



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
«ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ, ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ, ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ»

**Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός στελεχών Οξυγαλακτικών Βακτηρίων:
Έλεγχος αντιμικροβιακής τους δράσης και μερικός χαρακτηρισμός
βακτηριοσίνης από το νέο στέλεχος *Leuconostoc suionicum* am SF03**

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΛΕΤΣΙΟΥ ΣΤΑΥΡΟΥΛΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ, 2022

Η παρούσα Διατριβή Μεταπτυχιακής Ειδίκευσης πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών (ΠΜΣ) του τμήματος Χημείας με τίτλο «Συνθετική Χημεία, Βιοχημεία, Βιοδραστικές Ενώσεις».

Το πειραματικό μέρος της παρούσας διατριβής διεξήχθη στο ερευνητικό εργαστήριο της Βιοχημείας στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα θερμά να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλλαν στην εκπόνησή της.

Αρχικά, ένα θερμό ευχαριστώ στην επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κα. Άννα-Ειρήνη Κούκκου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε εξ' αρχής, αναθέτοντας μου το συγκεκριμένο θέμα, για την συνεχή καθοδήγηση, την στήριξη, την υπομονή και το αμείωτο ενδιαφέρον που έδειξε από την αρχή μέχρι το τέλος. Χωρίς την βοήθεια της και τις εποικοδομητικές υποδείξεις και την πολύτιμη συμβολή της, η ολοκλήρωση της εργασίας θα ήταν αδύνατη.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως όλα τα άτομα που στελέχωσαν το Ερευνητικό Εργαστήριο Βιοχημείας του τμήματος Χημείας για το φιλικό και ευχάριστο περιβάλλον στο οποίο βρισκόμουν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων μου και πιο συγκεκριμένα την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Ελπινίκη Βανδέρα για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσε και την συνεχή καθοδήγηση της καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην υποψήφια διδάκτορα Ματίνα Ασημακούλα για την μεγάλη προθυμία για βοήθεια που έδειξε τόσο στο πειραματικό κομμάτι όσο και στις κατευθύνσεις και τις εξηγήσεις για καλύτερη κατανόηση του θέματός μου. Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να δώσω ένα εξίσου μεγάλο ευχαριστώ στο υποψήφιο διδάκτορα Νώντα Τσαγκογιάννη και τον μεταπτυχιακό φοιτητή και καλό μου φίλο Ορφέα Μαρινάκο για την απίστευτη συνεργασία, την συμπαράσταση και όλη τη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές που μου πρόσφεραν όλο αυτό το διάστημα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου και όλους εκείνους τους ανθρώπους που μου στάθηκαν και πίστεψαν σε μένα και τις δυνατότητες μου, αλλά το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου και τον αδερφό μου που με στηρίζουν σε ότι και να κάνω, είναι πάντα εκεί για εμένα και ελπίζω να συνεχίσω να τους κάνω υπερήφανους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τόσο το γένος *Lactobacillus* όσο και το γένος *Leuconostoc* ανήκουν στα οξυγαλακτικά βακτήρια, μία κατηγορία βακτηρίων που χρησιμοποιείται ευρέως για την παρασκευή ζυμούμενων τροφίμων. Αυτά, έχουν την ικανότητα να παράγουν ριβοσωμικά συντιθέμενα αντιμικροβιακά πεπτίδια, μικρού μεγέθους, γνωστά ως βακτηριοσίνες. Οι βακτηριοσίνες διακρίνονται σε τέσσερις κατηγορίες δύο εκ των οποίων η τάξη IIa, IIb είναι οι πιο μελετημένες.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη οξυγαλακτικών βακτηρίων, η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός τους, εστιάζοντας στην αντιμικροβιακή δράση που εμφανίζουν, η οποία οφείλεται στην παραγωγή βακτηριοσινών και η περαιτέρω διερεύνηση αυτών.

Πιο συγκεκριμένα, έγινε ταυτοποίηση, χαρακτηρισμός και έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης των στελεχών *Lactobacillus pentosus* 208, *Leuconostoc mesenteroides* 105 (από την τράπεζα στελεχών του εργαστηρίου) και του *Leuconostoc suionicum* am SF03 (απομονωμένου πρόσφατα από μούστο, Vandera et al. unpublished), εστιάζοντας στην βακτηριοσίνη που παράγεται από αυτό το νέο στέλεχος.

Στο πλαίσιο χαρακτηρισμού των στελεχών, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των γονιδίων παθογένειας, *gelE*, *ace*, *hyl*, *espA*, *IS16*, *agg*, με μοριακές τεχνικές, όπου δε εντοπίστηκε σε κανένα στέλεχος. Ο έλεγχος ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, με μοριακές αλλά και άλλες τεχνικές (Broth dilution, Disk diffusion method) έδειξε ανθεκτικότητα και των τριών στελεχών έναντι της βανκομικίνης και της καναμυκίνης, ενώ το στέλεχος *L. pentosus* 208 εμφάνισε ανθεκτικότητα και στην γενταμυκίνη.

Κατά τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης προέκυψε ότι το στέλεχος *L. suionicum* am SF03 έχει δράση έναντι 13 από τα 19 στελέχη δείκτες που δοκιμάστηκαν, συμπεριλαμβανομένου θετικών και αρνητικών κατά Gram μικροοργανισμών. Την καλύτερη δράση φάνηκε να έχει έναντι των στελεχών δεικτών *Escherichia coli* ATCC 25922 και *Bacillus subtilis*, την ανάπτυξη των οποίων αναστέλλουν επίσης τα στελέχη 208 και 105. Περαιτέρω μελέτη του υπερκειμένου των *L. suionicum* am SF03 και *L. mesenteroides* 105 έδειξε ότι έχουν βέλτιστη δράση μεταξύ 12-24 ωρών, η οποία διατηρείται ακόμα και μετά από μια βδομάδα. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε μερικός καθαρισμός της πιθανής βακτηριοσίνης και από τα τρία στελέχη ύστερα από καταβύθιση με θειικό αμμώνιο και έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης.

Στη συνέχεια εστιάζοντας στο νέο στέλεχος *L. suionicum* am SF03, πραγματοποιήθηκε κατεργασία του υπερκειμένου με πρωτεολυτικά ένζυμα όπου αποδείχθηκε η πρωτεϊνική φύση του μορίου που προκαλεί την αντιμικροβιακή δράση καθώς αδρανοποιήθηκε η δράση του από το ένζυμο πρωτεϊνάση K. Η βακτηριοσίνη του στελέχους am SF03 είναι θερμοανθεκτική καθώς διατηρείται η δράση της ακόμα και μετά από αποστείρωση σε αυτόκαστο (121°C/20 min), ενώ δε μεταβάλλεται σε κλίμακα pH 4-10. Το μέγεθος της προσδιορίστηκε με ηλεκτροφόρηση Tricine SDS-PAGE, όπου εμφανίστηκε να είναι μικρότερο των 10 kDa.

ABSTRACT

Genus *Lactobacillus* and genus *Leuconostoc* belong to Lactic Acid Bacteria, a group of bacteria that widely used for fermented food production. They could produce ribosomally synthesized antimicrobial peptides, with small molecular weight, known as bacteriocins. Bacteriocins subdivided into four classes, two of them class IIa,IIb are the most studied.

The aim of this work is the study of Lactic Acid Bacteria, the identification and the characterization focused on the antibacterial activity existing, due to the production of bacteriocin and its further investigation.

Specifically, identification, characterization and study of the antimicrobial activity of strains *Lactobacillus pentosus* 208, *Leuconostoc mesenteroides* 105 (from laboratory strain bank) and *Leuconostoc suionicum* am SF03 (recently isolated from grape must, Vandera et al. unpublished) has done, focused on the bacteriocin produced from this new strain.

In the context of strains characterization, have checked for virulence factor genes existence, *gelE*, *ace*, *hyl*, *espA*, *IS16*, *agg*, with molecular techniques and none of them detected on any strain. Susceptibility on antibiotics has been checked, with molecular and other techniques (Broth dilution, Disk diffusion method) and the results shown susceptibility for all strains against vancomycin and kanamycin, while strain *L. pentosus* 208 shows susceptibility also against gentamicin.

Antimicrobial activity test came up that the strain *L. suionicum* am SF03 has activity against 13 of 19 indicator strains tested, including both Gram positive and negative microorganisms. The best antimicrobial activity was against indicator strains *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Bacillus subtilis*, which growth inhibited also from strain 208 and 105. Further study to the supernatant of *L. suionicum* am SF03 and *L. mesenteroides* 105 shows maximum activity between 12-24 hours, which retain even after a week. Simultaneously, partial purification of the possible bacteriocin for all three strains was performed after precipitation with ammonium sulphate and check of its antibacterial activity.

Subsequently, focusing on the new strain *L. suionicum* am SF03, treatment of the supernatant with proteolytic enzymes have been done to prove the proteinases nature of peptide, which are responsible for the antibacterial activity as its activity inactivated from the enzyme proteinase K. Bacteriocin of strain am SF03 is heat stable because it retains its activity even after autoclave (121°C/20 min), while it remains stable at pH range 4-10. The size was identified with Tricine SDS-PAGE electrophoresis and seems to be smaller than 10 kDa.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1 ^ο Κεφάλαιο: Εισαγωγή	5
1.1 Τα χαρακτηριστικά, η δομή και ο διαχωρισμός των βακτηρίων	5
1.2 Ο διττός ρόλος των βακτηρίων	6
1.3 Οξυγαλακτικά βακτήρια	7
1.3.1 Το γένος <i>Leuconostoc</i>	8
1.3.2 Το γένος <i>Lactobacillus</i>	10
1.4 Ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά LAB.....	12
1.4.1 Ύπαρξη γονιδίων παθογένειας.....	12
1.4.2 Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά.....	13
1.5 Απελευθέρωση βακτηριακών ουσιών από LAB με θετικά οφέλη	14
1.5.1 Αντιβιοτικά.....	14
1.5.2 Οργανικά οξέα.....	15
Γαλακτικό οξύ ($\text{CH}_3\text{-CH(OH)-COOH}$):.....	15
Οξικό οξύ ($\text{CH}_3\text{-COOH}$):	15
Βενζοϊκό οξύ ($\text{C}_6\text{H}_5\text{-COOH}$):	15
Προπανοϊκό οξύ ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COOH}$):	15
Υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2):	15
1.5.3 Βακτηριοσίνες	16
1.6 Βακτηριοσίνες.....	16
1.6.1 Κατηγοριοποίηση Βακτηριοσινών.....	17
1.6.1.1 Βακτηριοσίνες της τάξης I	21
1.6.1.2 Βακτηριοσίνες της τάξης II	23
➤ Βακτηριοσίνες της τάξης IIa	23
➤ Βακτηριοσίνες της τάξης IIb	27
➤ Βακτηριοσίνες της τάξης IIc	30
➤ Βακτηριοσίνες της τάξης IId	30
1.6.2 Παραγωγή βακτηριοσινών από <i>Leuconostoc spp.</i> και <i>Lactobacillus spp.</i>	31
1.6.3 Εφαρμογές Βακτηριοσινών.....	31
Εφαρμογή στη συντήρηση των τροφίμων.....	32
Εφαρμογή έναντι παθογόνων μικροοργανισμών που σχετίζονται με ασθένειες	33
Εφαρμογή ως προβιοτικά.....	33
Εφαρμογή έναντι καρκινικών κυττάρων	34
1.6.4 Αναζήτηση νέων βακτηριοσινών.....	35

2° Κεφάλαιο: Υλικά και Μέθοδοι.....	37
2.1 Χημικές ουσίες και όργανα.....	37
2.2 Βακτηριακά στελέχη, πλασμίδια και εκκνητές.....	38
2.3 Θρεπτικά μέσα καλλιέργειας κυττάρων.....	41
2.3.1 Πλήρες θρεπτικό μέσο καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων, Luria-Bertani medium (LB) (Sambrook, et al., 1989)	41
2.3.2 Θρεπτικό υλικό De Man, Rogosa and Sharpe, MRS (Lab M-A NEOGEN brand).....	41
2.3.3 Θρεπτικό υλικό M17 (Sigma-Aldrich)	41
2.4 Αντιβιοτικά.....	42
2.4.1 Broth dilution method (S. A. Pierce-Hendry & Dennis, 2010).....	42
2.4.2 Disk diffusion method (<i>Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol</i> , 2009)	42
2.5 Πειραματικές Πορείες - Μέθοδοι	47
2.5.1 Κατασκευή φυλογενετικού δέντρου (Tamura et al., 2007)	47
2.5.2 Μέθοδος Lowry (LOWRY et al., 1951)	47
2.5.3 Μέθοδος Bradford (Bradford, 1976)	48
2.5.4 Απομόνωση γενωμικού DNA με τη μέθοδο CTAB (mini preparation) (<i>Bacterial DNA Isolation CTAB Protocol Bacterial Genomic DNA Isolation Using CTAB</i> , n.d.).....	49
2.5.5 Απομόνωση γενωμικού DNA από λακτοβάκιλλους με παχύ κυτταρικό τοίχωμα (De et al., 2010)	50
2.5.6 Απομόνωση βακτηριακού DNA με την αυτοματοποιημένη μέθοδο (kit) Keyprep της ANACHEM	52
2.5.7 Αποθήκευση μικροβιακών κυττάρων στους -80°C με 30% γλυκερόλη (Sambrook and Russell, 2001)	53
2.5.8 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Mullis et al., 1986)	53
16s rRNA PCR (Petti et al., 2005).....	54
Multiplex PCR (Mahony & Chernesky, 1995).....	54
2.5.9 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με μεθόδους αλκαλικής λύσης των κυττάρων	55
2.5.9.1 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο <i>E. coli</i> σε μικρή κλίμακα (mini preparation)	55
2.5.9.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από το βακτήριο <i>E. coli</i> με την αυτοματοποιημένη μέθοδο Nucleospin Plasmid της Macherey-Nagel.....	56
2.5.10 Ηλεκτροφόρηση του DNA (Sambrook and Russell, 2001)	57
2.5.11 Απομόνωση DNA από πήγμα αγαρόζης με την αυτοματοποιημένη μέθοδο Nucleospin Extract II της Macherey – Nagel (Γερμανίας).....	60
2.5.12 Πέψη του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (Sambrook and Russell, 2001; Berg et al.,2015).....	60
2.5.12.1 Πέψεις πλασμιδιακού DNA (Sambrook and Russell, 2001)	61

2.5.12.2 Παρασκευή επιδεικτικών κυττάρων <i>E. coli</i> και μετασηματισμός (Mandel & Higa, 1970)	61
2.5.13 Κλωνοποίηση προϊόντος PCR σε πλασμίδια (Κυριακίδης, 2000).....	62
2.5.14 SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (Laemmli, 1970)	67
Χρωματισμός της πηκτής με χρωστική Coomassie blue (Schägger, 2006).....	70
Χρωματισμός της πηκτής με χρωστική αργύρου (silver staining) (Schägger, 2006).....	70
2.5.15 Tricine SDS-PAGE(Schägger, 2006)	71
2.5.16 Μερικώς καθαρισμός βακτηριοσίνης από LAB (Goyal et al., 2018) (ελαφρώς τροποποιημένο)	74
2.5.17 Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης επιλεγμένου στελέχους έναντι στελεχών δεικτών	75
2.5.18 Ποσοτικός προσδιορισμός αντιμικροβιακών ουσιών με την μέθοδο κρίσιμης αραιώσης (Critical dilution) (Arbitrary units ανά ml ή Au/ ml) (Barefoot & Klaenhammer, 1983; Batdorj et al., 2006; Yamamoto et al., 2003)	76
3 ^ο Κεφάλαιο: Αποτελέσματα	77
3.1 Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός των προς μελέτη μικροοργανισμών	77
3.1.1 Απομόνωση γενωμικού DNA	77
3.1.2 Ενίσχυση γονιδίου 16S rRNA του <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 105.....	78
3.1.3 Κλωνοποίηση του γονιδίου 16S rRNA του <i>L. mesenteroides</i> 105 σε πλασμιδιακό φορέα pBlueScript II SK (+)	78
3.1.4 Αποτελέσματα αλληλούχησης 16S rRNA και φυλογενετική ανάλυση.....	80
3.1.5 Multiplex PCR για τη μοριακή ταυτοποίηση του <i>Lactobacillus plantarum</i> 208 (Torriani et al., 2001).....	82
3.1.6 Ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός του βακτηριακού στελέχους am SF03	83
3.2 Έλεγχος ύπαρξης γονιδίων παθογένειας	86
3.2.1 Ενίσχυση του γονιδίου <i>gelE</i>	86
3.2.2 Ενίσχυση του γονιδίου <i>ace</i>	86
3.2.3 Ενίσχυση του γονιδίου <i>hyl</i>	87
3.2.4 Ενίσχυση του γονιδίου <i>espA</i>	88
3.2.5 Ενίσχυση του γονιδίου <i>IS16</i>	88
3.2.6 Ενίσχυση του γονιδίου <i>agg</i>	89
3.3 Έλεγχος ανθεκτικότητας έναντι αντιβιοτικών	90
3.3.1 Multiplex PCR για ανίχνευση γονιδίου ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό βανκομυκίνη	90
3.3.2 Υπολογισμός της κατώτερης συγκέντρωσης αναστολής (MIC) των προς μελέτη βακτηρίων έναντι αντιβιοτικών με την μέθοδο Broth dilution (S. Pierce-Hendry et al., 2010; Reller et al., 2009.).....	91

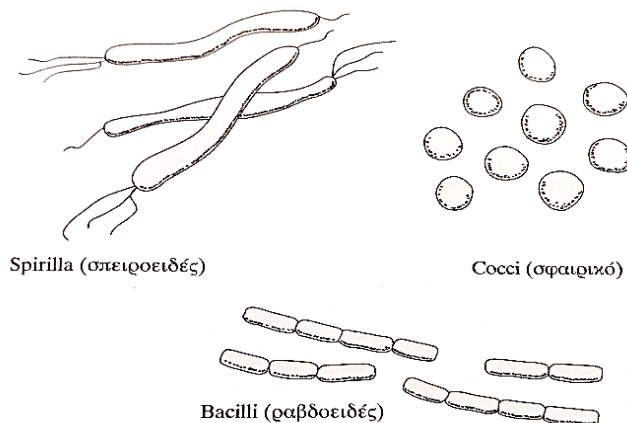
3.3.3 Έλεγχος ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά με μορφή δισκίων (Disk diffusion method) (Hudzicki, 2009).....	96
3.4 <i>In silico</i> ανάλυση του μικροοργανισμού <i>Leuconostoc suionicum</i> am SF03	98
3.5 Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης	103
3.5.1 Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης του στελέχους <i>Leuconostoc suionicum</i> am SF03 έναντι επιλεγμένων στελεχών δεικτών (indicator strains) (Wiese et al., 2009)(ελαφρώς τροποποιημένο)	103
3.5.2 Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης για τα στελέχη <i>Lactobacillus pentosus</i> 208, <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 105 έναντι επιλεγμένων στελεχών δεικτών (indicator strains) (Wiese et al., 2009)(ελαφρώς τροποποιημένο).....	105
3.6 Καμπύλες ανάπτυξης των προς μελέτη μικροοργανισμών.....	106
3.6.1 Καμπύλη ανάπτυξης <i>Lactobacillus pentosus</i> 208 στους 30°C	107
3.6.2 Καμπύλη ανάπτυξης <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 105 στους 30°C και έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης του υπερκειμένου έναντι στελέχους δείκτη στις διαφορετικές χρονικές στιγμές.....	107
3.6.3 Καμπύλη ανάπτυξης του <i>Leuconostoc suionicum</i> am SF03 στους 30°C και στους 25°C και έλεγχος της αντιμικροβιακής του δράσης έναντι στελέχους δείκτη στις διαφορετικές χρονικές στιγμές.....	109
3.6.4 Καμπύλη ανάπτυξης <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 με την προσθήκη υπερκειμένου του <i>Leuconostoc suionicum</i> am SF03 (Zangeneh et al., 2020).....	112
3.7 Καταβύθιση βακτηριοσίνης και έλεγχος δράσης αυτής έναντι στελεχών δεικτών.....	114
3.8 Περαιτέρω διερεύνηση της αντιμικροβιακής δράσης του στελέχους <i>Leuconostoc suionicum</i> am SF03.....	120
3.8.1 Κατεργασία υπερκειμένου καλλιέργειας του <i>Leuconostoc suionicum</i> am SF03 (Dündar et al., 2016; J. Zhang et al., 2018)(ελαφρώς τροποποιημένα)	120
3.8.2 Εύρεση μεγέθους της πιθανής βακτηριοσίνης του <i>Leuconostoc suionicum</i> am SF03 (Schägger, 2006).....	123
3.8.3 Προσδιορισμός των Arbitrary units (Au) ανά ml της αντιμικροβιακής ουσίας του <i>Leuconostoc suionicum</i> am SF03 (Barefoot & Klaenhammer, 1983; Batdorj et al., 2006; Yamamoto et al., 2003)	124
4ο Κεφάλαιο: Συζήτηση	127
Παράρτημα.....	133
Παράρτημα Α - Αλληλουχία 16S rRNA του <i>L. mesenteroides</i> 105	133
Παράρτημα Β – Αλληλουχία 16S rRNA του <i>L. suionicum</i> am SF03	133
Βιβλιογραφία	135

1^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ, Η ΔΟΜΗ ΚΑΙ Ο ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Η στοιχειώδης μονάδα οργάνωσης όλων των βιολογικών συστημάτων είναι το κύτταρο. Οι μικροοργανισμοί μπορεί να αποτελούνται από ένα μόνο κύτταρο (μονοκύτταροι) ή από περισσότερα του ενός (πολυκύτταροι). Τα μικροβιακά κύτταρα είναι ικανά να φέρουν σε πέρας όλες τις βιολογικές λειτουργίες, όπως τα κύτταρα των ζώων και των φυτών. Στην αρχιτεκτονική δομή των βακτηριακών κυττάρων διακρίνουμε δύο βασικούς τύπους, βάση των οποίων κατατάσσουμε τους μικροοργανισμούς σε προκαρυωτικούς (αρχαία, βακτήρια) και ευκαρυωτικούς (μύκητες, φύκη, πρωτόζωα), με βασική διαφορά τον εντοπισμό του γενετικού υλικού σε οργανωμένο πυρήνα (Αγγελής Γ., 2017).

Τα βακτήρια είναι μια μεγάλη κατηγορία προκαρυωτικών μικροοργανισμών, οι οποίοι εμφανίζουν μεταξύ τους μεγάλες μορφολογικές και φυσιολογικές διαφορές. Τα βακτηριακά κύτταρα συχνά διαθέτουν αυτόνομη κίνηση, το σχήμα τους μπορεί να είναι σφαιρικό (κόκκοι), ραβδοειδές (βάκιλοι), σπειροειδές ή και πολυμορφικό (ακαθόριστης μορφής) (Αγγελής Γ., 2017).



Εικόνα 1.1: Μορφολογικοί σχηματισμοί βακτηρίων (Κυριακίδης Δ. Α., 2002).

Υπάρχουν πολλές υποδιαιρέσεις βακτηρίων, η ταξινόμηση τους στηρίζεται στο αν βάφονται ή όχι με χρώση κατά Gram (θετικά ή αρνητικά βακτήρια κατά Gram), στον τρόπο διαβίωσης τους (αυτότροφα ή ετερότροφα) και στο αν σχηματίζουν ή όχι σπόρια. Θετικό κατά Gram θεωρείται ένα βακτήριο που διατηρεί το ιώδες-κυανούν χρώμα της χρωστικής μετά από την κατεργασία του με αυτήν, ενώ αρνητικά κατά Gram θεωρούνται αυτά που χάνουν το χρώμα της χρωστικής. Το γενετικό υλικό των βακτηρίων δεν είναι οργανωμένο σε χρωμοσώματα, αλλά βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, συνήθως ως δίκλωνο κυκλικό DNA (Κυριακίδης Δ. Α., 2002).

Μερικά βακτήρια, όπως τα κυανοβακτήρια, είναι ικανά να φωτοσυνθέτουν, ενώ άλλα προσλαμβάνουν την απαραίτητη για την αύξηση τους ενέργεια από την οξείδωση ανόργανων ή οργανικών ενώσεων (ετερότροφοι μικροοργανισμοί). Η ικανότητα των βακτηρίων να αποδομούν μια τεράστια ποικιλία οργανικών ενώσεων από τις απλούστερες, όπως η γλυκόζη, έως τις πλέον πολύπλοκες, όπως οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες, έχει μεγάλη περιβαλλοντική και βιοτεχνολογική σημασία (Αγγελής Γ., 2017). Μερικά βακτήρια είναι συμβιωτικά, άλλα μπορούν να τρέφονται από νεκρά οργανικά υλικά (σαπρόφυτα) ή να τρέφονται με ζώντα υλικά ενός κυττάρου ξενιστή, ως παράσιτα (Κυριακίδης Δ. Α., 2002).

Ένας καθοριστικός παράγοντας για όλες τις βιοτεχνολογικές διεργασίες είναι η ανάγκη των χρησιμοποιούμενων βακτηρίων και γενικότερα όλων των μικροοργανισμών, για οξυγόνο. Σε αερόβιους μικροοργανισμούς παράγεται οξυγόνο συνήθως διαβιβάζοντας αέρα της ατμόσφαιρας. Σε περιπτώσεις παραγωγής αλκοόλης ή πέψης οργανικών αποβλήτων, οι μικροοργανισμοί λειτουργούν χωρίς οξυγόνο σε αναερόβιες συνθήκες (Κυριακίδης Δ. Α., 2002).

Τα βακτήρια σχηματίζουν ενδοσπόρια κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες. Τα σπόρια είναι εφησυχασμένοι σχηματισμοί μικροοργανισμών, που ανθίστανται σε αυξημένες θερμοκρασίες, δηλητηριώδη χημικά ή ραδιενέργεια. Όταν τα σπόρια επιστρέψουν σε κατάλληλες συνθήκες μπορούν να αναπτυχθούν και να σχηματίσουν κανονικά και λειτουργικά κύτταρα. Αυτή η ενεργός βιολογική κατάσταση των κυττάρων ονομάζεται βλαστική κατάσταση (vegetative state) (Κυριακίδης Δ. Α., 2002).

1.2 Ο ΔΙΤΤΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Η λέξη βακτήριο είναι συνυφασμένη με τις λέξεις μόλυνση και ασθένεια. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα βακτήρια και σε γενικότερο πλαίσιο οι μικροοργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν έχοντας θετικά οφέλη στην υγεία του ανθρώπου (προβιοτικά, αντιβιοτικά, αντιμικροβιακές ουσίες), στην παραγωγή και την συντήρηση των τροφίμων, ως αντιμυκητιακοί, αντικαρκινικοί, ανοσοκατασταλτικοί, αντιφλεγμονώδης (Pham et al., 2019) παράγοντες, μπορούν να παρεμποδίσουν την δράση ενζύμων, να χρησιμοποιηθούν στην θεραπεία και την πρόληψη της παχυσαρκίας, της αναιμίας, της ατοπικής δερματίτιδας, της νόσου του Crohn, του διαβήτη, ως πηγή αντιοξειδωτικών, φυσικού χρώματος κλπ. (Gurta et al., 2014).

Από την άλλη πλευρά όμως μπορεί πράγματι να έχουν αρνητικές συνέπειες. Τα βακτήρια προκαλούν φθορές στα τρόφιμα, απειλούν την ποιότητα τους και είναι υπεύθυνα για κάποιες ασθένειες. Εάν παθογόνοι μικροοργανισμοί όπως οι *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Escherichia coli* αποκτήσουν πρόσβαση στους ανθρώπινους ιστούς προκαλούν φλεγμονές, μολύνσεις στο αναπνευστικό, συστηματική λοίμωξη, εντερικές δυσλειτουργίες έως και καρκίνο (Kumariya et al., 2019).

Είναι γεγονός ότι ορισμένα βακτήρια είναι καρκινογόνα και προαγωγείς όγκων. Έχει αποδειχτεί πως πολλά από αυτά προκαλούν χρόνιες λοιμώξεις ή παράγουν τοξίνες που διαταράσσουν τον κυτταρικό κύκλο με αποτέλεσμα την αλλοιωμένη κυτταρική ανάπτυξη. Επίσης πολλά ένζυμα τους πιθανολογείται πως δρουν ως καρκινογόνες ουσίες, όπως το

ένζυμο πεπτιδύλο αργινική δεαμινάση (καρκίνος παγκρέατος). Λόγω όμως της ανάπτυξης της βιοτεχνολογίας και την εφαρμογή της γενετικής μηχανικής η θεραπεία του καρκίνου με βακτήρια εμφανίζει μεγάλη αποτελεσματικότητα με λιγότερες παρενέργειες (Song et al., 2018).

Η ύπαρξη παθογόνων στελεχών, η αντίσταση σε αντιβιοτικά, η μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά από ένα παθογόνο σε ένα μη παθογόνο στέλεχος, η πιθανότητα αιμόλυσης, η μόλυνση τροφίμων και ποτών κατά την παραγωγή είναι μερικά από τα μειονεκτήματα που μπορεί να εμφανίσουν τα βακτήρια (de Paula et al., 2015).

1.3 ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Μια σημαντική κατηγορία βακτηρίων, είναι τα οξυγαλακτικά βακτήρια, γνωστά και ως LAB (Lactic Acid Bacteria), μία ετερογενή οικογένεια μικροοργανισμών, παρόν σε διάφορες διεργασίες, η οποία διαθέτει πολλά κοινά χαρακτηριστικά στη φυσιολογία της. Η ταξινόμηση των ειδών LAB βρίσκεται μεταξύ δύο φύλων, των *Firmicutes* και των *Actinobacteria*. Τα LAB με φύλο *Firmicutes*, ανήκουν στη σειρά *Lactobacillales*, η οποία περιλαμβάνει τα εξής γένη: *Aerococcus*, *Alloiooccus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Symbiobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weisella*. Αυτοί οι μικροοργανισμοί έχουν χαμηλή περιεκτικότητα σε G+C (31-49%). Όσον αφορά το φύλο *Actinobacterium* τα LAB που κατατάσσονται σε αυτή την κατηγορία ανήκουν στα γένη *Atopobium*, *Bifidobacterium* και έχουν περιεκτικότητα σε G+C αντίστοιχα, 36-46% και 58-61% (Giraffa, 2012).

Αυτά τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να ζυμώνουν σάκχαρα προς γαλακτικό οξύ, χαρακτηρίζονται ως θετικά κατά Gram, αρνητικά σε αντίδραση με καταλάση, προαιρετικά αναερόβια, μη σπορογόνα, ακίνητα και ανθεκτικά σε οξέα. Λόγω των μειωμένων ικανοτήτων βιοσύνθεσης και λόγω των μεγάλων απαιτήσεων σε πηγές άνθρακα και αζώτου, το φυσικό περιβάλλον τους πρέπει να είναι πλούσιο σε θρεπτικά στοιχεία (Giraffa, 2012).

Πολλοί μικροοργανισμοί επηρεάζουν τις οργανοληπτικές ιδιότητες του προϊόντος συνεισφέροντας στη βελτίωση της γεύσης, του αρώματος και την συντήρηση αυτών των τροφίμων (Masuda et al., 2011). Ενώσεις που σχετίζονται με τη γεύση παράγονται μέσα από διάφορες πορείες όπως η μετατροπή λακτόζης και κιτρικού οξέος. Γι' αυτό το λόγο πολλά είδη LAB χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία κυρίως ως καλλιέργειες εκκίνησης ή συμπληρωματικές καλλιέργειες σε πολλά ζυμούμενα τρόφιμα. Τα πιο γνωστά γένη που σχετίζονται με τρόφιμα ανήκουν στους *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Streptococcus* (Giraffa, 2012).

Τα LAB χρησιμοποιούνται σε βιομηχανικές εφαρμογές ξεκινώντας από καλλιέργειες εκκίνησης στη βιομηχανία των ζυμούμενων τροφίμων όπως αναφέρθηκε, σε προβιοτικά, σε συμπληρώματα διατροφής και παράγοντες συντήρησης. Ειδικότερα τα *Bifidobacteria* εντοπίζονται στο γαστρεντερικό σύστημα των θηλαστικών, των πτηνών και των ψυχρόαιμων ζώων. Συχνά χρησιμοποιούνται ως προβιοτικό συστατικό πολλών λειτουργικών τροφίμων, όμως είναι ελάχιστες οι πληροφορίες που έχουμε για τη φυλογενετικότητα τους, τη φυσιολογία τους και τη γενετική τους. Από την άλλη πλευρά πολλά είδη LAB που ανήκουν στη σειρά *Lactobacillales* είναι σημαντικά για την βιομηχανία των τροφίμων καθώς

χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες εκκίνησης ή ως επιπρόσθετες καλλιέργειες για την παραγωγή ζυμούμενων τροφίμων (Giraffa, 2012).

Τα LAB γενικά συσχετίζονται με φυτά και ωμά προϊόντα ζώων και ζυμούμενα προϊόντα συμπεριλαμβανομένου των γαλακτοκομικών προϊόντων, του κρέατος, των λαχανικών και των δημητριακών. Μερικά είδη εντοπίζονται σε αναπνευστικά, εντερικά και γενετικά μονοπάτια των θηλαστικών και συνεπώς του ανθρώπου (Nissen-Meyer et al., 2010). Η ικανότητά τους να εγκαθίστανται σε τόσα διαφορετικά περιβάλλοντα είναι φυσική απόρροια της μεταβολικής ευκολίας αυτής της ομάδας βακτηρίων. Συνεπώς δεν είναι περίεργο που τα LAB χρησιμοποιούνται εδώ και δεκαετίες για τη συντήρηση των τροφίμων, οδηγώντας στη διαδεδομένη κατανάλωση τους από τον άνθρωπο και γενικά έχουν αναγνωρισθεί ως ασφαλή (GRAS-General Recognized as Safe) (Giraffa, 2012).

Λόγω των επιβλαβών επιδράσεων των χημικών συντηρητικών έχει προκύψει η απαίτηση των καταναλωτών για την αναζήτηση και τη χρήση ασφαλών και φυσικών συντηρητικών (βιοσυντηρητικά). Τα βιοσυντηρητικά είναι η φυσική σημασία των συντηρητικών, συμπεριλαμβάνει τη χρήση μικροοργανισμών ή φυσικών προϊόντων τους (Kumariya et al., 2019). Μεταξύ των μικροοργανισμών, τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι πιθανά για χρήση ως βιοσυντηρητικά καθώς παρέχουν μικροβιακή σταθερότητα στα τελικά προϊόντα. Τα προϊόντα τους, όπως τα οργανικά οξέα, το διακετύλιο, το διοξείδιο του άνθρακα, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, η αιθανόλη, και αντιμικροβιακές ενώσεις όπως είναι τα λιπαρά οξέα, οι βακτηριοσίνες και σχετικά πρωτεϊνικά μόρια και τα αντιβιοτικά εμφανίζουν προστατευτική δράση (Giraffa, 2012). Επίσης στις μεταβολικές διαδικασίες η ικανότητα παραγωγής οξέος και αντοχής σε χαμηλές τιμές pH προσδίδει πλεονέκτημα έναντι άλλων μικροοργανισμών σε ένα οικοσύστημα (Klaenhammer, 1988).

Η ικανότητα τους να παράγουν ποικίλες αντιμικροβιακές ουσίες, εξαλείφει ανταγωνιστικούς μικροοργανισμούς κατά τη διάρκεια της ζύμωσης. Μερικά LAB παράγουν διαφορετικούς τύπους βακτηριοσινών και αυτά τα πεπτίδια μπορεί να έχουν βακτηριοκτόνο ή βακτηριοστατική δράση σε θετικά κατά Gram βακτήρια συμπεριλαμβανομένου των παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα αλλά όχι ενάντια των ευκαρυωτικών κυττάρων. Γενικά οι βακτηριοσίνες των LAB αντέχουν στις υψηλές θερμοκρασίες και το χαμηλό pH, ενώ πέπτονται εύκολα από τα ανθρώπινα πρωτεολυτικά ένζυμα (Masuda et al., 2011) (βλέπε παρ. 1.6).

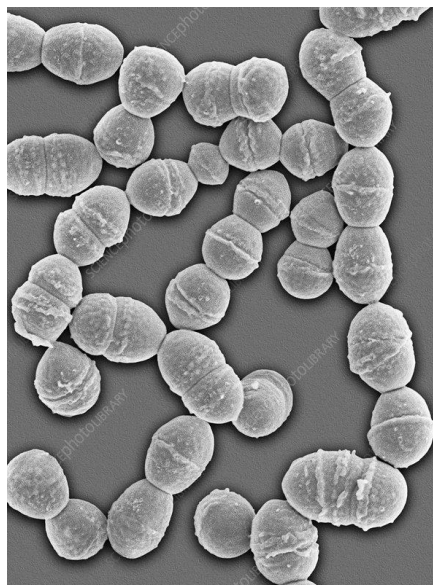
1.3.1 ΤΟ ΓΕΝΟΣ *LEUCONOSTOC*

Το γένος *Leuconostoc* ανήκει στη συνομοταξία των *Firmicutes*, η οποία περιλαμβάνει θετικούς κατά τη χρώση Gram, ετεροζυμωτικούς (καθώς ζυμώνουν γλυκόζη προς D-γαλακτικό οξύ, αιθανόλη προς οξικό οξύ και CO₂ προερχόμενο από μονοπάτια φωσφοκετολάσης) μικροοργανισμούς, που παρουσιάζουν σφαιρικό ή ραβδοειδές σχήμα. Αυτά τα βακτήρια συνήθως σχηματίζουν ζεύγη ή μικρές αλυσίδες, δεν διαθέτουν μηχανισμούς για να κινούνται, είναι μη σπορογόνα, αρνητικά στην αντίδραση με καταλάση, προαιρετικά αναερόβια, μεσόφιλα και δεν παράγουν αμμωνία από αργινίνη. Εμφανίζουν σύνθετες διατροφικές απαιτήσεις, συμπεριλαμβανομένων και διάφορων αμινοξέων. Επιπλέον, δεν σχηματίζουν H₂S, αναπτύσσονται παρουσία 7% NaCl και έχουν χαμηλή περιεκτικότητα γουανίνης-κυτοσίνης (G+C) στο μόριο του DNA (31-49%). Αυτοί οι μικροοργανισμοί έχουν χαρακτηριστικά μεσόφιλων, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης 20

και 30°C. Είδη που ανήκουν στο γένος *Leuconostoc* μπορούν να ανιχνευτούν κυρίως σε λαχανικά, δημητριακά, φρέσκο χορτάρι, φρούτα, κρασί, ψάρι, κρέας και γαλακτοκομικά προϊόντα (de Paula et al., 2015).

Η ανάπτυξη τους γίνεται χρησιμοποιώντας ως μέσα ανάπτυξης τα APT, Briggs, LA, BHIYE με βέλτιστο το MRS. Τα στελέχη αναπτύσσονται στους 30°C αλλά αρκούνται και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Ορισμένα στελέχη είναι θερμοανθεκτικά καθώς επιβιώνουν σε συνθήκες παστερίωσης. Έχουν μεγάλη οικονομική σημασία και σχετίζονται με πολλές θετικές πτυχές:

- Ζύμωση τροφίμων (ξινόλαχανο, πίκλες, ελιές, αλλαντικά κλπ.).
- Παραγωγή αερίων (CO₂) στα τυριά.
- Παραγωγή ενώσεων που σχετίζονται με τη γεύση πολλών γαλακτοκομικών προϊόντων.
- *In situ* παραγωγή δεξτράνης σε προϊόντα που περιλαμβάνουν σάκχαρα ή υψηλής αξίας πολυμερή με βιομηχανική και κλινική χρήση ή ως βιολογικά βοηθητικά στην βιομηχανία λαδιού.
- Πιθανό ρόλο σε λειτουργικά τρόφιμα (Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2004).



Εικόνα 1.3.1: *Leuconostoc citreum* μέσω SEM μικροσκοπίου (sciencephoto.com).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένου και του *Leuconostoc*, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ζύμωση μεγάλης ποικιλίας τροφίμων. Κατά τη ζύμωση τα τελικά προϊόντα του μεταβολισμού των υδατανθράκων, συμβάλουν όχι μόνο στην συντήρηση λόγω της οξίνισης αλλά και στη γεύση και την υφή του προϊόντος. Η ζύμωση, επίσης, μπορεί να αυξήσει την θρεπτική αξία του τροφίμου, αυξάνοντας την ικανότητα πέψης του από τον οργανισμό ή μειώνοντας την τοξικότητα του (Gueguen et al., 1997).

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η χρήση των στελεχών *Leuconostoc* στην τεχνολογία των γαλακτοκομικών, παρόλο που η φυσιολογία τους και η γενετική τους δεν είναι τόσο ανεπτυγμένη όσο των *Lactococcus*. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καλλιέργεια εκκίνησης σε γαλακτοκομικά προϊόντα άλλα επίσης μπορούν να ανιχνευθούν σε αυτά χωρίς να γίνει προσθήκη τους. Παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του αρώματος, της γεύσης και της υφής των γαλακτοκομικών προϊόντων (Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2004). Η ζύμωση κιτρικού οξέος έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή διακετυλίου, μιας ένωσης που προσδίδει γεύση στα γαλακτοκομικά προϊόντα (τυρί, βούτυρο). Ο σχηματισμός του διακετυλίου απαιτεί όξινο περιβάλλον, πράγμα που δεν παρεμποδίζει την ανάπτυξη των *Leuconostoc* καθώς επιβιώνουν μέχρι pH 4.8. Ένα άλλο προϊόν του μεταβολισμού του κιτρικού οξέος είναι το CO₂ που χρησιμεύει στη διαμόρφωση των τυριών (eye formation) (Holland & Liu, 2011).

Επίσης, πέρα από την ανίχνευση τους στα τρόφιμα και το περιβάλλον (Mundt, 1970), αποτελούν κομμάτι της φυσιολογικής μικροχλωρίδας του ανθρώπου καθώς έχουν απομονωθεί από ανθρώπινα περιττώματα, κοιλικά δείγματα και δείγματα μητρικού γάλακτος (Bello et al., 2003; Green et al., 1990; Heikkilä & Saris, 2003).

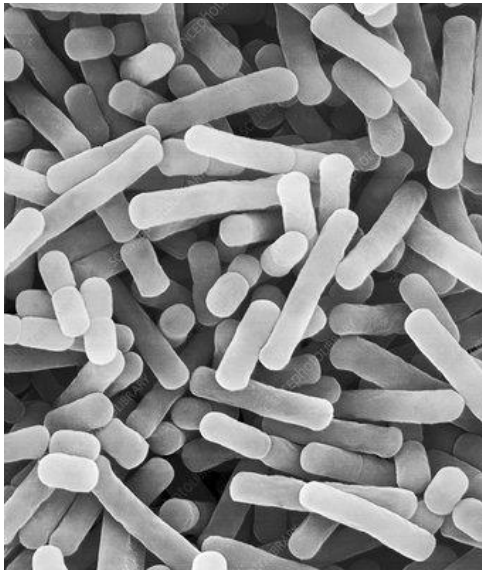
Στελέχη *Leuconostoc* συνδέονται επίσης, με μερικές αρνητικές πτυχές, συμπεριλαμβανομένου της μόλυνσης στη βιομηχανία ζάχαρης (Day, 1992) και σε τρόφιμα («d Ennahar et al., 2000; Lyhs, 2002; Susiluoto et al., 2003) μέσω της δημιουργίας γλίτσας και την ασφάλεια, όπως έχουν πιστοποιηθεί από κλινικές απομονώσεις. Κάποιοι *Leuconostoc* μπορεί να προκαλέσουν μόλυνση στο παγωμένο κρέας έχοντας ως αποτέλεσμα μη επιθυμητά χαρακτηριστικά όπως στη μυρωδιά του κρέατος, τον αποχρωματισμό του και τη δημιουργία γλίτσας (Holland & Liu, 2011). Κλινικά έχει περιγραφεί ότι ο *Leuconostoc* μπορεί να προκαλέσει βακτηριαμία, μόλυνση στους πνεύμονες και εμπύημα, περιτονίτιδα και μόλυνση των περιτονικών υγρών, ενδοκαρδίτιδα, μηνιγγίτιδα, οστεομυελίτιδα, κοιλίτιδα, απόστημα και σηψαιμία (Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2004). Εμφανίζει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό βανκομυκίνη λόγω εμφάνισης πεπτιδίου με C τελικό άκρο D-γαλακτικό οξύ αντί για D-αλανίνη στην πεπτιδογλυκάνη (Delcour et al., 1999). Υπάρχουν βέβαια και μερικές αναφορές για ανθεκτικότητα και σε άλλα αντιβιοτικά (Carpelli et al., 1999; Herrero et al., 1996; Katla et al., 2001; Kikuchi et al., 1994; Swenson, et al., 1990; Zarazaga et al., 1999). Όμως η έκθεση του ανθρώπου και η κατανάλωση τους εδώ και εκατοντάδες χρόνια έχει οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι ο *Leuconostoc* είναι ένας μικροοργανισμός που γενικά θεωρείται ασφαλής για χρήση στη βιομηχανία των τροφίμων και την κατανάλωση του από τον άνθρωπο (Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2004).

Οι *Leuconostoc* που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία του γάλακτος είναι γνωστοί για την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών έναντι παθογόνων αλλά και άλλων μικροοργανισμών που προκαλούν μόλυνση (Holland & Liu, 2011). Η αντιμικροβιακή δράση των οργανικών οξέων, συμπεριλαμβανομένου του γαλακτικού και του οξικού οξέος επηρεάζουν τη μεμβράνη και την ακεραιότητα του κυττάρου (Alakomi et al., 2000; Cabo et al., 2002; Davidson et al., 2014; Marion et al., 1995). Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του διακετυλίου ή της αιθανόλης είναι ελάχιστες σε συνηθισμένες γαλακτικές ζυμώσεις. Παρουσία οξυγόνου ο *Leuconostoc* συσσωρεύει υπεροξειδίο του υδρογόνου αναστέλλοντας κάποιους μικροοργανισμούς (Condon, 1987). Επίσης υπάρχουν αναφορές όπου ο *Leuconostoc* παράγει και μια άλλη κατηγορία αντιμικροβιακών ενώσεων πρωτεϊνικής φύσης, που έχουν δράση έναντι παθογόνων και μικροοργανισμών που προκαλούν μολύνσεις και ονομάζονται βακτηριοσίνες (Stiles, 1994). Η δράση αυτών των ουσιών δεν έχει μελετηθεί αρκετά. Γενικά όμως έχουν δράση έναντι συγγενικών ειδών, αλλά και έναντι παθογόνων στελεχών όπως η *Listeria monocytogenes* (Holland & Liu, 2011).

Πιθανώς να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν συντηρητικό σε τρόφιμα, με προσθήκη βακτηριοσίνης ή προσθήκη των μικροοργανισμών που την παράγουν στα τρόφιμα. Στην πραγματικότητα για καλύτερη δράση έναντι των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών στα τρόφιμα, οι βακτηριοσίνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν μέρος του συστήματος συντήρησης (Cleveland et al., 2001; «d Ennahar et al., 2000).

1.3.2 ΤΟ ΓΕΝΟΣ *LACTOBACILLUS*

Το γένος *Lactobacillus* είναι η μεγαλύτερη κατηγορία που ανήκει στα οξυγαλακτικά βακτήρια. Περιέχει 166 διαφορετικά είδη, τα οποία χρησιμοποιούνται κυρίως στην παρασκευή ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων, *soredrought*, κρέατος και λαχανικών ή ως προβιοτικά. Ανήκει στο φύλο *Firmicutes*, τάξη *Bacilli* και οικογένεια *Lactobacillaceae*. Είναι θετικά κατά Gram βακτήρια, αρνητικά σε αντίδραση με καταλάση, μη σπορογόνα, ραβδοειδή και παράγουν γαλακτικό οξύ ως κύριο προϊόν των ζυμώσεων (de Angelis & Gobbetti, 2016). Τα



Εικόνα 1.3.2: *Lactobacillus bulgaricus* μέσω SEM μικροσκοπίου (sciencephoto.com).

κύτταρα των *Lactobacillus* έχουν κλίμακα μεγέθους 0.5-1.2×1-10 μm. Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης το σχήμα τους μοιάζει σχεδόν σφαιρικό, γι' αυτό το δεν αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό διαχωρισμού των διαφορετικών ειδών. Οι *lactobacilli* είναι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί και γενικά αναπτύσσονται ελάχιστα σε συνθήκες αέρα αλλά η ανάπτυξη τους ορισμένες φορές μπορεί να ενισχυθεί κατά 5% από το CO₂ (παράγεται κατά το μεταβολισμό γλυκόζης ή/ και γλυκονικού οξέος) (Batt, 2014). Είναι αυξότροφοι μικροοργανισμοί, καθώς έχουν πολύπλοκες διατροφικές απαιτήσεις και χρειάζονται υδατάνθρακες, λιπαρά οξέα ή λιπαρά οξέα εστέρων, άλατα, νουκλεϊκά οξέα και βιταμίνες. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης τους είναι το MRS και το APT (de Angelis & Gobbetti, 2016).

Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους είναι 30-40°C, αλλά μπορούν να αναπτυχθούν σε μία ευρεία κλίμακα θερμοκρασιών 5-53°C. Επίσης προτιμούν να αναπτυχθούν σε όξινο περιβάλλον με βέλτιστο pH 5.5-5.8, αλλά μπορούν να αναπτυχθούν και σε pH χαμηλότερο του 5. Έχουν ακόμη την δυνατότητα να αναπτύσσονται παρουσία 6.5% NaCl (Batt, 2014). Είναι μία ομάδα βακτηρίων που έχει χαρακτηριστεί από μεγάλη ποικιλία G+C συγκεντρώσεων και μικρή ομολογία DNA μεταξύ των διαφορετικών ειδών. Στο γένος *Lactobacillus* πολλά είδη έχουν πολύ μεγάλη ομολογία 16S rRNA αλληλουχίας όπως για παράδειγμα οι *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. paraplantarum* (99.7-99.9%). Τα πιο κοντινά γένη είναι οι *Leuconostoc* και οι *Pediococcus* (de Angelis & Gobbetti, 2016).

Τα μέλη του γένους *Lactobacillus* εντοπίζεται σε μεγάλο αριθμό τροφίμων και συμβάλλουν στη συντήρηση, την θρεπτική διαθεσιμότητα και την γεύση. Προστίθενται σε αυτά ως καλλιέργειες εκκίνησης ή παίρνουν μέρος στις ζυμώσεις προϋπάρχοντας εξ αρχής στο υπόστρωμα. Μεγάλος αριθμός γαλακτοκομικών προϊόντων παράγεται χρησιμοποιώντας *Lactobacillus* ή σε συνδυασμό με προσθήκη και άλλων οξυγαλακτικών βακτηρίων. Λαχανικά ζυμώνονται με την προσθήκη *lactobacilli* για την παραγωγή προϊόντων όπως οι πίκλες, οι ελιές και το ξινολάχανο, ενώ άλλα βρίσκονται φυσικά στα λαχανικά και παίρνουν μέρος στη ζύμωση. Σημαντικό ρόλο παίζουν επίσης στην παραγωγή του sourdough (ψωμί) (Batt, 2014).

Υπάρχουν ομοζυμωτικοί *lactobacilli* που ζυμώνουν εξόζες σχεδόν ολοκληρωτικά προς γαλακτικό οξύ, ενώ οι πεντόζες και το γλυκονικό οξύ δεν ζυμώνονται. Υπάρχουν προαιρετικά ετεροζυμωτικοί *lactobacilli* που ζυμώνουν εξόζες είτε ολοκληρωτικά σε γαλακτικό οξύ ή κάτω από συνθήκες περιορισμένης συγκέντρωσης γλυκόζης σε γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, αιθανόλη και φορμικό οξύ και επίσης ζυμώνει πεντόζες σε γαλακτικό και οξικό οξύ. Τέλος υπάρχουν υποχρεωτικά ετεροζυμωτικοί *lactobacilli* οι οποίοι ζυμώνουν εξόζες σε γαλακτικό οξύ, CO₂, οξικό οξύ, αιθανόλη και πεντόζες που παράγουν γαλακτικό και οξικό οξύ (de Angelis & Gobbetti, 2016).

Οι *Lactobacillus* είναι σημαντικοί είτε όταν προστίθενται είτε όταν προϋπάρχουν στα τρόφιμα, με σημαντικό πιθανό τους ρόλο ως προβιοτικά. Κλινικά έχουν αναφερθεί κάποια θετικά αποτελέσματα λόγω κατανάλωσης *Lactobacillus*, όπως η βελτιστοποίηση του ανοσοποιητικού, μειώνοντας την δράση των ενζύμων των κοπράνων, προλαμβάνοντας τις εντερικές διαταραχές και μειώνοντας την ιογενή διάρροια. Τα περισσότερα στελέχη προβιοτικά έχουν την ικανότητα να εγκαθίστανται στο γαστρεντερικό σωλήνα και να επηρεάζουν θετικά την μικροβιακή χλωρίδα του αποτρέποντας ίσως την παραμονή παθογόνων μικροοργανισμών (Batt, 2014).

Οι *Lactobacilli*, επίσης παράγουν έναν μεγάλο αριθμό ουσιών συμπεριλαμβανομένου του γαλακτικού οξέος, του υπεροξειδίου του υδρογόνου, του διακετυλίου και των βακτηριοσινών, τα οποία παρεμποδίζουν την ανάπτυξη άλλων βακτηρίων. Οι βακτηριοσίνες είναι πρωτεϊνικής φύσης και μπορεί να έχουν βακτηριοκτόνο ή βακτηριοστατική δράση έναντι συγγενικών βακτηρίων. Έχουν δύο κύριες εφαρμογές, να βελτιώσουν την ασφάλεια του τροφίμου παρεμποδίζοντας παθογόνους μικροοργανισμούς και να βελτιώσουν την ποιότητα μέσω της παρεμπόδισης μη επιθυμητών μικροοργανισμών ή αυτών που μπορεί να προκαλέσουν μόλυνση (de Angelis & Gobbetti, 2016).

Η βακτηριοσίνη για παράδειγμα στην περίπτωση των τυριών μπορεί να προστίθεται κατά την παραγωγή τους ή να ψεκάζεται στην επιφάνεια τους μετά το τέλος της παραγωγής τους. Οι *Lactobacilli* όμως δεν θα πρέπει να παρεμποδίζουν την καλλιέργεια εκκίνησης, αλλά θα πρέπει να φτάνουν σε επαρκή επίπεδα τις πρώτες μέρες ώστε να παράγουν ποσότητες βακτηριοσίνης μετά την παραγωγή του τροφίμου. Οι βακτηριοσίνες επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο μη επιθυμητών ρυπογόνων μικροοργανισμών (de Angelis & Gobbetti, 2016). Ενσωμάτωση των *Lactobacillus spp.* ως εκκινητές ή η προσθήκη καθαρών ή ημικαθαρισμένων βακτηριοσινών στα τρόφιμα μπορεί να επιφέρει πρόληψη από την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών (Batt, 2014).

1.4 ΑΝΕΠΙΘΥΜΗΤΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ LAB

1.4.1 ΥΠΑΡΞΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ

Οι *Lactobacilli* και οι *Leuconostoc* (Muñoz-Atienza et al., 2013), γενικά θεωρούνται μη παθογόνοι μικροοργανισμοί για τον άνθρωπο. Παρόλα αυτά κάποιοι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν κλινικά από αυτά τα γένη βακτηρίων έχουν προσδιοριστεί ότι είναι υπεύθυνα για προβλήματα υγείας και ασθένειες χάρες την παρουσία γονιδίων παθογένειας (Colautti et al., 2022). Μερικά γονίδια που μπορούν να ανιχνευθούν είναι τα εξής:

- *agg* (aggregation protein) - είναι μία πρωτεΐνη συσσωμάτωσης που εμπλέκεται στην προσκόλληση στα ευκαρυωτικά κύτταρα, τη συσώρευση και τη σύζευξη κυττάρων (Eaton & Gasson, 2001),
- *ace* (accessory colonization factor) - είναι μία πρωτεΐνη που προσκολλάτε στο κολλαγόνο (Lebreton et al., 2009),
- *hyl* (hyaluronidase) - κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη την υαλουρονιδάση, που πιστεύεται ότι εισβάλλει στον ρινοφάρυγγα και μπορεί να προκαλέσει πνευμονιοκοκκική πνευμονία (Vankerckhoven et al., 2004),

- *gelE* (gelatinase) - η ζελατινάση είναι μία τοξίνη, εξωκυττάρια μεταλλοενδοπεπτιδάση, η οποία υδρολύει τη ζελατίνη, το κολλαγόνο, την αιμοσφαιρίνη και άλλες βιοδραστικές ενώσεις (Eaton & Gasson, 2001),
- *esp* (enterococcal surface protein) - είναι μία πρωτεΐνη που σχετίζεται με το κυτταρικό τοίχωμα, μπορεί να διευκολύνει την ανοσολογική διαφυγή σε περίπτωση ανοσοανεπάρκειας, σχετίζεται με αυξημένη λοιμογόνο δράση, την εγκατάσταση και την παραμονή στο ουροποιητικό σύστημα και το σχηματισμό βιοφίλμ (Vankerckhoven et al., 2004),
- *cyl* (cytolysin) - η κυτολυσίνη είναι μία βακτηριακή τοξίνη με αιμολυτική δράση έναντι ευκαρυωτικών κυττάρων που κωδικοποιείται από το γονίδιο *cylA* και μπορεί ακόμη και να προκαλέσει βλάβη στους ιστούς (Laukoná et al., 2019),
- *asa1* (aggregation substance) - αυτή η πρωτεΐνη προσκόλλησης διευκολύνει τη σύζευξη πλασμιδίων που περιέχουν γονίδιο φερομόνης του φύλου και ενισχύει τη λοιμογόνο δύναμη μέσω προσκόλλησης σε νεφρικά κύτταρα, καρδιακά ενδοκαρδιακά κύτταρα και εσωτερίκευση από εντερικά επιθηλιακά κύτταρα (Kiruthiga et al., 2020),
- *IS16* (element IS) - είναι ένας δείκτης ειδικός για κλινικά *E. faecium*/*E. faecalis* στελέχη που σχετίζονται με νοσοκομειακές λοιμώξεις (Laukoná et al., 2019).

1.4.2 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ

Η ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά είναι ένας φυσικός μηχανισμός για τα βακτήρια. Η μη επιτρεπτή και η γενικευμένη χρήση των αντιβιοτικών έχει αυξήσει την επιλεκτική αποτελεσματικότητα λόγω της προσαρμογής των βακτηρίων στις αλλαγές του περιβάλλοντος και τη σχετική αύξηση της αντίστασης τους. Πράγματι, έκθεση για μεγάλο διάστημα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις αντιβιοτικών μειώνει την ανθεκτικότητα τους στο βακτήριο. Με την πάροδο του χρόνου, αύξηση έχει παρατηρηθεί στην αντίσταση όχι μόνο σε παθογόνους αλλά και άλλους μικροοργανισμούς όπως οι *Lactobacilli*. Αυτά τα βακτηριακά γκρουπ προσαρμόζονται στις συνθήκες του περιβάλλοντος αποκτώντας γονίδια αντίστασης σε αντιβιοτικά από άλλα βακτήρια που έχουν μέσω μηχανισμού μεταφοράς τους σε αυτά. Αυτό το φαινόμενο εντείνεται λόγω πολλών παραγόντων όπως η ευρεία χρήση αντιβιοτικών στην τροφική αλυσίδα. Επομένως, εκτός από τον περιορισμό της χρήσης αντιβιοτικών και την παρακολούθηση της παρουσίας παραγόντων αντίστασης σε γνωστά παθογόνα βακτήρια, θα πρέπει να δοθεί προσοχή σε ολόκληρο το μικροβιακό πληθυσμού όπως έχει επισημάνει και η EFSA (Colautti et al., 2022).

Για τον εντοπισμό ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά διενεργούνται διάφοροι έλεγχοι, όπως μέσω μοριακών μεθόδων μπορεί να γίνει εντοπισμός γονιδίων ανθεκτικότητας, με τη χρήση δισκίων αντιβιοτικών σε στερεό θρεπτικό υλικό (Disk diffusion method), μέσω υγρών καλλιεργειών (Broth dilution method) για τον εντοπισμό της κατώτερης συγκέντρωσης αναστολής του μικροοργανισμού (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) (Colautti et al., 2022).

Στο γένος *Leuconostoc* έρευνες έχουν δείξει πιθανή μη τυπική ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη και με μικρότερη συχνότητα στην τετρακυκλίνη και την χλωραφενικόλη (Flórez et al., 2016). Τα περισσότερα στελέχη αυτού του γένους ήταν ευαίσθητα στην αμπικιλλίνη, την μουπιροκίνη, την ερυθρομυκίνη και την κινουπριστίνη/νταλφοπριστίνη, ορισμένα όμως ταξινομήθηκαν ως ανθεκτικά στην οξακιλλίνη, την σιπροφλοξασίνη και την

νιτροφουραντονίνη, ενώ όλα τα στελέχη βρέθηκαν ανθεκτικά στη βανκομυκίνη (Morandi et al., 2013).

Όσον αφορά το γένος *Lactobacillus*, η συντριπτική πλειοψηφία των ελεγμένων στελεχών αποκάλυψαν φαινοτυπική ανθεκτικότητα στην βανκομυκίνη, την σιπροφλοξασίνη και τις αμινογλυκοσίδες. Το μεγαλύτερο μέρος των *Lactobacillus*, έδειξαν υψηλές ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις (MICs) στα αντιβιοτικά κεφτοταξίμη, κεφτριαξόνη, κεφαζολίνη και επομένως θεωρήθηκαν ανθεκτικά στις κεφαλοσπορίνες. Επίσης γονίδια ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη και την ερυθρομυκίνη εντοπίστηκαν σε ορισμένα στελέχη (Anisimova & Yarullina, 2019).

Έχει γίνει γνωστό ότι η διαχείριση ενός ευρύ φάσματος αντιβιοτικών μπορεί να οδηγήσει σε εγγυημένη ζημιά της μικροβιακής χλωρίδας του ανθρώπου, πράγμα που παίζει βασικό ρόλο στην υγεία του ανθρώπου. Ο πιθανός συσχετισμός μεταξύ της χρήσης μεγάλου φάσματος αντιβιοτικών και της αύξησης των περιπτώσεων ατοπικών και αυτοάνοσων νοσημάτων προκαλεί λόγους ανησυχίας. Ως συνέπεια αυτού του γεγονότος έχει δημιουργηθεί η ανάγκη για ανάπτυξη αντιμικροβιακών που μπορούν να έχουν κλινική χρήση. Έτσι πέρα από φυτικά προϊόντα έχουν ανακαλυφθεί βακτηριοφάγοι και λυσίνες φάγων, θεραπευτικά που βασίζονται στο RNA, προβιοτικά και αντιμικροβιακά πεπτίδια από πολλές πηγές. Μία περίπτωση αντιμικροβιακών ενώσεων η οποία πρέπει να μελετηθεί καλύτερα λόγω των προοπτικών της είναι οι βακτηριοσίνες (Cotter et al., 2012).

1.5 ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΑΠΟ LAB ΜΕ ΘΕΤΙΚΑ ΟΦΕΛΗ

Πέρα από τις αρνητικές επιπτώσεις που αναφέρθηκαν, η χρησιμότητα των βακτηρίων είναι μεγάλη. Οι ωφέλιμες ουσίες που εκκρίνονται από τα βακτήρια είναι οι εξής:

1.5.1 ANTIBIOTIKA

Τα αντιβιοτικά είναι χημικές ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς και έχουν την ικανότητα να σκοτώνουν άλλους μικροοργανισμούς που μπορούν να προκαλέσουν διάφορες νόσους. Επίσης, έχουν αντικαρκινική δράση και χρησιμοποιούνται ως αντιογκολογικά φάρμακα (Kargiński & Adamczak, 2018). Από την ανακάλυψη της πενικιλίνης το 1929, έχουν ανακαλυφθεί πιο αποτελεσματικά αντιμικροβιακά που αναπτύχθηκαν με την αποσαφήνιση των αλληλεπιδράσεων φαρμάκου-στόχου και μέσω της τροποποίησης του μορίου φαρμάκου. Ωστόσο, ο κυτταρικός θάνατος που προκαλείται από αντιβιοτικά είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που ξεκινά με τη φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ του μορίου ενός φαρμάκου και του ειδικού στόχου του στα βακτήρια, και προκαλεί αλλοιώσεις στο προσβεβλημένο βακτήριο σε βιοχημικό, μοριακό και δομικό επίπεδο (Kohanski et al., 2010).

1.5.2 ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΟΞΕΑ

ΓΑΛΑΚΤΙΚΟ ΟΞΥ ($\text{CH}_3\text{—CH(OH)—COOH}$):

Η παραγωγή του και χρήση του σχετίζεται με την βιομηχανία των τροφίμων, καθώς εντοπίζεται φυσιολογικά είτε παράγεται κατά την ζύμωση τους. Χρησιμοποιείται ως μέσο οξύνισης, αρωματικό, ρυθμίζει το pH και αναστέλλει τυχόν βακτηριακές αλλοιώσεις σε μεγάλη ποικιλία επεξεργασμένων τροφίμων (Reis et al., 2012).

ΟΞΙΚΟ ΟΞΥ ($\text{CH}_3\text{—COOH}$):

Το οξικό οξύ και τα άλατά του χρησιμοποιούνται σε διάφορα τρόφιμα για να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη και να μειώσουν την βιωσιμότητα των Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων, των ζυμών και των μυκήτων. Γενικά έχει βακτηριοστατική δράση κατά 0.2%, ενώ βακτηριοκτόνο δράση μόνο κάτω από 0.3% και έχει αποτελεσματικότερη δράση έναντι Gram αρνητικών βακτηρίων. Η δράση του εξαρτάται από την τιμή του pH και η βακτηριοκτόνος δράση του εκφράζεται καλύτερα σε χαμηλές τιμές pH κάτω από 4.5 (Reis et al., 2012).

ΒΕΝΖΟΪΚΟ ΟΞΥ ($\text{C}_6\text{H}_5\text{—COOH}$):

Είναι το πιο κοινά χρησιμοποιούμενο συντηρητικό στην βιομηχανία των τροφίμων. Το βενζοϊκό οξύ και το βενζοϊκό νάτριο χρησιμοποιούνται ως αντιμυκητιακοί παράγοντες. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα μπορεί να περιέχουν φυσικά βενζοϊκό οξύ, καθώς ορισμένα οξυγαλακτικά βακτήρια μπορούν να μετασχηματιστούν ορισμένα οξέα που υπάρχουν στο γάλα, σε βενζοϊκό οξύ (Reis et al., 2012).

ΠΡΟΠΑΝΟΪΚΟ ΟΞΥ ($\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{—COOH}$):

Τα προπανοϊκού οξέος βακτήρια (PAB) είναι γνωστά για την ικανότητα που έχουν να μετατρέπουν γαλακτικό σε προπανοϊκό οξύ και οξικό σε διοξείδιο του άνθρακα. Αυτό το οξύ χρησιμοποιείται στα τρόφιμα ως μυκητοστατικός παράγοντας αλλά επίσης και γιατί επιδρά στην ανάπτυξη και την μείωση της βιωσιμότητας Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων. Τα ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν προπανοϊκό οξύ σε ποσότητες που ανιχνεύονται (Reis et al., 2012).

ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ (H_2O_2):

Η παραγωγή H_2O_2 από LAB μπορεί να αποτρέψει την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα και μπορεί επίσης να συμβάλλει στη συντήρηση τροφίμων. Η παραγωγή του έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη ψυχότροφων και παθογόνων μικροοργανισμών σε θερμοκρασίες ψύξης. Τα περισσότερα στελέχη του γένους *Lactobacilli* μπορούν να σχηματίσουν υπεροξείδιο του υδρογόνου μέσω οξείδωσης γαλακτικού οξέος. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί να επηρεάσει τις οργανοληπτικές ιδιότητες των προϊόντων κρέατος που έχουν υποστεί ζύμωση αυξάνοντας την τάγγιση και τον αποχρωματισμό του τελικού προϊόντος (Reis et al., 2012).

1.5.3 ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΕΣ

Τα βακτήρια παράγουν ριβοσωμικά συντιθέμενα αντιμικροβιακά πολυπεπτίδια που ονομάζονται βακτηριοσίνες. Αυτά τα πολυπεπτίδια έχουν τραβήξει το ενδιαφέρον λόγω της πιθανής τους χρήσης ως αντιμικροβιακοί παράγοντες για την θεραπεία μολύνσεων και τη συντήρηση των τροφίμων και των ζωοτροφών (Nissen-Meyer et al., 2010).

1.6 ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΕΣ

Οι βακτηριοσίνες είναι μία μεγάλη και πολυπληθής ομάδα ριβοσωμικά συντιθέμενων αντιμικροβιακών πεπτιδίων ή πρωτεϊνών (de Paula et al., 2015), που παράγονται είτε από Gram θετικά είτε από Gram αρνητικά βακτήρια και έχουν βακτηριοκτόνο δράση έναντι ειδών συγγενικών με αυτό που τις παράγει (Klaenhammer, 1988). Είναι μικρά κατιονικά, αμφιπαθητικά μόρια που παρουσιάζουν δομή α-έλικας ή/και β-πτυχωτού φύλλου, τα οποία μπορούν να αναμιχθούν παρουσία υδάτινων μέσων ή σε υψηλές συγκεντρώσεις. Η παραγωγή τους γίνεται συνήθως μέσω των οξυγαλακτικών βακτηρίων (de Paula et al., 2015). Ένα σημαντικό πλεονέκτημα πολλών βακτηριοσινών είναι η χαμηλή τοξικότητα τους ως προς τον ξενιστή όταν λαμβάνονται από το στόμα (Cotter et al., 2012).

Κάποια χαρακτηριστικά τους είναι κοινά για όλες τις βακτηριοσίνες όπως:

- η έμφυτη ανοσία στη δική τους βακτηριοσίνη,
- η αντίσταση ή η ευαισθησία σε άλλες βακτηριοσίνες,
- η παραγωγή πάνω από μία αντιμικροβιακή ουσία,
- η ίδια βακτηριοσίνη μπορεί να παράγεται από διαφορετικά γένη,
- τα ίδια είδη μπορεί να παράγουν διαφορετικές ενώσεις κλπ. (de Paula et al., 2015).

Οι περισσότεροι ερευνητές υποστηρίζουν ότι οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων ενός μικροοργανισμού είναι συνδεδεμένες και με την παραγωγή βακτηριοσίνης. Έχει παρατηρηθεί όμως ότι η βέλτιστη ανάπτυξη των κυττάρων δεν έχει πάντα σαν αποτέλεσμα την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων βακτηριοσίνης (Mataragas et al., 2003).

Κάποιες βακτηριοσίνες έχουν απομονωθεί από μία μεγάλη ποικιλία LAB συμπεριλαμβανομένου *Lactobacillus sp.*, *Enterococcus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Carnobacterium sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Streptococcus sp.* *Weissella sp.*. Έχουν βρεθεί επίσης και σε non-LAB βακτήρια, όπως το *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bacillus coagulans* και *Listeria innocua*. Αυτά τα στελέχη που παράγουν βακτηριοσίνες έχουν απομονωθεί από μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων, όπως τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα λουκάνικα, τα λαχανικά και το γαστρεντερικό σωλήνα θηλαστικών (Cui et al., 2012).

Οι βακτηριοσίνες, είναι μία μεγάλη ομάδα ετερόλογων βακτηριακών ανταγωνιστών, οι οποίες ποικίλουν ως προς το μοριακό τους βάρος, την πρόδρομη δομή τους, τις βιοχημικές του ιδιότητες, τον τρόπο δράσης τους, την θερμοανθεκτικότητα τους και τις γενετικές τους ιδιότητες (Cui et al., 2012). Η αντιμικροβιακή δράση των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι ευρέως διαδεδομένη και μελετημένη για τις ζυμώσεις τροφίμων, για την συντήρηση τροφίμων και για την ενδογενή μικροχλωρίδα του ανθρώπου (Klaenhammer, 1988). Παρόλο που μελετώνται εδώ και χρόνια, μόνο λίγες έχουν εμπορική χρήση. Αυτή η απογοητευτική έλλειψη προόδου οφείλεται στην γενική έλλειψη γνώσης του πως οι βακτηριοσίνες επιλέγουν το στόχο τους, πως δημιουργούνται οι πόροι στις μεμβράνες των κυττάρων

στόχων, πως τα ίδια τα κύτταρα που τις παράγουν προστατεύονται από αυτές και πως αναπτύσσεται η ανθεκτικότητα (Kjos et al., 2011).

Οι έρευνες πάνω στις βακτηριοσίνες έχουν εστιάσει σε τέσσερις γενικές περιοχές που συμπεριλαμβάνουν την έκφραση της βακτηριοσίνης, την παραγωγή και τον τρόπο δράσης της, το χαρακτηρισμός των πλασμιδίων που κωδικοποιούν την παραγωγή της και την ανοσία της και η χρήση τους ως μέσο μεταφοράς γονιδίων, ο προσδιορισμός και η περιγραφή των βακτηριοσινών που παράγονται από βακτήρια που δεν έχουν προσδιοριστεί ως βακτηριοσινογενή και η ταξινόμηση και ο χαρακτηρισμός βακτηρίων με βάση των παραγωγή ή την ευαισθησία τους σε βακτηριοσίνες (Klaenhammer, 1988).

Οι βακτηριοσίνες έχουν αρκετούς διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης και διαφέρουν από αυτούς των αντιβιοτικών. Οι μηχανισμοί αυτοί μπορούν να χωριστούν σε αυτούς που πρώτα δρουν στην ανάπτυξη του κυττάρου και σε αυτούς και σε αυτούς που επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων και την παραγωγή πρωτεϊνών στο κύτταρο (Cotter et al., 2012).

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοσυντηρητικά στα τρόφιμα ή μπορεί να παράγονται στο γαστρεντερικό σωλήνα από οξυγαλακτικά βακτήρια ως ανταγωνιστικός παράγοντας. Η παραγωγή βακτηριοσινών από μικροοργανισμούς, που μπορούν να προστατέψουν ή να προλάβουν την μόλυνση από παθογόνους μικροοργανισμούς ή μη επιθυμητούς που μολύνουν τα τρόφιμα, έχει τραβήξει το ενδιαφέρον των βιομηχανιών τροφίμων. Επίσης, η αυξανόμενη απαίτηση των καταναλωτών για βιολογικά προϊόντα με την προσθήκη λιγότερων ή καθόλου χημικών συντηρητικών οδηγεί τις βιομηχανίες τροφίμων να αναζητήσουν νέες βιοσυντηρητικές ενώσεις όπως οι βακτηριοσίνες. Επιπλέον η αντίσταση στις υψηλές θερμοκρασίες, το χαμηλό pH, τους οργανικούς διαλύτες μαζί με το γεγονός ότι πέπτονται εύκολα από τα πρωτεολυτικά ένζυμα στον άνθρωπο τις καθιστά ενδιαφέρον εργαλείο για εφαρμογή στη συντήρηση των τροφίμων. Η νισίνη, όμως είναι η μοναδική βακτηριοσίνη της οποίας η χρήση έχει εγκριθεί από τους οργανισμούς FAO/WHO/FDA (de Paula et al., 2015).

Συμπερασματικά, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον στην ανάπτυξη αυτών των πεπτιδίων σε παράγοντες θεραπείας μολύνσεων και για τη συντήρηση τροφίμων και ζωοτροφών, λόγω της ανησυχητικής αύξησης των ανθεκτικών σε αντιβιοτικά παθογόνων βακτηρίων και των μη επιθυμητών αποτελεσμάτων που πολλά χημικά συντηρητικά μπορεί να προκαλέσουν. Σπουδαίο ενδιαφέρον έχουν οι βακτηριοσίνες που παράγονται από οξυγαλακτικά βακτήρια των τροφίμων και της βιομηχανικής σημαντικότητας αυτών των βακτηρίων (Orpegård et al., 2007).

1.6.1 ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΩΝ

Έχουν γίνει πολλές προσπάθειες ανά τα χρόνια για την κατηγοριοποίηση των βακτηριοσινών. Όπως αναφέρει ο Klaenhammer, 1993 οι βακτηριοσίνες διακρίνονται σε:

(I) Λαντιβιοτικά, μικρά, ενεργά στη μεμβράνη πεπτίδια (<5 kDa) που περιέχουν ασυνήθιστα αμινοξέα όπως η λανθειονίνη, η 3-μεθυλ-λανθειονίνη και αφυδατωμένα κατάλοιπα.

(II) Μικρά θερμοανθεκτικά πεπτίδια (< 10 kDa) που δεν περιέχουν λανθειονίνη, είναι δραστικά στη μεμβράνη και χαρακτηρίζονται από τη θέση Gly-Gly^{-1**+1}Χaa στο πρόδρομο μόριο της βακτηριοσίνης. Οι ώριμες βακτηριοσίνες προβλέπεται να

σχηματίζουν αμφίφιλες έλικες, με δομή β-πτυχωτού φύλλου. Υποομάδες που μπορούν να οριστούν για την κατηγορία II είναι:

(IIα) Πεπτίδια που έχουν δράση έναντι της *Listeria* με αλληλουχία στο N-τελικό άκρο Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys-.

(IIβ) Συμπλέγματα που αποτελούνται από δύο δραστικά πρωτεϊνικά πεπτίδια.

(IIγ) Πεπτίδια ενεργοποιημένα μεθειόλη που απαιτούν μειωμένα κατάλοιπα κυστεΐνης για να είναι δραστικά.

(III) Μεγάλες θερμικά ασταθείς πρωτεΐνες (>30 kDa).

(IV) Σύνθετες βακτηριοσίνες, που αποτελούνται από πρωτεΐνη συν ένα ή περισσότερα χημικά τμήματα (λιπίδιο, υδατάνθρακες).

Στη συνέχεια ο Cotter et al., 2005, πρότεινε την εξής κατηγοριοποίηση:

- Βακτηριοσίνες τάξης I (λαντιβιοτικά): Τα λαντιβιοτικά (αντιβιοτικά που περιέχουν λανθειονίνη) είναι μικρά πεπτίδια (μήκους 19-38 αμινοξέων) που διαθέτουν κατάλοιπα λανθειονίνης ή β-μεθυλ-λανθειονίνης, τα οποία σχηματίζουν ομοιοπολικές γέφυρες μεταξύ αμινοξέων. Επιπλέον, μπορεί να περιέχουν και άλλα κατάλοιπα που προκύπτουν από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Τα λαντιβιοτικά μπορούν να χωριστούν με βάση τη δομή και τον τρόπο δράσης τους. Διακρίνονται σε:

Επιμήκη, αμφίφιλα, κατιονικά λαντιβιοτικά που έχουν την ικανότητα να δημιουργούν πόρους.

Σφαιρικά λαντιβιοτικά που δρουν μέσω της αναστολής του ενζύμου 18.

Λόγω της δυσκολίας ταξινόμησης των πολύπλοκων σε δομή λαντιβιοτικών (ενός ή δύο πεπτιδίων) προτάθηκε η υποδιαίρεση της κατηγορίας σε 11 υποομάδες, βάση των αλληλουχιών των μη τροποποιημένων πεπτιδίων.

- Βακτηριοσίνες τάξης II: Αυτή η κατηγορία αποτελείται από τις πιο κοινές βακτηριοσίνες, που δεν περιέχουν λανθειονίνη, είναι μικρές σε μέγεθος (<10 kDa), θερμοανθεκτικές και δεν υπόκειται σε εκτεταμένη μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Αρκετές διαφορετικές περαιτέρω ομαδοποιήσεις έχουν προταθεί, αλλά η ετερογενής φύση τους καθιστά δύσκολη την σωστή ταξινόμηση τους. Δύο τύποι είναι κοινί σε όλα τα συστήματα ταξινόμησης και διατηρούνται στο προτεινόμενο σύστημα ταξινόμησης:

Τάξη IIa: βακτηριοσίνες pediocin-like (YGNGVXCXXXXVXV, όπου X οποιοδήποτε αμινοξύ), με δραστηριότητα έναντι του παθογόνου *Listeria monocytogenes*.

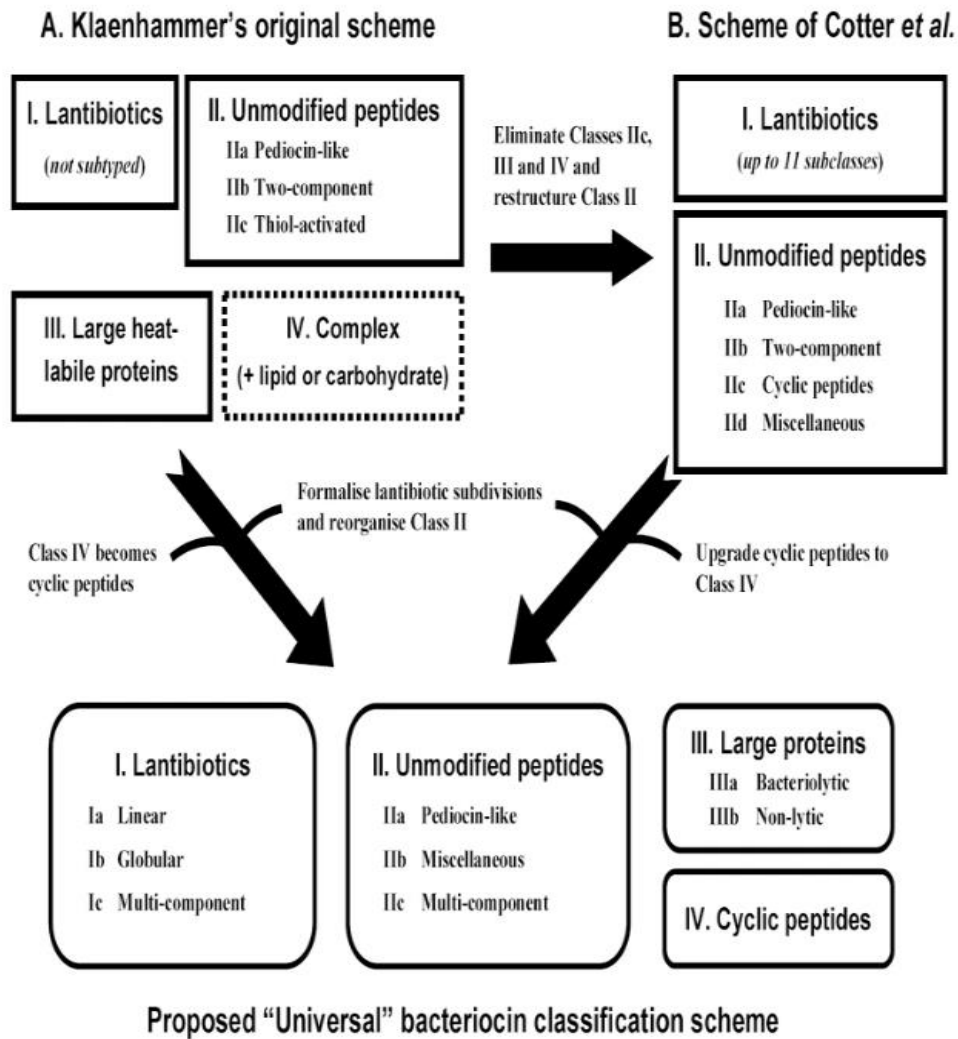
Τάξη IIb: βακτηριοσίνες που αποτελούνται από δύο πεπτίδια με συνεργατική δράση.

Τάξη IIc: κυκλικές βακτηριοσίνες.

Τάξη IId: βακτηριοσίνες που δεν μπορούν να καταταγούν σε καμία από τις παραπάνω ομάδες.

- Βακτηριολυσίνες (μη βακτηριολυτικές πρωτεΐνες): Είναι μεγάλες σε μέγεθος, ασταθείς κατά τη θέρμανση αντιμικροβιακές πρωτεΐνες.

Με τη σειρά τους οι Heng & Tagg, 2006 χρησιμοποιώντας τις δύο κατηγοριοποιήσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω (Cotter et al., 2005; Klaenhammer, 1993) και πρότεinan μία καθολική κατάταξη, κατά την οποία διαμόρφωσαν καλύτερα τις υποομάδες των λαντιβιοτικών και αναδιοργάνωσαν την τάξη II, αναλυτικότερα φαίνεται στο σχήμα 1.6.1.α:

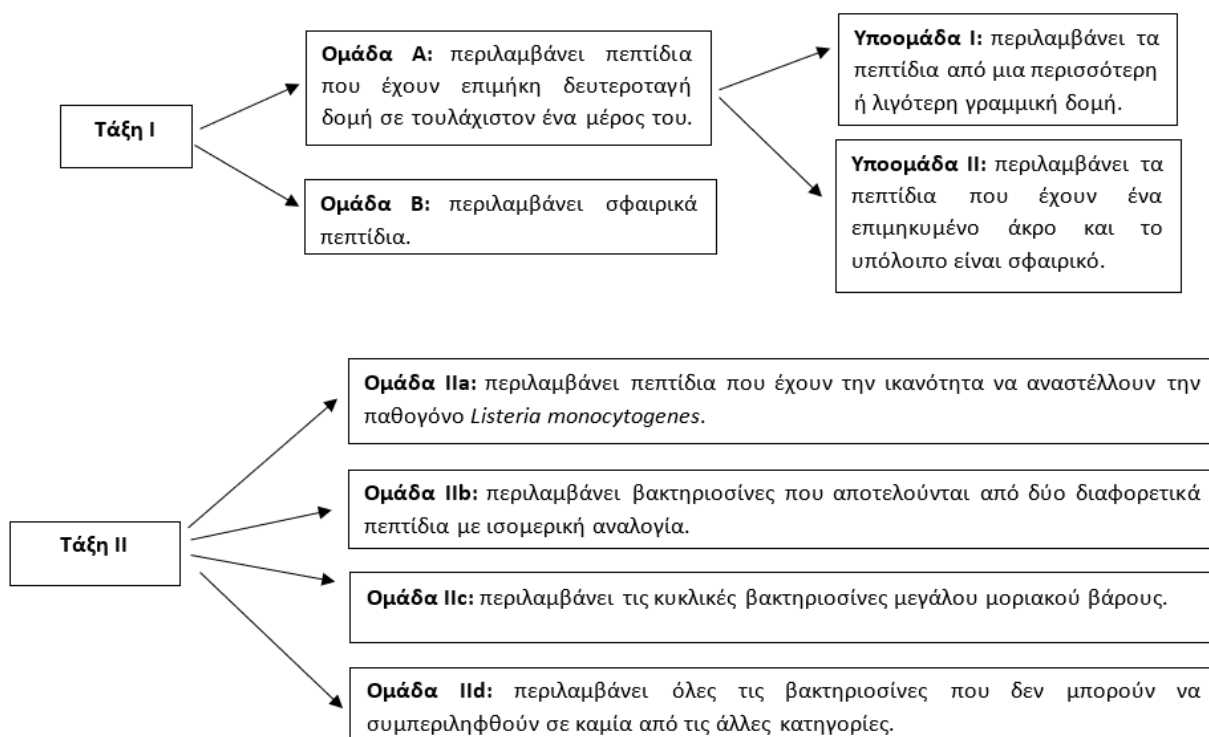


Σχήμα 1.6.1.α: Παραπάνω προβάλλεται ένα «καθολικό» σχήμα ταξινόμησης των βακτηριοσινών που βασίζεται στα θεμέλια (α) του αρχικού σχήματος ταξινόμησης για τις βακτηριοσίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων (LAB) από τον Klaenhammer, 1993 και ενσωματώνει στοιχεία (β) του αναθεωρημένου σχήματος των Cotter et al., 2005. Προτείνεται επίσης η επισήμοποίηση των υποδιαίρέσεων των λαντιβιοτικών σε τύπους Ia (γραμμικός), Ib (σφαιρικός) και Ic (πολλαπλών συστατικών) (Heng & Tagg, 2006).

Αντιμικροβιακά πεπτίδια που έχουν συντεθεί ριβοσωμικά από αρνητικούς κατά Gram μικροοργανισμούς μπορεί να διαχωριστούν σε μικρά πεπτίδια όπως μικροσίνες ή μεγαλύτερα πεπτίδια όπως οι κολισίνες. Οι μικροσίνες έχουν κατηγοριοποιηθεί και αυτές με βάση αν υπάρχουν ή όχι τροποποιήσεις. Οι βακτηριοσίνες της τάξης I μπορεί να υποδιαιρεθούν σε λαντιβιοτικά, λιναρδίνες, πρωτεΐνες, γραμμικές αζόλες ή πεπτίδια που περιέχουν αζόλη, κυανοβακτίνες, θειοπεπτίδια, πεπτίδια με θηλιές, σακτιβιοτικά,

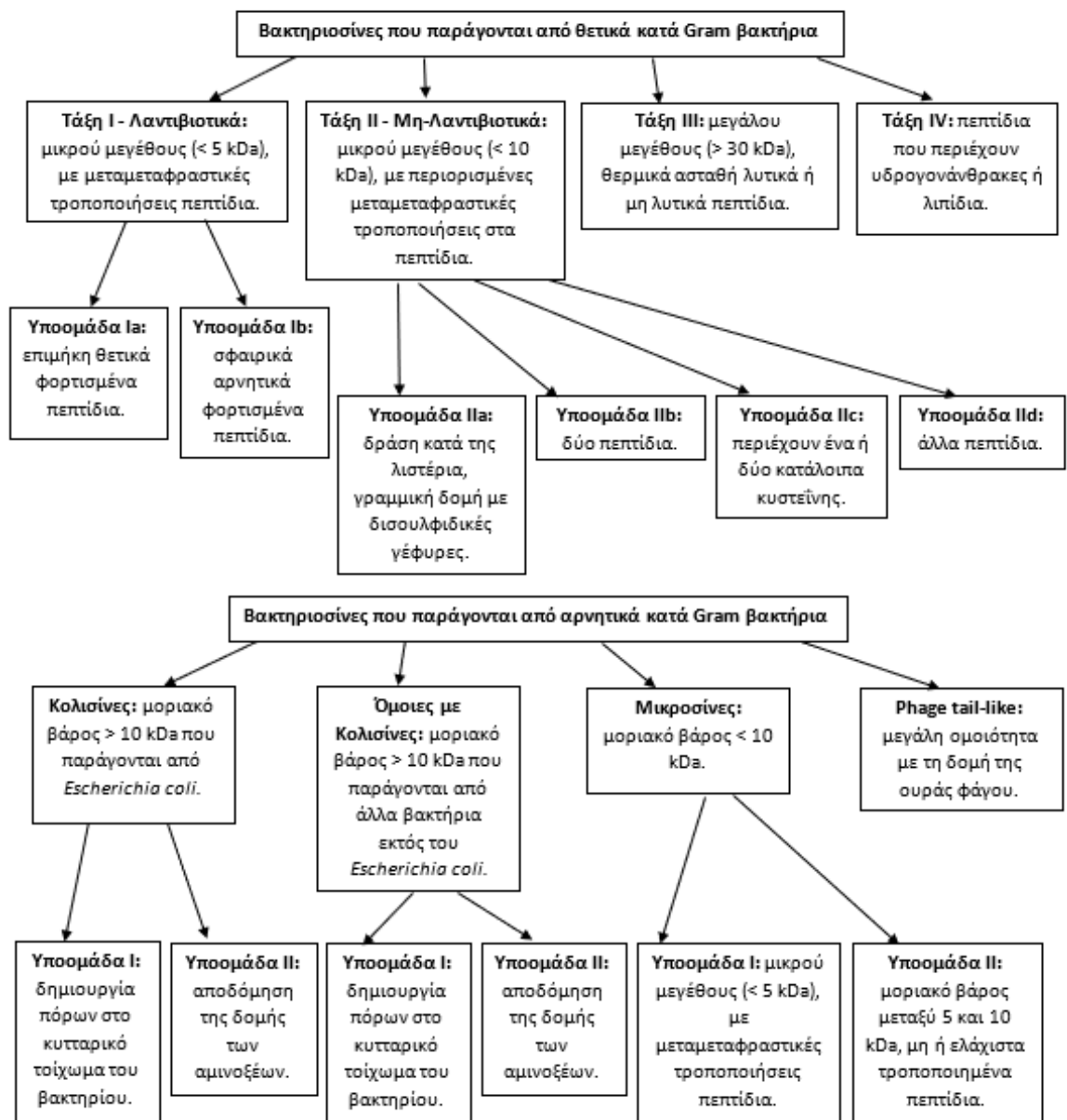
βοτρομυκίνες, γλυκοσίνες και τροποποιημένες μικροσίνες. Σε μερικές από αυτές τις κατηγορίες τα πεπτίδια είναι σπάνια ή δεν έχουν χαρακτηριστεί πλήρως. Οι μη τροποποιημένες ή κυκλικές βακτηριοσίνες μπορούν να διαχωριστούν σε πέντε κατηγορίες εκ των οποίων οι τέσσερις θα περιέχουν τα μη τροποποιημένα πεπτίδια και η άλλη τις μη τροποποιημένες μικροσίνες. Οι υποκατηγορίες αποτελούνται από πεπτίδια που περιέχουν το μοτίβο YGNGV, βακτηριοσίνες δύο πεπτιδίων, κυκλικές βακτηριοσίνες μη τροποποιημένα, γραμμικά, χωρίς μοτίβο pediocin-like, μονά πεπτίδια που δεν ανήκουν σε κάποιο άλλο γκρουπ (Cotter et al., 2012).

Στη σχηματική απεικόνιση 1.6.1.β, που φαίνεται παρακάτω, διακρίνονται οι κατηγορίες των βακτηριοσινών αναλυτικά, όπως διαχωρίστηκαν από τους Martínez et al., 2016, καθώς αποτελεί μια κατηγοριοποίηση που έχει επικρατήσει τα τελευταία χρόνια:



Σχήμα 1.6.1.β.: Σχηματική απεικόνιση της κατάταξης των βακτηριοσινών κατά τους Martínez et al., 2016.

Μια άλλη κατάταξη που έγινε γνωστή τα τελευταία χρόνια και αξίζει να αναφερθεί είναι από τους Simons et al., 2020, περιλαμβάνει την κατηγοριοποίηση των βακτηριοσινών των Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων, αλλά και των μεγαλύτερων σε μέγεθος πεπτιδίων απεικονίζεται στο σχήμα 1.6.1.γ:



Σχήμα 1.6.1.γ: Σχηματική απεικόνιση της κατάταξης των βακτηριοσινών κατά τους Simons et al., 2020.

Παρακάτω παρουσιάζονται αναλυτικότερα οι κατηγορίες των βακτηριοσινών με βάση την επικρατέστερη κατάταξη των Martínez et al., 2016 και η παρούσα εργασία θα εστιάσει στην τάξη II και κυρίως στις υποκατηγορίες IIa, IIb.

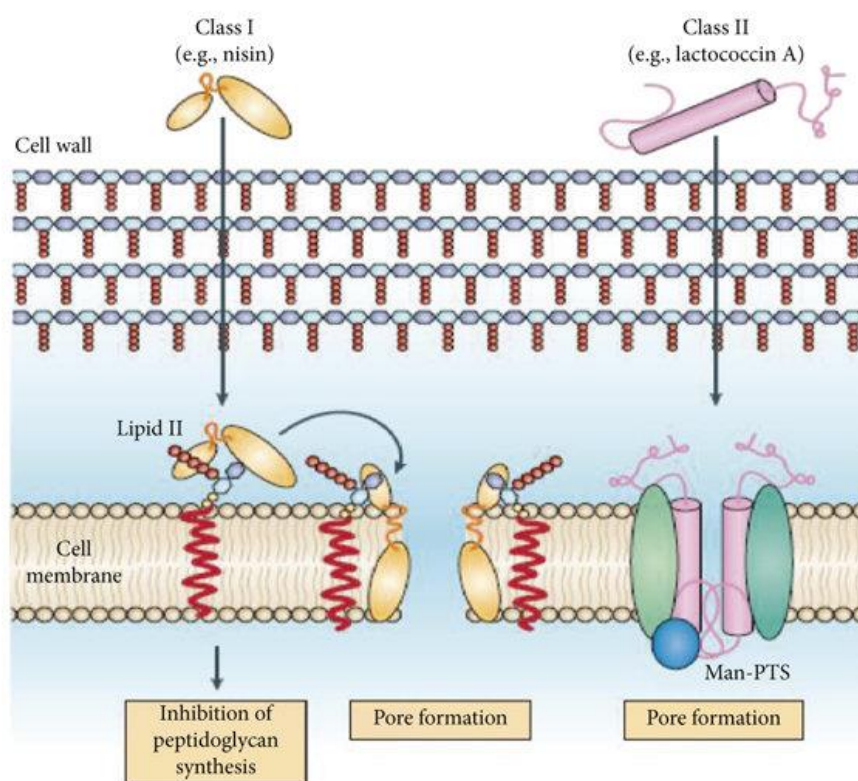
1.6.1.1 ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΕΣ ΤΗΣ ΤΑΞΗΣ I

Γενικά οι βακτηριοσίνες της τάξης I περιλαμβάνουν μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις και είναι γνωστές με το όνομα λαντιβιοτικά (συνήα σχηματίζονται θειοαιθερικές συνδέσεις με τις ομάδες του σουλφυδρυλίου γειτονικών κυστεϊνών, τα υπολείμματα που προκύπτουν από αυτή τη συμπύκνωση ονομάζονται λανθειονίνη και 3-μεθυλ-λανθειονίνη αντίστοιχα, γι' αυτό ονομάζονται λαντιβιοτικά), αποτελούν το 1/3 των βακτηριοσινών (Martínez et al., 2016),

διαμορφώνουν πόρους στη μεμβράνη (Kumariya et al., 2019). Τα λαντιβιοτικά και τα θειοπεπτίδια είναι κυρίως δραστικά έναντι Gram θετικών βακτηρίων. Λαντιβιοτικά όπως η νισίνη, εμφανίζουν αξιοσημείωτη *in vitro* δράση έναντι κλινικά παθογόνων βακτηρίων όπως ο *Streptococcus pneumoniae*, *staphylococci*, *enterococci* που είναι ανθεκτικά σε βανκομυκίνη. Παρόλα αυτά δεν χρησιμοποιούνται εμπορικά λόγω της δυσκολίας διαλυτοποίησης τους (Cotter et al., 2012).

Γενικά θεωρείται ότι τα λαντιβιοτικά δεν έχουν δράση έναντι Gram αρνητικών βακτηρίων, ορισμένες όμως καθαρισμένες βακτηριοσίνες όπως η νισίνη και η επιδερμίνη έχει βρεθεί ότι σκοτώνουν ορισμένα από αυτά τα βακτήρια. Οι βακτηριοσίνες επίσης μπορούν να συνδυαστούν με άλλες αντιμικροβιακές ουσίες ή επιφανειακά ενεργές ουσίες (Cotter et al., 2012).

ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΩΝ ΤΗΣ ΤΑΞΗΣ I: Η νισίνη και διάφορα άλλα λαντιβιοτικά της τάξης I και κάποιες βακτηριοσίνες της τάξης II στοχεύουν στο Λιπίδιο II (Lipid II). Το Λιπίδιο II είναι το ενδιάμεσο κλειδί της βιοσύνθεσης πεπτιδογλυκάνης στο εσωτερικό του κυττάρου και είναι επίσης ο στόχος του αντιβιοτικού βανκομυκίνη. Έτσι η νισίνη και άλλες βακτηριοσίνες προσδέονται στο Λιπίδιο II σε μια συγκεκριμένη περιοχή, που είναι η περιοχή πρόσδεσης της βανκομυκίνης και έτσι έχουν δράση ενάντια των θετικών κατά Gram βακτηρίων που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Συνεπώς αναστέλλουν την σύνθεση της πεπτιδογλυκάνης με αυτό τον τρόπο. Άλλα λαντιβιοτικά μπορούν να χρησιμοποιήσουν το Λιπίδιο II ως μέσο πρόσδεσης για να διευκολύνουν την δημιουργία πόρων στη μεμβράνη του κυττάρου οδηγώντας σε διάρρηξη της μεμβράνης και στη συνέχεια σε κυτταρικό θάνατο (Εικόνα 1.6.1.1) (Cotter et al., 2012).



Εικόνα 1.6.1.1: Σχηματική απεικόνιση του τρόπου δράσης των βακτηριοσινών της τάξης I και II (Cotter et al., 2012).

1.6.1.2 ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΕΣ ΤΗΣ ΤΑΞΗΣ II

Οι βακτηριοσίνες της τάξης II αποτελούνται από πεπτίδια που είναι κατά κύριο λόγο μη τροποποιημένα ή έχουν κάποια μικρή τροποποίηση όπως είναι για παράδειγμα η δημιουργία δισουλφιδικής γέφυρας ή η κυκλοποίηση (Cotter et al., 2012), είναι μικρά μόρια με ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δράσης και αυξάνουν τη διαπερατότητα της μεμβράνης (Kumariya et al., 2019). Εμφανίζουν πιθανή αντιμικροβιακή δράση έναντι Gram θετικών βακτηρίων. Γενικά είναι λιγότερο πιθανό οι βακτηριοσίνες να εμφανίσουν δράση έναντι Gram αρνητικών μικροοργανισμών. Οι βακτηριοσίνες που παράγονται από Gram αρνητικούς μικροοργανισμούς έχουν μικρό φάσμα δράσης και έχουν γίνει πολύ λίγες μελέτες γύρω από αυτές (Cotter et al., 2012).

ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΩΝ ΤΗΣ ΤΑΞΗΣ II: Υπάρχουν δύο προτεινόμενοι τρόποι δράσης αυτής της κατηγορίας βακτηριοσινών. Ο πρώτος τρόπος δράσης είναι η αλληλεπίδραση τους με τη φορτισμένη μεμβράνη του κυτταρικού τοιχώματος του κυττάρου που οδηγεί στην εξάντληση του ATP, σε ιοντική ανισορροπία και διάρρηξη της μεμβράνης μέσω της δημιουργίας πόρων. Η δεύτερη προτεινόμενη δράση είναι μέσω της αλληλεπίδρασης με ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια της μεμβράνης που οδηγεί σε δημιουργία πόρων διάρρηξη της μεμβράνης και κυτταρικό θάνατο (Belguesmia et al., 2020) (Εικόνα 1.6.1.1).

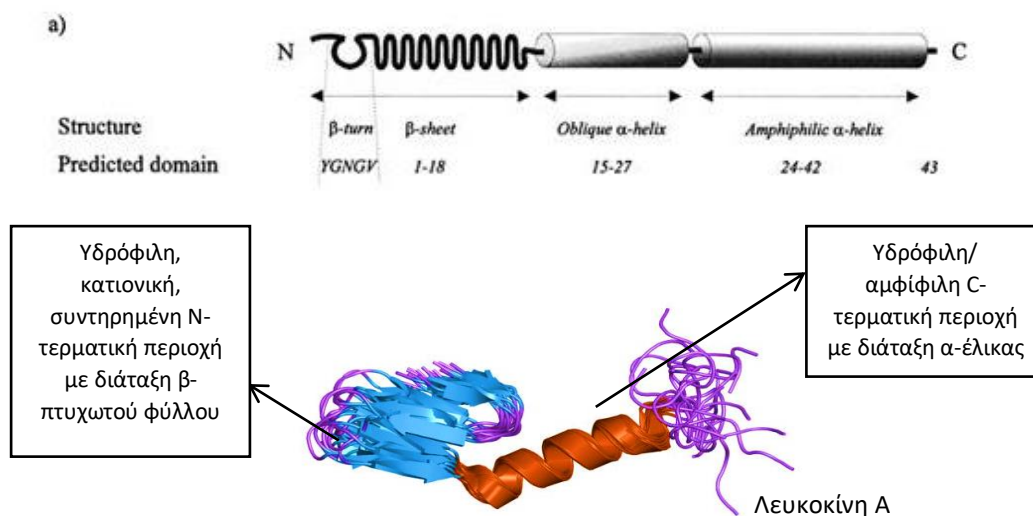
➤ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΕΣ ΤΗΣ ΤΑΞΗΣ IIa

Οι βακτηριοσίνες της τάξης IIa είναι θερμοανθεκτικά, μη τροποποιημένα πεπτίδια με μία συντηρημένη αμινοξική αλληλουχία στο N τελικό άκρο. Έχουν τραβήξει την προσοχή των ερευνητών καθώς γενικά αναγνωρίζονται ως ασφαλή, με υψηλή βιολογική δράση και σταθερότητα μόρια έναντι των υψηλών θερμοκρασιών. Αυτές οι ενώσεις είναι πολλά υποσχόμενα βιοσυντηρητικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην βιομηχανία των τροφίμων (Cui et al., 2012).

Η βακτηριοσίνες της τάξης IIa έχουν χαρακτηριστεί λόγω του υψηλά συντηρημένου υδρόφιλου και φορτισμένου N τελικού άκρου, το οποίο περιέχει μία σύνδεση μέσω δισουλφιδικού δεσμού. Σε μερικές βακτηριοσίνες υπάρχει ένας επιπλέον δισουλφιδικός δεσμός. Η κοινή αμινοξική αλληλουχία των βακτηριοσινών τάξης IIa είναι το “pediocin box” YGNGV (όπου το V μπορεί να αντικατασταθεί από L σε μερικές περιπτώσεις). Αυτή η κοινή αλληλουχία βρίσκεται στο N τελικό άκρο (YGNGVxCxK/NxxC, όπου x είναι οποιοδήποτε αμινοξύ) (Cui et al., 2012). Οι βακτηριοσίνες της τάξης IIa έχουν δράση έναντι του *Listeria monocytogenes* άλλα το φάσμα περιορισμού τους περιλαμβάνει *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* και *Clostridium* (Kjos et al., 2011).

ΔΟΜΗ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΩΝ ΤΑΞΗΣ IIa: Η τρισδιάστατη δομή διαφόρων βακτηριοσινών τάξης IIa έχει χαρακτηριστεί με τη βοήθεια φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι αποτελούνται από ένα υδρόφιλο, θετικά φορτισμένο, υψηλά συντηρημένο N τελικό άκρο με διαμόρφωση β-πτυχωτού φύλλου και ένα ευέλικτο υδρόφιλο/αμφίφιλο C τελικό άκρο. Η δομή αυτή σταθεροποιείται μέσω συντηρημένων

δισουλφιδικών δεσμών, οι οποίοι περιέχουν μία κεντρική αμφίφιλη α-έλικα, η οποία ολοκληρώνεται με μία επιμήκη ουρά στο C άκρο (Cui et al., 2012).



Εικόνες 1.6.1.2.α: Σχηματική απεικόνιση της δομής των βακτηριοσινών της τάξης IIa [πάνω εικόνα (d Ennahar et al., 2000)] (κάτω εικόνα Wikipedia).

Η αμφιπαθητική α-έλικα παίζει κύριο ρόλο στην αντιμικροβιακή εξειδίκευση και στην εξαρτώμενη από την θερμοκρασία δράση των βακτηριοσινών της τάξης IIa. Το C τελικό άκρο των βακτηριοσινών της τάξης IIa διαμορφώνει μία δομή φουρκέτας, η οποία σταθεροποιείται από μία δισουλφιδική γέφυρα μεταξύ καταλοίπων κυστεΐνης στο μέσω της α-έλικας και ενός καταλοίπου κυστεΐνης στο C άκρο. Δύο κυστεΐνες που προέρχονται από τη συντηρημένη N περιοχή δημιουργούν ένα συντηρημένο δισουλφιδικό δεσμό (συνήθως μεταξύ Cys 9-Cys 14). Μελέτες έχουν αποδείξει ότι αυτός ο συντηρημένος δισουλφιδικός δεσμός απαιτείται για την αντιμικροβιακή δράση των βακτηριοσινών τάξης IIa. Είναι δυνατή και η ύπαρξη δεύτερης δισουλφιδικής γέφυρας στις βακτηριοσίνες IIa, η οποία συνεισφέρει στην αύξηση του εύρους αντιμικροβιακής δράσης και την αντοχή στις αυξανόμενες θερμοκρασίες (Cui et al., 2012).

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΩΝ ΤΗΣ ΤΑΞΗΣ IIa: Τουλάχιστον 4 γονίδια απαιτούνται για την παραγωγή των βακτηριοσινών της τάξης IIa, συμπεριλαμβανομένου ενός δομικού γονιδίου βακτηριοσίνης που κωδικοποιεί ένα πρόδρομο μόριο, ένα γονίδιο ανοσίας που κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη ανοσίας, γονίδια που κωδικοποιούν έναν ATP-binding cassette μεταφορέα και μία επικουρική πρωτεΐνη για την εξωκυττάρια μετατόπιση της βακτηριοσίνης. Τα δομικά γονίδια βρίσκονται στο ίδιο οπερόνιο, ενώ τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που σχετίζονται με την ανοσία και την έκκριση δεν βρίσκονται πάντα στο ίδιο οπερόνιο, μπορεί να εντοπίζονται σε άλλο γειτονικό (Cui et al., 2012).

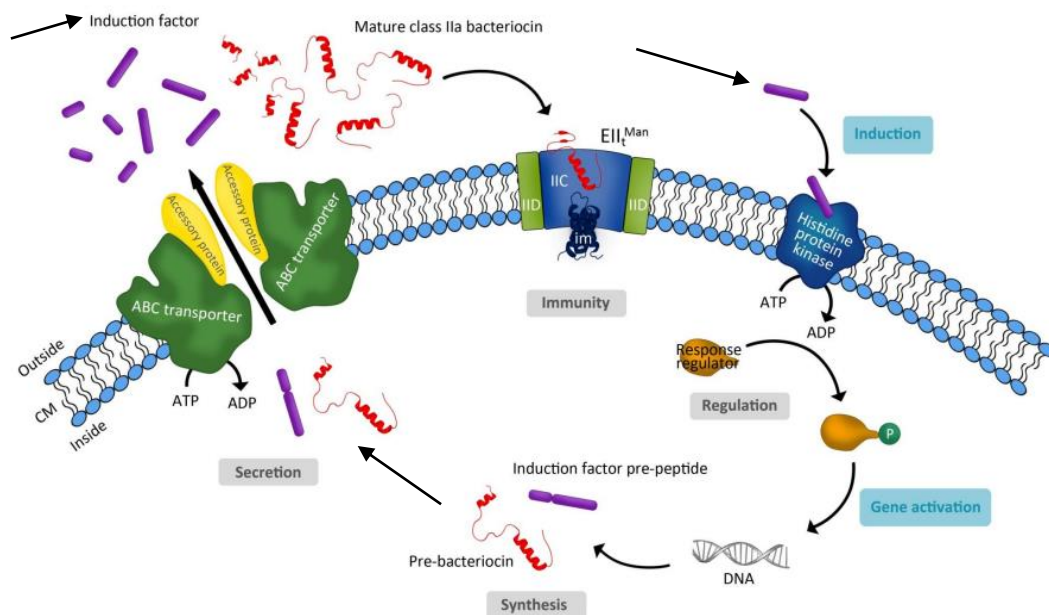
Η παραγωγή των βακτηριοσινών της τάξης IIa ρυθμίζεται από ένα quorum sensing (QS) σύστημα. Τα QS συστήματα εντοπίζονται στην πλειοψηφία των θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων ως αρχικός μηχανισμός αυτών, να ανιχνεύουν στο περιβάλλον τους άλλα βακτήρια και να αλλάζουν τη συμπεριφορά τους σε μία μεγάλη κλίμακα πληθυσμού ως απάντηση στις αλλαγές του αριθμού ή/και των ειδών που είναι παρών (Cui et al., 2012).

Τα συστήματα QS χρησιμοποιούνται για την ρύθμιση της παραγωγής των βακτηριοσινών της τάξης IIa και αποτελούνται από τρία γονίδια που δίνουν προϊόντα ένα πεπτίδιο επαγωγέα, μία πρωτεϊνική κινάση της ιστιδίνης που σχετίζεται με τη μεμβράνη (histidine protein kinase-HPK) και έναν κυτταροπλασματικό ρυθμιστή απόκρισης (response regulator-RR). Το πεπτίδιο επαγωγέας συντίθεται ριβοσωμικά σε χαμηλά επίπεδα σε πρόδρομη μορφή στην οποία δεν είναι βιολογικά ενεργό και περιέχει μία προέκταση στο N τελικό άκρο, μία αλληλουχία καθοδήγησης. Συνεπώς σε συγκεκριμένες περιοχές γίνεται αποκοπή της αλληλουχίας καθοδήγησης από το πρόδρομο μόριο. Έπειτα το πεπτίδιο επαγωγέας εκκρίνεται και εξέρχεται μέσω του μεταφορέα ABC-type και της επικουρικής πρωτεΐνης (Cui et al., 2012).

Γενικότερα, οι βακτηριοσίνες της τάξης IIa παράγονται ως ένα πρόδρομο πρωτεϊνικό μόριο, το οποίο περιέχει ένα πεπτίδιο-οδηγό στο N άκρο του. Αυτό το πεπτίδιο-οδηγός απομακρύνεται μέσω μιας εξειδικευμένης θέσης, πρωτεολυτικής σχισμής κατά την έξοδο του για να προκύψει η ώριμη βακτηριοσίνη. Το μέγεθος των τελικών μορίων είναι από 25 έως 58 αμινοξέα. Η πρόδρομη αλληλουχία της βακτηριοσίνης παίζει διττό ρόλο στη βιοσύνθεση της βακτηριοσίνης. Ο ένας είναι προστατευτικός όταν βρίσκεται στη εσωτερική πλευρά της κυτταρικής μεμβράνης κρατώντας την βακτηριοσίνη ανενεργή και ο άλλος είναι να αποτελεί αναγνωριστικό σήμα της έκκρισης της (Cui et al., 2012).

Παρόλα αυτά κάποιες βακτηριοσίνες τάξης IIa εκκρίνονται από ένα *sec*-dependend export system και διαθέτουν μία υδρόφοβη *sec*-dependend αλληλουχία καθοδήγησης στο N άκρο. Αυτή η αλληλουχία καθοδηγεί τη εκκρινόμενη πρωτεΐνη στην κυτταρική μεμβράνη και επεξεργάζεται από μία πεπτιδάση σήμα κατά τον εντοπισμό της στην κυτταρική μεμβράνη (Cui et al., 2012).

Σε συγκεκριμένη συγκέντρωση το πεπτίδιο επαγωγέας και η διαμεμβρανική ΗΡΚ ανιχνεύουν μία αλλαγή στο περιβάλλον και ενεργοποιούνται οδηγώντας στην αυτοφωσφορυλίωσή τους. Έπειτα η φωσφορυλιωμένη ΗΡΚ μεταφέρει μία φωσφορική ομάδα στον ρυθμιστή απόκρισης RR. Ο φωσφορυλιωμένος RR με τη σειρά του δρα σαν μεταγραφικός παράγοντας και



Εικόνα 1.6.1.2.β: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας παραγωγής μια βακτηριοσίνης IIa από τη στιγμή που θα λάβει το σήμα από το πεπτίδιο επαγωγέα έως και την έκκριση της ώριμης βακτηριοσίνης («d Ennahar et al., 2000).

ενεργοποιεί την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τη βακτηριοσίνη συμπεριλαμβανομένου των γονιδίων που κωδικοποιούν την βακτηριοσίνη, την πρωτεΐνη ανοσίας, το σύστημα έκκρισης και τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Η βακτηριοσίνη και τα γονίδια ανοσίας συχνά βρίσκονται στο ίδιο οπερόνιο και εκφράζονται ταυτόχρονα. Σε μια συγκεκριμένη στιγμή όλα τα κύτταρα που παράγουν βακτηριοσίνη πιστεύετε ότι εκκρίνουν βακτηριοσίνες και είναι αποτέλεσμα μιας γρήγορης ενεργοποίησης της παραγωγής βακτηριοσίνης (Cui et al., 2012).

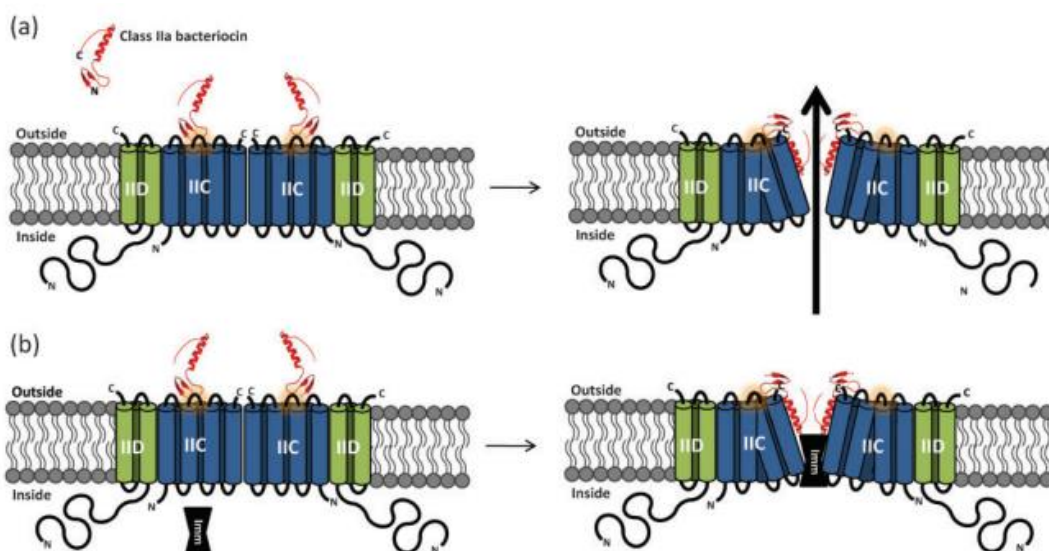
ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΩΝ ΤΗΣ ΤΑΞΗΣ IIA: Είναι γνωστό ότι οι βακτηριοσίνες της τάξης IIA σκοτώνουν τα κύτταρα-στόχους δημιουργώντας πόρους και διαρρηγνύοντας την ακεραιότητα της μεμβράνης των κυττάρων, προκαλώντας διάλυση της δύναμης των πρωτονίων, εξαντλώντας το ενδοκυττάριο ATP και προκαλώντας διαρροή αμινοξέων και ιόντων. Ποικίλες μελέτες έχουν γίνει για τον τρόπο δράσης αποδεικνύοντας ότι το sugar transporter mannose phosphotransferase system (Man-PTS) λειτουργεί ως υποδοχέας των βακτηριοσινών στα ευαίσθητα κύτταρα. Το Man-PTS είναι ένα πολύπλοκο σύστημα πρόσληψης σακχάρων στους θετικούς κατά Gram *Firmicutes* και στα αρνητικά κατά Gram *Gamma proteobacteria*, συμπεριλαμβάνοντας ένα γενικό PTS πρωτεϊνικό ένζυμο I (EI), μία histidine containing phosphocARRIER protein (HPr) και ένα carbonhydrated-specific protein complex (ένζυμο II, EII) (Cui et al., 2012). Δεν εντοπίζεται σε ευκαρυώτες και γι' αυτό το λόγο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν πιθανός υποδοχέας φαρμάκων για να την στόχευση και την θανάτωση παθογόνων βακτηρίων χωρίς να παρεμποδίζει τη φυσιολογική μικροχλωρίδα των θηλαστικών (Kjos et al., 2011).

Το ένζυμο II αποτελείται από 4 υπομονάδες: IIA, IIB, IIC, IID. Οι υπομονάδες IIA, IIB εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα και είναι υπεύθυνες για την φωσφορυλίωση. Συνήθως βρίσκονται σε μία πρωτεΐνη. Η υπομονάδα IIC είναι μία εσωτερική μεμβρανική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στον σύστημα μεταφοράς σακχάρων. Η IID υπομονάδα είναι επίσης μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη. Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες IIC, IID μαζί διαμορφώνουν ένα μεμβρανικό σύμπλεγμα. Οι IIA, IIB είναι σε μια αναστρέψιμη επαφή με το μεμβρανικό σύμπλεγμα. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι μία εξωκυττάρια θηλιά της μεμβρανικής πρωτεΐνης IIC (MptC) εμπλέκεται στην στοχευμένη αναγνώριση από τις βακτηριοσίνες της τάξης IIA και είναι ο κύριος παράγοντας που είναι υπεύθυνος για την εξειδίκευση των ειδών (Cui et al., 2012). Η υπομονάδα IID είναι μέρος του συμπλόκου του υποδοχέα αλλά ο ρόλος της είναι ασαφής (Kjos et al., 2011).

Ο προτεινόμενος μηχανισμός δράσης των βακτηριοσινών της τάξης IIA εξηγείται ως εξής: Αρχικά το συντηρημένο N άκρο με διαμόρφωση β-πτυχωτού φύλλου της βακτηριοσίνης αλληλεπιδρά με την εξωκυττάρια θηλιά του Man-PTS την πρωτεΐνη IIC, πράγμα που καθιστά δυνατό το C άκρο με την α-έλικα να εισέρχεται στη μεμβράνη μέσω αλληλεπιδράσεων έλικας-έλικας με τις διαμεμβρανικές πρωτεΐνες IIC ή/και IID (Kjos et al., 2011). Αυτή η αλληλεπίδραση πιθανόν να προκαλέσει αλλαγή της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών του Man-PTS, που προσδίδει στο μεταφορέα ένα μη αναστρέψιμο άνοιγμα προκαλώντας μη ελεγχόμενη εκροή απαραίτητων μορίων, διαρρηγνύοντας την ακεραιότητα της μεμβράνης και οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο (Cui et al., 2012). Η ποικιλομορφία των αλληλεπιδράσεων έλικα-έλικα διαφέρει μεταξύ των βακτηριοσινών λόγω των διαφορών στην αλληλουχία του C άκρου. Αυτό το πράγμα εξηγεί γιατί το C άκρο είναι υπεύθυνο για τα κύτταρα-στόχους και για την ειδική αναγνώριση των πρωτεϊνών ανοσίας (Kjos et al., 2011).

Σε μια διαφορετική μελέτη που έχει γίνει, όπου χρησιμοποιήθηκε ένα υβρίδιο βακτηριοσινών τάξης IIa όπου μισό από το συντηρημένο N άκρο και μισό από το C άκρο συνδυάστηκαν από διαφορετικές βακτηριοσίνες (gene fusion) παρέχοντας απόδειξη ότι το μισό του C άκρου είναι πιο πιθανό να εμπλέκεται στην ειδίκευση όσον αφορά το κύτταρο-στόχο (Kjos et al., 2011).

Στα κύτταρα που παράγουν βακτηριοσίνες μία πρωτεΐνη ανοσίας προσδένεται ισχυρά στον υποδοχέα της πρόσδεσης βακτηριοσίνης για να αποτρέψει τον θάνατο του κυττάρου από την ίδια τους τη βακτηριοσίνη (Cui et al., 2012).



Εικόνα 1.6.1.2.γ: Προτεινόμενο μοντέλο του τρόπου δράσης των βακτηριοσινών της τάξης IIa. (a) Το N-άκρο του β-πτυχωτού φύλλου που περιέχει η βακτηριοσίνη (κόκκινο) αλληλεπιδρά με την εξωκυτταρική θηλία (κίτρινο) της IIC πρωτεΐνη του Man-PTS (αριστερά), πριν το ελικοειδή C-άκρο αλληλεπιδράσει με τις διαμεμβρανικές έλικες της IIC και/ή IID πρωτεΐνης (δεξιά) προκαλώντας αλλαγές στη διαμόρφωση με σκοπό τη δημιουργία πόρων, (b) Στα κύτταρα που έχουν ανοσία, η βακτηριοσίνη προκαλεί τις ίδιες αλλαγές στη διαμόρφωση αλλά οι πόροι μπλοκάρονται από την ειδική πρωτεΐνη ανοσία (μαύρο), η οποία προσδένεται ισχυρά στο Man-PTS (Kjos et al., 2011).

➤ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΕΣ ΤΗΣ ΤΑΞΗΣ IIb

Τουλάχιστον 15 βακτηριοσίνες της τάξης IIb έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από την απομόνωση της πρώτης αυτής της κατηγορίας, της λακτοκοκκίνης G το 1952. Αυτές οι βακτηριοσίνες αποτελούνται από δύο διαφορετικά πεπτίδια και η βέλτιστη αντιμικροβιακή τους δράση απαιτεί την παρουσία και των δύο σε ίσες ποσότητες (Nissen-Meyer et al., 2010). Γενικά αυτή η κατηγορία βακτηριοσινών έχει μελετηθεί ελάχιστα σε σχέση με την τάξη IIa και διαθέτουμε λίγα στοιχεία για την δομή, την παραγωγή και τον τρόπο δράσης τους, συγκριτικά με τις βακτηριοσίνες της τάξης IIa.

ΔΟΜΗ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΩΝ ΤΗΣ ΤΑΞΗΣ IIb: Η δομή τριών αρκετά μελετημένων βακτηριοσινών αυτής της κατηγορίας περιλαμβάνει μία μακριά αμφίφιλη α-έλικα και δύο συμπληρωματικά πεπτίδια τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (Orregård et al., 2007).

Μελέτες CD (Circular Dichroism) και NMR (Nuclear Magnetic Resonance) έδειξαν ότι τα πεπτίδια δεν έχουν δομικές αλληλεπιδράσεις όταν βρίσκονται σε υδατικό διάλυμα, όταν όμως εκτίθενται σε περιβάλλον υδρόφοβο ή όμοιο με αυτό της μεμβράνης δημιουργούν ελικοειδή δομή. Όλα τα πεπτίδια των βακτηριοσινών της τάξης IIb έχει ταυτοποιηθεί ότι περιέχουν μοτίβα GxxxG, στα οποία οφείλονται οι διαμεμβρανικές έλικες και μπορεί να εμφανιστούν και ως SxxxS και AxxxA μοτίβα γνωστά στο να δημιουργούν αλληλεπιδράσεις έλικα-έλικα με τις μεμβρανικές πρωτεΐνες. Όταν σε μία α-έλικα τα δύο κατάλοιπα γλυκίνης του μοτίβου βρίσκονται στην ίδια πλευρά δημιουργούν μία επίπεδη περιοχή που επιτρέπει την κοντινή επαφή της έλικας δημιουργώντας αλληλεπιδράσεις τύπου van der Waals και σταθεροποιώντας την ελικοειδή δομή με τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου. Η παρουσία GxxxG μοτίβων και η αυξημένη ελικοειδής μορφή προδίδει ότι τα δύο αυτά πεπτίδια διαμορφώνουν δομή έλικα-έλικα που διεισδύει στη μεμβράνη (Nissen-Meyer et al., 2010).

Οι βακτηριοσίνες της τάξης IIb μοιράζονται πολλά κοινά με αυτές που αποτελούνται από ένα πεπτίδιο καθώς όλες είναι κατιονικά μόρια και περιέχουν ένα υδρόφοβο και/ή μία αμφίφιλη περιοχή. Ένα πεπτίδιο εκ των δύο εμφανίζει την μέγιστη αντιμικροβιακή του δράση μόνο όταν συνδυαστεί με το συμπληρωματικό του πεπτίδιο από την ίδια βακτηριοσίνη ή μια ομόλογη (Orpegård et al., 2007).

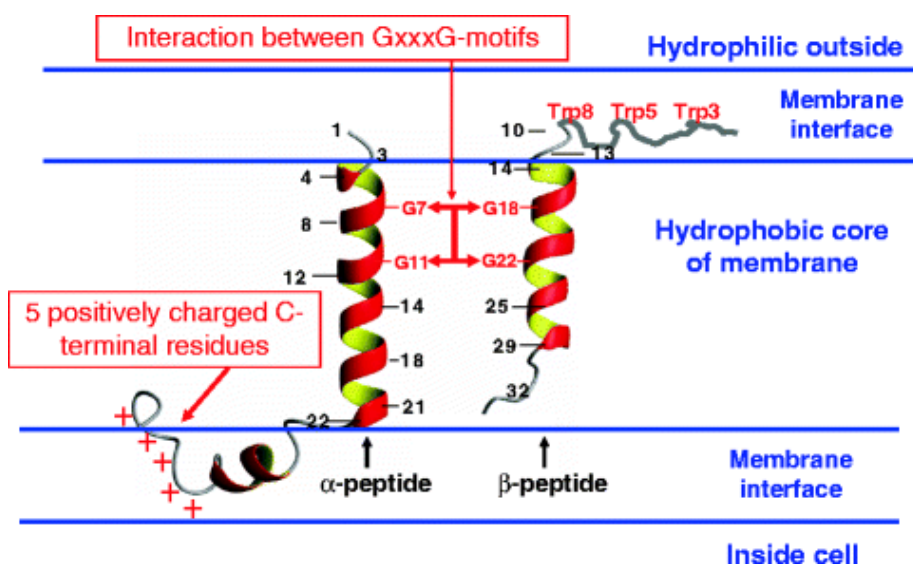
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΩΝ ΤΗΣ ΤΑΞΗΣ IIb: Οι βακτηριοσίνες της τάξης IIb, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αποτελούνται από δύο μη τροποποιημένα πεπτίδια, εκ των οποίων και τα δύο πρέπει να είναι παρών σε ίσες ποσότητες έτσι ώστε αυτές οι βακτηριοσίνες να έχουν τη βέλτιστη αντιμικροβιακή δράση (Orpegård et al., 2007). Το γεγονός ότι παρουσιάζουν την μέγιστη δράση τους μόνο όταν δρουν μαζί έχει ως αποτέλεσμα να τα χαρακτηρίσουμε ως μία αντιμικροβιακή μονάδα, πράγμα που εξηγεί και την ύπαρξη των γονιδίων που τα κωδικοποιούν δίπλα δίπλα στο ίδιο οπερόνιο, έτσι ώστε τα πεπτίδια να παράγονται σε περίπου ίσες ποσότητες (Nissen-Meyer et al., 2010) και είναι κοντά στα γονίδια που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη ανοσίας, η οποία προστατεύει το βακτήριο που παράγει την βακτηριοσίνη από το να σκοτωθεί από την ίδια του τη βακτηριοσίνη, έναν διαδεδομένο μεταφορέα ABC-type που μεταφέρει την βακτηριοσίνη έξω από το κύτταρο που την παράγει και μία επικουρική πρωτεΐνη της οποίας ο ακριβής ρόλος δεν είναι γνωστός αλλά φαίνεται ότι εμπλέκεται στην έκκριση της βακτηριοσίνης (Orpegård et al., 2007).

Αυτές οι βακτηριοσίνες καθιστούν την μεμβράνη των κυττάρων-στόχων διαπερατή σε πολλά μικρά μόρια. Η παραγωγή των βακτηριοσινών της τάξης IIb, όπως και των βακτηριοσινών της τάξης IIa, ρυθμίζεται μεταγραφικά μέσω ενός ρυθμιστικού συστήματος τριών εργαλείων, το οποίο αποτελείται από ένα πεπτίδιο φερομόνη που αλληλεπιδρά με τη μεμβράνη, μία πρωτεϊνική κινάση της ιστιδίνης (HPK) που σχετίζεται με τη μεμβράνη και ένα ρυθμιστή απόκρισης (RR) (Orpegård et al., 2007).

Οι βακτηριοσίνες της τάξης IIb συντίθενται ως πρόδρομα μόρια, που αποτελούνται από 15-έως 30- κατάλοιπα στο N τελικό άκρο τα οποία διαθέτουν ένα double-glycine-type μοτίβο. Αυτό το μοτίβο αποκόπτεται στο C άκρο των δύο κατάλοιπων γλυκίνης από τον μεταφορέα ABC-type και εξέρχεται από το κύτταρο η ώριμη βακτηριοσίνη. Η αλληλουχία-οδηγός χρησιμεύει στην αλληλεπίδραση με τον μεταφορέα ABC-type και μπορεί ίσως να κρατά την βακτηριοσίνη ανενεργή μέχρι να εκκριθεί (Orpegård et al., 2007).

ΤΡΟΠΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΩΝ ΤΗΣ ΤΑΞΗΣ IIb: Βασιζόμενοι σε μελέτες που έχουν γίνει στην δομή τους, έχει προταθεί ότι οι βακτηριοσίνες που αποτελούνται από δύο πεπτίδια διαμορφώνουν μία δομή έλικα-έλικα που διεισδύουν στη μεμβράνη συμπεριλαμβάνοντας αλληλεπιδράσεις μεταξύ έλικας-έλικας στα GxxxG μοτίβα που εντοπίζονται και στα δύο πεπτίδια. Επίσης έχει προταθεί ότι αυτή η δομή αλληλεπιδρά με μεμβρανικές πρωτεΐνες προκαλώντας αλλαγή στη διαμόρφωσή τους, η οποία προκαλεί διαρροή στη μεμβράνη. Αυτοί οι προτεινόμενοι τρόποι δράσης είναι παρόμοιοι με τον τρόπο δράσης των βακτηριοσινών της τάξης IIa και της λακτοκοκίνης A (τάξη II d) που προσδένονται στη επιφάνεια της μεμβράνης του Man-PTS προκαλώντας διάρρηξη της μεμβράνης και κυτταρικό θάνατο (Nissen-Meyer et al., 2010).

Γενικά, τα πεπτίδια πρώτα προσδένονται στο κυτταρικό τοίχος ή την μεμβράνη και μετά αλληλεπιδρούν πριν διεισδύσουν μέσα στο υδρόφοβο κομμάτι των μεμβρανών (Orpegård et al., 2007). Οι βακτηριοσίνες δείχνουν εξειδίκευση με έμφαση στα μικρά μόρια που μεταφέρουν μέσω της μεμβράνης, για παράδειγμα κάποιες μεταφέρουν μόνο μονοσθενή κατιόντα άλλα όχι υδρογονοκατιόντα και δισθενή κατιόντα ή ανιόντα. Αυτή η ικανότητα να διαφοροποιούνται με βάση τα μόρια που μεταφέρουν προάγει την δημιουργία διαφορετικών πόρων που δείχνουν εξειδίκευση στη μεταφορά μορίων παρά διαρρηγνύοντας τελείως τη μεμβράνη (Nissen-Meyer et al., 2010).



Εικόνα 1.6.1.2.δ: Απεικόνιση της δομής της Λακτοκοκκίνης G και της θέσης της στη μεμβράνη. Τα δύο πεπτίδια αλληλεπιδρούν μεταξύ του G_7xxxG_{11} μοτίβου στο α -πεπτίδιο και του $G_{18}xxxG_{22}$ μοτίβου στο β -πεπτίδιο και διαμορφώνουν μία διαμεμβρανική δομή έλικα-έλικα. Τα κατάλοιπα τρυπτοφάνης στο δομικά ευέλικτο N άκρο του β -πεπτιδίου είναι μέσα ή δίπλα στην εξωτερική επιφάνεια της μεμβράνης, ενώ το θετικά φορτισμένο και δομικά ευέλικτο C άκρο του α -πεπτιδίου ωθείται διαμέσου της μεμβράνης λόγω διαμεμβρανικού δυναμικού (αρνητικό φορτίο μέσα) (Nissen-Meyer et al., 2010).

Σε μερικά μέλη της τάξης IIb των βακτηριοσινών έχει προταθεί η ύπαρξη ενός πρωτεολυτικού μηχανισμού που μπορεί να εμπλέκεται στην ανοσία τους. Γονίδια που κωδικοποιούν διαμεμβρανικές πρωτεάσες της οικογένειας CPBP (Caax Proteases and Bacteriocin Processing enzymes) εμπλέκονται στους καθοριστές ανοσίας πολλών περιοχών που κωδικοποιούν βακτηριοσίνες τάξης IIb (Kjos et al., 2011).

Μια κάπως διαφορετική περίπτωση, είναι αυτή της πλανταρισίνης A, όπου έχουμε πρόσδεση της στην ΗΡΚ και ενεργοποίηση της με σκοπό τη φωσφορυλίωση των δύο ρυθμιστών απόκρισης οι οποίοι με τη σειρά τους ενεργοποιούν τα γονίδια που κωδικοποιούν την πλανταρισίνη E/F και J/K όπως και το γονίδιο που κωδικοποιεί την πλανταρισίνη A. Αλληλεπιδρά με μη χειρικό τρόπο με τα λιπίδια της μεμβράνης και αυτή η αλληλεπίδραση περιέχει μία α -έλικα που είναι μέρος της δομής του πεπτιδίου. Το πεπτίδιο διαμορφώνει τη δομή του και τοποθετείται κοντά στη μεμβράνη και αυτό του δίνει τη δυνατότητα να αλληλεπιδράσει χειρικά με τον υποδοχέα της μεμβράνης ή δίπλα στην επιφάνεια της. Αυτός ο τρόπος δράσης που σχετίζεται με την αλληλεπίδραση με τη μεμβράνη μπορεί να εξηγήσει γιατί τα πεπτίδια φερομόνες που είναι μέρος του ρυθμιστικού συστήματος είναι συχνά κατιονικά με την δυνατότητα να διαμορφώνουν μία αμφίφιλη έλικα όταν αλληλεπιδρούν με τη μεμβράνη (Orregård et al., 2007).

➤ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΕΣ ΤΗΣ ΤΑΞΗΣ IIc

Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει τις κυκλικές βακτηριοσίνες μεγάλου μοριακού βάρους (μεταξύ 58 και 70 αμινοξέα). Οι βακτηριοσίνες αυτές συντίθενται αρχικά ως γραμμικά πεπτίδια και στη συνέχεια με την ομοιοπολική σύνδεση του πρώτου και του τελευταίου υπολείμματος γίνονται κυκλικές. Αυτή τους η διαμόρφωση τις καθιστά ανθεκτικές αφού η δραστηρότητα τους μπορεί να μην αλλοιωθεί και μετά από κατεργασία στους 121°C για 15 λεπτά. Στην κατηγορία αυτή οι βακτηριοσίνες χωρίζονται περαιτέρω με βάση τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και συγκεκριμένα με βάση το ισοηλεκτρικό σημείο (pI). Από τη μία είναι τα κατιονικά πεπτίδια με ισοηλεκτρικό σημείο κοντά στο 10 με χαρακτηριστικό παράδειγμα την βακτηριοσίνη AS-48 (Εικόνα 1.6.1.2.ε). Από την άλλη είναι τα πεπτίδια αυτά των οποίων τα ισοηλεκτρικά σημεία βρίσκονται κοντά στην ουδέτερη περιοχή ή την περιοχή των οξέων (Martínez et al., 2016).



Εικόνα 1.6.1.2.ε: Δομή ακτινών X βακτηριοσίνης AS-48 σε pH 4.5 δεσμευμένη με θειικό άλας (πηγή Wikipedia).

➤ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΕΣ ΤΗΣ ΤΑΞΗΣ IId

Η τάξη IId περιλαμβάνει όλες τις βακτηριοσίνες που δεν μπορούν να συμπεριληφθούν σε καμία από τις κατηγορίες IIa, IIb, IIc. Πρόκειται για βακτηριοσίνες που δεν περιλαμβάνουν το χαρακτηριστικό διατηρημένο πεπτίδιο YGNVG /L, είτε πρόκειται για βακτηριοσίνες οι οποίες δεν διαθέτουν αποκλειστικό σύστημα εξαγωγής αλλά χρησιμοποιούν το γενικό εκκριτικό μηχανισμό του κυττάρου (Martínez et al., 2016).

1.6.2 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΩΝ ΑΠΟ *LEUCONOSTOC SPP.* ΚΑΙ *LACTOBACILLUS SPP.*

Ο *Leuconostoc spp.* είναι πολλά υποσχόμενος με εφαρμογές στα γαλακτοκομικά προϊόντα ως βακτηριοσινογενής και/ ή προβιοτικός μικροοργανισμός μέσω της ενίσχυσης των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών αυτών των προϊόντων, κυρίως λόγω της παραγωγής οργανικών οξέων, CO₂ και πτητικών ενώσεων που συνεισφέρουν στη γεύση και στην υφή του βουτύρου, της κρέμας και των τυριών (de Paula et al., 2015).

Οι περισσότερες βακτηριοσίνες που παράγονται από *Leuconostoc* ανήκουν στην τάξη II, είναι μικρά πεπτίδια (<10 kDa), θερμοανθεκτικά χωρίς μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις και εμφανίζουν κυρίως βακτηριοστατική και όχι βακτηριοκτόνο δράση. Αυτά τα πεπτίδια δρουν παρουσιάζοντας δομή αμφίφιλης έλικας που τους επιτρέπει να εισέρχονται στην μεμβράνη καταστρέφοντας την πόλωση της που οδηγεί σε διαρροή χρησιμων μορίων και στη συνέχεια κυτταρικό θάνατο (de Paula et al., 2015).

Είναι σημαντικό να επισημάνουμε ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν τις βακτηριοσίνες φαίνεται να είναι πολύ καλά συντηρημένα κατά την εξέλιξη του γένους *Leuconostoc*. Το πιο πιθανό, μερικά γονίδια βακτηριοσίνης να είναι μέρος μιας περίπλοκης γενετικής δομής και μπορεί να έχουν κάποιες άλλες λειτουργίες. Μιας και τα βακτηριοσινογενή βακτήρια έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν την δράση αντίπαλων στελεχών, η μεταφορά αυτών των γενετικών στοιχείων σε θυγατρικά κύτταρα μπορεί να μας δώσει εξήγηση για τη μοναδική οικολογία και εξέλιξη της συντήρησης αυτών των γονιδίων. Διαφορετικά στελέχη *L. mesenteroides*, απομονώθηκαν από ποικίλα υποστρώματα είναι ικανά να παράγουν τις ίδιες βακτηριοσίνες, παρόλα αυτά έχει παρατηρηθεί και η παραγωγή διαφορετικών βακτηριοσινών (de Paula et al., 2015).

Οι περισσότερες βακτηριοσίνες που παράγονται από *L. mesenteroides* εμφανίζουν δράση κατά της *Listeria monocytogenes*, η οποία προκαλεί μεγάλη ανησυχία καθώς είναι παθογόνος μικροοργανισμός στα τρόφιμα και μπορεί να προσαρμόσει την κυτταρική της φυσιολογία για να ξεπεράσει πολλές μορφές στρες, όπως για παράδειγμα έχει την ικανότητα να πολλαπλασιάζεται σε συνθήκες ψύξης και να παραμένει στο περιβάλλον ανάπτυξης του τροφίμου. Επίσης κάποιες ασυνήθιστες βακτηριοσίνες που παράγονται από τον *L. mesenteroides* εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι αρνητικών κατά Gram βακτηρίων όπως η *Salmonella typhimurium*, ο *E. coli* και θετικά κατά Gram βακτήρια όπως ο *Bacillus cereus*, και ο *S. aureus* (de Paula et al., 2015).

Όσον αφορά τις βακτηριοσίνες που προέρχονται από *Lactobacillus* που έχουν χαρακτηριστεί είναι πρωτεϊνικής φύσης, εμφανίζουν βακτηριοκτόνο τρόπο δράσης και συχνά έχουν μεγάλη κλίμακα παρεμπόδισης που επηρεάζει τα συγγενικά είδη των *Lactobacillaceae* (Klaenhammer, 1988).

1.6.3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΩΝ

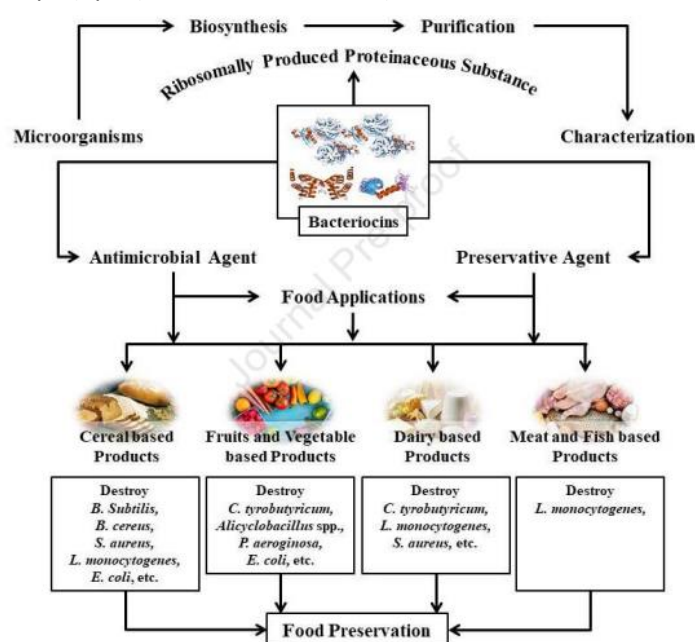
Κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών, οι βακτηριοσίνες αποτελούν αντικείμενο πολλών μελετών παγκόσμια λόγω της πιθανότητας να χρησιμοποιηθούν σαν φυσικά συντηρητικά για την αποτροπή ανάπτυξης ανεπιθύμητων ή παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα, σαν δεύτερης γενιάς αντιβιοτικά για την αντιμετώπιση παθογόνων μικροοργανισμών που εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε άλλα αντιβιοτικά και ως προβιοτικά με

θετικά οφέλη στην υγεία του ανθρώπου (Kjos et al., 2011). Μία άλλη εφαρμογή των βακτηριοσινών που μελετάται είναι η χρήση ως αντικαρκινικός παράγοντας (Garbacz, 2022).

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΗ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Προκειμένου να παραταθεί η διάρκεια ζωής των τροφίμων, ενσωματώνονται αντιβιοτικά ή συντηρητικά τροφίμων (π.χ. νιτρώδη και διοξείδιο του θείου) για την καθυστέρηση της ανάπτυξης ανεπιθύμητων μικροοργανισμών και πιθανής αλλοίωσης. Ωστόσο, τα περισσότερα εμπορικά συντηρητικά είναι χημικά και η μακροχρόνια κατανάλωση των συνθετικών αυτών συντηρητικών μπορεί να έχει δυσμενείς επιπτώσεις στο ανθρώπινο σώμα. Επιπλέον, είναι παράνομη η χρήση αντιβιοτικών σε προϊόντα διατροφής. Οι βακτηριοσίνες που παράγονται από θετικά κατά Gram ή αρνητικά κατά Gram βακτήρια είναι πεπτίδια ή πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από γονίδια, τα οποία τις καθιστούν κατάλληλες ως φυσικά συντηρητικά σε προϊόντα διατροφής. Λόγω της ευαισθησίας των βακτηριοσινών σε ορισμένες πρωτεάσες, οι αβλαβείς βακτηριοσίνες έχουν την ικανότητα να πέπτονται, επομένως, τα μη λειτουργικά μικρά πεπτίδια και τα αμινοξέα πέπτονται στο γαστρεντερικό σωλήνα. Έτσι, οι βακτηριοσίνες θεωρούνται ασφαλή πρόσθετα τροφίμων και μπορούν να χαρακτηριστούν ως βιοσυντηρητικά. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συντηρητικά σε προϊόντα γάλακτος, κρέατος, ιχθυηρών, αρτοποιίας, λαχανικών που έχουν υποστεί γαλακτική ζύμωση, καθώς και στην παραγωγή ζύθου και οίνου για τον έλεγχο των μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοιώσεις (S. C. Yang et al., 2014).

Οι βακτηριοσίνες που παράγονται από τα LAB μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα τρόφιμα με τρεις διαφορετικούς τρόπους: εισαγωγή των στελεχών που τις παράγουν, προσθήκη μερικώς ή πλήρως καθαρισμένων συγκεντρώσεων της βακτηριοσίνης, χρήση ζυμούμενων συστατικών. Παρόλα αυτά η παραγωγή βακτηριοσίνης μπορεί να επηρεαστεί από ποικίλους παράγοντες όπως η συγκέντρωση του NaCl, η θερμοκρασία, τα ένζυμα, το pH, τα υποστρώματα στα τρόφιμα (de Paula et al., 2015).



Εικόνα 1.6.3: Σχηματική απεικόνιση της χρήσης των βακτηριοσινών στη συντήρηση των τροφίμων (Verma et al., 2022).

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΕΝΑΝΤΙ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Οι βακτηριοσίνες έχουν πολλές ιδιότητες οι οποίες τις καθιστούν υποψήφιες για τη χρήση ως εναλλακτικά αντιβιοτικά. Αυτό οφείλεται στη δραστικότητα τους, τη χαμηλή τοξικότητα τους, την διαθεσιμότητα πεπτιδίων με ευρύ αλλά και στενό φάσμα δραστικότητας, την πιθανότητα *in situ* παραγωγής από προβιοτικά και το γεγονός ότι τα πεπτίδια μπορούν να τροποποιηθούν βιομηχανικά (Cotter et al., 2012).

Όπως έχει αναφερθεί οι βακτηριοσίνες, έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν σημαντικά ζωικά και φυτικά παθογόνα βακτήρια, όπως το *E. coli* που παράγει τοξίνες Shiga (STEC), το εντεροτοξιγονικό *E. coli* (ETEC), τον ανθεκτικό στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus* (MRSA), το VRE, το *Agrobacterium* και το *Brenneria spp* (S. C. Yang et al., 2014). Επίσης θεωρούνται αντιβιοτικά δεύτερης γενιάς καθώς αντιμετωπίζουν μικροοργανισμούς που έχουν ανθεκτικότητα σε άλλα αντιβιοτικά (Kjos et al., 2011), όπως αναφέρθηκε στον τρόπο δράσης των βακτηριοσινών της τάξης I σε μικροοργανισμούς με ανθεκτικότητα στην βανκομυκίνη (μέσω Lipid II).

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΩΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΑ

Ως προβιοτικά ορίζονται ζωντανοί, μη παθογόνοι μικροοργανισμοί που όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες προσδίδουν οφέλη στην υγεία του καταναλωτή. Το υποψήφιο στέλεχος που θα θεωρηθεί προβιοτικό πρέπει να επιβιώνει κάτω από συνθήκες στρες στο γαστρεντερικό σωλήνα (όξινο περιβάλλον του στομάχου και τα χολικά άλατα στο λεπτό έντερο), να είναι ικανό να ανταγωνιστεί, να παραμείνει και να αποικίσει στα κύτταρα του εντέρου, παρουσιάζοντας θεραπευτικά οφέλη και να είναι ασφαλές για χρήση σε τρόφιμα (να μην είναι παθογόνο, να μην εμφανίζει γονίδια παθογένειας ή ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και να είναι γενικά σταθερό) και να έχει επαρκή τεχνολογικά χαρακτηριστικά (να επιβιώνει σε συνθήκες αποθήκευσης, να αντιστέκεται σε βακτηριοφάγους και να παράγεται σε μεγάλη κλίμακα) (de Paula et al., 2015). Επίσης δεν πρέπει να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στη γεύση και το άρωμα των προϊόντων και δεν πρέπει να συμβάλλουν στην οξύνιση κατά την περίοδο παραμονής τους στο ράφι (Giraffa, 2012). Όλες αυτές οι ιδιότητες πρέπει να είναι επικυρωποιημένες και καταγεγραμμένες με μεγάλη επαναληψιμότητα στα αποτελέσματα, τα οποία έχουν βρεθεί *in vitro* και έχουν επιβεβαιωθεί με *in vivo* προσδιορισμούς (de Paula et al., 2015).

Οι καλλιέργειες προβιοτικών βακτηρίων διαχειρίζονται την ανάπτυξη των ωφέλιμων μικροοργανισμών στο γαστρεντερικό σύστημα, αποτρέποντας την ανάπτυξη πιθανών μη επιθυμητών βακτηρίων και ενεργοποιούν τους φυσικούς μηχανισμούς άμυνας του σώματος. Έχουν γίνει πάρα πολλές έρευνες έως σήμερα που αποδεικνύουν τα οφέλη των προβιοτικών στην υγεία του ανθρώπου (Giraffa, 2012). Μερικά από αυτά είναι η αύξηση της ανοσοαπόκρισης του ξενιστή, η ανακούφιση των συμπτωμάτων της δυσανεξίας στη λακτόζη, η παραγωγή ορισμένων βιταμινών, επίσης είναι χρήσιμα για την θεραπεία πολλών τύπων διάρροιας, στον ανταγωνισμό και την αναστολή παθογόνων μικροοργανισμών, την παραγωγή αντιμικροβιακών εργαλείων του γαστρεντερικού σωλήνα, την μείωση των επιπέδων χοληστερόλης, την μείωση της πιθανότητας εμφάνισης καρκίνου του παχέος εντέρου, την βελτίωση της στοματικής υγείας κλπ. (de Paula et al., 2015).

Τα LAB, χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά και έχουν σημαντικό ρόλο στη συντήρηση των τροφίμων και προσφέρουν διάφορα οφέλη στην υγεία, ενώ ακόμη μπορούν να παράγουν

αντιμικροβιακές ενώσεις, όπως διοξείδιο του άνθρακα, υπεροξείδιο του υδρογόνου, διακετύλιο, οργανικά οξέα, αιθανόλη, βακτηριοσίνες κλπ.(de Paula et al., 2015). Αυτές οι αντιμικροβιακές ενώσεις που παράγονται από τα προβιοτικά αναστέλλουν την ανάπτυξη μη επιθυμητών μικροοργανισμών στον γαστρεντερικό σωλήνα αλλά και άλλων παθογόνων (S. C. Yang et al., 2014).

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ENANTI ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ο ακριβής αντικαρκινικός τρόπος δράσης των βακτηριοσινών δεν έχει καταστεί ακόμα σαφής (Kaur & Kaur, 2015). Παρ' όλα αυτά, αυτή τους η δραστηριότητα μπορεί να εξηγηθεί με βάση τις αλληλεπιδράσεις τους με την στοχευμένη μεμβράνη, καθώς τα καρκινικά κύτταρα διαθέτουν χαρακτηριστικά που τα διαφοροποιούν από τα φυσιολογικά κύτταρα (Drider et al., 2016).

Όσον αφορά τις μεμβράνες των καρκινικών κυττάρων υπάρχει άνιση κατανομή φωσφολιπιδίων στη διπλοστιβάδα με υπερέκφραση της φωσφατιδύλοσερίνης και της Ο-γλυκοσυλιωμένης μουκίνης. Με αυτό τον τρόπο προσδίδεται ένα καθαρό αρνητικό φορτίο στις μεμβράνες των καρκινικών κυττάρων, το οποίο επιτρέπει την ανάπτυξη ηλεκτροστατικών δυνάμεων με τις βακτηριοσίνες, οι οποίες διαθέτουν θετικό φορτίο, ενώ τα φυσιολογικά κύτταρα έχουν ουδέτερο φορτίο και είναι αδύνατη η αλληλεπίδραση τους με τις βακτηριοσίνες (Baindara et al., 2017). Επίσης η επιλεκτική πρόσδεση των βακτηριοσινών σε καρκινικά κύτταρα οφείλεται και στη ρευστότητα της μεμβράνης. Αυτό γίνεται διότι, παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα ρευστότητας σε σχέση με τα φυσιολογικά κύτταρα, πράγμα που μπορεί να οδηγήσει εύκολα στην αποσταθεροποίηση της μεμβράνης (Kaur & Kaur, 2015). Παράλληλα, ένα άλλο χαρακτηριστικό των καρκινικών κυττάρων που οδηγεί στην επιλεκτική αλληλεπίδραση τους με τις βακτηριοσίνες είναι η ύπαρξη ακανόνιστων και πολλών μικρολάχνων (Baindara et al., 2017; Drider et al., 2016; Kaur & Kaur, 2015).

Επιπροσθέτως, η μιτοχονδριακή μεμβράνη είναι πλούσια σε καρδιολιπίνη, ένα φωσφολιπίδιο που προσδίδει αρνητικό φορτίο σε αυτή. Επομένως, οι βακτηριοσίνες δεσμεύονται και αποσταθεροποιούν την μεμβράνη έχοντας ως αποτέλεσμα την διακοπή της λειτουργίας των μιτοχονδρίων και την απελευθέρωση πολλών πρωτεϊνών, οπότε το κύτταρο οδηγείται σε απόπτωση (Baindara et al., 2017).

Η εμφάνιση παθογόνων μικροοργανισμών ανθεκτικών σε αντιβιοτικά προκαλεί ποικίλα προβλήματα σε ιατρικές θεραπείες και η αυξημένη απαίτηση των καταναλωτών για περισσότερα φυσικά τρόφιμα με λιγότερα χημικά πρόσθετα έχει οδηγήσει στην ανάγκη εύρεσης αντιμικροβιακών και καλύτερων στρατηγικών για την ασφάλεια των τροφίμων. Μελλοντικές έρευνες, βέβαια, πρέπει να εστιάσουν στον βιολογικό ρόλο των βακτηριοσινών στη φύση. Υπάρχει ένα ευρύ φάσμα δράσης των βακτηριοσινών της τάξης II που ίσως υποδηλώνει την ύπαρξη κάποιου ιδιαίτερου ρόλου πέρα από το να σκοτώνει τα κύτταρα στόχους (Kjos et al., 2011). Πέρα όμως από αυτά δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι όλοι οι οργανισμοί έχουν την τάση να προσαρμόζονται στις αλλαγές που συμβαίνουν στο περιβάλλον τους. Συνεπώς τα βακτήρια-στόχοι αναπτύσσουν τρόπους να αντιστέκονται στις βακτηριοσίνες και αποκτούν ανθεκτικότητα σε αυτές, άρα μπορούν να αποφύγουν τις βακτηριοσίνες ουδετεροποιώντας το φορτίο της μεμβράνης του κυτταρικού τοίχους τους (Kumariya et al., 2019).

1.6.4 ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΝΕΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΩΝ

Ο μεγάλος και ραγδαία αναπτυσσόμενος αριθμός των διαθέσιμων αλληλουχιών γονιδιώματος βακτηρίων σε δημόσιες βάσεις δεδομένων προσφέρει μία άλλη πηγή για αναζήτηση νέων βακτηριοσινών. Πρόσφατα παραδείγματα τέτοιων *in silico* προσεγγίσεων είναι η ανακάλυψη βακτηριοσινών της τάξης IIa, repocin A στο γονιδίωμα του *Pediococcus pentosaceus* και ο προσδιορισμός τεσσάρων οπερονίων γενετικών περιοχών της πλανταρισίνης του *Lb. plantarum*. Κάποιες βακτηριοσίνες περιέχουν αλληλουχίες ταυτότητες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εύρεση νέων. Η αναζήτηση γίνεται μέσω γονιδίων που σχετίζονται άμεσα με τη βακτηριοσίνη όπως τα γονίδια ανοσίας, του μεταφορέα και του ρυθμιστή απόκρισης και χρησιμοποιούνται σαν οδηγός για να εντοπιστεί η περιοχή που κωδικοποιεί μία νέα βακτηριοσίνη. Ο εντοπισμός νέων βακτηριοσινών *in silico* γίνεται με τη βοήθεια μίας πλατφόρμας δεδομένων του BAGEL χρησιμοποιώντας αλληλουχίες των πρωτεϊνών ανοσίας και των υπόλοιπων κοντινών περιοχών. Αυτό το εργαλείο βοηθάει στην εύρεση νέων βακτηριοσινών μέσω του προσδιορισμού συντηρημένων περιοχών της βακτηριοσίνης (Kjos et al., 2011).

2^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΑ

Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν αναλυτικής καθαρότητας (pro analysis) των εταιριών Merck, Fluka και Sigma-Aldrich. Τα θρεπτικά υλικά ήταν των εταιριών Lab M-A NEOGEN brand, Supelco Analytical Products και της NEOGEN ενώ η αгарόζη για την ηλεκτροφόρηση του DNA ήταν από την εταιρία NIPPON Genetics. Τα περιοριστικά ένζυμα, η T4 DNA λιγάση, η KapaTaq και η KapaHiFi πολυμεράση ήταν από την εταιρεία TaKaRa. Οι μάρτυρες λDNA ήταν της εταιρίας MINOTECH biotechnology. Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από τις εταιρίες Merck, Fluka, Amresco, Serva και Sigma-Aldrich. Τέλος, τα δισκία αντιβιοτικών ήταν Bio Maxima S.A. και Oxoid.

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν τα ακόλουθα:

- **Πιπέτες:** Gilson (P200, P20, P1000), Nichipet (EX (P5000), EX II (P1000), EX II (P2)).
- **Φυγόκεντροι:** Eppendorf Model 5418 Microcentrifuge, Hettich EBA 12 Centrifuge, Hettich EBA 12 R Centrifuge, HERMLE Z 326 K.
- **Φωτόμετρα:** SHIMADZU UV/Vis Spectrophotometer UV-1601, Dynamica HALO XB-10 UV-Vis single beam Spectrophotometer.
- **Ανακινούμενοι επωαστήρες:** Biosan Orbital Shaker-Incubator ES-20/60.
- **Υπερκαταψύκτης:** Forma Scientific -86 o C FREEZER.
- **Θάλαμος νηματικής ροής:** Microflow Safety Cabinet Class II, Series 'SE' Model 51424/2.
- **Συσκευές ηλεκτροφόρησης DNA:** Consort BIO-RAD.
- **Κλίβανος υγρής αποστείρωσης:** RAYPA Steam Sterilizer.
- **Θερμικός Κυκλοποιητής (PCR):** G-Storm GS1 Thermal Cycler.
- **Μετρητής pH:** HANNA Instruments HI-2211 pH/ORP Meter.
- **Συσκευές ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών:** Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, BIO-RAD Protean II Slab Cell.
- **Σύστημα εμφάνισης-φωτογράφισης πηκτών αгарόζης DNA:** BIO-RAD Gel Doc EZ Imager με UV-Tray και StainFree-Tray, Image Lab Software version 3.0 for Windows 10.
- **Τροφοδοτικά:** BIO-RAD PowerPac-300, BIO-RAD PowerPac-1000.
- **Υδατόλουτρο:** Chemical Electronics BLOCK HEATER 1230.

- **Nanodrop:** Quawell Q3000, UV Spectrophotometer, Software: Quawell Q3000 DNA/Protein analyzer, Quawell Technology, Inc. San Jose, CA, USA.
- **Θάλαμος UV:** UVP CL-1000 Ultraviolet Crosslinker.
- **Θερμαντικές πλάκες και μαγνητικοί αναδευτήρες:** Gallenkamp Magnetic Stirrer-Regular Hotplate, VELP Scientifica ARE Heating-Magnetic Stirrer.
- **Πλάκα εμφάνισης UV για πηγμάτα αγαρόζης:** UVP 3UV Benchtop UV Transilluminator.
- **Ζυγοί:** KERN ABT 100-5NM (αναλυτικός ζυγός), OHAUS 1500D Digital Scale.
- **Πυριαντήριο:** Binder B115 incubator.
- **Σταθεροί θάλαμοι επώασης (37°C, 30°C):** Memmert INP 200 Incubator.
- **Αναδευτήρας VORTEX:** Stuart Scientific SA6 AUTOVORTEX.

2.2 ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ, ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ ΚΑΙ ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ

Τα βακτηριακά στελέχη, τα πλασμίδια και οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία συνοψίζονται στους πίνακες 2.2.α, 2.2.β και 2.2.γ :

Πίνακας 2.2.α: Βακτηριακά στελέχη

Στέλεχος	Θρεπτικό μέσο / συνθήκες ανάπτυξης	Χρησιμότητα στην παρούσα εργασία	Αναφορές
<i>Bacillus subtilis</i>	Luria Broth/ 37°C/ με ανακίνηση	Στέλεχος δείκτης (Indicator strain)	(Martinez, 2013; Piggot, 2009)
<i>Enterococcus durans</i> KE96	MRS Broth/ 30°C/ χωρίς ανακίνηση	Στέλεχος δείκτης	(Giannou et al., 2009; Vandera et al., 2019)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	MRS Broth/ 30°C/ χωρίς ανακίνηση	Στέλεχος δείκτης	(E. B. Kim et al., 2012)
<i>Enterococcus faecium</i> 315VR	MRS Broth/ 30°C/ χωρίς ανακίνηση	Στέλεχος δείκτης	(Tsanasidou et al., 2021)
<i>Enterococcus faecium</i> GLP103	MRS Broth/ 30°C/ χωρίς ανακίνηση	Στέλεχος δείκτης	-
<i>Enterococcus faecium</i> H14	MRS Broth/ 30°C/ χωρίς ανακίνηση	Στέλεχος δείκτης	-
<i>Enterococcus faecium</i> KE82	MRS Broth/ 30°C/ χωρίς ανακίνηση	Στέλεχος δείκτης	(Giannou et al., 2009; Vandera et al., 2017, 2019)

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Luria Broth/ 37°C/ με ανακίνηση	Στέλεχος δείκτης	(He et al., 2014; Sauer & Moraru, 2009)
<i>Escherichia coli</i> DH5a	Luria Broth/ 37°C/ με ανακίνηση	Πλασμιδιακός φορέας	(Hanahan, 1983)
<i>Lactobacillus brevis</i> GLP205	MRS Broth/ 30°C/ χωρίς ανακίνηση	Στέλεχος δείκτης	(Samelis et al., 2021)
<i>Lactobacillus delbruecki</i> <i>subsp. bulgarius</i> GLP117	MRS Broth/ 30°C/ χωρίς ανακίνηση	Στέλεχος δείκτης	(Stachelska & Foligni, n.d.)
<i>Lactobacillus plantarum</i> 208	MRS Broth/ 30°C/ χωρίς ανακίνηση	Στέλεχος προς μελέτη	Αυτή η εργασία
<i>Lactobacillus plantarum</i> H25	MRS Broth/ 30°C/ χωρίς ανακίνηση	Στέλεχος δείκτης	(Tsanasidou et al., 2021)
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> KE109	MRS Broth/ 30°C/ χωρίς ανακίνηση	Στέλεχος δείκτης	(Giannou et al., 2009; Vandera et al., 2019)
<i>Lactococcus lactis subsp.</i> <i>cremoris</i> M78	MRS Broth/ 30°C/ χωρίς ανακίνηση	Στέλεχος δείκτης	(Parapouli et al., 2013; Trmčić et al., 2011)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 105	MRS Broth/ 30°C/ χωρίς ανακίνηση	Στέλεχος προς μελέτη	Αυτή η εργασία
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> GLP202	MRS Broth/ 30°C/ χωρίς ανακίνηση	Στέλεχος δείκτης	-
<i>Leuconostoc suionicum</i> am SF03	MRS Broth/ 30°C/ χωρίς ανακίνηση	Στέλεχος προς μελέτη	Αυτή η εργασία
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO	Luria Broth/ 37°C/ με ανακίνηση	Στέλεχος δείκτης	(Ohman et al., 1980)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> G101	MRS Broth/ 30°C/ χωρίς ανακίνηση	Στέλεχος δείκτης	(Iyer et al., 2021)
<i>Streptococcus thermophilus</i> ST1	M-17 Broth/ 37°C/ με ανακίνηση	Στέλεχος δείκτης	(Stachelska & Foligni, n.d.; T. Zhang et al., 2011)

Πίνακας 2.2.β: Πλασμίδια

Πλασμίδιο	Ανθεκτικότητα	Μέγεθος	Αναφορά
pBluescript SK (+)	Αμπικιλίνη (Amp)	2958 bp	(Alting-Mees & Short, 1989)

Πίνακας 2.2.γ: Εκκλητές

Ζευγάρι εκκλητών	Γονίδιο στόχος	Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδίων (5'→3')	Μέγεθος (bp)	Tm (°C)	Αναφορές
Agg-F	<i>agg</i> (Aggregation protein)	AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC	1553	53	(Espeche et al., 2012)
Agg-R		AAACGGCAAGACAAGTAAATA			
Ace-F	<i>ace</i> (Accessory colonization factor)	CAGGCCAACATCAAGCAACA	125	65	(Al-Talib et al., 1994)
Ace-R		GCTTGCCTCGCCTTCTACAA			
EspA-F	<i>espA</i> (Enterococcal surface protein)	TTTGGGGCAACTGGAATAGT	407	60	(Al-Talib et al., 1994)
EspA-R		CCCAGCAAATAGTCCATCAT			
IS16-F	<i>IS16</i> (a specific mobile element, exclusively prevalent among hospital <i>E. faecium</i> strains)	CATGTTCCACGAACCAGAG	547	55	(Werner et al., 2011)
IS16-R		TCAAAAAGTGGGCTTGGC			
Hyl-F	<i>hyl</i> (Hyaluronidase)	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG	276	58	(Vankerckhoven et al., 2004)
Hyl-R		GACTGACGTCCAAGTTTCCAA			
GelE-F	<i>gelE</i> (Gelatinase)	CGAAGTTGAAAAGGAGGC	372	50	(Al-Talib et al., 1994)
GelE-R		GGTGAAGAAGTACTCTGA			
VanA1	<i>Vancomycin resistance genes</i>	GCTGCGATATTCAAAGCTCA	545	50	(Vankerckhoven et al., 2004)
VanA2		CAGTACAATGCGGCCGTTA			
VanB1		ATGGGAAGCCGATAGTCTC	368		
VanB3		GTTACGCCAAAGGACGAAC			
16s-REV	16s ribosomal RNA gene	AAGGAGGTGATCCAGCC	200+	50	(J. Chen et al., n.d.)
16S-FOR		AGAGTTTGATCCTGGCTCAG			
ParaF	<i>recA</i> gene	GTCACAGGCATTACGAAAAC	322	56	(Torriani et al., 2001)
PentF		CAGTGGCGCGTTGATATC			
PlanF		CCGTTTATGCGGAACACCTA			
PREV		TCGGGATTACCAAACATCAC			

2.3 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

2.3.1 ΠΛΗΡΕΣ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΜΕΣΟ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ, LURIA-BERTANI MEDIUM (LB) (SAMBROOK, ET AL., 1989)

Συστατικά:

1% w/v τρυπτόνη (Casein Peptone Type I)

1% w/v NaCl

0,5% w/v εκχύλισμα ζύμης (Yeast extract)

0,15% v/v 1 M NaOH για ρύθμιση του pH σε τιμή 7,5

ddH₂O μέχρι τον απαιτούμενο όγκο

Αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

Για την παρασκευή πλήρους στερεού θρεπτικού μέσου καλλιέργειας Luria Agar (LA) προστίθενται επιπλέον 1,6-2% w/v άγαρ στο θρεπτικό μέσο και ακολουθεί αποστείρωση σε αυτόκαυστο. Το άγαρ είναι μίγμα πολυσακχαριτών και στερεοποιείται μεταξύ 32-40°C ενώ εμφανίζει σημείο τήξης στους 85°C.

2.3.2 ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ DE MAN, ROGOSA AND SHARPE, MRS (LAB M-A NEOGEN BRAND)

Για το υγρό θρεπτικό υλικό MRS Broth: Ζύγιση 55 gr για 1000 ml όγκο, διαλύεται σε ddH₂O και αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο.

Για το στερεό θρεπτικό υλικό MRS Agar: Ζύγιση 70 gr για 1000 ml όγκο, διαλύεται σε ddH₂O και αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο.

2.3.3 ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ M17 (SIGMA-ALDRICH)

Για το υγρό θρεπτικό υλικό M17 Broth: Ζύγιση 42 gr για 1000 ml όγκο, διαλύεται σε ddH₂O και αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο.

Για το στερεό θρεπτικό υλικό M17 Agar: Ζύγιση 42 gr για 1000 ml όγκο, ζύγιση και προσθήκη 1,8% w/v άγαρ, διαλύεται σε ddH₂O και αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο.

2.4 ANTIBIOTIKA

2.4.1 Broth dilution method (S. A. PIERCE-HENDRY & DENNIS, 2010)

Τα αντιβιοτικά που παρασκευάστηκαν για τον προσδιορισμό της κατώτατης συγκέντρωσης αντιβιοτικού για την αναστολή της ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού (MIC- Minimum Inhibitory Concentration), είχαν συγκέντρωση 5 και 10 μg/ml, φιλτραρίστηκαν με φίλτρο με διάμετρο πόρων 0,22 μm και αποθηκεύτηκαν στους -20°C. Η τελική τους συγκέντρωση κυμαινόταν σε μία κλίμακα από 0,1 - 1024 μg/ml. Έγινε προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας κάθε συγκέντρωσης αντιβιοτικού μέσα σε αποστειρωμένο σωληνάκι το οποίο περιείχε 100 μl καλλιέργειας του επιθυμητού μικροοργανισμού (περίπου 10⁸ cfu/ml) και θρεπτικό υλικό συμπληρωμένο για τελικό όγκο 5 ml. Ακολουθεί επώαση για περίπου 16 ώρες στην βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Ως κατώτατο όριο συγκέντρωσης αντιβιοτικού για την αναστολή ανάπτυξης του μικροοργανισμού, θεωρείτε η μεγαλύτερη συγκέντρωση αντιβιοτικού στην οποία μπορεί να αναπτυχθεί ο μικροοργανισμός.

2.4.2 DISK DIFFUSION METHOD (KIRBY-BAUER DISK DIFFUSION SUSCEPTIBILITY TEST PROTOCOL, 2009)

Τα αντιβιοτικά που ήταν σε μορφή δισκίου, ήταν συγκεκριμένης συγκέντρωσης και τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια στερεού θρεπτικού υλικού επιστρωμένου με 100 μl του προς μελέτη μικροοργανισμού, με τη βοήθεια αποστειρωμένης τσιμπιδας. Τα τρυβλία επώαστηκαν στη βέλτιστη θερμοκρασία του μικροοργανισμού μέχρι την επόμενη μέρα. Χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό τον υπολογισμό της ανθεκτικότητας του προς μελέτη μικροοργανισμού έναντι του αντιβιοτικού μέσω της μέτρησης της διαμέτρου του κύκλου που σχηματιζόταν γύρω από δισκίο.

Τα αντιβιοτικά σε μορφή διαλύματος, προστέθηκαν μετά την αποστείρωση των θρεπτικών μέσων καλλιέργειας και αφού η θερμοκρασία τους είχε μειωθεί στους 50°C. Η παρασκευή των διαλυμάτων των αντιβιοτικών γίνεται με διαλυτοποίηση του αντιβιοτικού σε κατάλληλο όγκο διαλύτη και στη συνέχεια φιλτράρονται με χρήση αποστειρωμένων φίλτρων με διάμετρο πόρων 0,22 μm.

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία συνοψίζονται στον πίνακα 2.4:

Πίνακας 2.4: Αντιβιοτικά

Αντιβιοτικό	Διαλύτης	Συγκέντρωση	Τρόπος δράσης	Αναφορές
Αμπικιλίνη	νερό/ σε μορφή δισκίου	0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 2.5, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14 16, 18 μg/ml σε διάλυμα/ 10 μg σε δισκίο	Δρα βακτηριολυτικά, αποτελεί μη αντιστρεπτό αναστολέα του ενζύμου τρανσπεπτιδάσης που είναι απαραίτητο στα βακτήρια για τη σύνθεση του	(Peechakara et al., 2021)

			κυτταρικού τοιχώματος τους, με αποτέλεσμα να προκαλείται ο πρόωρος τερματισμός σύνθεσης του.	
Βανκομυκίνη	σε μορφή δισκίου	30 μg σε δισκίο	Είναι ένα τρικυκλικό γλυκοπεπτιδικό αντιβιοτικό που αναστέλλει τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος σε ευαίσθητα βακτήρια συνδεόμενη με υψηλή συγγένεια στο άκρο της D-αλανυλ-D-αλανίνης μονάδων πρόδρομων κυτταρικών τοιχωμάτων, είναι βακτηριοκτόνο για τη διαίρεση μικροοργανισμών και εμποδίζει τη διαπερατότητα της βακτηριακής κυτταρικής μεμβράνης και τη σύνθεση RNA.	(Watanakun akorn, 1984)
Γενταμυκίνη	νερό/ σε μορφή δισκίου	0.5, 1, 2, 2.5, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 32, 64, 128, 256 μg/ml σε διάλυμα/ 10 μg σε δισκίο	Είναι ένα αντιβιοτικό που ανήκει στην ομάδα των αμινογλυκοσιδών και είναι αποτελεσματικό έναντι Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων, προσδέεται στην A θέση του 16s rRNA, είναι θετικά φορτισμένο σε φυσιολογικά pH, πράγμα που ευνοεί την πρόσδεση με το RNA και έτσι διαρρηγνύεται η κυτταρική μεμβράνη.	(Kumar et al., 2008)
Ερυθρομυκίνη	αιθανόλη 100%	0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8	Είναι ένα αντιβιοτικό που ανήκει στις	(Wolfe & Hahn, 1964)

		μg/ml σε διάλυμα	μακρολίδες και δρα αναστέλλοντας την πρωτεϊνοσύνθεση, συνδεόμενη με την υπομονάδα 50S των ριβοσωμάτων των βακτηρίων.	
Καναμυκίνη	νερό	1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 μg/ml σε διάλυμα	Δρα παρεμβαίνοντας στην πρωτεϊνοσύνθεση, προσδέεται στο 30S ριβόσωμα του βακτηρίου με αποτέλεσμα τη μη σωστή στοίχιση του με το αγγελιαφόρο RNA, δημιουργώντας σφάλματα κατά την ανάγνωση του και ως συνέπεια αυτού παράγονται μη λειτουργικά πεπτίδια.	(Konno Oizumi et al., 1973)
Οξακιλλίνη	σε μορφή δισκίου	5 μg σε δισκίο	Δρα με δέσμευση σε συγκεκριμένες πενικιλίνο-δεσμευτικές πρωτεΐνες (PBPs) που βρίσκονται στο εσωτερικό του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος και αναστέλλει τη σύνθεση του.	(M. Chen et al., 2011)
Πενικιλίνη	νερό	0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20 μg/ml σε διάλυμα	Δρα με τον ίδιο τρόπο που δρα και η αμπικιλίνη, επηρεάζοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου.	(Yocum et al., 1979)
ΡΙφαμπικίνη	μεθανόλη	0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 μg/ml σε διάλυμα	Είναι ένα αντιβιοτικό, που <i>in vivo</i> έχει βακτηριοκτόνο δράση στα στελέχη του μυκοβακτηριδίου της φυματίωσης, που βρίσκονται, όχι μόνο στα εξωκυττάρια,	(Levin & Hatfull, 1993)

			αλλά και ενδοκυτταρικά, έχει υψηλή αποστειρωτική δράση, αναστέλλει την από το DNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση των ευαίσθητων βακτηριδιακών στελεχών, χωρίς να επηρεάζει το αντίστοιχο ανθρώπινο ένζυμο.	
Στρεπτομυκίνη	νερό	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 μg/ml σε διάλυμα	Είναι υδατοδιαλυτή αμινογλυκοσίδη που παράγεται από τον <i>Streptomyces griseus</i> και κυκλοφορεί με τη μορφή του θειικού άλατος, προσδένεται στην υπομονάδα 30s του ριβοσώματος επεμβαίνοντας στην πρωτεϊνοσύνθεση και οδηγώντας σε κυτταρικό θάνατο.	(Waters & Tadi, 2021)
Τετρακυκλίνη	νερό	0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 μg/ml σε διάλυμα	Αναστέλλει την κυτταρική ανάπτυξη και συνεπώς την μετάφραση, προσδένεται στην υπομονάδα 30S του ριβοσώματος, αποτρέποντας την σύνδεση του tRNA στο σύμπλεγμα mRNA-ριβοσώματος.	(Chopra & Roberts, 2001)
Τριμεθοπρίμη	Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)	2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 μg/ml σε διάλυμα	Είναι αντιβιοτικό που προσδένεται στη διυδροφολική ρεδοκτάση και αναστέλλει την αναγωγή του διυδροφολικού οξέος (DHF) σε τετραϋδροφολικό οξύ (THF), το οποίο είναι πρόδρομο μόριο του μονοπατιού σύνθεσης της θυμιδίνης και παρεμβαίνοντας σε	(Gleckman et al., 1981)

			αυτό το μονοπάτι αναστέλλεται η σύνθεση του βακτηριακού DNA.	
Χλωραμφαινικόλη	αιθανόλη 100%	0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 μg/ml σε διάλυμα	Είναι αντιβιοτικό ευρέος φάσματος με άριστη διεισδυτικότητα και παρουσιάζει βακτηριοστατική δράση κυρίως κατά των αρνητικών και θετικών κατά Gram βακτηρίων, των ρικετσιών και των μικροοργανισμών του τραχώματος (χλαμύδια) και άλλων, εμφανίζεται να αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση παρεμποδίζοντας τη μεταφορά των αμινοξέων από το διαλυτό RNA στα ριβοσώματα.	(Abdollahi & Mostafalou, 2021)

2.5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ - ΜΕΘΟΔΟΙ

2.5.1 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΔΕΝΤΡΟΥ (TAMURA ET AL., 2007)

Με βάση τις αλληλουχίες των προς μελέτη μικροοργανισμών που υπάρχουν, είναι δυνατό να εντοπιστούν οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που παρουσιάζουν ομολογία, με τη βοήθεια της βάσης δεδομένων BLASTP του NCBI και του EzBiocloud.net. Η κατασκευή φυλογενετικών δέντρων για τις συγκεκριμένες αλληλουχίες έγινε με τη χρήση του προγράμματος MEGA, έκδοση 11.0.

2.5.2 ΜΕΘΟΔΟΣ LOWRY (LOWRY ET AL., 1951)

Αρχή Μεθόδου

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε ένα διάλυμα. Στηρίζεται στην αντίδραση των αλάτων του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteus με τις πρωτεΐνες, κατά την οποία σχηματίζεται μίγμα ανόργανων αλάτων (μπλε χρώμα). Οι δύο διαφορετικές αντιδράσεις που πραγματοποιούνται είναι οι εξής:

- A) Σχηματισμός συμπλόκου Cu^{2+} - πρωτεΐνης σε αλκαλικό περιβάλλον. (αντίδραση διουρίας)
- B) Αναγωγή του φωσφοροβολφραμικού και του φωσφορομολυβδαινικού άλατος που περιέχονται στο αντιδραστήριο Folin-Ciocalteus από το σχηματιζόμενο σύμπλοκο προς κυανούν του μολυβδαινίου αντίστοιχα.

Διαλύματα – Αντιδραστήρια

- 1) 2% w/v Na_2CO_3 σε απεσταγμένο νερό
- 2) 0,5% w/v $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ σε 1% w/v κιτρικό νάτριο (ο CuSO_4 προστίθεται στο διάλυμα του κιτρικού νατρίου)
- 3) Ανάμιξη των δύο παραπάνω διαλυμάτων 1) και 2) σε αναλογία 50 : 1 v/v πριν τη χρήση, το διάλυμα παραμένει σταθερό για 24 ώρες
- 4) Αντιδραστήριο φαινόλης: Ανάμιξη του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteus με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1 : 1 v/v, πριν τη χρήση (φωτοευαίσθητο)
- 5) Πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης (BSA) 0,2 mg/ml σε 0,5 N NaOH
- 6) Διάλυμα 1 N NaOH
- 7) Διάλυμα 0,5 N NaOH

Προσδιορισμός

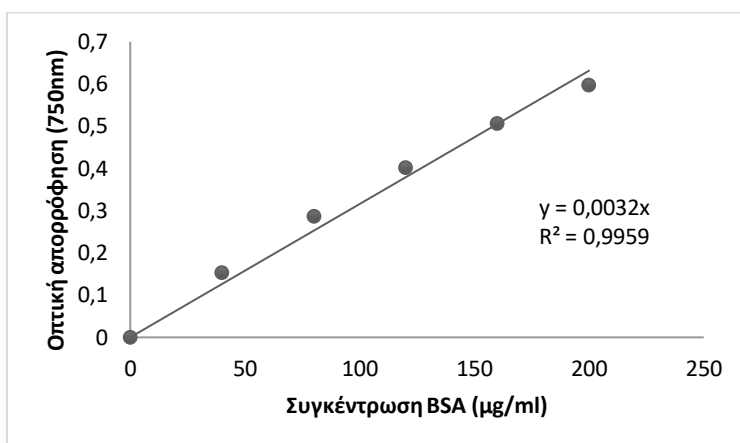
Το δείγμα των πρωτεϊνών επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ίσο όγκο διαλύματος 1 N NaOH. Μετά το τέλος της επώασης συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι 1 ml με 0,5 N NaOH.

Προστίθεται 5 ml του διαλύματος 3) , το δείγμα αναδεύεται και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.

Προστίθεται 0,5 ml του διαλύματος 4) , το δείγμα αναδεύεται και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.

Ακολουθεί ο σχηματισμός του χρώματος και το δείγμα φωτομετρείται στα 750 nm.

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας πρωτεΐνης του δείγματος γίνεται με αναφορά σε πρότυπη καμπύλη BSA (0 – 200 µg πρωτεΐνης).



Γράφημα 2.5.2: Πρότυπη Καμπύλη κατά Lowry.

2.5.3 ΜΕΘΟΔΟΣ BRADFORD (BRADFORD, 1976)

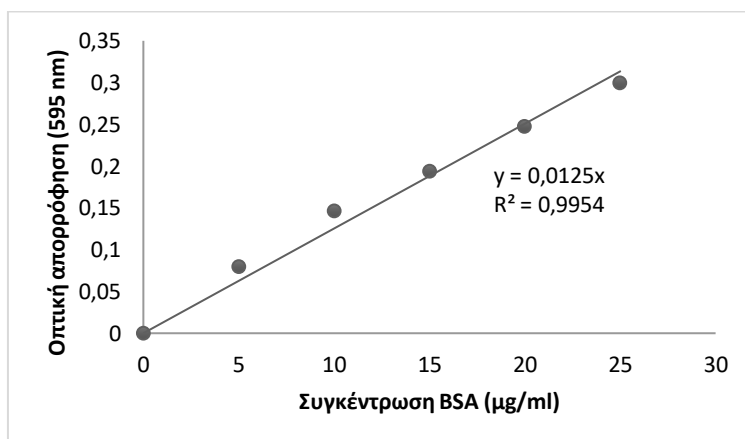
Αρχή Μεθόδου

Αποτελεί μέθοδο ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών, η οποία στηρίζεται στην αλλαγή του χρώματος της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R-250 κατά την πρόσδεση της με πρωτεΐνες. Το σύμπλοκο που δημιουργείται απορροφά στα 595nm.

Προσδιορισμός

Γίνεται πρότυπη καμπύλη BSA με συγκέντρωση 0-25 µg/ml, η οποία προστίθεται σε 2,5 ml αντιδραστηρίου Bradford και φωτομετρείται στα 595 nm μετά την πάροδο 1 λεπτού.

Ποσότητα προσδιοριζόμενου δείγματος έως 40 µl προστίθενται σε 2,5 ml αντιδραστηρίου Bradford και φωτομετρείται στα 595 nm μετά από 1 λεπτό.



Γράφημα 2.5.3: Πρότυπη καμπύλη Bradford

2.5.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ CTAB (MINI PREPARATION) (BACTERIAL DNA ISOLATION CTAB PROTOCOL BACTERIAL GENOMIC DNA ISOLATION USING CTAB, N.D.)

Διαλύματα – Αντιδραστήρια

- 1) Ρυθμιστικό διάλυμα TE: 10 mM Tris - HCl, 1 mM EDTA, pH= 8.0
- 2) Λυσοζύμη 100 mg/ml
- 3) Προνάση 20 mg/ml
- 4) 10% SDS
- 5) 5 M NaCl
- 6) Χλωροφόρμιο
- 7) Ισοαμλική αλκοόλη
- 8) Φαινόλη
- 9) Ισοπροπανόλη
- 10) 70% Αιθανόλη
- 11) RNase A 10 mg/ml
- 12) CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) / NaCl: 4,1 gr NaCl διαλύονται σε 80 ml H₂O και προστίθενται αργά 10 gr CTAB με ταυτόχρονη θέρμανση (65°C) και πολύ ήπια ανάδευση. Η διαδικασία αυτή διαρκεί περισσότερο από 3 ώρες μέχρι την πλήρη διάλυση του CTAB. Τέλος, προστίθεται H₂O μέχρι τελικού όγκου 100 ml και το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο.

Πειραματική πορεία

1,5 ml καλλιέργειας (βρίσκεται στο τέλος της εκθετικής με αρχή στατικής φάσης), φυγοκεντρείται στα 10.000 rpm / 5 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο της.

Γίνεται επαναιώρηση των κυττάρων σε 740 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE.

Ακολουθεί προσθήκη 20 μl λυσοζύμης 100 mg/ml, καλή ανάδευση και το δείγμα επωάζεται για 12 ώρες στους 37°C.

Προσθήκη 40 μl 10% SDS με καλή αλλά ήπια ανάδευση.

Προσθήκη 4 μl προνάση 20 mg/ml, καλή ανάδευση και το δείγμα επωάζεται για 12 ώρες στους 37°C.

Προσθήκη 100 μl 5 M NaCl και καλή ανάδευση με την πιπέτα.

Προσθήκη 100 μl CTAB / NaCl (προθερμασμένο στους 65°C) και καλή ανάδευση. Το δείγμα επωάζεται στους 65°C για 10 λεπτά.

Προσθήκη 0,5 ml χλωροφορμίου : ισοαμλική αλκοόλη (αναλογία 24 : 1) με καλή ανάδευση.

Φυγοκέντρηση στα 11.000 rpm / 10 λεπτά / θερμοκρασία δωματίου.

Μεταφέρεται η υδατική (πάνω) φάση σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι.

Προσθήκη 0,5 ml φαινόλης : χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη (αναλογία 25 : 24 : 1) με καλή ανάδευση.

Φυγοκέντρηση στα 10.000 rpm / 10 λεπτά / θερμοκρασία δωματίου.

Μεταφέρεται η υδατική (πάνω) φάση σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι και μετريέται ο όγκος της.

Προσθήκη ισοπροπανόλης (-20°C) σε ποσότητα ίση με το 0,6 του συνολικού όγκου της υδατικής φάσης και στη συνέχεια το δείγμα επωάζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Φυγοκέντρηση στα 10.000 rpm / 15 λεπτά και προσεκτική απόχυση του υπερκειμένου.

Έκπλυση του ιζήματος με 10% αιθανόλη (-20°C), φυγοκέντρηση στα 11.000 rpm / 15 λεπτά και προσεκτική απόχυση του υπερκειμένου.

Τα υπολείμματα αιθανόλης απομακρύνονται με εξάτμιση μέχρι ξηρού σε SpeedVac.

Το ίζημα επαναιωρείται σε 20 μl διαλύματος TE / RNase (99 μl TE + 1 μl RNase A 10 mg/ml) και ακολουθεί επώαση για 20 λεπτά στους 37°C.

Φυλάσσεται στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

2.5.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΛΑΚΤΟΒΑΚΙΛΛΟΥΣ ΜΕ ΠΑΧΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ (DE ET AL., 2010)

Διαλύματα – αντιδραστήρια

- 1) Αμπικικιλίνη 100 mg/ml
- 2) NaCl - EDTA: 30 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH = 8, αποστείρωση
- 3) Λυσοζύμη 10 mg/ml (σε NaCl - EDTA)
- 4) 10% SDS
- 5) Προνάση 20 mg/ml
- 6) Ρυθμιστικό διάλυμα TE: 10 mM Tris - HCl, 1 mM EDTA, pH= 8.0
- 7) 5 M NaCl
- 8) Χλωροφόρμιο
- 9) Ισοαμυλική αλκοόλη
- 10) Φαινόλη
- 11) Ισοπροπανόλη
- 12) 70% Αιθανόλη

13) RNase A 10 mg/ml

14) CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) / NaCl

Πειραματική πορεία

Σε 7 ml καλλιέργειας, η οποία βρίσκεται στο τέλος της εκθετικής φάσης ή στην αρχή την στατικής φάσης, προστίθεται 10 μl αμικικιλίνη 100 mg/ml και ακολουθεί επώαση για 1 ώρα στους 37°C.

Φυγοκέντρηση 1,5 ml από την καλλιέργεια στα 11.000 rpm / 5 λεπτά και απόρριψη του υπερκειμένου.

Έκπλυση με 1 ml NaCl - EDTA και φυγοκέντρηση στα 11.000 rpm / 5 λεπτά. (αυτό το βήμα επαναλαμβάνεται ×3 φορές)

Απορρίπτεται το υπερκείμενο και στην συνέχεια το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 200 μl NaCl - EDTA και μοιράζεται ίσα σε δύο καθαρά μικροφυγοκεντρικά σωληνάκια.

Προσθήκη 100 μl διαλύματος λυσοζύμης 10 mg/ml με καλή ανάδευση και επώαση στους 37°C για 8 ώρες.

Προσθήκη NaCl - EDTA έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι 500 μl.

Προσθήκη 50 μl 10% SDS με ήπια ανάδευση.

Προσθήκη 10 μl προνάση 20 mg/ml με ήπια ανάδευση και επώαση για όλο το βράδυ στους 37°C.

Προσθήκη 100 μl 5 M NaCl και καλή ανάδευση με την πιπέτα.

Προσθήκη 100 μl CTAB / NaCl (προθερμασμένο στους 65°C) και καλή ανάδευση. Το δείγμα επωάζεται στους 65°C για 10 λεπτά.

Προσθήκη 0,5 ml χλωροφορμίου : ισοαμυλική αλκοόλη (αναλογία 24 : 1) με καλή ανάδευση.

Φυγοκέντρηση στα 11.000 rpm / 10 λεπτά / θερμοκρασία δωματίου.

Μεταφέρεται η υδατική (πάνω) φάση σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι.

Προσθήκη 0,5 ml φαινόλης : χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη (αναλογία 25 : 24 : 1) με καλή ανάδευση.

Φυγοκέντρηση στα 10.000 rpm / 10 λεπτά / θερμοκρασία δωματίου.

Μεταφέρεται η υδατική (πάνω) φάση σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι και μετριέται ο όγκος της.

Προσθήκη ισοπροπανόλης (-20°C) σε ποσότητα ίση με το 0,6 του συνολικού όγκου της υδατικής φάσης και στη συνέχεια το δείγμα επωάζεται για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Φυγοκέντρηση στα 10.000 rpm / 15 λεπτά και προσεκτική απόχυση του υπερκειμένου.

Έκπλυση του ιζήματος με 10% αιθανόλη (-20°C), φυγοκέντρηση στα 11.000 rpm / 15 λεπτά και προσεκτική απόχυση του υπερκειμένου.

Τα υπολείμματα αιθανόλης απομακρύνονται με εξάτμιση μέχρι ξηρού σε SpeedVac.

Το ίζημα επαναιωρείται σε 20 μl διαλύματος TE / RNase (99 μl TE + 1 μl RNase A 10 mg/ml) και ακολουθεί επώαση για 20 λεπτά στους 37°C.

Φυλάσσεται στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

2.5.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ DNA ΜΕ ΤΗΝ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΜΕΘΟΔΟ (KIT) KEYPREP ΤΗΣ ANACHEM

Διαλύματα – Αντιδραστήρια

- 1) Ρυθμιστικό διάλυμα R1
- 2) Ρυθμιστικό διάλυμα R2
- 3) Ρυθμιστικό διάλυμα BG
- 4) Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης
- 5) Ρυθμιστικό διάλυμα έκλουσης
- 6) Λυσοζύμη 50 mg/ml
- 7) Πρωτεΐνάση K
- 8) RNase A
- 9) 100% αιθανόλη

Πειραματική πορεία

Φυγοκέντρηση 1-3 ml καλλιέργειας, η οποία βρίσκεται στο τέλος της εκθετικής φάσης ή στην αρχή της στατικής φάσης, στα 6.000 g / 2 λεπτά / θερμοκρασία δωματίου και απόρριψη υπερκειμένου.

Προσθήκη 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος R1 και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος με πιπετάρισμα.

Προσθήκη 10 μl λυσοζύμη 50 mg/ml με καλή ανάδευση και επώαση για 30 λεπτά στους 37°C.

Φυγοκέντρηση στα 10.000 g / 3 λεπτά και στη συνέχεια απόχυση του υπερκειμένου.

Επαναιώρηση ιζήματος σε 180 μl ρυθμιστικού διαλύματος R2 και προσθήκη 20 μl πρωτεΐνάσης K με καλή ανάδευση. Επώαση για 20 λεπτά στους 37°C.

Προσθήκη 20 μl RNase A με καλή ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά στους 37°C.

Προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος BG διπλάσιου όγκου του ήδη υπάρχοντος (περίπου 440 μl) με καλή - ήπια ανάδευση και επώαση για 10 λεπτά στους 65°C.

Προσθήκη 200 μl 100% αιθανόλη και καλή ανάδευση.

Ακολουθεί μεταφορά του δείγματος σε στήλη με καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι. Φυγοκέντρηση στα 10.000 g / 1 λεπτό και απόχυση του υγρού που συγκεντρώνεται στο σωληνάκι αφού περάσει από τη στήλη.

Έκπλυση της στήλης με 750 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης και φυγοκέντρηση στα 10.000 g / 1 λεπτό. Απόχυση του υγρού που βρίσκεται στο σωληνάκι.

Φυγοκέντρηση της στήλης στα 10.000 g / 1 λεπτό για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων αιθανόλης.

Τοποθέτηση της στήλης σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι.

Προσθήκη 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης και επώαση για 2 λεπτά. Φυγοκέντρηση στα 10.000 g / 1 λεπτό.

Το DNA φυλάσσεται στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

2.5.7 ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΟΥΣ -80°C ΜΕ 30% ΓΛΥΚΕΡΟΛΗ (SAMBROOK AND RUSSELL, 2001)

Η αποθήκευση στους -80°C γίνεται με γλυκερόλη διότι αποτρέπει τη δημιουργία κρυστάλλων του νερού στο θρεπτικό μέσο, το οποίο μπορεί να θανατώσει τα κύτταρα.

Για τελικό όγκο 1,8 ml (ο όγκος της γλυκερόλης που προστίθεται είναι 540 μl), προστίθενται πρώτα 1,26 ml δείγματος από την εκθετική φάση ανάπτυξης και έπειτα γλυκερόλη έως τα 1,8 ml. Ακολουθεί ανάδευση σε περιστροφικό αναδευτήρα.

2.5.8 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (MULLIS ET AL., 1986)

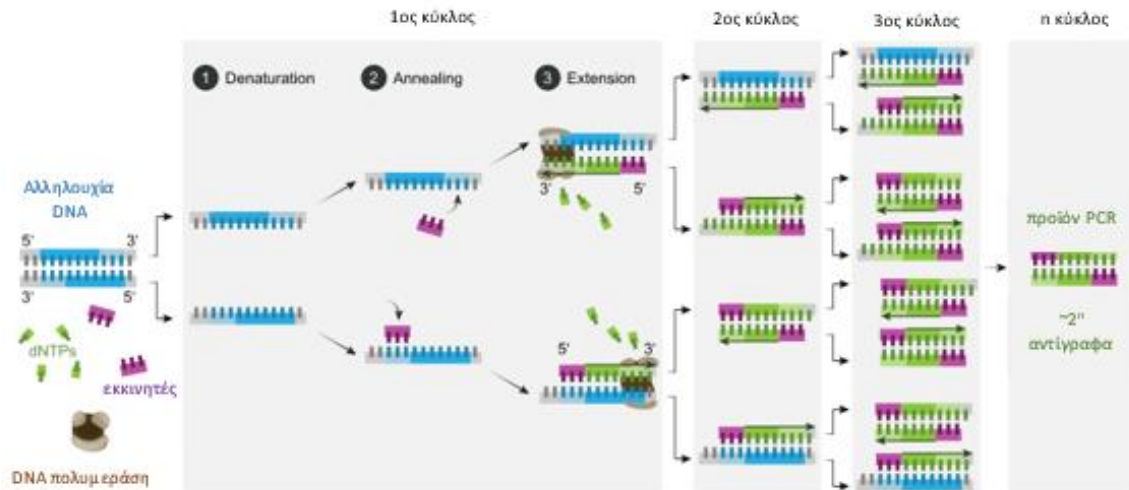
Το 1984, ο Kary Mullis επινόησε μια ευφύεστατη μέθοδο κλωνοποίησης μιας επιθυμητής αλληλουχίας DNA, χωρίς την απαραίτητη χρήση ζωντανών κυττάρων, που ονομάστηκε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR). Ας θεωρήσουμε μια διπλή έλικα DNA που περιέχει μια αλληλουχία-στόχο περιβαλλόμενη από αλληλουχίες οι οποίες δεν αποτελούν στόχο. Μέσω της PCR είναι δυνατή η ευχερής σύνθεση εκατομμυρίων αντιγράφων των αλληλουχιών-στόχων εάν είναι γνωστές οι παράπλευρες τους αλληλουχίες. Η PCR υλοποιείται μέσω προσθήκης των ακόλουθων αντιδραστηρίων σε ένα διάλυμα που περιέχει την αλληλουχία στόχο: 1) ένας ζεύγος εκκινητών (πριμοδοτικά ολιγονουκλεοτίδια, primers) που υβριδοποιούνται με τις παράπλευρες αλληλουχίες του στόχου, 2) τους τέσσερις τριφωσφορικούς δεοξυριβονουκλεοζίτες (dNTP) και 3) μια θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση.

Ένας κύκλος PCR χωρίζεται σε τρία επιμέρους στάδια:

- 1) Διαχωρισμός των αλυσίδων: Οι δύο αλυσίδες του γονικού μορίου DNA διαχωρίζονται με θέρμανση του διαλύματος στους 95°C για 15 δευτερόλεπτα.
- 2) Υβριδοποίηση των εκκινητών: Το διάλυμα ψύχεται απότομα στους 54°C προκειμένου ο κάθε εκκινητής να υβριδοποιηθεί με μία από τις αλυσίδες του DNA. Ο ένας εκκινητής υβριδοποιείται στο άκρο 3' του στόχου της μιας αλυσίδας και ο άλλος στο 3' άκρο του στόχου της συμπληρωματικής αλυσίδας. Προσθέτοντας εκκινητές σε περίσσεια αποφεύγεται η υβριδοποίηση του γονικού DNA με τον εαυτό του.
- 3) Σύνθεση του DNA: Στη συνέχεια το διάλυμα θερμαίνεται στους 72°C, στη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης των θερμοανθεκτικών πολυμερασών. Η πολυμεράση επιμηκύνει και τους δύο εκκινητές προς την κατεύθυνση της αλληλουχίας στόχου,

διότι η κατεύθυνση της σύνθεσης του DNA είναι από το άκρο 5' προς το 3'. Η σύνθεση του DNA πραγματοποιείται και στις δύο αλυσίδες αλλά προεκτείνεται και πέρα από την αλληλουχία στόχο.

Τα τρία αυτά στάδια αποτελούν έναν κύκλο ενίσχυσης με PCR και μπορούν να επαναληφθούν πολλές φορές με απλή μεταβολή της θερμοκρασίας του μείγματος.



Εικόνα 2.5.8: Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής PCR

16S rRNA PCR (PETTI ET AL., 2005)

Οι παραδοσιακές μέθοδοι προσδιορισμού μικροοργανισμών απαιτούν αναγνώριση των μορφολογικών χαρακτηριστικών, του τρόπου ανάπτυξης, της ενζυματικής δράσης και του μεταβολισμού για τον καθορισμό του γένους και του είδους. Η αλληλούχιση του γονιδίου 16S είναι μία ακριβής και αντικειμενική μέθοδο ταυτοποίησης ενός μικροοργανισμού, με ιδιαίτερη χρησιμότητα σε ένα κλινικό εργαστήριο.

MULTIPLEX PCR (MAHONY & CHERNESKY, 1995)

Η multiplex PCR είναι μια τεχνική ταυτόχρονης ενίσχυσης περισσότερων από μίας αλληλουχίας στόχου σε ένα μόνο σωλήνα με τη χρήση περισσότερων από ένα ζεύγος εκκινητών. Αυτή η ταυτόχρονη ενίσχυση σε μία μόνο αντίδραση εξαρτάται από τη συμβατότητα των εκκινητών που χρησιμοποιούνται. Πρέπει να έχουν παρόμοιες θερμοκρασίες τήξης (T_m), έτσι ώστε να μπορούν να αποδιαταχθούν και να αποχωριστούν οι συμπληρωματικές αλυσίδες. Κάθε ενίσχυση προχωρά ανεξάρτητα από τις άλλες, εφόσον τα αντιδραστήρια βρίσκονται σε περίσσεια συγκέντρωσης. Επίσης οι εκκινητές θα πρέπει να ορίζουν αμπλικόνια ίδιου εύρους μεγέθους (100-500 bp), ώστε το καθένα να συντίθεται αποτελεσματικά και με ίδιους ρυθμούς.

Πειραματική πορεία

Οι αντιδράσεις γίνονται σε τελικό όγκο 25 ή 50 μ l και οι συνθήκες επιλέγονται ανάλογα με τη θερμοκρασία T_m των πριμοδοτικών ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται κάθε φορά. Οι πολυμεράσες που χρησιμοποιήθηκαν είναι η KaraTaq από την εταιρία BIOSYSTEMS και η KaraHiFi από την εταιρία Roche.

Μια τυπική σύσταση αντίδρασης είναι η παρακάτω:

Πίνακας 2.5.8: Τυπική σύσταση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.

Αντιδραστήριο	Όγκος
ddH ₂ O	64 μl
10× ρυθμιστικού δ/τος	10 μl
MgCl ₂ (2.5 mM)	5 μl
dNTPs (10 mM)	10 μl
Πριμοδοτικό μόριο 1	3 μl (30 pmols)
Πριμοδοτικό μόριο 2	3 μl (30 pmols)
Εκμαγείο DNA	4 μl (30-100 ng)
Taq DNA Polymerase	1 μl (2.5 U)
Τελικός όγκος	100 μl

Οι αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν στο θερμοκυκλοποιητή G-Storm GS1 Thermal Cycler PCR στις ακόλουθες συνθήκες:

Μετουσίωση για 3 λεπτά στους 95°C ακολουθούμενη από 30 κύκλους με τα ακόλουθα στάδια:

- Μετουσίωση για 1 λεπτό στους 95°C.
- Αναδιάταξη για 2 λεπτά σε θερμοκρασία κατάλληλη, ανάλογα με τα χρησιμοποιούμενα κάθε φορά πριμοδοτικά μόρια.
- Επιμήκυνση για 3 λεπτά στους 72°C.

Τελική επιμήκυνση για έναν κύκλο και για 10 λεπτά στους 72°C.

2.5.9 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΑΛΚΑΛΙΚΗΣ ΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Οι μέθοδοι αλκαλικής λύσεως για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA βασίζονται στο εξής: Σε υψηλό pH οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν τις δύο αλυσίδες του DNA διασπώνται (μετουσίωση). Κατά την ουδετεροποίηση το πλασμιδιακό DNA επανουσιώνεται, ενώ το χρωμοσωμικό παραμένει μετουσιωμένο, διευκολύνοντας έτσι την εκλεκτική απομόνωση πλασμιδιακού DNA.

2.5.9.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *E. COLI* ΣΕ ΜΙΚΡΗ ΚΛΙΜΑΚΑ (MINI PREPARATION)

Η παρούσα μέθοδος είναι μια παραλλαγή της μεθόδου απομόνωσης DNA σε μεγάλη κλίμακα προσαρμοσμένη σε μικρούς όγκους καλλιέργειας και ακολουθεί την εξής πειραματική διαδικασία:

Διαλύματα – Αντιδραστήρια

- 1) Διάλυμα P1: 50 mM Tris-HCl pH=8.0, 10 mM EDTA, 100μg/ml RNase A (φυλάσσεται στους 4°C)
- 2) Διάλυμα P2: 200 mM NaOH, 1% SDS (παρασκευάζεται πριν τη χρήση του)

- 3) Διάλυμα P3: 3 M CH₃COOK, pH=5.5 (φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου ή στους 4°C)
- 4) 100% αιθανόλη
- 5) 70% αιθανόλη
- 6) Διάλυμα TE: 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH=8.0

Πειραματική πορεία

Από καλλιέργεια 1-1,5 ml τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση για 5 λεπτά/ 14.000 rpm.

Επαναιώρηση σε 200 μl διαλύματος P1 και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Προσθήκη 200 μl διαλύματος P2 και ήπια ανάδευση με το χέρι 6-8 φορές.

Επώαση για 10 λεπτά σε 0°C.

Προσθήκη 150 μl διαλύματος P3 και ήπια ανάδευση με το χέρι 6-8 φορές.

Επώαση για 5 λεπτά σε 0°C.

Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά/ 14.000 rpm.

Μεταφορά του υπερκειμένου σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι, προσθήκη 1 ml 100% αιθανόλης (0°C) και επώαση για 10 λεπτά στους 4°C ή σε θερμοκρασία δωματίου.

Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά/ 14000 rpm και απόχυση υπερκειμένου.

Προσθήκη 500 μl 70% αιθανόλης, φυγοκέντρηση 10 λεπτά/ 14.000 rpm προσεκτική απόχυση του υπερκειμένου.

Ακολουθεί ξήρανση του ιζήματος για περίπου 20 λεπτά.

Επαναιώρηση σε 50-55 μl διαλύματος TE.

2.5.9.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *E. COLI* ΜΕ ΤΗΝ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΜΕΘΟΔΟ NUCLEOSPIN PLASMID ΤΗΣ MACHEREY-NAGEL

Διαλύματα – Αντιδραστήρια

- 1) Διάλυμα A1
- 2) Διάλυμα A2
- 3) Διάλυμα A3
- 4) Διάλυμα AW
- 5) Διάλυμα A4
- 6) Διάλυμα AE

Πειραματική πορεία

Φυγοκέντρηση 1-5 ml καλλιέργειας κυττάρων για 10 λεπτά/ 6.000 g. Απόρριψη υπερκείμενου όσο το δυνατόν καλύτερα με τη βοήθεια πιπέτας.

Επαναιώρηση των κυττάρων σε 250 ml διαλύματος A1 με χρήση περιστροφικού αναδευτήρα.

Για τη λύση των κυττάρων γίνεται προσθήκη 250 ml διαλύματος A2 και ακολουθεί ήπια ανάδευση με το χέρι 6-8 φορές.

Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Προσθήκη 300 ml διαλύματος A3 και ήπια ανάδευση με το χέρι 6-8 φορές.

Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά/ 11.000 g/ θερμοκρασία δωματίου.

Τοποθέτηση του υπερκείμενου σε στήλη NucleoSpin Plasmid και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό/ 11.000 g. Απόρριψη του υπερκείμενου που συλλέγεται στο σωληνάκι.

Προσθήκη 500 ml του διαλύματος AW (προθερμαίνεται στους 50°C) και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό/ 11.000 g.

Προσθήκη 600 ml διαλύματος A4 και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό/ 11.000 g. Απόρριψη υπερκείμενου από το σωληνάκι της στήλης.

Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά/ 11.000 g και απόρριψη υπερκείμενου από το σωληνάκι. Επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση για την απομάκρυνση όσο το δυνατόν περισσότερων υπολειμμάτων αιθανόλης.

Τοποθέτηση της στήλης σε καθαρό φυγοκεντρικό σωληνάκι και προσθήκη 25 ml διαλύματος AE. Επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό/ 11.000 g. Το βήμα επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά με προσθήκη 25 ml διαλύματος AE επιπλέον.

Αποθήκευση στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

2.5.10 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΟΥ DNA (SAMBROOK AND RUSSELL, 2001)

Αρχή Μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης είναι μία μέθοδος διαχωρισμού, καθαρισμού και απομόνωσης τμημάτων DNA. Πραγματοποιείται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και βασίζεται στο ότι το DNA έχει αρνητικό φορτίο, με αποτέλεσμα να κινείται προς το θετικό πόλο όταν βρεθεί σε συνεχές ηλεκτρικό πεδίο. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την μετακίνηση του DNA στο πήγμα αγαρόζης είναι οι εξής:

- Το μέγεθος του DNA: Τα γραμμικά μόρια DNA μετακινούνται στο πήγμα αγαρόζης αντιστρόφως ανάλογα του δεκαδικού λογάριθμου του μεγέθους τους. Τα μεγαλύτερα μόρια κινούνται πιο αργά λόγω μεγαλύτερης δράσης της τριβής και λόγω μεγαλύτερης δυσκολίας να διέλθουν από τους πόρους του πηγματος σε αντίθεση με τα μικρότερα μόρια. Για να υπολογίσουμε το μέγεθος του τμήματος DNA που ηλεκτροφορείται, τοποθετούμε πάντα στο πήκτωμα, εκτός από τα δείγματά μας, και έναν μάρτυρα με κομμάτια DNA γνωστού μοριακού βάρους.

- Η συγκέντρωση της αγαρόζης: Η κινητικότητα του DNA σε σχέση με τη συγκέντρωση της αγαρόζης δίνεται από τον τύπο: $\log \mu = \log \mu_0 - k_r t$, όπου μ είναι η κινητικότητα του DNA, μ_0 η ελεύθερη κινητικότητα του DNA, k_r ο συντελεστής καθυστέρησης και t η συγκέντρωση της αγαρόζης.
- Η διαμόρφωση του DNA: Τα μόρια του DNA μπορούν να έχουν τρεις διαφορετικές διαμορφώσεις:
 - 1) Κυκλικά μόρια (form-I: πλασμίδια, βακτηριακό ή ιικό DNA).
 - 2) Κυκλικά μόρια τα οποία έχουν εγκοπές (form-II: πλασμίδια τα οποία έχουν εγκοπές στη μία αλυσίδα).
 - 3) Ευθύγραμμα μόρια (form-III: είναι συνήθως όλα τα μόρια DNA τα οποία έχουν υποστεί πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες).

Μόρια DNA ίδιου μεγέθους, αλλά διαφορετικής διαμόρφωσης, έχουν διαφορετική κινητικότητα, με τα υπερελικωμένα μόρια να κινούνται ταχύτερα και να ακολουθούν τα ανοιχτά κυκλικά και τα ευθύγραμμα μόρια DNA (Grinsted and Bennett, 1988).

- Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης: Το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρεί σταθερό το pH και περιέχει τα απαραίτητα ιόντα για την αύξηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Απουσία ιόντων, η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι ελάχιστη και το DNA μετακινείται ελάχιστα μέσα στο πήκτωμα. Τα συνήθη διαλύματα ηλεκτροφόρησης είναι το TBE και το TAE και χρησιμοποιούνται σε συγκέντρωση 1x.
- Η τάση πεδίου: Ο καλύτερος διαχωρισμός μορίων επιτυγχάνεται σε τάση ≤ 5 Volt/cm.

Για να απεικονιστούν οι ζώνες των μορίων DNA στο πήκτωμα αγαρόζης είναι απαραίτητη μια ουσία που να καθιστά ορατά τα μόρια του DNA. Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) είναι μια χρωστική που έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα γι' αυτόν τον σκοπό. Παρεμβάλλεται στη μεγάλη αύλακα του DNA (ή του RNA) μέσω σχηματισμού δεσμών van Der Waals και έχει την ιδιότητα να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία 302-366 nm. Ο φθορισμός του συμπλόκου EtBr-DNA είναι 20-30 φορές ισχυρότερος από αυτόν του ελεύθερου βρωμιούχου αιθιδίου. Η χρωστική προστίθεται στο πήκτωμα είτε κατά την παρασκευή του είτε με εμβάπτισή του σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 0,5 μg/ml για 15-20 λεπτά μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης. Η χρήση του βρωμιούχου αιθιδίου απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή γιατί η ουσία έχει μεταλλαξιγόνο και τερατογόνο δράση. Τα γάντια και τα πηκτώματα που περιέχουν βρωμιούχο αιθίδιο απορρίπτονται σε κάδους με σήμανση για τοξικά απόβλητα και υφίστανται κατάλληλη επεξεργασία εξουδετέρωσης.

Διαλύματα-Αντιδραστήρια

1. Διάλυμα TAE (Tris-acetate): 0,04 M Tris-acetate, 0,001 M EDTA pH=8.0. Το διάλυμα παρασκευάζεται σε συγκέντρωση 50 φορές μεγαλύτερη (50x) και φυλάσσεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το τελικό διάλυμα (1x) παρασκευάζεται λίγο πριν την ηλεκτροφόρηση με κατάλληλη αραιώση του διαλύματος 50x.
2. Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης: 0,25% κυανό της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανολικό ξυλένιο, 30% γλυκερόλη. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4 °C.

Πειραματική πορεία

Σε κωνική φιάλη των 250 ml ζυγίζονται 0,7-2 g αγαρόζης (ανάλογα με την επιθυμητή πυκνότητα του πήγματος). Γίνεται προσθήκη 100 ml διαλύματος ΤΑΕ και η φιάλη τοποθετείται στο φούρνο μικροκυμάτων όπου αφήνεται μέχρι να διαλυθεί τελείως η αγαρόζη.

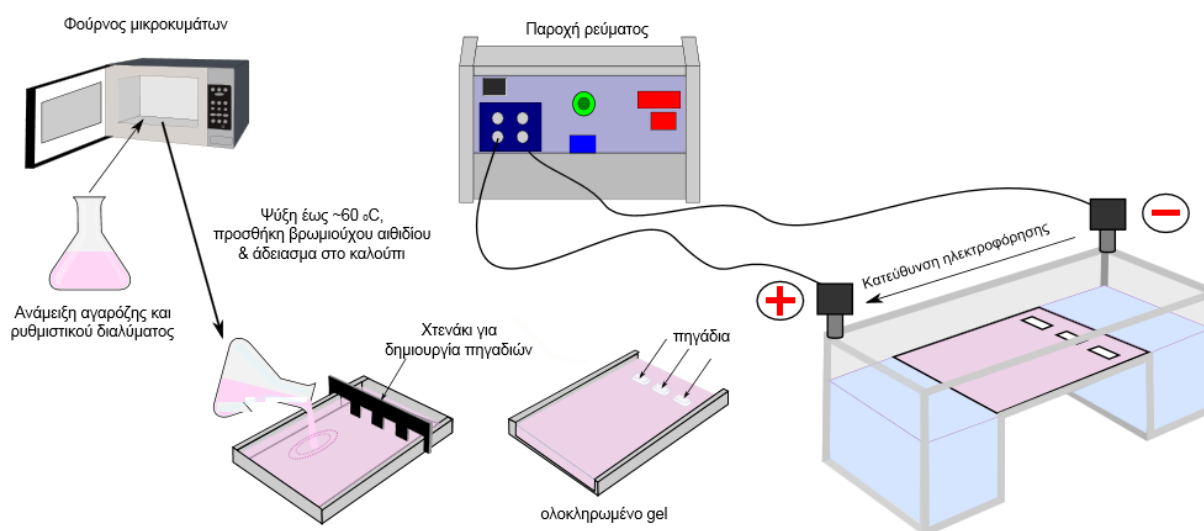
Όταν η θερμοκρασία της φιάλης μειωθεί στους 50°C, γίνεται προσθήκη κατάλληλου όγκου βρωμιούχου αιθιδίου, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωσή του στο διάλυμα να είναι 0,5 µg/ml.

Απόχυση του παραπάνω μίγματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και παραμένει εκεί μέχρι να πήξει οπότε αφαιρείται το κτένι για τη δημιουργία των φρεατίων.

Στα δείγματα του DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν, γίνεται προσθήκη κατάλληλου όγκου διαλύματος φόρτωσης σε αναλογία 5:1 αντίστοιχα. Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει γλυκερόλη, με αποτέλεσμα το δείγμα να μη διαχέεται και να κατακρατείται στον πυθμένα του φρεατίου. Επίσης το διάλυμα αυτό περιέχει δυο αρνητικά φορτισμένες χρωστικές των οποίων η μετακίνηση στο πήγμα αγαρόζης είναι ενδεικτική για το τέλος της ηλεκτροφόρησης.

Ακολουθεί φόρτωση των δειγμάτων στα φρεάτια του πήγματος και στη συνέχεια εφαρμόζεται τάση 2-5 Volt/cm. Η ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήγμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία (302 nm), προκειμένου να γίνουν ορατά τα σύμπλοκα DNA-βρωμιούχου αιθιδίου τα οποία εμφανίζονται σαν ζώνες πορτοκαλί χρώματος. Η φωτογράφιση του πήγματος γίνεται με συσκευή BIO-RAD Gel Doc EZ Imager.



Εικόνα 2.5.10: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ηλεκτροφόρησης DNA σε πήγμα αγαρόζης, από την παρασκευή του πήγματος μέχρι τη συσκευή.

2.5.11 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΠΗΓΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΜΕΘΟΔΟ NUCLEOSPIN EXTRACT II ΤΗΣ MACHEREY – NAGEL (ΓΕΡΜΑΝΙΑΣ)

Διαλύματα- Αντιδραστήρια

1. Διάλυμα NT1
2. Διάλυμα NT3
3. Διάλυμα NE

Πειραματική πορεία

Η ζώνη DNA που πρόκειται να καθαριστεί, αποκόβεται από το πήγμα αγαρόζης, ζυγίζεται (1 g = 1 ml) και τοποθετείται σε αποστειρωμένο μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι.

Προσθήκη 200 μl διαλύματος NT1 για κάθε 100 mg αγαρόζης.

Επώαση στους 50°C μέχρι να διαλυθεί πλήρως το μείγμα ενώ αναδεύεται ανά 2-3 λεπτά.

Τοποθέτηση του μείγματος σε στήλη Nucleospin Extract II και φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα/ 11.000 g. Απόχυση υπερκείμενου.

Προσθήκη 700 μl διαλύματος NT3, φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα/ 11.000 g και απόχυση υπερκείμενου.

Φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα/ 11.000 g για απομάκρυνση υπολειμμάτων των διαλυμάτων από τη στήλη.

Αν χρειαστεί γίνεται επανάληψη του παραπάνω βήματος γιατί το διάλυμα περιέχει αιθανόλη.

Τοποθέτηση της στήλης σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό/ 11.000 g.

Τοποθέτηση της στήλης σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι, προσθήκη 15 μl διαλύματος NE και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό.

Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό/ 11.000 g.

Το παραπάνω βήμα επαναλαμβάνεται με επιπλέον προσθήκη 15 μl διαλύματος NE.

Αποθήκευση στους -20°C.

2.5.12 ΠΕΨΗ ΤΟΥ DNA ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ (SAMBROOK AND RUSSELL, 2001; BERG ET AL., 2015)

Αρχή μεθόδου

Τα περιοριστικά ένζυμα που λέγονται και περιοριστικές ενδονουκλεάσες χρησιμοποιούνται στην ανάλυση και στις κλωνοποιήσεις DNA, είναι βακτηριακά ένζυμα και αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες τεσσάρων έως οχτώ ζευγών βάσεων και υδρολύουν ένα φωσφοδιεστερικό δεσμό σε κάθε αλυσίδα της περιοχής αυτής. Ένα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό σε αυτές τις θέσεις περιορισμού είναι ότι σχεδόν πάντα έχουν συμμετρία

περί έναν άξονα δευτέρας τάξεως. Τα μεγέθη των περιοριστικών τμημάτων του DNA που προκύπτουν μετά τη δράση των περιοριστικών ενδονουκλεασών υπολογίζονται συγκρίνοντας τις αποστάσεις που διανύουν σε ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης, με τις αποστάσεις προτύπων ζωνών DNA γνωστού μεγέθους. Κάθε περιοριστικό ένζυμο έχει βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας, pH και σύστασης ρυθμιστικού διαλύματος στις οποίες δρα και οι οποίες δίνονται από τις παρασκευαστικές εταιρίες. Η συγκέντρωση των περισσότερων ενδονουκλεασών εκφράζεται σε Unit/ μl, όπου 1 Unit ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την πέψη 1 μg DNA του φάγου λ σε 1 ώρα κατάλληλες συνθήκες δράσεως του εκάστοτε ενζύμου.

2.5.12.1 ΠΕΨΕΙΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA (SAMBROOK AND RUSSELL, 2001)

Η αντίδραση της πέψης πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10-20 μl, σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι και τοποθετούνται τα εξής:

- Κατάλληλη ποσότητα απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού, για τη ρύθμιση του τελικού όγκου της αντίδρασης.
- Ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ίση με 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης.
- Ορισμένη ποσότητα DNA (0,5-1,0 μg).
- 1 μl περιοριστικής ενδονουκλεάσης (2-10 U / μl).

Το μίγμα της αντίδρασης επάζεται στους 30°C ή στους 37°C (ανάλογα με τις βέλτιστες συνθήκες του περιοριστικού ενζύμου) για 1-2 ώρες.

Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος EDTA σε τελική συγκέντρωση 10 mM. Ορισμένα περιοριστικά ένζυμα απενεργοποιούνται με επώαση στους 65°C.

Σε περίπτωση μερικής πέψης οι παραπάνω συνθήκες της αντίδρασης τροποποιούνται: ο χρόνος της αντίδρασης μειώνεται σε 1-15 λεπτά και η συγκέντρωση του περιοριστικού ενζύμου είναι από 10 έως 100 φορές μικρότερη.

2.5.12.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *E. COLI* ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ (MANDEL & HIGA, 1970)

Διαλύματα – Αντιδραστήρια

1. Transformation Buffer: 50 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0
2. Γλυκερόλη
3. Θρεπτικό υλικό Luria Broth (LB)

Πειραματική πορεία

Συλλογή 100 ml κυττάρων DH5a σε οπτική απορρόφηση OD_{600nm} = 0.350.

Επώαση για 10 λεπτά σε πάγο.

Φυγοκέντρωση για 10 λεπτά/ 4°C / 2.700 g και στη συνέχεια απόχυση του υπερκειμένου.

Επαναίωση των κυττάρων σε 30 ml TB (Transformation Buffer), φυγοκέντρηση για 10 λεπτά/ 4°C / 2.700 g και στη συνέχεια απόχυση του υπερκλειμένου.

Ήπια επαναίωση σε 4 ml TB.

- ♦ Τα κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε για απευθείας μετασχηματισμό ή να αποθηκευτούν για διάστημα ενός έως δύο μηνών στους -80°C ως εξής:

Προσθήκη 10-15 % γλυκερόλη και μεταφορά 200 μl σε αποστειρωμένα μικροφυγοκεντρικά σωληνάκια.

- ♦ Ο μετασχηματισμός με τη χρήση των ανωτέρω επιδεικτικών κυττάρων πραγματοποιείται με την ακόλουθη διαδικασία:

1. Τα κύτταρα ξεπαγώνουν ήπια σε πάγο.
2. Προσθήκη πλασμιδιακού DNA και επώαση για 30 λεπτά στον πάγο.
3. Θερμικό σοκ για 45 δευτερόλεπτα στους 44°C.
4. Προσθήκη 1 ml θρεπτικού μέσου Luria Broth (LB) σε κάθε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι και τα κύτταρα αφήνονται να αναρρώσουν για να αντιγράψουν και να εκφράσουν το πλασμιδιακό DNA για 30-45 λεπτά στους 37°C.
5. Μετά την ανάρρωση των κυττάρων γίνεται εμβολιασμός 0,2 ml από την παραπάνω καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης που περιέχει το αντιβιοτικό της επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων.

2.5.13 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ PCR ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑ (ΚΥΡΙΑΚΙΔΗΣ, 2000) Αρχή μεθόδου

Φορέας κλωνοποίησης είναι απλά ένα μόριο DNA που περιέχει μία αφετηρία αντιγραφής και μπορεί να διπλασιαστεί στο κύτταρο ξενιστή. Οι περισσότεροι φορείς κλωνοποίησης που χρησιμοποιούνται με τους μικροοργανισμούς είναι εξωχρωμοσωμικά, αυτόνομα διπλασιαζόμενα κυκλικά τμήματα DNA που ονομάζονται πλασμίδια. Τα πλασμίδια αποτελούν, ένα μικρό μόνο μέρος του ολικού κυτταρικού DNA του ξενιστή, αλλά μπορούν να διαχωριστούν εύκολα, βάση του μικρού τους μεγέθους από το χρωμοσωμικό DNA.

Εκατοντάδες διαφορετικοί πλασμιδιακοί φορείς κλωνοποίησης έχουν περιγραφεί και πολλοί από αυτούς έχουν κατασκευαστεί για ειδικούς σκοπούς. Παρόλα αυτά, όλοι τους έχουν τρία κοινά χαρακτηριστικά:

1. Το DNA του φορέα κλωνοποίησης ιδανικά έχει μόνο μία περιοχή στόχο για κάποια συγκεκριμένη ενδονουκλεάση περιορισμού. Αν έχει περισσότερες από μία περιοχές στόχους, τότε τμήματα του πλασμιδίου μπορεί να χαθούν ή να επαναδιαταχθούν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας της κλωνοποίησης. Για όσες περισσότερες ενδονουκλεάσες περιορισμού το πλασμίδιο έχει μοναδικές περιοχές στόχους τόσο καλύτερο θα είναι ως φορέας.
2. Όλοι οι φορείς κλωνοποίησης έχουν έναν ή περισσότερους εύκολα επιλεγόμενους γενετικούς δείκτες, όπως αντίσταση σε αντιβιοτικά. Η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας του μετασχηματισμού είναι πολύ χαμηλή και τέτοιοι δείκτες είναι

απαραίτητοι, ώστε τα κύτταρα που έχουν μετασηματιστεί να μπορούν να επιλεγούν.

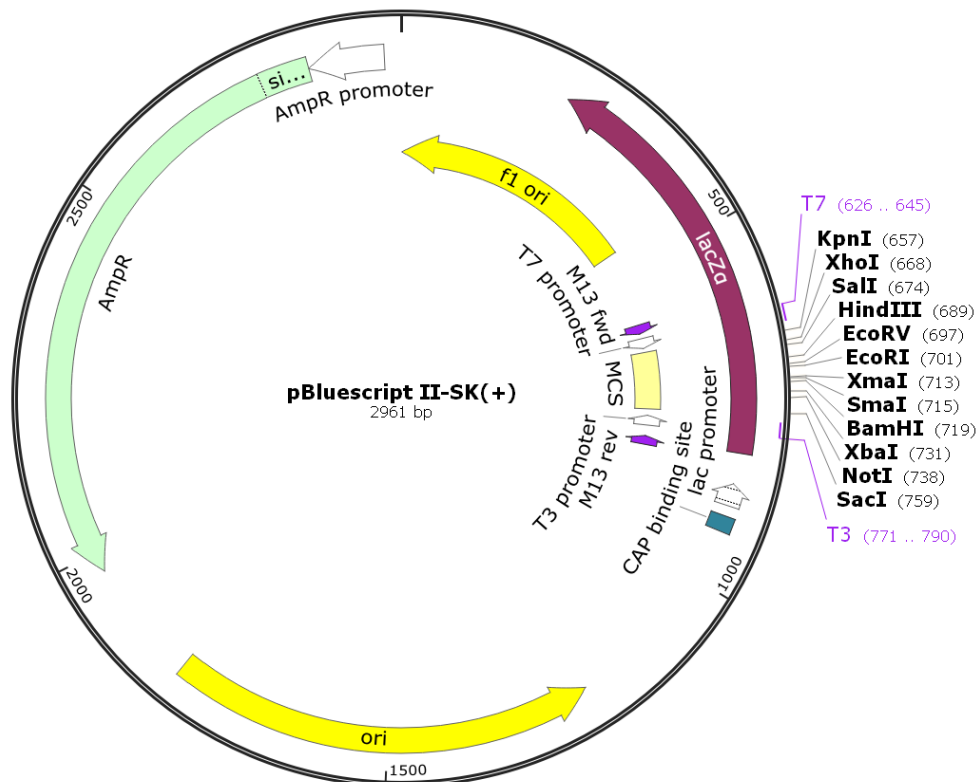
3. Μία άλλη ιδιότητα είναι να περιέχουν μία αφετηρία αντιγραφής (origin ή ori) που διασφαλίζει ότι πολλαπλασιάζονται στο επιθυμητό κύτταρο ξενιστή. Σε ορισμένες περιπτώσεις ένα πλασμίδιο χρησιμοποιείται ως φορέας κλωνοποίησης σε δύο μη σχετιζόμενα κύτταρα ξενιστές. Τέτοιοι διλειειτουργικοί φορείς έχουν δύο αφετηρίες αντιγραφής, μια για κάθε είδος ξενιστή.
4. Επίσης, πρέπει να μπορούν να μεταφέρονται εύκολα στα κύτταρα ξενιστές (μετασηματισμός ή βακτηριακή σύζευξη).

Πρέπει να σημειωθεί ότι πολλοί πλασμιδιακοί φορείς έχουν κάποια επιπλέον δομικά χαρακτηριστικά που αυξάνουν τις δυνατότητες τους. Τέτοια χαρακτηριστικά είναι τα εξής:

- Αλληλουχία πολλαπλής σύνδεσης (polylinker sequence ή polycloning site). Είναι μια μικρή αλληλουχία που περιέχει τις θέσεις τομής για ένα πλήθος νουκλεασών περιορισμού.
- Το γονίδιο *lacZ*, που παράγει β-γαλακτοσιδάση. Το γονίδιο αυτό επιτρέπει την επιλογή των βακτηρίων που περιέχουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια ως εξής: η πολλαπλή αλληλουχία περιέχεται στο *lacZ* με αποτέλεσμα όταν εισάγεται το ξένο DNA στο πλασμίδιο να διακόπτεται η αλληλουχία του *lacZ* και να μην μπορεί να σχηματιστεί β-γαλακτοσιδάση. Αν ληφθεί υπόψη ότι η β-γαλακτοσιδάση καταλύει την μετατροπή της άχρωμης ουσίας X-gal σε μπλε ίζημα, τότε είναι προφανές ότι κατά την καλλιέργεια βακτηρίων σε τρυβλία παρουσία X-gal οι αποικίες που περιέχουν άθικτα πλασμίδια θα χρωματιστούν μπλε, ενώ οι αποικίες που περιέχουν πλασμίδια με ξένο DNA θα είναι άχρωμες.
- Δομικά χαρακτηριστικά που επιτρέπουν την έκφραση του κλωνοποιημένου DNA (π.χ. προαγωγέας). Φορείς που περιέχουν τέτοια χαρακτηριστικά ονομάζονται φορείς έκφρασης.

Στην παρούσα εργασία ως φορέας κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκε ο pBlueScript II SK (+). Τα pBlueScript II είναι πλασμίδια που προέρχονται από φάγο και αποτελούν φορείς κλωνοποίησης που έχουν σχεδιαστεί για να απλοποιούν κοινές διαδικασίες όπως η κλωνοποίηση και η αλληλούχιση. Επίσης, διαθέτουν έναν πολυσυνδέτη (polylinker) με 21 μοναδικές θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων. Τον πολυσυνδέτη πλαισιώνουν οι T7 και T3 προαγωγείς της RNA πολυμεράσης, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την σύνθεση RNA *in vitro*. Η επιλογή του προαγωγέα καθορίζει ποιος κλώνος του ενθέματος στον πολυσυνδέτη θα μεταγραφεί.

Οι αλληλουχίες του πολυσυνδέτη και των προαγωγέων T7 και T3 της RNA πολυμεράσης βρίσκονται στο N-τελικό άκρο του γονιδίου *lacZ*. Ένα σύνολο 131 αμινοξέων της αλληλουχίας που κωδικοποιεί το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης διακόπτεται από τον πολυσυνδέτη με σκοπό την παραγωγή λευκών αποικιών αντί για μπλε όταν παρεμβάλλεται κάποια πρόσθετη αλληλουχία μέσα στο γονίδιο *lacZ*. (States, n.d.)



Εικόνα 2.5.13.α: Ο pBlueScript II SK (+) πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης που περιέχει σημείο για την αρχή της αντιγραφής του DNA (*ori*), το γονίδιο (*AmpR*) που προσφέρει αντίσταση κατά του αντιβιοτικού αμικικιλίνη, το γονίδιο *lacZ* που κωδικοποιεί την β-γαλακτοσιδάση και δύο προαγωγείς που επιτρέπει την έκφραση αυτού του γονιδίου. Μέσα στο γονίδιο *lacZ* βρίσκεται η πολλαπλή αλληλουχία που περιέχει τις θέσεις τομής για πολλές περιοριστικές ενδονουκλεάσες.

Πειραματική πορεία

Η κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία αποτελείται από τα εξής στάδια:

- **Στάδιο 1^ο:** Γίνεται απομόνωση, καθαρισμός και πέψη του πλασμιδιακού φορέα και του DNA το οποίο πρόκειται να κλωνοποιηθεί με την κατάλληλη ή τις κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Αναλυτικότερα:

Έγινε απομόνωση βακτηριακού DNA (2.5.4, 2.5.5, 2.5.6) και ενίσχυση του επιθυμητού γονιδίου με τη μέθοδο PCR (2.5.8).

Ηλεκτροφόρηση του δείγματος σε πηκτή αγαρόζης 1% (2.5.10) και απομόνωση του ενισχυμένου γονιδίου από το πήγμα αγαρόζης (2.5.11).

Ανάπτυξη του πλασμιδιακού φορέα pBlueScript II SK (+) σε θρεπτικό υλικό Luria Broth, εμβολιασμένο με αμικικιλίνη, στους 37°C υπό ανάδευση για περίπου 16 ώρες και απομόνωση του πλασμιδιακού DNA (2.5.9, 2.5.9.1, 2.5.9.2).

Πέψη του κυκλικού φορέα με περιοριστική ενδονουκλεάση *SmaI* (η τυπική σύσταση φαίνεται στον πίνακα 2.5.13.α) για την ευθυγράμμιση του (2.5.12, 2.5.12.1).

Πίνακας 2.5.13.α: Τυπική σύσταση πέψης με περιοριστική ενδονουκλεάση.

Αντιδραστήριο	Όγκος
Κυκλικός πλασμιδιακός φορέας <i>pBlue Script II SK (+)</i> (όπως απομονώθηκε από το kit)	15 μ l
10 \times Ρυθμιστικό διάλυμα	2.5 μ l
BSA	2.5 μ l
Περιοριστική ενδονουκλεάση <i>SmaI</i>	2 μ l
ddH ₂ O	3 μ l
Συνολικός όγκος	25 μl

Ακολουθεί επώαση για περίπου 3-3.5 ώρες στη θερμοκρασία που δρα η περιοριστική ενδονουκλεάση, σε αυτή την περίπτωση 30 °C.

Ηλεκτροφόρηση του δείγματος σε πηκτή αгарόζης 1% και απομόνωση του DNA του ευθύγραμμου φορέα (2.5.10, 2.5.11).

- **Στάδιο 2°:** Ακολουθεί το στάδιο σύνδεσης (ligation) των δύο ευθύγραμμων μορίων με την επίδραση της λιγάσης, ενός ενζύμου που καταλύει το σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού ανάμεσα στα 5' και 3' φωσφορικά άκρα του τμήματος στόχου και του φορέα. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Μέτρηση της συγκέντρωσης σε ng/ μ l του φορέα και του ευθύγραμμου τμήματος DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί με τη βοήθεια του Nanodrop.

Η τυπική σύσταση της αντίδρασης της λιγάσης, η οποία πραγματοποιείται σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάκι είναι:

Πίνακας 2.5.13.β: Τυπική σύσταση αντίδρασης λιγάσης.

Αντιδραστήριο	Όγκος
Ευθύγραμμος πλασμιδιακός φορέας	6-8 μ l (0.2 μ g)
Ευθύγραμμο DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί	6-8 μ l (0.8 μ g)
10 \times ρυθμιστικό διάλυμα λιγάσης	2 μ l
T ₄ DNA λιγάση (10 U/ μ l)	1-2 μ l
ddH ₂ O	Απαιτούμενος όγκος για να φτάσει τα 20 μ l
Συνολικός όγκος	20 μl

Το μίγμα τοποθετείται στους 16°C για την περίπτωση κολλωδών άκρων ή στους 25°C για την περίπτωση απότομων άκρων για τη διάρκεια τουλάχιστον 18 ωρών.

- **Στάδιο 3°:** Σε αυτό το στάδιο γίνεται η επιλογή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Στην παρούσα εργασία η επιλογή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων έγινε με την

ανίχνευση της δραστικότητας του ενζύμου β-γαλακτοσιδάση απουσία του οποίου οι μετασυζευγμένες αποικίες παραμένουν λευκές. Πιο συγκεκριμένα:

Ετοιμάζεται στερεό θρεπτικό μέσο και το κατάλληλο αντιβιοτικό (αμπικιλίνη).

Επίστρωση σε όλη την επιφάνεια του στερεού θρεπτικού υλικού με 40 μl διαλύματος X-gal.

Τοποθέτηση των τρυβλίων στους 37°C για μία ώρα ώστε να απορροφηθούν πλήρως τα υγρά από την επιφάνεια του άγαρ.

Ακολουθεί μετασχηματισμός κυττάρων του βακτηρίου *E. coli* με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια (2.5.12.2) και εμβολιασμός τους στα τρυβλία με το θρεπτικό μέσο επιλογής από κατάλληλη αραίωση ώστε να προκύψουν 150-200 αποικίες ανά τρυβλίο.

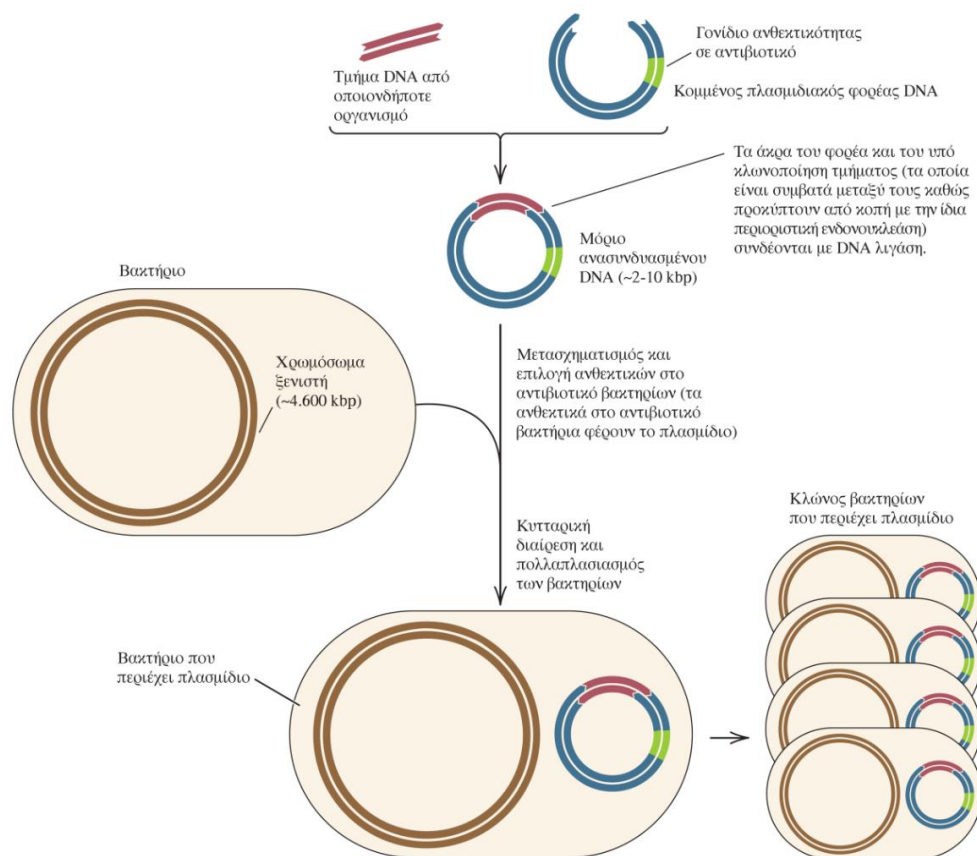
Τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C για μία νύχτα.

Την επόμενη τα τρυβλία μεταφέρονται στους 4°C για 3-4 ώρες, ώστε να γίνει πιο έντονο το μπλε χρώμα των μη ανασυνδυασμένων αποικιών.

Γίνεται επιλογή λευκών αποικιών, οι οποίες περιέχουν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια και ελέγχονται με απομόνωση και περαιτέρω ανάλυση του περιέχοντος πλασμιδιακού DNA.

Διαλύματα

X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside): 20 mg/ml σε διμέθυλοφορμαμίδιο. (φυλάσσεται σε σκοτεινά φιαλίδια στους -20°C).



Εικόνα 2.5.13.β: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της κλωνοποίησης ενός γονιδίου σε πλασμιδιακό φορέα.

2.5.14 SDS-PAGE ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (LAEMMLI, 1970)

Αρχή μεθόδου

Όπως έχει ήδη αναφερθεί και στο κομμάτι της ηλεκτροφόρησης, είναι μία τεχνική που βασίζεται στην κίνηση των φορτισμένων μορίων όταν αυτά βρεθούν μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο και προσφέρει έναν αναλυτικό τρόπο διαχωρισμού πρωτεϊνών και άλλων μακρομορίων όπως το DNA και το RNA. Στην περίπτωση των πρωτεϊνών αυτές οι αναλυτικές ηλεκτροφορήσεις πραγματοποιούνται σχεδόν πάντα σε πήγμα και πιο συγκεκριμένα πολυακρυλαμιδίου και όχι σε διάλυμα, γιατί το πήγμα λειτουργεί σαν μοριακός ηθμός καθιστώντας ευκολότερους τους μοριακούς διαχωρισμούς.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται κάτω από συνθήκες οι οποίες διασφαλίζουν αφενός την αποδιάταξη των πρωτεϊνών στις αντίστοιχες πολυπεπτιδικές τους υπομονάδες και αφετέρου το μη σχηματισμό συσσωματωμάτων. Πριν γίνει η φόρτωση των πρωτεϊνών στο πήγμα, πρέπει να αποδιαταχθούν, πράγμα που συμβαίνει συνήθως με τη βοήθεια του ισχυρά ανιονικού απορρυπαντικού δωδεκακυλοθειικού νατρίου (SDS) σε συνδυασμό με έναν αναγωγικό παράγοντα και αύξηση της θερμοκρασίας. Επίσης, με την προσθήκη β-μερκαπτοαιθανόλης στα δείγματα διασφαλίζεται ο μη σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών. Τα μετουσιωμένα πολυπεπτίδια προσδένονται με το SDS και έτσι φορτίζονται αρνητικά. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες σε αναλογία ένα μόριο ανά δύο αμινοξέα, δίνοντας στο σύμπλοκο ισχυρό φορτίο, ανάλογο της μάζας της πρωτεΐνης. Έτσι οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα μέσα στο πήγμα ενώ οι μεγάλες μένουν κοντά στο σημείο εκκίνησης. Η εκτίμηση του μοριακού βάρους των πολυπεπτιδικών αλυσίδων γίνεται με τη χρήση ειδικών μαρτύρων γνωστού μοριακού βάρους. Μετατροπές όμως του πολυπεπτιδικού σκελετού, όπως N- ή O- γλυκοζυλιώσεις έχουν μια σημαντική επίδραση στο μοριακό βάρος του πολυπεπτιδίου και πιθανών το μοριακό βάρος που υπολογίζεται να μην ανταποκρίνεται στην πραγματική μάζα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

Στις περισσότερες των περιπτώσεων, η SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ένα διακοπτόμενο σύστημα ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο, το ρυθμιστικό διάλυμα στη δεξαμενή έχει διαφορετικό pH και ιονική ισχύ από αυτό που χρησιμοποιείται για να παρασκευαστεί το πήγμα. Τα συμπλέγματα SDS-πολυπεπτιδίου μετακινούνται προς την κάθοδο της κατακόρυφης συσκευής όταν περάσει συνεχές ηλεκτρικό ρεύμα από τα ηλεκτρόδια. Όταν περάσουν πια μέσω του πήγματος επιστοιβάξης, το οποίο είναι αρκετά πορώδες, τα συμπλέγματα κατακάθονται σε μια πολύ λεπτή ζώνη στην επιφάνεια του πήγματος διαχωρισμού.

Τα ιόντα χλωρίου στο ρυθμιστικό διάλυμα του δείγματος και στο πήγμα επιστοιβάξης σχηματίζουν ένα προπορευόμενο άκρο του κινούμενου οροθετικού δείκτη ενώ το ρυμουλκούμενο άκρο αποτελείται από μόρια γλυκίνης. Μεταξύ του προπορευόμενου και του ρυμουλκούμενου άκρου του κινούμενου οροθετικού δείκτη υπάρχει μια ζώνη χαμηλής αγωγιμότητας η οποία εναποθέτει τελικά τα πολυπεπτίδια στην επιφάνεια του πήγματος διαχωρισμού. Εκεί το υψηλότερο pH του πήγματος ευνοεί τον ιονισμό της γλυκίνης και τα ιόντα γλυκίνης που προκύπτουν μεταναστεύουν στο πήγμα διαχωρισμού και διαχωρίζονται σύμφωνα με το μέγεθός τους.

Ο σχηματισμός του πηκτώματος γίνεται με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμίδης και bis-ακρυλαμιδίου, σε θερμοκρασία δωματίου με τη βοήθεια δύο πολυμεριστικών παραγόντων: του υπερθειικού αμμωνίου (ammonium persulfate, APS) και του TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο1,2-διαμινο-αιθάνιο), το οποίο καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών από το APS. Γενικά πηκτώματα με μικρή συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης έχουν μεγαλύτερους πόρους και το αντίστροφο.

Η ηλεκτροφόρηση σε πήγμα με SDS είναι γρήγορη, ευαίσθητη και έχει μεγάλη διαχωριστική (αναλυτική) ικανότητα. Χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πρωτεϊνών όχι μικρότερου μοριακού βάρους από 10 kDa. Μικρές πρωτεΐνες (<10 kDa) είναι δύσκολο να ανιχνευτούν, καθώς αδυνατούν να προσδεθούν στο SDS, πράγμα που μπορεί να επιλυθεί με τη χρήση διαφορετικής σύστασης πήγματος ή διαφορετικών συνθηκών ηλεκτροφόρησης, όπως είναι το Tricine SDS-PAGE.

Διαλύματα-Αντιδραστήρια

1. 1× διάλυμα φόρτωσης: 50mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 0.1% μπλε βρωμοφαινόλης, 10% γλυκερόλη, 5% 2-μερκαπτοαιθανόλη.
2. 10X διάλυμα ηλεκτροφόρησης (1L): 144 g γλυκίνη (250 mM pH 8.3), 20 g Tris base (25 mM), 50 ml SDS 10%.
3. Πίνακας 2.5.14: Σύσταση πηγμάτων SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών.

Πήγμα διαχωρισμού	8%	10%	12%	15%	Πήγμα επιστοίβαξης (5%)
ακρυλαμίδιο:bis (29:1)	2.67 ml	3.33ml	4 ml	5 ml	0.85 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	1.3 ml 0.5 M Tris pH 6.8
dsH₂O	4.75 ml	4.09 ml	3.2 ml	2.2 ml	2.8 ml
10 % SDS	100 μl	100 μl	100 μl	100 μl	50 μl
10 % APS	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	20 μl
TEMED	20 μl	20 μl	20 μl	20 μl	5 μl

Πειραματική πορεία

Η διαδικασία που ακολουθείται για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο SDS-PAGE είναι η ακόλουθη:

Στήνεται κατάλληλα η συσκευή που θα χρησιμοποιηθεί (Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, BIORAD).

Η βάση των δύο πλακών του πήγματος (gel plates) και τα στοιχεία δημιουργίας ενδιάμεσου κενού (spacers) πρέπει να εφάπτονται τέλεια στην κάτω επιφάνεια (βάση) της συσκευής, πριν τεντωθεί ο σφικτήρας. Ημιτελής ή λανθασμένη ευθυγράμμιση θα οδηγήσει σε διαρροή υλικού διαμέσου των θέσεων επαφής, πριν τη στερεοποίηση της γέλης (πηκτή).

Προετοιμασία πήγματος διαχωρισμού επιθυμητής πυκνότητας και πήγματος επιστοιβάξης με βάση τον παραπάνω πίνακα 2.5.14. (προσοχή! Με την προσθήκη APS και TEMED ξεκινάει ο πολυμερισμός, επομένως το ένα από τα δύο προστίθεται πριν την τοποθέτηση του πήγματος στη συσκευή).

Προσθήκη του πήγματος διαχωρισμού στη διάταξη «σάντουιτς» της συσκευής και αναμονή για περίπου 30 λεπτά μέχρι να γίνει ο πολυμερισμός.

Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη του πήγματος επιστοιβάξης και τοποθέτηση των χτενιών για την δημιουργία φρεατίων.

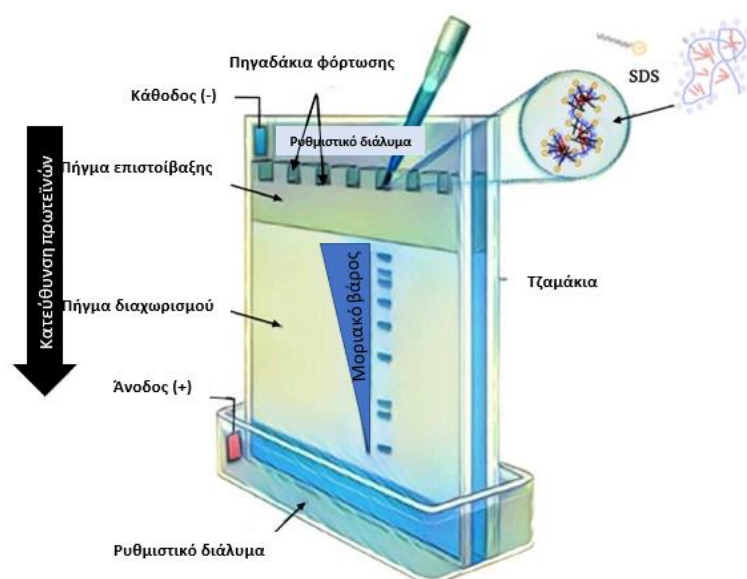
Μετά την πάροδο περίπου 20 λεπτών και αφού έχει γίνει ο πολυμερισμός του πήγματος επιστοιβάξης, αφαιρούνται τα κτένια και η συσκευή τοποθετείται σε ειδική δεξαμενή.

Η δεξαμενή γεμίζεται με 1 L περίπου 1× SDS-PAGE ρυθμιστικό διάλυμα, προσέχοντας η στάθμη του να βρίσκεται 1-2 cm πάνω από τη επιφάνεια των πηγμάτων.

Προετοιμασία των δειγμάτων με επαναιώρηση τους σε διάλυμα 1× ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης και φόρτωσή τους στο πήγμα με τη βοήθεια σύριγγας Hamilton.

Καθαρίζεται επιμελώς η σύριγγα με νερό πριν φορτωθούν τα διαφορετικά δείγματα. Επίσης γίνεται φόρτωση διαλύματος πρότυπου μοριακού βάρους (molecular weight markers) σε ένα ή και στα δύο εξωτερικά φρεάτια της πηκτής.

Η δεξαμενή καλύπτεται και η όλη διάταξη λειτουργεί περίπου στα 120 Volts μέχρις ότου η ζώνη της χρωστικής διατρέξει κατά μήκος του πήγματος.



Εικόνα 2.5.14.α: Σχηματική απεικόνιση της συσκευής ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών SDS-PAGE.

ΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΜΕ ΧΡΩΣΤΙΚΗ COOMASSIE BLUE (SCHÄGGER, 2006)
Αυτή η μέθοδος χρωματισμού είναι απλή, γρήγορη και μπορεί να ανιχνεύσει ακόμη και 0,1 μg πρωτεΐνης (Giulian et al., 1984).

Διαλύματα - Αντιδραστήρια

1. Διάλυμα χρώσης (100 ml): 0.1 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 40 ml ddH₂O, 50 ml μεθανόλη, 10 ml οξικό οξύ.
2. Διάλυμα αποχρωματισμού: 10% μεθανόλη ή αιθανόλη, 10% οξικό οξύ.

Πειραματική πορεία

Το πήγμα μεταφέρεται προσεκτικά σε δοχείο ξεπλένεται με απιονισμένο νερό και βράζει σε φούρνο μικροκυμάτων.

Απόχυση του νερού και προσθήκη μικρής ποσότητας διαλύματος χρώσης ώστε να καλύπτεται όλο το πήγμα.

Παραμονή για 15 λεπτά με ανάδευση στο ενδιάμεσο.

Απόχυση της χρωστικής, έκπλυση του πηγματος με νερό και βράσιμο στο φούρνο μικροκυμάτων.

Απόχυση του νερού, προσθήκη του διαλύματος αποχρωματισμού και παραμονή μέσα σε αυτό μέχρι την επόμενη μέρα.

ΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ ΜΕ ΧΡΩΣΤΙΚΗ ΑΡΓΥΡΟΥ (SILVER STAINING) (SCHÄGGER, 2006)
Αυτή η μέθοδος χρωματισμού μπορεί να ανιχνεύσει ακόμα και 2 ng πρωτεΐνης σε μια μόνο δέσμη (Giulian et al., 1984).

Διαλύματα – Αντιδραστήρια

1. Διάλυμα επιδιόρθωσης (fixing solution): 50% μεθανόλη, 10% οξικό οξύ, 100 mM οξικό αμμώνιο (NH₄CH₃COOH)
2. 0,005% θειοθειικό νάτριο (Na₂S₂O₃)
3. 0,1% νιτρικός άργυρος (AgNO₃)
4. Διάλυμα ανάπτυξης (developer): 0.036% φορμαλδεΰδη, 2% ανθρακικό νάτριο
5. 50 mM EDTA

Πειραματική πορεία

Επώαση του πηγματος στο διάλυμα επιδιόρθωσης, η διάρκεια εξαρτάται από τον τύπο του πηγματος: 15 λεπτά για 0,7 mm 10% πήγμα ακρυλαμιδίου, 30 λεπτά για 0,7 mm 16% πήγμα ακρυλαμιδίου και 60 λεπτά για 1.6 mm 16% πήγμα ακρυλαμιδίου (κάθε επώαση από εκεί και πέρα πρέπει να διαρκεί το ίδιο με την επώαση σε διάλυμα επιδιόρθωσης).

Έκπλυση του πήγματος δύο φορές με απιονισμένο νερό.

Επώαση του πήγματος σε διάλυμα θειοθειικού νατρίου.

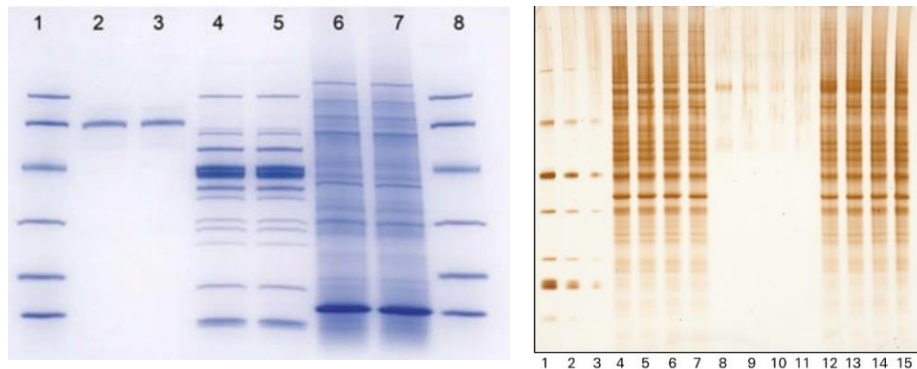
Επώαση του πήγματος σε διάλυμα νιτρικού αργύρου.

Έκπλυση του πήγματος δύο φορές με απιονισμένο νερό.

Επώαση σε διάλυμα ανάπτυξης για 1-2 λεπτά.

Επώαση του πήγματος σε EDTA, αντικαθιστώντας το διάλυμα με νέο μετά την πάροδο 2-5 λεπτών για να μειωθεί η συγκέντρωση της φορμαλδεΐδης το συντομότερο δυνατό.

Έκπλυση του πήγματος δύο φορές με απιονισμένο νερό.



Εικόνες 2.5.14.β: Αριστερά απεικονίζεται ένα πήγμα η χρώση του οποίου έχει γίνει με Coomassie blue και δεξιά απεικονίζεται ένα πήγμα που έχει χρωματιστεί με άργυρο (silver staining).

2.5.15 TRICINE SDS-PAGE(SCHÄGGER, 2006)

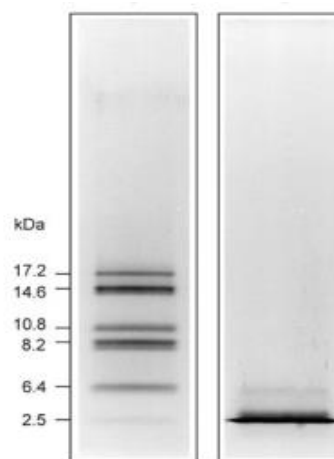
Αρχή μεθόδου

Το Glycine (γλυκίνη) SDS-PAGE, γνωστό και ως Laemmli SDS-PAGE, στο οποίο αναφερθήκαμε και παραπάνω (2.5.14) και το Tricine (τρισίνη) SDS-PAGE, βασίζονται στα συστήματα των ρυθμιστικών διαλυμάτων που δημιουργούνται μεταξύ Glycine-Tris και Tricine-Tris και αποτελούν τις πιο κοινά χρησιμοποιούμενες τεχνικές SDS ηλεκτροφορήσεις για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών. Αυτές οι δύο τεχνικές μαζί καλύπτουν μία κλίμακα μαζών από 1-500 kDa. Το Tricine SDS-PAGE, πιο συγκεκριμένα προτιμάται για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών, μάζας κάτω των 30 kDa. Το χαρακτηριστικό στο οποίο οφείλεται ο διαφορετικός διαχωρισμός μεταξύ των δύο τεχνικών, σχετίζεται με την τιμή pK της λειτουργικής ομάδας της γλυκίνης και της τρισίνης που καθορίζει την ηλεκτροφορητική δυνατότητα αυτών των ιόντων σε συνεργασία με την ηλεκτροφορητική ικανότητα των πρωτεϊνών.

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2.5.15.α, ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών μικρής μάζας του δείγματος με Tricine SDS-PAGE είναι ξεκάθαρος, καθώς δημιουργούνται διαφορετικές μπάντες για τις διαφορετικές μάζες των θραυσμάτων μυογλοβίνης, ενώ με το Glycine SDS-PAGE η επιστοίβαξη είναι μεγάλη και όλες οι πρωτεΐνες εμφανίζονται ενωμένες σε μία έντονη μπάντα.

Επίσης στην τεχνική Tricine SDS-PAGE, πέρα από το πήγμα διαχωρισμού και εισαγωγής των δειγμάτων, υπάρχει ένα ακόμα περίπου 1-1,5 cm μήκος και βοηθάει στον καλύτερο διαχωρισμό.

Εικόνα 2.5.15.α: Απεικονίζεται ο διαφορετικός διαχωρισμός θραυσμάτων μυογλοβίνης σε πήγμα ίδιας σύστασης αριστερά με την τεχνική Tricine SDS-PAGE και δεξιά με την τεχνική Glycine SDS-PAGE (Schägger, 2006).



Αντιδραστήρια-Διαλύματα

1. Διάλυμα φόρτωσης: 0.2 M Tris-HCL pH 6.8, 40% γλυκερόλη, 2% SDS, 0.04% Coomassie blue.
2. Πίνακας 2.5.15.α: Σύσταση διαλυμάτων Tricine SDS-PAGE.

	Ρυθμιστικό διάλυμα ανόδου (10×)	Ρυθμιστικό διάλυμα καθόδου (10×)	Ρυθμιστικό διάλυμα Gel (3×)
Tris (M)	1	1	3
Tricine (M)	-	1	-
HCl (M)	0.225	-	1
SDS (%)	-	1	0.3
pH	8.9	~ 8.25	8.45

3. Σύσταση για 2 πήγματα:

Πίνακας 2.5.15.β: Σύσταση πηγμάτων Tricine SDS-PAGE.

	4% πήγμα εισαγωγής δειγμάτων	10% ενδιάμεσο πήγμα	16% πήγμα διαχωρισμού
Ακρυλαμίδιο:bis (37:1)	0.4 ml	0.6 ml	2.4 ml
Ρυθμιστικό διάλυμα Gel	1 ml	0.5 ml	2 ml
70% γλυκερόλη	-	-	0.8 ml
dsH₂O	2.6 ml	935 μl	686 μl
APS 10%	30 μl	12 μl	30 μl
TEMED	3 μl	1.5 μl	3 μl
Σύνολο	4 ml	2 ml	6 ml

Πειραματική πορεία

Η διαδικασία που ακολουθείται για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο Tricine SDS-PAGE είναι η ακόλουθη:

Στήνεται κατάλληλα η συσκευή που θα χρησιμοποιηθεί (Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, BIORAD).

Η βάση των δύο πλακών του πήγματος (gel plates) και τα στοιχεία δημιουργίας ενδιάμεσου κενού (spacers) πρέπει να εφάπτονται τέλεια στην κάτω επιφάνεια (βάση) της συσκευής, πριν τεντωθεί ο σφικτήρας. Ημιτελής ή λανθασμένη ευθυγράμμιση θα οδηγήσει σε διαρροή υλικού διαμέσου των θέσεων επαφής, πριν τη στερεοποίηση της πηκτής.

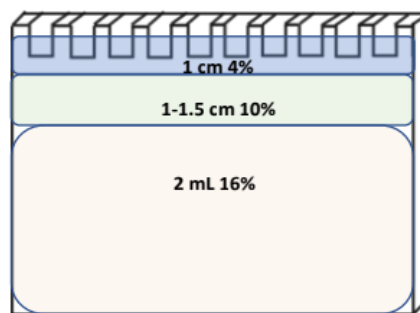
Προετοιμασία πήγματος διαχωρισμού 16%, πήγματος επιστοιβάξης 4% και ενδιάμεσου πήγματος πυκνότητας 10% με βάση τον παραπάνω πίνακα (προσοχή! Με την προσθήκη APS και TEMED ξεκινάει ο πολυμερισμός, επομένως το ένα από τα δύο προστίθεται πριν την τοποθέτηση του πήγματος στη συσκευή).

Προσθήκη του πήγματος διαχωρισμού στη διάταξη «σάντουιτς» της συσκευής και αναμονή για περίπου 30 λεπτά μέχρι να γίνει ο πολυμερισμός.

Προσθήκη του ενδιάμεσου πήγματος 1-1,5 cm και αναμονή για περίπου 20 λεπτά μέχρι να γίνει ο πολυμερισμός.

Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη του πήγματος επιστοιβάξης και τοποθέτηση των χτενιών για την δημιουργία φρεατίων.

Μετά την πάροδο περίπου 20 λεπτών και αφού έχει γίνει ο πολυμερισμός του πήγματος επιστοιβάξης, αφαιρούνται τα χτένια και η συσκευή τοποθετείται σε ειδική δεξαμενή.



Εικόνα 2.5.15.β: Απεικόνιση πηγμάτων Tricine SDS-PAGE.

Η δεξαμενή γεμίζεται κατάλληλα με ρυθμιστικό διάλυμα ανόδου και καθόδου και το ρυθμιστικό διάλυμα καθόδου πρέπει να καλύπτει την επιφάνεια των πηγμάτων.

Προετοιμασία των δειγμάτων με επαναιώρηση τους σε ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης και φόρτωσή τους στο πήγμα με τη βοήθεια σύριγγας Hamilton.

Καθαρίζεται επιμελώς η σύριγγα με νερό πριν φορτωθούν τα διαφορετικά δείγματα. Επίσης γίνεται φόρτωση διαλύματος πρότυπου μοριακού βάρους (molecular weight markers) σε ένα ή και στα δύο εξωτερικά φρεάτια της πηκτής.

Η δεξαμενή καλύπτεται και όλη η διάταξη λειτουργεί στα 30 Volts μέχρι τα δείγματα να περάσουν το πήγμα 4% και στη συνέχεια γίνεται αύξηση στα 50 Volts μέχρις ότου η ζώνη της χρωστικής διατρέξει κατά μήκος του πήγματος.

Η χρώση του πήγματος μπορεί να γίνει και με τους δύο τρόπους που αναφέρθηκαν παραπάνω.

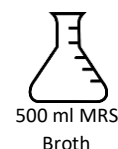
2.5.16 ΜΕΡΙΚΩΣ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΗΣ ΑΠΟ LAB (GOYAL ET AL., 2018) (ΕΛΑΦΡΩΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟ)

Διαλύματα-Αντιδραστήρια

1. Θρεπτικό υλικό MRS Broth
2. 1N NaOH
3. Θεικό αμμώνιο (σε σκόνη)
4. Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων, PBS (Phosphate Buffered Saline): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4 και φιλτράρισμα ή αποστείρωση (διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου)

Πειραματική πορεία

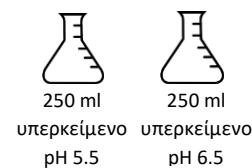
Εμβολιασμός από υγρή προκαλλιέργειας μικροοργανισμού (1% v/v) σε 500 ml MRS Broth και ανάπτυξη στην βέλτιστη θερμοκρασία αυτού έως ότου φτάσει στην αρχή της στατικής του φάσης.



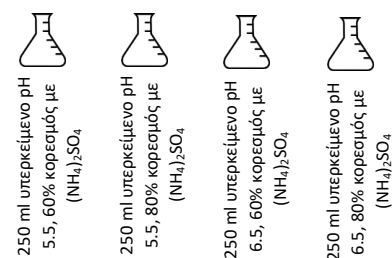
Φυγοκέντρηση 20.000 g/ 4°C / 15 λεπτά.

Το υπερκείμενο συλλέγεται προσεκτικά σε καθαρή κωνική φιάλη και φιλτράρεται σε χωνί Buchner υπό κενό με φίλτρο 0.45 μm.

Το υπερκείμενο χωρίζεται στη μέση και ακολουθεί ρύθμιση του pH στο 5.5 και 6.5 αντίστοιχα με 1 N NaOH.



Η παραπάνω ποσότητα υπερκείμενου για κάθε τιμή pH χωρίζεται σε ίσες ποσότητες και γίνεται εφαρμογή δύο διαφορετικών κορεσμών με θεικό αμμώνιο, 60 κα 80% με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας.



Ανάδευση μέχρι την επόμενη μέρα στους 4°C.

Φυγοκέντρηση 20.000 g/ 4°C / 45 λεπτά.

Επαναίωση της κάθε συνθήκης σε όσο δυνατόν λιγότερο όγκο PBS, το οποίο είναι ρυθμισμένο σε pH 5.5 ή 6.5 αντίστοιχα.

Αποθήκευση στους -20°C.

2.5.17 ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΕΝΑΝΤΙ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

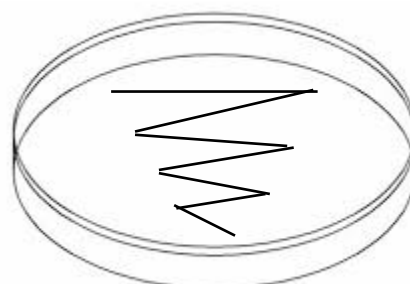
Διαλύματα-Αντιδραστήρια

1. Θρεπτικό υλικό MRS Broth και Agar
2. Βέλτιστο θρεπτικό υλικό ανάπτυξης του στελέχους δείκτη Broth και Agar

Πειραματική πορεία

Σε 5 ml θρεπτικό υλικό MRS Broth εμβολιάζεται μονή αποικία από τρυβλίο, του επιλεγμένου στελέχους και αφήνεται μέχρι την επόμενη μέρα να αναπτυχθεί στη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

Σε τρυβλίο με 20 ml MRS Agar επιστρώνεται με τη βοήθεια λούπας, η οποία πρώτα έχει αποστειρωθεί, μικρή ποσότητα της προκαλλιέργειας του στελέχους σε σχήμα «ζικ-ζακ» (με φθίνουσα συγκέντρωση) (Εικόνα 2.5.17).



Εικόνα 2.5.17: Απεικόνιση επίστρωσης καλλιέργειας σε σχήμα «ζικ-ζακ».

Τα τρυβλία επωάζονται για τρεις μέρες στη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

Σε 5 ml υγρού βέλτιστου θρεπτικού μέσου ανάπτυξης του στελέχους δείκτη εμβολιάζεται μονή αποικία από τρυβλίο και αφήνεται μέχρι την επόμενη μέρα να αναπτυχθεί στη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

Επιστρώνεται δεύτερη στρώση 20 ml στερεού βέλτιστου θρεπτικού μέσου ανάπτυξης του στελέχους δείκτη, εμβολιασμένο 0,2 % v/v της προκαλλιέργειας αυτού, στο ήδη υπάρχον που περιέχει το επιλεγμένο στέλεχος.

Αφού σταθεροποιηθεί το θρεπτικό υλικό της δεύτερης στρώσης τα τρυβλία επωάζονται στην βέλτιστη για το επιλεγμένο στέλεχος θερμοκρασία για όσες μέρες χρειαστεί και έπειτα παρατηρούνται.

- **Spot on lawn Method:** Ελαφρώς τροποποιημένη η παραπάνω μέθοδος αντί για το σχήμα «ζικ-ζακ», αφήνονται σταγόνες του επιλεγμένου στελέχους σε τρυβλίο MRS Agar, επωάζεται για μια μέρα στην βέλτιστη θερμοκρασία, επιστρώνεται με δεύτερη στρώση στερεού βέλτιστου θρεπτικού μέσου ανάπτυξης του στελέχους δείκτη, εμβολιασμένο 0,1 % v/v προκαλλιέργειας αυτού και αφού σταθεροποιηθεί επωάζεται μέχρι την επόμενη μέρα και παρατηρείται.

2.5.18 ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΚΡΙΣΙΜΗΣ ΑΡΑΙΩΣΗΣ (CRITICAL DILLUTION) (ARBITRARY UNITS ANA ML Η AU/ ML) (BAREFOOT & ΚΛΑΕΝΗΑΜΜΕΡ, 1983; BATDORJ ET AL., 2006; YAMAMOTO ET AL., 2003)

Διαλύματα-Αντιδραστήρια

1. 0.1 N NaOH
2. Τρυβλίο Luria soft Agar

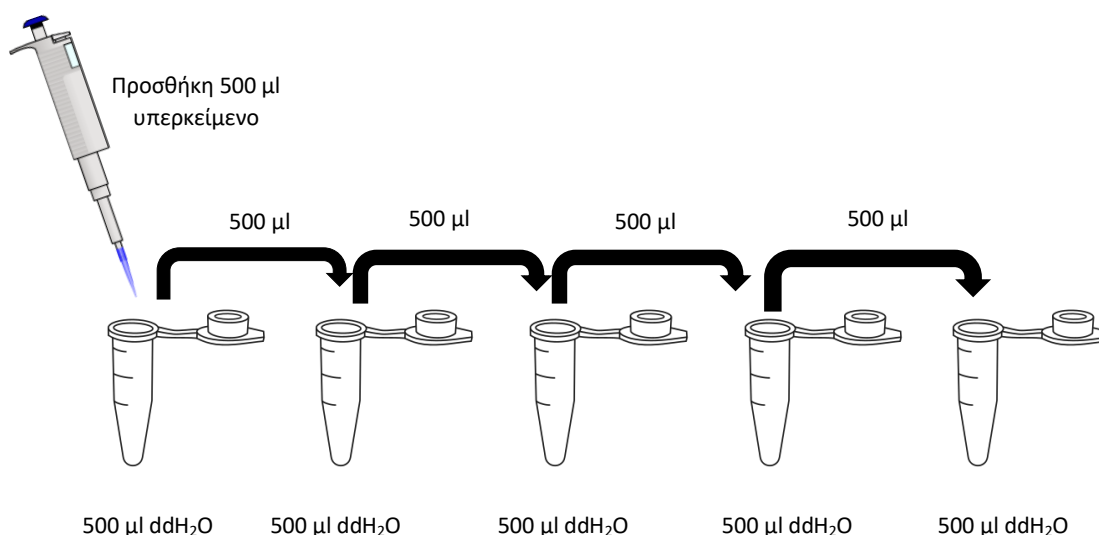
Πειραματική πορεία

Από προκαλλιέργεια του επιλεγμένου στελέχους απομονώνεται το υπερκείμενο με φυγοκέντρηση 6000 g/ 20 λεπτά/ 4°C.

Ρυθμίζεται το pH του υπερκειμένου στο 6.5 με 0.1 N NaOH.

Φιλτράρεται σε φίλτρο πόρων διαμέτρου 0.22 μm.

Ακολουθούν διαδοχικές δυαδικές αραιώσεις με ddH₂O.



Εικόνα 2.5.18: Σχηματική απεικόνιση των δυαδικών αραιώσεων.

Στην επιφάνεια τρυβλίων Luria soft Agar εμβολιασμένων με 0,1 % v/v προκαλλιέργεια επιλεγμένου στελέχους δείκτη αφήνονται σταγόνες (20 μl) των δυαδικών αραιώσεων υπερκειμένου που έγιναν.

Τα τρυβλία αφού διατηρηθούν πρώτα για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και για 1 ώρα στους 4°C, επωάζονται στους 30°C μέχρι την επόμενη μέρα.

Παρατηρούνται τα τρυβλία μέχρι ποια δυαδική αραιώση αναστέλλουν την ανάπτυξη του στελέχους δείκτη.

Τα Au/ml υπολογίζονται με βάση τον τύπο: $2^n \times 1000 \mu\text{l} / 20 \mu\text{l}$, όπου n είναι η ανώτερη αραιώση που εμφανίζει ακόμη δράση το υπερκείμενο.

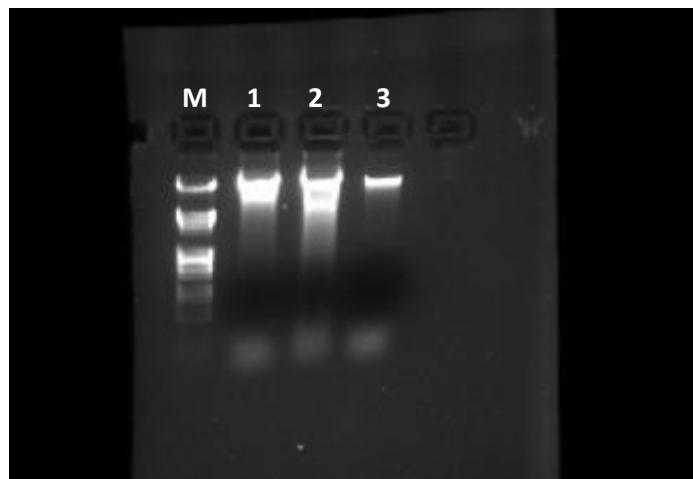
3^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΣ ΜΕΛΕΤΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 3 στελέχη LAB εκ των οποίων τα δύο υπήρχαν στην τράπεζα στελεχών του εργαστηρίου μας και ήταν μερικώς χαρακτηρισμένα βιοχημικά (*Lactobacillus plantarum* 208, *Leuconostoc mesenteroides* 105), ενώ το τρίτο στέλεχος απομονώθηκε πρόσφατα από μούστο (am SF03, Vandera et al. unpublished).

3.1.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA

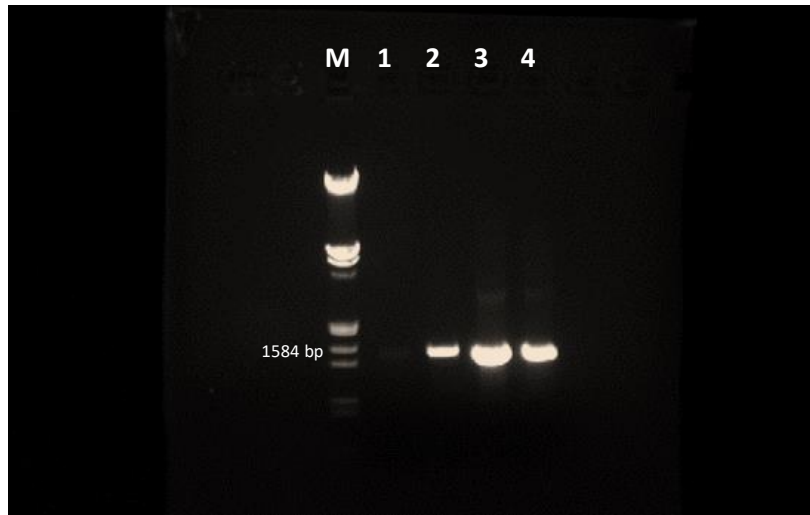
Για τη μοριακή ταυτοποίηση των ανωτέρω στελεχών, πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενωμικού DNA από κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε MRS Broth. Έγινε προσπάθεια απομόνωσης του γενωμικού υλικού τους με την μέθοδο CTAB (2.5.4), με τη μέθοδο απομόνωσης γενωμικού DNA από λακτοβάκιλλους με παχύ κυτταρικό τοίχωμα (2.5.5) και με την αυτοματοποιημένη μέθοδο (kit) Keygreen της ANACHEM (2.5.6). Η αυτοματοποιημένη μέθοδο (kit) Keygreen της ANACHEM (2.5.6) έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα, ενώ με τις άλλες δύο μεθόδους δεν ήταν ικανοποιητική η απομόνωση του DNA, τόσο σε ποσότητα όσο και σε ποιότητα. Στη συνέχεια, έγινε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης για την επιβεβαίωση του αποτελέσματος. Τα δείγματα αυτά απομονώθηκαν με σκοπό μελέτη γονιδίων με PCR.



Εικόνα 3.1.1: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης του γενωμικού DNA των στελεχών που απομονώθηκαν με την αυτοματοποιημένη μέθοδο kit. M: μάρτυρας λDNA-*Hind*III (μέγεθος από πάνω προς κάτω σε bp: 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 534), 1: am SF03, 2: *Lactobacillus plantarum* 208, 3: *Leuconostoc mesenteroides* 105.

3.1.2 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 16S rRNA ΤΟΥ *LEUCONOSTOC MESENEROIDES* 105

Με σκοπό τη μοριακή ταυτοποίηση του *Leuconostoc mesenteroides* 105, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA με Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και έγινε ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης του προϊόντος PCR.

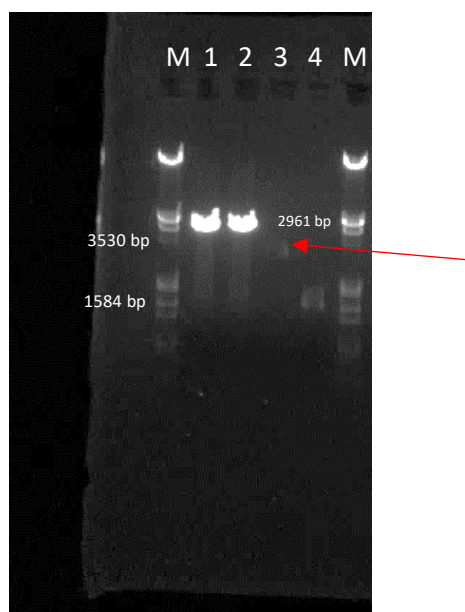


Εικόνα 3.1.2: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης των προϊόντων PCR του 16S rRNA. Μ: μάρτυρας λDNA-*Hind*III (μέγεθος από πάνω προς κάτω σε bp: 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 534), 1: αρνητικός μάρτυρας (ddH₂O), 2: δείγμα με 1:100 αραιώση του γενωμικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο της αντίδρασης PCR, το οποίο απομονώθηκε με τη μέθοδο CTAB, 3: δείγμα με 1:100 αραιώση του γενωμικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο της αντίδρασης PCR, το οποίο απομονώθηκε με την αυτοματοποιημένη μέθοδο kit, 4: δείγμα με 1:10 αραιώση του γενωμικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο της αντίδρασης PCR, το οποίο απομονώθηκε με την αυτοματοποιημένη μέθοδο kit.

3.1.3 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ 16S rRNA ΤΟΥ *L. MESENEROIDES* 105 ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ pBLUESCRIPT II SK (+)

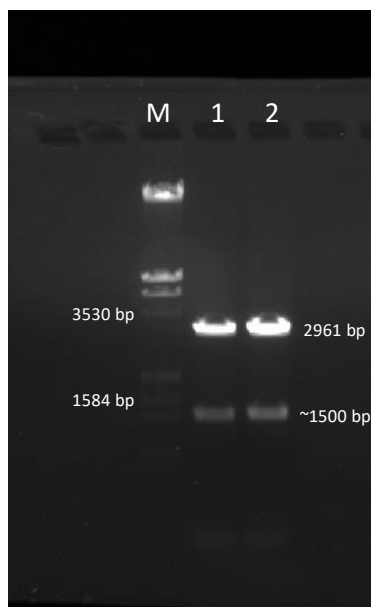
Για να ακολουθήσει η εύρεση της αλληλουχίας του γονιδίου 16S rRNA του *L. mesenteroides* 105 πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του προϊόντος PCR σε πλασμιδιακό φορέα pBlueScript II SK (+), όπως περιγράφεται στη παράγραφο 2.5.13. Το προϊόν PCR ανακτήθηκε από τη πηκτή αγαρόζης, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του DNA (62 ng/μl), συνδέθηκε με τον πλασμιδιακό φορέα pBlueScript II SK (+) συγκέντρωσης 4,9 ng/μl και έγινε μετασχηματισμός κυττάρων *E. coli* DH5a με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pBlueScriptII SK(+)::16SrRNA105. Επιλέχθηκαν 2 αποικίες, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA και ακολούθησαν πέψεις με το περιοριστικό ένζυμο *Eco*RI (Εικόνα 3.1.3.α), οπότε το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από τις 2 αποικίες εμφανίζει μέγεθος περίπου 4500 bp, το οποίο συνάδει με το άθροισμα του μεγέθους του πλασμιδιακού φορέα (2961 bp) συν το μέγεθος του ενθέματος (1584 bp). Ακολούθησαν επιπλέον πέψεις με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες, *Bam*HI και *Eco*RI. Στο πήγμα αγαρόζης ύστερα από ηλεκτροφόρηση ανιχνεύονται δύο ζώνες, όπως αναμένεται, η μία στα 2961 bp που αντιστοιχεί στο μέγεθος

του φορέα και η άλλη κοντά στα 1500 bp που αντιστοιχεί στο μέγεθος του ενθέματος και για τα δυο δείγματα (Εικόνα 3.1.3.β).



Εικόνα 3.1.3.α: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης M: μάρτυρας λDNA-*Hind*III (μέγεθος από πάνω προς κάτω σε bp: 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 534), 1, 2: απομονωμένο πλασμίδιο από τις αποικίες 1 & 2 ύστερα από πέψη με *Eco*RI , 3: πλασμιδιακός φορέας ύστερα από πέψη *Eco*RI , μεγέθους 2961 bp, 4: προϊόν της αντίδρασης ενίσχυσης του γονιδίου 16S rRNA του 105, το οποίο εμφανίζεται περίπου στα 1584 bp.

Στη συνέχεια μετράτε η καθαρότητα του δείγματος και η συγκέντρωσή του (126,2 ng/μl), στο φωτόμετρο Quawell Q3000 W και στέλνεται στην CEMIA (Cellular and Molecular Immunological Applications) για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του.



Εικόνα 3.1.3.β: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης των πέψεων του κλωνοποιημένου πλασμιδιακού φορέα με *Eco*RI και *Bam*HI. M: είναι ο μάρτυρας λDNA-*Hind*III (μέγεθος από πάνω προς κάτω σε bp: 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 534), 1,2: προϊόντα των πέψεων.

3.1.4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ 16S RRNA ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

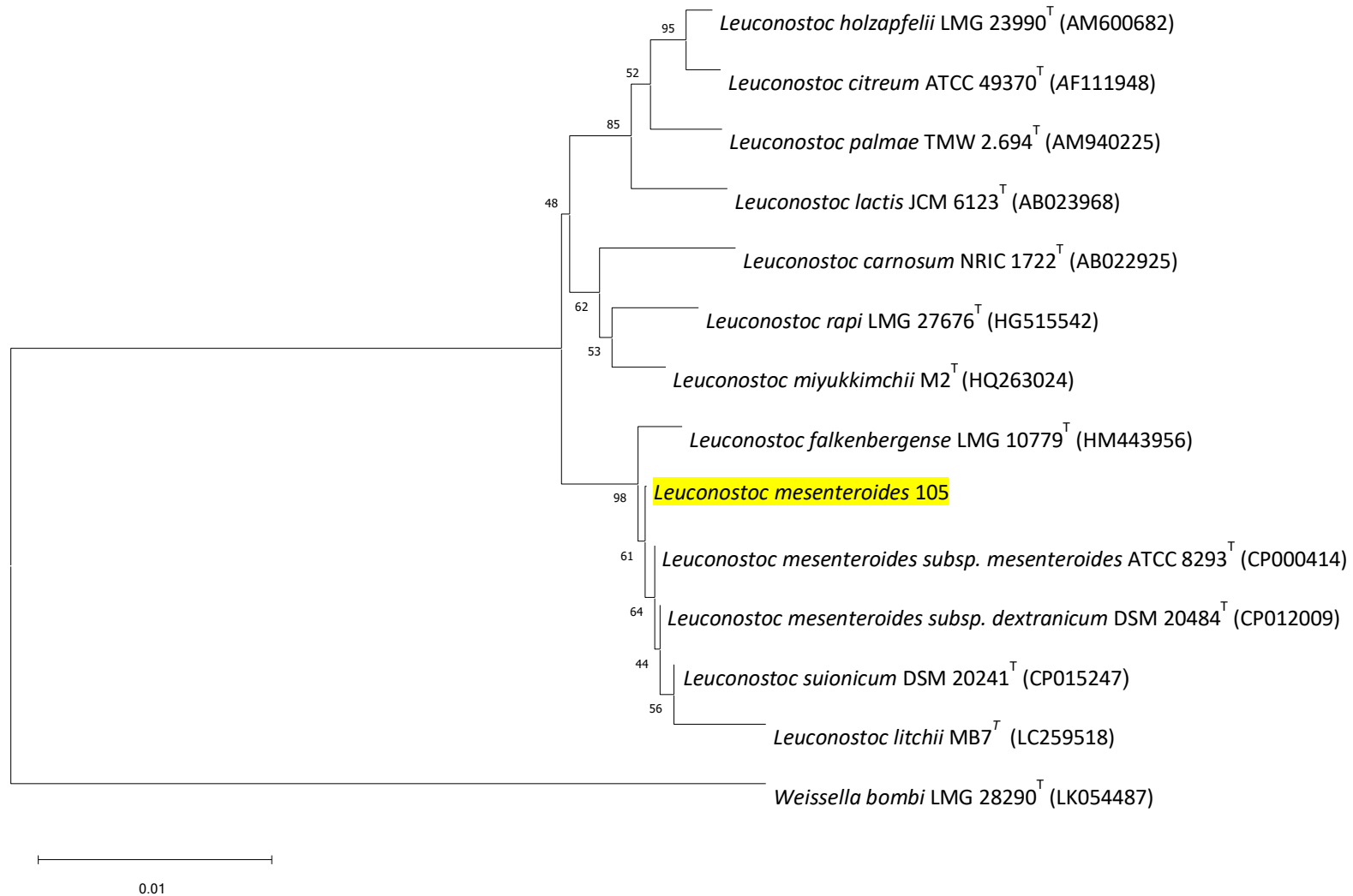
Μετά την ανάλυση των αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα Chromas, προέκυψε η αλληλουχία του 16S rRNA του *Leuconostoc mesenteroides* 105, η οποία υπάρχει στο παράρτημα Α και έχει μέγεθος 1508 bp.

Με ανάλυση της παραπάνω αλληλουχίας στο BLASTN και στο EzBiocloud.net (16S Database) προκύπτουν τα παρακάτω:

Πίνακας 3.1.4: Αποτελέσματα BLASTN και EzBiocloud για το γονίδιο 16S rRNA του στελέχους *Leuconostoc mesenteroides* 105.

Μικροοργανισμός	% Ταυτότητα	Αριθμός κατάθεσης σε διεθνή βάση δεδομένων (GeneBank accession no.)	Αναφορά
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293(T)	99.7	CP000414	(J. W. Kim et al., 2018)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> DSM 20484(T)	99.7	CP012009	(Chun, Kim, et al., 2017)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>jonggajibkimchii</i> DRC1506(T)	99.6	CP014611	(Jeon et al., 2017)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> ATCC 19254(T)	99.6	ACKV01000113	(Özcan et al., 2019)
<i>Leuconostoc suionicum</i> DSM 20241(T)	99.6	CP015247	(Gu et al., 2012a)
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> NRIC 1777(T)	99.3	AB023237	(Farrow et al., 1989)
<i>Leuconostoc falkenbergense</i> LMG 10779(T)	99.4	HM443956	(Wu & Gu, 2021)
<i>Leuconostoc litchii</i> MB7(T)	98.8	LC259518	(Y. S. Chen et al., 2020)
<i>Leuconostoc miyukkimchii</i> M2(T)	98.5	HQ263024	(Lee et al., 2012)
<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> LMG 18811(T)	98.7	FN822744	(Bjorkroth et al., 2000)

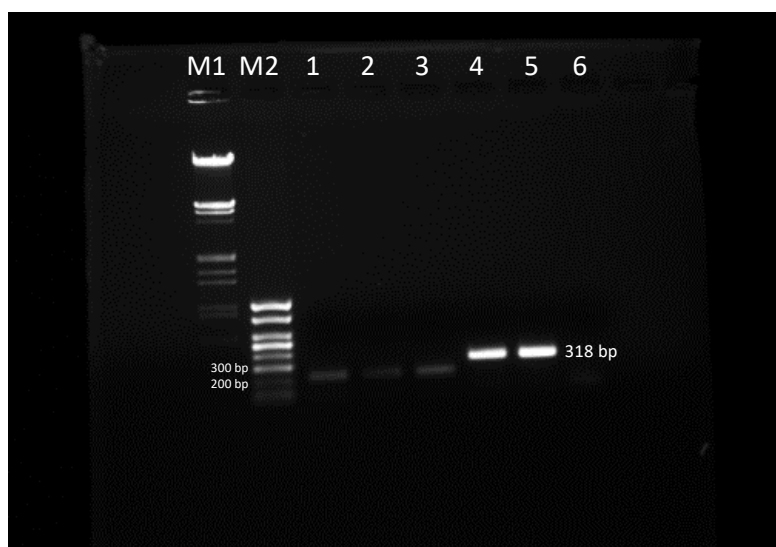
Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση για το γονίδιο 16S rRNA του στελέχους *Leuconostoc mesenteroides* 105. Το φυλογενετικό δέντρο προέκυψε με ανάλυση Neighbor-joining κατόπιν σύγκρισης κατατεθειμένων σε βάσεις δεδομένων στο διαδίκτυο νουκλεοτιδικών αλληλουχιών 16S rRNA στελεχών *Leuconostoc*, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MEGA 11 (Σχήμα 3.1.4) (Tamura et al., 2007).



Σχήμα 3.1.4: : Φυλογενετικό δέντρο για το στέλεχος *Leuconostoc mesenteroides* 105 και άλλων συγγενών στελεχών *Leuconostoc*, με βάση την νουκλεοτιδική αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου. Το στέλεχος *Weissella bombi* χρησιμοποιήθηκε ως outgroup. Οι εξελικτικές σχέσεις προκύπτουν με τη μέθοδο Neighbor-Joining. Το ποσοστό των δέντρων-αντιγράφων στα οποία οι συσχετιζόμενες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες ομαδοποιούνται μεταξύ τους στο τεστ bootstrap (500 επαναλήψεις) φαίνεται σε κάθε κλάδο. Η ανάλυση περιλαμβάνει 14 νουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Η κλίμακα υποδεικνύει τον αριθμό των υποκαταστάσεων ανά νουκλεοτίδιο. Η εξελικτική ανάλυση διεξάχθηκε με το MEGA 11.

3.1.5 MULTIPLEX PCR ΓΙΑ ΤΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* 208 (TORRIANI ET AL., 2001)

Με σκοπό την ταυτοποίηση του είδους του *Lactobacillus* 208 που με το βιοχημικό χαρακτηρισμό έχει προσδιοριστεί ως *plantarum* διενεργήθηκε ένα multiplex PCR για την ενίσχυση του γονιδίου *recA*, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη RecA. Η RecA είναι μια μικρή πρωτεΐνη, η οποία συμβάλει σε πολλές βιοχημικές δραστηριότητες, όπως η πρόσδεση του DNA. Ο ρόλος της είναι πολύ σημαντικός, γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιείται ως φυλογενετικός δείκτης για τον διαχωρισμό συγγενικών ειδών. Η ανίχνευση του συγκεκριμένου γονιδίου μπορεί να καθορίσει αν ο μικροοργανισμός ανήκει στο είδος *L. plantarum*, *L. pentosus* και *L. paraplantarum*. Πιο συγκεκριμένα ανάλογα με το μέγεθος του προϊόντος PCR μετά την ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης, στα 318 bp είναι *L. plantarum*, στα 218 bp είναι *L. pentosus* και στα 107 bp είναι *L. paraplantarum*.



Εικόνα 3.1.5: Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αγαρόζης των δειγμάτων του Multiplex PCR. M1: μάρτυρας λDNA-*Hind*III (μέγεθος από πάνω προς κάτω σε bp: 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 534), M2: μάρτυρας λDNA-*Hind*III μικρότερου μοριακού βάρους (μέγεθος από πάνω προς τα κάτω σε bp: 1000, 800, 600, 500, 400, 300, 200, 100), 1: δείγμα χωρίς αραίωση του γενωμικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο της αντίδρασης PCR, το οποίο απομονώθηκε με την αυτοματοποιημένη μέθοδο kit, 2: δείγμα με αραίωση 1:10 του γενωμικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο της αντίδρασης PCR, το οποίο απομονώθηκε με την αυτοματοποιημένη μέθοδο kit, 3: δείγμα χωρίς αραίωση του γενωμικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο της αντίδρασης PCR, το οποίο απομονώθηκε με την μέθοδο CTAB, 4: θετικός μάρτυρας *L. plantarum* H25, 5: θετικός μάρτυρας *L. plantarum* 211, 6: αρνητικός μάρτυρας το ddH₂O που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση.

Τα δείγματα του *Lactobacillus* 208 βρίσκονται κάτω από το θετικό μάρτυρα και εντοπίζονται περίπου στα 200 bp. Επομένως, το μέγεθος τους είναι κοντά στα 218 bp πράγμα που σημαίνει ότι ανήκουν στο είδος *pentosus*.

3.1.6 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ AM SF03

Το στέλεχος am SF03 απομονώθηκε στο εργαστήριο μας από το μέσο μιας αυθόρμητης ζύμωσης μούστου σταφυλιών ποικιλίας Ντεμπίνα, βάση της *in vitro* αντιμικροβιακής του δράσης έναντι των στελεχών δεικτών *Escherichia coli* ATCC 25922 και *Bacillus subtilis* (Vandera et al. unpublished).

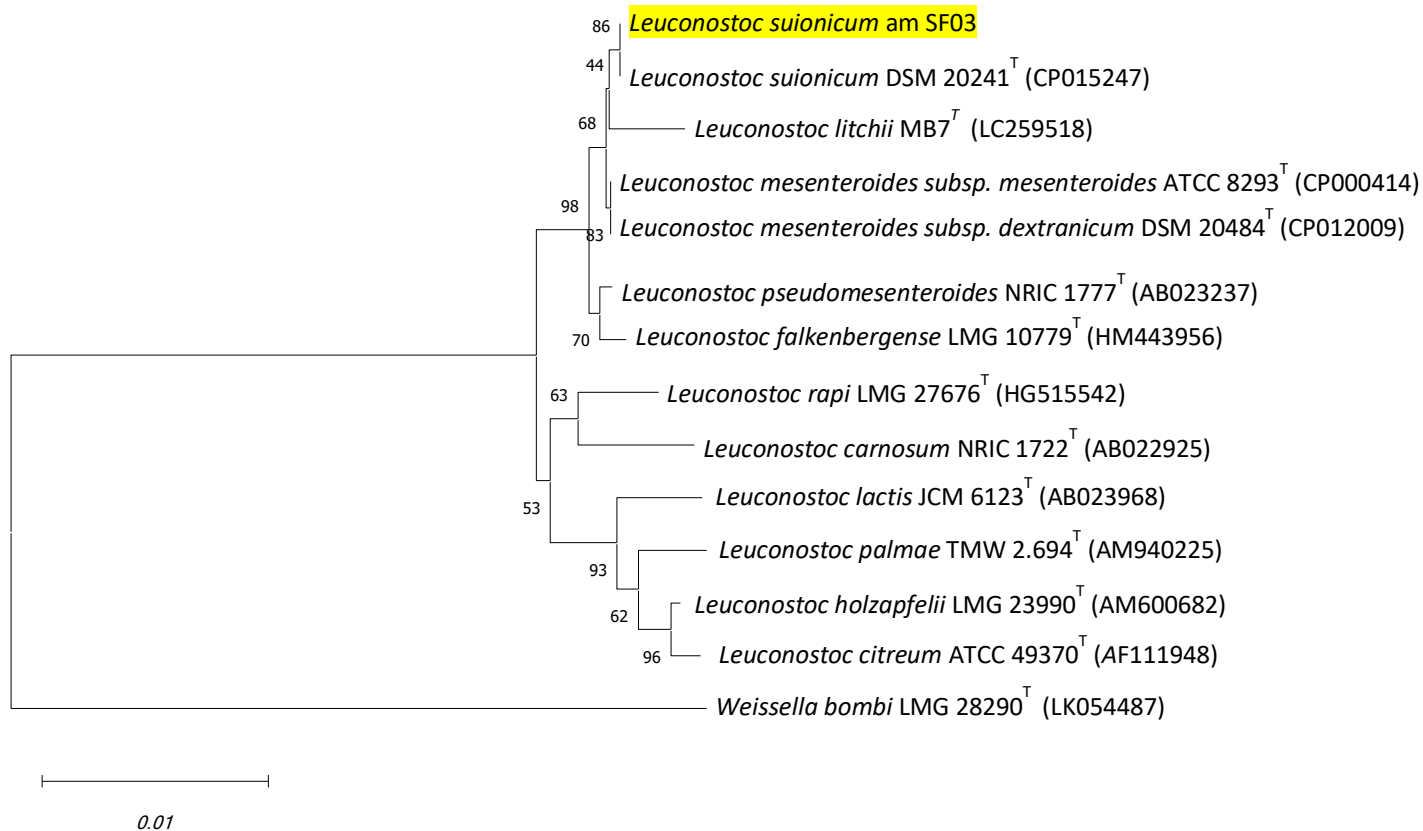
Για τη μοριακή ταυτοποίηση του στελέχους am SF03 πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA με PCR, κλωνοποίηση του σε φορέα pBlueScript II SK (+) και αποστολή για εύρεση της αλληλουχίας του. Η αλληλουχία του γονιδίου 16S rRNA του am SF03 (1543 bp) παρατίθεται στο Παράρτημα Β. Η ανάλυση της αλληλουχίας του πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα βασικά εργαλεία αναζήτησης BLASTN και EzBiocloud.net. Επειδή η βάση δεδομένων EzBiocloud.net εμφανίζει ομολογίες με Type strains μόνο, επιλέχτηκαν αυτά τα δεδομένα (Πίνακας 3.1.6):

Πίνακας 3.1.6: Αποτελέσματα από EzBiocloud για το γονίδιο 16S rRNA του στελέχους am SF03.

Μικροοργανισμός	% Ταυτότητα	Αριθμός κατάθεσης σε διεθνή βάση δεδομένων (GeneBank accession no.)	Αναφορά
<i>Leuconostoc suionicum</i> DSM 20241(T)	100	CP015247	(Gu et al., 2012; Jeon et al. 2017)
<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides</i> ATCC 8293(T)	99.86	CP000414	(J. W. Kim et al., 2018)
<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum</i> DSM 20484(T)	99.86	CP012009	(Chun, Kim, et al., 2017)
<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. jongsajikimchii</i> DRC1506(T)	99.8	CP014611	(Jeon et al., 2017)
<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris</i> ATCC 19254(T)	99.73	ACKV01000113	(Özcan et al., 2019)
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> NRIC 1777(T)	99.45	AB023237	(Farrow et al., 1989)
<i>Leuconostoc falkenbergense</i> LMG 10779(T)	99.37	HM443956	(Wu & Gu, 2021)
<i>Leuconostoc litchii</i> MB7(T)	99.25	LC259518	(Y. S. Chen et al., 2020)
<i>Leuconostoc gelidum subsp. gasicomitatum</i> LMG 18811(T)	98.17	FN822744	(Johansson et al., 2011)
<i>Leuconostoc miyukkimchii</i> M2(T)	98.12	HQ263024	(Lee et al., 2012)

Επομένως με βάση την ταυτότητα του γονιδίου 16S rRNA του στελέχους am SF03 με τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες 16S rRNA των άλλων μικροοργανισμών (Πίνακας 3.1.6), ανήκει στο γένος *Leuconostoc* και το είδος *suionicum*.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση για το γονίδιο 16S rRNA του στελέχους *Leuconostoc suionicum* am SF03. Το φυλογενετικό δέντρο προέκυψε με ανάλυση Neighbor-joining κατόπιν σύγκρισης κατατεθειμένων σε βάσεις δεδομένων στο διαδίκτυο νουκλεοτιδικών αλληλουχιών 16S rRNA στελεχών *Leuconostoc*, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MEGA 11 (Σχήμα 3.1.6) (Tamura et al., 2007).



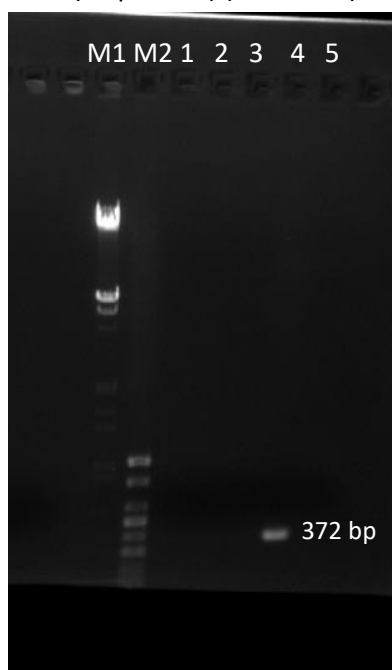
Σχήμα 3.1.6.: Φυλογενετικό δέντρο για το στέλεχος *Leuconostoc suionicum* am SF03 και άλλων συγγενών στελεχών *Leuconostoc*, με βάση την νουκλεοτιδική αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου. Το στέλεχος *Weissella bombi* χρησιμοποιήθηκε ως outgroup. Οι εξελικτικές σχέσεις προκύπτουν με τη μέθοδο Neighbor-Joining. Το ποσοστό των δέντρων-αντιγράφων στα οποία οι συσχετιζόμενες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες ομαδοποιούνται μεταξύ τους στο τεστ bootstrap (500 επαναλήψεις) φαίνεται σε κάθε κλάδο. Η ανάλυση περιλαμβάνει 14 νουκλεοτιδικές αλληλουχίες. Η κλίμακα υποδεικνύει τον αριθμό των υποκαταστάσεων ανά νουκλεοτίδιο. Η εξελικτική ανάλυση διεξήχθη με το MEGA 11.

3.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑΣ

Με σκοπό τον έλεγχο ύπαρξης γονιδίων παθογένειας στους μικροοργανισμούς *Leuconostoc suionicum* am SF03, *Lactobacillus pentosus* 208, *Leuconostoc mesenteroides* 105 έγινε ενίσχυση των συγκεκριμένων γονιδίων που ανιχνεύονται κατά κύριο λόγο σε κλινικά στελέχη εντεροκόκκων με τη χρήση εκκινητών σχεδιασμένων για εντερόκοκκους.

3.2.1 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *gelE*

Το γονίδιο *gelE* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ζελατινάση, το μέγεθος της οποίας είναι 372 bp.

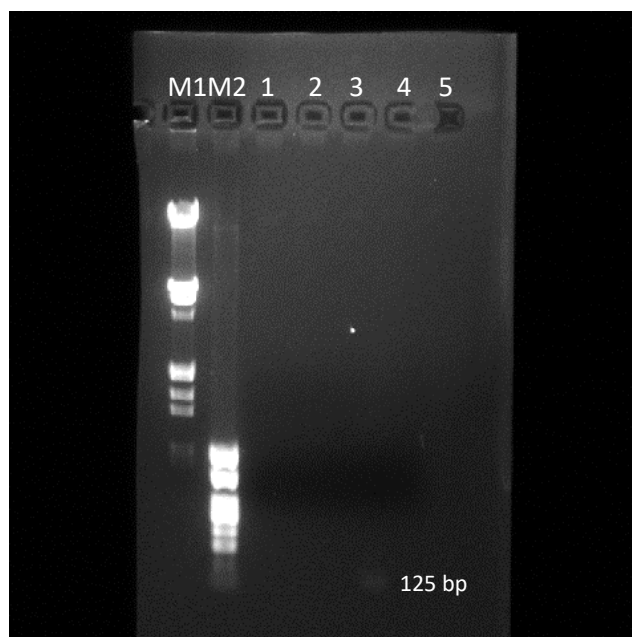


Εικόνα 3.2.1: Ηλεκτροφόρηση πήγματος αгарόζης των δειγμάτων για την ανίχνευση του γονιδίου *gelE*. M1: μάρτυρας λDNA-*Hind*III (μέγεθος από πάνω προς κάτω σε bp: 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 534), M2: μάρτυρας λDNA-*Hind*III μικρότερου μοριακού βάρους (μέγεθος από πάνω προς τα κάτω σε bp: 1000, 800, 600, 500, 400, 300, 200, 100), 1: προϊόν της αντίδρασης για το στέλεχος *L. suionicum* am SF03, 2: προϊόν της αντίδρασης για το στέλεχος *L. pentosus* 208, 3: προϊόν της αντίδρασης για το στέλεχος *L. mesenteroides* 105, 4: θετικός μάρτυρας *E. faecalis* ATCC 29212, 5: αρνητικός μάρτυρας το ddH₂O που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση.

Παρατηρείται ότι κανένας από τους τρεις μικροοργανισμούς δεν διαθέτει το γονίδιο *gelE*.

3.2.2 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *ace*

Το *ace* είναι ένας επικουρικός παράγοντας προσκόλλησης στο κολλαγόνο και το μέγεθος του είναι 125 bp.

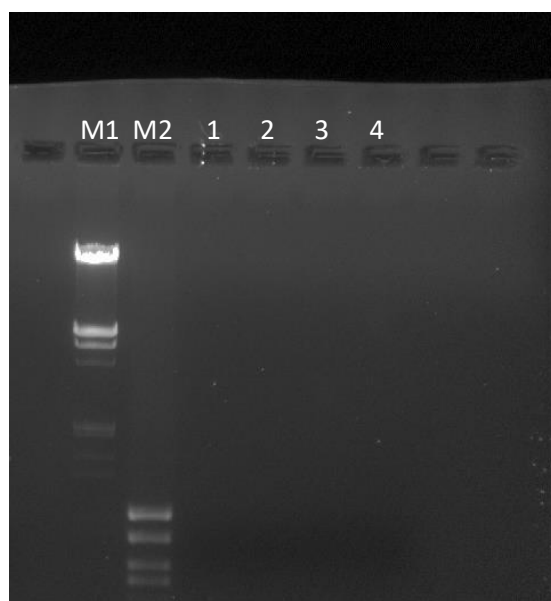


Εικόνα 3.2.2: Ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης των δειγμάτων για την ανίχνευση του γονιδίου *ace*. M1: μάρτυρας λDNA-*Hind*III (μέγεθος από πάνω προς κάτω σε bp: 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 534), M2: μάρτυρας λDNA-*Hind*III μικρότερου μοριακού βάρους (μέγεθος από πάνω προς τα κάτω σε bp: 1000, 800, 600, 500, 400, 300, 200, 100), 1: προϊόν της αντίδρασης για το στέλεχος *L. suionicum* am SF03, 2: προϊόν της αντίδρασης για το στέλεχος *L. pentosus* 208, 3: προϊόν της αντίδρασης για το στέλεχος *L. mesenteroides* 105, 4: θετικός μάρτυρας *E. faecalis* ATCC 29212, 5: αρνητικός μάρτυρας το ddH₂O που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση.

Παρατηρείται ότι κανένας από τους τρεις μικροοργανισμούς δεν διαθέτει το γονίδιο *ace*.

3.2.3 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *HYL*

Το γονίδιο *hyl* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη υαλουρονιδάση, το μέγεθος της οποίας είναι 276 bp.

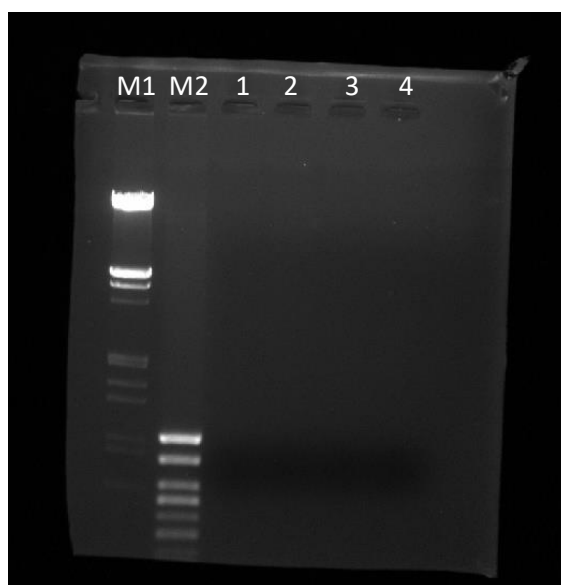


Εικόνα 3.2.3: Ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης των δειγμάτων για την ανίχνευση του γονιδίου *hyl*. M1: μάρτυρας λDNA-*Hind*III (μέγεθος από πάνω προς κάτω σε bp: 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 534), M2: μάρτυρας λDNA-*Hind*III μικρότερου μοριακού βάρους (μέγεθος από πάνω προς τα κάτω σε bp: 1000, 800, 600, 500, 400, 300, 200, 100), 1: προϊόν της αντίδρασης για το στέλεχος *L. suionicum* am SF03, 2: προϊόν της αντίδρασης για το στέλεχος *L. pentosus* 208, 3: προϊόν της αντίδρασης για το στέλεχος *L. mesenteroides* 105, 4: αρνητικός μάρτυρας το ddH₂O που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση.

Παρατηρείται ότι κανένας από τους τρεις μικροοργανισμούς δεν διαθέτει το γονίδιο *hyl*.

3.2.4 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *ESP*A

Το γονίδιο *espA* κωδικοποιεί μία επιφανειακή πρωτεΐνη εντεροκόκκων, το μέγεθος της οποίας είναι 407 bp.

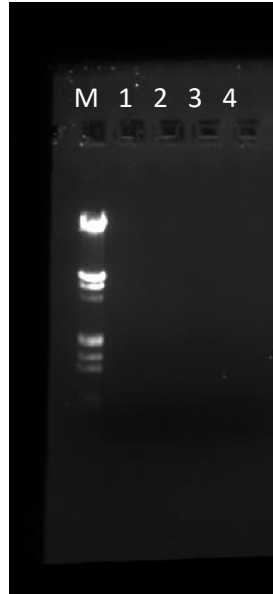


Εικόνα 3.2.4: Ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης των δειγμάτων για την ανίχνευση του γονιδίου *espA*. M1: μάρτυρας λDNA-*Hind*III (μέγεθος από πάνω προς κάτω σε bp: 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 534), M2: μάρτυρας λDNA-*Hind*III μικρότερου μοριακού βάρους (μέγεθος από πάνω προς τα κάτω σε bp: 1000, 800, 600, 500, 400, 300, 200, 100), 1: προϊόν της αντίδρασης για το στέλεχος *L. suionicum* am SF03, 2: προϊόν της αντίδρασης για το στέλεχος *L. pentosus* 208, 3: προϊόν της αντίδρασης για το στέλεχος *L. mesenteroides* 105, 4: αρνητικός μάρτυρας το ddH₂O που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση.

Παρατηρείται ότι κανένας από τους τρεις μικροοργανισμούς δεν διαθέτει το γονίδιο *espA*.

3.2.5 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *IS16*

Το γονίδιο *IS16* είναι ένας δείκτης σε στελέχη *E. faecium*/*E. faecalis* και σχετίζεται με νοσοκομειακές μολύνσεις. Το μέγεθος του είναι 547 bp.



Εικόνα 3.2.5: Ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης των δειγμάτων για την ανίχνευση του γονιδίου *IS16*. M: μάρτυρας λDNA-*Hind*III (μέγεθος από πάνω προς κάτω σε bp: 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 534), 1: προϊόν της αντίδρασης για το στέλεχος *L. suionicum* am SF03, 2: προϊόν της αντίδρασης για το στέλεχος *L. pentosus* 208, 3: προϊόν της αντίδρασης για το στέλεχος *L. mesenteroides* 105, 4: αρνητικός μάρτυρας το ddH₂O που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση.

Παρατηρείται ότι κανένας από τους τρεις μικροοργανισμούς δεν διαθέτει το γονίδιο *IS16*.

3.2.6 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ *agg*

Το γονίδιο *agg* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη συσσωμάτωσης, το μέγεθος της οποίας είναι 1553 bp.



Εικόνα 3.2.6: Ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης των δειγμάτων για την ανίχνευση του γονιδίου *agg*. M: μάρτυρας λDNA-*Hind*III (μέγεθος από πάνω προς κάτω σε bp: 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 534), 1: προϊόν της αντίδρασης για το στέλεχος *L. suionicum* am SF03, 2: προϊόν της αντίδρασης για το στέλεχος *L. pentosus* 208, 3:

προϊόν της αντίδρασης για το στέλεχος *L. mesenteroides* 105, 4: αρνητικός μάρτυρας το ddH₂O που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση.

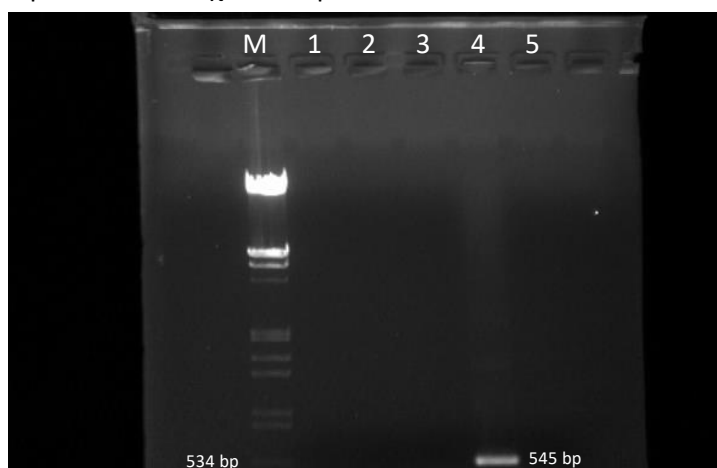
Παρατηρείται ότι κανένας από τους τρεις μικροοργανισμούς δεν διαθέτει το γονίδιο *agg*.

Επομένως δεν ανιχνεύτηκε κανένα από τα παραπάνω γονίδια παθογένειας σε κανέναν από τους τρεις προς μελέτη μικροοργανισμούς.

3.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΝΑΝΤΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ

3.3.1 MULTIPLEX PCR ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΟ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟ ΒΑΝΚΟΜΥΚΙΝΗ

Υπάρχουν δύο γονίδια που ανιχνεύουν την ανθεκτικότητα στη βανκομυκίνη, το *vanA* και το *vanB*. Το γονίδιο *vanA* ανιχνεύει επίσης ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό τεϊκοπλανίνη. Έχουν σχεδιαστεί κατάλληλοι εκκινητές για την ενίσχυση και των δύο αυτών γονιδίων και η ανίχνευση τους μπορεί να γίνει παράλληλα με μία Multiplex PCR. Το γονίδιο *vanA* έχει μέγεθος 545 bp και το *vanB* έχει 368 bp.



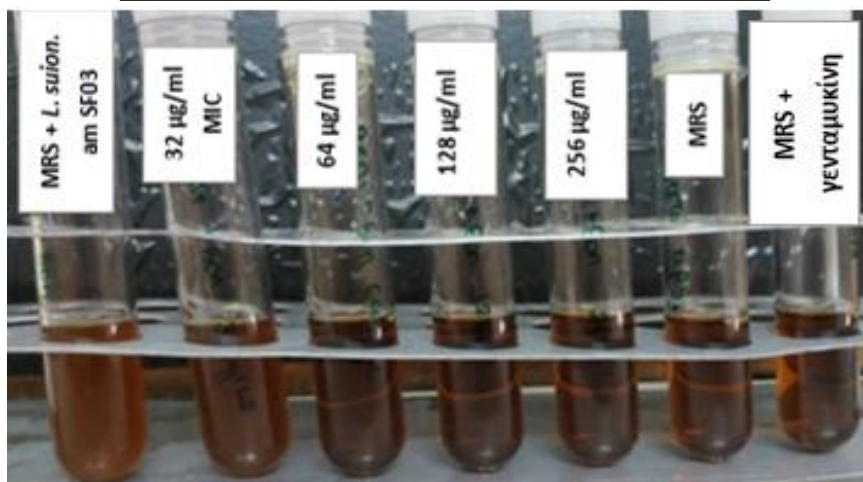
Εικόνα 3.3.1: Ηλεκτροφόρηση πήγματος αгарόζης των δειγμάτων για την ανίχνευση των γονιδίων *vanA/vanB*. M: μάρτυρας λDNA-*Hind*III (μέγεθος από πάνω προς κάτω σε bp: 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 534), 1: προϊόν της αντίδρασης για το στέλεχος *L. suionicum* am SF03, 2: προϊόν της αντίδρασης για το στέλεχος *L. pentosus* 208, 3: προϊόν της αντίδρασης για το στέλεχος *L. mesenteroides* 105, 4: θετικός μάρτυρας για το γονίδιο *vanA*, *E. faecium* 315VR, 5: αρνητικός μάρτυρας το ddH₂O που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση.

Παρατηρείται ότι κανένας από τους τρεις μικροοργανισμούς δεν διαθέτει κάποιο από τα δύο γονίδια ανθεκτικότητας σε βανκομυκίνη.

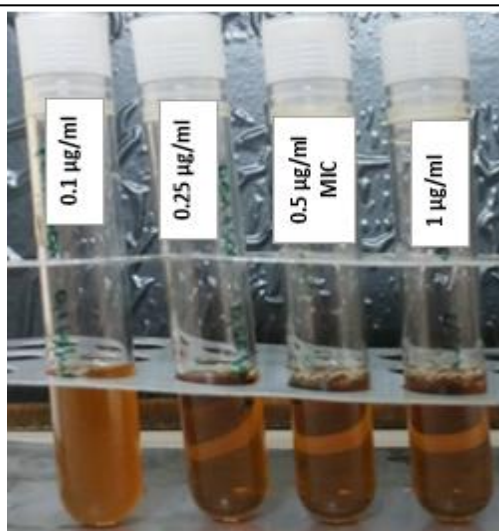
3.3.2 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΑΤΩΤΕΡΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΑΝΑΣΤΟΛΗΣ (MIC) ΤΩΝ ΠΡΟΣ ΜΕΛΕΤΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ BROTH DILUTION (S. PIERCE-HENDRY ET AL., 2010; RELLER ET AL., 2009.)

Έγινε έλεγχος για την ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών *Leuconostoc suionicum* am SF03, *Lactobacillus pentosus* 208 και *Leuconostoc mesenteroides* 105 έναντι 10 αντιβιοτικών. Τα αντιβιοτικά έχουν συγκέντρωση 5 και 10 µg/ml και γίνονται κατάλληλες αραιώσεις πριν χρησιμοποιηθούν. Ο προς μελέτη μικροοργανισμός πρέπει να έχει πληθυσμό περίπου 10^8 cfu/ml. Σε αποστειρωμένα σωληνάκια προστίθενται 100 µl προκαλλιέργεια, η επιθυμητή ποσότητα αντιβιοτικού και συμπληρώνεται με MRS Broth μέχρι ο τελικός όγκος να είναι 5 ml. Ακολουθεί επώαση στους 30°C μέχρι την επόμενη ημέρα. Ως κατώτερη συγκέντρωση αναστολής του μικροοργανισμού από το αντιβιοτικό θεωρείται η μεγαλύτερη συγκέντρωση που μπορεί να αναπτυχθεί έστω και λίγο και από εκεί και πάνω δεν αναπτύσσεται ξανά. Παρακάτω συνοψίζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν:

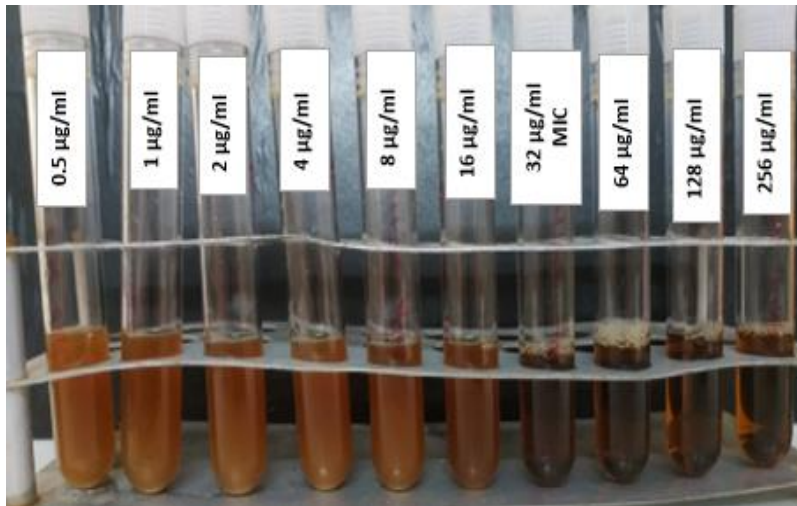
Leuconostoc suionicum am SF03 + γενταμικίνη



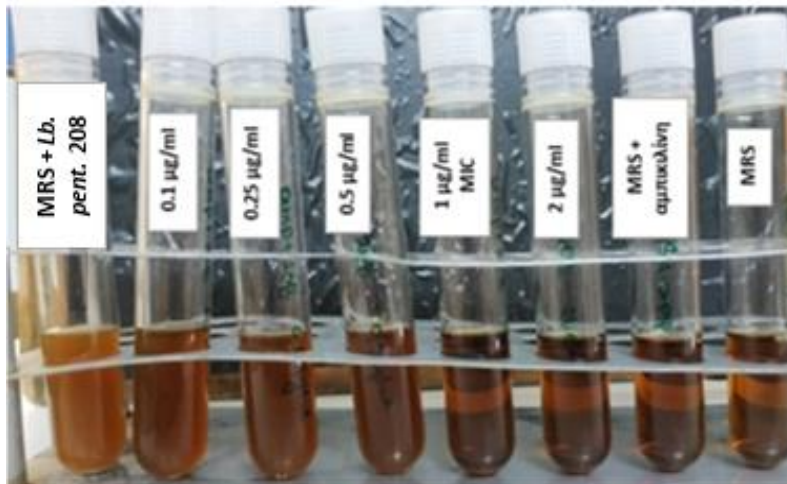
Leuconostoc suionicum am SF03 +



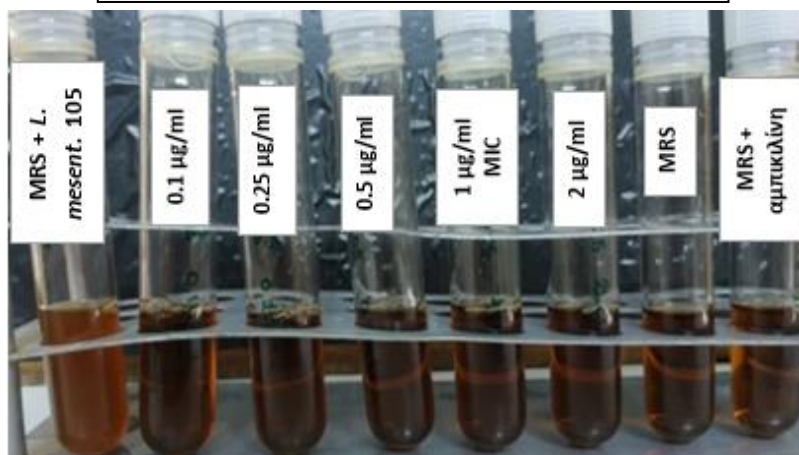
Lactobacillus pentosus 208 + γενταμικίνη



Lactobacillus pentosus 208 + αμπικιλίνη



Leuconostoc mesenteroides 105 + αμπικιλίνη



Εικόνες 3.3.2: Έλεγχος ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και εύρεση της κατώτερης συγκέντρωσης αναστολής.

Πίνακας 3.3.2.α: Αντιβιοτικά και οι συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν για τον *Leuconostoc suionicum* am SF03.

<i>Leuconostoc suionicum</i> am SF03										
	αμπικιλίνη	γενταμικίνη	πενικιλίνη	ερυθρομικίνη	τριμεθοπρίμη	ριφαμπικίνη	καναμικίνη	τετρακυκλίνη	χλωραφαινικόλη	στρεπτομικίνη
0.1 µg/ml	++		++	++		++				
0.25 µg/ml	++		++	(+)		++				
0.5 µg/ml	(++)		(++)	x		++				
1 µg/ml	x		X	x		(++)				++
2 µg/ml	x		x	x	++	x		(++)	++	++
2.5 µg/ml	x	++							++	
4 µg/ml			x	x	++	x	++	x		++
5 µg/ml	x	++								
6 µg/ml					++	x	++			
8 µg/ml			x	x	++	x	++	x	(++)	++
10 µg/ml	x	++			++					
12 µg/ml		++			++		++			
14 µg/ml		++								
16 µg/ml		++	x		++		++	x	x	++
18 µg/ml		++								
20 µg/ml		++								
32 µg/ml		(++)			++		++	x	x	++
64 µg/ml		x			++		++	x		++
128 µg/ml		x			++		++	x		++
256 µg/ml		x			++		++			++
512 µg/ml					(++)		++			(++)
1024 µg/ml					x		++			x

Σύμβολα: (x) ο μικροοργανισμός δεν αναπτύσσεται καθόλου παρουσία του συγκεκριμένου αντιβιοτικού σε αυτή τη συγκέντρωση, (+) ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται ελάχιστα παρουσία του συγκεκριμένου αντιβιοτικού σε αυτή τη συγκέντρωση, (++) ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται κανονικά παρουσία του συγκεκριμένου αντιβιοτικού σε αυτή τη συγκέντρωση.

Πίνακας 3.3.2.β: Αντιβιοτικά και οι συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν για τον *Lactobacillus pentosus* 208.

<i>Lactobacillus pentosus</i> 208										
	αμπικιλίνη	γενταμικίνη	πενικιλίνη	ερυθρομυκίνη	τριμεθοπρίμη	ριφαμπικίνη	καναμυκίνη	τετρακυκλίνη	χλωραφαινικόλη	στρεπτομυκίνη
0.1 µg/ml	++			++		++				
0.25 µg/ml	++			++		x				
0.5 µg/ml	++	++	++	x		x				
1 µg/ml	+	++	++	x		x	++		++	++
2 µg/ml	x	++	++	x		x	++	++	++	++
2.5 µg/ml		++								
4 µg/ml	x		++			x	++	++	++	++
5 µg/ml										
6 µg/ml	x		++			x	++			
8 µg/ml	x	++	x		++	x	++	++	x	++
10 µg/ml	x		x			x	++			
12 µg/ml	x		x							
14 µg/ml	x		x							
16 µg/ml	x	++	x		++		++	++	x	++
18 µg/ml	x									
20 µg/ml			x				++			
32 µg/ml		+			++		++	x	x	++
64 µg/ml		x			++		++	x		++
128 µg/ml		x			++		++			++
256 µg/ml		x			++		++			++
512 µg/ml					++		++			x
1024 µg/ml					x		++			x

Σύμβολα: (x) ο μικροοργανισμός δεν αναπτύσσεται καθόλου παρουσία του συγκεκριμένου αντιβιοτικού σε αυτή τη συγκέντρωση, (+) ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται ελάχιστα παρουσία του συγκεκριμένου αντιβιοτικού σε αυτή τη συγκέντρωση, (++) ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται κανονικά παρουσία του συγκεκριμένου αντιβιοτικού σε αυτή τη συγκέντρωση.

Πίνακας 3.3.2.γ: Αντιβιοτικά και οι συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν για τον *Leuconostoc mesenteroides* 105.

<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 105										
	αμπικιλίνη	γενταμικίνη	πενικιλίνη	ερυθρομικίνη	τριμεθοπρίμη	ριφαμπικίνη	καναμικίνη	τετρακυκλίνη	χλωραφαινικόλη	στρεπτομικίνη
0.1 µg/ml	++		++	++				++	++	
0.25 µg/ml	++		++	+				++	++	
0.5 µg/ml	++		x	x				++	++	
1 µg/ml	++		x	x		++		++	++	++
2 µg/ml	x	++	x	x	++	++		++	x	++
2.5 µg/ml	x									
4 µg/ml		++	x	x	++	++	++	x	x	++
5 µg/ml	x									
6 µg/ml		++			++	x	++			
8 µg/ml		++	x	x	++	x	++	x	x	++
1 µg/ml	x	++			++					
12 µg/ml		++			++		++			
14 µg/ml		++								
16 µg/ml		+	x		++		++	x	x	++
18 µg/ml		x								
20 µg/ml		x								
32 µg/ml		x			++		++	x	x	++
64 µg/ml					++		++	x		++
128 µg/ml					++		++	x		x
256 µg/ml					++		++			
512 µg/ml					++		++			
1024 µg/ml					x		++			

Σύμβολα: (x) ο μικροοργανισμός δεν αναπτύσσεται καθόλου παρουσία του συγκεκριμένου αντιβιοτικού σε αυτή τη συγκέντρωση, (+) ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται ελάχιστα παρουσία του συγκεκριμένου αντιβιοτικού σε αυτή τη συγκέντρωση, (++) ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται κανονικά παρουσία του συγκεκριμένου αντιβιοτικού σε αυτή τη συγκέντρωση.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρείται ότι και οι τρεις μικροοργανισμοί είναι ανθεκτικοί στην καναμυκίνη. Συνοπτικά οι κατώτερες συγκεντρώσεις αναστολής των τριών προς μελέτη μικροοργανισμών παρουσιάζονται στον πίνακα 3.3.2.δ:

Πίνακας 3.3.2.δ: Συνοπτικά αποτελέσματα κατώτερης συγκέντρωσης αναστολής.

<i>Leuconostoc suionicum</i> am SF03	
Αντιβιοτικό	Κατώτερη συγκέντρωση αναστολής (MIC)
αμπικιλίνη	0.5 µg/ml
γενταμυκίνη	32 µg/ml
πενικιλίνη	6 µg/ml
ερυθρομυκίνη	0.25 µg/ml
τριμεθοπρίμη	512 µg/ml
ριφαμικίνη	1 µg/ml
καναμυκίνη	ανθεκτικό
τετρακυκλίνη	2 µg/ml
χλωραφαινικόλη	8 µg/ml
στρεπτομυκίνη	512 µg/ml
<i>Lactobacillus pentosus</i> 208	
αμπικιλίνη	1 µg/ml
γενταμυκίνη	32 µg/ml
πενικιλίνη	6 µg/ml
ερυθρομυκίνη	0.25 µg/ml
τριμεθοπρίμη	512 µg/ml
ριφαμικίνη	0.1 µg/ml
καναμυκίνη	ανθεκτικό
τετρακυκλίνη	16 µg/ml
χλωραφαινικόλη	4 µg/ml
στρεπτομυκίνη	256 µg/ml
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 105	
αμπικιλίνη	1 µg/ml
γενταμυκίνη	16 µg/ml
πενικιλίνη	0.25 µg/ml
ερυθρομυκίνη	0.25 µg/ml
τριμεθοπρίμη	512 µg/ml
ριφαμικίνη	4 µg/ml
καναμυκίνη	ανθεκτικό
τετρακυκλίνη	2 µg/ml
χλωραφαινικόλη	1 µg/ml
στρεπτομυκίνη	64 µg/ml

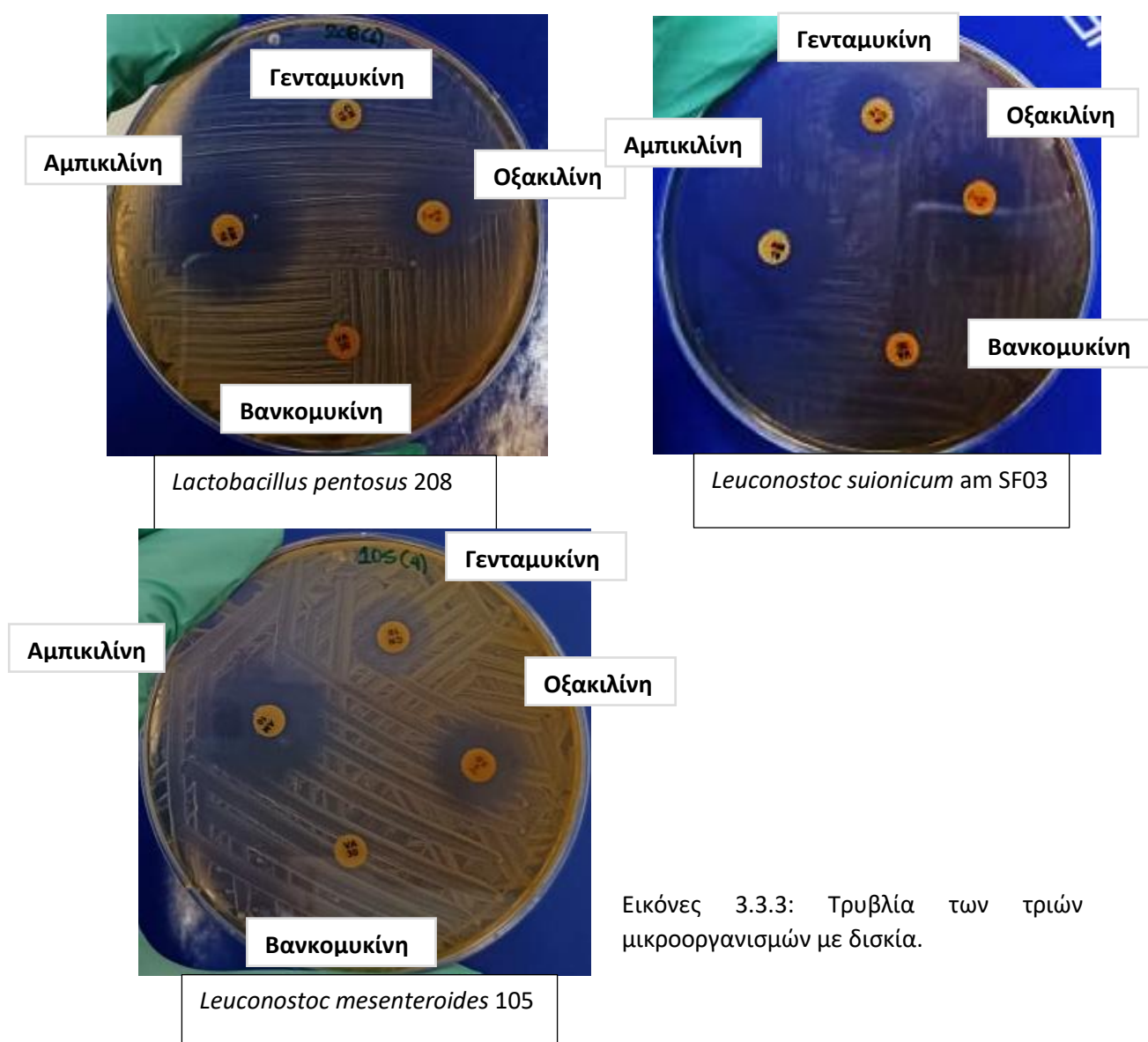
3.3.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΜΕ ΜΟΡΦΗ ΔΙΣΚΙΩΝ (DISK DIFFUSION METHOD) (HUDZICKI, 2009)

Έγινε έλεγχος για την ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών *Leuconostoc suionicum* am SF03, *Lactobacillus pentosus* 208 και *Leuconostoc mesenteroides* 105 έναντι 4 αντιβιοτικών σε

μορφή δισκίων. Στην επιφάνεια τρυβλίου με MRS Agar επιστρώθηκαν με αποστειρωμένο στυλεό 100 μl προκαλλιέργειας του προς μελέτη μικροοργανισμού, και τοποθετήθηκαν με προσοχή τα δισκία των αντιβιοτικών. Ακολούθησε επώαση τους 30°C μέχρι την επόμενη μέρα. Έπειτα μετρήθηκε η διάμετρος της ζώνης που δημιουργήθηκε γύρω από το δισκίο. Τα αντιβιοτικά που ελέγχθηκαν είναι γενταμυκίνη (10 μg), βανκομυκίνη (30 μg), αμπικιλίνη (10 μg), οξακιλίνη (5mg).

Πίνακας 3.3.3 : Δράση αντιβιοτικών δισκίων έναντι των προς μελέτη μικροοργανισμών.

	<i>L. suion. am SF03</i>	<i>L. mesent. 105</i>	<i>Lb. pent. 208</i>
Γενταμυκίνη	1.43 cm	1.53 cm	-
Οξακιλίνη	1.88 cm	1.78 cm	1.43 cm
Αμπικιλίνη	1.98 cm	2.2 cm	2.28 cm
Βανκομυκίνη	-	-	-



Εικόνες 3.3.3: Τρυβλία των τριών μικροοργανισμών με δισκία.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι και οι τρεις μικροοργανισμοί έχουν ανθεκτικότητα στη βανκομυκίνη (5 μg), ενώ το στέλεχος *L. pentosus* 208 έχει και στη

γενταμυκίνη (10 µg). Επίσης η αμπικιλίνη δρα καλύτερα απ' όλα τα αντιβιοτικά έναντι και των τριών μικροοργανισμών.

3.4 *IN SILICO* ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ *LEUCONOSTOC SUIONICUM* AM SF03

Για το είδος *suionicum* είναι ελάχιστα τα βιβλιογραφικά δεδομένα και δεν έχει αναφερθεί ούτε μελετηθεί η αντιμικροβιακή του δράση. Επομένως, λόγω της αντιμικροβιακής δράσης που παρουσίασε το στέλεχος am SF03 έναντι στελεχών δεικτών (*E. coli*, *B. subtilis*) κατά την απομόνωση του θεωρήθηκε ενδιαφέρον να πραγματοποιηθεί περαιτέρω βιοπληροφορική μελέτη, όσον αφορά πιθανά γονίδια που εμπλέκονται στη παραγωγή βακτηριοσινών στο είδος *suionicum*. Στη βάση δεδομένων Joint Genome Institute (JGI) (<https://img.jgi.doe.gov/>), ανευρίσκονται 5 στελέχη *Leuconostoc suionicum*, εκ των οποίων μόνο τα δύο έχουν διαθέσιμο το πλήρες γονιδίωμα τους:

- *Leuconostoc suionicum* CECT 8484
 - *Leuconostoc suionicum* CECT 9216
 - *Leuconostoc suionicum* CECT 8486
 - *Leuconostoc suionicum* LT-38 (Kato & Oikawa, 2017b)
 - *Leuconostoc suionicum* DSM 20241 (Chun, Lee, et al., 2017)
- } Πλήρης αλληλούχισις

Αυτά τα δύο στελέχη, διαθέτουν τα γονίδια που απαιτούνται για την παραγωγή βακτηριοσινών (1.6.1.1, 1.6.1.2). Στο στέλεχος *Leuconostoc suionicum* LT-38 εντοπίστηκε περιοχή του γονιδιώματος που φέρει όλα εκείνα τα γονίδια που απαιτούνται για την παραγωγή, την ρύθμιση και την έκκριση της βακτηριοσίνης του μικροοργανισμού (Εικόνα 3.4). Με την βοήθεια των εργαλείων BLASTP και BLASTN αναλύονται οι αλληλουχίες όλων των επιθυμητών γονιδίων με σκοπό την εύρεση ταυτώσεων ή πανομοιότυπων περιοχών σε άλλους μικροοργανισμούς. Επίσης γίνεται και BLASTN στη νουκλεοτιδική αλληλουχία της συνολικής περιοχής που μελετάται για τον εντοπισμό τυχόν συνάφειας σε άλλους μικροοργανισμούς (Πίνακας 3.4.α). Τα αποτελέσματα της παραπάνω αναζήτησης παρουσιάζονται αναλυτικά στην εικόνα 3.4. Με βάση την θεωρία για την παραγωγή βακτηριοσινών της τάξης I και II (1.6.1.1, 1.6.1.2), εντοπίζονται όλα τα απαιτούμενα γονίδια για την παραγωγή, την μεταγραφική ρύθμιση και την έκκριση της βακτηριοσίνης. Επίσης εντοπίζονται AxxxA και GxxxG μοτίβα, τα οποία συναντώνται στα γονίδια που κωδικοποιούν πεπτιδία βακτηριοσινών της τάξης IIb. Επίσης εντοπίζονται 3 πιθανά ζεύγη γονιδίων στην προς μελέτη περιοχή, τα οποία βρίσκονται το ένα δίπλα στο άλλο και μέσω του BLASTN και BLASTP προκύπτει ότι κωδικοποιούν μία πρωτεΐνη αναφερόμενη ως lactobin A/ cerein 7B family class IIb bacteriocin ή ως υποθετική πρωτεΐνη και έτσι προκύπτει ότι πιθανώς η βακτηριοσίνη να ανήκει στην τάξη IIb. Το μόνο που δεν εντοπίστηκε είναι το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ανοσίας, αλλά πιθανά αυτό το ρόλο να παίζει κάποιο από τα γονίδια που κωδικοποιεί υποθετικές πρωτεΐνες. Με ένα άλλο εργαλείο του JGI, το Transmembrane topology προσδιορίστηκε και η θέση ως προς την μεμβράνη του κυττάρου, των μορίων που κωδικοποιούνται από γονίδια που σχετίζονται με την έκκριση της βακτηριοσίνης. Προκύπτει τελικά ότι:

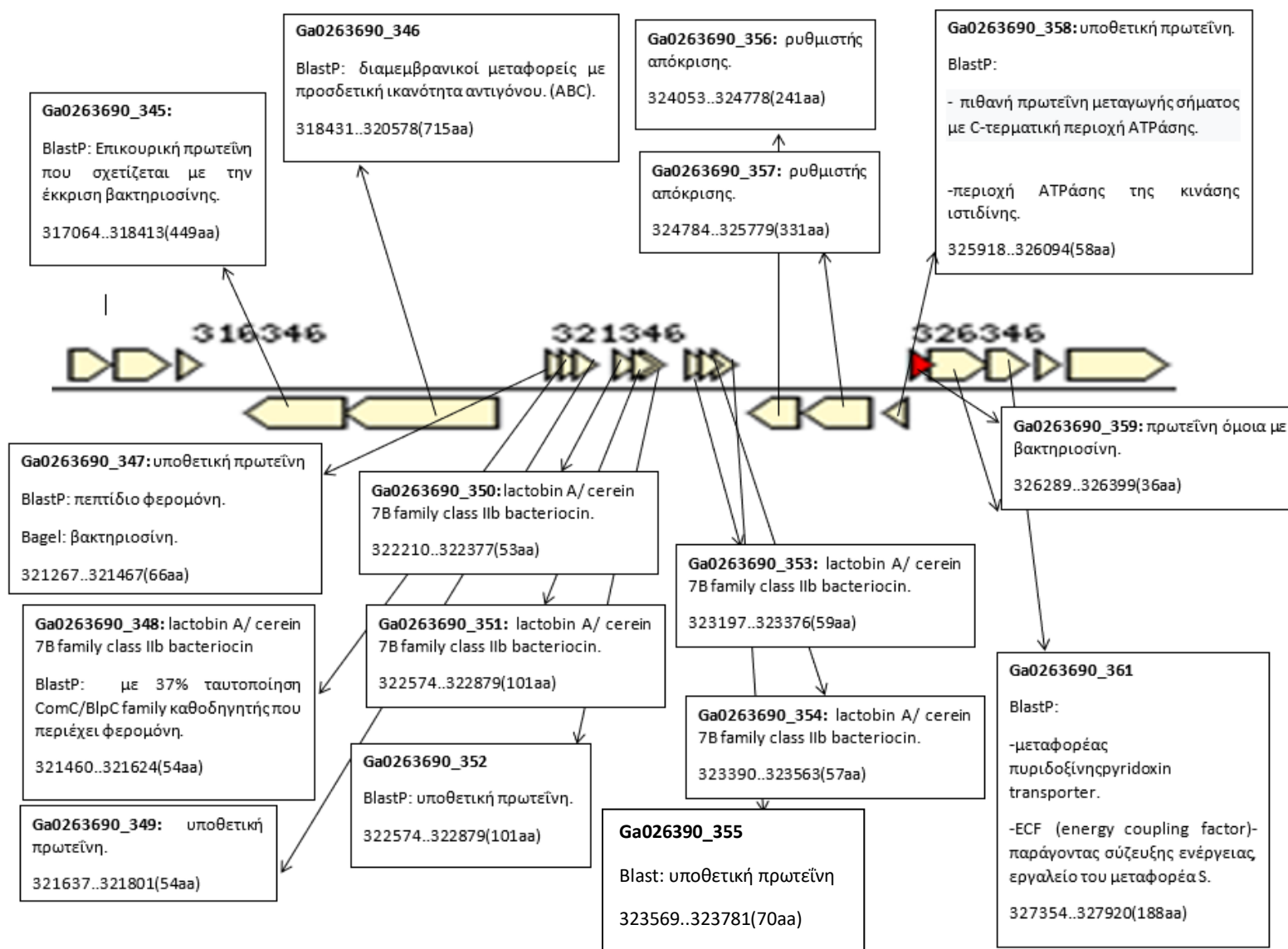
- **Ga0263690_345**: επικουρική πρωτεΐνη που βοηθά στην έκκριση της βακτηριοσίνης.

- **Ga0263690_346:** διαμεμβρανικοί μεταφορείς με προσδετική ικανότητα αντιγόνου (ABC-type transporter).
- **Ga0263690_347 + Ga0263690_348/ Ga0263690_350 + Ga0263690_351/ Ga0263690_353 + Ga0263690_354:** πιθανά ζεύγη γονιδίων που κωδικοποιούν την βακτηριοσίνη τάξης IIb.
- **Ga0263690_349/ Ga0263690_352/ Ga0263690_355:** υποθετική πρωτεΐνη (πιθανώς κάποια από αυτές η πρωτεΐνη ανοσίας).
- **Ga0263690_356/ Ga0263690_357:** ρυθμιστής απόκρισης (RR).
- **Ga0263690_358:** μεμβρανική κινάση ιστιδίνης (HPK).
- **Ga0263690_347:** πεπτίδιο φερομόνη.

Πίνακας 3.4.α: Αποτελέσματα BLASTN της προς μελέτη περιοχής που περιλαμβάνει τα επιθυμητά γονίδια.

Μικροοργανισμός	% Ταυτότητα	Αριθμός κατάθεσης σε διεθνή βάση δεδομένων (GeneBank accession no.)	Αναφορά
<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. suionicum</i> LT-38	100	AP017935.1	(Kato & Oikawa, 2017b)
<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. suionicum</i> DSM 20241	100	CP015247.1	(Chun, Lee, et al., 2017)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> LK-151	95.52	AP017936.1	(Kato & Oikawa, 2017a)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KNU-2	95.49	CP089782.1	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> WiKim32	96.06	CP037752.1	(Choi et al., 2021)
<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides</i> CBA3607	94.88	CP046062.1	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> CBA3628	94.88	CP042404.1	-

Παρατηρούμε ότι οι *Leuconostoc suionicum* LT-38 και *Leuconostoc suionicum* DSM 20241 έχουν 100% ταυτότητα και αλληλοεπικάλυψη της περιοχής των γονιδίων που μελετάται.



Εικόνα 3.4: Το gene neighborhood που περιλαμβάνει τα προς μελέτη γονίδια και τα αποτελέσματα των αλληλουχιών τους από το BLASTP.

Υπάρχουν τρία ζευγάρια γονιδίων, όπως φαίνεται και στο προηγούμενο σχήμα, που πιθανώς κωδικοποιούν την βακτηριοσίνη τάξης IIb. Χρησιμοποιώντας το CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) ελέγχθηκε η ύπαρξη συντηρημένων αμινοξικών αλληλουχιών στα πιθανά γονίδια που κωδικοποιούν την βακτηριοσίνη, με ήδη μελετημένες γνωστές βακτηριοσίνες που μπορεί να εντοπίσει κάποιος στη βιβλιογραφία (Kjos et al., 2011; Nissen-Meyer et al., 2010; Orpegård et al., 2007; Escamilla-Martínez et al., 2017). Στη συνέχεια, μέσω ενός βιοπληροφοριακού εργαλείου που έχει κατατεθειμένες τις αλληλουχίες όλων των γνωστών βακτηριοσινών, του BAGEL4 (<http://bagel4.molgenrug.nl/blast.php>) (βλέπε 1.6.4) και σε συνδυασμό με τα δεδομένα που συλλέξαμε από το CLUSTALW, η ύπαρξη ομοιότητας των πιθανών γονιδίων που κωδικοποιούν βακτηριοσίνη με άλλες ήδη γνωστές συνοψίζεται στον πίνακα 3.4.β:

Πίνακας 3.4.β: Σύνοψη αποτελεσμάτων από CLUSTALW και Bagel για τα γονίδια που πιθανώς να κωδικοποιούν βακτηριοσίνη.

Ga0263690_	347	348	350	351	353	354	359	Αναφορές
βακτηριοσίνη								
Enterocin X/ chain beta	x	x	-	x	x	-	-	(Hu et al., 2010)
Leucocin B-Ta11a	x	x	-	-	-	-	-	(Felix et al., 1994)
Plantaricin NC8-beta	x	-	-	-	-	x	-	(Jiang et al., 2016)
LeucocinA UAL187	x	x	-	-	-	-	-	(Hastings et al., 1991)
Putative bacteriocin (<i>Streptococcus gordonii</i> ATCC 3510)	x	x	-	-	-	-	-	-
SGR_1513 putative Linaridin	-	x	-	-	-	-	-	(Claesen & Bibb, 2010)
Lactacin F/ subunit lafA	-	x	-	-	-	-	-	(Klaenhammer et al., 1994)
Thurandacin	-	-	x	-	-	-	-	(Wang et al., 2014)
Prochlorosin	-	-	x	-	-	-	-	(Tang & van der Donk, 2012)
Carnobacteriocin BM1	-	-	x	x	-	-	-	(Quadri et al., 1994)
Brochocin C BrcA	-	-	x	-	-	-	-	(Garneau et al., 2003)
Durancin TW-49M	-	-	x	-	-	-	-	(Hu et al., 2008)
Durancin Q	-	-	x	-	-	-	-	-
Curvacin A	-	-	x	-	-	-	-	(Tichaczek et al., 1992)
Bicereucin BsJA1	-	-	-	x	-	-	-	(Huo & van der Donk, 2016)

Bicereucin BsJA2	-	-	-	x	-	-	-	(Huo & van der Donk, 2016)
Putative bacteriocin (<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K)	-	-	-	x	-	-	x	-
Plantaricin 125/ beta (plnB)	-	-	-	x	-	-	-	(Ehrmann et al., 2000)
Leucocin K	-	-	-	x	-	-	-	-
Geobacillin II	-	-	-	-	-	x	-	(Garg et al., 2012)
Carnobacteriocin B2	-	-	-	-	-	x	-	(Quadri et al., 1995)
Plantaricin K	-	-	-	-	-	x	-	(Pal & Srivastava, 2014)
Putative bacteriocin (<i>Streptococcus pyogenes</i> MGAS6180)	-	-	-	-	-	x	-	-
Putative bacteriocin (<i>Streptococcus pyogenes</i> MGAS315)	-	-	-	-	-	x	-	(Hynes, et al., 1993)
Putative bacteriocin (<i>Streptococcus mutans</i> UA159)	-	-	-	-	-	-	x	(Hale et al., 2005)
Plantaricin NC8-alpha	-	-	-	-	-	-	x	(Jiang et al., 2016)
BlpO	-	-	-	-	-	-	x	(Dawid et al., 2007; Whitford et al., 2001)
Bovicin 255	-	-	-	-	-	-	x	(Whitford et al., 2001)

Σύμβολα: (x) εμφανίζει ομοιότητα η αλληλουχία του γονιδίου με την βακτηριοσίνη, (-) δεν εμφανίζει ομοιότητα η αλληλουχία του γονιδίου με την βακτηριοσίνη.

Από τον παραπάνω πίνακα παρατηρούμε ότι η βακτηριοσίνη που παράγει ο *Leuconostoc suionicum* LT-38 παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με την εντεροσίνη X (enterocin X) η οποία παράγεται από το στέλεχος *Enterococcus faecium* KU-B5 (Hu et al., 2010).

3.5 ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

3.5.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *LEUCONOSTOC SUIONICUM* AM SF03 ΕΝΑΝΤΙ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ (INDICATOR STRAINS) (WIESE ET AL., 2009)(ΕΛΑΦΡΩΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟ)

Εφόσον είναι γνωστό από τη θεωρία ότι τα στελέχη του γένους *suionicum* εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση έγινε έλεγχος αυτής για τον *L. suionicum* am SF03 έναντι 19 στελεχών δεικτών. Σε τρυβλίο με 20 ml MRS Agar επιστρώνεται με τη βοήθεια λούπας μικρή ποσότητα προκαλλιέργειας του στελέχους am SF03 σε σχήμα «ζικ-ζακ» και ακολουθεί επώαση στους 30°C για τρεις μέρες (Εικόνα 3.5.1.α). Επιστρώνεται δεύτερη στρώση 20 ml κατάλληλου θρεπτικού υλικού ανάπτυξης του στελέχους δείκτη εμβολιασμένο με 0,2 % v/v αυτού και αφού σταθεροποιηθεί το άγαρ επωάζονται στους 30°C για όσο χρειαστεί ο κάθε μικροοργανισμός.



Εικόνα 3.5.1.α: Τρυβλίο MRS επιστρωμένο με το στέλεχος am SF03 σε σχήμα «ζικ-ζακ».

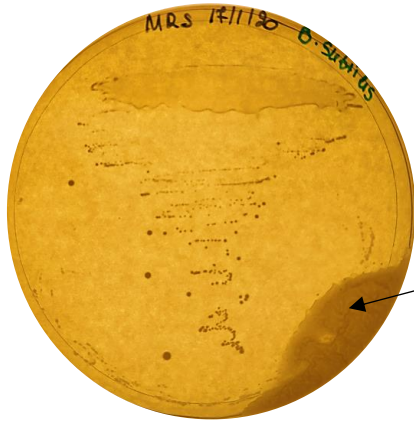
Τα αποτελέσματα που προκύπτουν παρουσιάζονται στον πίνακα 3.5.1:

Πίνακας 3.5.1: Αντιμικροβιακή δράση *L. suionicum* am SF03 έναντι επιλεγμένων στελεχών δεικτών.

Στέλεχος Δείκτης	Αντιμικροβιακή Δράση
<i>Bacillus subtilis</i>	+
<i>Enterococcus durans</i> KE96	+
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-
<i>Enterococcus faecium</i> 315 VR	+
<i>Enterococcus faecium</i> GLP216	+
<i>Enterococcus faecium</i> KE82	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+
<i>Lactobacillus brevis</i> GLP205	+
<i>Lactobacillus delbruecki subsp bulgarius</i> GLP117	+
<i>Lactobacillus paracasei</i> H14	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> 208	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> H25	-
<i>Lactococcus lactis subsp cremoris</i> M78	+
<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i> KE109	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 105	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> GLP202	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> G101	+
<i>Streptococcus thermophiles</i> ST1	+

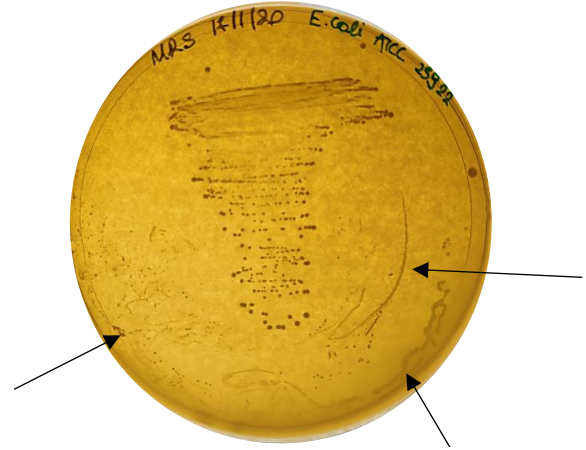
Σύμβολα: (+) εμφανίζεται ζώνη αναστολής ανάπτυξης του στελέχους δείκτη, (-) δεν εμφανίζεται ζώνη αναστολής ανάπτυξης του στελέχους δείκτη.

Παρακάτω παρουσιάζονται εικόνες με εμφανή δράση του στελέχους am SF03 έναντι των διαφορετικών στελεχών δεικτών:

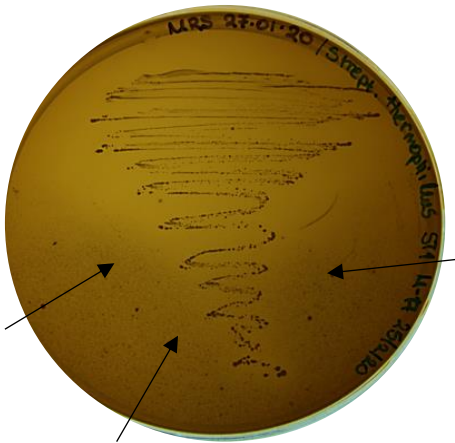


Εικόνα 3.5.1.β: Παρατηρείται ότι η ανάπτυξη του *B. subtilis* αναστέλλεται σε μεγάλο βαθμό από την ύπαρξη του στελέχους am SF03 στο ίδιο τρυβλίο, καθώς αναπτύχθηκε ελάχιστα κάτω δεξιά (βελάκι).

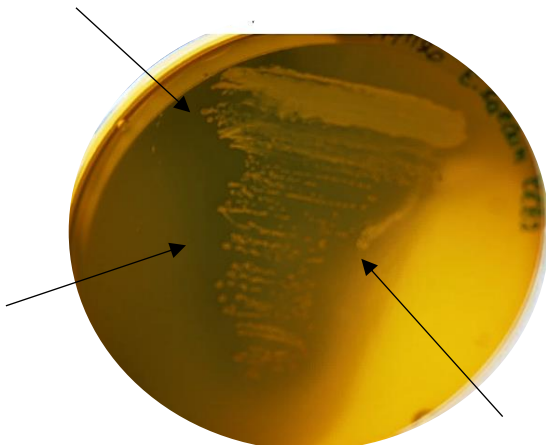
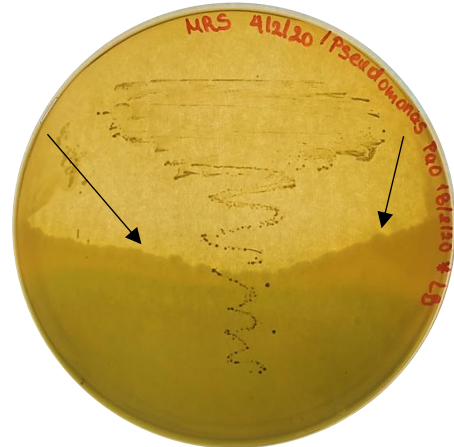
Εικόνα 3.5.1.γ: Παρατηρείται ότι ο *E. coli* ATCC 25922 αναπτύσσεται ελάχιστα σε κάποια σημεία στο κάτω μέρος του τρυβλίου (βελάκια) μακριά από τα σημεία ανάπτυξης του στελέχους am SF03.



Εικόνα 3.5.1.δ: Παρατηρείται ο σχηματισμός μιας ζώνης διαύγειας γύρω από το στέλεχος am SF03, πιο έντονη στο πάνω μέρος που είναι μεγαλύτερη η ποσότητα του, αλλά εμφανή και στο κάτω μέρος (βελάκια) αναστέλλοντας την ανάπτυξη του *S. thermophilus* ST1.

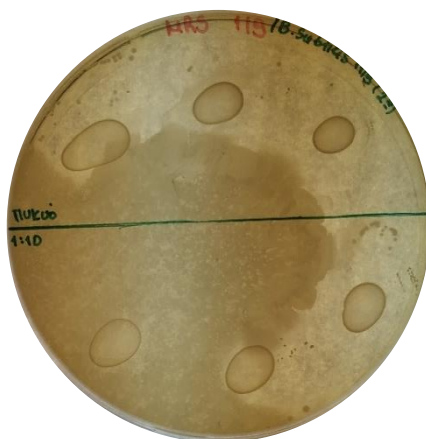


Εικόνα 3.5.1.ε: Παρατηρείται μερική αναστολή στην ανάπτυξη του στελέχους δείκτη *P. aeruginosa* PAO όταν αυτό συνυπάρχει στο ίδιο τρυβλίο με το στέλεχος am SF03. Έτσι στο κάτω μέρος (βελάκια), που υπάρχει μικρή ποσότητα του στελέχους am SF03 αναπτύσσεται περισσότερο συγκριτικά με το πάνω μέρος που δεν αναπτύσσεται καθόλου.

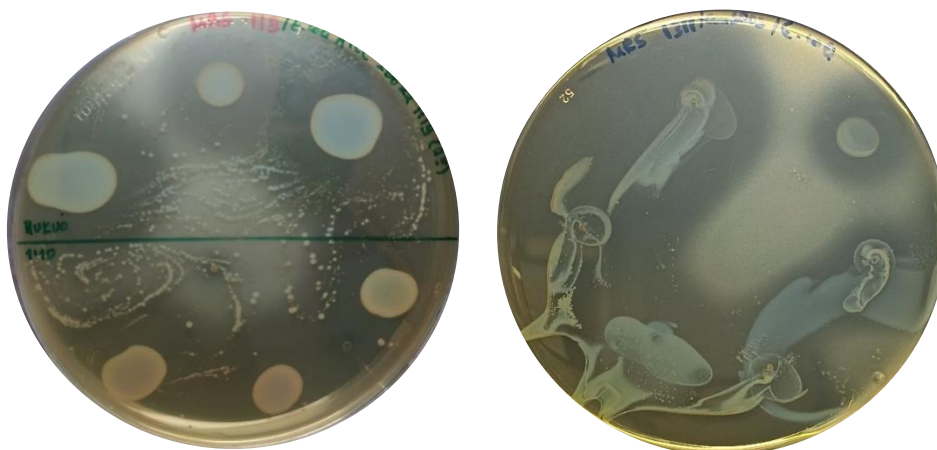


Εικόνα 3.5.1.στ: Παρατηρείται ο σχηματισμός ζώνης διαύγειας γύρω από το στέλεχος am SF03 (βελάκια), πράγμα που σημαίνει αναστολή της ανάπτυξης του στελέχους δείκτη *E. faecium* KE82.

Περαιτέρω έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης του *L. suionicum* am SF03 έγινε έναντι των στελεχών δεικτών *E. coli* ATCC 25922 και *B. subtilis* που φάνηκε να αναστέλλεται περισσότερο η ανάπτυξη τους. Σε τρυβλίο MRS, αφέθηκαν σταγόνες (spot on lawn method) του *L. suionicum* am SF03 και ακολούθησε επώαση στους 30°C μέχρι την επόμενη ημέρα. Μετά την επώαση ακολούθησε επίστρωση με 20 ml Luria soft Agar εμβολιασμένο με 0,1 % προκαλλιέργεια του στελέχους δείκτη. Αφού στερεοποιηθεί η δεύτερη στρώση άγαρ τα τρυβλία επωάζονται μέχρι την επόμενη μέρα.



Leuconostoc suionicum am SF03 + *B. subtilis*



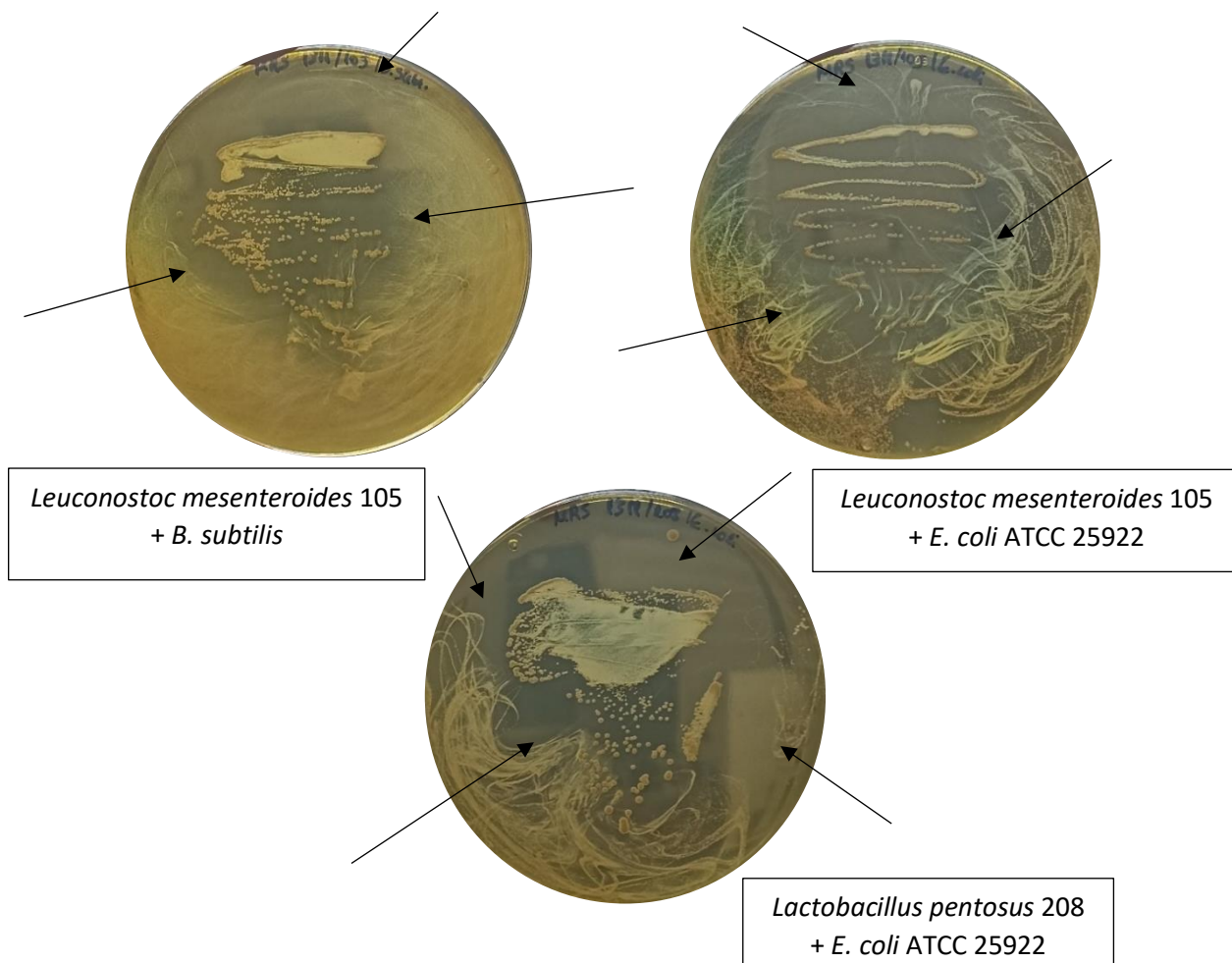
Leuconostoc suionicum am SF03 + *E. coli* ATCC 25922

Εικόνες 3.5.1.ζ: Αντιμικροβιακή δράση του *L. suionicum* am SF03 έναντι των δύο επιλεγμένων στελεχών δεικτών.

3.5.2 ΈΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΓΙΑ ΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ *LACTOBACILLUS PENTOSUS* 208, *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* 105 ΕΝΑΝΤΙ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ (INDICATOR STRAINS) (WIESE ET AL., 2009)(ΕΛΑΦΡΩΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟ)

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα επιλέχθηκαν οι *E. coli* ATCC 25922 και *B. subtilis* ως τα βασικά στελέχη δείκτες, ελέγχθηκε η αντιμικροβιακή δράση των *Lactobacillus pentosus* 208 και *Leuconostoc mesenteroides* 105 έναντι αυτών. Ο έλεγχος έγινε και με τις δυο μεθόδους

που αναφέρθηκαν παραπάνω (βλέπε 2.5.17) και φαίνεται να έχουν και οι δύο μικροοργανισμοί αντιμικροβιακή δράση έναντι των στελεχών δεικτών.



Εικόνες 3.5.2: Αντιμικροβιακή δράση των *Lactobacillus pentosus* 208 και *Leuconostoc mesenteroides* 105 έναντι των δύο επιλεγμένων στελεχών δεικτών.

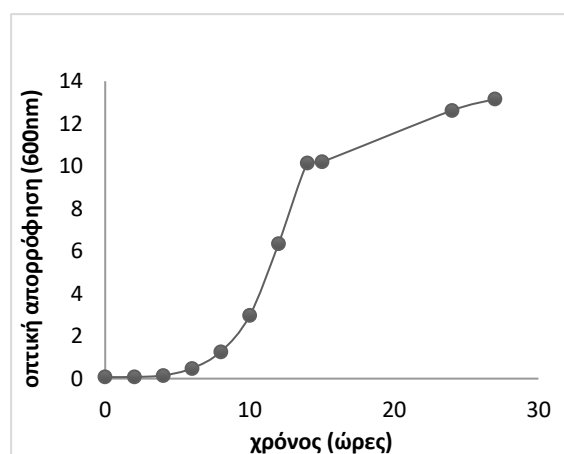
3.6 ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΠΡΟΣ ΜΕΛΕΤΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Έγιναν καμπύλες ανάπτυξης των μικροοργανισμών *Lactobacillus pentosus* 208, *Leuconostoc mesenteroides* 105 και *Leuconostoc suionicum* am SF03 με σκοπό την μελέτη των διάφορων φάσεων ανάπτυξης τους. Επίσης έγινε μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης του υπερκειμένου στις διάφορες φάσεις ανάπτυξης των στελεχών *Leuconostoc mesenteroides* 105 και *Leuconostoc suionicum* am SF03 έναντι επιλεγμένου στελέχους δείκτη. Η επιλογή του στελέχους *L. mesenteroides* 105 έγινε καθώς εμφάνιζε σταθερή αντιμικροβιακή δράση έναντι των στελεχών δεικτών που επιλέχθηκαν σε αντίθεση με τον *Lactobacillus pentosus* 208. Το στέλεχος *Leuconostoc suionicum* am SF03, αποτελεί ένα νέο στέλεχος που απομονώθηκε στο εργαστήριό μας (Vandera et al. unpublished), γι' αυτό το λόγο διερευνήθηκε εκτενέστερα συγκριτικά με τους άλλους μικροοργανισμούς, διότι υπάρχουν ελάχιστες πληροφορίες γι'

αυτό. Τέλος, έγινε καμπύλη ανάπτυξης του επιλεγμένου στελέχους δείκτη *Escherichia coli* ATCC 25922 με και χωρίς την προσθήκη υπερκειμένου του στελέχους *Leuconostoc suionicum* am SF03 για την μελέτη τυχόν μεταβολής της ανάπτυξης του.

3.6.1 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ *LACTOBACILLUS PENTOSUS* 208 ΣΤΟΥΣ 30°C

Για καλλιέργεια κυττάρων του στελέχους *L. pentosus* 208 δημιουργήθηκαν καμπύλες ανάπτυξης με βάση την οπτική απορρόφηση στα 600 nm σε σχέση με το χρόνο. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατός ο προσδιορισμός των διαφόρων φάσεων ανάπτυξης του μικροοργανισμού.



Χρόνος (ώρες)	Οπτική απορρόφηση (600 nm)
0	0.0715
2	0.079
4	0.15
6	0.48
8	1.265
10	2.96
12	6.345
14	10.15
24	12.62
27	13.16

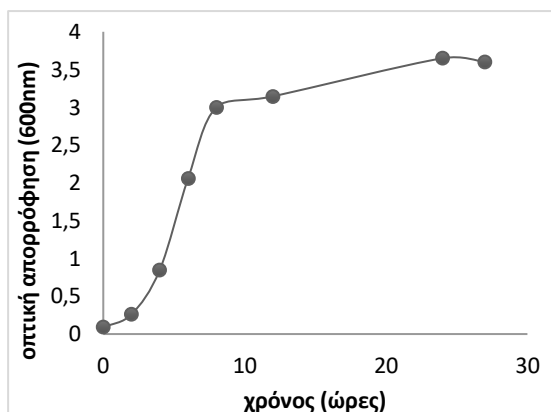
Γράφημα-Πίνακας 3.6.1: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους *Lb. pentosus* 208 στους 30°C με βάση την οπτική απορρόφηση στα 600 nm σε σχέση με το χρόνο.

Με βάση την καμπύλη ανάπτυξης της οπτικής απορρόφησης σε σχέση με το χρόνο, η εκθετική φάση ξεκινάει στις 6 ώρες, το μέσο της εκθετικής φάσης είναι κοντά στις 11 ώρες, ενώ το τέλος της και η αρχή της στατικής φάσης είναι κοντά στις 14-15 ώρες.

Με βάση την καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού σε συνάρτηση με το χρόνο του στελέχους *Lb. pentosus* 208 παρατηρούμε ότι ο πληθυσμός του φτάνει 10^8 cfu/ml κοντά στις 4 ώρες. Έτσι, παρακάτω όταν γίνεται χρήση της καλλιέργειας του στελέχους *Lb. pentosus* 208, λαμβάνεται δείγμα κοντά στις 3,5 ώρες. Η οπτική του απορρόφηση είναι περίπου 0.23 και ο πληθυσμός του $7,1 \times 10^7$ cfu/ml.

3.6.2 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ *LEUCONOSTOC MESENTEROIDES* 105 ΣΤΟΥΣ 30°C ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟΥ ΕΝΑΝΤΙ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΔΕΙΚΤΗ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΧΡΟΝΙΚΕΣ ΣΤΙΓΜΕΣ

Για καλλιέργεια κυττάρων του στελέχους *L. mesenteroides* 105 δημιουργήθηκαν καμπύλες ανάπτυξης με βάση την οπτική απορρόφηση στα 600 nm σε σχέση με το χρόνο. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατός ο προσδιορισμός των διαφόρων φάσεων ανάπτυξης του μικροοργανισμού.



Χρόνος (ώρες)	Οπτική απορρόφηση (600 nm)
0	0.089
2	0.262
4	0.85
6	2.06
8	3
12	3.145
24	3.65
27	3.6

Γράφημα-Πίνακας 3.6.2.α: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους *L. mesenteroides* 105 στους 30°C με βάση την οπτική απορρόφηση στα 600 nm σε σχέση με το χρόνο.

Με βάση την καμπύλη ανάπτυξης της οπτικής απορρόφησης σε σχέση με το χρόνο, η εκθετική φάση ξεκινάει στις 2 ώρες, το μέσο της εκθετικής φάσης είναι κοντά στις 6 ώρες, ενώ το τέλος της και η αρχή της στατικής φάσης είναι κοντά στις 12 ώρες.

Με βάση την καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού σε συνάρτηση με το χρόνο του στελέχους *L. mesenteroides* 105 παρατηρείται ότι ο πληθυσμός του φτάνει 10^8 cfu/ml κοντά στις 4 ώρες. Έτσι, παρακάτω όταν γίνεται χρήση της καλλιέργειας του στελέχους *L. mesenteroides* 105, λαμβάνεται δείγμα κοντά στις 3,5 ώρες. Η οπτική του απορρόφηση είναι περίπου 0.35 και ο πληθυσμός του 1.523×10^8 cfu/ml.

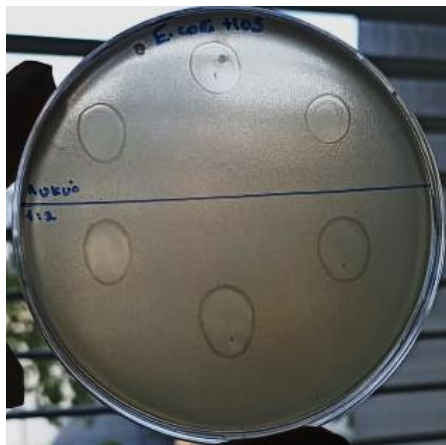
Για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης έναντι του στελέχους δείκτη, για κάθε χρονική στιγμή που επιλέχθηκε, συλλέχθηκαν 5 ml καλλιέργειας σε αποστειρωμένο σωληνάκι, ακολούθησε φυγοκέντρηση 6.000 g/ 20 λεπτά/ 4°C και το υπερκείμενο ρυθμίστηκε σε pH 6.5 και φιλτραρίστηκε. Σε Luria soft Agar εμβολιάστηκαν τα στελέχη δείκτες και στην επιφάνεια τους τοποθετήθηκαν σταγόνες του υπερκειμένου σε πυκνό και 1:2 αραίωση. Στη συνέχεια τα τρυβλία επώαστηκαν στους 30°C μέχρι και την επόμενη μέρα.

Πίνακας 3.6.2.β: Αντιμικροβιακή δράση του στελέχους *L. mesenteroides* 105 έναντι του *Escherichia coli* ATCC 25922 σε διάφορες χρονικές στιγμές.

Χρόνος (ώρες)		Δράση έναντι του <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
4	πυκνό	Ναι
	1:2	Ναι
8	πυκνό	Ναι
	1:2	Ναι
12	πυκνό	Ναι
	1:2	Ναι
24	πυκνό	Ναι
	1:2	Ναι
32	πυκνό	Ναι
	1:2	Ναι
55	πυκνό	Ναι
	1:2	Ναι
100	πυκνό	Ναι
	1:2	Ναι

168	πυκνό	Ναι
	1:2	Ναι

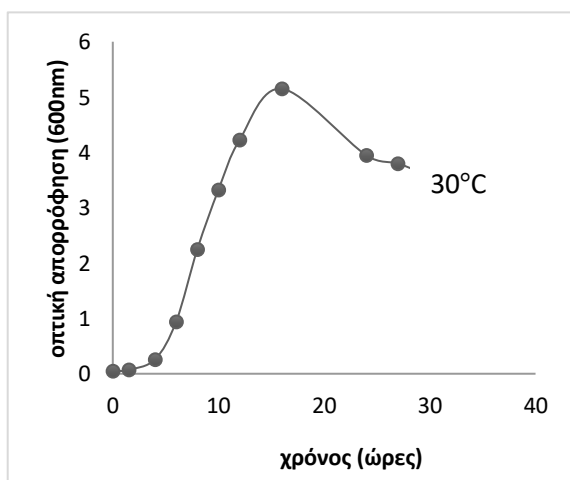
Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρείται ότι από την αρχή της εκθετικής φάσης μέχρι και τη στατική του φάση μετά από μια εβδομάδα, το στελέχος *L. mesenteroides* 105 έχει αντιμικροβιακή δράση έναντι του στελέχους δείκτη που επιλέχθηκε.



Εικόνα 3.6.2: Παρατηρείται η αντιμικροβιακή δράση του στελέχους *L. mesenteroides* 105 έναντι τους στελέχους δείκτη όπως αυτή ελέγχθηκε για τις διάφορες χρονικές στιγμές της καμπύλης ανάπτυξης.

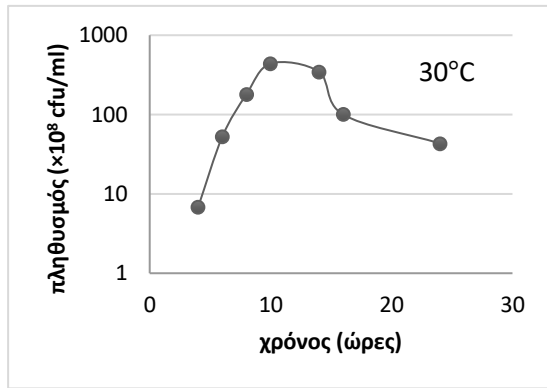
3.6.3 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ *LEUCONOSTOC SUIONICUM* AM SF03 ΣΤΟΥΣ 30°C ΚΑΙ ΣΤΟΥΣ 25°C ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΤΟΥ ΔΡΑΣΗΣ ΕΝΑΝΤΙ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΔΕΙΚΤΗ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΧΡΟΝΙΚΕΣ ΣΤΙΓΜΕΣ

Για καλλιέργεια κυττάρων του στελέχους *L. suionicum* am SF03 δημιουργήθηκαν καμπύλες ανάπτυξης με βάση την οπτική απορρόφηση στα 600 nm σε σχέση με το χρόνο και καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού του στελέχους σε σχέση με το χρόνο για δύο διαφορετικές θερμοκρασίες. Η παραπάνω διερεύνηση πραγματοποιήθηκε καθώς οι πληροφορίες που υπήρχαν για τις βέλτιστες συνθήκες, αλλά και τον τρόπο ανάπτυξης του μικροοργανισμού ήταν ελάχιστες. Επομένως, είναι δυνατός ο προσδιορισμός των διαφόρων φάσεων ανάπτυξης του μικροοργανισμού, η επιλογή της βέλτιστης θερμοκρασίας ανάπτυξης του και η μελέτη του πληθυσμού του στις διάφορες χρονικές στιγμές.



Χρόνος (ώρες)	Οπτική απορρόφηση (600 nm)
0	0.05
1.5	0.07
4	0.26
6	0.95
8	2.25
10	3.33
12	4.23
16	5.15
24	3.94
27	3.8
30	3.56

Γράφημα-Πίνακας 3.6.3.α: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους *L. suionicum* am SF03 στους 30°C με βάση την οπτική απορρόφηση στα 600 nm σε σχέση με το χρόνο.



Χρόνος (ώρες)	Πληθυσμός (cfu/ml)
4	6.78×10^8
6	5.25×10^9
8	18×10^9
10	4.4×10^{10}
14	3.45×10^{10}
16	10×10^9
24	4.33×10^9

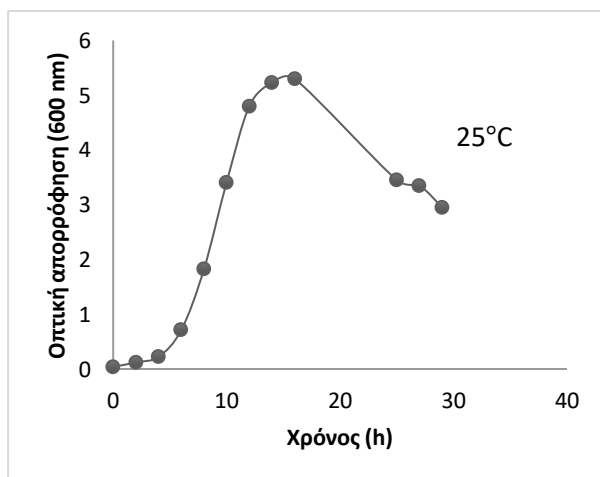
Γράφημα-Πίνακας 3.6.3.β: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους *L. suionicum* am SF03 στους 30°C με βάση τον πληθυσμό σε σχέση με το χρόνο.

Στους 30°C, με βάση την καμπύλη ανάπτυξης της οπτικής απορρόφησης σε σχέση με το χρόνο, η εκθετική φάση ξεκινάει στις 4 ώρες, το μέσο της εκθετικής φάσης είναι κοντά στις 9 ώρες, ενώ το τέλος της και η αρχή της στατικής φάσης είναι στις 16 ώρες. Στην καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού σε σχέση με το χρόνο, στις 6 ώρες ο μικροοργανισμός είναι της τάξης το 10^9 cfu/ml και στις 10 ώρες φθάνει στην ανώτερη τιμή της τάξης 10^{10} cfu/ml.

Επίσης έγινε μέτρηση του pH σε κάποια χρονικά σημεία της καμπύλης ανάπτυξης του μικροοργανισμού, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 3.6.3.γ:

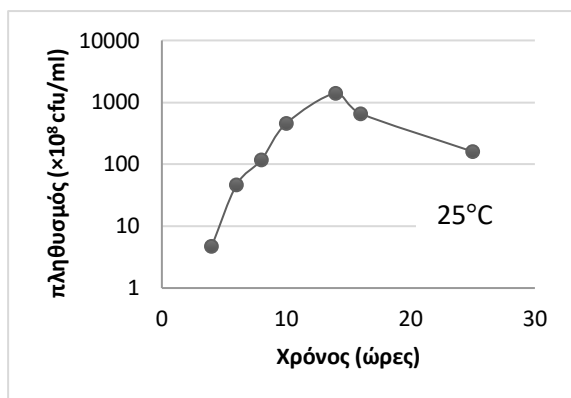
Πίνακας 3.6.3.γ: Τιμές pH σε διάφορες χρονικές στιγμές της καμπύλης ανάπτυξης του μικροοργανισμού στους 30°C.

Χρόνος (ώρες)	pH
3	6.39
5	6.07
9	4.87
12	4.6
15	4.57
24	4.57



Χρόνος (ώρες)	Οπτική απορρόφηση (600 nm)
0	0.04
2	0.12
4	0.22
6	0.71
8	1.82
10	3.41
12	4.8
14	5.23
16	5.3
25	3.45
27	3.35
29	2.95

Γράφημα-Πίνακας 3.6.3.δ: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους *L. suionicum* am SF03 στους 25°C με βάση την οπτική απορρόφηση στα 600 nm σε σχέση με το χρόνο.



Χρόνος (ώρες)	Πληθυσμός (cfu/ml)
4	4.67×10^8
6	4.61×10^9
8	11.78×10^9
10	4.55×10^{10}
14	14.03×10^{10}
16	6.58×10^{10}
25	16×10^9

Γράφημα-Πίνακας 3.6.3.ε: Καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους *L. suionicum* am SF03 στους 25°C με βάση τον πληθυσμό σε σχέση με το χρόνο.

Στους 25°C, με βάση την καμπύλη ανάπτυξης της οπτικής απορρόφησης σε σχέση με το χρόνο, η εκθετική φάση ξεκινάει στις 4 ώρες, το μέσο της εκθετικής φάσης είναι κοντά στις 9 ώρες, ενώ το τέλος της και η αρχή της στατικής φάσης είναι στις 16 ώρες. Στην καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού σε σχέση με το χρόνο, στις 6 ώρες ο μικροοργανισμός είναι της τάξης το 10^9 cfu/ml και στις 14 ώρες φθάνει στην ανώτερη τιμή της τάξης 10^{10} cfu/ml.

Επίσης έγινε μέτρηση του pH σε κάποια χρονικά σημεία της καμπύλης ανάπτυξης του μικροοργανισμού, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 3.6.3.στ:

Πίνακας 3.6.3.στ: Τιμές pH σε διάφορες χρονικές στιγμές της καμπύλης ανάπτυξης του μικροοργανισμού 25°C.

Χρόνος (ώρες)	pH
3	6.22
5	5.84
9	4.9
12	4.69
15	4.59
24	4.58

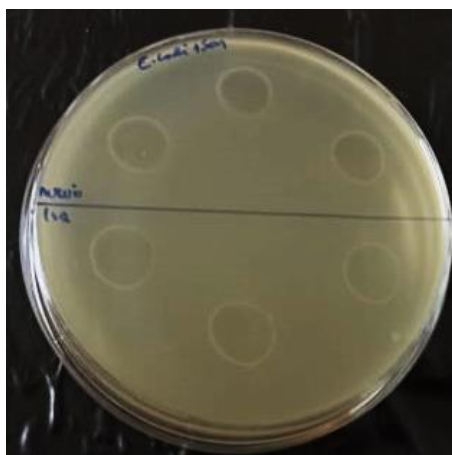
Παρατηρώντας τις καμπύλες και των δύο θερμοκρασιών, το στέλεχος *L. suionicum* am SF03 αναπτύσσεται εξίσου και στις δύο θερμοκρασίες. Μικρές διαφορές παρατηρούνται στην οπτική απορρόφηση, που είναι αναλογικά πιο χαμηλή στους 25°C. Επίσης, στους 30°C ο μικροοργανισμός φτάνει στις 10 ώρες στην ανώτερη τιμή του πληθυσμού του, ενώ στους 25°C φτάνει στις 14 ώρες. Επομένως, επιλέγουμε τους 30°C ως βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης.

Για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης έναντι του στελέχους δείκτη, για κάθε χρονική στιγμή που επιλέχθηκε, συλλέχθηκαν 5 ml καλλιέργειας σε αποστειρωμένο σωληνάκι, ακολούθησε φυγοκέντρηση 6.000 g/ 20 λεπτά/ 4°C και το υπερκείμενο ρυθμίστηκε σε pH 6.5 και φιλτραρίστηκε. Σε Luria soft Agar εμβολιάστηκαν τα στελέχη δείκτες και στην επιφάνεια τους τοποθετήθηκαν σταγόνες του υπερκείμενου σε πυκνό και 1:2 αραιώση. Στη συνέχεια τα τρυβλία επώαστηκαν στους 30°C μέχρι και την επόμενη μέρα.

Πίνακας 3.6.3.ζ: Αντιμικροβιακή δράση του στελέχους *L. suionicum* am SF03 έναντι του *Escherichia coli* ATCC 25922 σε διάφορες χρονικές στιγμές.

Χρόνος (ώρες)		Δράση έναντι του <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
4	πυκνό	Ναι
	1:2	Ναι
8	πυκνό	Ναι
	1:2	Ναι
12	πυκνό	Ναι
	1:2	Ναι
24	πυκνό	Ναι
	1:2	Ναι
32	πυκνό	Ναι
	1:2	Ναι
55	πυκνό	Ναι
	1:2	Ναι
100	πυκνό	Ναι
	1:2	Ναι
168	πυκνό	Ναι
	1:2	Ναι

Από τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρείται ότι από την αρχή της εκθετικής φάσης μέχρι και τη στατική του φάση μετά από μια εβδομάδα, το στέλεχος *L. suionicum* am SF03 έχει αντιμικροβιακή δράση έναντι του στελέχους δείκτη που επιλέξαμε.

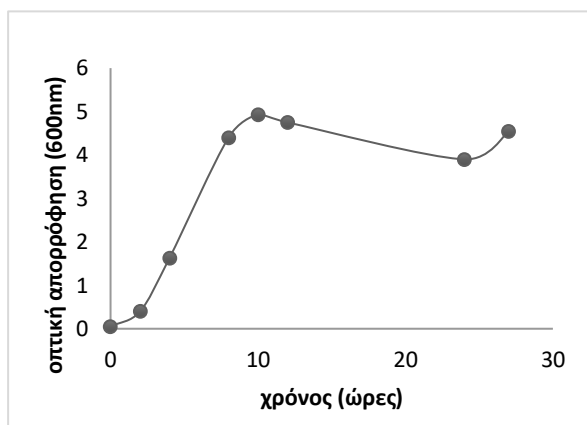


Εικόνα 3.6.3: Παρατηρείται η αντιμικροβιακή δράση του στελέχους *L. suionicum* am SF03 έναντι τους στελέχους δείκτη όπως αυτή ελέγχθηκε για τις διάφορες χρονικές στιγμές της καμπύλης ανάπτυξης.

3.6.4 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ *ESCHERICHIA COLI* ATCC 25922 ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΣΘΗΚΗ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟΥ ΤΟΥ *LEUCONOSTOC SUIONICUM* AM SF03 (ZANGENEH ET AL., 2020)

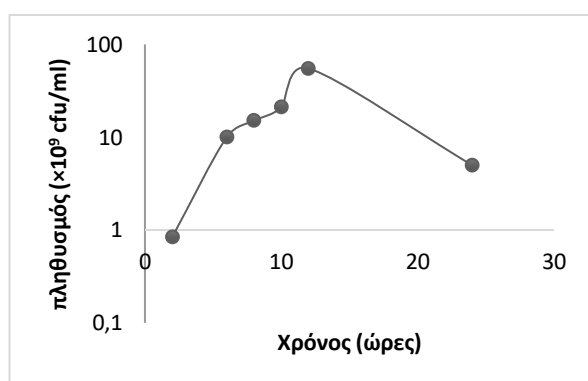
Στη συνέχεια, δημιουργήθηκαν καμπύλη ανάπτυξης του επιλεγμένου στελέχους δείκτη *E. coli* ATCC 25922 με βάση την οπτική απορρόφηση στα 600 nm σε σχέση με το χρόνο και καμπύλη ανάπτυξής του πληθυσμού του στελέχους σε σχέση με το χρόνο στους 37°C. Με αυτό τον

τρόπο είναι δυνατός ο προσδιορισμός των διαφόρων φάσεων ανάπτυξης του μικροοργανισμού και της μελέτης του πληθυσμού του στις διάφορες χρονικές στιγμές.



Χρόνος (ώρες)	Οπτική απορρόφηση (600 nm)
0	0.052
2	0.4
4	1.63
8	4.4
10	4.93
12	4.75
24	3.9
27	4.55

Γράφημα-Πίνακας 3.6.4.α: Καμπύλη ανάπτυξης του επιλεγμένου στελέχους δείκτη *E. coli* ATCC 25922 στους 37°C με βάση την οπτική απορρόφηση στα 600 nm σε σχέση με το χρόνο.



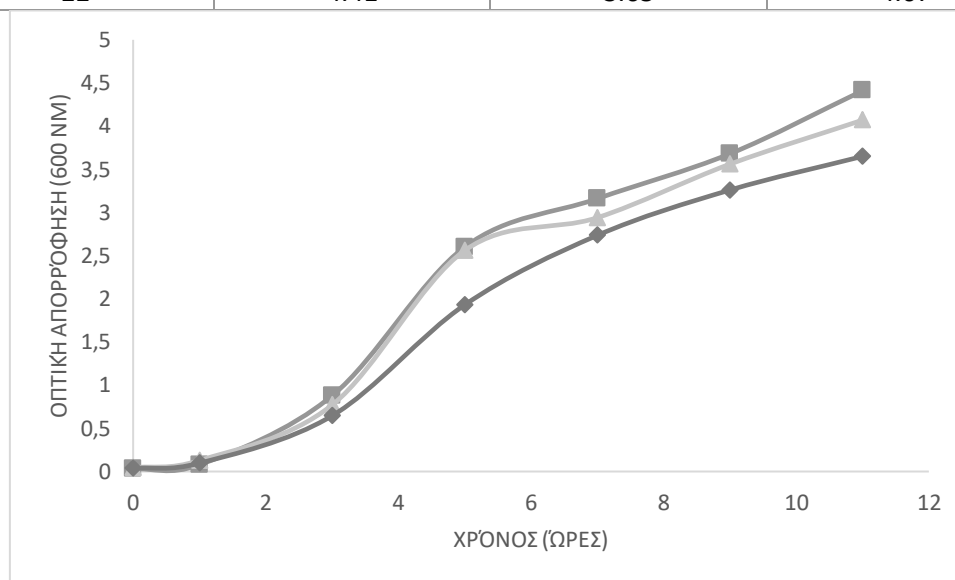
Χρόνος (ώρες)	Πληθυσμός (cfu/ml)
2	8.4×10^8
6	10×10^9
8	1.5×10^{10}
10	2.1×10^{10}
12	5.5×10^{10}
24	5×10^9

Γράφημα-Πίνακας 3.6.4.β: Καμπύλη ανάπτυξης του επιλεγμένου στελέχους δείκτη *E. coli* ATCC 25922 στους 37°C με βάση τον πληθυσμό σε σχέση με το χρόνο.

Με βάση την καμπύλη ανάπτυξης της οπτικής απορρόφησης σε σχέση με το χρόνο, η εκθετική φάση ξεκινάει στις 2 ώρες, το μέσο της εκθετικής φάσης είναι κοντά στις 6 ώρες, ενώ το τέλος της και η αρχή της στατικής φάσης είναι στις 10 ώρες. Στην καμπύλη ανάπτυξης του πληθυσμού σε σχέση με το χρόνο, στις 6 ώρες ο μικροοργανισμός είναι της τάξης το 10^9 cfu/ml και στις 8 ώρες φθάνει στην ανώτερη τιμή της τάξης 10^{10} cfu/ml.

Έπειτα έγινε καμπύλη ανάπτυξης της καλλιέργειας κυττάρων του *E. coli* ATCC 25922 με προσθήκη υπερκείμενου του στελέχους *L. suionicum* am SF03, με βάση την οπτική απορρόφηση στα 600 nm σε σχέση με τον χρόνο. Από προκαλλιέργεια του επιλεγμένου στελέχους δείκτη *E. coli* ATCC 25922 εμβολιάζονται τρεις φιάλες που περιέχουν 20 ml Luria Broth και η οπτική τους απορρόφηση πρέπει να ξεκινάει κάτω από το 0.1. Μετά την πάροδο μιας ώρας στην πρώτη φιάλη προστίθενται 4 ml υπερκείμενο του στελέχους *L. suionicum* am SF03, στη δεύτερη 4 ml 0,9% NaCl και η τρίτη μένει ως έχει (μάρτυρας). Συνεχίζονται οι μετρήσεις στις συγκεκριμένες χρονικές στιγμές που επιλέχθηκαν.

Χρόνος (ώρες)	Οπτική απορρόφηση (600nm)		
	Μάρτυρας	Με υπερκείμενο	Με 0,9% NaCl
0	0.03	0.036	0.044
1	0.078	0.097	0.128
3	0.877	0.645	0.77
5	2.6	1.93	2.56
7	3.16	2.735	2.94
9	3.68	3.26	3.56
11	4.41	3.65	4.07



Γράφημα-Πίνακας 3.6.4.γ: Καμπύλη ανάπτυξης του επιλεγμένου στελέχους δείκτη *E. coli* ATCC 25922 με προσθήκη υπερκείμενου του στελέχους *L. suionicum* am SF03. Με τετράγωνο σχήμα απεικονίζεται η καμπύλη ανάπτυξης του μάρτυρα, με σχήμα ρόμβου του δείγματος που έγινε η προσθήκη του υπερκείμενου και με τρίγωνο σχήμα του δείγματος που έγινε προσθήκη του 0,9% NaCl.

Παρατηρείται ότι η ανάπτυξη του στελέχους *E. coli* ATCC 25922 καθυστερεί με την προσθήκη υπερκείμενου του στελέχους am SF03, συγκριτικά με τον μάρτυρα και το δείγμα στο οποίο έχει γίνει αραιώση με την προσθήκη 0,9% NaCl.

3.7 ΚΑΤΑΒΥΘΙΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΗΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΥΤΗΣ ΕΝΑΝΤΙ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

Με σκοπό την καταβύθιση της πιθανής βακτηριοσίνης των μικροοργανισμών *Leuconostoc suionicum* am SF03, *Lactobacillus pentosus* 208 και *Leuconostoc mesenteroides* 105 ακολουθήθηκε η πειραματική πορεία που αναφέρθηκε παραπάνω (2.5.16). Η καταβύθιση έγινε σε δύο διαφορετικά pH (5.5, 6.5) και σε δύο διαφορετικούς κορεσμούς με θειικό αμμώνιο (60%, 80%) για κάθε τιμή pH. Έπειτα ελέγχθηκε το καταβύθισμα των τριών μικροοργανισμών για την αντιμικροβιακή του δράση έναντι του στελέχους δείκτη *Escherichia coli* ATCC 25922, με σκοπό την επιλογή των βέλτιστων συνθηκών καταβύθισης. Η

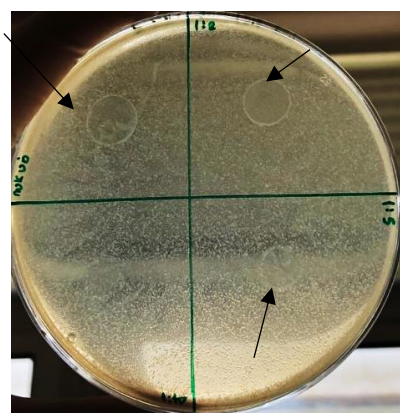
αντιμικροβιακή δράση ελέγχθηκε πέντε φορές ώστε να παρατηρηθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω:

Πίνακας 3.7.α: Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης του καταβυθίσματος του μικροοργανισμού *Leuconostoc suionicum* am SF03 στις διάφορες συνθήκες.

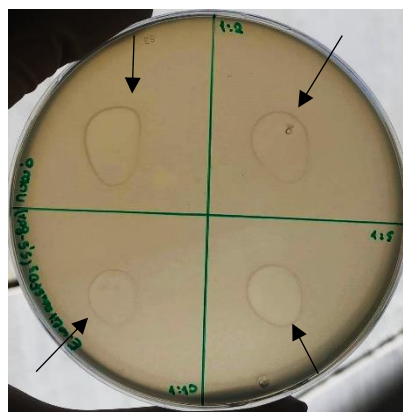
	πυκνό	1:2	1:3	1:5	1:10
<i>L. suionicum</i> am SF03 + <i>E. coli</i> ATCC 25922 (pH 5.5 – 60%)	(1) ✓	(1) ✓	(1)-	(1) ×	(1) ×
	(2) ✓	(2) ×	(2)-	(2) ×	(2) ×
	(3) ×	(3) ×	(3) ×	(3) ×	(3)-
	(4) ×	(4) ×	(4) ×	(4) ×	(4)-
	(5) ✓	(5) ✓	(5) ×	(5) ×	(5)-
<i>L. suionicum</i> am SF03 + <i>E. coli</i> ATCC 25922 (pH 5.5 – 80%)	(1) ×	(1) ×	(1)-	(1) ×	(1) ×
	(2) ✓	(2) ✓	(2)-	(2) ✓	(2) ✓
	(3) ×	(3) ×	(3) ×	(3) ×	(3)-
	(4) ×	(4) ×	(4) ×	(4) ×	(4)-
	(5) ✓✓	(5) ×	(5) ×	(5) ×	(5)-
<i>L. suionicum</i> am SF03 + <i>E. coli</i> ATCC 25922 (pH 6.5 – 60%)	(1) ✓	(1) ✓	(1)-	(1) ✓	(1) ×
	(2) ×	(2) ×	(2)-	(2) ×	(2) ×
	(3) ×	(3) ×	(3) ×	(3) ×	(3)-
	(4) ×	(4) ×	(4) ×	(4) ×	(4)-
	(5) ✓✓	(5) ✓✓	(5) ✓✓	(5) ✓✓	(5)-
<i>L. suionicum</i> am SF03 + <i>E. coli</i> ATCC 25922 (pH 6.5 – 80%)	(1) ×	(1) ×	(1) -	(1) ×	(1) ×
	(2) ✓	(2) ✓	(2)-	(2) ✓	(2) ✓
	(3) ✓✓	(3) ✓	(3) ✓	(3) ✓✓	(3) -
	(4) ✓✓	(4) ✓	(4) ✓	(4) ✓	(4)-
	(5) ✓✓	(5) ×	(5) ×	(5) ×	(5)-

Σύμβολα: (✓✓) δεν αναπτύσσεται καθόλου το στέλεχος δείκτης στο σημείο που υπάρχει η σταγόνα με την βακτηριοσίση, (✓) το στέλεχος δείκτης αναπτύσσεται λιγότερο στο σημείο που υπάρχει βακτηριοσίση συγκριτικά με γύρω, (×) το στέλεχος δείκτης αναπτύσσεται κανονικά στο σημείο που υπάρχει βακτηριοσίση, (-) δεν πραγματοποιήθηκε.

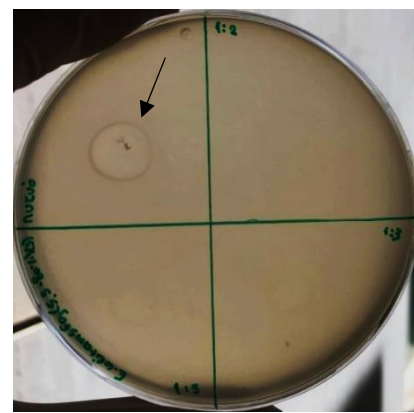
Από τον πίνακα 3.7.α παρατηρείται ότι την καλύτερη δράση με μεγάλη επαναληψιμότητα έχει το καταβύθισμα που έγινε σε pH 6.5 και κορεσμό 80% με θειικό αμμώνιο, χωρίς να αποκλείονται οι υπόλοιπες συνθήκες.

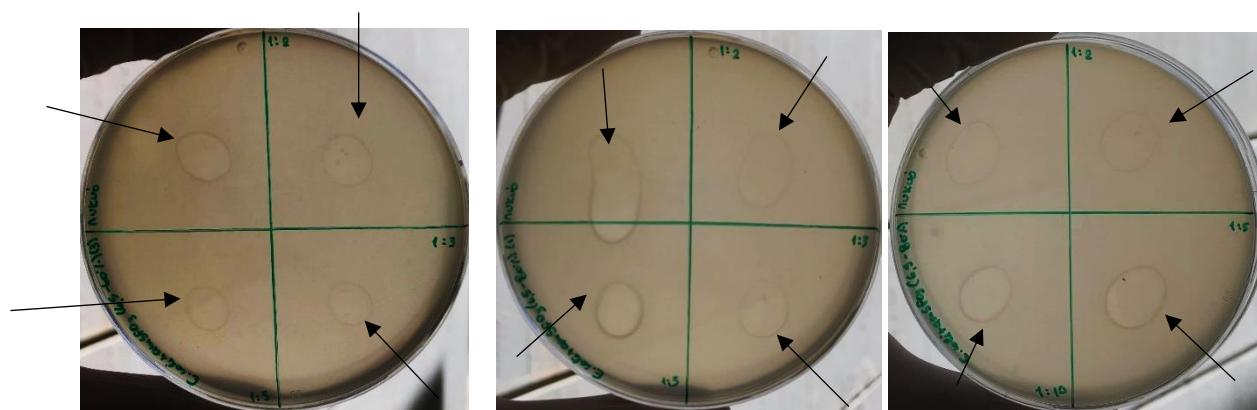


L. suionicum am SF03 + *E. coli* ATCC 25922 (pH 5.5 – 60%)



L. suionicum am SF03 + *E. coli* ATCC 25922 (pH 5.5 – 80%)





L. suionicum am SF03 + *E. coli*
ATCC 25922 (pH 6.5 – 60%)

L. suionicum am SF03 + *E. coli* ATCC 25922 (pH 6.5 – 80%)

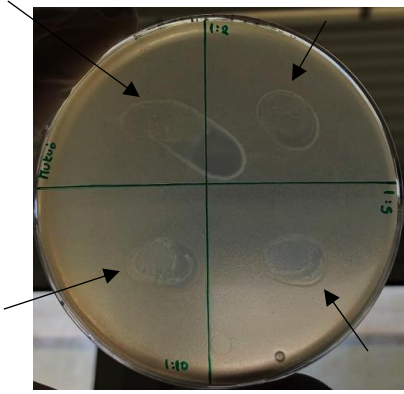
Εικόνες 3.7.α: Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης του καταβυθίσματος του *Leuconostoc suionicum* am SF03 στις διάφορες συνθήκες, έναντι του στελέχους δείκτη *E. coli* ATCC 25922.

Πίνακας 3.7.β: Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης του καταβυθίσματος του *Lactobacillus pentosus* 208 στις διάφορες συνθήκες.

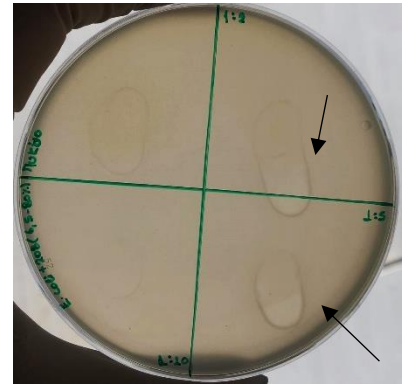
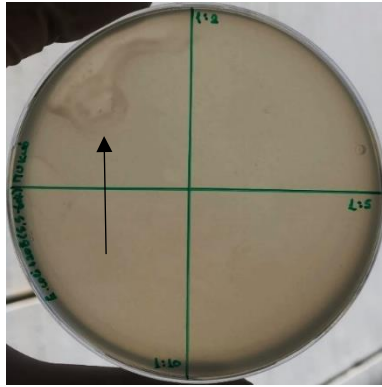
	πυκνό	1:2	1:3	1:5	1:10
<i>Lb. pentosus</i> 208 + <i>E. coli</i> ATCC 25922 (pH 5.5 – 60%)	(1) √√	(1) √√	(1)-	(1) √√	(1) √
	(2) √√	(2)×	(2)-	(2) ×	(2) ×
	(3) ×	(3)×	(3)×	(3) ×	(3)-
	(4) ×	(4)×	(4) ×	(4) ×	(4)-
	(5) √	(5) √	(5) ×	(5) ×	(5)-
<i>Lb. pentosus</i> 208 + <i>E. coli</i> ATCC 25922 (pH 5.5 – 80%)	(1)×	(1) ×	(1)-	(1) ×	(1) ×
	(2) √√	(2) √√	(2)-	(2) √√	(2) √
	(3) ×	(3) ×	(3) ×	(3) ×	(3)-
	(4)×	(4) ×	(4) ×	(4) ×	(4)-
	(5) ×	(5) √	(5) √	(5) √	(5)-
<i>Lb. pentosus</i> 208 + <i>E. coli</i> ATCC 25922 (pH 6.5 – 60%)	(1) √	(1) √	(1)-	(1) √	(1) √
	(2) √√	(2) √√	(2)-	(2) √√	(2) √
	(3) ×	(3) ×	(3) ×	(3) ×	(3)-
	(4) √	(4)√	(4)×	(4) ×	(4)-
	(5) √	(5) √	(5) √	(5) ×	(5)-
<i>Lb. pentosus</i> 208 + <i>E. coli</i> ATCC 25922 (pH 6.5 – 80%)	(1) √	(1) √	(1) -	(1) √	(1) ×
	(2) √	(2) √√	(2)-	(2) √√	(2) √
	(3)×	(3)×	(3) ×	(3)×	(3) -
	(4) ×	(4) ×	(4) ×	(4) ×	(4)-
	(5) ×	(5) ×	(5) ×	(5) ×	(5)-

Σύμβολα: (√√) δεν αναπτύσσεται καθόλου το στέλεχος δείκτης στο σημείο που υπάρχει η σταγόνα με την βακτηριοσίνη, (√) το στέλεχος δείκτης αναπτύσσεται λιγότερο στο σημείο που υπάρχει βακτηριοσίνη συγκριτικά με γύρω, (×) το στέλεχος δείκτης αναπτύσσεται κανονικά στο σημείο που υπάρχει βακτηριοσίνη, (-) δεν πραγματοποιήθηκε.

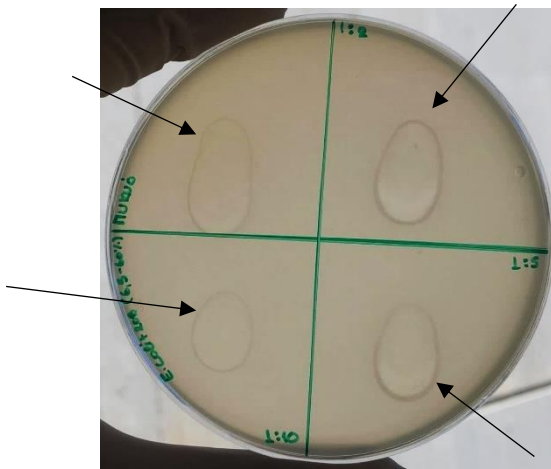
Από τον πίνακα 3.7.β παρατηρείται ότι την καλύτερη δράση με μεγάλη επαναληψιμότητα έχει το καταβύθισμα που έγινε σε pH 5.5 αλλά και 6.5, με κορεσμό 60% με θειικό αμμώνιο, χωρίς να αποκλείονται οι υπόλοιπες συνθήκες.



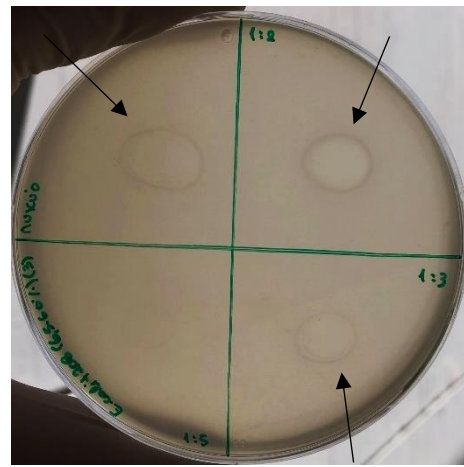
Lb. pentosus 208 + *E. coli* ATCC 25922 (pH 5.5 – 60%)



Lb. pentosus 208 + *E. coli* ATCC 25922 (pH 5.5 – 80%)



Lb. pentosus 208 + *E. coli* ATCC 25922 (pH 6.5 – 60%)



Lb. pentosus 208 + *E. coli* ATCC 25922 (pH 6.5 – 80%)

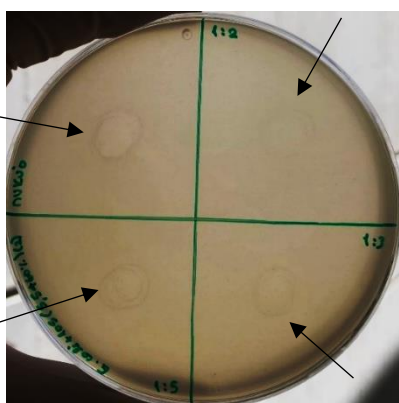
Εικόνες 3.7.β: Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης του καταβυθίσματος του *Lactobacillus pentosus* 208 στις διάφορες συνθήκες, έναντι του στελέχους δείκτη *E. coli* ATCC 25922.

Πίνακας 3.7.γ: Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης του καταβυθίσματος του *Leuconostoc mesenteroides* 105 στις διάφορες συνθήκες.

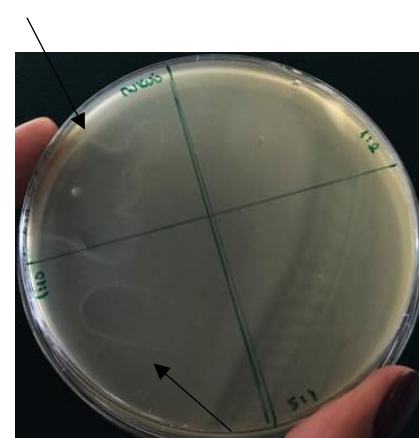
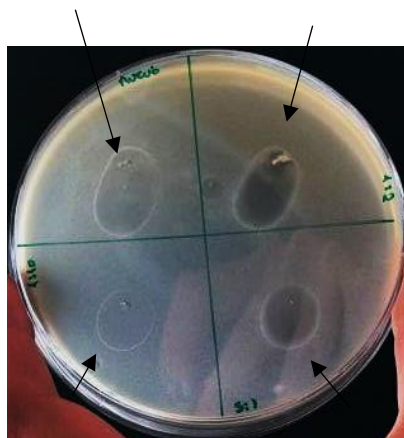
	πυκνό	1:2	1:3	1:5	1:10
L. mesenteroides 105 + E. coli ATCC 25922 (pH 5.5 – 60%)	(1) √√ (2) × (3) √√ (4) √√ (5) √	(1) × (2) √√ (3) √√ (4) √√ (5) √	(1)- (2)- (3) × (4) √ (5) √	(1) × (2) √√ (3) × (4) √ (5) √	(1) × (2) √√ (3)- (4)- (5)-
L. mesenteroides 105 + E. coli ATCC 25922 (pH 5.5 – 80%)	(1) √√ (2) × (3) × (4) × (5) ×	(1) √√ (2) × (3) × (4) × (5) ×	(1)- (2)- (3) × (4) × (5) ×	(1) √ (2) × (3) × (4) × (5) ×	(1) √ (2) × (3)- (4)- (5)-
L. mesenteroides 105 + E. coli ATCC 25922 (pH 6.5 – 60%)	(1) √ (2) × (3) × (4) √ (5) ×	(1) √ (2) √√ (3) × (4) √√ (5) √√	(1)- (2)- (3) × (4) × (5) √√	(1) × (2) √√ (3) × (4) × (5) ×	(1) × (2) √√ (3)- (4)- (5)-
L. mesenteroides 105 + E. coli ATCC 25922 (pH 6.5 – 80%)	(1) × (2) √ (3) × (4) × (5) √	(1) × (2) √ (3) × (4) × (5) ×	(1) - (2)- (3) × (4) × (5) ×	(1) × (2) √ (3) × (4) × (5) ×	(1) × (2) √ (3) - (4)- (5)-

Σύμβολα: (√√) δεν αναπτύσσεται καθόλου το στέλεχος δείκτης στο σημείο που υπάρχει η σταγόνα με την βακτηριοσίνη, (√) το στέλεχος δείκτης αναπτύσσεται λιγότερο στο σημείο που υπάρχει βακτηριοσίνη συγκριτικά με γύρω, (×) το στέλεχος δείκτης αναπτύσσεται κανονικά στο σημείο που υπάρχει βακτηριοσίνη, (-) δεν πραγματοποιήθηκε.

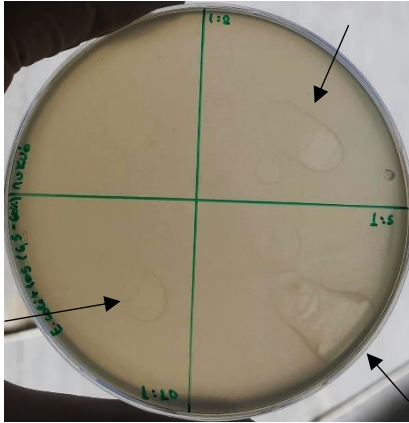
Από τον πίνακα 3.7.γ παρατηρείται ότι την καλύτερη δράση με μεγάλη επαναληψιμότητα έχει το καταβυθισμα που έγινε σε pH 5.5 και κορεσμό 60% με θειικό αμμώνιο, χωρίς να αποκλείονται οι υπόλοιπες συνθήκες.



L. mesenteroides 105 + *E. coli* ATCC 25922 (pH 5.5 – 60%)



L. mesenteroides 105 + *E. coli* ATCC 25922 (pH 5.5 – 80%)



L. mesenteroides 105 + *E. coli*
ATCC 25922 (pH 6.5 – 60%)



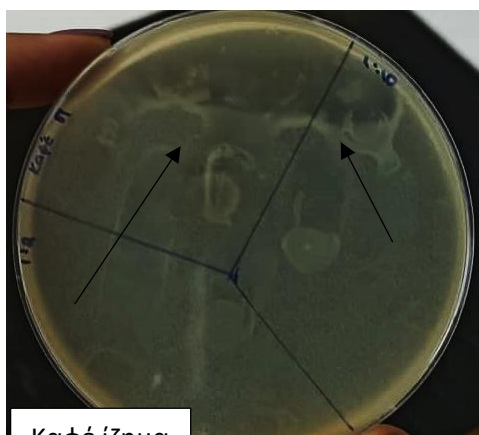
L. mesenteroides 105 + *E. coli*
ATCC 25922 (pH 6.5 – 80%)

Εικόνες 3.7.γ: Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης του καταβυθίσματος του *Leuconostoc mesenteroides* 105 στις διάφορες συνθήκες, έναντι του στελέχους δείκτη *E. coli* ATCC 25922.

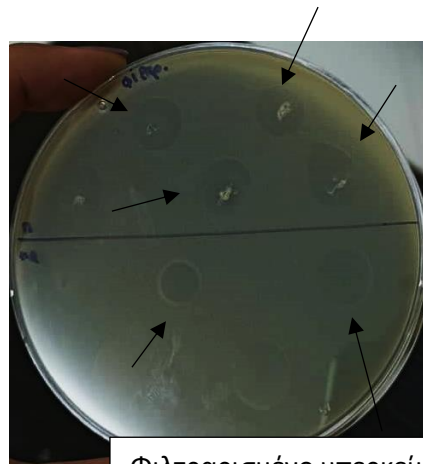
Με μέτρηση των καταβυθισμένων δειγμάτων με τη μέθοδο Bradford παρατηρείται ότι σε όλες τις περιπτώσεις η βέλτιστη συνθήκη που επιλέχθηκε έχει και την μεγαλύτερη συγκέντρωση σε πρωτεΐνες.

Έγινε έλεγχος της δράσης των καταβυθισμάτων και των τριών μικροοργανισμών έναντι επιλεγμένου στελέχους δείκτη, μετά από περίπου πέντε μήνες και η δράση του παραμένει ακόμη.

Κατά την επαναδιαλυτοποίηση του καταβυθίσματος υπήρχε δυσκολία, λόγω της δημιουργίας κολλώδους καφέ ιζήματος στα τοιχώματα των σωλήνων που χρησιμοποιήθηκαν. Γι' αυτό το λόγο προσδιορίστηκε η συγκέντρωση πρωτεΐνης του καφέ ιζήματος, το οποίο είχε συλλεχθεί και επαναδιαλυτοποιηθεί σε ddH₂O, και του φιλτραρισμένου υπερκείμενου του καταβυθίσματος με τη μέθοδο Lowry. Μετά από φωτομέτρηση στα 750 nm και τον υπολογισμό της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης μέσω της πρότυπης καμπύλης προέκυψε ότι το καφέ ίζημα είχε τριπλάσια πρωτεΐνη από το υπερκείμενο του καταβυθίσματος το οποίο είχε τόσο μικρή συγκέντρωση που δεν μπορούσε καν να ανιχνευτεί με τη μέθοδο Bradford. Στη συνέχεια, σε θρεπτικό υλικό Luria soft Agar εμβολιασμένο με στέλεχος δείκτη αφέθηκαν σταγόνες από το δείγμα με το καφέ ίζημα και το υπερκείμενο του καταβυθίσματος και ακολούθησε επώαση στους 30°C μέχρι την επόμενη μέρα. Από τα αποτελέσματα που φαίνονται και παρακάτω (Εικόνα 3.7.δ) παρατηρείται ότι και στις δύο περιπτώσεις έχει δραστηριότητα, επομένως η αντιμικροβιακή ουσία βρίσκεται και στο καφέ ίζημα αλλά και στο υπερκείμενο του καταβυθίσματος. Συνεπώς χρησιμοποιούνται και τα δύο μαζί χωρίς να διαχωριστούν για καλύτερη εικόνα.



Καφέ ίζημα



Φιλτραρισμένο υπερκείμενο

Εικόνες 3.7.δ: Αντιμικροβιακή δράση ιζήματος και υπερκείμενου καταβυθίσματος.

3.8 ΠΕΡΑΙΤΕΡΩ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ *LEUCONOSTOC SUIONICUM* AM SF03

Εστιάζοντας στο στέλεχος *L. suionicum* am SF03, έγινε περαιτέρω μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης που εμφάνισε καθώς υπάρχουν λιγότερες πληροφορίες για την αντιμικροβιακή δράση γενικά του είδους *suionicum*.

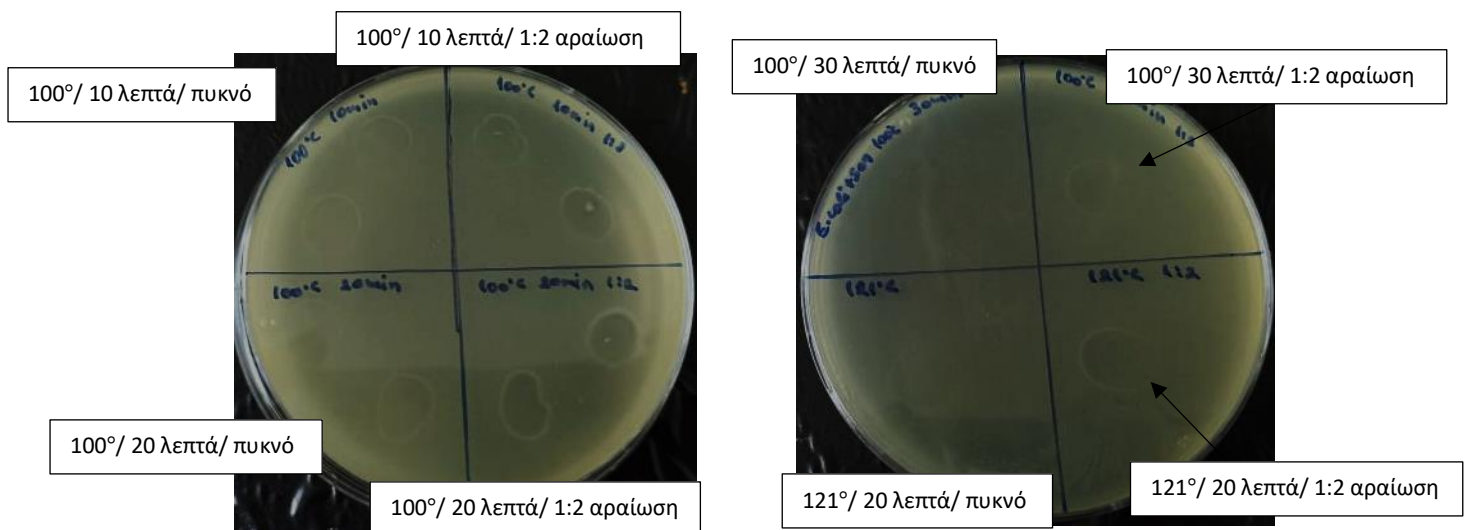
3.8.1 ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΟΥ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΟΥ *LEUCONOSTOC SUIONICUM* AM SF03 (DÜNDAR ET AL., 2016; J. ZHANG ET AL., 2018)(ΕΛΑΦΡΩΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ)

Για να αποδειχθεί ότι η αντιμικροβιακή δράση που παρατηρήθηκε προέρχεται από ένα πρωτεϊνικής φύσης μόριο, πραγματοποιήθηκε μια σειρά προσδιορισμών στο υπερκείμενο καλλιέργειας του *Leuconostoc suionicum* am SF03. Από καλλιέργεια 200 ml MRS Broth, συλλέχθηκε το υπερκείμενο με φυγοκέντρηση στα 6.000 g/ 20 λεπτά/ 4°C. Στη συνέχεια ρυθμίστηκε το pH στα 6.5 και φιλτραρίστηκε. Μετά από οποιαδήποτε κατεργασία υποστεί το υπερκείμενο τοποθετείται στη επιφάνεια Luria soft Agar εμβολιασμένο με στέλεχος δείκτη σε μορφή σταγόνας (πυκνό και 1:2 αραιωμένο). Επώαζεται μέχρι την επόμενη μέρα στους 30°C.

- **Κατεργασία σε διαφορετικές θερμοκρασίες και διαφορετικούς χρόνους**

Πίνακας 3.8.1.α: Έλεγχος θερμοανθεκτικότητας.

Ποσότητα	Θερμοκρασία	Χρόνος παραμονής	Δράση
5 ml	Θερμοκρασία δωματίου ~25°C	24 ώρες	Δεν παραμένει
5 ml	4°C	24 ώρες	Παραμένει
1 ml	100°C	10 λεπτά	Παραμένει
1 ml	100°C	20 λεπτά	Παραμένει
1 ml	100°C	30 λεπτά	Παραμένει
20 ml	121°C (αυτόκαυστο)	20 λεπτά	Παραμένει



Εικόνες 3.8.1.α: Επίδραση θερμοκρασίας στην αντιμικροβιακή δράση του στελέχους *L. suionicum* am SF03.

Παρατηρείται ότι η αντιμικροβιακή δράση δεν μεταβάλλεται με την κατεργασία σε υψηλές θερμοκρασίες και διαφορετικούς χρόνους, επομένως το μόριο που την προκαλεί είναι θερμοανθεκτικό.

- **Κατεργασία με ένζυμα**

Τα ένζυμα που δοκιμάστηκαν ήταν η τρυψίνη (0,1 mg/ml), η προνάση (1 mg/ml) και η πρωτεϊνάση K (1 mg/ml). Μετά την προσθήκη τους σε 1 ml υπερκειμένου ακολούθησε επώαση στους 37°C για 2 ώρες και στη συνέχεια βρασμός στους 100°C για 10 λεπτά ή στους 121°C για 20 λεπτά (αυτόκαυστο), ώστε να αδρανοποιηθούν τα ένζυμα.

Πίνακας 3.8.1.β: Κατεργασία με ένζυμα.

Ένζυμο	Δράση
Τρυψίνη	Παραμένει
Προνάση	Παραμένει
Πρωτεϊνάση K	Δεν παραμένει

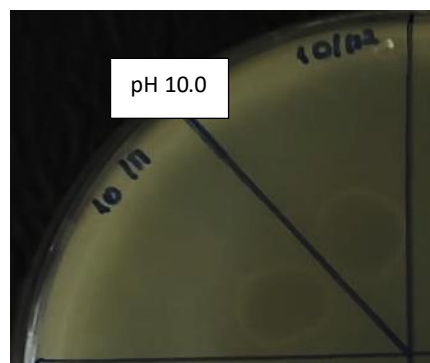
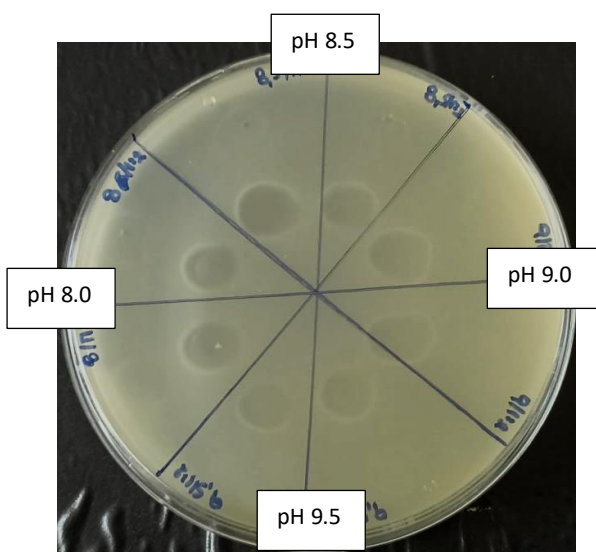
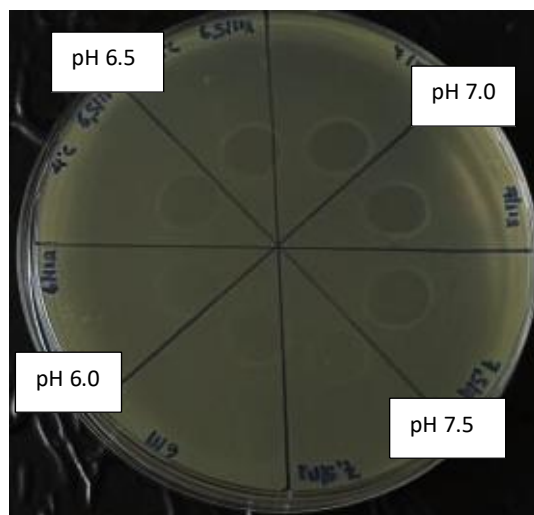
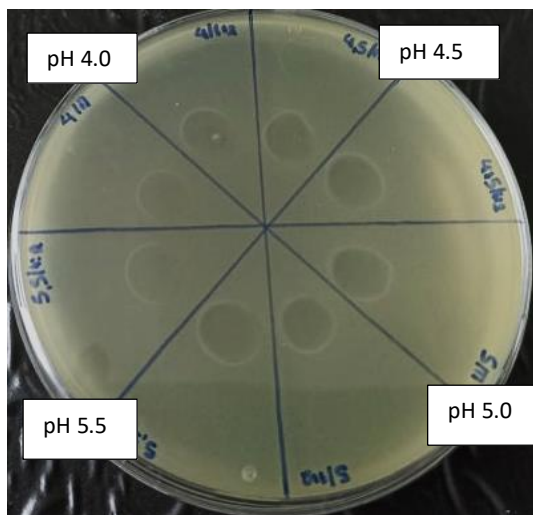
Παρατηρείται ότι έστω και ένα από τα παραπάνω ένζυμα απενεργοποιεί την αντιμικροβιακή δράση του στελέχους *L. suionicum* am SF03 πράγμα που υποδηλώνει ότι το μόριο που την προκαλεί είναι πρωτεϊνικής φύσης.

- **Μεταβολή του pH**

Το pH του υπερκειμένου ρυθμίζεται από 2-10 (ανά μισή μονάδα) και τα δείγματα επωάζονται στους 4°C για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα επαναφέρεται το pH στους 6.5.

Πίνακας 3.8.1.γ: Μεταβολή pH υπερκειμένου.

pH	Αραίωση	Δράση
2	πυκνό	Δεν παραμένει
	1:2	Δεν παραμένει
2.5	πυκνό	Δεν παραμένει
	1:2	Δεν παραμένει
3	πυκνό	Δεν παραμένει
	1:2	Δεν παραμένει
3.5	πυκνό	Δεν παραμένει
	1:2	Δεν παραμένει
4	πυκνό	Παραμένει
	1:2	Παραμένει
4.5	πυκνό	Παραμένει
	1:2	Παραμένει
5	πυκνό	Παραμένει
	1:2	Παραμένει
5.5	πυκνό	Παραμένει
	1:2	Παραμένει
6	πυκνό	Παραμένει
	1:2	Παραμένει
6.5	πυκνό	Παραμένει
	1:2	Παραμένει
7	πυκνό	Παραμένει
	1:2	Παραμένει
7.5	πυκνό	Παραμένει
	1:2	Παραμένει
8	πυκνό	Παραμένει
	1:2	Παραμένει
8.5	πυκνό	Παραμένει
	1:2	Παραμένει
9	πυκνό	Παραμένει
	1:2	Παραμένει
9.5	πυκνό	Παραμένει
	1:2	Παραμένει
10	πυκνό	Παραμένει
	1:2	Παραμένει



Εικόνες 3.8.1.β: Επίδραση pH στην αντιμικροβιακή δράση του στελέχους *L. suionicum* am SF03.

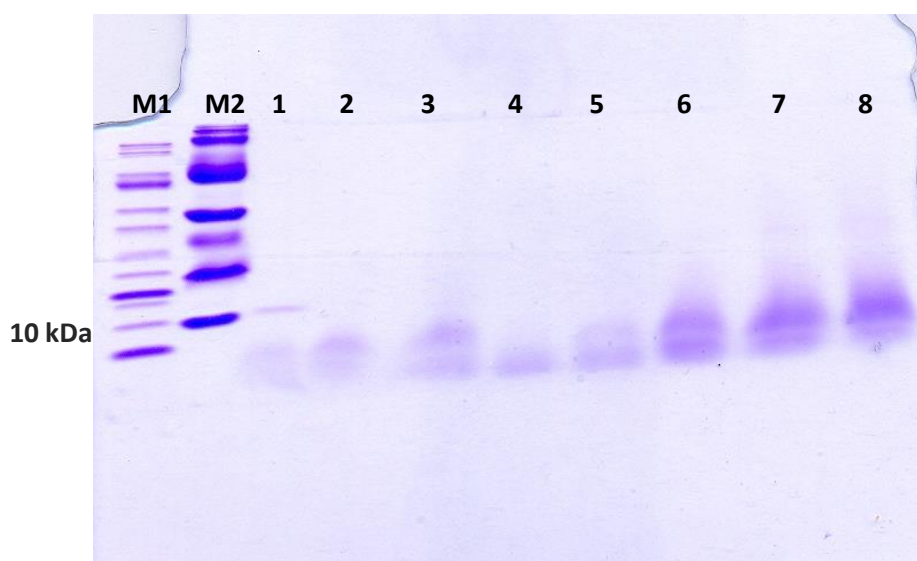
Παρατηρείται ότι η αντιμικροβιακή δράση του στελέχους *L. suionicum* am SF03 χάνεται μόνο όταν το pH είναι κάτω από 4, ενώ παραμένει ακόμα και μέχρι την τιμή 10 σε αρκετά βασικό περιβάλλον.

Τα παραπάνω τρυβλία δοκιμάστηκαν να αναπτυχθούν στους 30 και στους 37°C (βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του στελέχους δείκτη). Το αποτέλεσμα ήταν ακριβώς το ίδιο όσον αφορά την ανάπτυξη του στελέχους δείκτη και την ζώνη αναστολής που δημιουργούνται από το υπερκείμενο. Επιλέχθηκαν οι 30°C για να αναπτύσσονται τα τρυβλία.

3.8.2 ΕΥΡΕΣΗ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΤΗΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΟΣΙΝΗΣ ΤΟΥ *LEUCONOSTOC SUIONICUM* AM SF03 (SCHÄGGER, 2006)

Έγινε προσπάθεια εύρεσης του μεγέθους του πρωτεϊνικού μορίου στο οποίο οφείλεται η αντιμικροβιακή δράση του του στελέχους *L. suionicum* am SF03 έναντι επιλεγμένων στελεχών δεικτών. Μέσω του SDS-PAGE δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση του, πιθανώς λόγω του μικρού μοριακού του βάρους, γι' αυτό το λόγω δοκιμάστηκε το Tricine SDS-PAGE που έχει χαμηλότερο όριο ανίχνευσης.

Αφού μετρήθηκε η ποσότητα πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford σε δείγματα καταβύθισματος από διαφορετικές συνθήκες pH και κορεσμού σε θειικό αμμώνιο και υπερκείμενου, φορτώθηκαν στο πήγμα διαφορετικές συγκεντρώσεις αυτών. Η εικόνα που προέκυψε εμφανίζεται παρακάτω:



Εικόνα 3.8.2: Ηλεκτροφόρηση Tricine SDS PAGE πήγματος για το στελέχος *L. suionicum* am SF03. M1: πρωτεϊνικός μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών (σε kDa: 200, 150, 100, 85, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10), M2: πρωτεϊνικός μάρτυρας μικρότερων μοριακών βαρών (σε kDa: 198,135, 103,158, 58,156, 41,596, 27,704, 20,537, 15,204, 6,456), 1: υπερκείμενο του στελέχους am SF03 (10 μ l), 2: υπερκείμενο του στελέχους am SF03 (15 μ l), 3: καταβύθισμα του στελέχους am SF03 σε pH 5.5 και κορεσμό 60% σε $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (15 μ l), 4: καταβύθισμα του στελέχους am SF03 σε pH 6.5 και κορεσμό 60% σε $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5 μ l), 5: καταβύθισμα του στελέχους am SF03 σε pH 6.5 και κορεσμό 60% σε $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10 μ l), 6: καταβύθισμα του στελέχους am SF03 σε pH 6.5 και κορεσμό 80% σε $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5 μ l), 7: καταβύθισμα του στελέχους am SF03 σε pH 6.5 και κορεσμό 80% σε $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10 μ l), 8: καταβύθισμα του στελέχους am SF03 σε pH 6.5 και κορεσμό 80% σε $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (15 μ l).

Παρατηρείται ότι σε όλα τα δείγματα εμφανίζονται ζώνες κάτω από τα 10 kDa, οι οποίες είναι πιο έντονες στο καταβύθισμα και συγκεκριμένα στις βέλτιστες συνθήκες καταβύθισης συγκριτικά με το υπερκείμενο.

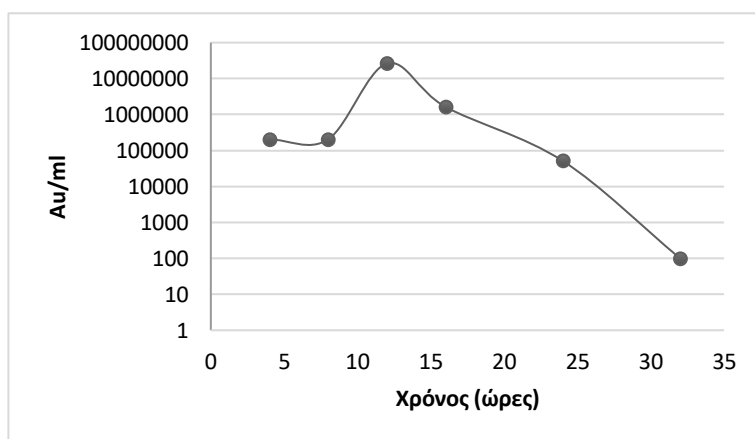
3.8.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ARBITRARY UNITS (AU) ANA ML ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΟΥΣΙΑΣ ΤΟΥ *LEUCONOSTOC SUIONICUM* AM SF03 (BAREFOOT & KLAENHAMMER, 1983; BATDORJ ET AL., 2006; YAMAMOTO ET AL., 2003)

Για τον προσδιορισμό των Au/ml συλλέχθηκε υπερκείμενο του στελέχους *L. suionicum* am SF03 (pH 6.5, φιλτραρισμένο) από διαφορετικές φάσεις της καμπύλης ανάπτυξης του και έγιναν σε αυτό δυαδικές αραιώσεις με ddH₂O. Αφέθηκαν σταγόνες (20 μ l) των διαφορετικών αραιώσεων στην επιφάνεια Luria soft Agar εμβολιασμένου με 0,1 % v/v στέλεχος δείκτη. Ο υπολογισμός των Au/ml γίνεται από το τύπο: **2ⁿ × 1000 μ l / 20 μ l.**

Πίνακας 3.8.3.α: Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης υπερκειμένου του στελέχους *L. suionicum* am SF03 από διαφορετικά σημεία της καμπύλης ανάπτυξης του και σε διαφορετικές αραιώσεις έναντι στελέχους δείκτη.

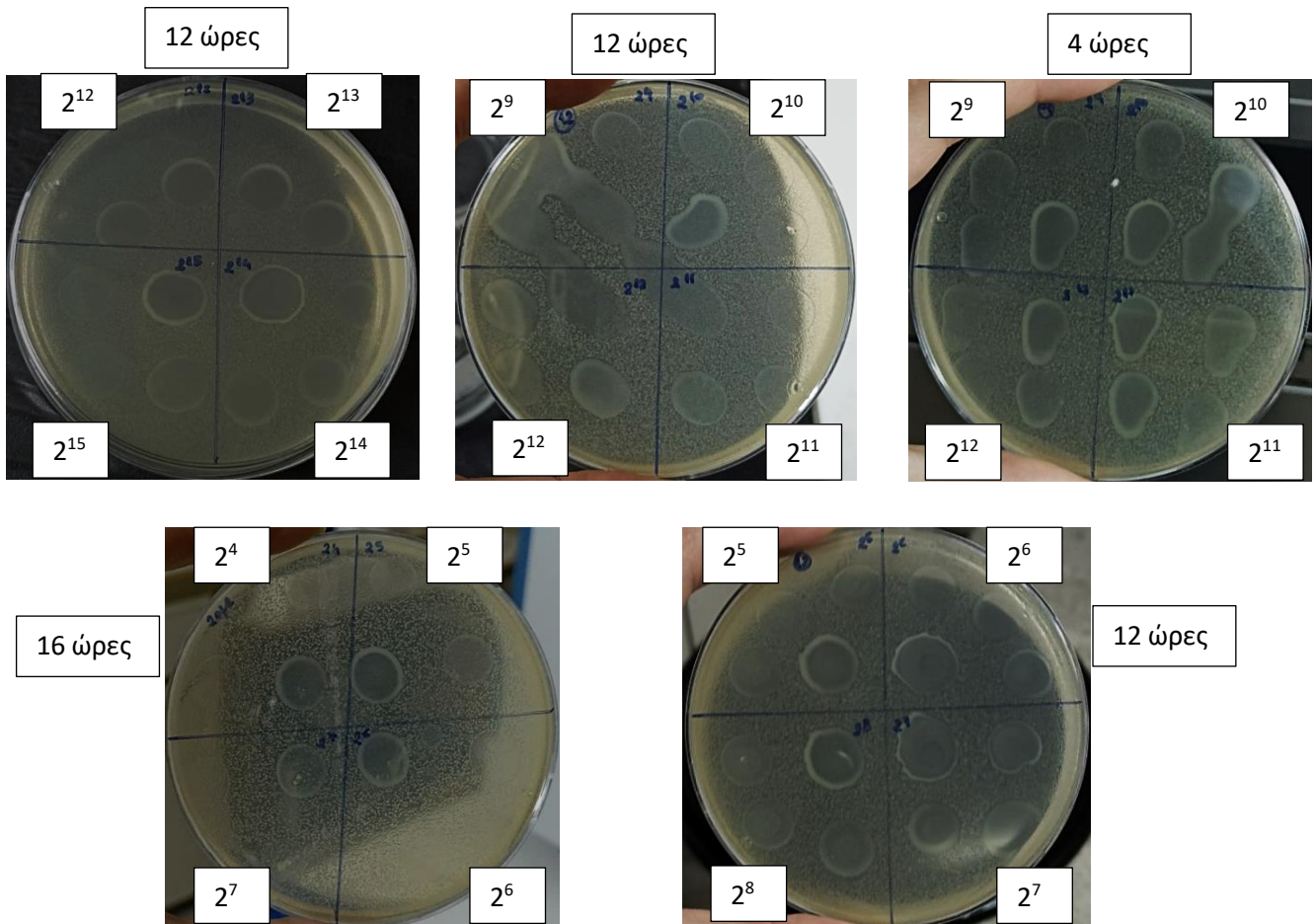
	4 ώρες	8 ώρες	12 ώρες	16 ώρες	24 ώρες	32 ώρες
n= 1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2	✓	✓	✓	✓	✓	-
3	✓	✓	✓	✓	✓	-
4	✓	✓	✓	✓	✓	-
5	✓	✓	✓	✓	✓	-
6	✓	✓	✓	✓	✓	-
7	✓	✓	✓	✓	✓	-
8	✓	✓	✓	✓	✓	-
9	✓	✓	✓	✓	✓	-
10	✓	✓	✓	✓	✓	-
11	✓	✓	✓	✓	-	-
12	✓	✓	✓	✓	-	-
13	-	-	✓	✓	-	-
14	-	-	✓	✓	-	-
15	-	-	✓	-	-	-
16	-	-	✓	-	-	-
17	-	-	✓	-	-	-
18	-	-	✓	-	-	-
19	-	-	✓	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-

Σύμβολα: (✓) εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση, (-) δεν εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση.



Χρονική στιγμή που λήφθηκε το υπερκείμενο κατά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού	Μέγιστη δυαδική αραιώση που εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση	Au/ml
4 ώρες	2^{12}	204×10^3
8 ώρες	2^{12}	204×10^3
12 ώρες	2^{19}	26214×10^3
16 ώρες	2^{14}	819×10^3
24 ώρες	2^{10}	512×10^2
32 ώρες	2^1	10^2

Γράφημα-Πίνακας 3.8.3.β: Αποτελέσματα υπολογισμού Au/ml.



Εικόνες 3.8.3: Αντιμικροβιακή δράση υπερκευμένου του στελέχους *L. suionicum* am SF03 από διαφορετικές χρονικές στιγμές της καμπύλης ανάπτυξης του και σε διαφορετικές αραιώσεις.

Όπως έχει αναφερθεί παραπάνω η ένωση που προκαλεί την αντιμικροβιακή δράση φαίνεται να είναι πρωτεϊνικής φύσης (βλέπε 3.8.1), αλλά η πολύ υψηλή τιμή των Au/ml που εμφανίζεται χρήζει περαιτέρω διερεύνησης λόγω του ότι δεν χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο καταλάση στο ανωτέρω πείραμα. Είναι επομένως πιθανόν να οφείλεται και σε άλλους παράγοντες (π.χ. H_2O_2).

4^ο ΚΕΦΑΛΑΙΟ: ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) χρησιμοποιούνται ευρέως ως καλλιέργειες εκκίνησης κατά την παραγωγή ζυμούμενων τροφίμων και παίζουν σημαντικό ρόλο στη συντήρησή τους, την μικροβιολογική σταθερότητα τους και την παραγωγή του αρώματος σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων (Todoron & Dicks, 2004). Επίσης αποτελούν κομμάτι της ενδογενούς μικροβιακής χλωρίδας του ανθρώπου και γενικότερα των θηλαστικών. Πολλά από αυτά τα βακτήρια παράγουν ριβοσωμικά συντιθέμενα, αντιμικροβιακά και θερμοανθεκτικά πεπτίδια, μικρού μοριακού βάρους που ονομάζονται βακτηριοσίνες. Οι βακτηριοσίνες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, αυτές που ανήκουν στην τάξη I και είναι γνωστές ως λαντιβιοτικά και αυτές που ανήκουν στην τάξη II και αποτελούνται από μη τροποποιημένα πεπτίδια. Η τάξη II υποδιαιρείται περαιτέρω σε τέσσερις ομάδες, δύο εκ των οποίων, η τάξη IIa και IIb, είναι περισσότερο μελετημένες από τις υπόλοιπες (Nissen-Meyer et al., 2010).

Στην παρούσα εργασία έγινε ταυτοποίηση και χαρακτηρισμός τριών στελεχών που υπήρχαν στην τράπεζα του εργαστηρίου. Τα τρία αυτά στελέχη ανήκουν στην κατηγορία των οξυγαλακτικών βακτηρίων που όπως αναλύθηκε εκτενέστερα και στην Εισαγωγή, έχουν πολλαπλές εφαρμογές τόσο στον άνθρωπο και την υγεία του, όσο και σε βιομηχανική κλίμακα (de Paula et al., 2015; Kaur & Kaur, 2015; Kjos et al., 2011; S. C. Yang et al., 2014).

Οι *Lactobacillus* και πιο συγκεκριμένα το είδος *plantarum*, είναι ιδιαίτερα μελετημένοι μικροοργανισμοί και χρησιμοποιούνται ευρέως στην παραγωγή ζυμούμενων τροφίμων και κυρίως γαλακτοκομικών προϊόντων, ενώ παράγουν ποικιλία αντιμικροβιακών ενώσεων, οι οποίες μπορούν να συμβάλλουν στη συντήρησή τους (Batt, 2014). Πολλά είδη που ανήκουν στο συγκεκριμένο γένος έχουν μεγάλη ομολογία 16S rRNA αλληλουχίας (de Angelis & Gobetti, 2016), γι' αυτό το λόγο διενεργήθηκε ένα multiplex PCR (Torriani et al., 2001) για τον ακριβή προσδιορισμό του είδους του στελέχους *Lactobacillus plantarum* 208, ο οποίος όπως τελικά φαίνεται και από την Εικόνα 3.1.5 ανήκει στο είδος *pentosus* καθώς εμφανίζεται κοντά στα 218 bp. Στο είδος *pentosus* συναντώνται στελέχη που χαρακτηρίζονται ως προβιοτικά (Abo Saif & Sakr, 2020; Ye et al., 2020), ενώ υπάρχουν αρκετές αναφορές για την αντιμικροβιακή τους δράση. Για παράδειγμα το στέλεχος *L. pentosus* DZ35 παράγει δύο βακτηριοσίνες, τις pentocin D21 και pentocin D22, οι οποίες έχουν δράση έναντι Gram θετικών μικροοργανισμών αλλά και αρνητικών (Yi et al., 2020), όπως ακριβώς και η pentocin 31-1, η οποία παράγεται από το στέλεχος *L. pentosus* 31-1 (Liu et al., 2008).

Το γένος *Leuconostoc* περιλαμβάνει θετικούς κατά Gram, ετεροζυμωτικούς μικροοργανισμούς, με πολύπλοκες διατροφικές απαιτήσεις, οι οποίοι αναπτύσσονται βέλτιστα σε θερμοκρασίες μεταξύ 20 και 30°C (μεσόφιλοι) (de Paula et al., 2015). Σε αυτό το γένος ανήκουν οι δύο εκ των τριών προς μελέτη μικροοργανισμών. Όσον αφορά έναν από αυτούς, το στέλεχος *Leuconostoc mesenteroides* 105, έγινε ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA και ακολούθησε κλωνοποίηση σε πλασμιδιακό φορέα με σκοπό την ταυτοποίησή του. Από την *in silico* ανάλυση προέκυψε ότι το στέλεχος *Leuconostoc mesenteroides* 105 εμφανίζει μεγάλη ομοιότητα με στελέχη του είδους *mesenteroides* (υποείδη *mesenteroides*, *dextranicum*, *jonggajibkimchii*, *cremoris*) και *suionicum*. Υπάρχουν αρκετές μελέτες για το είδος *mesenteroides* και την αντιμικροβιακή του δράση, όπως για παράδειγμα για το

στέλεχος *L. mesenteroides* Y105, το οποίο παράγει την βακτηριοσίνη mesentericin Y105 και έχει δράση έναντι του παθογόνου στελέχους *Listeria monocytogenes* (Hechard et al., 1992) και του στελέχους *L. mesenteroides* E131 το οποίο παράγει μία ταυτόσημη βακτηριοσίνη με την mesentericin Y105, την mesentericin E131 (Xiraphi et al., 2008). Αναφορές για κυκλική βακτηριοσίνη υπάρχουν για το στέλεχος *L. mesenteroides* TK41401, το οποίο παράγει την lactocyclin Q με δράση έναντι του *Bacillus coagulans* (Masuda et al., 2011). Επίσης υπάρχουν μελέτες για τις συνθήκες ανάπτυξης και παραγωγής της βακτηριοσίνης, για τα μεταβολικά μονοπάτια και την γενωμική ανάλυση στελεχών αυτού του είδους (Chun, Kim, et al., 2017; Jeon et al., 2017; J. W. Kim et al., 2018; Mataragas et al., 2003; Özcan et al., 2019), σε αντίθεση με τις ελάχιστες αναφορές που έχουν γίνει για το είδος *suionicum* και αφορούν μόνο τη γενωμική ανάλυση στελεχών του (Choi et al., 2021; Chun, Lee, et al., 2017; Gu et al., 2012b; Jeon et al., 2017; Kato & Oikawa, 2017b).

Στο είδος *suionicum* φαίνεται να ανήκει το στέλεχος am SF03, ο μικροοργανισμός που απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε στο εργαστήριο μας (Vandera et al. unpublished). Στην *in silico* μελέτη που πραγματοποιήθηκε φαίνεται ότι έχει 100% ταυτότητα η αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου του με τους *Leuconostoc suionicum* LT-38 και DSM 20241 που είναι και οι μόνοι πλήρως αλληλουχιμένοι του είδους τους (Chun, Lee, et al., 2017; Kato & Oikawa, 2017b). Πιο συγκεκριμένα, με ανάλυση του γονιδιώματος του στελέχους *L. suionicum* LT-38 εντοπίζονται όλα τα γονίδια που απαιτούνται για την παραγωγή, την ρύθμιση και την έκφραση της βακτηριοσίνης, όπως είναι αυτά που κωδικοποιούν την επικουρική πρωτεΐνη, τον μεταφορέα τύπου ABC, τον ρυθμιστή απόκρισης, μία πρωτεϊνική κινάση ιστιδίνης, ένα πεπτίδιο φερομόνη. Επίσης εντοπίζονται τρία ζεύγη γονιδίων που πιθανών να κωδικοποιούν μία βακτηριοσίνη που αποτελείται από δύο πεπτίδια. Με περαιτέρω ανάλυση των αλληλουχιών των συγκεκριμένων γονιδίων με τη βοήθεια του CLUSTALW και του BAGEL4 προκύπτει ότι τέσσερα από τα έξι πιθανά γονίδια εμφανίζουν ομοιότητα με την εντεροσίνη X, μια βακτηριοσίνη που έχει δράση όπως αναφέρουν οι Hu et al., 2010, έναντι θετικών κατά Gram μικροοργανισμών. Δύο εκ των έξι γονιδίων, εμφανίζουν ομοιότητα με τη leucocin B-Ta11a (Felix et al., 1994) και τη plantaricin NC8-b (Jiang et al., 2016) με αντιμικροβιακή δράση έναντι θετικών αλλά και αρνητικών κατά Gram μικροοργανισμών. Τέλος, μόνο ένα από τα έξι γονίδια, εμφανίζει ομοιότητα με βακτηριοσίνες που ανήκουν στην κατηγορία των λαντιβιοτικών, όπως είναι η prochlorosin (Tang & van der Donk, 2012), η bicereucin BsJA₁ και BsJA₂ (Huo & van der Donk, 2016). Λόγω των λιγοστών πληροφοριών γύρω από αυτό το είδος είναι ενδιαφέρουσα η περαιτέρω μελέτη των χαρακτηριστικών αυτού του στελέχους στο οποίο εστιάζει και η έρευνα της παρούσας εργασίας.

Τα στελέχη LAB που προορίζονται για χρήση στην βιομηχανία των τροφίμων, ως προβιοτικά και κατ' επέκταση ως αντιβιοτικά 2^{ης} γενιάς θα πρέπει να έχουν ελεγχθεί για τυχόν ύπαρξη γονιδίων παθογένειας και για την ανθεκτικότητα τους σε αντιβιοτικά (Kjos et al., 2011). Γενικότερα όμως τα LAB έχουν αναγνωριστεί ως ασφαλή (GRAS – General Recognized as Safe) για την κατανάλωση από τον άνθρωπο (Colautti et al., 2022; Cui et al., 2012; Giraffa, 2012; Hemme & Foucaud-Scheunemann, 2004; S. C. Yang et al., 2014). Στη παρούσα εργασία έγινε ενίσχυση των γονιδίων παθογένειας *gelE*, *ace*, *hyl*, *espA*, *IS16*, *agg* με PCR και για τα τρία στελέχη κάνοντας χρήση primers σχεδιασμένων για εντεροκόκκους. Όπως αναμενόταν κανένα από τα παραπάνω γονίδια δεν ανιχνεύτηκε, πράγμα που επιβεβαιώνεται και από τους Colautti et al., 2022 όσον αφορά το γένος *Lactobacillus*. Παρόμοια για το γένος *Leuconostoc* δεν υπάρχουν πολλές αναφορές για μελέτη γονιδίων παθογένειας. Με βάση όμως τους de Paula et al., 2014 ο *Leuconostoc mesenteroides* SJRPSS παρόλο που η ανάλυση

του DNA του έδειξε την ύπαρξη open reading frames (ORFs) που πιθανώς να κωδικοποιούν γονίδια παθογένειας στη συνέχεια κανένα από αυτά δεν ανιχνεύτηκε.

Παράλληλα, έγινε ενίσχυση των γονιδίων *vanA/vanB*, με σκοπό την ανίχνευση ανθεκτικότητας των τριών στελεχών στο αντιβιοτικό βανκομυκίνη. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.3.1, κανένα από τα δύο γονίδια δεν ανιχνεύτηκαν. Παρόλα αυτά υπάρχει ποικιλία γονιδίων στα οποία μπορεί να οφείλεται η ανθεκτικότητα σε βανκομυκίνη, πιο συγκεκριμένα πέρα από τα *vanA*, *vanB* υπάρχουν και τα *vanC₁*, *vanC₂*, *vanC₂/C₃* και *vanX* (Colautti et al., 2022). Οι *Lactobacilli* εγγενώς εμφανίζουν αντίσταση στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό και όπως αναφέρουν οι Campedelli et al., 2019, τα 141 από τα 182 (77%) στελέχη που ελέγχθηκαν εμφάνισαν ανθεκτικότητα. Παρόμοια και οι *Leuconostoc* αναφέρεται ότι έχουν εγγενή ανθεκτικότητα στη βανκομυκίνη (W. A. D. Kaboré et al., 2021). Πράγματι η ανθεκτικότητα και των τριών στελεχών αποδείχθηκε στη συνέχεια με τη χρήση της Disk Diffusion μεθόδου (Εικόνα 3.3.3).

Περαιτέρω έλεγχος για την εύρεση της κατώτερης συγκέντρωσης αναστολής (MIC) και την ύπαρξη ανθεκτικότητας σε επιλεγμένα αντιβιοτικά έγινε με την Broth Dilution και την Disk Diffusion μέθοδο. Έρευνες έχουν δείξει, όπως αναφέρθηκε ήδη και στην παράγραφο 1.4.2, ότι το γένος *Leuconostoc* εμφανίζει ανθεκτικότητα κατά κύριο λόγο στην καναμυκίνη, σε μικρότερο βαθμό στην τετρακυκλίνη και την χλωραφαινικόλη, ενώ αρκετά στελέχη βρέθηκαν ανθεκτικά στην αμπικιλίνη, την ερυθρομυκίνη και την οξακιλλίνη (Flórez et al., 2016). Πράγματι τόσο το στέλεχος *L. suionicum* am SF03, όσο και το στέλεχος *L. mesenteroides* 105 εμφάνισαν ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη καθώς αναπτύσσονται κανονικά ακόμα και όταν η συγκέντρωση της είναι 1024 µg/ml. Επίσης μεγάλα MIC εμφανίζουν και οι δύο μικροοργανισμοί στα αντιβιοτικά τριμεθοπρίμη και στρεπτομυκίνη. Τέλος, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.3.3, το στέλεχος am SF03 αναπτύσσεται αρκετά παρουσία 10 µg δισκίου γενταμυκίνης, όπως και το στέλεχος 105 με παρόμοια ανάπτυξη και παρουσία 5 µg δισκίου οξακιλλίνης.

Όσον αφορά τους *Lactobacillus*, τα περισσότερα στελέχη έχουν φαινοτυπική ανθεκτικότητα στη βανκομυκίνη, τη στρεπτομυκίνη, την ερυθρομυκίνη, τη γενταμυκίνη και την καναμυκίνη. Ανθεκτικά έχουν βρεθεί στις κεφαλοσπορίνες και την τετρακυκλίνη (Anisimova & Yarullina, 2019). Στην Εικόνα 3.3.3 είναι εμφανής η ανθεκτικότητα του στελέχους *L. pentosus* 208 στην βανκομυκίνη και την γενταμυκίνη όπως προκύπτει από την Disk Diffusion μέθοδο. Επίσης ανθεκτικό φαίνεται να είναι το συγκεκριμένο στέλεχος στην καναμυκίνη, ενώ τα MICs της τριμεθοπρίμης και της στρεπτομυκίνης είναι υψηλά.

Με βάση την δράση έναντι των *Escherichia coli* ATCC 25922 και του *Bacillus subtilis* που έδειξε να έχει το στέλεχος am SF03 κατά την απομόνωση του (Vandera et al. unpublished) ελέγχθηκε η αντιμικροβιακή του δράση και έναντι άλλων βακτηρίων. Από τα 19 στελέχη που δοκιμάστηκαν εμφάνισε δράση έναντι των 13 συμπεριλαμβανομένου θετικών και αρνητικών κατά τη χρώση Gram βακτηρίων, με βέλτιστη δράση έναντι των *E. coli* ATCC 25922 και *B. subtilis*. Γενικά τα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν μία ποικιλόμορφη και πολυπληθή ομάδα βακτηριοσινών που είναι υπεύθυνη για τον ανταγωνισμό έναντι άλλων θετικών κατά Gram βακτηρίων (Klaenhammer, 1988), η δράση όμως έναντι αρνητικών κατά Gram βακτηρίων είναι πιο ασυνήθιστο φαινόμενο (Ivanova et al., 1998) και με βάση τους Todorov & Dicks, 2004, έχει αναφερθεί για ελάχιστες περιπτώσεις, όπως της *thermophilus* 81 που παράγεται από τον *Streptococcus thermophilus*, τις βακτηριοσίνες που παράγονται από τους *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* LI26 και LI34, την βακτηριοσίνη που παράγεται από

τον *Lactococcus lactis* KCA 2386 και την plantaricin 35d που παράγεται από τον *Lactobacillus plantarum*. Έναντι των *E. coli* ATCC 25922 και *B. subtilis* δοκιμάστηκαν και τα άλλα δύο στελέχη, *L. pentosus* 208 και *L. mesenteroides* 105, ο οποίος εμφάνισαν επίσης δράση έναντι αυτών.

Μετά τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης, προέκυψε ότι η δράση του στελέχους *L. mesenteroides* 105 ήταν σταθερή έναντι των επιλεγμένων στελεχών δεικτών συγκριτικά με αυτή του *L. pentosus* 208, γι' αυτό το λόγο έγινε περαιτέρω μελέτη για το στέλεχος am SF03 και το 105 με έλεγχο του υπερκειμένου από διάφορες φάσεις ανάπτυξης έναντι επιλεγμένου στελέχους δείκτη. Τα αποτελέσματα έδειξαν δράση και για τα δύο στελέχη έως και μετά από μία βδομάδα, με βέλτιστη μεταξύ 12-24 ωρών. Στη συνέχεια εστιάζοντας στο στέλεχος am SF03 έγινε καμπύλη ανάπτυξης του *E. coli* ATCC 25922 με και χωρίς προσθήκη υπερκειμένου του προς μελέτη στελέχους με σκοπό τον έλεγχο της πορείας ανάπτυξης του στελέχους δείκτη. Από το Γράφημα 3.6.4.γ παρατηρείται μείωση της ανάπτυξης του στελέχους δείκτη στο δείγμα που προστέθηκε το υπερκείμενο του am SF03 σε σχέση με το μάρτυρα και με το αραιωμένο με 0.9 % NaCl δείγμα. Για καλύτερη εικόνα βέβαια του παραπάνω αποτελέσματος θα μπορούσε να γίνει απομόνωση και καθαρισμός της αντιμικροβιακής ουσίας πριν προστεθεί στην καλλιέργεια του στελέχους δείκτη.

Με σκοπό την πιο ολοκληρωμένη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης του στελέχους *L. suionicum* am SF03 έγινε προσπάθεια καταβύθισης της πιθανής βακτηριοσίνης με προσθήκη θειικού αμμωνίου. Η καταβύθιση αποτελεί ένα αρχικό στάδιο καθαρισμού και η χρήση θειικού αμμωνίου προτιμάται συγκριτικά με το χλωροφόρμιο, την αιθανόλη ή την βουτανόλη (Bindu & Lakshmidēvi, 2021). Βέλτιστες συνθήκες καταβύθισης φαίνεται να είναι η ρύθμιση του pH στο 6.5 και κορεσμό 80% σε θειικό αμμώνιο, ενώ η δράση αυτού του καταβυθίσματος διατηρείται μέχρι και μετά από 5 μήνες. Καταβύθιση έγινε και για την αντιμικροβιακή ένωση του στελέχους *L. mesenteroides* 105 με βέλτιστες συνθήκες pH 5.5 και 60% κορεσμό σε θειικό αμμώνιο, ενώ για το στέλεχος *L. pentosus* 208 pH 5.5 ή 6.5 και 60% κορεσμό σε θειικό αμμώνιο.

Όπως έχει αναφερθεί ήδη, οι βακτηριοσίνες, έχουν μικρό μοριακό βάρος, είναι πρωτεϊνικής φύσης, θερμοανθεκτικές, με ευρύ φάσμα δράσης (Zamfir et al., 1999). Για την απόδειξη της πρωτεϊνικής φύσης αυτής της ένωσης που παράγεται από το στέλεχος am SF03, έγινε απομόνωση του υπερκειμένου της καλλιέργειας του και κατεργασία με τα πρωτεολυτικά ένζυμα τρυψίνη (0.1 mg/ml), προνάση (1 mg/ml) και πρωτεϊνάση K (1 mg/ml). Όπως αναμενόταν η πρωτεϊνάση K ανέστειλε την αντιμικροβιακή δράση του υπερκειμένου, καθώς αυτό το ένζυμο υδρολύει αλειφατικά αμινοξέα, τα οποία αποτελούν τα πιο κοινά κατάλοιπα σε πρωτεΐνες και πεπτίδια (Hernández-Saldaña et al., 2020). Παρόλα αυτά οι πρωτεάσες τρυψίνη και προνάση δεν έδρασαν αδρανοποιώντας την αντιμικροβιακή δράση, πράγμα που έχει παρατηρηθεί και σε άλλες βακτηριοσίνες καθώς δεν γίνεται όλα τα πρωτεϊνικά μόρια να είναι ευαίσθητα στα ίδια πρωτεολυτικά ένζυμα (Ivanova et al., 1998).

Για την απόδειξη της σταθερότητας του μορίου αυτή τη φορά, έγινε κατεργασία του pH του υπερκειμένου και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αντιμικροβιακή δράση του *L. suionicum* am SF03 διατηρείται σε τιμές pH από 4-10, με βέλτιστη δράση σε pH 6.5-7, ενώ αδρανοποιείται σε pH 4 και κάτω. Αυτή η σταθερότητα που διατηρεί σε μεγάλη κλίμακα του pH, είναι κοινό χαρακτηριστικό των βακτηριοσινών, πράγμα που δείχνει πως οι βακτηριοσίνες είναι εξίσου χρήσιμες σε όξινα και μη προϊόντα (Ivanova et al., 1998).

Επίσης έγινε κατεργασία του υπερκειμένου σε διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνους. Η δράση του παραμένει με θέρμανση στους 100°C έως και 30 λεπτά, μετά από αποστείρωση σε αυτόκαυστο, ενώ δεν διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου. Δραστικό παραμένει επίσης το υπερκείμενο του στελέχους am SF03 και μετά από αποθήκευση στους -4°C για τουλάχιστον 2 μήνες. Όπως αναφέρουν οι Bindu & Lakshmidēvi, 2021 υπάρχουν δεδομένα ότι οι βακτηριοσίνες του *Lactobacillus plantarum* παραμένουν σταθερές κατά τη θέρμανση. Πιο συγκεκριμένα μελέτες έδειξαν σταθερότητα μέχρι τους 60°C, ενώ πάνω από τους 80°C παρατηρείται μείωση της δραστικότητας της βακτηριοσίνης. Άλλες έδειξαν σταθερότητα ακόμη και στους 90°C, όπως στην περίπτωση της LPBM10, της ST202Ch, της bacST216Ch, της enterocin AS-48 και της plantaricin OL15. Μια anti-listerial βακτηριοσίνη του *Lactobacillus sakei* MBa1 παραμένει σταθερή στους 121°C για 15 λεπτά, ενώ η lactocin NK24 του *Lactococcus lactis* στους 100°C μειώνεται η δράση της κατά 87%, ενώ αδρανοποιείται πλήρως κατά την αποστείρωση (Bindu & Lakshmidēvi, 2021). Στην περίπτωση του στελέχους am SF03 η αντιμικροβιακή ένωση είναι θερμοανθεκτική.

Έπειτα, έγινε προσπάθεια εύρεσης του μεγέθους της αντιμικροβιακής ουσίας του στελέχους am SF03 μέσω ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών με την ευαίσθητη μέθοδο Tricine SDS-PAGE και όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.8.2 η ζώνη εντοπίζεται κάτω από τα 10 kDa. Στα 2510 – 3480 Da όπως αναφέρουν οι Xiraphi et al., 2008 εντοπίζονται τα μοριακά βάρη ποικίλων βακτηριοσινών που απομονώνονται από *leuconostocs* από προϊόντα κρέατος, όπως η leucocin AUAL187 (3930 Da), leucocin C-TA33a (4598 Da), leucocin B-TA33a (3466 Da), leucocins 4010 (4600-5300 Da), ενώ οι βακτηριοσίνες των *lactococci* είναι περίπου 2-6 kDa (Goyal et al., 2018). Η enterocin X εντοπίζεται κάτω από τα 10 kDa (Hu et al., 2010), είναι βακτηριοσίνη της τάξης IIb και με βάση την *in silico* μελέτη που έγινε για το στέλεχος am SF03 εμφανίζει πολλές ομοιότητες με τις πιθανές περιοχές που κωδικοποιούν γονίδια παραγωγής βακτηριοσίνης. Παρόλα αυτά εμφανίζει δράση μόνο έναντι Gram θετικών μικροοργανισμών, ενώ το στέλεχος am SF03 φαίνεται να έχει και έναντι Gram αρνητικών.

Επίσης έγινε προσδιορισμός των Arbitrary Units ανά ml του *L. suionicum* am SF03, τα αποτελέσματα που προέκυψαν επιβεβαιώνουν το αποτέλεσμα που αναφέρθηκε προηγουμένως ότι μεταξύ 12-24 ωρών παρατηρείται η καλύτερη αντιμικροβιακή δράση. Πιο συγκεκριμένα στις 12 ώρες μετρήθηκαν 26214 kAu/ml, ενώ στις 16 ώρες ήταν 819 kAu/ml. Αρκετά υψηλή είναι η τιμή των Au/ml που υπολογίστηκε, συγκριτικά με τα αποτελέσματα που παρουσίασαν οι Todoron & Dicks, 2004 οι οποίοι αναφέρουν ότι οι βακτηριοσίνες ST194BZ(a) και ST194BZ(b) στις 14 ώρες ανάπτυξης της καλλιέργειας του μικροοργανισμού που τις παράγει είχαν 12800 Au/ml. Επίσης οι Gutiérrez-Cortés et al., 2018, αναφέρουν ότι η αντιμικροβιακή δράση της βακτηριοσίνης που παράγεται από τον *Lactobacillus plantarum* LE27 είναι 51200 Au/ml. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν πάντως επιβεβαιώνουν τα λεγόμενα των E. Yang et al., 2018, ότι η μέγιστη ποσότητα βακτηριοσίνης παράγεται συνήθως μεταξύ μέσης και τέλους εκθετικής φάσης. Ο συγκεκριμένος προσδιορισμός βέβαια, χρήζει περαιτέρω διερεύνηση, καθώς μπορεί να επιδρά κάποιος άλλος ανασταλτικός παράγοντας στην ανάπτυξη του στελέχους δείκτη, όπως είναι η συσσώρευση υπεροξειδίου του υδρογόνου, πράγμα που μπορεί να ανασταλεί με την προσθήκη του ενζύμου καταλάση κατά την κατεργασία του υπερκειμένου του στελέχους am SF03, το οποίο έχει την δυνατότητα να διασπά το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο.

Διενεργώντας όλες τις παραπάνω αναλύσεις προκύπτει το συμπέρασμα ότι η αντιμικροβιακή ουσία που παράγει το στέλεχος am SF03, πιθανώς να είναι μια βακτηριοσίνη, καθώς είναι πρωτεϊνικό μόριο, θερμοανθεκτικό και πιο συγκεκριμένα ανήκει στην τάξη II λόγω της

δράσης που εμφανίζει έναντι Gram θετικών και αρνητικών μικροοργανισμών. Επίσης λόγω του μικρού της μεγέθους όπως προέκυψε από το Tricine SDS-PAGE δεν μπορεί να ανήκει στην τάξη IIc, στην οποία ανήκουν βακτηριοσίνες μεγάλου μοριακού βάρους. Λόγω της *in silico* μελέτης που διενεργήθηκε και της ταυτότητας που είχε το στέλεχος am SF03 με το στέλεχος LT-38, υποθέτουμε ότι η βακτηριοσίνη ανήκει στην τάξη IIb, καθώς ο *L. suionicum* LT-38 διαθέτει περιοχές που από το BLASTP χαρακτηρίζονται ως lactobin A/ cerein 7B family class IIb bacteriocin και στο γονιδίωμα του εντοπίζονται GxxxG μοτίβα. Η επιβεβαίωση των ανωτέρω ισχυρισμών χρήζει περαιτέρω μελέτης και αποτελεί μέρος μελλοντικής έρευνας, όπως επίσης και ο έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης των τριών στελεχών έναντι του παθογόνου *Listeria monocytogenes*. Τα αποτελέσματα αυτά μαζί με τον περαιτέρω καθαρισμό των βακτηριοσινών θα συνεισφέρει στον πλήρη χαρακτηρισμό τους και θα καθορίσει την τάξη στην οποία ανήκουν. Αρκετά ενδιαφέροντα θα ήταν και η μελέτη των εφαρμογών που θα μπορούσε να έχει.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α - ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ 16S RRNA ΤΟΥ *L. MESENTEROIDES* 105

GATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCACAGCGAAAGGTGCTTGACCTTT
CAAGTGAGTGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTGCCTCAAGGCTGGGGATAACATTTGG
AAACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGTGTCGCATGACACAAAGTTAAAAGGCGCTTCGGCGTC
ACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGACAATGATGC
ATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGG
CTGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGTGTGATGAAGG
CTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAAGCAGCTAGAATAGGAAATGATTTTAGTTTGACG
GTACCATAACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCG
TTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAG
CTCAACTCCGGAATGGCATTGGAACTGGTTAACTTGAGTGCAAGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGT
GTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAAC
TGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAA
CGATGAACACTAGGTGTTAGGAGGTTCCGCTCTTAGTGCCGAAGCTAACGCATTAAGTGTCCGC
CTGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCTTGACATCCTTTGAAGCTTTAGAG
ATAGAAGTGTCTCTTCGGAGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCTGTA
GATGTTGGGTTAAGTCCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAGCATTGAGATGGGCAC
TCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGACGACGGTCAGATCATCATGCCCTT
ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAACGAGTTGCCAACCCGCGAGGGTGAGCT
AATCTCTTAAAGTACGTCTCAGTTCCGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGTCGGAATCGCTA
GTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGCTTGTACACACCGCCCGTCACACCA
TGGGAGTTTGAATGCCCAAAGCCGGTGGCCTAACCTTTAGGAAGGAGCCGTCTAAGGCAGGACA
GATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGC

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β – ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ 16S RRNA ΤΟΥ *L. SUIONICUM* AM SF03

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCACAG
CGAAAGGTGCTTGACCTTTCAAGTGAGTGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGACAACCTACCTCA
AGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGTGTCGCATGACACAAA
GTTAAAAGGCGCTTCGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAA
GGCCTACCAAGACAATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACAC
GGCCAAACTCCTACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCA
ACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAGCACTGTTGTATGGGAAGAAGCAGCTAGAAT
AGGAAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATAACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTA
AGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGCAG
TAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCG
AAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACACTAGGTGTTAGGAGGTTCCGCTCTTAG

TGCCGAAGCTAACGCATTAAGTGTTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAA
AGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGA
AGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAAGCTTTTAGAGATAGAAGTGTTCTCTTCGGAG
ACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTC
CCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAGCATTAGATGGGCACTCTAGCGAGACT
GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCTTATGACCT
GGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTATACAACGAGTTGCCAGCCCGCGAGGGTGAGCTA
ATCTCTTAAAGTACGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGTCGGAAT
CGTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGC
CCGTCACACCATGGGAGTTTGTAAATGCCCAAAGCCGGTGGCCTAACCTTTTAGGAAGGAGC
CGTCTAAGGCAGGACAGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCT
GCGGCTGGATCACCTCCTT

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdollahi, M., & Mostafalou, S. (2021). Chloramphenicol. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, 837–840. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00709-0>
- Abo Saif, F. A. A., & Sakr, E. A. E. (2020). Characterization and bioactivities of exopolysaccharide produced from probiotic *Lactobacillus plantarum* 47FE and *Lactobacillus pentosus* 68FE. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 24. <https://doi.org/10.1016/J.BCDF.2020.100231>
- Alakomi, H. L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., & Helander, I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2001–2005. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.2001-2005.2000>
- Al-Talib, H., Al-Khateeb, A., & Hassan, H. (1994). Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* Isolates in Malaysian Tertiary Hospital A triplex PCR assay for rapid detection of diarrhea-causing parasitic pathogens from spiked stool View project A quadriplex PCR assay for rapid detection of diarrhoeacausing parasitic protozoa from spiked stool samples View project Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* Isolates in Malaysian Tertiary Hospital. *Article in International Medical Journal*, 22(1), 1–3. <https://www.researchgate.net/publication/274212812>
- Alting-Mees, M. A., & Short, J. M. (1989). pBluescript II: gene mapping vectors. *Nucleic Acids Research*, 17(22), 9494. <https://doi.org/10.1093/NAR/17.22.9494>
- Anisimova, E. A., & Yarullina, D. R. (2019). Antibiotic Resistance of LACTOBACILLUS Strains. *Current Microbiology*, 76(12), 1407–1416. <https://doi.org/10.1007/S00284-019-01769-7/TABLES/3>
- Bacterial DNA Isolation CTAB Protocol Bacterial genomic DNA isolation using CTAB*. (n.d.). Retrieved November 10, 2021, from www.jgi.doe.gov
- Baindara, P., Gautam, A., Raghava, G. P. S., & Korpole, S. (2017). Anticancer properties of a defensin like class II d bacteriocin Laterosporulin10. *Scientific Reports 2017 7:1*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep46541>
- Barefoot, S. F., & Klaenhammer, T. R. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(6), 1808–1815. <https://doi.org/10.1128/AEM.45.6.1808-1815.1983>
- Batdorj, B., Dalgarrondo, M., Choiset, Y., Pedroche, J., Métro, F., Prévost, H., Chobert, J. M., & Haertlé, T. (2006). Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. *Journal of Applied Microbiology*, 101(4), 837–848. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2006.02966.X>
- Batt, C. A. (2014). LACTOBACILLUS | Introduction. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 409–411. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00176-2>
- Belguesmia, Y., Bendjedou, K., Kempf, I., Boukherroub, R., & Drider, D. (2020). Heterologous Biosynthesis of Five New Class II Bacteriocins From *Lactobacillus*

- paracasei CNCM I-5369 With Antagonistic Activity Against Pathogenic Escherichia coli Strains. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 1198.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01198/BIBTEX>
- Bello, F. D., Walter, J., Hammes, W., ecology, C. H.-M., & 2003, undefined. (n.d.). Increased complexity of the species composition of lactic acid bacteria in human feces revealed by alternative incubation condition. *JSTOR*. Retrieved February 12, 2022, from <https://www.jstor.org/stable/4287722>
- Bindu, A., & Lakshmidivi, N. (2021). In vitro and in silico approach for characterization of antimicrobial peptides from potential probiotic cultures against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *37*(10), 1–15.
<https://doi.org/10.1007/S11274-021-03135-X/FIGURES/5>
- Bjorkroth, K. J., Geisen, R., Schillinger, U., Weiss, N., de Vos, P., Holzapfel, W. H., Korkeala, H. J., & Vandamme, P. (2000). Characterization of Leuconostoc gasicomitatum sp. nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified-atmosphere conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(9), 3764–3772. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.9.3764-3772.2000>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cabo, M. L., Braber, A. F., & Koenraad, P. M. F. J. (2002). Apparent Antifungal Activity of Several Lactic Acid Bacteria against Penicillium discolor Is Due to Acetic Acid in the Medium. *Journal of Food Protection*, *65*(8), 1309–1316.
- Campedelli, I., Mathur, H., Salvetti, E., Clarke, S., Rea, M. C., Torriani, S., Ross, R. P., Hill, C., & O’Toole, P. W. (2019). Genus-wide assessment of antibiotic resistance in Lactobacillus spp. *Applied and Environmental Microbiology*, *85*(1).
https://doi.org/10.1128/AEM.01738-18/SUPPL_FILE/AEM.01738-18-S0001.PDF
- Cappelli, E. A., Barros, R. R., Camello, T. C. F., Teixeira, L. M., & Merquior, V. L. C. (1999). Leuconostoc pseudomesenteroides as a cause of nosocomial urinary tract infections. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(12), 4124–4126.
<https://doi.org/10.1128/JCM.37.12.4124-4126.1999>
- Chen, J., Banks, D., Jarret, R. L., Chang, C. J., & Smith, B. J. (n.d.). *Use of 16S rDNA Sequences as Signature Characters to Identify Xylella fastidiosa*.
<https://doi.org/10.1007/s002849910006>
- Chen, M., Vijay, V., Shi, Q., Liu, Z., Fang, H., & Tong, W. (2011). FDA-approved drug labeling for the study of drug-induced liver injury. *Drug Discovery Today*, *16*(15–16), 697–703.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.05.007>
- Chen, Y. S., Wang, L. T., Wu, Y. C., Mori, K., Tamura, T., Chang, C. H., Chang, Y. C., Wu, H. C., Yi, H. H., & Wang, P. Y. (2020). Leuconostoc litchii sp. Nov., a novel lactic acid bacterium isolated from lychee. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(3), 1585–1590.
<https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.003938/CITE/REFWORKS>

- Choi, I. S., Ko, S. H., Lee, M. E., Kim, H. M., Yang, J. E., Jeong, S. G., Lee, K. H., Chang, J. Y., Kim, J. C., & Park, H. W. (2021). Production, Characterization, and Antioxidant Activities of an Exopolysaccharide Extracted from Spent Media Wastewater after *Leuconostoc mesenteroides* WiKim32 Fermentation. *ACS Omega*, *6*(12), 8171–8178. https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.0C06095/SUPPL_FILE/AO0C06095_SI_001.PDF
- Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *65*(2), 232–260. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001/ASSET/888D1A1C-E13A-44A4-BC75-CCA94875551D/ASSETS/GRAPHIC/MR0210009002.JPEG>
- Chun, B. H., Kim, K. H., Jeon, H. H., Lee, S. H., & Jeon, C. O. (2017). Pan-genomic and transcriptomic analyses of *Leuconostoc mesenteroides* provide insights into its genomic and metabolic features and roles in kimchi fermentation. *Scientific Reports* *2017 7:1*, *7*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12016-z>
- Chun, B. H., Lee, S. H., Jeon, H. H., Kim, D. W., & Jeon, C. O. (2017). Complete genome sequence of *Leuconostoc suionicum* DSM 20241T provides insights into its functional and metabolic features. *Standards in Genomic Sciences*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/S40793-017-0256-0>
- Claesen, J., & Bibb, M. (2010). Genome mining and genetic analysis of cypemycin biosynthesis reveal an unusual class of posttranslationally modified peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(37), 16297–16302. https://doi.org/10.1073/PNAS.1008608107/SUPPL_FILE/PNAS.201008608SI.PDF
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., & Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, *71*(1), 1–20. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00560-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00560-8)
- Colautti, A., Arnoldi, M., Comi, G., & Iacumin, L. (2022). Antibiotic resistance and virulence factors in lactobacilli: something to carefully consider. *Food Microbiology*, *103*, 103934. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2021.103934>
- Condon, S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Reviews*, *3*(3), 269–280. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6968.1987.TB02465.X>
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* *2005 3:10*, *3*(10), 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273>
- Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2012). Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology* *2012 11:2*, *11*(2), 95–105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
- Cui, Y., Zhang, C., Wang, Y., Shi, J., Zhang, L., Ding, Z., Qu, X., & Cui, H. (2012). Class IIa Bacteriocins: Diversity and New Developments. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(12), 16668. <https://doi.org/10.3390/IJMS131216668>

- «d Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., & Ishizaki, A. (2000). Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews*, *24*(1), 85–106. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2000.TB00534.X>
- Davidson, P. M., Taylor, T. M., & Schmidt, S. E. (2014). Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds. *Food Microbiology*, 765–801. <https://doi.org/10.1128/9781555818463.CH30>
- Dawid, S., Roche, A. M., & Weiser, J. N. (2007). The blp Bacteriocins of *Streptococcus pneumoniae* Mediate Intraspecies Competition both In Vitro and In Vivo. *Infection and Immunity*, *75*(1), 443. <https://doi.org/10.1128/IAI.01775-05>
- Day, D. F. (1992). Spoilage in the Sugar Industry. *The Lactic Acid Bacteria Volume 1*, 343–361. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3522-5_13
- de Angelis, M., & Gobbetti, M. (2016). *Lactobacillus* SPP.: General Characteristics. *Reference Module in Food Science*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.00851-9>
- de Paula, A. T., Jeronymo-Ceneviva, A. B., Silva, L. F., Todorov, S. D., Franco, B. D. G. de M., Choiset, Y., Haertlé, T., Chobert, J. M., Dousset, X., & Penna, A. L. B. (2014). *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: A Bacteriocinogenic Strain Isolated from Brazilian Water Buffalo Mozzarella Cheese. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *6*(3–4), 186–197. <https://doi.org/10.1007/S12602-014-9163-5>
- de Paula, A. T., Jeronymo-Ceneviva, A. B., Todorov, S. D., & Penna, A. L. B. (2015). The Two Faces of *Leuconostoc mesenteroides* in Food Systems. <http://Dx.Doi.Org/10.1080/87559129.2014.981825>, *31*(2), 147–171. <https://doi.org/10.1080/87559129.2014.981825>
- De, S., Kaur, G., Roy, A., Dogra, G., Kaushik, R., Yadav, P., Singh, R., Datta, T. K., & Goswami, S. L. (2010). A Simple Method for the Efficient Isolation of Genomic DNA from *Lactobacilli* Isolated from Traditional Indian Fermented Milk (dahi). *Indian Journal of Microbiology*, *50*(4), 412. <https://doi.org/10.1007/S12088-011-0079-4>
- Delcour, J., Ferain, T., Deghorain, M., Palumbo, E., & Hols, P. (1999). The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *76*(1–4), 159–184. <https://doi.org/10.1023/A:1002089722581>
- diseases, S. Z.-C. infectious, & 1999, undefined. (n.d.). Changing epidemiology of infections in patients with neutropenia and cancer: emphasis on gram-positive and resistant bacteria. *Academic.Oup.Com*. Retrieved February 12, 2022, from <https://academic.oup.com/cid/article-abstract/29/3/490/308300>
- Drider, D., Bendali, F., Naghmouchi, K., & Chikindas, M. L. (2016). Bacteriocins: Not Only Antibacterial Agents. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *8*(4), 177–182. <https://doi.org/10.1007/S12602-016-9223-0>
- Dündar, H., Salih, B., & Bozoğlu, F. (2016). Purification and characterization of a bacteriocin from an oenological strain of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Cremoris*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, *46*(4), 354–359. <https://doi.org/10.1080/10826068.2015.1031395>

- Eaton, T. J., & Gasson, M. J. (2001). Molecular Screening of Enterococcus Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1628–1635. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1628-1635.2001>
- Ehrmann, M. A., Remiger, A., Eijsink, V. G. H., & Vogel, R. F. (2000). A gene cluster encoding plantaricin 1.25 β and other bacteriocin-like peptides in *Lactobacillus plantarum* TMW1.25. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1490(3), 355–361. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00003-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00003-8)
- Escamilla-Martínez, E. E., Cisneros, M. Á., Fernández, F. J., Quirasco-Baruch, M., & Ponce-Alquicira, E. (2017). Identification of Structural and Immunity Genes of a Class IIb Bacteriocin Encoded in the Enterocin A Operon of *Enterococcus faecium* Strain MXVK29. *Journal of Food Protection*, 80(11), 1851–1856. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-039>
- Espeche, M. C., Pellegrino, M., Frola, I., Larriestra, A., Bogni, C., & Nader-Macías, M. E. F. (2012). Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis. *Anaerobe*, 18(1), 103–109. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2012.01.002>
- Farrow, J. A. E., Facklam, R. R., & Collins, M. D. (1989). Nucleic acid homologies of some vancomycin-resistant leuconostocs and description of *Leuconostoc citreum* sp. nov. and *Leuconostoc pseudomesenteroides* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(3), 279–283. <https://doi.org/10.1099/00207713-39-3-279/CITE/REFWORKS>
- Felix, J. v., Papathanasopoulos, M. A., Smith, A. A., von Holy, A., & Hastings, J. W. (1994). Characterization of leucocin B-Ta11a: A bacteriocin from *Leuconostoc carnosum* Ta11a isolated from meat. *Current Microbiology* 1994 29:4, 29(4), 207–212. <https://doi.org/10.1007/BF01570155>
- Flórez, A. B., Campedelli, I., Delgado, S., Alegría, Á., Salvetti, E., Felis, G. E., Mayo, B., & Torriani, S. (2016). Antibiotic susceptibility profiles of dairy leuconostoc, analysis of the genetic basis of atypical resistances and transfer of genes in vitro and in a food matrix. *PLoS ONE*, 11(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0145203>
- Garbacz, K. (2022). Anticancer activity of lactic acid bacteria. *Seminars in Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCANCER.2021.12.013>
- Garg, N., Tang, W., Goto, Y., Nair, S. K., & van der Donk, W. A. (2012). Lantibiotics from *Geobacillus thermodenitrificans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(14), 5241–5246. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1116815109>
- Garneau, S., Ference, C. A., van Belkum, M. J., Stiles, M. E., & Vederas, J. C. (2003). Purification and characterization of brochocin A and brochocin B(10-43), a functional fragment generated by heterologous expression in *Carnobacterium piscicola*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1352–1358. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1352-1358.2003/ASSET/F42C133C-A30A-4301-AD0F-8F8A5A34124E/ASSETS/GRAPHIC/AM0331485004.JPEG>

- Giannou, E., Kakouri, A., Bogovič, B., Rogelj, I., & Samelis, J. (2009). Fate of *Listeria monocytogenes* on Fully Ripened Greek Graviera Cheese Stored at 4, 12, or 25C in Air or Vacuum Packages: In Situ PCR Detection of a Cocktail of Bacteriocins Potentially Contributing to Pathogen Inhibition. *Journal of Food Protection*, 72(3), 531–538. http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/72/3/531/1679719/0362-028x-72_3_531.pdf
- Giraffa, G. (2012). Selection and design of lactic acid bacteria probiotic cultures. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 391–398. <https://doi.org/10.1002/ELSC.201100118>
- Giulian, G. G., Moss, R. L., & Greaser, M. (1984). Analytical isoelectric focusing using a high-voltage vertical slab polyacrylamide gel system. *Analytical Biochemistry*, 142(2), 421–436. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90486-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90486-X)
- Gleckman, R., Blagg, N., & Joubert, D. W. (1981). Trimethoprim: mechanisms of action, antimicrobial activity, bacterial resistance, pharmacokinetics, adverse reactions, and therapeutic indications. *Pharmacotherapy*, 1(1), 14–19. <https://doi.org/10.1002/J.1875-9114.1981.TB03548.X>
- Goyal, C., Malik, R. K., & Pradhan, D. (2018). Purification and characterization of a broad spectrum bacteriocin produced by a selected *Lactococcus lactis* strain 63 isolated from Indian dairy products. *Journal of Food Science and Technology*, 55(9), 3683. <https://doi.org/10.1007/S13197-018-3298-4>
- Green, M., Wadowsky, R. M., & Barbadora', K. (1990). Recovery of Vancomycin-Resistant Gram-Positive Cocci from Children. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 484–488.
- Gu, C. T., Wang, F., Li, C. Y., Liu, F., & Huo, G. C. (2012a). *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *suonicum* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt 7), 1548–1551. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.031203-0>
- Gu, C. T., Wang, F., Li, C. Y., Liu, F., & Huo, G. C. (2012b). *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *suonicum* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(7), 1548–1551. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.031203-0>
- Gueguen, Y., Chemardin, P., Labrot, P., Arnaud, A., & Galzy, P. (1997). Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from a new strain of *Leuconostoc mesenteroides* isolated from cassava. *Journal of Applied Microbiology*, 82(4), 469–476. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.1997.00136.X>
- Gupta, C., Prakash, D., & Gupta, S. (2014). *Natural useful therapeutic products from microbes*. <https://doi.org/10.15406/jmen.2014.01.00006>
- Gutiérrez-Cortés, C., Suarez, H., Buitrago, G., Nero, L. A., & Todorov, S. D. (2018). Enhanced Bacteriocin Production by *Pediococcus pentosaceus* 147 in Co-culture With *Lactobacillus plantarum* LE27 on Cheese Whey Broth. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02952>
- Hale, J. D. F., Ting, Y. T., Jack, R. W., Tagg, J. R., & Heng, N. C. K. (2005). Bacteriocin (mutacin) production by *Streptococcus mutans* genome sequence reference strain UA159: Elucidation of the antimicrobial repertoire by genetic dissection. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7613–7617.

<https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7613-7617.2005/ASSET/D8FA7AF8-35E0-447E-89B4-F54F5055B4D9/ASSETS/GRAPHIC/ZAM0110560240002.JPEG>

- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, *166*(4), 557–580. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Hastings, J. W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K. L., Vederas, J. C., & Stiles, M. E. (1991). Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *Journal of Bacteriology*, *173*(23), 7491. <https://doi.org/10.1128/JB.173.23.7491-7500.1991>
- He, M., Wu, T., Pan, S., & Xu, X. (2014). Antimicrobial mechanism of flavonoids against *Escherichia coli* ATCC 25922 by model membrane study. *Applied Surface Science*, *305*, 515–521. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2014.03.125>
- Hechard, Y., Derijard, B., Letellier, F., & Cenatiempo, Y. (1992). Characterization and purification of mesentericin Y 105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. In *Journal of General Microbiology* (Vol. 138).
- Heikkilä, M. P., & Saris, P. E. J. (2003). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *Journal of Applied Microbiology*, *95*(3), 471–478. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.2003.02002.X>
- Hemme, D., & Foucaud-Scheunemann, C. (2004). *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal*, *14*(6), 467–494. <https://doi.org/10.1016/J.IDAIRYJ.2003.10.005>
- Heng, N. C. K., & Tagg, J. R. (2006). What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology* *2006* *4*:2, *4*(2), 160–160. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1273-c1>
- Hernández-Saldaña, O. F., Barboza-Corona, J. E., Bideshi, D. K., & Casados-Vázquez, L. E. (2020). New bacteriocin-like substances produced by *Streptomyces* species with activity against pathogens. *Folia Microbiologica*, *65*(4), 669–678. <https://doi.org/10.1007/S12223-020-00770-Z>
- Herrero, M., Mayo, B., Gonzalez, B., & Suárez, U. E. (1996). Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*, *81*(5), 565–570. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.1996.TB03548.X>
- Hocking, A. (2014). Foodborne Fungi: Estimation by Cultural Techniques The Challenge of Quantifying Fungal Growth. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 68–75. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00133-6>
- Holland, R., & Liu, S. Q. (2011). Lactic Acid Bacteria | *Leuconostoc* spp. *Encyclopedia of Dairy Sciences: Second Edition*, 138–142. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00267-3>
- Hu, C. B., Malaphan, W., Zendo, T., Nakayama, J., & Sonomoto, K. (2010). Enterocin X, a novel two-peptide bacteriocin from *enterococcus faecium* KU-B5, has an antibacterial spectrum entirely different from those of its component peptides. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(13), 4542–4545. <https://doi.org/10.1128/AEM.02264->

09/ASSET/4C930724-5590-4D27-9255-
BD164F400788/ASSETS/GRAPHIC/ZAM9991010330002.JPEG

- Hu, C. B., Zendo, T., Nakayama, J., & Sonomoto, K. (2008). Description of durancin TW-49M, a novel enterocin B-homologous bacteriocin in carrot-isolated *Enterococcus durans* QU 49. *Journal of Applied Microbiology*, *105*(3), 681–690. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2008.03798.X>
- Hudzicki, J. (2009). *Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol*. <https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3189?crawler=true>
- Huo, L., & van der Donk, W. A. (2016). Discovery and Characterization of Bicereucin, an Unusual d -Amino Acid-Containing Mixed Two-Component Lantibiotic. *Journal of the American Chemical Society*, *138*(16), 5254–5257. https://doi.org/10.1021/JACS.6B02513/SUPPL_FILE/JA6B02513_SI_001.PDF
- Hynes, W. L., Ferretti, And, J. J., & Tagg, J. R. (1993). Cloning of the Gene Encoding Streptococcin A-FF22, a Novel Lantibiotic Produced by *Streptococcus pyogenes*, and Determination of Its Nucleotide Sequence. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 1969–1971.
- Ivanova, I., Miteva, V., Stefanova, T., Pantev, A., Budakov, I., Danova, S., Moncheva, P., Nikolova, I., Dousset, X., & Boyaval, P. (1998). Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. *International Journal of Food Microbiology*, *42*(3), 147–158. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00067-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00067-1)
- Iyer, V., Raut, J., & Dasgupta, A. (2021). Impact of pH on growth of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* in vitro. *Journal of Medical Microbiology*, *70*(9). <https://doi.org/10.1099/JMM.0.001421>
- Jeon, H. H., Kim, K. H., Chun, B. H., Ryu, B. H., Han, N. S., & Jeon, C. O. (2017). A proposal of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Jonggajbkimchii* subsp. nov. and reclassification of *leuconostoc mesenteroides* subsp. *suionicum* (Gu et al., 2012) as *Leuconostoc suionicum* sp. nov. based on complete genome sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *67*(7), 2225–2230. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.001930/CITE/REFWORKS>
- Jiang, H., Li, P., & Gu, Q. (2016). Heterologous expression and purification of plantaricin NC8, a two-peptide bacteriocin against *Salmonella* spp. from *Lactobacillus plantarum* ZJ316. *Protein Expression and Purification*, *127*, 28–34. <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2016.06.013>
- Johansson, P., Paulin, L., Säde, E., Salovuori, N., Alatalo, E. R., Björkroth, K. J., & Auvinen, P. (2011). Genome sequence of a food spoilage lactic acid bacterium, *Leuconostoc gasicomitatum* LMG 18811T, in association with specific spoilage reactions. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(13), 4344–4351. <https://doi.org/10.1128/AEM.00102-11>
- Karpiński, T. M., & Adamczak, A. (2018). Anticancer Activity of Bacterial Proteins and Peptides. *Pharmaceutics*, *10*(2). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS10020054>

- Katla, A. K., Kruse, H., Johnsen, G., & Herikstad, H. (2001). Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 67(1–2), 147–152. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00522-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00522-5)
- Kato, S., & Oikawa, T. (2017a). Genome Sequence of *Leuconostoc mesenteroides* LK-151 Isolated from a Japanese Sake Cellar as a High Producer of d-Amino Acids. *Genome Announcements*, 5(30). <https://doi.org/10.1128/GENOMEA.00661-17>
- Kato, S., & Oikawa, T. (2017b). Whole-Genome Sequence of *Leuconostoc mesenteroides* LT-38, a Non-Spore-Forming Gram-Positive Lactic Acid Bacterium. *Genome Announcements*, 5(31). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00670-17>
- Kaur, S., & Kaur, S. (2015). Bacteriocins as Potential Anticancer Agents. *Frontiers in Pharmacology*, 6(NOV). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2015.00272>
- Kikuchi, K., Totsuka, K., Shimizu, K., Yoshida, K., Kobayashi, M., Tomonaga, O., Oomori, Y., & Okada, S. (1994). [Microbiological and clinical studies of vancomycin resistant *Leuconostoc* spp. and *Pediococcus* spp. isolated from septicemia patients]. *Kansenshogaku Zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*, 68(9), 1084–1092. <https://doi.org/10.11150/KANSENSHOGAKUZASSHI1970.68.1084>
- Kim, E. B., Kopit, L. M., Harris, L. J., & Marco, M. L. (2012). Draft genome sequence of the quality control strain *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. *Journal of Bacteriology*, 194(21), 6006–6007. <https://doi.org/10.1128/JB.01423-12>
- Kim, J. W., Choi, B. H., Jung, J. H., Yuan, X., Kim, J. M., & Lee, P. C. (2018). Genome resequencing and analysis of d-lactic acid fermentation ability of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293. *Process Biochemistry*, 75, 83–88. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2018.09.009>
- Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*. (2009). www.atcc.org
- Kiruthiga, A., Padmavathy, K., Shabana, P., Naveenkumar, V., Gnanadesikan, S., & Malaiyan, J. (2020). Improved detection of *esp*, *hyl*, *asa1*, *gelE*, *cylA* virulence genes among clinical isolates of *Enterococci*. *BMC Research Notes*, 13(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/S13104-020-05018-0/TABLES/3>
- Kjos, M., Borrero, J., Opsata, M., Birri, D. J., Holo, H., Cintas, L. M., Snipen, L., Hernández, P. E., Nes, I. F., & Diep, D. B. (2011). Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology*, 157(12), 3256–3267. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.052571-0/CITE/REFWORKS>
- Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70(3), 337–349. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(88\)90206-4](https://doi.org/10.1016/0300-9084(88)90206-4)
- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1–3), 39–85. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.1993.TB00012.X>
- Klaenhammer, T. R., Ahn, C., & Muriana, P. M. (1994). Lactacin F, A Small Hydrophobic Heat-Stable Bacteriocin from. *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, 377–396. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2668-1_14

- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., & Collins, J. J. (2010). How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology* 2010 8:6, 8(6), 423–435.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2333>
- Konno Oizumi, K. K., Kumano, N., & Oka, S. (1973). Mode of action of kanamycin on *Mycobacterium bovis* BCG. *AMER.REV.RESP.DIS.*, 108(1), 101–107.
<https://doi.org/10.1164/ARRD.1973.108.1.101>
- Kumar, C., Himabindu, M., Jetty, A., & Ganesh Kumar, C. (2008). Microbial Biosynthesis and Applications of Gentamicin: A Critical Appraisal. *Critical Reviews in Biotechnology*, 28(3), 173–212. <https://doi.org/10.1080/07388550802262197>
- Kumariya, R., Garsa, A. K., Rajput, Y. S., Sood, S. K., Akhtar, N., & Patel, S. (2019). Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 128, 171–177.
<https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2019.01.002>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970 227:5259, 227(5259), 680–685.
<https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lauková, A., Stropfová, V., Ščerbová, J., & Simonová, M. P. (2019). Virulence factor genes incidence among enterococci from sewage sludge in eastern Slovakia following safety aspect. *BioMed Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2735895>
- Lebreton, F., Riboulet-Bisson, E., Serror, P., Sanguinetti, M., Posteraro, B., Torelli, R., Hartke, A., Auffray, Y., & Giard, J. C. (2009). ace, which encodes an adhesin in *Enterococcus faecalis*, is regulated by Ers and is involved in virulence. *Infection and Immunity*, 77(7), 2832–2839. <https://doi.org/10.1128/IAI.01218-08/ASSET/9F76C8F9-02E8-4D1B-9E71-22A20D963801/ASSETS/GRAPHIC/ZII0070980220005.JPEG>
- Lee, S. H., Park, M. S., Jung, J. Y., & Jeon, C. O. (2012). *Leuconostoc miyukkimchii* sp. nov., isolated from brown algae (*Undaria pinnatifida*) kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(5), 1098–1103.
<https://doi.org/10.1099/IJS.0.032367-0>
- Levin, M. E., & Hatfull, G. F. (1993). *Mycobacterium smegmatis* RNA polymerase: DNA supercoiling, action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance. *Molecular Microbiology*, 8(2), 277–285. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.1993.TB01572.X>
- Liu, G., Lv, Y., Li, P., Zhou, K., & Zhang, J. (2008). Pentocin 31-1, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* 31-1 isolated from Xuan-Wei Ham, a traditional China fermented meat product. *Food Control*, 19(4), 353–359.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2007.04.010>
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., & RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Lyhs, U. (2002). Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. *Undefined*.

- Mahony, J. B., & Chernesky, M. A. (1995). Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Molecular Methods for Virus Detection*, 219–236. <https://doi.org/10.1016/B978-012748920-9/50011-X>
- Mandel, M., & Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology*, 53(1), 159–162. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90051-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90051-3)
- Marion, M., Raffellini, S., Fantuzzi, L., & González, F. (1995). Inhibitory effect of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* on *Pseudomonas fluorescens* in milk stored at low temperature. *Australian Journal of Dairy Technology*.
- Martínez, B., Rodríguez, A., Suárez, E., Martínez, B., Rodríguez, Á. A., Suárez, Á. E., Rodríguez, A., & Suárez, E. (2016). Antimicrobial Peptides Produced by Bacteria: The Bacteriocins. *New Weapons to Control Bacterial Growth*, 15–38. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28368-5_2
- Martinez, R. M. (2013). *Bacillus subtilis*. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 246–248. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00125-X>
- Masuda, Y., Ono, H., Kitagawa, H., Ito, H., Mu, F., Sawa, N., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2011). Identification and characterization of leucocyclicin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* TK41401. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(22), 8164–8170. <https://doi.org/10.1128/AEM.06348-11>
- Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M., & Drosinos, E. H. (2003). Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Science*, 64(3), 265–271. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00188-2](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00188-2)
- Morandi, S., Cremonesi, P., Silveti, T., & Brasca, M. (2013). Technological characterisation, antibiotic susceptibility and antimicrobial activity of wild-type *Leuconostoc* strains isolated from North Italian traditional cheeses. *The Journal of Dairy Research*, 80(4), 457–466. <https://doi.org/10.1017/S0022029913000447>
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51 Pt 1(1), 263–273. <https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032>
- Mundt, J. O. (1970). LACTIC ACID BACTERIA ASSOCIATED WITH RAW PLANT FOOD MATERIAL. *Journal of Milk and Food Technology*, 33(12), 550–553. <https://doi.org/10.4315/0022-2747-33.12.550>
- Muñoz-Atienza, E., Gómez-Sala, B., Araújo, C., Campanero, C., del Campo, R., Hernández, P. E., Herranz, C., & Cintas, L. M. (2013). Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiology*, 13(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-15/TABLES/6>
- Nissen-Meyer, J., Oppegård, C., Rogne, P., Haugen, H. S., & Kristiansen, P. E. (2010a). Structure and mode-of-action of the two-peptide (class-IIb) bacteriocins. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2(1), 52–60. <https://doi.org/10.1007/s12602-009-9021-z>

- Nissen-Meyer, J., Opegård, C., Rogne, P., Haugen, H. S., & Kristiansen, P. E. (2010b). Structure and mode-of-action of the two-peptide (class-IIb) bacteriocins. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2(1), 52–60. <https://doi.org/10.1007/S12602-009-9021-Z/FIGURES/2>
- Ohman, D. E., Cryz, S. J., & Iglewski, B. H. (1980). Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. *Journal of Bacteriology*, 142(3), 836. <https://doi.org/10.1128/jb.142.3.836-842.1980>
- Opegård, C., Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P. E., Fimland, G., & Nissen-Meyer, J. (2007). The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(4), 210–219. <https://doi.org/10.1159/000104750>
- Özcan, E., Selvi, S. S., Nikerel, E., Teusink, B., Toksoy Öner, E., & Çakır, T. (2019). A genome-scale metabolic network of the aroma bacterium *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(7), 3153–3165. <https://doi.org/10.1007/S00253-019-09630-4/FIGURES/7>
- Pal, G., & Srivastava, S. (2014). Inhibitory effect of plantaricin peptides (PIn E/F and J/K) against *Escherichia coli*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 30(11), 2829–2837. <https://doi.org/10.1007/S11274-014-1708-Y>
- Parapouli, M., Delbès-Paus, C., Kakouri, A., Koukkou, A. I., Montel, M. C., & Samelis, J. (2013). Characterization of a wild, novel nisin A-Producing *Lactococcus* strain with an *L. lactis* subsp. *cremoris* genotype and an *L. lactis* subsp. *lactis* phenotype, isolated from Greek raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(11), 3476–3484. <https://doi.org/10.1128/AEM.00436-13>
- Peechakara, B. v., Basit, H., & Gupta, M. (2021). Ampicillin. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.61227-9>
- Petti, C. A., Polage, C. R., & Schreckenberger, P. (2005). The Role of 16S rRNA Gene Sequencing in Identification of Microorganisms Misidentified by Conventional Methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), 6123–6125. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.12.6123-6125.2005>
- Pham, J. v., Yilma, M. A., Feliz, A., Majid, M. T., Maffetone, N., Walker, J. R., Kim, E., Cho, H. J., Reynolds, J. M., Song, M. C., Park, S. R., & Yoon, Y. J. (2019). A review of the microbial production of bioactive natural products and biologics. *Frontiers in Microbiology*, 10(JUN), 1404. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01404/BIBTEX>
- Pierce-Hendry, S. A., & Dennis, J. (2010). *CE Article 3 CE CREDITS | Compendium: Continuing Education for Veterinarians® E1 Bacterial Culture and Antibiotic Susceptibility Testing*.
- Pierce-Hendry, S., Compend, J. D., & 2010, undefined. (2010). Bacterial culture and antibiotic susceptibility testing. *Vetfolio-Vetstreet.S3.Amazonaws.Com*. http://vetfolio-vetstreet.s3.amazonaws.com/29/97c5b069be11e09ce70050568d17ce/file/PV0710_hendry_CE.pdf
- Piggot, P. J. (2009). *Bacillus Subtilis*. *Encyclopedia of Microbiology*, 45–56. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00036-5>

- Quadri, L. E. N., Sailer, M., Roy, K. L., Vederas, J. C., & Stiles, M. E. (1994). Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *Journal of Biological Chemistry*, 269(16), 12204–12211. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)32702-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)32702-3)
- Quadri, L. E. N., Sailer, M., Terebiznik, M. R., Roy, K. L., Vederas, J. C., & Stiles, M. E. (1995). Characterization of the protein conferring immunity to the antimicrobial peptide carnobacteriocin B2 and expression of carnobacteriocins B2 and BM1. *Journal of Bacteriology*, 177(5), 1144–1151. <https://doi.org/10.1128/JB.177.5.1144-1151.1995>
- Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., & Penna, A. L. B. (2012). Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Engineering Reviews* 2012 4:2, 4(2), 124–140. <https://doi.org/10.1007/S12393-012-9051-2>
- Reller, L., Weinstein, M., ... J. J.-C. infectious, & 2009, undefined. (n.d.). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Academic.Oup.Com*. Retrieved January 18, 2022, from <https://academic.oup.com/cid/article-abstract/49/11/1749/344384>
- Samelis, J., Doulgeraki, A. I., Bikouli, V., Pappas, D., & Kakouri, A. (2021). Microbiological and Metagenomic Characterization of a Retail Delicatessen Galotyri-Like Fresh Acid-Curd Cheese Product. *Fermentation* 2021, Vol. 7, Page 67, 7(2), 67. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION7020067>
- Sauer, A., & Moraru, C. I. (2009). Inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Escherichia coli* O157:H7 in Apple Juice and Apple Cider, Using Pulsed Light Treatment. *Journal of Food Protection*, 72(5), 937–944. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.5.937>
- Schägger, H. (2006). Tricine–SDS-PAGE. *Nature Protocols* 2006 1:1, 1(1), 16–22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>
- Simons, A., Alhanout, K., & Duval, R. E. (2020). Bacteriocins, Antimicrobial Peptides from Bacterial Origin: Overview of Their Biology and Their Impact against Multidrug-Resistant Bacteria. *Microorganisms*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8050639>
- Song, S., Vuai, M. S., & Zhong, M. (2018). The role of bacteria in cancer therapy - Enemies in the past, but allies at present. *Infectious Agents and Cancer*, 13(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/S13027-018-0180-Y/FIGURES/1>
- Stachelska, M. A., & Foligni, R. (n.d.). *Development of a time-effective and highly specific quantitative real-time polymerase chain reaction assay for the identification of Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus and Streptococcus thermophilus in artisanal raw cow's milk cheese*. <https://doi.org/10.2754/avb201887030301>
- States, U. (n.d.). *pBluescript II Phagemid Vectors INSTRUCTION MANUAL LIMITED PRODUCT WARRANTY ORDERING INFORMATION AND TECHNICAL SERVICES*. Retrieved December 13, 2021, from www.stratagene.com.
- Stiles, M. E. (1994). Bacteriocins Produced by *Leuconostoc* Species. *Journal of Dairy Science*, 77(9), 2718–2724. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(94\)77214-3](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(94)77214-3)

- Susiluoto, T., Korkeala, H., & Björkroth, K. J. (2003). *Leuconostoc gasicomitatum* is the dominating lactic acid bacterium in retail modified-atmosphere-packaged marinated broiler meat strips on sell-by-day. *International Journal of Food Microbiology*, *80*(1), 89–97. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00123-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00123-X)
- Swenson, J. M., Facklam, R. R., & Thornsberry, C. (1990). Antimicrobial Susceptibility of Vancomycin-Resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* Species. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, *34*(4), 543–549.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, *24*(8), 1596–1599. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSM092>
- Tang, W., & van der Donk, W. A. (2012). Structural characterization of four prochlorosins: A novel class of lantipeptides produced by planktonic marine cyanobacteria. *Biochemistry*, *51*(21), 4271–4279. https://doi.org/10.1021/BI300255S/SUPPL_FILE/BI300255S_SI_001.PDF
- Tichaczek, P. S., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Vogel, R. F., & Hammes, W. P. (1992). Characterization of the Bacteriocins Curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and Sakacin P from *L. sake* LTH673. *Systematic and Applied Microbiology*, *15*(3), 460–468. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80223-7](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80223-7)
- Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2004). Characterization of mesentericin ST99, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ST99 isolated from boza. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *31*(7), 323–329. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0153-6>
- Torriani, S., Felis, G. E., & Dellaglio, F. (2001). Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(8), 3450–3454. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3450-3454.2001>
- Trmčić, A., Samelis, J., Monnet, C., Rogelj, I., & Matijašić, B. B. (2011). Complete nisin A gene cluster from *Lactococcus lactis* M78 (HM219853) - Obtaining the nucleic acid sequence and comparing it to other published nisin sequences. *Genes and Genomics*, *33*(3), 217–221. <https://doi.org/10.1007/S13258-010-0140-4>
- Tsanasidou, C., Asimakoula, S., Sameli, N., Fanitsios, C., Vandera, E., Bosnea, L., Koukkou, A. I., & Samelis, J. (2021). Safety evaluation, biogenic amine formation, and enzymatic activity profiles of autochthonous enterocin-producing greek cheese isolates of the *enterococcus faecium/durans* group. *Microorganisms*, *9*(4), 777. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9040777/S1>
- Vandera, E., Kakouri, A., Koukkou, A. I., & Samelis, J. (2019). Major ecological shifts within the dominant nonstarter lactic acid bacteria in mature Greek Graviera cheese as affected by the starter culture type. *International Journal of Food Microbiology*, *290*, 15–26. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2018.09.014>
- Vandera, E., Lianou, A., Kakouri, A., Feng, J., Koukkou, A. I., & Samelis, J. (2017). Enhanced Control of *Listeria monocytogenes* by *Enterococcus faecium* KE82, a Multiple

- Enterocin–Producing Strain, in Different Milk Environments. *Journal of Food Protection*, 80(1), 74–85. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-082>
- Vankerckhoven, V., van Outgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D., & Goossens, H. (2004a). Development of a multiplex PCR for the detection of *asal*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among european hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(10), 4473–4479. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4473-4479.2004/ASSET/2BF41B7E-FA19-4F85-9111-A1FE0E68C326/ASSETS/GRAPHIC/ZJM0100446400002.JPEG>
- Vankerckhoven, V., van Outgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., Jabes, D., & Goossens, H. (2004b). Development of a multiplex PCR for the detection of *asal*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among european hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(10), 4473–4479. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4473-4479.2004/ASSET/2BF41B7E-FA19-4F85-9111-A1FE0E68C326/ASSETS/GRAPHIC/ZJM0100446400002.JPEG>
- Verma, D. K., Thakur, M., Singh, S., Tripathy, S., Gupta, A. K., Baranwal, D., Patel, A. R., Shah, N., Utama, G. L., Niamah, A. K., Chávez-González, M. L., Gallegos, C. F., Aguilar, C. N., & Srivastav, P. P. (2022). Bacteriocins as antimicrobial and preservative agents in food: Biosynthesis, separation and application. *Food Bioscience*, 46, 101594. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2022.101594>
- Wang, H., Oman, T. J., Zhang, R., Garcia De Gonzalo, C. v., Zhang, Q., & van der Donk, W. A. (2014). The glycosyltransferase involved in thurandacin biosynthesis catalyzes both O- and S-glycosylation. *Journal of the American Chemical Society*, 136(1), 84–87. <https://doi.org/10.1021/JA411159K>
- Watanakunakorn, C. (1984). Mode of action and in-vitro activity of vancomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 14(suppl_D), 7–18. https://doi.org/10.1093/JAC/14.SUPPL_D.7
- Waters, M., & Tadi, P. (2021). Streptomycin. *Kucers the Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs, Seventh Edition*, 2471–2487. <https://doi.org/10.1201/9781315152110>
- Wendpoulomdé Aimé Désiré Kaboré, Simavé René Dembélé, & Nicolas Barro. (2021). Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Leuconostoc*: An emergent pathogenic associated with acute endodontic infections. *Turkish Endodontic Society*. <https://doi.org/10.14744/TEJ.2021.29591>
- Werner, G., Fleige, C., Geringer, U., van Schaik, W., Klare, I., & Witte, W. (2011). IS element IS16 as a molecular screening tool to identify hospital-associated strains of *Enterococcus faecium*. *BMC Infectious Diseases*, 11(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-80/TABLES/2>
- Whitford, M. F., McPherson, M. A., Forster, R. J., & Teather, R. M. (2001). Identification of Bacteriocin-Like Inhibitors from Rumen *Streptococcus* spp. and Isolation and

- Characterization of Bovicin 255. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), 569. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.2.569-574.2001>
- Wiese, J., Thiel, V., Nagel, K., Staufenberger, T., & Imhoff, J. F. (2009). Diversity of antibiotic-active bacteria associated with the brown alga laminaria saccharina from the baltic sea. *Marine Biotechnology*, 11(2), 287–300. <https://doi.org/10.1007/S10126-008-9143-4/TABLES/3>
- Wolfe, A. D., & Hahn, F. E. (1964). Erythromycin: Mode of Action. *Science*, 143(3613), 1445–1446. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.143.3613.1445>
- Wu, Y., & Gu, C. T. (2021). *Leuconostoc falkenbergense* sp. nov., isolated from a lactic culture, fermentating string beans and traditional yogurt. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(1), 1–8. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.004602>
- Xiraphi, N., Georgalaki, M., Rantsiou, K., Cocolin, L., Tsakalidou, E., & Drosinos, E. H. (2008). Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131. *Meat Science*, 80(2), 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.11.020>
- Yamamoto, Y., Togawa, Y., Shimosaka, M., & Okazaki, M. (2003). Purification and Characterization of a Novel Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecalis* Strain RJ-11. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 5746. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.5746-5753.2003>
- Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., & Walker, B. (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express*, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S13568-018-0536-0/FIGURES/6>
- Yang, S. C., Lin, C. H., Sung, C. T., & Fang, J. Y. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology*, 5(MAY), 241. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00241/BIBTEX>
- Ye, K., Li, P., & Gu, Q. (2020). Complete genome sequence analysis of a strain *Lactobacillus pentosus* ZFM94 and its probiotic characteristics. *Genomics*, 112(5), 3142–3149. <https://doi.org/10.1016/J.YGENO.2020.05.015>
- Yi, L., Qi, T., Hong, Y., Deng, L., & Zeng, K. (2020). Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in Chinese homemade pickle and dry-cured meat, and bacteriocin identification by genome sequencing. *LWT*, 125. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2020.109177>
- Yocum, R. R., Waxman, D. J., Rasmussen, J. R., & Strominger, J. L. (1979). Mechanism of penicillin action: penicillin and substrate bind covalently to the same active site serine in two bacterial D-alanine carboxypeptidases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(6), 2730–2734. <https://doi.org/10.1073/PNAS.76.6.2730>
- Zamfir, M., Callewaert, R., Cornea, P. C., Savu, L., Vatafu, I., & de Vuyst, L. (1999). Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 923–931.

- Zangeneh, M., Khorrami, S., & Khaleghi, M. (2020). Bacteriostatic activity and partial characterization of the bacteriocin produced by *L. plantarum* sp. isolated from traditional sourdough. *Food Science & Nutrition*, 8(11), 6023–6030. <https://doi.org/10.1002/FSN3.1890>
- Zarazaga, M., Sáenz, Y., Portillo, A., Tenorio, C., Ruiz-Larrea, F., del Campo, R., Baquero, F., & Torres, C. (1999). In Vitro Activities of Ketolide HMR3647, Macrolides, and Other Antibiotics against *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, and *Pediococcus* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(12), 3039. <https://doi.org/10.1128/aac.43.12.3039>
- Zhang, J., Yang, Y., Yang, H., Bu, Y., Yi, H., Zhang, L., Han, X., & Ai, L. (2018). Purification and partial characterization of bacteriocin Lac-B23, a novel bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum*J23, isolated from Chinese traditional fermented milk. *Frontiers in Microbiology*, 9(OCT), 2165. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02165/BIBTEX>
- Zhang, T., Zhang, C., Li, S., Zhang, Y., & Yang, Z. (2011). Growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST1 in skim milk. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(4), 1470. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220110004000033>