

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ
ΜΟΝΟΤΕΡΠΕΝΙΟΥ β -ΦΕΛΛΑΝΔΡΕΝΙΟΥ ΑΠΟ ΤΟ
ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΟ
SYNECHOCYSTIS SP. PCC 6803**

ΧΡΥΣΟΥΛΑΚΗ ΕΛΕΝΗ

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΓΑΝΩΤΑΚΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2021

UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
GENERAL POSTGRADUATE PROGRAM

LABORATORY OF BIOCHEMISTRY



MASTER THESIS

OPTIMAL CONDITIONS FOR THE PRODUCTION OF THE MONOTERPENE β -
PHELLANDRENE BY THE GENETICALLY MODIFIED CYANOBACTERIUM
SYNECHOCYSTIS SP. PCC 6803

CHRYSOULAKI ELENI

THESIS SUPERVISOR: DEMETRIOS GHANOTAKIS

HERAKLION 2021

Εξεταστική Επιτροπή (αλφαβητικά)

Δημήτριος Γανωτάκης

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης (Επιβλέπων)

Ιωάννης Παυλίδης

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Γεώργιος Τσιώτης

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η στιγμή ολοκλήρωσης αυτού του κύκλου των μεταπτυχιακών μου σπουδών έφτασε. Υπήρχαν στιγμές που έκαναν αυτή την εμπειρία αρκετά δύσκολη, όμως υπήρχαν και στιγμές γεμάτες χαρά και εποικοδομητική δουλειά. Θα ήταν επομένως άδικο, εάν μετά από όλα αυτά δεν ευχαριστήσω όλους όσους ήταν εκεί για εμένα.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, το οποίο με αγκάλιασε μαζί με τους υπόλοιπους συμφοιτητές μου τόσο σε προπτυχιακό, όσο και σε μεταπτυχιακό επίπεδο. Μέσα από το τμήμα κατάφερα να έχω υψηλού επιπέδου σπουδές σε ότι αφορά το γνωστικό κομμάτι, αλλά και μέσω των υλικοτεχνικών υποδομών κατάφερα να έρθω πιο κοντά στο πρακτικό κομμάτι των σπουδών μου.

Φυσικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Δημήτρη Γανωτάκη, ο οποίος ήταν επιβλέπωντας καθηγητής μου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και δέχτηκε να με πάρει στο εργαστήριό του, ώστε αρχικά να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία ως προπτυχιακή φοιτήτρια κι έπειτα να συνεχίσω για τις μεταπτυχιακές μου σπουδές. Τον ευχαριστώ θερμά καθώς μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ σε ένα ερευνητικό εργαστήριο. Ήταν συνεχώς διαθέσιμος και πρόθυμος να μου δώσει συμβουλές σε ό,τι με απασχολούσε, είτε αυτό αφορούσε το κομμάτι της έρευνάς μου, είτε θέματα που με προβλημάτιζαν γενικότερα. Η εμπειρία που απέκτησα στο εργαστήριο του κυρίου Γανωτάκη ήταν πολύ μεγάλη, καθώς και οι γνώσεις που πήρα πάνω σε αρκετά ζητήματα, πρακτικά και θεωρητικά, ήταν αμέτρητες.

Ακολουθώς, ευχαριστώ θερμά τα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής μου, τους κυρίους Γεώργιο Τσιώτη και Ιωάννη Παυλίδη, οι οποίοι δέχθηκαν να διαβάσουν και να αξιολογήσουν την παρούσα εργασία. Τους ευχαριστώ διότι είχαν πάντα την προθυμία να με βοηθήσουν, ενώ οι γνώσεις που πήρα από εκείνους στην πορεία του μεταπτυχιακού μου ήταν πολλές και χρήσιμες μέσα από τα πολύ οργανωμένα και εμπλουτισμένα τους μαθήματα.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Αναστάσιο Μελή στο University of California, Berkeley, ο οποίος εμπιστεύτηκε ερευνητική εργασία του εργαστηρίου του στη Δρ. Βαλσαμή με την οποία συνεργάστηκε. Δίνοντας χρήσιμες συμβουλές, αλλά και με την στήριξή του και την καθοδήγησή του στήθηκε το project

στο εργαστήριο μας στην Κρήτη. Έτσι, κατάφερα κι εγώ να συνεχίσω την έρευνα στο κομμάτι αυτό στις μεταπτυχιακές σπουδές μου.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ Μαρία Αποστολάκη, για την πολύτιμη βοήθειά της για την λήψη χρωματογραφημάτων στο GC-MS. Ευχαριστώ τον κύριο Στέφανο Παπαδάκη από το εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας στο Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης, για την βοήθειά του στη προετοιμασία και την παρατήρηση μέσω Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης των δειγμάτων. Ακόμα ευχαριστώ τον κύριο Παύλο Ζάρμπα από το εργαστήριο του κυρίου Μιχαλόπουλου, ο οποίος ανέλυσε μέσω ιοντικής χρωματογραφίας δείγμα θαλασσινού νερού, που χρησιμοποίησα στην εργασία μου. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Πόπη Καβελάκη και την κυρία Μαρία Φουσκάκη για τη βοήθεια τους.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την Δρ. Βαλσαμή Ελευθερία, η οποία από την πτυχιακή μου εργασία μου μετέδωσε όλες τις γνώσεις της πάνω σε θέματα μοριακής βιολογίας, αλλά και φωτοσύνθεσης. Ο ρόλος της ήταν καθοριστικός, καθώς μαζί κάναμε τα πρώτα μου βήματα μέσα σε ένα ερευνητικό εργαστήριο. Την ευχαριστώ για τις πολύτιμες συμβουλές που μου έδωσε και με βοήθησε στο να χτίσω ένα σωστό και ηθικό τρόπο εργασίας. Ακόμα και τώρα που δεν βρίσκεται πλέον στο εργαστήριο είναι πρόθυμη να με βοηθήσει με όποιο τρόπο και να μου δώσει χρήσιμες συμβουλές. Φυσικά ευχαριστώ θερμά και την υποψήφια διδάκτορα Μαριλένα Ψυχογιού, καλή φίλη που απέκτησα στο εργαστήριο. Εργαστήκαμε μαζί για ένα μικρό χρονικό διάστημα στο τέλος του μεταπτυχιακού της και στην αρχή του δικού μου. Δέσαμε πολύ καλά μεταξύ μας καθώς είχαμε τον ίδιο τρόπο σκέψης, αλλά και εργασίας. Ευχαριστώ πολύ για τον χρόνο που έχει αφιερώσει, όσες φορές χρειάστηκα την συμβουλή της. Ήταν και είναι πάντα πρόθυμη ακόμα και τώρα που βρίσκεται σε άλλο πανεπιστήμιο στο Λονδίνο.

Οι συνθήκες δεν μας το επέτρεψαν να εργαστούμε όπως είχαμε συνηθίσει παλιότερα και να είμαστε ταυτόχρονα όλα τα μέλη του εργαστηρίου μαζί. Παρόλα αυτά όσες φορές κατάφερα να βρεθώ με τα μέλη του εργαστηρίου μας, είχαμε μια άψογη σχέση. Τους ευχαριστώ έναν έναν ξεχωριστά, γιατί από όλους κατάφερα να πάρω κάτι. Όλοι ήταν πάντα πρόθυμοι, όποτε χρειαζόμουν βοήθεια για οποιοδήποτε ζήτημα. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Θεοφάνια, με την οποία περάσαμε μαζί τον περισσότερο χρόνο από όλους, καθώς εργαζόμασταν απογευματινές ώρες

στο εργαστήριο και ήμασταν συνήθως μόνες. Ευχαριστώ γιατί ήταν εκεί σε στιγμές όμορφες και ήρεμες, αλλά και άγχους. Μαζί καταφέραμε να το ξεπερνάμε και να συνεχίζουμε την εργασία μας με καλύτερη διάθεση και ανεβασμένη ψυχολογία. Επίσης ευχαριστώ και τα μέλη των υπολοίπων εργαστηρίων του τομέα, του κυρίου Παυλίδη και κυρίου Τσιώτη, καθώς στήριξαν την εργασία μου με εξοπλισμό, όλοι με συμβούλευαν με προθυμία και με στήριξαν ηθικά.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου που με στήριξαν τόσο στις εύκολες, όσο και στις δύσκολες στιγμές. Περάσαμε μαζί αρκετό χρόνο και χαλαρές στιγμές που οδηγούσαν στην αποφόρτιση από την πίεση που μπορεί να υπήρχε λόγω φόρτου εργασίας. Πάντα εκεί να μου φτιάχνουν τη διάθεση και να κάνουν την εμπειρία των φοιτητικών μου χρόνων ακόμα πιο ξεχωριστή.

Στο τέλος των ευχαριστιών άφησα την οικογένειά μου. Δεν μπορούν να περιγράψουν λόγια το πόσο πολύ τους ευχαριστώ για την τόσο μεγάλη στήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια. Με υπομονή και επιμονή ήταν πάντα κάθε λεπτό ακλόνητοι βράχοι στο πλευρό μου. Τα πιο μεγάλα ευχαριστώ αξίζουν οι γονείς μου, Μανώλης και Χρυσάνθη, αυτοί οι υπέροχοι άνθρωποι, που με μεγάλωσαν με τον πιο όμορφο τρόπο. Πάντα δίπλα μου σε δυσκολίες που βρέθηκαν μπροστά μου αυτά τα χρόνια. Χωρίς κανέναν ενδοιασμό μου έδειξαν εμπιστοσύνη και ακολούθησαν κι εκείνοι μαζί μου τα βήματα που ήθελα να κάνω στις σπουδές μου. Σε δύσκολες περιόδους η στήριξή τους σε όλους του τομείς ήταν τεράστια και πραγματικά νιώθω ευγνωμοσύνη που τους έχω γονείς. Τους αγαπώ πολύ!

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΧΡΥΣΟΥΛΑΚΗ ΕΛΕΝΗ

ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑ-ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ



6939847730



chrysoulaki.el@gmail.com



Ιπποκράτους 10, 71500
Ηράκλειο

Ημερομηνία γέννησης: 23/08/1997
Εθνικότητα: Ελληνική

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- **01/09/2019-Σήμερα: Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στη Χημεία (Κατεύθυνση: Βιολογίας και Οργανικής Χημείας)**
Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας
Ηράκλειο, 70013, Ελλάδα
<http://www.chemistry.uoc.gr>
- **09/2015-24/07/2019: Πτυχίο Χημείας**
(Βαθμολογία 8,42/10)
Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας
Ηράκλειο, 70013, Ελλάδα
<http://www.chemistry.uoc.gr>
- **11/09/2012-30/06/2015: Απολυτήριο Γενικού Λυκείου**
(Βαθμολογία 18,2/20)
1^ο Γενικό Λύκειο Αγίου Νικολάου Κρήτης, 72100
Ελλάδα
<https://1lyk-ag-nikol.las.sch.gr/>

ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

- **17/05/2021-Σήμερα: Χημικός σε Διαγνωστικό Μικροβιολογικό εργαστήριο,**
Καπετανάκη 22, Άγιος Νικόλαος Κρήτης, 72100
- **01/09/2019-Σήμερα: Μεταπτυχιακή εργασία, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ελλάδα**
Επιβλέπων καθηγητής Γανωτάκης Δημήτριος
- **01/04/2019-30/06/2019: Πρακτική Άσκηση σε Διαγνωστικό Μικροβιολογικό εργαστήριο,**
Καπετανάκη 22, Άγιος Νικόλαος Κρήτης, Ελλάδα
Λειτουργία Βιοχημικού - Ανοσολογικού - Αιματολογικού αναλυτή
- **01/02/2018-31/03/2019: Διπλωματική εργασία, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Ελλάδα**
Επιβλέπων καθηγητής Γανωτάκης Δημήτριος, "Μελέτη της παραγωγής τερπενοειδών από το κυανοβακτήριο *Synechocystis* sp. PCC 6803."

ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

- **Εργασιακές δεξιότητες**
 - Καλλιέργειες μικροοργανισμών
 - Τεχνικές ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών και DNA (SDS-PAGE, Western blot, Agarose Gel Electrophoresis)
 - Φασμαφωτομετρία UV-Vis
 - Τεχνικές χρωματογραφίας (GC-MS, HPLC, χρωματογραφία συγγένειας, TLC)
 - Τεχνικές κλωνοποίησης
 - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PCR
 - Απομόνωση πλασμιδίου και γενωμικού DNA
- **Μητρική γλώσσα:** Ελληνικά
- **Ξένες Γλώσσες:**
 - **Αγγλικά:**
Certificate in ESOL International, City & Guilds (C2)
 - **Γερμανικά:**
Goethe - Zertifikat, Goethe Institut (B1)
- **Ψηφιακές δεξιότητες**

Microsoft Office Specialist, Πιστοποιητικό Γνώσης Χαρακτήρα H/Y (Word, Excel, Power Point, Outlook, Access)

ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- **Προγράμματα και Πιστοποιήσεις**
 - Παρακολούθηση επιμορφωτικού προγράμματος "Φαρμακευτικά Φυτά. Από την παραδοσιακή και την λαϊκή ιατρική στην Επιστήμη". Από το Κέντρο Επιμόρφωσης και Δια Βίου Μάθησης του Πανεπιστημίου Κρήτης και το Μουσείο Ιατρικής Κρήτης, 2018-2019
 - Παρακολούθηση Σεμιναρίου εξ' αποστάσεως διαδικτυακά: "Κοσμετολογία, Βοτανολογία και Νομοθεσία Αδειοδότησης", 29/01/2021-Σήμερα.
- **Βεβαιώσεις**
 - Προπτυχιακός βοηθός στα Εργαστήρια Γενικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης (χειμερινό εξάμηνο 2016/17)
 - Συμμετοχή στην Παγκόσμια Εβδομάδα Δράσης για την Εκπαίδευση 2014 με τίτλο "Στείλε όλους τους φίλους μου Σχολείο", που συντονίζεται στην Ελλάδα από την Action Aid
- **Συνέδρια**
 - 3^ο Συνέδριο Βιοασφάλειας από την Ελληνική Εταιρεία Βιοασφάλειας, Αθήνα 13-14 Νοεμβρίου 2020, διαδικτυακή παρακολούθηση
- **Δημοσιεύσεις**
 - ✓ Eleftheria-Angeliki Valsami, Maria Eleni Psychogyiou, Angeliki Pateraki, **Eleni Chrysoulaki**, Anastasios Melis, Demetrios F. Ghanotakis, "*Fusion constructs enhance heterologous β -phellandrene production in *Synechocystis* sp. PCC 6803*", Journal of Applied Phycology (2020) 32:2889–2902.
- **Συνδρομές**

Μέλος της Ένωσης Ελλήνων Χημικών (ΕΕΧ)

CURRICULUM VITAE

CHRYSOULAKI ELENI

PERSONAL INFORMATION



6939847730



chrysoulaki.el@gmail.com



B' Ergatikos katoikies 41,
Agios Nikolaos, Crete,
72100

Date of birth: 23/08/1997

Nationality: Greek

EDUCATION

- **01/09/2019-Today: Master's in Biochemistry,**
Department of Chemistry,
University of Crete,
Voutes, Heraklion, 70013, Greece
<http://www.chemistry.uoc.gr>
- **09/2015-24/07/2019: Bachelor in the
Department of Chemistry**
(grade 8,42/10)
Department of Chemistry,
University of Crete,
Voutes, Heraklion, 70013, Greece
<http://www.chemistry.uoc.gr>
- **11/09/2012-30/06/2015: High School diploma**
(grade 18,2/20)
1^o General High School in Agios Nikolaos, Crete,
72100 Greece
<https://1lyk-ag-nikol.las.sch.gr/>

WORK EXPERIENCE

- **17/05/2021-Today: Chemist in a Diagnostic
Microbiology Laboratory**
Kapetanaki 22, Agios Nikolaos, Crete, 72100
- **01/09/2019-Today: Master's thesis,**
Department of Chemistry, University of Crete, Greece,
Supervisor prof. Ghanotakis
- **01/04/2019-30/06/2019: Internship in a
Diagnostic Microbiology Laboratory**
Kapetanaki 22, Agios Nikolaos, Crete, 72100
Function of Biochemical - Immunological - Hematology
analyzer
- **01/02/2018-31/03/2019: Diploma thesis,**
Department of Chemistry, University of Crete, Greece,
Supervisor prof. Ghanotakis
"Study of the production of terpenoids by the
cyanobacterium *Synechocystis* sp.PCC 6803"

PERSONAL SKILLS

- **Job-related skills**

- Cultures of microorganisms (Algae, Bacteria, Fungi, Yeast)
- Techniques of proteins and DNA electrophoresis (SDS-PAGE, IEF, Western blot, Agarose Gel Electrophoresis)
- UV-Vis spectroscopy
- chromatographic techniques (GC-MS, HPLC, TLC),
- Common cloning techniques,
- Polymerase chain reaction, PCR
- Protein isolation and purification
- Plasmid and genomic DNA isolation

- **Mother tongue:** Greek

- **Other languages:**

- **English:**

Certificate in ESOL International, City & Guilds (C2)

- **German:**

Goethe - Zertifikat, Goethe Institut (B1)

- **Digital skills**

Microsoft Office Specialist,
Computer Operating Knowledge Certificate
(Word, Excel, Power Point, Outlook, Access)

ADDITIONAL INFORMATION

- **Seminars:**

- Attendance of training program "**Medicinal Plants. From traditional and folk medicine to Science**". From the Training and Lifelong Learning Center of the University of Crete and the Museum of Medical Crete, 2018-2019.
- Attendance of an online Seminar: "**Cosmetology, Botany and Licensing Legislation**", 29/01/2021-Today.

- **Certifications**

- Undergraduate assistant in the General Chemistry Laboratories of the Department of Chemistry University of Crete (winter semester 2016/17)
- Participation in the World Education Action Week 2014 with the title "Send all my friends to school", which coordinated in Greece by Action Aid

- **Conferences**

- 3rd Biosafety Conference by the Hellenic Biosafety Society, Athens 13-14 November 2020, online monitoring

- ✓ **Publications**

Eleftheria-Angeliki Valsami, Maria Eleni Psychogyiou, Angeliki Pateraki, **Eleni Chrysoulaki**, Anastasios Melis, Demetrios F. Ghanotakis, "*Fusion constructs enhance heterologous β -phellandrene production in *Synechocystis* sp. PCC 6803*", Journal of Applied Phycology (2020) 32:2889–2902.

- **Memberships**

Member of Association of Greek Chemists

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η εύρεση βέλτιστων συνθηκών με σκοπό την αύξηση της ετερόλογης παραγωγής του μονοτερπενίου β -φελλανδρενίου από μεταλλαγμένα στελέχη του κυανοβακτηρίου *Synechocystis* sp. PCC 6803. Το κυανοβακτήριο αυτό 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.

Σε παλαιότερες μελέτες του εργαστηρίου είχαν μελετηθεί εκτενώς η ανάπτυξη, η φωτοσυνθετική δραστηριότητα και η παραγωγή β -φελλανδρενίου από μεταλλαγμένα στελέχη του κυανοβακτηρίου, σε συνθήκες υψηλής αλατότητας ή ακόμα και σε συνθήκες που χρησιμοποιούνταν αποκλειστικά 100 % θαλασσινό νερό. Τόσο η ανάπτυξη αυτών, αλλά και η παραγωγή ήταν επιτυχείς. Επομένως, στο πρώτο κεφάλαιο της εργασίας αυτής μελετήθηκε ο άγριος τύπος του κυανοβακτηρίου σε διάφορες συνθήκες εμπλουτισμένου θαλασσινού νερού, το οποίο βρίσκεται σε αφθονία στον πλανήτη και η διάρκεια του πειράματος ήταν δέκα ημέρες με τιμές μετρήσεων να λαμβάνονται κάθε δεύτερη ημέρα. Σκοπός ήταν η εύρεση της πιο κατάλληλης συνθήκης ανάπτυξης του στελέχους προκειμένου στη συνέχεια η συνθήκη αυτή να μελετηθεί και στα μεταλλαγμένα στελέχη και ποια επίδραση υπάρχει στην παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος. Οι συνθήκες που ξεχώρισαν από όσες μελετήθηκαν ήταν εκείνες με εμπλουτισμένο θαλασσινό με όλα τα συστατικά του BG11 και ρυθμιστικό διάλυμα HEPES/NaOH pH 7,5 και εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό με κάποια συστατικά του BG11, που βρέθηκαν μέσω ιοντικής χρωματογραφίας ότι λείπουν από αυτό, με το ίδιο ρυθμιστικό. Σε αυτές τις συνθήκες η ανάπτυξη προσομοίαζε σε πολύ καλό βαθμό την αντίστοιχη ανάπτυξη του στελέχους WT στη συνθήκη μάρτυρα- BG11. Τα ίδια αποτελέσματα φάνηκαν και στη φωτοσυνθετική δραστηριότητα. Επομένως, για να έχουμε μια αρκετά οικονομική μέθοδο στη συνέχεια της μελέτης μας, επιλέχθηκε σαν συνθήκη για να εφαρμοστεί και σε μεταλλαγμένα στελέχη, εκείνη με το εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό με κάποια συστατικά που υπάρχουν στο θρεπτικό μέσο BG11.

Στο επόμενο κεφάλαιο, μελετήθηκαν τα στελέχη $\Delta crc+crcB.PHLS+crcA.GPPS$ και $\Delta crc+crcB.PHLS+crc(-crcA)$ ως προς την ανάπτυξη, την φωτοσυνθετική δραστηριότητα και την παραγωγή του β -φελλανδρενίου στη βέλτιστη αυτή συνθήκη με εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό με συστατικά του BG11. Τα πειράματα διήρκησαν δέκα ημέρες και οι μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε δεύτερη ημέρα. Τα αποτελέσματα έδειξαν μεγάλη ομοιότητα στη συνθήκη μάρτυρα σε ότι αφορά στην ανάπτυξη και τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα. Η απόδοση του β -φελλανδρενίου φάνηκε να είναι μικρότερη σε σχέση με τη συνθήκη μάρτυρα-BG11, όμως δεν παύουν τα κύτταρα να είναι ικανά να το παράγουν επιτυχώς.

Τέλος, στο τελευταίο κεφάλαιο τα στελέχη $\Delta crc+crcB.PHLS+crc(-crcA)$ και $\Delta crc+crcB.PHLS+crcA.GPPS+crc$ ακινητοποιήθηκαν σε σφαιρίδια αλγινικού άλατος στη συνθήκη με εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό και μελετήθηκαν για 12 ημέρες η παραγωγή του β -φελλανδρενίου από αυτά, πάντα σε σύγκριση με την παραγωγή του ίδιου στελέχους σε ελεύθερα κύτταρα στην ίδια συνθήκη. Προηγούμενη μελέτη στο εργαστήριο έδειξε ότι η ακινητοποίηση των κυττάρων του στελέχους $\Delta crc+crcB.PHLS+crc(-crcA)$ δίνει μεγαλύτερη παραγωγή β -φελλανδρενίου σε σύγκριση με τα ελεύθερα κύτταρα στο θρεπτικό μέσο BG11, αλλά και σε 100 % θαλασσινό νερό. Η ακινητοποίηση των κυττάρων σε εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό έδωσε χαμηλότερη παραγωγή σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα. Τα δυο αυτά στελέχη που μελετήθηκαν παραμένουν μεταβολικά ενεργά για το χρονικό διάστημα των δώδεκα ημερών που μελετήθηκαν και η παραγωγή προϊόντος είναι εφικτή.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Κυανοβακτήρια, *Synechocystis*, φωτοσύνθεση, *crc* 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 finding of optimal conditions in order to increase the heterologous production of the monoterpene β -phellandrene by *Synechocystis* sp. PCC 6803 transformants. This cyanobacterium 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 (CO₂) as raw materials.

Previous laboratory studies have extensively studied the growth, photosynthetic activity and production of β -phellandrene by mutant strains of the cyanobacterium, under conditions of high salinity or even under conditions that used only 100% seawater and the experiment lasted ten days with measurement values taken every two days. Both their growth and production were successful. Therefore, in the first chapter of this work, the wild type of cyanobacterium was studied under various conditions of enriched seawater, which is abundant on the planet. The aim was to find the most suitable growth condition of the strain in order to then study this condition in the mutant strains and what is the effect on the production of the desired product. The conditions that stood out from those studied were those with enriched seawater with all the components of BG11 and HEPES / NaOH as buffer with pH 7.5 and enriched seawater with some components of BG11 with the same buffer. Under these conditions the growth simulates to a very good extent the corresponding growth of the WT strain in the control condition-BG11. The same results were seen in photosynthetic activity. Therefore, in order to have a fairly economical method in the rest of our study, as a condition to be applied to mutant strains was chosen, the one with enriched seawater with some components present in the nutrient medium BG11.

In the next chapter, the mutants $\Delta cpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS$ and $\Delta cpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA)$ were studied for growth, photosynthetic activity and production of β -phellandrene in the optimal condition of seawater with some components of BG11. The experiments lasted ten days and the measurements were performed every second day. The results showed great similarity to the control condition in terms of growth and photosynthetic activity. The yield of β -phellandrene

seemed to be lower than the control condition-BG11, but the cells are still able to produce it successfully.

Finally, in the last chapter the constructs $\Delta cpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA)$ and $\Delta cpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc$ were immobilized in alginate polymeric spheres in the condition with enriched seawater for 12 days and β -phellandrene production was measured, always compared to the production of the same construct in free cells under the same condition. A previous study in the laboratory showed that immobilization of the cells of the construct $\Delta cpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA)$ gives higher production of β -phellandrene compared to the free cells in the nutrient medium BG11, but also in 100 % seawater. Immobilization of cells in enriched seawater seems to have lower yields than free cells. These two strains studied remain metabolically active for the period of twelve days of studied and the production of β -phellandrene is possible.

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

Περιεχόμενα

| | |
|---|----|
| ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ..... | 19 |
| Κεφάλαιο 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 21 |
| 1.1 Φωτοσύνθεση..... | 21 |
| 1.2 Κυανοβακτήρια..... | 25 |
| 1.3 Κυανοβακτήριο <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 | 28 |
| 1.4 Φωτοσυνθετικές χρωστικές..... | 29 |
| 1.4.1 Χλωροφύλλες | 30 |
| 1.4.2 Καροτενοειδή | 31 |
| 1.4.3 Φυκοχολίνες | 32 |
| 1.5 Φυκοχολοσώματα | 33 |
| 1.6 Περικοπή κεραίας συλλογής φωτός σε μεταλλαγμένα στελέχη..... | 36 |
| 1.7 Τερπενοειδή..... | 39 |
| 1.8 Βιοσυνθετικά μονοπάτια τερπενοειδών (MVA και MEP pathway)..... | 41 |
| 1.8.1 MVA βιοσυνθετικό μονοπάτι..... | 42 |
| 1.8.2 MEP βιοσυνθετικό μονοπάτι | 42 |
| 1.9 β -Φελλανδρένιο..... | 43 |
| 1.10 Συνθάση β -φελλανδρενίου | 45 |
| 1.11 Ετερόλογη έκφραση β -φελλανδρενίου από το κυανοβακτήριο <i>Synechocystis</i> .. | 46 |
| Κεφάλαιο 2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ ΤΟΥ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΟΥ <i>SYNECHOCYSTIS</i> SP. PCC 6803 ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ..... | 50 |
| 2.1 Εισαγωγή..... | 50 |
| 2.2 Σκοπός | 51 |
| 2.3 Εύρεση βέλτιστης συνθήκης ανάπτυξης για τον άγριο τύπο του κυανοβακτηρίου <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803..... | 52 |
| 2.3.1 Πειραματικό μέρος | 52 |
| 2.3.1.1 Συνθήκες ανάπτυξης..... | 52 |
| 2.3.1.2 Ανάπτυξη καλλιεργειών σε βιοαντιδραστήρες για τη λήψη μετρήσεων.. | 55 |
| 2.3.1.3 Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων - Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας στα 730nm (OD_{730})..... | 56 |
| 2.3.1.4 Ποσοτικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών..... | 57 |
| 2.3.2 Αποτελέσματα και συζήτηση | 57 |
| 2.3.2.1 Μελέτη της ανάπτυξης του αγρίου τύπου σε συνθήκες - Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας στα 730nm (OD_{730}) | 57 |
| 2.3.2.2 Μελέτη και ποσοτικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών..... | 61 |

| | | |
|---|--|----|
| 2.4 | Μελέτη του αγρίου τύπου του κυανοβακτηρίου <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803 στις βέλτιστες συνθήκες..... | 63 |
| 2.4.1 | Πειραματικό μέρος | 63 |
| 2.4.1.1 | Συνθήκες ανάπτυξης..... | 63 |
| 2.4.1.2 | Ανάπτυξη καλλιεργειών σε βιοαντιδραστήρες για τη λήψη μετρήσεων..... | 64 |
| 2.4.1.3 | Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων - Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας στα 730nm (OD ₇₃₀)..... | 65 |
| 2.4.1.4 | Λύση κυττάρων για την ποιοτική μελέτη φωτοσυνθετικών χρωστικών..... | 65 |
| 2.4.1.5 | Ποιοτική μελέτη φωτοσυνθετικών χρωστικών..... | 65 |
| 2.4.1.6 | Ποσοτικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών..... | 66 |
| 2.4.1.7 | Πολαρογραφικός προσδιορισμός ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου..... | 66 |
| 2.4.1.8 | Μελέτη της μορφολογίας του μικροοργανισμού με χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM)..... | 67 |
| 2.4.2 | Αποτελέσματα και συζήτηση..... | 68 |
| 2.4.2.1 | Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων - Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας στα 730nm (OD ₇₃₀)..... | 68 |
| 2.4.2.2 | Ποιοτική μελέτη φωτοσυνθετικών χρωστικών..... | 69 |
| 2.4.2.3 | Μελέτη του ποσοτικού προσδιορισμού φωτοσυνθετικών χρωστικών..... | 71 |
| 2.4.2.4 | Πολαρογραφικός προσδιορισμός του ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου..... | 73 |
| 2.4.2.5 | Μελέτη της μορφολογίας του μικροοργανισμού με χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM)..... | 74 |
| 2.5 | Μελέτη του φαινοτύπου του αγρίου τύπου του κυανοβακτηρίου <i>Synechocystis</i> που καλλιεργήθηκε σε σκέτο θαλασσινό νερό και τελικά επαναιωρήθηκε σε BG11..... | 77 |
| 2.6 | Συμπεράσματα | 79 |
| Κεφάλαιο 3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ <i>SYNECHOSYSTIS</i> ΜΕ ΤΗ ΣΥΝΘΑΣΗ ΤΟΥ β-ΦΕΛΛΑΝΔΡΕΝΙΟΥ ΣΕ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟ ΘΑΛΑΣΣΙΝΟ ΝΕΡΟ..... | | |
| 3.2 | Σκοπός | 82 |
| 3.3 | Πειραματικό μέρος..... | 83 |
| 3.3.1 | Στελέχη | 83 |
| 3.3.2 | Συνθήκες ανάπτυξης..... | 85 |
| 3.3.3 | Ανάπτυξη καλλιεργειών σε βιοαντιδραστήρες για τη λήψη μετρήσεων..... | 85 |
| 3.3.4 | Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων - Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας στα 730nm (OD ₇₃₀)..... | 86 |
| 3.3.5 | Λύση κυττάρων για την ποιοτική μελέτη φωτοσυνθετικών χρωστικών | 86 |

| | | |
|--|--|-----|
| 3.3.6 | Ποιοτική μελέτη φωτοσυνθετικών χρωστικών..... | 86 |
| 3.3.7 | Ποσοτικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών..... | 87 |
| 3.3.8 | Πολαρογραφικός προσδιορισμός ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου..... | 87 |
| 3.3.9 | Παρατήρηση της μορφολογίας του μικροοργανισμού με χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) | 88 |
| 3.3.10 | Ταυτοποίηση του παραγόμενου β-φελλανδρενίου..... | 88 |
| 3.3.11 | Ποσοτικός προσδιορισμός του παραγόμενου β-φελλανδρενίου | 90 |
| 3.4 | Αποτελέσματα και συζήτηση..... | 90 |
| 3.4.1 | Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων - Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας στα 730nm (OD ₇₃₀)..... | 90 |
| 3.4.2 | Ποιοτική μελέτη φωτοσυνθετικών χρωστικών..... | 92 |
| 3.4.3 | Μελέτη του ποσοτικού προσδιορισμού φωτοσυνθετικών χρωστικών.... | 94 |
| 3.4.4 | Πολαρογραφικός προσδιορισμός του ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου | 97 |
| 3.4.5 | Ποιοτική και ποσοτική μελέτη του παραγόμενου β-φελλανδρενίου | 99 |
| | 3.4.5.1Ταυτοποίηση του β-φελλανδρενίου με φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους και με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με χρωματογραφία μάζας.. | 99 |
| | 3.4.5.2Ποσοτικός προσδιορισμός του παραγόμενου β-φελλανδρενίου..... | 102 |
| 3.4.6 | Μελέτη της μορφολογίας του μικροοργανισμού με χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM)..... | 105 |
| 3.5 | Συμπεράσματα | 107 |
| Κεφάλαιο 4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΛΟΓΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ β-ΦΕΛΛΑΝΔΡΕΝΙΟΥ ΣΕ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΓΕΝΕΤΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ SYNECHOCYSTIS ΣΕ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟ ΘΑΛΑΣΣΙΝΟ ΝΕΡΟ..... | | |
| 4.1 | Εισαγωγή..... | 108 |
| 4.1.1 | Ακίνητοποίηση κυττάρων | 108 |
| 4.1.2 | Αλγινικά πολυμερή | 109 |
| 4.1.3 | Πλεονεκτήματα και εφαρμογές παγιδευμένων κυττάρων σε αλγινικά πολυμερή... .. | 111 |
| 4.2 | Σκοπός..... | 113 |
| 4.3 | Πειραματικό μέρος..... | 114 |
| 4.3.1 | Συνθήκες ανάπτυξης..... | 114 |
| 4.3.2 | Ανάπτυξη καλλιεργειών σε βιοαντιδραστήρες για τη λήψη μετρήσεων..... | 114 |
| | 4.3.2.1 Ακίνητοποίηση των κυττάρων σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου..... | 115 |
| 4.3.3 | Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων - Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας στα 730nm (OD ₇₃₀)..... | 115 |

| | |
|---|-----|
| 4.3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών..... | 116 |
| 4.3.5 Ταυτοποίηση του παραγόμενου β -φελλανδρενίου..... | 116 |
| 4.3.6 Ποσοτικός προσδιορισμός του παραγόμενου β -φελλανδρενίου | 117 |
| 4.4 Αποτελέσματα και συζήτηση..... | 118 |
| 4.4.1 Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων - Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας στα 730nm (OD_{730}) - Προσδιορισμός απελευθέρωσης κυττάρων από τα σφαιρίδια αλγινικού | 118 |
| 4.4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών..... | 121 |
| 4.4.3 Ποιοτική και ποσοτική μελέτη του παραγόμενου β -φελλανδρενίου | 124 |
| 4.4.3.1 Ταυτοποίηση του β -φελλανδρενίου με φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους και με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με χρωματογραφία μάζας..... | 124 |
| 4.4.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός του παραγόμενου β -φελλανδρενίου..... | 127 |
| 4.5 Συμπεράσματα | 130 |
| Κεφάλαιο 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ..... | 131 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ..... | 135 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 138 |

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AP: Αλλοφυκοκυανίνη

APS: Υπερθεϊκό αμμώνιο

BG11: Θρεπτικό μέσο για την ανάπτυξη των *Synechocystis*

β-PHL: β-φελλανδρένιο

Car: Καροτενοειδή

Chl: Χλωροφύλλη

crcA: Γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα A της φυκοκυανίνης

crcA.GPPS: Γονίδιο σύντηξης των γονιδίων crcA και GPPS που κωδικοποιεί το πεπτίδιο crcA.GPPS

crcA.PHLS: Γονίδιο σύντηξης των γονιδίων crcA και PHLS που κωδικοποιεί το πεπτίδιο crcA.PHLS

crcC1: Γονίδιο που κωδικοποιεί το συνδετικό πεπτίδιο crcC1 του crc οπερονίου

crcC2: Γονίδιο που κωδικοποιεί το συνδετικό πεπτίδιο crcC2 του crc οπερονίου

crcB: Γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα B της φυκοκυανίνης

crcB.GPPS: Γονίδιο σύντηξης των γονιδίων crcB και GPPS που κωδικοποιεί το πεπτίδιο crcB.GPPS

crcB.PHLS: Γονίδιο σύντηξης των γονιδίων crcB και PHLS που κωδικοποιεί το πεπτίδιο crcB.PHLS

crcD: Γονίδιο που κωδικοποιεί το συνδετικό πεπτίδιο crcD του crc οπερονίου

Crc_ds: Περιοχή καθοδικά του crc οπερονίου

cmR: Γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην χλωραμφενικόλη

Crc οπερόνιο: Το οπερόνιο στο οποίο οργανώνονται τα γονίδια που κωδικοποιούν τις δύο κύριες υπομονάδες της φυκοκυανίνης και των συνδετικών πεπτιδίων

Crc_us: Περιοχή ανοδικά του crc οπερονίου

DMAPP: Πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο

GC-MS: Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας

GPPS: Συνθάση πυροφωσφορικού γερανυλίου (Geranyl diphosphate synthase)

IPP: Πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο

MEP μονοπάτι: Μονοπάτι φωσφορικής μεθυλερυθριτόλης

MVA μονοπάτι: Μονοπάτι μεβαλονικού οξέος

NTPI: Γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη

OD: Οπτική πυκνότητα

OCP: Orange Carotenoid Protein

PHLS: Συνθάση του β -φελλανδρενίου (Phellandrene synthase)

Phc: Φυκοκυανίνη

PMSF: Phenylmethylsulfonyl fluoride (χρησιμοποιείται ως αναστολέας πρωτεασών)

RuBisCO: καρβοξυλάση/οξυγονάση της 1,5-διφωσφορικής ριβουλόζης

SEM: Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy)

WT: Στέλεχος Αγρίου Τύπου (Wild Type)

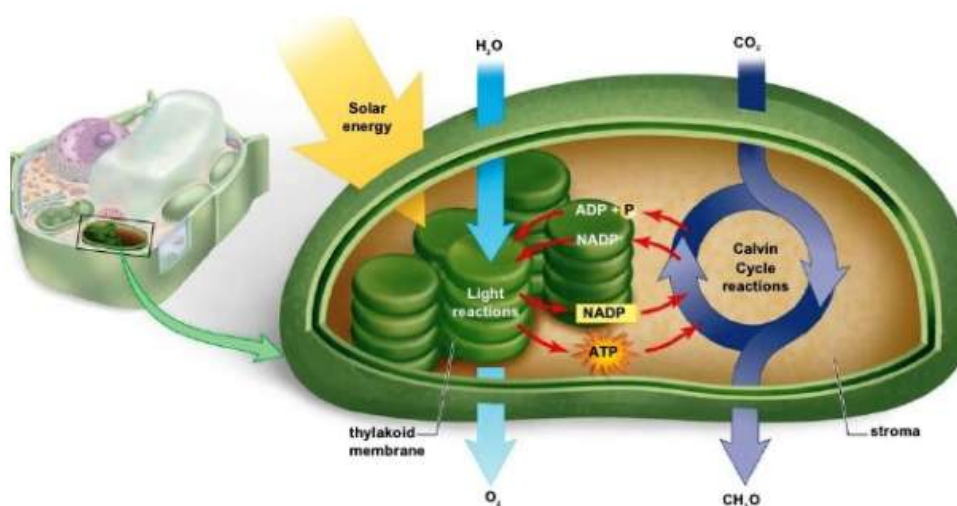
Κεφάλαιο 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φωτοσύνθεση

Η φωτοσύνθεση είναι απαραίτητη για όλη τη ζωή στη Γη. Είναι η βιολογική διαδικασία που συλλέγει την ηλιακή ενέργεια και τη μετατρέπει σε χημική ενέργεια με τη μορφή G3P (Glyceraldehyde 3-phosphate, 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη), η οποία με τη σειρά της μπορεί να μετατραπεί σε σάκχαρα ή άλλες ενώσεις. Οργανισμοί που είναι ικανοί να επιτελούν φωτοσύνθεση (οξυγονική φωτοσύνθεση) είναι τα πράσινα φυτά και σε μεγαλύτερο ποσοστό τα άλγη και τα κυανοβακτήρια. Για την πραγματοποίηση της φωτοσύνθεσης οι οργανισμοί χρησιμοποιούν τη φωτεινή ενέργεια από τον ήλιο, προκειμένου να γίνει η μετατροπή του διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) και του νερού (H₂O) σε υδατάνθρακες, ακολουθώντας την εξής αντίδραση:
$$\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \xrightarrow{h\nu} (\text{CH}_2\text{O}) + \text{O}_2$$
 [1, 2]. Αναλυτικότερα, η διαδικασία της φωτοσύνθεσης χαρακτηρίζεται από δυο διακριτά είδη αντιδράσεων, τις φωτεινές και τις σκοτεινές αντιδράσεις. Κατά τις φωτεινές αντιδράσεις η φωτεινή ενέργεια μετατρέπεται και αποθηκεύεται σε χημική ενέργεια, και πιο συγκεκριμένα στη μορφή που αξιοποιείται από τα κύτταρα, τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP). Κατά τις σκοτεινές αντιδράσεις, γνωστές και ως κύκλος Calvin-Benson [1], η αποθηκευμένη χημική ενέργεια χρησιμοποιείται για την αναγωγή του CO₂ σε οργανικές ενώσεις. Τα ηλεκτρόνια που απαιτούνται για την αναγωγή του CO₂ προέρχονται από τα αναγωγικά ισοδύναμα NADH ή NADPH. Τα πράσινα φυτά, τα άλγη και τα κυανοβακτήρια χρησιμοποιούν ως πηγή αναγωγικής ισχύος το H₂O, για να ανάγουν NADP⁺ προς NADPH, παράγοντας ταυτόχρονα μοριακό οξυγόνο, O₂, ως παραπροϊόν. Για το λόγο αυτό η διαδικασία της φωτοσύνθεσης ονομάζεται οξυγονική (oxygenic). Αντίθετα, τα βακτήρια ως πηγή αναγωγικής ισχύος χρησιμοποιούν πηγές θείου στην ανηγμένη τους μορφή (H₂S) ή H₂, για την παραγωγή NADH. Σε αυτή την περίπτωση δεν παράγεται παραπροϊόν O₂, για αυτό και η διαδικασία ονομάζεται ανοξυγονική (anoxygenic) [2-4].

Ο χώρος στον οποίο πραγματοποιείται η φωτοσύνθεση είναι σε εξειδικευμένες φωτοσυνθετικές μεμβράνες των κυττάρων, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών οργανισμών. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η φωτοσύνθεση πραγματοποιείται σε μικρά οργανίδια καλούμενα χλωροπλάστες με τρεις διακριτούς χώρους, το διαμεμβρανικό, το στρωματικό και τον θυλακοειδή (Εικόνα 1.1). Περιβάλλονται από μία εξωτερική και μία εσωτερική

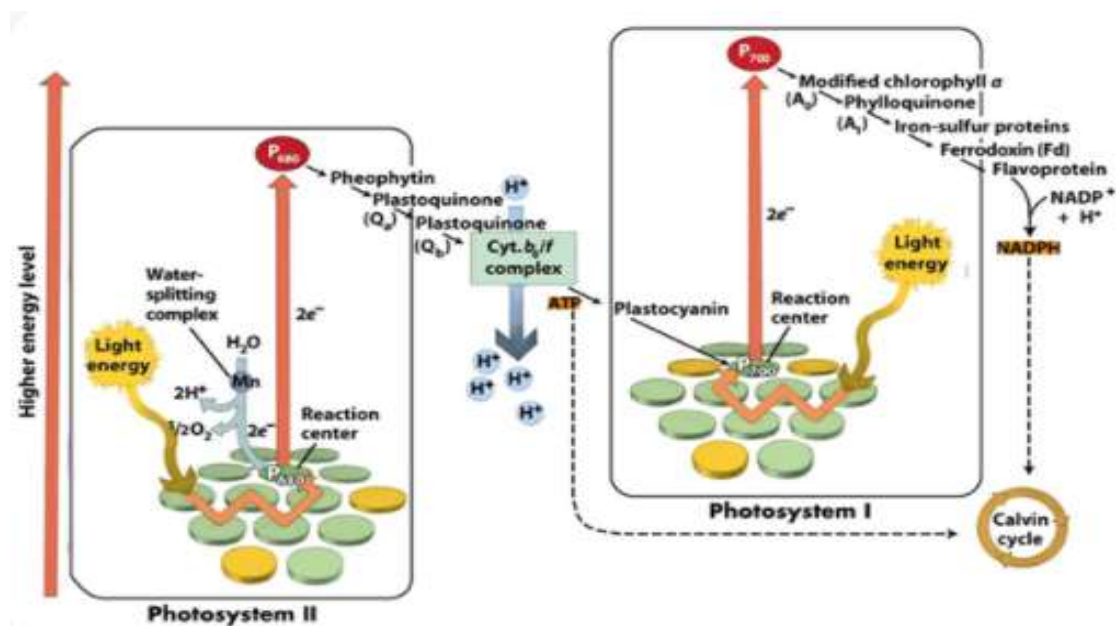
μεμβράνη, ανάμεσα στις οποίες βρίσκεται ο διαμεμβρανικός χώρος. Το εσωτερικό της εσωτερικής μεμβράνης ονομάζεται στρώμα, όπου πραγματοποιούνται οι σκοτεινές αντιδράσεις. Μέσα στο στρώμα εντοπίζονται τα θυλακοειδή, μεμβρανικές δομές σε σχήμα δίσκων. Οι δίσκοι αυτοί είναι στοιβαγμένοι μεταξύ τους και σχηματίζουν κόκκους (ή grana) και σε αυτούς πραγματοποιούνται οι φωτεινές αντιδράσεις [1, 2]. Αντίθετα, στους προκαρυωτικούς οργανισμούς, όπου δεν υπάρχουν χλωροπλάστες, η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε συστήματα μεμβρανών που προκύπτουν από εγκοιλώσεις της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (purple bacteria), από την ίδια την κυτταροπλασματική μεμβράνη (heliobacteria), από ειδικές μη στοιχειακές μεμβρανικές δομές, τα χλωροσώματα (green bacteria) ή από θυλακοειδείς μεμβράνες των κυανοβακτηρίων [2].



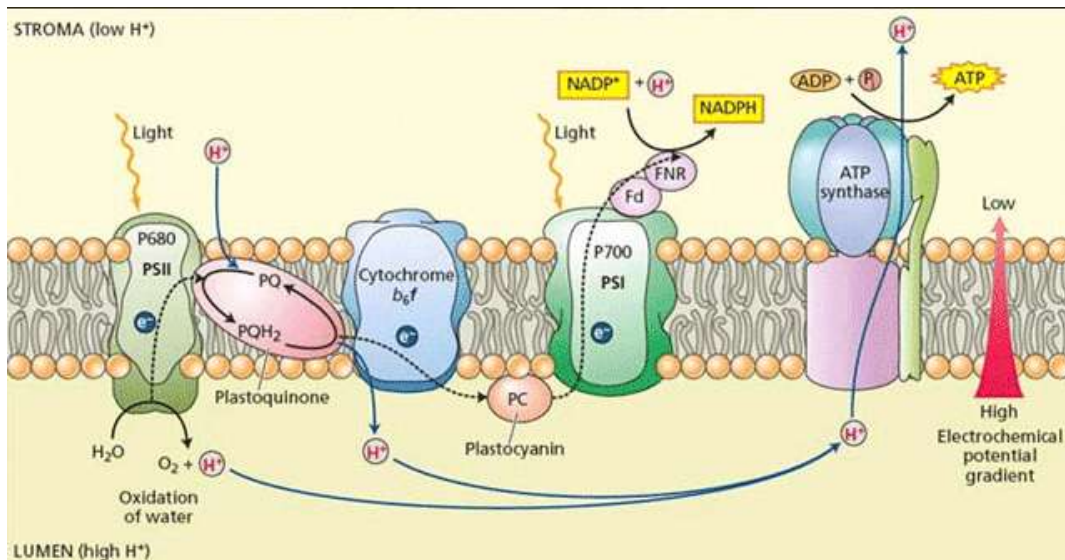
Εικόνα 1.1: Απλοποιημένο διάγραμμα χλωροπλάστη για τον καθορισμό της συνολικής διαδικασίας της φωτοσύνθεσης. Οι χλωροπλάστες στα φυτικά κύτταρα των φύλλων απορροφούν την ηλιακή ενέργεια και τη μετατρέπουν σε χημική ενέργεια, η οποία χρησιμοποιείται για τη σύνθεση υδατανθράκων (CH₂O) και την απελευθέρωση οξυγόνου (O₂) Ελήφθει από την παραπομπή [5].

Αυτό που πραγματοποιείται αρχικά στις φωτεινές αντιδράσεις είναι η συλλογή φωτός από μόρια χρωστικών που βρίσκονται στην φωτοσυνθετική κεραία. Η ενέργεια μεταφέρεται μέσω φαινομένων συντονισμού σε ειδικά πολυπρωτεϊνικά σύμπλοκα συλλογής φωτός, τα φωτοσυστήματα II (ή P680) και I (ή P700) (Εικόνα 1.2, 1.3). Τα σύμπλοκα αυτά διαθέτουν κυρίως μόρια χλωροφύλλης στο κέντρο αντίδρασής τους, τα οποία διεγείρονται υποστηρίζοντας την μεταφορά ηλεκτρονίων

από το νερό στο NADP^+ μέσω μίας αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων που περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό οξειδοαναγωγικών συμπλόκων. Αρχικά, στο κέντρο αντίδρασης του φωτοσυστήματος II πραγματοποιείται η οξείδωση του νερού, μέσω ενός συμπλόκου μαγγανίου, με σκοπό την αναγωγή του πρώτου. Κατά τη διαδικασία αυτή απελευθερώνεται μοριακό οξυγόνο ως παραπροϊόν. Τα ηλεκτρόνια από την διέγερση του φωτοσυστήματος II ωθούνται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, περνώντας από την πλαστοκινίνη (PQ), το σύμπλεγμα b_6f και την πλαστοκυανίνη (PC) καταλήγοντας στο φωτοσύστημα I. Έπειτα από τη διέγερση του φωτοσυστήματος I τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται διαμέσου της φερρεδοξίνης στον τελικό αποδέκτη τον παράγοντα NADP^+ μέσω της οξειδοαναγωγής του ζεύγους φερρεδοξίνη-NADPH (FMN). Κατά την πορεία των ηλεκτρονίων κατά μήκος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, δημιουργείται βαθμίδωση συγκέντρωσης πρωτονίων μεταξύ των μεμβρανών, η οποία τελικά ωθεί τη σύνθεση του ATP από την συνθάση της ATP [1].

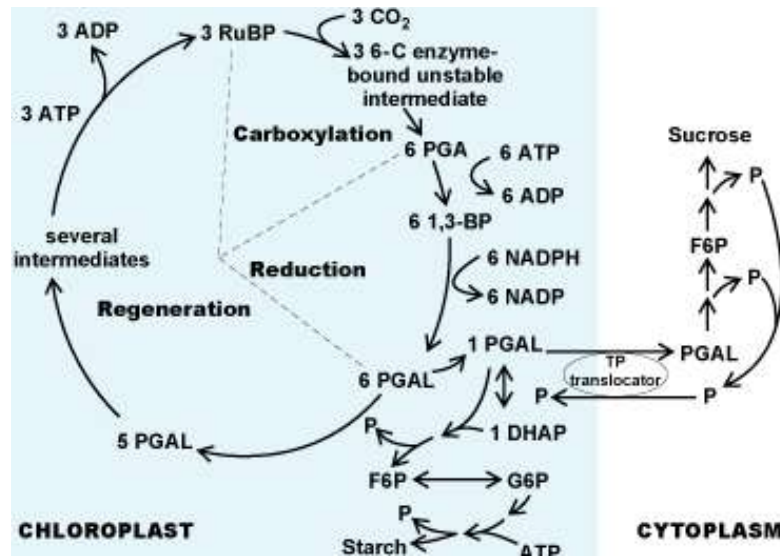


Εικόνα 1.2: Απλοποιημένο διάγραμμα απεικόνισης των Φωτοσυστημάτων II και I της φωτοσύνθεσης με την ροή των ηλεκτρονίων μεταξύ των διαφόρων μορίων. Ελήφθη από την παραπομπή [6].



Εικόνα 1.3: Στο κέντρο αντίδρασης του φωτοσυστήματος II (PSII), η ενέργεια από το φως του ήλιου χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση ηλεκτρονίων από νερό. Τα ηλεκτρόνια ταξιδεύουν μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στο φωτοσύστημα I (PSI), το οποίο ανάγει το NADP^+ σε NADPH. Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων μετακινεί πρωτόνια κατά μήκος της μεμβράνης του θυλακοειδούς στον αυλό. Ταυτόχρονα, η διάσπαση του νερού προσθέτει πρωτόνια στον αυλό και η αναγωγή του NADP^+ απομακρύνει τα πρωτόνια από το στρώμα. Το τελικό αποτέλεσμα είναι χαμηλό pH στον αυλό του θυλακοειδούς και υψηλό pH στο στρώμα. Η συνθάση του ATP χρησιμοποιεί αυτήν την βαθμίδωση συγκέντρωσης για την παραγωγή ATP. Ελήφθει από την παραπομπή [5].

Τα μόρια ATP και NADPH που παράγονται στο στρώμα, χρησιμοποιούνται για να τροφοδοτήσουν τον κύκλο Calvin-Benson στα καρβοξυσώματα στο κυτοσόλιο (Εικόνα 1.4). Εκεί 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.

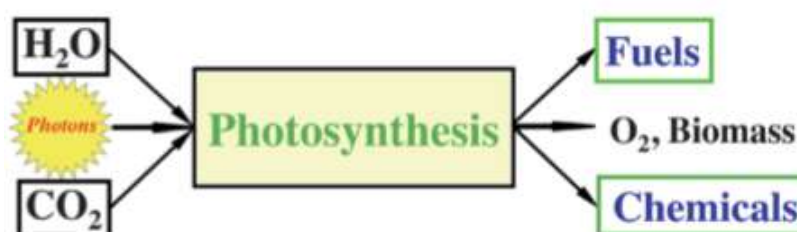


Εικόνα 1.4: Σχηματικό περίγραμμα του κύκλου Calvin-Benson (συμπεριλαμβανομένων των τριών φάσεων καρβοξυλίωσης, αναγωγής και αναγέννησης), δείχνοντας την κατανομή του αφομοιωμένου άνθρακα σε άμυλο εντός του χλωροπλάστη [μέσω των φωσφορυλιωμένων ενδιάμεσων 6-C, 6-φωσφορική φρουκτόζη (F6P) και 6-φωσφορική γλυκόζη (G6P)], και η εκροή αφομοίωσης [μέσω του μεταφορέα τριών ανθρακικών φωσφορικών τριοζών (TP)] διαμέσου του εσωτερικού του χλωροπλάστη στο κυτόπλασμα (σε αντάλλαγμα ανόργανου φωσφορικού άλατος) που οδηγεί στη σύνθεση σακχαρόζης. Για τις αντιδράσεις του κύκλου C₃, που φαίνονται στον χλωροπλάστη, οι σχετικοί αριθμοί μορίων που εμπλέκονται σε κάθε συγκεκριμένο στάδιο φαίνονται στα αριστερά του υποστρώματος και / ή του προϊόντος. Ο κύκλος του Calvin-Benson έχει τρία στάδια: Στο στάδιο 1, το ένζυμο RuBisCO ενσωματώνει διοξείδιο του άνθρακα σε ένα οργανικό μόριο. Στο στάδιο 2, το οργανικό μόριο ανάγεται. Στο στάδιο 3, το RuBP, το μόριο που ξεκινά τον κύκλο, αναγεννάται έτσι ώστε ο κύκλος να μπορεί να συνεχιστεί. Ελήφθη από την παραπομπή [5].

1.2 Κυανοβακτήρια

Τα κυανοβακτήρια, ή αλλιώς γνωστά ως κυανοπροκαρυώτες, κυανο-πράσινα άλγη κυανόφυτα, μιξόφυτα, ανήκουν στην οικογένεια των Gram-αρνητικών φωτότροφων προκαρυωτικών οργανισμών [7]. Είναι αρκετά σημαντικοί οργανισμοί για την ιστορία της Γης, ως πρωτογενείς παραγωγοί του οξυγόνου που συνέβαλαν στην αύξηση των επιπέδων αυτού στην ατμόσφαιρα πριν από περίπου 2,6 με 3,5 δισεκατομμύρια χρόνια πριν, οπότε και εμφανίστηκαν [8]. Αυτό ήταν εφικτό καθώς έχουν την ιδιότητα να επιτελούν οξυγονική φωτοσύνθεση, όπως τα φυτά και τα άλγη (Εικόνα 1.5). Η εξελικτική εξήγηση αυτής της ομοιότητας είναι ότι οι χλωροπλάστες (τα κυτταρικά οργάνια όπου λαμβάνει χώρα η φωτοσύνθεση) σε φυτά και άλγη προέρχονται από κυανοβακτήρια που ενδοσυμβίωσαν σε ένα ευκαρυωτικό

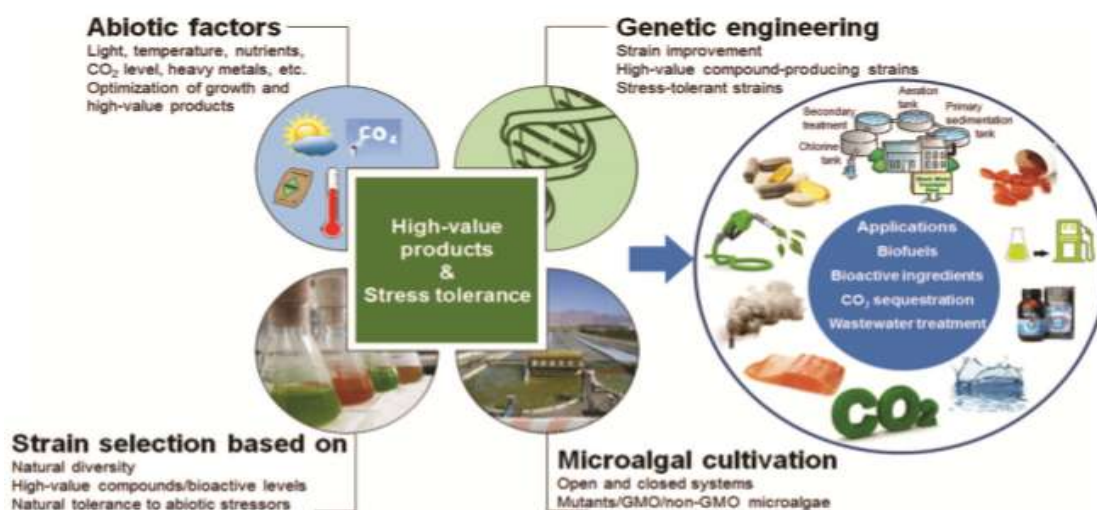
μικροοργανισμό περίπου 1,5 δισεκατομμύρια χρόνια πριν [9]. Τα πρώτα κυανοβακτήρια φαίνεται να παρήγαγαν μεγάλες ποσότητες οξυγόνου, εμπλουτίζοντας με αυτό την ατμόσφαιρα και οδηγώντας έτσι στην εξέλιξη της ζωής, όπως είναι γνωστή σήμερα. Βέβαια ορισμένα κυανοβακτήρια αφομοιώνουν οργανικές ενώσεις σε μικρό βαθμό, ενώ άλλα σταθεροποιούν το ατμοσφαιρικό άζωτο (N_2) απευθείας σε αμμώνιο για ανάπτυξη, μια ιδιότητα που απουσιάζει από τα φυτά και τα άλγη [9]. Ορισμένοι οργανισμοί αφού επιτελούν φωτοσύνθεση πέρα από φωτοκαταλύτες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σαν παραγωγοί βιοκαυσίμων όπως είναι το H_2 , ή οι υδατάνθρακες.



Εικόνα 1.5: Σχηματική απεικόνιση της έννοιας των «φωτοσυνθετικών βιοκαυσίμων», όπου ένας μεμονωμένος οργανισμός μετατρέπει, μέσω της διαδικασίας της οξυγονικής φωτοσύνθεσης, H_2O και CO_2 σε βιομάζα και O_2 . Εναλλακτικά, η κατεύθυνση της φωτοσύνθεσης μπορεί να στραφεί προς την παραγωγή καυσίμων και χημικών. Το οξυγόνο είναι ένα παραπροϊόν της φωτοσύνθεσης. Ελήφθει από την παραπομπή [10].

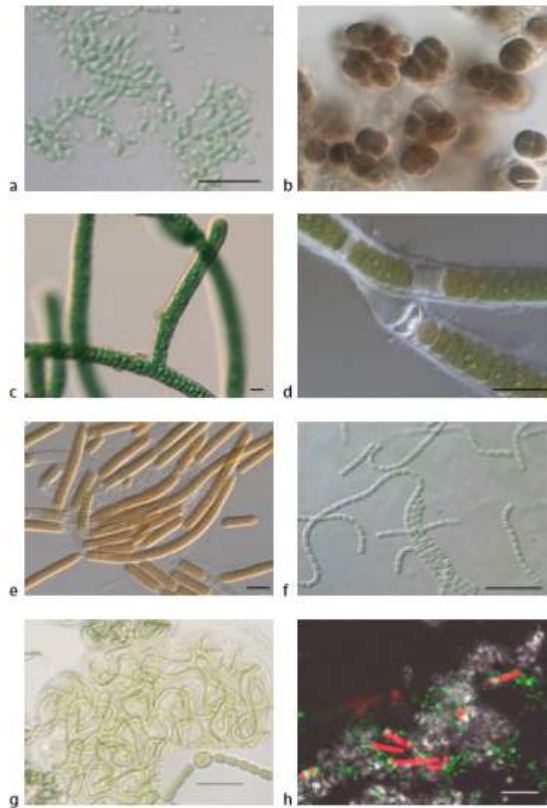
Ακόμα είναι ικανά και μπορούν να επιβιώνουν σε μια ευρεία ποικιλία βιοτόπων. Μεταξύ αυτών των διαφορετικών συνθηκών περιβάλλοντος συγκαταλέγονται οι ωκεανοί, λίμνες, θερμές πηγές και βράχοι. Τα κυανοβακτήρια είναι γνωστά για την ικανότητα τους να προσαρμόζουν τον μεταβολισμό τους πολύ γρήγορα ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Αυτό συμβαίνει καθώς συχνά απαιτείται να επιβιώσουν κάτω από δυσμενείς συνθήκες (αβιοτικοί παράγοντες) όπως είναι η περιορισμένη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών και οι διακυμάνσεις θερμοκρασίας και φωτισμού. Μπορούν να ζουν είτε ελεύθερα, είτε συμβιωτικά με άλλους οργανισμούς όπως ορισμένα είδη φυτών και ζώων (Εικόνα 1.6) [11]. Επιπλέον, μπορούν να επιβιώσουν σε συνθήκες, όπου 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 [12].



Εικόνα 1.6: Σχηματική απεικόνιση της εκμετάλλευσης των φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών για πιθανές βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Ελήφθει από την παραπομπή [13].

Μορφολογικά διακρίνονται σε μονοκύτταρες ή νηματοειδείς μορφές και εμφανίζονται μόνα τους ή σχηματίζοντας αποικίες (Εικόνα 1.7). 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 [14]. Ως φωτοσυνθετικοί οργανισμοί συλλέγουν την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία του ήλιου μέσω χρωστικών που διαθέτουν όπως η χλωροφύλλη α και η φυκοκυανίνη, στην οποία οφείλεται και η ονομασία τους "κυανο-πράσινα βακτήρια" [7, 9, 15].



Εικόνα 1.7: Διαφορετικοί μορφολογικοί τύποι κυανοβακτηρίων από καθαρή καλλιέργεια. Η εικόνα ελήφθει από την παραπομπή [16].

Τα κυανοβακτήρια αποτελούν τεράστια πηγή για την παραγωγή μιας ποικιλίας βιοενεργών μορίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διατήρηση και τη βιώσιμη ανάπτυξη του περιβάλλοντος. Η χρήση κυανοβακτηρίων σε βιομηχανίες προσφέρει πολλαπλά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλους οργανισμούς, επειδή υπάρχουν σε πολλούς βιοτόπους και μπορεί να διατηρηθεί η φωτοσυνθετική τους ικανότητα στις εργαστηριακές συνθήκες με ελάχιστη απαίτηση θρεπτικών συστατικών. Αυτά τα χαρακτηριστικά τα καθιστούν ικανά για την παραγωγή βιομορίων και βιοενεργών ενώσεων σε μεγάλη βιομηχανική κλίμακα με χαμηλό κόστος [8, 17, 18].

1.3 Κυανοβακτήριο *Synechocystis* sp. PCC 6803

Το κυανοβακτήριο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα πειραματική έρευνα είναι το *Synechocystis* sp. PCC 6803 (*Synechocystis*). Το στέλεχος αυτό

απομονώθηκε από λίμνη στην California από τον R. Kunisawa [19]. Αποτελεί ένα μονοκύτταρο οργανισμό με κοκοειδές ή σφαιρικό σχήμα [20]. Η ενδοκυτταρική του οργάνωση έχει μελετηθεί εκτενώς μέσω παρατηρήσεων ηλεκτρονικής μικροσκοπίας [21]. Αποτελεί τον πρώτο φωτοαυτότροφο οργανισμό του οποίου αποκρυπτογραφήθηκε πλήρως η αλληλουχία του γονιδιώματός του, το οποίο είναι υψηλής περιεκτικότητας GC με 3167 γονίδια. Από αυτά τα γονίδια τα 128 κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε διάφορα στάδια της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης [20].

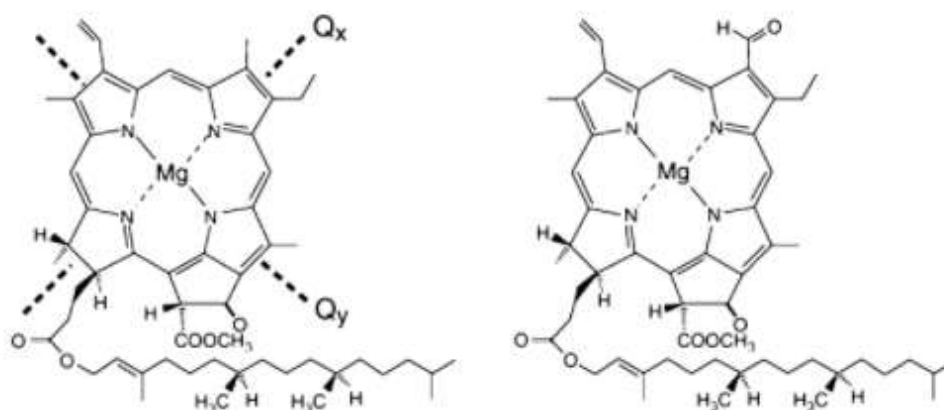
Αυτό το κυανοβακτήριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως οργανισμός-μοντέλο για τη μελέτη της λειτουργίας της φωτοσύνθεσης και των γονιδίων που εμπλέκονται σε αυτή. Ο λόγος βρίσκεται στο γεγονός ότι ο οργανισμός αυτός μπορεί να αναπτυχθεί τόσο σε φωτοαυτότροφες, όσο και σε ετερότροφες συνθήκες [20, 22] και μπορεί να υποστεί γενετική τροποποίηση [23]. Εξαιτίας αυτών των ιδιοτήτων στη βιβλιογραφία έχει χαρακτηριστεί ως το «πράσινο *E. coli*» [20].

1.4 Φωτοσυνθετικές χρωστικές

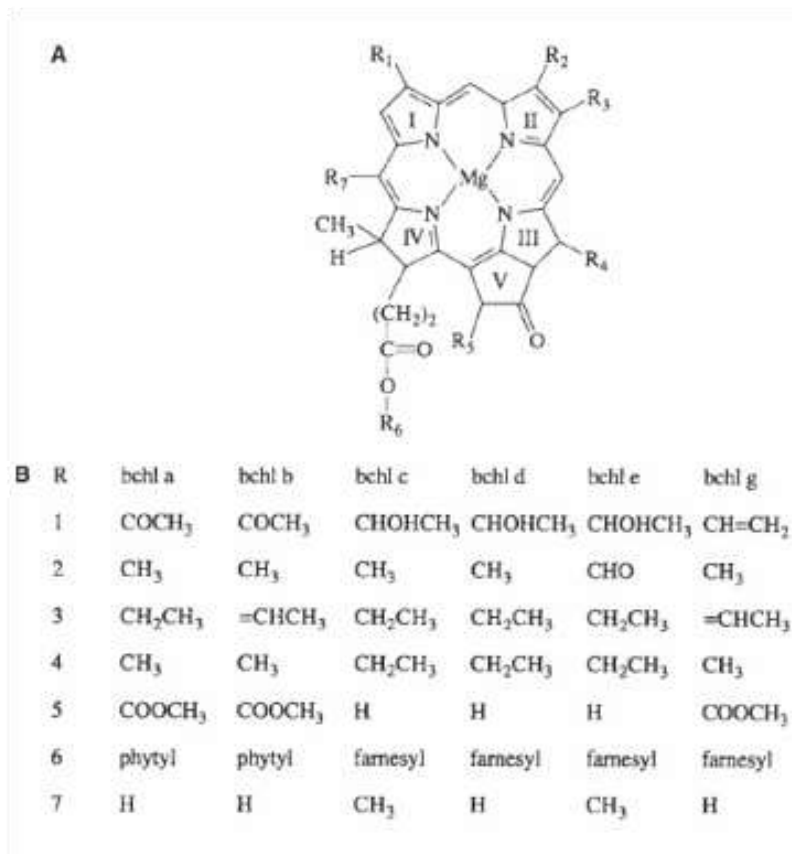
Οι φωτοσυνθετικές χρωστικές είναι βιοδραστικά μόρια εξαιρετικής σημασίας για τις βιομηχανίες τροφίμων, καλλυντικών και φαρμακευτικών προϊόντων. Ο κύριος ρόλος τους είναι η δέσμευση της ηλιακής ενέργειας με σκοπό την πραγμάτωση της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης, καθώς δρουν σαν δότες ηλεκτρονίων. Πέρα όμως από αυτόν τους το ρόλο δρουν φωτοπροστατευτικά και έχουν αντιοξειδωτική δράση [24, 25]. Οι κυριότερες φωτοσυνθετικές χρωστικές που απαντώνται σε όλους τους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς είναι οι χλωροφύλλες ή βακτηριοχλωροφύλλες και τα καροτενοειδή, τα οποία βάση δομής ανήκουν στα τερπενοειδή λιπίδια των οργανισμών. Στα κυανοβακτήρια πέρα από αυτές τις ομάδες χρωστικών συναντώνται και οι φυκοκυανίνες. Το φωτοσυνθετικό σύστημα που χρησιμοποιούν τα κυανοβακτήρια είναι αρκετά όμοιο με αυτό των φυτών, με την κυριότερη διαφορά να βρίσκεται στις φωτοσυνθετικές χρωστικές που χρησιμοποιούν τα δύο είδη. Στα κυανοβακτήρια στο φωτοσύστημα I (PS I) παρατηρείται μόνο η χλωροφύλλη *a*, ενώ διαθέτει μία επιπλέον φωτοσυνθετική κεραία στη θυλακοειδή μεμβράνη στο φωτοσύστημα II (PS II), καλούμενη φυκοχολόσωμα (phycobilisome, PBS), πάνω στο οποίο εκφράζεται η φυκοκυανίνη [26].

1.4.1 Χλωροφύλλες

Οι χλωροφύλλες είναι χρωστικές χρώματος πράσινου. Αποτελούν ένα σύμπλοκο μαγνησίου (Mg^{2+}) με τέσσερις πυρρολικούς δακτυλίους και μια μακριά φυτολική ομάδα εστεροποιημένη στον ένα πυρρολικό δακτύλιο, επιτρέποντας έτσι λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα της να συνδέονται με λιπίδια και υδρόφοβες πρωτεΐνες των φωτοσυνθετικών μεμβρανών [25, 27]. Διακρίνονται κυρίως σε δυο είδη χλωροφυλλών α , και β (Εικόνα 1.8). Η χλωροφύλλη α συναντάται στα φυτά, τα φύκη και τα κυανοβακτήρια. Η χλωροφύλλη β απουσιάζει στα κυανοβακτήρια και διαφέρει από τη χλωροφύλλη α καθώς στη θέση μίας μεθυλομάδας βρίσκεται μία αλδεϋδομάδα. Η χλωροφύλλη α εμφανίζει μέγιστα απορρόφησης στα 430 nm και 662 nm, ενώ η χλωροφύλλη β στα 453 nm και 642 nm. Από τους προκαρυωτικούς οργανισμούς, τα μη οξυγονοπαραγωγικά φωτότροφα, όπως τα πορφυρά και τα πράσινα βακτήρια, διαθέτουν βακτηριοχλωροφύλλες (βακτηριοχλωροφύλλη a , b , c , d , e , και g), οι οποίες παρουσιάζουν αρκετές ομοιότητες με τις αντίστοιχες χλωροφύλλες, ενώ διαφέρουν μεταξύ τους στην πλευρική ομάδα R (Εικόνα 1.9). Οι χρωστικές αυτές απορροφούν στο ορατό αλλά και στο υπεριώδες, στα περίπου 700-1000 nm, ενώ το μέγιστο απορρόφησης διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό [27]. Η απορρόφηση του φωτός έχει ως αποτέλεσμα τη διέγερση ενός ηλεκτρονίου στο μόριο της χλωροφύλλης παρέχοντας έτσι την ενέργεια για την έναρξη της φωτοσυνθετικής διαδικασίας.



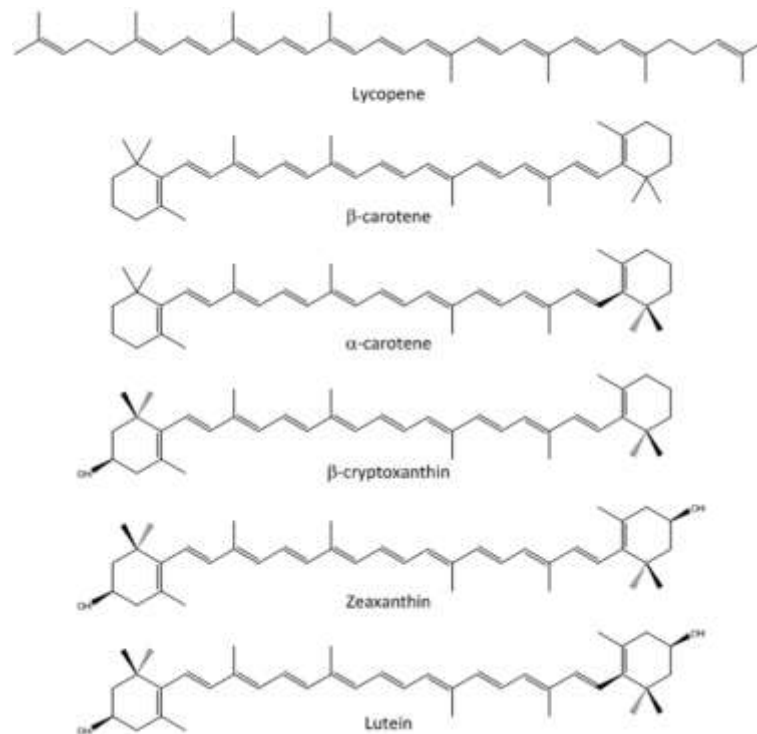
Εικόνα 1.8: Η μοριακή δομή των χλωροφυλλών α (αριστερά) και β (δεξιά). Ελήφθει από την παραπομπή [28].



Εικόνα 1.9: Η μοριακή δομή των βακτηριοχλωροφυλλών a, b, c, d, e και g με τις ομάδες που τις διαφοροποιούν. Α. η γενικότερη δομή των βακτηριοχλωροφυλλών και Β. οι ομάδες που τις χωρίζουν στα διάφορα είδη αυτών [29].

1.4.2 Καροτενοειδή

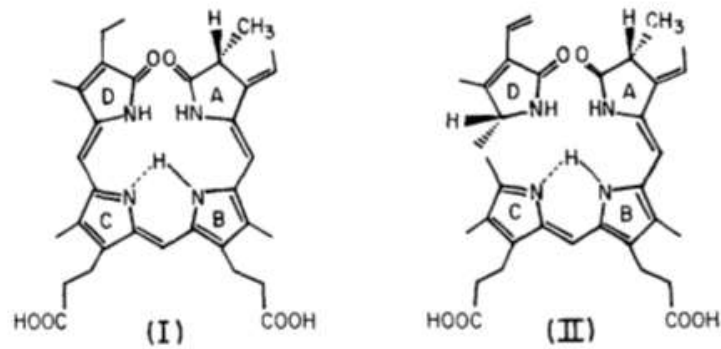
Τα καροτενοειδή αποτελούν βοηθητικές χρωστικές στη διαδικασία της φωτοσύνθεσης μεταφέροντας ηλιακή ενέργεια στις χλωροφύλλες. Η μεγάλη συζυγία τους προσδίδει σημαντικό ρόλο στην προστασία από πιθανές καταστροφικές επιδράσεις που θα προκαλούσαν οι ρίζες οξυγόνου στις χλωροφύλλες καθώς επίσης αποσβαίνουν την περίσσεια ενέργεια ως θερμότητα. Αποτελούν χρωστικές χρώματος κόκκινου, πορτοκαλί και κίτρινου. Η παρουσία ή απουσία οξυγόνου τα κατηγοριοποιεί σε καροτένια, τα οποία αποτελούνται μόνο από υδρογονανθρακικές αλυσίδες και σε ξανθοφύλλες, οι οποίες διαθέτουν επιπλέον οξυγόνο στη δομή τους ως υδροξείδιο ή εποξείδιο. Στα καροτένια συμπεριλαμβάνονται κυρίως το α-καροτένιο, β-καροτένιο και το λυκοπένιο, ενώ στις ξανθοφύλλες η λουτεΐνη, η ζεαξανθίνη και η βιολαξανθίνη [30]. Τα καροτενοειδή απορροφούν σε μήκη κύματος 400-550 nm [27, 31].



Εικόνα 1.10: Η μοριακή δομή μερικών σημαντικών καροτενοειδών μορίων [32].

1.4.3 Φυκοχολίνες

Οι φυκοχολίνες εμφανίζονται μόνο στα κυανοβακτήρια, τα ροδόφυτα και τα κρυπτόφυτα [33]. Είναι υδατοδιαλυτές χρωστικές και εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα ή το στρώμα των χλωροπλαστών. Οι φυκοχολίνες διαθέτουν τις χολίνες, οι οποίες είναι χρωμοφόρα που ωθούν την ενέργεια γρήγορα και άμεσα μέσω των φυκοχολοσωμάτων στη χλωροφύλλη *a*. Εξαιτίας του φάσματος απορρόφησης χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: τις φυκοερυθρίνες (PE ή φυκοερυθροκυανίνες PEC) με μέγιστο απορρόφησης τα 490-570 nm (συναντώνται στα κόκκινα φύκη), τις φυκοκυανίνες (PC, συναντώνται στα κυανοβακτήρια) με μέγιστο στα περίπου 620 nm και την αλλοφυκοκυανίνη (AP) με μέγιστο στα 650nm. Βρίσκονται στα φυκοχολοσώματα των κυανοβακτηρίων όπου λειτουργούν ως επικουρικές χρωστικές. Όλες οι κύριες φυκοχολίνες είναι ολιγομερή ενός μονομερούς $\alpha\beta$, όπου τα α και β είναι ανόμοιες πολυπεπτιδικές αλυσίδες περίπου 160-180 αμινοξικών καταλοίπων. Επιπλέον, αποτελούν ανοιχτές αλυσίδες τετραπυρολικών δακτυλίων με διάφορες περιφερειακές ομάδες [33, 34].



Εικόνα 1.11: Τροποποιημένη εικόνα που έχει ληφθεί από την παραπομπή [33]. Η μοριακή δομή της φυκοκυανίνης (I) και φυκοερυθρίνης (II).

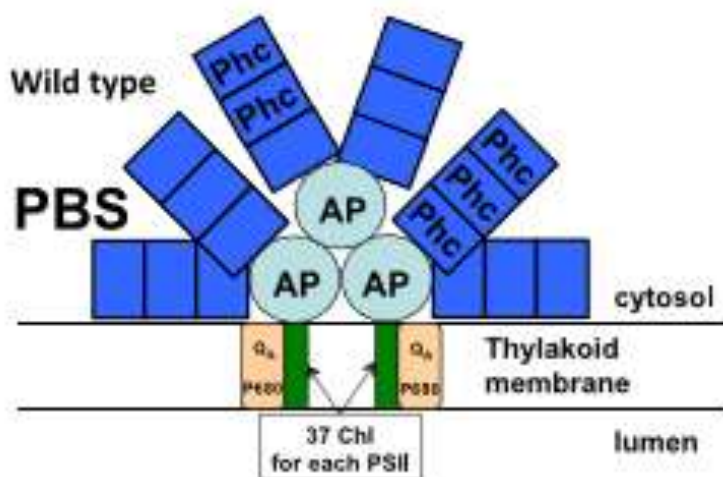
1.5 Φυκοχολοσώματα

Τα κυανοβακτήρια αναπτύσσονται σε οικοσυστήματα, όπου η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία δεν είναι αρκετή, προκειμένου να τη συλλέξουν και να επιτελέσουν φωτοσύνθεση με σκοπό την επιβίωσή τους. Για το λόγο αυτό, έχουν αναπτύξει βοηθητικές κεραιές συλλογής φωτός, που ονομάζονται φυκοχολοσώματα (PBS) και είναι χαλαρά συνδεδεμένα με την εξωτερική μεμβράνη των θυλακοειδών. Ανάλογα με την προέλευσή τους, τα φυκοχολοσώματα περιέχουν μεταξύ 300 με 800 χρωμοφόρα τετραπυρρολίου, τα οποία απορροφούν φως σε μεγάλο μέρος του ορατού φάσματος και από συνδετικά πεπτίδια, που λαμβάνουν μέρος στην οργάνωση της τελικής δομής αυτών. Ο σχεδιασμός του φυκοχολοσώματος είναι τέτοιος ώστε η ενέργεια διέγερσης να μεταφέρεται από οποιοδήποτε από αυτά τα χρωμοφόρα σε ένα κέντρο αντίδρασης στη φωτοσυνθετική μεμβράνη (στο PS II) με απόδοση που πλησιάζει το 100% [33].

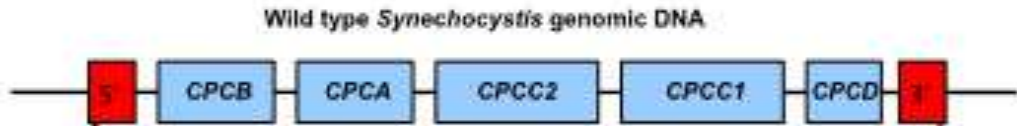
Στα κυανοβακτήρια φυκοχολοσώματα διακρίνονται δομικά από δύο τμήματα, τον πυρήνα και τα περιφερειακά ραβδία. Στον πυρήνα βρίσκονται κυλινδρικές δομές, που αποτελούνται από δίσκους αλλοφυκοκυανίνης ($\alpha\beta$)₃ στοιβαγμένοι ο ένας δίπλα στον άλλο και γύρω από αυτών εκτείνονται τα περιφερειακά ραβδία (Εικόνα 1.12). Ο άξονας του πυρήνα είναι παράλληλος της θυλακοειδούς μεμβράνης, εξασφαλίζοντας κατάλληλη δομή για να μεταφερθεί η ενέργεια διέγερσης στη χλωροφύλλη α του κέντρου αντίδρασης του φωτοσυστήματος II [34]. Οι δύο κύλινδροι του πυρήνα ακουμπούν άμεσα στη μεμβράνη των θυλακοειδών, ενώ ο τρίτος βρίσκεται στη μεριά του στρώματος [35]. Σε ότι αφορά στα περιφερειακά ραβδία αποτελούνται από

δίσκους στοιβαγμένους ο ένας δίπλα στον άλλο και μπορεί να έχουν φυκοερυθρίνη ή φυκοκυανίνη, ανάλογα τι διαθέτουν (Εικόνα 1.14). Στα κυανοβακτήρια λείπει η φυκοερυθρίνη και κάθε δίσκος περιέχει 6 ετεροδιμερή αποτελούμενα από τις υπομονάδες της φυκοκυανίνης *crc-a* και *crc-β* που και κωδικοποιούνται από τα γονίδια *crcA* και *crcB* στο *crc* οπερόνιο, αντίστοιχα. Τα διμερή αυτά λαμβάνουν την τελική τους δομή με τη βοήθεια των συνδετικών πεπτιδίων (linker peptides) τα οποία ενώνουν τις δύο υπομονάδες και κωδικοποιούνται από τα γονίδια *crcC1*, *crcC2* και *crcD*.

Το κυανοβακτήριο *Synechocystis* διαθέτει το *crc* οπερόνιο, όπου είναι οργανωμένα τα γονίδια *crcA*, *crcB*, *crcC1*, *crcC2* και *crcD* (Εικόνα 1.13). Τα συγκεκριμένα σύμπλοκα συλλογής φωτός αυξάνουν την απορρόφηση της ηλιακής ακτινοβολίας και ρυθμίζουν την κατανομή ενέργειας διέγερσης στα φωτοσυστήματα I και II. Με αυτό τον τρόπο αντιμετωπίζεται η ανισοκατανομή λόγω της μεγαλύτερης ποσότητας φωτοσυστήματος I καθώς και του μεγαλύτερου αριθμού χλωροφυλλών που βρίσκονται σε αυτό, σε σχέση με το φωτοσύστημα II στα κυανοβακτήρια [26].

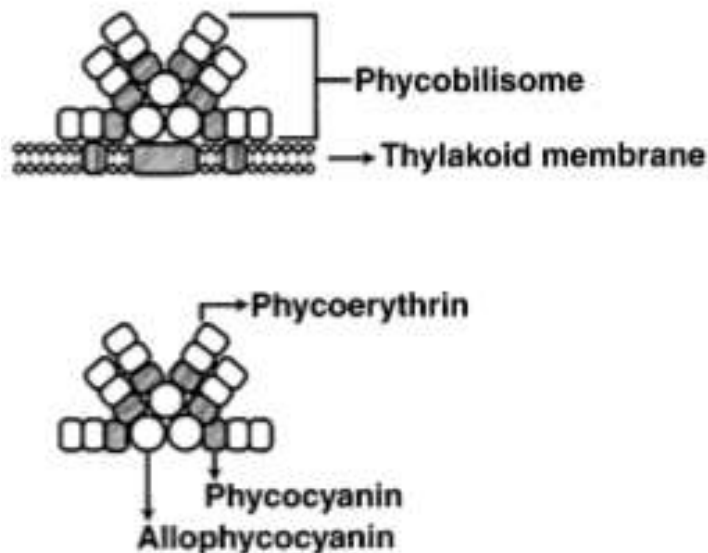


Εικόνα 1.12: Σχηματική αναπαράσταση ενός φυκοχολοσώματος. Αποτελείται από έναν πυρήνα αλοφυκοκυανίνης (AP), που προσδένεται στη μεμβράνη του θυλακοειδούς και από τα ραβδία φυκοκυανίνης (Phc), τα οποία αναδύονται από τον πυρήνα. Ελήφθη από την παραπομπή [35].



Εικόνα 1.13: Γενετικός χάρτης των γονιδίων του *cpe* οπερονίου. Ελήφθει από την παραπομπή [35].

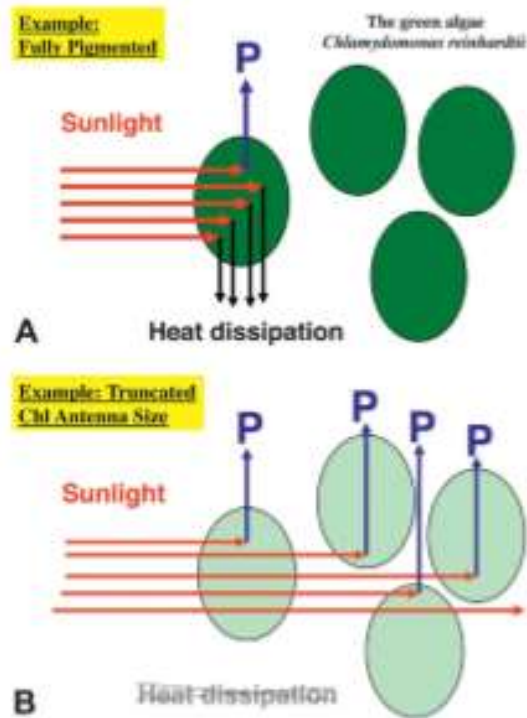
Ακόμα, όπως έχει ήδη αναφερθεί η κεραία συλλογής φωτός εξυπηρετεί στην επιβίωση των οργανισμών, διοχετεύοντας τους την απαραίτητη ενέργεια καθώς αναπτύσσονται σε οικοσυστήματα όπου η ηλιακή ακτινοβολία δεν επαρκεί. Όταν οι συνθήκες φωτισμού είναι τέτοιες ώστε να παρέχεται συνεχώς φως στις καλλιέργειες, (τέτοιες είναι οι εργαστηριακές συνθήκες), η απορρόφηση φωτός είναι πολύ περισσότερη σε σχέση με αυτή που μπορεί να διαχειριστούν τα κυανοβακτήρια με αποτέλεσμα η περίσσεια ενέργειας να αποσβαίνει μη φωτοχημικά. Μια διαλυτή πρωτεΐνη δέσμευσης καροτενοειδών (orange carotenoid protein, OCP) παίζει ουσιαστικό ρόλο στη διαδικασία αυτή στα *Synechocystis* καθώς απορροφά την περίσσεια ακτινοβολίας αποτρέποντας έτσι την ανεπιθύμητη φωτογήρανση και τη φωτοαναστολή [35].



Εικόνα 1.14: Μοντέλο τρικυλινδρικού φυκοχολοσώματος. Στο πάνω σχέδιο, φαίνεται πως το φυκοχολόσωμα είναι συνδεδεμένο με το φωτοσύστημα II στη μεμβράνη του θυλακοειδούς. Δύο σωματίδια φωτοσυστήματος I φαίνονται δίπλα στο σωματίδιο φωτοσυστήματος II. Εμφανίζεται ένας τρικυλινδρικός πυρήνας και οι δύο κύλινδροι του πυθμένα συνδέονται με τη μεμβράνη του θυλακοειδούς. Ελήφθει από την παραπομπή [34].

1.6 Περικοπή κεραίας συλλογής φωτός σε μεταλλαγμένα στελέχη

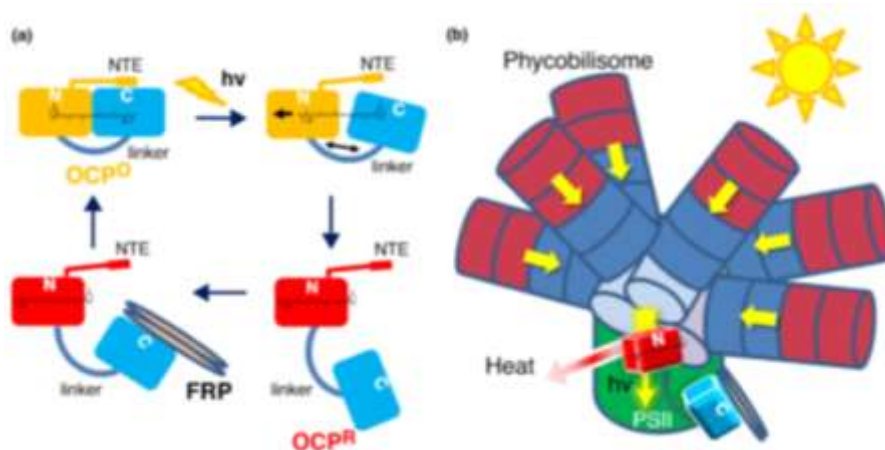
Στα κυανοβακτήρια όπως και σε άλλους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς βρέθηκε πως η μέγιστη απόδοση χρήσης της ηλιακής ενέργειας σε βιομάζα μέσω της φωτοσύνθεσης, που φτάνει στα κύτταρα είναι της τάξεως 1-2%, έναντι του θεωρητικού ποσοστού που ανέρχεται στο 8-10% [10]. Το υπόλοιπο ποσοστό αποσβάνει μη φωτοχημικά (μη φωτοχημική απόσβεση της ενέργειας, NPQ) (Εικόνα 1.15) [35]. Στην περίπτωση όπου η ένταση της φωτονιακής ακτινοβολίας είναι υψηλότερη από την φυσιολογική, το ποσοστό της ακτινοβολίας που μπορούν να αξιοποιήσουν τα άλγη μειώνεται στο 2-3%, ενώ ακόμα μικρότερο ποσοστό οι υπόλοιποι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί. Τα κυανοβακτήρια *Synechocystis* που μελετώνται στην παρούσα εργασία, έχουν αναπτύξει μια ιδιαίτερη φωτοσυνθετική κεραία, τα φυκοχολοσώματα. Μέσω αυτής επιτυγχάνεται η απορρόφηση της απαραίτητης ακτινοβολίας, καθώς στο περιβάλλον το οποίο αναπτύσσονται στη φύση, η ηλιακή ακτινοβολία δεν φτάνει με την ίδια ευκολία όσο στην επιφάνεια της Γης. Στους θαλάμους ανάπτυξης του εργαστηρίου, η ακτινοβολία είναι συνεχής και υψηλή, το οποίο θα οδηγούσε σε αυξημένη μη φωτοχημική απόσβεση (φθορισμός και θερμότητα) στα εξωτερικά κύτταρα που έρχονται άμεσα σε επαφή με το φως, ενώ μειωμένη ακτινοβολία θα εισερχόταν στο εσωτερικό της καλλιέργειας. Το πρόβλημα αντιμετωπίζεται με τη μείωση του μεγέθους της φωτοσυνθετικής κεραίας, με σκοπό τη μείωση του μεγέθους του συμπλόκου συλλογής φωτός του φωτοσυστήματος II. Το φαινόμενο αυτό ονομάστηκε περικεκομμένη κεραία συλλογής φωτός (Truncated Light-harvesting Antenna-TLA) [36]. Επομένως, με μικρότερο μέγεθος φωτοσυνθετικής κεραίας έχουμε μειωμένη απορρόφηση φωτονίων από τα κύτταρα που βρίσκονταν στο εξωτερικό της καλλιέργειας και εισαγωγή μεγαλύτερης ποσότητας στο εσωτερικό αυτής [37]. Έτσι, βρέθηκε να αυξάνεται η συνολική φωτοσυνθετική παραγωγικότητα [38].



Εικόνα 1.15: Σχηματικές απεικονίσεις της πορείας της προσπίπτουσας απορρόφησης και χρήσης του ήλιου από το *Chlamydomonas reinhardtii* σε υγρή καλλιέργεια. (A) Πλήρως χρωματισμένα (σκούρο πράσινο) μικροφύκη σε καλλιέργεια μάζας υψηλής πυκνότητας. Τα κύτταρα στην επιφάνεια της καλλιέργειας απορροφούν υπερβολικά το εισερχόμενο φως του ήλιου (περισσότερο από αυτό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τη φωτοσύνθεση) και διαλύουν το μεγαλύτερο μέρος τους μέσω μη φωτοχημικής απόσβεσης, περιορίζοντας έτσι την παραγωγικότητα (P). Σημειώστε ότι η υψηλή πιθανότητα απορρόφησης από το πρώτο στρώμα των κυττάρων θα προκαλούσε σκίαση, δηλαδή, αποτρέποντας την έκθεση των κυττάρων βαθύτερα στην καλλιέργεια στο φως του ήλιου. Οι μετρήσεις της ενεργειακής απόδοσης της ηλιακής ενέργειας προς τη βιομάζα της υπό αυτές τις συνθήκες ήταν στην καλύτερη περίπτωση 2–3%. (B) Μικροφύκη με περικομμένη φωτοσυνθετική κεραία (ανοιχτό πράσινο) σε καλλιέργεια μάζας υψηλής πυκνότητας. Μεμονωμένα κύτταρα με περικομμένη κεραία για τα φωτοσυστήματα έχουν μειωμένη πιθανότητα απορρόφησης του ηλιακού φωτός, επιτρέποντας έτσι μεγαλύτερη διείσδυση και πιο ομοιόμορφη κατανομή και χρήση ακτινοβολίας μέσω της καλλιέργειας. Αυτό ανακουφίζει τη θερμική διάχυση από το απορροφούμενο ηλιακό φως και ενισχύει τη φωτοσυνθετική παραγωγικότητα (P) από την καλλιέργεια στο σύνολό της. Η αποτελεσματικότητα της μετατροπής ενέργειας από ηλιακή ενέργεια σε βιομάζα υπό αυτές τις συνθήκες ήταν 8-10%. Ελήφθη από την παραπομπή [10].

Η διάχυση της περίσσειας της απορροφούμενης ακτινοβολίας αποτρέπει τη φωτοαναστολή, αλλά ταυτόχρονα οδηγεί σε μειωμένη μετατροπή του ηλιακού φωτός από τα κέντρα αντίδρασης. Η διαδικασία ωθείται από μια πορτοκαλί καροτενοειδή πρωτεΐνη (Orange Carotenoid Protein, OCP). Η OCP πρωτεΐνη έχει την ικανότητα να δέχεται την περίσσεια ενέργειας από τα φυκοχολοσώματα (στα οποία και

προσδένεται), ώστε αυτή να μη μεταφέρεται στο φωτοσύστημα II, προστατεύοντάς το. Πρόκειται για μια υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη, αποτελούμενη από δυο υπομονάδες (N- και C- terminal) ενωμένες με μια μακριά, ευκίνητη αλυσίδα και ένα μόριο καρροτενοειδούς που χρησιμεύει σαν χρωμοφόρο (Εικόνα 1.16). Επομένως, όταν οι συνθήκες φωτισμού είναι σε μεγαλύτερη ένταση από την κανονική (ή ακόμα και σε άλλες συνθήκες καταπόνησης όπως υψηλή αλατότητα ή απώλεια θρεπτικών στοιχείων), τότε η πρωτεΐνη αυτή απορροφά και μετατρέπεται από μια σκοτεινή, σταθερή πορτοκαλή μορφή (OCP^O) σε μια φωτεινή κόκκινη μορφή (OCP^R), αλλάζοντας διαμόρφωση. Η OCP^R είναι η μορφή της πρωτεΐνης που προσδένεται στα PBS. Για την επαναφορά του συστήματος και την αποδέσμευση της OCP από τα φυκοχλωσώματα, υπεύθυνη είναι μια πρωτεΐνη επαναφοράς του φθορισμού (Fluorescence Recovery Protein, FRP). Επιπλέον, η OCP πρωτεΐνη απομακρύνει το τοξικό 1O_2 που δημιουργείται με την περίσσεια ενέργειας. Παράλληλα, επειδή έχει βρεθεί ότι μπορούν να μεταφέρουν μόρια καρροτενοειδών στο κυτταρόπλασμα και στην εξωτερική μεμβράνη, το χρώμα που αποκτά η καλλιέργεια των κυανοβακτηρίων είναι πορτοκαλί [39, 40]. Με αυτόν τον τρόπο, αλλάζοντας χρώμα επιτυγχάνεται η προστασία των κυττάρων.

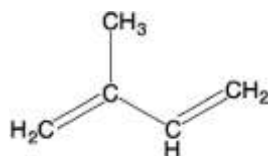


Εικόνα 1.16: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου των OCP και τον μηχανισμό φωτοπροστασίας OCP/FRP. (a) Μηχανισμός για την OCP φωτορύθμιση: απορρόφηση της ηλιακής ακτινοβολίας από την OCP^O προκαλεί δομικές αλλαγές στο μόριο του καρροτενοειδούς, επιτρέποντας στο καρροτενοειδές να μετατοπιστεί εξ ολοκλήρου από το NTD, συνοδευόμενη από πλήρη αποσύνδεση των δύο δομών. Το φωτοενεργό OCP^R μετατρέπεται στο ανενεργό OCP^O στο σκοτάδι και μπορεί να επιταχυνθεί από την αλληλεπίδραση μεταξύ FRP και CTD. (b) Το OCP^R αλληλεπιδρά με το PBS διαμέσου του τριμερούς της APC έτσι ώστε η περίσσεια ενέργειας να μετατραπεί σε θερμότητα. Το FRP επιτυγχάνει την αποδέσμευση του OCP^R από το PBS. Ελήφθη από την παραπομπή [39].

Στα κυανοβακτήρια *Synechocystis* sp. PCC 6803 η πρωτεΐνη OCP εκφράζεται από το γονίδιο *slr1963*. Έχει βρεθεί επίσης, ότι η πρωτεΐνη μπορεί να εκφραστεί αποτελεσματικά και σε μεταλλαγμένα στελέχη του κυανοβακτηρίου, όπου τα φυκοχολοσώματα απουσιάζουν [41].

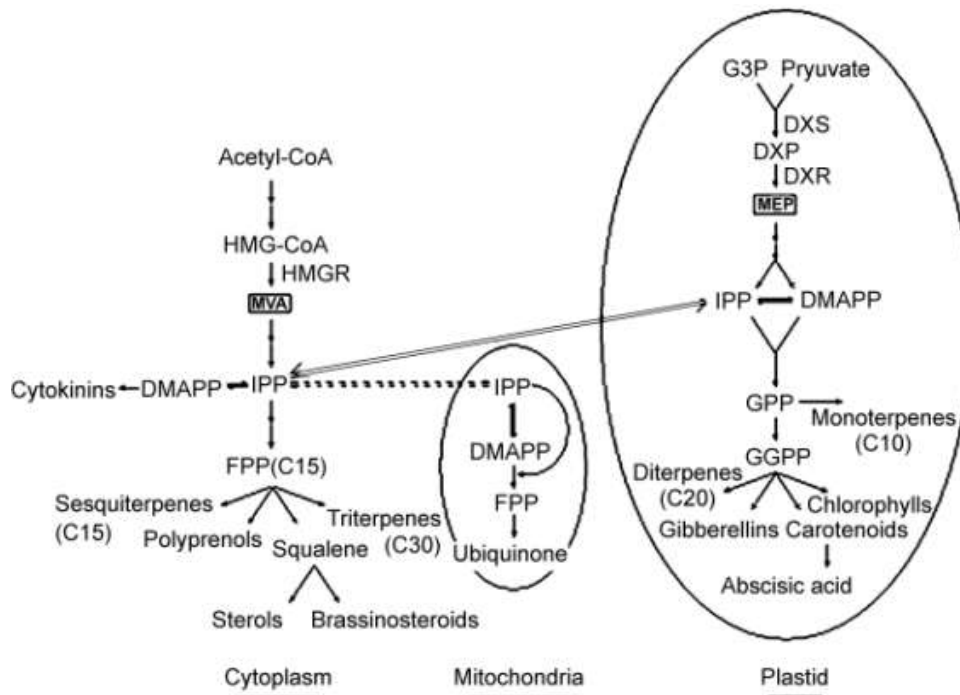
1.7 Τερπενοειδή

Τα τερπενοειδή ή τερπένια είναι μια ομάδα φυσικών προϊόντων (υδρογονανθράκων), τα οποία παράγονται από ένα μεγάλο εύρος φυτών, μικροοργανισμών, εντόμων και ποικίλων θαλάσσιων οργανισμών. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία περισσότερα από 80000 τερπενοειδή έχουν χαρακτηριστεί δομικά [42]. Τα τερπενοειδή καλούνται και ισοπρενοειδή, ενώ αποτελούν υποκατηγορία των πρενυλ-λιπιδίων (σε αυτή ανήκουν τα τερπενοειδή, οι πρενυλ-κινόνες και οι στερόλες). Η ονομασία τους ως ισοπρενοειδή οφείλεται στο γεγονός ότι η μικρότερη μονάδα που τα αποτελεί είναι το ισοπρένιο (Εικόνα 1.17). Το ισοπρένιο αποτελείται από πέντε άτομα άνθρακα και είναι η δομική μονάδα όλων των τερπενοειδών. Τα τερπενοειδή κατηγοριοποιούνται βάσει του αριθμού μονάδων ισοπρενίου που αποτελείται η ένωσή τους (κανόνας ισοπρενίου) και της τελικής δομής που σχηματίζει το μόριο. Συγκεκριμένα, βάσει του αριθμού ισοπρενικών μονάδων χωρίζονται σε ημιτερπένια (με πέντε άτομα άνθρακα, C₅, άρα μια μονάδα ισοπρενίου), μονοτερπένια (με δέκα άτομα άνθρακα, C₁₀), σεσκιτερπένια (με δεκαπέντε άτομα άνθρακα, C₁₅), διτερπένια (με είκοσι άτομα άνθρακα, C₂₀), σεστιτερπένια (με εικοσιπέντε άτομα άνθρακα, C₂₅) τριτερπένια (με τριάντα άτομα άνθρακα, C₃₀), τετρατερπένια (με σαράντα άτομα άνθρακα, C₄₀) και πολυτερπένια (μεγαλύτερα από C₄₀) [43]. Παρόλα αυτά όπως και με οποιαδήποτε κατηγορία ενώσεων, δεν είναι όλα τα τερπένια αριθμός ακέραιων μονάδων ισοπρενίου, καθώς κάποια από αυτά μπορεί να είναι αποικοδομημένα τμήματα ισοπρενίου με λιγότερους άνθρακες όπως τα C₁₉ διτερπιοειδή. Ο αριθμός των επαναλήψεων του ισοπρενίου, οι αντιδράσεις κυκλοποίησης, οι αναδιατάξεις και η περαιτέρω οξειδωση του σκελετού άνθρακα ευθύνονται για την τεράστια ποικιλία των δομών των τερπενοειδών [44].



Εικόνα 1.17: Δομή μια ισοπρενικής μονάδας. Η εικόνα ελήφθει από την παραπομπή.

Τα τερπενοειδή διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην πρωτογενή ανάπτυξη, καθώς έχουν αποδειχθεί χρήσιμα ως ορμόνες (όπως οι γιββερελλίνες), φωτοσυνθετικές χρωστικές ουσίες (όπως η φυτόλη, τα καροτενοειδή), φορείς ηλεκτρονίων (η ουβικινόνη, η πλαστοκινόνη) και μεσολαβητές της συγκρότησης πολυσακχαριτών, καθώς και μηχανισμοί επικοινωνίας και άμυνας [44]. Ωστόσο, η πλειονότητα αυτών έχουν εξελιχθεί ως δευτερεύοντες μεταβολίτες φυτικής προέλευσης, με ρόλους που περιλαμβάνουν άμυνα ενάντια σε φυτοφάγα, έλξη επικονιαστών με σκοπό τη γονιμοποίησή τους και διασπορά σπόρων τους. Αυτός τους ο ρόλος αποτελεί μεγάλο πλεονέκτημα για τη βιομηχανία, ενώ έχει και πολλές εφαρμογές, όπως η παραγωγή αρωμάτων, φαρμακευτικών προϊόντων, εντομοκτόνων, καθώς επίσης υπάρχει δυνατότητα χρήσης αυτών ως βιοκαύσιμα, αποτελώντας μια εναλλακτική αλλά και ανανεώσιμη πηγή ενέργειας [43]. Ακόμα, τα τερπενοειδή προέρχονται από τις πρόδρομες ενώσεις πέντε ατόμων άνθρακα το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) και το πυροσταφυλικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP). Στα φυτά το IPP παράγεται από δύο ανεξάρτητες οδούς που βρίσκονται σε ξεχωριστά ενδοκυτταρικά διαμερίσματα (Εικόνα 1.18). Στο κυτοσόλιο, το IPP προέρχεται από το μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος (MVA pathway) που ξεκινά με τη συμπύκνωση του ακετυλο-CoA. Στα πλαστίδια, το IPP σχηματίζεται από πυροσταφυλικό και 3φωσφορική γλυκεραλδεΐδη. Αυτό το μονοπάτι που είναι ανεξάρτητο από το μεβαλονικό οξύ (MVA), ονομάζεται μονοπάτι MEP (MEP pathway) εξαιτίας του βασικού ενδιάμεσου, της φωσφορικής μεθυλ-ερυθριτόλης (MEP). Κατά τη βιοσύνθεσή των τερπενοειδών που γίνεται μέσω του μονοπατιού του μεβαλονικού οξέος, συνήθως παράγονται τα σεσκι- και τριτερπένια, ενώ από το μονοπάτι της φωσφορικής μεθυλ-ερυθριτόλης προκύπτουν συνήθως τα ημι-, μονο-, δι- και τετρατερπένια [45].



Εικόνα 1.18: Η οδός βιοσύνθεσης των ισοπrenoειδών στα φυτικά κύτταρα. Ελήφθει από την παραπομπή [45].

Στην περίπτωση των κυανοβακτηρίων η βιοσύνθεση των τερπενοειδών πραγματοποιείται βάση του MEP βιοσυνθετικού μονοπατιού. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω παράγονται οι πρόδρομες ενώσεις (IPP και DMAPP), καταλήγοντας έπειτα στο σχηματισμό του πυροφωσφορικού γερανυλίου (GPP) και τελικά στα διάφορα ενδογενή τερπένια [46].

1.8 Βιοσυνθετικά μονοπάτια τερπενοειδών (MVA και MEP pathway)

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο υπάρχουν στη φύση δύο διαφορετικά βιοσυνθετικά μονοπάτια για τη σύνθεση ενδογενών τερπενοειδών μορίων. Το MVA μονοπάτι (μονοπάτι μεβαλονικού οξέος, MVA pathway) πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα των ευκαρυωτών και των αρχαίων και το MEP βιοσυνθετικό μονοπάτι (μονοπάτι φωσφορικής μεθυλ-ερυθριτόλης, MEP pathway) εντοπίζεται στα πλαστίδια φυτών, τα κυανοβακτήρια και τα μικροφύκη (Εικόνα 1.19) [47-49]. Τα δύο αυτά μονοπάτια οδηγούν στην παραγωγή των τερπενοειδών πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) και πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP). Αυτές οι ενώσεις οδηγούν στο σχηματισμό του πυροφωσφορικού γερανυλίου (GPP) από τη συνθήση του πυροφωσφορικού γερανυλίου (GPPS) και το

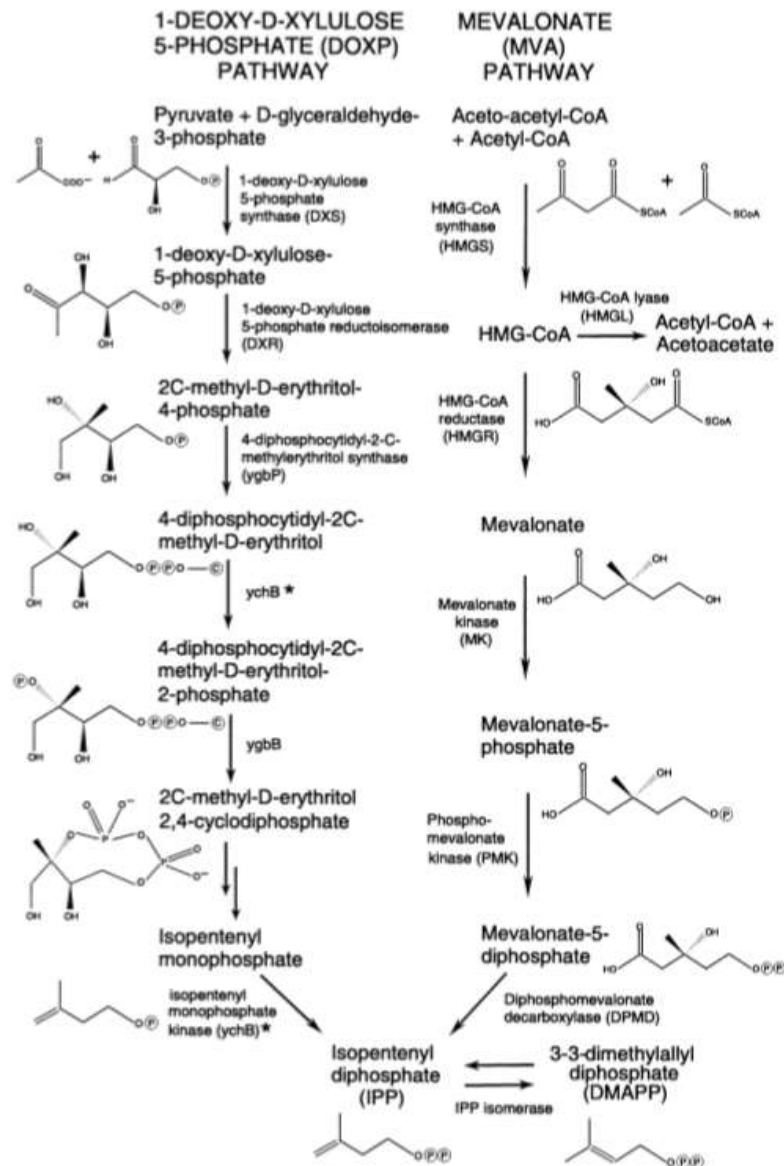
οποίο λειτουργεί σαν πρόδρομη ένωση για την παράγωγή ενδοκυτταρικών τερπενοειδών [50].

1.8.1 MVA βιοσυνθετικό μονοπάτι

Το MVA μονοπάτι χρησιμοποιεί το ακέτυλο συνένζυμα A (acetyl-CoA). Μια συμπύκνωση Claisen δύο μορίων ακετυλο CoA αποδίδει ακετοακετυλο CoA. Στη συνέχεια, μία αλδολική προσθήκη ενός ακόμη μορίου ακετυλο CoA, αποδίδει 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρυλο CoA, το οποίο ανάγεται σε μεβαλονικό οξύ σε επόμενο στάδιο. Έπειτα το μεβαλονικό φωσφορυλιώνεται, αποδίδοντας 3-φωσφο-5-πυροφωσφο-μεβαλονικό, και η επακόλουθη απομάκρυνση του φωσφορικού και CO₂, αποδίδει IPP, το οποίο μπορεί να μετατραπεί σε DMAPP με ισομερίωση. Τα μόρια IPP και DMAPP που προέρχεται από το μονοπάτι MVA χρησιμεύουν ως πρόδρομα του διφωσφορικού φαρνεσουλίου (FPP) και, τελικά, των σεσκιτερπενίων, των τριτερπενίων και των στερολών [51, 52].

1.8.2 MEP βιοσυνθετικό μονοπάτι

Το βιοσυνθετικό αυτό μονοπάτι ονομάζεται και 5-φωσφορικής 1 -δεοξυ -D -ξυλόζης (1deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway, DOXP), εξαιτίας ενός άλλου ενδιάμεσου του μονοπατιού [53]. Το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) που καθλώνεται μέσω της φωτοσύνθεσης μετατρέπεται σε 3-φωσφογλυκερικό οξύ (3PGA), το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε 3-φωσφορική γλυκεραλδεΐδη (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). Το DMAPP παρέχει τους προδρόμους του διφωσφορικού γερανίου (GPP), του διφωσφορικού γερανυλγερανυλίου (GGPP) και τελικά των μονοτερπενίων, των διτερπενίων και των τετρατερπενίων [54]. Κατά το μονοπάτι MEP καταναλώνονται αναγωγικά ισοδύναμα και κυτταρική ενέργεια με τη μορφή NADPH, ανηγμένης φερρεδοξίνης, CTP και ATP, τα οποία προέρχονται από τη φωτοσύνθεση.

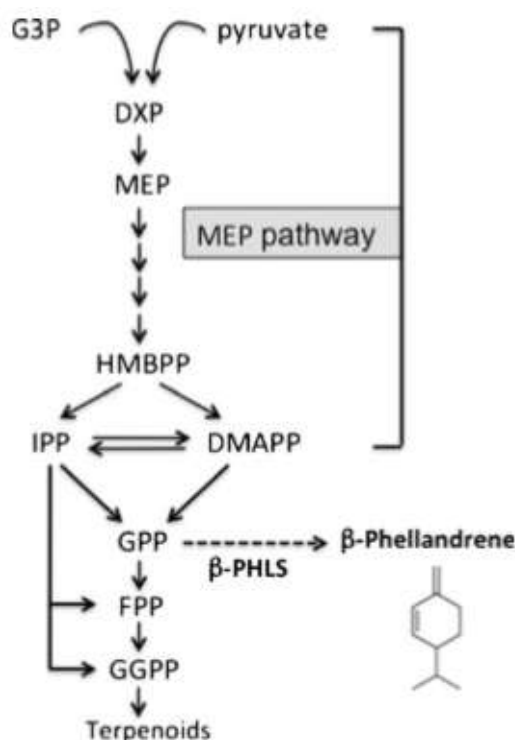


Εικόνα 1.19: Σχηματική αναπαράσταση των δύο οδών για σύνθεση διφωσφορικού ισοπεντενιίου (IPP). Το κυκλικό P υποδηλώνει ένα τμήμα φωσφορικού και το κυκλικό C ένα τμήμα κυτιδυλίου. Τα ένζυμα που καταλύουν αρκετά ενδιάμεσα στάδια που οδηγούν σε φωσφορικό ισοπεντενύλιο μέσω της οδού DOXP είναι ακόμη άγνωστα, όπως υποδεικνύεται από τα διπλά βέλη που οδηγούν σε αυτό το προϊόν. Ελήφθη από την παραπομπή [53].

1.9 β-Φελλανδρένιο

Ορισμένα είδη φυτών παράγουν φυσικά το μονοτερπένιο β-φελλανδρένιο ($C_{10}H_{16}$) ως συστατικό των αιθέριων ελαίων τους, συμπεριλαμβανομένης της λεβάντας (*Lavandula angustifolia*), του έλατου (*Abies grandis*) και του ευκαλύπτου (Εικόνα 1.20). Τα αιθέρια έλαια είναι προϊόν φωτοσύνθεσης και του σχετικού

μεταβολισμού των χλωροπλαστών, και στη λεβάντα συγκεκριμένα (από όπου απομονώθηκε το γονίδιο της συνθάσης του β -φελλανδρενίου, που μας απασχολεί στην παρούσα ερευνητική εργασία) συσσωρεύονται σε εξειδικευμένα όργανα που ονομάζονται αδενικά τριχώματα (*glandular trichomes*), τα οποία σχηματίζονται στην επιφάνεια των φύλλων και των άνθων και λειτουργούν στη χημική άμυνα κατά των φυτοφάγων ζώων [43].



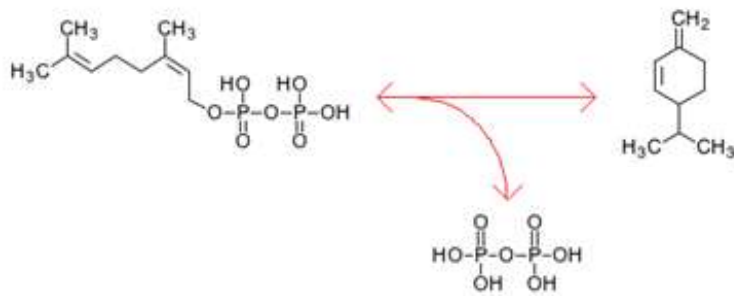
Εικόνα 1.20: Βιοσύνθεση τερπενοειδών μέσω της οδού 4-φωσφορικής μεθυλ-ερυθριτόλης (MEP) στο κυανοβακτήριο *Synechocystis*. Ελήφθει από την παραπομπή [43].

Οι φωτοσυνθετικοί μικροοργανισμοί όπως τα κυανοβακτήρια και τα μικροάλγη ακολουθούν το MEP βιοσυνθετικό μονοπάτι για τη σύνθεση ποικίλων τερπενοειδών μορίων, τα οποία είναι απαραίτητα για την λειτουργία των κυττάρων. Παραδείγματα αυτών είναι τα καροτενοειδή, οι στερόλες και διάφορες ορμόνες. Αντίθετα, οι οργανισμοί αυτοί δεν μπορούν να συνθέσουν δευτερογενείς μεταβολίτες όπως τα μονοτερπένια, καθώς δε διαθέτουν τα γονίδια από τις συνθάσες αυτών. Αυτό που ακολουθείτε επομένως στη συγκεκριμένη εργασία είναι η χρήση τεχνικών γενετικής μηχανικής, ώστε να επιτευχθεί ετερόλογη έκφραση της συνθάσης του β -φελλανδρενίου και άρα παραγωγή αυτού από τα κυανοβακτήρια *Synechocystis* μέσω της φωτοσύνθεσης [43].

Το β -φελλανδρένιο αποτελεί μικρό, υδρόφοβο οργανικό μόριο, μη αναμίξιμο με την καλλιέργεια των κυανοβακτηρίων, επομένως συγκεντρώνεται πάνω από την επιφάνεια αυτής. Μπορεί να διαχέεται από τη κυτταρική μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμα των κυανοβακτηρίων και να συγκεντρώνεται στον εξωκυττάριο χώρο στην επιφάνεια της καλλιέργειας. Αυτό αποτελεί πλεονέκτημα καθώς αποφεύγονται πιθανές τοξικές επιδράσεις στην καλλιέργεια και καθιστά ευκολότερη τη συλλογή του από την επιφάνεια αυτής. Τέλος, ποικίλες εφαρμογές του β -φελλανδρενίου συναντώνται στη συνθετική χημεία, την ιατρική, χρήση αυτού σε καλλυντικά και προϊόντα καθαρισμού καθώς επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοκαύσιμο [48, 55].

1.10 Συνθάση β -φελλανδρενίου

Το ένζυμο της συνθάσης του β -φελλανδρενίου (PHLS) ανήκει στην ομάδα των λυασών και έχει αριθμό κατά E.C. 4.3.2.51. Η αντίδραση που καταλύει είναι η κυκλοποίηση του πυροφωσφορικού γερανυλίου και πυροφωσφορικού νερυλίου, δίνοντας ως προϊόν με μέγιστο ποσοστό το β -φελλανδρένιο και παραπροϊόν διφωσφορικό στη δική μας περίπτωση. Μεγαλύτερη συγγένεια εμφανίζει για το πυροφωσφορικό γερανύλιο ως υπόστρωμα [56]. Οι PHLS από διαφορετικούς οργανισμούς εμφανίζουν μεγάλες διαφορές μεταξύ τους, τόσο στους οργανισμούς που εκφράζονται ομόλογα, αλλά και σε αυτούς που εκφράζονται ετερόλογα. Διαφορετικές PHLS από διάφορα φυτά οδηγούν στην παραγωγή μειγμάτων τερπενοειδών, όταν εκφραστούν ετερόλογα στα *Synechocystis* [57]. Το γονίδιο της συνθάσης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία απομονώθηκε από το φυτό *Lavandula Angustifolia* και κυρίως εντοπίζεται στους ιστούς των φύλλων του φυτού. Σε αυτή την περίπτωση πέρα από το β -φελλανδρένιο, παράγεται σε μικρότερο ποσοστό λιμονένιο (limonene). Το ένζυμο της συνθάσης όταν απομονωθεί από άλλους φυτικούς οργανισμούς μπορεί να παράγει κι άλλα παραπροϊόντα. Για παράδειγμα, η συνθάση που έχει απομονωθεί από έλατο παράγει 52% β -φελλανδρένιο, 34% β -πιπένιο, 8.5% α -πινένιο και 6% 4S-λεμονένιο [43, 56, 58].



Εικόνα 1.21: Η αντίδραση που πραγματοποιεί το ένζυμο της PHLS, με υπόστρωμα το πυροφωσφορικό νερόλιο.

1.11 Ετερόλογη έκφραση β -φελλανδρενίου από το κυανοβακτήριο *Synechocystis*

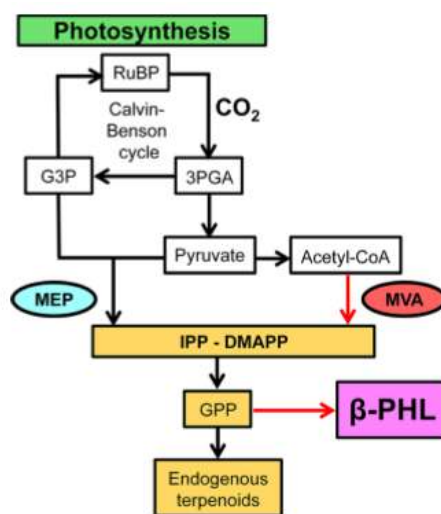
Το β -φελλανδρένιο (PHL) όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενη παράγραφο παράγεται στα τριχώματα των φύλλων των φυτών από τη συνθάση του β -φελλανδρενίου (PHLS). Εξαιτίας της μεγάλης εμπορικής του αξίας είναι επιθυμητές αρκετά μεγάλες ποσότητες αυτού. Όμως, η παραγωγή και η συγκομιδή PHL από φυτά υπόκεινται σε περιορισμούς, συμπεριλαμβανομένης της χαμηλής απόδοσης ανά μονάδα φυτού, του υψηλού κόστους συλλογής και των διακυμάνσεων στην τροφοδοσία πρώτων υλών. Επιπλέον, το μονοτερπένιο αυτό είναι αρκετά ακριβό σαν προϊόν. Επομένως, για την ελαχιστοποίηση αυτών των περιορισμών το 2013 αναφέρθηκε για πρώτη φορά η ετερόλογη παραγωγή σε PHL μέσω της φωτοσύνθεσης των κυανοβακτηρίων *Synechocystis* [43].

Αυτός ο μικροοργανισμός επιλέχθηκε λόγω της ευκολίας του γενετικού χειρισμού, του γρήγορου ρυθμού ανάπτυξης και παραγωγικότητας, σε σχέση με τα φυτά που παράγουν το αιθέριο έλαιο και της ικανότητας κλιμάκωσης της διαδικασίας παραγωγής για να καταστεί δυνατή η εμπορική εκμετάλλευση. Παρά αυτά τα πλεονεκτήματα, τα εμπόδια για την παραγωγή υψηλής απόδοσης PHL μέσω της φωτοσύνθεσης των *Synechocystis* περιλαμβάνουν την αργή καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου PHLS ($k_{cat} = \sim 3s^{-1}$) [59] και την περιορισμένη κατανομή του φωτοσυνθετικού άνθρακα στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των τερπενοειδών ($\sim 5\%$ του συνολικού φωτοσυνθετικού άνθρακα) [60, 61].

Οι προσεγγίσεις που ακολουθήθηκαν για την ετερόλογη έκφραση του PHL, περιελάμβαναν υπερέκφραση των ενζύμων GPPS και PHLS της βιοσυνθετικής του

οδού αύξηση της καταλυτικής τους δράσης. Η ετερόλογη έκφραση του MVA μονοπατιού στα κυανοβακτήρια λειτουργεί παράλληλα με το ενδογενές MEP μονοπάτι, πράγμα που οδηγεί στην αύξηση των υποστρωμάτων DMAPP και IPP [62].

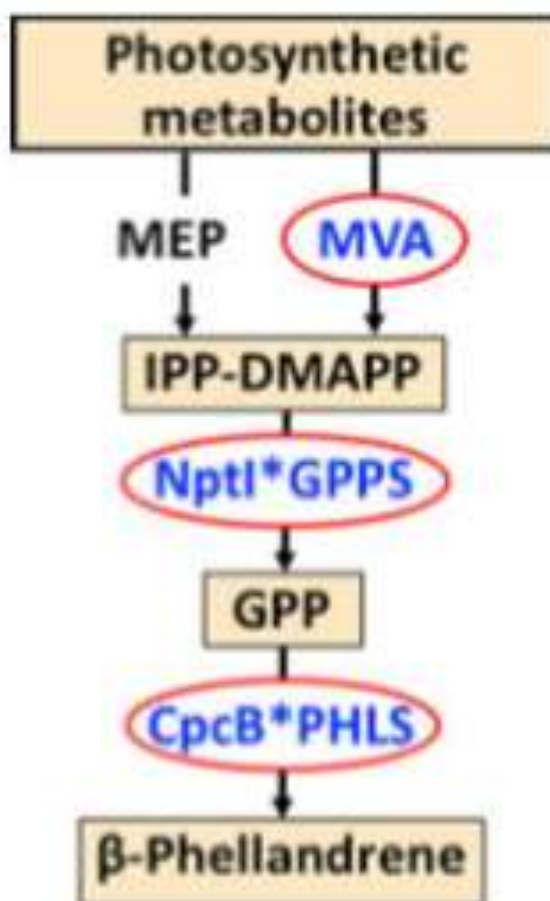
Το γονίδιο της συνθάσης του β -φελλανδρενίου (PHLS) από τον οργανισμό *Lavandula angustifolia* (λεβάντα) έπειτα από βελτιστοποίηση των κωδικονίων του (codon optimization) ενσωματώθηκε στο γονιδίωμα του *Synechocystis*, προσδίδοντας του έτσι την ικανότητα να παράγει β -φελλανδρένιο μέσω της φωτοσύνθεσης [63, 64]. Το γονίδιο της PHLS εκφράστηκε ως γονίδιο σύντηξης με τη β -υπομονάδα (cpcB υπομονάδα) της φυκοκυανίνης, κάτω από τη δράση του ισχυρού υποκινητή του cpc operonίου (cpcB.PHLS) [55, 65]. Ακόμα, 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 (Εικόνα 1.22) [62].



Εικόνα 1.22: Σχηματική απεικόνιση του ενδογενούς μονοπατιού MEP (αριστερά) και του ετερόλογου MVA μονοπατιού (δεξιά) για τον σχηματισμό του β -φελλανδρενίου. Η εικόνα ελήφθη από την παραπομπή [64].

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 [62].



Εικόνα 1.23: Τροποποιημένη ροή τερπενοειδών μονοπατιών και παραγωγή προϊόντων σε κυανοβακτήρια. Το ενδογενές MEP μονοπάτι στο *Synechocystis* μεταβλήθηκε με την ενσωμάτωση γονιδιωματικού DNA των ετερόλογων γονιδίων σύντηξης CrcB * PHLS και NptI * GPPS, με την βοήθεια του MVA μονοπατιού με αποτέλεσμα σημαντικούς ρυθμούς και απόδοση παραγωγής β -φελλανδρενίου. Ελήφθει από την παραπομπή [62].

Παρόλα αυτά, δεν μπορούν αποτελεσματικά όλες οι αλληλουχίες γονιδίων που υπερεκφράζονται στα *Synechocystis* (crcB και crcA) να χρησιμοποιηθούν σαν ακολουθίες έναρξης (leader sequences) για την παραγωγή του β -φελλανδρενίου. Ευρήματα μελετών έδειξαν ότι η χρήση ενός ισχυρού υπικινητή (cpc οπερονίου) σε συνδυασμό με το υπερεκφραζόμενο γονίδιο crcB δεν ήταν από μόνη της επαρκής για την έκφραση της πρωτεΐνης crcB.PHLS, ενώ έλειπαν τα υπόλοιπα λειτουργικά

πεπτίδια του *crc* οπερονίου (*crcA*, *crcC2*, *crcC1*, *crcD*). Σημαντικά υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης σύντηξης *crcB*.PHLS επιτεύχθηκε μόνο όταν υπήρχαν όλα τα γονίδια του *crc* οπερονίου. Σε αυτήν την περίπτωση, η απόδοση β -φελλανδρενίου ήταν ουσιαστικά μεγαλύτερη σε σύγκριση με στελέχη που εξέφρασαν επίσης το γονίδιο σύντηξης *crcB*.PHLS απουσία των υπόλοιπων γονιδίων οπερονίου *crc*. Επίσης αρκετά ενδιαφέρον είναι ότι, όταν το γονίδιο *crcA* χρησιμοποιήθηκε σαν *leader sequence*, η πρωτεΐνη σύντηξης *crcA*.PHLS προκάλεσε την ετερόλογη παραγωγή ενός μίγματος ισομερών τερπενοειδών, αντί του επιθυμητού β -φελλανδρενίου [66].

Παρά το γεγονός ότι έχουν γίνει πολλές μελέτες όλα αυτά τα χρόνια σε γενετικό επίπεδο, ώστε να παραχθούν στελέχη με μεγαλύτερη απόδοση προϊόντος, υπάρχουν αρκετά προβλήματα που προκύπτουν όταν επιθυμείται χρήση μεγαλύτερης κλίμακας καλλιέργειών. Τα προβλήματα αυτά είναι κυρίως προβλήματα σκίασης, αρκετές πιθανές μολύνσεις, δυσκολία διαχείρισης της παραγόμενης βιομάζας [67]. Παράλληλα, η χρήση πολλών λίτρων γλυκού- πόσιμου νερού μπορεί να οδηγήσει σε πολλά περιβαλλοντικά ζητήματα, καθώς η ποσότητα αυτού είναι περιορισμένη και πολλοί οργανισμοί κινδυνεύουν με αφανισμό.

Κεφάλαιο 2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ ΤΟΥ ΚΥΑΝΟΒΑΚΤΗΡΙΟΥ *SYNECHOCYSTIS SP. PCC 6803* ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

2.1 Εισαγωγή

Το μονοτερπένιο β -φελλανδρένιο αποτελεί ένα τερπενοειδές με αρκετά μεγάλη εμπορική και βιομηχανική αξία καθώς έχει ποικίλες εφαρμογές στη συνθετική χημεία, την ιατρική, γίνεται χρήση αυτού σε καλλυντικά και προϊόντα καθαρισμού καθώς επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοκαύσιμο [55]. Για το λόγο αυτό έχει κεντρίσει το επιστημονικό ενδιαφέρον η ετερόλογη παραγωγή του από το κυανοβακτήριο *Synechocystis sp. PCC 6803*. Αυτό έχει επιτευχθεί με ενσωμάτωση του γονιδίου της συνθάσης του β -φελλανδρενίου στο γονιδίωμα του οργανισμού. Το γονίδιο της συνθάσης του β -φελλανδρενίου εκφράζεται υπό τον ισχυρό υποκινητή του *cpc* οπερονίου.

Στόχος όλων των μελετών είναι η αύξηση της παραγωγής από την καλλιέργεια των κυττάρων. Τα τελευταία χρόνια όμως στοχεύουν στην εύρεση μεθόδων πιο οικονομικών και ταυτόχρονα με τις λιγότερες αρνητικές επιπτώσεις για το περιβάλλον, με σκοπό την παραγωγή φυσικών προϊόντων. Συγκεκριμένα για το β -φελλανδρένιο σε προηγούμενη ερευνητική εργασία του εργαστηρίου μας έγινε για πρώτη φορά μελέτη για την εύρεση βέλτιστων συνθηκών παραγωγής του [67] και σε αυτό βασιζόμαστε στην παρούσα εργασία για την εύρεση ακόμα καλύτερης μεθόδου. Το γεγονός ότι τα κυανοβακτήρια έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται με επιτυχία σε διάφορες συνθήκες φωτισμού, θερμοκρασίας αλλά και θρεπτικού μέσου [68], αποτελεί ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό για την εύρεση νέων μεθόδων καλλιέργειας που πληρούν τα παραπάνω κριτήρια. Βασιζόμενοι λοιπόν σε αυτά αλλά και στη βιβλιογραφία, σε παλιότερες ερευνητικές εργασίες του εργαστηρίου μας χρησιμοποιήθηκε σαν θρεπτικό μέσο 100% θαλασσινό νερό. Η επιλογή της συνθήκης αυτής έγινε προκειμένου να περιοριστεί όσο το δυνατόν η χρήση γλυκού νερού, που είναι απαραίτητο για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού. Το γλυκό νερό αποτελεί μόνο το 3% του συνολικού νερού στο πλανήτη [69]. Η κατανάλωση αυτού τόσο για την επιβίωση όλων των οργανισμών, αλλά και η τεράστια κατανάλωση από βιομηχανίες προς όφελος του ανθρώπου, σταδιακά οδηγούν σε υπερκατανάλωση με άμεσο κίνδυνο την δημιουργία μιας πληθώρας προβλημάτων, όπως ο αφανισμός αρκετών ειδών του πλανήτη [70]. Επομένως, έγινε προσπάθεια προσομοίωσης των

συνθηκών θαλασσινού νερού στις καλλιέργειες για να μελετηθεί η ανάπτυξη των κυττάρων καθώς και η παραγωγή του προϊόντος σε αυτές με αποκλειστική χρήση θαλασσινού νερού που βρίσκεται σε πολύ μεγαλύτερη αφθονία. Τα αποτελέσματα όλων αυτών των μελετών έδειξαν επιτυχή ανάπτυξη και παραγωγή του προϊόντος από τα μεταλλαγμένα στελέχη του κυανοβακτηρίου *Synechocystis*.

Επομένως, στη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία θέλαμε να επεκτείνουμε ακόμα περισσότερη την παραπάνω μελέτη. Για το λόγο αυτό δοκιμάστηκαν συνθήκες με θρεπτικό μέσο θαλασσινό νερό σε διάφορες παραλλαγές που το εμπλουτίζουν, προκειμένου να καταλήξουμε στη βέλτιστη. Σε αυτό το κεφάλαιο μελετήθηκε εκτενώς ο άγριος τύπος (WT) του κυανοβακτηρίου, με σκοπό να βρεθεί η βέλτιστη συνθήκη ανάπτυξης και σε επόμενα κεφάλαια η συνθήκη αυτή θα χρησιμοποιηθεί για την εφαρμογή σε μεταλλαγμένα στελέχη, για να μελετηθεί και η παραγωγή του β -φελλανδρενίου.

2.2 Σκοπός

Το κεφάλαιο αυτό έχει σαν στόχο την μελέτη της ανάπτυξης και της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας του αγρίου τύπου του κυανοβακτηρίου *Synechocystis* sp. PCC 6803 σε συνθήκες με την χρήση θαλασσινού νερού. Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου έγινε αρχικά η χρήση θρεπτικού μέσου με αυξημένη αλατότητα [71] και έπειτα η χρήση 100% θαλασσινού [72] με επιτυχή ανάπτυξη των κυττάρων και παραγωγή του προϊόντος β -φελλανδρενίου και στις δυο περιπτώσεις από μεταλλαγμένα στελέχη του κυανοβακτηρίου. Επομένως, σε αυτή την εργασία κρίθηκε απαραίτητο να μελετηθεί εκτενώς ο άγριος τύπος του κυανοβακτηρίου με σκοπό την εύρεση βέλτιστης συνθήκης ανάπτυξης με χρήση εμπλουτισμένου θαλασσινού νερού σαν θρεπτικό μέσο, προτού προχωρήσουμε στην εφαρμογή των συνθηκών αυτών στα μεταλλαγμένα στελέχη και να ελέγξουμε την παραγωγή. Το κεφάλαιο χωρίζεται σε δυο επιμέρους κεφάλαια με το πρώτο να αφορά στο αρχικό πείραμα για την εύρεση βέλτιστης συνθήκης ανάπτυξης για τον άγριο τύπο ανάμεσα σε έξι διαφορετικές, ενώ το δεύτερο κεφάλαιο αφορά στην εκτενή μελέτη της βέλτιστης συνθήκης με λήψη μετρήσεων για την ανάπτυξη και τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα του αγρίου τύπου του κυανοβακτηρίου.

2.3 Εύρεση βέλτιστης συνθήκης ανάπτυξης για τον άγριο τύπο του κυανοβακτηρίου *Synechocystis* sp. PCC 6803

2.3.1 Πειραματικό μέρος

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν των εταιρειών Merck, Sigma-Aldrich και Fisher Scientific. Για την παρασκευή των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό. Για τις μετρήσεις απορρόφησης και τη λήψη φασμάτων χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού της Shimadzu UV-2700. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των λογισμικών Origin και Microsoft Office Excel 2007.

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

2.3.1.1 Συνθήκες ανάπτυξης

Στο παρόν κεφάλαιο της συγκεκριμένης μελέτης χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος του αγρίου τύπου (WT) του κυανοβακτηρίου *Synechocystis* sp. PCC 6803. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν φωτοαυτότροφα σε υγρό θρεπτικό υλικό BG11 μέσα σε κωνικές φιάλες. Υπήρχε συνεχής παροχή ατμοσφαιρικού αέρα μέσω αντλίας προκειμένου να υπάρχει διαρκής τροφοδοσία CO₂ στα κύτταρα, έτσι ώστε να μπορούν να επιτελούν φωτοσύνθεση. Οι κωνικές φιάλες ήταν σφραγισμένες με πώμα πάνω στο οποίο είχαν προσαρμοστεί δύο σωλήνες (Εικόνα 2.1). Ο ένας από αυτούς ήταν βυθισμένος στην καλλιέργεια παρέχοντας τον αέρα σε αυτήν. Ο αέρας που εισερχόταν στην καλλιέργεια περνούσε πρώτα από κατάλληλο φίλτρο (0,2 μm) προκειμένου να αποφευχθούν μολύνσεις. Ο δεύτερος σωλήνας είχε μικρότερο μήκος και χρησιμοποιούνταν για την εκτόνωση των φιαλών και έτσι να υπάρχει ισορροπία πιέσεων στο σύστημα. Επιπλέον, το pH στο διάλυμα των καλλιιεργειών ήταν σταθερό (pH=7,5) με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος 25 mM NaH₂PO₄. Η ανάπτυξη των καλλιιεργειών και οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο

σταθερής θερμοκρασίας $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ με ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50 \mu\text{mol φωτονίων}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ με την χρήση λευκών (cool white) λαμπών φθορισμού. Οι υγρές καλλιέργειες αποτέλεσαν μητρικές καλλιέργειες για τη διεξαγωγή των πειραμάτων.



Εικόνα 2.1: Κωνικές φιάλες ανάπτυξης των κυανοβακτηρίων με τους δυο σωλήνες υποδοχής φιλτραρισμένου αέρα και εκτόνωσης αντίστοιχα σε ειδικά διαμορφωμένο θάλαμο.

Για την διατήρηση των στελεχών χρησιμοποιήθηκε 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). 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 |
|---|-------------|
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 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 ·7H ₂ O | 7,49 g/L |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 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 ₃ BO ₃ | 2,86 g/L |
| MnCl ₂ ·4H ₂ O | 1,82 g/L |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0,222 g/L |
| MoO ₃ | 0,399 g/L |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,079 g/L |
| Co (NO ₃) ₂ ·6H ₂ O | 0,0494 g/L |

Πίνακας 2.5. Συστατικά διαλύματος 1000x Ferric ammonium citrate.

| Συστατικά | Συγκέντρωση |
|-------------------------|--------------------------------|
| Ferric ammonium citrate | 600 mg/100 mL H ₂ O |

Πίνακας 2.6. Συστατικά διαλύματος 1000x Na₂CO₃.

| Συστατικά | Συγκέντρωση |
|---------------------------------|----------------------------|
| Na ₂ CO ₃ | 2 g/100mL H ₂ O |

Πίνακας 2.7. Συστατικά διαλύματος 1000x K₂HPO₄.

| Συστατικά | Συγκέντρωση |
|---------------------------------|-------------------------------|
| K ₂ HPO ₄ | 3,05 g/100mL H ₂ O |

2.3.1.2 Ανάπτυξη καλλιιεργειών σε βιοαντιδραστήρες για τη λήψη μετρήσεων

Προκειμένου να βρεθεί η βέλτιστη συνθήκη ανάπτυξης για το στέλεχος του αγρίου τύπου σε ότι αφορά στα θρεπτικά, χρησιμοποιήθηκαν έξι διαφορετικά θρεπτικά μέσα. Τα θρεπτικά υλικά για την συγκεκριμένη πειραματική διεργασία ήταν τα εξής:

1. BG11, 25 mM NaH₂PO₄ pH 7,5
2. BG11 σε θαλασσινό νερό, 25 mM NaH₂PO₄ pH 7,5
3. BG11 με το 1/2 της συγκέντρωσης αυτού, 25 mM NaH₂PO₄ pH 7,5
4. BG11 με το 1/2 της συγκέντρωσης αυτού σε θαλασσινό νερό, 25 mM NaH₂PO₄ pH 7,5
5. BG11 σε θαλασσινό νερό, 25 mM HEPES/NaOH pH 7,5
6. Συστατικά του BG11 σε θαλασσινό νερό, 25 mM HEPES/NaOH pH 7,5

Το πρώτο θρεπτικό αποτελεί το βασικό μέσο ανάπτυξης των κυανοβακτηρίων και για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε για την σύγκριση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τα υπόλοιπα θρεπτικά που χρησιμοποιήθηκαν σαν συνθήκη μάρτυρας. Για το δεύτερο θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε η συνταγή παρασκευής του BG11, μόνο που αντί απιονισμένο νερό χρησιμοποιήθηκε 100% θαλασσινό νερό. Στα θρεπτικά 3 και 4 χρησιμοποιήθηκαν οι μισές συγκεντρώσεις από την συνταγή του BG11 σε όλα τα συστατικά με συμπλήρωση του απαιτούμενου όγκου με απιονισμένο νερό και 100% θαλασσινό νερό αντίστοιχα. Για το πέμπτο θρεπτικό ακολουθήθηκε η ακριβής συνταγή για το BG11 σε θαλασσινό νερό με τη διαφορά πως για ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε 25 mM HEPES/NaOH, καθώς θέλουμε να αποφύγουμε τη δημιουργία αλάτων με τη χρήση φωσφορικών. Στο έκτο και τελευταίο θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκαν κάποια από τα συστατικά του BG11 που παρατηρήθηκαν ότι απουσιάζουν από το θαλασσινό νερό, έπειτα μελέτη του θαλασσινού νερού με ιοντική χρωματογραφία.

Όταν οι μητρικές καλλιέργειες έφτασαν στην εκθετική φάση, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 6000 x g για 10 min και επαναιωρήθηκαν σε μικρή ποσότητα από κάθε θρεπτικό μέσο. Έπειτα, 50 mL της αραιωμένης καλλιέργειας τοποθετήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα δύο φάσεων (υγρή/αέρια) (Εικόνα 2.2) με την τελική τιμή της οπτικής πυκνότητας (OD₇₃₀) να είναι 0,5. Ο βιοαντιδραστήρας έχει χωρητικότητα 100 mL, έχει ύψος 9,5 cm και διάμετρο 5 cm. Στη συνέχεια, κλείστηκε

με πλαστικό πώμα (septum), το οποίο σφραγίστηκε με την προσθήκη επιπλέον μεταλλικού πώματος. Ακολούθησε προσθήκη 20% v/v καθαρού CO₂ και το σύστημα αφέθηκε για ανάπτυξη σε περιστροφικό αναδευτήρα (shaker), ο οποίος ήταν τοποθετημένος σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 28 ± 1°C και με φωτισμό 50 μmol φωτονίων m⁻²·s⁻¹. Κάθε 48 h λαμβάνονταν μετρήσεις για διάστημα δέκα ημερών. Παράλληλα, κάθε 48 h γινόταν προσθήκη 10% CO₂.



Εικόνα 2.2: Βιοαντιδραστήρας δύο φάσεων (υγρή/αέρια) χωρητικότητας 100 mL, με ύψος 9,5 cm και διάμετρο 5 cm.

Η ημέρα αυτή αποτελούσε την ημέρα μηδέν για την έναρξη των πειραμάτων. Μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε δύο ημέρες για μια διάρκεια δέκα ημερών. Ο λόγος που αφέθηκαν δέκα ημέρες είναι διότι θέλαμε να δούμε σε βάθος χρόνου πως συμπεριφέρονται τα κύτταρα στις διάφορες συνθήκες. Επιπλέον, επειδή αυτό το πείραμα αποτελεί πείραμα για την εύρεση της βέλτιστης συνθήκης για την ανάπτυξη του αγρίου τύπου του *Synechocystis*, οι βιοαντιδραστήρες παρέμειναν κλειστοί καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και με μια αποστειρωμένη σύριγγα λαμβάνονταν ποσότητα για την λήψη μετρήσεων οπτικής πυκνότητας (OD₇₃₀) και φωτοσυνθετικών χρωστικών.

2.3.1.3 Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων - Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας στα 730nm (OD₇₃₀)

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 απορροφά το φωτοσύστημα I (PSI), δεν απορροφούν άλλοι

παράγοντες όπως παραδείγματος χάριν οι χρωστικές, συνεπώς η αύξηση της απορρόφησης υποδεικνύει πιο πυκνή καλλιέργεια, και συνεπώς μεγαλύτερη ανάπτυξη της [73].

2.3.1.4 Ποσοτικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών

Για την ποσοτικοποίηση των φωτοσυνθετικών χρωστικών, ποσότητα καλλιέργειας 1 mL φυγοκεντρήθηκε 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 φυγοκεντρήθηκε προκειμένου να απομακρυνθεί το ίζημα και μετρήθηκε η απορρόφηση του υπερκείμενου 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 [31]:

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

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

2.3.2 Αποτελέσματα και συζήτηση

2.3.2.1 Μελέτη της ανάπτυξης του αγρίου τύπου σε συνθήκες - Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας στα 730nm (OD₇₃₀)

Όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενη παράγραφο του τρέχοντος κεφαλαίου, βασιζόμενοι σε παλαιότερες εργασίες του εργαστηρίου μας, κατά τις οποίες έγινε είτε προσομοίωση του θαλασσινού νερού με αύξηση της αλατότητας του θρεπτικού, είτε χρήση 100% θαλασσινού νερού, προκειμένου να βρεθεί μια πιο οικονομική και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος, στραφήκαμε στη χρήση θαλασσινού νερού με κάποιες προσθήκες για την ακόμη καλύτερη ανάπτυξη των κυττάρων. Οι προσθήκες αφορούσαν στην παρασκευή θρεπτικών υλικών που να χρησιμοποιείται θαλασσινό νερό σαν μέσο, όμως να περιέχει είτε όλα τα συστατικά του BG11, που είναι και το κύριο θρεπτικό ανάπτυξης των κυανοβακτηρίων στο εργαστήριο, είτε κάποια από τα

συστατικά αυτού. Με αυτό τον τρόπο θέλαμε να αποφευχθεί το στρες, που προκαλούσε το σκέτο θαλασσινό νερό στα κύτταρα, όπως παρατηρήθηκε σε προηγούμενες μελέτες [72], αλλά και να βελτιωθεί η ανάπτυξη και κατ' επέκταση η παραγωγή β-φελλανδρενίου, όπως θα δούμε σε επόμενα κεφάλαια.

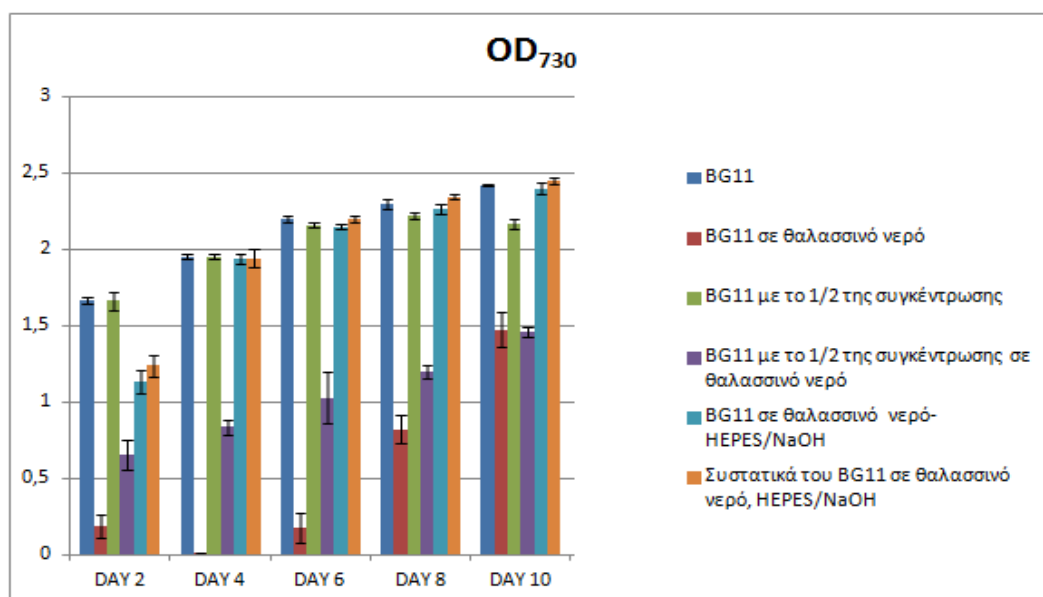
Στην περίπτωση όπου το θρεπτικό ήταν θαλασσινό νερό με κάποια συστατικά του BG11, προηγήθηκε ανάλυση με ιοντική χρωματογραφία στο θαλασσινό νερό, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στον πίνακα 2.8. Μέσα από την ανάλυση αυτή βρέθηκαν τα συστατικά που υπάρχουν στο BG11, όμως απουσιάζουν από το θαλασσινό νερό.

Πίνακας 2.8: Αποτελέσματα ιοντικής χρωματογραφίας σε δείγμα θαλασσινού νερού

| Ιόντα | Cl ⁻ | NO ₃ ⁻ | SO ₄ ²⁻ | Na ⁺ | K ⁺ | NH ₄ ⁺ | Mg ²⁺ | Ca ²⁺ |
|------------------|-----------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------|----------------|------------------------------|------------------|------------------|
| Ποσότητα σε mg/L | 16565,11 | 11,77 | 2262,45 | 8402,82 | 292,38 | 143,72 | 39869,14 | 771,19 |

Επομένως, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από την ιοντική χρωματογραφία με τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του BG11, τα συστατικά που βρέθηκαν ότι λείπουν από το θαλασσινό νερό είναι τα C₆H₈O₇·xFe₃⁺·yNH₃ (Ferric ammonium citrate), K₂HPO₄ και NaNO₃. Άρα, προστέθηκαν σε ποσότητες ίσες με αυτές που χρησιμοποιούνται στο BG11.

Στην εικόνα 2.3 φαίνεται η ανάπτυξη των κυττάρων του αγίου τύπου του *Synechocystis* στις συνθήκες που αναφέρθηκαν εκφραζόμενη ως οπτική πυκνότητα OD₇₃₀.



Εικόνα 2.3: Αποτελέσματα οπτικής πυκνότητας (OD_{730}) για το στέλεχος του αγρίου τύπου σε χρονικό διάστημα 10 ημερών παραμονής των καλλιιεργειών στους βιοαντιδραστήρες δύο φάσεων (υγρής/αέρας) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50 \mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, θερμοκρασία 28°C σε έξι διαφορετικές συνθήκες: σε θρεπτικό μέσο BG11 (μάρτυρας), BG11 σε θαλασσινό νερό, BG11 με το 1/2 της συγκέντρωσης αυτού σε απιονισμένο νερό, BG11 με το 1/2 της συγκέντρωσης αυτού σε θαλασσινό νερό, BG11 σε θαλασσινό νερό με HEPES/NaOH και συστατικά του BG11 σε θαλασσινό νερό με HEPES/NaOH.

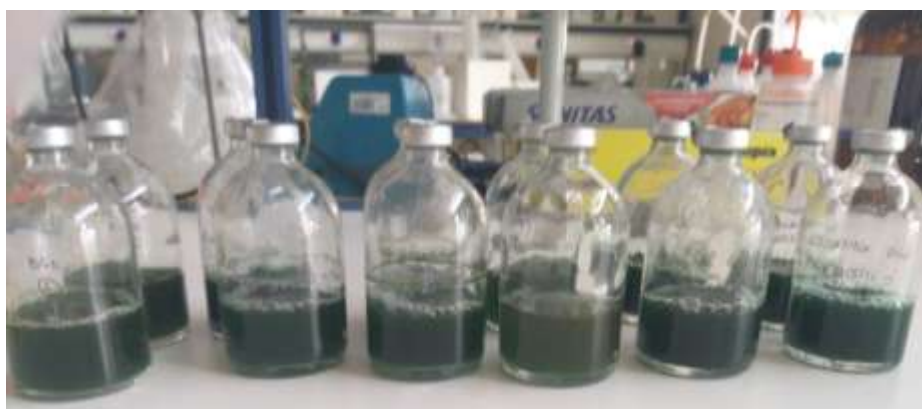
Όπως φαίνεται από την εικόνα 2.3 στην περίπτωση όπου το θρεπτικό μέσο είναι BG11 σε θαλασσινό με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικά, εξαιτίας του γεγονότος ότι παράγονται πολλά άλατα, ορατά και στην εικόνα 2.4, δεν είναι εύκολος ο σωστός προσδιορισμός της ανάπτυξης καθώς τα άλατα εμποδίζουν τη λήψη σωστής μέτρησης. Έτσι, φαίνεται από τις μετρήσεις απορρόφησης πολύ χαμηλές τιμές και ακόμα την τέταρτη μέρα η απορρόφηση είναι μηδενική. Από την έκτη μέρα κι έπειτα η ανάπτυξη αυξάνεται όμως αρκετά χαμηλότερα σε σχέση με το κανονικό θρεπτικό BG11. Επόμενη περίπτωση, όπου το θρεπτικό είναι BG11 με τη μισή συγκέντρωση των συστατικών του, η ανάπτυξη είναι σχεδόν ίδια με το control, όμως με την πάροδο των ημερών εξαιτίας του ότι μειώνονται τα θρεπτικά συστατικά από το μέσο, παρατηρείται μείωση της ανάπτυξης. Επιπλέον, όταν το θρεπτικό υλικό είναι η μισή συγκέντρωση των συστατικών του BG11 σε θαλασσινό νερό με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, παρατηρείται μειωμένη ανάπτυξη πάλι λόγω παρουσίας αλάτων, που δυσκολεύουν την λήψη μετρήσεων. Οι δυο τελευταίες περιπτώσεις όπου στην μεν πρώτη χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο BG11 σε θαλασσινό νερό με ρυθμιστικό

διάλυμα HEPES/NaOH και στη δεύτερη χρησιμοποιήθηκαν συστατικά του BG11 σε θαλασσινό νερό με ρυθμιστικό διάλυμα HEPES/NaOH, η ανάπτυξη φαίνεται να προσομοιάζει την συνθήκη μάρτυρα (BG11). Σε αυτές τις δυο περιπτώσεις δεν παράγονται άλατα (Εικόνα 2.4), καθώς έχει χρησιμοποιηθεί οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα.



Εικόνα 2.4: Φαινοτυπική απεικόνιση του αγρίου τύπου σε βιοαντιδραστήρες δύο φάσεων (υγρής/αέριας) σε έξι διαφορετικές συνθήκες: σε θρεπτικό μέσο BG11 (μάρτυρας), BG11 σε θαλασσινό νερό, BG11 με το 1/2 της συγκέντρωσης αυτού σε θαλασσινό νερό, BG11 με το 1/2 της συγκέντρωσης αυτού σε απιονισμένο νερό, BG11 σε θαλασσινό νερό με HEPES/NaOH και συστατικά του BG11 σε θαλασσινό νερό με HEPES/NaOH, την ημέρα δυο της πειραματικής διαδικασίας.

Φαινοτυπικά παρατηρήθηκε επίσης πως με την πάροδο των ημερών κι ενώ την δεύτερη ημέρα του πειράματος υπήρχε διαφορά μεταξύ των βιοαντιδραστήρων στο χρώμα (Εικόνα 2.4), την τελευταία ημέρα του πειράματος, υπήρχε μια ομοιομορφία. Σε όλες τις συνθήκες το χρώμα ήταν έντονο κυανοπράσινο (Εικόνα 2.5). Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει μια προσαρμογή των κυττάρων στις συνθήκες.

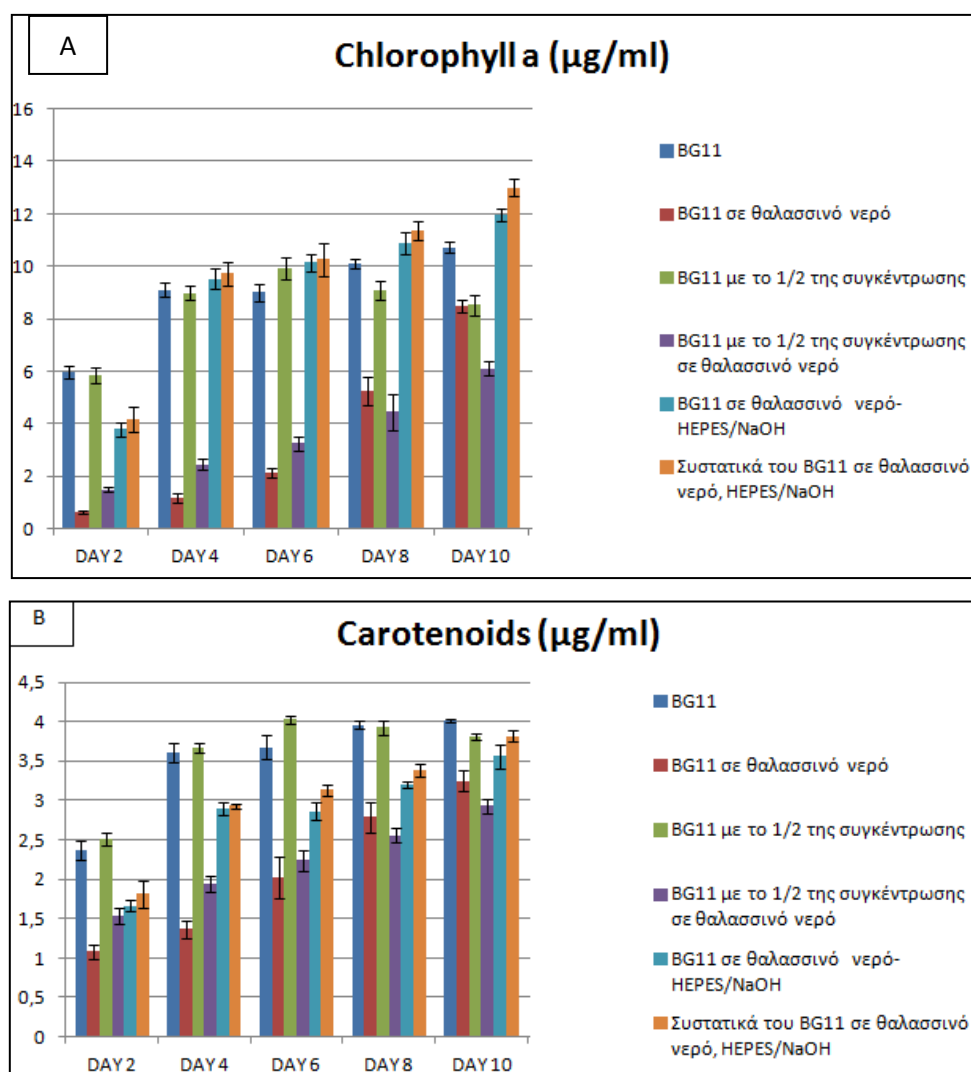


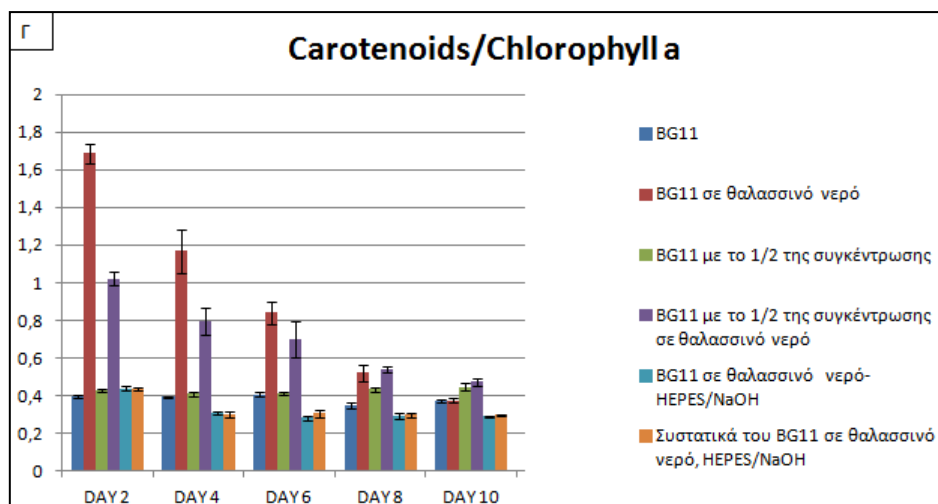
Εικόνα 2.5: Φαινοτυπική απεικόνιση του αγρίου τύπου σε βιοαντιδραστήρες δύο φάσεων (υγρής/αέριας) σε έξι διαφορετικές συνθήκες: σε θρεπτικό μέσο BG11 (μάρτυρας), BG11 σε

θαλασσινό νερό, BG11 με το 1/2 της συγκέντρωσης αυτού σε θαλασσινό νερό, BG11 με το 1/2 της συγκέντρωσης αυτού σε απιονισμένο νερό, BG11 σε θαλασσινό νερό με HEPES/NaOH και συστατικά του BG11 σε θαλασσινό νερό με HEPES/NaOH, την δέκατη ημέρα της πειραματικής διαδικασίας.

2.3.2.2 Μελέτη και ποσοτικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών

Τα αποτελέσματα του περιεχομένου των φωτοσυνθετικών χρωστικών στις δύο συγκεντρώσεις θαλασσινού νερού παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.6.





Εικόνα 2.6: Περιεχόμενο φωτοσυνθετικών χρωστικών του μεταλλαγμένου στελέχους του αγρίου τύπου σε χρονικό διάστημα 10 ημερών παραμονής των καλλιεργειών στους βιοαντιδραστήρες δύο φάσεων (υγρής/αέριας) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50 \mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, θερμοκρασία 28°C σε έξι διαφορετικές συνθήκες: σε θρεπτικό μέσο BG11 (μάρτυρας), BG11 σε θαλασσινό νερό, BG11 με το 1/2 της συγκέντρωσης αυτού σε απιονισμένο νερό, BG11 με το 1/2 της συγκέντρωσης αυτού σε θαλασσινό νερό, BG11 σε θαλασσινό νερό με HEPES/NaOH και συστατικά του BG11 σε θαλασσινό νερό με HEPES/NaOH. Οι χρωστικές εκφράστηκαν στις εικόνες A και B ως μg χρωστικής ανά ml καλλιέργειας και Γ ως Car/Chla.

Η συγκέντρωση χλωροφύλλης α και καροτενοειδών αντίστοιχα εκφράστηκαν σε μg ανά mL της καλλιέργειας (Εικόνα 2.6A) και (Εικόνα 2.6B). Στην εικόνα 2.6 Γ δίνεται ο λόγος καροτενοειδών ανά χλωροφύλλη. Παρατηρείται ότι η ποσότητα της χλωροφύλλης που παράγεται όταν σαν θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε BG11 σε θαλασσινό νερό και BG11 με τη μισή συγκέντρωση σε θαλασσινό νερό με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικά, είναι αρκετά μικρότερη σε σχέση με το μάρτυρα κατά τη διάρκεια ολόκληρου του πειράματος. Στις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα HEPES, αυτό που παρατηρείται είναι πως τη δεύτερη πειραματική μέρα η ποσότητα της χλωροφύλλης που παράγεται από τα κύτταρα είναι λίγο μικρότερη σε σχέση με το BG11. Μετά όμως από την τέταρτη πειραματική μέρα κι έπειτα, η ποσότητα αυξάνεται προσομοιάζοντας την ποσότητα στο BG11 και την δέκατη ημέρα φαίνεται να παράγει σε αυτές τις συνθήκες μεγαλύτερη ποσότητα από αυτό. Αυτό φανερώνει πως τα κύτταρα στις συνθήκες αυτές απαιτούν ένα χρονικό διάστημα για να προσαρμοστούν και έπειτα μπορούν και αναπτύσσονται με αρκετά γρήγορους ρυθμούς.

Στην περίπτωση των παραγόμενων καροτενοειδών παρατηρείται η ίδια τάση με τη χλωροφύλλη στις αντίστοιχες συνθήκες. Μόνη διαφορά το γεγονός ότι τα καροτενοειδή στις συνθήκες με ρυθμιστικό διάλυμα HEPES φτάνουν την τιμή της συνθήκης μάρτυρα την δέκατη ημέρα, χωρίς να την ξεπερνούν.

Τα αποτελέσματα μπορούν να φαίνονται επίσης από τον λόγο καροτενοειδών ανά χλωροφύλλη α (Εικόνα 2.6 Γ). Στις συνθήκες με BG11 σε θαλασσινό νερό και BG11 με τη μισή συγκέντρωση σε θαλασσινό νερό με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικά, ο λόγος είναι αρκετά αυξημένος, πράγμα που υποδηλώνει μεγαλύτερη παραγωγή καροτενοειδών σε αυτές τις συνθήκες. Πιθανότατα τα κύτταρα να υπόκεινται σε στρες εξαιτίας της παρουσίας αλάτων στην καλλιέργεια κι άρα να προσπαθούν να προστατευθούν παράγοντας μεγαλύτερα ποσοστά καροτενοειδών και συγκεκριμένα τη πορτοκαλί καροτενοειδή πρωτεΐνη (Orange Carotenoid Protein, OCP) [74]. Στις υπόλοιπες συνθήκες ο λόγος μεταξύ των δυο χρωστικών είναι συγκρίσιμος.

2.4 Μελέτη του αγρίου τύπου του κυανοβακτηρίου *Synechocystis* sp. PCC 6803 στις βέλτιστες συνθήκες

2.4.1 Πειραματικό μέρος

2.4.1.1 Συνθήκες ανάπτυξης

Στο παρόν κεφάλαιο της συγκεκριμένης μελέτης χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος του αγρίου τύπου (WT) του κυανοβακτηρίου *Synechocystis* sp. PCC 6803. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν φωτοαυτότροφα σε υγρό θρεπτικό υλικό BG11 μέσα σε κωνικές φιάλες. Υπήρχε συνεχής παροχή ατμοσφαιρικού αέρα μέσω αντλίας προκειμένου να υπάρχει διαρκής τροφοδοσία CO₂ στα κύτταρα, έτσι ώστε να μπορούν να επιτελούν φωτοσύνθεση. Επιπλέον, το pH στο διάλυμα των καλλιεργειών ήταν σταθερό (pH=7,5) με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος 25 mM NaH₂PO₄. Η ανάπτυξη των καλλιεργειών και οι πειραματικές διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 28±1°C με 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 σκευή που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή καλλιεργειών

αποστειρώθηκαν προηγουμένως σε αυτόκαυστο στους 120°C για 20-30 min. Όλα τα πειράματα παρασκευής καλλιεργείων διεξήχθησαν σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar flow hood) παρουσία φλόγας, αφού είχε προηγουμένως αποστειρωθεί με αιθανόλη και λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας.

2.4.1.2 Ανάπτυξη καλλιεργείων σε βιοαντιδραστήρες για τη λήψη μετρήσεων

Από τις συνθήκες που μελετήθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο και που φάνηκε να προσομοιάζουν με τον καλύτερο τρόπο τη συνθήκη μάρτυρα, ήταν εκείνες με όλα τα συστατικά του BG11 σε θαλασσινό νερό και μερικά από τα συστατικά του BG11 σε θαλασσινό νερό και οι δύο με ρυθμιστικό HEPES/NaOH. Επομένως, αυτές ήταν και οι συνθήκες που επιλέχθηκαν να μελετηθούν εκτενέστερα για τον άγριο τύπο του κυανοβακτηρίου στο τρέχον κεφάλαιο. Παράλληλα με αυτές τις συνθήκες επιλέχθηκε και σαν θρεπτικό μέσο σκέτο θαλασσινό νερό, του οποίου το pH ρυθμίστηκε με το ίδιο ρυθμιστικό (HEPES/NaOH). Αρχικά, το pH του θαλασσινού νερού μετρήθηκε περίπου στο 7,9. Σε παλαιότερη εργασία του εργαστηρίου μας είχε μελετηθεί η συνθήκη αυτή σε μεταλλαγμένο στέλεχος [72], και τώρα μελετήθηκε ταυτόχρονα με τις υπόλοιπες συνθήκες για τον άγριο τύπο, προκειμένου να έχουμε συγκρίσιμα αποτελέσματα, καθώς επίσης το τρέχον πείραμα διήρκησε δέκα ημέρες. Επομένως, οι συνθήκες που μελετήθηκαν στο κεφάλαιο αυτό ήταν οι εξής:

1. BG11, 25 mM NaH₂PO₄ pH 7,5
2. 100% θαλασσινό νερό, 25mM HEPES/NaOH pH 7,5
3. BG11 σε θαλασσινό νερό, 25 mM HEPES/NaOH pH 7,5
4. Συστατικά του BG11 σε θαλασσινό νερό, 25 mM HEPES/NaOH pH 7,5

Όταν οι μητρικές καλλιέργειες έφτασαν στην εκθετική φάση, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις 6000 x g για 10 min και επαναιωρήθηκαν σε μικρή ποσότητα από κάθε θρεπτικό μέσο. Έπειτα, 50 mL της αραιωμένης καλλιέργειας τοποθετήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα δύο φάσεων (υγρή/αέρια) με την τελική τιμή της οπτικής πυκνότητας (OD₇₃₀) να είναι 0,5. Ο βιοαντιδραστήρας έχει χωρητικότητα 100 mL, έχει ύψος 9,5 cm και διάμετρο 5 cm. Στη συνέχεια, κλείστηκε με πλαστικό πώμα (septum), το οποίο σφραγίστηκε με την προσθήκη επιπλέον μεταλλικού πώματος.

Ακολούθησε προσθήκη 20% v/v καθαρού CO₂ και το σύστημα αφέθηκε για ανάπτυξη σε περιστροφικό αναδευτήρα (shaker), ο οποίος ήταν τοποθετημένος σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 28 ±1°C και με φωτισμό 50 μmol φωτονίων m⁻²·s⁻¹. Κάθε 48 h λαμβάνονταν μετρήσεις στο διάστημα των δέκα ημερών. Παράλληλα, κάθε 48 h γινόταν προσθήκη 10% CO₂.

2.4.1.3 Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων - Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας στα 730nm (OD₇₃₀)

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

2.4.1.4 Λύση κυττάρων για την ποιοτική μελέτη φωτοσυνθετικών χρωστικών

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 =8,0. Η λύση των κυττάρων επιτεύχθηκε με τη χρήση υάλινων σφαιριδίων 0,5 mm (glass beads), έπειτα από επαναλαμβανόμενους κύκλους, 5 min μεταξύ ανάδευσης στο vortex και επώασης σε πάγο, για 30 min συνολικά. Πριν από τη λύση των κυττάρων προστέθηκε στο διάλυμα αναστολέας πρωτεασών PMSF. Τα άσπαστα κύτταρα και τα κυτταρικά απόβλητα απορρίφθηκαν μετά από φυγοκέντριση στις 3500 rpm για 3 min. Το υπερκείμενο περιείχε τις χρωστικές.

2.4.1.5 Ποιοτική μελέτη φωτοσυνθετικών χρωστικών

Για την ποιοτική μελέτη του περιεχομένου των φωτοσυνθετικών χρωστικών λήφθηκε φάσμα στο λύμα των κυττάρων, που λήφθηκε έπειτα από κατεργασία των καλλιιεργειών glass beads, σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UV-2700, Shimadzu. Η χλωροφύλλη-α εμφανίζει κορυφές στα 680 nm και 435 nm, η φυκοκυανίνη στα 625 nm και τα καροτενοειδή στα 470 nm [75].

2.4.1.6 Ποσοτικός προσδιορισμός του περιεχομένου των φωτοσυνθετικών χρωστικών

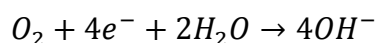
Για την ποσοτικοποίηση των φωτοσυνθετικών χρωστικών, ποσότητα καλλιέργειας 1 mL φυγοκεντρήθηκε στα 1000 x g για 1 min σε φυγόκεντρο Eppendorf και έπειτα από την απόρριψη του υπερκείμενου, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1 mL 100% μεθανόλης. Έπειτα από επώαση 10-15 min στο σκοτάδι, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε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

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

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

2.4.1.7 Πολαρογραφικός προσδιορισμός ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου

Η μέτρηση του ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου πραγματοποιήθηκε με χρήση ενός επιλεκτικού ηλεκτροδίου οξυγόνου τύπου Clark [76]. 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:



Για τις μετρήσεις έκλυσης οξυγόνου, 10 mL καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκαν 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 NaHCO₃, 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 υπέρυθη ακτινοβολία. Τέλος, το φως διήλθε από ένα κόκκινο φίλτρο, επιτρέποντας μόνο τα επιθυμητά μήκη κύματος να φτάσουν στο δείγμα [77]. Η μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα καταγράφηκε σε ένταση φωτισμού $500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ από μία λάμπα βολφραμίου για χρονικό διάστημα 60 s και τελικά εκφράστηκε σε $\text{mmol O}_2 (\text{mol Chl})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

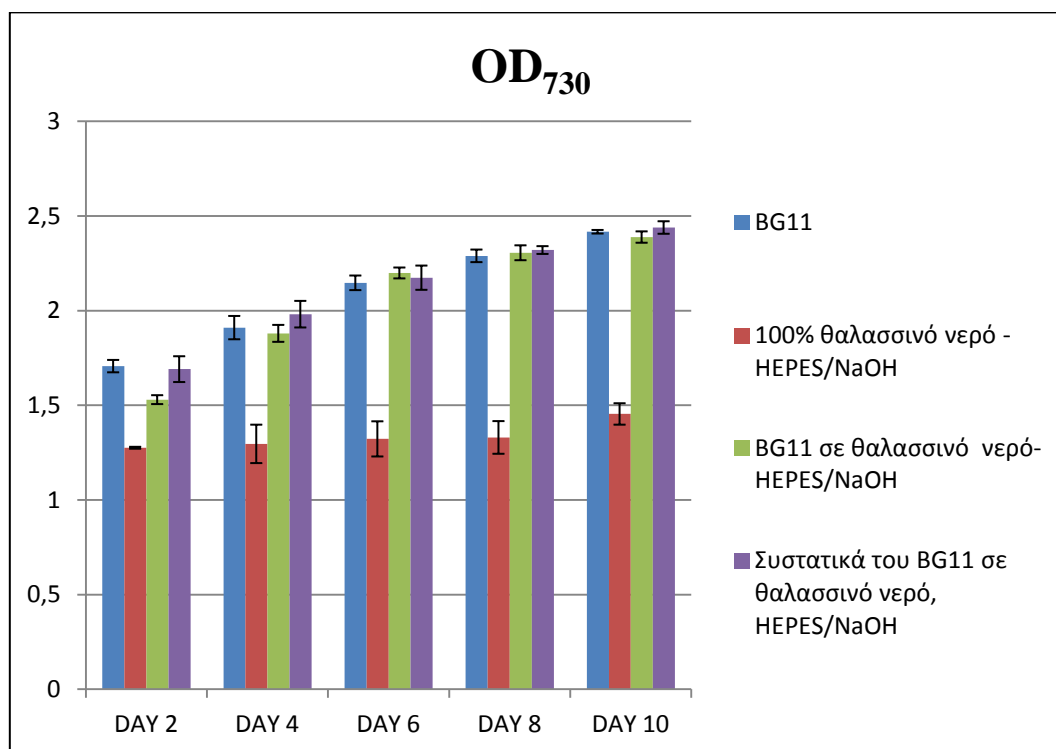
2.4.1.8 Μελέτη της μορφολογίας του μικροοργανισμού με χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM)

Για την παρατήρηση με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, ποσότητα καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε σε μία φυγόκεντρο *Eppendorf Centrifuge 5412* για 5 min. Το ίζημα υπέστη δύο δεκάλεπτες πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα διμεθυλαρσινικού νατρίου (sodium cacodylate buffer, SCB) συγκέντρωσης 0,1 M και $\text{pH} = 7,4$. Έπειτα μονιμοποιήθηκε με χρήση διαλύματος 2,5% w/v γλουταραλδεΐδης (GDA) σε διάλυμα SCB συγκέντρωσης 0,08 M και $\text{pH} = 7,4$ για 45 min. Οι μονιμοποιητές απομακρύνθηκαν με δύο δεκάλεπτες πλύσεις με διάλυμα SCB 0,1 M και $\text{pH} = 7,4$. Έπειτα τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε φίλτρο Whatman 0,2 μm και υπέστησαν αφυδάτωση χρησιμοποιώντας διαδοχικές δεκάλεπτες πλύσεις με 30%, 50%, 70%, 90% και 100% (v/v) αιθανόλη. Κατά τη διάρκεια της κάθε πλύσης τα δείγματα φυλάσσονταν σε θερμοκρασία 4°C. Έπειτα πλύθηκαν με ξηρή αιθανόλη για 10 min και υπέστησαν ξήρανση με χρήση μίας συσκευής ξήρανσης κρίσιμου σημείου του διοξειδίου του άνθρακα (BAL-TEC, CPD 030 Critical Point Dryer) προκειμένου να αφυδατωθούν πλήρως. Έπειτα τα φίλτρα επικολλήθηκαν σε ύαλο με χρήση ταινίας διπλής όψεως και επικαλύφθηκαν με πάχος 10 nm χρυσό με χρήση ενός Sputter Coater (SCD 050) της BAL-TEC προκειμένου να γίνουν ηλεκτρικά αγώγιμα. Η παρατήρηση έγινε σε JEOL JSM-6390LV Scanning Electron Microscope σε διαφορά δυναμικού δέσμησης ηλεκτρονίων 20 kV από όπου τραβήχτηκαν φωτογραφίες.

2.4.2 Αποτελέσματα και συζήτηση

2.4.2.1 Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων - Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας στα 730nm (OD₇₃₀)

Στην εικόνα 2.7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανάπτυξης του αγρίου τύπου του *Synechocystis*, μέσω του προσδιορισμού της οπτικής πυκνότητας στα 730 nm (OD₇₃₀).



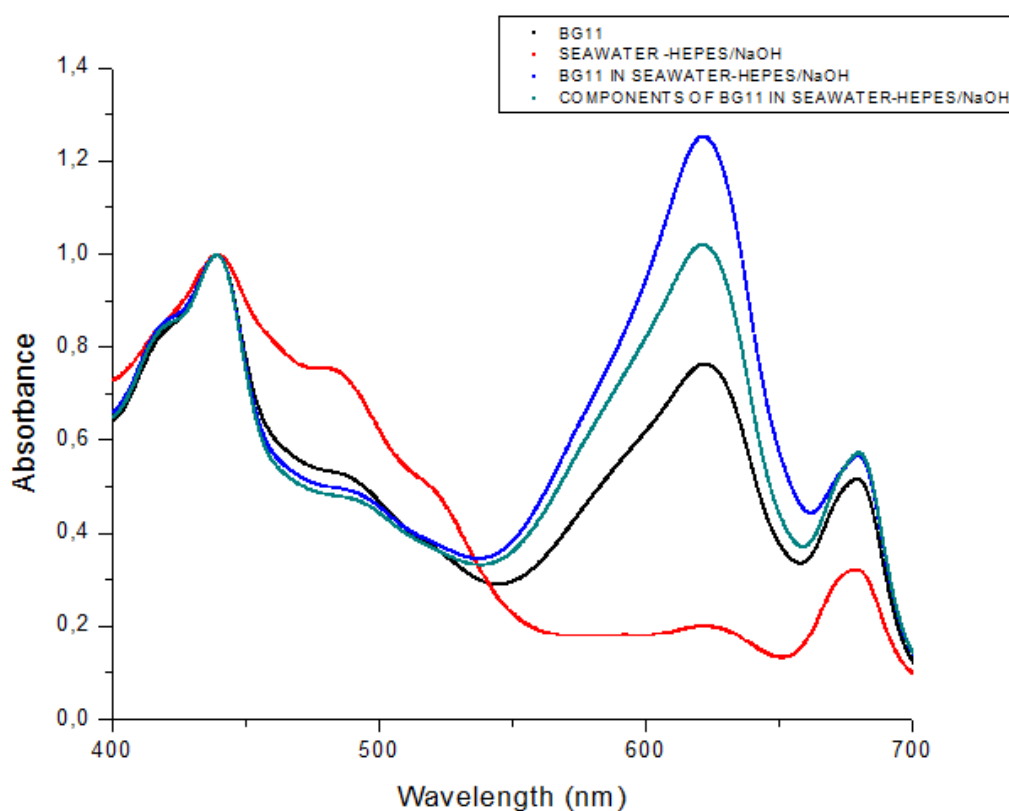
Εικόνα 2.7: Αποτελέσματα οπτικής πυκνότητας (OD₇₃₀) για το στέλεχος του αγρίου τύπου σε χρονικό διάστημα 10 ημερών παραμονής των καλλιεργειών στους βιοαντιδραστήρες δύο φάσεων (υγρής/αέρας) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων · m⁻² · s⁻¹, θερμοκρασία 28°C σε τέσσερις διαφορετικές συνθήκες: σε θρεπτικό μέσο BG11 (μάρτυρας), 100% θαλασσινό νερό με HEPES/NaOH, BG11 σε θαλασσινό νερό με HEPES/NaOH και συστατικά του BG11 σε θαλασσινό νερό με HEPES/NaOH.

Όπως παρατηρήθηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο στις συνθήκες με θρεπτικό μέσο BG11 σε θαλασσινό νερό και συστατικά του BG11 σε θαλασσινό νερό με ρυθμιστικό HEPES/NaOH, η ανάπτυξη των κυττάρων του αγρίου τύπου είναι ικανοποιητικά συγκρίσιμη με την αντίστοιχη ανάπτυξη στη συνθήκη μάρτυρα σε όλες τις ημέρες μετρήσεων κατά τη διάρκεια των δέκα ημερών του πειράματος. Στην περίπτωση όπου σε θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε 100% θαλασσινό νερό, με μόνη προσθήκη το ρυθμιστικό διάλυμα, παρατηρήθηκε μειωμένη ανάπτυξη των κυττάρων.

Πιθανότατα αυτό συμβαίνει επειδή λείπουν από το θρεπτικό μέσο συστατικά που είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους.

2.4.2.2 Ποιοτική μελέτη φωτοσυνθετικών χρωστικών

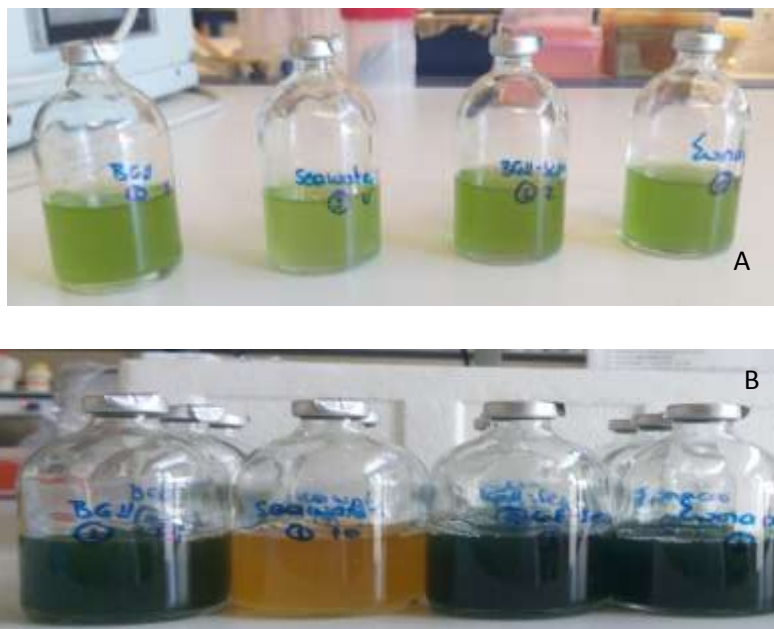
Η ποιοτική μελέτη των χρωστικών του αγρίου τύπου του κυανοβακτηρίου *Synechocystis* sp. PCC 6803 πραγματοποιήθηκε με τη λήψη φάσματος λυμένων κυττάρων στην περιοχή του ορατού φάσματος (400-700 nm), όπως φαίνεται στην εικόνα 2.8.



Εικόνα 2.8: Ολικό φάσμα λυμένων κυττάρων στον άγριο τύπο του κυανοβακτηρίου *Synechocystis* sp. PCC 6803 την έκτη ημέρα του πειράματος. Οι κορυφές της χλωροφύλλης *a* διακρίνονται στα μήκη κύματος 435 nm και 680 nm, των καροτενοειδών στα 470 nm και της φυκοκυανίνης στα 625 nm.

Στην Εικόνα 2.8 παρουσιάζονται τα φάσματα των λυμάτων του αγρίου τύπου, τα οποία λήφθηκαν την έκτη ημέρα του πειράματος. Πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση ως προς την κορυφή της χλωροφύλλης *a* στα 435 nm. Διακριτές είναι οι κορυφές της χλωροφύλλης *a* στα 435 nm και 680 nm σε όλες τις περιπτώσεις των συνθηκών, όπως και των καροτενοειδών στα 470 nm. Στην περίπτωση των καροτενοειδών, παρατηρήθηκε αυξημένη κορυφή στην περίπτωση του 100% θαλασσινού νερού (κόκκινη γραμμή). Πράγμα το οποίο περιμέναμε καθώς τα

κύτταρα προκειμένου να προστατευθούν εκφράζουν το γονίδιο *slr1963* το οποίο εκφράζει την πορτοκαλί καροτενοειδή πρωτεΐνη (Orange Carotenoid Protein, OCP) (Παράγραφος 1.6). Με τον τρόπο αυτό οι καλλιέργειες αποκτούν το χαρακτηριστικό πορτοκαλί χρώμα, το οποίο διακρίνεται και στην Εικόνα 2.9 Β.



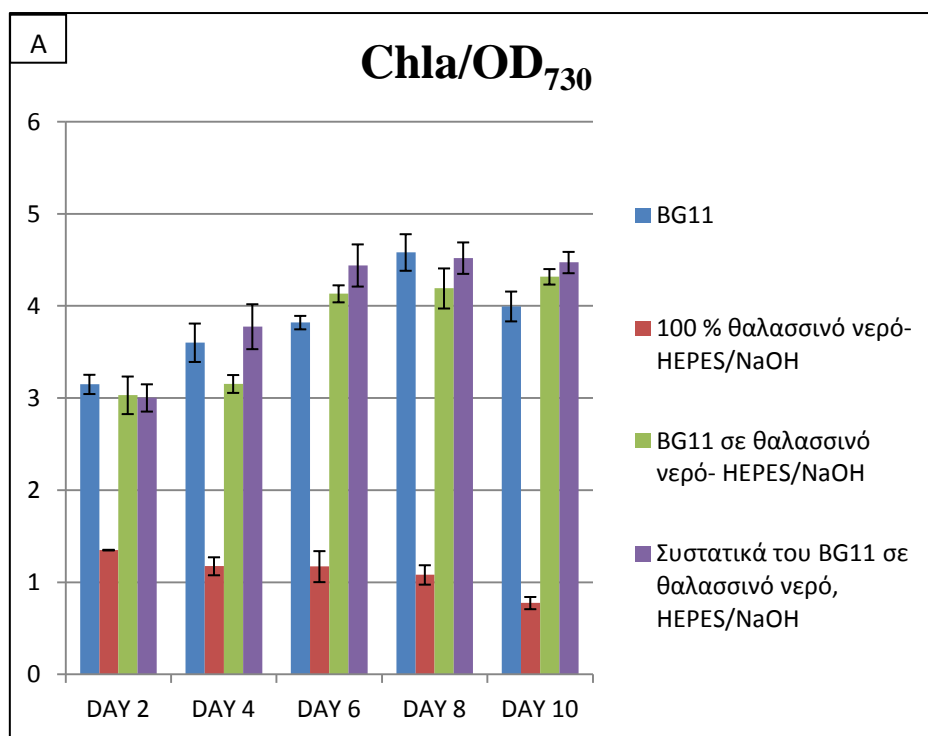
Εικόνα 2.9: Φαινοτυπική αντιστοιχία των συνθηκών 1. BG11, 2. 100% θαλασσινό νερό, 3. BG11 σε θαλασσινό νερό, 4. Συστατικά του BG11 σε θαλασσινό νερό, την ημέρα 0 (A) και την ημέρα 10 (B) του πειράματος.

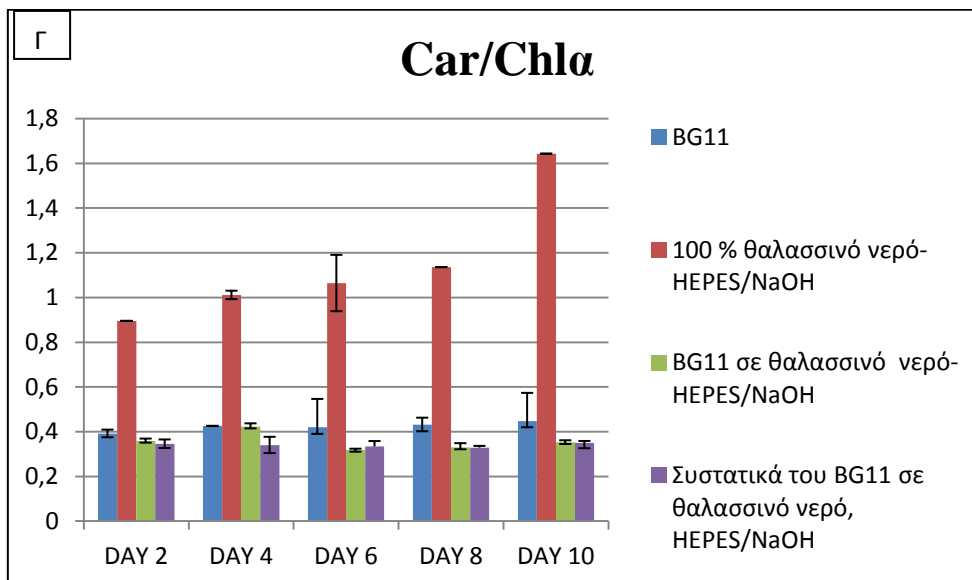
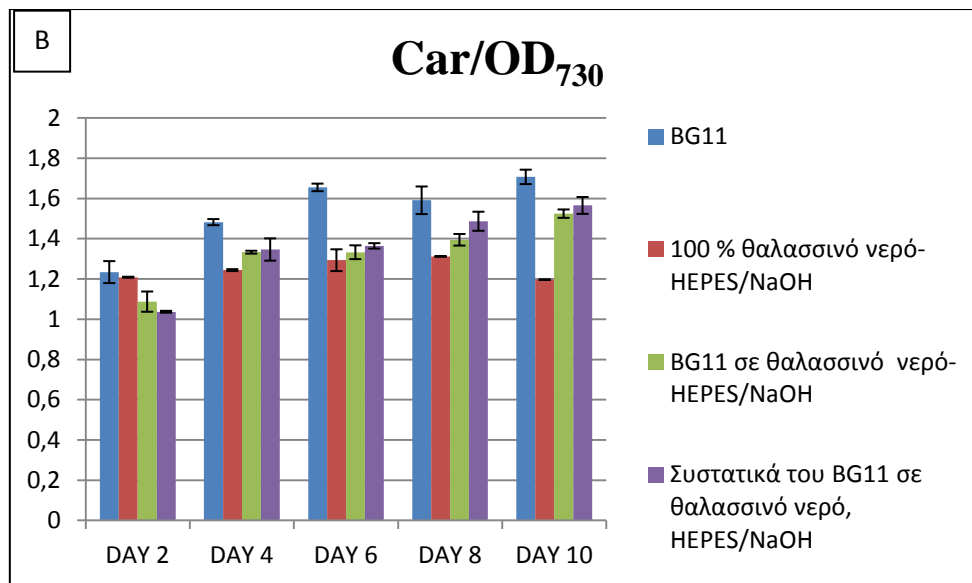
Η κορυφή στα 625 nm που εμφανίζεται στον άγριο τύπο είναι ορατή σε όλες τις περιπτώσεις, πλην του κόκκινου. Στην περίπτωση του σκέτου θαλασσινού νερού η κορυφή της φυκοκυανίνης παρατηρείται να είναι μικρότερη, καθώς σε αυτή τη συνθήκη τα κύτταρα βρίσκονται σε στρες και προσπαθούν να προστατευθούν, παράγοντας περισσότερα καροτενοειδή και όχι φυκοκυανίνη, ενώ πιθανότατα η κορυφή αυτή να αφορά στην αλλόφυκοκυανίνη ως μόνη χρωστική στα φυκοχολοσώματα. Στις περιπτώσεις των συνθηκών BG11 σε θαλασσινό νερό και συστατικά του BG11 σε θαλασσινό νερό (κορυφές μπλε και γαλάζιο αντίστοιχα), η κορυφή της φυκοκυανίνης είναι αρκετά υψηλότερη, το οποίο βρέθηκε βιβλιογραφικά πως οφείλεται σε αυξημένα επίπεδα αζώτου και αλατότητας στο θρεπτικό μέσο [78-80]. Το γεγονός ότι παράγονται αρκετά μεγαλύτερες ποσότητες φυκοκυανίνης είναι αρκετά σημαντικό πλεονέκτημα, καθώς η φυκοκυανίνη έχει αρκετές εφαρμογές στη βιολογία, τη βιοτεχνολογία, τα τρόφιμα και τη φαρμακευτική. Χρησιμοποιείται σαν χρωστική στα τρόφιμα, τα ποτά, τα καλλυντικά, σαν παράγοντας φθορισμού, σαν

συντηρητικό τροφίμων, αντιοξειδωτικό, στη φαρμακευτική λόγω της αντιφλεγμονώδους, αντιοξειδωτικής, αντικαρκινικής, ηπατοπροστατευτικής, νευροπροστατευτικής και υποχοληστερολαιμικής δραστηριότητας του [81-85].

2.4.2.3 Μελέτη του ποσοτικού προσδιορισμού φωτοσυνθετικών χρωστικών

Στην Εικόνα 2.10 συγκρίθηκαν οι φωτοσυνθετικές χρωστικές του αγρίου τύπου στις διάφορες συνθήκες τόσο μεταξύ τους, όσο και με την συνθήκη μάρτυρα. Στην Εικόνα 2.10 Α και Β παρουσιάζονται αντίστοιχα η χλωροφύλλη α και τα καροτενοειδή εκφρασμένα ανά την ανάπτυξη των κυττάρων σε οπτική πυκνότητα OD_{730} . Επιπλέον, λόγος καροτενοειδών ανά χλωροφύλλη παρουσιάζεται στην Εικόνα 2.10 Γ.





Εικόνα 2.10: Περιεχόμενο φωτοσυνθετικών χρωστικών του αγρίου τύπου των καλλιιεργειών *Synechocystis* sp. PCC 6803 σε διάρκεια πειράματος δέκα ημερών, έπειτα από ανάπτυξη στους βιοαντιδραστήρες διπλής φάσης (αέριας/υγρής) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50 \mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ και θερμοκρασία 28°C . Σε όλες τις συνθήκες οι χρωστικές εκφράστηκαν Α και Β ως μg χρωστικής ανά OD_{730} και Γ ως Car/Chla .

Η ποσότητα χλωροφύλλης και καροτενοειδών αντίστοιχα εκφράστηκαν ανά την οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας, η οποία αποτελεί δείκτη της ανάπτυξης του οργανισμού (Εικόνα 2.10 Α) και (Εικόνα 2.10 Β). Στην εικόνα 2.10 Γ δίνεται ο λόγος καροτενοειδών ανά χλωροφύλλη a . Παρατηρείται στις δύο συνθήκες με BG11 και συστατικά του BG11 σε θαλασσινό νερό ότι η χλωροφύλλη είναι στα ίδια επίπεδα σε σχέση με τις κανονικές συνθήκες ανάπτυξης σε θρεπτικό μέσο BG11 σε όλες τις ημέρες του πειράματος, όπως ήδη φάνηκε και από το προηγούμενο κεφάλαιο.

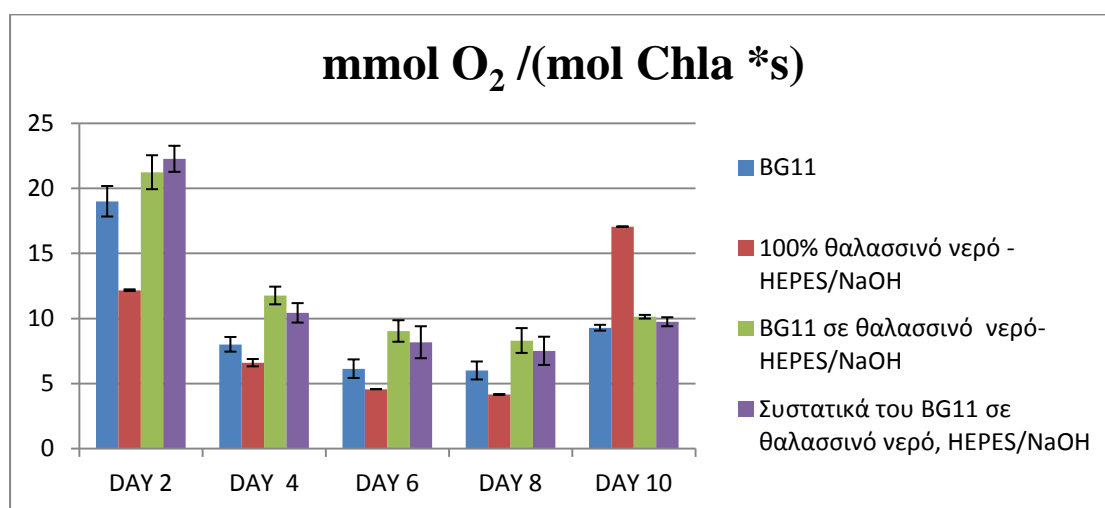
Αντιθέτως, στη συνθήκη με 100% θαλασσινό νερό οι τιμές της χλωροφύλλης είναι κατά πολύ μειωμένες.

Επιπρόσθετα, τα καροτενοειδή εμφανίζονται ελαφρώς μειωμένα στις συνθήκες με BG11 και συστατικά του BG11 σε θαλασσινό νερό σε σχέση με τη συνθήκη μάρτυρα. Στην περίπτωση του σκέτου θαλασσινού νερού τα καροτενοειδή είναι σχετικά υψηλά με τις τιμές να φτάνουν αρκετά κοντά με αυτές του μάρτυρα.

Μελετώντας τον λόγο καροτενοειδών προς χλωροφύλλη, στην περίπτωση του σκέτου θαλασσινού νερού ο λόγος είναι αρκετά αυξημένος, που σημαίνει πως τα καροτενοειδή που παράγονται είναι πολύ περισσότερα από την χλωροφύλλη, όπως έχει ήδη σχολιαστεί στην παράγραφο 2.4.2.2. Στις άλλες δυο συνθήκες ο λόγος είναι αρκετά συγκρίσιμος με τον αντίστοιχο στη συνθήκη μάρτυρα. Σημαντική είναι όμως η παρουσία και των δύο φωτοσυνθετικών χρωστικών στις δύο διαφορετικές συνθήκες.

2.4.2.4 Πολαρογραφικός προσδιορισμός του ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου

Η φωτοσυνθετική δραστηριότητα του μικροοργανισμού έπειτα από ανάπτυξη του στις παραπάνω συνθήκες, συγκρίθηκε με τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα έπειτα από ανάπτυξη του στο θρεπτικό μέσο BG11 (Εικόνα 2.13).

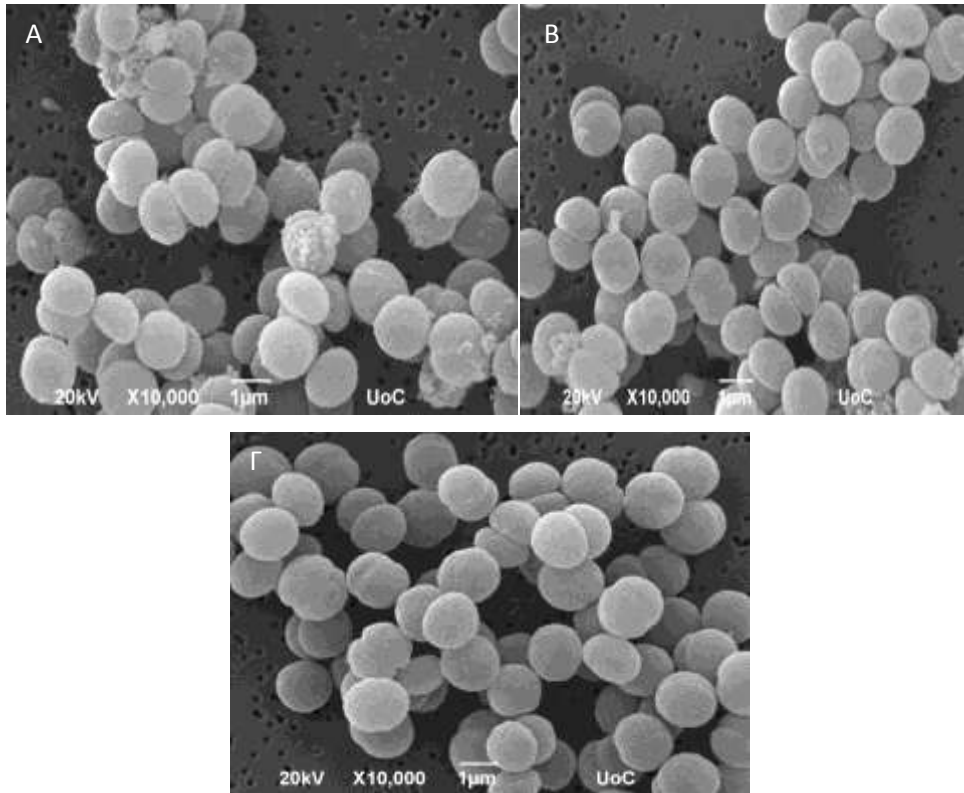


Εικόνα 2.11: Πολαρογραφικός προσδιορισμός παραγωγής οξυγόνου για το στέλεχος του αγρίου τύπου σε πείραμα διάρκειας δέκα ημερών παραμονής των καλλιιεργειών στους βιοαντιδραστήρες δύο φάσεων (υγρής/αέριος) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50 \mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, θερμοκρασία 28°C σε τέσσερις διαφορετικές συνθήκες: σε θρεπτικό μέσο BG11 (μάρτυρας), 100% θαλασσινό νερό, BG11 σε θαλασσινό νερό και συστατικά του BG11 σε θαλασσινό νερό.

Οι μετρήσεις έδειξαν ότι το στέλεχος του αγρίου τύπου σε συνθήκες με σκέτο θαλασσινό νερό και σε θαλασσινό νερό με όλα τα συστατικά του BG11 ή κάποια από αυτά, εξακολουθεί να διαθέτει την ικανότητα παραγωγής οξυγόνου μέσω της φωτοσυνθετικής διαδικασίας (Εικόνα 2.11) σε όλες τις ημέρες μετρήσεων στη διάρκεια των δέκα ημερών του πειράματος. Στην περίπτωση του σκέτου θαλασσινού νερού το στέλεχος έχει μειωμένη παραγωγή όλες τις ημέρες, ενώ παρατηρείται μια απότομη αύξηση την τελευταία, δέκατη ημέρα του πειράματος. Στις άλλες δυο συνθήκες ο ρυθμός παραγωγής οξυγόνου είναι πολύ κοντά σε τιμές με τον μάρτυρα σε όλες τις ημέρες των μετρήσεων και κάποιες ημέρες τον ξεπερνά ελάχιστα. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στο γεγονός ότι το κυανοβακτήριο αυτό, σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, αυξάνει τον αριθμό των κέντρων αντίδρασης στο φωτοσύστημα I, αυξάνοντας το ρυθμό της φωτοσύνθεσής του [86]. Τη δέκατη ημέρα σε όλες τις συνθήκες παρατηρείται αύξηση του ρυθμού παραγωγής οξυγόνου, ενώ ξεφεύγει από την πτωτική τάση που είχε από τη δεύτερη ημέρα μέχρι και την όγδοη.

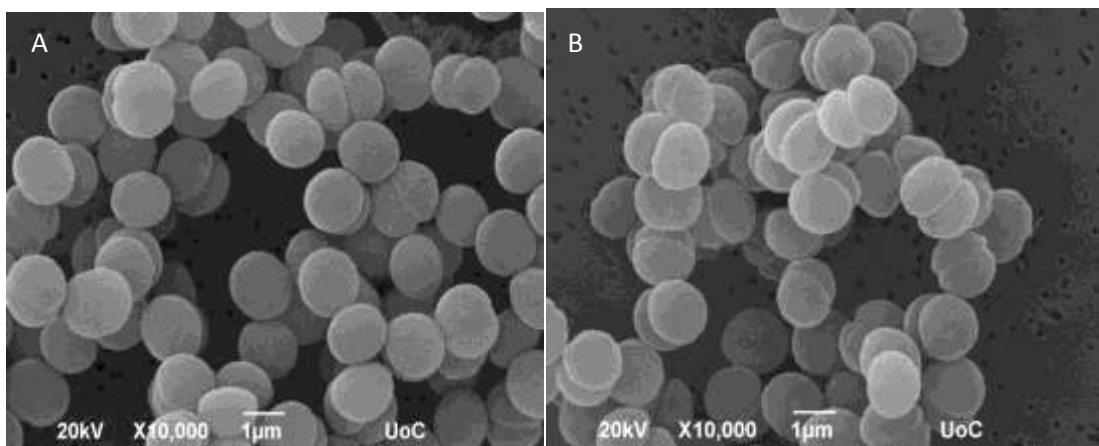
2.4.2.5 Μελέτη της μορφολογίας του μικροοργανισμού με χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM)

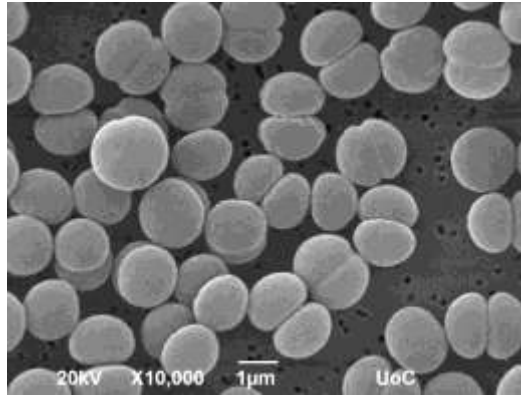
Κατά τη διάρκεια των δέκα ημερών του πειράματος λήφθηκαν κάθε δεύτερη ημέρα εικόνες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, προκειμένου να γίνει παρατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων στις συνθήκες BG11 που είναι η συνθήκη μάρτυρα, σε 100% θαλασσινό νερό και στην περίπτωση του θρεπτικού μέσου όπου περιέχει συστατικά του BG11 σε θαλασσινό νερό. Στις παρακάτω εικόνες (Εικόνες 2.12-2.13) παρουσιάζονται οι λήψεις από τις ημέρες δυο και δέκα.



Εικόνα 2.12: Λήψη εικόνων από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης για τον άγριο τύπο την δεύτερη ημέρα του πειράματος στις συνθήκες BG11 -μάρτυρας (A), σε 100 % θαλασσινό νερό (B) και σε θαλασσινό νερό με συστατικά του BG11 (Γ).

Αυτό που παρατηρείται από τις εικόνες του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης την δεύτερη ημέρα του πειράματος, είναι πως για το στέλεχος του αγρίου τύπου δεν υπάρχει κάποια επίδραση στη μορφολογία των κυττάρων μεταξύ των συνθηκών. Στις συνθήκες με θαλασσινό νερό είτε σκέτο είτε με συστατικά του BG11 (Εικόνες 2.12 B και 2.12 Γ) παρατηρείται ξεκάθαρα το σφαιρικό σχήμα των κυττάρων, το οποίο διατηρείται συγκρίνοντας με τις κανονικές συνθήκες ανάπτυξης - BG11.





Εικόνα 2.13: Λήψη εικόνων από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης για τον άγριο τύπο την δέκατη ημέρα του πειράματος στις συνθήκες BG11 -μάρτυρας (Α), σε 100 % θαλασσινό νερό (Β) και σε θαλασσινό νερό με συστατικά του BG11 (Γ).

Στις Εικόνες 2.13 Β και Γ παρουσιάζονται οι εικόνες που λήφθηκαν από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης τη δέκατη ημέρα του πειράματος για τις συνθήκες 100% θαλασσινό νερό και θαλασσινό με συστατικά του BG11 αντίστοιχα. Από τις εικόνες αυτές δεν παρατηρούνται ακόμα και μετά από δέκα ημέρες του πειράματος αλλαγές στην μορφολογία των κυττάρων του αγρίου τύπου συγκρίνοντας με την εικόνα που λήφθηκε για την συνθήκη μάρτυρα (Εικόνα 2.13 Α).

Σε παλιότερη εργασία που είχε μελετηθεί το στέλεχος $\Delta crp+crcB*PHLS+(-craA)$ στη συνθήκη με 100% θαλασσινό νερό είχαν παρουσιαστεί σε εικόνα από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, κύτταρα ενωμένα μεταξύ τους, με ένα λεπτό περίβλημα να διακρίνεται γύρω από αυτά [72]. Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ο σχηματισμός εξωπολυσακχαριτών από το κυανοβακτήριο *Synechocystis* sp. PCC 6803 όταν αυτό βρίσκεται σε δυσμενές περιβάλλον [87, 88]. Κάτι τέτοιο όμως δεν παρατηρήθηκε λαμβάνοντας υπόψη τις Εικόνες 2.12 Β, 2.13 Β για τον άγριο τύπο του κυανοβακτηρίου

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν για ακόμα μια φορά την μεγάλη προσαρμοστικότητα του κυανοβακτηρίου *Synechocystis* σε δυσμενείς συνθήκες όπως είναι αυτές τις υψηλής αλατότητας.

2.5 Μελέτη του φαινοτύπου του αγρίου τύπου του κυανοβακτηρίου *Synechocystis* που καλλιεργήθηκε σε σκέτο θαλασσινό νερό και τελικά επαναιωρήθηκε σε BG11

Όπως φάνηκε και σε παραπάνω παράγραφο, τα κύτταρα του αγρίου τύπου του κυανοβακτηρίου, όταν καλλιεργηθούν σε σκέτο θαλασσινό νερό αποκτούν το χαρακτηριστικό πορτοκαλί χρώμα, το οποίο διακρίνεται και στις Εικόνες 2.9 Β και 2.14. Τα κύτταρα σε αυτή την περίπτωση βρίσκονται σε καταπόνηση, καθώς πρόκειται για ένα οργανισμό γλυκού νερού και σε αυτή την περίπτωση δεν είναι εμπλουτισμένο το θαλασσινό νερό. Επομένως, προκειμένου να προστατευθούν παράγουν περισσότερα καροτενοειδή. Σε αυτό οφείλεται και το πορτοκαλί χρώμα που αποκτούν οι καλλιέργειες. Παρά την καταπόνηση τα κύτταρα φαίνεται πως αναπτύσσονται κανονικά σε χαμηλότερα όμως επίπεδα.

Για το λόγο αυτό, μετά από μερικές ημέρες παραμονής των κυττάρων σε βιοαντιδραστήρα με θαλασσινό νερό και έπειτα από φυγοκέντριση, πάρθηκαν τα κύτταρα και επαναιώθηκαν σε θρεπτικό μέσο BG11. Μετά από δυο μέρες παραμονής σε αυτό το θρεπτικό μέσο, τα κύτταρα άρχισαν να επανέρχονται στην αρχική του κατάσταση και να παράγουν περισσότερη φυκοκυανίνη. Αυτό έγινε αντιληπτό από το πράσινο χρώμα που άρχισε να παίρνει η καλλιέργεια (Εικόνα 2,16). Επομένως, τα κύτταρα παρόλο που ήταν σε κατάσταση καταπόνησης, κατάφεραν να ανακάμψουν. Αυτό επιβεβαιώνει για ακόμα μια φορά την προσαρμοστικότητα του μικροοργανισμού στα διάφορα περιβάλλοντα.



Εικόνα 2.14: Φαινοτυπική απεικόνιση του αγρίου τύπου του κυανβακτηρίου *Synechocystis*, έπειτα από 10 ημέρες παραμονής σε βιοαντιδραστήρα με σκέτο θαλασσινό νερό (αριστερά) και έπειτα από δυο ημέρες μετά από επαναϊώρηση σε θρεπτικό μέσο BG11, ενώ είχε μείνει σε βιοαντιδραστήρα με σκέτο θαλασσινό για οχτώ ημέρες (δεξιά).

Τα πειράματα αυτά θα πρέπει να επαναληφθούν και να συνεχιστούν καθώς δεν πάρθηκαν μετρήσεις για την ανάπτυξη και την φωτοσυνθετική δραστηριότητα των κυττάρων, έγινε απλά φαινοτυπική παρατήρηση των βιοαντιδραστήρων. Επίσης, θα πρέπει να γίνουν δοκιμές προσθέτοντας στον ήδη υπάρχον βιοαντιδραστήρα συστατικά που λείπουν από το θαλασσινό νερό, αλλά υπάρχουν στο θρεπτικό μέσο BG11, με σκοπό να δούμε εάν και με αυτό τον τρόπο επανέλθουν τα κύτταρα.

2.6 Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό μέσα από τα δυο υποκεφάλαια αναπτύχθηκε μια μέθοδος για την καλλιέργεια των κυττάρων του αγρίου τύπου του *Synechocystis* sp. PCC 6803, που χρησιμοποιεί θαλασσινό νερό για λόγους οικονομικούς αλλά και οικολογικούς. Αρχικά, φάνηκε πως η ανάπτυξη του αγρίου τύπου του κυανοβακτηρίου *Synechocystis*, δε μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια μέσω οπτικής πυκνότητας (OD_{730}) και ξηρής βιομάζας κυττάρων (DCW) στην περίπτωση που θρεπτικό μέσο είναι το BG11 σε θαλασσινό νερό με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικά, εξαιτίας της παρουσίας αλάτων. Επιπλέον, τα άλατα επηρέασαν ως ένα βαθμό τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα καθώς ο λόγος καροτενοειδών προς χλωροφύλλη είναι αρκετά αυξημένος σε σχέση με την συνθήκη μάρτυρα που είναι το BG11 και άρα τα κύτταρα υπόκεινται καταπόνηση. Όμως έπειτα από επαναιώρηση των κυττάρων αυτών σε θρεπτικό μέσο BG11 τα κύτταρα, άρχισαν να παράγουν ξανά φυκοκυανίνη και η καλλιέργεια να αποκτά πράσινο χρώμα. Τα πειράματα αυτά θα πρέπει να επαναληφθούν. Παράλληλα, στο πρώτο υποκεφάλαιο έγινε έλεγχος για την επίδραση της μείωσης της συγκέντρωσης του BG11 σε απιονισμένο νερό και θαλασσινό με φωσφορικά στην ανάπτυξη των κυττάρων. Στις περιπτώσεις όπου χρησιμοποιείται η μισή ποσότητα των συγκεντρώσεων του BG11, φάνηκε πως με την πάροδο των ημερών η ανάπτυξη μειώνεται. Αυτό συμβαίνει επειδή τα απαραίτητα συστατικά για την ανάπτυξη των κυττάρων καταναλώνονται γρηγορότερα. Επιπρόσθετα, στις συνθήκες όπου το θαλασσινό νερό εμπλουτίζεται με συστατικά του BG11 είτε όλα, είτε κάποια από αυτά και σαν ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιείται HEPES/NaOH για την αποφυγή αλάτων, παρατηρείται αρκετά καλή προσομοίωση της συνθήκης μάρτυρα, με την ανάπτυξη αλλά και την φωτοσυνθετική δραστηριότητα να βρίσκεται και στις δυο περιπτώσεις σε παρόμοια επίπεδα.

Βάση λοιπόν των παραπάνω, επιλέχθηκαν στο δεύτερο υποκεφάλαιο να μελετηθούν εκτενώς οι συνθήκες με εμπλουτισμένο θαλασσινό και με οργανικό ρυθμιστικό διάλυμα. Τα αποτελέσματα έδειξαν για ακόμα μια φορά πολύ καλή προσομοίωση με το κανονικό θρεπτικό τους μέσο που είναι το BG11, με την ανάπτυξη, την παραγωγή των χρωστικών, αλλά και τον ρυθμό παραγωγής οξυγόνου να είναι σε ίδια επίπεδα. Σε αυτό το υποκεφάλαιο μελετήθηκε επιπλέον και η συνθήκη με 100% θαλασσινό νερό. Παρατηρήθηκε μειωμένη ανάπτυξη των

κυττάρων αλλά και μειωμένη φωτοσυνθετική δραστηριότητα, καθώς τα κύτταρα υπόκεινται στρες.

Επομένως, το κυανοβακτήριο *Synechocystis* μπορεί να αναπτύσσεται επιτυχώς σε θρεπτικά μέσα που έχει χρησιμοποιηθεί θαλασσινό νερό είτε αυτό έχει εμπλουτιστεί με συστατικά του BG11 είτε όχι. Αυτό σημαίνει πως ήδη έχουμε φτάσει σε μια μέθοδο αρκετά οικονομική καθώς στοχεύουμε στη χρήση θαλασσινού νερού με λίγα μόνο στοιχεία για τον εμπλουτισμό του, το οποίο υπάρχει σε αφθονία και θα αντικαταστήσει το γλυκό νερό, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την επιβίωση διαφόρων άλλων οργανισμών στο περιβάλλον. Η μέθοδος αυτή είναι αρκετά οικονομική και δεν προκαλεί επιπλέον προβλήματα στο περιβάλλον. Καταλήγοντας στα επόμενα κεφάλαια θα χρησιμοποιηθεί η συνθήκη του θαλασσινού νερού εμπλουτισμένο με κάποια συστατικά από το BG11 και όχι όλα τα συστατικά του για εξοικονόμηση συστατικών καθώς τα αποτελέσματα των δυο αυτών συνθηκών φάνηκαν σε πολλά σημεία ταυτόσημα.

Κεφάλαιο 3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ *SYNECHOCYSTIS* ΜΕ ΤΗ ΣΥΝΘΑΣΗ ΤΟΥ β - ΦΕΛΛΑΝΔΡΕΝΙΟΥ ΣΕ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟ ΘΑΛΑΣΣΙΝΟ ΝΕΡΟ

3.1 Εισαγωγή

Όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενες παραγράφους, το β -φελλανδρένιο έχει τεράστια εμπορική και βιομηχανική αξία. Για το λόγο αυτό έχει κεντρίσει το επιστημονικό ενδιαφέρον η ετερόλογη έκφρασή του από το κυανοβακτήριο *Synechocystis* sp. PCC 6803 με την ενσωμάτωση του γονιδίου της συνθάσης του β -φελλανδρενίου στο γονιδίωμα του οργανισμού.

Έπειτα από διάφορες μελέτες διαπιστώθηκε ότι όταν το γονίδιο της συνθάσης του β -φελλανδρενίου συντήχθηκε με το γονίδιο της β υπομονάδας της φυκοκυανίνης (*crpB.PHLS*) επιτυγχάνεται η μεγαλύτερη παραγωγή αυτού συγκριτικά με τα υπόλοιπα μεταλλαγμένα στελέχη [50, 89-91]. Επιπλέον, με παράλληλη ενσωμάτωση του γονιδίου της συνθάσης του διφωσφορικού γερανυλίου (*GPPS*), το οποίο αποτελεί το πρόδρομο μόριο του β -φελλανδρενίου στο *crp* οπερόνιο οδήγησε σε ακόμα υψηλότερη παραγωγή του προϊόντος [91, 92]. Επίσης, αυξημένη παραγωγή παρατηρείται και σε στελέχη, στα οποία δεν έχουν αφαιρεθεί γονίδια του *crp* οπερονίου, αντιθέτως είναι παρόντα όλα τα γονίδια μαζί με τη συνθάση του β -φελλανδρενίου [90]. Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου [71] μελετήθηκαν διαφορετικά στελέχη με διαφορετικούς συνδυασμούς των γονιδίων του *crp* οπερονίου, στα οποία απουσίαζαν τα γονίδια που εκφράζουν τα συνδετικά πεπτίδια (*crpC1*, *crpC2*, *crpD*) τα οποία χρησιμοποιούνται για την διαμόρφωση της διμερούς δομής της φυκοκυανίνης. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι η παράλληλη έκφραση του διφωσφορικού γερανυλίου (*GPP*) παρουσία φυσικά της συνθάσης του β -φελλανδρενίου (*PHL*) οδηγεί σε αύξηση της παραγωγής. Επιτυχής παραγωγή του προϊόντος παρατηρήθηκε σε όλα τα στελέχη όπου η συνθάση του β -φελλανδρενίου ήταν συντηγμένη με τη β υπομονάδα της φυκοκυανίνης. Αντιθέτως, όταν δοκιμάστηκε η σύντηξη της συνθάσης του β -φελλανδρενίου με την α υπομονάδα της φυκοκυανίνης το στέλεχος δεν παρήγαγε β -φελλανδρένιο, αλλά μίγμα άλλων τερπενοειδών. Τέλος, δημιουργήθηκε ένα νέο στέλεχος από το εργαστήριο μας [71], στο οποίο συμπεριλαμβάνονται όλα τα γονίδια του *crp* οπερονίου. Το γονίδιο για την

PHLS είναι συντηγμένο με το γονίδιο για την β υπομονάδα της φυκοκυανίνης και το γονίδιο για την *GPPS* είναι συντηγμένο με την α υπομονάδα της φυκοκυανίνης ($\Delta cpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc$). Το στέλεχος αυτό βρέθηκε έπειτα από μελέτες ότι την ικανότητα να παράγει β -φελλανδρενίου σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τα υπόλοιπα μεταλλαγμένα στελέχη που μελετήθηκαν στο εργαστήριο, έπειτα από καλλιέργειά του σε φωτοαυτότροφες συνθήκες στους βιοαντιδραστήρες χωρίς να έχει επίπτωση στην ανάπτυξή και τη φωτοσυνθετική τους δραστηριότητα [72].

Στο τρέχον κεφάλαιο της παρούσας εργασίας μελετήθηκαν τα στελέχη $\Delta cpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS$ και $\Delta cpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA)$ στη συνθήκη "θαλασσινό νερό εμπλουτισμένο με συστατικά του BG11". Η συνθήκη αυτή φάνηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο ότι οδηγεί σε ανάπτυξη του αγρίου τύπου του κυανοβακτηρίου σε παρόμοια επίπεδα με το θρεπτικό μάρτυρα, BG11. Επομένως, σε αυτό το κεφάλαιο μελετάται η παραγωγή του β -φελλανδρενίου στη συνθήκη αυτή, συγκρίνοντας πάντα με την κανονική συνθήκη ανάπτυξης και παραγωγής.

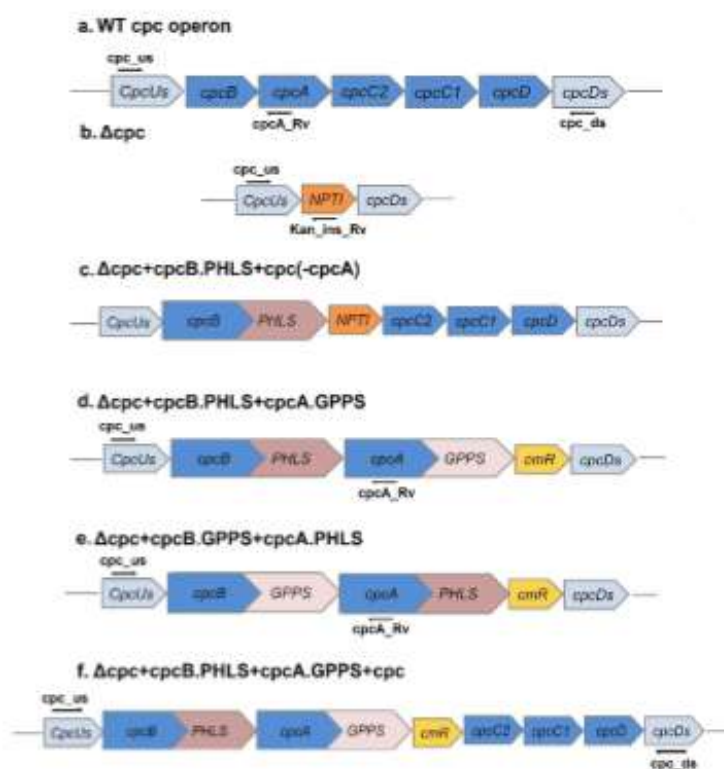
3.2 Σκοπός

Σκοπός του κεφαλαίου είναι η μελέτη της ανάπτυξης, της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας και της ετερόλογης παραγωγής β -φελλανδρενίου στη συνθήκη όπου χρησιμοποιείται θαλασσινό νερό εμπλουτισμένο με όσα συστατικά του λείπουν από το BG11, για τα στελέχη $\Delta cpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS$ και $\Delta cpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA)$. Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με τα αντίστοιχα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη μελέτη των στελεχών αυτών σε θρεπτικό μέσο, BG11. Τα πειράματα έχουν χρονική διάρκεια δέκα ημερών και οι μετρήσεις λαμβάνονται κάθε δεύτερη ημέρα.

3.3 Πειραματικό μέρος

3.3.1 Στελέχη

Τα στελέχη που μελετήθηκαν στο εργαστήριό μας παρουσιάζονται στην εικόνα 3.1. Στο γονιδίωμα του αγρίου τύπου (εικόνα 3.1.a) είναι παρόντα όλα τα γονίδια του *crc* οπερονίου. Τα γονίδια *crcA* και *crcB* αναφέρονται στις υπομονάδες της φυκοκυανίνης α και β αντίστοιχα, ενώ τα γονίδια *crcC2*, *crcC1* και *crcD* εκφράζουν τα συνδετικά πεπτίδια που είναι αναγκαία για την τελική δομή της πρωτεΐνης.



Εικόνα 3.1: Γονιδιακές αλληλουχίες αγρίου τύπου (WT) και των μεταλλαγμένων στελεχών *Synechocystis* Δ *crc*, Δ *crc*+*crcB*.PHLS+*crc(-cra)*, Δ *crc*+*crcB*.PHLS+*crcA*.GPPS, Δ *crc*+*crcB*.GPPS+*crcA*.PHLS και Δ *crc*+*crcB*.PHLS+*crcA*.GPPS+*crc*, που μελετήθηκαν στο εργαστήριο. Οι αλληλουχίες c. και d. αφορούν στις αλληλουχίες των μεταλλαγμένων στελεχών που μελετήθηκαν στο συγκεκριμένο κεφάλαιο. Η εικόνα ελήφθη από την παραπομπή [93].

Στην εικόνα 3.1.b παρουσιάζεται το μεταλλαγμένο στέλεχος Δ *crc*, στο οποίο έχει αφαιρεθεί το *crc* οπερόνιο, έχουν διατηρηθεί οι 3' και 5' αμετάφραστες

περιοχές, ανάμεσα στις οποίες έχει τοποθετηθεί γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό καναμυκίνη.

αντιβιοτικό καναμυκίνη. Στην εικόνα 3.1.c παρατηρείται ότι το στέλεχος $\Delta crc+crcB.PHLS+crc(-crcA)$, στο *crcB* γονίδιο έχει πραγματοποιηθεί σύντηξη με το γονίδιο που εκφράζει τη συνθάση του β -φελλανδρενίου. Το *crcA* γονίδιο απουσιάζει, ενώ είναι παρόντα τα γονίδια που κωδικοποιούν τα συνδεδετικά πεπτίδια της φυκοκυανίνης. Το στέλεχος διαθέτει επίσης γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη. Τα μεταλλαγμένα στελέχη Δcrc και $\Delta crc+crcB.PHLS+crc(-crcA)$ κατασκευάστηκαν από την ομάδα του καθηγητή Αναστάσιου Μελή στο University of California, Berkeley. Στην εικόνα 3.1.d το μεταλλαγμένο στέλεχος $\Delta crc+crcB.PHLS+crcA.GPPS$ διαθέτει τα γονίδια για τις δύο υπομονάδες της φυκοκυανίνης, τα οποία είναι συντηγμένα, το *crcB* με τη συνθάση του β -φελλανδρενίου (*crcB.PHLS*) και το *crcA* με τη συνθάση του διφωσφορικού γερανυλίου (*crcA.GPPS*). Απουσιάζουν οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν τα συνδεδετικά πεπτίδια. Το στέλεχος διαθέτει επίσης γονίδιο ανθεκτικότητας στη χλωραμφενικόλη. Στην εικόνα 3.1.e στο οπερόνιο του στελέχους $\Delta crc+crcB.GPPS+crcA.PHLS$ περιέχει τα γονίδια για τις δύο υπομονάδες της φυκοκυανίνης, τα οποία είναι συντηγμένα, το *crcB* με τη συνθάση του διφωσφορικού γερανυλίου (*crcB.GPPS*) και το *crcA* με τη συνθάση του β -φελλανδρενίου (*crcA.PHLS*). Απουσιάζουν οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν τα συνδεδετικά πεπτίδια. Το στέλεχος διαθέτει επίσης γονίδιο ανθεκτικότητας στη χλωραμφενικόλη. Στην εικόνα 3.1f φαίνεται η αλληλουχία για το στέλεχος $\Delta crc+crcB.PHLS+crcA.GPPS+crc$. Το στέλεχος αυτό περιέχει τα γονίδια σύντηξης *crcB.PHLS* και *crcA.GPPS*, και τις αλληλουχίες που κωδικοποιούν τα συνδεδετικά πεπτίδια. Το στέλεχος διαθέτει επίσης γονίδιο ανθεκτικότητας στη χλωραμφενικόλη. Τα στελέχη των Εικόνων 3.1d-3.1f δημιουργήθηκαν από το εργαστήριό μας [66]. Όλα τα στελέχη έχουν μελετηθεί εκτενώς σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης, τόσο σε ότι αφορά στην ανάπτυξη και την φωτοσυνθετική δραστηριότητα, όσο και στην παραγωγή του β -φελλανδρενίου [71, 72].

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τα στελέχη $\Delta crc+crcB.PHLS+crcA.GPPS$ και $\Delta crc+crcB.PHLS+crc(-crcA)$ σε βέλτιστες συνθήκες για την παραγωγή του προϊόντος β -φελλανδρενίου.

3.3.2 Συνθήκες ανάπτυξης

Στο παρόν κεφάλαιο της συγκεκριμένης μελέτης χρησιμοποιήθηκαν τα μεταλλαγμένα στελέχη $\Delta crp+crpB.PHLS+crpA.GPPS$ και $\Delta crp+crpB.PHLS+(-crpA)$ του κυανοβακτηρίου *Synechocystis* sp. PCC 6803. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν φωτοαυτότροφα σε υγρό θρεπτικό υλικό BG11 μέσα σε κωνικές φιάλες. Υπήρχε συνεχής παροχή ατμοσφαιρικού αέρα μέσω αντλίας προκειμένου να υπάρχει διαρκής τροφοδοσία CO_2 στα κύτταρα, έτσι ώστε να μπορούν να επιτελούν φωτοσύνθεση. Επιπλέον, το pH στο διάλυμα των καλλιεργειών ήταν σταθερό (pH=7,5) με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος 25 mM NaH_2PO_4 . Η ανάπτυξη των καλλιεργειών πριν και κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας $28 \pm 1^\circ C$ με ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50 \mu mol \text{ φωτονίων} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 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 σκευή που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή καλλιεργειών αποστειρώθηκαν προηγουμένως σε αυτόκαυστο στους $120^\circ C$ 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.

3.3.3 Ανάπτυξη καλλιεργειών σε βιοαντιδραστήρες για τη λήψη μετρήσεων

Από τις συνθήκες που μελετήθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο επιλέχθηκε το θαλασσινό νερό με συστατικά του BG11 και ρυθμιστικό HEPES/NaOH pH =7,5, καθώς συμφωνεί περισσότερο με τη συμπεριφορά του μάρτυρα. Η συνθήκη αυτή επιλέχθηκε να μελετηθεί εκτενέστερα για τα μεταλλαγμένα στελέχη του κυανοβακτηρίου στο τρέχον κεφάλαιο, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με αυτά που προκύπτουν σε κανονικό θρεπτικό BG11, αντίστοιχα και για τα δυο στελέχη που μελετήθηκαν.

Όταν οι μητρικές καλλιέργειες έφτασαν στην εκθετική φάση, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν στις $6000 \times g$ για 10 min και επαναιωρήθηκαν σε μικρή ποσότητα από κάθε θρεπτικό μέσο. Έπειτα, 50 mL της αραιωμένης καλλιέργειας τοποθετήθηκαν σε βιοαντιδραστήρα δύο φάσεων (υγρή/αέρια) με την τελική τιμή

της οπτικής πυκνότητας (OD_{730}) να είναι 0,5. Ο βιοαντιδραστήρας έχει χωρητικότητα 100 mL, έχει ύψος 9,5 cm και διάμετρο 5 cm. Στη συνέχεια, κλείστηκε με πλαστικό πώμα (septum), το οποίο σφραγίστηκε με την προσθήκη επιπλέον μεταλλικού πώματος. Ακολούθησε προσθήκη 20% v/v καθαρού CO_2 και το σύστημα αφέθηκε για ανάπτυξη σε περιστροφικό αναδευτήρα (shaker), ο οποίος ήταν τοποθετημένος σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας $28 \pm 1^\circ C$ και με φωτισμό $50 \mu mol$ φωτονίων $v m^{-2} s^{-1}$. Κάθε 48 h λαμβάνονταν μετρήσεις στο διάστημα των δέκα ημερών. Παράλληλα, κάθε 48 h γινόταν προσθήκη 10% CO_2 .

3.3.4 Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων - Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας στα 730nm (OD_{730})

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

3.3.5 Λύση κυττάρων για την ποιοτική μελέτη φωτοσυνθετικών χρωστικών

Τα κύτταρα συλλέχθηκαν από τις μητρικές καλλιέργειες στο τέλος της εκθετικής φάσης με φυγοκέντριση στα $4000 \times g$ για 10 min. Έπειτα επαναιωρήθηκαν σε μικρό όγκο 50 mM Tris-HCl, pH =8,0. Η λύση των κυττάρων επιτεύχθηκε με τη χρήση υάλινων σφαιριδίων 0,5 mm (glass beads), έπειτα από επαναλαμβανόμενους κύκλους, 5 min μεταξύ ανάδευσης στο vortex και επώασης σε πάγο, για 30 min συνολικά. Πριν από τη λύση των κυττάρων προστέθηκε στο διάλυμα αναστολέας πρωτεασών PMSF. Τα άσπαστα κύτταρα και τα κυτταρικά απόβλητα απορρίφθηκαν μετά από φυγοκέντριση στις 3500 rpm για 3 min. Το υπερκείμενο περιείχε τις χρωστικές.

3.3.6 Ποιοτική μελέτη φωτοσυνθετικών χρωστικών

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

3.3.7 Ποσοτικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών

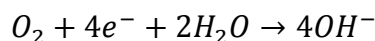
Για την ποσοτικοποίηση των φωτοσυνθετικών χρωστικών, ποσότητα καλλιέργειας 1 mL φυγοκεντρήθηκε στα 1000 x g για 1 min σε μία φυγόκεντρο Eppendorf και έπειτα από την απόρριψη του υπερκείμενου, το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 1 mL 100% μεθανόλης. Έπειτα από επώαση 10-15 min στο σκοτάδι, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε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

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

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

3.3.8 Πολαρογραφικός προσδιορισμός ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου

Η μέτρηση του ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου πραγματοποιήθηκε με χρήση ενός επιλεκτικού ηλεκτροδίου οξυγόνου τύπου Clark. 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:



Για τις μετρήσεις έκλυσης οξυγόνου, 10 mL καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκαν 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 NaHCO₃, 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 υπέρυθη ακτινοβολία. Τέλος, το φως διήλθε από ένα κόκκινο φίλτρο, επιτρέποντας μόνο τα επιθυμητά μήκη κύματος να φτάσουν στο δείγμα. Η μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα καταγράφηκε σε ένταση φωτισμού $500 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ από μία λάμπα βολφραμίου για χρονικό διάστημα 60 s και τελικά εκφράστηκε σε $\text{mmol O}_2 (\text{mol Chl})^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

3.3.9 Παρατήρηση της μορφολογίας του μικροοργανισμού με χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM)

Για την παρατήρηση με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, ποσότητα καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκε σε μία φυγόκεντρο *Eppendorf Centrifuge 5412* για 5 min. Το ίζημα υπέστη δύο δεκάλεπτες πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα διμεθυλαρσινικού νατρίου (sodium cacodylate buffer, SCB) συγκέντρωσης 0,1 M και $\text{pH} = 7,4$. Έπειτα μονιμοποιήθηκε με χρήση διαλύματος 2,5% w/v γλουταραλδεΐδης (GDA) σε διάλυμα SCB συγκέντρωσης 0,08 M και $\text{pH} = 7,4$ για 45 min. Οι μονιμοποιητές απομακρύνθηκαν με δύο δεκάλεπτες πλύσεις με διάλυμα SCB 0,1 M και $\text{pH} = 7,4$. Έπειτα τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε φίλτρο Whatman 0,2 μm και υπέστησαν αφυδάτωση χρησιμοποιώντας διαδοχικές δεκάλεπτες πλύσεις με 30%, 50%, 70%, 90% και 100% (v/v) αιθανόλη. Κατά τη διάρκεια της κάθε πλύσης τα δείγματα φυλάσσονταν σε θερμοκρασία 4°C. Έπειτα πλύθηκαν με ξηρή αιθανόλη για 10 min και υπέστησαν ξήρανση με χρήση μίας συσκευής ξήρανσης κρίσιμου σημείου του διοξειδίου του άνθρακα (BAL-TEC, CPD 030 Critical Point Dryer) προκειμένου να αφυδατωθούν πλήρως. Έπειτα τα φίλτρα επικολλήθηκαν σε ύαλο με χρήση ταινίας διπλής όψεως και επικαλύφθηκαν με πάχος 10 nm χρυσό με χρήση ενός Sputter Coater (SCD 050) της BAL-TEC προκειμένου να γίνουν ηλεκτρικά αγώγιμα. Η παρατήρηση έγινε σε JEOL JSM-6390LV Scanning Electron Microscope σε διαφορά δυναμικού δέσμησης ηλεκτρονίων 20 kV από όπου τραβήχτηκαν φωτογραφίες.

3.3.10 Ταυτοποίηση του παραγόμενου β -φελλανδρενίου

Η ανάλυση για την ταυτοποίηση του παραγόμενου β -φελλανδρενίου πραγματοποιήθηκε με δυο διαφορετικές μεθόδους. Τα δείγματα εξανίου που

συλλέχθηκαν αναλύθηκαν τόσο με φασματομετρία απορρόφησης στο υπεριώδες, όσο και με αέρια χρωματογραφία μάζας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας.

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

Η ανάλυση για την ταυτοποίηση του παραγόμενου β-φελλανδρενίου πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UV-2700 της Shimadzu. Κάθε 48 h από την ημέρα μηδέν έως και τη δέκατη ημέρα όπου κράτησε η συγκεκριμένη πειραματική διεργασία, προσθέτονταν στο βιοαντιδραστήρα 4 mL εξανίου. Ο βιοαντιδραστήρας αφηνόταν με το εξάνιο για επιπλέον 2 h, ώστε να συσσωρευτεί το προϊόν στην υδρόφοβη φάση. Στη συνέχεια, η οργανική φάση απομακρύνθηκε με τη χρήση υάλινης πιπέτας Pasteur και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 232,4 nm, στο οποίο το β-φελλανδρένιο δίνει χαρακτηριστική κορυφή.

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

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°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 εισαγωγή και ο όγκος του δείγματος ήταν 1 μL. Η θερμοκρασία της transfer line ήταν 280°C. Οι συνθήκες ηλεκτρονικού ιονισμού ήταν ενέργεια ιονισμού 70 eV, 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.

3.3.11 Ποσοτικός προσδιορισμός του παραγόμενου β -φελλανδρενίου

Για την ποσοτικοποίηση του παραγόμενου β -φελλανδρενίου χρησιμοποιήθηκε η απορρόφηση στο υπεριώδες, όπου το β -φελλανδρένιο δίνει χαρακτηριστική κορυφή στα 232,4 nm σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UV-2700 της Shimadzu. Έπειτα έγινε εφαρμογή του νόμου του Beer-Lambert ($\epsilon_{232,4}=15,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [89].

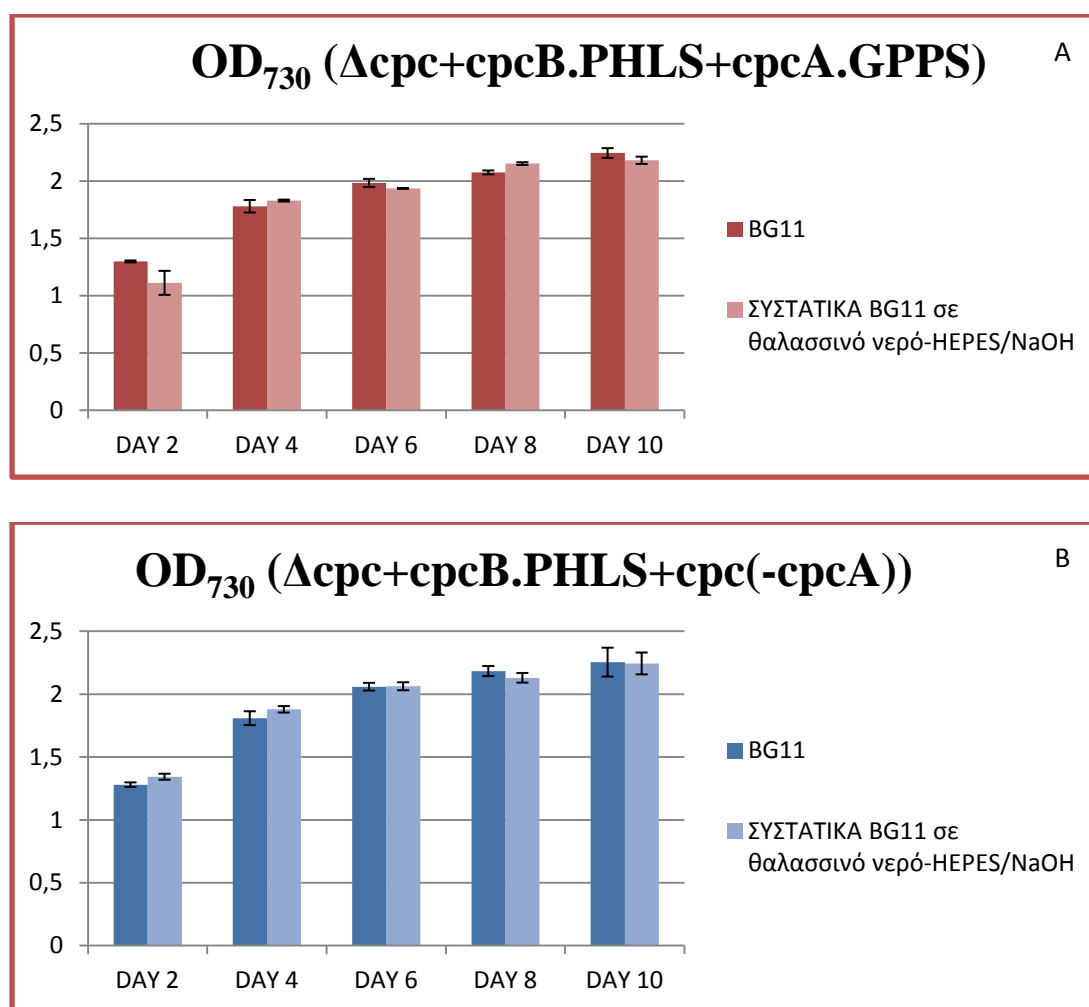
3.4 Αποτελέσματα και συζήτηση

3.4.1 Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων - Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας στα 730nm (OD_{730})

Τα στελέχη $\Delta\text{cpc+crcB.PHLS+crcA.GPPS}$ και $\Delta\text{cpc+crcB.PHLS+crc(-cpcA)}$ σε παλαιότερες εργασίες έχουν μελετηθεί τόσο σε συνθήκες αυξημένης αλατότητας 600 mM NaCl σε BG11, όσο και σε 100% θαλασσινό νερό. Σε αυτές τις συνθήκες είχε παρατηρηθεί αποτελεσματική ανάπτυξη, φωτοσυνθετική δραστηριότητα αλλά και παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος β -φελλανδρενίου σε χαμηλότερα όμως επίπεδα από τη συνθήκη μάρτυρα που είναι το BG11. Στο τρέχον κεφάλαιο της παρούσας εργασίας θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθούν τα στελέχη αυτά σε συνθήκες εμπλουτισμένου θαλασσινού νερού, προκειμένου να αποσαφηνιστεί το πως επηρεάζεται η ανάπτυξη, αλλά και η παραγωγή στην περίπτωση που σε 100% θαλασσινό νερό προστεθούν κάποια συστατικά που υπάρχουν στο BG11, ώστε να το εμπλουτίσουν. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τη συνθήκη μάρτυρα (BG11).

Στην Εικόνα 3.2 Α και Β παρουσιάζεται διαγραμματικά η ανάπτυξη των κυττάρων των στελεχών $\Delta\text{cpc+crcB.PHLS+crcA.GPPS}$ και $\Delta\text{cpc+crcB.PHLS+crc(-cpcA)}$ αντίστοιχα εκφρασμένη ανά οπτική πυκνότητα OD_{730} . Τα δυο στελέχη

φαίνεται να αναπτύσσονται επιτυχώς στη συνθήκη του εμπλουτισμένου θαλασσινού νερού, όπως είχε προκύψει και με τον άγριο τύπο του κυανοβακτηρίου σε προηγούμενο κεφάλαιο. Μάλιστα, αναπτύσσονται ακριβώς όπως και στη συνθήκη μάρτυρα. Στο διάστημα αυτό των δέκα ημερών που διήρκησε το πείραμα τα στελέχη εξακολουθούν να αναπτύσσονται, ενώ την έκτη ημέρα φαίνεται να αρχίζουν να μπαίνουν στην στατική φάση.

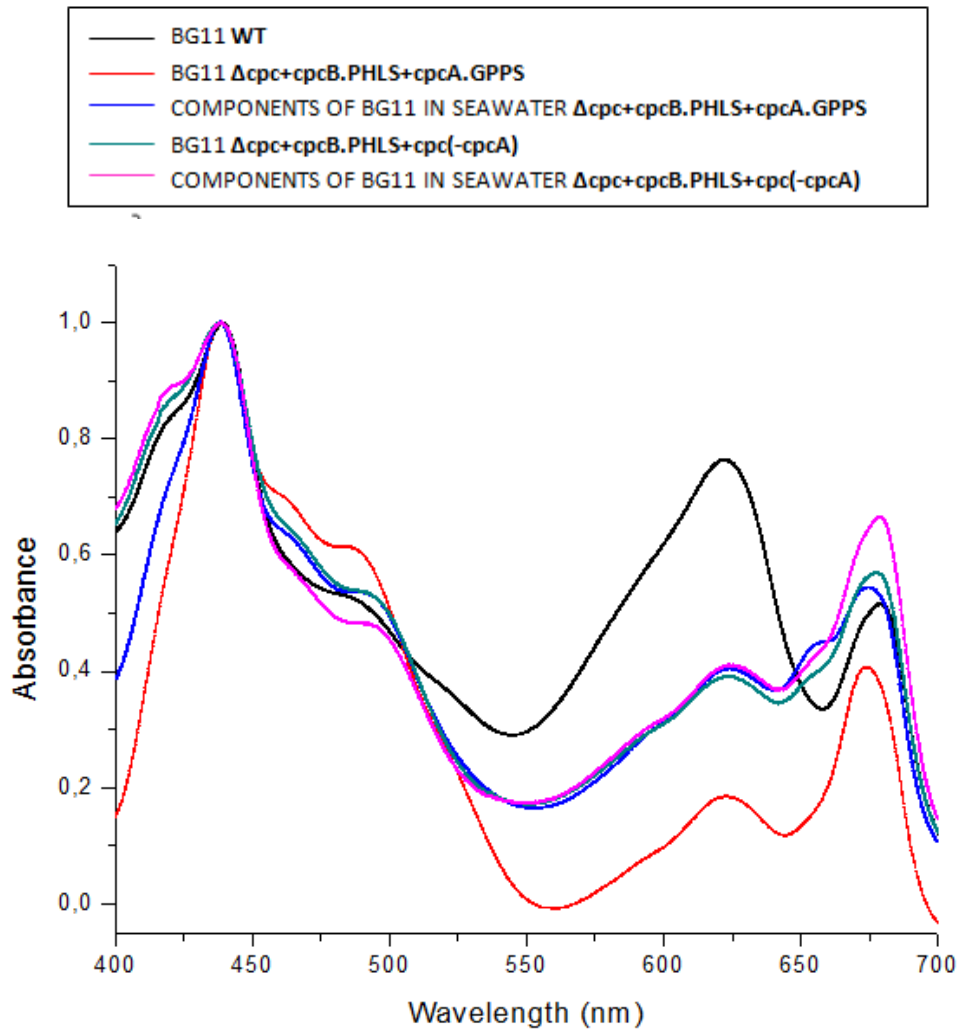


Εικόνα 3.2: Αποτελέσματα οπτικής πυκνότητας (OD_{730}) για τα στελέχη $\Delta cpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS$ (A) και $\Delta cpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA)$ (B) σε ένα χρονικό διάστημα 10 ημερών παραμονής των καλλιεργειών στους βιοαντιδραστήρες δύο φάσεων (υγρής/αέριας) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50 \mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, θερμοκρασία 28°C σε δυο διαφορετικές συνθήκες: σε θρεπτικό μέσο BG-11 (μάρτυρα), σε εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό με συστατικά του BG11. Οι μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε δεύτερη ημέρα.

Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει πως τα κύτταρα μπορούν να αναπτυχθούν επιτυχώς στο θαλασσινό νερό σε όμοια μάλιστα επίπεδα με τη συνθήκη μάρτυρα, αρκεί αυτό να περιέχει θρεπτικά συστατικά, τα οποία θα χρησιμοποιήσουν τα κύτταρα για την ανάπτυξή τους.

3.4.2 Ποιοτική μελέτη φωτοσυνθετικών χρωστικών

Στην Εικόνα 3.3 παρουσιάζονται τα φάσματα (400-700 nm) των λυμάτων των μεταλλαγμένων στελεχών $\Delta crc+crcB.PHLS+crcA.GPPS$ και $\Delta crc+crcB.PHLS+crc(-crcA)$ σε θρεπτικό μέσο BG11 και σε θαλασσινό νερό εμπλουτισμένο με συστατικά του BG11. Τα φάσματα λήφθηκαν την έκτη ημέρα του πειράματος. Πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση ως προς την κορυφή της χλωροφύλλης *a* στα 435 nm. Διακριτές είναι οι κορυφές της χλωροφύλλης *a* στα 435 nm και 680 nm σε όλες τις περιπτώσεις, όπως και των καροτενοειδών στα 470 nm. Η κορυφή στα 625 nm που αποδίδεται στη φυκοκυανίνη απουσιάζει από τα μεταλλαγμένα στελέχη, ενώ είναι εμφανής στον άγριο τύπο στο θρεπτικό μέσο BG11.

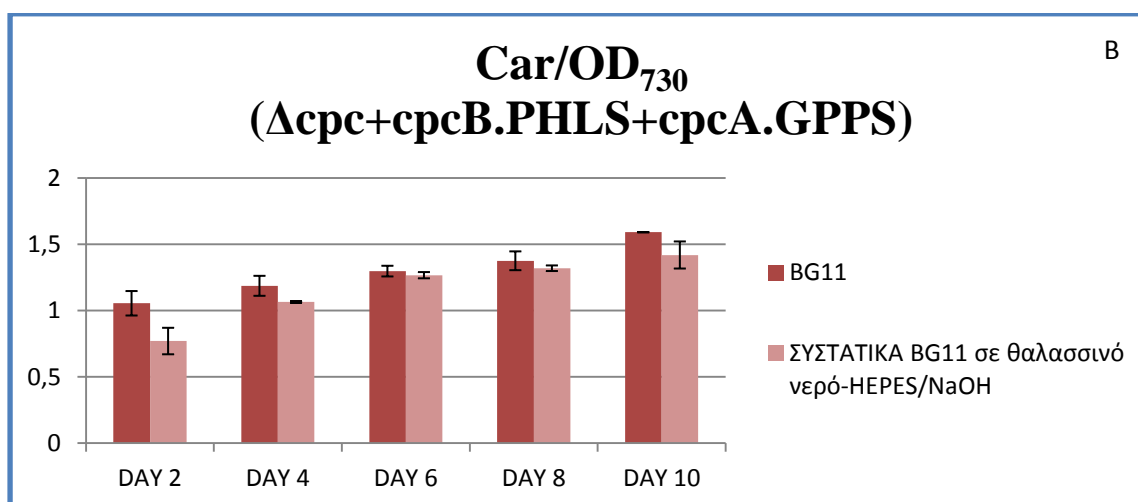
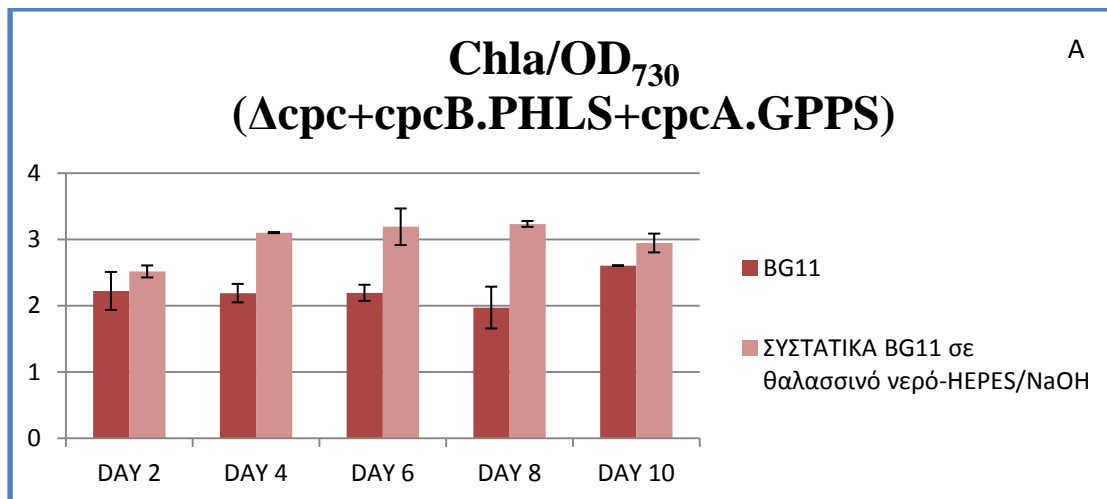


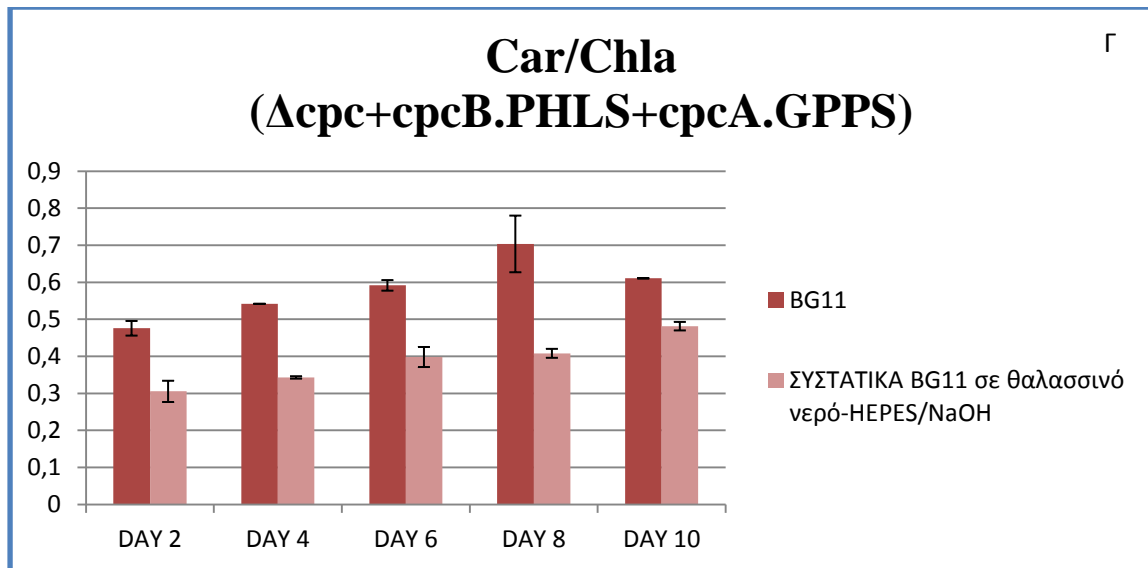
Εικόνα 3.3: Ολικό φάσμα λυμένων κυττάρων στα μεταλλαγμένα στελέχη $\Delta cpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS$ και $\Delta cpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA)$ σε θρεπτικό μέσο BG11 και σε θαλασσινό νερό εμπλουτισμένο με συστατικά του BG11. Οι κορυφές της χλωροφύλλης *a* διακρίνονται στα μήκη κύματος 435 nm και 680 nm, των καροτενοειδών στα 470 nm για τα δυο στελέχη τόσο στη συνθήκη με θρεπτικό μέσο BG11, όσο και με εμπλουτισμένο με συστατικά του BG11 θαλασσινό νερό. Η κορυφή της φυκοκυανίνης παρουσιάζεται στα 625 nm για τον άγριο τύπο (WT), ενώ απουσιάζει από τα μεταλλάγματα.

Αυτό είναι αναμενόμενο λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι στα γονίδια που κωδικοποιούν τις δύο υπομονάδες των χρωστικών αυτών έχουν αντικατασταθεί από τα γονίδια σύντηξης των δύο υπομονάδων με τις συνθάσες του β -φελλανδρενίου και διφωσφορικού γερανυλίου έχοντας ως αποτέλεσμα την ανικανότητα αυτής να λάβει την τελική διμερική της δομή. Ωστόσο, οι κορυφές μεταξύ των συνθηκών για τα δυο στελέχη δεν παρουσιάζουν διαφορές.

3.4.3 Μελέτη του ποσοτικού προσδιορισμού φωτοσυνθετικών χρωστικών

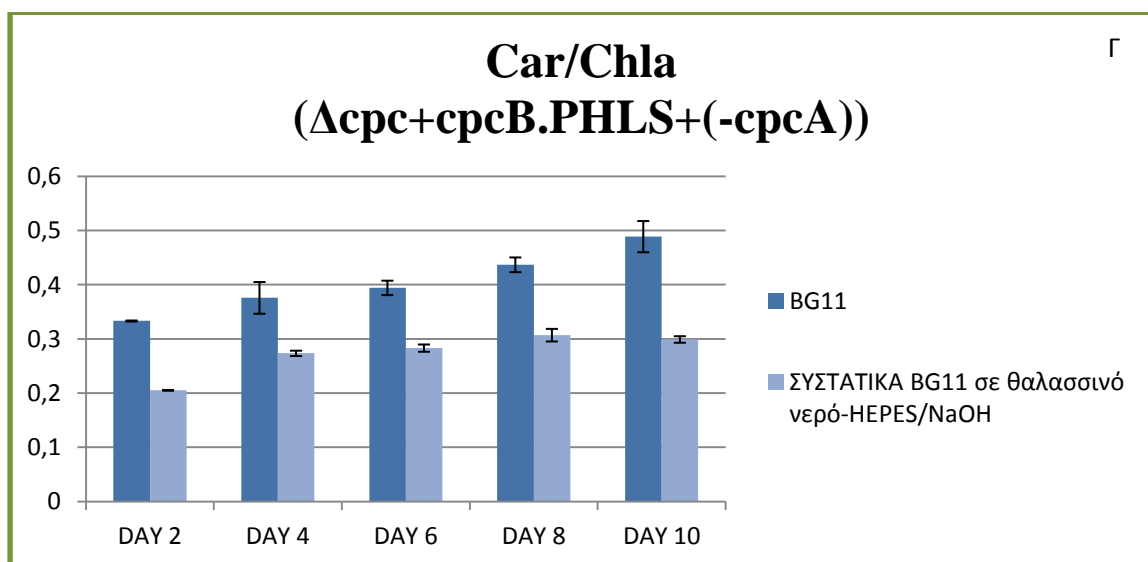
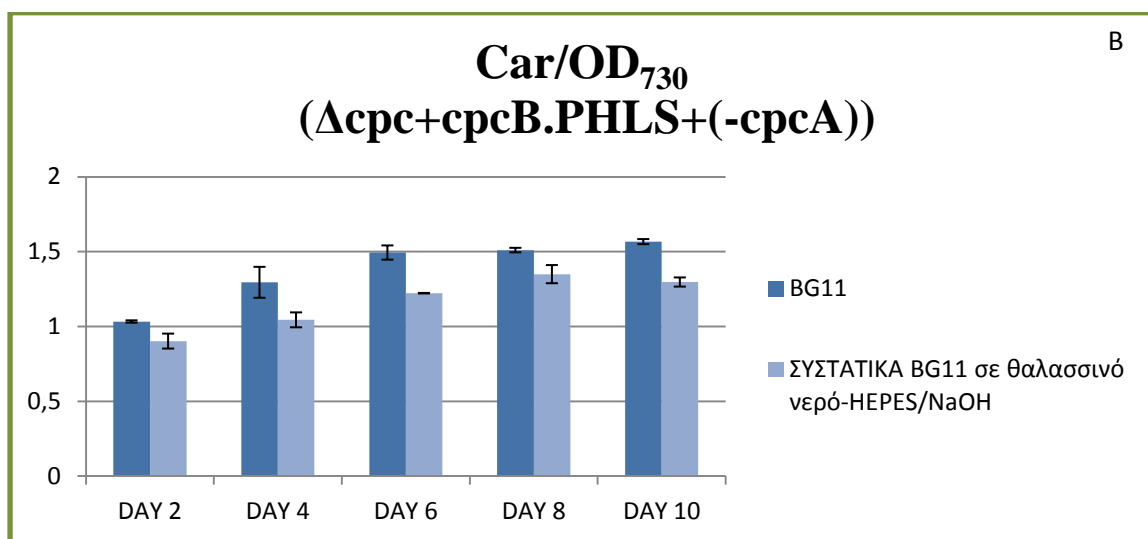
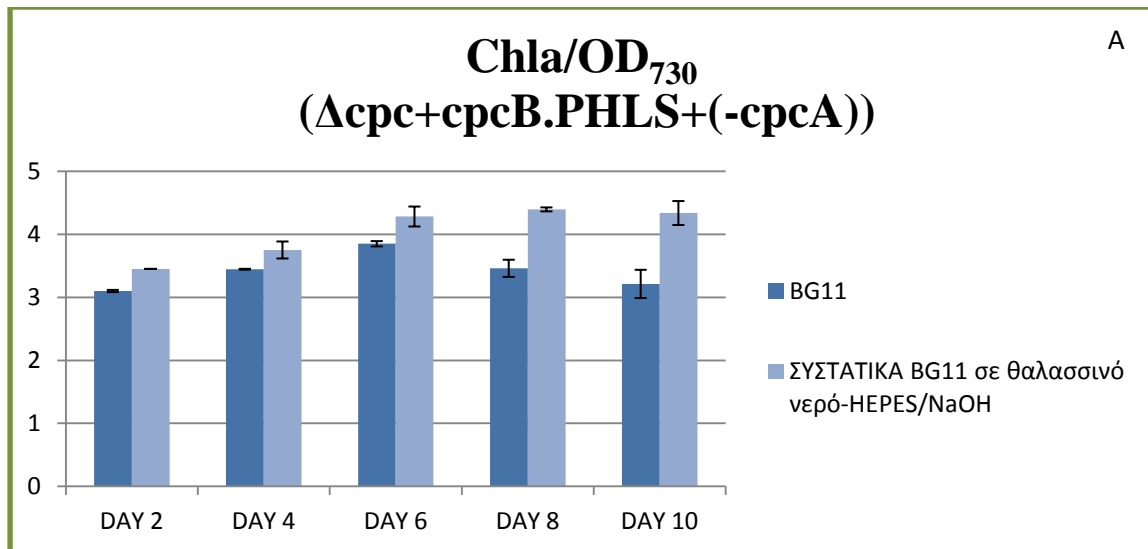
Τα αποτελέσματα του περιεχομένου των φωτοσυνθετικών χρωστικών στις δύο συνθήκες για τα στέλεχη $\Delta cpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS$ και $\Delta cpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA)$ παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.4 και 3.5 αντίστοιχα.





Εικόνα 3.4: Περιεχόμενο φωτοσυνθετικών χρωστικών του μεταλλαγμένου στελέχους $\Delta crp+crpB.PHLS+crpA.GPPS$ σε ένα χρονικό διάστημα δέκα ημερών ανάπτυξης των καλλιεργειών στους βιοαντιδραστήρες διπλής φάσης (αέριας/υγρής) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50 \mu\text{mol}$ φωτονίων $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ και θερμοκρασία 28°C σε δύο συνθήκες: BG11 (συνθήκη μάρτυρας) και εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό. Οι χρωστικές εκφράστηκαν στις εικόνες A και B ως μg χρωστικής ανά OD_{730} και Γ. ως Car/Chla. Οι μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε δεύτερη ημέρα.

Η συγκέντρωση χλωροφύλλης a και καροτενοειδών αντίστοιχα εκφράστηκαν ανά την οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας, η οποία αποτελεί δείκτη της ανάπτυξης του οργανισμού (Εικόνα 3.4 A) και (Εικόνα 3.4 B) Στην εικόνα 3.4 Γ δίνεται ο λόγος καροτενοειδών ανά χλωροφύλλη a . Παρατηρείται ότι η χλωροφύλλη είναι αυξημένη σε σχέση με το BG11, ενώ τα καροτενοειδή κυμαίνονται στα ίδια επίπεδα. Αυτό αποδεικνύει ότι τα κύτταρα προσαρμόζονται αρκετά καλά στη νέα συνθήκη χωρίς να υπάρχει καταπόνηση. Ο λόγος των καροτενοειδών προς χλωροφύλλη a (εικόνα 3.4 Γ) παρουσιάζεται υψηλότερος στις κανονικές συνθήκες σε σύγκριση με τη συνθήκη με εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό.



Εικόνα 3.5: Περιεχόμενο φωτοσυνθετικών χρωστικών του μεταλλαγμένου στελέχους $\Delta cpcB$.PHLS+ $cpc(-cpcA)$ σε χρονικό διάστημα δέκα ημερών ανάπτυξης των καλλιεργειών στους βιοαντιδραστήρες διπλής φάσης (αέριας/υγρής) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol

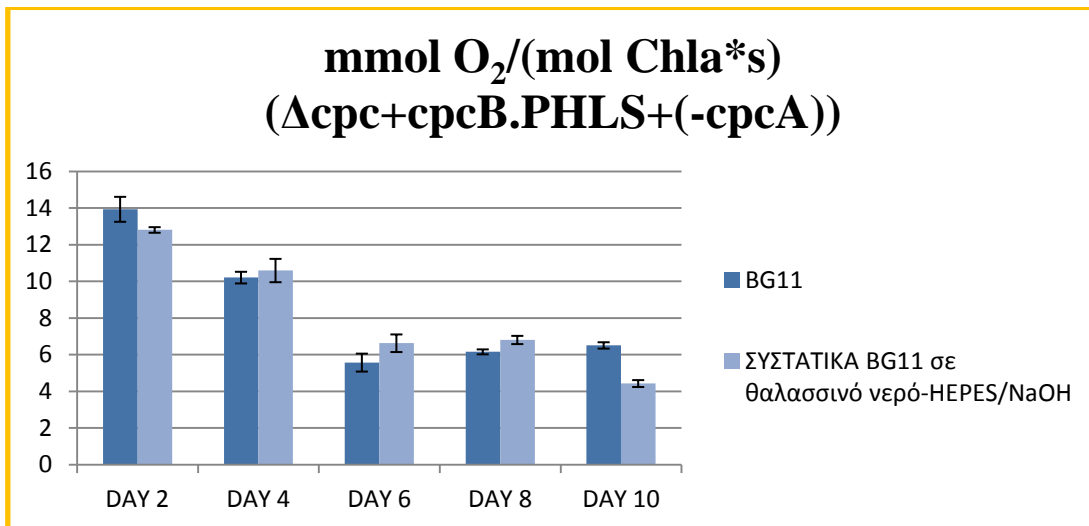
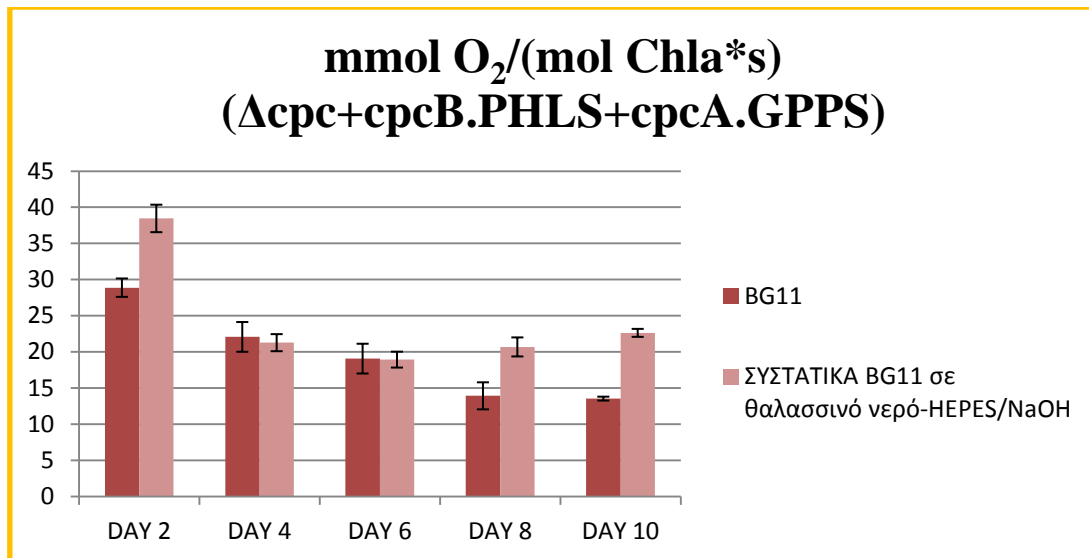
φωτονίων· $\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ και θερμοκρασία 28 °C σε BG11 (μάρτυρας) και σε εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό. Οι χρωστικές εκφράστηκαν στις εικόνες Α. και Β. ως μg χρωστικής ανά OD_{730} και Γ. ως Car/Chl. Οι μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε δεύτερη ημέρα.

Η συγκέντρωση χλωροφύλλης a και καροτενοειδών αντίστοιχα εκφράστηκαν ανά την οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας, η οποία αποτελεί δείκτη της ανάπτυξης του οργανισμού (Εικόνα 3.5 Α) και (Εικόνα 3.5 Β). Στην εικόνα 3.5 Γ δίνεται ο λόγος καροτενοειδών ανά χλωροφύλλη για το στέλεχος $\Delta\text{cpc}+\text{cpcB.PHLS}+\text{cpc}(-\text{cpcA})$. Παρατηρείται ότι η χλωροφύλλη είναι αυξημένη σε σχέση με το BG11, ενώ τα καροτενοειδή κυμαίνονται σε χαμηλότερα επίπεδα. Αυτό αποδεικνύει ότι τα κύτταρα προσαρμόζονται αρκετά καλά στη νέα συνθήκη χωρίς να υπάρχει καταπόνηση. Ο λόγος των καροτενοειδών προς χλωροφύλλη (εικόνα 3.5 Γ) παρουσιάζεται υψηλότερος στις κανονικές συνθήκες σε σύγκριση με τις δύο συγκεντρώσεις θαλασσινού νερού.

Βάση των παραπάνω αποτελεσμάτων τα δύο είδη χρωστικών παράγονται επιτυχώς και για τα δυο στελέχη στη συνθήκη όπου το θαλασσινό νερό είναι εμπλουτισμένο.

3.4.4 Πολαρογραφικός προσδιορισμός του ρυθμού φωτοσυνθετικής παραγωγής οξυγόνου

Η φωτοσυνθετική δραστηριότητα των δυο στελεχών, έπειτα από ανάπτυξή του στη συνθήκη με εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό συγκρίθηκε με τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα έπειτα από ανάπτυξή του στο θρεπτικό μέσο BG11 (εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6: Πολαρογραφικός προσδιορισμός παραγωγής οξυγόνου για τα στελέχη Δ cpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS (A) και Δ cpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) (B) έπειτα από χρονικό διάστημα δέκα ημερών παραμονής των καλλιεργειών στους βιοαντιδραστήρες δύο φάσεων (υγρή/αέρας) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50 \mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, θερμοκρασία 28°C σε δυο διαφορετικές συνθήκες: σε θρεπτικό μέσο BG11 (μάρτυρας), εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό με συστατικά του BG11.

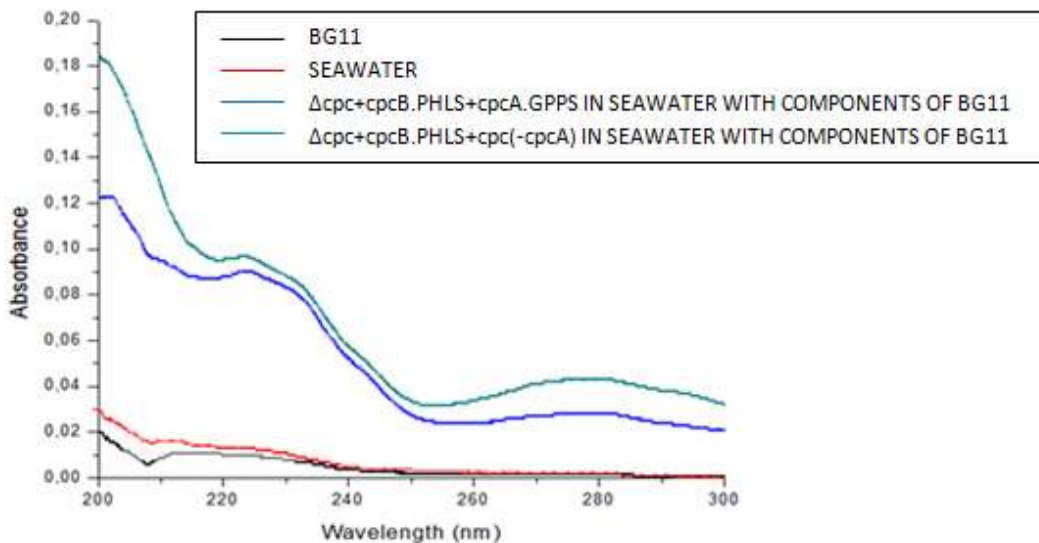
Για το στέλεχος Δ cpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS (Εικόνα 3.6 A) παρατηρείται κατά το πέρας των ημερών του πειράματος πως υπάρχει μια πτωτική τάση στο ρυθμό παραγωγής οξυγόνου. Τις ημέρες δυο, οχτώ και δέκα παρατηρείται πως υπάρχει αύξηση της παραγωγής οξυγόνου σε σχέση με τη συνθήκη μάρτυρα. Αντίστοιχα, για το στέλεχος Δ cpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) (Εικόνα 3.6 B) παρατηρείται πως ο ρυθμός παραγωγής οξυγόνου μεταξύ των δυο συνθηκών βρίσκεται σε παρόμοια επίπεδα. Κατά την διάρκεια των δέκα ημερών υπάρχει πτώση των τιμών παραγωγής

οξυγόνου. Μεταξύ των δυο στελεχών το στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS έχει μεγαλύτερη φωτοσυνθετική δραστηριότητα σε σχέση με το στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) και στις δυο συνθήκες. Η πτωτική αυτή τάση στο ρυθμό παραγωγής οξυγόνου στη διάρκεια των δέκα ημερών πιθανότατα οφείλεται στο γεγονός ότι καταναλώνονται τα θρεπτικά συστατικά που υπάρχουν και στα δυο θρεπτικά μέσα.

3.4.5 Ποιοτική και ποσοτική μελέτη του παραγόμενου β-φελλανδρενίου

3.4.5.1 Ταυτοποίηση του β-φελλανδρενίου με φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους και με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με χρωματογραφία μάζας

Ο ποιοτικός χαρακτηρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS) για το στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA), καθώς και με φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους και για τα δυο στελέχη. Ο χρόνος κατακράτησης του β-φελλανδρενίου στην αέρια χρωματογραφία είναι περίπου 12.45 min, ενώ στη φασματοσκοπία υπεριώδους το β-φελλανδρένιο δίνει χαρακτηριστική κορυφή στα 232.4 nm. 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 [43]. 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).

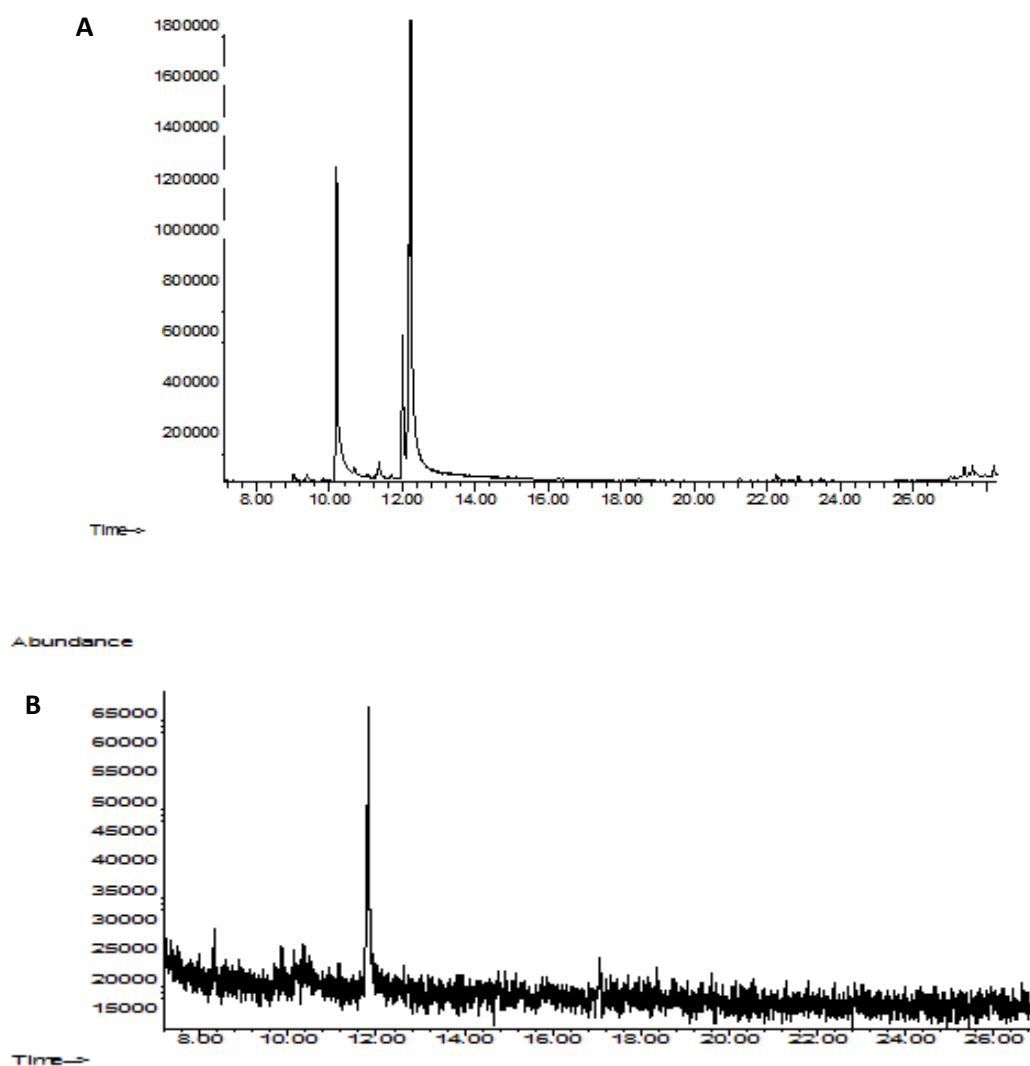


Εικόνα 3.7: Φάσματα απορρόφησης στο υπεριώδες των εκχυλισμάτων εξανίου για την ταυτοποίηση του παραγόμενου β -φελλανδρενίου. Με μαύρο φαίνεται το φάσμα από το εκχύλισμα εξανίου σε σκέτο BG11, με κόκκινο σε σκέτο θαλασσινό νερό, με μπλε αφορά στο στέλεχος $\Delta cpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS$ σε εμπλουτισμένο με συστατικά του BG11 θαλασσινό νερό και με πράσινο αφορά στο στέλεχος $\Delta cpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA)$.

Αρχικά λήφθηκε φάσμα απορρόφησης των δειγμάτων που συλλέχθηκαν με εξάνιο στην περιοχή 200-300 nm για τα δυο θρεπτικά που χρησιμοποιήθηκαν για τις δυο συνθήκες, BG11 (μαύρη γραμμή στο φάσμα) και θαλασσινό νερό (κόκκινη γραμμή στο φάσμα). Από τα φάσματα είναι φανερό πως στα 232,4 nm δεν απορροφά τίποτα στα δυο θρεπτικά καθώς δεν περιέχουν κύτταρα. Στις περιπτώσεις όπου μελετώνται τα στελέχη $\Delta cpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS$ και $\Delta cpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA)$ σε εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό παρατηρείται και στις δυο περιπτώσεις κορυφή στα 232,4 nm. Αυτό αποδεικνύει πως τα στελέχη αυτά παράγουν β -φελλανδρένιο επιτυχώς. Η απουσία κορυφής στα 260 nm φανερώνει πως δεν παράγεται το α -ισομερές. Η συνθήκη του BG11 έχει ελεγχτεί σε παλαιότερες ερευνητικές εργασίες [71], καθώς αποτελεί το κύριο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης των κυανοβακτηρίων τόσο του αγρίου τύπου όσο και των μεταλλαγμάτων.

Στο χρωματογράφημα του GC εκχυλίσματος εξανίου από το μεταλλαγμένο στέλεχος $\Delta cpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA)$ παρατηρείται μία μόνο κορυφή με χρόνο κατακράτησης περίπου στα 12,00 min (Εικόνα 3.8 B) δηλαδή κοντά στο χρόνο κατακράτησης με αυτόν που είχε το εμπορικό πρότυπο β -φελλανδρένιο (Εικόνα 3.8

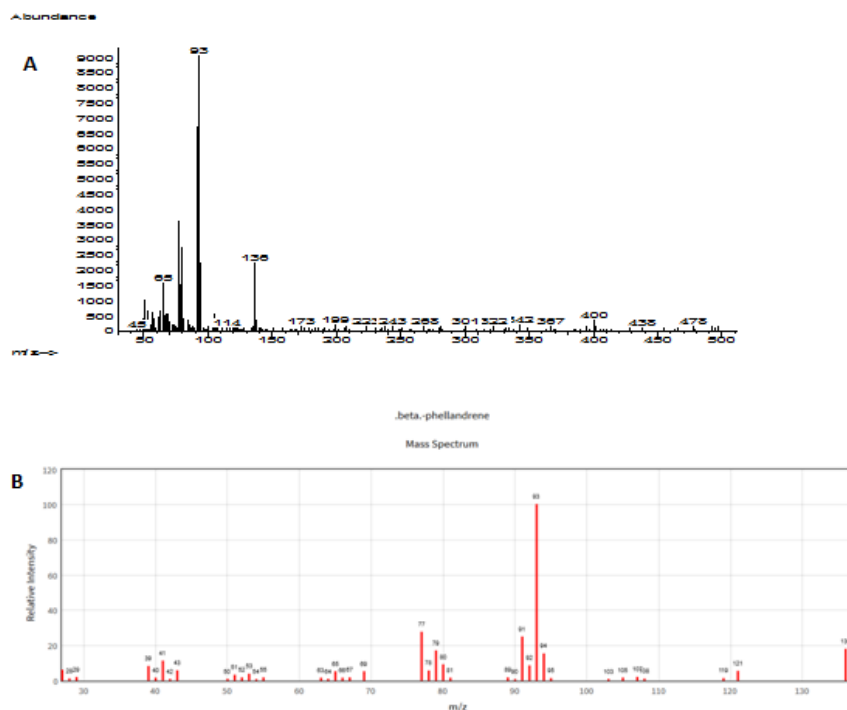
A), ελαφρώς μετατοπισμένη. Συνεπώς, η κορυφή αυτή αντιστοιχεί στο β -φελλανδρένιο.



Εικόνα 3.8: A. Χρωματογράφημα εμπορικού β -φελλανδρενίου με χαρακτηριστικό χρόνο κατακράτησης του β -φελλανδρενίου στα 12.45 min., B. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος εξανίου που συλλέχθηκε από την επιφάνεια των βιοαντιδραστήρων του στελέχους Δ cpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA).

Επιπλέον, επιτυχής ταυτοποίηση του β -φελλανδρενίου πραγματοποιείται με τη λήψη φάσματος μάζας και τη σύγκριση αυτού με φάσμα μάζας πρότυπης ένωσης β -φελλανδρενίου, όπως αυτό βρέθηκαν στη βιβλιοθήκη του ιστοτόπου του National Institute of Standards and Technology «NIST». Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν ακόμα μία επιβεβαίωση πως η κορυφή με χρόνο κατακράτησης περίπου 12,00 min στο χρωματογράφημα GC αντιστοιχεί στο β -φελλανδρένιο. Το φάσμα μάζας του β -φελλανδρενίου στις βάσεις δεδομένων NIST καθώς και του εκχυλίσματος εξανίου από την επιφάνεια των καλλιιεργειών του μεταλλάγματος είναι πανομοιότυπα και

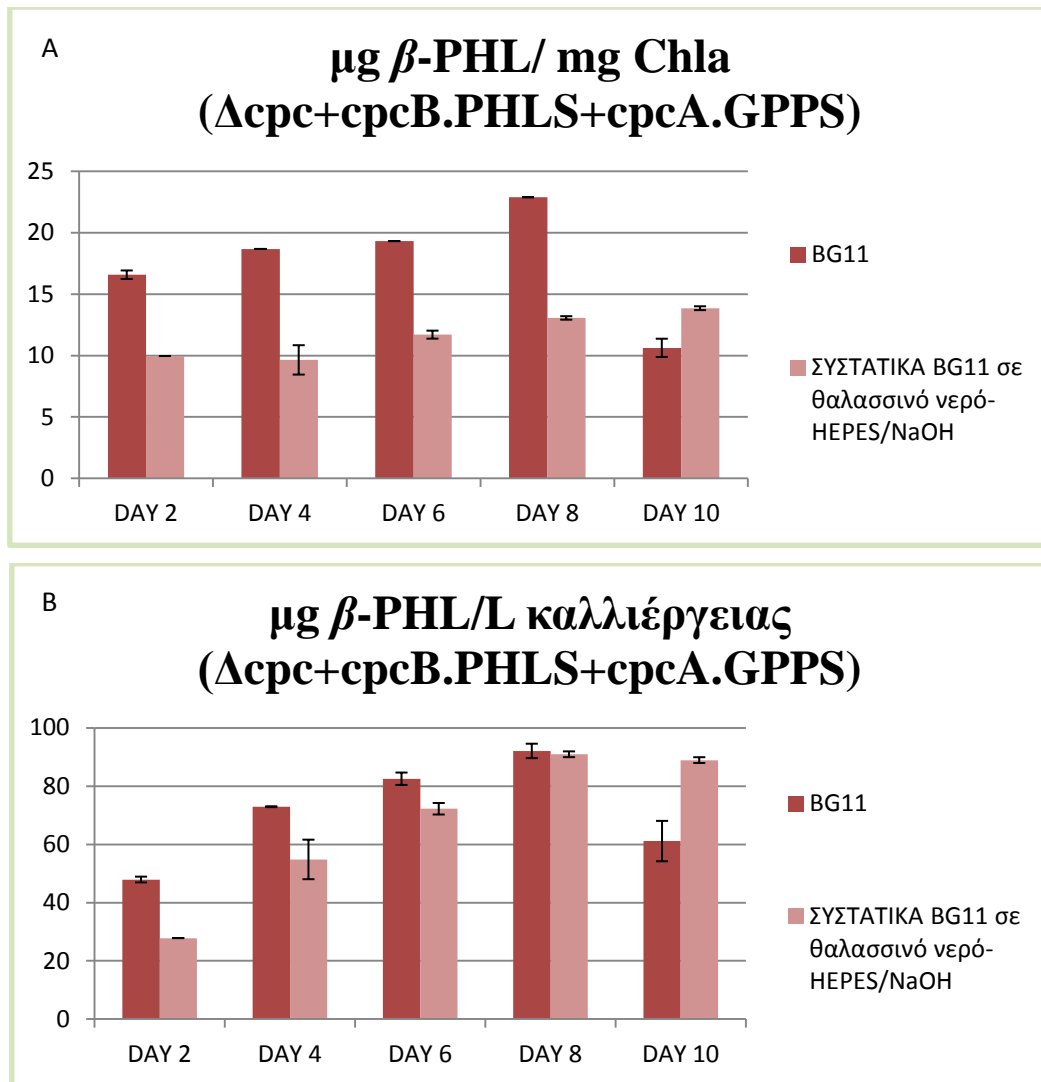
εμφανίζουν τις χαρακτηριστικές κορυφές του β -φελλανδρενίου σε m/z 77,91 και 136 (μητρική κορυφή) (Εικόνα 3.9).



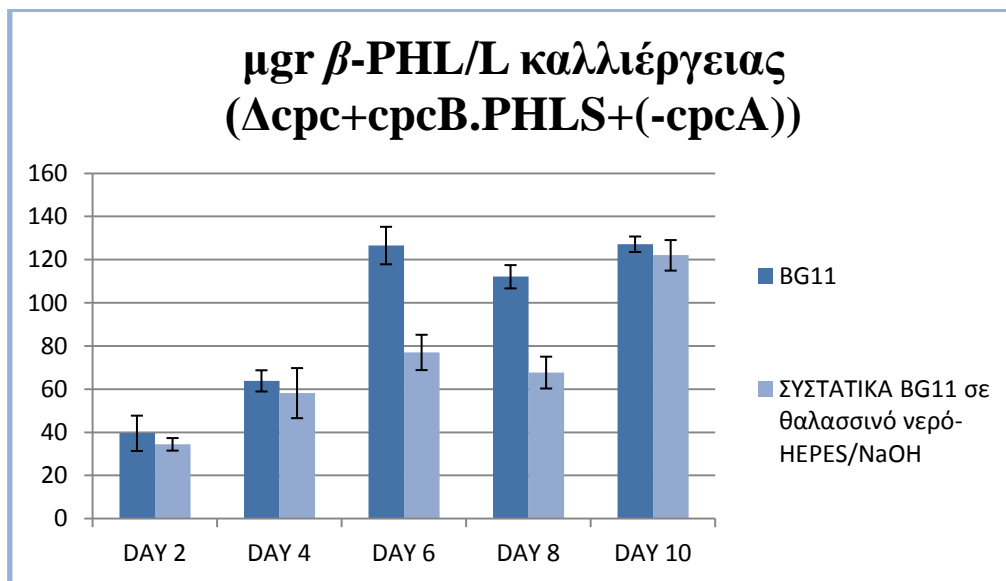
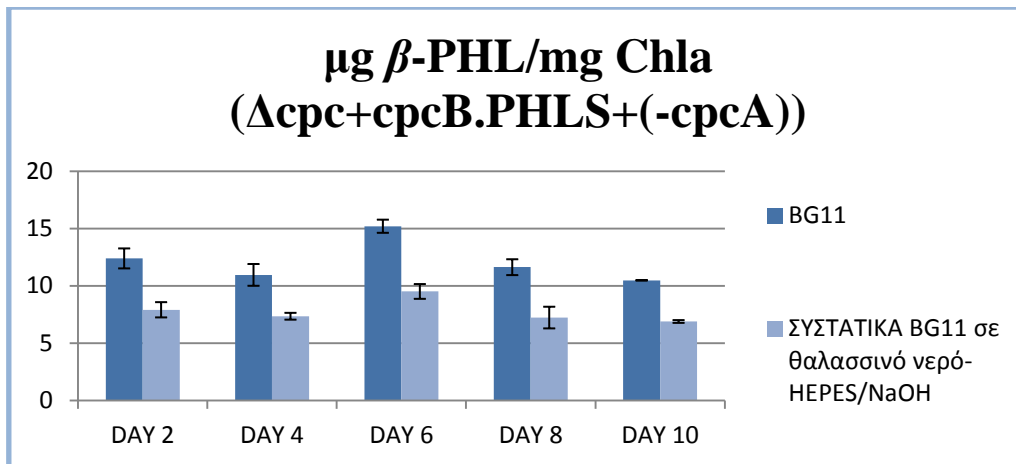
Εικόνα 3.9: Φάσματα μάζας των κορυφών του GC με χρόνο κατακράτησης 12 min. Α. Φάσμα μάζας του δείγματος από το εκχύλισμα εξανίου για το στέλεχος $\Delta crc+crcB.PHLS+crc(-crcA)$, Β. Φάσμα μάζας του β -φελλανδρενίου καταχωρημένο σε βάσεις δεδομένων (NIST).

3.4.5.2 Ποσοτικός προσδιορισμός του παραγόμενου β -φελλανδρενίου

Στις Εικόνες 3.10 και 3.11 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν στην ποσότητα β -φελλανδρενίου που παράγεται από τα στελέχη $\Delta crc+crcB.PHLS+crcA.GPPS$ και $\Delta crc+crcB.PHLS+crc(-crcA)$ εκφραζόμενη ως μg β -φελλανδρενίου ανά μg χλωροφύλλης και μg β -φελλανδρενίου ανά L καλλιέργειας. Στην περίπτωση αυτή δεν μπορεί να εκφραστεί ως προς g ξηρής βιομάζας κυττάρων (DCW) της καλλιέργειας, όπως συνέβαινε σε παλιότερες εργασίες, καθώς το άλας στο θαλασσινό νερό επηρεάζει το ξηρό βάρος της καλλιέργειας.



Εικόνα 3.10: Υπολογισμός παραγόμενου β-φελλανδρενίου έπειτα από χρονικό διάστημα δέκα ημερών παραμονής των καλλιιεργειών σε βιοαντιδραστήρες δύο φάσεων (υγρή/αέριας) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50 \mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, θερμοκρασία 28°C στο στέλεχος $\Delta\text{cpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS}$ σε κανονικές συνθήκες (BG11), και σε εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μg β-φελλανδρενίου ανά mg χλωροφύλλης α (A) και ως μg β-φελλανδρενίου ανά L καλλιέργειας (B).

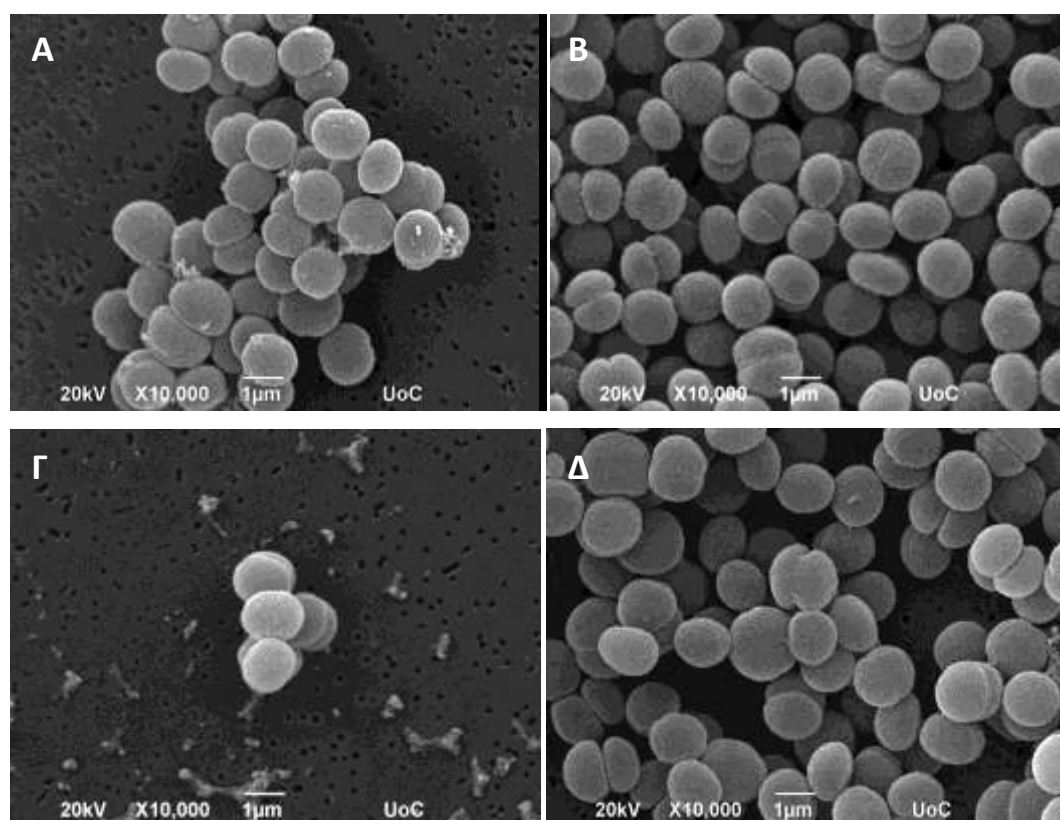


Εικόνα 3.11: Υπολογισμός παραγόμενου β-φελλανδρενίου έπειτα από χρονικό διάστημα δέκα ημερών παραμονής των καλλιιεργειών σε βιοαντιδραστήρες δύο φάσεων (υγρής/αέρας) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50 \mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, θερμοκρασία 28°C στο στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) σε κανονικές συνθήκες (BG11), και σε εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μg β-φελλανδρενίου ανά mg χλωροφύλλης α (A) και ως μg β-φελλανδρενίου ανά L καλλιέργειας (B).

Τα στελέχη Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS και Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) φάνηκε πως είναι ικανά να παράγουν β-φελλανδρένιο παρουσία θαλασσινού νερού εμπλουτισμένο με συστατικά του BG11, σε μικρότερο όμως ποσοστό σε σχέση με τις κανονικές συνθήκες. Η ικανότητα παραγωγής του β-φελλανδρενίου σε αυτή τη συνθήκη είναι μεγάλης σημασίας, καθώς με τον τρόπο αυτό μειώνεται εξαιρετικά το κόστος της μεθόδου, χωρίς να επιβαρύνεται παράλληλα ο πλανήτης, καθώς υπάρχει άφθονο θαλασσινό νερό διαθέσιμο.

3.4.6 Μελέτη της μορφολογίας του μικροοργανισμού με χρήση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM)

Κατά τη διάρκεια των δέκα ημερών του πειράματος λήφθηκαν την δεύτερη και δέκατη ημέρα εικόνες από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, προκειμένου να γίνει παρατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων στις συνθήκες BG11 που είναι η συνθήκη μάρτυρας και στην περίπτωση του θρεπτικού μέσου όπου περιέχει συστατικά του BG11 σε θαλασσινό νερό. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3.12) φαίνονται τα αποτελέσματα λήψεων των εικόνων για το στέλεχος Δ crc+crcB.PHLS+crc(-crcA).



Εικόνα 3.12: Λήψη εικόνων από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης για το στέλεχος Δ crc+crcB.PHLS+crc(-crcA) την δεύτερη (A) και τη δέκατη (B) ημέρα του πειράματος στις συνθήκες BG11 -μάρτυρας και σε εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό με συστατικά του BG11 (Γ) και (Δ) για τις ημέρες δυο και δέκα αντίστοιχα.

Από τις εικόνες του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου δεν φαίνεται κάποια διαφορά στη μορφολογία του στελέχους Δ crc+crcB.PHLS+crc(-crcA) μεταξύ των συνθηκών BG11 (συνθήκη μάρτυρας) και εμπλουτισμένου θαλασσινού. Το σχήμα τους παραμένει σφαιρικό χωρίς κάποια ουσιαστική διαφορά και σε βάθος των ημερών. Παράλληλα δεν παρατηρείται παραγωγή εξωπολυσακχαριτών, όπως είχε προκύψει από παρατήρηση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης σε προηγούμενη ερευνητική

εργασία του εργαστηρίου για το ίδιο στέλεχος σε 100% θαλασσινό νερό. Γενικότερα, εξωπολυσακχαρίτες (EPS) δημιουργούνται από πολλά βακτήρια και μικροφύκη προσδίδοντάς τους ανθεκτικότητα σε συνθήκες στρες [94]. Επομένως, η συνθήκη με εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό δεν προκαλεί καταπόνηση στα κύτταρα του στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA).

3.5 Συμπεράσματα

Στο κεφάλαιο αυτό επιβεβαιώνεται η επιτυχής ανάπτυξη των στελεχών $\Delta\text{cpc}+\text{cpcB.PHLS}+\text{cpcA.GPPS}$ και $\Delta\text{cpc}+\text{cpcB.PHLS}+\text{cpc}(-\text{cpcA})$ με παράλληλη ετερόλογη παραγωγή β -φελλανδρενίου στη συνθήκη με εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό με συστατικά του BG11.

Συγκεκριμένα, τα στελέχη είχαν μελετηθεί προηγουμένως στο εργαστήριο σε συνθήκες υψηλής αλατότητας και σε 100% θαλασσινό νερό, όπου ανταπεξήλθαν επιτυχώς και παράγαγαν το επιθυμητό προϊόν. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν ως προς την ανάπτυξη, φωτοσυνθετική δραστηριότητα και παραγωγή β -φελλανδρενίου σε θαλασσινό νερό, το οποίο είχε εμπλουτιστεί με συστατικά από το BG11, το οποίο αποτελεί το κανονικό μέσο ανάπτυξης των κυανοβακτηρίων. Και τα δύο στελέχη αναπτύχθηκαν κανονικά έπειτα από δέκα ημέρες παραμονής σε ειδικούς βιοαντιδραστήρες 100 mL, πραγματοποιώντας φωτοσύνθεση και παραγωγή β -φελλανδρενίου.

Έπειτα, τα αποτελέσματα του κεφαλαίου αυτού έδειξαν ότι τα στελέχη μπορούν να αναπτύσσονται αποτελεσματικά στο θρεπτικό μέσο εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό, χωρίς σημαντικές επιπτώσεις στη φωτοσυνθετική δραστηριότητα και εξακολουθώντας να παράγει β -φελλανδρένιο. Η ανάπτυξή τους ωστόσο προσομοίαζε πολύ καλά την αντίστοιχη ανάπτυξη στο BG11. Τα παραπάνω συμπεράσματα μπορούν να συνεισφέρουν στη μεταφορά της παρούσας έρευνας σε βιομηχανική κλίμακα. Η βιομηχανική παραγωγή του προϊόντος απαιτεί βιοαντιδραστήρες μεγάλης κλίμακας συνεπώς τεράστιες ποσότητες καλλιέργειας. Η ικανότητα των μεταλλαγμένων στελεχών να αναπτύσσονται σε θαλασσινό νερό εξακολουθώντας την παραγωγή β -φελλανδρενίου, μειώνει το κόστος της παραγωγής, καθώς το θαλασσινό νερό είναι άφθονο στη Γη. Με τον τρόπο αυτό, αποφεύγονται βιο-ηθικά ζητήματα που αφορούν την κατανάλωση του μικρού ποσοστού γλυκού νερού στον πλανήτη και τις τεράστιες ανάγκες που έχουν όλοι οι οργανισμοί και οι βιομηχανίες σε αυτό. Δίνει επίσης το πλεονέκτημα χρήσης υφάλμυρου ή θαλασσινού νερού, το οποίο είναι άφθονο έναντι του περιορισμένου πόσιμου νερού. 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.

**Κεφάλαιο 4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΤΕΡΟΛΟΓΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ β-
ΦΕΛΛΑΝΔΡΕΝΙΟΥ ΣΕ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΓΕΝΕΤΤΙΚΑ
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ *SYNECHOCYSTIS* ΣΕ
ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟ ΘΑΛΑΣΣΙΝΟ ΝΕΡΟ**

4.1 Εισαγωγή

4.1.1 Ακίνητοποίηση κυττάρων

Ως ακίνητοποίηση 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 [95]. Έχει βρεθεί στη φύση πως όταν οι μικροοργανισμοί είναι προσκολλημένοι μεταξύ τους, είναι πιο ενεργοί σε σχέση με τους αντίστοιχους ελεύθερους μικροοργανισμούς [96]. Επιπλέον, θετικά στοιχεία της ακίνητοποίησης είναι η υψηλότερη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων, ανθεκτικότητα σε βαρέα μέταλλα, επικίνδυνους διαλύτες, μη ευνοϊκά pH και θερμοκρασίες, υψηλότερη ανάπτυξη και παραγωγή χρήσιμων προϊόντων [96]. Επιπλέον, παρουσιάζουν διαφορές στην έκφραση γονιδίων [97]. Συνεπώς τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον έχει στραφεί σε συστήματα ακίνητοποιημένων κυττάρων με στόχο βιοτεχνολογικές εφαρμογές, στη βιομηχανία τροφίμων, σε χημικές και κλινικές μελέτες, στην οργανική σύνθεση [96, 98].

Η επιλογή και η καταλληλότητα ενός συστήματος ακίνητοποίησης εξαρτάται από το είδος της εφαρμογής για την οποία προορίζεται. Μερικά γενικά επιθυμητά χαρακτηριστικά του φορέα ακίνητοποίησης 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 ακίνητοποίησης και να επιτρέπει τη διέλευση θρεπτικών συστατικών. Τέλος, πρέπει να παρέχει μία απλή και οικονομικά βιώσιμη διαδικασία ακίνητοποίησης [95]. Για βιομηχανική χρήση η μέθοδος ακίνητοποίησης 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 ακίνητοποιημένα κύτταρα να διατηρούν τη δραστηριότητα που έχουν όταν είναι ελεύθερα στο θρεπτικό μέσο και τέλος να έχουν μεγάλη διάρκεια ζωής όταν ακίνητοποιηθούν. Το τελευταίο αφορά τόσο την αντοχή του μέσου

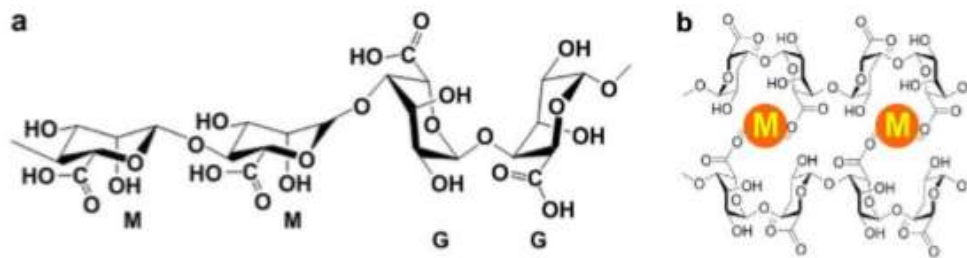
ακίνητοποίησης όσο και τη δραστικότητα των κυττάρων η οποία θα πρέπει να διατηρηθεί όσο γίνεται περισσότερο καιρό [99].

Οι τεχνικές ακίνητοποίησης είναι αρκετές, ενώ χωρίζονται γενικότερα σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη ονομάζεται προσκόλληση και μπορεί να γίνει είτε μέσω δέσμησης των κυττάρων μεταξύ τους (συσσωμάτωση), είτε μέσω προσκόλλησης αυτών πάνω σε μία στερεή επιφάνεια. Η δεύτερη ονομάζεται παγίδευση. Στη περίπτωση αυτή τα κύτταρα είτε ενθυλακώνονται σε στερεά ή γελώδη κυστίδια, είτε παγιδεύονται σε μεμβράνες ή πορώδη μήτρες [100].

Στην συγκεκριμένη ερευνητική μελέτη η τεχνική που εφαρμόζεται είναι η ενθυλάκωση των κυττάρων σε στερεά σφαιρίδια. Συγκεκριμένα δημιουργήθηκαν σφαιρίδια αλγινικού πολυμερούς.

4.1.2 Αλγινικά πολυμερή

Το αλγινικό πολυμερές αποτελεί έναν φυσικό ανιοντικό πολυσακχαρίτη με υδρόφιλες ιδιότητες [101]. Δομικά, αποτελεί έναν γραμμικό ετεροπολυμερή πολυσακχαρίτη, που συντίθεται από την επανάληψη δύο μονάδων γουλουρονικού οξέος (G) συνδεδεμένες με α -1,4 γλυκοζιτικό δεσμό και δύο μονάδες μαννουρονικού οξέος (M) συνδεδεμένες τόσο μεταξύ τους, όσο και με τις μονάδες γουλουρονικού οξέος με β -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. Ο σχηματισμός της κοιλότητας επιτρέπει την συνεργατική δέσμηση κατιόντων μετάλλων (Εικόνα 4.1.b) [102, 103]. 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 [102, 104].



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 για τη δημιουργία πολυμερούς με τον εγκλωβισμό άλατος ανάμεσα στις πολυσακχαρικές αλυσίδες. Ελήφθη από την παραπομπή [102].

Αύτη η διαδικασία ακινητοποίησης μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ένα απλό βήμα κάτω από πολύ ήπιες συνθήκες, γεγονός που την καθιστά συμβατή με τα περισσότερα ζωντανά κύτταρα. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής αποτελεί το πολύ χαμηλό κόστος εφαρμογής [105, 106].

Τα αλγινικά σφαιρίδια παρασκευάζονται με την προσθήκη διαλύματος αλγινικού νατρίου σε διάλυμα δισθενών κατιόντων. 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 [103]. 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 [107].

Ο σχηματισμός της ιοντροπικής γέλης πραγματοποιείται με ανταλλαγή των ιόντων νατρίου του γουλουρονικού νατρίου με τα δισθενή κατιόντα που αναφέρονται παραπάνω [108]. 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 [103].

Όσο υψηλότερη είναι η περιεκτικότητα σε γουλουρονικό οξύ, τόσο πιο ισχυρές μηχανικές ιδιότητες στο αλγινικό. Ενώ χαμηλότερη περιεκτικότητα προσδίδει μεγαλύτερη ελαστικότητα. Σε ότι αφορά στη 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 [71].

Ακόμα μια σημαντική ιδιότητα του αλγινικού οξέος που χρησιμοποιείται για την ακινητοποίηση κυττάρων είναι η ισχύς με την οποία συγκρατεί τα ακινητοποιημένα κύτταρα. Ταυτόχρονα επιτρέπει τη μεταφορά θρεπτικών ουσιών όπως και προϊόντων του μεταβολισμού μέσω πόρων. Συνεπώς, η ανάπτυξη των κυττάρων καθίσταται δυνατή καθώς μπορούν να λαμβάνουν τα θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη και επιβίωσή τους από το θρεπτικό μέσο, που είναι τοποθετημένα τα σφαιρίδια, καθώς επίσης το επιθυμητό προϊόν, β -φελλανδρένιο στη συγκεκριμένη μελέτη, μπορεί να εξέλθει από αυτά και να συσσωρευτεί στην επιφάνεια της υδατικής φάσης ώστε να μπορεί να απομακρυνθεί [109].

4.1.3 Πλεονεκτήματα και εφαρμογές παγιδευμένων κυττάρων σε αλγινικά πολυμερή

Με την ακινητοποίηση των κυττάρων μέσα σε υδρογέλες αλγινικού ασβεστίου επιτρέπεται η αύξηση της πυκνότητας των κυττάρων μέσα σε ένα διαφανές και διαπερατό υλικό, το οποίο παράγεται. Οι ακινητοποιημένοι μικροοργανισμοί συνήθως αναπτύσσονται σε μικροαποικίες, των οποίων η μορφολογία μπορεί να διαφέρει αρκετά σε σχέση με αυτές που σχηματίζουν τα ελεύθερα κύτταρα.

Τα ακινητοποιημένα κύτταρα εμφανίζουν αρκετά πλεονεκτήματα έναντι των ελεύθερων κυττάρων. Αρχικά είναι πιο εύκολος και αποτελεσματικός ο χειρισμός τους, καθώς μπορεί να γίνει ανάκτηση αυτών από το θρεπτικό μέσο πολύ εύκολα. Επιπλέον, μέσω της ακινητοποίησης τα κύτταρα προστατεύονται από μηχανική κατάπτωση, περιβαλλοντικές καταπονήσεις (όπως pH, θερμοκρασία, άλατα), από τοξικές επιδράσεις οργανικών διαλυτών όπως επίσης και από μολύνσεις. Ακόμη η ακινητοποίηση κυττάρων είναι οικονομικά πιο προσιτή σε μεγαλύτερης κλίμακας καλλιέργειες, διότι απαιτεί μικρότερο χώρο για κατασκευή βιοαντιδραστήρα σε

σύγκριση με τη χρήση καλλιεργειών ελεύθερων κυττάρων [110]. 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 [110]. Τέλος, έχουν παρατηρηθεί αξιοσημείωτες διαφορές στην κυτταρική ανάπτυξη, στο μεταβολισμό και στη φυσιολογία των κυττάρων κατά την ακινητοποίηση [111]. Εξαιτίας των πλεονεκτημάτων αυτών, συστήματα ακινητοποιημένων κυττάρων σε μήτρες αλγινικού ασβεστίου βρίσκουν ολοένα και περισσότερες εφαρμογές σε μεγάλης κλίμακας βιοαντιδραστήρες με ποικίλες εφαρμογές.

Η ακινητοποίηση στον τομέα της υγείας και φαρμακοβιομηχανίας έχει μια πληθώρα παραδειγμάτων για τη χρήση σφαιριδίων αλγινικού πολυμερούς με στόχο τη μεταφορά φαρμάκων, ανάπτυξη κυττάρων και σε μεταμοσχεύσεις. Ο έλεγχος συγκράτησης και διάχυσης του φαρμάκου είναι εφικτός με αποτέλεσμα να γίνεται στοχευμένη δράση. Μεταμοσχεύσεις καθίστανται δυνατές αναπτύσσοντας τα κύτταρα του επιθυμητού ιστού στο εσωτερικό των σφαιριδίων [112].

Επιπρόσθετα, η ακινητοποίηση μικροοργανισμών βρίσκει αρκετές εφαρμογές στο πεδίο της βιοαποκατάστασης (τοξικοί ρύποι και ξενοβιοτικές ουσίες). Τα ακινητοποιημένα κύτταρα εμφάνισαν καλύτερη απόδοση βιοαποκατάστασης σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα [111, 113]. 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 [113].

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, λόγω καλύτερης ανάπτυξης και μεταβολικής δραστηριότητας των ακινητοποιημένων κυττάρων, μπορεί να γίνει εκμετάλλευση ενθυλάκωσης μικροοργανισμών για την απομόνωση χρήσιμων προϊόντων παραγόμενων από το μεταβολισμό τους, είτε παραγόμενων έπειτα από ετερόλογη έκφρασή τους. Αυτό βρίσκει πολύ μεγάλη εφαρμογή σε διάφορους επιστημονικούς κλάδους, καθώς υψηλότερη ανάπτυξη στα σφαιρίδια θα οδηγήσει και σε υψηλότερη παραγωγή του προϊόντος ενδιαφέροντος. Τέτοια παραδείγματα αφορούν την παραγωγή ειδικών μεταβολιτών, π.χ. αντιβιοτικών, οργανικών οξέων, αμινοξέων ή

αιθανόλης [114]. Ακόμα μπορεί να αφορούν δευτερογενείς συνήθως μεταβολίτες συμπεριλαμβανομένου την παραγωγή πολυσακχαριτών [115] και την παραγωγή βιοκαυσίμων [116]. Ενώ και στη βιομηχανία τροφίμων ιδιαίτερο ενδιαφέρον διαθέτουν τα προϊόντα που παράγονται από τους οργανισμούς μέσω της ζύμωσης.

Συνεπώς φαίνεται πως η ακινητοποίηση μικροοργανισμών είναι μία διαδικασία που διευκολύνει το χειρισμό της βιομάζας και πολλές φορές ευνοεί και την απόδοση των μικροοργανισμών. Μέσω των πολλών πλεονεκτημάτων της μεθόδου 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* των μεταλλαγμένων στελεχών $\Delta\text{cpc}+\text{cpcB.PHLS}+\text{cpc}(-\text{cpcA})$ και $\Delta\text{cpc}+\text{cpcB.PHLS}+\text{cpcA.GPPS}+\text{cpc}$ σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου για ένα χρονικό διάστημα των δώδεκα ημερών. Ταυτόχρονα μελετήθηκε η βιωσιμότητας του συστήματος με απώτερο στόχο μία πιθανή βιοτεχνολογική εφαρμογή. Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό με συστατικά του BG11. Μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε δεύτερη ημέρα και συγκρίνονταν με καλλιέργεια μάρτυρα, η οποία αποτελείται από ελεύθερα κύτταρα του εκάστοτε στελέχους, όταν αυτά αναπτύσσονται στο ίδιο θρεπτικό μέσο (εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό). Σε παλιότερες ερευνητικές εργασίες του εργαστηρίου, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη παραγωγή β -φελλανδρενίου από τα ακινητοποιημένα κύτταρα, έναντι των ελεύθερων. Επομένως, αφού στα προηγούμενα κεφάλαια της παρούσας εργασίας βρέθηκε η συνθήκη που προσομοιάζει σε ανάπτυξη την κανονική συνθήκη ανάπτυξης, δηλαδή το BG11, στο κεφάλαιο αυτό θελήσαμε να δούμε ποια θα είναι τα αποτελέσματα της παραγωγής στην αντίστοιχη συνθήκη σε ακινητοποιημένα κύτταρα.

4.3 Πειραματικό μέρος

4.3.1 Συνθήκες ανάπτυξης

Στο παρόν κεφάλαιο της συγκεκριμένης μελέτης χρησιμοποιήθηκαν τα μεταλλαγμένα στελέχη $\Delta crc+crcB.PHLS+(-crcA)$ και $\Delta crc+crcB.PHLS+crcA.GPPS+crc$ του κυανοβακτηρίου *Synechocystis* sp. PCC 6803. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν φωτοαυτότροφα σε υγρό θρεπτικό υλικό BG11 μέσα σε κωνικές φιάλες. Υπήρχε συνεχής παροχή ατμοσφαιρικού αέρα μέσω αντλίας προκειμένου να υπάρχει διαρκής τροφοδοσία CO₂ στα κύτταρα, έτσι ώστε να μπορούν να επιτελούν φωτοσύνθεση. Επιπλέον, το pH στο διάλυμα των καλλιεργειών ήταν σταθερό (pH =7,5) με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος 25 mM NaH₂PO₄. Η ανάπτυξη των καλλιεργειών πριν και κατά τη διάρκεια των πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 28±1°C με 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 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.

4.3.2 Ανάπτυξη καλλιεργειών σε βιοαντιδραστήρες για τη λήψη μετρήσεων

Η συνθήκη που προσομοιάζει με τον καλύτερο τρόπο την συνθήκη μάρτυρα, ήταν εκείνη με θαλασσινό νερό με συστατικά του BG11 και ρυθμιστικό 25 mM HEPES/NaOH pH =7,5. Επομένως, η συνθήκη αυτή επιλέχθηκε να μελετηθεί και σε ακινητοποιημένα κύτταρα για τα μεταλλαγμένα στελέχη $\Delta crc+crcB.PHLS+(-crcA)$ και $\Delta crc+crcB.PHLS+crcA.GPPS+crc$ του κυανοβακτηρίου στο τρέχον κεφάλαιο, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με αυτά που προκύπτουν σε ελεύθερα κύτταρα στο ίδιο θρεπτικό μέσο, αντίστοιχα και για τα δυο στελέχη που μελετήθηκαν.

4.3.2.1 Ακίνητοποίηση των κυττάρων σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου

Έπειτα από ανάπτυξη της μητρικής καλλιέργειας ως την στατική φάση, φυγοκεντρήθηκε στα 6000 x g για 10 min ώστε να συλλεχθούν τα κύτταρα. Στη συνέχεια επαναιωρήθηκαν σε εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό, ώστε η τελική οπτική συγκέντρωση (OD_{730}) να είναι 0,5. Ακολούθησε ήπια ανάδευση 5 mL των αραιωμένων κυττάρων (OD_{730} 0,5) με 5 mL διαλύματος αλγινικού άλατος νατρίου (Alginic acid sodium salt from brown algae, Fluca) συγκέντρωσης 6% w/v ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση αλγινικού άλατος 3% w/v. Το διάλυμα 6% w/v αλγινικού άλατος είχε αποστειρωθεί στο αυτόκαυστο. Το διάλυμα κυττάρων αλγινικού μεταφέρεται σε θάλαμο συνεχούς νηματικής ροής αέρα και παρουσία φλόγας προστέθηκε στάγδην με τη χρήση πιπέτας Gilson 1000 μ L σε διάλυμα $CaCl_2$ συγκέντρωσης 2% w/v με αποτέλεσμα την δημιουργία 100 μ L σφαιριδίων μέσα στο διάλυμα. Τα σφαιρίδια αφέθηκαν με ήπια ανάδευση για μία ώρα ώστε να πραγματοποιηθεί η σκλήρυνσή τους. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με νερό και μια πλύση με θρεπτικό, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια ασβεστίου και μεταφέρθηκαν σε βιοαντιδραστήρες των 100 mL. Προστέθηκαν 50 mL εμπλουτισμένου θαλασσινού νερού, 20% (v/v) καθαρό διοξείδιο του άνθρακα και το σύστημα σφραγίστηκε. Τοποθετήθηκαν σε περιστροφικό αναδευτήρα (shaker) με συχνότητα ανάδευσης 180 min^{-1} και φωτονιακή ακτινοβολία 50 μ mol φωτονίων $m^{-2} \cdot s^{-1}$. Κατά την πειραματική περίοδο, κάθε 48 h για διάστημα 12 ημερών μελετήθηκαν βιοαντιδραστήρες ως προς την παραγωγή προϊόντος και απελευθέρωση κυττάρων. Παράλληλα, κάθε 48 h γινόταν προσθήκη 10% CO_2 .

4.3.3 Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων - Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας στα 730nm (OD_{730})

Η ανάπτυξη της καλλιέργειας προσδιορίστηκε με μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UV-2700 της Shimadzu. Με τον ίδιο τρόπο πραγματοποιήθηκε έλεγχος εάν απελευθερώνονται κύτταρα από τα σφαιρίδια αλγινικού στο εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό, που ήταν τοποθετημένα τα σφαιρίδια.

4.3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών

Για την ποσοτικοποίηση των φωτοσυνθετικών χρωστικών, ποσότητα καλλιέργειας 1 mL φυγοκεντρήθηκε 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 φυγοκεντρήθηκε προκειμένου να απομακρυνθεί το ίζημα και μετρήθηκε η απορρόφηση του υπερκείμενου 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:

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

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

4.3.5 Ταυτοποίηση του παραγόμενου β-φελλανδρενίου

Η ανάλυση για την ταυτοποίηση του παραγόμενου β-φελλανδρενίου πραγματοποιήθηκε με δυο διαφορετικές μεθόδους. Τα δείγματα εξανίου που συλλέχθηκαν αναλύθηκαν τόσο με φασματομετρία απορρόφησης στο υπεριώδες, όσο και με αέρια χρωματογραφία μάζας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας.

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

Η ανάλυση για την ταυτοποίηση του παραγόμενου β-φελλανδρενίου πραγματοποιήθηκε σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UV-2700 της Shimadzu. Κάθε 48 h από την ημέρα μηδέν έως και τη δέκατη ημέρα όπου κράτησε η συγκεκριμένη πειραματική διεργασία, προσθέτονταν στο βιοαντιδραστήρα 4 mL εξανίου. Ο βιοαντιδραστήρας αφηνόταν με το εξάνιο για επιπλέον 2 h, ώστε να συσσωρευτεί το προϊόν στην υδρόφοβη φάση. Στη συνέχεια, η οργανική φάση απομακρύνθηκε με τη χρήση υάλινης πιπέτας Pasteur και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 232,4 nm, στο οποίο το β-φελλανδρένιο δίνει χαρακτηριστική κορυφή.

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

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°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 εισαγωγή και ο όγκος του δείγματος ήταν 1 μL. Η θερμοκρασία της transfer line ήταν 280°C. Οι συνθήκες ηλεκτρονικού ιονισμού ήταν ενέργεια ιονισμού 70 eV, 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.

4.3.6 Ποσοτικός προσδιορισμός του παραγόμενου β-φελλανδρενίου

Για την ποσοτικοποίηση του παραγόμενου β-φελλανδρενίου χρησιμοποιήθηκε η απορρόφηση στο υπεριώδες, όπου το β-φελλανδρένιο δίνει χαρακτηριστική κορυφή στα 232,4 nm σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UV-2700 της Shimadzu. Έπειτα έγινε εφαρμογή του νόμου του Beer-Lambert ($\epsilon_{232,4}=15,7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [89].

4.4 Αποτελέσματα και συζήτηση

Τα μεταλλαγμένα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο κεφάλαιο ήταν τα $\Delta\text{cpc}+\text{cpcB.PHLS}+(-\text{cpcA})$ και $\Delta\text{cpc}+\text{cpcB.PHLS}+\text{cpcA.GPPS}+\text{cpc}$ του κυανοβακτηρίου *Synechocystis*. Ήδη από προηγούμενες μελέτες φάνηκε πως τα στελέχη αυτά παράγουν τη μεγαλύτερη ποσότητα προϊόντος, οπότε και επιλέχθηκαν να μελετηθούν σε ακινητοποιημένη μορφή, που από προηγούμενες εργασίες φάνηκε πως παράγεται περισσότερο προϊόν στην περίπτωση ακινητοποίησης [71, 72].

Ταυτόχρονα με τα ακινητοποιημένα κύτταρα, το πείραμα πραγματοποιήθηκε και σε κύτταρα του αντίστοιχου στελέχους, που αναπτύχθηκαν ελεύθερα σε εμπλουτισμένο με συστατικά του BG11 θαλασσινό νερό. Τόσο τα ελεύθερα κύτταρα, όσο και τα σφαιρίδια αλγινικού που περιείχαν τα κύτταρα τοποθετήθηκαν για ανάπτυξη σε εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό για 12 πειραματικές ημέρες.

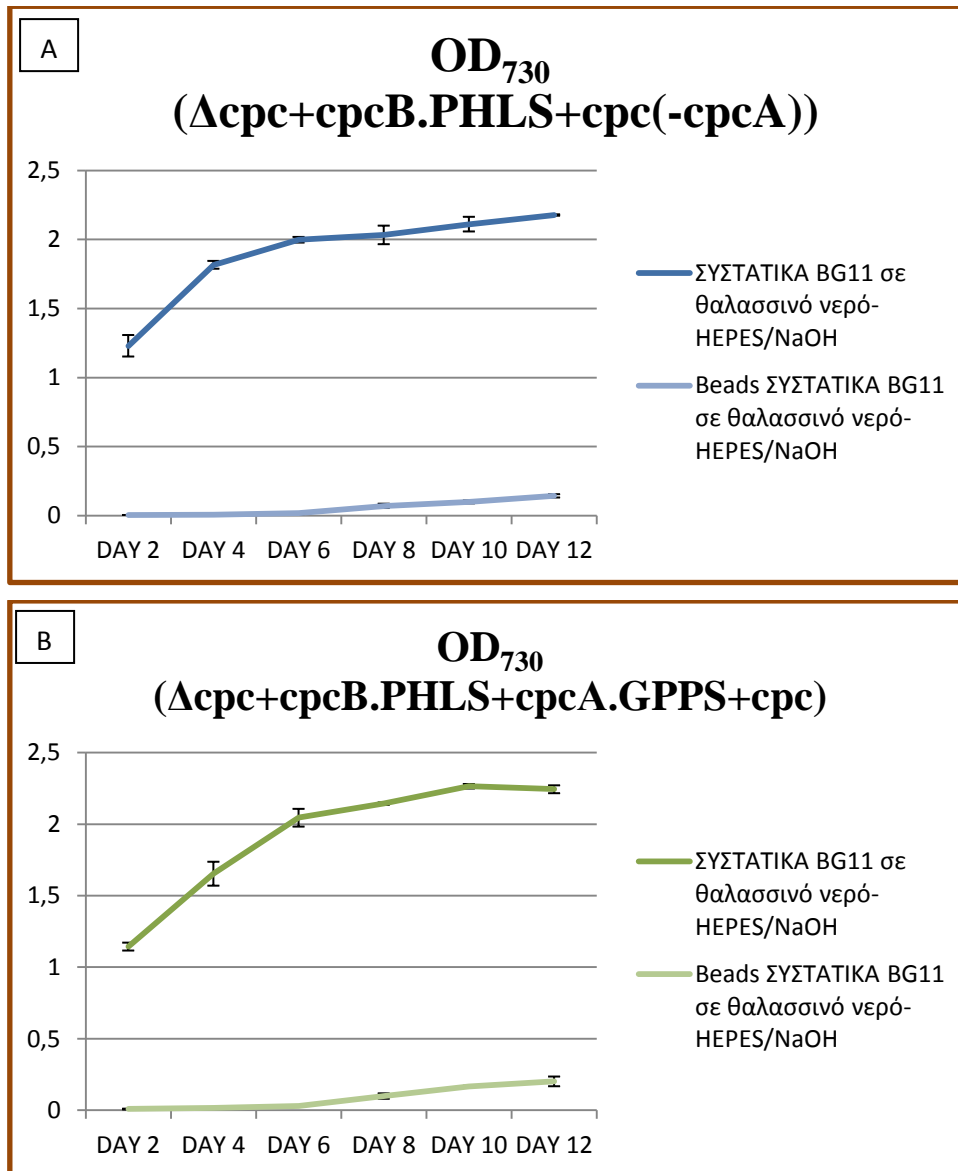
4.4.1 Μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων - Προσδιορισμός οπτικής πυκνότητας στα 730nm (OD_{730}) - Προσδιορισμός απελευθέρωσης κυττάρων από τα σφαιρίδια αλγινικού

Οι μετρήσεις οπτικής πυκνότητας (OD_{730}) για τα στελέχη $\Delta\text{cpc}+\text{cpcB.PHLS}+(-\text{cpcA})$ και $\Delta\text{cpc}+\text{cpcB.PHLS}+\text{cpcA.GPPS}+\text{cpc}$ παρουσιάζονται στην Εικόνα 4.2, για τα ελεύθερα κύτταρα του κάθε στελέχους στην συνθήκη με εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό και για τα ακινητοποιημένα κύτταρα προκειμένου να δούμε αν απελευθερώνονται κύτταρα στο θρεπτικό.

Στην εικόνα 4.2 παρατηρείται η επιτυχής ανάπτυξη του στελέχους $\Delta\text{cpc}+\text{cpcB.PHLS}+\text{cpc}(-\text{cpcA})$ (A) και $\Delta\text{cpc}+\text{cpcB.PHLS}+\text{cpcA.GPPS}+\text{cpc}$ (B) σε εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό με συστατικά του BG11. Ακολουθείται φυσιολογική καμπύλη ανάπτυξης, καθώς διακρίνεται η εκθετική φάση ανάπτυξη ως την 6^η πειραματική ημέρα και η στατική φάση από την 8^η ως τη 12^η.

Δείκτη της απελευθέρωσης κυττάρων από τα σφαιρίδια αλγινικού πολυμερούς αποτελεί η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του υπερκειμένου των σφαιριδίων, δηλαδή του θαλασσινού νερού στο οποίο είναι τοποθετημένα. Απορρόφηση στα 730 nm σημαίνει παρουσία κυττάρων. Στην εικόνα 4.2 A και B παρουσιάζεται η οπτική πυκνότητα του υπερκειμένου των σφαιριδίων (OD_{730}) για τα δυο στελέχη. Μέχρι και

την έκτη πειραματική ημέρα δεν εντοπίστηκαν κύτταρα στο υπερκείμενο, από το οποίο επιβεβαιώνεται ότι τα κύτταρα αναπτύσσονται είτε στο εσωτερικό είτε στην εξωτερική επιφάνεια των σφαιριδίων και δεν απελευθερώνονται στο θρεπτικό στο οποίο βρίσκονται. Από την 8^η ημέρα κι έπειτα παρατηρούνται μικρές τιμές απορρόφησης, που υποδηλώνουν την απελευθέρωση των κυττάρων στο θρεπτικό. Αυτό παρατηρείται και στα δυο στελέχη που μελετήθηκαν στον τρέχον κεφάλαιο.



Εικόνα 4.2: Μέτρηση οπτικής πυκνότητας OD₇₃₀. Στέλεχος $\Delta cpc + cpcB.PHLS + cpc(-cpcA)$ (A) και στέλεχος $\Delta cpc + cpcB.PHLS + cpcA.GPPS + cpc$ (B) παρουσία εμπλουτισμένου θαλασσινού νερού, σε ελεύθερα κύτταρα και σε παγιδευμένα κύτταρα για να δούμε την ανάπτυξη και την απελευθέρωση κυττάρων στο θρεπτικό αντίστοιχα. Μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε δυο ημέρες σε ένα χρονικό

διάστημα 12 ημερών παραμονής των καλλιιεργειών στους βιοαντιδραστήρες δύο φάσεων (υγρής/αέριας) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50 \mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, θερμοκρασία 28°C .

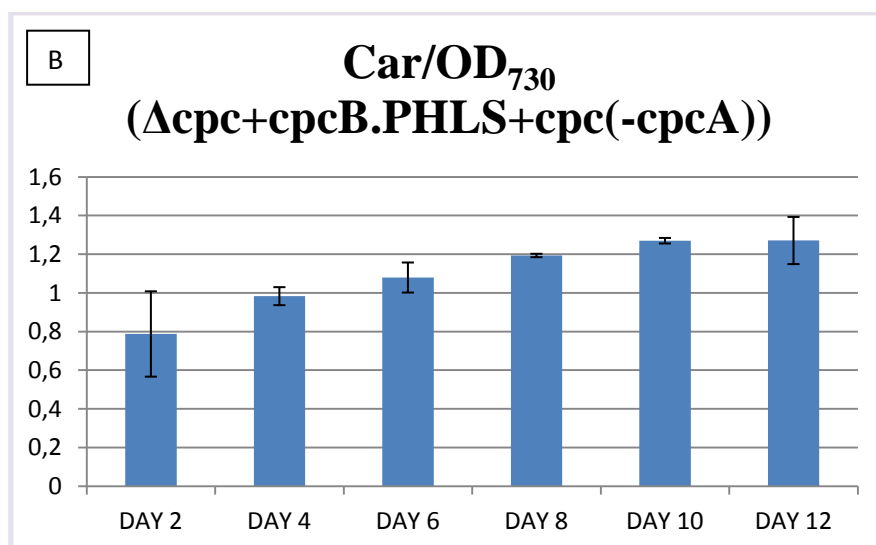
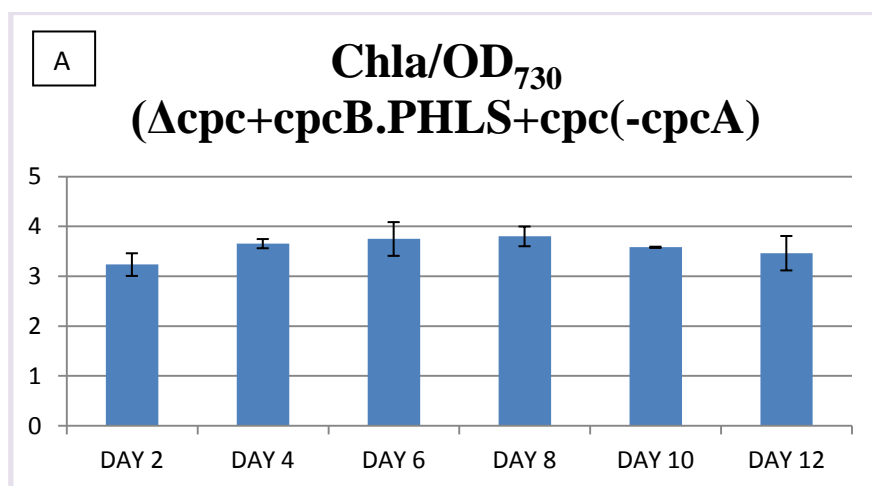
Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να επιβεβαιωθεί και φαινοτυπικά όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.3. Την έκτη ημέρα (αριστερά στην Εικόνα 4.3) στον βιοαντιδραστήρα με τα ακινητοποιημένα κύτταρα, δεν παρατηρείται κάποιο χρώμα στο θρεπτικό μέσο. Αντιθέτως, την δωδέκατη ημέρα παρατηρείται ότι το θρεπτικό γίνεται λιγότερο διαυγές στον αντίστοιχο βιοαντιδραστήρα με τα ακινητοποιημένα κύτταρα, το οποίο υποδηλώνει την απελευθέρωση κυττάρων στο θρεπτικό. Παρατηρώντας τα ελεύθερα κύτταρα τόσο την ημέρα έξι, όσο και την ημέρα δώδεκα του πειράματος φαίνεται να αναπτύσσονται τα κύτταρα κανονικά έχοντας πράσινο χρώμα που με την πάροδο των ημερών γίνεται πιο έντονο. Κατά την ανάπτυξη των κυττάρων σχηματίζονται αποικίες στην εξωτερική επιφάνεια των σφαιριδίων. Η κυτταρική διαίρεση στη μήτρα του πολυμερούς οδηγεί στο σχηματισμό αποικιών. Ο σχηματισμός αποικίας άσκησε μηχανικές δυνάμεις στην πολυμερή μήτρα από έναν αριθμό προεξοχών στην επιφάνεια του σφαιριδίου. Αυτά οδηγούν σε σχηματισμό οπών, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση κυττάρων από την εξωτερική επιφάνεια των σφαιριδίων στο μέσο [67].

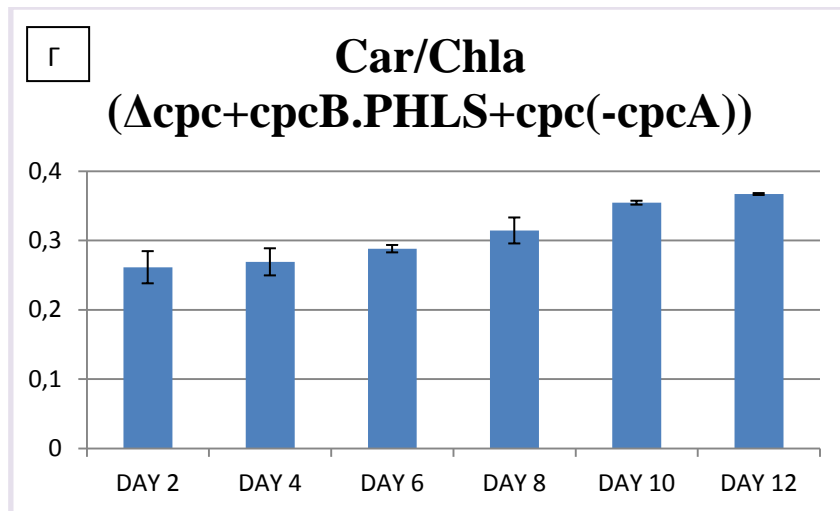


Εικόνα 4.3: Φαινότυπος καλλιιεργειών του στελέχους $\Delta\text{cpc}+\text{cpcB.PHLS}+\text{cpcA.GPPS}+\text{cpc}$ σε βιοαντιδραστήρες την έκτη ημέρα (αριστερά) και την δωδέκατη (δεξιά), τόσο σε ακινητοποιημένα κύτταρα, όσο και σε ελεύθερα (μάρτυρας) σε εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό με συστατικά του BG11. Την έκτη ημέρα δεν παρατηρείται χρώμα στο θρεπτικό του βιοαντιδραστήρα με τα ακινητοποιημένα κύτταρα, το οποίο να υποδηλώνει την ύπαρξη κυττάρων σε αυτό, σε αντίθεση με την ημέρα δώδεκα, όπου το χρώμα του θρεπτικού είναι θολό. Σε ότι αφορά στα ελεύθερα κύτταρα φαινοτυπικά φαίνεται να αναπτύσσονται κανονικά.

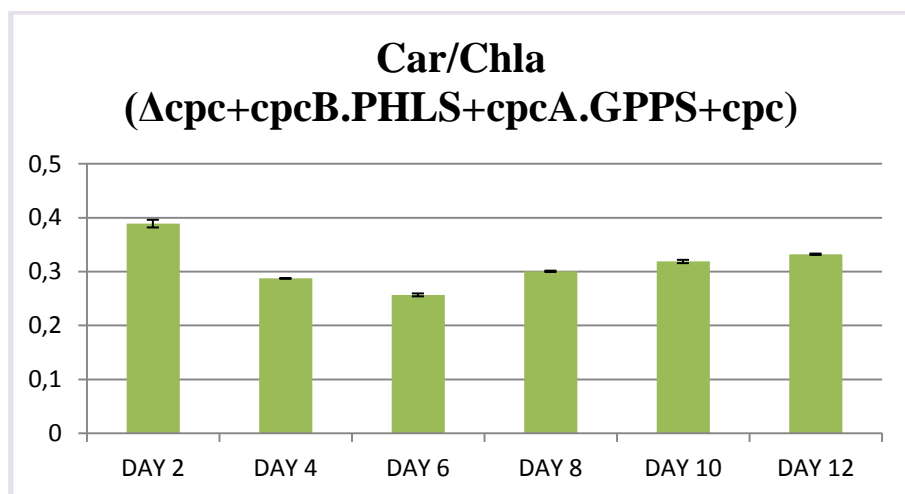
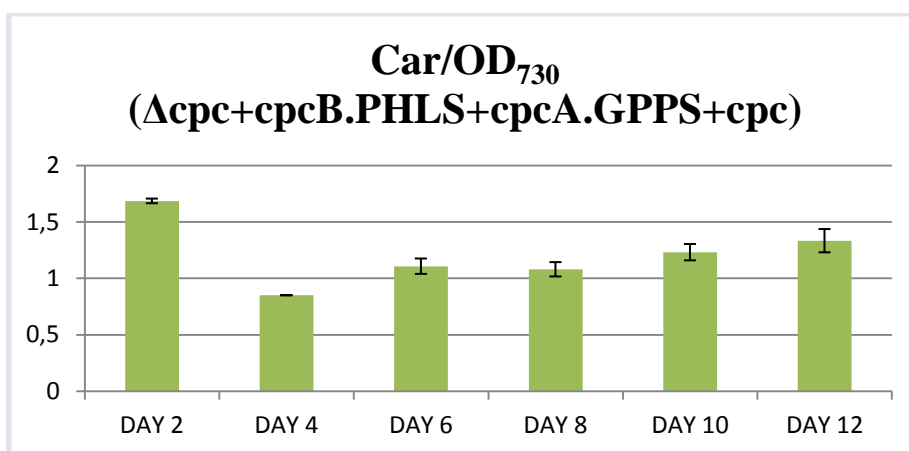
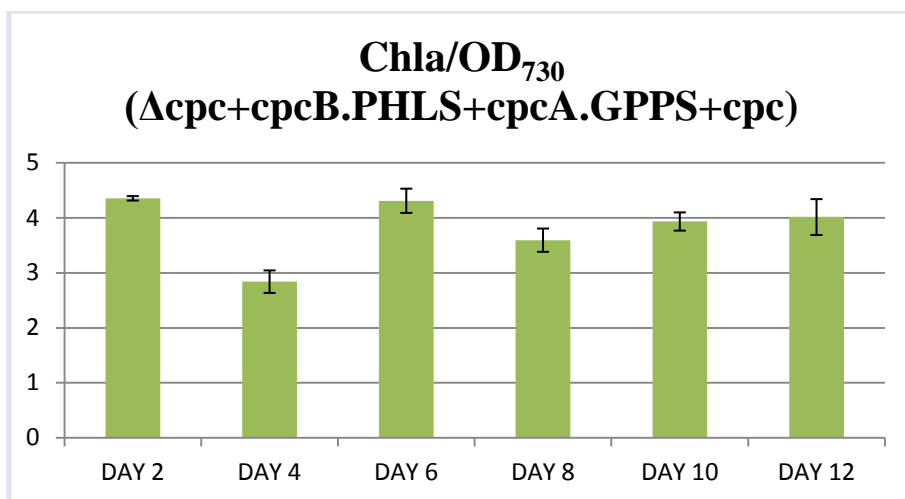
4.4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός φωτοσυνθετικών χρωστικών

Στην εικόνα 4.4 και 4.5 παρουσιάζεται η μεταβολή των χρωστικών των ελεύθερων κυττάρων του στελέχους $\Delta cpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA)$ και του στελέχους $\Delta cpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc$ κατά την ανάπτυξη τους σε εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό σε διάστημα 12 πειραματικών ημερών.





Εικόνα 4.4: Περιεχόμενο φωτοσυνθετικών χρωστικών του μεταλλαγμένου στελέχους $\Delta cpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA)$ σε χρονικό διάστημα δέκα ημερών ανάπτυξης των καλλιεργειών στους βιοαντιδραστήρες διπλής φάσης (αέριας/υγρής) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας $50 \mu\text{mol φωτονίων} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ και θερμοκρασία 28°C σε εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό. Οι χρωστικές εκφράστηκαν στις εικόνες A και B ως μg χρωστικής ανά OD_{730} και Γ. ως Car/Chla. Οι μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε δεύτερη ημέρα στη διάρκεια δώδεκα ημερών.



Εικόνα 4.5: Περιεχόμενο φωτοσυνθετικών χρωστικών του μεταλλαγμένου στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc σε χρονικό διάστημα δέκα ημερών ανάπτυξης των καλλιεργειών στους βιοαντιδραστήρες διπλής φάσης (αέριας/υγρής) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων ·m⁻² ·s⁻¹ και θερμοκρασία 28°C σε εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό. Οι χρωστικές εκφράστηκαν στις εικόνες Α και Β ως μg χρωστικής ανά OD₇₃₀ και Γ. ως Car/Chla. Οι μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε δεύτερη ημέρα στη διάρκεια δώδεκα ημερών.

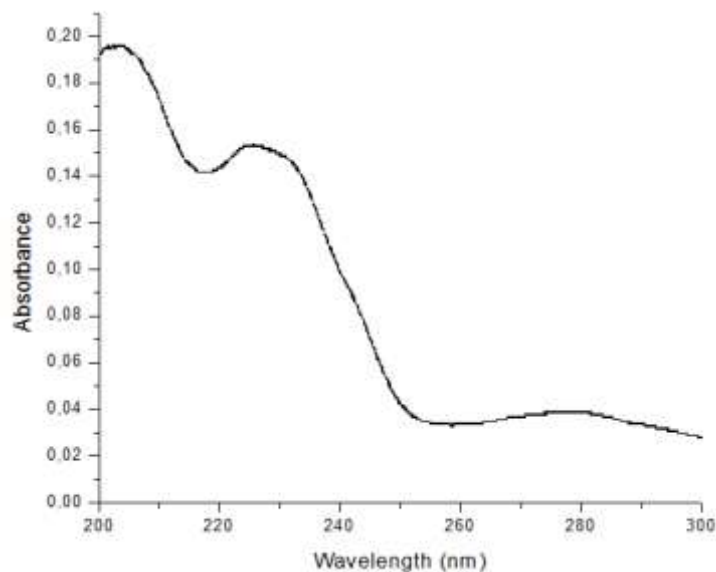
Η συγκέντρωση χλωροφύλλης *a* και καροτενοειδών αντίστοιχα εκφράστηκαν ανά την οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας για τα στελέχη $\Delta crp+crpB.PHLS+crp(-crpA)$ (Εικόνα 4.4 A, B) και $\Delta crp+crpB.PHLS+crpA.GPPS+crp$ (Εικόνα 4.5 A, B), η οποία αποτελεί δείκτη της ανάπτυξης του οργανισμού. Επιπλέον, δίνεται και ο λόγος καροτενοειδών προς χλωροφύλλη Εικόνες 4.4 Γ και 4.5 Γ. Και στα δυο στελέχη παρατηρείται παραγωγή της χλωροφύλλης *a* και υπάρχει μια παρόμοια παραγωγή και για τα δυο στελέχη στο διάστημα των δώδεκα ημερών. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρούνται και στην περίπτωση των καροτενοειδών, ενώ το στέλεχος $\Delta crp+crpB.PHLS+crp(-crpA)$ παράγει περισσότερα καροτενοειδή σε σχέση με το στέλεχος $\Delta crp+crpB.PHLS+crpA.GPPS+crp$.

Βάση των παραπάνω αποτελεσμάτων τα δύο είδη χρωστικών παράγονται επιτυχώς και για τα δυο στελέχη σε εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό.

4.4.3 Ποιοτική και ποσοτική μελέτη του παραγόμενου β -φελλανδρενίου

4.4.3.1 Ταυτοποίηση του β -φελλανδρενίου με φασματισκοπία ορατού-υπεριώδους και με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με χρωματογραφία μάζας

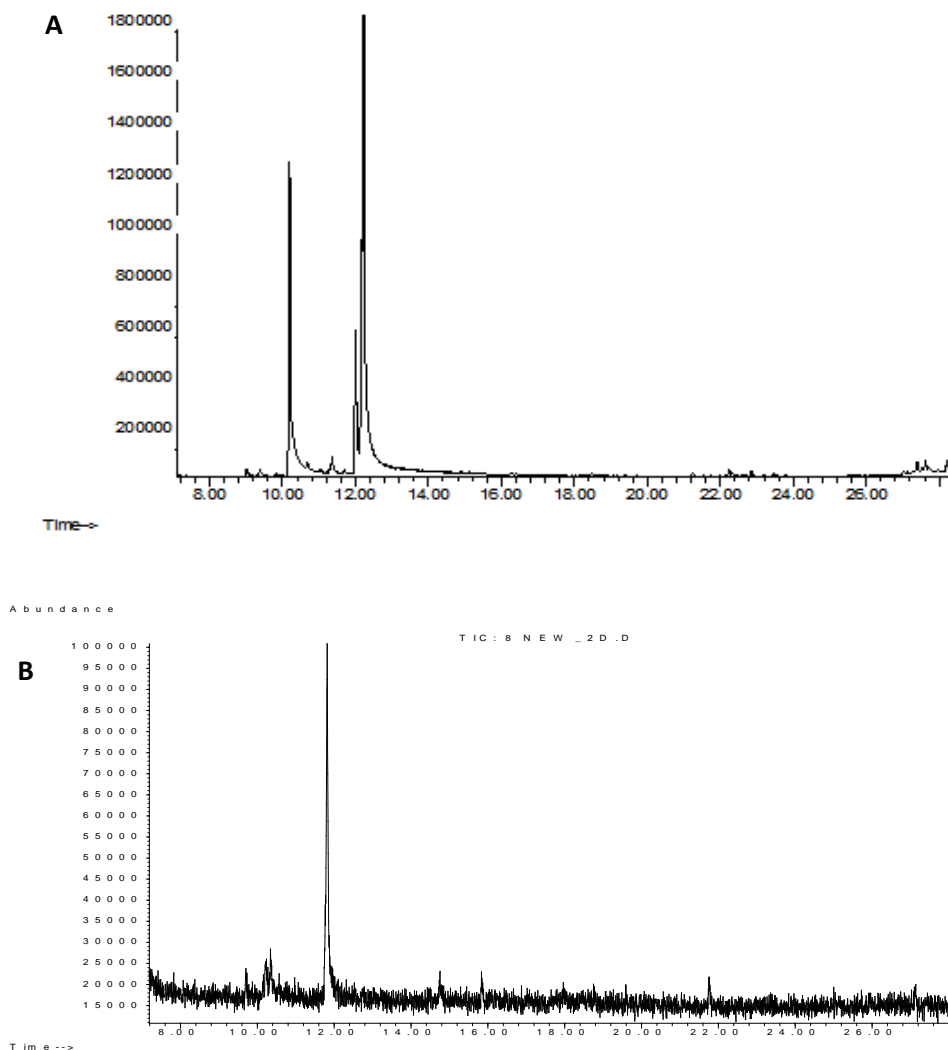
Ο ποιοτικός χαρακτηρισμός του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS) για το στέλεχος $\Delta crp+crpB.PHLS+crpA.GPPS+crp$, καθώς και με φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους και για τα δυο στελέχη. Ο χρόνος κατακράτησης του β -φελλανδρενίου στην αέρια χρωματογραφία είναι περίπου 12.45 min, ενώ στη φασματοσκοπία υπεριώδους το β -φελλανδρένιο δίνει χαρακτηριστική κορυφή στα 232.4 nm. 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 [43]. 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 4.6: Φάσματα απορρόφησης στο υπεριώδες εκχυλίσματος εξανίου για την ταυτοποίηση του παραγόμενου β -φελλανδρενίου. Με μαύρο φαίνεται το φάσμα από το εκχύλισμα εξανίου σε εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό με συστατικά του BG11 για το στέλεχος $\Delta crc+crcB.PHLS+crcA.GPPS+crc$.

Λήφθηκε φάσμα απορρόφησης των δειγμάτων που συλλέχθηκαν με εξάνιο στην περιοχή 200-300 nm για το στέλεχος $\Delta crc+crcB.PHLS+crcA.GPPS+crc$ σε εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό και παρατηρείται κορυφή στα 232,4 nm. Αυτό αποδεικνύει πως το στέλεχος αυτό παράγει β -φελλανδρένιο επιτυχώς σε αυτή τη συνθήκη. Η απουσία κορυφής στα 260 nm φανερώνει πως δεν παράγεται το α -ισομερές. Η περίπτωση του στελέχους $\Delta crc+crcB.PHLS+crc(-craA)$, έχει ελεγχθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο της παρούσας εργασίας και φάνηκε πως και αυτό παράγει το επιθυμητό προϊόν στην συνθήκη του εμπλουτισμένου θαλασσινού νερού.

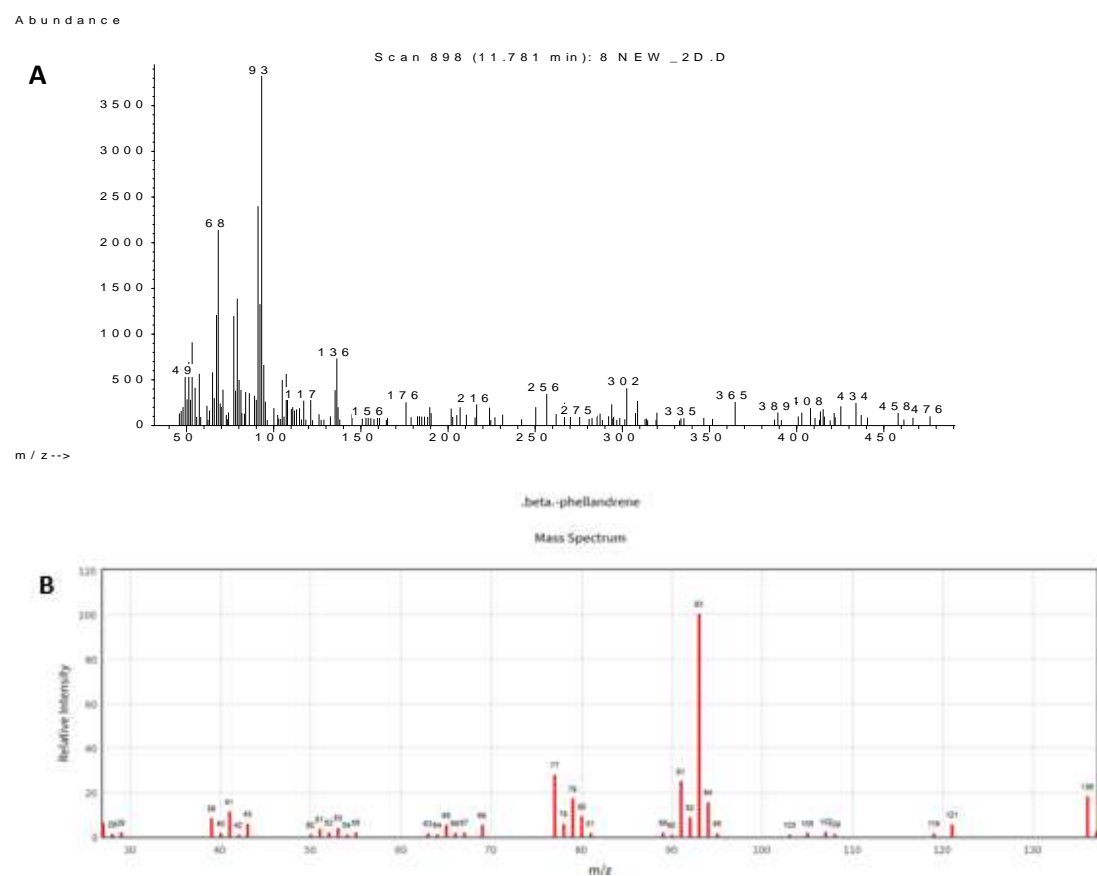
Στο χρωματογράφημα του GC εκχυλίσματος εξανίου από το μεταλλαγμένο στέλεχος $\Delta crc+crcB.PHLS+crcA.GPPS+crc$ παρατηρείται μία μόνο κορυφή με χρόνο κατακράτησης περίπου στα 12,00 min (Εικόνα 4.7 Β) δηλαδή κοντά στον χρόνο κατακράτησης με αυτόν που είχε το εμπορικό πρότυπο β -φελλανδρένιο (Εικόνα 4.7 Α), ελαφρώς μετατοπισμένη. Συνεπώς, η κορυφή αυτή αντιστοιχεί στο β -φελλανδρένιο.



Εικόνα 4.7: Α. Χρωματογράφημα εμπορικού β -φελλανδρενίου με χαρακτηριστικό χρόνο κατακράτησης του β -φελλανδρενίου στα 12.45 min., Β. Χρωματογράφημα εκχυλίσματος εξανίου που συλλέχθηκε από την επιφάνεια των βιοαντιδραστήρων του στελέχους Δcpc+cpcB.PHLS+cpcA.GPPS+cpc.

Επιπλέον, επιτυχής ταυτοποίηση του β -φελλανδρενίου πραγματοποιείται με τη λήψη φάσματος μάζας και τη σύγκριση αυτού με φάσμα μάζας πρότυπης ένωσης β -φελλανδρενίου, όπως αυτό βρέθηκαν στη βιβλιοθήκη του ιστοτόπου του National Institute of Standards and Technology «NIST». Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν ακόμα μία επιβεβαίωση πως η κορυφή με χρόνο κατακράτησης περίπου 12,00 min στο χρωματογράφημα GC αντιστοιχεί στο β -φελλανδρένιο. Το φάσμα μάζας του β -φελλανδρενίου στις βάσεις δεδομένων NIST καθώς και του εκχυλίσματος εξανίου από την επιφάνεια των καλλιεργειών του μεταλλάγματος είναι πανομοιότυπα και

εμφανίζουν τις χαρακτηριστικές κορυφές του β -φελλανδρενίου σε m/z 77,91 και 136 (μητρική κορυφή) (Εικόνα 4.8).

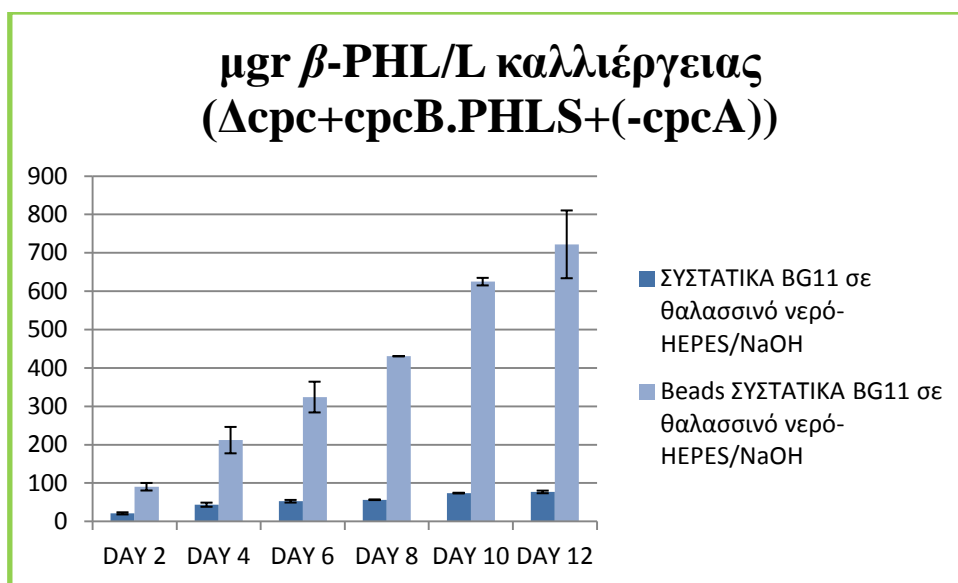


Εικόνα 4.8: Α. Φάσμα μάζας του δείγματος από το εκχύλισμα εξανίου για το στέλεχος Δερε+ερεΒ.PHLS+ερεΑ.PHLS+ερε. Β. Φάσμα μάζας του β -φελλανδρενίου καταχωρημένο σε βάσεις δεδομένων (NIST).

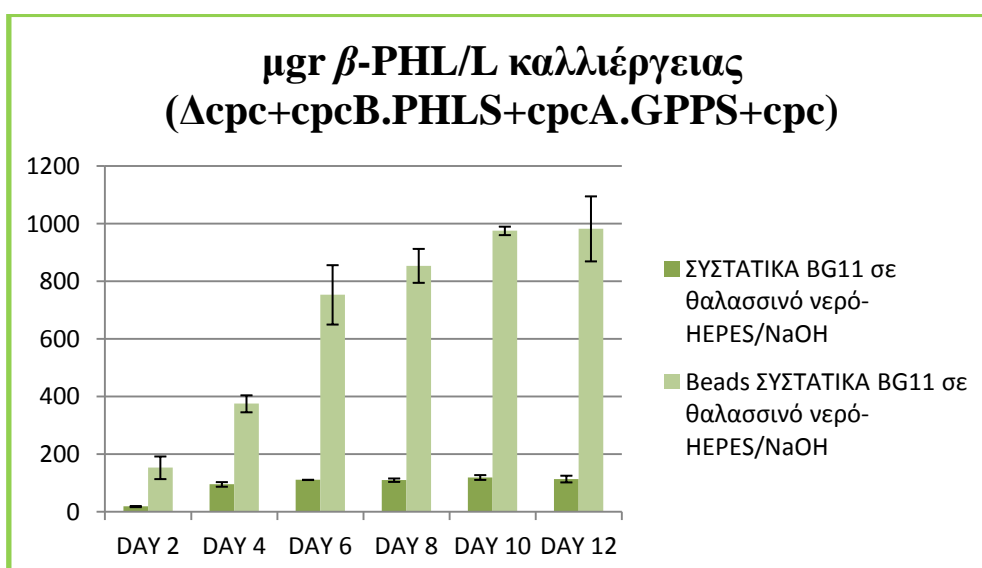
Για το στέλεχος Δερε+ερεΒ.PHLS+ερε(-ερεΑ), έχει ληφθεί χρωματογράφημα GC και φάσμα μάζας σε προηγούμενο κεφάλαιο της παρούσας εργασίας και επιβεβαιώθηκε ξανά πως και αυτό παράγει το επιθυμητό προϊόν στην συνθήκη του εμπλουτισμένου θαλασσινού νερού.

4.4.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός του παραγόμενου β -φελλανδρενίου

Στις Εικόνες 4.9 και 4.10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν στην ποσότητα β -φελλανδρενίου που παράγεται από τα στελέχη Δερε+ερεΒ.PHLS+ερε(-ερεΑ) και Δερε+ερεΒ.PHLS+ερεΑ.GPPS+ερε, αντίστοιχα εκφραζόμενη μg β -φελλανδρενίου ανά L καλλιέργειας.



Εικόνα 4.9: Υπολογισμός παραγόμενου β-φελλανδρενίου έπειτα από χρονικό διάστημα δώδεκα ημερών παραμονής των καλλιεργείων σε βιοαντιδραστήρες δύο φάσεων (υγρή/αέριος) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων ·m⁻² ·s⁻¹, θερμοκρασία 28°C στο στέλεχος Δcpc+cpcB.PHLS+cpc(-cpcA) σε συνθήκες με εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό τόσο σε ελεύθερα κύτταρα, όσο και σε ακινητοποιημένα. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μgr β-φελλανδρενίου ανά L καλλιέργειας.



Εικόνα 4.10: Υπολογισμός παραγόμενου β-φελλανδρενίου έπειτα από χρονικό διάστημα δώδεκα ημερών παραμονής των καλλιεργείων σε βιοαντιδραστήρες δύο φάσεων (υγρή/αέριος) υπό ένταση φωτονιακής ακτινοβολίας 50 μmol φωτονίων ·m⁻² ·s⁻¹, θερμοκρασία 28°C στο στέλεχος

$\Delta crc+crcB.PHLS+crcA.GPPS+crc$ σε συνθήκες με εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό τόσο σε ελεύθερα κύτταρα, όσο και σε ακινητοποιημένα. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως μg β -φελλανδρενίου ανά L καλλιέργειας.

Από τις Εικόνες 4.9 και 4.10 φαίνεται πως τα δυο στελέχη που μελετήθηκαν στο συγκεκριμένο κεφάλαιο είναι ικανά να παράγουν β -φελλανδρενίο τόσο σε ελεύθερα, όσο και σε ακινητοποιημένα κύτταρα στη συνθήκη με εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό με συστατικά του BG11. Διακρίνεται ότι στο διάστημα όλων των πειραματικών ημερών τα ακινητοποιημένα στα σφαιρίδια αλγινικού κύτταρα οδηγούν σε πολύ μεγαλύτερη παραγωγή παρουσία εμπλουτισμένου θαλασσινού νερού σε σύγκριση με τα ελεύθερα κύτταρα που αναπτύσσονται στις ίδιες συνθήκες. Έχει βρεθεί ότι με τη διαδικασία της ακινητοποίησης τα κύτταρα προστατεύονται από τις εξωτερικές συνθήκες οι οποίες μπορεί να είναι δυσμενείς για την ανάπτυξή τους (υψηλή αλατότητα, ρύποι κ.ά.) [96]. Με τον τρόπο αυτό, διατηρούν τους μεταβολικούς ρυθμούς τους και από ότι φαίνεται η απόδοση σε προϊόν ευνοείται περισσότερο καθώς είναι πιο ελεγχόμενο το περιβάλλον. Μεταξύ των δυο στελεχών, το στέλεχος $\Delta crc+crcB.PHLS+crcA.GPPS+crc$ παράγει πολύ περισσότερη ποσότητα προϊόντος σε σχέση με το στέλεχος $\Delta crc+crcB.PHLS+crc(-crcA)$ στις ίδιες συνθήκες. Σημαντικό όμως είναι πως και τα δυο στελέχη παράγουν αρκετή ποσότητα β -φελλανδρενίου σε θαλασσινό νερό, το οποίο έχει εμπλουτιστεί με συστατικά του BG11.

4.5 Συμπεράσματα

Στο τρέχον κεφάλαιο της παρούσας εργασίας μελετήθηκαν τα στελέχη $\Delta cpc+crcB.PHLS+crc(-cpcA)$ και $\Delta cpc+crcB.PHLS+crcA.GPPS+crc$ σε θαλασσινό νερό εμπλουτισμένο με συστατικά του BG11, τόσο σε ελεύθερα, όσο και σε ακινητοποιημένα. Επιβεβαιώθηκε αρχικά η επιτυχής ανάπτυξη αυτών και στη συνέχεια μελετήθηκε η παραγωγή του προϊόντος β -φελλανδρενίου, η οποία ήταν εξίσου επιτυχής. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε διάστημα 12 πειραματικών ημερών με παράλληλη μελέτη καλλιέργειας μάρτυρα, η οποία αποτελούνταν από ελεύθερα κύτταρα του ίδιου στελέχους, τα οποία αναπτύχθηκαν επίσης σε εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό.

Παρατηρήθηκε πως και τα δυο στελέχη έχουν πολύ καλή ανάπτυξη στη συνθήκη αυτή. Εντυπωσιακό ήταν όμως το γεγονός ότι τα ενθυλακωμένα στα σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου οδήγησαν σε αποτελεσματική παραγωγή του προϊόντος σε πολύ μεγαλύτερα επίπεδα, σε σχέση με την παραγωγή στα ελεύθερα κύτταρα στο ίδιο θρεπτικό μέσο και για τα δυο στελέχη. Συνεπώς αυτό ανοίγει τις πόρτες για τον σχεδιασμό νέας μεθόδου, επίσης οικονομικά προσιτής και φιλικής προς το περιβάλλον, στο άφθονα διαθέσιμο και οικονομικό θαλασσινό νερό με ελάχιστα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν για τον εμπλουτισμό του.

Κεφάλαιο 5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Στην παρούσα μελέτη επιτεύχθηκε η βελτίωση της ετερόλογης παραγωγής β -φελλανδρενίου από μεταλλαγμένα στελέχη του κυανοβακτηρίου *Synechocystis* sp. PCC 6803. Ο όρος βελτίωση αφορά κυρίως την ανάπτυξη πιο οικονομικής και φιλικότερης προς το περιβάλλον διεργασίας διεξαγωγής του πειράματος.

Η μελέτη ξεκίνησε με την εύρεση της βέλτιστης συνθήκης ανάπτυξης και φωτοσυνθετικής δραστηριότητας του στελέχους του αγρίου τύπου (WT) του κυανοβακτηρίου, χρησιμοποιώντας διάφορες παραλλαγές του θαλασσινού νερού εμπλουτίζοντας το με διάφορα συστατικά. Ο λόγος που επιλέχθηκε θαλασσινό νερό είναι καθώς σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου είχαν μελετηθεί τόσο συνθήκες με αυξημένη αλατότητα στο θρεπτικό BG11 ως προσομοίωση του θαλασσινού νερού, όσο και 100% θαλασσινό νερό. Σε αυτές τις μελέτες φάνηκε επιτυχημένη ανάπτυξη των στελεχών, αλλά και παραγωγή του προϊόντος από αυτά σε μικρότερη απόδοση. Παράλληλα με αυτές τις συνθήκες του θαλασσινού νερού μελετήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία, αρχικά η συνθήκη με θρεπτικό μέσο BG11, που είναι και το βασικότερο μέσο ανάπτυξης των κυανοβακτηρίων και χρησιμοποιήθηκε σαν συνθήκη μάρτυρας. Σε ότι αφορά το θαλασσινό νερό, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, φάνηκε έπειτα από ιοντική χρωματογραφία πως λείπουν από αυτό κάποια συστατικά, τα οποία όμως υπάρχουν στο BG11. Επομένως, από τις συνθήκες με θαλασσινό νερό που χρησιμοποιήθηκαν η χρήση θαλασσινού νερού και όλων των συστατικών που χρησιμοποιούνται για το θρεπτικό μέσο BG11, καθώς επίσης και θαλασσινό νερό με συστατικά του BG11 που έλειπαν από αυτό, ήταν και οι συνθήκες που ξεχώρισαν και προχωρήσαμε σε επιπλέον μελέτη της ανάπτυξης, της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας. Επίσης έγινε και λήψη εικόνων από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM). Στις δυο αυτές τελευταίες περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε σαν ρυθμιστικό διάλυμα HEPES/NaOH, το οποίο δεν οδήγησε στον σχηματισμό αλάτων. Σε αυτές τις περιπτώσεις η ανάπτυξη και φωτοσυνθετικής δραστηριότητας του αγρίου τύπου προσομοίαζε την συνθήκη μάρτυρα (BG11). Σε ότι αφορά στις εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου φάνηκε πως η μορφολογία των κυττάρων δεν επηρεάζεται από την παρουσία θαλασσινού νερού. Η συνθήκη του θαλασσινού νερού που είχε εμπλουτιστεί με κάποια συστατικά του BG11, ήταν και η συνθήκη που χρησιμοποιήθηκε για την μελέτη τόσο της ανάπτυξης αλλά και της ετερόλογης παραγωγής του β -φελλανδρενίου στα μεταλλαγμένα

στελέχη στα επόμενα κεφάλαια της εργασίας. Αυτό αποσκοπεί σε όσο το δυνατόν πιο οικονομική μέθοδο, καθώς τα συστατικά αυτά είναι αρκετά οικονομικά και δεν θα ανεβάσουν το κόστος της μεθόδου, ενώ το θαλασσινό νερό βρίσκεται σε αφθονία

Στο τρίτο κεφάλαιο μελετήθηκαν η ανάπτυξη, η φωτοσυνθετική δραστηριότητα και η ετερόλογη παραγωγή του β -φελλανρενίου των στελεχών $\Delta crp+crpB.PHLS+crpA.GPPS$ και $\Delta crp+crpB.PHLS+crp(-crpA)$. Τα δυο αυτά στελέχη είχαν μελετηθεί σε προηγούμενες εργασίες είτε σε BG11 με αυξημένη αλατότητα, είτε σε 100% θαλασσινό νερό. Τα αποτελέσματα έδειξαν την επιτυχή επιβίωση και ετερόλογη παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος, συνεπώς η παρούσα μελέτη προχώρησε στη δοκιμή εμπλουτισμένου θαλασσινού νερού. Τα στελέχη φάνηκαν να αναπτύσσονται κανονικά έπειτα από δέκα ημέρες παραμονής σε ειδικούς βιοαντιδραστήρες 100 mL, φωτοσυνθέτοντας επιτυχώς και παράγοντας σημαντική ποσότητα β -φελλανδρενίου. Η ανάπτυξη και η φωτοσυνθετική δραστηριότητα προσομοίαζε τα αντίστοιχα αποτελέσματα στη συνθήκη μάρτυρα (BG11). Η παραγωγή του β -φελλανδρενίου παρατηρήθηκε σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τη συνθήκη μάρτυρα. Το γεγονός όμως ότι τα κύτταρα παράγουν επιτυχώς το επιθυμητό προϊόν σε εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό είναι ένα πολύ σημαντικό στοιχείο.

Στο επόμενο κεφάλαιο η μελέτη πραγματοποιήθηκε έπειτα από ακινητοποίηση των κυττάρων σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου συγκέντρωσης 3% των στελεχών $\Delta crp+crpB.PHLS+crp(-crpA)$ και $\Delta crp+crpB.PHLS+crpA.GPPS+crp$, τα οποία τοποθετήθηκαν σε εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό με συστατικά του BG11. Στη συνθήκη αυτή διαπιστώθηκε ότι δεν υπήρχε απελευθέρωση κυττάρων από το πολυμερές, παρά μόνο τις τελευταίες ημέρες διάρκειας του πειράματος, η οποία μάλιστα δεν ήταν σημαντική. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε διάστημα 12 πειραματικών ημερών με παράλληλη μελέτη καλλιέργεια μάρτυρα, η οποία αποτελούνταν από ελεύθερα κύτταρα του ίδιου στελέχους, που αναπτύχθηκαν επίσης σε εμπλουτισμένο θαλασσινό νερό. Η ανάπτυξη των κυττάρων ήταν επιτυχής, τόσο στα ελεύθερα, όσο και στα ακινητοποιημένα κύτταρα, ενώ η παραγωγή ήταν αρκετά μεγαλύτερη στα ακινητοποιημένα κύτταρα σε σχέση με τη συνθήκη μάρτυρα κατά τη διάρκεια όλου του πειράματος.

Μέσω των παραπάνω επιμέρους συμπερασμάτων διαπιστώνεται ότι συνθήκες που μελετήθηκαν, οδήγησαν στην ανάπτυξη οικονομικής, εναλλακτικής και φιλικής προς το περιβάλλον διαδικασίας παραγωγής β-φελλανδρενίου. Επιβεβαιώνεται η μεγάλη προσαρμοστικότητα του κυανοβακτηρίου *Synechocystis* στο οποίο πραγματοποιήθηκαν όλες οι μελέτες. Αποτελεί χρήσιμο οργανισμό μοντέλο, καθώς επιτυγχάνονται μεταλλάξεις στο γονιδιώμα του, ενώ παράλληλα μπορεί να αναπτυχθεί σε ποικίλες συνθήκες. Οι νέες μέθοδοι που αναπτύχθηκαν είναι υποσχόμενες για βιομηχανική παραγωγή του προϊόντος. Καθίσταται δυνατή η χρήση του άφθονα διαθέσιμου 100 % θαλασσινού νερού με ελάχιστα συστατικά να χρησιμοποιούνται για τον εμπλουτισμό του, για την παραγωγή του εξαιρετικής βιομηχανικής αξίας β-φελλανδρενίου. Ακόμα πιο υποσχόμενη μέθοδος είναι η ακινητοποίηση των κυττάρων στα σφαιρίδια αλγινικού πολυμερούς. Στα σφαιρίδια τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να παράγουν παρουσία εμπλουτισμένου θαλασσινού νερού ποσότητες ακόμα και τρεις φορές μεγαλύτερες σε σχέση με τα ελεύθερα κύτταρα σε αντίστοιχες συνθήκες ανάπτυξης.

Ακόμα πολλές δοκιμές μπορούν να πραγματοποιηθούν ώστε να επιτευχθεί το βέλτιστο αποτέλεσμα παραγωγής, με την οικολογικότερη και οικονομικότερη μέθοδο. Επόμενο βήμα για τη μελέτη αυτή μπορεί να αποτελέσει η δημιουργία σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου σε υψηλότερο pH και έπειτα ίσως ο συνδυασμός θαλασσινού νερού και υψηλού pH σε παγιδευμένα κύτταρα στα σφαιρίδια, συνδυασμός ο οποίος είναι ιδανικός για τη βέλτιστη ανάπτυξη μεθόδου. Σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας έχει βρεθεί πως σε περίπτωση αύξησης του pH, τα μεταλλαγμένα στελέχη επιβιώνουν και διατηρούν την παραγωγή του επιθυμητού τερπενοειδούς. Το αποτέλεσμα αυτό καθιστά εφικτή την ανάπτυξη των καλλιεργειών σε ανοιχτό σύστημα βιομηχανικής κλίμακας, προστατεύοντάς σημαντικά από μολύνσεις από άλλους μικροοργανισμούς.

Επιπρόσθετα, μελλοντικό στόχο αποτελεί η δημιουργία νέων στελεχών με διαφορετικούς συνδυασμούς γονιδίων. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση της συνθάσης του β-φελλανδρενίου πραγματοποιείται με σκοπό να βρίσκεται σε μεγάλες ποσότητες για να μπορεί να ανταγωνιστεί τις συνθάσεις των ενδογενών τερπενοειδών και να παραχθεί από το κοινό αυτών υπόστρωμα διφωσφορικό γερανύλιο, β-φελλανδρένιο. Επομένως, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί αποσιωποποίηση των υπολοίπων συνθασών, με αποτέλεσμα όλη η ποσότητα του διφωσφορικού γερανυλίου να

οδηγείται στην παραγωγή του β -φελλανδρενίου. Παράλληλα, γονίδια για τις συνθάσες άλλων πρόδρομων μορίων του MEP βιοσυνθετικού μονοπατιού, οι οποίες εμφανίζουν χαμηλότερη κινητική Michaelis-Menten, θα μπορούσαν επίσης να εκφραστούν στο *cpc* οπερόνιο στα μεταλλαγμένα στελέχη, ώστε να γίνεται υπερέκφραση αυτών υπό τον ισχυρό *cpc* υποκινητή.

Αναμφισβήτητα, η ετερόλογη παραγωγή του β -φελλανδρενίου από μεταλλαγμένα στελέχη του κυανοβακτηρίου *Synechocystis* sp. PCC 6803 αποτελεί μία πολύ ενδιαφέρουσα προοπτική για την παραγωγή αυτού στη βιομηχανία.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι: ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΣΥΝΤΗΓΜΕΝΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Αλληλουχία *crcB*.PHLS

μικρά γράμματα= *crcB*

ΚΕΦΑΛΑΙΑ ΓΡΑΜΜΑΤΑ= PHLS

atgttcgaacgtattcactcgggttggttcccaagctgatgctcgcggcgagtacctctctg
gttctcagttagatgctttgagcgtaccggtgctgaaggcaacaaacggattgattctgt
taaccgcatcaccggtaatgcttccgctatcgtttccaacgctgctcgtgctttgttcgcc
gaacagccccaattaatccaaccgggtggaacgcctacaccagcgcgtcgtatggctgctt
gtttgcgtgacatggaatcatcctccgctatgttacctacgcaaccttcaccggcgacgc
ttccggttctagaagatcgttgcttgaacggtctccgtgaaacctacgttgacctgggtgtt
cccgggtgcttccgtagctgctggcgttcaaaaaatgaaagaagctgccctggacatcgta
acgatcccaatggcatcaccggtggtgattgcagtgctatcgttgctgaaatcgctggta
cttcgaccgcgccgctgctgacctagccCATATGTGTAGTTTGCAAGTTTCTGATCCTATT
CCTACCGGACGCCGTTCCGGTGGTTATCCCCGGCCTTATGGGATTTTCGATACTATTCAAT
CCCTGAATACCGAATATAAGGGCGAACGTCACATGCGTCGGGAAGAAGACTTAATTGGTCA
AGTTCGGGAAATGTTGGTGCACGAAGTAGAAGATCCCACCTCCCAGTTGGAATTCATTGAC
GATCTGCATAAAATGGGCATTTCTGCCATTTTGAAAACGAGATTCTGCAAATTTCTCAAAT
CCATTTATCTCAACCAAAACTATAAACGGGACCTCTATTCTACCAGTTTAGCCTTCCGTCT
CTTGCGTCAATACGGGTTTATCTTGCCGCAGGAAGTTTTTGACTGCTTTAAAAACGAAGAA
GGTACGGATTTTAAACCCAGCTTCGGCCGGGATATTAAGGGTCTGTTACAGTTGTACGAAG
CCTCCTTTTTGTCCCGGAAGGGGGAAGAACTTTACAACCTCGCCCGGAATTTGCTACCAA
AATCTTGCAAAAGGAAGTCGATGAACGGGAATTTGCTACTAAAATGGAATTTCCCAGTCAC
TGGACCGTACAAATGCCTAACGCTCGGCCTTTTATCGATGCCTATCGTCGGCGTCCCAGACA
TGAACCCCGTGGTTCGGAACCTCGCCATTTCTCGATACCAATATCGTGCAAGCTCAGTTTCA
AGAAGAATTGAAGGAGACCTCCCGTTGGTGGGAAAGCACGGGGATTGTTCAAGAACTGCCG
TTTGTTCGGGACCGGATTGTGGAAGGTTATTTTTGGACCATGGTGTACTCAACGCCGTG
AACACGGTTACGAACGTATTATGACGGCCAAAGTCATCGCTTTGGTGACCTGTTTGGATGA
TATTTATGACGTATATGGCACTATTGAAGAATTGCAACTCTTCACCTCTACGATTCAGCGT
TGGGATTTGGAGTCTATGAAGCAGTTACCGACTTATATGCAGGTAAGCTTCCTGGCCTTGC
ACAATTTTGTAACCGAAGTGGCCTATGATACGCTGAAGAAAAAGGGCTACAACCTTACCCC
CTATTTGCGGAAGACTTGGGTGGATTTGGTTCGAAAGTTACATTAAGGAAGCCACTTGGTAC
TATAATGGGTACAAACCCCTCTATGCAGGAATACCTCAACAACGCCTGGATCTCTGTGGGCA
GCATGGCTATTTGAATCATTGTTTTTTTCGCTTTACTAATGAACGCATGCATAAGTACCG
GGACATGAATCGTGTATCCTCTAATATTGTGCGGTTAGCCGACGATATGGGAACCTCTTTG
GCCGAAGTTGAACGCGGTGACGTGCCCAAAGCTATCCAATGTTACATGAATGAAACGAACG
CCTCTGAGGAGGAGGCCCGCGAATATGTGCGGCGCTTATCCAGGAAGAATGGGAAAAACT
GAACACTGAACTGATGCGCGACGACGACGATGACGATGATTTACCTTAAGTAAATACTAC
TGCGAAGTCGTTGCTAACCTGACCCGGATGGCTCAGTTCATTTACCAAGATGGTTCGGATG
GGTTTGGGATGAAAGATTCCAAGTAAATCGTTTACTGAAAGAAACGCTGATTGAGCGCTA
TGA

Αλληλουχία *crcB*.GPPS

μικρά γράμματα = *crcB*

ΚΕΦΑΛΑΙΑ ΓΡΑΜΜΑΤΑ = GPPS

atgttcgcagctattcactcgggttgtttcccaagctgatgctcgcggcgagtacctctctg
gttctcagtttagatgctttgagcgcctaccggttgctgaaggcaacaaacggattgattctgt
taaccgcatcaccggtaatgcttccgctatcgtttccaacgctgctcgtgctttgttcgcc
gaacagccccaattaatccaaccgggtggaaacgcctacaccagcgcgctgatggctgctt
gtttgctgacatggaaatcatcctccgctatgttacctacgcaaccttcaccggcgacgc
ttccgttctagaagatcgttgcttgaacggctccgctgaaacctacgttgccctgggtggt
cccgggtgcttccgtagctgctggcgttcaaaaaatgaaagaagctgccctggacatcgta
acgatcccaatggcatcaccggtggtgattgcagtgctatcgttgctgaaatcgctgggtta
cttcgaccgcgcgctgctgcccgtagccCATATGACGCGCAGCAGTAAGGCCTTGGTCCAA
CTAGCTGATCTATCCGAACAAGTAAAAAACGTGGTGGAAATTTGATTTTGACAAGTATATGC
ACTCCAAGGCCATTGCGGTTAATGAGGCCTTAGATAAAGTTATTCCTCCCGCTATCCTCA
AAAAATCTATGAAAGTATGCGCTATTCCTCCTAGCCGGCGGGAAGAGGGTTCGACCAATT
TTATGTATTGCGGCCTGTGAGCTAATGGGGGGGACTGAGGAACTTGCCATGCCTACGGCTT
GTGCCATCGAGATGATTCACACTATGAGTTGATTCATGACGATTTGCCCTATATTGATAA
CGATGATTTGCGTCGCGGTAAGCCTACCAACCACAAAGTTTTTGGTGAAGACACGGCGATC
ATTGCTGGCGATGCATTATTGTCATTGGCCTTTGAACATGTAGCCGTGAGCACCAGTCGTA
CCCTAGGTA CTGACATTATTTTACGGTTGCTATCCGAAATGGACGCGCCACAGGAAGTGA
GGGCGTGATGGGTGGTCAAGTGGTGGATATTGAAAGCGAAGGTGATCCCAGTATAGACTTA
GAAACGCTGGAATGGGTCCATATTCATAAAAACGGCTGTGTTGTTGGAATGCAGTGTCTGT
GTGGCGCAATTATGGGGGGTGCCAGCGAGGACGACATCGAGCGTGCTAGACGGTACGCTCG
CTGTGTAGGATTGCTTTTCCAAGTTGTCGATGATATTTTGGATGTAAGCCAGTCCTCGGAA
GAACTCGGAAAGACTGCTGGGAAAGATTTGATTTCTGACAAAGCCACCTATCCCAAACCTCA
TGGGTTTTGAAAAAGCGAAGGAATTTGCCGATGAATTA CTGAACCGTGAAAAACAGGAACT
TAGTTGTTTTGATCCTACCAAAGCAGCACCTCTATTTGCGTTAGCAGACTACATTGCATCT
CGTCAGAATTAA

Αλληλουχία *crsA*.PHLS

μικρά γράμματα = *crsA*

ΚΕΦΑΛΑΙΑ ΓΡΑΜΜΑΤΑ = PHLS

atgaaaaccctttaactgaagccgtttccaccgctgactctcaaggtcgctttctgagca
gcaccgaattgcaaattgctttcggtcgctctacgtcaagctaattgctggtttgcaagccgc
taaagctctgaccgacaatgccagagcttggtaaatgggtgctgcccaagccgttataac
aaattcccctacaccacccaaacccaaggcaacaactttgctgcggatcaacggggtaaag
acaagtgtgcccgggacatcggctactacctccgcatcggttacctactgcttagttgctgg
tggtaccggtcctttggatgagtaacttgatcgccggattgatgaaatcaaccgcaccttt
gacctctccccagctgggatggtgaagctctgaaatacatcaaagctaaccacggcttga
gtggcgatgcccgtgacgaagctaattcctacctcgattacgccatcaatgctctgagcac
tagtTG TAGTTTGCAAGTTTCTGATCCTATTCCTACCGGACGCCGTTCCGGTGGTTATCCC
CCGGCCTTATGGGATTTGATACTATTCAATCCCTGAATACCGAATATAAGGGCGAACGTC
ACATGCGTCGGGAAGAAGACTTAATTGGTCAAGTTCGGGAAATGTTGGTGCACGAAGTAGA
AGATCCCCTCCAGTTTGGAAATTCATTGACGATCTGCATAAATTGGGCATTTCTGCCAT
TTTGA AACGAGATTCTGCAAATTTCTCAAATCCATTTATCTCAACCAAAACTATAAACGGG
ACCTCTATTCTACCAGTTTAGCCTTCCGTCTCTTGCCTCAATACGGGTTTATCTTGCCGCA
GGAAGTTTTTGACTGCTTTAAAAACGAAGAAGGTACGGATTTTAAACCCAGCTTCGGCCG
GATATTAAGGGTCTGTTACAGTTGTACGAAGCCTCCTTTTTGTCCCGGAAGGGGAAGAAA
CTTTACAACCTCGCCGCGAATTTGCTACCAAAATCTTGCAAAAGGAAGTCGATGAACGGGA
ATTTGCTACTAAAATGGAATTTCCAGTCACTGGACCGTACAAATGCCTAACGCTCGGCCT
TTTATCGATGCCTATCGTCGGCGTCCCGACATGAACCCCGTGGTTCTGGAACCTCGCCATTC
TCGATACCAATATCGTGCAAGCTCAGTTTCAAGAAGAATTGAAGGAGACCTCCCGTTGGTG
GGAAAGCACGGGGATTGTTCAAGAACTGCCGTTTGTTCGGGACCGGATTGTGGAAGGTTAT
TTTTGGACCATTGGTGTACTCAACGCCGTGAACACGGTTACGAACGTATTATGACGGCCA
AAGTCATCGCTTTGGTGACCTGTTTGGATGATATTTATGACGTATATGGCACTATTGAAGA
ATTGCAACTCTTCACCTCTACGATTCAGCGTTGGGATTTGGAGTCTATGAAGCAGTTACCG
ACTTATATGCAGGTAAGCTTCTTGGCCTTGCACAATTTTGTAACCGAAGTGGCCTATGATA
CGCTGAAGAAAAAGGGCTACAACCTTACCCCTATTTGCGGAAGACTTGGGTGGATTTGGT
CGAAAGTTACATTAAGGAAGCCACTTGGTACTATAATGGGTACAAACCTCTATGCAGGAA
TACCTCAACAACGCCTGGATCTCTGTGGCAGCATGGCTATTTTGAATCATTGTTTTTTC
GCTTTACTAATGAACGCATGCATAAGTACCGGGACATGAATCGTGTATCCTCTAATATTGT
GCGGTTAGCCGACGATATGGGAACCTCTTTGGCCGAAGTTGAACGCGGTGACGTGCCCAA
GCTATCCAATGTTACATGAATGAAACGAACGCCTCTGAGGAGGAGGCCCGCGAATATGTGC
GGCGCTTATCCAGGAAGAATGGGAAAACTGAACACTGAACTGATGCGCGACGACGACGA
TGACGATGATTTACCTTAAGTAAATACTACTGCGAAGTCGTTGCTAACCTGACCCGGATG
GCTCAGTTCAATTAACAAGATGGTTCCGATGGGTTTGGGATGAAAGATTCCAAAGTAAATC
GTTTACTGAAAGAACGCTGATTGAGCGCTATGAGtga

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Jeremy M. Berg, J.L.Tymoczko., G.T.Gatto., L. Stryer, Βιοχημεία, ed. 7η. 2015, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης σελ. 579-598.
2. Michael T. Madigan, John.M.Martinko., Jack Parker, Βιολογία των μικροοργανισμών, τόμος 2, 2005, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, σελ 633-647.
3. Blankenship, R., Smedha Sadekar, Jason Raymond , The evolutionary transition from anoxygenic to oxygenic photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 2007. **91**(2-3): p. 135-135.
4. Hanada, S., Anoxygenic Photosynthesis -A Photochemical Reaction That Does Not Contribute to Oxygen Reproduction. *Microbes Environ*, 2016. **31**(1): p. 1-3.
5. Blankenship, R.E., Govindjee, Berkowitz, Gerald A. , Portis, Jr., Archie R. and R.J. Shopes, *Photosynthesis*. 2014.
6. <https://docplayer.gr/12457926-Fotosynthesi-kyttariki-anapnoi-amylo-alles-organikes-oysies.html>.
7. Vachard, D., *Cyanobacteria*. 2019.
8. Jay Kumar, D.S., Madhu B. Tyagi, Ashok Kumar, *Cyanobacteria: Applications in Biotechnology*. 2019.
9. Frigaard, N.-U., *Sugar and Sugar Alcohol Production in Genetically Modified Cyanobacteria*. 2018.
10. Melis, A., Photosynthesis-to-fuels: from sunlight to hydrogen, isoprene, and botryococcene production. *Energy & Environmental Science*, 2012. **5**(2): p. 5531-5539.
11. Gao, Z.X., Zhao H. Li Z., Tan X., Lu X., , Photosynthetic production of ethanol from carbon dioxide in genetically engineered cyanobacteria. *Energy & Environmental Science*, 2012. **5**(12): p. 9857-9865.
12. Liang, F., Endlung E., Lindberg L., Lindblad P. Engineered cyanobacteria with enhanced growth show increased ethanol production and higher biofuel to biomass ratio. *Metab Eng*, 2018. **46**: p. 51-59.
13. Guiheneuf, F., A. Khan, and L.S.P. Tran, Genetic Engineering: A Promising Tool to Engender Physiological, Biochemical, and Molecular Stress Resilience in Green Microalgae. *Frontiers in Plant Science*, 2016. **7**.
14. 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. 366-72.
15. Sivonen, K., Cyanobacterial toxins. 2009, *Encyclopedia of Microbiology* (pp.290-307).
16. Kathrin I. Mohr, N.B., Thomas Friedl, *CYANOBACTERIA*.
17. Chaves, J.E. and A. Melis, Biotechnology of cyanobacterial isoprene production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018. **102**(15): p. 6451-6458.
18. Mazard, S., Penesyan A., Ostrowski M., Paulsen I.T., Egan S., Tiny Microbes with a Big Impact: The Role of Cyanobacteria and Their Metabolites in Shaping Our Future. *Marine Drugs*, 2016. **14**(5).
19. Stanier, R.Y., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G. , Purification and Properties of Unicellular Blue-Green Algae (Order Cchroococcales). *Bacteriological Reviews*, 1971. **35**(2): p. 171-205.

20. Ikeuchi, M. and S. Tabata, *Synechocystis* sp PCC 6803 - a useful tool in the study of the genetics of cyanobacteria. *Photosynthesis Research*, 2001. **70**(1): p. 73-83.
21. Liberton M., Howard Berg R., Heuser J., Roth R., B. Pakrasi H., Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp strain PCC 6803. *Protoplasma*, 2006. **227**(2-4): p. 129-138.
22. Williams, John G.K., Construction of Specific Mutations in Photosystem-II Photosynthetic Reaction Center by Genetic-Engineering Methods in *Synechocystis*-6803. *Methods in Enzymology*, 1988. **167**: p. 766-778.
23. Grigorieva, G. and S. Shestakov, Transformation in the Cyanobacterium *Synechocystis* Sp 6803. *Fems Microbiology Letters*, 1982. **13**(4): p. 367-370.
24. Kuczynska, P., M. Jemiola-Rzeminska, and K. Strzalka, Photosynthetic Pigments in Diatoms. *Marine Drugs*, 2015. **13**(9): p. 5847-5881.
25. Von Wettstein, D., S. Gough, and C.G. Kannangara, Chlorophyll Biosynthesis. *Plant Cell*, 1995. **7**(7): p. 1039-1057.
26. Elmorjani, K., J.C. Thomas, and P. Sebban, Phycobilisomes of Wild-Type and Pigment Mutants of the Cyanobacterium *Synechocystis* Pcc 6803. *Archives of Microbiology*, 1986. **146**(2): p. 186-191.
27. Oren, A., Characterization of Pigments of Prokaryotes and Their Use in Taxonomy and Classification. *Methods in Microbiology*, Vol 38: Taxonomy of Prokaryotes, 2011. **38**: p. 261-282.
28. Chen, M. and R.E. Blankenship, Expanding the solar spectrum used by photosynthesis. *Trends in Plant Science*, 2011. **16**(8): p. 427-431.
29. <https://microbiochem.weebly.com/603uivpigments.html>.
30. Maoka, T., Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*, 2020. **74**(1): p. 1-16.
31. Lichtenthaler, H.K., Chlorophylls and Carotenoids - Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology*, 1987. **148**: p. 350-382.
32. Marhuenda-Munoz Maria, Sara Hurtado-Barroso, Anna Tresserra-Rimbau & Rosa Maria Lamuela-Raventós, A review of factors that affect carotenoid concentrations in human plasma: differences between Mediterranean and Northern diets. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2019. **72**: p. 18-25.
33. Glazer, A.N., Phycobilisome - a Macromolecular Complex Optimized for Light Energy-Transfer. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1984. **768**(1): p. 29-51.
34. MacColl, R., Cyanobacterial phycobilisomes. *Journal of Structural Biology*, 1998. **124**(2-3): p. 311-334.
35. Kirst, H., C. Formighieri, and A. Melis, Maximizing photosynthetic efficiency and culture productivity in cyanobacteria upon minimizing the phycobilisome light-harvesting antenna size. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 2014. **1837**(10): p. 1653-1664.
36. Melis, A., Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: Minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Science*, 2009. **177**(4): p. 272-280.
37. Neidhardt, J., Benemann J. R., Zhang L. & Melis A., Photosystem-II repair and chloroplast recovery from irradiance stress: relationship between chronic photoinhibition, light-harvesting chlorophyll antenna size and photosynthetic

- productivity in *Dunaliella salina* (green algae). *Photosynthesis Research*, 1998. **56**(2): p. 175-184.
38. Ort D.R. and Melis A., Optimizing antenna size to maximize photosynthetic efficiency. *Plant Physiol*, 2011. **155**(1): p. 79-85.
 39. Bao, H., M.R. Melnicki, and C.A. Kerfeld, Structure and functions of Orange Carotenoid Protein homologs in cyanobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 2017. **37**: p. 1-9.
 40. Muzzopappa, F. and D. Kirilovsky, Changing Color for Photoprotection: The Orange Carotenoid Protein. *Trends in Plant Science*, 2020. **25**(1): p. 92-104.
 41. Kirilovsky, D., Photoprotection in cyanobacteria: the orange carotenoid protein (OCP)-related non-photochemical-quenching mechanism. *Photosynthesis Research*, 2007. **93**(1-3): p. 7-16.
 42. Bian, G.K., T. Ma, and T.G. Liu, In Vivo Platforms for Terpenoid Overproduction and the Generation of Chemical Diversity. *Enzymes in Synthetic Biology*, 2018. **608**: p. 97-129.
 43. Bentley, Fiona K, García-Cerdán, Jose Gines Chen, Hsu-Ching, Melis, Anastasios, Paradigm of Monoterpene (beta-phellandrene) Hydrocarbons Production via Photosynthesis in Cyanobacteria. *Bioenergy Research*, 2013. **6**(3): p. 917-929.
 44. Priyanka P. Brahmkshatriya, P.S.Brahmkshatriya., Terpenes: Chemistry, Biological Role, and Therapeutic Applications. 2013.
 45. Ai-Xia Cheng, Yong-Gen Lou, Ying-Bo Mao, Shan Lu, Ling-Jian Wang, Xiao-Ya Chen , Plant terpenoids: Biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2007. **49**(2): p. 179-186.
 46. Pia Lindberg, Bagmi Pattanaik., Terpenoids and Their Biosynthesis in Cyanobacteria. 2015.
 47. Bentley F.K., A. Zurbriggen, and A. Melis, Heterologous Expression of the Mevalonic Acid Pathway in Cyanobacteria Enhances Endogenous Carbon Partitioning to Isoprene. *Molecular Plant*, 2014. **7**(1): p. 71-86.
 48. Formighieri, C. and A. Melis, Carbon partitioning to the terpenoid biosynthetic pathway enables heterologous beta-phellandrene production in *Escherichia coli* cultures. *Archives of Microbiology*, 2014. **196**(12): p. 853-861.
 49. Rohdich, F., W Eisenreich, J Wungsintaweekul, S Hecht, C A Schuhr, A Bacher , Biosynthesis of terpenoids. 2C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF) from *Plasmodium falciparum*. *Eur J Biochem*, 2001. **268**(11): p. 3190-7.
 50. 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.
 51. Eisenreich W., M Schwarz, A Cartayrade, D Arigoni, M H Zenk, A Bacher, The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. *Chem Biol*, 1998. **5**(9): p. R221-33.
 52. Rohmer, M., The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat Prod Rep*, 1999. **16**(5): p. 565-74.
 53. Boucher Y. and W.F. Doolittle, The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Mol Microbiol*, 2000. **37**(4): p. 703-16.

54. Englund Elias, Johan Andersen-Ranberg, Rui Miao, Björn Hamberger, Pia 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.
55. 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. 309-324.
56. 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.
57. Formighieri C. and A. Melis, Cyanobacterial production of plant essential oils. *Planta*, 2018. **248**(4): p. 933-946.
58. Bohlmann J., M. Phillips, V. Ramachandiran, S. Katoh, R. Croteau, cDNA cloning, characterization, and functional expression of four new monoterpene synthase members of the Tpsd gene family from grand fir (*Abies grandis*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1999. **368**(2): p. 232-243.
59. Zurbriggen A., H. Kirst, and A. Melis, Isoprene Production Via the Mevalonic Acid Pathway in *Escherichia coli* (Bacteria). *Bioenergy Research*, 2012. **5**(4): p. 814-828.
60. Lindberg P., S. Park, and A. Melis, Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism. *Metabolic Engineering*, 2010. **12**(1): p. 70-79.
61. Melis A., Carbon partitioning in photosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2013. **17**(3): p. 453-456.
62. Betterle N. and A. Melis, Photosynthetic generation of heterologous terpenoids in cyanobacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 2019. **116**(8): p. 2041-2051.
63. 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. 685-696.
64. Formighieri C. and A. Melis, Sustainable heterologous production of terpene hydrocarbons in cyanobacteria. *Photosynthesis Research*, 2016. **130**(1-3): p. 123-135.
65. 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 Synthetic Biology*, 2018. **7**(3): p. 912-+.
66. Eleftheria-Angeliki Valsami, Maria Eleni Psychogyioly, Angeliki Pateraki, Eleni Chrysoulaki, Anastasios Melis, Demetrios F. Ghanotakis, Fusion constructs enhance heterologous β -phellandrene production in *Synechocystis* sp. PCC 6803. 2020.
67. Eleftheria-Angeliki Valsami, Angeliki Pateraki, Anastasios Melis, Demetrios F. Ghanotakis, Heterologous β -phellandrene production by alginate immobilized *Synechocystis* sp. PCC 6803. 2021.
68. Mavroudakis Leonidas, Eleftheria-Angeliki Valsami, Sofia Grafanaki, Theofania-Pagona Andreadaki, Demetrios F. Ghanotakis, Spiros 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. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2019. **1861**(10): p. 183027.

69. R. Serang, e.a., "Utilization of solar energy for processing sea water into fresh water by the distillation method," *International Journal of Advanced Engineering Research and Science*. 2019. **6**: p. 208-215.
70. Albert S. James, Georgia Destouni, Scott M. Duke-Sylvester, Anne E. Magurran, Thierry Oberdorff, Roberto E. Reis, Kirk O. Winemiller & William J. Ripple Scientists' warning to humanity on the freshwater biodiversity crisis. *Ambio*, 2021. **50**(1): p. 85-94.
71. Βαλσαμής Ελευθερία-Αγγελική, Παραγωγή τερπενοειδών από φωτοσυνθετικούς οργανισμούς. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Χημείας, Ηράκλειο Κρήτης, 2019.
72. Ψυχογιού Μαρία Ελένη., Παραγωγή φυσικών προϊόντων για βιομηχανικές εφαρμογές από φωτοσυνθετικούς μικροοργανισμούς. Πανεπιστήμιο Κρήτης.
73. Jennings R.C., Giuseppe Zucchelli, Enrico Engelmann, Flavio M Garlaschi., The long-wavelength chlorophyll states of plant LHCI at room temperature: a comparison with PSI-LHCI. *Biophys J*, 2004. **87**(1): p. 488-97.
74. Kirilovsky D., Photoprotection in cyanobacteria: the orange carotenoid protein (OCP)-related non-photochemical-quenching mechanism. *Photosynth Res*, 2007. **93**(1-3): p. 7-16.
75. Chaves J.E., Paloma Rueda-Romero, Henning Kirst, Anastasios Melis, Engineering Isoprene Synthase Expression and Activity in Cyanobacteria. *Acs Synthetic Biology*, 2017. **6**(12): p. 2281-2292.
76. Clark L.C., Jr., Wolf R., Granger R., Taylor Z., Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *J Appl Physiol*, 1953. **6**(3): p. 189-93.
77. Delieu T. and D.A. Walker, Polarographic Measurement of Photosynthetic Oxygen Evolution by Leaf-Disks. *New Phytologist*, 1981. **89**(2): p. 165-178.
78. Lopez-Pacheco I.Y., Susana Fuentes-Tristan, Laura Isabel Rodas-Zuluaga, Carlos Castillo-Zacarías, Itzel Pedro-Carrillo, María Adriana Martínez-Prado, Hafiz M. N. Iqbal, and Roberto Parra-Saldívar, Influence of Low Salt Concentration on Growth Behavior and General Biomass Composition in *Lyngbya purpurem* (Cyanobacteria). *Mar Drugs*, 2020. **18**(12).
79. El-Baky H.H.A., Over Production of Phycocyanin Pigment in Blue Green Alga *Spirulina* sp. and It's Inhibitory Effect on Growth of Ehrlich Ascites Carcinoma Cells. 2003.
80. M. A.Vargas, H.R.1., J. Moreno, H. Olivares, J. A. Del Campo, J. Rivas, and M. G. Guerrero, Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria, 1998. **34**: p. 812-817.
81. Bertolin T.E.G., C. Farias, D. Souza, F.T.; Gutkoski, L.C.; Colla, L.M. , Antioxidant effect of phycocyanin on dried-salted fish. *Ciênc. Agrotec*. 2011. **35**: p. 751-757.
82. Eriksen N.T., Production of phycocyanin--a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008. **80**(1): p. 1-14.
83. Cherng S.C., S. Tarn, A. Chou, T. , Anti-inflammatory activity of c-phycocyanin in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. 2007. **81**: p. 1431-1435.
84. Nagaoka S.S., K.; Kaneko, H.; Shibayama, F.; Morikawa, K.; Kanamaru, Y.; Otsuka, A.; Hirahashi, T.; Kato, T., Nutrient Interactions and Toxicity A Novel Protein C-Phycocyanin Plays a Crucial Role in the

- Hypocholesterolemic Action of *Spirulina platensis* Concentrate in Rats. 2005: p. 2425-2430.
85. Concurrent purification and antioxidant activity of phycobiliproteins from *Lyngbya* sp. A09DM: An antioxidant and anti-aging potential of phycoerythrin in *Caenorhabditis elegans*. *Process Biochem.* 2014. **49**: p. 1757-1766.
 86. Sudhir P., "Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis," *Photosynthetica* 2004. **42**: p. 481-486.
 87. Fisher L. Michael, Rebecca Allen, Yingqin Luo, Roy Curtiss, Export of extracellular polysaccharides modulates adherence of the Cyanobacterium *synechocystis*. *PLoS One*, 2013. **8**(9): p. e74514.
 88. Thichakorn Jittawuttipoka, Mariane Planchon, Olivier Spalla, Karim Benzerara, François Guyot, Corinne Cassier-Chauvat, Franck Chauvat, Multidisciplinary evidences that *Synechocystis* PCC6803 exopolysaccharides operate in cell sedimentation and protection against salt and metal stresses. *PLoS One*, 2013. **8**(2): p. e55564.
 89. 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.
 90. 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.
 91. Formighieri C. and A. Melis, Sustainable heterologous production of terpene hydrocarbons in cyanobacteria. *Photosynth Res*, 2016. **130**(1-3): p. 123-135.
 92. Betterle N. and A. Melis, Photosynthetic generation of heterologous terpenoids in cyanobacteria. *Biotechnol Bioeng*, 2019. **116**(8): p. 2041-2051.
 93. Eleftheria-Angeliki Valsami, Maria Eleni Psychogyiou, Angeliki Pateraki, **Eleni Chrysoulaki**, Anastasios Melis, Demetrios F. Ghanotakis, Fusion constructs enhance heterologous β -phellandrene production in *Synechocystis* sp. PCC 6803. 2020.
 94. Theocharis T. Nazos, Emmanuel J. Kokarakis, Eleftheria-Angeliki Valsami, Napoleon-Christoforos Stratigakis, Eleni G. Poloniataki, Georgios P. Sfendourakis, Demetrios F. Ghanotakis, Characterization of a novel herbicide and antibiotic-resistant *Chlorella* sp. with an extensive extracellular matrix. *Photosynth Res*, 2020. **143**(3): p. 315-334.
 95. Willaert R., *Cell Immobilization and Its Applications in Biotechnology*. 2011: p. 313-367.
 96. Zur J., D. Wojcieszynska, and U. Guzik, Metabolic Responses of Bacterial Cells to Immobilization. *Molecules*, 2016. **21**(7).
 97. 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.
 98. al, I.C.e., Use of immobilized cells. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*. 1981. **10**: p. 197-216.
 99. Vojtisek V. and V. Jirku, Immobilized cells. *Folia Microbiol (Praha)*, 1983. **28**(4): p. 309-40.
 100. Scott C.D., "Immobilized cells: a review of recent literature," *Enzyme and Microbial Technology*. 1987. **9**: p. 66-72.
 101. Sun J. and H. Tan, Alginate-Based Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. *Materials (Basel)*, 2013. **6**(4): p. 1285-1309.

102. Wee S. and W.R. Gombotz, Protein release from alginate matrices. *Adv Drug Deliv Rev*, 1998. **31**(3): p. 267-285.
103. Νάζος Θ., Μελέτη της βιοαποικοδόμησης φαινολικών ενώσεων από μικροοργανισμούς, Ηράκλειο Κρήτης: Πανεπιστήμιο Κρήτης Τμήμα Χημείας. 2018.
104. de Vos P., et al., Polymers in cell encapsulation from an enveloped cell perspective. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014. **67-68**: p. 15-34.
105. MattJasson B., Immobilized cells and Organelles 1983: p. 3-35.
106. Skjåk-Bræk G.M., A. , Applications of some algal polysaccharides in biotechnology. In: Guiry, M. & Blunden, G. *Seaweed Resources in Europe: Uses and Potential*. John Wiley & Sons, Chichester. 1991.
107. Paredes Juarez G.A., et al., Immunological and technical considerations in application of alginate-based microencapsulation systems. *Front Bioeng Biotechnol*, 2014. **2**: p. 26.
108. Rees D.A.a.E.J., Secondary and Tertiary Structure of Polysaccharides in Solutions and Gels, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1977. **16**: p. 214-224.
109. al, G.S.e., Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*. 1990. **8**: p. 71-78.
110. Zhu Y., "Immobilized Cell Fermentation for Production of Chemicals and Fuels", *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*. 2007: p. 373-396.
111. 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.
112. al., C.H.G.e., "Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications," *Carbohydrate Polymers*. 2012. **88**: p. 1-12.
113. Sekaran G., et al., Immobilization of *Bacillus* sp. in mesoporous activated carbon for degradation of sulphonated phenolic compound in wastewater. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2013. **33**(2): p. 735-45.
114. Ramakrishna S.V.a.R.S.P., Microbial fermentations with immobilized cells. 1999. **77**: p. 87-100.
115. 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.
116. Kiyota H., Okuda Y., Ito M., Yokota Hirai M, Ikeuchi M., Engineering of cyanobacteria for the photosynthetic production of limonene from CO₂. *J Biotechnol*, 2014. **185**: p. 1-7.