



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Kaja BAŽEC

**MIKROALGE KOT VIR SPOJIN ZA ZAŠČITO PRED  
SONCEM**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2019

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Kaja BAŽEC

**MIKROALGE KOT VIR SPOJIN ZA ZAŠČITO PRED SONCEM**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**MICROALGAE AS A SOURCE OF SUN PROTECTION  
COMPOUNDS**

B. SC. THESIS  
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2019

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija – 1. stopnja Biotehnologija.

Eksperimentalni del je bil opravljen na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Polono Jamnik.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Mojca NARAT  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Polona JAMNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: izr. prof. dr. Nataša ŠTAJNER  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum predstavitve: 8. julij 2019

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du1
DK	UDK 62-784.7:551.521.17:616.5-001.15:582.26(043.2)
KG	UV sevanje, UV filtri, mikroalge, biotehnologija
AV	BAŽEC Kaja
SA	JAMNIK Polona (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
LI	2019
IN	MIKROALGE KOT VIR SPOJIN ZA ZAŠČITO PRED SONCEM
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
OP	VIII, 20, [4] str., 1 pregl., 1 sl., 88 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Diplomsko delo v prvem delu vključuje pregled škodljivih učinkov UV sevanja in UV filtrov, ki jih uporabljajo v sredstvih za zaščito pred soncem. Prav tako vključuje pregled prilagoditve mikroalg na UV sevanje in zaščitne učinke spojin mikroalg, kot alternativa UV filtrom. V drugem delu pa so predstavljeni rezultati eksperimentalnega dela, v katerem je bila kot modelni organizem uporabljena kvasovka <i>S. cerevisiae</i> , na kateri smo preverjali potencialno spremembo preživelosti po tretiranju z ekstrakti mikroalge <i>A. platensis</i> in naknadni izpostavitvi UV sevanju.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du1  
DC UDC 62-784.7:551.521.17:616.5-001.15:582.26(043.2)  
CX UV radiation, UV filters, microalgae, biotechnology  
AU BAŽEC Kaja  
AA JAMNIK Polona (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology  
PY 2019  
TI MICROALGAE AS A SOURCE OF SUN PROTECTION COMPOUNDS  
DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)  
NO VIII, 20, [4] p., 1 tab., 1 fig., 88 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB This thesis in the first part includes an overview of harmful effects of UV radiation and UV filters, which are used in sunscreens. It also includes an overview of microalgal adaptation to UV radiation and protective effects of microalgae compounds as an alternative to UV filters. In the second part of the thesis the experimental results are shown. *S. cerevisiae* yeast was used as a model organism on which we examined the potential change in survival after pretreatment with extracts of microalgae *A. platensis* and after exposure to UV radiation.

## KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO PRILOG	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 ULTRAVIJOLIČNO SEVANJE</b>	<b>1</b>
<b>3 ŠKODLJIVI UČINKI UV SEVANJA</b>	<b>1</b>
3.1 POSLEDICE UV SEVANJA NA KOŽI	1
3.2 MEHANIZMI ŠKODLJIVIH UČINKOV UV SEVANJA	2
<b>4 UV FILTRI KOT ZAŠČITA PRED UV SEVANJEM</b>	<b>4</b>
4.1 ANORGANSKI UV FILTRI	4
4.2 ORGANSKI UV FILTRI	4
<b>5 MIKROALGE</b>	<b>5</b>
5.1 VPLIV UV SEVANJA NA MIKROALGE	5
5.2 PRILAGODITEV MIKROALG NA UV SEVANJE	6
<b>5.2.1 Izogibanje</b>	<b>7</b>
<b>5.2.2 Endogeni sistemi antioksidantov</b>	<b>7</b>
<b>5.2.3 Sinteza UV absorpcijskih spojin</b>	<b>7</b>
<b>5.2.4 Izražanje proteinov toplotnega stresa</b>	<b>8</b>
<b>5.2.5 Popravilo in resinteza poškodovane DNA in proteinov</b>	<b>8</b>
<b>6 RAZISKAVE O UPORABI MIKROALGE <i>Arthrospira platensis</i> V ZAŠČITI PRED SONCEM</b>	<b>9</b>
<b>7 EKSPERIMENTALNI DEL</b>	<b>10</b>
7.1 HIPOTEZE	10
7.2 MATERIALI	10
<b>7.2.1 Mikroorganizmi</b>	<b>10</b>
<b>7.2.2 Gojišča</b>	<b>11</b>
<b>7.2.3 Aparature in naprave</b>	<b>11</b>
7.3 METODE	12

<b>7.3.1 Priprava inokuluma/kultivacija kvasovk</b>	12
<b>7.3.2 Tretiranje kvasovk z mikroalgnimi ekstrakti</b>	12
<b>7.3.3 Določanje kultivabilnosti</b>	12
<b>8 REZULTATI IN DISKUSIJA</b>	13
<b>9 ZAKLJUČEK</b>	14
<b>10 VIRI</b>	15
ZAHVALA	
PRILOGE	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava trdnega gojišča YEPD	11
---------------------------------------------	----

## KAZALO SLIK

Slika 1: Model odzivov mikroalg na UV sevanje	6
-----------------------------------------------	---

## KAZALO PRILOG

Priloga A1: Kultivabilnost tretiranih (300 mikrolitrov osnovne raztopine) celic kvasovke <i>S. cerevisiae</i> (log CFU/mL); brez izpostavitve UV sevanju	
Priloga A2: Kultivabilnost tretiranih (300 mikrolitrov osnovne raztopine) celic kvasovke <i>S. cerevisiae</i> (log CFU/mL); 30-sekundna izpostavitve UV sevanju	
Priloga A3: Kultivabilnost tretiranih (300 mikrolitrov osnovne raztopine) celic kvasovke <i>S. cerevisiae</i> (log CFU/mL); 60-sekundna izpostavitve UV sevanju	
Priloga B1: Kultivabilnost tretiranih (600 mikrolitrov osnovne raztopine) celic kvasovke <i>S. cerevisiae</i> (log CFU/mL), brez izpostavitve UV sevanju	
Priloga B2: Kultivabilnost tretiranih (600 mikrolitrov osnovne raztopine) celic kvasovke <i>S. cerevisiae</i> (log CFU/mL); 30-sekundna izpostavitve UV sevanju	
Priloga B3: Kultivabilnost tretiranih (600 mikrolitrov osnovne raztopine) celic kvasovke <i>S. cerevisiae</i> (log CFU/mL); 60-sekundna izpostavitve UV sevanju	



## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

UV	ultravijolično sevanje
ECM	ekstracelularni matriks (ang. extracellular matrix, ECM)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (ang. reactive oxygen species, ROS)
MMP	matriks metaloproteinaza
CPD	ciklobutan pirimidinski dimeri
6-4PP	6-4 pirimidinski fotoprodukti
SOD	superoksidna dismutaza
CAT	katalaza
GPX	glutation peroksidaza
MAA	aminokislina podobne mikrosporinu (ang. microsporine like amino acid, MAA)
SCY	scitonemin (ang. scytonemin, SCY)
EPS	zunajcelične ali ekstracelularne polimerne substance
Hsp	proteini toplotnega stresa (ang. heat shock proteins, Hsp)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	vodikov peroksid
O <sub>2</sub>	kisik
H <sub>2</sub> O	voda
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	superoksidni anion
OH <sup>•</sup>	hidroksilni radikal
DMSO	dimetil sulfoksid

## 1 UVOD

V zadnjih desetletjih je izpust antropogenih atmosferskih onesnaževalcev privedel do izginotja ozonske plasti ozračja. Posledica ozonske luknje je UV sevanje, ki sedaj dosega zemeljsko površje in povzroča vrsto škodljivih učinkov. Raziskave kažejo, da sedaj uporabljene spojine za zaščito pred soncem predstavljajo problem za človeško zdravje in okolje, v katerem živimo, zato raziskovalci iščejo alternative tem spojinam. V zadnjih letih so postale mikroalge zanimivo področje raziskav alternativnih naravnih spojin za zaščito pred UV sevanjem prav zaradi svojih mehanizmov prilagoditve nanj. Namen diplomskega dela je predstaviti obrambne sisteme mikroalg na UV sevanje in eksperimentalno preveriti UV zaščito ekstraktov mikroalge *Arthrospira platensis* na modelnem organizmu kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*.

## 2 ULTRAVIJOLIČNO SEVANJE

Poznamo tri vrste UV sevanja, in sicer UV-A, UV-B in UV-C sevanje. Glavni del UV sevanja predstavljata UV-A in UV-B sevanje (Schmid in sod., 2004).

UV-B (280-320 nm) predstavlja manjši del sončnega sevanja, ki prodira na zemljino površje in je najbolj citotoksično in mutageno območje sončnega spektra. UV-B sevanje lahko v človeškem telesu zavre imunske reakcije, vzbudi tvorbo ciklobutan pirimidinskih dimerov in fotoproduktov, ki inducirajo mutacije v epidermalnih celicah in privedejo do abnormalne celične rasti ter povečanega tveganja za kožnega raka (Budden in Bowden, 2013). Citotoksični učinki UV-B sevanja se pojavljajo v epidermisu kože in ne prodirajo naprej v dermis (Schmid in sod., 2004).

UV-A sevanje (320-400 nm) je sevanje, ki lahko za razliko od UV-B sevanja prodre v globlje plasti kože, v dermis in je tako odgovorno za staranje kože, gube in pigmentacijo (Schmid in sod., 2004). Fototoksičen učinek UV-B sevanja je veliko večji od UV-A, ampak je izpostavljenost UV-B sevanju odvisna od letnega časa, ure, oblakov in zemljepisne širine. Prisotnost škodljivih odmerkov UV-A sevanja je več ali manj konstantna skozi celo leto in ima veliko večjo intenziteto, kot jo ima UV-B sevanje. UV-A sevanje lahko prodira skozi steklene površine, kar pomeni da je še bolj škodljivo kot UV-B, ki preko steklenih površin ne more prehajati (Schmid in sod., 2004).

## 3 ŠKODLJIVI UČINKI UV SEVANJA

### 3.1 POSLEDICE UV SEVANJA NA KOŽI

Koža je prvi kontaktni organ za zunanje okoljske dejavnike vključno z UV sevanjem in deluje kot pregrada za zaščito notranjih organov (Proksch in sod., 2008). Imamo tri plasti kože: epidermis, dermis in hipodermis (povrhnjica, usnjica in podkožje), vsaka od teh plasti ima različne strukturne in fiziološke funkcije (Goldsmith, 1991).

Zunanji vplivom je najbolj izpostavljen epidermis. Funkcija epidermisa je zaščita kože pred potencialnimi okoljskimi nevarnostmi in zagotovitev biokemijske, kemijske, fizikalne in imunološke ovire. Dermis se nahaja pod epidermisom in je plast vezivnega tkiva, katerega funkcija je zagotavljanje mehanske, kompaktne in fleksibilne opore koži (Baroni in sod., 2012). Glavni celični tip v dermisu so dermalni fibroblasti, ti producirajo ekstracelularni matriks (ang. extracellular matrix, ECM), ki vključuje kolagen in elastin, kar daje koži trdnost, oporo, obliko in elastičnost (Pieraggi in sod., 1985). Tkiva se čez čas postopoma spreminjajo. Spremembe so opazne ravno pri človeški koži, kjer proces staranja kože poteka preko dveh biološko različnih mehanizmov, kronološkega staranja in staranja kože zaradi izpostavljenosti soncu (Farage in sod., 2008).

Kronološko staranje je ireverzibilen proces, ki vključuje genetske, hormonske in metabolne procese. Popravljalni mehanizmi imajo veliko vlogo v preprečevanju staranja, saj če se poškodovane celice ne popravijo, pride do mutacij in to privede do prezgodnjega staranja (Quan in sod., 2015).

Za razliko od kronološkega staranja se staranju zaradi izpostavljenosti soncu lahko izognemo (Kligman in Kligman, 1986). Povzročajo ga okoljska izpostavljenost in neprimerna zaščita pred UV sevanjem. Daljša izpostavitvev okoljskemu oksidativnemu stresu, kot je UV sevanje, ima lahko škodljive posledice za našo kožo (pigmentacija, gube itd.). Te posledice so odvisne od trajanja, pogostosti in intenzivnosti izpostavitve sončnim žarkom (Zouboulis in Makrantonaki, 2011). UV sevanje povzroča spremembe v strukturi proteinov, DNA in drugih biološko pomembnih molekulah, kar vodi do zmanjšanja rasti in delitve celic, izgube pigmenta in fotoinhibicije fotosinteze v organizmih (Llabres in sod., 2010).

Kožne celice so razvile veliko obrambnih mehanizmov in strategij, kot so antioksidanti in DNA popravljalni encimi, s katerimi poskušajo zmanjšati poškodbe, ki nastanejo zaradi UV sevanja. A prevelika izpostavljenost sevanju lahko kljub tem mehanizmom prizadane celice in povzroči mutacije in genetsko nestabilnost (Stiefel in Schwack, 2013).

### 3.2 MEHANIZMI ŠKODLJIVIH UČINKOV UV SEVANJA

UV sevanje v celicah sproži vrsto različnih mehanizmov, ki privedejo do poškodb celic, ki se nato kažejo na naši koži kot klinični znaki staranja zaradi izpostavljenosti soncu, kot so netipična pigmentacija, gube, izguba elastičnosti kože, ohlapnost, suhost in izguba tonusa kože (Naylor in sod., 2011).

UV sevanje lahko direktno ali indirektno poškoduje celično DNA, proteine, lipide in posledično fiziološke in biokemijske procese (Pourzand in Tyrrell, 1999). Oksidativne poškodbe nastanejo v veliki meri zaradi nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti (ang. reactive oxygen species, ROS). Nastanek ROS zaradi znotrajceličnega in zunajceličnega oksidativnega stresa je glavni razlog staranja pri človeku (Kohl in sod., 2011). ROS nastajajo v keratinocitih in fibroblastih in so hitro odstranjeni z neencimskimi in encimskimi antioksidativnimi spojinami, ki jih najdemo v koži in tako preprečujejo njihove škodljive učinke na organizem (Kammeyer, 2015). Če je koncentracija ROS previsoka, tudi antioksidanti ne bodo preprečili poškodb, ki jih bodo ROS zadale našim kožnim celicam in bodo posledično (Imalay in Linn, 1998) poškodovale celične komponente, inducirale

diferenciacijo, senescenco in spremembe vezivnih tkiv (Leem, 2015). Poškodbe vodijo v oksidativni stres, ki je vpleten v številne bolezni (Valko in sod., 2007). Npr. hidroksilni radikal ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) lahko poškoduje komponente DNA molekul, kot so purinske in pirimidinske baze, kar zavira normalne funkcije celic (Halliwell in Gutteridge, 2007).

Nastajajo tudi encimi matriks metaloproteinaze (ang. matrix metalloproteinases, MMP), ki so odgovorni za razgradnjo kolagena in zunajceličnega matriksa (ECM) (Löffek in sod., 2011). Poleg oksidativnih poškodb, ki jih povzročajo ROS, poznamo na ravni DNA še druge poškodbe, ki se kažejo kot napačna vključitev baz med replikacijo in hidrolitične poškodbe (rezultirajo v deaminizaciji baz, depurinizaciji, depirimidinizaciji) (Halliwell in Gutteridge, 2007). Pri depurinizaciji/depirimidinizaciji pride do popolne odstranitve purinskih/pirimidinskih baz, kar lahko povzroči zlom verige DNA. Med različnimi tipi poškodb je zlom dvojne vijačnice najbolj škodljiv, saj vpliva na obe verigi DNA in vodi k izgubi genetskega materiala (Valko in sod., 2007). Vse to privede to DNA lezij, kot so ciklobutan pirimidinski dimeri (ang. cyclobutane-pyrimidine dimers, CPD) in 6-4 pirimidinski fotoprodukti (ang. 6-4 photoproducts, 6-4PP) (Friedberg, 2016; Osakabe in sod., 2015). CPD in 6-4PP poškodbe skupaj z oksidacijskimi produkti prevladujejo in so najbolj obstojne poškodbe, ki lahko povzročijo hude strukturne napake v DNA molekuli. CPD in 6-4PP kažejo različne vplive na DNA konformacijo, oslabijo njene regulatorne funkcije in ostale dinamične procese. Napake v DNA molekuli negativno vplivajo na pomembne celične procese (DNA replikacijo in transkripcijo), kar ogroža celično viabilnost in integriteto ter nenazadnje vodi do mutageneze, tumorogeneze in celične smrti (Lindahl, 1993; Britt, 2004).

Skozi leta so se ljudje začeli zavedati negativnih vplivov UV sevanja in pomembnosti zaščite pred le-tem, zato so začeli iskati rešitve, da bi kožne celice zaščitili pred negativnimi vplivi UV sevanja. Tako se je razvila ideja o sredstvih za zaščito pred soncem, ki vsebujejo UV zaščito. Eden najbolj pomembnih zaščitnih ukrepov, ki bi preprečil poškodbe kože, je bil izum UV filtrov. UV filtri so ena glavnih sestavin krem za zaščito pred soncem in ostalih kozmetičnih izdelkov za nego kože (Stiefel in Schwack, 2013). Skozi čas se je večala potreba po zaščiti pred UV sevanjem in zato so ljudje zahtevali produkte, ki vsebujejo visok zaščitni faktor (ZF) in to je privedlo do večjih količin in različnih UV filtrov (Manová in sod., 2013).

## 4 UV FILTRI KOT ZAŠČITA PRED UV SEVANJEM

### 4.1 ANORGANSKI UV FILTRI

Anorganski oz. mineralni UV filtri so sestavljeni iz mineralnih delcev, ki odbijajo sončno svetlobo. Uporabljajo se v kremah za sončenje kot sredstva za odbijanje tako UV-A kot UV-B sevanja (Hexsel in sod., 2008). Najpogosteje uporabljeni anorganski UV filtri v kremah za sončenje so kovinski oksidi, kot so titanov dioksid ( $\text{TiO}_2$ ) ter cinkov oksid ( $\text{ZnO}$ ). UV filtri imajo škodljive učinke tako na ljudi kot na okolje. Fotoaktivacija kovinskih oksidov z UV sevanjem lahko privede do nastanka ROS, kot npr.  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ki je znan po svoji citotoksičnosti in genotoksičnosti (Serpone in sod., 2007). Kasneje so kovinske mikrodelce zamenjali z nanodelci, a je to privedlo do novih težav. Nanodelci imajo sposobnost prehajanja skozi membrane celic in s tem oslabijo funkcijo dermalnih fibroblastov v koži. Oslabitev fibroblastov se kaže v zmanjšani proliferaciji, mobilnosti in zmanjšani zmožnosti tvorbe kolagena, ki ima funkcijo dajanja opore in oblike (Pan in sod., 2009).

Pri obsevanju  $\text{TiO}_2$  delcev, ekstrahiranih iz sončnih krem, z UV, je sevanje povzročilo zlome enojnih in dvojnih verig v DNA človeških kožnih celic (Dunford in sod., 1997). Huang in sod. (1997) so pokazali, da z UV obsevani  $\text{TiO}_2$  delci inducirajo oksidativne poškodbe DNA, kar vodi do celične smrti. Nekagawa in sod. (1997) so pokazali, da v temi  $\text{TiO}_2$  delci niso genotoksični za DNA, medtem ko obsevani z UV sevanjem povzročijo veliko poškodb DNA.

### 4.2 ORGANSKI UV FILTRI

Organski UV filtri so skupina spojin, ki absorbirajo UV sevanje. Najpogosteje uporabljeni organski UV filtri so butil metoksidibenzoilmetan oz. avobenzon (BM-DBM), oktil metoksicinamat (EHMC) in oktokrilin (OCR). To so fotostabilne kemikalije, ki so učinkovite v zaščiti kože pred UV poškodbami (Manová in sod., 2013). V zadnjih letih se niso povečale skrbi le za uporabo anorganskih filtrov, temveč tudi organskih. OCR UV filter je bil identificiran kot močan alergen, kar je lahko razlog za kontaktni dermatitis pri otrocih in odraslih (Audran in sod., 2010). Poskusi na podganah so pokazali, da izpostavljenost visokim koncentracijam EHMC povzroči velik upad ščitničnih hormonov, kar lahko prizadane tako reproduktivni kot nevrološki razvoj (Klammer in sod., 2007; Axelstad in sod., 2011).

UV filtri in ostale sestavine v kremah za sončenje so učinkovite v zaščiti pred UV sevanjem, a povzročajo poleg pozitivnih učinkov tudi vrsto neželenih učinkov, kot je kontaktna senzitivnost. Poleg negativnih učinkov na ljudi imajo UV filtri škodljive učinke tudi na okolje. Prav negativne posledice, ki jih našemu telesu povzročajo doseganji kozmetični izdelki, so bile povod za začetek znanstvenih raziskav naravnih spojin, ki bi ponudile ljudem varnejšo alternativo (Derikvand, 2016). Ena glavnih tem raziskovanja so prav mikroalge, ki ponujajo naravno alternativo doseganjim UV filtrom.

## 5 MIKROALGE

Mikroalge so raznovrstna skupina prokariontskih fotosintetskih mikroorganizmov. Prokariontske mikroalge imenujemo cianobakterije (Gershwin in Belay, 2007; Slocombe in Benemann, 2016). Najdemo jih v različnih ekosistemih in so sposobne preživetja v skoraj vseh območjih od golih kamnov, do ledu, vročih vrelcev, arktičnih jezer, itd. So največji producenti biomase tako v vodnih kot kopenskih ekosistemih. Njihove celice so sposobne transformacije sončne energije v kemijsko energijo s pomočjo procesa, ki ga imenujemo fotosinteza (Rastogi in sod., 2014).

Mikroalge so vir naravnih produktov, ki imajo medicinsko, industrijsko in kmetijsko vrednost. Njihova uporaba pa sega tudi v kozmetično industrijo, kjer se uporabljajo kot alternativni vir že prisotnim UV filtrom v kozmetičnih izdelkih (Whitton in Potts, 2000). Mikroalge so fotosintetski organizmi in za svoje preživetje porabljajo energijo sonca, CO<sub>2</sub> in osnovna hranila, prav tako pa imajo zaradi razmnoževanja zagotovljeno konstantno zalogo snovi (Witcover in sod., 2013). Veliko naravnih snovi ekstrahiranih iz vodnih ali kopenskih rastlin se lahko uporablja kot vir spojin za zaščito pred soncem prav zaradi njihovih antioksidativnih lastnosti in UV zaščite (Mahajan in Wasule, 2008). Višje rastline se soočajo z ekonomskimi ovirami, kot so počasna, sezonska rast, potreba po obdelovanju zemlje itd., vse to pripomore k višjim stroškom produkcije aktivnih snovi.

Izkoriščanje fotosintetskih prokariontskih mikroalg predstavlja alternativen pristop pridobivanja naravnih spojin za zaščito pred UV sevanjem, saj imajo višjo fotosintetsko stopnjo in hitrejšo rast kot višje rastline. Te mikroorganizme lahko gojimo v zaprtih kultivacijskih sistemih (Quintana in sod., 2011). Mikroalge producirajo metabolite, ki jim pomagajo pri soočanju z visokim UV sevanjem in izsušitvijo, kar jim daje velik potencial, da postanejo glavni vir spojin za zaščito pred soncem (Fleming in Castenholz, 2007).

### 5.1 VPLIV UV SEVANJA NA MIKROALGE

UV sevanje povzroča veliko škode tako kopenskemu kot vodnemu ekosistemu, kjer prizadane tudi mikroalge. Kot vsi fotosintetski organizmi so tudi mikroalge odvisne od sončne svetlobe, ki jo nujno potrebujejo za normalno življenje in delovanje procesov, tako se ne morejo izogniti škodljivim učinkom UV sevanja. A na kaj vse imajo vpliv škodljivi učinki UV sevanja v mikroalgah?

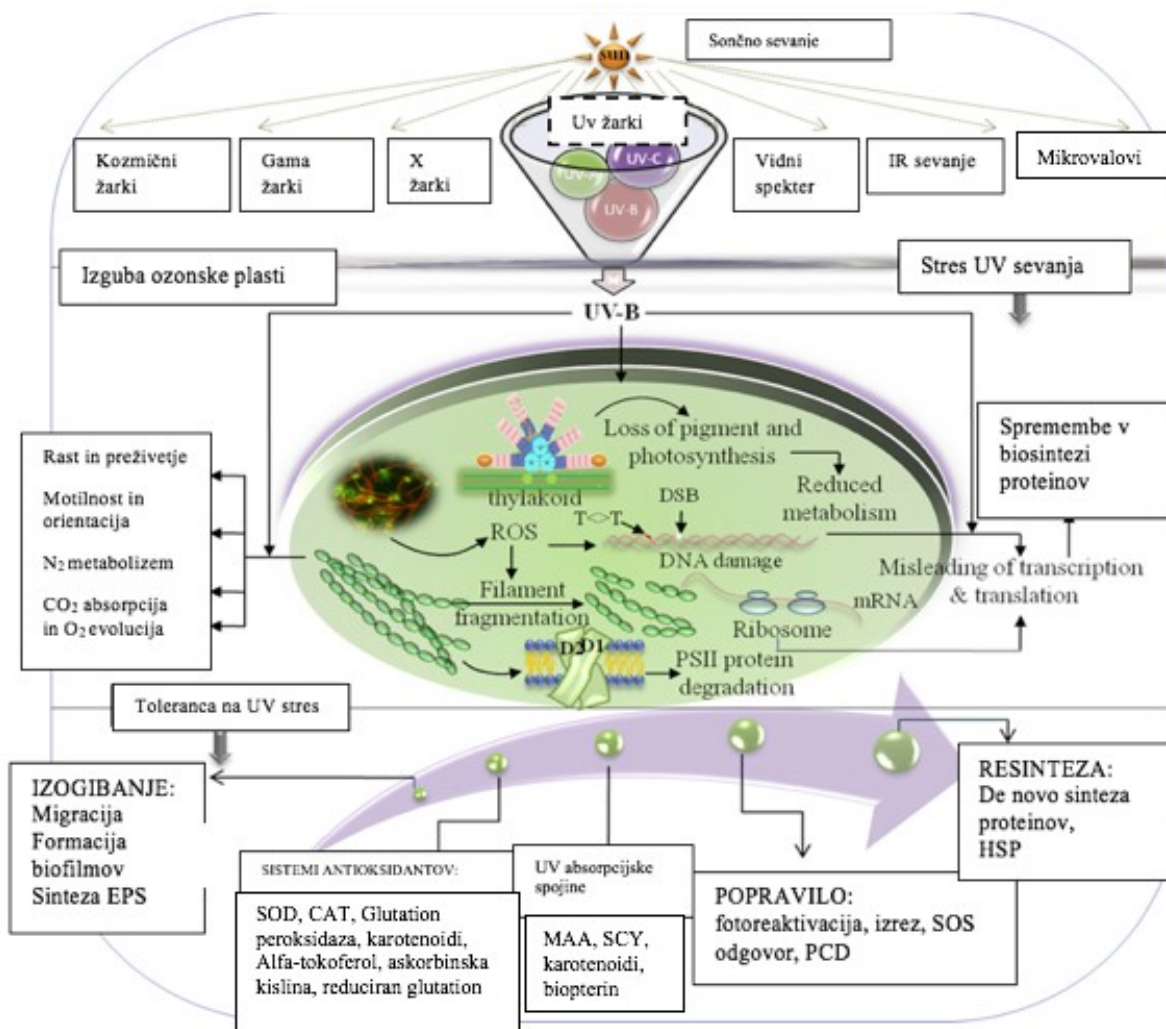
Po izpostavitvi UV sevanju so odkrili motnje v diferenciaciji vegetativnih celic v heterociste in redukcijo v dolžini trihomov. UV sevanje inducira akumulacijo ROS, kar privede do spiralnih zlomov zaradi oksidacije lipidov celične membrane v *A. platensis* (Donkor in sod., 1993). Gibljivost mikroalg je pomemben mehanizem izogibanja, ki jih ščiti pred škodljivimi učinki UV. UV znatno vpliva na odstotek gibljivih filamentov in s tem oslabi hitrost mikroalg ter sposobnost pobega pred škodljivimi učinki UV (Donkor in sod., 1993).

Različne študije so pokazale različne učinke UV sevanja tudi na fiziologijo mikroalg, na pigmentacijo in fotosintetske parametre. Pigmenti mikroalg, kot so klorofil A, karatenoidi in fikobilini, vsrkavajo sončno energijo. UV sevanje oslabi te pigmente in zmanjša fotosintetsko funkcijo cianobakterij, kar jih zelo oslabi (Sinha in sod., 1997).

Poleg vpliva na celično raven ima UV sevanje vpliv predvsem na molekule mikroalgnih celic. Proteini in nukleinske kisline so primarna tarča UV sevanja (Six in sod., 2007). DNA je pomembna molekula, katere stabilnost je ključna za pravilno delovanje in obstoj vseh živih sistemov. UV sevanje negativno vpliva na genomsko funkcijo, saj nativne DNA molekule direktno absorbirajo UV sevanje, to lahko spreminja normalno delovanje organizmov, saj povzroča različne mutagene in citotoksične poškodbe (Banerjee in Häder, 1996). S tem ko prizadane lipide in maščobne kisline pa lahko spremeni tudi celično integriteto (Rastogi in sod., 2010).

## 5.2 PRILAGODITEV MIKROALG NA UV SEVANJE

Mikroalge so prav zaradi povečane izpostavitve UV sevanju razvile številne obrambne mehanizme, ki jim pomagajo preživeti in rasti v okoljih z visokim UV sevanjem (Slika 1).



Slika 1: Model odzivov mikroalg na UV sevanje (Rastogi, 2014: 158)

### 5.2.1 Izogibanje

Med prvimi obrambnimi mehanizmi je bila migracija z območij z veliko UV sevanja proti območjem z manj UV sevanja (pomikanje globlje v globino voda) (Vaara, 1982). Poleg migracije ustvarjajo mikroalge biofilme (ang. mat formation), ki jim omogočajo izognitev UV sevanju (Singh in sod., 2010). Sestava biofilmov variira glede na klimatske pogoje in substrate. Na splošno velja, da velike filamentozne mikroalge kolonizirajo prve, saj imajo debel zunajcelični ovoj (Sotheland, 2009).

Mikroalge imajo možnost sinteze EPS (zunajcelični polimeri), ki so večinoma polisaharidne narave. EPS služijo kot meja med mikroalgami in okoljem, ki jih obdaja. EPS se sintetizirajo kot odgovor na UV sevanje, saj le ti zagotavljajo matriks, kamor se ujamejo UV absorpcijske spojine, s katerimi se je mikroalga sposobna upreti in zaščititi pred UV sevanjem (Ehling-Schulz, 1997). EPS v mikroalgah imajo torej pomembno vlogo pri zaščiti mikroalg pred poškodbami, ki jih povzroča UV sevanje (Chen, 2009).

### 5.2.2 Endogeni sistemi antioksidantov

Mikroalge so se UV sevanju prilagodile tudi tako, da so razvile encimske in neencimske sisteme antioksidantov. Ti sistemi jim dovoljujejo optimalno izrabo sončne energije in preprečijo oksidativne poškodbe molekul z ROS, kot so  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  in  $OH^{\bullet}$ , ki jih inducira UV sevanje. Med neencimske antioksidante spadajo: superoksidna dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPX) in drugi (Ehling-Schulz in sod., 2002).

Superoksidna dismutaza (SOD) je antioksidant, ki obstaja v različnih kovinskih oblikah in ščiti različne celične proteine pred oksidativnim stresom tako, da lovi superoksidne radikale in jih pretvarja v  $H_2O_2$ , ki se nato pretvori v  $H_2O$  in  $O_2$  preko katalaza peroksidnega sistema (Tel-Or in sod., 1986). Glutation ima antioksidativno vlogo in vzpostavlja redoks homeostazo v celicah (Schafer in Buettner, 2001).

Ob daljši izpostavitvi UV sevanju se poveča tudi sinteza karotenoidov. Ti so locirani v zunanji celični membrani ter tilakoidni membrani in služijo kot svetlobni pigmenti v fotosintezi ter varujejo mikroalge pred fotooksidativnimi poškodbami (Ehling-Schulz, 1991).

### 5.2.3 Sinteza UV absorpcijskih spojin

Morda najpomembnejša prilagoditev na UV sevanje je prav sinteza UV absorpcijskih snovi, med katere spadajo aminokislinske podobne mikrosporinu (MAA) in scitonemin (SCY), ki so fotoprotektanti in delujejo proti UV sevanju. MAA so skupina več kot dvajsetih vodotopnih UV absorpcijskih metabolitov, ki zagotavljajo zaščito pred UV sevanjem. MAA so majhne, brezbarvne, vodotopne molekule, ki imajo močan UV absorpcijski maksimum (310-362 nm). MAA spojine dokazano varujejo pred prezgodnjim staranjem kože. So fotostabilne ter toplotno stabilne molekule z antioksidativnimi lastnostmi in so odporne na abiotični stres (T, UV sevanje, pH itd.) (Conde in sod., 2000; Schmid in sod., 2003; De la Coba in sod., 2009).



MAA se nahajajo v citoplazmi in zunanji membrani mikroalg, kjer delujejo kot filtri za preprečitev poškodb, induciranih preko UV (Llewellyn in Airs, 2010; Carreto in Carignan, 2011; Wada in sod., 2015). Vse te molekule imajo na sredini strukture cikloheksanonski ali cikloheksaminski obroč, ki je odgovoren za UV absorpcijo (Derikvand in sod., 2016). Znotraj obročaste strukture so te molekule sposobne stabilizacije prostih radikalov (Suh in sod., 2003). Njihova fotoprotektivna učinkovitost je odvisna od okolja in lokacije spojin v sami celici. MAA učinkovito razpršujejo absorbirano sevanje kot toploto, ne da bi pri tem proizvajale ROS (Conde in sod., 2000). Staranje kože je pogosto inducirano s strani prostih radikalov, ki nastanejo zaradi izpostavljenosti UV sevanju. MAA imajo zaradi svojih antioksidativnih lastnosti možnost zmanjšanja opeklin in povečanja proliferacije fibroblastov (Soule in Garcia-Pichel, 2014). Ti naravni metaboliti imajo velik potencial, da nadomestijo obstoječe UV filtre v komercialno dostopnih sončnih kremah.

Drugi pomemben fotoprotektant je scytonemin. SCY je najbolj razširjen in okarakteriziran pigment za zaščito pred soncem, ki ga proizvajajo le mikroalge. Je rumeno rjava, lipidotopna, dimerna molekula, ki je sestavljena iz indolnih in fenolnih podenot (Bultel-Poncé in sod., 2004). Ta spojina se nahaja v EPS ovoju nekaterih mikroalg, kjer deluje kot sredstvo za zaščito pred UV sevanjem (Proteau in sod., 1993). Absorpcijski maksimum SCY je pri 370 nm (Sinha, 1999). Garcia-Pichel in Castenholz (1991) sta pokazala, da tretiranje z UV sevanjem učinkovito inducira sintezo scytonemina, medtem ko modra, zelena in rdeča svetloba nimajo značilnih učinkov na njegovo sintezo. Dillon in sod. (2002) pa so ugotovili, da če poleg UV sevanja dodamo še povišano temperaturo, se produkcija tega fotoprotektanta še poveča. SCY je stabilna molekula za zaščito mikroalg pred UV sevanjem, medtem ko so ostali mehanizmi zaščite manj neučinkoviti (Jones, 2011). Mikroalgam omogoča preživetje UV sevanja v okoljih z veliko sonca, saj ima tudi antioksidativno aktivnost (Matsui in sod., 2012; Rastogi in sod., 2015).

#### **5.2.4 Izražanje proteinov toplotnega stresa**

Proteini toplotnega stresa (ang. heat shock proteins, Hsp) imajo pomembno vlogo v normalnih celičnih funkcijah in stresnem odgovoru celic (Verschooten in sod., 2006). Odgovorni so za povečanje celične odpornosti na stres, saj vplivajo na DNA popravljalne mehanizme ali inducirajo apoptozo (Torok in sod., 2001). Hsp imajo proteinsko zaščitno aktivnost in zmožnost stabilizacije lipidnih membran celice (Horváth in sod., 1998). Dokazali so, da fizične interakcije med majhnimi Hsp in tilakoidnimi membranami mikroalg dajo tilakoidam ob visokih temperaturah, svetlobi in ob oksidativnem stresu visoko stabilnost (Hossain in Nakamoto, 2003).

#### **5.2.5 Popravilo in resinteza poškodovane DNA in proteinov**

Popravilo in resinteza UV poškodovanih biomolekul, kot so DNA in proteini, sta ključna za ohranitev normalnega stanja organizmov. Kar nekaj DNA popravljalnih mehanizmov kot npr. fotoreaktivacija, popravljanje z izrezovanjem, rekombinacije, delujejo tako, da zmanjšujejo škodo, ki jo povzroča UV sevanje (Essers in sod., 2006). Fotoreaktivacija lahko popravi poškodbe DNA, kot so ciklobutan pirimidinski dimeri (CPD), ki so posledica UV sevanja (Johnson in sod., 1988). Popravljanje z izrezovanjem je mehanizem, v katerem poškodovano DNA nadomestimo z novimi nepoškodovanimi nukleotidi preko komplementarne DNA.

Pri tem so pomembni encimi DNA glikozilaze, ki odstranjujejo različne tipe modificiranih baz (Williams in sod, 1979). Kopičenje velikih količin poškodb DNA v celicah lahko aktivira SOS popravljalni sistem, ki se aktivira, ko fotoreaktivacija ni zmožna popravila poškodb DNA (Courcelle in sod. 2001).

Poznavanje obrambnih sistemov mikroalg pred UV sevanjem je pomembno za uporabo mikroalgnih bioaktivnih spojin v kozmetični industriji. Ta skupina mikroorganizmov producira UV absorbne snovi, kot so MAA in SCY, ki služijo kot naravni fotoprotektanti in so lahko primerne alternative zdajšnjim sintetičnim UV filtrom. Negativna stran pa je ekonomska in trajnostna produkcija teh spojin v večjem merilu (Fernandes in sod., 2015).

## **6 RAZISKAVE O UPORABI MIKROALGE *Arthrospira platensis* V ZAŠČITI PRED SONCEM**

V nadaljevanju sta prikazani dve raziskavi, ki sta bili izvedeni na mikroalgi *A. platensis*, saj je tudi naše eksperimentalno delo temeljilo na delu z ekstrakti iz te mikroalge.

Liu in sod. (2011) so testirali, ali ima predtretiranje z ekstrakti mikroalgne biomase antioksidativne, protivnetne in protibakterijske učinke ter ali zaščiti HaCaT celice pred UV sevanjem. Uporabili so mikroalžno biomaso, ki je bila fermentirana z mlečnokislinskimi bakterijami in nefermentirano biomaso. Obe sta pokazali, da imata vse zgoraj naštetih aktivnosti razen protibakterijskega učinka. Tako nefermentirana kot fermentirana *A. platensis* nista pokazali citotoksičnih učinkov na HaCaT celice, kljub temu pa je fermentirana pokazala manj škodljivih učinkov kot nefermentirana v visokih koncentracijah. Obe biomasi *A. platensis* sta pri koncentraciji 25 µg ss/mL zaščitili HaCaT celice pred UV-B sevanjem in tudi v tem primeru se je fermentirana biomasa izkazala kot boljše izbira zaščite pred UV. Fermentirana *A. platensis* je vidno zaščitila celice pred prostimi radikali in UV-B sevanjem, najverjetneje zaradi visoke vsebnosti polifenolnih spojin in fikocianobilinov. Zato so fermentirano biomaso *A. platensis* v tem članku označili kot potencialno za uporabo v kozmetiki kot vir spojin za zaščito pred UV sevanjem (Liu in sod., 2011).

Druga študija se je posvetila ekstraktom mikroalge *A. platensis* kot sredstvo, ki ima obraten učinek na poškodbe povzročene z UV (izguba celične viabilnosti, DNA poškodbe in uničenje kolagena v dermalnih fibroblastih). Pokazali so, da ima *A. platensis* veliko bioloških lastnosti, kot so: antioksidativno, protirakavo, protimikrobno in hepatoprotektivno. *A. platensis* je izboljšala kolagenski in elastinski indeks v koži in inhibirala nastanek kožnih tumorjev v miših. Pravtako je fermentirana *A. platensis* inhibirala z UV-B inducirane poškodbe celic in izboljšala viabilnost. Ekstrakti so pokazali zaščitni učinek v dermalnih fibroblastih z regulacijo UV-B inducirane citotoksičnosti, regulacijo staranja, timin-dimerske formacije in izražanja MMP. Pri ekstrakciji so uporabili različna topila (etanol, heksan, etil acetat), ki so pokazala različen zaščitni učinek. Najbolj učinkovit ekstrakt *A. platensis*, ki je zaščitil celice pred UV sevanjem, je bil etanolni ekstrakt. Opazili so, da predtretiranje z mikroalgnimi ekstrakti inhibira izražanje MMP, ki ga inducira UV-B sevanje. Ekstrakti so zelo zaščitili humane fibroblastne celice pred staranjem, ki je posledica UV-B sevanja. Zaključili so, da ima *A. platensis* zaščitne učinke proti UV sevanju in razgradnji ECM (Lee in sod. 2017).

## 7 EKSPERIMENTALNI DEL

Mikroalge so se pokazale kot dobra alternativa trenutnim UV filtrom v kozmetičnih izdelkih za zaščito pred soncem. Zaradi svojih mehanizmov za zaščito pred UV sevanjem so postale pomemben vir raziskav. V eksperimentalnem delu smo uporabili ekstrakte nefermentirane in fermentirane biomase mikroalge *A. platensis*, s katerimi smo tretirali kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, in jih nato izpostavili UV sevanju za 30 in 60 sekund. Po izpostavitvi smo preverili kultivabilnost s štetjem kolonij na ploščah.

### 7.1 HIPOTEZE

Hipoteza 1: Celice kvasovk, ki bodo tretirane z višjo koncentracijo suhe snovi ekstraktov mikroalgne biomase, bodo pokazale višjo zaščito pred UV sevanjem.

Hipoteza 2: Vrsta topila za pripravo ekstraktov mikroalge *A. platensis* bo vplivala na UV zaščito celic kvasovk

Hipoteza 3: Ekstrakti fermentirane biomase bodo pokazali višjo UV zaščitno funkcijo v primerjavi z ekstrakti nefermentirane biomase.

### 7.2 MATERIALI

#### 7.2.1 Mikroorganizmi

##### **Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae***

Za izvedbo poskusov smo uporabljali kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 2155 iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (ZIM) Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

##### **Mikroalga *Arthrospira platensis***

Uporabili smo vodne in etanolne ekstrakte nefermentirane in fermentirane mikroalgne biomase *A. platensis*. Najprej smo pripravili osnovne raztopine, in sicer tako, da smo posušene vodne in etanolne ekstrakte raztopili v taki količini dH<sub>2</sub>O ali DMSO, da je bila koncentracija suhe snovi ekstrakta 50 mg/mL (Mrak, 2019). Mlečnokislinska fermentacija mikroalgne biomase je potekala različno dolgo (24, 48 in 72 ur). Kot inokulum so bile uporabljene bakterije vrste *Lactobacillus brevis*.

## 7.2.2 Gojišča

### Trdno gojišče YEPD

Za precepljanje in vzdrževanje kulture kvasovk *S. cerevisiae* in za določanje kultivabilnosti z metodo štetja kolonij na ploščah smo uporabili trdno gojišče YEPD.

Preglednica 1: Sestava trdnega gojišča YEPD (Atlas in Lawrence, 1993)

SESTAVINA	KOLIČINA g/L
Glukoza (Merck)	20
Pepton (Biolife)	20
Kvasni ekstrakt (Conda)	10
Agar (Conda)	20
Dodamo 1L dH <sub>2</sub> O	

Vse sestavine gojišča smo zatehtali, dodali 1 L dH<sub>2</sub>O in 15 min avtoklavirali v parnem sterilizatorju pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,2 bar. Po koncu sterilizacije smo ohladili gojišče do 50 °C in ga nato sterilno razlili v petrijeve plošče.

### Tekoče gojišče YEPD

Za kultivacijo kulture kvasovk do stacionarne faze rasti smo uporabili tekoče gojišče YEPD. Priprava gojišča je enaka kot pri trdnem YEPD gojišču le da tukaj ne dodajamo agarja (Preglednica 1).

### PBS pufer

PBS pufer smo uporabili za vzdrževanje kulture kvasovk v stacionarni fazi rasti in redčenje po Kochu. Tableto PBS pufera (Oxoid) smo raztopili v 100 mL ddH<sub>2</sub>O. PBS pufer smo 15 min sterilizirali v avtoklavu pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,2 bar.

## 7.2.3 Aparature in naprave:

- Tehtnica PS/1200/C/2 (Radwag)
- Magnetno mešalo etc basic (Ika)
- Centrifuga Centric 322A (Tehtnica)
- Parni sterilizator (Sutjeska)
- Sušilnik laboratorijske steklovine SO-250 (Elektromedicina)
- Inkubator IG150 (Jouan)
- Stresalnik multitron pro (Infors HT)
- Zamrzovalna skrinja (-20 °C) (LTH)
- Hladilnik (LTH)
- Spektrofotometer (Iskra), merjenje optične gostote (650nm)
- Brezprašna komora LFV P122 (Pio)
- Brezprašna komora LFV P15 (Pio)
- UV luč v brezprašni komori LFV P15 (Pio)

## 7.3 METODE

### 7.3.1 Priprava inokuluma/kultivacija kvasovk

Kulturo kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* smo precepili na trdno YEPD gojišče (Preglednica 1). Po treh dneh inkubacije smo kulturo prenesli s trdnega gojišča YEPD v 100-mL erlenmajerico s stransko roko, v kateri je bilo 50 mL tekočega gojišča YEPD (Preglednica 1). To smo naredili s cepilno zanko v brezprašni komori. S cepilno zanko smo dali v gojišče toliko kulture, da smo prišli do optične gostote 0,5 - 0,55 pri valovni dolžini 650 nm. Nato smo 20 mL celične suspenzije prenesli v novo erlenmajerico, v kateri smo imeli 180 mL predhodno steriliziranega gojišča YEPD. Kultivacija je potekala 60 h pri 28 °C in 220 obr./min do stacionarne faze rasti. Nato smo kulturo prenesli v PBS pufer. Koncentracija celic/mL v PBS pufru je bila  $1 \times 10^8$ . Kulturo smo nato inkubirali 96 ur na stresalniku pri temperaturi 28 °C in 220 obr./min.

### 7.3.2 Tretiranje kvasovk z mikroalgnimi ekstrakti

Po 96-urni inkubaciji kvasovk v PBS pufru smo kulturo tretirali z vodnimi in etanolnimi ekstrakti fermentirane in nefermentirane mikroalgne biomase. V falkonke smo prenesli 9,7 mL oz. 9,4 mL celične suspenzije kvasovk in nato dodali 300 µL oz. 600 µL osnovnih raztopin mikroalgnih ekstraktov (točka 7.2.1) ter ustrezne volumne PBS pufra oz. DMSO pri kontroli. Tretiranje je potekalo 2 uri pri temperaturi 28 °C in 220 obr./min.

### 7.3.3 Določanje kultivabilnosti

Tretirano celično suspenzijo smo razredčili po Kochu s PBS pufrom in 10 µl ustrezne razredčitve prenesli na trdno gojišče (Preglednica 1). Delali smo v 2 ponovitvah. Nacepljene plošče smo izpostavili UV svetlobi za 30 sekund, 60 sekund in 0 sekund. Nato smo plošče inkubirali pri temperaturi 28 °C za 48 ur. Števne so bile plošče, ki so imele med 3 in 30 kolonij. To število smo pomnožili z ustreznim faktorjem redčitve. Rezultati so prikazani kot povprečni relativni CFU/mL  $\pm$  SD glede na ustrezno kontrolo.

## 8 REZULTATI IN DISKUSIJA

V diplomskem delu smo preverjali kultivabilnost kvasovk *S. cerevisiae* po predhodnem tretiranju z vodnimi in etanolnimi ekstrakti nefermentirane in fermentirane mikroalgne biomase in naknadni izpostavitvi UV sevanju. Med seboj smo primerjali različen čas obsevanja, različne koncentracije mikroalgnih ekstraktov, vpliv časa fermentacije na uspešnost zaščite pred UV sevanjem in rezultate prikazali v grafičnem prikazu (Priloga A, B).

Celice kvasovk, ki so bile tretirane z višjo koncentracijo etanolnih ekstraktov mikroalgne biomase, so pokazale višjo zaščito pred UV sevanjem glede na vodne ekstrakte, torej večjo kultivabilnost. Pri nižji koncentraciji 1,5 mg ss ekstrakta/mL pa razlik med vodnimi in etanolnimi ekstrakti nismo opazili (Priloga A, B). S tem smo potrdili hipotezo 1, vendar samo v primeru etanolnih ekstraktov. Vrsta topila, s katerim smo pripravili ekstrakte mikroalgne biomase, je kot pričakovano vplivala na UV zaščito celic (Hipoteza 2).

Pri času 0 sekund, brez izpostavitve vzorcev UV sevanju, lahko pri nižji koncentraciji opazimo podobno kultivabilnost tako pri vodnih kot etanolnih ekstraktih, medtem ko pri višji opazimo nekoliko nižjo kultivabilnost vodnih ekstraktov v primerjavi z etanolnimi (Priloga A1, B1). Kljub temu se kultivabilnost giblje med 90 in 100 %, s tem lahko zaključimo, da sami ekstrakti nimajo inhibitornega učinka na rast kvasovk, temveč lahko inhibicijo rasti kvasovk pripisujemo le UV sevanju.

Trideset-sekundna izpostavitve predhodno tretiranih kvasovk UV sevanju (Priloga A2, B2) pri nižji koncentraciji suhega ekstrakta ne nakazuje bistvenih razlik med vodnimi in etanolnimi ekstrakti, pri višji koncentraciji 3 mg ss ekstrakta/mL pa smo dobili boljše rezultate pri etanolnih ekstraktih, kjer opazimo tudi razliko med vodnimi in etanolnimi ekstrakti, ki je pri nižjih koncentracijah ne.

Pri 60-sekundni izpostavitvi UV sevanju (Priloga A3, B3), predhodno tretiranih kvasovk z etanolnimi ekstrakti nefermentirane mikroalgne biomase (Priloga B3), lahko opazimo višjo zaščito pred UV sevanjem v primerjavi z vodnimi ekstrakti. Izjema je nefermentirana mikroalgna biomasa z dodanim inokulumom pri času 0 sekund. Pri fermentirani mikroalgni biomasi je razlika med vodnimi in etanolnimi ekstrakti večja kot pri 30 sekundni izpostavitvi UV sevanju v prid etanolnim ekstraktom (Priloga B2, B3).

Hipotezo, da so ekstrakti fermentirane mikroalgne biomase *A. platensis* pokazali višjo UV zaščitno funkcijo moramo zavreči, saj je iz rezultatov vidno, da so pri zaščiti nekoliko boljši ekstrakti nefermentirane biomase. Vsi rezultati skupaj nam dajo jasno sliko, kako UV sevanje in ekstrakti mikroalg delujejo na celice kvasovk. Vzorci na splošno niso pokazali višje zaščitne funkcije glede na tretiranje s kontrolo (PBS in DMSO). Tako lahko zaključimo, da izbrana mikroalgna biomasa *A. platensis* ni ponudila dovoljšne zaščite celicam kvasovk pred UV sevanjem, če primerjamo s celicami kvasovke, ki so bile brez predhodnega tretiranja izpostavljene UV sevanju (Priloga A, B). Celice kvasovk imajo različne popravljalne procese, s katerimi se borijo proti UV stresu, a so bile nastale poškodbe, očitno premočne, da bi se uspele tudi po tretiranju z mikroalgnimi ekstrakti v testiranih koncentracijah popraviti. Potrebno je poudariti, da sami ekstrakti algne biomase na celice kvasovk niso delovali inhibitorno.

Ekstrakti fermentirane biomase so bili nekoliko slabši, kar nakazuje, da se lahko med fermentacijo zaščitne snovi, ki se nahajajo v mikroalgah razgradijo oz. modificirjo z mlečnokislinskimi bakterijami *Lb. brevis*.

Vsekakor so potrebne še nadaljne raziskave z različnimi parametri, ki bodo pojasnile nastalo dogajanje in podale odgovor na vprašanje, ki si ga vsi zastavljamo: Ali so mikroalge dobro sredstvo za zaščito pred soncem?

## 9 ZAKLJUČEK

Vsi se vedno bolj zavedamo škodljivih učinkov UV sevanja, ki dosega zemeljsko površje zaradi uničene ozonske plasti, ki je posledica človeške malomarnosti. Sredstva za zaščito pred soncem, ki jih uporabljamo sedaj, vsebujejo visoke koncentracije UV filtrov in s tem predstavljajo resen problem za človeško zdravje. Prav zato je iskanje alternativnih snovi za zaščito pred soncem, ključnega pomena za zmanjšanje ogroženosti človeškega zdravja. Mikroalge so glavni vir raziskav na tem področju, saj so se pokazale kot eden boljših sistemov za zaščito pred UV sevanjem zaradi različnih mehanizmov, ki so jim omogočili preživetje na območjih z visokim UV sevanjem. Rezultati opravljenega eksperimentalnega dela kažejo na to, da mikroalge ponujajo zaščito pred UV sevanjem, a kakšno in v kolikšni meri sedaj ostaja neznanka. Potrebne bodo podrobnejše raziskave, da odkrijemo točne mehanizme, ki mikroalgam omogočajo takšno zaščito pred UV sevanjem, kako te mehanizme prenesti v sredstva za zaščito pred soncem ter s tem odkriti alternativno sredstvo UV filtrom, ki bodo človeško kožo zaščitili pred vedno bolj škodljivimi učinki UV sevanja, ki prodira na zemljino površje.

Na trgu je že kar nekaj krem za zaščito pred soncem, ki vsebujejo mikroalge in se prodajajo kot naravna sredstva za zaščito pred soncem. Gledano iz biotehnološkega vidika so produkti na trgu še vedno pod velikim vprašajem, saj še vedno vsebujejo škodljive UV filtre h katerim dodajajo neznane koncentracije mikroalgne biomase. Tej produkti predstavljajo biotehnologom izziv za nadaljne raziskave. Raziskati bo potrebno katere koncentracije ekstraktov mikroalgne biomase so učinkovite pred UV sevanjem in ali visoke koncentracije ekstraktov morda predstavljajo še večjo grožnjo za celice kot UV filtri. Pravitako bodo potrebne raziskave, ki potrjujejo, da interakcije različnih spojin in koncentracij le teh, v kremah za zaščito pred soncem ne povzročajo negativnih učinkov na celice oz. če že kakšne in v kakšni meri. Osebno menim, da mikroalge predstavljajo dobro alternativo dosedanjim izdelkom na trgu a bo potrebno še veliko raziskav na tem področju, saj se zavedam škodljivih učinkov, ki jih lahko zadajo tudi nepravilne koncentracije snovi iz naravnih virov.

## 10 VIRI

- Audran A. M., Dutartre H., Goossens A., Jeanmougin M., Comte C., Bernier C., Benkalfate L., Michel M., Ferrier-Lebouedec M. C., Vigan M., Bourrain J. L., Outtas O., Peyron, J. L., Martin, L. 2010. Octocrylene, an emerging photoallergen. *Archives of Dermatology*, 146, 7: 753–757
- Axelstad M., Boberg J., Hougaard K. S., Christiansen S., Jacobsen P. R., Mandrup K. R., Nellemann C., Lund S. P., Hass U. 2011. Effects of pre-and postnatal exposure to the UV-filter octylmethoxycinnamate (OMC) on the reproductive, auditory and neurological development of rat offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 250, 3: 278–290
- Banerjee M., Häder D. P. 1996. Effects of UV radiation on the rice field cyanobacterium, *Aulosira ferixissima*. *Environmental and Experimental Botany*, 36: 281–291
- Baroni A., Buommino E., De Gregorio V., Ruocco E., Ruocco V., Wolf R. 2012. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in Dermatology*, 30: 257–262
- Belay A. 2002. The potential application of spirulina (*arthrospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *The Journal of the American Nutraceutical Association*, 5, 2: 27–48
- Britt A. B. 2004. Repair of DNA damage induced by solar UV. *Photosynthesis Research*, 81, 2: 105–112
- Bultel-Poncé V., Felix-Theodore F., Sarthon C., Ponge J. -F., Bodo B. 2004. New pigments from the terrestrial cyanobacterium *scytonema sp.* collected on the mitaraka inselberg, french guyana. *Journal of Natural Products*, 67, 4: 678–681
- Carreto J. I., Carignan, M. O. 2011. Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects. *Marine Drugs*, 9: 387–446
- Chen L. Z., Wang G. H., Hong S., Liu A., Li C., Liu Y. D. 2009. UV-B-induced oxidative damage and protective role of exopolysaccharides in desert cyanobacterium *Microcoleus vaginatus*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51: 194–200
- Conde F. R., Churio M. S., Previtali C. M. 2000. The photoprotector mechanism of mycosporine-like amino acids. Excited-state properties and photostability of porphyra-334 in aqueous solution, *The Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 56: 139–144
- Costa J. A. V., Moro G. M. B., Filgueira D., Corsini E., Bertolin T. E. 2017. The potential of *spirulina* and its bioactive metabolites as ingested agents for skin care. *Industrial Biotechnology*, 13, 5: 244-252
- Courcelle J., Khodursky A., Peter B., Brown P. O., Hanawalt P. C. 2001. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOSdeficient *Escherichia coli*. *Genetics*, 58: 41–64
- De la Coba F., Aguilera J., Figueroa F. L., De Gálvez M. V., Herrera E. 2009. Antioxidant activity of mycosporine-like amino acids isolated from three red macroalgae and one marine lichen. *Journal of Applied Phycology*, 21, 2: 161–169



- Derikvand P., Llewellyn C. A., Purton S. 2016. Cyanobacterial metabolites as a source of sunscreens and moisturizers: a comparison with current synthetic compounds. *European Journal of Phycology*, 52, 1: 43-56
- Dillon J. G., Tatsumi C. M., Tandingan P. G., Castenholz R. W. 2002. Effect of environmental factors on the synthesis of scytonemin, a UV-screening pigment, in a cyanobacterium (*Chroococcidiopsis sp.*). *Archives of Microbiology*, 177: 322–331
- Donkor V. A., Amewowor D. H. A. K., Häder D. -P. 1993. Effects of tropical solar radiation on the motility of filamentous cyanobacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 12, 2: 143–148
- Dunford R., Salinaro A., Cai L., Serpone N., Horikoshi S., Hidaka H., Knowland J. 1997. Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. *FEBS Letters*, 418, 1: 87-90
- Ehlin-Schulz M., Bilger W., Scherer S. 1997. UV B induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of Bacteriology*, 179: 1940–1945
- Ehling-Schulz M., Schulz S., Wait R., Görg A., Scherer S. 2002. The UV-B stimulon of the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune* comprises early shock proteins and late acclimation proteins. *Molecular Microbiology*, 46: 827–843
- Essers J., Vermeulen W., Houtsmuller A. B. 2006. DNA damage repair: anytime, anywhere?. *Current Opinion in Cell Biology*, 18, 3: 240–246
- Farage M. A., Miller K. W., Elsener P., Maibach H. I. 2008. Intrinsic and extrinsic factors in skin aging: A review. *International Journal of Cosmetic Science*, 30, 2: 87-95
- Fernandes B. D., Mota A., Teixeira J. A., Vicente A. A. 2015. Continuous cultivation of photosynthetic microorganisms: approaches, applications and future trends. *Biotechnological Advances*, 33: 1228–1245
- Fleming E. D., Castenholz, R. W. 2007. Effects of periodic desiccation on the synthesis of the UV-screening compound, scytonemin, in cyanobacteria. *Environmental Microbiology*, 9: 1448–1455
- Friedberg E. C. 2016. A history of the DNA repair and mutagenesis field: the discovery of base excision repair. *DNA Repair*, 37: 35-39
- Gao K., Yu H., Brown M. T. 2007. Solar PAR and UV radiation affects the physiology and morphology of the cyanobacterium *Anabaena sp.* PCC 7120. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 89: 117–124
- Garcia-Pichel F., Castenholz R. W. 1991. Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment. *Journal of Phycology*, 27: 395–409
- Gershwin A, Belay A. 2007. *Spirulina in human nutrition and health*. Boca Raton, CRC Press: 328 str.
- Goldsmith L. A. 1991. *Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin*. 2nd ed. New York, Oxford University Press: 1323 str.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 2007. *Free radicals in biology and medicine*, 4th ed. Oxford, Oxford University Press: 888 str.

- Hexsel C. L., Bangert S. D., Hebert A. A., Lim H. W. 2008. Current sunscreen issues: 2007 food and drug administration sunscreen labelling recommendations and combination sunscreen/insect repellent products. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 59, 2: 316–323
- Horváth I., Glatz A., Varvasovszki V., Török Z., Páli T., Balogh G., Kovács E., Nádasdi L., Benkő S., Joó F., Vígh L. 1998. Membrane physical state controls the signaling mechanism of the heat shock response in *Synechocystis* PCC 6803: identification of hsp17 as a “fluidity gene”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95, 7: 3513–3518
- Hossain M. M., Nakamoto H. 2003. Role for the cyanobacterial htpg in protection from oxidative stress. *Current Microbiology*, 46, 1: 70–76
- Huang N. P., Xu M. H., Yuan C. W., Yu R.R. 1997. The study of the photokilling effect and mechanism of ultrafine TiO<sub>2</sub> particles on U937 cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology A Chemistry*, 108, 2: 229-233
- Imlay J. A., Linn S. 1998. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, 240, 4857: 1302–1309
- Johnson J. L., Hamm-Alvarez S., Payne G., Sancar G. B., Rajagopalan K. V., Sancar A. 1988. Identification of the second chromophore of *Escherichia coli* and yeast DNA photolyases as 5,10-methenyltetrahydrofolate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 85: 2046–2050
- Jones C. S., Esquenazi E., Dorrestein P. C., Gerwick W. H. 2011. Probing the in vivo biosynthesis of scytonemin, a cyanobacterial ultraviolet radiation sunscreen, through small scale stable isotope incubation studies and MALDI-TOF mass spectrometry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19, 22: 6620–6627
- rgens U.J., Mäntele W. 1991. Orientation of carotenoids in the outer membrane of *Synechocystis* PCC 6714 (Cyanobacteria). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1067: 208–212
- Kammeyer A., Luiten R. M. 2015. Oxidative events and skin aging. *Ageing Research Reviews*, 21: 16–29
- Klammer H., Schlecht C., Wuttke W., Schmutzler C., Gotthardt I., Köhrle J., Jarry H. 2007. Effects of a 5-day treatment with the UV-filter octyl-methoxycinnamate (OMC) on the function of the hypothalamopituitary – thyroid function in rats. *Toxicology*, 238, 2: 192–199
- Kligman L. H., Kligman A. M. 1986. The nature of photoaging: Its prevention and repair. *Photodermatology*, 3, 4: 215–227
- Kohl E., Steinbauer J., Landthaler M., Szeimies R. M. 2011. Skin ageing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 25, 8: 873–884
- Lee J. J., Kim K. B., Heo J., Cho D. H., Kim H. S., Han S. H., Ahn K. J., An I. S., An S., Bae S. 2017. Protective effect of *Arthrospira platensis* extracts against ultraviolet B-induced cellular senescence through inhibition of DNA damage and matrix metalloproteinase-1 expression in human dermal fibroblasts. *The Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 173: 196-203

- Leem K. H. 2015. Effects of Olibanum extracts on the collagenase activity and procollagen synthesis in Hs68 human fibroblasts and tyrosinase activity. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology*, 7, 5: 127-134
- Lindahl T. 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362: 709–715
- Liu J. G., Hou C. W., Lee S. Y., Chuang Y., Lin C. C. 2011. Antioxidant effects and UVB protective activity of *Spirulina (Arthrospira platensis)* products fermented with lactic acid bacteria. *Process Biochemistry*, 46, 7: 1405-1410
- Llabres M., Agustí S., Alonso-Laita P., Herndl G. J. 2010. Synechococcus and Prochlorococcus cell death induced by UV radiation and the penetration of lethal UVR in the Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 399: 27-37
- Llewellyn C. A., Airs R. L. 2010. Distribution and abundance of MAAs in 33 species of microalgae across 13 classes. *Marine Drugs*, 8: 1273–1291
- Löffek S., Schilling O., Franzke C. W. 2011. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *European respiratory journal*, 38: 191-208
- Mahajan, U., Wasule, D. 2008. Sunscreen and anti-oxidant activities of herbal gel formulations. *Pharmacognosy Magazine*, 4, 13: 99–101
- hler K. 2013. Organic UV filters in personal care products in Switzerland: a survey of occurrence and concentrations. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216, 4: 508–514
- Matsui, K., Nazifi, E., Hirai, Y., Wada, N., Matsugo, S. & Sakamoto, T. (2012). The cyanobacterial UV-absorbing pigment scytonemin displays radical-scavenging activity. *Journal of General and Applied Microbiology*, 58: 137–144
- Nakagawa Y., Wakuri S., Sakamoto K., Tanaka N. 1997. The photogenotoxicity of titanium dioxide particles. *Mutat. Res.*, 394: 125-132
- Naylor E. C., Watson R. E., Sherratt M. J. 2011. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas*, 69, 3: 249–256
- Pan Z., Lee W., Slutsky L., Clark R. A., Pernodet N., Rafailovich, M. H. 2009. Adverse effects of titanium dioxide nanoparticles on human dermal fibroblasts and how to protect cells. *Small*, 5, 4: 511–520
- Pieraggi M. T., Bouissou H., Angelier C., Uhart D., Magnol J. P., Kokolo J. 1985. The fibroblast. *Annals of Pathology*, 5, 2: 65–76
- Pourzand C., Tyrrell R. M. 1999. Apoptosis, the role of oxidative stress and the example of solar UV radiation. *Photochemistry and Photobiology*, 70, 4: 380–390
- Proksch E., Brandner J. M., Jensen J. M. 2008. The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*, 17, 12: 1063-1072
- Proteau P. J., Gerwick W. H., Garcia-Pichel F., Castenholz R. 1993. The structure of scytonemin, an ultraviolet sunscreen pigment from the sheaths of cyanobacteria. *Experientia*, 49, 9: 825–829

- Quan C., Cho M. K., Perry D., Quan T. 2015. Age-associated reduction of cell spreading induces mitochondrial DNA common deletion by oxidative stress in human skin dermal fibroblasts: Implication for human skin connective tissue aging. *Journal of Biomedical Science*, 22, 1: 62
- Quintana N., Van der Kooy F., Van de Rhee M. D., Voshol G. P., Verpoorte R. 2011. Renewable energy from Cyanobacteria: energy production optimization by metabolic pathway engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91: 471–490
- Rastogi R. P., Richa, Kumar A., Tyagi M. B., Sinha R. P. 2010. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of Nucleic Acids*, doi: 10.4061/2010/592980: 33 str
- Rastogi R. P., Sinha R. P. 2009. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 27: 521–539
- Rastogi R. P., Sinha R. P., Moh S. H., Lee T. K., Kottuparambil S., Kim Y. J., Rhee J. S., Choi E. M., Brown M. T., Häder D. P., Han T. 2014. Ultraviolet radiation and cyanobacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 141: 154-169
- Rastogi, R.P., Sonani, R.R. & Madamwar, D. (2015). Cyanobacterial sunscreen scytonemin: role in photoprotection and biomedical research. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176: 1551–1563
- Schafer F. Q., Buettner G. R. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 30: 191–212
- Schmid D., Schürch C., Zülfi F. 2004. UV-A sunscreen from red algae for protection against premature skin aging. *Cosmetics and Toiletries Manufacture Worldwide*, 204: 139–143
- Schürch C., Zülfi F., Nissen H. P., Prieur H. 2003. Mycosporine-like amino acids: natural UVscreening compounds from red algae to protect the skin against photoaging. *SOFW Journal*, 129: 38–42
- Serpone N., Dondi D., Albini, A. 2007. Inorganic and organic UV filters: their role and efficacy in sunscreens and suncare products. *Inorganica Chimica Acta*, 360, 3: 794–802
- Singh S. P., Häder D. -P., Sinha R. P. 2010. Cyanobacteria and ultraviolet radiation (UVR) stress: mitigation strategies. *Ageing Research Reviews*, 9, 2: 79–90
- Sinha R. P., Klisch M., Häder D. -P. 1999. Induction of a mycosporine-like amino acid (MAA) in the rice-field cyanobacterium *Anabaena* sp. by UV irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology*, 52: 59–64
- Sinha R. P., Singh N., Kumar A., Kumar H. D., Häder D. -P. 1997. Impacts of ultraviolet- B irradiation on nitrogen-fixing cyanobacteria of rice paddy fields. *Journal of Plant Physiology*, 150: 188–193
- Six C., Joubin L., Partensky F., Holtzendorff J., Garczarek L. 2007. UV-induced phycobilisome dismantling in the marine picocyanobacterium *Synechococcus* sp. WH8102. *Photosynthesis Research*, 92, 1: 75–86
- Slocombe S. P., Benemann J. R. 2016. *Microalgal production for biomass and high-value products*. 1st ed. Boca Raton, CRC Press: 334 str.

- Soule T., Garcia-Pichel F. 2014. Ultraviolet photoprotective compounds from cyanobacteria in biomedical applications. V: *Cyanobacteria: an economic perspective*. Wiley: 119-143.
- Sutherland D. L. 2009. Microbial mat communities in response to recent changes in the physiochemical environment of the melt water ponds on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Polar Biology*, 32: 1023–1032
- Stevenson C. S., Capper E. A., Roshak A. K., Marquez B., Eichman C., Jackson J. R., Mattern M., Gerwick W. H., Jacobs R. S., Marshall L. A. 2002. The identification and characterization of the marine natural product scytonemin as a novel antiproliferative pharmacophore. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 303: 858–866
- Stiefel C., Schwack W. 2013. Rapid screening method to study the reactivity of UV filter substances towards skin proteins by high-performance thin-layer chromatography. *International Journal of Cosmetic Science*, 35, 6: 588–599
- Suh H. J., Lee H. W., Jung J. 2003. Mycosporine glycine protects biological systems against photodynamic damage by quenching singlet oxygen with a high efficiency. *Photochemistry and Photobiology*, 78: 109–113
- Tel-Or E., Huflejt M. E., Packer L. 1986. Hydroperoxide metabolism in cyanobacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 246: 396–402
- Torok Z., Goloubinoff P., Horvath I., Tsvetkova N. M., Glatz A., Balogh G., Varvasovszki V., Los D. A., Vierling E., Crowe J. H., Vigh L. 2001. Synechocystis HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 6: 3098–3103
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T., Mazur M., Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 1: 44–84
- Vaara T. 1982. The outermost surface structures in chroococcacean cyanobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 28, 8: 929–941
- Verschooten L., Claerhout S., Laethemii A. V., Agostinis P., Garmyn M. 2006. New strategies of photoprotection. *Photochemistry and Photobiology*, 82, 4: 1016–1023
- Wada N., Sakamoto T., Matsugo S. 2015. Mycosporine-like amino acids and their derivatives as natural antioxidants. *Antioxidants*, 4, 3: 603–646
- Whitton B. A., Potts M. 2000. *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*. 1st ed. Netherlands, Kluwer Academic Publishers: 669 str.
- Williams E., Lambert J., O'Brien P., Houghton J. A. 1979. Evidence for dark repair of ultraviolet light damage on the bluegreen alga *Gleocapsa alpicola*. *Photochemistry and Photobiology*, 29: 543–547
- Witcover J., Yeh S., Sperling D. 2013. Policy options to address global land use change from biofuels. *Energy Policy*, 56: 63–74
- Zouboulis C. C., Makrantonaki E. 2011. Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. *Clinical Dermatology*, 29, 1: 3–14

## **ZAHVALA**

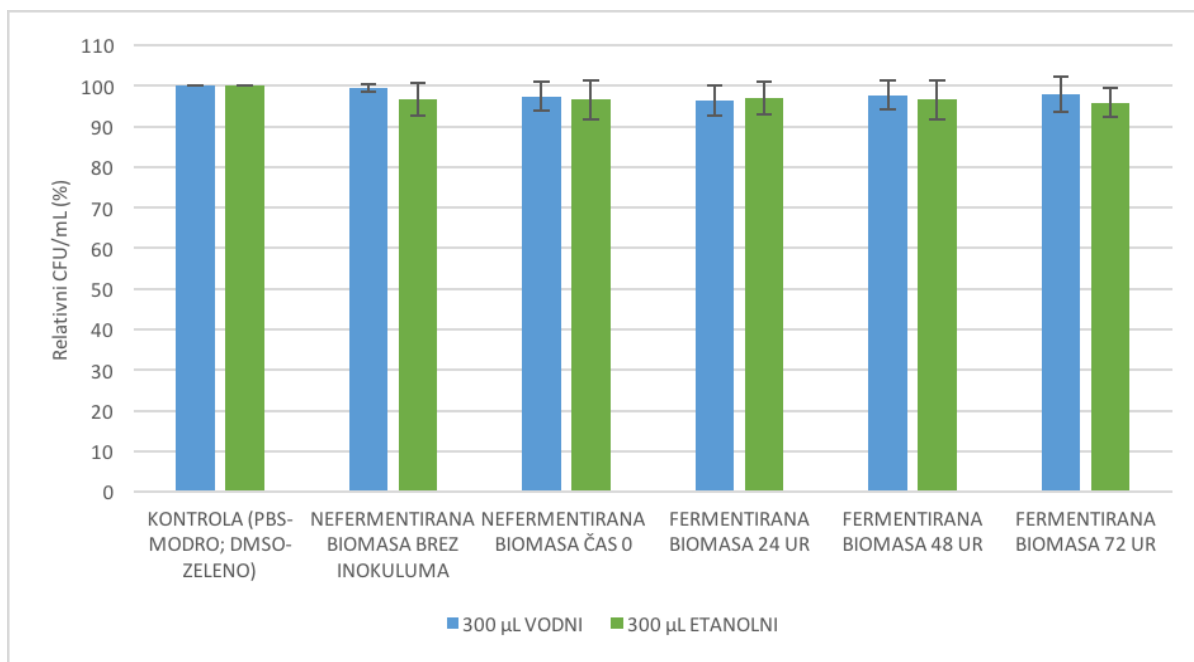
Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Poloni Jamnik, ki mi je namenila veliko spodbudnih besed, omogočila delo v laboratoriju in za vso podporo, motivacijo, pomoč in usmeritev pri izvajanju eksperimenta. Poleg tega se zahvaljujem za vse izkušnje in znanje, ki ga je prenesla name.

Zahvaljujem se Niku Mahničju in Alenu Fuksu za pomoč in dobro družbo pri izvajanju eksperimentalnega dela.

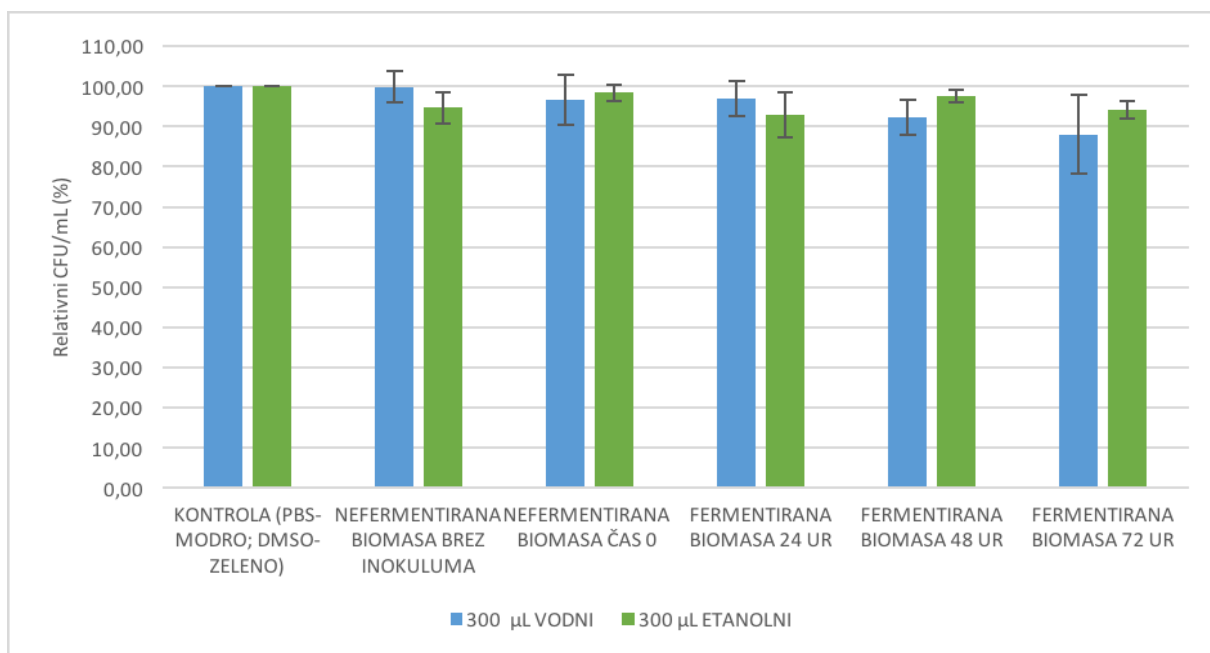
Navsezadnje se zahvaljujem svojim staršem, ki sta mi študij omogočila, mi vedno stala ob strani in me podpirala na moji študijski poti. Zahvala gre tudi Petru in prijateljem za vso potrpežljivost in podporo ob študiju.

## PRILOGA A

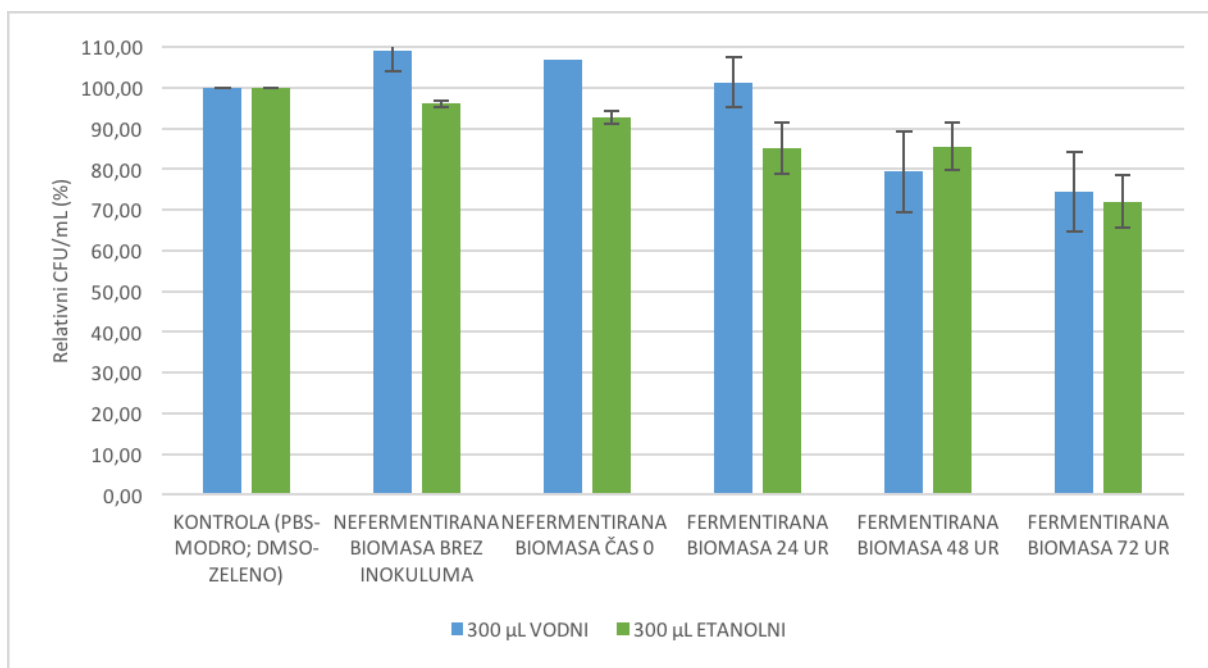
Spremljanje odziva celic kvasovk *S. cerevisiae* na dodatek 300 mikrolitrov osnovnih raztopin (1,5 mg suhega ekstrakta na 1 mL suspenzije) vodnih in etanolnih ekstraktov mikroalge *A. platensis* in izpostavitve UV sevanju z določanjem kultivabilnosti.



Priloga A1: Kultivabilnost tretiranih (300 mikrolitrov osnovne raztopine) celic kvasovke *S. cerevisiae* (log CFU/mL); brez izpostavitve UV sevanju



Priloga A2: Kultivabilnost tretiranih (300 mikrolitrov osnovne raztopine) celic kvasovke *S. cerevisiae* (log CFU/mL); 30-sekundna izpostavitve UV sevanju

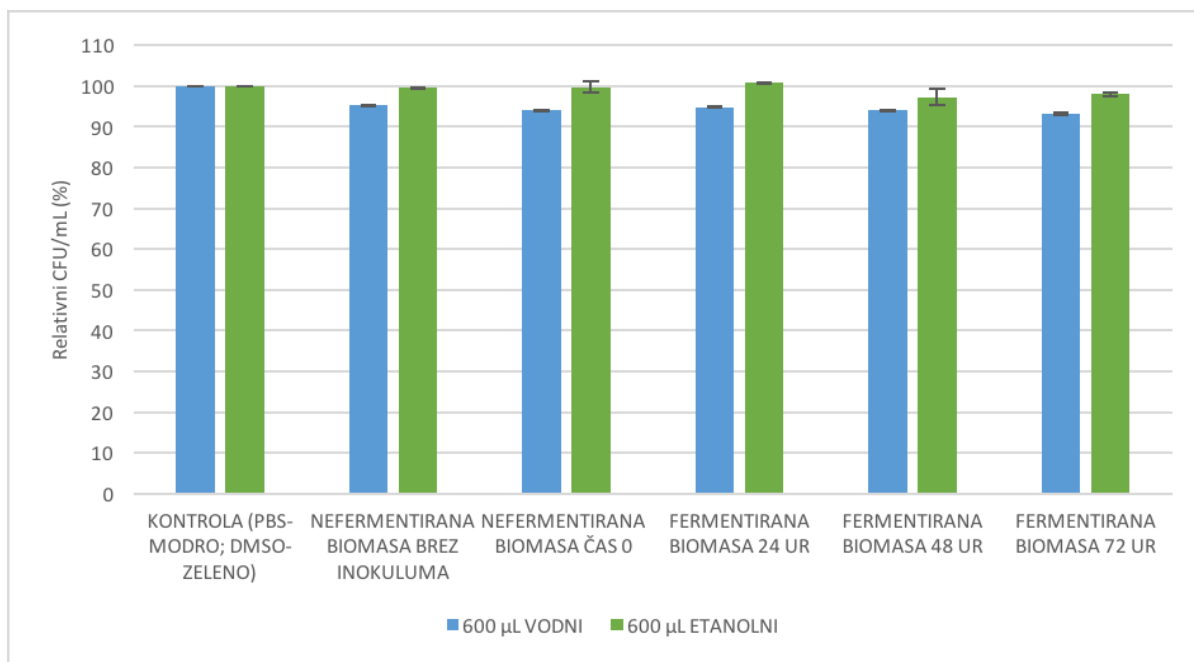


Priloga A3: Kultivabilnost tretiranih (300 mikrolitrov osnovne raztopine) celic kvasovke *S. cerevisiae* (log CFU/mL); 60-sekundna izpostavitve UV sevanju

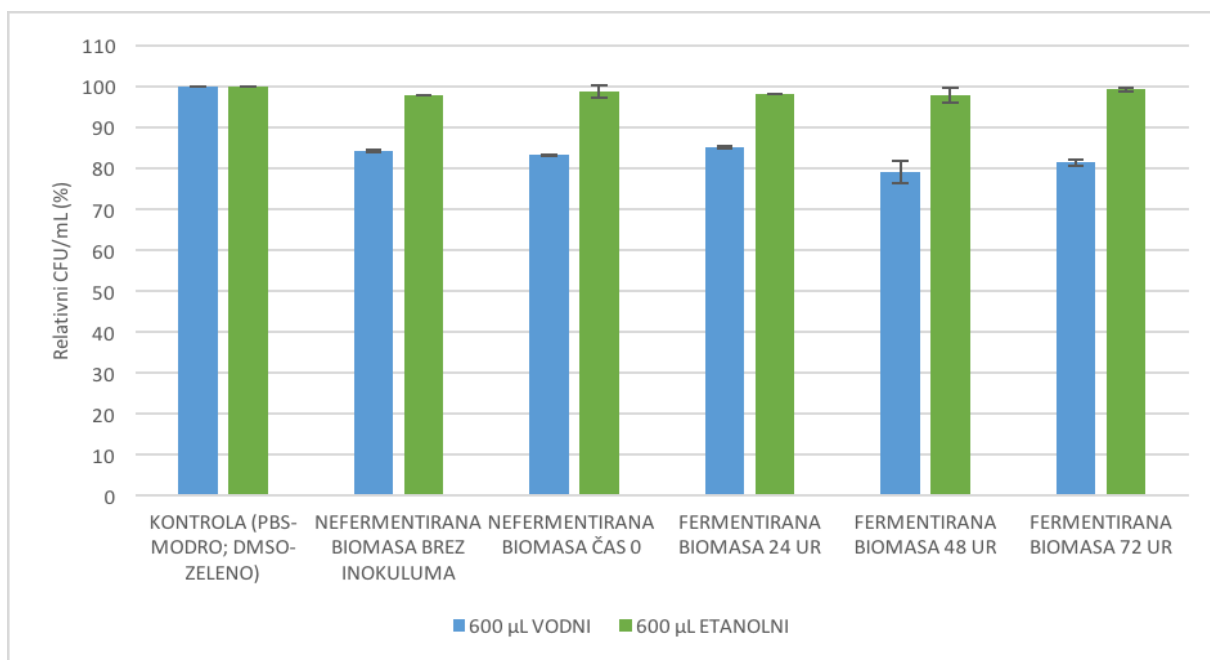


## PRILOGA B

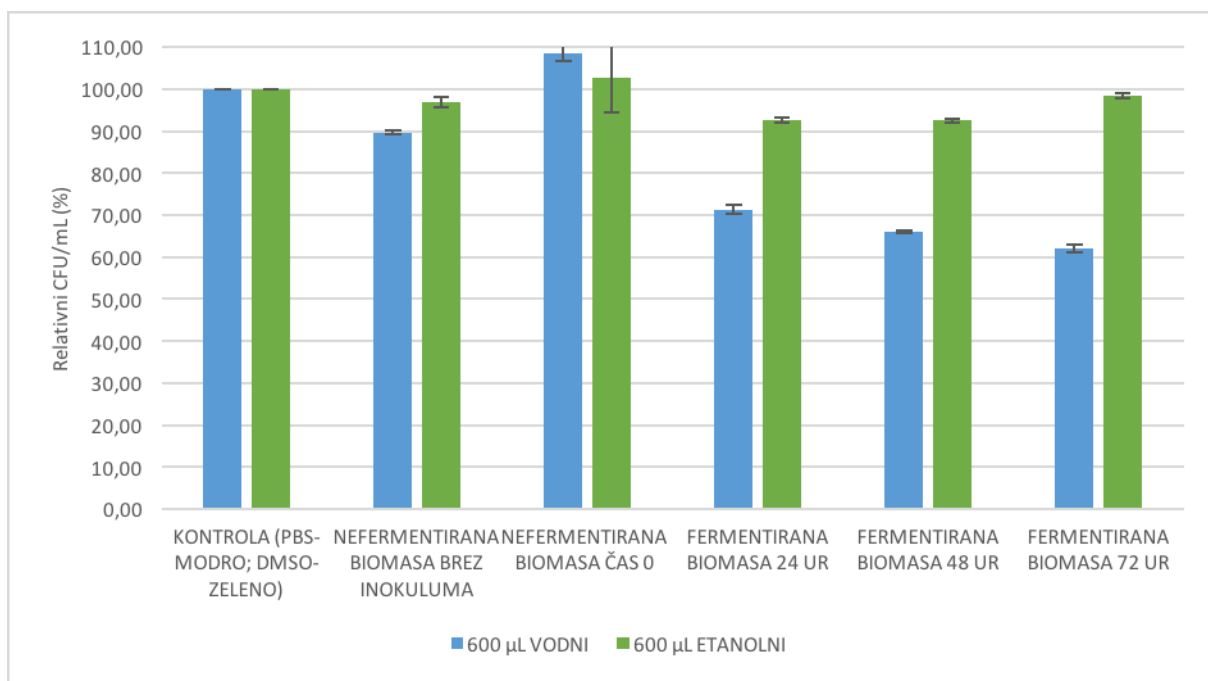
Spremljanje odziva celic kvasovk *S. cerevisiae* na dodatek 600 mikrolitrov (3 mg suhega ekstrakta na 1 mL suspenzije) vodnih in etanolnih ekstraktov mikroalge *A. platensis* in izpostavitve UV sevanju z določanjem kultivabilnosti.



Priloga B1: Kultivabilnost tretiranih (600 mikrolitrov osnovne raztopine) celic kvasovke *S. cerevisiae* (log CFU/mL), brez izpostavitve UV sevanju



Priloga B2: Kultivabilnost tretiranih (600 mikrolitrov osnovne raztopine) celic kvasovke *S. cerevisiae* (log CFU/mL); 30-sekundna izpostavitve UV sevanju



Priloga B3: Kultivabilnost tretiranih (600 mikrolitrov osnovne raztopine) celic kvasovke *S. cerevisiae* (log CFU/mL); 60-sekundna izpostavitve UV sevanju