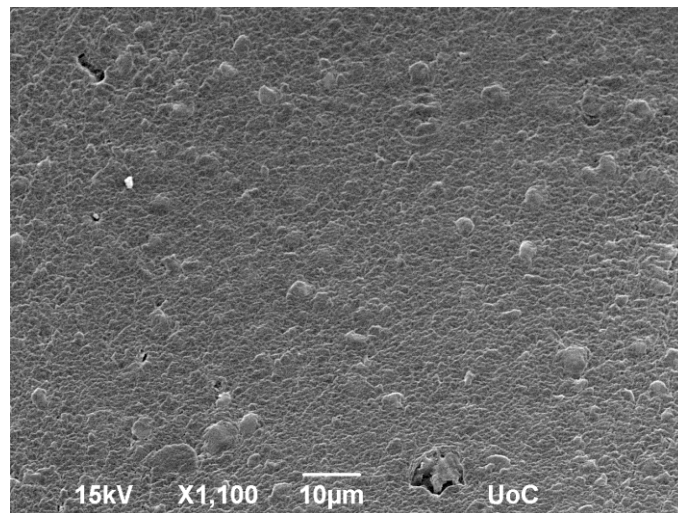
Εικόνα 44. Φωτογραφία SEM ενός ολόκληρου σφαιριδίου αλγινικού ασβεστίου

Ο πυρήνας των σφαιριδίων φαίνεται να είναι λιγότερο πακεταρισμένος σε σχέση με την περιφέρεια των σφαιριδίων, λόγω του ταχύτερου σχηματισμού της γέλης στην εξωτερική στιβάδα. Στην εικόνα που ακολουθεί φαίνεται το εσωτερικό ενός σφαιριδίου.



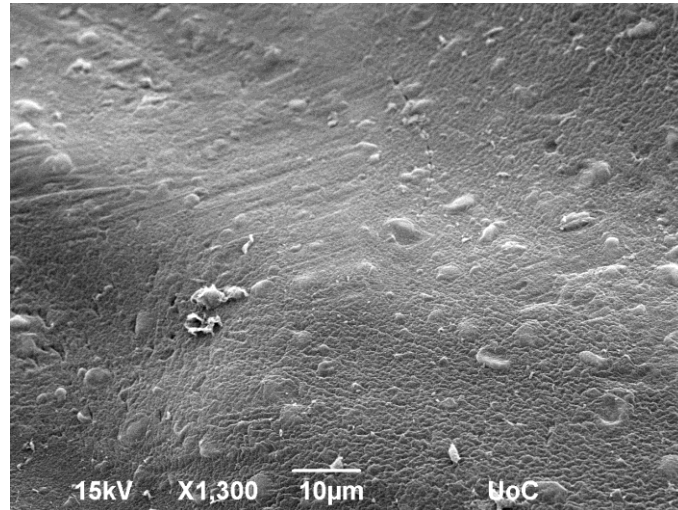
**Εικόνα 45.** Φωτογραφία SEM του εσωτερικού ενός σφαιριδίου αλγινικού ασβεστίου

Με την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) παρατηρήθηκε ότι τα ακινητοποιημένα σωματίδια (θυλακοειδής μεμβράνες από σπανάκι) ήταν τυχαία καταναμημένα εντός του δικτύου της υδρογέλης. Στις εικόνες SEM που ακολουθούν εμφανίζονται ακινητοποιημένες θυλακοειδής μεμβράνες στο εσωτερικό των σφαιριδίων και στην επιφάνεια μεμβρανών αλγινικού ασβεστίου.

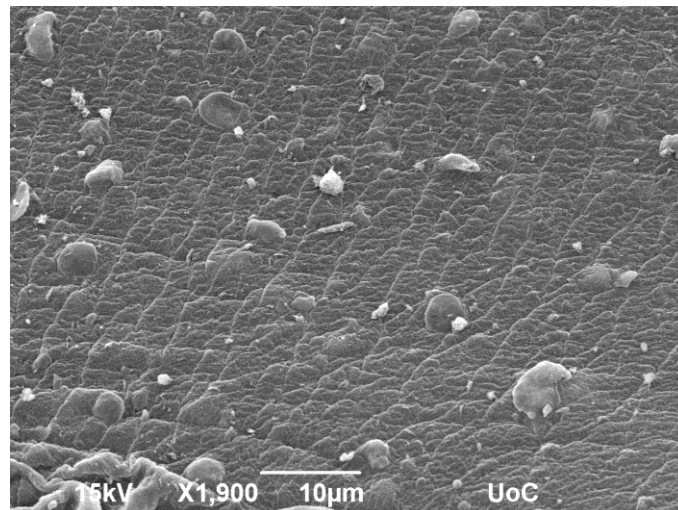


**Εικόνα 46.** Φωτογραφία SEM του εσωτερικού ενός σφαιριδίου αλγινικού ασβεστίου, στο οποίο παρατηρούνται ακινητοποιημένες θυλακοειδής μεμβράνες





**Εικόνα 47.** Φωτογραφία SEM της επιφάνειας μίας μεμβράνης αλγινικού ασβεστίου, στην οποία παρατηρούνται ακινητοποιημένες θυλακοειδής μεμβράνες

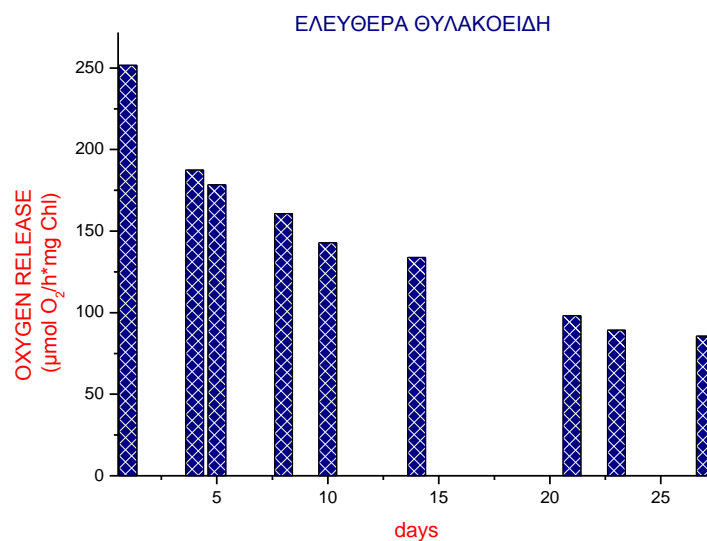


**Εικόνα 48.** Φωτογραφία SEM άλλης όψης της επιφάνειας μίας μεμβράνης αλγινικού ασβεστίου, στην οποία παρατηρούνται ακινητοποιημένες θυλακοειδής μεμβράνες

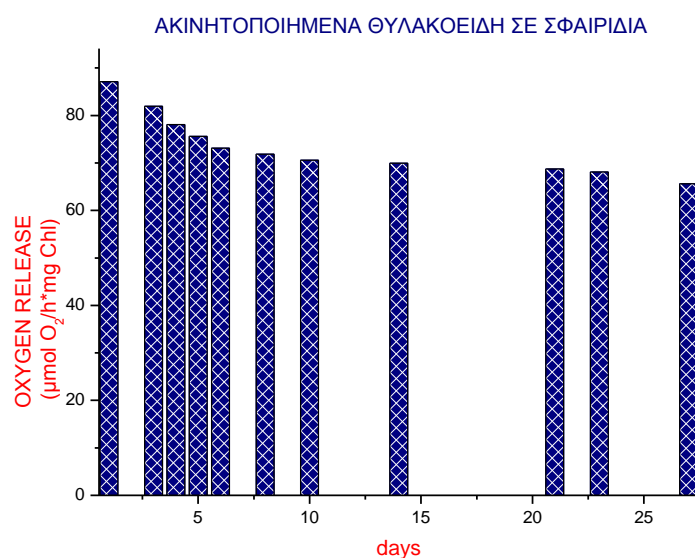
Από τις φωτογραφίες μπορούμε να αποσπάσουμε πληροφορίες και για το μέγεθος του ακινητοποιημένου υλικού. Στην προκειμένη περίπτωση συμπεράναμε ότι μερικές από τις θυλακοειδής μεμβράνες από σπανάκι ήταν συμπλοκοποιημένες και εμφάνισαν πλευρά μεγέθους που κυμαίνεται από 1,67 έως 5,55 µm.

Με τον τρόπο αυτό η μικροσκοπία σάρωσης αποτέλεσε μία ακόμα συνιστώσα για την απόδειξη της ακινητοποίησης των θυλακοειδών μεμβρανών από σπανάκι μέσα στη μήτρα αλγινικού ασβέστιου τόσο με τη μορφή σφαιριδίων όσο και με τη μορφή μεμβρανών.

#### iv. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΜΕ ΤΟΝ ΧΡΟΝΟ

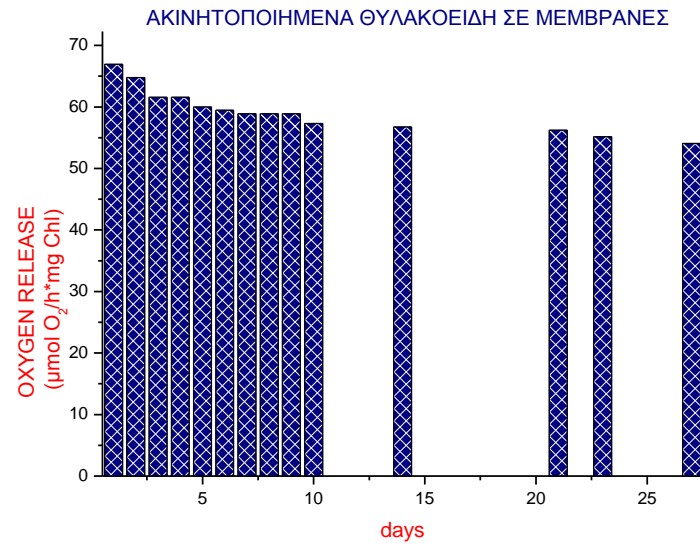


Παρατηρούμε ότι η μείωση στην παραγωγή οξυγόνου στα ελεύθερα θυλακοειδή είναι κατακόρυφη σε σχέση με αυτή του ακινητοποιημένου υλικού που φαίνεται στα διαγράμματα που ακολουθούν. Αν και η παραγωγή οξυγόνου στα ακινητοποιημένα δείγματα δεν είναι τόσο μεγάλη λόγω των παρεμποδίσεων που υπάρχουν κατά τη μέτρηση, εντούτις τα επίπεδα της παραμένουν ικανοποιητικά με την πάροδο του χρόνου.





**[ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΣΠΑΝΑΚΙ ]**

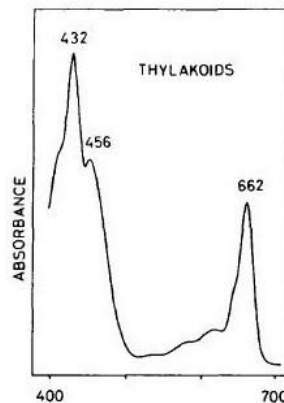


### 3) ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ *CHLAMYDOMONAS* *REINHARDTII*

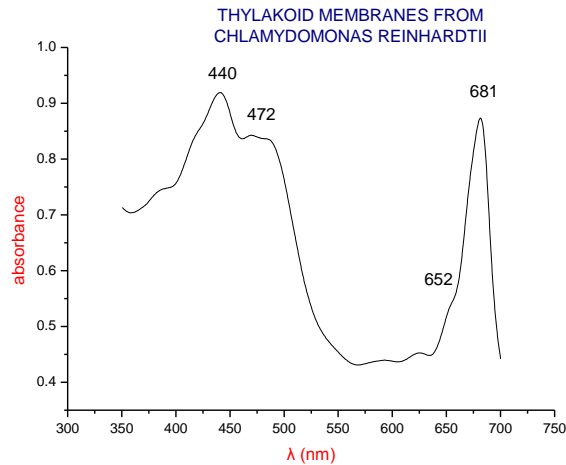
Η απομόνωση των θυλακοειδών μεμβρανών από κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* πραγματοποιήθηκε με αρχική διάρρηξη των κυττάρων με τη βοήθεια γυάλινων σφαιριδίων και εν συνεχεία με χρήση υδατικών διαλυμάτων σε συνδυασμό με τη μέθοδο της φυγοκέντρωσης. Στη συνέχεια οι χλωροπλάστες , τοποθετήθηκαν σε υποτονικό μέσο και υπέστησαν όσμωση απελευθερώνοντας με τον τρόπο αυτό τις φωτοσυνθετικές μεμβράνες. Οι γυμνοί χλωροπλάστες τοποθετήθηκαν πάλι σε ένα ισοτονικό μέσο. Αυτή η διαδικασία σπάει τους χλωροπλάστες και απελευθερώνει το stroma με τα θυλακοειδή. Η απόδοση της απομόνωσης των θυλακοειδών μεμβρανών από τα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* ανέρχεται σε 60mg χλωροφύλλης ανά 18L καλλιέργειας.

#### ι.ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

Παρακάτω παρατίθεται το φάσμα απορρόφησης των θυλακοειδών μεμβρανών που απομονώθηκαν από τα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* με τη μέθοδο που περιγράφηκε παραπάνω καθώς και αντίστοιχο φάσμα της βιβλιογραφίας. Είναι εμφανείς οι χαρακτηριστικές κορυφές των θυλακοειδών όπως αναφέρονται στη βιβλιογραφία αλλά και η ομοιότητα του φάσματος με αυτό των θυλακοειδών που απομονώθηκαν από σπανάκι.



Εικόνα 49. Φάσμα απορρόφησης θυλακοειδών μεμβρανών από βιβλιογραφική πηγή (Mendiola-Morgenthaler & Eichenberger, 1985)



Εικόνα 50. Φάσμα απορρόφησης απομονωμένων θυλακοειδών μεμβρανών από τα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii*

## ii. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΚΚΛΥΣΗΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

Η ταχύτητα έκλυσης οξυγόνου των απομονωμένων θυλακοειδών μεμβρανών ήταν  $276,66 \pm 5,03 \mu\text{moles O}_2 / \text{mg}_{\text{Chl}} \text{ hr}$  (παρουσία 300μM DCBQ).

## iii. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗΣ

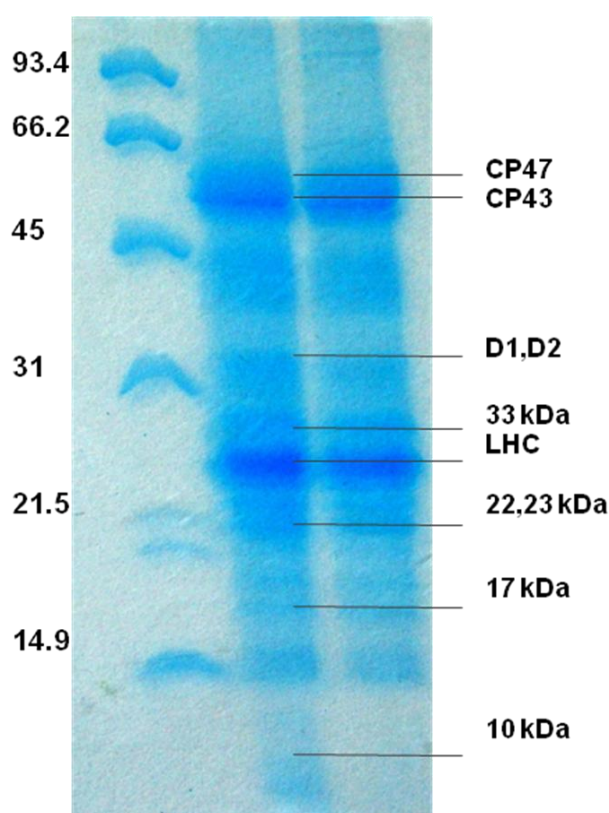
Ο λόγος  $F_v/F_m$  των απομονωμένων θυλακοειδών μεμβρανών (μέσος όρος δυο δειγμάτων) ήταν 0,703. Οι τιμή αυτή δείχνει ότι οι μεμβράνες βρίσκονται στην ενεργή τους μορφή. Ο λόγος για το PSII και το PSII core ήταν 0,615 και 0,403 αντίστοιχα.

Λοιπές παραμέτροι:

	$F_v/F_m$	Pi	Area
THYL chlamys	0,364	0,92	2380

#### iv. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η πρωτεϊνική σύσταση των θυλακοειδών μεμβρανών που απομονώθηκε με τις μεθόδους που περιγράφηκαν παραπάνω από τα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii*. Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης εμφάνισε ζώνες που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες D1 και D2 του πυρήνα του φωτοσυστήματος II, τις περιφερειακές 10, 22, 43 και 47 kDa, τις εξωτερικές 17, 23 και 33 kDa και την εσωτερική φωτοσυνθετική κεραία.



Εικόνα 51. Ανάλυση της πρωτεϊνικής σύστασης δείγμα 1.marker, 2.θυλακοειδή από σπανάκι, 3.θυλακοειδή από *Chlamydomonas reinhardtii*

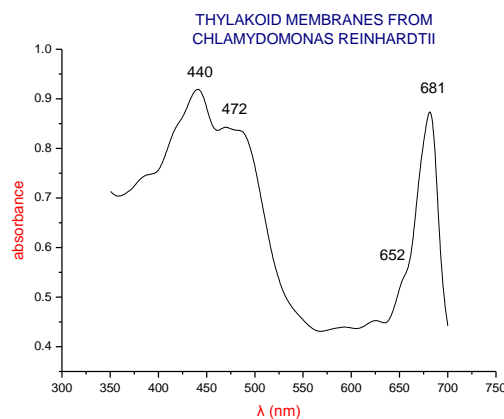
## 4) ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ *CHLAMYDOMONAS* *REINHARDTII*

### Συνθήκες ακινητοποίησης

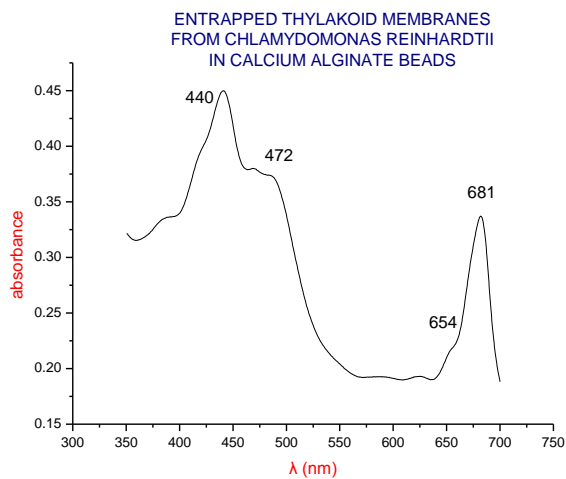
Και σε αυτή την περίπτωση ακολουθήθηκε η μέθοδος ακινητοποίησης που περιγράφηκε προηγουμένως. Επίσης ακινητοποιήθηκαν και ολόκληρα κύτταρα. Στην περίπτωση αυτή όμως χρησιμοποιήθηκε ως ρυθμιστικό διάλυμα Τρισίνη σε pH 7.0 που ταυτόχρονα αποτελεί και θρεπτικό υλικό για τα ακινητοποιημένα κύτταρα.

### ι. ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ

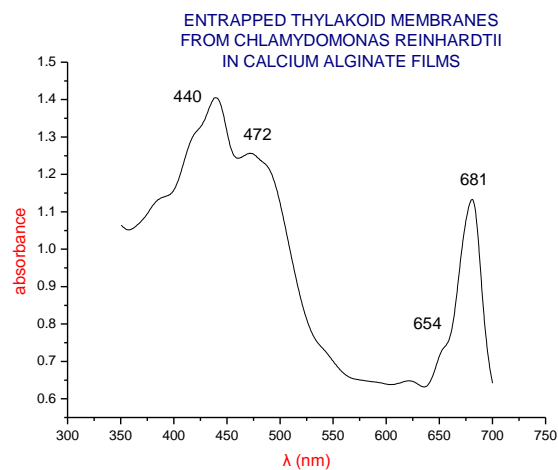
Παρακάτω παρατίθενται φάσματα ελεύθερου και ακινητοποιημένου φωτοσυνθετικού υλικού. Η ομοιότητα των φασμάτων των ελεύθερων και των ακινητοποιημένων συμπλόκων είναι απόδειξη εισχώρησης τους στη μήτρα αλγινικού ασβεστίου.



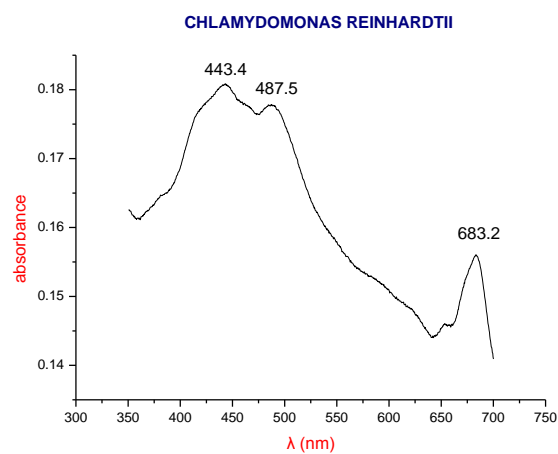
Εικόνα 52. Φάσμα απορρόφησης απομονωμένων θυλακοείδων μεμβρανών από τα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii*



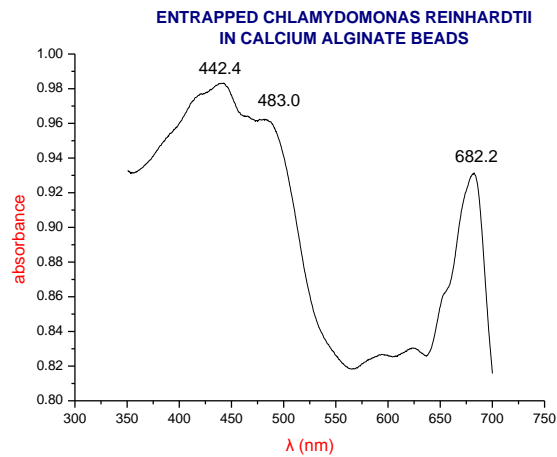
**Εικόνα 53. Φάσμα απορρόφησης ακινητοποιημένων θυλακοειδών μεμβρανών σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου**



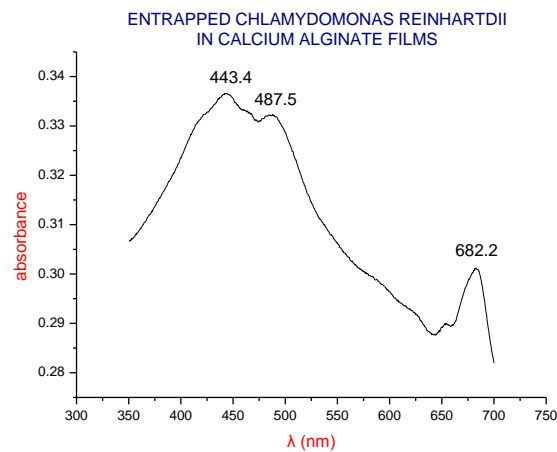
**Εικόνα 54. Φάσμα απορρόφησης ακινητοποιημένων θυλακοειδών μεμβρανών σε μεμβράνες αλγινικού ασβεστίου**



**Εικόνα 55. Φάσμα απορρόφησης κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii***



**Εικόνα 56. Φάσμα απορρόφησης ακινητοποιημένων κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου**



**Εικόνα 57. Φάσμα απορρόφησης ακινητοποιημένων κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* σε μεμβράνες αλγινικού ασβεστίου**

## ii. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΚΚΛΥΣΗΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ

Η ταχύτητα έκλυσης οξυγόνου των απομονωμένων θυλακοειδών μεμβρανών ήταν  $276,66 \pm 5,03$   $\mu\text{moles O}_2 / \text{mg}_{\text{Chl}} \text{ hr}$  (παρουσία 300 $\mu\text{M}$  DCBQ). Για τις ακινητοποιημένες θυλακοειδής μεμβράνες σε σφαιρίδια και μεμβράνες αλγινικού ασβεστίου η ταχύτητα ήταν  $74,97 \pm 2,18$  και  $64,25 \pm 3,45$   $\mu\text{moles O}_2 / \text{mg}_{\text{Chl}} \text{ hr}$  (παρουσία 300 $\mu\text{M}$  DCBQ και 10mM  $\text{CaCl}_2$ ) αντίστοιχα. Και σε αυτή την περίπτωση το αποτέλεσμα αυτών των μετρήσεων είναι πλασματικό γιατί υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που τις παρεμποδίζουν. Παρ'όλα αυτά όμως αποτελούν σημαντική

## [ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΠΟ CHLAMYS ]

ένδειξη ότι τα ακινητοποιημένα σωματίδια εξακολουθούν να έχουν φωτοσυνθετική δραστηριότητα.

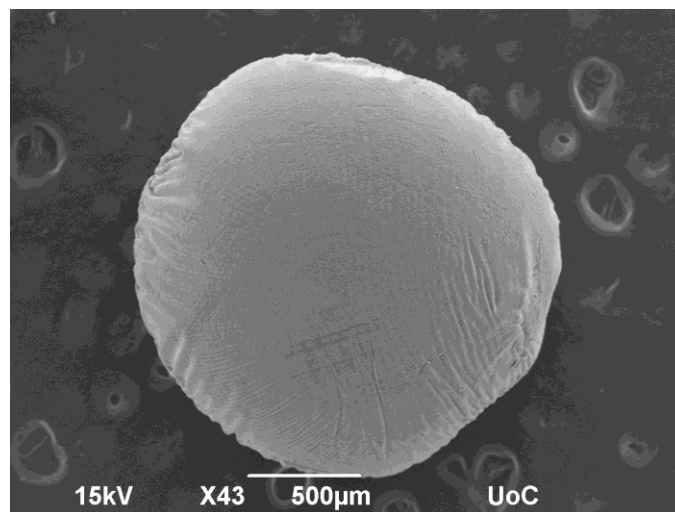
### iii.ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗΣ

Μετά από κάθε ακινητοποίηση, σε μορφή bead και film, μετρήθηκε ο λόγος φθορισμού Fv/Fm ο οποίος αντικατοπτρίζει την ενεργότητα του φωτοσυνθετικού υλικού.

	Θυλακοειδή	Κύτταρα <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Ελεύθερα	0,364	0.767
Ακινητοποιημένα σε σφαιρίδια	0,125	0.721
Ακινητοποιημένα σε μεμβράνες	0,103	0.757

### iv.ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ ΣΑΡΩΣΗΣ

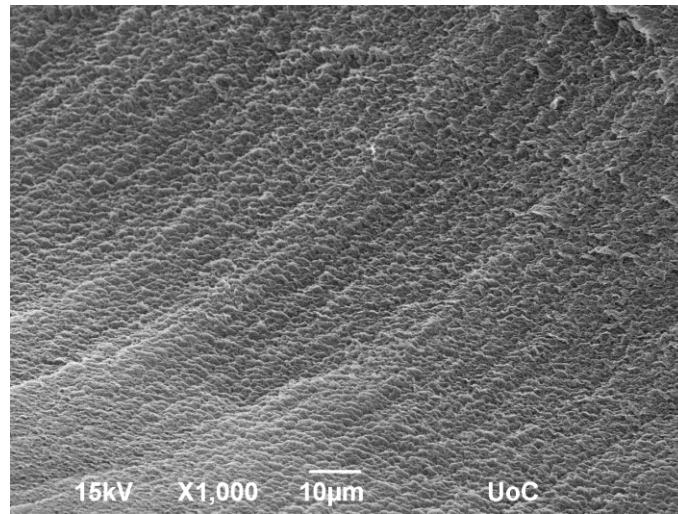
Φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης πάρθηκαν και σε αυτή την περίπτωση και έδειξαν παρόμοια αποτελέσματα. Παρακάτω εμφανίζεται η επιφάνεια ενός ολόκληρου σφαιριδίου αλγινικού ασβεστίου.



Εικόνα 58. Φωτογραφία SEM ενός ολόκληρου σφαιριδίου αλγινικού ασβεστίου

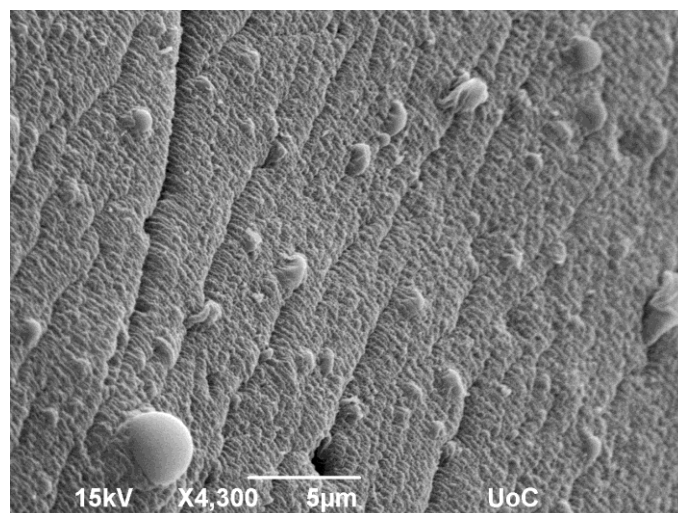


Στην εικόνα που ακολουθεί φαίνεται το εσωτερικό ενός σφαιριδίου που προέκυψε από του σφαιριδίου.

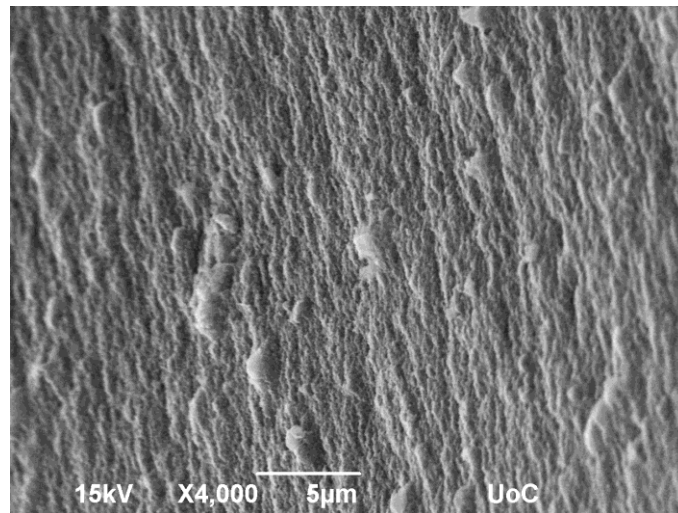


**Εικόνα 59. Φωτογραφία SEM του εσωτερικού ενός σφαιριδίου αλγινικού ασβεστίου**

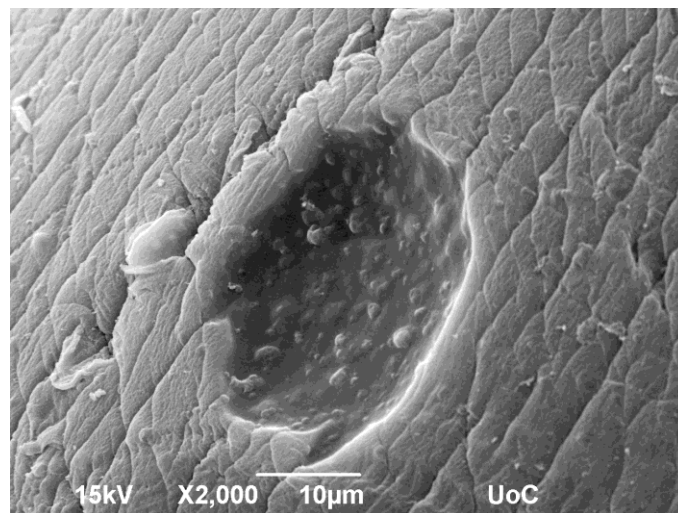
Και σε αυτή την περίπτωση η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) μας υπέδειξε ότι τα ακινητοποιημένα σωματίδια (θυλακοειδής μεμβράνες από κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* και κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii*) ήταν τυχαία κατανεμημένα μέσα στην υδρογέλη. Στις εικόνες SEM που ακολουθούν εμφανίζονται ακινητοποιημένες θυλακοειδής μεμβράνες και κύτταρα στο εσωτερικό των σφαιριδίων και στην επιφάνεια μεμβρανών αλγινικού ασβεστίου.



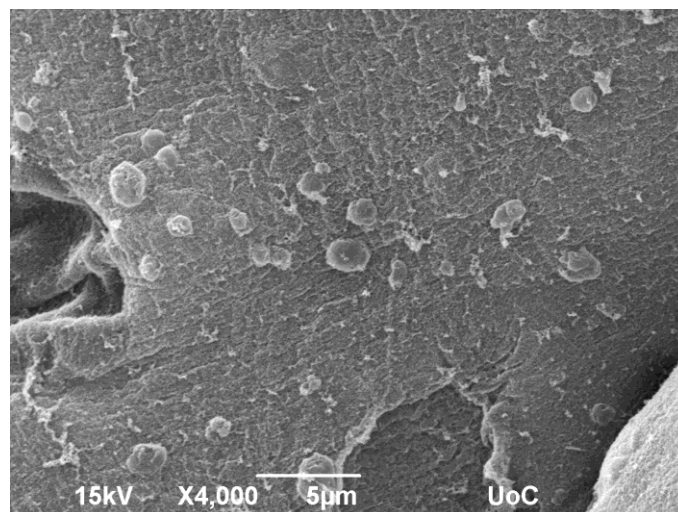
**Εικόνα 60. Φωτογραφία SEM της επιφάνειας ενός σφαιριδίου αλγινικού ασβεστίου στην οποία φαίνονται ακινητοποιημένες θυλακοειδής μεμβράνες**



**Εικόνα 61.** Φωτογραφία SEM του εσωτερικού ενός σφαιριδίου αλγινικού ασβεστίου, στο οποίο παρατηρούνται ακινητοποιημένες θυλακοειδής μεμβράνες

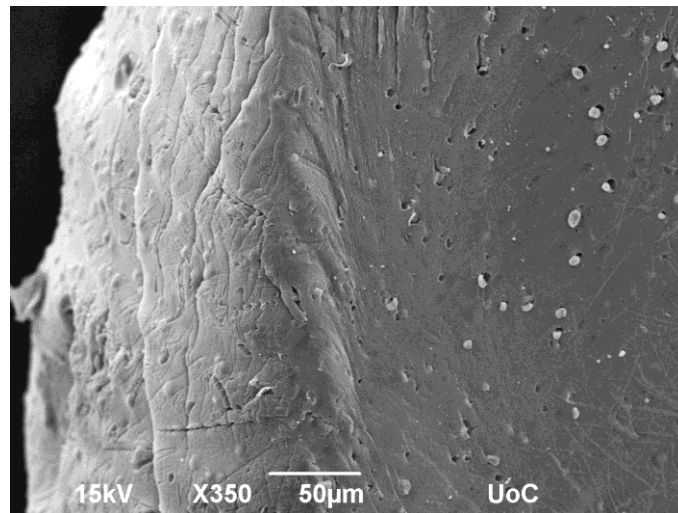


**Εικόνα 62.** Φωτογραφία SEM της επιφάνειας μίας μεμβράνης αλγινικού ασβεστίου, στην οποία παρατηρούνται ακινητοποιημένες θυλακοειδής μεμβράνες

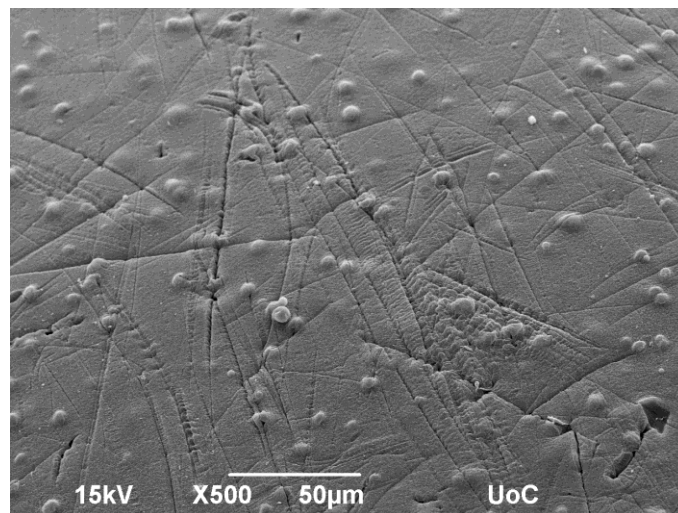


**Εικόνα 63.** Φωτογραφία SEM άλλης όψης της επιφάνειας μίας μεμβράνης αλγινικού ασβεστίου, στην οποία παρατηρούνται ακινητοποιημένες θυλακοειδής μεμβράνες

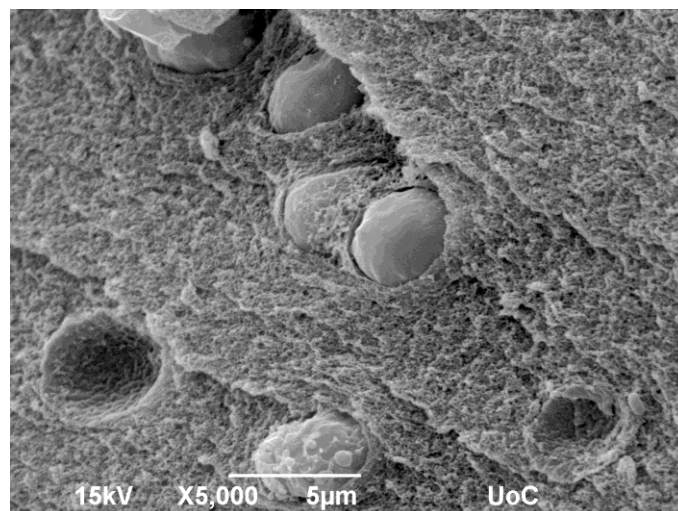




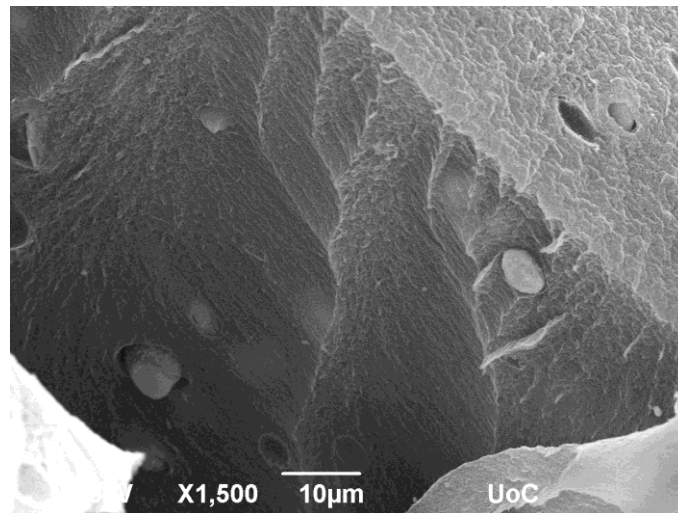
Εικόνα 64. Φωτογραφία SEM της επιφάνειας και του εσωτερικού ενός σφαιριδίου αλγινικού ασβεστίου στην οποία φαίνονται ακινητοποιημένα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii*



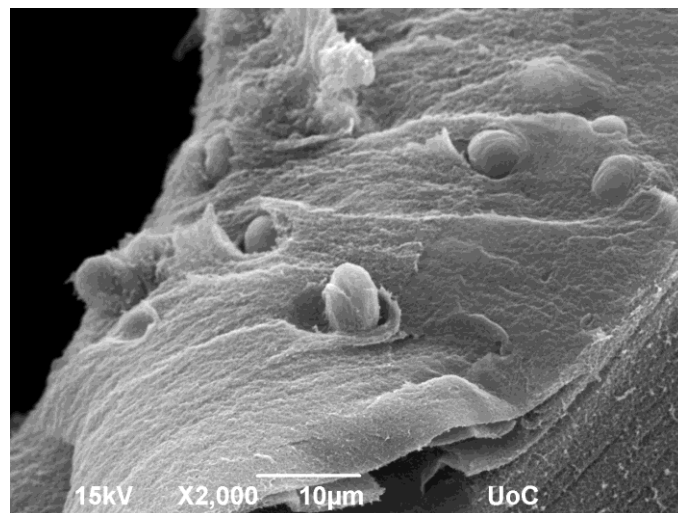
Εικόνα 65. Φωτογραφία SEM της επιφάνειας ενός σφαιριδίου αλγινικού ασβεστίου στην οποία φαίνονται ακινητοποιημένα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii*



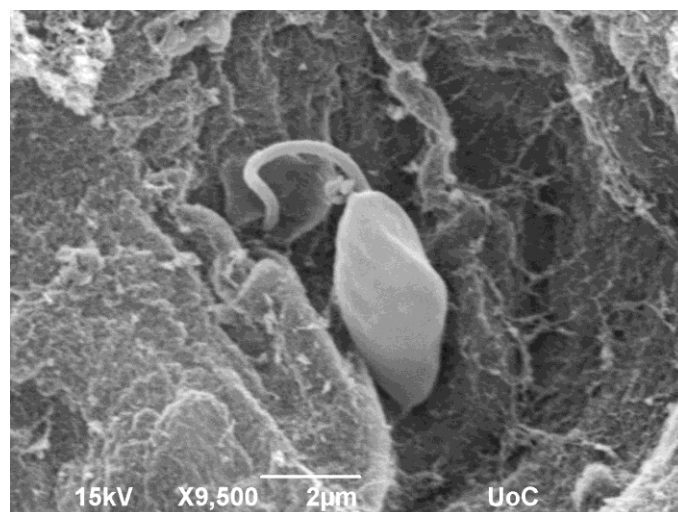
Εικόνα 66. Φωτογραφία SEM του εσωτερικού ενός σφαιριδίου αλγινικού ασβεστίου στην οποία φαίνονται ακινητοποιημένα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii*



Εικόνα 67. Φωτογραφία SEM μιας τομής ενός σφαιριδίου αλγινικού ασβεστίου στην οποία φαίνονται ακινητοποιημένα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* καθώς και θέσεις στις οποίες υπήρχαν κύτταρα και απομακρύνθηκαν με την επεξεργασία.



Εικόνα 68. Φωτογραφία SEM μιας μεμβράνης αλγινικού ασβεστίου στην οποία φαίνονται κινητοποιημένα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii*



Εικόνα 69. Φωτογραφία SEM του εσωτερικού μιας μεμβράνης αλγινικού ασβεστίου στην οποία φαίνεται ακινητοποιημένο ένα κύτταρο *Chlamydomonas reinhardtii*

## [ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΑΠΟ CHLAMYS ]

Από τις φωτογραφίες μπορούμε να αποσπάσουμε πληροφορίες και για το μέγεθος του σκινητοποιημένου υλικού. Στην προκειμένη περίπτωση παρατηρούμε ότι οι θυλακοειδής μεμβράνες από κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* έχουν ένα μέγεθος που κυμαίνεται από 1,05 έως 3,16μm και τα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* έχουν διαστάσεις 2,2x4,4μm.

Με τον τρόπο αυτό η μικροσκοπία σάρωσης και εδώ αποτέλεσε ένδειξη της ακινητοποίησης θυλακοειδών μεμβρανών από κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* καθώς και των ίδιων των κυττάρων τόσο στα σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου όσο και στις μεμβράνες.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η εργασία αυτή πραγματεύεται δυο οργανισμούς, οι οποίοι έχουν αρκετά κοινά χαρακτηριστικά. Ο στόχος μας αρχικά ήταν η απομόνωση φωτοσυνθετικών συμπλόκων από το άλγος *Chlamydomonas reinhardtii*. Για να είναι όμως αξιόπιστα τα αποτελέσματα μας έπρεπε να έχουμε ένα καλό σύστημα αναφοράς. Έτσι ασχοληθήκαμε εκ νέου με το σπανάκι (*Spinacia oleracea*), ένα ανώτερο φυτό το οποίο μέσα από την έρευνα έχει δώσει σημαντικές πληροφορίες στο πεδίο της φωτοσύνθεσης.

Το σπανάκι και το άλγος *Chlamydomonas reinhardtii* είναι δύο πρότυποι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί (Govindjee, Beatty, & Gest, 2005). Η ύπαρξη πολυάριθμων χλωροπλαστών στα φυλλάδια του σπανακιού και ενός χλωροπλάστη ανά κύτταρο *Chlamydomonas reinhardtii* το καθιστά κατάλληλα για την απομόνωση φωτοσυνθετικού υλικού.

Αποφασίσαμε όμως να μην μείνουμε μόνο στην απομόνωση αλλά να βρούμε τις κατάλληλες συνθήκες για την ακινητοποίηση των συμπλόκων αυτών. Με τον τρόπο αυτό η παρούσα εργασία απέκτησε άμεση εφαρμογή και σε άλλα πεδία έρευνας.

Ξεκινώντας λοιπόν, έγινε απομόνωση φωτοσυνθετικού υλικού από το φυτό σπανάκι χρησιμοποιώντας ήδη δημοσιευμένα πρωτόκολλα. Συγκεκριμένα απομονώθηκαν θυλακοειδής μεμβράνες, το φωτοσύστημα II καθώς και ο πυρήνας του και χαρακτηρίστηκαν πλήρως ποσοτικά και ποιοτικά.

Αναλυτικότερα οι χαρακτηριστικές κορυφές στα φάσματα απορρόφησης σε συνδυασμό με την πολυπεπτιδική ανάλυση των δειγμάτων που έγινε μέσω της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου καταδεικνύουν την ομοιότητα των συμπλόκων με εκείνα της βιβλιογραφίας (Ghanotakis, Demetriou, & Yokum, 1987). Από την άλλη πλευρά, ικανοποιητικές τιμές από τις μετρήσεις έκλυσης O<sub>2</sub> και φθορισμού μας υπέδειξαν ότι τα σύμπλοκα που απομονώθηκαν ήταν ενεργά.

Πιο συγκεκριμένα εμφανίστηκαν οι κορυφές στα 440 και 670nm της χλωροφύλλης a και στα 470 και 650nm της χλωροφύλλης b. Επίσης στην πηκτική

## [ΣΥΖΗΤΗΣΗ]

πολυακριλαμιδίου παρατηρήσαμε ζώνες που αντιστοιχούν στις πρωτεΐνες D1, D2 του πυρήνα του φωτοσυστήματος II, τις περιφερειακές 10, 22, 43 και 47 kDa, τις εξωτερικές 17, 23, 33 kDa και την εσωτερική φωτοσυνθετική κεραία που είναι ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών 20-27 kDa.

Επόμενο βήμα ήταν η προσπάθεια απομόνωσης φωτοσυνθετικού υλικού από το άλγος *Chlamydomonas reinhardtii*. Η απόπειρα αυτή υπήρξε ιδιαίτερα δύσκολη και στην πορεία αντιμετωπίσαμε διάφορα προβλήματα. Η δυσκολία αυτή έγκειται στο γεγονός ότι ο οργανισμός αυτός είναι γενικά λιγότερο χαρακτηρισμένος και η μορφολογία του είναι τελείως διαφορετική από εκείνη των ανώτερων φυτών.

Αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολλο απομόνωσης θυλακοειδών μεμβρανών και απομονώθηκαν θυλακοειδής μεμβράνες από τρία στελέχη του άλγους. Και στην περίπτωση αυτή έγινε χρήση φασματοφωτομετρίας και ηλεκτροφόρησης για τον χαρακτηρισμό των δειγμάτων αλλά τα αποτελέσματα δεν συγκρίθηκαν μόνο με αυτά της βιβλιογραφίας αλλά και με τα δεδομένα των πειραμάτων απομόνωσης θυλακοειδών από το σπανάκι. Τέλος διαπιστώθηκε ότι οι απομονωμένες θυλακοειδής μεμβράνες από κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* διατηρούν επαρκώς τη φωτοσυνθετική τους δραστηριότητα.

Στη συνέχεια θελήσαμε να προχωρήσουμε στην ακινητοποίηση των φωτοσυνθετικών συμπλόκων. Επιλέχθηκε η μήτρα αλγινικού ασβεστίου ως υλικό ακινητοποίησης και αυτό λόγω της απουσίας τοξικότητας, της απλής και ήπιας διαδικασίας σχηματισμού της υδρογέλης, καθώς και της βιοσυμβατότητας του υλικού.

Μετά από δοκιμές προσεγγίστηκε η καταλληλότερη τιμή pH που θα χρησιμοποιούνταν στις διεργασίες. Επίσης καταλήξαμε στα κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα που θα εξυπηρετούσαν όχι μόνο τις ανάγκες των διαδικασιών της ακινητοποίησης, αλλά και της αποθήκευσης των δειγμάτων, ούτως ώστε αυτά παραμένουν φωτοσυνθετικά ενεργά.

Πραγματοποιήθηκε λοιπόν ακινητοποίηση όλων των απομονωμένων συμπλόκων και διασταυρώθηκε η επιτυχία της μεθόδου φασματοφωτομετρικά σε όλες τις περιπτώσεις και με μικροσκοπία σάρωσης σε τρεις εκ των πέντε. Επίσης ελέγχθηκε η φωτοσυνθετική τους δραστηριότητα και όσον αφορά την έκλυση O<sub>2</sub>

## [ΣΥΖΗΤΗΣΗ]

αλλά και τον φθορισμό της χλωροφύλλης. Επιλεκτικά στην περίπτωση των θυλακοειδών μεμβρανών από σπανάκι μελετήθηκε η διατήρηση της δραστηριότητας αυτής και στην πάροδο του χρόνου, όπου παρατηρήθηκε ότι οι ακινητοποιημένες θυλακοειδής μεμβράνες διατηρούν ικανοποιητικά επίπεδα ενεργότητας μετά την πάροδο ενός μήνα αποθήκευσης τους σε διάλυμα Mes 20 mM σε θερμοκρασία 7°C.

Έτσι από τη φασματοφωτομετρία διαπιστώθηκε ότι τα φάσματα απορρόφησης των ελεύθερων και των ακινητοποιημένων συμπλόκων ήταν πανομοιότυπα, γεγονός που μαρτυρεί ότι τα σύμπλοκα εισχώρησαν στο δίκτυο του αλγινικού ασβεστίου. Αυτό επιβεβαιώθηκε και από τη μικροσκοπία σάρωσης όπου πήραμε πληροφορίες για τις θυλακοειδής μεμβράνες και τα κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* αλλά και για τη γενική μορφολογία του υλικού μας.

Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι οι θυλακοειδής μεμβράνες από σπανάκι είχαν σχήμα κατά βάση τετράγωνο και οι πλευρές τους κυμαίνονταν από 1,67-5,55μm ελαφρώς μεγαλύτερες από αυτές που απομονώθηκαν από κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* που είχαν πλευρές περίπου στα 1,05-3,16μm. Από την άλλη πλευρά ένα κύτταρο *Chlamydomonas reinhardtii* είχε διαστάσεις περίπου 2,2x4,4μm<sup>2</sup>.

Εν κατακλείδι, η εργασία αυτή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως απαρχή για μελλοντική έρευνα πάνω στην απομόνωση και την ακινητοποίηση μικρότερων συμπλόκων από το άλγος *Chlamydomonas reinhardtii*. Στα μελλοντικά σχέδια της ομάδας μας είναι η απομόνωση του πυρήνα του φωτοσυστήματος II και του κέντρου αντίδρασης του από θυλακοειδής μεμβράνες των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii*.

Η ακινητοποίηση φωτοσυνθετικού υλικού σε ενεργή μορφή θα μπορούσε να βρεί άμεση εφαρμογή στη δημιουργία βιοαισθητήρων. Η χρήση φυτικών ιστών και φωτοσυνθετικών υλικών για την κατασκευή ενός βιοαισθητήρα είναι ενδιαφέρουσα όχι μόνο όσον αφορά την ανάπτυξη νέων βιοαναλυτικών συσκευών αλλά και για τη χρήση τους ως εργαλεία τα οποία θα παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη βιοχημεία και τη φυσιολογία των φυτών και για μια καλύτερη κατανόηση ενζυματικών και φωτοσυνθετικών διεργασιών (Campas, Carpentier, & Rouillon, 2008).



## [ΣΥΖΗΤΗΣΗ]

Επίσης, ένα άλλο πεδίο στο οποίο σκοπεύουμε να εστιάσουμε την έρευνα μας είναι η φωτοσυνθετική παραγωγή υδρογόνου, θέμα που χαρακτηρίζεται ως ιδιαίτερα ενδιαφέρον αφού συνδέεται άμεσα με ανανεώσιμες πηγές ενέργειας.

Έχει αναφερθεί ότι η φωτοσύνθεση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ο βασικός άξονας για την παραγωγή υδρογόνου (Esper, Badura, & Rögnér) καθώς ακινητοποιημένες, στερημένες σε θείο καλλιέργειες φυκών μπορούν να φωτοπαράγουν  $H_2$  (Laurinavichene, Fedorov, Ghirardi, Seibert, & Tsygankov, 2006). Συγκεκριμένα ακινητοποιημένες καλλιέργειες *Chlamydomonas reinhardtii* είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν για μεγάλου διαστήματος παραγωγή υδρογόνου (Melis & Melnicki, 2006).

Τέλος, θα θέλαμε να προχωρήσουμε την ακινητοποίηση των κυττάρων *Chlamydomonas reinhardtii* που παρουσιάστηκε σε αυτή την εργασία ένα βήμα παρακάτω και να βελτιώσουμε τις συνθήκες ακινητοποίησης ούτως ώστε τα κύτταρα να ολοκληρώνουν έναν κύκλο ζωής φυσιολογικά και γιατί όχι να παράγουν υδρογόνο όντας ακινητοποιημένα.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Anderson, J. (1986). Photoregulation of the composition, function and structure of the thylakoid membranes. *Annu Rev Plant Physiol* , 37, 93-136.

Andresen, I., Skipnes, O., Smidsrod, O., Ostgaard, K., & Hemmer, P. (1977). Some biological functions of matrix components in benthic algae in relation to their chemistry and the composition of seawater. *ACS Symp. Ser* , 48, 361-381.

Arnon, D. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase in beta vulgaris. *Plant Physiology* , 1-15.

Badwan, A., Abumaloo, A., Sallam, E., Abukalaf, A., & Jawan, O. (1985). A sustained release drug delivery system using calcium alginate beads. *Drug Dev. Ind. Pharm* , 11, 239–256.

Barber, J., Chapman, D., & Tefler, A. (1987). Characterisation of a photosystem II reaction centre isolated from chloroplasts of *Pisum sativum*. *FEBS* (220), 67-73.

Bardeletti. (1991).

Berthold, D., Babcock, G., & Yocum, C. (1981). A highly resolved oxygen evolving PS II preparation from spinach thylakoid membranes. EPR and electron transport properties. *FEBS Letters* , 134, 231–234.

Bodmeier, R., & Wang, J. (1993). Microencapsulation of drugs with aqueous colloidal polymer dispersions. *Journal of pharmaceutical sciences* , 82, 191-194.

Black, C., & Mayne, B. (1970). P700 Activity and chlorophyll content of plants with different photosynthetic carbon dioxide fixation cycles. *Plant Physiol* , 45, 738-741.

Bricker, T., & Ghanotakis, D. (1997). Introduction to Oxygen Evolution and the Oxygen-Evolving Complex. In *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (pp. 113-136). The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Campas, M., Carpentier, R., & Rouillon, R. (2008). Plant tissue and photosynthesis based biosensors. *Biotechnology Advances* , 26, 370-378.

Chang, H., Park, H., Kelly, P., & Robinson, J. (1985). Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery. II. Synthesis and evaluation of some swelling, water-insoluble bioadhesive polymers. *J.Pharm.Sci.* , 74, 399-405.

Chapman, V., & Chapman, D. (1980). In *Seaweeds and their Uses*. New York: Chapman and Hall.

## [ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ]

- Chen, Wu, Mi, Lin, Yu, & Sung. (2004). A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. *Journal of Controlled Release* , 96, 285-300.
- Chickering, D., & Mathiowitz, E. (1995). A Novel electrobalance-based method to study adhesive interactions between individual microspheres and intestinal mucosa. *J. Controlled Release* , 34, 251-261.
- Debus, R. (1992). The Manganese and Calcium ions of Photosynthetic Oxygen Evolution. *Biochim Biophys Acta* , 1102, 269-352.
- Delfine, S., Alvino, A., Villiani, M., & Loreta, F. (1999). Restrictions to carbon dioxide conductance and photosynthesis in spinach leaves recovering from salt stress. *. Plant Physiol* , 119, 1101-1106.
- Ertesvåg, H., & Valla, S. (1998). Biosynthesis and application of alginates. *Polymer Degradation and Stability* , 59, 85–91.
- Esper, B., Badura, A., & Rogner, M. Photosynthesis as a power supply for (bio-)hydrogen production. *Trends in Plant Science* , 11 (11), 543-549.
- Gacesa, P. (1988). Alginates. *Carbohydr. Polym.* , 8, 161-182.
- Ghanotakis, D. F., Demetriou, D. M., & Yokum, C. F. (1987). *Biochim. Biophys. Acta* , 891, 15-21.
- Ghanotakis, D., & Yokum, C. (1990). Photosystem II and the oxygen evolving complex. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* , 41, 255-276.
- Gombotz, W., & Wee, S. (1998). Protein release from alginate matrices. *Adv. Drug Deliv. Rev* , 31, 267-285.
- Goodenough, U. W., Armbrust, E. V., Campbell, A. M., & Feris, P. J. (1995). Molecular genetics of sexuality in Chlamydomonas. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* , 46, 21-44.
- Gorman, D., & Levine, R. (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of Chlamydomonas reinhardtii. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 54, 1665–1669.
- Govindjee, Beatty, & Gest. (2005). *Discoveries in photosynthesis*. Springer.
- Gross, J. (1991). *Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids*. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Hardt, H., & Bessel, K. (1978). Comparison of Photosynthetic Activities of Spinach Chloroplasts with Those of Corn Mesophyll and Corn Bundle Sheath Tissue. *Plant Physiol* , 62, 59-63.

## [ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ]

Hari, P., Chandy, T., & Sharma, C. (1996). Chitosan/calcium alginate microcapsules for intestinal delivery of nitrofurantoin. *Journal of microencapsulation* , 59, 1795-1801.

Harris, E. (2009). In *The Chlamydomonas*. Elsevier.

Haug, A., & Larsen, B. (1962). Quantitative Determination of the Uronic Acid Composition of Alginates. *Acta Chem Scand* , 16, 1908-1918.

Haug, A., Larsen, O., & Smidsrod, O. (1967). Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid. *21*, 691-704.

Huguet, M., Groillot, A., Neufeld, R., Poncelet, D., & Dellacherie, E. (1994). Hemoglobin encapsulation in chitosan/calcium alginate beads. *J. Appl. Polym. Sci.* , 51, 1427-1432.

Kathiresan, K., & Kannan, L. (1985). Photosynthetic productivity in species of Rhizophora. In *The Mangroves* (pp. 262-265). India.

Kim, C., & Lee, E. (1992). The controlled release of blue dextran from alginate beads. *Int.J.Pharm.* , 79, 11-19.

Kwok, K., Groves, M., & Burgess, D. (1989). Sterile microencapsulation of BCG in alginate-poly-L -lysine by an air spraying technique. *Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.* , 16, 170.

Kwok, K., Groves, M., & Burgess, D. (1991). Production of 5-15 microns diameter alginate-polylysine microcapsules by an air-atomization technique. *Pharm Res* , 8, 341-344.

Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* , 227, 680-685.

Lalonde, J., & Margolin, A. (2002). Immobilization of Enzymes. In K. Drauz, & H. Waldmann (Eds.), *Enzyme Catalysis in Organic Chemistry* (2nd ed., pp. 163-184). Weinheim: Wiley-VCH.

Laurinavichene, T. V., Fedorov, A. S., Ghirardi, M. L., Seibert, M., & Tsygankov, A. A. (2006). Demonstration of sustained hydrogen photoproduction by immobilized, sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *International Journal of Hydrogen Energy* , 31, 659-667.

Liu, P., & Krishnan, T. (1999). Alginate-pectin-poly-L -lysine particulate as a potential

Martinsen, A., Skjak-Braek, G., Smidsrod, O., Zanetti, F., & Paoletti, S. (1991). Comparison of different methods for determination of molecular-weight and molecular-weight distribution of alginates. *Carbohydr. Polym.* , 15, 171-193.

## [ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ]

Mathis, P., & Rutherford, A. (1987). Photosynthesis. In *New Comprehensive Biochemistry* (p. 63). Amsterdam: Elsevier.

Meera, G., & Emilia, A. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review. *Journal of Controlled Release* , 114, 1-14.

Melis, A., & Melnicki, M. (2006). Integrated biological hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy* , 31, 1563-1573.

Mendiola-Morgenthaler, L., & Eichenberger, W. (1985). Isolation of chloroplast envelopes from *Chlamydomonas*. Lipid and polypeptide composition. *Plant Science* (41), 97-104.

Mi, Sung, & Shyu. (2002). Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent. *Carbohydrates Polymers* , 48, 61-72.

Mikkelsen, A., & Elgsaeter, A. (1995). Density distribution of calcium-induced alginate gels. A numerical study. *Biopolymers* , 36, 17-41.

Namba, O., & Satoh, K. (1987). Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome b-559. *PNAS* (84), 109-112.

Porra, R., Thompson, W., & Kriedemann, P. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophyll a and b extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* , 975, 384–394.

Ramandas, M., Paul, W., Dileep, K., Anitha, Y., & Sharma, C. (2000). Lipoinulin encapsulated alginate-chitosan capsules: intestinal delivery in diabetic rats. *Journal of Microencapsulation* , 17, 405-411.

Rees, D. (1981). Polysaccharide Shapes and Their Interactions -Some Recent Advances. *Pure Appl Chem* , 53, 1-14.

Rees, D., & Welsh, E. (1977). Secondary and Tertiary Structure of Polysaccharides in Solutions and Gels. *Angewandte Chemie International Edition in English* , 16, 214-224.

Rochaix, J., Goldschmidt-Clermont, A., & Merchant, S. (1998). The molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in *Chlamydomonas*. In *Advances in Photosynthesis* (p. 7). Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Schnurch, A., Kast, C., & Richter, M. (2001). Improvement in the mucoadhesive properties of alginate by the covalent attachment of cysteine. *J Control Rel* , 71, 277-285.

## [ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ]

- Sezer, A., & Akbuga, J. (1999). Release characteristics of chitosan treated alginate beads: I. Sustained release of a macromolecular drug from chitosan treated alginate beads. *Journal of microencapsulation* , 16, 195-203.
- Smidsrod, O. (1974). Smidsrød, Molecular basis for some physical properties of alginate in the gel state. *Faraday Discussions Chem. Soc* , 57, 263–274.
- Smidsrød, O., Glover, R., & Whittington, S. (1973). The relative extension of alginates having different chemical composition. *Carbohydr.Res.* , 26, 107-118.
- Smidsrod, O., Haug, A., & Lian, B. (1972). Properties of poly(1,4-hexuronates) in the gel state. I. Evaluation of a method for the determination of stiffness. *Acta chem. Scand* , 26, 71–78.
- Stokke, B., Draget, K., Smidsrød, O., Yuguchi, Y., Urakana, H., & Kajiwara, K. (2000). Small-Angle X-ray Scattering and Rheological Characterization of Alginate Gels. 1. Ca–Alginate Gels. *Macromolecules* , 33, 1853-1863.
- Sugawara, S., Imai, T., & Otagiri, T. (1994). The controlled release of prednisolone using alginate gel. *Pharmaceutical research* , 11, 272-277.
- Sutherland, I. (1991). Novel Materials from Biological Sources. In *Biomaterials* (pp. 309-331). New York: Stockton.
- Thu, B., Gaserod, O., Paus, D., Mikkelsen, A., Skjak-Braek, G., Toffanin, R., et al. (2000). Inhomogeneous alginate gel spheres: an assessment of the polymer gradient by synchrotron radiation-induced x-ray emission, magnetic resonance microimaging and mathematical modelling. *Biopolymers* , 53, 60-71.
- Torre, M., Giunchedi, P., Maggi, L., Stefli, R., Ochoa, E., Machiste, E., et al. (1998). Formulation and Characterization of Calcium Alginate Beads Containing Ampicillin. *Pharm. Technol.* , 3, 193-198.
- Vandenberg, G., & Noue, J. (2001). Evaluation of protein release from chitosan-alginate microcapsules produced using external or internal gelation. *Journal of Microencapsulation* , 18, 433-441.
- Vilchez, C., Garbayo, I., Markvicheva, E., Galván, F., & Leon, R. (2001). Studies on the suitability of alginate-entrapped *Chlamydomonas reinhardtii* cells for sustaining nitrate consumption processes. *Biores. Technol.* , 78, 55–61.
- Wellburn. (1982). Bioenergetic and Ultrastructural Changes Associated with Chloroplast Development. *International Review of Cytology* , 80, 133-191.
- Wheatley, M., Chang, M., Park, E., & Langer, R. (1991). Coated Alginate Microspheres: Factors Influencing the Controlled Delivery of Macromolecules. *J. Appl. Poly. Sci.* , 43, 1555-1563.

## **[ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ]**

Yotsuyanagi, T., Ohkubo, T., Ohhashi, T., & Ikeda, K. (1987). Acid-induced and calcium-induced gelation of alginic acid: Bead formation and pH-dependent swelling. *Chem. Pharm. Bull.* , 35, 1555-1563.