ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΧΤΗΡΙΣΜΟΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΑΠΟ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

ΚΟΚΑΡΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΑΝΩΤΑΚΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2018

UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

GENERAL POSTGRADUATE PROGRAMME

LABORATORY OF BIOCHEMISTRY

MASTER THESIS

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF NATURAL PRODUCTS FROM PHOTOSYNTHETIC MICROORGANISMS

KOKARAKHS EMMANOUEL

MASTER THESIS SUPERVISOR: GHANOTAKIS DIMITRIS

HERAKLION 2018

Στην οικογένειά μου και στους ανθρώπους που μου στάθηκαν δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια…

Εξεταστική Επιτροπή (αλφαβητικά)

Δημήτριος Γανωτάκης
Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης (Επιβλέπων)

Ιωάννης Παυλίδης
Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Γεώργιος Τσιώτης
Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης και για του υψηλού επιπέδου σπουδές που μου προσέφερε σε προπτυχιακό αλλά και μεταπτυχιακό επίπεδο, αλλά και για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε για να μπορέσω να ολοκληρώσω την μεταπτυχιακή μου εργασία.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον επιβλέποντα Καθηγητή μου Δημήτριο Γανωτάκη ο οποίος με εμπιστεύτηκε και μου επέτρεψε να εργαστώ στο εργαστήριο του. Η εμπειρία του στο πεδίο των φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών και η βοήθεια η οποία προσέφερε ήταν καθοριστική για την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω γιατί ήταν πέρα από επιστήμονας μου συμπαραστάθηκε και ως άνθρωπος στα εύκολα αλλά και δύσκολα. Θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω για τον χρόνο που μου διέθεσε από το πρώτο κιόλας έτος των προπτυχιακών σπουδών μου καθώς ήταν από τους πρώτους καθηγητές που μίλησα και είναι ένας από τους κύριους λόγους που αγάπησα την Βιοχημεία...

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής μου Επιτροπής, Καθηγητές Γεώργιο Τσιώτη και Ιωάννη Παυλίδη που δέχτηκαν να διαβάσουν και να κρίνουν την παρούσα διατριβή. Οι παρατηρήσεις του και οι διορθώσεις που πρότειναν βοήθησαν σε σημαντικό βαθμό την τελική μορφή του κειμένου . Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον Καθηγητή Γεώργιο Τσιώτη γιατί τις πολύτιμες συμβουλές του αλλά και για την βοήθεια που παρείχε για τον χαρακτηρισμό του μικροοργανισμού. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Αναστάσιο Μελή ο οποίος μου εμπιστεύτηκε και μου παρέδωσε τον μικροοργανισμό *Botryococcus braunii* . Επιπλέον κομβική ήταν η βοήθεια που μας έδωσε όσο αφορά το χαρακτηρισμό του μικροοργανισμού από τον ποταμό Γιόφυρο.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου αυτά τα χρόνια που περάσαμε άπειρες ώρες μαζί . Η συνεργασία και το καλό κλίμα λειτούργησαν καταλυτικά για την ολοκλήρωση της διατριβής αλλά και τις ωραίες στιγμές που περάσαμε. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διδάκτωρ Θεοχάρη Νάζο οποίος ήταν δίπλα μου από τα πρώτα βήματα στο εργαστήριο. Οι συμβουλές του, η βοήθειά του και η φιλία και η θέληση να βοηθήσει λειτούργησαν σαν καλός μέντορας και έμαθα πολλά πράγματα δίπλα του, καθώς τολμώ να πω πώς απέκτησα μια καλή φιλία. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Υποψήφια Διδάκτωρ Ελευθερία Βαλσαμή για την άψογη συνεργασία τις ανταλλαγές γνώσεων και απόψεων και για την βοήθεια που μου πρόσφερε παρόλη την πίεση την οποία βρισκόταν . Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να δώσω για τον Υποψήφιο Διδάκτωρ Γεώργιο Σφενδουράκη για την υποστήριξή του, την φιλία του αλλά και για την βοήθεια που μου παρείχε εσωτερικά και

εξωτερικά του εργαστηρίου στα εύκολα αλλά και στα δύσκολα. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Δημήτριο Στεφανάκη ο οποίος με βοήθησε να προσαρμοστώ στο εργαστήριο. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς που είχα την τύχη και την ευχαρίστηση να συνευρεθώ και να συνεργαστώ αυτα τα χρόνια. Ναπολέοντα Στρατηγάκη, Ελένη Πολωνιατάκη, Μιχάλη Σαρουκιάδη, Σιμόδωρο Μαστρόκαλο Άλκιστη Σκλαβούνου και την Δώρα Σταυρινού. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον μεταπτυχιακό φοιτητή Ναπολέων Στρατηγάκη καθώς περάσαμε αρκετά βράδια και ξενύχτια όλο αυτό διάστημα. Η βοήθεια και η φιλία του ήταν ένας πολύ σημαντικός καταλυτικός παράγοντας και αισθάνομαι τυχερός και χαίρομαι που ήταν δίπλα μου αυτά τα χρόνια. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου του κυρίου Τσιώτη και κυρίου Παυλίδη για τη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που επικρατούσε στον τομέα αυτά τα χρόνια.

Ιδιαίτερη ευχαριστία θα ήθελα να αποδώσω θα ήθελα να αποδώσω στο Καθηγητή Απόστολο Σπύρο για την πολύτιμη βοήθεια και τον προσωπικό χρόνο που αφιέρωσε για την διεξαγωγή των πειραμάτων φασματοσκοπίας NMR . Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω το εργαστήριο του Καθηγητή Σπύρο Περγαντή και ιδιαιτέρως τον μεταπτυχιακό φοιτητή Λεωνίδα Μαυρουδάκη για την πολύτιμη βοήθεια του χρόνο που αφιέρωσε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων φασματομετρίας μάζας καθώς και για τη βοήθεια που προσέφερε στη συλλογή των δεδομένων και επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αποστολάκη Μαρία για την υπομονή και την εκμάθηση που μου προσέφερε στο GC-MS η βοήθειά της ήταν πολύτιμη και την ευχαριστώ πολύ. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του εργαστηρίου μικροσκοπίας Στέφανο Παπαδάκη και Σεβαστή Παπαδογιωργάκη για τη διάθεσή τους στην εκμάθηση της τεχνικής προετοιμασίας δειγμάτων καθώς και για τη λήψη φωτογραφιών με ηλεκτρονική μικροσκοπία. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου στο Ηράκλειο και στην Αθήνα που με στήριξαν όλα αυτά τα χρόνια στις εύκολες και στις δύσκολες στιγμές

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να αποδώσω την οικογένειά μου και ιδιαίτερα τους γονείς μου Ιωάννη Κοκαράκη και Μαρία Θεοδωράκη. Θα ήθελα να τους ευχαριστήσω για την υποστήριξη που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια καθώς ήταν οι πρώτοι που στάθηκαν δίπλα μου και με τις θυσίες τους και συνεχίζουν να με βοηθούν να κυνηγάω τα όνειρά μου και να ολοκληρώνω τους στόχους μου. Τους ευχαριστώ πάρα πολύ γιατί ήταν σωστά πρότυπα και μου έδωσαν τις καλύτερες αρχές για να είμαι καλύτερος άνθρωπος.

ΚΟΚΑΡΑΚΗΣ ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Ημερομηνία γέννησης:	14/3/1994
Διεύθυνση:	Ηράκλειο Κρήτης (Ελλάδα) 71304
Τηλέφωνο:	(+30) 697 591 7904,(+30) 694 376 7081
Διεύθυνση ηλεκτρονικού ταχυδρομείου:	kokomanoschem@gmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

10/2016-12/2018 **Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στη Βιοχημεία**

Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο (Ελλάδα)

Τίτλος Διατριβής: Απομόνωση και χαρακτηρισμός φυσικών προϊόντων από φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς. (Επιβλέπων: Δημήτριος Γανωτάκης)

09/2012–08/2016: **Πτυχίο Χημείας**

Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ηράκλειο (Ελλάδα)

Βαθμός: Λίαν Καλώς (8,11/10)

Διπλωματική Εργασία: Βιοαποικοδόμηση της φαινόλης από το μικροφύκος *Chlamydomonas reinhardtii* κάτω υπό συνθήκες που επηρεάζουν τη φωτοσύνθεση.

(Επιβλέπων: Δημήτριος Γανωτάκης)

ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Μητρική γλώσσα: Ελληνικά

Αγγλικά: Certificate of Proficiency in English, University of Michigan (B2 Level)

Οργανωτικές δεξιότητες: Εθελοντής στο συνέδριο του 18ου Συνεδρίου Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας, Ηράκλειο Κρήτης, 26-28 Μαρτίου 2016

Τεχνικές δεξιότητες: Καλλιέργειες βακτηρίων, μυκήτων, καρκινικών κυττάρων, χλωροφυκών και κυανοβακτηρίων, φυγοκέντρηση, φθορισμομετρία, φωτομετρία UV-Vis, τεχνικές χρωματογραφίας (HPLC, GC-MS), πολαρογραφία, τεχνικές ηλεκτροφόρησης, φασματοσκοπία FT-IR, απομόνωση φυσικών προϊόντων από φυτικούς οργανισμούς, προσδιορισμός αντιμικροβιακών, αντιοξειδωτικών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων.

Ψηφιακή δεξιότητα: Βεβαίωση επαρκούς γνώσης πληροφορικής και χειρισμού Η/Υ, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Δημοσιεύσεις: Nazos**, T. T.**, **Kokarakis, E**. J. & Ghanotakis, D. F. 2017. Metabolism of xenobiotics by *Chlamydomonas reinhardtii*: Phenol degradation under conditions affecting photosynthesis. *Photosynth Res*, 131, 31-40. DOI:10.1007/s11120-016-0294-2

Συνέδρια: **7th European Bioremediation (EBC-VII) and 11th International Society of Environmental Biotechnology (ISEB 2018) Joint Conference**, Chania, Crete, Greece, June 25-28, 2018. *"Bioenergetics as a tool to monitor environment restoration- Phenol biodegradation by photosynthetic microalgae"* T. Nazos, E. Kokarakis, E. Poloniataki, G.T. Mastrokalos, M. Papavasileiou and D. Ghanotakis

19th Postgraduates' Conference on Chemistry, Heraklion, Crete, Greece, May 2-4, 2017. *"Biodegradation of phenolic compounds by photosynthetic microalgae- From bioenergetics to environment restoration'* T. Nazos, E. Kokarakis, E. Poloniataki, G.T. Mastrokallos and D. Ghanotakis

18ο Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας. Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα, 26-28 Μαρτίου 2016. *«Βιοενεργητική προσέγγιση για την αποικοδόμηση της φαινόλης από το μικροφύκος Chlamydomonas reinhardtii»*. Θεοχάρης Νάζος, Μανώλης Κοκαράκης και Δημήτριος Γανωτάκης

CURRICULUM VITAE
KOKARAKHS EMMANOUEL

PERSONAL INFORMATION

Date of birth:	14/3/1994
Address:	Heraklion, Crete, Greece, 71304
Phone number:	(+30) 6975917901,(+30) 6943767081
E-mail:	kokomanoschem@gmail.com

EDUCATION AND TRAINING

10/2016-12/2018: **Master of Sciences (MSc) in Biochemistry**

Department of Chemistry, School of Sciences and Engineering, University of Crete, Heraklion (Greece)

09/2012–08/2016: **Degree in Chemistry**

Department of Chemistry, School of Sciences and Engineering, University of Crete, Heraklion (Greece)

Grade: 8.11/10

Bachelor Thesis: Biodegradation of phenol from a photosynthetic microalgae *Chlamydomonas reinhardtii.* (Thesis Supervisor: Professor Demetrios Ghanotakis)

PERSONAL SKILLS

Mother Tongue:	Greek
English:	Certificate of Proficiency in English, University of Michigan (B2 Level)
Organisational / managerial skills:	Volunteer at the 18nth Conference of post graduates students of Chemistry Heraklio, Crete 26-28 March 2016
Job-related skills:	Culture methods for bacteria, fungi, tumor cells, microalgae and cyanobacteria, centrifugation, UV-Vis and fluorescence spectroscopy, chromatographic techniques (HPLC, GC),IR spectroscopy polarography, electrophoresis, immobilization techniques, isolation and characterization of natural products from plants, antimicrobial and antioxidant properties of natural products.
Digital competence:	Certification of competency in computer use, Department of Chemistry, University of Crete

ADDITIONAL INFORMATION

Publications: Nazos, T. T., **Kokarakis, E. J**. & Ghanotakis, D. F. 2017. Metabolism of xenobiotics by *Chlamydomonas reinhardtii*: Phenol degradation under conditions affecting photosynthesis. *Photosynth Res*, 131, 31-40. DOI:10.1007/s11120-016-0294-2

Conferences: **7th European Bioremediation (EBC-VII) and 11th International Society of Environmental Biotechnology (ISEB 2018) Joint Conference**, Chania, Crete, Greece, June 25-28, 2018. *"Bioenergetics as a tool to monitor environment restoration- Phenol biodegradation by photosynthetic microalgae"*. T. Nazos, E. Kokarakis, E. Poloniataki, G.T. Mastrokalos, M. Papavasileiou and D. Ghanotakis

19th Postgraduates' Conference on Chemistry, Heraklion, Crete, Greece, May 2-4, 2017. *"Biodegradation of phenolic compounds by photosynthetic microalgae- From bioenergetics to environment restoration"*. T. Nazos, E. Kokarakis, E. Poloniataki, G.T. Mastrokallos and D. Ghanotakis

18° Postgraduates' Conference on Chemistry . Heraklion, Crete, Greece, March 26-28, 2016. *"Bioenergetic approach for the biodegradation of phenol by the green microalgae Chlamydomonas reinhardtii"*. T. Nazos**,** E. Kokarakis and D. Ghanotakis.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η απομόνωση φυσικών ουσιών που παράγουν φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί. Πιο συγκεκριμένα τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ένας μικροοργανισμός που απομονώθηκε από τον ποταμό Γιόφυρο, ένα κυανοβακτήριο που ανήκει στο γένος των *Anabaena* αλλά και το μικροφύκος *Botryococcus braunii.*

Από τα αποτελεσμάτα των εργαστηριακών μελετών έγινε κατανοητό ότι το μικροφύκος που απομονώθηκε από τον ποταμό Γιόφυρο είναι ευκαριωτικός μικροοργανισμός. Από τον τρόπο διαίρεσης, τα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά συμπεραίνεται ότι αυτό το μικροφύκος ανήκει στο γένος *Chlorella*. Παράλληλα το συμπέρασμα αυτό ενισχύεται απο το γεγονός ότι η μήτρα που παράγει περιέχει γλυκοζαμίνη. Η γλυκοζαμίνη είναι ένας υδατάνθρακας που συναντάται συχνά στο κυτταρικό τοίχωμα του γένους της *Chlorella*. Επιπλέον μέσω των τεχνικών ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM) και ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) διαπιστώθηκε ότι η μήτρα που παράγει ο μικροοργανισμός τον χρησιμοποιεί ως ένα προστατευτικό μανδύα για την διαίρεσή του. Έπειτα από απομόνωση της μήτρας που μακροσκοπικά φαίνεται ως ένα λευκό στερεό πραγματοποιήθηκε η ανάλυσή της. Επιπλέον με περαιτέρω ανάλυση μέσω των τεχνικών πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR) και φασματομετρία μάζας ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS) βρέθηκε ότι η μήτρα αυτή αποτελείται από τέσσερεις τουλάχιστον υδατάνθρακες και πιο συγκεκριμένα την γλυκοζαμίνη, την αραβινόζη, την γαλακτόζη και την ραμνόζη.

Στο δεύτερο μέρος της εργασίας μελετήθηκε η ανάπτυξη του μικροοργανισμού *Botryococcus braunii* και η απομόνωση ενός τριτερπενίου από ένα κυανοβακτήριο. Το μικροφύκος αυτό είναι γνωστό ότι παράγει υψηλές ποσότητες λιπιδίων παρόλα αυτά όμως διαπιστώθηκε ότι η αργή ανάπτυξή του δεν το καθιστά βασικό υποψήφιο για την βιομηχανική εκμετάλευσή του. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε ένα κυανοβακτήριο που αναπτύσσεται πολύ πιο γρήγορα από αυτό το μικροφύκος και κατέστη δυνατός ο χαρακτηρισμός και η απομόνωση ενός τριτερπενίου. Το τριτερπένιο που απομονώθηκε

από αυτό το κυανοβακτήριο ήταν το σκουαλένιο και ταυτοποιήθηκε με αέρια χρωματογραφία συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (GC-MS).

Λέξεις κλειδιά: Φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί, ευκαριωτικός, μικροφύκη, *Chlorella*, *Anabaena*, EPS, υδατάνθρακες, *Botryococcus braunii,* μήτρα, σκουαλένιο, Γιόφυρος, GC-MS,, TEM, SEM, NMR

ABSTRACT

In the present study, the isolation of natural substances producing photosynthetic microorganisms has been studied. In particular, the strains used were a microorganism isolated from the Yofyros River, a cyanobacterium which belongs to the genus *Anabaena* and the microalgae *Botryococcus braunii*.

It was understood from the results of the laboratory studies that the microalgae isolated from the Yofyros River is a eukaryotic microorganism. We have concluded from its way of division, morphological and biochemical characteristics that this microalgae belongs to the genus *Chlorella*. This conclusion is also reinforced by the fact that the matrix it produces, contains glucosamine. Glucosamine is a carbohydrate commonly found in the cell wall of the genus *Chlorella*. In addition, through the transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) techniques it was found that the matrix produced by the microorganism uses it as a protective mantle to separate it. The matrix of the microorganism appears macroscopically as a white solid. Isolation of the matrix and analysis was performed. Further analysis by nuclear magnetic resonance (NMR) and electrospray ionization coupled with mass spectrometry (ESI-MS) showed that this matrix consists of at least four carbohydrates, namely glucosamine, arabinose, galactose and rhamnose.

In the second part of the thesis, we studied the development of the B*otryococcus braunii* microorganism and the isolation of a triterpene from a cyanobacterium. This microalgae is known to produce high amounts of lipids, but it has been found that its slow growth does not make it a key candidate for industrial exploitation. For this reason, a cyanobacterium growing much faster than this microalgae was used and it was possible to characterize and isolate a triterpene. The triterpene isolated from this cyanobacterium was squalene and was identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS).

Keywords: Photosynthetic microorganisms, eukaryotic, microalgae, *Chlorella, Anabaena*, EPS, carbohydrates, *Botryococcus braunii*, matrix, squalene, Yofyros, GC-MS, TEM, SEM, NMR

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ 30

1.1 Φωτοσύνθεση 32

1.1.1 Καροτένια και ξανθοφύλλες 33

1.2 Μικροφύκη 35

1.2.1. Botryococcus braunii 36

1.2.2. Chlorella species και χαρακτηριστικά 38

1.3 Κυανοβακτήρια 40

1.4 *Anabaena* 41

1.5 Εμπορική παραγωγή φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών 42

1.6 Σκουαλένιο 44

1.7 Πολυσακχαρίτες 46

1.8 Έξωπολυσακχαρίτες 48

1.9 Εφαρμογές εξωπολυσακχαριτών 48

1.10 Σκοπός της διατριβής 49

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΟ *ANABAENA* ΚΑΙ ΤΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΣ *BOTRYOCOCCUS BRAUNII* 52

2.1 Εισαγωγή 54

2.2 Σκοπός 54

2.3 Πειραματικό μέρος 54

2.3.1. Οργανισμοί και συνθήκες ανάπτυξης 54

2.3.2. Παρασκευή καλλιεργειών για μελέτη ανάπτυξης των μικροοργανισμών 59

2.3.3. Δειγματοληψία και μετρήσεις ανάπτυξης 60

2.3.4. Μετρήσεις οπτικού μικροσκοπίου. 61

2.3.5. Παρατήρηση λιπιδίων μέσω της ουσίας Nile red στον μικροοργανισμό Botryococcus braunii. 61

2.3.6. Παρατήρηση του μικροοργανισμού Botryococcus braunii με χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) 62

2.3.7. Διαδικασία εκχυλίσεως του σκουαλενίου από Anabaena 62

2.3.8. Διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος 64

2.3.9. Ταυτοποίηση σκουαλενίου μέσω της αέριας χρωματογραφίας συνεζευγμένης με φασματομετρία μάζας (GC-MS). 65

2.4 Αποτελέσματα και Συζήτηση 66

2.4.1 Σύγκριση της ανάπτυξης των δύο μικροοργανισμών 66

2.4.2. Ποιοτική μελέτη της παραγωγής λιπιδίων από το μικροφύκος *Botryococcus braunii* με χρήση οπτικής μικροσκοπίας και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης 70

2.4.3. Αποτελέσματα χρωματογραφία στήλης 73

2.4.4. Αποτελέσματα χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας 76

2.4.5. Αποτελέσματα ταυτοποίηση σκουαλενίου μέσω της αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (GC-MS) 77

2.5 Συμπεράσματα 83

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΗΤΡΑΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ ΕΝΟΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΕ ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΟΤΑΜΟ ΓΙΟΦΥΡΟ- ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ. 86

3.1 Εισαγωγή 88

3.2 Σκοπός 90

3.3 Πειραματικό μέρος 90

3.3.1. Συνθήκες ανάπτυξης μικροοργανισμού 90

3.3.2. Απομόνωση της εξωκυπάριας μήτρας 92

3.3.3. Χρήση αντιδραστηρίου Lugol's (τεστ Ιωδίου) 93

3.3.4. Αντίδραση α-ναφθόλης (τεστ Molisch) 94

3.3.5 . Φασματοσκοπία υπερύθρου(IR) 94

3.3.6. Παρατήρηση της εξωκυπάριας μήτρας και του μικροοργανισμού με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) 94

3.3.7. Παρατήρηση της εξωκυπάριας μήτρας και του μικροοργανισμού με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης (Transmission Electron Microskopy, TEM) 95

3.3.8. Υδρόλυση της εξωκυπάριας μήτρας 96

*3.*3.9. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας 96

3.3.10. Φασματομετρία μάζας με ιοντισμό ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS) 97

3.3.11. Φασματοσκοπία NMR 97

3.3.11.1 Λήψη φασμάτων zgpr 1D NMR 97

3.3.11.2 Λήψη φασμάτων ^{1}H-^{1}H COSY 2DNMR 98

3.3.11.3 Λήψη φασμάτων ^{1}H-^{13}C, gHSQC και gHMBC 2D NMR 98

*3.*3.12. Εκχύλιση δευτερογενών χρωστικών 99

3.3.13. Αντιδράσεις σαπωνοποίησης 99

3.4 Αποτελέσματα και συζήτηση 100

3.4.1 Μελέτη του μικροοργανισμού και του λευκού ιζήματος με τη χρήση Ηλεκτρονιακή Μικροσκοπία Διέλευσης (TEM). 100

3.4.2. Μελέτη του παραγόμενου στερεού με τη χρήση με τη χρήση ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) 109

3.4.3. Χαρακτηρισμός της εξωκυττάριας μήτρας 113

3.4.4. Αποτελέσματα εκχυλίσεων και σαπωνοποιήσεις των δευτερογενών χρωστικών με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. 127

3.5 Συμπεράσματα 130

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ 132

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 138

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 150

Συντομογραφίες

ESI-MS:	Φασματομετρία μάζας με ιοντισμό ηλεκτροψεκασμού
BGM:	Θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη *Botryoccocus Braunii*
BG11:	Θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη κυανοβακτηρίων
COSY:	Ομοπυρηνικά φάσματα 1H-1H
GC-MS:	Αέρια χρωματογραφία συνεζευγμένη με φασματομετρία μάζας
NMR:	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
Acetate:	Συνθήκη στην οποία υπάρχει οξικό οξύ στο μέσο καλλιέργειας ως πηγή άνθρακα
MS/MS:	Φάσματα θραυσματοποίησης
TFA:	τριφθορο οξικό οξύ
TEM:	Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης
CS:	Επιφάνεια διατομής
ESI:	Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό
GDA:	Γλουταραλδεΰδη
GC:	Αέρια χρωματογραφία
HS:	Θρεπτικό μέσο ανόργανων αλάτων του Sueoka
HSQC:	Ετεροπυρηνικά φάσματα 1H-13C
OD:	Οπτική πυκνότητα
PFA:	Παραφορμαλδεΰδη
SCB:	Ρυθμιστικό διάλυμα διμεθυλαρσινικού νατρίου (Sodium Cacodylate Buffer)
SEM:	Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης
TAP:	Θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη μικροφυκών (Tricine-Acetate-Phosphate)
Amplitude:	Ισχύς των υπερήχων
IR:	Φάσμα υπερύθρου

UV:	Υπεριώδης ακτινοβολία
EPS:	Έξω-πολυσακχαρίτης
pcv:	σωλήνες που χρησιμοποιούνται για την μέτρηση του όγκου καθιζαμένων κυττάρων

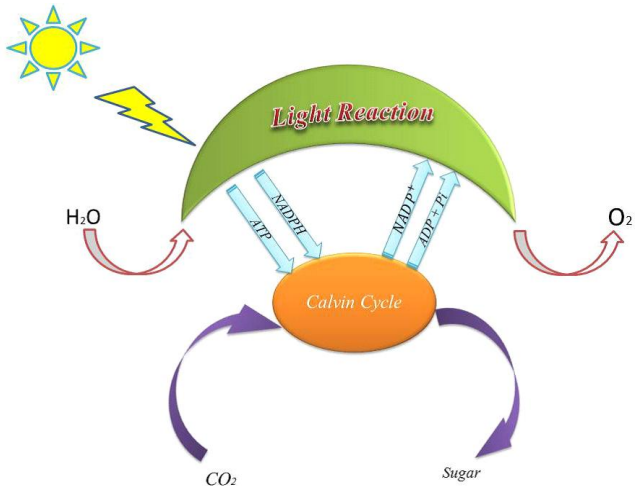
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φωτοσύνθεση

Η φωτοσύνθεση είναι μια από τις πιο σημαντικές διεργασίες στον πλανήτη. Οι κυριότερες κατηγορίες φωτοσυνθετικών οργανισμών είναι τα φυτά, τα βακτήρια και τα μικροφύκη. Οι παραπάνω οργανισμοί απορροφούν ηλιακή ακτινοβολία, μετατρέπουν το διοξείδιο του άνθρακα της ατμόσφαιρας σε οργανικά προϊόντα και ως παραπροϊόν της αντίδρασης παράγεται οξυγόνο. Η διαδικασία αυτή συνοψίζεται στην αντίδραση

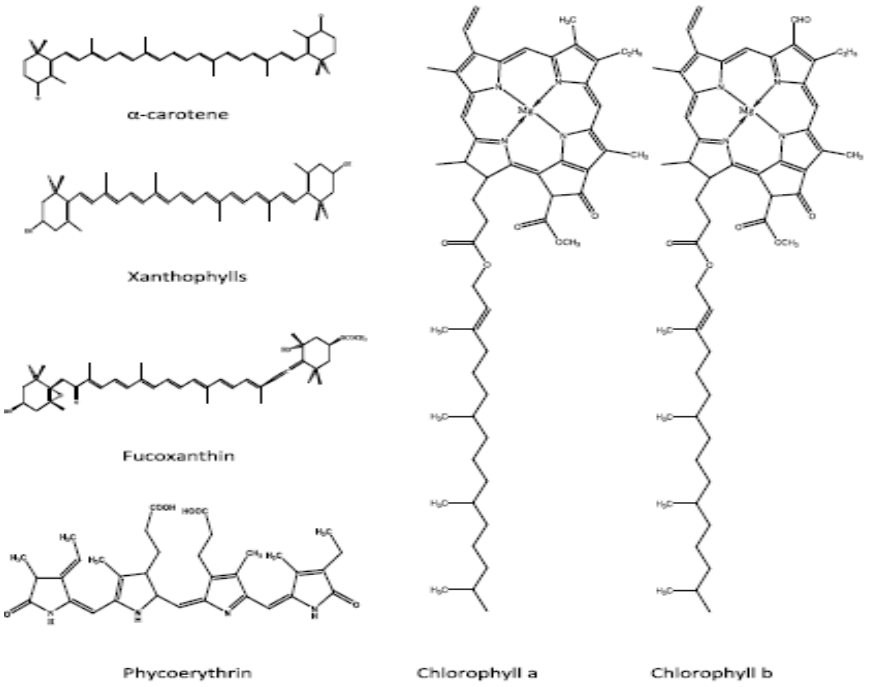
$$H_2O + CO_2 \xrightarrow{\Phi\omega\varsigma} (CH_2O) + O_2$$

Η διαδικασία της φωτοσύνθεσης περιγράφεται περιληπτικά στην εικόνα 1.1.



Εικόνα 1.1. Διαδικασία φωτοσύνθεσης [1].

Το βασικό οργανίδιο όπου πραγματοποιείται η διαδικασία της φωτοσύνθεσης είναι ο χλωροπλάστης. Η απορρόφηση της ακτινοβολίας επιτυγχάνεται με τις φωτοσυνθετικές χρωστικές που είναι οι χλωροφύλλες a και b, τα καροτένια και οι ξανθοφύλλες, όπως φαίνονται στην εικόνα 1.2 [2].

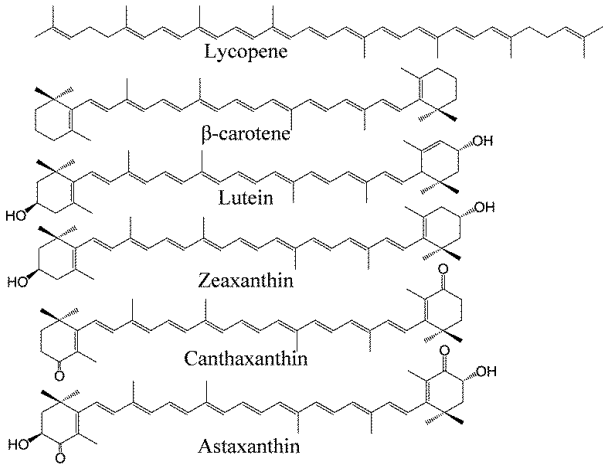


Εικόνα 1.2. Φωτοσυνθετικές χρωστικές για την απορρόφηση ακτινοβολίας [1].

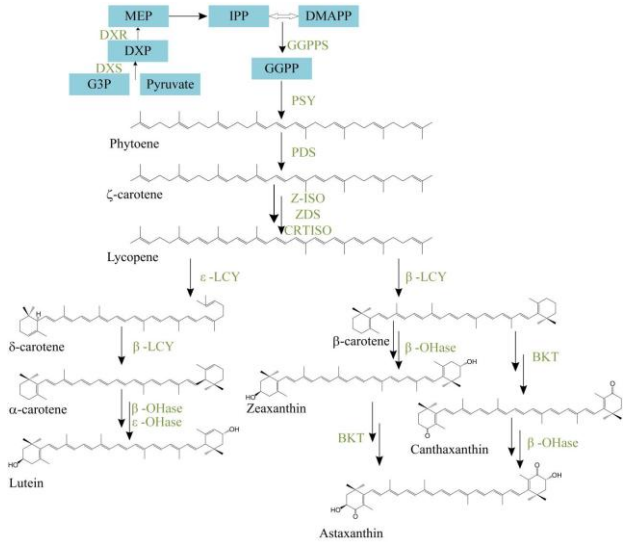
1.1.1 Καροτένια και ξανθοφύλλες

Τα καροτενοειδή είναι λιπόφιλες ενώσεις, χρωστικές κίτρινου, πορτοκαλί ή κόκκινου χρώματος και είναι ευρέως διαδεδομένες στη φύση [3, 4]. Τα περισσότερα καροτενοειδή έχουν κοινή δομή 40 μονάδων ανθράκα και χωρίζονται σε δύο ομάδες: καροτένια και ξανθοφύλλες. Καθένα από τα καροτενοειδή αποτελείται από διαφορετικά *trans* και *cis* ισομερή. Οι ξανθοφύλλες είναι τα οξυγονωμένα παράγωγα καροτενίων και έχουν υδρόφιλο χαρακτήρα. Αυτό το χαρακτηριστικό οφείλεται στην παρουσία ομάδων υδροξειδίου και όξο-ομάδων στους ακραίους δακτυλίους. Ως αντιοξειδωτικά τα καροτενοειδή είναι ευάλωτα στο φως, το οξυγόνο και τη θερμότητα, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε δυσκολίες αποθήκευσης και χειρισμού. Παρά την ποικιλία στην οικογένεια των καροτενοειδών, λιγότερο από 30 καροτενοειδή έχουν κυρίαρχο ρόλο στη φωτοσύνθεση [4]. Τα περισσότερα από αυτά βρίσκονται στις θυλακοειδείς μεμβράνες και δεσμεύονται με τα σύμπλοκα συλλογής φωτός (LHCs) [5]. Τα καροτενοειδή απορροφούν το φως με αποτέλεσμα την απόσβεση της περίσσειας ενέργειας κατά τη φωτοσυνθετική λειτουργία. Μερικά καροτενοειδή όπως η λουτεΐνη, χρησιμεύουν ως

βοηθητικές χρωστικές ουσίες για την καλύτερη μεταφορά ενέργειας προς τις χλωροφύλλες [6].



Εικόνα 1.3 . Χημική δομή γνωστών καροτενοειδών που έχουν βρεθεί σε μικροφύκη [7].



Εικόνα 1.4 . Τα πρωταρχικά στάδια της βιοσυνθετικής πορείας των καροτενοειδών στα περισσότερα είδη πράσινων μικροφυκών και ανώτερων φυτών μοιράζονται σχεδόν τα ίδια στάδια εκτός από τη βιοσύνθεση της ασταξανθίνης, η οποία είναι μόνο σε συγκεκριμένα είδη μικροφυκών. Παραπάνω εικονίζονται το διφωσφορικό ισοπεντύλιο (IPP) και το πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP) . Το DMAPP είναι το δομικό στοιχείο όλων των καροτενοειδών. Οι οξυγονωμένες ξανθοφύλλες προέρχονται από α- ή β-καροτένιο. Τα ένζυμα που εμφανίζονται περιγράφονται με μεγαλύτερη λεπτομέρεια στην βιβλιογραφία [5].

Τα οφέλη των καροτενοειδών όσον αφορά τον τομέα της υγείας έχουν δείξει ότι σχετίζονται κατά κύριο λόγο με τον αντιοξειδωτικό τους χαρακτήρα [8, 9]. Επίσης, έρευνες έχουν αναφερθεί στη μειώση των κινδύνων του AIDS, του διαβήτη, του καταρράκτη, του εκφυλισμού της ωχράς κηλίδας και του νευροεκφυλισμού [4, 10]. Ένα άλλο καροτενοειδές, το οποίο ονομάζεται β-καροτένιο, είναι υπεύθυνο για την πρόληψη της συσσώρευσης τοξινών στο ήπαρ και πιθανοτατα βελτιώνει το ανοσοποιητικό σύστημα [10]. Η λουτεΐνη και η ζεαξανθίνη, είναι βιομόρια με εμπορική αξία , αφού έχουν σημαντικό ρόλο στην υγεία των ματιών [11].

1.2 Μικροφύκη

Τα μικροφύκη είναι μονοκύτταροι φωτοαυτότροφοι μικροοργανισμοί. Τα μικροφύκη εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία μεταβολισμού, χρωστικών, κυτταρικών τοιχωμάτων, λιπαρών οξέων και λιπίδιων. Οι κυριότερες κατηγορίες μικροφυκών είναι:

1.Χλωρόφυτα

Τα χλωρόφυτα μπορούν να βρεθούν σε γλυκά, αλμυρά νερά, καθώς και σε χερσαία περιβάλλοντα. Τα μέλη αυτά, περιλαμβάνουν μονοκύτταρους και πολυκύτταρους οργανισμούς που έχουν χλωροφύλλες a και b. Οι κυριότεροι εκπρόσωποι χλωροφυτών που ανήκουν στην κατηγορία των μονοκύτταρων οργανισμών είναι τα *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris* και *Scenedesmus obliquus* [12].

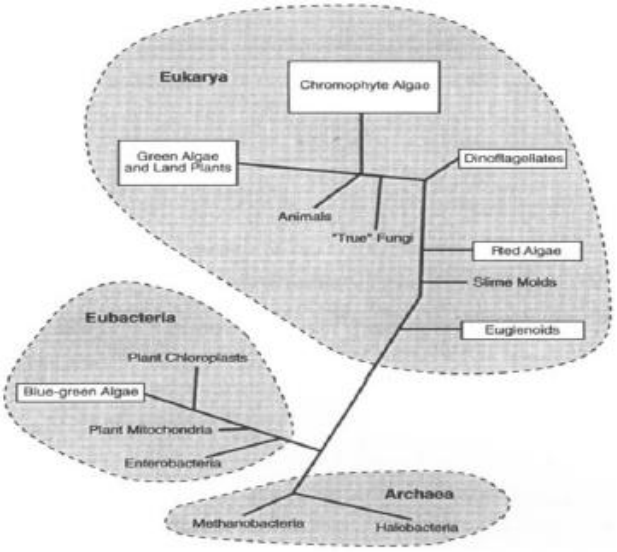
2.Ερυθροφύκη

Τα ερυθροφύκη είναι κυρίως θαλάσσια πολυκύτταρα είδη, ενώ σπανίζουν τα είδη του γλυκού νερού. Τα κύτταρά τους είναι σφαιρικού σχήματος με έναν κεντρικό πυρήνα και περιέχουν ένα μεγάλο ενιαίο χλωροπλάστη που περιβάλλεται [13].

3.Απτόφυτα

Τα μικροφύκη που ανήκουν στα απτόφυτα είναι κυρίως μονοκύτταρα. Τα περισσότερα είδη είναι θαλάσσια αν και μερικά είδη του γλυκού νερού είναι γνωστά. Όλα τα απτόφυτα περιέχουν χλωροπλάστες και έναν πυρήνα με πυρηνικό φάκελο [14].

.

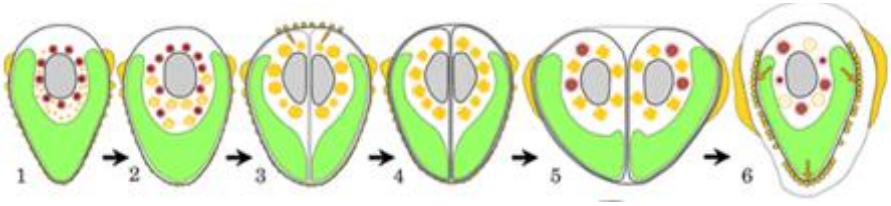


Εικόνα 1.5.Απεικόνιση της φυλογενετικής συγγένειας ορισμένων ομάδων των φυκιών. Τα μήκη των τμημάτων των γραμμών είναι ανάλογα της εξελικτικής απόστασης, με βάση την ανάλυση των γονιδιακών αλληλουχιών ριβοσωμικού RNA [15].

1.2.1. Botryococcus braunii

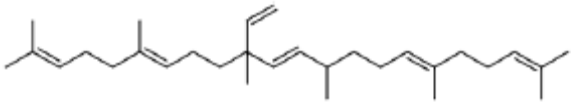
Το *Botryococcus braunii* είναι ένα πράσινο αποικιακό μικροφύκος, με διάφορες παραλλαγές που αφορούν το μέγεθος και το σχήμα των κυττάρων. Οι παραλλαγές αυτές μπορούν να είναι περισσότερο ή λιγότερο ενσωματωμένες στη μήτρα και με την παρουσία (ή όχι) επαναλαμβανώμενων νημάτων που συνδέουν τα κύτταρα, οδηγώντας

στο σχηματισμό μεγάλων αποικιών. Τα *Botryococcus braunii* υπό παρατήρηση στο μικροσκόπιο παρουσιάζουν μία τυπική μορφολογία, που χαρακτηρίζεται από μια οργάνωση μεμονωμένων κυττάρων ωοειδούς σχήματος, που συγκρατούνται μαζί με μια εξωκυττάρια μήτρα που περιέχει λιπίδια. Μελέτες χαρακτηρισμού της μήτρας έδειξαν ότι αποτελείται από εξωκυττάρια κυτταρικά τοιχώματα που προέρχονται από διαδοχικές κυτταρικές διαιρέσεις [16].

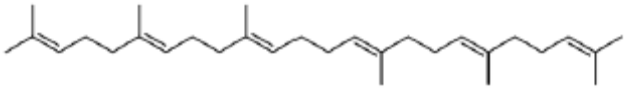


Εικόνα 1.6 . Δημιουργία λιπιδικών σωμάτων και κενοτοπιών κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου. Το σχήμα απεικονίζει το στάδιο ανάπτυξης του *B. braunii*. Με κίτρινο χρώμα παρουσιάζονται τα λιπίδια στο κυτταρόπλασμα και τα λιπίδια στην κυτταρική επιφάνεια. Με κόκκινο χρώμα είναι τα κενοτοπία, με πράσινο ο χλωροπλάστης και με γκρι ο πυρήνας [17].

Αυτό το μικροφύκος χαρακτηρίζεται από μια εμφανή ικανότητα να συνθέτει και να συσσωρεύει μια ποικιλία λιπιδίων. Ανάλογα με τον τύπο των υδρογονανθράκων που βρίσκονται μέσα στα κύτταρά του, το είδος αυτό μπορεί να ταξινομηθεί σε τρεις τύπους. Ο τύπος Α παράγει τα n-αλκαδιένια (C21-C33) και πεντένια. Ο τύπος Β παράγει τριτερπενία ως κύριους υδρογονάνθρακες, που λέγονται Botrycoccenes (C30-C37), σκουαλένιο και μεθυλο διακλαδισμένα σκουαλένια. Ο τύπος L παράγει ένα απλό C40 λυκοπαδιένιο [18, 19] και πρόσφατα αναγνωρίστηκε ένα τύπος S που παράγει υδρογονάνθρακες μικρού μήκους αλυσίδας [20].



a. Botryococcene



b. Squalene

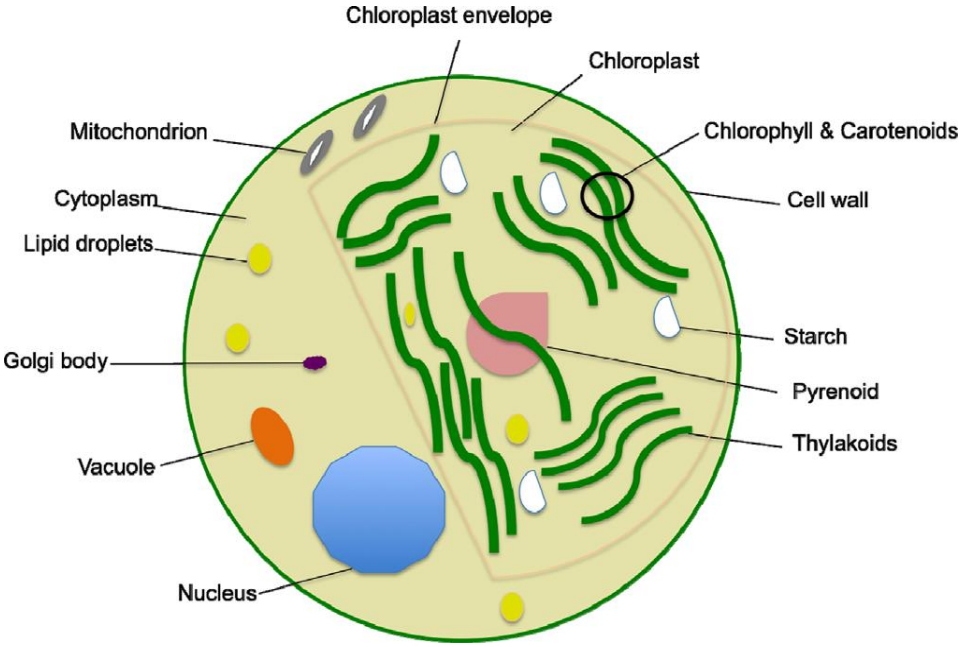
Εικόνα 1.7 . Δομή του σκουαλενίου αλλά και των μεθυλιωμένων παραγώγων του (Botryococcenes) [21].

Από τους τρεις τύπους, η περιεκτικότητα σε έλαιο βρέθηκε να είναι η υψηλότερη στον τύπο B (86%), ακολουθούμενη από τον τύπο A (61%) και τον τύπο L (8%) [22]. Οι υδρογονάνθρακες που παράγονται από τον τύπο A και τον τύπο L είναι σε πολλές περιπτώσεις διακλαδισμένοι και χρησιμοποιούνται εντός των κυτταρικών τοιχωμάτων τους. Οι υδρογονάνθρακες που περιέχονται στον τύπο B βρίσκονται μέσα στο εξωκυτταρικό τους πλέγμα (χώρος αποικιών) καθιστώντας ευκολότερο για την εξαγωγή τους [23].

1.2.2. Chlorella species και χαρακτηριστικά

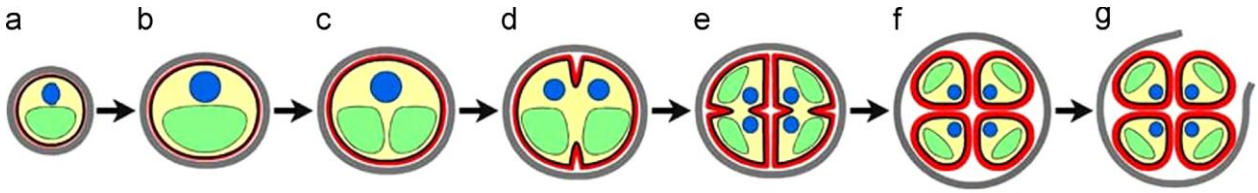
Τα είδη της *Chlorella* μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες με βάση τα συστατικά σακχάρων που αποτελούν το κυτταρικό τους τοίχωμα. Το ένα είναι γλυκόζης-μαννόζης και η άλλη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος είναι η γλυκοζαμίνη. Η *Chlorella* είναι ένα γένος από μονοκύτταρα πράσινα μικροφύκη που ανήκουν στα *Chlorophyta*. Είναι σφαιρικού σχήματος, διαμέτρου περίπου 2 έως 10 μm και χωρίς μαστίγια. Τα μικροφύκη του γένους *Chlorella* περιέχουν τις φωτοσυνθετικές χρωστικές χλωροφύλλη a και b στον χλωροπλάστη τους. Μέσω της φωτοσύνθεσης πολλαπλασιάζεται γρήγορα, απαιτώντας μόνο διοξείδιο του άνθρακα, νερό, ηλιακό φως και ιχνοστοιχεία [24, 25]. Η ακαμψία που έχει το κυτταρικό τοίχωμα διατηρεί την ακεραιότητα του κυττάρου και λειτουργεί ως ένας προστατευτικός μανδύας. Κατά την αυτοσποραγία, το κυτταρικό

τοίχωμα των νέων θυγατρικών κυττάρων (τρόπος διαίρεσης) αποτελείται από ένα στρώμα μικροϊνιδίων. Αυτό το στρώμα θυμίζει δομικά τη χιτοζάνη, με τη διαφορά ότι αποτελείται από γλυκοζαμίνη [26]. Κατά την ωρίμανση των κυττάρων το πάχος του κυτταρικού τοιχώματος αλλά και η σύστασή του εξαρτάται από τις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες αλλά και τις συνθήκες ανάπτυξης [27].



Εικόνα 1.8 . Σχηματική απεικόνιση της *Chlorella vulgaris* με τα διαφορετικά οργανίδια [28].

Η αυτοσποραγία είναι ένας κοινός τρόπος διαίρεσης για μονοκύτταρα πράσινα μικροφύκη που περικλείονται από κυτταρικά τοιχώματα. Στην αυτοσποραγία του μικροφύκους *Chlorella beijerinck*, ο πρωτοπλάστης χωρίζεται σταδιακά στα δύο, στα τέσσερα και τέλος στα οκτώ μέρη στο εσωτερικό του μητρικού κυτταρικού τοιχώματος. Μετά την ωρίμανση αυτών των αυτοσπορίων, το κυτταρικό τοίχωμα του μητρικού κυττάρου διασπάται, επιτρέποντας την απελευθέρωση των θυγατρικών κυττάρων (έχοντας και αυτά δικά τους κυτταρικά τοιχώματα) και τα υπόλοιπα θραύσματα του αρχικού κυττάρου μπορεί να καταναλωθούν ως τροφή από τα νεοσυσταθέντα θυγατρικά κύτταρα [25].

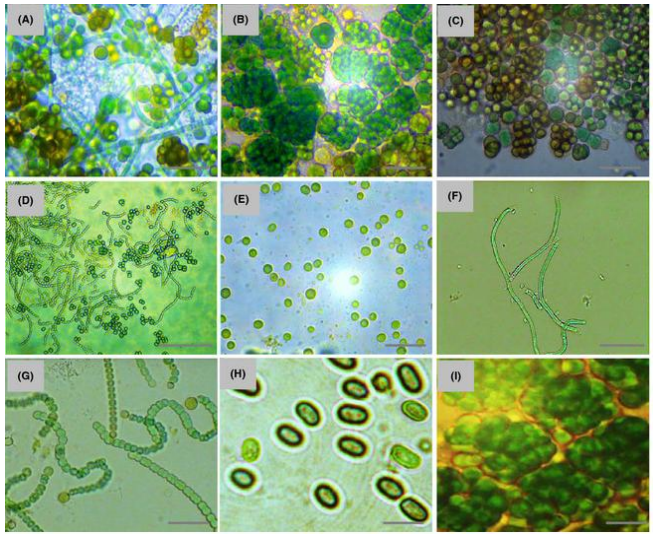


Εικόνα 1.9 . Σχέδια που δείχνουν τις διαφορετικές φάσεις σχηματισμού τοιχωμάτων θυγατρικών κυττάρων στο *Chlorella vulgaris*: (a) φάση πρώιμης κυτταρικής ανάπτυξης, (b) φάση μετέπειτης κυτταρικής ανάπτυξης, (c) φάση διαίρεσης, (d) φάση διαίρεσης πρώιμου πρωτοπλάστη, (e) φάση διαίρεσης μετέπειτου πρωτοπλάστη, (f) φάση ωρίμανσης θυγατρικών κυττάρων και (g) φάση εκκόλαψης [25].

1.3 Κυανοβακτήρια

Τα κυανοβακτήρια, αναφερόμενα ως μπλε-πράσινα φύκη, είναι οι παλαιότεροι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί στη γη που δημιουργήθηκαν περίπου 2,6-3,5 δισεκατομμύρια χρόνια πριν [1]. Πράγματι, η προέλευση των φωτοσυνθετικών οργανιδίων σε ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, θεωρείται ότι έχει προκύψει από την ενδοσυμβίωση μεταξύ ενός φαγοτροφικού ξενιστή και ενός κυανοβακτηρίου [2]. Τα κυανοβακτήρια συναντώνται σε διάφορες μορφές συμπεριλαμβανομένων των μονοκύτταρων, νηματοειδών, πλαγκτονικών και κοκκοειδών [3, 4]. Τα κυανοβακτήρια ευδοκιμούν σε ένα ευρύ φάσμα οικολογικών τοποθεσιών, που κυμαίνονται από θαλάσσια, γλυκά ύδατα, μέχρι σε χερσαία περιβάλλοντα. Όλα τα κυανοβακτήρια είναι ικανά να φωτοσυνθέσουν οξυγονικά, αλλά μερικά είδη κυανοβακτηρίων μπορούν να φωτοσυνθέσουν ανοξυγονικά [6]. Στο σκοτάδι ή υπό ανοξικές συνθήκες, τα κυανοβακτήρια μπορούν να πραγματοποιήσουν ζυμώσεις για την παραγωγή ενέργειας [7]. Μερικά νηματοειδή ανέπτυξαν εξειδικευμένα κύτταρα που λέγονται ετεροκύστες για την μετατροπή του αζώτου σε αμμωνία [8]. Τα κυανοβακτήρια έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια για την πιθανή χρήση τους στη γεωργία, επεξεργασία λυμάτων και παραγωγή βιοκαυσίμων. Επίσης παράγουν μια πληθώρα βιοδραστικών ενώσεων με αντιβακτηριακές, αντιμυκητιακές και αντι-ιικές ιδιότητες που έχουν φαρμακευτική και γεωργική σημασία. Αρκετά στελέχη κυανοβακτηρίων είναι πηγές

φυσικών προϊόντων υψηλής αξίας, για παράδειγμα χρωστικές, βιταμίνες και ένζυμα [29].

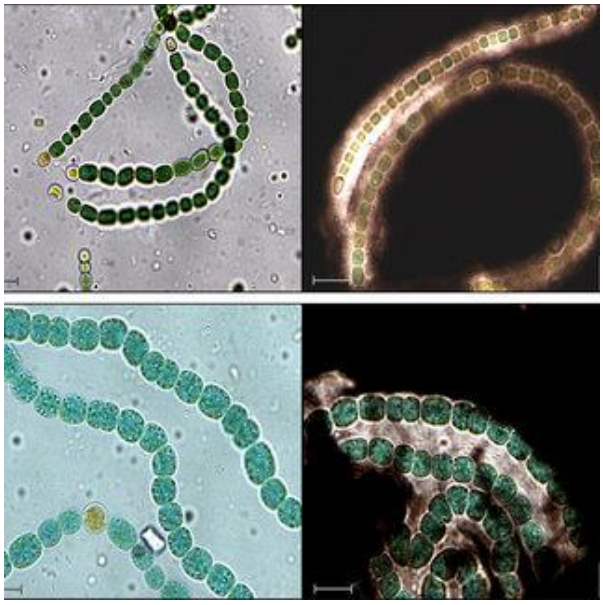


Εικόνα 1.10. Οι κυανοβακτηριακές συναθροίσεις (A-I) που παρουσιάζουν τα μονοκύτταρα καθώς και νηματοειδή κυανοβακτήρια στα βιολογικά υμένια(biofilm) και τη μορφολογία ορισμένων κυρίαρχων κυανοβακτηριακών κυττάρων όπως το *Synechocystis sp.* (E), *Scytonema sp.* (F), *Nostoc sp.* (G), *Gloeocapsa sp.* (H) και *Gloeocapsopsis sp*. (I) [30].

1.4 *Anabaena*

Anabaena είναι ένα γένος από νηματοειδή κυανοβακτήρια που υπάρχουν ως πλαγκτόν. Είναι γνωστά για την ικανότητα καθήλωσης αζώτου και σχηματίζουν συμβιωτικές σχέσεις με ορισμένα φυτά μέσω των ετεροκυστών που πραγματοποιούν αυτή τη διαδικασία [31]. Η *Anabaena* είναι μια καλή πηγή πρωτεΐνες των φυκοχολοσωμάτων, που περιλαμβάνει φυκοκυανίνη (PC), φυκοερυθρίνη (PE) και αλλοφυκοκυανίνη (APC) [32]. Η φυκοκυανίνη χρησιμοποιείται ως φυσική χρωστική στα τρόφιμα, τα καλλυντικά και αντικαθιστά τις συνθετικές χρωστικές ουσίες. Η φυκοκυανίνη δεν παρουσιάζει αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη δράση, συνεπώς θα μπορούσε να

χρησιμοποιηθεί σε φαρμακευτικά συμπληρώματα [33]. Επιπλέον, το γένος *Anabaena* δύναται να χρησιμοποιηθεί στην απομόνωση διαφόρων στερολών και σκουαλενίου [34].

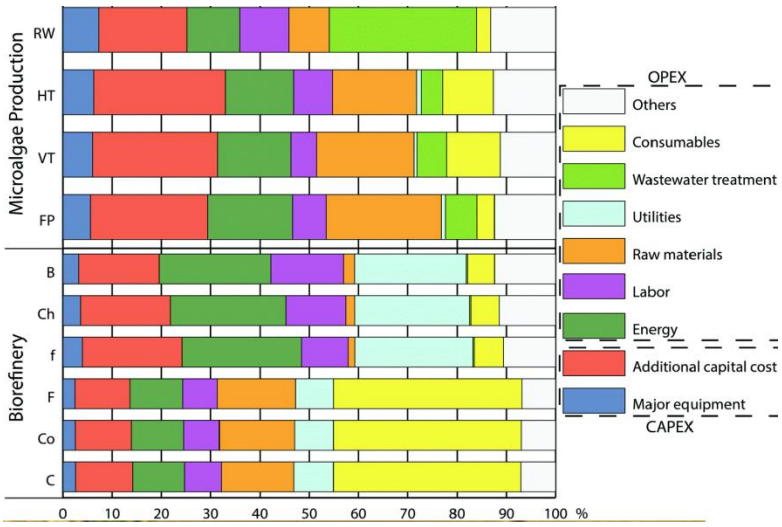


Εικόνα 1.11. Εικόνες από οπτικό μικροσκόπιο του γένους Anabaena [35, 36].

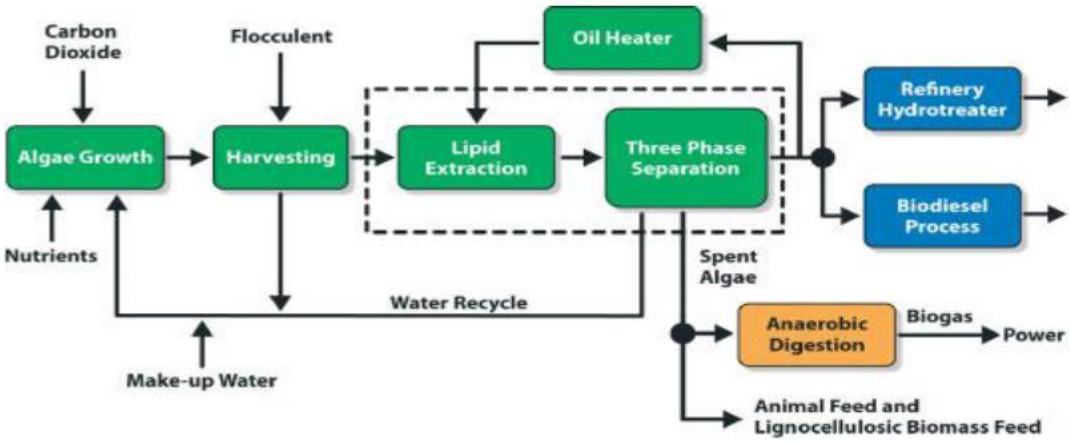
1.5 Εμπορική παραγωγή φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών

Είναι ευρέως γνωστό το γεγονός ότι τα μικροφύκη έχουν πολλές διαφορετικές εφαρμογές, με σημαντικότερη την παραγωγή βιοκαυσίμων. Ωστόσο, αξιοσημείωτη είναι η χρήση μικροοργανισμών στην παραγωγή προϊόντων υψηλής βιομηχανικής αξίας (π.χ. καλλυντικά) [37]. Πολλά είδη μικροφυκών εμφανίζουν υψηλές συγκεντρώσεις λιπιδίων και αυτό το γεγονός τα καθιστά εξαιρετική επιλογή με εκτεταμένες εφαρμογές στη βιομηχανία καλλυντικών. Κάποιοι από τους μικροοργανισμούς που χρησιμοποιούνται εκτενώς στην βιομηχανία περιλαμβάνουν τα γένη *Chlorella, Neochloris, Parachlorella, Bracteacoccus, Scenedesmus, Anabaena, Chlorococcum* και *Ankistrodesmus* [38]. Η διαδικασία παραγωγής προϊόντων με εμπορική αξία από φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς περιλαμβάνει διάφορα στάδια, όπως ανάπτυξη των μικροργανισμών, η συλλογή τους και η εκχύλιση επιθυμητών προϊόντων [39]. Στην εικόνα 1.12 απεικονίζονται τα τυπικά στάδια σε ένα σύστημα παραγωγής προϊόντων από μικροφύκη. Μερικές παράμετροι για την επιτυχή ανάπτυξη των μικροφυκών

συμπεριλαμβάνουν την ένταση φωτεινής ακτινοβολίας, διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, νερό, και κατάλληλα ελεγχόμενη θερμοκρασία.



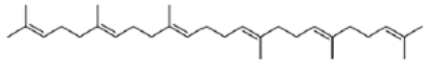
Εικόνα 1.12 . Ανάλυση του κόστους για τις προβλέψεις για την τρέχουσα παραγωγή μικροκαλλιέργειας (καλλιέργεια και συγκομιδή) και βιοτεχνία στη νότια Ισπανία. RW: λίμνη διαδρόμου. HT: οριζόντιος σωληνωτός βιοαντιδραστήρας. VT: κατακόρυφος σωληνωτός βιοαντιδραστήρας. FP: Φωτοβολταϊκές επίπεδες πλάκες. B: βιοκαύσιμα. Ch: χημική ουσία. f: ζωοτροφές . F: πρόσθετα τροφίμων. Co: καλλυντικά-υγειονομική περίθαλψη [40].



Εικόνα 1.13. Τυπικά στάδια σε ένα μοντέλο συστήματος ανοικτής παραγωγής [41].

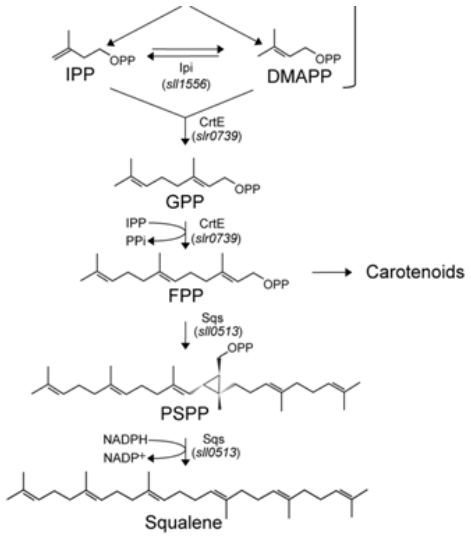
1.6 Σκουαλένιο

Το σκουαλένιο είναι μια ουσία λιπιδικής φύσεως που αποτελεί κοινή συνιστώσα άλλων ελαίων. Είναι ένα φυσικό συστατικό του ανθρώπινου σμήγματος, ενός μείγματος λιπιδίων που παράγονται από αδένες στο δέρμα. Στα προϊόντα καλλυντικών και προσωπικής περιποίησης, το σκουαλένιο χρησιμοποιείται στη σύνθεση μιας ευρείας ποικιλίας προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των ελαίων για μπάνιο, προϊόντα για τα μαλλιά, μακιγιάζ ματιών, βάση άλλων ειδών μακιγιάζ, προϊόντα κραγιόν, αντηλιακά, προϊόντα για τα νύχια και προϊόντα φροντίδας του δέρματος [42].



.

Εικόνα 1.14 . Σκελετική δομή σκουαλενίου [36].



Εικόνα 1.15 . Μονοπάτι βιοσύνθεσης σκουαλενίου μέσω της οδού MEP G3P = 3-φωσφορική γλυκεραλδεΰδη DXP = 5-φωσφορική δεοξυξυλουλόζη. MEP = 4-φωσφορική μεθυλερυθριτόλη, IPP = διφωσφορικός ισοπεντενύλιο. DMAPP = διφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο,GPP = διφωσφορικό γερανύλιο, FPP = διφωσφορικό φαρνεσύλιο ,PSPP = διφωσφορική πρεσβαλενάνη. Τα ένζυμα: Ipi = διφωσφορικό ισοπεντενυλίονισομεράσης δέλτα. CrtE = συνθετάση πυροφωσφορικής γερανυλγερανυλίου. Sqs = συνθάση σκουαλενίου [43].

Επιπλέον, το σκουαλένιο λειτουργεί βιοσυνθετικά ως πρόδρομη ένωση των στεροειδών σε φυτά και ζώα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιοκαυσίμων και περισσότερο σε καλλυντικά, ως πρόσθετα και ως λιπαντικά υψηλής ποιότητας. [44, 45] Το σκουαλένιο έχει φαρμακευτικές εφαρμογές λόγω των θεραπευτικών ιδιοτήτων του. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι το σκουαλένιο δρα ως φυσικός παράγοντας και μπορεί να εμποδίσει την χημικώς επαγόμενη ογκογένεση του δέρματος σε τρωκτικά [46]. Επιπλέον, το σκουαλένιο μπορεί να καταναλωθεί σε καθημερινή βάση και να μειώσει τη συχνότητα εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου και ορισμένων καρκίνων [46, 47]. Δεδομένου ότι το έλαιο από συκώτι καρχαρία περιέχει 60% κατά βάρος σκουαλένιο, μεγάλο μέρος της παραγωγής του προέρχεται από καρχαρίες [45]. Οι περιορισμοί στη θανάτωση των καρχαριών οδήγησαν σε έλλειψη πρώτης ύλης και σε αυξημένη ζήτηση εναλλακτικών και ανανεώσιμων πηγών σκουαλενίου.

1.7 Πολυσακχαρίτες

Οι πολυσακχαρίτες χωρίζονται σε ομο- ή ετεροπολυσακχαρίτες. Παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία στις χημικές δομές που βασίζονται σε συνδυασμούς των γλυκοσιδικών δεσμών έως 40-50 διαφορετικούς μονοσακχαρίτες (κυρίως εξόζες και πεντόζες). Μπορούν να υπάρξουν διάφοροι υποκαταστάτες όπως ακυλομάδες, αμινοξέα ή θειικά άλατα σε αυτή την πολυσακχαριδική αλυσίδα, η οποία μπορεί να είναι γραμμική αλλά και να έχει διακλαδώσεις. Αυτή η ποικιλία στους πιθανούς τρόπους που σχηματίζονται οι γλυκοζιτικοί δεσμοί οδηγούν σε μια πληθώρα διαφορετικών δομών [48]. Πολυσακχαρίτες από φυτά, μακροφύκη, μικροοργανισμούς, μύκητες και τα ζώα χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία ως υδροκολλοειδή, υλικά βιολογικής προέλευση. Οι φαρμακευτικές και καλλυντικές βιομηχανίες έχουν προωθήσει την ανάπτυξη πολυσακχαριτών με ειδικές βιολογικές ιδιότητες για χρήση ως αντιπαρασιτικά, αντιπηκτικά ή αντιμικροβιακά προιόντα [49]. Στον πίνακα 1.1 παρουσίαζονται κάποιοι πολυσακχαρίτες από μικροφύκη και κυανοβακτήρια.

Πίνακας 1.1. Συστατικά και εφαρμογές πολυσακχαριτών.

Είδος πολυσακχαρίτη	**Πηγή**	**Μονοσακχαρίτες**	**Εφαρμογές**	**Αναφορές**
sPS	*Chlorella stigmatophora*	glc, xyl, fuc,	Αντιφλεγμονώδης ανοσοδιαμορφωτής	[50]
PS β-(1,3)-glucan	*Chlorella vulgaris*	rham, gal, arab,	Προληπτικός παράγοντας κατά του καρκίνου	[51, 52]
EPS	*Botryococcus braunii*	gal, fuc, glc, rham		[53]
EPS	*Dunaliella salina*	gal, glc, xyl, fru		[54]
EPS	*Aphanothece halophytica*	glc, fuc, man, arab, glcAc		[55]

PS: πολυσακχαρίτες, EPS: εξωπολυσακχαρίτες, sPS: θειικοί πολυσακχαρίτες

gal: γαλακτόζη, rham: ραμνόζη, xyl: ξυλόζη, glc: γλυκόζη, arab:αραβινόζη, fru:φρουκτόζη, fuc: φουκόζη

1.8 Έξωπολυσακχαρίτες

Οι εξωπολυσακχαρίτες (EPS) είναι μια ομάδα σημαντικών βιοπολυμερών υψηλού μοριακού βάρους που εκκρίνονται από μικροοργανισμούς στο περιβάλλον κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους [56, 57]. Μπορούν είτε να συνδεθούν ασθενώς στο κυτταρικό τοίχωμα, είτε να απεκκριθούν στο περιβάλλον [58, 59]. Πολλά μικροφύκη, ειδικά μια ποικιλία από κόκκινα φύκη και κυανοβακτήρια, είναι παραγωγοί ποικίλων EPS. Οι EPS προστατεύουν τα κύτταρα από τη δυσμενή πίεση στο φυσικό περιβάλλον [60]. Επιπλέον, εμπλέκεται στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου, πρόσφυσης και σχηματισμού βιολογικών υμενίων [61, 62]. Παράλληλα, χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων ως πυκνωτικά και πρόσθετα πηκτωμάτων, τα οποία βελτιώνουν την ποιότητα και την υφή των τροφίμων [60]. Οι EPS απελευθερώνονται στο μέσο καλλιέργειας, επομένως μπορούν εύκολα να ανακτηθούν και να καθαριστούν [63].

1.9 Εφαρμογές εξωπολυσακχαριτών

Οι εξωπολυσακχαρίτες από μικροφύκη έχει αποδειχθεί ότι έχουν σημαντικές φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες (υψηλού ιξώδους και βιοδραστικότητας) και υποσχόμενες εφαρμογές που προέρχονται από την χημική σύνθεση και δομή. Συχνά, είναι δύσκολο να προσδιοριστεί η χημική δομή τους, οπότε και οι ιδιότητές τους. Οι ιδιότητες των EPS συνήθως προκύπτουν από μια σύνθετη αλληλεπίδραση πολλών δομικών χαρακτηριστικών όπως το μοριακό βάρος, τα κατάλοιπα σακχάρων, το επίπεδο σούλφωσης, την κατανομή των θειικών ομάδων κατά μήκος του πολυσακχαρίτη, το είδος των πρωτεινών που ενώνονται και τη στερεοχημεία [64]. Για παράδειγμα, η αντιπηκτική δραστικότητα του φουκανίου οφείλεται από στη σύσταση των σακχάρων, το επίπεδο σούλφωσης και τη θέση της ομάδας θείου. Γαλακτάνες, φουκάνες και γαλακτοφουκάνες είναι τυπικοί εξωπολυσακχαρίτες και αναφέρθηκε ότι αναστέλλουν μόλυνση τύπου 1 και 2 του ιού απλού έρπητα (HSV), παρόλο που έχουν διαφορετική δομή, επίπεδο θειώσεως και μοριακό βάρος [64]. Ερευνητική ομάδα

διαπίστωσε ότι οι διακλαδισμένοι ολιγοσακχαρίτες της φουκοϊδάνης είχαν υψηλότερη αντιφλεγμονώδη δράση σε σχέση με την γραμμική φουκοϊδάνη [65]. Η έρευνα σχετικά με τα EPS από μικροφύκη εξακολουθεί να βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο, όμως αποτελούν μεγάλη πολυμερών με βιολογική δραστικότητα, εμφανίζοντας διάφορες εφαρμογές στον ιατρική, βιοϊατρική, τα τρόφιμα, τη μηχανολογία, τις περιοχές επεξεργασίας λυμάτων [66]. Στον πίνακα 1.2 παρουσιάζονται εφαρμογές έξωπολυσακχαριτών.

Πίνακας 1.2 Εφαρμογές εξωπολυσακχαριτών από μικροφύκη

Είδος μικροοργανισμού	**Εφαρμογές**	**Αναφορά**
Chroococcus dispersus	Αντιμυκητιακό	[57]
Chlamydomonas reinhardtii	Αντιμυκητιακό	[67]
Chlorella vulgaris	Αντιβακτηριακό	[67]
Chlorella pyrenoidosa	Αντιμυκητιακό	[67]
Chlorella stigmatophora	Αντι φλεγμονώδες και αναλγητική	[68]
Chlorella autotrophica	Αντιικό : VHSV and ASFV	[69]

Οι EPS μπορούν να έχουν πολύ σημαντικό ρόλο στην επεξεργασία των λυμάτων. Οι EPS, χημικά μπορούν να συνδεθούν με πολλές εξωγενείς οργανικές και ανόργανες ενώσεις, λόγω των άφθονων λειτουργικών ομάδων του (όπως -COOH, -NH, -OH, -CO) [70]. Για Παράδειγμα, EPS από μικροφύκη μπορεί να επάγουν την πρόσληψη νιτρικών και φωσφορικών ιόντων και να αντιδρούν με βαρέα μέταλλα (π.χ Cu^{2+} και Cd^{2+}) μέσω ιονανταλλαγής [71, 72].

1.10 Σκοπός της διατριβής

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η απομόνωση φυσικών προϊόντων από φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς.

Στο πρώτο μέρος σκοπός ήταν η μελέτη με τον οποίο τα λιπίδια κατανέμονται εξωτερικά των κυττάρων *Botryococcus braunii*. Παράλληλα συγκρίθηκε η ανάπτυξη του συγκεκριμένου μικροφύκους που βιβλιογραφικά είναι γνωστό ότι παράγει μεγάλες πόσοτητες λιπιδίων με την ανάπτυξη ενός κυανοβακτήριου που ανήκει στο γένος

Anabaena. Επίσης σκοπός ήταν ανίχνευση η απομόνωση του προϊόντος σκουαλενίου από ένα κυανοβακτήριο που ανήκει στο γένος *Anabaena*.

Στο δεύτερο μέρος σκοπός ήταν η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός μιας μήτρας που παράγει ένα μικροφύκος που έχει απομονωθεί από τον ποταμό Γιόφυρο .Επίσης σκοπός ήταν ο χαρακτηρισμός του απομονωμένου μικροφύκους. Παράλληλα στόχος ήταν η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός δευτερογενών χρωστικών καροτένια και ξανθοφύλλες από το μικροφύκος αυτό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΛΙΠΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΟ *ANABAENA* ΚΑΙ ΤΟ ΜΙΚΡΟΦΥΚΟΣ *BOTRYOCOCCUS BRAUNII*

2.1 Εισαγωγή

Στο κεφάλαιο αυτό μελετήθηκαν οι μικροοργανισμοί *Botryococcus braunii* και ένα νηματοειδές κυανοβακτηρίο που ανήκει στο γένος *Anabaena.*Το *Botryococcus braunii* παράγει σε μεγάλες ποσότητες τερπενοειδών και λιπίδια . Ένα χρήσιμο τερπενοειδές που έχει την ικανότητα να παράγει είναι το σκουαλένιο. Επειδή όμως ο χρόνος ανάπτυξης του μικροφύκους είναι μεγάλος μελετήθηκε και ένα κυανοβακτηρίο που ανήκει στο γένος *Anabaena*. Στη βιβλιογραφία έχει μελετηθεί η παραγωγή σκουαλενίου κυρίως για το κυανοβακτήριο *Anabaena cylindrica [73]* .

2.2 Σκοπός

Η συγκεκριμένη πειραματική σειρά είχε σκοπό την ανίχνευση και την απομόνωση του προϊόντος σκουαλενίου από ένα κυανοβακτήριο που ανήκει στο γένος *Anabaena*. Για να επιτευχθεί αυτό, παρόμοιες διαδικασίες απομόνωσης του προϊόντος πραγματοποιήθηκαν με αυτές τις βιβλιογραφίας. Επίσης στην παρούσα πειραματική σειρά συγκρίθηκε η ανάπτυξη του μικροφύκους *Botryococcus braunii* με το στέλεχος *Anabaena*. Επιπλέον μελετήθηκε ο τρόπος με τον οποίο κατανέμονται τα λιπίδια στο μικροφύκος *Botryococcus braunii*. ·

2.3 Πειραματικό μέρος

2.3.1. Οργανισμοί και συνθήκες ανάπτυξης

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ένα κυανοβακτήριο που ανήκει στο γένος *Anabaena* και το μικροφύκος *Botryococcus braunii* showa race B.

Τα κύτταρα *Anabaena* αναπτύχθηκαν ετερότροφα σε υγρό θρεπτικό BG11 σε κωνικές φιάλες υπό συνεχή διοχέτευση αέρα για 7 ημέρες. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν υπό σταθερή θερμοκρασία δωματίου 29±1°C και υπό ένταση ακτινοβολίας 40-50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1} με την χρήση λευκών (cool white) λαμπών

φθορισμού. Αντίστοιχα τα κύτταρα *Botryococcus braunii* αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό BGM σε κωνικές φιάλες. Η ανάδευση γινόταν με ανακίνηση της φιάλης 2 φορές την ημέρα και η ανάπτυξη συνεχίστηκε έως 20 μέρες. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία δωματίου 25±1°C και υπό ένταση ακτινοβολίας 20-25 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1} με τη χρήση λευκών (cool white) λαμπών φθορισμού. Οι υγρές καλλιέργειες αυτές αποτέλεσαν μητρικές καλλιέργειες για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Παρακάτω παρουσιάζονται σε πίνακες τα συστατικά των θρεπτικών που χρησιμοποιήθηκαν

Πίνακας 2.1. Συστατικά του υγρού θρεπτικού BG11 (pH=7.5).

Διαλύματα	**Ποσότητα θρεπτικών ανά λίτρο καλλιέργειας**
BG11 χωρίς Fe, φωσφορικά και ανθρακικά	10(mL)
$(NH_4)_5[Fe(C_6H_4O_7)_2]$	1(mL)
Na_2CO_3	1(mL)
K_2HPO_4	1(mL)
NaH_2PO_4*	50(mL)

*Το ρυθμιστικό διάλυμα προστίθεται στο θρεπτικό μετά την αποστείρωση

Πίνακας 2.2 Συστατικά του BG11 χωρίς Fe, φωσφορικά και ανθρακικά.

Συστατικά του BG11 χωρίς Fe, φωσφορικά και ανθρακικά	**Συγκέντρωση των συστατικών στο διάλυμα**
$NaNO_3$	149,60 (g/L)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,49 (g/L)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	3,60 (g/L)

Κιτρικό οξύ	0,6 (g/L)
NaEDTA pH 8.0 0.25M	1,12 (ml/L)
Ιχνοστοιχεία	100 (ml/L)

Πίνακας 2.3. Συστατικά διαλύματος των ιχνοστοιχείων.

Ιχνοστοιχεία	**Συγκέντρωση στο διάλυμα (g/L)**
H_3BO_3	28,6
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	18,1
$ZnSO_4 \cdot 4H_2O$	2,22
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	3,9
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,79
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,494

Πίνακας 2.4. Συστατικά των ουσιών αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα (g/L)**
$(NH_4)_5[Fe(C_6H_4O_7)_2]$	6,0
Na_2CO_3	20,0
K_2HPO_4	30,5
NaH_2PO_4*	70,0

Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε με NaOH έως το pH=7,5.

Πίνακας 2.5. Συστατικά του υγρού θρεπτικού BGM pH=7,0

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα**

KNO_3	0,75 (g/L)
$CaCl_2 \cdot H_2O$	0,038 (g/L)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,075 (g/L)
K_2HPO_4	0,075 (g/L)
KH_2PO_4	0,175 (g/L)
Na_2CO_3	0,02 (g/L)
Βιταμίνη B12	$0.15x10^{-6}$(g/L)
Hutner's Trace Metals	1(mL/L)
$(NH_4)_5[Fe(C_6H_4O_7)_2]$	0.0335 (g/L)

Το pH του θρεπτικού ρυθμίζεται στα 7,00. Η δημιουργία διαλύματος βιταμίνης B12 πραγματοποιήθηκε αφού διαλύθηκε σε υπερκάθαρο (nanopure) νερό και το διάλυμα φιλτράρεται μέσω ενός φίλτρου σύριγγας 0,2 μm. Η προσθήκη της βιταμίνης B12 προστέθηκε στο θρεπτικό μετά την αποστείρωση και μετά που θα έχει επιστρέψει το θρεπτικό σε θερμοκρασία δωματίου και υπό αποστειρωμένες συνθήκες.

Πίνακας 2.6. Συστατικά διαλύματος ιχνοστοιχείων (*Hutner's Trace Metals).*

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα (g/L)**
EDTA	50,00
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	4,99
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	22,00
H_3BO_3	11,40
$MnCl_2 \cdot H_2O$	5,06
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1,57
$Mo_7O_{24}(NH_4)_6 \cdot 4H_2O$	1,10
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,61

Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε με KOH έως το pH=6,5

Παράλληλα για το μικροφύκος εκτός το θρεπτικό BGM δοκιμάστηκαν και ορισμένες παραλλαγές. Πιο συγκεκριμένα δοκιμάστηκε η γλυκόζη ως οργανική πηγή άνθρακα. Σε αποστειρωμένο περιβάλλον και παρουσία φλόγας παρασκευάστηκε διάλυμα γλυκόζης συγκέντρωσης 1M με διαλύτη αποστειρωμένο νερό, το οποίο στη συνέχεια φιλτραρίστηκε μέσω ενός φίλτρου σύριγγας 0,2 μm. Η τελική συγκέντρωση της γλυκόζης στις καλλιέργειες ήταν 17,5 mM και 8,75 mM. Επιπλέον στο θρεπτικό BGM δοκιμάστηκε η προσθήκη εκχυλίσματος χώματος(10ml/L soil extract) πλούσιο σε οργανική πηγή άνθρακα αζώτου και φωσφόρου. Τέλος επιλέχθηκε να δοκιμαστεί θρεπτικό BGM με διπλάσια συγκέντρωση φωσφορικών.

Πίνακας 2.7. Συστατικά του διαλύματος Soil extract.

Συστατικά	**Συγκέντρωση**
Εμπορικό χώμα φύτευσης	75(g/L)
$NaHCO_3$	8,4(g/L)
CH_3COOH	5,7 (ml/L)
NH_4HCO_3	7,9 (g/L)

Όλα τα θρεπτικά μέσα και τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν είχαν προηγουμένως αποστειρωθεί σε αυτόκαυστο στους 120°C για 20-30 min για την αποφυγή μολύνσεων από άλλους μικροοργανισμούς. Όλα τα πειράματα παρασκευής καλλιεργειών διεξήχθησαν σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow hood), ο οποίος είχε προηγουμένως αποστειρωθεί με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας και αιθανόλη. Τα πειράματα έλαβαν χώρα παρουσία φλόγας.

2.3.2. Παρασκευή καλλιεργειών για μελέτη ανάπτυξης των μικροοργανισμών

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν από τη μητρική καλλιέργεια με φυγοκέντριση στα 6000rpm για 10 λεπτά. Έπειτα επαναιωρήθηκαν στο νέο θρεπτικό της καλλιέργειας και κατανεμήθηκαν σε κλειστές κωνικές φιάλες με χωρητικότητα όγκου 250 mL. Ο τελικός όγκος καλλιέργειας που προστέθηκε στην κωνική ήταν 200 mL για τα *Anabaena* και 120mL για τα *Botryococcus braunii*. Η κυτταρική συγκέντρωση για τα κύτταρα *Anabaena* προσαρμόστηκε ώστε να έχει οπτική πυκνότητα, OD=0,3 στα 750nm. Τα πειράματα με το μικροοργανισμό *Botryococcus braunii* ξεκίνησαν με κυτταρική συγκέντρωση ίση με 0,11g/L καλλιέργειας, η οποία υπολογίστηκε υπολογίστηκε μέσω του ξηρού βάρους των κυττάρων της μητρικής καλλιέργειας. Οι κωνικές φιάλες που περιείχαν καλλιέργειες του *Botryococcus braunii* κλείστηκαν με γάζα και βαμβάκι. Οι καλλιέργειες των *Anabaena* κλείστηκαν με παρόμοιο τρόπο και εφαρμόστηκε συνεχής αερισμός μέσω γυάλινης πιπέτας (ο αέρας φιλτράρεται από βαμβάκι για την αποφυγή μόλυνσης της καλλιέργειας). Οι καλλιέργειες του μικροοργανισμού *Botryococcus braunii* αναπτύχθηκαν για 20 ημέρες σε δωμάτιο σταθερής θερμοκρασίας 25±1°C υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 20-25 μmol φωτονίων·m-^{2}·s^{-1}. Οι καλλιέργειες για το μικροοργανισμό *Anabaena* αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 29±1°C για 7 ημέρες υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 40-50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s. Στον πίνακα 2.8 συνοψίζονται τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων για τον μικροοργανισμό *Botryococcus braunii*. Για τον μικροοργανισμό *Anabaena* χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο BG11. Κάθε πειραματική σειρά επαναλήφθηκε τρεις φορές συνολικά.

Πίνακας 2.8. Θρεπτικά μέσα που δοκιμάστηκαν για την ανάπτυξη του *Botryococcus braunii*

Θρεπτικά
BGM
BGM+soil extract
BGM με διπλάσια συγκέντρωση φωσφορικών
BGM+0,0175M γλυκόζη
BGM+0,00875M γλυκόζη

2.3.3. Δειγματοληψία και μετρήσεις ανάπτυξης

Η κυτταρική ανάπτυξη για το στέλεχος *Anabaena* μελετήθηκε μέσω μέτρησης οπτικής πυκνότητας και μέτρηση του ξηρού βάρους των κυττάρων, ενώ για το μικροοργανισμό *Botryococcus braunii* μετρήθηκε μόνο το ξηρό βάρος. Πιο συγκεκριμένα, για τη μέτρηση του ξηρού βάρους των καλλιεργειών, ελήφθησαν 10 mL καλλιέργειας από την καλλιέργεια, φυγοκεντρηθήκαν και η βιομάζα ξεπλήθηκε με απιονισμένο νερό για την απομάκρυνση αλάτων. Έπειτα έγινε επαναιώρηση των κυττάρων σε 1 mL απιονισμένο νερό και μεταφέρθηκαν σε προζυγισμένα ξηρά πιατάκια αλουμινίου, τα οποία τοποθετήθηκαν σε φούρνο στους 80°C για 14 ώρες. Το ξηρό βάρος μετρήθηκε καθημερινά για τις καλλιέργειες του στελέχους *Anabaena*, ενώ κάθε 4 ημέρες για το στέλεχος *Botryococcus braunii*. Για την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας(OD) χρησιμοποιήθηκε ένα φασματοφωτομέτρου υπεριώδους- ορατού (Shimadzu UV-2700). Οι δειγματοληψίες μετρήσεων πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο

νηματικής ροής αέρα παρουσία φλόγας που προηγουμένως είχε απολυμανθεί με αιθανόλη

2.3.4. Μετρήσεις οπτικού μικροσκοπίου.

Για την παρατήρηση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το οπτικό μικροσκόπιο Nikon Eclipse E800. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση ενός ελαιοβυθιζόμενου αντικειμενικού φακού Plan Apo 60x και η λήψη των φωτογραφιών πραγματοποιήθηκε με χρήση μίας CCD κάμερας ProgRes CF.

2.3.5. Παρατήρηση λιπιδίων μέσω της ουσίας Nile red στον μικροοργανισμό Botryococcus braunii.

Για την παρατήρηση των λιπιδίων χρησιμοποιήθηκε η λιπόφιλη χρωστική Nile red(ονομασία κατά IUPAC 9-διαιθυλαμινο-5-βενζο[α]φαινοξαζινόνης) η οποία συνδέεται ομοιοπολικά στα λιπίδια των κυττάρων [74]. Διάλυμα Nile red παρασκευάστηκε συγκέντρωσης 1 (μg/mL) σε αιθανόλη και πραγματοποιήθηκε παρόμοια διαδικασία με αυτή της βιβλιογραφίας [75]. Πιο συγκεκριμένα σε ποσότητα καλλιέργειας 400μL τοποθετήθηκε χρωστική Nile red ώστε να έχει τελική συγκέντρωση στο διάλυμα 0,2 (μg/mL). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε βίαιη ανάδευση για 2 min και η καλλιέργεια τοποθετήθηκε στο σκοτάδι για 10 min. Έπειτα η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε ώστε να αφαιρεθεί περισσευούμενο διάλυμα. Χρησιμοποιήθηκε το οπτικό μικροσκόπιο όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.3.5. Για τη μικροσκοπία φθορισμού η διέγερση προκλήθηκε από μια λάμπα UV και χρησιμοποιήθηκε ένα φίλτρο B-2A που επιτρέπει μόνο μήκη κύματος εύρους 450-490nm. Η εκπομπή του φθορισμού από το Nile red δείχνει με κίτρινο χρώμα τα μη πολικά λιπίδια και με κόκκινο τα πολικά [75].

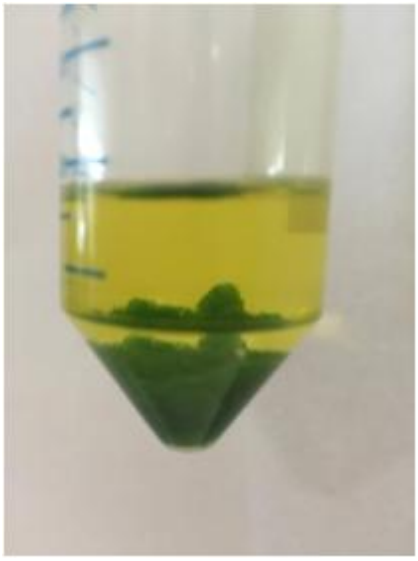
2.3.6. Παρατήρηση του μικροοργανισμού Botryococcus braunii με χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)

Για την παρατήρηση με ηλεκτρονική μικροσκοπία, τα κύτταρα αρχικά υπέστησαν δύο δεκάλεπτες πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα διμεθυλαρσινικού νατρίου (sodium cacodylate buffer, SCB) συγκέντρωσης 0,1 M και pH=7,4. Έπειτα μονιμοποιήθηκαν με χρήση διαλύματος 2% w/v γλουταραλδεΰδης (GDA) και 2% w/v παραφορμαλδεΰδης (PFA) σε διάλυμα SCB συγκέντρωσης 0,08 M και pH=7,4 για 45 λεπτά. Οι μονιμοποιητές απομακρύνθηκαν με δύο δεκάλεπτες πλύσεις με διάλυμα SCB 0,1 M και pH=7,4. Έπειτα τα κύτταρα υπέστησαν αφυδάτωση χρησιμοποιώντας διαδοχικές δεκάλεπτες πλύσεις με 30%, 50%, 70%, 90% και 100% αιθανόλη. Κατά τη διάρκεια της κάθε πλύσης τα δείγματα φυλάσσονταν σε θερμοκρασία 4°C. Έπειτα πλύθηκαν με ξηρή αιθανόλη για 10 λεπτά και υπέστησαν ξήρανση με χρήση μίας συσκευής ξήρανσης κρίσιμου σημείου του διοξειδίου του άνθρακα (BAL-TEC, CPD 030 Critical Point Dryer) προκειμένου να αφυδατωθούν πλήρως. Έπειτα τα δείγματα επικολλήθηκαν σε ύαλο με χρήση αγώγιμης ταινίας άνθρακα (carbon tape) και επικαλύφθηκαν με πάχος 20 nm χρυσό με χρήση ενός Sputter Coater (SCD 050) της BAL-TEC προκειμένου να γίνουν ηλεκτρικά αγώγιμα. Η παρατήρηση στο SEM πραγματοποιήθηκε σε διαφορά δυναμικού δέσμης ηλεκτρονίων 20 kV.

2.3.7. Διαδικασία εκχυλίσεως του σκουαλενίου από Anabaena

Για να επιτευχθεί η εκχύλιση του σκουαλενίου από τα κύτταρα Ana*baena* θα πρέπει πρώτα να επιτευχθεί το σπάσιμο των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, γνωστή ποσότητα λυοφιλοποιημένης μάζας κυττάρων τοποθετήθηκε σε ένα φιαλίδιο eppendorf χωρητικότητας 2 mL με 500 μL καθαρού επτανίου. Το πρωτόκολλο που πραγματοποιήθηκε είναι τροποποιημένο από την αναφορά [44]. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η χρήση μιας συσκευής υπερήχων με λεπτή βελόνα με amplitude 90% για 8 λεπτά. Πραγματοποιήθηκαν κύκλοι χρόνου 30 δευτερόλεπτα υπέρηχοι και 30 δευτερόλεπτα παύσης ώστε να μην υπερθερμανθεί το δείγμα. Παράλληλα το δείγμα

ήταν τοποθετημένο σε ποτήρι με πάγο για να την αποφυγή υπερθέρμανσης. Μετά το πέρας του χρόνου των 8 λεπτών ακολούθησε σπάσιμο των κυττάρων με γυάλινα σφαιρίδια 0.5 mm διαμέτρου. Στο φιαλίδιο eppendorf τοποθετήθηκαν 1.5gr γυάλινων σφαιριδίων και ακολούθησε βίαιη ανακίνηση για 20 λεπτά. Μέσω του οπτικού μικροσκοπίου παρατηρήθηκε η επιτυχής λύση των κυττάρων. Μετά το πέρασμα του χρόνου η ποσότητα του δείγματος μαζί με τα γυάλινα σφαιρίδια τοποθετήθηκαν σε ένα σωλήνα (falcon) χωρητικότητας 50 mL με επιπλέον 9 mL διαλύτη καθαρού επτανίου. Το δείγμα δέχεται βίαιη ανακίνηση για 5 λεπτά.



Εικόνα 2.1. Φωτογραφία από την διαδικασία εκχύλισης.

Συλλέχθηκε το υπερκείμενο και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία έως ότου το διάλυμα να είναι διαυγές. Στη συνέχεια συλλέχθηκαν τα οργανικά κλάσματα και προστέθηκαν 10 mL υδατικού διαλύματος 10% w/v NaCl με σκοπό τη δημιουργία 2 φάσεων για να διαχωριστούν οι άπολες με τις πολικές ενώσεις. Πραγματοποιήθηκε βίαιη ανακίνηση για 2 λεπτά και το διάλυμα αφέθηκε σε ηρεμία για 5 λεπτά. Η οργανική φάση συλλέχθηκε και συμπυκνώθηκε έως ξηρού σε απόσταξη υπό κενό και επαναιωρήθηκε σε 2mL διαλύτη επτάνιο. Το δείγμα αποθηκεύτηκε στους -20 ^{o}C. Η ίδια διαδικασία εκχύλισης ακολουθήθηκε και με διαλύτη εξάνιο αντί για επτάνιο καθώς είναι πιο συμβατός στην αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας.

2.3.8. Διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος

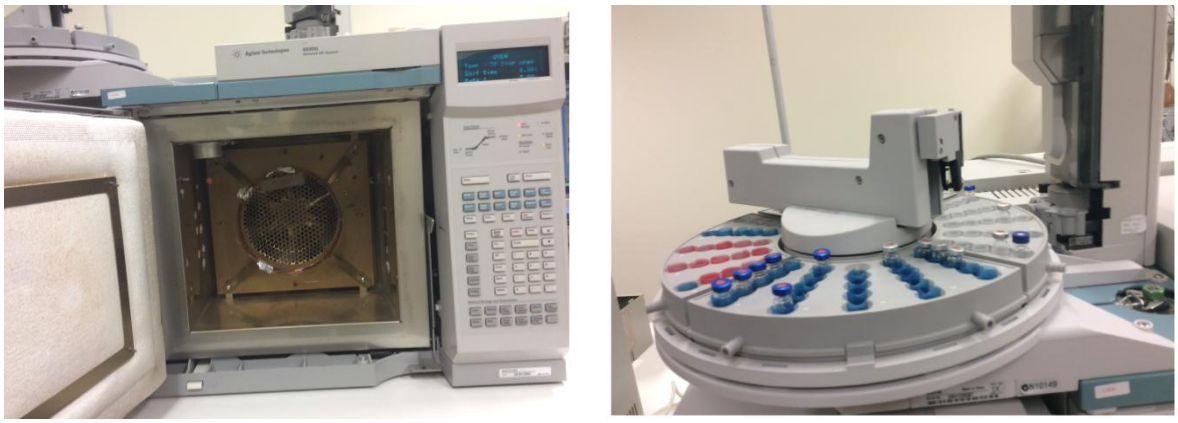
Ο διαχωρισμός των συστατικών του συμπυκνωμένου έγινε χρωματογραφία κολώνας με πληρωτικό υλικό silica gel 60 F254. Η κολώνα πακεταρίστηκε με διαλύτη επτάνιο. Χρησιμοποιήθηκαν οι διαλύτες επτάνιο , διχλωρομεθάνιο και οξικός αιθυλεστέρας για τη συλλογή των διαφορετικών κλασμάτων. Στην αντίστοιχη περίπτωση που η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με διαλύτη εξάνιο χρησιμοποιήθηκε το εξάνιο αντί για το επτάνιο [76].

Εικόνα 2.2. Η κολώνα που χρησιμοποιήθηκε γυάλινη πιπέτα Pasteur.

Στα κλάσματα που ελήφθησαν από τη χρωματογραφία κολώνας πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Η στατική φάση ήταν silica gel 60 F254 ενώ η κινητή φάση ήταν εξάνιο. Για την εμφάνιση των λιπιδίων πραγματοποιήθηκε χρώση του πλακιδίου με υπερμαγγανικό κάλιο και έπειτα θέρμανση στους 120 ^{o}C για 10 λεπτά [76].

2.3.9. Ταυτοποίηση σκουαλενίου μέσω της αέριας χρωματογραφίας συνεζευγμένης με φασματομετρία μάζας (GC-MS).

Τα κλάσματα για τα οποία υπήρχε ένδειξη για την ύπαρξη σκουαλενίου αναλύθηκαν μέσω αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (Agilent 6890 GC). Η κολώνα που χρησιμοποιήθηκε ήταν DB-5ms και είχε διαστάσεις 0.25mm * 30m * 0.25μm. Αρχική θερμοκρασία του GC ήταν 130°C και η θερμοκρασία του φούρνου αυξανόταν 20°T/min μέχρι να φτάσει στους 270°C. Έπειτα η θερμοκρασία αυξανόταν με ρυθμό 4 ^{o}C/min έως τους 300 ^{o}C και σε αυτή τη θερμοκρασία παρέμεινε για 5 λεπτά. Το φέρον αέριο ήταν ήλιο με ροή 1,3mL/min [43]. Η προσθήκη του δειγμάτος έγινε με βελόνα 1μL front inlet (SPLIT). Ο Θερμαντήρας γραμμής μεταφοράς είχε σταθερή θερμοκρασία στους 280°C. Φάσματα μάζας αναλύθηκαν στην περιοχή των μονάδων μάζας ατόμων 40-550. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε είναι τροποποιημένο από την αναφορά [77].

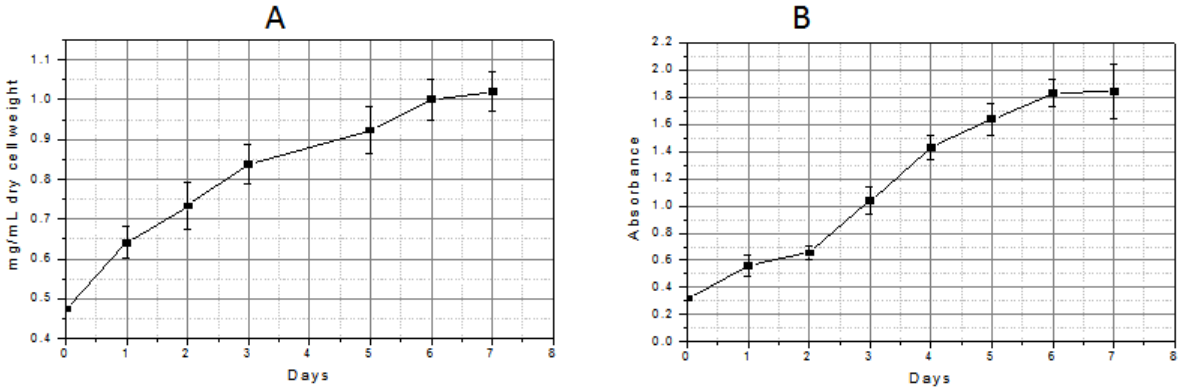


Εικόνα 3.3. Το όργανο GC-MS που χρησιμοποιήθηκε.

2.4 Αποτελέσματα και Συζήτηση

2.4.1 Σύγκριση της ανάπτυξης των δύο μικροοργανισμών

Σε αυτή την πειραματική σειρά μελετήθηκε η ανάπτυξη των 2 μικροοργανισμών σε διαφορετικές συνθήκες με στόχο να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξής τους. Για το κυανοβακτήριο *Anabaena* χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο BG11 καθώς είναι το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιούν για την ανάπτυξη των περισσότερων κυανοβακτηρίων . Όπως φαίνεται και από τα διαγράμματα της εικόνας 2.4, η ανάπτυξη μετρήθηκε μέσω της οπτικής πυκνότητας (εικόνα 2.4 διάγραμμα Α) και την μέτρηση του ξηρού βάρους (εικόνα 2.4 διάγραμμα Β). Επίσης φαίνεται ότι η καλλιέργεια φτάνει την έβδομη μέρα στην στατική φάση. Παράλληλα στην εικόνα 2.5 φαίνεται η καλλιέργεια την έβδομη μέρα.



Εικόνα 2.4. Στο διάγραμμα Α φαίνεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού εκφρασμένη ως το ξηρό βάρος των κυττάρων συναρτήσει χρόνου για χρονικό διάστημα 7 ημερών. Στο διάγραμμα Β παρουσιάζεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού εκφρασμένη ως την OD της καλλιέργειας σε μήκος κύματος 750nm συναρτήσει χρόνου σε διάστημα 7 ημερών.

Εικόνα 2.5. Στην εικόνα φαίνεται το χρώμα της καλλιέργειας μετά το πέρας των 7 πειραματικών ημερών, με θρεπτικό μέσο BG11.

Όσο αναφορά το μικροοργανισμό *Botryococcus braunii* δοκιμάστηκαν διάφορα θρεπτικά με στόχο να βρεθούν οι ταχύτερες συνθήκες ανάπτυξης. Από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι αυτός ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται με αργό ρυθμό. Για αυτόν τον λόγο χρησιμοποιήθηκε μια πηγή άνθρακα όπως η γλυκόζη με σκοπό να αυξήσει την ανάπτυξη της καλλιέργειας. Η γλυκόζη είναι μια πολύ σημαντική πηγή άνθρακα που ο μικροοργανισμός μπορεί να την χρησιμοποιήσει είτε για την διασπάσει σε μικρότερα μόρια όπως το πυροσταφυλικό και μέσω των μιτοχονδρίων να παράξει υψηλές ποσότητες ATP (Τριφωσφορική αδενοσίνη), είτε να την αποθηκεύσει σχηματίζοντας αποθήκες αμύλου (αποτελείται από μονομερή γλυκόζης) [78]. Ενέργεια που είναι απάραιτητη για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Έχει βρεθεί με αναζήτηση στην βιβλιογραφία ότι και άλλα μικροφύκη όπως το *Chlamydomonas reinhardtii* μπορεί να χρησιμοποιήσει αποτελεσματικά την γλυκόζη για την ανάπτυξή του [79]. Επιπλέον δοκιμάστηκε η προσθήκη διπλάσιας συγκέντρωσης φωσφορικών αλλά και ένα εκχύλισμα χώματος το οποίο περιέχει υψηλές ποσότητες φωσφορικών αλλά και νιτρικών ιόντων. Ο βασικός λόγος που δοκιμάστηκαν ήταν επειδή τα φωσφορικά και τα νιτρικά ιόντα αποτελούν βασικά συστατικά για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών

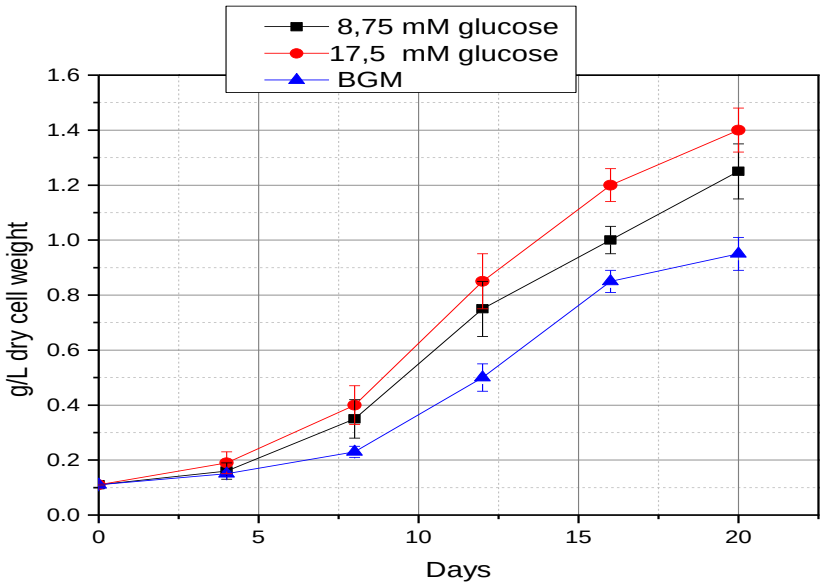
αυτών [80]. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα θρεπτικά μέσα στα οποία καλλιεργήθηκε το μικροφύκος.

Πίνακας 2.9. Τα θρεπτικά που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη ανάπτυξης του μικροφύκους.

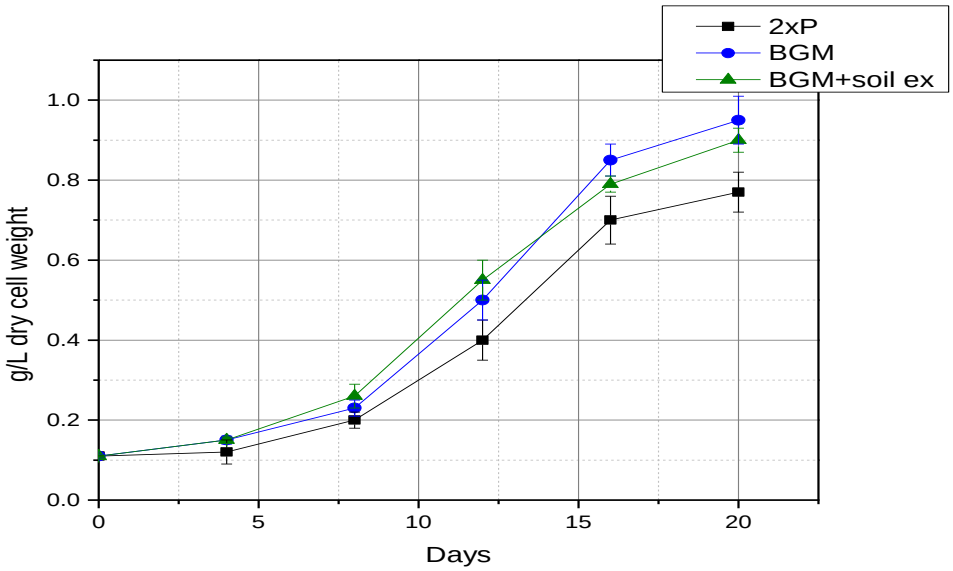
Θρεπτικά μέσα
BGM
BGM+εκχύλισμα χώματος
BGM +0,0175M γλυκόζης
BGM+0,00875M γλυκόζης
BGM με διπλάσια συγκέντρωση φωσφορικών

Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού μετρήθηκε με την μέθοδο της ξηρής μάζας. Η παρουσία των εξωκυττάριων λιπιδίων αποδείχθηκε ότι αυξάνει τις τιμές απορρόφησης, καθιστώντας τις μετρήσεις οπτικής πυκνότητας λιγότερο αξιόπιστες από τις μετρήσεις ξηρού βάρους [81]. Παράλληλα όπως φαίνεται στις εικόνες 2.6 και 2.7. ο χρόνος ανάπτυξης του μικροφύκους ήταν σημαντικά μεγαλύτερος σε σχέση με αυτή του κυανοβακτηρίου, γεγονός οφείλεται στη συσσώρευση λιπιδίων του *Botryococcus braunii* που καθυστερεί τον χρόνο διπλασιασμού του [82]. Όπως φαίνεται και από το διάγραμμα της εικόνα 2.6 η αυξανόμενη συγκέντρωση της γλυκόζης ως πηγή άνθρακα στο θρεπτικό μέσο μπορεί να αυξήσει σημαντικά την ανάπτυξη του μικροφύκους. Καθώς η ξηρή μάζα της καλλιέργειας μάρτυρα (BGM) έφτασε σε 0,95 g/L ενώ στην καλλιέργεια με την προσθήκη γλυκόζης (17,5 mM) είχε φτάσει σε αυτήν την συγκέντρωση της ξηρής βιομάζας κοντά την 16η μέρα. Παράλληλα φαίνεται ότι με την προσθήκη γλυκόζης αυξάνεται και η μέγιστη βιομάζα στον ίδιο χρόνο σε σχέση με αυτή του BGM . Επιπλέον στο διάγραμμα της εικόνα 2.8 παρατηρήθηκε ότι η καλλιέργεια με την προσθήκη εκχυλίσματος χώματος, το οποίο είναι πλούσιο σε φωσφορικά και νιτρικά, δεν βελτίωσε την ανάπτυξη του μικροοργανισμού καθώς είχε παρόμοια ανάπτυξη με την καλλιέργεια μάρτυρα. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός η συγκέντρωση αλλά και οι διαφορετικές μορφές αλάτων στις οποίες εμφανίζονται τα φωσφορικά και νιτρικά μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού [83]. Η σύσταση του χώματος μπορεί

να ήταν υψηλή σε φωσφορικά και νιτρικά ιόντα αλλά είναι εξίσου σημαντικό στην μορφή με την οποία βρίσκονται όπως έχει αποδειχτεί και στην βιβλιογραφία [83]. Παράλληλα ο διπλασιασμός της συγκέντρωσης των φωσφορικών στο θρεπτικό μέσο δεν οδήγησε αύξηση της βιομάζας της καλλιέργειας. Στο διάγραμμα 2.7 φαίνεται ότι η προσθήκη διπλάσιας συγκέντρωσης φωσφορικών μείωσε την ανάπτυξη της καλλιέργειας. Ένας πιθανός λόγος είναι ότι μπορεί να προέκυψε υπερκορεσμός στο διάλυμα από τα φωσφορικά ιόντα και να λειτούργησε αρνητικά στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Κατά συνέπεια, λόγω της αργής ανάπτυξης του *Botryococcus braunii* κρίθηκε αναγκαία η μελέτη για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση του σκουαλένιου από ένα μικροοργανισμό όπως το κυανοβακτήριο του στελέχους *Anabaena* που μεγαλώνει ταχύτερα.



Εικόνα 2.6. Η ανάπτυξη του *Botryococcus braunii* με προσθήκη γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο BGM. Η ανάπτυξη του μικροργανισμού μελετήθηκε για συνολικό διάστημα 20 ημερών.

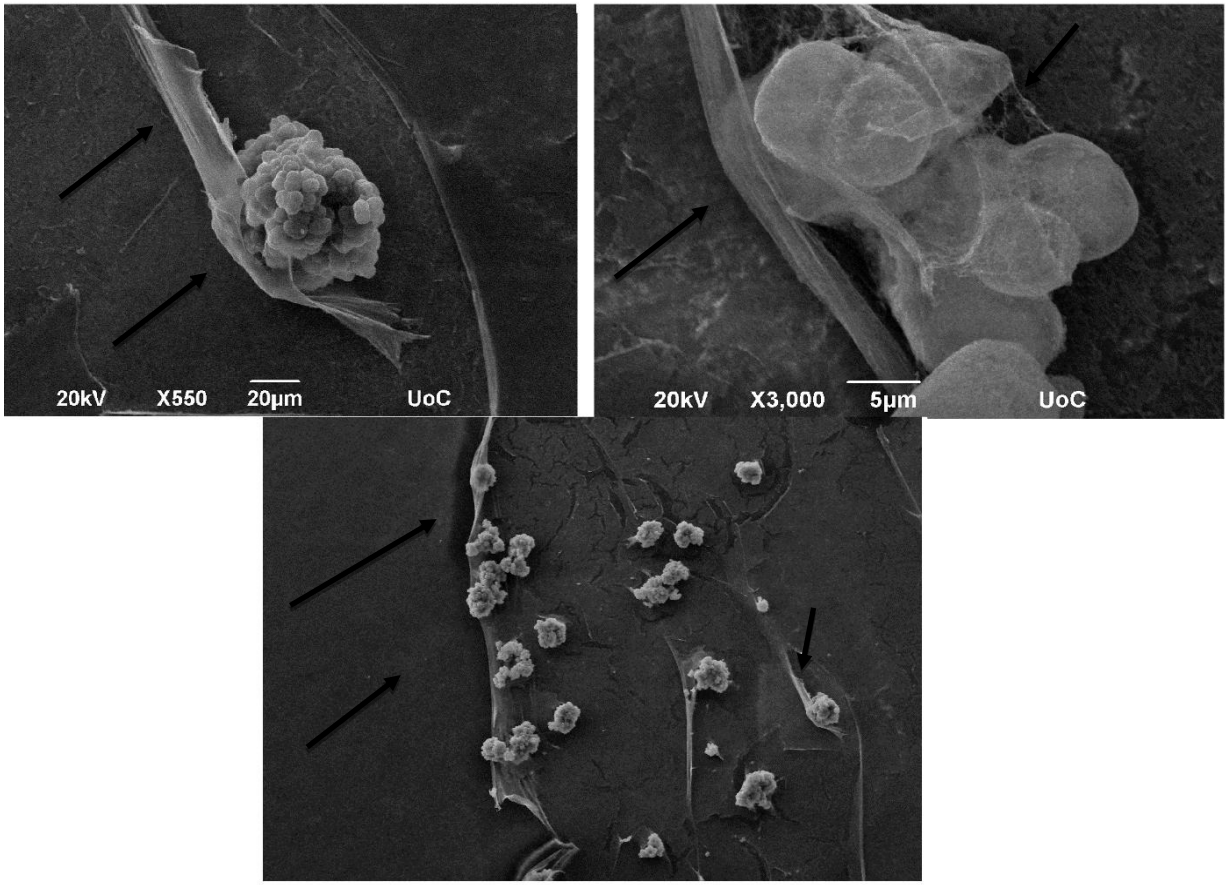


Εικόνα 2.7. Η ανάπτυξη του *Botryococcus braunii* σε τροποποιημένα θρεπτικά μέσα με βάση το θρεπτικό μέσο BGM. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι συνθήκες με διπλάσια συγκέντρωση φωσφορικών από αυτή του BGM αλλά και η προσθήκη ενός εκχυλίσματος χώματος στο θρεπτικό μέσο BGM Η ανάπτυξη του μικροργανισμού μελετήθηκε για συνολικό διάστημα 20 ημερών.

2.4.2. Ποιοτική μελέτη της παραγωγής λιπιδίων από το μικροφύκος *Botryococcus braunii* με χρήση οπτικής μικροσκοπίας και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης

Στη βιβλιογραφία, το μικροφύκος *Botryococcus braunii* έχει βρεθεί ότι παράγει μεγάλες ποσότητες υδρογονανθράκων, οι οποίοι έχουν εφαρμογή ως βιοκαύσιμα. Μέχρι το 75% του ξηρού βάρους του μικροφύκους μπορεί να είναι υδρογονάνθρακες μακράς αλυσίδας [22]. Σε σύγκριση με άλλα είδη φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών, το *Botryococcus braunii* έχει ένα σχετικά παχύ κυτταρικό τοίχωμα που συσσωρεύεται από προηγούμενες κυτταρικές διαιρέσεις, καθιστώντας δύσκολη την εκχύλιση κυτταροπλασματικών συστατικών. Ένα σημαντικό μέρος των πολύτιμων υδρογονανθράκων βρίσκεται εκτός του κυττάρου, λειτουργώντας ως ένα βιολογικό

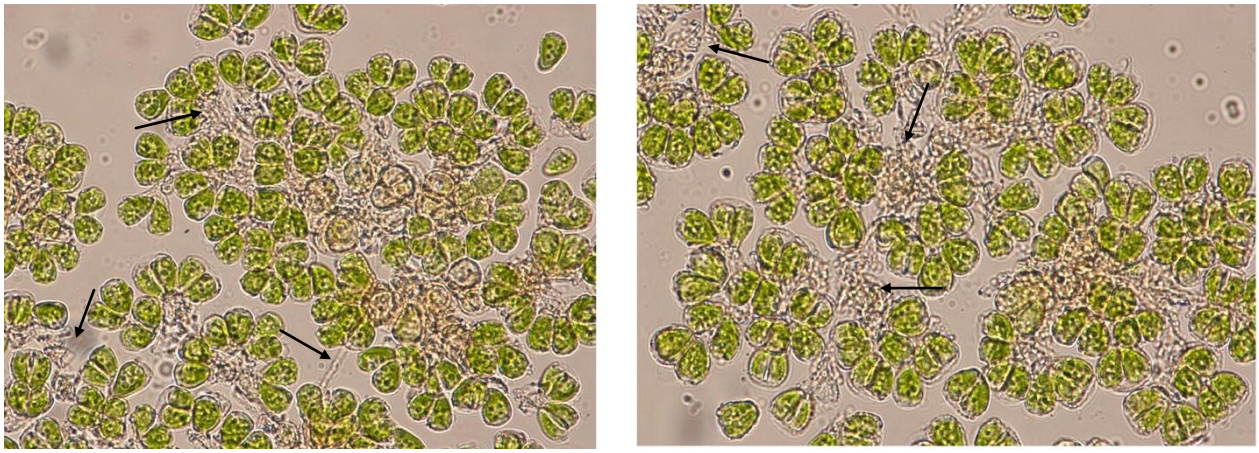
υμένιο (biofilm) για τη συσσωμάτωση μεμονωμένων κυττάρων σε αποικίες [84]. Αυτό επιβεβαιώθηκε από τις φωτογραφίες SEM. Στην εικόνα 2.8 μπορεί φαίνονται τα βιολογικά υμένια (biofilm) που είναι ο κύριος παράγοντας για την δημιουργία μικροαποικιών και την συσσώρευση λιπιδίων.



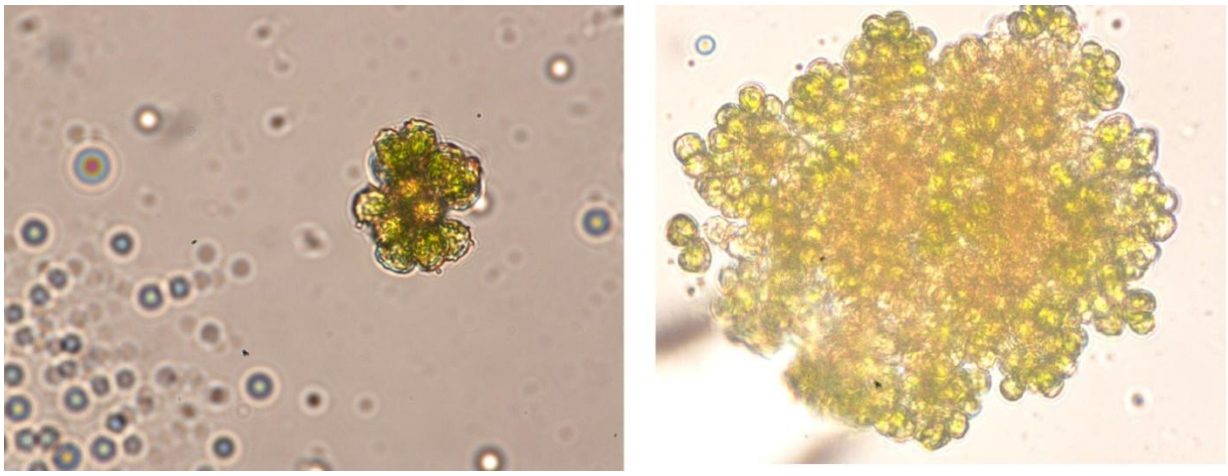
Εικόνα 2.8. Φωτογραφίες SEM στο *Botryococcus braunii*. Στις φωτογραφίες τα βέλη δείχνουν τα βιολογικά υμένια(biofilm) που είναι ο κύριος παράγοντας για την δημιουργία μικροαποικιών και την συσσώρευση λιπιδίων.

Επίσης παρατηρήθηκε ότι στις καλλιέργειες μάρτυρα στο διάστημα των 20 ημερών το χρώμα της καλλιέργειας ήταν πράσινο (εικόνα 2.9.), ενώ στην καλλιέργεια που περιείχε εκχύλισμα χώματος το χρώμα ήταν κίτρινο (εικόνα 2.10). Μια πιθανή εξήγηση για το κίτρινο χρώμα της καλλιέργειας οφείλεται κυρίως στη συσσώρευση εχινενόνης (echinenone) στο διακυτταρικό πλέγμα. Επίσης συσσωρεύονται σημαντικές ποσότητες

μποτρυοξανθινών και μπραουνιξανθινών (botryoxanthins, braunixanthin), οι οποίες είναι καροτενοειδή και προσδίδουν μια κόκκινη απόχρωση στο μικροφύκος όπως έχει εξηγηθεί στην βιβλιογραφία [85].



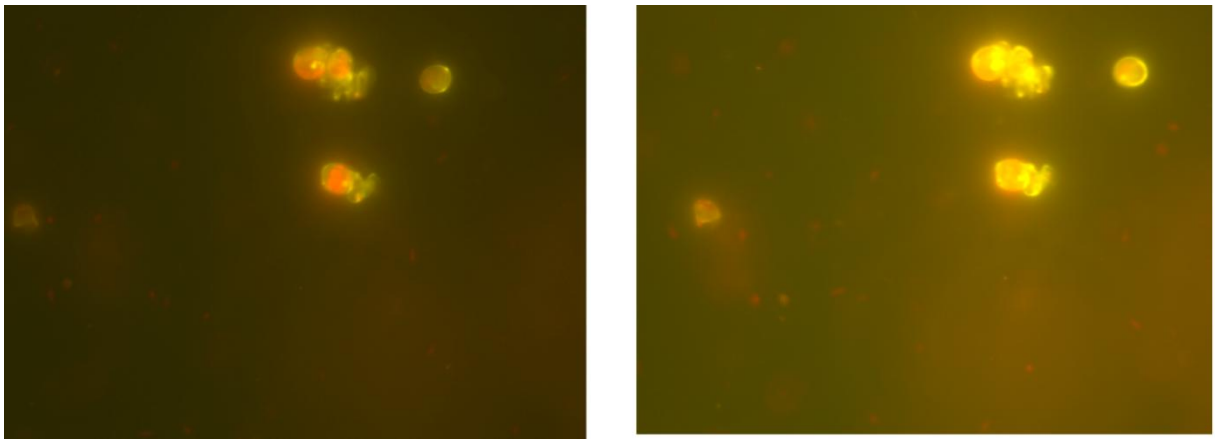
Εικόνα 2.9. Καλλιέργεια μάρτυρα μετά το πέρας των 20 ημερών. Στην εικόνα μπορούν να φανούν με βέλη τα εξωκυττάρια λιπίδια.



Εικόνα 2.10. Καλλιέργεια *Botryococcus braunii* με θρεπτικό BGM+εκχύλισμα χώματος μετά το πέρας των 20 ημερών.

Έπειτα έγινε χρώση με τη λιπόφιλη χρωστικέ Nile red η οποία προσδένεται ομοιοπολικά στα λιπίδια. Το χαρακτηριστικό αυτης της χρωστικής είναι ότι όταν διεγείρεται με με κατάλληλη ακτινοβολία, φθορίζει και γίνονται διακριτά τα λιπίδια στα

οποία προσδένεται. Στην εικόνα 2.11.είναι φανερά με κίτρινο χρώμα τα ουδέτερα λιπίδια ενώ με κόκκινο τα πολικά [74].

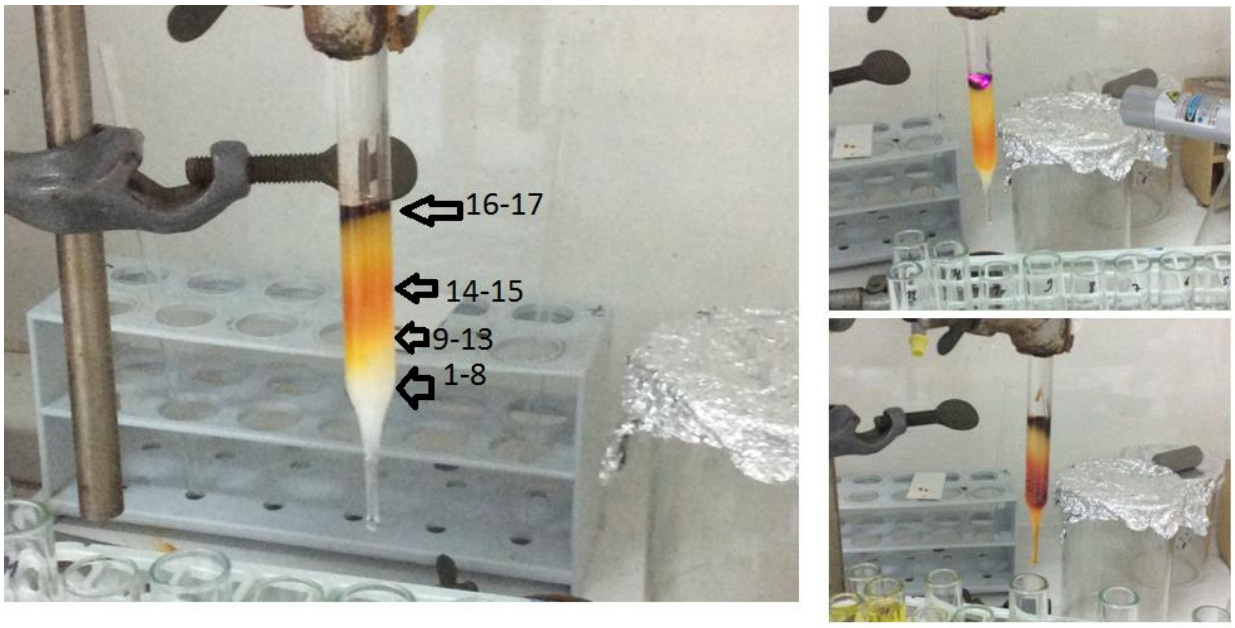


Εικόνα 2.11. Εικόνες μικροσκοπίας φθορισμού μετά από χρώση με Nile red. Στην εικόνα φαίνονται τα εξωκυττάρια λιπίδια που συσσωρεύονται ανάμεσα από τα κύτταρα αλλά και τα λιπίδια εσωτερικά των κυττάρων. Το κίτρινο χρώμα αναφέρεται στα άπολα λιπίδια ενώ το κόκκινο στα πολικά.

2.4.3. Αποτελέσματα χρωματογραφία στήλης

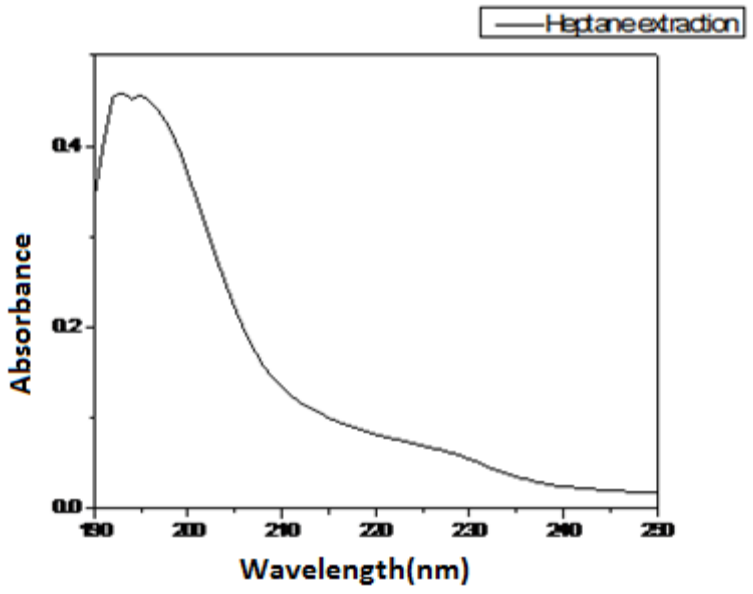
Το σκουαλένιο είναι είναι ενα τριτερπένιο με συντακτικό τύπο $C_{30}H_{50}$ με υψηλή διαλυτότητα στους διαλύτες εξάνιο και επτάνιο. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί καθαρισμός του σκουαλενίου σε κολώνα με πληρωτικό υλικό silica gel 60 F254 και διαλύτη έκλουσης 1% διαιθυλαιθέρα σε πετρελαϊκό αιθέρα[86]. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες έκλουσης το εξάνιο και το επτάνιο αντίστοιχα. Κατα τη διάρκεια της χρωματογραφίας στήλης που πραγματοποιήθηκε λήφθηκαν 4 διαφορετικά κλάσματα. Τα κλάσματα από 1-8 εκλούχθηκαν με εξάνιο (χρησιμοποιήθηκε διαλύτης επτάνιο στο βήμα αυτό για τη λήψη φάσματος στο υπεριώδες) και δεν είχαν χρώμα. Τα κλάσματα από 9-13 εκλούχθηκαν ομοίως με εξάνιο και είχαν κίτρινο χρώμα, το οποίο αποτελεί για την ύπαρξη δευτερογενών χρωστικών. Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε διαλύτης διχλωρομεθάνιο για τα κλάσματα 14-15 που είχαν πιο έντονο κόκκινο χρώμα. Στο τέλος χρησιμοποιήθηκε διαλύτης οξικός αιθυλεστέρας για την έκλουση των κλασμάτων 16-17 που είχαν σκουρόχρωμο χρώμα. Η ακτινοβολία με

λέιζερ στο μαύρο σκουρόχρωμο εμφάνισε φθορισμό, γεγονός που δείχνει την ύπαρξη χλωροφυλλών, όπως φαίνεται και στην είκονα 2.12.



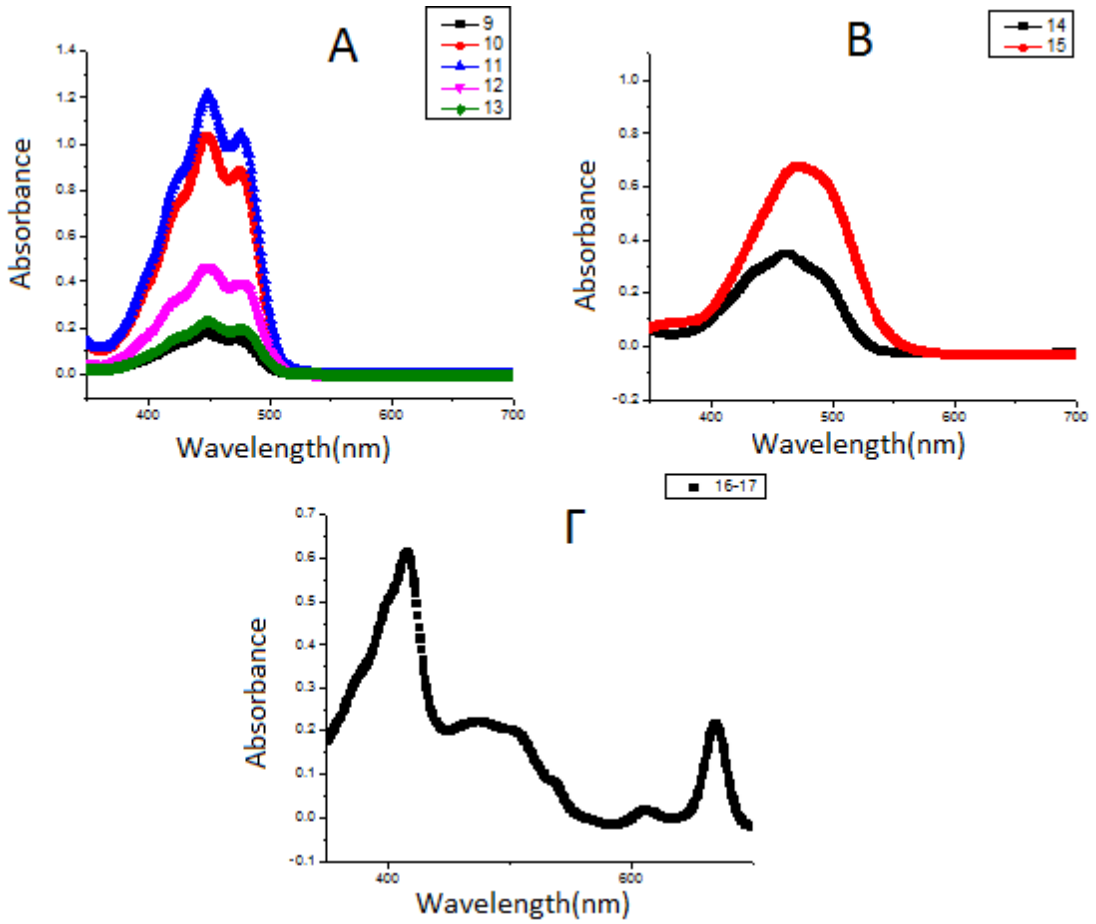
Εικόνα 2.12. Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται η εξέλιξη της διαδικασίας της χρωματογραφίας κολώνας. Τα βέλη αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά κλάσματα που ελήφθησαν σε αυτή τη διαδικασία.

Ομοίως ελήφθησαν φάσματα στο ορατό και υπεριώδες και για τα υπόλοιπα κλάσματα. Πιο συγκεκριμένα στην εικόνα 2.13 παρουσιάζεται το φάσμα υπεριώδους για τα κλάσματα από 3 έως 8. Το μέγιστο της κορυφής στα 195 nm είναι ένδειξη για την ύπαρξη τριτερπενίων, αποτέλεσμα το οποίο συμφωνεί προηγούμενα αποτελέσματα που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία [44]. Λόγω σημαντικού θορύβου στην περιοχή του περιοχή του υπεριώδους επιλέχθηκε ο διαλύτης επτάνιο αντί για εξάνιο για τη λήψη φάσματος σε αυτά τα μήκη κύματος. Τα άχρωμα κλάσματα στη συνέχεια αναπτύχθηκαν σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.



Εικόνα 2.13. Φάσμα υπεριώδους από τα κλάσματα 3 έως 8 της χρωματογραφίας κολώνας.

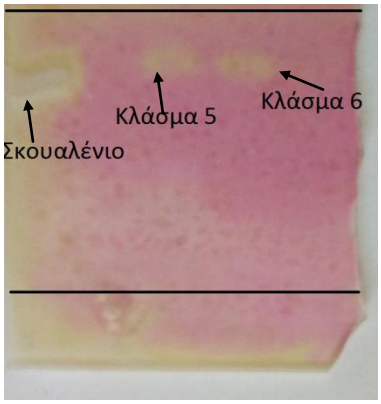
Αντίστοιχα λήφθηκαν φάσματα και για τα υπόλοιπα κλάσματα της χρωματογραφίας. Στην εικόνα 2.14 παρουσιάζοναι τα κλάσματα από 9 έως 13 (μέρος Α). Από τη μορφή του ορατού φάσματος συμπεραίνεται ότι οι ουσίες ανήκουν στην οικογένεια των καροτενοειδών. Το ίδιο συμπέρασμα απορρέει και από τα φάσματα των κλάσματων 14 και 15 (εικόνα 2.14 – μέρος Β). Στο μέρος Γ της ίδιας εικόνας εκτός από την παρουσία των καροτενοειδών είναι εμφανής και η παρουσία των χλωροφυλλών στα κλάσματα 16 και 17. Οι χλωροφύλλες εμφανίζουν τη χαρακτηριστική Soret κορυφή στην περιοχή του κυανού και τις ταινίες Q, ενώ τα καροτενοειδή εμφανίζουν χαρακτηριστικές απορροφήσεις στα μήκη κύματος 400-500 nm [87].



Εικόνα 2.14. Τα φάσματα από τα κλάσματα 9 έως 17. Στα κλάσματα από 9 έως 15 περιέχονται καροτενοειδή, καθώς έχουν την χαρακτηριστική απορρόφηση στα 400-500 nm ενώ στα κλάσματα 16-17 εκλούχθηκαν και οι χλωροφύλλες με μερικές δευτερογενείς χρωστικές.

2.4.4. Αποτελέσματα χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας

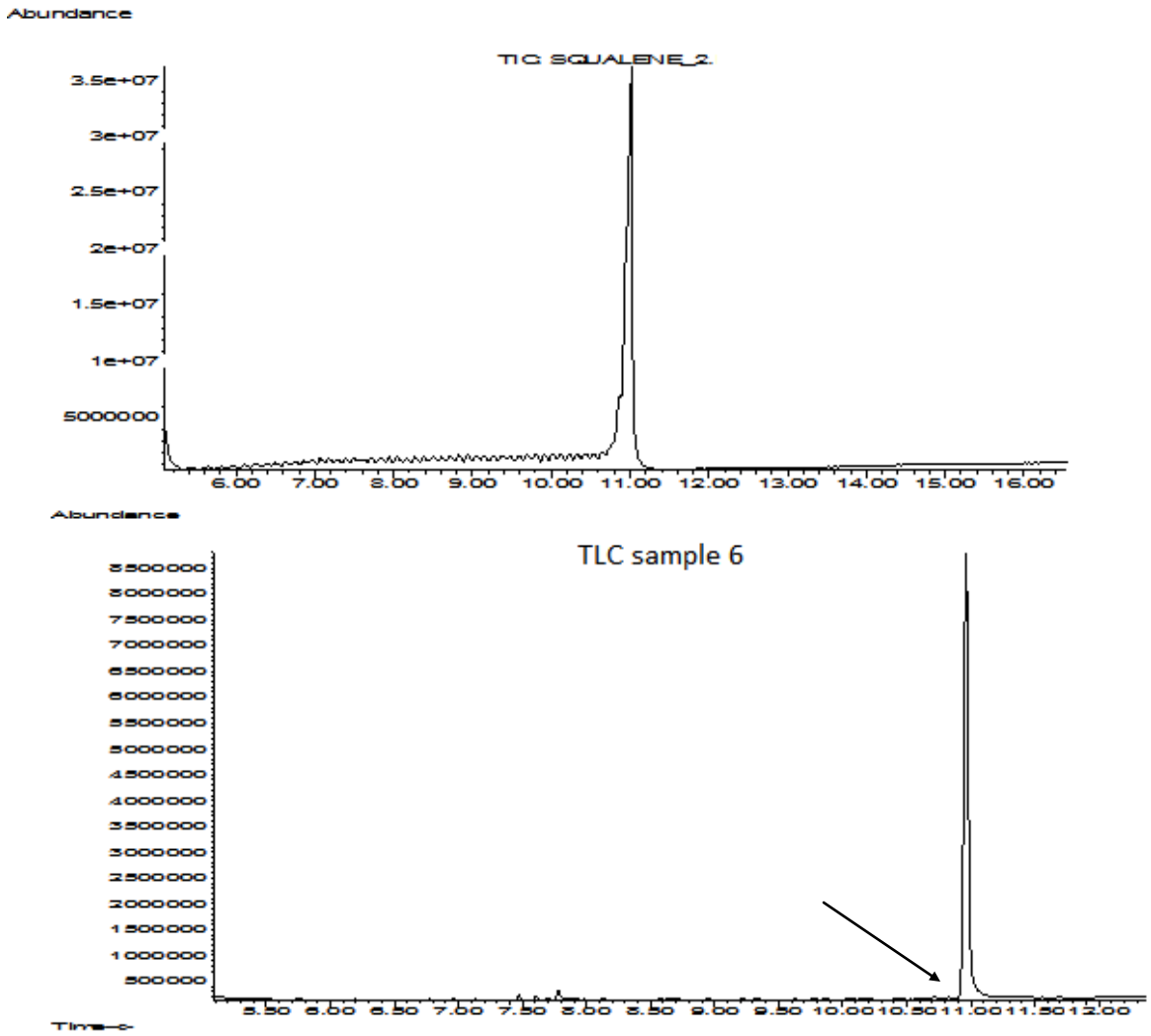
Η χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας έδωσε περισσότερες ενδείξεις για την ύπαρξη σκουαλενίου στα κλάσματα καθώς οι κηλίδες που εμφανίστηκαν μετά την χρώση συγκρίθηκαν με την κηλίδα της πρότυπης ένωσης σκουαλενίου . Η κινητή φάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν εξάνιο ενώ η στατική φάση ήταν silica gel F254 . Η χρώση του πλακιδίου πραγματοποιήθηκε με $KMnO_4$ έπειτα από θέρμανση στους 100°C για 5 λεπτά. Τα κλάσματα 5 και 6 είναι πιθανό να περιέχουν σκουαλένιο, καθώς εμφανίζουν κηλίδες στο ίδιο ύψος με την πρότυπη ουσία σκουαλενίου (εικόνα 2.15).



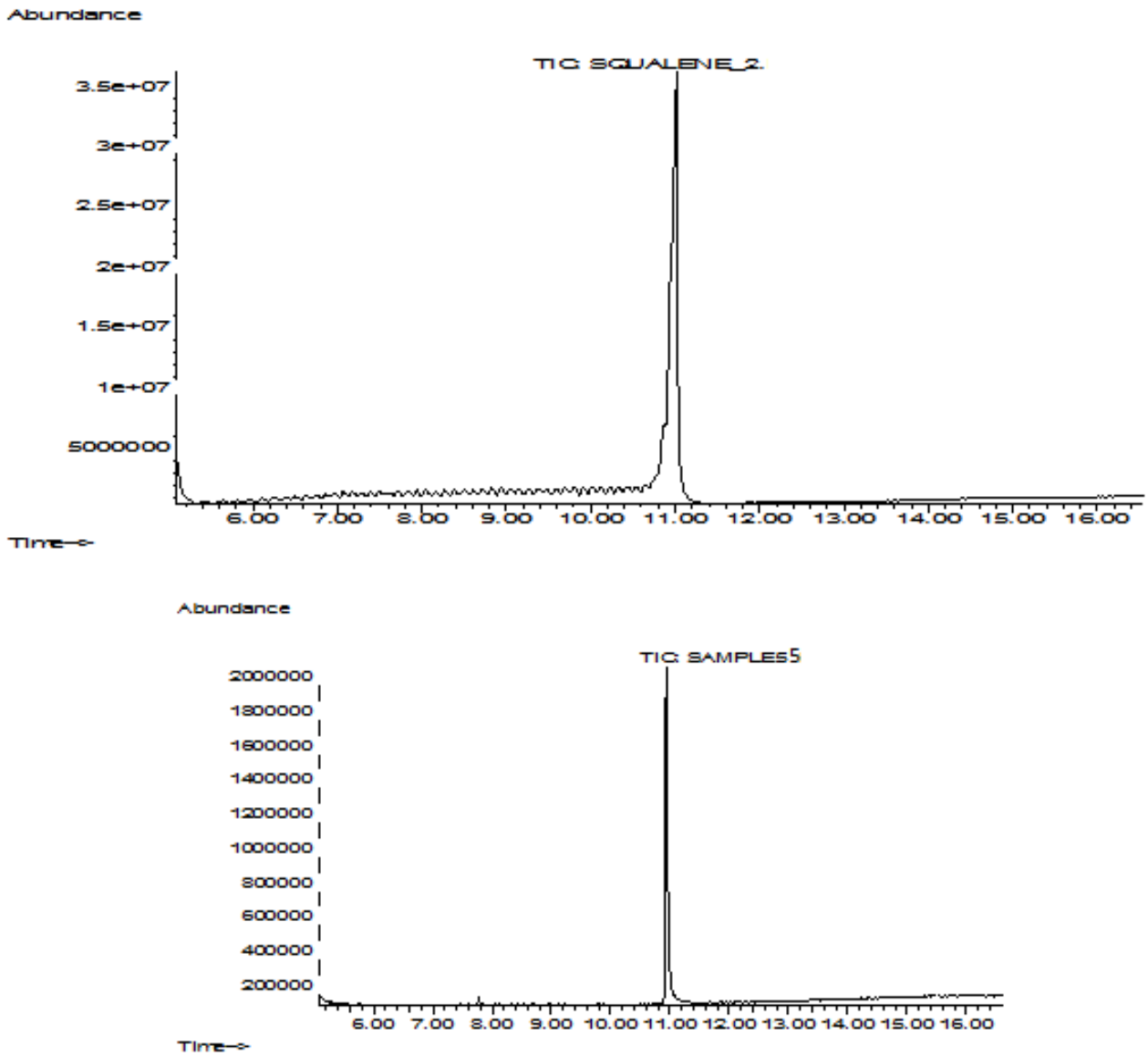
Εικόνα 2.15. Αποτέλεσμα χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Η κινητή φάση ήταν εξάνιο, η στατική silica gel F254 και η χρώση του πλακιδίου έγινε με $KMnO_4$. Στο πλακίδιο με βέλη φαίνονται η πρότυπη ουσία σκουαλένιο και τα κλάσματα 5 και 6. Οι γράμμες υποδεικνύουν την έναρξη (κάτω γραμμή) και την λήξη (πάνω γραμμή).

2.4.5. Αποτελέσματα ταυτοποίηση σκουαλενίου μέσω της αέριας χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (GC-MS)

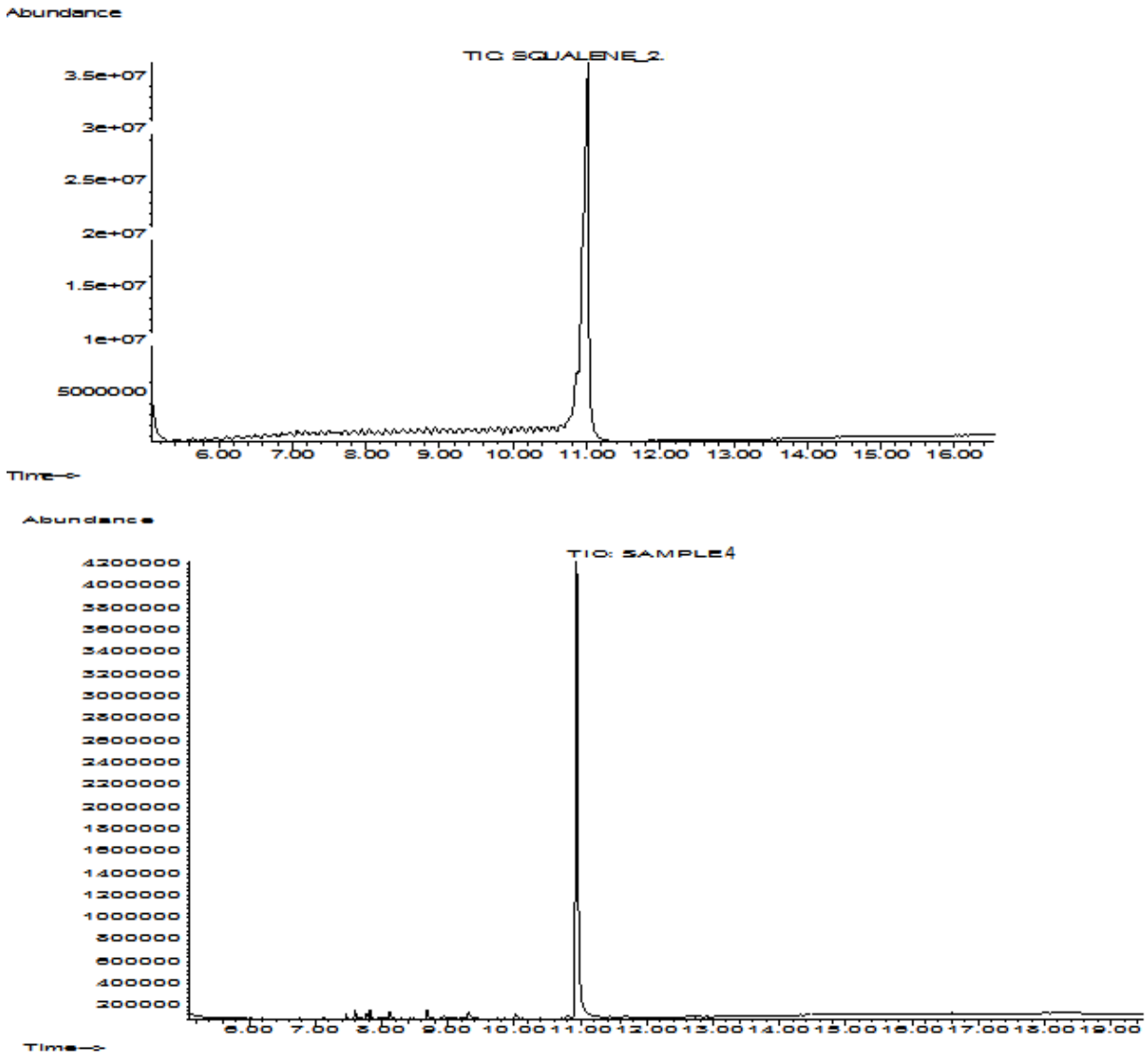
Για την επιβεβαίωση της ύπαρξης σκουαλενίου στα κλάσματα πραγματοποιήθηκε αέρια χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας, με καθαρό σκουαλένιο ως πρότυπη ουσία. Οι χρόνοι κατακράτησης του πρότυπου σκουαλενίου αλλά και των δειγμάτων συγκρίθηκαν ομοίως και για το αποτύπωμα MS/MS. Στη βιβλιογραφία πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία [43]. Όπως φαίνεται και στις εικόνες 2.16 έως 2.18 ο χρόνος κατακράτησης του πρότυπου σκουαλενίου των κλασμάτων 4, 5 και 6 είναι σε όλες τις περιπτώσεις 11 λεπτά. Ο χρόνος κατακράτησης στην κολώνα και τα φάσματα MS/MS είναι ισχυρά τεκμήρια για την ταυτοποίηση του σκουαλενίου.



Εικόνα 2.16. Σύγκριση χρωματογραφήματος πρότυπου σκουαλενίου με το κλάσμα 6,



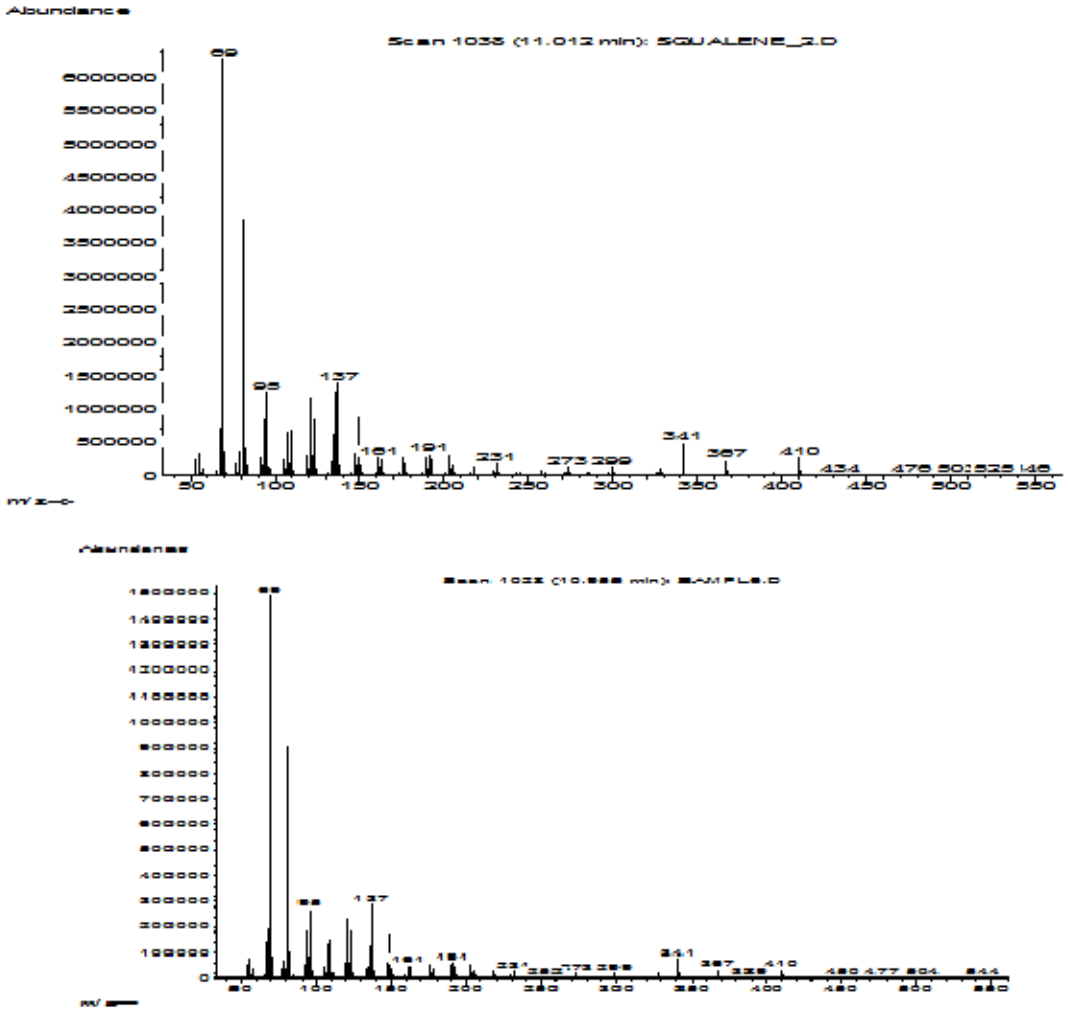
Εικόνα 2.17. Σύγκριση χρωματογραφήματος πρότυπου σκουαλενίου με το κλάσμα 5.



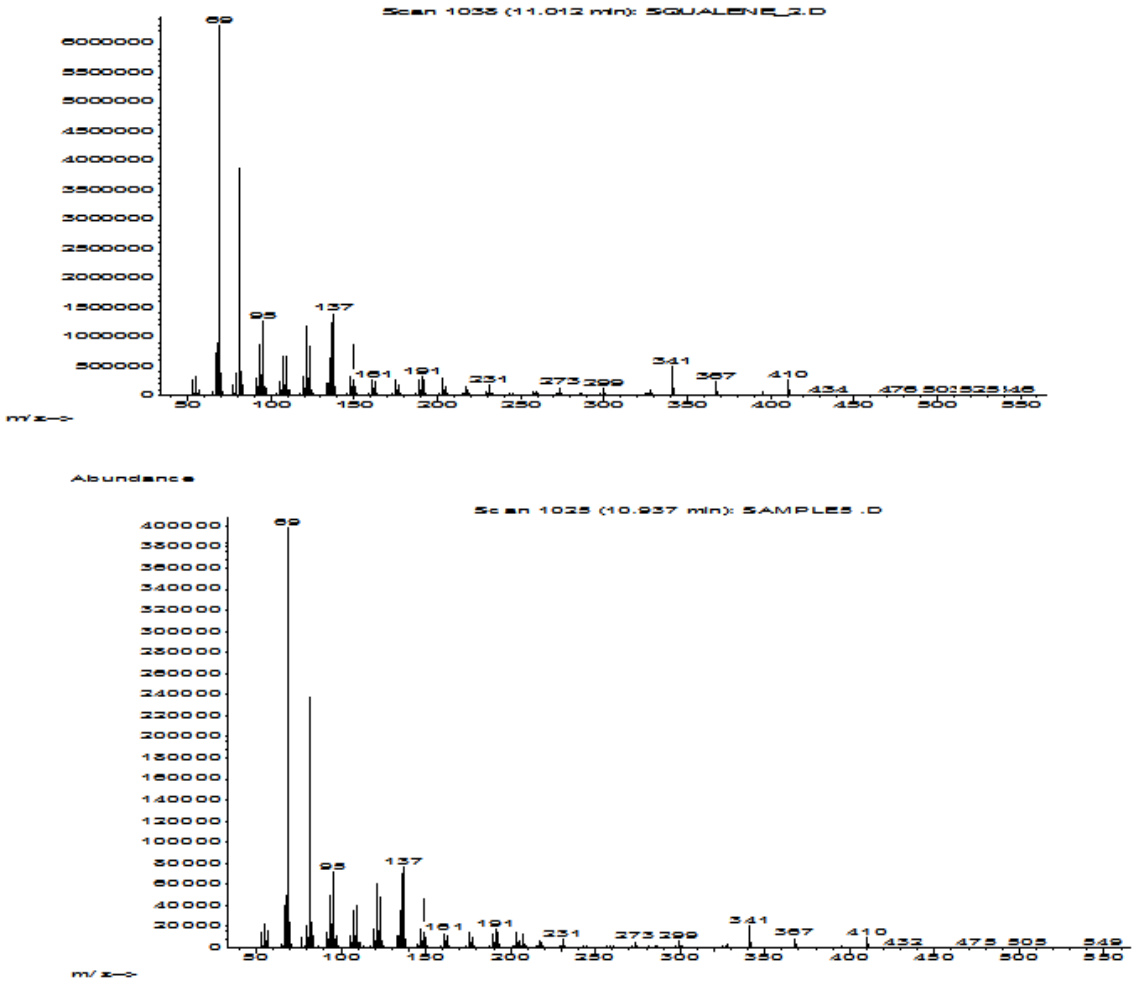
Εικόνα 2.18. Σύγκριση χρωματογραφήματος πρότυπου σκουαλενίου με το κλάσμα 4.

Στη συνέχεια, στις εικόνες 2.19 έως 2.21 παρουσιάζονται τα φάσματα MS/MS του πρότυπου σκουαλενίου αλλά και των αντίστοιχων κλασμάτων (4,5 και 6), όπου είναι εμφανής η πλήρης ταύτιση των κορυφών των θραυσμάτων της πρότυπης ουσίας με τις αντίστοιχες κορυφές των κλασμάτων καθώς και η παρουσία του ίδιου μοριακού ιόντος

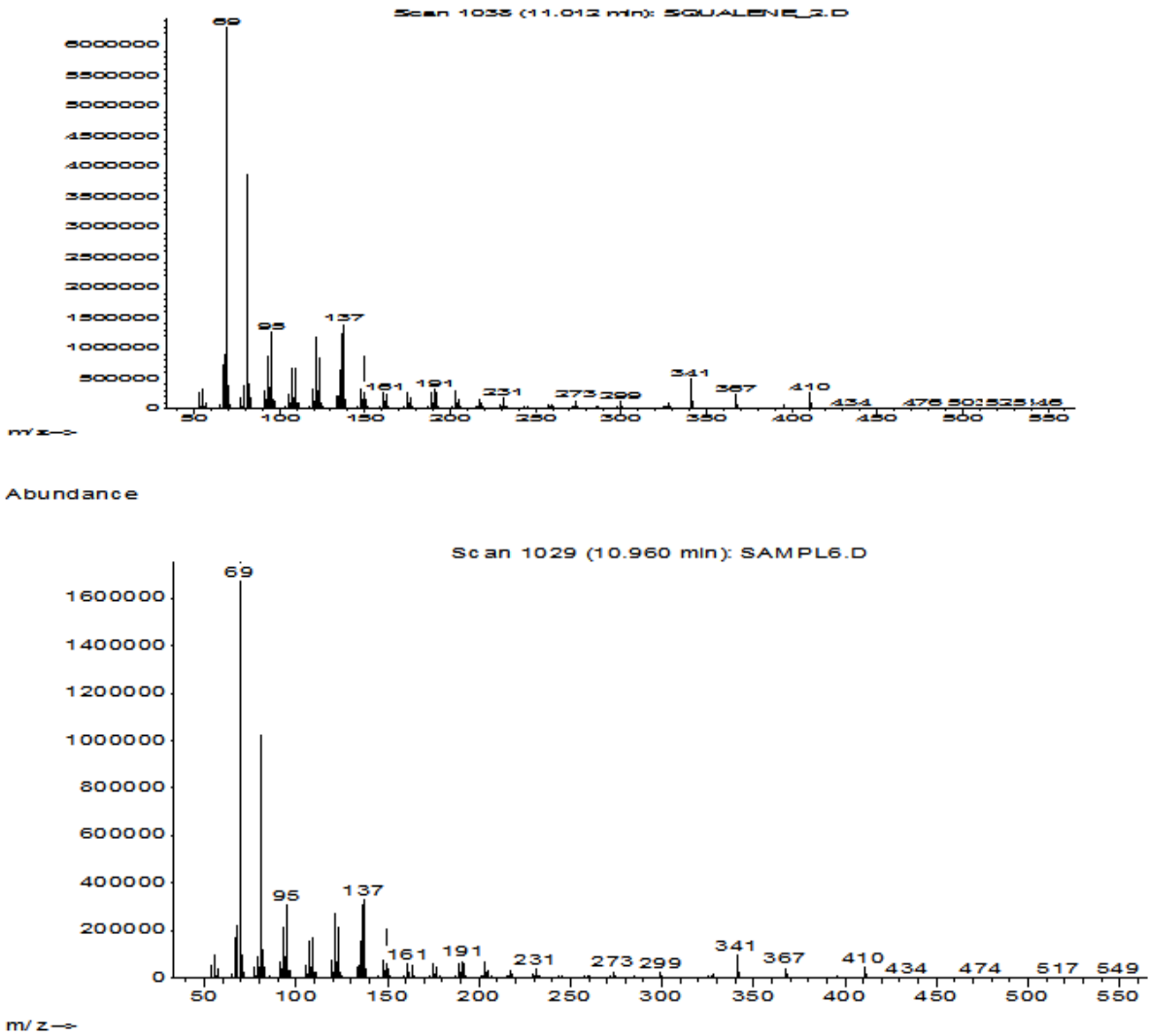
στα 410 (είναι το μοριακό βάρος των ενώσεων). **Που ταυτοποιεί την ύπαρξη σκουαλενίου στα δείγματα**.



Εικόνα 2.19. Φάσμα MS/MS σκουαλενίου και του κλάσματος 6



Εικόνα 2.20. Φάσμα MS/MS σκουαλενίου και του κλάσματος 5



Εικόνα 2.21. Φάσμα MS/MS σκουαλενίου και του κλάσματος 4

2.5 Συμπεράσματα

Σε αυτό το κεφάλαιο μελετήθηκε ο τρόπος με τον οποίο τα λιπίδια κατανέμονται στα κύτταρα *Botryococcus braunii.* Συμπερασματικά βρέθηκε ότι ένα μεγάλο μέρος των λιπιδίων κατανέμονται και αποθηκεύονται σε βιολογικά υμένια (biofilm) εξωτερικά των κυττάρων. Επιπλέον συγκρίθηκε η ανάπτυξη των μικροοργανισμών *Botryococcus braunii* και ενός στελέχους *Anabaena*. Για το μικροφύκος *Botrycococcus braunii*

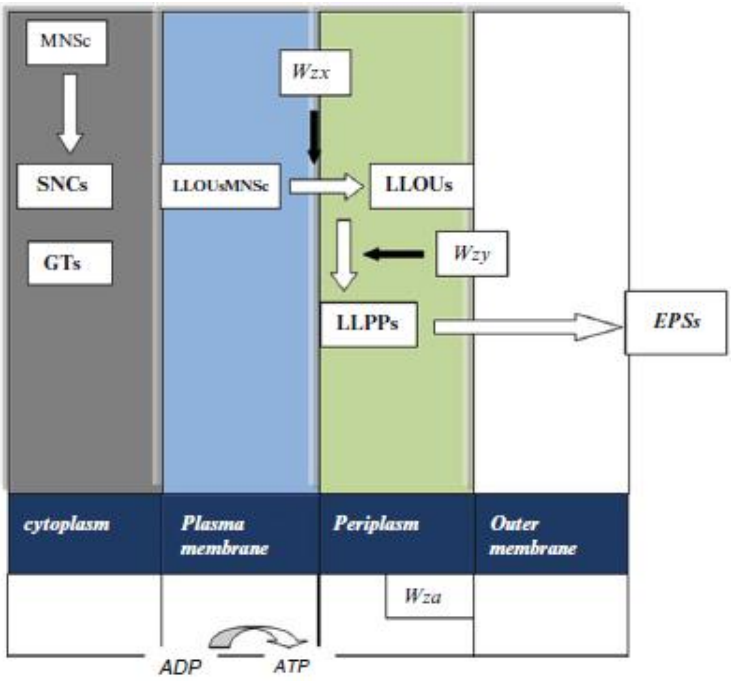
βρέθηκε ότι η προσθήκη γλυκόζης αύξησε σημαντικά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Παρόλα αυτά η ανάπτυξη του μικροφύκους ήταν αρκετά μικρότερη από εκείνη του κυανοβακτηρίου. Για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε ο μικροοργανισμός *Anabaena* για την ανίχνευση του σκουαλενίου. Για την απομόνωση του σκουαλενίου πραγματοποιηθήκε ταυτόχρωνα λύση των κυττάρων αλλά και εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες. Έπειτα με την χρωματογραφία στήλης επιτεύχθηκε ο επιτυχής διαχωρισμός και βρέθηκε ότι στα πρώτα κλάσματα που εκλούχθηκαν με εξάνιο υπήρξε ένδειξη για την παρουσία του σκουαλένιου. Η ταυτοποίηση του σκουαλενίου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση GC-MS έπειτα από σύγκριση των χρόνων κατακράτησης αλλά και των φασμάτων θραυσματόποιησης των κλασμάτων με την πρότυπη ουσία σκουαλενίου. Με την ανίχνευση του σκουαλένιου σε ένα στέλεχος *Anabaena* που ανήκει στα κυανοβακτήρια μπορεί να λειτουργήσει ως μία προοπτική για την περαιτέρω αξιοποίηση των κυανοβακτηρίων για την παραγωγή σκουαλενίου. Καθώς βιβλιογραφικά δεν έχουν γίνει αρκετές έρευνες για αυτού του χρήσιμου προϊόντος από τα κυανοβακτήρια. Η χρησιμότητα του σκουαλενίου είναι ευρέως γνωστή καθώς είναι ένα πολύ σημαντικό φυσικό προϊόν που χρησιμοποιείται αρκετά τόσο ως συμπλήρωμα διατροφής αλλά και ως φαρμακευτικό σκεύασμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΜΗΤΡΑΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ ΕΝΟΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΕ ΑΠΟ ΤΟΝ ΠΟΤΑΜΟ ΓΙΟΦΥΡΟ- ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ.

3.1 Εισαγωγή

Φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί με σκοπό να επιβιώσουν δυσμενείς συνθήκες (όπως ακραία περιβάλλοντα) έχουν αναπτύξει την ικανότητα παραγωγής εξωκυττάριων ουσιών. Οι ουσίες αυτές κάποιες μήτρες που αποτελούνται κυρίως από εξωπολυσακχαρίτες (EPS) και πρωτείνες. Οι εξωκυττάριες αυτές μήτρες καλύπτουν τα κύτταρα και τα προστατεύουν κατά τη διάρκεια της διαίρεσης. Επιπλέον μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τα κύτταρα για να προσκολληθούν μεταξύ τους ή και με άλλους μικροοργανισμούς κατά την αλληλεπίδρασή τους. Επιπλέον με αυτόν τον τρόπο μπορούν να σχηματίσουν βιολογικά υμένια (biofilms) [88]. Πολλά είδη πράσινων μικροφυκών μπορούν να παράγουν εξωπολυσακχαρίτες (EPS). Οι πιο συνηθισμένοι μονοσακχαρίτες που αποτελούν τα EPS είναι γλυκόζη, γαλακτόζη, αραβινόζη, φουκόζη, ξυλόζη, μαννόζη, γλυκουρονικό οξύ και γαλακτουρονικό οξύ. Για παράδειγμα, το μικροφύκος *S. acuminatus* χρησιμοποιεί εκτός της γλυκόζης όλα τα προηγούμενα σάκχαρα σε εξωπολυσακχαρίτες. Η μαννόζη είναι ένας τυπικός και σημαντικός μονοσακχαρίτης των εξωπολυσακχαριτών που συναντώνταιστα χλωρόφυτα. Η μαννόζη φαίνεται να είναι ένα από τα βασικά σάκχαρα (μεταξύ μαννόζης, ραμνόζης και ουρονικού οξέος) που είναι υπεύθυνα για τη σύμπλοκοποίηση με βαρέα μέταλλα, όπως χαλκό και μόλυβδο [69],[89]. Η γαλακτόζη βρέθηκε ότι είναι το κύριο συστατικό των πολυσακχαριτών και σε μικρότερες ποσότητες περιέχονταν φουκόζη, ραμνόζη και γλυκόζη [90]. Επιπλέον, η 3-Ο-μεθυλο φουκόζη και η 3-Ο-μεθυλο-ραμνόζη ανιχνεύθηκαν στο *Botryococcus braunii*. Επιπλεόν έχει επιβεβαιωθεί η παρουσία μεθυλικών σακχάρων σε άλλους EPS. Βρέθηκε ότι η *Chlorella ellipsoidea* δεν περιείχε ξυλόζη στους εξωπολυσακχαρίτες της [91]. Ένας μεγάλος αριθμός ενζύμων δρα επί των γλυκοσυζευγμάτων ολιγο- και πολυσακχαρίτων που αποτελούν μέρος των περισσότερων διαφορετικών υποστρωμάτων στη Γη [92]. Αυτά τα ένζυμα ονομάζονται δραστικά ένζυμα υδατανθράκων (Carbohydrate Active EnZyme - CAZymes). Τα CAZymes ταξινομούνται σε διαφορετικές ομάδες αναλόγως τη δραστικότητά τους: [92] Υδρολάσες γλυκόζης (GHs), συμπεριλαμβανομένων των γλυκοζιδάσεων και trans-γλυκοζιδάσεις. Αυτά τα ένζυμα είναι υπεύθυνα για την υδρόλυση και την *trans*-γλυκοζυλίωση των γλυκοζιτικών δεσμών. Γλυκοζυλτρανσφεράσες (GTs), που είναι

υπεύθυνες για τη σύνθεση των γλυκοζιτικών δεσμών και ενεργοποιούνται από σάκχαρα πουδρουν ως δώτες φωσφόρου. Λυάσες πολυσακχαρίτη (PLs), υπεύθυνες για την υδρόλυση των γλυκοζιτικών δεσμών των σακχάρων που περιέχουν ουρονικό οξύ. Εστεράσες υδατανθράκων (CEs), οι οποίες απομακρύνουν τον εστέρα και διευκολύνουν τη δράση της GH σε περίπλοκα σάκχαρα. Μόρια πρόσδεσης σε υδατάνθρακες (CBM), τα οποία έχουν δεν ασκούν άμεση δραστικότητα, αλλά ενισχύουν τη δραστικότητα των προαναφερθέντων ενζύμων, προάγοντας την αλληλεπίδραση με διαφορετικά υποστρώματα [92].



Εικόνα 3.1 Προτεινόμενη πορεία για τη σύνθεση των EPS στα κυανοβακτηρία και στα μικροφύκη MNS :Μονοσακχαρίτες, SNCs:νουκλεοτίδια σακχάρου, GTs: γλυκοζυλο τρανσφεράσες,LLOUs: μονάδες ολιγοσακχαριτών συνδεδεμένες με λιπίδια,LLPPS: πολυμερισμένες μονάδες πολυσακχαρίτη συνδεδεμένες με λιπίδια [93].

3.2 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας πειραματικής σειράς ήταν η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός της εξωκυττάριας μήτρας. Από ένα μικροφύκος που απομονώθηκε σε προηγούμενη διατριβή της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου μας [94] καθώς και η μελέτη της φυσιολογίας του μικροοργανισμού με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) και ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM). Στην προηγούμενη διατριβή αποδείχθηκε ότι η μήτρα αυτή προσδίδει ανθεκτικότητα απέναντι σε χημικούς αναστολείς όπως το ζιζανιοκτόνο DCMU και μία σειρά αντιβιοτικών που είναι αναστολείς της πρωτεϊνοσύνθεσης από τα οποία απομονώθηκε το μικροφύκος αυτό. Παράλληλα έγινε προσπάθεια και για την απομόνωση και χαρακτηρισμό των δευτερογενών χρωστικών (καροτένια-ξανθοφύλλες).

3.3 Πειραματικό μέρος

3.3.1. Συνθήκες ανάπτυξης μικροοργανισμού

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένας μικροοργανισμός που είχε απομονωθεί από τον ποταμό Γιόφυρο. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν φωτοετερότροφα σε υγρό θρεπτικό μέσο TAP (Tris-Acetate-Phosphate), σε κωνικές φιάλες των 1L και 2L με συνεχή ανάδευση για 4-5 ημέρες, προκειμένου να μην κατακαθίσουν τα κύτταρα [95]. Όλα τα πειράματα εκτελέστηκαν σε δωμάτιο σταθερής θερμοκρασίας 25±1°C. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 20-25 μmol φωτονίων$\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ με την χρήση λευκών (cool white) λαμπών φθορισμού. Η σύσταση του θρεπτικού μέσου TAP παρουσιάζεται στους ακόλουθους πίνακες.

Πίνακας 3.1. Συστατικά υγρού θρεπτικού μέσου TAP (pH=7,2).

Διαλύματα	**Ποσότητα**
Trizma – base	2,42g/L
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών I (Phosphate buffer I)	1 mL/L
Διάλυμα ιχνοστοιχείων (Hutner'sTrace Metals)	1 mL/L
Τροποποιημένο διάλυμα του Beijerink (Solution A)	10 mL/L
Οξικό οξύ	1,048 g/L

Πίνακας 3.2. Συστατικά ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών I (*Phosphate buffer)*

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα (g/L)**
K_2HPO_4	104,4
KH_2PO_4	54,0

Πίνακας 3.3. Συστατικά διαλύματος ιχνοστοιχείων (*Hutner's Trace Metals).*

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα (g/L)**
EDTA	50,0
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	4,99
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	22,00
H_3BO_3	11,40
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	5,06
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	1,57
$Mo_7O_{24}(NH_4)_6 \cdot 4H_2O$	1,10
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,61

Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε με KOH έως το pH=6,5 .

Πίνακας 3.4. Συστατικά τροποποιημένου διαλύματος του Beijerinck (*Solution A).*

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα(g/L)**
NH_4Cl	40,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	10,0
$CaCl_2$	3,8

Σε μία άλλα σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ένα απλό θρεπτικό μέσο υψηλής συγκέντρωσης αλάτων (Sueoka's High Salt Medium, HS medium) [96]. Η σύστασή του παρουσιάζεται στους ακόλουθους πίνακες.

Πίνακας 3.5. Συστατικά θρεπτικού μέσου υψηλής συγκέντρωσης αλάτων (HS medium).

Διαλύματα	**Ποσότητα (mL/L)**
Διάλυμα τουBeijerinck	5,0
Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών ΙΙ (Phosphate buffer II)	5,0
Διάλυμα ιχνοστοιχείων (Hutner'sTrace Metals)	1,0

Πίνακας 3.6. Συστατικά διαλύματος του Beijerinck

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα(g/L)**
NH_4Cl	100,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	4,0
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,51

Πίνακας 3.7. Συστατικά ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών ΙΙ (*Phosphate buffer* ΙΙ*)*

Συστατικά	**Συγκέντρωση στο διάλυμα(g/L)**
K_2HPO_4	288,0
KH_2PO_4	144,0

Όλα τα θρεπτικά μέσα και τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν είχαν αποστειρωθεί σε αυτόκαυστο στους 120°C για 20-30 min για την αποφυγή μολύνσεων από άλλους μικροοργανισμούς. Όλα τα πειράματα παρασκευής καλλιεργειών πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow hood), ο οποίος είχε αποστειρωθεί με λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας και αιθανόλη. Τα πειράματα έλαβαν χώρα παρουσία φλόγας.

3.3.2. Απομόνωση της εξωκυττάριας μήτρας

Παρακάτω περιγράφονται τα στάδια με τα οποία έγινε η απομόνωση του άσπρου στερεού. Φυγοκέντρηση καλλιέργειας και πλύσεις των κυττάρων σε απιονισμένο νερό για την απομάκρυνση αλάτων από το θρεπτικό μέσο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για τη συλλογή της βιομάζας. Στο στάδιο αυτό είναι διακρίνεται εύκολα η παρουσία της εξωκυττάριας μήτρας ως ένα λευκό ίζημα που κατακάθεται πάνω από το κυτταρικό ίζημα.

Εικόνα 3.2. Το διαφανές στερεό που επικαλύπτει τα κύτταρα μετα τις πλύσεις με το απιονισμένο νερό .

Μηχανική απομάκρυνση του διαφανούς στρώματος από το ίζημα. Επαιναιώρηση του ιζήματος και επανάληψη της διαδικασίας απομάκρυνσης έως ότου να μην εμφανίζεται το διαφανές στρώμα στο πράσινο ίζημα. Φυγεκέντρηση σε γυάλινους τριχοειδείς(packed cell volume) σωλήνες για το διαχωρισμό των πράσινων κυττάρων από τη διαφανή μήτρα. Συλλογή του καθαρού προϊόντος απαλλαγμένου από τα κύτταρα. Η καθαρότητα της εξωκυττάριας μήτρας επιβεβαιώνεται με παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο. Ακολουθούν πλύσεις του προϊόντος με υπερκάθαρο νερό και έπειτα με καθαρή ακετόνη. Τέλος, το προϊόν ξηραίνεται σε ξηραντήρα.

3.3.3. Χρήση αντιδραστηρίου Lugol's (τεστ Ιωδίου)

Πραγματοποιήθηκε χρώση του απομονωμένου στερεού με το αντιδραστήριο Lugol (υδατικό διάλυμα 0,125% w/v I_2 και 0,5% w/v KI) για την ανίχνευση της ύπαρξης αμύλου [97].

3.3.4. Αντίδραση α-ναφθόλης (τεστ Molisch)

Το συγκεκριμένο τεστ βασίζεται στην υδρόλυση του πολυμερούς με χρήση θειικού οξέος και τη μετατροπή των υδατανθράκων σε παράγωγα φουρφουράλης. Τα παράγωγα αυτά αντιδρούν με το δακτύλιο της α-ναφθόλης για να σχηματίσουν ένα ιώδες σύμπλοκο [98].

3.3.5 . Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)

Για το χαρακτηρισμό της εξωκυττάριας μήτρας χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της φασματοσκοπίας υπερύθρου. Τα φάσματα υπερύθρου λήφθηκαν σε φασματόμετρο Thermo-Electron Nicolet 6700 FT-IR και η περιοχή των φασμάτων ήταν μεταξύ 400 και 4000 cm^{-1}. Γενικά, η υπέρυθρη ακτινοβολία αντιστοιχεί στην ενέργεια που χαρακτηρίζει τα δονητικά και περιστροφικά ενεργειακά επίπεδα ενός μορίου, τα οποία είναι κβαντισμένα. Επομένως, για να απορροφήσει ένα μόριο υπέρυθρη ακτινοβολία, πρέπει η ενέργειά της να είναι ακριβώς τόση ώστε να προκληθεί μια δονητική ή περιστροφική μετάπτωση. Όταν υπέρυθρη ακτινοβολία πέσει σε ένα μόριο, ένα ποσοστό αυτής απορροφάται. Η απορρόφηση της ακτινοβολίας πραγματοποιείται σε συχνότητες ν_{δ}, οι οποίες είναι συχνότητες δόνησης των δεσμών και είναι χαρακτηριστικές για κάθε ουσία.

3.3.6. Παρατήρηση της εξωκυττάριας μήτρας και του μικροοργανισμού με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)

Για την παρατήρηση με ηλεκτρονική μικροσκοπία, τα κύτταρα και το στερεό υπέστησαν δύο δεκάλεπτες πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα διμεθυλαρσινικού νατρίου (sodium cacodylate buffer, SCB) συγκέντρωσης 0,1 M και pH=7,4. Έπειτα, μονιμοποιήθηκαν με χρήση διαλύματος 2% w/v γλουταραλδεΰδης (GDA) και 2% w/v παραφορμαλδεΰδης (PFA) σε διάλυμα SCB συγκέντρωσης 0,08 M και pH7,4 για 45

min. Οι μονιμοποιητές απομακρύνθηκαν με δύο δεκάλεπτες πλύσεις με διάλυμα SCB 0,1 M και pH7,4. Έπειτα, τα κύτταρα αφυδατώθηκαν χρησιμοποιώντας διαδοχικές δεκάλεπτες πλύσεις με 30%, 50%, 70%, 90% και 100% αιθανόλη. Κατά τη διάρκεια της κάθε πλύσης τα δείγματα φυλάσσονταν σε θερμοκρασία 4°C. Τα δείγματα πλύθηκαν με ξηρή αιθανόλη για 10 λεπτά και ξυράνθηκαν με χρήση μίας συσκευής ξήρανσης κρίσιμου σημείου του διοξειδίου του άνθρακα (BAL-TEC, CPD 030 Critical Point Dryer), προκειμένου να αφυδατωθούν πλήρως. Στη συνέχεια, επικολλήθηκαν σε ύαλο με χρήση αγώγιμης ταινίας άνθρακα (carbon tape) και επικαλύφθηκαν με χρυσό πάχους 20 nm με χρήση ενός Sputter Coater (SCD 050) της BAL-TEC, προκειμένου να γίνουν ηλεκτρικά αγώγιμα. Η παρατήρηση στο SEM πραγματοποιήθηκε σε διαφορά δυναμικού δέσμης ηλεκτρονίων 20 kV.

3.3.7. Παρατήρηση της εξωκυττάριας μήτρας και του μικροοργανισμού με τη χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης (Transmission Electron Microskopy, TEM)

Για την παρατήρηση με ηλεκτρονική μικροσκοπία, τα κύτταρα αρχικά υπέστησαν δύο δεκάλεπτες πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα διμεθυλαρσινικού νατρίου (sodium cacodylate buffer, SCB) συγκέντρωσης 0,1 M και pH=7,4. Έπειτα μονιμοποιήθηκαν με χρήση διαλύματος 2% w/v γλουταραλδεΰδης (GDA) και 2% w/v παραφορμαλδεΰδης (PFA) σε διάλυμα SCB συγκέντρωσης 0,08 M και pH=7,4 για 45 λεπτά. Οι μονιμοποιητές απομακρύνθηκαν με δύο δεκάλεπτες πλύσεις με διάλυμα SCB 0,1 M και pH=7,4. Έπειτα τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν με τη χρήση ενός διαλύματος 2% w/v OsO_4 σε διάλυμα SCB συγκέντρωσης 0,08 M και pH=7,4 για 60 λεπτά. Οι μονιμοποιητές όπως προηγουμένως απομακρύνθηκαν με δύο δεκάλεπτες πλύσεις με διάλυμα SCB 0,1 M και pH=7,4 .Έπειτα τα κύτταρα υπέστησαν αφυδάτωση χρησιμοποιώντας διαδοχικές δεκάλεπτες πλύσεις (εκτός την περίπτωση που προστέθηκε το οξικό ουρανύλιο) με 30%, 50%, 70% αιθανόλη και 2% οξικό ουρανύλιο για 20 λεπτά , 90% και 100% αιθανόλη. Κατά τη διάρκεια της κάθε πλύσης τα δείγματα φυλάσσονταν σε θερμοκρασία 4°C. Έπειτα πλύθηκαν με ξηρή αιθανόλη δύο φορές για 15 λεπτά. Και στην συνέχεια τα κύτταρα εγκλείστηκαν σε μια επόξυ-ρητίνη (της Duckpan Sigma) οι τομές είχαν πάχος 70-100 nm

3.3.8. Υδρόλυση της εξωκυττάριας μήτρας

Για την υδρόλυση της εξωκυττάριας μήτρας χρησιμοποιήθηκε ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο [99]. Ποσότητα 200-300 μL υδατικού διαλύματος καθαρής εξωκυττάριας μήτρας φυγοκεντρήθηκε στα 6000 g και έπειτα επαναιωρήθηκε σε 500 μL 2M TFA (αραιωμένο με H_2O). Μεταφορά του διαλύματος σε γυάλινο φιαλίδιο με βιδωτό πώμα που περιέχει μαγνήτη ανάδευσης. Το διάλυμα τοποθετείται σε ελαιόλουτρο στους 100^oC, υπό ανάδευση με ταχύτητα 400 rpm για 2 h. Στο τέλος της αντίδρασης το διάλυμα φυγοκεντρείται για το διαχωρισμό του υπερκειμένου από το ίζημα και το TFA εξατμίζεται με ροή αερίου αζώτου. Η παρουσία στερεού σημαίνει ότι η αντίδραση υδρόλυσης δενήταν πλήρης. Στην περίπτωση αυτή το στερεό επαναιωρείται σε 500μL πυκνού TFA και η αντίδραση επαναλαμβάνεται όπως προηγουμένως. Στην περίπτωση που εξακολουθει να παραμένει στερεό υπόλειμμα επαναιωρείται σε 100% TFA και η ίδια αντίδραση επαναλαμβάνεται για 12-16 ώρες στους 120 ^oC,έτσι ώστε η υδρόλυση να είναι πλήρης. Το υπερκείμενο με τα υδρολυμένα σάκχαρα είχε καφέ χρώμα και η περίσσεια TFA απομακρύνθηκε με αερίου αζώτου.

3.3.9. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

Το υδρολυμένο στερεό(καφέ χρώματος) επαναιωρήθηκε απιονισμένο ύδωρ και έγινε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Η στατική φάση ήταν silica gel 60 F254, ενώ η κινητή φάση ακετονιτρίλο:νερό 17:3. Για την εμφάνιση έγινε χρώση του πλακιδίου με διάλυμα θυμόλης-θειικού οξέος και θέρμανση στους 120^oC για 10 λεπτά. Τα σάκχαρα χρωματίστηκαν ανοικτό κόκκινο και μαύρο [100]. Ομοίως χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας στις δευτερογενείς χρωστικές σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [101, 102].

3.3.10. Φασματομετρία μάζας με ιοντισμό ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS)

Για την ανάλυση με φασματομετρία μάζας με ιοντισμό ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS) το δείγμα αραιώθηκε σε διαλύτη MeOH:H_2O 1:1 v/v και εισήχθη στο φασματόμετρο μάζας (LCQAdvantage, ThermoFinnigan) με την βοήθεια αντλίας σύριγγας με ροή 15 $\mu l min^{-1}$. Το φάσμα μάζας θετικών ιόντων καταγράφηκε στο εύρος m/z 50-500 χρησιμοποιώντας τις παρακάτω παραμέτρους πίνακας 3.8 στην πηγή ηλεκτροψεκασμού και στο φασματόμετρο μάζας:

Πίνακας 3.8. Παραμέτροι που χρησιμοποιήθηκαν.

Παράμετρος	Τιμή
Spray voltage	4.0 kV
Sheath gas flow rate	45 arb. units
Aux gas flow rate	5 arb. units
Capillary voltage	14 V
Capillary temperature	300 °C
Tube lens voltage	25 V
Source induced dissociation voltage	20 V

Για την ταυτοποίηση των ιόντων λήφθηκαν φάσματα MS^n (n=2-5).

3.3.11. Φασματοσκοπία NMR

3.3.11.1 Λήψη φασμάτων zgpr 1D NMR

Τα μονοδιάστατα φάσματα ^1H NMR του υδρολύματος και του προτύπου γλυκοζαμίνης σε διαλύτη δευτεριωμένο νερό (D_2O) λήφθηκαν με 64K πραγματικά δεδομένα (data points). Η χρονική διάρκεια του παλμού 90° μοιρών για τον πυρήνα ^1H ήταν 12.0μs και η ακολουθία παλμών περιελάμβανε την εξάλειψη του σήματος του νερού (ακολουθία παλμών **zgpr**). Για κάθε φάσμα λήφθηκαν 64 σαρώσεις. Ο χρόνος

καταγραφής σήματος ήταν 3.3 sec. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης 8 ψευδοσαρώσεις (dummy scans) ώστε το σύστημα των σπιν να φτάσει σε δυναμική ισορροπία πριν την εφαρμογή της επόμενης ακολουθίας παλμών. Η επεξεργασία των φασμάτων μετά το μετασχηματισμό Fourier περιελάμβανε πολλαπλασιασμό με εκθετική συνάρτηση (LB=0.3 Hz), διόρθωση φάσης και διόρθωση της γραμμής βάσης του φάσματος (baseline correction), και έγινε με το λογισμικό TopSpin της εταιρίας Bruker.

3.3.11.2 Λήψη φασμάτων ^{1}H-^{1}H COSY 2DNMR

Τα ομοπυρηνικά φάσματα ^{1}H-^{1}H COSY 2D NMR λήφθηκαν χρησιμοποιώντας 128 πραγματικά δεδομένα των 2K, 80 σαρώσεις και 16 ψευδοσαρώσεις, με χρονική καθυστέρηση 1.5s. Χρησιμοποιήθηκαν 2 ημιτονοειδή παλμικά βαθμιδωτά πεδία 1:1 διάρκειας 1 ms. Πριν το μετασχηματισμό Fourier τα δεδομένα στη δεύτερη διάσταση αυξήθηκαν στα 1K πραγματικά δεδομένα (data points) με την τεχνική της γραμμικής πρόβλεψης (linear prediction) και κατόπιν στα 2K με την προσθήκη μηδενικών σημείων στη μνήμη του υπολογιστή, ώστε τα δεδομένα να σχηματίσουν μια μήτρ αδεδομένων 2K*2K. Τα δεδομένα των δύο διαστάσεων πολλαπλασιάστηκαν με τη μαθηματική συνάρτηση sine-bell squared .

3.3.11.3 Λήψη φασμάτων ^{1}H-^{13}C, gHSQC και gHMBC 2D NMR

Τα ετεροπυρηνικά ^{1}H-^{13}C, gHSQC multiplicity-edited (hsqcedetgpsisp2.3) και gHMBC (hmbcgplpndqf) 2D NMR φάσματα λήφθηκαν χρησιμοποιώντας 128 πραγματικά δεδομένα των 2K, 128 σαρώσεις και 32ψευδοσαρώσεις, με χρονική καθυστέρηση 1.5s. Το πείραμα gHSQC βελτιστοποιήθηκε για συζεύξεις ενός δεσμού ^{1}H-^{13}C, των 145 Hz. Χρησιμοποιήθηκε η σύνθετη παλμική ακολουθία GARP για την αποσύζευξη των πρωτονίων κατά τη διάρκεια της ανίχνευσης. Η αναλογία των εντάσεων των βαθμωτών πεδίων G1, G2, G3 ημιτονοειδούς σχήματος ήταν 80:20.1:11 για το πείραμα gHSQC και 50:30:40.1 για το πείραμα gHMBC, ενώ είχαν διάρκεια 1 ms. Πριν το μετασχηματισμό Fourier τα δεδομένα στη δεύτερη διάσταση αυξήθηκαν στα 2K πραγματικά δεδομένα (data points) με την τεχνική της γραμμικής πρόβλεψης (linearprediction) και με την προσθήκη μηδενικών σημείων στη μνήμη του υπολογιστή, τα δεδομένα σχημάτισαν

έναν πίνακα δεδομένων 2K*2K. Τα δεδομένα των δύο διαστάσεων πολλαπλασιάστηκαν με τη μαθηματική συνάρτηση sine-bell squared.

3.3.12. Εκχύλιση δευτερογενών χρωστικών

Χρησιμοποιήθηκε ένα κατάλληλα τροποποιημένο πρωτόκολλο από [103]: Αρχικά γνωστή ποσότητα λυοφιλοποιημένων κυττάρων τοποθετήθηκε μαζί με 10 g γυάλινων σφαιριδίων και 50 mL αιθανόλης σε μπλέντερ για 60 min με παύσεις των 3 λεπτών ανά 5 λεπτά για αποφυγή υπερθέρμανσης του δείγματος. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε στο σκοτάδι για αποφυγή ισομερισμού των χρωστικών από την ακτινοβολία. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν 2 εκχυλίσεις με διαλύτη εξάνιο/αιθανόλη 1:1 για 30 λεπτά και έπειτα έγινε εκχύλιση με εξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα 1:1 άλλες 2 φορές(30 λεπτά κάθε φορά). Στο τέλος η εκχύλιση έγινε με εξάνιο μέχρι το υπερκείμενο να είναι άχρωμο. Συλλογή και φυγοκέντρηση της υγρής φάσης. Στο τέλος παρατηρήθηκε ένα μεγάλο μέρος των κυττάρων να έχουν αποχρωματιστεί. Απομάκρυνση του διαλύτη με απόσταξη υπό κενό και επαναδιαλυτοποιήση του στερεού σε ακετόνη και οξικό αιθυλεστέρα 1:1

3.3.13. Αντιδράσεις σαπωνοποίησης

Πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις σαπωνοποίησης με σκοπό να απομακρυνθούν οι χλωροφύλλες στις περαιτέρω αναλύσεις. Οι σαπωνοποιήσεις που ακολούθησαν πραγματοποιήθηκαν ακολουθώντας τροποποιημένες τεχνικές που βρέθηκαν βιβλιογραφικά [104-106]. Πιο συγκεκριμένα,περιγράφονται οι σχετικές διαδικασίες:

10 mL από το εκχύλισμα της διαδικασίας 3.3.13, τοποθετήθηκαν με 10 mL 2% KOH σε μεθανόλη 25°C υπό ανάδευση στα 800 rpm για 18 ώρες.

10 mL από το εκχύλισμα της διαδικασίας 3.3.13 τοποθετήθηκαν με 10 mL 10% KOH σε μεθανόλη για 15 min για βίαιη ανάδευση.

10 mL από το εκχύλισμα της διαδικασίας 3.3.13 τοποθετήθηκαν με 10 mL 3.6 % KOH σε μεθανόλη 40°C στα 800 rpm για 40 min.

Στο τέλος ενώθηκαν τα εκχυλίσματα και προστέθηκαν 30 mL διαλύματος NaCl περιεκτικότητας 10% για τη δημιουργία 2 φάσεων. Πραγματοποιήθηκαν 2 εκχύλισεις

του μίγματος σε εξάνιο και οξικό αιθυλεστέρα με αναλογία 1:1 και μετά με εξάνιο μέχρι το διάλυμα να μη χρωματιστεί κίτρινο. Οι φάσεις συλλέχθηκαν, φυγοκέντρηθηκαν και ο διαλύτης συμπυκνώθηκε σε ρότορα υπό κενό. Στη συνέχεια έγινε επαναιώρηση σε 15 ml ακετόνης/εξανίου.

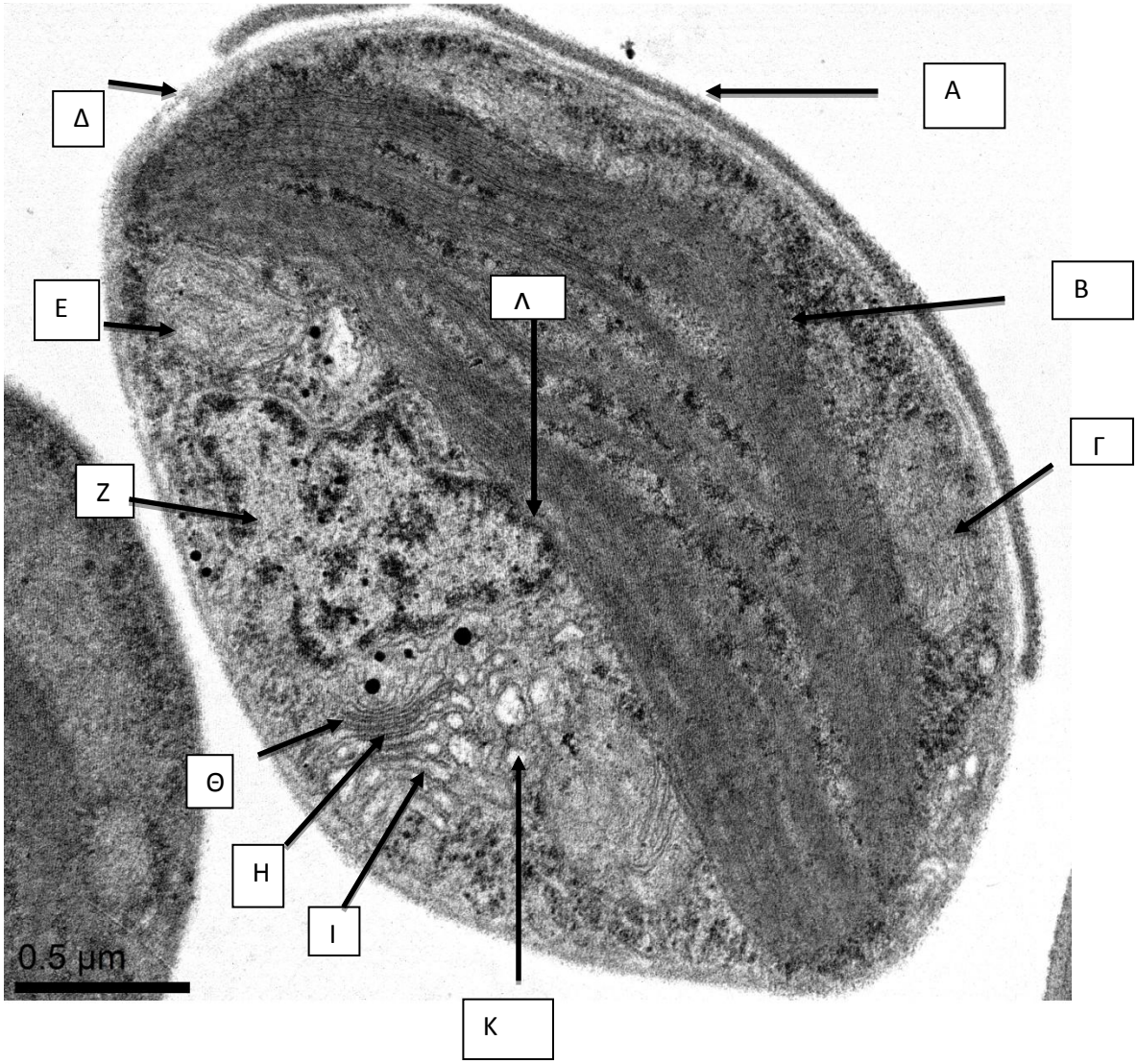
3.4 Αποτελέσματα και συζήτηση

3.4.1 Μελέτη του μικροοργανισμού και του λευκού ιζήματος με τη χρήση Ηλεκτρονιακή Μικροσκοπία Διέλευσης (TEM).

Προηγούμενα αποτελέσματα της ερευνητικής μας ομάδας απέδειξαν πως πρόκειται για ένα πράσινο μικροφύκος το οποίο πιθανότατα ανήκει στο γένος *Chlorella* [94]. Για την περαιτέρω μελέτη ελήφθησαν φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης σε τομές του μικροφύκους.

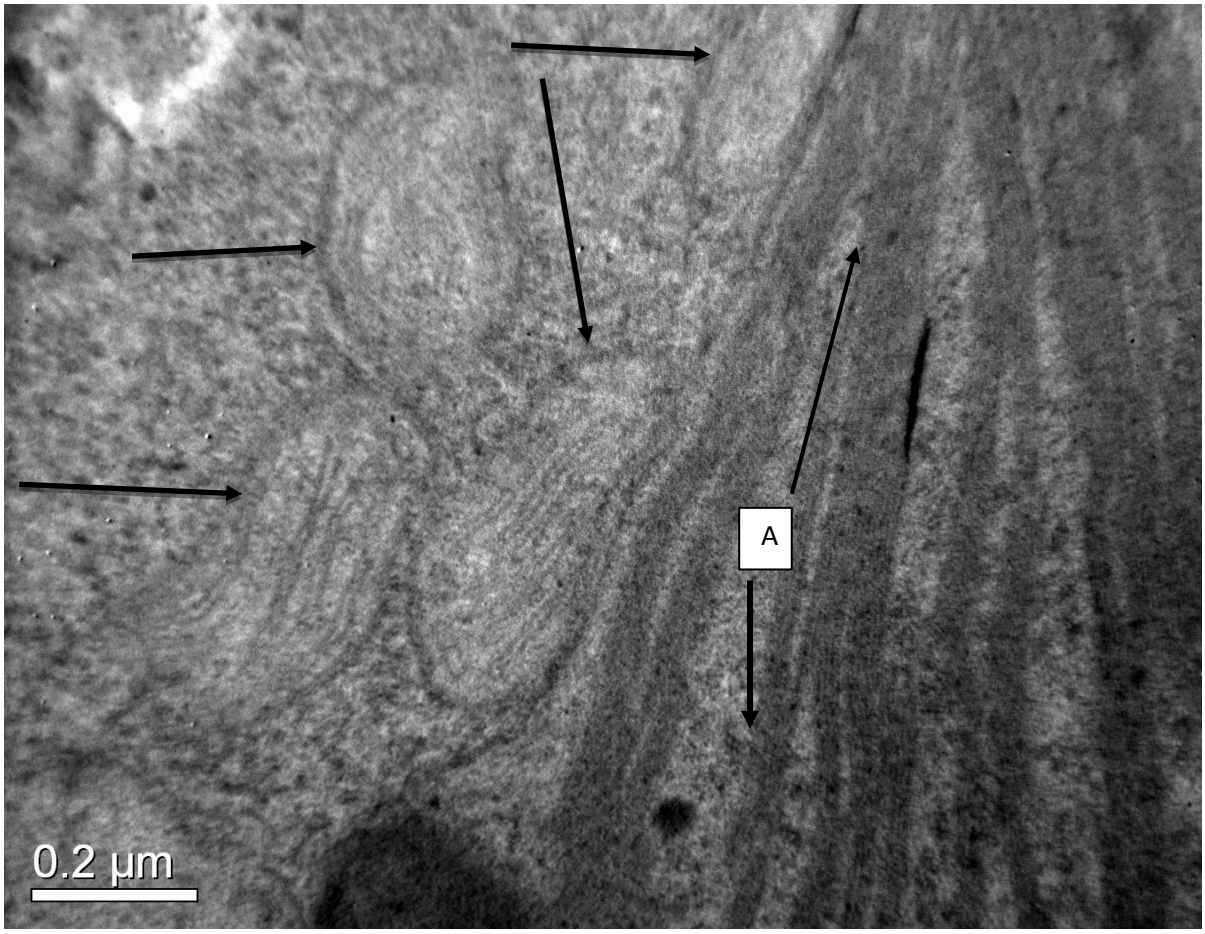
Στην εικόνα 3.3 μπορούν να φανούν σαφώς καθαρά τα οργανίδια του κυττάρου. Εύκολα μπορεί να διαπιστωθεί η παρουσία πυρήνα που περιέχει πυρινίσκους (Ζ), χλωροπλάστη με θηλακοειδή μεμβράνες (Β) αλλά και πάνω από ένα μιτοχόνδρια είναι διακριτά (Ε, Γ). Η παρουσία αυτών των οργανιδίων είναι επαρκής για να συμπεράνουμε ότι αυτός ο φωτοσυνθετικός μικροοργανισμός είναι ένα μικροφύκος και όχι κυανοβακτήριο, καθώς τα μικροφύκη, ως είναι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί [107] έχουν οργανωμένο πυρήνα, χλωροπλάστες, μιτοχόνδρια και σύμπλεγμα Golgi. Στην εικόνα μπορεί να φανεί έντονα το σύμπλεγμα Golgi (Η). Παράλληλα λεπτομέρειες μπορούν να φανούν καθώς φαίνεται η *cis* πλευρά του συμπλέγματος Golgi (Θ), η *trans* πλευρά του συμπλέγματος Golgi (Ι) αλλά και τα εκκριτικά κυστίδια (σφαιρικού σχήματος λευκοί κύκλοι) όπου μεταφέρουν πρωτεΐνες και άλλα βιομόρια από το σύμπλεγμα Golgi σε άλλα μέρη του κυττάρου (Κ). Το κυτταρικό τοίχωμα (Δ) αλλά και η εξωκυττάρια μήτρα που είναι προσδεμένη στο κυτταρικό τοίχωμα του κυττάρου (Α). Όπως μπορεί να φανεί δεν καλύπτει όλο το κύτταρο αλλά ένα μέρος του, όπου ο λόγος είναι ότι παίζει ρόλο η γωνία της τομής 3.3. Κάτι που παρουσιάζει επίσης ενδιαφέρον είναι ότι η μεμβράνη του θυλακοειδούς αλληλεπιδρά με μεμβράνη του πυρήνα, μια παρατήρηση που συμφωνεί με [108] καθώς αυτό έχει παρατηρηθεί και σε άλλα είδη *Chlorella*. Στην εικόνα 3.4

μπορούν να φανούν με μεγαλύτερη λεπτομέρεια τα μιτοχόνδρια του μικροοργανισμού αλλά και οι θηλακοειδής μεμβράνες (Α).



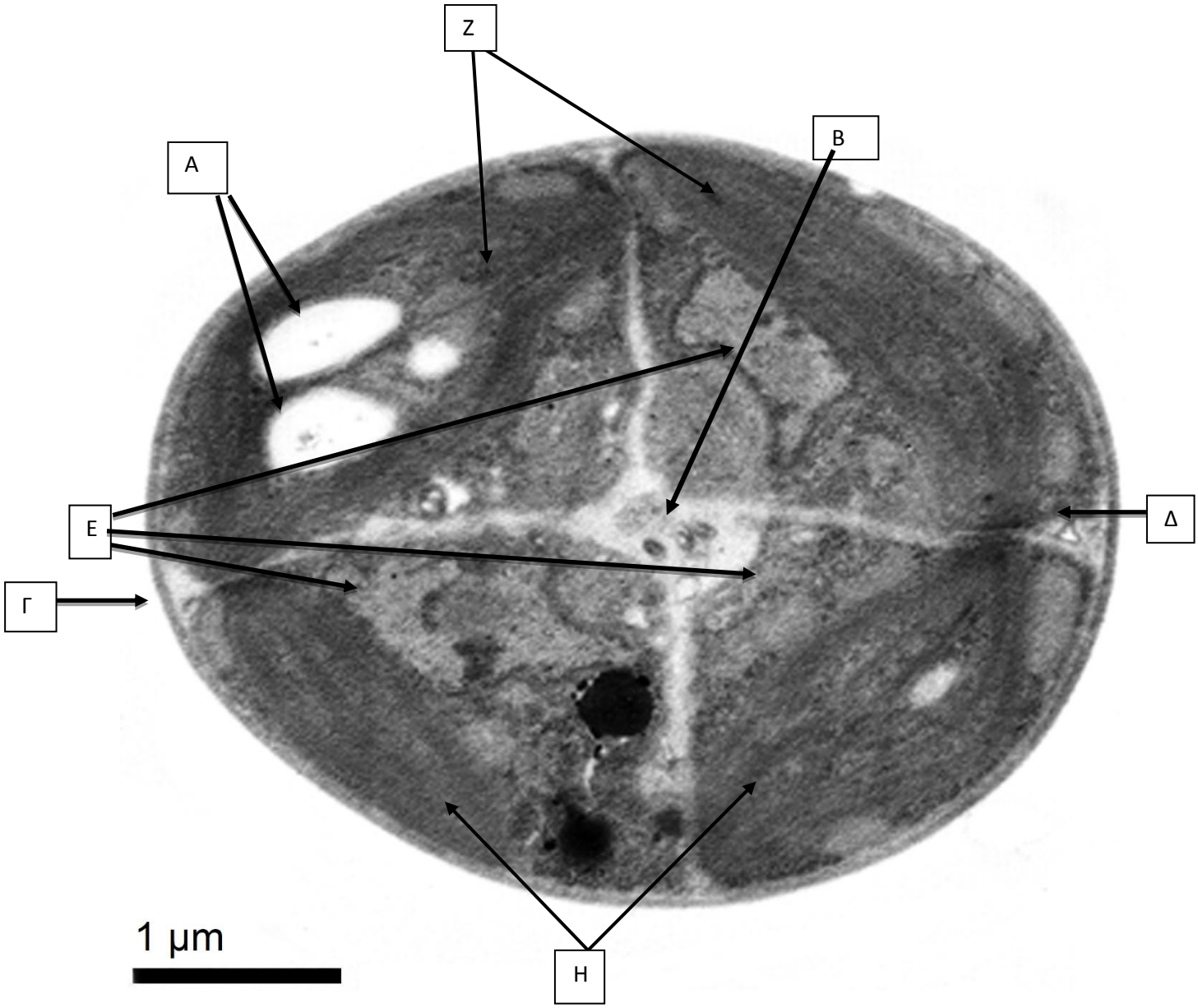
Εικόνα 3.3. Φωτογραφία τομής TEM. Στο βέλος Α φαίνεται η εξωκυττάρια μήτρα που καλύπτει ένα μέρος του κυτταρικού τοιχώματος. Το βέλος Β δείχνει το χλωροπλάστη με τα θηλακοειδή. Τα βέλη Γ και Ε δείχνουν τα μιτοχόνδρια. Το βέλος Δ δείχνει το κυτταρικό τοίχωμα. Το βέλος Ζ δείχνει την οργάνωση του γενετικού υλικού σε πυρήνα και την παρουσία άνω του ενός πυρινίσκων. Στο βέλος Η φαίνεται το σύμπλεγμα Golgi. Το βέλος Θ δείχνει τη *cis* πλευρά του συμπλέγματος Golgi, ενώ το

βέλος Ι την *trans* πλευρά του. Το βέλος Κ δείχνει τα κυστιδία που εκκρίνονται από την *trans* πλευρά του συμπλέγματος Golgi. Στο βέλος Λ μπορεί να φανεί η διείσδυση της θυλακοειδούς μεμβράνης στην μεμβράνη του πυρήνα.



Εικόνα 3.4. Φωτογραφία τομής ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας διέλευσης, τα βέλη δείχνουν τα μιτοχόνδρια στον μικροοργανισμό. Τα βέλη Α υποδεικνύουν τις θηλακοειδής μεμβράνες.

Με βάση τα μέχρι τώρα αποτελέσματα και τη σύγκριση με τη βιβλιογραφία [28, 109, 110] ο μικροοργανισμός ανήκει στο γένος *Chlorella*.

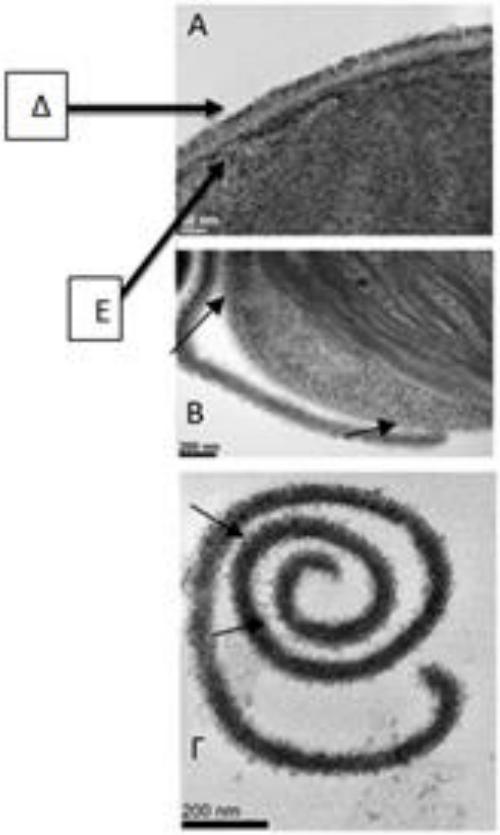


Εικόνα 3.5. Φωτογραφία τομής ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας διέλευσης όπου μπορεί να φανεί η διαδικασία της αυτοσποραγίας. Στο βέλος Α φαίνονται τα κοκίδια αμύλου, Στο βέλος Β είναι ο ενδιάμεσος χώρος του κυτταροσπόριου, στο βέλος Γ μπορεί να φανεί η μήτρα, στο βέλος Δ φαίνεται το νεοσυντεθέμενο κυτταρικό τοίχωμα του θυγατρικού κυττάρου, στα βέλη Ε φαίνονται οι πυρήνες των θυγατρικών κυττάρων και στα βέλη Ζ,Η είναι οι χλωροπλάστες με τα θηλακοειδή των θυγατρικών κυττάρων.

Όπως μπορεί να διαπιστωθεί και με την εικόνα 3.5 ο μικροοργανισμός αυτός διαιρείται με την μέθοδο της αυτοσποραγίας, όπως έχει αναφερθεί για τα κύτταρα του γένους *Chlorella*. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.5, το κύτταρο είναι στο στάδιο της δεύτερης διαίρεσης του πρωτοπλάστη [49]. Στην εικόνα 3.5 το βέλος (Β) δείχνει το

ενδιάμεσο διάστημα που μεσολαβεί ανάμεσα στα τέσσερα νέα θυγατρικά κύτταρα. Παράλληλα τα βέλη Ζ και Η δείχνουν τους χλωροπλάστες με τα θηλακοειδή των θυγατρικών κυττάρων. Έπειτα στο βέλος (Γ) είναι η μήτρα εξωπολυσακχαρίτη που καλύπτει το αυτοσπόριο, της οποίας η δομή καταρρέει και με αυτόν τον τρόπο ολοκληρώνεται η διαδικασία της εκκόλαψης και απελευθερώνονται προς τα έξω τα νέα κύτταρα με τα νέα συντιθέμενα κυτταρικά τοιχώματα. Όταν το κυτταρικό τοίχωμα των νέων κυττάρων γίνει αρκετά πυκνό ξεκινάει η διαδικασία της εκκόλαψης [25]. Αυτός μπορεί να είναι και ένας αποτελεσματικός τρόπος διαίρεσης, καθώς η μήτρα προστατεύει τα νεοσυντιθέμενα κύτταρα από αντίξοες συνθήκες κάνοντάς τα πιο ανθεκτικά. Επίσης στα βέλη (Α) μπορεί να φανούν τα κοκκίδια αμύλου. Κάτι που είναι επίσης διακριτό είναι τα νέα κυτταρικά τοιχώματα των θυγατρικών κυττάρων (Δ) ενώ με τα βέλη (Ε) φαίνονται οι νέοι πυρήνες των κυττάρων αυτών. Αυτή η μέθοδος αυτοσποραγίας είναι ένας πρόωρος τύπος σύνθεσης θυγατρικου κυτταρικού τοιχώματος τον ίδιο τρόπο διαίρεσης γίνεται και στα κύτταρα *Chlorella vulgaris, Chlorella sorokiniana, Chlorella lobophora* [25]. Σε μικροφύκη και κυανοβακτήρια, η σύνθεση υδατανθράκων λαμβάνει χώρα στους χλωροπλάστες και στο κυτταρόπλασμα κατά τη διάρκεια του κύκλου του Calvin, χρησιμοποιώντας NADPH και ATP, που με τη σειρά τους παράγονται από πρωτόνια και ηλεκτρόνια που προέρχονται από τη διάσπαση του νερού κατά τη διάρκεια των φωτοσυνθετικών αντιδράσεων. Το διοξείδιο του άνθρακα καθηλώνεται στον κύκλο του Calvin με την παρέμβαση της Rubisco. Η Rubisco καρβοξυλιώνεται σε 2 μόρια 3-φωσφογλυκερικού εστέρα, ένα από τα οποία χρησιμοποιείται για τον σχηματισμό υδατανθράκων [111]. Όπως μπορεί να φανεί και στην εικόνα 3.3 ξεχωρίζει το σύμπλεγμα Golgi, που φαίνεται ως ένα σύστημα από παράλληλους πεπλατυσμένους σάκους το οποίο βρίσκεται κοντά στο κυτταρικό τοίχωμα. Το σύμπλεγμα Golgi συγκροτείται από στοίβες επιπεδομένων μεμβρανικών ασκών (Cisternae), που ονομάζονται δικτυοσώματα και δύο οργανωμένες πολύ-υπομονάδες πρωτεϊνικών (τετράδες μεμβράνης) που πιστεύεται ότι είναι πολύ-ενζυμικά σύμπλοκα. Η τοποθεσία του οργανιδίου βρίσκεται κοντά στον πυρήνα και φαίνεται αρκετά καθαρά. Μετά από έρευνες που έγιναν με τη χρήση του αντιβιοτικού Brefeldin A (BFA) και διάφορες τεχνικές χρώσης με πολυσακχαρίτες αποδείχθηκε ότι η βιοσύνθεση και η τροποποίηση πολυσακχαριτών και έξωπολυσακχαριτών στα μικροφύκη λαμβάνει

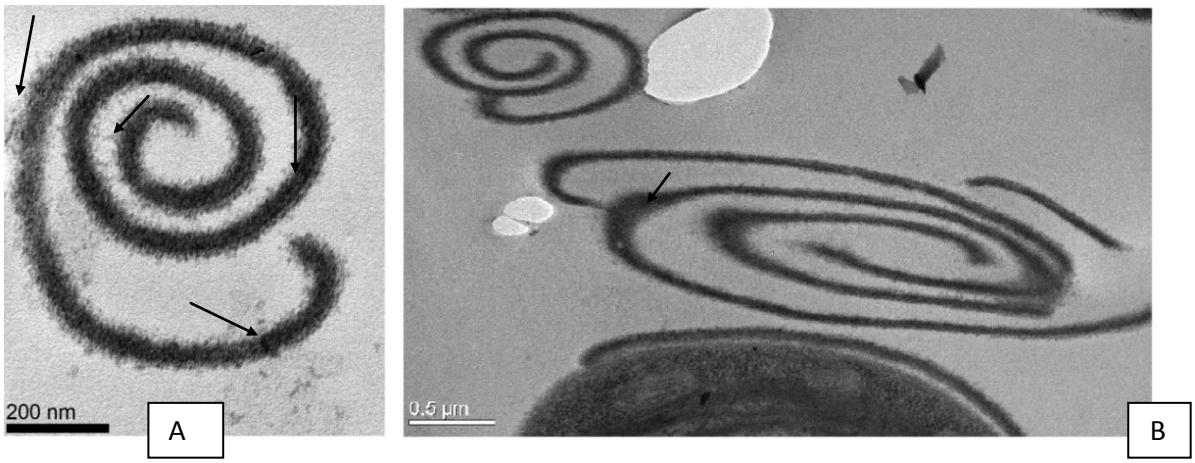
χώρα μέσω του συμπλέγματος Golgi. Το αντιβιοτικό αυτό αλλάζει τη δομη του συμπλέγματος Golgi και εμποδίζει τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το ενδοπλασματικό δίκτυο [112, 113]. Πακεταρισμένα εκκριτικά προϊόντα κυστιδίων ακολουθούν τη διαδρομή από το σύμπλεγμα Golgi έως τη σύντηξη τους με τη κυτταροπλασματική μεμβράνη. Στο σύμπλεγμα θεωρείται ότι λαμβάνει χώρα η σύνθεση των EPS. Επιπλέον μελέτες ραδιοεπισήμανσης έχουν δείξει ότι η βιοσύνθεση της ανθρακικής αλυσίδας αλλά και τροποποιήσεις του πολυσακχαρίτη γίνεται στο σύμπλεγμα Golgi. Στα στοιβαγμένα στρώματα πραγματοποιείται η σύνθεση πρωτεϊνών, γλυκοπρωτεϊνών, πρωτεογλυκανών και πολύπλοκων σακχάρων και στο ίδιο σύμπλεγμα ενεργούν ένζυμα όπως γλυκοζυλτρανσφεράσεις [114]. Όπως φαίνεται και από την εικόνα 3.3 το σύμπλεγμα Golgi αποτελείται από την *cis* και *trans* πλευρά. Αναλυτικότερα η σύνθεση πολυσακχαριτών γίνεται σε διαφορετικές στοίβες των παράλληλων επιπεδωμένων δίσκων του συμπλέγματος Golgi. Η κατεύθυνση της μεταφοράς των πολυσακχαριτών εσωτερικά του Golgi είναι από την *cis* στην *trans* πλευρά. Έπειτα οι πολυσακχαρίτες πακετάρονται σε εκκριτικά κυστίδια και μεταφέρονται [115, 116].



Εικόνα 3.6. Φωτογραφία τομής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας: στην εικόνα Α το βέλος Δ δείχνει το πάχος του εξωπολυσακχαρίτη και το βέλος Ε την εσωτερική μεμβράνη του κυτταροπλάσματος. Τα βέλη στην εικόνα Δ δείχνουν τις αλληλεπιδράσεις του πολυσακχαρίτη με το κυτταρικό τοίχωμα του κυττάρου. Ενώ τα βέλη στην εικόνα Γ φαίνονται οι αλληλεπιδράσεις στο εσωτερικό του εξωπολυσακχαρίτη.

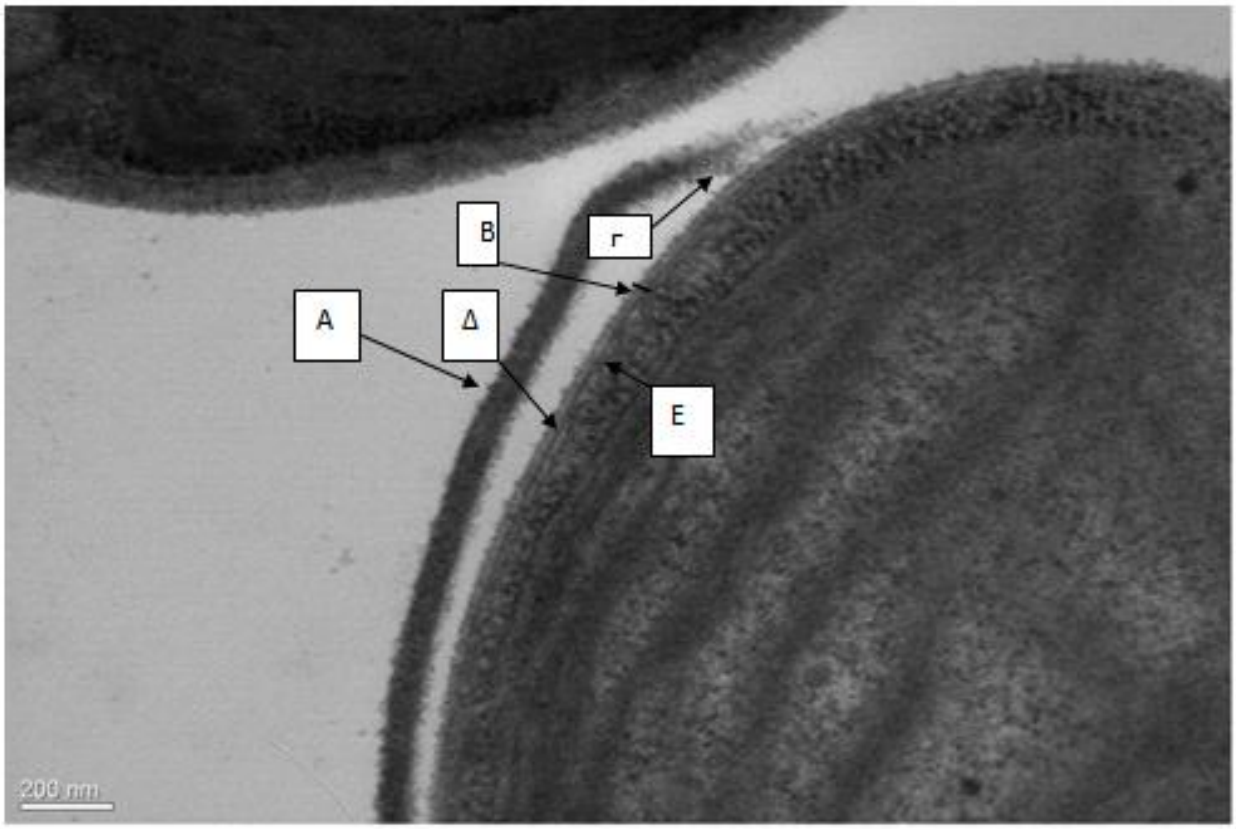
Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.6.Γ, κομμάτι της μήτρας είναι απελευθερωμένο στο διάλυμα κάπι αρκετά παρόμοιο μπορεί να παρατηρηθεί και σε κύτταρα *Chlorella vulgari* [117]. Η παρατήρηση αυτή με την μήτρα απελευθερωμένη στο διάλυμα μπορεί να παρατηρηθεί αντίστοιχα και στις εικόνες SEM (εικόνες 3.12 και 3.14). Στην εικόνα Β) μπορεί να φανεί το θυγατρικό κύτταρο μετά την εκκόλαψη από το αυτοσπόριο. Επιπλέον φαίνεται ότι μετά την εκκόλαψη από το αυτοσπόριο το κυτταρικό τοίχωμα των θυγατρικών κυττάρων είναι αρκετά πυκνό που θυμίζει το πάχος της μήτρας κατά την διαδικασία της αυτοσποραγίας. Τα νέα θυγατρικά κύτταρα μετά την εκκόλαψη ξεκινάνε

τη διαδικασία της αυτοσποραγίας. Μια επιπλέον παρατήρηση ήταν το γεγονός ότι το πάχος του κυτταρικού τοιχώματος των κυττάρων άλλαζε αναλόγως τη φάση του κυτταρικού κύκλου των κυττάρων. Παράλληλα φαίνεται ότι υπάρχει ένα μοτίβο που επαναλαμβάνεται στην δομή της εξωκυττάριας μήτρας όπου στις τομές φαίνεται ως σπειροειδής δομή. Επίσης, όπως μπορεί να φανεί και στην εικόνα 3.7, υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των ινιδίων της μήτρας με περιοχές του σπειράματος σχηματίζοντας αυτές τις σπειροειδής δομές. Λόγω της αλληλεπίδρασης αυτής έχει ένα επαναλαμβανόμενο σχήμα, πράγμα που μπορεί να φανεί και στις εικόνες του SEM (εικόνες 3.12 και 3.14).

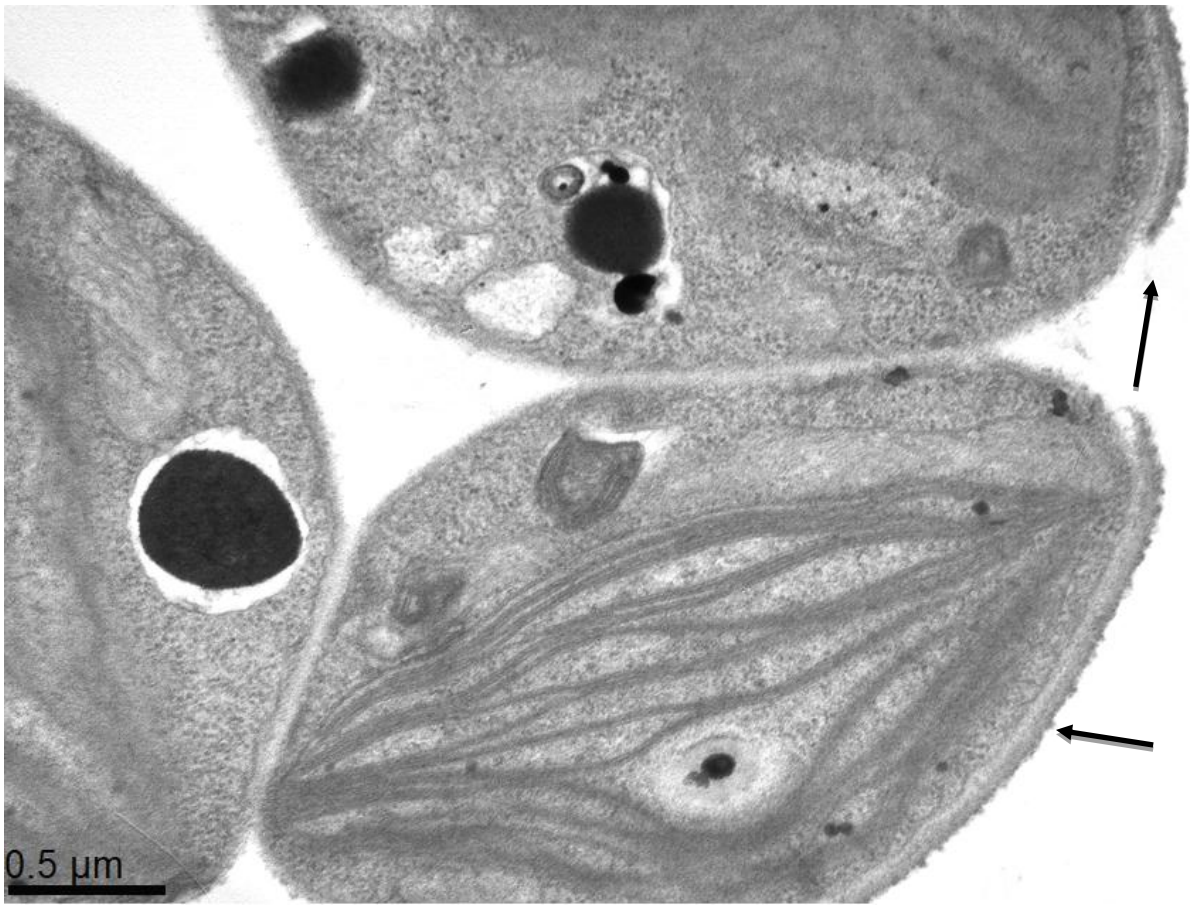


Εικόνα 3.7. Φωτογραφία τομής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας. Η εικόνα Α είναι η μεγεθυμένη εικόνα από την Γ της εικόνας 3.6. Με τα βέλη στην εικόνα Α και Β μπορεί να φανούν μικροϊνίδια της μήτρας, κάτι που δίνει τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης με το κυτταρικό τοίχωμα κυττάρων αλλά και με την ίδια τη μήτρα. Στην εικόνα Β φαίνεται η αλληλεπίδραση της μήτρας με τον εαυτό της, καθώς φαίνεται να περιτυλίγεται.

Στην εικόνα 3.8 μπορεί να φανεί καλύτερα η αλληλεπίδραση της μήτρας με το κυτταρικό τοίχωμα του κυττάρου να γίνεται μέσω των μικροϊνίδίων (Γ). Παράλληλα στην εικόνα μπορεί να φανεί η εσωτερική (Ε) και η εξωτερική μεμβράνη (Δ) του κυτταροπλάσματος. Επίσης στην εικόνα είναι διακριτό και το κυτταρικό τοίχωμα του κυττάρου (Β).



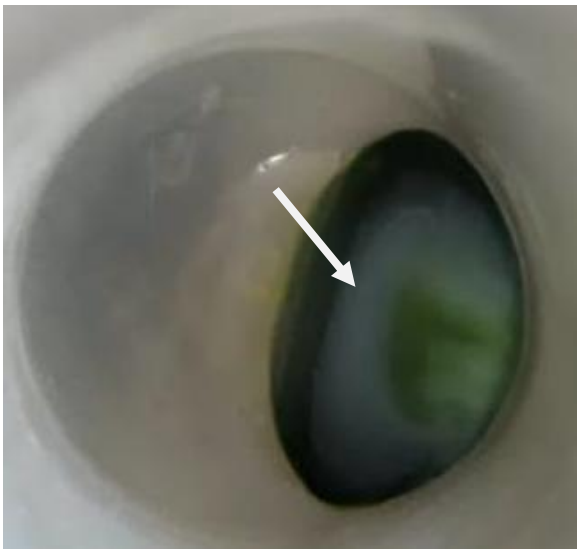
Εικόνα 3.8. Φωτογραφία τομής ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας. Το βέλος Α δείχνει την εξωκυττάρια μήτρα, ενώ το βέλος Γ δείχνει την αλληλεπίδραση της μήτρας με το κυτταρικό τοίχωμα. Τα βέλη Ε, Δ και Β δείχνουν την εσωτερική, εξωτερική μεμβράνη του κυτταροπλάσματος και το κυτταρικό τοίχωμα αντίστοιχα.



Εικόνα 3.9. Φωτογραφία τομής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας τα βέλη δείχνουν τα σημεία στα οποία είναι προσδεμένη η μήτρα στα κύτταρα.

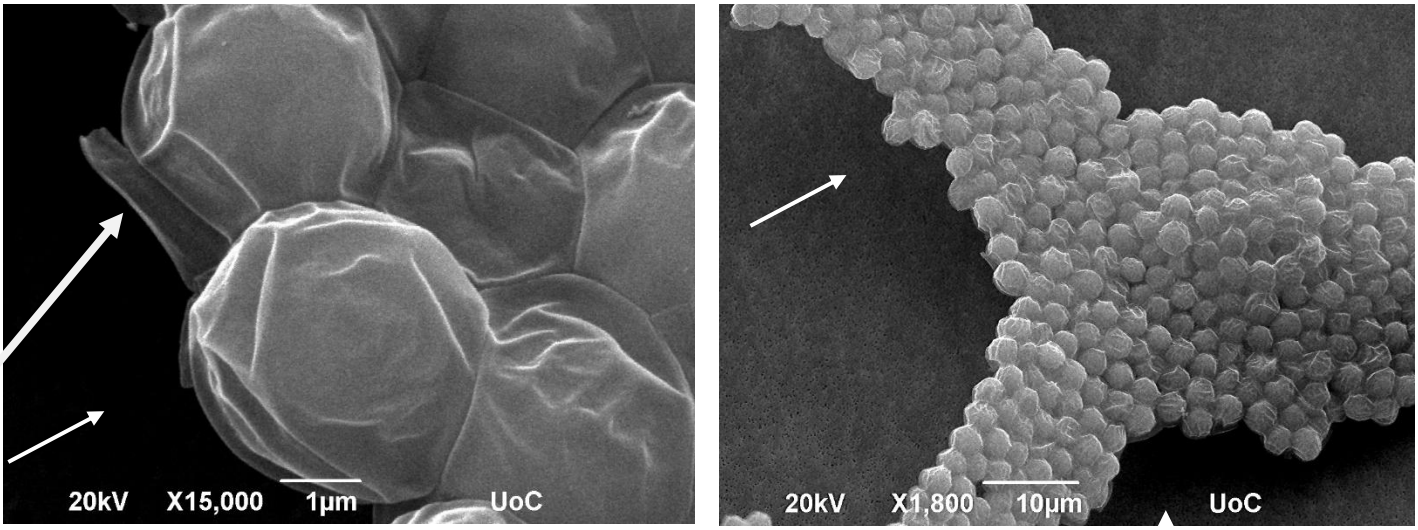
3.4.2. Μελέτη του παραγόμενου στερεού με τη χρήση με τη χρήση ηλεκτρονιακής μικροσκοπίας σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM)

Όπως έχει μελετηθεί και σε προηγούμενη εργασία, τα κύτταρα παράγουν μια εξωκυττάρια μήτρα τριγύρω τους. Στην εικόνα 3.10 εμφανίζεται η μήτρα αυτή, όπως παρατηρήθηκε για πρώτη φορά να επικαλύπτει τα κύτταρα.



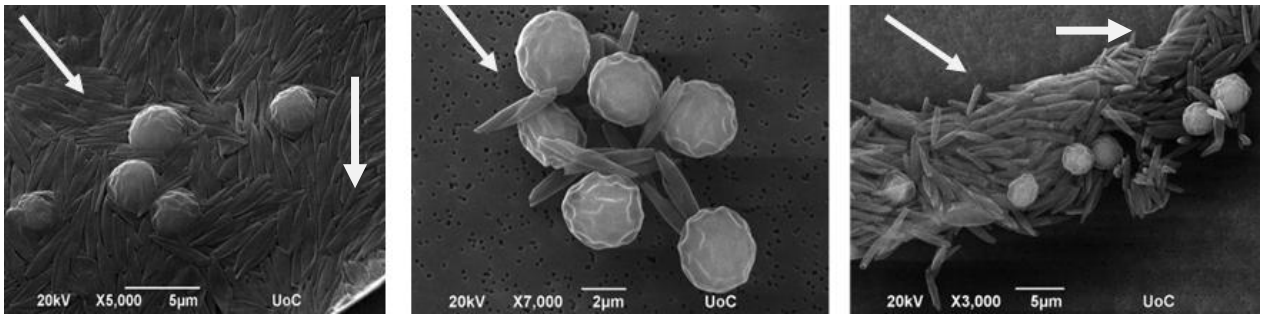
Εικόνα 3.10. Λευκό στερεό που επικαλύπτει τα κύτταρα έπειτα από φυγοκεντρήσεις

Το στερεό μελετήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο και στη συνέχεια σε SEM. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.11, η μήτρα περιβάλλει το κύτταρο. Αυτό μας οδηγεί στην υπόθεση ότι η μήτρα αυτή μπορεί να παίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού σε ακραία περιβάλλοντα, όπως ο ποταμός Γιόφυρος, αλλά και στην ανθεκτικότητα που έχει σε αντιβιοτικά όπως αυτή έχει διαπιστωθεί και σε προηγούμενη εργασία στο εργαστήριο



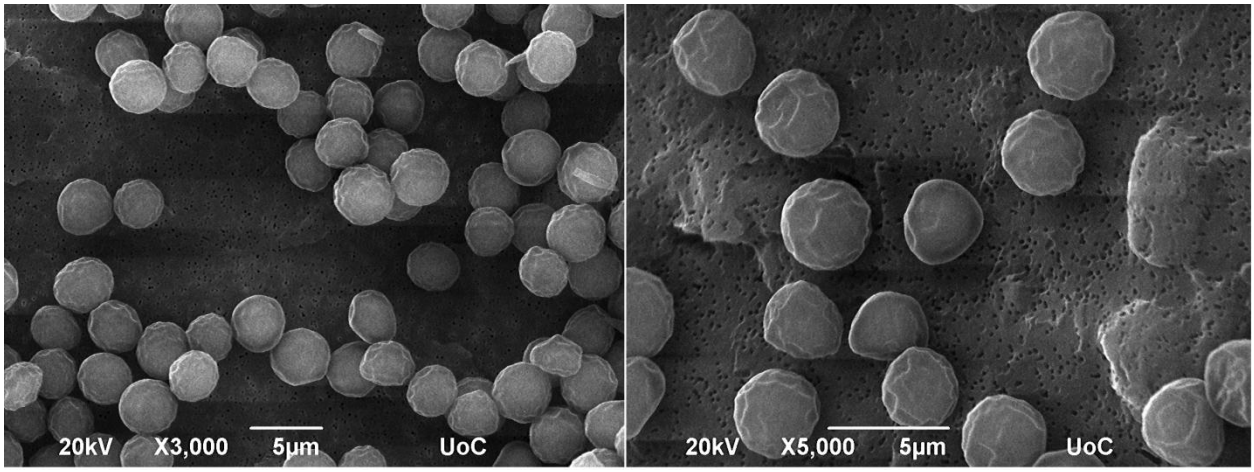
Εικόνα 3.11. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης του μείγματος μικροοργανισμού και λευκού ιζήματος, τα βέλη δείχνουν την μήτρα των κυττάρων.

Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η μήτρα μπορεί να διαχωριστεί μερικώς από τα κύτταρα, μηχανικά, με φυγοκέντρηση. Ο διαχωρισμός αυτός είναι εμφανής και στις φωτογραφίες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης 3.6.



Εικόνα 3.12. Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης του ιζήματος της εικόνας. Τα βέλη δείχνουν το τη λευκή μήτρα

Επιπλέον εικόνες ελήφθησαν από το πράσινο τμήμα, μετά το διαχωρισμό του από το λευκό στερεό, και αυτό που διαπιστώθηκε ήταν ότι δεν υπήρχε αυτή η μήτρα που επικάλυπτε τα κύτταρα, πράγμα που σημαίνει ότι το λευκό στερεό που παρατηρείται είναι από την εξωκυττάρια μήτρα. Πιο συγκεκριμένα, στην εικόνα 3.7 μπορεί να φανεί η αποικία των κυττάρων και η απουσία της μήτρας που έχει διαχωριστεί μηχανικά με φυγοκέντριση [94].

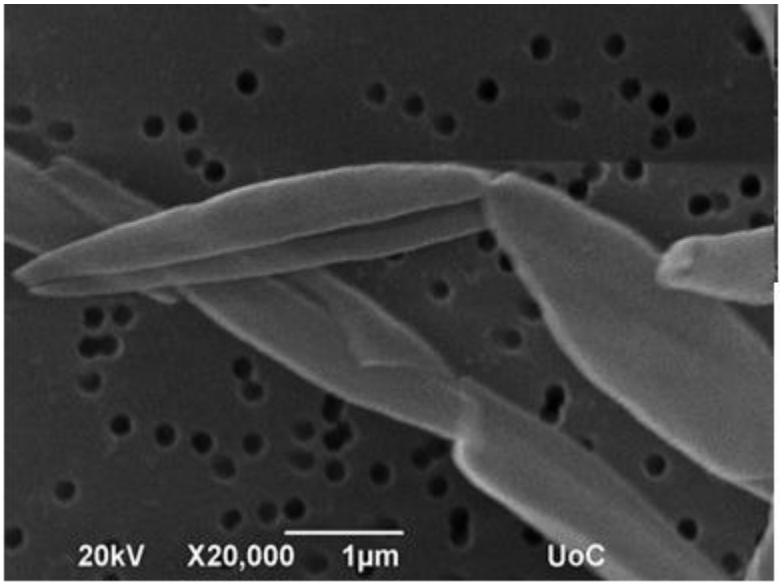


Εικόνα 3.13. Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης του ιζήματος της εικόνας. Πράσινο κομμάτι στερεού.

Αρκετά είδη μικροοργανισμών που ανήκουν στο γένος *Chlorella* χρησιμοποιούν εξωκυττάριες μήτρες με σκοπό την διαίρεση των κυττάρων τους [28]. Όπως έχει αναφερθεί και βιβλιογραφικά οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν να χρησιμοποιήσουν την εξωκυττάρια μήτρα και ως τροφή [28].

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση του λευκού ιζήματος με βάση το πρωτόκολλο που αναφέρεται στην παράγραφο 3.3.2. Στην εικόνα 3.14 διαπιστώνεται η αλλαγή της δομής της εξωκυττάριας μήτρας που έχει διαχωριστεί πλήρως από τα κύτταρα. Η αλλαγή της δομής της μητράς μπορεί να οφείλεται στην διαδικασία ξήρανσης που πραγματοποιήθηκε αναλυτικότερη αναφορά γίνεται παρακάτω. Σε αρκετούς μικροοργανισμούς αυτή η εξωκυττάρια μήτρα είναι ένας συνδυασμός από μονοσακχαρίτες και γλυκοπρωτεΐνες, που μπορούν να ενσωματωθούν είτε εξωτερικά στο κυτταρικό τοίχωμα είτε να απελευθερωθούν ως κολλώδεις ουσίες στο θρεπτικό [118]. Αυτοί οι εξωπολυσακχαρίτες (EPS) λειτουργούν ως ένας φυσικός φραγμός, προστατεύοντας τα κύτταρα από επιβλαβείς παράγοντες [49, 119] και εξυπηρετούν σε μια ευρεία σειρά φυσιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων της κυτταρικής προσκόλλησης, τις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και προς τον σχηματισμό βιολογικών υμενίων (biofilms) [120]. Σε μικροφύκη και κυανοβακτήρια, τα EPS είναι ορατά ως βλεννώδες στρώμα που περιβάλλει κύτταρα και διευκολύνουν το σχηματισμό βιολογικών υμενίων (biofilms), όπως παρατηρείται και στις εικόνες από την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης [121-124]. Οι EPS μπορούν να χαρακτηριστούν ως ένα λεπτό περίβλημα το οποίο βρίσκεται δίπλα στην εξωτερική κυτταρική μεμβράνη. Επίσης μπορεί να θεωρηθούν καψίδιο που συνδέεται στενά με την κυτταρική επιφάνεια και μπορεί να είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με το κυτταρικό τοίχωμα. Σε αρκετές περιπτώσεις μπορεί να είναι χαλαρά προσδεμένα στην κυτταρική επιφάνεια εξού και η μηχανική απομόνωσή τους με φυγοκέντρηση [8]. Βιβλιογραφικά αναφέρεται ότι στις μήτρες λειτουργούν δυνάμεις van der Waals, ιοντικές αλληλεπιδράσεις ελκτικές δυνάμεις ηλεκτροστατικής φύσεις [125]. Έχει αναφερθεί ότι στους έξω-πολυσακχαρίτες δημιουργούνται ισχυρές δυνάμεις υδρογόνου μεταξύ των υδατανθράκων και των πρωτεϊνών και του νερού που μπορεί να περιέχεται ανάμεσα [125]. Η απουσία νερού λόγω της ξήρανσης μπορεί να είναι ένας βασικός παράγοντας για την παρατηρούμενη δομή της μήτρας μετά την ξήρανση όπως φαίνεται και στις αντίστοιχες εικόνες 3.12 και

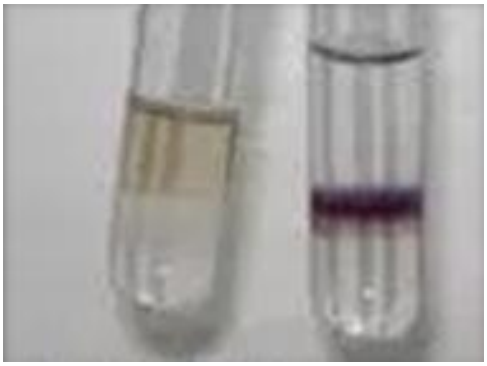
3.14 . Ομοίως το ίδιο παρατηρήθηκε και στις εικόνες TEM. Το συμπέρασμα είναι λογικό καθώς και στις δύο διαδικασίες το δείγμα ξηραίνεται οπότε και στις δύο τεχνικές είναι λογικό να εμφανίζεται αυτή η επαναλαμβανόμενη σπειροειδής δομή.



Εικόνα 3.14.Φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης του πλήρως απομονωμένου λευκού ιζήματος από τα κύτταρα.

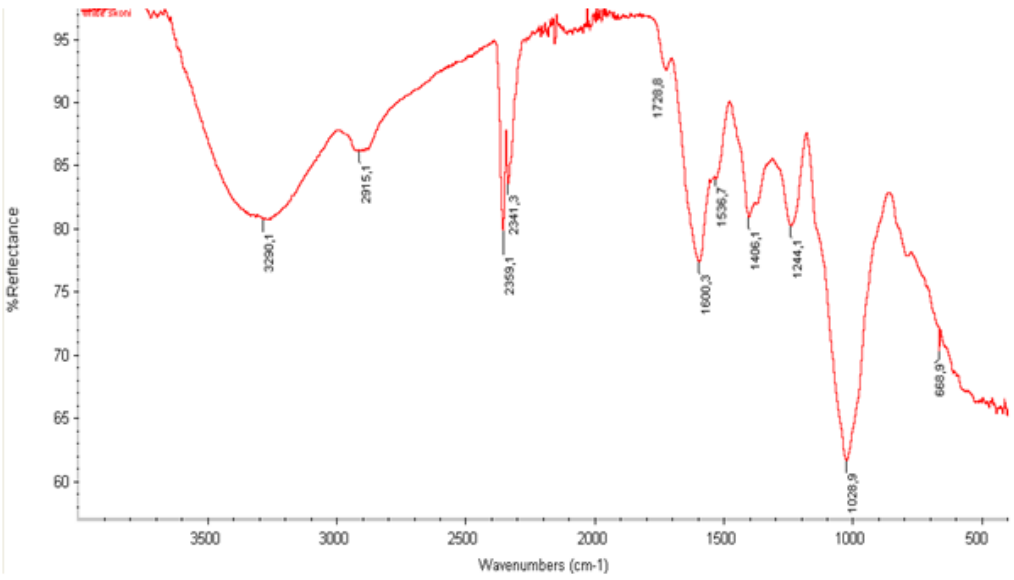
3.4.3. Χαρακτηρισμός της εξωκυττάριας μήτρας

Σε μια ποσότητα από το ξηρό στερεό της εξωκυττάριας μήτρας πραγματοποιήθηκαν οι δοκιμασίες με το αντιδραστήριο Lugol (τεστ ιωδίου) και του τεστ Molisch για την ανίχνευση σακχάρων.Κατά τη δοκιμασία του τεστ Molisch εμφανίστηκε ο χαρακτηριστκός μωβ δακτύλιος που επιβεβαιώνει την ύπαρξη πολυσακχαρίτη. Το προϊόν αυτό δεν ήταν άμυλο, καθώς το διάλυμα δεν χρωματίστηκε ιώδες κατά τη δοκιμασία με το τεστ ιωδίου.



Εικόνα 3.15. Στα δεξιά φαίνεται το θετικό αποτέλεσμα του Molisch test για το διαφανές στερεό και στα αριστερά το αρνητικό αποτέλεσμα που περιείχε νερό.

Για τον επιπλέον χαρακτηρισμό πραγματοποιήθηκε μελέτη με φασματοσκοπία υπερύθρου. Στην εικόνα 3.16 φαίνεται το φάσμα υπερύθρου του στερεού. Παρατηρήθηκαν, χαρακτηριστικές κορυφές που υποδηλώνουν την ύπαρξη γλυκοσιδικού δεσμού στην περιοχή 900-1200 cm^{-1} [126-128]. Παράλληλα το φάσμα υπερύθρου εμφανίζει συγκρίσιμες κορυφές με άλλα φάσματα υπερύθρου από πολυσακχαρίτες, ειδικά από τους πολυσακχαρίτες χιτίνης και χιτοζάνης [126, 129, 130]. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ότι το κυτταρικό τοίχωμα στο μικροφύκος *Chlorella variabilis* περιλαμβάνει χιτίνη και χιτοζάνη [131]. Κάτι που ενισχύει την υποψία ύπαρξης πολυσακχαρίτη είναι η κάμψη της δόνησης του δεσμού O-H όπως φαίνεται και στην περιοχή 3290 cm^{-1}, καθώς είναι χαρακτηριστικό για την ύπαρξη ομάδων υδροξειδίων στους πολυσακχαρίτες. Επίσης αξιοσημείωτη είναι η ύπαρξη κορυφής στα 1536 cm^{-1},η οποία υποδηλώνει την ύπαρξη αμινομάδας [132]. Κάτι που υποδηλώνει την πιθανή ύπαρξη πρωτεϊνών αλλά και υδατανθράκων που μπορεί να περιέχουν αμινομάδες όπως η γλυκοζαμίνη και η γαλακτοζαμίνη. Για να διαπιστωθεί, πραγματοποιήθηκε και μελέτη NMR. Τέλος, η κορυφή στα 1600,3 cm^{-1} αποδίδεται στην επικάλυψη των σημάτων της κάμψης NH και $-COO^-$ [133].



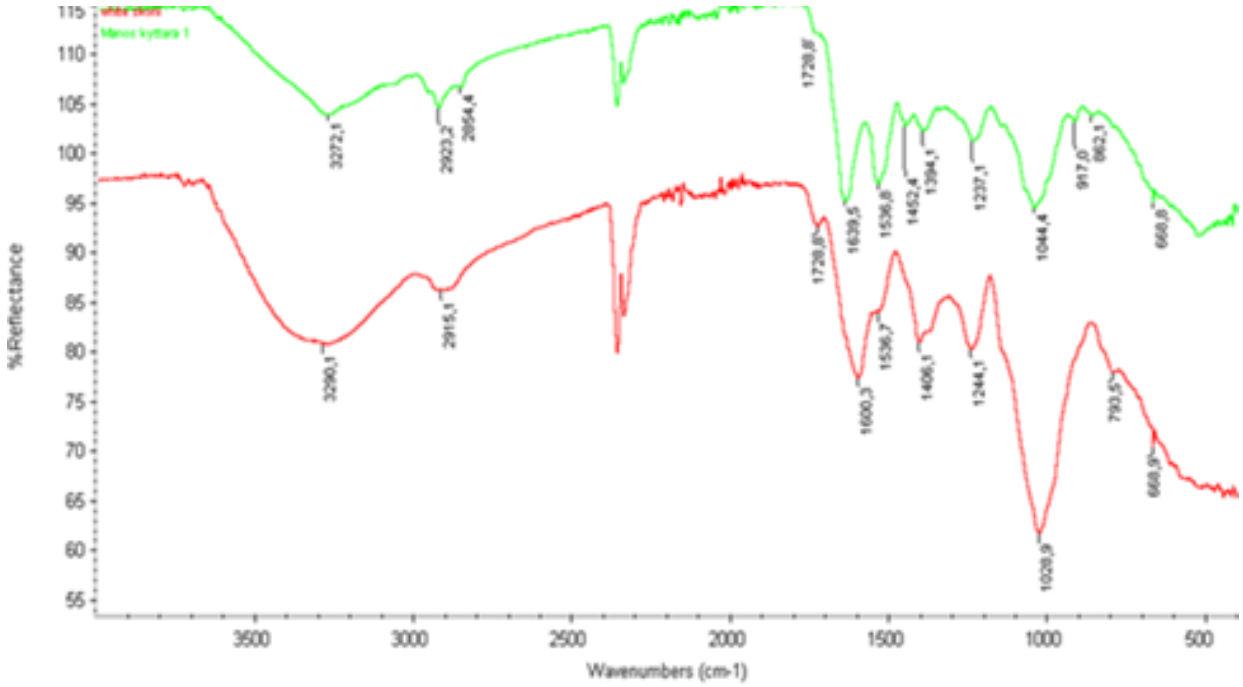
Εικόνα 3.16. IR από τον απομονωμένο πολυσακχαρίτη.

Πίνακας 3.8. Ανάθεση κορυφών από το φάσμα υπερύθρου της εικόνας 3.16

Κορυφές σε cm^{-1}	**Αντίστοιχες αναθέσεις κορυφών**
3290,1	Δόνηση κάμψης δεσμού O-H[134]
2915,1	Αλειφατική δόνηση κάμψης δεσμού (C-H)[134]
1728,8	Δόνηση κάμψης δεσμού (C = O) ελεύθερης οξικής ομάδας και (C = O) εστερικής ομάδας[134]
1600,3	Δόνηση δεσμών $-NH_2$, C=O[134]
1536,7	φθίνουσα δόνηση του $-NH_2$[132]
1406,1	Δόνηση δεσμού αλειφατικής αλυσίδας C-Cκαι δόνηση έκταση δεσμού C-O-O[134, 135]
1244,1	C-OH και C-H κάμψη στο επίπεδο [136]
1028,9	Ενισχυμένη κορυφή α-γλυκοσιδικού δεσμού O-C-O[126-128, 137]

Στη συνέχεια ελήφθη φάσμα υπερύθρου από λυοφιλοποιημένα κύτταρα. Ο βασικός λόγος ήταν να διαπιστωθεί ότι η απομονωμένη μήτρα καλύπτει τα κύτταρα και το φάσμα IR να συγκριθεί με την απομονωμένη από τα κύτταρα μήτρα. Στην εικόνα 3.17 φαίνεται

το φάσμα υπερύθρου των λυοφιλοποιημένων κυττάρων σε σύγκριση με του πολυσακχαρίτη. Όπως παρατηρείται, τα φάσματα υπερύθρου του απομονωμένου πολυσακχαρίτη αλλά και των λυοφιλοποιημένων κυττάρων μοιάζουν αρκετά. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στον πίνακα 3.9 οι περισσότερες κορυφές που εμφανίζονται στο φάσμα υπερύθρου των λυοφιλοποιημένων κυττάρων είναι ακριβώς οι ίδιες ή ελαφρές μετατοπίσεις αυτών του προς μελέτη στερεού. Επιβεβαιώνοντας την υπόθεση ότι η μήτρα αυτή επικαλύπτει τα κύτταρα και έχει αρκετό πάχος ώστε η υπέρυθρη ακτοβολία να μην είναι αρκετή για να διαπεράσει την μήτρα. Μπορούμε να συμπεράνουμε λοιπόν ότι η μήτρα καλύπτει τα κύτταρα, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.



Εικόνα 3.17. Συγκρίσεις από τα φάσματα υπερύθρου του απομονωμένου πολυσακχαρίτη(κόκκινη γραμμή) αλλά και των λυοφιλοποιημένων κυττάρων (πράσινη γραμμή)

Πίνακας 3.9. Ανάθεση κορυφών από το φάσμα υπερύθρου των λυοφιλοποιημένων κυττάρων (πράσινη γραμμή).

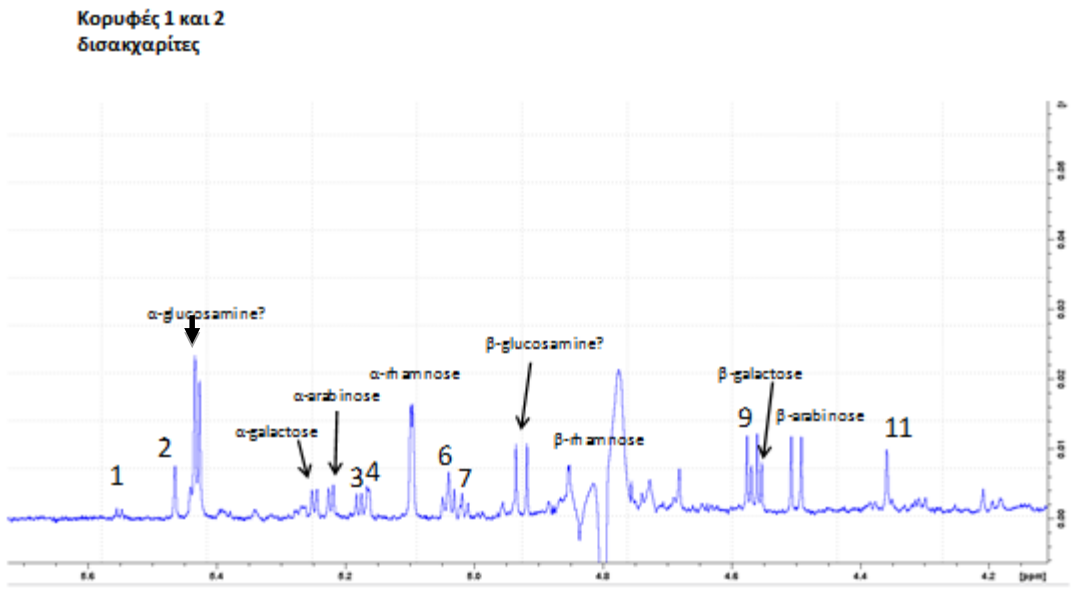
Κορυφές σε cm^{-1}	**Αντίστοιχες αναθέσεις κορυφών**
3272,1	Δόνηση κάμψης δεσμού O-H [134]
2923,2 και 2854,4	Αλειφατική δόνηση κάμψης δεσμού (C-H) [134]
1728,8	Δόνηση κάμψης δεσμού (C = O) ελεύθερης οξικής ομάδας και (C = O) εστερικής ομάδας [134]
1639,5	Δόνηση του NH_2 [138]
1536,6	φθίνουσα δόνηση του δεσμού NH_2[132]
1452,4	CH_2 σε πολυσακχαρίτες [139]
1237,1	C-OH και C-H κάμψη στο επίπεδο [136]
1044,4	επιμήκυνση δόνησης ομάδας C-O-C [128]
862,1	Επιμικύνινση δαχτυλίου του β-1,4 γλυκοσιδικού δεσμού [140, 141]

Παρόλα αυτά ο πολυσακχαρίτης αυτός δεν εμφάνισε διαλυτότητα στο νερό ή σε οργανικούς διαλύτες (ακετόνη, DMSO). Κατά συνέπεια, για περαιτέρω μελέτες χαρακτηρισμού κρίθηκε αναγκαία η υδρόλυση του πολυμερούς. Η διαδικασία υδρόλυσης περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 3.3.9. Μετά το τέλος της υδρόλυσης και την απομάκρυνση του TFA παρέμεινε ένα καφέ στερεό, γεγονός που υποδεικνύει την καραμελοποίηση των σακχάρων που υπήρχαν. Έπειτα το στερεό αυτό διαλύθηκε σε λίγο νερό και πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.3.10. Στην εικόνα 3.20 παρουσιάζεται το πλακίδιο χρωματογραφήματος.

Εικόνα 3.18.Το πλακίδιο TLC για το δείγμα με τα υδρολυμένα σάκχαρα. Στη θέση Γ είναι γαλακτόζη, στη Β γαλακτόζη και γλυκόζη, στην Α το υδρόλυμα και στη Δ γλυκοζαμίνη και γαλακτόζη. Με μαύρη γραμμή σημειώνεται η γραμμή εκκίνησης.

Όπως μπορεί να φανεί και στην είκονα 3.18 εμφανίζονται τέσσερις κηλίδες από το υδρόλυμα. Το δείγμα με τα υδρολυμένα σάκχαρα (θέση Α) εμφανίζει κηλίδες στο ίδιο ύψος με τις αντίστοιχες κηλίδες των πρότυπων θέσεων για τη γαλακτόζη (θέση Γ) και για γλυκοζαμίνη (θέση Δ). Αυτή η παρατήρηση αποτελεί ένδειξη για την παρουσία γαλακτόζης και γλυκοζαμίνης στα υδρολυμένα σάκχαρα. Για τη λήψη περισσότερο αξιόπιστων αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω μελέτες με τις τεχνικές που ακολουθούν.

Στη συνέχεια ακολούθησε ταυτοποίηση των σακχάρων του υδρολυμένου πολυμερούς μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού συντονισμού. Στην εικόνα 3.19 ταυτοποιούνται τα σακχάρα που υπήρχαν στο υδρόλυμα. Από αυτό το φάσμα NMR επιβεβαιώνεται η παρουσία γλυκοζαμίνης και γαλακτόζης, γεγονός που συμφωνεί και με τα αποτελέσματα από τη χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας. Παράλληλα ταυτοποιούνται επιπλέον σάκχαρα, όπως η ραμνόζη και η αραβινόζη. Οι κορυφές U1 και U2 στο ίδιο φάσμα αποτελούν ένδειξη για την ύπαρξη δισακχαρίτων. Επιπλέον δεν ήταν δυνατό να χαρακτηριστούν κάποιες οι κορυφές φάσμα στην εικόνα 3.19.



Εικόνα 3.19. Μονοδιάστατο(1D) φάσμα 1H NMR του υδρολύματος

Έπειτα λήφθηκαν επιπλέον φάσματα COSY και HSQC 1H-13C, τα οποία παρουσιάζονται στα σχήματα 13 και 14 του παραρτήματος. Με το φάσμα COSYδιαπιστώνεται η σχάση των γειτονικών πρωτονίων, ενώ με το φάσμα HSQC 1H-13C συσχετίζονται τα πρωτόνια και οι αντίστοιχοι πυρήνες 13C με τους οποίους συνδέονται ομοιοπολικά. Οι σχάσεις και τα ανωμερικά πρωτόνια και οι αντίστοιχοι άνθρακές τους συγκρίθηκαν με βάση δεδομένων του BMRB (Biological Magnetic Resonance Databank). Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται οι πειραματικές τιμές, καθώς και εκείνες της βιβλιογραφίας.

Πίνακας 3.10. Οι πειραματικές τιμές του υδρολύματος όλων των ενώσεων

	H-1(ppm)	H-1 J coupling	C-1 (ppm)
α-γλυκοζαμίνη	5.43	3.35	92.0
β-γλυκοζαμίνη	4.93	8.35	95.6
α-γαλακτόζη	5.25	3.65	95.0
β-γαλακτόζη	4.56	7.9	99.5
α-αραβινόζη	5.22	3.7	95.4

U1	5.55	3.75	102.1
U2	5.45	-	105.6
U3	5.18	3.75	95.0
U4	5.17	1.75	97.0
α-ραμνόζη	5.1	1.65	96.8
U6	5.04	-	86.6
U7	5.02	-	80.5
β-ραμνόζη	4.85	-	96.5
U9	4.57	7.9	99.5
β-αραβινόζη	4.5	7.9	99.8
U11	4.36	-	79.4

Πίνακας 3.11. Οι τιμές της βιβλιογραφίας για τις αντίστοιχες ενώσεις.

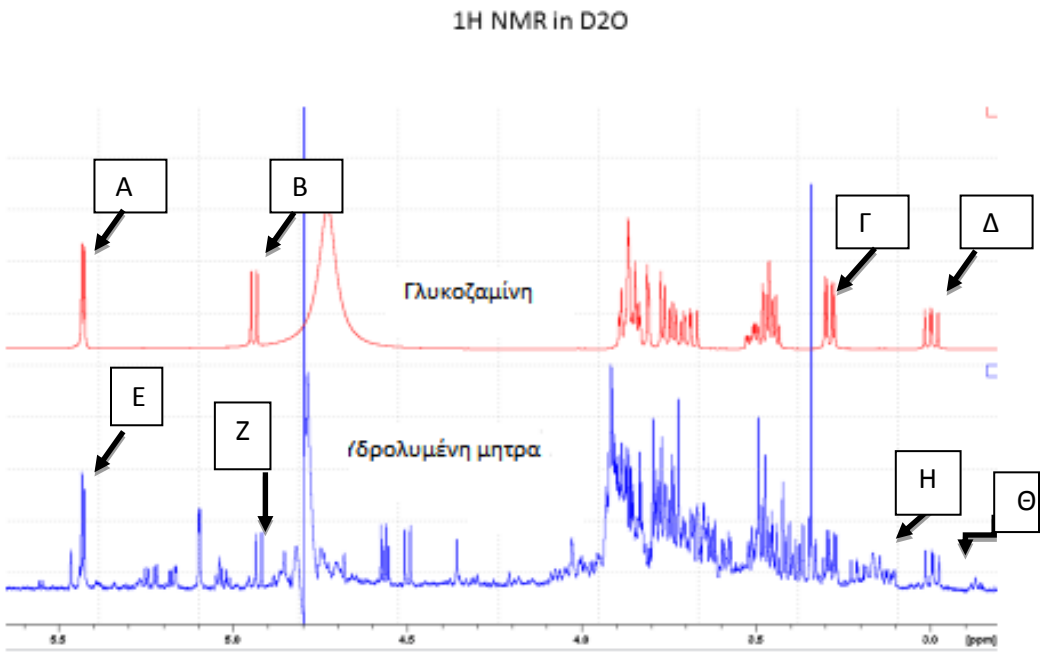
	H-1	H-1 J coupling	C-1
α-γλυκοζαμίνη	5.46	3.5	91.7
β-γλυκοζαμίνη	4.97	8.4	95.4
α-γαλακτόζη	5.25	-	95
β-γαλακτόζη	4.57	-	99.3
α-αραβινόζη	5.23	-	95.3
α-ραμνόζη	5.11	-	96.8
β-ραμνόζη	4.86	-	96.2
β-αραβινόζη	4.5	-	99.6

Συγκρίνοντας τις τιμές της βιβλιογραφίες με τις πειραματικές στους παραπάνω πίνακες, ταυτοποιείται ένας αριθμός σακχάρων.

Πίνακας 3.12 Ποσοτικοποίηση των κορυφών.

Ενώσεις	**%**
α-γλυκοζαμίνη	22.4
β-γλυκοζαμίνη	7.3
α-γαλακτόζη	3.4
β-γαλακτόζη	4.4
α-αραβινόζη	4.0
U1	0.9
U2	3.4

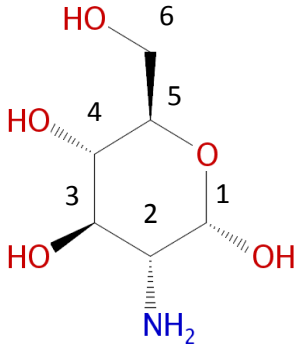
U3	2.0
U4	3.2
α-ραμνόζη	14.4
U6	6.1
U7	2.3
β-ραμνόζη	7.5
U9	7.2
β-αραβινόζη	8.1
U11	3.6
	71.6% των ταυτοποιημένων ενώσεων /100%



Εικόνα 3.20. Μονοδιάστατα φάσματα 1H NMR γλυκοζαμίνης και μίγματος-υδρολύματος. Από την εικόνα του φάσματος υπάρχει αντιστοιχία στις κορυφές Α(ανωμερικό πρωτόνιο α-γλυκοζαμίνης) με Ε, Β(ανωμερικό πρωτόνιο β-γλυκοζαμίνης) με Ζ, Γ με Η και Δ με Θ.

Για την περαιτέρω επιβεβαίωση της παρουσίας γλυκοζαμίνης λήφθηκε φάσμα 1H NMR για πρότυπη ένωση γλυκοζαμίνης και συγκρίθηκε με το αντίστοιχο φάσμα του υδρολύματος. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.20 αλλά και στο σχήμα 14 του

παραρτήματος, οι ίδιες κορυφές της πρότυπης ουσίας γλυκοζαμίνης εμφανίζονται και στο υδρόλυμα. Στους πίνακες 3.13-3.16 είναι φανερή η αντιστοιχία των τιμών του υδρολύματος της γλυκοζαμίνης με το πρότυπο γλυκοζαμίνης για τα πρωτόνια και τους άνθρακες που ενώνονται ομοιοπολικά. Επίσης, η ταυτοποίηση των σακχάρων γίνεται μέσω των ανωμερικών πρωτονίων. Καθώς η υδροξυλομάδα του ανωμερικού άνθρακα είναι που συμμετέχει στο γλυκοζιτικό δεσμό, κάθε σάκχαρο έχει πολύ συγκεκριμένη τιμή που εμφανίζεται στην περιοχή 4,5-5,5(ppm) [142]. Οι περισσότερες μελέτες NMR των υδατανθράκων περιλαμβάνουν υδατικά διαλύματα στα οποία υπάρχει ένα μίγμα ισορροπίας από μονοσακχαρίτες που σταθεροποιούνται με κυκλοποίηση για να σχηματίσουν μια ημιακετάλη. Αν και οι κυκλικές μορφές σακχάρων συνήθως ευνοούνται σε μεγάλο βαθμό, οι ημιακετάλες σε υδατικό διάλυμα βρίσκονται σε ισορροπία με τις μορφές τους με την ανοιχτή αλυσίδα. Αυτή η αναστρέψιμη μέθοδος τυπικά οδηγεί σε ένα μίγμα ανωμερών στο οποίο τελικά επιτυγχάνεται ισορροπία μεταξύ των δύο απλών ανωμερών. Η αναλογία των δύο ανωμερών είναι συγκεκριμένη για το σάκχαρο που εξαρτώνται κάθε φορά από τις συνθήκες που επικρατούν [142]. Κάτι που επίσης φαίνεται και στα φάσματα NMR είναι μίγματα α και β ισομερών των σακχάρων.



Εικόνα 3.21. Αρίθμηση των πρωτονίων στην ένωση της γλυκοζαμίνης.

Πίνακας 3.13. Τιμές της α-γλυκοζαμίνης του υδρολύματος.

	1H(ppm)	H-1 J coupling	13C(ppm)
1	5.43	3.35	92.0
2	3.28	10.53/3.73	57.1
3	3.88	-	71.9
4	3.48	-	72.4
5	3.92	-	73.9
6	3.72-3.93	-	62.9

Πίνακας 3.14. Τιμές της ένωσης της α-γλυκοζαμίνης.

	1H(ppm)	H-1 J coupling	13C(ppm)
1	5.46	3.59	91.7
2	3.32	10.53/3.59	56.9
3	3.9	-	72.4
4	3.49	-	72.4
5	3.89	-	74.2
6	3.75-3.91	-	63

Πίνακας 3.15. Τιμές της β-γλυκοζαμίνης του υδρολύματος.

	1H(ppm)	H-1 J coupling	13C(ppm)
1	4.93	8.35	95.6
2	2.99	10.70/8.45	59.35
3	3.66	-	75.2
4	3.48	-	72.4
5	3.51	-	79.1
6	3.72-3.93	-	63

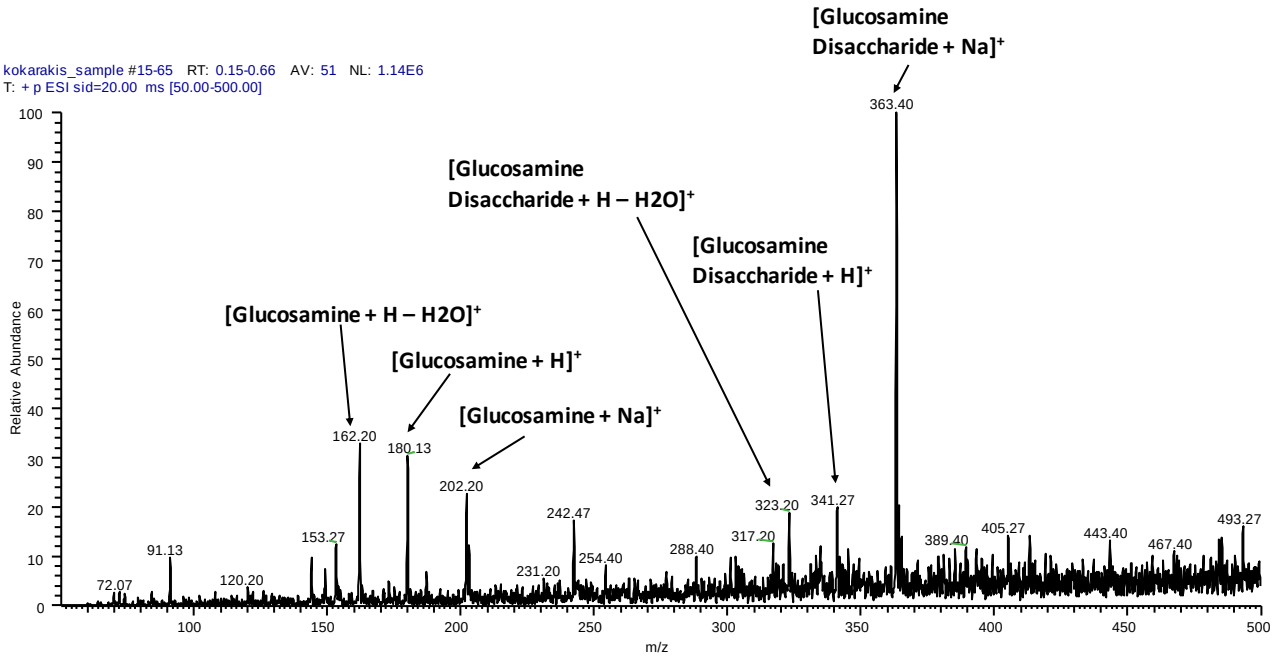
Πίνακας 3.16. Τιμές της ένωσης της β-γλυκοζαμίνη.

	1H(ppm)	H-1 J coupling	13C(ppm)
1	4.97	8.54	95.4
2	3.03	10.76/8.32	59.3
3	3.72	-	74.7
4	3.49	-	72.4
5	3.54	-	78.7
6	3.75-3.91	-	63.1

Ταυτόχρονα σε αρκετές αναφορές έχει παρατηρηθεί η συσσώρευση πολυσακχαριτών στο θρεπτικό μέσο [143, 144]. Για αυτό το λόγο μελετήθηκε η ανάπτυξη των μικροοργανισμών στο θρεπτικό μέσο HS (High Salt medium), από το οποίο απουσιάζει η οργανική πηγή άνθρακα. Ο βασικός που χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο ήταν για να αποφευχθούν παρεμποδίσεις από το Trisma base και το οξικό οξύ στο φάσμα NMR .Όταν η καλλιέργεια έφτασε στη στατική φάση φυγοκεντρήθηκε και το υπερκείμενο θρεπτικό φιλτραρίστηκε μέσω ενός φίλτρου σύριγγας 0,2 μm για την απομάκρυνση των κυττάρων. Έπειτα το θρεπτικό λυοφιλοποιήθηκε και μια ποσότητα του στερεού επαναιωρήθηκε σε δευτεριωμένο νερό (D_2O). Στο σχήμα 15 του παραρτήματος διαπιστώνεται η παρουσία α-γλυκοζαμίνης στο θρεπτικό μέσο. Παρόλα αυτά δεν ήταν δυνατό να ταυτοποιηθεί κάποιο άλλο σάκχαρο, λόγω του ισχυρού σήματος του νερού που επικάλυπτε τις υπόλοιπες περιοχές. Συνεπώς, επιβεβαιώνεται η εξαγωγή γλυκοζαμίνης στο θρεπτικό μέσο. Είναι σημαντικό όμως να σημειωθεί ότι τα κατάλοιπα του έξωπολυσακχαρίτη μπορεί να επηρεαστούν από πολλές περιβαλλοντικές συνθήκες αλλά και την σύσταση του θρεπτικού μέσου [145, 146].

Ταυτόχρονα χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της φασματομετρίας μάζας ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού για την περαιτέρω τεκμηρίωση στην ταυτοποίηση των μονομερών σακχάρων. Στη φασματομετρία μάζας κάθε ένωση έχει συγκεκριμένο μοριακό βάρος και ταυτόχρονα ο τρόπος με τον οποίο θραυσματοποιείται είναι χαρακτηριστικός, αποτελώντας το μοναδικό αποτύπωμα της ουσίας. Στην παράγραφο 3.3.11

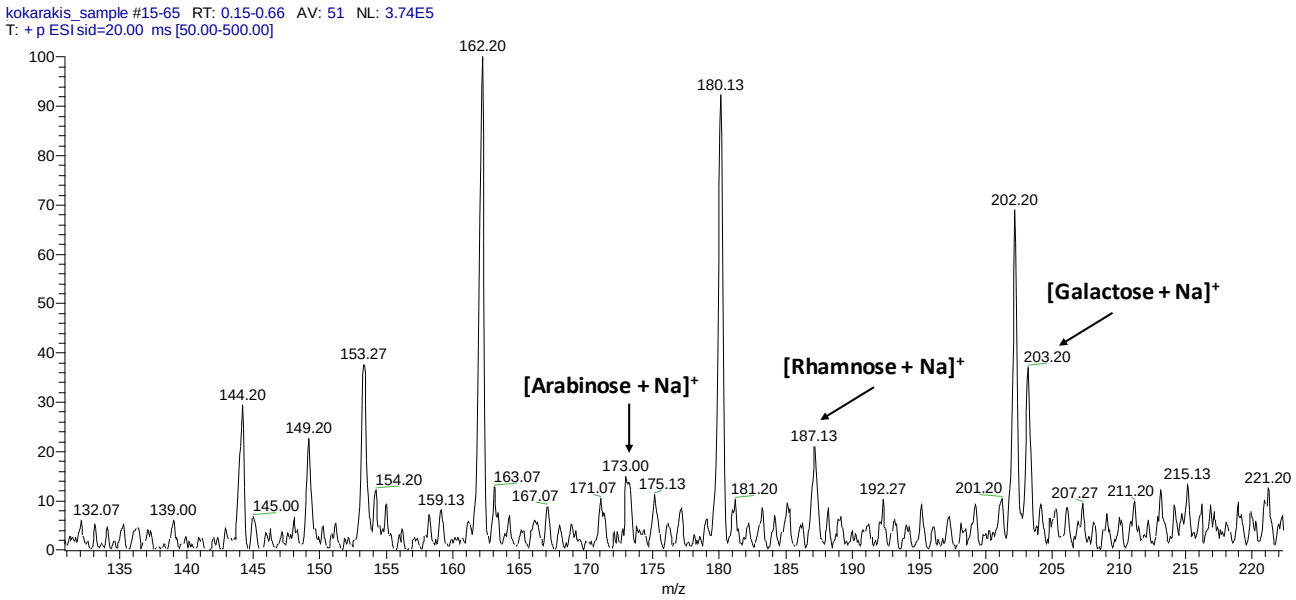
αναφέρονται αναλυτικά οι συνθήκες του οργάνου που χρησιμοποιήθηκε. Στις εικόνες 3.22 και 3.23 φαίνεται το φάσμα MS του υδρολύματος του EPS.



Εικόνα 3.22. Φάσμα μάζας MS και αντιστοίχηση της κάθε κορυφής

Στο φάσμα της εικόνας 3.22 έχει γίνει η ανάθεση των κορυφών στα αντίστοιχα ιόντα. Για τις κορυφές των ιόντων της γλυκοζαμίνης και της γαλακτόζης (εικόνα 3.22 και 3.23) έγινε σύγκριση με πρότυπες ουσίες γλυκοζαμίνης και γαλακτόζη. Για τα σάκχαρα αραβινόζη και ραμνόζη έγινε αναζήτηση σε βιβλιοθήκες μάζας(m/z) MoNA (Mass bank of North America) και στην βιβλιοθήκη massbankEU και συγκρίθηκαν τα MS^n (n=2-5)με αυτά από τις βιβλιοθήκες. Επιπλέον λόγος m/z των θραυσμάτων της γλυκοζαμίνης είναι αρκέτα κοντά με τις τιμές της βιβλιογραφίας [147]. Για να διαπιστωθεί ότι η γλυκοζαμίνη αποτελεί συστατικό των δισακχαριτών, αναζητήθηκε το ιόν της γλυκοζαμίνης του σχήματος στα αντίστοιχα φάσματα MS των σχημάτων 6 και 4 του παραρτήματος. Εφόσον περιέχεται το ιόν του δισακχαρίτη το οποίο έχει ταυτοποιηθέι ότι ανήκει στην γλυκοζαμίνη, συμπεραίνουμε ότι πρόκειται για τους αντίστοιχους δισακχαρίτες. Ένα επιπλέον τεκμήριο για την υπόθεση αυτή είναι η σύγκριση της θραυσματοποιήσης του σχήματος 5 του παραρτήματος του δισακχαρίτη της γλυκοζαμίνης με αυτό της βιβλιογραφίας [148]. Το γεγονός ότι στο μικροφύκος αυτό εμφανίζεται η γλυκοζαμίνη

είναι μια ακόμα ένδειξη ότι ανήκει στο γένοςChlorella.Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα είδη που ανήκουν στο γένος Chlorella χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με το αν στο τοίχωμά τους πέριεχεται α) γλυκοζάμινη ή β) συνδυασμός γλυκόζης-μανόζης [149].



Εικόνα 3.23. Φάσμα μάζας (MS) και ανάθεση της κάθε κορυφής

Επίσης κάτι που πρέπει να επισημανθεί είναι το γεγονός ότι στην τεχνική αυτή η αναλογία στις εντάσεις των κορυφών δεν είναι ποσοτική, καθώς κάποιες ενώσεις μπορούν να ιοντίζονται πιο εύκολα σε σχέση με άλλες.

3.4.4. Αποτελέσματα εκχυλίσεων και σαπωνοποιήσεις των δευτερογενών χρωστικών με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας.

Στο τέλος της διαδικασίας της εκχύλισης παρέμεινε ένα σκουρόχρωμο στερεό. Έπειτα πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας στο εκχύλισμα, με το χρωματογράφημα να παρουσιάζεται στην εικόνα 3.24.

Εικόνα 3.24. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας με πληρωτικό υλικό silica και κινητή φάση εξάνιο/διέθυλαιθέρα/μεθανόλη/ακετόνη με αναλογία 17:4:2:2 αντίστοιχα.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα υπάρχει μεγάλη παρεμπόδιση από τις χλωροφύλλες. Η απομάκρυνση των χλωροφυλλών ήταν απαραίτητη και πραγματοποιήθηκε μέσω αντίδρασης σαπωνοποίησης για την υδρόλυσή τους. Πιο συγκεκριμένα, με την αντίδραση σαπωνοποίησης αποσπάται η φυτόλη από τη χλωροφύλλη που οδηγεί σε αυξηση της πολικότητας. Επιπλέον με την αντίδραση σαπωνοποίησης οι εστέρες ξανθοφυλλών υδρολύονται με αποτέλεσμα να είναι στην ελεύθερη μορφή τους. [150] Όπως αναφέρεται και στην παράγραφο 3.3.15 ο λόγος που προστίθεται διάλυμα NaCl 10% είναι για να σταθεροποιηθεί το pH μετά την αντίδραση αλλά και για είναι

περισσότερο διακριτές οι δύο φάσεις που δημιουργούνται. Πιο συγκεκριμένα, οι χλωροφυλλίνες(χλωροφύλλες που δεν διαθέτουν φυτόλη) θα είναι πολύ πιο πολικές οπότε θα περάσουν στην πολική φάση, ενώ τα καροτένια και οι ξανθοφύλλες θα βρίσκονται στην οργανική. Επομένως ακολουθήθηκαν εκχυλίσεις με μίγματα οργανικών διαλυτών όπως περιγράφεται και στην παράγραφο 3.3.15. Έπειτα, μετά τη συμπύκνωση των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 3.25.

Εικόνα 3.25. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας με πληρωτικό υλικό silica και κινητή φάση εξάνιο/διέθυλαιθέρα/μεθανόλη/ακετόνη με αναλογία 17:4:2:2 αντίστοιχα.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο προηγούμενων χρωματογραφημάτων διαπιστώνεται η σημασία της σαπωνοποίησης, καθώς διακρίνονται επιπλέον κηλίδες που ήταν φανερές πριν. Παράλληλα οι χλωροφύλλες έχουν απομακρυνθεί αποτελεσματικά, όπως ήταν επιθυμητό. Επιπλέον για τον πιο ακριβή χαρακτηρισμό των καροτενοειδών και ξανθοφυλλών του εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε μια ακόμα χρωματογραφία λεπτής στιβάδας με κινητή φάση πετρελαϊκού αιθέρα/ ακετόνης σε

αναλογία 50:50. Στην εικόνα 3.26 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα και τα πειραματικά Rf που υπολογίστηκαν (πίνακας 3.17) συγκρίθηκαν με αυτά της βιβλιογραφίας [102].

Εικόνα 3.26. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας με πληρωτικό υλικό silica και κινητή φάση πετρελαϊκού αιθέρα/ακετόνης με αναλογία 50:50 αντίστοιχα.

Πίνακας 3.17. Οι τιμές Rf που υπολογίστηκαν από το χρωματογράφημα της εικόνας 3.28 και η αντιστοίχηση τους έγινε από την αναφορά [102].

Rf	Ουσίες
0,54	-
0,58	Zeaxanthin
0,61	Lutein
0,64	Cryptoxanthin
0,7	-
0,78	-
0,89	Isomers of β-Carotene
0,94	Isomers of β-Carotene
0,99	β-Carotene

3.5 Συμπεράσματα

Στην παρούσα πειραματική σειρά διαπιστώνεται ότι ο μικροοργανισμός που απομονώθηκε από τον ποταμό Γιόφυρο σε προηγούμενη δουλειά του εργαστηρίου μας [94] είναι μικροφύκος που ανήκει στο γένος *Chlorella*. από τις εικόνες από την ηλεκτρονιακή μικροσκοπία διέλευσης διαπιστώνεται ότι πρόκειται για έναν ευκαρυώτικο μικροοργανισμό που έχει τη δυνατότητα να φωτοσυνθέτει. Τα κύτταρα έχουν γενετικό υλικό οργανωμένο σε πυρήνα και παράλληλα διαθέτουν μιτοχόνδρια, σύμπλεγμα Golgi και χλωροπλάστη με θυλακοειδής μεμβράνες. Ο τρόπος αναπαραγωγής του μικροοργανισμού που γίνεται με τη διαδικασία της αυτοσποραγίας, γεγονός που αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι ανήκει στο γένος *Chlorella*. Ο χαρακτηρισμός του μικροφύκους συμφωνεί και βιοχημικές και μορφολογικές μελέτες του γένους στελέχους αυτού που περιλαμβάνονται σε προηγούμενη δουλειά του εργαστηρίου και στη βιβλιογραφία [110, 151]. Παράλληλα έγινε επιτυχής απομόνωση και χαρακτηρισμός της εξωκυττάριας μήτρας του μικροφύκους αυτού. Βρέθηκε ότι η διαφανής εξωκυττάρια μήτρα είναι ένας πολυσακχαρίτης που λειτουργεί ως ένα επιπλέον κυτταρικό τοίχωμα που χρησιμοποιείται κατά τη διαδικασία της αυτοσποραγίας. Κατά την εκκόλαψη των θυγατρικών κυττάρων ο πολυσακχαρίτης είτε αποκόπτεται και διαχέεται στο θρεπτικό μέσο. Από την υδρόλυση του πολυμερούς ταχτοποιήθηκαν τέσσερα κατάλοιπα σακχάρων, τα οποία είναι η γλυκοζαμίνη, η αραβινόζη, η ραμνόζη και η γαλακτόζη. Η παρουσία γλυκοζαμίνης στον εξωπολυσακχαρίτη αποτελεί ένδειξη ότι ο μικροοργανισμός αυτός ανήκει στο γένος *Chlorella*. Τέλος, έγινε εκχύλιση καροτενοειδών και ξανθοφυλλών του μικροφύκους και ταυτοποίησή τους μέσω των τιμών Rf που υπολογίστηκαν μέσω χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός φυσικών προιόντων από φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς. Αρχικά μελετήθηκε η ανάπτυξη και η δυνατότητα παραγωγής λιπιδίων από φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς. Τα πειράματα που έλαβαν χώρα με το μικροφύκος *Botryococcus braunii* έδειξαν τον τρόπο με τον οποίο τα λιπίδια κατανέμονται εξωτερικά των κυττάρων. Παράλληλα ενδιαφέρον του εργαστηρίου αποτέλεσε την βελτιστοποίηση της βιομάζας που θα έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων υψηλής εμπορικής σημασίας. Έπειτα, για τον ίδιο σκοπό μελετήθηκε ένα εργαστηριακό στέλεχος κυανοβακτηρίου που ανήκει στο γένος *Anabaena*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται με πιο γρήγορους ρυθμούς και παράλληλα βρέθηκε ότι το κυανοβακτήριο αυτό παράγει σκουαλένιο. Το γεγονός ότι βρέθηκε αυτό το κυανοβακτήριο μπορεί να παράγει σκουαλένιο είναι ένα αρκετά σημαντικό εύρημα καθώς δεν έχουν γίνει αρκετές έρευνες για την παραγωγή προϊόντος με την χρήση κυανοβακτηρίων. Κάτι που παρουσιάζει αρκετά ενδιαφέρον είναι να βρεθούν οι κατάλληλες συνθήκες για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής του. Πιο συγκεκριμένα ενδιαφέρον θα ήταν να δοκιμαστούν επιπλέον πηγές άνθρακα αλλά και διαφορετικά θρεπτικά μεσα σκοπό την αύξηση της παραγωγής του προϊόντος. Επιπλέον έρευνες έχουν δείξει ότι ο στοιχειακός σίδηρος και η αλατότητα λαμβάνουν πολύ σημαντικό ρόλο στην υψηλή παραγωγή λιπιδίων. Παράλληλα στην βιβλιογραφία αρκετοί χρησιμοποιούν στερήσεις αζώτου και έχουν παρατηρήσει υψηλή παραγωγή λιπιδίων.

Με βάση τα αποτελέσματα βρέθηκε ότι ο φωτοσυνθετικός μικροοργανισμός που απομονώθηκε από το Γιόφυρο είναι ευκαρυωτικός φωτοσυνθετικός μικροοργανισμός και ότι ανήκει στο γένος *Chlorella*, τα οποία είναι φωτοσυνθετικά μικροφύκη. Από μελέτες μικροσκοπίας διαπιστώθηκε η παρουσία μιτοχονδρίων, η οργάνωση γενετικού υλικού σε πυρήνα, αλλά και η αναπαραγωγή του μικροοργανισμού με τη μέθοδο της αυτοσποραγίας, που αποτελεί και τον τρόπο που αναπαράγονται τα μικροφύκη του γένους *Chlorella*. Αναπτύχθηκε πρωτόκολλο για την επιτυχή απομόνωση της εξωκυττάριας μήτρας . Από την μελέτη της εξωκυττάριας μήτρας βρέθηκε ότι πρόκειται για έναν πολυσακχαρίτη και ταχτοποιήθηκαν τέσσερα μονομερή σακχάρων. Τα σάκχαρα αυτά ήταν η γλυκοζαμίνη, γαλακτόζη, αραβινόζη και η ραμνόζη. Παρόλα αυτά και άλλα σάκχαρα είναι πιθανό να υπάρχουν. Το γεγονός ότι ένα από τα σάκχαρα είναι

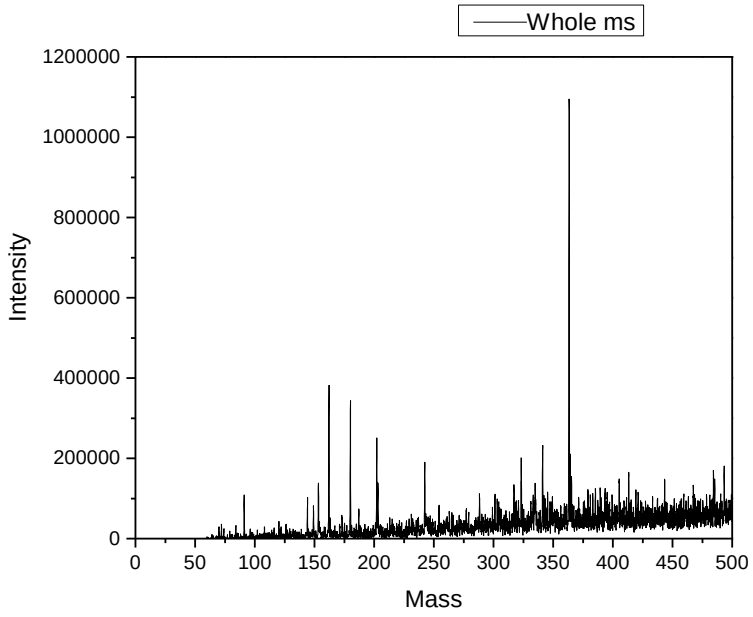
η γλυκοζαμίνη ενισχύει το συμπέρασμα ότι ο μικροοργανισμός αυτός ανήκει στο είδος της *Chlorella*. Τα μικροφύκη που ανήκουν σε αυτό το γένος χρησιμοποιούν τη γλυκοζαμίνη ως βασικό συστατικό στο κυτταρικό τους τοίχωμα. Το γεγονός ότι ένα μεγάλο ποσοστό της υδρολυμένης μήτρας αποτελούνταν από γλυκοζαμίνη (30%) αποτελεί ένα πολύ σημαντικό αποτέλεσμα. Καθώς η γλυκοζαμίνη είναι ένας πολύ σημαντικός υδατάνθρακας που χρησιμοποιείται αρκέτα στις βιομηχανίες τροφίμων αλλά και φαρμακοβιομηχανίες. Η περαιτέρω μελέτη του έξωπολυσακχαρίτη έχει πολλές προοπτικές καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη βιομηχανία. Αρκετοί πολυσακχαρίτες χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων και αρκετοί από αυτούς έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες, κάτι που τους καθιστά αρκετά ελκυστικούς σε τομείς έρευνας και ανάπτυξης. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης να μελετηθούν οι βέλτιστες συνθήκες παραγωγής και απομόνωσης αυτού του πολυσακχαρίτη. Καθώς υπάρχει δυνατότητα για την βελτιστοποίηση παραγωγής αυτού του προϊόντος αυτού. Βιβλιογραφικά έχει βρεθεί ότι με στέρηση στοιχειακού αζώτου από το θρεπτικό μέσο των μικροοργανισμών αυξάνουν αρκετά τους υδατάνθρακες κάτι που θα ήταν άξιο να ερευνηθεί. Αυτή τη στιγμή στο εργαστήριο έχει γίνει μια απομόνωση μικροοργανισμών από τον ποταμό Γιόφυρο. Επιπλέον πειράματα για το χαρακτηρισμό αυτών των μικροοργανισμών που έχουν απομονωθεί από τον ποταμό Γιόφυρο. Αρκετό ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι λόγω της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από ακραία περιβάλλοντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διαχείριση αποβλήτων (απόβλητα ελαιοτριβείου, απόβλητα γαλακτοβιομηχανίας, απόβλητα χαρτοβιομηχανίας κτλ). Παράλληλα αρκετά υποσχόμενη είναι η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός χρήσιμων φυσικών προϊόντων που παρουσιάζουν εμπορικό ενδιαφέρον από αυτούς τους μικροοργανισμούς.

Συνολικά στην παρούσα διατριβή αποδείχθηκε πως οι μικροοργανισμοί μπορούν να λειτουργήσουν ως χρήσιμες *«καλοκουρδισμένες μηχανές»* που μπορούν να παράξουν χρήσιμα φυσικά προϊόντα. Πιο συγκεκριμένα στην παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκαν κάποια βήματα για την περαιτέρω αξιοποίηση των κυανοβακτηρίων. Το γεγονός ότι βρέθηκε να παράγουν σκουαλένιο είναι ένα πολύ σημαντικό βήμα για την εξέλιξη της βιομηχανίας για την παραγωγή φυσικών προϊόντων από κυανοβακτήρια. Παράλληλα βρέθηκε ένα μικροφύκος απομονωμένο από ένα

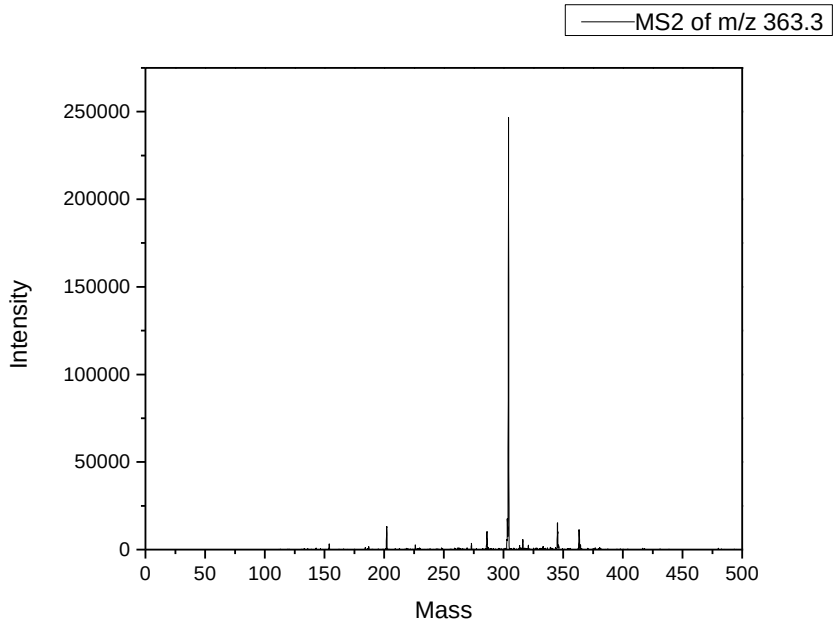
ριπαγόνο περιβάλλον παράγει χρήσιμα εξωκυττάρια προϊόντα-εξωπολυσακχαρίτες. Η ευελιξία που διαθέτουν οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί για παραγωγή μιας πληθώρας χρήσιμων προϊόντων ανοίγει τον δρόμο για την αξιοποίηση και την έναρξη μιας νέας βιομηχανίας που θα έχει ως στόχο την χρήση φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών για την παραγωγή προϊόντων που θα έχουν όφελος στον άνθρωπο. Σε αυτήν την εργασία πραγματοποιήθηκαν βήματα για την αξιοποίηση μικροφυκών για την παραγωγή χρήσιμών έξω-πολυσακχαριτών που μπορεί να χρησιμοποιηθούν τόσο σε φαρμακοβιομηχανίες όσο και σε βιομηχανίες τροφίμων.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

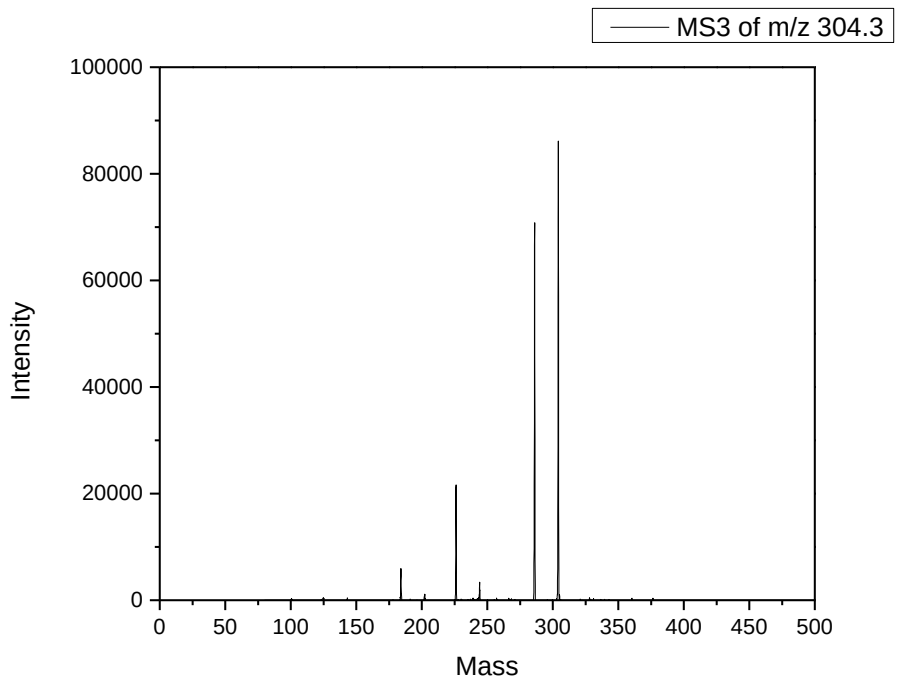
MS/MS φάσματα από ESI-MS



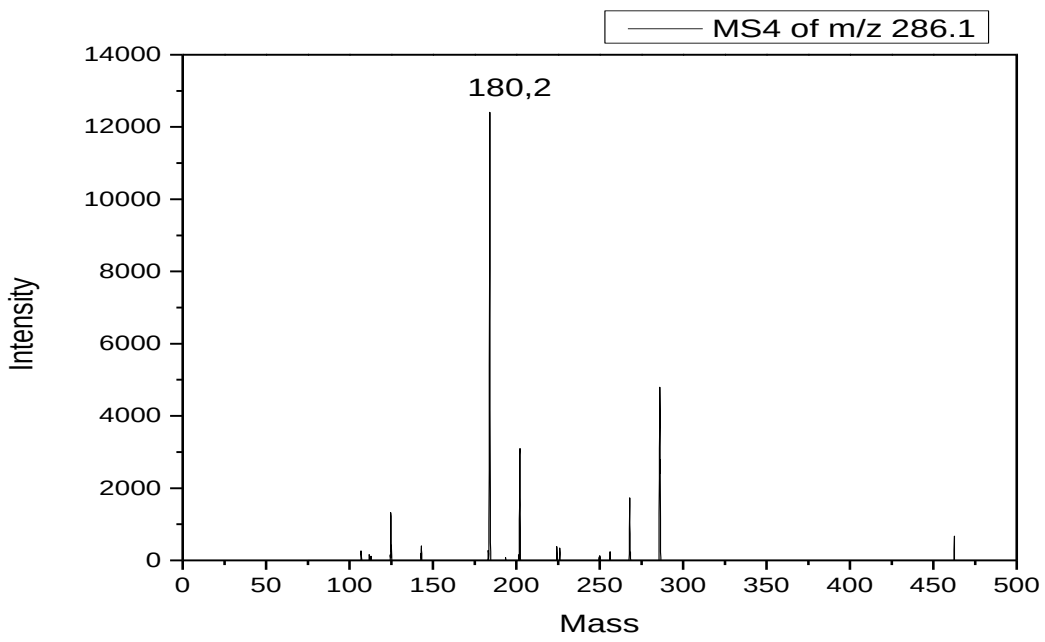
Σχημα 1. Ολικό MS του υδρολύματος



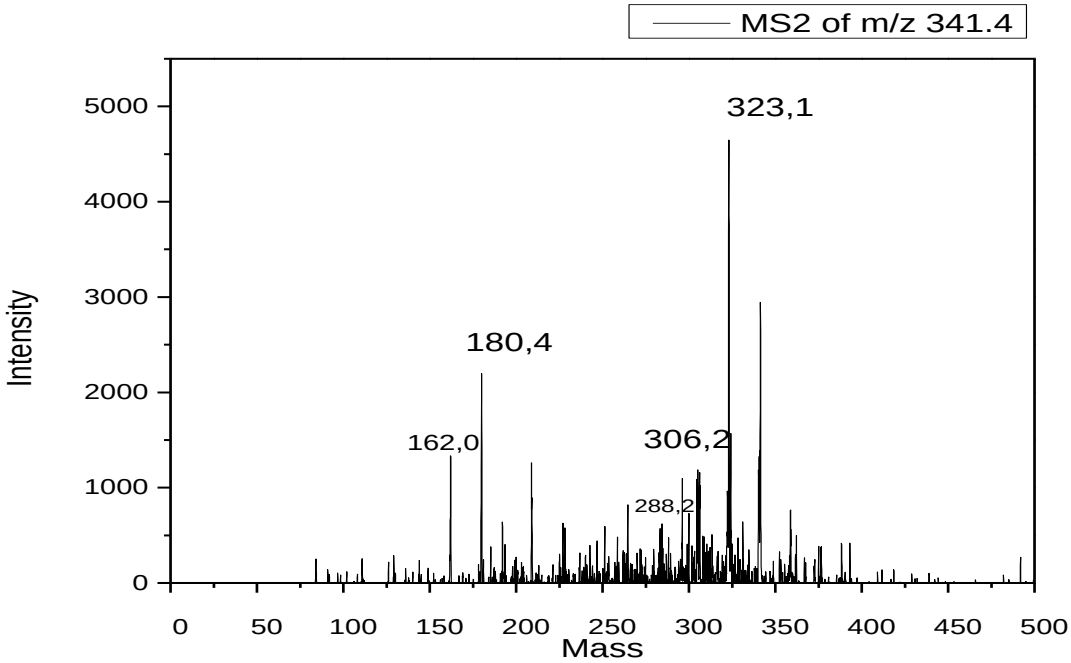
Σχήμα 2. MS^2 του Ιόντος του [Δυσακχαρίτη της γλυκαζαμίνης+Na]$^+$



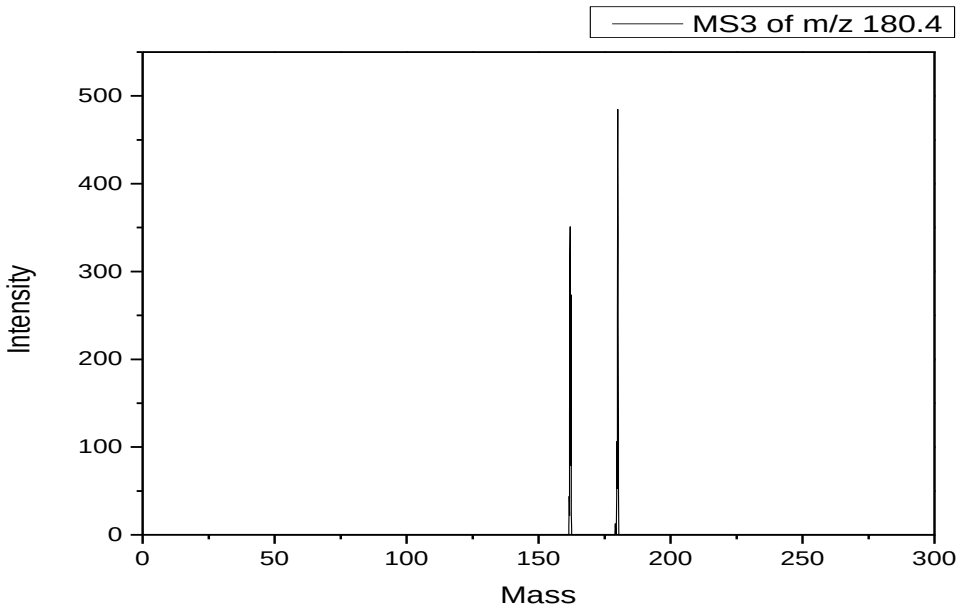
Σχήμα 3. MS^3 του Ιόντος του [Δυσακχαρίτη της γλυκαζαμίνης+Na]$^+$



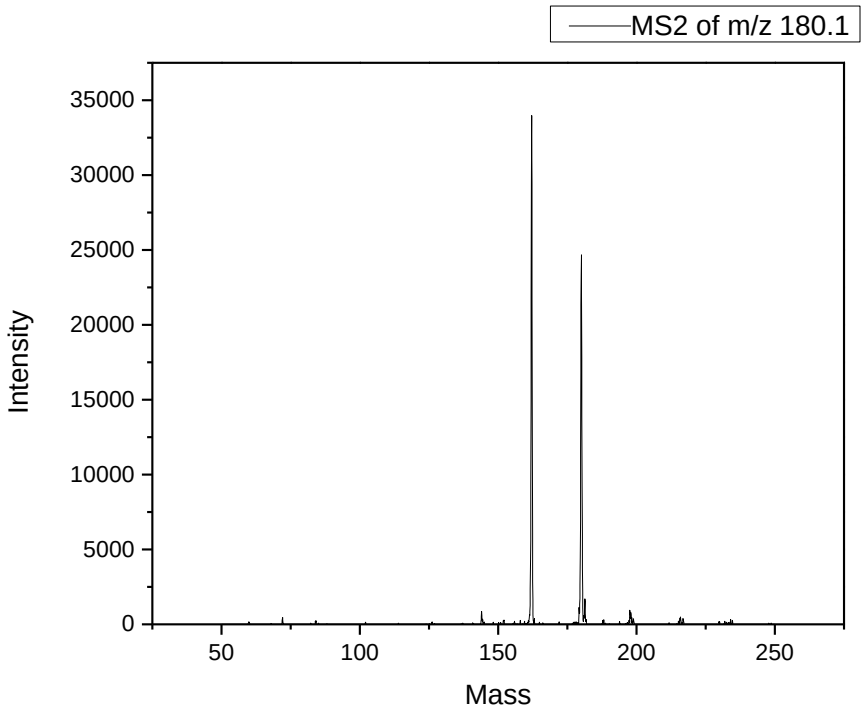
Σχήμα 4. MS^4 του Ιόντος του [Δυσακχαρίτη της γλυκαζαμίνης+Na]$^+$



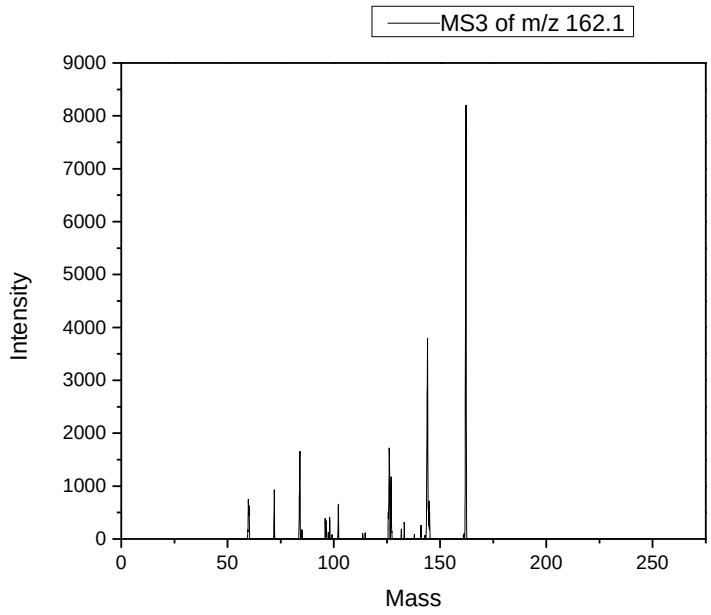
Σχήμα 5. MS^2 του Ιόντος του [Δυσακχαρίτη της γλυκαζαμίνης+H]$^+$



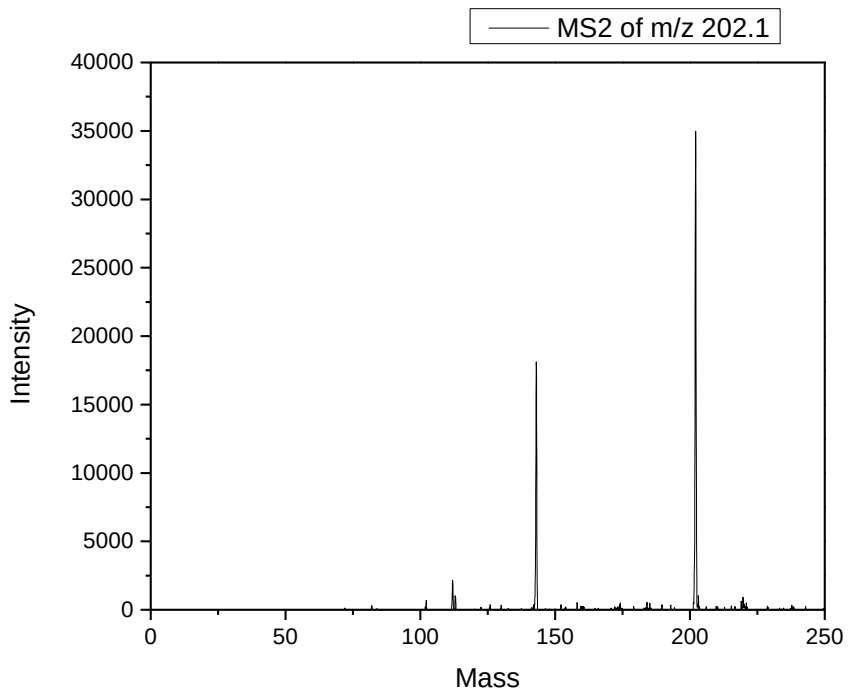
Σχήμα 6. MS^3 του Ιόντος του [Δυσακχαρίτη της γλυκαζαμίνης+H]$^+$



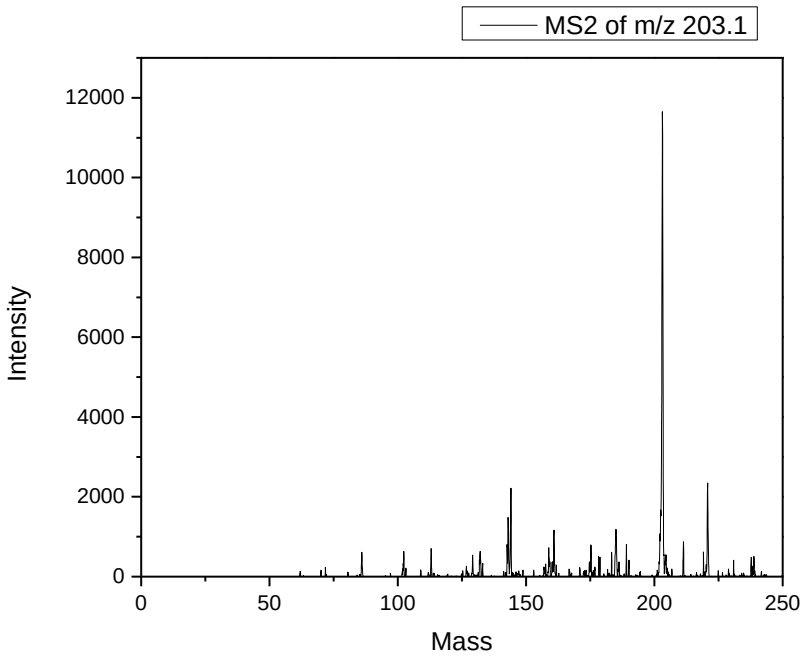
Σχήμα 7. MS^2 του Ιόντος της [γλυκαζαμίνης+H]$^+$



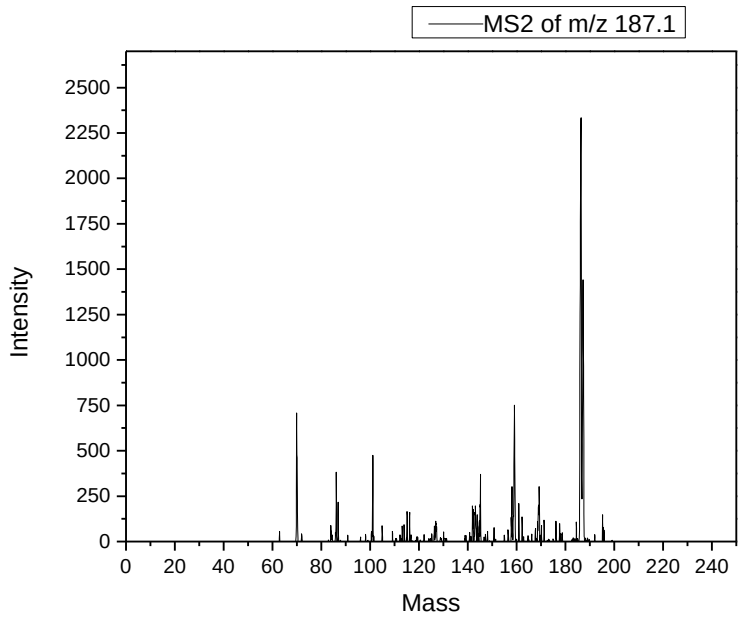
Σχήμα 8. MS^3 του Ιόντος της [γλυκαζαμίνης+H]$^+$



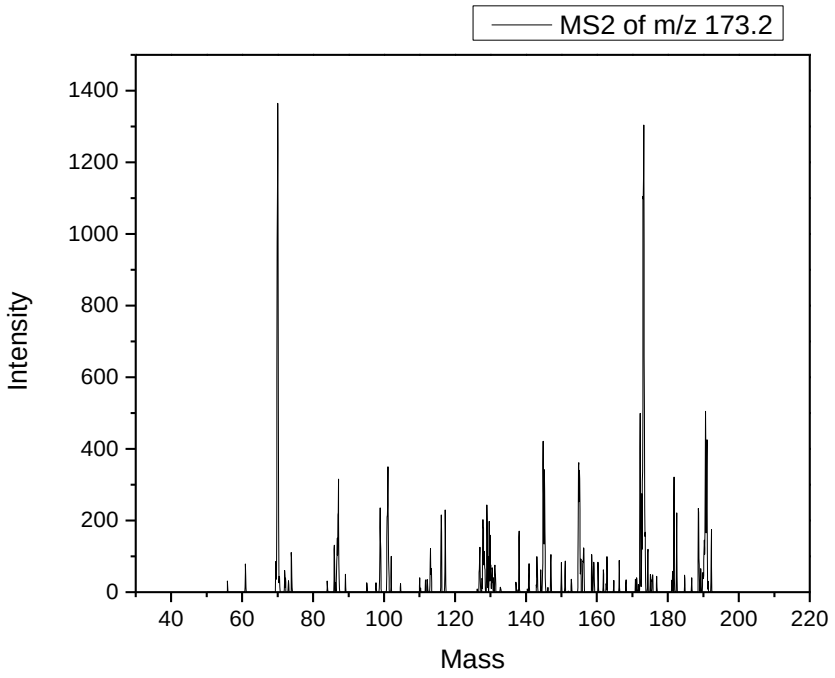
Σχήμα 9. MS^2 του Ιόντος της [γλυκαζαμίνης+Na]$^+$



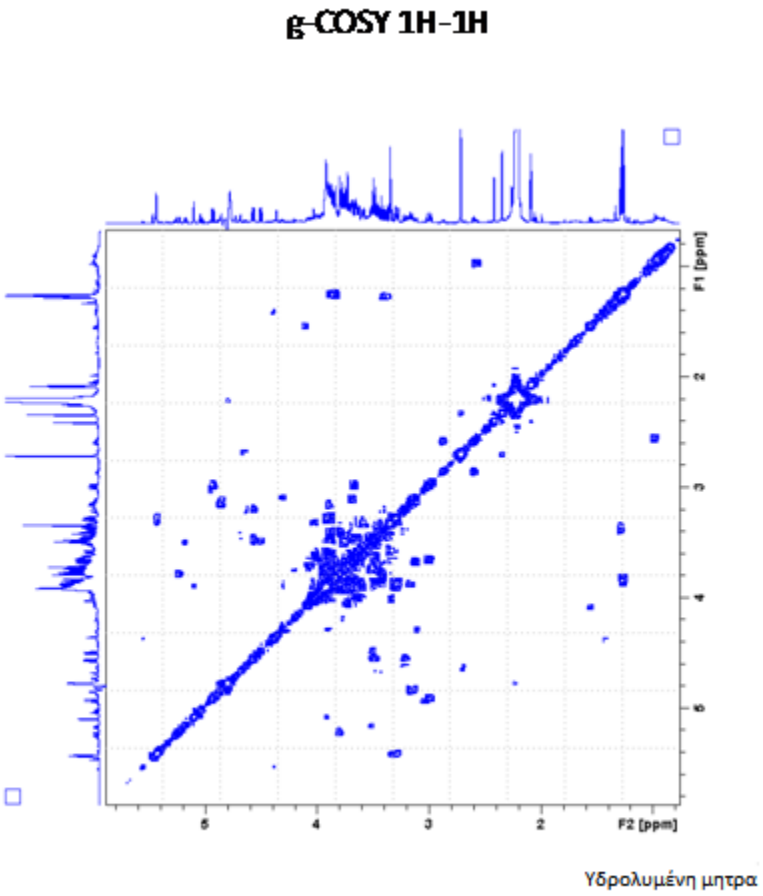
Σχήμα 10. MS^2 του Ιόντος της [γαλακτόζης+Na]$^+$



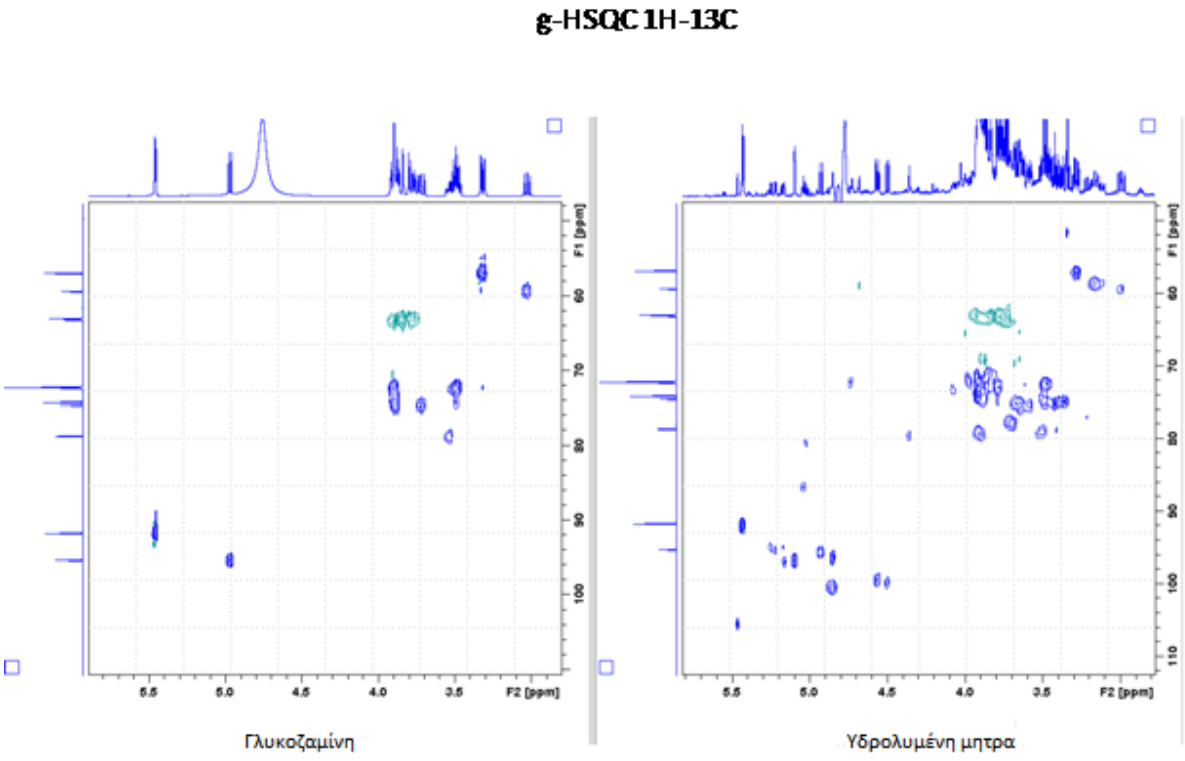
Σχήμα 11. MS^2 του Ιόντος της [Ραμνόζης+Na]$^+$



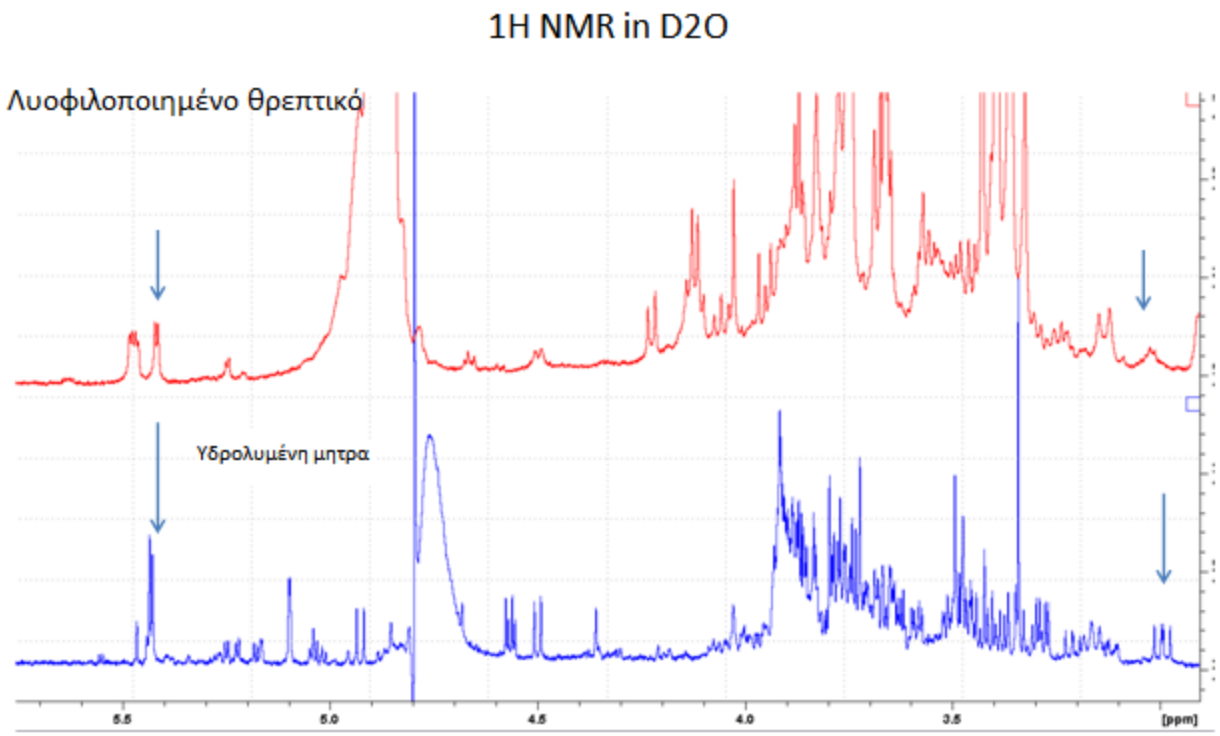
Σχήμα 12. MS^2 του Ιόντος της [Αραβινόζης+Na]$^+$



Σχήμα 13. Φάσμαg-COSY 1H-1H της υδρολυμένης μήτρας



Σχήμα 14. Σύγκριση φασμάτων g-HSQC 1H-13C πρότυπης γλυκοζαμίνης και υδρολύματος(μείγμα).



Σχήμα 15. Σύγκριση μονοδιάστατου 1H NMR μεταξύ του λυοφιλοποιημένου θρεπτικού μέσου HS μετά το πέρασμα της κυτταρικής ανάπτυξης και της υδρολυμένης μήτρας.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Berry, J.A. and W.J.S. Downton, *9: - Environmental Regulation of Photosynthesis*, in *Photosynthesis*, Govindjee, Editor. 1982, Academic Press. p. 263-343.
2. Raven, J.A., *Functional evolution of photochemical energy transformations in oxygen-producing organisms.* Functional Plant Biology, 2009. **36**(6): p. 505-515.
3. Sasso, S., et al., *Microalgae in the postgenomic era: a blooming reservoir for new natural products.* FEMS Microbiol Rev, 2012. **36**(4): p. 761-785.
4. Varela, J.C., et al., *Production of carotenoids by microalgae: achievements and challenges.* Photosynth Res, 2015. **125**(3): p. 423-436.
5. Nisar, N., et al., *Carotenoid metabolism in plants.* Mol Plant, 2015. **8**(1): p. 68-82.
6. Ye, Z.W., J.G. Jiang, and G.H. Wu, *Biosynthesis and regulation of carotenoids in Dunaliella: progresses and prospects.* Biotechnol Adv, 2008. **26**(4): p. 352-360.
7. Gong, M. and A. Bassi, *Carotenoids from microalgae: A review of recent developments.* Biotechnol Adv, 2016. **34**(8): p. 1396-1412.
8. Britton, G., *Structure and properties of carotenoids in relation to function.* Faseb j, 1995. **9**(15): p. 1551-1558.
9. Chuyen, H.V. and J.B. Eun, *Marine carotenoids: Bioactivities and potential benefits to human health.* Crit Rev Food Sci Nutr, 2017. **57**(12): p. 2600-2610.
10. Dufosse, L., et al., *Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?* Trends in Food Science & Technology, 2005. **16**(9): p. 389-406.
11. Manayi, A., et al., *Lutein and cataract: from bench to bedside.* Crit Rev Biotechnol, 2016. **36**(5): p. 829-839.
12. Leliaert, F. and et al., *Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. Critical Reviews in Plant Sciences.* 2012. **31**(1): p. 1-46.
13. Gantt, E. and S.F. Conti, *The ultrastructure of Porphyridium cruentum.* J Cell Biol, 1965. **26**(2): p. 365-381.
14. Edvardsen, B. and et al., *Phylogenetic reconstructions of the Haptophyta inferred from.*
15. Radmer, R.J. and B.C. Parker, *Commercial Applications of Algae - Opportunities and Constraints. .* Journal of Applied Phycology, 1994. **6**(2): p. 93-98.
16. Metzger, P. and C. Largeau, *Botryococcus braunii: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2005. **66**(5): p. 486-496.
17. Hirose, M., et al., *Active hydrocarbon biosynthesis and accumulation in a green alga, Botryococcus braunii (race A).* Eukaryot Cell, 2013. **12**(8): p. 1132-1141.
18. Okada, S., M. Murakami, and K. Yamaguchi, *Hydrocarbon composition of newly isolated strains of the green microalga Botryococcus braunii.* Journal of Applied Phycology, 1995. **7**(6): p. 555-559.
19. Metzger, P., et al., *Strucure and chemistry of a new chemical race of Botryococcus braunii (Chlorophyceae) that produces lycopadiene, a tetraterpenoid hydrocarbon. .* Journal of Phycology, 1990. **26**(2): p. 258-266.
20. Demura, M., et al., *Desiccation tolerance of Botryococcus braunii (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) and extreme temperature tolerance of dehydrated cells.* Journal of applied phycology, 2014. **26**(1): p. 49-53.
21. Metzger, P., et al., *Structures of some botryococcenes: branched hydrocarbons from the b-race of the green alga Botryococcus braunii.* Phytochemistry, 1985. **24**(12): p. 2995-3002.

22. Banerjee, A., et al., *Botryococcus braunii: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals.* Crit Rev Biotechnol, 2002. **22**(3): p. 245-279.
23. Metzger, P. and C. Largeau, *Botryococcus braunii: a rich source for hydrocarbons and related ether lipids.* Appl Microbiol Biotechnol, 2005. **66**(5): p. 486-96.
24. Illman, A.M., A.H. Scragg, and S.W. Shales, *Increase in Chlorella strains calorific values when grown in low nitrogen medium.* Enzyme and Microbial Technology, 2000. **27**(8): p. 631-635.
25. Yamamoto, M., I. Kurihara, and S. Kawano, *Late type of daughter cell wall synthesis in one of the Chlorellaceae, Parachlorella kessleri (Chlorophyta, Trebouxiophyceae).* Planta, 2005. **221**(6): p. 766-775.
26. Yamamoto, M., et al., *Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga Chlorella vulgaris (Chlorophyta, Trebouxiophyceae).* J Plant Res, 2004. **117**(4): p. 257-264.
27. Atkinson, A.W., B.E.S. Gunning, and P.C.L. John, *Sporopollenin in the cell wall of Chlorella and other algae: Ultrastructure, chemistry, and incorporation of 14C-acetate, studied in synchronous cultures.* Planta, 1972. **107**(1): p. 1-32.
28. Safi, C., et al., *Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review.* Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2014. **35**: p. 265-278.
29. Lau, N.-S., M. Matsui, and A.A.-A. Abdullah, *Cyanobacteria: Photoautotrophic Microbial Factories for the Sustainable Synthesis of Industrial Products.* BioMed Research International, 2015. **2015**: p. 9.
30. Rastogi, R.P., D. Madamwar, and A. Incharoensakdi, *Sun-screening bioactive compounds mycosporine-like amino acids in naturally occurring cyanobacterial biofilms: role in photoprotection.* J Appl Microbiol, 2015. **119**(3): p. 753-62.
31. Kumar, K., R.A. Mella-Herrera, and J.W. Golden, *Cyanobacterial heterocysts.* Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2010. **2**(4): p. a000315-a000315.
32. Chakdar, N., S. Sakha, and S. Pabbi, *[Chromatographic and spectroscopic characterization of phycocyanin and its subunits purified from Anabaena variabilis CCC421].* Prikl Biokhim Mikrobiol, 2014. **50**(1): p. 72-79.
33. Romay, C., et al., *C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects.* Curr Protein Pept Sci, 2003. **4**(3): p. 207-216.
34. Teshima, S.-i. and A. Kanazawa, *Occurrence of Sterols in the Blue-Green Alga, Anabaena cylindrica.* NIPPON SUISAN GAKKAISHI, 1972. **38**(10): p. 1197-1202.
35. Tiwari, O.N., et al., *Characterization and Optimization of Bioflocculant Exopolysaccharide Production by Cyanobacteria Nostoc sp. BTA97 and Anabaena sp. BTA990 in Culture Conditions.* Appl Biochem Biotechnol, 2015. **176**(7): p. 1950-63.
36. Kerrihard, A.L. and R.B. Pegg, *13 - Utilizing the bioactive contents of specialty oils and fats*, in *Specialty Oils and Fats in Food and Nutrition*, G. Talbot, Editor. 2015, Woodhead Publishing. p. 317-348.
37. Yang, S.-T., *Bioprocessing for value-added products from renewable resources: new technologies and applications*, ed. Elsevier. 2011, Amesterdam, The Netherlands.
38. Hallmann, A., *Algal transgenics and biotechnology.* Transgenic Plant J, 2007. **1**(1): p. 81-98.
39. Bhatnagar, S.K., A. Saxena, and S. Kraan, *Algae-Based Biofuels: a review of challenges and opportunities for developing countries*, Food and O. Agriculture, Editors. 2011, Studium Press LLC: Houston. p. 1-40.
40. Ruiz Gonzalez, J., et al., *Towards industrial products from microalgae*. Vol. 9. 2016.
41. Pienkos, P.T. and A. Darzins, *The promise and challenges of microalgal-derived biofuels.* Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2009. **3**(4): p. 431-440.

42. Sugihara, N., et al., *Novel Fractionation Method for Squalene and Phytosterols Contained in the Deodorization Distillate of Rice Bran Oil.* Journal of Oleo Science, 2010. **59**(2): p. 65-70.
43. Englund, E., et al., *Production of Squalene in Synechocystis sp. PCC 6803.* PLOS ONE, 2014. **9**(3): p. e90270.
44. Eroglu, E. and A. Melis, *Extracellular terpenoid hydrocarbon extraction and quantitation from the green microalgae Botryococcus braunii var. Showa.* Bioresour Technol, 2010. **101**(7): p. 2359-2366.
45. Spanova, M. and G. Daum, *Squalene – biochemistry, molecular biology, process biotechnology, and applications.* European Journal of Lipid Science and Technology, 2011. **113**(11): p. 1299-1320.
46. Reddy, L.H. and P. Couvreur, *Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy.* Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61**(15): p. 1412-1426.
47. Huang, Z.R., Y.K. Lin, and J.Y. Fang, *Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology.* Molecules, 2009. **14**(1): p. 540-554.
48. Edens, R.E., *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility, 2nd ed Edited by Severian Dumitriu (University of Sherbrooke, Quebec). Marcel Dekker: New York. 2005. xviii + 1204 pp. $269.95. ISBN 0-8247-5480-8.* Journal of the American Chemical Society, 2005. **127**(28): p. 10119-10119.
49. Kumar, A.S., K. Mody, and B. Jha, *Bacterial exopolysaccharides--a perception.* J Basic Microbiol, 2007. **47**(2): p. 103-117.
50. Guzman, S., et al., *Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of polysaccharide from Chlorella stigmatophora and Phaeodactylum tricornutum.* Phytother Res, 2003. **17**(6): p. 665-670.
51. Nomoto, K., et al., *[Antitumor activity of chlorella extract, PCM-4, by oral administration].* Gan To Kagaku Ryoho, 1983. **10**(3): p. 781-785.
52. Ogawa, K., M. Yamaura, and I. Maruyama, *Isolation and Identification of 2-O-Methyl-l-rhamnose and 3-O-Methyl-l-rhamnose as Constituents of an Acidic Polysaccharide of Chlorella vulgaris.* Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1997. **61**(3): p. 539-540.
53. Blifernez-Klassen, O., et al., *Metabolic survey of Botryococcus braunii: Impact of the physiological state on product formation.* PloS one, 2018. **13**(6): p. e0198976-e0198976.
54. Mishra, A., K. Kavita, and B. Jha, *Characterization of extracellular polymeric substances produced by micro-algae Dunaliella salina.* Carbohydrate Polymers, 2011. **83**(2): p. 852-857.
55. Raposo, M.F.d.J., R.M.S.C. de Morais, and A.M.M. Bernardo de Morais, *Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae.* Marine drugs, 2013. **11**(1): p. 233-252.
56. Delbarre-Ladrat, C., et al., *Exopolysaccharides produced by marine bacteria and their applications as glycosaminoglycan-like molecules.* Front Chem, 2014. **2**: p. 85.
57. Xiao, R. and Y. Zheng, *Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications.* Biotechnol Adv, 2016. **34**(7): p. 1225-1244.
58. Trabelsi, L., et al., *Partial characterization and antioxidant and antiproliferative activities of the aqueous extracellular polysaccharides from the thermophilic microalgae Graesiella sp.* BMC Complement Altern Med, 2016. **16**: p. 210.
59. Ruas-Madiedo, P., J. Hugenholtz, and P. Zoon, *An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria.* International Dairy Journal, 2002. **12**(2): p. 163-171.
60. Patel, S., A. Majumder, and A. Goyal, *Potentials of exopolysaccharides from lactic Acid bacteria.* Indian journal of microbiology, 2012. **52**(1): p. 3-12.

61. Dertli, E., M.J. Mayer, and A. Narbad, *Impact of the exopolysaccharide layer on biofilms, adhesion and resistance to stress in Lactobacillus johnsonii FI9785.* BMC Microbiol, 2015. **15**: p. 8.
62. Ghafoor, A., I.D. Hay, and B.H. Rehm, *Role of exopolysaccharides in Pseudomonas aeruginosa biofilm formation and architecture.* Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(15): p. 5238-5246.
63. Bafana, A., *Characterization and optimization of production of exopolysaccharide from Chlamydomonas reinhardtii.* Carbohydr Polym, 2013. **95**(2): p. 746-752.
64. de Jesus Raposo, M.F., A.M. de Morais, and R.M. de Morais, *Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications.* Mar Drugs, 2015. **13**(5): p. 2967-3028.
65. Clement, M.J., et al., *NMR characterization and molecular modeling of fucoidan showing the importance of oligosaccharide branching in its anticomplementary activity.* Glycobiology, 2010. **20**(7): p. 883-894.
66. Xiao, R. and Y. Zheng, *Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications.* Biotechnology Advances, 2016. **34**(7): p. 1225-1244.
67. Acurio, L.P., et al., *Antimicrobial potential of Chlorella algae isolated from stacked waters of the Andean Region of Ecuador.* IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2018. **151**(1): p. 012040.
68. Guzman, S., A. Gato, and J.M. Calleja, *Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae Chlorella stigmatophora and Phaeodactylum tricornutum.* Phytother Res, 2001. **15**(3): p. 224-230.
69. Fabregas, J., et al., *In vitro inhibition of the replication of haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) and African swine fever virus (ASFV) by extracts from marine microalgae.* Antiviral Res, 1999. **44**(1): p. 67-73.
70. Chen, B., et al., *Role of extracellular polymeric substances from Chlorella vulgaris in the removal of ammonium and orthophosphate under the stress of cadmium.* Bioresour Technol, 2015. **190**: p. 299-306.
71. Yin, Y., Y. Hu, and F. Xiong, *Biosorption properties of Cd(II), Pb(II), and Cu(II) of extracellular polymeric substances (EPS) extracted from Aspergillus fumigatus and determined by polarographic method.* Environ Monit Assess, 2013. **185**(8): p. 6713-6718.
72. d'Abzac, P., et al., *Metal binding properties of extracellular polymeric substances extracted from anaerobic granular sludges.* Environ Sci Pollut Res Int, 2013. **20**(7): p. 4509-4519.
73. Stanier, R.Y., et al., *Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales).* Bacteriological reviews, 1971. **35**(2): p. 171-205.
74. Lee, S.J., B.-D. Yoon, and H.-M. Oh, *Rapid method for the determination of lipid from the green alga Botryococcus braunii.* Biotechnology Techniques, 1998. **12**(7): p. 553-556.
75. Weiss, T.L., et al., *Colony Organization in the Green Alga Botryococcus braunii (Race B) Is Specified by a Complex Extracellular Matrix.* Eukaryotic Cell, 2012. **11**(12): p. 1424.
76. Jiang, Z., C. Kempinski, and J. Chappell, *Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids.* Current protocols in plant biology, 2016. **1**: p. 345-358.
77. Tatli, M., et al., *Isolation and Characterization of Cyclic C33 Botryococcenes and a Trimethylsqualene Isomer from Botryococcus braunii Race B.* Journal of Natural Products, 2017. **80**(4): p. 953-958.
78. Blifernez-Klassen, O., et al., *Metabolic survey of Botryococcus braunii: Impact of the physiological state on product formation.* PLOS ONE, 2018. **13**(6): p. e0198976.
79. Johnson, X. and J. Alric, *Central Carbon Metabolism and Electron Transport in <span class="named-content genus-species" id="named-content-*

1">Chlamydomonas reinhardtii: Metabolic Constraints for Carbon Partitioning between Oil and Starch. Eukaryotic Cell, 2013. **12**(6): p. 776.
80. Mostert, E.S. and J.U. Grobbelaar, *The influence of nitrogen and phosphorus on algal growth and quality in outdoor mass algal cultures.* Biomass, 1987. **13**(4): p. 219-233.
81. Al-Hothaly, K.A., et al., *The Effect of Media on Biomass and Oil Production in Botryococcus braunii Strains Kossou-4 and Overjuyo-3.* International Journal of Clean Coal and Energy, 2015. **Vol.04No.01**: p. 12.
82. Ge, Y., J. Liu, and G. Tian, *Growth characteristics of Botryococcus braunii 765 under high CO2 concentration in photobioreactor.* Bioresour Technol, 2011. **102**(1): p. 130-134.
83. Kim, G., G. Mujtaba, and K. Lee, *Effects of nitrogen sources on cell growth and biochemical composition of marine chlorophyte Tetraselmis sp. for lipid production.* ALGAE, 2016. **31**(3): p. 257-266.
84. Wolf, F.R., A.M. Nonomura, and J.A. Bassham, *Growth abd brached hydrocarbon production in a strain of Botryococcus braunii (Chlorophyta).* Journal of Phycology, 1985. **21**(3): p. 388-396.
85. Tonegawa, I., et al., *Pigment Composition of the Green Microalga Botryococcus braunii Kawaguchi-1.* Fisheries science, 1998. **64**(2): p. 305-308.
86. He, H.P., et al., *Extraction and purification of squalene from amaranthus grain.* J Agric Food Chem, 2002. **50**(2): p. 368-372.
87. Boyer, R.F., *Isolation and spectrophotometric characterization of photosynthetic pigments.* Biochemical Education, 1990. **18**(4): p. 203-206.
88. Liu, L., G. Pohnert, and D. Wei, *Extracellular Metabolites from Industrial Microalgae and Their Biotechnological Potential.* Marine drugs, 2016. **14**(10): p. 191.
89. Paulsen, B.S., et al., *Extracellular polysacharides from Ankistrodesmus densus (Chlorophyceae).* Journal of Phycology, 2002. **34**(4): p. 638-641.
90. Allard, B. and E. Casadevall, *Carbohydrate composition and characterization of sugars from the green microalga Botryococcus Braunii.* Phytochemistry, 1990. **29**(6): p. 1875-1878.
91. Moore, B.G. and R.G. Tischer, *Extracellular Polysaccharides of Algae: Effects on Life-Support Systems.* Science, 1964. **145**(3632): p. 586-587.
92. Cantarel, B.L., et al., *The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics.* Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Database issue): p. D233-8.
93. Pereira, S., et al., *Complexity of cyanobacterial exopolysaccharides: composition, structures, inducing factors and putative genes involved in their biosynthesis and assembly.* FEMS Microbiol Rev, 2009. **33**(5): p. 917-41.
94. Νάζος, Θ., *Μελέτη της Βιοαποικοδόμησης Φαινολικών Ενώσεων από Μικροοργανισμούς*. 2018, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης: Ηράκλειο.
95. Damodaran, S.P., et al., *A millifluidic study of cell-to-cell heterogeneity in growth-rate and cell-division capability in populations of isogenic cells of Chlamydomonas reinhardtii.* PloS one, 2015. **10**(3): p. e0118987-e0118987.
96. Sueoka, N., *Mitotic Replication of Deoxyribonucleic Acid in Chlamydomonas Reinhardi.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1960. **46**(1): p. 83-91.
97. Bahadur, S., et al., *Review on natural gums and mucilage and their application as excipient.* Journal of Applied Pharmaceutical Research; Vol 5 No 4 (2017)DO - 10.18231/2348-0335.2017.0010, 2017.
98. Elzagheid, M.I., *Laboratory Activities to Introduce Carbohydrates Qualitative Analysis to College Students.* World Journal of Chemical Education, 2018. **6**(2): p. 82-86.
99. Fengel, D. and G. Wegener, *Hydrolysis of Polysaccharides with Trifluoroacetic Acid and its Application to Rapid Wood and Pulp Analysis*, in *Hydrolysis of Cellulose: Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis*. 1979, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. p. 145-158.

100. Kassakul, W., et al., *Characterization of the mucilages extracted from Hibiscus mutabilis linn and their skin moisturizing effect.* 2014, 2014: p. 5.
101. Ren, D. and S. Zhang, *Separation and identification of the yellow carotenoids in Potamogeton crispus L.* Food Chemistry, 2008. **106**(1): p. 410-414.
102. Zeb, A. and M. Murkovic, *Thin-layer chromatographic analysis of carotenoids in plant and animal samples.* JPC - Journal of Planar Chromatography - Modern TLC, 2010. **23**(2): p. 94-103.
103. Amorim-Carrilho, K.T., et al., *Review of methods for analysis of carotenoids.* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2014. **56**: p. 49-73.
104. Ceron, M.C., et al., *Recovery of lutein from microalgae biomass: development of a process for Scenedesmus almeriensis biomass.* J Agric Food Chem, 2008. **56**(24): p. 11761-11766.
105. Inbaraj, B.S., et al., *Determination of carotenoids and their esters in fruits of Lycium barbarum Linnaeus by HPLC-DAD-APCI-MS.* J Pharm Biomed Anal, 2008. **47**(4-5): p. 812-818.
106. Saini, R.K. and Y.-S. Keum, *Carotenoid extraction methods: A review of recent developments.* Food Chemistry, 2018. **240**: p. 90-103.
107. Driver, T., et al., *Metabolic responses of eukaryotic microalgae to environmental stress limit the ability of FT-IR spectroscopy for species identification.* Algal Research, 2015. **11**: p. 148-155.
108. Ikeda, T. and H. Takeda, *SPECIES-SPECIFIC DIFFERENCES OF PYRENOIDS IN CHLORELLA (CHLOROPHYTA)1.* Journal of Phycology, 1995. **31**(5): p. 813-818.
109. Azaman, S.N.A., et al., *A comparison of the morphological and biochemical characteristics of Chlorella sorokiniana and Chlorella zofingiensis cultured under photoautotrophic and mixotrophic conditions.* PeerJ, 2017. **5**: p. e3473.
110. Gacheva, G. and P. Pilarski, *The resistance of a new strain Chlorella sp. R-06/2, isolated from an extreme habitat, to environmental stress factors*. Vol. 34. 2008.
111. Markou, G., I. Angelidaki, and D. Georgakakis, *Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels.* Appl Microbiol Biotechnol, 2012. **96**(3): p. 631-645.
112. Arad, S.M. and O. Levy-Ontman, *Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects.* Curr Opin Biotechnol, 2010. **21**(3): p. 358-364.
113. Keidan, M., M. Friedlander, and S. Arad, *Effect of Brefeldin A on cell-wall polysaccharide production in the red microalga Porphyridium sp. (Rhodophyta) through its effect on the Golgi apparatus.* Journal of Applied Phycology, 2009. **21**(6): p. 707.
114. Brosch-Salomon, S., et al., *Ultrastructural localization of polysaccharides and N-acetyl-d-galactosamine in the secretory pathway of green algae (Desmidiaceae).* Journal of Experimental Botany, 1998. **49**(319): p. 145-153.
115. Zhang, G.F. and L.A. Staehelin, *Functional compartmentation of the Golgi apparatus of plant cells : immunocytochemical analysis of high-pressure frozen- and freeze-substituted sycamore maple suspension culture cells.* Plant Physiol, 1992. **99**(3): p. 1070-1083.
116. L A Staehelin, a. and I. Moore, *The Plant Golgi Apparatus: Structure, Functional Organization and Trafficking Mechanisms.* Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1995. **46**(1): p. 261-288.
117. Gärtner, G., et al., *Microscopic investigations (LM, TEM and SEM) and identification of Chlorella isolate R-06/2 from extreme habitat in Bulgaria with a strong biological activity and resistance to environmental stress factors.* Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2015. **29**(3): p. 536-540.
118. Coesel, P.F.M. and K. Wardenaar, *Light-limited growth and photosynthetic characteristics of two planktonic desmid species.* Freshwater Biology, 1994. **31**(2): p. 221-226.
119. De Philippis, R. and M. Vincenzini, *Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications.* FEMS Microbiology Reviews, 1998. **22**(3): p. 151-175.

120. Mann, E.E. and D.J. Wozniak, *Pseudomonas biofilm matrix composition and niche biology.* FEMS Microbiol Rev, 2012. **36**(4): p. 893-916.
121. Sutherland, I.W., *Biosynthesis of microbial exopolysaccharides.* Adv Microb Physiol, 1982. **23**: p. 79-150.
122. Decho, A.W. and G.R. Lopez, *Exopolymer microenvironments of microbial flora: Multiple and interactive effects on trophic relationships.* Limnology and Oceanography, 1993. **38**(8): p. 1633-1645.
123. De Philippis, R., et al., *Potential of unicellular cyanobacteria from saline environments as exopolysaccharide producers.* Applied and environmental microbiology, 1998. **64**(3): p. 1130-1132.
124. Wotton, R.S., *The ubiquity and many roles of exopolymers (EPS) in aquatic systems*. Vol. 68. 2004. 13-21.
125. Flemming, H.C. and J. Wingender, *The biofilm matrix.* Nat Rev Microbiol, 2010. **8**(9): p. 623-633.
126. Bhat, S., A. Tripathi, and A. Kumar, *Supermacroprous chitosan-agarose-gelatin cryogels: in vitro characterization and in vivo assessment for cartilage tissue engineering.* Journal of the Royal Society, Interface, 2011. **8**(57): p. 540-554.
127. Nikonenko, N.A., et al., *Investigation of stretching vibrations of glycosidic linkages in disaccharides and polysaccharides with use of IR spectra deconvolution.* Biopolymers, 2000. **57**(4): p. 257-262.
128. Zhao, T., et al., *Isolation, characterization and antioxidant activity of polysaccharide from Schisandra sphenanthera.* Carbohydr Polym, 2014. **105**: p. 26-33.
129. Ospina, et al., *Comparison of Extraction Methods of Chitin from Ganoderma lucidum Mushroom Obtained in Submerged Culture.* BioMed Research International, 2014. **2014**: p. 7.
130. Zhang, H., et al., *Hypoglycemic Properties of Oxovanadium (IV) Coordination Compounds with Carboxymethyl-Carrageenan and Carboxymethyl-Chitosan in Alloxan-Induced Diabetic Mice.* Evid Based Complement Alternat Med, 2011. **2011**: p. 691067.
131. Blanc, G., et al., *The Chlorella variabilis NC64A genome reveals adaptation to photosymbiosis, coevolution with viruses, and cryptic sex.* Plant Cell, 2010. **22**(9): p. 2943-55.
132. Rahmani, O., B. Bouzid, and A. Guibadj, *Extraction and characterization of chitin and chitosan: applications of chitosan nanoparticles in the adsorption of copper in an aqueous environment*, in *e-Polymers*. 2017. p. 383.
133. Bava, A., et al., *Heparin and carboxymethylchitosan metal nanoparticles: an evaluation of their cytotoxicity.* Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 314091.
134. Kozarski, M., et al., *Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms Ganoderma applanatum, Ganoderma lucidum, Lentinus edodes and Trametes versicolor.* Journal of Food Composition and Analysis, 2012. **26**(1-2): p. 144-153.
135. Cael, J.J., J.L. Koenig, and J. Blackwell, *Infrared and Raman spectroscopy of carbohydrates. Part VI: Normal coordinate analysis of V-amylose.* Biopolymers, 1975. **14**(9): p. 1885-1903.
136. Goo, B.G., et al., *Characterization of a renewable extracellular polysaccharide from defatted microalgae Dunaliella tertiolecta.* Bioresour Technol, 2013. **129**: p. 343-350.
137. MUREŞAN, A.E., et al., *HPLC Determination and FT-MIR Prediction of Sugars from Juices of Different Apple Cultivars during Fruits Development.* 2015, 2015. **43**(1): p. 7.
138. Zhang, F., et al., *Assessment of the effect of trichostatin A on HeLa cells through FT-IR spectroscopy.* Anal Chem, 2015. **87**(4): p. 2511-2517.
139. Xue, Q., W. Peng, and M. Ohkoshi, *Molecular bonding characteristics of Self-plasticized bamboo composites.* Pak J Pharm Sci, 2014. **27**(4 Suppl): p. 975-982.

140. Liu, S., et al., *Extraction and characterization of chitin from the beetle Holotrichia parallela Motschulsky.* Molecules, 2012. **17**(4): p. 4604-11.
141. Li, Q., et al., *Applications and Properties of Chitosan.* Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 1992. **7**(4): p. 370-397.
142. Bubb, W.A., *NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity.* Concepts in Magnetic Resonance Part A, 2003. **19A**(1): p. 1-19.
143. Evans, L.V., et al., *Studies on the Synthesis and Composition of Extracellular Mucilage in the Unicellular Red Alga <em>Rhodella</em&gt.* Journal of Cell Science, 1974. **16**(1): p. 1.
144. Ramus, J., *The production of extracellular polysaccharide by the unicellular red alga Porpyridium aerugineum.* Journal of Phycology, 1972. **8**(1): p. 97-111.
145. Matsunaga, T., et al., *Sulfated extracellular polysaccharide production by the halophilic cyanobacterium Aphanocapsa halophytia immobilized on light-diffusing optical fibers.* Applied Microbiology and Biotechnology, 1996. **45**(1): p. 24-27.
146. Bermúdez, J., et al., *Exopolysaccharide, pigment and protein production by the marine microalga Chroomonas sp. in semicontinuous cultures.* World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2004. **20**(2): p. 179-183.
147. Zheng, L., et al., *Determination of glucosamine in food supplements by HILIC-ESI-MS*, in *European Pharmaceutical Review*. 2017. p. 62-65.
148. Kim, J., et al., *LC-MS/MS analysis of chitooligosaccharides.* Carbohydr Res, 2013. **372**: p. 23-29.
149. Takeda, H., *Sugar compotition of the cell wall and the raxonomy of Chlorella (Chlorophyceae).* Journal of Phycology, 1991. **27**(2): p. 224-232.
150. Li, T., et al., *A Saponification Method for Chlorophyll Removal from Microalgae Biomass as Oil Feedstock.* Marine drugs, 2016. **14**(9): p. 162.
151. Bock, C., L. Krienitz, and T. Pröschold, *Taxonomic reassessment of the genus Chlorella (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species*. Vol. 11. 2011.