

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tjaša ANZELC

**FIZIKALNE LASTNOSTI ARHEOSOMOV PRIPRAVLJENIH IZ LIPIDOV
HIPERTERMOFILNE ARHEJE *Aeropyrum pernix* K1**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PHYSICAL PROPERTIES OF ARCHEOSOMES MADE FROM LIPIDS OF
HYPERTHERMOPHILIC ARCHAEON *Aeropyrum pernix* K1**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za kemijo, Oddelek za živilstvo, Biotehniške fakultete, Univerza v Ljubljani in v laboratoriju Katedre za biokemijo, Oddelek za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerza v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Natašo Poklar Ulrih, za somentorico prof. dr. Kristino Sepčić in za recenzentko prof. dr. Veroniko Abram.

Mentorica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrih

Somentorica: prof. dr. Kristina Sepčić

Recenzentka: prof. dr. Veronika Abram

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tjaša Anzelc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Dn
DK UDK 579.22/.26: 577.2/.3: 547.915 (043)=863
KG arheje/ hipertermofili/ *Aeropyrum pernix*/ gojenje arhej/ izolacija lipidov/ priprava liposomov /arheosom/ tankoplastna kromatografija/ adsorpcijska kromatografija/ fluorescenčna spektroskopija/ presevni elektronski mikroskop
AV ANZELC, Tjaša
SA POKLAR ULRIH, Nataša (mentorica)/ SEPČIĆ, Kristina (somentorica)/ ABRAM, Veronika (recenzentka)
KZ 1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2006
IN FIZIKALNE LASTNOSTI ARHEOSOMOV PRIPRAVLJENIH IZ LIPIDOV TERMOFILNE ARHEJE *Aeropyrum pernix* K1
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP X, 45 str., 1 pregl., 23 sl., 35 vir.
IJ sl
JI sl / en

AL *Aeropyrum pernix* je hipertermofilna arheja, ki ima optimalne pogoje rasti pri temperaturi 92 °C in pH 7,0. Na ekstremne pogoje so prilagojene tudi membrane. Za lipide, iz katerih so membrane sestavljene, je značilno, da vsebujejo etrske vezi, ki povezujejo izoprenoidne verige z glicerolom. Eksperimentalno delo je potekalo v dveh delih. Biomaso potrebno za izolacijo lipidov smo pridobivali tako, da smo aerobno arhejo *Aeropyrum pernix* gojili v steklenici ob stalnem mešanju in dovajjanju zraka. Temperatura gojenja je bila 92 °C, v gojišču Marine Broth 2216 z dodatkom natrijevega tiosulfata pri pH 7,0. V drugem delu smo izolirali lipide iz pridobljene količine biomase. Z metodo tankoplastne kromatografije smo določili vsebnost posameznih lipidov. Ugotovili smo, da je najboljša ločitev takoj po ekstrakciji, po ločitvi z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE kolona) pride do spremenjanja lastnosti lipidov. Lipidi iz arheje *A. pernix* zahtevajo torej posebne pogoje za ločevanje, saj je postopek klasičnega ločevanja membranskih lipidov odpovedal. Iz celotnih izoliranih lipidov smo pripravili liposome (arheosome) z uporabo ekstrudorja in ultrazvočne kopeli. Proučevali smo njihove fizikalne lastnosti. Velikost arheosomov smo določili z transmisijskim elektronskim mikroskopom. Termično stabilnost arheosomov napolnjenih s kalceinom smo določili z uporabo fluorescenčne spektrometrije. Ugotovili smo, da so liposomi (arheosomi), pripravljeni iz izoliranih lipidov termično zelo stabilni, saj prepuščanja kalceina nismo opazili niti po daljši izpostavljenosti visoki temperaturi.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Dn
DC UDC 579.22/26: 577.2/.3: 547.915 (043)=863
CX archaea/ hyperthermophyles/ *Aeropyrum pernix*/archaea cultivation/ isolation of lipids/archaeosomes/thin-layer chromatography/ solid – phase extraction fluorescence spectrometry/ transmission electron microscop
AU ANZELC, Tjaša
AA POKLAR ULRIH, Nataša (supervisior) / SEPČIĆ, Kristina (co-advisor) / ABRAM, Veronika (reviewer)
PP SI – 1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
LI 2006
IN PHYSICAL PROPERTIES OF ARCHAEOSOMES MADE FROM LIPIDS OF HYPERTHERMOPHILIC ARCHAEOON *Aeropyrum pernix* K1
TD Graduation Thesis (University studies)
NO X, 45 p., 1 tab., 23 fig., 35 ref.
LA sl
AL sl / en
AB *Aeropyrum pernix* is a hyperthermophilic archaea which grows optimally at 92 °C and pH 7.0; its membranes are adapted to extreme conditions. The membrane lipids contain ether bonds which connect the isoprenoid chains with glycerol. Biomass needed for isolation of lipids was obtained from the aerobic archaea *Aeropyrum pernix* cultivated in a glass bottle by constant mixing and air supply. It was cultivated in Marine Broth 2216 medium by adding sodium thiosulphate at 92 °C and pH 7.0. During the next phase, lipids were isolated from the biomass of hyperthermophilic archaea *Aeropyrum pernix*. Lipid contents were determined by using the thin-layer chromatography method. Optimal separation of lipids was obtained immediately after extraction. After the SPE column separation, the characteristics of lipids changed. Lipids from the archaea *A. pernix* lipids thus demand special separation conditions, as the classic protocol used to separate membrane lipids failed. By using an extrudor and an ultrasound bath, we prepared liposomes (archaeosomes) from total isolated lipids, and then we studied their physical characteristics. The size of archaeosomes was determined with a transmission electron microscop and thermal stability of archaeosomes filled with calcein was determined with fluorescence spectrometry. We proved a high thermic stability of liposomes (archaeosomes) prepared from isolated *A. pernix* lipids, as no calcein leakage was noticed even after longer exposure to high temperatures.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV.....	X

1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 ARHEJE	4
2.1.1 Taksonomija arhej.....	4
2.1.2 Razlike v celični zgradbi med arhejami in bakterijami.....	4
2.1.3 Naravna okolja ekstremofilnih organizmov	6
2.1.4 <i>Aeropyrum pernix</i>	8
2.2 LIPOSOMI	11
3 MATERIALI IN OPREMA	14
3.1 MATERIALI	14
3.2 PRIBOR IN OPREMA.....	16
4 METODE	18
4.1 GOJENJE <i>Aeropyrum pernix</i> K1	18
4.1.1 Eksperimentalni del.....	18
4.2 IZOLACIJA SKUPNIH LIPIDOV	19
4.2.1 Esperimentalni del.....	19
4.3 IZOLACIJA POLARNIH LIPIDOV.....	19
4.3.1 Eksperimentalni del.....	19
4.4 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA.....	20
4.4.1 Osnove tankoplastne kromatografije	20
4.4.2 Detekcija in identifikacija lipidov s tankoplastno kromatografijo	20
4.4.3 Eksperimentalni del.....	20
4.4.3.1 Barvanje s primulinom.....	21
4.5 ADSORBCIJSKA KROMATOGRAFIJA	21
4.5.1 Osnove adsorbcjske kromatografije	21
4.5.2 Eksperimentalni del.....	21
4.6 FLUORESCENČNA SPEKTROMETRIJA	22
4.6.1 Osnove fluorescenčne spektrometrije	22
4.6.2 Eksperimentalni del.....	24
4.6.2.1 Priprava liposomov s kalceinom.....	24
4.7 PRESEVNA (TRANSMISIJSKA) ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA	26
4.7.1 Osnove transmisijske elektronske mikroskopije	26
4.7.2 Opis transmisijskega elektronskega mikroskopa	28
4.7.3 Preparati za transmisijsko elektronsko mikroskopijo	29
4.7.4 Eksperimentalni del.....	29
4.7.4.1 Priprava vzorca za transmisijski elektronski mikroskop.....	29
4.7.4.2 Mikroskopiranje.....	29

5 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	31
5.1 GOJENJE <i>Aeropyrum pernix</i>	31
5.1.1 Vpliv načina gojenja na količino bakterijske biomase.....	31
5.2 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA NA SILIKAGELU 60	32
5.2.1 Detekcija in identifikacija lipidov s tankoplastno kromatografijo	32
5.2.2 Poskus ločevanja lipidov z adsorpcijsko kromatografijo	33
5.3 MERITVE FLUORESCENČNE SPEKTROMETRIJE	36
5.4. ELEKTRONSKA TRANSMISIJSKA MIKROSKOPIJA.....	39
6 SKLEPI	41
7 POVZETEK.....	42
8 VIRI	43

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestavine za pripravo gojišča Marine Broth.....18

KAZALO SLIK

Slika 1:	Razlika v zgradbi estrske in eterske vezi (Kates, 1993).....	5
Slika 2:	Geotermalni vrelec v yellowstonsken narodnem parku v Wyomingu, ki ga naseljujejo termofilne arheje (Madigan in sod., 1997).....	6
Slika 3:	Mamutovi stopničasti vrelci v yellowstonskem narodnem parku v Wyomingu, ki ga naseljujejo ekstremni termofili (Bucik N. in Bucik T., 2004).....	7
Slika 4:	Arheja <i>Aeropyrum pernix</i> : aerobna hipertermofilna arheja (Sako in sod., 1996).8	
Slika 5:	Lipidi arheje <i>A.pernix</i> a) sesterterpanilarheol b) C ₂₅ – C ₂₅ – arhetidil (glukozil) inozitol c) C ₂₅ – C ₂₅ – arhetidilinozitol (Morii in sod., 1999).....	9
Slika 6:	Tipični lipidi arhej (Patel in Sprott, 1999).....	10
Slika 7:	Enoslojni liposom (Lasic, 1993).....	11
Slika 8:	Molekula naložena v notranjosti liposoma (Lasic, 1993).....	12
Slika 9:	Jabloński energijski diagram (Herman in sod., 2005).....	22
Slika 10:	Prehodi elektronov med različnimi vibracijskimi energijskimi stanji v molekuli (Fluorescencija ... , 2005).....	23
Slika 11:	Struktorna formula kalceina (Calcein ... , 2005).....	25
Slika 12:	Transmisijski elektronski mikroskop (Stušek in sod., 1997).....	26
Slika 13:	Primerjava osnovne zgradbe svetlobnih in elektronskih mikroskopov (Veranič in sod., 2000).....	27
Slika 14:	Rastne krivulje pri gojenju <i>A. pernix</i> (Milek, 2005).....	31
Slika 15:	Primerjava mobilnih faz pri tankoplastni kromatografiji lipidov.....	32
Slika 16:	Tankoplastna kromatografija skupnih-S lipidov izoliranih iz hipertermofilne arheje <i>A. pernix</i> na Silikagelu 60 v sistemu topil: kloroform/metanol/ocetna kislina/voda (85/22,5/10/4).....	33
Slika 17:	Tankoplastna kromatografija skupnih lipidov. Slika A: sistem topil: kloroform/metanol/voda (85/22,5/4). Slika B: sistem topil: kloroform/metanol/ocetna kislina/voda (85/22,5/10/4).....	34
Slika 18:	Tankoplastna kromatografija skupnih lipidov iz arheje <i>A. pernix</i> na Silikagelu	

60 v sistemu topil: kloroform/metanol/voda (85/22,5/4).....	35
Slika 19: Fluorescenčni emisijski spektri pri različnih koncentracijah lipidov v liposomih z vgrajenim kalceinom.....	36
Slika 20: Spremljanje intenzitete fluorescence liposomov z vgrajenim kalceinom kot funkcija časa po dodatku 0,2 % (w/v) NaDS.....	37
Slika 21: Spremljanje intenzitete fluorescence med segrevanjem kot pokazateljem prepuščanja vključenega kalceina.....	38
Slika 22: Razmazano kontrastirno sredstvo pod transmisijskim elektronskim mikroskopom.....	39
Slika 23: Liposomi pod transmisijskim elektronskim mikroskopom.....	39

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

<i>A. pernix</i> K1	<i>Aeropyrum pernix</i> K1
HEPES	N- [2-hidroksietil]piperazin-N'- [2-etan-sulfonska kislina]
MES	2-morfolinoetansulfonska kislina
min ⁻¹	obratov na minuto
NaDS	natrijev dodecilsulfat
OD ₆₅₀	optična gostota pri valovni dolžini 650 nm
SPE	ekstrakcija na trdni fazi (solid phase extraction)
S	skupni lipidi
TEM	transmisijijski elektronski mikroskop
TLC	tankoplastna kromatografija
UV	ultravijolično

1 UVOD

Danes razvrščamo vse poznane organizme v tri domene: evkarionte (Eucarya), bakterije (Bacteria) in arheje (Archaea). Največ ekstremofilnih organizmov najdemo prav v domeni arhej (Reysenbach, 2000). Ekstremofili so prilagojeni na življenje v ekoloških nišah, kot so visoka temperatura, ekstremne vrednosti pH, visoke koncentracije soli in visoki tlaki. Najbolj značilni so ekstremni halofili, metanogeni in ekstremni termofili (Cowan, 1992).

Hipertermofilni organizmi najbolje rastejo pri temperaturi nad 80 °C, pod 60 °C pa ne rastejo več (Stetter, 1996). Večina hipertermofilnih arhej je anaerobna, *Aeropyrum pernix* pa je eden redkih striktnih aerobov. Optimalna temperatura rasti *A. pernix* je med 90 °C in 95 °C, optimalna pH vrednost okoli 7 in slanost 3,5 % (Sako in sod., 1996). Izoliran je bil iz morske vode v priobalnem termalnem vrelcu sulfatara na Japonskem.

Arhejska celična membrana je najznačilnejši strukturni kriterij za razlikovanje arhej in bakterij. V bakterijskih in evkarionskih membranskih lipidih je med glicerolom in maščobnimi kislinami etrska vez, medtem ko je pri arhejah etrska vez med glicerolom in hidrofobnim delom. V etrske vezanih lipidih bakterij najdemo samo nerazvezjane molekule, medtem ko so v etrske vezanih lipidih arhej razvezjani ogljikovodiki. Namesto maščobnih kislin imajo namreč arheje na hidrofobni strani vezano razvezjano izoprenoidno verigo s fitanilno ali bifitanilno zgradbo. Glicerolni dietrski lipidi (fitalini) oblikujejo prave dvoslojne membrane, medtem ko se tetraetrski lipidi (bifitalini) oblikujejo v enoslojne membrane (Nekrep, 1996).

Svetovna živilska industrija spodbuja razvoj novih izdelkov. Aditive dodajajo hrani za izboljšanje njene kakovosti, zagotavljanje varnosti živil, podaljšanje uporabnosti izdelkov, izboljšanje organoleptičnih lastnosti živil ali pa za spreminjanje njihove prehranske vrednosti. Liposomi izdelani na osnovi jajčnega fosfatidilhololina se že nekaj let uporabljam v živilski industriji za zaščito izdelkov pred vlago, toploto in drugimi ekstremnimi pogoji. Z vključitvijo v liposome se podaljša obstojnost okusov, umetnih sladil, barvil, konzervansov, antioksidantov, lahko pa se zakrijejo tudi razni neželjeni okusi in vonji. V mlečni industriji liposomi z vključenimi encimi skrajšajo čas zorenja sirov za 30-50 % ter izboljšajo njihovo teksturo in okus. To dosežejo tako, da zmanjšajo aktivnost proteolitičnih encimov v zgodnji fazi fermentacije sira. Zadnje čase se liposome uporablja tudi pri pripravi emulzij, kot so različni namazi, margarine in majoneze. Liposomi prenašajo lipotopne arome v lipidnem dvosloju, vodotopne okuse pa v svoji vodni notranjosti. Ker s tem zavarujejo okuse pred razgradnjo in podaljšajo njihovo obstojnost, se je uporaba liposomov zelo razširila tudi v proizvodnji osvežilnih brezalkoholnih pičač. V pekarstvu se liposomi med procesom mešanja in gnetenja testa ne uničijo, zato spodbujajo sproščanje okusov, dišav in drugih aditivov. Hitrost sproščanja je odvisna od fizikalnih lastnosti liposomov. Pri lecitinu sta pomembna dejavnika vrednost pH in temperatura. Arheosomi so odporni na oksidacijo in so topotno stabilni, zato se jih lahko sterilizira. Poleg tega so odporni na kisel pH in fosfolipaze v prebavnem traktu, zato bi jih lahko vključili v liposome skupaj s fosfatidilholinom. S tem bi se podaljšala obstojnost aditivov v novih izboljšanih liposomih, hkrati pa bi tako zagotovili podaljšano sproščanje okusov in dišav ter pred oksidacijo zaščitili vitamine, konzervanse in barvila (Baianu in sod., 2004).

V okviru diplomske naloge smo želeli podrobnejše proučiti fizikalne lastnosti liposomov (arheosomov), ki smo jih pripravili iz lipidov izoliranih iz *A. pernix*. Vsebnost posameznih lipidov izoliranih iz *A. pernix* smo ugotavljali z metodo tankoplastne kromatografije. Sledila je priprava liposomov s pomočjo ekstrudorja in ultrazvočne kopeli. Fizikalne lastnosti arheosomov smo proučevali z dvema metodama: fluorescenčno spektrofotometrijo in z elektronsko transmisijsko mikroskopijo.

1.1 NAMEN DELA

Delovni organizem naše raziskave je bila aerobna hipertermofilna arheja *Aeropyrum pernix* K1, ki smo jo gojili pri optimalnih pogojih rasti zanjo in sicer pri 92 °C in pH 7,0. Spada med ekstremofilne mikroorganizme.

Namen raziskovalnega dela diplomske naloge je bil proučiti fizikalne lastnosti liposomov (arheosomov) pripravljenih iz celotnih izoliranih lipidov hipertermofilne arheje *Aeropyrum pernix* K1. Velikost arheosomov smo določili z uporabo elektronskega transmisijskega mikroskopa, termično stabilnost arheosomov, napolnjenih s kalceinom, pa smo določili s fluorescenčno spektrofotometrijo.

Delovna hipoteza:

Predvidevali smo, da so liposomi (arheosomi) pripravljeni iz lipidov hipertermofilne arheje *Aeropyrum pernix* stabilni pri temperaturah do 100 °C.

Zastavljene naloge:

- gojenje celic *Aeropyrum pernix*
- izolacija lipidov iz hipertermofilne arheje *A. pernix*
- analiza vsebnosti posameznih lipidov z metodo TLC
- priprava liposomov (arheosomov)
- določanje velikosti in termične stabilnosti arheosomov, napolnjenih s kalceinom.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ARHEJE

2.1.1 Taksonomija arhej

Arheje (Archaea) predstavljajo eno najmanj raziskanih skupin mikroorganizmov. Ker je bila večina znanih predstavnikov arhej izoliranih iz ekstremnih okolij ali zelo specializiranih ekoloških niš, so bili predstavniki arhej manj zanimivi za raziskave in ekologijo od mikrobnih združb v manj ekstremnih okoljih. Predstavniki prvega arhejskega kraljestva *Crenarchaeota* so termofilne arheje, predstavniki drugega arhejskega kraljestva *Euryarchaeota* pa zajemajo ekstremne halofile, sulfatne reducente, termofilne heterotrofe in metanogene bakterije. V stabilnih anaerobnih okoljih, kot so močvirja, barje, poplavljena področja in komposti, so prisotne predvsem striktno anaerobne metanogene arheje. Ekstremno halofilne in ekstremno termofilne arheje so v sedimentih slanih voda ter podmorskih vrelcih, v tleh pa teh predstavnikov še niso identificirali (Stres, 2001).

Med arhejami so poleg hipertermofilov in halofilov odkrili tudi psihrofile, ki najhitreje rastejo pri temperaturah pod 15 °C in ne rastejo nad 20 °C, piezofile, ki rastejo najbolje pri tlaku večjem od atmosferskega in acidofile, ki rastejo najbolje pod pH 3 (Milek, 2005).

Najbolj razširjena je delitev arhej na osnovi fenotipov. Delijo se na ekstremne termofile, ekstremne halofile in metanogene (Cowan, 1992).

Arheje je mogoče deliti tudi glede na ekološke niše, v katerih jih najdemo. Razlikujemo štiri skupine:

- metanogeni: anaerobni producenti metana
- ekstremni halofili: od soli odvisni organizmi
- hipertermofili: topotno odvisni organizmi
- thermoplasma: skupina topotno odvisnih in na kislino odpornih organizmov brez celične stene (Nekrep, 2004).

2.1.2 Razlike v celični zgradbi med arhejami in bakterijami

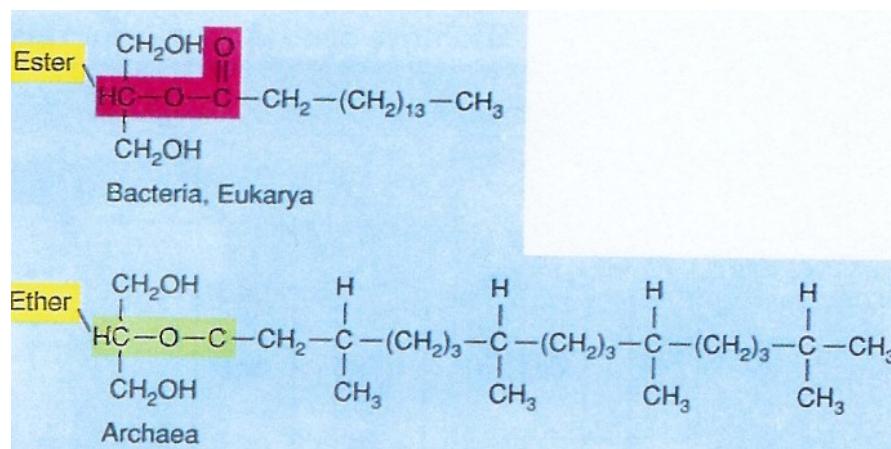
Arheje se bistveno ločijo od bakterij po celi vrsti pomembnih lastnosti (Nekrep, 1996):

- njihove celične stene ne vsebujejo peptidoglikana, ki je značilen pri bakterijah, ampak imajo zelo različno in raznovrstno zgradbo celičnih ovojev
- posebnost so izoprenoidni membranski lipidi in etrska vez med glicerolom in izoprenom
- njihova 16S rRNA je bistveno drugačna kot pri prokariontih in evkariontih
- arhejske skupine se razlikujejo med seboj in od drugih mikroorganizmov tudi po svojih ribosomalnih proteinih, translacijskih faktorjih, RNA-polimerazah in po teh lastnostih so marsikdaj bližje evkarionskim kot pa bakterijskim celicam

- v celicah arhej najdemo proteinske strukture, ki so podobne evkariontskim histonom
- značilna je tudi večja skupina t.i. metanogenih mikrobov, katerih značilnost je izjemna energetska biokemija, v katero so vključeni zelo unikatni koencimi.

Celična membrana

Celična membrana razmejuje celico od zunajceličnega prostora in omejuje predelke v celici. Regulira prehajanje snovi v celico in iz nje, zagotavlja ohranjanje konstantnega notranjega okolja v celici in omogoča komunikacijo celice z okoljem. Osnovno ogrodje biološke membrane je fosfolipidni dvosloj, sestavljen iz različnih asimetrično razporejenih fosfolipidov (fosfatidilholina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina in sfingomielina), glikolipidov in holesterola (Veranič in sod., 2000). V bakterijskih membranskih lipidih je med glicerolom in maščobnimi kislinami etrska vez, medtem ko je pri arhejah med glicerolom in hidrofobnim delom etrska vez (slika 1). Arhejska celična membrana je najznačilnejši strukturni kriterij za razlikovanje arhej in bakterij (Nekrep, 1996).



Slika 1: Razlika v zgradbi bakterijskih in arhejskih strukturnih lipidov (Madigan in sod., 1997)

Celična stena

Pri arhejah je temeljna struktura celične stene precej drugačna od bakterijske. Zgrajena je iz dolgih celuloznih molekul, ki so združene v mikrofibrile, te pa zvite v vrvicam podobne makrofibrile. Makrofibrile so vložene v pektin in hemicelulozo (Pickering, 1996). Pri arhejah gre za veliko pestrost različnih struktur, ki dodatno poudarja njihovo evolucijsko širino. Manjka za bakterije značilna struktura peptidoglikana (murein), saj pri arhejah ne najdemo mureinske kisline in ne D-aminokislin, ki so bistvena značilnost peptidoglikanov (Nekrep, 1996).

Citoskelet

Oblika, notranja organizacija celice in gibanje so odvisni od kompleksnega omrežja proteinskih filamentov v citoplazmi, ki ga s skupnim imenom označujemo kot celično ogrodje ali citoskelet. Sestavlajo ga mikrofilamenti, mikrotubuli in intermediarni filamenti (Veranič, 2000). Predpostavljamo, da naj bi evkariotske celice podedovale zasnova svojega citoskeleta od skupnega prednika, podobnega nekaterim današnjim arhejam. Citoskelet je najverjetneje adaptacija na metabolizem žvepla, ki se je kasneje pokazala kot učinkovita zasnova za evolucijsko pot v evkariotsko celico (Nekrep, 1996).

2.1.3 Naravna okolja ekstremofilnih organizmov

Hipertermofilne arheje

Hipertermofili so definirani kot (mikro)organizmi, ki imajo optimalno temperaturo rasti nad 80 °C in ne rastejo pod 60 °C (Stetter, 1996). Večino hipertermofilnih arhej so izolirali iz geotermalno ogretih tal ali voda (slika 2), ki vsebujejo elementarno žveplo ali pa sulfide, saj večina teh vrst presnavlja žveplo. Termofilne arheje naseljujejo tudi vroče vrelce v yellowstonskem narodnem parku v ameriški zvezni državi Wyoming (slika 3). V okolju solfatara prevladuje poleg visoke temperature alkalno do zmerno kislo ali zelo kislo stanje in anoksični pogoji. Zanimive ekološke niše so podmorska vulkanska nahajališča teh hipertermofilnih organizmov imenovana "black smokers" (Nekrep, 2004; Madigan in sod., 1997).



Slika 2: Geotermalni vrelec v yellowstonskem narodnem parku v Wyomingu, ki ga naseljujejo termofilne arheje (Madigan in sod., 1997)



Slika 3: Mamutovi stopničasti vrelci v yellowstonskem narodnem parku v Wyomingu, ki jih naseljujejo ekstremni termofili (Bucik N. in Bucik T., 2004)

Ekstremno halofilne arheje

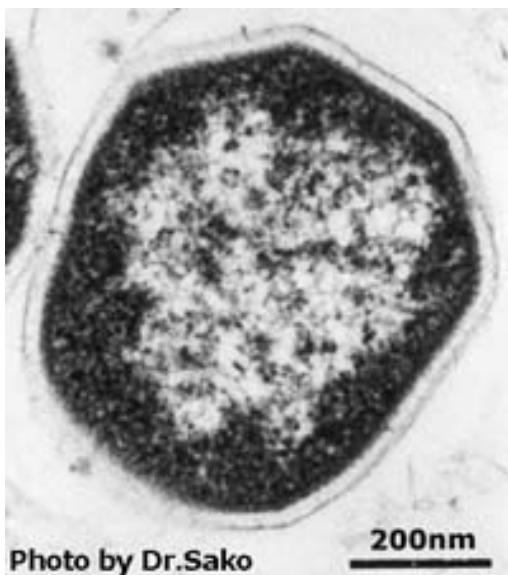
V to skupino spadajo arheje, ki naseljujejo skrajno slana, neutralna ali bazična jezera in sedimente, pa tudi solarne soline, oziroma jih najdemo kot kontaminante slanih živil. Potrebujejo hipersalino okolje, pogosto na ravni nasičenosti (32 % za NaCl). Večina jih je kemoorganotrofnih in aerobnih. Nekatere vrste so posebno zanimive, saj uspejo ATP generirati s pomočjo svetlobe v reakciji, ki ne vključuje klorofila, temveč temelji na proteinu bakteriorodopsinu (Nekrep, 2004).

Sp. Thermoplasma

Ima posebno anatomijo, v kateri manjka celična stena. Našli so je v ogretih premogovih odpadkih, druge vrste pa tudi v geotermalno ogretih vodah. V metabolizmu izkorišča organske spojine, v okolju pa ji pomaga preživeti posebno čvrsto grajena celična membrana, v katero so vključene komponente polisaharidov (Nekrep, 2004).

2.1.4 *Aeropyrum pernix*

Aeropyrum pernix K1 (slika 4) je prva nevtrofilna, striktno aerobna, hipertermofilna arheja. Leta 1993 so jo raziskovalci iz skupine Y. Sako (Univerza v Kyotu, Japonska) izolirali iz morske vode v priobalnem termalnem solfatara vrelcu na Japonskem. Spada v kraljestvo *Crenarchaeota*. Optimalna temperatura za njeno rast je med 90 °C in 95 °C, optimalna pH vrednost okoli 7, slanost pa 3,5 %. V optimalnih pogojih rasti je generacijski čas približno 200 minut. Za rast izrablja proteinske substrate, dodatek tiosulfata le stimulira njeno rast. *A. pernix* za rast ne zahteva žveplenih spojin, zato med rastjo ob prisotnosti ali odsotnosti tiosulfata ne proizvaja H₂S. Celice *A. pernix* (slika 4) so nepravilnih oblik, v premeru merijo 1-2 µm, so okrogle oblike, ponavadi se pojavljajo posamezno, včasih tudi v parih. Imajo pilom podobne izrastke (Sako in sod., 1996).

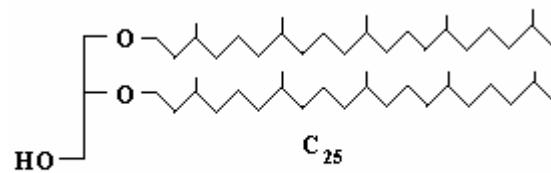


Slika 4: Arheja *Aeropyrum pernix*; aerobna hipertermofilna arheja (Sako in sod., 1996)

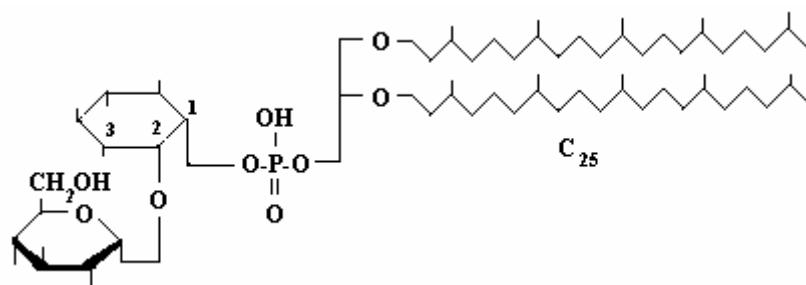
Posebnost arheje *A. pernix* so lipidi, ki so drugačni od ostalih, ki so jih do sedaj našli v hipertermofilih. *A. pernix* v membrani nima bipolarnega monosloja, ampak dvosloj, v katerem je osnovni lipid izključno arheol (C₂₅-C₂₅-etrsko vezana na glicerol) (slika 5a). Na splošno je v arhejah zastopan C₂₀-izoprenoid, v arheji *A. pernix* pa so odkrili le C₂₅-izoprenoid, kar je genetsko določeno.

Arhejo *Aeropyrum pernix* sestavlja dve vrsti lipidov: fosfolipid arhetidil(glukozil)inozitol (AGI), ki predstavlja 91 mol % vseh lipidov v organizmu in arhetidilinozitol (AI), ki predstavlja 9 mol % (Morii in sod., 1999). AGI ima za komponento polarne glave glukozo in inozitol, fosfat pa je povezan z inozitolom (slika 5b). Druga vrsta fosfolipida AI ima kot komponento polarne glave samo inozitol, ki je vezan na fosfat (slika 5c).

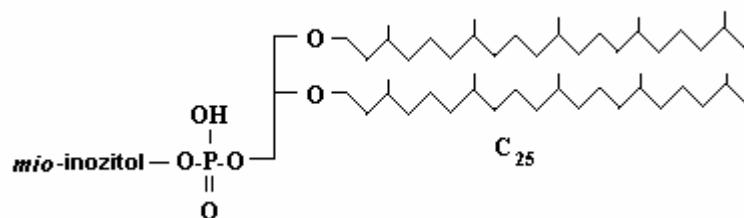
a:



b:

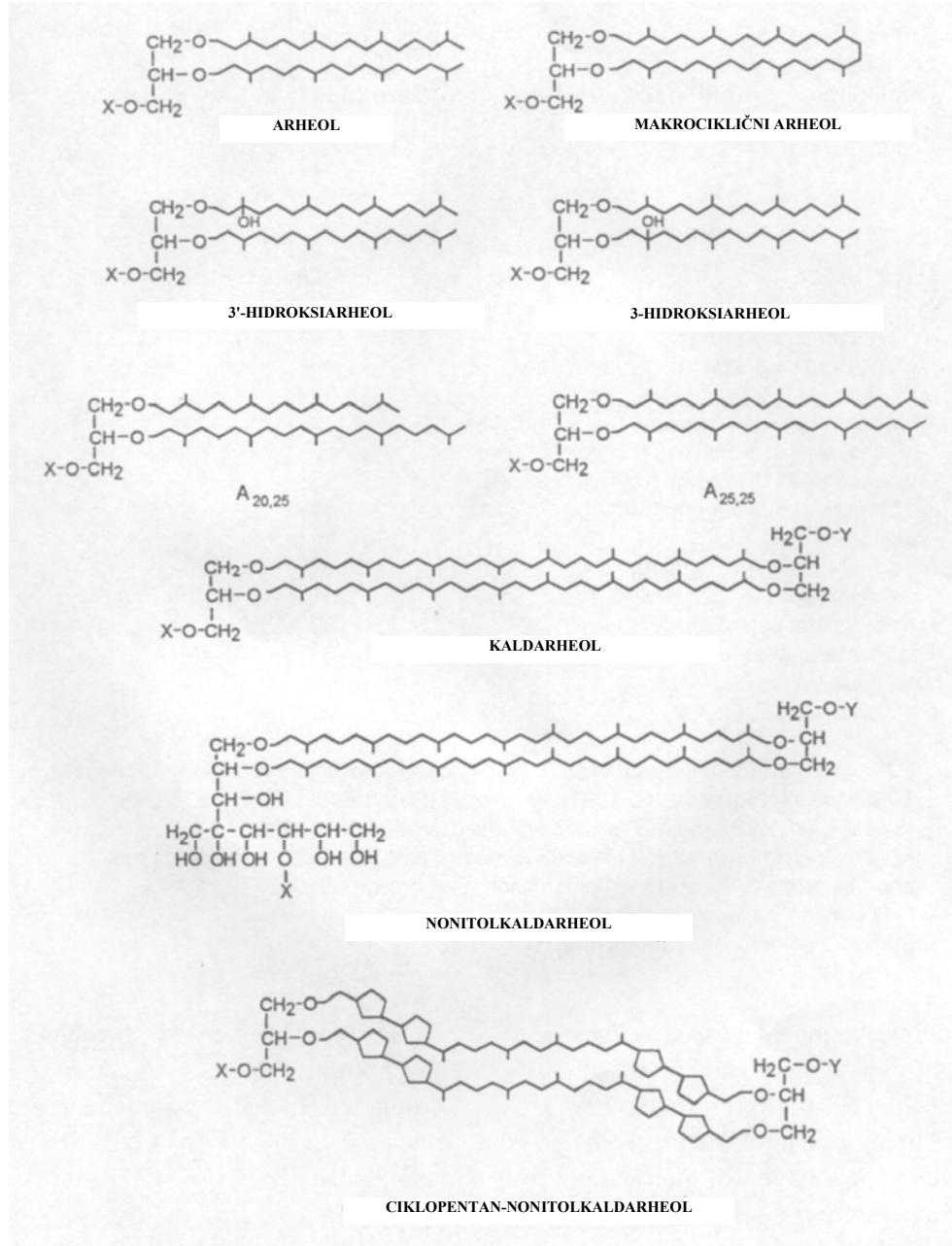


c:



Slika 5: Lipidi arheje *A. pernix*: a) sesterterpanilarheol, b) C₂₅-C₂₅-arhetidil(glukozil)inozitol, c) C₂₅-C₂₅-arhetidilinozitol (Morii in sod., 1999)

Kaldarheol (slika 6) je osnovni lipid pri večini hipertermofilnih arhej. Je sestavni del membrane bipolarnega monosloja (Gambacorta in sod., 1995).



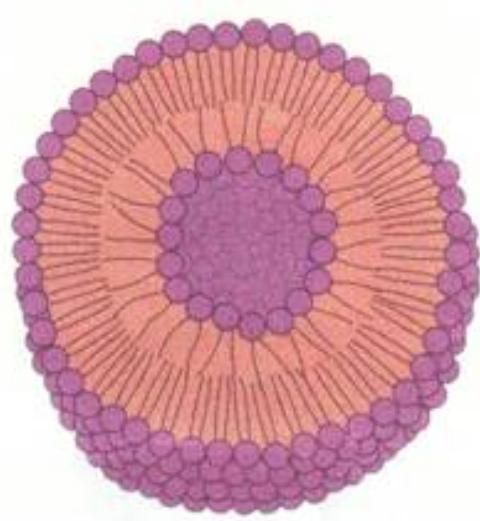
Slika 6: Tipični lipidi arhej (Patel in Sprott, 1999)

2.2 LIPOSOMI

Liposomi so vezikli, ki jih sestavljajo amfifilni lipidi, urejeni v eno ali več značilnih dvojnih plasti. Nastanejo spontano od stiku lipida z vodno fazo. Število dvoslojev in velikost veziklov določa poimenovanje liposomov:

- MLV (multilamellar vesicles) - liposomi z več dvosloji, veliki od 100 – 4000 nm
- ULV (unilamellar vesicles) - enoslojni liposomi, ki jih po velikosti delimo na SUV (small unilamellar vesicles), ki so veliki 20 – 100 nm in na LUV (large unilamellar vesicles) z velikostjo 100 – 800 nm (Kristl in sod., 1992).

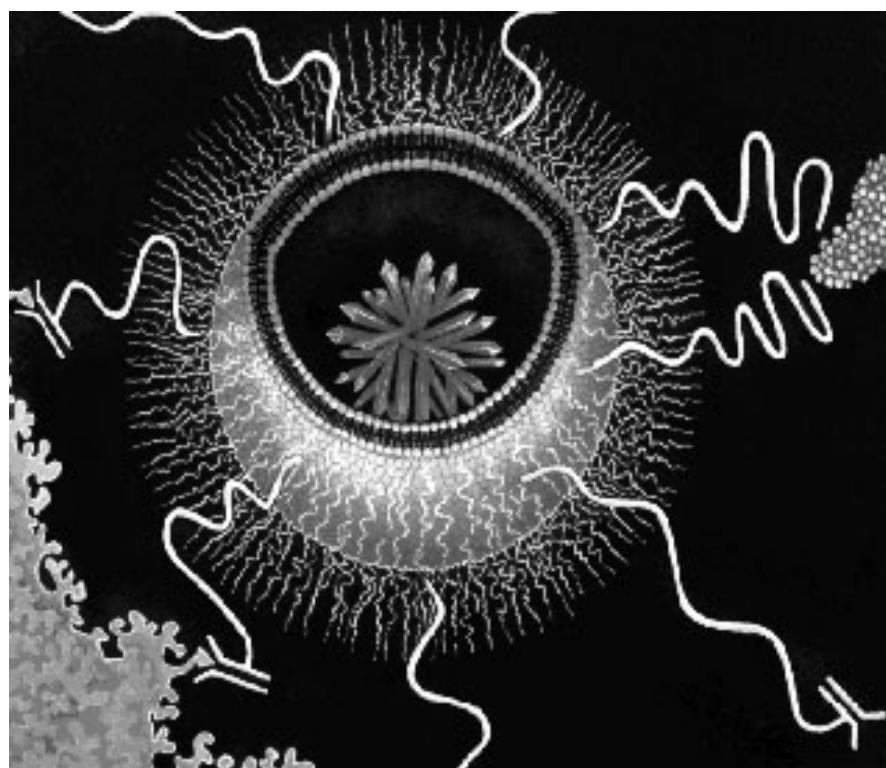
Osnovni gradbeni deli liposomov so torej lipidi. To so molekule, ki imajo hidrofilno glavo, na katero je pritrjen dolg nepolaren hidrofobni rep. Kadar ima hidrofilna glava fosfatno skupino, imenujemo te lipide fosfolipidi. Hidrofobni rep je sestavljen iz ene ali dveh dolgih, hidrofobnih ogljikovodikovih verig. Amfifilne molekule se v vodi združujejo v urejene strukture, ki ločijo hidrofobne repe od vode. Najpreprostejša struktura je lipidna dvojna plast, v kateri so polarne glave lipidov obrnjene proti vodi in tako osamijo hidrofobno sredico micel. Najstabilnejše lipidne dvojne plasti so tiste, ki tvorijo zaključeno celoto z obliko mehurčka – liposom (slika 7) (Lasic, 1993).



Slika 7: Enoslojni liposom (Lasic, 1993)

Liposome običajno sestavljajo fosfolipidi naravnega izvora in ogljikovodikove verige. Najpogosteje se za pripravo liposomov uporabljajo glicerofosfolipidi: fosfatidilholin, fosfatidilserin, fosfatidilinozitol, fosfatidilglicerol in fosfatidiletanolamin. Izvor teh so običajno naravni viri, npr. sojina zrna, ki vsebujejo mešanico fosfatidilholina z maščobnimi kislinami različne stopnje in nasičenosti. Poleg fosfolipidov je v membrani liposomov lahko še holesterol in amfifilna molekula z električnim nabojem, ki preprečuje neposreden stik med membranami liposoma in tako pripomore k stabilnosti (New, 1990).

Liposomi so zelo uporabni, služijo predvsem kot transportni sistem različnih molekul, kot so majhne molekule zdravil, proteini, nukleotidi in celo plazmidi. Te molekule so lahko v notranjosti liposoma (slika 8) ali na lipidnem dvosloju (Lasic, 1993).



Slika 8: Molekula zapakirana v notranjosti liposoma (Lasic, 1993)

Glede na posebnost lipidov arhej, so liposome pripravljene iz njih poimenovali arheosomi. Arheosomi so izredno stabilni. Največkrat njihovo stabilnost spremljamo z merjenjem sprememb v fluorescenci v liposome zaprtega karboksilfluorescina med segrevanjem (Choquet in sod., 1996).

Liposomi velikokrat postanejo nestabilni. Vzroki za nestabilnost so:

- kemijski, pogojeni z oksidacijo nenasičenih lipidov ali s hidrolizo lipidnih komponent
- fizikalni, pogojeni s sestavo lipidov in načinom priprave liposomov. Kažejo se kot sprememba velikosti, oblike in lamelarnosti
- mikrobiološki, pogojeni z bakterijsko kontaminacijo in inaktivacijo konzervansov (Marinko, 1995).

Liposomi so zlasti uporabni v medicini in farmaciji, kjer gre za dostavljanje zdravilnih učinkovin na obolela mesta. V našem eksperimentu smo preverjali temperaturno stabilnost liposomov (arheosomov) napolnjenih s kalceinom.

3 MATERIALI IN OPREMA

3.1 MATERIALI

- mikroorganizem: hipertermofilna arheja *Aeropyrum pernix* K1 – JCM 9820 iz japonske zbirke mikroorganizmov (Japan Collection of Microorganisms, Saitama, Japonska)
- aceton; CH_3COCH_3 (Merck, Nemčija)
- amonijev sulfat; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Merck, Nemčija)
- bidestilirana voda (ddH_2O)
- destilirana voda (dH_2O)
- diklorodimetsilan (Fluka, Švica)
- etilendiaminotetraocetna kislina; EDTA (Kemika, Hrvatska)
- 96 % etanol; $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (Merck, Nemčija)
- filter papir (št. 389, Sartorius, Nemčija)
- 50 mM fosfatni pufer; KH_2PO_4 (Riedel-de Haen, Nemčija), pH = 7,4
- gojišče: Marine Broth 2216 (Difco, Becton, Dickinson & Co., Sparks, MD 21152 ZDA)
- kalcein; $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_{13}$ (Sigma, Nemčija)
- kloroform; CHCl_3 (Merck, Nemčija)
- metanol; CH_3OH (Merck, Nemčija)
- 2 mL mikrokolone (Pierce, ZDA)
- NaDS; natrijev dodecilsulfat (Sigma, ZDA)
- natrijev tiosulfat; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (Alkaloid, Skopje, Makedonija)
- 4 M NaOH in 1 M HCl
- 20 mM pufer HEPES; $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ (Sigma, Nemčija), pH = 7,0
- primulin (Aldrich Chemical Company, ZDA)

- pufer za liposome: 140 mM NaCl
20 mM Tris
1 mM EDTA
pH 8,0
- Sephadex G-50 medium (Sigma, ZDA)
- SPE kolone (Waters, ZDA)
- steklene kroglice (Sigma, ZDA)
- TLC plošče Kieselgel 60F₂₅₄ (Merck, Nemčija)
- 2 % nasičen uranilacetat
- plin N₂ (Messer, Ruše, Slovenija)

3.2 PRIBOR IN OPREMA

- avtoklav (Sutjeska, Beograd, SČG)
- ekstrudor (Avestin, Ottawa, Kanada)
- rotavapor (Devarot; Elektromedicina, Slovenija)
- rotavapor in vodna kopel B-480 (Büchi, Švica)
- pH meter (MA 5705, Iskra, Slovenija)
- spektrofotometer (UV-VIS, Hewlett-Packard HP 8453, ZDA)
- grelna plošča (Intos, Hrvaška)
- fluorimeter (Cary Eclipse, Varian, Avstralija)
- mešalnik (Vibromix 104EV, Tehnica Železniki, Slovenija)
- tehtnica EXACTA 2200EB (Tehnica Železniki, Slovenija)
- centrifuga model centric 322 B (Tehnica Železniki, Slovenija)
- sterilna centrifuga (Beckman, ZDA)
- liofilizator (Gamma2-20, Nemčija)
- presevni elektronski mikroskop Philips CM 100 (FEI, Nizozemska)
- digitalna kamera Gatan – Bio Scan Camera Model 792 (ZDA)
- ultrazvočna kopel (Bandelin, Nemčija)
- sušilnik (Elektromedicina, Ljubljana, Slovenija)
- avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija)
- steklena komora
- laboratorijska steklovina
- steklene kroglice
- lij ločnik

- bučke za rotavapor
- gorilnik
- centrifugirke
- Eppendorfove epruvete
- 3 mL, 1 cm kvarčne kivete (FLR Cary, Varian, Avstralija)
- spatula
- plastične ladjice za tehtanje
- magnetna mešala
- 1000 mL filtrirna steklenica za gojenje *A. pernix*
- parafilm
- aluminjasta folija

4 METODE

4.1 GOJENJE *Aeropyrum pernix* K1

Hipertermofilno arhejo *Aeropyrum pernix* smo gojili v tekočem gojišču Marine Broth 2216 ob dodatku natrijevega tiosulfata pri pH 7,0. Šlo je za aerobni bioprocес z enkratnim polnjenjem v steklenici z mešanjem. Za ta namen smo skonstruirali sistem s kontrolo temperature, prezračevanjem in mešanjem. Gojenje je potekalo na magnetnem mešalniku z grelno ploščo v 1000 mL filtrirni steklenici z debelo steno. Mešanje je bilo nastavljeno na 800 min^{-1} , temperatura na 92°C in uravnavana preko senzorja potopljenega v gojišču. Zrak za prezračevanje smo dovajali preko $0,45 \mu\text{m}$ filtra ob pretoku okoli $0,5 \text{ L/min}$ v gojišče preko frite s poroznostjo $25-50 \mu\text{m}$, potopljene do 2-3 mm nad magnetnim mešalom. Izhlapecvanje smo preprečili z Liebigovim hladilnikom pritrjenim na odprtini za izhod zraka (Milek, 2005).

Prirast biomase smo spremajali z merjenjem optične gostote pri 650 nm (OD_{650}) v enakomernih časovnih razmakih (Milek, 2005).

4.1.1 Eksperimentalni del

- priprava gojišča

Za gojenje *Aeropyrum pernix* smo uporabljali tekoče gojišče, katerega osnova je Marine Broth 2216. Vsebuje vse soli, ki posnemajo sestavo morske vode, so vir ogljika in dušika. Gojišče smo pripravili tako, da smo v steklenico za gojenje zatehtali količine, ki so podane v preglednici 1. Zatehtane količine smo rastopili in dopolnili z destilirano vodo do $0,72 \text{ L}$ in dobro premešali. pH rastnega medija smo uravnali na 6,8 z dodatkom 4 M NaOH ali 1 M HCl pri sobni temperaturi. Gojišče smo avtoklavirali 20 minut pri 121°C in 1,1 bar.

Preglednica 1: Sestavine za pripravo gojišča Marine Broth

Destilirana voda	0,72 L
Marine Broth 2216	26,93 g
Natrijev tiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$)	0,72 g
HEPES pufer ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$; končna konc. 20 mM)	3,43 g

- gojenje

Pred inokuliranjem smo z dodatkom sterilne destilirane vode nadomestili med avtoklaviranjem izparelo vodo (cca. 4 %). Aseptično smo v gojišče inokulirali 80 g čiste kulture *A. pernix* in priklopili steklenico za gojenje na skonstruiran sistem za gojenje termofilne arheje *A. pernix*.

Prirast biomase smo spremajali z merjenjem optične gostote pri 650 nm v enakomernih časovnih intervalih. Vzgojene celice *A. pernix* smo centrifugirali v sterilni centrifugi (Beckman, ZDA, velikost rotorja 14 JA; 8500 min^{-1} ; 10 min).

4.2 IZOLACIJA SKUPNIH LIPIDOV

Lipide smo izolirali iz hipertermofilne arheje *Aeropyrum pernix* K1 z metodo po Blighu in Dyerju (1959), modificirano po Mancusovi in sod. (1986).

4.2.1 Esperimentalni del

Izgubo lipidov zaradi adsorbcije na stenah posode smo preprečili tako, da smo vso steklovino, ki smo jo uporabljali pri delu z lipidi silanizirali. V raztopini, ki je vsebovala 475 g kloroform in 25 g diklorodimetilsilana, smo pet minut namakali steklovino, nato petkrat sprali z bidestilirano vodo in jo dve in pol uri sušili v peči pri 180 °C. Teflonske zamaške epruvet smo silanizirali po istem postopku, le da smo jih sušili v peči pri 60 °C.

Celice arheje *Aeropyrum pernix* K1 smo najprej liofilizirali. V 10 mL silanizirano epruveto s teflonskim zamaškom smo zatehtali 45 µg – 55 µg liofiliziranih celic ter dodali 5 mL metanola. Epruveto smo položili v ultrazvočno kopel za 30 minut, da so se skupki celic razgradili. Nato smo dodali 2,5 mL kloroform in 2 mL 50 mM fosfatnega pufra (pH 7,4), dobro premešali in ekstrahirali 18 ur pri sobni temperaturi. Vzorce smo nato centrifugirali (centrifuga model centric 322 B; Tehnica Železniki, Slovenija) 10 min pri 4000 min⁻¹. Supernatant smo prelili v silaniziran lij ločnik ter dodali 2,5 mL kloroform in 2,0 mL 50 mM fosfatnega pufra (pH 7,4). Končno razmerje metanol / kloroform / pufer je bilo 2 / 2 / 1,8. Vsebino v liju ločniku smo pustili ločevati približno 18 ur. Po tem času sta bili vidni dve fazi. Zgornja faza je bila videti bolj motna, spodnja, (kloroformova) bistra, obe pa je ločevala tanka mrena. Spodnjo (kloroformovo) fazo smo spustili skozi filter papir in jo zbrali v silanizirani bučki. Topilo smo odparili na rotavaporju pod tokom suhega dušika pri 37 °C. Maso izoliranih lipidov smo določili s tehtanjem suhe prazne bučke in bučke s posušenimi lipidi. Suhe lipide smo do nadaljnih raziskav hranili pri – 20 °C.

4.3 IZOLACIJA POLARNIH LIPIDOV

Polarne lipide smo izolirali z metodo po Blighu in Dyerju (1959), modificirano po Choquetu in sod. (1992).

4.3.1 Eksperimentalni del

V bučko, v kateri so bili hranjeni skupni izolirani lipidi arheje *Aeropyrum pernix*, smo dodali 3 mL mešanice kloroform / metanol, 2 / 1. Bučko smo postavili v ultrazvočno kopel za 15 minut, da so lipidi odstopili od stene. Tej vsebini v bučki smo dodali 20 - kratno količino hladnega acetona. Vsebino smo prelili v centrifugirke po 10 mL in centrifugirali (centriguga model centric 322 B; Tehnica Železniki, Slovenija) 10 min pri 4000 min⁻¹. Sedimentu smo dodali 1 mL mešanice kloroform / metanol in mešali na vibracijskem mešalniku, ker so bila še vedno opazna bela zrnca, ki se niso raztopila v mešanici. Vsebino obeh centrifugirk smo prelili v silanizirano bučko, ponovno dodali 20–kratno količino hladnega acetona in ponovno centrifugirali. Supernatant smo zavrgli, sedimentu pa zopet dodali 1 mL mešanice kloroform / metanol ter hladni aceton, nato pa še enkrat centrifugirali. Sediment smo prepahali z dušikom in vzorec hranili pri –20 °C.

4.4 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA

4.4.1 Osnove tankoplastne kromatografije

Tankoplastna kromatografija (TLC) je metoda, ki se uporablja za ločitev kompleksnih zmesi. Zaradi hitrosti in preprostosti je pogosto uporabljena metoda za analizo lipidov. Raztopljeni vzorec nanesemo z mikropipeto kot piko ali črtico na startno linijo, ki je primerno oddaljena od spodnjega roba plošče, prevlečene s stacionarno fazo, in ga posušimo. Sama ločitev poteka v zaprti kromatografski komori, v kateri je na dnu mobilna faza (kromatografsko topilo). Ploščo postavimo vertikalno v posodo in topilo začne zaradi kapilarnosti potovati navzgor in z njim potujejo tudi snovi vzorca. Ko topilo pripotuje blizu zgornjega roba, ploščo osušimo in detektiramo spojine. Če je komponent v vzorcu veliko in ločitev ni bila zadovoljiva, ploščo obrnemo za 90 °C in jo kromatografiramo v drugem topilu (dvodimensionalna kromatografija).

Spojine po kromatografski ločbi napravimo vidne lahko z orošanjem z različnimi reagenti ali z osvetlitvijo z UV – svetlogo. Količino snovi določimo z merjenjem zmanjšanja intenzitete odbite svetlobe obarvanih lis glede na ozadje s pomočjo posebnih aparatur - denzitometrov (Kregar, 1996).

4.4.2 Detekcija in identifikacija lipidov s tankoplastno kromatografijo

Poznamo več tehnik za lokalizacijo in identifikacijo lipidov na TLC ploščah. Zaradi hitrosti in preprostosti smo uporabljali metodo barvanja s primulinom. Metoda je nedestruktivna, zato lahko tako tretirane plošče uporabimo za nadaljne markiranje s specifičnimi reagenti.

4.4.3 Eksperimentalni del

Vzorec skupnih lipidov, ki smo ga hrаниli na temperaturi –20 °C, smo raztopili v 500 µL kloroform, ter vsebino dobro premešali, da so se lipidi popolnoma raztopili. Za ločevanje lipidov z enodimensionalno TLC smo uporabili dva sistema topil (Ota, 2003; Choquet in sod., 1992):

Sistem 1: kloroform/metanol/ocetna kislina/acetona/voda (35/25/4/14/2)

Sistem 2: kloroform/metanol/ocetna kislina/voda (85/22,5/10/4)

Pred razvijanjem TLC plošč smo v stekleno kromatografsko komoro nalili mešanico topil do višine 5 mm, pokrili, dobro premešali in pustili 2 uri pri sobni temperaturi (ekvilibracija topil in vzpostavljanje parnega tlaka).

Kot stacionarno fazo smo uporabili polaren silikagel, ki je bil premazan na steklene plošče velikosti 5 x 20 cm. 2,5 cm od spodnjega roba plošče smo v razmaku vsaj 1 cm nanesli trikrat po 3 µL lipidnega vzorca. Ko je topilo izhlapelo, smo ploščo prenesli v stekleno komoro, kjer se je začela kromatografska ločba. Počakali smo, da je fronta topil prišla 1 cm pod vrh plošče. Ploščo smo vzeli iz komore in jo posušili na zraku.

4.4.3.1 Barvanje s primulinom

Pet miligramov primulina smo raztopili v 100 mL mešanice aceton/voda (8/2) in ga do uporabe shranili v temi.

Razvite in posušene TLC plošče smo pred špricanjem s primulinom in po njem pregledali pod UV- svetlobo, ampak rumene lise, karakteristične za lipide iz evkariontskih celic, niso bile vidne. Nato smo plošče pošpricali še z 20 % amonijevim sulfatom in jih dali za 20 minut v pečico na 180 °C. Lise, kjer so bili prisotni lipidi so bile dobro opazne in so se obarvale temno zaradi pooglenitve. Vzorec smo čistili še naprej in lipide poskušali ločiti tudi po polarnosti z adsorpcijsko kromatografijo na trdni fazi (na SPE koloni).

4.5 ADSORBCIJSKA KROMATOGRAFIJA

4.5.1 Osnove adsorpcijske kromatografije

S to tehniko ločujemo snovi, ki se različno močno adsorbirajo na stacionarno fazo in nato desorbirajo z mobilno fazo. Adsorbcijo povzročajo šibke van der Waalsove sile. Za separacijo komponent je pomembna razlika v njihovi adsorbciji, to je vezavi na površino adsorbenta in njihovi topnosti v mobilni fazi. Adsorbent mora biti kemijsko čim bolj inerten, imeti mora veliko površino, ki je dosežena s poroznostjo delcev in mora primerne granulacije, da je omogočen pretok mobilne faze. Za mobilne faze uporabljamo kromatografsko čista topila različne polarnosti. Lahko eluiramo le z enim topilom ali pa z več topili. Adsorbirana količina snovi na adsorbentu narašča s koncentracijo topljenca v mobilni fazi, ki je v stiku s trdno fazo.

4.5.2 Eksperimentalni del

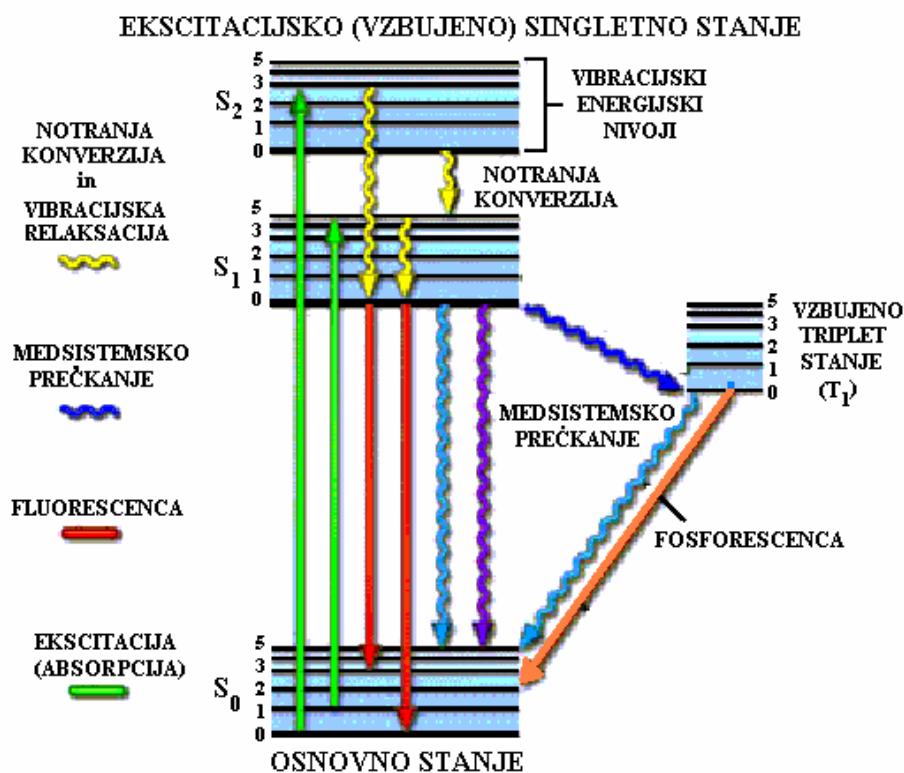
S pomočjo adsorpcijske kromatografije smo poskušali skupne lipide ločiti na več frakcij po polarnosti, kajti bolj je lipid polaren, bolj se veže na polarno stacionarno fazo (silikagel). V bučko z izoliranimi skupnimi lipidi smo dodali 200 µL kloroform in 50 µL metanola, tako, da so lipidi odstopili od stene bučke. Čez čas smo dodali še 1 mL kloroforma in vsebino bučke dobro premešali, da smo dobili čim bolj homogen vzorec. Kolono za SPE ekstrakcijo smo sprali s 150 mL kloroform. Na vrh silikagela smo nanesli ekstrakt s skupnimi lipidi, opisan v točki 4.2.1. Kolono smo najprej sprali s 170 mL kloroform, ki smo mu dodali 1 % ocetne kisline. Nato smo kolono sprali z 250 mL mešanice aceton/metanol 9/1, v/v) in na koncu še s 170 mL metanola. Vse tri frakcije smo skoncentrirali z vodno vakuumsko črpalko in ločili s tankoplastno kromatografijo ter razvite plošče pošpricali z 20 % amonijevim sulfatom, ter segregirali v peči pri 180 °C.

4.6 FLUORESCENČNA SPEKTROMETRIJA

4.6.1 Osnove fluorescenčne spektrometrije

O fotoluminiscenci govorimo, kadar je oddajanje svetlobe posledica predhodnega vzbujanja s fotoni ultravijolične ali vidne svetlobe. Luminiscenca pa je oddajanje svetlobe, do katerega pride, ko elektroni snovi iz vzbujenega stanja prehajajo nazaj v osnovno. Vzbujeno stanje dosežemo na več načinov: mehansko (npr. s trenjem), kemijsko (s kemijsko reakcijo) ali fizikalno (npr. absorpcija svetlobe) (Herman in sod., 2005). Znotraj fluorescenčne spektroskopije ločimo tri vrste metod: direktne, kjer merimo intenziteto naravne fluorescirajoče spojine, derivatizacijske, kjer nefluorescirajočo spojino pretvorimo v fluorescirajoči derivat ter pogasitvene, kjer zmanjšamo signal fluorescirajoče spojine (Mlekuž, 1995). Celoten proces od absorpcije do emisije svetlobe najlepše prikazuje Jabłoński energijski diagram (slika 9), ki je poimenovan po poljskem znanstveniku, profesorju Aleksandru Jabłońskemu, ki se je s pojavom fotoluminiscence ukvarjal v prvi polovici prejšnjega stoletja (Herman in sod., 2005; Lakowicz, 1999).

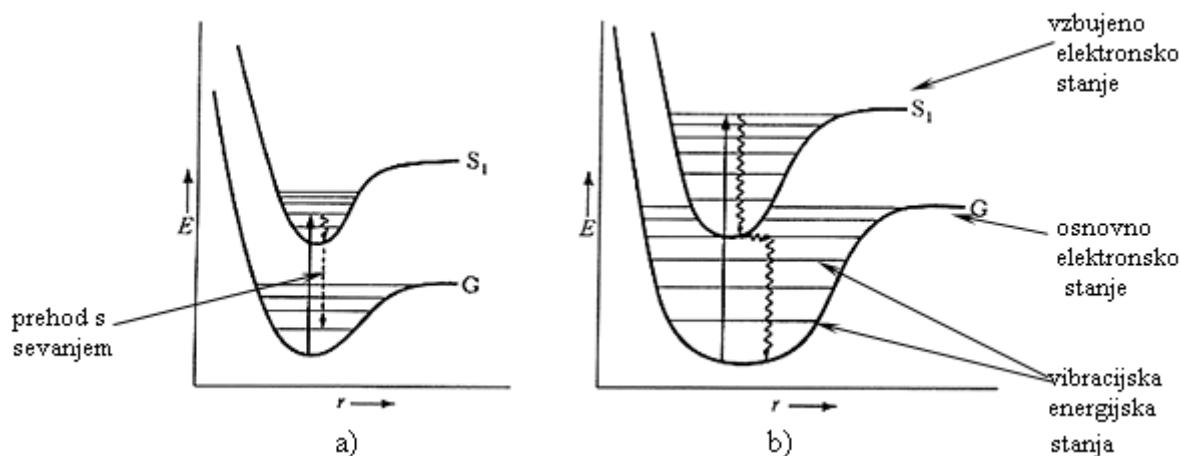
Vsaka molekula, atom ali ion ima enoten niz energijskih stanj. To so osnovna stanja in vzbujena stanja. Z absorpcijo energije preide delec v vzbujeno stanje, relaksacijski procesi pa ga vrnejo v energijsko stabilnejše osnovno stanje. Fluorescenza je relaksacijski proces.



Slika 9: Jabłoński energijski diagram (Herman in sod., 2005).
Prikazan je celoten proces od absorpcije do emisije svetlobe (fluorescenza in fosforescenza)

Večina molekul je v osnovnem stanju v obliki S_0 . To pomeni, da so vsi elektroni sparjeni in imajo nasprotni spin. Za vsako molekulo obstaja več t.i. elektronskih energetskih stanj, ki so označeni z S_0 , S_1 in S_2 . Znotraj vsakega od teh stanj obstajajo vibracijski nivoji označeni z 0, 1 in 2 (Lakowicz, 1999).

Fluorescencija je pojav, pri katerem se molekula, ki absorvira svetlobo in s tem preide v višje vzbujeno stanje, vrne v osnovno stanje s sevalnim prehodom. Pri tem se le delež absorbirane energije ponovno emitira kot svetloba. Nekatere molekule so dokaj toge in imajo manjše število vibracijskih energijskih stanj. Zato se vibracijska energijska stanja v vzbujenem in osnovnem stanju ne prekrivajo. Take molekule fluorescirajo in jih imenujemo fluorofori, saj je prehod iz vzbujenega v osnovno stanje možen le s sevanjem. Možne energijske ravni molekule so prikazane na sliki 10a, kjer vidimo dve elektronski stanji, osnovno stanje G in prvo vzbujeno stanje S_1 (poudarjeni, ukrivljeni črti) in nekaj vibracijskih stanj za G in S_1 (tanke, vodoravne črte). Če se vibracijska energijska stanja osnovnega in vzbujenega stanja prekrivajo in se molekula lahko vrne v osnovno stanje z vrsto nesevajočih prehodov pomeni, da ne fluorescira (slika 10b).



Slika 10: Prehodi elektronov med različnimi vibracijskimi energijskimi stanji v molekuli (Fluorescenc... , 2005).

Pri prehodu med vibracijskimi energijskimi stanji se vedno nekaj energije iz absorbirane svetlobe pretvori v toploto. Zaradi tega je izsevana svetloba skoraj vedno daljše valovne dolžine kot absorbirana. Vzbujeno stanje fluorofora je navadno zelo kratko in znaša od 0,5 do 8,0 ns ($5 \cdot 10^{-10}$ s do $8 \cdot 10^{-9}$ s). V posebnih primerih lahko vzbujeno stanje traja tudi do 2 sekundi. Tipičen čas za celoten proces fluorescence je 10^{-4} sekunde (http://fizika.uni-mb.si/biofizika/projekt/spektro_metode/fluoro.htm).

Razpolovni čas je čas, v katerem se polovica vzbujenih molekul s fluorescenco vrne v osnovno stanje. Tipični razpolovni časi za proces fluorescence so okrog 10 ns (10^{-8} s). V raztopini pri sobni temperaturi se v tem času lahko zgodi veliko procesov, ki vplivajo na emisijo.

Fluorescenci konkurirajo neradiacijski procesi, kot so interna konverzija, prehod triplet-singlet (angl. intersystem crossing) ter interakcije z drugimi molekulami ali kromoforji, ki znižujejo intenziteto emisije. Vsi ti procesi med seboj tekmujejo za depopulacijo vzbujenega singletnega stanja. Od hitrosti konkurenčnih pojavov je odvisna intenziteta fluorescence. Kvantni izkoristek je enak deležu vzbujenih singletov, ki se deaktivirajo s fluorescenco. Enak je razmerju med številom emitiranih in absorbiranih fotonov. Kvantni izkoristki so visoki le za nekatere spojine, katerih strukturne značilnosti upočasnijo konkurenčne procese, običajno pa so kvantni izkoristki nizki. Največkrat so to aromatski kondenzirani sistemi (Lakowicz, 1999).

Za fluorescenco je torej značilno, da je energija emisije manjša kot energija absorpcije. Torej se fluorescenza pojavi pri manjših energijah in s tem pri večjih valovnih dolžinah, kar imenujemo Stokes-ov premik. Izgubo energije povzroči hitra relaksacija vzbujenega elektrona na energetsko najnižji vibracijski nivo stanja S_1 . Dodatno izgubo povzročijo elektroni, ker se med fluorescenco navadno vrnejo v višje vibracijske nivoje stanja S_0 . Na izgube energije vplivajo tudi drugi faktorji, kot so polarnost topila v katerem se fluorofor nahaja, reaktivnost v vzbujenem stanju, tvorba kompleksov in resonančni prenos energije. Ločimo interne in eksterne fluoroforce. Interni imajo lastnost fluorescence in so prisotni v naravi (npr. aromatske aminokisline, nevrotansmitterji in porfirini). Vzorcu, ki naravno ne kaže željenih spektralnih lastnosti, pa moramo dodati eksterne fluoroforce. To so navadno sintetične barve ali modificirane biomolekule. Fluoroforji naj bi bili stabilni med dolgorajno iluminacijo, kazali naj bi veliko intenziteto in naj ne bi vplivali na molekulo ali proces, ki ga preiskujemo (Herman in sod., 2005; Lakowicz, 1999).

Viskoznost, temperatura, pH, denaturanti in oligomerizacija so faktorji, ki vplivajo na velikost in obliko segmentov makromolekul. V biokemijskih raziskavah pogosto uporablajo meritve polarizacije fluorescence, ki dajejo informacije o denaturaciji proteinov, hitrostih rotacije proteinov in lastnostih membran.

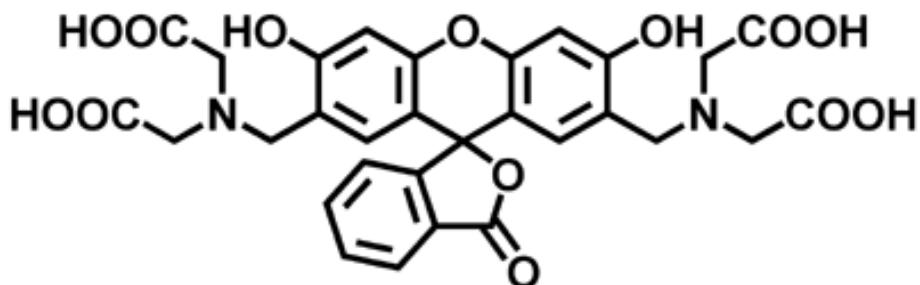
Organske molekule absorbirajo svetlobo valovnih dolžin med 200 nm in 500 nm. Dipolni moment fluoroforja se po absoprciji fotona spremeni, običajno se zveča. Če imajo tudi molekule topila dipolni moment, se prerazporedijo okrog vzbujenega dipola, ter mu tako znižajo energijo (Lakowicz, 1999).

4.6.2 Eksperimentalni del

4.6.2.1 Priprava liposomov s kalceinom

Liposome smo pripravili z uporabo ekstrudorja z modificirano metodo po Tejuca in sod. (1996). Posušene lipide, ki smo jih izolirali iz biomase *Aeropyrum pernix*, smo raztoplili v vodi z raztopljenim kalceinom ($C_{30}H_{26}N_2O_{13}$) (slika 11). Koncentracija kalceina je bila 80 mM, pH pa smo uravnali na vrednost 7,0 z 1 M NaOH, tako, da je bila končna

koncentracija lipidov 1,6 mg/mL. Dodali smo nekaj steklenih kroglic in mešali na vibracijskem mešalniku nekaj minut, da je lipidni film odstopil od silanizirane stene bučke. Na ta način so nastali multilamelarni vezikli. Vsebino smo prenesli v eppendorfovno epruveto za zmrzovanje ter jo nato izpostavili sedmim ciklom zamrzovanja v tekočem dušiku in odmrzovanja v vodni kopeli s 40 °C. Na ta način se lipidne plasti odlepijo ena od druge in interlamelarni prostori se povečajo. Vzorec smo nato 31-krat iztisnili preko ekstrudorja z dvema polikarbonatnima filtroma z velikostjo por 100 nm. S tem postopkom smo dobili vezikle s približno enako velikostjo. Nevgrajen kalcein smo odstranili z gelsko filtracijo z uporabo 2 mL mikrokolon napolnjenih z gelom Sephadex G-50 in uravnovešenih s pufrom za liposome.



Slika 11: Strukturna formula kalceina C₃₀H₂₆N₂O₁₃ (Calcein ... , 2005).

Meritve fluorescence smo opravili na fluorescenčnem spektrofotometru (Cary Eclipse) v laboratoriju Katedre za kemijo, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta.

Na fluorimetru smo izvedli tri vrste eksperimentov. Najprej smo določili koncentracijo lipidov v liposomih z vgrajenim kalceinom, ki smo jo potrebovali za nadaljni študij stabilnosti liposomov. Koncentracijo lipidov v liposomih z vgrajenim kalceinom smo določili s tehtanjem bučk (masa bučka + lipidi – masa prazna bučka = masa lipidi). V naslednjem eksperimentu smo spremljali kako se fluorescenčna intenziteta liposomov z vgrajenim kalceinom po dodatku 0,2 % (w/v) NaDS spreminja s časom. Nazadnje smo proučevali termično stabilnost liposomov z vgrajenim kalceinom med segrevanjem. Segrevanje je potekalo s hitrostjo 1 °C/min; vzbujanje pri 494 nm; merjenje intenzitete pa pri 510 nm.

4.7 PRESEVNA (TRANSMISIJSKA) ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA

Transmisijski elektronski mikroskop je instrument analogen presevnemu optičnemu mikroskopu. Slika nastane zaradi različnega sisanja elektronov na atomih z različnimi atomskimi števili, ki so na različnih mestih v preparatu. Uporabljamo ga za proučevanje ultrastrukture celice, ker ima veliko večjo ločljivost kot svetlobni mikroskop (Bene, 1999).



Slika 12: Transmisijski elektronski mikroskop (Stušek in sod., 1997)

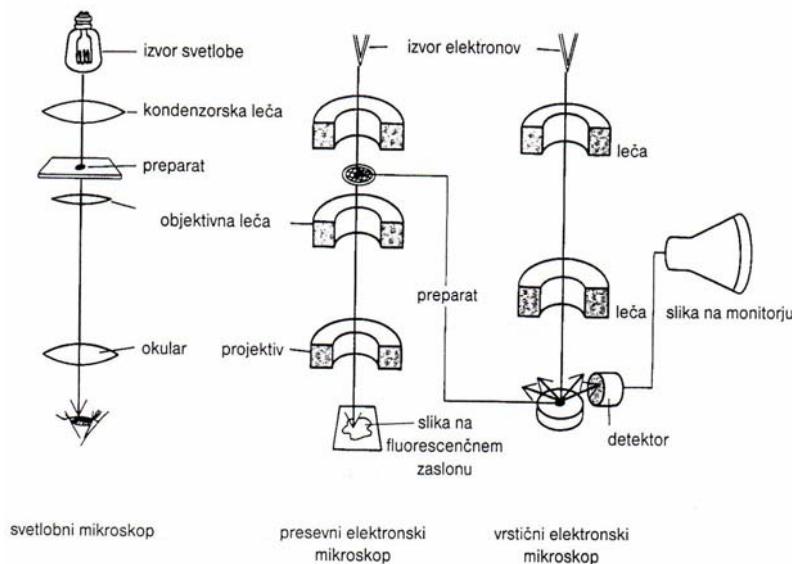
4.7.1 Osnove transmisijske elektronske mikroskopije

Elektronski mikroskop, pri katerem obsevamo z elektri zelo tanke rezine tkiva, imenujemi presevni (transmisijski) elektronski mikroskop (TEM) (slika 13) (Stušek in sod., 1997).

Uporabljamo ga za proučevanje ultrastrukture celice, ker ima veliko večjo ločljivost od svetlobnega mikroskopa. Slika preparata nastane s pomočjo hitrih elektronov, ki imajo pri veliki hitrosti valovanja zelo kratko valovno dolžino ($\lambda = 0,005$ nm). Slika nastane zaradi različnega sisanja elektronov na atomih z različnimi atomskimi števili, ki so na različnih mestih v preparatu.

Vir elektronov v mikroskopu je kovinski filament (katoda), ki ob segrevanju z električnim tokom oddaja elektrone. Visoka napetost med katodo in anodo (40-100 kV) pospeši snop elektronov skozi majhno odprtino v anodi, elektromagnetna polja pa usmerjajo pot gibanja elektronov na podoben način, kot steklene leče lomijo svetlobne žarke. Ker bi se elektroni

ob trkih z molekulami v zraku sipali in bi se njihovo gibanje hitro ustavilo, mora biti v celotni cevi, skozi katero elektroni potujejo, vakuum.



Slika 13: Primerjava osnovne zgradbe svetlobnih in elektronskih mikroskopov (Veranič in sod., 2000)

Elektronski mikroskop ima sistem elektromagnetnih leč, ki imajo enako funkcijo kot steklene leče v svetlobnem mikroskopu: kondenzor zbere snop elektronov na preparatu, objektiv poveča sliko predmeta, projektiv, ki ustreza okularju, pa sliko, ki jo je dal objektiv, še poveča in jo projicira na fluorescentni zaslon ali fotografiski film (Veranič in sod., 2000).

Curek elektronov, ki ga pospešimo z visoko napetostjo, ima valovno dolžino, ki je mnogo krajša od valovne dolžine vidne svetlobe. Zato je ločljivost elektronskega mikroskopa mnogo večja, do 0,2 nm. Koristne povečave, ki jih omogoča ta mikroskop so do 500.000-kratne (Stušek in sod., 1997).

Druga vrsta elektronskega mikroskopa je vrstični ("scanning") elektronski mikroskop (slika 13). Ta tip elektronskega mikroskopa omogoča neposredno opazovanje površine preparata. Snop primarnih elektronov izhaja iz katode, ki jo segreva električni tok. Ta elektronski žarek od točke do točke otipava površino preparata in sproži oddajanje signalov različnih vrst s površine preparata. Eden od teh signalov je tudi oddajanje sekundarnih elektronov, ki jih zbira detektor. Ta je nameščen v neposredni bližini površine preparata. Sekundarne elektrone scintilator spreminja v fotone, ti pa se na fotopomnoževalki pretvorijo v električni signal, ki ga na monitirju zaznamo kot sliko površine preparata (Veranič in sod., 2000).

4.7.2 Opis transmisijskega elektronskega mikroskopa

Zgradba in način delovanja elektronskega mikroskopa sta v mnogočem podobna delovanju svetlobnega mikroskopa. Namesto optičnih so v elektronskem mikroskopu elektromagnetne leče: kondenzor, objektiv, okularju svetlobnega mikroskopa pa ustreza elektromagnetno leče, ki mu pravimo projektiv. Ker naše oko elektronov ni sposobno zaznati, usmeri projektiv elektrone na fluorescenčen zaslon ali na fotografski film ozziroma fotografsko ploščo. Elektroni povzročijo fluoresciranje zaslona, podobno kot pri televizijskem zaslonu in tako ustvarjajo vidno sliko objekta. Na film delujejo elektroni podobno kot svetlobni žarki (Stušek in sod., 1997).

Sestavni deli transmisijskega elektronskega mikroskopa:

Na vrhu mikroskopa je nameščen elektronski top s pospeševalnimi napetostmi med 20 in 125 kV. Izbira napetosti je odvisna od opazovanega vzorca.

Katoda: kovinska elektroda (ponavadi platinasta), ki oddaja snop hitrih elektronov.

Anoda: pozitivno nabita elektroda s 50 kV napetostne razlike do katode - pospešuje elektronski žarek.

Kondenzor: elektromagnetna leča, ki zbere elektronski snop na preparat. Naloga kondenzorskih leč je formiranje vzporednega elektronskega curka želenega predmeta. Premer curka izberemo glede na povečavo, pri kateri želimo vzorec pregledovati. S prilagajanjem premera curka dosežemo, da je vedno osvetljen samo neznatno večji del vzorca kot ga vidimo na zaslonu.

Zračna zapora/vrata za preparat: omogoča namestitev preparata v mikroskop brez izgube vakuuma. Menjava vzorca mora potekati zelo hitro, saj pri tem v komoru vdira zunanji zrak, hkrati pa moramo pred samo menjavo vzorca zapreti posebne zapornice, ki preprečujejo vdor zraka v ostale dele mikroskopa.

Objektiv: elektromagnetna leča, ki izostri in poveča prvo sliko.

Projektiv: dodatno poveča, ker z njim izberemo področje slike, ki ga opazujemo.

Vakuumska črpalka: izsesa zrak, da zmanjša sisanje elektronov in segrevanje zaradi trkov elektronov od molekule zraka.

Fluorescentni zaslon: potreben, ker se elektronskih žarkov (slike) ne vidi neposredno. Je odmakljiv.

Fotografska plošča: da trajen črno-beli dokument elektronske slike. Pri izdelavi pozitiva sliko lahko še dodatno povečamo.

Betonska osnova: stabilna podloga, ki zmanjša tresljaje in s tem nezaželene odklone elektronskega snopa (Pickering, 1996).

4.7.3 Preparati za transmisijsko elektronско mikroskopijo

Ponavadi uporabljamo ultratanke rezine, ki imajo površino 0,1-0,5 mm² in so debele 40-60 nm. Režemo jih z diamantnimi noži. Noži so opremljeni s kadičko z vodo, ki sega do roba noža, tako da rezine takoj zaplavajo na vodno površino, od koder jih skupaj s kapljico vode poberemo na kovinsko mrežico, ki je nosilec preparata.

Ko se mrežica s preparatom posuši, preparat še kontrastiramo. Ta faza ustreza barvanju histološkega preparata. V bioloških strukturah prevladujejo atomi z nižjimi atomskimi števili (ogljik, vodik, kisik, dušik) in ker je kontrast v elektronskem mikroskopu odvisen od sisanja elektronov na atomih z večjim atomskim številom, so biološki preparati slabo kontrastni. Kontrast ponavadi povečamo z vnosom atomov težkih kovin, ki se specifično vežejo na različne strukture v celici. Največ se uporablja metoda kontrastiranja s kombinacijo svinčevega citrata in uranilacetata (Veranič in sod., 2000).

4.7.4 Eksperimentlni del

4.7.4.1 Priprava vzorca za transmisijski elektronski mikroskop

Skupnim lipidom v bučki smo dodali 1 mL kloroform in dobro premešali, da so lipidi odstopili od stene bučke. Vzorec smo posušili na vodni vakuumski črpalki pri znižanem tlaku. Lipidom v bučki smo dodali 1 mL bidestilirane vode in steklene kroglice ter intenzivno 5 min stresali na vibracijskem stresalniku. Tako dobljen vzorec smo prenesli v eppendorfovo epruveto za zmrzovanje. Dobili smo multilamelarne vezikle. Izpostavili smo jih 7 ciklom zamrzovanja v tekočem dušiku in odmrzovanja v vodni kopeli s 40 °C. Lipidne plasti so se na ta način odlepile ena od druge. Vzorec smo nato 31-krat iztisnili preko ekstrudorja z dvema polikarbonatnima filtromi z velikostjo por 100 nm. S tem postopkom smo dobili vezikle približno enake velikosti, ki smo jih kasneje pregledovali pod transmisijskim elektronskim mikroskopom.

4.7.4.2 Mikroskopiranje

Liposome smo pregledovali s presevnim elektronskim mikroskopom Philips CM 100 in fotografirali z digitalno kamero Gatan – Bio Scan Camera Model 792 na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete. Fotografije smo obdelali z računalniškim programom Digital Micrograph 3.31.

Uporabili smo dva postopka:

- Vzorec smo 15 minut kontrastirali z 2 % uranilacetatom (Bozzola in Russel, 1999). Na bakreno mrežico (cca. 3 mm v premeru) smo nanesli 8 µL vzorca in pustili, da se je posušil ter ga pregledovali pod transmisijskim elektronskim mikroskopom.
- K 100 µL vzorca smo dodali 100 µL 1 % fosfovolframove kisline (1/1) in jih sonicirali približno 3 min. S tem smo dobili enako koncentracijo 1 % fosfovolframove kisline v

veziklih kot je v okolici. Vzorec smo nato 10-krat razredčili in na ta način dobili 10-krat večjo koncentracijo fosfovolframove kisline v veziklih kot je bila v okolici.

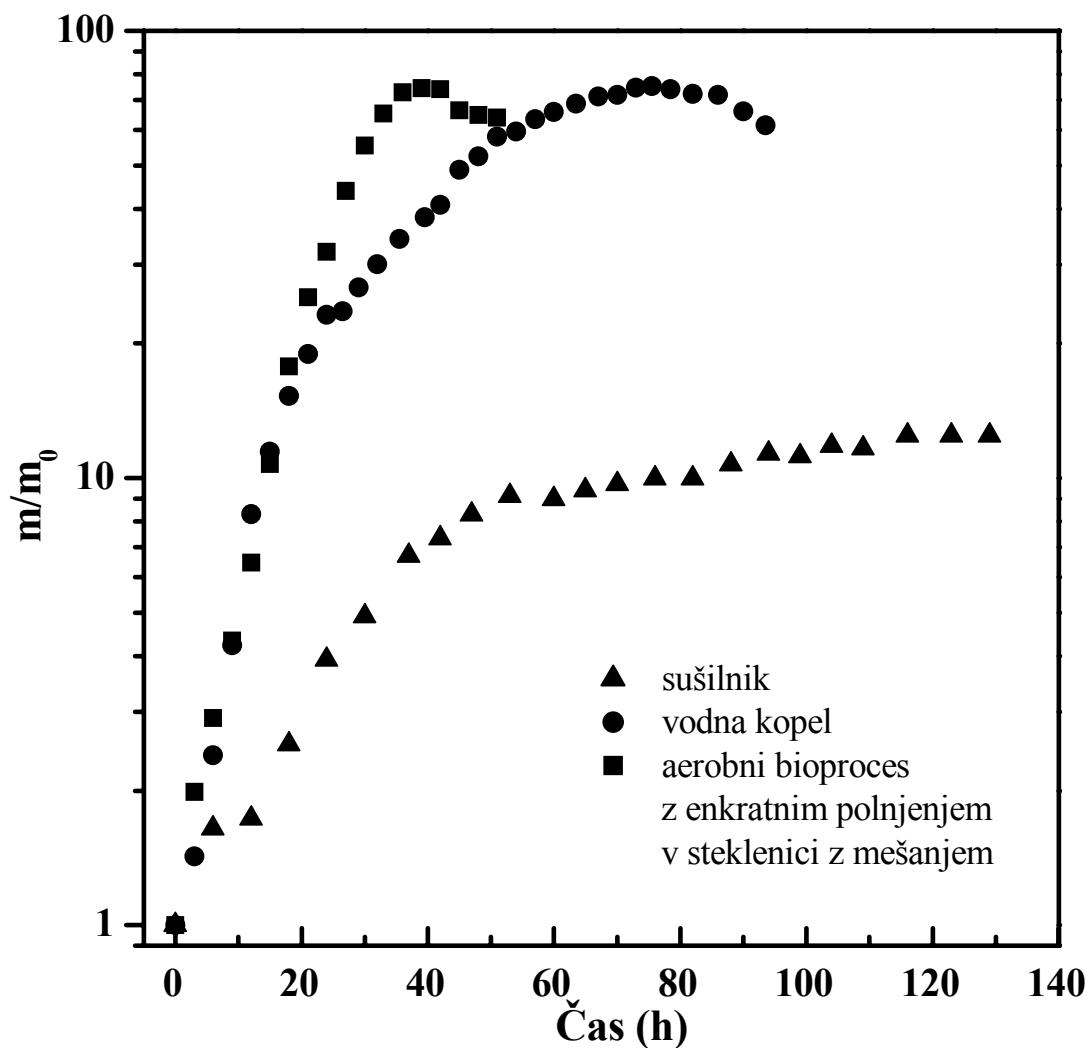
Na bakreno mrežico smo dali 8 μL vzorca, ga posušili in pregledovali pod transmisijskim elektronskim mikroskopom.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 GOJENJE *Aeropyrum pernix*

Rast hipertermofilne arheje *A. pernix* smo spremljali na tri načine. Arhejo *A. pernix* smo najprej gojili v sušilniku brez stresanja, nato v vodni kopeli s stresanjem. Nazadnje smo spremljali aerobni bioprocес z enkratnim polnjenjem v steklenici z mešanjem.

5.1.1 Vpliv načina gojenja na količino bakterijske biomase



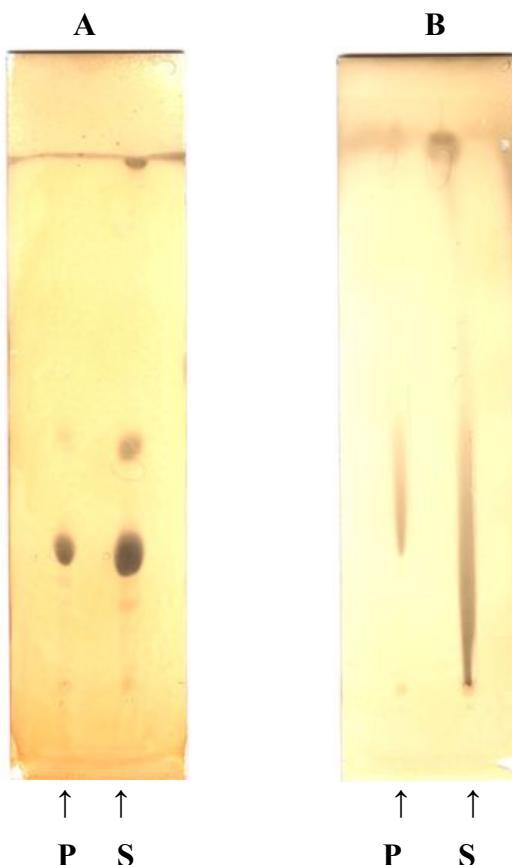
Slika 14: Rastne krivulje pri gojenju *A. pernix* v sušilniku brez stresanja, v vodni kopeli s stresanjem (80 min^{-1}) in pri aerobnem bioprocесu z enkratnim polnjenjem v steklenici z mešanjem (800 min^{-1}), normalizirane glede na začetno koncentracijo biomase (m/m_0) (Milek, 2005).

Primerjava različnih načinov gojenja *A. pernix* je pokazala, da je bila rast najhitrejša v primeru aerobnega bioprocесa z enkratnim polnjenjem v steklenici z mešanjem (glej točko 4.1.1). V začetni fazи je bila hitrost rasti (μ_{MAX}) $0,15 \text{ h}^{-1}$ (Milek, 2005).

5.2 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA NA SILIKAGELU 60

S tankoplastno kromatografijo na Silikagelu 60 smo poskušali določiti polarnost in število lipidov, ki se nahajajo v hipertermofilni arheji *A. pernix*.

5.2.1 Detekcija in identifikacija lipidov s tankoplastno kromatografijo



Slika 15: Primerjava mobilnih faz pri tankoplastni kromatografiji lipidov (polarnih-P in skupnih-S izoliranih iz hipertermofilne arheje *A. pernix* na Silikagelu 60. **Slika A:** sistem topil: kloroform/metanol/ocetna kislina/voda (85/22,5/10/4). **Slika B:** sistem topil: kloroform/metanol/ocetna kislina/aceton/voda (35/25/4/14/4)

Lise razvite na TLC plošči (slika 15A) kažejo na lepo ločitev lipidov. Opazili smo, da prevladujejo bolj polarni lipidi – širje polarni lipidi, med katerimi se eden pojavlja v zelo veliki količini, ostali trije pa v manjših količinah. Razviden je še en močno nepolaren lipid. Opazili smo tudi, da kvaliteta ločitve s časom pada, oz. da najlepše rezultate dobimo, če s TLC ločujemo sveže ekstrahirane lipide. Na sliki 15B vidimo, da se lipidzi z uporabljenoma mešanicom topil niso lepo ločili, torej pogoj ločitve niso bili ustreznii, zato smo za nadaljnje poskuse uporabljali prvi sistem topil: kloroform/metanol/ocetna kislina/voda (85/22,5/10/4).

5.2.2 Poskus ločevanja lipidov z adsorpcijsko kromatografijo

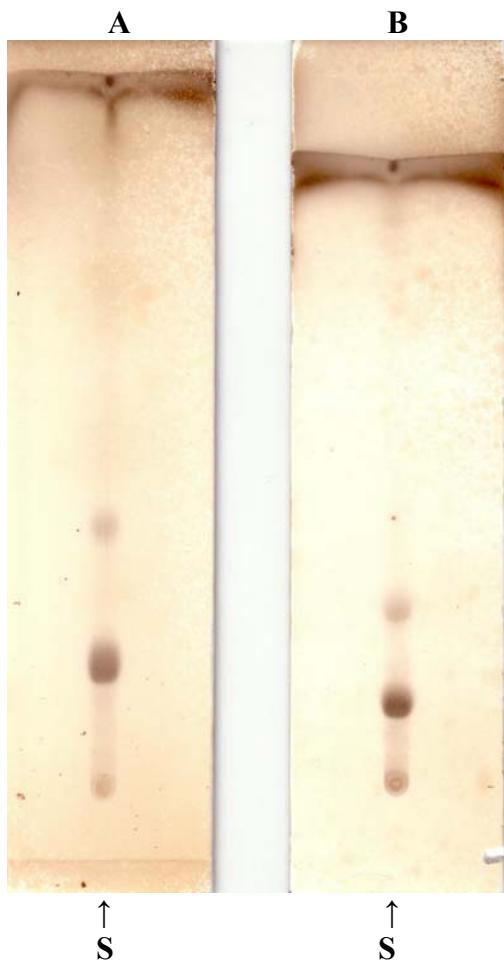


Slika 16: Tankoplastna kromatografija skupnih-S lipidov izoliranih iz hipertermofilne arheje *A. pernix* na Silikagelu 60 v sistemu topil: kloroform/metanol/ocetna kislina/voda (85/22,5/10/4). **Slika A** prikazuje vzorec pred čiščenjem z adsorpcijsko kromatografijo na trdni fazi, **slika B** pa takoj po njem. Frakcije dobljene po adsorpcijski kromatografiji na trdni fazi: **1** frakcija po spiranju vzorca s 170 mL kloroformom z dodatkom 1% acetne kisline; **2** frakcija po spiranju vzorca z 250 mL mešanice aceton/metanol (9/1, v/v); **3** frakcija po spiranju vzorca s 170 mL metanola

Skupne lipide smo ločevali tudi s pomočjo adsorpcijske kromatografije, nakar smo skoncentrirane frakcije, ki naj bi vsebovale različno polarne lipide, ločili še s TLC.

Vzorec smo čistili z adsorpcijsko kromatografijo na trdni fazi-SPE kolona (glej točko 4.5.2) in na ploščo nanesli vse tri ločene in skoncentrirane frakcije (slika 16B). Na TLC plošči se je lisa pokazala samo v najbolj nepolarni frakciji (frakciji sprani s kloroformom).

To lahko pomeni, da ni prišlo do spiranja bolj polarnih frakcij, ki se nahajajo tudi v nanosu oziroma, da so se kemijske lastnosti lipidov spremenile.



Slika 17: Tankoplastna kromatografija skupnih lipidov-S izoliranih iz hipertermofilne arheje *A. pernix* na Silikagelu 60. **Slika A:** sistem topil: kloroform/metanol/voda (85/22,5/4). **Slika B:** sistem topil: kloroform/metanol/ocetna kislina/voda (85/22,5/10/4)

Ker smo domnevali, da acetna kislina, ki smo jo uporabili pri adsorbcijski kromatografiji, lahko vpliva na strukturo lipidov in posledično slabo ločitev na SPE koloni, smo izhodni vzorec (nanos na SPE kolono) ločili s sistemom topil kloroform/metanol/voda (85/22,5/4) z in brez prisotnosti acetne kisline. V obeh primerih smo dobili povsem enak rezultat – lepo ločene lipide. Acetna kislina očitno ne spremeni kemijskih lastnosti molekul v vzorcu.

Poskušali smo še ugotoviti, kako prisotnost (odsotnost) ocetne kisline vplivata na kvaliteto ločitve lipidov iz arheje *A. pernix* z adsorpcijsko kromatografijo.

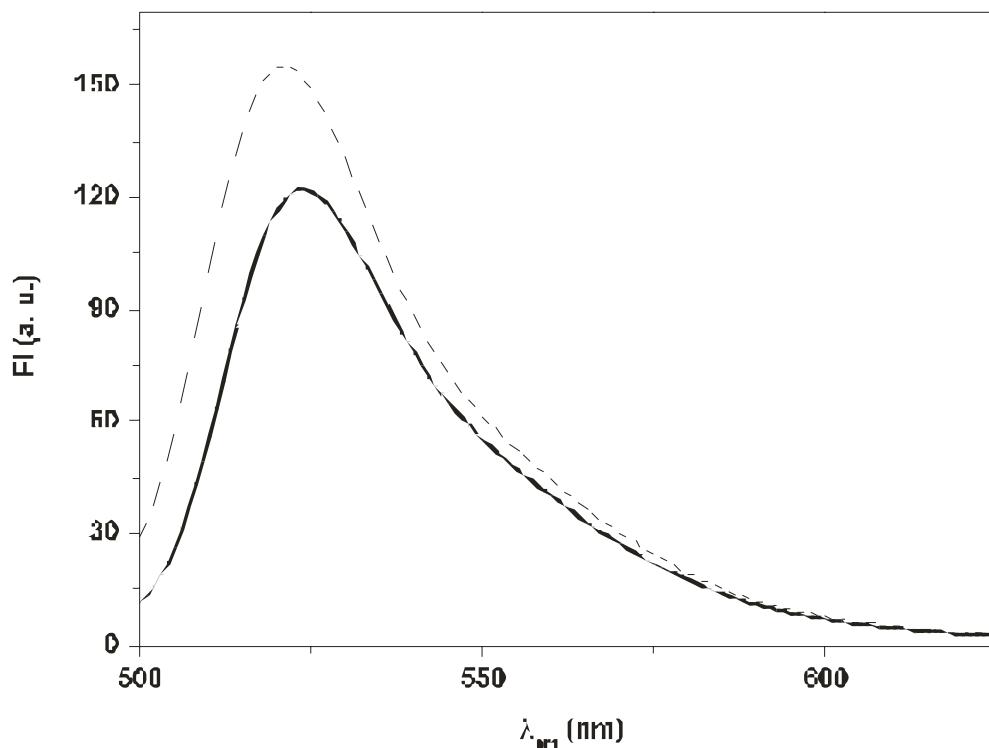


Slika 18: Tankoplastna kromatografija skupnih lipidov iz arheje *A. pernix* na Silikagelu 60 v sistemu topil: kloroform/metanol/voda (85/22,5/4). Slika prikazuje: **1** frakcija po spiranju vzorca s 170 mL kloroforma, **2** frakcija po spiranju vzorca z 250 mL mešanice aceton/metanol (9/1, v/v), **3** frakcija po spiranju vzorca s 170 mL metanola. Frakcije so bile nanešene na TLC ploščo isti dan po spiranju s SPE kolone.

Tudi če smo za spiranje lipidov s SPE-kolone uporabili sistem topil brez ocetne kisline, smo ponovno dobili slabo ločitev (slika 18).

5.3 MERITVE FLUORESCENČNE SPEKTROMETRIJE

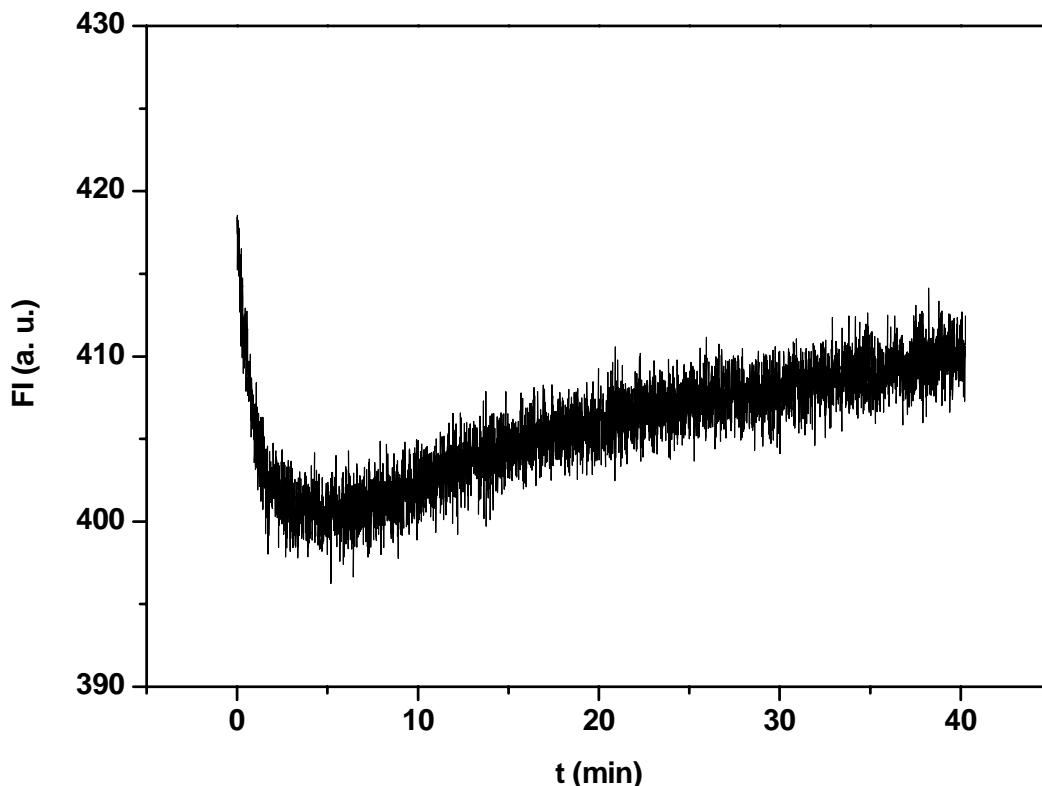
Iz izoliranih lipidov *A. pernix* smo pripravili liposome in določili koncentracijo lipidov v liposomih z vgrajenim kalceinom.



Slika 19: Fluorescenčni emisijski spektri pri različnih koncentracijah lipidov v liposomih z vgrajenim kalceinom
---- ($c_{\text{kalcein}} = 0,043 \text{ mol/L}$; $c_{\text{lipidov}} = 0,4 \text{ g/mL}$)
---- ($c_{\text{kalcein}} = 0,086 \text{ mol/L}$; $c_{\text{lipidov}} = 0,8 \text{ g/mL}$)

Koncentracijo lipidov v liposomih z vgrajenim kalceinom smo določili s tehtanjem bučk na način: (masa bučka + lipidi) – (masa prazna bučka) = (masa lipidi)

Zanimalo nas je, kako se intenziteta fluorescence liposomov z vgrajenim kalceinom spreminja s časom po dodatku 0,2 % (w/v) NaDS.



Slika 20: Spremljanje intenzitete fluorescence liposomov z vgrajenim kalceinom kot funkcija časa po dodatku 0,2 % (w/v) NaDS. Intenziteta fluorescence je merjena pri 510 nm, valovna dolžina vzbujanja je 494 nm in temperatura 95 °C, ($c_{\text{kalcein}} = 0,173 \text{ mol/L}$; $c_{\text{lipidov}} = 1,6 \text{ g/mL}$).

Slika 20 prikazuje spremljanje intenzitete fluorescence liposomov z vgrajenim kalceinom po dodatku 0,2 % (w/v) NaDS. Razvidno je, da je intenziteta na začetku padala, pri intenziteti 400 nm pa je začela naraščati, kar kaže na to, da so verjetno nastale določene spremembe v liposomih z vgrajenim kalceinom.

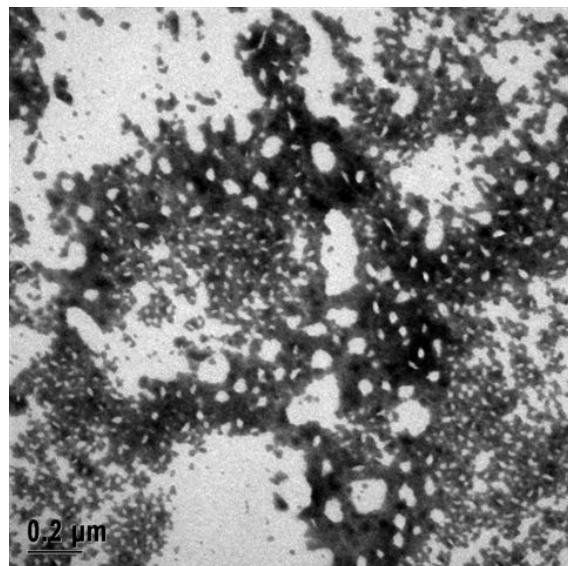
Stabilnost liposomov pripravljenih iz izoliranih lipidov *A. pernix* smo določili z uporabo fluorimetrije. Spremljali smo intenziteto fluorescence med segrevanjem kot pokazateljem prepuščanja vključenega kalceina po dodatku 1,2 % (w/v) NaDS.

Slika 21: Spremljanje intenzitete fluorescence med segrevanjem kot pokazateljem prepuščanja vključenega kalceina po dodatku 1,2 % (w/v) NaDS (segrevanje s hitrostjo 1 °C/min; vzbujanje 494 nm; merjenje intenzitete pri 510 nm) ($c_{\text{kalcein}} = 0,173 \text{ mol/L}$; $c_{\text{lipidov}} = 1,6 \text{ g/mL}$).

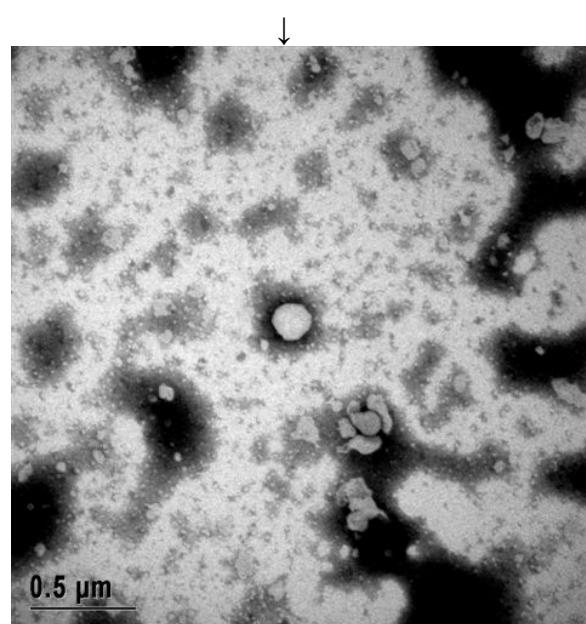
S slike 21 je razvidno, da je prišlo med segrevanjem liposomov pripravljenih iz izoliranih lipidov *A. pernix* in dodatku 1,2 % (w/v) NaDS, ter zadrževanju pri temperaturi 90 °C do znižanja intenzitete emitirane svetlobe. Vidimo, da ni prisotnih ostrih prehodov v fluorescenčni intenziteti, zato ne moremo govoriti o prepuščanju kalceina.

5.4. ELEKTRONSKA TRANSMISIJSKA MIKROSKOPIJA

Z elektronsko transmisijsko mikroskopijo smo poskušali pokazati kako izgledajo liposomi pripravljeni iz lipidov arheje *A. pernix* pod elektronskim transmisijskim mikroskopom.



Slika 22: Razmazano kontrastirno sredstvo pod transmisijsim elektronskim mikroskopom. Kontrola (2 % uranil acetat) brez veziklov, kjer ni opaznih okroglih zaključenih struktur - liposomov.



Slika 23: Liposomi pod transmisijskim elektronskim mikroskopom

Na sliki 22 je prikazan kontrolni vzorec (2% uranil acetat). Opazno je vse, razen zaključenih svetlosivih struktur – liposomov. Naredili smo ga, da bi se prepričali, da v samih topilih in kontrastirnem sredstvu ni struktur, ki bi bile podobne liposomom in ki bi predstavljale artefakt. Na sliki 22 dejansko vidimo le razmazano kontrastirno sredstvo, ki se suši, opaznih ni nobenih zaključenih okroglih struktur – liposomov. Tako smo lahko prepričani, da svetlosive kroglice in agregati (slika 23) ustrezajo liposomom. S te slike ne moremo razbrati, ali so liposomi multilamelarni ali unilamelarni, lahko pa ocenimo njihovo velikost, ki je od 50 do 200 nm. Pri barvanju s fosfovolframovo kislino nismo dobili lepo ločljivih slik pod transmisijskim elektronskim mikroskopom.

6 SKLEPI

Za pridobivanje biomase celic *A. pernix* je optimalen aerobni bioprocес z enkratnim polnjenjem v steklenici z mešanjem ob uporabi gojišča Marine Broth pri pH 7,0 in optimalno temperaturo gojenja 92 °C.

Za ločevanje lipidov izoliranih iz hipertermofilne arheje *A. pernix* s tankoplastno kromatografijo na Silikagelu 60, je najbolj ustreznna uporaba mešanice topil: kloroform/metanol/ocetna kislina/voda (85/22,5/10/4).

Najboljša ločljivost lipidov pri tankoplastni kromatografiji dosežemo, če vzorec nanašamo na TLC ploščo neposredno po izolaciji lipidov iz hipertermofilne arheje *A. pernix*. S starostjo vzorca je ločitev lipidov slabša.

Lise razvite na TLC plošči (slika 15A) dokazujojo, da se v arheji *A. pernix* nahajajo širje bolj polarni lipidi, med katerimi se eden pojavlja v zelo veliki količini, ostali trije pa v manjših količinah. Opazen je tudi en močno nepolaren lipid.

Liposomi pripravljeni iz lipidov hipertermofilne arheje *A. pernix* so termostabilni. Niti z dodatkom detergenta kot je NaDS (1,2 %; w/v) nismo dosegli prepuščanja kalceina.

Z uporabo transmisijskega elektronskega mikroskopa smo detektirali, da svetlosive kroglice in agregati ustrezajo liposomom. Njihova velikost je bila med 50 in 200 nm.

7 POVZETEK

Arheje (Archaea) predstavljajo eno najmanj raziskanih skupin mikroorganizmov. Največ ekstremofilnih organizmov najdemo prav v domeni arhej. Prilagojeni so na življenje v ekoloških nišah, kot so visoka temperatura, ekstremne vrednosti pH, visoke koncentracije soli in visoki tlaki.

Hipertermofili so definirani kot (mikro)organizmi, ki imajo optimalno temperaturo rasti nad 80 °C in ne rastejo pod 60 °C. Izolirali so jih iz geotermalno ogretih tal in voda. Večina hipertermofilnih arhej je anaerobna, *Aeropyrum pernix* pa je eden redkih striktnih aerobov.

Aeropyrum pernix K1 je prva nevtrofilna, striktno aerobna, hipertermofilna arheja. Optimalna temperatura za njeno rast je med 90 °C in 95 °C, optimalna pH vrednost okoli 7, slanost pa 3,5 %. Zaradi rasti arheje pri visoki temperaturi je *A. pernix* izredno težavna za gojenje.

V diplomskem delu smo za zagotovitev pridobitve biomase, ki smo jo uporabili za nadaljnje delo uporabili aerobni bioprocес z enkratnim polnjenjem v steklenici z mešanjem, ob uporabi gojišča Marine Broth 2216 z dodatkom natrijevega tiosulfata pri pH 7,0, ki se je izkazal za najbolj produktivnega. Temperatura gojenja je bila 92 °C. Cilj raziskovalnega dela je bila izolacija lipidov iz hipertermofilne arheje *A. pernix*, nato pa analiza izoliranih lipidov z metodo tankoplastne kromatografije. Ugotovili smo, da je pri nanašanju na TLC plošče potrebno uporabiti lipide takoj po izolaciji iz *A. pernix*, kajti samo po neposrednem nanosu je ločitev zadovoljiva. Sklepamo, da so lipidi *A. pernix* močno občutljivi. Rezultati dokazujo (slika 18), da je ustrezen sistem topil pri tankoplastni kromatografiji: kloroform/metanol/ocetna kislina/voda (85/22,5/10/4). Uporabili smo tudi klasične metode za ločevanje membranskih lipidov, vendar postopek ni bil primeren za ločevanje membranskih lipidov arhej.

Iz skupnih izoliranih lipidov smo pripravili liposome (arheosome), ki so nam omogočili proučevanje fizikalnih lastnosti le teh. Uporabili smo metodo presevne transmisjske mikroskopije in metodo fluorescenčne spektrometrije. Pod elektronskim mikroskopom so bile opazne kroglice, ki ustrezajo liposomom, njihova velikost je med 50 in 200 nm. Poskusi s fluorescenčno spektrometrijo so pokazali, da so liposomi pripravljeni iz lipidov *A. pernix* izredno obstojni, saj ne prepuščajo vgrajenega kalceina ob uporabi detergenta NaDS.

8 VIRI

- Baianu I.C., Lozano P.R., Prisecaru V.I., Lin H.C. 2004. Novel techniques and their applications to agricultural biotechnologl, health foods medical biotechnology. Southampton, University of Southampton, Cogprints: 2 str.
<http://www.cogprints.org/view/subjects/archives.html> (december 2005): 2 str.
- Bene J. 1999. Mikrobiološke metode dela in njihov pomen za razvoj. Seminarska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije: 8-9
www.bf.uni-lj.si/cgi-bin/slo/zt/bioteh/seminar_abstract/mikrobio/1998_99/MBH/Bene: 8 – 9 str.
- Bligh E.G., Dyer W.J. 1959. A rapidmethod of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, 37, 8: 911-917
- Bozzola J.J., Russell L.D. 1999. Electron microscopy. Boston. Jones & Bartlett Publishers: 101-102
- Bucik N., Bucik T. 2004. Čudežna dežela: Yellowstonski narodni park. Gea, 14, 11: 25-26
- Calcein. 2005. Powell (ZDA). GFS Chemicals, Inc.
<http://www.gfschemicals.com/chemicals/gfschem-222.asp> (november, 2005): 1 str.
- Choquet C.G., Patel G.B., Beverige T.J., Sprott G.D. 1992. Formation of unilamellar liposomes from total polar lipid extracts of methanogens. Applied and Environmental Microbiology, 58,9: 2894-2900
- Choquet C.G., Patel G.B., Sprott G.D. 1996. Heat sterilization of archaeal liposomes. Canadian Journal of Microbiology, 42, 2: 183-186
- Cowan D.A. 1992. Biotechnology of the Archaea. Trends in Biotechnology, 10: 315-322
- Fluorescenca. 2005. Maribor, Pedagoška fakulteta, Oddelek za fiziko, Laboratorij za biofiziko
http://fizika.uni-mb.si/biofizika/projekt/spektro_metode/fluoro.htm (oktober, 2005): 1 str.
- Gambacorta A., Gliozi A., de Rosa M. 1995. Archaeal lipids and their biotechnological applications. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 11: 115-131
- Herman B., Frohlich V., Lakowicz J.R., Murphy D.B., Spring K.R., Davidson M.W. Basic concepts in fluorescence. 2005. Melville, Olympus Microscopy Research Centre
<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorescenceintro.html> (julij 2005): 18 str.
- Kregar I. 1996. Kromatografske metode. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspored P. (ur.). Ljubljana, Bia: 609-632

- Kristl J., Šmid – Korbar J., Srčič S. 1992. Farmacevtska tehnologija. 1. del in praktikum. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 157-159
- Lakowicz J.R. 1999. Principles of fluorescence spectroscopy. 2nd ed. New York, Kluwer Academic Plenum Publishers: 4, 698
- Lasic D.D. 1993. Liposomes: from physics to application. Amsterdam, Elsevier Science Publishers B.V.: 9-19
- Madigan M., Martinko J., Parker J., 1997. Biology of microorganisms. 8th ed. New Jersey, Prentice-Hall, Inc.: 606-634, 741-768
- Mancuso C.A., Nichols P.D., White D.C. 1986. A method for the separation and characterization of archaebacterial signature ether lipids. Journal of Lipid Research, 27, 1: 49-56
- Marinko P. 1995. Načrtovanje, oblikovanje in vrednotenje liposomov za uporabo na koži. Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za naravoslovje in tehnologijo, Oddelek za farmacijo: 10-13
- Milek I. 2005. Termična inaktivacija in biokemična karakterizacija biološko aktivnih substanc hipertermofilne arheje *Aeropyrum pernix*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 2, 26, 69-70
- Mlekuž S. 1995. Teoretične osnove in uporabnost fluorescenčne spektroskopije v farmaciji. Farmacevtski vestnik, 46: 305-328
- Morii H., Yagi H., Akutsu H., Nomura N., Sako Y., Koga Y. 1999. A novel phosphoglycolipid archaetidyl(glucosyl)inositol with two sesterterpanyl chains from the aerobic hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1. Biochimica et Biophysica Acta, 1436: 426-436
- Nekrep F.V. 1996. Bakterije in arheje. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 15-49
- Nekrep F.V. 2004. Arheje. Domžale, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Inštitut za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo (21. januar 2004) <http://www.bfro.uni-lj.si/zoo/studij/dodipl/mikro/momik2002/predavanja.htm>(januar 2005): 9 str.
- New R.R.C. 1990. Liposomes. V: Liposomes: a practical approach. New R.R.C. (ed.). Oxford, New York, Tokyo, IRL Press: 1-32
- Ota A. 2003. Interakcija hemolitičnega proteina iz bukovega ostrigarja *Pleurotus ostreatus* z membranskimi lipidi. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 10-11

- Patel G.B., Sprott G.D. 1999. Archaeobacterial ether lipid liposomes (archaeosomes) as novel vaccine and drug delivery systems. Critical Reviews in Biotechnology, 19, 4: 317-357
- Pickering W.R. 1996. Biologija - shematski pregledi. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 6,12
- Reysenbach A. 2000. Archaea V: Encyclopedia of microbiology. 2nd ed. Vol 1. Lederberg J. (ed.). San Diego, Academic Press: 319-330
- Sako Y., Nomura N., Uchida A., Ishida Y., Morii H., Koga Y., Hoaki T., Maruyama T. 1996. *Aeropyrum pernix* gen. nov., sp. nov., a novel aerobic hyperthermophilic archaeon growing at temperatures up to 100 °C. International Journal of Systematic Bacteriology, 46, 4: 1070-1077
- Stetter K.O. 1996. Hyperthermophilic prokaryotes. FEMS Microbiology Reviews, 18: 149-158
- Stres B. 2001. Molekulsko odkrivanje in sledenje bakterij rodu *Pseudomonas* in podskupine *Pseudomonas stutzeri* v vzorcih iz okolja. Magistrsko delo. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 5-5
- Stušek P., Podobnik A., Gogala N. 1997. Celica. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 15-27
- Tejuca M., Dalla Serra M., Ferreras M., Lario M.E., Menestrina G. 1996. Mechanism of membrane permeabilization by sticholysin I, a cytolysin isolated from the venom of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*. Biochemistry, 35, 47: 14947-14957
- Veranič P., Pšeničnik M., Romih R., Sterle M., Kralj M. 2000. Osnove celične biologije z navodili za vaje. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 11-17, 24-28, 37-42