

2013•2014
FACULTEIT INDUSTRIËLE INGENIEURSWETENSCHAPPEN
master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterproef

Onderzoek naar het fycocyaninepigment van *Arthrospira* sp. PCC8005, een stralingsresistente cyanobacterie, geselecteerd als voedingssupplement voor ruimtemissies

Promotor :
ir. Myriam MEYERS

Promotor :
dr. ing. PAUL JANSSEN
dr. ir. NATALIE LEYS

Stijn Ramaekers

Proefschrift ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: biochemie

Gezamenlijke opleiding Universiteit Hasselt en KU Leuven

2013•2014

Faculteit Industriële

ingenieurswetenschappen

master in de industriële wetenschappen: biochemie

Masterproef

Onderzoek naar het fycocyaninepigment van *Arthrospira* sp. PCC8005, een stralingsresistente cyanobacterie, geselecteerd als voedingssupplement voor ruimtemissies

Promotor :
ir. Myriam MEYERS

Promotor :
dr. ing. PAUL JANSSEN
dr. ir. NATALIE LEYS

Stijn Ramaekers

Proefschrift ingediend tot het behalen van de graad van master in de industriële wetenschappen: biochemie

Woord vooraf

In het kader van mijn afstudeerrichting Master in de Industriële Wetenschappen Biochemie heb ik de kans gekregen om mijn masterproef uit te voeren in het Studiecentrum voor Kernenergie (SCK•CEN) te Mol. Deze masterproef kon enkel succesvol worden afgerond door een goede samenwerking en steun van een aantal personen. Daarom wil ik graag van deze gelegenheid gebruik maken om hen te bedanken.

Allereerst wil ik mijn externe promotoren, dr. ir. Natalie Leys en dr. ing. Paul Janssen, bedanken om mij de kans te bieden mijn masterproef in de Onderzoekseenheid Microbiologie van het SCK•CEN uit te voeren. Bovendien kon ik steeds bij hen terecht voor hun deskundig advies.

Verder dank ik mijn interne promotor, ir. Myriam Meyers, die veel tijd en toewijding spendeerde aan mijn masterproef.

Speciale dank gaat uit aan Wietse Heylen, laborant in de Onderzoekseenheid Microbiologie. Hij heeft mij gedurende mijn onderzoek bijgestaan in de hele procedure. Hij stond altijd klaar om mijn praktische vaardigheden te verbeteren en om mijn theoretische inzichten bij te schaven.

Ook wil ik alle andere laboranten, (post)doctoraatstudenten en andere stagiair(e)s van de Onderzoekseenheid Microbiologie bedanken. Zij stonden steeds paraat en ik kon altijd terecht bij hen als ik vragen had.

Tot slot wil ik graag de mensen bedanken die een belangrijke plaats hebben in mijn leven. Mijn ouders, die mij de kans hebben gegeven om een hoger diploma te behalen, voor hun steun en bekommernis. Mijn vriendin, die met haar geduld en aanmoedigingen er telkens in slaagde mij extra te motiveren.

Inhoudsopgave

Woord vooraf	3
Tabellenlijst	9
Figurenlijst	11
Abstract	13
Abstract (English) / Summary	15
Inleiding	17
1. Situering	17
2. Onderzoeksvraag	18
3. Doelstellingen	19
4. Materiaal en methode	20
4.1. Kweek van bacteriën	20
4.1.1. <i>Arthrospira</i> sp. PCC8005	20
4.1.2. <i>Escherichia coli</i>	20
4.2. Pigmentextractie en kwantificatie	20
4.3. Antioxidant assay.....	21
4.4. Bio-informatica	21
4.5. Clonering en heterologe expressie	21
Literatuurstudie	23
1. Arthrospira	23
1.1. Geschiedenis en ontdekking.....	23
1.2. Taxonomie	24
1.3. Morfologie.....	24
1.2.1. Ultrastructuur.....	26
1.4. Voorkomen en groei	27
1.4.1. Koolstofbron	27
1.4.2. pH en zout	27
1.4.3. Temperatuur	28
1.4.4. Licht	29

1.5.	Toepassingen.....	29
1.5.1.	Zuurstof- en voedselproductie in de ruimte -MELiSSA.....	29
1.5.2.	Voeding.....	31
1.5.3.	Gezondheid.....	32
2.	Fycocyanine	33
2.1.	Introductie.....	33
2.2.	Structuur en opbouw	33
2.3.	Biosynthese van c-fycocyanine	35
2.4.	Antioxidant.....	37
2.4.1.	Introductie	37
2.4.2.	Wat is een antioxidant?	37
2.4.3.	C-fycocyanine als antioxidant.....	37
	Materiaal & methode.....	39
1.	Kweek van <i>Arthrospira</i> sp. PCC8005	39
1.1.	Bereiding van het vloeibaar Zarroukmedium.....	39
1.2.	Inoculatie van <i>Arthrospira</i> sp. PCC8005.....	41
1.3.	Opvolging groei <i>Arthrospira</i> sp. PCC8005.....	41
1.3.1.	OD-meting	42
1.3.2.	Bepaling relatie tussen OD ₇₅₀ en celconcentratie in g.L ⁻¹	42
1.3.3.	pH-meting.....	43
1.4.	Pigmentextractie.....	44
2.	Clonering <i>cpcA</i>-gen en heterologe expressie in <i>E. coli</i>.....	47
2.1.	Primerontwerp en PCR amplificatie.....	47
2.1.1.	Primerontwerp	47
2.1.2.	PCR-amplificatie	47
2.1.3.	Gelelektroforese	48
2.1.4.	PCR clean-up	49
2.1.5.	Concentratiebepaling	50
2.2.	Constructie van expressievector	50
2.2.1.	pETDuet-1vector in <i>E. coli</i> DG1 via chemische transformatie.....	51
2.2.2.	Selectie van <i>E. coli</i> DG1-cloen die petDuet-1 bevat.....	51
2.2.3.	Cultivatie <i>E. coli</i> DG1-cloen met pETDuet-1 vector	52
2.2.4.	Extractie van pETDuet-1 vector uit <i>E. coli</i> DG1-cultuur.....	52

2.2.5.	Concentratie bepalen van pETDuet-1 vector	53
2.3.	Constructie van CpcA-expressievector	53
2.3.1.	Restrictie van vector en amplicon.....	53
2.3.2.	Ligatie van het amplicon in de vector	55
2.4.	Transformatie van de pETDuet-cpcA in <i>E. coli</i> BL21-cellen	56
2.4.1.	Selectie van <i>E. coli</i> BL21-cloen die construct bevat.....	56
3.	Heterologe expressie van CpcA-eiwit in <i>E. coli</i> BL21-cellen en eiwitextractie.....	59
3.1.	Inductie met IPTG.....	60
3.2.	Eiwitextractie	60
3.2.1.	Extractie.....	60
3.2.2.	Totale concentratiebepaling.....	61
3.2.3.	Scheiding van de eiwitten.....	62
4.	Antioxidanttest.....	65
4.1.	Principe	65
4.2.	Protocol.....	66
5.	UV-experiment.....	67
5.1.	Stalen.....	67
5.2.	Protocol.....	67
	Resultaten	69
1.	Vergelijkende genomanalyse betreffende het <i>cpc</i>-operon	69
2.	Effect van zoutconcentratie op de groei en fycocyanineproductie van <i>Arthrospira. sp.</i> PCC8005	71
2.1.	OD ₇₅₀ - en pH-meting.....	71
2.2.	Biomassaconcentratie en specifieke groeisnelheid (μ)	74
2.2.1.	Biomassaconcentratie uitgedrukt in OD ₇₅₀	74
2.2.2.	Biomassaconcentratie uitgedrukt in g.L ⁻¹ per dag.....	75
2.2.3.	Specifieke groeisnelheid (μ)	76
2.3.	Pigmentextractie en fycocyanineconcentratie	79
3.	Cloning <i>cpcA</i>-gen in <i>E. coli</i>.....	81
3.1.	Productie van het <i>cpcA</i> -gen	81
3.1.1.	Gelelektroforese	81

3.1.2.	Concentratie <i>cpcA</i> -amplicon.....	81
3.2.	Productie van de pETDuet-1 vector.....	82
3.3.	Restrictie en ligatie van <i>cpcA</i> -amplicon en pETDuet-1 vector.....	82
3.3.1.	Gelelektroforese na restrictie met <i>Bam</i> HI.....	82
3.3.2.	Gelelektroforese na restrictie met <i>Pst</i> I.....	83
3.3.3.	Concentratie geknipt <i>cpcA</i> -gen en pETDuet-1 vector.....	84
3.4.	Introductie van pETDuet- <i>cpcA</i> in <i>E. coli</i> BL21.....	84
3.4.1.	Sequencing.....	85
4.	Heterologe expressie van CpcA in <i>E. coli</i> en eiwitextractie	87
4.1.	Eiwitconcentratiebepaling.....	87
4.2.	Eiwitelektroforese.....	87
5.	Antioxidatieve testen	91
5.1.	Antioxidantassay.....	91
6.	UV-experiment.....	93
	Besluit.....	97
1.	Discussie	97
2.	Toekomstperspectieven.....	99
	Bibliografie	101
	Bijlagen	105
	Bijlage 1.....	105
	Bijlage 2.....	107
	Bijlage 3.....	108

Tabellenlijst

Tabel 1: Specifieke groeisnelheden (μ) en generatietijden van <i>Arthrospira</i> stammen onder verhoogde NaCl-concentraties bij 35°C [2].....	28
Tabel 2: Eiwitgehalte(in %) in <i>Arthrospira</i> vergeleken met andere voedingsmiddelen..	31
Tabel 3: Genen en enzymen betrokken bij de biosynthese van CpcA.....	36
Tabel 4: Samenstelling oplossing 1 voor het vloeibaar Zarrouk-UBP medium.	39
Tabel 5: Samenstelling oplossing 2 voor het vloeibaar Zarrouk-UBP medium.	40
Tabel 6: Samenstelling sporenelementen voor het vloeibaar Zarrouk-UBP medium.....	40
Tabel 7: Protocol <i>Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific)</i>	48
Tabel 8: Gemiddelde OD ₇₅₀ van <i>Arthrospira</i> sp. PCC8005 voor elke NaCl-concentratie met standaarddeviatie.....	71
Tabel 9: 95%-betrouwbaarheidsintervallen van de 3 verschillende NaCl-concentraties	73
Tabel 10: Gemiddelde pH van <i>Arthrospira</i> sp. PCC8005 voor elke NaCl-concentratie met standaarddeviatie.....	73
Tabel 11: Gemiddelde biomassaconcentratie van <i>Arthrospira</i> sp. PCC8005 (n=4) uitgedrukt in OD ₇₅₀ voor elke NaCl-concentratie.....	75
Tabel 12: Maximale gemiddelde biomassaconcentratie van <i>Arthrospira</i> sp. PCC8005 uitgedrukt in g.L ⁻¹	76
Tabel 13: Gemiddelde specifieke groeisnelheid (μ) van <i>Arthrospira</i> sp. PCC8005 (n=4) uitgedrukt in OD ₇₅₀ per dag	77
Tabel 14: Maximale specifieke groeisnelheid ($\mu_{\max}$) in g.L ⁻¹ per dag en bijbehorende generatietijd (g) per dag	78
Tabel 15: Gemiddelde % c-FC per cel <i>Arthrospira</i> sp. PCC8005 uitgaande van de concentratie aan c-FC bij de verschillende NaCl-concentraties met bijbehorende standaarddeviaties.....	79
Tabel 16: T-test tussen de verschillende NaCl-concentraties.....	79
Tabel 17: Eiwitconcentratie van het totaal eiwitextract na eiwitextractie.....	87
Tabel 18: Scavenging percentage (%) van het totaal eiwitextract van de geïnduceerde BL21-cellen	91
Tabel 19: Scavenging percentage (%) van het totaal eiwitextract van de niet-geïnduceerde BL21-cellen.....	91
Tabel 20: Ratio CFU – 0/CFU – x van, met IPTG, geïnduceerde en niet-geïnduceerde <i>E. coli</i> BL21-cellen die het petDUet-cpcA plasmide bezitten met bijbehorende T-test (tussen IPTG + en IPTG -).....	93
Tabel 21: Ratio CFU – 0/CFU – x van, met IPTG, geïnduceerde en niet-geïnduceerde <i>E. coli</i> BL21-cellen die het petDUet-cpcA plasmide bezitten met bijbehorende T-test (tussen IPTG + en IPTG -).....	95

Figurenlijst

Figuur 1: Verzamelen en drogen van <i>Arthrospira</i> door vrouwen van de Kanembustam	23
Figuur 2: Weergave van een helixstructuur met de straal (r) en de helix pitch (h).....	24
Figuur 3: [A] Morfologisch uitzicht van <i>Arthrospira</i> sp. PCC8005 p1	
[B] SEM van <i>Arthrospira platensis</i>	25
Figuur 4: "Levenscyclus" van <i>Arthrospira</i> [1].....	26
Figuur 5: [A] SEM van <i>Arthrospira platensis</i> in dwarsdoorsnede	
[B] SEM van <i>Arthrospira platensis</i> in overlangse doorsnede.....	26
Figuur 6: Groeicurve van <i>Arthrospira platensis</i> onder verhoogde NaCl-concentraties. ...	28
Figuur 7: Absorptiespectrum van onder andere chlorofyl <i>a</i> en fycocyanine.....	29
Figuur 8: Het MELiSSA systeem [10].	30
Figuur 9: <i>Arthrospira</i> in tablet-, capsule- en poedervorm.....	31
Figuur 10: [A] Schematische structuur van een fycobilisoom (FBS).....	34
Figuur 11: Chemische structuur van fycocyanine m	35
Figuur 12: Biosynthese van holo- α -subunit van c-fycocyanine [25].....	36
Figuur 13: Het carbonaatevenwicht.....	43
Figuur 14: NanoDrop 2000 spectrophotometer	50
Figuur 15: pETDuet-1 vector	51
Figuur 16: pETDuet-cpcA (pETDuet-1 vector + <i>cpcA</i> -gen)	56
Figuur 17: Eiwitexpressie na IPTG-inductie	59
Figuur 18 Direct™ Detect Assay-free Card.....	61
Figuur 19: Direct Detect System	61
Figuur 20: Amersham™ ECL™ Gel Box van GE Healthcare Life Sciences	62
Figuur 21: MultiBlastanalyse van cyanobacteriële genomen.	69
Figuur 22: Invloed van verschillende zoutconcentraties op de groei van <i>Arthrospira</i> sp.	
PCC8005	72
Figuur 23: Invloed van verschillende NaCl-concentraties op de groei en bijbehorende	
pH van <i>Arthrospira</i> sp. PCC8005	74
Figuur 24: Drooggewicht van elk replicaat <i>Arthrospira</i> sp. PCC8005 (n=4) in functie	
van de OD ₇₅₀ van <i>Arthrospira</i> sp. PCC8005 voor elke NaCl-concentratie.	75
Figuur 25: Gemiddelde specifieke groeisnelheid van <i>Arthrospira</i> sp. PCC8005 (n=4) in	
verschillende NaCl-concentraties.....	77
Figuur 26: Invloed van verschillende NaCl-concentraties op de fycocyanineproductie..	80
Figuur 27: Gelelektroforese van <i>cpcA</i> -gen na PCR	81
Figuur 28: Gelelektroforese van het <i>cpcA</i> -amplicon (2) en de pETDuet-1 vector (3) na	
restrictie met BamHI en met pETDuet-1 vector zonder restrictie als	
controle (4).....	82
Figuur 29: Gelelektroforese van het <i>cpcA</i> -amplicon (2) en de pETDuet-1 vector (3) na	
restrictie met PstI en met pETDuet-1 vector zonder restrictie als controle	
(4).....	83

Figuur 30: Gelelektroforese na kolonie-PCR van BL21-cellen met daarin het genconstruct en pETDuetcpcA*	84
Figuur 31: Gekleurde eiwitelektroforesegel	88
Figuur 32: Hydroxyl radicaal scavenging activiteit van totaal eiwitextract.....	92
Figuur 33: Invloed van UV-dosis op de overleving van, met IPTG, geïnduceerde <i>E. coli</i> BL21-cellen met pETDuet-cpcA t.o.v. niet-geïnduceerde.....	94
Figuur 34: Invloed van UV-dosis op de overleving van, met IPTG, geïnduceerde <i>E. coli</i> BL21-cellen met pETDuet-cpcA* t.o.v. niet-geïnduceerde (= positieve controle)	95

Abstract

Met het oog op lange ruimtemissies heeft het SCK•CEN samen met partners een regeneratieve bioreactor ontwikkeld, MELiSSA genaamd. In het 4^{de} compartiment hiervan wordt de cyanobacterie *Arthrospira* sp. PCC8005 gebruikt voor de productie van O₂ en eetbare biomassa uit afval. Één van de pigmenten geproduceerd door *Arthrospira* is c-fycocyanine (c-FC) dat een antioxidatieve werking vertoont en daardoor verantwoordelijk geacht wordt voor de stralingsbescherming noodzakelijk in de ruimte. Of c-FC van *Arthrospira* sp. PCC8005 daadwerkelijk deze eigenschappen heeft, en of dit pigment ook voldoende kan worden geproduceerd in de biomassa moet nog bewezen worden.

Deze masterproef beoogde de biosynthese van c-FC van verder te karakteriseren wat betreft antioxidantactiviteiten. Er werd nagegaan of de voorloper (apo-fycocyanine) ook een aandeel heeft in de antioxidatieve eigenschappen van *Arthrospira* sp. PCC8005.

Om de biosynthese van c-FC te karakteriseren wordt gebruik gemaakt van bio-informatica en recombinante technieken. Er blijken 7 genen verantwoordelijk te zijn voor de biosynthese van c-FC. Als eerst werd apo-fycocyanine succesvol heteroloog tot expressie gebracht in *E. coli*. Het UV-experiment toont aan dat *E. coli* mét het CpcA-eiwit een hogere *survival* heeft dan *E. coli* zonder CpcA-eiwit. Tot slot werd de antioxidantactiviteit ervan geanalyseerd. Daarvoor werd een gestandaardiseerde antioxidantassay op punt gesteld en geïmplementeerd. De experimentele resultaten indiceren dat het CpcA-eiwit antioxidantactiviteit heeft.

Abstract (English) / Summary

In view of long-haul space missions a bioregenerative life support system, MELiSSA, is under development by SCK•CEN and collaborating partners (e.g. the European Space Agency, ESA). In the 4th compartment of this bioreactor, the cyanobacterium *Arthrospira* sp. PCC 8005 is used for the generation of oxygen and edible biomass from waste. One of the pigments produced by *Arthrospira* is c-phyococyanine (c-PC) acting as an antioxidant. Hence its consumption is seen as beneficial for the protection of space crew against ionizing radiation. It still needs to be proved that c-PC of *Arthrospira* sp. PCC8005 actually has these antioxidant properties, and on the other hand if this pigment can be enough produced in the biomass of *Arthrospira* sp. PCC8005.

This Master's Thesis aims to characterize the biosynthesis of c-PC from *Arthrospira* sp. PCC8005 as to better understand its antioxidant activities. Of particular interest is to know to what extent the precursor apo-phyococyanine contributes to this activity of *Arthrospira* sp. PCC8005.

To characterize c-PC biosynthesis, bioinformatic and DNA-recombinant methods were used. Apparently, seven genes are involved in c-PC biosynthesis, one of which (*cpcA*, encoding apo-phyococyanine) was successfully introduced in *Escherichia coli* by PCR and molecular cloning. The UV-experiment showed that *E. coli* which contained the CpcA-protein had a higher survival rate compared to *E. coli* without the CpcA-protein. In the end the antioxidant activity of the CpcA-protein was analyzed. For this reason a standardized antioxidant assay was designed and implemented. Experimental results indicated that the CpcA-protein has an antioxidant activity.

Inleiding

1. Situering

Als masterstudent Industrieel Ingenieur biochemie aan de Universiteit Hasselt vormt de masterproef het sluitstuk van de opleiding. Deze masterproef vond plaats in de Onderzoekseenheid “Microbiologie” (MIC) van het Studiecentrum voor Kernenergie (SCK•CEN) te Mol, waar de eetbare cyanobacterie *Arthrospira* wordt onderzocht. Dit organisme, dat als voedingssupplement wordt gebruikt voor langdurige ruimtemissies, is een spiraalvormige, meercellige prokaryoot die aan zuurstofvormende fotosynthese kan doen dankzij de aanwezigheid van verschillende lichtabsorberende pigmenten. De opdracht bestond uit het onderzoeken van het fycocyaninepigment afkomstig van *Arthrospira* sp. PCC8005.

Met het oog op langdurige ruimtemissies heeft het Europees Ruimte Agentschap (ESA) samen met verschillende universiteiten en onafhankelijke organisaties, waaronder het SCK•CEN, een gesloten, bio-regeneratieve bioreactor ontwikkeld. Het zogenaamde MELiSSA (Micro-Ecological Life Support System Alternative) systeem voorziet de bemanning van zuurstof, water en voedsel door recyclage van grondstoffen uit afval. Het systeem bestaat uit vier onderdelen (compartimenten). *Arthrospira* is in het 4^{de} compartiment van het MELiSSA-systeem gesitueerd waar het samen met planten groeit op ,uit afval herwonnen, nutriënten en verantwoordelijk is voor de generatie van O₂ en eetbare biomassa.

De ruimte is gevuld met verschillende types straling. Deze kosmische straling veroorzaakt in blootgestelde organismen de aanmaak van radicalen. Omdat levende cellen grotendeels uit water bestaan worden zuurstof radicalen (hoofdzakelijk O₂• en OH•) gevormd. Dergelijke “Reactive Oxygen Species” (ROS) beschadigen weefsels en celstructuren door moleculen aanwezig in de cellen te oxideren.

In de afdeling Moleculaire en Cellulaire Biologie, waarvan de Onderzoekseenheid Microbiologie (MIC) deel uitmaakt, wordt onderzocht wat precies de effecten zijn van straling op cellulair niveau. Om de effecten van kosmische straling op *Arthrospira* na te gaan, werd in het MIC-labo *Arthrospira* sp. PCC8005 blootgesteld aan verschillende dosissen γ -straling. Hieruit is gebleken dat deze cyanobacterie uitzonderlijk goed bestand is tegen hoge dosissen γ -straling.

Een van de pigmenten geproduceerd door *Arthrospira* is c-fycocyanine. C-fycocyanine is onder andere gekend om zijn antioxidatieve werking. C-fycocyanine neutraliseert namelijk ROS waardoor de celstructuren behouden blijven.

2. Onderzoeksvraag

Eén van de pigmenten geproduceerd door cyanobacteria zoals *Arthrospira*, is c-fycocyanine (c-FC) dat een antioxidatieve werking vertoont en daardoor nuttig geacht wordt als 'voedingssupplement' voor de bescherming van de mens tegen de schadelijke effecten van ioniserende straling in de ruimte. Of de c-fycocyanine van de MELiSSA bacterie *Arthrospira* sp. PCC8005 daadwerkelijk ook deze eigenschappen heeft, en of dit pigment ook voldoende kan worden aangemaakt in de biomassa tijdens kweek in MELiSSA- en ruimte-condities moet nog wetenschappelijk bewezen worden.

De natuurlijke habitat van *Arthrospira* is een carbonaatrijk meer, dus water met een hoge alkaliniteit tot pH 11. De cyanobacterie tolereert daarnaast ook hoge saliniteit en kan groeien in zoutconcentraties tot 0,7M NaCl (bv. zeewater). Men heeft in het verleden vastgesteld dat een verhoogde zoutconcentratie mede bijdraagt tot een verhoogde pigmentproductie, waaronder c-fycocyanine, in bepaalde cyanobacteriestammen. In het MIC-labo is de invloed van verhoogde zoutconcentraties op de fotosynthetische groei, en de c-fycocyanineconcentratie, van *Arthrospira* sp. stam PCC8005 echter nog niet onderzocht. Daarom werd dit getest in deze thesis.

Verschillende enzymen zijn nodig voor de biosynthese van c-fycocyanine. Eerst en vooral moest voor *Arthrospira* sp. PCC8005 uitgezocht worden welke substraten, enzymen en genen verantwoordelijk zijn voor de vorming van apo-fycocyanine en het finale (holo-) c-fycocyanine. Ook moest worden nagegaan hoe de genen van *Arthrospira* sp. PCC8005 zijn opgebouwd, die coderen voor deze enzymen, zodat een idee wordt verkregen omtrent hun regulatie. Verder werd bekeken in hoeverre de regio's van deze genen van *Arthrospira* sp. PCC8005 overeenkomen met deze van andere cyanobacteriën (vb. *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Nostoc*, etc.).

Het is beschreven in de literatuur dat c-fycocyanine een goede antioxidatieve werking heeft. Het is daarbij de vraag of de voorloper (apo-fycocyanine) ook een aandeel heeft in de antioxidatieve eigenschappen van *Arthrospira* sp. PCC8005. Hiervoor werd het *cpcA*-gen, dat specifiek codeert voor het apo-fycocyanine, heteroloog tot expressie gebracht in *E. coli*. Het voordeel hiervan is dat men de specifieke eigenschappen van het gecloneerde apo-fycocyanine kon onderzoeken, met inbegrip van de antioxidantactiviteit.

MIC beschikte niet over een gestandaardiseerde antioxidantassay. Deze moest dus nog ontwikkeld worden. Het is immers van belang om te weten met welke efficiëntie de pigmenten van *Arthrospira* sp. PCC8005, waaronder c-fycocyanine in staat zijn hydroxylradicalen (en andere ROS) te neutraliseren.

3. Doelstellingen

De algemene doelstelling van deze masterproef is de bijdrage aan een verdere karakterisering van het c-fycocyaninepigment van *Arthrospira* sp. PCC8005 en een onderzoek naar de rol van dit pigment inzake de stralingsbestendigheid van deze cyanobacterie zelf en zijn potentieel als voedingssupplement voor stralingsbescherming van de mens.

Een eerste doelstelling is het verder karakteriseren van de biosynthese van c-fycocyanine in *Arthrospira* sp. PCC8005. Er moet met behulp van bio-informatica gezocht worden naar de enzymen, genen en substraten die verantwoordelijk zijn voor de vorming van c-fycocyanine. De verschillende genen en enzymen die betrokken zijn bij het fycocyanine-biosynthese-reactiepad ('pathway') van de stam *Arthrospira* sp. PCC8005 moeten worden geïdentificeerd. Aansluitend wordt een beschrijving gegeven van de ligging van deze genen in het genoom van *Arthrospira* sp. PCC8005. Nadien kan er vergeleken worden met andere cyanobacteriën (vb. *Synechocystis*, *Synechococcus*, *Nostoc*, etc.) hoe de genen, die coderen voor de verschillende enzymen nodig voor de biosynthese van c-fycocyanine, georganiseerd zijn en onderling overeenkomen.

Het verkrijgen van heterologe expressie van de bovengenoemde pathway in *E. coli* is een tweede doelstelling. Dit wordt gedaan door, als een eerste stap, het gen van *cpcA* (één van de 4 subeenheden van fycocyanine) recombinant in te bouwen in *E. coli*. Omdat enkel het *cpcA*-gen wordt ingebouwd, zal in dit eerste construct niet het eigenlijke holo c-fycocyanine gevormd worden maar wel zijn voorloper, namelijk het apo-fycocyanine. Als heterologe expressie in *E. coli* wordt verkregen, kan daarna de antioxidantactiviteit bepaald worden van het apo-fycocyanine. De bekomen resultaten geven weer of de voorloper van het c-fycocyanine al dan niet zelf een antioxidatieve werking heeft.

Een volgende doelstelling is om een eenvoudige, maar effectieve antioxidantassay te ontwikkelen. In het labo is er momenteel nog geen gestandaardiseerde antioxidantassay geïmplementeerd. Het is van belang om in de beschikbare wetenschappelijke literatuur een kwalitatief goede antioxidantassay te vinden. Eens een bruikbare assay is gevonden, kan de antioxidantcapaciteit van het expressieconstruct worden bepaald.

De laatste doelstelling is het nagaan wat het effect is van verschillende concentraties NaCl op de groei en het gehalte aan pigmenten, waaronder c-fycocyanine, van *Arthrospira* sp. PCC8005.

4. Materiaal en methode

4.1. Kweek van bacteriën

4.1.1. *Arthrospira* sp. PCC8005

Er werden 4 onafhankelijke culturen van *Arthrospira* sp. PCC8005 gestart (4 replicaten, n=4) in Zarrouk-UBP groei medium. Om de invloed van de verhoogde zoutconcentraties na te gaan, werd aan het medium verschillende zoutconcentraties toegevoegd, van respectievelijk 1g.L^{-1} , 5g.L^{-1} en 10g.L^{-1} NaCl. Groeicurves werden gemaakt door elke werkdag de optische densiteit bij een golflengte van 750 nm en pH te meten, met een spectrofotometer en met een pH-meter.

Zo kon men nagaan in welke groeifase *Arthrospira* sp. PCC8005 een hoog gehalte aan pigmenten vertoonde. Om dit te achterhalen werd bij elke staalname voor pigmentextractie de fluorescentie gemeten bij 615 en 652 nm. Dit zijn de golflengtes waarbij respectievelijk c-fycocyanine en allofycocyanine het licht maximaal absorbeert. Uitgaande van de fluorescentie bij deze twee golflengtes, werd de concentratie aan c-fycocyanine berekend.

4.1.2. *Escherichia coli*

Voor de transformatie van de pETDuet-1 vector werden competente DG1-*E. coli* cellen gebruikt. De getransformeerde DG1-cellen werden opgekweekt in vloeibaar LB-medium met daarin ampicilline met een eindconcentratie van 100 mg.mL^{-1} .

Om het *cpcA*-gen tot expressie te kunnen brengen, werd het construct (pETDuet-1 + *cpcA*-gen) een tweede maal getransformeerd, nu in competente BL21-*E. coli* cellen. Deze BL21-cellen kunnen geïnduceerd worden met IPTG, daar DG-1 cellen dit niet kunnen. Ook de BL21-cellen werden opgekweekt in vloeibaar LB-medium met daarin ampicilline met een eindconcentratie van 100 mg.mL^{-1} .

4.2. Pigmentextractie en kwantificatie

De pigmentconcentratie van culturen van *Arthrospira* sp. PCC8005 werd bepaald op 3 verschillende tijdstippen. Zo kan er gekeken worden in welke fase van het groeiproces van *Arthrospira* sp. PCC8005 een hoog gehalte aan pigmenten aanwezig is. Er vond eerst een pigmentextractie plaats om daarna spectrofotometrisch de optische densiteit te meten bij 615 en 652 nm. Dit zijn de golflengtes waarbij respectievelijk c-fycocyanine en allofycocyanine het licht maximaal absorbeert. Uitgaande van deze waarden bij deze twee golflengtes, werd de concentratie aan c-fycocyanine berekend.

4.3. Antioxidant assay

In de literatuur werd gezocht naar bruikbare antioxidantassays. Het is daarbij van belang om de voor- en nadelen voor MIC tegen elkaar af te wegen. Antioxidantassays waar veel verschillende reagentia voor nodig zijn, of waar een specifiek (meestal prijzig) toestel noodzakelijk is voor de bepaling, werden geweerd. Na selectie van een gepaste assay (m.i.v. samenspraak) kon deze uitgetest worden zoals hieronder beschreven.

Eenmaal de gekozen antioxidantassay op punt was gesteld, kon hiermee de antioxidantactiviteit gemeten worden van het apo-fycocyanine verkregen via heterologe expressie in *E. coli*.

4.4. Bio-informatica

Het gebruik van GenBank en geassocieerde databanken en softwareprogramma's was cruciaal om enkele doelstellingen tot een goed einde te brengen. Ten eerste werden de enzymen, genen en substraten die verantwoordelijk zijn voor de vorming van c-fycocyanine opgezocht worden in het genoom van *Arthrospira* sp. PCC8005. Verder werd bio-informatica ook gebruikt om te bekijken in welke mate deze genen van *Arthrospira* sp. PCC8005 overeenkomen met deze van andere cyanobacteriën. Voor het ontwerp van de PCR-primers en analyse van de *cpcA* DNA-sequentie werd gebruik gemaakt van de ArthroScope databank welke deel uitmaakt van het Microbial Genome Annotation & Analysis (MaGe) platform. Voor vergelijkende genoomanalyse werd MultiGeneBLAST-software gebruikt.

4.5. Clonering en heterologe expressie

Om de heterologe expressie te verkrijgen van apo-fycocyanine werd het *cpcA*-gen van *Arthrospira* sp. PCC8005 gecloneerd in *E. coli*. Daarvoor werden *cpcA*-specifieke primers ontwikkeld voor de amplificatie van het betreffende gen. Deze primers bevatten DNA-restrictiesites voor de optimale clonering in de plasmidevector. Het amplicon werd hierna gezuiverd en via restrictie-digestie en ligase ingebouwd in de gezuiverde petDuet-1 vector, geopend ("linearised") met de corresponderende restrictie-enzymes. De volgende stap omvatte het inbrengen van het recombinant plasmide in *E. coli* via elektroporatie of chemische transformatie. Eens de genconstructie was ingebracht, werd *E. coli* uitgeplaat voor selectie en reïncultuur. Vervolgens werd van enkele kolonies DNA bereid en het bekomen recombinant DNA werd geverifieerd door PCR of door restrictieanalyse. Na verificatie werd van een geselecteerde recombinante kolonie een cultuur opgegroeid voor eiwitextractie en verdere analyses.

Literatuurstudie

1. Arthrospira

1.1. Geschiedenis en ontdekking

In 1940, publiceerde de Franse phycoloog Dangeard een rapport over de consumptie van een blauwgroene “cake” door de lokale bevolking nabij het Tsjaadmeer, dat zich uitspreid over de Afrikaanse landen Tsjaad, Kameroen, Niger en Nigeria. Na dit rapport werden geen verdere vaststellingen genoteerd omtrent dit gebruik. Tot in 1964 botanist Jean Léonard een blauwgroene cake beschreef die verkocht werd op lokale markten in en rond het toenmalige Fort Lamy, Tsjaad. Verdere studies toonden aan dat deze eetbare cake, “Dihé” genoemd door de lokale bevolking, blauwgroene “algen” bevat die in die tijd geïdentificeerd werden als *Spirulina*. Later bleek dat deze blauw-groene “algen” geen echte algen zijn gesitueerd moeten worden binnen de groep van prokaryoten (m.n. cyanobacteriën) en in feite een afzonderlijk genus vormen, *Arthrospira* (zie verder). Deze cyanobacteriën worden geoogst uit het water met behulp van kleien potten, waarna het water eruitwordt geperst en de overblijvende massa wordt uitgespreid over het strand om ze te laten drogen (Fig. 1). Hierna wordt de half gedroogde substantie in kleinere stukken gesneden en vervoerd naar de stad waar het droogproces op matten voortgezet wordt. Eens droog, worden deze cakes verkocht op de lokale markt als dihé [1] [2] [3].



Figuur 1: Verzamelen en drogen van *Arthrospira* door vrouwen van de Kanembustam (Bron: www.spirulinaresource.com).

Rond dezelfde tijd dat Léonard *Spirulina/Arthrospira* herontdekte in Afrika, ontving het “Institut Français du Pétrole” een aanvraag van een bedrijf genaamd Sosa-Textcoco Ltd. Dit bedrijf wilde onderzoek doen naar algen die groeiden in het meer gelegen langs hun natriumbicarbonaatfabriek. De resultaten leidden tot een gedetailleerde en systematische studie over de benodigde groeiomstandigheden en fysiologie van *Spirulina/Arthrospira* [1] [2] [3].

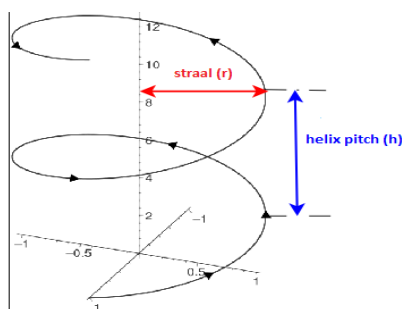
1.2. Taxonomie

De naamgeving en bepaling van de taxonomische positie van *Arthrospira* in de groep van cyanobacteriën is doorheen de geschiedenis moeilijk gebleken. Het genus *Spirulina* werd gevestigd in 1827 door P.J. Turpin voor *Spirulina oscillarioides* die hij isoleerde uit vers water [1] [3]. Turpin vermeldde echter de aanwezigheid van septa in zijn isolaat niet. In 1852 benoemde Stizenberger het genus *Arthrospira*, gebaseerd op de aanwezigheid van duidelijk zichtbare septa in spiraalvormige cyanobacteriën. Tussen deze twee genera werd er in 1892, door Gomont, ook een onderscheid gemaakt tussen de langere en kortere spiralen. In het genus *Arthrospira* groepeerde hij de langere spiralen met zichtbare septa zoals bijvoorbeeld *A. platensis*. Onder het genus *Spirulina* werden de kleinere vormen geklasseerd waarin geen septa zichtbaar waren. Op basis hiervan werden cyanobacteriën die bij het genus *Spirulina* hoorden, gezien als unicellulaire trichomen. In 1950 herzag Geitler de classificatie door de twee genera onder één noemer te brengen, namelijk *Spirulina*. Hij splitste het genus op in 2 subklassen. Subklasse I, *Arthrospira*, voor de grotere vormen met de aanwezigheid van zichtbare septa en subklasse II, *Euspirulina*, voor de kleinere exemplaren met onzichtbare septa. In 1989 werden deze micro-organismen opnieuw afzonderlijk geklasseerd in de genera *Arthrospira* en *Spirulina*. Deze classificatie wordt tot op heden gebruikt [1] [3].

Wereldwijd wordt de naam “Spirulina” veel gebruikt in commerciële toepassingen. Deze commerciële vorm is doorgaans een combinatie van *Arthrospira* stammen, i.e. *Arthrospira maxima* en *Arthrospira platensis*, en niet van *Spirulina* stammen [3].

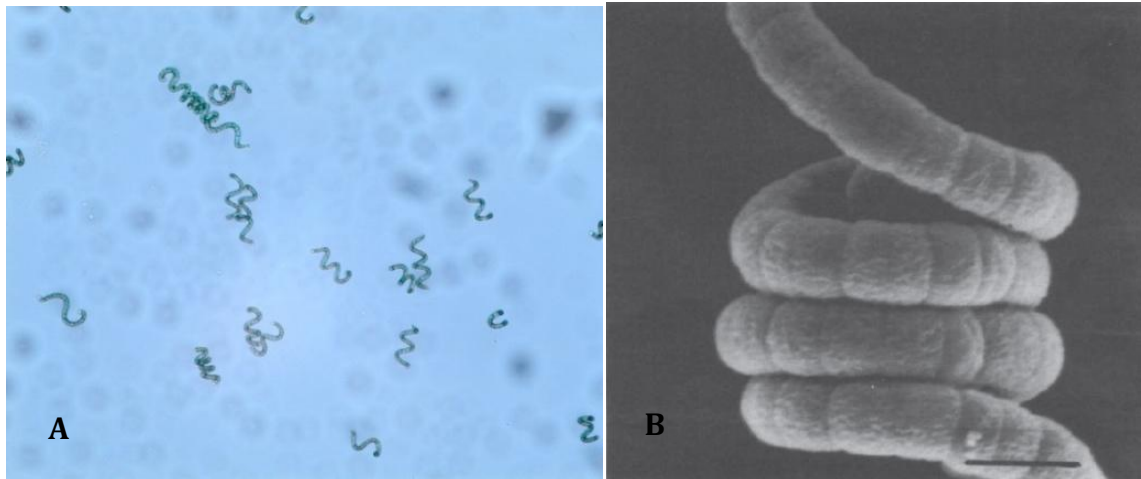
1.3. Morfologie

Arthrospira zijn filamenteuze, multicellulaire cyanobacteriën. Onder de microscoop komt *Arthrospira* voor als blauwgroene filamenten, trichomen genoemd, bestaande uit cilindrische cellen. Deze trichomen zijn onvertakt en helicoïdaal (Fig.3 A) [1] [2] [4]. De spiraalvormige structuur kan echter variëren, zelfs binnen eenzelfde soort. Zo kan enerzijds de helix pitch (h) en anderzijds de volledige lengte van de spiraal verschillen. De helix pitch is de breedte van één volledige helix, parallel gemeten ten opzichte van de as van de helix. De helix pitch wordt bepaald volgens de vergelijking: $h = 2\pi \cdot r \cdot \cot\alpha$ met r = straal en α = hoek (Fig.2).



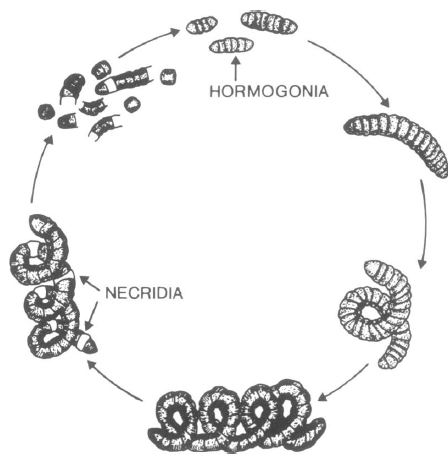
Figuur 2: Weergave van een helixstructuur met de straal (r) en de helix pitch (h)

De variaties in de spiraalvormige structuur kunnen geïnduceerd worden door veranderende omgevingsfactoren zoals bijvoorbeeld de temperatuur [1] [2]. Wu *et al* [5] toonden aan dat UV-straling ook een impact heeft op de morfologie van *Arthrospira platensis*. De helicoïdale vorm blijft enkel behouden in vloeibare media. In vaste media worden de filamenten platgedrukte spiralen. *Arthrospira platensis* heeft een helixdiameter variërend van 30 tot 70 μm en een helix pitch van 12- 72 μm . De cilindrische cellen op zich hebben een diameter van 6 tot 12 μm [2].



Figuur 3: [A] Morfologisch uitzicht van *Arthrospira* sp. PCC8005 p1 onder de lichtmicroscop 10 X 20 vergroot. [B] SEM van *Arthrospira platensis* met een detail van een trichoom. De cross-walls loodrecht op de lengteas splitst de trichome in verschillende cellen. Het lijntje stelt een lengte van 10 μm voor [2].

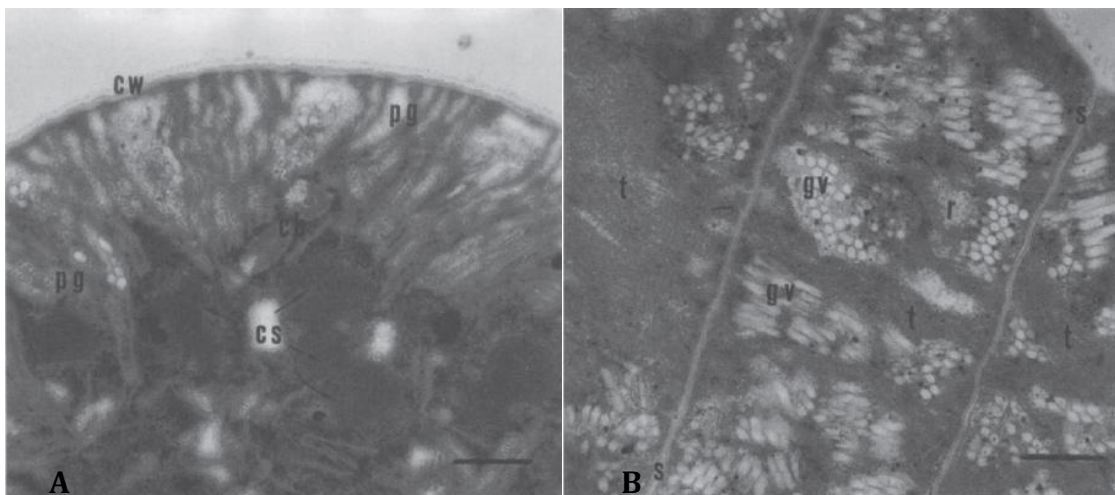
Arthrospira reproduceert zich door binaire fissie. De celsplitsing gebeurt in één vlak loodrecht op de lengteas van de trichoom. Onder de microscoop (zowel in een licht –als elektronenmicroscop) is de plaats van de celdeling te zien als een duidelijk zichtbare transversale lijn (“cross-walls”) loodrecht op de lengteas (zie Fig. 3 B). Eindstandige cellen zijn doorgaans afgerond, maar kunnen eventueel ook puntig zijn [2]. Verlenging van het trichoom vindt plaats door een opeenvolging van celdelingen die zich voordoen over het hele filament. Vermenigvuldiging tot nieuwe trichomen gebeurt door fragmentatie van de trichomen. Dit is een proces waarbij de trichomen transcellulair breken door het openbreken (lyse) van een tussenliggende cel, ook opofferingscel of necridium genaamd. Necridia zijn unieke, gespecialiseerde cellen die het transcellulair breken van trichomen toelaat. Dit resulteert in de vorming van beweeglijke, kortere fragmenten (2 tot 4 cellen), ook wel hormogonia genoemd. Hormogonia bewegen weg van het ouderlijk fragment om zo ruimte te hebben voor de vorming van een nieuwe trichoom. Hormogonia vermenigvuldigen door binaire fissie en worden zo verlengd. Verder ondergaan ze een maturatieproces en nemen ze hun helicoïdale vorm aan (zie Fig. 4) [1] [4].



Figuur 4: "Levenscyclus" van *Arthrospira* [1].

1.2.1. Ultrastructuur

Onder een elektronmicroscop is te zien dat bij *Arthrospira*, net zoals bij andere prokaryote organismen, een celkern ontbreekt in de cilindrische cellen. Verder zijn de cellen wel omgeven door een celwand. De celwand, met een dikte van 40 tot 60 nm, bestaat uit meerdere lagen [2]. Peptidoglycaan is verantwoordelijk voor de dense laag die goed zichtbaar is onder de elektronmicroscop (zie Fig. 5 A). Net onder de celwand bevindt zich het plasmamembraan dat rond het cytoplasma zit. Het cytoplasma is op zijn beurt rijk aan subcellulaire moleculen. De moleculen zijn precies geschikt in het plasma om het functie juist uit te voeren. Zo komen de gasvacuolen en glycogeen stockage moleculen vooral in het perifeer cytoplasma voor. De thylakoïde membranen liggen tussen het perifeer en centraal cytoplasma en zijn geassocieerd met de fycobilisomen die de fotosynthetische systemen bevatten. Verder liggen deze membranen parallel met de celwand en loodrecht op de *cross-walls* (zie Fig. 5 B) [2].



Figuur 5: [A] SEM van *Arthrospira platensis* in dwarsdoorsnede met daarin zichtbaar de meerlagige celwand (cw) en de subcellulaire moleculen in het cytoplasma met onder andere polyglucan granulen (pg). De lijn stelt een lengte van 0,5 μm voor. [B] SEM van *Arthrospira platensis* in overlangse doorsnede met daarin zichtbaar de *cross-walls* (s), gasvacuolen (gv) en thylakoidmembranen (t). De lijn stelt een lengte van 0,5 μm voor [2].

1.4. Voorkomen en groei

Arthrospira komen veelvuldig voor in de natuur. Na de eerste isolatie door Turpin in 1827 [1] [3] uit een vers waterstroom werden *Arthrospira* species gevonden in verschillende soorten omgevingen (grond, zand, moerassen, water, enz.). Ze werden geïsoleerd uit verschillende soorten natuurlijke wateren inclusief afvalwater, zeewater (zoals de Noordzee), warmwaterbronnen en visvijvers [1]. *Arthrospira* blijkt zich dus aan te kunnen passen aan diverse omstandigheden en soms omgevingen te koloniseren waar andere algensoorten moeilijk of niet kunnen overleven.

1.4.1. Koolstofbron

Arthrospira is, zoals de meeste cyanobacteriën, foto-autotroof. Autotrofe organismen gebruiken koolstof van anorganische moleculen zoals koolstofdioxide (CO_2) en waterstofcarbonaat (HCO_3^-). Verschillende studies hebben echter aangetoond dat *Arthrospira* ook gebruik kan maken van een organische C-bron en dus heterotroof kan groeien. Ogawa en Terui waren in 1970 de eersten die aantoonde dat een reincultuur van *Arthrospira* een verhoogde groeisnelheid had op een minerale voedingsbodem aangereikt met 1% peptoon (organische C-bron) [2]. Verdere studies toonden ook aan dat een verhoogde groeisnelheid en biomassa werd verkregen als 0,1% glucose werd toegevoegd aan het medium. Een combinatie van 0.1% glucose en 0.1% peptoon verdubbelde zelfs de groeisnelheid vergeleken met de groei van *Arthrospira* in afwezigheid van een organische C-bron [1] [2] [6] [7].

1.4.2. pH en zout

Arthrospira gedijen goed in wateren met een hoge concentratie aan carbonaten dus met hoge pH. In zoutrijke ($> 30 \text{ g.L}^{-1}$) wateren met hoge conductiviteit en hoge pH (8,5 – 11,0) komen deze cyanobacteriën praktisch monospecifiek voor. Hoe hoger de pH en de conductiviteit van het water, hoe groter de kans dat *Arthrospira* species dominant voorkomen ten opzichte van andere micro-organismen [3]. Zo werd reeds *Arthrospira platensis* geïsoleerd uit wateren met een zoutconcentratie van 85 – 270 g.L^{-1} [1]. Optimale groei van deze soort vond plaats bij een zoutconcentratie van 20 – 70 g.L^{-1} [1] [2] [3]. Op laboschaal vertonen culturen *Arthrospira* ook een breed pH-optimum (8 -11).

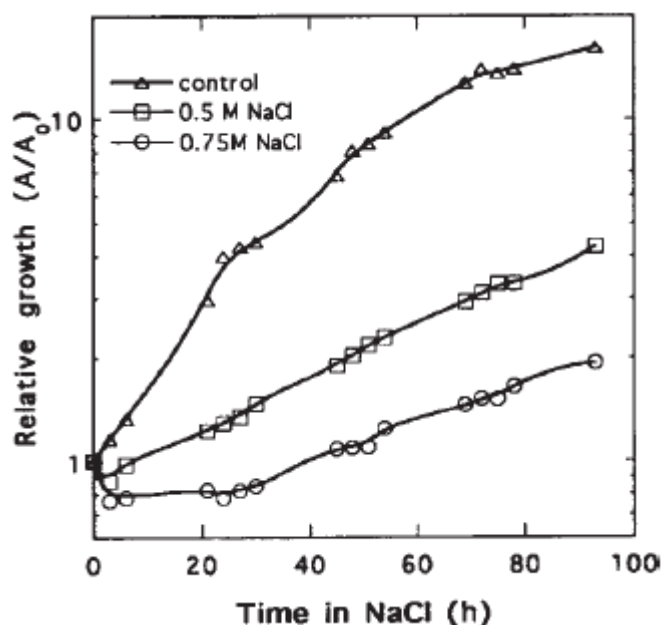
Vonshak *et al.* [2] toonden aan dat *Arthrospiraculturen* bij verhoogde NaCl-concentraties een sterk vertraagde groei kennen. *Arthrospira platensis* groeide in Zarroukmedium met pH 9 in een schudincubator op 30 °C met een lichtintensiteit van 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ [8]. In Fig. 6 is te zien dat een verhoogde concentratie NaCl niet enkel bijdraagt tot een verlaagde groeisnelheid, maar ook resulteert in een lagere maximale biomassa. Bij een zoutconcentratie van 0.75 M (43.83 g.L^{-1}) wordt er, na een lagperiode van ongeveer 24 uur, een nieuwe steady-state verwezenlijkt en kan de cultuur opnieuw aangroeien. Uit Tabel 1 blijkt inderdaad dat de specifieke groeisnelheid (μ) in een verhoogde NaCl-

concentratie lager is. Bijgevolg is de generatietijd (g) in een hogere NaCl-concentratie groter.

De reactie van *Arthrospira* op verhoogde zoutconcentraties, met betrekking tot groei-inhibitie en adaptatie aan verhoogde NaCl-concentraties, varieert zeer van stam tot stam. Uit Tabel 1 valt ook af te leiden dat, de veranderingen in groeisnelheid en generatietijd na de aanpassingsfase, de M2-stam meer resistent is tegen verhoogde NaCl-concentratie dan de 6MX-stam [2].

Tabel 1: Specifieke groeisnelheden (μ) en generatietijden van *Arthrospirastammen* onder verhoogde NaCl-concentraties bij 35°C [2].

Treatment	M2		6MX	
	Specific growth rate (h^{-1})	Doubling time (h)	Specific growth rate (h^{-1})	Doubling time (h)
Control	0.063	11.0	0.059	11.8
+0.50 M NaCl	0.044	15.9	0.026	26.2
+0.75 M NaCl	0.034	20.3	0.018	39.4



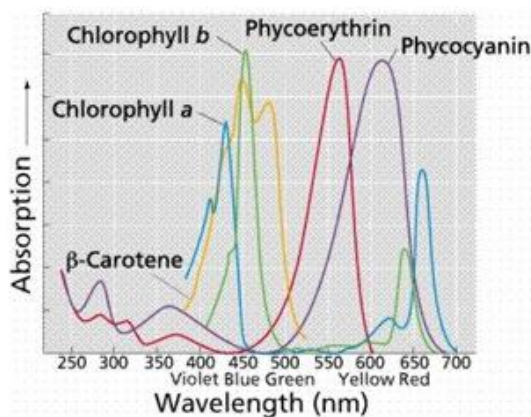
Figuur 6: Groeicurve van *Arthrospira platensis* onder verhoogde NaCl-concentraties. Hier is “A” de absorptantie bij een golflengte van 560 nm van de groeiende cultuur en “A₀” de absorptantie van de startcultuur [2].

1.4.3. Temperatuur

Bij een temperatuur van 35 – 37°C groeit de cultuur het best. In hun natuurlijk habitat groeien ze optimaal bij temperaturen rond 40°C. Boven 45°C breken de trichomen gevolgd door cel afbraak [1] [3].

1.4.4. Licht

Om aan fotosynthese te kunnen doen, hebben cyanobacteriën licht nodig met een golflengte variërend van 400 - 700 nm. Deze range wordt de “Photosynthetically Active Radiation” (PAR) genoemd en omvat de verschillende golflengtes van het spectrum van zichtbaar licht. PAR kan worden uitgedrukt in $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ of in μE ($\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$). De pigmenten in *Arthrospira* die bijdragen tot de fotosynthese zijn chlorofyl *a*, fycocyanine en allofycocyanine (zie 2.2.). Chlorofyl *a* heeft een absorptiemaximum bij 440 en 678 nm, fycocyanine bij 622 nm en allofycocyanine bij 652 nm. In Fig. 7 worden de absorptiespectra van onder andere chlorofyl *a* en fycocyanine weergegeven. PAR kan worden uitgedrukt in $\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$ of in μE ($\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$).



Figuur 7: Absorptiespectrum van onder andere chlorofyl *a* en fycocyanine.

1.5. Toepassingen

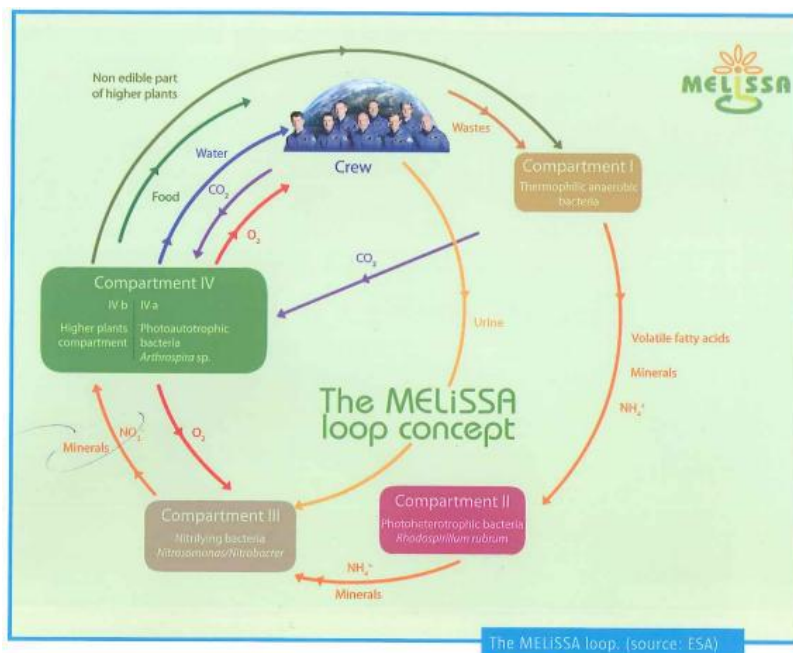
1.5.1. Zuurstof- en voedselproductie in de ruimte -MELiSSA

Een astronaut verbruikt per dag ongeveer 1 kg voedsel, 1 kg zuurstof, 3.56 L drinkwater en ongeveer 26 L water voor persoonlijke hygiëne [9] [10]. Met het oog op langdurige ruimtemissies (vb. Mars) is het onmogelijk om een dergelijke hoeveelheid water en voedsel mee te nemen en het grote volume aan geproduceerd afval te bewaren. Daarom zijn bio-regeneratieve systemen nodig die in staat zijn afvalproducten om te zetten tot eetbare biomassa en O_2 in de ruimte. Om deze reden heeft ESA samen met verschillende universiteiten en onderzoeksinstituten, waaronder het SCK•CEN, een gesloten bio-regeneratieve reactor ontwikkeld. Het zogenaamde MELiSSA (Micro-Ecological Life Support System Alternative) systeem voorziet de crew van O_2 , water en voedsel door de herwinning van grondstoffen uit afval en bestaat uit 4 compartimenten. In het vierde compartiment (IV a) (zie Fig.8) wordt de cyanobacterie *Arthrospira* sp. PCC8005 benut voor de verwijdering van CO_2 , de productie van O_2 , en de aanmaak van eetbare biomassa. Zoals in alle cyanobacteriën verloopt de aanmaak van koolhydraten, en de daarvoor noodzakelijke omzetting van zonlicht naar cellulaire energie, via respectievelijk koolstofdioxide-fixatie en de fotosynthese [9] [10].

In 2010 werd een eerste versie van het *Arthrospira* sp. PCC8005 genoom bekend gemaakt [11]. Deze versie bestond oorspronkelijk uit 119 ongesorteerde scaffolds maar werd door GenoScope (Evry, Frankrijk), het bedrijf aan wie de sequencerende werd uitbesteed door MIC, over de laatste vier jaar voortdurend verbeterd. De huidige versie (v5) bevat 6 geordende scaffolds en wordt momenteel beschouwd als de "final assembly" (meer informatie over *Arthrospira* genomica in sectie Materiaal en Methoden; zie verder).

De gebruikte organismen moeten efficiënt CO₂ fixeren en voldoende O₂ produceren. Cyanobacteriën zijn ideale kandidaat-organismen om grotendeels aan deze eisen te voldoen. Bomen kunnen 1 tot 4 ton CO₂ per hectare per jaar fixeren. Maar *Arthrospira* species blijken nog efficiënter. Onderzoek in het woestijnachtige gebied van Imperial Valley in California, USA, waar *Arthrospira* commercieel gekweekt wordt in open renbaan reservoirs, toonde aan dat *Arthrospira*, in equivalenten van hectare per jaar, 6,3 ton CO₂ kan fixeren en 168 ton O₂ kan produceren [9] [12]. Het *in vitro* kweken van *Arthrospira* sp. is bovendien eenvoudig en zeer productief in vergelijking met planten of bomen.

Vanwege al deze positieve eigenschappen werd de *Arthrospira* sp. PCC8005 gekozen als O₂-producent, en daarnaast ook als gezond voedingssupplement in compartiment IV a van de MELiSSA loop (zie Fig. 8)



Figuur 8: Het MELiSSA systeem [10].

1.5.2. Voeding

Een gebalanceerd dieet bestaat uit koolhydraten, vetten en eiwitten alsook bepaalde vitaminen en mineralen. Verschillende instellingen en bedrijven zien in *Arthrospira*, als voedingsmiddel, een winstgevende markt. *Arthrospira* is vooral gekend wegens een erg hoog gehalte aan eiwitten (tot 70% droog gewicht), belangrijke vitaminen, antioxidanten en onverzadigde vetzuren [1] [3] [4] [9]. Verder is *Arthrospira* zeer goed verteerbaar, mede door de afwezigheid van cellulose in hun celwand en kan het zonder enige voorafgaande behandeling gegeten worden, in tegenstelling tot bijvoorbeeld de biomassa van de groene alg *Chlorella* [9]. Het grote voordeel hiervan is dat eiwitten, vitaminen en onverzadigde vetzuren hun originele structuur en functionaliteit behouden (geen oxidatie).

Deze cyanobacteriën bevatten tot 70 % eiwit, wat veel hoger is dan in andere traditionele plantaardige en dierlijke voedingsmiddelen (zie Tabel 2) [1] [3] [4] [12]. Eiwitten zijn opgebouwd uit aminozuren die via een peptidebinding met elkaar verbonden zijn. De aminozuren zijn onderverdeeld in twee groepen: de essentiële en de niet-essentiële aminozuren. Essentiële aminozuren kunnen niet aangemaakt worden in het menselijk lichaam en moeten we dus rechtstreeks via onze voeding worden opgenomen. Niet-essentiële aminozuren kunnen wel in ons lichaam aangemaakt worden. Om deze te kunnen aanmaken, moeten we wel via onze voeding voldoende N-houdende voedingsmiddelen binnenkrijgen. Eiwitten voor optimale voeding bevatten alle essentiële aminozuren bevat. *Arthrospira* is rijk aan deze eiwitten [12]. Commercieel is *Arthrospira* vooral te verkrijgen in tablet-, capsule- en poedervorm (zie Fig. 9) [3].

Tabel 2: Eiwitgehalte (in %) in *Arthrospira* vergeleken met andere voedingsmiddelen [4].

Food Type	Crude Protein %
<i>Spirulina</i> powder	65
Whole Dried egg	47
Beer Yeast	45
Skimmed powdered milk	37
Whole soybean flour	36
Parmesan Cheese	36
Wheat germ	27
Peanuts	26
Chicken	24
Fish	22
Beef meat	22



Figuur 9: *Arthrospira* in tablet-, capsule- en poedervorm.

1.5.3. Gezondheid

Klinische studies tonen aan dat *Arthrospira* bijdraagt tot snellere genezing bij verschillende ziektes. Zo is bewezen dat *Arthrospira* effectief bijdraagt tot een vermindering aan vetpercentage in het bloed en daardoor het risico op hart- en vaatziekte kan verlagen, en het niveau van witte bloedcellen kan verhogen of normaliseren na radio- of chemotherapie [3] [13].

Het hypolipidemisch (anticholesterol) effect van *Arthrospira* werd weliswaar in verschillende studies aangetoond, maar het mechanisme achter deze werking is onvoldoende bekend [13]. In een studie met *Spirulina (Arthrospira) platensis* concentraat (SPC) werd vastgesteld dat SPC in het darmlumen kan binden op galzuren, die in de lever ontstaan door hydroxylatie en oxidatie van cholesterol, en dat de oplosbaarheid en daardoor de reabsorptie van galzuren daalde [14]. Bij de ratten die gevoed werden met SPC werd een verhoogde concentratie cholesterol en galzuren teruggevonden in de fecaliën. Zo werd de hypothese gesteld dat SPC een verlaagde intestinale opname veroorzaakt van cholesterol en galzuren, waardoor het vetgehalte in bloed daalt [14].

Arthrospira bevat ook componenten met een antioxidantactiviteit. “The Academy of Chinese Military Medical Sciences” toonde aan dat muizen, die gevoed werden met *Arthrospira* als supplement, een verhoogde overlevingskans hadden na blootstelling aan een dodelijke dosis straling. Het bleek ook dat verhoogde toediening van *Arthrospira* extracten de cellulaire activiteit van het superoxide dismutase (SOD) in het bloed van de muizen verhoogde. Dit is een enzym dat zuurstofradicalen in het lichaam neutraliseert [3]. Er wordt gesuggereerd dat vooral het pigment fycocyanine verantwoordelijk is voor deze antioxidantactiviteiten. Dit wordt verder toegelicht 2.4.

2. Fycocyanine

2.1. Introductie

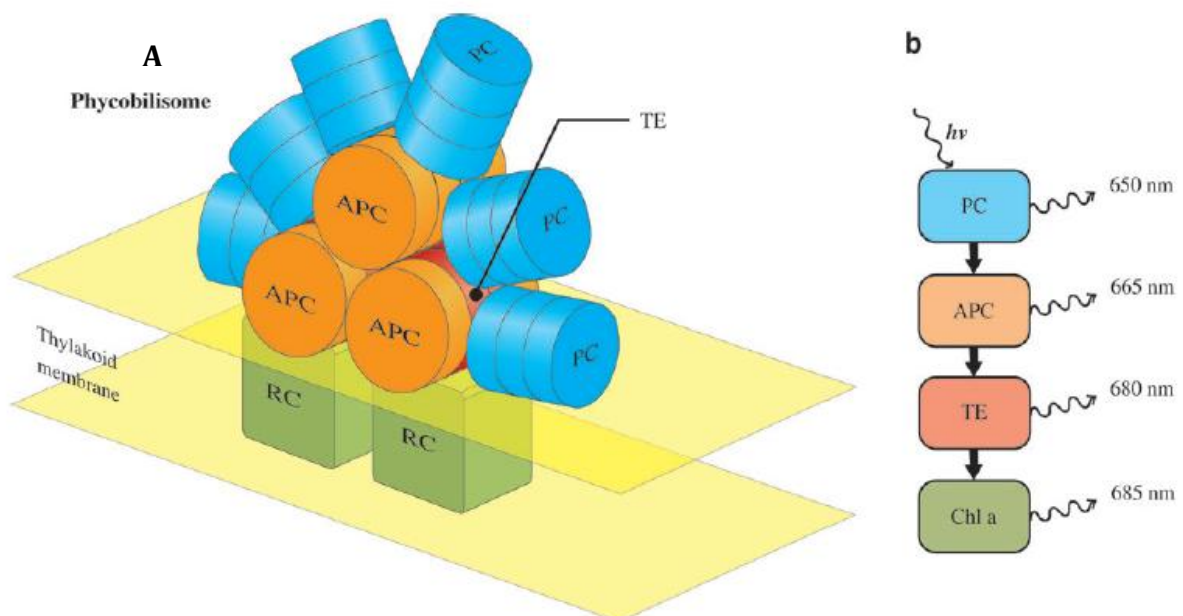
C-fycocyanine (c-FC) is een van de belangrijkste lichtabsorberende pigmenten aanwezig in het fycobilisoom (FBS) dat gelegen is op de thylakoïde membranen van cyanobacteriën. Het is c-FC dat verantwoordelijk is voor de blauwige kleur van de cyanobacteriën en waarom deze ook oorspronkelijk gekend waren onder de naam “groen-blauwe algen”. C-fycocyanine is wateroplosbaar, sterk fluorescerend, en bezit antioxidante eigenschappen [15] [16]. Fycocyanine vindt men terug in talrijke toepassingen in de voedings- en cosmetische industrie alsook in de biotechnologie en de medische wereld.

2.2. Structuur en opbouw

Fycobilisomen (FBS) zijn antennevormige, lichtabsorberende eiwitcomplexen die opgebouwd zijn uit enerzijds chromofore eiwitten (fycobiliproteïnen) en chlorofyl moleculen (waaronder chl *a*) die zorgen voor de lichtabsorptie, en anderzijds kleine "linker peptides" die zorgen voor het bijeen houden van de cluster. FBS absorberen lichtenergie van verschillende golflengtes (= *Light Harvesting Complex (LHC)*) [16] [17] [18]. Het FBS in *Arthrospira* is opgebouwd uit twee fycobiliproteïnen (FBP): c-fycocyanine (c-FC) en allofycocyanine (AFC). Beide FBP spelen een rol in de fotosynthese door licht bij verschillende golflengtes te absorberen en de energie hiervan te transfereren naar chlorofyl *a*. Chlorofyl *a* bevindt zich in het reactiecentrum van het fotosysteem dat verankerd zit in het thylakoïd membraan [18] [19] [20]. Door deze lichtenergie, wordt chlorofyl *a* geëxciteerd en komt zo in een verhoogde, labiele energietoestand. Deze energie wordt door chlorophyl *a* in PSII ('Photosystem II') gebruikt om water te splitsen. Het water (de elektronendonor) wordt dus in PSII geoxideerd waardoor, via volgende reactie: $2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow 4 \text{e}^- + 4 \text{H}^+ + \text{O}_2$, H^+ en O_2 ontstaan en elektronen. De vrijgekomen elektronen worden komen via een cascade aan overdrachten via onder andere plastoquinone en cytochroom c uiteindelijk in PSI ('Photosystem I') terecht waar ze gebruikt worden voor de reductie van NADP^+ naar NADPH. Het, door de H^+ aangedreven, ATPase maakt ATP (biologisch bruikbare energie) aan. Het ATP en de bekomen NADPH (biologisch bruikbare elektronen) worden tenslotte gebruikt voor metabolische processen via de Calvin-Benson cyclus (CO_2 -fixatie; met CO_2 als finale elektronenacceptor) [2].

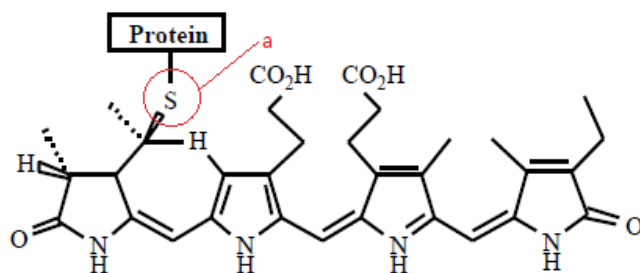
Er zijn nog twee andere fycobiliproteïnen gekend namelijk fycoërythrine en fycoërythrocyanine. Ze zijn aanwezig in de meeste cyanobacteriën voor het absorberen van fotonen bij een bepaalde golflengte om zo een rol te spelen in de fotosynthese. Uit studies van onder andere Nomsawai *et al.* [21] en Akimoto *et al.* [22] blijkt dat bij *Arthrospira* deze twee pigmenten ontbreken in het fycobilisoom en dat dus enkel de fycobiliproteïnen c-FC en AFC aanwezig zijn.

In Fig.10a is de schematische structuur van een fycobilisoom weergegeven. Hier is duidelijk de antennestructuur van het FBS waar te nemen. Door deze antennestructuur verhoogt de efficiëntie van de lichtabsorptie. Hier is te zien hoe 6 fycocyanine-cilinders rond een kern van 3 allofycocyanine-cilinders vastgemaakt zijn. De “terminal emitters” (TE) van het FBS transfereren de verzamelde lichtenergie naar chlorofyl *a* dat aanwezig is in het reactiecentrum (RC) van het fotosysteem. In Fig.10b is te zien hoe lichtenergie efficiënt wordt doorgegeven van fycocyanine naar chlorofyl *a* via een proces dat ook “*resonance energy transfer*” wordt genoemd. Indien de geëxciteerde FBP-moleculen hun energie niet kunnen doorgeven, zullen ze van hun verhoogde, labiele energietoestand terugvallen naar hun grondtoestand, en het teveel aan energie uitzenden als een lichtquantum met een bepaalde golflengte (emissiemaximum). Dit is fluorescentie, wat gemeten kan worden en het emissiemaximum is typerend is voor elke FBC molecule. [20].



Figuur 10: [A] Schematische structuur van een fycobilisoom (FBS) met daarin weergegeven fycocyanine (PC), allofycocyanine (APC), de terminal emitters (TE) en het reactiecentrum (RC) waarin chlorofyl *a* zich bevindt. [B] Doorgeven van lichtenergie van fycocyanine naar chlorofyl *a*. De golflengtes geven de verschillende emissiemaxima weer van de moleculen. Licht bestaande uit fotonen dat met frequentie ν (de reciproke van de golflengte) invalt op het FBS bevat een hoeveelheid energie E die gelijk is aan $h\nu$ (met h = constante van Planck) [20].

Beide fycobiliproteïnen zijn holo-proteïnen opgebouwd uit een fycocyanobiline-chromofoor die covalent gebonden is met een polypeptideketen (apo-proteïne) via een thioëtherbinding [15]. De fycocyanobilinechromofoor heeft de structuur van een lineair tetrapyrroolsysteem. Zijn functie bestaat uit het absorberen van bepaalde golflengtes van het zichtbaar licht. De geconjugeerde dubbele bindingen van de chromofoor zijn hiervoor verantwoordelijk. Deze structuur laat toe dat een elektron van een C-atoom, door de absorptie van een lichtquantum, naar hogere energieniveaus springt [15] [16] [20]. Het apo-proteïne zorgt ervoor dat de fycocyanobilinechromofoor in een lineaire toestand blijft, waardoor maximale absorptie kan plaatsvinden. De chemische structuur van de fycocyanobilinechromofoor is in Fig. 11 voorgesteld [20].



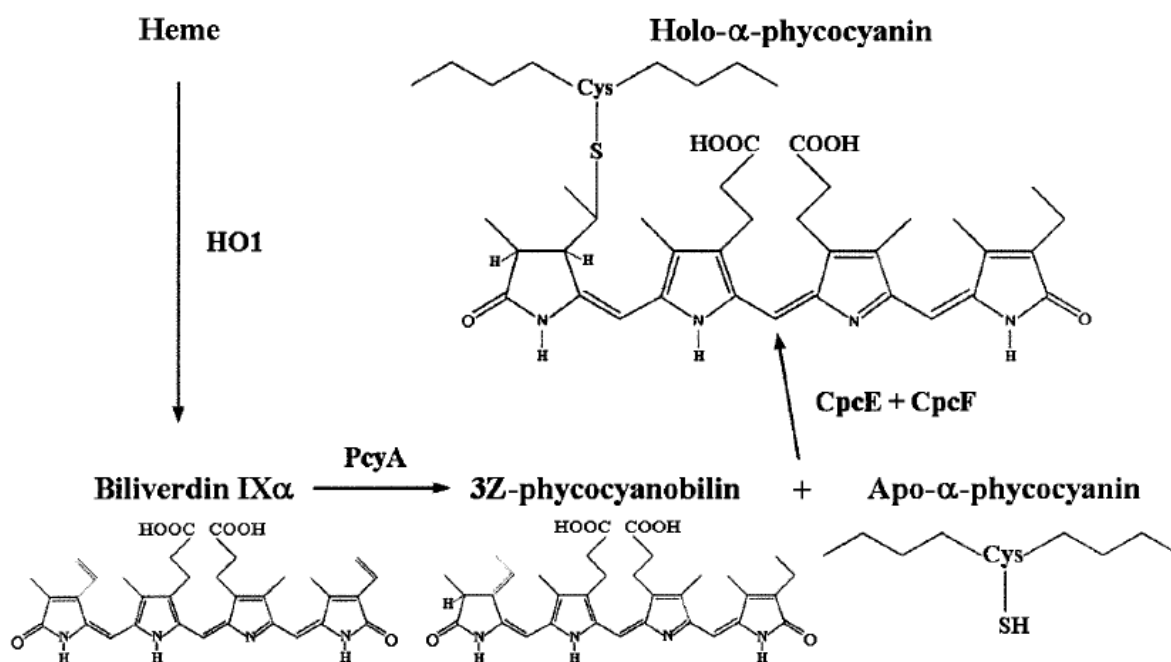
Figuur 11: Chemische structuur van fycocyanine met daarin zichtbaar de thioëtherbinding (a) tussen het apo-proteïne en de fycocyanobilinechromofoor (lineair tetrapyrroolsysteem)

Fycocyanine zelf heeft een absorptiemaximum tussen 615 – 620 nm en een emissiemaximum rond 650 nm (zie Fig. 10b) [15]. C-FC is opgebouwd uit twee verschillende subunits (α en β). De α -subunit heeft een moleculaire massa tussen 15000 en 20000 Da en deze van de β -subunit varieert van 17000 tot 22000 Da [23]. De α -subunit is verbonden met één fycocyanobilinechromofoor aan cysteïneresidu 84 (α 84) en de β -subunit met twee fycocyanobilinechromofooren aan cysteïneresidu's 84 en 155 (β 84, β 155). Een α/β -heterodimeer wordt in de literatuur een "monomeer" genoemd. Deze kunnen aggregeren tot trimeren $(\alpha\beta)_3$ en verder tot diskvormige hexameren $(\alpha\beta)_6$, de functionele eenheid van fycocyanine [15] [17].

2.3. Biosynthese van c-fycocyanine

Zoals eerder vermeld is c-fycocyanine een belangrijk pigment met talrijke toepassingen in bijvoorbeeld de medische wereld en de voedingsindustrie. Het is dus industrieel en (bio)technologisch interessant om methodes te ontwikkelen voor een verhoogde c-fycocyanine productie. Momenteel wordt c-FC veelal gekregen door de extractie uit cyanobacteriën waaronder *Arthrospira*. Dit is een tijdrovende en moeilijke procedure waarvoor veel celmateriaal, dat anders benut kon worden, verloren gaat. Een beproefde techniek is het heteroloog inbouwen van de genen die betrokken zijn bij de synthese van c-fycocyanine in een, daarvoor speciaal ontwikkelde, bacteriestam. Op deze manier kan een veel hogere productie van zuiver of gemakkelijk te zuiveren c-FC verkregen worden [24] [25] [26].

De α - en β -subunits van c-fycocyanine gelijken structureel veel op elkaar [24] [27]. In Fig. 12 is de biosynthese pathway van de holo- α -subunit van c-fycocyanine weergegeven.



Figuur 12: Biosynthese van holo- α -subunit van c-fycocyanine [25].

Er zijn 5 genen en 4 enzymen betrokken bij de biosynthese van CpcA. Een overzicht wordt gegeven in Tabel 3.

Tabel 3: Genen en enzymen betrokken bij de biosynthese van CpcA

Gen	Codeert voor	Functie	Enzymklasse
<i>hox1</i>	heemoxygenase (HO1)	eiwit met enzymfunctie	oxidoreductase
<i>pcyA</i>	ferrodoxineoxidoreductase (PcyA)	eiwit met enzymfunctie	oxidoreductase
<i>cpcA</i>	apo- α -subunit van CpcA	eiwit zonder enzymfunctie	/
<i>cpcE</i>	CpcA fycocyanobiline lyase subunit	eiwit met enzymfunctie	lyase
<i>cpcF</i>	CpcA fycocyanobiline lyase subunit	eiwit met enzymfunctie	lyase

Voor de biosynthese van de prostetische groep (chromofoor) wordt uitgegaan van heemkernen, aanwezig in de cyanobacteriële of recombinant bacteriële cel. Deze heem wordt omgezet naar biliverdine IV door het enzym heemoxygenase (HO1). Hierbij wordt de heemring opengebroken tot een linair tetrapyrroolsysteem en komt Fe^{2+} vrij. In de volgende stap wordt het biliverdine IV door het oxidoreductase PcyA enzymatisch omgezet naar 3Z-fycocyanobiline. Het *cpcA*-gen codeert voor het de apo- α -subunit van CpcA. In de daaropvolgende stap gebeurt de additie van 3Z-fycocyanobiline op cysteïne-84 van dit apo-proteïne. Dit wordt enzymatisch gekatalyseerd door de samenwerking van twee subeenheden van eenzelfde enzym (lyase) namelijk CpcE en CpcF, waarna het finale product, holo- α -subunit van fycocyanine, wordt gesynthetiseerd [24] [25] [26].

2.4. Antioxidant

2.4.1. Introductie

In de ruimte komen verschillende types straling voor. Deze kosmische straling veroorzaakt in blootgestelde organismen oxidatieve stress door de aanmaak van radicalen. Radicalen zijn moleculen die een ongepaard elektron bezitten. Deze energetisch ongunstige configuratie verklaart waarom radicalen zodanig reactief zijn. Ze hebben namelijk de neiging om een gepaarde elektronenstructuur te bekomen door te reageren, omdat ze dan in een stabiele toestand terecht komen. Moleculen die een vrij of beschikbaar elektronenpaar bezitten, kunnen door radicalen aangevallen worden.

Omdat water in cellen het belangrijkste bestanddeel is, worden door ioniserende straling vooral hydroxyl radicalen ($\text{OH}\cdot$) gevormd in de cel. Dergelijke “Reactive Oxygen Species” (ROS) beschadigen celstructuren door moleculen met vrije elektronenparen aanwezig in de cellen aan te vallen en te oxideren zoals lipiden, eiwitten, suikers, RNA en DNA. [10] [15] [28].

2.4.2. Wat is een antioxidant?

Halliwell en Gutteridge [29] omschreven een antioxidant als “elke stof die aanwezig is in lage concentratie ten opzichte van een oxideerbare stof maar toch significant de oxidatie van een substraat inhibeert”. Krinsky breidde deze definitie uit tot “bestanddelen die biologische systemen beschermen tegen de potentieel schadelijke effecten van processen of reacties die oxidaties veroorzaken” [30]. Antioxidanten bezitten vrije of beschikbare elektronenparen, waardoor ze geoxideerd kunnen worden. Ze geven dus een elektron af aan de radicalen, waardoor deze gestabiliseerd worden en bijgevolg minder reactief [28]. Het antioxidant wordt daarbij zelf geoxideerd, maar is stabiel en stopt dus op die manier de oxidatieve kettingreacties die ROS veroorzaken, en kan vaak ook eenvoudig terug geregenereerd (gereduceerd) worden.

2.4.3. C-fycocyanine als antioxidant

De antioxidatieve eigenschappen van c-FC zijn uitvoerig beschreven [15] [31] [32] [33] [34] [35]. Bhat *et al.* [31] beschreef onder andere de betrokkenheid van de bilinechromofoor in de antioxidantactiviteit van c-FC (zie Fig. 11). Ze bestudeerden de reactiviteit van c-FC op superoxideradicalen ($\text{O}_2\cdot$) die verkregen werden door de thermolyse van 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH). AAPH is een wateroplosbare azoverbinding die wordt gebruikt als generator van vrije radicalen. Er werd een significante daling (60%) van de absorptie bij 618 nm waargenomen wanneer 10 μM c-FC samen met 10 mM AAPH geïncubeerd werd op 37°C. Lissi *et al.* [35] toonden ook aan dat de bilinechromofoor hoofdzakelijk betrokken was bij de antioxidantactiviteit. In deze studie werd c-FC blootgesteld aan superoxideradicalen, andermaal gegenereerd door de thermolyse van AAPH. Uit de daling van de absorptie bij

618 nm blijkt dat c-FC een antioxidant effect heeft. Na evaluatie van de aan radicalen blootgestelde groepen blijkt dat voornamelijk bilinegroepen werden geoxideerd. Ook Patel *et al.* [34] toonden op gelijkaardige manier aan dat de bilinegroep verantwoordelijk was voor de antioxidantactiviteit. Andere studies tonen aan dat de antioxidantactiviteit van c-FC ook ten dele kan toegewezen worden aan het proteïnegedeelte (zie Fig. 11) [19] [32] [33]. In alle drie de studies werd een apo-fycocyanine eiwit heteroloog ingebouwd in *E. coli*. Dit laat toe om de antioxidantactiviteit van de apo-proteïnen te onderzoeken zonder interferentie van chromofore groepen, andere pigmenten of antioxidanten. Uit de resultaten blijkt dat de apo-proteïnen wel degelijk een antioxidantactiviteit bezitten. Meer specifiek, de antioxidantactiviteit van apo-proteïnen, waaronder apo-cpcA (zie Fig. 12), zou verband houden met de zwavelbevattende aminozuren cysteïne en methionine gezien het betrokken zwavelatoom de transfer van vrije elektronen naar de ROS mogelijk maakt [36]. Wanneer deze aminozuren op het oppervlak van het proteïne gelokaliseerd zijn, zijn de vrije elektronen beter beschikbaar voor de ROS en zal er dus een hoger of beter antioxidantief effect zijn [19].

Materiaal & methode

1. Kweek van *Arthrospira* sp. PCC8005

In het MIC-labo wordt *Arthrospira* sp. PCC8005 aseptisch opgekweekt in vloeibaar Zarrouk-UBP medium [37]. Dit medium bevat een NaCl-concentratie van 1 g.L^{-1} , representatief voor zoet water. Om de invloed van verhoogde zoutconcentraties op de fycocyanineproductie na te gaan, wordt *Arthrospira* sp. PCC8005 opgekweekt in vloeibaar Zarrouk-UBP medium met 3 verschillende NaCl-concentraties. Naast 1 g.L^{-1} NaCl (controle), wordt *A. sp.* PCC8005 gekweekt in een vloeibaar Zarrouk-UBP medium met respectievelijk 5 en 10 g.L^{-1} NaCl. Dit zijn hogere zoutconcentraties maar nog steeds lager dan zeewater dat ca. 30 g.L^{-1} NaCl bevat.

1.1. Bereiding van het vloeibaar Zarroukmedium

Het vloeibaar Zarrouk-UBP medium is een alkalisch medium met minerale zouten, dat specifiek wordt gebruikt voor de kweek van *Arthrospira* sp. PCC8005. Hieronder is de bereiding van vloeibaar Zarrouk-UBP medium met 1 g.L^{-1} NaCl beschreven. Om het experiment uit te voeren wordt oplossing 2 ook gemaakt met een NaCl-concentratie van respectievelijk 5 en 10 g.L^{-1} . Het protocol verloopt analoog aan deze van vloeibaar Zarrouk-UBP medium met 1 g.L^{-1} NaCl.

Oplossing 1

In Tabel 4 zijn de gebruikte hoeveelheden aan componenten weergegeven voor 1 L vloeibaar Zarrouk-UBP medium, maar deze hoeveelheden worden eerst opgelost in slechts 500 mL milliQ water. MilliQ water is een merknaam van *Millipore Corporation* die gebruikt wordt voor 'ultrazuiver' water.

Tabel 4: Samenstelling oplossing 1 voor het vloeibaar Zarrouk-UBP medium.

Component	Hoeveelheid per L
K_2HPO_4	0.5 g
NaHCO_3	10.5 g
Na_2CO_3	7.6 g

Oplossing 2

In Tabel 5 zijn de gebruikte hoeveelheden aan componenten weergegeven voor 1 L vloeibaar Zarrouk-UBP-medium, maar deze hoeveelheden worden opgelost in 500 mL milliQ.

Tabel 5: Samenstelling oplossing 2 voor het vloeibaar Zarrouk-UBP medium.

Component	Hoeveelheid per L
NaNO ₃	2.5 g
K ₂ SO ₄	1.0 g
NaCl	1.0 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O (1%)	8 mL
CaCl ₂ (1%)	1 mL
FeSO ₄ . 7 H ₂ O (1%)	1 mL
EDTA (1%)	1mL

Sporenelementen

In Tabel 6 zijn de gebruikte hoeveelheden aan sporenelementen weergegeven voor 1L oplossing. Deze hoeveelheden worden opgelost in 1L milliQ.

Tabel 6: Samenstelling sporenelementen voor het vloeibaar Zarrouk-UBP medium.

Component	Hoeveelheid
MnCl ₂ . 4 H ₂ O (1%)	23 mL
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O (1%)	11 mL
CuSO ₄ . 5 H ₂ O (1%)	3 mL

Protocol

Voor de bereiding van het vloeibaar Zarrouk-UBP medium wordt onderstaand protocol aangehouden:

- alle componenten voor oplossing 1 worden afgewogen en samen opgelost in een 1L-fles in 500 milliQ;
- alle componenten voor oplossing 2 worden afgewogen en samen opgelost in een 1L-fles in 500 mL milliQ;
- alle componenten voor de sporenelementen worden afgewogen en samen opgelost in een 1L fles in 1000 mL milliQ;
- alle producten moeten opgelost zijn voor sterilisatie;
- de pH van de oplossingen moet 9.5 zijn, check deze en voeg HCl of NaOH toe indien nodig;
- steriliseer alle oplossingen in autoclaaf op 121°C en 1 bar voor 20 minuten;
- laat alle oplossingen afkoelen;
- voeg oplossing 1 en oplossing 2 samen en mix deze;
- voeg 1 mL sporenelementen toe aan voorgaande oplossing en mix deze. Dus je sporenoplossing is 1000x.

1.2. Inoculatie van *Arthrospira* sp. PCC8005

De inoculatie van *Arthrospira* sp. PCC8005 gebeurt in viervoud. Dit is om biologisch onafhankelijke culturen van *Arthrospira* sp. PCC8005 te hebben waarop nadien statistiek kan gedaan worden. Er wordt gestart van vier stockculturen (p1, p2, p3, p4) met optische densiteit bij 750 nm (OD_{750}) van 1.0 – 1.5. Bij het overenten moet gezorgd worden dat de nieuwe startcultuur een OD_{750} heeft van ± 0.1 . Om ervoor te zorgen dat de verschillende zoutconcentratie de enige parameter is met effect op de groei en op de fycocyanineconcentratie van *Arthrospira* sp. PCC8005, wordt er vanuit eenzelfde stockcultuur overgeënt in 3 verschillende vloeibaar Zarrouk-UBP media met respectievelijk 1; 5 en 10 g.L⁻¹ NaCl. Bij het overenten is het belangrijk om aseptisch te werken om contaminatie te vermijden.

Benodigde materialen

- steriele laminaire flowkast;
- steriele erlenmeyers van 250 mL afgesloten met wattenstop;
- micropipetten en steriele pipetpunten;
- *Binder* schudincubator met *Osram* daglichtlampen.

Benodigde oplossingen

- vloeibaar Zarrouk-UBP medium met 1; 5 en 10 g.L⁻¹NaCl;
- *Arthrospira* sp. PCC8005 stockculturen (p1, p2, p3, p4) met een OD_{750} van 1.000 - 1.500.

Protocol

In onderstaand protocol wordt een stockcultuur met OD_{750} van 1.000 aseptisch 10x verdund om ongeveer een start-OD van 0.100 te bekomen. Dit protocol verloopt voor de drie verschillende zoutconcentraties analoog.

- breng aseptisch 45.0 mL vloeibaar Zarrouk-UBP medium (pH = 9.5) over in een steriele erlenmeyer van 250 mL;
- voeg hieraan aseptisch 5.0 mL stockcultuur van *Arthrospira* sp. PCC8005 toe;
- incubeer de cultuur op 30°C in de *Binder* schudincubator op 120 rpm, onder wit licht met een constante lichtintensiteit van 22.5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$.

1.3. Opvolging groei *Arthrospira* sp. PCC8005

De groei van *Arthrospira* sp. PCC8005 kan opgevolgd worden door het meten van de optische densiteit bij 750 nm (OD_{750}) en de pH van de oplossingen. Om praktisch makkelijker te werken wordt eerst de OD_{750} gemeten van stalen en aansluitend de pH.

1.3.1. OD-meting

Bij een golflengte van 750 nm absorbeert geen enkel pigment van *Arthrospira* sp. PCC8005 licht en wordt het invallend licht enkel verstrooid door de, in het Zarrouk-UBP medium, aanwezige cellen. Hoe meer cellen er aanwezig zijn, hoe meer het licht verstrooid zal worden. Dus de OD is een indirecte maat voor het aantal aanwezig cellen.

Benodigde materialen

- micropipetten en steriele pipetpunten;
- cuvetten,
- *Spectronic Unicam Aquamate UV/VIS Spectrophotometer*;
- groeiende cultuur

Protocol

- schakel de *Spectronic Unicam Aquamate UV/VIS Spectrophotometer* aan;
- voor blanco: breng 1 mL vloeibaar Zarrouk-UBP medium (zonder cellen) steriel over in een cuvet;
- breng 1 mL staal steriel over in een cuvet;
- zet de fotometer op mode 'fixed' en autozero met de blanco op 750 nm;
- meet vervolgens de OD van de stalen op 750 nm.

1.3.2. Bepaling relatie tussen OD₇₅₀ en celconcentratie in g.L⁻¹

De OD₇₅₀ geeft niet rechtstreeks weer welke celconcentratie aan *Arthrospira* sp. PCC8005 aanwezig is in de erlenmeyer. De relatie tussen OD₇₅₀ en celconcentratie aan droog stof (in g.L⁻¹) is weergegeven door de relatie: $Y = a \cdot X$ waarin X de celconcentratie weergeeft uitgedrukt in OD₇₅₀ en X de celconcentratie in g.L⁻¹ is. De onbekende in deze relatie is "a". Deze wordt bepaald volgens volgend protocol:

- weeg eerst een lege tube en noteer de massa (m1);
- voeg op 3 verschillende tijdstippen eenzelfde hoeveelheid volume cultuur van *Arthrospira* sp. PCC8005 toe aan de lege tube;
- bepaal op diezelfde 3 tijdstippen de OD₇₅₀ (=Y);
- centrifugeer de tube op maximale snelheid;
- verwijder zorgvuldig het supernatans met een micropipet zodat enkel de cellen overblijven;
- lyofiliseer de tubes;
- weeg het gelyofiliseerd staal en noteer de massa (m2);
- bepaal de massa drooggewicht (DG) (m2 - m1);
- maak een grafiek in Microsoft Excel van het DG in functie van de OD₇₅₀;
- plot een trendlijn;
- de helling van deze trendlijn is factor "a"

Op basis van de celconcentratie *Arthrospira* sp. PCC8005 in g.L⁻¹, wordt de specifieke groeisnelheid (μ) per dag bepaald volgens volgende vergelijking:

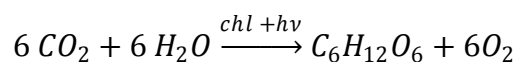
$$\mu \cdot \text{dag}^{-1} = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1} \cdot \text{factor "a"}$$

waarin "x₁" en "x₂" de biomassaconcentraties in OD₇₅₀ zijn op tijdsintervallen t₁ en t₂.

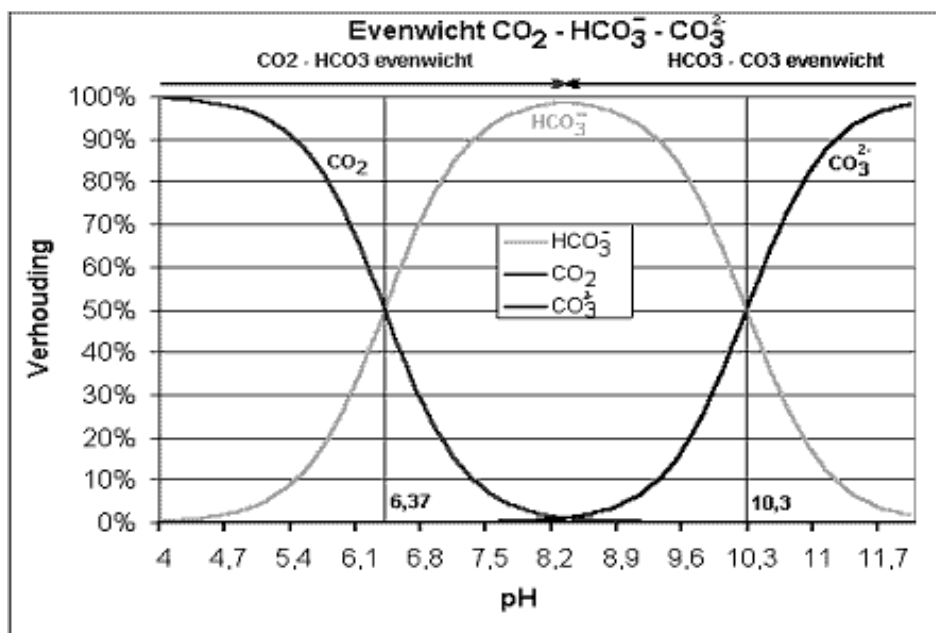
Aansluitend wordt de generatietijd (g) bepaald volgens volgende vergelijking: $g = \frac{\ln(2)}{\mu}$

1.3.3. pH-meting

De groei van *Arthrospira* sp. PCC8005 kan ook opgevolgd worden door de pH van de stalen te meten. *Arthrospira* sp. PCC8005 doet aan fotosynthese volgens de volgende reactie:



Arthrospira sp. PCC8005 doet aan fotosynthese en zal hierbij het beschikbare opgeloste HCO₃⁻ in het Zarrouk-UBP medium gebruiken als anorganische C-bron. Door HCO₃⁻ weg te nemen uit het Zarrouk-UBP medium blijft enkel CO₃²⁻ over en dit carbonaat zal zorgen voor de hoge pH. Want hoe minder moleculen HCO₃⁻ er zijn ten opzichte van de vaste hoeveelheid CO₃²⁻, hoe hoger de pH zal zijn. Als alle HCO₃⁻-moleculen weg zijn, zal de pH 12 zijn. Dit is ook af te leiden uit Fig. 13.



Figuur 13: Het carbonaatevenwicht

Benodigde materialen

- cuvetten met daarin de stalen,
- pH-meter

Protocol

- plaats de pH-meter eerst in een buffer met pH 7 of pH 9.21 voor controle en calibratie;
- plaats na het meten van de controle en de OD₇₅₀ de pH-meter in de stalen;
- lees de pH af.

1.4. Pigmentextractie

Om na te gaan of een hogere NaCl-concentratie bij *Arthrospira* sp. PCC8005 bijdraagt tot een hogere fycocyanineproductie, wordt een pigmentextractie uitgevoerd. De wateroplosbare fycobiliproteïnen c-FC en AFC zullen na cellysis vrijkomen. Na de pigmentextractie wordt de oplossing spectrofotometrisch gemeten bij een golflengte van 615 nm en 652 nm. De concentratie aan c-FC wordt berekend volgens Bennet & Bogorad [38]:

$$[c\text{-FC}] = \frac{OD_{615} - 0.474(OD_{652})}{5.34}$$

Uitgaande van de concentratie aan c-FC kan berekend worden hoeveel % c-FC er aanwezig is per cel met behulp van volgende vergelijking:

$$\% \text{ c-FC/cel} = \frac{[c - FC] \cdot V}{DG}$$

waarin V het totaal volume is waarin de gelyofiliseerde cellen worden opgelost. V is hier 1.1 mL (1 mL Na₂HPO₄ + 100 µL lysozyme) en DG is het drooggewicht van de gedehydrateerde cellen *Arthrospira* sp. PCC8005.

Benodigde materialen

- steriele laminaire flowkast;
- steriele erlenmeyers van 250 mL afgesloten met wattenstop;
- micropipetten, pipetpunten;
- lyofilisator (*Lyofac GT2*);
- warmwaterbad,
- zeef,
- cuvetten,
- *spectronic Unicam Aquamate UV/VIS Spectrophotometer*;
- stalen.

Benodigde oplossingen

- Na₂HPO₄ (0.05 M),
- vloeibaar stikstof,
- lysozyme (100 mg.mL⁻¹).

Protocol

- centrifugeer 6 mL cultuur *Arthrospira* sp. PCC80005 op maximale rpm voor 15 min;
- stockeer de celpellets op $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tot het moment van analyse;
- lyofiliseer de bevroren celpellets overnacht in de *Lyofac GT 2*;
- los de celpellets terug op in 1 mL Na_2HPO_4 (0.05 M);
- dompel de stalen in vloeibare stikstof tot alles bevroren is;
- haal de stalen met een zeef uit de vloeibare stikstof en ontdooi ze in het warmwaterbad op 37°C ;
- herhaal vorige 2 stappen 5x;
- voeg aan elk staal 100 μL lysozyme ($100\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) toe (totaal volume is nu 1.1 mL);
- incubeer de stalen gedurende 1 uur op 37°C ;
- centrifugeer de gelyseerde fractie 10 minuten op 10,000 rpm;
- breng het supernatans over in een cuvet;
- meet de absorbantie op 615 en 652 nm.

2. Clonering *cpcA*-gen en heterologe expressie in *E. coli*

2.1. Primerontwerp en PCR amplificatie

2.1.1. Primerontwerp

De primers die specifiek coderen voor het *cpcA*-gen zijn gebaseerd op de genoomsequentie van *Arthrospira* sp. PCC8005 (versie 5; MaGe ArthroScope project [39] en de procedures van Cherditakul en Suwanwong [19]. De totale gensequentie van het *cpcA*-gen is weergegeven in bijlage 3. Rekening houdend met het feit dat het amplicon ingebouwd moet worden in de pETDuet-1 vector, en deze restrictiesites voor restrictie-enzymen *Bam*HI en *Pst*I heeft, werden de primers ook voorzien van corresponderende restrictiesites.

Forward-primer *cpcA*-*Arthrospira* sp. PCC8005:

5'-TA**G,GAT,CCA**,TCG,GGA,GAT,AAC,TCG,AGA,**ATG**,AAA,ACC,CCC,CTA,AC-3'

Reverse-primer *cpcA*-*Arthrospira* sp. PCC8005:

3'-GT**C,TGC,AGCTA**G,CTT,AGG,GCG,TTG,ATC,GCG-5'

De geel- en blauw-gemarkeerde sequentie stellen de restrictiesequenties voor van respectievelijk *Bam*HI en *Pst*I. Het groene ATG is het startcodon in de *forward* streng en het rode CTA het stopcodon in de *reverse* streng.

2.1.2. PCR-amplificatie

Met de polymerase chain reaction (PCR) werd het target-gen (*cpcA*) geamplificeerd. Voorafgaande aan de PCR werden de ontworpen primers (besteld bij Eurogentec, BE) op ijs ontdooid. De aangekochte primers hebben een initiële concentratie van 100 μM. Ze worden routinematig 10x verdund tot een concentratie van 10 μM voor werkoplossingen.

De PCR werd uitgevoerd met de "*Phusion High-Fidelity DNA Polymerase*"-kit, van Thermo Fischer Scientific, USA. Er werd tweemaal een mastermix gemaakt in 50 μL PCR-tubes, om na de PCR voldoende materiaal te hebben voor de opzuivering.

De mastermix (50 μL) bestaat uit:

- 32.5 μL H₂O (milliQ);
- 10 μL 5x Phusion HF Buffer;
- 1 μL dNTP's (10 mM);
- 2.5 μL *forward* primer (10 μM);
- 2.5 μL *reverse* primer (10 μM);

- 1 µL DNA extract *Arthrospira* sp. PCC8005 (519 ng.µL⁻¹);
- 0.5 µl Phusion DNA Polymerase.

Het DNA-extract van *Arthrospira* sp. PCC8005 dat gebruikt werd in deze reactie, werd verkregen van MIC doctoraatstudente Hanène Badri.

Vervolgens worden de 2 PCR-tubes in het "Gene Amp® PCR system 2700"-toestel van Applied Biosystems (USA), geplaatst en werd het cyclisch profiel gehouden zoals weergegeven in Tabel 7. Na afloop werd de PCR gecontroleerd via gelelektroforese.

Tabel 7: Protocol Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific)

Temperatuur (°C)	Tijd	
98	30 s	
98	10 s	25 cycli
57	20 s	
72	20 s	
72	10 min	
4	∞	

2.1.3. Gelelektroforese

DNA-gelelektroforese is een techniek waarbij DNA-fragmenten gescheiden worden op basis van grootte, onder invloed van een aangelegd elektrisch veld. Het doel is om na te gaan of de PCR succesvol en specifiek was. Concreet betekent dit dat men wil testen of het juiste amplicon (*cpcA*) geamplificeerd is én of er geen aspecifieke bindingen hebben plaatsgevonden. Dit laatste uit zich in de vorming van meerdere bandjes op de agarosegel.

Voor het visualiseren van het amplicon (*cpcA*) werd een 1% (massa/volume) agarosegel gebruikt: 1 g agarose wordt gemengd met 100 mL TBE-buffer en tot koken gebracht in een microgolfoven om ervoor te zorgen dat de agarose goed oplost. TBE-buffer bestaat uit tris, boorzuur en EDTA. Aan het afgekoelde (warme) mengsel wordt *Gelred*® (Biotium, Hayward, USA) in een verdunning van 1/20,000 (volume/volume) toegevoegd. Nadien wordt de oplossing, in een daarvoor bestemd bakje, gegoten. *Gelred*® is een intercalerend fluorogeen die ervoor zorgt dat de gevormde DNA-bandjes, na elektroforese, visueel zichtbaar worden onder UV-licht. In het bakje wordt een kam geplaatst die de slotjes creëert om de PCR-amplicons in te doen. Na ongeveer 15 minuten is de gel gestold. De kam wordt vervolgens verwijderd en de gel wordt in het *Mupid*®-One elektroforesetoestel van Advance (Tokyo, Japan) geplaatst die gevuld is met TBE-buffer.

Het is van belang dat de gel correct in het elektroforesetoestel zit. Aangezien DNA negatief geladen is, moet het gel met de zijde met slotjes aan de kathode liggen. Tijdens de elektroforese zullen de DNA-fragmenten immers migreren naar de anode.

Voordat de stalen in de slotjes worden gepipetteerd, worden ze eerst gemengd met *loading dye*. Dit is een kleurstof die enerzijds gebruikt wordt om het densiteit van het DNA-staal te verhogen waardoor het naar de bodem van de slotjes zakt en niet drijft in de bufferoplossing. Anderzijds dient de *loading dye* als '*tracking dye*': hij laat zien hoever de elektroforese gevorderd is en kan later gebruikt worden voor het bepalen van de RF-waarde (relatieve migratie-afstand). Praktisch wordt er 5 μ L PCR-product (*cpcA*) gemengd met *loading dye*. Hierna wordt er 5 μ L van het mengsel gepipetteerd in de slotjes.

Als referentie moet er in één van de slotjes een DNA-ladder toegevoegd worden zodat de lengte van het *cpcA*-amplicon bepaald kan worden. Als ladder wordt er gebruikt gemaakt van de *Generuler 1 kb plus Ladder* (Thermo Fisher Scientific, USA) die in het slotje net naast het staal wordt gepipetteerd. De elektroforese verloopt gedurende 30 minuten onder een spanning van 100 V. Na de elektroforese wordt de agarosegel in het BIORADtoestel (of scanner) gevisualiseerd onder UV-licht.

2.1.4. PCR clean-up

De opzuivering van het amplicon ("PCR clean-up") heeft als doel de overvloedige zouten, nucleotiden, polymerase en primers, die niet opgebruikt werden tijdens de PCR, te verwijderen. De PCR clean-up wordt uitgevoerd met de *Wizard®SV Gel and PCR Clean-up System*-kit van *Promega* (USA). Het principe van deze kit is gebaseerd op het vermogen van DNA om reversibel te binden met het silicamembraan, terwijl alle andere componenten dit niet zullen doen.

Het protocol gaat als volgt:

Vorbereiding PCR product

1. voeg 50 μ L membraanbindingsoplossing toe aan het PCR-product;

Binden van het DNA

2. plaats een SV minikolom in een collectietube;
3. giet het voorbereide PCR-product over de kolom en incubeer 1 minuut op kamertemperatuur;
4. centrifugeer 1 minuut op 10,000 rpm, giet het eluens weg en zet de minikolom terug in de collectietube.

Wassen

5. voeg 700 μ L wasoplossing toe, centrifugeer 1 minuut op 10,000 rpm, giet het eluens weg en zet de minikolom terug in de collectietube;
6. herhaal stap 5 met 500 μ L wasoplossing, centrifugeer 5 minuten op 10,000 rpm;
7. ledig de collectietube en centrifugeer opnieuw 1 minuut op 10,000 rpm, maar nu zonder de collectietube te sluiten.

Elutie

8. breng de minikolom over in een proper microcentrifuge-tube van 1.5 mL;
9. breng 50 μ L nuclease-vrij water aan op de minikolom, incubeer 1 minuut op kamertemperatuur en centrifugeer vervolgens 1 minuut op 10,000 rpm;
10. verwijder de minikolom en stockeer de microcentrifuge tube op -20°C .

2.1.5. Concentratiebepaling

De *NanoDrop 2000 spectrophotometer* van Thermo Fisher Scientific (USA) (zie Fig.14) meet DNA-concentraties aanwezig in een staal. Na PCR en opzuivering van het PCR-product wordt de concentratie van het amplicon (*cpcA*) gemeten bij 280 nm. De fotometer bestaat uit een voetstukje waarop het 1.5 mL staal wordt aangebracht. Centraal is er een zeer smalle opening waarin een glasvezeldraad zit. Het staal wordt wordt tussen de 2 contactpunten 'opgespannen' waardoor het een waterbrug vormt tussen de 2 punten. Over die waterbrug (1 mm hoog) wordt de absorptie gemeten. Inwendig wordt een xenon pulslamp als lichtbron gebruikt [40].



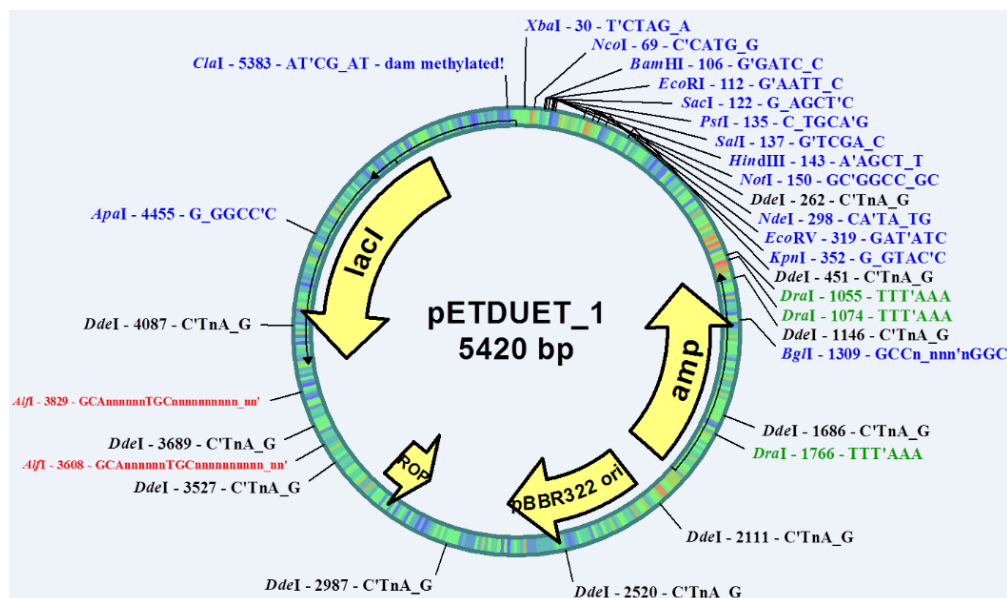
Figuur 14: *NanoDrop 2000 spectrophotometer*

Voordat de *cpcA*-concentratie wordt gemeten, moet er eerst een blanco als referentie ingesteld worden. Hiervoor wordt 1.5 μ L DNase- en RNase-vrij water gepipetteerd op het voetstukje. Na het meten van de blanco, wordt de druppel DNase- en RNase-vrij water van het voetstuk eerst verwijderd met een stofvrij doekje. Daarna wordt 1.5 μ L staal aangebracht en gemeten.

2.2. Constructie van expressievector

De pETDuet-1 vector is een expressievector die wordt gebruikt voor het verkrijgen van heterologe expressie in *E. coli* (zie Fig. 15). De vector is 5420 bp lang en bezit twee multiple cloning sites (MCS). De MCS is een kort stukje DNA waarin zich meerdere restrictiesites bevinden. In de MCS-1 van de pETDuet-1 vector bevinden zich de restrictiesites *Bam*HI en *Pst*II. Voor selectie bezit deze vector een

ampicillineresistentiegen (amp). Verder bezit de pETDuet-1 vector ook nog een origin of replication (ORI). Het *cpcA*-gen zal in deze vector ingebouwd worden (zie Fig. 16 bij 2.3.2.). Tot slot is er ook nog het *lacI*-gen dat belangrijk is bij het tot expressie brengen van het CpcA eiwit met behulp van IPTG. Dit wordt verder toegelicht in 2.2.5.



2.2.1. pETDuet-1vector in *E. coli* DG1 via chemische transformatie

Volgend protocol wordt aangehouden:

2.2.2. Selectie van *E. coli* DG1-cloon die petDuet-1 bevat

glasparels over de gehele plaat verspreid. Tot slot worden de platen 24 uur geïncubeerd op 37°C tot de cellen zijn uitgegroeid tot individuele kolonies.

Na 24 uur incubatie op 37°C wordt er van de 100x verdunde celcultuurplaat 1 kolonie overgeënt op een nieuwe LB-ampicillineplaat voor verder opzuivering van de kolonie tot reincultuur. De platen worden opnieuw 24 uur geïncubeerd op 37°C.

2.2.3. Cultivatie *E. coli* DG1-cloen met pETDuet-1 vector

Voor de productie van de pETDuet-1 vector werd een vloeibare cultuur gestart van de DG1-cellen. Men voegt 25 mL LB medium toe in een 100 mL steriele erlenmeyer. Vervolgens werd 25 µL ampicillinstockoplossing toegevoegd. De stockoplossing ampicilline heeft een concentratie van 100 mg.mL⁻¹, de eindconcentratie in de erlenmeyer bedraagt 100 µg.mL⁻¹ voor voldoende selectiedruk.

Stip vervolgens met een steriele entnaald een kolonie aan op de LB-ampicillineagarplaat waarop de reincultuur DG1-kolonies zijn gegroeid en ent deze over in de erlenmeyer. Incubeer overnacht op 37°C.

2.2.4. Extractie van pETDuet-1 vector uit *E. coli* DG1-cultuur

Met de miniprep methode wordt de pETDuet-1 vector geïsoleerd uit de *E. coli* cellen. Deze wordt uitgevoerd met het *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* van *Promega*. Deze methode is gebaseerd op het feit dat, na toevoegen van cellyseoplossing, het celmembraan van de bacteriecellen stuk gaat en de celinhoud en plasmiden (pETDuet-1) vrijkomen. Vervolgens werd alkalineprotease toegevoegd. Dit enzym denatureert chromosomaal DNA, plasmideDNA, en eiwitten die vrijgekomen zijn na cellyse. Na het toevoegen van de neutralisatievloeistof renatureren het hoog-moleculair, chromosomaal DNA en eiwitten niet, maar vormen ze een onoplosbaar complex. Het laag-moleculaire supercoiled (niet het genicked en "relaxed" i.e. ontrold) plasmide-DNA renatureert wel en blijft in oplossing [41]. Na het binden van het plasmide-DNA aan de minikolom, wordt de minikolom gewassen. Nadien wordt het plasmide-DNA geëluëerd met nuclease-vrij water.

Cellysis en opzuivering

1. doe 1-10 mL DG1- cellen uit vloeibaar LB-ampicilline medium in eppendorfbuisje en centrifugeer 5 min;
2. decanteer het supernatans;
3. voeg 250 µL resuspensieoplossing toe aan de celpellet;
4. voeg 250 µL cellysisoplossing toe, keer eppendorfbuisje 4 keer om om te mengen;
5. voeg 10 µL alkalische protease oplossing toe, keer eppendorfbuisje 4 keer om, incubeer 5 minuten op kamertemperatuur;
6. voeg 350 µL neutralisatie-oplossing toe, keer het eppendorfbuisje 4 keer om;
7. centrifugeer 10 minuten aan maximale snelheid op kamertemperatuur.

Binden van plasmide-DNA

8. breng een spinkolom in een collectietube;
9. decanteer voorzichtig het geklaard lysaat in de spinkolom;
10. centrifugeer 1 minuut op kamertemperatuur, giet eluens weg en plaats de kolom opnieuw in de collectietube.

Wassen

11. voeg 750 μ L wasoplossing toe, centrifugeer 1 minuut aan maximale rpm, giet eluens weg en plaats de kolom opnieuw in de collectietube;
12. herhaal stap 11 met 250 μ L wasoplossing;
13. centrifugeer 2 minuten aan maximale snelheid op kamertemperatuur.

Elutie

14. plaats de kolom in een steriel eppendorfbuisje van 1.5 mL, centrifugeer nogmaals 1 minuut aan maximale snelheid op kamertemperatuur om alle wasoplossing er zeker uit te verwijderen;
15. plaats de kolom in nieuw steriel eppendorfbuisje van 1.5 mL;
16. voeg 50 μ L nuclease-vrij water toe aan de spinkolom, centrifugeer 1 minuut aan maximale snelheid op kamertemperatuur;
17. verwijder de kolom en stockeer het eppendorfbuisje op -20°C .

2.2.5. Concentratie bepalen van pETDuet-1 vector

Na de elutie wordt de concentratie aan het opgezuiverde plasmide gemeten met de *NanoDrop 2000 spectrophotometer* van *Thermo Scientific* (zie 2.1.5.).

2.3. Constructie van CpcA-expressievector

2.3.1. Restrictie van vector en amplicon

Voor de restrictie van de pETDuet-1 vector en het geamplificeerd *cpcA* worden restrictie-enzymen *Bam*HI en *Pst*I gebruikt voor 'directional cloning'. Zowel pETDuet-1 als het *cpcA*-amplicon bezitten unieke restrictiesites die herkend worden door deze twee restrictie-enzymen. De restrictieplaatsen in het amplicon zijn toegevoegd via de 5'verlengde primers.

*Bam*HI is een restrictie-enzym uit *Bacillus amyloliquefaciens*. Dit enzym bindt op zijn herkenningssequentie 5'-G/GATCC-3' en knipt deze sequentie asymmetrisch ter hoogte van de tweede guanine. Deze dubbelstrengige restrictie leidt tot de vorming van zogenaamde 5'-GATC *stickyends*. *Pst*I is geïsoleerd uit *Providencia stuartii* en bindt op de sequentie 5'-CTGCA/G-3' daarbij de sequentie klievend ter hoogte van de eerste adenine wat eveneens leidt tot de vorming van *stickyends*, maar ditmaal in de vorm 5'-TCGA. De

*Bam*HI en *Pst*I stickyends zijn niet complementair aan elkaar en kunnen nooit aan elkaar kleven zodat het *cpcA* gen steeds in de juiste oriëntatie zal gecloneerd worden.

De restricties van *cpcA* en pETDuet-1, met *Bam*HI en *Pst*I, worden afzonderlijk uitgevoerd, omdat voor de twee restrictie-enzymen twee verschillende buffers nodig zijn. *Bam*HI heeft namelijk in de *Bam*HI-buffer zijn hoogste activiteit. Voor *Pst*I wordt een universele *FastDigest Pst*I-buffer van Thermo Fisher Scientific (USA) gebruikt.

2.3.1.1. Restrictie met *Bam*HI

De volumes aan pETDuet-1 en *cpcA*, na elutie en concentratiebepaling, bedroegen respectievelijk 32 μ L en 48 μ L. Aan deze hoeveelheden worden *Bam*HI en 10x *Bam*HI-buffer toegevoegd.

A) 32 μ L pETDuet-1 + 5 μ L *Bam*HI + 4 μ L 10x *Bam*HI-buffer

B) 48 μ L *cpcA*-gen + 5 μ L *Bam*HI + 6 μ L 10x *Bam*HI-buffer

Vervolgens wordt er een 5-tal seconden gecentrifugeerd om alles bijeen te brengen op de bodem van het epje. Hierna wordt er 1.5 uur geïncubeerd op 37°C. Dit is de optimale temperatuur voor *Bam*HI. Om na te gaan of de restrictie met *Bam*HI gelukt is, wordt een controle uitgevoerd via gelelektroforese.

2.3.1.2. Drop dialyse

Om nu op dit product de restrictie met *Pst*I te kunnen uitvoeren, moeten het *cpcA*-gen en de pETDuet-1 vector eerst opgezuiverd worden. In het eppendorfbuisje is namelijk een mengeling aanwezig van DNA, enzymen en zoutionen afkomstig van de *Bam*HI-buffer. Er wordt een membraanfilter voor dialyse gebruikt om het DNA van de zoutionen te scheiden.

Een lege petrischaal voor *cpcA* en een voor pETDuet-1 worden gevuld met milliQ water. Vervolgens worden er membraanfilters van *Millipore* op gelegd en het volume aan *cpcA*-gen en pETDuet-1 (respectievelijk 48 en 32 μ L) hier op gepipetteerd. De membraanfilters bestaan uit nitrocellulose en hebben een membraangrootte van 0.025 μ m. Laat dit gedurende 1 uur op kamertemperatuur staan. In deze tijd zullen de zoutionen doorheen het membraan diffunderen en blijft het DNA achter op het membraan. Hierna wordt de druppel op de membraanfilter in een nieuw eppendorfbuisje gebracht. In deze druppel zit nu het gezuiverd, ontzout *cpcA*-gen en pETDuet-1.

2.3.1.3. Restrictie met *Pst*I

Het beschikbare volume na de opzuivering van pETDuet-1 en het *cpcA*-gen zijn respectievelijk 45 en 55 μ L. Aan deze hoeveelheden worden *Pst*I en 10x *FastDigest Pst*I-buffer toegevoegd. Er wordt ook milliQ aan toegevoegd om ervoor te zorgen dat er finaal 1x *FastDigest Pst*I-buffer aanwezig is.

- A) 45 µL pETDuet-1 + 5 µL *Pst*I + 6 µL *FastDigest* 10x*Pst*I-buffer + 4 µL milliQ
B) 55 µL *cpcA*-gen + 5 µL *Pst*I + 7 µL *FastDigest* 10x*Pst*I-buffer + 3 µL milliQ

Vervolgens wordt er een 5-tal seconden gecentrifugeerd om alles terug te laten zakken op de bodem van het epje. Hierna wordt er 1.5 uur geïncubeerd op 37°C (optimale temperatuur voor *Pst*I) en controle via gelelektroforese.

2.3.2. Ligatie van het amplicon in de vector

Voordat er ligatie van pETDuet-1 en het *cpcA*-gen kan plaatsvinden, moeten deze eerst verder opgezuiverd worden om korte DNA-fragmenten, zouten en enzymen te verwijderen. Dit wordt gedaan met de *Wizard®SV Gel and PCR Clean-up System*-kit van *Promega*. Het protocol is uitgelegd in sectie 2.1.4. Na de opzuivering wordt de concentratie aan DNA gemeten met de *NanoDrop 2000 spectrophotometer* van *ThermoScientific*. Hoe dit in zijn werk gaat, werd al eerder toegelicht in sectie 2.1.5.

De ligatie gebeurt met het T₄ DNA-ligase. Bij het uitvoeren van de ligatie moet er molair gezien ongeveer 4x meer *cpcA*-amplicon aanwezig zijn dan plasmide(pETDuet-1). Zo stijgt de kans voor insert-vector ligatie aanzienlijk.

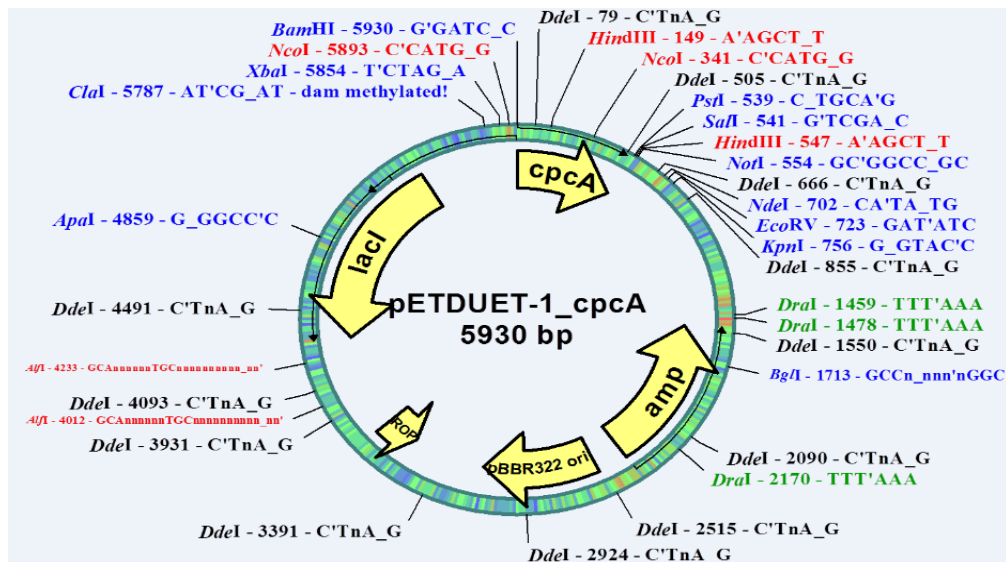
2.3.2.1. Protocol

1. eerst wordt er een mix van 20 µL gemaakt met volgende samenstelling:
 - 4 µL pETDuet-1 vector DNA,
 - 3 µL *cpcA*-amplicon DNA,
 - 2 µL T₄ 10x DNA-ligase buffer,
 - 1 µL T₄ DNA-ligase,
 - 10 µL nuclease-vrij water.
2. incubeer de mix 12 uur op kamertemperatuur;
3. verhit de mix 10 minuten op 65°C.

Voor het verwijderen van overtollige zoutionen, afkomstig van de T₄ DNA-ligase buffer, wordt opnieuw een drop dialyse uitgevoerd (zie 2.3.1.2.). Na deze opzuivering wordt het construct (pETDuet-1 + *cpcA*) gestockeerd in de vriezer. Het construct is weergegeven in Fig. 16.

Als positieve controle werd ook de pETDuet-*cpcA* vector afkomstig uit het artikel van Cherdkiatikul en Suwanwong [19] besteld. Deze bezit het *cpcA*-gen van cyanobacterium *Arthrospira platensis* met hoogstwaarschijnlijk NIES-39 als gebruikte stam.

Vanaf dit moment wordt het eigen construct (pETDuet-1 + *cpcA*-gen) pETDuet-*cpcA* genoemd. De positieve controle vector uit het artikel van Cherdkiatikul en Suwanwong [19] wordt aangeduid met een "*" (pETDuet-*cpcA**).



Figuur 16: pETDuet-cpcA (pETDuet-1 vector + cpcA-gen)

2.4. Transformatie van de pETDuet-cpcA in *E. coli* BL21-cellen

Vervolgens werd het construct getransformeerd in *E. coli* BL21-cellen. BL21-cellen zijn chemisch competente *E. coli* cellen die voornamelijk gebruikt worden om eiwitten tot expressie te brengen door gebruik te maken van hun T₇-promotor. De heatshocktransformatie van het construct in *E. coli* gebeurt praktisch zoals uitgelegd in sectie 2.2.1.

2.4.1. Selectie van *E. coli* BL21-cloen die construct bevat

2.4.1.1. Selectiemedië met ampicilline

Het is van belang dat enkel de BL21-cellen, die het (recombinant) plasmide (PetDuet-cpcA) hebben opgenomen, vermenigvuldigen. Voor de selectie van deze cellen met vector wordt gebruik gemaakt van het ampicillineresistentiegen dat in de pETDuet-1 vector aanwezig is. Door ampicilline aan een voedingsbodem toe te voegen, zullen enkel de bacteriecellen groeien die de vector hebben opgenomen. De opzuivering gebeurt praktisch op dezelfde manier als in 2.2.2.

2.4.1.2. PCR-bevestiging

Kolonie-PCR is een techniek om enerzijds te testen of de transformatie van de BL21-cellen gelukt is en anderzijds om aan te tonen dat de ligatie tussen amplicon en vector gelukt is. Bij kolonie-PCR is geen voorafgaande extractie van het DNA nodig, maar kan er rechtstreeks een fractie van een kolonie bij de mastermix toegevoegd worden.

Om deze procedure uit te voeren, wordt er gebruik gemaakt van de *Thermo Scientific Dream Taq Green PCR Master Mix (2x)*. 2x wijst erop dat deze mix 2 keer verdund moet worden. In deze mastermix zitten de volgende bestanddelen:

- dNTP's,
- Dream Taq green buffer,
- MgCl₂,
- DreamTaq DNA-polymerase,
- Loadingdye.

Voor de PCR worden specifieke *forward* en *reverse* primers gebruikt voor het *cpcA*-gen (zie 2.1.1.).

Protocol

De PCR-reactie wordt ditmaal uitgevoerd in een volume van 25 µL.

1. ontdooi en meng de *Dream Taq Green PCR Master Mix (2x)*;
2. plaats een PCR-tube op ijs en voeg de volgende bestanddelen toe voor een 25 µL-reactie:
 - 12.5 µL *Dream Taq Green PCR Master Mix (2x)*,
 - 1.25 µL *cpcA forward* primer,
 - 1.25 µL *cpcA reverse* primer,
 - 10 µL milliQ,
 - fractie van de te testen kolonie.
3. meng het geheel;
4. plaats de PCR-tube in het "Gene Amp® PCR system 2700"-toestel van *Applied Biosystems* en voer volgend PCR-protocol uit:

Temperatuur (°C)	Tijd	
94	10 min	
94	30 s	25 cycli
57	30 s	
72	1 min	
72	10 min	
4	∞	

Na afloop wordt de PCR gecontroleerd via gelelektroforese.

2.4.1.3. Sequencing

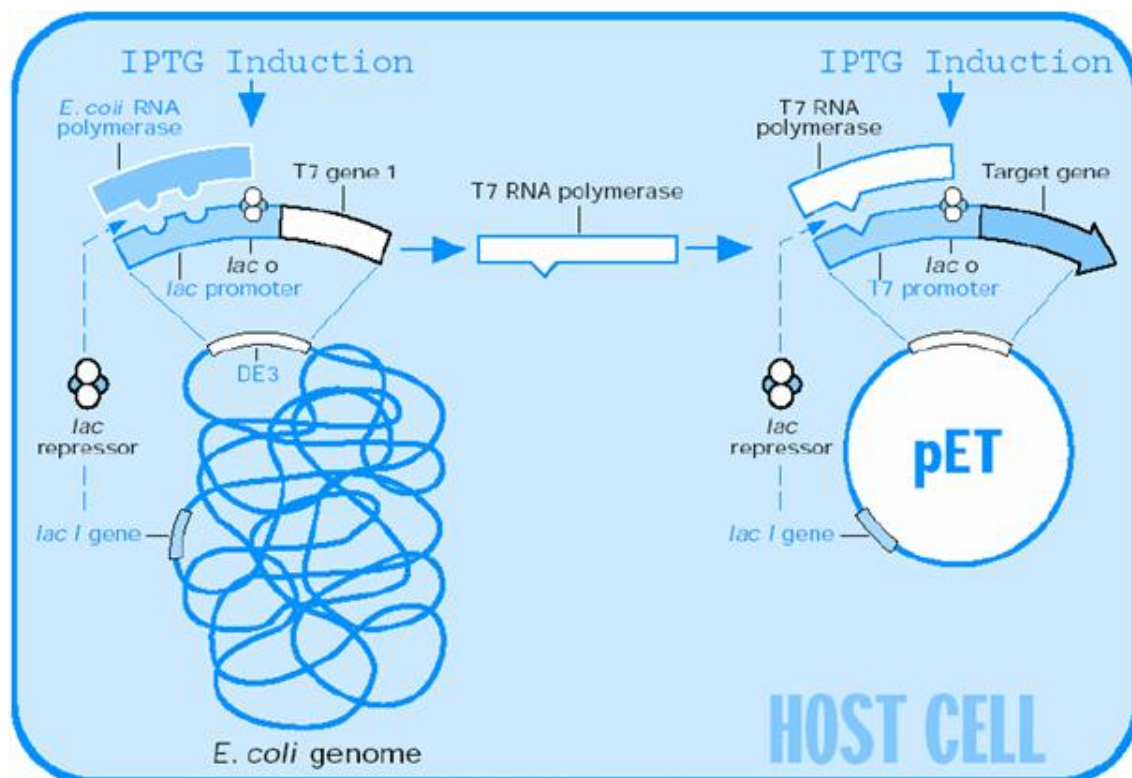
Met behulp van DNA-sequencing kan de juiste volgorde van de nucleotiden van het *cpcA*-gen bepaald worden. Eerst werd het plasmide (PetDuet-cpcA) geëxtraheerd uit de *E. coli* BL21-cellen zoals uitgelegd in sectie 2.2.4. Vervolgens werd 5 µL van het miniprepje gemengd met 5 µL van de primer waarmee je wilt sequencen. De primers die gebruikt worden zijn deze die reeds beschreven zijn in sectie 2.1.1. In totaal heb je nu twee stalen (een staal voor sequencen met de *forward* primer en een staal met de *reverse* primer. Deze twee talen worden opgestuurd naar de firma MacroGen, Amsterdam. Deze firma is onder andere gespecialiseerd in het sequencen.

3. Heterologe expressie van CpcA-eiwit in *E. coli* BL21-cellen en eiwitextractie

Het *lacI*-gen is aanwezig in het chromosomaal DNA van de BL21-cellen en in het construct. Dit gen codeert voor het *lac*-repressoreiwit (LacI), dat op zijn beurt gebonden is op de *lac*-operator, aanwezig upstream van *cpcA* in het construct, maar ook van het T7-polymerase gen op het chromosoom van de gebruikte *E. coli* stam. Zolang het repressoreiwit gebonden is, codeert het T7-gen niet voor het T7-polymerase (RNA-polymerase voor transcriptie) en wordt dit dus niet geproduceerd. Bijgevolg kan T7-polymerase niet binden op de promotorsequentie aanwezig op het *lacI*-gen van het construct en wordt *cpcA* niet tot expressie gebracht [42].

Als een derivaat van lactose, allolactose, bindt met het *lac*-repressoreiwit induceert dit een structurele verandering in LacI waardoor het niet meer kan binden op zijn operatorsequentie en dus loskomt en de repressie eindigt, zowel bij *cpcA* als bij het T7-gen.

IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside) is een molecule dat structureel lijkt op allolactose. IPTG kan eveneens binden op het *lac*-repressoreiwit waardoor dit loskomt van de *lac*-operator. Hierdoor kan op de eerste plaats T7-polymerase geproduceerd worden. Vervolgens kan T7-polymerase binden op de T7-promotorsequentie aanwezig in het construct en wordt *cpcA* tot expressie gebracht [42]. De IPTG-inductie wordt visueel weergegeven in Fig. 17, waarbij het doelgen ("target gene") het *cpcA*-gen voorstelt.



Figuur 17: Eiwitexpressie na IPTG-inductie

3.1. Inductie met IPTG

Om het *cpcA*-gen tot expressie te brengen, moeten de getransformeerde BL21-cellen eerst geïnduceerd worden met IPTG. De methode beschreven in het artikel van Cherdkiatikul en Suwanwong [19] wordt gevolgd, met lichte aanpassingen.

Van de getransformeerde BL21-cellen werd een kolonie aangestipt en overgeënt in LB-medium met 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ampicilline. Vervolgens worden de cellen geïncubeerd op 37°C in een schudincubator. De cellen moeten zich in de exponentiële fase bevinden om effectief geïnduceerd te kunnen worden. Er is geweten dat de cellen zich bevinden in de exponentiële fase als een optische densiteit van 0.4 – 0.6 wordt bereikt bij een golflengte van 600 nm (OD_{600}). Hierna werd 1 mM IPTG (uitgaande van een 100 mM IPTG stockoplossing) toegevoegd aan de celcultuur om het recombinante *cpcA* tot expressie te brengen. De geïnduceerde cultuur werd al schuddend overnacht geïncubeerd op kamertemperatuur. De inductie wordt stopgezet door de cellen te centrifugeren en ze vervolgens, na een wasstep met 10 mM MgSO_4 , te suspenderen in MgSO_4 oplossing.

3.2. Eiwitextractie

Om te controleren of de inductie met IPTG succesvol is gebeurd, wordt een eiwitextractie uitgevoerd. Het totaal eiwitextract wordt vervolgens gescheiden via elektroforese. Het CpcA-eiwit heeft een grootte van 19.8 kDa [19] en zou dus een bandje moeten geven na eiwitelektroforese d.w.z. ter hoogte van 20 kDa.

3.2.1. Extractie

De eiwitextractie wordt uitgevoerd met het *BugBuster® Protein Extraction Reagent* van Novagen®. Het reagens dat wordt gebruikt is de *BugBuster Master Mix*. Dit reagens bevat nucleasen en lysozyme om efficiënt eiwitten te kunnen extraheren. Het lysozyme breekt de celwand (bestaande uit mucopeptiden) van de BL21-cellen af en de nucleasen degraderen het aanwezige DNA en RNA. Aan de *BugBuster Master Mix* wordt ook 10 mM protease-inhibitoren toegevoegd om te voorkomen dat de geëxtraheerde eiwitten gehydrolyseerd worden.

Bij gebruik van de *BugBuster Master Mix* wordt volgend protocol aangehouden:

1. centrifugeer een 10 mL vloeibare cultuur op 10,000 rpm gedurende 10 minuten;
2. verwijder het supernatans;
3. suspendeer de cellen in 500 μL *BugBuster Master Mix* (verdunding 1/20);
4. incubeer de celsuspensie op kamertemperatuur voor 10 - 20 minuten in een ronddraaiende mixer;
5. verwijder de celdebris door centrifugatie op maximale rpm gedurende 20 minuten op 4°C;
6. breng het supernatans over in een verse tube.

3.2.2. Totale concentratiebepaling

De totale concentratie aan eiwitten in het eiwitextract wordt bepaald met de *Direct™ Detect Assay-free Card* van Millipore. In Fig.18 is de *Direct™ Detect Assay-free Card* voorgesteld. De kaart bevat 4 hydrofiele polytetrafluoroëthyleenmembranen (PTFE). De aanwezige proteïnen in het staal binden immers op het PTFE-membraan [43]. Na toevoeging van het staal wordt de kaart in het *Direct Detect System* geplaatst, dat voorgesteld is in Fig. 19. Via een infraroodstraal wordt het aantal amidebindingen, aanwezig in het staal, spectrofotometrisch gemeten.



Figuur 18 *Direct™ Detect Assay-free Card*



Figuur 19: *Direct Detect System* [43]

Bij gebruik van de *Direct™ Detect Assay-free Card* van Millipore wordt volgend protocol aangehouden [43]:

1. pipetteer 2 μ L staal op membraan 2,3 en/of 4;
2. pipetteer op membraan 1, 2 μ L *BugBuster* Buffer, als blanco;
3. laat het membraan gedurende 30 minuten drogen op kamertemperatuur;
4. plaats de kaart in het *Direct Detect System*;
5. duid op de pc "start meting" aan.

3.2.3. Scheiding van de eiwitten

Om een scheiding van de eiwitten van het eiwitextract te verwezenlijken, wordt een horizontale eiwitelektroforese uitgevoerd met de *Amersham™ ECL™ Gel Box* van *GE Healthcare Life Sciences*. Het toestel is voorgesteld in Fig. 20.



Figuur 20: *Amersham™ ECL™ Gel Box* van *GE Healthcare Life Sciences* [44]

3.2.3.1. Elektroforese protocol

Vorbereiding:

1. Voeg 90 mL Tris-glycine-SDS *running buffer* toe aan de 2 reservoirs van de *Amersham™ ECL™ Gel Box*;
2. haal de *Amersham™ ECL™ Gel Cassette* uit de verpakking en verwijder de beschermende tape;
3. plaats de *Amersham™ ECL™ Gel Cassette* in de *Amersham™ ECL™ Gel Box*;
4. plaats de afdekplaat boven op de *Amersham™ ECL™ Gel Box*;
5. laat de gel 12 minuten lopen op 160 V om de gel te conditioneren;
6. haal de afdekplaat eraf en verwijder overtollige gel;
7. Voeg 6 mL *running buffer* toe aan de slotjes [44].

Elektroforese van het eiwitstaal:

1. Neem 10 μ L eiwitextract en voeg hieraan 10 μ L Laemli buffer met SDS (1/50) toe;
2. verwarm de stalen vervolgens 5 minuten op 85°C;
3. voeg het staal toe aan de slotjes;
4. laat de gel op 160 V lopen tot het front beneden is [44].

3.2.3.2. Eiwitkleuring

Na de eiwitelektroforese worden de gescheiden eiwitten zichtbaar gemaakt via een coomassiekleuring van het gel. Zo kan een kwalitatieve bepaling gedaan worden en grootte van de eiwitten aanwezig in het extract worden geschat. Voor de coomassiekleuring wordt volgend protocol aangehouden [44]:

1. **Fixatie:** dompel de gel gedurende 30 minuten onder in de fixeeroplossing bestaande uit 400 mL ethanol, 100 mL azijnzuur en 500 mL milliQ. In deze stap worden de eiwitten neergeslagen en wordt de SDS uit de gel verwijderd.
2. **Kleuren:** verwijder de fixeervloeistof en kleur het gel voor 10 minuten met de kleuroplossing bestaande uit een opgeloste tablet *PhastGel™ Blue R-350*.
3. **Wassen:** dompel het gel vervolgens onder in gedistilleerd water.
4. **Ontkleuren:** dompel het gel onder in de ontkleurvloeistof bestaande uit 250 mL ethanol, 80 mL azijnzuur en 670 mL milliQ. Ververs deze oplossing verschillende keren tot de gekleurde proteïnebandjes duidelijk zichtbaar zijn.

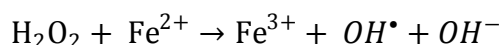
4. Antioxidanttest

Om de antioxidatieve eigenschappen van het CpcA-eiwit aan te tonen, wordt een antioxidant assaytest uitgevoerd. De antioxidantassay wordt uitgevoerd op het totaal eiwitextract van een geïnduceerde en een niet-geïnduceerde cultuur BL21-cellen. De gebruikte antioxidantassay is gebaseerd op het artikel van Dong *et al* [24] mits kleine aanpassingen voor het optimaliseren van de assay.

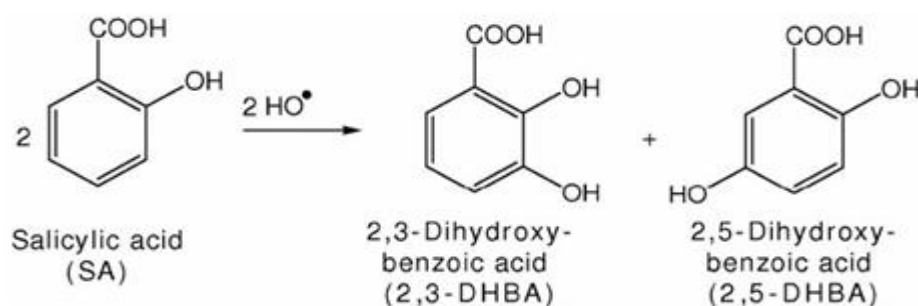
4.1. Principe

In deze assay worden hydroxylradicalen ($\text{OH}^\bullet$) gegenereerd, die daarna kwantiteit worden gemeten door een kleur reactie.

In een eerste stap worden hydroxylradicalen gegenereerd door de reactie tussen H_2O_2 en Fe^{2+} . Deze reactie is beter bekend als de Fentonreactie:



In een tweede stap, reageren de gevormde hydroxylradicalen met salicylzuur tot 2,3-dihydroxy-benzoëzuur (2,3-DHBA) of tot 2,5-dihydroxy-benzoëzuur (2,5-DHBA). De gevormde producten 2,3-DHBA en 2,5-DHBA zijn ijzerchelatoren en vormen met Fe^{3+} een violet-blauwe gekleurd complex. Dat kan gemeten worden via absorptie bij 510 - 530 nm.



Indien de hydroxylradicalen worden geneutraliseerd door antioxidatieve eiwitten, is de kleur reactie minder intens. Het CpcA-eiwit heeft een antioxidatieve werking en zal dus in competitie treden met het salicylzuur om de hydroxylradicalen te neutraliseren. Hierdoor zal er minder 2,3-DHBA en 2,5-DHBA gevormd worden waardoor de violet-blauwe kleur van de oplossing zal afnemen naarmate de concentratie aan CpcA zal stijgen.

4.2. Protocol

Voor de antioxidantassay werd volgend protocol aangehouden:

1. meet van een geïnduceerd en niet-geïnduceerd eiwitextract de totale eiwit concentratie met *Direct™ Detect Assay-free Card* van Millipore;
2. maak een reactiemengsel bestaande uit salicylzuur (6 mM), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2 mM), H_2O_2 (6 mM) en fosfaatbuffer (pH 7.5 – 8.0);
3. maak als negatieve controle ook een reactiemix waar het H_2O_2 wordt vervangen door milliQ ;
4. maak verdunningen van het eiwitextract van 0 - 0.10 - 0.20 - 0.30 - 0.40 - 0.50 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ door het eiwitextract te verdunnen met het reactiemengsel;
5. maak verdunningen van het eiwitextract van 0 - 0.10 - 0.20 - 0.30 - 0.40 - 0.50 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ door het eiwitextract te verdunnen met de controle reactie mix;
6. neem een 96-well plaat en pipetteer allemaal in aparte wells 2x 200 μl (in duplo) van het initiële reactiemengsel (= Ac)(positieve controle), van de controle reactie mix (negatieve controle), en van elke verdunde eiwitconcentratie 2 x 200 μl in het reactie mengsel (= Ai), en van elke verdunde eiwitconcentratie 2 x 200 μl in de controlemix (=Aj)
7. incubeer de 96-well plaat gedurende 15 minuten op 37°C;
8. meet de absorbantie op 530 nm.

5. UV-experiment

In het UV-experiment worden de BL21-cellen, met en zonder *cpcA*-gen, blootgesteld aan verschillende dosissen UV-straling en vervolgens wordt gekeken wat de overleving is van de BL21-cellen mét het *cpcA*-gen (tot expressie gebracht of niet) in vergelijking met deze zonder het *cpcA*-gen.

Dit experiment is dus een fenotypische test om te kijken of het CpcA-eiwit (na inductie) en bijgevolg het *cpcA*-gen, met zijn mogelijk antioxidante eigenschappen, het fenotype van de *E. coli* BL21-cellen kan wijzigen. Dit wil concreet zeggen of de resistentie van BL21-cellen aan UV kan verhogen, door de antioxidantcapaciteit van het CpcA-eiwit.

Praktisch worden de *E. coli* BL21-cellen blootgesteld aan verschillende dosissen UV met een golflengte van 254 nm in het *UV Crosslinker*-gedeelte van het *Hybrilinker HL-2000*-toestel van *UVP Laboratory Products* (USA). Vervolgens wordt bepaald of de overleving bij de, met IPTG, geïnduceerde cellen groter is dan bij de niet-geïnduceerde cellen.

5.1. Stalen

In dit experiment worden 3 verschillende kolonies *E. coli* BL21 met pETDuet-cpcA gebruikt, al dan niet geïnduceerd met IPTG. Het experiment wordt dus uitgevoerd in drievoud. De inductie met IPTG gebeurt volgens het protocol uitgelegd in sectie 3.1.

Als positieve controle wordt hetzelfde experiment in triplicaat uitgevoerd op *E. coli* BL21-cellen met daarin pETDuet-cpcA*, een gelijkaardig construct met het *cpcA*-gen van *Arthrosira platensis* NIES39, bekomen van Cherdkiatikul en Suwanwong [19]. Als negatieve controle worden *E. coli* BL21-cellen met een leeg plasmide (enkel pETDuet-1 vector zónder *cpcA*-gen) onderworpen aan het UV-experiment.

In totaal heb je dus 13 vloeibare culturen:

1. 3x geïnduceerde *E. coli* BL21 met pETDuet-cpcA;
2. 3x niet-geïnduceerde *E. coli* BL21 met pETDuet-cpcA;
3. 3x geïnduceerde *E. coli* BL21 met pETDuet-cpcA* (positieve controle);
4. 3x niet-geïnduceerde *E. coli* BL21 met pETDuet-cpcA* ;
5. 1 x niet-geïnduceerde *E. coli* BL21 met pETDuet-1 (negatieve controle);

5.2. Protocol

Voor het UV-experiment is **1 mL** cultuur *E. coli* BL-21 nodig met een OD₆₀₀-waarde van 1. Dit komt overeen met circa 10⁹ cellen. Dit protocol geldt voor alle 13 de culturen:

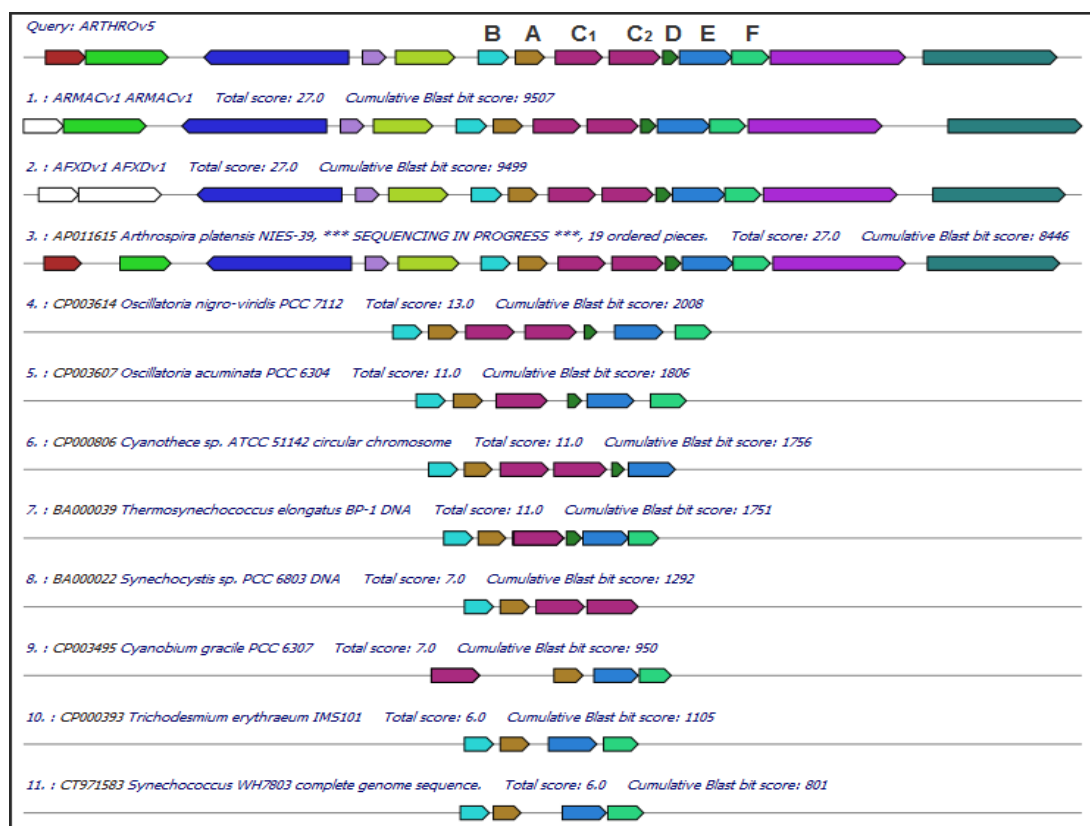
1. meet de absorbantie van de cultuur op een golflengte van 600 nm (= OD₆₀₀);
2. verdun (indien nodig) de cultuur zodat 1 mL cultuur een OD₆₀₀ heeft van 1. Dit komt overeen met 10⁹ cellen:

- byb: $OD_{600} = 1.200 \rightarrow$ om te zorgen dat je nu in 1 mL 10^9 cellen hebt neem je ($1/1.200 =$) 0.83 mL cultuur en pipetteer je dit in een andere tube;
3. centrifugeer en verwijder supernatans;
 4. wassen: voeg 1 mL (10mM) $MgSO_4$ toe aan de cellen, vortex, centrifugeer en verwijder supernatans;
 5. los de cellen op in 1 mL (10mM) $MgSO_4$, je hebt nu 10^9 cellen in 1 mL (= zogenaamde onverdunde cultuur);
 6. maak een verdunningsreeks tot en met een verdunning van 10^{-7} (900 μ L $MgSO_4$ + 100 μ L van vorige verdunning)
 7. plaat volgende verdunning uit op een LB-agar:
 - (+) geïnduceerd: 0: 10^{-7} , 10^{-6}
 10: 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3}
 20: 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1}
 30: 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1}
 40: 10^{-2} , 10^{-1} , 10^0
 50: 10^{-1} , 10^0
 - (-) geen inductie: 0: 10^{-7} , 10^{-6}
 10: 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3}
 20: 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1}
 30: 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 10^0
 40: 10^{-2} , 10^{-1} , 10^0
 50: 10^{-1} , 10^0
 8. stel de gewenste UV-intensiteit ($\times 100 \mu J \cdot cm^{-2}$) in op *UV Crosslinker*-gedeelte van het *Hybrilinker HL-2000*-toestel;
 9. haal het deksel van de plaat, plaats de plaat in het *UV Crosslinker*-gedeelte en duw op start;
 10. herhaal stap 8 en 9 voor elke plaat;
 11. plaats de bestraalde voedingsbodems in de incubator op $30^\circ C$ voor minstens 24 uur;
 12. tel het aantal kolonies per verdunning (telbare plaat: tussen 30 - 300 kolonies).

Resultaten

1. Vergelijkende genomanalyse betreffende het *cpc*-operon

Om na te gaan waar precies het *cpcA* gen gelegen is op het genoom van *Arthrospira* sp. PCC8005 en of dit gen geclusterd is met andere genen relevant voor de biosynthese van fycocyanine werden de volledige genomen van 50 cyanobacteriën met elkaar vergeleken. Hiervoor werd MultiGeneBLAST (MGB) [45] gebruikt. Deze software laat toe volledige genoomsequenties in te laden via GenBank om dan vervolgens in te zoomen op een bepaald gen, gen clusters, operons, of genoomregio's van interesse. Door genoom-tot-genoom BLAST vergelijkingen kunnen dan homologe genoom regio's met elkaar vergeleken worden en similariteiten tussen genen en hun orthologen (i.e. homologe genen in andere organismen) en de overeenkomstige syntenie over deze regio's berekend worden. Het MGB programma plaatst alle bekomen resultaten in een XHTML bestand dat geopend kan worden door een internet browser (bvb. Internet Explorer, Mozilla, ..) zodat de gebruiker de resultaten interactief kan bekijken. In Fig. 21 wordt ter illustratie een screenshot gegeven voor de 11 cyanobacterie genoomsequenties met de hoogste syntenie over de geselecteerde genoom regio (het *cpc*-operon bevattend).



Figuur 21: MultiBlastanalyse van cyanobacteriële genomen met het *cpcBAC₁C₂DEF* operon en omliggende regio's van *Arthrospira* sp. PCC8005 als "seed". Genen met dezelfde kleur worden beschouwd als orthologen (en in het geval van *cpcC 1* en 2, tevens als paralogen wegens genduplicatie).

Uit Fig. 21 valt af te leiden dat het *cpc*-operon bestaat uit 7 genen namelijk *cpcB*, *cpcA*, *cpcC₁*, *cpcC₂*, *cpcD*, *cpcE* en *cpcF*. Verder leert men uit Fig. 21 dat het *cpc*-operon en de omliggende regio's binnen het genus *Arthrospira* zeer goed geconserveerd is gebleven. Ook nauw verwante species zoals *Oscillatoria* vertonen een goed geconserveerd *cpc*-operon. Deze conservatie blijkt echter lager naarmate het organisme minder verwant is met *Arthrospira*. Desniettemin hebben alle genomen in Fig. 21 de *cpcA*, *cpcB*, *cpcE* en *cpcF* genen samen geclusterd, met uitzondering van *Cyanothece* sp. ATCC 51142, *Cyanobium gracile* PCC 6307 en *Synechocystis* sp. PCC 6803; deze species hebben respectievelijk hun *cpcF*, *cpcBD*, en *cpcDEF* loci elders op hun genoom liggen. De andere 39 onderzochte cyanobacteriële genomen beschikken niet over een overeenkomstig, geconserveerd *cpcBACDEF*-operon.

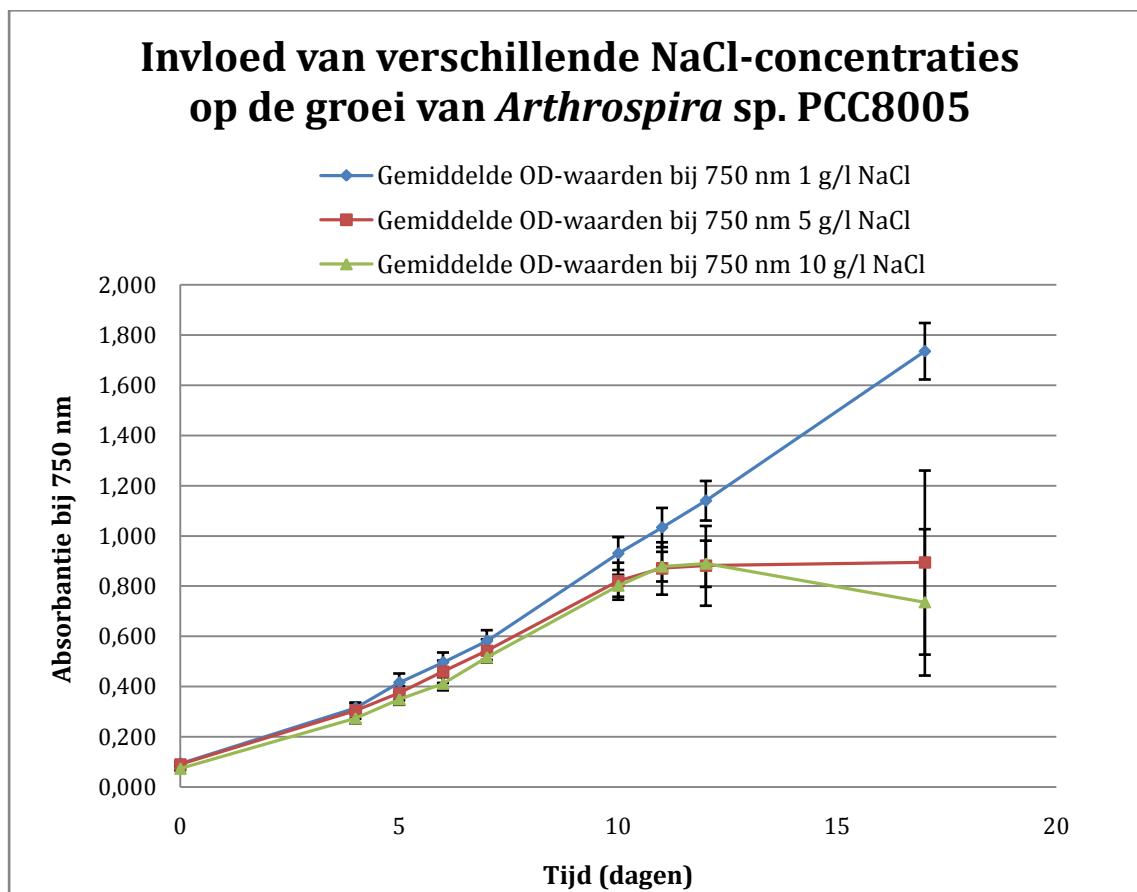
2. Effect van zoutconcentratie op de groei en fycocyanineproductie van *Arthrospira* sp. PCC8005

2.1. OD₇₅₀- en pH-meting

Om de groei van *Arthrospira* sp. PCC8005 op te volgen werd elke werkdag, gedurende 17 dagen, de optische densiteit bij een golflengte van 750 nm (OD₇₅₀) gemeten. De OD₇₅₀ werd gemeten voor 4 onafhankelijke culturen (p1, p2, p3, p4) en dit voor groei in elke zoutconcentratie. In Tabel 8 zijn de gemiddelde resultaten van de 4 replicaten samen met standaardafwijking weergegeven van de metingen bij geselecteerde dagen. Alle individuele metingen zijn terug te vinden in bijlage 1. In Fig. 22 zijn deze resultaten grafisch weergegeven.

Tabel 8: Gemiddelde OD₇₅₀ van *Arthrospira* sp. PCC8005 voor elke NaCl-concentratie met standaarddeviatie

dag	1 g.L⁻¹ NaCl	stdev	5 g.L⁻¹ NaCl	stdev	10 g.L⁻¹ NaCl	stdev
0	0.093	0.007	0.090	0.006	0.074	0.007
4	0.315	0.022	0.304	0.031	0.273	0.020
5	0.416	0.037	0.374	0.028	0.349	0.021
6	0.497	0.040	0.460	0.044	0.412	0.026
7	0.582	0.044	0.543	0.046	0.517	0.010
10	0.931	0.066	0.820	0.074	0.802	0.044
11	1.034	0.078	0.871	0.104	0.878	0.059
12	1.141	0.079	0.882	0.159	0.890	0.092
17	1.736	0.113	0.895	0.367	0.736	0.291



Figuur 22: Invloed van verschillende zoutconcentraties op de groei van *Arthrospira* sp. PCC8005

Uit de resultaten blijkt dat *Arthrospira* sp. PCC8005 zowel in een NaCl-concentratie van 5 en 10 g.L⁻¹ groeit evenals in een 'normale' NaCl-concentratie van 1 g.L⁻¹. Er wordt geen lagfase waargenomen, waaruit blijkt dat *Arthrospira* sp. PCC8005 zich meteen aan alle omstandigheden, inclusief de hogere zoutconcentraties heeft aangepast.

Op basis van de stijging van de OD₇₅₀-waarden kan besloten worden dat de groeisnelheid in de verschillende zoutconcentraties de eerste 7 dagen niet significant (95% betrouwbaarheid) verschilt. Na 7 dagen is er wel een verschil in groeisnelheid.

Bij concentraties van 5 en 10 g.L⁻¹ bereikt de cultuur sneller (en op lager kiemgetal) de stationaire fase. Vanaf dag 11 bereikt *Arthrospira* sp. PCC8005 de stationaire fase in een zoutconcentratie van 5 en 10 g.L⁻¹. Op diezelfde dag bevindt *Arthrospira* sp. PCC8005 zich in een zoutconcentratie van 1 g.L⁻¹ nog steeds in de exponentiële groeifase.

Uit Fig. 22 valt dus af te leiden dat *Arthrospira* sp. PCC8005 in een concentratie van 1 g.L⁻¹ NaCl het best groeit. Uit Tabel 9 blijkt dat, pas na het intreden van de stationaire fase bij de hoge zoutconcentratie een significant verschil te zien is in OD₇₅₀-waarde aldus biomassa productie komt en er mag besloten worden dat er in een NaCl-concentratie van 1 g.L⁻¹ een hogere biomassaconcentratie wordt bereikt dan in een medium met respectievelijk 5 en 10 g.L⁻¹ NaCl. Op dag 17 is er nog steeds geen significant verschil zichtbaar tussen de biomassaconcentraties van *Arthrospira* sp. PCC8005 gegroeit in een NaCl-concentratie van 5 versus 10 g.L⁻¹.

Op het eind van de exponentiële fase en in de stationaire fase is de standaarddeviatie op de metingen echter zeer groot (de OD₇₅₀ tussen p1, p2, p3 en p4 onderling varieerde sterk).

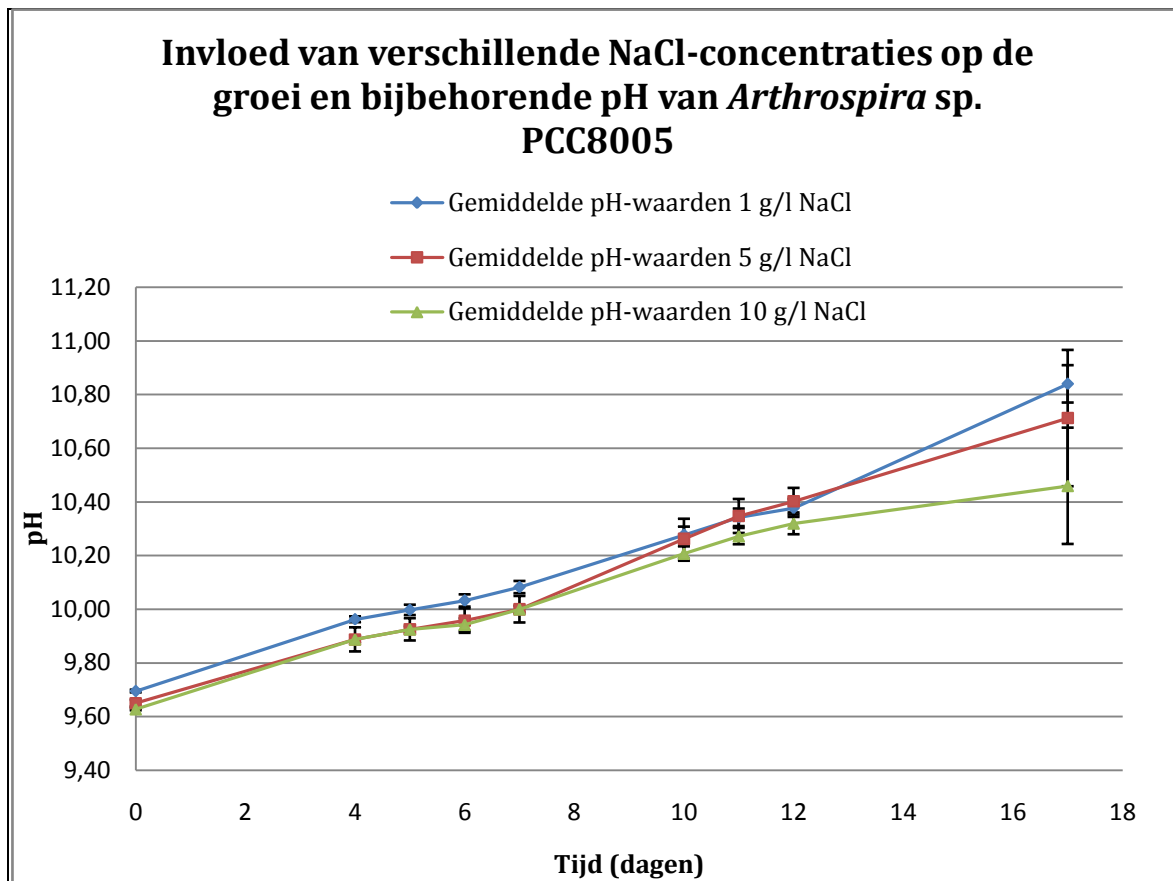
Tabel 9: 95%-betrouwbaarheidsintervallen van de 3 verschillende NaCl-concentraties

dag	gemid- delde OD₇₅₀ 1 g.L⁻¹ NaCl	95 % onder	95% boven	gemid- delde OD₇₅₀ 5 g.L⁻¹ NaCl	95 % onder	95% boven	gemid- delde OD₇₅₀ 10 g.L⁻¹ NaCl	95 % onder	95% boven
0	0.093	0.223	0.128	0.090	-0.114	0.391	0.074	-0.216	0.499
4	0.315	0.175	0.526	0.304	0.108	0.612	0.273	-0.013	0.702
5	0.416	0.275	0.626	0.374	0.163	0.668	0.349	0.038	0.753
6	0.497	0.374	0.726	0.460	0.218	0.723	0.412	0.089	0.804
7	0.582	0.474	0.825	0.543	0.274	0.779	0.517	0.140	0.855
10	0.931	0.773	1.124	0.820	0.440	0.945	0.802	0.292	1.007
11	1.034	0.873	1.224	0.871	0.496	1.001	0.878	0.343	1.058
12	1.141	0.972	1.323	0.882	0.551	1.056	0.890	0.393	1.108
17	1.736	1.470	1.821	0.895	0.829	1.333	0.736	0.647	1.362

De groei van *Arthrospira* sp. PCC 8005 kan ook opgevolgd worden door de pH te meten. De pH geeft niet rechtstreeks een bepaalde celconcentratie aan voor *Arthrospira* sp. PCC8005, maar geeft eerder een kwalitatieve indicatie van de groei van *Arthrospira* sp. PCC8005. Zolang *Arthrospira* sp. PCC8005 aan fotosynthese doet, zal de pH stijgen. De pH werd gedurende 17 dagen elke werkdag in viervoud (p1, p2, p3, p4) gemeten en dit voor elke NaCl-concentratie. Het Zarrouk-UBP medium zelf heeft een start-pH van 9.50. In Tabel 10 is de gemiddelde pH en standaarddeviatie van het Zarrouk-UBP medium weergegeven tijdens groei in een NaCl-concentratie van 1, 5 en 10 g.L⁻¹. Alle individuele pH-metingen zijn terug te vinden in bijlage 1. De resultaten uit Tabel 10 zijn voorgesteld in Fig. 23.

Tabel 10: Gemiddelde pH van *Arthrospira* sp. PCC8005 voor elke NaCl-concentratie met standaarddeviatie

dag	1 g.L⁻¹ NaCl	stdev	5 g.L⁻¹ NaCl	stdev	10 g.L⁻¹ NaCl	stdev
0	9.70	0.005	9.65	0.012	9.63	0.004
4	9.96	0.011	9.89	0.045	9.89	0.013
5	10.00	0.019	9.93	0.042	9.93	0.011
6	10.03	0.023	9.96	0.045	9.94	0.024
7	10.08	0,023	10.00	0.049	10.00	0.012
10	10.28	0.030	10.26	0.075	10.21	0.027
11	10.34	0.033	10.35	0.063	10.27	0.030
12	10.38	0.033	10.40	0.050	10.32	0.041
17	10.84	0.070	10.71	0.254	10.46	0.217



Figuur 23: Invloed van verschillende NaCl-concentraties op de groei en bijbehorende pH van *Arthrospira* sp. PCC8005

In Tabel 10 en Fig. 23 is te zien dat de pH tijdens groei stijgt en dit bij elke NaCl-concentratie. Dit wijst erop dat *Arthrospira* sp. PCC8005 gedurende de 17 dagen durende meting aan fotosynthese doet. Omdat de pH-meting slechts een kwalitatieve indicatie van de groei weergeeft, mogen deze pH-waarden niet meteen gelinkt worden met een bepaalde biomassaconcentratie aan *Arthrospira* sp. PCC8005.

2.2. Biomassaconcentratie en specifieke groeisnelheid (μ)

2.2.1. Biomassaconcentratie uitgedrukt in OD₇₅₀

De biomassaconcentratie aan *Arthrospira* sp. PCC8005 kan uitgedrukt worden in OD₇₅₀. Deze waarden zijn weergegeven in Tabel 11. Uit deze tabel blijkt dat de maximale biomassaconcentratie aan *Arthrospira* sp. PCC8005 bekomen wordt op dag 17 in medium met een concentratie van 1 g.L⁻¹ NaCl (in deze zoutconcentratie werd de stationaire fase op het einde van de metingen, i.e. dag 17, nog niet bereikt).

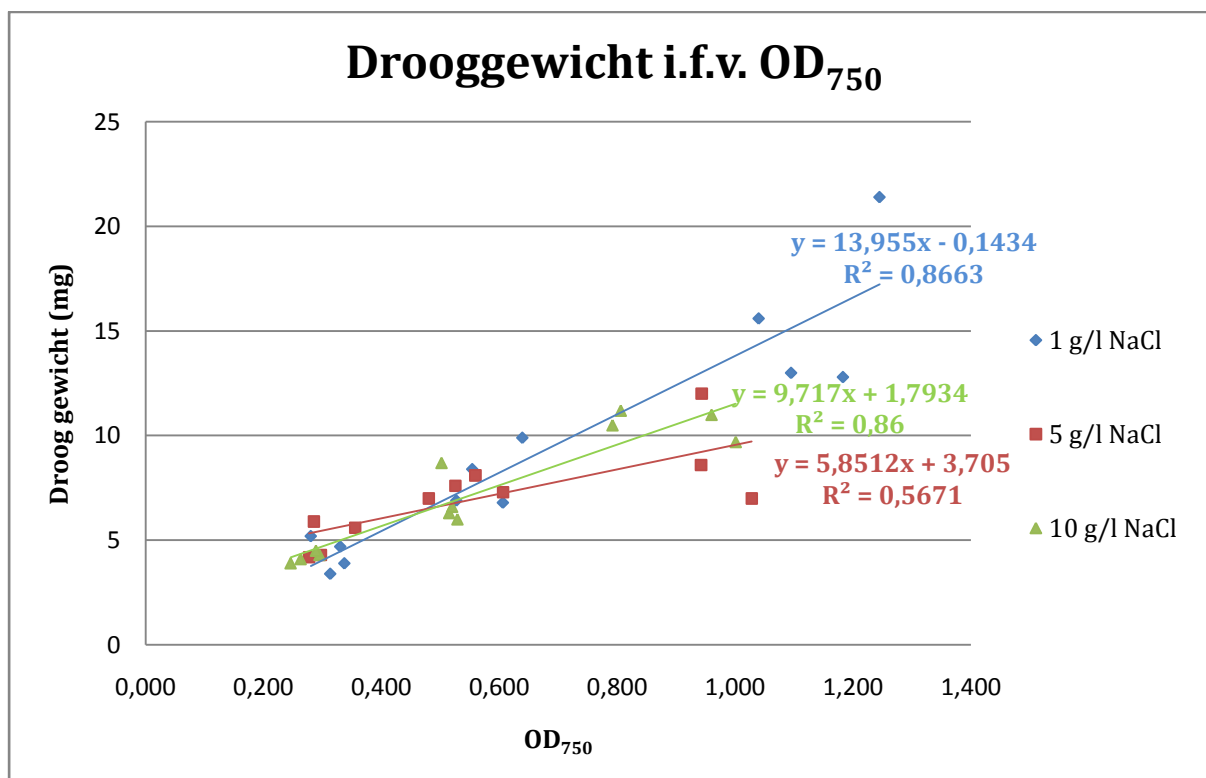
Tabel 11: Gemiddelde biomassaconcentratie van *Arthrospira* sp. PCC8005 (n=4) uitgedrukt in OD₇₅₀ voor elke NaCl-concentratie

dag	1 g.L ⁻¹ NaCl	5 g.L ⁻¹ NaCl	10 g.L ⁻¹ NaCl
0	0.093	0.090	0.074
4	0.315	0.304	0.273
5	0.416	0.374	0.349
6	0.497	0.460	0.412
7	0.582	0.543	0.517
10	0.931	0.820	0.802
11	1.034	0.871	0.878
12	1.141	0.882	0.890
17	1.736	0.895	0.736

2.2.2. Biomassaconcentratie uitgedrukt in g.L⁻¹ per dag

2.2.2.1. Bepaling van de relatie tussen de OD₇₅₀ en de celconcentratie in g.L⁻¹

Om de biomassaconcentratie die gemeten werd in OD₇₅₀, te kunnen omzetten in g/L⁻¹, werd voor 3 verschillende OD₇₅₀-waarden, ook het drooggewicht bepaald, om zo de omrekeningsfactor "a" te bepalen. Uit Fig. 24 kan omrekeningsfactor "a" bepaald worden, afzonderlijk voor elke zoutconcentratie. Uit de helling van de trendlijn wordt omrekeningsfactor "a" bepaald. Hieruit valt af te leiden dat de omrekeningsfactor "a" voor 1, 5 en 10 g.L⁻¹ respectievelijk 13.955, 5.8512 en 9.717. In bijlage 2 zijn alle afgewogen massa's weergegeven.



Figuur 24: Drooggewicht van elk replicaat *Arthrospira* sp. PCC8005 (n=4) in functie van de OD₇₅₀ van *Arthrospira* sp. PCC8005 voor elke NaCl-concentratie.

Er is duidelijk op te merken dat er een grote variatie in het laatste punt is. Hierdoor is het zeer moeilijk om de relatie van de punten via een lineaire relatie te beschrijven (de R^2 -factor is te laag). En omwille van het feit dat dit punt niet kan worden weggelaten omdat er maar 3 punten zijn (dag 4, 7 en 12), zijn deze curves niet betrouwbaar. Daarom wordt niet gekozen om met deze omrekeningsfactoren verder te werken.

Daarom werd een factor "a" genomen die al eerder in het MIC-labo bepaald werd door Hanene Badri voor culturen in normaal Zarrouk-UBP medium (1g.L^{-1}) en onder dezelfde cultuurcondities (temperatuur, lichtintensiteit, schudincubator). Deze omrekeningsfactor "a" bedraagt **1.5**.

2.2.2.2. Maximale biomassaconcentratie in g.L^{-1}

Op basis van de omrekeningsfactor "a" kan voor elke zoutconcentratie afzonderlijk de maximaal bekomen biomassaconcentratie in g.L^{-1} worden bepaald uitgaande van de gemeten OD_{750} . Tabel 12 geeft de biomassaconcentratie uitgedrukt in g DG per liter.

Tabel 12: Maximale gemiddelde biomassaconcentratie van *Arthrospira* sp. PCC8005 uitgedrukt in g.L^{-1}

NaCl-concentratie	dag	factor "a"	maximale biomassaconcentratie in OD_{750}	maximale biomassaconcentratie in g.L^{-1}
1 g.L^{-1} NaCl	17	1.5	1.736	2.60
5 g.L^{-1} NaCl	17	1.5	0.895	1.34
10 g.L^{-1} NaCl	12	1.5	0.890	1.34

Uit Tabel 12 valt af te leiden dat de maximale biomassaconcentratie aan *Arthrospira* sp. PCC8005, in een medium met 1g.L^{-1} NaCl, 2.60 g.L^{-1} bedraagt bijna dubbel zoveel als voor een medium met 5 en 10 g.L^{-1} NaCl (beiden 1.34 g.L^{-1}).

2.2.3. Specifieke groeisnelheid (μ)

De specifieke groeisnelheid (μ) geeft weer hoe snel micro-organismen biomassa produceren tijdens de groeifase. Dit werd in de praktijk gemeten en uitgedrukt op basis van absorptiemetingen en werd herberekend naar gram drooggewicht geproduceerd per gram oorspronkelijke drooggewicht.

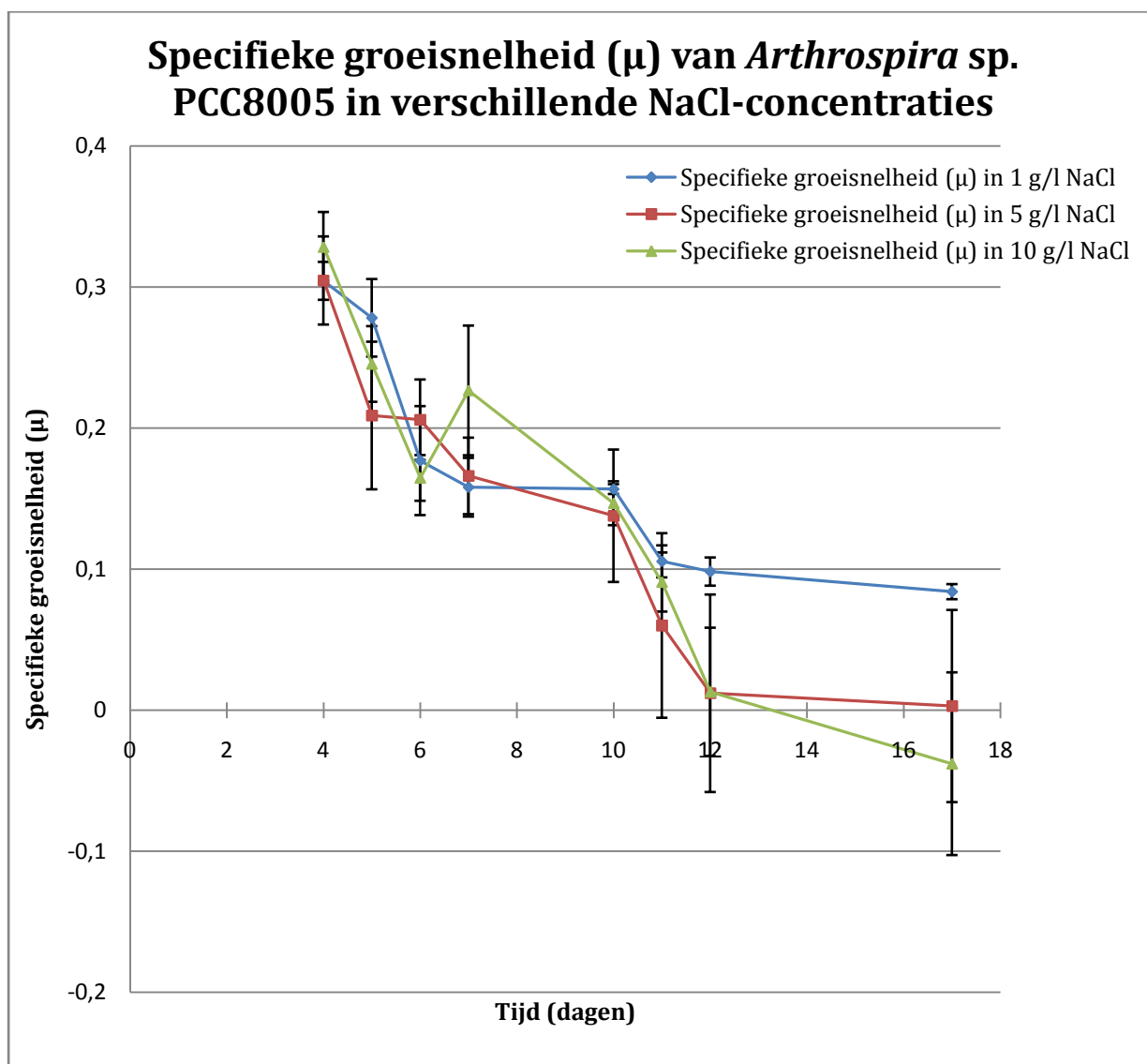
Uit de richtingscoëfficiënt van de exponentiële groeicurve (in logaritme uitgezet):

$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1}$$

waarin " x_1 " en " x_2 " de biomassaconcentraties in OD_{750} zijn op tijdsintervallen t_1 en t_2 . Tabel 13 geeft " μ " weer van *Arthrospira* sp. PCC8005 in de verschillende NaCl-concentraties uitgedrukt in $\ln\text{OD}_{750}$ per dag. Deze resultaten zijn visueel voorgesteld in Fig. 25.

Tabel 13: Gemiddelde specifieke groeisnelheid (μ) van *Arthrospira* sp. PCC8005 (n=4) uitgedrukt in OD₇₅₀ per dag

dag	specifieke groeisnelheid (μ) per dag in 1 g.L ⁻¹ NaCl	specifieke groeisnelheid (μ) per dag in 5 g.L ⁻¹ NaCl	specifieke groeisnelheid (μ) per dag in 10 g.L ⁻¹ NaCl
0			
4	0.304	0.305	0.328
5	0.278	0.209	0.245
6	0.177	0.206	0.165
7	0.158	0.166	0.227
10	0.157	0.138	0.147
11	0.105	0.060	0.091
12	0.098	0.012	0.013
17	0.084	0.003	-0.038



Figuur 25: Gemiddelde specifieke groeisnelheid van *Arthrospira* sp. PCC8005 (n=4) in verschillende NaCl-concentraties

In een medium met NaCl-concentraties van 1, 5 en 10 g.L⁻¹ NaCl bedraagt de maximale μ respectievelijk 0.304; 0.305 en 0.328 uitgedrukt in OD₇₅₀ per dag. Verder valt af te leiden dat de specifieke groeisnelheden van *Arthrospira* sp. PCC8005 in de verschillende NaCl-concentraties dalen in de tijd. Tot dag 12 zijn de specifieke groeisnelheden van *Arthrospira* sp. PCC8005 in de verschillende NaCl-concentraties ongeveer dezelfde. Vanaf dag 12 is duidelijk te zien dat de specifieke groeisnelheid van *Arthrospira* sp. PCC8005 in een medium met 1g.L⁻¹ NaCl significant hoger ligt dan deze van 5 en 10 g.L⁻¹ (0.098 ten opzichte van 0.012 en 0.013). Dit wijst erop dat *Arthrospira* sp. PCC8005 de stationaire fase bereikt heeft na 12 dagen in een medium met 5 en 10 g.L⁻¹NaCl, terwijl het organisme verder doorgroeit (nog in exponentiële fase is) in een medium met 1 g.L⁻¹ NaCl.

De specifieke groeisnelheid kan ook uitgedrukt worden in g.L⁻¹per dag. Hiervoor wordt de specifieke groeisnelheid uitgedrukt in OD₇₅₀ per dag vermenigvuldigd met factor "a" namelijk 1.5.

Uitgaande van de specifieke groeisnelheid uitgedrukt in g.L⁻¹ d⁻¹ wordt de relatie met de generatietijd (g) in dagen weergegeven als:

$$g = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu}$$

Hier is te zien dat de generatietijd in weze overeenkomt met de tijd vereist per celdeling. In deze tijd wordt dus de biomassa verdubbeld. In Tabel 14 is de maximale specifieke groeisnelheid ($\mu_{\max}$) weergegeven in OD₇₅₀ en in gram per gram per dag (g.L⁻¹d⁻¹). In deze tabel is de generatietijd (g) bij deze $\mu_{\max}$ terug te vinden.

Tabel 14: Maximale specifieke groeisnelheid ($\mu_{\max}$) in g.L⁻¹ per dag en bijbehorende generatietijd (g) per dag

NaCl-concentratie	$\mu_{\max}$	$\mu_{\max}$	$\mu_{\max}$	g
	(OD ₇₅₀) per dag	g.L ⁻¹ per dag	g.L ⁻¹ per uur	dag
1 g.L ⁻¹ NaCl	0.304	0.456	0.019	1.5
5 g.L ⁻¹ NaCl	0.305	0.457	0.019	1.5
10 g.L ⁻¹ NaCl	0.328	0.492	0.021	1.4

Uit Tabel 14 valt experimenteel af te leiden dat de maximale groeisnelheid van *Arthrospira* sp. PCC8005 uitgedrukt in g.L⁻¹ per dag het hoogst is in het medium met 10 g.L⁻¹ NaCl, met een waarde van 0.492. Maar deze waarde is niet significant verschillend ten opzichte van de maximale groeisnelheid van *Arthrospira* sp. PCC8005 in het medium met 1 of 5 g.L⁻¹. Er mag dus niet besloten worden dat de maximale groeisnelheid van *Arthrospira* sp. PCC8005 in het medium met 10 g.L⁻¹ NaCl hoger is dan deze in het medium met 1 of 5 g.L⁻¹ NaCl. Statistisch gezien is de maximale groeisnelheid van *Arthrospira* sp. PCC8005 in elk medium dezelfde.

2.3. Pigmentextractie en fycocyanineconcentratie

Volgens het protocol in sectie 1.4 van Materiaal en Methoden wordt de fycocyanineproductie berekend. Tabel 15 geeft per NaCl-concentratie, per meting de OD₆₁₅ en OD₆₅₂ weer die nodig zijn om de concentratie aan c-FC te berekenen, ook weergegeven. Uiteindelijk wordt het % c-FC per cel berekend. Dit laatste is ook weergegeven in Tabel 15 met bijbehorende standaarddeviaties.

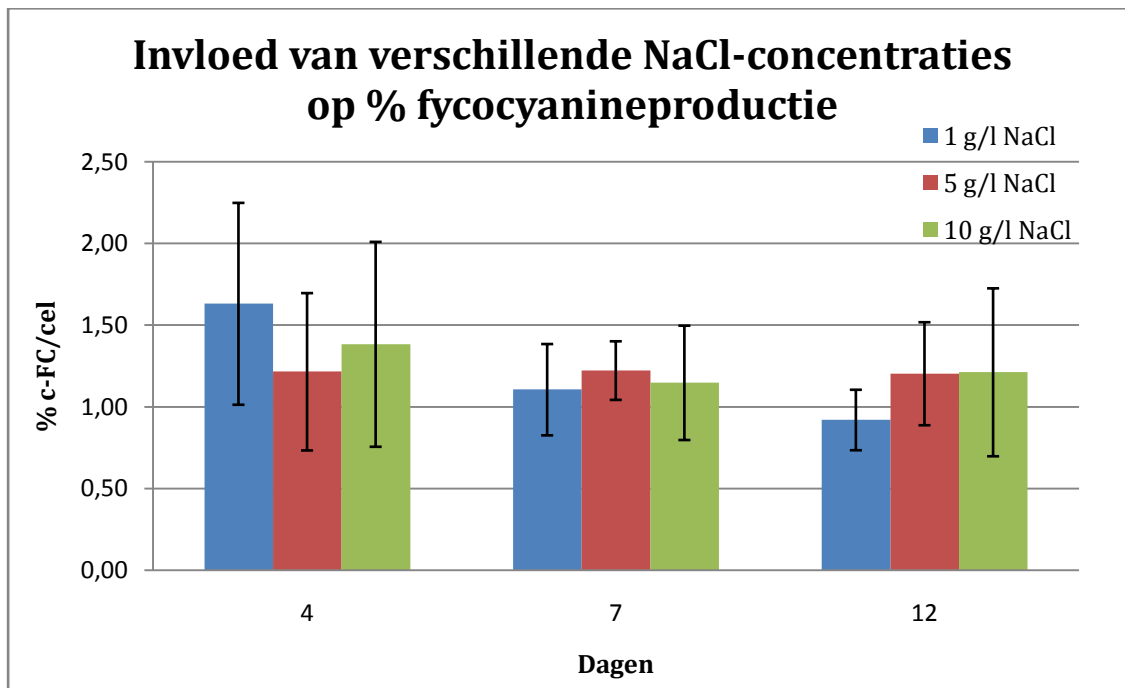
In Fig. 26 is de invloed van de verschillende zoutconcentraties grafisch weergegeven

Tabel 15: Gemiddelde % c-FC per cel *Arthrospira* sp. PCC8005 uitgaande van de concentratie aan c-FC bij de verschillende NaCl-concentraties met bijbehorende standaarddeviaties

	NaCl-Concentratie	OD ₇₅₀	OD ₆₁₅	OD ₆₅₂	concentratie c-FC (mg.mL ⁻¹)	droog gewicht (mg)	% c-FC per cel	stdev
Dag 4	1 g.L ⁻¹ NaCl	0.315	0.514	0.378	0.063	4.3	1.63	0.618
	5 g.L ⁻¹ NaCl	0.582	0.470	0.375	0.055	5.0	1.22	0.482
	10 g.L ⁻¹ NaCl	1.141	0.450	0.366	0.052	4.2	1.38	0.627
Dag 7	1 g.L ⁻¹ NaCl	0.304	0.705	0.556	0.083	8.0	1.11	0.279
	5 g.L ⁻¹ NaCl	0.543	0.681	0.491	0.084	7.5	1.22	0.179
	10 g. L ⁻¹ NaCl	0.882	0.592	0.449	0.071	6.9	1.15	0.350
Dag 12	1 g. L ⁻¹ NaCl	0.273	1.039	0.729	0.130	15.7	0.92	0.185
	5 g. L ⁻¹ NaCl	0.157	1.037	0.987	0.107	9.9	1.20	0.315
	10 g. L ⁻¹ NaCl	0.990	1.008	0.835	0.115	10.6	1.21	0.514

Tabel 16: T-test tussen de verschillende NaCl-concentraties

dag	T-test (tussen 1 g.L ⁻¹ en 5 g.L ⁻¹): p-waarde	T-test (tussen 1 g.L ⁻¹ en 10 g.L ⁻¹): p-waarde	T-test (tussen 5 g.L ⁻¹ en 10 g.L ⁻¹): p-waarde
4	0.357	0.666	0.389
7	0.498	0.822	0.737
12	0.265	0.381	0.986



Figuur 26: Invloed van verschillende NaCl-concentraties op de fycocyanineproductie

Uit Tabel 16 blijkt dat er geen significant verschil is tussen de verschillende NaCl-concentraties. Uit Tabel 15 en Fig. 26 is er wel een mogelijke trend zichtbaar dat de fycocyanineproductie daalt naarmate *Arthrospira* sp. PCC8005 verder groeit. Deze tendens is best zichtbaar bij een NaCl-concentratie van 1 g.L⁻¹, doch ook te zien bij een NaCl-concentratie van 10 g.L⁻¹. Bij een NaCl-concentratie van 5 g/L⁻¹ blijft de fycocyanineproductie gelijk doorheen de groei van *Arthrospira* sp. PCC8005, doch zoals reeds vermeld, niet significant.

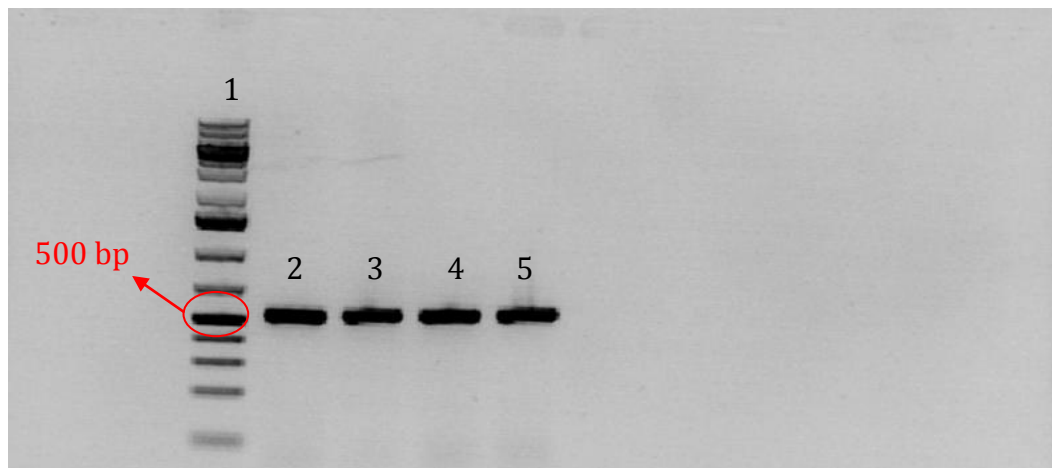
In Fig. 22 en Tabel 9 (pagina 72 en 73 respectievelijk) is te zien dat er pas een significant verschil is vanaf dag 17.

3. Clonering *cpcA*-gen in *E. coli*

3.1. Productie van het *cpcA*-gen

3.1.1. Gelelektroforese

Om na te gaan of de PCR van het *cpcA*-gen met succes gebeurd is, werd het PCR-product gecontroleerd via gelelektroforese. In Fig. 27 wordt het bekomen *cpcA*-amplicon weergegeven. Om te schatten hoe groot het PCR-product ongeveer is, werd een 1kb Plus ladder gebruikt om het PCR-product mee te vergelijken. De 1kb Plus ladder is terug te vinden op lijn 1. Het onderste dikke bandje is representatief voor DNA-fragmenten met een lengte van 500 basenparen (in rood aangeduid). In lijnen 2 tot en met 5 is het *cpcA*-gen terug te vinden na PCR.



Figuur 27: Gelelektroforese van *cpcA*-gen na PCR

Uit Fig. 27 is ten eerste af te leiden dat het juiste amplicon (het *cpcA*-gen bevattend) werd geamplificeerd. Op basis van de gebruikte PCR-primers is de verwachte grootte van het product 524bp (489 bp coderend voor het *cpcA*-gen en 27 en 8 bp van *forward* en *reverse* primer sequenties respectievelijk). Als vervolgens bandjes 2 tot 5 worden vergeleken met de DNA-ladder, is te zien dat deze iets hoger liggen dan het DNA-bandje van de ladder die represent is voor 500 basenparen. Ten tweede zijn er op de gelelektroforese geen andere DNA-fragmenten waar te nemen. Dit wijst erop dat er geen aspecifieke amplificatie was en dat de gebruikte *forward* en *reverse* primer ter hoogte van het juiste doelgen ("target-gen" *cpcA*) op specifieke wijze hybridiseerden tijdens de annealingfase.

3.1.2. Concentratie *cpcA*-amplicon

Na opzuivering van het PCR-product (het *cpcA*-gen bevattend) werd met de *NanoDrop 2000 spectrophotometer* van *ThermoScientific* een concentratie van **138.1 ng.μL⁻¹** aan DNA (*cpcA*- amplicon) gemeten

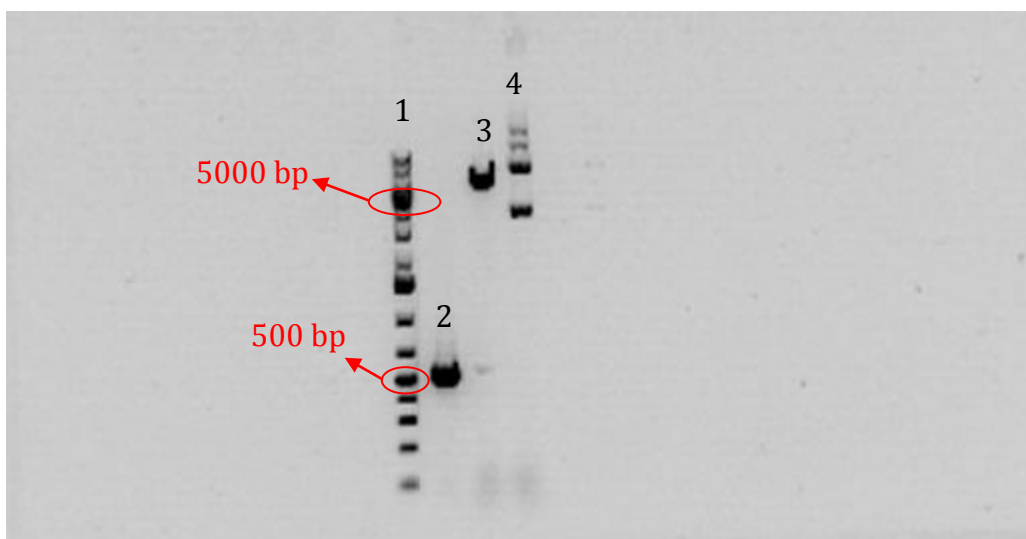
3.2. Productie van de pETDuet-1 vector

Na transformatie van de originele pETDuet-1 vector in DG1-cellen werden deze cellen verder opgekweekt en opgezuiverd. Na extractie van plasmide DNA werd de concentratie aan **pETDuet-1 vector** gemeten met de *NanoDrop 2000 spectrophotometer* van *ThermoScientific* en deze bedroeg **126.3 ng.µL⁻¹**.

3.3. Restrictie en ligatie van *cpcA*-amplicon en pETDuet-1 vector

3.3.1. Gelelektroforese na restrictie met *Bam*HI

Via gelelektroforese werd gecontroleerd of de restrictie van het opgezuiverde *cpcA*-amplicon en de (lege) pETDuet-1 vector gelukt was. In Fig. 28 is het gel weergegeven. Lijn 1 geeft de 1kb Plus ladder weer. Naast het onderste dikke bandje van 500 bp, is het bovenste dikke bandje (5000 bp) in de 1kb Plus ladder belangrijk. In lijn 2 bevindt zich het *cpcA*-amplicon dat geknipt is met *Bam*HI. In de laatste twee lijnen bevinden zich de pETDuet-1 vector geknipt met *Bam*HI(3) en ongeknipt (4).

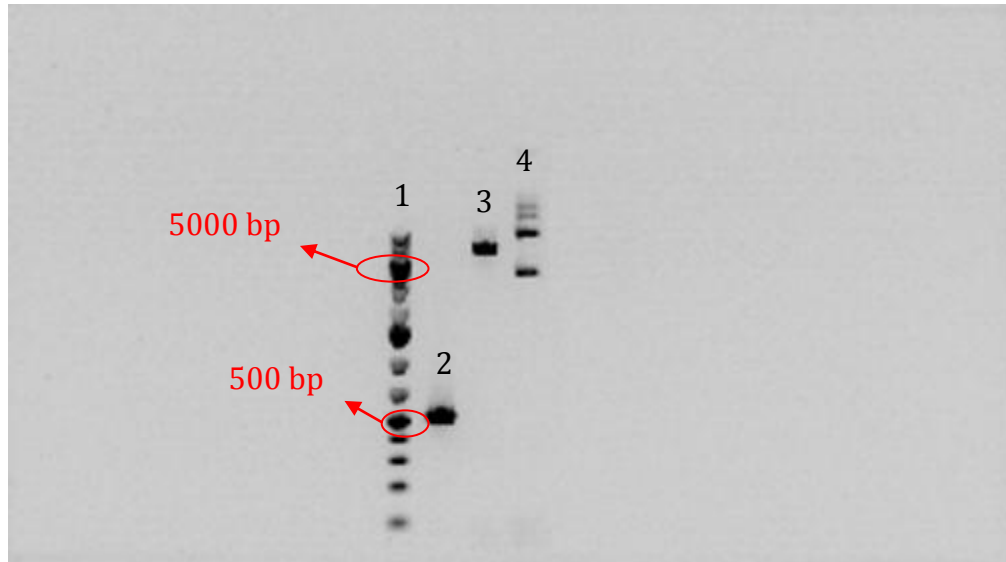


Figuur 28: Gelelektroforese van het *cpcA*-amplicon (2) en de pETDuet-1 vector (3) na restrictie met *Bam*HI en met pETDuet-1 vector zonder restrictie als controle (4)

Uit dit gel kan men besluiten dat na restrictie het genconstruct *cpcA* nog intact is en zich nog steeds ter hoogte van 500bp bevindt. De geknipte pETDuet-1 vector is lineair en heeft een lengte van 5420bp: er is op het gel maar één enkel bandje zichtbaar in laan 3 op de juiste hoogte wat duidt op een complete restrictie. De ongeknipte pETDuet-1, in laan 4, is nog steeds circulair en dit uit zich in de vorming van meerdere bandjes Op basis van deze bevindingen, mag besloten worden dat ook de restrictie pETDuet-1 gelukt is.

3.3.2. Gelelektroforese na restrictie met *Pst*I

In Fig. 29 is het gel weergegeven bekomen via elektroforese van het *cpcA*-amplicon en pETDuet-1 na restrictie met *Pst*I (respectievelijk lijn 2 en 3). Lijn 4 stelt een ongeknijpte pETDuet-1 vector voor.



Figuur 29: Gelelektroforese van het *cpcA*-amplicon (2) en de pETDuet-1 vector (3) na restrictie met *Pst*I en met pETDuet-1 vector zonder restrictie als controle (4)

Van de bovenstaande gelelektroforese kan men zien dat de met *Bam*HI geknijpte DNA's van het *cpcA*-amplicon en de pETDuet-1 vector van de juiste lengte zijn en nog intact zijn na de restrictie met *Pst*I. Het 29 bp-kleine *Bam*HI-*Pst*I intern gelegen in de MCS is niet meer zichtbaar omdat het reeds uit de gelmatrix is gemigreerd. Er zijn dus geen ongewenste DNA-fragmenten gevormd, want dit zou dan resulteren in meerdere zichtbare bandjes op de gel.

Uit het visuele resultaat tussen de gels vóór (Fig. 27) en ná (Figs. 28-29) restrictie van het *cpcA*-amplicon, i.e. met *Bam*HI resp. *Pst*I, kan men onmogelijk afleiden of restrictie van het amplicon compleet was (de restrictiesites liggen slechts enkele bp van de uiteindes van het amplicon zodat fragment grootte nauwelijks wordt beïnvloed), maar DNA restricties werden in overmaat van tijd (90 min) en restrictie-enzymes (2-3 U) uitgevoerd (1 U enzyme knipt standaard i.e. onder optimale condities 1 µg DNA in één uur) en de restrictie van het plasmide DNA geeft één enkele band zodat men veilig kan stellen dat een complete reactie bereikt werd voor beide DNA's en voor beide restrictie enzymes.

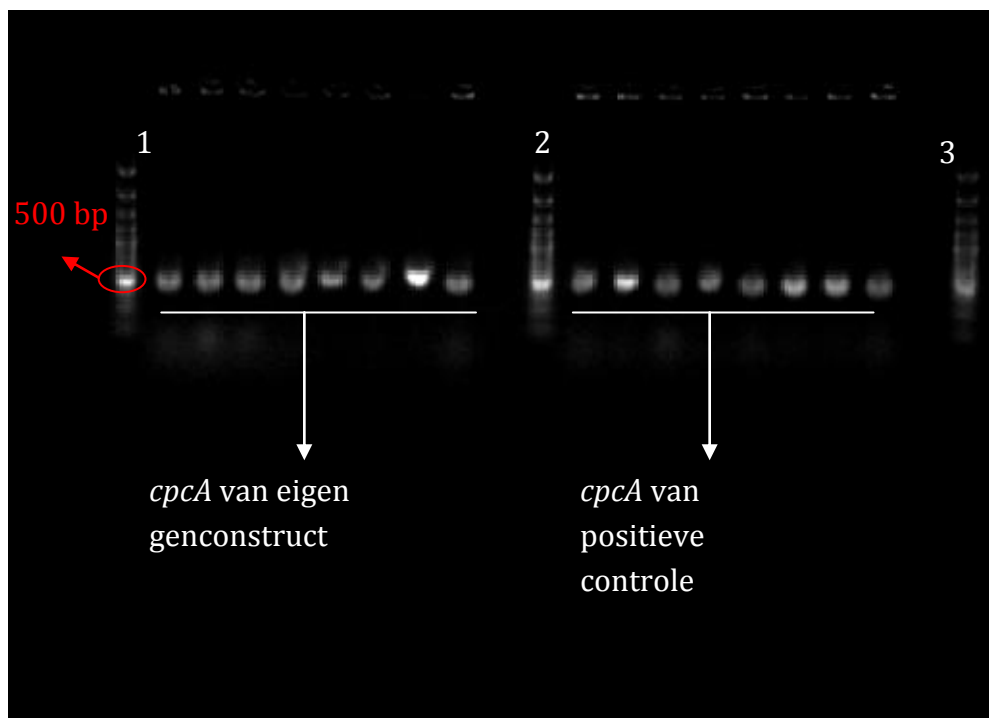
3.3.3. Concentratie geknipt *cpcA*-gen en pETDuet-1 vector

Na opzuivering van de geknipte DNA's van het *cpcA*-amplicon en de pETDuet-1 vector met de Wizard®SV Gel and PCR Clean-up System-kit van Promega werden de finale DNA concentraties bepaald met de NanoDrop 2000 spectrophotometer van Thermo Scientific. De concentratie aan *cpcA*-amplicon bedroeg 63.4 ng.µL⁻¹ en de concentratie aan pETDuet-1 plasmide bedroeg 26.0 ng.µL⁻¹.

Hierna is nog een ligatie- en opzuiveringsstap gevolgd, maar het resultaat daarvan kan pas nagekeken worden na introductie en propagatie van het finale construct in *E. coli* BL21-cellen. Er werd ook een positieve controle (pETDuet-*cpcA**) besteld en verder gebruikt en in de verschillende testen.

3.4. Introductie van pETDuet-*cpcA* in *E. coli* BL21

De nieuw gemaakte pETDuet-*cpcA* vector werd daarna via transformatie in *E. coli* BL21-gebracht. Om te controleren of de transformatie van het genconstruct en de positieve controle (pETDuet-*cpcA**) [19] in de BL21-cellen is gelukt, werd een kolonie-PCR uitgevoerd op acht verschillende, opgezuiverde BL21-kolonies van met construct getransformeerde cellen alsook op acht kolonies van met de positieve controle getransformeerde cellen. De aldus bekomen PCR producten werden gecontroleerd via gelelektroforese (Fig. 30).



Figuur 30: Gelelektroforese na kolonie-PCR van BL21-cellen met daarin het genconstruct en pETDuet-*cpcA**

Uit Fig. 30 valt af te leiden dat in alle opgezuiverde kolonies (zowel met het eigen genconstruct als de positieve controle) het *cpcA*-amplicon aanwezig is. Alle gevormde bandjes hebben een grootte van ongeveer 500bp, vergeleken met de aanwezige 100bp Plus ladder (1,2 en 3), wat overeen komt met de verwachte lengte van de *cpcA*-amplicons namelijk 524 bp (489 bp coderend voor het *cpcA*-gen en 27 en 8 bp van *forward* en *reverse* primer sequenties respectievelijk).

3.4.1. Sequencing

In bijlage 3 zijn de resultaten van de sequencing met de *forward* (1) en de *reverse* (2) primer weergegeven. Uit de resultaten is af te leiden dat er bij de sequencing met de *forward* primer 98.34 % match is en bij de sequencing met de *reverse* primer 94.89 % match. Er is te zien dat er bij de *forward* in het begin en bij de *reverse* bij het einde van de sequentie een aantal *gaps* zijn. Er kan bij sequencing pas na een 10 - 15-tal basenparen een betrouwbare aflezing gebeuren. Maar omdat bidirectioneel afgelezen werd, is te zien dat er, bij de *forward* primer op het einde en bij de *reverse* primer in het begin, wel de goede sequentie is. Er is dus 100 % match.

4. Heterologe expressie van CpcA in *E. coli* en eiwitextractie

Er werd een vloeibare cultuur BL21- pETDuet-cpcA cellen geïnduceerd met IPTG en een andere vloeibare cultuur wordt niet geïnduceerd met IPTG. Als extra negatieve controle werd er ook een ,met leeg pETDuet plasmide (zonder *cpcA*) getransformeerde, en ook deze BL21 pETDuet -cellen werden geïnduceerd met IPTG en een zonder IPTG. Als extra positieve controle werd ook een cultuur van BL21- pETDuet-cpcA*, met het cpcA van *Arthrospira platensis* NIES39 [19] meegenomen, geïnduceerd en niet geïnduceerd. In totaal zijn er dus 6 culturen waarmee gewerkt wordt, elk geanalyseerd in triplicaat.

4.1. Eiwitconcentratiebepaling

In Tabel 17 zijn de concentraties van het totaal eiwitextract weergegeven van de geïnduceerde (+) en niet-geïnduceerde (-) culturen. Na de overnacht inductie is de OD₆₀₀ van de cultuur niet gemeten. Hierdoor is niet geweten hoeveel cellen in de 10 mL, gebruikt voor de eiwitextractie, aanwezig waren. Want een hoger aantal aan cellen resulteert bijgevolg ook in een hogere concentratie aan eiwitten. Uit onderstaande resultaten kan dus weinig worden afgeleid. Deze concentraties kunnen wel als hulpmiddel dienen om de gekleurde eiwitelektroforese gel te analyseren.

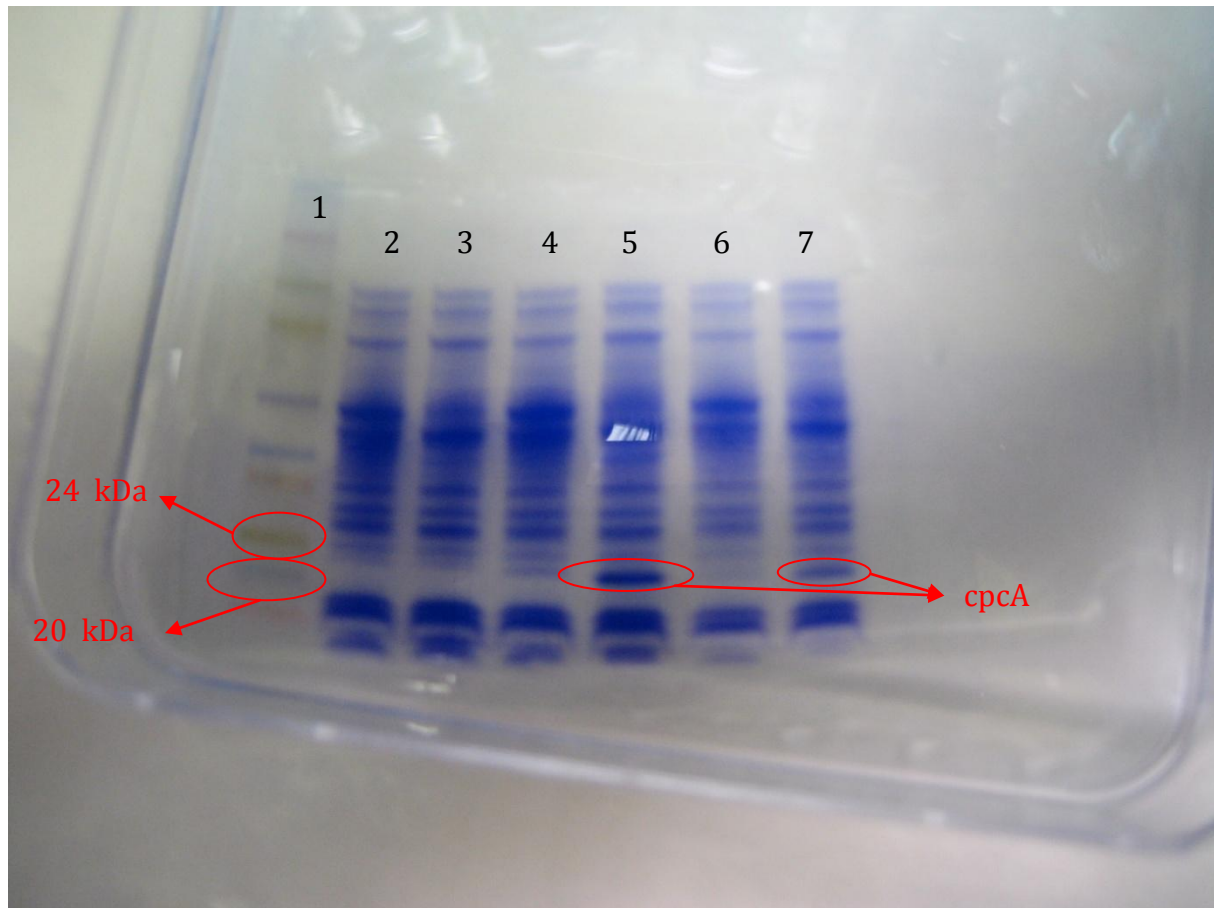
Tabel 17: Eiwitconcentratie van het totaal eiwitextract na eiwitextractie

meting	Concentratie (mg.mL ⁻¹)					
	lege petDuet-1		pETuet-cpcA* [19]		pETDuet-cpcA	
	- IPTG	+ IPTG	- IPTG	+IPTG	- IPTG	+ IPTG
1	6.614	6.166	5.263	6.800	6.182	4.955
2	5.417	6.286	7.136	7.511	6.407	5.010
3	5.852	6.278	7.236	7.177	5.908	5.012
Gem.	5.961	6.243	6.545	7.163	6.166	4.992

4.2. Eiwitelektroforese

Om na te gaan of de inductie van het *cpcA*-gen met IPTG met succes is gebeurd, wordt het eiwitextract vervolgens gescheiden via eiwitelektroforese en daarna gekleurd. Zo ziet men na eiwitelektroforese duidelijk of de inductie al dan niet gelukt is, door de aanwezigheid van een extra eiwit band in het extract van de geïnduceerde cultuur.

In Fig. 31 is het met coomassie gekleurde gel weergegeven. In laan 1 bevindt zich een moleculaire ladder. In laan 2 zit de niet-geïnduceerde (-) negatieve controle en in laan 3 de geïnduceerde (+) negatieve controle. Op lijnen 4 en 5 bevinden zich respectievelijk de niet-geïnduceerde (-) en de geïnduceerde (+) positieve controle (pETDuet-cpcA*) [19]. Vervolgens zit in laan 6 het niet-geïnduceerd eigen genconstruct. In laan 7 zit het eigen geïnduceerd genconstruct (pETDuet-1 + *cpcA*).



Figuur 31: Gekleurde eiwitelektroforesegel

Uit Fig. 31 is af te leiden dat er een extra bandje terug te vinden is in lijn 5 en 7. Dit wil zeggen dat de inductie met IPTG gelukt is en dat het *cpcA*-gen tot expressie is gekomen, zowel in de positieve controle (5) als in de eigen recombinante cellijn (7). Het feit dat het eigen heteroloog tot expressie gebrachte CpcA-eiwit (lijn 7) op dezelfde hoogte ligt als het *cpcA*-eiwit van de positieve controle (lijn 5), wijst erop dat de hele cloneringsprocedure correct is verlopen en het finale geproduceerde eiwit correct is. De grootte van het geïnduceerde recombinant CpcA-eiwit komt ongeveer overeen met 20 kDa na vergelijking met de moleculaire ladder in lijn 1. Dit is ook zo beschreven in het artikel van Cherdkiatikul en Suwanwong [19].

Verder is ook te zien dat het CpcA-bandje in lijn 7 minder dik is vergeleken met de positieve controle in lijn 5. Dit kan te wijten zijn aan het feit dat de concentratie aan totaal eiwitextract van de geïnduceerde positieve controle (7.163 mg.mL^{-1}) groter is dan deze van de geïnduceerde cultuur met het eigen *cpcA*-gen (4.992 mg.mL^{-1}). Deze

concentraties zijn terug te vinden in Tabel 17. Het is trouwens niet enkel het CpcA-eiwitbandje dat minder fel zichtbaar is, maar alle bandjes in baan 7 zijn minder intensgekleurd vergeleken met de andere banen; m.a.w. de concentraties aan totaal eiwitextract liggen overal hoger dan de concentratie aan totaal eiwitextract van de geïnduceerde eigen heterologe cultuur.

5. Antioxidatieve testen

5.1. Antioxidantassay

In tabel 17 zijn de absorbanties bij 530 nm weergegeven met bijbehorende OH[•]-radicalen capteringspercentage van het eiwitextract afkomstig van de IPTG-geïnduceerde *E. coli* BL21 pETDuet-cpcA -cellen. Tabel 18 geeft de absorbanties bij 530 nm weer, alsook het bijbehorende OH[•]-radicalen capteringspercentage van het eiwitextract afkomstig van de niet-geïnduceerde *E. coli* BL21 pETDuet-cpcA cellen. Uit de tabellen valt af te leiden dat het OH[•]-radicalen capteringspercentage stijgt naarmate de concentratie aan eiwitextract stijgt, zowel bij de geïnduceerde als niet geïnduceerde cultuur.

Tabel 18: OH[•]-radicalen capteringspercentage (%) van het totaal eiwitextract van de geïnduceerde *E. coli* BL21 pETDuet-cpcA-cellen

(+) IPTG	Absorbantie bij 530 nm			OH [•] -radicalen capteringspercentage (%)
Concentratie totaal eiwit (mg.mL ⁻¹)	Ac	Ai	Aj	
	0.264			
0		0.258	0.025	11.55
0.1		0.239	0.098	46.59
0.2		0.283	0.158	52.84
0.3		0.247	0.152	64.20
0.4		0.196	0.174	92.61
0.5		0.149	0.114	86.74

Tabel 19: OH[•]-radicalen capteringspercentage (%) van het totaal eiwitextract van de niet-geïnduceerde *E. coli* BL21 pETduet-cpcA-cellen

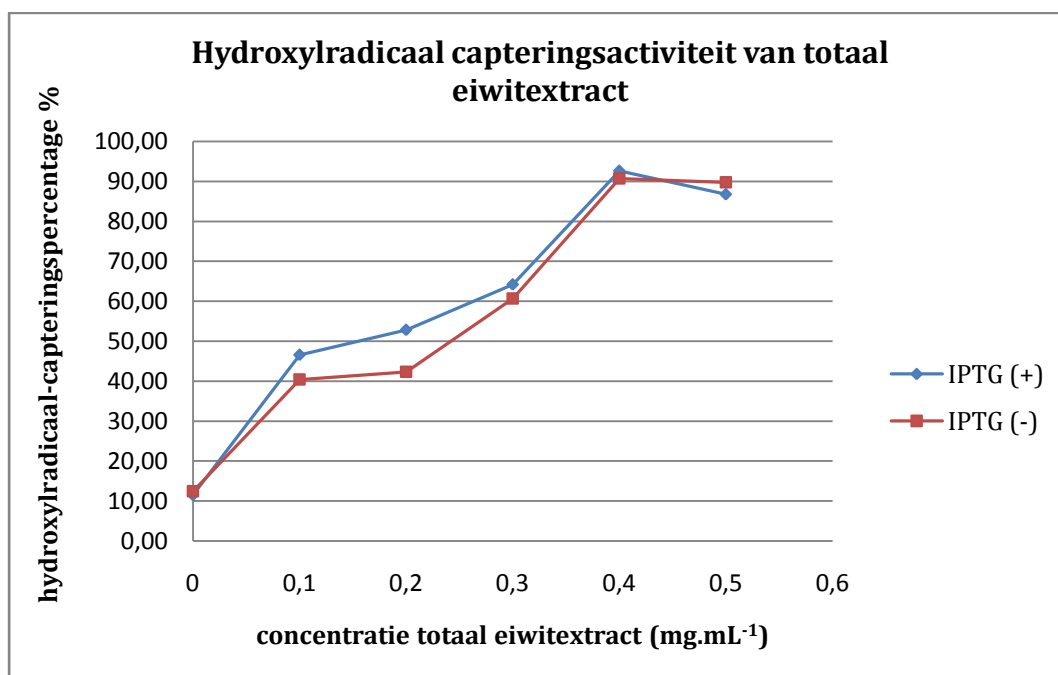
(-) IPTG	Absorbantie bij 530 nm			OH [•] -radicalen capteringspercentage (%)
Concentratie totaal eiwit (mg.mL ⁻¹)	Ac	Ai	Aj	
	0.265			
0		0.259	0.028	12.48
0.1		0.254	0.096	40.45
0.2		0.273	0.120	42.34
0.3		0.250	0.146	60.68
0.4		0.204	0.179	90.74
0.5		0.171	0.144	89.79

De resultaten uit Tabel 18 en Tabel 19 zijn samengevoegd in Fig. 32. Hieruit valt af te leiden dat bij een hogere concentratie aan totaal eiwitextract, het percentage aan OH[•]-radicaalcaptering ook stijgt. Er kan maximaal ongeveer 90% aan hydroxylradicalen geneutraliseerd worden door een concentratie van 0.4 mg.mL⁻¹ van het totaal eiwitextract, zowel afkomstig van de geïnduceerde recombinante BL21-cellen (dus met *cpcA*) als de niet-geïnduceerde.

Het enige verschil tussen het totaal eiwitextract van de geïnduceerde en niet-geïnduceerde cultuur is het feit dat bij de geïnduceerde cultuur het *cpcA*-gen tot expressie is gebracht en dat er dus ook CpcA-eiwit in het totaal eiwitextract aanwezig is. Er is te zien dat het geïnduceerde eiwitextract (blauwe lijn) bij eenzelfde concentratie iets meer hydroxylradicalen kan neutraliseren dan het niet-geïnduceerde eiwitextract (rode lijn). Dit is zo voor concentraties van 0.1 tot en met 0.4 mg.mL⁻¹. Dit is ook te zien in Tabel 18 en Tabel 19. De extra capteringscapaciteit van het geïnduceerde eiwitextract kan toegewezen worden aan het recombinant CpcA-eiwit dat ten gevolge van inductie hierin aanwezig is. Dit is een indicatie dat het CpcA-eiwit een potentiële antioxidante activiteit heeft.

Er is duidelijk te zien in Fig 32. dat de niet-geïnduceerde recombinante BL21-cellen ook hydroxylradicalen neutraliseren. Dit indiceert dat *E. coli* BL21-cellen verschillende eiwitten in zijn cytoplasma heeft zitten (bv. katalase, superoxide dismutase (SOD),...) waardoor ze zelf al tot 90% hydroxylradicalen kunnen neutraliseren.

Maar omdat deze test slechts in duplo is uitgevoerd wegens een beperking aan staal, kan er geen significantie aangetoond worden. Deze test moet nog een keer herhaald worden in dezelfde omstandigheden om definitief te bevestigen dat het CpcA-eiwit een antioxidante activiteit heeft.



Figuur 32: Hydroxylradicaal capteringsactiviteit van totaal eiwitextract

6. UV-experiment

Op basis van het protocol uitgelegd in 5.2. in de sectie "Materiaal en methoden" is het UV-experiment uitgevoerd. Na het tellen van de kolonies werd eerst het aantal *Colony Forming Units* (CFU) per mL berekend. Van hieruit is dan de ratio berekend van het aantal CFU bij een UV-dosis "x": $\left(\frac{CFU-x}{CFU-0}\right)$, ten opzichte van het aantal CFU zonder UV-bestraling ($=0 \mu\text{J}.\text{cm}^{-2}$).

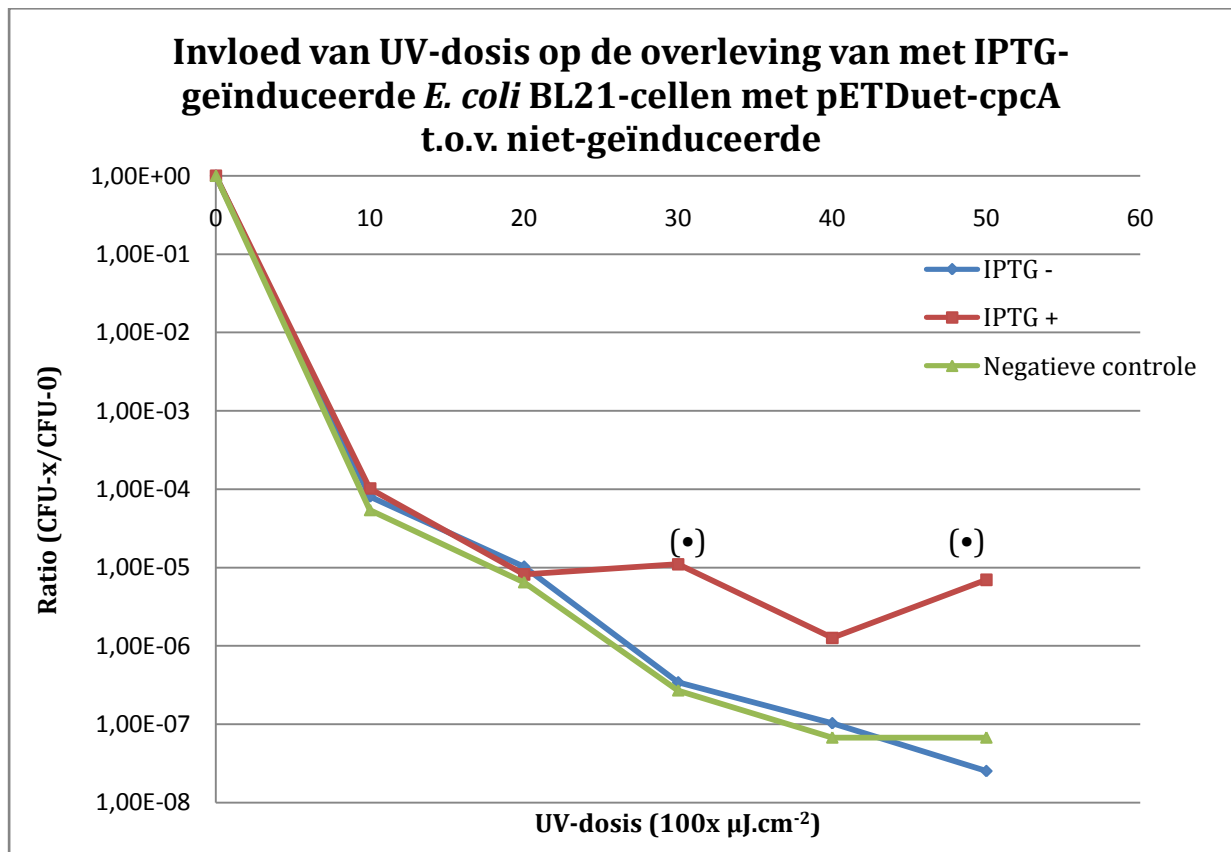
Dit experiment werd uitgevoerd in drievoud ($n=3$) op de *E. coli* BL21-cellen die het pETDuet-cpcA plasmide bezitten. Enerzijds werden een, met IPTG geïnduceerde, cultuur blootgesteld aan verschillende dosissen UV en anderzijds een niet-geïnduceerde cultuur. Hetzelfde experiment werd uitgevoerd op de *E. coli* BL21-cellen die het pETDuet-cpcA* plasmide (= positieve controle) bezitten. Tot slot werd ook een cultuur *E. coli* BL21-cellen met de originele pETDuet-1 plasmide (dus zonder *cpcA*-gen) (= negatieve controle) meegenomen.

In Tabel 20 is de gemiddelde $\left(\frac{CFU-x}{CFU-0}\right)$ -ratio weergegeven voor de geïnduceerde en niet-geïnduceerde *E. coli* BL21-cellen die het pETDuet-cpcA plasmide bezitten en de negatieve controle. Deze resultaten zijn grafisch weergegeven in Fig. 33.

In Tabel 21 is de $\left(\frac{CFU-x}{CFU-0}\right)$ -ratio weergegeven voor de geïnduceerde en niet-geïnduceerde *E. coli* BL21-cellen die het pETDuet-cpcA* plasmide bezitten (=positieve controle) en de negatieve controle. Deze resultaten zijn grafisch weergegeven in Fig. 34.

Tabel 20: Gemiddelde ratio $\left(\frac{CFU-x}{CFU-0}\right)$ van, met IPTG, geïnduceerde en niet-geïnduceerde *E. coli* BL21-cellen die het petDuet-cpcA plasmide bezitten met bijbehorende T-test (tussen IPTG + en IPTG -)

UV-dosis (100x $\mu\text{J}.\text{cm}^{-2}$)	Ratio (CFU-x/ CFU-0) IPTG -	Ratio (CFU-x/ CFU-0) IPTG +	Ratio (CFU-x/CFU-0) negatieve controle	T-test: p-waarde
0	1.00E+00	1.00E+00	1	
10	8.05E-05	1.02E-04	5.41E-05	0.802
20	1.03E-05	8.19E-06	6.49E-06	
30	3.42E-07	1.10E-05	2.70E-07	0.011
40	1.03E-07	1.27E-06	6.76E-08	0.307
50	2.52E-08	6.97E-06	6.76E-08	0.018



Figuur 33: Invloed van UV-dosis op de overleving van, met IPTG, geïnduceerde *E. coli* BL21-cellen met pETDuet-cpcA t.o.v. niet-geïnduceerde

Uit Fig. 33 valt af te leiden dat er bij lagere UV-dosissen van 10,000 en 20,000 $\mu\text{J}.\text{cm}^{-2}$ geen significant verschil is tussen de geïnduceerde en de niet-geïnduceerde *E. coli* BL21-cellen die het pETDuet-cpcA plasmide bevatten en het CpcA-eiwit tot expressie brengen. Bij hogere dosissen UV (30,000 en 50,000 $\mu\text{J}.\text{cm}^{-2}$) is er wél een significant verschil tussen geïnduceerde (waar het cpcA-eiwit tot expressie komt) en de niet-geïnduceerde cellen.

Uit de waarden van de T-test die weergegeven zijn Tabel 20 blijkt dat bij een UV-dosis van 30,000 en 50,000 $\mu\text{J}.\text{cm}^{-2}$ er een significant verschil is tussen de geïnduceerde en de niet-geïnduceerde cultuur (p-waarde < 0.05). De significantie is aangeduid op Fig. 33 door middel van een (•). Bij de UV-dosis van 20,000 $\mu\text{J}.\text{cm}^{-2}$ was er bij de geïnduceerde cultuur 1 van de drie platen waarop te veel kolonies aanwezig waren om te tellen. Daarom zijn er maar 2 metingen bij deze UV-dosis en kan er geen T-test uitgevoerd worden.

Bij een UV-dosis van 40,000 $\mu\text{J}.\text{cm}^{-2}$ is er geen significant verschil tussen geïnduceerde en niet-geïnduceerde *E. coli* BL21-cellen. Experimenteel is er wel een verschil tussen beiden waargenomen, maar dit mag niet statistisch besloten worden op basis van deze resultaten. Maar aangezien dat er wel een significant verschil is bij 30,000 en 50,000 $\mu\text{J}.\text{cm}^{-2}$ wordt er aangenomen dat dit bij 40,000 $\mu\text{J}.\text{cm}^{-2}$ ook zo zal zijn. Door de variatie die er kan ontstaan bij het enten met de glasparels, is het aantal kolonies dat geteld wordt minder betrouwbaar.

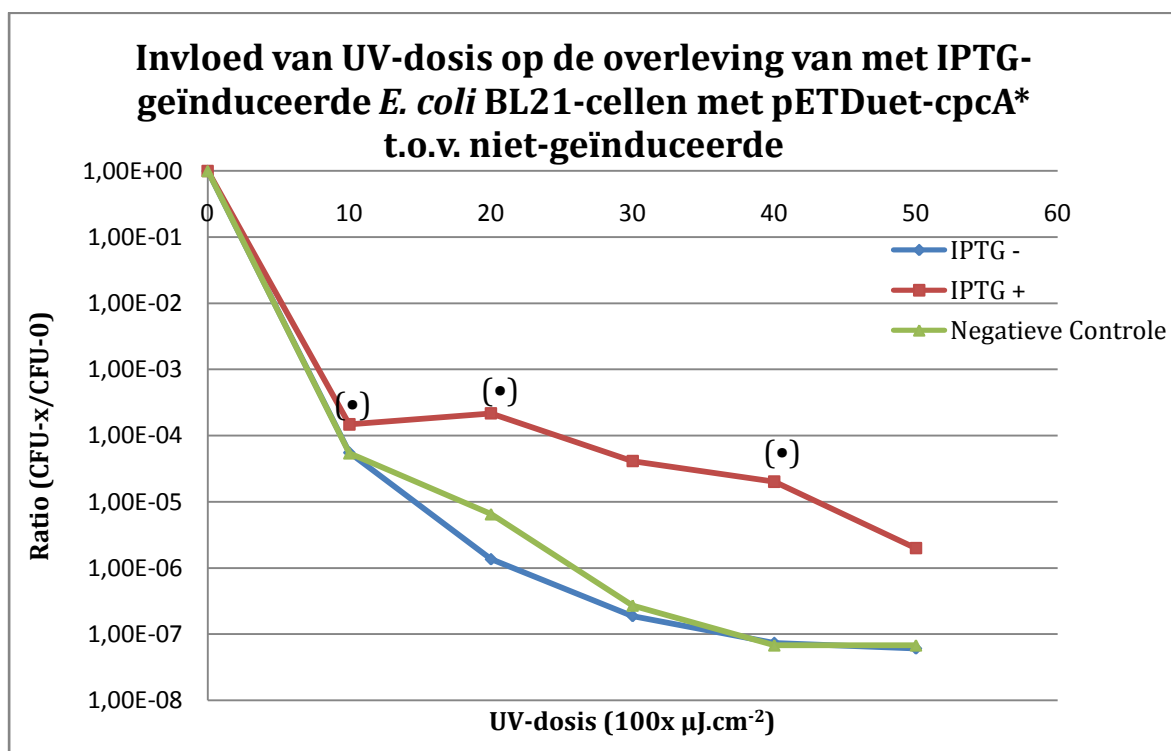
Het blijkt dus dat er meer overlevende *E. coli* BL21-cellen ,waarbij het CpcA-eiwit tot expressie is gekomen na IPTG-inductie, zijn dan bij deze waar het CpcA-eiwit niet tot expressie komt. Hieruit kan besloten worden dat CpcA wel degelijk de capaciteit heeft om de, door UV gegenereerde, OH•-radicalen te neutraliseren en er zo voor te zorgen dat er meer *E. coli* BL21-cellen overleven.

Uit Fig. 33 en uit de waarden van Tabel 20 blijkt ook dat er weinig verschil is tussen de niet-geïnduceerde *E. coli* BL21-cellen die het pETDuet-cpcA plasmide bevatten en de negatieve controle. Hieruit blijkt dat het experiment correct is uitgevoerd.

Tabel 21: Gemiddelde ratio $\left(\frac{\text{CFU-x}}{\text{CFU-0}}\right)$ van, met IPTG, geïnduceerde en niet-geïnduceerde *E. coli* BL21-cellen die het petDUet-cpcA plasmide bezitten met bijbehorende T-test (tussen IPTG + en IPTG -)

UV-dosis (100x µJ.cm ⁻²)	Ratio (CFU-x/ CFU-0) IPTG -	Ratio (CFU-x/ CFU-0) IPTG +	Ratio (CFU-x/ CFU-0) negatieve controle	T-test: p-waarde
0	1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00	
10	5.54E-05	1.48E-04	5.41E-05	0.041
20	1.35E-06	2.17E-04	6.49E-06	0.045
30	1.87E-07	4.13E-05	2.70E-07	0.207
40	7.35E-08	2.01E-05	6.76E-08	0.038
50	6.06E-08	1.99E-06	6.76E-08	0.262

Uit de waarden van de T-test die weergegeven zijn Tabel 21 blijkt dat bij een UV-dosis van 10,000/20,000/ 40,000 µL.cm⁻² er een significant verschil is tussen de geïnduceerde en de niet geïnduceerde cultuur (p-waarde < 0.05). De significantie is aangeduid op Fig. 34 door middel van een (•).



Figuur 34: Invloed van UV-dosis op de overleving van, met IPTG, geïnduceerde *E. coli* BL21-cellen met pETDuet-cpcA* t.o.v. niet-geïnduceerde (= positieve controle)

Fig. 34 toont aan dat er bij UV-dosissen van 10,000, 20,000 en 40,000 $\mu\text{J}.\text{cm}^{-2}$ een significant verschil is tussen de geïnduceerde (waar het cpcA-eiwit tot expressie komt) en de niet-geïnduceerde *E. coli* BL21-cellen die het pETDuet-cpcA* plasmide bevatten. Hier wordt dus bevestigd dat er meer overlevende *E. coli* BL21-cellen zijn, waarbij het CpcA*-eiwit tot expressie is gekomen na IPTG-inductie, zijn dan bij deze waar het CpcA*-eiwit niet tot expressie komt. Hieruit kan nogmaals besloten worden dat CpcA* wel degelijk de capaciteit heeft om de, door UV gegenereerde, $\text{OH}^{\bullet}$ -radicalen te neutraliseren en er zo voor te zorgen dat er meer *E. coli* BL21-cellen overleven.

Bij UV-dosissen van 30,000 en 50,000 $\mu\text{J}.\text{cm}^{-2}$) is er statistisch gezien geen significant verschil tussen geïnduceerde en de niet-geïnduceerde cellen. Experimenteel is ook hier wel een verschil te zien tussen geïnduceerde en niet-geïnduceerde cellen. Om dezelfde reden als bij *E. coli* BL21-cellen die het pETDuet-cpcA plasmide bevatten, kan er aangenomen worden dat er in optimale omstandigheden wél een significant verschil wordt verkregen.

Uit Fig. 34 en uit de waarden van Tabel 21 blijkt ook dat er weinig verschil is tussen de niet-geïnduceerde *E. coli* BL21-cellen die het pETDuet-cpcA* plasmide bevatten en de negatieve controle. Hieruit blijkt dat het experiment correct is uitgevoerd.

Besluit

1. Discussie

De resultaten van de groei en biomassaconcentratie van *Arthrospira* sp. PCC8005 in verschillende zoutconcentraties toont aan dat de groei in 1, 5 of 10 g.L⁻¹ gelijk loopt tot en met dag 12 (niet-significant verschillend). Maar *Arthrospira* sp. PCC8005 groeiende in Zarrouk-UBP medium met NaCl-concentraties van 5 en 10 g.L⁻¹ bereiken na ongeveer 11 dagen reeds de stationaire groeifase. Terwijl *Arthrospira* sp. PCC8005 groeiende in Zarrouk-UBP medium met 1 g.L⁻¹ NaCl op dat moment nog in zijn exponentiële groeifase zit. In de normale zoutconcentratie (1g.L⁻¹) bereikt *Arthrospira* sp. PCC8005 een significant hogere maximale biomassaconcentratie (2.6 g.L⁻¹) dan groeiende in een NaCl-concentratie van 5 en 10 g.L⁻¹ (tweemaal 1.34 g.L⁻¹). In tegenstelling tot wat er werd verwacht, werd er in deze test ook geen significant verschil in fycocyanineproductie van *Arthrospira* sp. PCC8005 gemeten in de verschillende zoutconcentraties tot en met dag 12. Uit deze resultaten blijkt dus dat *Arthrospira* sp. PCC8005 toch al gevoelig is aan een kleine concentratieverhoging aan NaCl in het Zarrouk-UBP medium.

Uit de genomanalyse van het *cpc*-operon blijkt dat een cluster van 7genen verantwoordelijk zijn voor de biosynthese van c-fycocyanine namelijk *cpcB*, *cpcA*, *cpcC₁*, *cpcC₂*, *cpcD*, *cpcE* en *cpcF*. De genen *hox1* en *pcyA* ,die respectievelijk coderen voor eiwitten HO1 en PcyA (nodig voor de aanmaak van de fycocyanobilinechromofoor van c-fycocyanine) , liggen niet in de buurt van het *cpc*-operon, maar elders op het genoom van *Arthrospira* sp. PCC8005. Het *cpc*-operon en de omliggende regio's binnen het genus *Arthrospira* zijn zeer goed geconserveerd gebleven. Naarmate de organismen minder verwant zijn met *Arthrospira* blijkt dat de conservatie van het *cpc*-operon lager is. Dankzij deze bevindingen zijn nu de genen die verantwoordelijk zijn voor de biosynthese van c-fycocyanine voor *Arthrospira* sp. PCC8005 gekend.

Uit de verschillende gelelektroforesegels blijkt dat de verschillende stappen (PCR, productie pETDuet-1 vector, restrictie-ligatie, transformatie in *E. coli* BL21) van de clonering van het *cpcA*-gen met succes zijn uitgevoerd. De gels tonen een bandje ter hoogte van 500 bp, wat ongeveer overeenkomt met de grootte van het *cpcA*-gen (+ de fragmenten van de *forward* en *reverse* primers) namelijk 524 bp zonder de interferentie van andere DNA-fragmenten. De resultaten van de sequencing geven weer dat er 100% match is.

De heterologe expressie van het CpcA-eiwit in *E. coli* BL21 is ook met succes gebeurd. Dit blijkt uit het resultaat van de eiwitelektroforese. De grootte van het geïnduceerde recombinant CpcA-eiwit komt ongeveer overeen met 20 kDa. Dit is ook zo beschreven in het artikel van Cherdkiatikul en Suwanwong [19].

De resultaten van de oxidantassay geeft een experimentele indicatie dat het CpcA-eiwit wel degelijk een antioxidantcapaciteit heeft. Maar omdat deze test slechts in duplo is uitgevoerd wegens een beperking aan staal (en geen significantie kan aangetoond worden), moet deze test nog een keer herhaald worden om definitief te bevestigen dat CpcA dit daadwerkelijk heeft. De resultaten tonen wel aan dat de oxidantassay werkt en uitvoerbaar is, ook op andere stalen.

De resultaten van het fenotypisch UV-experiment tonen aan dat *E. coli* BL21-cellen ,waarbij het CpcA-eiwit tot expressie komt, een hogere overleving hebben na verschillende dosissen UV. Dit geeft aan dat het CpcA-eiwit ook de capaciteit heeft om OH[•]-radicalen te neutraliseren en UV-stralingsbescherming kan bieden aan de cellen

2. Toekomstperspectieven

De resultaten van de invloed van verschillende NaCl-concentraties op de groei en biomassaproductie van *Arthrospira* sp. PCC 8005 geeft een nieuw inzicht in de zouttolerantie van *Arthrospira* sp. PCC 8005 van het MIC-labo. *Arthrospira* sp. PCC 8005 blijkt al gevoelig te zijn aan de lichte NaCl-concentratieverhoging wat resulteert in een lagere maximale biomassaconcentratie. In de fycocyanineproductie van *Arthrospira* sp. PCC 8005 was er geen significant verschil waargenomen na dag 4, 7 en 12. Maar aangezien het verschil in biomassaconcentratie pas significant verschild na 17 dagen groei, is het in de toekomst een optie om dan ook op dit tijdstip pigmentextractie uit te voeren en de fycocyanineconcentratie per cel te bepalen.

Doordat de clonering van het *cpcA*-gen volledig is gelukt, kan dit construct verder gebruikt worden om andere de andere genen van *Arthrospira* sp. PCC 8005 die nodig zijn voor de biosynthese van c-fycocyanine erbij te cloneren. Indien dit lukt, kan het overeenkomstig eiwit tot expressie gebracht worden en kan opnieuw antioxidantactiviteit gemeten worden. Het UV-experiment kan eveneens opnieuw uitgevoerd worden. Op basis van die resultaten kan gekeken worden of het eiwit afkomstig van de insert van de nieuwe genen, coderend voor het c-fycocyanine, bijdragen tot een hogere overleving van *E. coli* BL21-cellen. Het UV-experiment zelf zal dan ook eerst geoptimaliseerd moeten worden. Zo zorgt het enten met glasparsels voor minder correcte resultaten. Het enten met een steriele drigalskispatel is nauwkeuriger en zo voorkom je beter dat er kolonies tegen de rand van de voedingsbodem worden geënt. Deze kolonies zijn immers iets meer beschermd tegen UV-licht dan deze die in het midden geënt zijn.

Door het introduceren van een nieuwe antioxidantassay is het nu mogelijk de antioxidantcapaciteit van verschillende antioxidanten te bepalen. Het is wel nodig om de AO-assay op het totaal eiwitextract opnieuw uit te voeren, maar dan minstens in triplicaat om zo statistisch te kunnen aantonen dat CpcA een antioxidantcapaciteit heeft. In een volgende stap is het dan mogelijk om een opgezuiverd CpcA-eiwit te onderwerpen aan de antioxidantassay zo dat men juist kan weten hoeveel % OH•-radicalen CpcA kan neutraliseren. Bijkomstig zou dan het geëxtraheerde c-fycocyanine ook dezelfde antioxidantassay moeten ondergaan om van daaruit te bepalen hoeveel % aandeel CpcA heeft in het neutraliseren van OH•-radicalen ten opzichte van het complete c-fycocyaninepigment.

Bibliografie

- [1] O. Ciferri, „Spirulina, the Edible Microorganism,” *Microbiological reviews*, nr. 47, pp. 551-578, 1983.
- [2] A. Voshak, *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology*, Negev, Israel: Taylor & Francis, 1997.
- [3] M. Ahsan, B. Habib en M. Parvin, *A review on culture, production and use of spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish*, Rome: Food and agriculture organization of the united nations, 2008.
- [4] S. K. Ali en A. M. Saleh, „Spirulina - An overview,” *International journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, nr. 4, pp. 9 - 15, 2012.
- [5] H. Wu, K. Gao, V. E. Villafañe, T. Watanabe en E. W. Helbling, „Solar UV Radiation on Morphology and Photosynthesis of Filamentous Cyanobacterium *Arthrospira platensis*,” *Applied and Environmental Microbiology*, pp. 5004 - 5013, 2005.
- [6] F. Chen en Y. Zhang, „High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system,” *Enzym and Microbial Technology*, pp. 221 - 224, 1997.
- [7] T. Chen, W. Zheng, Y.-S. Wong, F. Yang en Y. Bai, „Accumulation of selenium in mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose,” *Biosource Technology*, pp. 2260 - 2265, 2006.
- [8] A. Vonshak, R. Guy en M. Guy, „The respons of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* to salt stress,” *Archives of Microbiology*, vol. 150, nr. 5, pp. 417 - 420, 1988.
- [9] L. Hendrickx en et al, „Microbial ecology of the closed artificial ecosystem MELiSSA (Micro-Ecological Life Support System Alternative):Reinventing and compartmentalizing the Earth’s food and oxygen regeneration system for long-haul space exploration missions,” *Research in Microbiology*, pp. 77-86, 2006.
- [10] SCK • CEN - Belgian Nuclear Research Centre, *Space research*, Mol, 2012.
- [11] P. J. Janssen, N. Morin, M. Mergeay, B. Leroy, R. Wattiez, T. Vallaeys, K. Waleron, M. Waleron, A. Wilmotte, P. Quillardet, N. Tandeau de Marsac, E. Talla, C.-C. Zhang en N. Leys, „Genome Sequence of the Edible Cyanobacterium *Arthrospira* sp. PCC 8005,” *Journal of Bacteriology*, vol. 192, nr. 9, pp. 2465 - 2466, 2010.

- [12] R. Henrikson, *Earth food spirulina: How this remarkable blue-green algae can transform your health and our planet*, Hana, Maui, Hawai: Ronore Enterprises, 2009.
- [13] R. Deng en T.-J. Chow, „Hypolipidemic, Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Microalgae Spirulina,” *Cardiovascular Drug Review*, vol. 28, pp. 33 - 45, 2010.
- [14] S. Nagaoka, K. Shimizu en et al, „A Novel Protein C-Phycocyanin Plays a Crucial Role in the Hypocholesterolemic Action of *Spirulina platensis* Concentrate in Rats,” *Journal of Nutrition*, pp. 2425 - 2430, 2005.
- [15] C. Romy, R. González, N. Ledón, D. Ramirez en V. Rimbau, „C-Phycocyanin: A Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects,” *Current Protein and Peptide Science*, pp. 207 - 216, 2003.
- [16] N. T. Eriksen, „Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine,” *Applied Microbiological Biotechnology*, pp. 1 - 14, 2008.
- [17] M. Watanabe en M. Ikeuchi, „Phycobilisome: architecture of a light-harvesting supercomplex,” *Photosynthesis Research*, pp. 265 - 276, 2013.
- [18] A. N. Glazer, „Light Guides.directional energy transfer in a photosynthetic antenna,” *The Journal of Biological Chemistry*, pp. 1 -4, 1989.
- [19] T. Cherdkiatikul en Y. Suwanwong, „Production of the alpha and beta Subunits of Spirulina Allophycocyanin and C-Phycocyanin in *Escherichia coli*: A Comparative Study of Their Antioxidant Activities,” *Journal of Biomolecular Screening*, pp. 1 - 7, 2014.
- [20] L. R. Dartnell, M. C. Storrie-Lombardi en et al, „Degradation of Cyanobacterial Biosignatures by Ionizing Radiation,” *Astrobiology*, pp. 997 - 1016, 2011.
- [21] P. Nomsawai, N. Tandeau de Marsac, J. Thomas, M. Tanticharoen en S. Cheevadhanarak, „Light Regulation of Phycobilisome Structure and Gene Expression in *Spirulina platensis* Cl (*Arthrospira* sp. PCC 9438),” *Plant Cell Physiology*, pp. 1194 - 1202, 1999.
- [22] S. Akimoto, M. Yokono, F. Hamada, A. Teshigahara, S. Aikawa en A. Kondo, „Adaptation of light-harvesting systems of *Arthrospira platensis* to light conditions, probed by time-resolved fluorescence spectroscopy,” *Biochimica and Biophysica Acta*, pp. 1483 - 1489, 2012.

- [23] A. R. Grossman, M. R. Schaeffer, G. G. Chiang en J. L. Collier, „The Phycobilisome, a Light-Harvesting Complex Responsive to Environmental Conditions,” *Microbiological reviews*, pp. 725 - 749, 1993.
- [24] D. Dong, H. Pan en P. Yu, „Directed evolution of the CpcA biosynthetic pathway and optimization of conditions for CpcA production and its properties,” *Applied Microbiological Biotechnology*, pp. 1 - 13, 2014.
- [25] A. J. Tooley, Y. A. Cai en A. N. Glazer, „Biosynthesis of a fluorescent cyanobacterial C-phycocyanin holo- α subunit in a heterologous host,” *Proceeding of the National Academy of Sciences*, pp. 10560 - 10565, 2001.
- [26] X. Guan, S. Qin, Z. Su, F. Zhao, B. Ge, F. Li en X. Tang, „combinational Biosynthesis of a Fluorescent Cyanobacterial Holo- α -Phycocyanin in *Escherichia coli* by Using One Expression Vector,” *Applied Microbiological Biotechnology*, pp. 52 - 59, 2007.
- [27] P. Yu, J.-R. Li, P.-L. Cen, S. Qin en F. Lin, „Cloning and sequencing of the phycocyanin gene from *Spirulina maxima* and its evolutionary analysis,” *Journal of Applied Phycology*, pp. 307 - 310, 2002.
- [28] S. Flora, „Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure,” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, pp. 191 - 206, 2009.
- [29] B. Halliwell en J. Gutteridge, *Free Radicals and other reactive species in Disease*, 2 red., Oxford: Clarendon Press, 1989.
- [30] N. I. Krinsky, „Mechanism of Action of Biological Antioxidants,” *Experimental Biology and Medicine*, pp. 248 - 252, 1992.
- [31] V. B. Bhat en K. M. Madyastha, „C-Phycocyanin: A Potent Peroxyl Radical Scavenger in Vivo and in Vitro,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, pp. 20 - 25, 2000.
- [32] B. Ge, S. Qin, F. Lin, L. Han, Ren en Y., „Antioxidant properties of recombinant allophycocyanin expressed in *Escherichia coli*,” *Journal of Photochemistry and Photobiology*, pp. 175 - 180, 2006.
- [33] W. Zhang, X. Guan, Y. Yang, B. Ge, H. Chen, F. Li en S. Qin, „Biosynthesis of fluorescent allophycocyanin α -subunits by autocatalysis in *Escherichia coli*,” *Biotechnology and Applied Biochemistry*, pp. 135 - 140, 2009.

- [34] A. Patel, S. Mishra en P. K. Ghosh, „Antioxidant Potential of C-phycocyanin isolated from cyanobacterial species *Lyngbyan Phormidium* and *Spirulina spp.*,” *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, pp. 25 - 31, 2006.
- [35] E. A. Lissi, M. Pizarro, A. Aspée en C. Romy, „Kinetics of phycocyanine bilin groups destruction by peroxy radicals,” *Free Radical Biology and Medicine*, pp. 1051 - 1055, 2008.
- [36] G. Atmaca, „Antioxidant Effects of Sulfur-Containing Amino Acids,” *Yonsei Medical Journal*, pp. 776 - 788, 2004.
- [37] I Coninx, *Standard Operating Procedure: Zarrouk-UBP culture medium for Arthrospira sp. PCC8005*, 2009.
- [38] A. Bennet en L. Bogorad, „Complementary Chromatic Adaption In a Filamentous Blue-green Alga,” *The Journal of Cell Biology*, vol. 58, pp. 419 - 435, 1973.
- [39] „MicroScope Microbial Genome Annotation & Analysis Platform,” [Online]. Available: <https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope/home/>. [Geopend mei 2014].
- [40] Thermo Fisher Scientific, *NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer: V1.0 User Manual*, Wilmington, 2009.
- [41] H. Birnboim en J. Doly, „A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA,” *Nucleic Acids Research*, vol. 7, nr. 6, pp. 1513 - 1523, 1979.
- [42] A. Siegel, „Quora,” 16 September 2011. [Online]. Available: [//www.quora.com/How-does-IPTG-induced-gene-expression-work-at-a-molecular-level](https://www.quora.com/How-does-IPTG-induced-gene-expression-work-at-a-molecular-level). [Geopend May 2014].
- [43] Millipore, *Direct Detect Spectrometer User Guide*, Billerica, USA, 2012.
- [44] G. H. L. Sciences, *Amersham ECL Gel Box: User Manual*, Uppsala, Sweden, 2011.
- [45] M. H. Medema, „MultiGeneBlast: Combined BLAST searches for operons and gene clusters,” [Online]. Available: <http://multigeneblast.sourceforge.net/>. [Geopend mei 2014].

Bijlagen

Bijlage 1

Dag	Staal	Arthrospira sp. PCC8005		Arthrospira sp. PCC8005		Arthrospira sp. PCC8005	
		1 g.L ⁻¹ NaCl		5 g.L ⁻¹ NaCl		10 g.L ⁻¹ NaCl	
		Absorbantie bij 750 nm	pH	Absorbantie bij 750 nm	pH	Absorbantie bij 750 nm	pH
0	p1	0.085	9.69	0.091	9.64	0.068	9.63
	p2	0.100	9.69	0.087	9.67	0.069	9.62
	p3	0.100	9.70	0.099	9.64	0.085	9.63
	p4	0.088	9.70	0.082	9.65	0.072	9.63
	gem.	0.093	9.70	0.090	9.65	0.074	9.63
	stdev	0.007	0.005	0.006	0.012	0.007	0.004
4	p1	0.313	9.95	0.297	9.85	0.295	9.90
	p2	0.337	9.98	0.355	9.95	0.263	9.87
	p3	0.330	9.96	0.285	9.84	0.289	9.90
	p4	0.280	9.96	0.277	9.91	0.246	9.88
	gem.	0.315	9.96	0.304	9.89	0.273	9.89
	stdev	0.022	0.011	0.031	0.045	0.020	0.013
5	p1	0.405	9.98	0.392	9.90	0.376	9.94
	p2	0.466	10.03	0.408	9.99	0.328	9.91
	p3	0.428	9.99	0.362	9.88	0.364	9.93
	p4	0.365	9.99	0.334	9.93	0.329	9.92
	gem.	0.416	10.00	0.374	9.93	0.349	9.93
	stdev	0.037	0.019	0.028	0.042	0.021	0.011
6	p1	0.458	10.01	0.486	9.93	0.446	9.97
	p2	0.553	10.07	0.508	10.03	0.395	9.93
	p3	0.515	10.03	0.454	9.91	0.427	9.96
	p4	0.460	10.02	0.390	9.96	0.379	9.91
	gem.	0.497	10.03	0.460	9.96	0.412	9.94
	stdev	0.040	0.023	0.044	0.045	0.026	0.024
7	p1	0.554	10.06	0.559	9.97	0.529	10.02
	p2	0.639	10.12	0.606	10.08	0.515	9.99
	p3	0.606	10.08	0.525	9.95	0.520	10.00
	p4	0.527	10.07	0.480	10.00	0.502	9.99
	gem.	0.582	10.08	0.543	10.00	0.517	10.00
	stdev	0.044	0.023	0.046	0.049	0.010	0.012

10	p1	0.877	10.24	0.897	10.24	0.849
	p2	1.018	10.32	0.719	10.39	0.738
	p3	0.969	10.29	0.884	10.21	0.835
	p4	0.858	10.26	0.781	10.21	0.786
	gem.	0.931	10.28	0.820	10.26	0.802
	stdev	0.066	0.030	0.074	0.075	0.044
11	p1	0.978	10.30	0.963	10.35	0.924
	p2	1.127	10.39	0.694	10.45	0.801
	p3	1.093	10.35	0.922	10.30	0.946
	p4	0.938	10.33	0.905	10.29	0.842
	gem.	1.034	10.34	0.871	10.35	0.878
	stdev	0.078	0.033	0.104	0.063	0.059
12	p1	1.095	10.34	1.028	10.43	1.001
	p2	1.245	10.43	0.613	10.47	0.792
	p3	1.183	10.38	0.943	10.36	0.960
	p4	1.040	10.36	0.942	10.35	0.806
	gem.	1.141	10.38	0.882	10.40	0.890
	stdev	0.079	0.033	0.159	0.050	0.092
17	p1	1.740	10.72	1.117	10.98	1.091
	p2	1.848	10.87	0.338	10.33	0.507
	p3	1.804	10.89	0.814	10.64	0.950
	p4	1.553	10.88	1.309	10.90	0.396
	gem.	1.736	10.84	0.895	10.71	0.736
	stdev	0.113	0.070	0.367	0.254	0.291

Bijlage 2

			massa (mg)			
			lege tube (m1)	na lyofilisatie (m2)	drooggewicht (m2 - m1)	gemiddelde
dag 4	1 g.L ⁻¹ NaCl	p1	1043.5	1046.9	3.4	4.3
		p2	1040.9	1044.8	3.9	
		p3	1045.4	1050.1	4.7	
		p4	1045.8	1050.0	5.2	
	5 g.L ⁻¹ NaCl	p1	1040.1	1044.4	4.3	5.0
		p2	1044.5	1050.1	5.6	
		p3	1042.2	1048.1	5.9	
		p4	1051.6	1055.8	4.2	
	10 g.L ⁻¹ NaCl	p1	1059.8	1064.1	4.3	4.2
		p2	1053.1	1057.2	4.1	
		p3	1053.7	1058.2	4.5	
		p4	1056.3	1060.2	3.9	
dag 7	1 g.L ⁻¹ NaCl	p1	1047.2	1055.6	8.4	8.0
		p2	1039.4	1049.3	9.9	
		p3	1033.6	1040.4	6.8	
		p4	1040.1	1047.0	6.9	
	5 g.L ⁻¹ NaCl	p1	1056.6	1064.7	8.1	7.5
		p2	1048.8	1056.1	7.3	
		p3	1044.9	1052.5	7.6	
		p4	1043.8	1050.8	7.0	
	10 g.L ⁻¹ NaCl	p1	1049.2	1055.2	6.0	6.9
		p2	1060.1	1066.4	6.3	
		p3	1045.6	1052.2	6.6	
		p4	1039.8	1048.5	8.7	
dag 12	1 g.L ⁻¹ NaCl	p1	1039.3	1052.3	13	15.7
		p2	1039.3	1060.7	21.4	
		p3	1053.8	1066.6	12.8	
		p4	1053,8	1069.4	15.6	
	5 g.L ⁻¹ NaCl	p1	1049,2	1056.2	7	9.9
		p2	1045.0	1057.0	12	
		p3	1039.3	1051.3	12	
		p4	1044.9	1053.5	8.6	
	10 g.L ⁻¹ NaCl	p1	1053.2	1062.9	9.7	10.6
		p2	1053.4	1063.9	10.5	
		p3	1045.1	1056.1	11	
		p4	1042.9	1054.1	11.2	

Bijlage 3

>ARTHROv3_1100011 c-phycocyanin alpha-subunit (**cpcA**)

ATGAAAACCCCCCTAACCGAAGCAGTTTCTATCGCTGATTCCCAAGGTCGTTTCCTAAGC
AGCACCGAAATCCAAGTGGCTTTTGGCCGTTTTTCGTCAAGCCAAAGCTGGTCTGGAAGCT
GCTAAAGCTTTGACCTCTAAAGCTGATAGTCTGATCAGTGGTGCTGCCCAAGCAGTGATAC
AACAAGTTCCCCTACACCACCCAAATGCAGGGACCTAACTACGCGGCAGACCAACGCGGT
AAGGACAAATGTGCTCGTGACATAGGCTACTACCTGCGGATGGTAACTTATTGCCTGATT
GCTGGTGGAACTGGCCCCATGGATGAGTACCTGATTGCCGGTATTGATGAAATCAACCGG
ACTTTTCGAGCTTTCTCCAAGCTGGTACATTGAAGCCCTGAAATACATCAAAGCTAACCAC
GGTTTGTCTGGTGACGCTGCTGTTGAAGCTAACTCCTACCTCGACTACGCGATCAACGCC
CTAAGCTAG

Sequence #1:cpcA

Sequence #2: Sequence result cpcA FW primer

Length #1: 489

Length #2: 1512

Gap open: 10.0

Gap extend: 0.5

Length: 482

Identity: 474/482 (98,34%)

Similarity: 474/482 (98,34%)

Gaps: 5/482 (1,04%)

Score: 2846,50

jaligner_1	10	CCCCTAACCGAAGCAG--TTTCTATCGCTGATTCCCAAGGTCGTTTCCTA	57
		.. .	
jaligner_2	1	CCCGGAAC---TGCAGGTTTTCTATCGCTGATTCCCAAGGTCGTTTCCTA	47
jaligner_1	58	AGCAGCACCGAAATCCAAGTGGCTTTTGGCCGTTTTTCGTCAAGCCAAAGC	107
jaligner_2	48	AGCAGCACCGAAATCCAAGTGGCTTTTGGCCGTTTTTCGTCAAGCCAAAGC	97
jaligner_1	108	TGGTCTGGAAGCTGCTAAAGCTTTGACCTCTAAAGCTGATAGTCTGATCA	157
jaligner_2	98	TGGTCTGGAAGCTGCTAAAGCTTTGACCTCTAAAGCTGATAGTCTGATCA	147
jaligner_1	158	GTGGTGCTGCCCAAGCAGTGTAACAACAAGTTCCCCTACACCACCCAAATG	207
jaligner_2	148	GTGGTGCTGCCCAAGCAGTGTAACAACAAGTTCCCCTACACCACCCAAATG	197
jaligner_1	208	CAGGGACCTAACTACGCGGCAGACCAACGCGGTAAGGACAAATGTGCTCG	257
jaligner_2	198	CAGGGACCTAACTACGCGGCAGACCAACGCGGTAAGGACAAATGTGCTCG	247
jaligner_1	258	TGACATAGGCTACTACCTGCGGATGGTAACTTATTGCCTGATTGCTGGTG	307
jaligner_2	248	TGACATAGGCTACTACCTGCGGATGGTAACTTATTGCCTGATTGCTGGTG	297
jaligner_1	308	GAACTGGCCCCATGGATGAGTACCTGATTGCCGGTATTGATGAAATCAAC	357
jaligner_2	298	GAACTGGCCCCATGGATGAGTACCTGATTGCCGGTATTGATGAAATCAAC	347
jaligner_1	358	CGGACTTTCGAGCTTTCTCCAAGCTGGTACATTGAAGCCCTGAAATACAT	407
jaligner_2	348	CGGACTTTCGAGCTTTCTCCAAGCTGGTACATTGAAGCCCTGAAATACAT	397
jaligner_1	408	CAAAGCTAACCACGGTTTGTCTGGTGACGCTGCTGTTGAAGCTAACTCCT	457
jaligner_2	398	CAAAGCTAACCACGGTTTGTCTGGTGACGCTGCTGTTGAAGCTAACTCCT	447
jaligner_1	458	ACCTCGACTACGCGATCAACGCCCTAAGCTAG	489
jaligner_2	448	ACCTCGACTACGCGATCAACGCCCTAAGCTAG	479

Sequence #1: cpcA
Sequence #2: reverse compliment van sequence result cpcA RV primer
Length #1: 489
Length #2: 1390
Gap open: 10.0
Gap extend: 0.5
Length: 489
Identity: 464/489 (94,89%)
Similarity: 464/489 (94,89%)
Gaps: 20/489 (4,09%)
Score: 4257,50

jaligner_1	1	ATGAAAACCCCCCTAACCGAAGCAGTTTCTATCGCTGATTCCCAAGGTCG	50
jaligner_2	921	ATGAAAACCCCCCTAACCGAAGCAGTTTCTATCGCTGATTCCCAAGGTCG	970
jaligner_1	51	TTTCCTAAGCAGCACCAGAAATCCAAGTGGCTTTTGGCCGTTTTCGTCAAG	100
jaligner_2	971	TTTCCTAAGCAGCACCAGAAATCCAAGTGGCTTTTGGCCGTTTTCGTCAAG	1020
jaligner_1	101	CCAAAGCTGGTCTGGAAGCTGCTAAAGCTTTGACCTCTAAAGCTGATAGT	150
jaligner_2	1021	CCAAAGCTGGTCTGGAAGCTGCTAAAGCTTTGACCTCTAAAGCTGATAGT	1070
jaligner_1	151	CTGATCAGTGGTGTGCCCCAAGCAGTGTAACAAGTTCCCCTACACCAC	200
jaligner_2	1071	CTGATCAGTGGTGTGCCCCAAGCAGTGTAACAAGTTCCCCTACACCAC	1120
jaligner_1	201	CCAAATGCAGGGACCTAACTACGCGGCAGACCAACGCGGTAAGGACAAAT	250
jaligner_2	1121	CCAAATGCAGGGACCTAACTACGCGGCAGACCAACGCGGTAAGGACAAAT	1170
jaligner_1	251	GTGCTCGTGACATAGGCTACTACCTGCGGATGGTAACCTATTGCCTGATT	300
jaligner_2	1171	GTGCTCGTGACATAGGCTACTACCTGCGGATGGTAACCTATTGCCTGATT	1220
jaligner_1	301	GCTGGTGGAAGTGGCCCCATGGATGAGTACCTGATTGCCGGTATTGATGA	350
jaligner_2	1221	GCTGGTGGAAGTGGCCCCATGGATGAGTACCTGATTGCCGGTATTGATGA	1270
jaligner_1	351	AATCAACCGGACTTTTCGAGCTTTCTCCAAGCTGGTACATTGAAGCCCTGA	400
jaligner_2	1271	AATCAACCGGACTTTTCGAGCTTTCTCCAAGCTGGTACATTGAAGCCCTGA	1320
jaligner_1	401	AATACATCAAAGCTAACCACGGTTTGTCTGGTGACGCTGCTGTTGAAGCT	450
jaligner_2	1321	AATACATCAAAGCTAACCACGGTTTGTCTGGTGACGCTGCTG-TGAATCT	1369
jaligner_1	451	AACTCCTACCTCGACTACGCGATCAACGCCCTAAGCTAG	489
			
jaligner_2	1370	-ACTCCT-CCT-----GCG-----TGTGTTGG	1389

Auteursrechtelijke overeenkomst

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

Onderzoek naar het fycocyaninepigment van Arthrospira sp. PCC8005, een stralingsresistente cyanobacterie, geselecteerd als voedingssupplement voor ruimtemissies

Richting: **master in de industriële wetenschappen: biochemie**

Jaar: **2014**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Voor akkoord,

Ramaekers, Stijn

Datum: **11/06/2014**