

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Ανάπτυξη κατιούσας επεξεργασίας πρωτεϊνών
από μικροφύκη**



**Μεταπτυχιακή Μελέτη
του φοιτητή του τμήματος Βιοτεχνολογίας
Γάκου Κωνσταντίνου**

Αθήνα 2013

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της Ενζυμικής Τεχνολογίας του τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η τριμελής συμβουλευτική και εξεταστική επιτροπή:

- 1) Αναπληρωτής Καθηγητής Λάμπρου Νικόλαος Άμεσος Επιβλέπων
- 2) Καθηγητής Κλώνης Ιωάννης Μέλος
- 3) Επίκουρος Καθηγητής Φλεμετάκης Εμμανουήλ Μέλος

Ευχαριστίες

Έχοντας ολοκληρώσει την παρούσα μελέτη, αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω:

- Τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Νικόλαο Λάμπρου για την εμπιστοσύνη που μου υπέδειξε καθώς και για την συνεχή και πολύτιμη καθοδήγηση του.
- Τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Κλώνη Ιωάννη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Φλεμετάκη Εμμανουήλ για τη συνεισφορά τους στην ολοκλήρωση της μελέτης αυτής.
- Την Δρ. Χρονοπούλου Ευαγγελία, την κ. Παππά Ευαγγελία, μέλος Ε.Τ.Ε.Π του εργαστηρίου και τους υπόλοιπους φοιτητές και φοιτήτριες του εργαστηρίου που με τις ουσιαστικές υποδείξεις τους με βοήθησαν να ολοκληρώσω τη μελέτη αυτή.

Συντομογραφίες

TCA: Τρι-χλωρο οξικό οξύ

TEMED: Τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη

APS: Υπερθεϊκό αμμώνιο

SDS: Δωδεκαωνοθεϊκό νάτριο

ddH₂O: δις-απιονισμένο νερό

NaCl: χλωριούχο νάτριο

Da: μονάδα μέτρησης ατομικής ή μοριακής μάζας

PEG: πολυμερές πολυαιθυλενογλυκόλης

Pi: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

CH₃COONa: οξικό νάτριο

pH: μέτρο οξύτητας ή βασικότητας ενός διαλύματος

C: συγκέντρωση πρωτεΐνης (mg/mL)

s: χρόνος σε δευτερόλεπτα

rpm: στροφές/min

nm: μονάδα μήκους κύματος του φωτός

M(Molarity): μονάδα μέτρησης της μοριακής συγκέντρωσης μιας ουσίας σε ένα διάλυμα

μM/mg: μονάδα μέτρησης ολικής αντιοξειδωτικής χωρητικότητας ανά mg πρωτεΐνης

T^e: υψηλή θερμοκρασία

S: αλατότητα

N: έλλειψη αζώτου

sp: είδος

ATPS: υδατικό διφασικό σύστημα κατιούσας επεξεργασίας

mL: όγκος δειγμάτων

V_r: λόγος φάσεων διφασικού συστήματος

UV-Vis: υπεριώδες-ορατό φώς

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Συντομογραφίες	4
Περίληψη	7
Abstract	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Μικροφύκη.....	10
1.1.1 <i>Phaeodactylum</i> sp.	11
1.2.1 <i>Tetraselmis</i> sp.....	12
1.3 Ρόλος ελεύθερων ριζών (ROS).....	15
1.5 Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	20
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
2.1 Υλικά	21
2.1.1 Βιολογικά υλικά	21
2.1.2 Χημικά αντιδραστήρια.....	21
2.2 Εξοπλισμός.....	22
2.3 Μέθοδοι.....	23
2.3.1 Λύση των κυττάρων και παραλαβή εκχυλίσματος	23
2.3.2. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford	23
2.3.3 Φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (UV- Vis).....	24
2.3.4. Κατιούσα επεξεργασία πρωτεϊνών με εφαρμογή υδατικού διαφασικού συστήματος PEG-Pi	25
2.3.5. Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής χωρητικότητας με τη μέθοδο FRAP	25
2.3.6 Διαπίδυση	26
2.3.7. Λυοφιλίωση	27
2.3.8. Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με χρήση TCA.....	27
2.3.9. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε ασυνεχή πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκαθειικού νατρίου (SDS)	28
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	30

3.2 Μελέτη εκχύλισης ολικών πρωτεϊνών από <i>Phaeodactylum</i> sp. και <i>Tetraselmis</i> sp. υπό την επίδραση υπερήχων.	33
3.3 Επίδραση συνθηκών καταπόνησης στα επίπεδα εκχυλιζόμενων πρωτεϊνών.....	36
3.4 Ανάπτυξη κατιούσας επεξεργασίας στο φύκος <i>Tetraselmis</i> sp.	37
3.4.1 Ανάπτυξη υδατικού διαφασικού συστήματος πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG)/φωσφορικών.....	37
3.4.2 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής χωρητικότητας στις φάσεις PEG-Pi.	39
3.4.3 Μελέτη επίδρασης pH και συγκέντρωσης άλατος (NaCl) στο διαφασικό σύστημα PEG-Pi	42
3.4.4 Μελέτη επίδρασης pH στο διαφασικό σύστημα PEG-Pi.....	46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	49
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	49
Βιβλιογραφία	56

Περίληψη

Τα μικροφύκη συγκεντρώνουν το ενδιαφέρον τόσο της επιστημονικής κοινότητας όσο και της βιομηχανικής για την πληθώρα των προϊόντων του μεταβολισμού τους που παράγουν. Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια ανάπτυξης πρωτοκόλλου κατιούσας επεξεργασίας ολικών πρωτεϊνών από *Tetraselmis* sp. και *Phaeodactylum* sp. με την εφαρμογή υδατικού διαφασικού συστήματος που αποτελείται από πολυαιθυλενογλυκόλη και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PEG/Pi). Εξετάστηκε η επίδραση στην κατανομή των ολικών πρωτεϊνών τριών διαφορετικών συντελεστών που καθορίζουν την κατανομή των πρωτεϊνών σε διαφασικά συστήματα PEG/Pi. Αυτοί ήταν: το pH (6,5, 7, 7,5, 8,5), το μοριακό βάρος του πολυμερούς PEG (1500 Da, 3000 Da και 6000 Da) και η συγκέντρωση αλατότητας (NaCl, 0% w/v, 3,5% w/v, 7% w/v, 10% w/v). Μελετήθηκε η κατανομή των πρωτεϊνών χρησιμοποιώντας τόσο εκχυλίσματα που είχαν υποστεί αρχικά φυγοκέντρωση όσο και εκχυλίσματα που δεν είχαν υποστεί. Επίσης, μελετήθηκε η ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα με τη μέθοδο FRAP σε εκχυλίσματα από *Tetraselmis* sp. και προσδιορίστηκε η κατανομή πρωτεϊνών (%) στις φάσεις του διαφασικού συστήματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι παραπάνω παράγοντες κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες επηρεάζουν σημαντικά την κατανομή των ολικών πρωτεϊνών και ολικών αντιοξειδωτικών στις διαφορετικές φάσεις του συστήματος.

Λέξεις κλειδιά: μικροφύκη, *Tetraselmis* sp., *Phaeodactylum* sp., υδατικό διαφασικό σύστημα, ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα, κατιούσα επεξεργασία, συνετελεστές κατανομής, φάσματα απορρόφησης.

Abstract

Microalgae attract the interest of both the scientific community and the industry for its variety of products of their metabolism producing . In the present study the application of a polyethylene glycol/phosphate (PEG/phosphate) ATPS was development in effort to process total proteins of *Tetraselmis* sp. and *Phaeodactylum* sp. The effect on the distribution of total proteins of three different factors that determine the distribution of proteins in two-phase systems PEG / Pi was investigated. These were: pH (6,5, 7, 7,5, 8,5), the polymer molecular weight PEG (1500 Da, 3000 Da and 6000 Da) and the concentration of salinity (NaCl, 0% w/v, 3,5% w/v, 7% w/v, 10% w/v). Furthermore, was studied the distribution of proteins using both extracts that had been originally centrifugation and extracts not suffered. Also was investigated the total antioxidant capacity using the method FRAP in extracts from *Tetraselmis* sp. and determined the distribution of proteins (%) in the phases of the the system. The results has shown that these factors under certain conditions significantly affect the distribution of the total protein and total antioxidant at different phases of the system.

Keywords: Microalgae, *Tetraselmis* sp., *Phaeodactylum* sp., Aqueous two-phase system, total antioxidant capacity, downstream processing, distribution factors, absorption spectra.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

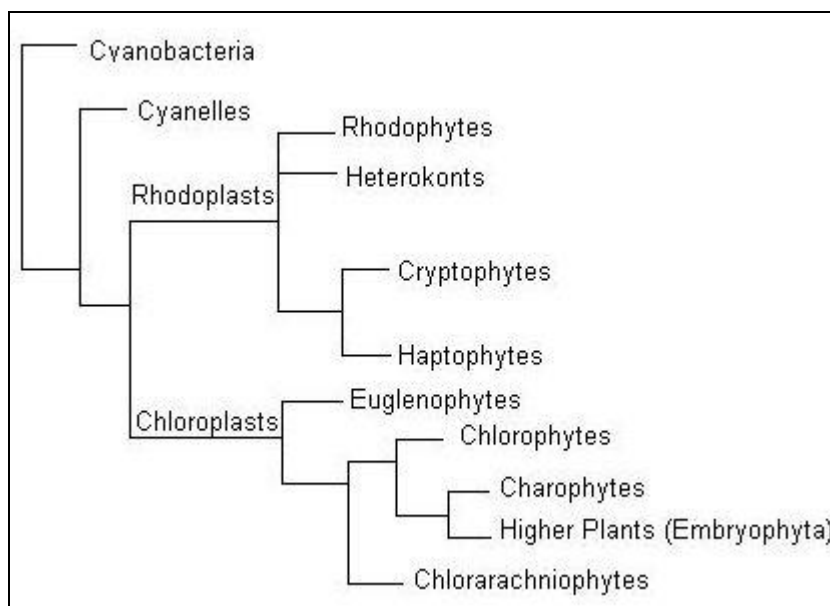
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μικροφύκη

Τα φύκη είναι μια πολύ μεγάλη ομάδα διαφορετικών απλών συνήθως αυτότροφων οργανισμών προκαρυωτικής ή ευκαρυωτικής προέλευσης. Ο όρος μικροφύκη αναφέρεται στα μικροσκοπικά φύκη και στα φωτοσυνθετικά βακτήρια τα κυανοβακτήρια κοινώς κυανοφύκη (Richmond, 2004). Συναντώνται σε γλυκά και θαλάσσια συστήματα. Οι μεγαλύτερες και οι πολυπλοκότερες μορφές των οργανισμών αυτών ονομάζονται φύκια Σε αντίθεση με τα ανώτερα φυτά, τα φύκη δεν έχουν ρίζες, βλαστούς και φύλλα.. Παράγουν περίπου το ήμισυ του ατμοσφαιρικού οξυγόνου και χρησιμοποιούν ταυτόχρονα την εκπομπή του διοξειδίου του άνθρακα για αναπτυχθούν φωτοαυτοτροφικά (Rasmussen & Morissey, 2007, Shalaby, 2011, Rasmussen & Morissey, 2005; Morton & Steve, 2008; Simoons & Federick, 1991; Hawkins & Nakamura, 1999; Rasmussen, 2005).

Από φυλογενετικής πλευράς στους προκαρυώτες ανήκουν τα κυανοβακτήρια ή κοινώς κυανοφύκη (μπλε-πράσινα φύκη) τα οποία παράγουν χλωροφύλλη α και b και το χρώμα τους οφείλεται στην κυανοκυανίνη και φυκοερυθρίνη. Στους ευκαρυώτες ανήκουν τα ροδόφυτα (κόκκινα φύκη), χλωρόφυτα (πράσινα φύκη), φαιόφυτα (καφέ φύκη), δινομαστιγωτά, χρυσόφυτα, ευγλενόφυτα, κρυπτόφυτα, ετερόκοντα, γλαυκοκυστόφυτα (Bhattacharya & Medlin, 1998).

Τα μικροφύκη είτε είναι ευκαρυωτικοί είτε προκαρυωτικοί οργανισμοί απαντώνται τόσο μεμονωμένα ή σε συμβίωση με άλλους οργανισμούς. Έχουν διάφορους τύπους κυτταρικής οργάνωσης: ατομικά, αποικίες, νηματοειδής σχηματισμούς. Τα περισσότερα απλούστερα φύκη είναι μαστιγοφόρα ή αμοιβαδοειδή και απαντώνται μόνα τους. Κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους μπορούν να αποκτήσουν διάφορα επίπεδα οργάνωσης όπως αποικίες, καμμοειδή σε μυκήλια, κοκκοειδή με κυτταρικά τοιχώματα, νηματοειδή, παρέγχυμα σχηματίζοντας έναν θαλλό, παλμελοειδή σε μυκήλια. Έχουν ένα ευρύ φάσμα αναπαραγωγικών στρατηγικών από την απλή, αγενή κυτταρική διαίρεση σε πολύπλοκες μορφές σεξουαλικής αναπαραγωγής.



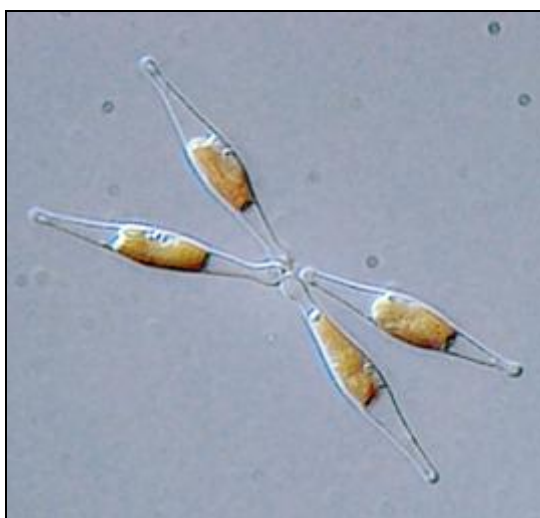
Εικόνα 1: Φυλογενετικό δέντρο μικροφυκών.

Η κατηγοριοποίηση τους βασίζεται κυρίως στο χρώμα. Υπάρχουν και άλλα βασικά κριτήρια κατηγοριοποίησης όπως το είδος των χρωστικών που δίνουν και το αντίστοιχο χρώμα στα κύτταρα, η χημική φύση των προϊόντων που αποθηκεύονται και των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος (Richmond, 2004).

1.1.1 *Phaeodactylum* sp.

Το *Phaeodactylum* sp. ανήκει στην τάξη Bacillariophyceae ή διάτομα, που αποτελούν την πιο κοινό τύπο φυτοπλαγκτού. Τα περισσότερα ζουν ως ατομικές μονάδες ή συνδέονται μεταξύ τους σε αλυσίδες κυττάρων ή σε αποικίες, σε υδάτινα και χερσαία ενδιαιτήματα. Είναι ευκαρυωτικοί μονοκύτταροι οργανισμοί και το χρώμα τους οφείλεται στην επικάλυψη του πράσινου χρώματος των χλωροφυλλών a , c_1 και c_2 και των καφέ και κίτρινων χρωστικών της φυκοξανθίνης και β -καροτενίου (Richmond, 2004). Το μέγεθος τους κυμαίνεται από 2 - 200 μ m (Hasle et al.,1996), έχουν μορφή ατράκτου και κατόπτρου και χαρακτηριστικό των κυττάρων είναι ότι περικλείονται εντός ενός κυτταρικού τοιχώματος από οξειδίο του πυριτίου που ονομάζεται frustule (Horner, 2002). Τα *Phaeodactylum* sp. μπορεί να αναπτυχτεί και απουσία του εν λόγω κυτταρικού τοιχώματος. Αυτά τα κυτταρικά τοιχώματα παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία στη μορφή σχηματίζοντας πόρους, ραβδώσεις, λεπτό αγκάθια κ.α. Τα διάτομα κατηγοριοποιούνται σε δύο τάξεις : τα κεντρικά με ακτινική συμμετρία και

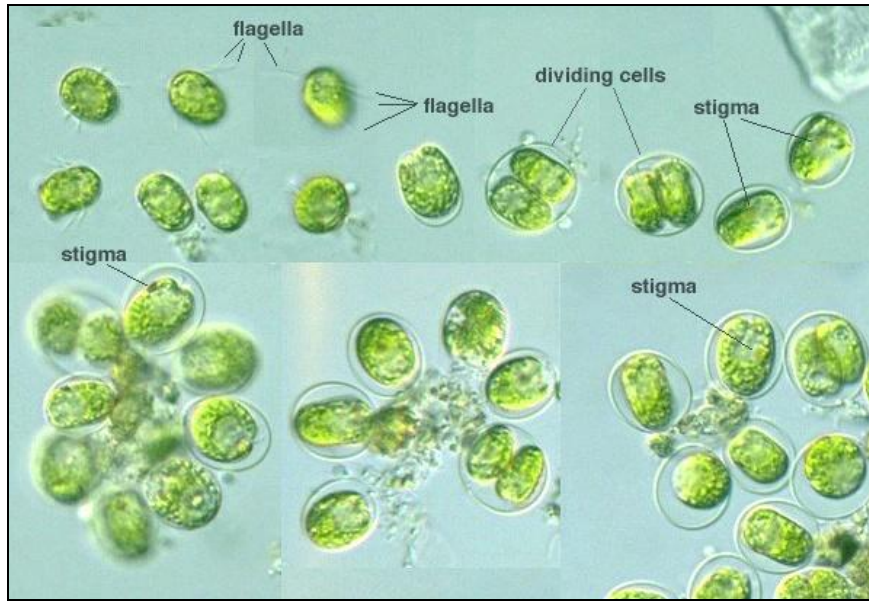
τα πτερωτά με αμφίπλευρη συμμετρία. Το ίδιο το κύτταρο αποτελείται από δύο μισά, το καθένα περιέχει μία ουσιαστικά επίπεδη πλάκα ή βαλβίδα. Το σχήμα τους είναι συνήθως κυκλικό, όμως μερικά κύτταρα έχουν σχήμα τριγωνικό, τετράγωνο ή ελλειπτικό. Στα διάτομα περιλαμβάνονται αυτότροφοι, ετερότροφοι και αυξότροφοι οργανισμοί.



Εικόνα 2: Κύτταρα φύκους *Phaeodactylum* sp. (Martino & Bowler, 2004).

1.2.1 *Tetraselmis* sp.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος *Tetraselmis* sp., το οποίο είναι ένα γένος φυτοπλαγκτόν, με υψηλό επίπεδο συγκέντρωσης λιπιδίων. Οι θαλάσσιοι οργανισμοί το χρησιμοποιούν στην διατροφή τους λόγω των αμινοξέων που έχει το φύκος. Ανήκει στα Χλωρόφυτα, δηλαδή στα πράσινα φύκη, τα οποία παράγουν χλωροφύλλη α και β καθώς και καροτενοειδή (Richmond, 2004). Είναι μονοκύτταρα φύκη, κινούνται με 4 μαστίγια σε δύο αντίθετα ζεύγη. Το σχήμα του είναι καρδιάσχημο, ελλειπτικό ή σχεδόν σφαιρικό. Αναπτύσσεται συνήθως σε μήκος 10μm x 14μm πλάτος. Έχει έναν χλωροπλάστη, σπανίως απαντώνται με δύο και συνήθως φέρει ένα κεντρικό πυρηνοειδές.



Εικόνα 4: Κύτταρα φύκους *Tetraselmis* sp. σε διάφορες μορφές κυτταρικής οργάνωσης (Protist Informatios Server).

Η φωτοσύνθεση στα μικροφύκη είναι μια οξειδοαναγωγική αντίδραση προκαλούμενη από την φωτεινή ενέργεια. Κατά την διάρκεια της αντίδρασης αυτής το διοξείδιο του άνθρακα και το νερό μετατρέπονται σε υδατάνθρακες και οξυγόνο. Ο βασικός μηχανισμός της είναι η μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ των φωτοσυστημάτων II και I, η σύνθεση του ATP και μείωση της ισχύος (NADH), αφομοίωση του διοξειδίου του άνθρακα (Cardol P. et al., 2010).

Στα προκαρυωτικά φύκη, τα κυανοβακτήρια (μπλε-πράσινα φύκη) απουσιάζει ο πυρήνας του κυττάρου και διάφορα οργανίδια στην μεμβράνη του κυττάρου. Υπάρχει ένα κυκλικό χρωμόσωμα και απαντάται στα κυτταρικά τοιχώματα τους ενώσεις όπως οι πεπτιδογλυκάνες. Επίσης, υπάρχουν διαφορετικού μεγέθους ριβοσώματα από εκείνα των ευκαρυωτικών κυττάρων (Losos *et al.*, 2007; Jochem & Frank J., 2008). Η φωτοσύνθεση συμβαίνει σε εξειδικευμένες περιφερειακές κυτταροπλασματικές μεμβράνες που ονομάζονται θυλακοειδής μεμβράνες και αποτελείται από χλωροπλάστες που περιέχουν φωτοσυνθετικές μεμβράνες. Εν αντίθεση τα ευκαρυωτικά φύκη, η φωτοσύνθεση λαμβάνει μέρος σε φωτοσυνθετικά οργανίδια, τους χλωροπλάστες. Οι χλωροπλάστες έχουν κυκλικό DNA και παρόμοια δομή με τα κυανοφύκη.

1.1 Εφαρμογές μικροφυκών

Τα μικροφύκη έχουν τραβήξει το ενδιαφέρον τόσο της επιστημονικής κοινότητας όσο και της βιομηχανικής για την πληθώρα των προϊόντων του μεταβολισμού τους που παράγουν. Τέτοια προϊόντα είναι οι χρωστικές, λιπαρά οξέα, πολυσακχαρίτες, φαρμακευτικά και αγροχημικά, δηλαδή ενώσεις με βιοδραστικές ιδιότητες όπως β-καροτένιο, ω-3 λιπαρά οξέα και αντιοξειδωτικά (Rasmussen & Morissey, 2007; Shalaby, 2011).

Επιπρόσθετα πολλά ένζυμα που απομονώνονται από αυτούς τους θαλάσσιους οργανισμούς προσφέρουν πληθώρα πλεονεκτημάτων στη διατροφή λόγω της ικανότητας τους να αντέχουν σε ακραίες τιμές θερμοκρασίες και pH (Rasmussen & Morissey, 2005).

Υπάρχει πληθώρα επιλογών ως προς τις εφαρμογές που μπορούν να έχουν σε υδατοκαλλιέργειες, βιοαισθητήρες, πρόσθετα υψηλής αξίας στα τρόφιμα όπως βιταμίνες A, B1, B2, B6, νιασίνη, βιταμίνη C, σπιρουλίνα, β-καροτένιο, σταθεροποιητικά τροφών όπως είναι η καραγεννάνη (Morton & Steve, 2008; Simoons & Federick, 1991), φαρμακευτικές ουσίες (Skjanes *et al.*, 2013), βιοκαύσιμα, συμπληρώματα διατροφής ζώων (Richmond, 2004; Mosleh *et al.*, 2012; Brayner *et al.*, 2011; Rodriguez-Bernaldo *et al.*, 2010). Άλλες εφαρμογές όπως βελτιωτικά εδάφους και λιπάσματα (McHugh & Dennis, 2003), έλεγχο μόλυνσης υδάτων, μείωση τοξικών χημικών όπως βαρέα μέταλλα, χρωστικές (Arad *et al.*, 1998) προστασία από την απορροή των φυτοφαρμάκων στις γεωργικές εκτάσεις (Hallman, 2007).

Τα μικροφύκη μας προσφέρουν την δυνατότητα ως βιολογικές μηχανές ικανές να εκφράζουν και να παράγουν ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες και πεπτίδια όπως τα μονοκλωνικά αντισώματα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι οργανισμοί αυτοί ως βιολογικό σύστημα έχει χαμηλό κόστος, παράγεται σε μεγάλη κλίμακα παρέχει προστασία από μολύνσεις ιών, φυτοφαρμάκων και ριπίον, έχει οργανίδια όπως τα τσαπερόνια κ.α. που αναδιπλώνουν τις πρωτεΐνες και γενικά κάνουν τις απαραίτητες τροποποιήσεις ώστε να εκφραστεί σωστά μια πρωτεΐνη. Επιπρόσθετα, εν δυνάμει

μείωση των σταδίων καθαρισμού των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών (Shalaby, 2011; Specht *et. al.*, 2010).

Για να αξιοποιηθούν όμως τόσο τα φύκη όσο τα προϊόντα του μεταβολισμού τους θα πρέπει να πληρούν κάποια κριτήρια. Κάποια από αυτά είναι εκτός της ικανότητας υψηλού επιπέδου έκφρασης της πρωτεΐνης, το χαμηλό κόστος και η διαθεσιμότητα των θρεπτικών μέσων για την ανάπτυξη, η ευκολία της καλλιέργειας κάτω από διάφορες συνθήκες καταπόνησης, η ενεργειακή απόδοση, περιβαλλοντικές συνέπειες, ο χαμηλού και εύκολος τρόπος καθαρισμού (Hawkins & Nakamura, 1999; Rasmussen, 2005).

Πολλά από τα μικροφύκη ανταποκρίνονται στα παραπάνω κριτήρια, πάνω στα οποία έχουν γίνει πληθώρα ερευνητικών εργασιών. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το μικροφύκος γλυκού νερού *Tetraselmis* sp. και το *Phaeodactylum* sp. για να ερευνηθεί η κατανομή πρωτεϊνών, η ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα καθώς και η ανάπτυξη πρωτοκόλλου κατιούσας επεξεργασίας με την εφαρμογή του υδατικού διαφασικού συστήματος (ATPS).

1.3 Ρόλος ελεύθερων ριζών (ROS)

Τα μικροφύκη συναντώνται σε διάφορες περιοχές, όπου οι συνθήκες περιβάλλοντος μερικές φορές είναι πολύ ακραίες. Κάτω από τις συνθήκες αυτές τα φύκη υπόκεινται σε στρες, γεγονός που οδηγεί σε σχηματισμό ελεύθερων ριζών (ROS) μέσα στο κύτταρο, δημιουργώντας προβλήματα σ' αυτό.

Οι ROS μπορεί να σχηματιστούν ως αποτέλεσμα της ξηρασίας, τραυματισμού, επίδρασης ζιζανιοκτόνων και φυτοφαρμάκων, το όζον, τη μεταβολική δραστηριότητα του φυτού, διατροφικές ανεπάρκειες, φωτοαναστολή, θερμοκρασία πάνω και κάτω από το έδαφος, τα τοξικά μέταλλα, καθώς και UV ή ακτίνες γάμμα (Smirnoff, 1993; Raychaudhuri *et. al.*, 2008; Mallick *et al.*, 2000). Συγκεκριμένα, το μοριακό O₂ ανάγεται προς O₂⁻ (μια ROS που ονομάζεται δισμουτάση), όταν απορροφά ένα διεγερμένο ηλεκτρόνιο που απελευθερώνεται από ενώσεις της αλυσίδας μεταφοράς

ηλεκτρονίων. Το σουπεροξειδίο είναι γνωστό ότι μετουσιώνει τα ένζυμα, οξειδώνει τα λιπίδια και το DNA. Οι σουπεροξειδικές δισμουτάσες καταλύουν την παραγωγή του O_2 και H_2O_2 από υπεροξειδίου (O_2^-), η οποία οδηγεί σε λιγότερο επιβλαβής ενώσεις. Οι SOD δρουν ως αντιοξειδωτικά και προστατεύουν τα κυτταρικά συστατικά από την οξείδωση που προκαλούν αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) (Alscher, et.al, 2002).

Οι ROS μπορούν να αντιδράσουν με λιπίδια, μεμβράνες, και πρωτεΐνες και να προκαλέσουν ανεπανόρθωτες βλάβες σε ένα κύτταρο (Wolfe-Simon et.al, 2005). Υπό φυσιολογικές συνθήκες η συγκέντρωσή τους στο κύτταρο είναι σε χαμηλά επίπεδα, όμως σε συνθήκες στρες όπως αναφέραμε παραπάνω η συγκέντρωσή τους αυξάνει και δημιουργεί προβλήματα στην λειτουργία του κυττάρου. Στους χλωροπλάστες μπορεί να προκαλέσει βλάβη στις θυλακοειδείς μεμβράνες, στις μεμβρανικές πρωτεΐνες οδηγώντας σε λειτουργική απώλεια των διάφορων συστατικών των φωτοσυνθετικών ηλεκτρονίων στην μεταφορική αλυσίδα (Khanna-Chopra et. al., 2011). Ωστόσο, ο οργανισμός αυξάνει την συγκέντρωση της SOD καθώς και με την διαμερισματοποίηση των διάφορων μορφών, επιτυγχάνει την μείωση του οξειδωτικού στρες.

Στα κύτταρα των οργανισμών το σουπεροξειδίο είναι από τα κύρια είδη ελεύθερων ριζών οξυγόνου δημιουργώντας σε υψηλές συγκεντρώσεις προβλήματα στην εύρυθμη λειτουργία τους. Επειδή το οξειδωτικό στρες παίζει σημαντικό ρόλο στις φλεγμονώδεις αντιδράσεις και στην καρκινογένεση, τα φυσικά προϊόντα που παράγονται από τα φύκη και κυρίως βιομόρια με αντιοξειδωτική δράση έχουν δυνατότητες για χρήση σε αντικαρκινικά και αντιφλεγμονώδη φάρμακα (Lee et. al., 2013).

1.4 Ανάπτυξη κατιούσας επεξεργασίας

Το αυξανόμενο ενδιαφέρον της βιοφαρμακευτικής και βιοτεχνολογικής βιομηχανίας να εκμεταλλευτεί τα φυτά ως ένα εμπορικά βιώσιμο σύστημα παραγωγής απαιτεί την ανάπτυξη νέων στρατηγικών για την μεγιστοποίηση παραγωγής των προϊόντων. Η ανάγκη αυτή οδήγησε στην έρευνα μιας αποτελεσματικής και οικονομικής κατιούσας

επεξεργασίας εφαρμόζοντας το υδατικό διαφασικό σύστημα ATPS για τον διαχωρισμό και τον καθαρισμό πολλών διαφορετικών βιομορίων (Omidinia E. *et al.*, 2009). Το σύστημα αυτό έχει εφαρμοστεί σε διάφορα πεδία καθαρισμού ενώσεων όπως αντιβιοτικά, διαφορετικοί τύποι πρωτεΐνων π.χ κουτινάση, ανθρώπινη χυμοθρυψίνη κ.α καθώς και πλασμιδιακό DNA (Bench *et. al.*, 2007).

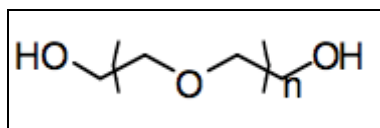
Η τεχνική αυτή εκμεταλλεύεται τις ήπιες υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών και των πολυμερών σε υδατικά περιβάλλοντα. Τα ATPS συστήματα σχηματίζονται όταν δύο διαλυτά πολυμερή (π.χ πολυαιθυλενογλυκόλη, δεξτράνη) ή πολυμερές και ένα άλας (π.χ φωσφορικό κάλιο, θειικό νάτριο κ.α) αναμιγνύονται σε υδατικά διαλύματα δεδομένη αναλογία (Hatti-Kaul, 2000). Η διαμερισματοποίηση των βιομορίων είναι η επιλεκτική διανομή μεταξύ των δύο φάσεων και εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των υλικών, (π.χ μοριακό βάρος των πολυμερών, ιονική ισχύ των αλάτων, σχετική αναλογία των συστατικών, pH κ.α) και τις συνθήκες του συστήματος περιβάλλοντος (Omidinia *et al.*, 2009).

Αναλυτικότερα, ο τύπος του άλατος που θα χρησιμοποιηθεί είναι ικανός να προκαλέσει τον διαχωρισμό των φάσεων και την διαμερισματοποίηση του βιομορίου στις δυο φάσεις. Αν η χρήση του άλατος δεν οδηγήσει στον διαχωρισμό αυτό πιθανόν να οφείλεται στις ασθενείς αλληλεπιδράσεις που έχει με το πολυμερές και τα μόρια του νερού. Το μοριακό βάρος του πολυμερούς επιδρά στην σύνθεση των φάσεων και στον αριθμό των αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτού και της πρωτεΐνης, λόγω των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αλυσίδων της PEG και της υδροφοβικής περιοχής της πρωτεΐνης. Άλλη σημαντική παράμετρος είναι το pH, αυξάνοντας την τιμή μειώνουμε τα αρνητικά φορτία των οξυγόνων της PEG, οδηγώντας στην πρόσδεση με είδη ανιόντων, αυξάνοντας τον συντελεστή κατανομής. Το εύρος τιμών της θερμοκρασίας καθώς όταν αυξάνει μόρια νερού μετακινούνται από την φάση PEG στην φάση του άλατος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα πιο συμπυκνωμένη PEG φάση και μειωμένη πυκνότητα άλατος, οδηγώντας σε αποτελεσματικότερο καθαρισμό. Σημαντική παράμετρος επίσης είναι και ο όγκος του δείγματος που θα εισάγουμε στο σύστημα όπως και αναλογία όγκου των φάσεων (Narayan & Raghavarao, 2007; Omidinia *et al.*, 2010; Rosa *et al.*, 2007). Τελευταίος αλλά εξίσου σημαντικός παράγοντας είναι το μήκος γραμμής (TLL), που ενώνει τα σημεία μεταξύ των δύο

φάσεων στο διάγραμμα φάσεων. Μέσω αυτής βρίσκουμε την αναλογία των όγκων των δύο φάσεων καθώς και το κρίσιμο σημείο της καμπύλης. Επιδιώκουμε η αναλογία των όγκων να είναι ίση κοντά στο κρίσιμο σημείο ώστε να επιτύχουμε τον αποτελεσματικό διαχωρισμό των φάσεων αλλά και του βιομορίου (Hatti-Kaul, 2000).

Το σύστημα ATPS πολυμερούς-άλας προτιμάται από το σύστημα πολυμερές-πολυμερές των πολλών πλεονεκτημάτων. Δεν χρησιμοποιεί πτητικές οργανικές ενώσεις, όπως διαλύτες, σχηματισμός των φάσεων των πολυμερών που βασίζονται στη δομή του νερού, εκμεταλλεύεται τις ιδιότητες των πολυμερών, όπως το πολυαιθυλένιο γλυκόλης, πολυβινυλο πυρρολιδόνη (PVP) κλπ. και καθιστά χρήση του σχηματισμού φάσεων από συστατικά τα οποία θα μπορούσαν να ανακτηθούν και να ανακυκλωθούν σε περιορισμένο βαθμό (Raghavarao *et al.*, 2003). Επίσης, πλεονεκτεί διότι έχει χαμηλό κόστος, χαμηλό ιξώδες, ταχύς χωρισμός φάσης, ευρύ φάσμα υδροφοβικότητας, καλή ανάλυση, υψηλή απόδοση, χαμηλό κόστος υλικών, μείωση όγκου, υψηλή ικανότητα, καλή επαναληψιμότητα και φιλικό προς το περιβάλλον για βιομηχανικές εφαρμογές (Asenjo *et al.*, 2002; Omidinia *et al.*, 2009). Το ATPS μας παρέχει την δυνατότητα να αφαιρέσουμε αδιάλυτα συστατικά, καθαρίζοντας παράλληλα αποτελεσματικά το προϊόν στόχο (Bench *et al.*, 2007).

Η PEG είναι ένα συνθετικό πολυμερές αιθέρα, ολιγομερές ή πολυμερές, συνήθως κατασκευασμένα με υδατική ανιονικού πολυμερούς οξειδίου του αιθυλενίου, με μοριακό βάρος μεταξύ 1000-50.000g/mol (Greenwald *et al.*, 2002). Η πολυαιθυλενογλυκόλη έχει την παρακάτω δομή (Εικόνα 1.2): HO-CH₂-(CH₂-O-CH₂)_n-CH₂-OH.



Εικόνα 1.4 Δομή της πολυαιθυλένο γλυκόλης.

Η διαμερισματοποίηση των ενώσεων σ' αυτά τα συστήματα είναι πολύπλοκη διότι επιδρούν παράγοντες όπως δεσμοί υδρογόνου, ηλεκτρικά φορτία, υδρόφοβες και στατικές επιδράσεις (Yung *et al.*, 2005). Ωστόσο, μας παρέχει πληροφορίες για το φορτίο και τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις στην επιφάνεια των κυττάρων. Επιπλέον,

εντοπίζονται τυχόν μεταβολές της κυτταρικής επιφάνειας που οφείλονται σε κυτταρικές διεργασίες όπως η διαφοροποίηση, η γήρανση, η ωρίμανση (Hatti-Kaul, 2000).

Μελέτες έδειξαν ότι με την αύξηση του μεγέθους του πολυμερούς, αυξάνεται η αποτελεσματικότητα της PEG. Πρέπει να προσέξουμε όμως την τάση που έχουν οι μεγαλύτερες σε μέγεθος πρωτεΐνες να καθιζάνουν στις χαμηλές συγκεντρώσεις PEG (Atha & Ingham, 1981). Ειδικότερα, το μοριακό βάρος της PEG επιδρά στην σύνθεση των δύο φάσεων όπως και στον αριθμό των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πολυμερούς- πρωτεΐνης. Αυτό οφείλεται στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλυσίδων του πολυμερούς και της υδροφοβικής πλευράς της πρωτεΐνης (Omidinia *et. al.*, 2009).

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα παραπάνω στην παρακάτω παράγραφο παρουσιάζουμε τον σκοπό της παρούσας μελέτης, που είχε ως στόχο την βελτιστοποίηση από άποψη κόστους και αποτελεσματικότητας ανάπτυξης κατιούσας επεξεργασίας πρωτεϊνών από μικροφύκη.

1.5 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Σκοπός της παρούσας πειραματικής μελέτης ήταν η ανάπτυξη βελτιστοποιημένου πρωτοκόλλου κατιούσας επεξεργασίας πρωτεϊνών από μικροφύκη, εφαρμόζοντας το υδατικό διφασικό σύστημα ATPS. Το σύστημα αυτό αποτελείται από ένα πολυμερές, την πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) και άλας φωσφορικών (K_2HPO_4 - KH_2PO_4).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

2.1.1 Βιολογικά υλικά

Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη: *Tetraselmis* sp., *Phaeodactylum* sp. Τα στελέχη υποβλήθηκαν σε επίδραση τριών συνθηκών καταπόνησης όπως, υψηλής θερμοκρασίας (T°), συγκέντρωση αλατότητας (5‰) και έλλειψης αζώτου(N) στο θρεπτικό μέσο.

2.1.2 Χημικά αντιδραστήρια

Για την ανάπτυξη της καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια για την παρασκευή του θρεπτικού διαλύματος 3N-BBM+V. Το νιτρικό νάτριο [NaNO_3 , $M_r=84,99$] αγοράστηκε από την εταιρεία BDH (Αγγλία). Το ενυδατωμένο χλωριούχο ασβέστιο [$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $M_r=147,2 \text{ g/mol}$] αγοράστηκε από την εταιρεία Merck (Γερμανία). Το ενυδατωμένο θειικό μαγνήσιο [$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $M_r=246,48$] αγοράστηκε από την εταιρεία Sigma-Aldrich (Γερμανία), το διβασικό φωσφορικό κάλιο (ενυδατωμένο) [$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $M_r=174,18 \text{ g/mol}$] από την εταιρεία Merck (Γερμανία), το χλωριούχο νάτριο [NaCl , $M_r=58,44 \text{ g/mol}$], το δισόξινο φωσφορικό κάλιο [KH_2PO_4 , $M_r=136,09 \text{ g/mol}$, σκόνη] αγοράστηκαν από την εταιρεία Merck (Γερμανία). Το οξικό νάτριο [CH_3COONa , $\text{FW}=136,08$] αγοράστηκε από την εταιρεία Mallinckrodt (Η.Π.Α). Το Tris-HCl (Trizma base, >99,9%, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, $\text{F.W}=121,14$) της εταιρείας Sigma-Aldrich (Η.Π.Α).

Για τον φωτομετρικό προσδιορισμό ολικής αντιοξειδωτικής χωρητικότητας των φυκών με τη μέθοδο FRAP χρησιμοποιήθηκαν το αντιδραστήριο οξικό νάτριο [CH_3COONa , $\text{FW}=136,08$] αγοράστηκε από την εταιρεία Mallinckrodt (Η.Π.Α), ο ενυδατωμένος τριχλωριούχος σίδηρος [$\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $M_r=270,3$] από την εταιρεία Sigma-Aldrich (Η.Π.Α), το TPTZ [2,4,6-Tris(2-pyridyl)-triazine, $M_r=312,33$] από την εταιρεία Sigma-Aldrich (Ελβετία). Το υδροχλώριο [HCl , $M_r=36,46$, 12M, 37% extra pure, BP, DAB, Ph Eur, MF] και το ορθοφωσφορικό οξύ [H_3PO_4 , 85% reagent grade ACS, ISO] από την εταιρεία Scharlau (Ισπανία).

Για την κατιούσα επεξεργασία των φυκών με την μέθοδο του υδατικού διφασικού συστήματος (ATPS) χρησιμοποιήθηκαν η πολυαιθυλενογλυκόλη [PEG, $M_r=1400-1600$, $M_r=2700-3300$, $M_r=5000-7000$] από την εταιρεία Fluka (Γερμανία), το δισόξινο φωσφορικό κάλιο [KH_2PO_4 , $M_r=136,09g/mol$, σκόνη] αγοράστηκε από την εταιρεία Merck (Γερμανία), το διβασικό φωσφορικό κάλιο (ενυδατωμένο) [$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, $M_r=174,18 g/mol$] και το χλωριούχο νάτριο [$NaCl$, $M_r=58,44g/mol$] από την εταιρεία Merck (Γερμανία).

Για τον προσδιορισμό πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Coomassie Brilliant Blue (G-250) και η πρωτεΐνη αλβουμίνη (BSA) που αγοράστηκαν από την εταιρεία Merck και Sigma-Aldrich (Η.Π.Α) αντίστοιχα.

2.2 Εξοπλισμός

Κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω συσκευές:

- Για την πεχαμέτρηση των ρυθμιστικών διαλυμάτων έγινε χρήση της συσκευής ORION μοντέλο 410A.
- Οι φυγόκεντροι που χρησιμοποιήθηκαν για την συλλογή κυττάρων και για τον διαχωρισμό των κυτταρικών θραυσμάτων και του ενζυμικού εκχυλίσματος ήταν Heraeus Instruments Biofuge primo και eppendorf centrifuge 5804R.
- Για το λύσιμο των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε η συσκευή υπερήχων Sonics & Materials Inc Vibra Cell.
- Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου πραγματοποιήθηκε σε συσκευή της εταιρείας Hoefler H.Π.Α, μοντέλο SE 600, η οποία είναι συνδεδεμένη με τροφοδοτικό SP 500x Ta (500 Volt, 400 mA) της ίδιας εταιρείας.
- Υδατόλουτρο της εταιρείας BIBBY, Stuart Scientific.
- Ξηρό σύστημα επώασης, Daihan LabTech, Co., LTD
- Η φασματοσκοπία έγινε με το φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer UV/Vis spectrometer της εταιρείας Lambda Bio και με το U-2000 spectrophotometer της εταιρείας Hitachi Ltd.
- Η ανάλυση των φασμάτων έγινε με το φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer UV/Vis spectrometer της εταιρείας Lambda 16.

- Η φωτογράφιση των πηκτών ηλεκτροφόρησης έγιναν στην φωτογραφική συσκευή Mini Bis Pro 25mm της εταιρείας Kodak.

2.3 Μέθοδοι

2.3.1 Λύση των κυττάρων και παραλαβή εκχυλίσματος

Η λύση των κυττάρων έγινε με την επίδραση υπερήχων. Η επίδραση αυτή έγινε για διαφορετικές χρονικές περιόδους. Κατά τη διάρκεια της λύσης το δείγμα διατηρείται στον πάγο, για να αποφευχθεί η μετουσίωση των πρωτεϊνών από την παραγόμενη θερμότητα από τους υπερήχους. Μετά το πέρας της διαδικασίας ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14.000rpm για 7min (4°C), ώστε να συλλέξουμε το υπερκείμενο.

2.3.2. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 να αλλάζει χρώμα όταν αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον. Η ελεύθερη χρωστική έχει χρώμα καστανό και απορροφά στα 465nm, ενώ το σύμπλοκο πρωτεΐνη-χρωστική είναι γαλάζιο και απορροφά στα 595nm. Η μέθοδος είναι αξιόπιστη για πρωτεϊνικά δείγματα των οποίων η συγκέντρωση κυμαίνεται από 0,04mg/mL έως 0,20mg/mL (40–200μg/mL).

Αναλυτικά η διαδικασία έχει ως εξής: Η χρωστική (100 mg) διαλύεται σε 100mL υδατικού διαλύματος μεθανόλης (50% v/v). Στο διάλυμα προστίθενται 100 mL πυκνού φωσφορικού οξέος (85% w/v). Όλα τα υλικά προστίθενται εντός σκοτεινού δοχείου και το διάλυμα που προκύπτει αποτελεί το πυκνό αντιδραστήριο Bradford, το οποίο διατηρείται στους 25°C. Για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης το παραπάνω αντιδραστήριο αραιώνεται με νερό σε αναλογία $\frac{1}{4}$ δηλαδή 1 μέρος πυκνού αντιδραστηρίου Bradford και 4 μέρη νερού και το διάλυμα που προκύπτει διατηρείται σε σκοτεινό δοχείο και σε θερμοκρασία 25°C για 24h. Για τον προσδιορισμό αγνώστου δείγματος πρωτεΐνης, σε 950μL του αραιωμένου αντιδραστηρίου Bradford προστίθενται 50μL πρωτεΐνης κατάλληλης συγκέντρωσης ώστε στην κυψελίδα να υπάρχουν 2-10μg πρωτεΐνης. Το μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 25°C για 20-35min σε σκοτεινό μέρος και ακολούθως λαμβάνεται η απορρόφηση στα 595nm,

έχοντας ως αναφορά διάλυμα που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από πρωτεΐνη (σε 950μL του αραιωμένου αντιδραστηρίου Bradford προστίθενται 50μL δις αποσταγμένου νερού). Η απορρόφηση ανάγεται σε συγκέντρωση πρωτεΐνης με βάση πρότυπη καμπύλη αναφοράς, από την οποία υπολογίζεται ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης. Η καμπύλη αναφοράς σχεδιάζεται έχοντας ως πρότυπο γνωστές ποσότητες (2-10 mg) αλβουμίνης από ορό μόσχου.

Συγκεκριμένα για τα κύτταρα με και χωρίς φυγοκέντρωση μετά την λύση τους χρησιμοποιήθηκαν οι εξής ποσότητες: 940-945 μl αραιωμένο διάλυμα Bradford και 5-10μl κυττάρων. Στους μάρτυρες αντίστοιχα είχαμε 950 μl αραιωμένο διάλυμα Bradford και 50μl ddH₂O.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης έγινε με την παρακάτω σχέση:

$c = A \times V_{\text{τελ}} / \epsilon \times l \times V_{\text{δείγματος}}$, όπου A: τιμή απορρόφησης στα 595nm

$V_{\text{τελ}}$: τελικός όγκος δείγματος

$V_{\text{δείγματος}}$: όγκος βιολογικού δείγματος

ϵ : κλίση πρότυπης καμπύλης Bradford

l : μήκος οπτικής διαδρομής (cm)

2.3.3 Φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (UV- Vis)

Η φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) είναι μια οπτική μέθοδος ανάλυσης. Βασίζεται στην ικανότητα ορισμένων ουσιών να αλληλεπιδρούν με ακτινοβολίες χαρακτηριστικών συχνοτήτων. Με την φασματοφωτομετρία UV-Vis ταυτοποιείται μια άγνωστη ένωση, όπως επίσης επιτυγχάνεται η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση μιας ένωσης. Η ανίχνευση άγνωστων ενώσεων κυμαίνεται σε ένα εύρος μήκος κύματος μεταξύ 800-200nm, κατά την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας (200-340nm) και ορατής ακτινοβολίας (800-340nm). Με την μέθοδο αυτή λήφθηκαν τα φάσματα απορρόφησης σε περιοχή μήκους κύματος 700-220nm σε φυγοκεντρημένα και μη φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα *Phaeodactylum* sp. και *Tetraselmis* sp.

2.3.4. Κατιούσα επεξεργασία πρωτεϊνών με εφαρμογή υδατικού διαφασικού συστήματος PEG-Pi

Αρχικά, εφαρμόσαμε το σύστημα ATPS χρησιμοποιώντας σαν πολυμερές πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) με τρία 3 διαφορετικά μοριακά βάρη: $M_r=1500, 3000, 6000$ Da σε εκχύλισμα κυττάρων που είχαν υποστεί φυγοκέντρωση και σε εκχύλισμα κυττάρων που δεν είχε. Εν συνεχεία επιλέξαμε το σύστημα με την καλύτερη απόδοση επεξεργασίας, το οποίο ήταν το ATPS (PEG, $M_r= 3000$) και εφαρμόσαμε το ίδιο σύστημα σε εκχύλισμα κυττάρων (φυγοκεντρημένα και μη) σε διαφορετικές συνθήκες ιονικής ισχύος pH και αλατότητας (% NaCl). Αναλυτικά η διαδικασία είχε ως εξής: ζυγίστηκαν 80g PEG 1500 και 50g PEG 3000 & 6000 αντίστοιχα και διαλύθηκαν σε 20g, 50g, 50g ddH₂O, αντίστοιχα. Στη συνέχεια ζυγίστηκαν 22,4g KH₂PO₄ και 57,6g K₂HPO₄, τα οποία αρχικά διαλύθηκαν σε 100g ddH₂O προσθέτοντας αργά, μέχρι να διαλυθούν πλήρως τα φωσφορικά και να μην δημιουργηθούν συσσωματώματα. Ακολουθεί ρύθμιση του pH=7 και συμπλήρωση μέχρι τα 200g με ddH₂O. Οι ποσότητες των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν υπολογίστηκαν από τον νόμο της αραιώσης. Χρησιμοποιήθηκαν 6 falcon των 15mL για το κάθε σύστημα ATPS (PEG1500, 3000, 6000 Da) για τα κύτταρα με και χωρίς φυγοκέντρωση. Το κάθε σύστημα πρέπει να χει τελικό βάρος 10g.

Τα συστήματα αφήνονται υπό ανάδευση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου και μετά το πέρας του σταδίου αυτού, φυγοκεντρούμε τα falcon στις 1500rpm για 10min για να επιτύχουμε καλύτερο διαχωρισμό των δύο φάσεων PEG-Pi. Στη συνέχεια διαχωρίζουμε με προσοχή τις δύο φάσεις και τις διατηρούμε σε falcon στους 4°C.

Η παραπάνω διαδικασία εφαρμόστηκε ακριβώς και στην επιλογή του συστήματος PEG3000 στα μη φυγοκεντρημένα κύτταρα, στην μελέτη της επίδρασης της ιονικής ισχύος pH (6,5, 7, 7,5, 8,5) και στην συγκέντρωση αλατότητας % NaCl (0% w/v, 3,5% w/v, 7% w/v, 10% w/v).

2.3.5. Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής χωρητικότητας με τη μέθοδο FRAP

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για να προσδιορίσουμε την ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα των κυττάρων φύκους *Tetraselmis* sp., έπειτα από την εφαρμογή

συστήματος κατιούσας επεξεργασίας ATPS (PEG-Pi). Αρχικά, εφαρμόστηκε σε δείγματα κυττάρων που είχαν υποστεί φυγοκέντρωση και σε κύτταρα χωρίς φυγοκέντρωση σε 3 διαφορετικά μοριακά βάρη PEG (1500 Da, 3000 Da, 6000 Da). Έν συνεχεία εφαρμόστηκε στο σύστημα ATPS (PEG3000) σε μη φυγοκεντρημένα κύτταρα σε διάφορες τιμές pH=6.5, 7, 7.5, 8.5 και σε συγκέντρωση άλατος NaCl (0% w/v, 3,5% w/v, 7% w/v, 10% w/v).

Ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: αναμείξαμε σε ποτήρι ζέσεως 10mL δ/τος CH₃COONa 3H₂O 300 mM, pH=3,6, 1mL TPTZ 10mM και 1mL FeCl₃ 6H₂O 20mM(διάλυμα FRAP). Το διάλυμα αυτό διατηρήθηκε στους 37°C για 2h. Στη συνέχεια σε κυβέτα 1mL προσθέσαμε 990μl FRAP και 10μl από το διάλυμα στο οποίο λύθηκαν τα κύτταρα, η οποία αποτέλεσε τον μαρτυρά μας. Έπειτα, σε κυβέτα 1mL προσθέσαμε 990μl από το διάλυμα μας και 10μl από το αρχικό εκχύλισμα κυττάρων (crude) και 10μl από τα δείγματα μας από τις φάσεις που διαχωρίσαμε από το σύστημα ATPS στις διάφορες συνθήκες που εφαρμόσαμε. Ακολούθησε ανάδευση και επώαση στους 37°C για 4min και έγινε η φωτομέτρηση τους στα 593nm.

Ο υπολογισμός των τιμών FRAP γίνεται με την μετατροπή της τιμής απορρόφησης του δείγματος ανάλογα με την απορρόφηση του εξεταζόμενου δείγματος με την απορρόφηση του προτύπου δ/τος ασκορβικού οξέος που θα επιλεγθεί (πάντα μικρότερη από την απορρόφηση του εξεταζόμενου δείγματος). Οι τιμές FRAP υπολογίζονται σε μM, με την χρήση της παρακάτω εξίσωσης:

Τιμή FRAP= (Abs δείγματος/Abs προτύπου) x τιμή προτύπου

Αν αραιώσουμε κάποιο δείγμα τότε πολλαπλασιάζουμε τον παραπάνω τύπο με την τιμή της αραιώσης.

2.3.6 Διαπίδυση

Σε διαπίδυση υποβλήθηκαν οι φάσεις PEG και Pi μετά την εφαρμογή του συστήματος κατιούσας επεξεργασίας ATPS τόσο στα κύτταρα που είχαν υποβληθεί σε φυγοκέντρωση όσο και σε αυτά που δεν είχαν. Μέσω αυτής της διαδικασίας απομακρύνονται από το τις

δύο φάσεις τυχόν προϊόντα του μεταβολισμού του κυττάρου αλλά και ενώσεις μικρού μοριακού βάρους. Η διαδικασία διαπίδωσης επιτυγχάνεται μέσω ωσμωτικών φαινομένων σε 18–24h στους 4°C. Τα ενζυμικά εκχυλίσματα τοποθετούνται σε ημιπερατές μεμβράνες κυτταρίνης της εταιρείας Sigma-Aldrich (Η.Π.Α.) με όριο αποκλεισμού 12kDa. Χρησιμοποιήθηκαν ddH₂O όγκου 5000mL και 100μl stacking buffer (Tris-HCl, pH=6,8).

2.3.7. Λυοφιλίωση

Κατά τη διάρκεια του πειράματος στις περιπτώσεις που υπήρξαν πολύ αραιά δείγματα πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα η συγκέντρωση της να είναι πολύ μικρότερη από την απαιτούμενη για να τα ηλεκτροφορήσουμε. Έτσι, με την λυοφιλίωση, μειώνουμε τον όγκο των δειγμάτων με εξάχνωση, ώστε να συμπυκνώσουμε το διάλυμα με την πρωτεΐνη. Τα δείγματα ετοιμάζονται σε eppendorf, στα οποία έχουν ανοιχτεί μικρές τρύπες. Στην συνέχεια τοποθετούνται σε φλάσκα στη συσκευή λυοφιλίωσης, η οποία ψύχεται μεταξύ -50°C και -80°C. Μετά από εφαρμογή χαμηλής πίεσης για 24h, παραλαμβάνονται τα δείγματα σε στερεή μορφή στην βάση των eppendorf και στη συνέχεια τα επαναδιαλύουμε στον επιθυμητό όγκο.

2.3.8. Κατακρήμνιση πρωτεϊνών με χρήση TCA

Χρησιμοποιείται για τους ίδιους λόγους όπως και η λυοφιλίωση. Με την τεχνική αυτή οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται και κατακρημνίζονται, με μεταβολή του pH παρουσία TCA. Παρακάτω περιγράφονται τα στάδια του πρωτόκολλου κατακρήμνισης:

1. Σε έναν όγκο πρωτεϊνικού δείγματος προστίθενται 4 όγκοι 1,5M TCA.
2. Επωάζουμε στον πάγο για 20min, μετά την προσθήκη του TCA.
3. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του δείγματος για 9min στις 13.000rpm.
4. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 150μL παγωμένης ακετόνης (-20°C) και φυγοκεντρούμε στις 13.000rpm για 8min.
5. Απομακρύνουμε την ακετόνη και επαναλαμβάνουμε το στάδιο 4 για άλλη μια φορά.
6. Τοποθετούμε το eppendorf στο υδατόλουτρο (95°C) για 5-8min για να εξατμιστεί η ακετόνη.

2.3.9. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε ασυνεχή πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκαθειικού νατρίου (SDS)

Η μελέτη προσδιορισμού πρωτεϊνών από κύτταρα *Tetraselmis* έπειτα από την εφαρμογή υδατικού διφασικού συστήματος ATPS πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της ηλεκτροφόρησης (μέθοδος Laemmli, 1970). Κατά την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το φορτίο των πλευρικών ομάδων τους. Στην ηλεκτροφόρηση σε ασυνεχή πηκτή πολυακρυλαμιδίου, παρουσία SDS χρησιμοποιούνται δύο πηκτές ακρυλαμιδίου τοποθετημένες σε σειρά. Στην πάνω πηκτή, λεγόμενη και πηκτή συσσώρευσης (stacking gel) εισάγονται τα δείγματα. Αυτή έχει χαμηλή συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου (5% w/v) και προκαλεί συσσώρευση σε στενές ζώνες του πρωτεϊνικού δείγματος πριν εισέλθει στην πηκτή διαχωρισμού (separating gel). Η πηκτή αυτή έχει υψηλότερη συγκέντρωση πολυακρυλαμιδίου (8-20% w/v).

Παρουσία όμως SDS ο διαχωρισμός γίνεται αποκλειστικά με την μοριακή μάζα και όχι με το φορτίο. Είναι ένα ισχυρό απορρυπαντικό που αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες και οδηγεί στην ολική αποδιάταξη τους αυτών και των υπομονάδων τους ώστε να προκύψουν πολύ ανιονικές αλυσίδες πολυπεπτιδίων. Επίσης, προσδίδει ένα σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα πρωτεΐνης, ενώ η συγκέντρωση της πηκτής δρα ως μοριακό κόσκινο, όπου το μέγεθος των πόρων της καθορίζουν την σχετική κινητικότητα. Παρακάτω ακολουθεί το πρωτόκολλο της μεθόδου, όπου η περιεκτικότητα ακρυλαμιδίου 12,5%w/v.

Προετοιμασία ρυθμιστικού διαλύματος πηκτής διαχωρισμού (separating buffer)

Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτής διαχωρισμού (875μL) αναμειγνύονται με διάλυμα SDS 10% w/v (70μL), διάλυμα ακρυλαμιδίου 30%w/v (2,935μL), δις-απιονισμένο νερό (2.935μL), διάλυμα APS (170μL) και τέλος στον απαγωγό προσθέτουμε το TEMED (6.24μL) επειδή είναι καρκινογόνο. Αναδεύουμε το διάλυμα και το εισάγουμε σε γυάλινο κάθετο καλούπι και αφήνουμε να γίνει ο πολυμερισμός για 20-30min. Καλύπτουμε την επιφάνεια 1mL υδατικού διαλύματος βουτανόλης 50%, για αποτροπή δημιουργίας φυσαλίδων. Ξεπλένουμε έπειτα με νερό για 2-3 φορές και εισάγουμε την πηκτή συσσώρευσης (stacking gel). Αυτή αποτελείται από δις απιονισμένο νερό (3,450μL), ακρυλαμίδη 30% (625μL), διάλυμα επιστοίβαξης (625μL), APS (170μL), SDS 10%w/v

(50μL) και TEMED (6,25μL). Αφήνουμε να γίνει ο πολυμερισμός για 20-30min. Ακολουθεί η παρασκευή του διαλύματος φόρτωσης (running buffer) που αποτελείται από 50mL running buffer και 450mL ddH₂O.

Προετοιμασία δειγμάτων

Για να ηλεκτροφορήσουμε τα δείγματα μας προηγήθηκε ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford. Προετοιμάζουμε το δείγμα συγκέντρωσης 50μg, που διαλύεται με 20μL loading buffer. Τοποθετούμε τα δείγματα στο υδατόλουτρο στους 95°C για 5min. Ακολουθεί vortex και spin. Το loading buffer (1X SDS gel-loading buffer) αποτελείται από: 50mM Tris-Cl (pH=6.8), 100mM dithiothreitol, 2% w/v SDS, 0,1% w/v μπλέ βρωμοφαινόλη, 10% w/v γλυκερόλη. Φορτώνουμε τα δείγματα στα αυλάκια της πηκτής μέχρι τα 20μL ενώ χρησιμοποιούμε και 10μL από τον μάρτυρα. Συνδέουμε τα ηλεκτρόδια με την συσκευή παροχής ρεύματος, ρυθμίζοντας την ένταση στα 20mA.

Βαφή με Coomassie Brilliant Blue R-250

Μετά την ηλεκτροφόρηση η πηκτή εμβαπτίζεται σε υδατικό διάλυμα που περιέχει μεθανόλη (45%v/v), οξικό οξύ (7%v/v) και Coomassie Brilliant Blue (0,25–1%w/v), για 20min. Στη συνέχεια η πηκτή αποχρωματίζεται για 1h στο υδατικό διάλυμα Destayning I: μεθανόλη (40%v/v) και οξικό οξύ (7%v/v) ενώ αφήνεται όλη την νύχτα στο Destayning II: μεθανόλη (5%v/v) και οξικό οξύ (7%v/v).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

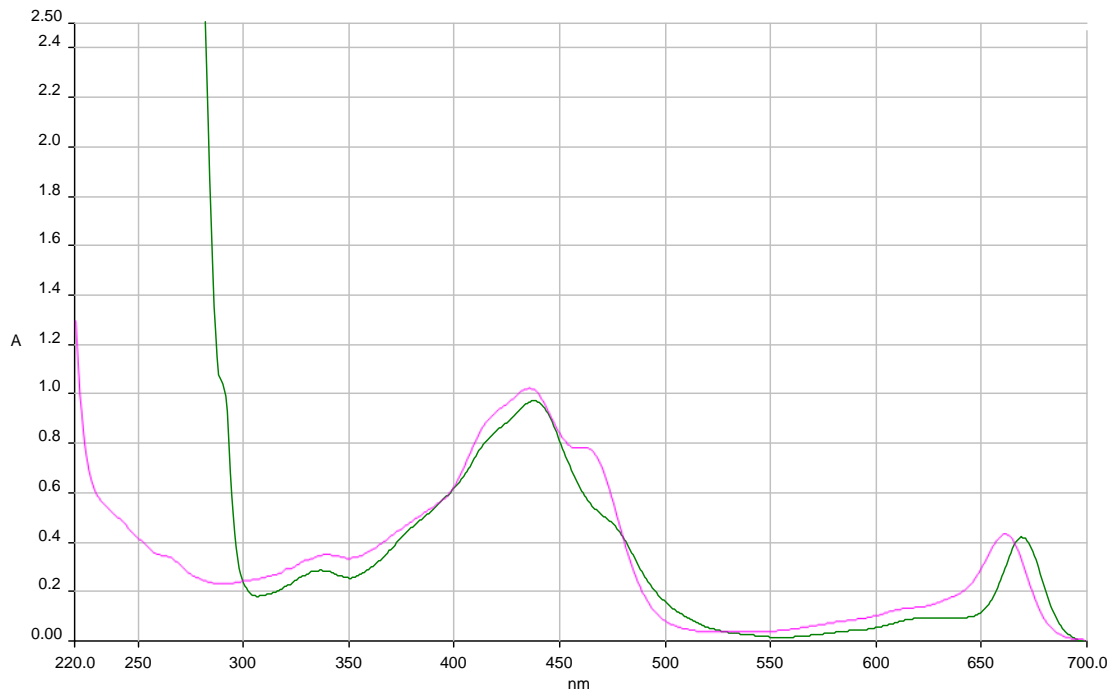
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ανάλυση μικροφυκών με φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)

Η φασματοφωτομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) είναι μια οπτική μέθοδος ανάλυσης. Βασίζεται στην ικανότητα ορισμένων ουσιών να αλληλεπιδρούν με ακτινοβολίες χαρακτηριστικών συχνοτήτων. Με την φασματοφωτομετρία UV-Vis ταυτοποιείται μια άγνωστη ένωση, όπως επίσης επιτυγχάνεται η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση μιας ένωσης. Η ανίχνευση άγνωστων ενώσεων κυμαίνεται σε ένα εύρος μήκος κύματος μεταξύ 800-200nm, κατά την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας (200-340 nm) και ορατής ακτινοβολίας (800-340 nm).

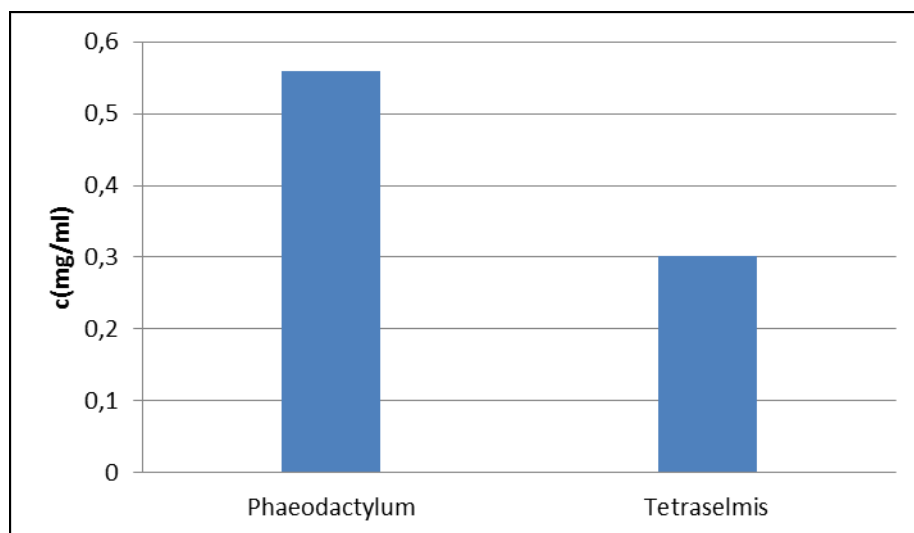
Στην παρούσα μελέτη για τα εκχυλίσματα των φυκών το μήκος κύματος κυμάνθηκε μεταξύ 700-220 nm. Αρχικά, ζυγίστηκαν 0,5 g κυττάρων φυκών *Phaeodactylum* και *Tetraselmis*, τα οποία εν συνεχεία αιωρήθηκαν σε 5 mL MeOH. Ακολούθησε λύση των κυττάρων με την χρήση υπερήχων διάρκειας 150 s. Έπειτα, φυγοκεντρήθηκαν για 5min στις 14.000 rpm. Μετά το πέρας της διαδικασίας αυτής, συλλέχθηκε το υπερκείμενο διάλυμα των κυττάρων στο οποίο λήφθηκε το φάσμα UV-Vis. Στην παρακάτω Εικόνα 1 απεικονίζονται τα φάσματα απορρόφησης των δύο εκχυλισμάτων.

Οι κορυφές που παρατηρούνται (Εικόνα 1) στην περιοχή μήκους κύματος μεταξύ 650-670nm, οφείλονται στην απορρόφηση της χλωροφύλλης a και b. Επίσης, μεταξύ της περιοχής μήκους κύματος 430-450nm, οι κορυφές πιθανόν να οφείλονται στην απορρόφηση καροτενοειδών και μερικώς στην απορρόφηση της χλωροφύλλης. Η ανάλυση των φασμάτων έγινε με βάση τα φάσματα απορρόφησης από *Chlorella* sp. και *Tetraselmis* sp. (Cho & Govindjee, 1970; Sathyendranath *et al.*, 1987).



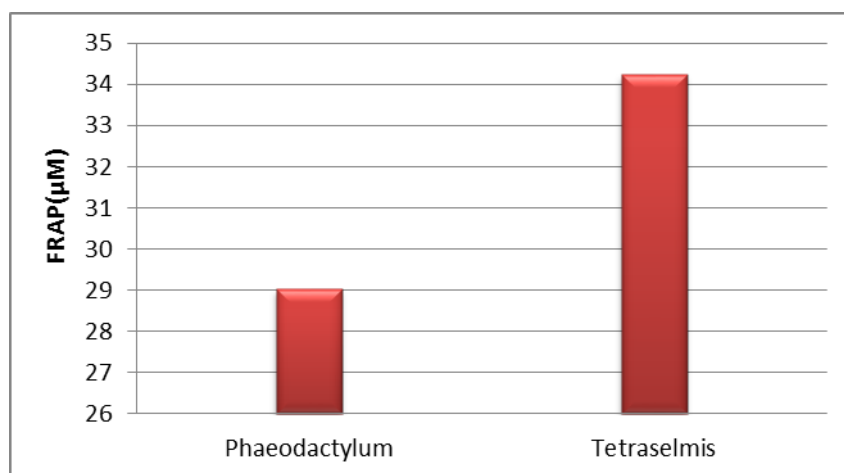
Εικόνα 2. Φάσμα απορρόφησης *Phaeodactylum* sp. (πράσινο) και *Tetraselmis* sp.(ροζ) σε αραιώση (1:150).

Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford στα παραπάνω εκχυλίσματα. Στην παρακάτω Εικόνα 2 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις (mg/mL) της πρωτεΐνης στα δύο φύκη. Την υψηλότερη συγκέντρωση πρωτεΐνης εμφανίζει το *Phaeodactylum* sp.



Εικόνα 2. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford των εκχυλισμάτων *Phaeodactylum* sp. και *Tetraselmis* sp.

Ακολούθως, υπολογίστηκε η ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα των δύο εκχυλισμάτων βάση του πρωτόκολλου FRAP. Η ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα μετρήθηκε σε μM . Στην παρακάτω γραφική παράσταση (Εικόνα 3) παρουσιάζονται οι τιμές FRAP (μM) των εκχυλισμάτων. Την υψηλότερη αντιοξειδωτική χωρητικότητα εμφάνισε το *Tetraselmis* sp.

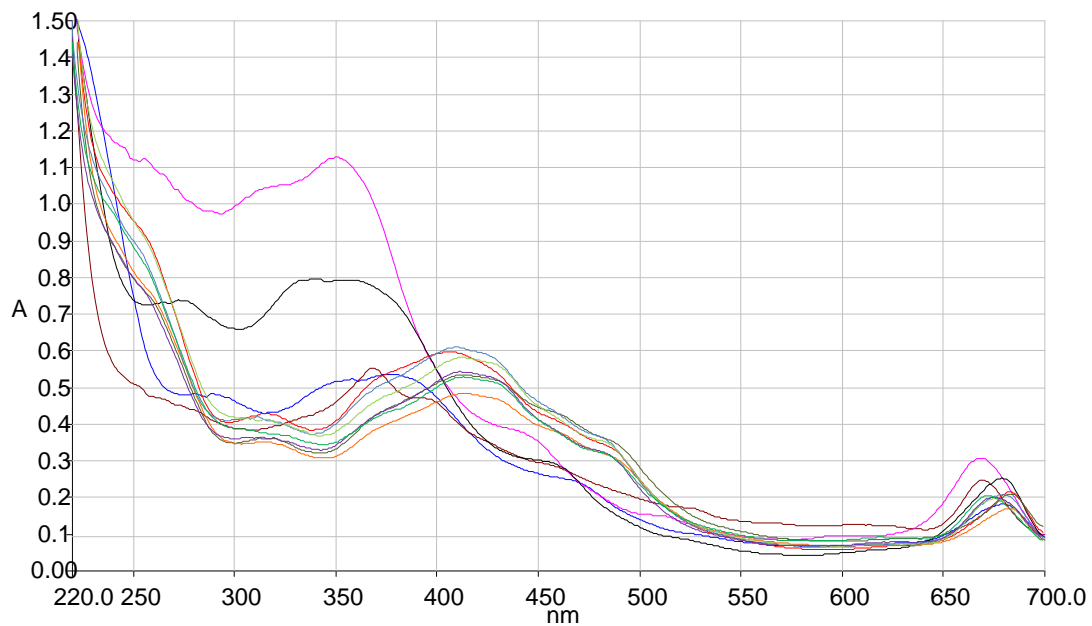


Εικόνα 3. Υπολογισμός ολικής αντιοξειδωτικής χωρητικότητας με την μέθοδο FRAP των δειγμάτων από τα εκχυλίσματα *Phaeodactylum* sp. και *Tetraselmis* sp.

3.2 Μελέτη εκχύλισης ολικών πρωτεϊνών από *Phaeodactylum* sp. και *Tetraselmis* sp. υπό την επίδραση υπερήχων.

Στο πείραμα αυτό διαφοροποιήθηκαν οι χρόνοι λύσης των κυττάρων με υπέρηχους. Αρχικά, 0,15g κυττάρων *Phaeodactylum* sp. και *Tetraselmis* sp. αραιώθηκαν σε 1,5mL ρυθμιστικού διαλύματος Pi (pH=7, 100 mM). Στη συνέχεια τα κύτταρα λύθηκαν σε διάφορους χρόνους. Οι χρόνοι ήταν οι εξής : 0s, 5s, 10s, 20s, 30s, 40s, 50s, 60sec, 120s, 300s. Με το πέρας της διαδικασίας τα κύτταρα προετοιμάστηκαν για φασματοφωτομετρία UV-Vis και ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford.

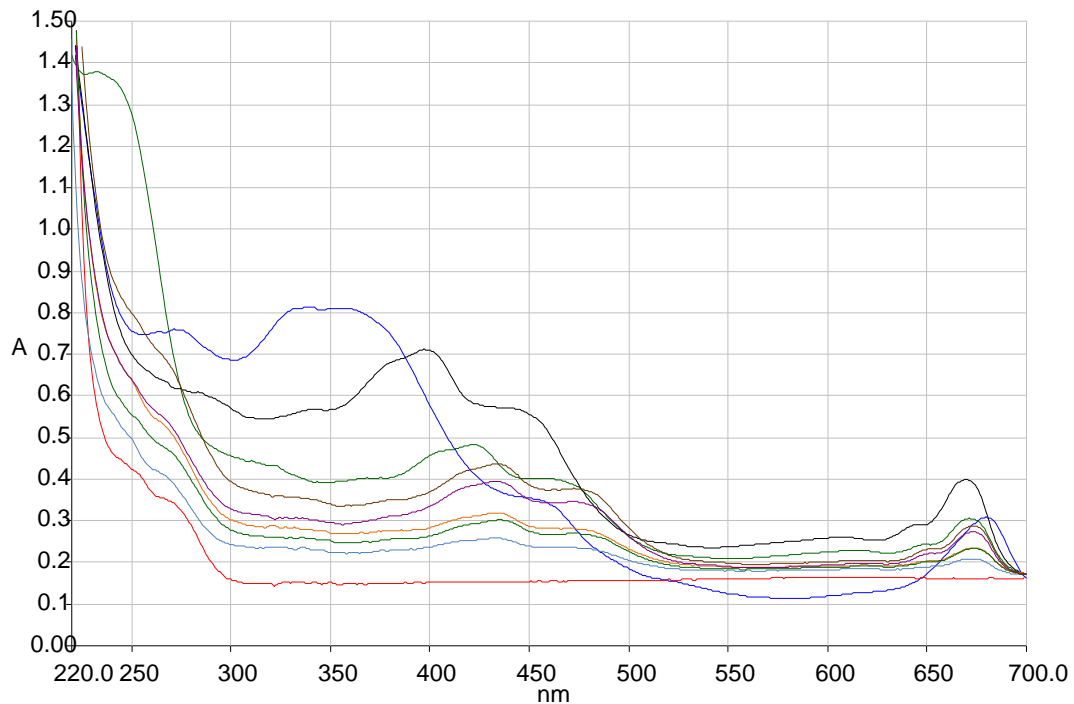
Στις Εικόνες 4 και 5 παρουσιάζονται τα φάσματα απορρόφησης μεταξύ 700-220nm στα χρονικά διαστήματα που λύθηκαν τα κύτταρα.



Εικόνα 4.: Φάσματα κυττάρων *Phaeodactylum* sp. σε διάφορους χρόνους εκχύλισης σε υπέρηχους 0s (σκούρο κόκκινο), 5s (ροζ), 10s (μπλέ), 20s (μαύρο), 30s (κόκκινο), 40s (λαδί), 50s (πορτοκαλί), 60s (γαλάζιο), 100s (ανοιχτό πράσινο), 120s (μωβ), 300s (πράσινο).

Με βάση φάσματα άλλων μικροφυκών όπως *Chlorella* sp., *Tetraselmis* sp. και *Phaeodactylum tricornerutum*, οι κορυφές που παρουσιάζονται σε διάφορους χρόνους εκχύλισης πιθανόν να οφείλονται στην χλωροφύλλη και στα καροτενοειδή (Cho & Govindjee, 1970; Mann & Myers, 1968). Πιο συγκεκριμένα στην περιοχή μήκους κύματος 660-680nm απορροφούν οι χλωροφύλλες α και c και μερικώς η φυκοξανθίνη. Στην περιοχή μήκους κύματος 400-440nm οι κορυφές οφείλονται στην απορρόφηση των καροτενοειδών και ενός ποσοστού χλωροφύλλης c.

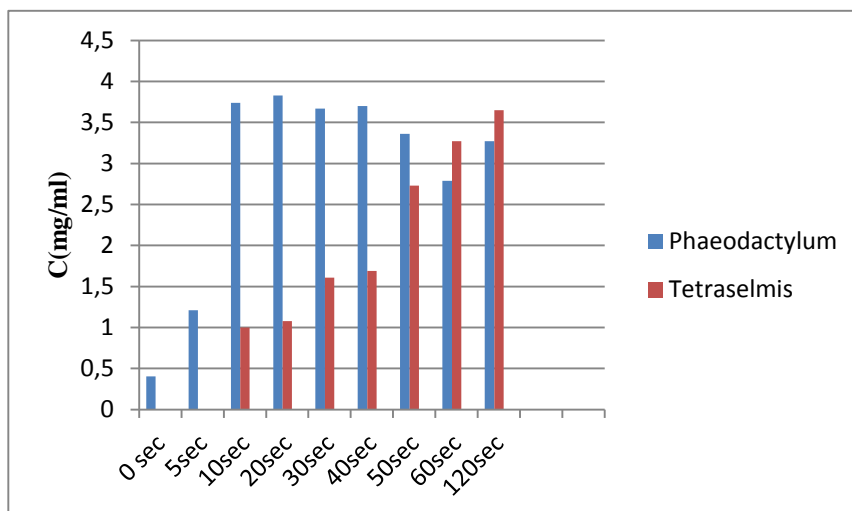
Παρόμοια φάσματα απορρόφησης με αυτά του *Phaeodactylum* sp. παρουσίασαν τα εκχυλίσματα από το *Tetraselmis* sp. (Εικόνα 5). Βάση των φασμάτων από *Chlorella* sp. και *Tetraselmis* sp., παρατηρούνται κορυφές απορρόφησης σε περιοχή μήκους κύματος 650-670nm που οφείλονται στην χλωροφύλλη a, b, c και στην περιοχή μήκους κύματος 390-440nm, οι κορυφές πιθανόν να οφείλονται σε διάφορα καροτενοειδή (Sathyendranath, et.al. 1987). Παρατηρείται πως με την αύξηση των χρόνων εκχύλισης αυξάνονται και οι κορυφές απορρόφησης όπως δείχνει το φάσμα στα 30s.



Εικόνα 5: Φάσματα εκχυλισμάτων *Tetraselmis* sp. σε διαφορετικούς χρόνους εκχύλισης σε υπέρηχους 0s (κόκκινο), 10s (μπλε), 20s (πράσινο), 30s (μαύρο), 40s (γαλάζιο), 50s (πορτοκαλί), 60s (σκούρο πράσινο), 100s (μωβ), 120s (καφέ).

Ακολούθως, έγινε ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford. Παρατηρήθηκε ότι την μέγιστη συγκέντρωση εκχυλιζόμενης πρωτεΐνης και για τα δύο εκχυλίσματα ήταν μετά τον χρόνο 100s.

Στην παρακάτω Εικόνα 6 απεικονίζεται η πορεία εκχύλισης ολικής πρωτεΐνης από τους δύο οργανισμούς κατά την διάρκεια επίδρασης υπερήχων. Παρατηρείται ότι η συγκέντρωση εκχυλιζόμενης πρωτεΐνης για το *Phaeodactylum* sp. βρίσκεται το μέγιστο μετά από περίπου 10s. Σε αντίθεση το *Tetraselmis* sp. για την εκχύλιση απαιτείται χρόνος περίπου 60s.

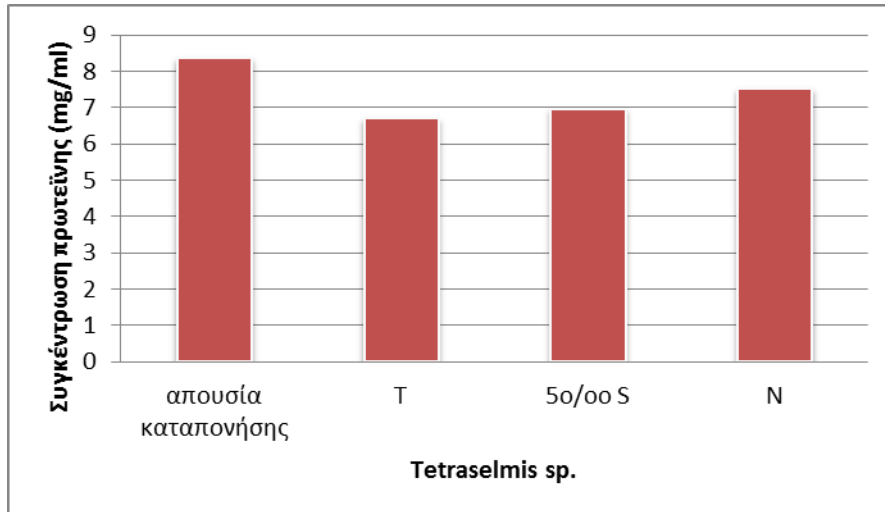


Εικόνα 6: Προσδιορισμός συγκέντρωσης πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford στους διάφορους χρόνους εκχύλισης των *Phaeodactylum* sp. και *Tetraselmis* sp.

3.3 Επίδραση συνθηκών καταπόνησης στα επίπεδα εκχυλιζόμενων πρωτεϊνών

Στην παράγραφο αυτή παρουσιάζεται η συνολική συγκέντρωση πρωτεϊνών σε εκχυλίσματα μικροφύκους *Tetraselmis* sp., τα οποία αναπτύχθηκαν σε συνθήκες καταπόνησης. Μελετήθηκε η επίδραση τριών συνθηκών καταπόνησης όπως, υψηλής θερμοκρασίας (T°), συγκέντρωση αλατότητας (5‰) και έλλειψης αζώτου (N). Με την μέθοδο Bradford προσδιορίστηκαν οι συνολικές πρωτεΐνες στα εκχυλίσματα. Στην Εικόνα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος.

Παρατηρείται ότι οι συνολικές πρωτεΐνες στις τρεις συνθήκες καταπόνησης μειώνονται σε σχέση με το αρχικό εκχύλισμα, το οποίο ανεπτύχθη υπό φυσιολογικές συνθήκες. Μεταξύ των συνθηκών καταπόνησης την υψηλότερη συγκέντρωση πρωτεϊνών εμφανίζει το εκχύλισμα υπό συνθήκη καταπόνησης έλλειψης αζώτου.



Εικόνα 7: Διάγραμμα προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford σε εκχυλίσματα *Tetraselmis sp.*, απουσία καταπόνησης και σε συνθήκες καταπόνησης με υψηλή θερμοκρασία (T^ο), 5% συγκέντρωση αλατότητας (S) και έλλειψης αζώτου (N).

3.4 Ανάπτυξη κατιούσας επεξεργασίας στο φύκος *Tetraselmis sp.*

3.4.1 Ανάπτυξη υδατικού διαφασικού συστήματος πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG)/φωσφορικών.

Τα υδατικά διαφασικά συστήματα (ATPS) αποτελούν αποτελεσματική και οικονομική μέθοδο κατιούσας επεξεργασίας, η οποία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και καθαρισμό πολλών βιομορίων (Omidinia *et al.*, 2009). Το σύστημα αποτελείται από δύο φάσεις, οι οποίες είναι, ένα πολυμερές, συνήθως πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), και ένα άλας συνήθως φωσφορικό ή θειικό κ.α (Hatti-Kaul, 2000). Τα πλεονεκτήματα που εμφανίζουν ως σύστημα καθαρισμού είναι το χαμηλό κόστος, καλή απόδοση, καλή επαναληψιμότητα και δεν είναι τοξικό προς το περιβάλλον. Η μέθοδος αυτή εκμεταλλεύεται τις ήπιες υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών και των πολυμερών σε υδατικό περιβάλλον (Aguilar & Rito-Palomares, 2010), για να γίνει ο διαχωρισμός των βιομορίων στις δύο φάσεις.

Για την συγκεκριμένη μελέτη εφαρμόστηκε σύστημα πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG)/φωσφορικών (Pi). Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση του μοριακού βάρους της PEG (1500 Da, 3000 Da, 6000 Da) στην κλασμάτωση των βιομορίων σε εκχύλισμα

Tetraselmis sp. Το εκχύλισμα είχε προκύψει είτε κατόπιν φυγοκέντρησης ή χωρίς φυγοκέντρηση. Παράλληλα με την εφαρμογή του συστήματος προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford και μελετήθηκε η κατανομή πρωτεϊνών και η απόδοση του καθαρισμού. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μετά από την εφαρμογή των παραπάνω μεθόδων σε φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα. Αναλυτικότερα, οι πίνακες περιέχουν τις συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης, οι όγκοι φάσεων και οι λόγοι φάσεων.

Πίνακας 1: Εφαρμογή συστήματος ATPS με PEG/Pi μοριακού βάρους 1500 Da, 3000 Da, 6000 Da, σε φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα *Tetraselmis* sp.

Φάσεις	Κατανομή πρωτεΐνης (%)	Όγκος φάσεων (mL)	Λόγος φάσεων (V_{PEG}/V_{Pi})
PEG1500-Pi			0,875
PEG	58,3	3,5	
Pi	33,7	4	
PEG 3000-Pi			1,08
PEG	52,3	2,7	
Pi	26,6	2,5	
PEG 6000-Pi			1,66
PEG	50,5	3	
Pi	38,5	5	

Παρατηρήθηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεΐνης κατανέμεται στις φάσεις πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) και για τα τρία εξεταζόμενα μοριακά βάρη, σε σχέση με την φάση των φωσφορικών. Η φάση PEG με μοριακό βάρος 1500 Da παρουσίασε το υψηλότερο ποσοστό πρωτεΐνης έναντι των φάσεων με μοριακό βάρος 3000 Da και 6000 Da.

Επιπλέον, μελετήθηκε η κατανομή των πρωτεϊνών στο ίδιο σύστημα PEG/Pi χρησιμοποιώντας μη φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα *Tetraselmis* sp. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Εφαρμογή συστήματος ATPS με PEG/Pi μοριακού βάρους 1500 Da, 3000 Da, 6000 Da, σε μη φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα *Tetraselmis* sp.

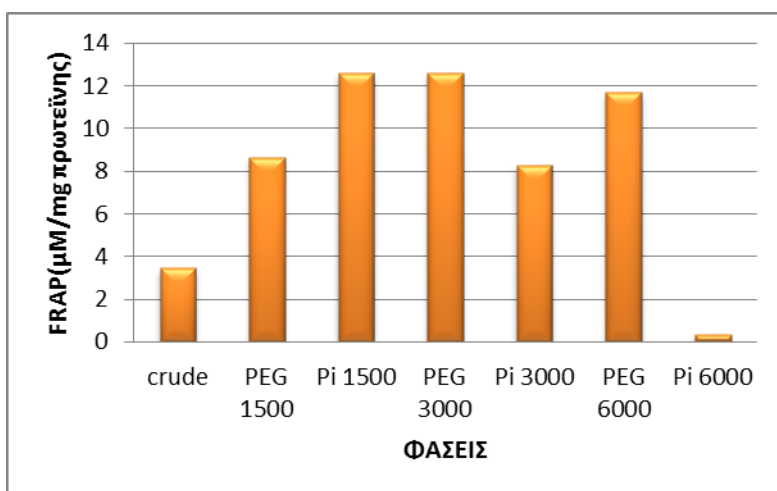
Φάσεις	Κατανομή πρωτεΐνης (%)	Όγκος φάσεων (mL)	Λόγος φάσεων (Vr)
PEG 1500-Pi			
PEG	6,99	3,6	0,9
Pi	6,86	4	
PEG 3000-Pi			
PEG	7,67	3,5	1
Pi	8,82	3,5	
PEG 6000-Pi			
PEG	9	3	2
Pi	5,67	6	

Παρατηρήθηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεΐνης κατανεμήθηκε στην φάση πολυαιθυλενογλυκόλης με μοριακό βάρος 6000 Da. Η φάση φωσφορικών με μοριακό βάρος 3000 Da παρουσίασε το υψηλότερο ποσοστό πρωτεΐνης έναντι των φάσεων με μοριακό βάρος 1500Da και 6000 Da.

3.4.2 Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής χωρητικότητας στις φάσεις PEG-Pi.

Για τον προσδιορισμό ολικής αντιοξειδωτικής χωρητικότητας εφαρμόστηκε υδατικό διαφασικό σύστημα PEG-Pi σε φυγοκεντρημένα και μη φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα *Tetraselmis* sp. χρησιμοποιώντας πολυαιθυλενογλυκόλη με μοριακά βάρη (1500 Da, 3000 Da, 6000 Da). Στο συγκεκριμένο πείραμα μελετήθηκε η ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα με την μέθοδο FRAP και υπολογίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford. Στα μη φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα παρατηρήθηκε ότι οι φάσεις PEG στα μοριακά βάρη 3000 Da και 6000 Da παρουσιάζουν υψηλότερη ολική

αντιοξειδωτική χωρητικότητα από τις αντίστοιχες φάσεις φωσφορικών. Αντιθέτως σε μοριακό βάρος 1500 Da η φάση φωσφορικών είχε υψηλότερο αντιοξειδωτική χωρητικότητα. Συγκρίνοντας τις φάσεις διαπιστώθηκε πως την υψηλότερη αντιοξειδωτική χωρητικότητα εμφάνισε η φάση PEG σε μοριακό βάρος 3000 Da, όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 7 .



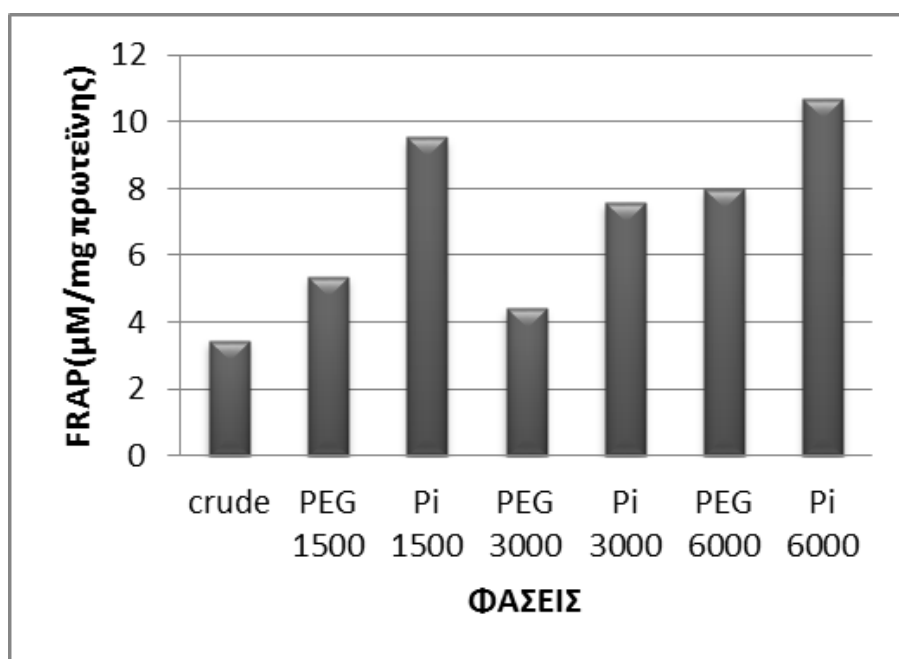
Εικόνα 7: Διάγραμμα ολικής αντιοξειδωτικής χωρητικότητας μM/mg πρωτεΐνης σε μη φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα στο αρχικό ενζυμικό εκχύλισμα (crude) και στις φάσεις του διφασικού συστήματος PEG/Pi στα μοριακά βάρη πολυαιθυλενογλυκόλης (1500 Da, 3000 Da, 6000 Da) με την μέθοδο FRAP.

Στον Πίνακα 4 που ακολουθεί παρατίθενται οι όγκοι και οι λόγοι των διφασικών συστημάτων χρησιμοποιώντας μη φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα *Tetraselmis* sp.

Ακολούθως, η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε και στα φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα από *Tetraselmis* sp. Παρατηρήθηκε ότι την υψηλότερη ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα εμφάνισαν οι φάσεις φωσφορικών και στα τρία μοριακά βάρη πολυαιθυλενογλυκόλης (Εικόνα 8).

Πίνακας 4: Εφαρμογή διφασικού συστήματος ATPS με PEG/Pi μοριακού βάρους PEG 1500 Da, 3000 Da, 6000 Da, σε μη φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα *Tetraselmis* sp.

Φάσεις	Όγκος φάσεων(mL)	Λόγος φάσεων(Vr)
PEG 1500-Pi		
PEG	3,8	0,926
Pi	4,1	
PEG 3000-Pi		
PEG	3,5	0,813
Pi	4,3	
PEG 6000-Pi		
PEG	2,4	2,70
Pi	6,5	



Εικόνα 8: Διάγραμμα ολικής αντιοξειδωτικής χωρητικότητας μM/mg πρωτεΐνης σε φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα στο αρχικό ενζυμικό εκχύλισμα (crude) και στις φάσεις του διφασικού συστήματος PEG/Pi στα μοριακά βάρη πολυαιθυλενογλυκόλης (1500 Da, 3000 Da, 6000 Da) με την μέθοδο FRAP.

Στον Πίνακα 5 παρατίθενται οι όγκοι και οι λόγοι των διφασικών συστημάτων χρησιμοποιώντας φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα *Tetraselmis* sp.

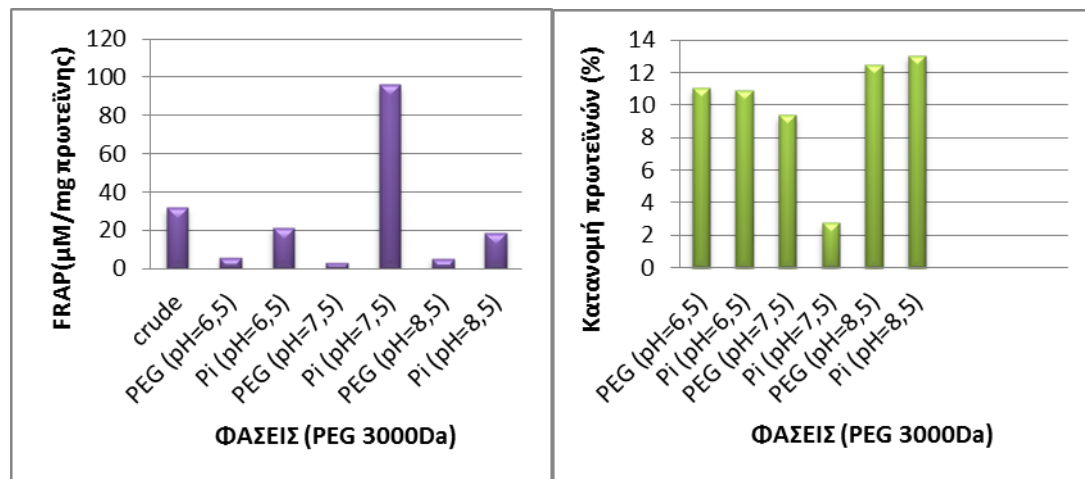
Πίνακας 5: Εφαρμογή διφασικού συστήματος ATPS με PEG/Pi μοριακού βάρους PEG 1500Da, 3000Da, 6000Da σε φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα *Tetraselmis* sp.

Φάσεις	Όγκος φάσεων (mL)	Λόγος φάσεων (Vr)
PEG 1500-Pi		
PEG	2,9	0,659
Pi	4,4	
PEG 3000-Pi		
PEG	3	0,681
Pi	4,4	
PEG 6000-Pi		
PEG	2,5	2,6
Pi	6,5	

3.4.3 Μελέτη επίδρασης pH και συγκέντρωσης άλατος (NaCl) στο διφασικό σύστημα PEG-Pi

Ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία εφαρμογής του υδατικού διφασικού συστήματος με φάσεις την PEG και Pi, όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο 3.2.1, με εξαίρεση την διαφοροποίηση δύο παραγόντων κατανομής. Αυτοί ήταν το pH και η συγκέντρωση άλατος του συστήματος. Η μελέτη έγινε σε μη φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα σε PEG 3000Da. Έπειτα, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση πρωτεΐνης στις φάσεις με την μέθοδο Bradford και μελετήθηκε με την μέθοδο FRAP η ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα των εκχυλισμάτων *Tetraselmis* sp.

Στην Εικόνα 9 παρουσιάζονται η κατανομή της πρωτεΐνης (%) και η ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα υπό τη επίδραση του παράγοντα κατανομής pH σε τρεις διαφορετικές τιμές.



Εικόνα 9: Διφασικό σύστημα PEG/Pi σε μοριακό βάρος PEG (3000 Da) σε μη φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα *Tetraselmis* sp. σε τρία διαφορετικά pH (6,5/ 7,5/ 8,5).

Παρατηρείται ότι την υψηλότερη αντιοξειδωτική χωρητικότητα εμφανίζει η φάση φωσφορικών σε τιμή pH 7,5 ενώ τα υψηλότερα ποσοστά ολικών πρωτεϊνών παρουσιάζει επίσης η φάση φωσφορικών σε τιμή pH 8,5 σε σύγκριση με τις υπόλοιπες φάσεις, όπως δείχνουν τα διαγράμματα της Εικόνας 9.

Στον παρακάτω Πίνακα 6 παρουσιάζονται οι όγκοι της κάθε φάσης στα διάφορα pH καθώς και οι λόγοι αυτών αντίστοιχα.

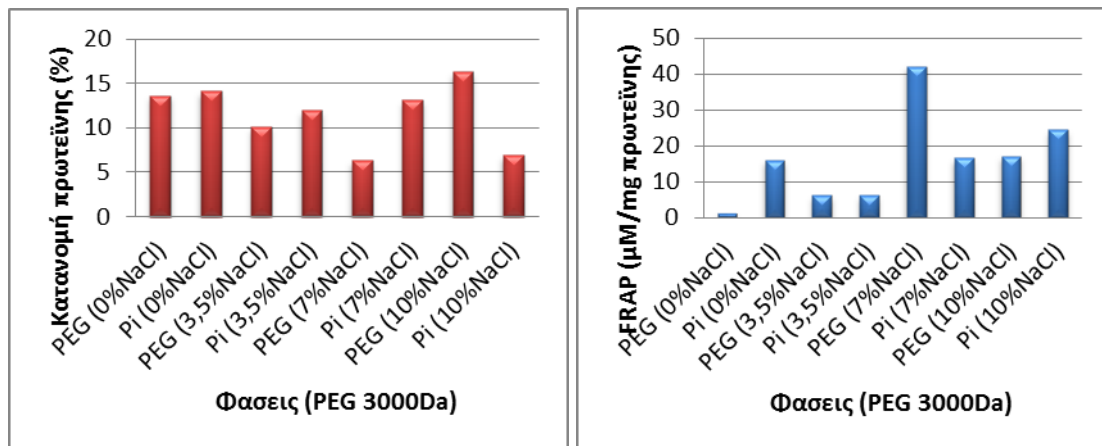
Από τα διαγράμματα (Εικόνα 10) στις διαφορετικές συγκεντρώσεις άλατος παρατηρείται ότι από τις φάσεις φωσφορικών το μεγαλύτερο ποσοστό κατανομής πρωτεϊνών παρουσιάζει σε συγκέντρωση NaCl 7% (w/v) ενώ από τις φάσεις PEG το μεγαλύτερο ποσοστό εμφανίζεται σε συγκέντρωση NaCl 10% (w/v). Όσον αφορά το αντιοξειδωτικό FRAP (μM/mg πρωτεΐνης), στις φάσεις φωσφορικών το υψηλότερο εμφανίζεται σε συγκέντρωση NaCl 10% (w/v) ενώ στις φάσεις PEG εμφανίσε σε συγκέντρωση NaCl 7% (w/v).

Στον παρακάτω Πίνακα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του διφασικού συστήματος PEG/Pi σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (0% (w/v), 3,5% (w/v), 7% (w/v), 10% (w/v)).

Πίνακας 6: Εφαρμογή συστήματος ATPS PEG/Pi σε PEG μοριακού βάρους 3000 Da σε μη φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα *Tetraselmis* sp. σε διάφορα pH.

Φάσεις	Όγκος φάσεων(mL)	Λόγος φάσεων(Vr)
pH=6,5		
PEG	4	1,14
Pi	3,5	
pH=7,5		
PEG	3,5	0,875
Pi	4	
pH=8,5		
PEG	3	0,83
Pi	3,6	

Στην Εικόνα 10 παρουσιάζονται η κατανομή της πρωτεΐνης (%) και την ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα FRAP ($\mu\text{M}/\text{mg}$ πρωτεΐνης) υπό τη επίδραση του παράγοντα κατανομής άλατος (NaCl) σε συγκεντρώσεις 0% (w/v), 3,5% (w/v), 7% (w/v), 10% (w/v).



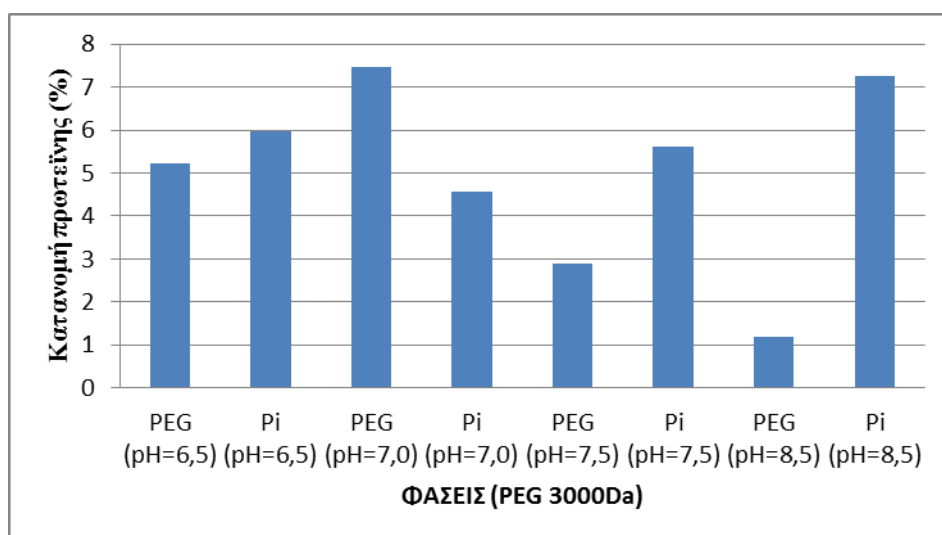
Εικόνα 10: Διφασικό σύστημα PEG/Pi σε μοριακό βάρος PEG (3000 Da) σε μη φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα *Tetraselmis* sp. σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (0%, 3,5%, 7%, 10%).

Πίνακας 7: Εφαρμογή συστήματος ATPS PEG/Pi σε PEG μοριακού βάρους 3000 Da σε μη φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα *Tetraselmis* sp. σε διάφορες συγκεντρώσεις NaCl ((0% (w/v), 3,5% (w/v), 7% (w/v), 10% (w/v)).

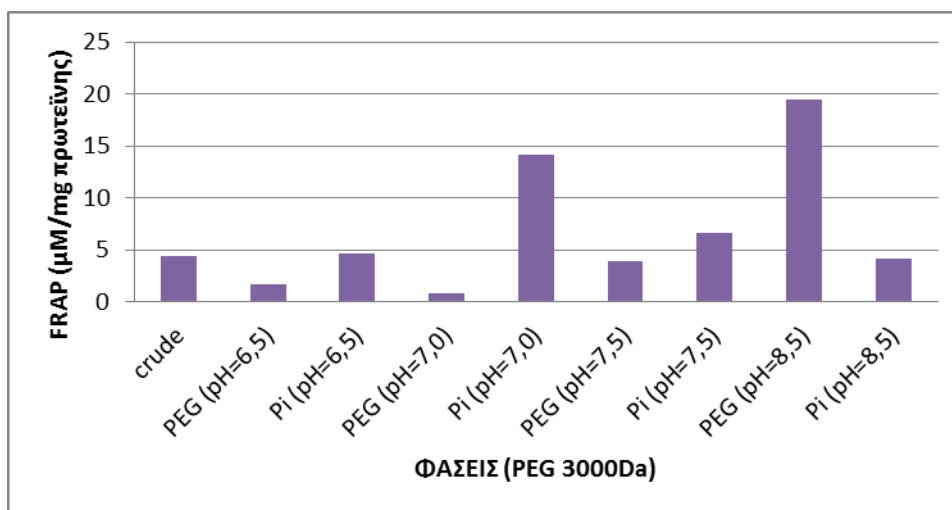
Φάσεις	Όγκος φάσεων (mL)	Λόγος φάσεων (Vr)
0% (w/v) NaCl		
PEG	3,6	0,92
Pi	3,9	
3,5% (w/v) NaCl		
PEG	3,5	1
Pi	3,5	
7% (w/v) NaCl		
PEG	3	0,75
Pi	4	
10% (w/v) NaCl		
PEG	3,3	0,94
Pi	3,5	

3.4.4 Μελέτη επίδρασης pH στο διφασικό σύστημα PEG-Pi.

Ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία εφαρμογής του υδατικού διφασικού συστήματος με φάσεις την PEG και Pi όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.4.1, διαφοροποιώντας τον συντελεστή κατανομής pH. Η εφαρμογή έγινε σε μη φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα σε PEG 3000 Da. Έπειτα, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση πρωτεΐνης στις φάσεις με την μέθοδο Bradford και μελετήθηκε με την μέθοδο FRAP η ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα των μη φυγοκεντρημένων εκχυλισμάτων *Tetraselmis* sp. Στις Εικόνες 11 και 12 παρουσιάζονται σε διαγράμματα το ποσοστό κατανομής πρωτεΐνης (%) και το ολικό αντιοξειδωτικό FRAP(μM/mg πρωτεΐνης).



Εικόνα 11: Διάγραμμα κατανομής πρωτεϊνών (%) σε διφασικό σύστημα PEG (3000 Da)/Pi σε διάφορες τιμές pH.



Εικόνα 13: Διάγραμμα ολικής αντιοξειδωτικής χωρητικότητας χρησιμοποιώντας την μέθοδο FRAP. Οι τιμές εκφράστηκαν σε μM/mg πρωτεΐνης.

Πίνακας 8: Εφαρμογή συστήματος ATPS PEG/Pi σε PEG μοριακού βάρους 3000 Da σε μη φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα *Tetraselmis* sp σε διάφορες τιμές pH.

	Όγκος φάσεων(mL)	Λόγος φάσεων (Vr)
pH= 6,5		
PEG	4,2	1,4
Pi	3	
pH=7,0		
PEG	3	0,93
Pi	3,2	
pH=7,5		
PEG	3	0,85
Pi	3,5	
pH=8,5		
PEG	3,1	1,03
Pi	3	

Παρατηρήθηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεΐνης κατανέμεται από τις φάσεις PEG σε pH=7 και αντίστοιχα στις φάσεις φωσφορικών σε pH=8,5 (Εικόνα11). Όσον

αφορά την ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα η φάση φωσφορικών σε pH= 7 εμφανίζει το υψηλότερο δυναμικό ενώ από τις φάσεις PEG εμφανίζει σε pH=8 (Εικόνα 12).

Στον Πίνακα 8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της εφαρμογής του διαφασικού συστήματος PEG (3000Da)/ Pi, σε τιμές pH= 6, 7, 7,5, 8 σε μη φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα *Tetraselmis* sp.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα πράσινα μικροφύκη χρησιμοποιούνται εδώ και αρκετές δεκαετίες σε διάφορους τομείς της ανθρώπινης δραστηριότητας. Έχουν πολλαπλές εφαρμογές όπως είναι για ανθρώπινη κατανάλωση, σε συστήματα υδατοκαλλιέργειας, για ζωοτροφές, ως χρωστικές ουσίες, στην φαρμακευτική και καλλυντική βιομηχανία, στην βιομηχανία τροφίμων ως συμπληρώματα διατροφής και αντιοξειδωτικά, στην βιομηχανία καυσίμων ως πιθανή εναλλακτική πηγή ανανεώσιμης ενέργειας (Gao *et al.*, 2012; Shalaby, 2011; Skjanes *et al.*, 2012). Πολλά από τα προϊόντα που χρησιμοποιούνται σήμερα, αποτελούνται από δευτερογενείς μεταβολίτες που εξάγονται από την βιομάζα των φυκών. Τέτοιοι είναι τα καροτονοειδή, ασταξανθίνη κ.α καθώς και διάφορες άλλες οργανικές ενώσεις όπως λιπίδια, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες με εμπορική αξία. Κάποιοι από τους μεταβολίτες αυτούς έχουν βιολογικές εφαρμογές με αντιοξειδωτική, αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδη δράση (Lee Jin-Ching *et al.*, 2013). Η παραγωγή των ενώσεων αυτών παράγεται μέσω της φωτοσυνθετικής διαδικασίας και σε συνθήκες καταπόνησης μπορούν να παράγουν τις ενώσεις σε υψηλές συγκεντρώσεις.

Στην παρούσα πειραματική μελέτη, έγινε προσπάθεια ανάπτυξης κατιούσας επεξεργασίας μικροφυκών με εφαρμογή του διαφασικού συστήματος PEG-Pi. Μελετήθηκε η επίδραση τριών συντελεστών κατανομής: της συγκέντρωσης άλατος, pH και το μοριακό βάρος της πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) στον διαχωρισμό των βιομορίων. Παράλληλα, μελετήθηκε η ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα και η κατανομή πρωτεϊνών στο φύκος *Tetraselmis* sp.

Αρχικά, με την φασματοφωτομετρία υπεριώδους ορατού (UV-Vis) έγινε ανάλυση φασμάτων σε μήκος κύματος που κυμάνθηκε μεταξύ 700-220nm στο *Phaeodactylum* sp. και *Tetraselmis* sp. Παράλληλα, υπολογίστηκε η συγκέντρωση πρωτεΐνης με την μέθοδο Bradford, με το *Phaeodactylum* sp. να παρουσιάζει μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεϊνών έναντι του *Tetraselmis* sp., όπως δείχνει το διάγραμμα της Εικόνας 2. Εν συνεχεία, εξετάζοντας η ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα τους με την μέθοδο FRAP. Το *Tetraselmis* sp. παρουσίασε το μεγαλύτερο χωρητικότητα με 34,23μM σε σχέση με το *Phaeodactylum* sp. με 29,03μM (Εικόνα 3).

Στα *Phaeodactylum* sp. και *Tetraselmis* sp. μελετήθηκε επιπλέον η επίδραση των υπέρηχων στην εκχύλιση των συνολικών πρωτεϊνών. Αφού τα κύτταρα λύθηκαν σε διάφορους χρόνους εφαρμογής υπέρηχων, ακολούθησε ανάλυση φασμάτων στα εκχυλίσματα αυτών με φασματοφωτομετρία UV-Vis. Τα φάσματα των εκχυλισμάτων των δύο φυκών παρουσιάζονται στις Εικόνες 4 και 5 αντίστοιχα. Στα φάσματα της *Phaeodactylum* sp. (Εικόνα 4) παρατηρήθηκαν ίδιες κορυφές με μικρές διακυμάνσεις στις περιοχές με μήκη κύματος 660-680nm και 400-440nm σε όλα τα χρονικά διαστήματα. Οι κορυφές στην περιοχή 660-680nm οφείλονται στην απορρόφηση των χλωροφυλλών α και c και μερικώς καροτενοειδών ενώ στην περιοχή 400-440nm απορροφούν κυρίως καροτονοειδή (Cho & Govindjee, 1970; Mann & Myers, 1968).

Στην Εικόνα 5 παρουσιάζονται τα φάσματα του *Tetraselmis* sp., όπου παρατηρήθηκαν κορυφές μεταξύ 650-700nm σε όλα τους χρόνους πλην στα 0s και κορυφές απορρόφησης μεταξύ 390-440nm σε όλους τους χρόνους εκχύλισης ελαφρώς μετατοπισμένες. Η εμφάνιση των κορυφών στην περιοχή μήκους κύματος 650-670nm οφείλονται στην χλωροφύλλη a, b, c και στην περιοχή μήκους κύματος 390-440nm, οι κορυφές πιθανόν να οφείλονται σε διάφορα καροτενοειδή (Sathyendranath, et.al, 1987). Όσον αφορά την συγκέντρωση πρωτεΐνης στα εκχυλίσματα τους, στο *Phaeodactylum* sp. παρατηρήθηκε το μέγιστο μετά από περίπου 10s με υψηλότερη αυτή στον χρόνο 100s. Σε αντίθεση το *Tetraselmis* sp. για την εκχύλιση απαιτείται χρόνος περίπου 60s, με υψηλότερη αυτή στον χρόνο 100s.

Συγκρίνοντας τις τιμές των συγκεντρώσεων στον χρόνο 100s, το *Tetraselmis* sp. παρουσιάζει την μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεΐνης 5,69mg/mL σε σχέση με το *Phaeodactylum* sp. που έχει 4,05mg/mL πρωτεΐνης (Εικόνα 6).

Με βάση των αποτελεσμάτων της ολικής αντιοξειδωτικής χωρητικότητας προσδιορισμένη με το FRAP (μM) επελέγη η συνέχιση των πειραμάτων με το *Tetraselmis* sp. Η μελέτη συνεχίστηκε σε κύτταρα *Tetraselmis* sp., που είχαν αναπτυχθεί σε τρεις συνθήκες καταπόνησης με προσδιορισμό της συγκέντρωσης ολικών πρωτεϊνών. Αυτοί είναι η υψηλή θερμοκρασία (T°), συγκέντρωση άλατος (5%S) και έλλειψη αζώτου (N). Τα αποτελέσματα παρατίθενται στο διάγραμμα της Εικόνας 7. Παρατηρείται ότι η συνολική συγκέντρωση πρωτεϊνών είναι μειωμένη στα εκχυλίσματα που είχαν καταπονηθεί σε σχέση με το εκχύλισμα απουσίας

καταπόνησης. Συγκρίνοντας δε τις συγκεντρώσεις πρωτεϊνών μεταξύ των τριών συνθηκών καταπόνησης, την μεγαλύτερη συγκέντρωση εμφανίζει το εκχύλισμα υπό έλλειψη αζώτου.

Σε επόμενο στάδιο της μελέτης, αναπτύχθηκε πρωτόκολλο κατιούσας επεξεργασίας στο *Tetraselmis* sp. Το πρωτόκολλο που επελέγη ήταν το υδατικό διφασικό σύστημα ATPS, με φάσεις την πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) και φωσφορικών (Pi). Τα πλεονεκτήματα που έχει ως σύστημα καθαρισμού είναι το χαμηλό κόστος, καλή ανάλυση και απόδοση, καλή επαναληψιμότητα και δεν είναι τοξικό προς το περιβάλλον. Χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και καθαρισμό πολλών βιομορίων (Omidinia E. *et al.*, 2009). Το παρόν σύστημα εφαρμόστηκε σε φυγοκεντρημένα και μη φυγοκεντρημένα κύτταρα *Tetraselmis* sp. μελετώντας την επίδραση του μοριακού βάρους πολυμερούς (PEG), της συγκέντρωσης άλατος και pH στον καθαρισμό και διαχωρισμό των βιομορίων του *Tetraselmis* sp..

Τα αποτελέσματα από την μελέτη της επίδρασης του μοριακού βάρους της πολυαιθυλενογλυκόλης PEG (1500 Da, 3000 Da, 6000 Da) σε φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Προσδιορίστηκε επίσης η κατανομή πρωτεϊνών (%) στις δύο υδατικές φάσεις. Οι φάσεις πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG) παρουσίασαν το μεγαλύτερο ποσοστό κατανομής από τις φάσεις φωσφορικών και στα τρία μοριακά βάρη. Η φάση PEG με μοριακό βάρος 1500 Da παρουσίασε το υψηλότερο ποσοστό πρωτεΐνης έναντι των φάσεων με μοριακό βάρος 3000 Da και 6000 Da. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται αντίστοιχα τα αποτελέσματα σε μη φυγοκεντρημένα κύτταρα όπως παρουσιάστηκαν στον προηγούμενο Πίνακα 1. Το μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεΐνης κατανεμήθηκε στην φάση πολυαιθυλενογλυκόλης με μοριακό βάρος 6000Da. Η φάση φωσφορικών με μοριακό βάρος 3000Da παρουσίασε το υψηλότερο ποσοστό πρωτεΐνης έναντι των φάσεων με μοριακό βάρος 1500Da και 6000Da.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα στα φυγοκεντρημένα και μη φυγοκεντρημένα κύτταρα *Tetraselmis*, διαπιστώνεται ότι την μεγαλύτερη κατανομή πρωτεϊνών απαντάται στις φάσεις PEG τόσο στα φυγοκεντρημένα όσο και στα μη φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα. Εξαιρεση αποτελεί στο σύστημα μη φυγοκεντρημένων εκχυλισμάτων η φάση φωσφορικών στο σύστημα με μοριακό βάρος PEG 3000 Da, εμφανίζοντας μεγαλύτερη

κατανομή πρωτεϊνών από την φάση PEG. Το διφασικό σύστημα PEG-Pi με PEG 1500 Da, 3000 Da, 6000 Da εφαρμόστηκε επίσης για τον προσδιορισμό της ολικής αντιοξειδωτικής χωρητικότητας των φάσεων με την μέθοδο FRAP. Το διάγραμμα (Εικόνα 7) απεικονίζει η ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα σε $\mu\text{M}/\text{mg}$ σε μη φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα. Η υψηλότερη ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα προσδιορίστηκα στις φάσεις PEG στα μοριακά βάρη 3000 Da και 6000 Da από τις αντίστοιχες φάσεις φωσφορικών. Εξάιρεση αποτελεί η φάση φωσφορικών σε μοριακό βάρος PEG 1500Da που παρουσίασε την υψηλότερη ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα. Συγκρίνοντας το δυναμικό των δύο φάσεων διαπιστώθηκε πως το υψηλότερο FRAP εμφάνισε η φάση PEG σε μοριακό βάρος 3000 Da. Αντίστοιχα, στο διάγραμμα (Εικόνα 8) παρουσιάζεται η ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα σε $\mu\text{M}/\text{mg}$ σε φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα. Παρατηρήθηκε ότι το υψηλότερο FRAP εμφάνισαν οι φάσεις φωσφορικών και στα τρία μοριακά βάρη πολυαιθυλενογλυκόλης. Συγκρίνοντας τις τιμές FRAP ($\mu\text{M}/\text{mg}$) από τα διαγράμματα διαπιστώνεται ότι η ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα των μη φυγοκεντρημένων εκχυλισμάτων είναι μεγαλύτερο έναντι των φυγοκεντρημένων και στις δύο φάσεις PEG και Pi.

Ακολούθως, επιλέγοντας ως κριτήριο την ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα και την κατανομή των πρωτεϊνών στις φάσεις στα συστήματα με μοριακό βάρος PEG 1500Da, 3000Da, 6000Da, επιλέχθησαν μη φυγοκεντρημένα εκχυλίσματα σε μοριακό βάρος PEG 3000Da για περαιτέρω μελέτη της επίδρασης δύο συντελεστών κατανομής. Οι συντελεστές που εξετάστηκαν ήταν το pH και η συγκέντρωση άλατος στο σύστημα ATPS (PEG/Pi).

Ο τύπος του άλατος που χρησιμοποιείται είναι ικανός να προκαλέσει τον διαχωρισμό των φάσεων και την διαμερισματοποίηση των βιομορίων στις δυο φάσεις. Αν η χρήση του άλατος δεν οδηγήσει στον διαχωρισμό αυτό πιθανόν να οφείλεται στις ασθενείς αλληλεπιδράσεις που έχει με το πολυμερές και τα μόρια του νερού. Το μοριακό βάρος του πολυμερούς επιδρά στην σύνθεση των φάσεων και στον αριθμό των αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτού και της πρωτεΐνης, λόγω των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αλυσίδων της PEG και της υδροφοβικής περιοχής της πρωτεΐνης (Narayan & Raghavarao, 2007; Omidinia *et. al.*, 2010; Rosa *et al.*, 2007).

Αρχικά, στο πρώτο μέρος του πειράματος μελετήθηκε η εφαρμογή η επίδραση του pH στο σύστημα. Εξετάστηκαν τρεις τιμές pH=6,5/ 7,5/ 8,5. Στο διάγραμμα (Εικόνα 9) παρουσιάζονται η ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα και η (%) κατανομή των ολικών πρωτεϊνών. Παρατηρείται ότι η υψηλότερη αντιοξειδωτική χωρητικότητα εμφανίζει η φάση φωσφορικών σε τιμή pH=7,5 με μέγιστο 96,04 $\mu\text{M}/\text{mg}$ ενώ την μεγαλύτερη κατανομή πρωτεϊνών παρουσιάζει επίσης η φάση φωσφορικών σε τιμή pH=8,5 σε σύγκριση με τις υπόλοιπες φάσεις.

Στο δεύτερο μέρος του πειράματος μελετήθηκε η επίδραση συγκέντρωσης άλατος, στις τιμές 0 % (w/v), 3,5% (w/v), 7% (w/v), 10% (w/v) NaCl. Στην Εικόνα 10 παρουσιάζονται σε διαγράμματα τα αποτελέσματα. το μεγαλύτερο ποσοστό κατανομής πρωτεϊνών παρουσιάζει σε συγκέντρωση NaCl 7% (w/v) ενώ από τις φάσεις PEG το μεγαλύτερο ποσοστό εμφανίζεται σε συγκέντρωση NaCl 10% (w/v). Όσον αφορά η ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα FRAP ($\mu\text{M}/\text{mg}$ πρωτεΐνης), στις φάσεις φωσφορικών το υψηλότερο εμφανίζεται σε συγκέντρωση NaCl 10% (w/v) ενώ στις φάσεις PEG εμφάνισε σε συγκέντρωση NaCl 7% (w/v).

Μετά το πέρας της παραπάνω μελέτης, εξετάστηκε πάλι η επίδραση του pH, διευρύνοντας το εύρος του pH. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν σε τέσσερις τιμές pH 6,5, 7,0, 7,5, 8,5. Παρατηρήθηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεΐνης κατανέμεται από τις φάσεις PEG σε pH 7 και αντίστοιχα στις φάσεις φωσφορικών σε pH 8,5 (Εικόνα 11). Όσον αφορά την ολική αντιοξειδωτική χωρητικότητα, η φάση φωσφορικών σε pH 7 εμφανίζει το υψηλότερο δυναμικό ενώ από τις φάσεις PEG εμφανίζει σε pH 8 (Εικόνα 12).

Συνοψίζοντας τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρείται πως τόσο η συγκέντρωση άλατος όσο και το μοριακό βάρος του πολυμερούς PEG έχουν σημαντική επίδραση στην κατανομή των βιομορίων του *Tetraselmis* sp. Η καλύτερη απόδοση του συστήματος ATPS (PEG-Pi), παρατηρήθηκε τις συνθήκες με μοριακό βάρος PEG 3000, pH 7,0 και 0% NaCl.

Η μελέτη κατιούσας επεξεργασίας με εφαρμογή του συστήματος ATPS, δίνει την δυνατότητα περαιτέρω έρευνας του βάσης των θετικών και ενθαρρυντικών αποτελεσμάτων που λήφθηκαν. Εξετάζοντας μόνο τρεις συντελεστές κατανομής pH, συγκέντρωση άλατος και μοριακό βάρος πολυμερούς διαπιστώθηκε η επίδραση τους στον καθαρισμό και τον διαχωρισμό των βιομορίων. Επιπλέον, διαπιστώθηκε πως το *Tetraselmis* sp. μπορεί ως κατάλληλο βιολογικό σύστημα να χρησιμοποιηθεί σε πολλαπλές εφαρμογές όπως στην βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών και φαρμακευτικών κ.α.

Βιβλιογραφία

Aguilar O., Rito-Palomares M.(2010). Aqueous Two-Phase Systems Strategies for the Recovery of Proteins from Plants. *J Sci Food Agric* 2010, 90: 1385–1392.

Asenjo J., Andrews B. A.(2011). Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. *Journal of Chromatography A*, 1218: 8826– 8835.

Atha D. H. and Inghamg K. C.(1981). Mechanism of Precipitation of Proteins by Polyethylene Glycols. *J. Of Biological Chemistry*, vol. 256, No. 23., pp. 12108-12117.

Arad S.(Malis), Varon A. (1992). Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 31.

Asenjo J.A., Mistry S.L., Andrews B.A., Merchuk J.C.(2002). Phase separation rates of aqueous two-phase systems: Correlation with system properties. *Biotechnology and Bioengineering*, vol.79, No.2.

Ashraf M.(2009). Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnology Advances*, 27:84–93.

Banerjee S.S., Aher N., Patil R., Khandare J.(2012). Poly(ethylene glycol)- Prodrug Conjugates: Concept, Design, and Applications, *J. of Drug Delivery*, vol.2012.

Banerjee S., Aher N., Patil R. and Khandare J. (2012). Poly(ethylene glycol)-Prodrug Conjugates:Concept, Design and Applications. *Journal of Drug Delivery*, vol.2012.

Batista A.P., Gouveia L., Bandarra N. M., Franco J.M, Raymundo A.(2013). Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*, 2:164–173.

Bensch M., Selbach B., Hubbuch J.(2007). High throughput screening techniques in downstream processing: Preparation, characterization and optimization of aqueous two-phase systems. *Chemical Engineering Science*, 62: 2011–2021.

Bhattacharya D., Medlin L.(1998). Algal Phylogeny and the Origin of Land Plants. *Plant Physiol.*, 116: 9–15.

Brayner R., Coyte A., Livage J. Perrette C., Sicard C.(2011). Micro-algal biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.*, 401:581-597.

Cadoret J.P., Garnier M., Saint-Jean B.(2012). Functional Genomics and Biotechnology. *Advanced in Botanical Research Microalgae*, vol.64, ch. 8.

Cho F., Govindjee(1970). Low-temperature (4-77°K) spectroscopy of *Chorella*; temperature dependence of energy transfer efficiency. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 45:958.

Cardol P., Forti G., Finazzi G.(2011). Regulation of electron transport in microalgae. *BBA*, 1807: 912-918.

Dalrymple O. K., Halfhide T., Udom I., Gilles B., Wolan J., Zhang Q., Ergas S. (2013). Wastewater use in algae production for generation of renewable resources: a review and preliminary results. *Aquatic Biosystems*, 9:2.

Dring M. J.(2005). Stress Resistance and Disease Resistance in Seaweeds: The Role of Reactive Oxygen Metabolism. *Advances in Botanical Research*, Vol. 43: 175–207.

Greenwald R.B., Choe Y. H., McGuire J., Conover C.D.(2003). Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. *Adv. Drug Delivery Rev*, 55: 217-250.

Hallmann A.(2007). Algal Transgenics and Biotechnology. *Transgenic Plant Journal* 1(1), 81-98.

Harun R., Singh M., Forde G. M., Danquah M. K.(2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14:1037–1047.

Hatti-Kaul R.(2000). Aqueous Two-Phase Systems: Methods and Protocols. Humana Press, pp. 3, 11-14, 25-31.

Hawkins R.L., Nakamura M.,(1999). Expression of human growth hormone by the eukaryotic Alga, *Chlorella*. *Current Microbiology*, vol.38, pp. 335-341.

Iwamoto K. and Shiraiwa Y.(2005). Technical improvement in the purification of enzymes from red algae using an aqueous two-phase partitioning system. *Phycological Research*, 53: 164–168.

Jarvis E.E., Brown L.M.(1991). Transient expression of firefly luciferase in protoplasts of the green alga *Chlorella ellipsoidea*. *Current Genetics*, 19:317-321.

Khanna-Chopra R., Jajoo A., Semwal V. K.(2011). Chloroplasts and mitochondria have multiple heat tolerant isozymes of SOD and APX in leaf and inflorescence in *Chenopodium album*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 412: 522–525.

Keating C. D.(2011). Aqueous Phase Separation as a Possible Route to Compartmentalization of Biological Molecules. *Accounts of chemical research*, vol. 45, No. 12:2114–2124.

Kleinegris D.M.M., Janssen M., Brandenburg W.A, Wijffels R. H.(2011). Two-phase systems: Potential for in situ extraction of microalgal products. *Biotechnology Advances*, 29 502–507.

Lee J.-C., Hou M.-F., Huang H.-W., Chang F.-R., Yeh C.-C, Tang J.-Y., Chang H.-W.(2013). Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. *Cancer Cell International*, 13:55.

Losos J., Mason K. A., Singer S. R.(2007). *Biology* (8 ed.). McGraw-Hill.

Mallick N., Mohn F. H.(2000). Reactive oxygen species: response of algal cells. *J. Plant Physiol.*, 157: 183-193.

Mosleh M. AA, Manssor H., Malek2 S., Milow P., Salleh A.(2012). A preliminary study on automated freshwater algae recognition and classification system. *BMC Bioinformatics*, 13(Suppl 17):S25.

Narayan AV and Raghavarao KSMS(2007). "Extraction and Purification of C-Phycocyanin from *Spirulina Platensis* Employing Aqueous Two Phase Systems," *International Journal of Food Engineering*, Vol. 3: Iss. 4, Article 16.

Oelmeier S.A., Dismer F., Hubbuch J.(2012). Molecular dynamics simulations on aqueous two-phase systems- Single PEG-molecules in solution. *BMC Biophysics*, 5:14.

Omindinia E., Mohamadi H.S., Dinarvand R., Taherkhani H.A.(2010). Investigation of chromatography and polymer/salt two-phase processes for downstream processing development of recombinant phenylalanine dehydrogenase. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 33:317-329.

Pangestutia R., Kima Se-K.(2011). Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *J. of Functional Foods*, 3:255-266.

Raghavarao K.S.M.S., Ranganathan T.V., Srinivas N.D., Barhate R.S(2003). Aqueous two phase extraction—an environmentally benign technique. *Clean Techn Environ Policy*, 5: 136–141.

Rehnstam A.S., Holm, Godhe A.(2003). Genetic engineering of algal species. In *Biotechnology* (Ed.H.W.Doelle) In: *Encyclopaedia of Life Support Systems (EOLSS)*, UNESCO.

Rasmussen R. S., Morrissey M. T.(2007). Marine Biotechnology for Production of Food Ingredients. *Advances in Food and Nutrition Research.*, Vol. 52:237–292.

Richmond A.(2004). *Handbook of Microalgal Culture*. Blackwell Publishing, pp.3-4, 10, 84-88, 471, 477.

Rodriguez-Bernaldo de Quiros A., Frecha-Ferreiro S., Vidal-Perez A.M., Lopez-Hernandez J.(2010). Antioxidant compounds in edible brown seaweeds. *Eur. Food Res. Technol*, 231:495-498.

Sathyendranath S., Lazzara., and Prieur L.(1987). Variations in the spectral values of specific absorption of phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 32(2), 403-4 15.

Schwenzfeier A, Helbig A.,Wierenga P. A, Gruppen H.(2012). Emulsion properties of algae soluble protein isolate from *Tetraselmis* sp. *Food Hydrocolloids*, 30:258-263.

Shalaby E. A.(2011). Algae as promising organisms for environment and health. *Plant Signaling & Behavior* 6:9, 1338-1350.

Skjånes K., Rebours C. and Lindblad P.(2013). Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33(2): 172–215.

Specht E., Stoner S. M., Mayfield S.(2010). Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. *Biotechnol Lett.* 32:1373–1383.

Torres M. A., Barros M. P., Campos S. C.G., Pinto E., Rajamani S. Sayre R. T, Colepicolo P.(2008). Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71:1– 15.

Wang B., Wang J., Zhang W. and Meldrum R.(2012). Application of synthetic biology in cyanobacteria and algae. *Frontiers in Microbiology.* 3:344.

Wolfe-Simon F., Grzebyk D., Schofield O., Falkowski P. G.(2005). The role and evolution of superoxide dismutase in algae. *J. Phycol.* 41, 453–465.

Stevenson R.J., Bothwell M.L., Lowe R.L.(1996). Algal Ecology: Fresh benthic ecosystems. Elsevier(USA).