

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ - ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ**

Εργασία για την απόκτηση μεταπτυχιακού τίτλου ειδίκευσης  
Επιβλέπων: Αναπλ. καθηγ. Κ. Κοτζαμπάσης

**ΦΩΤΟΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΘΑΝΟΛΗΣ ΚΙ  
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΣΤΗ ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ  
ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ**

**ΘΕΟΔΩΡΙΔΟΥ Κ. ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ**

Ηράκλειο, Σεπτέμβριος 2000.

## 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

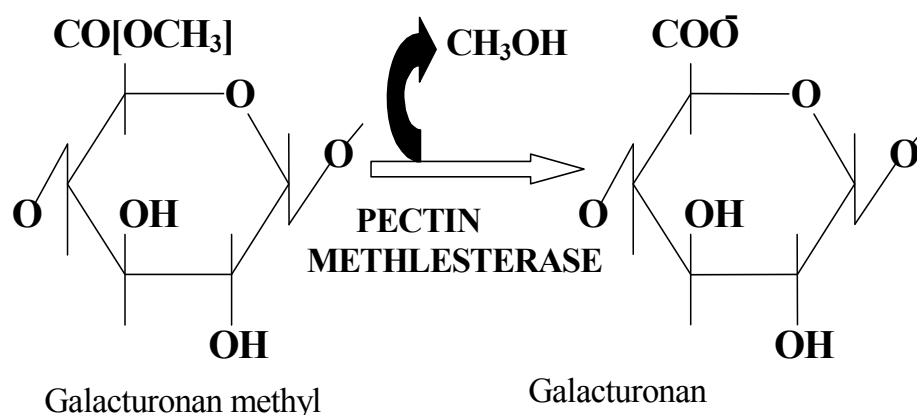
### **Αφομοίωση και μεταβολισμός της μεθανόλης από τους φυτικούς οργανισμούς.**

Η μεθανόλη αποτελεί ένα από τα απλούστερα φυσικά προϊόντα του μεταβολισμού των φυτών. Σύμφωνα με μελέτες της ατμοσφαιρικής χημείας, σημαντικές ποσότητες μεθανόλης εκπέμπονται από δασικά συστήματα και μάλιστα ο ρυθμός της εκπομπής του πτητικού αυτού οργανικού μορίου εξαρτάται από την ένταση του φωτός. Σε περιόδους μεγάλης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας (υψηλή ένταση φωτισμού και μεγάλη διάρκεια ημέρας) οι ποσότητες της εκπεμπόμενης μεθανόλης ήταν μεγαλύτερες (Snider and Dawson, 1992; Nemecek and Marshall, 1995). Δύο είναι οι πιθανές κύριες πηγές παραγωγής μεθανόλης από τα φυτά:

1) Η μεθανόλη παράγεται στα φύλλα κι εκπέμπεται από τα στόματά τους. Αποτελεί παραπροϊόν της αντίδρασης απομεθυλίωσης των πηκτινών του κυτταρικού τοιχώματος (Εικ. 1). Κατά τη διάρκεια επιμήκυνσης των φυτών τα πρόδρομα μόρια της πηκτίνης είναι συνδεδεμένα με γαλακτουρονικούς μεθυλεστέρες (O'Neil, 1990) πιθανόν για να διευκολύνουν τη μεταφορά ουσιών μέσω κυτταρικού τοιχώματος (Levy and Staehelin, 1992). Η ενζυμική απομεθυλίωση των πηκτινών εξυπηρετεί την κυτταρική ωρίμανση μιας κι έτσι είναι δυνατή η πρόσδεση ιόντων ασβεστίου και η διασύνδεση πολυμερών αλυσίδων που προσδίδει μεγαλύτερη ακαμψία και σταθερότητα στα κυτταρικά τοιχώματα (Jarvis, 1984).

2) Η μεθανόλη εκπέμπεται στη βιόσφαιρα μέσω της δράσης μεθυλοτροφικών βακτηρίων και μυκήτων σε μόρια λιγνίνης των κυτταρικών

τοιχωμάτων των φύλλων. Η λιγνίνη είναι κύριο συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων και είναι πλούσια σε ομάδες μεθυλαιθέρων. Η αναγωγή αυτών των ομάδων από μεθυλοτροφικά βακτήρια και ζύμες που ζουν στις επιφάνειες των φύλλων οδηγεί στην παραγωγή μεθανόλης.



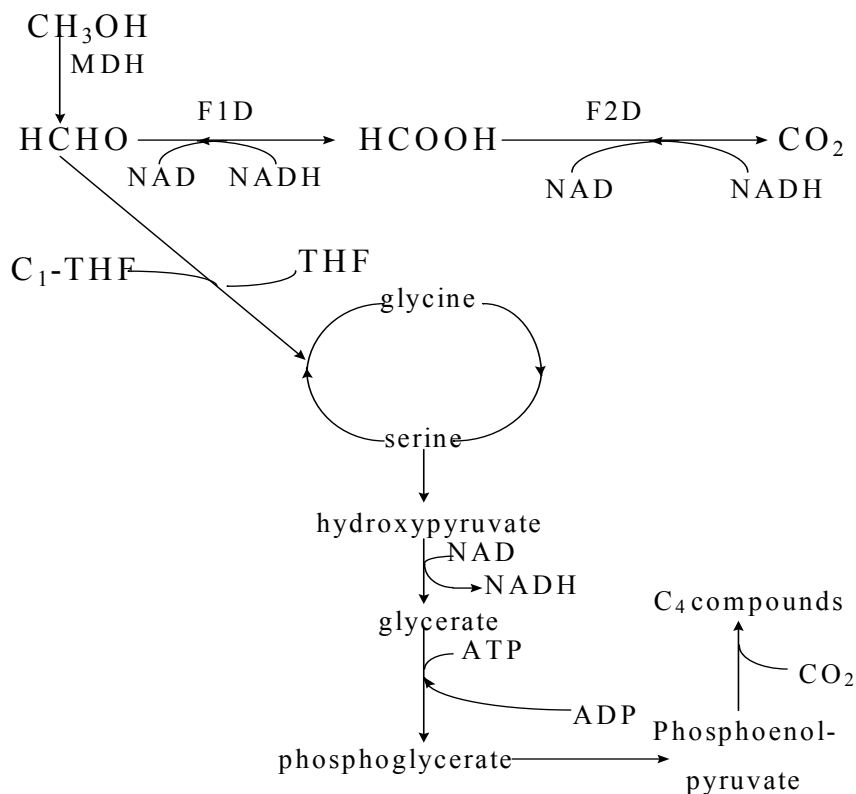
**Εικόνα 1** :Δράση της μεθυλεστεράσης της πηκτίνης και παραγωγή μεθανόλης στους φυτικούς οργανισμούς.

Επίσης, πολύ μικρά ποσά μεθανόλης παράγονται από τα φυτά μέσω ενός βιοχημικού μονοπατιού πρωτεϊνικής επιδιόρθωσης. Ένα ενζυμικό σύστημα, το PIMT (protein L-isospartate (D-aspartate)L O-methyltransferase) αναγνωρίζει συγκεκριμένες βλάβες των πρωτεϊνικών αλυσίδων τις οποίες και επιδιορθώνει. Το ποσό της μεθανόλης που προκύπτει απ' αυτές τις αντιδράσεις είναι πολύ μικρό ενώ το ενζυμικό αυτό σύμπλεγμα υπάρχει σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς (Mudgettand -Clarke, 1993).

Γίνεται, λοιπόν, σαφές πως όλοι οι ζωικοί οργανισμοί εκτίθενται σε μικρά ποσά μεθανόλης μέσω του εισπνεόμενου αέρα και των εισερχόμενων απ' την τροφή υλικών. Εκτεταμένες μελέτες παρέχουν στοιχεία για την τοξική δράση της μεθανόλης στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς (Core, 1985).

Ο μεταβολισμός της μεθανόλης στους μεθυλοτροφικούς μικροοργανισμούς αποτέλεσε αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας (Quale, 1980). Οι μεθυλοτροφικές ζύμες οξειδώνουν τη μεθανόλη σε φορμαλδεΐδη στα

περοξυσώματα, με τη δράση μιας αλκοολικής οξειδάσης. Τελική τύχη της μεθανόλης είναι είτε η γραμμική οξείδωσή της σε CO<sub>2</sub> ή η κυκλική συσσώρευση του C της μεθανόλης στους υδατάνθρακες η οποία και ελέγχεται αυστηρά, ένδειξη της τοξικής της δράσης στο κύτταρο. Μεθυλοτροφικές ζύμες και βακτήρια διαφέρουν στην αρχική οξείδωση της μεθανόλης. Και στα δύο η μεθανόλη οξειδώνεται σε φορμαλδεΐδη, φορμικό και διοξείδιο του άνθρακα (CH<sub>3</sub>OH → HCHO → HCOOH). Η φορμαλδεΐδη οξειδώνεται σε φορμικό με τη βοήθεια NAD<sup>+</sup> αλδεΐδο -δεϋδρογονασών οι οποίες τυπικά διαφέρουν στην απαίτηση συμπαραγόντων. Ένα ενδιαφέρον μεθυλοτροφικό μονοπάτι μεταβολισμού της μεθανόλης είναι το βακτηριακό μονοπάτι της σερίνης (Εικ.2). Σύμφωνα με το μονοπάτι αυτό, χρησιμοποιείται γλυκίνη ως δέκτης του οξειδωμένου ενδιαμέσου της μεθανόλης (στην περίπτωση αυτή του υδροξυ-μεθυλ- τετραϋδροφολικού). Το προκύπτον μόριο σερίνης τελικά μετατρέπεται – σε συνδυασμό με ένα επιπρόσθετο μόριο CO<sub>2</sub> – σε C<sub>4</sub> μεταβολίτες. Με τον τρόπο αυτό εμποδίζεται η τοξικότητα που θα προκαλούνταν απ' τη σύνδεση της φορμαλδεΐδης με κυτταρικές πρωτεΐνες.



**Εικόνα 2:** Βακτηριακό μονοπάτι της σερίνης (Quale,1980). F1D= formaldehyde dehydrogenase, F2D=formate dehydrogenase, THF=tetrahydrofolate.

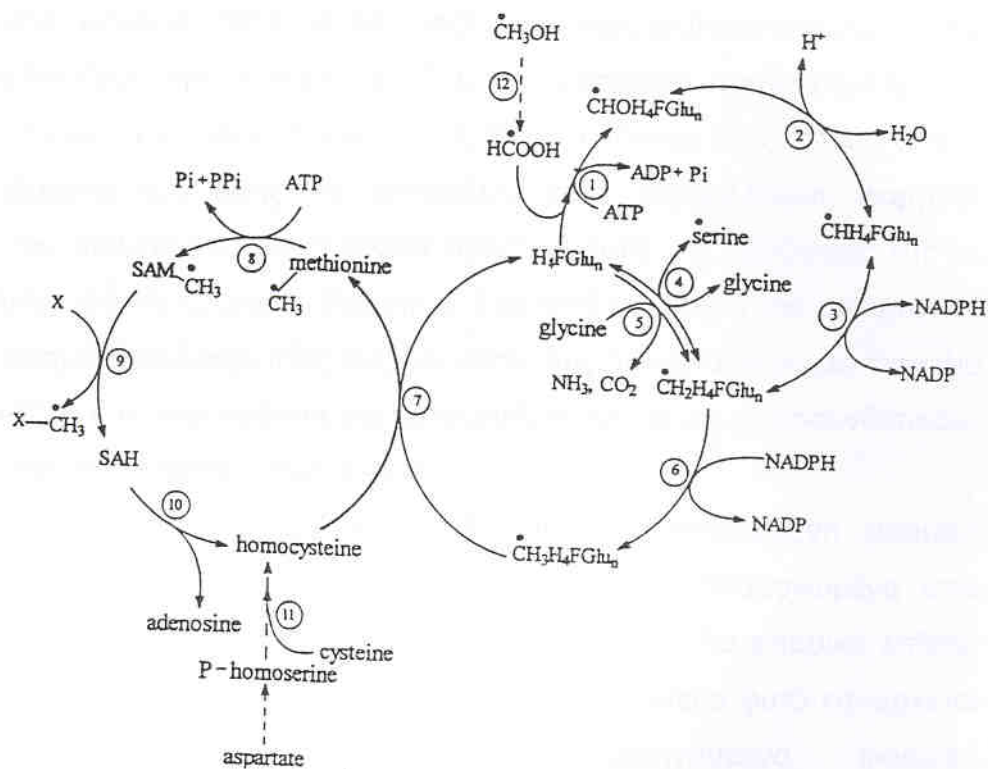
Σε αντίθεση με το πλήρως διευκρινισμένο βιοχημικό μονοπάτι στους μικροοργανισμούς, ελάχιστα είναι κατανοητά για το μεταβολισμό της μεθανόλης στους φυτικούς οργανισμούς. Ταχύτατη αφομοίωση της μεθανόλης από φυτά που φωτοσυνθέτουν κι επακόλουθη επαγωγή της αύξησής τους πρωτοπαρατηρήθηκε απ' τους Nonomura και Benson (1992a,1992b). Η επαγωγή που παρατηρήθηκε στην αύξηση διαφόρων φυτικών ειδών μετά από επιφανειακό ψεκασμό με μεθανόλη φαίνεται στον πίνακα 1.

**Πίνακας 1 :** Κατάλογος φυτών που δοκιμάστηκε η επίδραση της μεθανόλης (Rave et al., 1994).

<b>Φυτικοί οργανισμοί</b>	<b>Ημέρες μεταχείρισης</b>	<b>Ανάπτυξη (%)</b>
Botrococcus	10	100
Τομάτα	30	50
Φράουλα	30	60
Βαμβάκι	30	50
Σιτάρι	60	100
Τριανταφυλλιά	45	40
Πεύκο	180	70
Πεπόνι	75	36

Χρησιμοποιώντας  $^{13}\text{C}$ -NMR αναλύσεις αποδείχτηκε πως το άτομο του άνθρακα της μεθανόλης, η οποία χορηγήθηκε σε κύτταρα ανώτερων φυτών, ενσωματώνεται σε μεθυλο- ομάδες διαφόρων μορίων, όπως η μεθειονίνη και η φωσφατιδιλοχολίνη (Gout E. et al, 2000). Η μεθανόλη είναι ένα μόριο αρκετά μικρό και εισέρχεται γρήγορα σε φυτικά κύτταρα. Οι Gout E. et al,

(2000) υποστηρίζουν πως η είσοδος αυτή ενδεχομένως να γίνεται μέσω μιας ακουαπορίνης και μεταβολίζεται σύμφωνα με το μονοπάτι που απεικονίζεται παρακάτω (Εικ 3). Η αφομοίωση του απλού αυτού οργανικού μορίου απαιτεί πρωταρχικά την οξειδωσή του, αν και ο ακριβής μηχανισμός αυτής της οξειδωσης δεν είναι γνωστός. Μια λογική πιθανότητα θα ήταν ο σχηματισμός φορμαλδεΐδης και ακολούθως η οξειδωσή της σε φορμικό οξύ, αντιδράσεις οι οποίες καταλύονται από την οξειδάση της μεθανόλης και την αφυδρογονάση της φορμαλδεΐδης αντίστοιχα.



**Εικόνα 3:** Προτεινόμενο βιοχημικό μονοπάτι αφομοίωσης και μεταβολισμού της μεθανόλης. •:  $^{13}\text{C}$ . Η μεταχείριση έγινε σε κύτταρα φύλλων συκομουριάς και το μονοπάτι κατασκευάστηκε με βάση NMR ανάλυση (Gout E. et al, 2000).

Αν και το ποσοστό της μεθανόλης που ανακυκλώνεται στα φυτά δεν είναι γνωστό, είναι πλέον σαφές πως οι φυτικοί ιστοί μεταβολίζουν τη μεθανόλη. Τα ανώτερα φυτά πιθανότατα δεν διαθέτουν την οξειδάση της

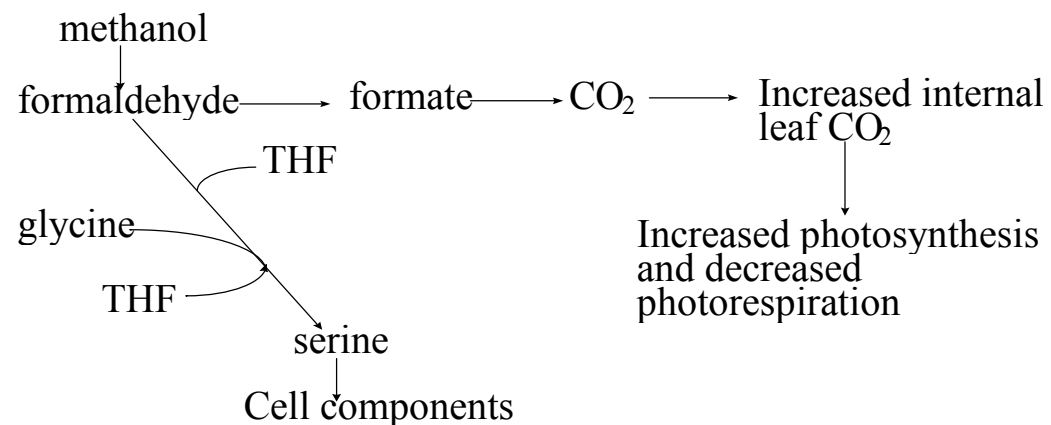
μεθανόλης, ένα ένζυμο που μέχρι στιγμής έχει εντοπιστεί μόνο σε μικροοργανισμούς.

Λίγες προσπάθειες έχουν γίνει για να αποσαφηνίσουν την αφομοίωση των καταναλισκόμενων C<sub>1</sub> ανθρακικών πηγών (λ.χ φορμικό, φορμαλδεΐδη και μεθανόλη). Πρώιμη δουλειά των Doman and Romanova (1962) υποδεικνύει ότι αυτές οι C<sub>1</sub>- πηγές αρχικά μετατρέπονται στα φύλλα σε CO<sub>2</sub>, το οποίο γρήγορα αφομοιώνεται κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης. Οι ρυθμοί αφομοίωσης στο σκοτάδι είναι αρκετές φορές πιο αργοί. Χρησιμοποιώντας <sup>14</sup>C-CH<sub>3</sub>OH σε μια ποικιλία φυτικών ιστών το αποτέλεσμα ήταν η συγχώνευσή του σε οργανικά οξέα, σάκχαρα, αμινοξέα, λιπίδια, CO<sub>2</sub> και αδιάλυτα υπολείμματα (Cossins, 1964). Αυτό υποδεικνύει πως οι περισσότεροι φυτικοί ιστοί μεταβολίζουν την <sup>14</sup>CH<sub>3</sub>OH σε CO<sub>2</sub> και μικρότερα ποσά σημασμένων φυτικών υλικών. Η παραγωγή του <sup>14</sup>C-HCOOH σε όλους τους ιστούς δείχνει πως τα βήματα οξειδωσης της μεθανόλης είναι φορμαλδεΐδη, φορμικό, διοξειδίο του άνθρακα και είναι γενικά όμοια μ' αυτά της οξειδωσής της σε ζώα, μεθυλοτροφικές ζύμες και βακτήρια. Ένα από τα ένζυμα του μονοπατιού αυτού, η φορμική δεϋδρογενάση είναι γνωστό πως συναντάται σε μια ποικιλία φυτικών ιστών και είναι άφθονη στα μιτοχόνδρια και σε μη φωτοσυνθετικούς ιστούς (Colas des Francs-Small, 1993).

Στα ανώτερα φυτά έχει ανιχνευθεί μια NAD-εξαρτώμενη φορμική αφυδρογονάση (Suzuki et al, 1998) και μιτοχόνδρια απομονωμένα από διάφορους ιστούς μπορούν να οξειδώσουν το φορμικό. Το φορμικό επίσης αποτελεί μια δυνητική μονο-ανθρακική πηγή για τα ανώτερα φυτά και αρκετοί ερευνητές έχουν αποδείξει πως εξωτερικά χορηγούμενο φορμικό μεταβολίζεται σε γλυκίνη και σερίνη μέσω μιας ATP- εξαρτώμενης διαδικασίας. Τα ενζυμικά σύμπλοκα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του φορμικού έχουν εντοπιστεί σε διάφορα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα, συμπεριλαμβανομένου του κυτταροπλάσματος (Chen et al, 1997), των μιτοχονδρίων αλλά και των πλαστιδίων (Colas des Francs-Small, 1993, Neuburger et al, 1996). Συνεπώς οι ανώτεροι φυτικοί οργανισμοί διαθέτουν ολοκληρωμένο ενζυμικό μηχανισμό που καταλύει την ενσωμάτωση του άνθρακα που προέρχεται από το φορμικό -και πιθανόν κι από τη μεθανόλη- και τη μετατροπή του σε μεθυλικές ομάδες ποικίλων οργανικών συστατικών.

Αν και όχι αποδεδειγμένο, το προτεινόμενο βιοχημικό μονοπάτι μεταβολισμού της μεθανόλης για τα φυτά παρουσιάζει ομοιότητες-κλειδιά με το αντίστοιχο των μικροβίων (Εικ. 4).

Για τους φωτοσυνθετικούς ιστούς έχει προταθεί πως η οξείδωση της μεθανόλης σε  $\text{CO}_2$  έχει ως αποτέλεσμα τη συγχώνευση του άνθρακα της  $\text{CH}_3\text{OH}$  σε μεταβολίτες μέσω του κύκλου Calvin-Benson. Η συγχώνευση του  $^{14}\text{C}-\text{CH}_3\text{OH}$  στον άνθρακα της σερίνης σε φυτικούς ιστούς υποδεικνύει πως η  $\text{CH}_3\text{OH}$  παρέχει τον άνθρακα για την αντίδραση της υδροξυμεθυλτρανσφοράσης (Rebeille;1994, MacKensie;1984).



**Εικόνα 4:** Προτεινόμενος μηχανισμός μεταβολισμού της μεθανόλης φωτοσυνθετικά ενεργών  $\text{C}_3$  φυτών (Nonomura and Benson, 1992).

Το ενδιαφέρον με το μεταβολισμό της μεθανόλης από τους φυτικούς οργανισμούς είναι το εύρημα πως σε πολλές περιπτώσεις συνοδεύεται από σημαντική αύξηση της βιομάζας του οργανισμού, καθώς κι από ταυτόχρονη αύξηση της φωτοσυνθετικής του απόδοσης. Αφομοίωση της μεθανόλης από φυτά που φωτοσυνθέτουν κι επακόλουθη επαγωγή της αύξησής τους παρατηρήθηκε τόσο σε εφαρμογές σε θερμοκήπιο όσο και σε εξωτερικές καλλιέργειες (MacGiffen R, 1996). Επαγωγή επίσης παρατηρήθηκε στην αύξηση διαφόρων φυτικών ειδών μετά από επιφανειακό ψεκασμό με διάλυμα μεθανόλης υψηλής συγκέντρωσης (Nonomura και Benson 1992a, 1992b). Επιπλέον, χορήγηση χαμηλής συγκέντρωσης μεθανόλης σε αυτότροφες,



φωτιζόμενες, καλλιέργειες του ευκαρυωτικού χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* (πτυχιακή εργασία, Θεοδωρίδου Αναστασία, 1998), καθώς και σε καλλιέργειες του χλωροφύκου *Chlorella minutissima* (Kotzabasis et al, 1999), είχε ως συνέπεια την ταχεία επαγωγή της αύξησης, χωρίς παράλληλα να εμφανιστούν συμπτώματα τοξικότητας.

Η αύξηση της βιομάζας των μεταχειρισμένων με μεθανόλη φυτικών οργανισμών αποδίδεται πρωτίστως στη χρήση της  $\text{CH}_3\text{OH}$  ως άμεση πηγή άνθρακα και ενδεχομένως στον περιορισμό της απώλειας άνθρακα μέσω της διαδικασίας της φωτοαναπνοής.

Μέχρι σήμερα η επιστημονική έρευνα δεν κατάφερε να δώσει απαντήσεις σχετικά με το ακριβές μονοπάτι μεταβολισμού της μεθανόλης και το μηχανισμό διέγερσης της ανάπτυξης έπειτα από χορήγησή της σε διάφορα φυτικά είδη. Η αναπαραγωγή συγκεκριμένων πειραματικών αποτελεσμάτων δεν έχει καταστεί δυνατή ως τώρα κι ένα πλήθος ερευνητικών αναφορών έρχονται σε αντίφαση μεταξύ τους σχετικά με την αποτελεσματικότητα της μεθανόλης ως επαγωγή της αύξησης.

Στο σημείο αυτό, θα πρέπει να διευκρινιστεί ότι οι πειραματικές μεταχειρίσεις με μεθανόλη που πραγματοποιήθηκαν από διάφορους ερευνητές έλαβαν χώρα κάτω από διαφορετικές συνθήκες (διαφορετική φωτοπερίοδος, ένταση φωτισμού, διαφορετικοί χειρισμοί ως προς τον τρόπο χορήγησης της μεθανόλης, συγκέντρωση του οργανικού αυτού μορίου ως προς την αρχική βιομάζα).

Γίνεται, λοιπόν, κατανοητό πως μια σειρά κρίσιμων μεταβλητών και παραμέτρων επηρεάζουν σημαντικά την αφομοίωση και τον μεταβολισμό της μεθανόλης. Απομένει, λοιπόν, η εργαστηριακή έρευνα να παράσχει συγκεκριμένες πληροφορίες για το μηχανισμό δράσης της μεθανόλης. Επιπρόσθετα, αναγκαίο είναι να εξακριβωθούν οι μεταβλητές που επηρεάζουν το μεταβολισμό της κι επιπλέον, να διευκρινιστεί ο βέλτιστος συνδυασμός τους έτσι ώστε να εξασφαλισθεί η επιθυμητή απόκριση και το απλό και άφθονο αυτό οργανικό μόριο να αποτελέσει επιτυχή επαγωγή της αύξησης των φυτικών οργανισμών. Όταν κάτι τέτοιο συμβεί θα μπορεί να επιτευχθεί μεγαλύτερη και ταχύτερη αύξηση της φυτικής παραγωγής, χωρίς πολύπλοκες και δαπανηρές παρεμβάσεις.

Σε αντιδιαστολή με τις εμφανείς επιδράσεις της μεθανόλης στην επαγωγή της αύξησης των C3 φυτών (Πίνακας 1), στα C4 φυτά -κάτω από τις ίδιες συνθήκες- δεν παρατηρήθηκε καμία απ' αυτές τις επιδράσεις. Η καθαρή αυτή διαφορά μεταξύ των C3 και C4 φυτών αποδόθηκε στην αναστολή της φωτοαναπνοής κατά την αφομοίωση της μεθανόλης. Αυτή η πρόταση υποστηρίχθηκε απ' το εύρημα ότι αυξημένες συγκεντρώσεις μεθανόλης σε συνδυασμό με γλυκίνη δεν είναι τοξικές. Οι Nonomura και Benson (1992) πρότειναν ότι η γλυκίνη που παράγεται κατά τη φωτοαναπνοή ήταν απαραίτητη για την αφομοίωση της μεθανόλης. Φυτά που δεν έχουν φωτοαναπνοή (C4-φυτά) δεν αφομοιώνουν μεθανόλη και εμφανίζουν συμπτώματα τοξικότητας. Η αναστολή της φωτοαναπνοής πιθανόν να οφείλεται στην απότομη αύξηση της εσωτερικής συγκέντρωσης του CO<sub>2</sub> μετά τον ψεκασμό με CH<sub>3</sub>OH.

Με βάση τα στοιχεία αυτά, η αύξηση της βιομάζας των μεθανόλο-θεραπευμένων C3 φυτών αποδίδεται: 1) Στη χρήση της CH<sub>3</sub>OH ως άμεσης πηγής C και 2) στη μειούμενη απώλεια C από τη φωτοαναπνοή.

Όμως οι βιοχημικές αποκρίσεις των φυτών στη μεθανόλη έχουν γίνει αντικείμενο έντονων συζητήσεων και αμφισβητήσεων από τότε που οι Nonomura και Benson (1992a, 1992b) ανέφεραν αξιοσημείωτη αύξηση της ανάπτυξης των C3 φυτών στα οποία χορηγήθηκε μεθανόλη. Παρότι θετικές αποκρίσεις στη μεθανόλη έχουν αναφερθεί αναφορικά με τη βιομάζα, τη φωτοσυνθετική και αναπνευστική δραστηριότητα, την κάρπιση κ.τ.λ (Devlin et al., 1994; Hemming et al., 1995;) πολλοί ερευνητές δεν αναφέρουν καμιά απόκριση κέρδους σε βιομάζα σε μεθανόλο-θεραπευμένα φυτά (Hartz et al., 1994; Mauney and Gerik, 1994). Τα εκ πρώτης όψεως αντιφατικά αυτά αποτελέσματα δικαιολογούνται αν λάβει κανείς υπόψιν πως οι διάφορες μεταχειρίσεις δεν πραγματοποιήθηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες (π.χ φωτισμός, θερμοκρασία, συγκέντρωση μεθανόλης). Η αδυναμία καθορισμού των συνθηκών στις οποίες η χορήγηση μεθανόλης επάγει την αύξηση καθιστούν την αποτελεσματικότητα της μεθανόλης άλυτο πρόβλημα. Οι παράμετροι που επηρεάζουν την αφομοίωση της μεθανόλης κάνουν δύσκολη την αναπαραγωγή των αποτελεσμάτων. Αυτό που μένει είναι η εργαστηριακή έρευνα να παράσχει συγκεκριμένες πληροφορίες για το μηχανισμό δράσης

της μεθανόλης και να καθοριστεί ποια ή ποιες μεταβλητές πρέπει να ελέγχονται έτσι ώστε να εξασφαλισθεί η επιθυμητή απόκριση.

Εύκολα κατανοεί κανείς πως αν διευκρινιστεί ο μηχανισμός με τον οποίο η μεθανόλη επάγει την αύξηση των φυτικών οργανισμών οι βιοτεχνολογικές χρήσεις και προεκτάσεις ενός τέτοιου ευρήματος θα ήταν πολλές και ποικίλες. Αν η μεθανόλη αποτελεί άμεσα αξιοποιήσιμη πηγή άνθρακα τότε θα μπορεί να επιτευχθεί γρήγορη και οικονομική αύξηση της βιομάζας φυτών και φυτοπλαγκτού.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η διαλεύκανση των παραμέτρων που ρυθμίζουν την αφομοίωση αλλά και το μεταβολισμό της μεθανόλης. Επίσης έγινε μια αρχική προσέγγιση του βιοχημικού μονοπατιού και των γεγονότων που καταλήγουν στην αποτελεσματική αποτοξικοποίηση κι εκμετάλλευση της απλής αυτής αλκοόλης.

Ο φυτικός οργανισμός που επιλέχθηκε για να μελετηθεί η επίδραση της μεθανόλης ήταν το μονοκύτταρο ευκαρυωτικό χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus*. Ο συγκεκριμένος οργανισμός, εκτός του ότι είναι ευκολότερο να χειριστεί σε σύγκριση με τους ανώτερους πολυκύτταρους οργανισμούς, παρουσιάζει και παρόμοια χαρακτηριστικά με τη *Chlorella*, η καλλιέργεια της οποίας εμφανίζει και οικονομικό ενδιαφέρον.

Τα ζητήματα - ερωτήματα που τέθηκαν διαδοχικά κι επιχειρήθηκε πειραματικά η διαλεύκανση- απάντησή τους, ήταν τα εξής:

- Επάγεται αύξηση της βιομάζας έπειτα από χορήγηση μεθανόλης; Κάτω από ποιες συνθήκες επιτυγχάνεται η μέγιστη αύξηση;
- Ποιο είναι το ποσοστό της χορηγούμενης μεθανόλης που αφομοιώνεται από τα κύτταρα (σε σχέση μ' αυτό που εξατμίζεται); Ποιος είναι ο χρόνος και ο ρυθμός αυτής της αφομοίωσης;
- Επηρεάζει η αφομοίωση κι ο μεταβολισμός της μεθανόλης τη μοριακή δομή και σύσταση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού; Αν ναι, ποια είναι αυτή η επίδραση;
- Ο μεταβολισμός της μεθανόλης είναι μια φωτοεξαρτώμενη διαδικασία; Αν ναι, ποιο είναι το μόριο που αποτελεί τον πρωτογενή φωτούποδοχέα για τη ρύθμιση αυτής της διαδικασίας;

- Το μεταβολικό μονοπάτι που διερευνούμε είναι ειδικό για τη μεθανόλη, ή μήπως υπάρχει η δυνατότητα μεταβολισμού και άλλων απλών οργανικών αλκοολών;
- Ποια είναι η επίδραση αλκοολών με περισσότερους άνθρακες (αιθανόλη, προπανόλη, ισοπροπανόλη) στην επαγωγή της αύξησης και στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό;

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Οργανισμός και συνθήκες καλλιέργειας

Ο οργανισμός που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν το μονοκύτταρο ευκαρυωτικό χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus*. Φυλογενετικά ταξινομείται ως εξής:

Οικογένεια: Χλωροφύκη (Chlorophyceae)

Γένος: Scenedesmus

Υπογένος: Acutodesmus

Είδος: Obliquus

Πρόκειται για ένα μονοκύτταρο ευκαρυωτικό οργανισμό με διάμετρο κυττάρου περίπου 2μm. Ο κύκλος ζωής του διαρκεί γύρω στις είκοσι ώρες. Στο διάστημα αυτό διαιρείται μία φορά δίνοντας έξι θυγατρικά κύτταρα, τα οποία μόλις σχηματιστούν πλήρως αποκόπτονται μεταξύ τους (δεν σχηματίζουν κοινόβια). Εξελικτικά βρίσκεται πολύ κοντά σε άλλα δύο γνωστά στο ερευνητικό πεδίο φύκη, τη Χλαμυδομονάδα (*Chlamydomonas*) και τη Χλωρέλλα (*Chlorella*).

Το γένος *Scenedesmus* είναι ευρέως διαδεδομένο σε πολλά και ποικίλα αεριζόμενα υδάτινα περιβάλλοντα. Παίζει ρόλο στην πρωτογενή παραγωγικότητα των λιμνών και συχνά αποτελεί την κυρίαρχη ομάδα ευτροφικών υδάτινων συστημάτων. Το ευκαρυωτικό αυτό χλωροφύκος, εκτός απ' τις αυτότροφες, μπορεί να αναπτυχθεί τόσο σε μιξότροφες, όσο και σε ετερότροφες συνθήκες. Όσον αφορά στα χαρακτηριστικά του φωτοσυνθετικού του μηχανισμού, μοιάζει με τα γυμνόσπερμα φυτά: ο άγριος τύπος (wt) έχει την ικανότητα βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης τόσο στο σκοτάδι όσο και στο φως. Αυτό σημαίνει πως ακόμα και στο σκοτάδι, σε ετερότροφες συνθήκες έχει διαμορφωμένους χλωροπλάστες και ενεργά φωτοσυστήματα I και II. Η ιδιότητά του αυτή, δικαιολογεί την ευρεία διάδοσή του και το καθιστά κατάλληλο για διάφορες εργαστηριακές μελέτες.

Πολύ μεγάλη βοήθεια στην έρευνα της φωτοσύνθεσης έχει προσφέρει η δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών των φωτοσυνθετικών οργανισμών. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη του είδους *Scenedesmus obliquus*: ο

άγριος τύπος, στέλεχος D3 (όπως περιγράφηκε παραπάνω) και το μεταλλαγμένο στέλεχος C-2A'.

C-2A': Συμπεριφέρεται όπως και τα αγγειόσπερμα φυτά. Φωτοσυνθέτουν μόνο στο φως. Στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία 27- 32°C δεν έχει διαμορφωμένους χλωροπλάστες. Στα πλαστίδια των κυττάρων αυτού του στελέχους υπάρχουν σχηματισμοί όμοιοι με τα προελασματοειδή σωμάτια που βρίσκονται στους ωχροπλάστες των αγγειόσπερμων φυτών. Η βιοσύνθεση της χλωροφύλλης σταματάει στο επίπεδο του πρωτοχλωροφυλλιδίου (Pchl<sub>id</sub>) και φυσικά δεν έχει ενεργά φωτοσυστήματα (PSI και PSII). Μόλις ο οργανισμός εκτεθεί στο φως ξεκινά η βιοσύνθεση της χλωροφύλλης και η διαμόρφωση του φωτοσυνθετικά ενεργού χλωροπλάστη (Wellburn et al., 1980; Brinkmann and Senger, 1978). Επιπλέον, όταν το συγκεκριμένο μεταλλαγμένο στέλεχος αναπτυχθεί σε χαμηλότερη θερμοκρασία (20- 25 °C) από αυτή που αναφέρεται παραπάνω (27- 32 °C), ακόμα και αν βρίσκεται στο σκοτάδι, ξεκινά και πάλι το σχηματισμό φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

## Συνθήκες καλλιέργειας

### A) Στο φως

Το χλωροφύκος *Scenedesmus obliquus* επώαστηκε σε υγρό, αυτότροφο μέσο καλλιέργειας, τοποθετημένο σε μακροσωλήνες μήκους 40 cm και διαμέτρου 5 cm. Η σύσταση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας φαίνεται στον παρακάτω πίνακα 1 (Bishop and Senger, 1971). Οι καλλιέργειες διατηρήθηκαν σε ενυδρείο με ελεγχόμενη θερμοκρασία (32 °C) και φωτισμό (~180). Συγκεκριμένα, για το φωτισμό χρησιμοποιήθηκαν 8 λάμπες φθορισμού (~20 Wm<sup>-2</sup>, L-40W, Osram, Muenchen, FRG). Οι καλλιέργειες εμπλουτίζονταν συνεχώς με φιλτραρισμένο αέρα.

Κάθε φορά οι καλλιέργειες παρασκευάζονταν με προσθήκη κυττάρων σε νέο θρεπτικό μέσο τελικού όγκου 150 ml, από μια ήδη υπάρχουσα καλλιέργεια (stock) του συγκεκριμένου στελέχους, ηλικίας τεσσάρων ημερών. Η ποσότητα της καλλιέργειας-stock που εμβολιάζονταν, ήταν κάθε φορά τέτοια ώστε κάθε μεταχείριση να ξεκινά με αρχικό PCV 0,5μl/ml.

### B) Στο σκοτάδι

Οι μεταχειρίσεις που πραγματοποιήθηκαν στο σκοτάδι έγιναν απουσία οργανικής πηγής άνθρακα και η σύσταση του υδατικού θρεπτικού μέσου ήταν η ίδια

με αυτή των καλλιιεργειών που εκτέθηκαν στο φως (πίνακας 1). Οι καλλιιεργειες τοποθετήθηκαν σε κωνικές φιάλες Erlenmayer των 250 ml που περιείχαν 150 ml του υγρού θρεπτικού μέσου. Η επώαση έγινε σε επωαστή τύπου gyratory shaker και σε σταθερή θερμοκρασία 30 °C. Και πάλι η ποσότητα της καλλιιεργειας-stock που εμβολιάζονταν, ήταν κάθε φορά τέτοια ώστε κάθε μεταχείριση να ξεκινά με αρχικό PCV 0,5μl/ml.

Η συγκομιδή των κυττάρων έγινε με φυγοκέντριση των καλλιιεργειών σε 1400 g για 5 min στους 25 °C και σε συνθήκες απόλυτου σκοταδιού για τους πράσινους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς (πράσινος φωτισμός χαμηλής έντασης). Τα δείγματα που ελήφθησαν για τις διάφορες αναλύσεις αποθηκεύονταν ως ιζήματα σε θερμοκρασία -30 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

*Πίνακας 2: Θρεπτικό μέσο για την καλλιιεργεια του χλωροφύκου Scenedesmus obliquus*

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (σε g/l)	ΜΟΡΙΑΚΟΤΗΤΑ (M)
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1.50	1x10 <sup>-4</sup>
KNO <sub>3</sub>	80.0	8x10 <sup>-3</sup>
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	24.6	1x10 <sup>-3</sup>
NaCl	47.0	8x10 <sup>-3</sup>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	17.8	1x10 <sup>-3</sup>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x1H <sub>2</sub> O	40.5	3x10 <sup>-3</sup>
Na-Citrate x2H <sub>2</sub> O	16.5	5.5x10 <sup>-4</sup>
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> x1H <sub>2</sub> O	0.40	7.5x10 <sup>-6</sup>
<u>Ιχνοστοιχεία</u>		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86	
MnCl <sub>2</sub> x4H <sub>2</sub> O	1.81	
ZnSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	0.222	
CuSO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O	0.079	
MoO <sub>3</sub> (85%-99.5%)	0.0177	

## Καθορισμός του πακεταρισμένου όγκου κυττάρων (PCV)

Ο πακεταρισμένος όγκος κυττάρων (Packed Cell Volume, PCV) ενός συγκεκριμένου κυτταρικού δείγματος υπολογίζεται έπειτα από φυγοκέντρίσή του στα 1400g για 5 min μέσα σε αιματοκριτικά σωληνάκια. Ο πακεταρισμένος όγκος των κυττάρων αποδίδει τα ml πακεταρισμένων κυττάρων ανά ml καλλιέργειας και είναι ενδεικτικός του αριθμού των κυττάρων στις καλλιέργειές μας (πυκνότητα κυττάρων στο θρεπτικό μέσο).

## Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός χρωστικών

Η ανάλυση της ποιότητας και ποσότητας των χλωροφυλλών a και b έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Holden (1965). Δείγμα από την καλλιέργεια φυγοκεντρείται για 5min στα 1400g. Κατόπιν, από τα κυτταρικά ιζήματα, γίνεται εκχύλιση των χρωστικών με προσθήκη ζεστής MeOH (70 °C). Το μεθανολικό εκχύλισμα φυγοκεντρείται για 5min στα 1400g και η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι να αποχρωματιστεί το ίζημα. Το συνολικό εκχύλισμα στη συνέχεια φωτομετρείται στα 650 και 665 nm. Η ποσότητα των χλωροφυλλών (Chl a και Chl b) προσδιορίζεται βάσει των παρακάτω εξισώσεων (Holden 1965) :

$$\text{Chl a } (\mu\text{g/ml}) = (16.5 \times E_{665}) - (8.3 \times E_{650})$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g/ml}) = (33.8 \times E_{650}) - (12.5 \times E_{665})$$

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του πρωτοχλωροφυλλιδίου (Pchl<sub>id</sub>) ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία εκχύλισης σε μεθανόλη, σύμφωνα με τη μέθοδο των Brouers and Wolwertz (1983). Μέρος του εκχυλίσματος εξατμίστηκε σε υδατόλουτρο κι επαναδιαλύθηκε σε ακετόνη 80% v/v. Το διάλυμα αυτό φωτομετρήθηκε στα 664, 647, και 626 nm και η ποσοτικοποίηση του Pchl<sub>id</sub> έγινε με βάση την παρακάτω εξίσωση:

$$\text{Pchlid (nmol)} = -4,37 \times (E_{664}) - 7,44 \times (E_{647}) + 33,67 \times (E_{626})$$



## **Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών**

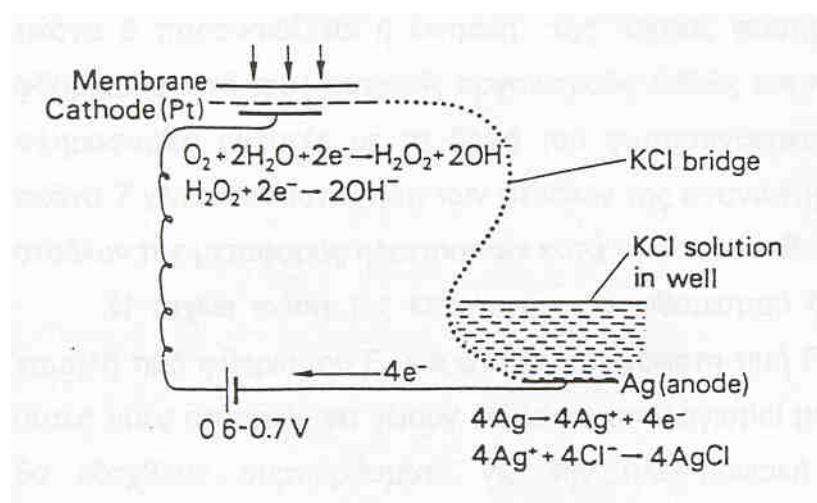
Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1979). Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών υπολογίστηκε με βάση πρότυπη καμπύλη, η οποία σχεδιάστηκε χρησιμοποιώντας καθορισμένες ποσότητες της πρωτεΐνης αλβουμίνη (BSA). Ο όγκος του δείγματος ήταν 200 μl. Στο δείγμα προστέθηκαν 800 μl διαλύματος Bio- Rad Protein Assay και έπειτα από επώαση πέντε λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C) μετρήθηκε η απορρόφηση στα 595 nm.

## **Μετρήσεις φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και ρυθμού αναπνοής**

Η φωτοσυνθετική δραστηριότητα, καθώς και οι ρυθμοί αναπνοής προσδιορίστηκαν πολαρογραφικά στους 30 °C, με τη χρήση Clark type ηλεκτροδίου (Hansatech, UK), σύμφωνα με τη μέθοδο του Walker (1988). Το ηλεκτρόδιο αποτελείται από κάθοδο λευκόχρυσου και άνοδο αργύρου. Το ηλεκτρόδιο καλύπτεται από μια λεπτή μεμβράνη, εκλεκτικά διαπερατή σε μικρά μόρια και ιόντα. Όταν εφαρμοστεί κατάλληλη τάση, το οξυγόνο που παράγεται από την οξείδωση του νερού αντιδρά στην κάθοδο παράγοντας ηλεκτρικό ρεύμα. Η καταγραφή ρεύματος σε Ampere είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του οξυγόνου στο δείγμα.

Η ένταση του φωτός ( $470\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ ) για τον προσδιορισμό της μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, επιτεύχθηκε με μία ENX360W/82V λάμπα και εκτιμήθηκε με ένα ευαίσθητο σύστημα ραδιομέτρου, το οποίο αποτελείται από ένα control box IL 700, International Light, New-buryport, MA) και έναν φωτοπολλαπλασιαστή (IL 760). Η ρύθμιση του ηλεκτροδίου έγινε σε 25 °C με απιονισμένο νερό, που ήταν κορεσμένο σε οξυγόνο. Η κυψελίδα που

χρησιμοποιήθηκε ήταν γυάλινη με πρόσθετο γυάλινο περίβλημα, που επιτρέπει τη διέλευση νερού προκειμένου να διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία. Για την απομάκρυνση της IR ακτινοβολίας παρεμβλήθηκε «φίλτρο»  $\text{CuSO}_4$ -διαλύματος (2%  $\text{CuSO}_4$ ), 4cm πλάτος ανάμεσα στην λάμπα και στην κυψελίδα μέτρησης. Η κυτταρική πυκνότητα των δειγμάτων προς μέτρηση καθορίστηκε στα 10  $\mu\text{l}$  PCV/ml. Οι πολυρογραφικές μετρήσεις έγιναν σε ρυθμιστικό διάλυμα *tricine*, με την προσθήκη 0.34gr  $\text{NaHCO}_3$  (MG=84.01). Η αναγωγή όλων των τιμών έγινε σε  $\mu\text{mol O}_2/\mu\text{g Chl} \times \text{h}$ .



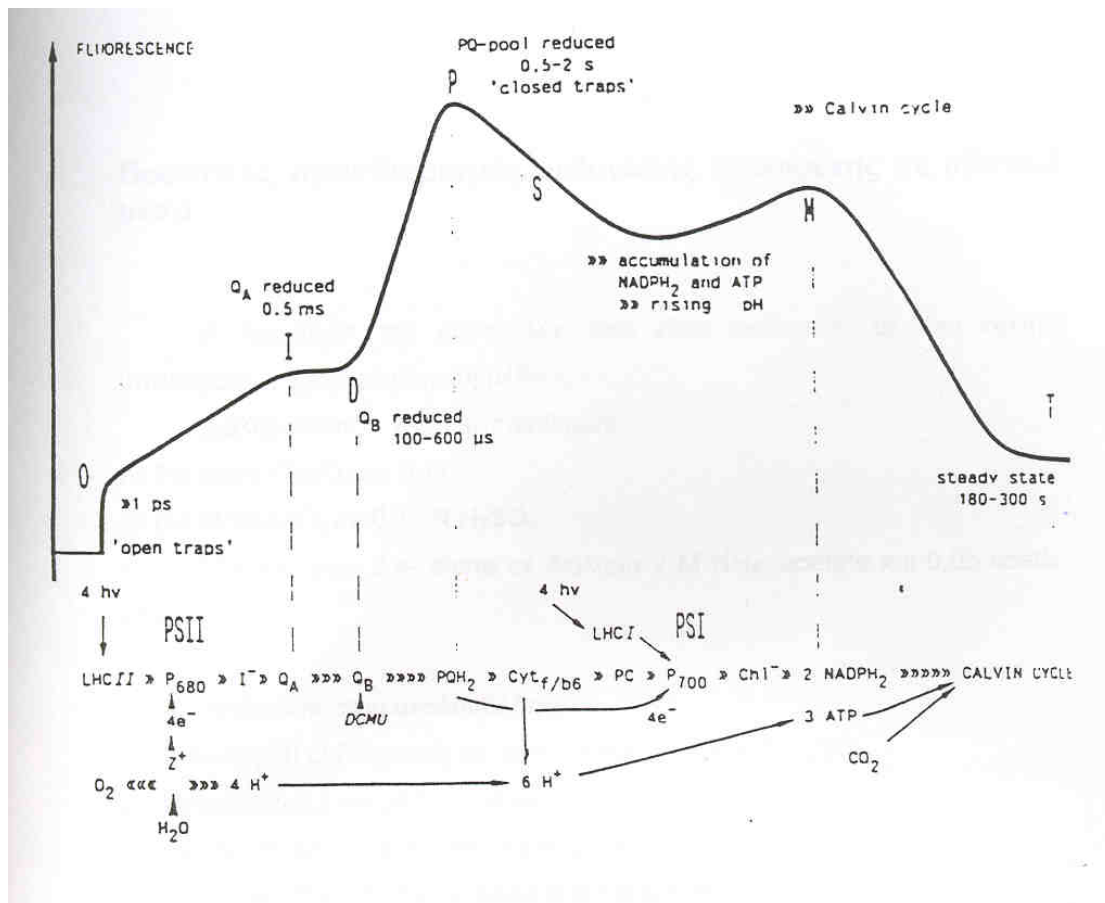
## Μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού

Η ηλιακή ενέργεια που απορροφάται από τη φωτοσυλλεκτική κεραία του PSII δεν αξιοποιείται πάντα μέσω της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης. Έτσι, είναι δυνατό τμήμα της να εκπέμπεται από το PSII ως φθορισμός ή να διαχέεται ως θερμότητα. Το μεγαλύτερο ποσοστό του φθορισμού προέρχεται από τα μόρια χλωροφύλλης α του φωτοσυστήματος II (Furuya et al 1992).

Η επαγωγή του φθορισμού από φωτοσυνθετικούς οργανισμούς παρατηρήθηκε για πρώτη φορά από τον Kautsky το 1931 (Kautsky et al 1931). Η επαγωγή του φθορισμού από τα φυτά πραγματοποιείται σε δύο φάσεις, εκ των οποίων η πρώτη είναι ταχεία και η δεύτερη αργή. Σήμερα, η μελέτη της καμπύλης του επαγωγικού φθορισμού – ιδιαίτερα της ταχείας φάσης - έχει εξελιχθεί σε πολύτιμο

ερευνητικό μέσο για τη μελέτη της δραστηριότητας αλλά και της απόδοσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού (Lichtenhaler 1992, Bulhar – Nordenkampf et al 1993, Lazar 1999 ). Στην εικόνα ...παρουσιάζεται η κινητική της ταχείας φάσης κατά την επαγωγή φθορισμού από τους φυτικούς οργανισμούς καθώς και τα μεγέθη που δίνουν πληροφορίες σχετικές με τη δομή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Στην εικόνα ...γίνεται αντιστοίχιση των σταδίων της επαγωγής φθορισμού και των σταδίων της μεταφοράς ηλεκτρονίων κατά τη φωτοσύνθεση.

Οι μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού έγιναν με τη συσκευή «ανάλυσης της απόδοσης των φυτών» (*Plant Efficiency Analyser, PEA*), της *Hansatech Instruments*. Η ποσότητα του δείγματος που ελήφθη από κάθε καλλιέργεια, προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις ήταν 1 ml. Όλα τα δείγματα παρέμειναν στο σκοτάδι για 10 min πριν τις μετρήσεις του φθορισμού.



## Ποσοτικός προσδιορισμός μεθανόλης διαλυμένης σε υδατικό μέσο

Η ποσότητα της μεθανόλης που είναι διαλυμένη σε ένα δείγμα υπολογίστηκε με φωτομετρική μέθοδο (.....).

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν:

A) 2% (w/v)  $\text{KmnO}_4$  σε  $\text{H}_2\text{O}$

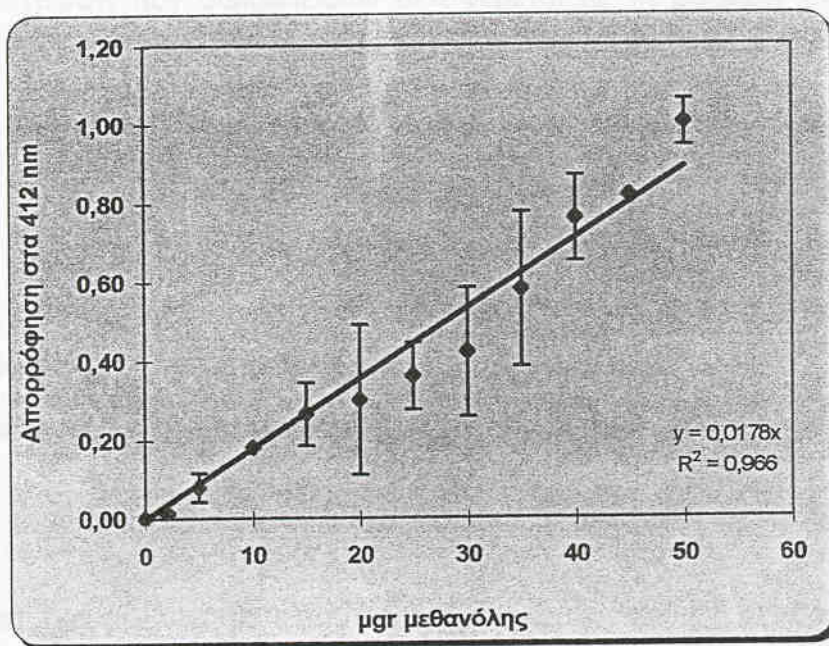
B) 0,5 M  $\text{NaAsO}_2$  σε 0,12 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$

Γ) 0,02 M pentane- 2,4- dione σε διάλυμα 2 M  $\text{NH}_4$ - acetate και 0,05 acetic acid

Διαδικασία που ακολουθήθηκε:

1. Διάλυση 50  $\mu\text{l}$  δείγματος σε τελικό όγκο 1 ml με 1 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .
2. Προσθήκη 0,2 ml από το διάλυμα A.
3. Ανάδευση και επώαση για 15 min στον πάγο
4. Προσθήκη 0,2 ml από το διάλυμα B και 0,6 ml  $\text{H}_2\text{O}$ .
5. Ανάδευση και επώαση για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου
6. Προσθήκη 2 ml από το διάλυμα Γ.
7. Ανάδευση και θέρμανση στους 58- 60  $^\circ\text{C}$  για 15 min.
8. Μέτρηση της απορρόφησης στα 412 nm

Η συγκέντρωση των δειγμάτων σε μεθανόλη ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) προσδιορίστηκε μέσω πρότυπης καμπύλης που κατασκευάστηκε με γνωστές συγκεντρώσεις μεθανόλης.



## Απομόνωση θυλακοειδών μεμβρανών

Για την απομόνωση των θυλακοειδών μεμβρανών η προετοιμασία των δειγμάτων γίνεται με φυγοκέντριση στα 1500 g για 7 min. Στη συνέχεια το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών οξέων, με pH= 7,5. Το αιώρημα αυτό αναμιγνύεται με γυάλινα σφαιρίδια διαμέτρου 0.5 mm (Biospec Products Inc.) για το σπάσιμο των κυττάρων σε ομογενοποιητή (vibrogen cell mill, Type Vi2, Buhler). Η διαδικασία της ομογενοποίησης πραγματοποιείται συνολικά τέσσερις φορές, η κάθε μια από τις οποίες διαρκεί 1 min, με ενδιάμεσες διακοπές 4-5 min. κατόπιν, το ομογενοποίημα φιλτράρεται μέσα από γυάλινο φίλτρο για το διαχωρισμό των σφαιριδίων και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στα 500g για 10 min προκειμένου να απομακρυνθούν τα άσπαστα κύτταρα. Έπειτα, το υπερκείμενο φυγοκεντρείται ξανά στα 10000 g για 45 min. Το ίζημα που προκύπτει από αυτή τη φυγοκέντριση περιέχει δύο στρώματα: Το επάνω στρώμα περιέχει τις πλαστιδιακές μεμβράνες, ενώ το κάτω στρώμα αποτελείται κυρίως από άμυλο. Η στρώση των θυλακοειδών μεταφέρεται με τη βοήθεια πινέλου σε ρυθμιστικό διάλυμα Tricine 0,5M, pH= 7,3.

## Απομόνωση πρωτεϊνικών υποσυμπλόκων του φωτοσυνθετικού μηχανισμού

Αφού έχει προηγηθεί απομόνωση των θυλακοειδών μεμβρανών και διαλυτοποίησή τους σε ρυθμιστικό διάλυμα Tricine 0,5 M, pH= 7,3, τα δείγματά μας αραιώνονται έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση της χλωροφύλλης σε κάθε δείγμα να είναι ίση με 1200 µg/ml. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων σε πάγο για περίπου 30 min. Κατόπιν τα θυλακοειδή διαλυτοποιούνται σε αναλογία 1:1 με ρυθμιστικό διάλυμα διαλυτοποίησης Tris 0,3M, pH= 8,8 με 10% γλυκερόλη και 1% SDS.

Στη συνέχεια κατασκευάζεται διάλυμα συνεχούς διαβάθμισης σουκρόζης 5-22% όγκου 10 ml και σ' αυτό τοποθετούνται 500 µl από το διαλυτοποιημένο δείγμα των θυλακοειδών. Ακολουθεί υπερφυγοκέντριση στα 170000 g για 18 ώρες, στους 4 °C, με το ρότορα SW40. Μετά την υπερφυγοκέντριση τα σωληνάκια με τη συνεχή διαβάθμιση σουκρόζης και το δείγμα των θυλακοειδών έχουν τη μορφή που φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.... Τα σύμπλοκα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού που βρίσκονται στις μεμβράνες των θυλακοειδών διαχωρίζονται και ο ποιοτικός χαρακτηρισμός τους φαίνεται στην εικόνα... (Akogiounoglou????). Ακολουθεί απομόνωση των ζωνών που ενδιαφέρουν τη μελέτη μας. Από τις ζώνες αυτές γίνεται ποσοτική εκτίμηση χλωροφυλλών, πρωτεϊνών, καθώς και ηλεκτροφόρηση σε πλάκα πολυακρυλαμιδίου, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί ακριβέστερος ποσοτικός προσδιορισμός των εν λόγω ζωνών.



*Εικόνα 9.Σχηματική απεικόνιση των ζωνών που προκύπτουν έπειτα από την υπερφυγοκέντριση ειδικά κατεργασμένων θυλακοειδών σε συνεχή διαβάθμιση σουκρόζης 5-22%.*

## **Ηλεκτροφόρηση**

Η πρωτεϊνική σύσταση των δειγμάτων εξετάστηκε με ηλεκτροφόρηση πλάκας πολυακρυλαμιδίου (Laemmli σύστημα), όπου ως απορρυπαντικό χρησιμοποιήθηκε το δωδεκακυκλοθειικό νάτριο (SDS), το οποίο καταστρέφει σχεδόν όλες τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών έγινε στο πήκτωμα διαχωρισμού (resolving gel), το οποίο παρασκευάστηκε με σταθερή συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου (12,5%). Πριν την είσοδο των πρωτεϊνών στο πήκτωμα διαχωρισμού, οι πρωτεΐνες διέρχονταν από το πήκτωμα συσσώρευσης (stacking gel), το οποίο είχε συγκέντρωση 3,2% πολυακρυλαμιδίου. Τα δύο πηκτώματα περιείχαν και 1M ουρία και 2mM EDTA. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες εμφανίστηκαν έπειτα από χρώση με Coomassie Blue R-250. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Aldrich της SIGMA συσκευή για mini gel. Η μετακίνηση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε μετά την εφαρμογή δυναμικού. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πρωτεϊνών είναι ανάλογη με το λογάριθμο της μάζας τους.

## **Φάσμα δράσης**

Για την εύρεση του πρωτογενούς φωτοϋποδοχέα της μεθανόλης, αυτότροφες καλλιέργειες του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*, wild type, strain D3, αρχικού PCV= 0,5 µl/ml τοποθετήθηκαν σε αεριζόμενες φιάλες χωρητικότητας 200 ml σε σκοτεινούς μικροθαλάμους σε σταθερή θερμοκρασία 30 °C κι εκτέθηκαν για 48 ώρες σε μονοχρωματική ακτινοβολία διαφορετικού μήκους κύματος. Η ένταση της μονοχρωματικής ακτινοβολίας ήταν 2 µmole.m<sup>-2</sup>.sec<sup>-1</sup>. Το μονοχρωματικό φως

λήφθηκε με φίλτρα double interference line (DIL) και double absorption line (DAL). Τα διαφορετικά μήκη κύματος στα οποία εκτέθηκαν οι καλλιέργειες κυμαίνονταν από 400- 700 nm. Τα φίλτρα τοποθετήθηκαν σε προβολείς Prado.

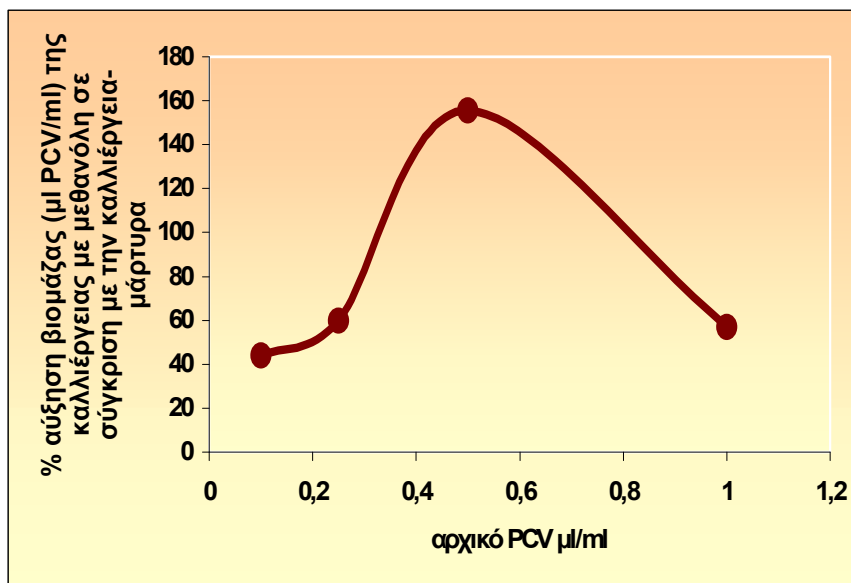
Μετά το πέρας των 48 ωρών έκθεσης στη μονοχρωματική ακτινοβολία ελήφθησαν δείγματα των οποίων και μετρήθηκε ο πακεταρισμένος όγκος κυττάρων (PCV). Πραγματοποιήθηκαν δύο μεταχειρίσεις. Στην πρώτη οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε αυτότροφο θρεπτικό μέσο χωρίς μεθανόλη (καλλιέργεια ελέγχου) και στη δεύτερη προστέθηκε μεθανόλη 0,5% v/v. Με βάση τις τιμές που καταγράφηκαν από αυτές τις μετρήσεις κατασκευάστηκε το διάγραμμα που αναπαριστά τη μεταβολή της βιομάζας (μεταβολή PCV) στα διάφορα μήκη κύματος, συγκριτικά στις δύο μεταχειρίσεις.



### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

#### **Επίδραση της μεθανόλης στην αύξηση της βιομάζας του μονοκύτταρου ευκαρυωτικού χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*.**

Από εργασίες που έχουν προηγηθεί της παρούσας (π.χ πτυχιακή εργασία Θεοδωρίδου Αναστασία, 1998) έχει καταστεί σαφές, ότι τόσο η αφομοίωση, όσο και ο μεταβολισμός της μεθανόλης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως: η συγκέντρωση της μεθανόλης, ο αριθμός των κυττάρων και συνεπώς το ποσό της μεθανόλης ανά κύτταρο, ο φωτισμός, η θερμοκρασία, η ύπαρξη εναλλακτικών πηγών άνθρακα. Διατηρώντας σταθερές τις τέσσερις από τις πέντε αυτές μεταβλητές διαπιστώθηκε πως σε αυτοτροφικές συνθήκες, στους 30 °C, με ένταση φωτισμού ίση με 175  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$  (υψηλής έντασης φωτισμός) και χορήγηση μεθανόλης 0,5% v/v στο διάλυμα καλλιέργειας τη βέλτιστη απόδοση σε βιομάζα στο μικρότερο χρονικό διάστημα εμφανίζει η μεταχείριση με αρχικό PCV= 0,5  $\mu\text{mol}/\text{ml}$  (εικ. 10)

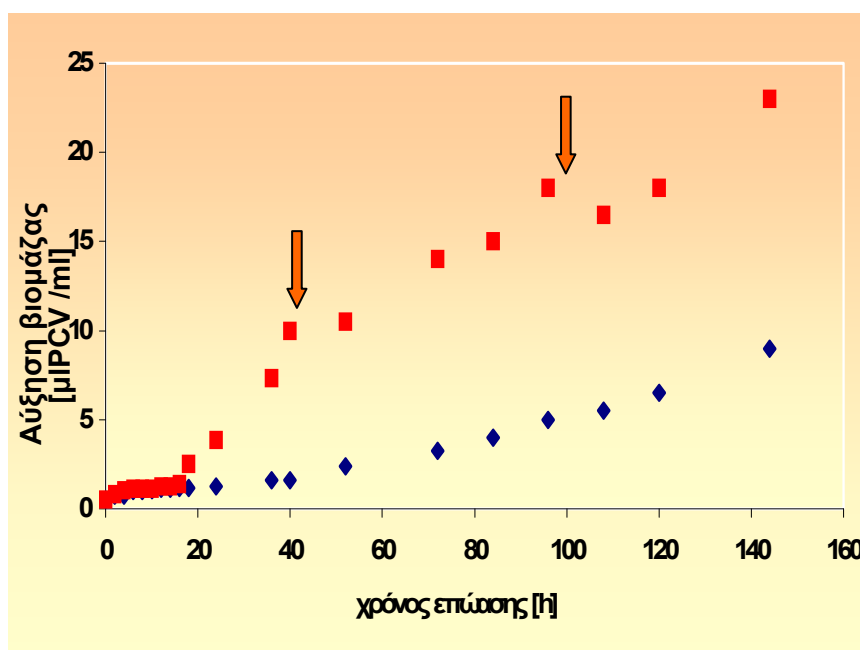


**Εικόνα 10: % αύξηση βιομάζας κατά τη δεύτερη ημέρα επώασης έπειτα από χορήγηση 0,5% v/v μεθανόλης**

Όλες οι μεταχειρίσεις στο φως, λοιπόν, πραγματοποιήθηκαν ξεκινώντας με τις ίδιες σταθερές συνθήκες που αναφέρονται παραπάνω. Η χορήγηση μεθανόλης 0,5% v/v (0,123 M) επιλέχθηκε ως η καταλληλότερη, μιας και επάγει τη μεγαλύτερη ποσοστιαία αύξηση της βιομάζας στο συντομότερο χρόνο, δίχως παράλληλα να προκαλεί συμπτώματα τοξικότητας στις κυτταροκαλλιέργειες.

Η απόκριση των υπό μελέτη κυττάρων στη μεθανόλη (αύξηση βιομάζας) επηρεάζεται σημαντικά από τον παράγοντα «φως». Έχει βρεθεί πως χορήγηση μεθανόλης κι επώαση των καλλιεργειών στο σκοτάδι, όχι μόνο δεν συνοδεύτηκε από επαγωγή της αύξησης αλλά προκάλεσε και συμπτώματα καταπόνησης (stress). Ένα επιπλέον πειραματικό δεδομένο που συνηγορεί υπέρ της συνεργιστική δράσης του φωτός στο μεταβολισμό της μεθανόλης, είναι το εξής: Χαμηλής έντασης φωτισμός προκαλεί ποσοστιαία μείωση και χρονική καθυστέρηση στην επαγωγή της αύξησης (πτυχιακή εργασία, Θεοδωρίδου Αναστασία, 1998).

Όπως διαπιστώνουμε από την παρακάτω απεικόνιση (εικ. 11) της αύξησης της βιομάζας σε καλλιέργειες με και χωρίς μεθανόλη, η επίδραση της μεθανόλης στην επαγωγή της αύξησης δεν εμφανίζεται αμέσως μετά τη χορήγησή της, αλλά έπειτα από 16-18 ώρες επώασης. Από το χρονικό αυτό σημείο και μετά παρατηρείται μια αξιοσημείωτη αύξηση της βιομάζας που προσεγγίζει το 200 % ως προς την καλλιέργεια αναφοράς, στις 24 ώρες και το 350% στις 40 ώρες επώασης. Πέρα από τις 40 ώρες εμφανίζεται κορεσμός και δεν παρατηρείται περαιτέρω αύξηση της βιομάζας. Προσθήκη της ίδιας συγκέντρωσης μεθανόλης ανά PCV στις 42 ώρες (0,5% v/v αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 0,123 M/ 0,5 μl/ml) επέφερε νέα επαγωγή της αύξησης. Η ίδια επίδραση εμφανίστηκε όταν επαναχορηγήθηκε μεθανόλη μετά το δεύτερο κορεσμό στις 96 ώρες.



**Εικόνα 11:** Μεταβολή του όγκου των πακεταρισμένων κυττάρων (PCV) κατά τη διάρκεια 6 ημερών σε καλλιέργειες που χορηγήθηκε μεθανόλη (κόκκινη γραμμή) και καλλιέργειών χωρίς μεθανόλη (μπλε γραμμή). Μεθανόλη 0,5% v/v επαναχορηγήθηκε στις 42 και στις 96 ώρες επώασης.

Κρίνεται αναγκαίο στο σημείο αυτό να διευκρινιστεί πως η ποσοστιαία αύξηση της βιομάζας παρουσία μεθανόλης παρουσιάζει διακυμάνσεις από μεταχείριση σε μεταχείριση (αν και σταθερά εμφανίζεται σε ποσοστά μεγαλύτερα του 100%) ανάλογα με την ηλικία της καλλιέργειας που χρησιμοποιείται για τον αρχικό εμβολιασμό.

Όπως μπορεί να διαπιστώσει κανείς παρατηρώντας την εικόνα 11 εμφανίζεται κάποια χρονική καθυστέρηση στην επαγωγή της αύξησης (η διαφορά εμφανίζεται μετά τις 16 ώρες). Η εξήγηση της χρονικής αυτής καθυστέρησης θα μπορούσε να δοθεί αν λάβουμε υπόψιν μας το λόγο αφομοιωμένης/ μη αφομοιωμένης μεθανόλης στα κύτταρα των καλλιεργειών μας. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν πως την αποτελεσματική αφομοίωση και μεταβολισμό της μεθανόλης επηρεάζουν τόσο το ποσοστό της αφομοιωμένης μεθανόλης σε σχέση με την ολική μεθανόλη που χορηγήθηκε, όσο και το ποσοστό των κυττάρων που έχουν προσλάβει μεθανόλη σε σχέση με τον ολικό αριθμό των κυττάρων. Πιο απλά θα μπορούσαμε να πούμε ότι η παραγωγή βιομάζας με χρήση μεθανόλης επηρεάζεται απ' τους δύο παρακάτω λόγους A και B:

$$A = \frac{\text{μεθανόλη αφομοιωμένη απ' τα κύτταρα}}{\text{μεθανόλη αφομοιωμένη} + \text{μεθανόλη ελεύθερη στο διάλυμα}}$$

$$B = \frac{\text{Αριθμός κυττάρων που έχουν αφομοιώσει μεθανόλη}}{\text{Κύτταρα με μεθανόλη} + \text{κύτταρα χωρίς μεθανόλη}}$$

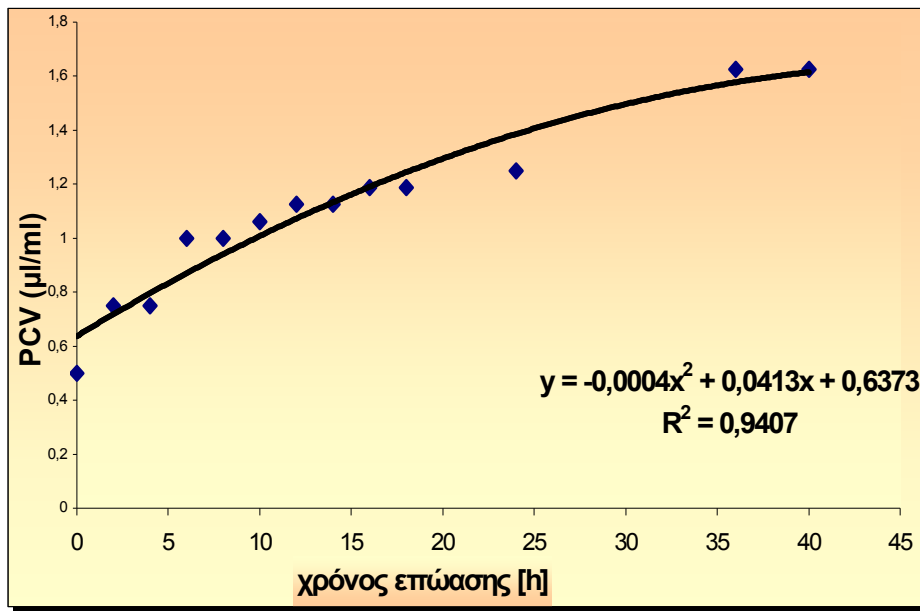
Όταν οι δύο αυτοί λόγοι τείνουν στη μονάδα τότε η επίδραση που παρατηρούμε είναι η μέγιστη. Δηλαδή όσο περισσότερα κύτταρα έχουν

προσλάβει Μεθανόλη την οποία και μεταβολίζουν και όσο λιγότερη είναι η ελεύθερη μεθανόλη στο διάλυμα (η οποία ενδεχομένως θα αποτελούσε και τοξικό παράγοντα) τόσο μεγαλύτερη είναι η αύξηση της βιομάζας.

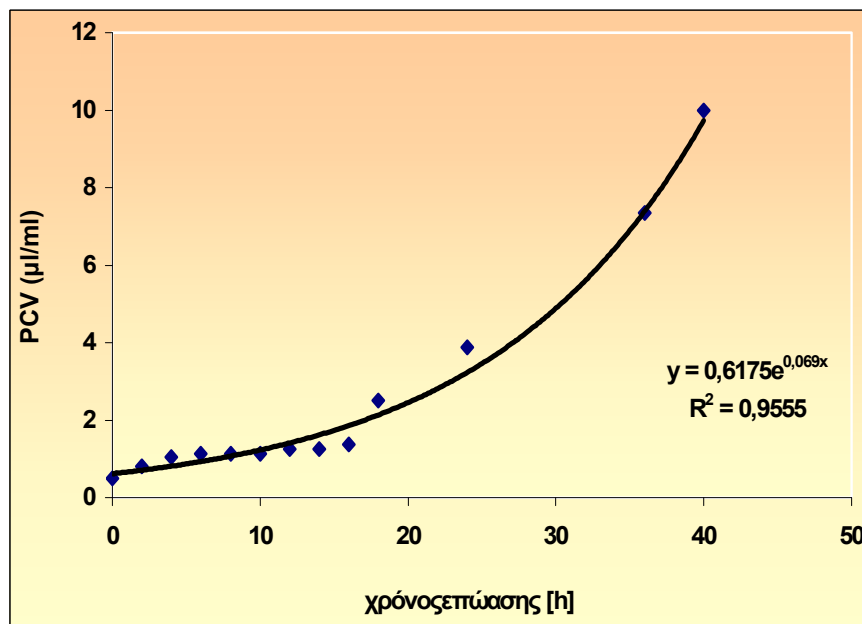
Αντίστοιχες αποκρίσεις ως προς την αύξηση της βιομάζας σε ανώτερα φυτά έπειτα από χορήγηση μεθανόλης έχουν αναφερθεί από μια πληθώρα ερευνητικών ομάδων ( Devlin et al, 1994; Hemming et al, 1995; Li et al, 1995; Nishio et al 1994; Valenzuela et al 1994). Οι Li et al, 1994 αναφέρουν σημαντική αύξηση στο βάρος των σπόρων και τον αριθμό των καρπών ανά φυτό σόγιας έπειτα από χορήγηση μεθανόλης. Πέρα από τις μεταχειρίσεις που μέχρι τώρα έχουν γίνει σε ανώτερα φυτά, μεθανόλη χορηγήθηκε και σε ευκαρυωτικά χλωροφύκη. Χορήγηση χαμηλής συγκέντρωσης μεθανόλης στο ευκαρυωτικό χλωροφύκος *Chlorella minutissima* είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της πυκνότητας των κυττάρων αλλά και την αύξηση του ξηρού τους βάρους (Kotzabasis et al, 1999).

Αφομοίωση μεθανόλης από τα κύτταρα και συσχετισμός της με την επαγωγή της αύξησης.

Η επανάληψη στις μετρήσεις του ποσοστού μεταβολής της βιομάζας τόσο των μεθανόλο- χειριζόμενων καλλιεργειών, όσο και των καλλιεργειών ελέγχου έδωσε τη δυνατότητα εξαγωγής εξισώσεων που μας επιτρέπουν την εκτίμηση του ποσού των κυττάρων σε κάθε χρονική στιγμή. Στις παρακάτω εικόνες 12 και 13 απεικονίζεται η μεταβολή του PCV σε καλλιέργειες χωρίς μεθανόλη και με μεθανόλη αντίστοιχα.



**Εικόνα 12:** Καμπύλη αύξησης του PCV της καλλιέργειας ελέγχου σε σχέση με το χρόνο



**Εικόνα 13:** Καμπύλη αύξησης του PCV της καλλιέργειας στην οποία χορηγήθηκε 0,5% v/v μεθανόλη σε σχέση με το χρόνο.

Με βάση τις γραφικές αυτές παραστάσεις προκύπτουν οι ακόλουθες εξισώσεις για τη μεταβολή του PCV σε σχέση με το χρόνο:

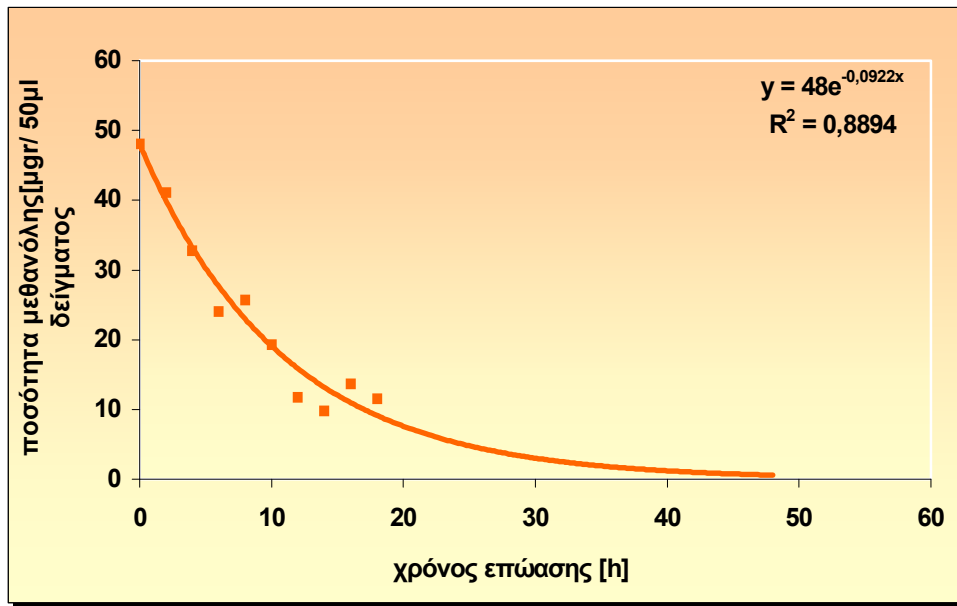
$$\text{PCV}_{\text{μάρτυρα}} = -0,0004 \cdot x^2 + 0,0413x + 0,6373 \quad (\text{I}),$$

και

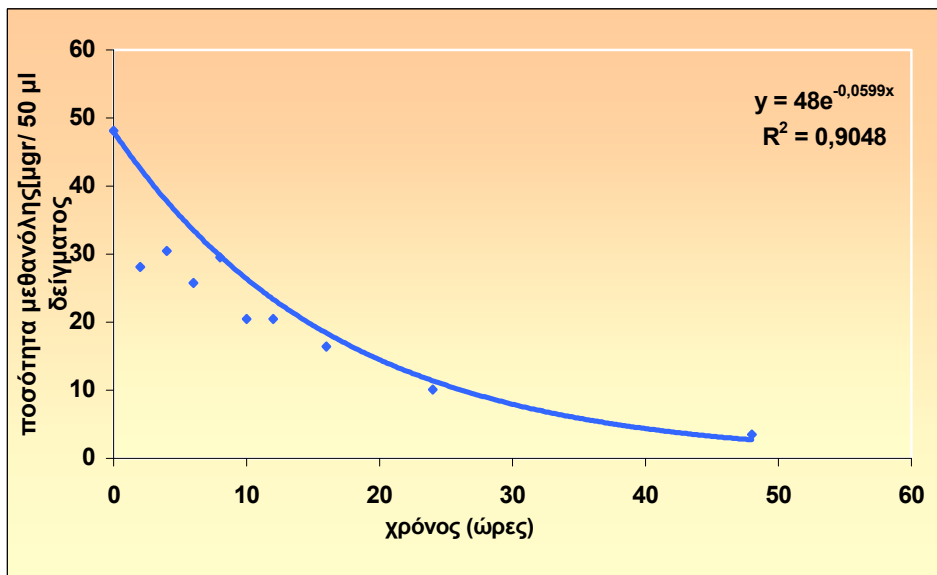
$$\text{PCV}_{\text{μεθανόλης}} = 0,6175 \cdot E^{0,069x} \quad (\text{II}).$$

X: χρόνος επώασης

Για να υπολογιστεί η πραγματική ποσότητα της μεθανόλης που απορροφάται από τα κύτταρα, σε σχέση με αυτή που βρίσκεται στο διάλυμα έγιναν οι εξής χειρισμοί: Τοποθετήθηκαν αεριζόμενοι μακροσωλήνες με 200 ml θρεπτικού μέσου, 0,5 μl PCV κυττάρων/ml και 0.5% v/v μεθανόλη, αλλά και αεριζόμενοι μακροσωλήνες με 200 ml θρεπτικού μέσου και 0.5% v/v μεθανόλη, χωρίς κύτταρα. Και στις δύο περιπτώσεις υπολογίζονταν σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα η ποσότητα της μεθανόλης που υπήρχε στο διάλυμα. Η διαφορά στην ποσότητα μεθανόλης που υπάρχει στο διάλυμα χωρίς κύτταρα σε σχέση με το διάλυμα των κυττάρων αντιστοιχεί στην ποσότητα της μεθανόλης που έχει απορροφηθεί από τα κύτταρα. Η μεταβολή στην ποσότητα της μεθανόλης που απομένει στο θρεπτικό διάλυμα και στις δύο μεταχειρίσεις απεικονίζεται στις παρακάτω εικόνες 14 και 15. Με βάση τις γραφικές αυτές παραστάσεις προκύπτουν οι ακόλουθες εξισώσεις για τη μεταβολή της ποσότητας της μεθανόλης στο θρεπτικό μέσο:



**Εικόνα 14:** Μεταβολή της ποσότητας μεθανόλης στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας που περιέχει κύτταρα



**Εικόνα 15:** Μεταβολή της ποσότητας μεθανόλης στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας απουσία κυττάρων



Με βάση τις γραφικές αυτές παραστάσεις προκύπτουν οι ακόλουθες εξισώσεις για τη μεταβολή της ποσότητας της μεθανόλης στο θρεπτικό μέσο:

$$\text{III) } M_{\delta/\text{τος χωρίς κύτταρα}} = 48 \cdot e^{-0.0599x} \quad ($$

$$\text{IV) } M_{\delta/\text{τος με κύτταρα}} = 48 \cdot e^{-0.0922x} \quad ($$

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα και τις εξισώσεις I-IV μπορούν να υπολογιστούν: α) η ποσότητα της μεθανόλης που αφομοιώνεται από τα κύτταρα ανά PCV σε σχέση με το χρόνο (εξίσωση V, γραφική απεικόνιση εικ 16), β) η ποσοστιαία αύξηση του PCV παρουσία μεθανόλης σε σχέση με τον μάρτυρα (εξίσωση VI, γραφική απεικόνιση εικ.17).

$$\text{Αφομοιωμένη μεθανόλη } [\mu\text{gr}/\mu\text{l PCV}] = \frac{(M_{\delta/\text{τος χωρίς κύτταρα}} - M_{\delta/\text{τος με κύτταρα}})}{\text{PCV}_{\text{μεθανόλης}}} \quad \text{(V)}$$

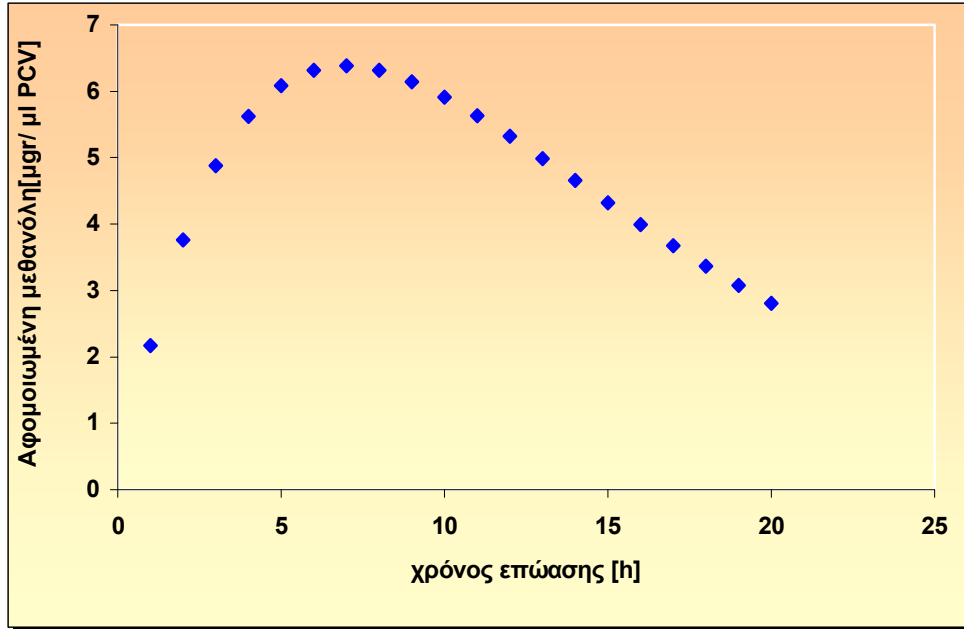
$$\text{, ή Αφομοιωμένη μεθανόλη } [\mu\text{gr}/\mu\text{l PCV}] = \frac{(48 \cdot e^{-0.0599x} - 48 \cdot e^{-0.0922x})}{0,6175 \cdot E^{0,069x}}$$

$$\text{Ποσοστιαία αύξηση βιομάζας} = \frac{(\text{PCV}_{\text{μάρτυρα}} - \text{PCV}_{\text{μεθανόλης}})}{\text{PCV}_{\text{μάρτυρα}}} \cdot 100 \quad \text{(VI)}$$

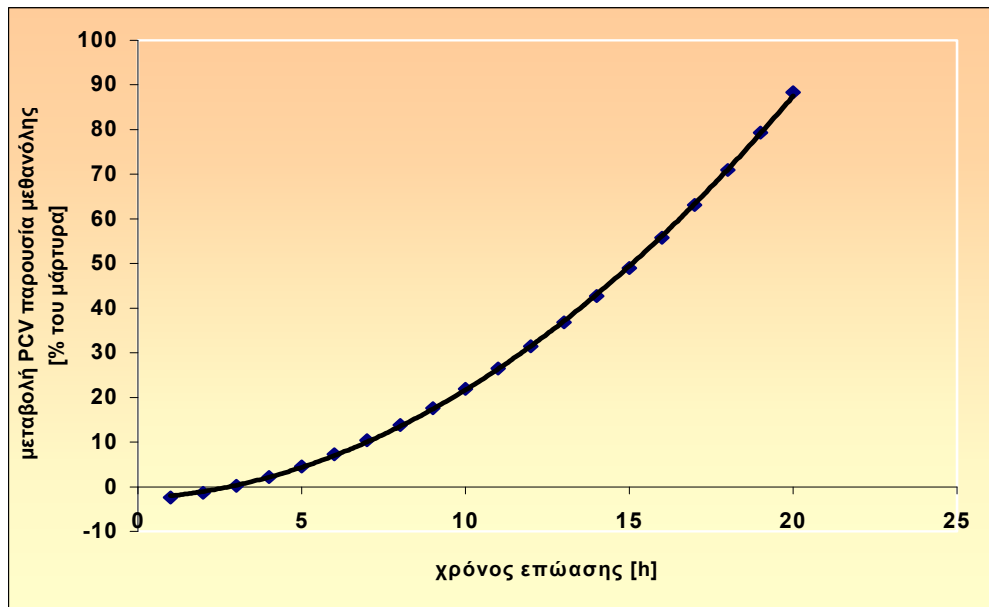
$$\text{ή Ποσοστιαία αύξηση βιομάζας} = \frac{-0,0004 \cdot x^2 + 0,0413x + 0,6373 - 0,6175 \cdot E^{0,069x}}{\text{PCV}_{\text{μάρτυρα}}}$$

$$-0,0004 \cdot x^2 + 0,0413x + 0,6373$$

Οι γραφικές απεικονίσεις των δύο παραπάνω εξισώσεων δίνονται στις παρακάτω εικόνες 16 και 17.



**Εικόνα 16:** Οι τιμές του άξονα y προκύπτουν από την εφαρμογή της εξίσωσης V



**Εικόνα 17:** Οι τιμές του άξονα y προκύπτουν από την εφαρμογή της εξίσωσηςVI

Επιχειρώντας να ερμηνεύσουμε τα δεδομένα των παραπάνω απεικονίσεων, θα μπορούσαμε να πούμε πως παρατηρούμε μια αύξηση του ρυθμού της απορρόφησης της μεθανόλης όσο αυξάνεται ο αριθμός των κυττάρων, ενώ ο ρυθμός αυτός μειώνεται από κάποιο χρονικό σημείο και μετά (περίπου μετά τις 6 ώρες). Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο ότι πλέον αντιστοιχούν λιγότερα μόρια μεθανόλης ανά κύτταρο, εφόσον από τη χρονική στιγμή των τεσσάρων ωρών και μετά αρχίζει ουσιαστικά μια εντυπωσιακή αύξηση της βιομάζας.

Παρατηρώντας την εικόνα 17 διαπιστώνουμε πως αρχικά (τις 4 πρώτες ώρες) το κλάσμα αύξησης των κυττάρων παρουσία μεθανόλης σε σχέση με το control είναι αρνητικό, ενώ από εκεί και πέρα η αύξηση γίνεται εκθετική. Πιθανόν αρχικά στα κύτταρα η παρουσία της μεθανόλης προκαλεί stress και μετά από μια σύντομη περίοδο προσαρμογής κι ενδεχομένως βιοσύνθεσης των μορίων- ενζύμων που μεταβολίζουν τη μεθανόλη εκδηλώνεται η θετική της επίδραση στην αύξηση της βιομάζας.

### **Διαφοροποιήσεις της δομής και της λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στη διαδικασία του μεταβολισμού της μεθανόλης.**

Κάποιοι ερευνητές που παρατήρησαν θετική επίδραση της μεθανόλης ως προς την αύξηση της βιομάζας αναφέρουν πως δεν εμφανίστηκε καμία αλλαγή στο επίπεδο των συνολικών χλωροφυλλών, ενώ ταυτόχρονα παρατηρούνταν αύξηση της φωτοσυνθετικής τους απόδοσης (Li et al, 1995; Hemming et al 1995).

Επόμενο βήμα της μελέτης μας είναι η διερεύνηση των διαφοροποιήσεων που υφίσταται ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός, δομικά και λειτουργικά, έπειτα από τη χορήγηση μεθανόλης.

## **Μελέτη φωτοσυνθετικής δραστηριότητας**

Μια πρώτη- αδρή εκτίμηση για το αν και πως επηρεάζεται ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός από την πρόσληψη και διάσπαση της μεθανόλης είναι δυνατόν να γίνει εξετάζοντας τα επίπεδα των χλωροφυλλών καθώς και τη φωτοσυνθετική απόδοση των καλλιεργειών στις οποίες χορηγήθηκε 0,5% v/v μεθανόλη.

Επιλέχθηκαν τρεις διαφορετικές χρονικές περιόδους για τη μέτρηση χλωροφυλλών και φωτοσυνθετικής δραστηριότητας:

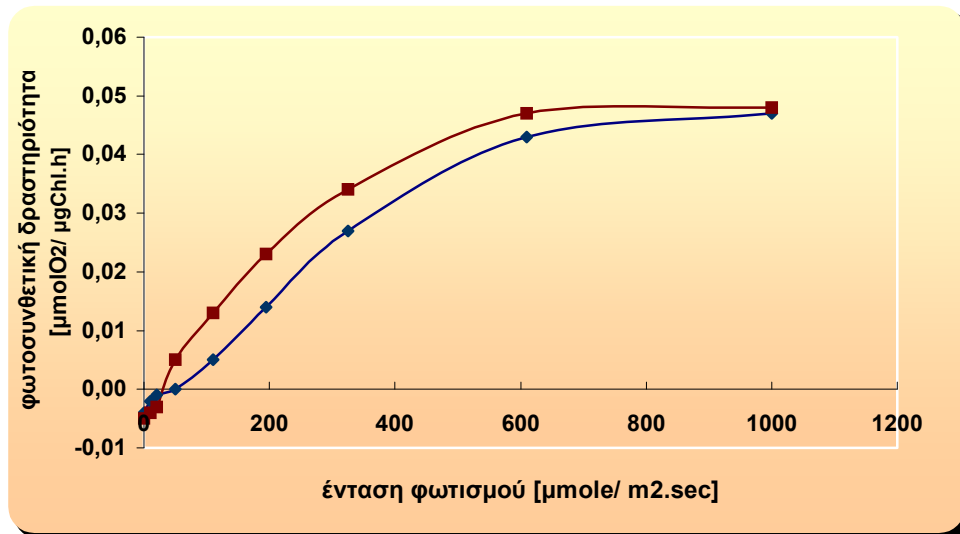
- 1) Λίγες ώρες μετά τη χορήγηση της μεθανόλης (κατά τη διάρκεια του πρώτου εξαώρου) . Στον χρόνο αυτό, όπως αποδείξαμε παραπάνω, εμφανίζεται υψηλός ρυθμός αφομοίωσης της μεθανόλης και μηδενική ή ακόμα και αρνητική επίδραση ως προς την αύξηση των κυττάρων.
- 2) Το χρονικό διάστημα στο οποίο εμφανίζεται η εξάντληση της μεθανόλης από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας (περίπου είκοσι ώρες μετά τη χορήγηση της μεθανόλης). Στον χρόνο αυτό, το σύνολο σχεδόν της χορηγούμενης μεθανόλης έχει αφομοιωθεί και η επίδραση της μεθανόλης ως προς την αύξηση του αριθμού των κυττάρων έχει εκδηλωθεί.
- 3) Χρονικό διάστημα κορεσμού (σαράντα ώρες μετά τη χορήγηση της μεθανόλης). Στον χρόνο αυτό, αφενός η διαθέσιμη μεθανόλη στο διάλυμα καλλιέργειας έχει εξαντληθεί κι αφετέρου η αύξηση της βιομάζας έχει φτάσει στο μέγιστο επίπεδο (κατάσταση κορεσμού).

Αυτότροφες καλλιέργειες του *Scenedesmus obliquus* αναπτύχθηκαν σε συνθήκες υψηλού φωτισμού ( $175 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ ). Μελετήθηκαν συγκριτικά καλλιέργειες ελέγχου (χωρίς μεθανόλη) και καλλιέργειες στις οποίες χορηγήθηκε μεθανόλη 0,5% v/v.

Κατά τις πρώτες ώρες έκθεσης των καλλιεργειών μας στη μεθανόλη τόσο το επίπεδο των συνολικών χλωροφυλλών όσο και ο λόγος Chl a/b δεν παρουσίαζε αξιόλογες διαφορές μεταξύ της καλλιέργειας ελέγχου και αυτής στην οποία χορηγήθηκε μεθανόλη. Η επίδραση της μεθανόλης στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό μόλις έχει αρχίσει να διαφαίνεται. Στον ακόλουθο πίνακα 3 και την εικόνα 18 δίνονται τα επίπεδα των χλωροφυλλών και οι φωτοσυνθετική δραστηριότητα, αντίστοιχα, των δειγμάτων που μελετήθηκαν.

	Ολικές χλωροφύλλες ( $\mu\text{gr}/\mu\text{l}$ PCV)	Χλωροφύλλη a/b Chl a/b
Καλλιέργεια μάρτυρας	<b>4,38</b>	<b>2,45</b>
Καλλιέργεια με μεθανόλη	<b>4,10</b>	<b>2,60</b>

*Πίνακας 3: επίπεδα ολικών χλωροφυλλών καθώς και του λόγου χλωροφύλλης a/b σε καλλιέργειες με- και χωρίς- μεθανόλη έπειτα από έξι ώρες επώασης.*



Εικόνα 18: Καμπύλη μεταβολής της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας στις καλλιέργειες αναφοράς (μπλε χρώμα) και στις καλλιέργειες με 0,5% v/v μεθανόλη (κόκκινο χρώμα) σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού. Η επώαση έγινε για 6 ώρες σε υψηλής έντασης φωτισμό ( $175 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{sec}^{-1}$ ).

Ερμηνεύοντας τα δεδομένα αυτά θα λέγαμε πως τα κύτταρα-αποκρινόμενα στη μεθανόλη- έχουν αρχίσει να διαμορφώνουν κατάλληλα το φωτοσυνθετικό τους μηχανισμό. Αν και παραπλήσια τα επίπεδα του λόγου Chl a/b είναι ελαφρώς υψηλότερα στις καλλιέργειες με μεθανόλη ενώ η συγκέντρωση των ολικών χλωροφυλλών έχει μειωθεί. Οι λόγοι αυτοί είναι ενδεικτικοί του μεγέθους της φωτοσυνθετικής κεραίας. Συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερος ο λόγος Chl a/b τόσο μικρότερο το μέγεθος του LHC. Μικρότερο LHC όμως σημαίνει και μεγαλύτερη φωτοσυνθετική δραστηριότητα, κάτι το οποίο έχει επίσης αρχίσει να διαφαίνεται (εικ. 18). Ένα τρίτο στοιχείο που έρχεται να ενισχύσει την άποψη για τη μείωση του μεγέθους του LHC είναι το σημείο αντιστάθμισης φωτοσύνθεσης κι αναπνοής. Στο δείγμα με τη μεθανόλη φωτοσύνθεση και αναπνοή αντισταθμίζονται σε υψηλότερη ένταση φωτισμού. Τα στοιχεία αυτά, με βάση και ανάλογες μελέτες (Senger and Fleischhacker, 1977) υποδεικνύουν τη μείωση του LHC.

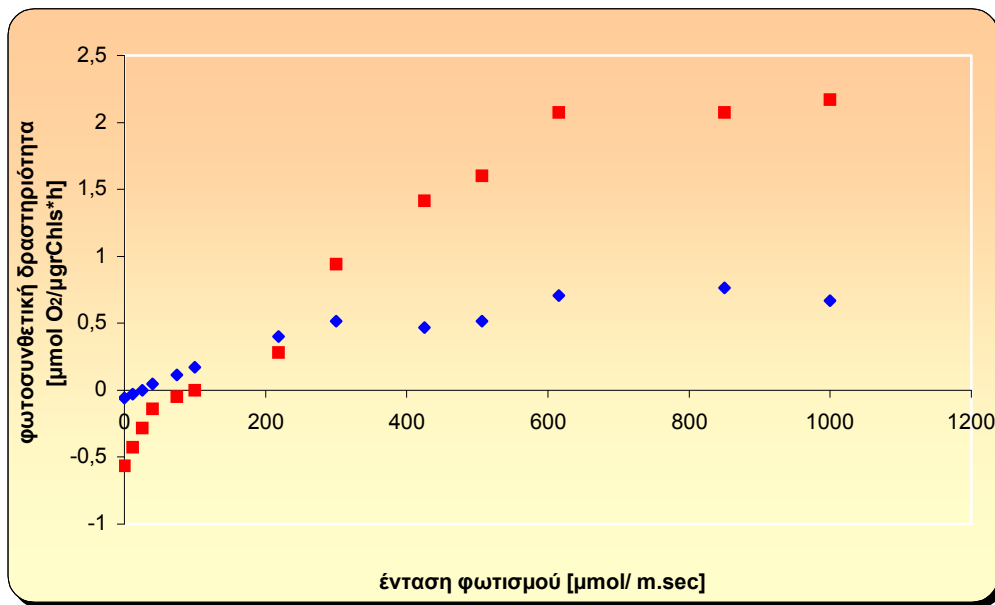
Έπειτα από είκοσι ώρες επώασης παρουσία μεθανόλης κι αφού το οργανικό αυτό μόριο είχε σχεδόν εξαντληθεί από το θρεπτικό μέσο (κάποια ποσότητα απορροφήθηκε από τα κύτταρα και κάποια εξατμίστηκε), η

απόκριση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στη μεθανόλη έχει εκδηλωθεί και μπορεί να καταγραφεί. Τη χρονική αυτή στιγμή το PCV στις καλλιέργειες με μεθανόλη είναι ίσο με 3μl PCV/ml καλλιέργειας και τριπλάσιο από το αντίστοιχο της καλλιέργειας ελέγχου. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 19 και τον πίνακα 4, ενώ το επίπεδο των ολικών χλωροφυλλών λόγω της μεθανόλης μειώνεται σημαντικά, ο λόγος Chl a/b παρουσιάζεται αυξημένος.

	Ολικές χλωροφύλλες (μgr/μl PCV)	Χλωροφύλλη a/b Chl a/b
Καλλιέργεια μάρτυρας	<b>9,9</b>	<b>3,05</b>
Καλλιέργεια με μεθανόλη	<b>2,08</b>	<b>4,05</b>

*Πίνακας 4: Επίπεδα του κλάσματος Chl a/b καθώς και των συνολικών χλωροφυλλών κατά την 20<sup>η</sup> ώρα επώασης καλλιεργειών με- και χωρίς- μεθανόλη.*

Επιπρόσθετα παρατηρήθηκε και αύξηση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, ενώ και πάλι το σημείο αντιστάθμισης φωτοσύνθεσης-αναπνοής εμφανίζεται σε υψηλότερη ένταση φωτισμό (εικ. 19). Θα μπορούσαμε λοιπόν να καταλήξουμε στο συμπέρασμα πως η αφομοίωση της μεθανόλης από φωτοσυνθετικούς οργανισμούς επιφέρει μείωση του μεγέθους του LHC. Αυτό βρίσκεται εμμέσως σε συμφωνία με την αρχική υπόθεση ότι η μεθανόλη μέσω φορμαλδεϋδης και φορμικού μεταβολίζεται σε CO<sub>2</sub>. Οι Van Oosten et al (1994) έχουν δείξει ότι αύξηση της συγκέντρωσης του CO<sub>2</sub> επιφέρει μείωση του επιπέδου του LHC.



Εικόνα 19: Καμπύλη μεταβολής της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας στις καλλιέργειες αναφοράς (μπλε χρώμα) και στις καλλιέργειες με 0,5% v/v μεθανόλη (κόκκινο χρώμα) σε διαφορετικές εντάσεις φωτισμού. Η επώαση έγινε για 20 ώρες σε υψηλής έντασης φωτισμό ( $175 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ )

Ωστόσο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι αντίστοιχες μετρήσεις κατά τη 40<sup>η</sup> ώρα επώασης. Στο χρονικό αυτό σημείο και αφού η αφομοίωση της μεθανόλης έχει ήδη λάβει χώρα σημειώνονται κάποιες αλλαγές στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Συγκεκριμένα, οι σχετικές αναλογίες τόσο στη φωτοσυνθετική δραστηριότητα, όσο και στα επίπεδα των ολικών χλωροφυλλών και του μεταξύ τους λόγου, αντιστρέφονται σε σύγκριση με αυτές που καταγράφηκαν την 6<sup>η</sup> και την 20<sup>η</sup> ώρα επώασης (εικόνα 20 και πίνακας 5). Οι συνολικές χλωροφύλλες, ο λόγος Chl a/b καθώς και η μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα παρουσιάζουν υψηλότερες τιμές στις καλλιέργειες ελέγχου σε σχέση με αυτές των μεθανόλο-χειριζόμενων καλλιεργειών.

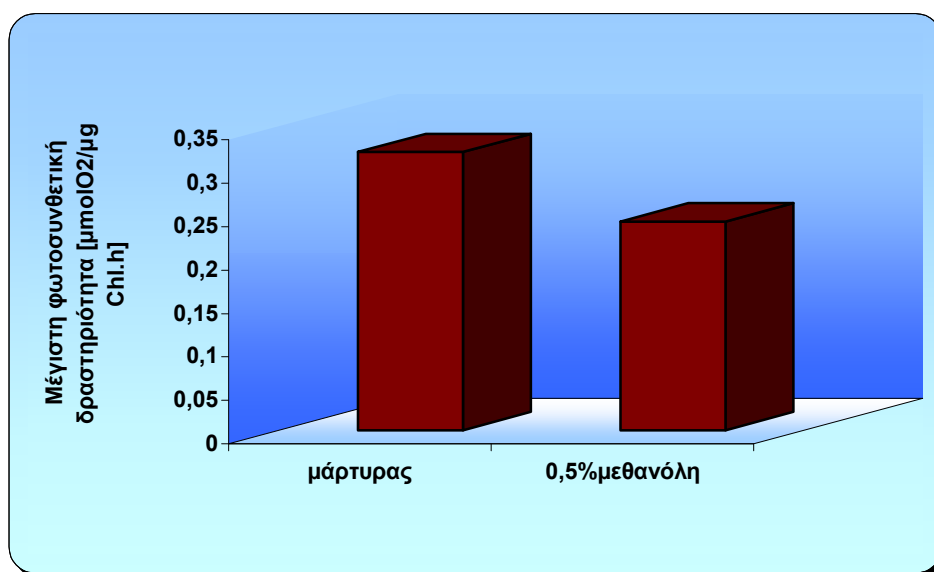
Στις 40 ώρες επώασης η αύξηση της βιομάζας εξαιτίας της προσθήκης μεθανόλης είναι της τάξης του 350% και η πυκνότητα των κυττάρων στο διάλυμα καλλιέργειας πολύ υψηλή. Η αυξημένη κυτταρική πυκνότητα



προκαλεί το φαινόμενο του αυτοσκιασμού. Συνεπώς το μέσο φως που παρέχεται ανά κύτταρο μειώνεται σημαντικά (Senger et al., 1977). Ουσιαστικά, λοιπόν, ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός προσαρμόζεται σε συνθήκες χαμηλής έντασης φωτισμού. Το φαινόμενο αυτό της φωτοπροσαρμογής σε χαμηλής έντασης φωτισμό σύμφωνα και με τους Kotzabasis et al., (1999) λαμβάνει χώρα μέσω της αύξησης του επιπέδου του LHC που συνοδεύεται με μείωση της μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και μείωση της αναλογίας Chl a/b.

	Ολικές χλωροφύλλες (μg/μl PCV)	Χλωροφύλλη a/b Chl a/b
Καλλιέργεια μάρτυρας	<b>5,53</b>	<b>3,32</b>
Καλλιέργεια με μεθανόλη	<b>2,6</b>	<b>2,9</b>

*Πίνακας 5: Επίπεδα συνολικών χλωροφυλλών καθώς και του λόγου Chl a/b κατά τη 40<sup>η</sup> ώρα επώασης σε καλλιέργειες χωρίς μεθανόλη (καλλιέργειες ελέγχου) και σε καλλιέργειες με μεθανόλη 0,5% v/v.*



*Εικόνα 20: Επίπεδα μέγιστης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας κατά τη 40<sup>η</sup> ώρα επώασης σε καλλιέργειες χωρίς μεθανόλη (καλλιέργειες ελέγχου) και σε καλλιέργειες με μεθανόλη 0,5% v/v. Ο υπολογισμός της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας έγινε σε υψηλής έντασης φωτισμό (1000 μmole.m<sup>-2</sup>.sec<sup>-1</sup>).*

Φαίνεται, λοιπόν πως δύο αντίρροπα συστήματα συμμετέχουν στη ρύθμιση του μεγέθους του συμπλόκου αποκομιδής του φωτός. Από τη μια, έχουμε την παρουσία μιας αξιοποιήσιμης πηγής άνθρακα (μεθανόλη) κι από την άλλη τη φωτοπροσαρμογή σε χαμηλής έντασης φωτισμό λόγω του φαινομένου του αυτοσκιασμού. Σε πρώτη φάση φαίνεται πως υπερισχύει ο ρυθμιστικός μηχανισμός που ελέγχεται από τη μεθανόλη και σημειώνεται μείωση του LHC. Όσο όμως η συγκέντρωση των κυττάρων αυξάνεται, ο ανεπαρκής φωτισμός ανά κύτταρο είναι πλέον ισχυρότερος ρυθμιστής του μεγέθους του LHC και τα κύτταρα προσαρμόζουν το φωτοσυλλεκτικό τους σύστημα στις εν λόγω συνθήκες, μειώνοντας τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα και συνεπώς το ρυθμό αύξησης της βιομάζας. Ως εκ τούτου η φωτοπροσαρμογή καθορίζει τα όρια της επίδρασης της μεθανόλης στην αύξηση της βιομάζας. Τεχνικός περιορισμός του φαινομένου της φωτοπροσαρμογής εξασφαλίζει μια συνεχή αύξηση της βιομάζας στη διάρκεια του χρόνου με την προσθήκη μεθανόλης.

## **Φυσικοχημική προσέγγιση της επίδρασης της μεθανόλης στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό με μετρήσεις επαγωγικού φθορισμού.**

Οι βιοχημικές/ φυσιολογικές μετρήσεις ανάλυσης φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, συγκέντρωσης χλωροφυλλών κι εκτίμησης της σχέσης Chl a/b, που προηγήθηκαν δίνουν μια πρώτη εικόνα για τις τροποποιήσεις/ προσαρμογές του φωτοσυνθετικού μηχανισμού εξαιτίας της παρουσίας της μεθανόλης. Ωστόσο, ασφαλέστερα συμπεράσματα για τις αλλαγές στη μοριακή δομή και τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού είναι δυνατόν να εξαχθούν προσεγγίζοντας και φυσικοχημικά το θέμα, μέσω μετρήσεων επαγωγικού φθορισμού, σύμφωνα με τη μέθοδο Strasser and Strasser, (1995).

Οι τιμές που ελήφθησαν από τις μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού κατά τη διάρκεια του κορεσμού της αύξησης της καλλιέργειας ήρθαν να

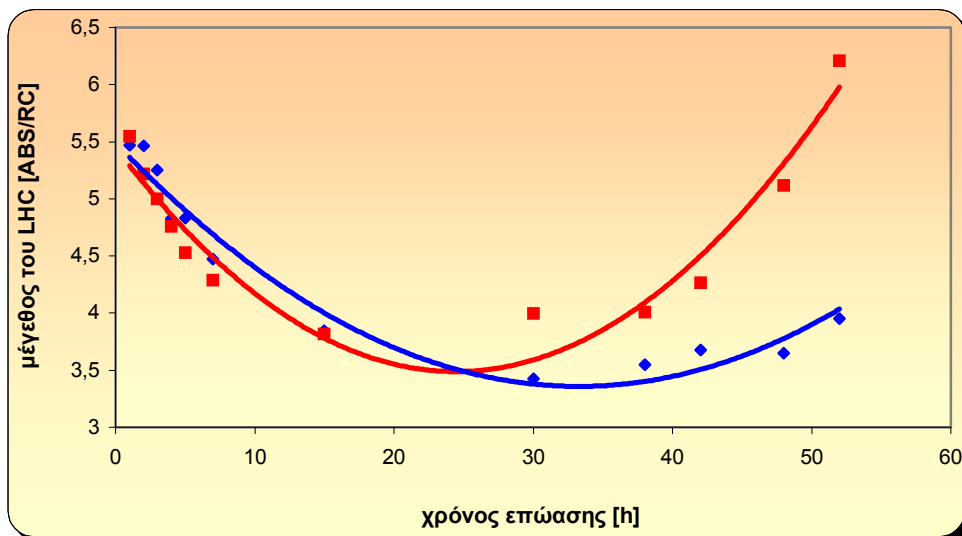
επιβεβαιώσουν τις πρώτες ενδείξεις για την απόκριση του φωτοσυνθετικού μηχανισμού παρουσία μεθανόλης.

Η ποσότητα της ενέργειας που απορροφάται ανά φωτοσυνθετικό κέντρο αντίδρασης (ABS/RC), όπως αυτή ορίζεται από την καμπύλη του επαγωγικού φθορισμού βάσει της μεθόδου Strasser and Strasser, είναι αποδεικτική του μεγέθους της φωτοσυλλεκτικής κεραίας LHC. Όσο μεγαλύτερος ο λόγος ABS/RC τόσο μεγαλύτερο το LHC. Η απόκριση του LHC στην παρουσία της μεθανόλης θα μπορούσε να χωριστεί και να μελετηθεί σε τρία χρονικά διαστήματα, σε συμφωνία με τις μετρήσεις χλωροφυλλών και φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, αλλά και σε συσχέτισμό με τους χρόνους αφομοίωσης της μεθανόλης από τα κύτταρα (στοιχεία που παρουσιάστηκαν και παραπάνω):

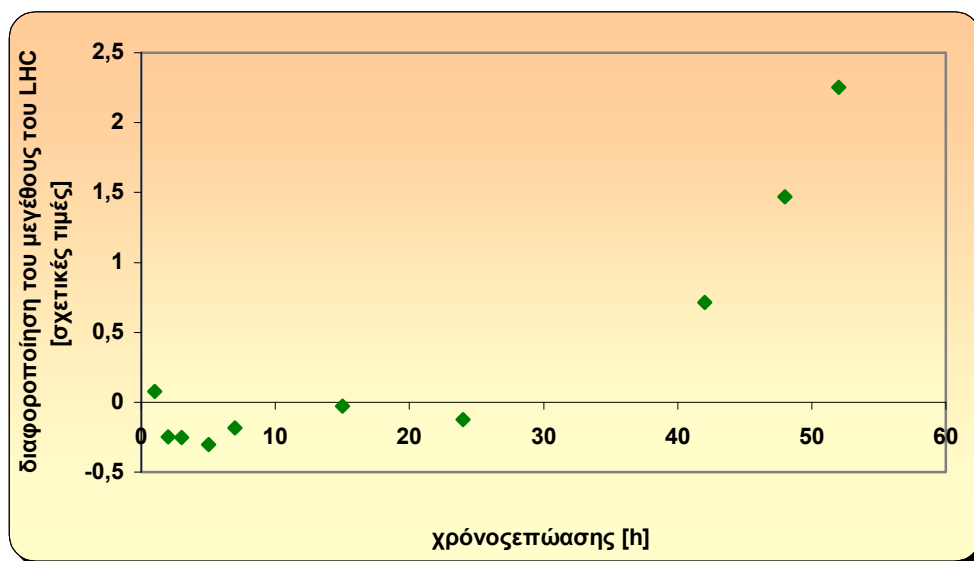
- 1) Από τις 6- 20 περίπου ώρες επώασης : Ο λόγος ABS/RC είναι μεγαλύτερος στην καλλιέργεια ελέγχου (εικόνες 21 και 22). Αυτό σημαίνει πως το LHC στις καλλιέργειες με μεθανόλη είναι μικρότερο και τα κύτταρα έχουν αρχίσει να προσαρμόζουν το φωτοσυνθετικό τους μηχανισμό αποκρινόμενα στη μεθανόλη.
- 2) Το χρονικό διάστημα γύρω στις 25 ώρες επώασης: Η διαφορά στο λόγο ABS/RC σιγά- σιγά μικραίνει και σταδιακά εξομοιώνεται για τις μεταχειρίσεις με- και χωρίς μεθανόλη. Κατά το χρονικό αυτό διάστημα η πυκνότητα των κυττάρων στο διάλυμα με τη μεθανόλη γίνεται ολοένα και μεγαλύτερη. Θα μπορούσαμε λοιπόν να καταλήξουμε στο συμπέρασμα πως το μέγεθος του LHC στα κύτταρα με μεθανόλη αντικατοπτρίζει το αποτέλεσμα των δύο αντίρροπων ρυθμιστικών συστημάτων του μεγέθους του. Από τη μια έχουμε την αυξημένη ενδοκυτταρική παρουσία μεθανόλης κι ενδεχομένως  $CO_2$  (αν αυτό είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού της) που επιφέρει μείωση του μεγέθους του LHC . Από την άλλη, αρχίζει να εκδηλώνεται το φαινόμενο της φωτοπροσαρμογής και συνεπώς εκδηλώνεται τάση αύξησης της φωτοσυνθετικής κεραίας έτσι ώστε το κύτταρο να εκμεταλλευτεί κατά το δυνατόν αποδοτικότερα το διαθέσιμο φως που λιγοστεύει.

3) Μετά τις 40 περίπου ώρες επώασης (περίοδος κορεσμού της αύξησης): Το φαινόμενο του αυτοσκιασμού είναι πλέον τόσο ισχυρό λόγω της υπερβολικής αύξησης του αριθμού των κυττάρων στα διαλύματα με μεθανόλη, που αναγκάζουν τα κύτταρα να φωτοπροσαρμοστούν σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού αυξάνοντας το μέγεθος του LHC.

Στις παρακάτω εικόνες 21 και 22 φαίνονται αντίστοιχα η χρονική διακύμανση του λόγου ABS/RC (και συνεπώς του μεγέθους της φωτοσυλλεκτικής κεραίας) για τις κυτταροκαλλιέργειες που μελετήσαμε καθώς και η χρονική διακύμανση της μεταξύ τους διαφοράς.



**Εικόνα21:** Γραφική απεικόνιση της μεταβολής του λόγου ABS/RC. Κόκκινη γραμμή: καλλιέργεια με μεθανόλη, μπλε γραμμή: καλλιέργεια ελέγχου



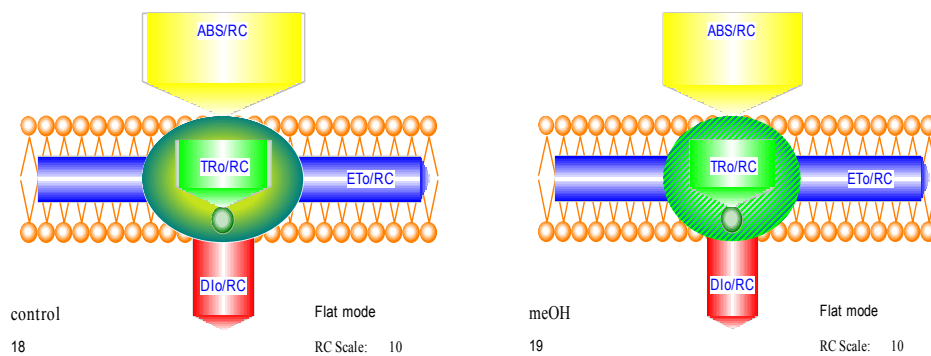
**Εικόνα 22:** Γραφική απεικόνιση της μεταβολής της διαφοράς του λόγου ABS/RC μεταξύ των καλλιεργειών με μεθανόλη και control

Με βάση τα αποτελέσματα που πήραμε από τις μετρήσεις του επαγωγικού φθορισμού και το πλήθος των πληροφοριών που αυτές παρέχουν μπορούμε να αναπαραστήσουμε σχηματικά τη μορφή του PSII στις μεμβράνες των θυλακοειδών στις διάφορες χρονικές στιγμές. Στις εικόνες 23-25 απεικονίζεται σχηματικά η μοριακή του δομή αλλά και οι σχετικές διαφορές σε αυτή στις καλλιεργείες ελέγχου και μεθανόλης στα τρία χρονικά διαστήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω κι εμφανίζονται διαδοχικά οι τροποποιήσεις στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό.

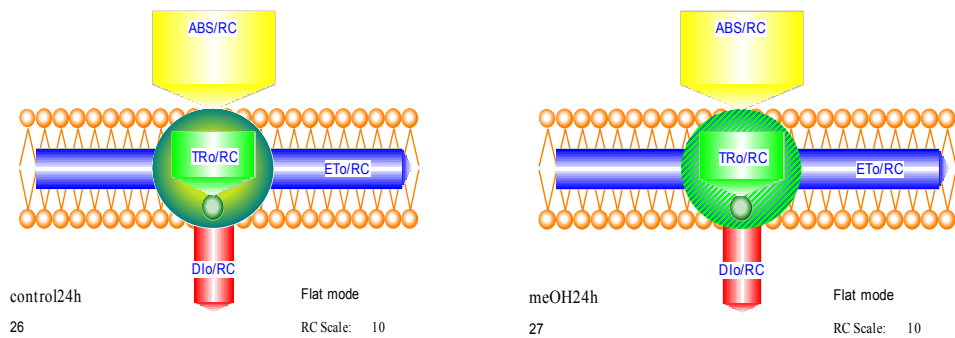
Οι αντιπροσωπευτικοί χρόνοι που επιλέχθηκαν στις τρεις χρονικές περιόδους προσαρμογής /απόκρισης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού που ορίσαμε παραπάνω ήταν: α) οι 6-20 ώρες: περίοδος απόκρισης στη μεθανόλη, β) οι 25 ώρες: συνεπίδραση του φαινομένου του φωτοσκιασμού και της επίδρασης της μεθανόλης και γ) οι 40 ώρες: περίοδος κατά την οποία παρουσιάζεται υψηλή βιομάζα και άρα είναι έντονες οι επιδράσεις του

φαινομένου του φωτοσκιασμού, παράλληλα με τη σταθερή πλέον επίδραση της μεθανόλης.

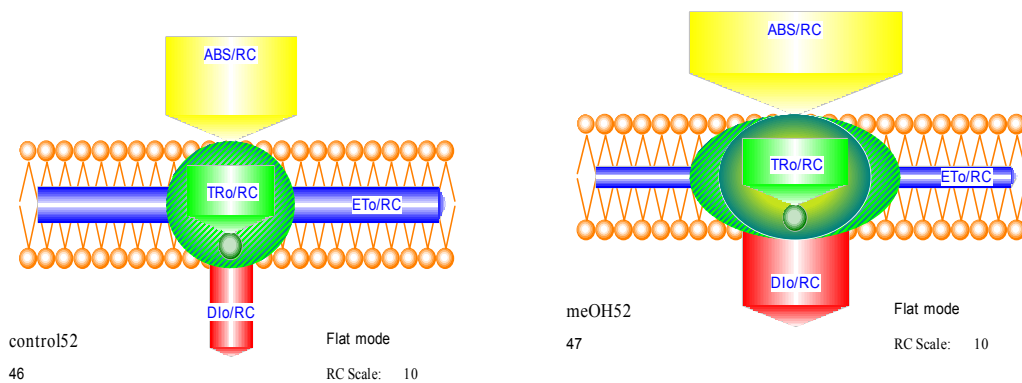
Τα δεδομένα των σχηματικών απεικονίσεων (που λήφθηκαν από τη συσκευή ανάλυσης του επαγωγικού φθορισμού) στις οποίες αναπαριστάται – εκτός των άλλων- και το μέγεθος της φωτοσυνθετικής κεραίας (εικ23-25), έρχονται σε πλήρη συμφωνία με όσα μέχρι στιγμής απέδειξαν οι μετρήσεις της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και των χλωροφυλλών. Στην πρώτη περίοδο (6-20 ώρες) το LHC είναι μικρότερο στα κύτταρα που χορηγήθηκε μεθανόλη, ως απόκριση σε αυτή. Στη δεύτερη περίοδο (25 ώρες) το LHC έχει σχεδόν το ίδιο μέγεθος στις καλλιέργειες με μεθανόλη και στις καλλιέργειες ελέγχου, λόγω συνεπίδρασης μεθανόλης και φαινομένου αυτοσκιασμού. Στην τρίτη περίοδο (40 ώρες) το LHC είναι πολύ μεγαλύτερο στις καλλιέργειες με μεθανόλη, λόγω της επικράτησης του φαινομένου του αυτοσκιασμού που υπερκαλύπτει αυτό της μεθανόλης.



Εικόνα 23: Σχηματική απεικόνιση της μοριακής δομής του PSII στις μεμβράνες των θυλακοειδών. Το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας εμφανίζεται ως ABS/RC. Αριστερά: καλλιέργεια ελέγχου, δεξιά: καλλιέργεια με μεθανόλη. Η απεικόνιση αφορά την 6<sup>η</sup> ώρα επώασης σε καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες υψηλού φωτισμού ( $175\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ )



Εικόνα 24: Σχηματική απεικόνιση της μοριακής δομής του PSII στις μεμβράνες των θυλακοειδών. Το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας εμφανίζεται ως ABS/RC. Αριστερά: καλλιέργεια ελέγχου, δεξιά: καλλιέργεια με μεθανόλη. Η απεικόνιση αφορά την 25<sup>η</sup> ώρα επώασης σε καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες υψηλού φωτισμού ( $175\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ )



Εικόνα 25: Σχηματική απεικόνιση της μοριακής δομής του PSII στις μεμβράνες των θυλακοειδών. Το μέγεθος της φωτοσυλλεκτικής κεραίας εμφανίζεται ως ABS/RC. Αριστερά: καλλιέργεια ελέγχου, δεξιά: καλλιέργεια με μεθανόλη. Η απεικόνιση αφορά την 40<sup>η</sup> ώρα επώασης σε καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες υψηλού φωτισμού ( $175\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ )

## **Απομόνωση και ποσοτική εκτίμηση μονομερών και ολιγομερών μορφών του LHC**

Όλα τα μέχρι τώρα βιοχημικά και φυσικοχημικά πειράματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω επιβεβαιώνουν αλλαγές στο φωτοσυνθετικό μηχανισμό (που επικεντρώνεται στο μέγεθος του LHC) λόγω της επίδρασης της μεθανόλης. Για κατοχύρωση αυτών των συμπερασμάτων επιχειρήθηκε περαιτέρω μοριακή και βιοχημική ανάλυση των αλλαγών αυτών. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκαν θυλακοειδείς μεμβράνες χλωροπλαστών, κατά την έκτη ώρα επώασης (αυτότροφες συνθήκες, υψηλής έντασης φωτισμός [ $175 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ ]), σε κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε μεθανόλη και σε κύτταρα που αναπτύχθηκαν χωρίς μεθανόλη (καλλιέργεια ελέγχου). Επιλέχθηκε αυτή η χρονική στιγμή για την ξεκάθαρη καταγραφή του φαινομένου της επίδρασης της μεθανόλης χωρίς την επίδραση της φωτοπροσαρμογής του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Τα πρωτεϊνικά υποσύνπλοκα του φωτοσυνθετικού μηχανισμού που βρίσκονται στις μεμβράνες των θυλακοειδών διαχωρίστηκαν σε συνεχή διαβάθμιση σουκρόζης 5%-22% μετά από υπερφυγοκέντρηση στα 170000 g (βλ. υλικά και μέθοδοι). Με τον τρόπο αυτό διαχωρίστηκαν τα πρωτεϊνικά μονομερή και ολιγομερή του φωτοσυλλεκτικού συμπλόκου LHC (εικ.28)

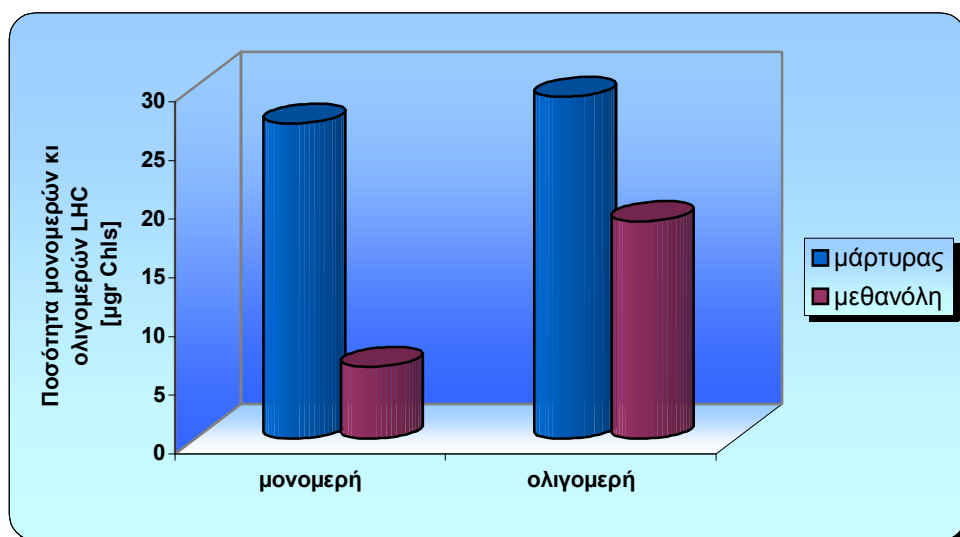
Η ποσοτική ανάλυση των πρωτεϊνικών αυτών υποομάδων του LHC απέδειξε ξεκάθαρα πως παρουσία μεθανόλης μειώνεται δραστικά (περίπου 50%) το επίπεδο του LHC. Είτε λάβουμε ως μετρήσιμη παράμετρο το επίπεδο των χλωροφυλλών κάθε κλάσματος (πίνακας 6, εικόνα 26), είτε το αντίστοιχο επίπεδο των πρωτεϊνών (πίνακας 6, εικόνα 27), αυτό που διαπιστώνουμε είναι πως το επίπεδο του LHC των κυττάρων που αναπτύχθηκαν με μεθανόλη είναι κατά 50% μικρότερο (συνολικές τιμές μονομερών κι ολιγομερών, βλ. πίνακα 6) σε σχέση με αυτό του μάρτυρα. Η μείωση του LHC είναι εμφανής και στα δύο κλάσματα (μονομερή και ολιγομερή). Ωστόσο, δραστικότερη



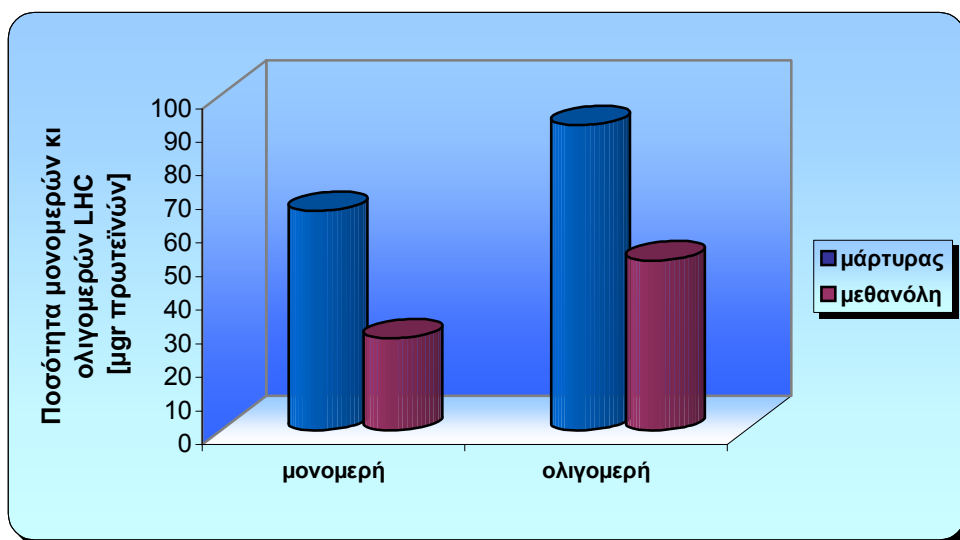
μείωση εμφανίζει το κλάσμα των μονομερών. Ως εκ τούτου, το κλάσμα των ολιγομερών προς τα μονομερή (ολιγομερή/ μονομερή) του LHC είναι μεγαλύτερο στις μεταχειριζόμενες με μεθανόλη καλλιέργειες. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και με εφαρμογή SDS-gel.

	Μάρτυρας		μεθανόλη	
	Ολιγομερή LHC	Μονομερή LHC	Ολιγομερή LHC	Μονομερή LHC
Μέγεθος υποσυμπλόκων LHC [μgr χλωροφυλλών]	<b>29,15</b>	<b>26,89</b>	<b>18,55</b>	<b>6,14</b>
Μέγεθος υποσυμπλόκων LHC [μgr πρωτεϊνών]	<b>90,75</b>	<b>65,305</b>	<b>50,505</b>	<b>27,285</b>

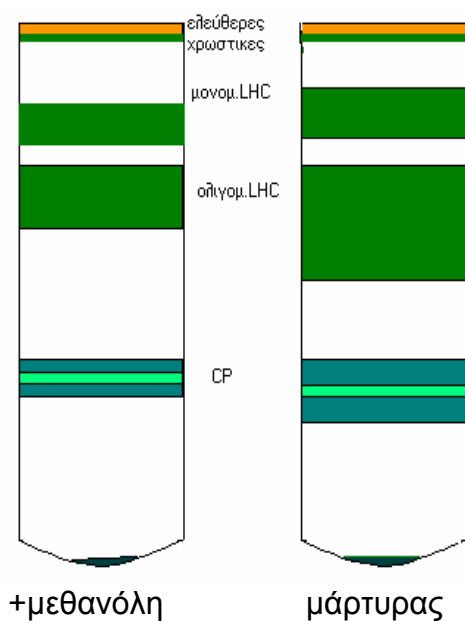
**Πίνακας 6:** ποσότητα ολικών χλωροφυλλών και πρωτεϊνών στα κλάσματα ολιγομερών και μονομερών του LHC σε καλλιέργειες που χορηγήθηκε μεθανόλη (0,5% v/v) και σε καλλιέργειες χωρίς μεθανόλη (μάρτυρας). Τα κλάσματα προέκυψαν έπειτα από υπερφυγοκέντρηση των θυλακοειδών στα 17000g σε συνεχή διαβάθμιση σουκρόζης 5-22%. Τα θυλακοειδή απομονώθηκαν την κατά την έκτη ώρα επώασης σε αυτότροφες συνθήκες και υψηλής έντασης φωτισμό ( $175 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ ).



**Εικόνα 26:** Ποσοτική ανάλυση μονομερών κι ολιγομερών υποσυμπλόκων του LHC σε καλλιέργειες στις οποίες χορηγήθηκε μεθανόλη σε σύγκριση με αντίστοιχες του μάρτυρα. Η επώαση των καλλιεργειών έγινε για 6 ώρες σε αυτότροφες συνθήκες και υψηλής έντασης φωτισμό ( $175 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ ).



**Εικόνα 27:** Ποσοτική ανάλυση μονομερών κι ολιγομερών υποσυμπλόκων του LHC σε καλλιέργειες στις οποίες χορηγήθηκε μεθανόλη σε σύγκριση με τα αντίστοιχα του μάρτυρα Η επώαση των καλλιεργειών έγινε για 6 ώρες σε αυτότροφες συνθήκες και υψηλής έντασης φωτισμό ( $175 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ ).



**Εικόνα 28:** Σχηματική απεικόνιση του διαχωρισμού των μονομερών και ολιγομερών του LHC, όπως προέκυψε από την υπερφυγοκέντρωση θυλακοειδών στα  $170000g$  σε συνεχή διαβάθμιση σουκρόζης 5- 22%

## Φωτορύθμιση του μεταβολισμού της μεθανόλης

Όπως ήδη αναφέρθηκε και στην αρχή, η διαδικασία του μεταβολισμού της μεθανόλης είναι ένα φωτορυθμιζόμενο φαινόμενο.

Επώαση καλλιέργειών του αγρίου τύπου του χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus* στο απόλυτο σκοτάδι, έδειξε ότι ο ρυθμός αύξησης της καλλιέργειας στην οποία χορηγήθηκε μεθανόλη ήταν μικρότερος από τον αντίστοιχο ρυθμό της καλλιέργειας ελέγχου. Η παρατήρηση αυτή αποτελεί ένδειξη πως η ένταση του φωτισμού σχετίζεται με την αποτελεσματικότητα μεταβολισμού της μεθανόλης.

Επιπλέον, έπειτα από υποβολή των κυτταροκαλλιιεργειών σε χαμηλής έντασης φωτισμό ( $5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ ) εμφανίστηκε χρονική καθυστέρηση στην επαγωγή της αύξησης της βιομάζας (πτυχιακή εργασία, Θεοδωρίδου Αναστασία, 1998). Η χρονική αυτή μετατόπιση αποτελεί μία ακόμη ένδειξη πως η ένταση του φωτισμού επηρεάζει σημαντικά (επάγει) το μεταβολισμό της μεθανόλης και συνεπώς την απόκριση των κυττάρων στη μεθανόλη.

Ένα τρίτο σημείο στο οποίο αξίζει να σταθούμε είναι τα ενδοκυτταρικά επίπεδα των πολυαμινών. Οι πολυαμίνες (PAs) και ιδιαίτερα η αύξηση της διαμίνης πουτρεσίνη (Put) αποτελούν δείκτες stress (Smith et al., 1985), για μια σειρά καταστάσεων. Μετρήσεις των PAs σε καλλιέργειες που επώαστηκαν με τα ίδια ποσά μεθανόλης στο σκοτάδι έδειξαν πως η μεθανόλη αποτελεί παράγοντα stress (σε αντίθεση με το φως), αφού τα επίπεδα Put ήταν υψηλότερα στις μεταχειρισμένες με μεθανόλη καλλιέργειες σε σύγκριση με τα αντίστοιχα του μάρτυρα (πτυχιακή εργασία, Θεοδωρίδου Αναστασία, 1998).

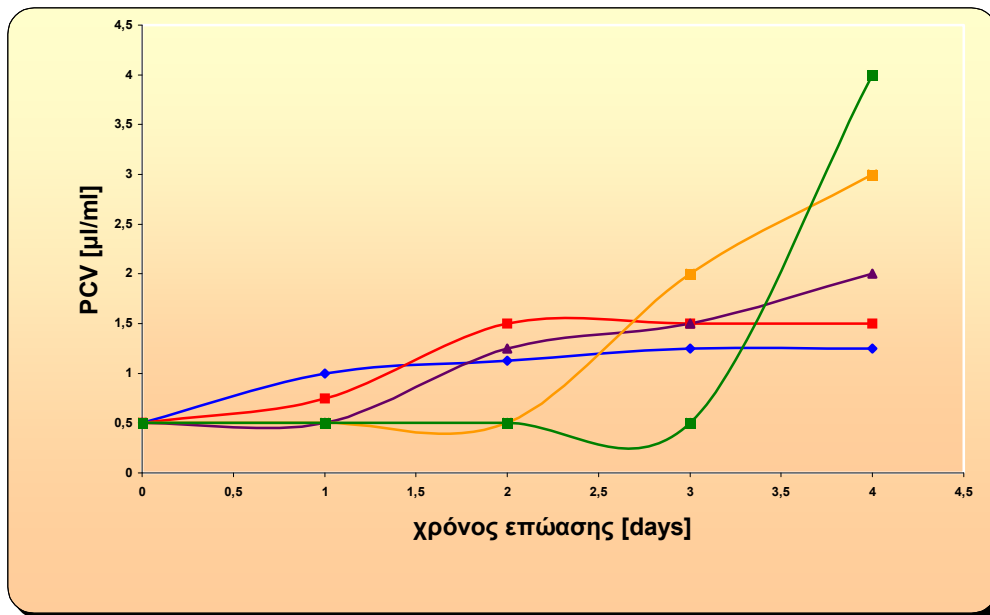
Από τη μια λοιπόν υπάρχει το δεδομένο της φωτοεξάρτησης του μεταβολισμού της μεθανόλης κι από την άλλη, όπως αποδείχτηκε στην παρούσα μελέτη η εμπλοκή και του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Θέλοντας να συνδυάσουμε και να μελετήσουμε την αλληλεξάρτηση των δυο αυτών δεδομένων, χορηγήσαμε μεθανόλη σε αυτότροφες καλλιέργειες του μεταλλαγμένου στελέχους C-2A' οι οποίες εκτέθηκαν στο φως μετά από διαφορετικούς χρόνους παραμονής στο σκοτάδι. Οι μεταχειρίσεις ξεκίνησαν με αρχικό όγκο πακεταρισμένων κυττάρων ίσο με 0,5 ml/ml. Το στέλεχος αυτό

δεν εμφανίζει σχηματοποιημένο φωτοσυνθετικό μηχανισμό στο σκοτάδι και η βιοσύνθεση της Chl σταματάει στο επίπεδο του πρωτοχλωροφυλλιδίου. Με την έναρξη του φωτισμού αρχίζει η βιοσύνθεση της χλωροφύλλης και ο σχηματισμός του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

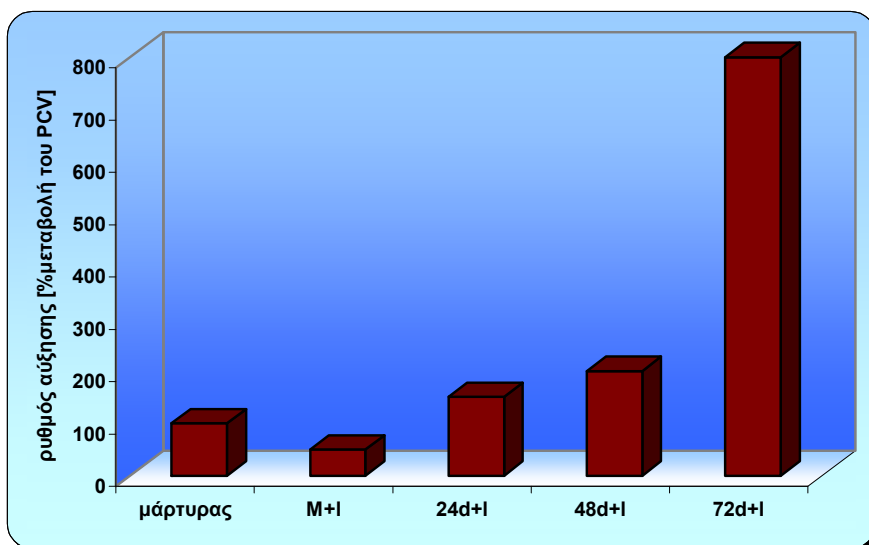
Καταρχήν παρατηρήθηκε πως η παραμονή του συγκεκριμένου στελέχους με μεθανόλη στο σκοτάδι προκαλούσε αρνητική ρύθμιση του επιπέδου της βιομάζας. Πράγματι, οι καλλιέργειες της C-2A' (όπως φαίνεται και στην εικόνα 29) για όσο διάστημα βρίσκονταν στο σκοτάδι με μεθανόλη παρουσίαζαν μηδενική αύξηση, εν αντιθέσει με την καλλιέργεια μάρτυρα που παρουσιάζει την αναμενόμενη αύξηση.

Η δεύτερη παρατήρηση είναι πως όσο περισσότερο έμενε η C-2A' στο σκοτάδι με μεθανόλη τόσο μεγαλύτερος ήταν ο ρυθμός αύξησης αμέσως μετά την έκθεση της καλλιέργειας στο φως. Στην εικόνα 29 φαίνεται καθαρά η μεταβολή στο PCV καλλιεργειών C-2A' στις οποίες χορηγήθηκε μεθανόλη 0,5% (v/v) και εκτέθηκαν στο φως έπειτα από διαφορετικούς χρόνους παραμονής τους στο σκοτάδι (0,24, 48, 72 ώρες). Επιπλέον, η παρατήρησή μας αυτή επιβεβαιώνεται στην εικόνα 30, στην οποία δίνεται ο ρυθμός αύξησης των εν λόγω καλλιεργειών κατά τη διάρκεια της πρώτης ημέρας έκθεσής τους στο φως.

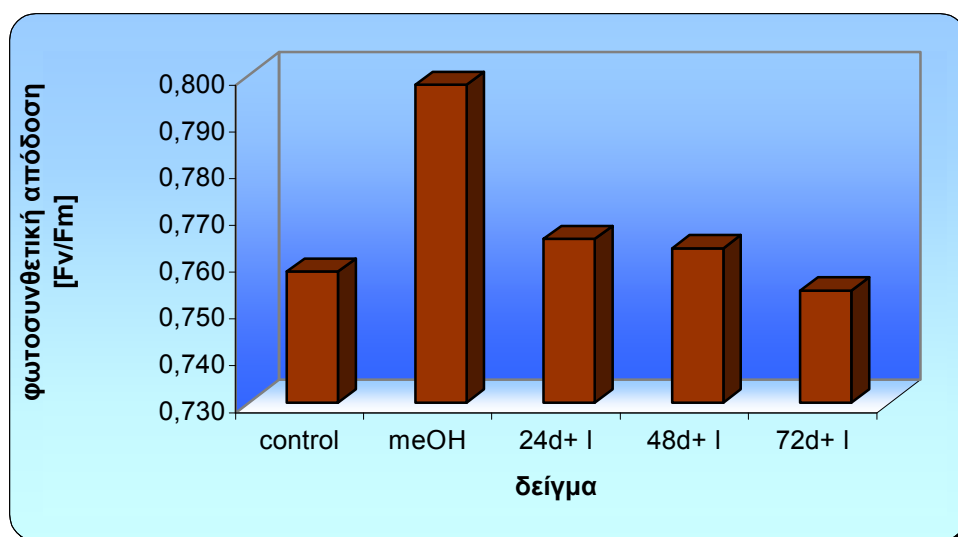
Παρατηρώντας τα δεδομένα της εικόνας 29 διαπιστώνουμε πως όσο περισσότερο έμενε μια καλλιέργεια στο σκοτάδι με μεθανόλη, παρόλο που δεν αυξάνονταν εκεί, τόσο εντυπωσιακότερος ήταν ο ρυθμός της αύξησης της βιομάζας μετά την έκθεσή της σε συνθήκες υψηλού φωτισμού. Το ίδιο ακριβώς συμβαίνει και με το ρυθμό αύξησης κατά τη διάρκεια της πρώτης ημέρας έκθεσης στο φως για κάθε μεταχείριση (εικ.30). Από την άλλη, η φωτοσυνθετική απόδοση, ως έκφραση του λόγου  $F_v / F_m$  της καμπύλης του επαγωγικού φθορισμού εξαρτάται άμεσα από το χρόνο έκθεσης στο φως και την τέταρτη ημέρα είναι μεγαλύτερη για την καλλιέργεια που εκτέθηκε 4 μέρες στο φως παρουσία μεθανόλης (εικ. 31).



**Εικόνα 29:** μεταβολή του PCV σε αυτότροφες καλλιέργειες C-2A'. Μπλε γραμμή: καλλιέργεια ελέγχου (0% μεθανόλη, έκθεση στο φως απ' την αρχή της επώασης). Κόκκινη γραμμή: 0,5% μεθανόλη, έκθεση στο φως απ' την αρχή της επώασης. Μοβ γραμμή: 0,5% μεθανόλη, έκθεση στο φως μετά από 24 ώρες στο σκοτάδι(24d). Πορτοκαλί γραμμή: 0,5% μεθανόλη, έκθεση στο φως μετά από 48 ώρες στο σκοτάδι(48d). Πράσινη γραμμή: 0,5% μεθανόλη, έκθεση στο φως μετά από 72 ώρες στο σκοτάδι (72d).



**Εικόνα 30:** Ρυθμός αύξησης κατά την πρώτη μέρα έκθεσης καλλιεργειών C-2A' στο φως. (M+l: μεθανόλη και αμέσως στο φως, 24d+l: 24 ώρες σκοτάδι και μετά στο φως, 48d+l: 48 ώρες σκοτάδι και μετά στο φως, 72d+l: 72 ώρες σκοτάδι και μετά στο φως



**Εικόνα 31:** Απεικόνιση του λόγου Fv/Fm κατά την τέταρτη μέρα επώασης. Ο λόγος αυτός είναι χαρακτηριστικός της απόδοσης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού.

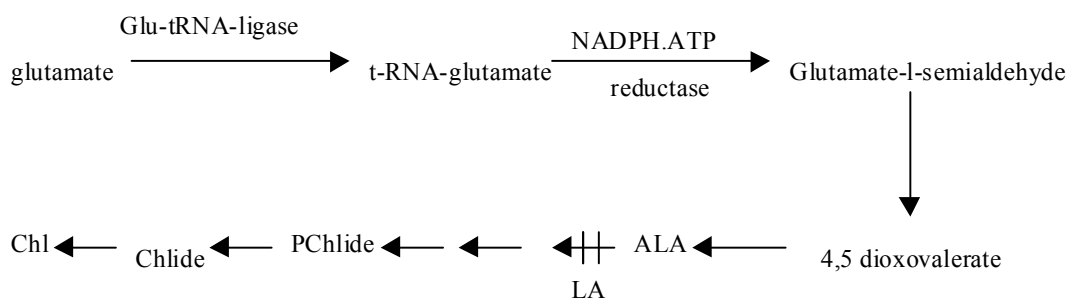
Τα δεδομένα αυτής της μεταχείρισης επιβεβαιώνουν το ότι ο μεταβολισμός της μεθανόλης είναι άμεσα φωτοεξαρτώμενος μιας και μόνο παρουσία φωτισμού παρατηρήθηκε επαγωγή της αύξησης της βιομάζας έπειτα από χορήγηση μεθανόλης και μάλιστα, όσο μεγαλύτερη είναι η ενδοκυτταρική συγκέντρωση της μεθανόλης λόγω της συσσώρευσής της στο σκοτάδι, τόσο μεγαλύτερος είναι και ο ρυθμός της αύξησης. Ενδεχομένως η φωτοενεργοποίηση του ενζυμικού μονοπατιού του μεταβολισμού της μεθανόλης εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωση του προς μεταβολισμό μορίου της μεθανόλης. Συνεπώς πρόκειται για ένα ενζυμικό μονοπάτι, του οποίου η ταχύτητα ενεργοποίησης ρυθμίζεται από το φως και βεβαίως απ' την ενδοκυττάρια συγκέντρωση της μεθανόλης.

Επίσης, διαφαίνονται οι πρώτες ενδείξεις για το ότι στο μεταβολισμό της μεθανόλης και την απόκριση των κυττάρων σ' αυτή πιθανόν να

συμμετέχει και ο ίδιος ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός. Απουσία αυτού η μεθανόλη δεν μεταβολίζεται, αλλά απλώς συσσωρεύεται στα κύτταρα (εικ. 29). Το φως στην περίπτωση της C-2A', αφενός ενεργοποιεί τη σχηματοποίηση του φωτοσυνθετικού συστήματος κι αφετέρου επάγει το μεταβολισμό της μεθανόλης και κατ' επέκταση την αύξηση της βιομάζας.

Για να δοθεί μια σαφής απάντηση στη συμμετοχή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού επιχειρήθηκε η μελέτη της απόκρισης των κυττάρων παρουσία μεθανόλης, σε συνθήκες υψηλής έντασης φωτισμού απουσία όμως σχηματοποιημένου φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Για να επιτευχθεί μια τέτοια μελέτη χρησιμοποιήθηκαν και πάλι καλλιέργειες του μεταλλαγμένου στελέχους C-2A' του *Scenedesmus obliquus*, στις οποίες όμως χορηγήθηκε 10mM λεβουλινικού οξέος (LA), το οποίο παρεμποδίζει τη βιοσύνθεση των χλωροφυλλών.

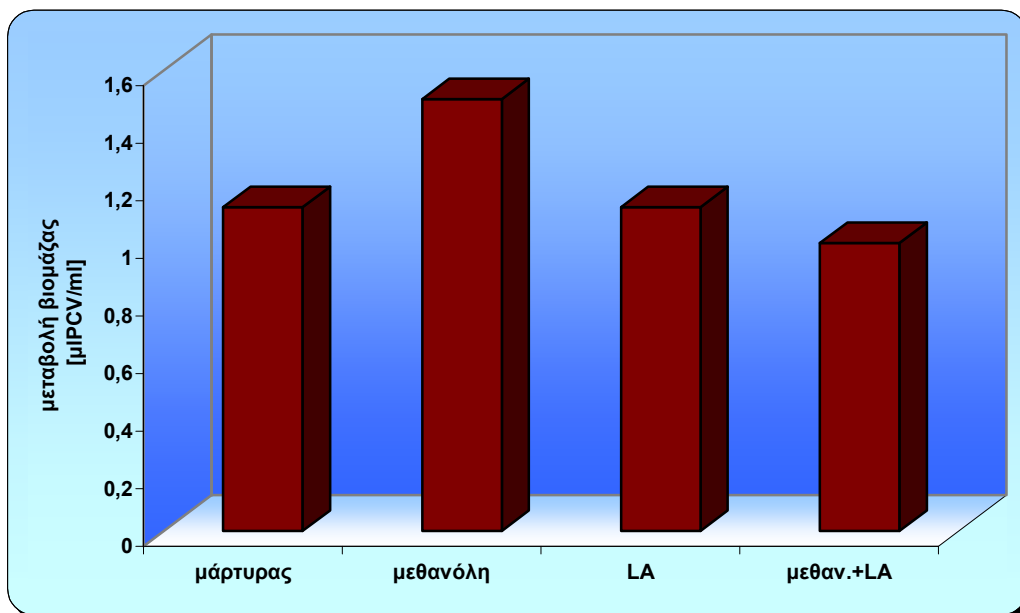
Το λεβουλινικό οξύ (LA) αποτελεί ανταγωνιστικό αναστολέα του αμινολεβουλινικού οξέος (ALA) και προσθήκη του στο θρεπτικό διάλυμα αναστέλλει τη βιοσύνθεσή της Chl στο επίπεδο του αμινολεβουλινικού. Το C-5 μονοπάτι βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης φαίνεται στην εικόνα 32. Το αμινολεβουλινικό οξύ (ALA) αποτελεί την πρόδρομη ένωση όλων των τετραπυρρολών. Η βιοσύνθεση της χλωροφύλλης, που είναι κι αυτή μια τετραπυρρόλλη, ξεκινά από το σχηματισμό του αμινολεβουλινικού οξέος.



**Εικόνα 32:** Μονοπάτι βιοσύνθεσης χλωροφυλλών

Με τη μεταχείριση αυτή επιβεβαιώνεται η συμμετοχή του φωτοσυνθετικού συστήματος στο μεταβολισμό της μεθανόλης παρουσία φωτός.

Σε αυτότροφες καλλιέργειες του C-2A' χορηγήθηκε λεβουλινικό οξύ (10 mM) στο σκοτάδι, καθώς και συνδυασμός μεθανόλης και λεβουλινικού οξέος. Έπειτα από αρχική παραμονή 6 ωρών στο σκοτάδι, οι καλλιέργειες εκτέθηκαν σε φως έντασης  $175 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ . Στόχος της μεταχείρισης αυτής ήταν η παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης και άρα η παρεμπόδιση του σχηματισμού ολοκληρωμένου φωτοσυνθετικού μηχανισμού και η διερεύνηση της επίδρασης της μεθανόλης στην αύξηση των κυττάρων. Μελετήθηκε η αύξηση στον αριθμό των κυττάρων (ως έκφραση του PCV) και διαπιστώθηκε πως εμφανίστηκε αρνητική ρύθμιση της αύξησης παρουσία της μεθανόλης (εικ. 33).



**Εικόνα 33:** Επίπεδα του PCV κατά τη δεύτερη ημέρα επώασης καλλιεργειών του C-2A' στις οποίες χορηγήθηκε μεθανόλη και λεβουλινικό οξύ. Μάρτυρας: αυτότροφη καλλιέργεια C-2A, μεθανόλη: +0,5%(v/v)μεθανόλη, LA: +10mM λεβουλινικό, μεθαν+LA: + μεθανόλη 0,5%(v/v) +λεβουλινικό 10mM.



Αυτό που φαίνεται καθαρά από την εικόνα 33 είναι το ότι η μεθανόλη ρυθμίζει αρνητικά την αύξηση των κυττάρων όταν ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός δεν υπάρχει. Συγκεκριμένα, η παρουσία μεθανόλης χωρίς ταυτόχρονη παρουσία φωτοσυνθετικού μηχανισμού (χαμηλά επίπεδα χλωροφυλλών, υψηλά τα αντίστοιχα του πρωτοχλωροφυλλιδίου) συνοδεύεται από ελάττωση του ρυθμού αύξησης κατά 33% σε σχέση με τη βιομάζα της καλλιέργειας με μεθανόλη αλλά χωρίς λεβουλινικό και κατά 12% σε σχέση με τον μάρτυρα (τη φυσιολογική αύξηση της βιομάζας).

Με τη μεταχείριση αυτή γίνεται σαφές πως ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός συμμετέχει στο μεταβολισμό της μεθανόλης, μια και δίχως την παρουσία του η μεθανόλη καθίσταται αρνητικός ρυθμιστής της αύξησης κι ενδεχομένως τοξικός παράγοντας.

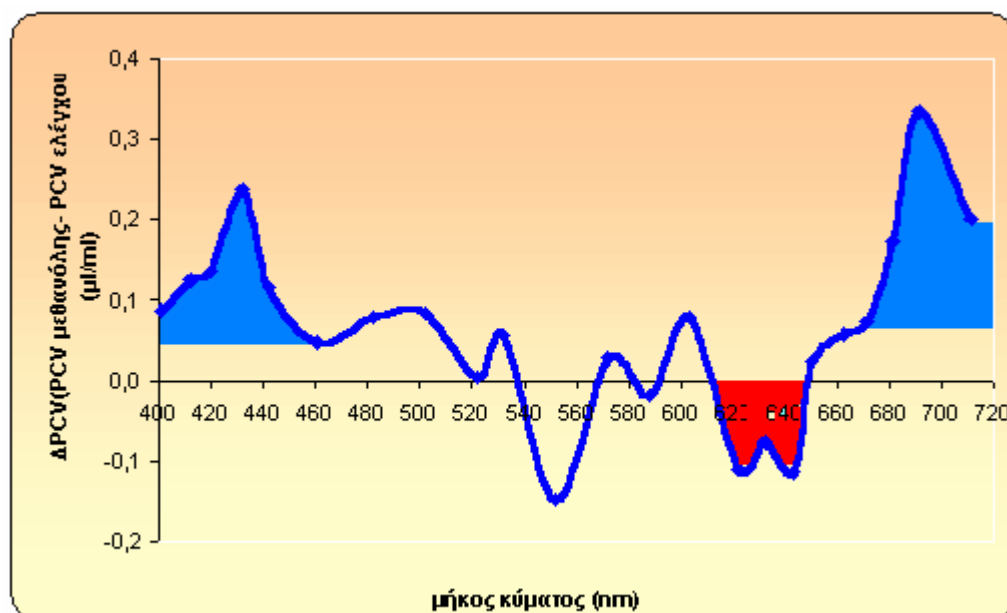
## **Εύρεση του πρωτογενούς φωτοϋποδοχέα του μεταβολισμού της μεθανόλης. Φάσμα δράσης.**

Πλέον έχει επιβεβαιωθεί η συμμετοχή του φωτός αλλά και του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στο μονοπάτι του μεταβολισμού της μεθανόλης και η έρευνά μας συνεχίστηκε με την αναζήτηση του πρωτογενούς φωτοϋποδοχέα του μεταβολισμού της μεθανόλης. Η απάντηση στο ερώτημα του ποιος είναι ο πρωτογενής φωτοϋποδοχέας του μεταβολισμού αυτής της αλκοόλης δόθηκε με την δημιουργία φάσματος δράσης. Καλλιέργειες ελέγχου και καλλιέργειες στις οποίες χορηγήθηκε μεθανόλη 0,5% (v/v) υποβλήθηκαν σε μονοχρωματικές ακτινοβολίες από 400-720 nm και φωτονιακής ροής 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$  και καταγράφηκε η απόκρισή τους ως προς την αύξηση της βιομάζας έπειτα από 48 ώρες επώασης. Από τη διαφορά του PCV σε κάθε μήκος κύματος μεταξύ μεθανόλο- χειριζόμενων καλλιεργειών και καλλιεργειών

ελέγχου (PCV μεθανόλης- PCV μάρτυρα) ετοιμάστηκε το παρακάτω φάσμα δράσης (εικόνα 34).

Κρίνεται απαραίτητο στο σημείο αυτό να διευκρινιστεί πως οι χαμηλές απόλυτες τιμές του PCV που καταγράφηκαν, σε σύγκριση με τις έως τώρα μεταχειρίσεις μας, οφείλονται στις συνθήκες πραγματοποίησης του πειράματος. Η μέγιστη ένταση μονοχρωματικού φωτισμού που μπορεί να εφαρμοστεί σε μια τέτοια διαδικασία φάσματος δράσης με DIL και DAL φίλτρα ήταν μόλις  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ , ακτινοβολία που αντιστοιχεί σε χαμηλής έντασης φωτισμό. Έτσι εξηγείται το ότι η απόκριση ως προς την αύξηση της βιομάζας εκδηλώνεται, αλλά με λιγότερη ένταση (μικρότερη σχετικά αύξηση του PCV), χωρίς βεβαίως να αλλοιώνει την ποιότητα του φάσματος δράσης.

Μελετώντας το φάσμα δράσης της παρακάτω εικόνας 34 γίνεται δυνατή η εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τον πρωτογενή φωτοϋποδοχέα του μεταβολισμού της μεθανόλης. Τα μήκη κύματος στα οποία παρατηρείται η μεγαλύτερη διαφορά στη μεταβολή της βιομάζας παρουσία μεθανόλης, σε σύγκριση με τον μάρτυρα, είναι χαρακτηριστικά του φωτοϋποδοχέα αυτού.



**Εικόνα 34:** Φάσμα δράσης καλλιεργειών της μεταβολής στην αύξηση της βιομάζας παρουσία μεθανόλης σε αυτότροφες καλλιέργειες του *Scenedesmus obliquus*.

Όπως φαίνεται από το παραπάνω φάσμα δράσης έχουμε θετική απόκριση ως προς την αύξηση της βιομάζας γύρω στα 430 nm και στα 680 nm. Οι δυο αυτές κορυφές είναι χαρακτηριστικές του κέντρου αντιδράσεως (RC) του φωτοσυστήματος II (PSII- RC). Θα μπορούσαμε λοιπόν να συμπεράνουμε πως πρωτογενής φωτοϋποδοχέας της μεθανόλης είναι το PSII.

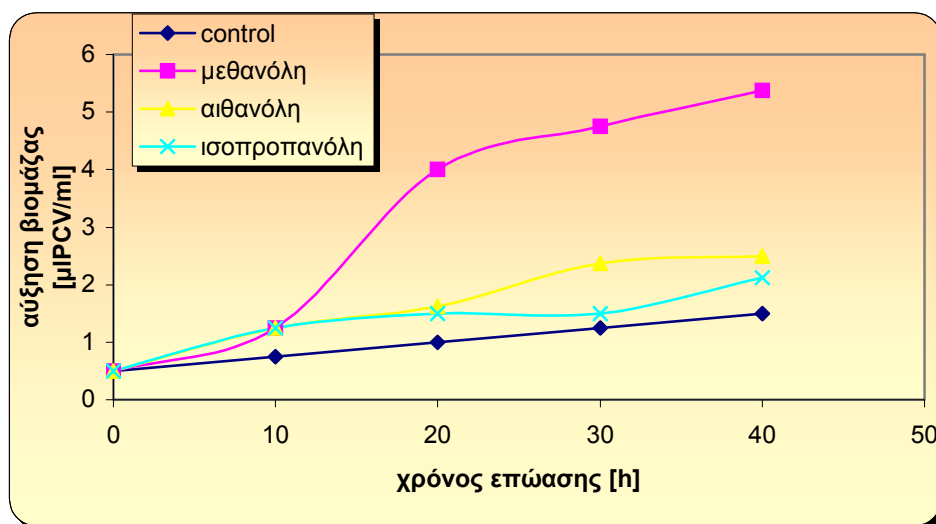
Παράλληλα στο φάσμα δράσης της εικόνας... παρατηρούμε αρνητική απόκριση στην αύξηση της βιομάζας στην περιοχή 610- 650 nm, περιοχές χαρακτηριστικές του πρωτοχλωροφυλλιδίου (*Pchl*ide). Μάλιστα οι δύο αρνητικές κορυφές είναι αντιπροσωπευτικές του ενεργού και ελεύθερου πρωτοχλωροφυλλιδίου. Θα λέγαμε λοιπόν πως το πρωτοχλωροφυλλίδιο ρυθμίζει αρνητικά το μεταβολισμό της μεθανόλης.

Τα αποτελέσματα του φάσματος δράσης βρίσκονται σε συμφωνία με τα μέχρι τώρα αποτελέσματα. Το πρωτοχλωροφυλλίδιο που ρυθμίζει αρνητικά το μεταβολισμό της μεθανόλης συσσωρεύεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο σκοτάδι ενώ με την έκθεση του φυτικού οργανισμού στο φως φωτομετατρέπεται και σχεδόν ταυτόχρονα εμφανίζεται ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός και φυσικά και το κέντρο αντίδρασης του PSII (PSII- RC). Μια επιπλέον επιβεβαίωση ότι ο πρωτογενής φωτοϋποδοχέας για το φωτομεταβολισμό της μεθανόλης είναι το κέντρο αντίδρασης του φωτοσυστήματος II, είναι η μείωση της αύξησης της βιομάζας από τη μεθανόλη, όταν παρεμποδιστεί ο σχηματισμός του φωτοσυνθετικού μηχανισμού με χορήγηση λεβουλινικού οξέος (βλ. παραπάνω).

## Συγκριτική μελέτη μεταβολισμού άλλων οργανικών αλκοολών

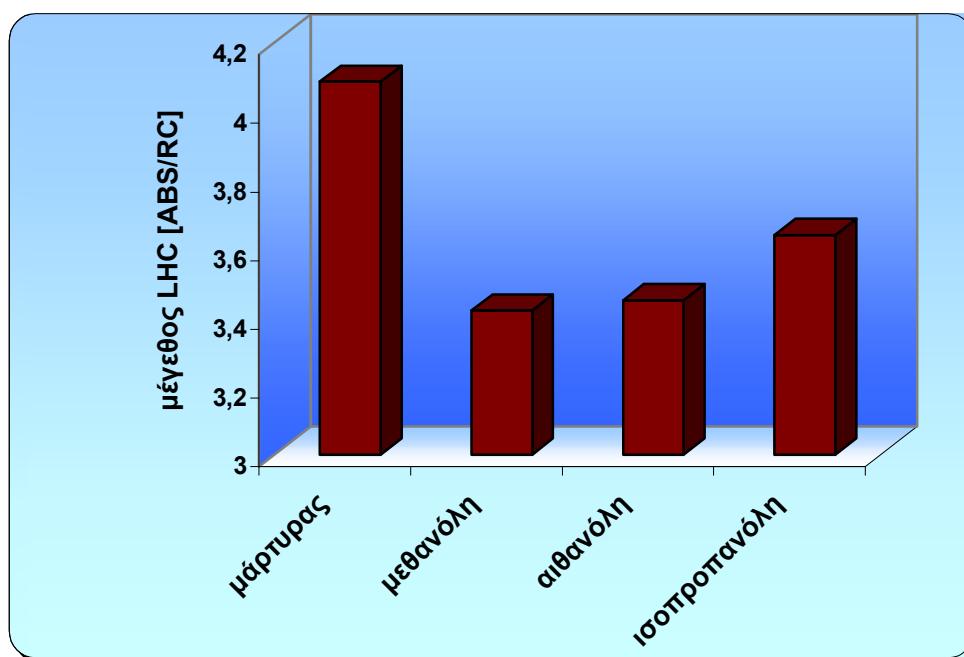
Τελευταίο κομμάτι της έρευνάς μας ήταν η μελέτη της επίδρασης άλλων απλών αλκοολών στην μεταβολή της βιομάζας του ευκαρυωτικού χλωροφύκου *Scenedesmus obliquus*.

Χορηγήθηκαν ίσες συγκεντρώσεις μεθανόλης, αιθανόλης και ισοπροπανόλης με αρχική συγκέντρωση αλκοολών =0,123M, όση δηλαδή η συγκέντρωση της μεθανόλης που αντιστοιχεί στο 0,5% v/v που χρησιμοποιήσαμε σε όλες τις προηγούμενες μεταχειρίσεις μας, σε καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν σε αυτότροφες συνθήκες, με υψηλής έντασης φωτισμό ( $175\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ ). Αυτό που επιχειρήθηκε ήταν μια πρώτη προσέγγιση της απόκρισης των κυττάρων και σε μεγαλύτερα μόρια οργανικών αλκοολών. Στις παρακάτω εικόνες 35 και 36 δίνεται η μεταβολή της βιομάζας καθώς και η μεταβολή στο μέγεθος του LHC (ABS/RC) αντίστοιχα.



**Εικόνα 35:** μεταβολή του PCV σε καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν με 0,123M μεθανόλης, αιθανόλης, ισοπροπανόλης αντίστοιχα καθώς και της καλλιέργειας

ελέγχου (χωρίς αλκοόλη). Η επώαση των καλλιιεργειών έγινε σε αυτότροφες συνθήκες και σε υψηλή ένταση φωτισμού.



**Εικόνα 36:** Εκτίμηση του μεγέθους του LHC (ABS/RC) την 6<sup>η</sup> ώρα επώασης σε καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν με 0,123M μεθανόλης, αιθανόλης, ισοπροπανόλης και της καλλιέργειας ελέγχου (χωρίς αλκοόλη). Η επώαση των καλλιιεργειών έγινε σε αυτότροφες συνθήκες και σε υψηλή ένταση φωτισμού ( $175\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ )

Αυτό που διαπιστώνουμε παρατηρώντας τις εικόνες 35 και 36 είναι πως και παρουσία μεγαλύτερων αλκοολών εκδηλώνεται θετική απόκριση ως προς την αύξηση της βιομάζας. Η ποσοστιαία αύξηση της βιομάζας είναι ωστόσο τόσο μικρότερη όσο περισσότερα άτομα άνθρακα περιέχει η αλκοόλη. Σε συμφωνία έρχονται και οι μετρήσεις του μεγέθους της

φωτοσυνθετικής κεραίας (LHC). Τα κύτταρα αποκρινόμενα στην αλκοόλη μικραίνουν το μέγεθος του LHC και μάλιστα όσο μικρότερη είναι η απόκριση ως προς την αύξηση της βιομάζας τόσο μικρότερη είναι και η μείωση του LHC.

Συμπερασματικά θα λέγαμε πως τα κύτταρα διαθέτουν το μηχανισμό φωτομεταβολισμού κι άλλων αλκοολών εκτός από τη μεθανόλη, ενδεχομένως μέσω του ίδιου βιοχημικού μονοπατιού.

Η έρευνα γύρω από το μεταβολισμό αυτών των αλκοολών βρίσκεται σε εξέλιξη και στόχος είναι η διερεύνηση των μηχανισμών και των μοριακών και βιοχημικών αλλαγών που εμπλέκονται σ' αυτούς. Απ' όλα τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας διαφαίνονται ξεκάθαρα οι άμεσες βιοτεχνολογικές εφαρμογές που μπορούν να δρομολογηθούν χρησιμοποιώντας κλασσικές καλλιέργειες ανώτερων φυτών αλλά και καλλιέργειες φυτοπλαγκτονικών οργανισμών.

## 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κάνοντας μια συνολική αποτίμηση των αποτελεσμάτων της εργασίας αυτής θα μπορούσαμε να αναφέρουμε συνοπτικά τα συμπεράσματα που εξήχθησαν:

- Η μεθανόλη αφομοιώνεται και μεταβολίζεται από τα φυτικά κύτταρα που μελετήσαμε και χορήγησή της σε κατάλληλη συγκέντρωση (ως προς τη συγκέντρωση της κυτταροκαλλιέργειας) είναι δυνατό να προκαλέσει εντυπωσιακή αύξηση της βιομάζας.
- Η διαδικασία της αφομοίωσης/ μεταβολισμού της μεθανόλης είναι μια φωτορυθμιζόμενη διαδικασία κι εξαρτάται άμεσα από την ένταση της προσπίπτουσας στα κύτταρα ακτινοβολίας. Μάλιστα, το βιοχημικό/ ενζυμικό μονοπάτι του μεταβολισμού της μεθανόλης ενεργοποιείται από το φως και ελέγχεται από την ενδοκυττάρια συγκέντρωση της μεθανόλης.
- Στη διαδικασία του μεταβολισμού της μεθανόλης συμμετέχει και ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός. Άμεση απόκριση του φωτοσυνθετικού συστήματος στη μεθανόλη είναι η μείωση του επιπέδου της φωτοσυλλεκτικής κεραίας (LHC) που επιφέρει αύξηση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας κι ως εκ τούτου αύξηση της βιομάζας.
- Ο φωτομεταβολισμός της μεθανόλης πιθανότατα καταλήγει στο CO<sub>2</sub>. Αύξηση της συγκέντρωσης του CO<sub>2</sub> επιφέρει τις ίδιες αλλαγές στον φωτοσυνθετικό μηχανισμό και στην αύξηση βιομάζας με αυτές που επιφέρει η μεθανόλη.
- Περιοριστικός παράγοντας της επίδρασης της μεθανόλης στη ραγδαία αύξηση της βιομάζας μέσω της διαφοροποίησης του φωτοσυνθετικού μηχανισμού είναι το φαινόμενο της φωτοπροσαρμογής.
- Το κέντρο αντίδρασης του φωτοσυστήματος II (PSII- RC) αποτελεί πιθανότατα τον πρωτογενή φωτοϋποδοχέα του μεταβολισμού της μεθανόλης.

- Το βιοχημικό μονοπάτι του μεταβολισμού της μεθανόλης δεν είναι εξειδικευμένο, αλλά μέσω αυτού μπορούν να μεταβολιστούν και άλλες απλές αλκοόλες (αιθανόλη, ισοπροπανόλη).
- Ο μεταβολισμός των μορίων αυτών επάγει επίσης την αύξηση της βιομάζας αλλά σε μικρότερη ένταση από την αντίστοιχη επαγωγή που προκαλεί η μεθανόλη.
- Η απόκριση του φωτοσυνθετικού συστήματος στο μεταβολισμό των εν λόγω αλκοολών είναι αντίστοιχη με αυτή της μεθανόλης (μείωση επιπέδου LHC).



1. Bishop N.I., Senger H. - Preparations and photosynthetic properties of synchronous cultures of *Scenedesmus*. In *Methods in enzymology*, Vol. 23, part A. (San Pietro, A., ed.), pp.53-66. Acad. Press. N.Y. (1971).
2. Bradford, M.M (1979)*Anal.Biochem* v 72, pp. 248- 254
3. Brinkmann G., Senger H. - Is there a regulatory effect of red light during greening of *Scenedesmus* mutant C-2A? In *Photoreceptors and plant development* pp.209-218. Univ. Press, Antwerp, Belgium.
4. Brouers M., Michael-Wolwertz M.R. - Estimation of protochlorophyll(ide) contents in plant extracts; re-evaluation of the molar absorption coefficient of protochlorophyll(ide). *Photos. Res.* 4: 265-270 (1983).
5. Chen L (1997) Distribution of folate derivatives and enzymes for synthesis of 10- formyltetra-hydrofolate in cytosolic and mitochondrial fractions of pea leaves *Plant Physiol.* v115, pp 299-309
6. Colas C. et al. - Identification of a major soluble protein in mitochondria from nonphotosynthetic tissues as NAD-dependent formate dehydrogenase. *Plant physiology*, v. 102, pp. 1171-1177 (1993).
7. Corpe W. - A method for detecting methylotrophic bacteria on solid surfaces. *J. Microbiol. Methods*, v. 3, pp. 215 - 221 (1985).
8. Cossins R. - The utilisation of carbon-1 compounds by plants. The metabolism of methanol - C<sup>14</sup> and its role in amino acid biosynthesis. *Can. J. Biochem.* v.44 pp.1739-1802 (1964).
9. Devlin R., Bhomik et al. - Influence of methanol on plant germination and growth. *Plant Growth Soc.Amer.Quart.*, v. 22, pp. 102-108 (1994).

10. Doman N. Romanova A. - Transformations of labeled formic acid, formaldehyde, methanol, and carbon dioxide by bean and barley leaves from air. *Plant physiology*, v. 37, pp. 833-840 (1962).
11. Gout E, (2000) Metabolism of methanol in plant cells, Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Studies *Plant Physiol.* v 123, pp287-296
12. Hartz T., Mayberry K., McGiffen M. - Foliar methanol application ineffective in tomato and melon. *Hort Science*, v. 22 pp.1087 (1994).
13. Hemming D., Criddle R. - Effects of methanol on plant respiration. *J. Plant Physiology*, v. 146 pp. 193-198 (1995).
14. Holden M. - Chlorophylls. In T.W. Goodwin (ed.), *Chemistry and Biochemistry of plant pigments*. Academic Press, London, 1965, pp. 461-483.
15. Jarvis M.C. - Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant Cell Environ.* V. 7, pp. 153-164 (1984).
16. Kotzabasis K, Hatzathanasiou A, Bengoa-Ruigomez, Kenturi M. Divanach P – Methanol as an alternative source for quicker efficient production of the microalgae *Chlorella minutissima*: Role of the concentration and frequency of administration. *Journal of Biotechnology* v. 70, pp.357-362.
17. Levy S., Staehein L. - Synthesis, assembly and function of plant wall macromolecules. *Cell Biology*, v. 4, pp. 855-862 (1992).
18. Li y., Gupta j. -Effect of methanol on soybean photosynthesis and chlorophyll. *Journal of plant nutrition*, 18(9), 1875-1880 (1995).
19. MacKensie R. - Biogenesis and interconversion of substituted tetrahydrofolates, *Chemistry and Biochemistry of Foliates*, v. 1, pp. 255-305 (1984).
20. McGiffen M., Mantley J. - The role of methanol in promoting plant growth: A current evaluation. *Hort Science*.v.31(7), pp.1092-1096 (1995).

21. Mudgett M., Clarke S. - Characterization of plant L-isoaspartyl methyltransferases that may be involved in seed survival: purification, cloning and sequence analysis of the germ enzyme, *Biochemistry*, v.32, pp. 11100-11111 (1993).
22. Neuburger M, Rebeille F (1996) Mitochondria are a major site for folate and thymidilate synthesis in plants. *J. Biol. Chem* v 271 pp 9466- 9472
23. Nonomura A., Benson A. - The path of carbon in photosynthesis: Improved crop yields with methanol. *Proc.Nat.Acad.Science*, v.89, pp. 9794-0798 (1992a).
24. Nonomura A., Benson A. - The path of carbon in photosynthesis: Methanol and light. *Research in photosynthesis*, pp. 911-914 (1992b).
25. O'Neil M., Albersheim P., Darvill A. - The pectic polysaccharides of primary cell walls. *Methods in Plant Biochemistry*, v. 2, pp. 415-441 (1990).
26. Qualley J.R. - Microbial assimilation of C<sub>1</sub> compounds. *Biochem.Soc.Trans.*, v. 8, pp. 1-10 (1980).
27. Rave J.A (1994) Carbon fixation and carbon availability in marine phytoplankton. *Photosynth. Res*, v 39, pp 259- 273
28. Rebeille F., Neuburger M. - Interaction between glycine decarboxylase, serine hydroxymethyltransferase and tetrahydrofolate polyglutamates in pea leaf mitochondria. *Biochem. J.*, v. 302, pp. 223-228 (1994).
29. Senger H and Fleischacker P.(1977) Adaptation of the photosynthetic apparatus of *Scenedesmus obliquus* to strong and weak light conditions. *Physiol.Plant.* v 43, pp 35- 42
30. Smith, TA(1985) *Ann.Rev. Plant Physiology*, v 36, pp 117-143
31. Snider J., Dawson G. - Tropospheric light, alcohols, carbonyls and acetonitrile: concentrations in the south western United States and Henry's law data. *J. Geophys. Res.* V, 90, pp. 3797-3805 (1985).

32. Strasser B., Strasser R. - From light to biosphere. *Photosynthesis*, v. 5, pp. 977-980, (1995).
33. Suzuki K (1998) Formate dehydrogenase, an enzyme of anaerobic metabolism, is induced by iron deficiency in barley roots. *Plant Physiol.* V 116, pp 725- 732

