



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

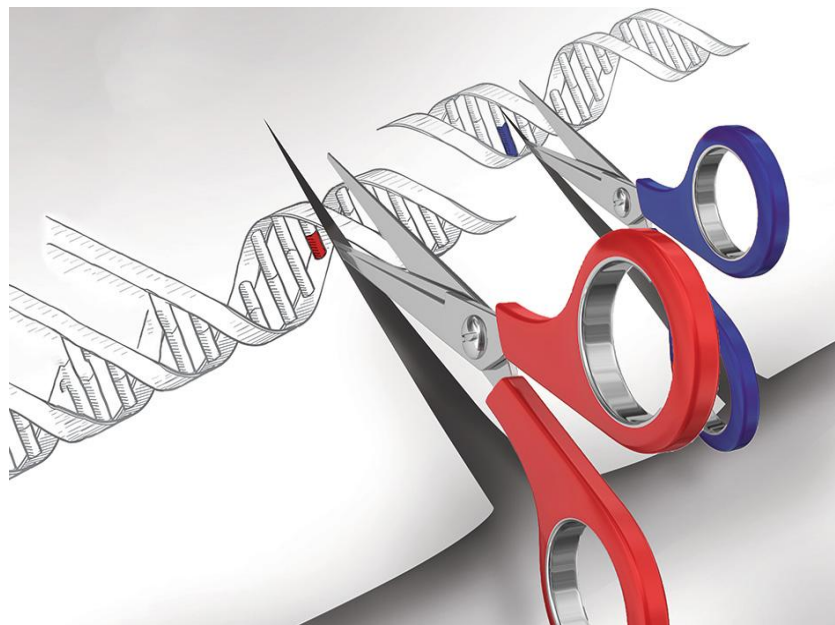
**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: «ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ & ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ»**

**ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ  
ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ  
*Lactococcus lactis ssp. cremoris* MG1363  
ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΩΣΜΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ**



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**ΜΑΡΓΑΡΙΤΑ Ν. ΜΕΖΙΑΗ**

**ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2014**

**ΑΘΗΝΑ**



**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: «ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ & ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ»**

**ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ  
ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΟΥ  
*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363  
ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΣΤΟ ΩΣΜΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

**ΜΑΡΓΑΡΙΤΑ Ν. ΜΕΖΙΛΗ**

**ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

***ΕΙΣΗΓΗΤΡΙΑ:*** ΤΣΑΚΑΛΙΔΟΥ ΕΦΗ, Καθηγήτρια

***ΜΕΛΗ:*** ΠΟΛΥΣΙΟΥ ΜΟΣΧΟΣ, Καθηγητής

ΠΑΝΑΓΟΥ ΕΥΣΤΑΘΙΟΣ, Επίκουρος Καθηγητής

**ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2014**

**ΑΘΗΝΑ**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα αρχικά να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στην καθηγήτρια κ. Έφη Τσακαλίδου που δέχτηκε να αναλάβει την επίβλεψη της μεταπτυχιακής μου μελέτης και μου έδωσε την ευκαιρία να δουλέψω στο εργαστήριο Γαλακτοκομίας μαθαίνοντας κάθε μέρα και κάτι διαφορετικό. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Μόσκο Πολυσίου και τον επίκουρο καθηγητή κ. Ευστάθιο Πανάγου για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή που αξιολόγησε και βαθμολόγησε την παρούσα μελέτη.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνονται στον δρ. Κώστα Παπαδημητρίου για την καθοριστική συμβολή του στην πραγματοποίηση της μελέτης. Η βοήθεια και οι πολύτιμες συμβουλές του ήταν ιδιαίτερα χρήσιμες και πολλά από αυτά που διδάχτηκα θα αποτελέσουν μελλοντικά εφόδια στη σταδιοδρομία μου. Επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την υποψήφια διδάκτορα Μαρία Κάζου και τη δρ. Ράνια Αναστασίου για την ουσιαστική βοήθειά τους στο πειραματικό μέρος της εργασίας μου, αλλά και για τη συμπάρταση και την κατανόησή τους κάθε φορά που ο χρόνος μου στο εργαστήριο ήταν περιορισμένος. Τις ευχαριστώ που με εισήγαγαν στον κόσμο της μοριακής βιολογίας και που παρά το φόρτο εργασίας τους δε μου αρνήθηκαν ποτέ την καθοδήγησή τους. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό και τους φοιτητές του εργαστηρίου Γαλακτοκομίας για την άψογη συνεργασία.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω ειλικρινά τους συναδέλφους μου Θεόφιλο Μεταξάκη, Ηρακλή Λιβάνιο, Φαίη Λαζαρίδη, Άννα Κοντοράβδη και Ράνια Ρούσσου, χωρίς τη βοήθεια και την υποστήριξη των οποίων η εκπόνηση μεταπτυχιακής μελέτης και η εργασία σε ερευνητικό πρόγραμμα δε θα μπορούσαν να γίνουν ταυτόχρονα.

Τελευταίους σε σειρά, αλλά όχι και σε σπουδαιότητα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και την οικογένειά μου. Η κατανόηση, η υπομονή και η υποστήριξη τους σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου ήταν αμέριστη και χωρίς τη βοήθεια τους η μελέτη αυτή δεν θα είχε πραγματοποιηθεί.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|   |            |
|---|------------|
| <b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</b> .....  | <b>iii</b> |
| <b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....   | <b>7</b>   |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>8</b>   |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....   | <b>9</b>   |
| 1.1 Τα οξυγαλακτικά βακτήρια .....  | 9          |
| 1.2 Οξυγαλακτικά βακτήρια σε συνθήκες στρες.....  | 11         |
| 1.2.1 Θερμικό στρες .....   | 14         |
| 1.2.2 Ψυχρό στρες.....  | 14         |
| 1.2.3 Όξινο στρες .....   | 14         |
| 1.2.4 Οξειδωτικό στρες.....   | 15         |
| 1.2.5 Ασιτία.....   | 16         |
| 1.2.6 Χολικά άλατα .....  | 17         |
| 1.2.7 Ωσμωτικό στρες.....   | 17         |
| 1.3 Ο <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363 .....   | 19         |
| 1.3.1 Ο <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363 και η ανθεκτικότητα στο ωσμωτικό στρες.....   | 21         |
| 1.4 Σκοπός της μελέτης.....   | 22         |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ &amp; ΜΕΘΟΔΟΙ</b> .....  | <b>24</b>  |
| 2.1 Ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών.....  | 24         |
| 2.2 Απομόνωση του πλασμιδίου pGh9:ISS1 από το στέλεχος <i>Escherichia coli</i> EC101 .....  | 24         |
| 2.2.1 Απομόνωση του πλασμιδίου pGh9:ISS1.....   | 24         |
| 2.2.2 Μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA.....   | 26         |
| 2.3 Επιβεβαίωση της ποιότητας του πλασμιδίου pGh9:ISS1 μετά την απομόνωση από το στέλεχος <i>Escherichia coli</i> EC101 .....                     | 26         |
| 2.3.1 Πέψη του πλασμιδίου με περιοριστικές ενδονουκλεάσες .....   | 26         |
| 2.3.2 Ηλεκτροφόρηση των τμημάτων DNA σε πηκτή αгарόζης.....   | 27         |
| 2.4 Μετασχηματισμός του <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363 με το πλασμιδίο pGh9:ISS1.....                                      | 27         |
| 2.4.1 Δημιουργία κυττάρων του στελέχους <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363 επιδεκτικών σε μετασχηματισμό (Competent Cells) ... | 28         |
| 2.4.2 Μετασχηματισμός με το πλασμιδίο pGh9:ISS1 και λήψη μεταλλαγμένων στελεχών του <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363.        | 28         |

|  |   |           |
|--|---|-----------|
| 2.5  | Διερεύνηση των βέλτιστων συνθηκών για την επιλογή μεταλλαγμένων, ανθεκτικών σε υπερωσμωτικές συνθήκες στελεχών του <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363 .....                    | 29        |
| 2.6  | Κλωνοποίηση της πλευρικής αλληλουχίας της περιοχής όπου εισήλθε το πλασμίδιο pGh9:ISS1 στο γονιδίωμα των μεταλλαγμένων στελεχών του <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363 .....   | 31        |
| 2.6.1  | Δημιουργία κυττάρων του στελέχους <i>Escherichia coli</i> EC101 επιδεκτικών σε μετασχηματισμό (Competent Cells) .....   | 31        |
| 2.6.2  | Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από μεταλλαγμένα στελέχη του <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363.....  | 32        |
| 2.6.3  | Πέψη του χρωμοσωμικού DNA των μεταλλαγμένων στελεχών του <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363.....   | 33        |
| 2.6.4  | Κυκλοποίηση των γραμμικών προϊόντων της πέψης του χρωμοσωμικού DNA των μεταλλαγμένων στελεχών του <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363, μέσω αντίδρασης λιγάσης (Ligation) ..... | 34        |
| 2.6.5  | Συμπύκνωση των προϊόντων της δράσης της λιγάσης .....   | 34        |
| 2.6.6  | Μετασχηματισμός των ικανών προς μετασχηματισμό κυττάρων του στελέχους <i>Escherichia coli</i> EC101 .....   | 35        |
| 2.7  | Επιβεβαίωση του μετασχηματισμού των στελεχών <i>Escherichia coli</i> EC101.....   | 36        |
| 2.7.1  | Colony PCR των αποικιών των μετασχηματισμένων κυττάρων του στελέχους <i>Escherichia coli</i> EC101 και ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζη.....  | 36        |
| 2.7.2  | Συλλογή των επιθυμητών αποικιών και απομόνωση του πλασμιδιακού DNA.....   | 37        |
| 2.8  | Βιοπληροφορική Ανάλυση μετά από αλληλούχηση του γονιδιώματος των μεταλλαγμένων στελεχών του <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363.....  | 38        |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ &amp; ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b> |   | <b>39</b> |
| 3.1  | Απομόνωση του πλασμιδίου pGh9:ISS1 από το στέλεχος <i>Escherichia coli</i> EC101.....   | 39        |
| 3.2  | Δημιουργία και επιλογή μεταλλαγμένων στελεχών του <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363 με ανθεκτικότητα σε ωσμωτικό στρες.....   | 42        |
| 3.3  | Έλεγχος των πιθανά μεταλλαγμένων στελεχών με Colony PCR.....  | 44        |
| 3.4  | Έλεγχος της ποιότητας του χρωμοσωμικού DNA από μεταλλαγμένα στελέχη του <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363 .....   | 46        |

|                                       |  |           |
|---------------------------------------|--|-----------|
| 3.5                                   | Μετασχηματισμός στελεχών <i>Escherichia coli</i> EC101 με χρωμοσωμικό DNA από μεταλλαγμένα στελέχη του <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363 ..... | 48        |
| 3.6                                   | Απομόνωση DNA από τα μετασχηματισμένα στελέχη <i>Escherichia coli</i> EC101 και επιβεβαίωση της ποιότητά του.....  | 50        |
| 3.7                                   | Βιοπληροφορική ανάλυση .....   | 51        |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b> |  | <b>57</b> |
| <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b> |  | <b>59</b> |

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* είναι ένα οξυγαλακτικό βακτήριο με μεγάλη τεχνολογική και οικονομική σημασία. Κατά την παραγωγή τροφίμων εκτίθεται σε στρεσογόνες συνθήκες, και η απόκρισή του σε αυτές αποτελούσε και αποτελεί αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια. Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε η δημιουργία και ο χαρακτηρισμός γενετικά τροποποιημένων στελεχών του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 ώστε αυτά να καταστούν ανθεκτικά σε υπερωσμωτικές συνθήκες, με την εισαγωγή και ενσωμάτωση του θερμοευαίσθητου πλασμιδιακού φορέα pGh9:ISS1 στο χρωμόσωμά του. Στόχος ήταν επίσης η μελέτη και ο χαρακτηρισμός πέντε μεταλλαγμένων στελεχών που είχαν προκύψει από προηγούμενες μελέτες. Η απομόνωση νέων μεταλλαγμένων στελεχών δεν κατέστη εφικτή. Η ανάλυση που έγινε στα παλαιότερα μεταλλαγμένα στελέχη έδειξε πως το πλασμιδίο ενσωματώθηκε στο χρωμόσωμα του MG1363. Η κλωνοποίηση των σημείων ένωσης του πλασμιδίου με το χρωμόσωμα του MG1363 ήταν επιτυχής στα τέσσερα από τα πέντε μεταλλαγμένα στελέχη. Μετά την αλληλούχηση των πλευρικών αλληλουχιών του γονιδιώματος των μεταλλαγμένων στελεχών, με εργαλεία βιοπληροφορικής έγινε σύγκριση των αλληλουχιών αυτών με γονίδια του MG1363 και εκτιμήθηκε η ακριβής θέση στην οποία ενσωματώθηκε το πλασμιδίο pGh9:ISS1 στο χρωμόσωμα του MG1363. Η ενσωμάτωση του πλασμιδίου διέκοψε το ίδιο γονίδιο και στα τέσσερα μεταλλαγμένα στελέχη. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το γονίδιο αυτό είναι μία συντηρημένη υποθετική πρωτεΐνη και ένα από τα τμήματα της με γνωστό ρόλο είναι η αντλία μεταφοράς ιόντων. Φαίνεται πως η συγκεκριμένη πρωτεΐνη συμμετέχει στο ωσμωτικό στρες, προσδίδοντας ευαισθησία στο βακτήριο, αφού με την απενεργοποίηση του γονιδίου υπάρχει μια ενδεχόμενη συσχέτιση με την επίδειξη ανθεκτικότητας του οργανισμού στο συγκεκριμένο στρες. Οι πληροφορίες που προκύπτουν από την εργασία αυτή είναι ένα βήμα προς την κατανόηση της συμπεριφοράς τόσο του *L. lactis* ssp. *cremoris* όσο και των οξυγαλακτικών βακτηρίων γενικότερα σε συνθήκες ωσμωτικού στρες.

## **ABSTRACT**

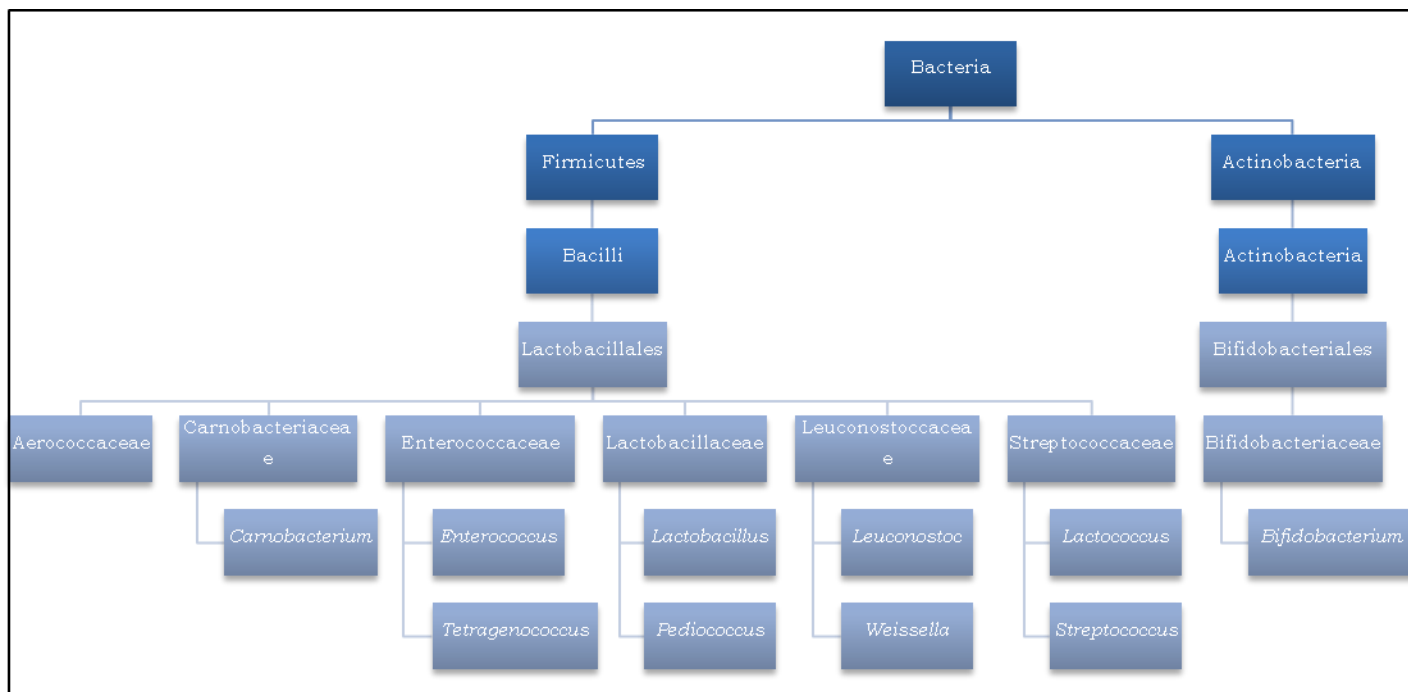
*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* is a lactic acid bacterium of great technological and economical importance. During food production procedure it is exposed to stressful conditions, and its response to them has been the subject of studies for many years. The purpose of this study was to generate and characterize genetically modified mutants of *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 resistant to hyperosmotic stress, by inserting the thermosensitive plasmid vector pGh9:ISS1 in its genome. Another aim of this study was to characterize five osmotic mutants that had been isolated in previous studies. The isolation of new mutants was not possible. The analysis performed in the other five mutants showed that the plasmid was inserted into the genome of MG1363. The cloning of the junctions of the plasmid with the genome of MG1363 was successful in four out of the five mutants. After the flanking sequences of the mutants' genome were sequenced, they were compared to MG1363 genes and the exact position where the plasmid vector pGh9:ISS1 was inserted into the MG1363 genome was found using bioinformatics tools. The insertion of the plasmid vector interrupted the same gene in all four mutants. The protein encoded by this gene is a conserved hypothetical protein and one of its domains is transporter-associated. It seems that this protein is osmotic-stress-involved, conferring sensitivity to the bacterium. Resistance to this stress is possibly related to the inactivation of the encoder gene. The information derived from this work will help understanding the response of *L. lactis* ssp. *cremoris* and lactic acid bacteria in general to osmotic stress.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Τα οξυγαλακτικά βακτήρια

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ή βακτήρια του γαλακτικού οξέος (Lactic Acid Bacteria, LAB) περιλαμβάνουν ένα ευρύ φάσμα μικροβιακών γενών και ειδών. Κατά τον [Orla-Jensen \(1919\)](#), ως «πραγματικά βακτήρια του γαλακτικού οξέος» ορίζεται μια ομάδα gram θετικών μικροοργανισμών, σχήματος βακίλλου ή κόκκου, που δεν παρουσιάζουν τυπικά αυτόνομη κίνηση ή σχηματισμό ενδοσπορίων και οι οποίοι παρουσιάζουν την ικανότητα ζύμωσης υδατανθράκων και ανώτερων αλκοολών προς γαλακτικό οξύ κυρίως ([Stiles & Holzapfel, 1997](#)). Πρόκειται για μικροοργανισμούς αρνητικούς στη δοκιμή της καταλάσης, που αναπτύσσονται υπό μικροαερόφιλες έως αυστηρά αναερόβιες συνθήκες με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 30-40° C, ενώ η αναλογία G+C (γουανίνη + κυτοσίνη) στο μόριο του DNA τους είναι μικρότερη του 55% ([Klein et al., 1998](#); [Schleifer & Ludwig, 1995](#)). Αν και τα κριτήρια του [Orla-Jensen](#) έβαλαν τα θεμέλια για τη συστηματική κατάταξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, οι σύγχρονες προσεγγίσεις, που λαμβάνουν υπόψη φυλογενετικές αναλύσεις και μοριακές τεχνικές, έχουν αυξήσει τον αριθμό των γενών που εκείνος είχε αναγνωρίσει αρχικά (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* *Streptococcus*) ([Von Wright & Axelsson, 2011](#)). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ταξινομούνται στην Τάξη Lactobacillales της Κλάσης Bacilli στο φύλο Firmicutes και περιλαμβάνουν τις οικογένειες Aerococcaceae, Carnobacteriaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Leuconostoccaceae και Streptococcaceae. Στα πιο σημαντικά γένη ανήκουν τα *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* και *Bifidobacterium* ([Klein et al., 1998](#)).



ΕΙΚΟΝΑ 1.1.: ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΣΗΜΑΝΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ ΓΕΝΩΝ ΤΩΝ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

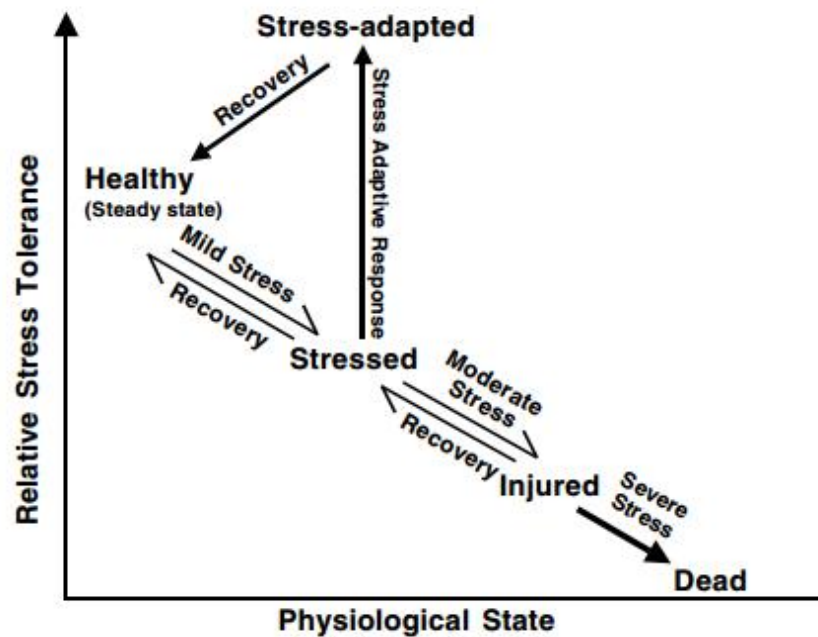
Τα οξυγαλακτικά βακτήρια απαντώνται γενικά σε διάφορα οικοσυστήματα, όπως στα ζυμούμενα τρόφιμα (γιαούρτι, τυρί, αλλαντικά, ελιές, μπύρα, κεφίρ κ.α.), καθώς και στην αναπνευστική, εντερική και γενετική οδό του ανθρώπου και των ζώων. Έχουν σημαντικό ρόλο στη βιομηχανία τροφίμων, αφού με την παραγωγή γαλακτικού οξέος, οξικού οξέος, υπεροξειδίου του υδρογόνου, διακετυλίου και βακτηριοσινών ανταγωνίζονται αλλοιωγόνους και παθογόνους μικροοργανισμούς και συμβάλλουν στη διατήρηση ή στην αλλοίωση των τροφίμων (Lucke, 2000). Επιπλέον, συμβάλλουν στη βελτίωση της ποιότητας των προϊόντων, αφού συμμετέχουν στη διαμόρφωση του αρώματος, της γεύσης και της υφής, ενώ παράλληλα βελτιώνουν την πεπτικότητα και τη θρεπτική αξία των τροφίμων, αφού εμπλουτίζονται με απαραίτητα αμινοξέα, λιπαρά οξέα και βιταμίνες.

Η πληθώρα ευεργετικών επιδράσεων στην ανθρώπινη εντερική μικροχλωρίδα δικαιολογεί το έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον της μελέτης των προβιοτικών τους ιδιοτήτων (Klein et al., 1998). Με αφορμή την ευ-

εργετική τους δράση στα οικοσυστήματα του ανθρώπου, πολλά στελέχη παρουσιάζουν διατροφικό ενδιαφέρον καθώς αξιοποιούνται ως προβιοτικά, ως καλλιέργειες δηλαδή ζωντανών μικροοργανισμών, η κατανάλωση των οποίων σε ικανές ποσότητες επιφέρει ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ξενιστή (Joint FAO/WHO, 2001). Οι επιστημονικά τεκμηριωμένες ευεργετικές επιδράσεις των προβιοτικών στην υγεία του ανθρώπου περιλαμβάνουν τη μείωση της διάρκειας της ιογενούς διάρροιας, την ανακούφιση των συμπτωμάτων της δυσανεξίας στη λακτόζη, την αποτροπή της επανεμφάνισης επιφανειακών όγκων της ουροδόχου κύστης, την ελάττωση της επιβλαβούς μικροβιακής ενζυμικής δραστηριότητας στο έντερο και την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος. Επιπλέον, φαίνεται πως μπορούν να συμβάλλουν στη θεραπεία διαφόρων παθολογικών καταστάσεων (φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, τροφικές αλλεργίες, λοίμωξη από *H. pylori*, καρκίνος της ουροδόχου κύστης, ουρογεννητικές λοιμώξεις) (Shortt, 1999).

## 1.2 Οξυγαλακτικά βακτήρια σε συνθήκες στρες

Ως στρες ορίζεται οποιαδήποτε μεταβολή στο γονιδίωμα, στις παραγόμενες πρωτεΐνες ή στο περιβάλλον, η οποία έχει ως συνέπεια τη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης ή της επιβίωσης ενός μικροοργανισμού (Sugimoto et al., 2008; Spano & Massa, 2006). Τα είδη στρες που μπορεί να αντιμετωπίσουν οι μικροοργανισμοί ποικίλλουν. Το «ήπιο» στρες (mild stress) χρησιμοποιείται για να περιγράψει υποθανάτια επίπεδα στρες που δεν επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων, αλλά μειώνουν ή σταματούν το ρυθμό ανάπτυξης. Το «μέτριο» στρες (moderate stress) όχι μόνο σταματά τη μικροβιακή ανάπτυξη, αλλά έχει επιπτώσεις και στη βιωσιμότητα των κυττάρων. Τέλος, το «ακραίο» στρες (extreme/severe stress) περιγράφει επίπεδα στρες θανατηφόρα για τα κύτταρα, με αποτέλεσμα το θάνατο της πλειοψηφίας του πληθυσμού τους (Yousef & Courtney, 2003).



ΕΙΚΟΝΑ 1.2: ΣΧΕΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΩΝ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΤΡΕΣ (YOUSEF & COURTNEY, 2003)

Το στρες αποτελεί μια κινητήρια δύναμη στην εξελικτική διαδικασία, προκαλώντας το φαινόμενο της βιοποικιλότητας και τη δημιουργία νέων ειδών. Όταν οι μικροοργανισμοί στρεσάρονται μπορεί να ακολουθήσει απόκριση προσαρμογής ή προστασίας. Η απόκριση αυτή μπορεί να αυξήσει την ανοχή του οργανισμού σε έναν ή περισσότερους στρεσογόνους παράγοντες, φαινόμενο που περιγράφεται ως απόκριση προσαρμογής (adaptive response) ή επαγόμενη ανοχή (induced tolerance) (Yousef & Courtney, 2003).

Σε μοριακό επίπεδο, η απόκριση στο στρες περιλαμβάνει την έκφραση γονιδίων που μεταφράζονται σε ρυθμιστικές πρωτεΐνες, η δράση των οποίων μπορεί να οδηγήσει στην σύνθεση άλλων πρωτεϊνών που θα αντιμετωπίσουν το στρεσογόνο παράγοντα και θα επαναφέρουν την ομοιότητα στο κύτταρο. Η απόκριση μπορεί να έχει τα εξής αποτελέσματα:

- Σύνθεση πρωτεϊνών που την αποκαθιστούν τις βλάβες και εξαλείφουν τον στρεσογόνο παράγοντα
- Παροδική αύξηση της ανθεκτικότητας ή ανοχή σε επιβλαβείς για το κύτταρο παράγοντες
- Μετασχηματισμός κυττάρων σε λανθάνουσα κατάσταση, π.χ. σχηματισμός σπορίων

Προσαρμοστικές μεταλλάξεις (Yousef & Courtney, 2003).

Κατά την παραγωγή τροφίμων, οι μικροοργανισμοί υποβάλλονται σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως είναι η οξίνιση, η θέρμανση ή η ψύξη, το οξειδωτικό ή το ωσμωτικό στρες, η ασιτία, οι τοξικές ενώσεις κ.α. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια, η απόκρισή των οποίων στα διάφορα στρες έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης λόγω της βιομηχανικής σημασίας τους, έχουν αναπτύξει μηχανισμούς ώστε να προσαρμόζονται επάγοντας διάφορους γενικούς ή ειδικούς μηχανισμούς απόκρισης (van de Guchte et al., 2002). Οι μηχανισμοί αυτοί βασίζονται στη συγχρονισμένη έκφραση γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων τροποποιούν διάφορες κυτταρικές διαδικασίες (κυτταρική διαίρεση, μεταβολισμός DNA, σύνθεση μεμβρανών κ.α.) και δρουν συντονισμένα ώστε να βελτιωθεί η βακτηριακή αντοχή στο στρες (Stortz et al., 2000).

Υπάρχουν τρεις κατηγορίες στις οποίες διακρίνονται τα συστήματα αντοχής στο στρες: τα ειδικά συστήματα, που επάγονται από την ύπαρξη στρες σε υποθανατηφόρο δόση, τα γενικά συστήματα, όπου η προσαρμογή στο στρες μπορεί να καταστήσει τα κύτταρα ανθεκτικά και σε άλλες στρεσογόνες καταστάσεις και, τέλος, οι αποκρίσεις που σχετίζονται με τη στατική φάση των βακτηρίων, οι οποίες μπορούν να προσφέρουν στο κύτταρο γενικευμένη ανθεκτικότητα έναντι πολλαπλών στρες (Lorca & de Valdez, 2009; van de Guchte et al., 2002). Η αναγνώριση των γονιδίων που συμμετέχουν στις αποκρίσεις του στρες είναι εξαιρετικά σημαντική όταν ο στόχος είναι ο έλεγχος και η πρόβλεψη της συμπεριφοράς των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

### **1.2.1 Θερμικό στρες**

Η έκθεση των κυττάρων σε υψηλές θερμοκρασίες προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών, μεταβολές στη ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης και αποσταθεροποίηση μακρομορίων, όπως τα ριβοσώματα και το RNA (De Angelis & Gobbetti, 2004; Hansen et al., 2001; Teixeira et al., 1997; Earnshaw et al., 1995). Μελέτες σχετικά με τη φυσιολογία των οξυγαλακτικών βακτηρίων έχουν δείξει ότι οι αποκρίσεις τους δε διαφέρουν από εκείνες των υπόλοιπων Gram θετικών βακτηρίων, ενώ κατά την απόκριση έχει παρατηρηθεί η παραγωγή πολλών πρωτεϊνών που παράγονται και κατά το ωσμωτικό στρες (van de Guchte et al., 2002).

### **1.2.2 Ψυχρό στρες**

Η έκθεση σε χαμηλές θερμοκρασίες έχει ως συνέπεια σημαντικές φυσιολογικές μεταβολές, όπως είναι η μείωση της ρευστότητας της κυτταρικής μεμβράνης, η υπερελίκωση του DNA και η σταθεροποίηση των δευτεροταγών δομών του RNA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της αποδοτικότητας της αντιγραφής, της μεταγραφής και της μετάφρασης του DNA. Η απόκριση των μικροοργανισμών σε αυτές τις συνθήκες σχετίζεται με τη σύνθεση πρωτεϊνών ψυχρού στρες (Cold-Induced Proteins, CIPs) (Champomier-Verges et al., 2002).

### **1.2.3 Όξινο στρες**

Η μείωση του εξωκυτταρικού pH οδηγεί στην απώλεια της πρωτονιαγεργτικής δύναμης (Proton Motive Force, PMF), η οποία αποτελεί πηγή ενέργειας για τα βακτήρια, ενώ επίσης μεταβάλλει τις ενζυμικές δραστηριότητες, μετουσιώνει τις πρωτεΐνες και καταστρέφει τα νουκλεϊκά οξέα (Champomier-Verges et al., 2002). Όταν τα οξέα με παθητική διάχυση βρεθούν στο εσωτερικό ενός κυττάρου, διίστανται απελευθερώνο-

ντας κατιόντα υδρογόνου (H) διαταράσσοντας έτσι την ομοιόσταση με τη μείωση του ενδοκυτταρικού pH. Για να μπορέσουν να ανταπεξέλθουν, τα κύτταρα είτε αποτρέπουν την είσοδο είτε επιδιώκουν την αποβολή των H<sup>+</sup> τόσο γρήγορα όσο εισέρχονται. Έτσι, το κύτταρο στην προσπάθειά του να διατηρήσει το εσωτερικό του pH σταθερό, αντλεί ενέργεια από άλλες λειτουργίες που σχετίζονται με την ανάπτυξή του με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η αύξησή του. Σε περίπτωση που η επαναφορά της ομοιόστασης δεν επιτευχθεί, αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα το θάνατο του κυττάρου. Η ρύθμιση του pH γίνεται με τη βοήθεια κάποιων ενζύμων που υπάρχουν ενδοκυτταρικά (αποκαρβοξυλάσες αμινοξέων), τα οποία αυξάνουν το pH (σχηματισμός αμινών) και είναι ενεργά σε τιμές pH περίπου 4.0 (ICMSF, 1980).

Η ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων χαρακτηρίζεται από την παραγωγή όξινων τελικών προϊόντων, τα οποία κατά τη ζύμωση συσσωρεύονται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Η παραγωγή οργανικών οξέων από αυτά τα βακτήρια δημιουργεί ένα δυσμενές περιβάλλον για πολλούς άλλους οργανισμούς και αυτό το χαρακτηριστικό αποτελεί τη βάση για πολλές μεθόδους συντήρησης ζυμωμένων τροφίμων. Επίσης, τα οξυγαλακτικά βακτήρια εκτίθενται σε όξινο στρες λόγω της παρουσίας του υδροχλωρικού οξέος του στομάχου κατά την κατανάλωσή τους ως προβιοτικά (van de Guchte et al., 2002).

#### **1.2.4 Οξειδωτικό στρες**

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που σχετίζονται με τα τρόφιμα είναι μικροαερόφιλοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι αναγεννούν το NAD<sup>+</sup> από το NADH που παράγεται κατά τη γλυκόλυση, κατά τη διάρκεια της οποίας η μεγαλύτερη ποσότητα του πυροσταφυλικού οξέος που παράγεται, ανάγεται προς γαλακτικό. Δεν απαιτούν οξυγόνο για να αναπτυχθούν και, μάλιστα, έχει παρατηρηθεί ότι σε γενικές γραμμές επιδρά αρνητικά στην ανάπτυξή τους (De Angelis & Gobbetti, 2004). Το οξειδωτικό στρες γε-

νικά αποδίδεται στα παράγωγα του ενεργού οξυγόνου, όπως είναι η ανιονική ρίζα υπεροξειδίου ( $O_2^-$ ), το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) και η ρίζα του υδροξυλίου ( $OH^-$ ) που παράγονται κατά την αναγωγή του  $O_2$  σε  $H_2O$  και που προσβάλλουν πρωτεΐνες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα με αποτέλεσμα το κυτταρικό θάνατο. Οι μικροοργανισμοί αντιμετωπίζουν την τοξικότητα του οξυγόνου εμποδίζοντας το σχηματισμό των ελευθέρων ριζών, εξουδετερώνοντας τις σχηματισμένες ρίζες, καθιστώντας έτσι τα μόρια-στόχους λιγότερα ευάλωτα ή, τελικά, επιδιορθώνοντας τη ζημιά που προκλήθηκε από αυτές (van de Guchte et al., 2002).

### 1.2.5 Ασιτία

Η εξάντληση των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών ή/και η συσσώρευση των τελικών προϊόντων ζύμωσης περιορίζει την εκθετική φάση ανάπτυξης ενός βακτηρίου και το οδηγεί στη στατική φάση. Υπάρχουν τρεις περιοριστικές συνθήκες: η έλλειψη υδατανθράκων που οδηγεί στην εξάντληση της ενέργειας στο κύτταρο, η έλλειψη φωσφορικών ομάδων που είναι επιζήμια για την παραγωγή ενέργειας και τη σύνθεση DNA/RNA και, τέλος, η έλλειψη αζώτου, που έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης (De Angelis & Gobbetti, 2004).

Πολλά βακτήρια έχουν προσαρμοστεί ώστε να επιβιώνουν στην παρατεταμένη ασιτία. Κάποια εισέρχονται σε μια διαδικασία σχηματισμού σπορίων, που τους προσδίδουν ανθεκτικότητα στο στρες, ενώ άλλα, όπως τα οξυγαλακτικά βακτήρια που δε διαθέτουν αυτήν την ικανότητα, ανταπεξέρχονται με μεταβολές στη μορφολογία του κυττάρου (van de Guchte et al. 2002). Σε μικροοργανισμούς-μοντέλα (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*), κάτω από συνθήκες διαφόρων στρες και κυρίως έλλειψης γλυκόζης, επάγεται η παραγωγή πρωτεϊνών γενικού στρες (General Stress Proteins, GSP). Ωστόσο, μέχρι στιγμής δεν έχει ανιχνευτεί ομόλογος σB παράγοντας στα οξυγαλακτικά βακτήρια και η ρύθμιση των πρωτεϊνών αυτών που επάγονται σε συνθήκες έλλειψης



θρεπτικών στοιχείων σε αυτά τα βακτήρια δεν είναι πλήρως κατανοητή (De Angelis & Gobbetti, 2004; van de Guchte et al., 2002).

### **1.2.6 Χολικά άλατα**

Τα χολικά οξέα ή χολικά άλατα αποτελούν τα κύρια συστατικά της χολής, μίας σύνθετης έκκρισης του πεπτικού συστήματος που παίζει σημαντικό ρόλο στη γαλακτωματοποίηση και την απορρόφηση των λιπών (Russell et al. 1992). Η τοξικότητα των χολικών οξέων απέναντι στα βακτηριακά κύτταρα δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητή, ωστόσο τα χολικά οξέα δρουν επιφανειακά, μειώνοντας την επιφανειακή τάση μεταξύ δύο υγρών ή ενός υγρού και ενός στερεού, καθώς περιέχουν υδρόφιλες και υδρόφοβες περιοχές. Η πιθανή αντιμικροβιακή τους δράση έγκειται ακριβώς στην απορρυπαντική και αποσυνθετική τους δράση. Φαίνεται όμως ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν αναπτύξει ειδικούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας στα χολικά άλατα, ώστε να μπορούν να επιβιώσουν σε ένα περιβάλλον πλούσιο σε χολή, όπως είναι ο πεπτικός σωλήνας (Gunn 2000).

### **1.2.7 Ωσμωτικό στρες**

Η έκθεση σε ωσμωτικό στρες για πολλά βακτήρια λειτουργεί ως σήμα που προετοιμάζει τα κύτταρα να προσαρμοστούν σε δυσμενείς συνθήκες στο άμεσο μέλλον. Οι ωσμολύτες, ενώσεις που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα ή στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, παίζουν σημαντικό ρόλο στο ωσμωτικό στρες. Στην αυξημένη εξωτερική ωσμωτική πίεση, τα μεμβρανικά κανάλια ανοίγουν και επιτρέπουν την εκροή ωσμολυτών και νερού από το κυτταρόπλασμα, που οδηγεί σε συρρίκνωση του κυττάρου. Με την εξίσωση των συγκεντρώσεων αποκαθίσταται η ισορροπία και κατ' επέκταση η ομοιόσταση του μικροοργανισμού. Τα κύτταρα αποκρίνονται στο ερέθισμα αυτό με τη συσσώρευση ωσμολυτών, ουσιών

διαλυτών στο κυτταρόπλασμα, με σκοπό την επανάκτηση του νερού και την αποκατάσταση του όγκου τους, ωστόσο, ακόμα και αν καταφέρουν να ελέγξουν την απώλεια νερού, η σύσταση του κυτταροπλάσματος μπορεί να μην είναι πλέον ευνοϊκή για τη διεξαγωγή βιοχημικών αντιδράσεων. Έχει ακόμη διαπιστωθεί πως σε κάποια βακτήρια σε συνθήκες στρες λαμβάνει χώρα η έκφραση κάποιων γονιδίων, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση καναλιών που ενισχύουν την είσοδο του νερού στο εσωτερικό του κυττάρου (ICMSF, 1980). Ωσμωλύτες που βοηθούν στη διατήρηση της ομοιόστασης είναι το N-οξειδίο της τριμεθυλο-αμίνης (TMAO), η τριμεθυλο-γλυκίνη, η σαρκοσίνη, η βεταΐνη, η γλυκεροφωσφορυλο-χολίνη και άλλες (Neuhofer & Beck, 2006).

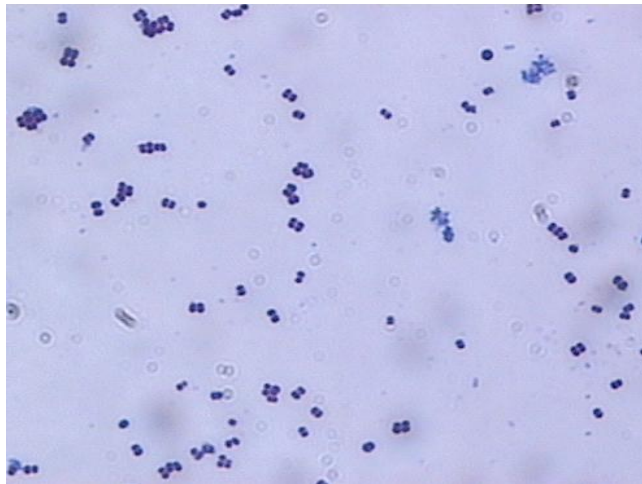
Για τη λειτουργία του κυττάρου είναι σημαντική η διατήρηση σταθερών συνθηκών στο εσωτερικό του κυρίως όσον αφορά την ιοντική σύσταση, το pH και τα επίπεδα των μεταβολιτών (Csonka & Hanson, 1991). Εξίσου σημαντική είναι η διατήρηση σταθερής θετικής σπαργής για τα κύτταρα. Δεδομένου ότι η βακτηριακή κυτταροπλασματική μεμβράνη είναι διαπερατή από το νερό αλλά αποτελεί ένα αποτελεσματικό φράγμα για τις περισσότερες διαλυτές ουσίες, μια αλλαγή στην ωσμωμοριακότητα του περιβάλλοντος μπορεί να θέσει σε κίνδυνο βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Τα βακτήρια πρέπει να προσαρμοστούν σε τέτοιες αλλαγές του περιβάλλοντος ούτως ώστε να επιβιώσουν.

Κατά την εφαρμογή τους σε διάφορες διαδικασίες της βιομηχανίας τροφίμων, τα οξυγαλακτικά βακτήρια εκτίθενται σε ωσμωτικό στρες με την προσθήκη αλάτων ή σακχάρων στα τρόφιμα. Φαίνεται πως τα άλατα (π.χ. NaCl, KCl) παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τις ισομοριακές συγκεντρώσεις σακχαρόζης (Glaasker et al., 1996). Σε αντίθεση με τα εντερικά, τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν περιορισμένη ή και καθόλου ικανότητα σύνθεσης συμβατών διαλυτών ενώσεων (Poolman & Glaasker, 1998) και βασίζονται κατά κύριο λόγο στην απορρόφηση αυτών των ενώσεων από το θρεπτικό μέσο.

### 1.3 Ο *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363

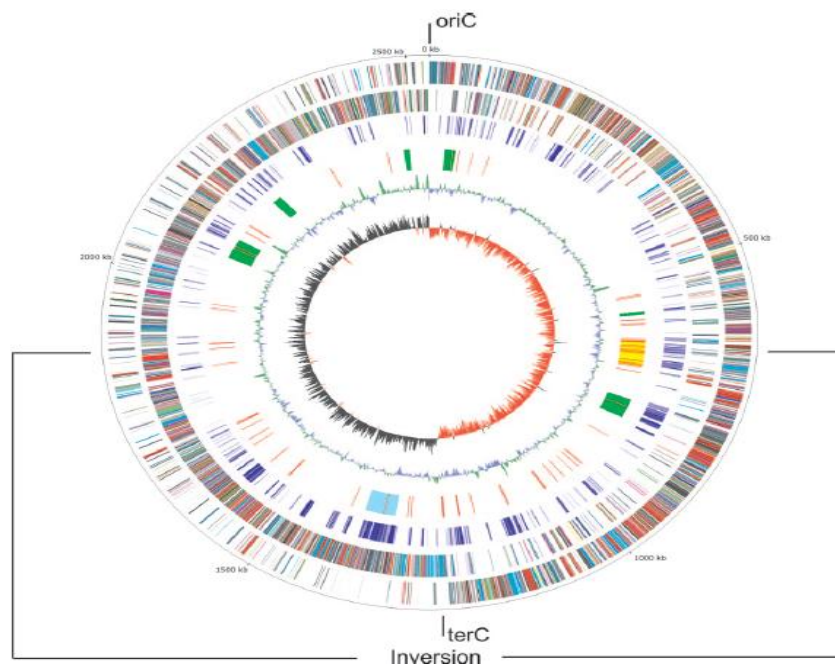
Ο *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* είναι ένα μεσόφιλο ομοζυμωτικό οξυγαλακτικό βακτήριο. Χρησιμοποιείται σε εναρκτήριες καλλιέργειες σε συνδυασμό με άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων ζύμωσης. Από την μακροχρόνια εμπειρική εφαρμογή του, ο *L. lactis* ssp. *cremoris* προσαρμόστηκε στο περιβάλλον του γάλακτος και συμβάλλει στη διαμόρφωση της γεύσης και της υφής των γαλακτοκομικών προϊόντων (van Hylckama et al., 2006; van Kranenburg et al., 2002; Klein & Lortal, 1999). Ο *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 είναι αναγνωρισμένος μικροοργανισμός-μοντέλο για τη γενετική των οξυγαλακτικών βακτηρίων και η γνώση που αποκομίζεται συνεχώς από την έρευνα πάνω σε αυτό το στέλεχος έχει αξιοποιηθεί τόσο σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές, όσο και σε θέματα βασικής έρευνας.

Το μητρικό στέλεχος του *L. lactis* MG1363 είναι ο *L. lactis* NCDO712, του οποίου το πλασμιδιακό DNA αφαιρέθηκε με εφαρμογή υπεριώδους ακτινοβολίας στις αρχές της δεκαετίας του 1980 (Gasson, 1983). Ο *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 έχει χρησιμοποιηθεί σαν κυτταρικό εργοστάσιο παραγωγής μιας μεγάλης ποικιλίας ετερόλογων προϊόντων, ενώ πολλά από τα εργαλεία που αρχικά αναπτύχθηκαν για αυτόν φαίνεται ότι είναι εφαρμόσιμα και σε όλα τα άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια (Kleerebezem et al., 1997).



ΕΙΚΟΝΑ 1.3: ΤΟ ΒΑΚΤΗΡΙΟ *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΧΡΩΣΗ GRAM (ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟ)

Το κυκλικό χρωμόσωμα του *L. lactis* ssp. *cremoris* έχει μήκος 2.53 Mb. Ένα σύνολο 2.517 αλληλουχιών κωδικοποιούν γονίδια (coding sequences-CDSs), στο 62% των οποίων αποδίδεται μια πιθανή γενική ή ειδική λειτουργία, ενώ έχουν ανιχνευθεί 81 ψευδογονίδια που αποτελούν το 3% του συνολικού αριθμού γονιδίων (Wegmann et al., 2007).



ΕΙΚΟΝΑ 1.4: ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ ΤΟΥ *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 (WEGMANN ET AL., 2007)

### 1.3.1 Ο *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 και η ανθεκτικότητα στο ωσμωτικό στρες

Σε αντίθεση με το *E. coli*, στο οποίο η ταχεία συσσώρευση ιόντων  $K^+$  συνιστά μια πρώτη απόκριση σε υπερωσμωτικό στρες, ο *L. lactis* είναι ανίκανος να αντιδράσει επαρκώς με συσσώρευση ιόντων  $K^+$  και  $Na^+$  σε επίπεδα υψηλότερα από αυτά που υπάρχουν ήδη στο αρχικό κύτταρο. Η γλυκίνη-βεταΐνη, η οποία αυξάνει την ωσμωανθεκτικότητα στον *L. lactis*, υπόκειται σε ωσμωρύθμιση σε δύο επίπεδα, έκφρασης γονιδίων και ενεργού μεταφοράς. Έχουν ταυτοποιηθεί τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτό το σύστημα μεταφοράς και συγκεκριμένα έναν ABC μεταφορέα (Bouvier et al., 2000; Van der Heide et al., 2000; Obis et al., 1999), καθώς και ένα μεταγραφικό ρυθμιστή της έκφρασής του, που ονομάζεται OpuA ή BusR (Romeo et al., 2003). Όταν το θρεπτικό μέσο εμφανίζει υψηλή ωσμωμοριακότητα παρατηρείται συσσώρευση των αμινοξέων γλουταμινικό οξύ και προλίνη, καθώς και του τετραεδρικού αμμωνίου, που είναι συστατικό της γλυκίνης-βεταΐνης όταν αυτή παρέχεται στο υπόστρωμα. Στην περίπτωση που αυτή δεν παρέχεται, η συσσώρευση γλουταμινικού οξέος και προλίνης είναι πολύ μεγαλύτερη. Η ωσμωμοριακότητα του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας μπορεί να επηρεάσει επίσης και τους εξωπολυσακχαρίτες που συνθέτει ο *L. lactis*, καθώς και την παραγωγή βακτηριοσίνης (Uguen et al., 1999; Liu et al., 1998).

Η μεταλλοπρωτεάση FtsH, η οποία είναι απαραίτητη στο *E. coli*, εμπλέκεται στον έλεγχο της απόκρισής του στο θερμικό στρες. Ένα ορθόλογο του γονιδίου (δηλαδή γονίδια που ενώ υπάρχουν σε διαφορετικά είδη, έχουν κοινό πρόγονο, κωδικοποιούν τις ίδιες λειτουργίες και μένουν σταθερά με την πάροδο της εξέλιξης) που κωδικοποιεί την FtsH βρέθηκε στον *L. lactis*. Όταν αυτή τροποποιήθηκε, το στέλεχος εμφάνισε ευαισθησία στη θερμότητα, το ψύχος και την αλατότητα (Nilsson et al., 1994), γεγονός που αποδεικνύει ότι η FtsH μπορεί να μην είναι απα-

ραίτητη στον *L. lactis*, σχετίζεται όμως με την ανθεκτικότητά του σε αρκετά στρες, μεταξύ οποίων και το ωσμωτικό (van de Guchte et al., 2002).

Επίσης, έχει βρεθεί ότι οι πρωτεΐνες DnaK, GroEL και GroES, ο σχηματισμός των οποίων επάγεται κατά το θερμικό στρες, παράγονται στον *L. lactis* κατά το ωσμωτικό στρες. Στα βακτήρια *B. subtilis* και *E. coli* σχετικές μελέτες έχουν δείξει το αντίθετο. Γενικά, η απόκριση των Gram αρνητικών βακτηρίων είναι πολύ διαφορετική από ό,τι των θετικών. Μία από τις σημαντικές διαφορές μεταξύ των Gram αρνητικών βακτηρίων, όπως το *E. coli* και Gram θετικών βακτηρίων, όπως *B. subtilis* και *L. lactis*, είναι το σταθερότερο κυτταρικό τοίχωμα και η μεγαλύτερη πίεση σπαραγγής του τελευταίου. Ως αποτέλεσμα, η εκροή νερού είναι πιο δύσκολο να αναλυθεί σε Gram θετικά βακτήρια, όπου η συρρίκνωση του κυττάρου είναι λιγότερο έντονη. Στο *E. coli*, η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας αυξάνει σημαντικά ως συνέπεια της συρρίκνωσης των κυττάρων μετά την προσθήκη NaCl, ενώ στον *L. lactis* η OD δεν αυξάνεται με την προσθήκη 1 έως 4% w/v NaCl στο θρεπτικό μέσο, κάτι που σημαίνει ότι δεν παρατηρείται συρρίκνωση των κυττάρων, ενώ επίσης δεν αλλάζει οπτικά η εμφάνισή τους (Kilstrup, 1997). Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στην πρόταση ότι ο σχηματισμός πρωτεϊνών θερμικού σοκ επάγεται ύστερα από συσσώρευση μετουσιωμένων πρωτεϊνών, οι οποίες έχουν δημιουργηθούν λόγω μειωμένης ενεργότητας νερού εξαιτίας της πλασμόλυσης που προέκυψε από το ωσμωτικό στρες (Kilstrup, 1997).

#### **1.4 Σκοπός της μελέτης**

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η δημιουργία και ο χαρακτηρισμός γενετικά τροποποιημένων στελεχών του *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 ώστε αυτά να καταστούν ανθεκτικά σε υπερωσμωτικές συνθήκες. Η δημιουργία μεταλλαγμένων στελεχών σχεδιάστηκε να γίνει με εισαγωγή και ενσωμάτωση του θερμοευαίσθητου πλασμι-

διακού φορέα pGh9:ISS1 στο χρωμόσωμά τους και να ακολουθήσει επιβεβαίωση του φαινότυπου ανθεκτικότητάς τους. Το πλασμιδίο pGh9:ISS1 φέρει γονίδιο ανθεκτικότητας στην ερυθρομυκίνη και, συνεπώς, η μετάθεση γίνεται αντιληπτή όταν γίνει δοκιμή για συλλογή στελεχών ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη. Με την ανάλυση των στελεχών προκύπτουν οι γενετικοί τόποι όπου ενσωματώθηκε το πλασμιδίο pGh9:ISS1, από τη διακοπή των οποίων προκύπτει ανθεκτικότητα στο ωσμωτικό στρες. Στη συνέχεια, στόχος ήταν να κλωνοποιηθούν τα σημεία ένωσης του πλασμιδίου με το χρωμόσωμα του MG1363 και να γίνει συσχετισμός των γονιδίων που αποσιωπήθηκαν με τον παρατηρούμενο φαινότυπο βάσει της υπάρχουσας βιβλιογραφίας. Εκτός από την προσπάθεια δημιουργίας και απομόνωσης νέων μεταλλαγμένων στελεχών, τμήμα της εργασίας ήταν και η ανάλυση πέντε ακόμη στελεχών του MG1363 που είχαν απομονωθεί σε προηγούμενες μελέτες.

Οι πληροφορίες που προκύπτουν είναι σημαντικές για τη γενικότερη κατανόηση της συμπεριφοράς των οξυγαλακτικών βακτηριών σε συνθήκες ωσμωτικού στρες. Επιπλέον, τα στελέχη αυτά, λόγω πιθανών τεχνολογικών πλεονεκτημάτων, μπορούν στο μέλλον να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτικές εναρκτηρίες καλλιέργειες στην παραγωγή τροφίμων.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ**

### **2.1 Ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών**

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα βακτηριακά στελέχη *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 και *Escherichia coli* EC101. Η ανάπτυξη του πρώτου στελέχους γινόταν σε θρεπτικό μέσο GM17 [M17 (Oxoid, Basingstoke, United Kingdom) ενισχυμένο με 0.5% w/v γλυκόζη (Applichem, Darmstadt, Germany), παρουσία ή απουσία 1 µg/ml ερυθρομυκίνης (Sigma, Taufkirchen, Germany). Η ανάπτυξη του δεύτερου στελέχους έγινε σε θρεπτικό μέσο LB (Luria-Bertani Media) [tryptone 10% w/v (Duchefa, Haarlem, The Netherlands), yeast extract 5% w/v (Biokar, Beauvais, France), NaCl 10% w/v (Merck, Darmstadt, Germany), pH=7.5], παρουσία ή απουσία 200 µg/ml ερυθρομυκίνης (Sigma).

Για την αποθήκευση των στελεχών, 100 µl από την κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκαν σε μικροσωληνάρια (vials) που περιείχαν τα αντίστοιχα μέσα ανάπτυξης και 20% w/v γλυκερόλη (HiMedia, Mumbai, India). Η αποθήκευση έγινε στους -80° C.

### **2.2 Απομόνωση του πλασμιδίου pGh9:ISS1 από το στέλεχος *Escherichia coli* EC101**

#### **2.2.1 Απομόνωση του πλασμιδίου pGh9:ISS1**

Η απομόνωση του πλασμιδίου pGh9:ISS1 από το μετασχηματισμένο στέλεχος *E. coli* EC101 πραγματοποιείται με το kit NucleoSpin Plasmid της εταιρίας Macherey-Nagel (Duren, Germany).

Από στατική καλλιέργεια του στελέχους EC101 (18 ώρες στους 30°C υπό ανάδευση σε θρεπτικό μέσο LB), 5 ml, που αντιστοιχούν σε περίπου  $5 \times 10^9$  κύτταρα, μεταφέρονται σταδιακά σε σωληνάριο



Eppendorf όγκου 2ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (Biofuge fresco, Heraeus, Hanau, Germany) στις 11000 rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Κατόπιν προστίθενται 250 μl διαλύματος επαναιώρησης A1 και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση, με σκοπό την επαναιώρηση των κυττάρων, ενώ μετά προστίθενται 250 μl διαλύματος λύσης των κυττάρων A2 και ακολουθεί ήπια ανάδευση με αναστροφή του σωλήνα 6-8 φορές. Μετά από επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου κι αφού το διάλυμα γίνει διαυγές, προστίθενται 300 μl διαλύματος εξουδετέρωσης A3 και ακολουθεί ήπια ανάδευση με αναστροφή του σωλήνα 6-8 φορές. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Γίνεται μεταφορά 750 μl από το υπερκείμενο σε στήλη (NucleoSpin Plasmid Column) που τοποθετείται μέσα σε σωλήνα συλλογής χωρητικότητας 2 ml (Collection tube) και γίνεται φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το περιεχόμενο του σωλήνα απορρίπτεται, η στήλη τοποθετείται ξανά σε αυτόν και στη συνέχεια προστίθενται 500 μl διαλύματος έκπλυσης AW και γίνεται φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως, προστίθενται 600 μl διαλύματος έκπλυσης A4 που περιέχει αιθανόλη και γίνεται φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το περιεχόμενο του σωλήνα απορρίπτεται και η στήλη τοποθετείται ξανά σε αυτόν. Γίνεται φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με σκοπό την απομάκρυνση της αιθανόλης. Ο σωλήνας των 2 ml απορρίπτεται μαζί με το περιεχόμενό του και η στήλη τοποθετείται σε νέο σωλήνα Eppendorf χωρητικότητας 1.5 ml. Κατόπιν προστίθενται 30 μl διαλύματος έκλουσης AE και ακολουθεί επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από φυγοκέντρηση στις 11000 rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, η στήλη απορρίπτεται και το πλασμιδιακό DNA αποθηκεύεται στους -20° C.

### **2.2.2 Μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA**

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA έγινε σε φωτόμετρο μικροποσοτήτων Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) με τη χρήση του προγράμματος «ND-1000 3.3.1 Nanodrop», το οποίο μετράει τη συγκέντρωση νουκλεϊκών οξέων ή πρωτεϊνών σε ένα διάλυμα. Ο μηδενισμός της συσκευής γίνεται με αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O και στη συνέχεια τοποθετείται το δείγμα σε όγκο 2 μL. Η φωτομέτρηση για το DNA γίνεται σε μήκος κύματος 260nm και από την τιμή της οπτικής πυκνότητας (optical density, O.D.) υπολογίζεται αυτόματα η συγκέντρωση. Παράλληλα, γίνεται μέτρηση του ίδιου δείγματος και στα 280 nm για τον έλεγχο της περιεκτικότητάς του σε πρωτεΐνες. Ο λόγος της O.D.<sub>260nm</sub>/O.D.<sub>280nm</sub> εκφράζει την καθαρότητα του δείγματος DNA από προσμίξεις πρωτεϊνών ή αλκοόλης.

### **2.3 Επιβεβαίωση της ποιότητας του πλασμιδίου pGh9:ISS1 μετά την απομόνωση από το στέλεχος *Escherichia coli* EC101**

Η επιβεβαίωση της ποιότητας του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA έγινε με πέψη με περιοριστικά ένζυμα.

#### **2.3.1 Πέψη του πλασμιδίου με περιοριστικές ενδονουκλεάσες**

Για την πέψη χρησιμοποιήθηκαν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI, HindIII και PstI (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) τόσο μόνες τους όσο και ο συνδυασμός EcoRI και HindIII. Σε ένα σωληνάριο Eppendorf χωρητικότητας 1.5 ml προστίθεται ένζυμο σε ποσότητα 2% v/v, το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου σε συγκέντρωση 10% v/v, DNA (500 ng) και νερό μέχρις ότου ο όγκος φτάσει τα 25 μl. Η πέψη λαμβάνει χώρα στους 37° C. Για τις EcoRI και HindIII η πέψη διήρκεσε 15 λεπτά, γιατί ήταν ένζυμο υψηλής πιστότητας (High Fidelity,

HF), και η απενεργοποίησή τους έγινε για 20 λεπτά στους 65 και τους 80° C, αντίστοιχα. Για την PstI η πέψη διήρκεσε 2 ώρες και η απενεργοποίησή της έγινε για 10 λεπτά στους 65° C.

### **2.3.2 Ηλεκτροφόρηση των τμημάτων DNA σε πηκτή αγαρόζη**

Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση του άκοπου και του κομμένου πλασμιδίου σε πηκτή αγαρόζη. Σε διάλυμα 1xTAE [0.004 M Tris – acetate (Merck), 1 mM EDTA (AppliChem)] προστίθεται 1% w/v αγαρόζη (Merck) και το διάλυμα θερμαίνεται μέχρι βρασμού για να διαλυθεί η αγαρόζη. Στη συνέχεια, αφού πέσει ελαφρά η θερμοκρασία του διαλύματος, προστίθεται διάλυμα EtBr (Sigma) σε ποσότητα 0.005% v/v, ώστε η τελική συγκέντρωση στην πηκτή να είναι 10 µg/mL. Γίνεται απόχυση σε «σκάφος» ηλεκτροφόρησης, στο οποίο έχουν τοποθετηθεί οι ειδικές «κτένες» για το σχηματισμό κενών («πηγάδια ηλεκτροφόρησης») και το διάλυμα αφήνεται να πήξει σε θερμοκρασία δωματίου. Η πηκτή βυθίζεται σε διάλυμα 1xTAE μέσα στη συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (Powerpac 1000, Bio-Rad, Hercules, USA). Στα κενά που δημιουργήθηκαν στην πηκτή τοποθετούνται τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση, αφού έχει προηγουμένως προστεθεί ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (Promega, Madison, WI, USA) σε ποσότητα 10% v/v του όγκου των δειγμάτων και ο δείκτης μοριακών μαζών, 1 kb DNA Ladder (Invitrogen, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 120 V.

### **2.4 Μετασχηματισμός του *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 με το πλασμίδιο pGh9:ISS1**

#### **2.4.1 Δημιουργία κυττάρων του στελέχους *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 επιδεκτικών σε μετασχηματισμό (Competent Cells)**

Κύτταρα του MG1363 εμβολιάζονται (σε ποσότητα 1% v/v) σε υγρό θρεπτικό μέσο GM17 και αναπτύσσονται στους 30° C για 18 ώρες. Γίνεται εμβολιασμός (σε ποσότητα 11% v/v) σε υγρό θρεπτικό μέσο GM17, στο οποίο έχει προστεθεί 1% w/v γλυκίνη (Duchefa), και ακολουθεί επώαση στους 30° C για 18 ώρες. Ακολούθως, γίνεται μεταφορά (εμβόλιο 12.5% v/v) σε ίδιο θρεπτικό μέσο ίσης θερμοκρασίας με το προηγούμενο και η καλλιέργεια επωάζεται στους 30° C μέχρι οπτική πυκνότητα 0.25 στα 600 nm. Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε πάγο για να σταματήσει η ανάπτυξή της και στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση στις 5000 rpm για 2 λεπτά, αφού πρώτα η φυγόκεντρος (Sorvall RC24, Du Pont, USA) έχει ψυχθεί στους 20° C για 10 λεπτά (5000 rpm). Ακολουθούν δύο εκπλύσεις με παγωμένο διάλυμα σακχαρόζης 0.5 M (AppliChem) που περιέχει 10% w/v γλυκερόλη, την πρώτη φορά με ίσο και τη δεύτερη φορά με τον μισό όγκο της καλλιέργειας. Κάθε έκπλυση ακολουθείται από φυγοκέντρηση σε ίδιες συνθήκες. Γίνεται επαναιώρηση των κυττάρων σε όγκο 60 μl στο παραπάνω διάλυμα, τα σωληνάρια βυθίζονται κατευθείαν σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονται στους -80° C.

#### **2.4.2 Μετασχηματισμός με το πλασμίδιο pGh9:ISS1 και λήψη μεταλλαγμένων στελεχών του *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363**

Για την πραγματοποίηση του μετασχηματισμού, τα επιδεκτικά κύτταρα αποψύχονται σε πάγο και προστίθεται σε αυτά 1 μg πλασμιδικού DNA. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε παγωμένη κυψελίδα (electroporation cuvette) σε συσκευή ηλεκτρομετασχηματισμού MicroPulser™ Electroporation Apparatus (Bio-Rad) και εκτίθενται σε

ηλεκτρικό παλμό. Ο μετασχηματισμός λαμβάνει χώρα υπό τάση 12.5 kV/cm κυψελίδας με διάρκεια 3 ms και η απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων της είναι 2 mm. Αμέσως μετά προστίθενται στην κυψελίδα 940 μl παγωμένου διαλύματος SGM17MC (GM17 ενισχυμένο με 1% w/v γλυκίνη, 0.5 M σακχαρόζη, 20 mM MgCl<sub>2</sub> και 2 mM CaCl<sub>2</sub>). Μετά από παραμονή σε πάγο για 5 λεπτά, ακολουθεί επώαση των κυττάρων στους 30° C για 1.5 ώρα κι έπειτα γίνονται οι κατάλληλες δεκαδικές αραιώσεις (10<sup>0</sup> - 10<sup>-8</sup>) σε διάλυμα SGM17MC.

Για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων που αναμένεται να είναι ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη, γίνεται επιφανειακή εξάπλωση όγκου 100 μl από κάθε αραιώση σε τρυβλία που περιέχουν GM17, 1.5% w/v άγαρ (BioKar) και 1 μg/ml ερυθρομυκίνη. Παράλληλα, σε πείραμα μάρτυρα, γίνεται με τον ίδιο τρόπο επιφανειακή εξάπλωση καλλιέργειας μη μετασχηματισμένων κυττάρων MG1363 σε τρυβλία που δεν περιέχουν ερυθρομυκίνη. Μετά από επώαση 48 ωρών στους 37.5° C για τα μεταλλαγμένα στελέχη και στους 30° C για το μάρτυρα γίνεται καταμέτρηση των αποικιών. Μονές αποικίες μεταφέρονται σε υπόστρωμα GM17 στο οποίο έχουν προστεθεί 180 mM MOPS [3-(N-morpholino)propanesulfonic acid] (Sigma), 1 μg/ml ερυθρομυκίνη και το pH έχει ρυθμιστεί στο 7.2. Οι καλλιέργειες επωάζονται για 18 ώρες στους 37.5° C για μελλοντική αποθήκευση και περαιτέρω μελέτη.

## **2.5 Διερεύνηση των βέλτιστων συνθηκών για την επιλογή μεταλλαγμένων, ανθεκτικών σε υπερωσμωτικές συνθήκες στελεχών του *Lactococcus lactis ssp. cremoris* MG1363**

Κύτταρα του MG1363 εμβολιάζονται (σε ποσότητα 1% v/v) σε υγρό θρεπτικό μέσο GM17 και αναπτύσσονται στους 30° C για 18 ώρες. Ακολουθεί νέος εμβολιασμός σε ίδιο θρεπτικό μέσο και η καλλιέργεια επωάζεται για 2.5 ώρες στους 30° C και κατόπιν για 2.5 ώρες στους 37.5° C. Από την καλλιέργεια αυτή έγιναν δύο αραιώσεις, 1/100 και

1/1000, και δεδομένου ότι η καλλιέργεια περιείχε αρχικά  $10^7$ - $10^8$  κύτταρα, ο αριθμός τους μειώθηκε στα  $10^5$ - $10^6$  και  $10^4$ - $10^5$  κύτταρα ανά αραιώση, αντίστοιχα. Ακολουθεί επιφανειακή εξάπλωση όγκου 100  $\mu$ l από κάθε αραιώση σε τρυβλία που περιέχουν GM17, 180 mM MOPS, χλωριούχο νάτριο (NaCl) σε συγκεντρώσεις 0%, 2%, 2.5%, 2.75%, 3% και 3.5% (w/v) και των οποίων το pH έχει ρυθμιστεί στο 7.2.

Μετά από επώαση 48 ωρών στους 37.5° C, οπότε και έγινε καταμέτρηση των αποικιών, παρατηρήθηκε μειωμένη ανάπτυξη του MG1363 στην περιεκτικότητα 2.75% w/v NaCl. Έτσι, στο εξής θεωρήθηκε ως η βέλτιστη συνθήκη για την επιλογή μεταλλαγμένων στελεχών που έχουν ανθεκτικότητα σε υπερωσμωτικές συνθήκες.

Για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας των μεταλλαγμένων στελεχών που προέκυψαν από το μετασχηματισμό που περιγράφηκε παραπάνω, αρχικά γίνεται εμβολιασμός (σε ποσότητα 1% v/v) σε υγρό θρεπτικό μέσο GM17, στο οποίο έχουν προστεθεί 180 mM MOPS και 1  $\mu$ g/ml ερυθρομυκίνη (pH=7.2). Μετά από επώαση στους 30° C για 18 ώρες, ακολουθεί νέος εμβολιασμός σε μέσο GM17 στο οποίο έχουν προστεθεί 180 mM MOPS (pH=7.2) και η καλλιέργεια επωάζεται για 2.5 ώρες στους 30° C και κατόπιν για 2.5 ώρες στους 37.5° C. Από την αρχική καλλιέργεια έγιναν και πάλι δύο αραιώσεις, 1/100 και 1/1000 ( $10^7$ - $10^8$  κύτταρα η αρχική καλλιέργεια,  $10^5$ - $10^6$  και  $10^4$ - $10^5$  κύτταρα ανά αραιώση, αντίστοιχα). Ακολουθεί επιφανειακή εξάπλωση όγκου 100  $\mu$ l από κάθε αραιώση σε τρυβλία που περιέχουν GM17, 180 mM MOPS, 1  $\mu$ g/ml ερυθρομυκίνη, χλωριούχο νάτριο (NaCl) σε συγκεντρώσεις 2.75% και 3% (w/v) και των οποίων το pH έχει ρυθμιστεί στο 7.2. Ως μάρτυρας χρησιμοποιείται ο MG1363 με τη διαφορά ότι το θρεπτικό μέσο στο οποίο αναπτύσσεται δεν περιέχει ερυθρομυκίνη.

Μετά από επώαση 48 ωρών στους 37.5° C για τα μεταλλαγμένα στελέχη και στους 30° C για το μάρτυρα, γίνεται καταμέτρηση των αποικιών. Μονές αποικίες των μεταλλαγμένων στελεχών μεταφέρονται σε υγρό υπόστρωμα GM17 που περιέχει 1  $\mu$ g/ml ερυθρομυκίνη. Οι καλ-

λιέργειες επωάζονται στους 37.5° C για 18 ώρες και στη συνέχεια γίνεται εξάπλωση με κρίκο σε τρυβλία που περιέχουν GM17 και 1 µg/ml ερυθρομυκίνη. Μετά από επώαση 48 ωρών στους 37.5° C λαμβάνονται μονές αποικίες για κάθε στέλεχος και μεταφέρονται σε υγρό θρεπτικό μέσο GM17. Η επώαση γίνεται στην ίδια θερμοκρασία για 18 ώρες.

## **2.6 Κλωνοποίηση της πλευρικής αλληλουχίας της περιοχής όπου εισήλθε το πλασμίδιο pGh9:ISS1 στο γονιδίωμα των μεταλλαγμένων στελεχών του *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363**

### **2.6.1 Δημιουργία κυττάρων του στελέχους *Escherichia coli* EC101 επιδεκτικών σε μετασχηματισμό (Competent Cells)**

Η δημιουργία επιδεκτικών σε μετασχηματισμό κυττάρων και η διαδικασία του μετασχηματισμού έγιναν με βάση το πρωτόκολλο των [Inone et al. \(1990\)](#).

Κύτταρα *E. coli* EC101 εμβολιάζονται (σε ποσότητα 2% v/v) σε υγρό θρεπτικό μέσο LB και αναπτύσσονται στους 30° C για 18 ώρες υπό ανάδευση (240 MOT). Γίνεται εμβολιασμός (1% v/v) σε 50 ml υγρό θρεπτικό μέσο LB και ακολουθεί επώαση στους 30° C μέχρι οπτική πυκνότητα 0.4-0.6 στα 600 nm. Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε πάγο για να σταματήσει η ανάπτυξη και στη συνέχεια μεταφέρεται σε σωληνάρια Eppendorf χωρητικότητας 2 ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 6500 rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία 2° C και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Έπειτα γίνεται επαναιώρηση των κυττάρων σε 0.8 ml διαλύματος TB [10 mM PIPES (Applichem), pH=6.7, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, 55 mM MnCl<sub>2</sub>] και επώαση για 10 λεπτά σε πάγο. Κατόπιν γίνεται φυγοκέντρηση ξανά στις ίδιες συνθήκες και μετά την απόρριψη του υπερκειμένου τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 160 µl διαλύματος TB και 15 µl DMSO.

Τα σωληνάρια βυθίζονται κατευθείαν σε υγρό άζωτο και αποθηκεύονται στους -80° C.

### **2.6.2 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από μεταλλαγμένα στελέχη του *Lactococcus lactis ssp. cremoris* MG1363**

Η απομόνωση του χρωμοσωμικού DNA (gDNA) πραγματοποιήθηκε με μια τροποποιημένη εκδοχή του πρωτοκόλλου των [Pitcher et al. \(1989\)](#).

Από στατική καλλιέργεια των μεταλλαγμένων στελεχών του MG1363 (18 ώρες στους 37.5°C σε θρεπτικό μέσο GM17), 1.5 ml, που αντιστοιχούν σε περίπου  $1.5 \times 10^9$  κύτταρα, μεταφέρονται σε σωληνάρια Eppendorf όγκου 2 ml. Γίνεται φυγοκέντρηση στις 8000 rpm 1 για λεπτό και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου αποκτηθεί ίζημα μεγέθους όσο ένας κόκκος ρυζιού. Ακολούθως, γίνεται επαναιώρηση των κυττάρων σε 1.5 ml διαλύματος PBS (0.8% w/v NaCl, 0.144% w/v Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.024% w/v KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7.4) και φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 1 λεπτό. Κατόπιν προστίθενται 0.5 ml από το ίδιο διάλυμα και τα δείγματα επωάζονται στους 65 °C για 10 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Αφού απομακρυνθεί το υπερκείμενο, σε κάθε σωληνάριο προστίθενται 100 μl λυσοζύμης (Sigma) διαλυμένης σε διάλυμα TE (50 mg/ml) [TE buffer: 10mM Tris-HCl (Merck), 1mM EDTA, pH=8], 10 μl μουτανολυσίνης (5 U/μl) (Sigma) και 20 μl RNase (Sigma). Τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 30 λεπτά, ενώ κάθε 10 λεπτά γίνεται ήπια ανάδευση με αναστροφή του σωλήνα.

Στη συνέχεια, σε κάθε σωληνάριο προστίθενται 0.5 ml διαλύματος GES [5M guanidium thiocyanate, 100mM EDTA, 0.5% v/v Sarkosyl (Applichem)], γίνεται ανακίνηση για τη λύση των κυττάρων και ακολουθεί επώαση σε πάγο για 5 λεπτά. Έπειτα προστίθενται 0.25 ml διαλύματος παγωμένου οξικού αμμωνίου και μετά από ήπια ανάδευση τα δείγ-



ματα παραμένουν σε πάγο για 10 λεπτά. Κατόπιν προστίθενται 0.5 ml διαλύματος χλωροφορμίου (Merck), γίνεται ισχυρή ανάδευση και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 λεπτά σε 4 °C. Προκύπτει διαχωρισμός των δύο φάσεων και η πάνω φάση μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο Eppendorf.

Σε κάθε σωληνάριο προστίθεται παγωμένη ισοπροπανόλη (Merck) σε ποσότητα 0.54 φορές του όγκου του υπερκειμένου και κατόπιν γίνεται ανακίνηση για να κατακρημνιστεί το DNA. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 7000 rpm για 1 λεπτό. Στη συνέχεια γίνονται 5 διαδοχικές εκπλύσεις του DNA με 700 μl παγωμένης 70% v/v αιθανόλης, καθεμία από τις οποίες ακολουθείται από φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 5 λεπτά. Μετά την τελευταία έκπλυση απομακρύνονται σχολαστικά τυχόν υπολείμματα αιθανόλης με την παραμονή των δειγμάτων στους 37°C για 2 λεπτά. Το χρωμοσωμικό DNA επαναιωρείται σε διάλυμα TE και παραμένει για 24 ώρες στους 37° C για να διαλυθεί. Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA χρησιμοποιήθηκε το φωτόμετρο Nanodrop και το πρόγραμμα «ND-1000 3.3.1 Nanodrop» (βλ. παραγραφο 2.2.2).

### **2.6.3 Πέψη του χρωμοσωμικού DNA των μεταλλαγμένων στελεχών του *Lactococcus lactis ssp. cremoris* MG1363**

Για την πέψη χρησιμοποιήθηκαν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και HindIII. Σε ένα σωληνάριο Eppendorf χωρητικότητας 1.5 ml προστίθεται ένζυμο σε ποσότητα 2% v/v, το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου σε συγκέντρωση 10% v/v, 1μg gDNA και νερό μέχρις ότου ο όγκος φτάσει τα 50 μl. Η πέψη λαμβάνει χώρα στους 37° C. για 15 λεπτά (HF enzymes) και η απενεργοποίησή τους γίνεται για 20 λεπτά στους 65 και στους 80° C, αντίστοιχα.

#### **2.6.4 Κυκλοποίηση των γραμμικών προϊόντων της πέψης του χρωμοσωμικού DNA των μεταλλαγμένων στελεχών του *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363, μέσω αντίδρασης λιγάσης (Ligation)**

Στα σωληνάρια των πέψεων προστίθεται το ένζυμο λιγάση (New England Biolabs) σε ποσότητα 0.3% v/v και το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου σε συγκέντρωση 10% v/v. Η επώαση γίνεται για 18 ώρες στους 10° C και η αδρανοποίηση του ενζύμου γίνεται με θέρμανση των δειγμάτων για 10 λεπτά στους 65° C.

#### **2.6.5 Συμπύκνωση των προϊόντων της δράσης της λιγάσης**

Η συμπύκνωση των προϊόντων της αντίδρασης λιγάσης πραγματοποιήθηκε με το kit NucleoSpin Plasmid/Plasmid της εταιρίας Macherey-Nagel. Στα σωληνάρια από την προηγούμενη διαδικασία προστίθεται δύο φορές ο όγκος τους από το διάλυμα εξουδετέρωσης A3 και ακολουθεί ήπια ανάδευση με αναστροφή του σωλήνα 6-8 φορές. Γίνεται μεταφορά 750 μl από το υπερκείμενο σε στήλη που τοποθετείται μέσα σε σωλήνα συλλογής χωρητικότητας 2 ml και γίνεται φυγοκέντρωση στις 11000 rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το περιεχόμενο του σωλήνα απορρίπτεται και η στήλη τοποθετείται ξανά σε αυτόν, όπου τώρα προστίθενται και τα υπόλοιπα 650 μl και γίνεται φυγοκέντρωση στις 11000 rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την εκ νέου απόρριψη του περιεχομένου του σωλήνα και την τοποθέτηση της στήλης σε αυτόν, προστίθενται 500 μl διαλύματος έκπλυσης AW και γίνεται φυγοκέντρωση στις 11000 rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθως προστίθενται 600 μl διαλύματος έκπλυσης A4, που περιέχει αιθανόλη, και γίνεται φυγοκέντρωση στις 11000 rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Το περιεχόμενο του σωλήνα απορρίπτεται και η στήλη τοποθετείται ξανά σε αυτόν. Γίνεται φυγοκέντρωση

στις 11000 rpm για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και κατόπιν ο σωλήνας απορρίπτεται μαζί με το περιεχόμενό του και η στήλη τοποθετείται σε νέο σωληνάριο Eppendorf χωρητικότητας 1.5 ml. Προστίθενται 30 μl διαλύματος έκλουσης ΑΕ και παραμονή για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου για την ενυδάτωση της στήλης. Μετά από φυγοκέντρωση στις 11000 rpm για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου, τα 30 μl του διαλύματος ΑΕ προστίθενται εκ νέου στη στήλη και γίνεται ξανά φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες. Η στήλη απορρίπτεται και πλέον το σωληνάριο περιέχει συμπυκνωμένο DNA.

#### **2.6.6 Μετασχηματισμός των ικανών προς μετασχηματισμό κυττάρων του στελέχους *Escherichia coli* EC101**

Για την πραγματοποίηση του μετασχηματισμού, τα επιδεκτικά κύτταρα EC101 αποψύχονται σε πάγο και προστίθεται σε αυτά 30 μL συμπυκνωμένου DNA. Μετά από επώαση 30 λεπτών σε πάγο, τα σωληνάρια με τα δείγματα θερμαίνονται στους 42° C για 30 δευτερόλεπτα (θερμικό σοκ) και μεταφέρονται ξανά στον πάγο, όπου παραμένουν για 2-3 λεπτά. Έπειτα προστίθενται σε αυτά 250 μL προθερμασμένου διαλύματος SOC (2% w/v tryptone, 0.5% w/v yeast extract, 0.5% w/v NaCl, 250Mm KCl, 0.36% w/v glucose, 2M MgCl<sub>2</sub>, pH=7) και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 37° C για 1 ώρα.

Για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων που αναμένεται να είναι ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη, γίνεται επιφανειακή εξάπλωση σε τρυβλία που περιέχουν LB και 200 μg/ml ερυθρομυκίνη. Έγινε αρχικά εξάπλωση όγκου 100 μl και στη συνέχεια, αφού τα σωληνάρια φυγοκεντρήθηκαν στις 2000 rpm για 2 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίφθηκε, έγινε επαναιώρηση του ιζήματος και εξάπλωση σε τρυβλία.

## **2.7 Επιβεβαίωση του μετασχηματισμού των στελεχών *Escherichia coli* EC101**

### **2.7.1 Colony PCR των αποικιών των μετασχηματισμένων κυττάρων του στελέχους *Escherichia coli* EC101 και ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης**

Μετά από επώαση 48 ωρών στους 37° C, γίνεται καταμέτρηση των αποικιών και από κάθε στέλεχος επιλέγονται 3 αποικίες. Η μισή από την κάθε αποικία μεταφέρεται σε σωληνάριο Eppendorf χωρητικότητας 1.5 ml, στο οποίο έχουν προστεθεί 20  $\mu$ L H<sub>2</sub>O. Μετά από θέρμανση στους 94° C για 5 λεπτά, τα δείγματα μεταφέρονται σε πάγο για 5 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12500 rpm για 5 λεπτά. Με τη φυγοκέντρηση καθιζάνουν τα κυτταρικά τοιχώματα και κάποιες πρωτεΐνες, ενώ στο υπερκείμενο βρίσκεται διαλυμένο το DNA των κυττάρων. Τα τρυβλία που περιέχουν την άλλη μισή από την κάθε αποικία επωάζονται στους 37° C για 16 ώρες και αποθηκεύονται προσωρινά στους 4° C.

Στη συνέχεια εφαρμόζεται η τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) (Mastercycler, Eppendorf, Hamburg, Germany). Σε μικροσωληνάριο Eppendorf χωρητικότητας 0.5 ml προστίθενται τα εξής:

- 12.5  $\mu$ l Taq ReadyMix PCR Kit (Kapa Biosystems, Wilmington, USA) που περιέχει Taq DNA Polymerase (1 U/50  $\mu$ l reaction), Taq Buffer, dNTPs (0.2 mM), MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM) και stabilizers
- 0.5  $\mu$ l εκκινητή Forward (pGHF)
- 0.5  $\mu$ l εκκινητή Reverse (pGER)
- 4  $\mu$ l από το υπερκείμενο των Eppendorfs που προήλθε από τις αποικίες, όπως περιγράφηκε προηγουμένως
- H<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 25  $\mu$ l.

Το DNA αρχικά αποδιατάσσεται στους 94° C για 2 λεπτά. Ακολουθεί παραμονή στους 90° C για 30 δευτερόλεπτα και η θερμοκρασία

μειώνεται στους 50° C για 1 λεπτό, οπότε και γίνεται η προσαρμογή των εκκινητών στη μήτρα του DNA (annealing). Στους 72° C για 3.5 λεπτά ξεκινά η πολυμεράση αντιγράφει το DNA και αρχίζουν να συντίθενται οι συμπληρωματικές αλυσίδες DNA από τα ελεύθερα νουκλεοτίδια. Στο τέλος του πρώτου κύκλου δημιουργούνται με αυτό τον τρόπο δύο αντίγραφα της επιθυμητής αλληλουχίας του DNA. Στο συγκεκριμένο πρόγραμμα πραγματοποιήθηκαν 30 τέτοιοι κύκλοι. Στη συνέχεια, με παραμονή στους 72° C για 10 λεπτά ολοκληρώνεται η σύνθεση των ημιτελών αλυσίδων του DNA.

Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε απομονωμένο πλασμιδίο pGh9:ISS1. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτική αγαρόζη, όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.2.2.

### **2.7.2 Συλλογή των επιθυμητών αποικιών και απομόνωση του πλασμιδιακού DNA**

Από την εικόνα της ηλεκτροφόρησης βγήκαν συμπεράσματα για την επιτυχία του μετασχηματισμού και επιλέχθηκαν οι αποικίες των αντίστοιχων στελεχών. Από τα τρυβλία που κρατήθηκαν στους 4° C, οι άλλες μισές αποικίες μεταφέρονται σε υγρό υπόστρωμα LB που περιέχει 200 μg/ml ερυθρομυκίνη και γίνεται επώαση υπό ανάδευση για 18 ώρες στους 37.5° C. Στη συνέχεια γίνεται απομόνωση του πλασμιδιακού DNA όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.1 και μέτρηση της συγκέντρωσης του DNA με το φωτόμετρο Nanodrop και τη χρήση του προγράμματος «ND-1000 3.3.1 Nanodrop».

## **2.8 Βιοπληροφορική Ανάλυση μετά από αλληλούχηση του γονιδιώματος των μεταλλαγμένων στελεχών του *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363**

Τα δείγματα στάλθηκαν στην εταιρία VBC-BIOTECH Service GmbH (Wien, Austria) για αλληλούχηση (sequencing) του πλασμιδιακού DNA.

Στη βιοπληροφορική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα BLAST (BLASTN 2.2.29) ([Altschul et al., 1990](#)) της ιστοσελίδας NCBI, INTERPROSCAN ([Zdobnov & Apweiler, 2001](#)), PHYRE 2 ([Bennett-Lovsey et al., 2007](#)) και TMRPres2D ([Spyropoulos et al., 2004](#)).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 3.1 Απομόνωση του πλασμιδίου pGh9:ISS1 από το στέλεχος *Escherichia coli* EC101

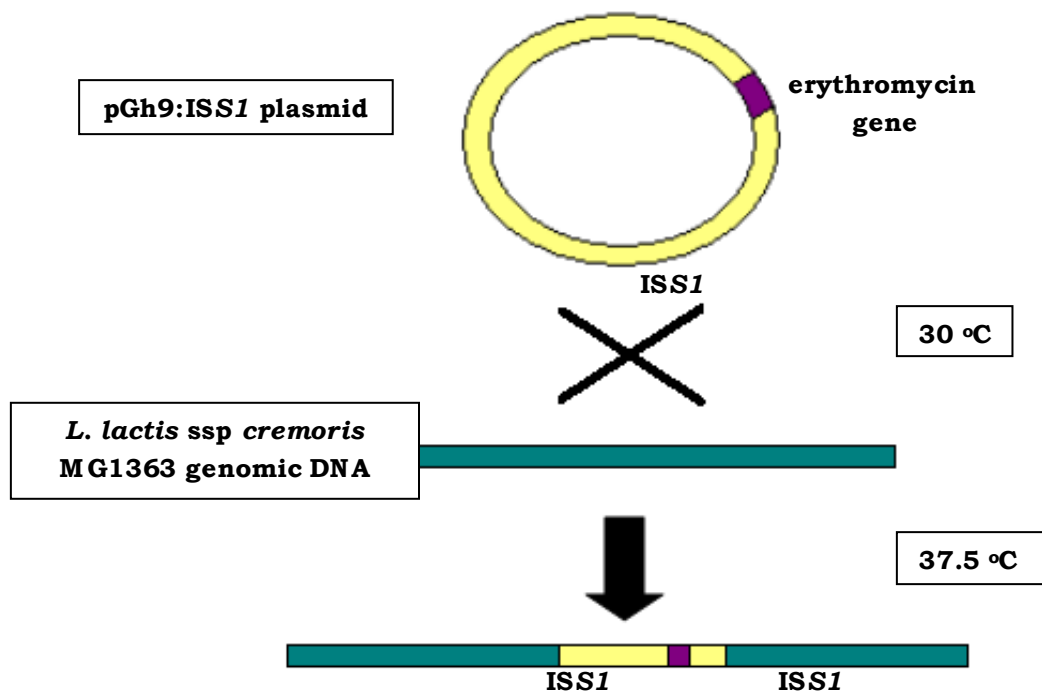
Ο φορέας είναι ένα μόριο DNA (συνήθως ένα πλασμίδιο) στο οποίο ενσωματώνονται ξένα τμήματα DNA (ένα ή περισσότερα γονίδια) και δρα ως γενετικό όχημα που μπορεί να μεταφέρει ξένα γονίδια σε ξενιστές, όπως τα βακτήρια. Οι φορείς έχουν γνωστή δομή και μπορούν να αναπαράγονται αυτόνομα. Επιπλέον, περιέχουν μία περιοχική κλωνοποίησης, όπου μπορεί να συνδεθεί το ξένο DNA, και φέρουν ένα γονίδιο επιλογής, που χρησιμεύει στην αναγνώριση κυττάρων ξενιστών που το περιέχουν (Μπατρίνου, 2011).

Το πλασμίδιο pG<sup>+</sup>host είναι ένα θερμοευαίσθητο παράγωγο αντιγραφής του pWV01, που απομονώθηκε μετά από μεταλλαξογένεση του pGK12 (Maguin et al., 1992; Kok et al., 1984; Otto et al., 1982). Στο βακτήριο *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363, το pG<sup>+</sup>host αντιγράφεται στους 28-30 °C, αλλά όχι σε θερμοκρασίες πάνω από 37 °C. Τα στοιχεία IS (Insertion Sequences, αλληλουχίες μετάθεσης) είναι μικρά (800-2,500 bp), βρίσκονται ανάμεσα σε αντεστραμμένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και κωδικοποιούν, γενικά, δικές τους μεταθετικές λειτουργίες. Τα στοιχεία ISS1, μία από τις τρεις οικογένειες IS στοιχείων που έχουν βρεθεί στους λακτοκόκκους (Romero et al., 1993), υποβάλλονται σε αντιγραφική μετάθεση που οδηγεί στην τυχαία ενσωμάτωση του πλασμιδίου pG<sup>+</sup>host μεταξύ διπλασιασμένων αλληλουχιών IS στο χρωμόσωμα του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363. Με χρήση του πλασμιδίου pG<sup>+</sup>host ως μέσου μεταφοράς του ISS1, επιτυγχάνεται μετάθεση υψηλής συχνότητας (τουλάχιστον 0.5%) που επιτρέπει επαρκή απενεργοποίηση γονιδίων και άμεση κλωνοποίηση του DNA της πλευρικής αλληλουχίας.

Το πλασμίδιο pGh9:ISS1 έχει μέγεθος περίπου 4.6 kb και η

πρωτεΐνη Ts που είναι υπεύθυνη για την αντιγραφή του πλασμιδίου είναι γενετικά τροποποιημένη, ώστε να είναι θερμοευαίσθητη (Maguin et al., 1996). Περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στην ερυθρομυκίνη και, συνεπώς, η μετάθεση γίνεται αντιληπτή όταν γίνει δοκιμή για συλλογή στελεχών ανθεκτικών στην ερυθρομυκίνη. Τα στελέχη που προκύπτουν είναι ικανά να αναπτυχθούν σε θερμοκρασία απαγορευτική για την αντιγραφή του πλασμιδίου. Επίσης, το πλασμίδιο περιέχει μία θέση αναγνώρισης για κάθε μία από τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI, HindIII και PstI.

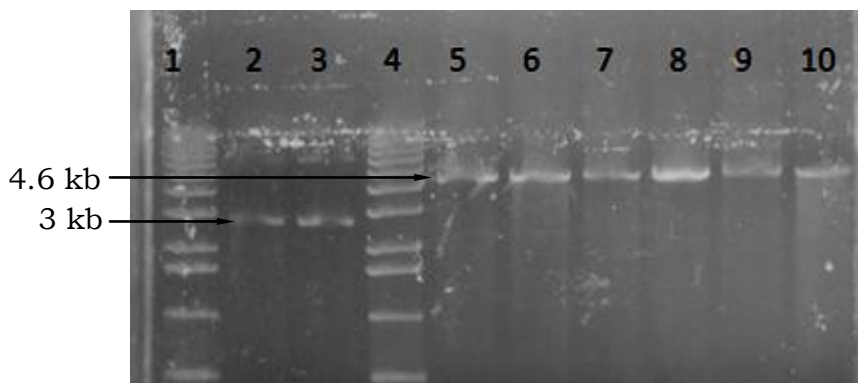
Η ενσωμάτωση του πλασμιδίου στο χρωμόσωμα του *L. lactis ssp cremoris* γίνεται σε τυχαία θέση. Στους 30 °C, το πλασμίδιο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων και η πρωτεΐνη Ts λειτουργεί, οπότε το πλασμίδιο αντιγράφεται φυσιολογικά, όμως παύει να λειτουργεί όταν η θερμοκρασία φτάσει τους 37.5 °C. Έτσι, τα πλασμίδια από το κυτταρόπλασμα ενσωματώνονται στο χρωμόσωμα.



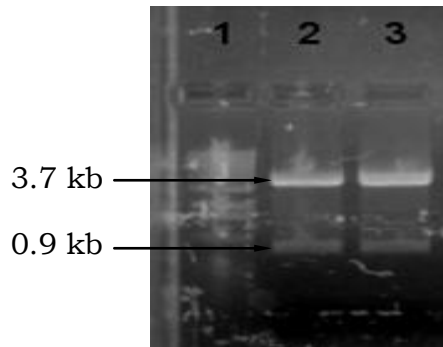
ΕΙΚΟΝΑ 3.1: ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΕΝΣΩΜΑΤΩΣΗΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ ΣΤΟ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑ, ΜΕ ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΑΠΟ ΤΟΥΣ 30 °C ΣΤΟΥΣ 37.5 °C



Μετά την απομόνωση του πλασμιδιακού φορέα pGh9:ISS1 από το βακτήριο EC101, η επιβεβαίωση της ποιότητάς του έγινε με πέψη με τη βοήθεια περιοριστικών ενζύμων κι ακολούθως με την ηλεκτροφόρηση τόσο του άκοπου όσο και του κομμένου πλασμιδίου σε πηκτή αгарόζης. Η πέψη έγινε με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI, HindIII και PstI, ενώ πραγματοποιήθηκε και πέψη με τα ένζυμα EcoRI και HindIII ταυτόχρονα. Το πλασμίδιο έχει μέγεθος περίπου 4.6 kb και στις «μονές» πέψεις υπήρχε μία θέση περιορισμού (στα 2359 kb, 1496 kb, 2369 kb, αντίστοιχα), ενώ στη «διπλή» υπήρχαν δύο τέτοιες θέσεις. Έτσι, μετά από κάθε «μονή» πέψη αναμένεται στην πηκτή αгарόζης ζώνη στα 4.6 kb, ενώ μετά από τη «διπλή» στα 3.7 kb και 0.9 kb. Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί πως το πλασμίδιο όταν ηλεκτροφορείται άκοπο εμφανίζει ζώνη περίπου στα 3 kb, λόγω του ότι κινείται πιο γρήγορα εξαιτίας της περιελίκωσης που οδηγεί σε μικρότερο μέγεθος.



ΕΙΚΟΝΑ 3.2: ΔΙΠΛΗ ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ pGh9:ISS1 ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ. ΔΙΑΔΡΟΜΕΣ: MARKER (1), ΑΚΟΠΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟ (2-3), MARKER (4), ΠΕΨΗ ΜΕ ECoRI (5-6), ΠΕΨΗ ΜΕ HindIII (7-8), ΠΕΨΗ ΜΕ PstI (9-10).



ΕΙΚΟΝΑ 3.3: ΔΙΠΛΗ ΕΠΑΝΑΛΗΨΗ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ pGh9:ISS1 ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΠΕΨΗ ΜΕ ΤΑ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ. ΔΙΑΔΡΟΜΕΣ: MARKER (1), ΠΕΨΗ ΜΕ EcoRI ΚΑΙ HindIII ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΑ (2-3)

Όπως φαίνεται στις εικόνες 3.2 και 3.3, τα μεγέθη των τμημάτων DNA ήταν τα αναμενόμενα, οπότε η ποιότητα του πλασμιδιακού DNA θεωρήθηκε ικανοποιητική για τη συνέχιση της μελέτης.

### **3.2 Δημιουργία και επιλογή μεταλλαγμένων στελεχών του *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 με ανθεκτικότητα σε ωσμωτικό στρες**

Αρχικά εντοπίστηκαν οι θανατηφόρες συνθήκες για το στέλεχος αγρίου τύπου. Όπως περιγράφηκε στην ενότητα 2.4, φάνηκε πως στην περιεκτικότητα 2.75% w/v NaCl υπήρξε αναστολή της ανάπτυξης του MG1363. Μέχρι τη συγκέντρωση 2.5% w/v NaCl τα στελέχη αγρίου τύπου παρουσίαζαν κανονική ανάπτυξη, όμως σε υψηλότερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκαν μεμονωμένες αποικίες. Έτσι, η συγκέντρωση 2.75% w/v NaCl θεωρήθηκε ως η βέλτιστη συνθήκη για την επιλογή μεταλλαγμένων στελεχών που έχουν ανθεκτικότητα σε υπερωσμωτικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα αυτού του πειράματος φαίνονται στον Πίνακα 3.1, όπου με + και - αντιπροσωπεύεται η εκτίμηση της ανάπτυξης στα τρυβλία.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.1: ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΘΑΝΑΤΗΦΟΡΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ NaCl ΓΙΑ ΤΟ *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ

| NaCl<br>(% w/v) | Αρχικά<br>(10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup> cfu) | 1/100<br>(10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup> cfu) | 1/1000<br>(10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup> cfu) |
|-----------------|--|---|--|
| 0.00            | +++  | +++   | +++  |
| 2.00            | +++  | +++   | +++  |
| 2.50            | +++  | ++  | ++   |
| 2.75            | +++  | +   | +  |
| 3.00            | ++   | +   | -  |
| 3.50            | +  | -   | -  |

Παρατηρήθηκε ότι στα τρυβλία που προέρχονταν από την αραιώση 1/100 ο βακτηριακός θάνατος επερχόταν σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 3.00% w/v NaCl, ενώ στα τρυβλία της αραιώσης 1/1000 σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 2.75% w/v NaCl.

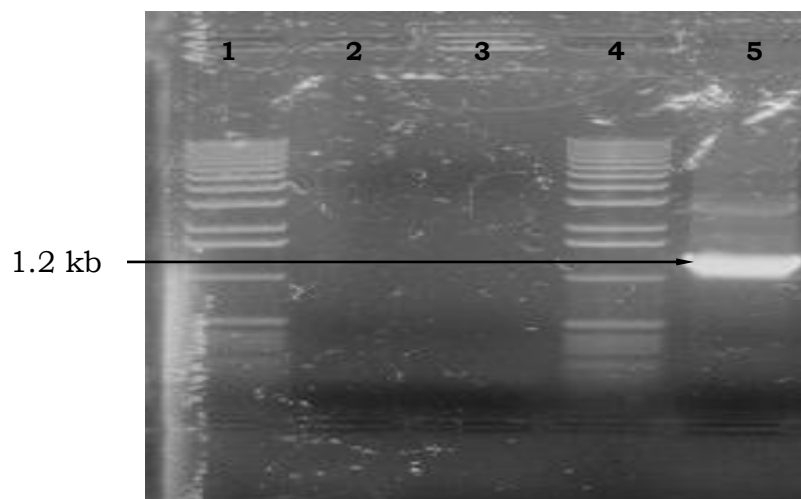
Στη συνέχεια, μετά το μετασχηματισμό του MG1363 με το πλασμίδιο pGh9:ISS1 και την επιφανειακή εξάπλωση σε τρυβλία με ερυθρομυκίνη, συλλέχθηκαν μεμονωμένες μετασχηματισμένες αποικίες που αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο με ερυθρομυκίνη, μέχρι οι καλλιέργειες να φτάσουν στη στατική φάση. Για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων, μετά από επώαση στους 30 °C για 2.5 ώρες και τους 37.5 °C για 2.5 ώρες, οι καλλιέργειες εξαπλώθηκαν επιφανειακά σε τρυβλία με ερυθρομυκίνη, που περιείχαν NaCl σε ποσότητες 2.75% και 3% w/v και επώαση στους 37.5 °C για 48 ώρες. Από τα τρυβλία αυτά συλλέχθηκαν δύο πιθανά μεταλλαγμένα στελέχη του MG1363.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.2: ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 ΣΕ 2.75% ΚΑΙ 3.5% w/v NaCl ΓΙΑ ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

| NaCl<br>(% w/v) | Αρχικά<br>(10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup> cfu) | 1/100<br>(10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup> cfu) | 1/1000<br>(10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup> cfu) |
|-----------------|--|---|--|
| 2.75            | -  | +   | -  |
| 3.00            | -  | -   | +  |

### 3.3 Έλεγχος των πιθανά μεταλλαγμένων στελεχών με Colony PCR

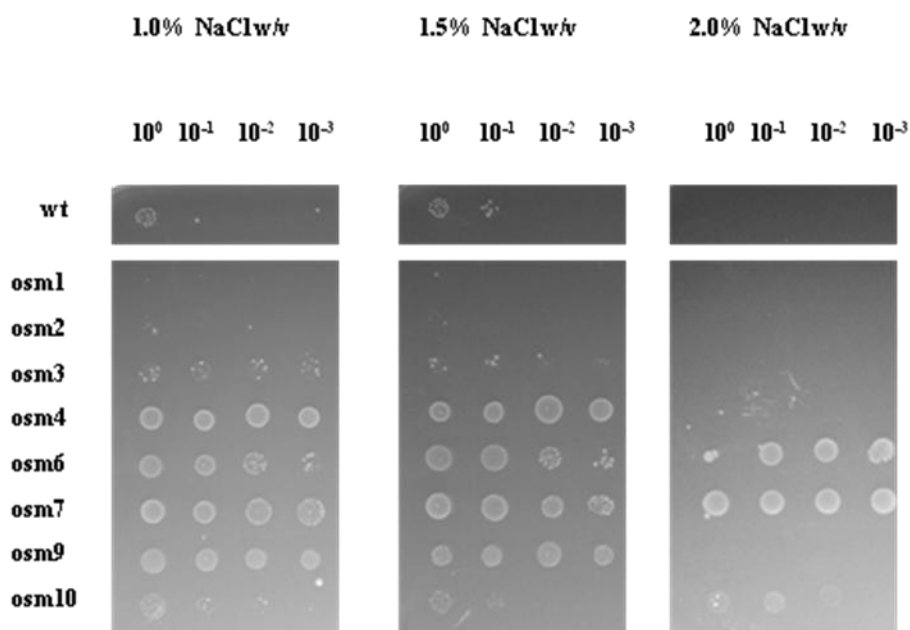
Αρχικά, τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα τρυβλία με 2.75% και 3% w/v NaCl ελέγχθηκαν με τη μέθοδο της Colony PCR για την επιβεβαίωση της μετάλλαξης. Οι ονομασίες A1, A2 αναφέρονται στα δύο αυτά στελέχη.



ΕΙΚΟΝΑ 3.4: ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΓΙΑ ΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ A1 ΚΑΙ A2 ΜΕΤΑ ΑΠΟ COLONY PCR. ΔΙΑΔΡΟΜΕΣ: MARKER (1), A1 (2), A2 (3), MARKER (4), pGh9:ISS1 (5)

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.4, τα δύο στελέχη δεν εμφανίζουν την αναμενόμενη ζώνη στην ηλεκτροφόρηση. Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR (*ermf/ermr*) είναι σχεδιασμένοι να

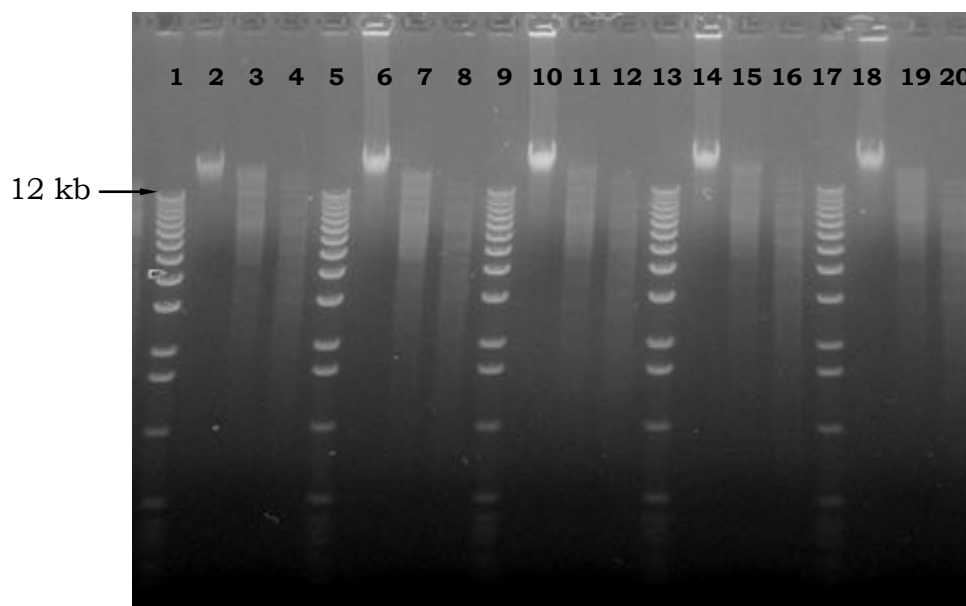
ενισχύουν το γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην ερυθρομυκίνη, οπότε θα έπρεπε να εμφανίζεται ζώνη στα 1.2 kb, όπως ακριβώς εμφανίζεται στο πλασμίδιο (θετικός μάρτυρας) pGh9:ISS1. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι όποιες μεταλλάξεις στα συγκεκριμένα στελέχη δεν προέκυψαν από την ενσωμάτωση του πλασμιδίου στο χρωμόσωμα των στελεχών, αλλά από σημειακές μεταλλάξεις στο γονιδίωμα του βακτηρίου. Για το λόγο αυτό τα συγκεκριμένα στελέχη αποκλείστηκαν από περαιτέρω ανάλυση και η μελέτη συνεχίστηκε με τον χαρακτηρισμό πέντε μεταλλαγμένων στελεχών που υπήρχαν στο εργαστήριο από προηγούμενες μελέτες, τα Osm4, Osm6, Osm7, Osm9 και Osm10. Στην Εικ. 3.5 παρουσιάζεται η ικανότητά ανάπτυξης των στελεχών αυτών σε στερεό θρεπτικό μέσο με 1%, 1.5% και 2% w/v NaCl σε σχέση με το στέλεχος αγρίου τύπου.



ΕΙΚΟΝΑ 3.5: ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ Osm4, Osm6, Osm7, Osm9 ΚΑΙ Osm10 ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΑΓΡΙΟΥ ΤΥΠΟΥ ΣΕ ΣΤΕΡΕΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ ΜΕ 1.0, 1.5 ΚΑΙ 2.0 % w/v NaCl

### 3.4 Έλεγχος της ποιότητας του χρωμοσωμικού DNA από μεταλλαγμένα στελέχη του *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363

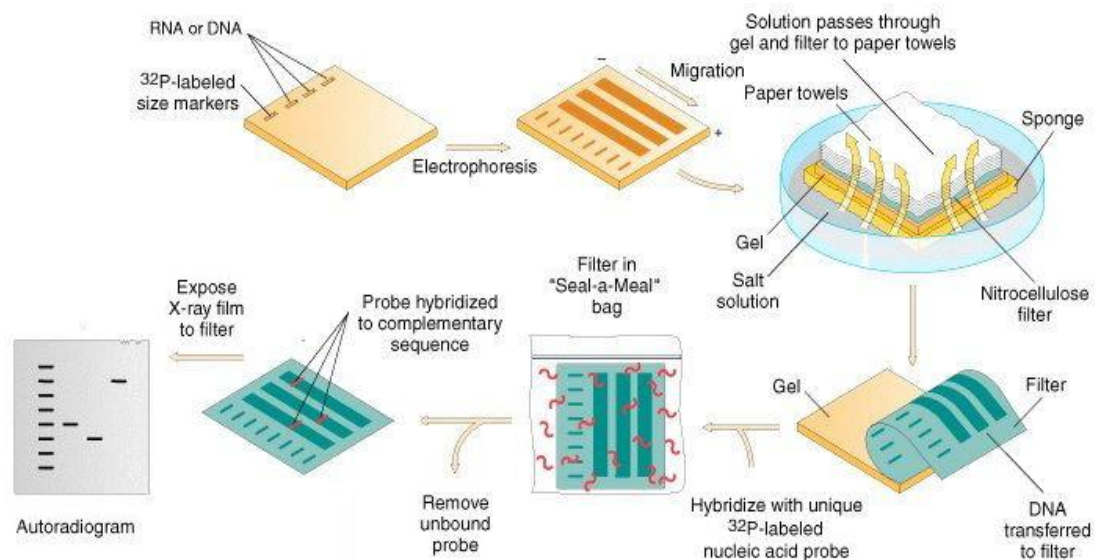
Το χρωμοσωμικό DNA των στελεχών Osm4, Osm6, Osm7, Osm9 και Osm10 απομονώθηκε και η ποιότητά του ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Εικ. 3.6). Στην εικόνα υπάρχουν τρεις διαδρομές για κάθε στέλεχος: το άκοπο χρωμοσωμικό DNA, η πέψη με ECoRI και η πέψη με HindIII. Παρατηρούμε την πλήρη πέψη του χρωμοσωμικού DNA που οδηγήθηκε προς κυκλοποίηση με αντίδραση λιγάσης.



ΕΙΚΟΝΑ 3.6: ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΕΨΗ ΤΟΥ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΟΥ DNA ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ Osm4, Osm6, Osm7, Osm9 ΚΑΙ Osm10. ΔΙΑΔΡΟΜΕΣ: MARKER (1) Osm4 (2-4), MARKER (5) Osm6 (6-8), MARKER (9) Osm7 (10-12), MARKER (13) Osm9 (14-16), MARKER (17) Osm10 (18-20)

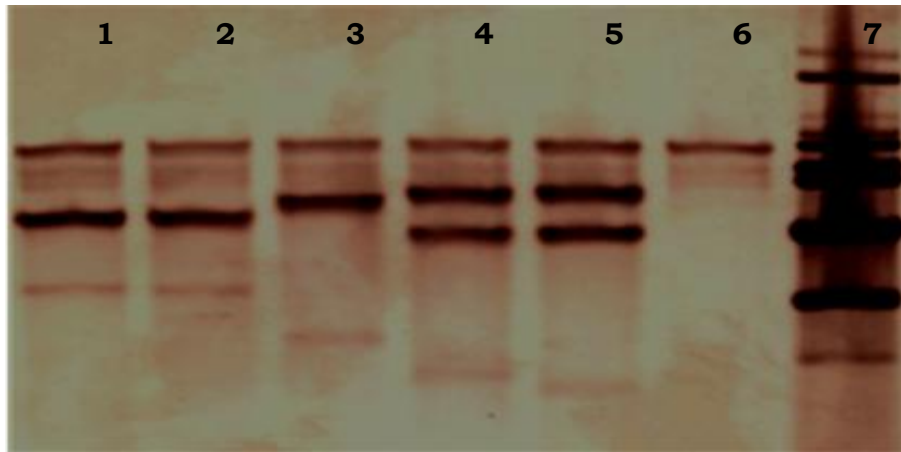
Από προηγούμενη μελέτη, όπου είχαν απομονωθεί τα μεταλλαγμένα στελέχη Osm4, Osm6, Osm7, Osm9 και Osm10, είχε πραγματοποιηθεί ανάλυση Southern (Εικ. 3.7), το αποτέλεσμα της οποίας παρατίθεται στην Εικόνα 3.8. Πρόκειται για μια μέθοδο που χρησιμοποιείται στη μοριακή βιολογία και επιτρέπει τον εντοπισμό μίας αλληλουχίας

DNA που υπάρχει στο γονιδίωμα. Στην ταυτοποίηση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών, η ανάλυση Southern αποτελεί καθοριστική δοκιμή που αποδεικνύει ότι ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA έχει ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του οργανισμού-ξενιστή.



ΕΙΚΟΝΑ 3.7: ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ SOUTHERN (Memorial University, Canada, <https://www.mun.ca/biology/>)

Από την εικόνα της μεμβράνης, φαίνεται ότι στο DNA των μεταλλαγμένων στελεχών Osm4, Osm6 και Osm7, το πλασμίδιο pGh9:ISS1 έχει ενσωματωθεί μία φορά. Φαίνεται ότι ίσως το πλασμίδιο στα δύο πρώτα στελέχη έχει ενσωματωθεί στην ίδια θέση, ενώ στο Osm7 δεν παρατηρείται το ίδιο και η ενσωμάτωση έχει γίνει σε άλλο σημείο. Στα μεταλλαγμένα στελέχη Osm9 και Osm10, από την άλλη, φαίνεται ότι το πλασμίδιο έχει ενσωματωθεί δύο ή περισσότερες φορές στο χρωμόσωμά τους (φαινόμενο της διαδοχικής μετάθεσης, tandem transposition), πιθανότατα στο ίδιο σημείο.



ΕΙΚΟΝΑ 3.8: ΜΕΜΒΡΑΝΗ SOUTHERN ΓΙΑ ΤΑ ΣΤΕΛΕΧΗ Osm4, Osm6, Osm7, Osm9 ΚΑΙ Osm10 ΚΑΙ MG1363. ΔΙΑΔΡΟΜΕΣ: Osm4 (1), Osm6 (2), Osm7 (3), Osm9 (4), Osm10 (5), MG1363 (6) ΚΑΙ pGh9:ISS1 (7)

### **3.5 Μετασχηματισμός στελεχών *Escherichia coli* EC101 με χρωμοσωμικό DNA από μεταλλαγμένα στελέχη του *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363**

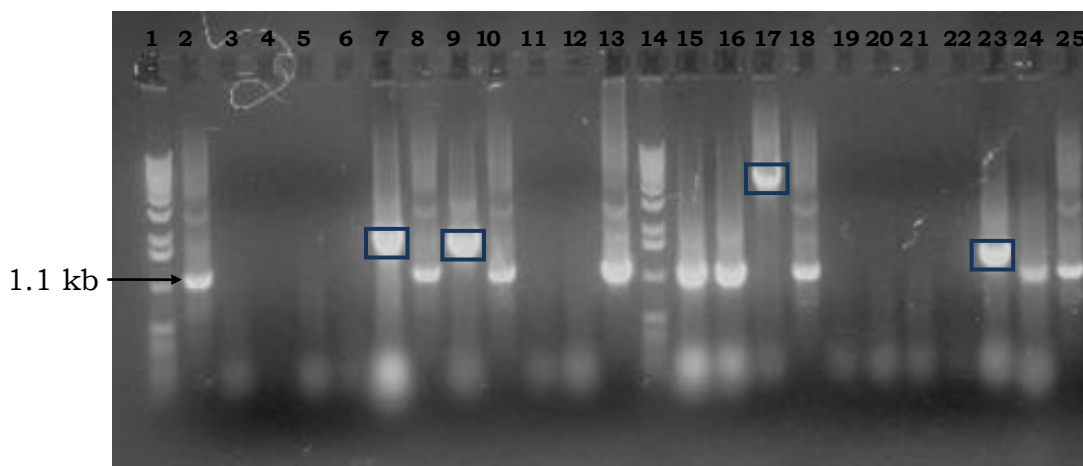
Μετά την πέψη του χρωμοσωμικού DNA, την κυκλοποίηση των γραμμικών τμημάτων που δημιουργεί η πέψη με την αντίδραση λιγάσης (ligation) και τη συμπύκνωση του γενωμικού DNA, πραγματοποιήθηκε ο μετασχηματισμός των κυττάρων EC101. Για την επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων που αναμένεται να είναι ανθεκτικά στην ερυθρομυκίνη, έγινε επιφανειακή εξαπλώση σε τρυβλία με LB και ερυθρομυκίνη. Αρχικά εξαπλώθηκαν 100 μl και στη συνέχεια, αφού τα σωληνάρια φυγοκεντρήθηκαν στις 2000 rpm για 2 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίφθηκε, το ίζημα επαναιωρήθηκε και εξαπλώθηκε στα τρυβλία (rest). Μετά από επώαση 48 ωρών στους 37 °C, γίνεται καταμέτρηση των αποικιών.



ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3: ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΜΕΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΤΩΝ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ *Escherichia coli* EC101

|       | ECoRI 100 $\mu$ l | ECoRI rest | HindIII 100 $\mu$ l | HindIII rest |
|-------|-------------------|------------|---------------------|--------------|
| Osm4  | +                 | ++         | -                   | +            |
| Osm6  | -                 | +          | -                   | +            |
| Osm7  | +                 | +          | +                   | ++           |
| Osm9  | +                 | ++         | +                   | +            |
| Osm10 | +                 | +          | +                   | ++           |

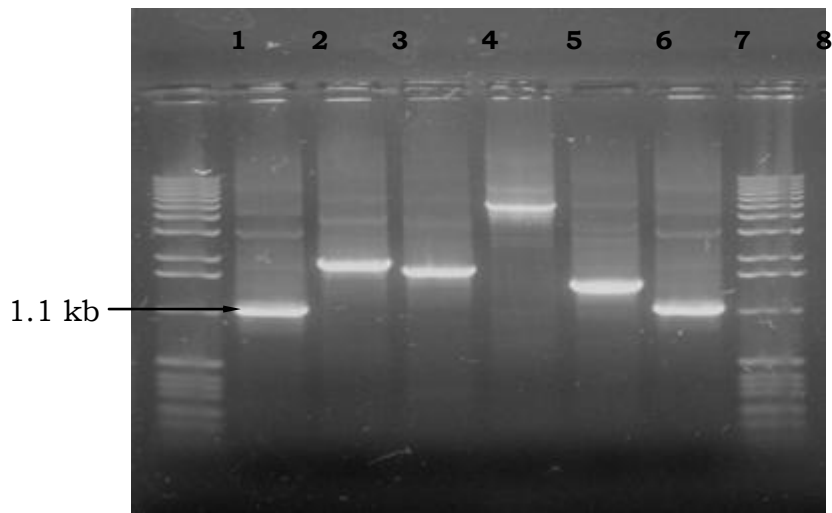
Από τις αποικίες που απομονώθηκαν ακολούθησε Colony PCR και στη συνέχεια ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτική αγαρόζης (Εικ. 3.9). Οι εκκινητές (pGHF/pGER) ήταν σχεδιασμένοι έτσι ώστε να ενισχύουν την αλληλουχία *ISS1*, συνεπώς στα μεταλλαγμένα στελέχη θα έπρεπε να ανιχνεύονται οι πλευρικές αλληλουχίες του χρωμοσώματος με αποτέλεσμα η ζώνη στην ηλεκτροφόρηση να είναι σαφώς μεγαλύτερη από αυτή που εμφανίζεται στο πλασμίδιο (1.1 kb). Η διαφορά στα μεγέθη των ζωνών σχετίζεται με το σημείο που έγινε η ενσωμάτωση στο χρωμόσωμα. Όπως φαίνεται και από την εικόνα, η κλωνοποίηση ήταν επιτυχής στα στελέχη Osm4, Osm6, Osm9, Osm10, αλλά όχι στο Osm7.



ΕΙΚΟΝΑ 3.9: ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΓΙΑ ΣΤΕΛΕΧΗ *Escherichia coli* EC101 ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΜΕΤΑ ΤΟ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ (COLONY PCR). ΔΙΑΔΡΟΜΕΣ: MARKER (1), pGh9:*ISS1* (2) Osm4 (3-7), pGh9:*ISS1* (8) Osm6 (9), pGh9:*ISS1* (10) Osm7 (11-12), pGh9:*ISS1* (13), MARKER (14), Osm9 (15-17), pGh9:*ISS1* (18), Osm10 (19-24), pGh9:*ISS1* (25)

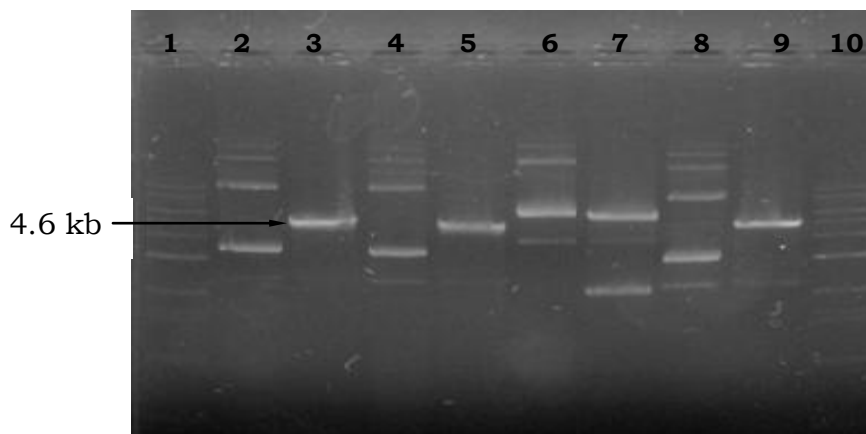
### 3.6 Απομόνωση DNA από τα μετασχηματισμένα στελέχη *Escherichia coli* EC101 και επιβεβαίωση της ποιότητά του

Το DNA των 4 μετασχηματισμένων στελεχών του EC101 απομονώθηκε και προς επιβεβαίωση έγινε PCR με εκκινητές (pGHF/pGER) σχεδιασμένους να ενισχύουν την αλληλουχία *ISS1*. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Από την Εικόνα 3.10 επιβεβαιώνεται το γεγονός ότι σε όλα τα στελέχη το πλασμίδιο έχει ενσωματωθεί στο χρωμόσωμα και ότι η κλωνοποίηση ήταν επιτυχής.



ΕΙΚΟΝΑ 3.10: ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΓΙΑ ΤΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ *Escherichia coli* EC101 (PCR). ΔΙΑΔΡΟΜΕΣ: MARKER (1), pGh9:*ISS1* (2), *Osm4* (3), *Osm6* (4), *Osm9* (5), *Osm10* (6), pGh9:*ISS1* (7), MARKER (8)

Για να επιβεβαιωθούν με μια δεύτερη, ανεξάρτητη μέθοδο τα αποτελέσματα, έγινε πέψη με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *EcoRI* και *HindIII*, που παρουσιάζεται στην εικόνα 3.10. Υπάρχουν δύο διαδρομές για κάθε στέλεχος, το άκοπο κυκλικό μόριο και το κομμένο, με τα κατάλληλα ένζυμα. Έτσι επιβεβαιώθηκε για μια ακόμη φορά ότι φέρουν τις πλευρικές αλυσίδες του MG1363.



ΕΙΚΟΝΑ 3.11: ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ ΓΙΑ ΤΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ *Escherichia coli* EC101 ΠΡΙΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ. ΔΙΑΔΡΟΜΕΣ: MARKER (1), Osm4 ΑΚΟΠΙΟ (2), Osm4 ΚΟΜΜΕΝΟ (3), Osm6 ΑΚΟΠΙΟ (4), Osm6 ΚΟΜΜΕΝΟ (5), Osm9 ΑΚΟΠΙΟ (6), Osm9 ΚΟΜΜΕΝΟ (7), Osm10 ΑΚΟΠΙΟ (8), Osm10 ΚΟΜΜΕΝΟ (9), MARKER (10)

### 3.7 Βιοπληροφορική ανάλυση

Τα κυκλικά μόρια απομονώθηκαν και στάλθηκαν για αλληλούχηση, με σκοπό τον μετέπειτα χαρακτηρισμό των πλευρικών αλυσίδων και κατ' επέκταση των σημείων μετάλλαξης. Στη συνέχεια έγινε ανάλυση με το εργαλείο βιοπληροφορικής BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) της ιστοσελίδας NCBI. Με τον τρόπο αυτό εκτιμήθηκε η ακριβής θέση στην οποία ενσωματώθηκε το πλασμίδιο pGh9:ISS1 στο χρωμόσωμα του MG1363, που όπως αποδείχτηκε, διέκοψε ένα γονίδιο. Στην Εικόνα 3.12 φαίνεται πως η νουκλεοτιδική αλληλουχία που αναλύθηκε με το πρόγραμμα (430 νουκλεοτίδια για το στέλεχος Osm4) όπως ήταν αναμενόμενο εντοπίστηκε στο γονιδίωμα του MG1363 με πλήρη ταύτιση. Το γονίδιο αυτό βάσει του χαρακτηρισμού του κωδικοποιεί μια αιμολυσίνη, γεγονός που μας προβλημάτισε ιδιαίτερος, αφού δεν υπάρχει εμφανής συσχέτιση της λειτουργίας αυτής με το ωσμωτικό στρες. Επίσης, μετά από ανάλυση των πλευρικών αλληλουχιών, έκπληξη προκάλεσε το γεγονός ότι και σε όλα τα υπόλοιπα μεταλλαγμένα στελέ-

χη (Osm6, Osm9, Osm10) διακόπηκε το ίδιο γονίδιο, γεγονός που υποδηλώνει ότι έχει σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα στο ωσμωτικό στρες.

Με τη χρήση του προγράμματος InterProScan έγινε ανάλυση της πρωτεΐνης αυτής, από την οποία προέκυψε το συμπέρασμα ότι ο αρχικός χαρακτηρισμός της ως αιμολυσίνης ήταν λανθασμένος. Όπως φαίνεται (Εικόνα 3.13), πρόκειται για μία συντηρημένη υποθετική πρωτεΐνη (conserved hypothetical protein), δηλαδή μια πρωτεΐνη που υπάρχει και σε άλλους οργανισμούς. Ένα από τα τμήματα της πρωτεΐνης, των οποίων ο ρόλος είναι γνωστός (domains), είναι αντλία μεταφοράς ιόντων Na-H (transporter-associated), αφού έχει το αντίστοιχο domain στο καρβοξυτελικό της άκρο. Φαίνεται πως η συγκεκριμένη πρωτεΐνη συμμετέχει στο ωσμωτικό στρες, προσδίδοντας κάποιου είδους ευαισθησία στον οργανισμό. Με την απενεργοποίηση του γονιδίου που την κωδικοποιεί υπάρχει μια ενδεχόμενη συσχέτιση με την ανθεκτικότητα του οργανισμού στο συγκεκριμένο στρες.

NCBI Blast:Nucleotide Sequen... +

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

**BLAST®** Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

My NCBI [Sign In] [Register]

CBW/BLAST/blastn suite/ Formatting Results - VZTYK6ZT01R

Your search is limited to records matching entrez query: txid416870 [ORGN].

Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download

YouTube How to read this page Blast report description

**Nucleotide Sequence (430 letters)**

RID [VZTYK6ZT01R](#) (Expires on 07-12 21:34 pm)

Query ID Id|50027 Database Name nr  
 Description None Description Nucleotide collection (nt)  
 Molecule type nucleic acid Program BLASTN 2.2.29+ Citation  
 Query Length 430

Other reports: Search Summary Taxonomy reports Distance tree of results

**Graphic Summary**

Distribution of 1 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse over to see the define, click to show alignments

Color key for alignment scores

|     |       |       |        |       |
|-----|-------|-------|--------|-------|
| <40 | 40-50 | 50-80 | 80-200 | >=200 |
|-----|-------|-------|--------|-------|

Query 1 80 160 240 320 400

**Descriptions**

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

|                          | Description  | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession  |
|--------------------------|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|------------|
| <input type="checkbox"/> | <a href="#">Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363, complete genome</a> | 795       | 795         | 100%        | 0.0     | 100%  | AM406671.1 |

**Alignments**

Download GenBank Graphics

**Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363, complete genome**  
 Sequence ID: [emblAM406671.1](#) Length: 2529478 Number of Matches: 1

Range 1: **1987767 to 1988196** GenBank Graphics

| Score         | Expect | Identities    | Gaps      | Strand    |
|---------------|--------|---------------|-----------|-----------|
| 795 bits(430) | 0.0    | 430/430(100%) | 0/430(0%) | Plus/Plus |

```

Query 1 ATATCAATCATGAAGGCGTCAGTTCCTTGGAAACCATAATTTTCACGCGCCACCAATTCATCC 60
Sbjct 1987767 ATATCAATCATGAAGGCGTCAGTTCCTTGGAAACCATAATTTTCACGCGCCACCAATTCATCC 1987826
Query 61 AAACGAATACACCAGTAATCATCTCACGTTTCATTATCATCAAGTGCTTCATCGTTGGTA 120
Sbjct 1987827 AAACGAATACACCAGTAATCATCTCACGTTTCATTATCATCAAGTGCTTCATCGTTGGTA 1987886
Query 121 TTAAGTAAATACTCAATTTTCATCACGAGTCATACTTTTCATCCAAATCATCAAATTTCAAT 180
Sbjct 1987887 TTAAGTAAATACTCAATTTTCATCACGAGTCATACTTTTCATCCAAATCATCAAATTTCAAT 1987946
Query 181 GGTGTCAAACGACTCAAGACGTTGGTTGAACTTGCTAAAAACCAAACAAAAGGTTTCATC 240
Sbjct 1987947 GGTGTCAAACGACTCAAGACGTTGGTTGAACTTGCTAAAAACCAAACAAAAGGTTTCATC 1988006
Query 241 ACTTTTCCTAAAAAATGGATTGGTGGTGCGACCCGTAGGGCCATTTTTCCTTGAGGTTT 300
Sbjct 1988007 ACTTTTCCTAAAAAATGGATTGGTGGTGCGACCCGTAGGGCCATTTTTCCTTGAGGTTT 1988066
Query 301 TGGGCAATTCGTTTAGGATAAAGTTTACCAAATACGAGTGAACATAAGTCAAAATAGCT 360
Sbjct 1988067 TGGGCAATTCGTTTAGGATAAAGTTTACCAAATACGAGTGAACATAAGTCAAAATAGCT 1988126
Query 361 AAAACAATAATTTGAGATAAAGTTTITAGCCAGTGCCGTTCCACCTAATAATGGTGCTAGG 420
Sbjct 1988127 AAAACAATAATTTGAGATAAAGTTTITAGCCAGTGCCGTTCCACCTAATAATGGTGCTAGG 1988186
Query 421 CGAGATGACA 430
Sbjct 1988187 CGAGATGACA 1988196
  
```

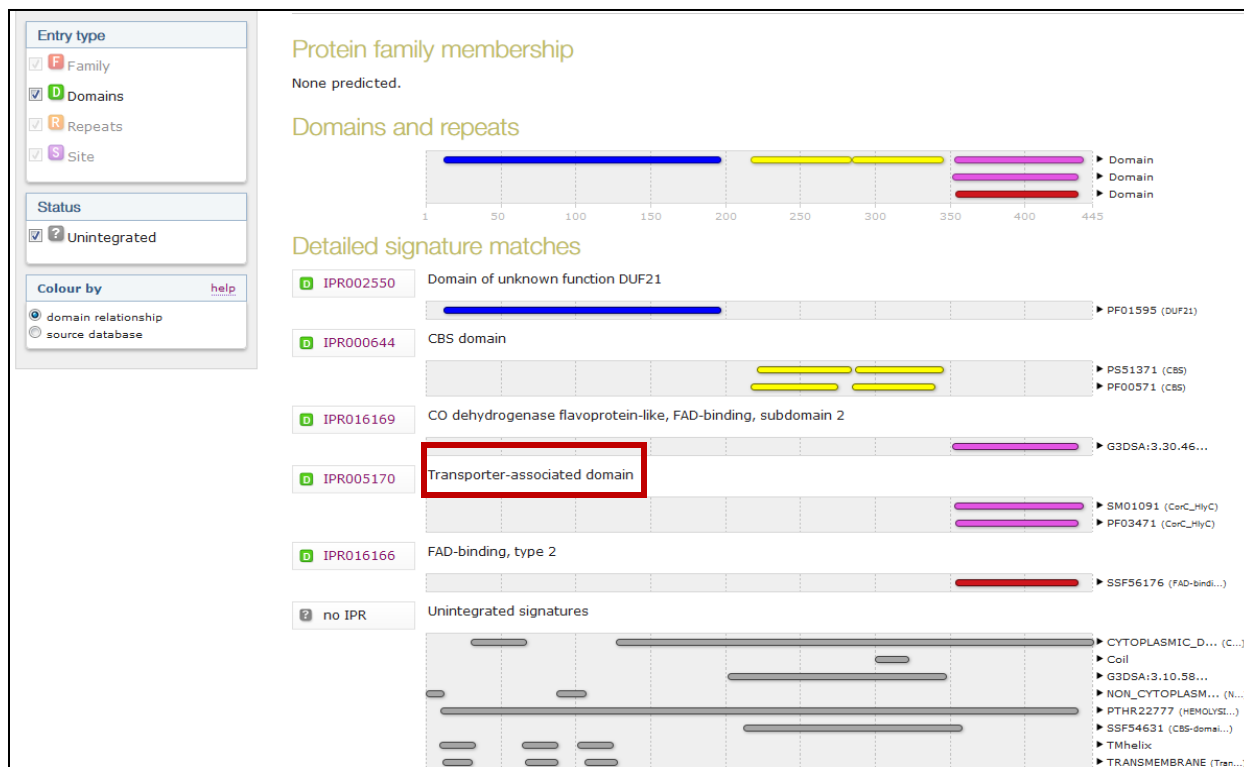
ΕΙΚΟΝΑ 3.12: ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΙΑ ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ Osm4 ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ BLAST

**CAL98568.1**  
 CDS: CAL98568.1  
 Title: conserved hypothetical protein  
 Comment: Protein of unknown function DUF21  
 Location: complement(1,987,127..1,988,464)  
 [Length]  
 Span: 1,338  
 Product: 445

Download: [CAL98568.1](#)

**Links & Tools**  
 View GOA: [A2RMN4](#)  
 View InterPro: [IPR000644](#), [IPR002550](#), [IPR005170](#), [IPR016169](#)  
 View UniProtKB/TrEMBL: [A2RMN4](#)

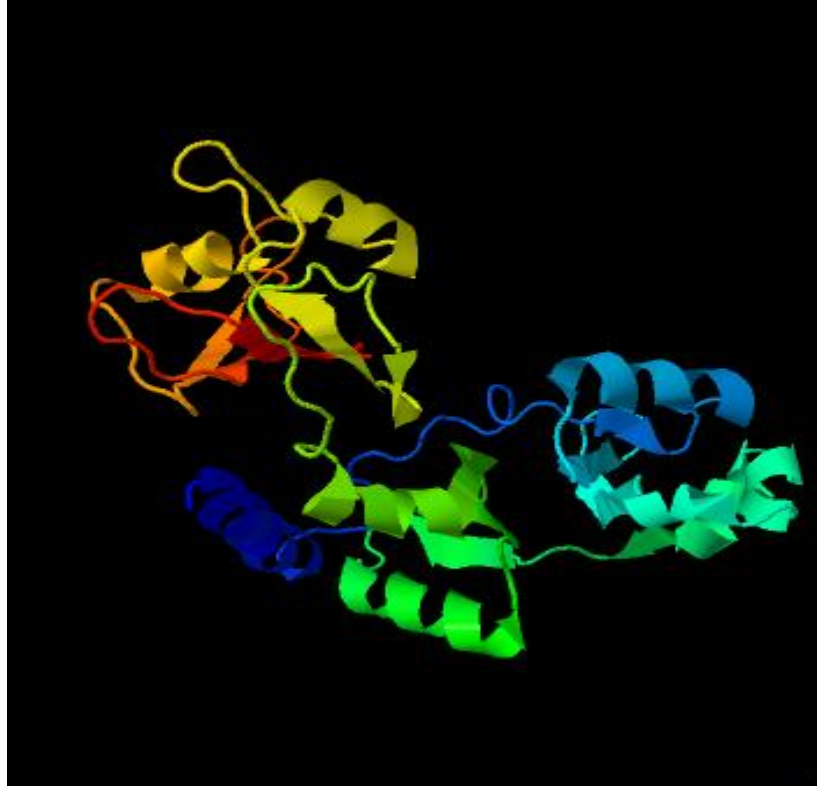
GenBank View: [AM406671.1 \(1,987,127..1,988,464\)](#), [CAL98568.1](#)  
 FASTA View: [AM406671.1 \(1,987,127..1,988,464\)](#), [CAL98568.1](#)  
 BLAST Genomic: [AM406671.1 \(1,987,127..1,988,464\)](#)  
 Graphical View: [CAL98568.1](#)  
 BLAST Protein: [CAL98568.1](#)  
 BLINK Results: [CAL98568.1](#)



ΕΙΚΟΝΑ 3.13: ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΙΑ ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ Osm4 ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ INTERPROSCAN

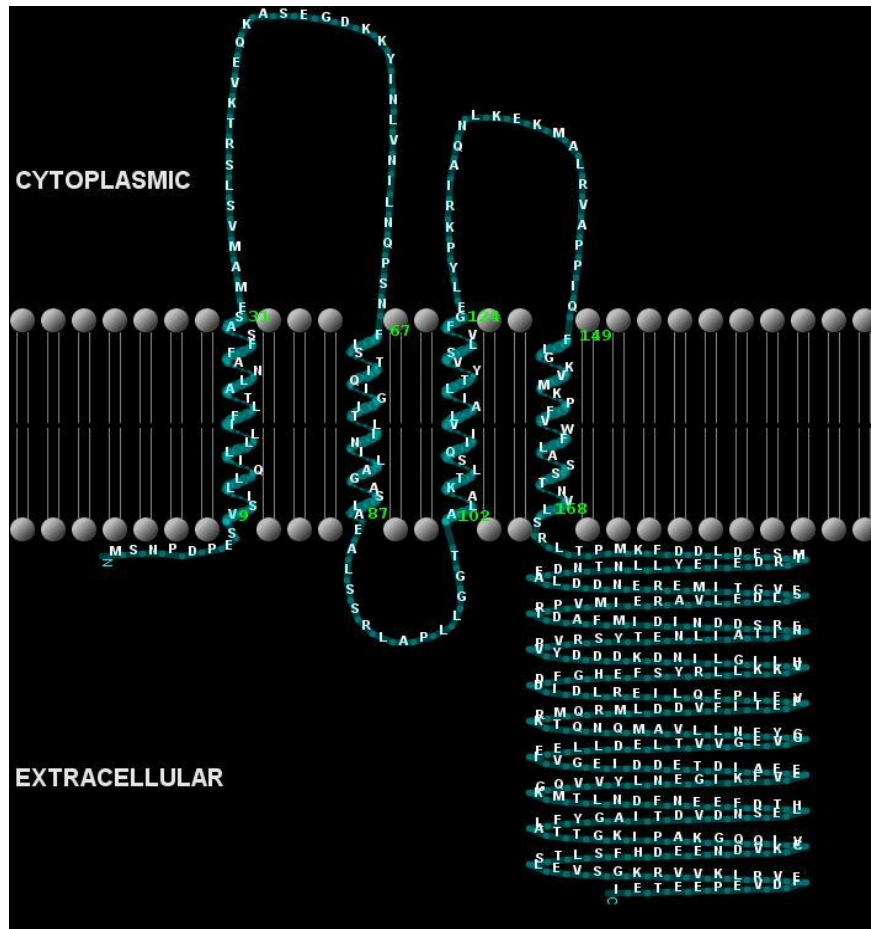
Στη συνέχεια, με το πρόγραμμα PHYRE 2 (Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0) επιχειρήθηκε μοντελοποίηση της δομής της πρωτεΐνης (Εικόνα 3.14). Με γαλάζιο χρώμα συμβολίζεται το καρβοξυτελικό ενώ με κόκκινο το αμινοτελικό άκρο. Η

Λειτουργία της αντλίας μεταφοράς ιόντων εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο.



ΕΙΚΟΝΑ 3.14: ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ PHYRE 2

Η Εικόνα 3.15 που ακολουθεί είναι μία ακόμη προσπάθεια μοντελοποίησης της δομής της πρωτεΐνης με το πρόγραμμα TMRPres2D (τοπολογική ανάλυση). Όπως φαίνεται, το αμινοτελικό άκρο βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, ένα τμήμα της βρίσκεται διαμεμβρανικά και το καρβοξυτελικό άκρο καταλήγει εξωκυτταρικά. Η δομή αυτή συμφωνεί με την υπόθεση ότι μία έστω λειτουργία της πρωτεΐνης αυτής είναι η μεταφορά ιόντων από το εσωτερικό στο εξωτερικό του κυτάρου, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με την ανθεκτικότητα στο ωσμωτικό στρες.



ΕΙΚΟΝΑ 3.15: ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ TMRPres2D



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* είναι ένα οξυγαλακτικό βακτήριο με μεγάλη τεχνολογική και οικονομική σημασία. Κατά την παραγωγή τροφίμων εκτίθεται σε στρεσογόνες συνθήκες, και η απόκρισή του σε αυτές αποτελούσε και αποτελεί αντικείμενο μελέτης εδώ και πολλά χρόνια. Η κατανόηση των μηχανισμών ανθεκτικότητας και η εφαρμογή κατάλληλων τεχνικών, έτσι ώστε να μπορεί να επιτευχθεί η ανάπτυξη και η χρήση του ακόμα και σε απαγορευτικά στρεσογόνες συνθήκες, έχει να προσφέρει σημαντικά οφέλη στη βιομηχανία τροφίμων.

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν η δημιουργία και ο χαρακτηρισμός γενετικά τροποποιημένων στελεχών του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363, ώστε αυτά να καταστούν ανθεκτικά σε υπερωσμωτικές συνθήκες, με την εισαγωγή και ενσωμάτωση του θερμοευαίσθητου πλασμιδιακού φορέα pGh9:ISS1 στο χρωμόσωμά του. Στόχος ήταν επίσης η μελέτη και ο χαρακτηρισμός 5 μεταλλαγμένων στελεχών που είχαν προκύψει από προηγούμενες μελέτες.

Η απομόνωση νέων μεταλλαγμένων στελεχών δεν κατέστη εφικτή. Η ανάλυση που έγινε στα παλαιότερα μεταλλαγμένα στελέχη έδειξε πως το πλασμίδιο ενσωματώθηκε στο χρωμόσωμα του MG1363. Η κλωνοποίηση των σημείων ένωσης του πλασμιδίου με το χρωμόσωμα του MG1363 ήταν επιτυχής στα τέσσερα από τα πέντε μεταλλαγμένα στελέχη.

Μετά την αλληλούχηση των πλευρικών αλληλουχιών του γονιδιώματος των μεταλλαγμένων στελεχών, με εργαλεία βιοπληροφορικής έγινε σύγκριση των αλληλουχιών αυτών με γονίδια του MG1363. Εκτιμήθηκε η ακριβής θέση στην οποία ενσωματώθηκε το πλασμίδιο pGh9:ISS1 στο χρωμόσωμα του MG1363, που όπως αποδείχτηκε, διέκοψε ένα γονίδιο. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η ενσωμάτωση του πλασμιδίου διέκοψε το ίδιο γονίδιο και στα 4 μεταλλαγμένα στελέχη. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το γονίδιο αυτό είναι μία συντηρημένη υποθετική πρωτεΐνη. Αρχικά είχε λανθασμένα χαρακτηριστεί ότι κωδικοποιεί μία αιμολυσίνη,

βάσει όμως της παρούσας ανάλυσης η πρωτεΐνη αυτή φαίνεται να είναι ένας μεταφορέας ιόντων, ο οποίος μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα στο ωσμωτικό στρες. Με την απενεργοποίηση του γονιδίου που την κωδικοποιεί, υπάρχει μια ενδεχόμενη συσχέτιση με την επίδειξη ανθεκτικότητας του οργανισμού στο συγκεκριμένο στρες. Επίσης, το γεγονός ότι η πρωτεΐνη αυτή είναι διαδεδομένη σε πολλά οξυγαλακτικά βακτήρια υποδηλώνει ότι μπορεί να έχει παρόμοιο ρολό σε αυτά.

Μελλοντικά, θα μπορούσε να γίνει προσπάθεια απενεργοποίησης του γονιδίου (knock-out) ή υπερέκφρασής του, για τη μελέτη της επίδρασής στον MG1363 και τη συσχέτισή του με την ανθεκτικότητα στο ωσμωτικό στρες. Στα μελλοντικά σχέδια, επίσης, θα μπορούσαν να συμπεριληφθούν η κλωνοποίηση των σημείων ένωσης του πλασμιδίου με το χρωμόσωμα του MG1363 στο στέλεχος Osm7 και η περαιτέρω μελέτη του, όπως και η δημιουργία νέων μεταλλαγμένων στελεχών του MG1363. Η υλοποίηση των παραπάνω στόχων θα βοηθήσει στην απόκτηση πολύπλευρης και βαθύτερης γνώσης των μηχανισμών άμυνας που συμβάλλουν στην εκδήλωση ανθεκτικότητας του *L. lactis* ssp. *cremoris* στο ωσμωτικό στρες.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z. & Miller W. (1997)** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990)** Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* 215 (3): 403-410.
- Bennett-Lovsey R.M., Herbert A.D., Sternberg M.J.E. & Kelley L.A. (2008)** Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 70 (3): 611-625.
- Bouvier G., Bordes P., Romeo Y., Fourcans A., Bouvier I. & Gutierrez C. (2000)** Characterization of OpuA, a glycine-betaine uptake system of *Lactococcus lactis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2: 199-205
- Champomier-Verges M.C., Maguin E., Mistou M.Y., Anglade P. & Chich J.F. (2002)** Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 771: 329-42
- Csonka L.N. & Hanson A.D. (1991)** Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology, *Annual Review of Microbiology* 62: 259-261
- De Angelis M. & Gobbetti M. (2004)** Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics* 4(1): 106-122
- Earnshaw R.G., Appleyard J. & Hurst R.M. (1995)** Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *International Journal of Food Microbiology* 28: 197-219

- Gasson M.J. (1983)** Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO712 and other lactic Streptococci after protoplast-induced curing. *Journal of Bacteriology* 154: 1-9
- Glaasker E., Konings W.N. & Poolman B. (1996)** Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* 178: 575-582
- Gunn J.S. (2000)** Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes and Infection* 2: 907-913
- Hansen M.C., Nielsen A.K., Molin S., Hammer K., Kilstrup M., Palmer Jr R.J., Udsen C. & White D.C. (2001)** Changes in rRNA levels during stress invalidates results from mRNA blotting: fluorescence in situ rRNA hybridization permits renormalization for estimation of cellular mRNA levels. *Journal of Bacteriology* 183: 4747-4751
- ICMSF (1980)** *Microbial Ecology of Foods, Vol. 1: Factors affecting Life and Death of Microorganisms.* New York, Academic Press.
- Inone H., Nojima H. & Okayama H. (1990)** High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96, 23-28
- Joint FAO/WHO (2001)** *Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*
- Kilstrup M., Jacobsen S., Hammer K. & Vogensen F.K. (1997)** Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1826-1837
- Kleerebezem M., Beerthuyzen M.M., Vaughan E., de Vos W.M. & Kuipers O.P. (1997)** Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc* and *Lactobacillus* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4581-4584

- Klein G., Pack A. & Reuter G. (1998)** Antibiotic resistance patterns of Enterococci and occurrence of vancomycin-resistant Enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Appl. Environ. Microbiol* 64: 1825-1830
- Klein N. & Lortal S. (1999)** Attenuated starters: an efficient means to influence cheese ripening-a review. *International Dairy Journal* 9: 751-762
- Kok J., van der Vossen M.B. & Venema G. (1984)** Construction of plasmid cloning vectors for lactic Streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 48: 726-731
- Liu S., Asmundson R.V., Gopal P.K., Holland R. & Crow V.L. (1998)** Influence of reduced water activity on lactose metabolism by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* at different pH values. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2111-2116
- Lorca G.L. & Font de Valdez G. (2009)** *Lactobacillus* stress responses. In: Ljungh A., Waldstrom T. *Lactobacillus* molecular biology, Caister Academic Press, Norfolk
- Lucke F.K. (2000)** Utilization of microbes to process and preserve meats. *Meat Science*, 56, 105-115
- Maguin E., Prévost H., Ehrlich S.D. & Gruss A. (1996)** Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology* 178 (3): 931-935
- Maguin E., Duwat P., Hege T., Ehrlich S.D. & Gruss A. (1992)** New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology* 174: 5633-5638
- Neuhof W., Beck F.X. (2006)** Survival in Hostile Environments: Strategies of Renal Medullary Cells. *Physiology* Published 21(3): 171-180

- Obis D., Guillot A., Gripon J.C., Renault P., Bolotin A. & Mistou M.Y. (1999)** Genetic and biochemical characterization of a high-affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals a new functional organization within bacterial ABC transporters. *Journal of Bacteriology* 181: 6238-6246
- Orla-Jensen, S. (1942)** The Lactic Acid Bacteria. 2nd ed. Copenhagen: Ejnar Munksgaard
- Otto R., de Vos W.M. & Gravieli J. (1982)** Plasmid DNA in *Streptococcus cremoris* Wg2: influence of pH on selection of a variant lacking a protease plasmid. *Applied and Environmental Microbiology* 43: 1272-1277
- Pitcher D.G., Saunders, N.A. & Owen, R.J. (1989)** Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, 8, 151-156
- Poolman, B. & Glaasker E. (1998)** Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol Microbiol* 29(2): 397-407
- Romeo Y., Gutierrez C. & Mistou M.Y. (2003)** Osmoregulation in *Lactococcus lactis*. BusR, a transcriptional repressor of the glycine-betaine uptake system BusA, *Molecular Microbiology* 47: 1135-1147
- Romero D.A. & Klaenhammer T.R. (1993)** Transposable elements in Lactococci: a review, *Journal of Dairy Science* 76: 1-19
- Russel D.W. & Setchell K.D. (1992)** Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* 31: 4737-4749
- Schleifer K.H. and Ludwig W. (1995)** Phylogeny of the Genus *Lactobacillus* and Related Genera. *System. Appl. Microbiol.* 9: 461-467
- Shortt C. (1999)** The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends in Food Science & Technology* 10: 411-417

- Spano G. & Massa S. (2006)** Environmental stress response in wine lactic acid bacteria. Beyond *Bacillus subtilis*. *Critical Reviews in Microbiology* 32: 77-86
- Spyropoulos I.C., Liakopoulos T.D., Bagos P.G. & Hamodrakas S.J. (2004)** TMRPres2D: high quality visual representation of transmembrane protein models. *Bioinformatics* 20 (17): 3258-3260.
- Stiles M.E. & Holzappel W.H. (1997)** Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36: 1-29
- Stortz G. & Hengge-Aronis R. (2000)** *Bacterial Stress Responses* p. 485, ASM Press, Washington DC
- Sugimoto S., Abdullah Al M. & Sonomoto K. (2008)** Molecular chaperones in lactic acid bacteria: physiological consequences and biochemical properties. *J Biosci Bioeng* 106: 324-336
- Teixera P., Castro H., Mohacsi-Farkas C. & Kirby R. (1997)** Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. *Journal of Applied Microbiology* 83: 219-226
- Uguen P., Hamelin J., Le Pennec J.P. & Blanco C. (1999)** Influence of osmolarity and the presence of an osmoprotectant on *Lactococcus lactis* growth and bacteriocin production. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 291-293
- Van de Guchte M., Serror P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S.D. & Maguin E. (2002)** Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82: 187-216
- Van der Heide T. & Poolman B. (2000)** Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 7102-7106

- Van Hylckama V.J.E.T., Rademaker J.L.W., Bachmann H., Molenaar D., Kelly W.J. & Siezen R.J. (2006)** Natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis*. *Current Opinion on Biotechnology* 17: 183-190
- Van Kranenburg R., Kleerebezem M., van Hylckama V., Ursing B.M., Boekhorst J., Smit B.A., Ayad E.H.E., Smit G. & Siezen R.J. (2002)** Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal* 12: 111-121
- Von Wright A. and Axelsson L. (2011)** Lactic Acid Bacteria: An Introduction. In: Salminen S., von Wright A., Lahtinen S., Ouwehand A. (eds.) *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*. CBC Press 2012. Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, USA
- Wegman U., O'Connell-Motherway M., Zomer A., Buist G., Shearman C., Canchaya C., Ventura M., Goesmann A., Gasson M.J., Kuipers O.P., van Sinderen D. & Kok J. (2007)** Complete Genome Sequence of the Prototype Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Journal of Bacteriology* 189: 3256-3270
- Yousef A.E. and Courtney P.D. (2003)** *Basics of Stress Adaptation and Implications in New-Generation Foods*. CRC Press LLC
- Zdobnov E.M. & Apweiler R. (2001)** InterProScan – an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics* 17 (9): 847-848
- Μπατρίνου Α.Μ. (2011)** Σύγχρονη Βιοτεχνολογία Τροφίμων. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη