ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΩΝ ΑΠΟ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ-ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΒΑΛΣΑΜΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΓΑΝΩΤΑΚΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2019

UNIVERSITY OF CRETE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

LABORATORY OF BIOCHEMISTRY

DOCTORAL THESIS

PRODUCTION OF TERPENOIDS BY PHOTOSYNTHETIC MICROORGANISMS

ELEFTHERIA-ANGELIKI VALSAMI

THESIS SUPERVISOR: DEMETRIOS GHANOTAKIS

HERAKLION 2019

Η διδακτορική διατριβή συγχρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Πρόγραμμα Χορήγησης Υποτροφιών για Μεταπτυχιακές Σπουδές Δευτέρου Κύκλου Σπουδών» (MIS-5003404), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).

Στην οικογένειά μου.

Εξεταστική Επιτροπή (αλφαβητικά)

Δημήτριος Γανωτάκης

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης (Επιβλέπων)

Χαράλαμπος Κατερινόπουλος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Κυριάκος Κοτζαμπάσης

Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Αναστάσιος Μελής

Καθηγητής Department of Plant and Microbial Biology UC Berkeley

Ιωάννης Παυλίδης

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Ιουλία Σμόνου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Γεώργιος Τσιώτης

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΞΕΤΑΣΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή της Διδακτορικής Διατριβής της κας. Βαλσαμή Ελευθερίας-Αγγελικής, η οποία ορίσθηκε στην από 17/05/2019 συνεδρία της Συνέλευσης Τμήματος, συνεδρίασε σήμερα Τετάρτη **11 Σεπτεμβρίου 2019** να εξετάσει τη διατριβή της υποψήφιας με τίτλο:

«Παραγωγή Τερπενοειδών από Φωτοσυνθετικούς Μικροοργανισμούς»

Τα παρόντα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής εκφράζουν ομόφωνα την πλήρη ικανοποίησή τους για την υψηλή ποιότητα του περιεχομένου και της υποστήριξης της Διατριβής.

Τα Ερευνητικά αποτελέσματα της εργασίας της κας. Βαλσαμή Ελευθερίας-Αγγελικής είναι σημαντικά, πρωτότυπα και διευρύνουν το πεδίο της έρευνας στον Τομέα Βιοχημείας.

Ως εκ τούτου η Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή προτείνει ομόφωνα την απονομή του Διδακτορικού Διπλώματος στην κυρία Βαλσαμή Ελευθερία-Αγγελική.

Τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής για την Αξιολόγηση της Διδακτορικής Διατριβής της κυρίας Βαλσαμή Ελευθερίας-Αγγελικής:

1. **Γανωτάκης Δημήτριος (Επιβλέπων)**
   Καθηγητής
   Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης
2. **Τσιώτης Γεώργιος**
   Καθηγητής
   Τμήματος Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης
3. **Κοτζαμπάσης Κυριάκος**
   Καθηγητής
   Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης
4. **Κατερινόπουλος Χαράλαμπος**
   Καθηγητής
   Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης
5. **Μελής Αναστάσιος**
   Καθηγητής
   Department of Plant and Microbial Biology UC Berkeley
6. **Παυλίδης Ιωάννης**
   Επίκουρος Καθηγητής
   Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης
7. **Σμόνου Ιουλία**
   Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
   Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΑΚΡΙΒΕΣ ΑΝΤΙΓΡΑΦΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
16/9/2019
ΑΝΝΑ ΠΑΝΤΕΛΙΔΑΚΗ

Τ.Θ.2208, Τ.Κ.71003 Βούτες,
Ηράκλειο, Κρήτη
Tel. +30 2810 545131, 545132, 545133, 545134, 545135, 545136

P.O. BOX 2208, 71003 Voutes,
Heraklion, Crete, Greece
Fax: +30 2810 545166, 545167

e-mail: pantelidaki@chemistry.uoc.gr, nbouranta@chemistry.uoc.gr, tsolis@uoc.gr

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Φτάνοντας στο τέλος της συγγραφής της παρούσας διδακτορικής διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα τους ανθρώπους με τους οποίους είχα την τύχη να συνεργαστώ όλα αυτά τα χρόνια και συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για τις υψηλού επιπέδου σπουδές που μου προσέφερε τόσο σε προπτυχιακό αλλά και σε μεταπτυχιακό επίπεδο καθώς και για την υλικοτεχνική υποδομή που μου παρείχε για να μπορέσω να φέρω εις πέρας την παρούσα Διδακτορική Διατριβή. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.) για την υποτροφία που μου παρείχε, η οποία συγχρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Πρόγραμμα Χορήγησης Υποτροφιών για Μεταπτυχιακές Σπουδές Δευτέρου Κύκλου Σπουδών» (MIS-5003404), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).

Τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου θα ήθελα να αποδώσω στον επιβλέποντα Καθηγητή μου Δημήτριο Γανωτάκη ο οποίος μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με την έρευνα από το 2011. Μου επέτρεψε να εργαστώ στο εργαστήριο του αρχικά για την εκπόνηση της διπλωματικής μου εργασίας, έπειτα για τη μεταπτυχιακή εργασία αλλά και για την παρούσα διδακτορική διατριβή. Μέσα από τη δικιά του μεγάλη εμπειρία στο πεδίο της φωτοσύνθεσης και τα θέματα που μου ανέθεσε με έκανε να αγαπήσω και εγώ το πεδίο αυτό. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια και για την ευκαιρία που μου έδωσε να επισκεφτώ το University of California, Berkeley, όπου και πραγματοποίησα μέρος των πειραμάτων μου. Είναι ο άνθρωπος που με έκανε να μη φοβηθώ να φύγω, και να το δω ως μία εμπειρία ζωής, αλλά και επιστρέφοντας με εμπιστεύτηκε ώστε να ξεκινήσουμε ένα τελείως καινούριο και αρκετά απαιτητικό και ακριβό θέμα σε μία δύσκολη περίοδο. Μου στάθηκε ως επιστήμονας αλλά και ως άνθρωπος και ήταν ανά πάσα στιγμή διαθέσιμος να προσφέρει τις συμβουλές και τη βοήθειά του σε δύσκολες και πιεστικές στιγμές. Η συνεχής υποστήριξη και καθοδήγηση του όλα αυτά τα χρόνια της συνεργασίας μας ήταν πολύτιμη και καθοριστική για την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής. Για όλα τα παραπάνω και για πολλά ακόμα που δεν είναι εύκολα να περιγράψει κανείς με λόγια τον ευχαριστώ ειλικρινά.

Τις θερμότερες ευχαριστίες μου θα ήθελα να αποδώσω στον Καθηγητή Αναστάσιο Μελή τον οποίο θεωρώ, αλλά και μου στάθηκε, μαζί με τον κύριο Γανωτάκη, σαν δεύτερος

επιβλέποντας καθηγητής μου. Τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για τη μεγάλη ευκαιρία που μου έδωσε να επισκεφτώ το εργαστήριο του στο University of California, Berkeley ως επισκέπτρια ερευνήτρια με υποτροφία. Από την πρώτη στιγμή με βοήθησε να προσαρμοστώ τόσο μέσα όσο και έξω από το εργαστήριο. Μου έδωσε την ευκαιρία να δουλέψω με ένα αρκετά ενδιαφέρον και επίκαιρο θέμα, επιτρέποντας μου μάλιστα να το συνεχίσω και στο εργαστήρια μας στην Κρήτη. Οι γνώσεις και οι εμπειρίες που απέκτησα κατά τους έξι μήνες παραμονής μου εκεί ήταν απαραίτητες και καθοριστικές για τη μετέπειτα πορεία της διδακτορικής μου διατριβής, αλλά και της εξέλιξης μου ως επιστήμονα και άνθρωπο. Μου έδωσε τη δυνατότητα να μάθω ένα αντικείμενο που μέχρι τότε ήταν άγνωστο σε μένα. Οι συνεχείς συμβουλές, υποδείξεις και η καθοδήγηση του καθώς η υλική βοήθεια, στα πρώτα στάδια της έρευνας μου αλλά ακόμα και μετά την επιστροφή μου στην Κρήτη, σε συνδυασμό με την επίσκεψη του στο εργαστήριο μας στην Κρήτη, σε κομβικά σημεία της παρούσας διατριβής ήταν πραγματικά πολύτιμες και με βοήθησαν να αποκτήσω το απαραίτητο υπόβαθρο ώστε να φέρω εις πέρας ένα τόσο πολυδιάστατο και ενδιαφέρον θέμα. Τον ευχαριστώ πραγματικά για όλα.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής μου Επιτροπής, Καθηγητές Γεώργιο Τσιώτη και Κυριάκο Κοτζαμπάση, για την παρακολούθηση της προόδου μου και τις συμβουλές τους αυτά τα χρόνια. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Γεώργιο Τσιώτη γιατί οι συμβουλές και η βοήθεια του σε περάματα πρωτεϊνικής ανάλυσης ήταν πραγματικά πολύ σημαντικές και καθοριστικές. Ήταν πάντα πρόθυμος να συζητήσουμε και να δώσει λύσεις σε κάθε δυσκολία που συναντούσα. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω ιδιαίτερα, για την ανάλυση των πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας που έκανε ο ίδιος στο Max Planck Institute for Biophysics (Frankfurt, Germany). Ευχαριστώ επίσης τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς μου Επιτροπής, Καθηγητή Χαράλαμπο Κατερινόπουλο, Επίκουρο Καθηγητή Ιωάννη Παυλίδη και Αναπληρώτρια καθηγήτρια Ιουλία Σμόνου οι οποίοι δέχτηκαν να διαβάσουν και να κρίνουν την παρούσα διατριβή. Με τις παρατηρήσεις τους αλλά και τις διορθώσεις που πρότειναν βοήθησαν σε σημαντικό βαθμό στη διαμόρφωση του τελικού κειμένου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επίκουρο Καθηγητή Ιωάννη Παυλίδη για όλο το χρόνο που αφιέρωσε και τη βοήθεια που μου προσέφερε στα πειράματα μοριακής βιολογίας. Με τις συμβουλές, τις παρατηρήσεις και τις προτάσεις του, μου έδωσε λύσεις όσες φορές έφτασα σε αδιέξοδο. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον Καθηγητή Χαράλαμπο Κατερινόπουλο για την παροχή κάποιων αντιδραστηρίων.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ. Μαρία Αποστολάκη για όλη τη βοήθεια που μου προσέφερε σε ότι είχε να κάνει με τα πειράματα GC-MS. Ο χρόνος που αφιέρωσε και η συνολική βοήθεια της ήταν πραγματικά πολύτιμα για την πορεία της παρούσας διατριβής. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον αναπληρωτή καθηγητή Απόστολο Σπύρο για την ανάλυση και ποσοτικοποίηση προτύπων τερπενοειδών με NMR. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Πόπη Καβελάκη και την κυρία Μαρία Φουσκάκη για τη βοήθεια τους. Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τον κύριο Στέφανο Παπαδάκη από το εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας "Βασίλης Γαλανόπουλος" για όλη τη βοήθεια κατά την προετοιμασία αλλά και παρατήρηση των δειγμάτων με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης. Θα ήθελα επιπλέον να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Ραφαέλα Παντελέρη από το εργαστήριο του Αναπληρωτή Καθηγητή Ιωάννη Βόντα για την παροχή δεκτικών κυττάρων *E. Coli*.

Θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στα μέλη του εργαστηρίου που πέρα από πολύ καλοί συνεργάτες είναι και πολύ καλοί φίλοι. Αρχικά οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους Διδάκτορες Δημήτριο Στεφανάκη και Χάρη Νάζο για την άψογη συνεργασία και τη βοήθεια τους όλα αυτά τα χρόνια. Από τη στιγμή που ξεκίνησα τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο μέχρι και σήμερα, ακόμα και όταν δεν ήταν οι ίδιοι παρόντες στο εργαστήριο, ήταν πάντα πρόθυμοι να προσφέρουν τη βοήθεια τους και να μοιραστούν τις γνώσεις τους. Οι συμβουλές τους ήταν πολύτιμες σε περιόδους που τις χρειαζόμουν. Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τις Μαριλένα Ψυχογιυού, Θεοφανία Ανδρεαδάκη, Αγγελική Πατεράκη και Ελένη Χρυσουλάκη με τις οποίες είχα την ευχαρίστηση να συνεργαστώ προσωπικά και προσέφεραν πολύτιμη βοήθεια. Μαζί περάσαμε πολλές ώρες δουλειάς στο εργαστήριο, καλές και δύσκολες στιγμές, έχοντας πάντα άψογη συνεργασία και ευχάριστο κλίμα. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Γρηγόρη Γιακουμάκη, Μάνο Κοκαράκη, Ελένη Πολωνιατάκη, Ναπολέων Στρατηγάκη, Γιώργο Σφενδουράκη, Δώρα Σταυρινού, Σίμο Μαστρόκαλλο, Τένια Παπαβασιλείου και Κάλλια Γιανακουδάκη. Μαζί περάσαμε πολλές ώρες και εργαστήκαμε ως μία ενωμένη ομάδα, σε ένα ευχάριστο περιβάλλον, ακόμα και όταν υπήρχε πίεση. Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τα μέλη του εργαστηρίου του κυρίου Τσιώτη Ειρήνη Μαθιουδάκη, Κατερίνα Κουρπά, Κατερίνα Αρβανίτη, Αντιγόνη Νικολάκη, Αλέξανδρο Λύρα, Αθηνά Δρακωνάκη, Ανδρονίκη Σπανού, Ηλιάνα Καναβάκη και Μυρτώ Κουντάντου για την άψογη συνεργασία, σαν μία ομάδα, και το ευχάριστο κλίμα που διαμορφώσαμε αυτά τα χρόνια στον τομέα.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τα μέλη της ομάδας του κυρίου Μελή. Αρχικά την Δρ. Cinzia Formighieri η οποία κατασκεύασε και μου παρείχε το αρχικό στέλεχος και πλασμίδιο ώστε να ξεκινήσω να δουλεύω. Έπειτα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους Διδάκτορες Ευαγγελία Βαμβακά, Henning Kirst, Julie Chaves και Csanad Gurdon, οι οποίοι με αγκάλιασαν από την πρώτη στιγμή που βρέθηκα στο εργαστήριο τους και με βοήθησαν να προσαρμοστώ εύκολα, κάνοντας την παραμονή μου εκεί μία ευχάριστη ανάμνηση. Με τη βοήθεια και τις τεχνικές γνώσεις που μου παρείχαν με «μύησαν» σε ένα καινούριο ερευνητικό πεδίο, δίνοντας μου τα απαραίτητα εφόδια ώστε να ολοκληρώσω την παρούσα διατριβή στην Κρήτη.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου στο Ηράκλειο και στη Ρόδο που με στήριξαν όλα αυτά τα χρόνια τόσο στις εύκολες όσο και στις δύσκολες στιγμές.

Τέλος οφείλω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, στους γονείς μου Νίκο και Κατερίνα και στα αδέλφια μου Χριστίνα και Κυριάκο. Στάθηκαν δίπλα μου στη δύσκολη αυτή προσπάθεια, όλα αυτά τα χρόνια, με πολλή υπομονή, έχοντας ως προτεραιότητα τους να πετύχω τους στόχους μου. Παρέχοντας μου δύναμη, οικονομική και ηθική βοήθεια με παρότρυναν να κυνηγήσω και να πραγματοποιήσω τα όνειρά μου ακόμα και σε δύσκολες οικονομικά περιόδους. Χωρίς αυτούς δεν θα είχα καταφέρει τίποτα. Τους χρωστάω ένα μεγάλο ευχαριστώ.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ-ΑΓΓΕΛΙΚΗ ΒΑΛΣΑΜΗ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Ημερομηνία γέννησης:	14/06/1990
Διεύθυνση:	Ηράκλειο Κρήτης (Ελλάδα), 71304
Διεύθυνση ηλεκτρονικού ταχυδρομείου:	valsami.el@gmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

11/2014–Σήμερα: **Υποψήφια Διδάκτωρ Χημείας**

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

Τίτλος Διδακτορικής Διατριβής: Παραγωγή τερπενοειδών από φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς (Επιβλέπων: Δημήτριος Γανωτάκης)

10/2012–10/2014: **Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στη Χημεία (Κατεύθυνση: Βιοχημεία)**

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

Μέσος όρος μεταπτυχιακών μαθημάτων: Άριστα (9,08)

Τίτλος Διατριβής: "*Μελέτη των ενζύμων της πορείας των λιποξυγενασών σε χλωροπλάστες*" (Επιβλέπων: Δημήτριος Γανωτάκης)

09/2008–07/2014: **Πτυχίο Χημείας**

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

Βαθμός: Λίαν Καλώς (7,37)

Διπλωματική Εργασία: "Απομόνωση και χαρακτηρισμός των ανθοκυανινών που απομονώθηκαν από τον καρπό του *Sambucus nigra*." (Επιβλέπων: Δημήτριος Γανωτάκης)

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

11/2016–312/2016: **Ερευνητικός Συνεργάτης** στο Ερευνητικό Πρόγραμμα "Παραγωγή ισοπρενίου από φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς"

Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, Επιστημονικά υπεύθυνος: Καθ. Δημήτριος Γανωτάκης

03/2016–08/2016: **Επισκέπτρια Ερευνήτρια με χορήγηση υποτροφίας**

University of California, Berkeley, Berkeley (Ηνωμένες Πολιτείες)

Τμήμα: Plant and Microbial Biology. Υπεύθυνος καθηγητής: Αναστάσιος Μελής.

07/2011–09/2011: **Πρακτική Άσκηση**

Γενικό Χημείο Κράτους Ρόδου, Ρόδος (Ελλάδα)

Τίτλος: "Μικροβιολογικές αναλύσεις σε νερά δικτύου, εμφιαλωμένα νερά, νερά θαλασσών και γεωτρήσεων και αναλύσεις σε υγρά απόβλητα"

ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Μητρική γλώσσα: Ελληνικά

Αγγλικά: Certificate of Proficiency in English, University of Michigan (C2 Level)

Τεχνικές δεξιότητες: Καλλιέργειες βακτηρίων, μυκήτων, κυανοβακτηρίων και χλωροφυκών, φυγοκέντριση, φωτομετρία UV-Vis, τεχνικές χρωματογραφίας (HPLC, GC-MS,TLC), πολαρογραφία, κοινές τεχνικές κλωνοποίησης, σχεδιασμός εκκινητών για ανάλυση DNA με PCR, τεχνικές ηλεκτροφόρησης, προετοιμασία πρωτεϊνικών δειγμάτων για ανάλυση με MS (φασματομετρία μάζας MALDI TOF/TOF MS/MS), τεχνικές ακινητοποίησης μικροοργανισμών σε μήτρες πολυμερών, απομόνωση φυσικών προϊόντων από φυτικούς οργανισμούς, προσδιορισμός αντιμικροβιακών, αντιοξειδωτικών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων, προετοιμασία βιολογικών δειγμάτων για μελέτη οπτικής και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.

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

ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Υποτροφίες: Υπότροφος του Ιδρύματος Κρατικών Υποτροφιών σε πρόγραμμα που χρηματοδοτήθηκε από την Πράξη «Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών για μεταπτυχιακές σπουδές δεύτερου κύκλου σπουδών» από πόρους του ΕΠ «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του ΕΣΠΑ 2014-2020 (15/05/2017-04/05/2019).

Δημοσιεύσεις: Mavroudakis, L., **Valsami, E. A**., Grafanaki, S., Andreadaki, T. P., Ghanotakis, D. F., Pergantis, S. A., *The effect of nitrogen starvation on membrane lipids of Synechocystis sp. PCC 6803 investigated by using easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes, 2019. 1861(10): p. 183027.

Συνέδρια:

- 20ό Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Χημείας, Ηράκλειο Κρήτης, Ελλάδα, 25-27 Ιουνίου 2018. «Χρήση μεθόδων γενετικής μηχανικής για την παραγωγή τερπενοειδών από φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς» **Ε.Α. Βαλσαμή**, Μ.Ε. Ψυχογυιού, Α. Μελής και Δ.Φ. Γανωτάκης (Προφορική Παρουσίαση).

- 66th Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, American Society for Mass Spectrometry (ASMS), San Diego, CA, USA, 3/6 – 7/6/2018. ‘’Desorption easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry for lipidomic analysis of cyanobacteria and green algae during growth and stress conditions’’ Leonidas Mavroudakis, Theocharis Nazos, **Eleftheria-Angeliki Valsami,** Evangelia-Veatriki Sakellaraki, N. Lydakis-Simantiris, Demetrios F. Ghantoakis, Spyros A. Pergantis (Poster presentation by L. Mavroudakis).
- 5η Ημερίδα Χημείας στη μνήμη της Δρ Μαρίας Χατζημαρινάκη, Ηράκλειο, 2/11/2017 “Χρήση μεθόδων γενετικής μηχανικής για την παραγωγή φυσικών προϊόντων με βιομηχανική σημασία” (προφορική παρουσίαση)
- 19th Postgraduates' Conference on Chemistry, Heraklion, Crete, Greece, May 2-4, 2017. "Investigation of fatty acid hydroperoxide lyase localization and action in chloroplast membranes of *Spinachia oleracea* " **E.A. Valsami** and D. Ghanotakis (Oral Presentation)

Σεμινάρια:

- Επιμορφωτικό Σεμινάριο "Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας " (12/05/2011-19/05/2011).
- AQUASYN Workshop on Drinking and Bottled Water in Heraklion,Crete, Greece (24/09/2015).

Πιστοποιήσεις:

- Certificate of Scientific Writing Workshop, Department of Chemistry, School of Sciences and Engineering, University of Crete, Greece, Heraklion, Greece (2019)
- Πιστοποιητικό Οινολογικής Εκπαίδευσης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης (2012)

Συνδρομές: Μέλος της Ένωσης Ελλήνων Χημικών (ΕΕΧ)

CURRICULUM VITAE
ELEFTHERIA-ANGELIKI VALSAMI

Date of birth: 14/06/1990

Address: Heraklion, Crete, Greece, 71304

E-mail: valsami.el@gmail.com

EDUCATION AND TRAINING

11/2014–Today: **PhD Candidate**

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

Supervisor: Demetrios F. Ghanotakis

10/2012–10/2014: **Master of Science (MSc)**

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

General Postgraduate Program in Chemistry (Grade: 9.08 / 10)

Bachelor Thesis title: *'Study of the enzymes of lypoxygenase pathway in chloroplasts'*

Supervisor: Demetrios F. Ghanotakis

09/2008–07/2012: **Bachelor of Science (BSc) in Chemistry**

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

Grade: 7.37 / 10

Bachelor Thesis title: *'Isolation and characterization of anthocyanins extracted from sabucus nigra berries'*

Supervisor: Demetrios F. Ghanotakis

WORK AND RESEARCH EXPERIENCE

11/2016–12/2016: **Research Associate in the research program "Production of isoprene from photosynthetic microorganisms"**

University of Crete, Heraklion Crete (Greece)

Principal Investigator: Prof. Demetrios Ghanotakis

03/2016–08/2016: **Visiting Scholar Researcher**

Department of Plant and Microbial Biology, University of California, Berkeley (USA)

Supervisor: Anastasios Melis

07/2011–09/2011: **Internship**

General Chemical State Laboratory, Rhodes (Greece)

Title: 'Study on microbiological analyses in different types of water samples'

PERSONAL SKILLS

Mother Tongue: Greek

English: Certificate of Proficiency in English, University of Michigan (C2 Level)

Job-related skills: Culture methods for bacteria, fungi, cyanobacteria and microalgae, centrifugation, UV-Vis spectroscopy, chromatographic techniques (GC-MS, HPLC, TLC), polarography, common cloning techniques, design primers for PCR analysis, techniques of proteins and DNA electrophoresis (SDS-PAGE, IEF, Western blot, Agarose Gel Electrophoresis), preparation of protein samples for MS analysis (proteomics using MALDI TOF/TOF MS/MS mass spectometer), immobilization techniques, isolation and characterization of natural products from plants, antimicrobial and antioxidant properties of natural products, characterization of metabolites, preparation of biological samples for optical and electron microscopy studies.

Digital competence: Certification of competency in computer use, Department of Chemistry, University of Crete

ADDITIONAL INFORMATION

Scholarship: Scholar of a programme of State Scholarships Foundation (IKY)- founded by the European Union (European Social Fund - ESF) and Greek national funds through the action entitled "Scholarships programme for postgraduates studies -2nd Study Cycle" in the framework of the Operational Programme "Human Resources Development Program, Education and Lifelong Learning" of the National Strategic Reference Framework (NSRF) 2014 – 2020 (15/05/2017-04/05/2019).

Publication: Mavroudakis, L., **Valsami, E. A**., Grafanaki, S., Andreadaki, T. P., Ghanotakis, D. F., Pergantis, S. A., *The effect of nitrogen starvation on membrane lipids of Synechocystis sp. PCC 6803 investigated by using easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2019. 1861(10): p. 183027.

Conferences:

- 20th Postgraduates' Conference on Chemistry, Heraklion, Crete, Greece, June 25 – 27, 2018. «Production of terpenoids by photosynthetic microorganisms using genetic engineering methods» **E. A. Valsami**, M. E. Psychogyiou, A. Melis and D. F. Ghanotakis (oral presentation).
- 66th Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, American Society for Mass Spectrometry (ASMS), San Diego, CA, USA, 3/6 – 7/6/2018. ''Desorption easy ambient

sonic-spray ionization mass spectrometry for lipidomic analysis of cyanobacteria and green algae during growth and stress conditions" Leonidas Mavroudakis, Theocharis Nazos, **Eleftheria-Angeliki Valsami,** Evangelia-Veatriki Sakellaraki, N. Lydakis-Simantiris, Demetrios F. Ghantoakis, Spyros A. Pergantis (Poster presentation by L. Mavroudakis)

- 5th Seminar of the Chemistry Department in the memory of Dr. Maria Chatzimarinaki. November 2, 2017. Oral presentation entitled: "Use of genetic engineering methods for the production of natural products of industrial importance"
- 19th Postgraduates' Conference on Chemistry, Heraklion, Crete, Greece, May 2-4, 2017. "Investigation of fatty acid hydroperoxide lyase localization and action in chloroplast membranes of *Spinachia oleracea* " **E.A. Valsami** and D. Ghanotakis (Oral Presentation)

Seminars:

- Handling System of Quality (H.A.S.P. – I.S.O.) Heraklion, Crete, Greece (12/05/2011-19/05/2011)
- AQUASYN Workshop on Drinking and Bottled Water in Heraklion, Crete, Greece (24/09/2015)

Certifications:

- Certificate of Scientific Writing Workshop, Department of Chemistry, School of Sciences and Engineering, University of Crete, Greece, Heraklion, Greece (2019)
- Certificate of Oenology, Department of Chemistry, School of Sciences and Engineering, University of Crete, Heraklion, Greece (2012)

Memberships: Member of Association of Greek Chemists

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η ετερόλογη παραγωγή του μονοτερπενίου *β*-φελλανδρενίου από μεταλλαγμένα στελέχη του κυανοβακτηρίου *Synechocystis*. Το κυανοβακτήριο *Synechocystis* αποτελεί πρότυπο οργανισμό, ικανό να εφαρμόσει την προσέγγιση «καύσιμα από τη φωτοσύνθεση». Το γεγονός αυτό τον καθιστά μικροοργανισμό κατάλληλο για βιοτεχνολογική εκμετάλλευση και παραγωγή μεγάλου αριθμού προϊόντων, έχοντας ως πρώτες ύλες μόνο φως, νερό και διοξείδιο του άνθρακα.

Μέσω της γενετικής και μεταβολικής μηχανικής δημιουργήθηκαν μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis* τα οποία ήταν ικανά να παράγουν *β*-φελλανδρένιο όταν καλλιεργήθηκαν σε φωτοαυτότροφες συνθήκες σε ειδικούς βιοαντιδραστήρες. Η διαδικασία δεν επηρέασε την ανάπτυξη των κυττάρων και τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού τους μηχανισμού. Στο γονιδίωμα των στελεχών αυτών εισήχθησαν τα νέα οπερόνια με τα γονίδια σύντηξης του γονιδίου των βελτιστοποιημένων κωδικονίων της συνθάσης του *β*-φελλανδρενίου (*PHLS*) και του γονιδίου της συνθάσης του πυροφωσφορικού γερανυλίου (*GPPS*) με τις δύο κύριες υπομονάδες της φυκοκυανίνης (cpcB και cpcA) και εκφράστηκαν κάτω από τη δράση του ισχυρού *cpc* υποκινητή. Από τα αποτελέσματα προέκυψε πως η ετερόλογη έκφραση της συνθάσης του πυροφωσφορικού γερανυλίου (GPPS), ενισχύει την παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου. Αντίθετα η χρήση ενός ισχυρού υποκινητή (*cpc*), σε συνδυασμό με τη χρήση της cpcB υπομονάδας ως αλληλουχίας οδηγό της *PHLS* φάνηκε να μην επάγει την έκφραση της σε υψηλότερα επίπεδα, όταν απουσιάζουν γονίδια του cpc οπερονίου. Επιπλέον, παρόλο που η σύντηξη της *PHLS* με την cpcB υπομονάδα της φυκοκυανίνης οδήγησε σε επιτυχή παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου στα μεταλλαγμένα στελέχη, η συγχώνευση της με την υπομονάδα cpcA της φυκοκυανίνης οδήγησε σε παραγωγή μείγματος ισομερών τερπενοειδών (*δ*-3-καρένιο, καμφένιο και *α*-πινένιο).

Σε δεύτερη φάση διαφοροποιήθηκαν οι συνθήκες ανάπτυξης των μεταλλαγμένων στελεχών *Synechocystis*. Οι συνθήκες που δοκιμάστηκαν ήταν η καλλιέργεια των κυττάρων σε θρεπτικό μέσο με υψηλότερη αλκαλικότητα και αλατότητα σε σχέση με τις συνήθεις συνθήκες ανάπτυξης, όπως επίσης η υψηλότερη συγκέντρωση CO_2 και φωτονιακή ακτινοβολία. Από τα αποτελέσματα προέκυψε πως η ικανότητα των μεταλλαγμένων στελεχών να παράγουν *β*-φελλανδρένιο δεν παρεμποδίστηκε από την υψηλότερη αλκαλικότητα και αλατότητα του θρεπτικού μέσου. Τα συμπεράσματα αυτά αποτελούν σημαντικά ευρήματα για την περαιτέρω βιοτεχνολογική εκμετάλλευση μεταλλαγμένων στελεχών *Synechocystis* για την παραγωγή προϊόντων υψηλής εμπορικής αξίας. Ενδιαφέρον

εύρημα της διατριβής ήταν ότι στις συνθήκες που παρατηρήθηκε υψηλότερη παραγωγή κυτταρικής βιομάζας, δεν οδήγησε απαραίτητα σε αύξηση της παραγωγής του *β*-φελλανδρενίου.

Ακινητοποιημένα κύτταρα *Synechocystis* σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου ήταν σε θέση να παράγουν *β*-φελλανδρένιο σε σημαντικά μεγαλύτερες ποσότητες, συγκριτικά με τα ελεύθερα κύτταρα, παραμένοντας μεταβολικά ενεργά για το χρονικό διάστημα των δώδεκα ημερών που μελετήθηκε. Τα συστήματα αυτά δίνουν μία προοπτική για μελλοντική εφαρμογή τους σε μεγαλύτερης κλίμακας βιοαντιδραστήρες.

Βασικό συμπέρασμα της παρούσας διατριβής είναι πως μέσω της γενετικής και μεταβολικής μηχανικής, τα κυανοβακτήρια *Synechocystis* καθίστανται ικανά να παράγουν ένα προϊόν με υψηλή ζήτηση και κόστος στη βιομηχανία έχοντας ως πρώτες ύλες μόνο φως, νερό και διοξείδιο του άνθρακα. Το *β*-φελλανδρένιο αποτελεί απλά ένα παράδειγμα μονοτερπενίου και η ετερόλογη παραγωγή του ανοίγει νέες προοπτικές για την παραγωγή συγγενικών δομικά τερπενοειδών μορίων με πολλαπλές χρήσεις. Η ευελιξία των μικροοργανισμών αυτών να προσαρμόζονται στις εκάστοτε συνθήκες ανάπτυξης, χωρίς πολλές φορές να επηρεάζεται η ικανότητα τους να παράγουν *β*-φελλανδρένιο προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα όσον αφορά την εκμετάλλευση τους σε βιομηχανική κλίμακα. Οι προσεγγίσεις που παρουσιάστηκαν στην παρούσα διατριβή, αποτελούν ανανεώσιμες, φιλικές προς το περιβάλλον και οικονομικά βιώσιμες εναλλακτικές για τη μαζική παραγωγή οργανικών μορίων υψηλής βιομηχανικής αξίας.

Λέξεις κλειδιά: Κυανοβακτήρια, *Synechocystis*, φωτοσύνθεση, *cpc* οπερόνιο, πρωτεΐνες σύντηξης, συνθάση του φελλανδρενίου (PHLS), συνθάση του πυροφωσφορικού γερανυλίου (GPPS), *β*-φελλανδρένιο, βιοκαύσιμα, μεταβολική μηχανική, τερπενοειδή.

ABSTRACT

The main objective of this study was the heterologous production of the monoterpenoid *β*-phellandrene by *Synechocystis* transformants. The cyanobacterium *Synechocystis* is a model organism, in which the "photosynthesis to fuel" approach has been successfully applied. Thus, it is a suitable microorganism for biotechnological exploitation and production of a large number of products, by using only sunlight, water and carbon dioxide (CO_2) as raw materials.

Through genetic and metabolic engineering, *Synechocystis* transformants with the ability to produce *β*-phellandrene, when grown under photoautotrophic conditions without affecting their biomass production as well as photosynthetic activity, were generated. Various fusion constructs of the codon optimized gene of phellandrene synthase (*PHLS*) along with the gene of geranyl diphosphate synthase (*GPPS*) with the highly-expressed endogenous *cpcB* and *cpcA* genes, encoding the phycocyanin β-and α-subunits respectively, were constructed and incorporated into the genomic DNA of *Synechocystis*. These constructs were expressed under the native *cpc* operon promoter. Findings of this study indicate that the heterologous expression of GPPS, did enhance the production of *β*-phellandrene. However, the utilization of a strong promoter (*cpc*) in combination with the cpcB as a leader sequence seemed not to be sufficient for PHLS protein overexpression levels, when the rest of the *cpc* operon genes were not present. The cpcB.PHLS fusion protein leads to the heterologous production of *β*-phellandrene in *Synechocystis* transformants. On the contrary, the cpcA.PHLS fusion protein was found to lead to the heterologous production of a mixture of terpenoid isomers (*δ*-3-carene, camphene and *α*-pinene).

In the second part of this thesis, different growth conditions for *Synechocystis* transformants were examined. Conditions such as higher salinity, alkalinity, CO_2 concentration, and light intensity were tested. It was shown that higher alkalinity and salinity did not inhibit the ability of *Synechocystis* transformants to produce *β*-phellandrene. Thus, *Synechocystis* transformant under these conditions could be further exploited for the production of high commercial value products. Furthermore, throughout this study, it has been shown that increased biomass production did not necessarily lead to increased *β*-phellandrene production.

Immobilized *Synechocystis* transformants in calcium alginate beads were found to be able to produce *β*-phellandrene in significantly larger quantities, compared to free cells,

remaining metabolically active for a period of twelve days. These systems provide a renewable perspective for their future application in larger scale bioreactors.

The main conclusion of this thesis is that through genetic and metabolic engineering, *Synechocystis* are capable of heterologous production of a product with high demand and cost in industry by using light, water and CO_2. Heterologous *β*-phellandrene production is just an example that opens new ways for the production of other similarly structured terpenoids with multiple application. The flexibility of these microorganisms to adapt to various growth conditions without affecting their ability to produce *β*-phellandrene, offers many advantages in their exploitation on an industrial scale to produce such products. The approaches presented in this thesis are renewable, environmentally friendly and economically viable alternatives for the mass production of organic molecules of high industrial value.

Keywords: Cyanobacteria, *Synechocystis*, photosynthesis, *cpc* operon, fusion proteins, phellandrene synthase (PHLS), geranyl diphosphate synthase (GPPS), *β*-phellandrene, biofuels, metabolic engineering, terpenoids.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ **35**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ **37**

1.1 Γενικοί προβληματισμοί 38

1.2 Επισκόπηση φωτοσύνθεσης στα κυανοβακτήρια 38

1.3 Φωτοσυνθετικές χρωστικές 42

1.4 Φυκοχολοσώματα 44

1.5 Κυανοβακτήρια 46

1.6 Κυανοβακτήριο *Synechocystis* sp. PCC 6803 48

1.7 Μεταλλαγμένα στελέχη με περικομμένη κεραία συλλογής φωτός 48

1.8 Τερπενοειδή 50

1.9 Βιοσύνθεση τερπενοειδών 52

1.10 Παραγωγή τερπενοειδών από κυανοβακτήρια 55

1.11 Ετερόλογη παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου από το κυανοβακτήριο *Synechocystis* .. 59

1.12 Βελτιστοποίηση κωδικονίων (Codon optimization) 64

1.14 Μετασχηματισμός βακτηρίων 65

Σκοπός της διατριβής 66

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΛΟΓΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ *β*-ΦΕΛΛΑΝΔΡΕΝΙΟΥ ΑΠΟ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ *SYNECHOCYSTIS* .. **67**

2.1 Εισαγωγή 69

2.2 Σκοπός 72

2.3 Πειραματικό μέρος 73

2.3.1 Φορείς κλωνοποίησης *73*

2.3.2 Στελέχη *75*

Στην Εικόνα 2.3 παρουσιάζονται τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή. *75*

2.3.3 Συνθήκες ανάπτυξης *76*

2.3.4 Παρασκευή χημειοδεκτικών βακτηριακών κυττάρων *79*

2.3.5 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων E. Coli με πλασμιδιακό DNA *80*

2.3.6 Απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα Synechocystis *81*

2.3.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) *81*

2.3.8 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης *85*

2.3.9 Κατασκευή φορέων κλωνοποίησης *85*

2.3.10 Μετασχηματισμός κυανοβακτηρίων Synechocystis *89*

2.3.11 Λύση κυττάρων και απομόνωση πρωτεϊνών *90*

2.3.12 Ποσοτικός προσδιορισμός χλωροφύλλης-α *91*

2.3.13 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτική πηκτή ακρυλαμιδίου *91*

2.3.14 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών *92*

2.3.15 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας *94*

2.3.16 Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων-Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας στα 730 nm *94*

2.3.17 Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων-Προσδιορισμός ξηρή βιομάζας κυττάρων . *94*

2.3.18 Ποιοτική μελέτη του περιεχομένου των φωτοσυνθετικών χρωστικών *94*

2.3.19 Ποσοτικός προσδιορισμός του περιεχομένου των φωτοσυνθετικών χρωστικών .. *94*

2.3.20 Πολαρογραφικός προσδιορισμός ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου *95*

2.3.21 Παρασκευή καλλιεργειών για την παραγωγή β-φελλανδρενίου *95*

2.3.22 Ταυτοποίηση του παραγόμενου β-φελλανδρενίου με φασματομετρία απορρόφησης στο υπεριώδες *97*

2.3.23 Ταυτοποίηση του παραγόμενου β-φελλανδρενίου με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας *97*

2.3.24 Ποσοτικός προσδιορισμός του παραγόμενου β-φελλανδρενίου *98*

2.4 Αποτελέσματα και συζήτηση 99

2.4.1 Κατασκευή φορέων κλωνοποίησης *99*

2.4.2 Έλεγχος για τη ορθή κατασκευή των φορέων *101*

2.4.3 Αλληλούχιση των φορέων κλωνοποίησης *108*

2.4.4 Γενετική ανάλυση των μεταλλαγμένων στελεχών Synechocystis-Επίτευξη ομοπλασμίας *110*

2.4.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτική πηκτή ακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών *121*

2.4.6 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας *124*

2.4.7 Ποιοτική μελέτη του περιεχομένου των φωτοσυνθετικών χρωστικών *128*

2.4.8 Μελέτη της παραγωγής του β-φελλανδρενίου *130*

2.4.9 Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων και της λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού *138*

2.4.10. Προσδιορισμός της ποσότητας του παραγόμενου β-φελλανδρενίου *144*

2.5 Συμπεράσματα 147

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *SYNECHOCYSTIS* ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥ *β*-ΦΕΛΛΑΝΔΡΕΝΙΟΥ 150

3.1 Εισαγωγή 152

3.2 Σκοπός 154

3.3 Πειραματικό μέρος 155

3.3.1 Συνθήκες ανάπτυξης *155*

3.3.2 Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων-Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας *155*

3.3.32 Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων-Προσδιορισμός ξηρή βιομάζας κυττάρων155

3.3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός του περιεχομένου των φωτοσυνθετικών χρωστικών .. *155*

3.3.5 Πολαρογραφικός προσδιορισμός ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου 156

3.3.6 Παρασκευή καλλιεργειών για την παραγωγή β-φελλανδρενίου *156*

3.3.7 Ταυτοποίηση του παραγόμενου β-φελλανδρενίου με φασματομετρία απορρόφησης στο υπεριώδες *157*

3.3.8 Ταυτοποίηση του παραγόμενου β-φελλανδρενίου με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS) *157*

3.3.9 Ποσοτικός προσδιορισμός του παραγόμενου β-φελλανδρενίου *158*

3.4 Αποτελέσματα και συζήτηση 159

3.4.1 Μελέτη της επίδρασης του pH στην ετερόλογη παραγωγή του β-φελλανδρενίου από μεταλλαγμένα στελέχη Synechocystis *159*

3.4.2 Μελέτη της επίδρασης της αλατότητας σε pH 7,5 στην ετερόλογη παραγωγή του β-φελλανδρενίου *165*

3.4.3 Μελέτη της επίδρασης της αλατότητας σε pH 10,5 στην ετερόλογη παραγωγή του β-φελλανδρενίου *169*

3.4.4 Μελέτη της επίδρασης της παρουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα στην ετερόλογη παραγωγή του β-φελλανδρενίου *175*

3.4.5 Μελέτη της επίδρασης της έντασης του παρεχόμενου φωτισμού στην ετερόλογη παραγωγή του β-φελλανδρενίου *181*

3.5 Συμπεράσματα 185

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΛΟΓΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ *β*-ΦΕΛΛΑΝΔΡΕΝΙΟΥ ΑΠΟ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ *SYNECHOCYSTIS* ΣΕ ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ 189

4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 191

4.1.1. Ακινητοποίηση κυττάρων *191*

4.1.2. Αλγινικά πολυμερή *192*

4.1.3. Πλεονεκτήματα και εφαρμογές παγιδευμένων κυττάρων σε αλγινικά πολυμερή .. *195*

4.2. Σκοπός 197

4.3. Πειραματικό μέρος 198

4.3.1 Οργανισμός και συνθήκες ανάπτυξης *198*

4.3.2 Μελέτη κυτταρικής συγκέντρωσης-Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας *198*

4.3.3. Ακινητοποίηση των κυττάρων Synechocystis σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου *198*

4.3.4 Ταυτοποίηση του παραγόμενου β-φελλανδρενίου με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας *200*

4.3.5 Ποσοτικός προσδιορισμός του παραγόμενου β-φελλανδρενίου *200*

4.3.6 Προσδιορισμός ελεύθερων κυττάρων στο θρεπτικό μέσο *200*

4.3.7 Ποσοτικός προσδιορισμός της χλωροφύλλης *201*

4.3.8 Παρατήρηση σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου με χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης *201*

4.4 Αποτελέσματα και συζήτηση 203

4.5. Συμπεράσματα 220

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 . ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ 222

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι. ΑΝΤΙΓΡΑΦΟ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗΣ 228

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΥΝΤΗΞΗΣ 232

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΤΟΙΧΙΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΘΕΩΡΗΤΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ (ALIGNMENT) 239

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΛΥΘΗΚΑΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ 245

ΒΙΒΛΙΟΓΑΡΦΙΑ 253

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AP:	Αλλοφυκοκυανίνη
APS:	Υπερθειϊκό αμμώνιο
BG11:	Θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη των *Synechocystis*
BSA:	Αλβουμίνη
β-PHL:	*β*-φελλανδρένιο
bp:	Ζεύγη βάσεων (base pairs)
Car:	Καροτενοειδή
Chl:	Χλωροφύλλη
CO_2+glu:	Συνθήκη καλλιέργειας στην οποία υπάρχουν συνδυαστικά διοξείδιο του άνθρακα και γλυκόζη στο μέσο καλλιέργειας ως εναλλακτική πηγή άνθρακα
cpcA:	Γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα Α της φυκοκυανίνης
cpcA.GPPS:	Γονίδιο σύντηξης των γονιδίων cpcA και GPPS που κωδικοποιεί το πεπτίδιο cpcA.GPPS
cpcA.PHLS:	Γονίδιο σύντηξης των γονιδίων cpcA και PHLS που κωδικοποιεί το πεπτίδιο cpcA.PHLS
cpcC1:	Γονίδιο που κωδικοποιεί το συνδετικό πεπτίδιο cpcC1του cpc οπερονίου
cpcC2:	Γονίδιο που κωδικοποιεί το συνδετικό πεπτίδιο cpcC2 του cpc οπερονίου
cpcB:	Γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα Β της φυκοκυανίνης
cpcB.GPPS:	Γονίδιο σύντηξης των γονιδίων cpcB και GPPS που κωδικοποιεί το πεπτίδιο cpcB.GPPS
cpcB.PHLS:	Γονίδιο σύντηξης των γονιδίων cpcB και PHLS που κωδικοποιεί το πεπτίδιο cpcB.PHLS
cpcD:	Γονίδιο που κωδικοποιεί το συνδετικό πεπτίδιο cpcD του cpc οπερονίου
Cpc_ds:	Περιοχή καθοδικά του cpc οπερονίου
cmR:	Γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην χλωραμφενικόλη
Cpc οπερόνιο:	Το οπερόνιο στο οποίο οργανώνονται τα γονίδια που κωδικοποιούν τις δύο κύριες υπομονάδες της φυκοκυανίνης και των συνδετικών πεπτιδίων
Cpc_us:	Περιοχή ανοδικά του cpc οπερονίου
Δcpc:	Στέλεχος στο οποίο το cpc οπερόνιο έχει αντικατασταθεί από το γονίδιο NTPI
DCW:	Ξηρή βιομάζα κυττάρων (Dry Cell Weight)

DMAPP:	Πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο
GC-MS:	Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας
Glu:	Συνθήκη στην οποία υπάρχει γλυκόζη στο μέσο καλλιέργειας ως εναλλακτική πηγή άνθρακα
GPPS:	Συνθάση πυροφωσφορικού γερανυλίου (Geranyll diphosphate synthase)
IPP:	Πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο
kDa:	kilodalton
MEP μονοπάτι:	Μονοπάτι φωσφορικής μεθυλερυθριτόλης
MVA μονοπάτι:	Μονοπάτι μεβαλονικού οξέος
NTPI:	Γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη
OD:	Οπτική πυκνότητα καλλιέργειας
PCR:	Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)
PHLS:	Συνθάση του *β*-φελλανδρενίου (Phellandrene synthase)
Phc:	Φυκοκυανίνη
PMSF:	Phenylmethylsulfonyl fluoride (χρησιμοποιείται ως αναστολέας πρωτεασών)
RuBisCO:	καρβοξυλάση/οξυγονάση της 1,5-διφοσφωρικής ριβουλόζης
SDS:	Δωδεκανοθειϊκό νάτριο
SEM:	Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy)
TEMED:	τετρα-μεθυλ-αιθυλενοδιαμίνη (N,N,N,N-tetramethylethylenediamine)
WT:	Στέλεχος Αγρίου Τύπου (Wild Type)

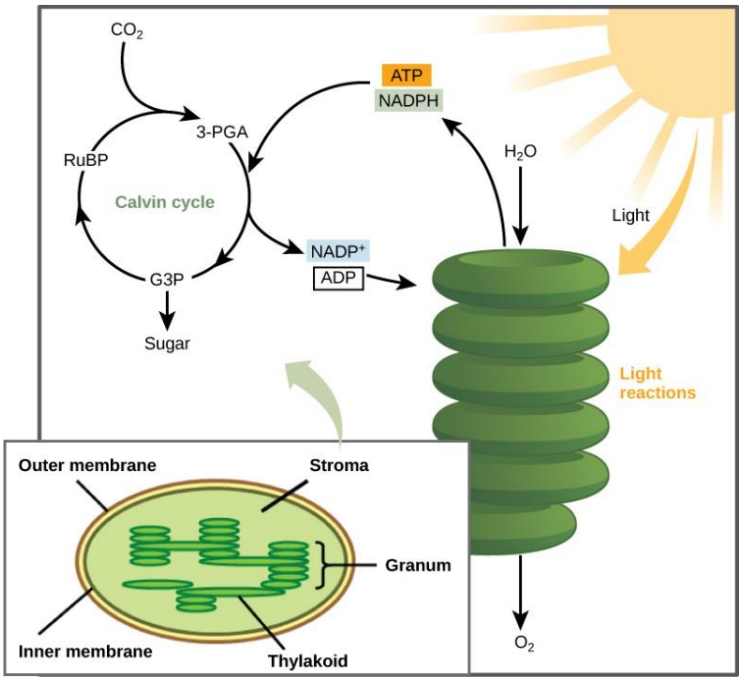
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικοί προβληματισμοί

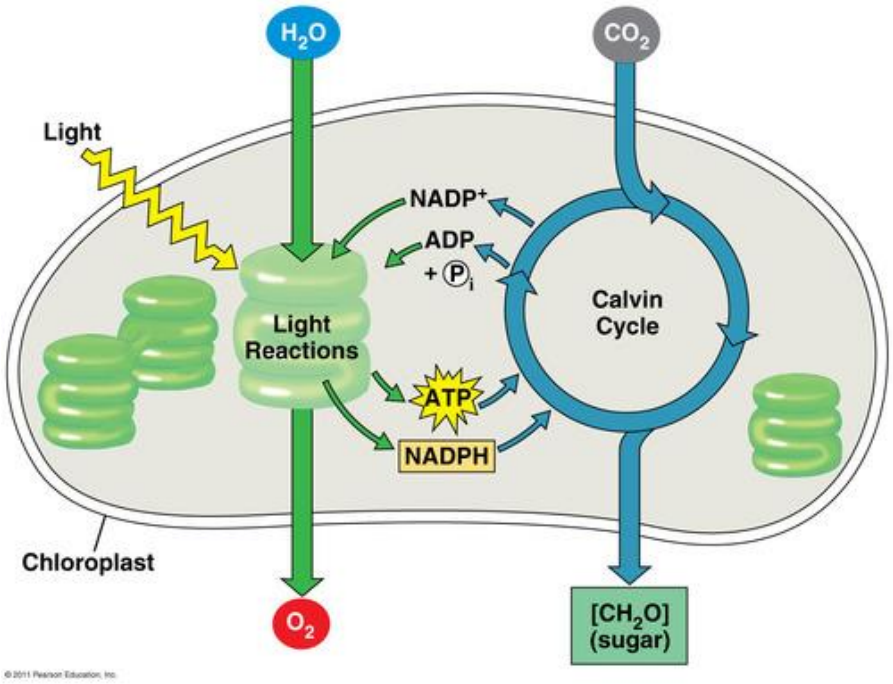
Η πλειονότητα των βιομηχανικών προϊόντων, όπως καύσιμα, πλαστικά, καουτσούκ, κόλλες, λιπαντικά και διαλύτες παράγονται με χρήση του πετρελαίου ή των παραγώγων του ως πρώτη ύλη. Έρευνες αναφέρουν πως η κατανάλωση του πετρελαίου σήμερα είναι περίπου 10^5 φορές μεγαλύτερη απ' όσο μπορεί η φύση να δημιουργήσει [1, 2]. Η υπερβολική χρήση των ορυκτών πόρων έχει οδηγήσει σε σημαντικά περιβαλλοντικά ζητήματα. Μερικά από αυτά είναι η ατμοσφαιρική συσσώρευση του CO_2, το φαινόμενο του θερμοκηπίου, με απώτερη συνέπεια, τη ρύπανση και τη ραγδαία επιδείνωση της κλιματικής αλλαγής [3]. Προβλέπεται μάλιστα ότι μέχρι το 2050 ο παγκόσμιος πληθυσμός θα αυξηθεί τουλάχιστον κατά 30% σε σχέση με το 2015 [4]. Λόγω της μεγάλης αύξησης του πληθυσμού σε συνδυασμό με το υψηλότερο βιοτικό επίπεδο, έχει προβλεφθεί ακόμη ότι η παγκόσμια ζήτηση ενέργειας θα αυξηθεί κατά 50-60% έως το 2030 [5, 6]. Τα παραπάνω δεδομένα σε συνδυασμό με τα περιορισμένα πλέον αποθέματα ορυκτών πόρων θεωρούνται σήμερα μεγάλες απειλές για την ανθρωπότητα [2]. Συνεπώς, είναι απαραίτητο να αναπτυχθούν τεχνολογίες, ανανεώσιμες και φιλικές προς το περιβάλλον, που να μπορούν να συμπληρώνουν και να αντικαθιστούν σταδιακά την εξάρτηση από ορυκτές πηγές [3].

1.2 Επισκόπηση φωτοσύνθεσης στα κυανοβακτήρια

Φωτοσύνθεση είναι η διαδικασία μετατροπής της φωτεινής ενέργειας σε χημική. Κατά την φωτοσύνθεση πραγματοποιούνται δυο ειδών αντιδράσεις: οι φωτεινές και οι σκοτεινές. Στις φωτεινές αντιδράσεις η ενέργεια του φωτός που συλλέγεται από μόρια χρωστικών του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των φωτοσυνθετικών οργανισμών χρησιμοποιείται για την παραγωγή ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας με υψηλό αναγωγικό δυναμικό. Τα ηλεκτρόνια αυτά χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ATP και NADPH (Εικόνα 1.1). Τα προϊόντα αυτά χρησιμοποιούνται στις σκοτεινές αντιδράσεις για να ωθήσουν την αναγωγή του CO_2 σε γλυκόζη και άλλα μόρια υδατανθράκων μέσω ενζυμικών αντιδράσεων (Εικόνα 1.2). Οι σκοτεινές αντιδράσεις είναι γνωστές κι ως κύκλος Calvin-Benson ή φωτοανεξάρτητες αντιδράσεις [7].

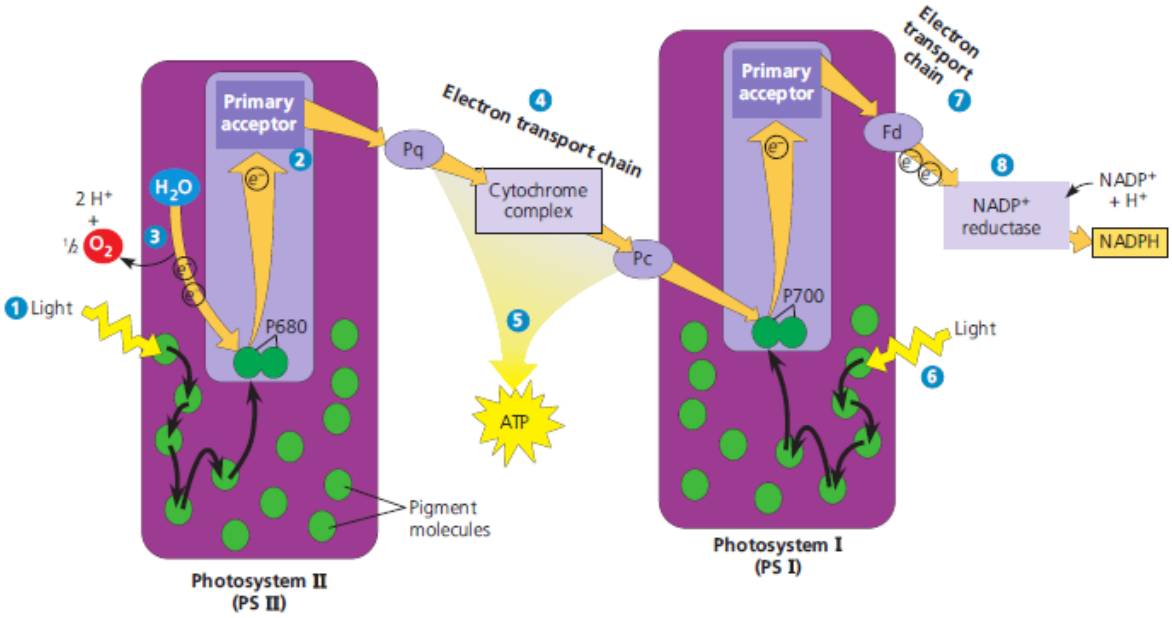


Εικόνα 1.1. Οι φωτεινές αντιδράσεις χρησιμοποιούν την ηλιακή ενέργεια για να παράγουν ATP και NADPH. Τα συγκεκριμένα μόρια μεταφοράς ενέργειας μεταφέρονται στο στρώμα όπου πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις κύκλου Calvin-Benson. Ελήφθη από την παραπομπή [8].

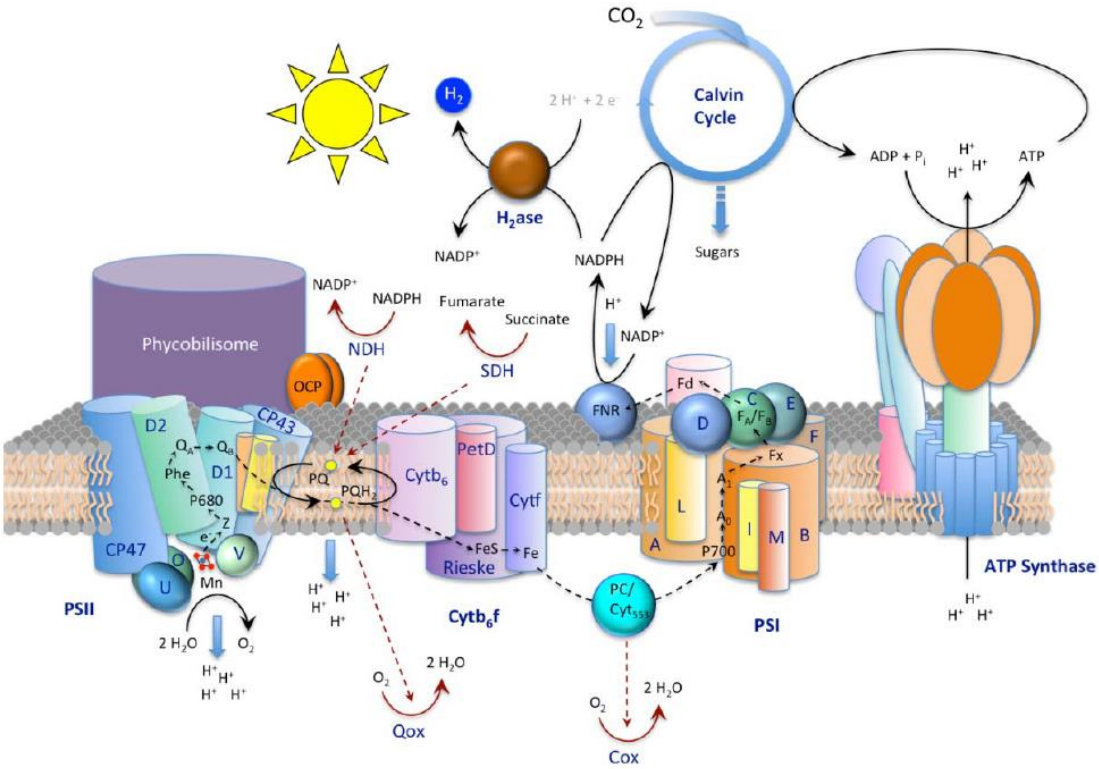


Εικόνα 1.2. Σχηματική απεικόνιση φωτεινών και σκοτεινών αντιδράσεων. Ελήφθη από την παραπομπή [9].

Κατά τη διάρκεια της οξυγονικής φωτοσύνθεσης, το CO_2 μετατρέπεται σε οργανικές ενώσεις μέσω του κύκλου του Calvin-Benson, χρησιμοποιώντας ως ενέργεια ATP και NADPH, και τα αντίστοιχα ανηγμένα ισοδύναμα τους. Αρχικά οι χρωστικές της φωτοσυνθετικής κεραίας δεσμεύουν το φως με απορρόφησή του. Μέσω φαινομένων συντονισμού μεταφέρουν την ενέργεια του στα κέντρα αντίδρασης των φωτοσυστημάτων II και I. Τα περιφερειακά σύμπλοκα συλλογής φωτός στα κυανοβακτήρια ονομάζονται φυκοχολοσώματα. Στα κέντρα αντίδρασης των φωτοσυστημάτων II και I η φωτεινή ενέργεια προκαλεί διέγερση υποστηρίζοντας την μεταφορά ηλεκτρονίων από το νερό στο $NADP^+$ μέσω μίας αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων που περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό οξειδοαναγωγικών συμπλόκων. Μεταξύ αυτών είναι τα δύο φωτοσυστήματα, πλαστοκινόνες (PQ), το σύμπλεγμα κυτοχρωμάτων b_6f, πλαστοκυανίνη (PC) και οξειδοαναγωγάση του ζεύγους φερρεδοξίνη-NADPH (FNR). Ταυτόχρονα με τη ροή ηλεκτρονίων παράγεται μία βαθμίδωση της συγκέντρωσης πρωτονίων με αποτέλεσμα την παραγωγή ATP από τη συνθάση της ATP (Εικόνα 1.3) [10].

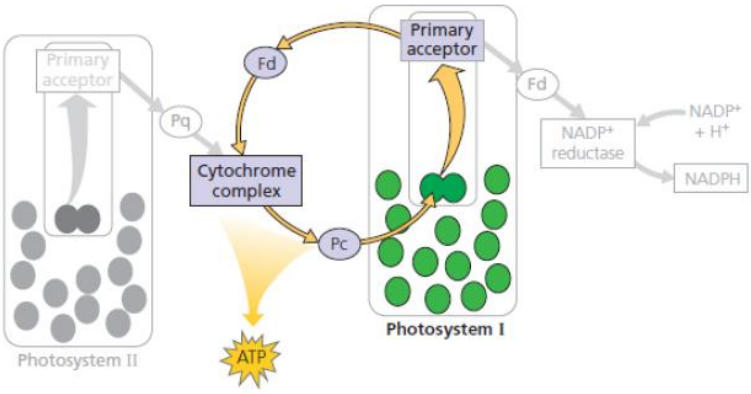


Εικόνα 1.3. Σχήμα Z των φωτεινών αντιδράσεων της φωτοσύνθεσης. Η Εικόνα ελήφθη από την παραπομπή [9].



Εικόνα 1.4. Φωτοσυνθετικός μηχανισμός στα κυανοβακτήρια. Φωτοσυνθετική μεταφορά ηλεκτρονίων και σύνθεση ATP στη μεμβράνη των θυλακοειδών. Η Εικόνα ελήφθη από την παραπομπή [11].

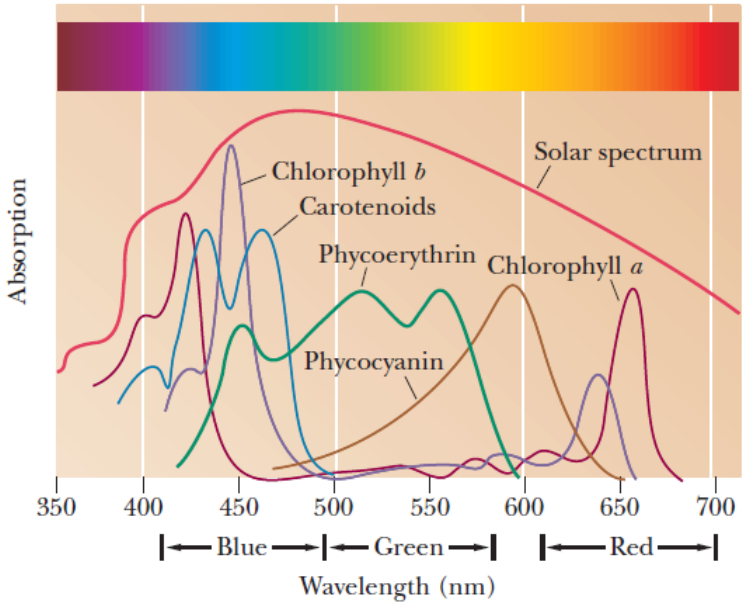
Τα ATP και NADPH που παράγονται με φωτοφωσφορυλίωση χρησιμοποιούνται για να τροφοδοτήσουν τον κύκλο Calvin-Benson στα καρβοξυσώματα στο κυτοσόλιο, όπου το ατμοσφαιρικό CO_2 καθηλώνεται από τη RuBisCO (καρβοξυλάση/οξυγονάση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης) και στη συνέχεια ανάγεται σε οργανικές ενώσεις με μία σειρά ενζυμικών αντιδράσεων [11].



Εικόνα 1.5. Κυκλική φωτοφωσφορυλίωση. Ελήφθη από την παραπομπή [12].

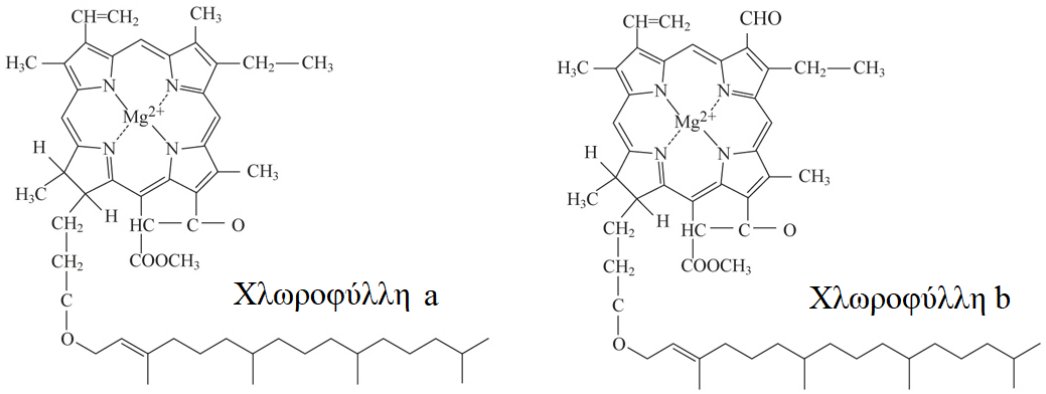
1.3 Φωτοσυνθετικές χρωστικές

Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές χρησιμοποιούνται από τα φωτοσυνθετικά βακτήρια, τα φύκη και τα φυτά για την απορρόφηση φωτονίων και για τη ροή των ηλεκτρονίων από τη μία πλευρά της μεμβράνης στην άλλη [13]. Οι κυριότερες φωτοσυνθετικές χρωστικές είναι οι χλωροφύλλες, τα καροτενοειδή, η φυκοκυανίνη και η φυκοερυθρίνη. Οι δύο τελευταίες συναντώνται στα κυανοβακτήρια και στα ερυθροφύκη αντίστοιχα. Όσο αφορά τα φωτοσυνθετικά μικροφύκη και τα ανώτερα φυτά, περιέχουν κυρίως χλωροφύλλες και καροτενοειδή. Τα φάσματα απορρόφησης στο ορατό των κυριότερων χρωστικών παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.6.



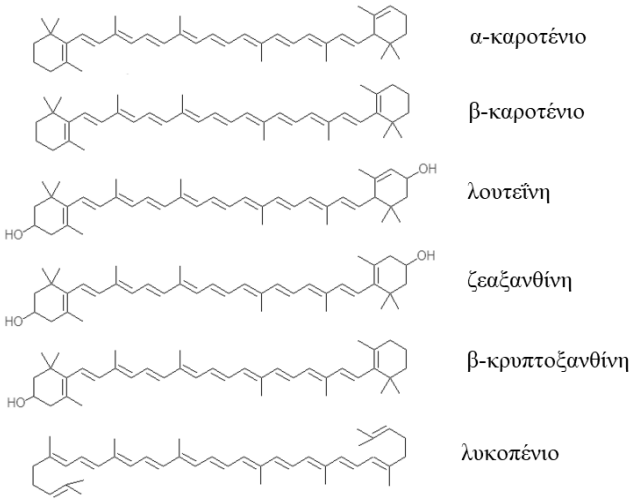
Εικόνα 1.6. Φάσματα απορρόφησης ορατού των κυριότερων φωτοσυνθετικών χρωστικών. Ελήφθη από την παραπομπή [9].

Οι χρωστικές στα ανώτερα φυτά εντοπίζονται στους χλωροπλάστες των κυττάρων, όπου είναι συνδεδεμένες με πρωτεΐνες των θυλακοειδών. Τα κυριότερα είδη χλωροφυλλών είναι η χλωροφύλλη-α και η χλωροφύλλη-β (Εικόνα 1.7). Η χλωροφύλλη-α συναντάται στα ενεργά κέντρα των φωτοσυστημάτων όλων των φυτών, φυκών και κυανοβακτηρίων που επιτελούν φωτοσύνθεση. Η χλωροφύλλη-β υπάρχει στα σύμπλοκα συλλογής φωτός των πράσινων μικροφυκών και στα ανώτερα φυτά, ενώ απουσιάζει από τα κυανοβακτήρια. Οι χλωροφύλλες-α και β διαφέρουν δομικά στη θέση 3 του δακτυλίου 3 όπου η χλωροφύλλη-α φέρει μια μεθυλομάδα ενώ η χλωροφύλλη-β μία αλδεϋδομάδα. Η χλωροφύλλη-α εμφανίζει μέγιστα απορρόφησης στα 430 nm και 662 nm, ενώ η χλωροφύλλη-β στα 453 nm και 642 nm.



Εικόνα 1.7. Δομές της χλωροφύλλης-a και χλωροφύλλης-b. Ελήφθη από την παραπομπή [10].

Τα καροτενοειδή είναι επικουρικές φωτοσυλλεκτικές χρωστικές που εντοπίζονται στα σύμπλοκα συλλογής φωτός, όπου και μεταφέρουν την ενέργεια στις χλωροφύλλες του κέντρου αντίδρασης. Επιπλέον διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φυτοπροστασία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού αποσβένοντας την περίσσεια ενέργειας ως θερμότητα. Αποτελούν χρωστικές χρώματος κόκκινου, πορτοκαλί και κίτρινου και συμπεριλαμβάνουν τα καροτένια, τα οποία είναι υδρογονάνθρακες και τις ξανθοφύλλες που είναι τερπενοειδή με ομάδες υδροξειδίου ή εποξειδίου. Τα κυριότερα καροτένια είναι το α-καροτένιο, β-καροτένιο και το λυκοπένιο, ενώ στις ξανθοφύλλες περιλαμβάνονται η λουτεΐνη, η ζεαξανθίνη, η νεοξανθίνη και η βιολαξανθίνη (Εικόνα 1.8). Τα καροτενοειδή απορροφούν σε μήκη κύματος 400-550 nm.



Εικόνα 1.8. Δομές κυριότερων καροτενοειδών. Ελήφθη από την παραπομπή [10].

Η φυκοκυανίνη, είναι μια, φωτοσυνθετική χρωστική που συναντάται στα κυανοβακτήρια, στα ροδόφυτα και στα κρυπτόφυτα. Σε αυτή οφείλεται το κυανό χρώμα των κυανοβακτηρίων. Είναι υδατοδιαλυτή και έχει μοριακό βάρος μεταξύ 70 και 110 kDa. Βρίσκεται στα φυκοχολοσώματα των κυανοβακτηρίων όπου λειτουργεί ως επικουρική χρωστική. Το φάσμα απορρόφησής της είναι μεταξύ 615 – 620 nm.

1.4 Φυκοχολοσώματα

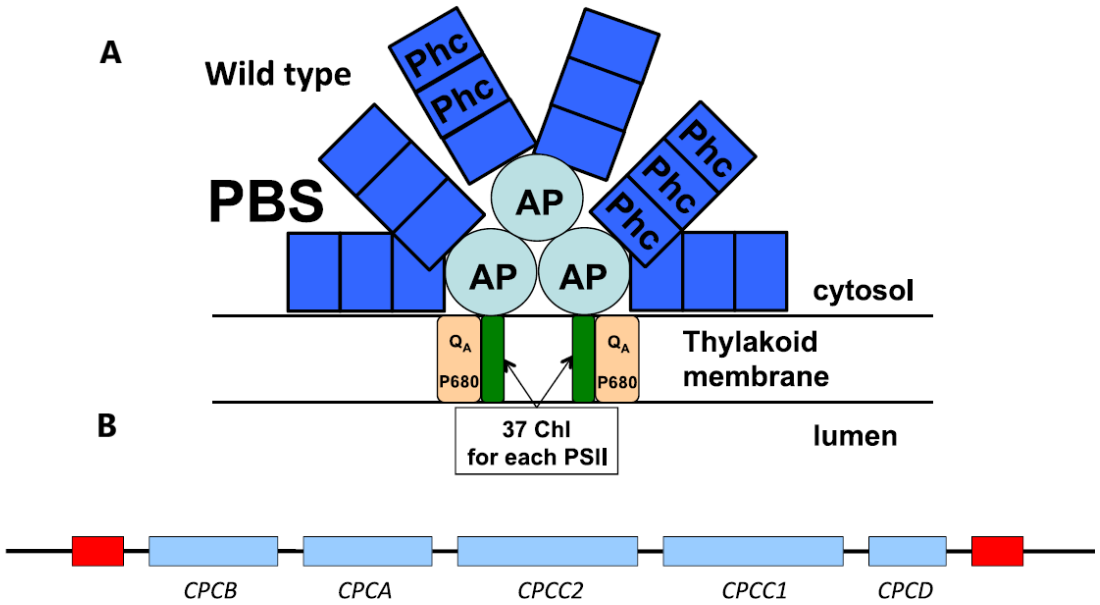
Τα κυανοβακτήρια συναντώνται συχνά σε δυσμενή οικοσυστήματα όπου δεν φτάνει αρκετό ηλιακό φως, όπως π.χ. σε μεγάλο βάθος στη θάλασσα. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτύξει μια βοηθητική κεραία συλλογής φωτός, τα φυκοχολοσώματα (PBS). Τα συγκεκριμένα σύμπλοκα συλλογής φωτός είναι χαλαρά συνδεδεμένα με την εξωτερική πλευρά της μεμβράνης των θυλακοειδών, όπου και λειτουργούν ως φωτοαπορροφητικές κεραίες [14, 15]. Τα φυκοχολοσώματα επιτρέπουν στα κυανοβακτήρια να απορροφούν το προσπίπτον ηλιακό φως, στην περιοχή 575-675 nm και να διοχετεύουν την ενέργεια φωτοδιέγερσης στα κέντρα αντίδρασης του φωτοσυστήματος ΙΙ (Εικόνα 1.10). Η μεγάλη αποτελεσματικότητα της μεταφοράς της ενέργειας (μεγαλύτερη από 95%), οφείλεται στη γεωμετρική διάταξη των πρωτεϊνών τους σε συνδυασμό με τις φασματοσκοπικές ιδιότητες τους. Πιο συγκεκριμένα, η ενέργεια που απορροφάται από αυτά φτάνει στο κέντρο αντίδρασης σε λιγότερο από 100 ps. Μπορούν να χαρακτηριστούν ως πολύ καλά σχεδιασμένοι φωταγωγοί που δίνουν την ικανότητα στα κυανοβακτήρια να κατέχουν οικολογικούς θώκους που θα ήταν αδύνατο να διατηρηθούν από οργανισμούς οι οποίοι εξαρτώνται αποκλειστικά από τη χλωροφύλλη για την παγίδευση του ηλιακού φωτός [7].

Κάθε φυκοχολόσωμα αποτελείται από δύο κύρια δομικά μέρη, τους κυλινδρικούς πυρήνες και τα περιφερειακά ραβδία (Εικόνα 1.9.Α). Ο πυρήνας αποτελείται από κυλίνδρους αλλοφυκοκυανίνης (ΑΡ) $(\alpha\beta)_3$ στοιβαγμένους τον έναν δίπλα στον άλλον [16]. Ο άξονας του κυλινδρικού πυρήνα είναι παράλληλος με την επιφάνεια της θυλακοειδούς μεμβράνης.

Στα *Synechocystis* υπάρχουν τρεις δίσκοι αλλοφυκοκυανίνης. Οι δύο ακουμπούν άμεσα στη μεμβράνη των θυλακοειδών ενώ ο τρίτος βρίσκεται στη μεριά του στρώματος σε ένα «αυλάκι» που σχηματίζουν οι άλλοι δύο κύλινδροι [17]. Οι κυλινδρικοί πυρήνες περιέχουν τις χρωστικές-πρωτεΐνες αλλοφυκοκυανίνη-α και αλλοφυκοκυανίνη-β, που κωδικοποιούνται από τα γονίδια *APCA* και *APCB* και ένα μικρό συνδετικό πολυπεπτίδιο L_C, που κωδικοποιείται από το γονίδιο *APCC* [18, 19]. Οι κύλινδροι του πυρήνα είναι συνδεδεμένοι με τη θυλακοειδή μεμβράνη και τις πρωτεΐνες του φωτοσυστήματος ΙΙ που

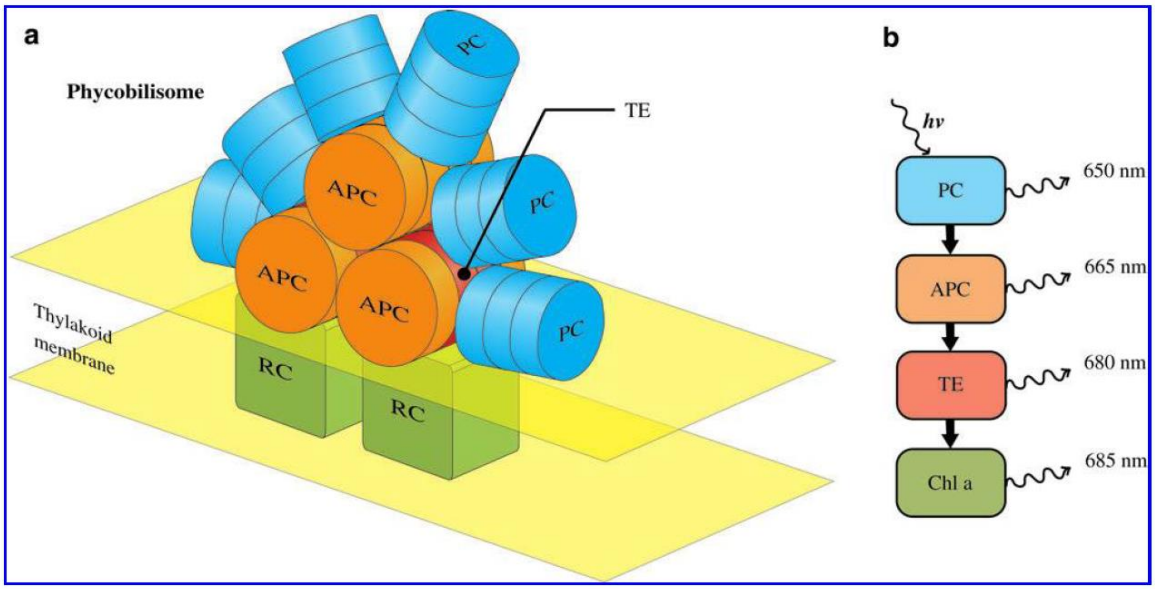
περιέχουν χλωροφύλλη με ένα μόριο αλλοφυκοκυανίνης, συμπεριλαμβανομένου και του πολυπεπτιδίου L_{CM}, το οποίο κωδικοποιείται από το APCE γονίδιο, που λειτουργεί ως δέκτης της διέγερσης. Αυτά σε συνδυασμό με τα προϊόντα των APCD και APCF γονιδίων, διευκολύνουν την αποτελεσματική μεταφορά της ενέργειας διέγερσης από τα φυκοχολοσώματα στο κέντρο αντίδρασης του φωτοσυστήματος ΙΙ. Περιφερειακά του πυρήνα βρίσκονται ραβδία που περιέχουν φυκοκυανίνη (PC). Τα ραβδία αυτά είναι επίσης σε κυλινδρική μορφή και εκτείνονται σαν προέκταση από τον πυρήνα. Τα περιφερειακά ραβδία αποτελούνται από στοιβαγμένους δίσκους. Κάθε ένας από αυτούς, αποτελείται από έξι ετεροδιμερή από CPC-α και CPC-β πρωτεΐνες που περιέχουν χρωστικές και κωδικοποιούνται από τα γονίδια *cpcA* και *cpcB,* αντίστοιχα. Τα διμερή CPC-α και CPC-β είναι συνδεδεμένα με συνδετικά πεπτίδια που κωδικοποιούνται από τα *cpcC1*, *cpcC2* και *cpcD* γονίδια. Στα *Synechocystis* τα γονίδια *cpcA, cpcB, cpcC2, cpcC1,cpcD* οργανώνονται στο cpc οπερόνιο (Εικόνα 1.9.Β) [20].

Στα *Synechocystis* τα φυκοχολοσώματα μπορούν να περιέχουν μέχρι και 450 χρωστικές φυκοκυανίνης (Phc) και αλλοφυκοκυανίνης (AP). Η τόσο μεγάλη κεραία συλλογής φωτός προσφέρει ένα πλεονέκτημα επιβίωσης στην φύση, όπου τα κυανοβακτήρια αναπτύσσονται συχνά κάτω από περιορισμένες συνθήκες φωτός [20].



Εικόνα 1.9. Α. Σχηματική αναπαράσταση ενός φυκοχολοσώματος. Αποτελείται από έναν πυρήνα αλοφυκοκυανίνης (AP), που προσδένεται στη μεμβράνη του θυλακοειδούς και από

τα ραβδία φυκοκυανίνης (Phc), τα οποία αναδύονται από τον πυρήνα. **Β.** Γενετικός χάρτης των γονιδίων του cpc οπερονίου. Οι εικόνες ελήφθησαν από την παραπομπή [20].

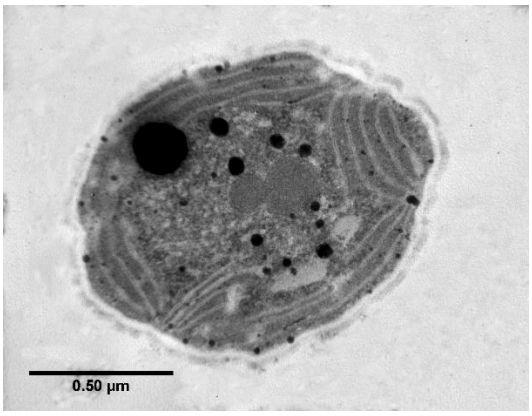


Εικόνα 1.10. Α. Σχηματική αναπαράσταση του συμπλόκου συλλογής φωτός (φυκοχολόσωμα-BS) στο κυανοβακτήριο *Synechocystis*. **Β.** Η αλυσίδα μεταφοράς ενέργειας στο PSII από τα φυκοχολοσώματα. Η φυκοκυανίνη απορροφάει φως μικρότερου μήκους κύματος, δηλαδή υψηλότερης ενέργειας, και διαβιβάζει την ενέργεια αυτή στην αλλοφυκοκυανίνη και, μέσω αυτής, στη χλωροφύλλη του κέντρου αντίδρασης με την οποία η αλλοφυκοκυανίνη είναι άμεσα συνδεδεμένη. Η Εικόνα ελήφθη από την παραπομπή [21].

1.5 Κυανοβακτήρια

Τα κυανοβακτήρια, ή αλλιώς μπλε-πράσινα φύκη ή κυανοφύκη όπως συχνά αποκαλούνται, αποτελούν μία μεγάλη και ευρέως διαδεδομένη ομάδα Gram-αρνητικών, φωτοαυτότροφων, μικροοργανισμών που εμφανίστηκαν στη Γη 2.6 με 3.5 δισεκατομμύρια χρόνια πριν [22]. Είναι οι μοναδικοί προκαρυωτικοί οργανισμοί που έχουν την ικανότητα να επιτελούν οξυγονική φωτοσύνθεση όπως τα φυτά [23]. Υπάρχουν σημαντικά στοιχεία που αποδεικνύουν ότι τα κυανοβακτήρια εμφανίστηκαν σχεδόν ένα δισεκατομμύριο χρόνια πριν το οξυγόνο αρχίσει να συσσωρεύεται σε σημαντικές ποσότητες στη Γη [24-26]. Τα πρώτα κυανοβακτήρια φαίνεται να παρήγαγαν μεγάλες ποσότητες οξυγόνου, εμπλουτίζοντας με αυτό την ατμόσφαιρα και οδηγώντας έτσι στην εξέλιξη της ζωής, όπως είναι γνωστή σήμερα. Αποτελούν τους αρχαιότερους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς και θεωρούνται πρόγονοι των χλωροπλαστών των φυκών και των φυτών [27]. Ένας βασικός λόγος για την εξελικτική τους ανθεκτικότητα είναι ο επιτυχής συνδυασμός διαφόρων

μεταβολικών μονοπατιών. Μορφολογικά διακρίνονται σε ποικίλες μορφές όπως μονοκύτταρες, νηματοειδείς, αποικιακές μορφές και πλαγκτονικές ή βενθικές [28, 29]. Αποτελούν τους πλέον προσαρμοστικούς και διαδεδομένους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς. Τα κυανοβακτήρια είναι γνωστά για την ικανότητα τους να προσαρμόζουν τον μεταβολισμό τους πολύ γρήγορα ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Συχνά απαιτείται να επιβιώσουν κάτω από εξαιρετικά δυσμενείς συνθήκες όπως είναι η περιορισμένη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών και οι διακυμάνσεις στη θερμοκρασία και το φωτισμό [30]. Συναντώνται σε μία ευρεία ποικιλία βιοτόπων που κυμαίνονται από γλυκά και αλμυρά ύδατα, χερσαία οικοσυστήματα και ακραία περιβάλλοντα (όπως π.χ. ψυχρές λίμνες της Ανταρκτικής ή θερμοπηγές) [23, 31-33]. Εκτός από το κυτταρικό τοίχωμα, ένα στρώμα πεπτιδογλυκάνης και την πλασματική μεμβράνη που διαθέτουν λόγω της προκαρυωτικής φύσης τους, στους οργανισμούς αυτούς εντοπίζεται και ένα περίπλοκο σύστημα εσωτερικών μεμβρανών, τα θυλακοειδή, όπου πραγματοποιούνται ταυτόχρονα οι διαδικασίες της αναπνοής και της φωτοσύνθεσης (Εικόνα 1.11). Μερικά νηματοειδή κυανοβακτήρια ανέπτυξαν εξιδεικευμένα κύτταρα, γνωστά ως ετεροκύστες, προκειμένου να καθηλώνουν άζωτο από την ατμόσφαιρα διαδραματίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στον κύκλο του αζώτου [34].



Εικόνα 1.11. Φωτογραφία από ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (TEM) του κυανοβακτηρίου *Synechocystis* sp. PCC 6803. Εξωτερικά παρατηρείται το κυτταρικό τοίχωμα και μέσα η πλασματική μεμβράνη. Μέσα στο κυτοσόλιο παρατηρούνται τα θυλακοειδή τα οποία είναι διατεταγμένα σε στρώσεις και έρχονται σε επαφή με την πλασματική μεμβράνη. Ελήφθη από την παραπομπή [30].

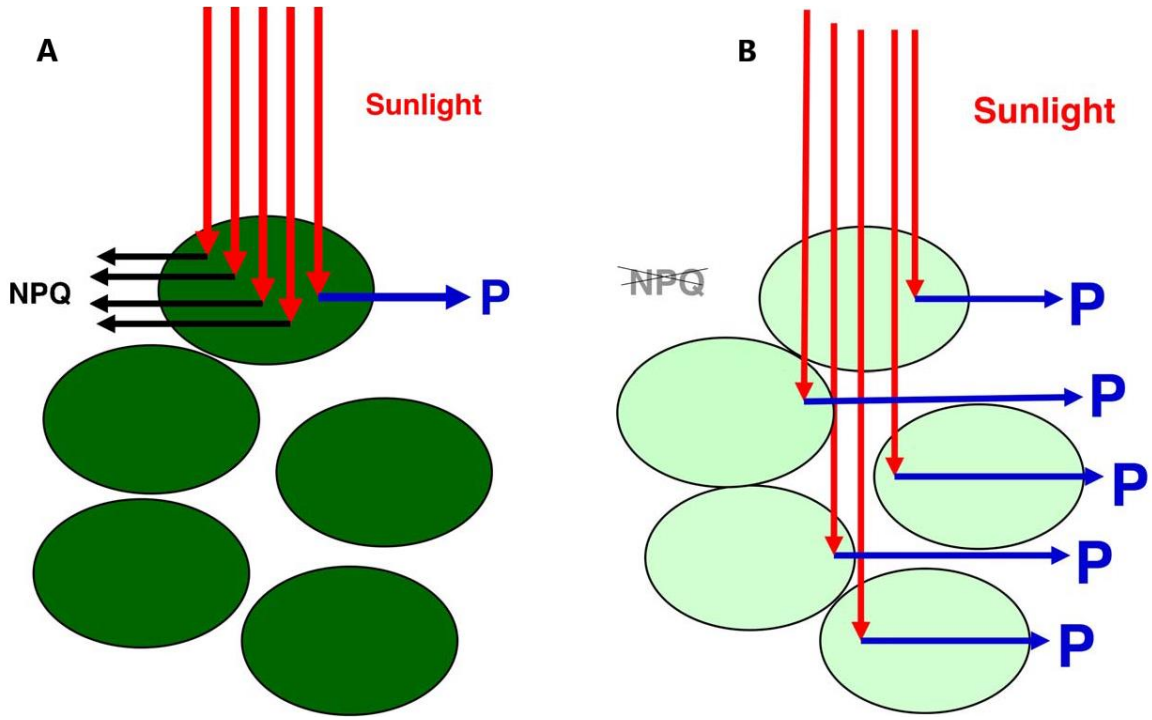
1.6 Κυανοβακτήριο *Synechocystis* sp. PCC 6803

Το κυανοβακτήριο *Synechocystis* sp. PCC 6803 (στο εξής θα αναφέρεται ως *Synechocystis*) είναι μονοκύτταρος μικροοργανισμός, με σφαιρικό σχήμα. Το στέλεχος αυτό απομονώθηκε από λίμνη στην California από τον R. Kunisawa [35, 36]. Η ενδοκυτταρική του οργάνωση έχει μελετηθεί εκτενώς μέσω παρατηρήσεων ηλεκτρονικής μικροσκοπίας [37, 38]. Αποτελεί τον πρώτο φωτοαυτότροφο οργανισμό του οποίου αποκρυπτογραφήθηκε πλήρως η αλληλουχία του γονιδιώματος του. [39]. Το γονιδίωμα του αποτελείται από 3167 γονίδια από τα οποία τα 128 κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε διάφορα στάδια της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης [40]. Τα τελευταία χρόνια έχει χρησιμοποιηθεί ως οργανισμός-μοντέλο για τη μελέτη της λειτουργίας της φωτοσύνθεσης και των γονιδίων που εμπλέκονται σε αυτή διότι μπορεί να αναπτυχθεί τόσο σε φωτοαυτότροφες (χωρίς παρουσία οργανικής πηγής άνθρακα, αλλά παρουσία CO_2) όσο και σε ετερότροφες συνθήκες (παρουσία γλυκόζης ως εναλλακτική πηγή άνθρακα, απουσία CO_2) [40, 41] και μπορεί να υποστεί γενετική τροποποίηση [42]. Εξαιτίας των ανωτέρω χαρακτηριστικών, στη βιβλιογραφία έχει χαρακτηριστεί ως το «πράσινο *E. coli*» [35, 43].

1.7 Μεταλλαγμένα στελέχη με περικομμένη κεραία συλλογής φωτός

Τα φυκοχολοσώματα αποτελούν ένα μεγάλο σύμπλοκο συλλογής φωτός. Το συγκεκριμένο πρωτεϊνικό σύμπλοκο προσφέρει μεγάλο πλεονέκτημα για την επιβίωση των κυανοβακτηρίων στη φύση, όπου σε πολλές περιπτώσεις αναγκάζονται να επιβιώσουν κάτω από περιορισμένες συνθήκες φωτισμού. Αντίθετα σε συνθήκες ανάπτυξης στο εργαστήριο όπου παρέχεται συνεχής φωτισμός, ο ρυθμός απορρόφησης φωτονίων υπερβαίνει κατά πολύ το ρυθμό με τον οποίο μπορούν να το αξιοποιήσουν μέσω της φωτοσύνθεσης. Ως συνέπεια η περίσσεια της φωτεινής ενέργειας διαχέεται μέσω μη φωτοχημικής απόσβεσης (NPQ) (Εικόνα 1.12. Α) [20, 44-47]. Η διάχυση της περίσσειας της απορροφούμενης ακτινοβολίας αποτρέπει τη φωτοαναστολή αλλά ταυτόχρονα οδηγεί σε μειωμένη μετατροπή του ηλιακού φωτός από τα κέντρα αντίδρασης [20, 48]. Ως αποτέλεσμα η μέγιστη απόδοση της χρήσης της ηλιακής ενέργειας σε βιομάζα, μέσω της φωτοσύνθεσης, στα κυανοβακτήρια, βρέθηκε να είναι 1-2%, έναντι της θεωρητικής τιμής που είναι 8-10% [49]. Το παραπάνω φαινόμενο εμφανίζεται σε όλους τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς. Σε αρκετά πράσινα μικροφύκη καθώς και στα κυανοβακτήρια *Synechocystis* το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίστηκε με ελαχιστοποίηση του μεγέθους της κεραίας συλλογής φωτός, περιορίζοντας με τον τρόπο αυτό αποτελεσματικά την ικανότητα των φωτοσυστημάτων να υπερ-απορροφούν το ηλιακό

φως. Το μικρότερο μέγεθος του συμπλόκου συλλογής φωτός του φωτοσυστήματος ΙΙ εμπόδισε την υπερ-απορρόφηση φωτονίων από τα εξωτερικά κύτταρα της καλλιέργειας. Με τον τρόπο αυτό κατέστη ικανή η βαθύτερη διείσδυση του φωτός στην καλλιέργεια, παρέχοντας την ευκαιρία σε περισσότερα κύτταρα να είναι παραγωγικά (Εικόνα 1.12 Β.). Το παραπάνω γεγονός βρέθηκε να αυξάνει την φωτοσυνθετική παραγωγικότητα της καλλιέργειας στο σύνολό της [20, 50-54]. Η ιδέα της αύξησης της φωτοσυνθετικής παραγωγικότητας μίας καλλιέργειας κάτω από άμεση ηλιακή ακτινοβολία, ελαχιστοποιώντας το μέγεθος του συμπλόκου συλλογής φωτός, είναι γνωστή ως περικομμένη κεραία συλλογής φωτός (Truncated Light-harvesting Antenna-TLA) [20].



Εικόνα 1.12. Α. Σχηματική απεικόνιση της απορρόφησης και επεξεργασίας του προσπίπτοντος ηλιακού φωτός από μικροφύκη που περιέχουν όλες τις χρωστικές τους (σκούρο πράσινο) σε καλλιέργεια υψηλής πυκνότητας. Μεμονωμένα κύτταρα στην επιφάνεια της καλλιέργειας υπερ-απορροφούν την ηλιακή ακτινοβολία (περισσότερη από όση από ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη φωτοσύνθεση), σκεδάζοντας το μεγαλύτερο μέρος του μέσω μη-φωτοχημικής απόσβεσης (NPQ), περιορίζοντας έτσι την παραγωγικότητα (P). Υπάρχει επίσης η πιθανότητα, το πρώτο στρώμα κυττάρων να προκαλέσει φαινόμενα σκίασης, να εμποδίζει δηλαδή τα κύτταρα που είναι βαθύτερα στην καλλιέργεια να εκτίθενται στο ηλιακό φως. **Β.** Σχηματική απεικόνιση απορρόφησης και επεξεργασίας του προσπίπτοντος ηλιακού φωτός από κύτταρα (ανοιχτό πράσινο) με

περικομμένη κεραία συλλογής φωτός. Τα εξωτερικά κύτταρα απορροφούν λιγότερη ακτινοβολία ηλιακού φωτός, επιτρέποντας έτσι μία περισσότερο ομοιόμορφη κατανομή της ακτινοβολίας στην καλλιέργεια. Αυτό μετριάζει το NPQ και ενισχύει τη φωτοσυνθετική παραγωγικότητα (P) στο σύνολο της καλλιέργειας. Οι εικόνες ελήφθησαν από την παραπομπή [49].

1.8 Τερπενοειδή

Τα τερπενοειδή αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία φυσικών προϊόντων με εξαιρετική ποικιλομορφία ως προς τη δομή τους. Περισσότερα από 80.000 τερπενοειδή έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα [3, 55]. Είναι απαραίτητα μόρια για την ανάπτυξη του φυτού και του μεταβολισμού του και πολλά από αυτά αποτελούν σημαντικούς δευτερογενείς μεταβολίτες. Στον πρωτογενή μεταβολισμό εμπλέκονται σε διαδικασίες όπως η φωτοσύνθεση (χλωροφύλλη, καροτενοειδή, και πλαστοκινόνη), η αναπνοή (ουβικινόνη), και η ρύθμιση της ανάπτυξης των φυτών (ορμόνες: γιβερελλίνες και αβκισικό οξύ). Εμπλέκονται ακόμη στη βιοσύνθεση και τη σταθερότητα του κυτταρικού τοιχώματος και των μεμβρανών (βατοπρενόλη, hopanoids σε βακτήρια και στερόλες στα φυτά) [56, 57]. Αποτελούν επίσης βασικό συστατικό των αιθέριων ελαίων των φυτών [58]. Τα τερπενοειδή εκκρίνονται από τα φυτά ως δευτερογενείς μεταβολίτες κατά την απόκριση σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες ως μηχανισμός άμυνας. Παραδείγματος χάριν το ισοπρένιο είναι ένα πτητικό μόριο, πέντε ατόμων άνθρακα, που παράγεται και εκπέμπεται από πολλά είδη φυτών και δέντρων ως απόκριση σε υψηλές θερμοκρασίες [56]. Η θερμότητα μπορεί να προκαλέσει ζημιά στις θυλακοειδείς μεμβράνες, με αποτέλεσμα να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα της φωτοσύνθεσης [59]. Το παραγόμενο ισοπρένιο ενσωματώνεται και ενισχύει τη σταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης ως απόκριση σε θερμική καταπόνηση, προσδίδοντας ανοχή στις απότομες ανόδους τις θερμοκρασίας [60]. Το ισοπρένιο προσφέρει επίσης κάποιου είδους αντίσταση σε δραστικές μορφές οξυγόνου [61]. Τα φυτά απελευθερώνουν επίσης τερπενοειδή τα οποία τα προστατεύουν από φυτοφάγα ζώα και παθογόνα μικρόβια όπως επίσης έλκουν επικονιαστές [62]. Παρά το γεγονός ότι τα τερπενοειδή είναι ενώσεις με εξαιρετικά μεγάλη ποικιλία στις δομές τους, όλα σχηματίζονται από το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) και το πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP). Σύμφωνα με τον κανόνα του ισοπρενίου θεωρείται ότι τα τερπενοειδή προέρχονται από συνδεδεμένες ομάδες ισοπρενίου. Ανάλογα με τον αριθμό των ισοπρενικών μονάδων που περιέχουν, τα τερπενοειδή ταξινομούνται σε κατηγορίες.

Τερπενοειδή με 10 άτομα άνθρακα ονομάζονται μονοτερπένια, με 15 άτομα άνθρακα σεσκιτερπένια, με 20 διτερπένια, με 30 τριτερπένια και με >40 πολυτερπένια [63].

Λόγω του μεγάλου εύρους φάσματος των βιολογικών λειτουργιών που έχουν, χρησιμοποιούνται ευρέως στην παραγωγή βιομηχανικών χημικών προϊόντων ως πρώτες ύλες (π.χ. το ισοπρένιο, αποτελεί το κύριο συστατικό του συνθετικού και φυσικού καουτσούκ), καλλυντικών, αρωμάτων (μενθόλη -οσμή μέντας, d-λιμονένιο-οσμή φλούδας πορτοκαλιού, α-φρενσένιο-οσμή πράσινου μήλου), φαρμάκων (πακλιταξέλη, αρτεμισινίνη, φορσκολίνη, παρθενολίδη) και εντομοκτόνων [64-70]. Μάλιστα ορισμένα μονοτερπένια (όπως το λιμονένιο, μυρσένιο, και φαρνεσένιο) έχουν προοπτικές ως βιοκαύσιμα, εφόσον έχει βρεθεί ότι είναι συμβατά με το πετρέλαιο κίνησης (diesel) και τα καύσιμα αεροπορίας [71-74].

Τα τερπενοειδή μέχρι σήμερα εκχυλίζονται από τη βιομάζα του φυτού, είτε παράγονται από το πετρέλαιο ή άλλους διαλύτες μέσω χημικής σύνθεσης [75]. Όμως, η μεγάλη διακύμανση στην ετήσια απόδοση βιομάζας σε συνδυασμό με την υψηλή ζήτηση των προϊόντων αυτών στη βιομηχανία ταυτόχρονα με το υψηλό κόστος για την απομόνωση μεγάλων ποσοτήτων, την καθιστούν μία λιγότερο αποδοτική λύση.

Δύο παραδείγματα τερπενοειδών με σημαντική φαρμακευτική αξία των οποίων η ετήσια παραγωγή από τη βιομάζα του φυτού δεν ανταποκρίνεται στη αυξημένη ζήτηση τους στο εμπόριο παρατίθενται παρακάτω [56].

Η πακλιταξέλη είναι ένα διτερπένιο με περίπλοκη δομή που απομονώνεται από το έλατο του Ειρηνικού (*Taxus brevifolia*). Χρησιμοποιείται ως φάρμακο σε χημειοθεραπείες για τη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου. Όμως, η χαμηλή απόδοση στην παραγωγή του από τον φλοιό του δέντρου (< 0.01% της ξηρής βιομάζας) αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την μεγάλης κλίμακας παραγωγής του προϊόντος αυτού [76].

Η αρτεμισινίνη είναι ένα σεσκιτερπένιο που παράγεται από το φυτό *Artemisia annua*. Παράγωγα αρτεμισινίνης αποτελούν φάρμακα πρώτης γραμμής κατά της ελονοσίας που συνιστώνται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας. Κάθε χρόνο η διαθεσιμότητα και η τιμή της αρτεμισινίνης κυμαίνεται λόγω των διακυμάνσεων στην καλλιέργεια του φυτού. Τα τελευταία χρόνια επιτεύχθηκε η ετερόλογη παραγωγή για εμπορική χρήση μίας πρόδρομης ένωσης της αερτεμισίνης, του αρτεμισινικού οξέος, από το ζαχαρομύκητα *S. cerevisiae,* μέσω μεθόδων συνθετικής βιολογίας και μεταβολικής μηχανικής [77].

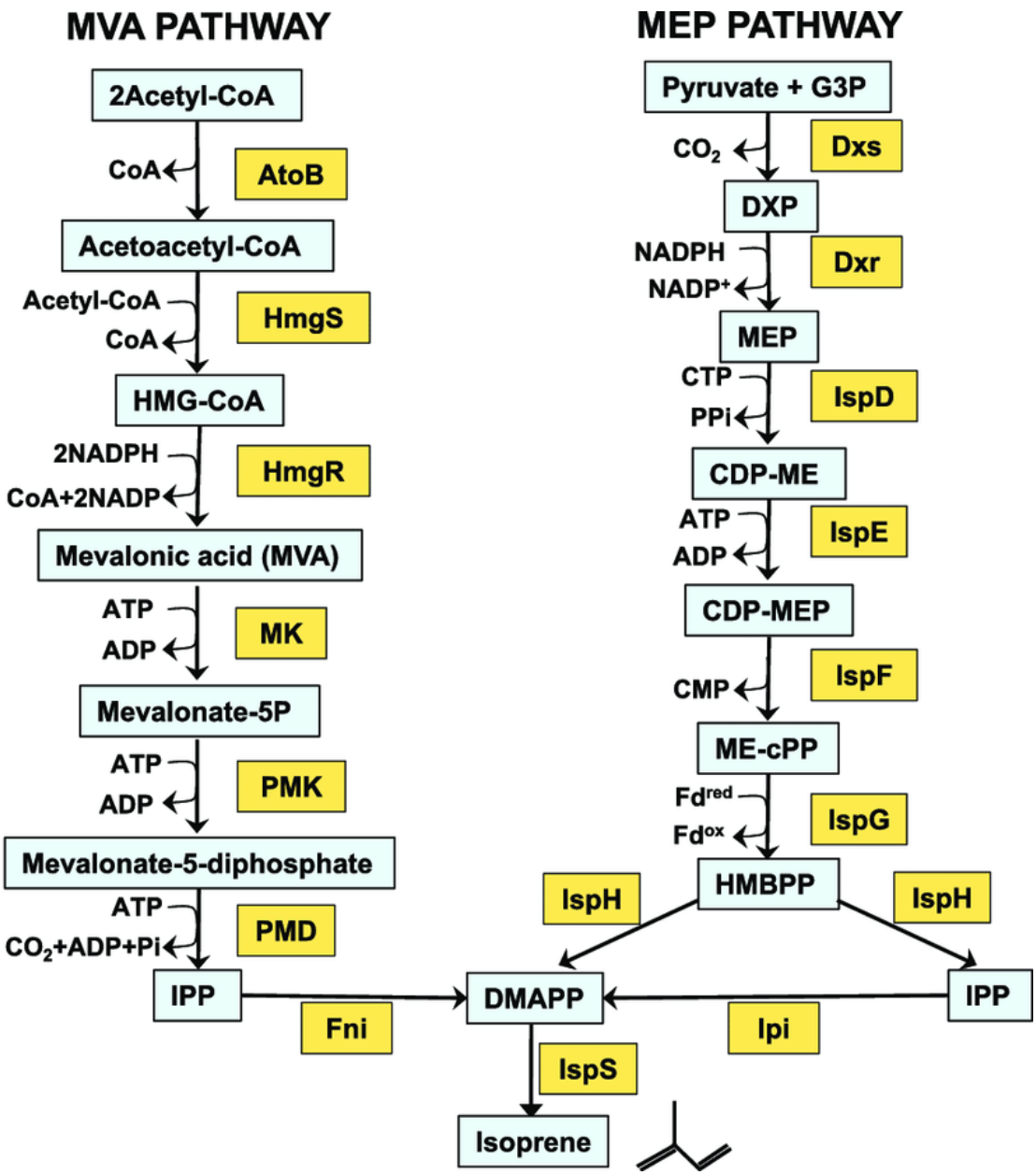
Όσον αφορά τη χημική σύνθεση των τερπενοειδών σε βιομηχανική κλίμακα, αποτελεί μία μη ανανεώσιμη και συχνά δύσκολη μέθοδο, λόγω της περίπλοκης χημικής δομής των μορίων αυτών [62, 78].

Φαίνεται λοιπόν πως χρειάζεται να αναπτυχθούν εναλλακτικές προσεγγίσεις για την παραγωγή τερπενοειδών, οι οποίες θα ανταποκρίνονται στη μεγάλη ζήτηση τους. Οι προϋποθέσεις για τις προσεγγίσεις αυτές περιλαμβάνουν το χαμηλό κόστος και το να είναι φιλικές προς το περιβάλλον.

1.9 Βιοσύνθεση τερπενοειδών

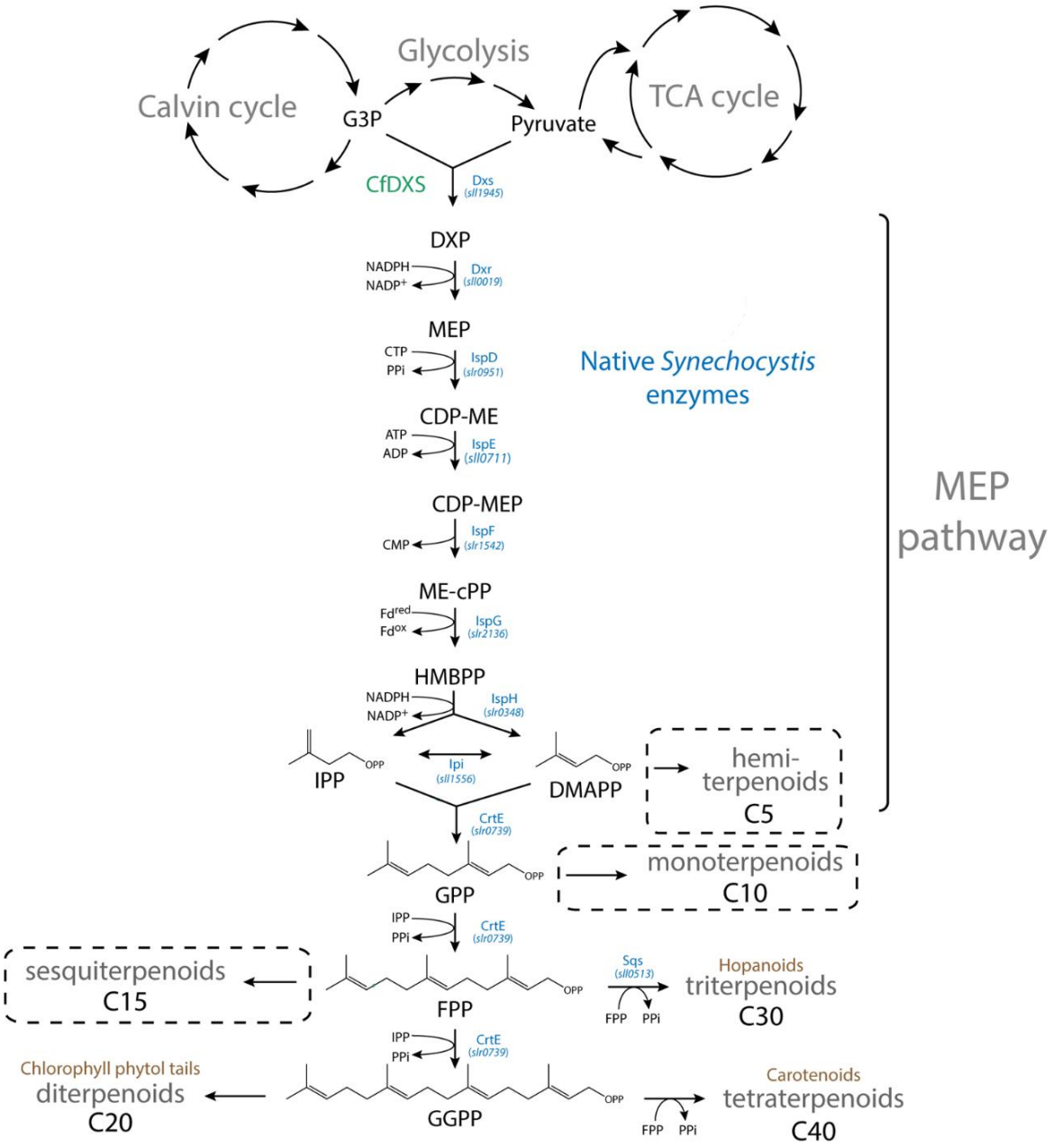
Η βιοσύνθεση των τερπενοειδών στο κυτταρόπλασμα των ανώτερων φυτών λαμβάνει χώρα μέσω του μονοπατιού του μεβαλονικού οξέος (MVA Pathway). Στα περισσότερα βακτήρια, κυανοβακτήρια, πράσινα μικροφύκη και στα πλαστίδια των φυτών πραγματοποιείται στο κυτοσόλιο μέσω του μονοπατιού της φωσφορικής μεθυλερυθριτόλης (methylerythritol phosphate [MEP] pathway) υπό τη δράση επτά συντηρημένων ενζύμων (Εικόνα 1.13) [79, 80]. Το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) που καθηλώνεται μέσω της φωτοσύνθεσης μετατρέπεται σε 3-φωσφογλυκερικό οξύ (3PGA) το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεΰδη (G3P) και πυροσταφυλικό. Τα δύο τελευταία είναι τα αρχικά αντιδρώντα του ενδογενούς MEP μονοπατιού στα *Synechocystis* και οδηγούν στη σύνθεση του πυροφωσφορικού ισοπεντενύλιου (IPP) και πυροφωσφορικού διμεθυλαλλύλιου (DMAPP). Επίσης, η αποκαρβοξυλίωση του πυροσταφυλικού οδηγεί στον σχηματισμό του ακέτυλο συνενζύμου Α, το οποίο είναι το αρχικό αντιδρών του MVA μονοπατιού. Αυτό με τη σειρά του οδηγεί στο σχηματισμό του πυροφωσφορικού ισοπεντενύλιου (IPP) και πυροφωσφορικού διμεθυλαλλυλίου (DMAPP). Οι δύο αυτές ενώσεις αποτελούν τα δομικά στοιχεία για το σχηματισμό των τερπενοειδών. Ομοιοπολική σύνδεση των IPP και DMAPP έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του πυροφοσφωρικού γερανυλίου (GPP), ένα τερπενοειδές 10 ατόμων άνθρακα το οποίο αποτελεί ενδιάμεσο μεταβολίτη για το σχηματισμό μεγαλύτερων τερπενοειδών στα *Synechocystis*. Ο συνδυασμός των IPP και DMAPP οδηγεί στο σχηματισμό πρόδρομων μορίων 10, 15 και 20 ατόμων άνθρακα, τα οποία στη συνέχεια θα τροποποιηθούν περαιτέρω δημιουργώντας έτσι τη μεγάλη δομική ποικιλομορφία των τερπενοειδών [81]. Παρόλο που τα γονίδια του MEP μονοπατιού έχουν ταυτοποιηθεί στα γονιδίωμα των κυανοβακτηρίων, λίγα είναι γνωστά για το μονοπάτι αυτό [57]. Έχει βρεθεί όμως ότι στο MEP μονοπάτι επιτυγχάνεται αποδοτικότερη χρήση του άνθρακα, με σχεδόν 50% υψηλότερη στοιχειομετρική απόδοση άνθρακα σε σχέση με το MVA μονοπάτι [82]. Στα κυανοβακτήρια το MEP μονοπάτι συνδέεται άμεσα με τη φωτοσύνθεση καθώς χρησιμοποιεί πυροσταφυλικό και 3-φωσφορική γλυκεραλδεΰδη (G3P) ως αρχικά υποστρώματα και η ενέργεια παρέχεται με τη μορφή

NADPH, ανηγμένης φερρεδοξίνης, CTP και ATP, τα οποία προέρχονται από τη φωτοσύνθεση (Εικόνα 1.14) [62].



Εικόνα 1.13. Βιοσυνθετικά μονοπάτια τερπενοειδών. Στα πλαστίδια όλων των φυτών, όπως και στα κυανοβακτήρια, τα τερπενοειδή παράγονται μέσω του MEP μονοπατιού. Στο κυτταρόπλασμα των φυτικών κυττάρων τερπενοειδή που λειτουργούν ως δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως αρτεμισινίνη και geranyl linalool, παράγονται μέσω του MVA μονοπατιού. Υπάρχουν ενδείξεις ότι ο χλωροπλάστης τροφοδοτεί με ενδιάμεσα τερπενοειδών το κυτταρόπλασμα για χρήση σε αυτό το διαμέρισμα του κυττάρου. Προϊόντα και των δύο μονοπατιών αποτελούν τα IPP και DMAPP. Οι C5 ενώσεις αυτές αποτελούν τα δομικά στοιχεία για τη βιοσύνθεση των τερπενοειδών. Αρχικά υποστρώματα για τα MVA

και MEP μονοπάτια αποτελούν το ακετυλο-CoA και το πυροσταφυλικό με την 3-φωσφορική γλυκεραλδεϋδη (G3P) αντίστοιχα. Ελήφθη από την παραπομπή [3].

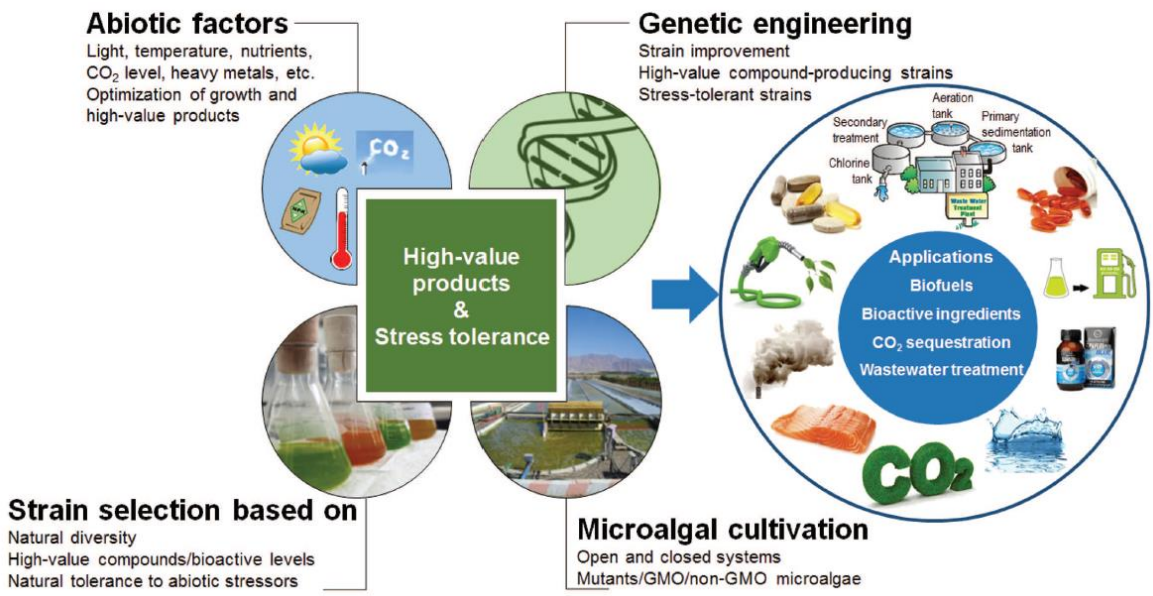


Εικόνα 1.14. Βιοσυνθετικό μονοπάτι MEP στο κυανοβακτήριο *Synechocystis*.Τα προϊόντα που μπορούν να παραχθούν ετερόλογα φαίνονται μέσα σε πλαίσιο με διακεκομμένες γραμμές (ημιτερπενοειδή, μονοτερπένια, σεσκιτερπένια). Τροποποιημένη Εικόνα που ελήφθη από την παραπομπή [81].

1.10 Παραγωγή τερπενοειδών από κυανοβακτήρια

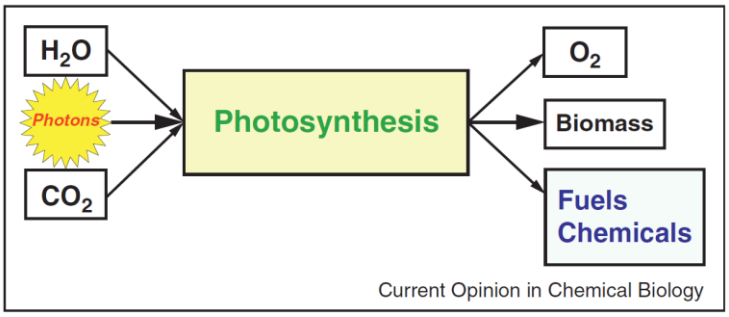
Μέχρι σήμερα, έχει επιτευχθεί η παραγωγή ενός μεγάλου αριθμού φυσικών προϊόντων από ετερότροφους μικροοργανισμούς όπως είναι τα *E. coli* και ο *S. cerevisiae* [83-90]. Θεωρητικά οι περισσότερες χημικές ενώσεις που μπορούν να παραχθούν από ετερότροφους μικροοργανισμούς έχοντας ως πρώτη ύλη σάκχαρα μπορούν να παραχθούν επίσης και από γενετικά τροποποιημένα κυανοβακτήρια χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το διοξείδιο του άνθρακα [91]. Τα τελευταία 20 χρόνια πάνω από 20 χημικές ενώσεις έχουν συντεθεί ετερόλογα από κυανοβακτήρια χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη CO_2. Μεταξύ αυτών είναι η αιθανόλη [92-95], το αιθυλένιο [96, 97], η ακετόνη [98], η ισοπροπανόλη [99], 1,2-προπανοδιόλη [100], η ισοβουτυραλδεΰδη και η ισοβουτανόλη [101], η 2,3-βουτανοδιόλη [102], το ισοπρένιο [103-106], το *β*-φελλανδρένιο [62, 107, 108], το λιμονένιο [109], η φορσκολίνη [73], το γαλακτικό οξύ [110], η σουκρόζη [111] και λιπαρά οξέα [112].

Η παραγωγή φυσικών προϊόντων από κυανοβακτήρια μπορεί να επιτευχθεί είτε με βιοτικούς είτε με αβιοτικούς παράγοντες (Εικόνα 1.15). Αβιοτικοί παράγοντες όπως είναι η διαφοροποίηση της έντασης του φωτός, της πηγής του οργανικού άνθρακα, του pH του θρεπτικού μέσου και της συγκέντρωσης του CO_2 και άλλων θρεπτικών συστατικών έχουν μελετηθεί και υπάρχουν αναφορές ότι η βελτιστοποίηση των συνθηκών αυτών μπορεί να αυξήσει την παραγωγή συγκεκριμένων μορίων ή προϊόντων [113, 114]. Όσον αφορά στους βιοτικούς παράγοντες, μέσω της γενετικής μηχανικής και της συνθετικής βιολογίας καθίσταται δυνατή η τροποποίηση αλλά και η εισαγωγή μεταβολικών μονοπατιών στα κύτταρα. Μερικές φορές μάλιστα η συνδυαστική βελτιστοποίηση των βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη απόδοση [115].



Εικόνα 1.15. Σχηματική απεικόνιση της εκμετάλλευσης των φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών για πιθανές βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Η επιλογή του κατάλληλου στελέχους φωτοσυνθετικού μικροοργανισμού το οποίο θα υποστεί γενετική τροποποίηση ή/και θα αναπτυχθεί κάτω από αβιοτικούς παράγοντες σε μεγαλύτερης κλίμακας συστήματα μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή μεγάλου εύρους προϊόντων με πολλαπλές εφαρμογές. Ελήφθη από την παραπομπή [116].

Η μετατροπή των κυανοβακτηρίων σε «κυανο-εργοστάσια» αποτελεί μία όλο και πιο ελκυστική προσέγγιση τα τελευταία χρόνια. Με τη χρήση της άφθονης ηλιακής ενέργειας και την ανακύκλωση του CO_2 επιτυγχάνεται η παραγωγή μεγάλου εύρους προϊόντων και ταυτόχρονα η αντιμετώπιση των παγκόσμιων ενεργειακών και περιβαλλοντικών ζητημάτων (Εικόνα 1.16) [117, 118]. Συνεπώς στα κυανοβακτήρια μπορεί να εφαρμοστεί η έννοια των «φωτοσυνθετικών καυσίμων» όπου ένας μοναδικός μικροοργανισμός λειτουργεί ταυτόχρονα ως φωτο-καταλύτης και παραγωγός βιοκαυσίμων [106].

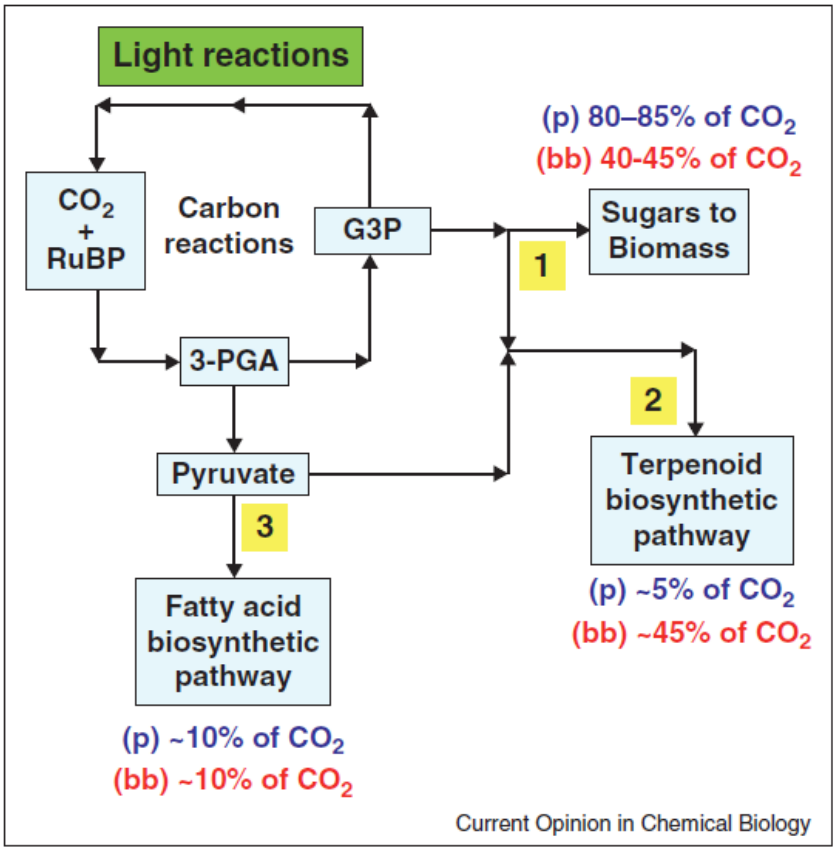


Εικόνα 1.16. Μέσω της φωτοσύνθεσης μπορούν να παραχθεί ένας μεγάλος αριθμός προϊόντων από το CO_2. Ελήφθη από την παραπομπή [119].

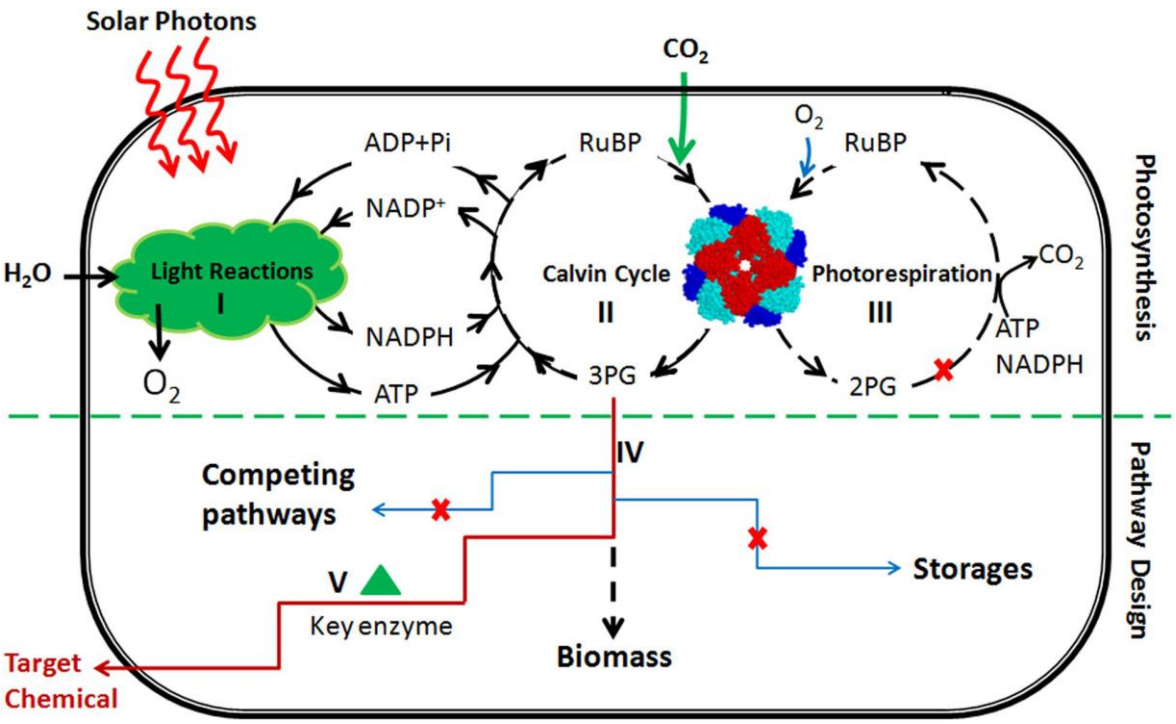
Η βιοτεχνολογική εκμετάλλευση των κυανοβακτηρίων έναντι των μικροφυκών και των ανώτερων φυτών εμφανίζει αρκετά πλεονεκτήματα. Παρόλο που τα κυανοβακτήρια όπως και τα φυτά επιτελούν οξυγονική φωτοσύνθεση, η φωτοσυνθετική απόδοση των κυανοβακτηρίων είναι δεκαπλάσια από αυτή των ανώτερων φυτών [120]. Στη φύση το CO_2 καθηλώνεται κυρίως μέσω του κύκλου του Calvin-Benson με τη χρήση ενός αργού ενζύμου, της RuBisCO (καρβοξυλάση/οξυγονάση της 1,5-διφοσφωρικής ριβουλόζης). Η RuBisCO στα κυανοβακτήρια έχει βρεθεί να είναι πιο ενεργή σε σχέση με τα ανώτερα φυτά [121]. Επιπλέον τα κυανοβακτήρια διαθέτουν ταχύτερο ρυθμό ανάπτυξης σε σύγκριση με τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς όπως τα πράσινα μικροφύκη και τα ανώτερα φυτά [122, 123]. Ακόμη, ο χειρισμός του γενετικού υλικού των κυανοβακτηρίων είναι ευκολότερος από αυτόν των ευκαρυωτικών φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών όπως είναι τα ανώτερα φυτά και τα μικροφύκη και μπορούν να τροποποιηθούν μέσω μεταβολικής μηχανικής και συνθετικής βιολογίας [124]. Η ικανότητα τους να αναπτύσσονται σε κλειστά συστήματα τα καθιστά ιδανικούς μικροοργανισμούς για την παραγωγή και την εύκολη συλλογή πτητικών μορίων όπως είναι το ισοπρένιο [53]. Τέλος, για την καλλιέργεια των κυανοβακτηρίων μπορούν να εκμεταλλευτούν άγονες, μη καλλιεργήσιμες εκτάσεις, και η προσαρμοστικότητα των μικροοργανισμών αυτών επιτρέπει τη χρήση θαλασσινού νερού σε αντίθεση με τις καλλιέργειες των ανώτερων φυτών.

Στο πλαίσιο της βιοτεχνολογικής εκμετάλλευσης των κυανοβακτηρίων, το βιοσυνθετικό μονοπάτι των τερπενοειδών παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς μέσω αυτού παράγεται η μεγαλύτερη και πιο ποικιλόμορφη σειρά οργανικών ενώσεων φυσικής προέλευσης [125]. Τα κυανοβακτήρια μέσω του MEP μονοπατιού έχουν την ικανότητα να συνθέτουν μεγάλο αριθμό τερπενοειδών μορίων απαραιτήτων για την κυτταρική λειτουργία τους. Δεν έχουν όμως την ικανότητα να συνθέτουν δευτερογενείς μεταβολίτες όπως είναι τα μονοτερπένια, διότι δε διαθέτουν τα γονίδια που κωδικοποιούν τις αντίστοιχες συνθάσες των μονοτερπενίων. Με την εισαγωγή ενός μόνο γονιδίου (π.χ. συνθάση του β-φελλανδρενίου) στο γενετικό τους υλικό τα κυανοβακτήρια είναι ικανά να παράγουν μέσω της φωτοσύνθεσης το αντίστοιχο προϊόν (Εικόνα 1.14) [62, 78, 126]. Ένας περιορισμός που προκύπτει στην περίπτωση αυτή είναι η κατανομή του φωτοσυνθετικού άνθρακα (του άνθρακα του διοξειδίου του άνθρακα που καθηλώνεται μέσω τις διαδικασίας της φωτοσύνθεσης) μεταξύ των χρήσιμων κυτταρικών προϊόντων και την παραγωγή βιομάζας. [119]. Τα κύτταρα, ως ζωντανοί μικροοργανισμοί, έχουν τις δικές τους απαιτήσεις και προτεραιότητες για την παραγωγή βιομάζας, οι οποίες πολλές φορές δρουν ανταγωνιστικά με την παραγωγή των δευτερογενών επιθυμητών (για εμάς) προϊόντων. Στην Εικόνα 1.18

παρουσιάζονται ορισμένες από τις στρατηγικές γενετικής μηχανικής που εφαρμόζονται σήμερα για την αντιμετώπιση του περιορισμού αυτού και την κατεύθυνση της ροής του άνθρακα στο επιθυμητό βιοσυνθετικό μονοπάτι (Εικόνα 1.17).



Εικόνα 1.17. Κατανομή του άνθρακα του CO_2 που καθηλώνεται μέσω της φωτοσύνθεσης, στα μεταβολικά μονοπάτια στα φυτά, στα μικροφύκη και στα κυανοβακτήρια. Στην πλειοψηφία των φωτοσυνθετικών συστημάτων, η κατανομή άνθρακα κατευθύνεται κατά κύριο λόγο προς τα σάκχαρα (*p*=80-85%) οδηγώντας στη συσσώρευση βιομάζας, και έπειτα στη βιοσύνθεση των τερπενοειδών (*p*=~5%) και των λιπαρών οξέων (*p*=~10%). Η κατανομή του φωτοσυνθετικού άνθρακα στα πράσινα μικροφύκη *Botryococcus braunii* var Showa (στέλεχος Berkeley) είναι διαφορετική, με μειωμένη ροή άνθρακα προς τα σάκχαρα (*bb*=40-45%) οδηγώντας σε μικρότερους ρυθμούς συσσώρευσης βιομάζας, ενώ τα τερπενοειδή (*bb*=45 %) και η βιοσύνθεση λιπαρών οξέων (*bb*=10%) συνιστούν μαζί την πλειονότητα της ροής C στον οργανισμό *B. braunii*. Το στέλεχος αυτό προσφέρει ένα παράδειγμα μιας φυσικά υπάρχουσας ουσιαστικής τροποποίησης στην κατανομή του φωτοσυνθετικού άνθρακα στους χλωροπλάστες. Η Εικόνα ελήφθη από την παραπομπή [119].



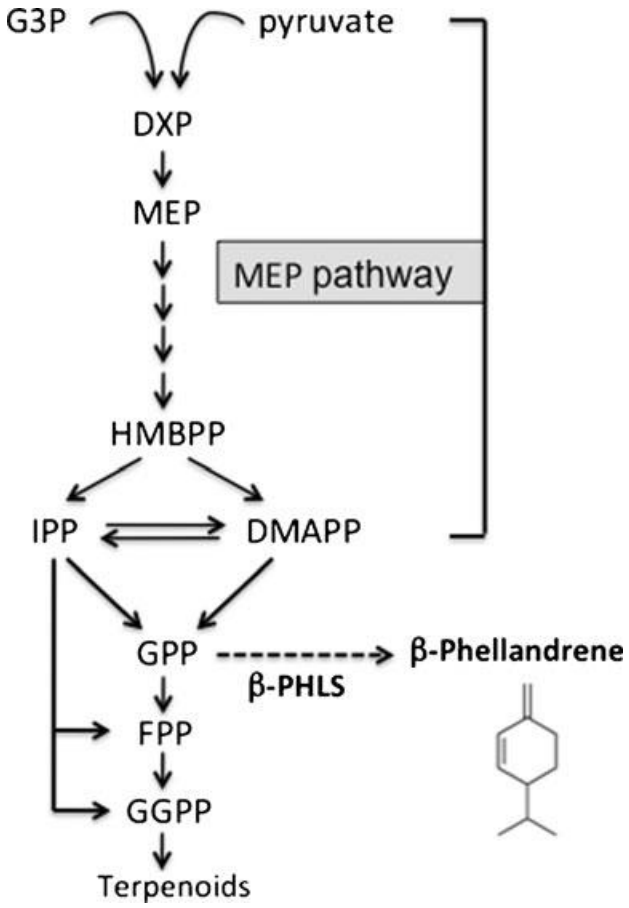
Εικόνα 1.18. Ορισμένες από τις στρατηγικές γενετικής μηχανικής για τη βελτιστοποίηση της παραγωγής οργανικών ενώσεων από το CO_2 που έχουν εφαρμοστεί μέχρι σήμερα στα κυανοβακτήρια. Κύριος στόχος είναι η βελτιστοποίηση της φωτοσύνθεσης μέσω (I) καλύτερης διαχείρισης της απορροφούμενης ενέργειας του φωτός, (II) βελτιστοποίηση της δράσης της RuBisCO με σκοπό την ενίσχυση της αποδοτικότητας του κύκλου του Calvin-Benson. Τα ετερόλογα μονοπάτια που εισήχθησαν αποσκοπούν (IV) στην παρεμπόδιση ανταγωνιστικών μονοπατιών και (V) στην αύξηση του επιπέδου έκφρασης σημαντικών ενζύμων, με σκοπό να οδηγήσουν τη ροή του άνθρακα προς τα μονοπάτια-στόχους. Η Εικόνα ελήφθη από την παραπομπή [117].

1.11 Ετερόλογη παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου από το κυανοβακτήριο *Synechocystis*

Το *β*-φελλανδρένιο ($C_{10}H_{16}$) είναι ένα μονοτερπένιο με μεγάλη εμπορική αξία. Έχει αρκετές εφαρμογές στη βιομηχανία εφόσον αποτελεί μόριο κλειδί στη συνθετική χημεία, στη φαρμακευτική, σε καλλυντικά, σε προϊόντα καθαρισμού αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως βιοκαύσιμο [62]. Παράγεται από ένα μεγάλο αριθμό φυτών όπως είναι η λεβάντα, το πεύκο, ο ευκάλυπτος και ο μαϊντανός [127]. Αποτελεί βασικό συστατικό των αιθέριων ελαίων των φυτών. Συντίθεται στα τριχώματα των φυτών από το πυροφωσφορικό γερανύλιο (GPP) με τη χρήση του ενζύμου της συνθάση του φελλανδρενίου (PHLS) μέσω του μονοπατιού του μεβαλονικού οξέος (mevalonic acid [MVA] pathway). Η PHLS κωδικοποιείται στον πυρήνα και εντοπίζεται στα πλαστίδια των

φυτών [126]. Παρά τη μεγάλη ζήτηση του στη βιομηχανία και στο εμπόριο, η παραγωγή του έχει μεγάλο κόστος και δύσκολα το συναντά κανείς εμπορικά διαθέσιμο σε καθαρή μορφή, χωρίς προσμίξεις ισομερών του.

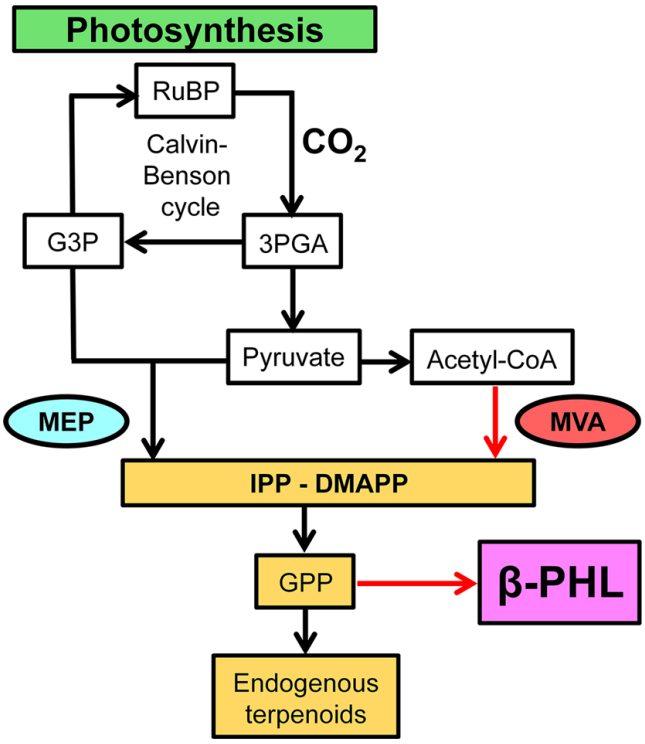
Το 2013 αναφέρθηκε για πρώτη φορά η ετερόλογη παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου από τα κυανοβακτήρια *Synechocystis* [62]. Πιο συγκεκριμένα το γονίδιο της συνθάσης του *β*-φελλανδρενίου (*PHLS*) από τον οργανισμό *Lavandula angustifolia* (λεβάντα) έπειτα από βελτιστοποίηση των κωδικονίων του (codon optimization) ενσωματώθηκε στο γονιδίωμα των *Synechocystis*, προσδίδοντας του έτσι την ικανότητα να παράγει *β*-φελλανδρένιο μέσω του MEP μονοπατιού έχοντας ως πρώτες ύλες μόνο φως, νερό και CO_2 (Εικόνα 1.19).



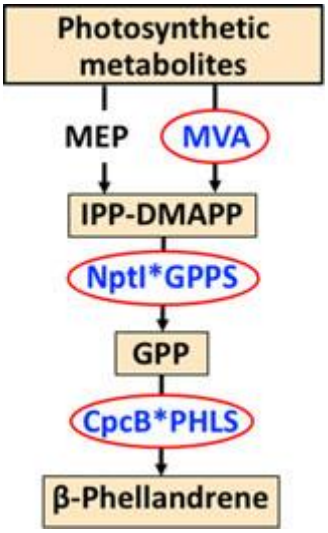
Εικόνα 1.19. Σχηματική απεικόνιση του MEP μονοπατιού μέσω του οποίου πραγματοποιείται η ετερόλογη παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου στα *Synechocystis*. Οι συμπαγείς γραμμές αντιπροσωπεύουν τις αντιδράσεις που καταλύονται από ενδογενή ένζυμα στα *Synechocystis*. Με διακεκομμένη γραμμή φαίνεται η ετερόλογη αντίδραση για την παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου. Η Εικόνα ελήφθη από την παραπομπή [62].

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μόνο το 5% περίπου του φωτοσυνθετικού άνθρακα οδηγεί στο μεταβολικό μονοπάτι για τη σύνθεση των τερπενοειδών. Αυτό έχει αντίκτυπο

στην αποδοτική ετερόλογη παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου από τα *Synechocystis*. Οι προσεγγίσεις που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία για την αντιμετώπιση του περιορισμού αυτού περιλαμβάνουν την έκφραση της PHLS κάτω από τη δράση του ισχυρού υποκινητή του οπερονίου *cpc*, ως πρωτεΐνης σύντηξης με την άφθονη στα κυανοβακτήρια *β*-υπομονάδα της φυκοκυανίνης (cpcB) [78, 107, 126, 128]. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε ετερόλογη έκφραση των ενζύμων του μονοπατιού MVA, που συναντάται στα φυτά, ταυτόχρονα με την έκφραση της cpcB.PHLS πρωτεΐνης σύντηξης και τέλος έκφραση της συνθάσης του πυροφωσφορικού γερανυλίου (GPPS) με σκοπό την ενίσχυση του υποστρώματος της PHLS (εικόνες 1.20, 1.21) [78, 108]. Η χρήση ενδογενών γονιδίων όπως είναι το *cpcB*, είτε ετερόλογων όπως είναι η NTPI, που υπερεκφράζονται στα *Synechocystis*, ως αλληλουχίες οδηγοί των πρωτεϊνών σύντηξης με τα *PHLS* και *GPPS* αντίστοιχα, έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί σε υπερέκφραση και συσσώρευση των αντίστοιχων πρωτεϊνών στα στελέχη που δημιουργήθηκαν. Οι παραπάνω στρατηγικές κατάφεραν να καθοδηγήσουν αποτελεσματικά τη ροή του άνθρακα που οδηγεί στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των τερπενοειδών και πιο συγκεκριμένα στη σύνθεση του β-φελλανδρενίου, πετυχαίνοντας έτσι απόδοση μέχρι και 24 mg *β*-φελλανδρενίου ανά g βιομάζας, δηλαδή 2,4% w/w *β*-φελλανδρενίου: βιομάζα [108].



Εικόνα 1.20. Σχηματική απεικόνιση του ενδογενούς MEP (αριστερά) και του ετερόλογου MVA (δεξιά) μονοπατιού για το σχηματισμό του β-φελλανδρενίου. Η Εικόνα ελήφθη από την παραπομπή [78].



Εικόνα 1.21. Σχηματική απεικόνιση της τροποποιημένης κατεύθυνσης της ροής του υποστρώματος (GPPS) του MEP μονοπατιού με σκοπό τη βιοσύνθεση του *β*-φελλανδρενίου σε μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis*. Το ενδογενές MEP τροποποιήθηκε έπειτα από ενσωμάτωση στο γενομικό DNA των *Synechocystis*, των ετερόλογων γονιδίων σύντηξης CpcB.PHLS και Nptl.GPPS, με ταυτόχρονη ενσωμάτωση των γονιδίων του MVA μονοπατιού. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της απόδοσης του *β*-φελλανδρενίου. Ελήφθη από την παραπομπή [108].

Μεγάλο πλεονέκτημα της συγκεκριμένης προσέγγισης για την παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου είναι ο αυθόρμητος διαχωρισμός του προϊόντος από τα κύτταρα και το μέσο ανάπτυξης. Το *β*-φελλανδρένιο, ως υδρόφοβο μόριο, διαχέεται μέσω της πλασματικής μεμβράνης και του κυτταρικού τοιχώματος των *Synechocystis* και συσσωρεύεται πάνω από την επιφάνεια της υγρής καλλιέργειας, μιας και δεν είναι υδατοδιαλυτό μόριο από όπου μπορεί να συλλεχθεί με τη χρήση ενός σιφωνίου. Με τον τρόπο αυτό, απλοποιούνται οι διαδικασίες συγκομιδής του προϊόντος και δεν απαιτούνται επιπλέον διαδικασίες για τον καθαρισμό του. Επιπλέον αποφεύγονται τυχόν τοξικές επιδράσεις και παρεμποδίσεις του προϊόντος στον μεταβολισμό του κυττάρου [78]. Στον πίνακα 1.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ετερόλογης παραγωγής του *β*-φελλανδρενίου από μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis*.

Πίνακας 1.1. Συγκριτικά αποτελέσματα της ετερόλογης παραγωγής του *β*-φελλανδρενίου στη βιβλιογραφία από μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis* όταν καλλιεργούνται στους ειδικούς βιοαντιδραστήρες 1L δύο φάσεων (υγρής/αέριας). Η τελεία ή ο αστερίσκος μεταξύ των γονιδίων υποδηλώνει τη σύντηξη των γονιδίων. Στις υπόλοιπες περιόδους πραγματοποιείται αντικατάσταση της αλληλουχίας *psbA2* ή του οπερονίου *cpc* από τις αλληλουχίες που αναφέρονται.

Μεταλλαγμένο στέλεχος		**Απόδοση *β*-φελλανδρενίου (mg · g^{-1} DCW)**	**Συνθήκες**	**Αναφορά**
		50 μg *β*-φελλανδρένιο · L^{-1} καλλιέργειας	150 μmol φωτονίων ·m^{-2} · s^{-1}, 48 h	[62]
ΔpsbA2-PHLS		0,01 ± 0,00	50 μmol φωτονίων ·m^{-2}· s^{-1}, 48 h	[107]
		0,04± 0,01	170 μmol φωτονίων ·m^{-2}· s^{-1}, 48 h	
ΔpsbA2(noAT box)-PHLS		0,05 ± 0,01	50 μmol φωτονίων ·m^{-2}· s^{-1}, 48 h	
		0,05± 0,01	170 μmol φωτονίων ·m^{-2}· s^{-1}, 48 h	
ΔpsbA2-trc-PHLS		0,12± 0,02	50 μmol φωτονίων ·m^{-2}· s^{-1}, 48 h	
		0,11 ± 0,01	170 μmol φωτονίων ·m^{-2}· s^{-1}, 48 h	
ΔpsbA2-trc-T7gene10-PHLS		0,25 ± 0,06	50 μmol φωτονίων ·m^{-2}· s^{-1}, 48 h	
		0,25 ± 0,05	170 μmol φωτονίων ·m^{-2}· s^{-1}, 48 h	
Δcpc-PHLS		0,26 ± 0,06	50 μmol φωτονίων ·m^{-2}· s^{-1}, 48 h	
		0,08 ± 0,00	170 μmol φωτονίων ·m^{-2}· s^{-1}, 48 h	
ΔCpc+CpcB·PHLS	Σειρά 1	0,05 ± 0,02	50 μmol φωτονίων ·m^{-2}· s^{-1}, 48 h	[126]
	Σειρά 2	0,02 ± 0,01	50 μmol φωτονίων ·m^{-2}· s^{-1}, 48 h	
	Σειρά 3	0,03 ± 0,02	50 μmol φωτονίων ·m^{-2}· s^{-1}, 48 h	
CpcB·PHL+Cpc	Σειρά 1	3,70 ± 0,48	50 μmol φωτονίων ·m^{-2}· s^{-1}, 48 h	
	Σειρά 2	2,57 ± 0,50	50 μmol φωτονίων ·m^{-2}· s^{-1}, 48 h	
	Σειρά 3	3,28 ± 0,90	50 μmol φωτονίων ·m^{-2}· s^{-1}, 48 h	
ΔCpc+NPTI·PHLS	Σειρά 1	0,72 ± 0,10	50 μmol φωτονίων ·m^{-2}· s^{-1}, 48 h	
	Σειρά 2	0,62 ± 0,20	50 μmol φωτονίων ·m^{-2}· s^{-1}, 48 h	
	Σειρά 3	0,56 ± 0,14	50 μmol φωτονίων ·m^{-2}· s^{-1}, 48 h	
ΔCpc+PHLS	Σειρά 1	0,50 ± 0,08	48 h	[78]

	Σειρά 2	0,43 ± 0,16	48 h	
	Σειρά 3	0,33 ± 0,06	48 h	
CpcB·PHLS	Σειρά 1	5,96 ± 0,08	48 h	
	Σειρά 2	4,60 ± 1,26	48 h	
	Σειρά 3	4,47 ± 0,.74	48 h	
CpcB·PHLS + GPPS	Σειρά 1	6,68 ± 0,84	48 h	
	Σειρά 2	5,78 ± 1,03	48 h	
	Σειρά 3	4,90± 0,73	48 h	
CpcB·PHLS + GPPS + MVA	Σειρά 1	12,44 ± 4,21	48 h	
	Σειρά 2	10,86 ± 3,54	48 h	
	Σειρά 3	9,22 ± 1,07	48 h	
Recipient (cpcB*PHLS)		1,42 ± 0,66	100 μmol φωτονίων $\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 48 h	[128]
R+GPPS-smR		1,89 ± 0,53	100 μmol φωτονίων $\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 48 h	
R+cmR29*GPPS-smR		2,42 ± 0,86	100 μmol φωτονίων $\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 48 h	
*R+nptI*GPPS*		5,95 ± 1,31	100 μmol φωτονίων $\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 48 h	
GPPS		9,40±1,20	100 μmol φωτονίων $\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 26ºC, 48 h	[108]
NptI*GPPS		24,0±1,60	100 μmol φωτονίων $\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 26ºC, 48 h	

1.12 Βελτιστοποίηση κωδικονίων (Codon optimization)

Σύμφωνα με το γενετικό κώδικα ένα αμινοξύ μπορεί να κωδικοποιείται από περισσότερα από ένα κωδικόνια, δηλαδή τριπλέτες νουκλεοτιδίων. Διαφορετικοί οργανισμοί εμφανίζουν προτίμηση σε συγκεκριμένα κωδικόνια έναντι άλλων, και σε μερικούς δε συναντώνται καθόλου κάποια κωδικόνια. Ανάλογα με τα κωδικόνια μπορεί να επηρεαστεί η έκφραση της πρωτεΐνης. Συνεπώς, όταν χρησιμοποιούνται γονίδια τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εκφράζονται σε άλλους οργανισμούς είναι σημαντικό να πραγματοποιηθεί η βελτιστοποίηση των κωδικονίων που χρησιμοποιούνται με σκοπό την επίτευξη υψηλών επιπέδων υπερέκφρασης ετερόλογων γονιδίων [129, 130].

1.14 Μετασχηματισμός βακτηρίων

Τα βακτήρια μπορούν να αποκτήσουν ξένο DNA με τρεις τρόπους: σύζευξη, μεταγωγή και μετασχηματισμό. Παρόλο που η μεταφορά DNA από το εξωκυττάριο περιβάλλον μέσα στο κυτοσόλιο αποτελεί μία περίπλοκη διεργασία (ιδίως στα *Gram*-αρνητικά βακτήρια όπου το εισερχόμενο DNA πρέπει να διασχίσει την εξωτερική μεμβράνη, το κυτταρικό τοίχωμα και την κυτταροπλασματική μεμβράνη) έχει βρεθεί ότι πάνω από 40 είδη βακτηρίων μπορούν να υποστούν φυσικά μετασχηματισμό [132]. Το ελεύθερο DNA είναι άφθονο στο περιβάλλον, καθώς απελευθερώνεται από νεκρούς μικροοργανισμούς. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται τρεις πιθανοί λόγοι για τους οποίους τα βακτήρια δέχονται φυσικά ξένο DNA [133].

1. Γενετική ποικιλομορφία. Η απόκτηση πιθανών χρήσιμων γενετικών πληροφοριών, όπως νέες μεταβολικές λειτουργίες ή ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά.
2. Επιδιόρθωση DNA. Το DNA από συγγενή βακτήρια που υπάρχει στο περιβάλλον μπορεί να χρησιμεύσει ως πρότυπο για την επιδιόρθωση βλάβης του DNA [132].
3. DNA ως τροφή. Το DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή άνθρακα, αζώτου και φωσφόρου [134, 135].

Πολλά κυανοβακτήρια είναι επιδεκτικά σε γενετική τροποποίηση. Μερικά, μεταξύ των οποίων και τα *Synechocystis*, είναι ικανά να δεχτούν φυσικά το εξωγενές DNA (natural competent bacteria) και να υποστούν γενετικό μετασχηματισμό (transformation), με απλή ανάμειξη των μορίων DNA με την καλλιέργεια [136]. Το DNA μπορεί να εισαχθεί είτε με ενσωμάτωση του στο γονιδίωμα του κυανοβακτηρίου είτε σε φορείς που μπορούν να αντιγραφούν [136]. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν φορείς για την ενσωμάτωση του εξωγενούς DNA στο γονιδίωμα του μικροοργανισμού (integrative vectors). Οι φορείς αυτοί «θυσιάζονται», δηλαδή δεν είναι ικανοί να αναπαραχθούν στα *Synechocystis*.

Σκοπός της διατριβής

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη της ετερόλογης παραγωγής *β*-φελλανδρενίου από μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis*. Για το σκοπό αυτό η εργασία χωρίστηκε σε τρία μέρη.

Στο πρώτο μέρος της διατριβής σκοπός ήταν η δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών που φέρουν το codon optimized γονίδιο της συνθάσης του *β*-φελλανδρενίου. Επίσης στόχος ήταν να εξεταστεί το κατά πόσο επηρεάζεται η παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου από την ταυτόχρονη ετερόλογη έκφραση της συνθάσης του πυροφωσφορικού γερανυλίου. Επιπλέον, σκοπός ήταν να εξεταστεί το κατά πόσο η χρήση ενός ισχυρού υποκινητή σε συνδυασμό με τη δημιουργία γονιδίων σύντηξης της συνθάσης του *β*-φελλανδρενίου με τις αλληλουχίες που κωδικοποιούν τις δύο κύριες υπομονάδες της φυκοκυανίνης είναι αρκετά ώστε να ενισχύσουν την παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου παρουσία ή απουσία των υπόλοιπων γονιδίων του *cpc* οπερονίου.

Στο δεύτερο μέρος της διατριβής, βασικός σκοπός ήταν η μελέτη της επίδρασης διαφόρων συνθηκών καλλιέργειας, στην ανάπτυξη, τη φωτοσυνθετική λειτουργία αλλά και την ικανότητα παραγωγής του *β*-φελλανδρενίου από τα μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis*. Εξετάστηκαν συνθήκες όπως η υψηλή αλκαλικότητα και αλατότητα του θρεπτικού μέσου, η υψηλότερη ένταση φωτός και συγκέντρωση CO_2 με σκοπό να βρεθούν λύσεις οι οποίες θα βοηθήσουν στην αντιμετώπιση κάποιων περιορισμών που προκύπτουν κατά τη μαζική καλλιέργεια των στελεχών αυτών.

Στο τρίτο και τελευταίο μέρος της διατριβής σκοπός ήταν η μελέτη της παραγωγής του *β*-φελλανδρενίου από ακινητοποιημένα μεταλλαγμένα κύτταρα *Synechocystis* σε σφαιρίδια αλγινικού. Κύριος στόχος ήταν η μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του αλγινικού στα σφαιρίδια στην απόδοση των κυττάρων στην παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου, σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα, προκειμένου να αναπτυχθεί ένα σύστημα που θα μπορεί να βρει εφαρμογή σε μεγαλύτερης κλίμακας βιοαντιδραστήρες για την παραγωγή αντίστοιχων προϊόντων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΛΟΓΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ *β*-ΦΕΛΛΑΝΔΡΕΝΙΟΥ ΑΠΟ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ *SYNECHOCYSTIS*

2.1 Εισαγωγή

Μέχρι σήμερα είναι γνωστό ότι τα τερπενοειδή απομονώνονται από τη βιομάζα του φυτού-παραγωγού. Όμως, η μεγάλη διακύμανση στην ετήσια απόδοση βιομάζας σε συνδυασμό με την υψηλή ζήτηση των προϊόντων αυτών στη βιομηχανία ταυτόχρονα με το υψηλό κόστος για την απομόνωση τους, την καθιστούν μία λιγότερο αποδοτική λύση. Επιπλέον, η χημική σύνθεση τους σε βιομηχανική κλίμακα αποτελεί μία μη ανανεώσιμη και συχνά δύσκολη μέθοδο, λόγω της περίπλοκης χημικής δομής των μορίων αυτών [62].

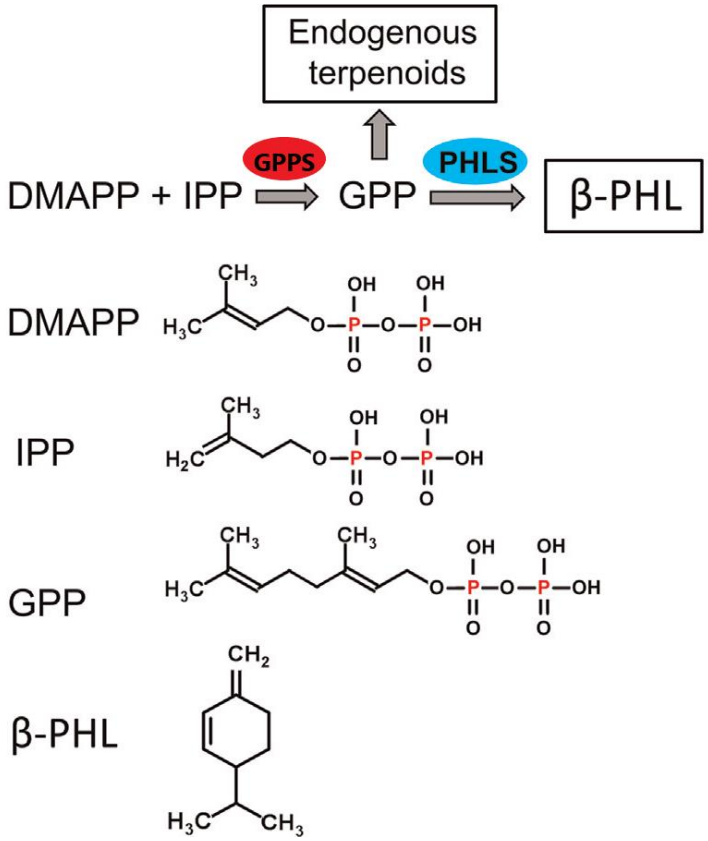
Στα κυανοβακτήρια το μονοπάτι της φωσφορικής μεθυλερυθριτόλης (methylerythritol phosphate [MEP] pathway) ευθύνεται για τη σύνθεση απαραίτητων τερπενοειδών. Παρόλο που οι οργανισμοί αυτοί χρησιμοποιούν αντίστοιχα ένζυμα με τη μεταβολική οδό του μεβαλονικού οξέος (mevalonic acid [MVA] pathway) των ανώτερων φυτών, δεν έχουν την ικανότητα να παράγουν μονοτερπένια [78]. Στη βιβλιογραφία αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 2013, η επαγόμενη από τη φωτοσύνθεση, παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου με ετερόλογη έκφραση του γονιδίου της συνθάσης του φελλανδρενίου από το φυτό *Lavandula angustifolia* (λεβάντα) στα *Synechocystis*, έπειτα από βελτιστοποίηση των κωδικονίων της (codon optimization) ως προς τα *Synechocystis*, από την ομάδα του Καθηγητή Αναστάσιου Μελή (University of California, Berkeley) [62]. Οι προσεγγίσεις μεταβολικής μηχανικής της ομάδας αυτής οδήγησαν στην επιτυχή κατασκευή στελεχών τα οποία κατευθύνουν τη ροή του ενδογενούς υποστρώματος (πυροφωσφορικού γερανύλιου-GPP) στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των τερπενοειδών και συγκεκριμένα στην παραγωγή *β*-φελλανδρενίου. Αποτέλεσμα είναι η παραγωγή χρήσιμων προϊόντων με βιομηχανικές εφαρμογές χρησιμοποιώντας μόνο φως, νερό και διοξείδιο του άνθρακα.

Αντίθετα υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί κατά την ετερόλογη έκφραση συνθασών μονοτερπενίων στα *Synechocystis*. Αρχικά, ένα πολύ μικρό ποσοστό του άνθρακα (4-5%) από το διοξείδιο του άνθρακα που καθηλώνεται μέσω της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης καταλήγει στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των τερπενοειδών [106]. Επίσης, η PHLS, ως ένζυμο του δευτερογενούς μεταβολισμού, εμφανίζει αργή καταλυτική δραστικότητα [126, 137]. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως οι συνθάσες των τερπενοειδών έχουν χαμηλή τιμή k_{cat}, περίπου 4 s^{-1} ή και χαμηλότερη [138]. Μια εναλλακτική προσέγγιση για να ξεπεραστεί ο περιορισμός αυτός είναι η προσπάθεια υπερέκφρασης της πρωτεΐνης PHLS. Έχει αποδειχθεί πως μεγαλύτερη αφθονία της πρωτεΐνης στο κύτταρο, μπορεί να οδηγήσει σε εξισορρόπηση της αργής καταλυτικής δραστικότητας του ενζύμου [108]. Μάλιστα η ίδια η φύση ακολουθεί αντίστοιχη προσέγγιση στην περίπτωση της RuBisCO (καρβοξυλάση/οξυγονάση της

1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη, παρόλο που αποτελεί ένα πολύ σημαντικό ένζυμο στα πρώτα στάδια της φωτοσύνθεσης, όπου καταλύει την αντίδραση για την καθήλωση του CO_2 από την ατμόσφαιρα, έχει εκ φύσεως πολύ χαμηλή καταλυτική δραστικότητα (k_{cat} = ~3.2 s^{-1}) [139]. Για το λόγο αυτό η φύση έκανε τη RuBisCO την πιο άφθονη πρωτεΐνη στον πλανήτη [140].

Η προσέγγιση που ακολουθείται στη βιβλιογραφία προκειμένου να επιτευχθεί υπερέκφραση της PHLS είναι η συγχώνευση της με την αλληλουχία που κωδικοποιεί τη cpcB υπομονάδα της φυκοκυανίνης, η οποία είναι άφθονη στα *Synechocystis*. Θεωρητικά η μετάφραση ενός γονιδίου σύντηξης οδηγεί σε ένα πολυπεπτίδιο με λειτουργικές ιδιότητες που προέρχονται από κάθε μία από τις αρχικές πρωτεΐνες. Έχει βρεθεί ότι η χρήση της cpcB ως αλληλουχία οδηγό (leading sequence) ενισχύει τη μετακίνηση του ριβοσωμάτιου και τη μετάφραση και στις δύο αλληλουχίες, την αλληλουχία οδηγό αλλά και την αλληλουχία στόχο που ακολουθεί [78, 108, 141]. Επιπλέον με την εισαγωγή των διαγονιδιακών αλληλουχιών στην περιοχή του cpc οπερονίου επιτυγχάνεται η εκμετάλλευση του υποκινητή του. Η έκφραση της πρωτεΐνης σύντηξης cpcB.PHLS κάτω από τη δράση του ισχυρού cpc υποκινητή ενισχύει την ετερόλογη έκφραση της PHLS. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερη συσσώρευση προϊόντος [39, 50, 54]. Επιπλέον αντικαθιστώντας τις αλληλουχίες των γονιδίων του cpc οπερονίου λαμβάνονται TLA (Truncated Light harvesting Antenna) μεταλλάγματα, τα οποία εμφανίζουν βελτιωμένη φωτοσυνθετική δραστηριότητα και συσσώρευση βιομάζας σε σχέση με τον άγριο τύπο [20, 142].

Ένας δεύτερος περιορισμός έγκειται στο γεγονός ότι εισάγοντας το γονίδιο της PHLS στα *Synechocystis*, η εκφραζόμενη πρωτεΐνη PHLS πρέπει να ανταγωνιστεί για το υπόστρωμα (πυροφωσφορικό γερανύλιο, GPP) με το ενδογενές μονοπάτι που οδηγεί στην παραγωγή άλλων τερπενοειδών όπως είναι τα καροτένια και οι φυτόλες (Εικόνα 2.1). Επιτυγχάνοντας υπερέκφραση της GPPS (και συνεπώς την παραγωγή περισσότερου υποστρώματος) μέρος της ροής του άνθρακα εμφανίζει μεγαλύτερη πιθανότητα να κατευθυνθεί προς την σύνθεση του *β*-φελλανδρενίου (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 22.1. Σχηματική απεικόνιση της μεταβολικής αντίδρασης για τη σύνθεση του πυροφωσφορικού γερανυλίου (GPP) από την αντίδραση του πυροφοσφωρικού ισοπεντενυλίου (IPP) με το πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP). Παρουσιάζεται επίσης ο ανταγωνισμός για το υπόστρωμα (GPP) μεταξύ του μονοπατιού για τη σύνθεση των ενδογενών τερπενοειδών και του ετερόλογου *β*-φελλανδρενίου (β-PHL). Τέλος παρουσιάζονται οι χημικές δομές των παραπάνω ενώσεων. Τροποποιημένη Εικόνα που ελήφθη από την παραπομπή [126].

2.2 Σκοπός

Η συγκεκριμένη πειραματική σειρά είχε σκοπό τη μελέτη της ετερόλογης παραγωγής του *β*-φελλανδρενίου από διάφορα μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis*. Στόχος ήταν να εξεταστούν κάποιοι παράγοντες που επηρεάζουν την έκφραση της PHLS. Αρχικά μελετήθηκε η χρήση του ισχυρού *cpc* υποκινητή σε συνδυασμό με τη συγχώνευση του της συνθάσης του *β*-φελλανδρενίου (*PHLS*), έπειτα από βελτιστοποίηση των κωδικονίων του ως προς το κυανοβακτήριο *Synechocystis,* με τις αλληλουχίες που κωδικοποιούν τις δύο κύριες υπομονάδες της φυκοκυανίνης. Τα παραπάνω εξετάστηκαν παρουσία ή απουσία κάποιων γονιδίων του cpc οπερονίου.

Σε δεύτερη φάση, μελετήθηκε η επίδραση της ετερόλογης έκφρασης της συνθάσης του πυροφωσφορικού γερανυλίου στο ίδιο οπερόνιο με τη συνθάση του *β*-φελλανδρενίου, με στόχο την υπερέκφραση της και τελικά την παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας πυροφωσφορικού γερανυλίου (GPP), στην παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου.

Μελετήθηκαν ακόμα οι πιθανές επιδράσεις που μπορεί να έχουν όλες οι παραπάνω επεμβάσεις στο γενετικό υλικό των *Synechocystis* καθώς και η ετερόλογη παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου στην ανάπτυξη και τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των κυανοβακτηρίων.

Τέλος μελετήθηκε η επίδραση που έχει η συγκέντρωση διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) που παρέχεται στον βιοαντιδραστήρα στην ανάπτυξη, τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των *Synechocystis* και την παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου.

Οι στόχοι αποτυπώνονται συνοπτικά παρακάτω.

- Κατασκευή πλασμιδίων που φέρουν τις αλληλουχίες που κωδικοποιούν τις PHLS και GPPS.
- Δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών.
- Γενετική ανάλυση των μεταλλαγμένων στελεχών *Synechocystis*-Επίτευξη ομοπλασμίας.
- Ανάλυση του πρωτεϊνικού προφίλ των μεταλλαγμένων στελεχών, έλεγχος έκφρασης των PHLS και GPPS πρωτεϊνών.
- Ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση του παραγόμενου *β*-φελλανδρενίου.
- Σύγκριση δύο μεθόδων ποσοτικοποίησης.
- Μελέτη της ανάπτυξης και της λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των μεταλλαγμένων στελεχών και σύγκριση των αποτελεσμάτων με το στέλεχος αγρίου τύπου και του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc.

- Συγκριτική μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης CO_2 στην παραγωγή το *β*-φελλανδρενίου από τα μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis*.

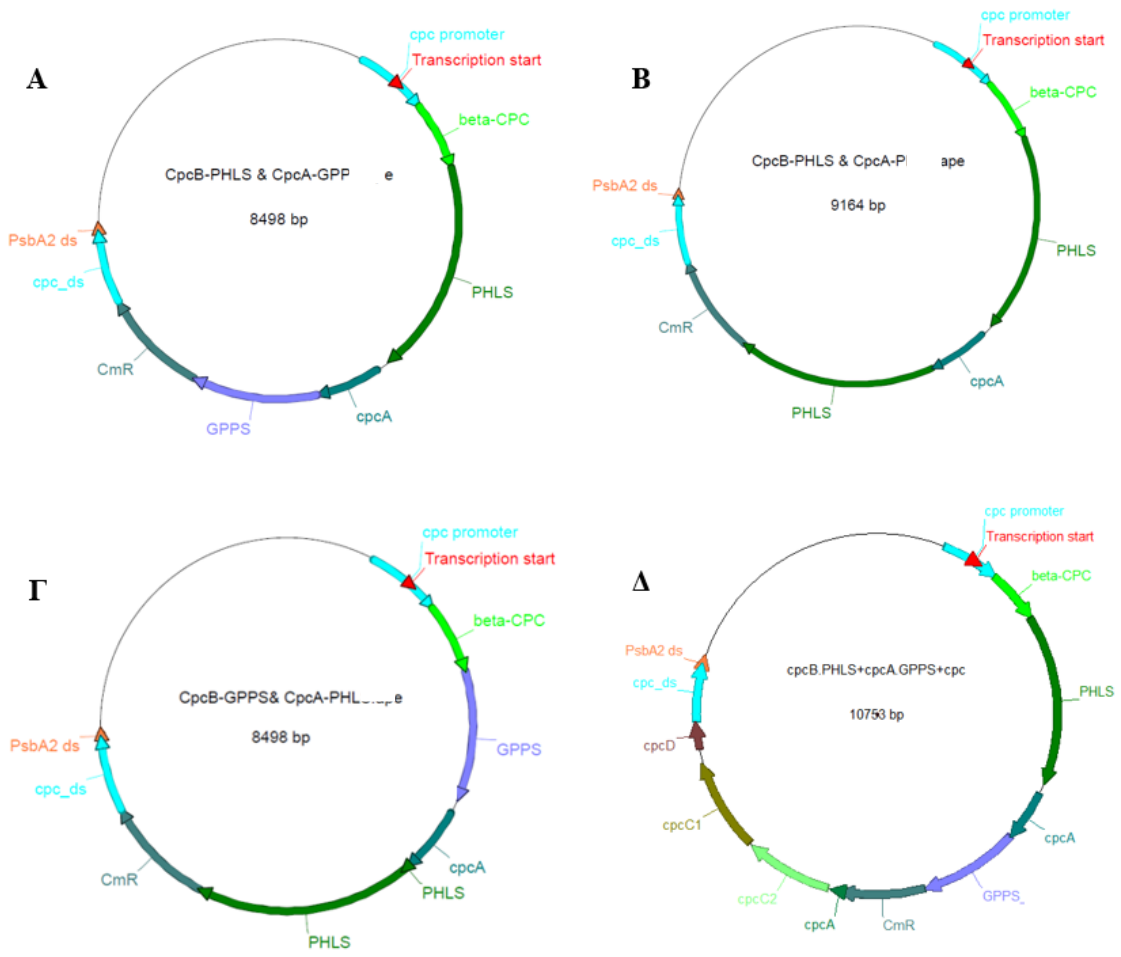
2.3 Πειραματικό μέρος

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Merck, Sigma-Aldrich, Bio-rad και Fisher Scientific. Τα ένζυμα που ήταν των εταιριών Thermofisher Scientific και New England Biolabs (NEB). Για την παρασκευή των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό. Για την ηλεκτροφόρηση (SDS PAGE, αγαρόζης) και την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο ύδωρ. Για τις μετρήσεις απορρόφησης και τη λήψη φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού της Shimadzu UV-2700 ενώ για την ανάλυση των δειγμάτων DNA χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Epoch Biotek Microplate. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των λογισμικών Origin 2017 και Microsoft Office Excel 2017.

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

2.3.1 Φορείς κλωνοποίησης

Στην Εικόνα 2.2 παρουσιάζονται τα πλασμίδια που κατασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς κλωνοποίησης με σκοπό να μετασχηματίσουν το γενωμικό DNA των *Synechocystis*.



Εικόνα 2.2. Χάρτες πλασμιδιακών φορέων που κατασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία για το μετασχηματισμό των *Synechocystis*. **Α.** cpcB.PHLS+cpcA.GPPS, ο συγκεκριμένος πλασμιδιακός φορέας κατασκευάστηκε από την ερευνητική ομάδα του καθηγητή Αναστάσιου Μελή. **Β.** cpcB.PHLS+cpcA.PHLS. **Γ.** cpcB.GPPS+cpcA.PHLS. Δ. cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc.

Στους τέσσερις παραπάνω φορείς οι διαγονιδιακές αλληλουχίες DNA πλαισιώνονται από 500 bp ανοδικά και καθοδικά αλληλουχίες DNA (upstream, cpc_us, και downstream, cpc_ds) του ενδογενούς cpc οπερονίου. Οι αλληλουχίες αυτές εξυπηρετούν στην αντικατάσταση του ενδογενούς cpc οπερονίου με τις εξωγενείς διαγονιδιακές αλληλουχίες που φέρουν τα παραπάνω πλασμίδια μέσω διπλού ομόλογου ανασυνδυασμού. Και τα τέσσερα πλασμίδια φέρουν ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό χλωραμφενικόλη. Μεταξύ των αλληλουχιών των γονιδίων δεν περιέχεται θέση δέσμευσης ριβοσώματος ούτε TATA box.

Το πλασμίδιο **Α. cpcB.PHLS+cpcA.GPPS** φέρει τα γονίδια PHLS και GPPS ως γονίδια σύντηξης με τις δύο κύριες υπομονάδες της φυκοκυανίνης cpcB και cpcA (cpcB.PHLS και cpcA.GPPS).

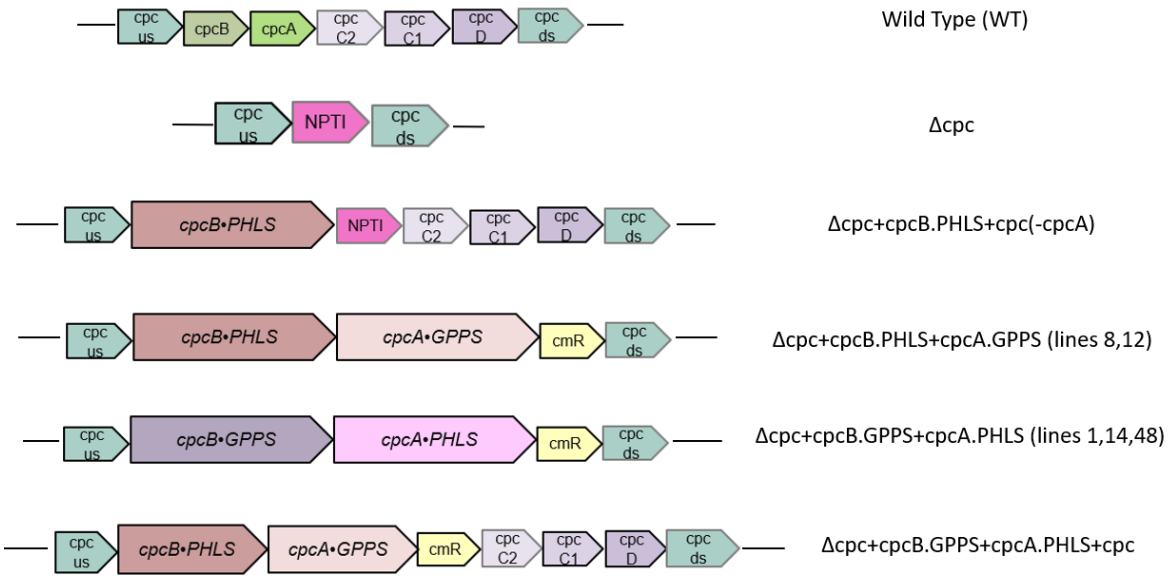
Το πλασμίδιο **Β. cpcB.PHLS+cpcA.PHLS** φέρει δύο φορές το γονίδιο της PHLS ως γονίδια σύντηξης με τις δύο κύριες υπομονάδες της φυκοκυανίνης cpcB και cpcA (cpcB.PHLS και cpcA.PHLS).

Το πλασμίδιο **Γ. cpcB.GPPS+cpcA.PHLS** φέρει τα γονίδια GPPS και PHLS ως γονίδια σύντηξης με τις ενδογενείς αλληλουχίες cpcB και cpcA αντίστοιχα (cpcB.GPPS και cpcA.PHLS).

Τέλος, το πλασμίδιο **Δ. cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc** φέρει τα γονίδια PHLS και GPPS ως γονίδια σύντηξης με τις ενδογενείς αλληλουχίες cpcB και cpcA αντίστοιχα (cpcB.PHLS και cpcA.GPPS) καθώς και τα γονίδια που κωδικοποιούν τα συνδετικά πεπτίδια cpcC2, cpcC1 και cpcD.

2.3.2 Στελέχη

Στην Εικόνα 2.3 παρουσιάζονται τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.



Εικόνα 2.3. Στην Εικόνα παρουσιάζονται το στέλεχος αγρίου τύπου (WT) καθώς και τα μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis* Δcpc, Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA), Δcpc+cpcB.PHLS+cpA.GPPS, Δcpc+cpcB.GPPS+cpA.PHLS και Δcpc+cpcB.PHLS+cpA.GPPS+cpc που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Στην πρώτη γραμμή παρουσιάζεται το **στέλεχος αγρίου τύπου (WT)**, το οποίο φέρει όλα τα γονίδια του *cpc* οπερονίου.

Στο **μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc** το *cpc* οπερόνιο έχει αντικατασταθεί από το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό καναμυκίνη.

Στο **μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA)** οι αλληλουχίες του *cpc* οπερονίου έχουν αντικατασταθεί από το γονίδιο σύντηξης του codon optimized γονιδίου της συνθάσης του *β*-φελλανδρενίου (*PHLS*) με την αλληλουχία που κωδικοποιεί τη cpcB υπομονάδα της φυκοκυανίνης, και τις αλληλουχίες που κωδικοποιούν τα συνδετικά πεπτίδια. Από το στέλεχος αυτό απουσιάζει η αλληλουχία που κωδικοποιεί τη cpcA υπομονάδα της φυκοκυανίνης.

Τα μεταλλαγμένα στελέχη Δcpc και Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) κατασκευάστηκαν από την ομάδα του καθηγητή Αναστάσιου Μελή.

Το **μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpA.GPPS** περιέχει τα γονίδια σύντηξης cpcB.PHLS και cpcA.GPPS, ενώ απουσιάζουν οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν τα συνδετικά πεπτίδια.

Το **μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc+cpcB.GPPS+cpA.PHLS** περιέχει τα γονίδια σύντηξης cpcB.GPPS και cpA.PHLS και απουσιάζουν οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν τα συνδετικά πεπτίδια.

Τέλος, το **μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpA.GPPS+cpc** περιέχει τα γονίδια σύντηξης cpcB.PHLS και cpcA.GPPS, και τις αλληλουχίες που κωδικοποιούν τα συνδετικά πεπτίδια.

2.3.3 Συνθήκες ανάπτυξης

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν το στέλεχος αγρίου τύπου (WT) *Synechocystis* sp. PCC 6803 καθώς και μεταλλάγματα αυτού. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν φωτοαυτότροφα σε υγρό θρεπτικό BG11 σε κωνικές φιάλες, με συνεχή παροχή ατμοσφαιρικού αέρα ώστε να επιτυγχάνεται συνεχής παροχή CO_2 στα κύτταρα. Στο πώμα της κωνικής φιάλης είχαν προσαρμοστεί δύο σωλήνες (Εικόνα 2.4). Ο ένας σωλήνας ήταν βυθισμένος στην καλλιέργεια για παροχή αέρα στην καλλιέργεια, ο οποίος κατά την εισαγωγή του διέρχονταν από κατάλληλο φίλτρο (0,2 μm) για την αποφυγή μολύνσεων. Ο δεύτερος, μικρότερου μήκους, σωλήνας αποσκοπούσε στην αποσυμπίεση της φιάλης. Το pH ρυθμίστηκε με την προσθήκη διαλύματος 25 mM NaH_2PO_4 (pH 7,5). Όλα τα πειράματα εκτελέστηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 28±1°C. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε

υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1} με την χρήση λευκών (cool white) λαμπών φθορισμού. Οι υγρές καλλιέργειες αποτέλεσαν μητρικές καλλιέργειες για τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Εικόνα 2.4. Στην Εικόνα παρουσιάζεται η διάταξη της φιάλης ανάπτυξης των υγρών καλλιεργειών. Στα αριστερά φαίνεται η καλλιέργεια του στελέχους τους αγρίου τύπου ενώ στα δεξιά καλλιέργεια του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA).

Η διατήρηση των στελεχών πραγματοποιήθηκε σε στερεό θρεπτικό μέσο BG11, στο οποίο προστέθηκε 0,3% (w/v) θειοθειικού νατρίου και 1% (w/v) άγαρ. Το pH στην προκειμένη περίπτωση ρυθμίστηκε με διάλυμα HEPES/NaOH (pH 7,5). Για την επιλογή και την ανάπτυξη των μετασχηματισμένων στελεχών προστέθηκαν στο θρεπτικό μέσο 25 μg/mL καναμυκίνη ή 15 μg/mL χλωραμφαινικόλης ανάλογα με το γονίδιο ανθεκτικότητας που έφερε κάθε μεταλλαγμένο στέλεχος. Ως πρόσθετη πηγή άνθρακα προστέθηκαν 5 mM γλυκόζης σε στερεό θρεπτικό μέσο BG11.

Η σύσταση του θρεπτικού μέσου BG11 παρουσιάζεται στους πίνακες 2.1-2.7.

Πίνακας 2.1. Συστατικά θρεπτικού μέσου BG11.

Διαλύματα	**Ποσότητα**
100x BG11 χωρίς σίδηρο, φωσφορικά και άνθρακα	10 mL/L
1000x Ferric ammonium citrate	1 mL/L
1000x Na_2CO_3	1 mL/L
1000x K_2HPO_4	1 mL/L

Πίνακας 2.2. Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate buffer).

Συστατικά	**Συγκέντρωση**
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, pH 7,5	0,50 M

Πίνακας 2.3. Συστατικά διαλύματος 100x BG11 χωρίς σίδηρο, φωσφορικά και άνθρακα.

Συστατικά	**Συγκέντρωση**
$NaNO_3$	149,60 g/L
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,49 g/L
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	3,60 g/L
Citric acid	0,60 g/L (ή 0,89 g/L Na-citrate, dehydrate)
0.25 M NaEDTA, pH 8.0	1,12 mL/L
Διάλυμα ιχνοστοιχείων (Trace minerals)	100 mL/L

Πίνακας 2.4. Συστατικά διαλύματος ιχνοστοιχείων (Trace minerals).

Συστατικά	**Συγκέντρωση**
H_3BO_3	2,86 g/L
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1,82 g/L
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,222 g/L
MoO_3	0,399 g/L
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,079 g/L
Co $(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,0494 g/L

Πίνακας 2.5. Συστατικά διαλύματος 1000x Ferric ammonium citrate.

Συστατικά	**Συγκέντρωση**
Feric ammonium citrate	600 mg/100 mL H_2O

Πίνακας 2.6. Συστατικά διαλύματος 1000x Na_2CO_3.

Συστατικά	**Συγκέντρωση**
Na_2CO_3	2 g/100mL H_2O

Πίνακας 2.7. Συστατικά διαλύματος 1000x K_2HPO_4.

Συστατικά	**Συγκέντρωση**
K_2HPO_4	3,0 5g/100mL H_2O

2.3.4 Παρασκευή χημειοδεκτικών βακτηριακών κυττάρων

Το βακτηριακό στέλεχος *E. coli* DH5a χρησιμοποιήθηκε για υποκλωνοποιήσεις ρουτίνας και πολλαπλασιασμό των πλασμιδίων.

Η παρασκευή των δεκτικών κυττάρων έγινε με τη χρήση χλωριούχου ρουβιδίου ($RbCl_2$) [143].

Διαλύματα

- Υγρό θρεπτικό LB

  1% w/v NaCl

  1% w/v πεπτόνη

  0.5% w/v Yeast extract

Το διάλυμα αποστειρώθηκε για 20 min σε αυτόκαυστο μετά την παρασκευή του.

- Διάλυμα RF1

  100 mM RbCl

  50 mM $MnCl_2$

  30 Mm CH_3COOK

  10 mM $CaCl_2$

  15% v/v Glycerol

Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε με 0,2 M CH_3COOH σε τιμή pH 5,8 και αποστειρώθηκε με φίλτρο 0,2 μm.

- <u>Διάλυμα RF2</u>

  10 mM RbCl

  75 mM $CaCl_2$

  10 mM MOPS

  15% v/v Glycerol

Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε με NaOH σε τιμή pH 7 και αποστειρώθηκε με φίλτρο 0,2 μm.

Ποσότητα 100 mL θρεπτικού LB εμβολιάστηκε με *E. coli* DH5a και επωάστηκε στους 30ºC για περίπου 16 ώρες υπό ανάδευση έως ότου η οπτική πυκνότητα τους στα 600 nm (OD_{600}) να αποκτήσει τιμή μεταξύ 0,3 και 0,5. Έπειτα η καλλιέργεια επωάστηκε στον πάγο για 15 min και φυγοκεντρίθηκε για 20 min στα 3112 x *g* στους 4ºC. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 20 mL διαλύματος RF1. Τα κύτταρα επωάστηκαν στον πάγο για 15 min και φυγοκεντρίθηκαν στις παραπάνω συνθήκες. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 4 mL διαλύματος RF2 και επωάστηκε για 15 min στον πάγο. Τέλος τα κύτταρα μοιράστηκαν σε παγωμένα σωληνάρια τύπου eppendorf, ψύχθηκαν σε υγρό άζωτο και φυλάχθηκαν στους -80ºC.

2.3.5 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων E. Coli με πλασμιδιακό DNA

Ο μετασχηματισμός του πλασμιδιακού DNA σε κατάλληλα επεξεργασμένα δεκτικά κύτταρα έγινε με την μέθοδο του θερμικού σοκ (heat sock). Η μέθοδος αυτή, στηρίζεται στην βαθμιαία διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος με την απότομη αύξηση της θερμοκρασίας. Η αύξηση της θερμοκρασίας δημιουργεί πόρους στο κυτταρικό τοίχωμα, οι οποίοι επιτρέπουν στο ξένο DNA να εισέλθει μέσα στο κύτταρο. Έπειτα, με τη μείωση της θερμοκρασίας το κυτταρικό τοιχώματος επαναφέρεται και οι πόροι που έχουν δημιουργηθεί κλείνουν [144].

<u>Διαλύματα</u>

- <u>Υγρό θρεπτικό LB</u>

  1% w/v NaCl

  1% w/v πεπτόνη

  0,5% w/v Yeast extract

Το διάλυμα αποστειρώθηκε για 20 min σε αυτόκαυστο έπειτα από την παρασκευή του.

Διάλυμα LB-SOC

Στο διάλυμα LB προστέθηκαν τα παρακάτω:

2,5 mM KCl

10 mM $MgCl_2$

10 mM $MgSO_4$

20 mM Glucose

Φιαλίδιο Eppendorf που περιέχει 50 μL δεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5α μεταφέρθηκε από τους -80ºC σε πάγο και αφέθηκε να ξεπαγώσει για 10 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 1-5 μL που περιείχαν ποσότητα μεταξύ 1pg και 100 ng πλασμιδιακού DNA και πραγματοποιήθηκε ήπια ανάδευση. Το μίγμα επωάστηκε στον πάγο για 30 min. Έπειτα μεταφέρθηκε στους 42ºC για 30 δευτερόλεπτα και αμέσως μετά στον πάγο για 2 min. Στη συνέχεια προστέθηκε 1 mL διαλύματος LB-SOC και το μίγμα επωάστηκε στους 37ºC για 1 ώρα υπό ανάδευση. Τα κύτταρα φυγοκεντρίθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε 70 mL θρεπτικού. Το εναιώρημα βακτηρίων επιστρώθηκε σε τρυβλίο Petri με 100 μg/mL αμπικιλλίνης και το τρυβλίο τοποθετήθηκε σε επωαστικό θάλαμο στους 37 ºC για 16 ώρες.

2.3.6 Απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα Synechocystis

Κύτταρα που ελήφθησαν από στερεή καλλιέργεια διαλύθηκαν αρχικά σε 20 μL αποστειρωμένου νερού. Έπειτα προστέθηκε ίσος όγκος αιθανόλης (100%) και το μείγμα αναδεύτηκε στο vortex. Έπειτα, προστέθηκαν 200 μL διαλύματος 10% w/v Chelex®100Resin (Biorad) και το μίγμα υπέστη ανάδευση και θέρμανση στους 98ºC για 10 min προκειμένου να προκληθεί λύση των κυττάρων. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση στα 13400 rpm για 10 min ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα των κυττάρων. Ποσότητα 5μL του υπερκειμένου χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο DNA σε αντίδραση PCR 25 μL.

2.3.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια *in vitro* διαδικασία κατά την οποία πραγματοποιείται πολλαπλασιασμός μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA που οριοθετείται από δύο εκκινητές (primers) που βρίσκονται εκατέρωθεν της, με τη χρήση μίας πολυμεράσης DNA. Η αντίδραση συνήθως περιλαμβάνει 25-35 κύκλους κάθε ένας από τους οποίους αποτελείται από τα εξής στάδια [131]:

1. Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (Denaturation): Λαμβάνει χώρα σε υψηλή θερμοκρασία (94ºC-98ºC) ώστε να επιτευχθεί ο διαχωρισμός της δίκλωνης έλικας.
2. Υβριδισμός εκκινητών (Annealing): Λαμβάνει χώρα σε χαμηλότερη θερμοκρασία (50ºC-65ºC) ώστε να επιτρέψει στους ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές να υβριδοποιηθούν ειδικά στις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες σε κάθε κλώνο-στόχο, δημιουργώντας ιοντικούς δεσμούς.
3. Επιμήκυνση των εκκινητών (Extension): Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72 ºC και η DNA πολυμεράση επιμηκύνει τους εκκινητές χρησιμοποιώντας τη συμπληρωματική αλληλουχία ως εκμαγείο.

Η διαδικασία λαμβάνει χώρα στους θερμοκυκλοποιητές (thermal cycler).

Στην παρούσα διατριβή στις τεχνικές κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε τόσο η Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase όσο και η Q5® High-Fidelity DNA Polymerase της εταιρίας New England Biolabs (NEB). Για όλα τα υπόλοιπα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η DreamTaq Green DNA Polymerase της εταιρίας Thermo Fisher Scientific. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν θερμοκυκλοποιητές των εταιριών Bio-Rad και Thermo Fisher Scientific.Οι ποσότητες και τα προγράμματα της PCR για κάθε DNA πολυμεράση παρουσιάζονται στους πίνακες 2.8, 2.9, 2.10 και 2.11.

Πίνακας 2.8. Συστατικά μίγματος PCR με High Fidelity DNA Polymerase.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	**ΌΓΚΟΣ (μL)**
5X Phusion HF/5X Q5 Reaction Buffer	5,0
10mM dNTPs	0,5
10μM Forward primer	1,25
10μM Reverse primer	1,25
Υπόστρωμα DNA	<250 ng
Phusion® DNA Polymerase/Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	0,25
H_2O	≤25

Πίνακας 2.9. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα PCR με High Fidelity DNA Polymerase.

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ PCR			
Στάδιο	**Κύκλοι**	**Θερμοκρασία**	**Χρόνος**
Αποδιάταξη	1	98ºC	30 sec
Αποδιάταξη	30	98ºC	10 sec
Υβριδισμός		45-72ºC	30 sec
Πολυμερισμός		72ºC	30 sec/kb
Πολυμερισμός	1	72ºC	10 min
Διατήρηση		10ºC	∞

Πίνακας 2.2. Συστατικά μίγματος PCR με την DreamTaq Green DNA Polymerase.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	**ΌΓΚΟΣ (μL)**
10X DreamTaq Green Buffer	2,5
10mM dNTPs	0,5
10μM Forward primer	0,5
10μM Reverse primer	0,5
Υπόστρωμα DNA	10 pg -1 μg
DreamTaq DNA Polymerase	0,125
H_2O	≤25

Πίνακας 2.3. Θερμοκρασιακό πρόγραμμα PCR με την DreamTaq Green DNA Polymerase.

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ PCR			
Στάδιο	**Κύκλοι**	**Θερμοκρασία**	**Χρόνος**
Αποδιάταξη	1	95ºC	1 min+30 sec
Αποδιάταξη	30	95ºC	30 sec
Υβριδισμός		Tm-5	30 sec
Πολυμερισμός		72ºC	1 min για προϊόντα PCR μέχρι 2kb. Για μεγαλύτερα προϊόντα 1 min/kb
Πολυμερισμός	1	72ºC	5 min
Διατήρηση		15ºC	∞

Στον πίνακα 2.12 παρουσιάζονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις PCR στο παρόν κεφάλαιο.

Πίνακας 2.4. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Εκκινητής	**Αλληλουχία εκκινητή (5΄προς 3΄)**	**Tm (ºC)**
PHLS_a_Fw	ATA CTA GTT GTA GTT TGC AAG TTT CTG ATC C	55
PHLS_a_Rv	ATG CGG CCG CTC ACT CAT AGC GCT CAA TCA	55
GPPS_a_Fw	ATT CAT ATG ACG CGC AGC AGT AAG GCC T	63
GPPS_a_Rv	ATA GAT CTT TAA TTC TGA CGA GAT GCA ATG	63
Insert_Fw	GTG CCC TTA AAC GCC TGG GTC AGT TTT TAA TTC TAG CTG GCC TGG	60
Insert_Rv	GCT CAA ATA GTA ATT AAC AAA ATA GCG GAT CCT AGT TTT GTT CGT TGC TGT CAG C	60
Vector_Fw	GCT GAC AGC AAC GAA CAA AAC TAG GAT CCG CTA TTT TGT TAA TTA CTA TTT GAG C	60
Vector_Rv	CCA GGC CAG CTA GAA TTA AAA ACT GAC CCA GGC GTT TAA GGG CAC	60
Seq_1	CGA GAA GAG TCC CTG AAT ATC A	55
Seq_2	CGT TGC TGA AAT CGC TGG	55
Seq_3	GCA GTT ACC GACT TAT ATG CAG	55
Seq_4	GGA CAT CGG CTA CTA CCT C	55
Seq_5	TTG ATT TCT GAC AAA GCC ACC	55
Seq_6	AGC ATT AAC TAA CCA TAA CAA TGA CT	55
Seq_7_Fw	ACG AAG CTA ATT CCT ACC T	49
Seq_7_Rv	TTC ATT ATG GTG AAA GTT GG	48
Seq_8_fw	AAA TCG CTG GTT ACT TCG	44
Seq_8_Rv	GGT ATG GAA CCT GAG TAA AG	45
CmR_Fw	CGT CTG TGA TGG CTT CCA TG	57
cpcC2_Fw	GGA GTT GGC TCG CAA TAC AG	57
cpcC1_Fw	GTG GCA GTA ATG CTG GTT GG	58
cpcC2s_Rv	CAT CCA CCT CTT CCT CTG TAC	55
cpc_us	GAG ATC AGT AAC AAT AAC TCT AGG GTC	56
cpc_ds	GAG ATT AGT CAT TGT TAT GGT TAG TTA ATG C	56
cpcA_Rv	GGT GGA AAC GGC TTC AGT TAA AG	58
cpcA_Fw	CTT TAA CTG AAG CCG TTT CCA CC	58
Kan_ins_Rv	AAG GGA CAA TTG CAA ACG GG	56
PHLS_Fw	TTT GCG GAA GACT TGG GTG G	59

2.3.8 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Για το διαχωρισμό, την απομόνωση και καθαρισμό μορίων DNA χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Διάλυμα

- 10x TE buffer

  100 mM Trisma base, pH 8

  10 mM EDTA

Παρασκευάστηκε διάλυμα αγαρόζης 0,8-1 %w/v σε ρυθμιστικό TE 1x, και προστέθηκε μικρή ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου. Το ποσοστό αγαρόζης είναι αντιστρόφως ανάλογου του μεγέθους του προς ανάλυση δείγματος DNA. Στην πηκτή αγαρόζης εφαρμόστηκε ρεύμα 120 V και η ηλεκτροφόρηση διήρκεσε περίπου 20 min. Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης η παρατήρηση έγινε σε λάμπα υπεριώδους.

2.3.9 Κατασκευή φορέων κλωνοποίησης

Κατασκευή φορέα cpcB.PHLS+cpcA.PHLS

Για την κατασκευή του πλασμιδιακού φορέα cpcB.PHLS+cpcA.PHLS χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο ο πλασμιδιακός φορέας cpcB.PHLS+cpcA.GPPS, ο οποίος κατασκευάστηκε από την ερευνητική ομάδα του Καθηγητή Αναστάσιου Μελή. Πιο συγκεκριμένα το γονίδιο GPPS αντικαταστάθηκε από το γονίδιο της PHLS στον φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS. Τα στάδια της διαδικασίας περιλαμβάνουν:

1. Ο φορέας cpcB.PHLS+cpcA.GPPS πολλαπλασιάστηκε με PCR με τους εκκινητές PHLS_a_Fw και PHLS_a_Rv χρησιμοποιώντας τη Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase. Με τους εκκινητές αυτούς επιτεύχθηκε όχι μόνο ο πολλαπλασιασμός και η απομόνωση του ενθέματος (insert-PHLS) αλλά και η προσθήκη στα άκρα του των αλληλουχιών DNA που κόβουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες SpeI και NotI.
2. Για τον καθαρισμό του προϊόντος της PCR χρησιμοποιήθηκε το QIAquick PCR Purification Kit της QIAGEN. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (https://www.qiagen.com/lu/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/dna-clean-up/qiaquick-pcr-purification-kit/#productdetails-11/09/2019).

3. Στη συνέχεια το ένθεμα εισήχθη σε pJET1.2/blunt φορέα από το CloneJET PCR Cloning Kit της Thermo Fisher Scientific. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012707_CloneJET_PCR_Cloning_20rxn_UG.pdf- 11/09/2019).
4. Ακολούθησε μετασχηματισμός του φορέα του βήματος 3, που περιέχει το ένθεμα, σε δεκτικά κύτταρα DH5a.
5. Επιλέχθηκαν αποικίες και αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες παρουσία αντιβιοτικού αμπικιλλίνης.
6. Απομονώθηκε πλασμίδιο από τις καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν παρουσία αντιβιοτικού, με τη χρήση του QIAprep Spin Miniprep Kit της QIAGEN. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή (https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/plasmid-dna/qiaprep-spin-miniprep-kit/#orderinginformation- 11/09/2019).
7. Ακολούθησε πέψη του pJET1.2/blunt φορέα που φέρει το ένθεμα καθώς και του φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες SpeI-HF και NotI-HF της εταιρίας NEB, για 2 ώρες στους 37°C. Λόγο του ότι τα δύο ένζυμα λειτουργούν στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη ταυτόχρονα. Η εισαγωγή του ενθέματος στον φορέα pJET1.2/blunt διευκολύνει την απομόνωση του κομμένου ενθέματος με τις παραπάνω περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Αποτέλεσμα αυτής της πέψης είναι ένθεμα και φορέας να έχουν συμπληρωματικά άκρα. Τα άκρα αυτά δημιουργήθηκαν έπειτα από πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες που αναφέρθηκαν παραπάνω.
8. Τα προϊόντα της πέψης φορτώθηκαν σε μία πηκτή αγαρόζης από όπου και απομονώθηκαν με τη χρήση του QIAquick PCR Purification Kit της QIAGEN (https://www.qiagen.com/ca/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/dna-clean-up/qiaquick-pcr-purification-kit/#orderinginformation- 11/09/2019). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.
9. Η σύνδεση των άκρων του DNA του γραμμικού φορέα και του ενθέματος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του ενζύμου T4 DNA λιγάση της Invitrogen. Οι ποσότητες του φορέα και του ενθέματος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σε αναλογία 1:3. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 12 ώρες στους 16 ^{o}C.

10. Ακολουθήθηκε μετασχηματισμός ποσότητας του μίγματος της αντίδρασης λιγάσης σε δεκτικά κύτταρα DH5a και η διαδικασία που αναφέρεται παραπάνω.

Κατασκευή φορέα cpcB. GPPS+cpcA.PHLS

Για την κατασκευή του φορέα cpcB.GPPS+cpcA.PHLS διαδικασία ήταν αντίστοιχη με αυτή της κατασκευής του φορέα cpcB.PHLS+cpcA.PHLS. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε ο φορέας cpcB.PHLS+cpcA.GPPS ως εκμαγείο στην PCR με τη χρήση των εκκινητών GPPS_a_Fw και GPPS_a_Rv ώστε να απομονωθεί το ένθεμα (GPPS) και ταυτόχρονα να αποκτήσει στα άκρα του της αλληλουχίες DNA που κόβουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες NdeI και BGIII. Στη συνέχεια το ένθεμα αντικατέστησε το PHLS που είναι συζευγμένο με την υπομονάδα cpcB της φυκοκυανίνης στον φορέα cpcB.PHLS+cpcA.PHLS.

Και για τους δύο φορείς η επιτυχής κατασκευή τους, δηλαδή η σωστή ακολουθία των βάσεων επιβεβαιώθηκε έπειτα από πέψη με συγκεκριμένες περιοριστικές ενδονουκλεάσες και ανάλυση των προϊόντων τους σε πηκτή αγαρόζης καθώς και αλληλούχισης τους. Η αλληλούχιση των δύο παραπάνω φορέων έγινε από το UC Berkeley DNA Sequencing Facility (Berkeley, California). Για την αλληλούχιση του φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Seq_1, Seq_2, Seq_3, Seq_4, Seq_5 και Seq_6. Για την αλληλούχιση του φορέα cpcB.PHLS+cpcA.PHLS χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Seq_7_Fw και Seq_7_Rv. Για την αλληλούχιση του φορέα cpcB.GPPS+cpcA.PHLS χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Seq_8_Fw και Seq_8_Rv.

Κατασκευή φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc

Για την κατασκευή του φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc ακολουθήθηκε η τεχνική FastCloning [145]. Πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής αποτελεί το γεγονός ότι δεν χρειάζεται καθαρισμός μέσω πηκτής των προϊόντος της PCR, χρήση ειδικών kit ή κάποιο συγκεκριμένη περιοριστική ενδονουκλεάση για κλωνοποίηση.

Πιο συγκεκριμένα στο φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS προστέθηκαν τα γονίδια που κωδικοποιούν τα συνδετικά πεπτίδια του cpc οπερονίου, μετά το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό χλωραμφενικόλη. Τα στάδια της διαδικασίας περιλαμβάνουν:

1. Απομόνωση γενωμικού DNA από τα *Synechocystis* WT με τη χρήση Chelex®100Resin Biorad με το πρωτόκολλο που αναφέρεται στην παράγραφο 2.3.6.

2. Έγινε PCR στο γενωμικό DNA του WT με τους εκκινητές insert_Fw και insert_Rv χρησιμοποιώντας τη Q5® High-Fidelity DNA Polymerase της εταιρίας New England Biolabs (NEB). Με τους εκκινητές αυτούς επιτεύχθηκε όχι μόνο ο πολλαπλασιασμός και η απομόνωση του ενθέματος (cpcC2-cpcC1-cpcD, των γονιδίων που κωδικοποιούν τα συνδετικά πεπτίδια του cpc οπερονίου) αλλά και η προσθήκη στα άκρα του αλληλουχιών DNA 16 ζευγών βάσεων συμπληρωματικά ως προς τα άκρα του φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS.
3. PCR στον φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS με τους εκκινητές vector_Fw και vector_Rv χρησιμοποιώντας τη Q5® High-Fidelity DNA Polymerase. Με τους συγκεκριμένους εκκινητές επιτυγχάνεται αρχικά το να γίνει γραμμικός ο φορέας και όπως και στο βήμα 2 η προσθήκη στα άκρα του αλληλουχιών DNA 16 ζευγών βάσεων συμπληρωματικά ως προς τα άκρα του ενθέματος.
4. Πραγματοποιήθηκε πέψη στο προϊόν της PCR του βήματος 3 με 1 μL περιοριστικής ενδονουκλεάσης DpnI για 1 ώρα και 30 min στους 37 ^{o}C. Η DpnI κόβει μόνο όταν η θέση αναγνώρισης της είναι μεθυλιωμένη. Με άλλα λόγια δεν μπορεί να κόψει το προϊόν της PCR. Συνεπώς χρησιμοποιήθηκε ώστε να καταστρέψει τον φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS ο οποίος λειτούργησε ως εκμαγείο DNA στην PCR του βήματος 3, και να παραμείνει μόνο το προϊόν της PCR, δηλαδή ο γραμμικός φορέας.
5. Έγινε απενεργοποίηση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης με θέρμανση στους 80 ^{o}C για 20 min.
6. Αναμείχθηκαν τα προϊόντα της PCR που περιείχαν το ένθεμα και το γραμμικό φορέα σε αναλογίες 1:2 και 1:4 και έγινε μετασχηματισμός σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* DH5a.

Παρόλο που δεν είναι γνωστός ο ακριβής μηχανισμός, πιστεύεται ότι πιθανόν η δράση της 3΄ εξωνουκλεάσης που έχει η high fidelity DNA πολυμεράση δημιουργεί αμέσως κολλώδη άκρα (sticky ends) στις επικαλυπτόμενες περιοχές του φορέα και του ενθέματος, επιτρέποντας τους έτσι να σχηματίσουν ένα κυκλικό κατασκεύασμα με κενά (nicks). Τα κενά αυτά επιδιορθώνονται έπειτα από το μετασχηματισμό στα βακτήρια.

7. Οι αποικίες που λήφθηκαν αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες με 70 μg/mL αμπικιλλίνης και έπειτα από δύο ώρες η μισή καλλιέργεια μεταφέρθηκε σε καινούριο δοκιμαστικό σωλήνα και προστέθηκαν 7,5 μg/mL χλωραμφενικόλης και επωάστηκαν για περίπου 16 ώρες στους 37 ^{o}C.

Η σωστή κατασκευή του φορέα εξετάστηκε με πέψη με συγκεκριμένες περιοριστικές ενδονουκλεάσες και ανάλυση των προϊόντων τους σε πηκτή αγαρόζης καθώς και αλληλούχισης τους. Η αλληλούχιση του παραπάνω φορέα έγινε από την Cemia SA,

(Λάρισα, Ελλάδα). Για την αλληλούχιση του φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές cmR_Fw, cpcC2_Fw, cpcC1_Fw και cpcC2s_Rv.

2.3.10 Μετασχηματισμός κυανοβακτηρίων Synechocystis

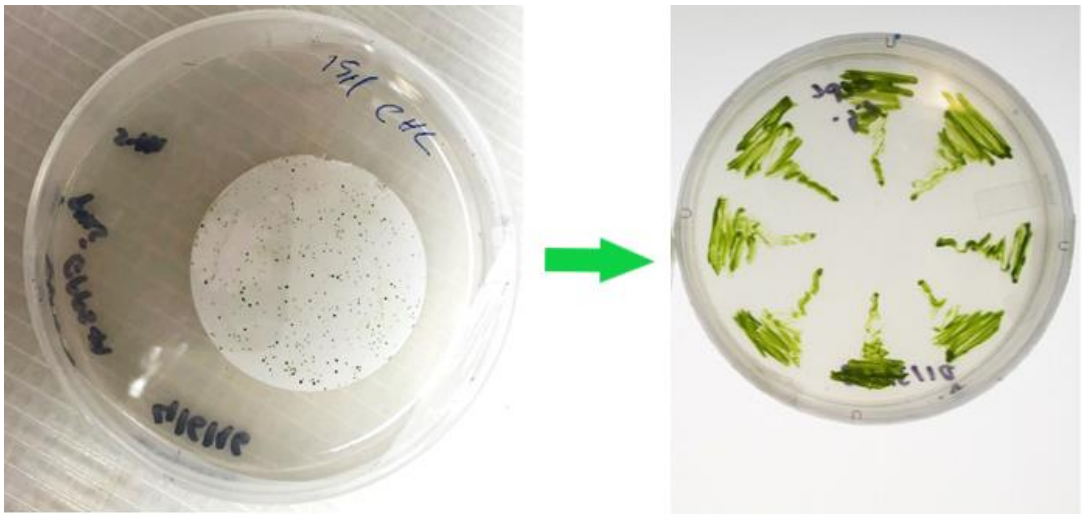
Οι πλασμιδιακοί φορείς cpcB.PHLS+cpcA.GPPS, cpcB.PHLS+cpcA.PHLS και cpcB.GPPS+cpcA.PHLS φέρουν τις επιθυμητές αλληλουχίες για ενσωμάτωση στο γενωμικό DNA των *Synechocystis*. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2.2 οι φορείς περιέχουν ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό χλωραμφενικόλη, με σκοπό την επιλογή και τον καθαρισμό των μεταλλαγμένων στελεχών από το στέλεχος δέκτη, μετά τον μετασχηματισμό. Οι αλληλουχίες αυτές βρίσκονται ανάμεσα στις αλληλουχίες cpc_us και cpc_ds του cpc οπερονίου και οι οποίες αποτελούνται από 500 νουκλεοτίδια η κάθε μία. Ο μετασχηματισμός έγινε μέσω διπλού ομόλογου ανασυνδυασμού μεταξύ των παραπάνω αλληλουχιών στους φορείς και των αλληλουχιών αυτών στο στέλεχος δέκτη (recipient strain). Για το φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS ως στέλεχος δέκτη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) ενώ για τους φορείς cpcB.PHLS+cpcA.PHLS και cpcB.GPPS+cpcA.PHLS το στέλεχος Δcpc.

Αναπτύχθηκε καλλιέργεια του στελέχους δέκτη σε θρεπτικό μέσο BG11 με προσθήκη αντιβιοτικού καναμικίνης. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν από την καλλιέργεια στο τέλος της εκθετικής φάσης με φυγοκέντριση στα 4500 rpm για 10 min. Έπειτα επαναιωρήθηκαν στο θρεπτικό μέσο σε τελικό όγκο 0,5 mL και τιμή οπτικής πυκνότητας OD_{730} =2,5. Στην καλλιέργεια προστέθηκε ποσότητα πλασμιδίου ίση με 5 μg και τα κύτταρα με το πλασμίδιο επωάστηκαν για 6 ώρες στους 30°C. Στη συνέχεια τα κύτταρα απλώθηκαν σε φίλτρα Whatman Nucleopore SN 145318 το οποίο προηγουμένως είχε τοποθετηθεί σε στερεό θρεπτικό BG11. Έπειτα από 12-16 ώρες τα φίλτρα μεταφέρθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο BG11 με 15 μg/mL χλωραμφενικόλης. Μετά από δύο εβδομάδες εμφανίστηκαν οι αποικίες των μεταλλαγμένων στελεχών. Οι αποικίες αυτές υπέστησαν συνεχείς μεταφορές σε στερεό θρεπτικό μέσο με αυξανόμενη ποσότητα χλωραμφενικόλης μέχρι τη συγκέντρωση 60 μg/mL έως ότου να επιτευχθεί ομοπλασμία (Εικόνα 2.5). Ο όρος ομοπλασμία αναφέρεται στη λήψη καθαρών μεταλλαγμένων στελεχών χωρίς την παρουσία του στελέχους δέκτη.

Μελέτη για την ομοπλασμία των μεταλλαγμένων στελεχών αλλά και για τη σωστή ενσωμάτωση των γονιδίων στο γενομικό τους DNA έγιναν με ανάλυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης του γενωμικού DNA (Genomic DNA PCR). Σχεδιάστηκαν

εκκινητές οι οποίοι έδωσαν μοναδικό προϊόν στα μεταλλαγμένα στελέχη και κανένα στο στέλεχος δέκτη ή διαφορετικά προϊόντα στα στελέχη αυτά. Για να εξεταστεί η επίτευξη ομοπλασμίας των μεταλλαγμένων στελεχών, σχεδιάστηκαν εκκινητές οι οποίοι έδωσαν μοναδικό προϊόν στο στέλεχος δέκτη και κανένα στα μεταλλάγματα.

Συλλέχθηκαν 2-3 αποικίες και αναπτύσσονται σε υγρές καλλιέργειες που αποτέλεσαν τις σειρές για όλες τις περαιτέρω μελέτες.



Εικόνα 2.5. Αριστερά: Αποικίες που αναπτύχθηκαν σε φίλτρο Whatman, σε στερεό θρεπτικό BG11 με 15 μg/mL χλωραμφενικόλης έπειτα από μετασχηματισμό. **Δεξιά:** μεταφορά τον αποικιών (σειρές) σε θρεπτικό με αυξανόμενη ποσότητα αντιβιοτικού (μέχρι 60 μg/mL χλωραμφενικόλης). Η Εικόνα δεξιά ελήφθη από την παραπομπή [20]

2.3.11 Λύση κυττάρων και απομόνωση πρωτεϊνών

<u>Διάλυμα</u>

- <u>Διάλυμα διαλυτοποίησης</u>

  250 mM Tris-HCl pH 6,8

  7% w/v SDS

  20% w/v γλυκερόλη

  2 M ουρία

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν από τις μητρικές καλλιέργειες στο τέλος της εκθετικής φάσης με φυγοκέντριση στα 4000 x *g* για 10 min. Έπειτα επαναιωρήθηκαν σε μικρό όγκο 50 mM Tris-HCl, pH 8. Η λύση των κυττάρων επιτεύχθηκε με εφαρμογή πίεσης 1500 psi με χρήση συσκευής French press. Πριν από τη λύση των κυττάρων προστέθηκε στο διάλυμα αναστολέας πρωτεασών PMSF. Τα άσπαστα κύτταρα και τα κυτταρικά απόβλητα

απορρίφθηκαν μετά από φυγοκέντριση στα 3500 rpm για 3 min. Στο υπερκείμενο προστέθηκε διάλυμα διαλυτοποίησης ίσου όγκου και επωάστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Πριν την ανάλυση των δειγμάτων με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE προστέθηκε σε αυτά 10% (v/v) μερκαπτοαιθανόλη. Ο διαχωρισμός μεμβρανικών με υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών έγινε με υπερφυγοκέντριση του δείγματος στα 35.000 x g για 90 min, πριν το βήμα της προσθήκης της μερκαπτοαιθανόλης [126, 142].

2.3.12 Ποσοτικός προσδιορισμός χλωροφύλλης-α

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των δειγμάτων που αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE έγινε ποσοτικός προσδιορισμός της χλωροφύλλης-α. Η ποσοτικοποίηση έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Lichtenhaler, με 90% μεθανόλης [146]. Ποσότητα 100 μL δείγματος αναμείχθηκαν με 900 μL μεθανόλης. Τα δείγματα επωάστηκαν για 10-15 min στο σκοτάδι, υπέστησαν φυγοκέντριση προκειμένου να απομακρυνθούν τα ιζήματα και μετρήθηκε η απορρόφηση των υπερκειμένων σε συγκεκριμένα μήκη κύματος (470 nm, 652,4 nm, 665,2 nm) με χρήση ενός φασματοφωτομέτρου υπεριώδους- ορατού (Shimadzu UV-2700). Ο υπολογισμός έγινε με βάση γνωστή εξίσωση από τη βιβλιογραφία η οποία παρουσιάζεται παρακάτω [141].

$$chla\ (\mu g/mL) = 16.82A_{665.2} - 9.28A_{652.4}$$

2.3.13 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτική πηκτή ακρυλαμιδίου

<u>Διαλύματα</u>

- <u>Ρυθμιστικό διάλυμα ακρυλαμιδίου/Δις-ακρυλαμιδίου</u>

49,5% ακρυλαμίδιο

3% Δις-ακρυλαμίδιο

- <u>3X Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος</u>

3 M Trisma base, pH 8,45

0,3% SDS

- <u>Sample buffer</u>

150 mM Tris-HCl, pH 7

12% SDS

6% β-μερκαπτοαιθανόλη

30% γλυκερόλη

0,05% Serva Blue G Coomasie

- Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (APS) 10%
- Διάλυμα ανόδου

0,1 M Tris, pH 8,9

- Διάλυμα καθόδου

0,1 M Tris, pH 8,25

0,1 M Tricine

0,1% SDS

Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου που παρασκευάστηκε αποτελούταν από την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) και την πηκτή διαχωρισμού (separating gel). Οι δύο πηκτές είχαν διαφορετική συγκέντρωση ακρυλαμιδίου και συνεπώς διαφορετικό μέγεθος πόρων. Η σύσταση των δύο πηκτών παρουσιάζεται στον πίνακα 2.13.

Πίνακας 2.5. Σύσταση πηκτής επιστοίβαξης (4%) και πηκτής διαχωρισμού (12%).

	Πηκτή επιστοίβαξης (4 %)	Πηκτή διαχωρισμού (12%)
Ρυθμιστικό διάλυμα ακρυλαμιδίου/Δις-ακρυλαμυδίου	500 μL	3,75 mL
3x Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος	1,5 mL	5 mL
Ουρία	-	2,75 gr
H_2O μέχρι V_{final}	6 mL	15 mL
APS	60 μL	150 μL
TEMED	10 μL	15 μL

Στις πηκτές αρχικά εφαρμόστηκε ρεύμα έντασης ρεύμα έντασης 15 mA, το οποίο αυξήθηκε στα 30 mA μόλις τα δείγματα πέρασαν στην πηκτή διαχωρισμού.

2.3.14 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών

Διαλύματα

- Διάλυμα Tris-buffered saline (TBS)

  10 mM Tris-HCl, pH 7,5

  150 mM NaCl

- Tris-buffered saline-Tween 20 (TBST)

  10 mM Tris-HCl, pH 7,5-8

  150 mM NaCl

  0,05% Tween 20

- Διάλυμα BSA

  Αλβουμίνη (BSA) 2% ή 5% γάλα σκόνη σε διάλυμα TBST

- Διάλυμα αλκαλικής φωσφατάσης (ALP Buffer)

  100 mM Tris HCl, pH 9,5

  100 mM NaCl

  5 mM $MgCl_2$

- Διάλυμα NBT (nitro-blue tetrazolium chloride)/BCIP (5-bromo-4- chloro-3'-indolyphosphatep-toluidine salt)

Αρχικά πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πηκτή ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE). Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ενεργοποιήθηκε σε διάλυμα TBST και τοποθετήθηκε μαζί με την πηκτή ακρυλαμιδίου στη συσκευή μεταφοράς αφού πρώτα καλύφθηκαν εξωτερικά με 5 στρώσεις διηθητικού χαρτιού εμποτισμένου με διάλυμα TBST. Η μεταφορά έλαβε χώρα για 90 min, σε σταθερό ρεύμα 1 mA/cm^2. Μετά το πέρας της μεταφοράς, οι μεμβράνη επωάστηκε υπό ανάδευση σε διάλυμα BSA 2% (w/v) σε TBST για 1 ώρα προκειμένου να γίνει δέσμευση των θέσεων μη ειδικής πρόσδεσης του αντισώματος. Έπειτα ακολούθησαν τρεις πλύσεις των 5 min με διάλυμα TBST και στη συνέχεια η μεμβράνη επωάστηκε για μία ώρα με το ειδικό πρωτοταγές αντίσωμα (αραίωση 1:500) ως προς την πρωτεΐνη-στόχο. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα ως προς τη συνθάση του *β*-φελλανδρενίου (PHLS) και τη συνθάση του πυροφωσφορικού γερανυλίου (GPPS). Ακολούθησαν δυο πλύσεις με διάλυμα TBST και μια πλύση με διάλυμα TBS. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάστηκε σε διάλυμα δευτεροταγούς αντισώματος (αραίωση 1:2000) για μια ώρα. Ακολούθησαν τρείς πλύσεις με αλκαλική φωσφατάση διάρκειας 5 min. Η εμφάνιση της μεμβράνης έλαβε χώρα με διάλυμα BCIP/NBT. Ο χρωματισμός των ζωνών είναι αποτέλεσμα της υδρόλυσης του BCIP από την αλκαλική φωσφατάση, απ’ όπου προκύπτει ένα ενδιάμεσο προϊόν που διμερίζεται και σχηματίζει τη χρώση.

2.3.15 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας

Παράλληλα με την ανάλυση των πρωτεϊνών με τις μεθόδους της SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης και ανοσοαποτύπωσης, πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των πρωτεϊνών σύντηξης σε όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη με τη χρήση ESI MS/MS σε όργανο Orbitrap Elite & Q Exective στο Max Planck Institute for Biophysics (Frankfurt, Germany).

2.3.16 Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων-Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας στα 730 nm

Η ανάπτυξη της καλλιέργειας προσδιορίστηκε με μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UV-2700 της Shimadzu. Σε αυτό το μήκος κύματος δεν απορροφούν άλλοι παράγοντες όπως παραδείγματος χάριν οι χρωστικές, συνεπώς η αύξηση της απορρόφησης υποδεικνύει πιο πυκνή καλλιέργεια, και συνεπώς μεγαλύτερη ανάπτυξη της.

2.3.17 Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων-Προσδιορισμός ξηρή βιομάζας κυττάρων

Η ανάπτυξης της καλλιέργειας προσδιορίστηκε και με μέτρηση της ξηρής βιομάζας κυττάρων (Dry Cell Weight, DCW). Συγκεκριμένη ποσότητα καλλιέργειας φυγοκεντρίθηκε και επαναιωρήθηκε σε μικρή ποσότητα υπερκάθαρου νερού. Η καλλιέργεια τοποθετήθηκε σε ειδικό αλουμινένιο, πιάτο γνωστού βάρους και αφέθηκε για ξήρανση στους 70°C για 12 ώρες.

2.3.18 Ποιοτική μελέτη του περιεχομένου των φωτοσυνθετικών χρωστικών

Για την ποιοτική μελέτη του περιεχομένου των φωτοσυνθετικών χρωστικών λήφθηκε φάσμα στο λύμα των κυττάρων, που λήφθηκε έπειτα από κατεργασία των καλλιεργειών με French Press, σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UV-2700, Shimadzu. Η χλωροφύλλη-α εμφανίζει κορυφές στα 680 και 435 nm, η φυκοκυανίνη στα 625 nm και τα καροτενοειδή στα 470 nm [141].

2.3.19 Ποσοτικός προσδιορισμός του περιεχομένου των φωτοσυνθετικών χρωστικών

Για την ποσοτικοποίηση των φωτοσυνθετικών χρωστικών, ποσότητα καλλιέργειας 1 mL φυγοκεντρίθηκε στα 1000 x *g* για 1 min σε μία φυγόκεντρο Eppendorf και έπειτα από την απόρριψη του υπερκείμενου, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1 mL 100% μεθανόλης. Έπειτα από επώαση 10-15 min στο σκοτάδι, το δείγμα φυγοκεντρίθηκε προκειμένου να απομακρυνθεί το ίζημα και μετρήθηκε η απορρόφηση του υπερκειμένου σε συγκεκριμένα

μήκη κύματος (470 nm, 650 nm, 665 nm, 710 nm) με χρήση ενός φασματοφωτόμετρου υπεριώδους-ορατού (Shimadzu UV-2700). Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης-α και των καροτενοειδών έγινε με βάση γνωστές εξισώσεις από τη βιβλιογραφία οι οποίες παρουσιάζονται παρακάτω [146].

$$\text{Chla (μg/mL)} = 16.5(A_{665} - A_{710}) - 8.3(A_{665} - A_{710})$$

$$\text{car (μg/mL)} = \frac{1000(A_{470} - A_{710}) - 1.63[Chla]}{221}$$

2.3.20 Πολαρογραφικός προσδιορισμός ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου

Η μέτρηση του ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου πραγματοποιήθηκε με χρήση ενός επιλεκτικού ηλεκτροδίου οξυγόνου τύπου Clark [147]. Η διάταξη του ηλεκτροδίου αποτελείται από μια άνοδο αργύρου και μια κάθοδο πλατίνας, σε διάλυμα ηλεκτρολύτη KCl, όπου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Για τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ ανόδου και καθόδου χρησιμοποιείται οξυγόνο, το οποίο εισέρχεται επιλεκτικά στον ηλεκτρολύτη από το δείγμα μέσω μιας ημιπερατής μεμβράνης, και ανάγεται στην κάθοδο σύμφωνα με την ημιαντίδραση:

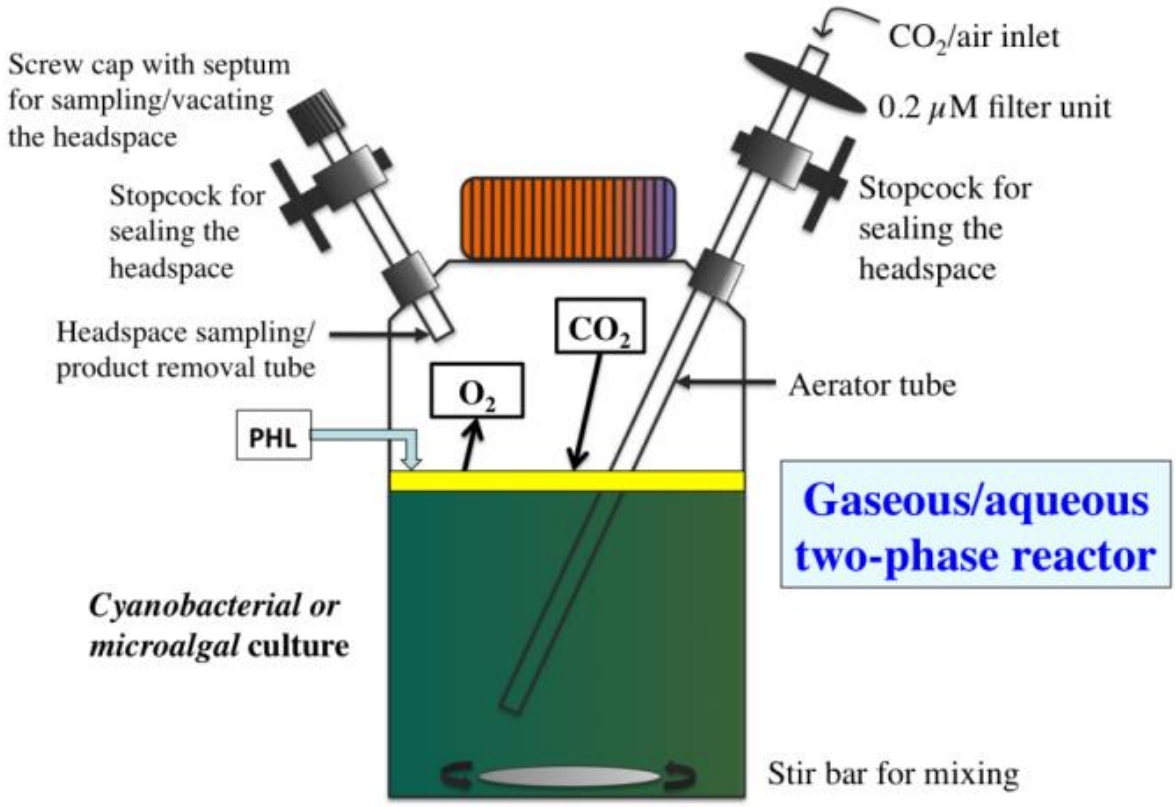
$$O_2 + 4e^- + 2H_2O \rightarrow 4OH^-$$

Για τις μετρήσεις έκλυσης οξυγόνου, 10 mL καλλιέργειας φυγοκεντρίθηκαν για 10 min στα 6000 x *g*. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 4 mL ρυθμιστικού διαλύματος με το οποίο είχε προηγουμένως σταθεροποιηθεί το ηλεκτρόδιο (0,896% w/v Tricine και 0,034% w/v $NaHCO_3$, pH 7.6). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε υδρόψυκτη γυάλινη κυψελίδα σε θερμοκρασία 25°C η οποία ρυθμίστηκε με τη χρήση θερμοστάτη με κυκλοφορητή νερού. Για την αποφυγή θέρμανσης του δείγματος, το φως πριν φτάσει στο δείγμα διήλθε από κυψελίδα με αραιό διάλυμα $CuSO_4$ που απορροφούσε την υπέρυθρη ακτινοβολία. Τέλος, το φως διήλθε από ένα κόκκινο φίλτρο, επιτρέποντας μόνο τα επιθυμητά μήκη κύματος να φτάσουν στο δείγμα [148]. Η μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα καταγράφηκε σε ένταση φωτισμού 500 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ από μία λάμπα βολφραμίου για χρονικό διάστημα 60 s και τελικά εκφράστηκε σε μmol O_2 (mg Chl)$^{-1} \cdot h^{-1}$.

2.3.21 Παρασκευή καλλιεργειών για την παραγωγή β-φελλανδρενίου

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν από τη μητρική καλλιέργεια με φυγοκέντριση στα 4.500 x *g* για 10 min. Έπειτα επαναιωρήθηκαν στο θρεπτικό μέσο σε τελικό όγκο 550 mL και αρχική

οπτική πυκνότητα OD_{730}=0,5 στους βιοαντιδραστήρες (1L) δύο φάσεων (αέριας/υγρής) (Εικόνα 2.6) [149]. Πραγματοποιήθηκε κορεσμός της αέριας φάσης με 100% CO_2. Στην παρούσα εργασία δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις CO_2, 8 και 22% (v/v). Οι βιοαντιδραστήρες σφραγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 28±1ºC, υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1} και σταθερή ανάδευση, ώστε η καλλιέργεια να αναπτυχθεί φωτοαυτότροφα. Έπειτα από χρονικό διάστημα 48 h, προστέθηκε συγκεκριμένη ποσότητα εξανίου στην επιφάνεια της καλλιέργειας και αφέθηκε για 2 h υπό ήπια ανάδευση. Με τον τρόπο αυτό αυξήθηκε ο όγκος της υδρόφοβης, οργανικής φάσης όπου βρίσκεται το προϊόν *β*-φελλανδρένιο και έτσι διευκολύνθηκε η συλλογή του πάνω από την επιφάνεια της υγρής καλλιέργειας με τη χρήση μίας υάλινης πιπέτας Pasteur.



Εικόνα 2.6. Βιοαντιδραστήρας 1L διπλής φάσης (αέριας/υγρής) που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των μεταλλαγμένων στελεχών *Synechocystis* με σκοπό την παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου. Ελήφθη από την παραπομπή [71].

2.3.22 Ταυτοποίηση του παραγόμενου β-φελλανδρενίου με φασματομετρία απορρόφησης στο υπεριώδες

Τα δείγματα εξανίου που συλλέχθηκαν αναλύθηκαν με φασματομετρία απορρόφησης στο υπεριώδες όπου το *β*-φελλανδρένιο δίνει χαρακτηριστική κορυφή στα 232,4 nm.

2.3.23 Ταυτοποίηση του παραγόμενου β-φελλανδρενίου με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας

Τα δείγματα εξανίου που συλλέχθηκαν αναλύθηκαν επίσης με αέρια χρωματογραφία (Agilent 6890) συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (Agilent 5973 inert). Χρησιμοποιήθηκε τριχοειδής στήλη DB-5ms με διαστάσεις: μήκος 30 m, διάμετρος 0,25 mm και πάχος 0,25 μm. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα είχε διάρκεια 39,50 min και είχε ως εξής:

i. Αρχική θερμοκρασία 50°C και παραμονή σε αυτή για 4 min.
ii. Σταθερή αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 4°C/min έως τους 150 ^{o}C.
iii. Αύξηση μέχρι τους 260°C με ρυθμό 20°C/min και παραμονή στους 260°C για 5 min.

Το φέρον αέριο ήταν ήλιο με ροή 1,2 mL/min. Η εισαγωγή του δείγματος έγινε με αυτόματο δειγματολήπτη σε on-column εισαγωγέα και ο όγκος του δείγματος ήταν 1 μL. Η θερμοκρασία της transfer line ήταν 280°C. Οι συνθήκες ηλεκτρονικού ιονισμού ήταν ενέργεια ιονισμού 70eV, θερμοκρασία της πηγής ιόντων 180°C και πεδίο τιμών μάζας 45-500.

Για την ταυτοποίηση του *β*-φελλανδρενίου στα δείγματα που συλλέχθηκαν έγινε σύγκριση του χρόνου κατακράτησης αυτών με αυτό προτύπου *β*-φελλανδρενίου. Επίσης έγινε σύγκριση των φασμάτων μάζας με το αντίστοιχο πρότυπο *β*-φελλανδρένιο και με φάσμα καταχωρημένο σε βάσεις δεδομένων.

2.3.24 Ποσοτικός προσδιορισμός του παραγόμενου β-φελλανδρενίου

Για την ποσοτικοποίηση του παραγόμενου *β*-φελλανδρενίου χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές μέθοδοι.

1. Αέρια χρωματογραφία και χρήση προτύπου *β*-φελλανδρενίου και *γ*-τερπινενίου ως εσωτερικών προτύπων.
2. Φασματομετρία απορρόφησης στο υπεριώδες όπου το *β*-φελλανδρένιο δίνει χαρακτηριστική κορυφή στα 232,4 nm, και εφαρμογή του νόμου του Beer-Lambert ($\varepsilon_{232,4}$=15,7 mM^{-1} cm^{-1}) [107].

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως:

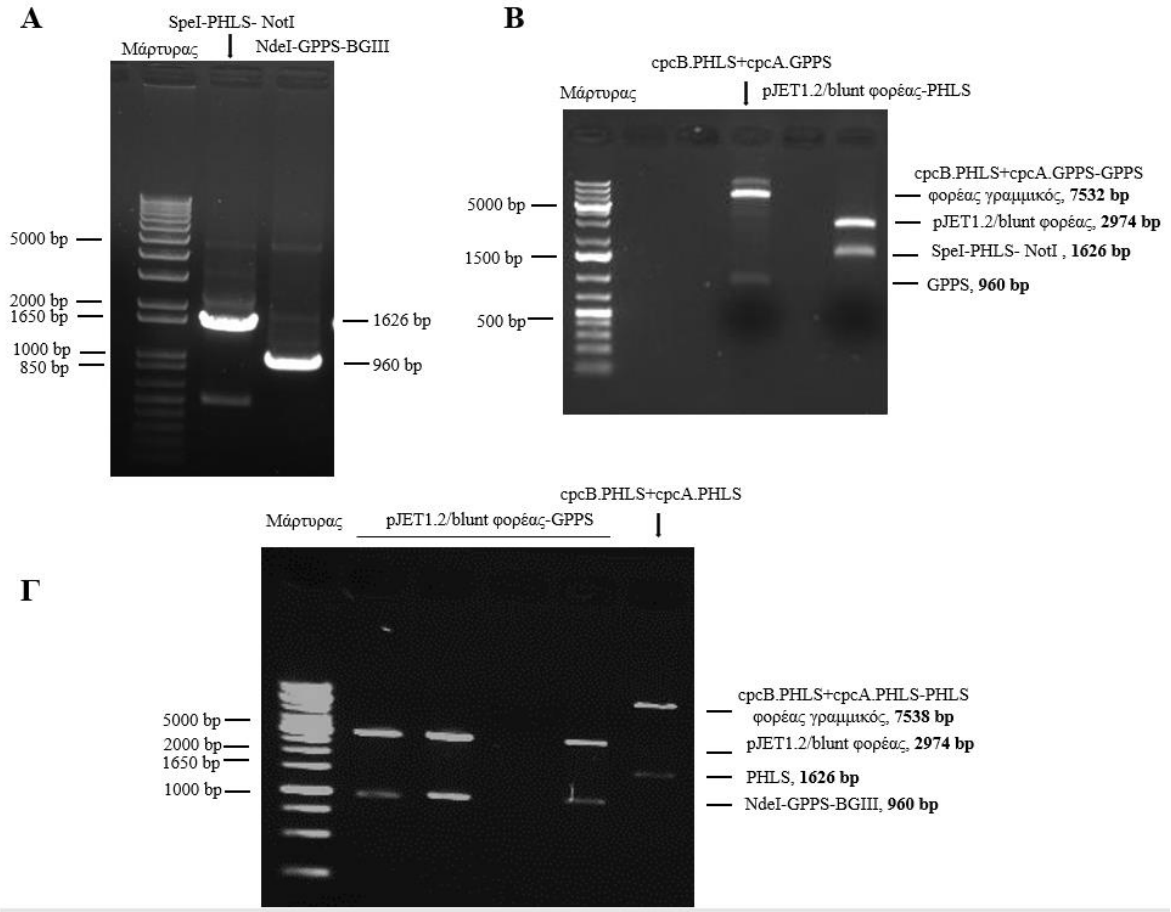
1. μg *β*-φελλανδρενίου ανά L καλλιέργειας,
2. μg *β*-φελλανδρενίου ανά μg χλωροφύλλης, και
3. mg *β*-φελλανδρενίου ως προς τη διαφορά της ξηρής βιομάζας κυττάρων (ΔDCW) ανάμεσα στην έναρξη και τη λήξη του πειράματος (48 h διάστημα παραμονής στους βιοαντιδραστήρες).

2.4 Αποτελέσματα και συζήτηση

2.4.1 Κατασκευή φορέων κλωνοποίησης

Στη συγκεκριμένη πειραματική σειρά, αρχικά σχεδιάστηκαν και κατασκευάστηκαν πλασμίδια τα οποία αποτελούν τους φορείς κλωνοποίησης, και φέρουν τις αλληλουχίες που θα ενσωματωθούν στο γενετικό υλικό των *Synechocystis*. Στις εικόνες 2.7 και 2.10 παρουσιάζονται οι πηκτές αγαρόζης με τα προϊόντα των PCR αλλά και της πέψης που πραγματοποιήθηκαν για την κατασκευή των πλασμιδιακών φορέων κλωνοποίησης.

Κατασκευή φορέων cpcB.PHLS+cpcA.PHLS και cpcB.GPPS+cpcA.PHLS



Εικόνα 2.7. Πηκτές αγαρόζης με τα προϊόντα των PCR και της πέψης για την κατασκευή των φορέων cpcB.PHLS+cpcA.PHLS και cpcB.GPPS+cpcA.PHLS. **Α.** Πηκτή αγαρόζης όπου παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR για τα εκθέματα speI-PHLS-NotI και NdeI-GPPS-BGIII. **Β.** και **Γ.** Στις πηκτές αγαρόζης παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της πέψης τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες speI- NotI, και NdeI-BGIII των φορέων και των ενθεμάτων για την κατασκευή των φορέων cpcB.PHLS+cpcA.PHLS και cpcB.GPPS+cpcA.PHLS αντίστοιχα.

Στην πηκτή αγαρόζης στην Εικόνα 2.7. Α παρουσιάζονται τα προϊόντα της PCR με τους εκκινητές PHLS_a_Fw - PHLS_a_Rv και GPPS_a_Fw - GPPS_a_Rv, speI-PHLS-NotI και NdeI-GPPS-BGIII στα 1626 bp και 960 bp αντίστοιχα ($2^{η}$ και $3^{η}$ σειρά). Τα προϊόντα αυτά αποτελούν το ένθεμα για την κατασκευή των φορέων cpcB.PHLS+cpcA.PHLS και cpcB.GPPS+cpcA.PHLS αντίστοιχα. Στα άκρα των προϊόντων αυτών έχουν προστεθεί οι αλληλουχίες για τις θέσεις αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών που υπάρχουν στους φορείς στις θέσεις όπου θα εισαχθούν. Πιο συγκεκριμένα στο 5΄ άκρο του γονιδίου

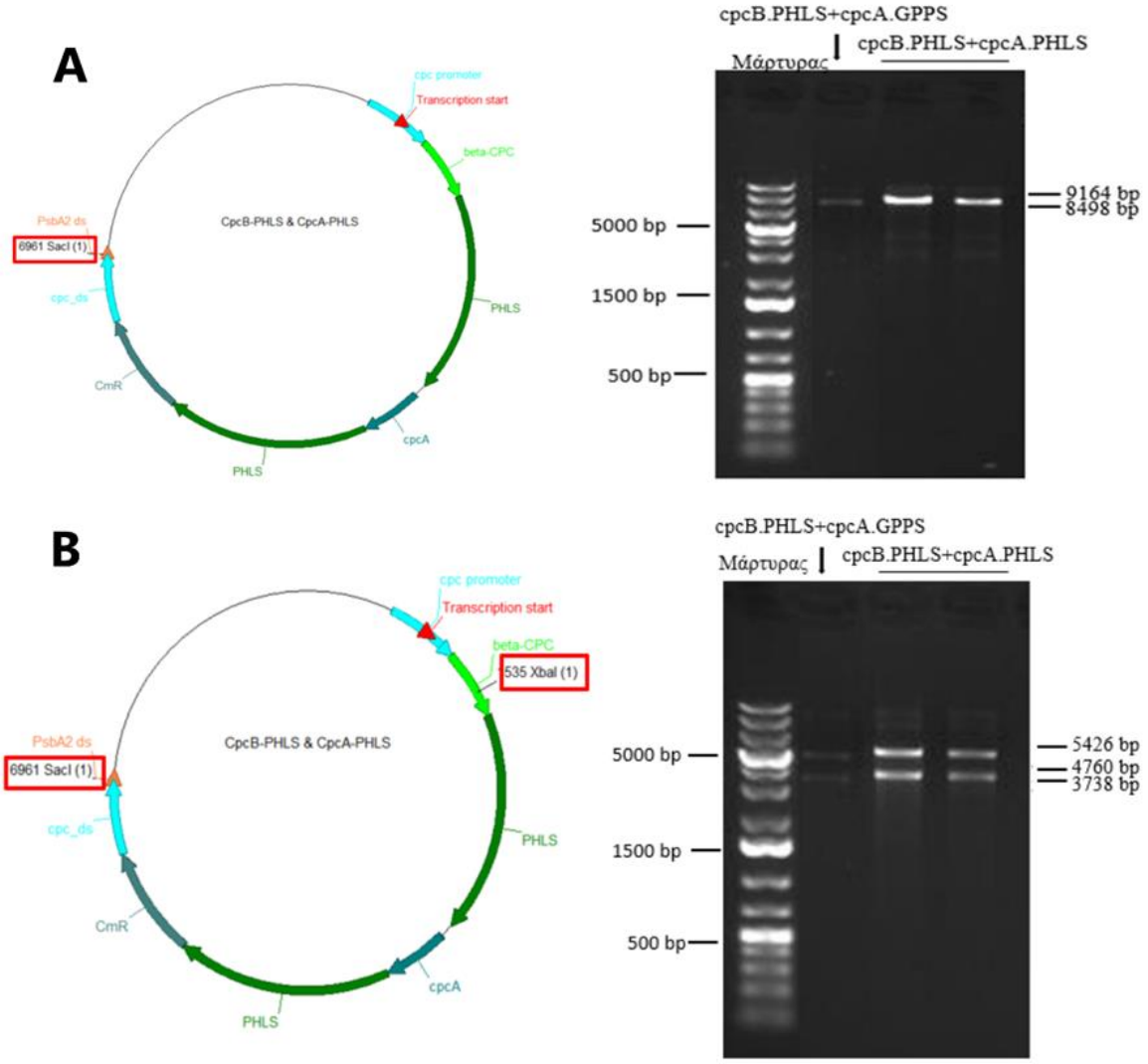
της *PHLS* προστέθηκε η αλληλουχία DNA την οποία κόβει η speI και στο 3΄ άκρο του η αλληλουχία DNA που κόβει η περιοριστική ενδονουκλεάση NotI. Στο 5΄ άκρο του γονιδίου της *GPPS* προστέθηκε η αλληλουχία DNA που κόβει η περιοριστική ενδονουκλεάση NdeI και στο 3΄ άκρο του η αλληλουχία DNA που κόβει η περιοριστική ενδονουκλεάση BGIII.

Στην Εικόνα 2.7. Β παρουσιάζεται η πηκτή αγαρόζης με τα προϊόντα της πέψης με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες speI και NotI για την κατασκευή του φορέα cpcB.PHLS+cpcA.PHLS. Αρχικά προϊόντα της πέψης είναι ο γραμμικός φορέας cpcB.PHLS+cpcA.GPPS-GPPS στα 7532 bp και χωρίς την αλληλουχία του *GPPS* η οποία φαίνεται στα 960 bp. Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 2.3.9 στα υλικά και μέθοδοι τα ενθέματα εισήχθησαν σε pJET1.2/blunt φορέα ώστε να διευκολυνθεί η περαιτέρω επεξεργασία τους. Στην τελευταία στήλη της πηκτής φαίνονται τα προϊόντα της πέψης του φορέα pJET1.2/blunt-PHLS. Στα 2974 bp εμφανίζεται ο γραμμικός pJET1.2/blunt φορέας και στα 1626 bp η αλληλουχία *speI-PHLS-NotI* που έχει αποκτήσει συμπληρωματικά άκρα με τον φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS-GPPS ώστε να γίνει η σύνδεση τους με τη χρήση λιγάσης.

Τέλος στην Εικόνα 2.7. Γ παρουσιάζεται η πηκτή αγαρόζης με τα προϊόντα της πέψης με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες NdeI και BGIII για την κατασκευή του φορέα cpcB.GPPS+cpcA.PHLS. Αρχικά στα 2974 bp παρουσιάζεται ο γραμμικός φορέας pJET1.2/blunt-GPPS, χωρίς την αλληλουχία *NdeI-GPPS-BGIII* η οποία φαίνεται στα 960 bp και αποτελεί το ένθεμα. Επίσης στα 7538 bp φαίνεται ο γραμμικός φορέας cpcB.PHLS+cpcA.PHLS-PHLS χωρίς τη δεύτερη αλληλουχία *PHLS* η οποία φαίνεται στα 1626 bp. Και σε αυτή την περίπτωση ο φορέας και το ένθεμα έχουν συμπληρωματικά άκρα με σκοπό τη σύνδεση τους με αντίδραση λιγάσης.

2.4.2 Έλεγχος για τη ορθή κατασκευή των φορέων

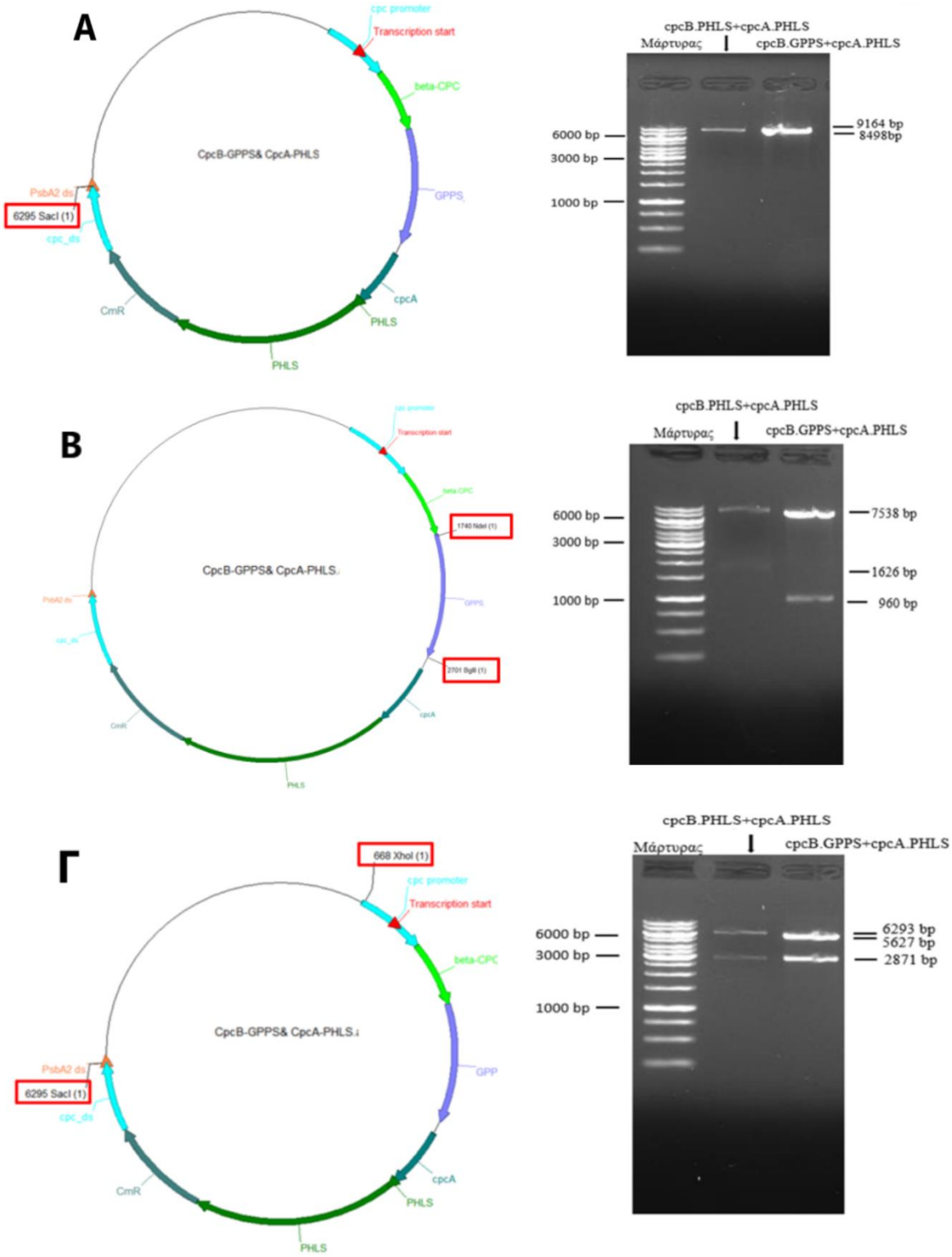
Για να εξεταστεί η σωστή κατασκευή των φορέων cpcB.PHLS+cpcA.PHLS και cpcB.GPPS+cpcA.PHLS αρχικά πραγματοποιήθηκε πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες προκειμένου να μελετηθεί εάν προκύπτουν τα αναμενόμενα προϊόντα (εικόνες 2.8 και 2.9 αντίστοιχα). Έπειτα στα δείγματα πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση DNA (sequencing), χρησιμοποιώντας εκκινητές οι οποίοι σχεδιάστηκαν ώστε να υβριδοποιούνται κοντά ή και μέσα στις περιοχές που τροποιήθηκαν. Με την αλληλούχιση ταυτοποιούνται 1000 νουκλεοτίδια από το σημείο όπου υβριδοποιείται ο εκκινητής στο δείγμα DNA.



Εικόνα 2.8. Στα αριστερά παρουσιάζεται ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα cpcB.PHLS+cpcA.PHLS (9164 bp). Με πλαίσιο επισημαίνονται τα σημεία που κόβουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν ώστε να εξεταστεί η σωστή κατασκευή του παραπάνω φορέα. Δεξιά φαίνονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα της πέψης με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες που παρουσιάζονται στα αριστερά. **Α**. Στην πηκτή αγαρόζης παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της πέψης με την περιοριστική ενδονουκλεάση SacI, ώστε να ληφθεί ως προϊόν της πέψης ο φορέας γραμμικός. **Β.** Στην πηκτή αγαρόζης παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της πέψης με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες SacI και XbaI.

Όσον αφορά το φορέα cpcB.PHLS+cpcA.PHLS, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.8. Α αρχικά πραγματοποιήθηκε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλέαση SacI ώστε να γίνει ο φορέας γραμμικός. Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε πέψη σε έναν ήδη ελεγμένο φορέα, τον cpcB.PHLS+cpcA.GPPS με την ίδια περιοριστική ενδονουκλεάση ώστε να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας για τη σωστή λειτουργία των περιοριστικών ενδονουκλεασών. Η πέψη αυτή έδωσε μοναδικό προϊόν στα 8498 bp. Στον φορέα cpcB.GPPS+cpcA.PHLS η αντικατάσταση της αλληλουχίας του GPPS με PHLS οδήγησε σε μεγαλύτερο προϊόν 9164 bp. Τα προϊόντα που έδωσε η πέψη στους παραπάνω φορείς ήταν αναμενόμενα.

Επιπλέον πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες SacI και XbaI, οι οποίες κόβουν έξω από την περιοχή που τροποποιήθηκε και έδωσαν δύο προϊόντα στα 5426 bp και στα 3738 bp όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.8.Β. Η πέψη του φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS έδωσε δύο προϊόντα στα 4760 bp και 3738 bp. Τα προϊόντα που έδωσε η πέψη με τις παραπάνω περιοριστικές ενδονουκλεάσες αποτέλεσαν ενδείξεις για τη σωστή κατασκευή του φορέα cpcB.PHLS+cpcA.PHLS.



Εικόνα 2.9. Στα αριστερά παρουσιάζεται ο χάρτης του πλασμιδιακού φορέα cpcB.GPPS+cpcA.PHLS (8498 bp). Με πλαίσιο επισημαίνονται τα σημεία που κόβουν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν ώστε να ελεγχθεί εάν ο παραπάνω φορέας κατασκευάστηκε σωστά. Δεξιά φαίνονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα των πέψεων με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες που παρουσιάζονται στα αριστερά. **Α.** Στην πηκτή

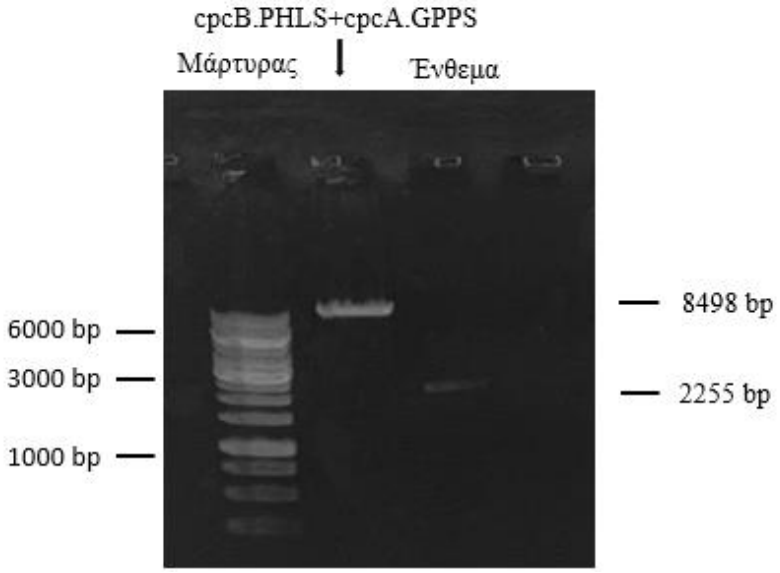
αγαρόζης παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της πέψης με την περιοριστική ενδονουκλεάση SacI, ώστε να ληφθεί ως προϊόν ο φορέας γραμμικός. **Β.** Πηκτή αγαρόζης όπου παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της πέψης με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες NdeI και BGIII, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν κατά την κατασκευή του φορέα. **Γ.** Στην πηκτή αγαρόζης παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της πέψης με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες SacI και XhoI, οι οποίες κόβουν έξω από την περιοχή του cpc οπερονίου που έχει τροποποιηθεί.

Όσον αφορά το φορέα cpcB.GPPS+cpcA.PHLS, όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.9.Α, αρχικά πραγματοποιήθηκε πέψη με την περιοριστική ενδονουκλέαση SacI ώστε να γίνει γραμμικός. Το μοναδικό προϊόν της πέψης φαίνεται στα 8498 bp. Πέψη με την περιοριστική ενδονουκλέαση SacI στο φορέα cpcB.PHLS+cpcA.PHLS έδωσε μοναδικό προϊόν στα 9164 bp.

Έπειτα πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες NdeI και BgIII οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν και κατά την κατασκευή του φορέα cpcB.GPPS+cpcA.PHLS. Η πέψη με τις συγκεκριμένες περιοριστικές ενδονουκλεάσες στο φορέα αυτό έδωσε τα δύο αναμενόμενα προϊόντα στα 7538 bp και 1626 bp (Εικόνα 2.9.Β). Η πέψη με τις ίδιες περιοριστικές ενδονουκλεάσες στον φορέα cpcB.PHLS+cpcA.PHLS έδωσε δύο προϊόντα στα 7538 bp και στα 960 bp.

Τέλος πραγματοποιήθηκε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες XhoI και SacI οι οποίες κόβουν έξω από την περιοχή που τροποποιήθηκε (Εικόνα 2.9.Γ). Στον φορέα cpcB.GPPS+cpcA.PHLS έδωσαν προϊόντα με μέγεθος 5627 bp και 2871 bp ενώ στον φορέα cpcB.PHLS+cpcA.PHLS στα 6293 bp και 2871 bp όπως ήταν αναμενόμενο. Τα προϊόντα της πέψης με τις παραπάνω περιοριστικές ενδονουκλεάσες αποτέλεσαν ενδείξεις ότι ο φορέας cpcB.GPPS+cpcA.PHLS κατασκευάστηκε ορθά. Για την επαλήθευση της ορθής κατασκευής των φορέων πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση DNA των δειγμάτων που αναλύεται στην ενότητα 2.4.3.

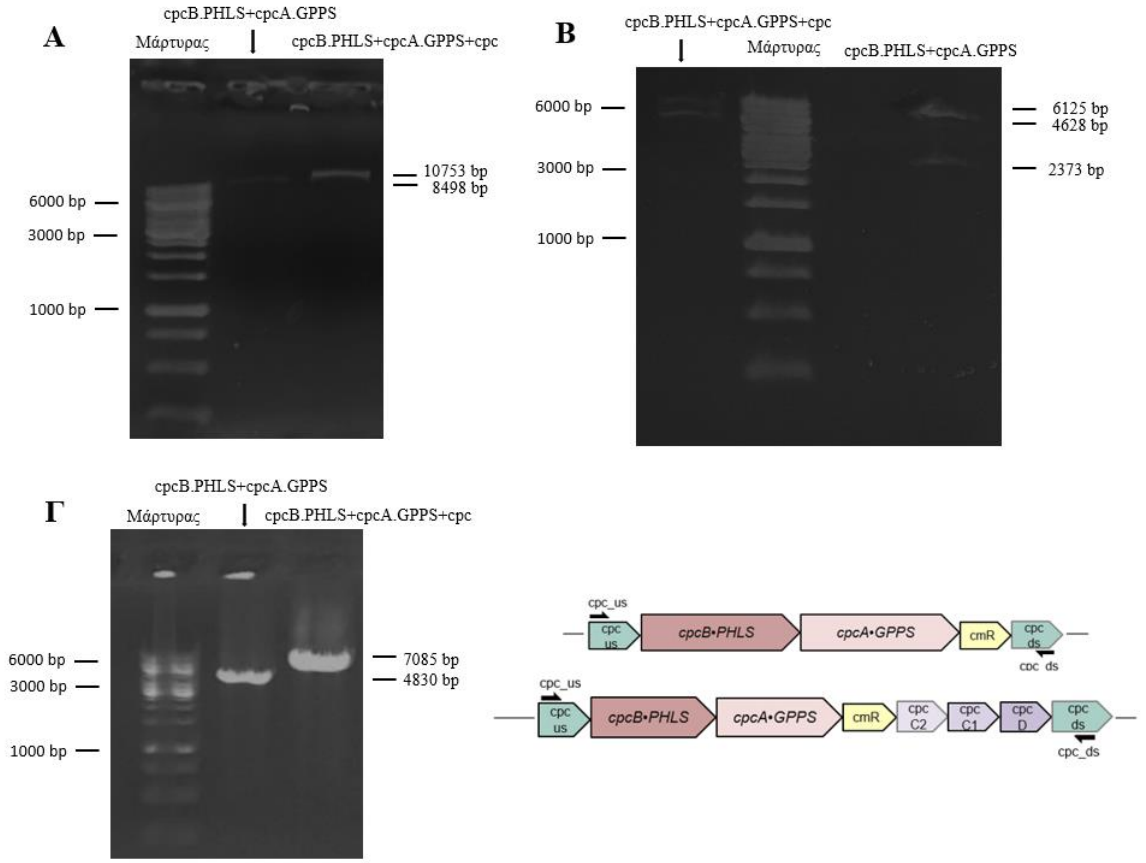
Κατασκευή φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc



Εικόνα 2.10. Στην πηκτή αγαρόζης παρουσιάζονται τα προϊόντα των PCR που ελήφθησαν για την κατασκευή του φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc. Στα αριστερά φαίνεται ο φορέας cpcB.PHLS+cpcA.GPPS γραμμικός και στα δεξιά οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν τα συνδετικά πεπτίδια του cpc οπερονίου και αποτελούν το ένθεμα.

Στην Εικόνα 2.10 παρουσιάζονται τα προϊόντα της PCR για την κατασκευή του φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc με τη μέθοδο FastCloning. Αρχικά στα 8498 bp παρουσιάζεται το προϊόν της PCR με τους εκκινητές vector_Fw και vector_Rv, δηλαδή ο φορέας cpcB.PHLS+cpcA.GPPS γραμμικός. Στην τελευταία σειρά, στα 2255 bp φαίνεται το προϊόν της PCR με τους εκκινητές insert_Fw και insert_Rv, δηλαδή τα γονίδια που κωδικοποιούν τα συνδετικά πεπτίδια του cpc οπερονίου, cpcC2-cpcC1-cpcD και αποτέλεσαν το ένθεμα.

Έλεγχος για τον φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc



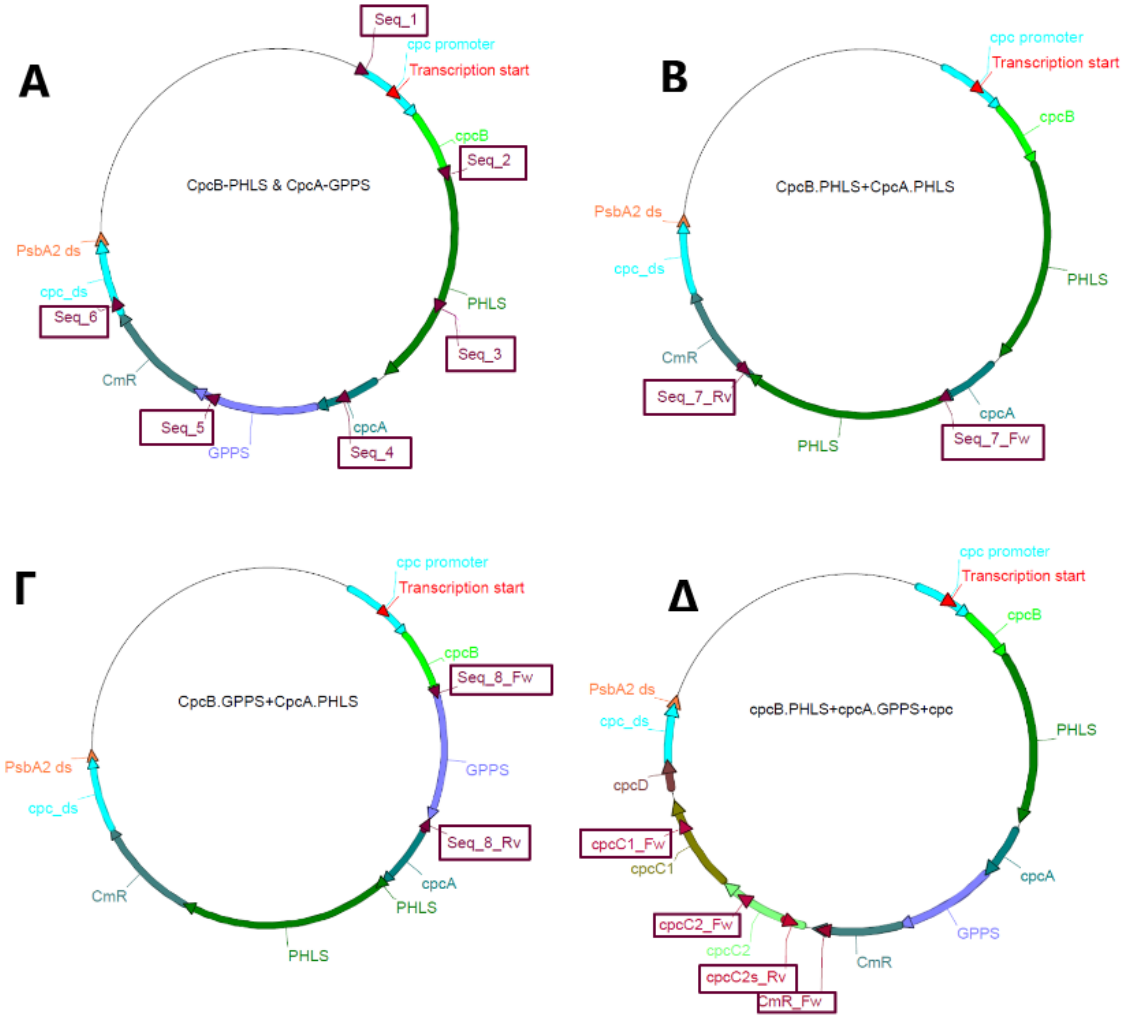
Εικόνα 2.11. Παρουσιάζονται τα προϊόντα της πεψης κα της PCR που πραγματοποιήθηκαν ώστε να εξεταστεί εάν ο φορέας cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc κατασκευάστηκε σωστά. **Α.** Προϊόντα της πέψης με την περιοριστική ενδονουκλεάση NdeI ώστε να γίνει γραμμικός ο φορέας. **Β.** Προϊόντα της πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες BamHI και BGIII. Γ. Προϊόντα PCR με τους εκκινητές cpc_us και cpc_ds οι οποίοι υβριδοποιούνται εκατέρωθεν του cpc οπερονίου.

Στην Εικόνα 2.11.Α παρουσιάζονται τα προϊόντα της πέψης με την περιοριστική ενδονουκλεάση NdeI. Πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα πέψη του φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS, ως μάρτυρα, και έδωσε μοναδικό προϊόν στα 8498 bp. Η εισαγωγή των γονιδίων που κωδικοποιούν τα συνδετικά πεπτίδια του cpc οπερονίου στον φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc οδήγησε σε μεγαλύτερο προϊόν στα 10753 bp. Έπειτα πραγματοποιήθηκε διπλή πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες BamHI και BGIII (Εικόνα 2.11.Β). Στο φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc η πέψη με τις παραπάνω περιοριστικές ενδονουκλεάσες έδωσε τα αναμενόμενα προϊόντα μεγέθους 6125 bp και 4628 bp ενώ στο φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS στα 6125 bp και 2373 bp. Στην Εικόνα

2.11.Γ παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της PCR με τους εκκινητές cpc_us και cpc_ds. Οι συγκεκριμένοι εκκινητές υβριδοποιούνται στις περιοχές ανοδικά και καθοδικά του cpc οπερονίου. Συνεπώς PCR με τους εκκινητές αυτούς οδήγησε σε προϊόντα διαφορετικού μεγέθους στους φορείς cpcB.PHLS+cpcA.GPPS και cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc. Πιο συγκεκριμένα ο φορέας cpcB.PHLS+cpcA.GPPS έδωσε μοναδικό προϊόν στα 4830 bp ενώ η εισαγωγή του ενθέματος στον φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc οδήγησε σε μεγαλύτερο προϊόν της PCR στα 7085 bp όπως ήταν αναμενόμενο. Τα προϊόντα που έδωσε η πέψη με τις παραπάνω περιοριστικές ενδονουκλεάσες καθώς και η PCR με τους παραπάνω εκκινητές αποτέλεσαν ενδείξεις ότι ο φορέας cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc κατασκευάστηκε ορθά.

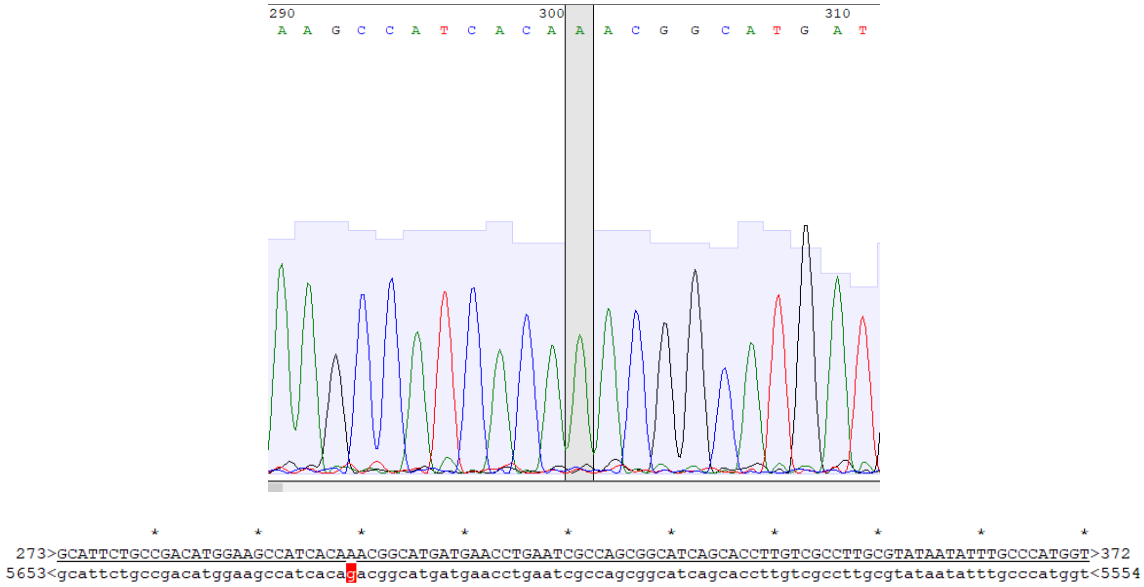
2.4.3 Αλληλούχιση των φορέων κλωνοποίησης

Στην Εικόνα 2.12. παρουσιάζονται οι φορείς που κατασκευάστηκαν καθώς και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχιση τους (με πλαίσιο). Με την αλληλούχιση ταυτοποιούνται 1000 νουκλεοτίδια από το σημείο όπου υβριδοποιείται ο εκκινητής στο δείγμα DNA. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης ελέγχθηκαν για ομολογία με τις αλληλουχίες των επιθυμητών γονιδίων, έπειτα από στοίχιση τους, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα APE A plasmid editor. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αλληλούχισης, τα οποία παρατίθενται στο Παράρτημα ΙΙ, οι τρεις φορείς κατασκευάστηκαν επιτυχώς.



Εικόνα 2.12. Χάρτες πλασμιδιακών φορέων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Με πλαίσιο επισημαίνονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αλληλούχιση των φορέων με σκοπό να επιβεβαιωθεί η σωστή κατασκευή τους.

Από τα αποτελέσματα της αλληλούχισης με τον εκκινητή cpcC2s_Rv στον φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc (10753 bp) προέκυψε πως έγινε μία σημειακή μετάλλαξη μίας G σε μία A στη θέση 5626 του φορέα, δηλαδή μέσα στην αλληλουχία DNA που αντιστοιχεί στο γονίδιο ανθεκτικότητας στη χλωραμφενικόλη (CmR) (Εικόνα 2.13.). Πειραματικά φάνηκε πως η μετάλλαξη αυτή δεν επηρεάζει την ενεργότητα της πρωτεΐνης, εφόσον καλλιέργειες κυττάρων *E. Coli* που φέρουν το πλασμίδιο αυτό αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο παρουσία του αντιβιοτικού χλωραμφενικόλης.



Εικόνα 2.13. Στην Εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αλληλούχισης του φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc. Πάνω φαίνεται το χρωματογράφημα της αλληλούχισης. Κάτω στην πάνω σειρά φαίνονται τα αποτελέσματα του δείγματος που αναλύθηκε και στην κάτω σειρά η αναμενόμενη αλληλουχία. Με κόκκινο επισημαίνεται η σημειακή μετάλλαξη που έγινε.

Συνεπώς τα προϊόντα που έδωσαν οι παραπάνω πέψη και PCR σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της αλληλούχισης επιβεβαιώνουν πως οι φορείς cpcB.PHLS+cpcA.PHLS, cpcB.GPPS+cpcA.PHLS και cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc κατασκευάστηκαν επιτυχώς.

2.4.4 Γενετική ανάλυση των μεταλλαγμένων στελεχών Synechocystis-Επίτευξη ομοπλασμίας

Οι αλληλουχίες που φέρουν οι φορείς cpcB.PHLS+cpcA.GPPS, cpcB.PHLS+cpcA.PHLS, cpcB.GPPS+cpcA.PHLS, cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc εισήχθησαν στο γενωμικό DNA των *Synechocystis* στην περιοχή του cpc οπερονίου μέσω διπλού ομόλογου ανασυνδυασμού.

Στους φορείς cpcB.PHLS+cpcA.PHLS και cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc το γονίδιο της συνθάσης του *β*-φελλανδρενίου (*PHLS*) ενώθηκε με το καρβοξυ-τελικό άκρο της αλληλουχίας που κωδικοποιεί την cpcB υπομονάδα της φυκοκυανίνης ενώ το γονίδιο της συνθάσης του πυροφωσφορικού γερανυλίου (*GPPS*) συγχωνεύτηκε με το καρβοξυ-τελικό άκρο της αλληλουχίας που κωδικοποιεί την CPCA υπομονάδα της φυκοκυανίνης. Επιπλέον στον φορέα cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc έχουν εισαχθεί και οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν τα συνδετικά πεπτίδια του cpc οπερονίου αμέσως μετά το γονίδιο ανθεκτικότητας στην χλωραμφενικόλη.

Όσον αφορά το φορέα cpcB.GPPS+cpcA.PHLS το γονίδιο της *PHLS* ενώθηκε με το καρβοξυτελικό άκρο της αλληλουχίας που κωδικοποιεί την CPCA υπομονάδα της φυκοκυανίνης ενώ το γονίδιο της *GPPS* ενώθηκε με το καρβοξυτελικό άκρο της αλληλουχίας που κωδικοποιεί την cpcB υπομονάδα της φυκοκυανίνης.

Τέλος, στο φορέα cpcB.PHLS+cpcA.PHLS το γονίδιο *PHLS* έχει ενωθεί με τα καρβοξυτελικά άκρα των αλληλουχιών που κωδικοποιούν τις υπομονάδες cpcB και cpcA.

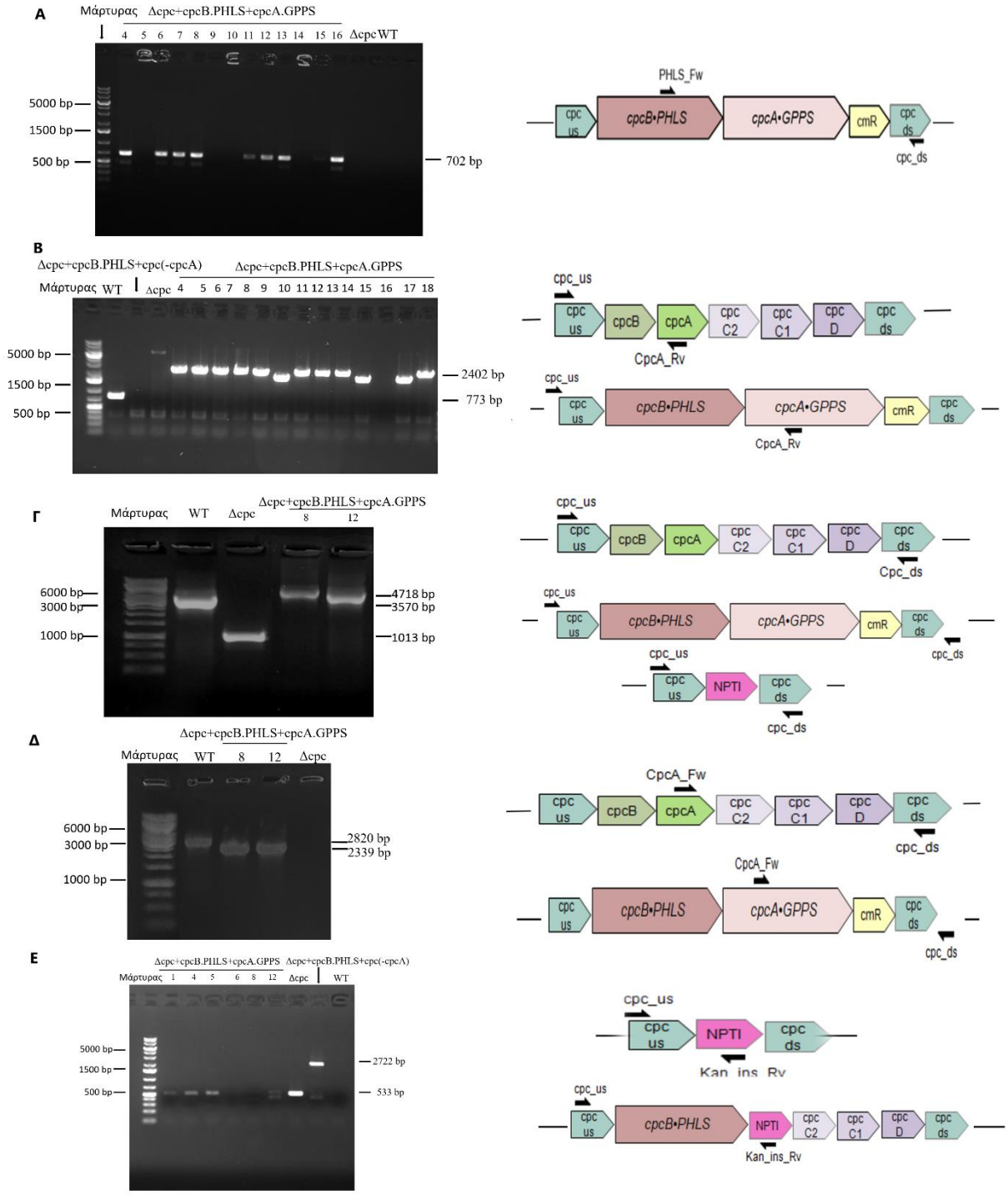
Τα κυανοβακτήρια περιέχουν πολλαπλά αντίγραφα των χρωμοσωμάτων τους, και συγκεκριμένα τα *Synechocystis* περιέχουν περίπου 12 αντίγραφα του γονιδιώματος τους ανά κύτταρο. Συνεπώς αμέσως μετά τον μετασχηματισμό λαμβάνονται ετερόζυγα κύτταρα, δηλαδή ένα μίγμα του στελέχους δέκτη και του μεταλλάγματος. Για το λόγο αυτό ήταν απαραίτητο να επιβεβαιωθεί ότι οι ετερόλογες αλληλουχίες DNA ενσωματώθηκαν σε όλα τα αντίγραφα του γονιδιώματος των *Synechocystis*, δηλαδή ότι ελήφθησαν ομοπλασμικά μεταλλαγμένα στελέχη.

Για να ελεγχθεί εάν οι αλληλουχίες που φέρουν οι φορείς αντικατέστησαν επιτυχώς τα ενδογενή γονίδια του cpc οπερονίου στα μεταλλαγμένα στελέχη, πραγματοποιήθηκε ανάλυση PCR στο γενωμικό DNA των *Synechocystis*. Οι εκκινητές cpc_us, cpcA_Rv, cpcA_Fw, PHLS_Fw και cpc_ds σχεδιάστηκαν ώστε να πλαισιώνουν την περιοχή όπου πραγματοποιήθηκε ο ομόλογος ανασυνδυασμός. Οι παραπάνω PCR έδωσαν προϊόντα διαφορετικού μεγέθους στα διαφορετικά μεταλλαγμένα στελέχη σε σχέση με το στέλεχος δέκτη και το στέλεχος αγρίου τύπου (WT) ή και μοναδικό προϊόν στα μεταλλαγμένα στελέχη.

Επίσης με την ίδια τεχνική και τους εκκινητές cpc_us και Kan_ins_Rv εξετάστηκε εάν έγινε αντικατάσταση όλων των αντιγράφων γενετικού υλικού του στελέχους δέκτη με αυτά των διαγονιδιακών στελεχών και συνεπώς επιτεύχθηκε ομοπλασμία.

Στις εικόνες 2.14. και 2.15. παρουσιάζονται οι πηκτές αγαρόζης με τα προϊόντα των PCR στο γενωμικό DNA των *Synechocystis* για τα διάφορα μεταλλαγμένα στελέχη.

Μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS



Εικόνα 2.14. Ανάλυση PCR στο γενωμικό DNA του WT και του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS. Αριστερά φαίνονται οι πηκτές αγαρόζης με τα προϊόντα των PCR. Δεξιά παρουσιάζονται οι γενετικοί χάρτες των στελεχών με επισημασμένους τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, και που αυτοί υβριδοποιούνται. Τα ζεύγη εκκινητών PHLS_Fw-cpcA_Rv, cpc_us-cpcA_Rv, cpc_us-cpc_ds και cpcA_Fw-cpc_ds έδωσαν

διαφορετικά ή μοναδικά προϊόντα PCR στο μεταλλαγμένο στέλεχος σε σχέση με το WT, αποδεικνύοντας τη επιτυχή αντικατάσταση του cpc οπερονίου. Το ζεύγος εκκινητών cpc_us-Kan_ins_Rv σχεδιάστηκε ώστε να εξετάσει για ομοπλασμία στο μεταλλαγμένο στέλεχος, δίνοντας μοναδικό προϊόν μόνο στο στέλεχος δέκτη.

Η χρήση των εκκινητών PHLS_Fw και cpcA_Rv, οι οποίοι υβριδοποιούνται στην αλληλουχία του γονιδίου της συνθάσης του *β*-φελλανδρενίου (*PHLS*) και μέσα στην αλληλουχία της υπομονάδας Α της φυκοκυανίνης (*cpcA*) αντίστοιχα έδωσαν μοναδικό προϊόν PCR στα 702 bp στις περισσότερες σειρές (lines) του στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS. Το αποτέλεσμα αυτό αποδεικνύει ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί τη συνθάση του *β*-φελλανδρενίου είναι παρόν σε αυτές τις σειρές. Στα στελέχη αγρίου τύπου και Δcpc απουσιάζει το γονίδιο της συνθάσης του *β*-φελλανδρενίου. Γεγονός που φαίνεται και από την πηκτή αγαρόζης όπου PCR με τους παραπάνω εκκινητές δεν έδωσε προϊόντα (Εικόνα 2.14.Α).

Οι εκκινητές cpc_us και cpcA_Rv υβριδοποιούνται στην περιοχή cpc_us του cpc οπερονίου (cpc_us) και μέσα στην αλληλουχία του γονιδίου που κωδικοποιεί την υπομονάδα Α της φυκοκυανίνης (*cpcA*) αντίστοιχα. Genomic DNA PCR με τη χρήση αυτών των εκκινητών στο στέλεχος αγρίου τύπου έδωσε προϊόν στα 773 bp. Στο μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS, η εισαγωγή των γονιδίων σύντηξης που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες σύντηξης *cpcB.PHLS* και *cpcA.GPPS* οδήγησε σε μεγαλύτερο προϊόν της PCR στα 2402 bp. Το προϊόν αυτό το έδωσαν οι περισσότερες σειρές του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS. Στα στελέχη Δcpc και Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) απουσιάζει το γονίδιο της cpcA, και όπως ήταν αναμενόμενο PCR με τους συγκεκριμένους εκκινητές δεν έδωσε προϊόν (Εικόνα 2.14.Β).

Από τις σειρές του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS επιλέχθηκαν οι σειρές 8 και 12 , οι οποίες έδωσαν θετικό προϊόν σε όλες τις παραπάνω PCR για περαιτέρω ανάλυση.

Οι εκκινητές cpc_us και cpc_ds υβριδοποιούνται εκατέρωθεν του cpc οπερονίου στις περιοχές cpc_us και cpc_ds. Στο στέλεχος αγρίου τύπου η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αυτούς τους εκκινητές έδωσε μοναδικό προϊόν στα 3570 bp, που αντιστοιχεί στις αλληλουχίες όλων των γονιδίων του cpc οπερονίου. Στο στέλεχος Δcpc, όπου όλο τα γονίδια του cpc οπερονίου έχουν αντικατασταθεί με την αλληλουχία του γονιδίου ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη, PCR με τους ίδιους εκκινητές έδωσε πολύ μικρότερο προϊόν στα 1013 bp. Στις σειρές 8 και 12 του μεταλλαγμένου στελέχους

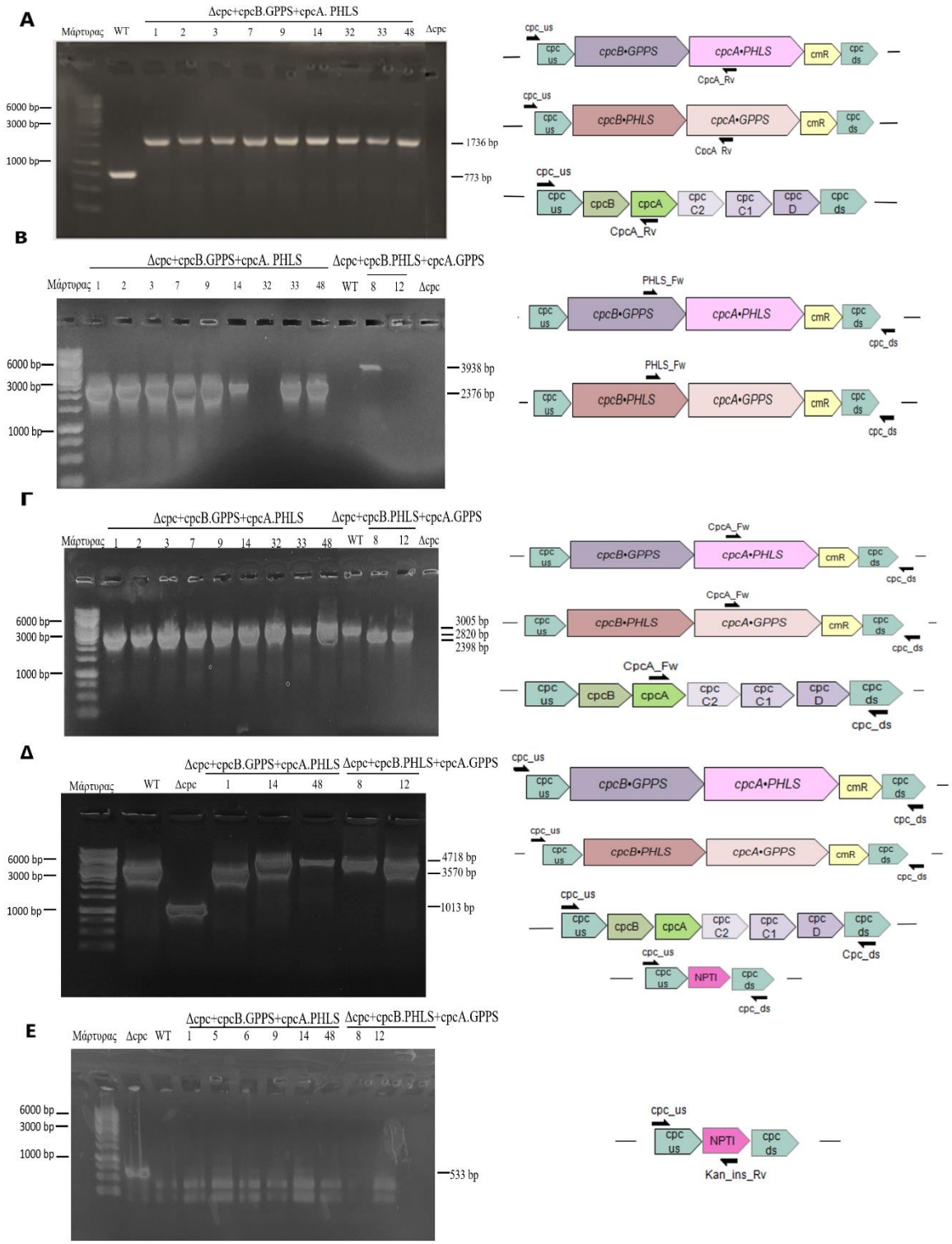
Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS η PCR με τη χρήση των παραπάνω εκκινητών έδωσε προϊόν στα 4718 bp που οφείλεται στην εισαγωγή των γονιδίων σύντηξης που κωδικοποιούν τις cpcB.PHLS και cpcA.GPPS πρωτεΐνες καθώς της αλληλουχίας του γονιδίου ανθεκτικότητας στη χλωραμφενικόλη (Εικόνα 2.14.Γ).

Οι εκκινητές cpcA_Fw και cpc_ds υβριδοποιούνται μέσα στην αλληλουχία του *cpcA* γονιδίου και έξω από το cpc οπερόνιο στην αλληλουχία του cpc_ds, αντίστοιχα. Στο στέλεχος αγρίου τύπου η ανάλυση PCR με τους παραπάνω εκκινητές έδωσε μοναδικό προϊόν στα 2820 bp. Και στις δύο σειρές του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS, 8 και 12, η αντικατάσταση των αλληλουχιών που κωδικοποιούν τα συνδετικά πεπτίδια του cpc οπερονίου cpcC2, cpcC1 και cpcD με την αλληλουχία που κωδικοποιεί τα γονίδια σύντηξης cpcA.GPPS και την αλληλουχία του γονίδιου ανθεκτικότητας στη χλωραμφενικόλη οδηγεί σε μικρότερο προϊόν της PCR στα 2339 bp. Όπως αναφέρθηκε και προηγούμενος, το γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα cpcA απουσιάζει από το στέλεχος Δcpc και συνεπώς ο εκκινητής cpcA_Fw δεν μπορούσε να υβριδοποιηθεί με αποτέλεσμα να μη ληφθεί προϊόν στη συγκεκριμένη αντίδραση PCR (Εικόνα 2.14.Δ).

Τέλος, η PCR με τους εκκινητές cpc_us και Kan_in_Rv, οι οποίοι υβριδοποιούνται στην περιοχή του cpc_us του cpc οπερονίου (cpc_us) και μέσα στην αλληλουχία του γονιδίου ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη αντίστοιχα, έδωσε μοναδικό προϊόν στα 2722 bp στο στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpcC2+cpcC1+cpcD και στα 533 bp στο στέλεχος Δcpc. Απουσία του τελευταίου προϊόντος από στις σειρές 8 και 12 του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS αποδεικνύει ότι και στις δύο σειρές έχει επιτευχθεί ομοπλασμία. Με άλλα λόγια έχει εξαλειφθεί το στέλεχος Δcpc που χρησιμοποιήθηκε ως στέλεχος δέκτης για τον μετασχηματισμό και το μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS έχει απομονωθεί επιτυχώς (Εικόνα 2.14.Ε).

Συνεπώς, τα αποτελέσματα των παραπάνω PCR αποδεικνύουν πως κατασκευάστηκαν και απομονώθηκαν επιτυχώς δύο σειρές, 8 και 12, του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS.

Μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS



Εικόνα 2.15. Ανάλυση PCR στο γενωμικό DNA του WT και του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS. Αριστερά φαίνονται οι πηκτές αγαρόζης με τα προϊόντα των PCR. Δεξιά παρουσιάζονται οι γενετικοί χάρτες των στελεχών με επισημασμένους τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, και που αυτοί υβριδοποιούνται. Τα ζεύγη εκκινητών

cpc_us-cpcA_Rv, PHLS_Fw-cpc_ds, cpcA_Fw-cpc_ds και cpc_us-cpc_ds έδωσαν διαφορετικά ή μοναδικά προϊόντα PCR στο μεταλλαγμένο στέλεχος σε σχέση με το WT, αποδεικνύοντας τη επιτυχή αντικατάσταση του cpc οπερονίου. Το ζεύγος εκκινητών cpc_us-Kan_ins_Rv σχεδιάστηκε ώστε να εξετάσει για ομοπλασμία στο μεταλλαγμένο στέλεχος, δίνοντας μοναδικό προϊόν μόνο στο στέλεχος δέκτη.

Οι εκκινητές cpc_us – cpcA_Rv υβριδοποιούνται στην αλληλουχία του cpc_us του cpc οπερονίου και μέσα στην αλληλουχία του *cpcA* γονιδίου αντίστοιχα. Στο στέλεχος αγρίου τύπου η PCR με τους παραπάνω εκκινητές έδωσε μοναδικό προϊόν στα 773 bp. Στο μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS η εισαγωγή των γονιδίων σύντηξης *cpcB.GPPS* και *cpcA.PHLS* οδήγησε σε μεγαλύτερο προϊόν της PCR στα 1736 bp. Το προϊόν αυτό το έδωσαν οι περισσότερες σειρές του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS. Στο μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc η απουσιάζει το γονίδιο της cpcA, και όπως ήταν αναμενόμενο δεν έδωσε προϊόν (Εικόνα 2.15.A).

Η χρήση των εκκινητών PHLS_Fw και cpc_ds, οι οποίοι υβριδοποιούνται μέσα στο γονίδιο της συνθάσης του *β*-φελλανδρενίου (*PHLS*) και στην cpc_ds αλληλουχία του cpc οπερονίου αντίστοιχα έδωσαν μοναδικό προϊόν PCR στα 3938 bp στις περισσότερες σειρές του στελέχους Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS. Το αποτέλεσμα αυτό αποδεικνύει ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί τη συνθάση του *β*-φελλανδρενίου είναι παρόν σε αυτά τα μεταλλάγματα. Στα στελέχη αγρίου τύπου και Δcpc απουσιάζει το γονίδιο της συνθάσης του *β*-φελλανδρενίου. Γεγονός που φαίνεται και από την πηκτή αγαρόζης όπου δεν φαίνεται προϊόν PCR με τους συγκεκριμένους εκκινητές (Εικόνα 2.15.B).

Οι εκκινητές cpcA_Fw και cpc_ds υβριδοποιούνται μέσα στην αλληλουχία του cpcA γονιδίου και έξω από το cpc οπερόνιο στην cpc_ds αλληλουχία, αντίστοιχα. Στο στέλεχος αγρίου τύπου η PCR με τους παραπάνω εκκινητές έδωσε προϊόν στα 2820 bp. Στις δύο σειρές, 8 και 12, του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS η αντικατάσταση των αλληλουχιών που κωδικοποιούν τα συνδετικά πεπτίδια του cpc οπερονίου cpcC2, cpcC1 και cpcD με τα γονίδια σύντηξης cpcA.GPPS και του γονίδιου ανθεκτικότητας στη χλωραμφενικόλη οδηγεί σε μικρότερο προϊόν της PCR στα 2339 bp. Όσον αφορά το μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS η αντικατάσταση των παραπάνω γονιδίων με τα γονίδια σύντηξης *cpcA.GPPS* και του γονίδιου ανθεκτικότητας στη χλωραμφενικόλη οδηγεί σε μεγαλύτερο προϊόν της PCR στα 3005 bp. Όπως αναφέρθηκε και προηγούμενος, η αλληλουχία που κωδικοποιεί την υπομονάδα cpcA

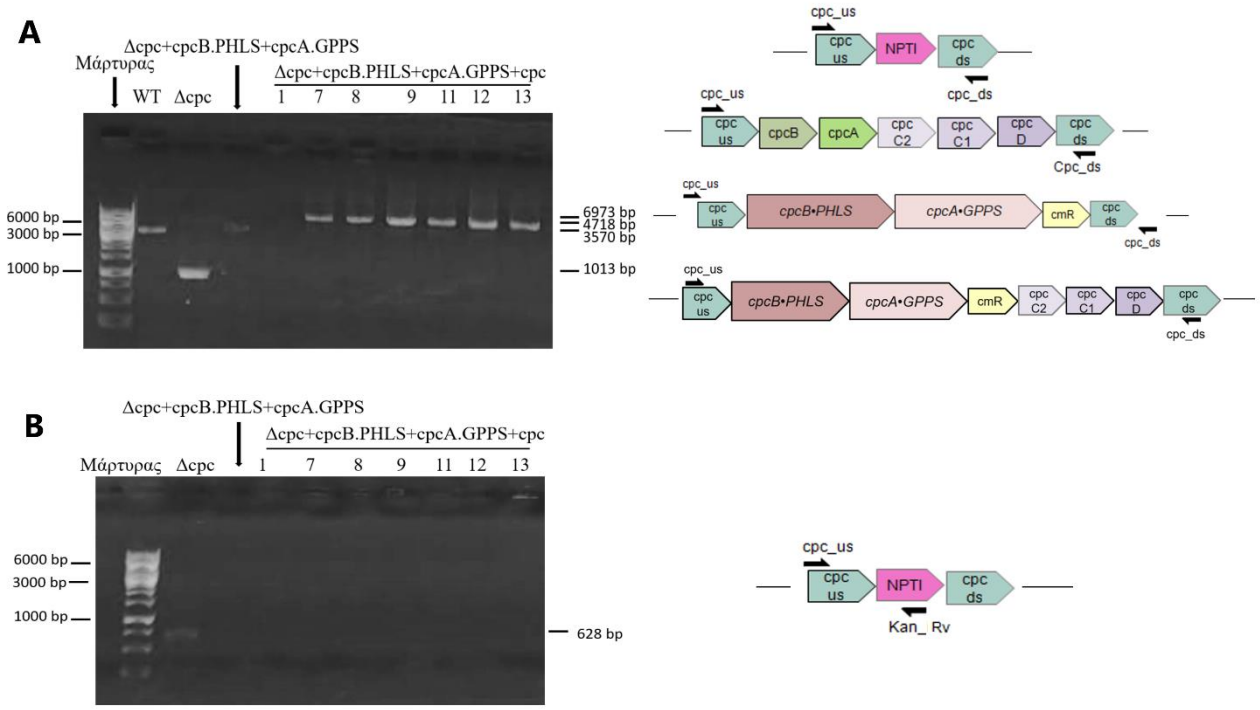
απουσιάζει από το στέλεχος Δcpc και για το λόγο αυτόν δεν έδωσε προϊόν στη συγκεκριμένη αντίδραση PCR (Εικόνα 2.15.Γ).

Οι εκκινητές cpc_us – cpc_ds υβριδοποιούνται εκατέρωθεν του cpc οπερονίου, στις αντίστοιχες αλληλουχίες. Στο στέλεχος αγρίου τύπου η PCR με τους παραπάνω εκκινητές έδωσε μοναδικό προϊόν στα 3570 bp. Στο μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc όλα τα γονίδια του cpc οπερονίου έχουν αντικατασταθεί με το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη. Συνεπώς έδωσε μικρότερο προϊόν στα 1013 bp. Στα μεταλλαγμένα στελέχη Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS και Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS η εισαγωγή των γονιδίων σύντηξης *cpcB.PHLS, cpcA.GPPS* και *cpcB.GPPS, cpcA.PHLS* οδήγησε σε μεγαλύτερο προϊόν της PCR στα 4718 bp. Το προϊόν αυτό το έδωσαν όλες οι σειρές των μεταλλαγμένων στελεχών Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS και Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS που επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη (Εικόνα 2.15.Δ).

Τέλος, η PCR με τους εκκινητές cpc_us και Kan_in_Rv, οι οποίοι υβριδοποιούνται στην cpc_us και μέσα στην αλληλουχία του γονιδίου ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό καναμικύνη αντίστοιχα, έδωσε μοναδικό προϊόν στα 533 bp στο στέλεχος Δcpc. Απουσία του τελευταίου προϊόντος από τις σειρές 1, 5, 6, 9, 14 και 48 του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS αποδεικνύει ότι ακόμη σε όλες τις σειρές έχει επιτευχθεί ομοπλασμία. Με άλλα λόγια έχει εξαλειφθεί το στέλεχος Δcpc που χρησιμοποιήθηκε ως στέλεχος δέκτης για τον μετασχηματισμό και κατασκευή του στελέχους Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS (Εικόνα 2.15.Ε).

Συνεπώς, από τις παραπάνω PCR φαίνεται πως κατασκευάστηκαν και απομονώθηκαν επιτυχώς τρεις σειρές, 1, 14 και 48, του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS.

Μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc



Εικόνα 23 Ανάλυση PCR στο γενωμικό DNA του WT και του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc Αριστερά φαίνονται οι πηκτές αγαρόζης με τα προϊόντα των PCR. Δεξιά παρουσιάζονται οι γενετικοί χάρτες των στελεχών με επισημασμένους τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν, και που αυτοί υβριδοποιούνται. Το ζεύγος εκκινητών cpc_us-cpc_ds έδωσε διαφορετικά προϊόντα PCR στο μεταλλαγμένο στέλεχος σε σχέση με το WT, αποδεικνύοντας τη επιτυχή αντικατάσταση του cpc οπερονίου. Το ζεύγος εκκινητών cpc_us-Kan_Rv σχεδιάστηκε ώστε να εξετάσει για ομοπλασμία στο μεταλλαγμένο στέλεχος, δίνοντας μοναδικό προϊόν μόνο στο στέλεχος δέκτη.

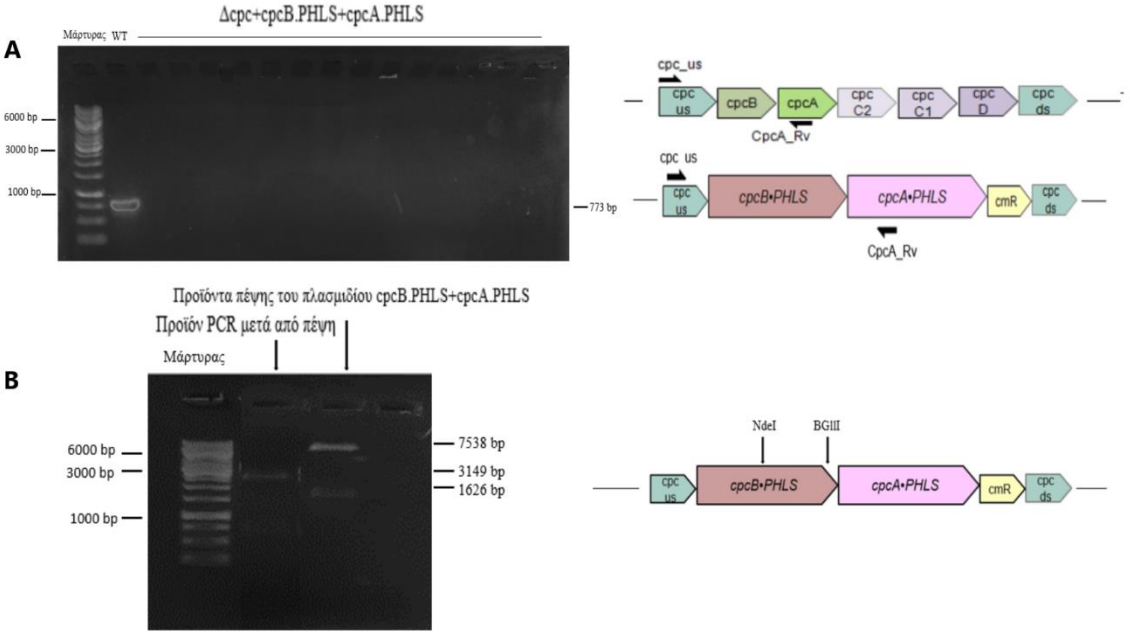
Οι εκκινητές cpc_us – cpc_ds υβριδοποιούνται εκατέρωθεν του cpc οπερονίου, στις αντίστοιχες αλληλουχίες. Στο στέλεχος αγρίου τύπου η PCR με τους παραπάνω εκκινητές έδωσε μοναδικό προϊόν στα 3570 bp. Στο μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc όλα τα γονίδια του cpc οπερονίου έχουν αντικατασταθεί με το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη. Συνεπώς έδωσε μικρότερο προϊόν στα 1013 bp. Στο μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS η εισαγωγή των γονιδίων σύντηξης *cpcB.PHLS* και *cpcA.GPPS* οδήγησε σε μεγαλύτερο προϊόν της PCR στα 4718 bp. Στο μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc η εισαγωγή των γονιδίων που κωδικοποιούν τα συνδετικά πεπτίδια οδήγησε σε μεγαλύτερο προϊόν στα 6973 bp. Το προϊόν αυτό το

έδωσαν όλες οι σειρές του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc (Εικόνα 2.16. Α).

Τέλος, η PCR με τους εκκινητές cpc_us και Kan_Rv, οι οποίοι υβριδοποιούνται στην cpc_us και μέσα στην αλληλουχία του γονιδίου ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό καναμικύνη αντίστοιχα, έδωσε μοναδικό προϊόν στα 628 bp στο στέλεχος Δcpc. Απουσία του τελευταίου προϊόντος από όλες τις σειρές του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc αποδεικνύει ότι σε όλες τις σειρές έχει επιτευχθεί ομοπλασμία (Εικόνα 2.16. Β).

Συνεπώς, από τις παραπάνω PCR φαίνεται πως κατασκευάστηκαν και απομονώθηκαν επιτυχώς επτά σειρές του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc.

Μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.PHLS



Εικόνα 2.17. Γενετική ανάλυση του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.PHLS. **Α.** Ανάλυση PCR στο γενωμικό DNA με τους εκκινητές cpc_us-cpcA_Rv. Καμία σειρά δεν έδωσε το αναμενόμενο προϊόν PCR με του συγκεκριμένους εκκινητές. **Β.** Πέψη του προϊόντος της PCR με τους εκκινητές cpc_us-cpc_ds με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες NdeI και BGIII. Ούτε η πέψη με τις παραπάνω περιοριστικές ενδονουκλεάσες έδωσε τα αναμενόμενα προϊόντα. Συνεπώς φαίνεται πως δεν δημιουργήθηκε το μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.PHLS.

Οι εκκινητές cpc_us και cpcA_Rv υβριδοποιούνται μέσα στην αλληλουχία του cpc_us και μέσα στην αλληλουχία του γονιδίου που κωδικοποιεί την υπομονάδας Α της φυκοκυανίνης (cpcA) αντίστοιχα. Ανάλυση PCR στο γενωμικό DNA με τη χρήση των συγκεκριμένων εκκινητών στο στέλεχος αγρίου τύπου έδωσε προϊόν στα 773 bp. Στο μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.PHLS, η εισαγωγή των γονιδίων σύντηξης *cpcB.PHLS* και *cpcA.PHLS* θα έπρεπε να έχει ως αποτέλεσμα μεγαλύτερο προϊόν της PCR στα 2402 bp. Παρόλα αυτά καμία σειρά του μεταλλαγμένου στελέχους δεν έδωσε το αναμενόμενο προϊόν (Εικόνα 2.17.Α).

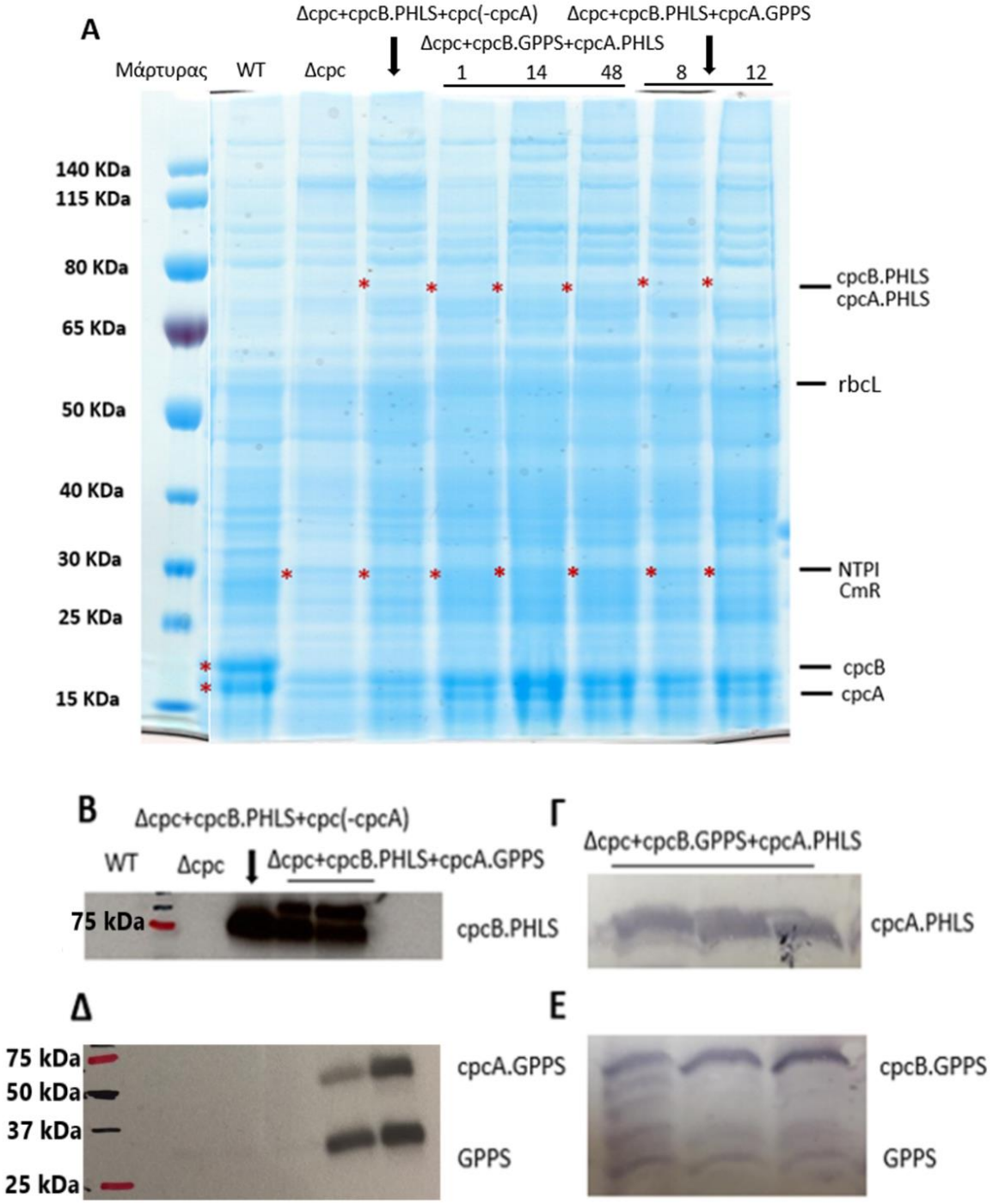
Ανάλυση με PCR στο γενωμικό DNA των σειρών του μεταλλάγματος Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.PHLS με την χρήση των εκκινητών cpc_us και cpc_ds έδωσε προϊόν στα 3149 bp, δηλαδή μικρότερο από το αναμενόμενο στα 5384 bp. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε πέψη με τα ένζυμα NdeI και BGIII στο προϊόν της PCR με τους εκκινητές cpc_us και cpc_ds καθώς και στο πλασμίδιο που χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό. Η πέψη του πλασμιδίου έδωσε προϊόντα μεγέθους 7538 bp και 1626 bp, ενώ το προϊόν της PCR μετά την πέψη έδωσε προϊόν στα 3149 bp, και όχι τα ίδια με του πλασμιδίου όπως ήταν αναμενόμενο.

Αυτό οφείλεται στη διπλή ύπαρξη του γονιδίου της συνθάσης του *β*-φελλανδρενίου (*PHLS*) στο στέλεχος αυτό με αποτέλεσμα να πραγματοποιείται ομόλογος ανασυνδυασμός μετά τον μετασχηματισμό των αλληλουχιών αυτών στα *Synechocystis*. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση των αλληλουχιών των *cpcA* και του πρώτου *PHLS* που βρίσκονται ανάμεσα στις δύο αλληλουχίες του *PHLS*, δηλαδή αλληλουχίας DNA μεγέθους 2224 bp. Σε αυτή την περίπτωση, η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης με το ζεύγος εκκινητών cpc_us –cpcA_Rv δε δίνει προϊόν για το στέλεχος αυτό, καθώς απουσιάζει η αλληλουχία DNA που κωδικοποιεί την υπομονάδα cpcA, και συνεπώς δεν μπορεί να υβριδιστεί ο εκκινητής cpcA_Rv στο εκμαγείο DNA. Η PCR με τους εκκινητές cpc_us και cpc_ds δίνει προϊόν κατά 2224bp μικρότερο από το αναμενόμενο. Αυτό επίσης επιβεβαιώνεται με πέψη με συγκεκριμένες περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Η περιοριστική ενδονουκλεάση BGIII κόβει ανάμεσα στην αλληλουχία του *cpcA* και την αλληλουχία του *PHLS*. Παράλληλα, οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες NdeI και BGIII κόβουν αμέσως πριν και μετά την πρώτη αλληλουχία του γονιδίου της *PHLS*. Συνεπώς, με την απομάκρυνση της αλληλουχίας τους *cpcA* και της μίας αλληλουχίας του *PHLS,* απομακρύνθηκαν και οι θέσεις αναγνώρισης των παραπάνω περιοριστικών ενδονουκλεασών και συνεπώς δεν μπορούσε να πραγματοποιηθεί η πέψη και το προϊόν παραμένει στα 3149 bp (Εικόνα 2.17.Β).

Συνεπώς, ήταν αδύνατη η κατασκευή του διαγονιδιακού στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.PHLS.

2.4.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αποδιατακτική πηκτή ακρυλαμιδίου και ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών

Οι ολικές πρωτεΐνες των στελεχών απομονώθηκαν έπειτα από λύση των κυττάρων με επεξεργασία με French press. Το πρωτεϊνικό προφίλ όλων των στελεχών αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πηκτή ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση (western blot) με τη χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων, ειδικών ως προς τις πρωτεΐνες PHLS και GPPS. Τα δείγματα φορτώθηκαν στην πηκτή ακρυλαμιδίου σύμφωνα με τη συγκέντρωση χλωροφύλλης που φαίνονται στον πίνακα 2.14.



Εικόνα 2.18. Ανάλυση πρωτεϊνικής έκφρασης του WT και των Δcpc μεταλλαγμένων στελεχών. Τρεις σειρές του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS και δύο του Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS εξετάστηκαν. **A.** Το πρωτεϊνικό προφίλ των στελεχών αναλύθηκε με αποδιατακτική πηκτή SDS-PAGE, διαβάθμισης 4-12% Bis-tris, ρυθμιστικό MOPS και χρώση με Coomassie. Με αστερίσκο αριστερά από τις ζώνες επισημαίνονται οι πρωτεΐνες που μελετώνται στην παρούσα εργασία. **B.** Τα ολικά

πρωτεϊνικά εκχυλίσματα διαχωρίστηκαν με SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση και έπειτα μεταφέρθηκαν μεμβράνη νιτροκυτταρίνης για ανάλυση Western blot. Ειδικά πολυκλωνικά αντισώματα ως προς τις PHLS (**Β,Γ)** και GPPS πρωτεΐνες (**Δ,Ε**) χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των πρωτεϊνών στόχων.

Έπειτα από χρώση της πηκτής με Coomassie παρατηρήθηκε μία ζώνη στα 55 kDa περίπου, σε όλα τα στελέχη, η οποία αντιστοιχεί στην μεγάλη υπομονάδα της Rubisco (RbcL). Στο στέλεχος αγρίου τύπου εμφανίστηκαν δύο έντονες ζώνες στα 15 και 20 kDa οι οποίες αντιστοιχούν στις δύο κύριες υπομονάδες, *β*- και *α*- αντίστοιχα, της φυκοκυανίνης και είναι άφθονες στα *Synechocystis*. Πολύ σημαντική παρατήρηση είναι ότι οι ζώνες αυτές απουσίαζαν από όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη, γεγονός που επιβεβαιώνει και τον TLA φαινότυπο που εμφανίζουν τα στελέχη αυτά [3, 20]. Στα στελέχη Δcpc και Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) η ζώνη στα 27 kDa αντιστοιχεί στην πρωτεΐνη NTPI, η οποία προσδίδει την ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη στα στελέχη αυτά [20]. Σε όλες τις σειρές των στελεχών Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS και Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS η ζώνη στα 23 kDa αντιστοιχεί στην CmR πρωτεΐνη, η οποία προσδίδει την ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό χλωραμφενικόλη [150]. Στα μεταλλαγμένα στελέχη Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS και Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS οι πρωτεΐνες σύντηξης cpcB.PHLS και cpcA.PHLS (με εκτιμώμενο μοριακό βάρος 82 kDa) φαίνονται αχνά στα περίπου 75 kDa, το οποίο υποδηλώνει χαμηλή έκφραση των διαγονιδιακών αυτών πρωτεϊνών (Εικόνα 2.18). Η εμφάνιση της πρωτεΐνης σύντηξης cpcB.PHLS σε άλλο μοριακό βάρος στην πηκτή ακρυλαμιδίου έχει παρατηρηθεί ξανά στη βιβλιογραφία [126].

Η ανοσοηλεκτροφόρηση western blot με τη χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων ειδικών ως προς τις πρωτεΐνες PHLS και GPPS επιβεβαίωσε την έκφραση όλων των πρωτεϊνών σύντηξης στα μεταλλαγμένα στελέχη Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA), Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS και Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS. Πιο συγκεκριμένα με τη χρήση αντισώματος ειδικού ως προς την PHLS ανιχνεύτηκε η πρωτεΐνη σύντηξης cpcB.PHLS στα μεταλλαγμένα στελέχη Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) και Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS στα 75 kDa (Εικόνα 2.18.Β). Επίσης ανοσοηλεκτροφόρηση western blot με τη χρήση του ίδιου αντισώματος οδήγησε στην ανίχνευση της πρωτεΐνης σύντηξης cpcA.PHLS και στις τρεις σειρές του στελέχους Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS (Εικόνα 2.18.Γ). Το συγκεκριμένο αντίσωμα δεν προσδέθηκε πουθενά στα δείγματα του WT και του Δcpc, όπως ήταν αναμενόμενο, εφόσον τα στελέχη αυτά εκφράζουν την PHLS.

Με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος ειδικού ως προς την πρωτεΐνη GPPS επιβεβαιώθηκε η έκφραση των πρωτεϊνών σύντηξης cpcA.GPPS και cpcB.GPPS (53 kDa) στα μεταλλαγμένα στελέχη Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS και Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS αντίστοιχα. Επίσης, με το ίδιο αντίσωμα ανιχνεύθηκε η ενδογενής πρωτεΐνη GPPS στα 35 kDa σε όλα τα στελέχη (Εικόνα 2.18.Δ,Ε).

Πίνακας 2.6. Συγκεντρώσεις χλωροφύλλης (Chl) σύμφωνα με τις οποίες τα δείγματα φορτώθηκαν στην αποδιατακτική πηκτή ακρυλαμιδίου.

Δείγμα	Chl (μg)
WT	0,052
Δcpc	0,18
Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA)	0,036
Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS σειρά 1	0,082
Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS σειρά 14	0,108
Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS σειρά 48	0,082
Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS σειρά 8	0,037
Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS σειρά 12	0,049

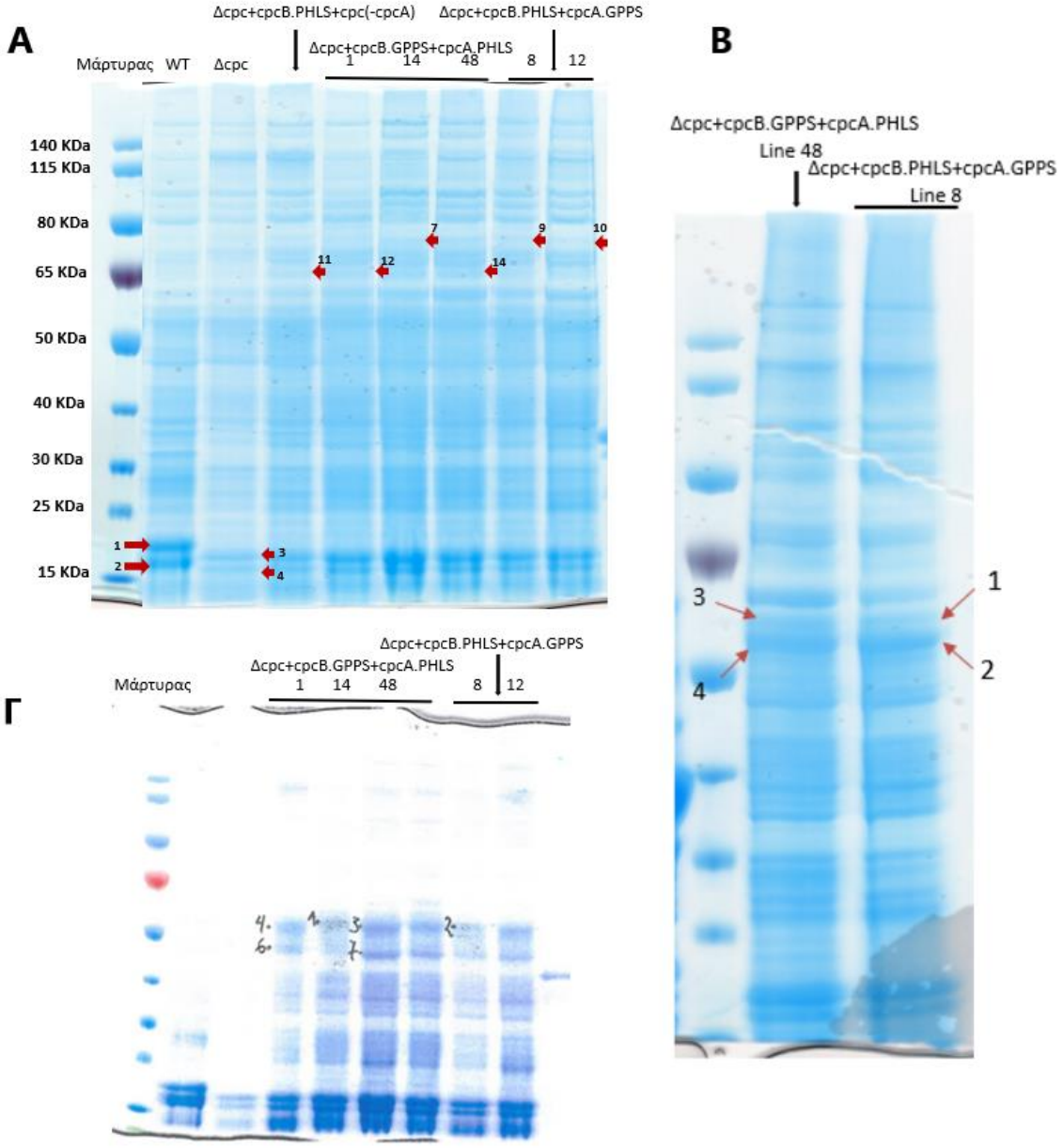
2.4.6 Ταυτοποίηση πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας

Στις πηκτές ακρυλαμιδίου που παρουσιάζονται παρακάτω στην Εικόνα 2.19 με βέλη και αριθμούς φαίνονται οι ζώνες πρωτεϊνών οι οποίες αναλύθηκαν με φασματομετρία μάζας. Στον Πίνακα 2.15 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σύμφωνα με τα οποία ταυτοποιήθηκαν όλες οι πρωτεΐνες σύντηξης (cpcB.PHLS, cpcA.PHLS, cpcA.GPPS και cpcB.PHLS) στα αντίστοιχα μεταλλαγμένα στελέχη που τις εκφράζουν.

Στο Παράρτημα ΙΙΙ παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των αμινοξέων των πρωτεϊνών με επισημασμένα τα πεπτίδια τα οποία ταυτοποιήθηκαν. Στις πρωτεΐνες σύντηξης ταυτοποιήθηκε ένας ικανοποιητικός αριθμός πεπτιδίων και από τις δύο πρωτεΐνες, αλληλουχία οδηγό και ετερόλογη αλληλουχία. Αυτό επιβεβαιώνει ότι οι πρωτεΐνες σύντηξης εκφράστηκαν διατηρώντας και τις δύο αλληλουχίες που έχουν, αλληλουχία οδηγό και αλληλουχία στόχο.

Πίνακας 2.7. Αποτελέσματα ανάλυσης των πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας.

Πηκτή	**Αριθμός ζώνης**	**Πρωτεΐνη**	**Αριθμός πεπτιδίων που ταυτοποιήθηκαν**	**Δείγμα**
A	1	cpcB	24	WT
A	2	cpcA	16	WT
A	3	Allophycocyanin alpha chain	15	Δcpc
A	4	Allophycocyanin beta chain	18	Δcpc
A	7	cpcA.PHLS	21	Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS 14
A	9	cpcB.PHLS	20	Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS 8
A	10	cpcB.PHLS	36	Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS 12
A	11	cpcB.PHLS	11	Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA)
A	12	cpcA.PHLS	24	Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS 1
A	14	cpcA.PHLS	17	Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS 48
B	2	cpcA.GPPS	7	Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS 12
B	3	cpcB.GPPS	35	Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS 48
Γ	1	cpcB.GPPS	13	Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS 1
Γ	2	cpcA.GPPS	3	Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS 8
Γ	3	cpcB.GPPS	14	Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS 14



Εικόνα 2.19. Αποδιατακτικές πηκτές ακρυλαμιδίου με επισημασμένες με αριθμούς τις ζώνες οι οποίες αναλύθηκαν με φασματομετρία μάζας.

Τα μεταλλαγμένα στελέχη που μελετήθηκαν για την ετερόλογη έκφραση της PHLS ήταν:

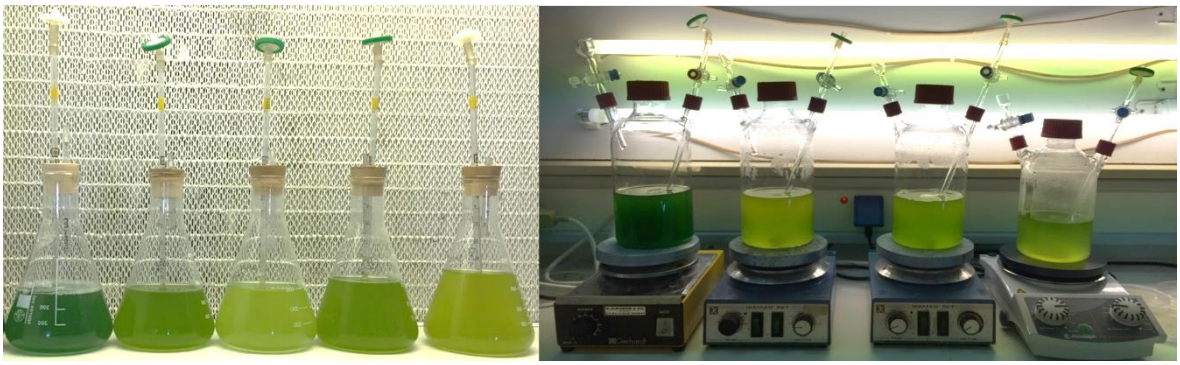
- το **Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA)** στο οποίο απουσιάζει η αλληλουχία που κωδικοποιεί τη cpcA υπομονάδα, και
- τα **Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS** και **Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS** στα οποία απουσιάζουν οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν τα συνδετικά πεπτίδια.

Στα στελέχη αυτά οι πρωτεΐνες σύντηξης ανιχνεύτηκαν με ανοσοηλεκτροφόρηση western blot με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος ειδικού ως προς την PHLS και ταυτοποιήθηκαν με φασματομετρία μάζας. Όμως σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πηκτής ακρυλαμιδίου οι πρωτεΐνες σύντηξης δεν εκφράστηκαν σε υψηλά επίπεδα, εφόσον φάνηκαν ως αχνές ζώνες. Για το λόγο αυτό κατασκευάστηκε ο φορέας cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc, ώστε να δημιουργηθεί το αντίστοιχο στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc. Το στέλεχος αυτό περιέχει εκτός των γονιδίων σύντηξης cpcB.PHLS και cpcA.GPPS και τις αλληλουχίες που κωδικοποιούν τα συνδετικά πεπτίδια. Περιέχει συνεπώς όλα τα γονίδια του *cpc* οπερονίου. Τα αποτελέσματα πρωτεϊνικής ανάλυσης του στελέχους αυτού αποσκοπούν στη διαπίστωση εάν η ύπαρξη όλων των γονιδίων του cpc οπερονίου σε συνδυασμό με την εκμετάλλευση του ισχυρού cpc υποκινητή αλλά και τη συγχώνευση των PHLS και GPPS πρωτεϊνών με τις δύο κύριες υπομονάδες της φυκοκυανίνης επάγει την έκφραση τους σε υψηλότερα επίπεδα.

Όσον αφορά στις πρωτεΐνες σύντηξης cpcA.GPPS και cpcB.GPPS δεν παρατηρείται κάποια ξεκάθαρη ζώνη στην πηκτή ακρυλαμιδίου, όμως οι πρωτεΐνες αυτές ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν με ανοσοηλεκτροφόρηση western blot και φασματομετρία μάζας.

2.4.7 Ποιοτική μελέτη του περιεχομένου των φωτοσυνθετικών χρωστικών

Διαφοροποίηση στο περιεχόμενο των χρωστικών των μεταλλαγμένων στελεχών παρατηρήθηκε, καθώς τα μεταλλάγματα παρουσιάζουν πράσινο φαινότυπο σε σχέση με το κυανοπράσινο χρώμα του στελέχους αγρίου τύπου (Εικόνα 2.20). Ο διαφορετικός φαινότυπος στα Δcpc μεταλλάγματα οφείλεται στην έλλειψη της φυκοκυανίνης.

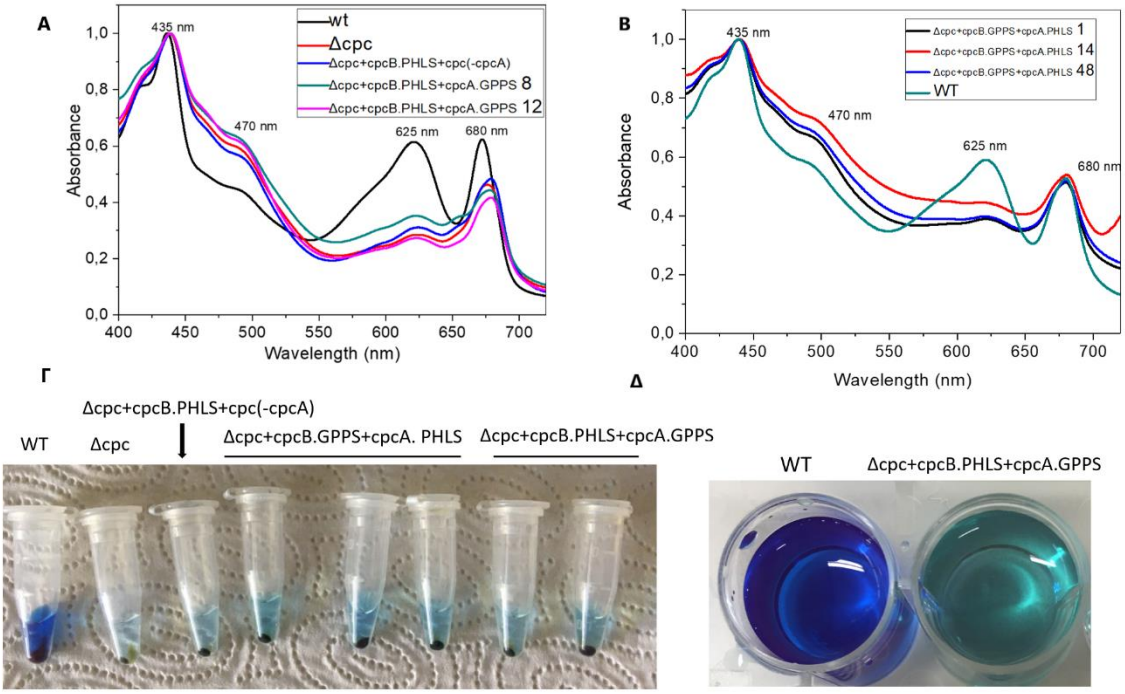


Εικόνα 2.20. Υγρές καλλιέργειες *Synechocystis* (αριστερά) και υγρές καλλιέργειες στους βιοαντιδραστήρες (1L) δύο φάσεων (υγρής/αέριας) για την παραγωγή *β*-φελλανδρενίου (δεξιά). Η καλλιέργεια στο αριστερό άκρο της κάθε Εικόνας αντιστοιχεί στο στέλεχος αγρίου τύπου (WT), ενώ οι επόμενες καλλιέργειες στα μεταλλαγμένα Δcpc στελέχη. Διακριτή είναι διαφορά στο φαινότυπο των μεταλλαγμένων στελεχών τα οποία εμφανίζουν πράσινο χρώμα σε σχέση με το κυανοπράσινο χρώμα του αγρίου τύπου.

Για να διευκρινιστεί το περιεχόμενο των χρωστικών των μεταλλαγμένων στελεχών λήφθηκε φάσμα απορρόφησης στην περιοχή του ορατού στα προϊόντα που προέκυψαν από τη λύση των κυττάρων (Εικόνα 2.20 A,B). Στα φάσματα έγινε κανονικοποίηση ως προς την κορυφή της χλωροφύλλης-α 435 nm. Σε όλα τα στελέχη, συμπεριλαμβανομένου και του αγρίου τύπου, παρατηρούνται οι δύο χαρακτηριστικές κορυφές της χλωροφύλλης-α στα 680 και στα 435 nm καθώς και των καροτενοειδών στα 470 nm [19, 20, 141, 151]. Στο στέλεχος αγρίου τύπου εμφανίζεται η χαρακτηριστική κορυφή της φυκοκυανίνης στα 625 nm, η οποία απουσιάζει από όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη. Αυτό οφείλεται στην αντικατάσταση του *cpc* οπερονίου, με αποτέλεσμα την απουσία της φυκοκυανίνης από τα στελέχη αυτά και τη διατήρηση της αλλοφυκοκυανίνης ως τη μόνη χρωστική στα φυκοχολοσώματα [141]. Αυτό επιβεβαιώνεται και από το χρώμα του υπερκειμένου που λαμβάνεται έπειτα από υπερφυγοκέντριση των λυμάτων των κυττάρων. Με υπερφυγοκέντριση επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός της χλωροφύλλης-α η οποία βρίσκεται στα κέντρα αντίδρασης των φωτοσυστημάτων στα θυλακοειδή τα οποία πέφτουν ως ίζημα, ενώ η φυκοκυανίνη η οποία

είναι υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη παραμένει στο υπερκείμενο. Το υπερκείμενο του αγρίου τύπου είχε σκούρο μπλε σκούρο χρώμα το οποίο οφείλεται στη φυκοκυανίνη, ενώ όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη έδωσαν υπερκείμενο γαλάζιου χρώματος, το οποίο οφείλεται στην αλοφυκοκυανίνη (Εικόνα 2.21.Γ).

Όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη υιοθετούν τον φαινότυπο των μεταλλαγμάτων με περικομμένη κεραία συλλογή φωτός [Truncated-Light-harvesting-Antenna (TLA)]. Σύμφωνα με αυτό η περικοπή της κεραίας συλλογής φωτός οδηγεί σε βελτιστοποίηση της φωτοσυνθετικής παραγωγικότητας και της βιομάζας της καλλιέργειας κάτω από έντονη ακτινοβολία φωτός [20, 49].



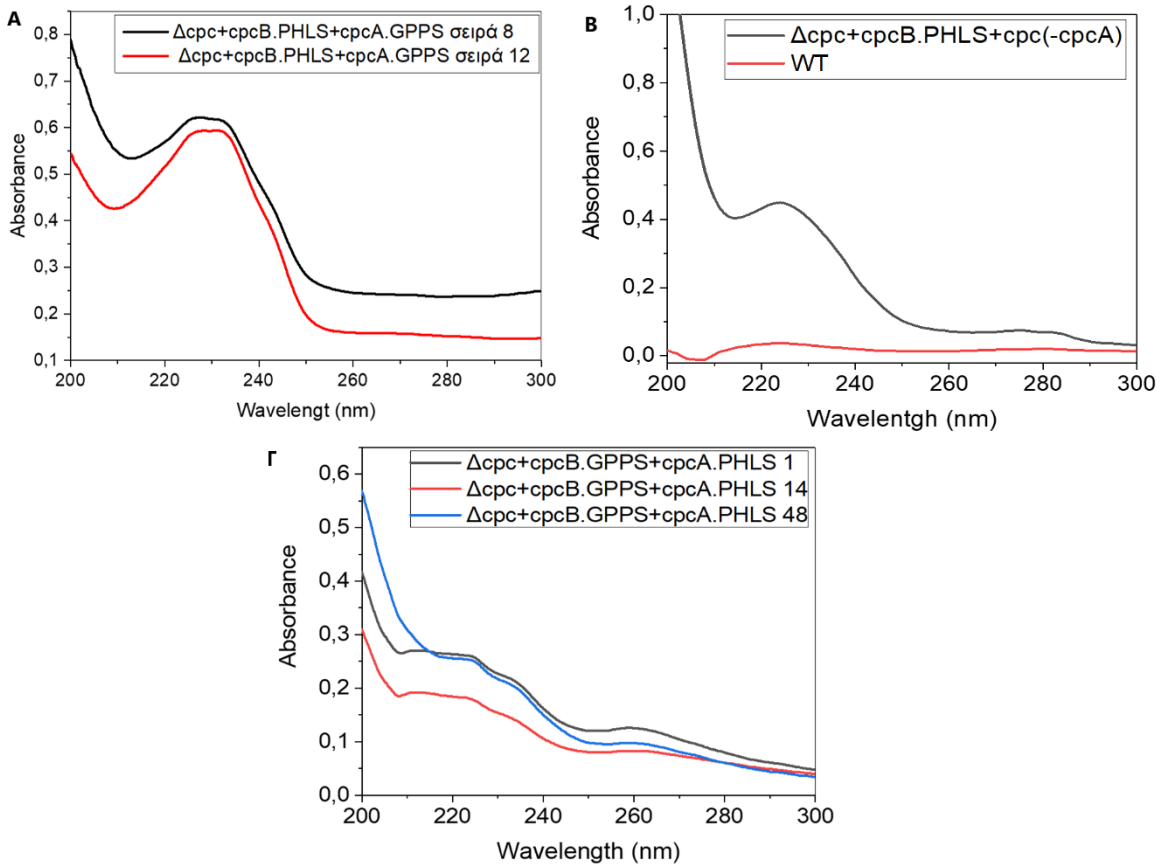
Εικόνα 2.21. Α, **Β.** Φάσμα απορρόφησης στο ορατό των λυμάτων των κυττάρων ώστε να προσδιοριστεί το περιεχόμενο των χρωστικών των διαφόρων στελεχών. Όλα τα στελέχη εμφανίζουν τις χαρακτηριστικές κορυφές της χλωροφύλλης-α και των καροτενοειδών ενώ από τα μεταλλαγμένα στελέχη απουσιάζει η κορυφή της φυκοκυανίνης. **Γ.** Το υπερκείμενο των λυμάτων των κυττάρων έπειτα από υπερφυγοκέντριση. Το κυανό χρώμα του δείγματος, που αντιστοιχεί στο δείγμα από τον άγριο τύπο, οφείλεται στην παρουσία της φυκοκυανίνης, η οποία απουσιάζει από τα μεταλλαγμένα στελέχη των οποίων τα δείγματα έδωσαν γαλάζιο χρώμα. Το γαλάζιο χρώμα στα μεταλλάγματα αντιστοιχεί στην αλλοφυκοκυανίνη η οποία είναι πλέον η μόνη χρωστική που έχουν στα φυκοχολοσώματα τους.

2.4.8 Μελέτη της παραγωγής του β-φελλανδρενίου

Από τα μέχρι τώρα αποτελέσματα προέκυψε ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA), Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS και Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS έχουν αφενός ενσωματώσει επιτυχώς στο γενομικό τους DNA τις επιθυμητές αλληλουχίες αλλά και είναι ικανά να εκφράσουν την *PHLS* και να παράγουν τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες σύντηξης cpcB.PHLS και cpcA.PHLS.

Για να εξεταστεί εάν οι εκφραζόμενες πρωτεΐνες σύντηξης είναι λειτουργικά ενεργές, και τα μεταλλαγμένα στελέχη παράγουν το *β*-φελλανδρένιο, οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν φωτοαυτότροφα, για 48 h, στους βιοαντιδραστήρες (1L) δύο φάσεων (αέριας/υγρής) με αντικατάσταση του κενού χώρου με 100% CO_2 σε φωτισμό 50 μmol photons·m^{-2}·s^{-1} στους 28±1°C. Το *β*-φελλανδρένιο, ως υδρόφοβο μόριο διαχέεται από την πλασματική μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμα των *Synechocystis* και συσσωρεύεται πάνω από την επιφάνεια της υγρής καλλιέργειας. Για να διευκολυνθεί η συλλογή του παραγόμενου *β*-φελλανδρενίου από τα μεταλλαγμένα στελέχη, προστέθηκαν 10 mL εξανίου στην επιφάνεια της καλλιέργειας και έπειτα συλλέχθηκαν με μία πιπέτα.

Η ταυτοποίηση του παραγόμενου *β*-φελλανδρενίου έγινε με δύο μεθόδους. Με φασματοσκοπία υπεριώδους όπου το *β*-φελλανδρένιο δίνει χαρακτηριστική κορυφή στα 232,4 nm και με ανάλυση με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS). Πλεονέκτημα της φασματοφωτομετρικής μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι μπορεί εύκολα και γρήγορα να διακριθεί εάν πρόκειται για *α*- ή *β*-φελλανδρένιο, διότι το α-φελλανδρένιο δίνει χαρακτηριστική μέγιστη απορρόφηση στα 260 nm, ενώ απουσιάζει η απορρόφηση στα 232,4 nm [62]. Όσον αφορά στην ανάλυση με GC-MS έγινε σύγκριση του χρωματογραφήματος των δειγμάτων με αντίστοιχο προτύπου *β*-φελλανδρενίου, καθώς και σύγκριση των φασμάτων μάζας με φάσμα μάζας του *β*-φελλανδρενίου καταχωρημένο σε βάσεις δεδομένων (NIST).



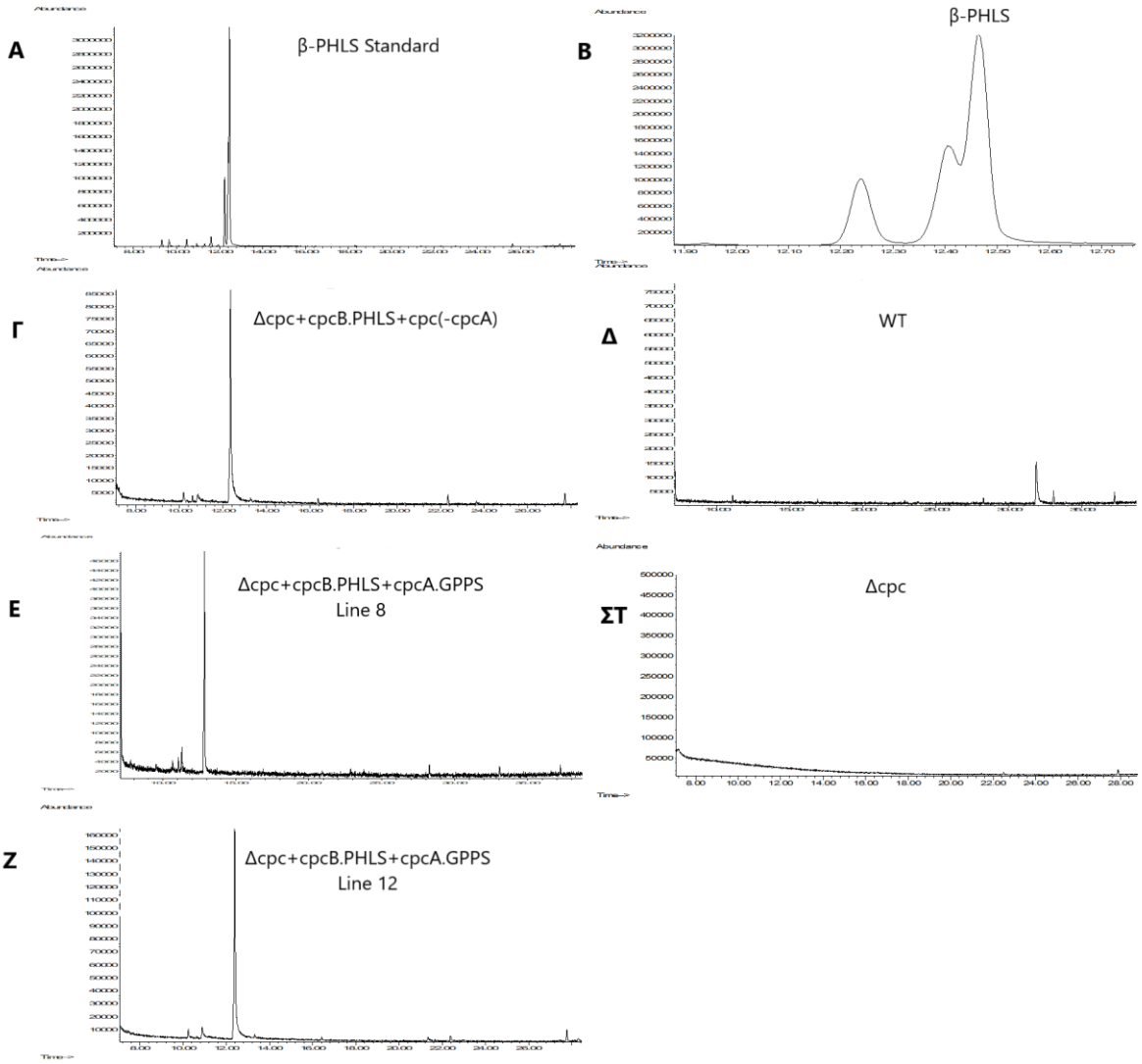
Εικόνα 2.22. Φάσματα απορρόφησης στο υπεριώδες των εκχυλισμάτων εξανίου για την ταυτοποίηση του παραγόμενου *β*-φελλανδρενίου. **Α.** Φάσμα απορρόφησης των εκχυλισμάτων εξανίου των δύο σειρών του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS. **Β.** Φάσμα απορρόφησης των εκχυλισμάτων εξανίου του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) και του στελέχους αγρίου τύπου (WT). **Γ.** Φάσμα απορρόφησης των εκχυλισμάτων εξανίου των τριών σειρών του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS.

Αρχικά λήφθηκε φάσμα απορρόφησης των δειγμάτων που συλλέχθηκαν με εξάνιο στην περιοχή 200-300 nm. Όπως προέκυψε από τα φάσματα τα εκχυλίσματα εξανίου των δύο σειρών του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS καθώς και του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA), εμφάνισαν την χαρακτηριστική κορυφή στα 232,4 nm (Εικόνα 2.22. Α, Β αντίστοιχα) σε αντίθεση με το εκχύλισμα του στελέχους αγρίου τύπου (WT) στελέχους δεν απορροφάει στο συγκεκριμένο μήκος κύματος. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν μία πρώτη ένδειξη για την παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου από τα δύο αυτά μεταλλαγμένα στελέχη. Απουσία απορρόφησης στα 260 nm επιβεβαιώνει ότι η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη cpcB.PHLS καταλύει ειδικά μόνο το

σχηματισμό του *β*-φελλανδρενίου και όχι του α- ισομερούς του. Επίσης, επιβεβαιώνεται ότι δεν παράγεται *β*-φελλανδρένιο από το στέλεχος αγρίου τύπου όπως ήταν αναμενόμενο [62].

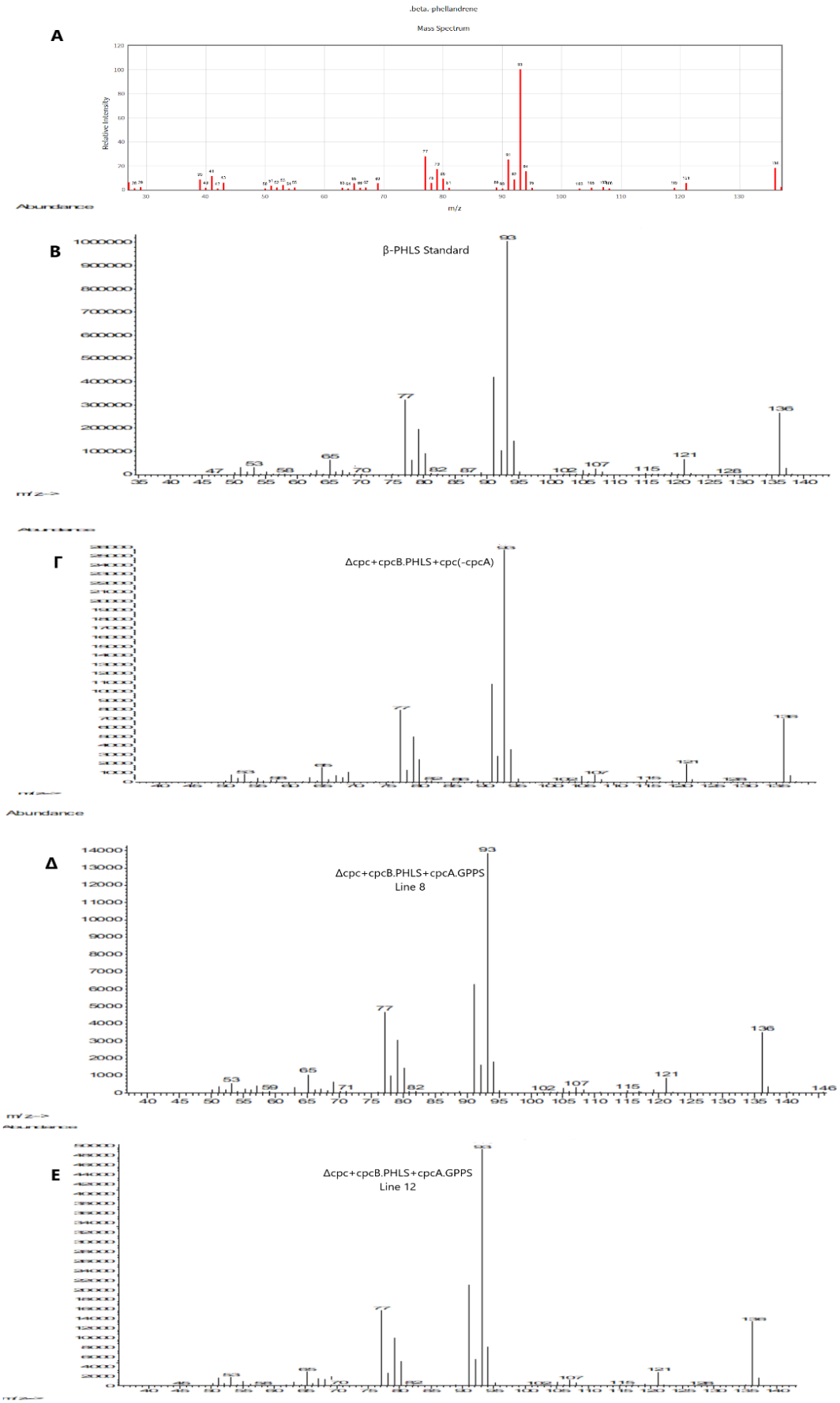
Όσον αφορά το δείγμα εξανίου που εκχυλίστηκε από τις τρεις σειρές του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.GPPS +cpcA.PHLS, φαίνεται ότι απορροφάει στην περιοχή αυτή, χωρίς να δίνει όμως ξεκάθαρη κορυφή στα 232,4 nm (Εικόνα 2.21.Γ).

Στα χρωματογραφήματα του GC των εκχυλισμάτων εξανίου από τα μεταλλαγμένα στελέχη Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS (σειρές 8 και 12) και Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA), παρατηρείται μία μόνο κορυφή με χρόνο κατακράτησης στα 12,45 min δηλαδή στον ίδιο χρόνο κατακράτησης με αυτόν που είχε το εμπορικό πρότυπο *β*-φελλανδρένιο. Συνεπώς, η κορυφή αυτή αντιστοιχεί στο *β*-φελλανδρένιο (Εικόνα 2.23). Η κορυφή του *β*-φελλανδρενίου δεν παρατηρήθηκε στα εκχυλίσματα εξανίου από τις καλλιέργειες των στελεχών WT και Δcpc, όπως ήταν αναμενόμενο, εφόσον τα στελέχη αυτά δεν έχουν ενσωματωμένο το γονίδιο της *PHLS* και συνεπώς την ικανότητα να παράγουν το *β*-φελλανδρένιο. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα της φασματοφωτομετρικής ανάλυσης των ίδιων δειγμάτων, όπου τα εκχυλίσματα εξανίου από τα δύο μεταλλαγμένα στελέχη Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS (σειρές 8 και 12) και Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) έδωσαν απορρόφηση σε μήκος κύματος που απορροφάει το *β*-φελλανδρένιο μόνο, ενώ το στέλεχος αγρίου τύπου δεν εμφάνισε κάποια απορρόφηση.



Εικόνα 2.23. Χρωματογραφικά προφίλ που λήφθηκαν μέσω της μεθόδου της αέριας χρωματογραφίας των εκχυλισμάτων εξανίου. **Α.** Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα του πρότυπου του *β*-φελλανδρενίου. **Β.** Το χρωματογράφημα του προτύπου *β*-φελλανδρενίου σε μεγέθυνση ώστε να διακρίνεται η κορυφή που αντιστοιχεί στο *β*-φελλανδρένιο. Τα δείγματα που εκχυλίστηκαν από τα μεταλλαγμένα στελέχη Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) και Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS σειρές 8 και 12 (**Γ.**, **Δ**. και **Ε.** αντίστοιχα) εμφάνισαν την κορυφή με χρόνο κατακράτησης 12,45 min που αντιστοιχεί στο *β*-φελλανδρένιο, εκτός των εκχυλισμάτων από τα στελέχη WT και Δcpc όπως ήταν αναμενόμενο.

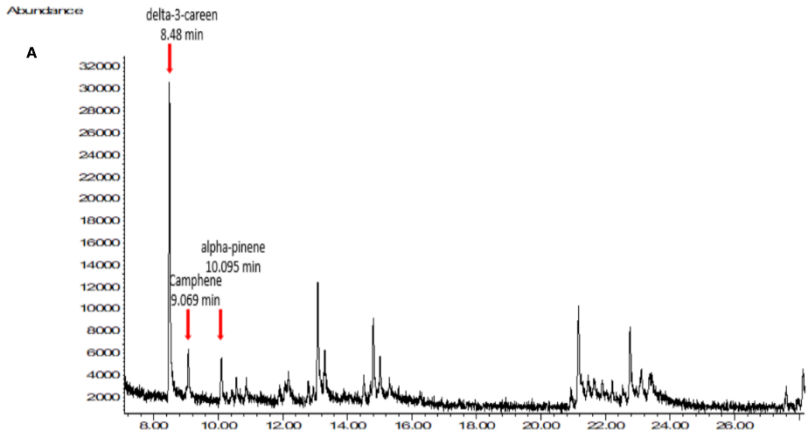
Έπειτα, πραγματοποιήθηκε επιπλέον σύγκριση των φασμάτων μάζας των κορυφών με χρόνο κατακράτησης 12,45 min ,των δειγμάτων που εκχυλίστηκαν από τις καλλιέργειες, με το αντίστοιχο του εμπορικού προτύπου *β*-φελλανδρενίου αλλά και του φάσματος μάζας του *β*-φελλανδρενίου που είναι καταχωρημένο σε βάση δεδομένων (NIST). Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν ακόμα μία επιβεβαίωση πως η κορυφή με χρόνο κατακράτησης 12,45 min στα χρωματογραφήματα GC αντιστοιχεί στο *β*-φελλανδρένιο. Τα φάσματα μάζας του εμπορικού προτύπου του *β*-φελλανδρενίου, του *β*-φελλανδρενίου στις βάσεις δεδομένων NIST καθώς και των εκχυλισμάτων εξανίου από την επιφάνεια των καλλιεργειών των μεταλλαγμάτων είναι πανομοιότυπα και εμφανίζουν τις χαρακτηριστικές κορυφές του *β*-φελλανδρενίου σε m/z 77,91 και 136 (μητρική κορυφή) (Εικόνα 2.24).


A
.beta. phellandrene
Mass Spectrum
Relative Intensity
m/z
B
β-PHLS Standard
Г
Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA)
Δ
Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS
Line 8
E
Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS
Line 12
Abundance
m/z-->

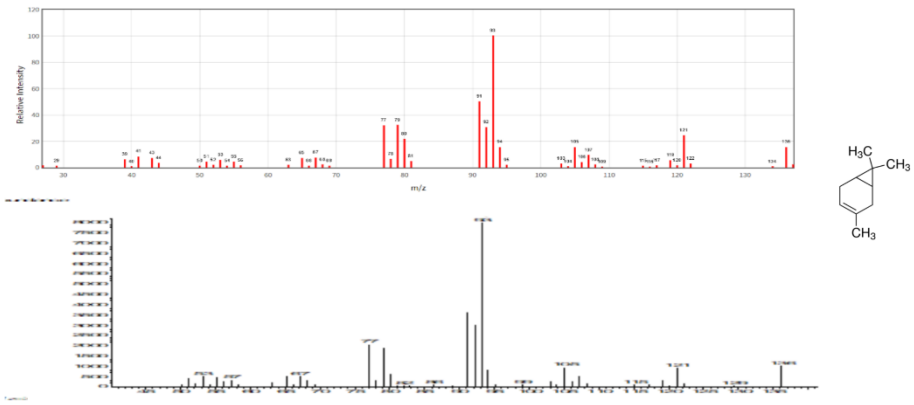
Εικόνα 2.24. Φάσματα μάζας των κορυφών του GC με χρόνο κατακράτησης 12 min. **Α.** Φάσμα μάζας του *β*-φελλανδρενίου καταχωρημένο σε βάσεις δεδομένων (NIST). **Β.** Φάσμα μάζας του προτύπου *β*-φελλανδρενίου. Τα φάσματα μάζας των δειγμάτων που εκχυλίστηκαν από τα μεταλλαγμένα στελέχη Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) και Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS σειρές 8 και 12 (**Γ.**, **Δ.** και **Ε.** αντίστοιχα) είναι πανομοιότυπα με το φάσμα μάζας **Α.** και **Β.**

Στο χρωματογράφημα του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS δεν παρατηρείται κορυφή με χρόνο κατακράτησης 12,45 min, η οποία όπως αναφέρθηκε παραπάνω αντιστοιχεί στο *β*-φελλανδρένιο (Εικόνα 2.25). Παρατηρούνται όμως τρεις κορυφές με χρόνους κατακράτησης 8,48, 9,07 και 10,10 min. Σύγκριση των φασμάτων μάζας των κορυφών αυτών με φάσματα μάζας καταχωρημένα σε βάσεις δεδομένων έδειξε ότι οι κορυφές αυτές αντιστοιχούν στα *δ*-3-καρένιο, καμφένιο και *α*-πινένιο αντίστοιχα. Παρόλο που από τα αποτελέσματα των αναλύσεων με PCR φαίνεται πως η *PHLS* συγχωνευμένη με το γονίδιο *cpcA* έχει ενσωματωθεί στο γενωμικό DNA των *Synechocystis,* και η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη σύντηξης cpcA.PHLS εκφράζεται σύμφωνα με την ανάλυση Western blot αλλά και με φασματομετρία μάζας, δεν καταλύει το σχηματισμό του *β*-φελλανδρενίου αλλά τριών άλλων συντακτικών ισομερών με μοριακό τύπο $C_{10}H_{16}$.

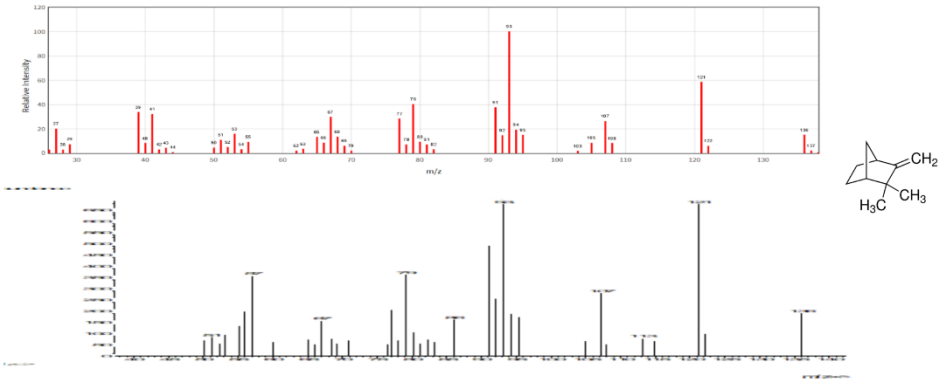
Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η διαμόρφωση και η λειτουργικότητα του ενζύμου PHLS εξαρτάται από το κυτοσολικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. Οι βιοχημικές ιδιότητες του κυτοσολικού περιβάλλοντος μπορούν να επηρεάσουν τη λειτουργικότητα του ενζύμου. Συνεπώς αλλαγή στο κυτοσολικό περιβάλλον του ενζύμου προκαλεί παρεκκλίσεις στην καταλυτική του ικανότητα και οδηγεί σε διαφορετικά προϊόντα από αυτά που θα παράγονταν φυσιολογικά από την αντίστοιχη πρωτεΐνη στα φυτά [152]. Στη βιβλιογραφία έχει παρατηρηθεί ότι η ετερόλογη έκφραση της συνθάσης του β-φελλανδρενίου στα *Synechocystis* από τους οργανισμούς *Solanum lycopersicum*, *Pinus banksiana* και *Picea* οδηγεί στην παραγωγή μίγματος μονοτερπενίων και όχι αποκλειστικά *β*-φελλανδρενίου [152]. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το ένζυμο PHLS στη φύση βρίσκεται και λειτουργεί σε τελείως διαφορετικά περιβάλλοντα στα φυτά σε σχέση με αυτό των κυανοβακτηρίων. Πιο συγκεκριμένα η δράση του στα φυτά εντοπίζεται στο στρώμα των χλωροπλαστών. Τα κυανοβακτήρια αντίθετα, ως προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί, δε διαθέτουν οργανίδια, συνεπώς το ένζυμο βρίσκεται στο κυτοσόλιο, το οποίο διαφέρει αρκετά με το φυσικό περιβάλλον του ενζύμου.



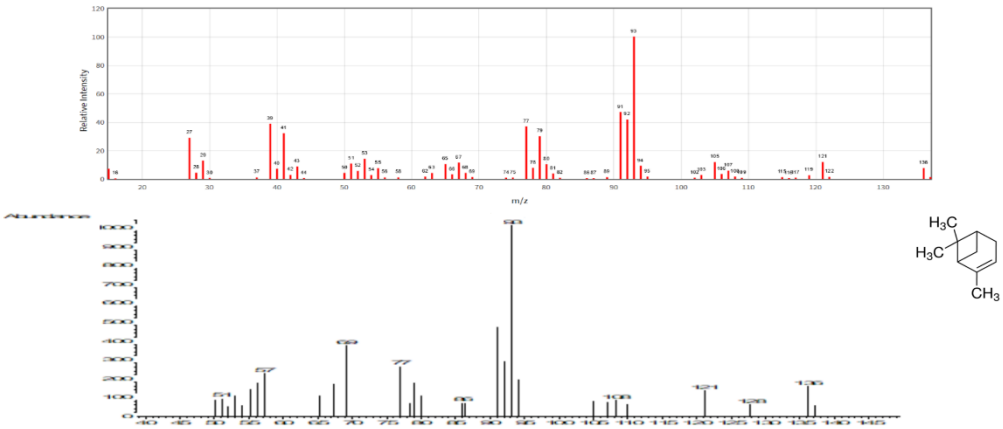
8.48 min delta-3-carene



9.069 min camphene



10.095 min alpha-pinene



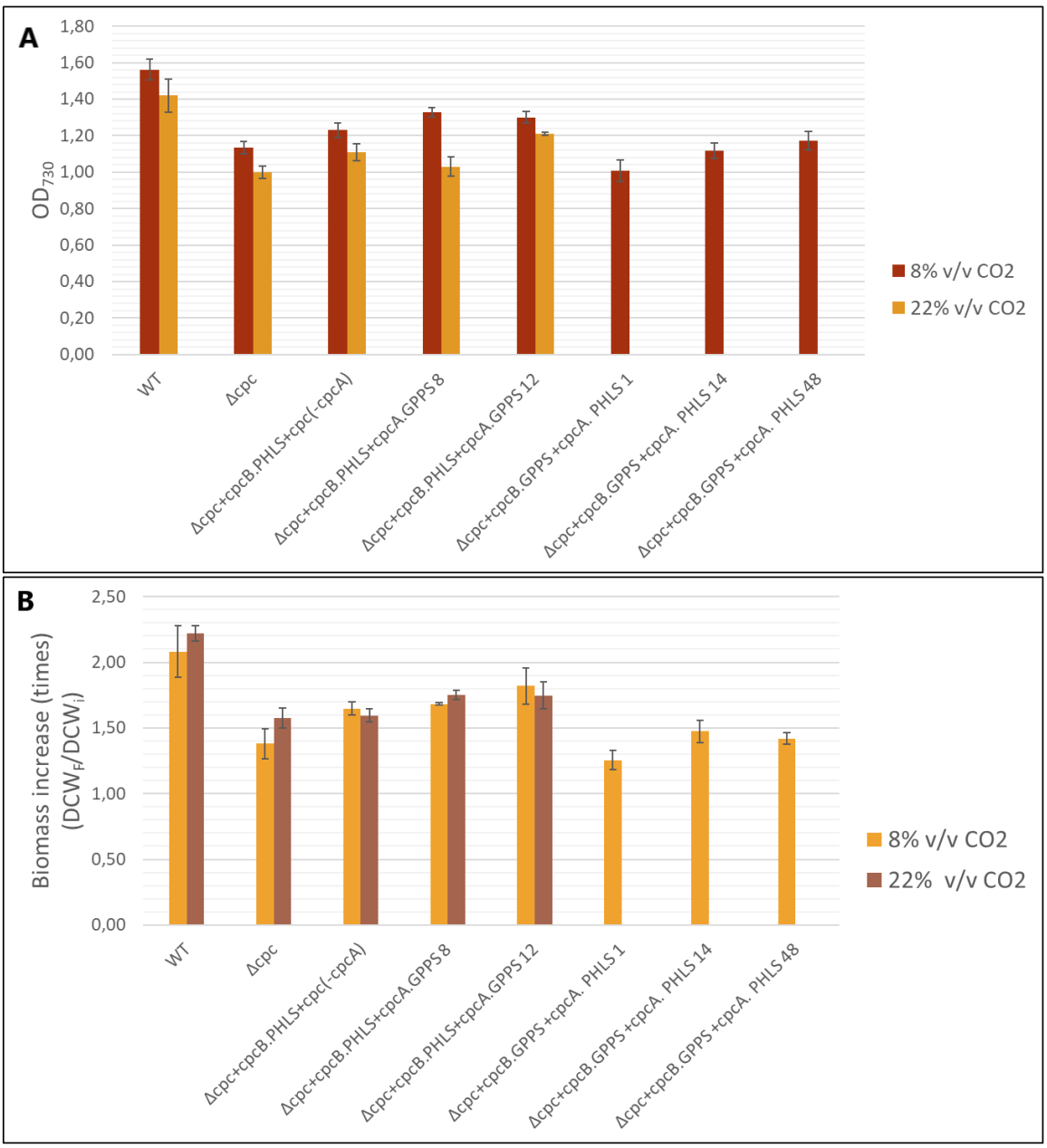
Εικόνα 2.25. Α. Χρωματογραφικό προφίλ που αναλύθηκε με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας του εκχυλίσματος εξανίου από το στέλεχος Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS. **Β.**, **Γ.** και **Δ.** Φάσματα μάζας των τριών κορυφών του GC με χρόνο κατακράτησης 8.48, 9.07 και 10.10 min. Από σύγκριση των φασμάτων μάζας με βάσεις δεδομένων φαίνεται πως οι κορυφές αυτές αντιστοιχούν στα *δ*-3-καρενίο, καμφένιο και *α*-πινένιο.

Συνεπώς τα φάσματα απορρόφησης στο υπεριώδες, αποτελέσματα της αέριας χρωματογραφίας καθώς και τα φάσματα μάζας, αποδεικνύουν ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS (σειρές 8 και 12) και Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) παράγουν επιτυχώς το *β*-φελλανδρένιο. Παρόλο που η σύντηξη της PHLS με την cpcB υπομονάδα της φυκοκυανίνης οδηγεί σε επιτυχή παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου στα δύο παραπάνω μεταλλαγμένα στελέχη, η σύντηξη της με την υπομονάδα cpcA της φυκοκυανίνης στο μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS φαίνεται να οδηγεί σε παραγωγή του *δ*-3-καρενίου, καμφενίου και *α*-πινενίου αντί για *β*-φελλανδρενίου.

2.4.9 Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων και της λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού

Μέχρι τώρα αναλύθηκε η γενετική τροποποίηση των κυανοβακτηρίων *Synechocystis* με σκοπό την ετερόλογη παραγωγή του *β*-φελλανδρένιο. Μάλιστα η τροποποίηση πραγματοποιήθηκε στο *cpc* οπερόνιο, το οποίο κωδικοποιεί τη φυκοκυανίνη, πρωτεΐνη που βρίσκεται στα ραβδία των φυκοχολοσωμάτων, τα οποία είναι ζωτικής σημασίας για την επιβίωση των κυανοβακτηρίων στη φύση. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε ένας αριθμός παραμέτρων ώστε να αξιολογηθούν οι συνέπειες που μπορεί να έχει η εξάλειψη της φυκοκυανίνης αλλά και η παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου στην ανάπτυξη των μεταλλαγμένων στελεχών. Επιπλέον η μελέτη αυτή είναι υψηλής σημασίας όσον αφορά σε μια πιθανή μελλοντική εφαρμογή υψηλής κλίμακας. Όλες οι παράμετροι μελετήθηκαν έπειτα από 48 h ανάπτυξης των καλλιεργειών στους βιοαντιδραστήρες (1L) δύο φάσεων (αέριας/υγρής).

Η μελέτη της κυτταρικής ανάπτυξης και βιομάζας πραγματοποιήθηκε με μετρήσεις οπτικής πυκνότητας στα 730 (OD_{730}) και ξηρής βιομάζας κυττάρων (DCW). Στην παρούσα εργασία δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις CO_2 (8 και 22% v/v).

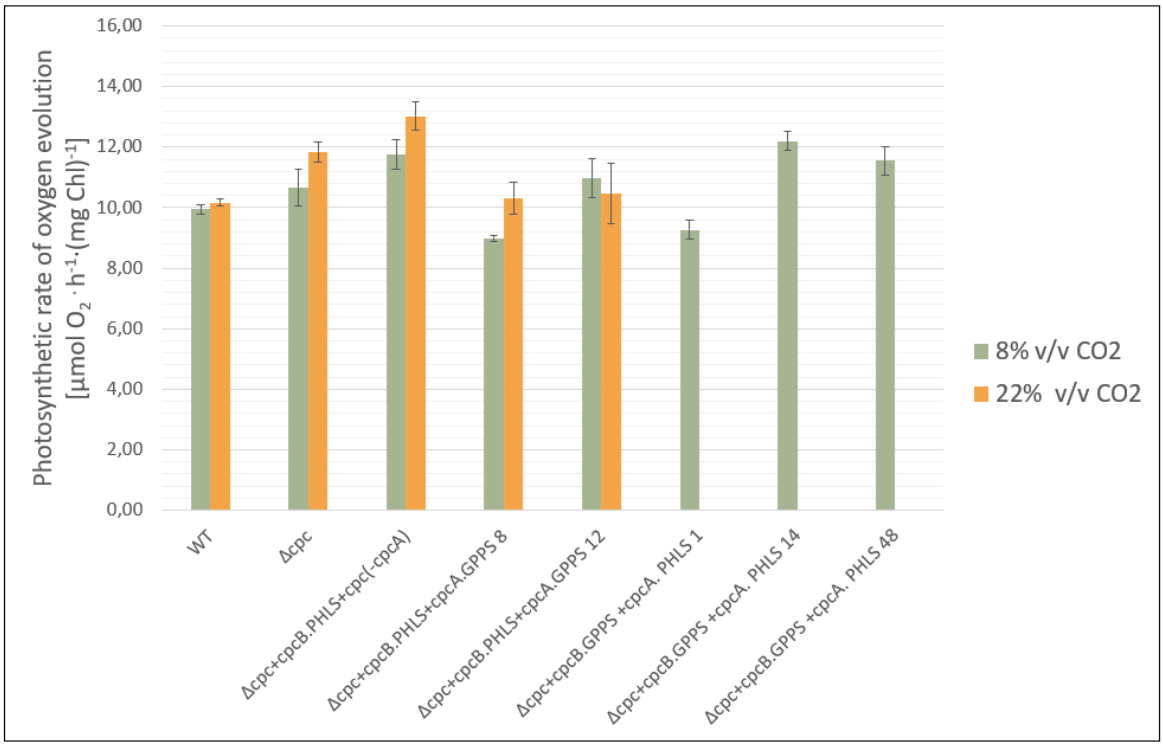


Εικόνα 2.26. Α. Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας (OD_{730}) και **Β.** αύξησης βιομάζας (DCW_f/DCW_i) οι οποίες πραγματοποιήθηκαν έπειτα από χρονικό διάστημα 48 ωρών διεξαγωγής του πειράματος στους βιοαντιδραστήρες 1L διπλής φάσης (αέριας/υγρής) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1} και θερμοκρασία 28ºC με σκοπό να μελετηθεί η ανάπτυξη τους. Στην Εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα δύο διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης, με παροχή 8 και 22% v/v CO_2 ως μόνη πηγή άνθρακα.

Στην Εικόνα 2.26 παρουσιάζονται οι μετρήσεις οπτικής πυκνότητας και μεταβολής της βιομάζας, εκφρασμένης ως ο λόγος της βιομάζας έπειτα από δύο ημέρες ανάπτυξης προς τη βιομάζα κατά την έναρξη του πειράματος (ημέρα 0) αντίστοιχα.

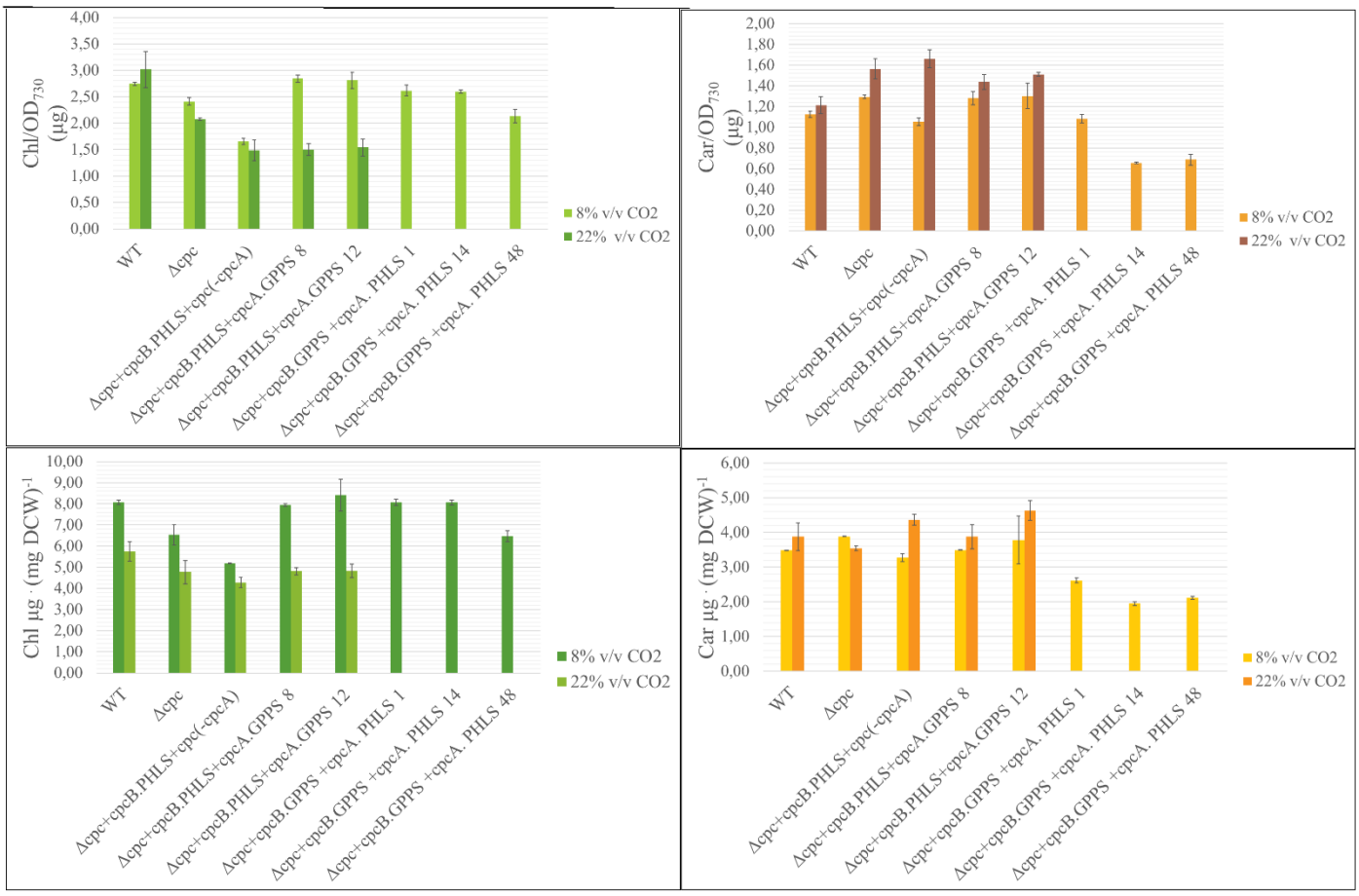
Από τα αποτελέσματα δεν παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση στην ανάπτυξη και συσσώρευση της βιομάζας των διαφόρων στελεχών μεταξύ των δύο συνθηκών. Επίσης, όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη παρουσιάζουν παρόμοια ανάπτυξη και παραγωγή βιομάζας μεταξύ τους και χαμηλότερη σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου στις συγκεκριμένες συνθήκες. Ο χαμηλότερος ρυθμός ανάπτυξης και παραγωγής της βιομάζας των μεταλλαγμένων στελεχών στις συγκεκριμένες συνθήκες φωτισμού, που αποτελούν τις φυσιολογικές συνθήκες για την ανάπτυξη των κυανοβακτηρίων, είναι αναμενόμενος διότι τα στελέχη αυτά έχουν μικρότερη κεραία συλλογής φωτός και συνεπώς περιορίζεται το εύρος του φωτός που απορροφούν [128]. Παρόλα αυτά, τα μεταλλαγμένα στελέχη αναπτύσσονται κανονικά στους βιοαντιδραστήρες, έστω και με μικρότερο ρυθμό και δεν επηρεάζονται από τη μικρότερη κεραία συλλογής φωτός που διαθέτουν λόγο της εξάλειψης της φυκοκυανίνης αλλά ούτε από την παραγωγή του β-φελλανδρενίου.

Οι Εικόνες 2.27 και 2.28 παρουσιάζουν τα αποτελέσματα του ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου και προσδιορισμού φωτοσυνθετικών χρωστικών αντίστοιχα. Ο λόγος που κρίθηκε απαραίτητο να πραγματοποιηθούν αυτές οι μελέτες βασιζόταν στο γεγονός ότι κατά τη μετάλλαξη έχει αφαιρεθεί ένα ζωτικό κομμάτι του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των *Synechocystis* και υπήρχε αυξημένη πιθανότητα να υπάρχουν αρνητικές επιπτώσεις.



Εικόνα 2.27. Αποτελέσματα φωτοσυνθετικού ρυθμού παραγωγής οξυγόνου. Οι μετρήσεις έγιναν πολαρογραφικά έπειτα από 48 ώρες ανάπτυξης των καλλιεργειών *Synechocystis* βιοαντιδραστήρες 1L διπλής φάσης (αέριας/υγρής) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1} και θερμοκρασία 28ºC. Στην Εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα δύο διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης, με παροχή 8 και 22% v/v CO_2 ως μόνη πηγή άνθρακα.

Τα αποτελέσματα του φωτοσυνθετικού ρυθμού παραγωγής οξυγόνου είναι κανονικοποιημένα ως προς τη συγκέντρωση χλωροφύλλης των αντίστοιχων δειγμάτων και παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.28. Από τα αποτελέσματα αποδεικνύεται πως όλα τα TLA στελέχη εμφανίζουν βελτιωμένο φωτοσυνθετικό ρυθμό παραγωγής οξυγόνου συγκριτικά με το αγρίου τύπου στέλεχος. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με ήδη δημοσιευμένα αποτελέσματα για το στέλεχος Δcpc [20]. Τα μεταλλαγμένα στελέχη δεν εμφανίζουν σημαντικές διαφορές όσο αφορά στη φωτοσυνθετική τους ικανότητα.

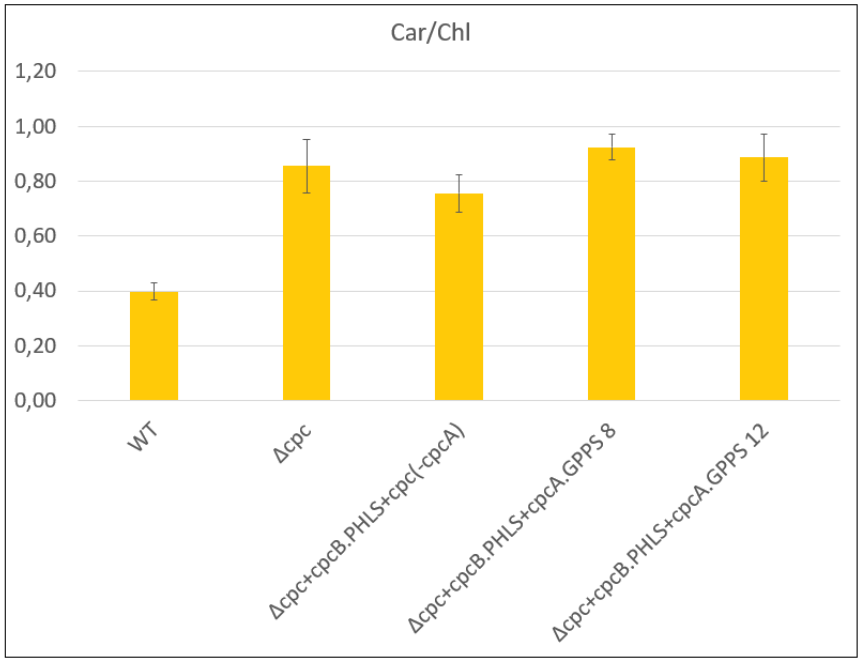


Εικόνα 2.28. Περιεχόμενο φωτοσυνθετικών χρωστικών των καλλιεργειών *Synechocystis* έπειτα από 48 ώρες ανάπτυξης των καλλιεργειών στους βιοαντιδραστήρες 1L διπλής φάσης (αέριας/υγρής) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1} και θερμοκρασία 28°C. Στην Εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα δύο διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης, με παροχή 8 και 22% v/v CO_2 ως μόνη πηγή άνθρακα. Όλες οι χρωστικές εκφράστηκαν σε μg χρωστικής ανά mg DCW και σε μg χρωστικής ανά OD_{730}.

Στις μετρήσεις των φωτοσυνθετικών χρωστικών παρατηρείται μείωση στη συγκέντρωση της χλωροφύλλης με αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης του CO_2. Αντίθετα αυτή η τάση δεν ακολουθείται από τα καροτενοειδή, στα οποία αυξάνεται μάλιστα η συγκέντρωση τους σε υψηλότερη συγκέντρωση CO_2. Η ίδια τάση παρατηρείται και όταν τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα ανά ξηρή βιομάζα κυττάρων (DCW) αλλά και ανά OD_{730}.

Όσον αφορά το περιεχόμενο των χρωστικών των διαφόρων στελεχών, το στέλεχος Δcpc παρουσιάζει χαμηλότερες τιμές Chl/DCW και Chl/OD_{730} σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου, ενώ οι τα Car/DCW δεν εμφανίζουν σημαντική διαφοροποίηση. Τα αποτελέσματα αυτά ακολουθούν την ίδια τάση με ήδη δημοσιευμένα αποτελέσματα για

το στέλεχος Δcpc, παρόλο που τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες φωτισμού [20]. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως οι διαφοροποιήσεις αυτές στις τιμές της χλωροφύλλης εκφρασμένης ανά ξηρή βιομάζα κυττάρων αντανακλά αλλαγές στη στοιχειομετρία μεταξύ των δύο φωτοσυστημάτων, ως αποτέλεσμα του μετασχηματισμού του στελέχους Δcpc. Η στοιχειομετρία μεταξύ των δύο φωτοσυστημάτων PSI/PSII προσαρμόζεται και βελτιστοποιείται όταν πραγματοποιούνται μεταλλάξεις οι οποίες επάγουν αλλαγές στην κεραία συλλογής φωτός και επιπρόσθετα επηρεάζουν τα δύο φωτοσυστήματα με ανόμοιο τρόπο [20, 153]. Στα κυανοβακτήρια το φωτοσύστημα I είναι πιο άφθονο σε σχέση με το φωτοσύστημα II, και περιέχει 95 μόρια χλωροφύλλης-α και 22 μόρια *β*-καροτενίου σε σχέση με το φωτοσύστημα II που περιέχει μόλις 37 μόρια χλωροφύλλης-α και 11 μόρια *β*-καροτένιου [154, 155]. Για το λόγο αυτό, τα μεγάλα σε μέγεθος φυκοχολοσώματα, είναι συνδεδεμένα με την εξωτερική πλευρά της μεμβράνης των θυλακοειδών, και λειτουργούν ως κεραίες απορρόφησης φωτός, διοχετεύοντας την ηλιακή ενέργεια στα κέντρα αντίδρασης του φωτοσυστήματος II [7]. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται ισορροπημένη κατανομή της διέγερσης μεταξύ των δύο φωτοσυστημάτων με λόγο PSI/ PSII περίπου 2: 1 έως 4: 1 στον άγριο τύπο [15, 20, 156, 157]. Περικοπή των περιφερειακών ραβδίων των φυκοχολοσωμάτων από το μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc μειώνει την ικανότητα και το ρυθμό απορρόφησης φωτός από το φωτοσύστημα II με αποτέλεσμα να ωθεί την ισορροπία της κατανομής της ενέργειας διέγερσης υπέρ του φωτοσυστήματος I. Η μείωση του αριθμού των μονάδων του φωτοσυστήματος I αποτελεί μία προσπάθεια εξισορρόπησης με σκοπό τη βελτιστοποίηση της λειτουργίας του, εξηγώντας έτσι τις χαμηλότερες τιμές Chl/DCW στο μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc [20]. Όσον αφορά τα μεταλλαγμένα στελέχη Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS και Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφοροποιήσεις στις τιμές των λόγων Chl/DCW, Chl/OD_{730} και Car/DCW σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου.



Εικόνα 2.24 Λόγος καροτενοειδών προς χλωροφύλλη. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν έπειτα από 48 ώρες ανάπτυξης των καλλιεργειών στους βιοαντιδραστήρες 1L διπλής φάσης (αέριας/υγρής) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1} και θερμοκρασία 28 ºC.

Όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα στην Εικόνα 2.29 ο λόγος καροτενοειδών προς χλωροφύλλη (Car/Chl) είναι υψηλότερος σε όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου. Τα αποτελέσματα αυτά για το στέλεχος Δcpc συμφωνούν με ήδη δημοσιευμένα αποτελέσματα [20, 141].

2.4.10. Προσδιορισμός της ποσότητας του παραγόμενου β-φελλανδρενίου

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του β-φελλανδρενίου που παράγεται από τα μεταλλαγμένα στελέχη Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS (σειρές 8 και 12) και Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) πραγματοποιήθηκε με δύο διαφορετικές μεθόδους. Η μία μέθοδος ήταν η αέρια χρωματογραφία (GC). Σε αυτή έγινε χρήση προτύπου *β*-φελλανδρενίου με εσωτερικό πρότυπο το *γ*-τερπινένιο. Η δεύτερη μέθοδος περιελάμβανε φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό και ποσοτικοποίηση μέσω του νόμου του Beer-Lambert στο υπεριώδες διότι το *β*-φελλανδρένιο εμφανίζει χαρακτηριστική απορρόφηση με μέγιστο στα 232,4 nm, με τη εφαρμογή του νόμου του Beer Lambert. Πραγματοποιήθηκε ποσοτικοποίηση του εκχυλίσματος εξανίου της σειράς 12 του στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS και με τις δύο μεθόδους ώστε να γίνει η σύγκριση τους.

Τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας έδειξαν ότι παράγονται 0,41±0,08 mg *β*-φελλανδρενίου/g DCW, ενώ με την εφαρμογή του νόμου του Beer-Lambert η συγκέντρωση του παραγόμενου *β*-φελλανδρενίου βρέθηκε να είναι 0,49±0,09 mg/g DCW. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν και με τις δύο μεθόδους βρίσκονται πολύ κοντά μεταξύ τους**.** Το αποτέλεσμα αυτό έχει μεγάλη σημασία αν αναλογιστούμε ότι οι πρότυπες ουσίες καθαρών αναλυτικών προτύπων τερπενοειδών (συνεπώς και του *β*-φελλανδρενίου), είναι δυσεύρετες στο εμπόριο και έχουν πολύ υψηλό κόστος. Συνεπώς για την περάτωση της διατριβής η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή του νόμου του Beer-Lambert, όπως γίνεται και από άλλες ερευνητικές ομάδες. Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής, σε τακτικά χρονικά διαστήματα πραγματοποιούνταν επαλήθευση της φωτομετρικής μεθόδου με παράλληλο ποσοτικό προσδιορισμό με αέρια χρωματογραφία για να λαμβάνονται αξιόπιστα αποτελέσματα. Στον Πίνακα 2.17 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις του *β*-φελλανδρενίου που παράγεται από τα μεταλλαγμένα στελέχη Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS και Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA). Στον Πίνακα 2.18 παρουσιάζεται η ποσοτικοποίηση των μονοτερπενίων που παράγονται από το στέλεχος Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS.

Πίνακας 2.8. Απόδοση του παραγόμενου *β*-φελλανδρενίου έπειτα από 48 ώρες ανάπτυξης των μεταλλαγμένων στελεχών Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) και Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS (σειρές 8 και 12) στους βιοαντιδραστήρες 1L δύο φάσεων (αέριας/υγρής). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μg *β*-φελλανδρενίου ανά λίτρο καλλιέργειας, μg *β*-φελλανδρενίου ανά mg χλωροφύλλης και mg *β*-φελλανδρενίου ανά g DCW (διαφοράς της ξηρής βιομάζας κυττάρων που συσσωρεύτηκε έπειτα από 48 ώρες με την αρχική όταν οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν στους βιοαντιδραστήρες).

Στελέχη	***β*-PHL μg·(Lκαλλιέργειας)$^{-1}$**		***β*-PHL μg·(mg Chl)$^{-1}$**		***β*-PHL mg· (g DCW)$^{-1}$**	
	8% CO_2	**22% CO_2**	**8% CO_2**	**22% CO_2**	**8% CO_2**	**22% CO_2**
Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA)	27,69±0,42	42,20±10,80	18,35±2,90	22,60±1,6	0,20±0,08	0,28±0,00
Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS 8	17,01±0,00	41,53±8,31	10,46±0,25	34,96±9,2	0,34±0,11	0,33±0,06
Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS 12	76,36±4,83	60,27±9,00	22,78±3,70	36,19±8,7	0,49±0,09	0,55±0.03

Από τα αποτελέσματα προέκυψε πως η ετερόλογη έκφραση της συνθάσης του πυροφωσφορικού γερανυλίου (GPPS) οδηγεί σε μεγαλύτερη παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου στο στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS σε σχέση με το στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA), όπου το πρώτο παράγει μέχρι και 27% παραπάνω *β*-φελλανδρένιο, και στους τρεις διαφορετικούς τρόπους έκφρασης. Επίσης, μεταξύ των δύο σειρών του στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS, για τα επόμενα πειράματα επιλέχθηκε η σειρά 12 διότι είχε καλύτερη απόδοση σε *β*-φελλανδρένιο. Τέλος, δεν παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση στην απόδοση των στελεχών μεταξύ των δύο διαφορετικών συνθηκών.

Πίνακας 2.9. Απόδοση των παραγόμενων τερπενοειδών έπειτα από 48 ώρες ανάπτυξης των τριών σειρών του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS στους βιοαντιδραστήρες 1L δύο φάσεων (αέριας/υγρής). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μg τερπενοειδών ανά λίτρο καλλιέργειας, μg τερπενοειδών ανά mg χλωροφύλλης-α και mg τερπενοειδών ανά g DCW (διαφοράς της ξηρής βιομάζας κυττάρων που συσσωρεύτηκε έπειτα από 48 ώρες με την αρχική όταν οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν στους βιοαντιδραστήρες).

Σειρές μεταλλάγματος Δcpc+cpcB.GPPS+cpcA.PHLS	**Τερπενοειδή**		
	μg·(Lκαλλιέργειας)$^{-1}$	**μg·(mg Chl)$^{-1}$**	**mg· (g DCW)$^{-1}$**
1	5,89±0,18	5,03±0,86	0,10±0,04
14	3,71±0,56	1,33±0,21	0,13±0,00
48	7,63±0,55	3,80±0,32	0,16±0,02

2.5 Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα του κεφαλαίου αυτού αποτυπώνεται πως κατασκευάστηκαν γενετικά τροποποιημένα στελέχη τα οποία μπορούν να εκφράζουν ετερόλογα τις συνθάσες του *β*-φελλανδρενίου και του πυροφωσφορικού γερανυλίου. Τα στελέχη αυτά μπορούν να παράγουν *β*-φελλανδρένιο όταν καλλιεργούνται σε φωτοαυτότροφες συνθήκες στους βιοαντιδραστήρες χωρίς να επηρεάζεται η ανάπτυξή τους και η λειτουργία του φωτοσυνθετικού τους μηχανισμού. Με άλλα λόγια είναι ικανά για την ετερόλογη παραγωγή ενός προϊόντος που ανήκει σε μία ευρύτερη ομάδα (τερπενοειδή) με υψηλή ζήτηση και κόστος στη βιομηχανία έχοντας ως πρώτες ύλες μόνο φως, νερό και διοξείδιο του άνθρακα. Μάλιστα το παραγόμενο *β*-φελλανδρένιο είναι καθαρό από προσμίξεις όπως αποδείχθηκε από τα αποτελέσματα της αέριας χρωματογραφίας. Συνήθως τα πρότυπα του *β*-φελλανδρενίου είναι δυσεύρετα στο εμπόριο, ακριβά και περιέχουν προσμίξεις άλλων μονοτερπενίων.

Η συγχώνευση των πρωτεϊνών PHLS και GPPS με τις cpcB και cpcA αλληλουχίες σε συνδυασμό με την έκφραση τους κάτω από τη δράση του ισχυρού cpc υποκινητή, στο ίδιο οπερόνιο, δεν οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα έκφρασης. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν τα ήδη δημοσιευμένα, ότι η επιλογή ενός ισχυρού υποκινητή και η χρήση της cpcB ως αλληλουχία οδηγό για την έκφραση της PHLS είναι απαραίτητα αλλά όχι ικανά από μόνα τους για να επάγουν υψηλά επίπεδα έκφρασης των συνθασών των μονοτερπενίων στα *Synechocystis* [78]. Τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης της PHLS είχαν ως αποτέλεσμα χαμηλότερη απόδοση σε σχέση με δημοσιευμένα αποτελέσματα [108], στα οποία έχει επιτευχθεί ετερόλογη έκφραση των γονιδίων του MVA μονοπατιού ταυτόχρονα με την ετερόλογη έκφραση της PHLS. Αποδεικνύεται όμως ότι η ετερόλογη έκφραση της GPPS, έστω και σε χαμηλότερα επίπεδα, οδηγεί σε αυξημένη παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου. Παρατηρήθηκε επίσης πως παρόλο που η συγχώνευση της PHLS με την cpcB υπομονάδα της φυκοκυανίνης οδηγεί σε επιτυχή παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου η σύντηξη της με την υπομονάδα cpcA της φυκοκυανίνης οδήγησε σε παραγωγή ενός μείγματος τριών ισομερών του. Αυτό αποτελεί σημαντική παρατήρηση που αφορά τη βασική έρευνα σε αυτό το πεδίο

Τα αποτελέσματα της πρωτεϊνικής ανάλυσης των μεταλλαγμένων στελεχών φανερώνουν πως οι δύο κύριες υπομονάδες της φυκοκυανίνης cpcB και cpcA απουσιάζουν από όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη, γεγονός που επιβεβαιώνει και τον TLA φαινότυπο.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε επίσης ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη αναπτύσσονται κανονικά και δεν επηρεάζονται από την έλλειψη της φυκοκυανίνης αλλά

ούτε από την παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου όταν καλλιεργούνται στους βιοαντιδραστήρες.

Δεν παρατηρήθηκαν επίσης σημαντικές διαφοροποιήσεις στην ανάπτυξη, λειτουργία φωτοσυνθετικού μηχανισμού και την παραγωγή του β-φελλανδρενίου παρουσία μεγαλύτερης συγκέντρωσης CO_2.

Τα αποτελέσματα του παρόντος κεφαλαίου αποτελούν ένα ακόμα παράδειγμα παραγωγής φυσικών προϊόντων υψηλής βιομηχανικής αξίας μέσω της εφαρμογής της γενετικής και μεταβολικής μηχανικής στο κυανοβακτήριο *Synechocystis*. Μέσω της φωτοσύνθεσης και έχοντας ως πρώτες ύλες μόνο φως, νερό και CO_2 επιτυγχάνεται η παραγωγή των προϊόντων αυτών μέσω μίας ανανεώσιμης, οικονομικά προσιτής και φιλικής προς το περιβάλλον μεθόδου. Η προσέγγιση παρακάμπτει τα πολυάριθμα βήματα της συνθετικής χημείας και τη χρήση οργανικών διαλυτών καθώς και τις δαπανηρές και χρονοβόρες μεταγενέστερες διαδικασίες για τη συλλογή του προϊόντος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *SYNECHOCYSTIS* ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥ *β*-ΦΕΛΛΑΝΔΡΕΝΙΟΥ

3.1 Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως (κεφάλαιο 1), τα κυανοβακτήρια είναι φωτοαυτότροφοι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί οι οποίοι, μέσω της οξυγονικής φωτοσύνθεσης, μετατρέπουν την ηλιακή ενέργεια σε χημική, η οποία αποθηκεύεται ως βιομάζα. Μάλιστα η ενέργεια που αποθηκεύεται είναι της τάξης των 450 TW, δηλαδή περίπου 25 φορές υψηλότερη από τη συνολική ισχύ που χρησιμοποιείται από τον άνθρωπο [158, 159]. Λόγο του ευέλικτου φωτοαυτοτροφικού μεταβολισμού τους, τα κυανοβακτήρια χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ανανεώσιμων βιοκαυσίμων και χημικών χρησιμοποιώντας ηλιακή ενέργεια και ταυτόχρονα CO_2, αέριο που συνεισφέρει στο φαινόμενο του θερμοκηπίου [124, 159, 160]. Συγκεκριμένα για το κυανοβακτήριο *Synechocystis* υπάρχουν αρκετές αναφορές στη βιβλιογραφία, όπου αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα για το πως ένας γενετικά τροποποιημένος μικροοργανισμός μπορεί να λειτουργήσει ταυτόχρονα ως φωτοκαταλύτης και παραγωγός, φωτοσυνθέτοντας και παράγοντας υδρογονάνθρακες ισοπρενίου και *β*-φελλανδρενίου [161].

Η μαζική καλλιέργεια των *Synechocystis* μπορεί να γίνει είτε σε ανοιχτές δεξαμενές-λίμνες (open raceway ponds) είτε σε κλειστούς βιοαντιδραστήρες, εκμεταλλευόμενοι άγονο έδαφος που δεν είναι κατάλληλο για τη γεωργία, όπως εδάφη κοντά σε θαλάσσιες περιοχές. Με τον τρόπο αυτό αμβλύνεται το ζήτημα του ανταγωνισμού για εκτάσεις που χρησιμοποιούνται για καλλιέργειες τροφίμων [161].

Υπάρχουν όμως κάποιοι περιορισμοί κατά τη μαζική καλλιέργεια των *Synechocystis* σε βιοαντιδραστήρες όπως είναι η ανάπτυξη μολύνσεων και η κατανάλωση αρκετών λίτρων πόσιμου νερού [161, 162]. Υπολογίζεται ότι απαιτούνται περίπου 34-3.400 L νερού για κάθε λίτρο παραγόμενου βιοκαυσίμου σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες, ανάλογα με το ποσό που εξατμίζεται και τις διαδικασίες ανακύκλωσης που εφαρμόζονται [161, 163, 164]. Ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή η καλλιέργεια 10 δισεκατομμυρίων γαλονιών καλλιεργειών μικροφυκών το χρόνο μπορεί να καταναλώσει το 70-170% των συνολικών αποθεμάτων νερού που προορίζεται για τη γεωργική άρδευση, ενισχύοντας έτσι έμμεσα το ηθικό ζήτημα της καλλιέργειας καυσίμων εναντίων τροφίμων [161, 165]. Ένας άλλος περιορισμός είναι η μεγάλη ανάπτυξη βιομάζας που απαιτείται για την παραγωγή των επιθυμητών προϊόντων. Η βέλτιστη καλλιέργεια των κυανοβακτηρίων εξαρτάται τόσο από τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών όσο και από τις συνθήκες καλλιέργειας (όπως είναι η ακτινοβολία φωτός, η θερμοκρασία και το pH) [159]. Οι ενδείξεις αυτές δείχνουν τη

σημασία που έχει μία αναλυτική εξέταση των επιμέρους παραμέτρων σε εργαστηριακή κλίμακα πριν την οποιαδήποτε εφαρμογή.

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως η αλκαλικότητα και η υψηλή αλατότητα δεν είχαν αρνητικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη στο αγρίου τύπου στέλεχος *Synechocystis* [162] καθώς και στην ικανότητα παραγωγής ισοπρενίου σε μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis* [161]. Η υψηλή αλκαλικότητα έχει αναφερθεί πως επιτρέπει την ανάπτυξη των κυανοβακτηρίων ενώ ταυτόχρονα αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα στην ανάπτυξη μολύνσεων [166]. Μάλιστα αρκετά βακτήρια, όπως *E. coli* που βρέθηκαν σε υγρά απόβλητα εμφάνισαν ανώτατο όριο ανοχής pH 9,2, καθιστώντας τα έτσι μη ικανά να αναπτυχθούν σε θρεπτικό μέσο BG11 με pH 10 ή μεγαλύτερο [161].

Τα *Synechocystis* έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν σε συνθήκες υψηλότερου pH μέσω αυξητικής ρύθμισης (upregulation) αρκετών γονιδίων συμπεριλαμβανομένων αντιμεταφορέων (antiporters) μονοσθενών κατιόντων/ανιόντων οι οποίοι εισάγουν πρωτόνια. Με τον τρόπο αυτό ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός καταφέρνει να συντηρεί σχετικά σταθερό το ενδοκυτταρικό pH [161, 167]. Αρκετά στελέχη κυανοβακτηρίων εμφανίζουν ανεκτικότητα στην αλατότητα. Αυτό οφείλεται στην παρουσία αντιμεταφορέων Na^+/H^+ οι οποίοι δουλεύουν μέσω παθητικής διάχυσης των πρωτονίων κάτω από κανονικές συνθήκες και ενεργή εξώθηση Na^+ κάτω από υψηλό pH. Η έκθεση σε περιβάλλοντα υψηλής αλατότητας έχει επίσης βρεθεί ότι προκαλεί αυξητική ρύθμιση του υποθετικού γονιδίου (sll1864) το οποίο κωδικοποιεί ένα κανάλι Cl^- στα *Synechocystis*. Κάτω από συνθήκες καταπόνησης λόγο αλατότητας η σύνθεση και η συσσώρευση στο κύτταρο συμβατών διαλυτών ουσιών, όπως σακχαρόζη, glucosylglycerol, και βεταΐνη της γλυκίνης, βοηθάει να αντισταθμιστεί η αλλαγή στο ωσμωτικό δυναμικό και να διατηρηθεί η πίεση σπαργής των κυττάρων [161, 168].

Η υψηλή αλατότητα σε συνδυασμό με την υψηλή αλκαλικότητα επιτρέπουν τη χρήση υφάλμυρου ή θαλασσινού νερού καθώς και υγρών αποβλήτων από αναερόβια χώνευση, τα οποία είναι πλούσια σε θρεπτικά συστατικά, για την παραγωγή βιο-προϊόντων από μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες κυανοβακτηρίων [169-171]. Αναμφίβολα η χρήση θαλασσινού ή υφάλμυρου νερού για τέτοιας κλίμακας καλλιέργειες αποτελεί μία ανανεώσιμη μέθοδο για την παραγωγή προϊόντων υψηλής βιομηχανικής σημασίας.

3.2 Σκοπός

Η συγκεκριμένη πειραματική σειρά είχε σκοπό τη μελέτη της επίδρασης διαφόρων συνθηκών ανάπτυξης στην ικανότητα και το βαθμό παραγωγής του β-φελλανδρενίου των μεταλλαγμένων στελεχών *Synechocystis* τα οποία κατασκευάστηκαν και μελετήθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο της παρούσας διατριβής. Στα πλαίσια της μελέτης αυτής εξετάστηκε και η επίδραση των συνθηκών αυτών στην ανάπτυξη και στη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των *Synechocystis*.

Οι στόχοι αποτυπώνονται συνοπτικά παρακάτω.

- Μελέτη της επίδρασης του pH.
- Μελέτη της επίδρασης της αλατότητας.
- Μελέτη της επίδρασης της παρουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα.
- Μελέτη της επίδρασης της έντασης του παρεχόμενου φωτισμού.

3.3 Πειραματικό μέρος

3.3.1 Συνθήκες ανάπτυξης

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν το στέλεχος αγρίου τύπου (WT) *Synechocystis* sp. PCC 6803 καθώς και μεταλλάγματα αυτού. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν φωτοαυτότροφα σε υγρό θρεπτικό BG11 σε κωνικές φιάλες, με συνεχή παροχή ατμοσφαιρικού αέρα ώστε να επιτυγχάνεται συνεχής παροχή CO_2 στα κύτταρα. Το pH ρυθμίστηκε με την προσθήκη 25 mM NaH_2PO_4 (pH 7,5). Όλα τα πειράματα εκτελέστηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 28±1°C. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1} με την χρήση λευκών (cool white) λαμπών φθορισμού. Οι υγρές καλλιέργειες αποτέλεσαν μητρικές καλλιέργειες για τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Για την αποφυγή μολύνσεων από άλλους μικροοργανισμούς όλα τα θρεπτικά μέσα και σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή καλλιεργειών αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο στους 120ºC για 20-30 min. Όλα τα πειράματα παρασκευής καλλιεργειών διεξήχθησαν σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow hood) παρουσία φλόγας, αφού είχε προηγουμένως αποστειρωθεί με αιθανόλη και λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας

3.3.2 Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων-Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας

Η ανάπτυξη της καλλιέργειας προσδιορίστηκε με μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UV-2700 της Shimadzu.

3.3.32 Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων-Προσδιορισμός ξηρή βιομάζας κυττάρων

Η ανάπτυξη της καλλιέργειας προσδιορίστηκε και με μέτρηση της ξηρής βιομάζας κυττάρων. Συγκεκριμένη ποσότητα καλλιέργειας φυγοκεντρίθηκε και επαναιωρήθηκε σε μικρή ποσότητα υπερκάθαρου νερού. Η καλλιέργεια τοποθετήθηκε σε ειδικό αλουμινένιο, προ ζυγισμένο πιάτο και αφέθηκε για ξήρανση στους 70ºC για 12 ώρες

3.3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός του περιεχομένου των φωτοσυνθετικών χρωστικών

Για την ποσοτικοποίηση των φωτοσυνθετικών χρωστικών, ποσότητα καλλιέργειας 1 mL φυγοκεντρίθηκε στα 1000 x *g* για 1 min σε μία φυγόκεντρο Eppendorf και έπειτα από την απόρριψη του υπερκειμένου, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1 mL 100% μεθανόλης. Έπειτα από επώαση 10-15 min στο σκοτάδι, το δείγμα φυγοκεντρείται προκειμένου να απομακρυνθεί το ίζημα και λαμβάνεται η απορρόφηση του υπερκειμένου σε συγκεκριμένα

μήκη κύματος (470 nm, 650 nm, 665 nm, 710 nm) με χρήση ενός φασματοφωτομέτρου υπεριώδους-ορατού (Shimadzu UV-2700). Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης-α και των καροτενοειδών έγινε με βάση γνωστές εξισώσεις από τη βιβλιογραφία οι οποίες παρουσιάζονται παρακάτω [146].

$$\text{Chla (μg/mL)} = 16.5(A_{665} - A_{710}) - 8.3(A_{665} - A_{710})$$

$$\text{car (μg/mL)} = \frac{1000(A_{470} - A_{710}) - 1.63[Chla]}{221}$$

3.3.5 Πολαρογραφικός προσδιορισμός ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου

Η μέτρηση του ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου πραγματοποιήθηκε με χρήση ενός επιλεκτικού ηλεκτροδίου οξυγόνου τύπου Clark [147]. Η διάταξη του ηλεκτροδίου αποτελείται από μια άνοδο αργύρου και μια κάθοδο πλατίνας, σε διάλυμα ηλεκτρολύτη KCl, όπου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Για τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ ανόδου και καθόδου χρησιμοποιείται οξυγόνο, το οποίο εισέρχεται επιλεκτικά στον ηλεκτρολύτη από το δείγμα μέσω μιας ημιπερατής μεμβράνης, και ανάγεται στην κάθοδο σύμφωνα με την ημιαντίδραση:

$$O_2 + 4e^- + 2H_2O \rightarrow 4OH^-$$

Για τις μετρήσεις έκλυσης οξυγόνου, 10 mL καλλιέργειας φυγοκεντρίθηκαν για 10 min στα 6000 x *g*. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 4 mL ρυθμιστικού διαλύματος με το οποίο είχε προηγουμένως σταθεροποιηθεί το ηλεκτρόδιο (0,896% w/v Tricine και 0,034% w/v $NaHCO_3$, pH 7,6). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε υδρόψυκτη γυάλινη κυψελίδα σε θερμοκρασία 25°C η οποία ρυθμίστηκε με τη χρήση θερμοστάτη με κυκλοφορητή νερού. Για την αποφυγή θέρμανσης του δείγματος, το φως πριν φτάσει στο δείγμα διήλθε από κυψελίδα με αραιό διάλυμα $CuSO_4$ που απορροφούσε την υπέρυθρη ακτινοβολία. Τέλος, το φως διήλθε από ένα κόκκινο φίλτρο, επιτρέποντας μόνο τα επιθυμητά μήκη κύματος να φτάσουν στο δείγμα [148]. Η μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα καταγράφτηκε σε ένταση φωτισμού 500 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ από μία λάμπα βολφραμίου για χρονικό διάστημα 45-60 s και τελικά εκφράστηκε σε μmol O_2 (mg Chl)$^{-1} \cdot h^{-1}$.

3.3.6 Παρασκευή καλλιεργειών για την παραγωγή β-φελλανδρενίου

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν από τη μητρική καλλιέργεια στο τέλος της εκθετικής φάσης με φυγοκέντριση στα 4000 x *g* για 10 min. Έπειτα επαναιωρήθηκαν σε νέο θρεπτικό μέσο

σε ερμητικά κλειστά γυάλινα μπουκάλια με septa διαμέτρου 5 cm και ύψους 9,5 cm με 100 mL συνολική χωρητικότητα όγκου. Ο τελικός όγκος καλλιέργειας που προστέθηκε στο μπουκάλι ήταν 50 mL και η αρχική κυτταρική συγκέντρωση ήταν ίση με OD_{730}=0,5. Στη συνέχεια, η αέρια φάση αντικαθίσταται με 20% (v/v) CO_2. Οι βιοαντιδραστήρες σφραγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό αναδευτήρα (shaker) και αναδεύονταν με συχνότητα 140 min^{-1} για 48 h σε θερμοκρασία 28 ^oC και φωτισμό 50 μmol φωτονίων·$m^{-2}s^{-1}$. Μετά το πέρας των 48 h, προστέθηκε συγκεκριμένη ποσότητα εξανίου στην επιφάνεια της καλλιέργειας και αφέθηκε για 2 h υπό ήπια ανάδευση. Με τον τρόπο αυτό αυξήθηκε ο όγκος της υδρόφοβης, οργανικής φάσης όπου βρισκόταν το προϊόν *β*-φελλανδρένιο διευκολύνοντας τη συλλογή του.

Εικόνα 3.1. Βιοαντιδραστήρας 100 mL κλεισμένος ερμητικά με septum που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των μεταλλαγμένων στελεχών *Synechocystis* στις διάφορες συνθήκες με σκοπό την παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου.

3.3.7 Ταυτοποίηση του παραγόμενου β-φελλανδρενίου με φασματομετρία απορρόφησης στο υπεριώδες

Τα δείγματα εξανίου που συλλέχθηκαν αναλύθηκαν με φασματομετρία απορρόφησης στο υπεριώδες όπου το *β*-φελλανδρένιο δίνει χαρακτηριστική κορυφή στα 232,4 nm.

3.3.8 Ταυτοποίηση του παραγόμενου β-φελλανδρενίου με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS)

Τα δείγματα εξανίου που συλλέχθηκαν αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία (Agilent 6890) συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (Agilent 5973 inert). Χρησιμοποιήθηκε τριχοειδής στήλη DB-5ms με διαστάσεις: μήκος 30m, διάμετρος 0,25 mm και πάχος 0,25 μm. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα είχε διάρκεια 39,50 min και είχε ως εξής:

i. Αρχική θερμοκρασία 50°C και παραμονή σε αυτή για 4 min.

ii. Σταθερή αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 4 ^{o}C/min έως τους 150°C.

iii. Αύξηση μέχρι τους 260°C με ρυθμό 20°C/min και παραμονή στους 260°C για 5 min.

Το φέρον αέριο ήταν ήλιο με ροή 1,2 mL/min. Η εισαγωγή του δείγματος έγινε με αυτόματο δειγματολήπτη σε on-column εισαγωγέα και ο όγκος του δείγματος είναι 1 μL. Η θερμοκρασία της transfer line ήταν 280°C. Οι συνθήκες ηλεκτρονικού ιονισμού ήταν ενέργεια ιονισμού 70eV, θερμοκρασία της πηγής ιόντων 180°C και πεδίο τιμών μάζας 45-500.

Για την ταυτοποίηση του *β*-φελλανδρενίου στα δείγματα που συλλέχθηκαν έγινε σύγκριση του χρόνου κατακράτησης αυτών με αυτό προτύπου *β*-φελλανδρενίου. Επίσης έγινε σύγκριση των φασμάτων μάζας με το αντίστοιχο πρότυπο *β*-φελλανδρένιο και με βάσεις δεδομένων.

3.3.9 Ποσοτικός προσδιορισμός του παραγόμενου β-φελλανδρενίου

Η ποσοτικοποίηση του *β*-φελλανδρενίου πραγματοποιήθηκε με φασματοφωτομετρία υπεριώδους όπου το *β*-φελλανδρένιο δίνει χαρακτηριστική κορυφή στα 232,4 nm, και με εφαρμογή του νόμου του Beer-Lambert ($\varepsilon_{232,4\ nm}$=15,7 $mM^{-1}\ cm^{-1}$) [107].

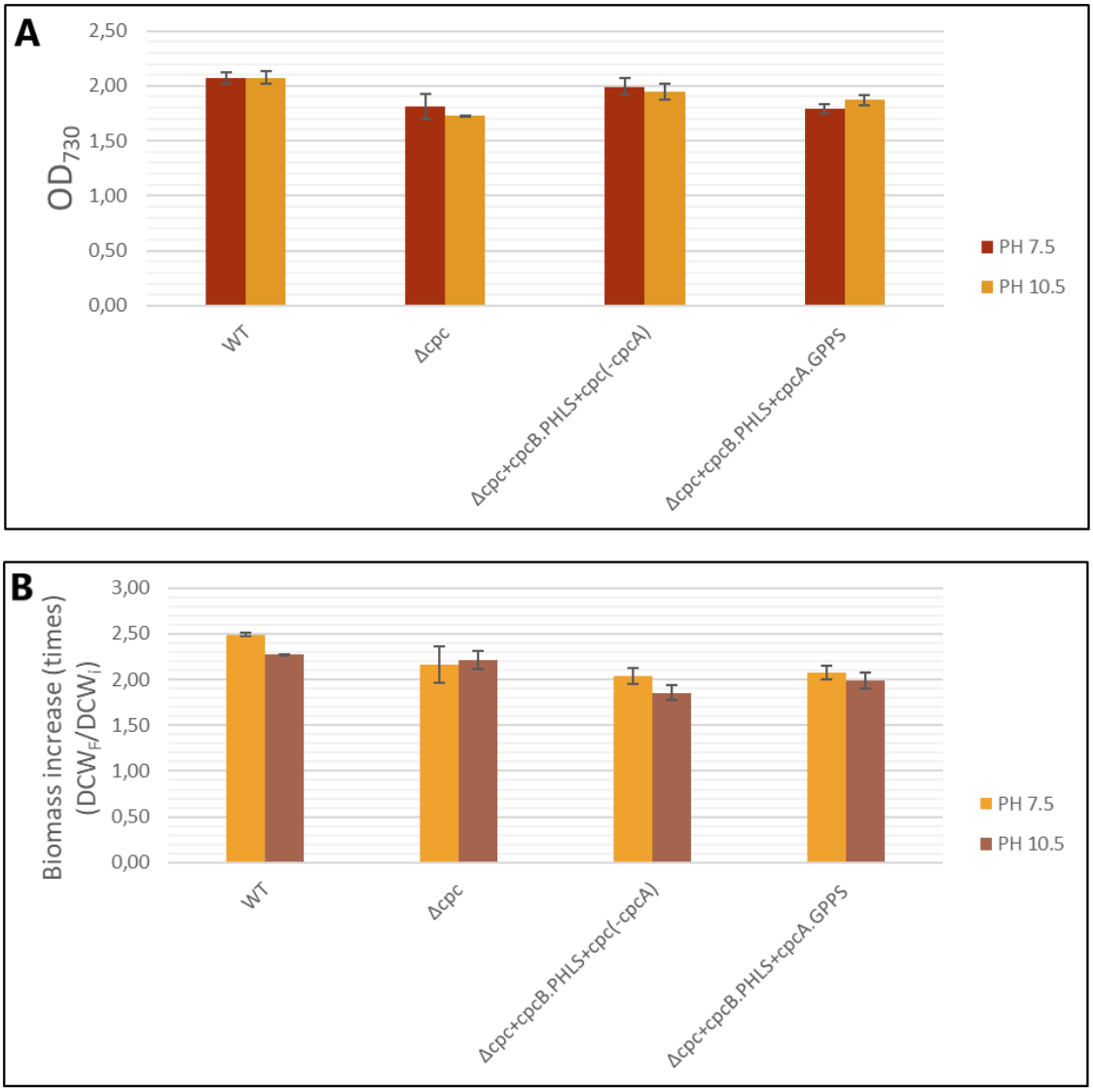
Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως:

1. μg *β*-φελλανδρενίου ανά L καλλιέργειας,
2. μg *β*-φελλανδρενίου ανά μg χλωροφύλλης, και
3. mg *β*-φελλανδρενίου ως προς τη διαφορά της ξηρής βιομάζας κυττάρων (ΔDCW) ανάμεσα στην έναρξη και τη λήξη του πειράματος (48 h διάστημα παραμονής στους βιοαντιδραστήρες).

3.4 Αποτελέσματα και συζήτηση

3.4.1 Μελέτη της επίδρασης του pH στην ετερόλογη παραγωγή του β-φελλανδρενίου από μεταλλαγμένα στελέχη Synechocystis

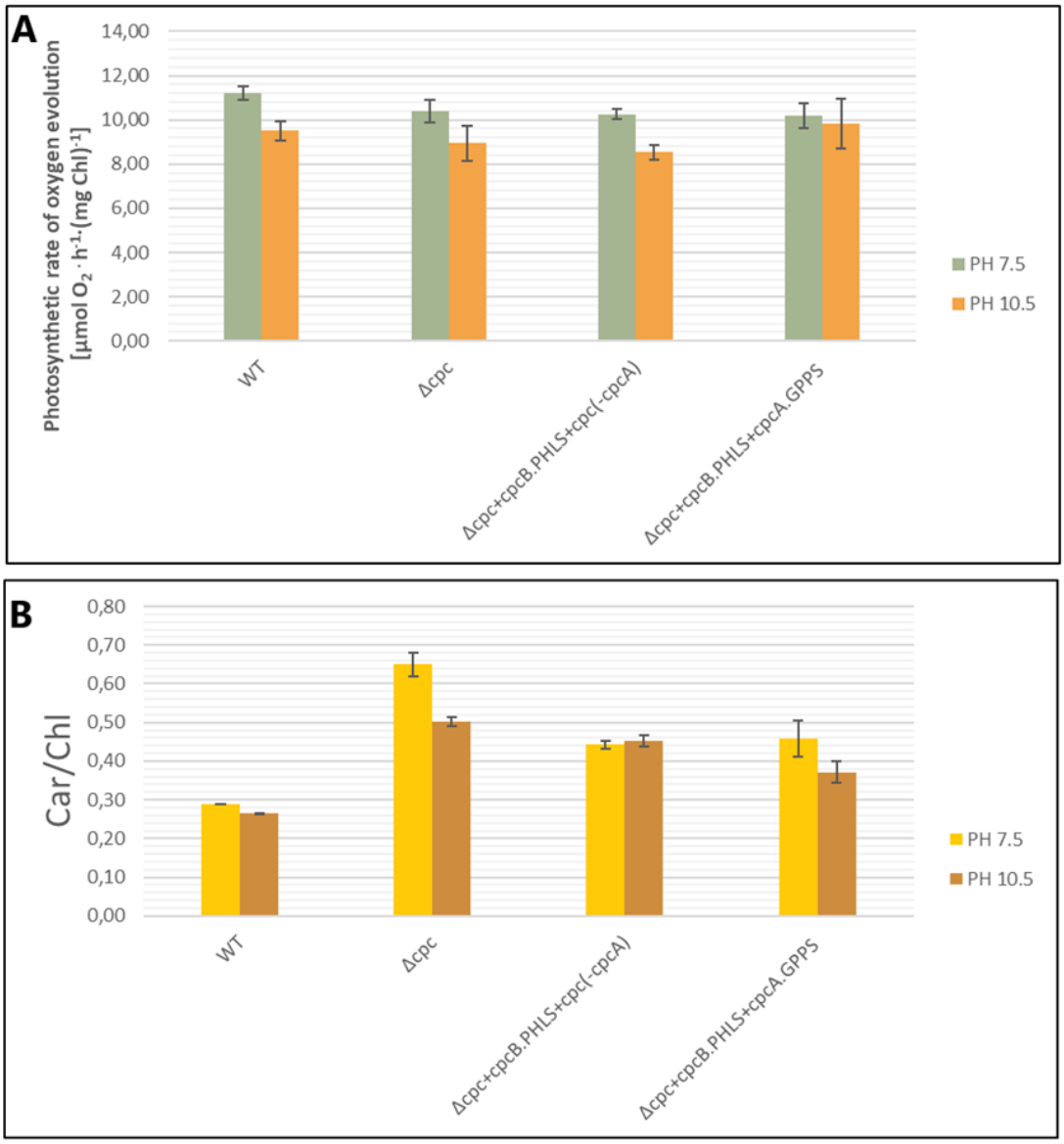
Στην παρούσα πειραματική σειρά πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη της ανάπτυξης, της λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και της ικανότητας παραγωγής του *β*-φελλανδρενίου των μεταλλαγμένων στελεχών *Synechocystis* σε pH 7,5 (φυσιολογικές συνθήκες, control) και pH 10,5. Ως ρυθμιστικό διάλυμα για το θρεπτικό μέσο BG11 στις καλλιέργειες με pH 10,5 χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα Na_2CO_3, συγκέντρωσης 25 mM.



Εικόνα 3.2. Α. Μετρήσεις οπτικής και πυκνότητας (OD730) και **Β.** αύξησης βιομάζας (DCW_f/DCW_i) που πραγματοποιήθηκαν έπειτα από χρονικό διάστημα 48 ωρών διεξαγωγής του πειράματος στους βιοαντιδραστήρες όγκου 100 mL υπό ένταση φωτονιακής

ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1}, θερμοκρασία 28 ^{o}C και υπό την παρουσία 20% v/v CO_2 με σκοπό να μελετηθεί η ανάπτυξη τους. Στην Εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα δύο διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης, σε θρεπτικό μέσο BG11 (control) και BG11-pH 10,5

Από τις μετρήσεις οπτικής πυκνότητας και ξηρής βιομάζας κυττάρων δεν παρατηρείται κάποια διαφοροποίηση στην ανάπτυξη των μεταλλαγμένων στελεχών Δcpc, Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) και Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS καθώς και του στελέχους αγρίου τύπου (WT) σε θρεπτικά μέσα με pH 7,5 και 10,5 όταν αυτά αναπτύσσονται στους ειδικούς βιοαντιδραστήρες υπό σταθερό φωτισμό 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1} στους 28°C και παρουσία 20% CO_2. Συνεπώς τα μεταλλαγμένα στελέχη, όπως και το στέλεχος αγρίου τύπου εμφάνισαν από κοινού την ικανότητα να αναπτύσσονται τόσο σε ουδέτερο όσο και σε αλκαλικό pH σε αυτότροφες συνθήκες.



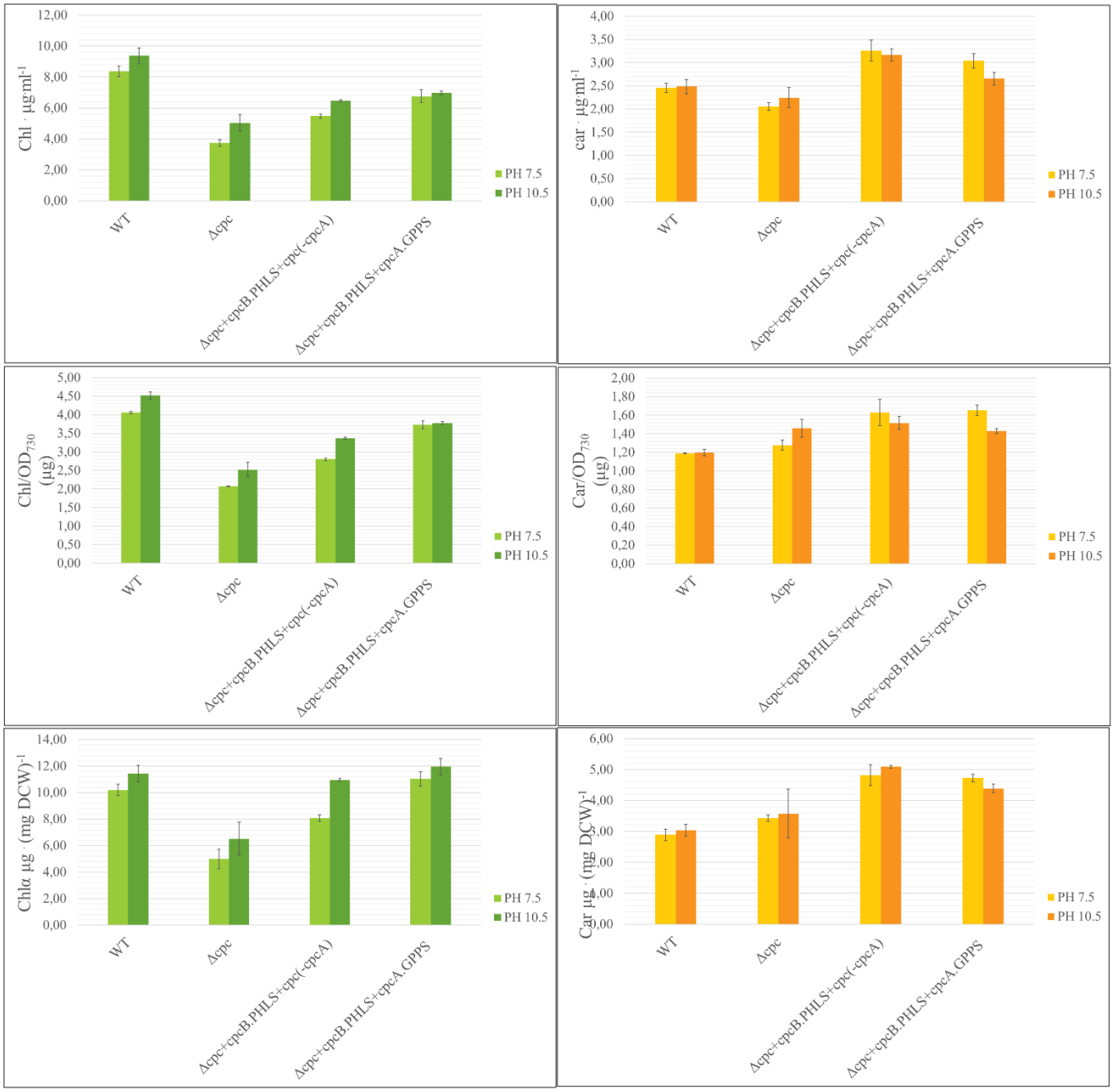
Εικόνα 3.3. Α. Αποτελέσματα φωτοσυνθετικού ρυθμού παραγωγής οξυγόνου. Οι μετρήσεις έγιναν πολαρογραφικά έπειτα από 48 ώρες ανάπτυξης των καλλιεργειών *Synechocystis* στους βιοαντιδραστήρες όγκου 100 mL υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1} θερμοκρασία 28ºC και υπό την παρουσία 20% v/v CO_2. **Β.** Λόγος καροτενοειδών προς χλωροφύλλη. Στην Εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα δύο διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης, σε θρεπτικό μέσο BG11 και BG11-pH 10,5.

Τα αποτελέσματα του φωτοσυνθετικού ρυθμού παραγωγής οξυγόνου υποδεικνύουν και αυτά πως η αλλαγή του pH από ουδέτερο σε αλκαλικό δεν επιφέρει αρνητικές επιπτώσεις στη φωτοσυνθετική τους δραστηριότητα.

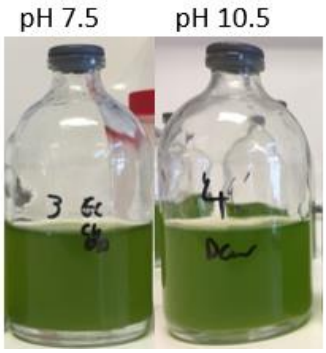
Σε αυτό συνηγορούν και τα αποτελέσματα ποσοτικού προσδιορισμού των φωτοσυνθετικών χρωστικών. Ο λόγος καροτενοειδών προς χλωροφύλλη-α είναι αυξημένος

στα μεταλλαγμένα στελέχη σε σχέση με τον άγριο τύπο. Μεταξύ των δύο τιμών pH δεν παρατηρείται όμως κάποια διαφοροποίηση (Εικόνα 3.4.B). Μακροσκοπικά αυτό φαίνεται και από το χρώμα των καλλιεργειών (Εικόνα 3.5).

Στην Εικόνα 3.4. οι χρωστικές έχουν εκφραστεί ως μg χρωστικής ανά mL, μg χρωστικής ανά DCW και μg χρωστικής ανά OD_{730}. Τα καροτενοειδή φαίνεται να μην επηρεάζονται καθόλου ενώ παρατηρείται ελαφρώς αυξημένο περιεχόμενο σε χλωροφύλλη-α (η οποία είναι και η ολική χλωροφύλλη στα *Synechocystis*) σε pH 10,5 σε όλα τα στελέχη. Συνεπώς το αλκαλικό pH δεν επηρέασε τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των μεταλλαγμάτων και του WT.



Εικόνα.3.4. Περιεχόμενο φωτοσυνθετικών χρωστικών των καλλιεργειών έπειτα από χρονικό διάστημα 48 ωρών διεξαγωγής του πειράματος στους βιοαντιδραστήρες όγκου 100 mL υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1}, θερμοκρασία 28ºC και υπό την παρουσία 20% v/v CO_2. Στην Εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα δύο διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης, σε θρεπτικό μέσο BG11 (control) και BG11-pH 10,5. Όλες οι χρωστικές εκφράστηκαν ως μg χρωστικής ανά mL καλλιέργειας, μg χρωστικής ανά OD_{730} και μg χρωστικής ανά mg DCW.



Εικόνα 3.5. Φωτογραφίες από τις καλλιέργειες του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS στους βιοαντιδραστήρες τη 2η πειραματική ημέρα (ημέρα συλλογής του β-φελλανδρενίου). Αριστερά καλλιέργεια μάρτυρας (BG11) και δεξιά καλλιέργεια σε θρεπτικό μέσο BG11-pH.

Όσον αφορά το παραγόμενο *β*-φελλανδρένιο τα αποτελέσματα ποσοτικοποίησης του παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1. Το προϊόν εκφράζεται ως μg ανά λίτρο καλλιέργειας, μg ανά mg χλωροφύλλης και mg ανά g DCW.

Πίνακας 3.10. Απόδοση του παραγόμενου *β*-φελλανδρενίου έπειτα από χρονικό διάστημα 48 ωρών διεξαγωγής του πειράματος στους βιοαντιδραστήρες (των 100 mL) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1}, θερμοκρασία 28ºC και υπό την παρουσία 20% v/v CO_2 των μεταλλαγμένων στελεχών Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) και Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μg *β*-φελλανδρενίου ανά λίτρο καλλιέργειας, μg *β*-φελλανδρενίου ανά mg χλωροφύλλης-α και mg *β*-φελλανδρενίου ανά g DCW (διαφοράς της ξηρής βιομάζας κυττάρων που συσσωρεύτηκε έπειτα από 48 ώρες με την αρχική όταν οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν στους βιοαντιδραστήρες).

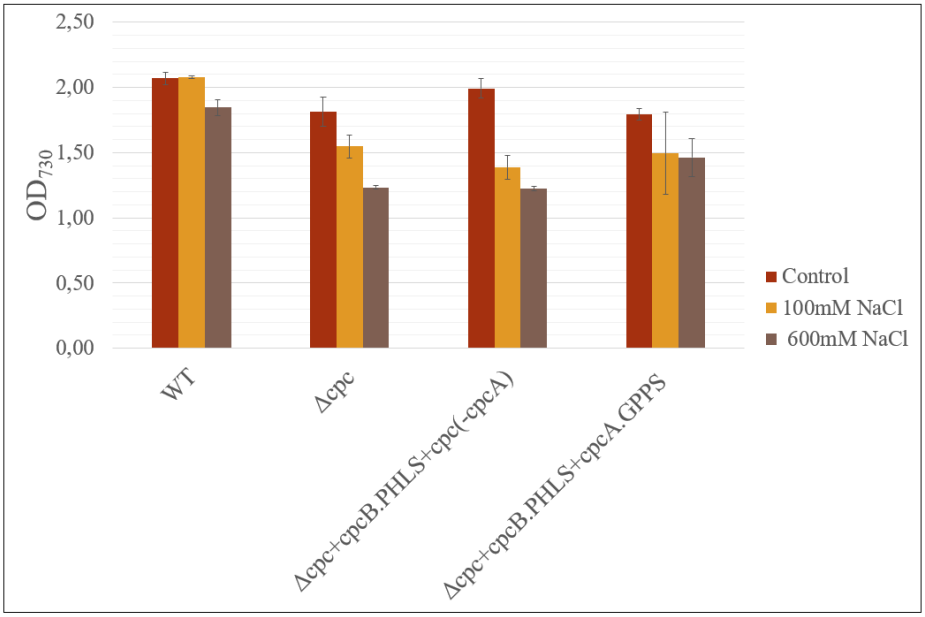
Στελέχη	***β*-PHL μg·(Lκαλλιέργειας)$^{-1}$**		***β*-PHL μg·(mg Chl)$^{-1}$**		***β*-PHL mg· (g DCW)$^{-1}$**	
	PH 7,5	**PH 10,5**	**PH 7,5**	**PH 10,5**	**PH 7,5**	**PH 10,5**
Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA)	123,22±6,33	117,78±16,56	22,79±1,25	20,50±0,5	0,47±0,03	0,48±0,03
Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS	107,6±9,46	121,79±31,02	26,65±2,35	22,21±2,04	0,42±0,03	0,47±0,04

Συνεπώς, από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει πως όλα τα μεταλλαγμένα στελέχη είναι ικανά να αναπτύσσονται και να παράγουν *β*-φελλανδρένιο σε αντίστοιχα επίπεδα τόσο σε ουδέτερο (7,5) όσο και αλκαλικό (10,5) pH στο σύστημα που μελετήθηκε. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με ήδη δημοσιευμένα αποτελέσματα για *SkIspS* μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis* που παράγουν ισοπρένιο [161].

3.4.2 Μελέτη της επίδρασης της αλατότητας σε pH 7,5 στην ετερόλογη παραγωγή του β-φελλανδρενίου

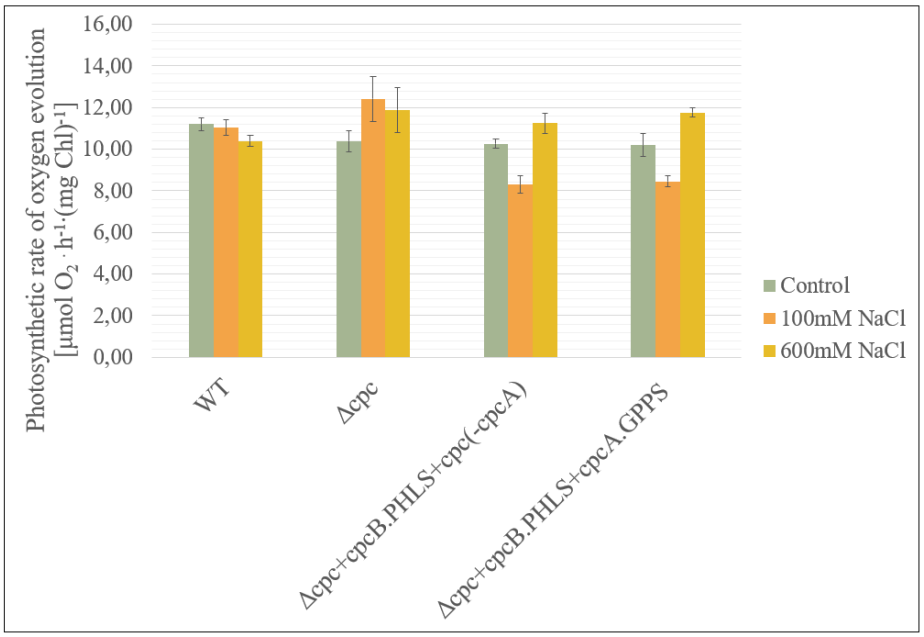
Στη συγκεκριμένη πειραματική σειρά μελετήθηκε η επίδραση της αλατότητας (100 και 600 mM) σε θρεπτικό μέσο με pH 7,5 στην ανάπτυξη, τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και την ικανότητα παραγωγής *β*-φελλανδρενίου στα μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis*. Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων ανάπτυξης και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού με τα αποτελέσματα του στελέχους αγρίου τύπου. Ως καλλιέργεια μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο BG11 χωρίς επιπλέον προσθήκη NaCl.

Στην παρούσα πειραματική σειρά, δεν ήταν δυνατό να μετρηθεί η ξηρή βιομάζα κυττάρων διότι οι υψηλές συγκεντρώσεις NaCl συνεισέφεραν στο DCW. Για το λόγο αυτό η ανάπτυξη μελετήθηκε μόνο με μετρήσεις οπτικής πυκνότητας στα 730.



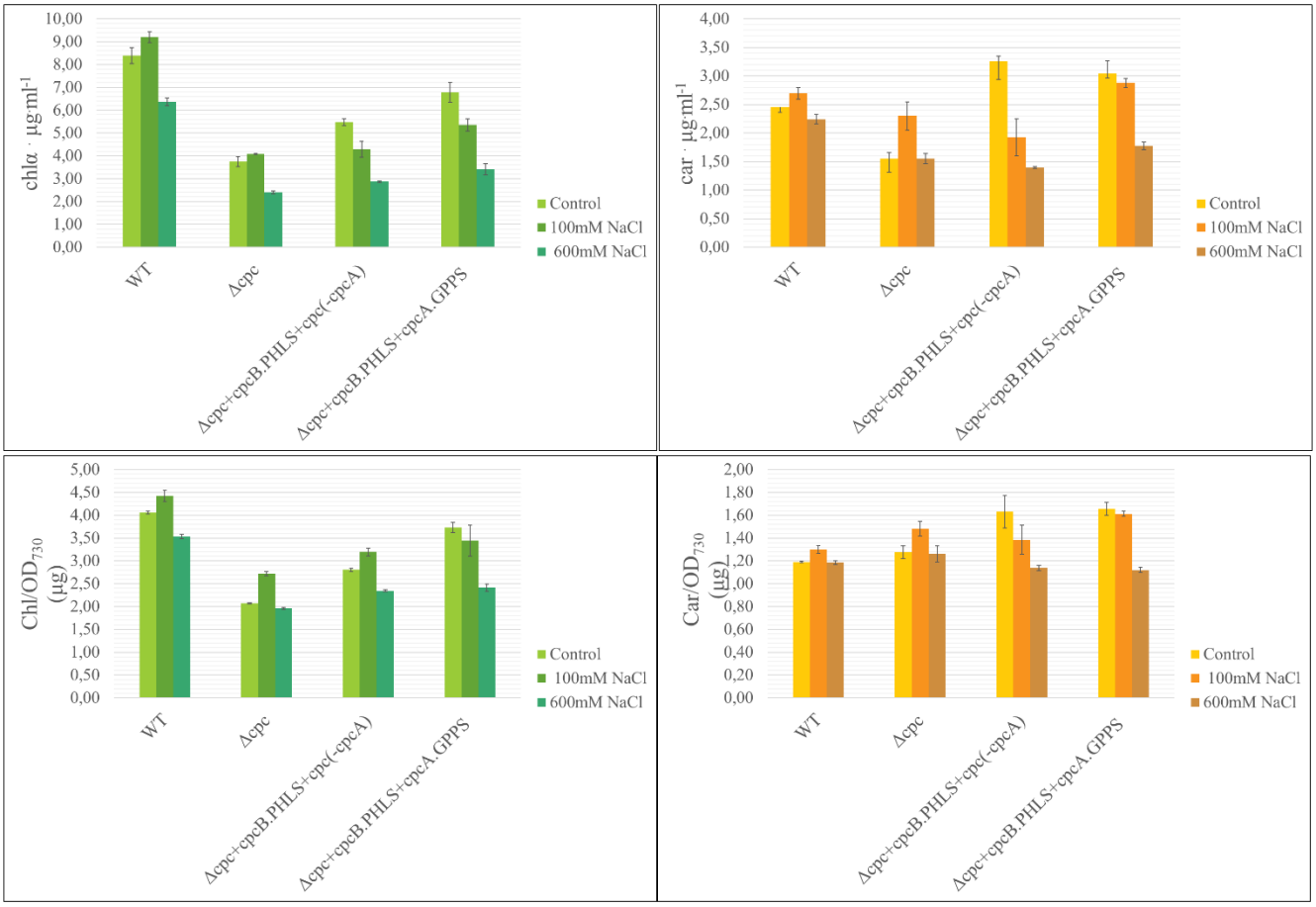
Εικόνα 3.6. Μετρήσεις οπτικής και πυκνότητας (OD_{730}) πραγματοποιήθηκαν έπειτα από χρονικό διάστημα 48 ωρών διεξαγωγής του πειράματος στους βιοαντιδραστήρες όγκου 100 mL υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1}, θερμοκρασία 28ºC και υπό την παρουσία 20% v/v CO_2 με σκοπό να μελετηθεί η ανάπτυξη τους. Στην Εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τριών διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης, σε θρεπτικό μέσο BG11 (control) , BG11+100 mM NaCl και BG11+600 mM NaCl.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της οπτικής πυκνότητας, η ανάπτυξη των κυττάρων παρουσία 100 mM NaCl ήταν παρόμοια με αυτή των καλλιεργειών μάρτυρα (απουσία NaCl) στα περισσότερα στελέχη. Παρουσία όμως 600 mM NaCl παρατηρείται μειωμένη ανάπτυξη των στελεχών. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως τα μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis* όπως και το στέλεχος αγρίου τύπου μπορούν και αναπτύσσονται σε συνθήκες αλατότητας, παραπάνω από τις φυσιολογικές, όταν καλλιεργούνται στους ειδικούς βιοαντιδραστήρες.



Εικόνα 3.7. Αποτελέσματα φωτοσυνθετικού ρυθμού παραγωγής οξυγόνου. Οι μετρήσεις έγιναν πολαρογραφικά έπειτα από χρονικό διάστημα 48 ωρών διεξαγωγής του πειράματος στους βιοαντιδραστήρες όγκου 100 mL υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1}, θερμοκρασία 28°C και υπό την παρουσία 20% v/v CO_2. Στην Εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τριών διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης, σε θρεπτικό μέσο BG11 (control) , BG11+100 mM NaCl και BG11+600 mM NaCl.

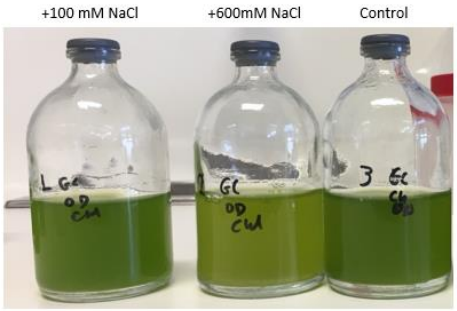
Όπως προκύπτει από τα αποτελέσματα του φωτοσυνθετικού ρυθμού παραγωγής οξυγόνου η υψηλότερη αλατότητα δεν επηρέασε τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα των μεταλλαγμένων στελεχών *Synechocystis* και του στελέχους WT (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.8. Περιεχόμενο φωτοσυνθετικών χρωστικών των καλλιεργειών *Synechocystis* έπειτα από χρονικό διάστημα 48 ωρών διεξαγωγής του πειράματος στους βιοαντιδραστήρες όγκου 100 mL υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1}, θερμοκρασία 28ºC και υπό την παρουσία 20% v/v CO_2. Στην Εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τριών διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης, σε θρεπτικό μέσο BG11 (control), BG11+100 mM NaCl και BG11+600 mM NaCl. Όλες οι χρωστικές εκφράστηκαν ως μg χρωστικής ανά mL καλλιέργειας και μg χρωστικής ανά OD_{730}.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα του περιεχομένου των φωτοσυνθετικών χρωστικών ακολουθείται το ίδιο μοτίβο με τα αποτελέσματα ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα των χρωστικών εκφράστηκαν ως μg χρωστικής ανά μL καλλιέργειας και μg χρωστικής ανά OD_{730} εξαιτίας του γεγονότος ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις NaCl δεν επέτρεψαν τον προσδιορισμό της ξηρής βιομάζας κυττάρων μιας και το άλας βρέθηκε να συνεισφέρει στην προσδιοριζόμενη μάζα κατά την ξήρανση (Εικόνα 3.8). Οι ποσότητες χλωροφύλλης και καροτενοειδών βρέθηκαν να μην επηρεάζονται σημαντικά κατά την προσθήκη 100 mM NaCl ενώ αντίθετα εμφάνισαν μείωση παρουσία 600 mM.

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτυπώνονται και στο χρώμα των καλλιεργειών στις συνθήκες αυτές όπου η καλλιέργεια σε θρεπτικό μέσο με 100 mM NaCl εμφανίζει ίδιο χρώμα με την καλλιέργεια μάρτυρα, ενώ καλλιέργεια σε θρεπτικό μέσο με 600 mM NaCl εμφανίζει λιγότερο έντονο πράσινο χρώμα σε σχέση με τις άλλες δύο συνθήκες (Εικόνα 3.9). Η διαφορά του χρώματος της καλλιέργειας σε θρεπτικό μέσο BG11 με 600 mM NaCl σε σχέση με τις άλλες δύο καλλιέργειες οφείλεται στη μικρότερη ανάπτυξη και περιεχόμενο χλωροφύλλης των κυττάρων.



Εικόνα 3.9. Φωτογραφίες από τις καλλιέργειες του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS στους βιοαντιδραστήρες τη 2η πειραματική ημέρα (ημέρα συλλογής του *β*-φελλανδρενίου). Αριστερά καλλιέργεια σε θρεπτικό μέσο BG11 με προσθήκη 100 mM NaCl, στη μέση καλλιέργεια σε θρεπτικό μέσο BG11 με προσθήκη 600 mM NaCl και δεξιά καλλιέργεια μάρτυρας (BG11).

Πίνακας 3.2. Απόδοση του παραγόμενου *β*-φελλανδρενίου έπειτα από χρονικό διάστημα 48 ωρών διεξαγωγής του πειράματος στους βιοαντιδραστήρες (των 100 mL) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1}, θερμοκρασία 28ºC και υπό την παρουσία 20% v/v CO_2 των μεταλλαγμένων στελεχών Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) και Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τριών διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης, σε θρεπτικό μέσο BG11 (control), BG11+100 mM NaCl και BG11+600 mM NaCl.Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μg *β*-φελλανδρενίου ανά λίτρο καλλιέργειας και μg *β*-φελλανδρενίου ανά mg χλωροφύλλης-α.

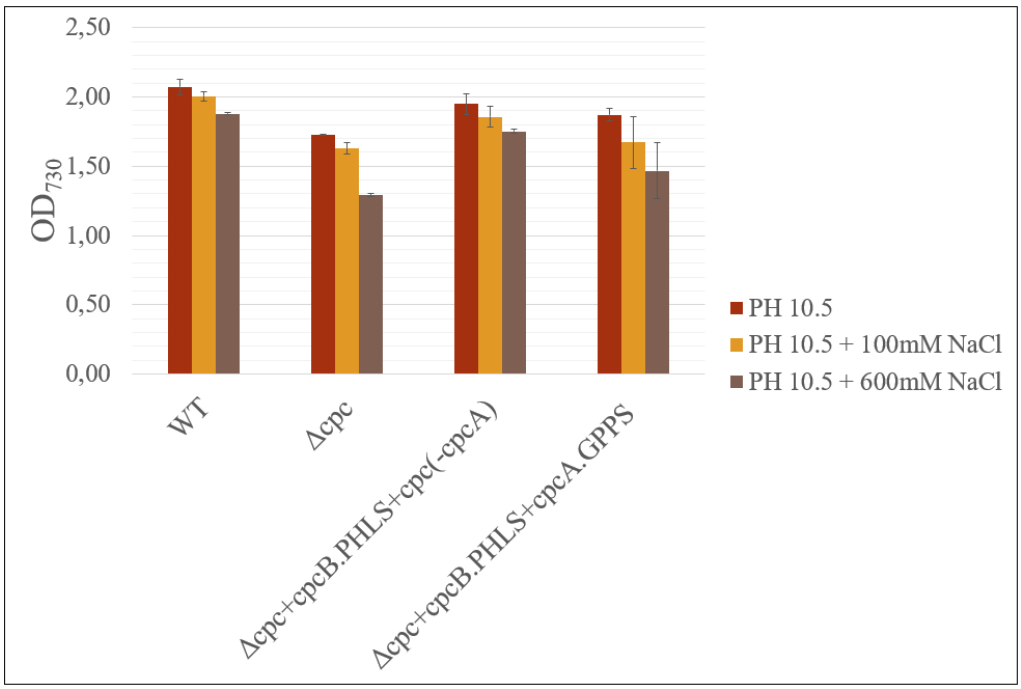
Στελέχη	***β*-PHL μg · (Lκαλλιέργειας)$^{-1}$**			***β*-PHL μg · (mg Chl) $^{-1}$**		
	Control	**100mM NaCl**	**600mM NaCl**	**Control**	**100mM NaCl**	**600mM NaCl**
Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA)	123,22±6,33	44,78±3,68	22,39±0,52	22,79±1,25	10,46±0,86	7,8±0,18
Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS	107,6±9,46	70,55±0,36	33,06±2,74	26,65±2,35	17,73±0,43	9,39±1,72

Τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.2 υποδηλώνουν μειωμένη παραγωγή *β*-φελλανδρενίου σε αυξημένη αλατότητα. Παρόλα αυτά αξίζει να σημειωθεί ότι τα κύτταρα διατήρησαν την ικανότητα παραγωγής του *β*-φελλανδρενίου στις συνθήκες αυτές, οι οποίες διαφέρουν αρκετά από τις φυσιολογικές στις οποίες αναπτύσσονται.

Το σύνολο των αποτελεσμάτων αυτών δείχνει πως η υψηλότερη αλατότητα στο θρεπτικό μέσω των καλλιεργειών δεν παρεμποδίζει την ικανότητα των μεταλλαγμένων στελεχών Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) και Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS να παράγουν *β*-φελλανδρένιο. Επίσης, όλα τα στελέχη ήταν εξίσου υγιή απουσία ή παρουσία 100 mM ή 600 mM NaCl σε θρεπτικό μέσο BG11 όταν καλλιεργήθηκαν σε ειδικούς βιοαντιδραστήρες, εφόσον δεν επηρεάστηκε σημαντικά η ανάπτυξη τους και η λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού τους.

3.4.3 Μελέτη της επίδρασης της αλατότητας σε pH 10,5 στην ετερόλογη παραγωγή του β-φελλανδρενίου

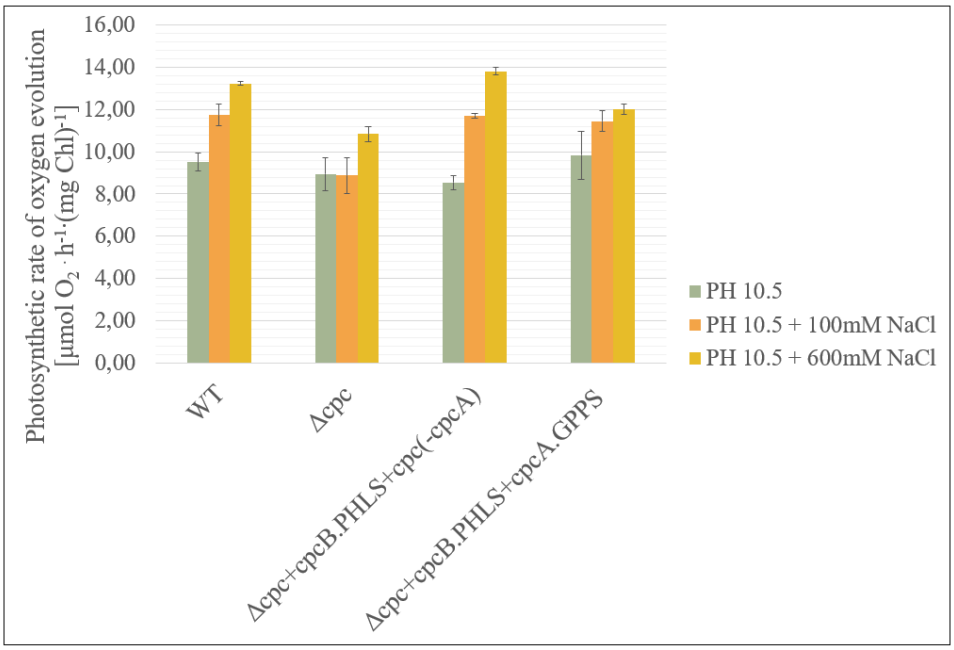
Από τα μέχρι τώρα αποτελέσματα προέκυψε πως τα μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis* είναι ικανά να αναπτύσσονται, να πραγματοποιούν φωτοσύνθεση και να παράγουν *β*-φελλανδρένιο τόσο σε θρεπτικό μέσο BG11 με αλκαλικό pH όσο και με υψηλή αλατότητα (10,5). Στην παρούσα πειραματική σειρά εξετάστηκε η επίδραση που έχει η συνδυαστική τροποποίηση δύο συνθηκών στο θρεπτικό μέσο BG11, η υψηλότερη αλατότητα και το αλκαλικό pH, στην ανάπτυξη, τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και την ικανότητα παραγωγής *β*-φελλανδρενίου στα μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis*. Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων ανάπτυξης και λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού με τα αποτελέσματα του στελέχους αγρίου τύπου. Οι δύο πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν ήταν 100 mM NaCl σε BG11 με pH 10,5 και 600 mM NaCl σε BG11 με pH 10,5. Η τελευταία συνθήκη προσομοιάζει τις συνθήκες του θαλασσινού νερού [161]. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες οι οποίες αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό μέσο BG11 με pH 10,5 χωρίς επιπλέον προσθήκη NaCl. Όπως προέκυψε από τα παραπάνω αποτελέσματα οι καλλιέργειες σε θρεπτικό μέσο BG11 με pH 10,5 είχαν αντίστοιχη συμπεριφορά με τις καλλιέργειες μάρτυρα σε θρεπτικό μέσο BG11.



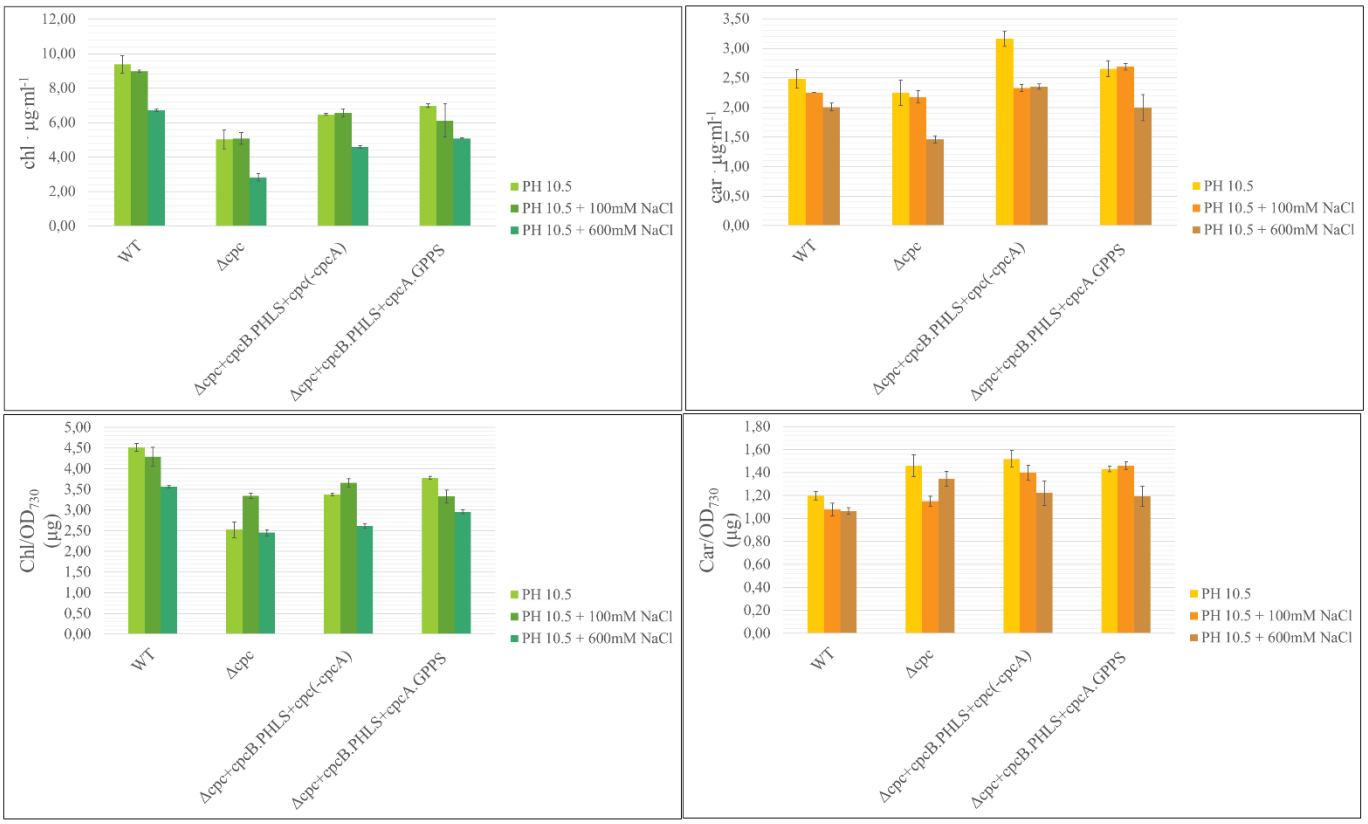
Εικόνα 3.10. Μετρήσεις οπτικής και πυκνότητας (OD_{730}) πραγματοποιήθηκαν έπειτα από χρονικό διάστημα 48 ωρών διεξαγωγής του πειράματος στους βιοαντιδραστήρες όγκου 100 mL υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1}, θερμοκρασία 28ºC και υπό την παρουσία 20% v/v CO_2 με σκοπό να μελετηθεί η ανάπτυξη τους. Στην Εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τριών διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης, σε θρεπτικό μέσο BG11-pH 10,5 (control), BG11-pH 10,5+100 mM NaCl και BG11-pH 10,5+600 mM NaCl.

Στην παρούσα πειραματική σειρά, όπως και στην προηγούμενη, δεν ήταν δυνατό να μετρηθεί η ξηρή βιομάζα κυττάρων. Για το λόγο αυτό η ανάπτυξη μελετήθηκε μόνο με μετρήσεις οπτικής πυκνότητας στα 730 (OD_{730}). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, η ανάπτυξη των κυττάρων σε pH 10,5 και παρουσία 100 mM NaCl ήταν παρόμοια με αυτή των καλλιεργειών μάρτυρα, σε pH 10,5 και απουσία NaCl. Παρουσία όμως 600 mM NaCl παρατηρείται μία μικρή μείωση, της τάξης του 10 % περίπου, στην ανάπτυξη των στελεχών. Συνεπώς τα μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis* όπως και το στέλεχος αγρίου τύπου μπορούν και αναπτύσσονται φυσιολογικά σε συνθήκες υψηλής αλατότητας και αλκαλικότητας ταυτόχρονα, όταν καλλιεργούνται στους ειδικούς βιοαντιδραστήρες.

Όσο αφορά τα αποτελέσματα του φωτοσυνθετικού ρυθμού παραγωγής οξυγόνου ακολουθείται μία αυξητική τάση με αύξηση της αλατότητας στο θρεπτικό μέσο (Εικόνα 3.11). Για να εξηγηθεί η τάση αυτή χρειάζεται περισσότερη έρευνα.



Εικόνα 3.11. Αποτελέσματα φωτοσυνθετικού ρυθμού παραγωγής οξυγόνου. Οι μετρήσεις έγιναν πολαρογραφικά έπειτα από χρονικό διάστημα 48 ωρών διεξαγωγής του πειράματος στους βιοαντιδραστήρες όγκου 100 mL υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1}, θερμοκρασία 28ºC και υπό την παρουσία 20% v/v CO_2. Στην Εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τριών διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης, σε θρεπτικό μέσο BG11-pH 10,5 (control), BG11-pH 10,5+100 mM NaCl και BG11-pH 10,5+600 mM NaCl.

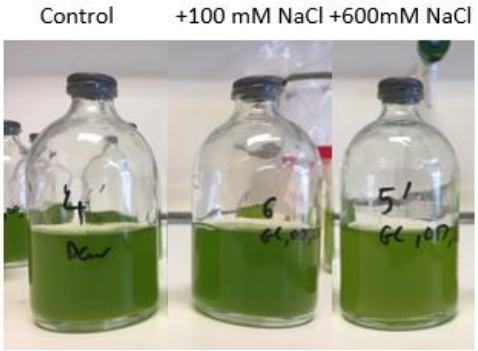


Εικόνα 3.12. Περιεχόμενο φωτοσυνθετικών χρωστικών των καλλιεργειών *Synechocystis* από χρονικό διάστημα 48 ωρών διεξαγωγής του πειράματος στους βιοαντιδραστήρες όγκου 100 mL υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol·φωτονίων $m^{-2}s^{-1}$, θερμοκρασία 28°C και υπό την παρουσία 20% v/v CO_2. Στην Εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τριών διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης, σε θρεπτικό μέσο BG11-pH 10,5 (control), BG11-pH 10,5+100 mM NaCl και BG11-pH 10,5+600 mM NaCl. Όλες οι χρωστικές εκφράστηκαν ως μg χρωστικής ανά mL καλλιέργειας και μg χρωστικής ανά OD_{730}.

Τα αποτελέσματα του περιεχομένου των φωτοσυνθετικών χρωστικών ακολουθούν το ίδιο μοτίβο με τα αποτελέσματα ανάπτυξης. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω λόγω του ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις NaCl συνεισέφεραν στη ξηρή βιομάζα κυττάρων, τα αποτελέσματα των χρωστικών εκφράστηκαν ως μg χρωστικής ανά μL καλλιέργειας και μg χρωστικής ανά OD_{730}. Τόσο η χλωροφύλλη όσο και τα καροτενοειδή δεν επηρεάζονται σημαντικά σε παρουσία 100 mM NaCl σε pH 10,5. Όμως παρουσία 600 mM NaCl παρατηρείται μία μικρή μείωση στο περιεχόμενο της χλωροφύλλης και των καροτενοειδών.

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτυπώνονται και στη μακροσκοπική Εικόνα των καλλιεργειών στις συνθήκες αυτές όπου η καλλιέργεια που καλλιεργήθηκε σε θρεπτικό μέσο με 100 mM NaCl εμφανίζει ίδιο χρώμα με την καλλιέργεια μάρτυρα, ενώ καλλιέργεια σε

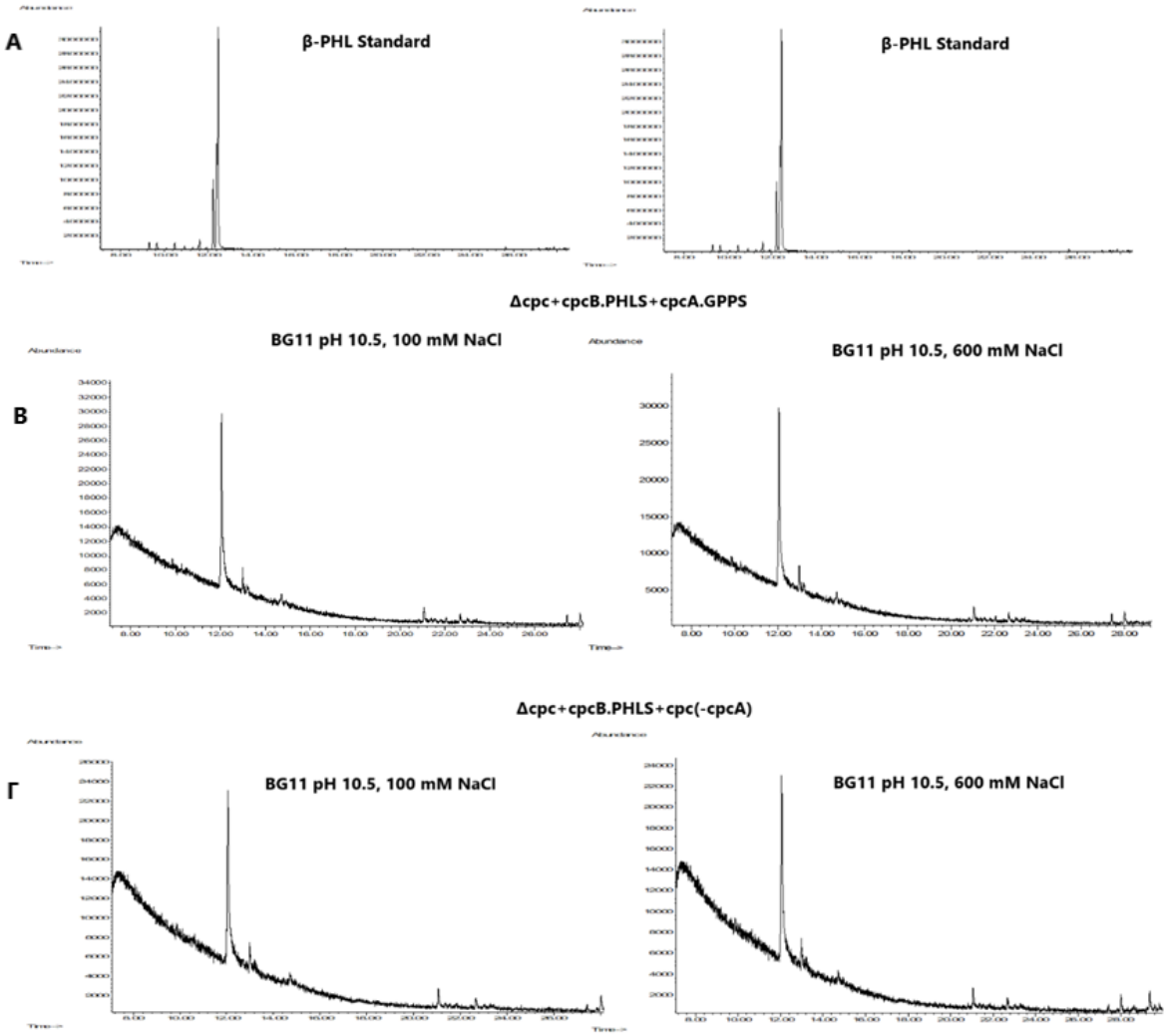
θρεπτικό μέσο με 600 mM NaCl εμφανίζει λιγότερο έντονο πράσινο χρώμα σε σχέση με τις άλλες δύο συνθήκες.



Εικόνα 3.13. Φωτογραφίες από τις καλλιέργειες του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS στους βιοαντιδραστήρες τη 2η πειραματική ημέρα (ημέρα συλλογής του *β*-φελλανδρενίου). Αριστερά καλλιέργεια μάρτυρας (BG11-pH 10,5) στη μέση καλλιέργεια σε θρεπτικό μέσο BG11-pH 10,5 με προσθήκη 100 mM NaCl και δεξιά καλλιέργεια σε θρεπτικό μέσο BG11-pH 10,5 με προσθήκη 600 mM NaCl.

Όπως παρουσιάζεται από τα χρωματογραφικά προφίλ που λήφθηκαν μέσω της μεθόδου της αέριας χρωματογραφίας στην Εικόνα 3.14, δεν επηρεάζεται η ικανότητα των μεταλλαγμένων στελεχών να παράγουν *β*-φελλανδρένιο σε συνθήκες υψηλής αλατότητας (100 και 600 mM NaCl) σε τιμή pH 10,5. Τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.3 υποδηλώνουν μειωμένη παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του NaCl. Όμως αξίζει να σημειωθεί ότι εξακολουθούν και παράγουν το προϊόν.

Το σύνολο των αποτελεσμάτων αυτών ακολουθεί αντίστοιχο μοτίβο με τα αποτελέσματα της προσθήκης NaCl σε θρεπτικό μέσο με pH 7,5. Επιπλέον από τα αποτελέσματα παρουσιάζεται πως ο συνδυασμός αλκαλικότητας και αλατότητας δεν επηρεάζει την ικανότητα των μεταλλαγμένων στελεχών Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) και Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS να παράγουν *β*-φελλανδρένιο. Επίσης, όλα τα στελέχη δεν εμφάνισαν σημαντική αναστολή στις εξεταζόμενες παραμέτρους. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες στελεχών *Synechocystis* για την παραγωγή ισοπρενίου σε συνδυασμό δύο διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης αλκαλικότητα και υψηλή αλατότητα [161].



Εικόνα 3.14. Χρωματογραφικά προφίλ που λήφθηκαν μέσω της μεθόδου της αέριας χρωματογραφίας των εκχυλισμάτων εξανίου. **Α.** Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα του πρότυπου του *β*-φελλανδρενίου. **Β.** Το χρωματογράφημα των δείγματα που εκχυλίστηκαν από το μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS σε θρεπτικό μέσο BG11-pH 10,5+100 mM NaCl (αριστερά) και σε θρεπτικό μέσο BG11-pH 10,5+600 mM NaCl (δεξιά). **Γ.** Το χρωματογράφημα των δείγματα που εκχυλίστηκαν από το μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) σε θρεπτικό μέσο BG11-pH 10,5+100 mM NaCl (αριστερά) και σε θρεπτικό μέσο BG11-pH 10,5+600 mM NaCl (δεξιά).

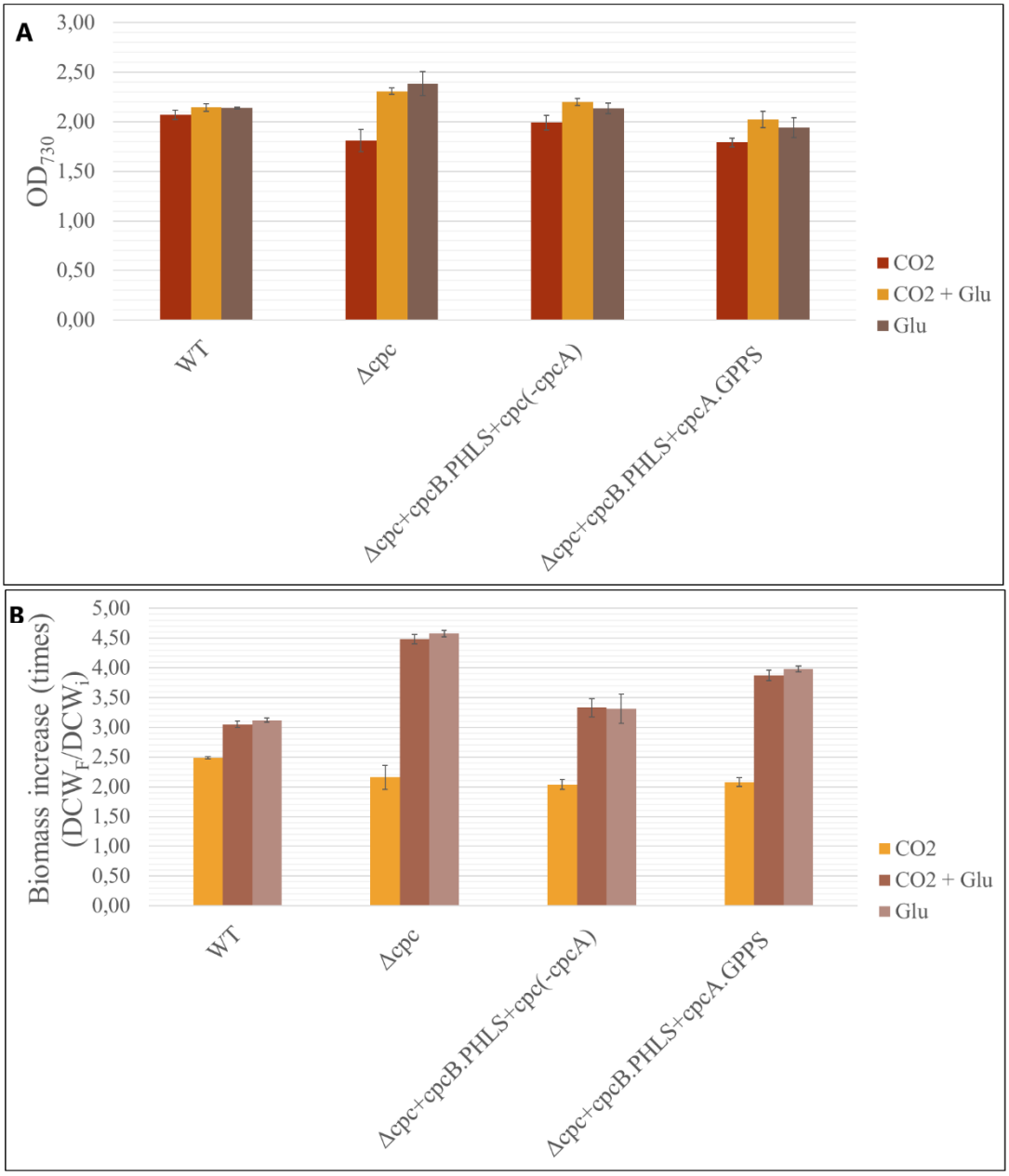
Πίνακας 3.3. Απόδοση του παραγόμενου *β*-φελλανδρενίου έπειτα από χρονικό διάστημα 48 ωρών διεξαγωγής του πειράματος στους βιοαντιδραστήρες όγκου 100 mL υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1}, θερμοκρασία 28ºC και υπό την παρουσία 20% v/v CO_2 των μεταλλαγμένων στελεχών Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) και Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τριών διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης, σε θρεπτικό μέσο BG11-pH 10,5 (control), BG1-pH 10,5+100 mM NaCl και BG11-pH 10,5+600 mM NaCl. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μg *β*-φελλανδρενίου ανά λίτρο καλλιέργειας και μg *β*-φελλανδρενίου ανά mg χλωροφύλλης-α.

Στελέχη	***β*-PHL μg·(Lκαλλιέργειας)$^{-1}$**			***β*-PHL μg·(mg Chl)$^{-1}$**		
	PH 10.5	**PH 10.5 +100mM NaCl**	**PH 10.5 + 600mM NaCl**	**PH 10,5**	**PH 10.5 + 100mM NaCl**	**PH 10.5 + 600mM NaCl**
Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA)	117,78±16,56	79,31±3,19	51,49±2,03	20,50±0,5	12,42±1,93	10,78±1,76
Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS	121,79±31,02	69,51±1,84	21,14±1,41	22,21±2,04	10,53±1,70	3,61±0,4

3.4.4 Μελέτη της επίδρασης της παρουσίας εναλλακτικής πηγής άνθρακα στην ετερόλογη παραγωγή του β-φελλανδρενίου

Όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή του συγκεκριμένου κεφαλαίου η παραγωγή βιο-προϊόντων από τα *Synechocystis* συχνά συνδέεται με τη μεγάλη ανάπτυξη βιομάζας. Επίσης είναι γνωστό ότι τα *Synechocystis* εμφανίζουν αρκετά ευέλικτο μεταβολισμό του άνθρακα. Μπορούν να αναπτυχθούν σε φωτοαυτότροφες, μιξότροφες και ετερότροφες συνθήκες. Μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες που προκύπτουν από ετερότροφες και μιξότροφες συνθήκες μπορούν να οδηγήσουν σε υψηλότερης κυτταρικής πυκνότητας καλλιέργειες και συνεπώς σε αύξηση της απόδοσης του παραγόμενου προϊόντος [172].

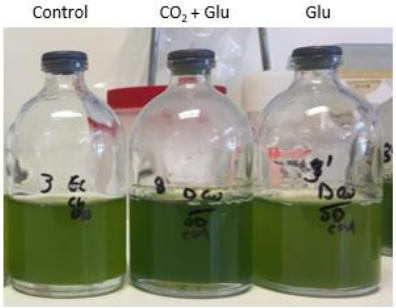
Στην παρούσα πειραματική σειρά εξετάστηκε η επίδραση που έχει η παρουσία εναλλακτικής πηγής άνθρακα (γλυκόζη) στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας στην ανάπτυξη, τη λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού αλλά και την ικανότητα των μεταλλαγμένων στελεχών να παράγουν *β*-φελλανδρένιο. Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν στους βιοαντιδραστήρες για 48 ώρες σε φωτοαυτότροφες (καλλιέργεια μάρτυρας), σε μιξότροφες [προσθήκη 10% (v/v) CO_2 και 5 mM γλυκόζη] και ετερότροφες συνθήκες (5 mM γλυκόζη) σε φωτισμό 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1} στους 28 ºC.



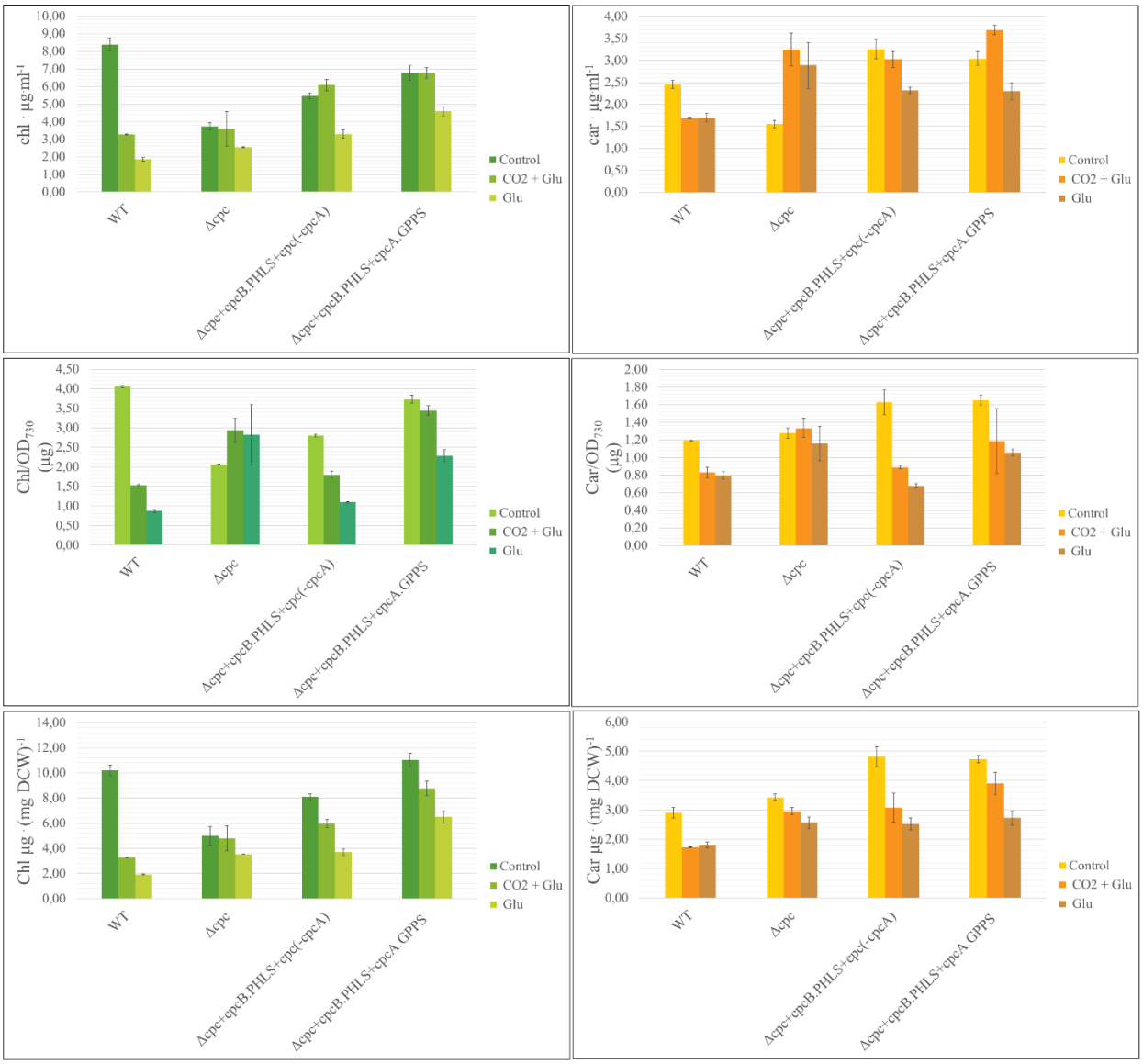
Εικόνα 3.15. Α. Μετρήσεις οπτικής και πυκνότητας (OD_{730}) και **Β.** Αύξησης βιομάζας (DCW_f/DCW_i) πραγματοποιήθηκαν έπειτα από χρονικό διάστημα 48 ωρών διεξαγωγής του πειράματος στους βιοαντιδραστήρες (των 100 mL) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1} και θερμοκρασία 28ºC με σκοπό να μελετηθεί η ανάπτυξη τους. Στην Εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τριών διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης, φωτοαυτότροφες συνθήκες [Control: 20% (v/v) CO_2], μιξότροφες συνθήκες [CO_2+Glu: 10% (v/v) CO_2 +5 mM γλυκόζης] και ετερότροφες συνθήκες (Glu: 5 mM γλυκόζης).

Τα αποτελέσματα μέτρησης της οπτικής πυκνότητας στα 730 nm και τα αποτελέσματα μέτρησης της ξηρής βιομάζας κυττάρων υποδηλώνουν εμφανώς μεγαλύτερη

ανάπτυξη σε μιξότροφες και ετερότροφες συνθήκες καλλιέργειας, συγκριτικά με τις φωτοαυτότροφες συνθήκες όπως ήταν αναμενόμενο [173, 174]. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο μεταβολισμός της γλυκόζης από τα *Synechocystis* δημιουργεί ένα περιβάλλον πλούσιο σε CO_2 που προωθεί την αυξημένη ανάπτυξη των κυανοβακτηρίων [175]. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με το χρώμα των καλλιεργειών όπου ειδικά σε μιξότροφες συνθήκες (παρουσία CO_2 και γλυκόζης) οι καλλιέργειες εμφανίζουν εντονότερο πράσινο χρώμα.



Εικόνα 3.16. Φωτογραφίες από τις καλλιέργειες του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS στους βιοαντιδραστήρες τη 2η πειραματική ημέρα (ημέρα συλλογής του β-φελλανδρενίου). Αριστερά καλλιέργεια μάρτυρας [20% (v/v) CO_2], στη μέση καλλιέργεια σε μιξότροφες συνθήκες [10% (v/v) CO_2+5 mM γλυκόζης] και δεξιά σε ετερότροφες συνθήκες (5 mM γλυκόζης).

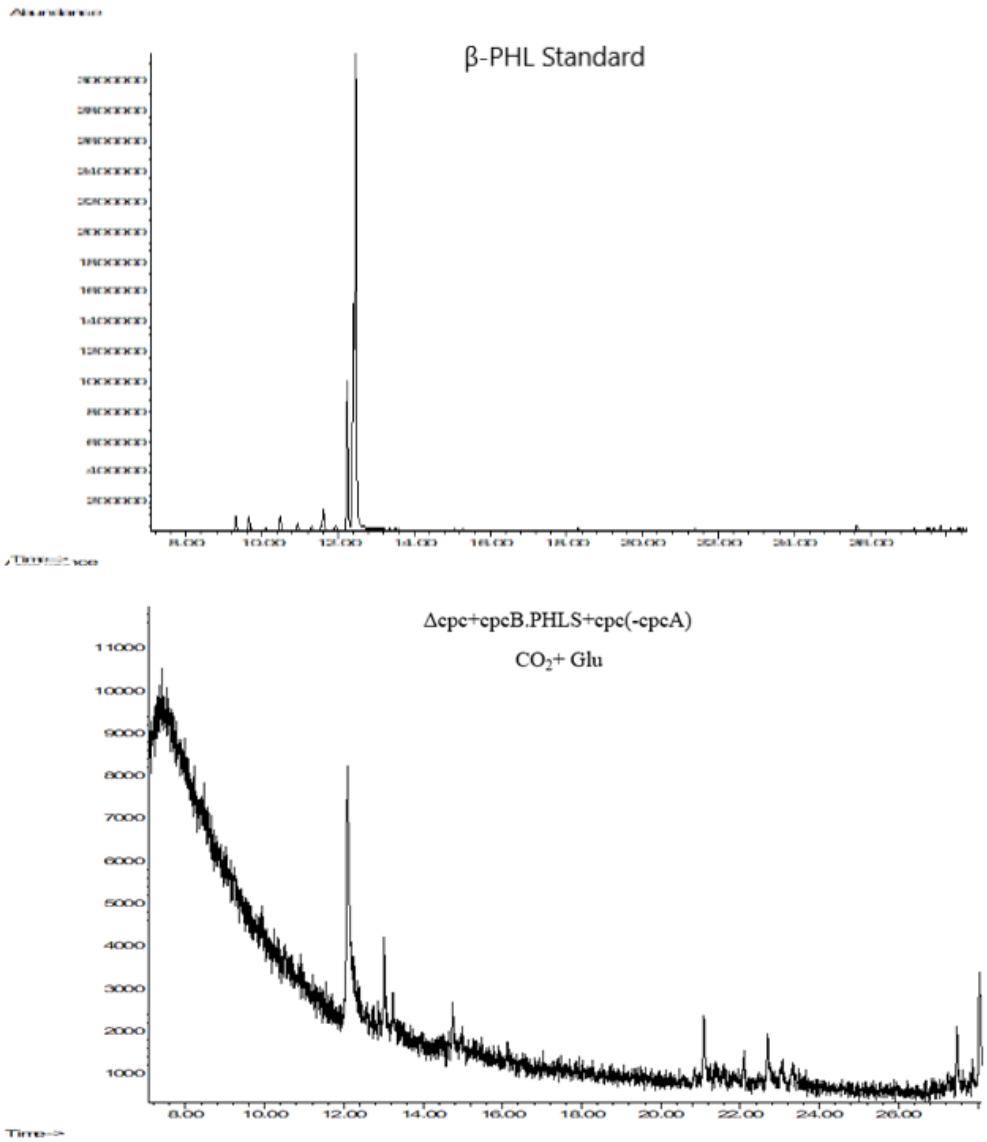


Εικόνα 3.17. Περιεχόμενο φωτοσυνθετικών χρωστικών των καλλιεργειών *Synechocystis* από χρονικό διάστημα 48 ωρών διεξαγωγής του πειράματος στους βιοαντιδραστήρες (των 100 mL) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol·φωτονίων $m^{-2}s^{-1}$, θερμοκρασία 28ºC. Στην Εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τριών διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης, φωτοαυτότροφες συνθήκες [Control: 20% (v/v) CO_2], μιξότροφες συνθήκες [CO_2+Glu:10% (v/v) CO_2 +5 mM γλυκόζης] και ετερότροφες συνθήκες (Glu: 5 mM γλυκόζης). Όλες οι χρωστικές εκφράστηκαν ως μg χρωστικής ανά mL καλλιέργειας και μg χρωστικής ανά OD_{730}.

Όσον αφορά στα αποτελέσματα των χρωστικών εκφράστηκαν ως μg χρωστικής ανά μL καλλιέργειας, μg χρωστικής ανά OD_{730}, μg χρωστικής ανά mg DCW. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν αρκετά χαμηλότερο περιεχόμενο σε χλωροφύλλη και καροτενοειδή σε ετερότροφες συνθήκες. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι υπάρχει μία μείωση στη σύνθεση των χλωροφυλλών εφόσον η φωτοσύνθεση αναστέλλεται και ο άνθρακας με την οργανική του μορφή ενσωματώνεται από τη γλυκόζη [175, 176]. Αυτό αναγκάζει τα μικροφύκη να προσαρμοστούν σε αυτό το είδος αφομοίωσης του άνθρακα όπου η σύνθεση της αχρησιμοποίητης χλωροφύλλης ρυθμίζεται να υπολειτουργεί για λόγους διατήρησης της ενέργειας. Ως εκ τούτου, αρχίζει η βιοαποικοδόμηση της χλωροφύλλης σε ετερότροφες καλλιέργειες ως ρύθμιση του μεταβολισμού [175, 177, 178].

Στις μιξότροφες και ετερότροφες συνθήκες ανάπτυξης δεν ήταν δυνατόν να πραγματοποιηθούν μετρήσεις φωτοσυνθετικού ρυθμού παραγωγής οξυγόνου, διότι το ηλετρόδιο τύπου Clark δεν σταθεροποιούταν. Ένας πιθανός λόγος, πέρα του ότι αναστέλλεται η φωτοσύνθεση σε ετερότροφες συνθήκες, ίσως να είναι ότι το παραγόμενο CO_2 κατά το μεταβολισμό της γλυκόζης δρα ανασταλτικά για το ηλεκτρόδιο οξυγόνου.

Τα αποτελέσματα της αέριας χρωματογραφίας (Εικόνα 3.18) δείχνουν ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis* είναι ικανά να παράγουν *β*-φελλανδρένιο σε μιξότροφες και ετερότροφες συνθήκες, με αρκετά χαμηλότερη όμως απόδοση όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα ποσοτικοποίησης στον Πίνακα 3.4.



Εικόνα 3.18. Χρωματογραφικό προφίλ που λήφθηκε μέσω της μεθόδου της αέριας χρωματογραφίας των εκχυλισμάτων εξανίου. **Πάνω:** Παρουσιάζεται το χρωματογράφημα του πρότυπου του *β*-φελλανδρενίου. **Κάτω:** Το χρωματογράφημα του δείγματος που εκχυλίστηκε από το μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS σε μιξότροφες συνθήκες [CO_2+Glu:10% (v/v) CO_2 +5 mM γλυκόζης].

Πίνακας 3.4. Απόδοση του παραγόμενου *β*-φελλανδρενίου έπειτα από χρονικό διάστημα 48 ωρών διεξαγωγής του πειράματος στους βιοαντιδραστήρες (των 100 mL υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων·$m^{-2}s^{-1}$, θερμοκρασία 28ºC των μεταλλαγμένων στελεχών Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) και Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τριών διαφορετικών συνθηκών ανάπτυξης, φωτοαυτότροφες συνθήκες [Control: 20% (v/v) CO_2], μιξότροφες συνθήκες[CO_2+Glu:10% (v/v) CO_2 +5 mM γλυκόζης] και ετερότροφες συνθήκες (Glu: 5 mM γλυκόζης). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μg *β*-φελλανδρενίου ανά λίτρο καλλιέργειας, μg *β*-φελλανδρενίου ανά mg χλωροφύλλης και mg *β*-φελλανδρενίου ανά g DCW (διαφοράς της ξηρής βιομάζας κυττάρων που συσσωρεύτηκε έπειτα από 48 ώρες με την αρχική όταν οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν στους βιοαντιδραστήρες).

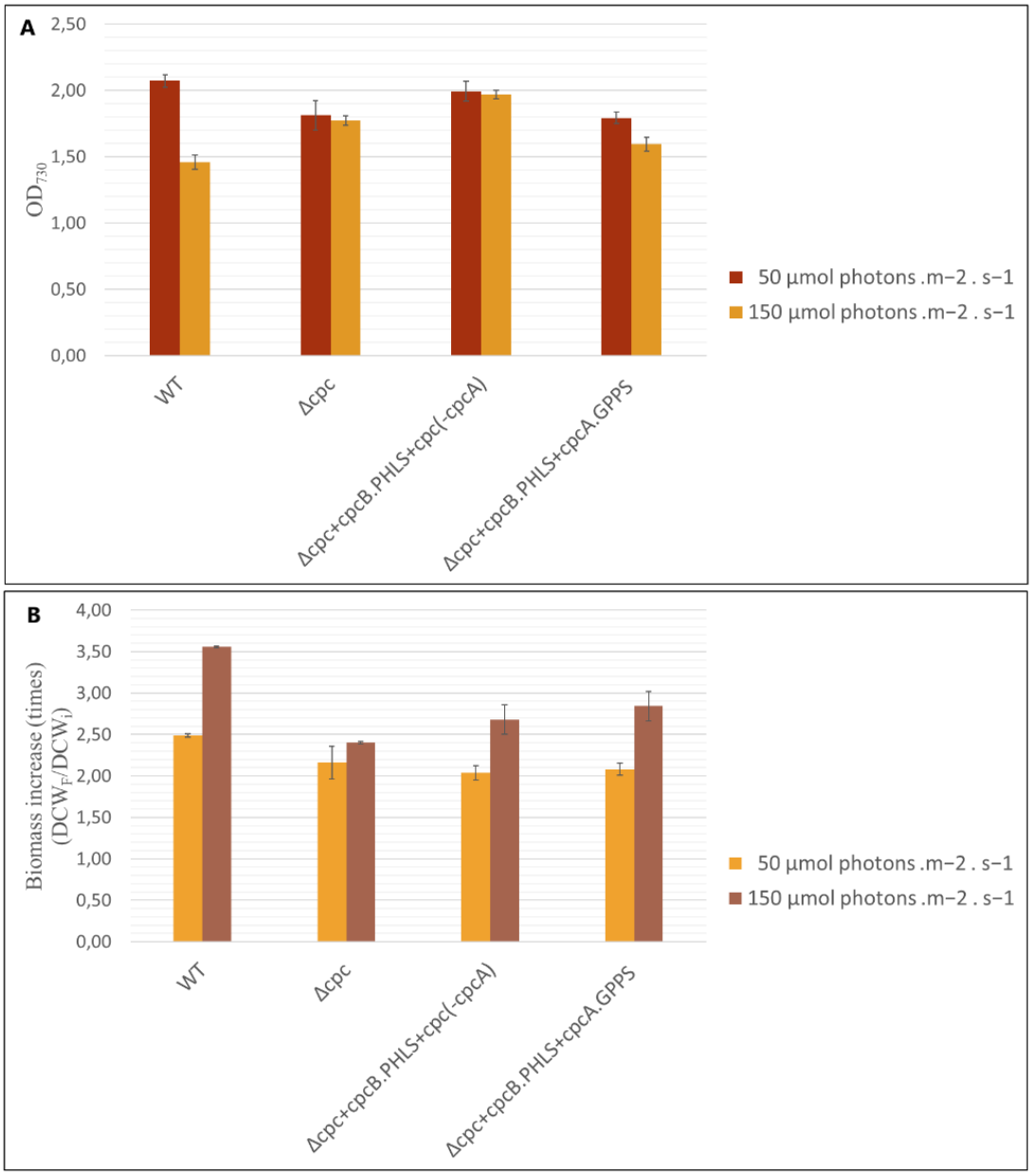
Στελέχη	***β*-PHL μg·(Lκαλλιέργειας)$^{-1}$**			***β*-PHL μg·(mg Chl)$^{-1}$**			***β*-PHL mg· (g DCW)$^{-1}$**		
	Control	**CO_2+Glu**	**Glu**	**Control**	**CO_2+Glu**	**Glu**	**Control**	**CO_2+Glu**	**Glu**
Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA)	123,22± 6,33	103,90± 0,88	77,75± 4,61	22,79± 1,25	24,41± 4,14	20,27± 4,55	0,47± 0,03	0,20± 0,01	0,16± 0,02
Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS	107,6± 9,46	101,53± 3,68	77,23± 1,67	26,65± 2,35	14,59± 0,96	14,22± 1,09	0,42± 0,03	0,19± 0,01	0,14± 0,01

Φαίνεται λοιπόν ότι τα μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis* εμφανίζουν μεγαλύτερη παραγωγή βιομάζας σε ετερότροφες και μιξότροφες συνθήκες συγκριτικά με τις φωτοαυτότροφες. Αντίθετα δεν ευνοείται η παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου στις συνθήκες αυτές. Το συμπέρασμα αυτό είναι λογικό εφόσον η ετερόλογη παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου πραγματοποιείται μέσω του φωτοσυνθετικά εξαρτώμενου MEP μονοπατιού στα μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis*. Είναι πολύ πιθανό να δημιουργούνται φαινόμενα σκίασης εξαιτίας της μεγάλης βιομάζας που επιφέρουν τα αρνητικά αποτελέσματα στην παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου.

3.4.5 Μελέτη της επίδρασης της έντασης του παρεχόμενου φωτισμού στην ετερόλογη παραγωγή του β-φελλανδρενίου

Ένας άλλος παράγοντας που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των κυανοβακτηρίων είναι ο φωτισμός. Στην παρούσα πειραματική σειρά πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη της ανάπτυξης, της λειτουργίας του φωτοσυνθετικού μηχανισμού και της ικανότητας παραγωγής του *β*-φελλανδρενίου των μεταλλαγμένων στελεχών *Synechocystis*

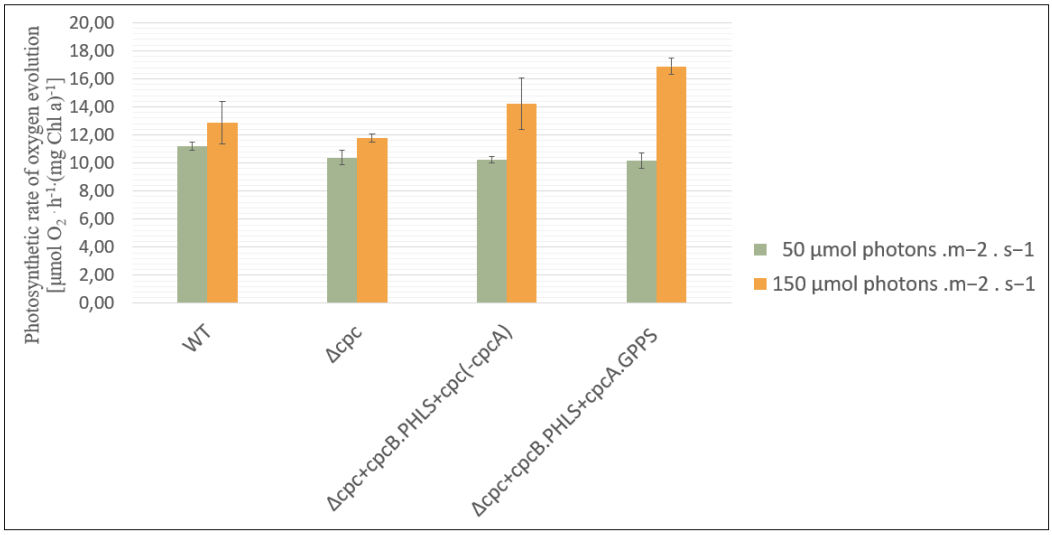
σε δύο διαφορετικές εντάσεις φωτισμού 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1} (καλλιέργεια μάρτυρας) και 150 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1} στους 28 ºC, παρουσία 20% (v/v) CO_2.



Εικόνα 3.19. Α. Μετρήσεις οπτικής και πυκνότητας (OD730) και **Β.** αύξησης βιομάζας (DCW_f/DCW_i) που πραγματοποιήθηκαν έπειτα από χρονικό διάστημα 48 ωρών διεξαγωγής του πειράματος στους βιοαντιδραστήρες όγκου 100 mL υπό την παρουσία 20% v/v CO_2 και θερμοκρασία 28ºC με σκοπό να μελετηθεί η ανάπτυξη τους. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν υπό δύο διαφορετικές εντάσεις φωτονιακής ακτινοβολίας, υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 και 150 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1}.

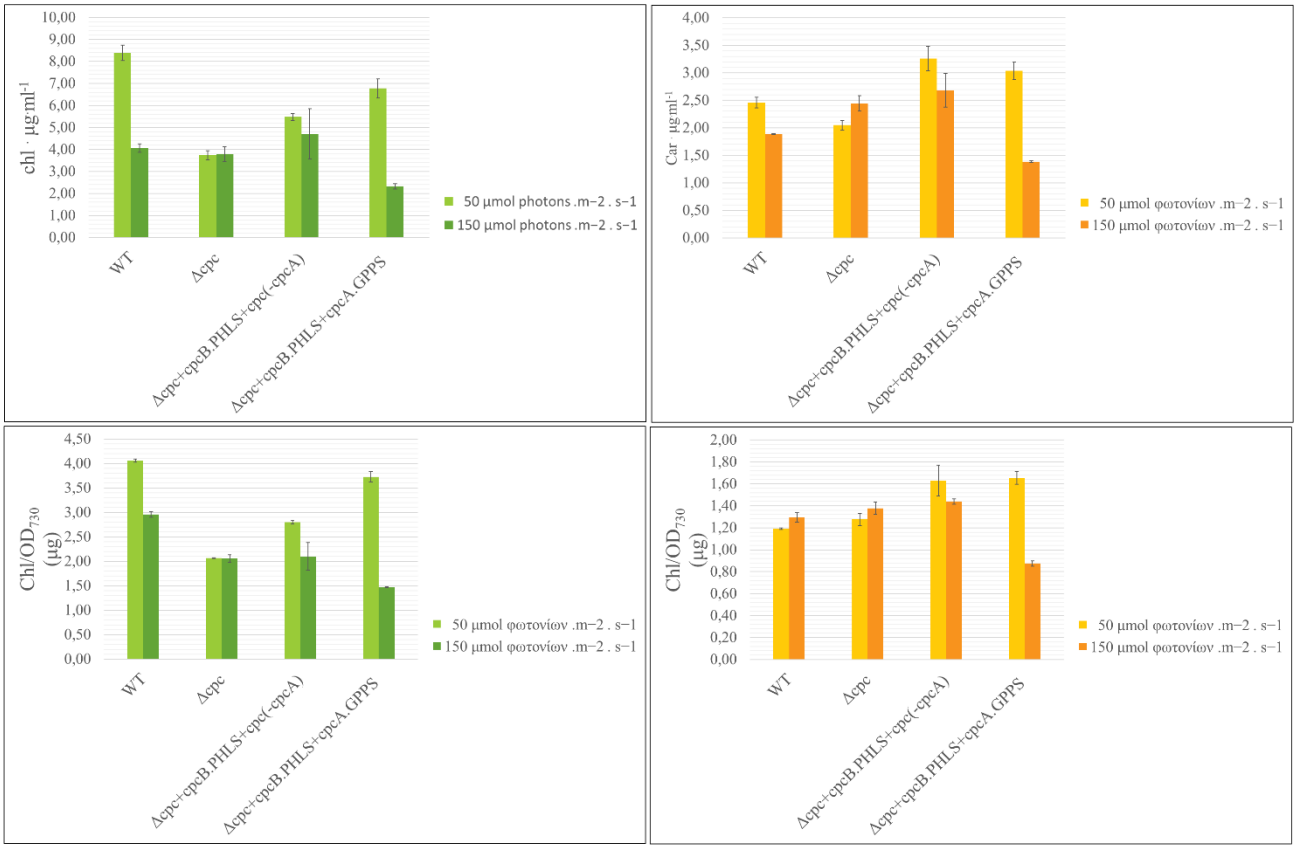
Από τα αποτελέσματα προέκυψε πως ευνοείται περισσότερο η συσσώρευση της βιομάζας σε υψηλότερες εντάσεις φωτισμού (150 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1}) σε σχέση με τις χαμηλότερες.

Το ίδιο μοτίβο ακολουθούν και τα αποτελέσματα του φωτοσυνθετικού ρυθμού παραγωγής οξυγόνου, τα οποία εμφανίζουν αύξηση και ιδιαίτερα τα μεταλλαγμένα στελέχη σε σχέση με το WT σε υψηλότερες συνθήκες φωτισμού.



Εικόνα3.20. Αποτελέσματα φωτοσυνθετικού ρυθμού παραγωγής οξυγόνου. Οι μετρήσεις έγιναν πολαρογραφικά έπειτα από 48 ώρες ανάπτυξης των καλλιεργειών *Synechocystis* στους βιοαντιδραστήρες όγκου 100 mL υπό την παρουσία 20% v/v CO_2 και θερμοκρασία 28ºC. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν υπό δύο διαφορετικές εντάσεις φωτονιακής ακτινοβολίας, υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 και 150 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1}.

Τα αποτελέσματα των φωτοσυνθετικών χρωστικών εκφράστηκαν ως μg χρωστικής ανά μL καλλιέργειας και μg χρωστικής ανά OD_{730}. Από τα αποτελέσματα αυτά προέκυψε πως το περιεχόμενο σε χλωροφύλλη και καροτενοειδή δεν επηρεάζεται σημαντικά στα περισσότερα στελέχη. Μόνο στο στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στις συνθήκες με αυξημένη ένταση φωτισμού.



Εικόνα 3.21. Περιεχόμενο φωτοσυνθετικών χρωστικών των καλλιεργειών έπειτα από χρονικό διάστημα 48 ωρών διεξαγωγής του πειράματος στους βιοαντιδραστήρες όγκου 100 mL υπό την παρουσία 20% v/v CO_2 και θερμοκρασία 28ºC. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν υπό δύο διαφορετικές εντάσεις φωτονιακής ακτινοβολίας, 50 και 150 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1}. Όλες οι χρωστικές εκφράστηκαν ως μg χρωστικής ανά mL καλλιέργειας και μg χρωστικής ανά OD_{730}.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης, η απόδοση του *β*-φελλανδρενίου στις συνθήκες φωτισμού 150 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1} δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφοροποιήσεις σε σχέση με τις φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης.

Πίνακας 11 Απόδοση του παραγόμενου *β*-φελλανδρενίου έπειτα από χρονικό διάστημα 48 ωρών διεξαγωγής του πειράματος στους βιοαντιδραστήρες (των 100 mL) υπό την παρουσία 20% v/v CO_2 και θερμοκρασία 28ºC των μεταλλαγμένων στελεχών Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) και Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα δύο διαφορετικών δύο διαφορετικών εντάσεων φωτονιακής ακτινοβολίας, 50 και 150 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1}. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μg *β*-φελλανδρενίου ανά λίτρο καλλιέργειας και μg *β*-φελλανδρενίου ανά mg χλωροφύλλης.

Στελέχη	***β*-PHL μg·(Lκαλλιέργειας)$^{-1}$**		***β*-PHL μg·(mg Chl)$^{-1}$**	
	50 μmol φωτονίων ·m^{-2}· s^{-1}	**150 μmol φωτονίων ·m^{-2}· s^{-1}**	**50 μmol φωτονίων ·m^{-2}· s^{-1}**	**150 μmol φωτονίων ·m^{-2}· s^{-1}**
Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA)	123,22±6,33	95,11±7,94	22,79±1,25	27,72±2,79
Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS	107,6±9,46	65,26±2,76	26,65±2,35	24,52±4,09

Συνεπώς, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν πως ευνοείται η ανάπτυξη και η λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των στελεχών σε υψηλότερες εντάσεις φωτισμού. Όμως η απόδοση στην παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου παραμένει στα ίδια επίπεδα με αυτή στις φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης. Για άλλη μια φορά αποδεικνύεται ότι η αυξημένη ανάπτυξη δε συνοδεύεται απαραίτητα με αυξημένη παραγωγή *β*-φελλανδρενίου.

3.5 Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα του κεφαλαίου αποτυπώνεται πως τόσο ο άγριος τύπος όσο και τα μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία μπορούν να αναπτύσσονται αποτελεσματικά τόσο σε ουδέτερο όσο και σε αλκαλικό pH χωρίς σημαντικές επιπτώσεις στη φωτοσυνθετική τους δραστηριότητα. Μάλιστα τα μεταλλαγμένα στελέχη Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) και Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS ήταν ικανά να παράγουν αντίστοιχες συγκεντρώσεις β-φελλανδρενίου σε ουδέτερο (7,5) ή αλκαλικό pH (10,5), όταν καλλιεργούνται στους βιοαντιδραστήρες. Επιπλέον προέκυψε πως η υψηλότερη αλατότητα στο θρεπτικό μέσω των καλλιεργειών δεν παρεμποδίζει την ικανότητα των παραπάνω μεταλλαγμένων στελεχών να παράγουν *β*-φελλανδρένιο, είτε πρόκειται για ουδέτερο είτε για αλκαλικό pH. Όλα τα στελέχη ήταν εξίσου υγιή απουσία ή παρουσία 100 mM ή 600 mM NaCl σε θρεπτικό μέσο BG11 (με ουδέτερο ή αλκαλικό pH) όταν καλλιεργήθηκαν σε ειδικούς βιοαντιδραστήρες.

Η ικανότητα των μεταλλαγμένων στελεχών *Synechocystis* να αναπτύσσονται και να παράγουν *β*-φελλανδρένιο σε pH και αλατότητα υψηλότερα του φυσιολογικού είναι ιδιαίτερης σημασίας για την καλλιέργεια τους σε μεγαλύτερη κλίμακα για βιομηχανικές εφαρμογές (κλειστοί βιοαντιδραστήρες ή τεχνητές λίμνες για την καλλιέργεια φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών). Η καλλιέργεια των *Synechocystis* σε θρεπτικό μέσο με αλκαλικό pH μειώνει σημαντικά τον αριθμό των μολύνσεων, που αποτελεί σημαντικό πρόβλημα σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες. Επιπλέον, η ικανότητα τους να αναπτύσσονται και να παράγουν *β*-φελλανδρένιο σε συνθήκες υψηλής αλατότητας και μάλιστα σε συγκεντρώσεις αντίστοιχες με το θαλασσινό νερό (600 mM NaCl) δίνει το πλεονέκτημα χρήσης υφάλμυρου ή θαλασσινού νερού, το οποίο είναι άφθονο έναντι του περιορισμένου πόσιμου νερού χωρίς να εγείρει ζητήματα ηθικής. Στα πλαίσια αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακόμα και υγρά απόβλητα από αναερόβια χώνευση τα οποία περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων. Με τον τρόπο αυτό όχι μόνο αποφεύγεται η χρήση πόσιμου νερού αλλά ταυτόχρονα επιτυγχάνεται δευτερογενής επεξεργασία αποβλήτων με αποτέλεσμα τη χρήση σε εφαρμογές βιοαποκατάστασης.

Ένας δεύτερος περιορισμός για τις μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες είναι το ότι πιστεύεται ότι απαιτείται μεγάλη ποσότητα βιομάζας η οποία συχνά σχετίζεται με την υψηλή απόδοση προϊόντος. Από τα αποτελέσματα προέκυψε πως καλλιέργεια των μεταλλαγμένων στελεχών σε ετερότροφες συνθήκες οδήγησε σε αύξηση της βιομάζας σε ποσοστό 62-91% στα μεταλλαγμένα στελέχη Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) και Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS αντίστοιχα. Η μεγάλη αύξηση όμως της βιομάζας δεν οδήγησε σε αύξηση της παραγωγής του *β*-φελλανδρενίου, αντίθετα η παραγωγή μειώθηκε κατά 66% περίπου. Συμπέρασμα λογικό εάν ληφθεί υπόψιν ότι το *β*-φελλανδρένιο παράγεται ετερόλογα στα μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis* μέσω του φωτοσυνθετικά εξαρτώμενου MEP μονοπατιού. Το συμπέρασμα αυτό δίνει το πλεονέκτημα της καλλιέργειας των μεταλλαγμένων στελεχών *Synechocystis* σε φωτοαυτότροφες συνθήκες, χωρίς την προσθήκη γλυκόζης ως εναλλακτικής πηγής άνθρακα. Η προσθήκη γλυκόζης όχι μόνο αυξάνει το συνολικό κόστος της διαδικασίας αλλά και τον κίνδυνο ανάπτυξης μολύνσεων σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες με πιθανές αρνητικές επιπτώσεις.

Μελετήθηκε επίσης ένας άλλος παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη της βιομάζας των *Synechocystis*, ο υψηλότερος φωτισμός. Στις συνθήκες αυτές φάνηκε να ευνοείται η ανάπτυξη και η λειτουργία του φωτοσυνθετικού μηχανισμού των στελεχών. Όμως η παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου παρέμεινε στα ίδια επίπεδα με τις φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης.

Από τα τελευταία αποτελέσματα αποδεικνύεται πως η έρευνα αρχικά πρέπει να επικεντρωθεί στη γενετική και μεταβολική μηχανική των *Synechocystis*. Με τη δημιουργία στελεχών με ενισχυμένο τον αργό δευτερογενή μεταβολισμό του βιοσυνθετικού μονοπατιού των τερπενοειδών μπορεί να επιτευχθεί ετερόλογη παραγωγή των προϊόντων με καλύτερη απόδοση. Πρόσφατα αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία η ετερόλογη έκφραση όλων των γονιδίων του MVA μονοπατιού ταυτόχρονα με την ετερόλογη έκφραση της PHLS στα *Synechocystis* [108]. Αυτό οδήγησε σε παραγωγή 24 mg/g βιομάζας β-φελλανδρενίου, σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή που είχε δημοσιευτεί μέχρι σήμερα.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα του παρόντος κεφαλαίου για την παραγωγή *β*-φελλανδρενίου σε συνδυασμό με τα ήδη δημοσιευμένα αποτελέσματα για την παραγωγή ισοπρενίου από *SkIspS* μεταλλάγματα [161] καθιστούν τα *Synechocystis* ως ικανό μικροοργανισμό-μέσο στην υπηρεσία της βιοτεχνολογίας για παραγωγή φυσικών προϊόντων υψηλής βιομηχανικής αξίας. Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν την προσέγγιση των «φωτοσυνθετικών βιοκαυσίμων και χημικών» (“photosynthetic biofuels”) ως μία αναμφίβολα ανανεώσιμη, οικονομικά προσιτή και φιλική προς το περιβάλλον εναλλακτική μέθοδο για την παραγωγή προϊόντων με πολλαπλές εφαρμογές στη βιομηχανία [71, 106, 161].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΛΟΓΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ *β*-ΦΕΛΛΑΝΔΡΕΝΙΟΥ ΑΠΟ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ *SYNECHOCYSTIS* ΣΕ ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ ΑΛΓΙΝΙΚΟΥ ΑΣΒΕΣΤΙΟΥ

4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

4.1.1. Ακινητοποίηση κυττάρων

Στη φύση έχει βρεθεί ότι οι προσκολλημένοι μεταξύ τους μικροοργανισμοί είναι πιο ενεργοί σε σχέση με τους αντίστοιχους ελεύθερους μικροοργανισμούς καθώς και ότι παρουσιάζουν επίσης διαφορές στην έκφραση γονιδίων [179, 180]. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ βακτηρίων και στερεής φάσης έχει ως αποτέλεσμα μία ποικιλία φυσιολογικών αλλαγών στη συμπεριφορά των βακτηρίων [181, 182]. Συνεπώς τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον έχει στραφεί σε συστήματα ακινητοποιημένων κυττάρων με στόχο βιοτεχνολογικές εφαρμογές [179].

Ως ακινητοποίηση ολόκληρων κυττάρων μπορεί να οριστεί ο φυσικός περιορισμός ή ο εντοπισμός ακέραιων κυττάρων σε μια ορισμένη περιοχή του χώρου, χωρίς απώλεια της επιθυμητής βιολογικής δραστηριότητας [183]. Όταν τα κύτταρα ενθυλακώνονται σε ένα ακινητοποιημένο κυτταρικό σύστημα, χρησιμοποιείται ο όρος "βιοενθυλάκωση" ή "μικροενθυλάκωση". Η καταλληλότητα ενός συστήματος ακινητοποίησης εξαρτάται από τον τύπο της εφαρμογής καθώς και από τα φυσικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του εκάστοτε φορέα ακινητοποίησης [10]. Μερικά γενικά επιθυμητά χαρακτηριστικά του φορέα ακινητοποίησης είναι το υλικό να έχει χαμηλό βαθμό τοξικότητας, να είναι βιοσυμβατό, να μπορεί να αποστειρωθεί και να επαναχρησιμοποιηθεί, να παρέχει υψηλή χωρητικότητα κυτταρικής βιομάζας, να επιτρέπει τον εύκολο διαχωρισμό των κυττάρων και του φορέα ακινητοποίησης και να επιτρέπει τη διέλευση θρεπτικών συστατικών. Τέλος, πρέπει να παρέχει μία απλή και οικονομικά βιώσιμη διαδικασία ακινητοποίησης [183].

Για βιομηχανική χρήση η μέθοδος ακινητοποίησης θα πρέπει να πληροί κάποια κριτήρια. Θα πρέπει να είναι ασφαλής, απλή, ήπια ώστε να μην καταστρέφει τα κύτταρα και οικονομική. Επιπλέον θα πρέπει τα ακινητοποιημένα κύτταρα να διατηρούν τη δραστικότητα που έχουν όταν είναι ελεύθερα στο θρεπτικό μέσο και τέλος να έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής όταν ακινητοποιηθούν. Το τελευταίο αφορά τόσο την αντοχή του μέσου ακινητοποίησης όσο και τη δραστικότητα των κυττάρων η οποία θα πρέπει να διατηρηθεί όσο γίνεται περισσότερο καιρό [184]. Για το λόγο αυτό στη βιβλιογραφία έχουν αναλυθεί εκτενώς διάφορες τεχνικές ακινητοποίησης ολόκληρων κυττάρων. Οι κύριες κατηγορίες είναι οι εξής:

1. Συσσωμάτωση κυττάρων
2. Προσρόφηση σε επιφάνεια
3. Ομοιοπολική σύζευξη σε επιφάνεια

4. Παγίδευση μέσα σε πορώδεις μήτρες.

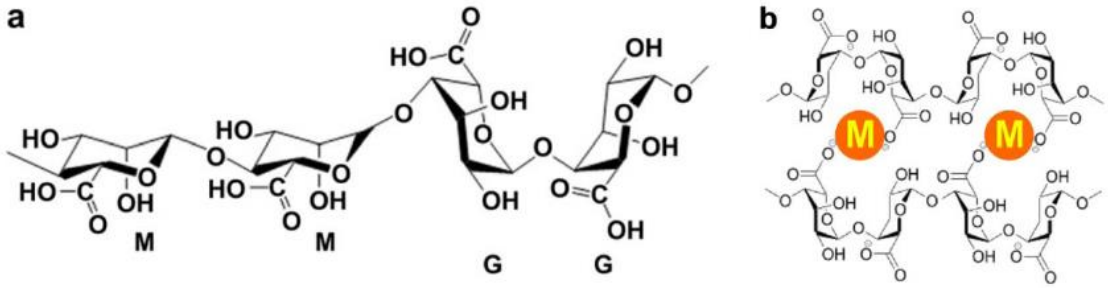
Η επιλογή μιας τεχνικής εξαρτάται πλήρως από την προοριζόμενη εφαρμογή. Όσον αφορά την παγίδευση σε πολυμερείς γέλες, αποτελεί μία από τις πιο δημοφιλείς μεθόδους ακινητοποίησης και χρησιμοποιείται με επιτυχία στην ακινητοποίηση ζωντανών βακτηρίων, μυκήτων, μικροφυκών καθώς και φυτικών και ζωικών κυττάρων [10]. Για την τεχνική αυτή έχουν χρησιμοποιηθεί μία πληθώρα φυσικών και συνθετικών υλικών όπως είναι το πολυακρυλαμίδιο, πρωτεΐνες (χρήση ανασυσταθέντος κολλαγόνου) και πολυσακχαρίτες (άγαρ, κ-καρραγενάνη, αλγινικό οξύ, χιτοζάνη και οξική κυτταρίνη) [184]. Τα πολυμερή αυτά έχουν την ικανότητα να συγκρατούν τα κύτταρα και να τους παρέχουν σταθερότητα, δομική υποστήριξη αλλά και άνοσοαπομόνωση. Τόσο οι συνθετικές όσο και οι φυσικές υδρογέλες έχουν ερευνηθεί για την ακινητοποίηση ενός πλήθους κυτταρικών τύπων σε τομείς όπως η ιατρική και η βιοτεχνολογία [185].

Μεταξύ των παραπάνω τεχνικών, η παγίδευση ολόκληρων κυττάρων σε μήτρες πολυσακχαριτών καθώς και η προσρόφηση σε επιφάνειες είναι οι τεχνικές ακινητοποίησης που προσεγγίζουν περισσότερο τις συνθήκες στις οποίες τα κύτταρα μπορεί να βρεθούν στη φύση. Επίσης, το αλγινικό ασβέστιο όπως και η κ-καρραγενάνη έχει βρεθεί ότι αποτελούν καλύτερα υλικά για παγίδευση κυττάρων [184].

4.1.2. Αλγινικά πολυμερή

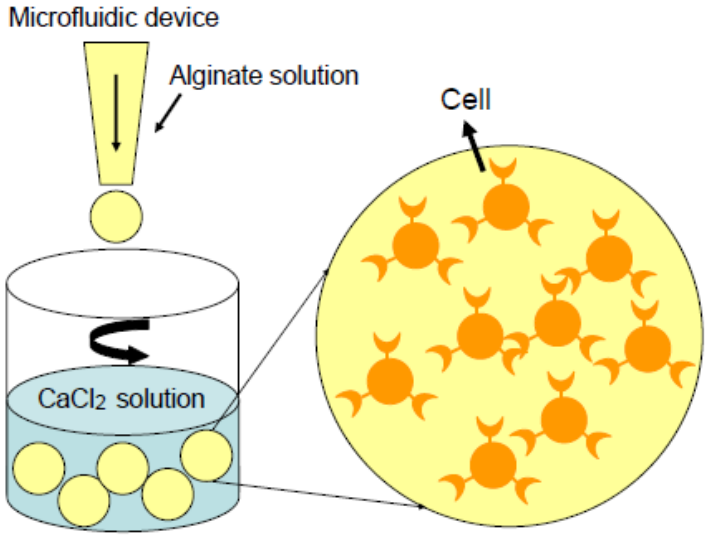
Το αλγινικό είναι ένας φυσικός, ανιονικός και υδρόφιλος πολυσακχαρίτης, ο οποίος παρουσιάζει εξαιρετική βιοσυμβατότητα και βιοδιασπασιμότητα. Είναι ένα από τα πιο άφθονα βιοσυνθετικά υλικά και συναντάται κυρίως στα καφέ φύκη (αποτελεί περίπου το 40% του ξηρού βάρους τους) και βακτήρια [10, 186-188]. Τα αλγινικά πολυμερή είναι γραμμικοί πολυσακχαρίτες αποτελούμενοι από β-D-μαννουρονικό (M) και α-L-γουλουρονικό οξύ (G). Το πολυμερές αποτελείται από μονάδες GG, GM και MM. Δύο μονάδες μαννουρονικού οξέος και μία μονάδα μαννουρονικού με μία γουλουρονικού οξέος συνδέονται μεταξύ τους με β-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό ενώ δύο μονάδες γουλουρονικού οξέος με α-1,4 γλυκοζιτικό δεσμό. Οι περιοχές του πολυμερούς όπου συνδέονται δύο μονάδες μαννουρονικού οξέος (M-περιοχές) έχουν ευθύγραμμη διάταξη. Οι περιοχές όπου συνδέονται δύο μονάδες γουλουρονικού οξέος (G-περιοχές) κάμπτονται σχηματίζοντας με τον τρόπο αυτό μία κοιλότητα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.1.a [189]. Ο σχηματισμός της κοιλότητας επιτρέπει την συνεργατική δέσμευση κατιόντων μετάλλων (Εικόνα 4.1.b) [10]. Ιόντα δισθενών μετάλλων εισέρχονται στις ηλεκτρικά φορτισμένες, εσωτερικές κοιλότητες

της αλυσίδας του πολυμερούς. Η σύσταση και η αλληλουχία του αλγινικού πολυμερούς εξαρτάται από τον οργανισμό και τον ιστό από τον οποίο έχει απομονωθεί. Με τον τρόπο αυτό, το πολυμερές αποκτά διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά [190-192].

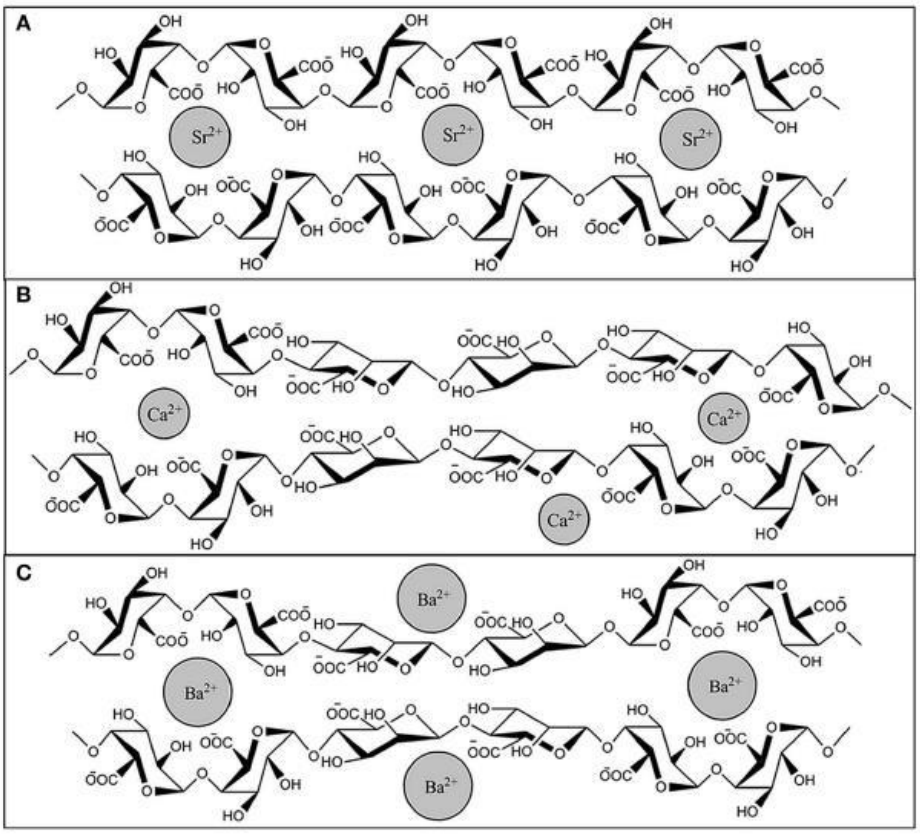


Εικόνα 4.1. a. Χημική δομή του αλγινικού άλατος. Με M συμβολίζεται το β-D-μαννουρονικό οξύ και με G το α-L-γουλουρονικό οξύ. Παρουσιάζεται επίσης και ο τρόπος σύνδεσης αυτών των μονάδων. **b.** Μηχανισμός της ιοντικής αλληλεπίδρασης μεταξύ αλγινικού και δισθενών κατιόντων (μοντέλο αυγού-θήκης). Ελήφθη από την παραπομπή [188].

Οι λειτουργικές ιδιότητες των αλγινικών ως μήτρες ακινητοποίησης σχετίζονται ισχυρά με τη σύσταση και την δομή τους. Πολύ σημαντική ιδιότητα των αλγινικών αποτελεί το ότι μπορούν να σχηματίζουν υδρογέλες υπό ήπιες συνθήκες όταν εκτίθενται σε διαλύματα δισθενών κατιόντων (Εικόνα 4.1.b). Τα αλγινικά σφαιρίδια παρασκευάζονται με την προσθήκη διαλύματος αλγινικού νατρίου σε διάλυμα δισθενών κατιόντων (Εικόνα 4.2). Τα δισθενή κατιόντα που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι Ca^{2+}, Sr^{2+} και Ba^{2+}, ενώ τα δισθενή κατιόντα Pb^{2+}, Cu^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} και Mn^{2+}, δεν χρησιμοποιούνται λόγω της τοξικότητάς τους. Κατά το σχηματισμό της γέλης τα κατιόντα δεσμεύονται στις μονάδες του αλγινικού σε ένα μοντέλο αυγού-θήκης (Εικόνα 4.1.b) [10]. Το δισθενές κατιόν που χρησιμοποιείται παίζει σημαντικό ρόλο στον τρόπο δέσμευσης. Πιο συγκεκριμένα το Ca^{2+} δεσμεύεται σε μονάδες GG και MG, το Ba^{2+} δεσμεύεται σε μονάδες GG και MM, ενώ το Sr^{2+} μόνο σε GG μονάδες (Εικόνα 4.3) [194].



Εικόνα 4.2. Διαδικασία σχηματισμού σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου με παγιδευμένα κύτταρα. Τα σφαιρίδια σχηματίζονται έπειτα από εναπόθεση σταγόνας διαλύματος αλγινικού νατρίου σε διάλυμα $CaCl_2$. Ελήφθη από την παραπομπή [188].



Εικόνα 4.3. Τρόπος δέσμευσης δισθενών κατιόντων Sr^{2+}, Ca^{2+} και Ba^{2+} σε αλγινικά πολυμερή. Ελήφθη από την παραπομπή [10].

Ο σχηματισμός της ιονοτροπικής γέλης πραγματοποιείται με ανταλλαγή των ιόντων νατρίου του γουλουρονικού νατρίου με τα δισθενή κατιόντα που αναφέρονται παραπάνω. Τα μονοσθενή κατιόντα δεν επάγουν το σχηματισμό της γέλης [194]. Το μέγεθος και η σφαιρικότητα των σφαιριδίων εξαρτώνται από το ιξώδες του διαλύματος του αλγινικού νατρίου, το μέγεθος της βελόνας που χρησιμοποιείται καθώς και την απόσταση μεταξύ της σύριγγας και του διαλύματος $CaCl_2$. Οι μηχανικές και διογκωτικές ιδιότητες των αλγινικών όπως και η διαπεραστική ικανότητα χημικών ουσιών επηρεάζονται από τη σύσταση των μονομερών (σχετική αναλογία των μονάδων μαννουρονικού και γουλουρονικού οξέος), τη συγκέντρωση του διαλύματος αλγινικού, τη φύση και τη συγκέντρωση του κατιόντος του μετάλλου που θα χρησιμοποιηθεί για το σχηματισμό της γέλης [10]. Υψηλότερη περιεκτικότητα σε γουλουρονικό οξύ προσδίδει ισχυρότερες μηχανικές ιδιότητες στο αλγινικό ενώ χαμηλότερη προσδίδει μεγαλύτερη ελαστικότητα [195]. Όσον αφορά τη σκληρότητα των σφαιριδίων, ο χρόνος που θα παραμείνουν τα σφαιρίδια εντός του διαλύματος $CaCl_2$, είναι ένας σημαντικός παράγοντας. Μεγαλύτερος χρόνος παραμονής των σφαιριδίων εντός του διαλύματος του κατιόντος, οδηγεί σε ισχυρότερο δέσιμο μεταξύ αλγινικών και δισθενών κατιόντων, και κατ' επέκταση σε μικρότερη ελαστικότητα της γέλης.

Μία από τις πιο σημαντικές ιδιότητες του αλγινικού οξέος για ακινητοποίηση κυττάρων είναι η ισχύς με την οποία συγκρατεί τα ακινητοποιημένα κύτταρα, ενώ ταυτόχρονα επιτρέπει τη μεταφορά θρεπτικών ουσιών όπως και προϊόντων του μεταβολισμού. Επίσης, έχει βρεθεί ότι στη φύση το αλγινικό παρέχει μηχανική υποστήριξη στα καφέ φύκη, δίνοντας τους έτσι την ικανότητα να αντέχουν τη δύναμη των καταιγίδων του ωκεανού. Επιπλέον, τα σφαιρίδια αλγινικού παρέχουν μεγάλη αντίσταση στην υδροστατική πίεση και στην τριβή [184].

Για όλους τους παραπάνω λόγους, η παγίδευση κυττάρων και ενζύμων σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου έχει γίνει από τις πλέον διαδεδομένες τεχνικές ακινητοποίησης τα τελευταία χρόνια.

4.1.3. Πλεονεκτήματα και εφαρμογές παγιδευμένων κυττάρων σε αλγινικά πολυμερή

Η ακινητοποίηση των κυττάρων μέσα σε υδρογέλες αλγινικού ασβεστίου είναι μια ήπια διαδικασία όπου παράγεται ένα διαφανές και διαπερατό υλικό το οποίο επιτρέπει την αύξηση της πυκνότητας των κυττάρων. Οι ακινητοποιημένοι μικροοργανισμοί συνήθως αναπτύσσονται σε μικροαποικίες, των οποίων η μορφολογία μπορεί να διαφέρει αρκετά σε σχέση με αυτές που σχηματίζουν τα ελεύθερα κύτταρα. Από παρατηρήσεις ηλεκτρονικής

μικροσκοπίας φαίνεται πως οι αποικίες αυτές περικλείονται από μία «μεμβράνη» του υλικού [196, 197].

Τα ακινητοποιημένα κύτταρα εμφανίζουν αρκετά πλεονεκτήματα έναντι των ελεύθερων κυττάρων. Αρχικά τα ακινητοποιημένα κύτταρα επιτρέπουν τον ευκολότερο και πιο αποτελεσματικό χειρισμό εφόσον μπορούν να ανακτηθούν από το θρεπτικό μέσο πολύ εύκολα. Ευκολότερη είναι επίσης και η ανάκτηση του προϊόντος, το οποίο δε χρειάζεται να διαχωριστεί από τα κύτταρα. Η ακινητοποίηση των κυττάρων έχει βρεθεί ότι προστατεύει τα κύτταρα από μηχανική κατάπτωση, από περιβαλλοντικές καταπονήσεις (όπως pH, θερμοκρασία, άλατα), από τοξικές επιδράσεις οργανικών διαλυτών όπως επίσης και από μολύνσεις. Ακόμη η ακινητοποίηση κυττάρων διευκολύνει το χειρισμό αλλά είναι και οικονομικά πιο προσιτή σε μεγαλύτερης κλίμακας καλλιέργειες, διότι απαιτεί μικρότερο χώρο για κατασκευή βιοαντιδραστήρα σε σύγκριση με τη χρήση καλλιεργειών ελεύθερων κυττάρων [199]. Επιπλέον, έχει βρεθεί πως η δραστικότητα, η βιωσιμότητα και η παραγωγικότητα των ακινητοποιημένων κυττάρων μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα γεγονός που επιτρέπει την επαναχρησιμοποίηση των κυττάρων. Μάλιστα στη βιβλιογραφία αναφέρεται πως ακινητοποιημένα κύτταρα *Synechocystis* σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου ήταν ικανά να επιβιώσουν για πάνω από 30 μέρες [199]. Τέλος, έχουν παρατηρηθεί αξιοσημείωτες διαφορές στην κυτταρική ανάπτυξη, στο μεταβολισμό και στη φυσιολογία των κυττάρων κατά την ακινητοποίηση [200]. Λόγω των προαναφερθέντων πλεονεκτημάτων, συστήματα ακινητοποιημένων κυττάρων σε μήτρες αλγινικού ασβεστίου βρίσκουν ολοένα και περισσότερες εφαρμογές σε μεγάλης κλίμακας βιοαντιδραστήρες με ποικίλες εφαρμογές.

Η ακινητοποίηση μικροοργανισμών βρίσκει αρκετές εφαρμογές στο πεδίο της βιοαποκατάστασης (τοξικοί ρύποι και ξενοβιοτικές ουσίες). Τα ακινητοποιημένα κύτταρα εμφάνισαν μάλιστα καλύτερη απόδοση βιοαποκατάστασης σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα [200, 201]. Βρέθηκε μάλιστα πως η πολυμερική μήτρα προστάτευε τα κύτταρα από την τοξική επίδραση των ρύπων. Σε υγρά απόβλητα φαίνεται οι οργανικές ενώσεις να προσροφώνται πρώτα στην επιφάνεια του μέσου και έπειτα να εισχωρούν σταδιακά μέσω των πόρων. Αυτό επιτρέπει στους μικροοργανισμούς να απελευθερώνουν εξωκυτταρικά ένζυμα για την προ-υδρόλυση οργανικών ξενοβιοτικών και στη συνέχεια να μεταφέρουν τα θραύσματα των ρύπων μέσω της κυτταρικής μεμβράνης για οξείδωση [179, 201-203]. Επιπλέον, η παραγωγή ειδικών μεταβολιτών, π.χ. αντιβιοτικών, οργανικών οξέων, αμινοξέων ή αιθανόλης, αποτελούν μερικές ακόμα εφαρμογές των συστημάτων ακινητοποιημένων κυττάρων [184, 204]. Ακινητοποιημένα κύτταρα *Synechocystis* σε

σφαιρίδια αλγινικού ήταν ικανά να αναπτύσσονται και να παράγουν H_2 [198]. Επίσης, η ακινητοποίηση του μυκροφύκους *Botryococcus braunii* σε σφαιρίδια αλγινικού οδήγησε σε αύξηση της παραγωγής υδρογονανθράκων. Στην τελευταία περίπτωση τα ακινητοποιημένα κύτταρα εμφάνισαν και υψηλότερη φωτοσυνθετική δραστηριότητα σε σχέση με ελεύθερα κύτταρα [205, 206].

Συνεπώς φαίνεται πως η ακινητοποίηση μικροοργανισμών είναι μία διαδικασία που διευκολύνει το χειρισμό της βιομάζας και πολλές φορές ευνοεί και την απόδοση των μικροοργανισμών. Έχει τέλος πολλά πλεονεκτήματα που την καθιστούν ιδανική για μεγαλύτερης κλίμακας εφαρμογές σε βιοαντιδραστήρες.

4.2. Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης πειραματικής σειράς ήταν η μελέτη της ετερόλογης παραγωγής του *β*-φελλανδρενίου από ακινητοποιημένα κύτταρα *Synechocystis* σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από αυτό των 48 ωρών καθώς και η μελέτη της βιωσιμότητας του συστήματος αλλά και της απελευθέρωσης των κυττάρων με απώτερο στόχο μία πιθανή βιοτεχνολογική εφαρμογή.

4.3. Πειραματικό μέρος

4.3.1 Οργανισμός και συνθήκες ανάπτυξης

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis* Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS και Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν φωτοαυτότροφα σε υγρό θρεπτικό BG11 σε κωνικές φιάλες, με συνεχή παροχή ατμοσφαιρικού αέρα ώστε να επιτυγχάνεται η παροχή ατμοσφαιρικού CO_2, ως πηγή άνθρακα στα κύτταρα. Το pH ρυθμίστηκε με προσθήκη διαλύματος 25 mM HEPES-NaOH σε pH 7,5 αντί του διαλύματος NaH_2PO_4, που χρησιμοποιήθηκε στα προηγούμενα κεφάλαια, διότι χηλικές ενώσεις όπως φωσφορικά και κιτρικά αποτελούν περιοριστικούς παράγοντες για τη χρήση αλγινικού ασβεστίου. Οι υγρές καλλιέργειες αποτέλεσαν μητρικές καλλιέργειες για τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Όλα τα πειράματα εκτελέστηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 28±1 °C. Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων$\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ με την χρήση λευκών (cool white) λαμπών φθορισμού.

Για την αποφυγή μολύνσεων από άλλους μικροοργανισμούς όλα τα θρεπτικά μέσα και σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή καλλιεργειών αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο στους 120ºC για 20-30 min. Όλα τα πειράματα παρασκευής καλλιεργειών διεξήχθησαν σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow hood) παρουσία φλόγας, αφού είχε προηγουμένως αποστειρωθεί με αιθανόλη και λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας

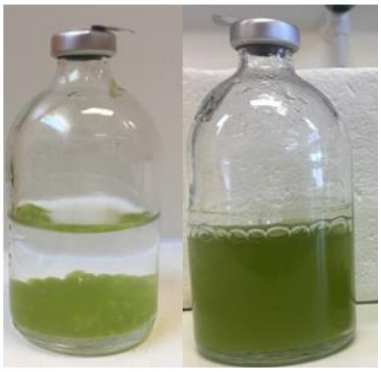
4.3.2 Μελέτη κυτταρικής συγκέντρωσης-Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας

Η ανάπτυξη των καλλιέργειας προσδιορίστηκε με μέτρηση της απορρόφησης στα 730nm σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UV-2700 της Shimadzu.

4.3.3. Ακινητοποίηση των κυττάρων Synechocystis σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν έπειτα από φυγοκέντριση στα 4.500 x *g* για 10 min από τη μητρική καλλιέργεια στο τέλος της εκθετικής φάσης. Έπειτα επαναιωρήθηκαν σε 5 mL θρεπτικού μέσου BG11 με HEPES-NaOH και η κυτταρική συγκέντρωση προσαρμόστηκε ώστε να είναι ίση με 0,5 OD_{730}. Στη συνέχεια τα διαλύματα κυττάρων αναμείχθηκαν ήπια, με διαλύματα αλγινικού προκειμένου να προκύψουν διαλύματα τελικής περιεκτικότητας αλγινικού ίσης με 3%, 4% και 5% w/v. Για το λόγο αυτό παρασκευάστηκαν και αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο διαλύματα αλγινικού νατρίου (Alginic acid sodium salt from brown algae, Fluca) όγκου 5 mL και περιεκτικότητας 6%, 8% και 10% w/v. Σε θάλαμο

νηματικής ροής αέρα και παρουσία φλόγας, προστέθηκαν στάγδην τα ομογενή διαλύματα αλγινικού ασβεστίου με τα κύτταρα, με τη χρήση πιπέτας 1000 μL, σε διάλυμα $CaCl_2$ περιεκτικότητας 2% w/v. Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκε ήπια ανάδευση ώστε τα σφαιρίδια να μην υποστούν μηχανική καταστροφή και αφέθηκαν για μία ώρα ώστε να σκληρύνουν. Έπειτα από μία ώρα, τα σφαιρίδια εκπλύθηκαν δύο φορές με αποστειρωμένο νερό και δύο φορές με θρεπτικό μέσο BG11 ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια $CaCl_2$ που δεν είχε δεσμευτεί. Τέλος τα σφαιρίδια μεταφέρθηκαν στους ειδικούς βιοαντιδραστήρες των 100 mL με όγκο θρεπτικού μέσου 50 mL και τα μπουκαλάκια τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό αναδευτήρα (shaker) με συχνότητα ανάδευσης 140 min^{-1} υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας ίσης με 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1}.



Εικόνα 4.4. Βιοαντιδραστήρας 100 mL που χρησιμοποιήθηκε για την ετερόλογη παραγωγή *β*-φελλανδρενίου από ακινητοποιημένα και ελεύθερα κύτταρα *Synechocystis*.

Αρχικά παρασκευάστηκαν σφαιρίδια αλγινικού και στις τρεις συγκεντρώσεις που αναφέρεται παραπάνω (3%, 4% και 5% w/v) ώστε να μελετηθεί η παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου και να πραγματοποιηθεί παρατήρηση με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης. Από τις τρεις συγκεντρώσεις αλγινικού επιλέχθηκε η 3% w/v για περαιτέρω μελέτη (βλέπε σελίδα 198). Κάθε 48 h, για συνολικό χρονικό διάστημα 12 ημερών, πραγματοποιούνταν η συλλογή του *β*-φελλανδρενίου, με προσθήκη 4 mL εξανίου. Η ίδια διαδικασία λάμβανε χώρα και σε αντίστοιχα συστήματα που περιείχαν ελεύθερα κύτταρα. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε εις διπλούν. Στην αρχή του πειράματος έγινε προσθήκη 20% (v/v) CO_2. Κάθε 48 ώρες, έπειτα από τη συλλογή του *β*-φελλανδρενίου γινόταν προσθήκη 10% (v/v) CO_2.

4.3.4 Ταυτοποίηση του παραγόμενου β-φελλανδρενίου με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας

Τα δείγματα εξανίου που συλλέχθηκαν αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία (Agilent 6890) συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (Agilent 5973 inert). Χρησιμοποιήθηκε τριχοειδής στήλη DB-5ms με διαστάσεις: μήκος 30 m, διάμετρος 0,25 mm και πάχος 0,25 μm. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα είχε διάρκεια 39,50 min και είχε ως εξής:

iv. Αρχική θερμοκρασία 50 ^{o}C και παραμονή σε αυτή για 4 min.

v. Σταθερή αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 4°C/min έως τους 150 ^{o}C.

vi. Αύξηση μέχρι τους 260 ^{o}C με ρυθμό 20 ^{o}C/min και παραμονή στους 260 ^{o}C για 5 min.

Το φέρον αέριο ήταν ήλιο με ροή 1,2 mL/min. Η εισαγωγή του δείγματος έγινε με αυτόματο δειγματολήπτη σε on-column εισαγωγέα και ο όγκος του δείγματος είναι 1 μL. Η θερμοκρασία της transfer line ήταν 280°C. Οι συνθήκες ηλεκτρονικού ιονισμού ήταν ενέργεια ιονισμού 70eV, θερμοκρασία της πηγής ιόντων 180 ^{o}C και πεδίο τιμών μάζας 45-500.

Για την ταυτοποίηση του *β*-φελλανδρενίου στα δείγματα που συλλέχθηκαν έγινε σύγκριση του χρόνου κατακράτησης αυτών με αυτό προτύπου *β*-φελλανδρενίου. Επίσης έγινε σύγκριση των φασμάτων μάζας με το αντίστοιχο πρότυπο *β*-φελλανδρένιο και με βάσεις δεδομένων.

4.3.5 Ποσοτικός προσδιορισμός του παραγόμενου β-φελλανδρενίου

Η ποσοτικοποίηση του *β*-φελλανδρενίου πραγματοποιήθηκε με φασματοφωτομετρία υπεριώδους όπου το *β*-φελλανδρένιο δίνει χαρακτηριστική κορυφή στα 232,4 nm, και την εφαρμογή του νόμου του Beer-Lambert ($\varepsilon_{232,4}$=15,7 mM^{-1} cm^{-1}) [107]. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μg *β*-φελλανδρενίου ανά L καλλιέργειας.

4.3.6 Προσδιορισμός ελεύθερων κυττάρων στο θρεπτικό μέσο

Για τον προσδιορισμό των ελεύθερων κυττάρων στο θρεπτικό μέσο πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις οπτικής πυκνότητας στα 730 (OD_{730}) και μετρήσεις συγκέντρωσης χλωροφύλλης.

4.3.7 Ποσοτικός προσδιορισμός της χλωροφύλλης

Για την ποσοτικοποίηση της χλωροφύλλης, 1 mL καλλιέργειας φυγοκεντρίθηκε στα 1000 x g για 1 min σε μία φυγόκεντρο Eppendorf και έπειτα από την απόρριψη του υπερκειμένου, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1 mL 100% μεθανόλης. Έπειτα από επώαση 10-15 min στο σκοτάδι, το δείγμα φυγοκεντρείται προκειμένου να απομακρυνθεί το ίζημα και λαμβάνεται η απορρόφηση του υπερκειμένου σε συγκεκριμένα μήκη κύματος (470 nm, 650 nm, 665 nm, 710 nm) με χρήση ενός φασματοφωτομέτρου υπεριώδους-ορατού (Shimadzu UV-2700). Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης-α έγινε με βάση γνωστή εξίσωση από τη βιβλιογραφία η οποία παρουσιάζεται παρακάτω [146].

$$\text{Chl (μg/mL)} = 16.5(A_{665} - A_{710}) - 8.3(A_{665} - A_{710})$$

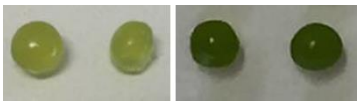
4.3.8 Παρατήρηση σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου με χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης

Δείγματα ελεύθερων καθώς και ακινητοποιημένων κυττάρων σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου προετοιμάστηκαν για παρατήρηση με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) [10, 30]. Τα σφαιρίδια αρχικά υπέστησαν δύο δεκάλεπτες πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα διμεθυλαρσινικού νατρίου (sodium cacodylate buffer, SCB) συγκέντρωσης 0,1 M και pH 7,4. Στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν σε διάλυμα 2% w/v γλουταραλδεΰδης (GDA) και 2% w/v παραφορμαλδεΰδης (PFA) σε διάλυμα 0,08 M SCB, pH 7,4 για 45 min. Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν δύο δεκάλεπτες πλύσεις με διάλυμα 0,1 M SCB, pH 7,4 προκειμένου να απομακρυνθούν οι μονιμοποιητές. Όσον αφορά τα ελεύθερα κύτταρα ποσότητα 1 mL καλλιέργειας φυγοκεντρίθηκε σε φυγόκεντρο Eppendorf Centrifuge 5412 για 5 min και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τα σφαιρίδια αλγινικού όσον αφορά τις πλύσεις και τη μονιμοποίηση. Στη συνέχεια τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε φίλτρα Whatman 0,2 μm. Έπειτα τα σφαιρίδια και τα ελεύθερα κύτταρα υπέστησαν αφυδάτωση με διαδοχικές πλύσεις διάρκειας 10 min με 30%, 50%, 70%, 90% και 100% αιθανόλη, στους 4°C και τέλος μία πλύση με ξηρή αιθανόλη. Στη συνέχεια τα δείγματα υπέστησαν πλήρη αφυδάτωση με χρήση μίας συσκευής ξήρανσης κρίσιμου σημείου του διοξειδίου του άνθρακα (BAL-TEC, CPD 030 Critical Point Dryer). Τα δείγματα 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 ώστε να γίνουν ηλεκτρικά αγώγιμα. Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε σε ένα

JEOL JSM-6390LV Scanning Electron Microscope σε διαφορά δυναμικού δέσμης ηλεκτρονίων 20 kV.

4.4 Αποτελέσματα και συζήτηση

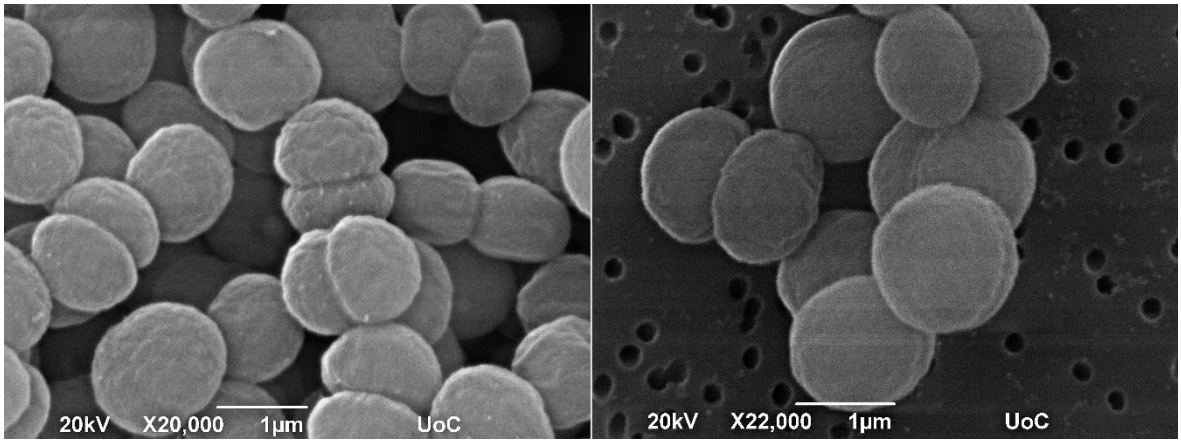
Για την παρασκευή των σφαιριδίων αλγινικού με παγιδευμένα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν τα μεταλλαγμένα στελέχη Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS και Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA). Τα σφαιρίδια την ημέρα που κατασκευάστηκαν είχαν ανοιχτό πράσινο χρώμα το οποίο οφείλεται στο περιεχόμενο χλωροφύλλης-α που περιέχουν τα παραπάνω μεταλλάγματα *Synechocystis*. Έπειτα από δύο ημέρες παραμονής των σφαιριδίων σε θρεπτικό μέσο BG11-HEPES/NaOH, παρουσία 20% (v/v) CO_2 και υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας ίσης με 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1} παρατηρήθηκε διαφοροποίηση στο χρώμα των σφαιριδίων, τα οποία απέκτησαν πιο έντονο πράσινο χρώμα (Εικόνα 4.5). Αυτό υποδηλώνει την ανάπτυξη των κυττάρων *Synechocystis* μέσα στα σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου. Με τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυξάνεται και το περιεχόμενο σε χλωροφύλλη-α με αποτέλεσμα να γίνεται εντονότερο το χρώμα των σφαιριδίων.



Εικόνα 4.5. Σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου συγκέντρωσης 3% με παγιδευμένα κύτταρα του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA). Αριστερά παρουσιάζονται σφαιρίδια αμέσως μετά την παρασκευή τους (πειραματική ημέρα 0) και δεξιά σφαιρίδια έπειτα από δύο μέρες παραμονής τους στο θρεπτικό μέσο BG11-HEPES/NaOH, παρουσία 20% (v/v) CO_2 και υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας ίσης με 50 μmol φωτονίων·m^{-2}·s^{-1}.

Φωτογραφίες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης λήφθηκαν αμέσως μετά την κατασκευή των σφαιριδίων (πειραματική ημέρα 0) αλλά και την πειραματική ημέρα 12 με σκοπό να ληφθούν πληροφορίες σχετικά με τα χαρακτηριστικά των παγιδευμένων κυττάρων και τον τρόπο ανάπτυξης τους μέσα στα σφαιρίδια. Πριν την μονιμοποίηση κατά την προετοιμασία των σφαιριδίων για παρατήρηση με SEM κάποια σφαιρίδια σκίστηκαν στη μέση με τη χρήση δύο βελονιών προκειμένου να επιτραπεί η μελέτη του εσωτερικού τους.

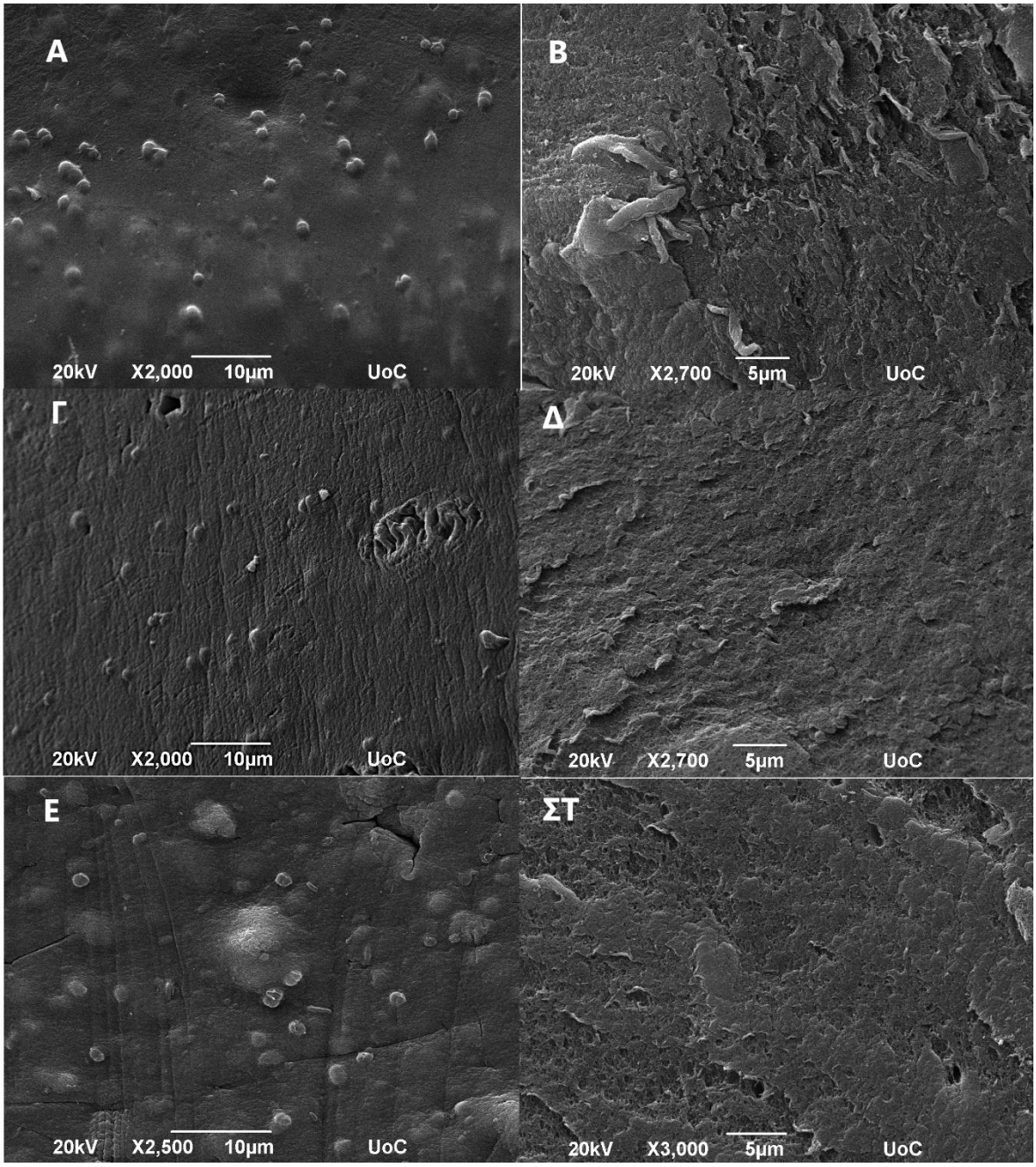
Στην Εικόνα 4.6 παρουσιάζονται φωτογραφίες από την παρατήρηση με SEM των κυττάρων *Synechocystis*, του στελέχους αγρίου τύπου όταν αναπτύσσονται ελεύθερα σε θρεπτικό μέσο BG11. Όπως παρατηρείται από τις φωτογραφίες, τα κύτταρα έχουν σφαιρικό σχήμα και διάμετρο 1 μm.



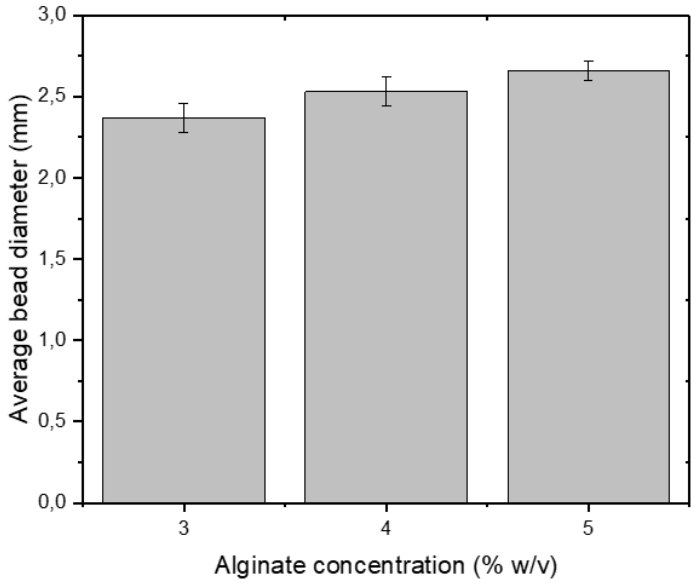
Εικόνα 4.6. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης κυττάρων *Synechocystis*, του στελέχους αγρίου τύπου. Η δεξιά Εικόνα ελήφθη από την παραπομπή [30].

Στην Εικόνα 4.7 παρουσιάζονται οι φωτογραφίες από την παρατήρηση με SEM τόσο των εξωτερικών (αριστερά) όσο και εσωτερικών (δεξιά) επιφανειών των σφαιριδίων με ποσοστό αλγινικού 3%, 4% και 5% αμέσως μετά την παρασκευή τους, την πειραματική ημέρα 0. Στις φωτογραφίες παρατηρείται τυχαία κατανομή των βακτηρίων στην εξωτερική επιφάνεια των σφαιριδίων. Όσον αφορά το εσωτερικό των σφαιριδίων δεν παρατηρούνται κύτταρα. Αυτό ίσως οφείλεται στο ότι κατά την παρασκευή των σφαιριδίων χρησιμοποιείται ποσότητα κυττάρων οπτικής πυκνότητας (OD_{730}) 0,5, δηλαδή δείγμα με χαμηλή συγκέντρωση κυττάρων.

Στις Εικόνες 4.9, 4.11 και 4.13 παρουσιάζονται οι φωτογραφίες που ελήφθησαν έπειτα από παρατήρηση με SEM τόσο της εξωτερικής όσο και εσωτερικής επιφάνειας των σφαιριδίων, με ποσοστό αλγινικού 3, 4 και 5% αντίστοιχα, έπειτα από 12 ημέρες παραμονής τους σε θρεπτικό μέσο. Και στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις αλγινικού παρατηρήθηκαν καλοσχηματισμένα σφαιρίδια με ομοιόμορφη επιφάνεια. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η διάμετρος των σφαιριδίων αυξάνεται αναλογικά όσο αυξάνεται και το ποσοστό του αλγινικού (Εικόνα 4.8). Η αύξηση της διαμέτρου των σφαιριδίων σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλγινικού οφείλεται στην αύξηση του ιξώδους του διαλύματος με αποτέλεσμα το σχηματισμό μεγαλύτερου μεγέθους σταγόνας.

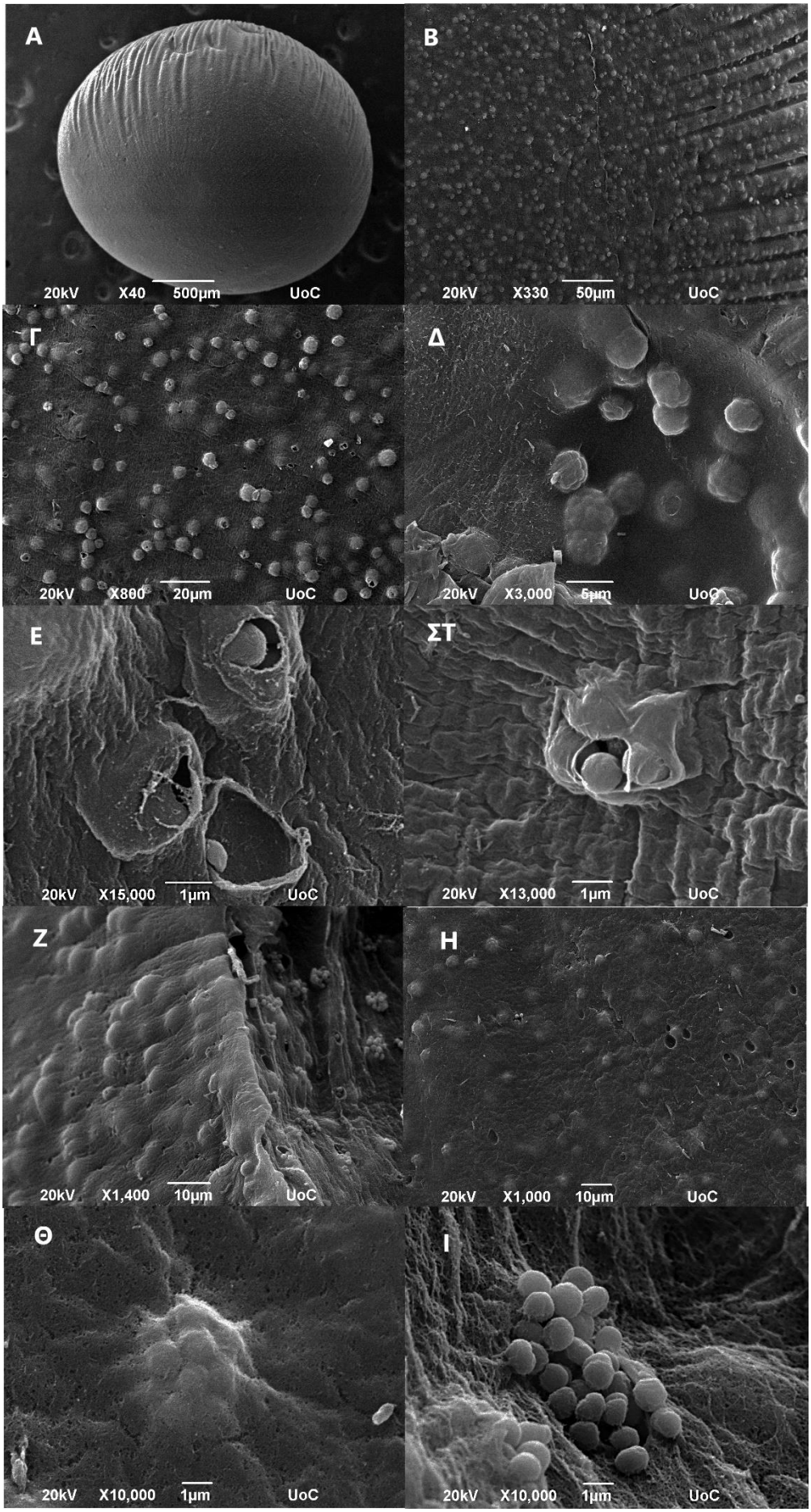


Εικόνα 4.7. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης των σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου που παρασκευάστηκαν από διαλύματα συγκέντρωσης 3%, 4% και 5%, αμέσως μετά την παρασκευή τους (πειραματική ημέρα 0). **Α-Β.** Εξωτερική και εσωτερική επιφάνεια του σφαιριδίου αντίστοιχα, 3% συγκέντρωσης αλγινικού. **Γ-Δ.** Εξωτερική και εσωτερική επιφάνεια του σφαιριδίου αντίστοιχα, 4% συγκέντρωσης αλγινικού. **Ε-ΣΤ.** Εξωτερική και εσωτερική επιφάνεια του σφαιριδίου αντίστοιχα, 5% συγκέντρωσης αλγινικού.



Εικόνα 4.8. Μέσος όρος διαμέτρου των σφαιριδίων που παρασκευάστηκαν από συγκεντρώσεις διαλύματος αλγινικού 3, 4 και 5% .

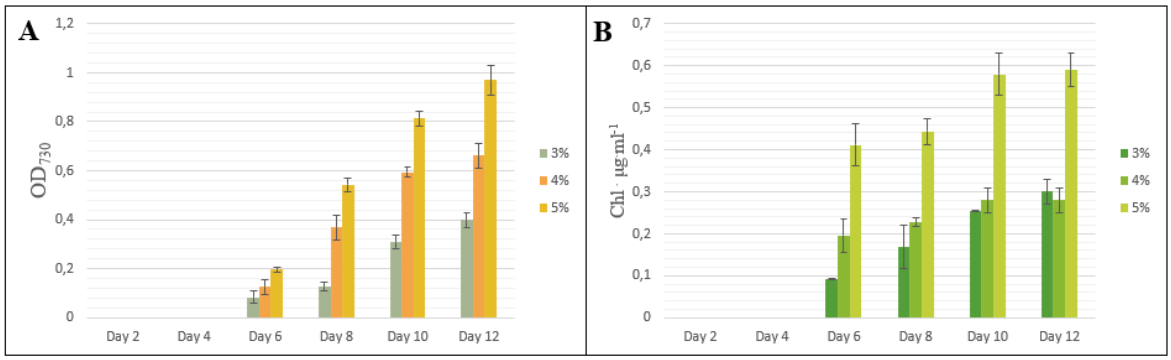
Οι φωτογραφίες που ελήφθησαν με SEM φανερώνουν πως τα *Synechocystis* μπορούν να πολλαπλασιάζονται και να σχηματίζουν διακριτές αποικίες τόσο στην εξωτερική επιφάνεια των σφαιριδίων όσο και στο εσωτερικό τους. Παρατηρείται πως η ανάπτυξη είναι μεγαλύτερη στην εξωτερική επιφάνεια του σφαιριδίου. Αυτό ίσως οφείλεται στο ότι τα κύτταρα που βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια του σφαιριδίου έρχονται σε επαφή με το θρεπτικό μέσο σε σχέση με αυτά που βρίσκονται στο εσωτερικό. Φαίνεται επίσης πως το υλικό περικλείει τις αποικίες των κυττάρων ως ένας μανδύας. Το φαινόμενο αυτό, όπου το πολυμερές «αγκαλιάζει» τα κύτταρα έχει παρατηρηθεί και στη βιβλιογραφία όπου αναφέρεται πως τα κύτταρα περικλείονται από μία «μεμβράνη» του υλικού [197, 198]. Το φαινόμενο αυτό φαίνεται να είναι πιο έντονο κυρίως σε μικρές συγκεντρώσεις αλγινικού όπως παρατηρήθηκε από τις φωτογραφίες SEM στις Εικόνες 4.9.Δ και 4.9.Θ. Η παρατήρηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με αποτελέσματα προηγούμενης εργασίας του εργαστηρίου όπου όταν κύτταρα *Chlamydomonas reinhardtii* ακινητοποιήθηκαν σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου συγκέντρωσης 3, 4, 5 και 6% έδειξαν πως το φαινόμενο όπου το υλικό περικλείει τα κύτταρα ως μεμβράνη είναι εντονότερο σε υψηλότερες και όχι χαμηλότερες συγκεντρώσεις αλγινικού [10].


A
20kV X40 500μm UoC
B
20kV X330 50μm UoC
Γ
20kV X800 20μm UoC
Δ
20kV X3,000 5μm UoC
E
20kV X15,000 1μm UoC
ΣΤ
20kV X13,000 1μm UoC
Z
20kV X1,400 10μm UoC
H
20kV X1,000 10μm UoC
Θ
20kV X10,000 1μm UoC
I
20kV X10,000 1μm UoC

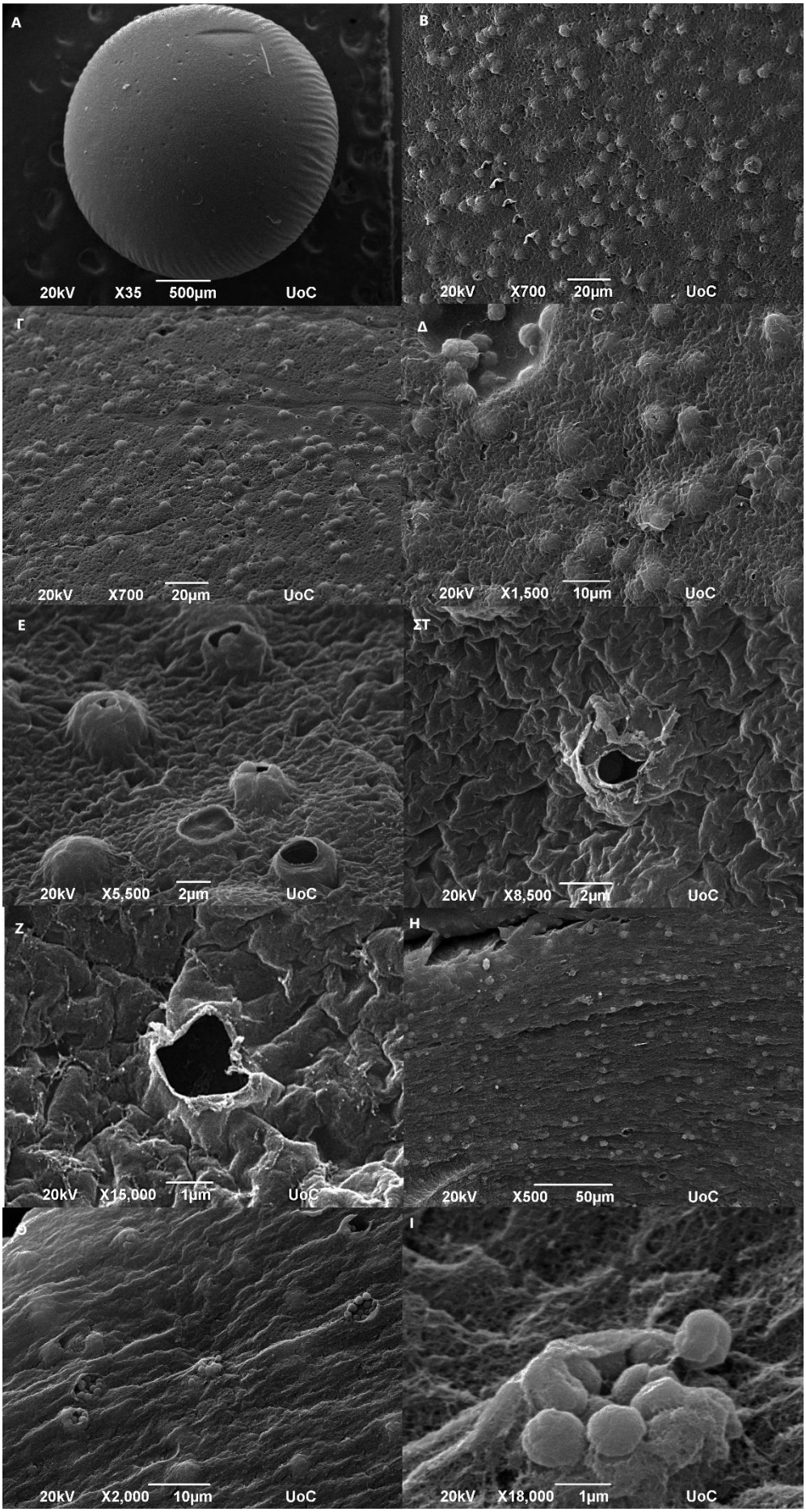
Εικόνα 4.9. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης της εξωτερικής επιφάνειας των σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου συγκέντρωσης 3%, με ακινητοποιημένα κύτταρα *Synechocystis* μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) την 12η πειραματική ημέρα. **A.** Ολόκληρο σφαιρίδιο αλγινικού. **B-ΣΤ.** Εξωτερική επιφάνεια του σφαιριδίου. **Ζ.** Εξωτερική και εσωτερική επιφάνεια του σφαιριδίου. **Η-Ι.** Εσωτερική επιφάνεια του σφαιριδίου.

Επιπλέον, και στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις αλγινικού παρατηρήθηκε ο σχηματισμός οπών σε αποικίες στην εξωτερική τους επιφάνεια. Οι οπές αυτές πιθανώς να οφείλονται στη μηχανική δύναμη που ασκείται κατά τη διαίρεση των κυττάρων, τα οποία φαίνεται να πολλαπλασιάζονται και να σχηματίζουν αποικίες προς τα έξω, στην επιφάνεια του σφαιριδίου. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται κυρίως σε υψηλές συγκεντρώσεις αλγινικού (5%) και όχι τόσο στο 3%, όπου τα κύτταρα φαίνεται να έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται περιμετρικά και όχι μόνο προς τα έξω. Επίσης, παρατηρήθηκε πως οι οπές σε συγκέντρωση 5% αλγινικού είναι περισσότερες και μεγαλύτερες σε μέγεθος σε σχέση με αυτές που παρατηρούνται στο 3%. Παρατηρούνται επίσης λιγότερα έως καθόλου κύτταρα μέσα στις οπές σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλγινικού σε σχέση με τα σφαιρίδια συγκέντρωσης αλγινικού 3%. Η παρατήρηση αυτή ίσως υποδηλώνει ευκολότερη απελευθέρωση κυττάρων σε υψηλές συγκεντρώσεις αλγινικού έναντι του 3%. Την 6η πειραματική ημέρα παρατηρήθηκε αλλαγή στο χρώμα του θρεπτικού μέσου όπου βρίσκονται τα σφαιρίδια αλγινικού, το οποίο από διαφανές, απέκτησε ένα ελαφρύ πράσινο χρώμα. Το χρώμα αυτό υποδηλώνει την παρουσία κυττάρων στο θρεπτικό μέσο. Το χρώμα μάλιστα ήταν περισσότερο έντονο σε συγκέντρωση αλγινικού 5% η ένταση μειωνόταν διαδοχικά με μείωση της συγκέντρωσης του αλγινικού. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τις μετρήσεις οπτικής πυκνότητας και συγκέντρωσης χλωροφύλλης στο θρεπτικό μέσο όπου βρίσκονται τα σφαιρίδια. Σε συγκέντρωση 3% αλγινικού το OD_{730} του θρεπτικού μέσου ήταν 0,08 (σημαντικά χαμηλότερο του 0,5 το οποίο αποτελεί την αρχική συγκέντρωση κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε κατά την παρασκευή των σφαιριδίων). Σε συγκεντρώσεις αλγινικού 4 και 5% οι τιμές OD_{730} στο θρεπτικό μέσο ήταν 0,13 και 0,20 αντίστοιχα. Να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα προσδιορισμού της συγκέντρωσης των ελευθέρων κυττάρων στο θρεπτικό μέσο από τις επόμενες ημέρες (8η και μετά) δεν αναφέρονται μόνο σε κύτταρα που έχουν απελευθερωθεί από τα σφαιρίδια, αλλά και στα κύτταρα που προέρχονται από τη διαίρεση των αρχικών που απελευθερώθηκαν. Επίσης σε

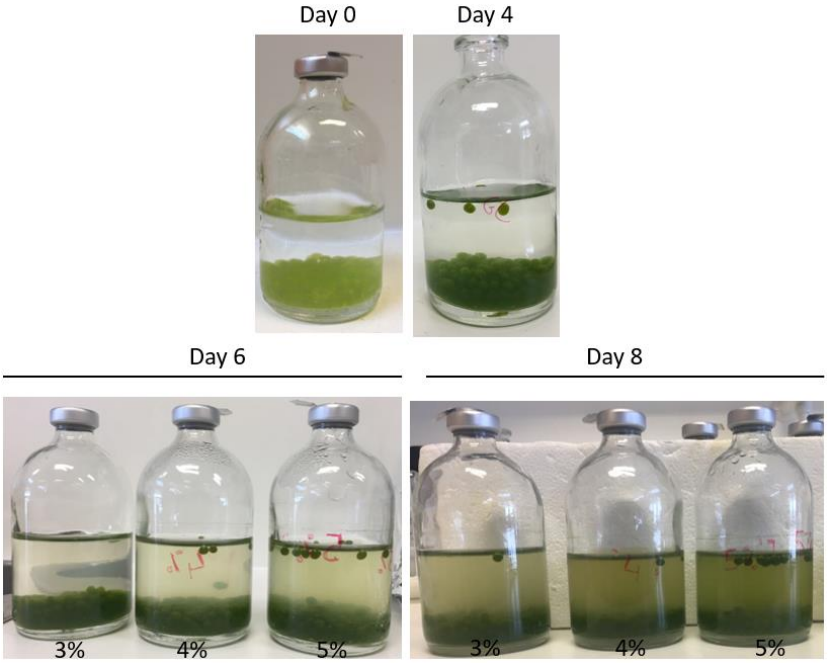
συγκεντρώσεις 4 και 5% φαίνεται να υπάρχουν λιγότερες και πιο μεμονωμένες αποικίες στο εσωτερικό των σφαιριδίων σε σχέση με τα σφαιρίδια σε συγκέντρωση 3%.



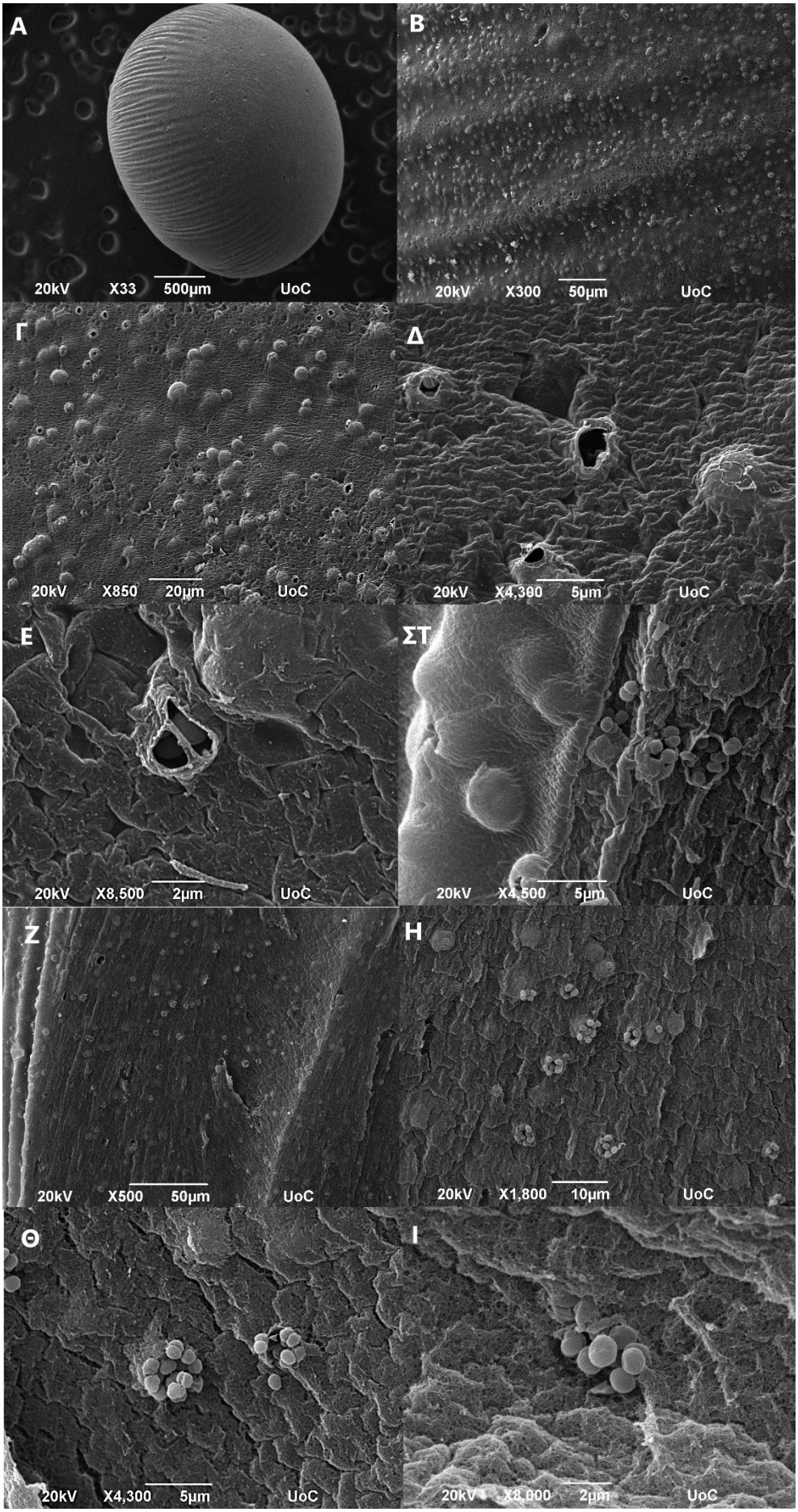
Εικόνα 4.10. Στην Εικόνα παρουσιάζονται οι μετρήσεις οπτικής πυκνότητας στα 730 nm (OD_{730}) και συγκέντρωσης χλωροφύλλης του θρεπτικού μέσου όπου βρίσκονται τα σφαιρίδια αλγινικού με τα παγιδευμένα κύτταρα *Synechocystis*.


A
20kV X35 500μm UoC
B
20kV X700 20μm UoC
Γ
20kV X700 20μm UoC
Δ
20kV X1,500 10μm UoC
E
20kV X5,500 2μm UoC
ΣΤ
20kV X8,500 2μm UoC
Z
20kV X15,000 1μm UoC
H
20kV X500 50μm UoC
20kV X2,000 10μm UoC
I
20kV X18,000 1μm UoC

Εικόνα 4.11. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης της εξωτερικής επιφάνειας των σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου συγκέντρωσης 4%, με ακινητοποιημένα κύτταρα *Synechocystis* μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) την 12η πειραματική ημέρα. **A.** Ολόκληρο σφαιρίδιο αλγινικού. **B-Z.** Εξωτερική επιφάνεια του σφαιριδίου. **H-I.** Εσωτερική επιφάνεια του σφαιριδίου.



Εικόνα 4.12. Βιοαντιδραστήρες των 100 mL με ακινητοποιημένα κύτταρα *Synechocystis* σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου από τέσσερις διαφορετικές πειραματικές ημέρες. Πάνω αριστερά παρουσιάζεται βιοαντιδραστήρας με σφαιρίδια που μόλις έχουν κατασκευαστεί, ενώ δεξιά έπειτα από τέσσερις μέρες. Κάτω παρουσιάζονται βιοαντιδραστήρες με παγιδευμένα κύτταρα σε σφαιρίδια αλγινικού συγκεντρώσεων 3, 4 και 5%. Κάτω αριστερά παρουσιάζονται οι βιοαντιδραστήρες κατά την 6η πειραματική ημέρα και δεξιά κατά την 8η. Στην 6η πειραματική ημέρα το θρεπτικό αποκτά ένα ελαφρύ πράσινο χρώμα που συνεπάγεται απελευθέρωση κυττάρων από τα σφαιρίδια.

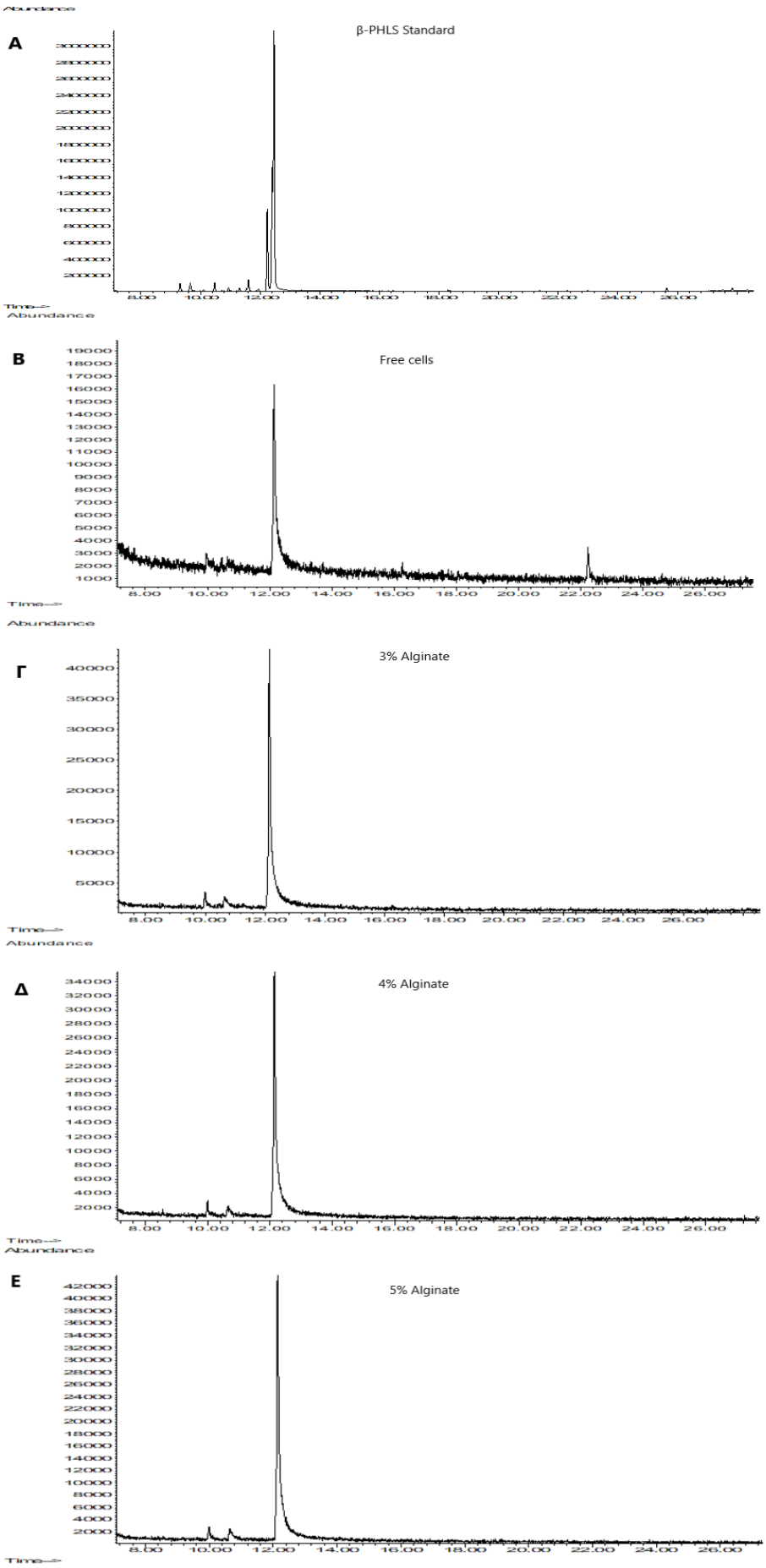

A
20kV X33 500μm UoC
B
20kV X300 50μm UoC
Γ
20kV X850 20μm UoC
Δ
20kV X4,300 5μm UoC
E
20kV X8,500 2μm UoC
ΣΤ
20kV X4,500 5μm UoC
Z
20kV X500 50μm UoC
H
20kV X1,800 10μm UoC
Θ
20kV X4,300 5μm UoC
I
20kV X8,000 2μm UoC

Εικόνα 4.13. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης της εξωτερικής επιφάνειας των σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου συγκέντρωσης 3%, με ακινητοποιημένα κύτταρα *Synechocystis* μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) την 12^{η} πειραματική ημέρα. **A.** Ολόκληρο σφαιρίδιο αλγινικού. **B-E.** Εξωτερική επιφάνεια του σφαιριδίου. **ΣΤ.** Εξωτερική και εσωτερική επιφάνεια του σφαιριδίου. **Ζ-Ι.** Εσωτερική επιφάνεια του σφαιριδίου.

Οι παρατηρήσεις από τις φωτογραφίες του SEM σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της μελέτης της απελευθέρωσης των κυττάρων από τα σφαιρίδια υποδεικνύουν πως σε μικρότερες συγκεντρώσεις αλγινικού ασβεστίου (3%) καταγράφεται χαμηλότερη απελευθέρωση κυττάρων σε σχέση με τις συγκεντρώσεις 4 και 5%. Αυτό ίσως οφείλεται στις μηχανικές ιδιότητες του υλικού. Φαίνεται πως η πιο αραιή συγκέντρωση αλγινικού ευνοεί το σχηματισμό αποικιών, οι οποίες παραμένουν πάνω στα σφαιρίδια. Σφαιρίδια μικρότερης συγκέντρωσης αλγινικού συνεπάγεται περισσότερη ελαστικότητα του υλικού, δίνοντας έτσι στα *Synechocystis* περισσότερο χώρο για να πολλαπλασιαστούν. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλγινικού, αφενός δημιουργούνται μικρότερες και λιγότερες σε αριθμό αποικίες, και αφετέρου λόγο του πιο συμπαγούς υλικού τα κύτταρα πιθανώς να μην να παραμένουν προσκολλημένα στην αποικία κατά τη διαίρεση και να απελευθερώνονται λόγο περιορισμένου χώρου.

Στη συνέχεια για να εξεταστεί εάν τα ακινητοποιημένα κύτταρα *Synechocystis* έχουν την ικανότητα να παράγουν ετερόλογα *β*-φελλανδρένιο παρασκευάστηκαν σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου με παγιδευμένα κύτταρα Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS σε συγκεντρώσεις αλγινικού 3, 4 και 5%. Το πείραμα έγινε ενδεικτικά και συνεπώς χρησιμοποιήθηκε ένας βιοαντιδραστήρας για κάθε συγκέντρωση αλγινικού και όχι εις διπλούν. Η διαδικασία συλλογής του παραγόμενου *β*-φελλανδρενίου καθώς και η ποσοτικοποίηση του πραγματοποιήθηκαν όπως αναφέρεται στο Κεφάλαιο 2. Τα χρωματογραφικά προφίλ των δειγμάτων αποδεικνύουν πως τα ακινητοποιημένα κύτταρα του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS διατηρούν την ικανότητα τους να παράγουν *β*-φελλανδρένιο. Πολύ ενδιαφέροντα μάλιστα έχουν τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης του παραγόμενου *β*-φελλανδρενίου, όπου φαίνεται πως τα ακινητοποιημένα κύτταρα παράγουν περίπου 80% περισσότερο προϊόν σε σχέση με τα ελεύθερα έπειτα από 48 ώρες καλλιέργειας τους στους βιοαντιδραστήρες. Μεταξύ των τριών συγκεντρώσεων αλγινικού δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση στη συγκέντρωση του παραγόμενου *β*-φελλανδρενίου.

Συνεπώς, από τα αποτελέσματα της παρατήρησης στο SEM, της μελέτης για την απελευθέρωση των κυττάρων και της ποσοτικοποίησης, όπου φάνηκε να μην υπάρχει διαφοροποίηση στις τρεις συγκεντρώσεις αλγινικού, επιλέχθηκε η παρασκευή σφαιριδίων με συγκέντρωση 3% αλγινικού προκειμένου να γίνει περαιτέρω μελέτη.


A
β-PHLS Standard
B
Free cells
Г
3% Alginate
Δ
4% Alginate
E
5% Alginate
Abundance
Time-->

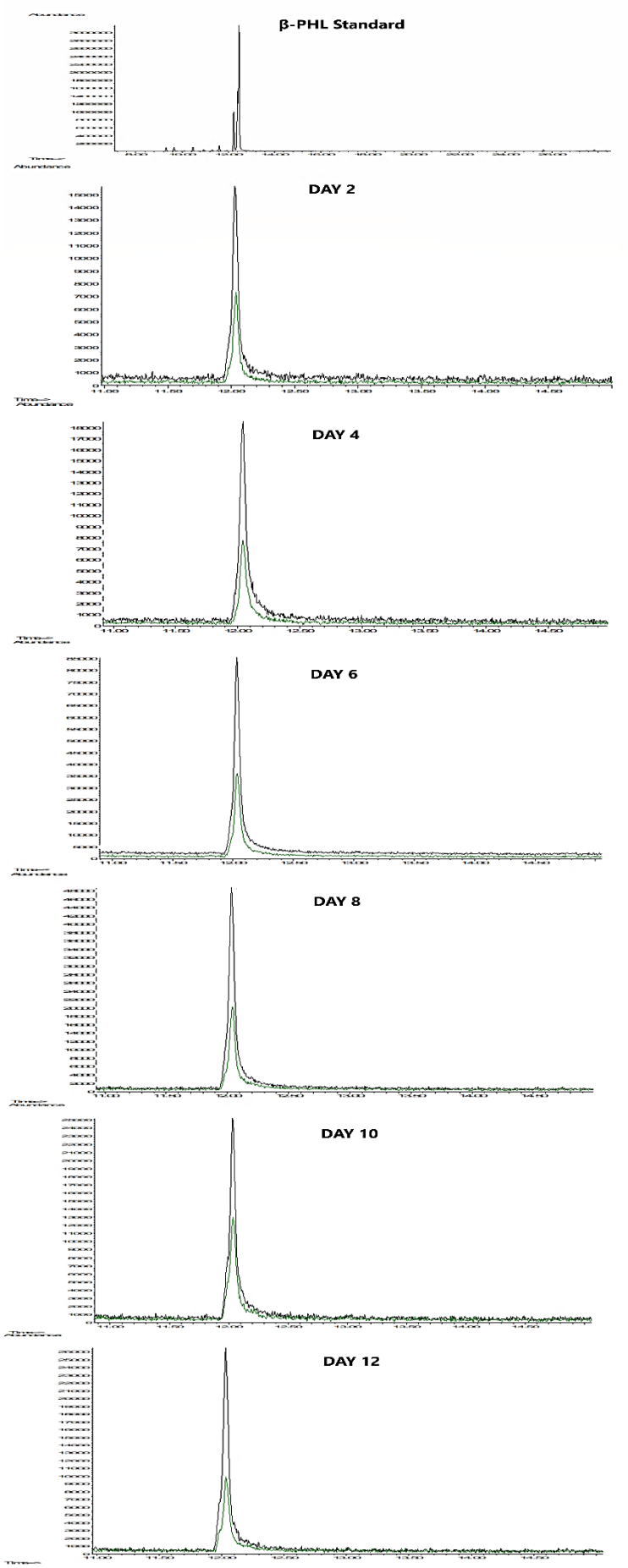
Εικόνα 4.14. Χρωματογραφικά προφίλ, που ελήφθησαν μέσω αέριας χρωματογραφίας, των δειγμάτων που εκχυλίστηκαν με εξάνιο από δείγματα ελεύθερων καθώς και ακινητοποιημένων κυττάρων Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου σε συγκεντρώσεις 3,4 και 5% (από πάνω προς τα κάτω). Πάνω παρουσιάζεται το χρωματογράφημα GC του προτύπου *β*-φελλανδρενίου.

Πίνακας 4.1. Απόδοση του παραγόμενου *β*-φελλανδρενίου από ελεύθερα και ακινητοποιημένα κύτταρα Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS έπειτα από 48 ώρες ανάπτυξης στους βιοαντιδραστήρες 100 mL. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μg *β*-φελλανδρενίου ανά λίτρο καλλιέργειας.

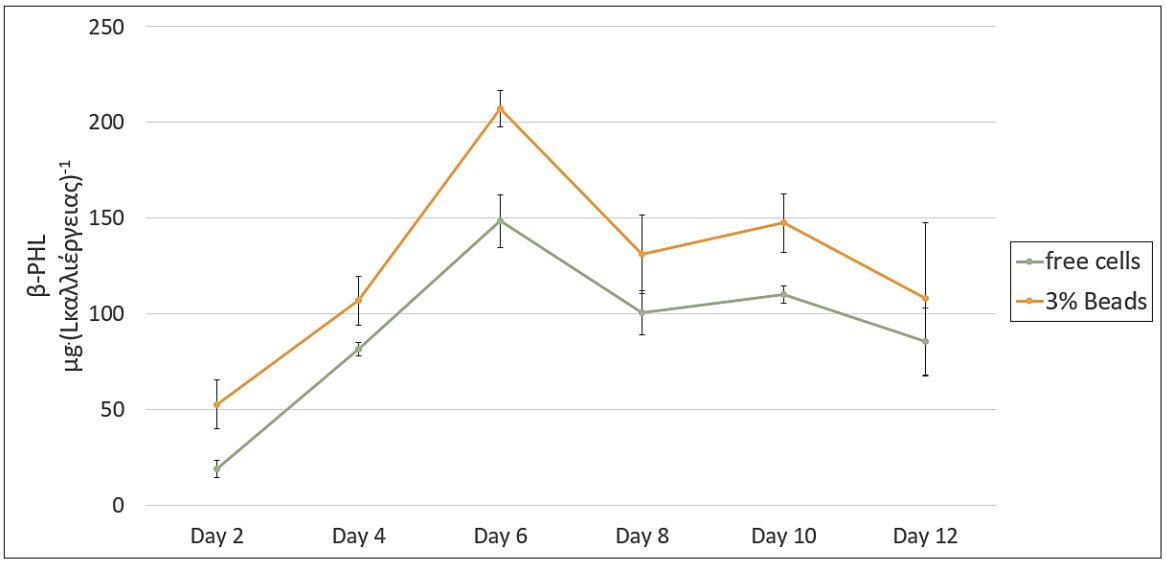
	***β*-PHL** **μg·(Lκαλλιέργειας)$^{-1}$**
Καλλιέργεια ελεύθερων κυττάρων	67
3%	123
4%	105
5%	120

Σε δεύτερη φάση παρασκευάστηκαν σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου συγκέντρωσης 3% με παγιδευμένα κύτταρα Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) προκειμένου να μελετηθεί η σταθερότητα των σφαιριδίων αλλά και η ικανότητα των ακινητοποιημένων κυττάρων Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) να παράγουν *β*-φελλανδρένιο με την πάροδο του χρόνου. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε για 12 ημέρες και, παράλληλα με τα ακινητοποιημένα κύτταρα, μελετήθηκαν καλλιέργειες ελεύθερων κυττάρων. Κάθε 48 ώρες, δείγμα *β*-φελλανδρενίου συλλεγόταν από ελεύθερα και ακινητοποιημένα κύτταρα ώστε να πραγματοποιηθεί ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση του. Κάθε 48 ώρες γινόταν προσθήκη μικρής ποσότητας CO_2 στους βιοαντιδραστήρες.

Από τα χρωματογραφικά προφίλ προκύπτει πως το μεταλλαγμένο στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) είναι ικανό να παράγει *β*-φελλανδρένιο για έως και 12 ημέρες, είτε τα κύτταρα αναπτύσσονται ελεύθερα σε θρεπτικό μέσο BG11 είτε είναι ακινητοποιημένα σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου. Στη βιβλιογραφία έχει μελετηθεί η παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου από μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis* μόνο έπειτα από 48 ώρες ανάπτυξης των κυττάρων σε ειδικούς βιοαντιδραστήρες. Υπάρχει μόνο μία αναφορά όπου μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis* ήταν ικανά να παράγουν *β*-φελλανδρένιο μέχρι και 8 ημέρες ανάπτυξης στους ειδικούς βιοαντιδραστήρες [62].


β-PHL Standard
DAY 2
DAY 4
DAY 6
DAY 8
DAY 10
DAY 12

Εικόνα 4.15. Συγκριτικά χρωματογραφικά προφίλ, που ελήφθησαν μέσω αέριας χρωματογραφίας, των δειγμάτων εξανίου που εκχυλίστηκαν από δείγματα ελεύθερων και ακινητοποιημένων κυττάρων Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου συγκέντρωσης 3% έπειτα από 2, 4, 6, 8, 10 και 12 ημέρες. Με μαύρο χρώμα παρουσιάζεται το χρωματογράφημα του δείγματος που εκχυλίστηκε από ακινητοποιημένα κύτταρα ενώ με πράσινο το δείγμα που συλλέχθηκε την ίδια πειραματική ημέρα από ελεύθερα κύτταρα. Πάνω παρουσιάζεται το χρωματογράφημα GC του προτύπου *β*-φελλανδρενίου.



Εικόνα 4.16. Απόδοση του παραγόμενου *β*-φελλανδρενίου από ελεύθερα και ακινητοποιημένα κύτταρα Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) έπειτα από 2, 4, 6, 8, 10 και 12 ημέρες ανάπτυξης στους βιοαντιδραστήρες 100 mL. Με πορτοκαλί φαίνονται τα αποτελέσματα για το δείγμα που συλλέχτηκε από ακινητοποιημένα κύτταρα ενώ με γκρι από ελεύθερα κύτταρα. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μg *β*-φελλανδρενίου ανά λίτρο καλλιέργειας.

Στην Εικόνα 4.15 παρουσιάζονται συγκριτικά τα χρωματογραφικά προφίλ των ελεύθερων αλλά και ακινητοποιημένων κυττάρων, στο ίδιο χρωματογράφημα, για τις πειραματικές ημέρες 2, 4, 6, 8, 10 και 12. Σύμφωνα με τα χρωματογραφήματα αλλά και τα αποτελέσματα της ποσοτικοποίησης του παραγόμενου *β*-φελλανδρενίου προκύπτει ότι τα ακινητοποιημένα κύτταρα παράγουν *β*-φελλανδρενίου σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, όλες τις ημέρες που διήρκεσε το πείραμα. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση παραγόμενου

β-φελλανδρενίου παρατηρείται την 6η πειραματική ημέρα τόσο στις καλλιέργειες των ακινητοποιημένων όσο και των ελεύθερων κυττάρων, ενώ από την 8η ημέρα παρατηρείται ένα πλατό στο παραγόμενο β-φελλανδρένιο. Να σημειωθεί ότι το β-φελλανδρένιο που παράγεται από την 6η ημέρα και μετά δεν οφείλεται μόνο στα ακινητοποιημένα κύτταρα αλλά και στα ελεύθερα που υπάρχουν στο θρεπτικό μέσο.

4.5. Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα του κεφαλαίου αυτού προκύπτει πως τα μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis* αναπτύσσονται σχηματίζοντας διακριτές αποικίες τόσο στην εξωτερική επιφάνεια όσο και στο εσωτερικό των σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου και στις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις αλγινικού που μελετήθηκαν. Η απελευθέρωση των κυττάρων ήταν σημαντικά υψηλότερη σε μεγαλύτερη συγκέντρωση αλγινικού σε σχέση με το 3%. Μάλιστα σε χαμηλότερη συγκέντρωση αλγινικού, 3%, τα *Synechocystis* παρουσίασαν καλύτερη ανάπτυξη, με περισσότερες και με μεγαλύτερες σε αριθμό κυττάρων αποικίες, στις οποίες τα κύτταρα παρέμεναν περισσότερο προσδεμένα στο υλικό.

Πολύ σημαντική είναι η παρατήρηση ότι τα ακινητοποιημένα κύτταρα *Synechocystis* παρέμειναν ενεργά για χρονικό διάστημα 12 ημερών. Όλες τις πειραματικές μέρες παρήγαγαν *β*-φελλανδρένιο σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα. Τα ελεύθερα κύτταρα παρέμειναν επίσης ενεργά για το ίδιο χρονικό διάστημα. Το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα παραγωγής *β*-φελλανδρενίου από μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis* που αναφέρεται στη βιβλιογραφία είναι 8 ημέρες.

Αναμφισβήτητα η χρήση συστημάτων ακινητοποιημένων κυττάρων μεταλλαγμένων στελεχών *Synechocystis* για την παραγωγή *β*-φελλανδρενίου ενισχύει την ήδη ανανεώσιμη, φιλική προς το περιβάλλον και οικονομικά προσιτή εναλλακτική μέθοδο που παρουσιάζεται στα προηγούμενα κεφάλαια. Η προσέγγιση αυτή για την παραγωγή τερπενοειδών από τα κυανοβακτήρια *Synechocystis* σε μεγαλύτερη κλίμακα προτείνει μία μέθοδο με σαφώς μεγαλύτερη ευκολία στο χειρισμό της κυτταρικής βιομάζας, καθώς τα κύτταρα θα αναπτύσσονται σε ένα πιο ελεγχόμενο περιβάλλον. Απαιτεί το σχεδιασμό μικρότερου μεγέθους βιοαντιδραστήρα και επιτρέπει την επαναχρησιμοποίηση των ίδιων κυττάρων, ενώ ταυτόχρονα επιτυγχάνεται σημαντικά μεγαλύτερη απόδοση. Αξιοσημείωτο είναι επίσης το γεγονός ότι προστατεύει τα κύτταρα από περιβαλλοντικούς παράγοντες και από μολύνσεις. Συνεπώς τέτοια συστήματα μπορούν να βρουν εφαρμογή και σε υγρά απόβλητα από αναερόβια χώνευση με σκοπό την παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου. Στην περίπτωση αυτή το πολυμερικό υλικό θα προστατεύει τα κύτταρα από πιθανές τοξικές ενώσεις ενώ ταυτόχρονα θα επιτρέπει τη διάχυση των θρεπτικών συστατικών. Τα αποτελέσματα του κεφαλαίου αυτού προσφέρουν την προοπτική της εφαρμογής της παραπάνω προσέγγισης σε μεγαλύτερης κλίμακας βιοαντιδραστήρες προκειμένου να παραχθούν προϊόντα υψηλής βιομηχανικής αξίας με έναν πιο ανανεώσιμο, οικονομικό και φιλικό προς το περιβάλλον τρόπο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 . ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η ετερόλογη παραγωγή του μονοτερπενίου *β*-φελλανδρενίου από μεταλλαγμένα στελέχη του κυανοβακτηρίου *Synechocystis*. Από τα αποτελέσματα αποτυπώνεται πως τα μεταλλαγμένα TLA στελέχη *Synechocystis* που δημιουργήθηκαν μπορούν να ενσωματώσουν επιτυχώς στο γενωμικό τους DNA και να εκφράζουν ετερόλογα τις συνθάσες του *β*-φελλανδρενίου και του πυροφωσφορικού γερανυλίου. Τα στελέχη αυτά είναι ικανά να παράγουν *β*-φελλανδρένιο όταν καλλιεργούνται σε φωτοαυτότροφες συνθήκες σε ειδικούς βιοαντιδραστήρες χωρίς να επηρεάζεται η ανάπτυξη και η λειτουργία του φωτοσυνθετικού τους μηχανισμού.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε πως η ετερόλογη έκφραση της συνθάσης του πυροφωσφορικού γερανυλίου (GPPS), έστω και σε χαμηλότερα επίπεδα ενισχύει την παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου. Αντίθετα η χρήση ενός ισχυρού υποκινητή (cpc), σε συνδυασμό με τη χρήση της cpcB υπομονάδας ως αλληλουχίας οδηγό της *PHLS* φάνηκε να μην επάγει την έκφραση της σε υψηλά επίπεδα, όταν απουσιάζουν γονίδια του cpc οπερονίου. Αυτό φάνηκε να έχει αντίκτυπο στην παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου. Παρατηρήθηκε επίσης πως παρόλο που η σύνδεση της PHLS με την cpcB υπομονάδα της φυκοκυανίνης οδήγησε σε επιτυχή παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου από μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis*, η συγχώνευση της με την υπομονάδα cpcA της φυκοκυανίνης οδήγησε σε παραγωγή μείγματος ισομερών του.

Από τα αποτελέσματα του τρίτου κεφαλαίου αποτυπώνεται πως τόσο ό άγριος τύπος όσο και τα μεταλλαγμένα στελέχη *Synechocystis* μπορούν να αναπτύσσονται και να επιτελούν οξυγονική φωτοσύνθεση εξίσου καλά σε ουδέτερο και αλκαλικό pH. Τα μεταλλαγμένα στελέχη μάλιστα ήταν ικανά να παράγουν αντίστοιχες συγκεντρώσεις *β*-φελλανδρενίου σε ουδέτερο ή αλκαλικό pH, όταν καλλιεργήθηκαν στους βιοαντιδραστήρες. Επιπλέον, προέκυψε πως η υψηλότερη αλατότητα στο θρεπτικό μέσω των καλλιεργειών δεν παρεμποδίζει την ικανότητα των μεταλλαγμένων στελεχών να παράγουν *β*-φελλανδρένιο, είτε πρόκειται για ουδέτερο είτε για αλκαλικό pH. Όλα τα στελέχη ήταν εξίσου υγιή απουσία ή παρουσία 100 mM ή 600 mM NaCl σε θρεπτικό μέσο BG11 (με ουδέτερο ή αλκαλικό pH) όταν καλλιεργήθηκαν σε ειδικούς βιοαντιδραστήρες.

Σε επόμενο βήμα διαφοροποιήθηκαν κάποιες από τις συνθήκες ανάπτυξης των κυανοβακτηρίων με σκοπό την αύξηση της βιομάζας προκειμένου να αυξηθεί η απόδοση του *β*-φελλανδρενίου. Αρχικά εξετάστηκαν συνθήκες υψηλότερης συγκέντρωσης CO_2 και έντασης φωτονιακής ακτινοβολίας κατά την καλλιέργεια των στελεχών στους βιοαντιδραστήρες. Και στις δύο διαφορετικές συνθήκες δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στην ανάπτυξη, λειτουργία φωτοσυνθετικού μηχανισμού αλλά ούτε στην

παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου. Όταν τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε μιξότροφες ή ετερότροφες συνθήκες παρατηρήθηκε μειωμένη παραγωγή φωτοσυνθετικών χρωστικών και αναστολή της φωτοσυνθετικής λειτουργίας των μικροοργανισμών. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της βιομάζας χωρίς όμως να συνεπάγεται αύξηση της παραγωγής του *β*-φελλανδρενίου, η οποία μάλιστα μειώθηκε σε σχέση με τις φωτοαυτότροφες συνθήκες. Συνεπάγεται λοιπόν πως σε ετερότροφες συνθήκες, η μεγάλη αύξηση της βιομάζας δεν ευνοεί την παραγωγή του *β*-φελλανδρενίου μέσω του φωτοσυνθετικά εξαρτώμενου MEP μονοπατιού, εφόσον στις συνθήκες αυτές αναστέλλεται ταυτόχρονα η φωτοσυνθετική λειτουργία. Η αύξηση της βιομάζας, είτε επιτυγχάνεται μέσω συνθηκών που ευνοούν τη φωτοσυνθετική λειτουργία (αυξημένος φωτισμός και συγκέντρωση CO_2) είτε μέσω συνθηκών που την αναστέλλουν (ετερότροφες ή μιξότροφες συνθήκες) δεν οδηγεί απαραίτητα σε αύξηση της παραγωγής του *β*-φελλανδρενίου. Συνεπώς, η έρευνα πρέπει να επικεντρωθεί στη γενετική και μεταβολική μηχανική των *Synechocystis*. Η δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών με ενισχυμένο τον αργό δευτερογενή μεταβολισμό του βιοσυνθετικού μονοπατιού των τερπενοειδών μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή ετερόλογων προϊόντων σε μεγαλύτερες ποσότητες. Τέλος, η καλλιέργεια των μεταλλαγμένων στελεχών *Synechocystis* σε φωτοαυτότροφες συνθήκες, χωρίς την προσθήκη γλυκόζης ως εναλλακτικής πηγής άνθρακα παρέχει δύο μεγάλα πλεονεκτήματα. Η προσθήκη γλυκόζης όχι μόνο αυξάνει το κόστος της όλης διαδικασίας αλλά και τον κίνδυνο ανάπτυξης μολύνσεων σε μεγάλης κλίμακας καλλιέργειες.

Τα συμπεράσματα της παρούσας διατριβής δίνουν λύσεις σε περιορισμούς και προβλήματα που προκύπτουν κατά την καλλιέργεια των μικροοργανισμών με σκοπό την παραγωγή προϊόντων για εκμετάλλευση σε βιομηχανική κλίμακα. Η ικανότητα των μεταλλαγμένων στελεχών *Synechocystis* να αναπτύσσονται και να παράγουν *β*-φελλανδρένιο σε pH και αλατότητα υψηλότερα από τις φυσιολογικές συνήθεις δίνει την εναλλακτική της χρήσης του άφθονου θαλασσινού ή υφάλμυρου νερού καθώς και υγρών αποβλήτων υψηλής αλατότητας από αναερόβια χώνευση έναντι του περιορισμένου πόσιμου νερού. Επιπλέον, η καλλιέργεια των *Synechocystis* σε θρεπτικό μέσο με αλκαλικό pH σε φωτοαυτότροφες συνθήκες χωρίς την προσθήκη γλυκόζης ως εναλλακτικής πηγής άνθρακα, μειώνει σημαντικά τον κίνδυνο των μολύνσεων από μη επιθυμητούς μικροοργανισμούς.

Όσον αφορά στα πειράματα που έλαβαν χώρα σε ακινητοποιημένα κύτταρα *Synechocystis* έδειξαν πως τα κύτταρα αυτά είναι σε θέση να παράγουν *β*-φελλανδρένιο σε σημαντικά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα παραμένοντας ενεργά για χρονικό διάστημα 12 ημερών. Μπορούν να αναπτύσσονται σε διακριτές αποικίες

τόσο στην εξωτερική όσο και στην εσωτερική επιφάνεια των σφαιριδίων. Μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων αλγινικού που μελετήθηκαν, παρατηρήθηκαν κάποιες διαφορές στο σχηματισμό και των αριθμό των αποικιών. Χαμηλότερες συγκεντρώσεις αλγινικού (3%) φάνηκε να προσφέρουν ένα περισσότερο ευνοϊκό περιβάλλον στο οποίο τα κύτταρα παρουσιάζουν καλύτερη ανάπτυξη και εμφανίζονται μεταβολικά ενεργά, ενώ ο βαθμός απελευθέρωσης τους στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας είναι μικρός. Τα αποτελέσματα αυτά προτείνουν μία εναλλακτική προσέγγιση για την παραγωγή τερπενοειδών από *Synechocystis* σε μεγαλύτερη κλίμακα. Πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι το ελεγχόμενο περιβάλλον όπου βρίσκονται τα κύτταρα καθώς και η απαίτηση μικρότερου όγκου βιοαντιδραστήρα σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα, με ταυτόχρονη αύξηση της απόδοσης. Ένα ερώτημα που προκύπτει αλλά χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για να απαντηθεί είναι εάν το *β*-φελλανδρένιο παράγεται μόνο από τα επιφανειακά κύτταρα ή και από αυτά τα οποία αναπτύσσονται στο εσωτερικό των σφαιριδίων, και διαχέεται από το πολυμερικό υλικό.

Συμπερασματικά στην παρούσα διατριβή αποδείχθηκε πως τα κυανοβακτήρια *Synechocystis* είναι ικανά να παράγουν ετερόλογα ένα προϊόν με υψηλή ζήτηση και κόστος στη βιομηχανία έχοντας ως πρώτες ύλες μόνο φως, νερό και διοξείδιο του άνθρακα. Το *β*-φελλανδρένιο αποτελεί ένα παράδειγμα και ανοίγει προοπτικές για την παραγωγή άλλων τερπενοειδών μορίων με πολλαπλές χρήσεις. Φάνηκαν να είναι επίσης αρκετά ευέλικτοι μικροοργανισμοί και να μπορούν να προσαρμόζονται στις εκάστοτε συνθήκες ανάπτυξης, χωρίς πολλές φορές να επηρεάζεται η ικανότητα τους να παράγουν *β*-φελλανδρένιο. Αυτή τους η ευελιξία προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα όσον αφορά την εκμετάλλευση τους σε βιομηχανική κλίμακα για την παραγωγή προϊόντων με μεγάλη εμπορική αξία. Παρέχει τέλος μία εναλλακτική προσέγγιση ανανεώσιμη, φιλική προς το περιβάλλον και οικονομικά βιώσιμη για την παραγωγή προϊόντων με πολλαπλές εφαρμογές στη βιομηχανία.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι. ΑΝΤΙΓΡΑΦΟ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗΣ ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΗΣ

BBA - Biomembranes 1861 (2019) 183027

Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Biomembranes

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbamem

The effect of nitrogen starvation on membrane lipids of *Synechocystis* sp. PCC 6803 investigated by using easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry

Leonidas Mavroudakis, Eleftheria-Angeliki Valsami, Sofia Grafanaki, Theofania-Pagona Andreadaki, Demetrios F. Ghanotakis, Spiros A. Pergantis*

Department of Chemistry, University of Crete, Voutes Campus, Heraklion 70013, Greece

ARTICLE INFO

Keywords:
Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry
Membrane lipids
Synechocystis 6803
Nitrogen deprivation

ABSTRACT

Background: Glycerolipids are important components of membranes in cyanobacteria that possess vital roles in biological processes. The effect of nitrogen deprivation on membrane lipids of *Synechocystis* sp. PCC 6803 lipids has not been previously examined.

Methods: Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry (EASI-MS) was used for the analysis of *Synechocystis* 6803 cells with minimal sample preparation, providing rapid qualitative and relative quantitative information on the lipid content of their membranes.

Results: Changes in the degree of unsaturation of membrane lipids were observed for cells grown under normal conditions during different growth phases. This physiological remodeling was disrupted when nitrogen was withdrawn from the cultivation medium. However, this disruption was reversed when the cells were re-suspended in normal N-containing medium. Mass spectrometric data were supported by examination of cells by electron microscopy.

Conclusions: EASI-MS was applied for the first time in the analysis of *Synechocystis* 6803 cells grown under nitrogen deprived conditions and was found to be a powerful technique operating in a high-throughput manner for the rapid lipid profiling of cells at different growth stages and under different growth conditions.

General significance: The effect of nitrogen deprivation on membrane lipids of *Synechocystis* 6803 cells was revealed using an ambient ionization technique which enabled high-throughput cell analysis with minimal sample preparation. The results obtained have the potential to be used in future studies to decipher the involvement of enzymes in the observed lipid profile changes.

1. Introduction

Cyanobacteria, also known as blue-green algae, are ancient photoautotrophic prokaryotes that perform oxygenic photosynthesis. They are the progenitors of higher plant and green microalgal chloroplasts [1–3]. The membranes of cyanobacteria consist of outer, plasma and thylakoid membranes [4]. Plasma and thylakoid membranes are composed of glycerolipids such as monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), digalactosyldiacylglycerol (DGDG), sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG), phosphatidylglycerol (PG) and phosphatidylinositol (PI) [5]. The overall integrity of photosynthetic membranes is based on an appropriate proportion of galactoglycerolipids such as MGDG and DGDG and (to a lesser degree on) charged polar lipids such as SQDG and PG [6]. Apart from stabilizing the membrane lipid bilayer, the aforementioned lipids also possess vital roles in biological activities of the cell such as photosynthetic light harvesting, electron transfer and signal transduction [6,7].

Cyanobacteria exhibit adaptability to environmental stresses due to the fact that they are frequently required to survive under highly adverse environments such as limited nutrient availability, light and temperature variations. Thus, cyanobacteria have developed sophisticated mechanisms that are correlated with a 'stand-by' energy metabolism in order to allow survival under stress conditions [8–10]. Nitrogen is an essential element that is indispensable for the synthesis of molecular building blocks such as amino acids and nucleotides. Therefore, its deprivation has significant impact on the growth of non-N_2-fixing cells, their morphology and physiology, such as the loss of photosynthetic membranes and functions, e.g. the Calvin–Benson cycle

* Corresponding author.
E-mail address: spergantis@uoc.gr (S.A. Pergantis).

https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.07.015
Received 25 January 2019; Received in revised form 19 July 2019; Accepted 22 July 2019
Available online 24 July 2019
0005-2736/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΥΝΤΗΞΗΣ

Αλληλουχία cpcB.PHLS

μικρά γράμματα= *cpcB*

ΚΕΦΑΛΑΙΑ ΓΡΑΜΜΑΤΑ= *PHLS*

atgttcgacgtattcactcgggttgtttcccaagctgatgctcgcggcgagtacctctctg
gttctcagttagatgctttgagcgctaccgttgctgaaggcaacaaacggattgattctgt
taaccgcatcaccggtaatgcttccgctatcgtttccaacgctgctcgtgctttgttcgcc
gaacagccccaattaatccaacccggtggaaacgcctacaccagccgtcgtatggctgctt
gtttgcgtgacatggaaatcatcctccgctatgttacctacgcaaccttcaccggcgacgc
ttccgttctagaagatcgttgcttgaacggtctccgtgaaacctacgttgccctgggtgtt
cccggtgcttccgtagctgctggcgttcaaaaaatgaaagaagctgccctggacatcgtta
acgatcccaatggcatcacccgtggtgattgcagtgctatcgttgctgaaatcgctggtta
cttcgaccgcgccgctgctgccgtagccCATATGTGTAGTTTGCAAGTTTCTGATCCTATT
CCTACCGGACGCCGTTCCGGTGGTTATCCCCCGGCCTTATGGGATTTCGATACTATTCAAT
CCCTGAATACCGAATATAAGGGCGAACGTCACATGCGTCGGGAAGAAGACTTAATTGGTCA
AGTTCGGGAAATGTTGGTGCACGAAGTAGAAGATCCCACTCCCCAGTTGGAATTCATTGAC
GATCTGCATAAATTGGGCATTTCCTGCCATTTTGAAAACGAGATTCTGCAAATTCTCAAAT
CCATTTATCTCAACCAAAACTATAAACGGGACCTCTATTCTACCAGTTTAGCCTTCCGTCT
CTTGCGTCAATACGGGTTTATCTTGCCGCAGGAAGTTTTTGACTGCTTTAAAAACGAAGAA
GGTACGGATTTTAAACCCAGCTTCGGCCGGGATATTAAGGGTCTGTTACAGTTGTACGAAG
CCTCCTTTTTGTCCCGGAAGGGGGAAGAAACTTTACAACTCGCCCGCGAATTTGCTACCAA
AATCTTGCAAAAGGAAGTCGATGAACGGGAATTTGCTACTAAAATGGAATTTCCCAGTCAC
TGGACCGTACAAATGCCTAACGCTCGGCCTTTTATCGATGCCTATCGTCGGCGTCCCGACA
TGAACCCCGTGGTTCTGGAACTCGCCATTCTCGATACCAATATCGTGCAAGCTCAGTTTCA
AGAAGAATTGAAGGAGACCTCCCGTTGGTGGGAAAGCACGGGGATTGTTCAAGAACTGCCG
TTTGTTCGGGACCGGATTGTGGAAGGTTATTTTTGGACCATTGGTGTTACTCAACGCCGTG
AACACGGTTACGAACGTATTATGACGGCCAAAGTCATCGCTTTGGTGACCTGTTTGGATGA
TATTTATGACGTATATGGCACTATTGAAGAATTGCAACTCTTCACCTCTACGATTCAGCGT
TGGGATTTGGAGTCTATGAAGCAGTTACCGACTTATATGCAGGTAAGCTTCCTGGCCTTGC
ACAATTTTGTAACCGAAGTGGCCTATGATACGCTGAAGAAAAAGGGCTACAACTCTACCCC
CTATTTGCGGAAGACTTGGGTGGATTTGGTCGAAAGTTACATTAAGGAAGCCACTTGGTAC
TATAATGGGTACAAACCCTCTATGCAGGAATACCTCAACAACGCCTGGATCTCTGTGGGCA
GCATGGCTATTTTGAATCATTTGTTTTTTCGCTTTACTAATGAACGCATGCATAAGTACCG
GGACATGAATCGTGTATCCTCTAATATTGTGCGGTTAGCCGACGATATGGGAACCTCTTTG
GCCGAAGTTGAACGCGGTGACGTGCCCAAAGCTATCCAATGTTACATGAATGAAACGAACG

CCTCTGAGGAGGAGGCCCGCGAATATGTGCGGCGCGTTATCCAGGAAGAATGGGAAAAACT
GAACACTGAACTGATGCGCGACGACGACGATGACGATGATTTCACCTTAAGTAAATACTAC
TGCGAAGTCGTTGCTAACCTGACCCGGATGGCTCAGTTCATTTACCAAGATGGTTCCGATG
GGTTTGGGATGAAAGATTCCAAAGTAAATCGTTTACTGAAAGAAACGCTGATTGAGCGCTA
TGA

Αλληλουχία cpcA.GPPS

μικρά γράμματα = *cpcA*

ΚΕΦΑΛΑΙΑ ΓΡΑΜΜΑΤΑ= *GPPS*

atgaaaacccctttaactgaagccgtttccaccgctgactctcaaggtcgctttctgagca
gcaccgaattgcaaattgctttcggtcgtctacgtcaagctaatgctggtttgcaagccgc
taaagctctgaccgacaatgcccagagcttggtaaatggtgctgcccaagccgtttataac
aaattcccctacaccacccaaacccaaggcaacaactttgctgcggatcaacggggtaaag
acaagtgtgcccgggacatcggctactacctccgcatcgttacctactgcttagttgctgg
tggtaccggtcctttggatgagtacttgatcgccggtattgatgaaatcaaccgcaccttt
gacctctcccccagctggtatgttgaagctctgaaatacatcaaagctaaccacggcttga
gtggcgatgcccgtgacgaagctaattcctacctcgattacgccatcaatgctctgagcac
tagtACGCGCAGCAGTAAGGCCTTGGTCCAACTAGCTGATCTATCCGAACAAGTAAAAAAC
GTGGTGGAATTTGATTTTGACAAGTATATGCACTCCAAGGCCATTGCGGTTAATGAGGCCT
TAGATAAAGTTATTCCCCCCCGCTATCCTCAAAAAATCTATGAAAGTATGCGCTATTCCCT
CCTAGCCGGCGGGAAGAGGGTTCGACCAATTTTATGTATTGCGGCCTGTGAGCTAATGGGG
GGGACTGAGGAACTTGCCATGCCTACGGCTTGTGCCATCGAGATGATTCACACTATGAGTT
TGATTCATGACGATTTGCCCTATATTGATAACGATGATTTGCGTCGCGGTAAGCCTACCAA
CCACAAAGTTTTTGGTGAAGACACGGCGATCATTGCTGGCGATGCATTATTGTCATTGGCC
TTTGAACATGTAGCCGTGAGCACCAGTCGTACCCTAGGTACTGACATTATTTTACGGTTGC
TATCCGAAATTGGACGCGCCACAGGAAGTGAGGGCGTGATGGGTGGTCAAGTGGTGGATAT
TGAAAGCGAAGGTGATCCCAGTATAGACTTAGAAACGCTGGAATGGGTCCATATTCATAAA
ACGGCTGTGTTGTTGGAATGCAGTGTCGTGTGTGGCGCAATTATGGGGGGTGCCAGCGAGG
ACGACATCGAGCGTGCTAGACGGTACGCTCGCTGTGTAGGATTGCTTTTCCAAGTTGTCGA
TGATATTTTGGATGTAAGCCAGTCCTCGGAAGAACTCGGAAAGACTGCTGGGAAAGATTTG
ATTTCTGACAAAGCCACCTATCCCAAACTCATGGGTTTGGAAAAAGCGAAGGAATTTGCCG
ATGAATTACTGAACCGTGGAAAACAGGAACTTAGTTGTTTTGATCCTACCAAAGCAGCACC
TCTATTTGCGTTAGCAGACTACATTGCATCTCGTCAGAATTAA

Αλληλουχία cpcB.GPPS

μικρά γράμματα = *cpcB*

ΚΕΦΑΛΑΙΑ ΓΡΑΜΜΑΤΑ = *GPPS*

atgttcgacgtattcactcgggttgtttcccaagctgatgctcgcggcgagtacctctctg
gttctcagttagatgctttgagcgctaccgttgctgaaggcaacaaacggattgattctgt
taaccgcatcaccggtaatgcttccgctatcgtttccaacgctgctcgtgctttgttcgcc
gaacagccccaattaatccaacccggtggaaacgcctacaccagccgtcgtatggctgctt
gtttgcgtgacatggaaatcatcctccgctatgttacctacgcaaccttcaccggcgacgc
ttccgttctagaagatcgttgcttgaacggtctccgtgaaacctacgttgccctgggtgtt
cccggtgcttccgtagctgctggcgttcaaaaaatgaaagaagctgccctggacatcgtta
acgatcccaatggcatcacccgtggtgattgcagtgctatcgttgctgaaatcgctggtta
cttcgaccgcgccgctgctgccgtagccCATATGACGCGCAGCAGTAAGGCCTTGGTCCAA
CTAGCTGATCTATCCGAACAAGTAAAAAACGTGGTGGAATTTGATTTTGACAAGTATATGC
ACTCCAAGGCCATTGCGGTTAATGAGGCCTTAGATAAAGTTATTCCCCCCCGCTATCCTCA
AAAAATCTATGAAAGTATGCGCTATTCCCTCCTAGCCGGCGGGAAGAGGGTTCGACCAATT
TTATGTATTGCGGCCTGTGAGCTAATGGGGGGGACTGAGGAACTTGCCATGCCTACGGCTT
GTGCCATCGAGATGATTCACACTATGAGTTTGATTCATGACGATTTGCCCTATATTGATAA
CGATGATTTGCGTCGCGGTAAGCCTACCAACCACAAAGTTTTTGGTGAAGACACGGCGATC
ATTGCTGGCGATGCATTATTGTCATTGGCCTTTGAACATGTAGCCGTGAGCACCAGTCGTA
CCCTAGGTACTGACATTATTTTACGGTTGCTATCCGAAATTGGACGCGCCACAGGAAGTGA
GGGCGTGATGGGTGGTCAAGTGGTGGATATTGAAAGCGAAGGTGATCCCAGTATAGACTTA
GAAACGCTGGAATGGGTCCATATTCATAAAACGGCTGTGTTGTTGGAATGCAGTGTCGTGT
GTGGCGCAATTATGGGGGGTGCCAGCGAGGACGACATCGAGCGTGCTAGACGGTACGCTCG
CTGTGTAGGATTGCTTTTCCAAGTTGTCGATGATATTTTGGATGTAAGCCAGTCCTCGGAA
GAACTCGGAAAGACTGCTGGGAAAGATTTGATTTCTGACAAAGCCACCTATCCCAAACTCA
TGGGTTTGGAAAAAGCGAAGGAATTTGCCGATGAATTACTGAACCGTGGAAAACAGGAACT
TAGTTGTTTTGATCCTACCAAAGCAGCACCTCTATTTGCGTTAGCAGACTACATTGCATCT
CGTCAGAATTAA

Αλληλουχία cpcA.PHLS

μικρά γράμματα = *cpcA*

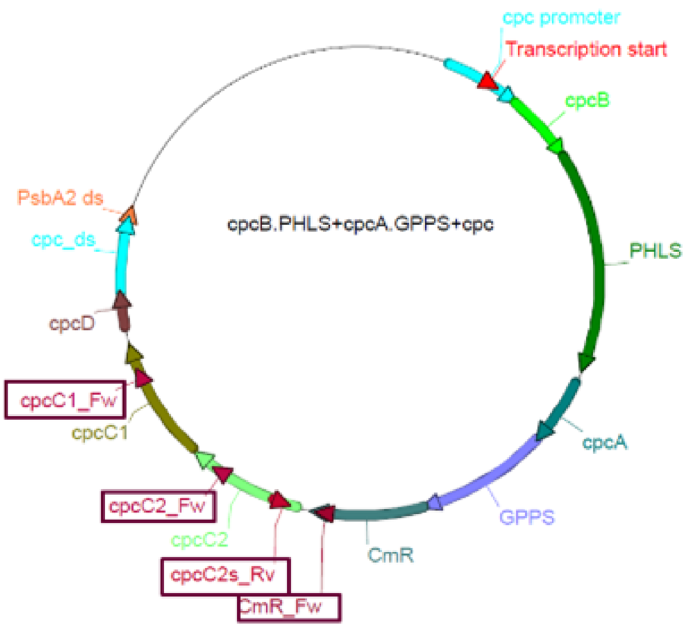
ΚΕΦΑΛΑΙΑ ΓΡΑΜΜΑΤΑ = *PHLS*

atgaaaacccctttaactgaagccgtttccaccgctgactctcaaggtcgctttctgagca
gcaccgaattgcaaattgctttcggtcgtctacgtcaagctaatgctggtttgcaagccgc
taaagctctgaccgacaatgcccagagcttggtaaatggtgctgcccaagccgtttataac
aaattcccctacaccacccaaacccaaggcaacaactttgctgcggatcaacggggtaaag
acaagtgtgcccgggacatcggctactacctccgcatcgttacctactgcttagttgctgg
tggtaccggtcctttggatgagtacttgatcgccggtattgatgaaatcaaccgcaccttt
gacctctcccccagctggtatgttgaagctctgaaatacatcaaagctaaccacggcttga
gtggcgatgcccgtgacgaagctaattcctacctcgattacgccatcaatgctctgagcac
tagtTGTAGTTTGCAAGTTTCTGATCCTATTCCTACCGGACGCCGTTCCGGTGGTTATCCC
CCGGCCTTATGGGATTTCGATACTATTCAATCCCTGAATACCGAATATAAGGGCGAACGTC
ACATGCGTCGGGAAGAAGACTTAATTGGTCAAGTTCGGGAAATGTTGGTGCACGAAGTAGA
AGATCCCACTCCCCAGTTGGAATTCATTGACGATCTGCATAAATTGGGCATTTCCTGCCAT
TTTGAAAACGAGATTCTGCAAATTCTCAAATCCATTTATCTCAACCAAAACTATAAACGGG
ACCTCTATTCTACCAGTTTAGCCTTCCGTCTCTTGCGTCAATACGGGTTTATCTTGCCGCA
GGAAGTTTTTGACTGCTTTAAAAACGAAGAAGGTACGGATTTTAAACCCAGCTTCGGCCGG
GATATTAAGGGTCTGTTACAGTTGTACGAAGCCTCCTTTTTGTCCCGGAAGGGGGAAGAAA
CTTTACAACTCGCCCGCGAATTTGCTACCAAAATCTTGCAAAAGGAAGTCGATGAACGGGA
ATTTGCTACTAAAATGGAATTTCCCAGTCACTGGACCGTACAAATGCCTAACGCTCGGCCT
TTTATCGATGCCTATCGTCGGCGTCCCGACATGAACCCCGTGGTTCTGGAACTCGCCATTC
TCGATACCAATATCGTGCAAGCTCAGTTTCAAGAAGAATTGAAGGAGACCTCCCGTTGGTG
GGAAAGCACGGGGATTGTTCAAGAACTGCCGTTTGTTCGGGACCGGATTGTGGAAGGTTAT
TTTTGGACCATTGGTGTTACTCAACGCCGTGAACACGGTTACGAACGTATTATGACGGCCA
AAGTCATCGCTTTGGTGACCTGTTTGGATGATATTTATGACGTATATGGCACTATTGAAGA
ATTGCAACTCTTCACCTCTACGATTCAGCGTTGGGATTTGGAGTCTATGAAGCAGTTACCG
ACTTATATGCAGGTAAGCTTCCTGGCCTTGCACAATTTTGTAACCGAAGTGGCCTATGATA
CGCTGAAGAAAAAGGGCTACAACTCTACCCCCTATTTGCGGAAGACTTGGGTGGATTTGGT
CGAAAGTTACATTAAGGAAGCCACTTGGTACTATAATGGGTACAAACCCTCTATGCAGGAA
TACCTCAACAACGCCTGGATCTCTGTGGGCAGCATGGCTATTTTGAATCATTTGTTTTTTC
GCTTTACTAATGAACGCATGCATAAGTACCGGGACATGAATCGTGTATCCTCTAATATTGT
GCGGTTAGCCGACGATATGGGAACCTCTTTGGCCGAAGTTGAACGCGGTGACGTGCCCAAA
GCTATCCAATGTTACATGAATGAAACGAACGCCTCTGAGGAGGAGGCCCGCGAATATGTGC

GGCGCGTTATCCAGGAAGAATGGGAAAAACTGAACACTGAACTGATGCGCGACGACGACGA
TGACGATGATTTCACCTTAAGTAAATACTACTGCGAAGTCGTTGCTAACCTGACCCGGATG
GCTCAGTTCATTTACCAAGATGGTTCCGATGGGTTTGGGATGAAAGATTCCAAAGTAAATC
GTTTACTGAAAGAAACGCTGATTGAGCGCTATGAGtga

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ ΣΕ ΣΤΟΙΧΙΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΘΕΩΡΗΤΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ (ALIGNMENT)

Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της αλληλούχισης του πλασμιδιακού φορέα Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc. Με πλαίσιο διακρίνονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αλληλούχιση του πλασμιδίου. Επίσης παρατίθενται οι αλληλουχίες της αλληλούχισης σε στοίχιση με τις θεωρητικές αλληλουχίες του πλασμιδίου.



Εκκινητής CmR_Fw

```
Matches:936; Mismatches:0; Gaps:3; Unattempted:9814

   1>~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~GWRWRRAAKKSTWWAWGAAWWMMAMAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAA>57
5601>ggcgattcaggttcatcatgccgtctgtgatggcttccatgtcggcagaatgcttaatgaattacaacagtactgcgatgagtggcagggcggggcgtaa>5700

  58>TTTTTTAAGGCAGTTATTGGTGCCCTTAAACGCCTGGGTCAGTTTTTAATTCTAGCTGGCCTGGAAGGGTGGGAAAGTGTTAACAACTGGTTGACAATA>157
5701>ttttttaaggcagttattggtgcccttaaacgcctgggtcagtttttaattctagctggcctggaagggtgggaaagtgttaacaactggttgacaata>5800

 158>TTCCGCTTTTCCAGGTCTTGTCGTATTTATTGACACTTATCTAGGAGAACAAAATGACTAGTTTAGTTTCGGCCCAGCGTCTGGGCATTGTGGCCGTGGA>257
5801>ttccgcttttccaggtcttgtcgtatttattgacacttatctaggagaacaaaatgactagtttagtttcggcccagcgtctgggcattgtggccgtgga>5900

 258>TGAGGCTATTCCCCTCGAGCTTCGTTCCCGGAGTACAGAGGAAGAGGTGGATGCCGTTATCCTGGCGGTTTACCGTCAAGTTTTGGGCAACGATCATCTC>357
5901>tgaggctattcccctcgagcttcgttcccggagtacagaggaagaggtggatgccgttatcctggcggtttaccgtcaagttttgggcaacgatcatctc>6000

 358>ATGTCCCAGGAACGACTGACCAGTGCAGAATCTTTGCTCCGGGGCAGGGAGATTTCGGTAAGGGATTTTGTTCGGGCTGTGGCTCTGTCGGAAGTGTACC>457
6001>atgtcccaggaacgactgaccagtgcagaatctttgctccggggcagggagatttcggtaagggattttgttcgggctgtggctctgtcggaagtgtacc>6100

 458>GGCAGAAGTTTTTCCATTCCAACCCACAAAATCGTTTTATCGAGCTTAATTATAAGCATTTACTGGGACGGGCTCCCTACGATCAGTCGGAAATTGCTTT>557
6101>ggcagaagtttttccattccaacccacaaaatcgttttatcgagcttaattataagcatttactgggacgggctccctacgatcagtcggaaattgcttt>6200

 558>CCACACCGATCTTTATCACCAGGGGGGCTATGAAGCGGAGATCAATTCCTATATTGACTCCGTAGAATACACGGAAAACTTTGGAGATTGG-TTGTACCT>656
6201>ccacaccgatctttatcaccaggggggctatgaagcggagatcaattcctatattgactccgtagaatacacggaaaactttggagattgggttgtacct>6300

 657>TATTTCCGCGGCTTTGCTACCCAGCGGAATCAAAAAACCGTTGGTTTCAGCCGTTCTTTCCAGGTGTATCGGGGCTACGCTACCAGTGATCGTTCCCAGG>756
6301>tatttccgcggctttgctacccagcggaatcaaaaaaccgttggtttcagccgttctttccaggtgtatcggggctacgctaccagtgatcgttcccagg>6400

 757>GAAATGGTTCCCGTTCTCGATTGACGCGGGAGTTGGCTCGCAATACAGCTTCTCCGGTGTATGCCGGTTCTACGGCCGAGAGTTTGCGGGGAACTTCGGC>856
6401>gaaatggttcccgttctcgattgacgcgggagttggctcgcaatacagcttctccggtgtatgccggttctacggccgagagtttgcggggaacttcggc>6500

 857>GGGTAGTCGTAACCAAATGTATCGTTTGCAAGTGATTCAAGGG-CGGCCCCCGGTCGTGGCACCCGAGTGCGCCGTGGTAA-GCGGAGTATCTAGTTTCC>954
6501>gggtagtcgtaaccaaatgtatcgtttgcaagtgattcaagggcggcccccggtcgtggcacccgagtgcgccgtggtaaagcggagtatctagtttcc>6600

 955>TACGATA---------------------------------------------------------------------------------------------->961
6601>tacgataatttgtctgccaagttgcaacaaatcaatcgccaaggagatacggtcacaatgatttcccttgcctagaatcaggatttttgtcaacctagt>6700
```

Εκκινητής cpcC2_Fw

```
Matches(|):1076  Mismatches(#):8

  13 ------------------------------------------------------------------TCTACGGCCGAGAGTTTGCGGGGA-CTTCGGC 43
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
6401 gaaatggttcccgttctcgattgacgcgggagttggctcgcaatacagcttctccggtgtatgccggttctacggccgagagtttgcggggaacttcggc 6500

  44 GGGTAGTCGTAACCAAATGTATCGTTTGCAAGTGATTCAAGGGGCGGCCCCCGGTCGTGGCACCCGAGTGCGCCGTGGTAAAGCGGAGTATCTAGTTTCC 143
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
6501 gggtagtcgtaaccaaatgtatcgtttgcaagtgattcaaggggcggcccccggtcgtggcacccgagtgcgccgtggtaaagcggagtatctagtttcc 6600

 144 TACGATAATTTGTCTGCCAAGTTGCAACAAATCAATCGCCAAGGAGATACGGTCACAATGATTTCCCTTGCCTAGAATCAGGATTTTTTGTCAACCTAGT 243
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
6601 tacgataatttgtctgccaagttgcaacaaatcaatcgccaaggagatacggtcacaatgatttcccttgcctagaatcaggatttttgtcaacctagt 6700

 244 TAGTAAAAGGAGATTATTTAGTGGCAATTACAACCGCAGCCTCCAGATTGGGGGTGGCTCCCTATAATGAGTCCCGTCCTGTGGAGTTACGCCCTGACTT 343
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
6701 tagtaaaaggagattatttagtggcaattacaaccgcagcctccagattgggggtggctccctataatgagtcccgtcctgtggagttacgccctgactt 6800

 344 TAGCCTTGATGATGCCAAAATGGTGATTCGGGCTGTATATCGTCAGGTTTTAGGCAACGATTACATTATGGATTCTGAGCGCCTCAAGGGTGCCGAGTCT 443
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
6801 tagccttgatgatgccaaaatggtgattcgggctgtatatcgtcaggttttaggcaacgattacattatggattctgagcgcctcaagggtgccgagtct 6900

 444 CTTTTGACCAATGGTTCTATTAGTGTGCGGGAATTTGTCCGTACCGTGGCCAAGTCGGAACTTTATAAGAAGAAATTCCTTTATAACAACTTCCAAACCC 543
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
6901 cttttgaccaatggttctattagtgtgcgggaatttgtccgtaccgtggccaagtcggaactttataagaagaaattcctttataacaacttccaaaccc 7000

 544 GGGTCATTGAACTCAACTACAAACATCTGTTGGGTCGTGCTCCTTTCAGTGAAGATGAGGTGATTTTCCATCTCGATCTCTATGAAAATCAGGGTTTTGA 643
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
7001 gggtcattgaactcaactacaaacatctgttgggtcgtgctcctttcagtgaagatgaggtgattttccatctcgatctctatgaaaatcagggttttga 7100

 644 TGCGGATATCGATTCTTACATTGATTCGGTCGAATACCAAGAGAACTTTGGGGAAAATATTGTTCCCTATTATCGTTTTAATAATCAGGTAGGCGATCGC 743
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
7101 tgcggatatcgattcttacattgattcggtcgaataccaagagaactttggggaaaatattgttccctattatcgttttaataatcaggtaggcgatcgc 7200

 744 ACTGTGGGATTTACCCGCATGTTCCGTCTTTACCGTGGTTATGCTAACAGTGACCGTTCCCAGTTAGAGCGCAGTTCTAGTCGTCTGGCAACGGAGTTGG 843
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
7201 actgtgggatttacccgcatgttccgtctttaccgtggttatgctaacagtgaccgttcccagttagagcgcagttctagtcgtctggcaacggagttgg 7300

 844 GACAAA-TACTGTTTCGGCGATCGTGGGCCCCAGTGGCAGTAATGCTGGTTGGGCCTATCGTCCTTCTCGGGCCGGCA-TA-CCCAGC-AAAGCGTTGGG 939
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
7301 gacaaaatactgtttcggcgatcgtgggccccagtggcagtaatgctggttgggcctatcgtccttctcgggccggcaataccccagcaaaagcgttggg 7400

 940 TGGTACGGTTCCCTTTGGTCA-GC-AGT-AGCTG-TCCGGGTGGAAATTACAG-CA-TTYTGCGCC--GT-ATCC--AAGTGCGTCGGAGCA-TAAGGC- 1026
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
7401 tggtacggttccctttggtcaagcaagtaagctgttccgggtggaaattacagccatttctgcgcccggttatcccaaagtgcgtcggagcaataaggcg 7500

1027 GTAA-TKKTCC--TTGAAC-ACTCA--CMGACCTTACAACAAATCAAWTCGTTTGGGGGW---------------------------------------- 1080
     ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
7501 gtaattgttccctttgaacaactcaaccagaccttacaacaaatcaa-tcgtttgggggtaaggttgctagtattaccccggctagcttgagctagatt 7599
```

Εκκινητής cpcC1_Fw

```
Matches:894; Mismatches:0;

                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                
  2>------------------------------------------------------------MSKKTYTCTYGGGGCGGCATACCCCAGCAAAGCGTTGGG>40
7301>gacaaaatactgtttcggcgatcgtgggccccagtggcagtaatgctggttgggcctatcgtccttctcgggccggcaataccccagcaaaagcgttggg>7400

                 *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
  41>TGGTACGGTTCCCTTTGGTCAAGCAAGTAAGCTGTTCCGGGTGGAAATTACAGCCATTTCTGCGCCCGGTTATCCCAAAGTGCGTCGGAGCAATAAGGCG>140
7401>tggtacggttccctttggtcaagcaagtaagctgttccgggtggaaattacagccatttctgcgcccggttatcccaaagtgcgtcggagcaataaggcg>7500

                 *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
 141>GTAATTGTTCCCTTTGAACAACTCAACCAGACCTTACAACAAATCAATCGTTTGGGGGGTAAGGTTGCTAGTATTACCCCGGCTAGCTTGAGCTAGATTT>240
7501>gtaattgttccctttgaacaactcaaccagaccttacaacaaatcaatcgtttgggggtaaggttgctagtattaccccggctagcttgagctagattt>7600

                 *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
 241>CTGTTTAGTTCAGGAGGAGAAGTGGCTTGACTTTATTTTCCCTTTGGGGAATAACTTGGGGTCGCTTCTCTTTTTGTCTTTGTAGATGATTTTGCTAATT>340
7601>ctgtttagttcaggaggagaagtggcttgactttattttccctttggggaataacttggggtcgcttctctttttgtctttgtagatgattttgctaatt>7700

                 *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
 341>AGCAAATTAAAACTTTAGTGTTCAGGAGTTTTTAGAATCGCCATGTTAGGTCAATCTTCTTTGGTGGGCTATTCCAATACCCAGGCGGCTAACCGTGTCT>440
7701>agcaaattaaaactttagtgttcaggagtttttagaatcgccatgttaggtcaatcttctttggtgggctattccaatacccaggcggctaaccgtgtct>7800

                 *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
 441>TTGTCTATGAAGTCAGTGGACTCCGCCAGACCGATGCCAATGAAAACAGTGCCCACGATATTCGTCGCAGCGGTAGTGTGTTTATCAAAGTTCCCTATGC>540
7801>ttgtctatgaagtcagtggactccgccagaccgatgccaatgaaaacagtgcccacgatattcgtcgcagcggtagtgtgtttatcaaagttccctatgc>7900

                 *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
 541>CCGTATGAATGATGAGATGCGCCGCATTTCCCGTCTGGGGGGAACTATTGTTAACATTCGTCCCTATCAAGCTGACAGCAACGAACAAAACTAGGATCCG>640
7901>ccgtatgaatgatgagatgcgccgcatttcccgtctgggggaactattgttaacattcgtccctatcaagctgacagcaacgaacaaaactagGATCCG>8000

                 *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
 641>CTATTTTGTTAATTACTATTTGAGCTGAGTGTAAAATACCTTACTTACTCAAAAGCATTAACTAACCATAACAATGACTAATCTCTTTTTTTGATTGAAC>740
8001>CTATTTTGTTAATTACTATTTGAGCTGAGTGTAAAATACCTTACTTACTCAAAAGCATTAACTAACCATAACAATGACTAATCTCTTTTTTTGATTGAAC>8100

                 *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
 741>TCCAAACTAGAATAGCCATCGAGTCAGTCCATTTAGTTCATTATTAGTGAAAGTTTGTTGGCGGTGGGTTATCCGTTGATAAACCACCGTTTTTGTTTGG>840
8101>TCCAAACTAGAATAGCCATCGAGTCAGTCCATTTAGTTCATTATTAGTGAAAGTTTGTTGGCGGTGGGTTATCCGTTGATAAACCACCGTTTTTGTTTGG>8200

                 *         *         *         *         *         *         *         *
 841>GCAAAGTAACGATTTGATGCAGTGATGGGTTTAAAGATAATCCCGTT-GAG--AATCCTGCA-GACGACGGGAACTTTAACCTGAC--------------->922
8201>GCAAAGTAACGATTTGATGCAGTGATGGGTTTAAAGATAATCCCGTTTGAGGAAATCCTGCACGACGACGGGAACTTTAACCTGACCGCTGCTGGGTTCG>8300
```

Εκκινητής cpcC2s_Rv

```
Matches:989; Mismatches:2;

                 *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
   1>~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~TAGKKGRRYTYGAGGGATAGCCTCATCCACGGSCACAATGCCCAGACGCTGGGCCGAAACTAAACTAGTCAT>72
5953<catccacctcttcctctgtactccgggaacgaagctcgaggggaatagcctcatccacggccacaatgcccagacgctgggccgaaactaaactagtcat<5854

                 *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
  73>TTTGTTCTCCTAGATAAGTGTCAATAAATACGACAAGACCTGGAAAAGCGGAATATTGTCAACCAGTTGTTAACACTTTCCCACCCTTCCAGGCCAGCTA>172
5853<tttgttctcctagataagtgtcaataaatacgacaagacctggaaaagcggaatattgtcaaccagttgttaacactttcccacccttccaggccagcta<5754

                 *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
 173>GAATTAAAAACTGACCCAGGCGTTTAAGGGCACCAATAACTGCCTTAAAAAAATTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAA>272
5753<gaattaaaaactgacccaggcgtttaagggcaccaataactgccttaaaaaaattacgccccgccctgccactcatcgcagtactgttgtaattcattaa<5654

                 *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
 273>GCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAAACGGCATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTCGCCTTGCGTATAATATTTGCCCATGGT>372
5653<gcattctgccgacatggaagccatcacaaacggcatgatgaacctgaatcgccagcggcatcagcaccttgtcgccttgcgtataatatttgcccatggt<5554

                 *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
 373>GAAAACGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCAAAACTGGTGAAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATA>472
5553<gaaaacgggggcgaagaagttgtccatattggccacgtttaaatcaaaactggtgaaactcacccagggattggctgagacgaaaaacatattctcaata<5454

                 *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
 473>AACCCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTCACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAAACTGCCGGAAATCGTCGTGGTATTCACTCCAGA>572
5453<aacccttagggaaataggccaggttttcaccgtaacacgccacatcttgcgaatatatgtgtagaaactgccggaaatcgtcgtggtattcactccaga<5354

                 *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
 573>GCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGGAAAACGGTGTAACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTTCATTGCCATACGGAATTC>672
5353<gcgatgaaaacgtttcagtttgctcatggaaaacggtgtaacaagggtgaacactatcccatatcaccagctcaccgtctttcattgccatacggaattc<5254

                 *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
 673>CGGATGAGCATTCATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATAAAACTTGTGCTTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGC>772
5253<cggatgagcattcatcaggcgggcaagaatgtgaataaaggccggataaaacttgtgcttattttttctttacggtctttaaaaaggccgtaatatccagc<5154

                 *         *         *         *         *         *         *         *         *
 773>TGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAA-TGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGA>871
5153<tgaacggtctggttataggtacattgagcaactgactgaaatgcctcaaaatgttctttacgatgccattgggatatatcaacggtggtatatccagtga<5054

     *         *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
 872>TTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGATA-CTC-AAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTCATTATGGTGAAAGTTGGAACC>969
5053<ttttttctccattttagcttccttagctcctgaaaatctcgataactcaaaaatacgcccggtagtgatcttatttcattatggtgaaagttggaacc<4954

       *         *         *         *         *         *
 970>TCTTACGTGCCGATCA-CGCGG-CGC-TAA-TCTGACGARATGCAATGTAGTCTGCTA------------------------------------------>1023
4953<tcttacgtgccgatcaacGCGGCCGCATAAATCTGACGACATGCAATGTAGTCTGCTAACGCAAATAGAGGTGCTGCTTTGGTAGGATCAAAACAACTAA<4854
```

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΛΥΘΗΚΑΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

Παρακάτω παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των αμινοξέων των πρωτεϊνών που αναλύθηκαν με φασματομετρία μάζας. Με κίτρινο χρώμα επισημαίνονται τα πεπτίδια τα οποία ταυτοποιήθηκαν.

Πηκτή Α

Ζώνη 1: cpcB

MFDVFTRVVSQADARGEYLSGSQLDALSATVAEGNKRIDSVNRITGNASAIVSNAARALFA
EQPQLIQPGGNAYTSRRMAACLRDMEIILRYVTYATFTGDASVLEDRCLNGLRETYVALGV
PGASVAAGVQKMKEAALDIVNDPNGITRGDCSAIVAEIAGYFDRAAAAVA

Ζώνη 2: cpcA

MKTPLTEAVSTADSQGRFLSSTELQIAFGRLRQANAGLQAAKALTDNAQSLVNGAAQAVYN
KFPYTTQTQGNNFAADQRGKDKCARDIGYYLRIVTYCLVAGGTGPLDEYLIAGIDEINRTF
DLSPSWYVEALKYIKANHGLSGDARDEANSYLDYAINALS

Ζώνη 14: cpcA.PHLS (PHLS από *Lavandula angustifolia*)

MKTPLTEAVSTADSQGRFLSSTELQIAFGRLRQANAGLQAAKALTDNAQSLVNGAAQAVYN
KFPYTTQTQGNNFAADQRGKDKCARDIGYYLRIVTYCLVAGGTGPLDEYLIAGIDEINRTF
DLSPSWYVEALKYIKANHGLSGDARDEANSYLDYAINALSTSCSLQVSDPIPTGRRSGGYP
PALWDFDTIQSLNTEYKGERHMRREEDLIGQVREMLVHEVEDPTPQLEFIDDLHKLGISCH
FENEILQILKSIYLNQNYKRDLYSTSLAFRLLRQYGFILPQEVFDCFKNEEGTDFKPSFGR
DIKGLLQLYEASFLSRKGEETLQLAREFATKILQKEVDEREFATKMEFPSHWTVQMPNARP
FIDAYRRRPDMNPVVLELAILDTNIVQAQFQEELKETSRWWESTGIVQELPFVRDRIVEGY
FWTIGVTQRREHGYERIMTAKVIALVTCLDDIYDVYGTIEELQLFTSTIQRWDLESMKQLP
TYMQVSFLALHNFVTEVAYDTLKKKGYNSTPYLRKTWVDLVESYIKEATWYYNGYKPSMQE
YLNNAWISVGSMAILNHLFFRFTNERMHKYRDMNRVSSNIVRLADDMGTSLAEVERGDVPK
AIQCYMNETNASEEEAREYVRRVIQEEWEKLNTELMRDDDDDDDFTLSKYYCEVVANLTRM
AQFIYQDGSDGFGMKDSKVNRLLKETLIERYE

Ζώνη 9: cpcB.PHLS (PHLS από *Lavandula angustifolia*)

MFDVFTRVVSQADARGEYLSGSQLDALSATVAEGNKRIDSVNRITGNASAIVSNAARALFA
EQPQLIQPGGNAYTSRRMAACLRDMEIILRYVTYATFTGDASVLEDRCLNGLRETYVALGV
PGASVAAGVQKMKEAALDIVNDPNGITRGDCSAIVAEIAGYFDRAAAAVAHMCSLQVSDPI
PTGRRSGGYPPALWDFDTIQSLNTEYKGERHMRREEDLIGQVREMLVHEVEDPTPQLEFID
DLHKLGISCHFENEILQILKSIYLNQNYKRDLYSTSLAFRLLRQYGFILPQEVFDCFKNEE
GTDFKPSFGRDIKGLLQLYEASFLSRKGEETLQLAREFATKILQKEVDEREFATKMEFPSH
WTVQMPNARPFIDAYRRRPDMNPVVLELAILDTNIVQAQFQEELKETSRWWESTGIVQELP
FVRDRIVEGYFWTIGVTQRREHGYERIMTAKVIALVTCLDDIYDVYGTIEELQLFTSTIQR
WDLESMKQLPTYMQVSFLALHNFVTEVAYDTLKKKGYNSTPYLRKTWVDLVESYIKEATWY
YNGYKPSMQEYLNNAWISVGSMAILNHLFFRFTNERMHKYRDMNRVSSNIVRLADDMGTSL
AEVERGDVPKAIQCYMNETNASEEEAREYVRRVIQEEWEKLNTELMRDDDDDDDFTLSKYY
CEVVANLTRMAQFIYQDGSDGFGMKDSKVNRLLKETLIERYE

Ζώνη 10: cpcB.PHLS (PHLS από *Lavandula angustifolia*)

MFDVFTRVVSQADARGEYLSGSQLDALSATVAEGNKRIDSVNRITGNASAIVSNAARALFA
EQPQLIQPGGNAYTSRRMAACLRDMEIILRYVTYATFTGDASVLEDRCLNGLRETYVALGV
PGASVAAGVQKMKEAALDIVNDPNGITRGDCSAIVAEIAGYFDRAAAAVAHMCSLQVSDPI
PTGRRSGGYPPALWDFDTIQSLNTEYKGERHMRREEDLIGQVREMLVHEVEDPTPQLEFID
DLHKLGISCHFENEILQILKSIYLNQNYKRDLYSTSLAFRLLRQYGFILPQEVFDCFKNEE
GTDFKPSFGRDIKGLLQLYEASFLSRKGEETLQLAREFATKILQKEVDEREFATKMEFPSH
WTVQMPNARPFIDAYRRRPDMNPVVLELAILDTNIVQAQFQEELKETSRWWESTGIVQELP
FVRDRIVEGYFWTIGVTQRREHGYERIMTAKVIALVTCLDDIYDVYGTIEELQLFTSTIQR
WDLESMKQLPTYMQVSFLALHNFVTEVAYDTLKKKGYNSTPYLRKTWVDLVESYIKEATWY
YNGYKPSMQEYLNNAWISVGSMAILNHLFFRFTNERMHKYRDMNRVSSNIVRLADDMGTSL
AEVERGDVPKAIQCYMNETNASEEEAREYVRRVIQEEWEKLNTELMRDDDDDDDFTLSKYY
CEVVANLTRMAQFIYQDGSDGFGMKDSKVNRLLKETLIERYE

Ζώνη 11: cpcB.PHLS (PHLS από *Lavandula angustifolia*)

MFDVFTRVVSQADARGEYLSGSQLDALSATVAEGNKRIDSVNRITGNASAIVSNAARALFA
EQPQLIQPGGNAYTSRRMAACLRDMEIILRYVTYATFTGDASVLEDRCLNGLRETYVALGV
PGASVAAGVQKMKEAALDIVNDPNGITRGDCSAIVAEIAGYFDRAAAAVAHMCSLQVSDPI
PTGRRSGGYPPALWDFDTIQSLNTEYKGERHMRREEDLIGQVREMLVHEVEDPTPQLEFID
DLHKLGISCHFENEILQILKSIYLNQNYKRDLYSTSLAFRLLRQYGFILPQEVFDCFKNEE
GTDFKPSFGRDIKGLLQLYEASFLSRKGEETLQLAREFATKILQKEVDEREFATKMEFPSH
WTVQMPNARPFIDAYRRRPDMNPVVLELAILDTNIVQAQFQEELKETSRWWESTGIVQELP
FVRDRIVEGYFWTIGVTQRREHGYERIMTAKVIALVTCLDDIYDVYGTIEELQLFTSTIQR
WDLESMKQLPTYMQVSFLALHNFVTEVAYDTLKKKGYNSTPYLRKTWVDLVESYIKEATWY
YNGYKPSMQEYLNNAWISVGSMAILNHLFFRFTNERMHKYRDMNRVSSNIVRLADDMGTSL
AEVERGDVPKAIQCYMNETNASEEEAREYVRRVIQEEWEKLNTELMRDDDDDDDFTLSKYY
CEVVANLTRMAQFIYQDGSDGFGMKDSKVNRLLKETLIERYE

Ζώνη 12: cpcA.PHLS (PHLS από *Lavandula angustifolia*)

MKTPLTEAVSTADSQGRFLSSTELQIAFGRLRQANAGLQAAKALTDNAQSLVNGAAQAVYN
KFPYTTQTQGNNFAADQRGKDKCARDIGYYLRIVTYCLVAGGTGPLDEYLIAGIDEINRTF
DLSPSWYVEALKYIKANHGLSGDARDEANSYLDYAINALSTSCSLQVSDPIPTGRRSGGYP
PALWDFDTIQSLNTEYKGERHMRREEDLIGQVREMLVHEVEDPTPQLEFIDDLHKLGISCH
FENEILQILKSIYLNQNYKRDLYSTSLAFRLLRQYGFILPQEVFDCFKNEEGTDFKPSFGR
DIKGLLQLYEASFLSRKGEETLQLAREFATKILQKEVDEREFATKMEFPSHWTVQMPNARP
FIDAYRRRPDMNPVVLELAILDTNIVQAQFQEELKETSRWWESTGIVQELPFVRDRIVEGY
FWTIGVTQRREHGYERIMTAKVIALVTCLDDIYDVYGTIEELQLFTSTIQRWDLESMKQLP
TYMQVSFLALHNFVTEVAYDTLKKKGYNSTPYLRKTWVDLVESYIKEATWYYNGYKPSMQE
YLNNAWISVGSMAILNHLFFRFTNERMHKYRDMNRVSSNIVRLADDMGTSLAEVERGDVPK
AIQCYMNETNASEEEAREYVRRVIQEEWEKLNTELMRDDDDDDDFTLSKYYCEVVANLTRM
AQFIYQDGSDGFGMKDSKVNRLLKETLIERYE

Ζώνη 7: cpcA.PHLS (PHLS από *Lavandula angustifolia*)

MKTPLTEAVSTADSQGRFLSSTELQIAFGRLRQANAGLQAAKALTDNAQSLVNGAAQAVYN
KFPYTTQTQGNNFAADQRGKDKCARDIGYYLRIVTYCLVAGGTGPLDEYLIAGIDEINRTF
DLSPSWYVEALKYIKANHGLSGDARDEANSYLDYAINALSTSCSLQVSDPIPTGRRSGGYP
PALWDFDTIQSLNTEYKGERHMRREEDLIGQVREMLVHEVEDPTPQLEFIDDLHKLGISCH
FENEILQILKSIYLNQNYKRDLYSTSLAFRLLRQYGFILPQEVFDCFKNEEGTDFKPSFGR
DIKGLLQLYEASFLSRKGEETLQLAREFATKILQKEVDEREFATKMEFPSHWTVQMPNARP
FIDAYRRRPDMNPVVLELAILDTNIVQAQFQEELKETSRWWESTGIVQELPFVRDRIVEGY
FWTIGVTQRREHGYERIMTAKVIALVTCLDDIYDVYGTIEELQLFTSTIQRWDLESMKQLP
TYMQVSFLALHNFVTEVAYDTLKKKGYNSTPYLRKTWVDLVESYIKEATWYYNGYKPSMQE
YLNNAWISVGSMAILNHLFFRFTNERMHKYRDMNRVSSNIVRLADDMGTSLAEVERGDVPK
AIQCYMNETNASEEEAREYVRRVIQEEWEKLNTELMRDDDDDDDFTLSKYYCEVVANLTRM
AQFIYQDGSDGFGMKDSKVNRLLKETLIERYE

Πηκτή Β

Ζώνη 2: cpcA.GPPS

MFDVFTRVVSQADARGEYLSGSQLDALSATVAEGNKRIDSVNRITGNASAIVSNAARALFA
EQPQLIQPGGNAYTSRRMAACLRDMEIILRYVTYATFTGDASVLEDRCLNGLRETYVALGV
PGASVAAGVQKMKEAALDIVNDPNGITRGDCSAIVAEIAGYFDRAAAAVAHMTRSSKALVQ
LADLSEQVKNVVEFDFDKYMHSKAIAVNEALDKVIPPRYPQKIYESMRYSLLAGGKRVRPI
LCIAACELMGGTEELAMPTACAIEMIHTMSLIHDDLPYIDNDDLRRGKPTNHKVFGEDTAI
IAGDALLSLAFEHVAVSTSRTLGTDIILRLLSEIGRATGSEGVMGGQVVDIESEGDPSIDL
ETLEWVHIHKTAVLLECSVVCGAIMGGASEDDIERARRYARCVGLLFQVVDDILDVSQSSE
ELGKTAGKDLISDKATYPKLMGLEKAKEFADELLNRGKQELSCFDPTKAAPLFALADYIAS
RQN

Ζώνη 3: cpcB.GPPS

MFDVFTRVVSQADARGEYLSGSQLDALSATVAEGNKRIDSVNRITGNASAIVSNAARALFA
EQPQLIQPGGNAYTSRRMAACLRDMEIILRYVTYATFTGDASVLEDRCLNGLRETYVALGV
PGASVAAGVQKMKEAALDIVNDPNGITRGDCSAIVAEIAGYFDRAAAAVAHMTRSSKALVQ
LADLSEQVKNVVEFDFDKYMHSKAIAVNEALDKVIPPRYPQKIYESMRYSLLAGGKRVRPI
LCIAACELMGGTEELAMPTACAIEMIHTMSLIHDDLPYIDNDDLRRGKPTNHKVFGEDTAI
IAGDALLSLAFEHVAVSTSRTLGTDIILRLLSEIGRATGSEGVMGGQVVDIESEGDPSIDL
ETLEWVHIHKTAVLLECSVVCGAIMGGASEDDIERARRYARCVGLLFQVVDDILDVSQSSE
ELGKTAGKDLISDKATYPKLMGLEKAKEFADELLNRGKQELSCFDPTKAAPLFALADYIAS
RQN

Πηκτή Γ

Ζώνη 1: cpcB.GPPS

MFDVFTRVVSQADARGEYLSGSQLDALSATVAEGNKRIDSVNRITGNASAIVSNAARALFA
EQPQLIQPGGNAYTSRRMAACLRDMEIILRYVTYATFTGDASVLEDRCLNGLRETYVALGV
PGASVAAGVQKMKEAALDIVNDPNGITRGDCSAIVAEIAGYFDRAAAAVAHMTRSSKALVQ
LADLSEQVKNVVEFDFDKYMHSKAIAVNEALDKVIPPRYPQKIYESMRYSLLAGGKRVRPI
LCIAACELMGGTEELAMPTACAIEMIHTMSLIHDDLPYIDNDDLRRGKPTNHKVFGEDTAI
IAGDALLSLAFEHVAVSTSRTLGTDIILRLLSEIGRATGSEGVMGGQVVDIESEGDPSIDL
ETLEWVHIHKTAVLLECSVVCGAIMGGASEDDIERARRYARCVGLLFQVVDDILDVSQSSE
ELGKTAGKDLISDKATYPKLMGLEKAKEFADELLNRGKQELSCFDPTKAAPLFALADYIAS
RQN

Ζώνη 2: cpcA.GPPS

MKTPLTEAVSTADSQGRFLSSTELQIAFGRLRQANAGLQAAKALTDNAQSLVNGAAQAVYN
KFPYTTQTQGNNFAADQRGKDKCARDIGYYLRIVTYCLVAGGTGPLDEYLIAGIDEINRTF
DLSPSWYVEALKYIKANHGLSGDARDEANSYLDYAINALSTSTRSSKALVQLADLSEQVKN
VVEFDFDKYMHSKAIAVNEALDKVIPPRYPQKIYESMRYSLLAGGKRVRPILCIAACELMG
GTEELAMPTACAIEMIHTMSLIHDDLPYIDNDDLRRGKPTNHKVFGEDTAIIAGDALLSLA
FEHVAVSTSRTLGTDIILRLLSEIGRATGSEGVMGGQVVDIESEGDPSIDLETLEWVHIHK
TAVLLECSVVCGAIMGGASEDDIERARRYARCVGLLFQVVDDILDVSQSSEELGKTAGKDL
ISDKATYPKLMGLEKAKEFADELLNRGKQELSCFDPTKAAPLFALADYIASRQN

Ζώνη 3: cpcB.GPPS

MFDVFTRVVSQADARGEYLSGSQLDALSATVAEGNKRIDSVNRITGNASAIVSNAA
RALFAEQPQLIQPGGNAYTSRRMAACLRDMEIILRYVTYATFTGDASVLEDRCLNGLRETY
VALGVPGASVAAGVQKMKEAALDIVNDPNGITRGDCSAIVAEIAGYFDRAAAAVAHMTRSS
KALVQLADLSEQVKNVVEFDFDKYMHSKAIAVNEALDKVIPPRYPQKIYESMRYSLLAGGK
RVRPILCIAACELMGGTEELAMPTACAIEMIHTMSLIHDDLPYIDNDDLRRGKPTNHKVFG
EDTAIIAGDALLSLAFEHVAVSTSRTLGTDIILRLLSEIGRATGSEGVMGGQVVDIESEGD
PSIDLETLEWVHIHKTAVLLECSVVCGAIMGGASEDDIERARRYARCVGLLFQVVDDILDV
SQSSEELGKTAGKDLISDKATYPKLMGLEKAKEFADELLNRGKQELSCFDPTKAAPLFALA
DYIASRQN

ΒΙΒΛΙΟΓΑΡΦΙΑ

1. Netravali, N.A. and S. Chabba, *Composites get greener*. Mater. Today, 2003. **6**(4): p. 22-29.
2. Satyanarayana, K.G., A.B. Mariano, and J.V.C. Vargas, *A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials.* Int. J. Energ. Res., 2011. **35**(4): p. 291-311.
3. Chaves, J.E. and A. Melis, *Engineering isoprene synthesis in cyanobacteria.* FEBS Lett, 2018. **592**(12): p. 2059-2069.
4. Liang, F., P. Lindberg, and P. Lindblad, *Engineering photoautotrophic carbon fixation for enhanced growth and productivity.* Sustain. Energ. Fuels, 2018. **2**(12): p. 2583-2600.
5. Stephens, E., I.L. Ross, J.H. Mussgnug, L.D. Wagner, M.A. Borowitzka, C. Posten, O. Kruse, and B. Hankamer, *Future prospects of microalgal biofuel production systems.* Trends Plant. Sci, 2010. **15**(10): p. 554-64.
6. Pimentel, D., A. Marklein, M.A. Toth, M.N. Karpoff, G.S. Paul, R. McCormack, J. Kyriazis, and T. Krueger, *Food Versus Biofuels: Environmental and Economic Costs.* Hum. Ecol., 2009. **37**(1): p. 1-12.
7. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Βιοχημεία*, ed. Π.Ε. Κρήτης. Ηράκλειο, 2001.
8. Flower, S. and R. Roush, J. Wise, *Concepts of Biology*. OpenStax. Houston, Texas, 2013 (Ημερομηνία αναζήτησης 14/09/19).
9. Campbell, M.K. and S.O. Farrell, *Biochemistry*, 6th ed. United States, 2009: Thomson.9780495390411.
10. Νάζος, Θ., *Μελέτη της βιοαποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων από μικροοργανισμούς*, in *Τμήμα Χημείας*. Πανεπιστήμιο Κρήτης: Ηράκλειο, 2018.
11. Kamennaya, N., C. M. Ajo-Franklin, T. Northen, and C. Jansson, *Cyanobacteria as Biocatalysts for Carbonate Mineralization.* Minerals, 2012. **2**(4): p. 338-364.
12. Reece, J.B., L.A. Urry, M.L. Cain, S.A. Wasserman, P.V. Minorsky, R.B. Jackson, and N.A. Campbell, *Campbell Biology*, 10th ed. Boston, 2014: Pearson. 978-0321775658.
13. Branden, C. and J. Tooze, *Εισαγωγή στη δομή των πρωτεϊνών*, Ακαδημαϊκές εκδόσεις. Αλεξανδρούπολη, 2006.
14. Anderson, L.K. and C.M. Toole, *A model for early events in the assembly pathway of cyanobacterial phycobilisomes.* Mol. Microbiol., 1998. **30**(3): p. 467-74.

15. Glazer, A.N. and A. Melis, *Photochemical Reaction Centers: Structure, Organization, and Function.* Ann. Rev. Plant Physio., 1987. **38**(1): p. 11-45.
16. Glazer, A.N., *Phycobilisome a macromolecular complex optimized for light energy transfer.* BBA-Rev. Biomembranes, 1984. **768**(1): p. 29-51.
17. Arteni, A.A., G. Ajlani, and E.J. Boekema, *Structural organisation of phycobilisomes from Synechocystis sp. strain PCC 6803 and their interaction with the membrane.* BBA-Bioenergetics, 2009. **1787**(4): p. 272-279.
18. MacColl, R., *Cyanobacterial Phycobilisomes.* J. Struct. Biol., 1998. **124**(2): p. 311-334.
19. Glazer, A.N., *Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna.* J. Biol. Chem., 1989. **264**(1): p. 1-4.
20. Kirst, H., C. Formighieri, and A. Melis, *Maximizing photosynthetic efficiency and culture productivity in cyanobacteria upon minimizing the phycobilisome light-harvesting antenna size.* BBA-Bioenergetics, 2014. **1837**(10): p. 1653-64.
21. Dartnell, L.R., M.C. Storrie-Lombardi, C.W. Mullineaux, A.V. Ruban, G. Wright, A.D. Griffiths, J.P. Muller, and J.M. Ward., *Degradation of cyanobacterial biosignatures by ionizing radiation.* Astrobiology, 2011. **11**(10): p. 997-1016.
22. Hedges, S.B., H. Chen, S. Kumar, D. Y-C Wang, A.S Thompson, and H. Watanabe, *A genomic timescale for the origin of eukaryotes.* BMC Evol. Biol., 2001. **1**:(4).
23. Lau, N.S., M. Matsui, and A.A. Abdullah, *Cyanobacteria: Photoautotrophic Microbial Factories for the Sustainable Synthesis of Industrial Products.* Biomed. Res. Int., 2015. **2015**: p. 754934.
24. Allwood, A.C., M.R. Walter, B.S. Kamber, C.P. Marshall, and I.W Burch, *Stromatolite reef from the Early Archaean era of Australia.* Nature, 2006. **441**(7094): p. 714-8.
25. Bosak, T., B. Liang, M.S. Sim, and A.P. Petroff, *Morphological record of oxygenic photosynthesis in conical stromatolites.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2009. **106**(27): p. 10939-43.
26. Govindjee and D. Shevela, *Adventures with cyanobacteria: a personal perspective.* Front. Plant Sci., 2011. **2**(1): p. 28.
27. Björn, L.O., and Govindjee., *The evolution of photosynthesis and chloroplasts.* Curr. Sci., 2009. **96**(11): p. 1466–1474.
28. Tan, L.T., *Marine Cyanobacteria: A Prolific Source of Bioactive Natural Products as Drug Leads*. In Marine Microbiology: Bioactive Compounds and

Biotechnological Applications. ed. S.K. Kim. p. 59-81. 2013 https://doi.org/10.1002/9783527665259.ch05 (Ημερομηνία αναζήτησης 26.08.2019).

29. Whitton, B. and M. Potts, *Introduction to the cyanobacteria, In the Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space. Eds B.* A. Whitton, M. Potts, 2000: p. 1-11.

30. Mavroudakis, L., E.A. Valsami, S. Grafanaki, T.P. Andreadaki, D.F. Ghanotakis, and S.A. Pergantis, *The effect of nitrogen starvation on membrane lipids of Synechocystis sp. PCC 6803 investigated by using easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry.* BBA- Biomembranes, 2019. **1861**(10): p. 183027.

31. Papke, R.T., N.B. Ramsing, M.M. Bateson, and D.M. Ward, *Geographical isolation in hot spring cyanobacteria.* Environ. Microbiol., 2003. **5**(8): p. 650-9.

32. Cankilic, M.Y., G. Arikberk, *Analysis of Cyanobacterial Diversity of Some Hot Springs in Afyonkarahisar, Turkey.* Appl. Ecol. Env. Res., 2016. **14**(2): p. 463-484.

33. Singh, S. and J. Elster, *Cyanobacteria in Antarctic lake environments: A mini-review*. In the Algae and Cyanobacteria in Extreme Environments. Publisher: Kluwer Academic Publisher, 2007. pp.302-320

34. Allen, M.B. and D.I. Arnon, *Studies on Nitrogen-Fixing Blue-Green Algae. I. Growth and Nitrogen Fixation by Anabaena Cylindrica Lemm.* Plant physiol., 1955. **30**(4): p. 366-372.

35. Branco Dos Santos, F., W. Du, and K.J. Hellingwerf, *Synechocystis: Not Just a Plug-Bug for CO2, but a Green E. coli.* Front. Bioeng. Biotechnol., 2014. **2**: p. 36.

36. Stanier, R.Y., R. Kunisawa, M. MAndel, and G. Cohen-Bazire, *Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales).* Bacteriol. rev., 1971. **35**(2): p. 171-205.

37. Liberton, M., R. Howard Berg, J. Heuser, R. Roth, and H.B. Pakrasi, *Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC 6803.* Protoplasma, 2006. **227**(2-4): p. 129-38.

38. van de Meene, A.M., M.F. Hohmann-Marriott, W.F. Vermaas, and R.W Roberson, *The three-dimensional structure of the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803.* Arch. Microbiol., 2006. **184**(5): p. 259-70.

39. Kaneko, T., S. Sato, H. Kotani, A. Tanaka, E. Asamizu, Y. Nakamura, N. Miyajima, M. Hirosawa, M. Sugiura, S. Sasamoto, T. Kimura, T. Hosouchi, A. Matsuno, A. Muraki, N. Nakazaki, K. Naruo, S. Okumura, S. Shimpo, C. Takeuchi, T. Wada, A.

Watanabe, M. Yasuda, and S. Tabata, *Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions.* DNA Res., 1996. **3**(3): p. 109-36.

40. Ikeuchi, M. and S. Tabata, *Synechocystis sp. PCC 6803 - a useful tool in the study of the genetics of cyanobacteria.* Photosynth. Res., 2001. **70**(1): p. 73-83.
41. Williams, J.G.K., *Construction of Specific Mutations in Photosystem-Ii Photosynthetic Reaction Center by Genetic-Engineering Methods in Synechocystis-6803.* Method. Enzymol., 1988. **167**: p. 766-778.
42. Grigorieva, G. and S. Shestakov, *Transformation in the cyanobacterium Synechocystis sp. 6803.* FEMS Microbiol. Lett., 1982. **13**(4): p. 367-370.
43. Ruffing, A.M. and T. Kallas, *Editorial: Cyanobacteria: The Green E. coli.* Front. Bioeng. Biotechnol., 2016. **4**:(7) p. 7-7.
44. Bailey, S. and A. Grossman, *Photoprotection in cyanobacteria: regulation of light harvesting.* Photochem. Photobiol., 2008. **84**(6): p. 1410-20.
45. Kirilovsky, D., *Photoprotection in cyanobacteria: the orange carotenoid protein (OCP)-related non-photochemical-quenching mechanism.* Photosynth. Res., 2007. **93**(1-3): p. 7-16.
46. Kirilovsky, D. and C.A. Kerfeld, *The orange carotenoid protein in photoprotection of photosystem II in cyanobacteria.* BBA-Bioenergetics, 2012. **1817**(1): p. 158-66.
47. Muller, P., X.P. Li, and K.K. Niyogi, *Non-photochemical quenching. A response to excess light energy.* Plant. Physiol., 2001. **125**(4): p. 1558-66.
48. Melis, A., *Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage ?* Trends Plant Sci., 1999. **4**(4): p. 130-135.
49. Melis, A., *Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: Minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency.* Plant Sci., 2009. **177**(4): p. 272-280.
50. Kirst, H., et al., *Assembly of the light-harvesting chlorophyll antenna in the green alga Chlamydomonas reinhardtii requires expression of the TLA2-CpFTSY gene.* Plant Physiol, 2012. **158**(2): p. 930-45.
51. Kirst, H., J.G. García-Cerdán, A. Zurbriggen, A. Melis, *Truncated Photosystem Chlorophyll Antenna Size in the Green Microalga Chlamydomonas reinhardtiiupon Deletion of the TLA3-CpSRP43 Gene.* Plant Physiol., 2012. **160**(4): p. 2251-2260.

52. Kirst, H. and A. Melis, *The chloroplast signal recognition particle (CpSRP) pathway as a tool to minimize chlorophyll antenna size and maximize photosynthetic productivity.* Biotechnol. Adv., 2014. **32**(1): p. 66-72.

53. Melis, A., *Photosynthesis-to-fuels: from sunlight to hydrogen, isoprene, and botryococcene production.* Energ. Environm. Sci., 2012. **5**(2): p. 5531-5539.

54. Smith, B.M., P.J. Morrissey, J.E. Guenther, J.A. Nemson, M.A. Harrison, J.F. Allen, A. Melis, *Response of the Photosynthetic Apparatus in Dunaliella salina (Green Algae) to Irradiance Stress.* Plant physiol. 1990. **93**(4): p. 1433-1440.

55. Breitmaier, E., *Terpenes: Importance, General Structure, and Biosynthesis*. In the Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones, 2006. p. 1-9.

56. Lin, P.C. and H.B. Pakrasi, *Engineering cyanobacteria for production of terpenoids.* Planta, 2019. **249**(1): p. 145-154.

57. Pattanaik, B. and P. Lindberg, *Terpenoids and their biosynthesis in cyanobacteria.* Life (Basel), 2015. **5**(1): p. 269-93.

58. Fornari, T., G. Vicente, E. Vázquez, M.R. García-Risco, and G.Reglero, *Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction.* J. Chromatogr. A., 2012. **1250**: p. 34-48.

59. Sharkey, T.D., A.E. Wiberley, and A.R. Donohue, *Isoprene Emission from Plants: Why and How.* Ann. Bot.-London, 2007. **101**(1): p. 5-18.

60. Siwko, M.E., S.J. Marrink, A.H. De Vries, A. Kozubek, A.J. Schoot Uiterkamp, and A.E. Mark., *Does isoprene protect plant membranes from thermal shock? A molecular dynamics study.* BBA-Biomembranes, 2007. **1768**(2): p. 198-206.

61. Vickers, C.E., M. Possell, C.I. Cojocariu, V.B. Velikova, J. Laothawornkitkul, A. Ryan, P.M. Mullineaux, and C. Nicholas Hewitt., *Isoprene synthesis protects transgenic tobacco plants from oxidative stress.* Plant Cell Environ., 2009. **32**(5): p. 520-31.

62. Bentley, F.K., J.G. García-Cerdán, H.C. Chen, A. Melis, *Paradigm of Monoterpene (β-phellandrene) Hydrocarbons Production via Photosynthesis in Cyanobacteria.* BioEnerg. Res., 2013. **6**(3): p. 917-929.

63. McMurry, J., *Οργανική Χημεία Τόμος ΙΙ*. 2008, Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

64. Ajikumar, P.K., K. Tyo, S. Carlsen, O. Mucha, T.H. Phon, and G. Stephanopoulos, *Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms.* Mol. Pharm., 2008. **5**(2): p. 167-90.

65. Van Agtmael, M.A., T.A. Eggelte, and C.J. van Boxtel, *Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication.* Trends Pharmacol. Sci., 1999. **20**(5): p. 199-205.

66. Guzman, M.L., R.M. Rossi, L. Karnischky, X. Li, D.R. Peterson, D.S. Howard, and C.T. Jordan, *The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells.* Blood, 2005. **105**(11): p. 4163-9.

67. Bohlmann, J. and C.I. Keeling, *Terpenoid biomaterials.* Plant J., 2008. **54**(4): p. 656-69.

68. Ammon, H.P. and A.B. Muller, *Forskolin: from an ayurvedic remedy to a modern agent.* Planta Med., 1985. **51**(6): p. 473-7.

69. Seamon, K.B., W. Padgett, and J.W. Daly, *Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981. **78**(6): p. 3363-7.

70. Wagh, V.D., P.N. Patil, S.J. Surana, and K.V. Wagh, *Forskolin: upcoming antiglaucoma molecule.* J. Postgrad. Med., 2012. **58**(3): p. 199-202.

71. Bentley, F.K. and A. Melis, *Diffusion-based process for carbon dioxide uptake and isoprene emission in gaseous/aqueous two-phase photobioreactors by photosynthetic microorganisms.* Biotechnol. Bioeng., 2012. **109**(1): p. 100-9.

72. Tracy, N.I., D. Chen, D. W. Crunkleton, G. L.Price, *Hydrogenated monoterpenes as diesel fuel additives.* Fuel, 2009. **88**(11): p. 2238-2240.

73. Englund, E., J. Andersen-Ranberg, R. Miao, B. Hamberger, and P. Lindberg, *Metabolic Engineering of Synechocystis sp. PCC 6803 for Production of the Plant Diterpenoid Manoyl Oxide.* ACS Synth. Biol., 2015. **4**(12): p. 1270-1278.

74. Leavell, M.D., D.J. McPhee, and C.J. Paddon, *Developing fermentative terpenoid production for commercial usage.* Curr. Opin. Biotechnol., 2016. **37**: p. 114-119.

75. Kiyota, H., Y. Okuda, M. Ito, M.Y. Hirai, M. Ikeuchi, *Engineering of cyanobacteria for the photosynthetic production of limonene from CO_2.* J. Biotechnol., 2014. **185**: p. 1-7.

76. Veeresham, C., V. Srinivasan, and M. L. Shuler, *Elicitation of Taxus sp. cell cultures for production of taxol.* Biotechnol. Lett., 1995. **17**: p. 1343-1346.

77. Paddon, C.J. and J.D. Keasling, *Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development.* Nat. Rev. Microbiol., 2014. **12**: p. 355.

78. Formighieri, C. and A. Melis, *Sustainable heterologous production of terpene hydrocarbons in cyanobacteria.* Photosynth. Res., 2016. **130**(1-3): p. 123-135.

79. Lichtenthaler, H.K., J. Schwender, A. Disch, M. Rohmer, *Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway.* FEBS Lett., 1997. **400**(3): p. 271-4.

80. Lee, P.C. and C. Schmidt-Dannert, *Metabolic engineering towards biotechnological production of carotenoids in microorganisms.* Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002. **60**(1-2): p. 1-11.

81. Englund, E., J. Andersen-Ranberg, R. Miao, B. Hamberger, P. Lindberg, *Metabolic Engineering of Synechocystis sp. PCC 6803 for Production of the Plant Diterpenoid Manoyl Oxide.* ACS Synth. Biol., 2015. **4**(12): p. 1270-8.

82. Gruchattka, E., O. Hädicke, S. Klamt, V. Schütz, O. Kayser, *In silico profiling of Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae as terpenoid factories.* Microb. Cell Fact., 2013. **12**: p. 84.

83. Ajikumar, P.K., W.H. Xiao, K.E.J. Tyo, Y. Wang, F. Simeon, E. Leonard, O. Mucha, T.H.Phon, B. Pfeifer, and G. Stephanopoulos, *Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in Escherichia coli.* Science, 2010. **330**(6000): p. 70-4.

84. Albrecht, M., N. Misawa, and G. Sandmann, *Metabolic engineering of the terpenoid biosynthetic pathway of Escherichia coli for production of the carotenoids β-carotene and zeaxanthin.* Biotechnol.Lett., 1999. **21**: p. 791-795.

85. Alper, H., K. Miyaoku, and G. Stephanopoulos, *Construction of lycopene-overproducing E. coli strains by combining systematic and combinatorial gene knockout targets.* Nat. Biotechnol., 2005. **23**(5): p. 612-6.

86. Martin, V.J., D.J. Pitera, S.T. Withers, J.D. Newman, J.D. Keasling, *Engineering a mevalonate pathway in Escherichia coli for production of terpenoids.* Nat. Biotechnol., 2003. **21**(7): p. 796-802.

87. Wang, C., M. Liwei, J.B. Park, S.H. Jeong, G. Wei, Y. Wang, and S.W. Kim., *Microbial Platform for Terpenoid Production: Escherichia coli and Yeast.* Front. Microbiol., 2018. **9**: p. 2460.

88. Moser, S. and H. Pichler, *Identifying and engineering the ideal microbial terpenoid production host.* Appl. Microbiol. Biotechnol., 2019. **103**(14): p. 5501-5516.

89. Tippmann, S., Y. Chen, V. Siewers, and J. Nielsen, *From flavors and pharmaceuticals to advanced biofuels: Production of isoprenoids in Saccharomyces cerevisiae.* Biotechnol. J., 2013. **8**(12): p. 1435-1444.

90. Jackson, B.E., E.A. Hart-Wells, and S.P.T. Matsuda, *Metabolic Engineering to Produce Sesquiterpenes in Yeast.* Org. Lett., 2003. **5**(10): p. 1629-1632.

91. Zhou, J., T. Zhu, Z. Cai, and Y. Li, *From cyanochemicals to cyanofactories: a review and perspective.* Microb. Cell Fact., 2016. **15**(1).

92. Gao, Z., H. Zhao, Z.Li, X. Tana and X.Lu, *Photosynthetic production of ethanol from carbon dioxide in genetically engineered cyanobacteria.* Energy Environ. Sci., 2012. **5**(12): p. 9857-9865.

93. Deng, M.D. and J.R. Coleman, *Ethanol synthesis by genetic engineering in cyanobacteria.* Appl. Environ. Microbiol., 1999. **65**(2): p. 523-8.

94. Dexter, J. and P. Fu, *Metabolic engineering of cyanobacteria for ethanol production.* Energ. Environ. Sci., 2009. **2**(8): p. 857.

95. Hellingwerf, K.J. and M.J. Teixeira de Mattos, *Alternative routes to biofuels: Light-driven biofuel formation from CO_2 and water based on the 'photanol' approach.* J. Biotechnol., 2009. **142**(1): p. 87-90.

96. Xiong, W., J.A. Morgan, J. Ungerer, B. Wang, P.C.Maness, and J. Yu, *The plasticity of cyanobacterial metabolism supports direct CO2 conversion to ethylene.* Nat. Plants, 2015. **1**(5): p. 15053.

97. Takahama, K., M. Matsuoka, K. Nagahama, and T. Ogawa, *Construction and analysis of a recombinant cyanobacterium expressing a chromosomally inserted gene for an ethylene-forming enzyme at the psbAI locus.* J. Biosci. Bioeng., 2003. **95**(3): p. 302-5.

98. Zhou, J., H. Zhang, Y. Zhang, Y. Li, Y. Ma, *Designing and creating a modularized synthetic pathway in cyanobacterium Synechocystis enables production of acetone from carbon dioxide.* Metab. Eng., 2012. **14**(4): p. 394-400.

99. Kusakabe, T., T. Tatsuke, K. Tsuruno, Y. Hirokawa, S. Atsumi, J.C. Liao, and T. Hanai, *Engineering a synthetic pathway in cyanobacteria for isopropanol production directly from carbon dioxide and light.* Metab. Eng., 2013. **20**: p. 101-8.

100. Li, H. and J.C. Liao, *Engineering a cyanobacterium as the catalyst for the photosynthetic conversion of CO_2 to 1,2-propanediol.* Microb. Cell Fact., 2013. **12**(4).

101. Atsumi, S., W. Higashide, and J.C. Liao, *Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobutyraldehyde.* Nat. Biotechnol., 2009. **27**(12): p. 1177-80.

102. Oliver, J.W., I.M.P. Machado, H. Yoneda, and S. Atsumi., *Cyanobacterial conversion of carbon dioxide to 2,3-butanediol.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2013. **110**(4): p. 1249-54.

103. Bentley, F.K., A. Zurbriggen, and A. Melis, *Heterologous expression of the mevalonic acid pathway in cyanobacteria enhances endogenous carbon partitioning to isoprene.* Mol. Plant., 2014. **7**(1): p. 71-86.

104. Oliver, J.W. and S. Atsumi, *Metabolic design for cyanobacterial chemical synthesis.* Photosynth. Res., 2014. **120**(3): p. 249-61.

105. Desai, S.H. and S. Atsumi, *Photosynthetic approaches to chemical biotechnology.* Curr. Opin. Biotechnol., 2013. **24**(6): p. 1031-6.

106. Lindberg, P., S. Park, and A. Melis, *Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using Synechocystis as the model organism.* Metab. Eng., 2010. **12**(1): p. 70-9.

107. Formighieri, C. and A. Melis, *Regulation of beta-phellandrene synthase gene expression, recombinant protein accumulation, and monoterpene hydrocarbons production in Synechocystis transformants.* Planta, 2014. **240**(2): p. 309-24.

108. Betterle, N. and A. Melis, *Photosynthetic generation of heterologous terpenoids in cyanobacteria.* Biotechno.l Bioeng., 2019. **116**(8): p. 2041-2051.

109. Kiyota, H., Y. Okuda, M. Ito, M.Y. Hirai, and M. Ikeuchi, *Engineering of cyanobacteria for the photosynthetic production of limonene from CO_2.* J. Biotechnol., 2014. **185**: p. 1-7.

110. Angermayr, S.A., M. Paszota, and K.J. Hellingwerf, *Engineering a cyanobacterial cell factory for production of lactic acid.* Appl. Environ. Microbiol., 2012. **78**(19): p. 7098-106.

111. Ducat, D.C., J.A. Avelar-Rivas, J.C. Way, P.A. Silver, *Rerouting carbon flux to enhance photosynthetic productivity.* Appl. Environ. Microbiol., 2012. **78**(8): p. 2660-8.

112. Liu, X., J. Sheng, and R. Curtiss, *Fatty acid production in genetically modified cyanobacteria.* Proc. Natl. Acad. Sci USA, 2011. **108**(17): p. 6899-904.

113. Gao, Z., H. Zhao, Z. Li, X. Tana, and Xuefeng Lu, *Photosynthetic production of ethanol from carbon dioxide in genetically engineered cyanobacteria.* Energ. Environm. Sci., 2012. **5**(12): p. 9857-9865.

114. Kanno, M., A.L. Carroll, and S. Atsumi, *Global metabolic rewiring for improved CO2 fixation and chemical production in cyanobacteria.* Nat. Commun., 2017. **8**(1): p. 14724.

115. Liang, F., E. Englund, P. Lindberg, P. Lindblad, *Engineered cyanobacteria with enhanced growth show increased ethanol production and higher biofuel to biomass ratio.* Metab. Eng., 2018. **46**: p. 51-59.

116. Guihéneuf, F., A. Khan, and L.-S. Tran, *Genetic Engineering: A Promising Tool to Engender Physiological, Biochemical, and Molecular Stress Resilience in Green Microalgae.* Front. Plant Sci., 2016. **7**(518): p. 400.

117. Zhou, J., T. Zhu, Z. Cai, and Y. Li., *From cyanochemicals to cyanofactories: areview and perspective.* Microb. Cell Fact., 2016. **15**(1): p. 2.

118. Savakis, P. and K.J. Hellingwerf, *Engineering cyanobacteria for direct biofuel production from CO2.* Curr. Opin. Biotechnol., 2015. **33**: p. 8-14.

119. Melis, A., *Carbon partitioning in photosynthesis.* Curr. Opin. Chem. Biol., 2013. **17**(3): p. 453-6.

120. Waterbury, J.B., S.W. Watson, R.R.L. Guillard, and L.E. Brand, *Widespread occurrence of a unicellular, marine, planktonic, cyanobacterium.* Nature, 1979. **277**(5694): p. 293-294.

121. Savir, Y., E. Noor, R. Milo, and T. Tlusty, *Cross-species analysis traces adaptation of Rubisco toward optimality in a low-dimensional landscape.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010. **107**(8): p. 3475-80.

122. Pei, G., L. Chen, J. Wang, J. Qiao, and W. Zhang, *Protein Network Signatures Associated with Exogenous Biofuels Treatments in Cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803.* Front. Bioeng. Biotechnol., 2014. **2**: p. 48.

123. Quintana, N., et al., *Renewable energy from Cyanobacteria: energy production optimization by metabolic pathway engineering.* Appl Microbiol Biotechnol, 2011. **91**(3): p. 471-90.

124. Wang, B., et al., *Application of synthetic biology in cyanobacteria and algae.* Front Microbiol, 2012. **3**: p. 344.

125. Davies, F.K., R.E. Jinkerson, and M.C. Posewitz, *Toward a photosynthetic microbial platform for terpenoid engineering.* Photosynth Res, 2015. **123**(3): p. 265-84.

126. Formighieri, C. and A. Melis, *A phycocyanin.phellandrene synthase fusion enhances recombinant protein expression and beta-phellandrene (monoterpene) hydrocarbons production in Synechocystis (cyanobacteria).* Metab Eng, 2015. **32**: p. 116-124.

127. Setzer., J.D.C.a.W.N., *The volatile components of parsley, Petroselinum crispum (Mill.) Fuss.* American Journal of Essential Oils and Natural Products, 2017. **5**(1): p. 27-32.

128. Betterle, N. and A. Melis, *Heterologous Leader Sequences in Fusion Constructs Enhance Expression of Geranyl Diphosphate Synthase and Yield of beta-Phellandrene Production in Cyanobacteria (Synechocystis).* ACS Synth. Biol., 2018. **7**(3): p. 912-921.

129. Xue, Y. and Q. He, *Cyanobacteria as cell factories to produce plant secondary metabolites.* Front. Bioeng. Biotechnol., 2015. **3**: p. 57.

130. Steen, E.J., Y. Kang, G. Bokinsky, Z. Hu, A. Schirmer, A. McClure, S.B. Del Cardayre, and J.D. Keasling, *Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass.* Nature, 2010. **463**: p. 559.

131. Watson, J.D., *Recombinant DNA:genes and genomes:a short course*. Third ed., W.H. Freeman: Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York. 2007.

132. Chen, I. and D. Dubnau, *DNA uptake during bacterial transformation.* Nat. Rev. Microbiol., 2004. **2**(3): p. 241-9.

133. Lorenz, M.G. and W. Wackernagel, *Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment.* Microbiol. Rev., 1994. **58**(3): p. 563-602.

134. Redfield, R.J., *Genes for Breakfast: The Have-Your-Cake and-Eat-lt-Too of Bacterial Transformation.* J. Heredity, 1993. **84**(5): p. 400-404.

135. Redfield, R.J., *Do bacteria have sex?* Nat. Rev. Gen., 2001. **2**(8): p. 634-639.

136. Heidorn, T., D. Camsund, H.H. Huang, P. Lindberg, P. Oliveira, K. Stensjö, P. Lindblad., *Synthetic biology in cyanobacteria engineering and analyzing novel functions.* Methods Enzymol., 2011. **497**: p. 539-79.

137. Ye, L., X. Lv, and H. Yu, *Engineering microbes for isoprene production.* Metab. Eng., 2016. **38**: p. 125-138.

138. Demissie, Z.A., L.S. Sarker, and S.S. Mahmoud, *Cloning and functional characterization of beta-phellandrene synthase from Lavandula angustifolia.* Planta, 2011. **233**(4): p. 685-96.

139. Sage, R.F., *Variation in the kcat of Rubisco in C3 and C4 plants and some implications for photosynthetic performance at high and low temperature.* J. Exp. Bot., 2002. **53**(369): p. 609-620.

140. Ellis, R.J., *The most abundant protein in the world.* Trends Biochem. Sci., 1979. **4**(11): p. 241-244.

141. Chaves, J.E., P.R. Romero, H. Kirst, and A. Melis, *Engineering Isoprene Synthase Expression and Activity in Cyanobacteria.* ACS Synth. Biol., 2017. **6**(12): p. 2281-2292.

142. Chaves, J.E., P.R. Romero, H. Kirst, A. Melis, *Role of isopentenyl-diphosphate isomerase in heterologous cyanobacterial (Synechocystis) isoprene production.* Photosynth. Res., 2016. **130**(1-3): p. 517-527.

143. Hanahan, D., *Studies on Transformation of Escherichia-Coli with Plasmids.* J. Mol. Bio., 1983. **166**(4): p. 557-580.

144. Guisbert, E., T. Yura, V.A. Rhodius, and C.A. Gross, *Convergence of molecular, modeling, and systems approaches for an understanding of the Escherichia coli heat shock response.* Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2008. **72**(3): p. 545-54.

145. Li, C., A. Wen, B. Shen, J. Lu, Y. Huang, and Y. Chang, *FastCloning: a highly simplified, purification-free, sequence- and ligation-independent PCR cloning method.* BMC Biotechnol., 2011. **11**(1): p. 92.

146. Lichtenthaler, H.K., *[34] Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes*, in *Methods in Enzymology*. 1987, Academic Press. p. 350-382.

147. Clark, L.C., Jr., R. Wolf, D. Granger, and Z. Taylor, *Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography.* J. Appl. Physiol., 1953. **6**(3): p. 189-193.

148. Delieu, T., Walker, D.A., *Polarographic measurements of photosynthetic oxygen evolution by leaf disks.* New Phytol., 1981. **89**: p. 165-178.

149. Bentley, F.K. and A. Melis, *Diffusion-based process for carbon dioxide uptake and isoprene emission in gaseous/aqueous two-phase photobioreactors by photosynthetic microorganisms.* Biotechnol. and Bioeng., 2012. **109**(1): p. 100-109.

150. Formighieri, C. and A. Melis, *Heterologous synthesis of geranyllinalool, a diterpenol plant product, in the cyanobacterium Synechocystis.* Appl. Microb. Biot., 2017. **101**(7): p. 2791-2800.

151. Glazer, A.N. and C.S. Hixson, *Characterization of R-phycocyanin. Chromophore content of R-phycocyanin and C-phycoerythrin.* J. Biol. Chem., 1975. **250**(14): p. 5487-95.

152. Formighieri, C. and A. Melis, *Cyanobacterial production of plant essential oils.* Planta, 2018. **248**(4): p. 933-946.

153. Melis, A., *Dynamics of photosynthetic membrane composition and function.* BBA-Bioenergetics, 1991. **1058**(2): p. 87-106.

154. Umena, Y., K. Kawakami, J.R. Shen, and N. Kamiya, *Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å.* Nature, 2011. **473**: p. 55.

155. Melis, A. and J.S. Brown, *Stoichiometry of system I and system II reaction centers and of plastoquinone in different photosynthetic membranes.* P. Natl. A. Sci. USA, 1980. **77**(8): p. 4712-4716.

156. Myers, J., J.R. Graham, and R.T. Wang, *Light Harvesting in Anacystis nidulans Studied in Pigment Mutants.* Plant Physiol., 1980. **66**(6): p. 1144-9.

157. Fujita, Y., A. Murakami, and K. Ohki, *Regulation of Photosystem Composition in the Cyanobacterial Photosynthetic System: the Regulation Occurs in Response to the Redox State of the Electron Pool Located between the Two Photosystems.* Plant and Cell Physiol., 1987. **28**(2): p. 283-292.

158. Pisciotta, J.M., Y. Zou, and I.V. Baskakov, *Light-dependent electrogenic activity of cyanobacteria.* PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10821.

159. Yu, Y., L. You, D. Liu, W. Hollinshead, Y.J. Tang, and F. Zhang, *Development of Synechocystis sp. PCC 6803 as a phototrophic cell factory.* Mar. Drugs, 2013. **11**(8): p. 2894-916.

160. Ruffing, A.M., *Engineered cyanobacteria: teaching an old bug new tricks.* Bioeng. Bugs., 2011. **2**(3): p. 136-49.

161. Chaves, J.E., H. Kirst, and A. Melis, *Isoprene production in Synechocystis under alkaline and saline growth conditions.* J. Appl. Phycol., 2014. **27**(3): p. 1089-1097.

162. Touloupakis, E., B. Cicchi, A.M.S. Benavides, G. Torzillo, *Effect of high pH on growth of Synechocystis sp. PCC 6803 cultures and their contamination by golden algae (Poterioochromonas sp.).* Appl. Microbiol. Biotechnol., 2016. **100**(3): p. 1333-1341.

163. Cooney, M.J., G. Young, and R. Pate, *Bio-oil from photosynthetic microalgae: case study.* Bioresour. Technol., 2011. **102**(1): p. 166-77.

164. Yang, J., M. Xu, X. Zhang, Q. Huc, M. Sommerfeldc, and Y. Chena, *Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: water footprint and nutrients balance.* Bioresour. Technol., 2011. **102**(1): p. 159-65.

165. Pate, R., G. Klise, and B. Wu, *Resource demand implications for US algae biofuels production scale-up.* Appl. Energ., 2011. **88**(10): p. 3377-3388.

166. McGinn, P.J., K.E. Dickinson, S. Bhatti, J.C. Frigon, S.R. Guiot, S.J. O'Leary, *Integration of microalgae cultivation with industrial waste remediation for biofuel*

and bioenergy production: opportunities and limitations. Photosynth. Res., 2011. **109**(1-3): p. 231-47.

167. Summerfield, T.C. and L.A. Sherman, *Global transcriptional response of the alkali-tolerant cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC 6803 to a pH 10 environment.* Appl. Environ. Microbiol., 2008. **74**(17): p. 5276-84.
168. Hagemann, M., *Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation.* FEMS Microbiol. Rev., 2011. **35**(1): p. 87-123.
169. Pittman, J.K., A.P. Dean, and O. Osundeko, *The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources.* Bioresource Technol., 2011. **102**(1): p. 17-25.
170. Abu Hajar, H.A., R. Guy Riefler, and B.J. Stuart, *Anaerobic digestate as a nutrient medium for the growth of the green microalga Neochloris oleoabundans.* Environ. Eng. Res., 2016. **21**(3): p. 265-275.
171. Zuliani, L., N. Frison, A. Jelic, F. Fatone, D. Bolzonella, M. Ballottari, *Microalgae Cultivation on Anaerobic Digestate of Municipal Wastewater, Sewage Sludge and Agro-Waste.* Int. J. Mol. Sci., 2016. **17**(10).
172. Chen, F., *High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth.* Trends Biotechnol., 1996. **14**(11): p. 421-426.
173. Morales-Sanchez, D., O.A. Martinez-Rodriguez, J. Kyndt, A. Martinez, *Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects.* World J. Microbiol. Biotechnol., 2015. **31**(1): p. 1-9.
174. Ingram, L.O., J. A. Calder, C. Van Baalen, F. E. Plucker, and P. L. Parker, *Role of reduced exogenous organic compounds in the physiology of the blue-green bacteria (algae): photoheterotrophic growth of a "heterotrophic" blue-green bacterium.* J. Bacteriol., 1973. **114**(2): p. 695-700.
175. Khan, M., O.A. Martinez-Rodriguez, J. Kyndt, A. Martinez, *Heterotrophic Growth of Micro Algae*. 2016. p. 1-19.
176. Brennan, L. and P. Owende, *Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products.* Renew. Sust. Energ. Rev., 2010. **14**(2): p. 557-577.
177. Xiong, W., X. Li, J. Xiang, Q. Wu, *High-density fermentation of microalga Chlorella protothecoides in bioreactor for microbio-diesel production.* Appl. Microbiol. Biotechnol., 2008. **78**(1): p. 29-36.

178. Howitt, S.M. and M.K. Udvardi, *Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants.* BBA-Biomembranes, 2000. **1465**(1-2): p. 152-70.

179. Zur, J., D. Wojcieszynska, and U. Guzik, *Metabolic Responses of Bacterial Cells to Immobilization.* Molecules, 2016. **21**(7).

180. Mitra, A. and S. Mukhopadhyay, *Biofilm mediated decontamination of pollutants from the environment.* AIMS Bioeng., 2016. **3**: p. 44-59.

181. Van Loosdrecht, M.C., J. Lyklema, W. Norde, and A.J. Zehnder, *Influence of interfaces on microbial activity.* Microbiol. Rev., 1990. **54**(1): p. 75-87.

182. Davey, M.E. and A. O'Toole G, *Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics.* Microbiol Mol Biol Rev, 2000. **64**(4): p. 847-67.

183. Willaert, R., *Cell Immobilization and Its Applications in Biotechnology.* 2011: p. 313-367.

184. Bucke, C. and D.E. Brown, *Immobilized Cells [and Discussion].* Philos. T. R. Soc. *B.*, 1983. **300**(1100): p. 369-389.

185. Orive, G., R.M. Hernandez, A.R. Gascón, J.L. Pedraz, *Biomedical Applications of Immobilized Cells*, in *Immobilization of Enzymes and Cells*, J.M. Guisan, Editor. Humana Press: Totowa, New Jersey. 2006, p. 427-437.

186. Narayanan, R.P., G. Melman, N.J. Letourneau, N.L. Mendelson, and A. Melman, *Photodegradable iron(III) cross-linked alginate gels.* Biomacromolecules, 2012. **13**(8): p. 2465-71.

187. Skjåk-Braek, G., H. Grasdalen, and O. Smidsrød, *Inhomogeneous polysaccharide ionic gels.* Carbohyd. Polym., 1989. **10**(1): p. 31-54.

188. Sun, J. and H. Tan, *Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications.* Materials (Basel), 2013. **6**(4): p. 1285-1309.

189. George, M. and T.E. Abraham, *Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan-a review.* J. Control Release, 2006. **114**(1): p. 1-14.

190. Wee, S. and W.R. Gombotz, *Protein release from alginate matrices.* Adv. Drug. Deliv. Rev., 1998. **31**(3): p. 267-285.

191. Ostgaard, K., S.H. Knutsen, N. Dyrset, I.M. and Aasen, *Production and characterization of guluronate lyase from Klebsiella pneumoniae for applications in seaweed biotechnology.* Enzyme Microb. Technol., 1993. **15**(9): p. 756-63.

192. De Vos, P., H.A. Lazarjani, D. Poncelet, M.M. Faas, *Polymers in cell encapsulation from an enveloped cell perspective.* Adv. Drug Deliv. Rev., 2014. **67-68**: p. 15-34.

193. Paredes Juarez, G.A., M. Spasojevic, M.M. Faas, P. De Vos, *Immunological and technical considerations in application of alginate-based microencapsulation systems.* Front. Bioeng. Biotechnol., 2014. **2**: p. 26.

194. Rees, D.A. and E.J. Welsh, *Secondary and Tertiary Structure of Polysaccharides in Solutions and Gels.* Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1977. **16**(4): p. 214-224.

195. Kim, H.S., C.-G. Lee, and E.Y. Lee, *Alginate lyase: Structure, property, and application.* Biotechnol.and Bioproc. E., 2011. **16**(5): p. 843.

196. Shapiro, J.A., *Scanning electron microscope study of Pseudomonas putida colonies.* J. Bacteriol., 1985. **164**(3): p. 1171-81.

197. Shapiro, J.A., *Organization of developing Escherichia coli colonies viewed by scanning electron microscopy.* J. Bacteriol., 1987. **169**(1): p. 142-56.

198. Touloupakis, E., G. Rontogiannis, A.M. Silva, B.B. Cicchi, D.F. Ghanotakis, and G. Torzillo, *Hydrogen production by immobilized Synechocystis sp. PCC 6803.* Int. J. Hydrogen Energ., 2016. **41**(34): p. 15181-15186.

199. Zhu, Y., *Immobilized Cell Fermentation for Production of Chemicals and Fuels.* Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources, 2007: p. 373-396.

200. Okada, M., H. Morinaga, and W. Nishijima, *Activated carbon as a better habitat for water and wastewater treatment microorganisms.* Water Sci. Technol., 2000. **42**: p. 149-154.

201. Sekaran, G., S. Karthikeyan, V.K. Gupta, R. Boopathy, and P.Maharajaa, *Immobilization of Bacillus sp. in mesoporous activated carbon for degradation of sulphonated phenolic compound in wastewater.* Mater. Sci. Eng. C, 2013. **33**(2): p. 735-745.

202. Antizar-Ladislao, B. and N.I. Galil, *Biosorption of phenol and chlorophenols by acclimated residential biomass under bioremediation conditions in a sandy aquifer.* Water Res., 2004. **38**(2): p. 267-76.

203. Del Castillo, I., P. Hernández, A. LafuenteI, D. Rodríguez-Llorente, M.A. Caviedes, and E. Pajuelo, *Self-bioremediation of cork-processing wastewaters by (chloro)phenol-degrading bacteria immobilised onto residual cork particles.* Water Res., 2012. **46**(6): p. 1723-1734.

204. Ramakrishna, S.V. and R.S. Prakasham, *Microbial fermentations with immobilized cells.* Cur. Sci., 1999. **77**(1): p. 87-100.

205. Bailliez, C., C. Largeau, and E. Casadevall, *Growth and hydrocarbon production ofBotryococcus braunii immobilized in calcium alginate gel.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 1985. **23**(2): p. 99-105.

206. Lau, P.S., N.F.Y. Tam, and Y.S. Wong, *Effect of carrageenan immobilization on the physiological activities of Chlorella vulgaris.* Bioresour. Technol., 1998. **63**(2): p. 115-121.