

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑΣ

ΝΕΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΑΠΟ
ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΑ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΤΥΡΙΑ -
ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ,
ΤΩΝ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΚΑΙ
ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

που υποβλήθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΙΩΑΝΝΑ-ΑΡΕΤΗ ΑΣΤΕΡΗ

Γεωπόνος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

ΑΘΗΝΑ 2011

*Αφιερώνεται στη μητέρα μου και τον πατέρα μου,
στις αδελφές μου Έφη και Νίκη
και στον Ανάγνο,
διότι χάρις την αγάπη και συμπαράσταση τους
ολοκληρώθηκε αυτή η διδακτορική διατριβή*

Ευχαριστίες

Ενώ η σελίδα με τις Ευχαριστίες είναι η πρώτη μιας διδακτορικής διατριβής, είμαι σίγουρη ότι για τους περισσότερους υποψήφιους διδάκτορες αυτή είναι η τελευταία σελίδα που γράφουν. Θεωρώ ότι σε όλη τη διάρκεια της πραγματοποίησης και της συγγραφής ενός διδακτορικού ο/η υποψήφιος σκέφτεται αυτή τη σελίδα. Έτσι λοιπόν και εγώ έφτασα σε αυτή τη σελίδα, όπου πρέπει να κοιτάξω πίσω σε αυτά τα χρόνια που πέρασα στο εργαστήριο.

Ο πρώτος άνθρωπος που ευχαριστώ είναι η καθηγήτρια μου Έφη Τσακαλίδου και οι λόγοι είναι πολλοί. Καταρχάς μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με την έρευνα από τη πρώτη στιγμή που μπήκα στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας το 2002. Μαζί της έκανα τη προπτυχιακή μου μελέτη, τη μεταπτυχιακή μου μελέτη αλλά και το διδακτορικό μου. Όλα αυτά τα χρόνια μου έμαθε πολλά πράγματα, από ερευνητικά θέματα, όπως το πώς να προσεγγίζω και να πραγματοποιώ το πείραμά μου, πώς να αναλύω τα αποτελέσματά μου, πώς να λειτουργώ μέσα στο εργαστήριο, αλλά κυρίως μου έμαθε να αγαπάω αυτό που κάνω, να το κάνω σωστά, προσεκτικά, με 'μεράκι'. Είναι αυτή που με πήγε κατά κάποιο τρόπο 'με το ζόρι' στη Νέα Ζηλανδία για την πραγματοποίηση μέρους των πειραμάτων. Αλλά το ταξίδι αυτό άλλαξε τη ζωή μου. Και δεν μπορώ με λέξεις να εκφράσω το πόσο τέλεια ήταν η εμπειρία, σίγουρα όμως το χρωστάω σε αυτήν. Θέλω να την ευχαριστήσω για την υποστήριξη και τη βοήθεια που μου πρόσφερε όλα αυτά τα χρόνια σε όλους τους τομείς, για το γεγονός ότι ήταν πρόθυμη ανά πάσα στιγμή να συζητήσουμε οποιοδήποτε θέμα με απασχολούσε, για την κατανόησή της σε στιγμές που εγώ δεν απέδιδα, αλλά και για τις στιγμές που πίστευε σε εμένα πιο πολύ και από ότι εγώ η ίδια στον εαυτό μου.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Βοργιά, τόσο ως μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής όσο και για το γεγονός ότι μου έδωσε απλόχερα την ευκαιρία να πραγματοποιήσω στο Εργαστήριό του ένα μεγάλο μέρος της παρούσας διατριβής, να μάθω νέες μεθόδους, να εξοικειωθώ με ένα εργαστήριο μοριακής βιολογίας και να αποκτήσω νέες εμπειρίες και προσανατολισμούς όσον αφορά την έρευνα.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Γεώργιο - Ιωάννη Νυχά, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, ο οποίος οποτεδήποτε χρειάστηκα τη βοήθειά του ανταποκρίθηκε άμεσα και επιπλέον μου έδωσε πρόσβαση στο Εργαστήριό του για την πραγματοποίηση αρκετών πειραμάτων.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Μόσχο Πολυσιού, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Μουντζούρη, τον Λέκτορα κ. Ιορδάνη Χατζηπαυλίδη και τον Λέκτορα κ. Αναστάσιο Ακτύπη, για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην κρίση του διδακτορικού μου.

Ιδιαίτερα, θέλω να πω πολλά ευχαριστώ στον Δρ. Κωνσταντίνο Παπαδημητρίου. Με τον Κώστα αρχίσαμε να συνεργαζόμαστε σε μια περίοδο που το διδακτορικό μου βρίσκονταν σε μια κρίσιμη καμπή. Αυτός μου πρότεινε τη λύση, την οποία και ακολουθήσαμε και η οποία απέδωσε. Η ολοκλήρωση του διδακτορικού μου οφείλεται σε μεγάλο βαθμό σε αυτόν. Οι γνώσεις που μου μετέδωσε θεωρώ ότι είναι άπειρες. Με βοήθησε να προσεγγίσω και να κατανοήσω διάφορα πεδία της έρευνας που μέχρι εκείνη τη στιγμή μου φαίνονταν μακρινά και απρόσιτα. Ο Κώστας είναι αυτός που με έφερε σε επαφή με το Εργαστήριο του κ. Βοργιά. Εκεί γνώρισα τη Δρ. Ευφροσύνη Μπούτου, την οποία θέλω να ευχαριστήσω επίσης. Η Φρόσω μοιράστηκε τις γνώσεις της μαζί μου ακόμα και σε στιγμές που δεν είχε το χρόνο και έπρεπε να την συναντώ στο Λαϊκό Νοσοκομείο όπου εργάζεται πλέον.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας, αλλά κυρίως τη Ράνια Αναστασίου, τη Μαρίνα Γεωργαλάκη, τη Μαρίνα Παπαδέλη και τη Γεωργία Ζουμποπούλου, οι οποίες με βοήθησαν πολύ, τόσο στα πειράματα όσο και με την παρουσία τους στο εργαστήριο. Με στήριξαν και ήταν πάντα πρόθυμες να συζητήσουμε οποιοδήποτε θέμα με απασχολούσε, ερευνητικό ή προσωπικό. Ακόμα θέλω να ευχαριστήσω την Ευγενία Μανολωπούλου, τον Τάσο Ακτύπη, την Γκόλφω Μοάτσου, την Καίτη Μοσχοπούλου και τον Πέτρο Μαραγκουδάκη, καθώς εκτός από την βοήθειά τους στις πειραματικές διαδικασίες, ακόμα και η ζεστή 'Καλημέρα' που αντάλλασα το πρωί μαζί τους ήταν πολύ σημαντική και ενθαρρυντική για μένα.

Θέλω να ευχαριστήσω ακόμη τους φίλους μου στη Νέα Ζηλανδία, και ιδιαίτερα τον Dr. Ross Holland και τον Dr. Tim Coolbear, (Principal Research Scientists στην εταιρεία Fonterra Co-operative Group Limited, Pamlerston North, Νέα Ζηλανδία), για τις πολύτιμες συμβουλές και συζητήσεις όσον αφορά το επιστημονικό κομμάτι, αλλά και γιατί έκαναν τα πάντα για να περάσω υπέροχα τους μήνες που έμεινα στην αγαπημένη αυτή χώρα. Παρά το γεγονός ότι βρισκόμουν στην άλλη άκρη του κόσμου με έκαναν να νιώθω σαν να είμαι στο σπίτι μου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην εταιρεία Fonterra που με φιλοξένησε αλλά και σε όλους τους ανθρώπους της, με τους οποίους συνεργάστηκα κατά τη διάρκεια της παραμονής μου στο Palmerston North, στη Νέα Ζηλανδία, τη Nicky Robertson, τον Paul Andrewes, την Stephanie Harvey, την

Sophia Stathopoulos και την Marie-Laure Delabre, αλλά και τους τυροκόμους τον Bruce και τον Garry.

Στην διάρκεια αυτών των χρόνων έφυγαν δυο εξαιρετικοί άνθρωποι, με τους οποίους είχα την τύχη να συνεργαστώ και στους οποίους θα ήθελα να αναφερθώ. Ο πρώτος είναι ο Καθηγητής Γιάννης Κανδαράκης, ένας καλός άνθρωπος, πάντα με το χαμόγελο, από τον οποίο δεν θα ξεχάσω ποτέ τις φιλικές συζητήσεις μαζί του όταν συναντιόμασταν στους διαδρόμους του εργαστηρίου, κυρίως τα απογεύματα. Ο δεύτερος είναι ο Dr. Vaughan Crow, ένας ‘γκουρού’ της βιοχημείας των τυριών, ένας άνθρωπος ερωτευμένος με αυτό που έκανε, πάντα χαμογελαστός, που με το χαρακτήρα του έκανε τους πάντες να νιώθουν υπέροχα.

Ιδιαίτερη μνεία θα ήθελα να κάνω και στο Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ), για την οικονομική στήριξη που μου προσέφερε κατά την εκπόνηση αυτής της διατριβής.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους, τη μητέρα μου Μαρί και τον πατέρα μου Βασίλη, τις αδελφές μου Έφη και Νίκη και τις οικογένειές τους (τον Θανάση, τον Κώστα, την Κωνσταντίνα, την Ελένη και την Βασιλική) και κυρίως τον Ανάγνο για την αγάπη και την υποστήριξη που πάντα μου δείχνουν. Αλλά και για την κατανόηση και υπομονή που είχαν απέναντι μου τις στιγμές που ήμουν κουρασμένη και απογοητευμένη. Ελπίζω με την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης να τους έκανα να νιώσουν υπερήφανοι για μένα.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

- Ε. Τσακαλίδου (Καθηγήτρια ΓΠΑ, Επιβλέπουσα)**
Κ. Βοργιάς (Καθηγητής ΕΚΠΑ, μέλος)
Γ.-Ι. Νυχάς (Καθηγητής ΓΠΑ, μέλος)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

- Ε. Τσακαλίδου (Καθηγήτρια ΓΠΑ)**
Κ. Βοργιάς (Καθηγητής ΕΚΠΑ)
Γ.-Ι. Νυχάς (Καθηγητής ΓΠΑ)
Μ. Πολυσίου (Καθηγητής ΓΠΑ)
Κ. Μουντζούρης (Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ)
Ι. Χατζηπαυλίδης (Λέκτορας ΓΠΑ)
Α. Ακτύπης (Λέκτορας ΓΠΑ)

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ
ΠΟΥ ΠΡΟΕΚΥΨΑΝ
ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- 1. Asteri, I.-A.,** Robertson, N., Kagkli, D.-M., Andrewes, P., Nychas, G.-J., Coolbear, T., Holland, R., Crow, V., & Tsakalidou, E. 2009. Technological and flavour potential of cultures isolated from traditional Greek cheeses - A pool of novel species and starters. *International Dairy Journal*, 19(10), 595-604.
- 2. Asteri, I.-A.,** Kittaki, N., & Tsakalidou, E. 2010. The effect of wild lactic acid bacteria on the production of goat's milk soft cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 63(2), 234-242.
- 3. Asteri, I.-A.,** Papadimitriou, K., Boutou, E., Pot, B., Vorgias, C. E., & Tsakalidou, E. 2010. Characterization of pLAC1, a cryptic plasmid isolated from *Lactobacillus acidipiscis* and comparative analysis with its related plasmids. *International Journal of Food Microbiology*, 141(3), 222-228.
- 4. Asteri, I.-A.,** Papadimitriou, K., Boutou, E., Pot, B., Vorgias, C. E., & Tsakalidou, E. 2011. Comparative and evolutionary analysis of plasmid pREN isolated from *Lactobacillus rennini*, a novel member of the theta-replicating pUCL287 family. *FEMS Microbiology Letters*. 2011 Feb 3. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02232.x. [Epub ahead of print] (in press).
- 5. Asteri, I.-A.,** Boutou, E., Anastasiou, R., Pot, B., Vorgias, C. E., Tsakalidou, E., & Papadimitriou, K. 2011. Characterization of plasmid pPS1 isolated from *Pediococcus pentosaceus*: *In silico* evidence for the horizontal gene transfer of the σ^B -regulated in Gram-positive bacteria *gsiB* to lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, (in press).
- 6. Asteri, I.-A.,** Boutou, E., Vorgias, C. E., Tsakalidou, E., & Papadimitriou, K. Identification of mannose and sorbose as novel osmolytes for *Lactobacillus acidipiscis*. (in preparation).

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ

- 1. Asteri, I.-A.,** Kittaki, N., & Tsakalidou, E. 2005. From Formaella Arachovas cheese to goat's milk cheese through the isolation, characterization and selection of new lactic acid bacteria strains. 8th Symposium on Lactic Acid Bacteria, Egmond aan Zee, The Netherlands.
- 2. Asteri, I.-A.,** Robertson, N., Kagkli, D.-M., Nychas, G.-J., Crow, V., Holland, R., & Tsakalidou, E. 2008. Salt loving lactobacilli in traditional greek cheeses. 1st National MikroBioKosmos Society Conference, Athens, Greece.
- 3. Asteri, I.-A.,** Papadimitriou, K., Boutou, E., Vorgias, C., & Tsakalidou, E. 2008. Differential gene expression of *Lactobacillus acidipiscis* under osmotic stress conditions assessed by RNA arbitrarily primed PCR. 1st National MikroBioKosmos Society Conference, Athens, Greece.
- 4. Asteri, I.-A.,** Papadimitriou, K., Boutou, E., Anastasiou, R., Vorgias, C., & Tsakalidou, E. 2009. Sequencing and characterization of the novel cryptic plasmid pPS1 carrying a general stress protein isolated from *Pediococcus pentosaceus*. 60th National Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB), Athens, Greece.
- 5. Asteri, I.-A.,** Boutou, E., Anastasiou, R., Pot, B., Vorgias, C., Tsakalidou, E., & Papadimitriou, K. 2010. Characterization of plasmid pREN isolated from *Lactobacillus rennini*, a novel member of the theta-replicating pUCL287 family. 61th National Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB), Alexandroupoli, Greece.
- 6. Asteri, I.-A.,** Boutou, E., Vorgias, C., Tsakalidou, E., & Papadimitriou, K. 2010. Identification of mannose and sorbose as novel osmolytes for *Lactobacillus acidipiscis*. 61th National Conference of the Hellenic Society for Biochemistry and Molecular Biology (HSBMB), Alexandroupoli, Greece.
- 7. Asteri, I.-A.,** Kittaki, N., & Tsakalidou, E. 2011. The effect of wild lactic acid bacteria in the production of soft goat's milk cheese. IDF International Symposium on Sheep, Goat and other non-Cow Milk, Athens, Greece.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή</u>	1
<u>1.1. Οξυγαλακτικά βακτήρια</u>	2
1.1.1. Γενικά χαρακτηριστικά της φυσιολογίας των οξυγαλακτικών βακτηρίων	2
1.1.2. Ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων	3
1.1.3. Λειτουργικότητα και εφαρμογές οξυγαλακτικών βακτηρίων	4
Εναρκτήριες και μη εναρκτήριες καλλιέργειες οξυγαλακτικών βακτηρίων	4
Λειτουργικά οξυγαλακτικά βακτήρια	6
1.1.4. Βασικά χαρακτηριστικά του μεταβολισμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων	7
Μεταβολισμός σακχάρων	7
Πρωτεολυτικό σύστημα	10
Λιπόλυτικό σύστημα	13
<u>1.2. Οξυγαλακτικά βακτήρια σε συνθήκες στρες</u>	14
1.2.1. Θερμικό στρες	15
1.2.2. Ψυχρό στρες	16
1.2.3. Οξινό στρες	16
1.2.4. Οξειδωτικό στρες	17
1.2.5. Ασιτία	18
1.2.6. Ωσμωτικό στρες	19
<u>1.3. Πλασμιδιακό DNA οξυγαλακτικών βακτηρίων</u>	21
1.3.1. Γενικά στοιχεία της βιολογίας των πλασμιδίων	21
1.3.2. Μηχανισμοί αντιγραφής των πλασμιδίων	23
Μηχανισμός θήτα αντιγραφής	24
Μηχανισμός κυλιόμενης αντιγραφής	25

1.3.3. Σημασία των πλασμιδίων στα οξυγαλακτικά βακτηρία	27
Πλασμίδια του γένους <i>Lactobacillus</i>	28
Πλασμίδια του γένους <i>Lactococcus</i>	30
Πλασμίδια του γένους <i>Streptococcus</i>	30
Πλασμίδια του γένους <i>Enterococcus</i>	31
Πλασμίδια του γένους <i>Leuconostoc</i>	31
Πλασμίδια του γένους <i>Oenococcus</i>	32
Πλασμίδια του γένους <i>Pediococcus</i>	32
Πλασμίδια του γένους <i>Tetragenococcus</i>	32

1.4. Σκοπός και διάρθρωση της μελέτης

33

Βιβλιογραφία	36
--------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Τεχνολογικό δυναμικό ‘άγριων’ οξυγαλακτικών βακτηρίων απομονωμένων από παραδοσιακά Ελληνικά τυριά

41

2.1. Εισαγωγή

42

2.2. Υλικά και μέθοδοι

43

2.2.1. Καταμέτρηση μικροβιακών πληθυσμών και απομόνωση νέων στελεχών	43
2.2.2. Χαρακτηρισμός στελεχών	45
2.2.3. Οξυπαραγωγική ικανότητα σε γάλα	46
2.2.4. Πρωτεολυτική δραστικότητα	46
2.2.5. Πεπτιδολυτική δραστικότητα	47
2.2.6. Λιπολυτική δραστικότητα	47
2.2.7. Εστερολυτική δραστικότητα	48
2.2.8. Καταβολισμός του κιτρικού οξέος	48
2.2.9. Αντιμικροβιακή δράση	48
2.2.10. Αιμολυτική δράση	49

2.2.11. Προσδιορισμός των πτητικών μεταβολιτών με ανάλυση αέριας χρωματογραφίας - φασματομετρίας μαζών (GC-MS)	49
2.2.12. Προσδιορισμός του προφίλ των πτητικών μεταβολιτών με ανάλυση ‘ηλεκτρονικής μύτης’ - φασματομετρίας μαζών (e-nose MS)	50
2.2.13. Στατιστική ανάλυση	50
<u>2.3. Αποτελέσματα και συζήτηση</u>	50
2.3.1. Καταμέτρηση της μικροχλωρίδας των τυριών και απομόνωση νέων στελεχών	51
2.3.2. Οξυπαραγωγική ικανότητα στο γάλα	58
2.3.3. Πρωτεολυτική και πεπτιδολυτική δραστικότητα	59
2.3.4. Λιπολυτική και εστερολυτική δραστικότητα	61
2.3.5. Μεταβολισμός κιτρικού οξέος, αντιμικροβιακή και αιμολυτική δράση	62
2.3.6. Παραγωγή πτητικών ενώσεων	63
<u>2.4. Συμπεράσματα</u>	67
Βιβλιογραφία	68
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Η επίδραση ‘άγριων’ οξυγαλακτικών βακτηρίων στην παραγωγή γίδινου μαλακού τυριού</u>	71
<u>3.1. Εισαγωγή</u>	72
<u>3.2. Υλικά και μέθοδοι</u>	74
3.2.1. Βακτηριακά στελέχη και θρεπτικά υποστρώματα	74
3.2.2. Τυροκόμηση γίδινου γάλακτος και δειγματοληψίες	74
3.2.3. Μικροβιολογικές αναλύσεις	75
3.2.4. Φυσικοχημικές αναλύσεις	75
3.2.5. Οργανοληπτικός έλεγχος	77

3.2.6. Στατιστική ανάλυση	78
---------------------------	----

<u>3.3. Αποτελέσματα και συζήτηση</u>	78
--	----

3.3.1. Δυναμική της μικροχλωρίδας στο γίδινο τυρί	78
---	----

3.3.2. Αλλαγές των φυσικοχημικών παραμέτρων κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του γίδινου τυριού	80
---	----

3.3.3. Οργανοληπτικός έλεγχος	87
-------------------------------	----

<u>3.4. Συμπεράσματα</u>	89
---------------------------------	----

Βιβλιογραφία	90
--------------	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

<u>Μελέτη της διαφορικής έκφρασης γονιδίων του <i>Lactobacillus acidipiscis</i> σε συνθήκες οσμωτικού στρες με τη μέθοδο RAP-PCR και χαρακτηρισμός της μαννόζης και της σορβόζης ως νέων ωσμωλυτών για τον <i>Lactobacillus acidipiscis</i></u>	93
--	----

<u>4.1. Εισαγωγή</u>	94
-----------------------------	----

<u>4.2. Υλικά και μέθοδοι</u>	95
--------------------------------------	----

4.2.1. Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες ανάπτυξης	95
--	----

4.2.2. Απομόνωση ολικού RNA από τα κύτταρα του <i>Lb. acidipiscis</i>	95
---	----

4.2.3. Σύνθεση της πρώτης αλυσίδας του συμπληρωματικού DNA	96
--	----

4.2.4. Ενίσχυση του συμπληρωματικού DNA με PCR	97
--	----

4.2.5. Ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης RAP-PCR	97
---	----

4.2.6. Απομόνωση των προϊόντων RAP-PCR	97
--	----

4.2.7. Κλωνοποίηση και προσδιορισμός της αλληλουχίας των προϊόντων RAP-PCR	98
--	----

4.2.8. Επιβεβαίωση των διαφορικής έκφρασης γονιδίων με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR)	99
4.2.9. Μελέτη της κινητικής ανάπτυξης του <i>Lb. acidipiscis</i>	101
4.2.10. Μέτρηση της ενεργότητας του ενζυμικού συστήματος της φωσφοτρανσφεράσης μαννόζης/σορβόζης που εξαρτάται από το φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό οξύ (PEP-PTS)	101
<u>4.3. Αποτελέσματα και συζήτηση</u>	103
4.3.1. Μελέτη των μεταγραφικών αλλαγών κυττάρων του <i>Lb. acidipiscis</i> σε ισο- και υπερ-ωσμωτικές συνθήκες με τη μέθοδο RAP-PCR	104
4.3.2. Ταυτοποίηση πιθανών γονιδίων που συνδέονται με την ανθεκτικότητα του <i>Lb. acidipiscis</i> σε συνθήκες ωσμωτικού στρες	105
4.3.3. Επιβεβαίωση των διαφορικής έκφρασης των γονιδίων με τη μέθοδο RT-PCR	116
4.3.4. Η μαννόζη/σορβόζη ως πιθανοί ωσμωλύτες για τον <i>Lb. acidipiscis</i>	117
4.3.4. Ενζυμική ενεργότητα του συστήματος PEP-PTS μαννόζης/σορβόζης	124
<u>4.4. Συμπεράσματα</u>	126
Βιβλιογραφία	127
<u>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5</u>	
<u>Διερεύνηση του πλασμιδιακού προφίλ οξυγαλακτικών βακτηρίων των ειδών <i>Lactobacillus acidipiscis</i>, <i>Lactobacillus rennini</i> και <i>Pediococcus pentosaceus</i></u>	131
<u>5.1. Εισαγωγή</u>	132
<u>5.2. Υλικά και μέθοδοι</u>	134
5.2.1. Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες ανάπτυξης	134

5.2.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	135
5.2.3. Πέψεις του πλασμιδιακού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, αντιδράσεις σύνδεσης των μορίων DNA και κλωνοποίηση	136
5.2.4. Βιοπληροφορική ανάλυση της αλληλουχίας των πλασμιδίων και σχολιασμός πιθανών γονιδίων	138
5.2.5. Στοιχίση πολλαπλών αλληλουχιών και φυλογενετική ανάλυση	139
5.2.6. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής συνδεδεμένη με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Reverse Transcription - Polymerase Chain reaction, RT-PCR)	139
5.2.7. Υβριδισμός κατά Southern για την ανίχνευση μονόκλωνων μορίων DNA (single-stranded DNA - ssDNA)	140
5.2.8. Προσδιορισμός του σχετικού αριθμού αντιγράφων των πλασμιδιακών μορίων	140
<u>5.3. Αποτελέσματα και συζήτηση</u>	142
<u>5.3.1. Χαρακτηρισμός του πλασμιδίου pLAC1 του Lactobacillus acidipiscis ACA-DC 1533</u>	142
5.3.1.1. Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και σχολιασμός του pLAC1	142
5.3.1.2. Συγκριτική ανάλυση του pLAC1 με τα συγγενικά του πλασμίδια	148
5.3.1.3. Ανίχνευση μονόκλωνων μορίων DNA με εφαρμογή του υβριδισμού κατά Southern	152
5.3.1.4. Προσδιορισμός του αριθμού αντιγράφων του pLAC1	153
5.3.1.5. Συμπεράσματα	154
<u>5.3.2. Χαρακτηρισμός του πλασμιδίου pREN του Lactobacillus rennini ACA-DC 1534</u>	155
5.3.2.1. Ανάλυση της αλληλουχίας του πλασμιδίου pREN	155
5.3.2.2. Χαρακτηριστικά του σημείου έναρξης αντιγραφής (ori) της οικογένειας πλασμιδίων pUCL287 που πολλαπλασιάζονται με μηχανισμό θήτα	159

5.3.2.3. Συγκριτική ανάλυση του <i>pREN</i> με μέλη της <i>pUCL287</i> οικογένειας πλασμιδίων θήτα αντιγραφής και εξελικτικές προεκτάσεις	162
5.3.2.4. Συμπεράσματα	166
<u>5.3.3. Χαρακτηρισμός του πλασμιδίου <i>pPS1</i> του <i>Pentosaceus pentosaceus</i> ACA-DC 3431 και <i>in silico</i> απόδειξη της οριζόντιας μεταφοράς του <i>σB</i> ρυθμιζόμενου γονιδίου <i>gsiB</i> στα οξυγαλακτικά βακτήρια</u>	167
5.3.3.1. Χαρακτηρισμός και ανάλυση της αλληλουχίας του πλασμιδίου <i>pPS1</i>	167
5.3.3.2. <i>In silico</i> ανάλυση της πρωτεΐνης <i>GsiB</i> του πλασμιδίου <i>pPS1</i>	
5.3.3.3. Η οριζόντια μεταφορά του γονιδίου <i>gsiB</i> στα οξυγαλακτικά βακτήρια	171
5.3.3.4. Η ριφαμπικίνη προκαλεί την αφαίρεση του πλασμιδίου <i>pPS1</i>	177
5.3.3.5. Ο σχετικός αριθμός αντιγράφων του πλασμιδίου <i>pPS1</i>	178
5.3.3.6. Συμπεράσματα	179
Βιβλιογραφία	181
<u>Περίληψη</u>	187
<u>Abstract</u>	192

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Οξυγαλακτικά βακτήρια

Ο άνθρωπος χρησιμοποιούσε τους μικροοργανισμούς στην εμπειρική παρασκευή διαφόρων ζυμούμενων τροφίμων για πολλές χιλιάδες χρόνια. Παρά το γεγονός ότι δεν γνώριζε από την αρχή την ύπαρξή τους, γνώριζε πολύ καλά το αποτέλεσμα της δράσης τους. Στα μέσα του 19^{ου} αιώνα, η κατάσταση αυτή άλλαξε. Όλα άρχισαν το 1857, με τη δημοσίευση των αποτελεσμάτων της έρευνας του Γάλλου βιοχημικού Louis Pasteur που αποδείκνυαν ότι οι ζυμώσεις είναι αποτέλεσμα της δράσης μικροοργανισμών. Λίγα χρόνια αργότερα, το 1878, ο Joseph Lister κατάφερε να απομονώσει το πρώτο βακτήριο που ήταν υπεύθυνο για την οξίνιση του γάλακτος. Έκτοτε ξεκίνησε μια προσπάθεια απομόνωσης και μελέτης διαφόρων μικροοργανισμών με σκοπό να χρησιμοποιηθούν στην παρασκευή τυριών αλλά και άλλων τροφίμων ζύμωσης. Η έρευνα αυτή συνεχίζεται ακόμα και σήμερα.

Σε παγκόσμιο επίπεδο τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid bacteria, LAB) συνιστούν την πλειονότητα των εμπορικών εναρκτήριων καλλιεργειών τόσο σε ποσότητα όσο και σε αξία, με τη μέγιστη χρήση τους να αφορά τη βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων (Hansen, 2002). Για το λόγο αυτό οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι πλέον από τους καλύτερα μελετημένους. Η ομάδα των οξυγαλακτικών βακτηρίων παρουσιάζει υψηλή ποικιλομορφία και περιλαμβάνει ένα μεγάλο αριθμό γενών και ειδών, τα οποία απαντώνται σε πολλά οικοσυστήματα, όπως στα ζυμούμενα τρόφιμα, στην αναπνευστική, εντερική και γενετική οδό του ανθρώπου και των ζώων, στα νερά των υπονόμων και στα αποσυντιθέμενα φυτικά υλικά.

1.1.1. Γενικά χαρακτηριστικά της φυσιολογίας των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Σε μια κλασική προσέγγιση, ο Orla-Jensen (1942) όρισε τα οξυγαλακτικά βακτήρια ως θετικούς κατά Gram, μη σποριογόνους οργανισμούς (ραβδία ή κόκκους) που ζυμώνουν τους υδατάνθρακες και τις ανώτερες αλκοόλες κυρίως προς γαλακτικό οξύ. Για τις σύγχρονες προσεγγίσεις, οι οποίες λαμβάνουν υπόψη φυλογενετικές αναλύσεις και μοριακές τεχνικές, αυτός ο ορισμός θεωρείται μονοσήμαντος. Παρόλα αυτά παραμένει γενικά αποδεκτός (Axelsson, 2004, Stiles & Holzapfel 1997).

Σήμερα πλέον γνωρίζουμε ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι μη αερόβιοι αλλά αερο-ανθεκτικοί μικροοργανισμοί, δεν διαθέτουν κυτοχρώματα και είναι αρνητικοί στη δοκιμή της καταλάσης. Στην πλειοψηφία τους δεν είναι ικανοί για

κίνηση, με εξαίρεση μεμονωμένες περιπτώσεις βακίλλων που φέρουν περίτριχα μαστίγια. Η αναλογία G+C (γουανίνη + κυτοσίνη) στο μόριο του DNA τους είναι μικρότερη του 55% (Axelsson, 2004, Klein *et al.*, 1998).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης μεταξύ 30-40° C. Είναι ανθεκτικά στα οξέα (έχει σημειωθεί ανάπτυξη ορισμένων ειδών ακόμα και σε pH 3.5) αν και έχουν βέλτιστη τιμή ανάπτυξης την ελαφρώς όξινη περιοχή (5.0-7.0). Στην αλκαλική περιοχή ο ρυθμός ανάπτυξής τους μειώνεται σημαντικά (Tannock, 1999).

Κατά την εξελικτική προσαρμογή τους σε οικολογικούς θώκους πλούσιους σε θρεπτικά συστατικά μειώθηκαν δραστικά οι βιοσυνθετικές τους ικανότητες. Ως αποτέλεσμα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν σύνθετες διατροφικές ανάγκες, και συγκεκριμένα έχουν αυξημένες απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά, όπως είναι οι βιταμίνες, κυρίως της ομάδας Β (πανθοθενικό οξύ, θειαμίνη, φολικό οξύ, νικοτινικό οξύ και βιοτίνη), τα αμινοξέα, οι πουρίνες και οι πυριμιδίνες, τα ανόργανα συστατικά κ.α. (Pfeiler & Klaenhammer, 2007).

Τέλος, ο μεταβολισμός τους είναι αυστηρά ζυμωτικός και η παραγωγή του ATP πραγματοποιείται μέσω της φωσφορυλίωσης σε επίπεδο υποστρώματος και των ΑΤΡασών της κυτταροπλασματικής μεμβράνης (Law, 1997). Χρησιμοποιούν τα σάκχαρα ως πηγή άνθρακα και κυρίως τη λακτόζη και τη γλυκόζη, για την παραγωγή ενός αριθμού προϊόντων με κυριότερο το γαλακτικό οξύ (ομοζυμωτικά) ή το γαλακτικό οξύ, το CO₂, την αιθανόλη ή/και το οξικό οξύ (ετεροζυμωτικά).

1.1.2. Ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Για πολλές δεκαετίες, η ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων βασίζονταν στα μορφολογικά και φαινοτυπικά χαρακτηριστικά τους. Παρόλα αυτά, η εξέλιξη των μοριακών μεθόδων και ο συνεχής εμπλουτισμός των βάσεων δεδομένων με αλληλουχίες 16S rRNA γονιδίων προκάλεσαν μεγάλες αλλαγές στη συστηματική των βακτηρίων. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ανήκουν στην τάξη *Lactobacillales* της κλάσης *Bacilli* του φύλου *Firmicutes* (Garrity & Holt, 2001). Γενικά, αποτελούν μια ομάδα βακτηρίων που επεκτείνεται ταχέως και επί του παρόντος περιλαμβάνει έξι οικογένειες και περίπου 40 γένη, γεγονός που απεικονίζει και τη μεγάλη ποικιλομορφία των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Συγκεκριμένα, έχουν περιγραφεί 7 γένη για την οικογένεια *Aerococcaceae*, 16 γένη για την οικογένεια *Carnobacteriaceae*, 7 γένη για την οικογένεια *Enterococcaceae*, 3 γένη για την

οικογένεια *Lactobacillaceae*, 4 γένη για την οικογένεια *Leuconostocaceae* και 3 γένη για την οικογένεια *Streptococcaceae*.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που σχετίζονται με τα τρόφιμα ανήκουν κυρίως στα γένη *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus* και *Carnobacterium*. Το γένος *Bifidobacterium*, αν και φυλογενετικά ανήκει στο φύλο *Actinobacteria*, εξετάζεται συνήθως με τα οξυγαλακτικά βακτήρια λόγω της στενής του συγγένειας με αυτά όσον αφορά τις φυσιολογικές και βιοχημικές ιδιότητες, αλλά και γιατί απαντάται στα ίδια οικοσυστήματα, όπως για παράδειγμα το γαστρεντερικό σύστημα (Vandamme *et al.*, 1996).

Η κατάταξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι υπό συνεχή εξέλιξη. Ο μεγάλος αριθμός των ειδών που έχουν ήδη περιγραφεί, η συνεχής απομόνωση νέων στελεχών παγκοσμίως και η βιο-διαφοροποίηση που αυτά παρουσιάζουν απαιτεί την εφαρμογή πολυφασικών ταξινομικών προσεγγίσεων.

1.1.3. Λειτουργικότητα και εφαρμογές οξυγαλακτικών βακτηρίων

Τα οξυγαλακτικά είναι τα πιο σημαντικά βακτήρια για τις ζυμώσεις τροφίμων είτε αυτές αφορούν τα γαλακτοκομικά προϊόντα, είτε άλλα τρόφιμα, όπως τα ζυμούμενα προϊόντα κρέατος, τα ζυμούμενα λαχανικά, τα ζυμούμενα δημητριακά και το κρασί. Οι καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται στις ζυμώσεις πρέπει να καλύπτουν προδιαγραφές από την άποψη τόσο της ασφάλειας όσο και της τεχνολογικής απόδοσης. Επιπλέον, ανάλογα με τη συγκεκριμένη εφαρμογή (είδος τροφίμου) σημασία έχουν οι εξειδικευμένες ιδιότητες αυτών των μικροοργανισμών. Ως εκ τούτου, τα κριτήρια επιλογής των καλλιεργειών εξαρτώνται από τα χαρακτηριστικά της πρώτης ύλης, από τον τύπο και τα επιθυμητά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος καθώς και την εφαρμοζόμενη τεχνολογία. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια διαθέτουν ένα μακρόχρονο και ασφαλές ιστορικό εφαρμογής στα τρόφιμα (Caplice & Fitzgerald, 1999). Στη συνέχεια του κειμένου αναλύεται η συνεισφορά των οξυγαλακτικών βακτηρίων στη ζύμωση των γαλακτοκομικών προϊόντων και συγκεκριμένα των τυριών καθώς αποτελεί σημαντικό τμήμα της παρούσας μελέτης.

Εναρκτήριες και μη εναρκτήριες καλλιέργειες οξυγαλακτικών βακτηρίων

Η πρωταρχική δράση των εναρκτήριων οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι η παραγωγή οξέος κατά τη διαδικασία της ζύμωσης. Ταυτόχρονα, τα οξυγαλακτικά

βακτήρια συμμετέχουν στα φαινόμενα της πρωτεόλυσης και της λιπόλυσης που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των τυριών, διαμορφώνοντας έτσι τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος. Ως εναρκτήρια οξυγαλακτικά βακτήρια ορίζονται αυτά που παράγουν οξύ ικανό να προκαλέσει μείωση του pH του γάλακτος κάτω από το 5.3 σε 6 ώρες στους 30-37° C και τα οποία κατά την παρασκευή των τυριών αναπτύσσονται σε πληθυσμούς της τάξης των 10⁸ cfu/g μέσα σε λίγες ώρες. Τα πλέον χρησιμοποιούμενα εναρκτήρια οξυγαλακτικά βακτήρια είναι μέλη των γενών *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* και *Enterococcus* (Beresford *et al.*, 2001).

Ως μη εναρκτήρια οξυγαλακτικά βακτήρια (Non Starter Lactic Acid Bacteria, NSLAB) χαρακτηρίζονται οι μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι και πεδιόκοκκοι. Δεν διαθέτουν υψηλή ικανότητα οξίνισης του γάλακτος και συνήθως αποτελούν σημαντικό τμήμα της μικροχλωρίδας που αναπτύσσεται δευτερογενώς κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης στις περισσότερες ποικιλίες τυριών. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιούνται κυρίως ως συμπληρωματικές καλλιέργειες (adjuncts). Τέτοια στελέχη ανήκουν στα είδη *Lactobacillus casei/paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus acidilactici* και *Pediococcus pentosaceus* (Beresford *et al.*, 2001).

Η χρήση παστεριωμένου γάλακτος αλλά και καλά χαρακτηρισμένων εναρκτήριων καλλιεργειών, όπως επίσης και η εφαρμογή αυστηρών κανόνων υγιεινής στις σύγχρονες βιομηχανικές μονάδες παρασκευής τυριών έχει οδηγήσει στη εξαφάνιση 'άγριων' στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων από τους διάφορους τύπους τυριών. Η πρακτική αυτή εξασφαλίζει μεν την τυποποίηση και την ασφάλεια των προϊόντων καθώς επίσης και την απόδοση της παραγωγής, ταυτόχρονα όμως τις περισσότερες φορές λειτουργεί εις βάρος των οργανοληπτικών ιδιοτήτων και ιδιαίτερα της γεύσης και του αρώματος του τελικού προϊόντος.

Σήμερα στην Ελλάδα, όπως και στις υπόλοιπες αναπτυγμένες χώρες, η βιομηχανική παραγωγή τυροκομικών προϊόντων βασίζεται στη χρήση εμπορικών εναρκτήριων καλλιεργειών. Παρόλα αυτά, στα μικρά τυροκομεία οι παραγωγοί εκμεταλλεύονται την παρουσία της άγριας μικροχλωρίδας του γάλακτος για την παρασκευή τυριών. Τα τυριά αυτά χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα, πιο έντονα και ευχάριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, αποτελώντας ταυτόχρονα μια πηγή ανεξερεύνητων ακόμη μικροοργανισμών με ιδιαίτερη τεχνολογική δυναμική. Γίνεται

σαφές λοιπόν, ότι αυτοί οι 'άγριοι' μικροοργανισμοί μπορούν να απομονωθούν και να χρησιμοποιηθούν ως εναρκτήριες ή συμπληρωματικές καλλιέργειες.

Λειτουργικά οξυγαλακτικά βακτήρια

Προκειμένου να παραχθεί μια εναρκτήρια καλλιέργεια κατάλληλη για μια συγκεκριμένη ζύμωση τροφίμου, απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί ο προσδιορισμός και η περιγραφή της επιθυμητής της λειτουργικότητας. Παρά το γεγονός ότι σήμερα η γενετική τροποποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι εφικτή και επιτρέπει την κατασκευή στελεχών με συγκεκριμένες λειτουργικές ιδιότητες, η εφαρμογή τους δεν επιτρέπεται από την υπάρχουσα Ευρωπαϊκή νομοθεσία. Πέραν τούτου, η χρήση των γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών σκοντάφτει στη χαμηλή αποδοχή από τη πλευρά του καταναλωτικού κοινού. Συνεπώς, ακόμη και σήμερα η αναζήτηση εναρκτήριων καλλιεργειών βασίζεται στην εξέταση μεγάλου αριθμού στελεχών απομονωμένων από τρόφιμα αυθόρμητης ζύμωσης, και η επιλογή των κατάλληλων, κατά περίπτωση, καλλιεργειών γίνεται με βάση τις μεταβολικές τους δραστηριότητες αλλά και τις επιδόσεις τους σε μικρής κλίμακας ζυμώσεις τροφίμων (Leroy & De Vuyst, 2004).

Μέχρι πρόσφατα, οι πιο μελετημένες λειτουργικές ιδιότητες των οξυγαλακτικών βακτηρίων αφορούσαν τη διαμόρφωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τελικού προϊόντος. Οι λειτουργικότητες αυτές σχετίζονται με τον καταβολισμό των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και του λίπους της πρώτης ύλης και αναλύονται εκτενώς στην Παράγραφο 1.1.4. Τα τελευταία χρόνια όμως, εκτός από τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, μεγάλη σημασία για τον καταναλωτή έχει τόσο η ασφάλεια του τροφίμου όσο και η σχέση μεταξύ διατροφής και υγείας.

Σε ό,τι αφορά την ασφάλεια των τροφίμων, υπάρχει μια σαφής στροφή στις προτιμήσεις των καταναλωτών για αντικατάσταση των χημικών από φυσικά/βιολογικά συντηρητικά. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ως εναρκτήριες καλλιέργειες μπορούν αποτελέσουν εναλλακτική λύση στο πεδίο αυτό, καθώς παράγουν διάφορες αντιμικροβιακές ενώσεις που περιλαμβάνουν οργανικά οξέα (γαλακτικό, οξικό, φορμικό, φαινυλο-γαλακτικό και καπροϊκό οξύ), το διοξειδίο του άνθρακα, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το διακετύλιο, την αιθανόλη και τέλος τις βακτηριοσίνες (Lucke, 2000). Οι βακτηριοσίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι μικρού μοριακού βάρους πεπτίδια ή πρωτεΐνες που έχουν αντιμικροβιακή δράση απέναντι σε συγγενή Gram θετικά βακτήρια. Αρκετές έρευνες έχουν δείξει ότι τα

οξυγαλακτικά βακτήρια μπορούν να παράγουν βακτηριοσίνες εντός του τροφίμου και συνεπώς να έχουν ανασταλτική δράση απέναντι στα αλλοιωγόνα και παθογόνα βακτήρια (Leroy & De Vuyst, 2004).

Σε ό,τι αφορά τη σχέση διατροφής και υγείας, είναι αξιοσημείωτη η ραγδαία ανάπτυξη της αγοράς των αποκαλούμενων ‘λειτουργικών’ τροφίμων που παρατηρείται τα τελευταία χρόνια. Κυρίαρχο κομμάτι αυτής της αγοράς αποτελούν τα προβιοτικά οξυγαλακτικά βακτήρια καθώς και οι εφαρμογές τους. Τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί που όταν καταναλωθούν σε ικανές ποσότητες έχουν ευεργετική επίδραση στην υγεία του ανθρώπου. Τεκμηριωμένες ή εν δυνάμει εφαρμογές των προβιοτικών βακτηρίων αφορούν τα ιδιοπαθή φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου, τις ουρογεννητικές λοιμώξεις, τη δυσανεξία της λακτόζης, τη μείωση της χοληστερόλης του αίματος, την υπέρταση, τη καρκινογένεση κ.α. Η μεγάλη πλειοψηφία των προβιοτικών μικροοργανισμών ανήκει στα οξυγαλακτικά βακτήρια και κυρίως στο γένος *Lactobacillus* καθώς και στο γένος *Bifidobacterium* (Mercenier *et al.*, 2002).

1.1.4. Βασικά χαρακτηριστικά του μεταβολισμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων

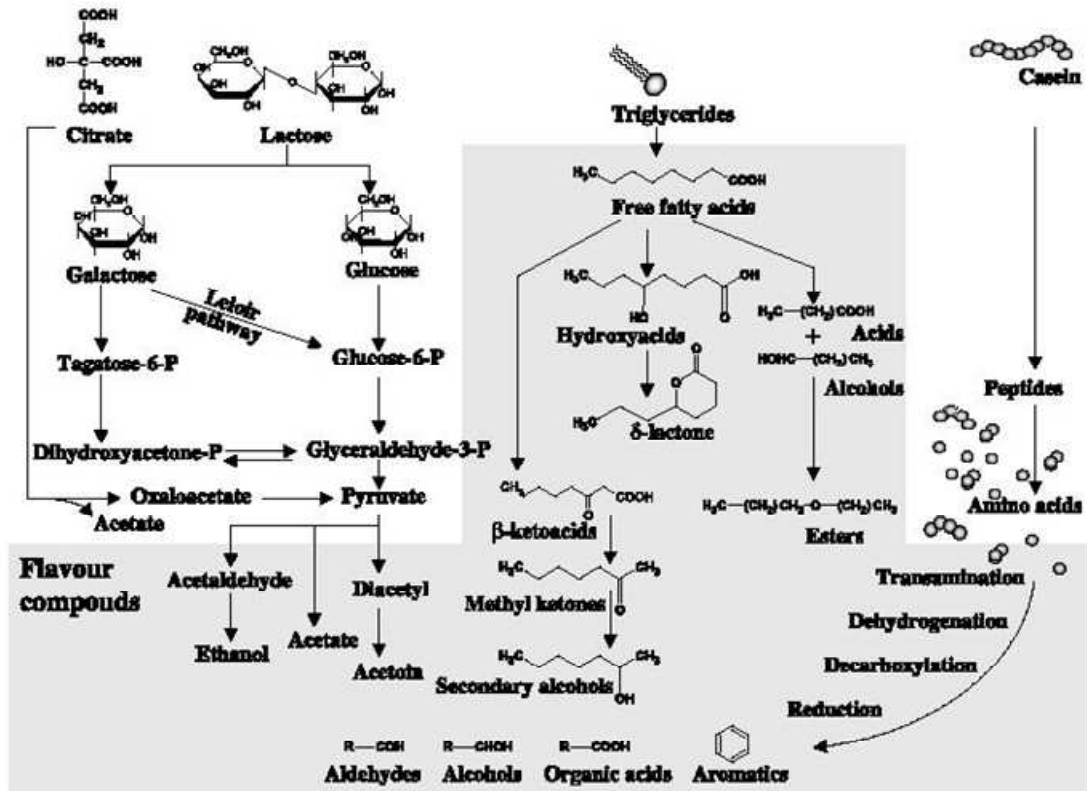
Τα οξυγαλακτικά βακτήρια όταν βρίσκονται σε κάποιο τεχνητό θρεπτικό μέσο χρησιμοποιούν διάφορες πηγές άνθρακα και αζώτου από αυτό. Όταν απαντούν στο φυσικό τους υπόστρωμα όπως π.χ. το γάλα, χρησιμοποιούν τη λακτόζη και το λίπος ως πηγή άνθρακα και τις πρωτεΐνες ως πηγή αζώτου. Τα παραπάνω συστατικά του γάλακτος υφίστανται μια σειρά από φυσικοχημικές μετατροπές (Γράφημα 1.1) που σχετίζονται με τις κύριες τεχνολογικές/βιοχημικές ιδιότητες των οξυγαλακτικών βακτηρίων (McSweeney & Sousa, 2000).

Μεταβολισμός σακχάρων

Το κύριο χαρακτηριστικό του μεταβολισμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι η ζύμωση των υδατανθράκων με τη φωσφορυλίωση σε επίπεδο υποστρώματος. Τα βακτήρια αυτά έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν διάφορους υδατάνθρακες και συγγενικές ενώσεις με κύριο τελικό προϊόν το γαλακτικό οξύ.

Όσον αφορά το μεταβολισμό της γλυκόζης, υπάρχουν δυο κύρια μεταβολικά μονοπάτια στα οξυγαλακτικά βακτήρια: το ομοζυμωτικό μονοπάτι (γλυκόλυση ή μονοπάτι Embden-Meyerhof-Parnas) και το ετεροζυμωτικό μονοπάτι (μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών). Η μεταφορά και φωσφορυλίωση της γλυκόζης λαμβάνει

χώρα με μεταφορά του ελεύθερου σακχάρου και φωσφορυλίωσή του από μια ATP-εξαρτώμενη γλυκοκινάση. Κάποια είδη χρησιμοποιούν το σύστημα της φωσφοτρανσφεράσης (Phosphotransferase system, PTS) που εξαρτάται από το φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό οξύ (Phosphoenolpyruvate, PEP) (σύστημα PEP-PTS) με το PEP να είναι ο δότης της φωσφορικής ομάδας (Postma *et al.*, 1993).



Γράφημα 1.1.

Κύρια μεταβολικά μονοπάτια των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Collins *et al.*, 2003).

Η γλυκόλυση χρησιμοποιείται από όλα τα οξυγαλακτικά βακτήρια εκτός από τους υποχρεωτικά ετεροζυμωτικούς γαλακτοβακίλλους, τα *Leuconostoc* spp., τα *Oenococcus* spp. και τα *Weisellas* spp. και χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό της 1,6-δισφωφορικής φρουκτόζης, η οποία με τη σειρά της διασπάται από μια αλδολάση προς φωσφορική διυδρόξυ ακετόνη και 3-φωσφορική γλυκεριναλδεύδη. Η 3-φωσφορική γλυκεριναλδεύδη στη συνέχεια μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ μέσω μιας αλληλουχίας αντιδράσεων που περιλαμβάνει τη φωσφορυλίωση σε

επίπεδο υποστρώματος. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και συγκεκριμένα παρουσία περίσσειας σακχάρου και περιορισμένης συγκέντρωσης οξυγόνου, το πυροσταφυλικό οξύ ανάγεται προς γαλακτικό οξύ μέσω της NAD^+ -εξαρτώμενης γαλακτικής αφυδρογονάσης, ενώ ταυτόχρονα το NADH αναγεννιέται στην οξειδωμένη του μορφή. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται μια οξειδοαναγωγική ισορροπία και το γαλακτικό οξύ είναι ουσιαστικά το μοναδικό τελικό προϊόν κατά το ομοζυμωτικό μονοπάτι.

Το άλλο κύριο μεταβολικό μονοπάτι είναι γνωστό με διάφορα ονόματα: μονοπάτι των φωσφορικών πεντοζών ή της φωσφοκετολάσης των πεντοζών ή της μονοφωσφορικής εξόζης (Kandler, 1983). Χαρακτηρίζεται από τα αρχικά στάδια οξείδωσης της γλυκόζης, το σχηματισμό του 6-φωσφογλυκονικού οξέος και τη αποκαρβοξυλίωση αυτού. Τα ετεροζυμωτικά βακτήρια στερούνται της αλδολάσης της 1,6-δισφωφορικής φρουκτόζης και της ισομεράσης των φωσφορικών τριοζών που αποτελούν σημαντικά ένζυμα της γλυκολυτικής οδού. Η παραγόμενη 6-φωσφορική πεντόζη διασπάται από τη φωσφοκετολάση προς 3-φωσφορική γλυκεριναλδεϋδη και ακετυλο-φωσφορικό οξύ. Η 3-φωσφορική γλυκεριναλδεϋδη στη συνέχεια εισέρχεται στη γλυκολυτική οδό με αποτέλεσμα την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Το ακετυλο-φωσφορικό οξύ είτε ανάγεται προς αιθανόλη, μέσω του ακετυλο- CoA και της ακεταλδεϋδης, είτε αποφωσφορυλιώνεται προς οξικό οξύ και ATP , είτε ενώνεται με ένα μόριο CoA , το οποίο στη συνέχεια ανάγεται προς ακεταλδεϋδη που με τη σειρά της ανάγεται προς αιθανόλη έτσι ώστε να αναγεννηθεί το NAD στην οξειδωμένη του μορφή (Law, 1997). Καθώς αυτός ο μεταβολισμός οδηγεί στο σχηματισμό γαλακτικού οξέος αλλά και σημαντικών ποσοτήτων άλλων τελικών προϊόντων (CO_2 , οξικό οξύ ή αιθανόλη) χαρακτηρίζεται ως ετεροζυμωτικό μονοπάτι.

Για τα οξυγαλακτικά βακτήρια η λακτόζη είναι η κύρια πηγή άνθρακα στο γάλα και η ζύμωσή της αποτελεί τον καλύτερα μελετημένο μεταβολισμό δισακχαρίτη. Σε διάφορα οξυγαλακτικά βακτήρια (όπως π.χ. στους θερμοφίλους *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* και *Lactobacillus acidophilus* και τα είδη του γένους *Leuconostoc*) η λακτόζη εισέρχεται στο κύτταρο μέσω της περμεάσης της λακτόζης και στη συνέχεια αποικοδομείται από την ενδοκυτταρική β-γαλακτοζιδάση προς γλυκόζη και γαλακτόζη (Fox et al., 1990). Σε άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια (π.χ. σε διάφορους λακτοκόκκους και γαλακτοβακίλλους) η λακτόζη εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα ως φωσφορική λακτόζη μέσω ενός συστήματος PEP-PTS και στη συνέχεια διασπάται από τη β-φωσφογαλακτοζιδάση

προς γλυκόζη και 6-φωσφορική γαλακτόζη. Το σύστημα PEP-PTS της λακτόζης καθώς και η β-φωσφογαλακτοζιδάση σε γενικές γραμμές επάγονται ή καταστέλλονται από την παρουσία της γλυκόζης (Kandler, 1983). Το σύστημα PEP-PTS είναι πιο πολύπλοκο από το σύστημα μεταφοράς μέσω της περμεάσης της λακτόζης, αφού για να λειτουργήσει απαιτεί την παρουσία ιόντων Mg^{2+} και τέσσερις πρωτεΐνες. Δυο από αυτές, το ένζυμο II και το ένζυμο III, βρίσκονται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση όσον αφορά το σάκχαρο-υπόστρωμα. Οι δυο άλλες, το ένζυμο I και μια χαμηλού μοριακού βάρους θερμοανθεκτική πρωτεΐνη (HPr), είναι διαλυτές πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος και απαντώνται σε όλα τα συστήματα PEP-PTS (Postma *et al.*, 1993). Ανεξάρτητα από το σύστημα μεταφοράς, η γλυκόζη στη συνέχεια θα οξειδωθεί προς πυροσταφυλικό οξύ μέσω της γλυκολυτικής οδού, η γαλακτόζη θα μεταβολισθεί μέσω της οδού Leloir ή μέσω του μονοπατιού της ταγκατόζης (Marilley & Casey, 2004). Παρόλα αυτά, επισημαίνεται ότι κάποια οξυγαλακτικά βακτήρια (π.χ. οι θερμοφίλοι *S. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* και *Lb. acidophilus*) δεν είναι ικανά να μεταβολίσουν τη γαλακτόζη, την οποία εκκρίνουν προς το εξωτερικό του κυττάρου.

Πρωτεολυτικό σύστημα

Είναι γενικά αποδεκτό, ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι ελάχιστα πρωτεολυτικά (Sousa *et al.*, 2001, McSweeney & Sousa, 2000, Fox, 1989). Παρόλα αυτά, διαθέτουν ένα πρωτεολυτικό σύστημα ικανό να υδρολύει τις καζεΐνες, προμηθεύοντας τα κύτταρα με τα απαραίτητα αμινοξέα για την ανάπτυξή τους στο γάλα, καθώς τα αμινοξέα αυτά είτε δεν υπάρχουν στο γάλα είτε απαντώνται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Επιπλέον, το πρωτεολυτικό σύστημα των οξυγαλακτικών βακτηρίων έχει μεγάλη σημασία για τη βιομηχανία τροφίμων καθώς συνεισφέρει σημαντικά στην ανάπτυξη του αρώματος στα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Το πρώτο στάδιο για την αποικοδόμηση των καζεϊνών από τα οξυγαλακτικά βακτήρια πραγματοποιείται από τις πρωτεϊνάσες που είναι αγκυροβολημένες στην κυτταροπλασματική μεμβράνη (Cell Envelope Proteinases, CEP) και οι οποίες διασπούν τις πρωτεΐνες προς ολιγοπεπτίδια. Έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί πέντε διαφορετικοί τύποι αυτών των ενζύμων στα οξυγαλακτικά βακτήρια: η PrtP του *Lactococcus lactis* και του *Lb. paracasei*, η PrtH του *Lactobacillus helveticus*, η PrtR του *Lb. rhamnosus*, η PrtS του *S. thermophilus* και η PrtB του *Lactobacillus bulgaricus* (Savijoki *et al.*, 2006). Στους λακτοκόκκους τα γονίδια *prtP* μπορεί να

βρίσκονται είτε σε πλασμίδια είτε στο χρωμόσωμα ενώ οι CEP των γαλακτοβακίλλων κωδικοποιούνται όλες από το χρωμόσωμα.

Το δεύτερο σημαντικό τμήμα του πρωτεολυτικού συστήματος των οξυγαλακτικών βακτηρίων περιλαμβάνει τη μεταφορά των πεπτιδίων που παράγονται με τη δράση των CEP εντός του κυττάρου μέσω του συστήματος Opp. Οι πρωτεΐνες Opp ανήκουν σε μια υπερικογένεια υψηλά συντηρημένων μεταφορέων κασέτας ATP-πρόσδεσης (Doeven *et al.*, 2005). Το σύστημα Opp του *L. lactis* μεταφέρει πεπτίδια με 4-18 αμινοξέα. Σε γενικές γραμμές, τα συστήματα Opp των υπόλοιπων οξυγαλακτικών βακτηρίων δεν είναι εξίσου μελετημένα έχει όμως αναφερθεί ότι για τον *S. thermophilus* και τον *Lb. bulgaricus* τα συστήματα Opp είναι παρόμοια με αυτά του *L. lactis*. Άλλοι μεταφορείς πεπτιδίων που έχουν προσδιοριστεί για τον *L. lactis* είναι τα συστήματα DtpP και DtpT. Το σύστημα DtpP μεταφέρει δι-, τρι- και τετραπεπίδια που περιέχουν σχετικά υδρόφοβα διακλαδισμένα αμινοξέα και παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια απέναντι στα τριπεπίδια (Sanz *et al.*, 2003), ενώ το σύστημα DtpT δείχνει μεγαλύτερη συγγένεια προς υδρόφιλα δι- και τριπεπίδια. Όσον αφορά τα συστήματα μεταφοράς των ελεύθερων αμινοξέων, οι λακτόκοκκοι φέρουν τουλάχιστον 10 τέτοια συστήματα, τα οποία έχουν υψηλή εξειδίκευση προς αμινοξέα με παρόμοια δομή (π.χ. αλανίνη/γλυκίνη, λευκίνη/ισολευκίνη/βαλίνη, σερίνη/θρεονίνη) (Kunji *et al.*, 1996).

Το τρίτο μέρος του πρωτεολυτικού συστήματος των οξυγαλακτικών βακτηρίων αφορά τις ενδοκυτταρικές πεπτιδάσες που διασπών τα πεπτίδια προς μικρότερα πεπτίδια και αμινοξέα (Law, 1997). Οι ενδοπεπτιδάσες, οι γενικές αμινοπεπτιδάσες (PepN και PepC) και η PepX είναι τα πρώτα ένζυμα που δρουν πάνω στα oligοπεπίδια. Οι ενδοπεπτιδάσες που έχουν χαρακτηριστεί στα οξυγαλακτικά βακτήρια (PepO, PepF, PepG, PepE) είναι όλες μεταλλοπεπτιδάσες με εξαίρεση την PepE του *Lb. helveticus*, της οποίας η ενεργότητα εξαρτάται από τη θειόλη. Ένα κοινό χαρακτηριστικό των ενδοπεπτιδασών είναι ότι δεν έχουν την ικανότητα να υδρολύουν την καζεΐνη αλλά μπορούν να υδρολύουν εσωτερικούς πεπτιδικούς δεσμούς των παραγόμενων καζεϊνικών πεπτιδίων. Άλλες πεπτιδάσες που υδρολύουν oligοπεπίδια είναι οι γενικές αμινοπεπτιδάσες PepN και PepC, οι οποίες έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί σε πολλά οξυγαλακτικά βακτήρια (γαλακτοβάκιλλοι, *L. lactis* και *S. thermophilus*). Αυτά τα ένζυμα απομακρύνουν αμινοξέα από το αμινοτελικό άκρο ενός μεγάλου εύρους πεπτιδίων που διαφέρουν τόσο σε μέγεθος όσο και σε σύσταση (Christensen *et al.*, 1999). Τα δι- και τριπεπίδια

που παράγονται από τις ενδοπεπτιδάσες, τις γενικές αμινοπεπτιδάσες και την PepX διασπώνται στη συνέχεια από την τριπεπτιδάση PepT και τις διπεπτιδάσες PepV και PepD. Αυτά τα ένζυμα προτιμούν πεπτίδια που περιέχουν υδρόφοβα αμινοξέα όπως λευκίνη, μεθειονίνη, φαινυλαλανίνη ή γλυκίνη. Άλλες πεπτιδάσες με πιο μεγάλη εξειδίκευση είναι η PepA που διασπά όξινα αμινοξέα από το αμινοτελικό άκρο πεπτιδίων μεγέθους 3 έως 9 αμινοξέων, η PepP που προτιμά τριπεπτίδια, στα οποία η πρόλινη βρίσκεται στη μεσαία θέση, οι PepR, PepI και PepQ που δρουν σε διπεπτίδια που φέρουν πρόλινη και η PepS που προτιμά πεπτίδια μεγέθους 2 έως 5 αμινοξέων με αργινίνη ή αρωματικό αμινοξύ στο αμινοτελικό άκρο (Christensen *et al.*, 1999, Kunji *et al.*, 1996). Επί του παρόντος δεν έχει αναφερθεί ένζυμο οξυγαλακτικών βακτηρίων που να έχει δραστικότητα καρβοξυπεπτιδάσης.

Ο βαθμός πρωτεόλυσης των καζεϊνών και τα παραγόμενα πεπτίδια καθορίζουν τα δομικά χαρακτηριστικά του τυριού. Παράλληλα, τα μικρού μοριακού βάρους πεπτίδια και τα ελεύθερα αμινοξέα που παράγονται κατά την πρωτεόλυση συνεισφέρουν στη διαμόρφωση της γεύσης του τυριού. Μεγάλη σημασία έχουν τα λεγόμενα πικρά πεπτίδια, τα οποία είναι μικρού μοριακού βάρους πεπτίδια, πλούσια σε υδρόφοβα αμινοξέα, όπως η λευκίνη και η φαινυλαλανίνη. Η δυσάρεστη πικρή γεύση που προκαλούν χάνεται με τη περαιτέρω αποικοδόμηση τους (McSweeney & Sousa, 2000). Τα τελικά προϊόντα της πρωτεόλυσης είναι τα ελεύθερα αμινοξέα, οι συγκεντρώσεις των οποίων εξαρτώνται από το είδος και την ποικιλία του τυριού και οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί ως δείκτες ωρίμανσης.

Εκτός όμως από αυτά καθ' αυτά τα ελεύθερα αμινοξέα, σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση του αρώματος και της γεύσης του τυριού παίζουν και τα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού τους. Αυτά προέρχονται από αντιδράσεις αποκαρβοξυλίωσης, τρανσαμίνωσης, απαμίνωσης και υδρολυτικής αποικοδόμησης, οι οποίες καταλύονται από μικροβιακά ένζυμα, είτε των εναρκτήριων καλλιιεργειών που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του τυριού, είτε της δευτερογενούς μικροχλωρίδας του. Τα προϊόντα αυτά δεν είναι πάντα επιθυμητά. Έτσι, η αποκαρβοξυλίωση των αμινοξέων προς αμίνες (όπως η τυραμίνη και η ισταμίνη), δημιουργεί δυσάρεστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και μπορεί να προκαλέσει αλλεργικού τύπου τροφογενείς δηλητηριάσεις.

Σήμερα, το ερευνητικό ενδιαφέρον επικεντρώνεται στο δευτερογενή μεταβολισμό των διακλαδισμένων, αρωματικών και θειούχων αμινοξέων και τη συμβολή των παραγόμενων προϊόντων τους στη διαμόρφωση του αρώματος και της

γεύσης στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Ο καταβολισμός των αμινοξέων αυτών έχει μελετηθεί διεξοδικά για τον *L. lactis* και τους μεσόφιλους γαλακτοβακίλλους. Στα βακτήρια αυτά ο καταβολισμός των αμινοξέων ξεκινά με μια αντίδραση τρανσαμίνωσης παρουσία ενός α-κετο-οξέος, το οποίο αποτελεί τον αποδέκτη της αμινομάδας. Από το δευτερογενή καταβολισμό των αμινοξέων παράγονται διάφορες ενώσεις-κλειδιά που συνεισφέρουν στα αρωματικά συστατικά του τελικού προϊόντος π.χ. η 2-μεθυλο-βουτανάλη, η 3-μεθυλο-βουτανάλη, η 3-μεθυλο-2-βουτανόνη, η 2-μεθυλο-1-προπανάλη, η 3-μεθυλο-βουτανόλη, το 2-μεθυλο-προπιονικό οξύ, και το 3-μεθυλο-βουτυρικό οξύ που προέρχονται από τα διακλαδισμένα αμινοξέα, η μεθειονάλη, η μεθανοθειόλη, το διμεθυλο-δισουλφίδιο και το διμεθυλο-τρισουλφίδιο που προέρχονται από τη μεθειονίνη, και τέλος, το φαινυλοξικό οξύ και η φαινυλακεταλδεΐδη που προέρχονται από τη φαινυλαλανίνη (Marilley & Casey, 2004).

Λιπόλυση

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια διαθέτουν εστερολυτικά/λιπολυτικά ένζυμα ικανά να υδρολύουν διάφορους εστέρες λιπαρών οξέων, καθώς και τρι-, δι- και μονο-ακυλογλυκερίδια (Liu *et al.*, 2004). Παρά την παρουσία όμως αυτών των ενζύμων, τα οξυγαλακτικά βακτήρια και ειδικά οι λακτόκοκκοι και οι γαλακτοβάκιλλοι θεωρούνται ελάχιστα λιπολυτικοί σε σχέση με άλλα βακτήρια όπως τα *Pseudomonas*, *Acinetobacter* και *Flavobacterium* (Collins *et al.*, 2003). Ωστόσο, λόγω της παρουσίας τους σε μεγάλους πληθυσμούς κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των τυριών, τα οξυγαλακτικά βακτήρια συνεισφέρουν στην παραγωγή σημαντικών επιπέδων ελεύθερων λιπαρών οξέων (Liu *et al.*, 2004). Αυτά τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, των οποίων η ανθρακική αλυσίδα μπορεί να ποικίλει σημαντικά ανάλογα με το είδος του λίπους του γάλακτος, επηρεάζουν άμεσα το άρωμα των τυριών. Μπορούν επίσης να μεταβολισθούν προς άλλα αρωματικά συστατικά, όπως είναι οι μεθυλοκετόνες και οι θειοεστέρες. Τα δ-κετοξέα, τα δ-υδροξυ-οξέα και οι λακτόνες αποτελούν επίσης προϊόντα διάσπασης των τριγλυκεριδίων και συνεισφέρουν στο άρωμα των τυριών (El Soda *et al.*, 1995).

Τα λιπολυτικά ένζυμα των οξυγαλακτικών βακτηρίων μπορούν να ταξινομηθούν σε εστεράσες και λιπάσες, έχοντας ως κριτήρια διαχωρισμού τα εξής: 1) το μήκος της αλυσίδας του υδρολυμένου ακυλο-εστέρα, 2) το φυσικοχημικό χαρακτήρα του υποστρώματος και 3) την ενζυμική κινητική. Οι εστεράσες

υδρολύουν αλυσίδες ακυλο-εστέρων μεταξύ 2-8 ατόμων άνθρακα, ενώ οι λιπάσες υδρολύουν εστέρες με αλυσίδες 10 ή περισσότερων ατόμων άνθρακα. Επίσης, οι εστεράσες υδρολύουν υδατοδιαλυτά υποστρώματα, ενώ οι λιπάσες γαλακτωματοποιημένα υποστρώματα. Η ενζυμική κινητική των εστερασών και των λιπασών επίσης διαφέρουν. Οι εστεράσες έχουν κλασική κινητική Michaelis-Menten, ενώ οι λιπάσες παρουσιάζουν επιφανειακή Michaelis-Menten κινητική (Collins *et al.*, 2003). Γενικά, τα λιπολυτικά ένζυμα είναι εξειδικευμένα πάνω στους εξωτερικούς εστερικούς δεσμούς των τρι- ή διγλυκεριδίων (θέσεις *sn*-1 και *sn*-3). Αρχικά, τα τριγλυκερίδια υδρολύονται προς 1,2- και 2,3-διγλυκερίδια και στη συνέχεια προς 2-μονογλυκερίδια. Το βουτυρικό οξύ, καθώς επίσης και άλλα μικρής και μεσαίας αλυσίδας λιπαρά οξέα, βρίσκεται κυρίως στη θέση *sn*-3 και είναι αυτό που απελευθερώνεται κατά προτίμηση από τα λιπολυτικά ένζυμα (Collins, 2003, McSweeney & Sousa, 2000).

Με βάση τα δεδομένα που υπάρχουν μέχρι σήμερα, οι λιπάσες/εστεράσες των οξυγαλακτικών βακτηρίων φαίνεται ότι είναι αποκλειστικά ενδοκυτταρικές και ενδεχομένως απαιτείται η αυτόλυση των κυττάρων για την απελευθέρωση και δράση των ενζύμων μέσα στη μάζα του τυριού. Έχει αποδειχθεί ότι οι υποχρεωτικοί ομοζυμωτικοί γαλακτοβάκιλλοι που χρησιμοποιούνται ως εναρκτήριοι καλλιέργειες (*Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. acidophilus*) παράγουν ενδοκυτταρικές εστεράσες, ενώ οι προαιρετικοί ετεροζυμωτικοί γαλακτοβάκιλλοι (π.χ. *Lb. casei*, *Lb. paracasei* και *Lb. plantarum*) που κυριαρχούν στην NSLAB χλωρίδα σε πολλά είδη τυριών, είναι ελάχιστα λιπολυτικοί (McSweeney & Sousa, 2000).

1.2. Οξυγαλακτικά βακτήρια σε συνθήκες στρες

Σε γενικές γραμμές, το στρες είναι κάτι που αρχικά γίνεται αντιληπτό με την αρνητική έννοια. Παρόλα αυτά, το στρες είναι μια από τις κινητήριες δυνάμεις της βακτηριακής εξέλιξης και προσαρμογής, προκαλώντας το φαινόμενο της βιοποικιλότητας και τη δημιουργία νέων ειδών. Οι επεξεργασίες παραγωγής τροφίμων υποβάλλουν τους μικροοργανισμούς σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες (οξίνιση, θέρμανση ή ψύξη, οξειδωτικό ή ωσμωτικό στρες, ασιτία, τοξικές

ενώσεις κ.τ.λ.), στις οποίες ανταποκρίνονται με την ανάπτυξη μηχανισμών προσαρμογής (van de Guchte *et al.*, 2002). Αυτοί οι μηχανισμοί με τη σειρά τους επηρεάζουν την επιβίωση και την τεχνολογική απόδοση των βακτηρίων. Τα βακτήρια διαθέτουν μια εγγενή ικανότητα να προσαρμόζονται στις συνθήκες στρες επάγοντας διάφορους γενικούς ή ειδικούς μηχανισμούς απόκρισης.

Εξαιτίας της μεγάλης βιομηχανικής σημασίας των οξυγαλακτικών βακτηρίων η μελέτη της απόκρισής τους στα διάφορα στρες είναι εξαιρετικά σημαντική. Προκειμένου να ολοκληρωθεί η ζύμωση και να αναπτυχθεί το επιθυμητό τελικό προϊόν, είναι απαραίτητο οι μικροοργανισμοί αυτοί να μπορούν να αντισταθούν στις δυσμενείς συνθήκες που απαντώνται στις βιομηχανικές διεργασίες. Επιπλέον, η ικανότητά τους να λειτουργήσουν ως προβιοτικά προϋποθέτει την επιβίωσή τους στον πεπτικό σωλήνα και την έκφραση συγκεκριμένων λειτουργιών κάτω από δυσμενείς συνθήκες. Αλλά και στη φύση, η ικανότητα ταχείας απόκρισης στα διάφορα στρες είναι απαραίτητη για την επιβίωση των βακτηρίων.

Έχουν περιγραφεί, σε επίπεδο γενετικής, ρύθμισης και φυσιολογίας, ποικίλοι μηχανισμοί απόκρισης των οξυγαλακτικών βακτηρίων απέναντι σε διάφορους τύπους στρες (π.χ. θέρμανση, χαμηλό pH, ωσμωτικό στρες κ.α.). Αν και η ποσότητα των δεδομένων που υπάρχουν στο συγκεκριμένο πεδίο είναι αρκετά μεγάλη, περιορίζεται σε συγκεκριμένα στελέχη και τύπους στρες (van de Guchte *et al.*, 2002). Στη συνέχεια αυτού του Κεφαλαίου γίνεται συνοπτική αναφορά στους κυριότερους τύπους στρες και στις αποκρίσεις των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε αυτά. Έμφαση δίνεται στους γαλακτοβακίλλους και το ωσμωτικό στρες καθώς αποτελούν θέμα της παρούσας μελέτης.

1.2.1. Θερμικό στρες

Η μεγαλύτερη επίδραση που προκαλούν οι υψηλές θερμοκρασίες είναι η μετουσίωση των πρωτεϊνών. Επίσης επηρεάζονται οι κυτταρικές μεμβράνες και τα νουκλεϊκά οξέα (De Angelis & Gobbetti, 2004). Σε γενικές γραμμές, η απόκριση των κυττάρων στις υψηλές θερμοκρασίες είναι κοινή τόσο στους ευκαρυωτικούς όσο και στους προκαρυωτικούς οργανισμούς και περιλαμβάνει την επαγωγή μιας σειράς συντηρημένων τσαπερονών (DnaK, DnaJ, GrpE, GroES και GroEL) και πρωτεασών (Clp, HtrA, FtsH) που επιδρούν στην αναδίπλωση ή στην αποικοδόμηση των κατεστραμμένων πρωτεϊνών, στη συναρμολόγηση των πρωτεϊνικών συμπλόκων ή στη μετακίνηση των πρωτεϊνών (Champomier-Vergès *et al.*, 2002). Μελέτες που

αφορούν τη φυσιολογία των οξυγαλακτικών βακτηρίων κατέδειξαν ότι αυτά παρουσιάζουν αποκρίσεις στο θερμικό στρες παρόμοιες με τα υπόλοιπα Gram θετικά βακτήρια (van de Guchte *et al.*, 2002).

1.2.2. Ψυχρό στρες

Η προσαρμογή των οξυγαλακτικών βακτηρίων στις χαμηλές θερμοκρασίες είναι πολύ σημαντική για τη ζύμωση των τροφίμων καθώς η διαδικασία συνήθως ξεκινάει με την προσθήκη κατεψυγμένων εναρκτηρίων καλλιεργειών και συνεπώς η απόκρισή τους σε συνθήκες κατάψυξης ή/και ψύξης αποτελεί σημαντική ιδιότητά τους. Επιπλέον, τα οξυγαλακτικά βακτήρια υποβάλλονται σε συνθήκες ψυχρού στρες κατά τη διάρκεια ζυμώσεων σε χαμηλές θερμοκρασίες αλλά και κατά την αποθήκευση των ζυμούμενων τροφίμων πριν την κατανάλωση (De Angelis & Gobbetti, 2004). Συνεπώς, η βέλτιστη επιβίωση των οξυγαλακτικών σε αυτές τις συνθήκες συνεισφέρει στη βιομηχανική επίδοση/απόδοση αυτών των στελεχών. Αυτό συνεπάγεται ότι η σωστή κατανόηση των αποκρίσεων στις χαμηλές θερμοκρασίες και την κατάψυξη συμβάλλουν στη βελτιστοποίηση των διεργασιών ζύμωσης, την αποθήκευση των προϊόντων και τις συνθήκες συντήρησης.

Όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε χαμηλές θερμοκρασίες υπόκεινται σε σημαντικές φυσιολογικές μεταβολές, όπως η μείωση της ρευστότητας της κυτταρικής μεμβράνης, η υπερελίκωση του DNA και η σταθεροποίηση των δευτεροταγών δομών του RNA, με συνέπεια να μειώνεται η αποδοτικότητα της μεταγραφής, της μετάφρασης και της αντιγραφής του DNA (Champomier-Verges *et al.*, 2002). Για να ανταπεξέλθουν σε αυτά τα φαινόμενα, οι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει μια απόκριση προσαρμογής που ονομάζεται απόκριση στο ψυχρό στρες, κατά την οποία συνθέτουν τις πρωτεΐνες ψυχρού στρες (Cold-Induced Proteins, CIPs).

1.2.3. Όξινο στρες

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 ζυμούμενων τροφίμων. Επίσης, τα οξυγαλακτικά βακτήρια εκτίθενται σε όξινο στρες λόγω της παρουσίας του υδροχλωρικού οξέος του στομάχου κατά την κατανάλωσή τους ως

προβιοτικά. Μάλιστα, η ανάπτυξη του πεδίου των προβιοτικών ανανέωσε το ενδιαφέρον για την επιβίωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε συνθήκες όξινου στρες. Από την άλλη πλευρά, η πρόκληση τερηδόνας από τα στοματικά οξυγαλακτικά βακτήρια, όπως οι στρεπτόκοκκοι και οι γαλακτοβάκιλλοι, σχετίζεται άμεσα με την παραγωγή οξύτητας και αλλά και την ανθεκτικότητά τους σε χαμηλά pH ([van de Guchte et al., 2002](#)). Η μείωση του εξωκυτταρικού pH οδηγεί στην απώλεια της πρωτονιεγερτικής δύναμης (Proton Motive Force, PMF) που αποτελεί πηγή ενέργειας για τα βακτήρια, μεταβάλλει τις ενζυμικές δραστηριότητες, μετουσιώνει τις πρωτεΐνες και καταστρέφει τα νουκλεϊκά οξέα ([Champomier-Verges et al., 2002](#)). Τα οξέα διαχέονται παθητικά μέσα από την κυτταρική μεμβράνη και εντός του κυτταροπλάσματος και δίστανται ταχέως σε πρωτόνια και ανιόντα, στα οποία η κυτταρική μεμβράνη είναι μη διαπερατή με αποτέλεσμα τη μείωση του ενδοκυτταρικού pH (pHi). Η ομοίωση του pHi ρυθμίζεται με διάφορους μηχανισμούς αλλά η F-ATPase αποτελεί το πιο σημαντικό από αυτούς για τα ζυμωτικά βακτήρια. Η συνολική διαπερατότητα της μεμβράνης σε πρωτόνια επίσης συνεισφέρει στη ρύθμιση του pHi. Το μονοπάτι της δεϊμινάσης της αργινίνης (Arginine Deiminase, ADI) είναι ένας ακόμα μηχανισμός απόκρισης. Παράλληλα, η επιπλέον ενέργεια που παράγεται από το μονοπάτι ADI επιτρέπει την εξαγωγή πρωτονίων από το κυτταρόπλασμα μέσω της F₀F₁ ATPase. Έρευνες πάνω στις αποκρίσεις προσαρμογής των γαλακτοβακίλλων στο όξινο στρες έχουν δείξει την επαγωγή ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών όξινου στρες (Acid Stress Proteins, ASP) αλλά επίσης και κάποιων πρωτεϊνών θερμικού στρες (Heat Shock Proteins, HSP) αν και η ταυτότητα των πρωτεϊνών αυτών διαφέρει από είδος σε είδος ([De Angelis & Gobbetti, 2004](#)).

1.2.4. Οξειδωτικό στρες

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια δεν απαιτούν οξυγόνο για την ανάπτυξη τους και μάλιστα έχει αναφερθεί το οξυγόνο επιδρά αρνητικά σε αυτήν. Σε γενικές γραμμές, είχε θεωρηθεί ότι τα συγκεκριμένα βακτήρια σε καμία περίπτωση δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν το οξυγόνο ως τελικό αποδέκτη ηλεκτρονίων, πλην όμως υπάρχουν πλέον αναφορές, σύμφωνα με τις οποίες τα οξυγαλακτικά ενδεχομένως μπορούν να υιοθετήσουν τη διαδικασία της αναπνοής όταν στο θρεπτικό μέσο υπάρχει αίμη. Σχετικά πρόσφατα, η μελέτη των [Duwat et al. \(2001\)](#) κατέδειξε ότι ο *L. lactis* IL1403 φέρει όλα τα γονίδια που απαιτούνται για την αερόβια αναπνοή. Παρόλα αυτά, το

οξυγόνο σε γενικές γραμμές επιδρά αρνητικά στα οξυγαλακτικά βακτήρια (De Angelis & Gobbetti, 2004).

Το οξειδωτικό στρες γενικά 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. Τα κύτταρα τόσο των προκαρυωτικών όσο και των ευκαρυωτικών οργανισμών έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για την αντιμετώπιση της τοξικότητας του οξυγόνου. Αυτοί περιλαμβάνουν α) την πρόληψη του σχηματισμού ή/και την αποικοδόμηση των μορφών ενεργού οξυγόνου, καθιστώντας έτσι τα μόρια-στόχους λιγότερα ευάλωτα, και β) την επισκευή των κατεστραμμένων μορίων. Τα βακτήρια χρησιμοποιούν ένζυμα (π.χ. καταλάση, οξειδάση του NADH, υπεροξειδάση του NADH και δισμουτάση του υπεροξειδίου) ή μη ενζυμικές ενώσεις (π.χ. Mn^{2+} , ασκορβικό οξύ, τοκοφερόλες και γλουταθειόνη) για να μειώσουν τις ρίζες οξυγόνου (Warriner & Morris, 1995). Η ικανότητα να αντιμετωπίσουν το οξειδωτικό στρες διαφέρει μεταξύ των οξυγαλακτικών βακτηρίων ανάλογα με τα επίπεδα και τους τύπους των αντιοξειδωτικών τους μηχανισμών.

1.2.5. Ασιτία

Η εξάντληση των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών ή/και η συσσώρευση των τελικών προϊόντων ζύμωσης (π.χ. γαλακτικό οξύ) περιορίζει την εκθετική φάση ανάπτυξης ενός μικροοργανισμού και το οδηγεί στη στατική φάση. Η είσοδος στη στατική φάση προκαλείται επίσης από το θερμικό, το ψυχρό, το φωσφοτικό και το οξειδωτικό στρες. Είναι γενικά αποδεκτό, ότι η στατική φάση είναι η πιο κοινή κατάσταση των βακτηριακών κυττάρων στη φύση. Υπάρχουν τρεις περιοριστικές συνθήκες και οι αποκρίσεις των βακτηρίων σε αυτές έχουν μελετηθεί εκτενώς: α) η έλλειψη υδατανθράκων που οδηγεί στην εξάντληση της ενέργειας στο κύτταρο, β) η έλλειψη φωσφορικών ομάδων που είναι επιζήμια για την παραγωγή ενέργειας αλλά και για τη σύνθεση DNA/RNA και γ) η έλλειψη αζώτου που έχει σαν αποτέλεσμα κατά κύριο λόγο τον περιορισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης (De Angelis & Gobbetti, 2004). Η απόκριση προσαρμογής κατά την εκθετική φάση της ανάπτυξης διαφέρει από εκείνη που χρησιμοποιείται στη στατική φάση. Στα οξυγαλακτικά βακτήρια η έλλειψη θρεπτικών στοιχείων που οδηγεί στην αναστολή της ανάπτυξης σχετίζεται με την τροποποίηση της μορφολογίας των κυττάρων. Σε πολλά μη σποριογόνα

βακτήρια, όπως το *E. coli*, αλλά και σε κάποιους εντεροκόκκους και λακτοκόκκους έχει αναφερθεί ως μηχανισμός απόκρισης η κυτταρική διαίρεση κατά τη στατική φάση που προκαλεί τη μείωση του μεγέθους των κυττάρων (Hartke *et al.*, 1996). Σε καλλιέργειες των ειδών *L. lactis* subsp. *lactis*, *Enterococcus faecalis* και *Streptococcus pyogenes* κάτω από έλλειψη γλυκόζης παρατηρήθηκε διφασική καμπύλη επιβίωσης (Trainor *et al.*, 1999). Αντίθετα, ο *Lb. bulgaricus* παρουσίασε πλήρη απώλεια βιωσιμότητας μετά από 48 h σε συνθήκες έλλειψης λακτόζης. Αυτές οι παρατηρήσεις υποδεικνύουν ότι οι αποκρίσεις των οξυγαλακτικών βακτηρίων διαφέρουν μεταξύ ειδών και γενών. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της επιβίωσης για τα περισσότερα οξυγαλακτικά βακτήρια φαίνεται ότι είναι η ικανότητα να διατηρούν μια ενεργή μεταβολική κατάσταση όπως η γλυκόλυση (Poolman *et al.*, 1987). Άλλες έρευνες έχουν δείξει ότι ο καταβολισμός των αμινοξέων παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση κάποιων οξυγαλακτικών βακτηρίων (van de Guchte *et al.*, 2002). Στους μικροοργανισμούς-μοντέλα *E. coli* και *Bacillus subtilis*, κάτω από συνθήκες διαφόρων στρες και κυρίως έλλειψης γλυκόζης, επάγεται ένας μεγάλος αριθμός πρωτεϊνών γενικού στρες (General Stress Proteins, GSP). Ο εναλλακτικός παράγοντας σ^B ελέγχει την έκφραση της πλειονότητας των GSP σε αυτούς τους μικροοργανισμούς. Παρόλα αυτά, μέχρι στιγμής δεν έχει ανιχνευτεί ομόλογος σ^B παράγοντας στα οξυγαλακτικά βακτήρια και η ρύθμιση των πρωτεϊνών αυτών που επάγονται σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών στοιχείων σε αυτά τα βακτήρια δεν είναι ακόμα κατανοητή (De Angelis & Gobbetti, 2004, van de Guchte *et al.*, 2002).

1.2.6. Ωσμωτικό στρες

Όταν η ενεργότητα νερού στο εξωτερικό περιβάλλον μειώνεται προκύπτουν δυο μηχανισμοί απόκρισης των κυττάρων. Στην περίπτωση μεγάλης μείωσης της ενεργότητας του νερού, συμβαίνει παθητική εκροή νερού, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε ταχεία μείωση του κυτταρικού όγκου και να προκαλέσει το θάνατο του κυττάρου. Όταν η μείωση της ενεργότητας του νερού δεν είναι πολύ μεγάλη, λαμβάνει χώρα μια ενεργή βιολογική απόκριση των ωσμωρυθμιστικών συστημάτων του κυττάρου. Στο *E. coli* το κύριο γεγονός ρύθμισης του κυτταρικού όγκου και της σπαργής είναι η ελεγχόμενη συσσώρευση ιόντων καλίου και η επακόλουθη συσσώρευση μικρών οργανικών ενώσεων που ονομάζονται συμβατές διαλυτές ουσίες (συμβατοί ωσμωλύτες) (Poirier *et al.*, 1998).

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. Σε γενικές γραμμές, τα βακτήρια κάτω από υπερωσμωτικές συνθήκες αντιδρούν α) με την επαγωγή πρωτεϊνών στρες, β) με τη συσσώρευση συμβατών διαλυτών ουσιών μέσω μεταφοράς από τον εξωκυτταρικό χώρο και γ) με την *de novo* σύνθεση συμβατών διαλυτών ουσιών, τις οποίες αποβάλλουν ή διασπούν σε υποωσμωτικές συνθήκες (van de Guchte *et al.*, 2002). Εκτός από την επίδρασή τους στην ωσμωτική ισορροπία, οι συμβατές διαλυτές ενώσεις συμβάλλουν στη σταθεροποίηση ενζύμων και συνεπώς παρέχουν προστασία όχι μόνο σε συνθήκες ωσμωτικού στρες αλλά επίσης και σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας, ψύξης-απόψυξης και ξήρανσης (Poolman *et al.*, 1998). Οι διαλυτές συμβατές ενώσεις είναι συνήθως μικρά, οργανικά μόρια χαμηλού μοριακού βάρους (π.χ. αμινοξέα, βεταΐνες, εκτοΐνες, σάκχαρα) που όταν συσσωρεύονται στο εσωτερικό του κυττάρου δεν διαταράσσουν τις κυτταρικές λειτουργίες ή την αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Ως εκ τούτου, οι συμβατές διαλυτές ουσίες μπορούν να συμβάλουν σημαντικά στην αποκατάσταση της σπαργής σε συνθήκες χαμηλής ενεργότητας του νερού παρεμποδίζοντας την εκροή του νερού από το κύτταρο.

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. 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. Στον *L. lactis* η ρύθμιση της πρόσληψης γλυκίνης-βεταΐνης εξαρτάται από τη δραστηριότητα των συστημάτων μεταφοράς και τη γονιδιακή έκφραση των μεταφορέων OpuA και BusR (Serrazanetti *et al.*, 2009). Επιπλέον, σε συνθήκες ωσμωτικού στρες έχουν αναφερθεί και άλλες σημαντικές φυσιολογικές μεταβολές στα βακτήρια που περιλαμβάνουν την επαγωγή

πρωτεϊνών στρες (GroEL, GroES και DnaK) αλλά και μεμβρανικών πρωτεϊνών (FtsH και HtrA) (van de Guchte *et al.*, 2002).

Σε γενικές γραμμές οι υπερωσμωτικές συνθήκες που προκαλούνται από τα σάκχαρα είναι παροδικές και λιγότερα επιζήμιες καθώς οι γαλακτοβάκιλλοι έχουν την ικανότητα να εξισορροπούν τις εξωκυτταρικές και τις ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις της λακτόζης και της σακχαρόζης. Τα άλατα (π.χ. NaCl και KCl) φέρονται να παρεμποδίζουν την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τις ισομοριακές συγκεντρώσεις σακχαρόζης (Glaasker *et al.*, 1996).

1.3. Πλασμιδιακό DNA οξυγαλακτικών βακτηρίων

1.3.1. Γενικά στοιχεία της βιολογίας των πλασμιδίων

Ο όρος 'πλασμίδιο' εισήχθη στην επιστημονική κοινότητα το 1952 από το βιολόγο Joshua Lederberg (Lederberg, 1952) περιγράφοντας γενικά κάθε εξωχρωμοσωμικό γενετικό υλικό για το βακτήριο *E. coli*. Εξ ορισμού, τα πλασμίδια είναι εξωχρωμοσωμικά μόρια DNA, με χαρακτηριστικό αριθμό αντιγράφων εντός του κυττάρου-ξενιστή που μπορούν να αντιγράφονται ανεξάρτητα από το βακτηριακό χρωμόσωμα, παρά το γεγονός ότι χρησιμοποιούν ένζυμα και πρωτεΐνες του ξενιστή τους. Αυτά τα ρεπλικόνια έχουν ανιχνευτεί σε είδη που αντιπροσωπεύουν και τις τρεις επικράτειες έμβιων οργανισμών, δηλαδή σε Αρχαία, σε Βακτήρια και σε κατώτερους Ευκαρυωτικούς οργανισμούς (ζύμες και μύκητες) (del Solar *et al.*, 1998). Τα πλασμίδια εντοπίζονται σχεδόν σε όλα τα βακτηριακά είδη (Gram θετικά και αρνητικά), κυμαίνονται σε μέγεθος από 1-1000 kbp και ως εκ τούτου, μπορεί να αντιπροσωπεύουν ένα μεγάλο ποσοστό του συνόλου του βακτηριακού γονιδιώματος (Mølbak *et al.*, 2003). Ο αριθμός αντιγράφων των πλασμιδίων μπορεί να είναι από ένα ή δυο μέχρι μερικές εκατοντάδες αντίγραφα.

Τα περισσότερα πλασμίδια είναι κυκλικά, δίκλιωνα μόρια DNA αν και έχουν απομονωθεί και γραμμικά πλασμίδια από διάφορα βακτήρια (Hinnebusch & Tilly, 1993). Σε γενικές γραμμές, τα πλασμίδια δεν είναι απαραίτητα για την επιβίωση των βακτηρίων, ωστόσο κάποια από αυτά κωδικοποιούν διάφορες πρωτεΐνες, οι οποίες επιτρέπουν στους βακτηριακούς ξενιστές τους να επιβιώσουν καλύτερα σε ένα δυσμενές περιβάλλον ή να ανταγωνιστούν καλύτερα τους άλλους μικροοργανισμούς

που καταλαμβάνουν την ίδια οικολογική περιοχή ([Actis et al., 1999](#)). Στην περίπτωση που τα πλασμίδια κωδικοποιούν μόνο πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην αντιγραφή αυτών των μορίων και δεν συνεισφέρουν άλλη ιδιότητα στο βακτήριο τότε τα πλασμίδια χαρακτηρίζονται ως κρυπτικά. Παρά το γεγονός ότι τα πλασμίδια κωδικοποιούν τα συγκεκριμένα μόρια που απαιτούνται για την έναρξη της αντιγραφής τους, εν τούτοις βασίζονται στους παράγοντες του ξενιστή τους για την αναπαραγωγή τους.

Τα πρώτα πλασμίδια απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν την δεκαετία του 1950 (μάλιστα πριν ακόμα οι Watson και Crick διασαφηνίσουν τη δομή διπλής έλικας του DNA) και σχετίστηκαν με ανθεκτικότητες σε αντιβιοτικά. Έκτοτε, η έρευνα πάνω στα πλασμίδια έχει συνεισφέρει σημαντικά στα πεδία της σύγχρονης μοριακής βιολογίας και γενετικής ([Actis et al., 1999](#)) και αφορά την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά και τοξικά βαρέα μέταλλα, την αποικοδόμηση ξενοβιοτικών, την παραγωγή βακτηριοσινών, τη βακτηριακή σύζευξη (conjugation) κ.α. ([Mølbak et al., 2003](#)).

Μια άλλη πολύ σημαντική ιδιότητα των πλασμιδίων είναι η συμμετοχή τους στην οριζόντια μεταφορά γονιδίων (Horizontal Gene Transfer, HGT), με την οποία τα βακτήρια αποκτούν ιδιότητες προσαρμογής βελτιώνοντας την επιβίωσή τους κάτω από επιλεκτικές πιέσεις (π.χ. απόκτηση ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά ή ικανότητας να χρησιμοποιούν διαφορετικές πηγές άνθρακα) ([Sørensen et al., 2005](#)). Τα στοιχεία που προκύπτουν από την αλληλούχηση των βακτηρίων δείχνουν σαφώς ότι τα βακτήρια προσαρμόζονται και τα γονιδιώματα εξελίσσονται με αναδιάταξη του υπάρχοντος DNA και με απόκτηση νέων αλληλουχιών. Συνεπώς, τα πλασμίδια συμβάλλουν στη γενετική ποικιλομορφία λειτουργώντας ως φορείς ανταλλαγής DNA μεταξύ των βακτηριακών πληθυσμών καθώς φέρουν ικανότητα μετακίνησης από μικροοργανισμό σε μικροοργανισμό μέσω σύζευξης ([Gogarten et al., 2002](#)). Οι γενετικές πληροφορίες που μεταφέρονται με τα πλασμίδια, ο αντίκτυπός τους στις μικροβιακές κοινότητες, αλλά και το δυναμικό αυτών των στοιχείων να δρουν ως φυσικοί φορείς κλωνοποίησης έχουν οδηγήσει στην εντατικοποίηση της έρευνας στο πεδίο των πλασμιδίων όχι μόνο από τη θεμελιώδη αλλά επίσης και από την κλινική, βιοτεχνολογική και περιβαλλοντική άποψη ([Mølbak et al., 2003](#)).

Επιπλέον, τα πλασμίδια κατέχουν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη της γενετικής μηχανικής και της μοριακής βιολογίας, όσον αφορά τις μεθόδους κλωνοποίησης του

DNA (Sorensen *et al.*, 2005). Η γενετική τροποποίηση των βακτηρίων πραγματοποιείται κυρίως μέσω μετασχηματισμό με πλασμιδιακούς φορείς.

Όσον αφορά τη γενετική δομή τους, τα πλασμίδια φέρουν μια βασική περιοχή με τα γονίδια και τις αλληλουχίες που συμμετέχουν στην αντιγραφή και τον έλεγχο της. Αυτή η περιοχή περιλαμβάνει: (α) τα σημεία έναρξης της αντιγραφής (origin of replication, *ori*) που είναι χαρακτηριστικά για κάθε ρεπλικόνιο, (β) τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην έναρξη της αντιγραφής (πρωτεΐνες Rep, αν και αυτό δεν αποτελεί γενικό χαρακτηριστικό των πλασμιδίων) και (γ) τα γονίδια που εμπλέκονται στον έλεγχο του αναδιπλασιασμού των πλασμιδίων. Η ανάγκη ύπαρξης μιας πλασμιδιακής πρωτεΐνης έναρξης αντιγραφής (Rep) αντικατοπτρίζεται από την παρουσία συναφών περιοχών DNA στα σημεία έναρξης αντιγραφής (*oris*), όπου λαμβάνουν χώρα αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-DNA.

1.3.2. Μηχανισμοί αντιγραφής των πλασμιδίων

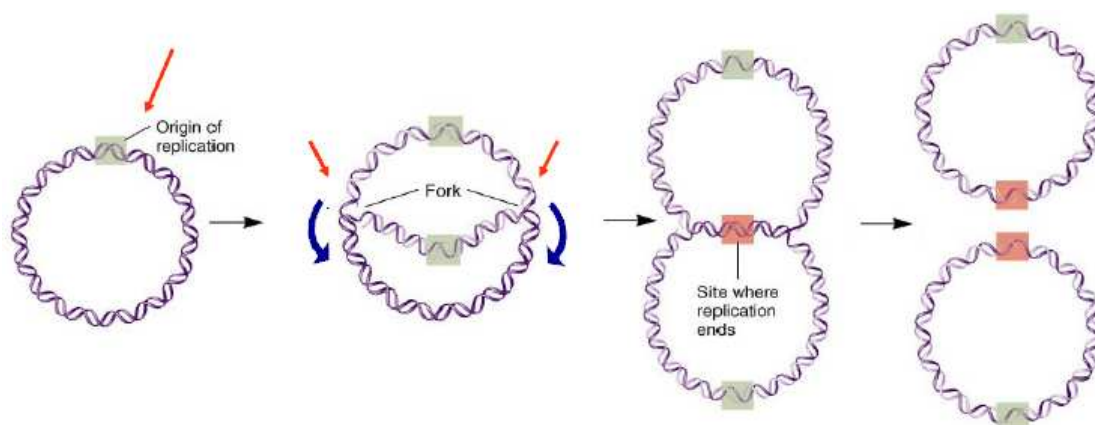
Υπάρχουν τρεις γενικοί μηχανισμοί αντιγραφής στα κυκλικά πλασμίδια, ο μηχανισμός θήτα (*theta*), η εκτόπιση κλώνου (*strand displacement*) και ο μηχανισμός κυλιόμενης αντιγραφής (*rolling circle*, RC). Η ιστορική εξέλιξη της έρευνας που αφορά τα πλασμίδια οδήγησε στην ιδέα ότι η αντιγραφή θήτα είναι πιο συχνή στα ρεπλικόνια των Gram αρνητικών βακτηρίων ενώ ο μηχανισμός κυλιόμενης αντιγραφής (RC) συναντάται ως επί το πλείστον στα θετικά κατά Gram βακτήρια. Αυτή η πεποίθηση είναι πιθανότατα λανθασμένη (del Solar *et al.*, 1998). Ωστόσο, οι σημερινές γνώσεις πάνω στο μηχανισμό θήτα πηγάζουν από ρεπλικόνια των Gram αρνητικών βακτηρίων και ο μηχανισμός RC από πλασμίδια Gram θετικών ξενιστών. Η εκτόπιση κλώνου έχει σχετιστεί με πλασμίδια της οικογένειας IncQ που έχουν απομονωθεί από τα είδη *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Τα γραμμικά πλασμίδια έχουν εντοπιστεί σε Gram θετικά και αρνητικά βακτήρια αλλά όσον αφορά τα οξυγαλακτικά ο *Lactobacillus gasseri* είναι το μοναδικό είδος για το οποίο έχει περιγραφθεί τέτοιο μόριο (Hinnebusch & Tilly, 1991).

Στην συνέχεια του κειμένου αναλύονται οι μηχανισμοί θήτα και αντιγραφής RC των κυκλικών πλασμιδίων. Οι μηχανισμοί αντιγραφής των γραμμικών πλασμιδίων δεν θα εξεταστούν καθώς τα συγκεκριμένα μόρια είναι εκτός του σκοπού της συγκεκριμένης εργασίας, όπως επίσης ο μηχανισμός αντιγραφής εκτόπισης κλώνου που δεν έχει αναφερθεί σε πλασμίδια οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Μηχανισμός θήτα αντιγραφής

Ο μηχανισμός αντιγραφής θήτα έχει εντοπιστεί κυρίως σε κυκλικά πλασμίδια Gram αρνητικών βακτηρίων αλλά έχει περιγραφεί και σε Gram θετικά και συγκεκριμένα σε στρεπτόκοκκους, εντεροκόκκους, λακτοκόκκους, πεδιοκόκκους και γαλακτοβακίλλους.

Η αντιγραφή του DNA μέσω του μηχανισμού θήτα περιλαμβάνει την τήξη των δύο κλώνων, τη σύνθεση ενός εκκινητή RNA (pRNA) και την έναρξη της σύνθεσης του DNA μέσω της ομοιοπολικής επιμήκυνσης του pRNA (Kornberg & Baker, 1992). Η αντιγραφή προχωράει με συνεχή σύνθεση του προπορευόμενου κλώνου (leading strand) και ασυνεχή σύνθεση του δευτερεύοντα κλώνου (lagging strand), αν και η σύνθεση και των δυο κλώνων είναι συνδεδεμένη. Η θήτα αντιγραφή μπορεί να ξεκινήσει από ένα ή από διάφορα *oris* και μπορεί να κινείται σε μία ή δυο κατευθύνσεις. Με τη χρήση της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας τα ενδιάμεσα μόρια φαίνεται ότι έχουν σχήμα του Ελληνικού γράμματος Θ (Γράφημα 1.2). Εκτός από μερικές εξαιρέσεις, τα πλασμίδια που αναπαράγονται με μηχανισμό θήτα απαιτούν μια πλασμιδιακή πρωτεΐνη έναρξης αντιγραφής Rep ενώ ορισμένα από αυτά χρησιμοποιούν την DNA πολυμεράση I (DNA Pol I) του κυττάρου-ξενιστή.



Γράφημα 1.2.

Σχηματική απεικόνιση της αντιγραφής με το μηχανισμό θήτα (Pearson Education Inc.).

Το σημείο έναρξης αντιγραφής των πλασμιδίων (*ori*) μπορεί να οριστεί ως (α) η ελάχιστη περιοχή *cis*-δράσης που υποστηρίζει την αυτόνομη αντιγραφή του πλασμιδίου, (β) η περιοχή όπου συμβαίνει η τήξη του δίκλωνου DNA για να ξεκινήσει η αντιγραφή, ή (γ) η ακολουθία όπου αρχίζει η σύνθεση του προπορευόμενου κλώνου (leading strand). Τα σημεία *ori* περιλαμβάνουν τις περιοχές που απαιτούνται για τις αλληλεπιδράσεις των πλασμιδικά κωδικοποιημένων ή/και των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από τον ξενιστή (del Solar *et al.*, 1998). Συγκεκριμένα, τα *ori* φέρουν τις αλληλουχίες με τις οποίες αλληλεπιδρά η πρωτεΐνη Rep. Πρόσθετα χαρακτηριστικά που εντοπίζονται σε πολλά πλασμίδια θήτα μηχανισμού είναι (α) μια παρακείμενη περιοχή με υψηλό ποσοστό σε αδενίνη και θυμίνη που περιέχει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και στην οποία λαμβάνει χώρα το άνοιγμα των δυο κλώνων καθώς και (β) μια ή περισσότερες θέσεις (*dnaA* boxes) όπου δεσμεύεται η πρωτεΐνη DnaA.

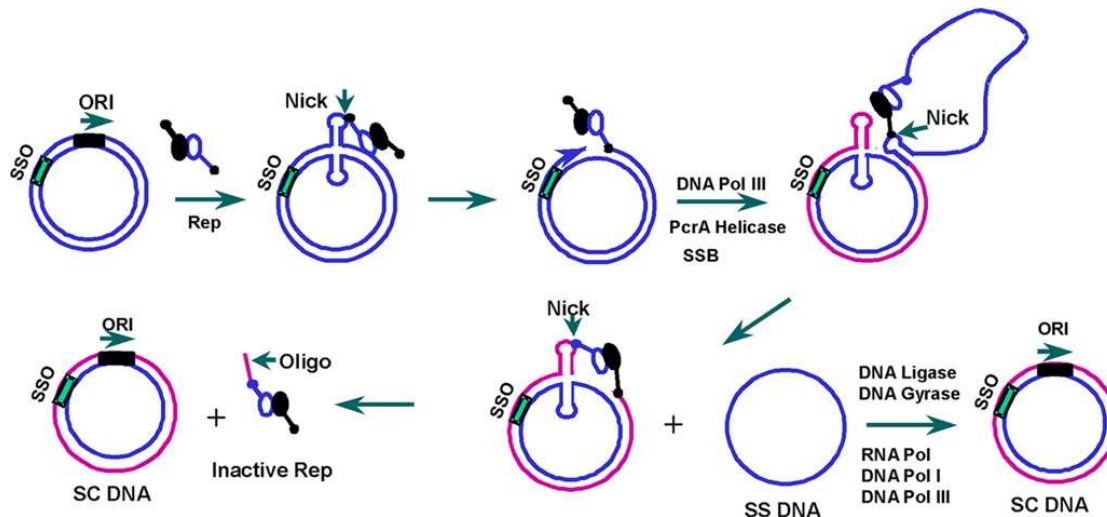
Σε πολλές περιπτώσεις, τα *ori* περιλαμβάνουν ευθείες/ομόρροπες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που ονομάζονται ιτερόνια (iterons) και που αποτελούν τα σημεία πρόσδεσης των πλασμιδιακών πρωτεϊνών Rep. Τα ιτερόνια δεν είναι απαραίτητα μόνο για την αντιγραφή αλλά επίσης παίζουν βασικό ρόλο στον έλεγχο της αντιγραφής του πλασμιδίου (Filutowicz *et al.*, 1994, Nordstrom, 1990).

Μηχανισμός κυλιόμενης αντιγραφής

Κατά το μηχανισμό κυλιόμενης αντιγραφής (Rolling Circle Replication, RCR) η σύνθεση του προπορευόμενου και του δευτερεύοντα κλώνου δεν συνδέονται. Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά της αντιγραφής RCR είναι ότι ο νέος προπορευόμενος κλώνος που συντίθεται παραμένει ομοιοπολικά συνδεδεμένος στον αντίστοιχο μητρικό κλώνο (del Solar *et al.*, 1998). Αρχικά, η RCR αντιγραφή θεωρήθηκε ότι περιορίζεται σε μικρά πλασμίδια πολλαπλών αντιγράφων Gram θετικών βακτηρίων. Πλέον, είναι γνωστό ότι αυτός ο μηχανισμός απαντάται και σε άλλους τύπους πλασμιδίων Gram θετικών βακτηρίων αλλά και Αρχαίων.

Η εκκίνηση της αντιγραφής RCR (Γράφημα 1.3) πραγματοποιείται από την πλασμιδιακή πρωτεΐνη έναρξης αντιγραφής (Replication initiation protein, Rep), η οποία εισάγει μια εγκοπή (nick site) στον προπορευόμενο κλώνο και συγκεκριμένα στην περιοχή που ονομάζεται σημείο έναρξης αναδιπλασιασμού της διπλής αλυσίδας (double-strand origin, dso). Αυτή η εγκοπή δημιουργεί ένα 3' άκρο που χρησιμοποιείται ως εκκινήτης για τη σύνθεση του προπορευόμενου κλώνου, στην

οποία εμπλέκονται οι πρωτεΐνες αντιγραφής του κυττάρου-ξενιστή (η DNA πολυμεράση III και η ελικάση). Η επιμήκυνση από το 3' άκρο σε συνδυασμό με τη μετατόπιση του μητρικού προπορευόμενου κλώνου συνεχίζεται μέχρις ότου το ρεπλίσωμα φτάσει το ανασυσταθέν dso και τότε τερματίζεται η αντιγραφή του προπορευόμενου κλώνου. Συνεπώς, τα τελικά προϊόντα της αντιγραφής του προπορευόμενου κλώνου είναι ένα δίκλωνο μόριο DNA (που αποτελείται από το μητρικό δευτερεύοντα κλώνο και το νέο-συντεθειμένο προπορευόμενο κλώνο) και ένα ενδιάμεσο μονόκλωνο μόριο DNA που αντιστοιχεί στο μητρικό πρωτεύοντα κλώνο. Η πρωτοποριακή εργασία του Ehrlich (1989) έδειξε ότι η παραγωγή μονόκλωνων μορίων DNA είναι το σήμα κατατεθέν των πλασμιδίων που χρησιμοποιούν το μηχανισμό αντιγραφής RCR (Gruss & Ehrlich, 1989, *te Riele et al., 1986*). Τέλος, ο μητρικός πρωτεύον κλώνος μετατρέπεται σε δίκλωνο μόριο DNA από τις πρωτεΐνες του κυττάρου-ξενιστή και αυτή η μετατροπή ξεκινάει από το σημείο έναρξης αντιγραφής της μονής αλυσίδας (single-strand origin, sso) που βρίσκεται μακριά από το dso. Το τελευταίο βήμα της RCR αντιγραφής περιλαμβάνει την υπερ-ελίκωση των παραγόμενων μορίων DNA από τη γυράση του ξενιστή.



Γράφημα 1.3.

Σχηματική απεικόνιση της αντιγραφής RCR (Khan, 2005).

Τα πλασμίδια RCR αποτελούνται από διάφορες υπομονάδες όμως η υπομονάδα που εμπλέκεται στην αντιγραφή είναι θεμελιώδης και περιλαμβάνει το

dso, τα γονίδια *rep* και τα στοιχεία που ελέγχουν τη διαδικασία της αντιγραφής (del Solar *et al.*, 1998). Επιπλέον, τα πλασμίδια μπορεί να περιλαμβάνουν παράγοντες ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, γονίδια που συμμετέχουν στη συζευγμένη κινητοποίηση (conjugative mobilization, *mob*) και μία ή δύο περιοχές *sso*. Με βάση τις ομολογίες της θεμελιώδους υπομονάδας αντιγραφής (τις πρωτεΐνες εκκίνησης Rep και τις περιοχές *dso*), τα πλασμίδια RCR ταξινομούνται σε τουλάχιστον πέντε οικογένειες (π.χ. pT181, pE194, pC194, pMV158) (Khan, 2005, Khan, 1997). Ένα τυπικό χαρακτηριστικό των RCR πλασμιδίων είναι ότι η περιοχή εγκοπής (nick site) είναι εξαιρετικά συντηρημένη ανάμεσα στα ρεπλικόνια της ίδιας οικογένειας.

1.3.3. Σημασία των πλασμιδίων στα οξυγαλακτικά βακτήρια

Η πρώτη υπόθεση για την παρουσία πλασμιδίων στα οξυγαλακτικά βακτήρια στηρίχθηκε στην παρατήρηση των McKay *et al.* (1972) που αφορούσε την απώλεια της ικανότητας ζύμωσης της λακτόζης σε διάφορους λακτοκόκκους. Πλέον είναι γνωστό ότι τα πλασμίδια εντοπίζονται σε πολλά οξυγαλακτικά βακτήρια και ποικίλουν τόσο ως προς το μέγεθος όσο και ως προς το γονιδιακό τους περιεχόμενο. Η συνεισφορά των πλασμιδιακών γονιδίων στο συνολικό γονιδιακό περιεχόμενο των οξυγαλακτικών βακτηρίων κυμαίνεται από 0 ως 4.8%. Έτσι τα πλασμίδια περιλαμβάνουν γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της λακτόζης/γαλακτόζης, στην πρωτεόλυση, στη μεταφορά ολιγοπεπτιδίων, στην ανθεκτικότητα σε βακτηριοφάγους, στο μεταβολισμό του κιτρικού οξέος, στην παραγωγή βακτηριοσινών αλλά και στους μηχανισμούς απόκρισης σε συνθήκες στρες (Gasson, 1990, McKay, 1983). Μάλιστα, όσον αφορά τον *L. lactis* πολλά πλασμιδιακά γονίδια συμμετέχουν σε λειτουργίες που δεν είχαν ποτέ αναφερθεί για το συγκεκριμένο μικροοργανισμό ενώ φέρουν σημαντικά διαφορετικό ποσοστό σε συγκέντρωση G+C%. Τέτοια χαρακτηριστικά των πλασμιδιακών γονιδίων υποδηλώνουν ότι αποκτήθηκαν μέσω οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (Horizontal Gene Transfer, HGT) από άλλους μικροοργανισμούς, όπως οι εντερόκοκκοι, οι στρεπτόκοκκοι ή οι γαλακτοβάκιλλοι (Schroeter & Klaenhammer, 2009).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν σημαντικά εργαλεία στην παραγωγή ζυμούμενων τροφίμων. Για το λόγο αυτό, τα στελέχη που επιλέγονται πρέπει να έχουν την ικανότητα να παράγουν το επιθυμητό προϊόν και να ανταπεξέρχονται τις συνθήκες της ζύμωσης. Επί του παρόντος, η χρήση γενετικά τροποποιημένων μικροοργανισμών δεν επιτρέπεται στη βιομηχανία τροφίμων. Εν

τούτοις, η εφαρμογή της γενετικής μηχανικής με σκοπό τη βελτίωση των χρησιμοποιούμενων καλλιεργειών ή την ανάπτυξη νέων στελεχών για τις εν λόγω ζυμώσεις αποτελεί ένα ενεργό πεδίο της έρευνας σε παγκόσμιο επίπεδο. Καθώς η γνώση σχετικά με τη γενετική και τη φυσιολογία των οξυγαλακτικών βακτηρίων αυξάνεται, καθίσταται δυνατή η κατασκευή γενετικά τροποποιημένων στελεχών με τα χαρακτηριστικά που απαιτούνται για συγκεκριμένες εφαρμογές (McKay & Baldwin, 1990). Η μελέτη της βιολογίας των πλασμιδίων των οξυγαλακτικών βακτηρίων και η περαιτέρω κατασκευή πλασμιδίων-φορέων διεξάγεται ενεργά και είναι απαραίτητη προκειμένου η βιομηχανία τροφίμων να καρπωθεί τα οφέλη της βιοτεχνολογίας.

Στην συνέχεια γίνεται συνοπτική αναφορά στα χαρακτηριστικά και τη σημασία των πλασμιδίων των κυριότερων γενών των οξυγαλακτικών βακτηρίων σύμφωνα με τις πλασμιδιακές αλληλουχίες που έχουν κατατεθεί μέχρι στιγμής στις βάσεις δεδομένων NCBI και EMBL (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/genlist.cgi?taxid=1&type=7&name=Plasmids>).

Πλασμίδια του γένους *Lactobacillus*

Τα πρώτα πλασμίδια που έχουν αναφερθεί για το γένος *Lactobacillus* απομονώθηκαν από τον *Lb. casei* (Chassy *et al.*, 1976) και εν συνεχεία από πολλούς άλλους γαλακτοβακίλλους. Μάλιστα, τα πλασμίδια αποτελούν κοινό χαρακτηριστικό του γένους *Lactobacillus*. Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί 76 πλασμίδια από 16 είδη αυτού του γένους (Πίνακας 1.1), αριθμός σχεδόν διπλάσιος από αυτόν του 2008 (34 πλασμίδια από 13 είδη, Zhang *et al.*, 2008). Κάποια από αυτά τα πλασμίδια φέρουν γονίδια που δυνητικά συνεισφέρουν στην προσαρμογή των κυττάρων σε διάφορες συνθήκες ανάπτυξης, π.χ. γονίδια που κωδικοποιούν την παραγωγή βακτηριοσινών, μεταφορείς σακχάρων ή αμινοξέων, ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό σακχάρων, συστήματα τροποποίησης αντιδράσεων περιορισμού κ.α.

Πίνακας 1.1.

Συγκεντρωτικός πίνακας των πλασμιδίων του γένους *Lactobacillus* με τις ιδιότητες που αυτά φέρουν (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Είδος	Συνολικός αριθμός πλασμιδίων	Αριθμός κρυπτικών πλασμιδίων	Μέγεθος (bp)	G+C%	Ιδιότητες
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2	1	2862-13913	40-43	Παραγωγή ασιδοσίνης
<i>Lactobacillus brevis</i>	7	3	1815-65037	37-42	Παραγωγή βρεβισίνης, NAD(FAD)-εξαρτώμενη αφυδρογενάση, σύστημα τοξίνης-αντιτοξίνης
<i>Lactobacillus casei</i>	9	4	3250-36487	38-44	ABC πρωτεΐνη-μεταφορέας, παραγωγή βακτηριοσινών, μεταβολισμός υδατανθράκων, μεταφορείς αμινοξέων, αφυδρογενάση ακετοΐνης/πυροσταφυλικού, υπομονάδες του συστήματος PTS, επιβίωση σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών, σύστημα τοξίνης-αντιτοξίνης
<i>Lactobacillus curvatus</i>	1	-	18664	34	Παραγωγή λακτοσίνης
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	3	3	6127-7921	44-45	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	3	-	8140-8716	42-43	Πρωτεΐνη HsdS, συστήματα τροποποίησης αντιδράσεων περιορισμού
<i>Lactobacillus farciminis</i>	1	1	2396	37	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	2	1	4392, 19389	33, 36	Συστήματα τροποποίησης αντιδράσεων περιορισμού, ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά (ερυθρομυκίνη, δαλφοπριστίνη)
<i>Lactobacillus gasseri</i>	1	-	33333		Παραγωγή γκασερίνης
<i>Lactobacillus helveticus</i>	8	5	3292-19360	34-36	-
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	2	2	3471, 25652	35, 30	-
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	5	3	3178-19882	39-43	Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, παραγωγή ασιδοσίνης, ABC μεταφορέας
<i>Lactobacillus plantarum</i>	21	16	1806-53560	36-41	Σύστημα τοξίνης-αντιτοξίνης, ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά και βαρέα μέταλλα, δραστηριότητα NADH-οξειδάσης, ATPase μεταφοράς καλίου, ABC μεταφορέας γλυκίνης/βεταΐνης/καρνιτίνης
<i>Lactobacillus reuteri</i>	7	1	4523-14173	33-41	Ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	3	-	8754-64508	41-42	Υπομονάδα IIA του PTS συστήματος λακτόζης, 6-φωσφορική-β-γαλακτοσιδάση, πρωτεΐνη πρόσδεσης ATP για μεταφορά σακχάρων, γλυκοσυλοτρανφεράση, πρωτεΐνη θερμικού στρες
<i>Lactobacillus sakei</i>	4	2	1970-12959	33-38	Ανθεκτικότητα σε τετρακυκλίνη, συστήματα τροποποίησης αντιδράσεων περιορισμού
<i>Lactobacillus salivarius</i>	3	-	20417-242436	-	Σύστημα τοξίνης-αντιτοξίνης

Για τους γαλακτοβακίλλους έχουν αναφερθεί τόσο RCR πλασμίδια που φαίνεται να ανιχνεύονται πιο συχνά, όσο και θήτα πλασμίδια που φέρονται να προτιμούνται για την κατασκευή φορέων κλωνοποίησης λόγω της μεγαλύτερης σταθερότητάς τους (Crutz-Le Coq & Zagorec, 2008). Σύμφωνα με τους Wang & Lee (1997) οι λειτουργίες των πλασμιδίων του γένους *Lactobacillus* μπορούν να διαχωριστούν σε τέσσερις κύριες ομάδες: 1) υδρόλυση πρωτεϊνών, 2) μεταβολισμός υδατανθράκων, αμινοξέων και κιτρικού οξέος, 3) παραγωγή βακτηριοσινών και εξωπολυσακχαριτών και 4) ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, βαρέα μέταλλα και φάγους.

Πλασμίδια του γένους *Lactococcus*

Όσον αφορά αυτό το γένος υπάρχει ένα πλασμίδιο κατατεθειμένο για τον *Lactococcus garviae* μεγέθους 20 kbp (32% G+C) με γονίδιο ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη και 39 πλασμίδια για τον *L. lactis* (από 1.5 μέχρι 68.3 kbp και G+C 29-48%). Από αυτά τα πλασμίδια τα 15 είναι κρυπτικά ενώ τα υπόλοιπα φέρονται να συμμετέχουν σε σημαντικές ιδιότητες του κυττάρου, όπως η μεταφορά κατιόντων (καλίου, μαγνησίου, μαγγανίου), η μεταφορά κιτρικού οξέος, η μεταφορά κοβαλτίου, η παραγωγή βακτηριοσινών (λακτοκοκκίνης), η ABC μεταφορά ολιγοπεπτιδίων, η σύνθεση της αφυδρογενάσης του γλουταμινικού οξέος και της αποκαρβοξυλάσης της 5-φωσφορικής οροτιδίνης, η ανθεκτικότητα σε βακτηριοφάγους (σύστημα τροποποίησης αντιδράσεων περιορισμού) κ.α. (O'Sullivan *et al.*, 2000, Seegers *et al.*, 2000, Dougherty *et al.*, 1998)

Πλασμίδια του γένους *Streptococcus*

Για το γένος *Streptococcus*, πλασμίδια έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από τα είδη *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. mutans*, *S. parasanguinis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. suis* και *S. thermophilus*. Τα τρία πλασμίδια του *S. agalactiae* κυμαίνονται σε μέγεθος από 5.5 έως 6.4 kbp (32-37% G+C) και τα δυο είναι κρυπτικά ενώ το ένα από αυτά φέρει γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Ο *S. dysgalactiae* έχει δυο πλασμίδια μεγέθους 3.0 και 3.5 kbp (35% GC) που συμμετέχουν στην παραγωγή της βακτηριοσίνης δυσγαλακτισίνης (Heng *et al.*, 2006). Ο *S. mutans* έχει δυο κρυπτικά πλασμίδια (μεγέθους 5.6 kbp και 32% G+C και τα δυο). Ο *S. parasanguinis* έχει ένα κρυπτικό πλασμίδιο (7.0 kbp και G+C 35%), ενώ ο *S. pneumoniae* φέρει τρία κρυπτικά (3.1-5.4 kbp, 32-35% G+C). Ο *S. pyogenes*

έχει τέσσερα πλασμίδια (3.0-28.9 kbp, 33-37% G+C) που φέρουν γονίδια παραγωγής βακτηριοσινών και ανθεκτικότητας στην ερυθρομυκίνη. Ο *S. suis* έχει ένα κρυπτικό πλασμίδιο (4.9 kbp και 36% G+C) και ένα πλασμίδιο μεγέθους 24.5 kbp (G+C 36%) που φέρει λοιμωγόνους παράγοντες και ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά (Holden *et al.*, 2009). Το είδος *S. thermophilus* έχει μέχρι στιγμής χαρακτηρισμένα 12 πλασμίδια ως επί το πλείστον μικρά σε μέγεθος (2.6-9.5 kbp, 32-38% G+C), εκ των οποίων τα έξι είναι κρυπτικά ενώ τα υπόλοιπα έξι κωδικοποιούν χαμηλού μοριακού βάρους πρωτεΐνες θερμικού στρες (Sollow & Somkuti, 2000).

Πλασμίδια του γένους *Enterococcus*

Μέχρι στιγμής στις βάσεις δεδομένων έχουν κατατεθεί 26 πλασμιδιακές αλληλουχίες από δύο είδη του γένους *Enterococcus* και συγκεκριμένα 13 για τον *E. faecalis* και 13 για τον *E. faecium* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Τα πλασμίδια αυτά κυμαίνονται σε μέγεθος από 2.2-106.5 kbp και έχουν ποσοστό G+C 31-39%. Μόλις τρία από τα πλασμίδια του *E. faecium* είναι κρυπτικά ενώ τα περισσότερα σχετίζονται με ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά (τετρακυκλίνη, γλωραμφενικόλη, φλορφενικόλη, βανκομυκίνη, γενταμυκίνη), με παραγωγή βακτηριοσινών (εντεροσινών), με σύζευξη που επάγεται από φερομόνες, με ανθεκτικότητα σε ακτινοβολία UV, με παραγωγή πρωτεϊνών θερμικού στρες κ.α. Γενικά, η φυσική ικανότητα των εντεροκόκκων να αποκτούν, να συσσωρεύουν και να διασπείρουν εξωχρωμοσωμικά πλασμίδια που κωδικοποιούν λοιμωγόνες ιδιότητες ή γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, τους δίνει πλεονεκτήματα για την επιβίωσή τους κάτω από περιβαλλοντικά στρες και εν μέρει εξηγεί τον αυξανόμενο ρόλο τους ως νοσοκομειακά παθογόνα (Murray, 1998).

Πλασμίδια του γένους *Leuconostoc*

Για το γένος αυτό έχουν περιγραφεί 10 πλασμίδια για το *Leuconostoc citreum*, 5 για τον *Ln. kimchii*, και 4 για τον *Ln. mesenteroides*. Τα πλασμίδια του *Ln. citreum* κυμαίνονται από 1.8 έως 38.7 kbp (με ποσοστό G+C 33-39%) και ενώ πέντε από αυτά είναι κρυπτικά, τα υπόλοιπα κωδικοποιούν ιδιότητες όπως: ABC μεταφορέα πεπτιδίων, πρωτεΐνη που συμμετέχει στη βιοσύνθεση εξωπολυσακχαριτών, πρωτεΐνη γενικού στρες, αφυδρογενάση, ΑΤΡαση μεταφοράς κατιόντων, πρωτεΐνη πρόσδεσης στο βλεννογόνο, οξειδάση χαλκού, θειορεδοξίνη κ.α. (Kim *et al.*, 2008). Από τα πέντε πλασμίδια του *Ln. kimchii* το ένα είναι κρυπτικό (3.1 kbp και G+C 37%) και τα υπόλοιπα τέσσερα έχουν μέγεθος από 21.0 μέχρι 29.6 kbp (G+C% 34-39). Φέρουν δε

γονίδια που συμμετέχουν στην ανθεκτικότητα στο κάδμιο, σε συστήματα τοξίνης/αντιτοξίνης ή που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, όπως η αναγωγή του αρσενικού, ο μεταφορέας ABC, ο αντιμεταφορέας Na^+/H^+ , το κανάλι μεταφοράς Cl^- , η θειορεδοξίνη κ.α. (Oh *et al.*, 2010). Μάλιστα, η παραγωγή θειορεδοξίνης από τα πλασμιδιακά γονίδια φαίνεται να είναι κοινό χαρακτηριστικό μεταξύ του *Ln. citreum* και του *Ln. kimchii*. Το είδος *Ln. mesenteroides* έχει τρία κρυπτικά πλασμίδια (1.8-4.6 kbp, 31-37% G+C), ενώ το τέταρτο είναι μεγέθους 37.3 kbp (35% GC) και φέρει μια ΑΤΡαση μεταφοράς κατιόντων, μια τσαπερόνη χαλκού, έναν ABC μεταφορέα, μια πρωτεΐνη ανθεκτικότητας στην καμφορά, μια NAD(FAD) εξαρτώμενη αφυδρογενάση κ.α. (Makarova *et al.*, 2006).

Πλασμίδια του γένους *Oenococcus*

Για αυτό το γένος έχουν περιγραφεί μόνο τρία κρυπτικά πλασμίδια του *Oenococcus oeni* που κυμαίνονται σε μέγεθος από 2.6 έως 3.9 kbp, ενώ και τα τρία έχουν ποσοστό σε G+C 35% (Mesas *et al.*, 2001).

Πλασμίδια του γένους *Pediococcus*

Όσον αφορά το γένος *Pediococcus*, έχουν χαρακτηριστεί δυο πλασμίδια για το είδος *P. acidilactici*, μεγέθους 8.9 και 11.6 kbp (G+C 36 και 34%, αντίστοιχα) που κωδικοποιούν την παραγωγή πεδιοσίνης (Motlagh *et al.*, 1994) και ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά ερυθρομυκίνη, τετρακυκλίνη και κλινδαμυκίνη (O'Connor *et al.*, 2007). Ο *P. damnosus* φέρει ένα κρυπτικό πλασμίδιο (5.5 kbp και 35% G+C). Ο *P. pentosaceus* έχει δυο κατατεθειμένα πλασμίδια, μεγέθους 10.1 και 19.5 kbp (34% G+C και για τα δύο) με το πρώτο φέρει σύστημα τροποποίησης αντιδράσεων περιορισμού και τοξίνης/αντιτοξίνης (Alegre *et al.*, 2009) και το δεύτερο να συμμετέχει στην παραγωγή της πεδιοσίνης A (Giacomini *et al.*, 2000) καθώς και ένα κρυπτικό πλασμίδιο μεγέθους 3.5 kbp (Alegre *et al.*, 2005).

Πλασμίδια του γένους *Tetragenococcus*

Από το γένος έχουν περιγραφεί μόνο τρία πλασμίδια για το είδος *Tetragenococcus halophilus*: δύο κρυπτικά μεγέθους 3.3 και 8.8 kbp (35% G+C) και ένα μεγέθους 29.9 kbp (35% G+C) που κωδικοποιεί την αποκαρβοξυλάση της ιστιδίνης (Satomi *et al.*, 2008).

1.4. Σκοπός και διάρθρωση της μελέτης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα οξυγαλακτικά αποτελούν τα πιο σημαντικά βακτήρια για τις ζυμώσεις τροφίμων, συνιστούν την πλειονότητα των εμπορικών εναρκτηρίων καλλιιεργειών και ως εκ τούτου είναι πλέον από τους καλύτερα μελετημένους μικροοργανισμούς (Hansen, 2002). Η απευθείας προσθήκη εμπορικών εναρκτηρίων καλλιιεργειών στην πρώτη ύλη αποτέλεσε επανάσταση στην παραγωγή ζυμούμενων τροφίμων. Παρόλα αυτά η αρχική επιλογή αυτών των καλλιιεργειών βασίστηκε κυρίως στην ικανότητά τους για ταχεία οξίνιση και την ανθεκτικότητά τους στους φάγους χωρίς να λαμβάνει υπόψη τις τεχνολογικά σημαντικές βιοχημικές τους ιδιότητες, ή τις αποκρίσεις τους σε τεχνολογικά στρες. Επιπλέον, ο τρόπος αναπαραγωγής των καλλιιεργειών εγκυμονεί κινδύνους απώλειας σημαντικών μεταβολικών ιδιοτήτων, πολλές από τις οποίες κωδικοποιούνται από πλασμίδια. Συνεπώς, η βιοποικιλότητα των εμπορικών εναρκτηρίων καλλιιεργειών είναι περιορισμένη με αποτέλεσμα τα χαρακτηριστικά του αρχικού προϊόντος που το καθιστούσαν μοναδικό να έχουν χαθεί (Leroy & De Vuyst, 2004).

Σήμερα στην Ελλάδα, όπως και στις υπόλοιπες αναπτυγμένες χώρες, η βιομηχανική παραγωγή τυροκομικών προϊόντων βασίζεται στη χρήση εμπορικών εναρκτηρίων καλλιιεργειών. Ωστόσο, στα μικρά τυροκομεία οι παραγωγοί εκμεταλλεύονται την παρουσία της άγριας μικροχλωρίδας του γάλακτος για την παρασκευή τυριών. Τα τυριά αυτά χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερα, πιο έντονα και ευχάριστα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, αποτελώντας ταυτόχρονα μια πηγή ανεξερεύνητων ακόμη μικροοργανισμών με ιδιαίτερη τεχνολογική δυναμική. Γίνεται σαφές λοιπόν, ότι αυτοί οι 'άγριοι' μικροοργανισμοί μπορούν να απομονωθούν και να χρησιμοποιηθούν ως εναρκτηρίες ή συμπληρωματικές καλλιιεργείες.

Προκειμένου να παραχθεί μια εναρκτηρία καλλιιεργεία κατάλληλη για μια συγκεκριμένη ζύμωση τροφίμου, απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί ο προσδιορισμός και η περιγραφή της επιθυμητής της λειτουργικότητας. Παρά το γεγονός ότι σήμερα η γενετική τροποποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι εφικτή και επιτρέπει την κατασκευή στελεχών με επιθυμητές λειτουργικές ιδιότητες, η εφαρμογή τους δεν επιτρέπεται από την υπάρχουσα Ευρωπαϊκή νομοθεσία. Πέρα τούτου, η χρήση τους σκοντάφτει στη χαμηλή αποδοχή από τη πλευρά του καταναλωτικού κοινού. Συνεπώς, ακόμη και σήμερα η αναζήτηση εναρκτηρίων καλλιιεργειών βασίζεται στην

εξέταση μεγάλου αριθμού στελεχών απομονωμένων από τρόφιμα αυθόρμητης ζύμωσης. Στη συνέχεια, η επιλογή των κατάλληλων, κατά περίπτωση, καλλιεργειών γίνεται με βάση τις μεταβολικές τους δραστηριότητες αλλά και τις επιδόσεις τους σε μικρής κλίμακας ζυμώσεις τροφίμων (Leroy & De Vuyst, 2004).

Με βάση τα προηγούμενα, ο σκοπός της 1^{ης} ενότητας της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της μικροχλωρίδας τριών παραδοσιακών Ελληνικών τυριών Π.Ο.Π., η απομόνωση νέων στελεχών και η μελέτη των τεχνολογικών/βιοχημικών τους ιδιοτήτων που σχετίζονται με το δυναμικό εφαρμογής τους ως εναρκτήριες καλλιέργειες σε ζυμώσεις τυριών. Από τα άγρια αυτά στελέχη επιλέχθηκαν τέσσερα με σκοπό την εφαρμογή τους ως εναρκτήριες καλλιέργειες στην παρασκευή ενός μαλακού τυριού από γίδινο γάλα, έτσι ώστε να εκτιμηθεί η τεχνολογική δυναμική τους σε πραγματικές συνθήκες παρασκευής και ωρίμανσης τυριού αλλά και η επίδρασή τους στα μικροβιολογικά, φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος.

Η 2^η ενότητα της παρούσας μελέτης αφορά τη διερεύνηση της απόκρισης του *Lactobacillus acidipiscis* σε συνθήκες ωσμωτικού στρες. Εξαιτίας της μεγάλης βιομηχανικής σημασίας των οξυγαλακτικών βακτηρίων η μελέτη της απόκρισής τους στα διάφορα στρες αποτελεί ένα σημαντικό πεδίο έρευνας. Τα στελέχη αυτά θα πρέπει να ανταπεξέλθουν στις δυσμενείς συνθήκες που απαντώνται στις βιομηχανικές διεργασίες, με σκοπό την ολοκλήρωση της σωστής ζύμωσης και την ανάπτυξη του επιθυμητού τελικού προϊόντος. Ιδιαίτερη σημασία στην περίπτωση της τυροκομίας έχει το ωσμωτικό στρες αφού η προσθήκη χλωριούχου νατρίου εφαρμόζεται στα τυριά τόσο για οργανοληπτικούς λόγους όσο και για λόγους ασφάλειας του τελικού προϊόντος. Ο *Lactobacillus acidipiscis* ACA-DC 1533 που απομονώθηκε από το δείγμα της παραδοσιακής Κοπανιστής (1^η ενότητα) παρουσίασε έναν ευδιάκριτο αλοανθεκτικό φαινότυπο. Ο σκοπός της 2^{ης} ενότητας λοιπόν ήταν ο εντοπισμός μηχανισμών που ενεργοποιούνται στο βακτήριο αυτό σε συνθήκες ωσμωτικού στρες, καθώς και ο προσδιορισμός των πιθανών εμπλεκόμενων ωσμωλυτών. Ο προσδιορισμός νέων ωσμωλυτών είναι πολύ σημαντικός για τη βιομηχανία τροφίμων, καθώς μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερη προστασία και έλεγχο των εναρκτήριων καλλιεργειών κατά τις επεξεργασίες που αποσκοπούν σε χαμηλή ενεργότητα νερού στο προϊόν.

Επιπλέον, έχει πολλάκις αναφερθεί σε έρευνες ότι τα πλασμιδιακά γονίδια εμπλέκονται σε σημαντικά τεχνολογικές ιδιότητες, όπως για παράδειγμα ο

καταβολισμός λακτόζης/γαλακτόζης, η πρωτεόλυση, η μεταφορά ολιγοπεπτιδίων, ο καταβολισμός του κιτρικού οξέος, η παραγωγή βακτηριοσινών, αλλά και οι μηχανισμοί απόκρισης σε συνθήκες στρες (Schroeter & Klaenhammer, 2009). Ακόμα και τα κρυπτικά πλασμίδια έχουν βρει βιοτεχνολογική εφαρμογή στην κατασκευή παλίνδρομων φορέων (shuttle vectors) οξυγαλακτικών βακτηρίων. Με βάση αυτά, στην 3^η ενότητα διερευνήθηκε το πλασμιδιακό περιεχόμενο επιλεγμένων οξυγαλακτικών στελεχών με σκοπό τον εντοπισμό γονιδίων που πιθανώς να συνεισφέρουν σε τεχνολογικές ιδιότητες. Η μελέτη αυτή αποκτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφού η διερεύνηση των πλασμιδίων των οξυγαλακτικών βακτηρίων έχει βασικά επικεντρωθεί μέχρι σήμερα στα καλά χαρακτηρισμένα και ερευνημένα είδη και στελέχη. Ως εκ τούτου, η επέκτασή της σε 'άγρια' στελέχη μπορεί να συνεισφέρει στην καλύτερη εκτίμηση της εξέλιξης και διαφοροποίησης των μορίων σε αυτά τα οικονομικώς σημαντικά βακτήρια.

Βιβλιογραφία

- Actis, L. A., Tolmasky, M. E., & Crosa, J. H. 1999. Bacterial plasmids: replication of extrachromosomal genetic elements encoding resistance to antimicrobial compounds. *Front Biosci*, 1(4), 43-62.
- Alegre, M. T., Rodríguez, M. C., & Mesas, J. M. 2009. Characterization of pRS5: a theta-type plasmid found in a strain of *Pediococcus pentosaceus* isolated from wine that can be used to generate cloning vectors for lactic acid bacteria.
- Alegre, M. T., Rodriguez, M.C., & Mesas, J.M. 2005. Nucleotide sequence, structural organization and host range of pRS4, a small cryptic *Pediococcus pentosaceus* plasmid that contains two cassettes commonly found in other lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 250, 151-6.
- Axelsson, L. 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*, third ed. Marcel Dekker, New York, pp. 1–66.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., & Cogan, T. M. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 259–274.
- Caplice, E., & Fitzgerald, G. F. 1999. Food fermentation: Role of microorganisms in food production and preservation. *Int J Food Microbiol*, 50, 131-149.
- Champomier-Vergès, 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(1-2), 329-42.
- Chassy, B. M., Gibson, E., & Giuffrida, A. 1976. Evidence for extrachromosomal elements in *Lactobacillus*. *J Bacteriol*, 127(3), 1576-8.
- Christensen, J. E., Dudley, E. G., Pederson, J. A., & Steele, J. L. 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76(1-4), 217-46.
- Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., & Wilkinson, M.G., 2003. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13, 841-866.
- Crutz-Le Coq, A.M., & Zagorec, M. 2008. Vectors for Lactobacilli and other Gram-positive bacteria based on the minimal replicon of pRV500 from *Lactobacillus sakei*. *Plasmid*, 60(3), 212-20.
- Csonka, L. N., & Hanson, A. D. 1991. Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu Rev Microbiol*, 45, 569-606.
- De Angelis, M., & Gobbetti, M. 2004. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics*, 4(1), 106-22.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M. J., Espinosa, M., & Diaz-Orejas, R. 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 434-464.
- Doeven, M. K., Kok, J., & Poolman, B. 2005. Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Mol Microbiol*, 57(3), 640-649.
- Dougherty, B. A., Hill, C., Weidman, J. F., Richardson, D. R., Venter, J. C., & Ross, R. P. 1998. Sequence and analysis of the 60 kb conjugative, bacteriocin-producing plasmid pMRC01 from *Lactococcus lactis* DPC3147. *Mol Microbiol*, 29(4), 1029-1038.

- Duwat, P., Sourice, S., Cesselin, B., Lamberet, G., Vido, K., Gaudu, P., Le Loir, Y., Violet, F., Loubière, P., & Gruss, A. 2001. Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *J Bacteriol*, 183(15), 4509-16.
- El Soda, M., Law, J., Tsakalidou, E., & Kalantzopoulos, G. 1995. Lipolytic activity of cheese-related microorganisms and its impact on cheese flavour. In G. Charalambous (Ed.), *Food flavors: generation, analysis and process influence* (pp. 1823–1847). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science.
- Filutowicz, M., Dellis, S., Levchenko, I., Urh, M., Wu, F., & York, D. 1994. Regulation of replication in an iteron-containing DNA molecule. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 68, 239–273.
- Fox, P. F., Lucey, J. A., & Cogan, T. M. 1990. Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 29(4), 237-253.
- Fox, P. F. 1989. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, 72, 1379-1400.
- Garrity, G. M., & Holt, J. G. 2001. The road map to the manual. In: Boone DR, Castenholz RW (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer Verlag, New York.
- Gasson, M. J. 1990. In vivo genetic systems in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 7, 43–60.
- Giacomini, A., Squartini, A., & Nuti, M. P. 2000. Nucleotide sequence and analysis of plasmid pMD136 from *Pediococcus pentosaceus* FBB61 (ATCC43200) involved in pediocin A production. *Plasmid*, 43(2), 111-22.
- Glaasker, E., Konings, W. N., & Poolman, B. 1996. Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol*, 178, 575–582.
- Gogarten, J. P., Doolittle, W. F., & Lawrence, J. G. 2002. Prokaryotic evolution in light of gene transfer. *Mol. Biol. Evol*, 19(12), 2226-38.
- Gruss, A. D., & Ehrlich, S. D. 1989. The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmids. *Microbiol Rev*, 53, 231–241.
- Hansen, E. B. 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 119–131.
- Hartke, A., Bouché, S., Giard, J. C., Benachour, A., Boutibonnes, P. & Auffray, Y. 1996. The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Curr Microbiol*, 33, 194–199.
- Heng, N. C., Ragland, N. L., Swe, P. M., Baird, H. J., Inglis, M. A., Tagg, J. R., & Jack, R. W. 2006. Dysgalacticin: a novel, plasmid-encoded antimicrobial protein (bacteriocin) produced by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Microbiology*, 152(7), 1991-2001.
- Hinnebusch, J., & Tilly, K. 1993. Linear plasmids and chromosomes in bacteria. *Mol Microbiol*, 10, 917-922.
- Holden, M. T., Hauser, H., Sanders, M., Ngo, T. H., Cherevach, I., Cronin, A., Goodhead, I., Mungall, K., Quail, M. A., Price, C., Rabinowitsch, E., Sharp, S., Croucher, N. J., Chieu, T. B., Mai, N. T., Diep, T. S., Chinh, N. T., Kehoe, M., Leigh, J. A., Ward, P. N., Dowson, C. G., Whatmore, A. M., Chanter, N., Iversen, P., Gottschalk, M., Slater, J. D., Smith, H. E., Spratt, B. G., Xu, J., Ye, C., Bentley, S., Barrell, B. G., Schultsz, C., Maskell, D. J., & Parkhill, J. 2009. Rapid evolution of virulence and drug resistance in the emerging zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *PLoS One*, 4(7), e6072.

- Kandler, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49(3), 209-224.
- Khan, S. A. 2005. Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research. *Plasmid*, 53(2), 126-136.
- Khan, S. A. 1997. Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61(4), 442-455.
- Kim, J. F., Jeong, H., Lee, J. S., Choi, S. H., Ha, M., Hur, C. G., Kim, J. S., Lee, S., Park, H. S., Park, Y. H., & Oh, T. K. 2008. Complete genome sequence of *Leuconostoc citreum* KM20. *J Bacteriol*, 190(8), 3093-4.
- 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.
- Kornberg, A., & T. Baker. 1992. DNA replication. W. H. Freeman & Co. New York, N.Y.
- Kunji, E. R., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B., & Konings, W. N. 1996. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70(2-4), 187-221.
- Law, B. A. (2001). Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technologies. *International Dairy Journal*, 11, 383-398.
- Law, B. A. (Ed), 1997. Microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk. Second edition. Blackie academic & professional. London, UK.
- Lederberg, J. 1952. Cell genetics and hereditary symbiosis. *Physiol Rev*, 32, 403-430.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.
- Liu, S. -Q., Holland, R., & Crow, V. L. 2004. Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *International Dairy Journal*, 14(11), 923-945.
- Lucke, F.-K. 2000. Utilization of microbes to process and preserve meats. *Meat Science*, 56, 105-115.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D. M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J. H., Díaz-Muñiz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., & Mills, D. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci*. 103, 15611-15616.
- Marilley, L., & Casey, M. G. 2004. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 139-159.
- McKay, L. L., & Baldwin, K. A. 1990. Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 87, 3-14.
- McKay, L. L. 1983. Functional properties of plasmids in lactic streptococci. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49, 259-274.
- McKay, L. L., Baldwin, K. A., & Zottola, E. A. 1972. Loss of lactose metabolism in lactic streptococci. *Appl Microbiol*, 23(6), 1090-6.

- McSweeney, P. L. H., & Sousa, M. J. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening: A review. *Lait*, 80, 293-324.
- Mercenier, A., Pavan, S., & Pot, B. 2002. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. *Curr Pharm Des*, 9(2), 175-191.
- Mesas, J. M., Rodríguez, M. C., & Alegre, M. T. 2001. Nucleotide sequence analysis of pRS2 and pRS3, two small cryptic plasmids from *Oenococcus oeni*. *Plasmid*, 46(2), 149-51.
- Mølbak, L., Tett, A., Ussery, D. W., Wall, K., Turner, S., Bailey, M., & Field, D. 2003. The plasmid genome database. *Microbiology*, 149, 3043-3045.
- Motlagh, A., Bukhtiyarova, M., & Ray, B. 1994. Complete nucleotide sequence of pSMB 74, a plasmid encoding the production of pediocin AcH in *Pediococcus acidilactici*. *Lett Appl Microbiol*, 18(6), 305-12.
- Murray, B. E. 1998. Diversity among multidrug-resistant enterococci. *Emerg Infect Dis*, 4(1), 37-47.
- Nordstrom, K. 1990. Control of plasmid replication. How do DNA iterons set the replication frequency? *Cell*, 63, 1121-1124.
- O'Connor, E. B., O'Sullivan, O., Stanton, C., Danielsen, M., Simpson, P. J., Callanan, M. J., Ross, R. P., & Hill, C. 2007. pEOC01: a plasmid from *Pediococcus acidilactici* which encodes an identical streptomycin resistance (*aadE*) gene to that found in *Campylobacter jejuni*. *Plasmid*, 58(2), 115-26.
- O'Sullivan, D., Twomey, D. P., Coffey, A., Hill, C., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. 2000. Novel type I restriction specificities through domain shuffling of HsdS subunits in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol*, 36(4), 866-875.
- Oh, H. M., Cho, Y. J., Kim, B. K., Roe, J. H., Kang, S. O., Nahm, B. H., Jeong, G., Han, H. U., & Chun, J. 2010. Complete genome sequence analysis of *Leuconostoc kimchii* IMSNU 11154. *J Bacteriol*, 192(14), 3844-5.
- Orla-Jensen, S. 1942. *The Lactic Acid Bacteria*, 2nd ed. Copenhagen: Ejnar Munksgaard.
- Poirier, I., Maréchal, P. A., Evrard, C., & Gervais, P. 1998. *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* responses to osmotic stress. *Appl Microbiol Biotechnol*, 50(6), 704-9.
- Poolman, B., & Glaesker, E. 1998. Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol Microbiol*, 29(2), 397-407.
- Poolman, B., Smid, E. J., Veldkamp, H., & Konings, W. 1987. Bioenergetic consequences of lactose starvation for continuously cultured *Streptococcus cremoris* and *Streptococcus lactis*. *J Bacteriol*, 169, 1460-1468.
- Postma, P. W., Lengeler, J. W., & Jacobson, G. R. 1993. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev*, 57(3), 543-594.
- Pfeiler, E. A., & Klaenhammer, T.R. 2007. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends Microbiol*, 15, 546-53.
- Sanz, Y., Toldrá, F., Renault, P., & Poolman, B. 2003. Specificity of the second binding protein of the peptide ABC-transporter (Dpp) of *Lactococcus lactis* IL1403. *FEMS Microbiol Lett*, 227, 33-38.
- Satomi, M., Furushita, M., Oikawa, H., Yoshikawa-Takahashi, M., & Yano, Y. 2008. Analysis of a 30 kbp plasmid encoding histidine decarboxylase gene in *Tetragenococcus halophilus* isolated from fish sauce. *Int J Food Microbiol*, 126(1-2), 202-9.
- Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 71(4), 394-406.

- Schroeter, J., & Klaenhammer, T. 2009. Genomics of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 292(1), 1-6.
- Seegers, J. F., van Sinderen, D., & Fitzgerald, G. F. 2000. Molecular characterization of the lactococcal plasmid pCIS3: natural stacking of specificity subunits of a type I restriction/modification system in a single lactococcal strain. *Microbiology*, 146 (2), 435-443.
- Serrazanetti, D. I., Guerzoni, M. E., Corsetti, A., & Vogel, R. 2009. Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. *Food Microbiol*, 26(7), 700-11.
- Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1-29.
- Solow, B. T., & Somkuti, G. A. 2000. Comparison of low-molecular-weight heat stress proteins encoded on plasmids in different strains of *Streptococcus thermophilus*. *Curr Microbiol*, 41(3), 177-81.
- Sørensen, S. J., Bailey, M., Hansen, L. H., Kroer, N., & Wuertz, S. 2005. Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. *Nat Rev Microbiol*, 3(9), 700-710.
- Sousa, M. J., Ardo, Y., & McSweeney, P. L. H. 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11, 327-345.
- Tannock, G. W. 1999. Identification of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr Issues Mol Biol*, 1, 53-64.
- te Riele, H., Michel, B., & Ehrlich, S. D. 1986. Single-stranded plasmid DNA in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci*, 83, 2541-2545.
- Trainor, V. C., Udy, R. K., Bremer, P. J., & Cook, G. M. 1999. Survival of *Streptococcus pyogenes* under stress and starvation. *FEMS Microbiol Lett*, 176, 421-428.
- 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(1-4), 187-216.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. Pp. 408-414. Laboratory of Microbiology, University of Gent, Gent, Belgium.
- Wang, T. T., & Lee, B. H. 1997. Plasmids in *Lactobacillus*. *Crit Rev Biotechnol*, 17(3), 227-72.
- Warriner, K. S. R., & Morris, J. G. 1995. The effects of aeration on the bioreductive abilities of some heterofermentative lactic acid bacteria. *Lett Appl Microbiol*, 20, 323-327.
- Zhang, W., Yu, D., Sun, Z., Chen, X., Bao, Q., Meng, H., Hu, S., & Zhang, H. 2008. Complete nucleotide sequence of plasmid plca36 isolated from *Lactobacillus casei* Zhang. *Plasmid*, 60(2), 131-5.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

**Τεχνολογικό δυναμικό
‘άγριων’ οξυγαλακτικών βακτηρίων
απομονωμένων από παραδοσιακά Ελληνικά τυριά**

2.1. Εισαγωγή

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια, οι ζύμες και οι μύκητες αποτελούν τις κυριότερες εναρκτήριες καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή ζυμούμενων τροφίμων, κατέχοντας ένα μέγεθος αγοράς της τάξης των 250 εκατομμυρίων δολαρίων (Hansen, 2002). Σε παγκόσμιο επίπεδο, τα οξυγαλακτικά βακτήρια συνιστούν την πλειονότητα των εμπορικών εναρκτήριων καλλιεργειών τόσο σε ποσότητα όσο και σε αξία με τη μέγιστη χρήση τους να αφορά τη βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων.

Προκειμένου να παραχθεί μια ιδανική εναρκτήρια καλλιέργεια για μια συγκεκριμένη ζύμωση τροφίμων, απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί ο προσδιορισμός και η περιγραφή της επιθυμητής της λειτουργικότητας. Πάνω σε αυτό στηρίζεται η επιλογή του πλέον κατάλληλου στελεχούς ή του συνδυασμού στελεχών. Τοιουτοτρόπως, οι ζυμώσεις τροφίμων μπορούν να βελτιωθούν. Πλέον έχουν αναπτυχθεί ερευνητικά εργαλεία, τα οποία επιτρέπουν τη διερεύνηση συγκεκριμένων γονιδίων και μεταβολικών μονοπατιών που επιφέρουν την επιθυμητή ιδιότητα/απόδοση των εναρκτήριων καλλιεργειών (de Vos & Hugenholtz, 2004, Renault, 2002). Παρόλα αυτά, οι καινοτομίες στο πεδίο των ζυμούμενων τροφίμων που απαιτούν νέα είδη εναρκτήριων καλλιεργειών, στηρίζονται ακόμα σε μια λεπτή ισορροπία μεταξύ επιστήμης και τεχνολογίας, ασφάλειας και νομοθεσίας, αγοραστικής ανάγκης και βούλησης των καταναλωτών, αλλά και σε οικονομικούς παράγοντες.

Παρά το γεγονός ότι σήμερα η γενετική τροποποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι εφικτή και επιτρέπει την κατασκευή στελεχών με συγκεκριμένες λειτουργικές ιδιότητες, η εφαρμογή τους δεν επιτρέπεται από την υπάρχουσα Ευρωπαϊκή νομοθεσία. Πέραν τούτου, η χρήση τους σκοντάφτει στη χαμηλή αποδοχή από τη πλευρά του καταναλωτικού κοινού. Συνεπώς, ακόμα και σήμερα η αναζήτηση εναρκτήριων καλλιεργειών βασίζεται στην εξέταση μεγάλου αριθμού στελεχών απομονωμένων από ζυμούμενα τρόφιμα αυθόρμητης ζύμωσης. Οι καλλιέργειες ελέγχονται ως προς τις επιθυμητές μεταβολικές δραστηριότητες αλλά και τις επιδόσεις τους σε μικρής κλίμακας ζυμώσεις τροφίμων (Leroy & De Vuyst, 2004). Η εναρκτήρια καλλιέργεια που τελικά επιλέγεται με αυτό τον τρόπο είναι αυτή που αποδίδει καλύτερα στην τεχνολογική διαδικασία αλλά επίσης προσδίδει τα επιθυμητά

οργανοληπτικά χαρακτηριστικά στο τελικό προϊόν. Η μεγάλη ποικιλία των ζυμούμενων τροφίμων που υπάρχουν σήμερα αποτελεί απόδειξη του μεγάλου αριθμού καλλιεργειών που έχουν απομονωθεί με αυτό τον τρόπο. Αυτή δε η μέθοδος θα χρησιμοποιηθεί με βεβαιότητα και στο μέλλον έτσι ώστε να διευρυνθεί αυτή η φυσική δεξαμενή μικροοργανισμών και να επιλεγούν τα κατάλληλα στελέχη ως εναρκτήριες καλλιέργειες στις ζυμώσεις τροφίμων.

Στην Ελλάδα υπάρχει μια πολύ μεγάλη ποικιλία παραδοσιακών τυριών με έντονα διαφοροποιημένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, τα οποία αποδίδονται κυρίως στο γάλα, τις συνθήκες επεξεργασίας αλλά και την αυτόχθονη μικροχλωρίδα. Είκοσι από αυτά τα τυριά έχουν κατοχυρωθεί ως προϊόντα Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.) (OJEC, 1996). Τα περισσότερα από αυτά τα τυριά παραμένουν επιστημονικά ανεξερευνήτα και συνεπώς μπορούν να θεωρηθούν ως μια πηγή μικροοργανισμών με πολύτιμες λειτουργικές ιδιότητες.

Με βάση τα προηγούμενα, ο σκοπός της πρώτης ενότητας αυτής της εργασίας ήταν η διερεύνηση της μικροχλωρίδας τριών παραδοσιακών Ελληνικών Π.Ο.Π. τυριών, η απομόνωση νέων στελεχών και η μελέτη των βιοχημικών τους ιδιοτήτων που σχετίζονται με το δυναμικό εφαρμογής τους ως εναρκτήριες καλλιέργειες στην παρασκευή τυριών.

2.2. Υλικά και μέθοδοι

2.2.1. Καταμέτρηση μικροβιακών πληθυσμών και απομόνωση νέων στελεχών

Σε αυτή τη μελέτη συμπεριλήφθηκαν πέντε δείγματα τυριών: (1) δυο δείγματα Φορμαέλλας Αραχώβης Παρνασσού (ένα τριών ημερών και ένα δύο μηνών ωρίμανσης), (2) ένα δείγμα Κοπανιστής Τήνου τρίμηνης ωρίμανσης, (3) ένα δείγμα Μάνας Μυκόνου δύο χρόνων και (4) ένα δείγμα Φέτας τεσσάρων μηνών από την περιοχή της Κορίνθου. Επίσης αναλύθηκε ένα δείγμα νωπού αγελαδινού γάλακτος. Όλα τα υπό εξέταση τυριά είχαν παραχθεί ακολουθώντας τις παραδοσιακές τεχνολογίες χωρίς την προσθήκη εμπορικών καλλιεργειών. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο υπό συνθήκες ψύξης και οι μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εντός 24 ωρών.

Η καταμέτρηση των μικροβιακών πληθυσμών έγινε σύμφωνα με το πρότυπο 122C της IDF (IDF, 1996). Συγκεκριμένα, 10 g τυριού ομογενοποιήθηκαν με 90 mL αποστειρωμένου διαλύματος κιτρικού νατρίου (2%, w/v) σε συσκευή Stomacher 400 (Seward Medical, London, UK). Ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις των ομογενοποιημένων τυριών αλλά και του δείγματος γάλακτος σε αποστειρωμένο ισοτονικό διάλυμα Ringer και εξάπλωση σε επιλεκτικά υποστρώματα (της εταιρείας Biokar Diagnostics, Beauvais, France, εκτός και αν αναφέρεται διαφορετικά). Οι μικροβιακές ομάδες που καταμετρήθηκαν ήταν: (1) η ολική μεσόφιλη μικροχλωρίδα σε Plate Count Agar (PCA) στους 30° C για 72 h, (2) οι θεرمόφιλοι και μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι σε MRS άγαρ pH 5.5 μετά από αναερόβια επώαση στους 42 και 25° C αντίστοιχα για 48-72 h, (3) οι θεرمόφιλοι και μεσόφιλοι κόκκοι σε M17 άγαρ στους 42 και 25° C αντίστοιχα για 48 h, (4) τα μη εναρκτήρια οξυγαλακτικά βακτήρια (NSLAB) σε Rogosa άγαρ υπό αναερόβια επώαση στους 30° C για 72 h, (5) οι εντερόκοκκοι σε Kanamycin Aesculin Azide (KAA) άγαρ (Merck, Darmstadt, Germany) στους 37° C για 24 h, (6) τα *Leuconostoc* spp. σε MRS άγαρ εμπλουτισμένο με βανκομυκίνη (30 µg/mL) στους 30° C για 72 h, (7) οι μικρόκοκκοι σε Mannitol Salt Agar (MSA) εμπλουτισμένο με κυκλοεξαμίδιο (100 µg/mL) στους 30° C για 72 h, (8) οι ζύμες και μύκητες σε Yeast extract Glucose Chloramphenicol (YGC) άγαρ (Merck) στους 30° C για 72 h, (9) τα κολοβακτηροειδή σε Violet Red Bile Lactose (VRBL) άγαρ στους 37° C για 24 h και (10) οι ψευδομονάδες σε Cephaloridine Fucidin Ceftrimide (CFC) άγαρ (Merck) στους 25° C για 48 h. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε cfu (colony forming units)/g ή mL (για το δείγμα γάλακτος). Οι αναερόβιες συνθήκες επώασης επετεύχθησαν χρησιμοποιώντας το σύστημα αναεροβίωσης GasPak (BBL, Cockeysville, MD, USA). Η βανκομυκίνη και το κυκλοεξαμίδιο ήταν της Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Στα επιστρωμένα τρυβλία πραγματοποιήθηκε μακροσκοπική εξέταση όλων των αποικιών με στερεοσκόπιο. Από κάθε ένα από τα επτά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την καταμέτρηση των επιμέρους ομάδων των οξυγαλακτικών βακτηρίων επιλέχθηκαν αποικίες (10 από κάθε υπόστρωμα), με βάση τη διαφορετικότητα της μορφολογίας τους (σχήμα, μέγεθος, χρώμα και υφή). Οι επιλεγμένες αποικίες υποβλήθηκαν σε διαδοχικές εξαπλώσεις με μικροβιολογικό κρίκο (streaking) σε τρυβλία Petri με το θρεπτικό υπόστρωμα από το οποίο συλλέχθηκαν μέχρι να παρουσιάζουν σταθερή μακροσκοπική και μικροσκοπική

μορφή, οπότε θεωρήθηκαν καθαρές καλλιέργειες και διατηρήθηκαν στους -80°C σε πλαστικά φιαλίδια όγκου 2 ml (cryovials) με MRS broth και γλυκερόλη 20% (v/v).

2.2.2. Χαρακτηρισμός στελεχών

Όλες οι καλλιέργειες υποβλήθηκαν στη διαφορική χρώση κατά Gram και στη δοκιμή της καταλάσης. Η αρχική ταυτοποίηση και ομαδοποίηση επιτεύχθηκε με βάση τη μορφολογία των κυττάρων αλλά και τις φαινοτυπικές τους ιδιότητες και συγκεκριμένα την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) από το μεταβολισμό γλυκόζης, την ανάπτυξη σε διάφορες θερμοκρασίες (10° , 15° και 45°C), την ανάπτυξη σε διάφορες συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου (2, 4 και 6.5%, w/v, NaCl) και την ανάπτυξη σε pH 9.6.

Για την ομαδοποίηση των απομονώσεων σε επίπεδο είδους χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφορητική ανάλυση πρωτεϊνών (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) σε κυτταρικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα. Η SDS-PAGE πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους [Pot *et al.* \(1994\)](#). Με σκοπό την εξασφάλιση της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων, η εκχύλιση των πρωτεϊνών και η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

Η ηλεκτροφόρηση πηκτής παλλόμενου πεδίου (Pulsed Field Gel Electrophoresis, PFGE, [Kagkli *et al.*, 2007](#)), χρησιμοποιώντας το ένζυμο περιορισμού *AscI* (New England Biolabs Ltd, Hitchin, Hertfordshire, UK), εφαρμόστηκε έτσι ώστε να τυποποιηθούν οι καλλιέργειες σε επίπεδο στελεχών. Η απεικόνιση και επεξεργασία των προφίλ που έδωσαν η SDS-PAGE και η PFGE, η ομαλοποίηση των πυκνομετρικών ιχνών, η ομαδοποίηση των στελεχών με το συντελεστή συσχέτισης Pearson (r) και η στατιστική ανάλυση συστοιχίας (cluster analysis, UPGMA) πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τους [Pot *et al.* \(1994\)](#) με το λογισμικό Gel Compar v. 4.0 (Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Belgium) κάτω από τις προεπιλεγμένες παραμέτρους του προγράμματος.

Επίσης, για την ταυτοποίηση πέντε στελεχών γαλακτοβακίλλων εφαρμόστηκε η αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA. Το γενωμικό DNA εκχυλίστηκε με την κλασική μέθοδο φαινόλης-χλωροφορμίου ([Sambrook *et al.*, 1989](#)). Τα ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό του γονιδίου 16S rRNA ήταν οι: A_{for} 5'-GGA GAG TTA GAT CTT GGC TCA G-3', και C_{rev} , 5'-AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC-3' ([Ntougias *et al.*, 2006](#)). Τα προϊόντα που προέκυψαν από την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

κλωνοποιήθηκαν στο φορέα (vector) PCR 2.1 του TA cloning-ligation kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) και αλληλουχίστηκαν από την Lark Technologies Inc. (Cambridge, UK).

2.2.3. Οξυπαραγωγική ικανότητα σε γάλα

Για να εξεταστεί η οξυπαραγωγική ικανότητα των καλλιέργειών, εκτιμήθηκε το ΔpH μετά από 6 h επώασης σε αποβουτυρωμένο εργαστηριακό γάλα (Reconstituted Skim Milk, RSM, 10%, w/v) στους 30 ή στους 37° C, ανάλογα με την καλλιέργεια (εμβόλιο 1%, v/v).

2.2.4. Πρωτεολυτική δραστηριότητα

Οι καλλιέργειες ανανεώθηκαν δύο διαδοχικές φορές σε RSM (10%, w/v) με εκχύλισμα ζύμης (0.3%, w/v) για 24 h στους 30 ή 37° C. Η τελική ανάπτυξη έγινε σε 5 mL RSM, εμβόλιο 1% (v/v), για 24 h στους 30 ή 37° C. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 5 mL διαλύματος τριχλωροξικού οξέος (TCA) 12% (w/v). Τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν με ανάδευση και παρέμειναν για 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (12500 rpm, για 5 min, στους 10° C). Τα πεπτίδια/αμινοξέα στο υπερκείμενο προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της ο-φθαλδουαλδεΐδης (o-phthal-dialdehyde, OPA) (Church *et al.*, 1983).

Ποσότητα 50 μL από το υπερκείμενο αναμίχθηκε με 1 mL αντιδραστηρίου OPA, αναδεύτηκε καλά και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 340_{nm}, ακριβώς μετά από 2 min, έναντι τυφλού. Ως τυφλό της φωτομέτρησης χρησιμοποιήθηκε δείγμα που περιείχε 50 μL απιονισμένου νερού (ddH₂O) και 1 mL αντιδραστηρίου OPA. Ως τυφλό της ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο, μη εμβολιασμένο RSM, για το οποίο επίσης ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία.

Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε ισοδύναμα λευκίνης (mM), σύμφωνα με πρότυπη καμπύλη. Για το σχεδιασμό της πρότυπης καμπύλης, παρασκευάστηκε μια σειρά από διαλύματα λευκίνης με συγκεντρώσεις 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5 και 10 mM και ακολούθησε η παραπάνω διαδικασία. Το αντιδραστήριο της ο-φθαλδουαλδεΐδης (OPA), παρασκευάστηκε λίγο πριν από την ανάλυση, με ανάμειξη 25 mL 100 mM τετραβορικού νατρίου, 2.5 mL 20% SDS, 40 mg OPA (σε 1 mL μεθανόλη) και 100 μL β-μερκαπτοαιθανόλη, μέχρι τελικού όγκου 50 mL με ddH₂O.

2.2.5. Πεπτιδολυτική δραστηριότητα

Για την παραλαβή του κυτταρικού εκχυλίσματος τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (12000 rpm, για 10 min, στους 4° C) και εκπλύθηκαν τρεις φορές με διάλυμα NaCl 0.9% (w/v). Στη συνέχεια επαναιωρήθηκαν σε 900 μl ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, προστέθηκαν 100 μL διαλύματος λυσοζύμης (τελική συγκέντρωση 2 mg/ml) και το δείγμα επωάστηκε στους 37° C, για 2 h. Μετά από νέα φυγοκέντρηση (12000 rpm, για 15 min, στους 4° C), παραλήφθηκε το υπερκείμενο που αποτέλεσε το κυτταρικό εκχύλισμα.

Για τον προσδιορισμό των πεπτιδολυτικών δραστηριοτήτων χρησιμοποιήθηκαν συνθετικά υποστρώματα και συγκεκριμένα αμίδια της 4-νιτροανιλίνης (pNA) με 9 αμινοξέα (αλανίνη, γλυκίνη, λευκίνη, λυσίνη, προλίνη, φαινυλαλανίνη, μεθειονίνη, βαλίνη, N-ακετυλο-L-αλανίνη) και 1 διπεπτίδιο (αργινυλο-προλίνη). Κυτταρικό εκχύλισμα (25 μL) και διάλυμα του υποστρώματος (25 μL, 20 mM σε μεθανόλη) επωάστηκαν σε 200 μL 50 mM φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος, pH 7.0, στους 30° C. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε ddH₂O (25 μL) αντί του κυτταρικού εκχυλίσματος. Η μεταβολή της απορρόφησης καταγράφηκε με φωτόμετρο SunriseTM (Tecan, Ges.m.b.H, Austria) στα 410_{nm} μέχρι και 6 h στους 30° C. Με βάση τις τιμές της απορρόφησης συναρτήσεως του χρόνου, κατασκευάστηκαν καμπύλες, από την κλίση των οποίων προσδιορίστηκε έμμεσα η πεπτιδολυτική δραστηριότητα, η οποία εκφράστηκε ως ΔA/Δt.

2.2.6. Λιπολυτική δραστηριότητα

Για τον προσδιορισμό της λιπολυτικής δραστηριότητας πραγματοποιήθηκε εξάπλωση των καλλιιεργειών σε τρυβλία με Nutrient άγαρ (1.5% agar w/v, pH 6.8) που περιείχε αραβικό κόμμι (1%, w/v) και το τριγλυκερίδιο τριβουτυρίνη (1%, v/v). Το θρεπτικό υπόστρωμα ομογενοποιήθηκε σε συσκευή ULTRA TARRAX (20500 rpm) για 5 min και στη συνέχεια αποστειρώθηκε για 10 min στους 121° C. Τα τρυβλία επωάστηκαν για 7 μέρες στους 30 ή 37° C και κάθε μέρα ελέγχονταν για το σχηματισμό διαυγούς ζώνης γύρω από τις αποικίες. Η ακτίνα (σε mm) της διαυγούς ζώνης χρησιμοποιήθηκε ως αυθαίρετη μονάδα για τον προσδιορισμό της λιπολυτικής δραστηριότητας.

2.2.7. Εστερολυτική δραστηριότητα

Για την ανίχνευση των εστερολυτικών δραστηριοτήτων χρησιμοποιήθηκαν συνθετικά υποστρώματα και συγκεκριμένα οι εστέρες της 4-νιτροφαινόλης (pNP) με οξικό (C2), βουτυρικό (C4), καπροϊκό (C6), καπρυλικό (C8), καπρικό (C10), λαυρικό (C12), μυριστικό (C14), παλμιτικό (C16) και στεαρικό οξύ (C18). Κυτταρικό εκχύλισμα (25 μ L) και διάλυμα του υποστρώματος (25 μ L, 20 mM σε μεθανόλη) επώαστηκαν σε 200 μ L 50 mM φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος, pH 7.0, στους 30° C. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκε ddH₂O (25 μ L) αντί του κυτταρικού εκχυλίσματος. Η μεταβολή της απορρόφησης καταγράφηκε με φωτόμετρο Sunrise (Tecan) στα 410_{nm} μετά από επώαση 6 h. Με βάση τις τιμές της απορρόφησης συναρτήσε του χρόνου, κατασκευάστηκαν καμπύλες από την κλίση των οποίων προσδιορίστηκε έμμεσα η εστερολυτική δραστηριότητα, η οποία εκφράστηκε ως $\Delta A/\Delta t$.

2.2.8. Καταβολισμός του κιτρικού οξέος

Ο προσδιορισμός του καταβολισμού του κιτρικού οξέος πραγματοποιήθηκε με έλεγχο της ανάπτυξης στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Simmons Citrate Agar (SCA, Oxoid, Cambridge, UK), το οποίο περιέχει ως μοναδική πηγή άνθρακα το κιτρικό οξύ και παρατήρηση του μεταχρωματισμού αυτού. Από φρέσκια καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε εξάπλωση στο στερεό SCA. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 30 ή 37° C για 7 μέρες. Θετικό θεωρείται το αποτέλεσμα όταν αναπτυχθούν αποικίες και το υπόστρωμα από πράσινο μεταχρωματιστεί σε μπλε.

2.2.9. Αντιμικροβιακή δράση

Τα ευαίσθητα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό αντιμικροβιακής δράσης από τις καλλιέργειες που εξετάστηκαν ήταν τα εξής: ο *Lactobacillus plantarum* LMG 2003 και ο *Lactobacillus sakei* LMG 2313. Τα ευαίσθητα στελέχη ανανεώθηκαν δυο φορές σε MRS broth για 24 h στους 30° C.

Για τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής δράσης εφαρμόστηκε η μέθοδος διάχυσης σε τρυβλία (Well Diffusion Assay, WDA). Το στερεό θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε ήταν MRS (1.5% w/v, άγαρ), το οποίο εμβολιάστηκε με το καθένα από τα ευαίσθητα στελέχη (εμβόλιο 1%, v/v, από φρέσκια καλλιέργεια). Στη συνέχεια, ανοίχτηκαν οπές (‘πηγάδια’) στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, όπου τοποθετήθηκαν 40 μ L του υπερκειμένου άνευ κυττάρων καλλιεργειών των στελεχών

(με ρυθμισμένο pH 6.5). Ακολούθησε επώαση στους 30° C για 24 h και παρατήρηση για δημιουργία διαυγούς ζώνης γύρω από τις οπές.

2.2.10. Αιμολυτική δράση

Καλλιέργεια 24 h εξαπλώθηκε σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Columbia Agar Base που περιείχε ανθρώπινο αίμα 5% (v/v) και εσκουλίνη 0.1% (w/v), τα οποία επώστηκαν στους 30 ή 37° C για 24 h. Η αιμολυτική δράση χαρακτηρίζεται ως α όταν γύρω από τις αποικίες σχηματίζεται πράσινη ζώνη, ως β όταν πραγματοποιείται πλήρης λύση των ερυθροκυττάρων και γύρω από τις αποικίες σχηματίζονται διαυγείς ζώνες και ως γ όταν δεν παρατηρείται καμία μεταβολή. Ο *Enterococcus faecalis* ACA-DC 3339 χρησιμοποιήθηκε σαν θετικός μάρτυρας (β-αιμόλυση).

2.2.11. Προσδιορισμός των πτητικών μεταβολιτών με ανάλυση αέριας χρωματογραφίας - φασματομετρίας μαζών (GC-MS)

Τα στελέχη ελέγχθηκαν ως προς την παραγωγή πτητικών ενώσεων μετά από ανάπτυξη σε RSM (10%, w/v) που περιείχε εκχύλισμα ζύμης (0.3%, w/v) και γλυκόζη (0.5%, w/v) καθώς και μετά από ανάπτυξη σε MRS broth pH 5.5 (ή M17 broth για κάποια στελέχη κόκκων). Τα στελέχη επώστηκαν για 24 h στους 30° C σε αποστειρωμένα γυάλινα φιαλίδια που περιείχαν 1 mL υποστρώματος. Στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν ως μάρτυρες κενά φιαλίδια αλλά και φιαλίδια που περιείχαν μη εμβολιασμένο υπόστρωμα.

Ο προσδιορισμός των πτητικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με το σύστημα μικρο-εκχύλισης στερεάς φάσης (Head-Space Solid Phase Micro Extraction, HS-SPME) σε αέριο χρωματογράφο συνδεδεμένο με φασματόμετρο μαζών (GC-MS QP2010, SHIMADZU Scientific Instruments, Inc., Kyoto, Japan). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η τριχοειδής SUPELCOWAX™ 10 (10 m × 0.1 mm × 0.1 μm, Supelco, Bellefonte, PA, USA) με ρυθμό έκλουσης της κινητής φάσης 0.63 mL/min (στους 60° C). Οι θερμοκρασίες εισόδου, αλληλεπίδρασης και πηγής ιόντων ήταν 250, 250 και 200° C, αντίστοιχα. Η αρχική θερμοκρασία της στήλης ήταν 60° C για 0.5 min και στη συνέχεια αυξήθηκε σταδιακά στους 150° C με ρυθμό 30° C/min. Η ανάκτηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της σάρωσης στην κλίμακα m/z 40 έως 350 με ταχύτητα σάρωσης 3333 amu/s.

2.2.12. Προσδιορισμός του προφίλ των πτητικών μεταβολιτών με ανάλυση ‘ηλεκτρονικής μύτης’ - φασματομετρίας μαζών (e-nose MS)

Τα στελέχη αξιολογήθηκαν επίσης για το αρωματικό τους δυναμικό με την ανάλυση της ‘ηλεκτρονικής μύτης’ σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μαζών (ανάλυση e-nose MS). Η ανάλυση αυτή πραγματοποιήθηκε μετά από επώαση, όπως αναφέρεται και στην περίπτωση της αέριας χρωματογραφίας, στο σύστημα GC/MS QP2010, SHIMADZU. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε στο GC ήταν SUPELCO™ - Non-Polar Fused Silica Column (15 m × 0.25 mm). Ο φασματογράφος μαζών είχε ρυθμιστεί στην επιλεκτική παρακολούθηση ιόντων σε 64 κανάλια με εύρος ιόντων από 45 έως 108 m/z και τα αποτελέσματα λήφθηκαν ως μέση σχετική ένταση του κάθε ιόντος.

2.2.13. Στατιστική ανάλυση

Λόγω της πολυπλοκότητας της δομής του συνόλου των πληροφοριών της HS-SPME GC-MS αλλά και της e-nose MS, τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων αναλύσεων υποβλήθηκαν σε περαιτέρω στατιστική επεξεργασία με την τεχνική της ανάλυσης των κυρίων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) έτσι ώστε να μειωθεί ο αριθμός των μεταβλητών (εμβαδά κορυφών χρωματογραφημάτων και αναλογίες m/z). Η στατιστική ανάλυση PCA πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού STATGRAPHICS® Centurion XV (StatPoint Inc., Warrenton, Virginia, USA). Τα αποτελέσματα του e-nose MS υποβλήθηκαν επίσης στη στατιστική μέθοδο της πολυμεταβλητής ανάλυσης δεδομένων: ανάλυση κατά συστάδες ή ομάδες (Cluster Analysis) με το ίδιο λογισμικό πρόγραμμα.

2.3. Αποτελέσματα και συζήτηση

Με σκοπό να διερευνηθεί η ‘άγρια’ μικροβιακή χλωρίδα Ελληνικών παραδοσιακών τυριών παρασκευασμένων χωρίς την προσθήκη εμπορικών εναρκτήριων καλλιεργειών, επιλέξαμε να αναλύσουμε τρία διαφορετικά τυριά αντί να αναλύσουμε πολλαπλά δείγματα από μια ποικιλία τυριού. Έτσι λοιπόν, επιλέχθηκαν η Φορμαέλλα, η Κοπανιστή και η Φέτα προς ανάλυση. Αυτά τα τρία τυριά έχουν κατοχυρωθεί ως προϊόντα Προστατευόμενης Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.). Η

Φορμαέλλα είναι ένα ημίσκληρο τυρί που παράγεται στην περιοχή της Αράχωβας Παρνασσού στην Κεντρική Ελλάδα. Η Κοπανιστή είναι ένα μαλακό τυρί που παράγεται στις Κυκλάδες από νοπό ή ελαφρώς θερμισμένο πρόβειο ή γίδινο γάλα ή μείγματα αυτών, χωρίς την προσθήκη εμπορικών καλλιεργειών. Κατά περίπτωση η Κοπανιστή μπορεί να παραχθεί και από αγελαδινό γάλα (Anifantakis, 1991). Το δείγμα Μάνα αναφέρεται σε υπερ-ώριμη Κοπανιστή που παραδοσιακά προστίθεται στο πήγμα της Κοπανιστής για να επιταχυνθεί η ωρίμανση. Η Φέτα είναι ένα λευκό τυρί άλμης και αποτελεί μακράν το πιο διάσημο Ελληνικό τυρί. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει καμία επιστημονική αναφορά για τη μικροχλωρίδα της Φορμαέλλας ενώ και για την Κοπανιστή οι πληροφορίες είναι πολύ περιορισμένες. Όσον αφορά τη Φέτα, παρά το γεγονός ότι υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες, η μεγάλη της παραγωγή στην Ελλάδα, τόσο σε βιομηχανικό επίπεδο όσο και σε επίπεδο μικρών οικογενειακών επιχειρήσεων, υποστηρίζει την περαιτέρω μελέτη με σκοπό την ανακάλυψη νέων μικροοργανισμών.

2.3.1. Καταμέτρηση της μικροχλωρίδας των τυριών και απομόνωση νέων στελεχών

Οι πληθυσμοί των μικροβιακών ομάδων που προσδιορίστηκαν στα δείγματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.1. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτέλεσαν την κυρίαρχη μικροχλωρίδα σε όλα τα δείγματα, ακολουθούμενα από τους μικροκόκκους, τα κολοβακτηριοειδή, τις ψευδομονάδες και τις ζύμες.

Οι μετρήσεις και στα δυο δείγματα Φορμαέλλας έδειξαν μια σημαντική παρουσία όλων των υπό εξέταση μικροβιακών ομάδων. Οι πληθυσμοί των διαφόρων ομάδων των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν παρόμοιοι μεταξύ των δυο δειγμάτων φτάνοντας τιμές της τάξης των 5.9 ± 0.2 - 7.2 ± 0.2 log cfu/g. Οι μικρόκοκκοι βρέθηκαν επίσης σε αξιοσημείωτους πληθυσμούς κυμαινόμενοι από 5.3 ± 0.2 (ώριμη Φορμαέλλα) μέχρι 6.0 ± 0.2 log cfu/g (φρέσκια Φορμαέλλα). Εν αντιθέσει, οι ζύμες, τα κολοβακτηριοειδή και οι ψευδομονάδες που αποτελούν ένδειξη κακής υγιεινής, παρουσίασαν υψηλότερες τιμές στην ώριμη παρά τη φρέσκια Φορμαέλλα, κάτι που υποδηλώνει κακές συνθήκες αποθήκευσης και συντήρησης από τον παραγωγό.

Η Κοπανιστή και η Μάνα αποδειχτήκαν σχετικά ασυνήθιστα οικοσυστήματα. Στην Κοπανιστή (τρίμηνης ωρίμανσης) οι μεγαλύτεροι πληθυσμοί οξυγαλακτικών βακτηρίων παρατηρήθηκαν για τα NSLAB (5.9 ± 0.1 log cfu/g) και τους μεσόφιλους γαλακτοβακίλλους (5.2 ± 0.2 log cfu/g) και ακολούθησαν οι *Leuconostoc* spp. και οι

θερμόφιλοι κόκκοι. Στη δε Μάνα αποικίες οξυγαλακτικών παρατηρήθηκαν μόνο στο επιλεκτικό υπόστρωμα για NSLAB ($6.5 \pm 0.4 \log \text{ cfu/g}$). Σε κανένα από αυτά τα δυο δείγματα δεν ανιχνεύτηκαν ζύμες ή ψευδομονάδες ενώ οι μικρόκοκκοι και τα κολοβακτηροειδή ήταν σε χαμηλά επίπεδα. Όλες οι αποικίες που απομονώθηκαν από αυτά τα δυο δείγματα τελικώς ταυτοποιήθηκαν φαινοτυπικά ως μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι (40 απομονώσεις).

Πίνακας 2.1.

Μικροβιακοί πληθυσμοί των δειγμάτων που εξετάστηκαν (εκφρασμένοι σε $\log \text{ cfu/g} \pm$ τυπική απόκλιση)

Μικροβιακές ομάδες	Φορμαέλλα 3 ημερών	Φορμαέλλα 2 μηνών	Κοπανιστή 3 μηνών	Μάνα 2 ετών	Φέτα 4 μηνών	Νωπό αγελαδινό γάλα
Ολική μεσόφιλη χλωρίδα (PCA, 30° C)	7.0 ± 0.3	7.1 ± 0.1	3.4 ± 0.2	nd ^a	7.1 ± 0.2	4.1 ± 0.6
Θερμόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι (MRS άγαρ pH 5.5, 42° C)	6.0 ± 0.3	6.0 ± 0.1	nd	nd	6.4 ± 0.4	4.8 ± 0.3
Μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι (MRS άγαρ pH 5.5, 25° C)	7.0 ± 0.0	6.4 ± 0.8	5.2 ± 0.2	nd	7.8 ± 0.3	nd
Θερμόφιλοι κόκκοι (M17 άγαρ, 42° C)	7.2 ± 0.2	7.0 ± 0.1	2.0 ± 0.7	nd	nd	6.6 ± 0.1
Μεσόφιλοι κόκκοι (M17 άγαρ, 25° C)	7.0 ± 0.5	6.7 ± 0.5	nd	nd	nd	7.4 ± 0.2
NSLAB (Rogosa άγαρ, 30° C)	6.8 ± 0.1	6.6 ± 0.2	5.9 ± 0.1	6.5 ± 0.4	7.7 ± 0.1	6.8 ± 0.2
Εντερόκοκκοι (KAA άγαρ, 37° C)	5.9 ± 0.2	6.2 ± 0.1	nd	nd	3.7 ± 0.2	3.8 ± 0.5
<i>Leuconostoc</i> spp. (MRS άγαρ με βανκομυκίνη, 30° C)	6.8 ± 0.3	6.7 ± 0.1	4.9 ± 0.2	nd	5.8 ± 0.3	nd
Μικρόκοκκοι (MSA με κυκλοεξαμίδιο, 30° C)	6.0 ± 0.2	5.3 ± 0.2	3.1 ± 0.2	2.5 ± 0.3	nd	4.4 ± 0.4
Ζύμες & μήκυτες (YGC άγαρ, 30° C)	2.5 ± 0.1	5.3 ± 0.4	nd	nd	nd	4.1 ± 0.1
Κολοβακτηροειδή (VRBL άγαρ, 37° C)	4.8 ± 0.2	6.6 ± 0.2	1.9 ± 0.3	2.0 ± 0.4	nd	5.6 ± 0.1
Ψευδομονάδες (CFC άγαρ, 25° C)	3.4 ± 0.1	4.1 ± 0.2	nd	nd	nd	6.7 ± 0.3

^a nd, δεν ανιχνεύτηκαν

Οι απομονώσεις που προέρχονταν από το M17 άγαρ στους 42° C (θεωρητικά θερμόφιλοι κόκκοι) ήταν θετικές στη χρώση κατά Gram αλλά και στη δοκιμή της καταλάσης και συνεπώς εξαιρέθηκαν από την περαιτέρω μελέτη. Σύμφωνα με τους Tzanetakis *et al.* (1987) οι αλο-ευαίσθητοι γαλακτικοί κόκκοι που πιθανόν υπήρχαν στη φρέσκια Κοπανιστή, εξαφανίζονται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης εξαιτίας των δυσμενών συνθηκών, ενώ οι *Lactobacillus casei* και *Lb. plantarum* (γνωστοί αλο-ανθεκτικοί γαλακτοβάκιλλοι) αποτελούν τα είδη που απομονώνονται πιο συχνά. Αν και η τεχνολογία παραγωγής της Κοπανιστής βασίζεται στην ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των ζυμών και των μυκήτων, τέτοιοι οργανισμοί δεν ανιχνεύτηκαν στην παρούσα έρευνα σε αντίθεση με προηγούμενες αναφορές (Tzanetakis *et al.*, 1987).

Παρόμοια με ό,τι παρατηρήθηκε στην Κοπανιστή, οι μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι ($7.8 \pm 0.3 \log \text{ cfu/g}$) και τα NSLAB ($7.7 \pm 0.1 \log \text{ cfu/g}$) αποτέλεσαν την κυρίαρχη μικροχλωρίδα και στο δείγμα της Φέτας. Οι θερμόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι εμφανίστηκαν επίσης σε υψηλά επίπεδα και ακολούθησαν οι *Leuconostoc* spp. και οι εντερόκοκκοι. Η επικράτηση των ετεροζυμωτικών μεσόφιλων γαλακτοβακίλλων και των NSLAB που παρατηρήθηκε στο δείγμα της Φέτας επιβεβαιώνει προηγούμενες έρευνες (Bintsis *et al.*, 2000, Litopoulou-Tzanetaki & Tzanetakis, 1992). Παρόλα αυτά, πρέπει να σημειωθεί ότι θερμόφιλοι και μεσόφιλοι κόκκοι δεν ανιχνεύτηκαν σε αυτή τη μελέτη, σε αντίθεση με προηγούμενα αποτελέσματα για Φέτα παρασκευασμένη από παστεριωμένο γάλα και με χρήση εμπορικών καλλιιεργειών ή γιαούρτης ως εμβόλιο (Manolopoulou *et al.*, 2003, Sarantinopoulos *et al.*, 2002). Οι μικρόκοκκοι, οι ζύμες, τα κολοβακτηροειδή και οι ψευδομονάδες δεν εντοπίστηκαν.

Μέχρι στιγμής υπάρχουν σχετικώς περιορισμένα βιβλιογραφικά δεδομένα όσον αφορά τον τεχνολογικό χαρακτηρισμό μικροχλωρίδας νωπού γάλακτος (Franciosi *et al.*, 2009). Για αυτό το λόγο στην παρούσα μελέτη συμπεριλήφθηκε ένα δείγμα νωπού αγελαδινού γάλακτος. Οι υψηλότεροι πληθυσμοί οξυγαλακτικών βακτηρίων παρατηρήθηκαν για τους μεσόφιλους κόκκους ($7.4 \pm 0.2 \log \text{ cfu/mL}$), τα NSLAB ($6.8 \pm 0.2 \log \text{ cfu/mL}$) και τους θερμόφιλους κόκκους ($6.6 \pm 0.1 \log \text{ cfu/mL}$), ενώ ακολούθησαν οι θερμόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι και οι εντερόκοκκοι. Μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι και *Leuconostoc* spp. δεν ανιχνεύτηκαν. Αντίθετα, οι πληθυσμοί των μικροκόκκων, των ζυμών, των κολοβακτηροειδών και των ψευδομονάδων ήταν

σε σημαντικά επίπεδα, όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως (Lafarge *et al.*, 2004). Αυτή η παρατήρηση μπορεί να αποδοθεί σε ανεπαρκείς συνθήκες υγιεινής, γεγονός που επιπλέον υποστηρίζεται από τους υψηλούς πληθυσμούς σχεδόν όλων των ομάδων οξυγαλακτικών βακτηρίων. Παρόλα αυτά κατά την απομόνωση οξυγαλακτικών στελεχών από το δείγμα του νωπού γάλακτος, ανακτήθηκαν μόνο οι μεσόφιλοι κόκκοι.

Με σκοπό την απομόνωση νέων στελεχών επιλέχθηκαν και συλλέχθηκαν κατά προσέγγιση δέκα αποικίες από τα επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα των οξυγαλακτικών μικροβιακών ομάδων.

Πίνακας 2.2.

Κατανομή των απομονώσεων ανά μικροβιακή ομάδα και προέλευση απομόνωσης

Μικροβιακή ομάδα	Φορμαέλλα 3 ημερών	Φορμαέλλα 2 μηνών	Κοπανιστή 3 μηνών	Μάνα 2 ετών	Φέτα 4 μηνών	Νωπό αγ/δινό γάλα	Σύνολο απ/σεων (%)
Θερμόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι (TB)	3	2	^a –	–	–	–	5 (3.8)
Μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι (MB)	1	13	25	15	3	–	56 (42.1)
Ετεροζυμωτικοί μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι (HMB)	–	1	–	–	29	–	30 (22.6)
Θερμόφιλοι κόκκοι (TC)	2	2	–	–	–	–	4 (3.0)
Μεσόφιλοι κόκκοι (MC)	2	–	–	–	–	6	8 (6.0)
Πεδιόκοκκοι (Pc)	–	1	–	–	9	–	10 (7.5)
Εντερόκοκκοι (Ec)	6	2	–	–	–	1	9 (6.8)
<i>Leuconostoc</i> spp. (Ln)	9	2	–	–	–	–	11 (8.3)
Σύνολο	23	22	25	15	41	7	133 (100)

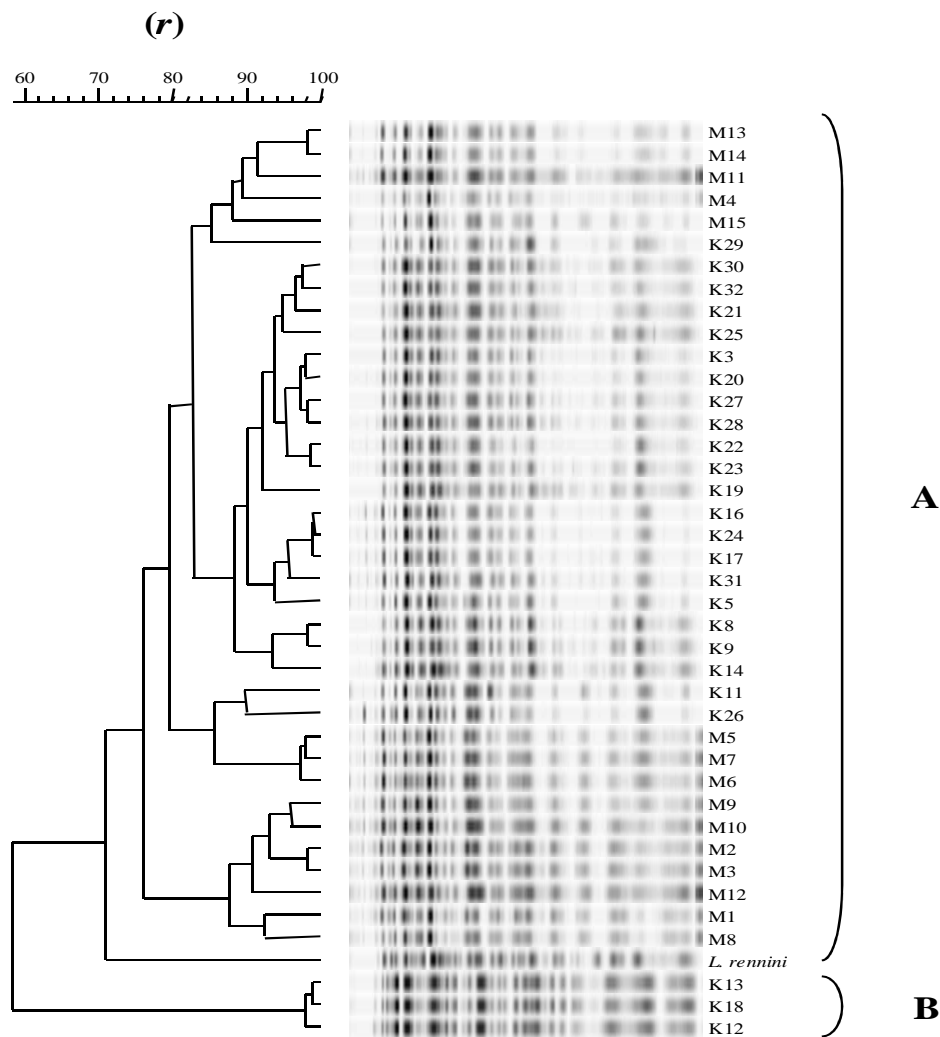
^a –, δεν απομονώθηκαν καλλιέργειες

Με αυτόν τον τρόπο λήφθηκαν 133 απομονώσεις που ήταν όλες θετικές κατά Gram και αρνητικές στη δοκιμή της καταλάσης. Αυτές οι καλλιέργειες όντας

‘καθαρές’ υποβλήθηκαν σε φαινοτυπικό χαρακτηρισμό και αναλόγως τοποθετήθηκαν σε οκτώ μείζονες ομάδες (Πίνακας 2.2). Η πλειονότητα των απομονώσεων (64.7%) βρέθηκαν να ανήκουν στην ομάδα των μεσόφιλων και ετεροζυμωτικών μεσόφιλων γαλακτοβακίλλων. Οι ομοζυμωτικοί μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι δε (40 απομονώσεις) ήταν η μοναδική μικροβιακή ομάδα που ανακτήθηκε από τα δείγματα της Κοπανιστής και της Μάνας, υποδηλώνοντας ότι αυτά τα δύο δείγματα αποτελούν ασυνήθιστα οικοσυστήματα.

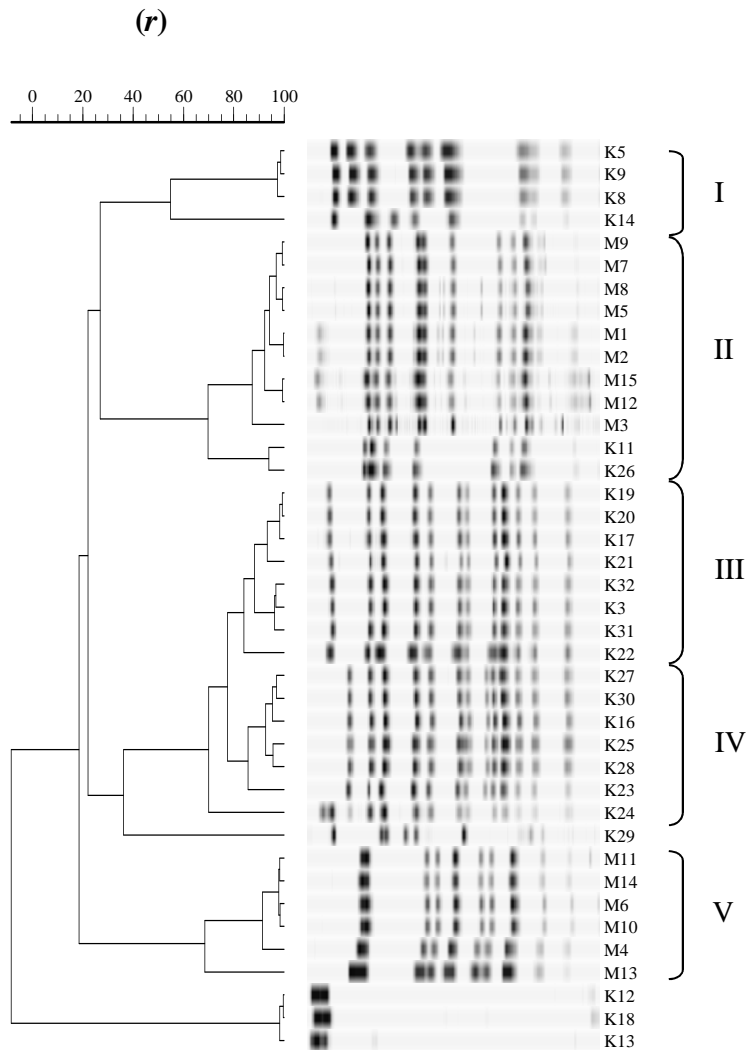
Με δεδομένο ότι η μικροχλωρίδα της Κοπανιστής και της Μάνας παρουσίασε αυτή την ιδιαιτερότητα, αποφασίστηκε η ταυτοποίηση των 40 αυτών απομονώσεων με τη μέθοδο της SDS-PAGE ολικών πρωτεϊνών, με βάση την οποία δημιουργήθηκαν δυο ομάδες (Γράφημα 2.1). Η ομάδα Α περιλαμβάνει 37 απομονώσεις προερχόμενες και από τα δυο δείγματα τυριών, με επίπεδο ομοιότητας $76.2 \pm 5.5\%$, ενώ η ομάδα Β έχει μόνο τρεις καλλιέργειες που απομονώθηκαν από την Κοπανιστή, με επίπεδο ομοιότητας $97.7 \pm 1.0\%$. Για πέντε απομονώσεις, της ομάδας Α και συγκεκριμένα για τα στελέχη K25, K28 (από Κοπανιστή) και M1, M9 (από Μάνα), αλλά και το K12 της ομάδας Β, πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA. Τα συγκεκριμένα στελέχη ταυτοποιήθηκαν με αυτόν τον τρόπο ως *Lactobacillus rennini* (K25, K28, M1, M9) και *Lactobacillus acidipiscis* (K12). Μετά από την εφαρμογή της PFGE, οι 37 *Lb. rennini* διαχωρίστηκαν σε πέντε βιότυπους (I-V), ενώ οι τρεις *Lb. acidipiscis* αποδείχτηκαν ότι είναι το ίδιο στέλεχος (Γράφημα 2.2).

Αξίζει να τονιστεί ότι ο *Lb. rennini* αποτελεί ένα είδος που περιγράφηκε σχετικά πρόσφατα για απομονώσεις που προέρχονταν από αλλοιωμένη τυτιά (Chenoll *et al.*, 2006) και μέχρι στιγμής δεν υπάρχει καμία άλλη βιβλιογραφική αναφορά που να αφορά αυτό το είδος καθώς δεν έχει απομονωθεί ξανά από καμία άλλη πηγή. Από την άλλη πλευρά, ο *Lb. acidipiscis* είναι ένα είδος που περιγράφηκε από τους Tanasupawat *et al.* (2000) για απομονώσεις από ζυμούμενα ψάρια (plara και pla-chom). Επίσης, απομονώθηκε από χυλό σάλτσας σόγιας στην Ταϊλάνδη (Tanasupawat *et al.*, 2002). Ο *Lactobacillus cypricasei* αποτελεί ένα μεταγενέστερο ετεροτυπικό συνώνυμο του *Lb. acidipiscis* (Naser *et al.*, 2006) που αρχικά περιγράφηκε για στελέχη απομονωμένα από το τυρί χαλούμι (Lawson *et al.*, 2001).



Γράφημα 2.1.

Δενδρόγραμμα της ανάλυσης κατά συστάδες (cluster analysis) με βάση τις σχέσεις ομοιότητας μεταξύ των ηλεκτροφορετικών προφίλ ολικών πρωτεϊνών όπως αυτά λήφθηκαν με τη μέθοδο της SDS-PAGE των 40 γαλακτοβακίλλων που απομονώθηκαν από τα δείγματα της Κοπανιστής και της Μάνας. Οι ομοιότητες υπολογίστηκαν σύμφωνα με το συντελεστή Pearson (r) και η ομαδοποίηση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο UPGMA.



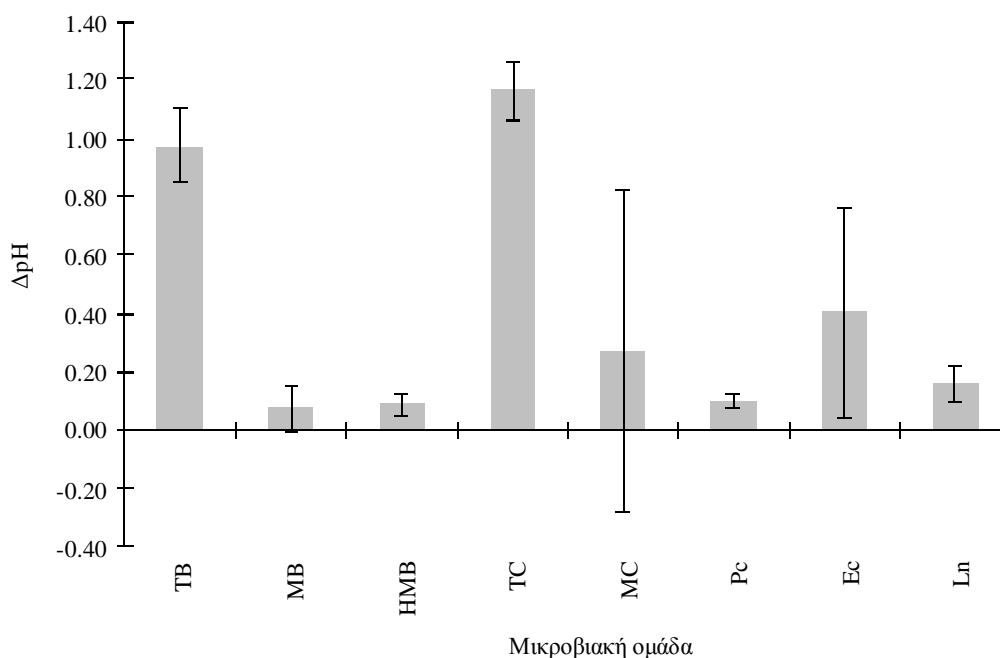
Γράφημα 2.2.

Δενδρόγραμμα της ανάλυσης κατά συστάδες (cluster analysis) με βάση την ανάλυση του χρωμοσωμικού DNA με τη μέθοδο PFGE των 40 γαλακτοβακίλλων που απομονώθηκαν από τα δείγματα της Κοπανιστής και της Μάνας μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *AscI*. Οι ομοιότητες υπολογίστηκαν σύμφωνα με το συντελεστή Pearson (r) και η ομαδοποίηση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο UPGMA.

Οι 133 καλλιέργειες που απομονώθηκαν μελετήθηκαν στη συνέχεια για βιοχημικές ιδιότητες που σχετίζονται με το τεχνολογικό τους δυναμικό.

2.3.2. Οξυπαραγωγική ικανότητα στο γάλα

Τα αποτελέσματα της παραγωγής οξέος μετά από 6 h ανάπτυξης των απομονώσεων σε γάλα παρουσιάζονται στο **Γράφημα 2.3**. Το αρχικό pH του γάλακτος ήταν 6.6. Τα θερμοφιλά στελέχη, τόσο των γαλακτοβακίλλων όσο και των κόκκων, ήταν με διαφορά τα περισσότερα οξυπαραγωγικά. Όσον αφορά τους εντεροκόκκους και τους μεσόφιλους κόκκους παρατηρήθηκε μια μεγάλη διακύμανση της οξυπαραγωγικής ικανότητας. Οι μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, οι ετεροζυμωτικοί μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, οι πεδιόκοκκοι και τα *Leuconostoc* spp. παρουσίασαν πολύ χαμηλές τιμές παραγωγής οξέος.



Γράφημα 2.3.

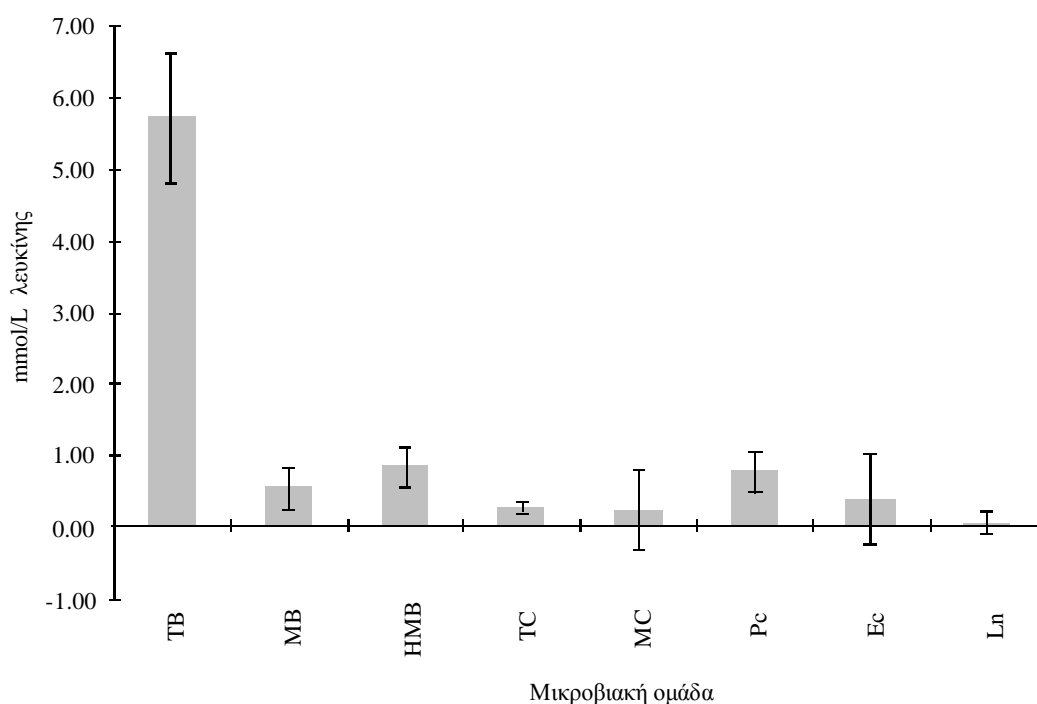
Μέση τιμή του ΔpH ανά μικροβιακή ομάδα μετά από ανάπτυξη 6 h σε γάλα. TB, Θερμόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, MB, Μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, HMB, Ετεροζυμωτικοί μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, TC, Θερμόφιλοι κόκκοι, MC, Μεσόφιλοι κόκκοι, Pc, Πεδιόκοκκοι; Ec, Εντερόκοκκοι, Ln, *Leuconostoc* spp.

Σύμφωνα με τους [Beresford et al. \(2001\)](#), ως εναρκτήριες καλλιέργειες μπορούν να οριστούν τα στελέχη που παράγουν οξύ ικανό να προκαλέσει μείωση του pH του γάλακτος σε τιμές μικρότερες του 5.3 μετά από 6 h επώασης στους 30 - 37° C. Κάτω από αυτό το κάτοπτρο, από τα στελέχη που μελετήθηκαν μόνο το 8.2% προκάλεσαν πτώση του pH κάτω από 5.3 σε 6 h και συνεπώς θα μπορούσαν να

αποτελέσουν εναρκτήριες καλλιέργειες. Το 89.4% των στελεχών παρήγαγαν ελάχιστη οξύτητα, καθώς το pH της καλλιέργειάς τους παρέμεινε μεγαλύτερο του 6.0 μετά από 6 h επώασης. Εν τούτοις, ακόμα και τα στελέχη που έχουν χαμηλή παραγωγή οξέων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρωματικές καλλιέργειες στις ζυμώσεις τυριών εφόσον παρουσιάζουν άλλες σημαντικές βιοχημικές-τεχνολογικές ιδιότητες (Sarantinopoulos *et al.*, 2001).

2.3.3. Πρωτεολυτική και πεπτιδολυτική δραστηριότητα

Οι πρωτεολυτικές και πεπτιδολυτικές δραστηριότητες των οξυγαλακτικών βακτηρίων δεν είναι απλά σημαντικές για τη βακτηριακή ανάπτυξη στο γάλα αλλά εμπλέκονται επίσης στην ανάπτυξη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών στα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα (Christensen *et al.*, 1999).

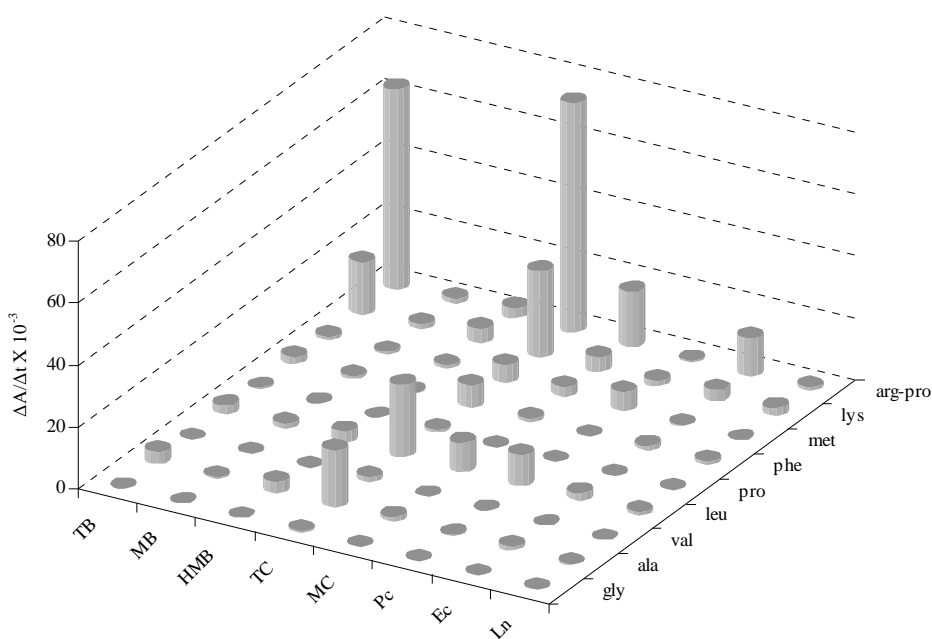


Γράφημα 2.4.

Μέση πρωτεολυτική δραστηριότητα των κυττάρων των οξυγαλακτικών βακτηρίων ανά μικροβιακή ομάδα εκφρασμένη σε ισοδύναμα λευκίνης (mmol/L). TB, Θερμόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, MB, Μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, HMB, Ετεροζυμωτικοί μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, TC, Θερμόφιλοι κόκκοι, MC, Μεσόφιλοι κόκκοι, Pc, Πεδιόκοκκοι; Ec, Εντερόκοκκοι, Ln, *Leuconostoc spp.*

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πρωτεολυτικής δραστηριότητας των στελεχών με βάση τη δοκιμασία της ο-φθαλδουαλδεύδης (Γράφημα 2.4), οι θερμοφιλοι γαλακτοβάκιλλοι εμφάνισαν με διαφορά την υψηλότερη απελευθέρωση αμινοομάδων (εκφρασμένες σε mmol/L λευκίνης), δίνοντας τιμές 4.75 - 6.85 mmol/L λευκίνης. Η πλειοψηφία των υπόλοιπων στελεχών επέδειξε χαμηλή εξωκυτταρική πρωτεολυτική δραστηριότητα (0 - 1.92 mmol/L λευκίνης).

Στο Γράφημα 2.5 φαίνονται τα αποτελέσματα των ενδοκυτταρικών πεπτιδολυτικών δραστηριοτήτων. Κανένα από τα υπό εξέταση στελέχη δεν ήταν δραστικό έναντι του pNA της N-ακετυλο-L-αλανίνης. Η πλειοψηφία των στελεχών έδειξαν πολύ χαμηλή ή και μηδενική δραστηριότητα αμινοπεπτιδάσης έναντι των υποστρωμάτων που περιείχαν υδρόφοβα αμινοξέα (γλυκίνη, αλανίνη, βαλίνη, λευκίνη, προλίνη), καθώς και έναντι των υποστρωμάτων που είχαν αρωματικά (φαινυλαλανίνη) ή θειούχα (μεθειονίνη) αμινοξέα.



Γράφημα 2.5.

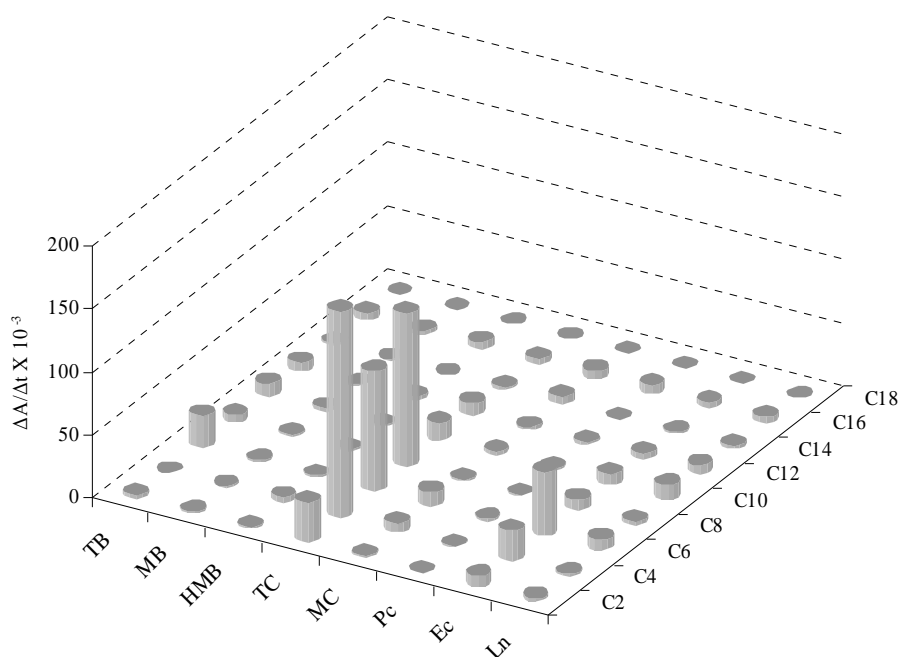
Μέση πεπτιδολυτική δραστηριότητα των ενδοκυτταρικών εκχυλισμάτων των οξυγαλακτικών βακτηρίων ανά μικροβιακή ομάδα (εκφρασμένη αυθαίρετα ως η κλίση $\Delta A/\Delta t$ στα 410_{nm}, $\text{min}^{-1} \times 10^{-3}$). TB, Θερμόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, MB, Μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, HMB, Ετεροζυμωτικοί μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, TC, Θερμόφιλοι κόκκοι, MC, Μεσόφιλοι κόκκοι, Pc, Πεδιόκοκκοι; Ec, Εντερόκοκκοι, Ln, *Leuconostoc* spp.

Το υπόστρωμα που υδρολύθηκε περισσότερο από τις ομάδες των οξυγαλακτικών βακτηρίων ήταν αυτό του pNA του διπεπτιδίου αργινυλο-προλίνης, με τους θερμοφίλους γαλακτοβακίλλους και τους θερμοφίλους κόκκους να παρουσιάζουν τις μεγαλύτερες δραστηριότητες. Οι θερμοφιλοι κόκκοι ήταν εν γένει τα πιο ενεργά στελέχη καθώς παρουσίασαν τις υψηλότερες δραστηριότητες έναντι των περισσότερων συνθετικών υποστρωμάτων.

2.3.4. Λιπολυτική και εστερολυτική δραστηριότητα

Η λιπολυτική ενεργότητα των στελεχών εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμή εξάπλωσης σε άγαρ που περιείχε τριβουτυρίνη. Με αυτήν τη μέθοδο μόνο πέντε στελέχη και συγκεκριμένα οι εντερόκοκκοι Fo29, Fo123 και Fo124 (όλοι απομονωμένοι από τη φρέσκια Φορμαέλλα), ο εντερόκοκκος Fo100 (από την ώριμη Φορμαέλλα), αλλά και ο ετεροζυμωτικός μεσόφιλος γαλακτοβάκιλλος F29 (από τη Φέτα) παρουσίασαν λιπολυτική δράση. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες μελέτες, στις οποίες αναφέρεται ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν γενικά χαμηλή λιπολυτική δραστηριότητα σε σχέση με άλλες μικροβιακές ομάδες (El Soda *et al.*, 1995).

Όσον αφορά την εστερολυτική δραστηριότητα, οι θερμοφιλοι κόκκοι παρουσίασαν τις υψηλότερες τιμές έναντι των συνθετικών υποστρωμάτων από C2-μέχρι και C8-pNP και ακολούθησαν οι εντερόκοκκοι (Γράφημα 2.6). Οι υπόλοιπες ομάδες των οξυγαλακτικών βακτηρίων που εξετάστηκαν έδειξαν χαμηλές ή μηδενικές δραστηριότητες έναντι των εστεροποιημένων λιπαρών οξέων. Κανένα από τα στελέχη δεν βρέθηκε ικανό να υδρολύει το pNP-στεαρικό οξύ (C18). Πράγματι, το κοινό χαρακτηριστικό των εστερασών των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι η προτίμησή τους στους εστέρες των C4 και/ή C6 λιπαρών οξέων, πλην όμως κάποια δείχνουν δραστηριότητα σε εστέρες μέχρι και των C12 λιπαρών οξέων (Holland *et al.*, 2005).



Γράφημα 2.6.

Μέση εστερολυτική δραστηριότητα των ενδοκυτταρικών εκχυλισμάτων των οξυγαλακτικών βακτηρίων ανά μικροβιακή ομάδα (εκφρασμένη αυθαίρετα ως η κλίση $\Delta A/\Delta t$ στα 410_{nm} , $min^{-1} \times 10^{-3}$). TB, Θερμόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, MB, Μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, HMB, Ετεροζυμωτικοί μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, TC, Θερμόφιλοι κόκκοι, MC, Μεσόφιλοι κόκκοι, Pc, Πεδιόκοκκοι, Ec, Εντερόκοκκοι, Ln, *Leuconostoc* spp.

2.3.5. Μεταβολισμός κιτρικού οξέος, αντιμικροβιακή και αιμολυτική δράση

Κανένα από τα 133 υπό εξέταση στελέχη δεν καταβόλιζε το κιτρικό οξύ ως μοναδική πηγή άνθρακα καθώς κανένα δεν αναπτύχθηκε στο συνθετικό θρεπτικό υπόστρωμα SCA.

Δυο εντερόκοκκοι απομονωμένοι από τη φρέσκια Φορμαέλλα (Fo61 και Fo100) παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση έναντι των ευαίσθητων στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν *Lb. plantarum* LMG 2003 και *Lb. sakei* LMG 2313. Ο μεσόφιλος γαλακτοβάκιλλος F43, απομονωμένος από τη Φέτα, ήταν δραστήσιος μόνο έναντι του ευαίσθητου στελέχους *Lb. plantarum* LMG 2003. Η ρύθμιση του pH των υπερκειμένων στο 6.5, αποκλείει το γεγονός η παρεμπόδιση να οφείλεται σε οργανικά οξέα. Απαιτείται λοιπόν περαιτέρω διερεύνηση για να χαρακτηριστεί η φύση της ένωσης που ευθύνεται για την αντιμικροβιακή δράση.

Κανένα από τα υπό εξέταση στελέχη δεν παρουσίασε αιμολυτική δράση και από αυτή την άποψη μπορούν να θεωρηθούν ως ασφαλή.

2.3.6. Παραγωγή πτητικών ενώσεων

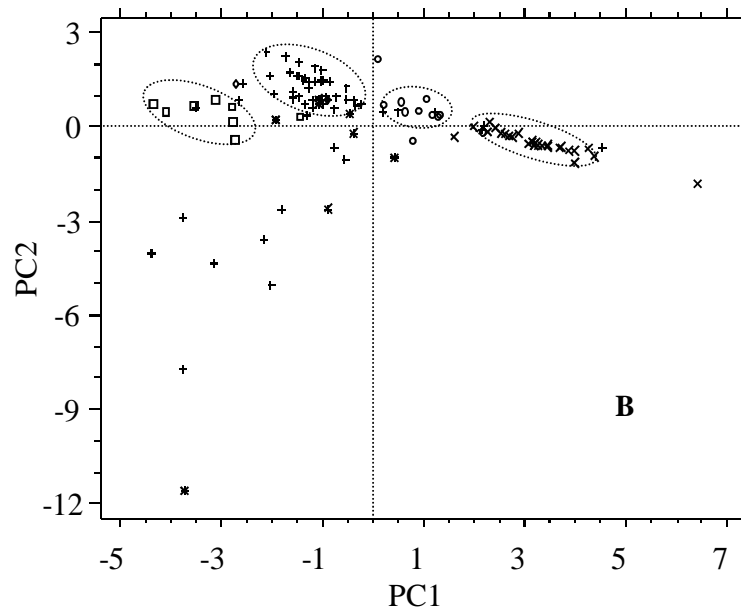
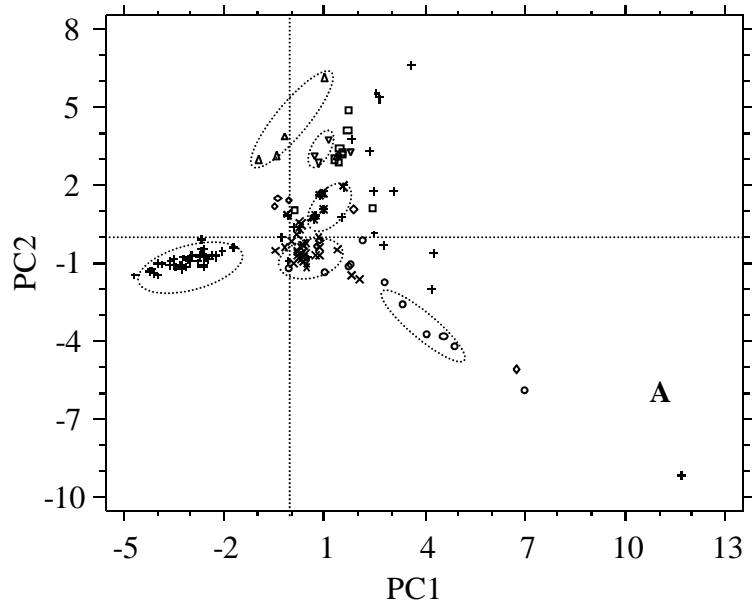
Η ικανότητα των στελεχών να παράγουν πτητικές ενώσεις προσδιορίστηκε μετά από ανάπτυξη είτε σε RSM είτε σε MRS broth και επακόλουθη ανάλυση SPME-GC-MS. Οι κύριες πτητικές ενώσεις που ανιχνεύτηκαν περιλαμβάνουν πρωτοταγείς αλκοόλες (αιθανόλη, *n*-προπανόλη, *n*-βουτανόλη, *n*-πεντανόλη), πρωτοταγείς διακλαδισμένες αλκοόλες (3-μεθυλο-βουτανόλη, 2-μεθυλο-βουτανόλη, 2-αιθυλο-εξανόλη, 2-μεθυλο-προπανόλη), αλδεύδες (ακεταλδεΐδη, βουτανάλη, 3-μεθυλο-βουτανάλη), κετόνες (ακετόνη, 2-βουτανόνη, διακετύλιο, ακετοΐνη), εστέρες (αιθυλο-οξικός και αιθυλο-βουτυρικός εστέρας), διμεθυλο-δισουλφίδιο, διμεθυλο-τρисуλφίδιο και μεθανοθειόλη.

Η παραγωγή των πτητικών ενώσεων βρέθηκε ότι εξαρτάται από το στέλεχος αλλά ήταν παρόμοια μεταξύ απομονώσεων που ανήκαν στην ίδια ομάδα. Μετά από την ανάλυση των χρωματογραφημάτων, δημιουργήθηκαν μεγάλα σύνολα δεδομένων με το ακριβές προφίλ των πτητικών κάθε καλλιέργειας. Με αυτά τα σύνολα δεδομένων γίνεται εφικτή η επιλογή καλλιεργειών με την επιθυμητή ικανότητα παραγωγής αρώματος, στοχεύοντας συγκεκριμένες πτητικές/αρωματικές ουσίες. Εξαιτίας του μεγάλου μεγέθους των συνόλων δεδομένων που αποκτήθηκαν από αυτή την ανάλυση, θεωρήθηκε σκόπιμο να μην παρουσιαστούν αναλυτικά οι ποιοτικές και ποσοτικές καταγραφές, αλλά αντ' αυτού να πραγματοποιηθεί στατιστική ανάλυση και συγκεκριμένα η ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA). Η PCA είναι μια γραμμική μέθοδος πολυμεταβλητής ανάλυσης, με την οποία ο αρχικός αριθμός των μεταβλητών μειώνεται σε ένα μικρότερο αριθμό 'νέων' μεταβλητών. Αυτές ονομάζονται κύριες συνιστώσες (Principal Components) και αποτελούν γραμμικό συνδυασμό των αρχικών μεταβλητών. Εν συντομία, για την πραγματοποίηση της PCA, οι μεταβλητές αρχικά τυποποιούνται (standardization) έτσι ώστε να έχουν μηδενικό μέσο όρο και τυπική απόκλιση (διακύμανση) ίση με τη μονάδα. Στη συνέχεια, δημιουργείται ο πίνακας συνδιακύμανσης/συσχέτισης και υπολογίζονται οι χαρακτηριστικές ρίζες (eigenvalues) και τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά ανύσματα (eigenvectors) από όπου θα προκύψουν οι τιμές των κυρίων συνιστωσών. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δυο κύριες συνιστώσες που εξηγούσαν το μεγαλύτερο ποσοστό διακύμανσης στα δεδομένα. Η

PCA αποκάλυψε ευδιάκριτες ομάδες, οι οποίες ήταν μάλιστα σε αντιστοιχία με την ομαδοποίηση των απομονώσεων όπως αυτή πραγματοποιήθηκε με βάση τον αρχικό φαινοτυπικό χαρακτηρισμό (Γράφημα 2.7).

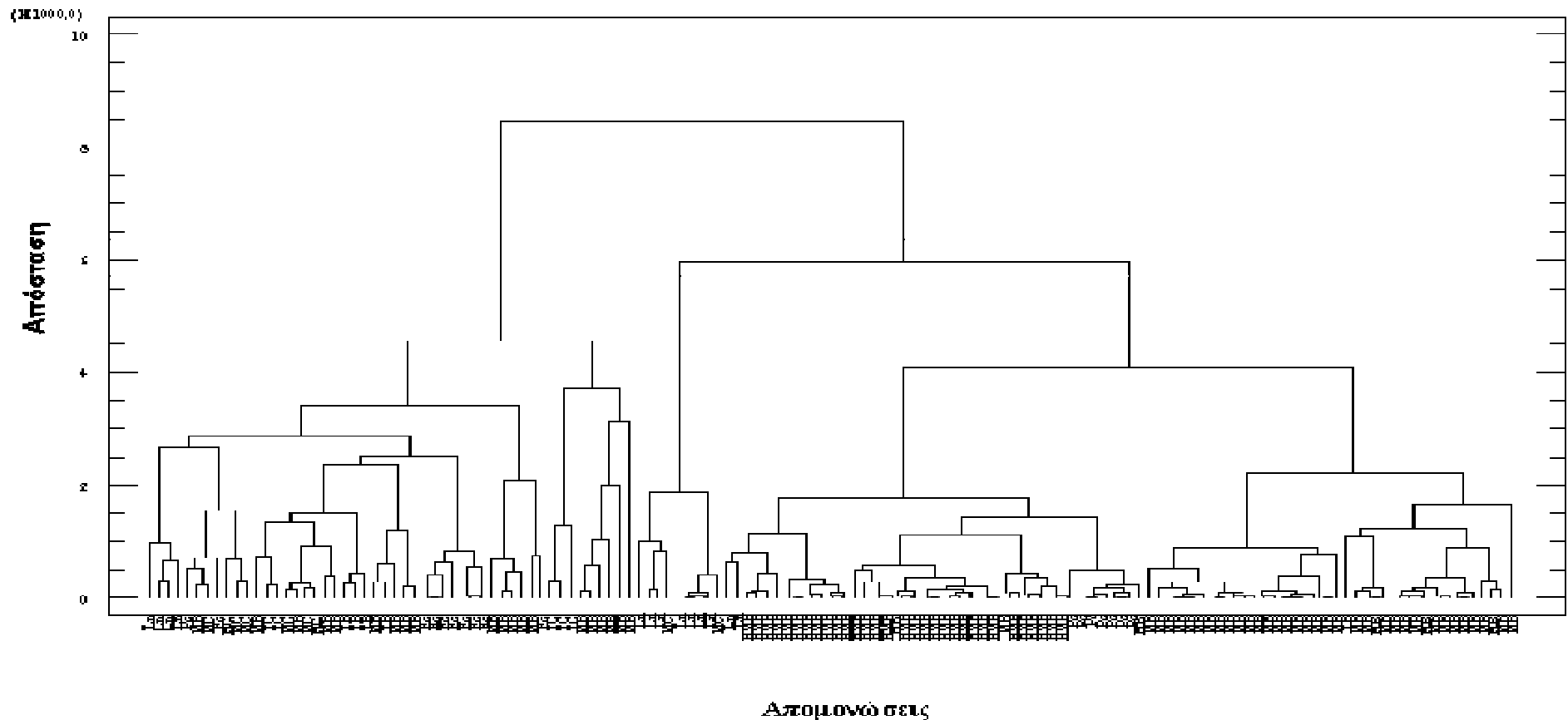
Αυτή η παρατήρηση ήταν ακόμα πιο έντονη για τους μεσόφιλους γαλακτοβακίλλους που απομονώθηκαν από την Κοπανιστή και τη Μάνα. Οι κύριοι μεταβολίτες που παράχθηκαν από αυτά τα στελέχη (3-μεθυλο-βουτανάλη, 3-μεθυλο-βουτανόλη, 2-μεθυλο-βουτανόλη και βενζαλδεΐδη) αποτελούν προϊόντα αποικοδόμησης των ελεύθερων αμινοξέων. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, ο καταβολισμός των αμινοξέων από τα οξυγαλακτικά βακτήρια θεωρείται ως ένα από τα πιο σημαντικά μεταβολικά μονοπάτια για την παραγωγή ενώσεων που συμβάλουν στη διαμόρφωση αρώματος και γεύσης στα γαλακτοκομικά προϊόντα (Smit *et al.*, 2005, Yvon & Rijnen, 2001).

Παρόμοια ομαδοποίηση των απομονώσεων πραγματοποιήθηκε όταν τα αποτελέσματα της ‘ηλεκτρονικής μύτης’ (e-nose MS) υποβλήθηκαν σε ιεραρχική ανάλυση κατά συστάδες (Hierarchical Cluster Analysis) (Γράφημα 2.8). Παρόλα αυτά, ο διαχωρισμός των στελεχών σύμφωνα με το φαινοτυπικό χαρακτηρισμό δεν ήταν το ίδιο αποτελεσματικός σε σχέση με την ανάλυση SPME-GC-MS. Τα σήματα που παράχθηκαν με την e-nose MS ερμηνεύτηκαν στατιστικώς με πολυμεταβλητή ανάλυση. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι ομάδες των απομονώσεων ήταν σε συμφωνία με τις μικροβιακές ομάδες στις οποίες ανήκουν. Η τεχνολογία ‘ηλεκτρονικής’ μύτης έχει αρχίσει να αποτελεί μια ενδιαφέρουσα επιλογή για την ανάλυση διαφόρων τύπων βιολογικών δειγμάτων καθώς είναι πολύ ταχεία και απαιτεί ελάχιστη προετοιμασία δείγματος (Green *et al.*, 2006). Μάλιστα έχουν αναφερθεί νέες μικροβιολογικές εφαρμογές της μεθόδου, όπως ο χαρακτηρισμός μυκήτων (Keshri & Magan, 2000) και βακτηρίων (Gardner *et al.*, 1998).



Γράφημα 2.7.

Ομαδοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων σύμφωνα με την στατιστική ανάλυση των κυρίων συνιστωσών (PCA) όταν αυτή εφαρμόστηκε στα αποτελέσματα της ανάλυσης πτητικών ενώσεων με τη μέθοδο ταχείας GC-MS. Τα στελέχη αναπτύχθηκαν σε RSM με εκχύλισμα ζύμης (0.3%, w/v) και γλυκόζη (0.5%, w/v) (**A**) και σε MRS broth (**B**). (Δ) TB, Θερμόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, (+) MB, Μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, (x) HMB, Ετεροζυμωτικοί μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, (∇) TC, Θερμόφιλοι κόκκοι, (◇) MC, Μεσόφιλοι κόκκοι, (*) Pc, Πεδιόκοκκοι, (□) Ec, Εντερόκοκκοι, (○) Ln, *Leuconostoc* spp.



Γράφημα 2.8.

Ιεραρχική ομαδοποίηση κατά συστάδες των οξυγαλακτικών βακτηρίων με τη μέθοδο Ward's και τον υπολογισμό της Ευκλείδειας απόστασης στα αποτελέσματα της ανάλυσης μεταβολιτών με τη μέθοδο ηλεκτρονικής μύτης. Για την ανάλυση, τα προφίλ των μεταβολιτών συγχωνεύτηκαν μετά από ανάπτυξη των στελεχών σε RSM με εκχύλισμα ζύμης (0.3%, w/v) και γλυκόζη (0.5%, w/v) και σε MRS broth. TB, Θερμόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, MB, Μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, HMB, Ετεροζυμωτικοί μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, TC, Θερμόφιλοι κόκκοι, MC, Μεσόφιλοι κόκκοι, Pc, Πεδιόκοκκοι; Ec, Εντερόκοκκοι, Ln, *Leuconostoc* spp.

2.4. Συμπεράσματα

Στο πρώτο στάδιο της παρούσας μελέτης διερευνήθηκε η μικροχλωρίδα τριών παραδοσιακών Ελληνικών τυριών Π.Ο.Π. (Φορμαέλλα, Φέτα και Κοπανιστή) καθώς και το τεχνολογικό της δυναμικό.

Για τη Φορμαέλλα αυτή είναι η πρώτη αναφορά για τη εν γένει μικροβιακή και ειδικότερα την οξυγαλακτική της χλωρίδα και την ποικιλομορφία της. Τα οξυγαλακτικά αποτέλεσαν την κυρίαρχη χλωρίδα περιλαμβάνοντας όλες τις μεγάλες ομάδες αυτών. Τα αποτελέσματα σχετικά με τη μικροχλωρίδα της Φέτας ήταν σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες. Οι βιοχημικές ιδιότητες των στελεχών που απομονώθηκαν από αυτά τα δυο τυριά είχαν το τυπικό προφίλ των οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Η Κοπανιστή και η Μάνα (Κοπανιστής) αποτέλεσαν τα πιο ενδιαφέροντα οικοσυστήματα. Από τα δείγματα αυτά απομονώθηκαν αποκλειστικά στελέχη που ανήκουν σε δυο σπάνια είδη γαλακτοβακίλλων και συγκεκριμένα του *Lb. rennini* και του *Lb. acidipiscis*. Τα είδη αυτά δεν έχουν περιγραφεί μέχρι σήμερα για άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα. Πέραν τούτου, το βιοχημικό προφίλ των στελεχών αυτών ήταν πλήρως διακριτό από αυτό των υπόλοιπων στελεχών, κυρίως ως προς τις παραγόμενες πτητικές ενώσεις καρβονυλικής φύσεως.

Βιβλιογραφία

- Anifantakis, E. M. 1991. *Greek cheeses. A tradition of centuries*. Athens, Greece: National Dairy Committee of Greece.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., & Cogan, T. M. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 259–274.
- Bintsis, T., Litopoulou-Tzanetaki, E., Davies, R., & Robinson, R. K. 2000. Microbiology of brines used to mature feta cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 53, 106–112.
- Chenoll, E., Macián, M. C., & Aznar, R. 2006. *Lactobacillus rennini* sp. nov., isolated from rennin and associated with cheese spoilage. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 449–452.
- Christensen, J. E., Dudley, E. G., Pederson, J. A., & Steele, J. L. 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 217–246.
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., & Catignani, G. L. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 66, 1219–1227.
- de Vos, W. M., & Hugenholtz, J. 2004. Engineering metabolic highways in lactococci and other lactic acid bacteria. *Trends in Biotechnology*, 22, 72–79.
- El Soda, M., Law, J., Tsakalidou, E., & Kalantzopoulos, G. 1995. Lipolytic activity of cheese-related microorganisms and its impact on cheese flavour. In G. Charalambous (Ed.), *Food flavors: generation, analysis and process influence* (pp. 1823–1847). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science.
- Gardner, J. W., Craven, M., Dow, C., & Hines, E. L. 1998. The prediction of bacteria type and culture growth phase by an electronic nose with a multi-layer perceptron network. *Measurement Science and Technology*, 9, 120–127.
- Green, G. C., Chan, A. D., & Goubran, R. A. 2006. An investigation into the suitability of using three electronic nose instruments for the detection and discrimination of bacteria types. In *Conference Proceedings: Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society* (Vol. 1, pp. 1850–1853). Piscataway, NJ, USA: IEEE.
- Hansen, E. B. 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 119–131.
- Holland, R., Liu, S.-Q., Crow, V. L., Delabre, M.-L., Lubbers, M., Bennett, M., & Norris, G. 2005. Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *International Dairy Journal*, 15, 711–718.
- IDF, 1996. *Preparation of samples and dilutions for microbiological examination*. IDF Standard 122C. Brussels, Belgium: International Dairy Federation.
- Franciosi E., Settanni, L., Cavazza, A., & Poznanski, E. 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal*, 19, 3–11.
- Kagkli, D. M., Vancanneyt, M., Hill, C., Vandamme, P., & Cogan, T. M. 2007. *Enterococcus* and *Lactobacillus* contamination of raw milk in a farm dairy environment. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 243–251.

- Keshri, G., & Magan, N. 2000. Detection and differentiation between mycotoxigenic and non-mycotoxigenic strains of two *Fusarium* spp. using volatile production profiles and hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 825–833.
- Lafarge, V., Ogier, J.-C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J.-V., Gruss, A., & Delacroix-Buchet, A. 2004. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5644–5650.
- Lawson, P., A., Papademas, P., Wachter, C., Falsen, E., Robinson, R., & Collins M., D. 2001. *Lactobacillus cypricasei* sp. nov., isolated from Halloumi cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 45–49.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 67–78.
- Litopoulou-Tzanetaki, E., & Tzanetakis, N. 1992. Microbiological study of white-brined cheese made from raw goat milk. *Food Microbiology*, 9, 13–19.
- Manolopoulou, E., Sarantinopoulos, P., Zoidou, E., Aktypis, A., Moschopoulou, E., Kandarakis, I. G., & Anifantakis, E. M. 2003. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 153–161.
- Naser, S. M., Vancanneyt, M., Hoste, B., Snauwaert, C., & Swings, J. 2006. *Lactobacillus cypricasei* Lawson *et al.* 2001 is a later heterotypic synonym of *Lactobacillus acidipiscis* Tanasupawat *et al.* 2000. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1681–1683.
- Ntougias, S., Zervakis, G. I., Ehaliotis, C., Kavroulakis, N., & Papadopoulou, K. K. 2006. Ecophysiology and molecular phylogeny of bacteria isolated from alkaline two-phase olive mill wastes. *Research in Microbiology*, 157, 376–385.
- OJEC, 1996. Commission Regulation (EEC) No. 1107/96 of 12 June 1996 on the registration of geographical indications and designations of origin under the procedure laid down in Article 17 of Council Regulation (EEC) No. 2081/92. *Official Journal of the European Communities*, No. L 148.
- Pot, B., Vandamme, P., & Kersters, K. 1994. Analysis of electrophoretic whole-organism protein fingerprints. In M. Goodfellow, & A. G. O'Donnell (Eds.), *Chemical methods in prokaryotic systematics* (pp. 493–521). Chichester, UK: J. Wiley and Sons.
- Renault, P. 2002. Genetically modified lactic acid bacteria: applications to food or health and risk assessment. *Biochimie*, 84, 1073–1087.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning - a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M. D., Rea, M. C., Lombardi, A., Cogan, T. M., Kalantzopoulos, G., & Tsakalidou, E. 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal*, 11, 621–647.
- Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., & Tsakalidou, E. 2002. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 76, 93–105.

- Smit, G., Smit, B. A., & Engels, W. J. M. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*, 29, 591–610.
- Tanasupawat, S., Shida, O., Okada, S., & Komagata, K. 2000. *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1479–1485.
- Tanasupawat, S., Thongsanit, J., Okada, S., & Komagata, K. 2002. Lactic acid bacteria isolated from soy sauce mash in Thailand. *Journal of General and Applied Microbiology*, 48, 201–209.
- Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Manolkidis, K. 1987. Microbiology of Kopanisti, a traditional Greek cheese. *Food Microbiology*, 4, 251–256.
- Yvon, M., & Rijnen, L. 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, 11, 185–201.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

**Η επίδραση ‘άγριων’ οξυγαλακτικών βακτηρίων
ως εναρκτήριες καλλιέργειες
στην παραγωγή γίδινου μαλακού τυριού**

3.1. Εισαγωγή

Στις αναπτυγμένες χώρες, τα γαλακτοκομικά προϊόντα παράγονται από αγελαδινό γάλα σε ποσοστό μεγαλύτερο από 95%. Εξαιρέση σε αυτό τον κανόνα είναι οι Μεσογειακές χώρες, στις οποίες το πρόβειο και το γίδινο γάλα καθώς και τα προϊόντα τους ανέκαθεν αποτελούσαν σημαντικό μέρος της πολιτιστικής τους κληρονομιάς (Michaelidou, 2008). Το γίδινο γάλα κατέχει μόλις το 1.98% της παγκόσμιας παραγωγής γάλακτος, με τη Μεσόγειο να είναι η κύρια παραγωγός περιοχή (18%) μετά την Ινδία (22%). Η Ελλάδα έχει την έκτη μεγαλύτερη παραγωγή γίδινου γάλακτος παγκοσμίως με 495000 μετρικούς τόνους. Ταυτόχρονα είναι η πρώτη χώρα στην κατά κεφαλή παραγωγή γίδινου γάλακτος (FAO, 2005).

Συνεπώς, η παραγωγή και επεξεργασία του γίδινου γάλακτος είναι ζωτικής σημασίας τόσο για την οικονομία όσο και για κοινωνία της Ελλάδας. Στις ορεινές περιοχές της χώρας η εκτροφή αιγών και προβάτων συνιστά την κύρια απασχόληση των ανθρώπων από τα αρχαία χρόνια. Με το πέρασμα των αιώνων, εμφανίστηκαν πολλά παραδοσιακά τυριά. Στις μέρες μας, παρότι παράγονται κάποια εξαιρετικά γίδινα τυριά σε μικρές οικογενειακές επιχειρήσεις, η παραγωγή τους σε βιομηχανική κλίμακα είναι περιορισμένη. Στην Ελλάδα, η μεγαλύτερη ποσότητα γίδινου γάλακτος χρησιμοποιείται στην τυροκομική διαδικασία ως μίγμα με πρόβειο ή αγελαδινό γάλα, σε αντίθεση με άλλες Μεσογειακές χώρες, όπως η Γαλλία και η Ισπανία, όπου το γίδινο γάλα αξιοποιείται πολύ πιο αποτελεσματικά σε βιομηχανικό επίπεδο (Dubeuf *et al.*, 2004, Haenlein, 2004). Επιπλέον, τα βιβλιογραφικά δεδομένα που υπάρχουν σχετικά με τις μικροβιολογικές και φυσικοχημικές ιδιότητες των Ελληνικών γίδινων τυριών είναι ελάχιστες (Psoni *et al.*, 2006, Psoni *et al.*, 2003, Hatzikamari *et al.*, 2001, Xanthopoulos *et al.*, 2000, Litopoulou-Tzanetaki & Tzanetakis 1992).

Ως εκ τούτου, το γίδινο και πρόβειο γάλα εξακολουθούν να αποτελούν ένα ενδιαφέρον θέμα έρευνας. Σύμφωνα με πρόσφατες αναφορές, τα προϊόντα από γίδινο και πρόβειο γάλα προσφέρουν στον άνθρωπο μια ευεργετική για την υγεία εναλλακτική επιλογή σε σχέση με τα προϊόντα αγελαδινού γάλακτος, εξαιτίας της σύστασης, της γεύσης, του αρώματος, της υφής αλλά και των φυσικών και υγιεινών τους χαρακτηριστικών (Raynal-Ljutovac *et al.*, 2008, Haenlein, 2004). Όταν αυτά τα προϊόντα καταναλώνονται ως μέρος της ημερήσιας διαίτας τότε μπορούν να αποτελέσουν πηγή πεπτιδίων που μειώνουν τη δραστηριότητα των ενζύμων που

επιδρούν στην αγγειοσυστολή και συνεπώς στη πίεση του αίματος (Michaelidou, 2008). Η παρουσία καζεϊνικών φωσφο-διπεπτιδίων μπορεί επίσης να προάγει τη φυσιολογική σημασία των προϊόντων από γίδινο και πρόβειο γάλα, καθώς αυτά τα βιοενεργά πεπτίδια προάγουν την εναπόθεση ασβεστίου στα οστά. Αλλά και συστατικά του μη πρωτεϊνικού, αζωτούχου κλάσματος του γάλακτος, όπως οι πολυαμίνες και τα νουκλεοτίδια, έχουν προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον (Michaelidou, 2008). Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι το γίδινο γάλα έχει, σε σχέση με το αγελαδινό, μεγαλύτερη συγκέντρωση σε βιταμίνη Α, θειαμίνη και νιασίνη ενώ το λίπος και οι πρωτεΐνες του είναι πολύ πιο εύπεπτες (Haenlein, 2001).

Στη σύγχρονη εποχή, το καταναλωτικό κοινό αναζητά τη διαφορετικότητα στα τυριά καθώς και την ανάπτυξη καινοφανών προϊόντων εν γένει. Η επιλογή νέων εναρκτήριων αλλά και συμπληρωματικών καλλιιεργειών είναι το πλέον υποσχόμενο εργαλείο για τη βελτίωση των γαλακτοκομικών προϊόντων. Η μόνη πηγή για την εύρεση νέων καλλιιεργειών εξακολουθούν να είναι τα παραδοσιακά, αυθόρμητης ζύμωσης τρόφιμα, από τα οποία είναι δυνατή η επιλογή νέων στελεχών βάση των μεταβολικών τους δραστηριοτήτων αλλά και της επίδοσης τους σε μικρής κλίμακας ζυμώσεις τροφίμων (Leroy & De Vuyst, 2004).

Στο προηγούμενο κεφάλαιο της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε απομόνωση 'άγριων' οξυγαλακτικών βακτηρίων. Από αυτά, 56 βακτήρια προήλθαν από τα δείγματα της Φορμαέλλας που είχε παρασκευαστεί από μίγμα νωπού γίδινου και πρόβειου γάλακτος χωρίς την προσθήκη εναρκτήριων καλλιιεργειών (Asteri *et al.*, 2009). Μετά από τον έλεγχο των βιοχημικών/τεχνολογικών ιδιοτήτων των απομονώσεων, επιλέχθηκαν τέσσερα στελέχη, τα οποία έδειξαν τα καλύτερα προφίλ. Ο *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* Fo24 ήταν το πιο οξυπαραγωγό και πρωτεολυτικό στέλεχος. Ο *Streptococcus thermophilus* Fo83 παρουσίασε εξαιρετική οξυπαραγωγή και ταυτόχρονα το πιο έντονο πεπτιδολυτικό προφίλ έναντι των περισσότερων συνθετικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν. Επίσης, είχε και εστερολυτική ενεργότητα έναντι των υποστρωμάτων μέχρι και το pNP του καπρυλικού οξέος (C8). Ο *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* Fo12 παρουσίασε σημαντική πεπτιδολυτική δραστηριότητα, ενώ ο *Enterococcus faecalis* Fo123 έδειξε την υψηλότερη λιπολυτική δράση.

Ο σκοπός αυτού του κεφαλαίου ήταν η επανα-εισαγωγή αυτών των τεσσάρων 'άγριων' στελεχών στην παρασκευή ενός μαλακού τυριού από γίδινο γάλα και η

εκτίμηση της επίδρασής τους στα μικροβιολογικά, φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος.

3.2. Υλικά και μέθοδοι

3.2.1. Βακτηριακά στελέχη και θρεπτικά υποστρώματα

Για την παρασκευή του γίδινου τυριού τα τέσσερα προαναφερθέντα στελέχη χρησιμοποιήθηκαν ως μικτή εναρκτήρια καλλιέργεια (εμβόλιο 0.5%, v/v, για το κάθε στέλεχος). Όλα τα στελέχη συντηρούνταν στους -80° C σε MRS broth (Biokar) που περιείχε γλυκερόλη (20%, v/v). Πριν από κάθε τυροκόμηση τα στελέχη υποβάλλονταν σε δυο διαδοχικές ανανεώσεις σε RSM (10%, w/v) με εκχύλισμα ζύμης (0.3%, w/v) για 24 h (εμβόλιο 1%, v/v) στους 37° C (για τους *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus* και *E. faecalis*) ή στους 30° C (για τον *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*). Για την προετοιμασία του εμβολίου της τυροκόμησης, η τελική ανάπτυξη (κάθε στελέχους χωριστά) έγινε σε παστεριωμένο γίδινο γάλα εμπορίου της εταιρείας Cretalat (Cretan Dairies, Greece) για 24 h στις αντίστοιχες θερμοκρασίες (εμβόλιο 1%, v/v).

3.2.2. Τυροκόμηση γίδινου γάλακτος και δειγματοληψίες

Οι τυροκομήσεις πραγματοποιήθηκαν στο πιλοτικό τυροκομείο του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και χρησιμοποιήθηκε παστεριωμένο γίδινο γάλα εμπορίου, πλήρες και ομογενοποιημένο της εταιρείας Cretalat. Έγιναν τρεις τυροκομικές δοκιμές σε τρεις διαδοχικές εβδομάδες. Σε κάθε δοκιμή τυροκομήθηκαν 7 L γίδινου γάλακτος ως εξής: το γάλα θερμάνθηκε στους 35° C και εμβολιάστηκε με τα τέσσερα επιλεγμένα στελέχη (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* και *E. faecalis*, εμβόλιο 0.5%, v/v για το κάθε ένα). Μετά από 60 min επώασης προστέθηκε εμπορική πτυιά (0.03 g/kg, 950 IMCU/g, Βλαχοπούλα Ε.Π.Ε, Αθήνα, Ελλάδα) και χλωριούχο ασβέστιο (10 g/100kg). Η πήξη διήρκησε 60 min (35° C) και στη συνέχεια το πήγμα διαιρέθηκε (1 × 1 cm) και αφέθηκε εν ηρεμία για 30 min. Μετά από αποστράγγιση στους 19° C για 18 h, προστέθηκε χλωριούχο νάτριο (1%, w/v) υπό ανάδευση και το πήγμα τοποθετήθηκε σε πλαστικούς περιέκτες υπό κενό. Το τυρί στη

συνέχεια μεταφέρθηκε σε ψυκτικό θάλαμο (5° C) και αφέθηκε για ωρίμανση 30 ημερών. Κατά τη διάρκεια της παρασκευής και ωρίμανσης του γίδινου τυριού, ελήφθησαν δείγματα από το εσωτερικό του με σκοπό την πραγματοποίηση μικροβιολογικών και φυσικοχημικών αναλύσεων (ημέρα 1, 3, 8, 15 και 30 της ωρίμανσης).

3.2.3. Μικροβιολογικές αναλύσεις

Οι μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το πρότυπο της IDF 122C 1996 (IDF, 1996). Η ολική χλωρίδα του γάλακτος προσδιορίστηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα PCA μετά από επώαση στους 30° C για 72 h. Οι μικροβιακές ομάδες που καταμετρήθηκαν ήταν οι θερμοφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, οι θερμοφιλοι κόκκοι, οι μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, οι εντερόκοκκοι, οι μικρόκοκκοι, οι ζύμες/μύκητες και τα κολοβακτηροειδή, όπως αναλυτικά περιγράφεται στην Παράγραφο 2.2.1 του Κεφαλαίου 2. Όλες οι αναλύσεις έγιναν σε τριπλά τρυβλία.

3.2.4. Φυσικοχημικές αναλύσεις

Οι φυσικοχημικές αναλύσεις επαναλήφθηκαν εις τριπλούν και ήταν οι εξής:

Προσδιορισμός του pH: πραγματοποιήθηκε με βύθιση του ηλεκτροδίου (Metholm Herisau, 632 pH-meter, Switzerland) στη μάζα του τυριού.

Προσδιορισμός υγρασίας: για τον υπολογισμό της υγρασίας, δείγμα τυριού 3g ξηράνθηκε σε κλίβανο των 105° C, για 24 h, μέχρι σταθερού βάρους.

Προσδιορισμός της τέφρας: δείγμα τυριού 3 g ξηράνθηκε στους 105° C, κατόπιν κάηκε σε φλόγα τύπου Bunsen και τέλος αποτεφρώθηκε στους 550° C, για 5 h (IDF, 1964).

Προσδιορισμός του NaCl: πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο IDF Standard 17A (IDF, 1972), και εκφράστηκε ως συντελεστής άλατος (S/M) {NaCl % του τυριού X 100 / (υγρασία % + NaCl%)}.

Προσδιορισμός της λιποπεριεκτικότητας: πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο Gerber & Van Gulik (Ardö & Polychroniadou, 1999) και εκφράστηκε ως λίπος επί ξηρού (FDM %).

Προσδιορισμός ολικού αζώτου (TN) και υδατοδιαλυτού αζώτου (Water Soluble Nitrogen, WSN): ο προσδιορισμός του ολικού αζώτου (Total Nitrogen, TN) έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Kjeldahl (Ardö & Polychroniadou, 1999). Για τον προσδιορισμό του υδατοδιαλυτού αζώτου, δείγμα τυριού 20 g αναμίχθηκε με 100 mL

H₂O θερμοκρασίας 40° C, ομογενοποιήθηκε σε συσκευή Stomacher για 5 min και το pH ρυθμίστηκε στο 4.5. Το δείγμα παρέμεινε στους 40° C για 1 h, φυγοκεντρήθηκε (12500 rpm, 30 min, 4° C) και τέλος διηθήθηκε από ηθμό Whatman No 40. Το άζωτο προσδιορίστηκε σε 10 mL διηθήματος με τη μέθοδο Kjeldahl (Ardö & Polychroniadou, 1999). Ο πρωτεολυτικός δείκτης (PI) εκφράστηκε ως ο επί της εκατό (%) λόγος του WSN προς το TN.

Ηλεκτροφόρηση πηκτής ουρίας - πολυακρυλαμιδίου (Urea-PAGE): η μέθοδος εφαρμόστηκε σύμφωνα με τον Andrews (1983). Για την προετοιμασία των δειγμάτων, 240 mg τυριού ομογενοποιήθηκαν σε 10 mL ρυθμιστικού διαλύματος τυριού (6 M ουρία, 0.1 M β-μερκαπτοαιθανόλη και 0.4 mL διάλυμα χρωστικής ανίχνευσης) και παρέμειναν στους 40° C για 15 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση (12000 rpm, 15 min, 4° C) και το λίπος απομακρύνθηκε με σπάτουλα. Ποσότητα 10 μL από την υπερκείμενη φάση χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφορητική ανάλυση. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης (LKB vertical electrophoresis unit 2001, Bromma, Sweden) με πλάκες 140 x 160 mm, πάχους 1.5 mm. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, κάθε πηκτή χρωματίστηκε για 24 h σύμφωνα με τους Blakesley & Boezi (1977) και την επόμενη μέρα αποχρωματίστηκε με απιονισμένο νερό. Οι πηκτές σαρώθηκαν σε οπτικό σαρωτή (ScanJet 4c/T, Hewlett Packard, 1995, Greeley, CO 80634, USA). Τα καζεϊνικά κλάσματα των δειγμάτων ταυτοποιήθηκαν με βάση το πρότυπο ισοηλεκτρικής πρόβειας καζεΐνης.

Ανάλυση του υδατοδιαλυτού εκχυλίσματος (Water Soluble Extract, WSE): Η ανάλυση του υδατοδιαλυτού εκχυλίσματος στο τυρί πραγματοποιήθηκε με χρήση της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC) σε συσκευή GBC Scientific Equipment Pty Ltd, με στήλη HPX-87H Aminex (BioRad, Hercules, CA) στους 35° C, χρησιμοποιώντας 5 mM H₂SO₄ με ρυθμό έκλουσης 0.5 mL/min (Sarantinopoulos *et al.*, 2002). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα HPLC Winchrom Chromatography software Version 1.32.

Ανάλυση των πεπτιδίων στο υδατοδιαλυτό εκχύλισμα (WSE): πραγματοποιήθηκε με τη χρήση Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης-Αντιστρόφου Φάσεως [Reverse Phase (RP)- HPLC] σε χρωματογράφο εξοπλισμένο με αντλία τεσσάρων διαλυτών WATERS 600 (WATERS Corp., 34 Marple Street, Milfort, MA 01757, USA), σύμφωνα με τους Sarantinopoulos *et al.* (2002). Χρησιμοποιήθηκε η στήλη Nucleosil C18 (5 μm, 30 nm, 300 × 4.0 mm, Bitschoff,

Germany) με την αντίστοιχη προστήλη (30 × 40 mm). Οι διαλύτες και τα δείγματα διηθήθηκαν με φίλτρα Nylon 66 και οξικής κυτταρίνης αντίστοιχα, με πορώδες 0.45 μm (Lida Manufacturing, Kenosha, WI 53143-6615, USA).

Προσδιορισμός των πτητικών αρωματικών ουσιών: πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Head-Space (HS-40, Perkin Elmer, Ueberlingen, Germany) Αέριου Χρωματογράφου συνδεδεμένου με Φασματογράφο Μάζων (GC-MS Q5050, Shimadzu Scientific Instruments, Inc., Columbia, MD, USA). Δείγμα τυριού 3 g τοποθετήθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο Head-Space όγκου 10 mL, το οποίο κλείσθηκε αεροστεγώς με πώμα. Η λειτουργία του Head-Space δειγματολήπτη είχε ως εξής: τα δείγματα θερμοστατήθηκαν στους 80° C για 25 min. Ακολούθως, διοχετεύτηκε υψηλής καθαρότητας ήλιο για διάστημα 0.5 min. Η θερμοκρασία της βελόνας ήταν 90° C και η θερμοκρασία μεταφοράς 90° C. Ο χρόνος έγχυσης ήταν 0.3 min. Ο διαχωρισμός των αρωματικών συστατικών έγινε με τη βοήθεια της στήλης HP INNOWAX μήκους 60 m, εσωτερικής διαμέτρου 0.25 mm και πάχους φιλμ 0.25 μm. Η θερμοκρασία του φούρνου ήταν 35° C. Η ταχύτητα ροής του φέροντος αερίου (ήλιο) ήταν 0.4 mL/min. Η αναλογία διαχωρισμού ήταν 1/5 και η θερμοκρασία του εγχυτή 200° C. Το πρόγραμμα των θερμοκρασιών που εφαρμόστηκε ήταν: 35° C για 3 min, αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό ανύψωσης 5° C/min στους 80° C και παραμονή για 5 min, αύξηση της θερμοκρασίας με ρυθμό 8° C/min στους 180° C και παραμονή για 5 min. Η λειτουργία του φασματογράφου μάζας ρυθμίστηκε στην κλίμακα m/z 35 έως 250 και η τάση του ανιχνευτή ήταν 1.4 KV, ενώ η θερμοκρασία του ήταν 250° C. Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε με τη βοήθεια της βιβλιοθήκης χημικών ουσιών Shimadzu NIST62. Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς που σχεδιάστηκε για κάθε μια από τις εξής ενώσεις: οξικό οξύ, αιθανόλη, ακετοΐνη, ακεταλδεΐδη, ακετόνη, και διακετύλιο. Οι συγκεντρώσεις εκφράστηκαν σε ppm.

3.2.5. Οργανοληπτικός έλεγχος

Ο οργανοληπτικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε στο τελικό προϊόν (τυρί ωρίμανσης 30 ημερών) και των τριών τυροκομήσεων από 11-μελή ομάδα του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γ.Π.Α.. Τα δείγματα αξιολογήθηκαν και βαθμολογήθηκαν ως προς το χρώμα (κλίμακα 0-15), τη γεύση και το άρωμα (κλίμακα 0-55) και την τομή (κλίμακα 0-30), ενώ η υφή χαρακτηρίστηκε ως μαλακή,

ημίσκληρη και σκληρή. Οργανοληπτικός έλεγχος πραγματοποιήθηκε επίσης και σε δυο εμπορικά τυριά από γίδινο γάλα έτσι ώστε να συγκριθούν τα αποτελέσματα.

3.2.6. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα StatGraphics Centurion XV (StatPoint Inc., Warrenton, VA, USA). Η ανάλυση διακύμανσης μονής κατεύθυνσης (One-way ANOVA) χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο των αποτελεσμάτων ($P < 0.05$) των δειγματοληψιών.

3.3. Αποτελέσματα και συζήτηση

Το γίδινο γάλα που χρησιμοποιήθηκε για την τυροκόμηση είχε την εξής χημική σύσταση όπως αυτή προσδιορίστηκε με το Milkoscan 133 (A/S N. Foss Electronic, Denmark): λακτόζη 4.54% (± 0.03), λίπος 4.35% (± 0.15) και πρωτεΐνη 3.16% (± 0.11). Η ολική μεσόφιλη χλωρίδα του γάλακτος ήταν $3.62 \pm 0.57 \log$ (cfu/mL) και το παραγόμενο τυρί είχε μέσο βάρος $1.31 \pm 0.05 \text{ kg}$ (απόδοση 18.7%).

3.3.1. Δυναμική της μικροχλωρίδας στο γίδινο τυρί

Η εξέλιξη των διάφορων μικροβιακών ομάδων κατά την παραγωγή και ωρίμανση παρουσιάζεται στον Πίνακα 3.1. Οι μικροβιακές ομάδες στις οποίες ανήκουν τα τέσσερα στελέχη που εμβολιάστηκαν και συγκεκριμένα οι θερμοφιλοι γαλακτοβάκιλλοι, οι θερμοφιλοι κόκκοι, οι μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι και οι εντερόκοκκοι αυξήθηκαν την πρώτη μέρα από 7 σε 9 log (cfu/g) κατά προσέγγιση και στη συνέχεια παρέμειναν σταθεροί για το υπόλοιπο της ωρίμανσης (30 ημέρες), αποτελώντας την κυρίαρχη χλωρίδα του τυριού, όπως ήταν αναμενόμενο (Beresford *et al.*, 2001).

Εκτός από τα οξυγαλακτικά βακτήρια υπάρχει μια τυχαίως αναπτυσσόμενη χλωρίδα, η οποία μπορεί επίσης να συνεισφέρει στην ωρίμανση του τυριού. Αυτή περιλαμβάνει ένα σύνθετο μίγμα 'άγριων' βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων. Αυτοί οι μικροοργανισμοί αποτελούν επιμολύνσεις του γάλακτος από τον περιβάλλοντα χώρο κατά την άμελξη ή την τυροκόμηση (Arenas *et al.*, 2004).

Οι μικρόκοκκοι (αποικίες που λήφθηκαν στο MSA) εντοπίστηκαν σε απρόσμενα υψηλές τιμές στο εμβολιασμένο γάλα ($5.94 \log \text{ cfu/g}$) και ο πληθυσμός τους δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μέχρι το τέλος της 30-ήμερης ωρίμανσης (επίπεδο εμπιστοσύνης 95.0%). Οι μικρόκοκκοι ανιχνεύονται συχνά στα Ελληνικά τυριά και θεωρούνται ως ένα σημαντικό μέρος της μικροχλωρίδας σε τυριά από νωπό γάλα (Manolopoulou *et al.*, 2003, Psoni *et al.*, 2003, Hatzikamari *et al.*, 2001), αλλά και σε τυριά από παστεριωμένο γάλα (Sarantinopoulos *et al.*, 2002, Fox, 1993). Οι μικρόκοκκοι παρουσιάζουν πρωτεολυτική και λιπολυτική δραστηριότητα και συνεπώς μπορούν να συνεισφέρουν στην ωρίμανση του τυριών (Ortiz-Apodaca *et al.*, 1993).

Πίνακας 3.1.

Μικροβιολογική ανάλυση του γίδινου τυριού κατά τα στάδια της ωρίμανσης (εκφρασμένη σε $\log \text{ cfu/g}$, μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση)

Μικροβιακές ομάδες	Mpi	D1	D3	D8	D15	D30
Θερμόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι (MRS pH 5.5, 42°C) ^a	7.02 \pm 0.11	9.26 \pm 0.20	9.02 \pm 0.32	8.98 \pm 0.22	8.97 \pm 0.23	8.96 \pm 0.23
Θερμόφιλοι κόκκοι (M17, 42°C) ^a	7.06 \pm 0.14	9.51 \pm 0.06	9.47 \pm 0.06	9.36 \pm 0.12	9.35 \pm 0.17	9.25 \pm 0.11
Μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι (Rogosa, 30°C) ^a	6.94 \pm 0.06	9.26 \pm 0.20	9.10 \pm 0.32	9.17 \pm 0.27	9.12 \pm 0.18	9.03 \pm 0.16
Εντερόκοκκοι (KAA, 37°C) ^a	6.50 \pm 0.25	8.41 \pm 0.21	8.64 \pm 0.23	8.48 \pm 0.26	8.40 \pm 0.20	8.30 \pm 0.27
Μικρόκοκκοι (MSA με κυκλοεξαμίδιο, 30°C) ^b	5.94 \pm 0.48	6.97 \pm 0.36	7.23 \pm 0.36	7.14 \pm 0.29	6.87 \pm 0.70	6.47 \pm 1.57
Κολοβακτηροειδή (VRBL, 37°C) ^γ	1.96 \pm 2.16	2.07 \pm 1.33	0.93 \pm 1.61	0.42 \pm 0.73	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
Ζύμες & μήκυτες (YGC, 30°C) ^δ	0.55 \pm 0.96	0.75 \pm 1.30	0.55 \pm 0.96	1.64 \pm 1.45	1.46 \pm 1.27	0.00 \pm 0.00

Mpi: εμβολιασμένο παστεριωμένο γάλα, D1: τυρί μέρας 1, D3: τυρί μέρας 3, D8: τυρί μέρας 8, D15: τυρί μέρας 15, D30: τυρί μέρας 30

^a Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των Mpi and D1, D3, D8, D15 και D30, $P=0.0003$)

^b Μη στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των σταδίων ωρίμανσης ($P=0.36$)

^γ Μη στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών ωρίμανσης 1, 3 και 8 ($P=0.08$)

^δ Μη στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ημερών ωρίμανσης 1, 3, 8 και 15 ($P=0.44$)

Τα κολοβακτηροειδή βρέθηκαν σε χαμηλά επίπεδα μέχρι την όγδοη ημέρα (0.42 - 2.07 log cfu/g) αλλά εξαφανίστηκαν μέχρι την ημέρα 15 της ωρίμανσης. Τα κολοβακτηροειδή αναπτύσσονται κατά τα πρώτα στάδια της τυροκόμησης όταν οι συνθήκες, όπως το pH και η θερμοκρασία, είναι ευνοϊκές (Gripou, 1993). Εξαιτίας των υψηλών πληθυσμών τους σε τυριά παρασκευασμένα από νωπό γάλα, οι Coppola *et al.* (2000) υποστηρίζουν ότι τα κολοβακτηροειδή ενδεχομένως να συνεισφέρουν στη ανάπτυξη του αρώματος σε αυτά τα τυριά. Ωστόσο στις περισσότερες περιπτώσεις θεωρούνται δείκτες επιμόλυνσης και δυνητικά παθογόνοι ή αλλοιωγόνοι οργανισμοί. Τα κολοβακτηροειδή απαντώνται συχνά στα φρέσκια Ελληνικά τυριά και ειδικά σε αυτά που παράγονται νωπό γάλα, αλλά κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης σταδιακά μειώνονται (Psoni *et al.*, 2003, Nikolaou *et al.*, 2002, Litopoulou-Tzanetaki & Tzanetakis, 1992).

Ο πληθυσμός των ζυμών ήταν χαμηλός μέχρι την ημέρα 15 της ωρίμανσης (0.55-1.64 log cfu/g) και τελικά δεν ανιχνεύτηκαν στο τελικό προϊόν, σε αντίθεση με άλλες αναφορές για γίδινα τυριά από νωπό γάλα (Psoni *et al.*, 2003, Hatzikamari *et al.*, 2001, Zarate *et al.*, 1997, Tornadijo *et al.*, 1995, Mor-Mur *et al.*, 1994). Οι ζύμες συναντώνται συχνά στα γαλακτοκομικά προϊόντα και ανάλογα με το προϊόν θεωρούνται ως αλλοιωγόνοι ή επιθυμητοί μικροοργανισμοί (Ferreira & Viljoen, 2003).

3.3.2. Αλλαγές των φυσικοχημικών παραμέτρων κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του γίδινου τυριού

Οι αλλαγές των φυσικοχημικών παραμέτρων κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2.

Το pH του πήγματος μειώθηκε από 6.45 που ήταν η αρχική τιμή του γαλακτος σε 4.65 κατά την πρώτη μέρα εξαιτίας της ταχείας ανάπτυξης των εμβολιασμένων καλλιεργειών και ειδικά των *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *S. thermophilus*. Στη συνέχεια το pH παρέμεινε σταθερό χωρίς να παρατηρηθούν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα διάφορα στάδια της ωρίμανσης ($P > 0.05$). Το pH του τελικού προϊόντος ήταν 4.53 ± 0.17 , που είναι παρόμοιο με αυτό άλλων μαλακών τυριών από γίδινο γάλα (Franco *et al.*, 2003, Hatzikamari *et al.*, 2001, Zarate *et al.*, 1997, Mor-Mur *et al.*, 1994). Το γεγονός ότι το πήγμα μεταφέρθηκε σε ψυκτικό θάλαμο (5° C) μετά την ημέρα 1 επιβράδυνε τη διαδικασία της ζύμωσης και έτσι αποτράπηκε η υπερβολική αύξηση της οξύτητας στο τυρί. Το pH των τυριών διαφέρει

όχι μόνο ανάμεσα στα είδη των τυριών, αλλά και μεταξύ των παρτίδων της ίδιας ποικιλίας. Συνήθως, το pH κυμαίνεται από 4.10 έως 7.90, ανάλογα με πολλούς παράγοντες, π.χ. τύπος τυριού, εναρκτήριες καλλιέργειες, τυροκομική διαδικασία, διάρκεια ωρίμανσης κ.τ.λ. Η ανάπτυξη οξύτητας με τον κατάλληλο ρυθμό και στον επιθυμητό χρόνο είναι απαραίτητο και σημαντικό χαρακτηριστικό της τυροκόμησης, καθώς έχει σημαντικό αντίκτυπο στην ποιότητα του τυριού, στην ενζυμική δραστηριότητα, καθώς στη μικροχλωρίδα (McSweeney & Fox, 2004).

Πίνακας 3.2.

Χημικές αναλύσεις του γίδινου τυριού κατά τα στάδια της ωρίμανσης (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση)

	Mpi	D1	D3	D8	D15	D30
pH ^α	6.45 ± 0.08	4.65 ± 0.12	4.83 ± 0.32	4.78 ± 0.32	4.69 ± 0.23	4.53 ± 0.17
Υγρασία % ^β	-	58.95 ± 3.30	57.98 ± 2.08	58.40 ± 1.63	59.02 ± 4.08	56.86 ± 1.87
NaCl % ^γ	-	1.14 ± 0.05	1.17 ± 0.11	1.18 ± 0.04	1.20 ± 0.03	1.17 ± 0.09
S/M% ^δ	-	1.89 ± 0.08	1.96 ± 0.11	1.97 ± 0.06	1.98 ± 0.13	2.00 ± 0.07
Τέφρα % ^ε	-	2.23 ± 0.25	2.28 ± 0.33	2.26 ± 0.24	2.24 ± 0.23	2.22 ± 0.15
Λίπος % ^ζ	-	22.89 ± 2.25	22.56 ± 2.22	22.83 ± 1.80	24.33 ± 2.25	24.83 ± 2.57
FDM % ^η	-	55.72 ± 1.87	53.67 ± 4.51	54.87 ± 3.22	59.41 ± 0.69	57.49 ± 3.98
Ολικό N % ^θ	-	15.54 ± 1.18	15.22 ± 0.58	15.28 ± 0.84	15.32 ± 0.44	15.72 ± 0.34
WSN % ^ι	-	1.27 ± 0.01	1.40 ± 0.04	1.51 ± 0.07	1.62 ± 0.09	1.83 ± 0.35
PI % ^κ	-	8.24 ± 0.66	9.26 ± 0.52	9.92 ± 0.49	10.55 ± 0.58	11.66 ± 2.19

Mpi: εμβολιασμένο παστεριωμένο γάλα, D1: τυρί μέρας 1, D3: τυρί μέρας 3, D8: τυρί μέρας 8, D15: τυρί μέρας 15, D30: τυρί μέρας 30

- : δεν προσδιορίστηκε

^α Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των Mpi and D1, D3, D8, D15 και D30 ($P=0.10$)

^β Μη στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των σταδίων ωρίμανσης ($P=0.37$)

^γ Μη στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των σταδίων ωρίμανσης ($P=0.81$)

^δ Μη στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των σταδίων ωρίμανσης ($P=0.76$)

^ε Μη στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των σταδίων ωρίμανσης ($P=0.80$)

^ζ Μη στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των σταδίων ωρίμανσης ($P=0.79$)

^η Μη στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των σταδίων ωρίμανσης ($P=0.80$)

^θ Μη στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των σταδίων ωρίμανσης ($P=0.81$)

^ι Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των D1, και D3, D8, και D15, D30 ($P=0.02$)

^κ Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των D1, D3, D8, και D15, D30 ($P=0.03$)

Το ποσοστό υγρασίας παρέμεινε σταθερό κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του τυριού έχοντας τελική τιμή 56.9%. Υπό αυτήν την έννοια, το γίδινο τυρί χαρακτηρίστηκε ως μαλακό. Το ποσοστό υγρασίας ήταν μεγαλύτερο σε σχέση με άλλα μαλακά τυριά, όπως το Brie (56%), το Camembert (48%), η Μοτσαρέλλα (53%), η Κοπανιστή (52%), η Ricotta (82%) και το Cottage (80%) (Robinson, 1990). Η υγρασία του τυριού είναι η μεταβλητή με τη μεγαλύτερη επίδραση στην απόδοσή του (Emmons, 1993). Βασικές παράμετροι της τυροκόμησης, όπως ο χρόνος πήξης, το μέγεθος διαίρεσης τεμαχιδίων, η θερμοκρασία πήξης, η ανάδευση, το αλάτισμα και ο χρόνος μεταξύ αλατίσματος και πίεσης, επηρεάζουν την υγρασία του τυριού, κι αυτή με τη σειρά της καθορίζει τη μικροβιακή ανάπτυξη, την ισορροπία μεταλλικών στοιχείων και τις φυσικές ιδιότητες του πηγματος (Jimenez-Marquez *et al.*, 2005).

Οι τιμές που παρατηρήθηκαν για την περιεκτικότητα σε χλωριούχο νάτριο, σε τέφρα αλλά και για το συντελεστή άλατος δεν μεταβλήθηκαν σημαντικά κατά την ωρίμανση ($P > 0.05$, Πίνακας 3.2). Η περιεκτικότητα σε χλωριούχο νάτριο ήταν 1%, που ήταν αναμενόμενη αν ληφθεί υπόψη ότι κατά την ημέρα 1 της τυροκόμησης, προστέθηκε στο πήγμα 1% NaCl (w/w). Στη συνέχεια η περιεκτικότητα σε αλάτι διατηρήθηκε σταθερή, που σημαίνει ότι η απομάκρυνση με τον ορό ήταν αμελητέα. Παρόλα αυτά, ο τελικός συντελεστής άλατος (2.0%) ήταν σχετικά χαμηλός σε σχέση με άλλα Ελληνικά μαλακά τυριά (Psoni *et al.*, 2003, Sarantinopoulos *et al.*, 2002, Hatzikamari *et al.*, 2001, Anifantakis, 1991). Η συγκέντρωση άλατος στα τυριά κυμαίνεται από 0.7-7 g/100g τυριού (τιμές που αντιστοιχούν σε a_w 0.99-0.95 αντίστοιχα), ανάλογα με την τεχνολογία που χρησιμοποιείται. Η προσθήκη άλατος δεν προσδίδει μόνο ευχάριστη γεύση αλλά ταυτόχρονα δρα ως παρεμποδιστικό μέσο για την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών.

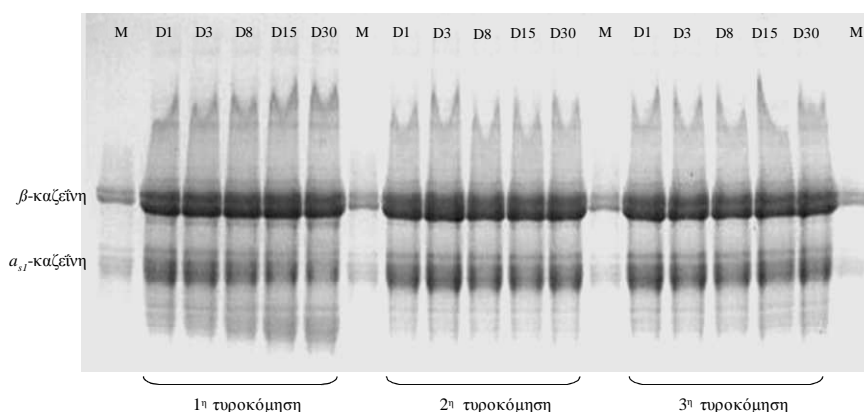
Η παρεμποδιστική δράση του αλατιού καθορίζεται από τον συντελεστή άλατος, δηλαδή την συγκέντρωση του αλατιού στην υδατική φάση του τυριού (Beresford *et al.*, 2001). Η τελική περιεκτικότητα σε τέφρα ήταν 2.22% (± 0.15). Οι Franco *et al.* (2003) αναφέρουν ότι η τέφρα στο Ισπανικό γίδινο μαλακό τυρί Babia-Laciana ήταν 2.8%. Η διαφορά αυτή μπορεί να εξηγηθεί μερικώς από τη μικρή συγκέντρωση NaCl αλλά και από την εφαρμοζόμενη τεχνολογία. Έτσι, η έντονη παραγωγή οξύτητας κατά τα πρώτα στάδια της παρασκευής του τυριού και το χαμηλό pH (4.53 κατά μέσο όρο) προκαλούν μεγάλη απώλεια ιόντων από τα καζεϊνικά μικκύλια, τα οποία παρασύρονται στο ορό.

Το λίπος (%) καθώς και το λίπος επί ξηρού (%) παρέμειναν σταθερά κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης χωρίς στατιστικά σημαντικές διαφορές. Οι τελικές τιμές του ποσοστού λίπους και του λίπους επί ξηρού ήταν 25% και 57%, αντίστοιχα, κατηγοριοποιώντας έτσι το τυρί ως πλήρως λιπαρό (Codex Alimentarius, 1978). Παρόμοιες ή ελαφρώς υψηλότερες τιμές λίπους επί ξηρού αναφέρονται και για άλλα τυριά από γίδινο γάλα (Franco *et al.*, 2003, Mas *et al.*, 2002, Olarte *et al.*, 1999, Fresno *et al.*, 1996). Οι τιμές του λίπους επί ξηρού (%) για άλλα μαλακά τυριά ποικίλλουν, από 12 και 18% για τα τυριά Μοτσαρέλλα και Ricotta αντίστοιχα, μέχρι 40 και 45% για τα Brie και Camembert (Robinson, 1990), διαφορές που σίγουρα οφείλονται και στη διαφορετική περιεκτικότητα σε υγρασία που έχουν αυτά τα τυριά. Το λίπος παίζει σημαντικό ρόλο στο να αποτρέπει τη συρρίκνωση του καζεϊνικού δικτύου που καταλήγει σε σκληρή και ανεπιθύμητη δομή (Ardö, 1999).

Το Ολικό Άζωτο (TN) δεν είχε σημαντικές μεταβολές κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, με μέση τιμή στο 15%, ενώ το Υδατοδιαλυτό Άζωτο (WSN) και ως εκ τούτου ο Συντελεστής Ωρίμανσης αυξήθηκαν φτάνοντας τιμές 1.8 και 11.6%, αντίστοιχα (Πίνακας 3.2). Το κλάσμα WSN περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες του ορού, υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες, αμινοξέα, αμίνες, ουρία, αμμωνία και χαμηλού μοριακού βάρους πεπτίδια (<15000 Da μοριακό βάρος) που προέρχονται από την υδρόλυση των καζεϊνών (Guven *et al.*, 2006).

Η πρωτογενής πρωτεόλυση στο τυρί μπορεί να εκτιμηθεί αποτελεσματικά με την ηλεκτροφόρηση urea-PAGE, ενώ ο επακόλουθος σχηματισμός πεπτιδίων (δευτερογενής πρωτεόλυση) που προκύπτει από μικροβιακές πεπτιδάσες, μπορεί να εξακριβωθεί με τη μέθοδο RP-HPLC. Τα προφίλ των ηλεκτροφορήσεων urea-PAGE των τριών τυριών φαίνονται στην Γράφημα 3.1. Η εικόνα της συνολικής αποικοδόμησης των πρωτεϊνών ήταν παρόμοια στα τρία τυριά αλλά πιο έντονη και σαφής στο πρώτο δείγμα. Τα καζεϊνικά κλάσματα έδειξαν ότι η β -καζεΐνη δεν υδρολύθηκε, ενώ η υπολειπόμενη α_{s1} -καζεΐνη παρουσίασε σταδιακή μείωση κατά τη διάρκεια των 30 ημερών της ωρίμανσης. Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε μια ανάλογη αύξηση των προϊόντων υδρόλυσης της α_{s1} -καζεΐνης. Η β -καζεΐνη δεν προσβάλλεται εύκολα από τη δράση της πυτιάς και η υδρόλυσή της αποδίδεται στη δράση μικροβιακών ενζύμων (Fox & McSweeney, 1996). Σε πολλά είδη τυριού, η α_{s1} -καζεΐνη αποικοδομείται σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τη β -καζεΐνη σε ένα δεδομένο χρονικό πλαίσιο και επομένως δημιουργούνται διαφορετικές συγκεντρώσεις των πρωτογενών προϊόντων υδρόλυσης (Fox, 1993). Σε χαμηλά pH, η αποικοδόμηση

της α_{s1} -καζεΐνης είναι ταχύτερη, πιθανώς επειδή η χυμοσίνη είναι πιο δραστική σε χαμηλότερες τιμές pH (Sousa *et al.*, 2001).

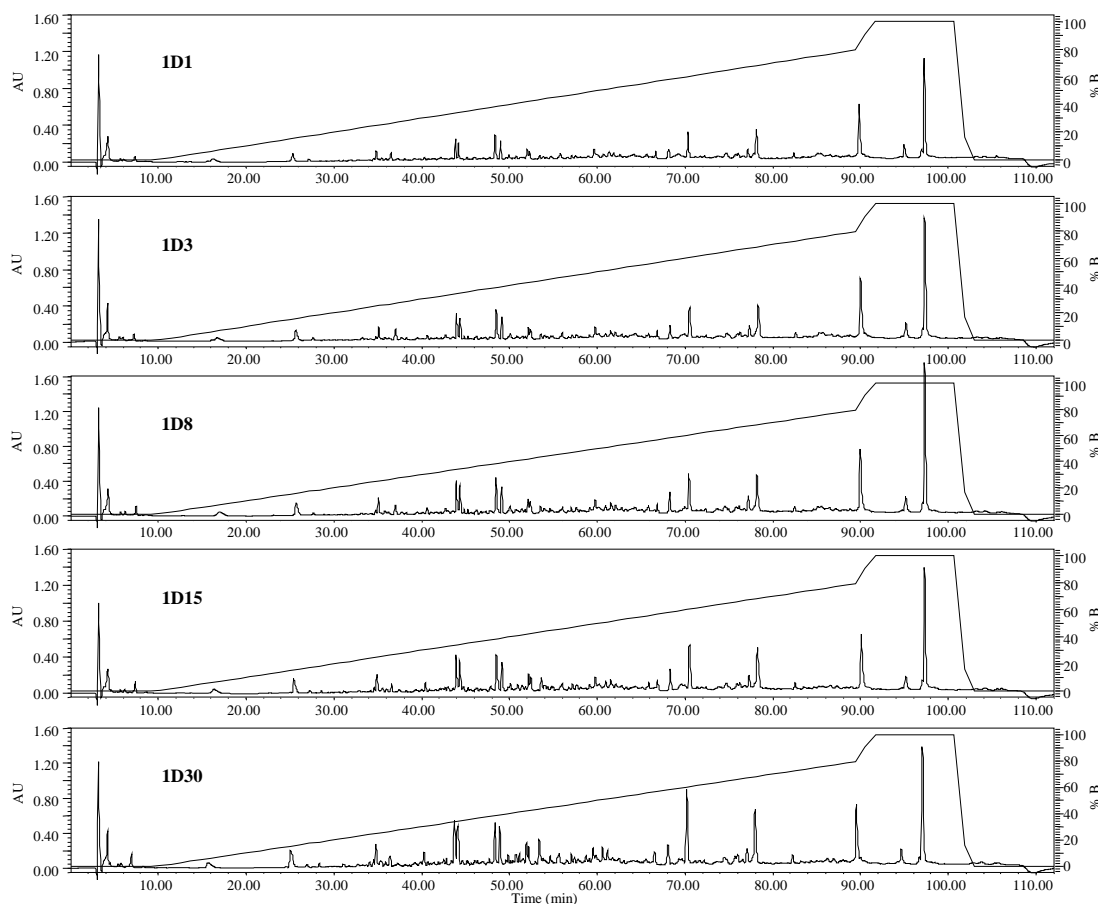


Γράφημα 3.1.

Ηλεκτροφορητικά προφίλ των καζεϊνικών κλασμάτων των τριών τυροκομήσεων του γίδινου τυριού, όπως αυτά αναλύθηκαν με τη μέθοδο της Urea-PAGE. M: ισοηλεκτρική βόεια καζεΐνη, D1: τυρί μέρας 1, D3: τυρί μέρας 3, D8: τυρί μέρας 8, D15: τυρί μέρας 15, D30: τυρί μέρας 30.

Τα προφίλ της RP-HPLC ανάλυσης του υδατοδιαλυτού αζώτου (WSN) του τυριού της 1^{ης} τυροκόμησης φαίνονται στο [Γράφημα 3.2](#). Στα χρωματογραφήματα παρατηρείται ένας μεγάλος αριθμός κορυφών, υποδεικνύοντας ένα ετερογενές μείγμα προϊόντων πρωτεόλυσης. Μολονότι η ανάλυση RP-HPLC διαχωρίζει τα πεπτίδια κατά μέγεθος και υδροφοβικότητα, τα χρωματογραφήματα των εκχυλισμάτων του WSN διαιρέθηκαν αυθαίρετα σε δύο ζώνες, κάθε μια από τις οποίες περιείχε περισσότερες από μία κορυφές. Η ζώνη I περιλαμβάνει τις κορυφές που εκλύονται σε 3-39% ακετονιτρίλιο (ή σε χρόνο έκλυσης 10-55 min), οι οποίες κατά πάσα πιθανότητα αντιστοιχούν σε ελεύθερα αμινοξέα και μικρά/μεσαία υδρόφιλα πεπτίδια. Η ζώνη II περιλαμβάνει τις κορυφές που εκλύονται σε 40-100% ακετονιτρίλιο (ή σε χρόνο έκλυσης 55-100 min), οι οποίες πιθανώς αντιστοιχούν σε μεσαία/μεγάλα υδρόφοβα πεπτίδια και σε πρωτεΐνες του ορού (Michaelidou *et al.*, 1998). Το εμβαδόν των κορυφών κάθε ζώνης υπολογίστηκε ως η αναλογία κάθε ζώνης προς το συνολικό εμβαδό των κορυφών του χρωματογραφήματος. Οι αντίστοιχες ποσοτικές αλλαγές των υδρόφιλων και υδρόφοβων κλασμάτων, απεικονίζονται στο [Γράφημα 3.3](#), όπου

παρουσιάζεται επίσης η μεταβολή του Συντελεστή Ωρίμανσης (Proteolytic Index, PI). Όσον αφορά την υδρόφοβη ζώνη, τα εμβαδά των κορυφών δεν έδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά παρότι παρατηρήθηκε μια σαφής τάση μείωσης. Αντιθέτως, στην υδρόφιλη ζώνη παρατηρήθηκε αύξηση των εμβαδών των κορυφών κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης.

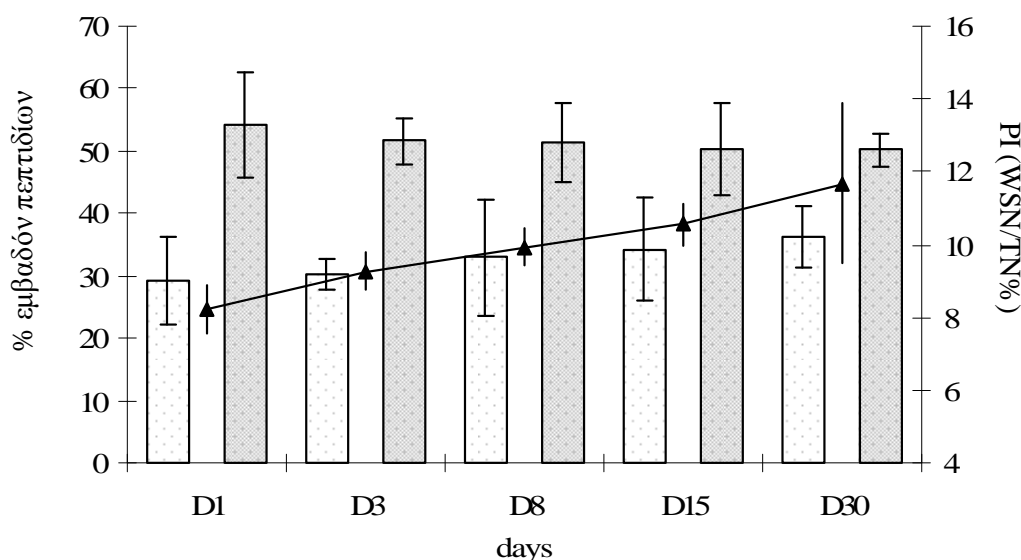


Γράφημα 3.2.

Προφίλ του υδατοδιαλυτού κλάσματος αζώτου (WSN) του γίδινου τυριού (1^η τυροκόμηση) όπως αυτό λήφθηκε με την ανάλυση RP-HPLC. D1: τυρί μέρας 1, D3: τυρί μέρας 3, D8: τυρί μέρας 8, D15: τυρί μέρας 15, D30: τυρί μέρας 30.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των μεταβολιτών στα δείγματα του γίδινου τυριού παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3. Η λακτόζη μειώθηκε σημαντικά κατά τη διάρκεια των 30 ημερών της ωρίμανσης ενώ ταυτόχρονα αυξήθηκε το γαλακτικό οξύ. Η γαλακτόζη ανιχνεύθηκε σε συγκέντρωση 9.3 mmol/L αλλά δεν διαφοροποιήθηκε

στατιστικώς σημαντικά στις 30 μέρες, πράγμα που σημαίνει ότι οι εναρκτήριες καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν δεν ζυμώνουν αυτόν τον υδατάνθρακα. Το κιτρικό οξύ βρέθηκε σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης.



Γράφημα 3.3.

Μεταβολές στα υδρόφιλα (□) και υδρόφοβα (■) πεπτίδια του υδατοδιαλυτού κλάσματος αζώτου καθώς και στο συντελεστή ωρίμανσης (P.I.) κατά τη ωρίμανση του γίδινου τυριού. D1: τυρί μέρας 1, D3: τυρί μέρας 3, D8: τυρί μέρας 8, D15: τυρί μέρας 15, D30: τυρί μέρας 30.

Οι κύριες πτητικές ενώσεις που παράχθηκαν κατά την περίοδο της ωρίμανσης ήταν η αιθανόλη, το διακετύλιο και η ακετοΐνη. Η συγκέντρωση της αιθανόλης δεν μεταβλήθηκε σημαντικά, αν και μια σταθερή αυξητική τάση ήταν εμφανής μέχρι την 30^η ημέρα. Η αιθανόλη έχει αναφερθεί σε διάφορα τυριά, όπως στη Φέτα και σε παρόμοια τυριά και παράγεται κατά τη ζύμωση της λακτόζης από ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια ή από ζύμες (Bintsis & Robinson, 2004). Ωστόσο, δεδομένου ότι δεν χρησιμοποιήθηκε ετεροζυμωτικό στέλεχος ως εναρκτήριο καλλιέργεια στην παρούσα μελέτη και ο πληθυσμός των ζυμών ήταν σχετικά μικρός, μπορεί να υποτεθεί ότι η αιθανόλη παράγεται από μη εναρκτήρια οξυγαλακτικά που αναπτύσσονται στο τυρί ως δευτερεύουσα χλωρίδα κατά την ωρίμανση.

Το διακετύλιο ανιχνεύτηκε σε υψηλά επίπεδα κατά την ημέρα 1, αλλά μειώθηκε κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, ενώ η ακετοΐνη παρουσίασε την αντίθετη

πορεία, καθώς αυξήθηκε ελαφρά μέχρι την ημέρα 30. Το διακετύλιο είναι μια σημαντική δι-κετόνη όσον αφορά τη γεύση των γαλακτοκομικών προϊόντων και έχει αναφερθεί σε φρέσκο τυρί Φέτας (Bintsis & Robinson, 2004). Αυτή η ένωση προκύπτει από το πυροσταφυλικό οξύ κατά το μεταβολισμό της λακτόζης ή/και του κιτρικού και οφείλεται κυρίως στη δραστηριότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Curioni & Bosset, 2002). Η αναγωγή του διακετυλίου οδηγεί στην παραγωγή ακετοΐνης (Engels *et al.*, 1997) και αυτό μπορεί να εξηγήσει τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Πίνακας 3.3.

Παραγωγή μεταβολιτών του γίδινου τυριού κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης

Ένωση	D1	D3	D8	D15	D30
Λακτόζη* ^α	1.9 ± 0.3	1.5 ± 0.4	1.2 ± 0.5	0.8 ± 0.6	0.5 ± 0.4
Γαλακτικό οξύ* ^β	21.9 ± 1.6	23.7 ± 0.5	24.9 ± 0.8	25.7 ± 1.9	28.2 ± 0.8
Γαλακτόζη* ^γ	9.3 ± 1.7	9.9 ± 2.3	10.0 ± 1.8	9.5 ± 1.9	9.0 ± 2.4
Κιτρικό οξύ* ^δ	0.7 ± 0.6	1.2 ± 0.5	1.3 ± 0.4	1.3 ± 0.4	1.4 ± 0.4
Αιθανόλη** ^ε	46.2 ± 7.0	55.2 ± 2.2	55.1 ± 12.9	56.3 ± 10.3	87.8 ± 67.4
Διακετύλιο** ^ζ	7.1 ± 5.0	7.0 ± 6.0	4.1 ± 4.9	2.0 ± 2.1	0.5 ± 0.3
Ακετοΐνη** ^η	60.5 ± 14.8	77.4 ± 13.3	89.2 ± 20.3	131.4 ± 65.4	143.2 ± 60.2

D1: τυρί μέρας 1, D3: τυρί μέρας 3, D8: τυρί μέρας 8, D15: τυρί μέρας 15, D30: τυρί μέρας 30.

* HPLC ανάλυση του υδατοδιαλυτού κλάσματος αζώτου σε μονάδες mmol/L (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση)

** GC-MS ανάλυση των πτητικών ενώσεων σε μονάδες ppm (μέση τιμή ± τυπική απόκλιση)

^α Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των D1 και D30 ($P=0.02$)

^β Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των D1 και D3, D8, D15 και D30 ($P=0.0014$)

^γ Μη στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των σταδίων ωρίμανσης ($P=0.97$)

^δ Μη στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των σταδίων ωρίμανσης ($P=0.37$)

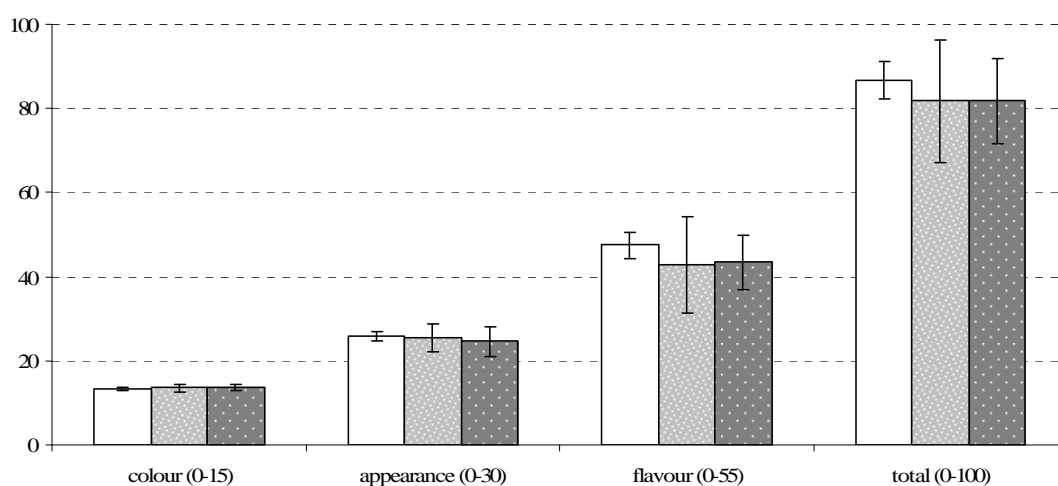
^ε Μη στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των σταδίων ωρίμανσης ($P=0.13$)

^ζ Μη στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των σταδίων ωρίμανσης ($P=0.28$)

^η Μη στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των σταδίων ωρίμανσης ($P=0.14$)

3.3.3. Οργανοληπτικός έλεγχος

Ο οργανοληπτικός έλεγχος των ζυμούμενων γαλακτοκομικών προϊόντων και ειδικότερα των τυριών αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο που βοηθά στην εκτίμηση της πιθανής επίδρασης των εναρκτήριων καλλιεργειών ή της υπόλοιπης μικροχλωρίδας αλλά και της τεχνολογίας στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά αυτών των προϊόντων. Η οργανοληπτική αξιολόγηση των τριών τυριών της παρούσας μελέτης παρουσιάζεται συνολικά στο **Γράφημα 3.4**. Στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν δυο εμπορικά μαλακά τυριά από γίδινο γάλα με σκοπό τη συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων. Όσον αφορά την υφή, και τα τρία τυριά χαρακτηρίστηκαν από τους δοκιμαστές ως μαλακά, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τον προσδιορισμό της υγρασίας (56.86% στο τελικό προϊόν). Είναι φανερό ότι τα τρία τυριά δεν



Γράφημα 3.4.

Οργανοληπτικός έλεγχος του γίδινου τυριού (□) σε σχέση με δυο εμπορικά, μαλακά τυριά από γίδινο γάλα (■ και ■).

παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στο χρώμα και στην εμφάνιση. Η σημαντικότερη διαφορά στη βαθμολογία από τους δοκιμαστές εστιάζεται στη γεύση/οσμή, με το τυρί 2 να λαμβάνει σαφώς καλύτερη βαθμολογία. Το τυρί 2 είχε ενδιάμεση (%) υγρασία και λιποπεριεκτικότητα σε σχέση με το 1^ο και το 3^ο τυρί. Η παρουσία του λίπους έχει άμεση επίδραση στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τυριών. Έτσι, δεν επηρεάζει μόνο την υφή αλλά συνεισφέρει και στο άρωμα/γεύσης των τυριών. Τα λίπος λειτουργεί ως αποθήκη αρωματικών ουσιών. Την υψηλότερη λιποπεριεκτικότητα

παρουσίασε το δείγμα 3 και αυτό χαρακτηρίστηκε ως αρκετά λιπαρό. Οι [Herrerros et al. \(2003\)](#) αναφέρουν ότι οι παράγοντες που επηρεάζουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ενός τυριού, είναι: το είδος του γάλακτος, η μικροβιακή του ποιότητα, η τεχνολογία που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του, οι συνθήκες ωρίμανσης κ.α. Ο [Mehaia \(2002\)](#), αναφέρει ότι η εμφάνιση, η υφή, η γεύση/άρωμα και η γενική αποδοχή των τυριών επηρεάζεται από τη διαδικασία παραγωγής και από το είδος της οξυγαλακτικής εναρκτήριας καλλιέργειας. Τα αποτελέσματα του οργανοληπτικού ελέγχου του γίδινου τυριού της μελέτης ήταν καλύτερα σε σχέση με τα εμπορικά γίδινα τυριά παρά το γεγονός ότι δεν ήταν στατιστικώς σημαντική η διαφορά.

3.4. Συμπεράσματα

Το καταναλωτικό κοινό αναζητά πλέον τυριά με διαφοροποιημένο άρωμα και γεύση. Αυτό το γεγονός καθιστά αναγκαία την αναζήτηση νέων στελεχών, εναλλακτικών πρώτων υλών και νεοφανών τεχνολογιών στη γαλακτοκομική βιομηχανία. Παρά το γεγονός ότι η Ελλάδα είναι παγκοσμίως η πρωτοπόρος χώρα στη κατά κεφαλή παραγωγή γίδινου γάλακτος, δεν υπάρχουν πολλά τυποποιημένα τυριά που να παράγονται εξ ολοκλήρου από γίδινο γάλα.

Κάτω από αυτή την οπτική γωνία, ο σκοπός της μελέτης ήταν η παραγωγή ενός νέου τυριού με τη χρήση γίδινου γάλακτος και νέων 'άγριων' οξυγαλακτικών στελεχών. Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι οι επιλεγμένες εναρκτήριες καλλιέργειες απέδωσαν καλά στη ζύμωση του παστεριωμένου γίδινου γάλακτος και συνέστησαν την κυρίαρχη μικροχλωρίδα κατά την ωρίμανση του τυριού. Το τελικό προϊόν ήταν ένα μαλακό τυρί, με pH 4.53, 56.9% υγρασία, 2.0% συντελεστή άλατος, 57.5% λίπος επί ξηρού. Όταν δε υποβλήθηκε σε οργανοληπτική αξιολόγηση χαρακτηρίστηκε από ήπια και αρωματική γεύση, καθώς και ομαλή δομή, δίνοντας αποτελέσματα παρόμοια ή ελαφρώς καλύτερα σε σχέση με τα εμπορικά τυριά. Ως εκ τούτου, καταφέραμε να παράγουμε και να χαρακτηρίσουμε πλήρως, μικροβιολογικά και φυσικοχημικά, ένα νέο τυρί από γίδινο γάλα με τη χρήση 'άγριων' οξυγαλακτικών στελεχών, το οποίο έδειξε ένα αξιόλογο προφίλ και του οποίου η εφαρμογή δύναται να δοκιμαστεί σε μεγάλης κλίμακας τυροκόμηση

Βιβλιογραφία

- Andrews, A. T. 1983. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *Journal Dairy Research*, 50, 45–55.
- Anifantakis, E. M. 1991. *Greek cheeses. A tradition of centuries* Athens Greece. National Dairy Committee of Greece.
- Ardö, Y., & Polychroniadou, A. 1999. Improvement of the quality of the production of raw milk cheeses. *Laboratory Manual for Chemical Analysis of Cheese*. COST 95.
- Arenas, R., González, L., Bernardo, A., Fresno, J. M., & Tornadijo, M. E. 2004. Microbiological and physico-chemical changes in Genestoso cheese a Spanish acid curd variety throughout ripening. *Food Control*, 15, 271-279.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., & Cogan, T. M. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 259–274.
- Bintsis, T., & Robinson, R. K. 2004. A study of the effects of adjunct cultures on the aroma compounds of Feta-type cheese. *Food Chemistry*, 88, 435-441.
- Codex Alimentarius, 1978. General Standard for Cheese. CODEX STAN 283 FAO/WHO.
- Coppola, R., Nanni, M., Iorizzo, M., Sorrentino, A., Sorrentino, E., Chiavari, C., & Grazia, L. 2000. Microbiological characteristics of Parmigiano Reggiano cheese during the cheesemaking and the first months of the ripening. *Lait*, 80, 479-490.
- Curioni, P. M. G., & Bosset, J. O. 2002. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*, 12, 959-984.
- Dubeuf, J-P., Morand-Fehr, P., & Rubino, R. 2004. Situation changes and future of goat industry around the world. *Small Ruminant Research*, 51, 165-173.
- Emmons, D. B. 1993. Definition and expression of cheese yield In Factors affecting the yield of cheese. Special Issue no 9301. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- Engels, W. J. M., Dekker, R., De Jong, C., Neeter, R., & Visser, S. 1997. A comparative study of volatile compounds in the water-soluble fraction of various types of ripened cheese. *International Dairy Journal*, 7, 255-263.
- Ferreira, A. D., & Viljoen, B. C. 2003. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 131-140.
- FAO, 2005. FAOSTAT Major Food and Agricultural Commodities and Producers <http://www.fao.org/es/ess/top/commodity.html>.
- Fox, P. F. 1993 Cheese: An overview. In *Cheese: Chemistry Physics and Microbiology*, pp 1–36, vol 1. Fox P F, ed. London: Chapman and Hall.
- Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. 1996. Proteolysis in cheese during ripening. *Food Reviews International*, 12, 457–509.
- Franco, I., Prieto, B., Bernardo, A., Prieto, J. G., & Carballo, J. 2003. Biochemical changes throughout the ripening of a traditional Spanish goat cheese variety (Babia-Laciana). *International Dairy Journal*, 13, 221-230.
- Fresno, J. M., Tornadijo, M. E., Carballo, J., González-Prieto, J., & Bernardo, A. 1996. Characterization and biochemical changes during the ripening of a Spanish craft goat's milk cheese (Armada variety). *Food Chemistry*, 55, 225-230.
- Gripon, J. C. 1993. Mould ripened cheeses In P F Fox (Ed) *Cheese: Chemistry physics and microbiology* Vol 2 (pp 111–136) London: Chapman and Hall.

- Guven, M., Yerlikaya, S., & Hayaloglu, A. A. 2006. Influence of salt concentration on the characteristics of Beyaz cheese a Turkish white-brined cheese. *Lait*, 86, 73-81.
- Haenlein, G. F. W. 2001. Past, present and future perspectives of small ruminant dairy research. *Journal of Dairy Science*, 84, 2097-2115.
- Haenlein, G. F. W. 2004. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*, 51, 155-163.
- Hatzikamari, M., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Tzanetakis, N. 2001. Microbiological characteristics of Anevato: A traditional Greek cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 595-601.
- IDF, 1964. Determination of the ash content of processed cheese products. IDF Standard 27:1964. Brussels, Belgium, International Dairy Federation.
- IDF, 1972. Determination of chloride content (reference method) IDF Standard 17A:1972. Brussels, Belgium, International Dairy Federation.
- IDF, 1996. of Samples and Dilutions for Microbiological Examination IDF Standard 122C. Brussels, Belgium, International Dairy Federation.
- Jimenez-Marquez, S. A., Thibault, J., & Lacroix, C. 2005. Prediction of moisture in cheese of commercial production using neural networks. *International Dairy Journal*, 15, 1156-1174.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 67-78.
- Litopoulou-Tzanetaki, E., & Tzanetakis, N. 1992. Microbiological study of white-brined cheese made from raw goat milk. *Food Microbiology*, 9, 13-19.
- Manolopoulou, E., Sarantinopoulos, P., Zoidou, E., Aktypis, A., Moschopoulou, E., Kandarakis, I. G., & Anifantakis, E. M. 2003. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 153-161.
- Mas, M., Tabla, R., Moriche, J., Roa, I., Gonzalez, J., Rebollo, J. E., & Cáceres, P. 2002. Ibores goat's milk cheese: Microbiological and physicochemical changes throughout ripening. *Lait*, 82, 579-587.
- McSweeney, P. L. H., & Fox, P. F. 2004. Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. In *Cheese: Chemistry Physics and Microbiology*, vol 1: *General Aspects* 3rd edn, pp 361-372. Fox P F McSweeney P L H Cogan T M and Guinee T P eds. London: Elsevier.
- Michaelidou, A. M. 2008. Factors influencing nutritional and health profile of milk and milk products. *Small Ruminant Research*, 79, 42-50.
- Michaelidou, A., Alichanidis, E., Urlaub, H., Polychroniadou, A., & Zerfiridis, G. K. 1998. Isolation and identification of some major water-soluble peptides in Feta cheese. *Journal of Dairy Science*, 81, 3109-3116.
- Mor-Mur, M., Carretero, C., Pla, R., & Guamis, B. 1994. Microbiological changes during ripening of Cendrat del Montsec a goat's milk cheese. *Food Microbiology*, 11, 177-185.
- Nikolaou, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Robinson, R. K. 2002. Changes in the microbiological and chemical characteristics of an artisanal low-fat cheese made from raw ovine milk during ripening. *International Journal of Dairy Technology*, 55, 12-17.
- Olarte, C., Sanz, S., Gonzalez-Fandos, E., & Torre, P. 1999. Microbiological and physicochemical characteristics of Cameros cheese. *Food Microbiology*, 16, 615-621.

- Ortiz de Apodaca, M. J., Selgas, M. D., & Ordoñez, J. A. 1993. Lipolytic and proteolytic activities of micrococci isolated from cheese. *Food Research International*, 26, 319–325.
- Psoni, L., Tzanetakis, N., & Litopoulou-Tzanetaki, E. 2003. Microbiological characteristics of Batzos a traditional Greek cheese from raw goat's milk. *Food Microbiology*, 20, 575-582.
- Psoni, L., Tzanetakis, N., & Litopoulou-Tzanetaki, E. 2006. Characteristics of Batzos cheese made from raw pasteurized and/or pasteurized standardized goat milk and a native culture. *Food Control*, 17, 533-539.
- Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., & Chilliard, Y. 2008. Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research*, 79, 57-72.
- Robinson, R. K., 1990 Microbiology of cheese. In *Dairy Microbiology*, Vol. 2, 2nd edn, pp 203–290. London: Elsevier Applied Science.
- Sarantinopoulos, P., Kalantzopoulos, G., & Tsakalidou, E. 2002. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 76, 93–105.
- Sousa, M. J., Ardö, Y., & McSweeney, P. L. H. 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11, 327-345.
- Tornadijo, M. E., Fresno, J. M., Bernardo, A., Martin Sarmiento, R., & Carballo, J. 1995. Microbiological changes throughout the manufacturing and ripening of a Spanish goat's raw milk cheese (Armada variety). *Lait*, 75, 551–570.
- Xanthopoulos, V., Polychroniadou, A., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Tzanetakis, N. 2000. Characteristics of Anevato cheese made from raw or heat-treated goat milk inoculated with a lactic starter. *LWT - Food Science and Technology*, 33, 483-488.
- Zarate, V., Belda, F., Pérez, C., & Cardell, E. 1997. Changes in the microbial flora of Tenerife goat's milk cheese during ripening. *International Dairy Journal*, 7, 635–641.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

**Μελέτη της διαφορικής έκφρασης γονιδίων του
Lactobacillus acidipiscis σε συνθήκες ωσμωτικού στρες
με τη μέθοδο RAP-PCR
και χαρακτηρισμός της μαννόζης και της σορβόζης ως
νέων ωσμωλυτών για τον *Lactobacillus acidipiscis***

4.1. Εισαγωγή

Στην παρούσα ενότητα διερευνήθηκε η απόκριση του *Lactobacillus acidipiscis* σε συνθήκες ωσμωτικού στρες. Ο *Lb. acidipiscis* απομονώθηκε από το δείγμα της παραδοσιακής Κοπανιστής (Κεφάλαιο 2). Ένα από τα χαρακτηριστικά του τυριού αυτού είναι η χαμηλή ενεργότητα νερού (τουλάχιστον 5% NaCl). Παρόμοιας ή υψηλότερης αλατότητας είναι και τα τρόφιμα, τα οποία έχουν αναφερθεί ως οι πρώτες πηγές απομόνωσης του είδους, συγκεκριμένα ζυμωμένα ψάρια (Tanasupawat *et al.*, 2000) και χυλός σάλτσας σόγιας (Tanasupawat *et al.*, 2002). Είναι ενδιαφέρον, ότι παρόλα αυτά, μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν δεδομένα σχετικά με τη φυσιολογία του είδους αυτού και ειδικότερα κάτω από συνθήκες ωσμωτικού στρες. Σε προκαταρκτικά πειράματα που έγιναν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα δείγματα της Κοπανιστής και της Μάνας εμφάνισαν ένα ενδιαφέροντα αλοανθεκτικό φαινότυπο.

Με βάση τα παραπάνω, αποφασίστηκε να διερευνηθούν σε μοριακό επίπεδο οι μηχανισμοί απόκρισης του *Lb. acidipiscis* σε συνθήκες ωσμωτικού στρες, καθώς επίσης και να προσδιοριστούν πιθανοί εμπλεκόμενοι ωσμωλύτες. Σε συνθήκες ωσμωτικού στρες, τα βακτήρια έχουν εξελίξει μηχανισμούς έτσι ώστε να συσσωρεύουν εντός των κυττάρων τους διάφορες διαλυτές ουσίες που ονομάζονται συμβατοί ωσμωλύτες. Αυτές οι ενώσεις είτε προκύπτουν από *de novo* βιοσύνθεση είτε εισέρχονται στο κύτταρο από το περιβάλλον (van de Guchte *et al.*, 2002). Υπό αυτό το κάτοπτρο, ο προσδιορισμός νέων ωσμωλυτών είναι πολύ σημαντικός για τη βιομηχανία τροφίμων, καθώς μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερη προστασία και έλεγχο των εναρκτήριων καλλιεργειών κατά τις επεξεργασίες που αποσκοπούν σε χαμηλή ενεργότητα νερού, όπως η προσθήκη NaCl ή σακχάρων, η ξήρανση, η κατάψυξη, η λυοφιλίωση κ.τ.λ.

Για να μελετηθεί η διαφορική έκφραση γονιδίων του *Lb. acidipiscis* σε ισο- και υπερωσμωτικές συνθήκες εφαρμόστηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με τη χρήση ενός αυθαίρετου εκκινητή (RNA Arbitrarily Primed-PCR, RAP-PCR). Η συγκεκριμένη τεχνική αρχικά αναπτύχθηκε για τη μελέτη της έκφρασης γονιδίων ως επί το πλείστον ευκαρυωτικών οργανισμών (McClelland *et al.*, 1995, Liang & Pardee, 1992, Welsh *et al.*, 1992), στη συνέχεια όμως προσαρμόστηκε με επιτυχία για την αναγνώριση διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων σε

προκαρυωτικούς οργανισμούς κάτω από συνθήκες διάφορων περιβαλλοντικών στρες (Li *et al.*, 2006, Frias-Lopez *et al.*, 2004, Bidle 2003, Paulino *et al.*, 2002, Benson *et al.*, 2000, Du & Kolenbrander 2000, Fleming *et al.*, 1998). Μάλιστα, έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία και σε οξυγαλακτικά βακτήρια, όπως αναφέρουν οι Papadimitriou *et al.* (2008) και Shepard & Gilmore (1999). Η τεχνική χρησιμοποιεί τυχαίους oligo-νουκλεοτιδικούς εκκινήτες για την παραγωγή ενός μοναδικού προφίλ συμπληρωματικού DNA (cDNA) για τον υπό εξέταση μικροοργανισμό σε κάθε δεδομένη φυσιολογική κατάσταση, παρέχοντας έτσι ένα ισχυρό εργαλείο για την αξιολόγηση της διαφορικής έκφρασης γονιδίων.

4.2. Υλικά και μέθοδοι

4.2.1. Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες ανάπτυξης

Ο *Lb. acidipiscis* ACA-DC 1533 αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS (Oxoid) στους 30° C. Για τους μετασχηματισμούς του DNA χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Escherichia coli* Mach1™ (Invitrogen) ως ξενιστής, το οποίο αναπτύχθηκε με αερόβια επώαση (250 rpm) σε θρεπτικό υπόστρωμα Luria-Bertani στους 37° C και όταν ήταν απαραίτητο προστίθετο αμπικιλίνη (Sigma) σε τελική συγκέντρωση 100 µg/mL.

4.2.2. Απομόνωση ολικού RNA από τα κύτταρα του *Lb. acidipiscis*

Το ολικό RNA απομονώθηκε από κύτταρα λογαριθμικής φάσης (OD₆₁₀ ~0.7) του *Lb. acidipiscis* με τα RNeasy και RNeasy Protect Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, με κάποιες τροποποιήσεις. Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε υγρό θρεπτικό μέσο MRS με προσθήκη 0, 2.5, 5 και 7.5% NaCl (w/v). Συγκεκριμένα, 5 mL καλλιέργειας φυγοκεντρήθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε 500 µL θρεπτικού μέσου MRS. Στο μίγμα προστέθηκαν δυο όγκοι διαλύματος RNeasy Protect και ακολούθησε επώαση για 5 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, για τη σταθεροποίηση του βακτηριακού RNA, την αποφυγή της αποικοδόμησής του, καθώς και την αποφυγή της επαγωγής γονιδίων κατά την μετέπειτα διαδικασία. Μετά από φυγοκέντρηση (6000 rpm για 10 min), το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 200 µL διαλύματος TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) που περιείχε λυσοζύμη (τελική συγκέντρωση 20

mg/mL) και μουτανολυσίνη (50 U). Ακολούθησε επώαση στους 37° C για 1 h και προσθήκη διαλύματος πρωτεΐνάσης K (τελική συγκέντρωση 10 µg/mL) με περαιτέρω επώαση στους 37° C για ακόμα 30 min. Μετά το τέλος της επώασης προστέθηκαν 700 µL διαλύματος μετουσιωτικής ικανότητας (που περιείχε ισοθειο-κυανικό γουανιδίνιο και β-μερκαπτοαιθανόλη) και 500 µL καθαρής αιθανόλης. Το δείγμα εφαρμόστηκε σε στήλη RNeasy που έχει την ικανότητα επιλεκτικής πρόσδεσης του RNA. Η στήλη στη συνέχεια εκπλύθηκε με το διάλυμα έκπλυσης και επώαστηκε με διάλυμα DNAσης I (απαλλαγμένου από RNase, της Qiagen) στους 30° C για 45 min, με σκοπό την πλήρη αποικοδόμηση των υπολειμμάτων του χρωμοσωμικού DNA. Ακολούθησε νέα έκπλυση της στήλης με τα κατάλληλα διαλύματα έκπλυσης που παρέχονται από το kit και έκλυση του RNA σε νέο φιαλίδιο eppendorf με 50 µL ddH₂O απαλλαγμένου από RNases. Η συγκέντρωση του RNA προσδιορίστηκε φωτομετρικά με τη συσκευή Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, MA, USA). Το διάλυμα μετουσιωτικής ικανότητας παρέχεται από το RNeasy kit.

4.2.3. Σύνθεση της πρώτης αλυσίδας του συμπληρωματικού DNA

Η σύνθεση της πρώτης αλυσίδας του cDNA πραγματοποιήθηκε σε φιαλίδιο τύπου 0.65-mL PCR eppendorf χρησιμοποιώντας ως μήτρα το ολικό RNA. Συγκεκριμένα, 1 µg RNA, αραιωμένο σε 12 µL ddH₂O, θερμάνθηκε στους 70° C για 10 min και μεταφέρθηκε αμέσως σε πάγο για 1 min. Μετά από σύντομη φυγοκέντρηση για τη συλλογή του περιεχομένου, προστέθηκαν 2 µL ρυθμιστικού διαλύματος της αντίστροφης μεταγραφάσης (10X), 2 µL του αυθαίρετα επιλεγμένου εκκινητή (τελική συγκέντρωση 1 µM), 2 µL μίγματος τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs, τελική συγκέντρωση 0.5 mM για κάθε dNTP) και 1 µL (40 U) διαλύματος αναστολέα RNase (RNasin Plus, Promega Corp., Madison, USA). Ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε είχε την αλληλουχία 5' AAT CTA GAG CTC TCC AGC '3. Ο συγκεκριμένος εκκινητής είχε προηγουμένως χρησιμοποιηθεί στο αντίστοιχο πρωτόκολλο της μελέτης διαφορικής έκφρασης γονιδίων του *Enterococcus faecalis* σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες (Shepard & Gilmore, 1999). Το μίγμα αφέθηκε για εξισορρόπηση στους 37° C για 5 min και στη συνέχεια προστέθηκε 1 µL (4 U) της αντίστροφης μεταγραφάσης Omniscript (Qiagen). Η αντίδραση (τελικού όγκου 20 µL) επώαστηκε στους 37° C για 1 h. Μετά τη ολοκλήρωση της σύνθεσης της πρώτης αλυσίδας του cDNA, το μίγμα θερμάνθηκε

στους 90° C για 5 min για την απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης Omniscript και τοποθετήθηκε στον πάγο για 10 min.

4.2.4. Ενίσχυση του συμπληρωματικού DNA με PCR

Για τη σύνθεση της δεύτερης αλυσίδας και την ενίσχυση του cDNA, το μίγμα αραιώθηκε (1:10) σε ddH₂O. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 10 μL του αραιωμένου δείγματος με προσθήκη 50 μL διαλύματος Taq PCR mastermix (Qiagen), 10 μL διαλύματος του ίδιου αυθαίρετα επιλεγμένου εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε και στο στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής (τελική συγκέντρωση 1 μM) και 30 μL ddH₂O απαλλαγμένου από νουκλεάσες. Το μίγμα (τελικού όγκου 100 μL) αναδεύτηκε ήπια και συλλέχθηκε μετά από ήπια φυγοκέντρηση. Οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) ήταν οι εξής: ένας κύκλος (στους 94° C για 3 min, στους 37° C για 5 min και στους 72° C για 5 min), 40 κύκλοι (στους 94° C για 1 min, στους 47° C για 1 min και στους 72° C για 1 min), ενώ το στάδιο της τελικής επιμήκυνσης έγινε στους 72° C για 10 min.

4.2.5. Ανάλυση των προϊόντων της αντίδρασης RAP-PCR

Τα προϊόντα της αντίδρασης RAP-PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Συγκεκριμένα, 10 μL δείγματος με 2 μL διαλύματος χρωστικής φόρτωσης (6X loading buffer) ηλεκτροφορήθηκαν σε μη μετουσιωτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου 4%, w/v (TBE-PAGE) διαστάσεων 24 X 19 cm. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 450 V για 16 h (στους 4° C). Η χρώση των πηκτών έγινε με το φθοροφόρο SYBR Gold (Molecular Probes Inc. Eugene, OR, USA), το οποίο παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με το βρωμιούχο αιθίδιο. Η εικόνα της πηκτής αναλύθηκε με το πρόγραμμα Fluorchem 8800 (Alpha Innotech, CA, USA).

4.2.6. Απομόνωση των προϊόντων RAP-PCR

Η απομόνωση των προϊόντων έγινε με το Qiaex II Kit (Qiagen). Μετά από την επιλογή των ζωνών που αντιπροσώπευαν πιθανά γονίδια διαφορετικής έκφρασης, οι ζώνες αφαιρέθηκαν από την πηκτή με χειρουργικό νυστέρι και τοποθετήθηκαν σε φιαλίδιο erpendorf. Προστέθηκαν 200 μL διαλύματος διάχυσης (0.5 M οξικό αμμώνιο, 10 mM οξικό μαγνήσιο, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.1% SDS) και στη συνέχεια τα δείγματα επώαστηκαν στους 50° C για 30 min. Μετά από φυγοκέντρηση το

υπερκεείμενο διηθήθηκε μέσα από φίλτρο Whatman τύπου GF/C για την πλήρη απομάκρυνση των υπολειμμάτων πολυακρυλαμιδίου και το διάλυμα που προέκυψε αραιώθηκε με τρεις όγκους διαλύματος πρόσδεσης και 10 μL εναιωρήματος σφαιριδίων πρόσδεσης QIAEX II. Το μίγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 10 min με σύντομες αναδεύσεις κάθε 2 min. Μετά από φυγοκέντρηση το υπερκεείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα σφαιριδίων εκπλύθηκε δύο φορές με 500 μL διαλύματος έκπλυσης. Στη συνέχεια το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει στον αέρα και η έκλυση του DNA έγινε σε 20 μL διαλύματος 10 mM Tris-HCl, pH 8.5. Τα σφαιρίδια κατακρημνίστηκαν με φυγοκέντρηση και το υπερκεείμενο που περιείχε το καθαρό DNA μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο eppendorf. Τα διαλύματα διάχυσης, πρόσδεσης, εναιωρήματος σφαιριδίων πρόσδεσης QIAEX II και έκπλυσης παρέχονται από το κιτ.

4.2.7. Κλωνοποίηση και προσδιορισμός της αλληλουχίας των προϊόντων RAP-PCR

Οι ανακτημένες ζώνες του συμπληρωματικού DNA επανενισχύθηκαν με PCR χρησιμοποιώντας τον ίδιο αυθαίρετα επιλεγμένο εκκινητή καθώς η αλληλουχία του είχε πλέον ενσωματωθεί στα προϊόντα της αντίδρασης RAP-PCR κατά τη σύνθεση της πρώτης και δεύτερης αλυσίδας του συμπληρωματικού DNA. Η αντίδραση PCR περιλάμβανε: 2 μL συμπληρωματικού DNA, 25 μL Taq PCR mastermix, 5 μL του εκκινητή (τελική συγκέντρωση 1 μM), ενώ ο όγκος συμπληρώθηκε με ddH₂O απαλλαγμένου από νουκλεάσες μέχρι τα 50 μL . Οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) ήταν οι εξής: ένας κύκλος (στους 94° C για 3 min), 35 κύκλοι (στους 94° C για 1 min, στους 47° C για 1 min και στους 72° C για 1 min), ενώ το στάδιο της τελικής επιμήκυνσης έγινε στους 72° C για 10 min. Μετά το τέλος της αντίδρασης, 5 μL από το προϊόν ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης (1.5%, w/v) και ο υπόλοιπος όγκος διατηρήθηκε στους -20° C.

Τα επανενισχυμένα τμήματα του cDNA κλωνοποιήθηκαν στο φορέα κλωνοποίησης pCR II-TOPO με χρήση του TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την αντίδραση της κλωνοποίησης, 4 μL από το προϊόν PCR αναμίχθηκαν με 1 μL αλατούχου διαλύματος (200 mM NaCl, 10 mM MgCl₂), 1 μL φορέα TOPO[®] και 1 μL ddH₂O. Το μίγμα αναδεύτηκε ήπια, επώαστηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 30 min και τοποθετήθηκε αμέσως σε πάγο. Για το μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν 2 μL της αντίδρασης κλωνοποίησης pCR[®]4-TOPO[®], τα οποία προστέθηκαν στο φιαλίδιο με τα χημικώς παρασκευασμένα

δεκτικά κύτταρα Mach1™-T1^R του *E. coli* (Invitrogen) και το δείγμα επώαστηκε στον πάγο για 30 min. Ακολούθησε θερμικό σοκ των κυττάρων στους 42° C για 30 sec και αμέσως μεταφορά στον πάγο. Μετά από την προσθήκη 250 μL θρεπτικού μέσου SOC τα κύτταρα επώαστηκαν υπό συνεχή ανάδευση (200 rpm) στους 37° C για 1 h. 50 μL από τα μετασχηματισμένα κύτταρα εξαπλώθηκαν με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (spread) σε προθερμασμένα (στους 37° C) τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB (1.5% άγαρ, w/v). Στα τρυβλία είχε ενσωματωθεί αμπικιλίνη (τελική συγκέντρωση 50 μg/mL) ενώ στην επιφάνειά τους είχαν προστεθεί 40 μL X-gal (40 mg/mL σε διμεθυλο-φορμαμίδιο, DMF). Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37° C για 16 h και στη συνέχεια επιλέχθηκαν οι λευκές αποικίες για περαιτέρω ανάλυση.

Οι συγκεκριμένες αποικίες εμβολιάστηκαν σε σωλήνες με 5 mL υγρού θρεπτικού υποστρώματος LB που περιείχε αμπικιλίνη (τελική συγκέντρωση 100 μg/mL) και οι καλλιέργειες που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν για απομόνωση του πλασμιδιακού DNA (φορέα) με το NucleoSpin Plasmid QuickPure Kit (Macherey-Nagel GmbH and Co. KG, Düren, Germany). Η συγκέντρωση του πλασμιδιακού DNA προσδιορίστηκε φωτομετρικά μετρώντας την απορρόφηση διαλύματος DNA σε H₂O (1:200 αραιώση) σε μήκος κύματος 260 nm (φωτόμετρο UV/Vis, Lambda 20, Perkin-Elmer Instruments, USA). Η δε καθαρότητα του δείγματος καθορίστηκε από το λόγο A_{260nm} / A_{280nm} (σε σχέση με προσμίξεις από πρωτεΐνες). Για να ελεγχθεί η κλωνοποίηση του σωστού τμήματος DNA, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε εκ νέου αντίδραση PCR με τον ίδιο αυθαίρετα επιλεγμένο εκκινητή και κάτω από τις ίδιες συνθήκες και τα προϊόντα αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1.5%, w/v) ως προς το μέγεθός τους.

Οι αντιδράσεις αλληλούχησης των κλώνων πραγματοποιήθηκαν από την εταιρία MacroGen Inc. (Seoul, Korea), ενώ οι αναζητήσεις ομολογίας των αλληλουχιών ως προς αλληλουχίες κατατεθειμένες στις βάσεις δεδομένων έγιναν με το πρόγραμμα BLAST (Altschul *et al.*, 1997) στην ιστοσελίδα του National Center of Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

4.2.8. Επιβεβαίωση των διαφορικής έκφρασης γονιδίων με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR)

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση των αλλαγών στα προφίλ του RNA

του στελέχους. Το ολικό RNA απομονώθηκε από κύτταρα λογαριθμικής φάσης (OD₆₁₀ ~0.7) καλλιέργειας του *Lb. acidipiscis* σε 0 και 10% NaCl (w/v) με τα RNeasy και RNAprotect Kit (Qiagen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 4.2.1. Οι αντιδράσεις RT-PCR πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript™ II (Invitrogen) και την DNA πολυμεράση DyNAzyme™ EXT (NEB) με 200 ng ολικού RNA ως εκμαγείο. Οι εκκινητές των αντιδράσεων (Πίνακας 4.1) σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να πολλαπλασιάσουν τμήμα των υπό εξέταση γονιδίων.

Σε όλες τις περιπτώσεις ελέγχθηκε η ύπαρξη υπολειμματικού DNA χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους αρνητικούς μάρτυρες ενώ ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δείγμα ολικού DNA. Οι αντιδράσεις αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης (2%, w/v) και επακόλουθη χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο, εις τριπλούν. Οι ζώνες ποσοτικοποιήθηκαν με το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer software (Version 4.0).

Πίνακας 4.1.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις RT-PCR.

Όνομα εκκινητή (Primer)	Αλληλουχία εκκινητή (5' – 3')	Μέγεθος προϊόντος
NifU_For	TTCCAAGCCAAAGTAGCAC	470
NifU_Rev	ACAACACAAAAGCAGACGC	
PTS_For	GCATCACGAACGCAGAGC	266
PTS_Rev	GCGACCTTGTTTAGCACC	
Hyp_For	CTGGAGGTGGAAACAATACG	114
Hyp_Rev	ACCAGAAACAACGCTACGC	
Trans_For	TTTAGCAATCGGCATCTTAG	152
Trans_Rev	TGTCATCCAAAACCTCACCC	
ABC_For	GTCAATGTGGTTCGCAGTCC	148
ABC_Rev	CATCCCCCAGCTTTTACTT	
Halog_For	ACTAATGATGAAGACGGTGTG	180
Halog_Rev	CTTTGCTTAATATACTCGTGAG	
16S_For	GTGGGGGATAACAATTGG	689
16S_Rev	CATCGTTTACAGCGTGGAC	

4.2.9. Μελέτη της κινητικής ανάπτυξης του *Lb. acidipiscis*

Η μελέτη της κινητικής ανάπτυξης του μικροοργανισμού πραγματοποιήθηκε σε μικροπλακίδιο 96 πηγαδιών σε συνδυασμό με φωτόμετρο Sunrise (Tecan) και μέτρηση της απορρόφησης στα 610_{nm}. Σε κάθε πηγάδι προστέθηκαν 250 μL υγρού θρεπτικού υποστρώματος MRS εμβολιασμένο με 2% (v/v) από καλλιέργεια μέσης λογαριθμικής φάσης. Κατά περίπτωση, όπως αναφέρεται στα αποτελέσματα, το MRS ήταν εμπλουτισμένο με 0, 2.5, 5, 7.5 και 10% (w/v) χλωριούχου νατρίου (NaCl), γλυκίνη-βεταΐνη, μαννόζη, σορβόζη και σορβιτόλη σε τελική συγκέντρωση 1, 10 και 100 μM. Η επώαση έγινε στους 30° C για 72 h. Οι καμπύλες ανάπτυξης κατασκευάστηκαν με βάση τις τιμές της απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου επώασης. Το πείραμα επαναλήφθηκε εις τριπλούν και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές (± τυπική απόκλιση).

4.2.10. Μέτρηση της ενεργότητας του ενζυμικού συστήματος της φωσφοτρανσφεράσης μαννόζης/σορβόζης που εξαρτάται από το φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό οξύ (PEP-PTS)

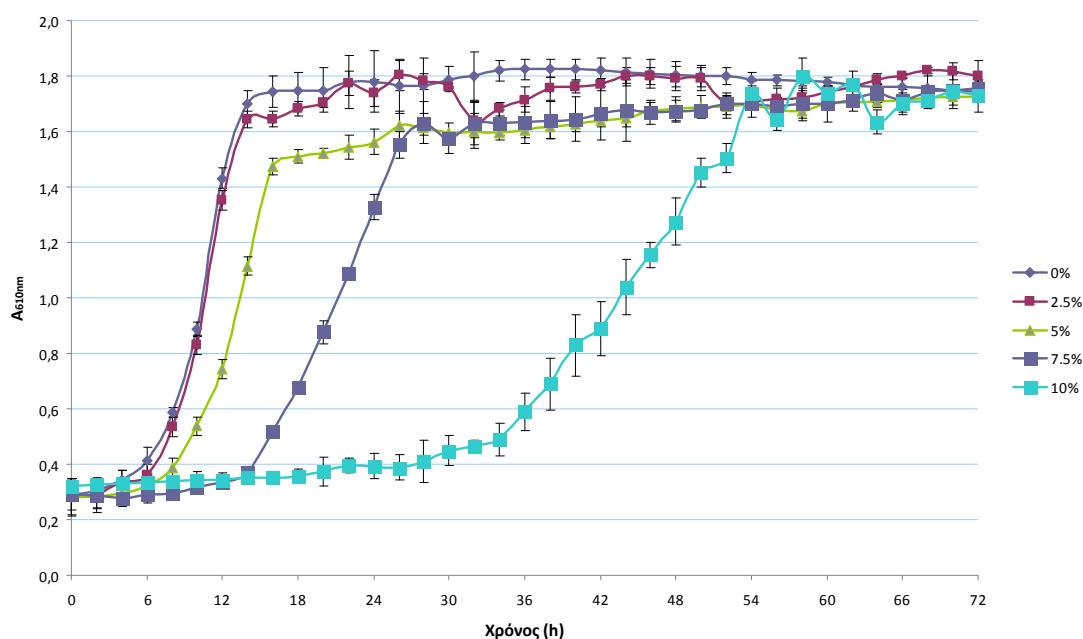
Η ενεργότητα του συστήματος PEP-PTS μαννόζης/σορβόζης προσδιορίστηκε σε διάτρητα κύτταρα του *Lb. acidipiscis* με την ενζυμική δοκιμή όπως αναφέρουν οι Papadimitriou *et al.* (2007), Fozo & Quivey (2004) και Phan *et al.* (2002). Για την παραλαβή των διάτρητων κυττάρων, φυγοκεντρήθηκαν 20 mL καλλιέργειας λογαριθμικής φάσης (σε MRS με 0 και 10% NaCl, w/v) και το ίζημα εκπλύθηκε και επαναιωρήθηκε σε 0.9 mL ρυθμιστικού διαλύματος ‘μεμβράνης’ (75 mM Tris, pH 7.0, 10 mM MgSO₄). Μετά την προσθήκη τολουόλιου σε τελική συγκέντρωση 10% (v/v), το μίγμα αναδεύτηκε έντονα (vortex) για 30 sec και υποβλήθηκε σε δύο κύκλους κατάψυξης-απόψυξης. Ακολούθησε φυγοκέντρωση και τα κύτταρα συλλέχθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε 0.5 mL διαλύματος ‘μεμβράνης’. Το μίγμα διαμοιράστηκε σε erpendorf (δείγματα των 100 μL) που τοποθετήθηκαν στους -80° C.

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του συστήματος PEP-PTS, 50 μL διάτρητων κυττάρων επώαστηκαν με 850 μL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-μηλικού οξέος (100 mM Tris-μηλικό οξύ, pH 7.0, 20 mM MgCl₂, 1 mM NaF, 40 mM μαννόζης ή σορβόζης και 5 mM PEP) στους 30° C για 30 min. Το μίγμα στην συνέχεια τοποθετήθηκε στον πάγο για 5 min και φυγοκεντρήθηκε. 200 μL από το υπερκείμενο αναμίχθηκαν με 300 μL ddH₂O, 500 μL διαλύματος NADH (0.21

mg/mL NADH, 1.5 Tris, pH 7.0, 0.021% NaN_3 , w/v) και 3 U γαλακτικής αφυδρογονάσης. Η κατανάλωση του NADH προσδιορίστηκε με μέτρηση της απορρόφησης (A) στα 340_{nm} στα 5 min. Η διαφορά στην κατανάλωση NADH (διαφορά στην A_{340}) μεταξύ των δειγμάτων επώασης 0 και 30 min αντιστοιχεί στην ποσότητα του παραγόμενου πυροσταφυλικού οξέος και συνεπώς στη ποσότητα του σακχάρου που φωσφορυλιώθηκε. Η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης των δειγμάτων προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford (Biorad). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές (\pm τυπική απόκλιση) τριών ανεξάρτητων πειραμάτων και εκφράζονται ως μM πυροσταφυλικού οξέος ανά μg ολικής πρωτεΐνης επί min.

4.3. Αποτελέσματα και συζήτηση

Σε προκαταρκτικά πειράματα που έγιναν στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, όλα τα στελέχη που απομονώθηκαν από τα δείγματα της Κοπανιστής και της Μάνας εμφάνισαν ένα ενδιαφέροντα αλοανθεκτικό φαινότυπο. Συγκεκριμένα το στέλεχος *Lb. acidipiscis* ACA-DC 1533 ήταν ικανό να αναπτυχθεί σε συγκεντρώσεις NaCl μέχρι και 10% (w/v) (Γράφημα 4.1). Οι Tanasupawat *et al.* (2000) που περιέγραψαν για πρώτη φορά το είδος αναφέρουν ότι παρουσιάζει ανάπτυξη σε 10% (w/v) NaCl ενώ κάποια στελέχη αναπτύσσονται μέχρι και σε 12% (w/v) NaCl. Αυτό το φαινόμενο καθοδήγησε την παρούσα μελέτη στην αναζήτηση των μεταγραφικών διαφοροποιήσεων του στελέχους σε συνθήκες ωσμωτικού στρες.



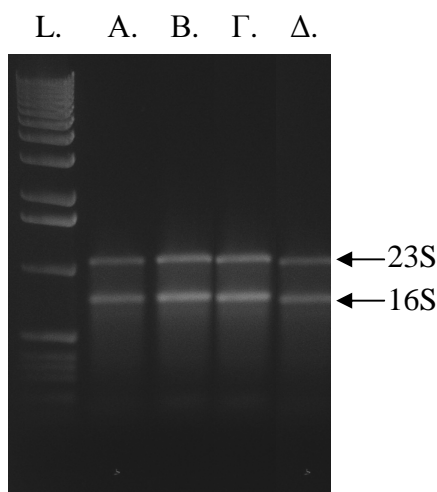
Γράφημα 4.1.

Κινητική ανάπτυξης του *Lb. acidipiscis* σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS με 0, 2.5, 5, 7.5 και 10% NaCl (w/v).

4.3.1. Μεταγραφικές αλλαγές των κυττάρων του *Lb. acidipiscis* σε ισο- και υπερωσμωτικές συνθήκες με τη μέθοδο RAP-PCR

Το ολικό RNA απομονώθηκε από κύτταρα λογαριθμικής φάσης καλλιέργειας σε MRS με 0, 2.5, 5 και 7.5% NaCl (w/v). Η ακεραιότητα του RNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (1%, w/v), με την οποία αποδείχθηκε ότι το ολικό RNA δεν είχε αποικοδομηθεί (Εικόνα 4.1). Σημειωτέον ότι η ακεραιότητα του RNA αποτελεί σημαντική ιδιότητα για την επακόλουθη αντίδραση RAP-PCR. Η συγκέντρωση των δειγμάτων RNA βρέθηκε να είναι 2 μg/μL και ο λόγος A_{260}/A_{280} κυμάνθηκε μεταξύ των τιμών 1.9-2.1 γεγονός που δείχνει την απουσία πρωτεϊνικών προσμίξεων.

Ο έλεγχος ύπαρξης υπολειμματικού DNA πραγματοποιήθηκε με αντίδραση PCR σε μη ειδικές συνθήκες (για να επιτραπεί η μη ειδική πρόσδεση του εκκινητή σε τυχόν χρωμοσωμικό DNA) χρησιμοποιώντας το ολικό RNA ως εκμαγείο και τον ίδιο αυθαίρετα επιλεγμένο εκκινητή όπως και για την αντίδραση RAP-PCR. Μετά από ηλεκτροφόρηση δεν παρατηρήθηκαν ζώνες επιβεβαιώνοντας την απουσία τμημάτων χρωμοσωμικού DNA.



Εικόνα 4.1.

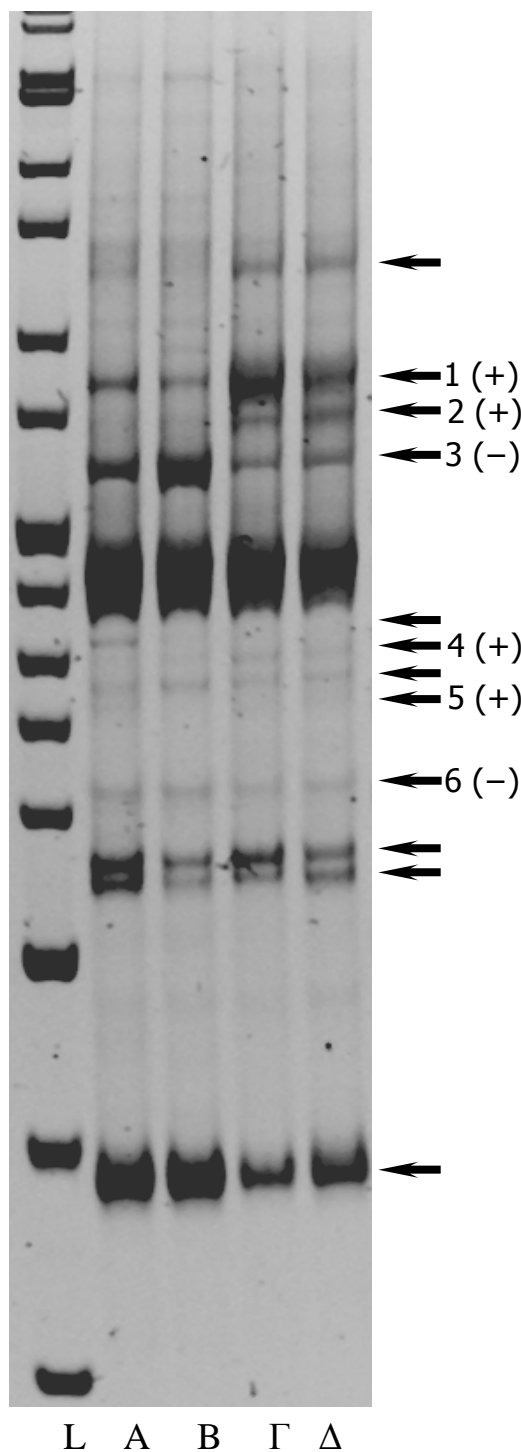
Προφίλ του ολικού RNA όπως αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης (1%, w/v) από καλλιέργειες του *Lb.acidipiscis* σε MRS με 0 (διαδρομή A), 2.5 (διαδρομή B), 5 (διαδρομή Γ) και 7.5 (διαδρομή Δ) % NaCl (w/v). Διαδρομή L: δείκτης μοριακών μεγεθών DNA (DNA ladder 1 kb, Invitrogen).

Το ολικό RNA αποτέλεσε το εκμαγείο για τη σύνθεση του cDNA με τη μέθοδο RAP-PCR χρησιμοποιώντας τον αυθαίρετα επιλεγμένο 18-μερή εκκινητή (Παράγραφος 4.2.2). Ο εκκινητής αυτός χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση τόσο του πρώτου όσο και του δεύτερου κλώνου του cDNA, όπως επίσης και για την ενίσχυσή του.

Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή ακρυλαμιδίου και τα αποτυπώματα του RNA των τεσσάρων καλλιεργειών (δηλαδή MRS με 0, 2.5, 5 και 7.5% NaCl) φαίνονται στην [Εικόνα 4.2](#). Με αυτόν τον τρόπο εντοπίστηκαν 12 ζώνες υποψήφιων διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων (βέλη στην [Εικόνα 4.2](#)). Αυτές οι ζώνες που παρουσίασαν διαφορετική ένταση (είτε αυξημένη είτε μειωμένη, σε σχέση με το μάρτυρα A) ανακτήθηκαν από την πηκτή και τα τμήματα DNA ενισχύθηκαν με τον ίδιο εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση RAP-PCR. Τα προϊόντα κλωνοποιήθηκαν και ακολούθησε προσδιορισμός της αλληλουχίας τους.

4.3.2. Ταυτοποίηση πιθανών γονιδίων που συνδέονται με την ανθεκτικότητα του *Lb. acidipiscis* σε συνθήκες ωσμωτικού στρες

Οι αλληλουχίες των 12 υπό εξέταση ζωνών υποβλήθηκαν σε συγκρίσεις BLASTN και BLASTX με τις βάσεις δεδομένων του NCBI. Από τις αναζητήσεις αυτές αποδείχθηκε ότι τα 6 από τα 12 προϊόντα cDNA παρουσίασαν υψηλή ομοιότητα με ήδη κατατεθειμένα γονίδια οξυγαλακτικών βακτηρίων ([Εικόνα 4.2](#) και [Πίνακας 4.2](#)). Τα υπόλοιπα 6 τμήματα cDNA αποδείχθηκαν ότι ανήκουν στα γονίδια του 16S ή του 23S rRNA του *Lb. acidipiscis*, αποτελώντας ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Η ανίχνευση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (μεταγραφών) αποτελεί συχνό φαινόμενο κατά την εφαρμογή της μεθόδου RAP-PCR ιδιαίτερα στους προκαρυωτικούς οργανισμούς όπου το ποσοστό των rRNA είναι πολύ υψηλό ([Papadimitriou et al., 2008](#), [Chang et al., 2007](#), [Shepard & Gilmore, 1999](#)).



Εικόνα 4.2.

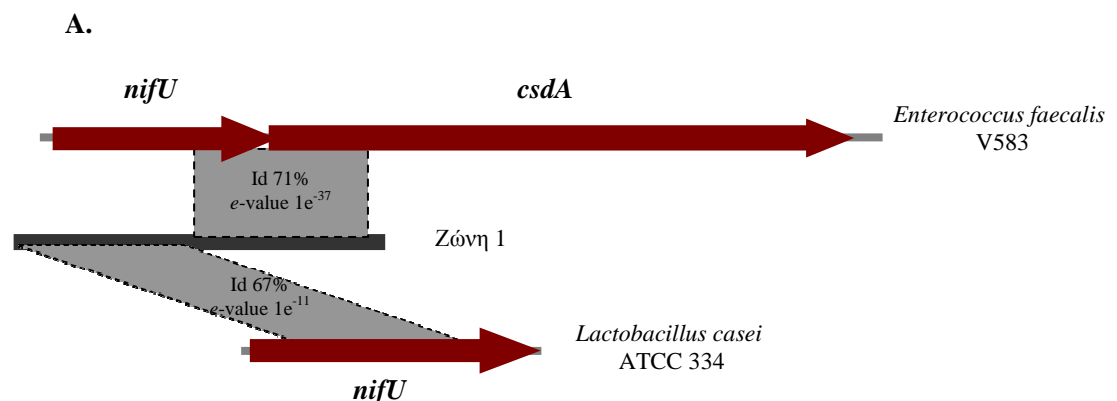
Προφίλ των προϊόντων RAP-PCR όπως αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (4%, w/v) από καλλιέργειες λογαριθμικής φάσης του *Lb.acidipiscis* σε MRS με 0 (διαδρομή A, μάρτυρας), 2.5 (διαδρομή B), 5 (διαδρομή Γ) και 7.5 (διαδρομή Δ) % NaCl (w/v). Διαδρομή L.: DNA ladder (2-Log DNA Ladder, 0.1-10.0 kb, NEB). Οι ζώνες που παρουσίασαν διαφορετική ένταση σε σχέση με το μάρτυρα, αφαιρέθηκαν από την πηκτή και τα τμήματα DNA ενισχύθηκαν, κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν. Τα cDNA που βρέθηκαν να αντιστοιχούν σε γονίδια επισημαίνονται με τους αριθμούς 1 μέχρι 6, ενώ τα υπόλοιπα βέλη αντιστοιχούν σε εσωτερικές περιοχές των 16S ή των 23S rRNA γονιδίων.

Πίνακας 4.2.

Τα έξι τμήματα cDNA (πιθανά διαφορεικά εκφραζόμενα γονίδια) και τα αποτελέσματα των αναζητήσεων BLASTN και BLASTX των αλληλουχιών τους.

Ζώνη RAP-PCR (προϊόν)	Πιθανό γονίδιο (οργανισμός) [BLASTN]	Πιθανή πρωτεΐνη (οργανισμός) [BLASTX]	Ομοιότητα αμινοξέων (%)	<i>e</i> -value
1	τμήμα του <i>nifU</i> και του <i>csdA</i> (<i>Enterococcus faecalis</i> V583)	NifU που εμπλέκεται στη συναρμολόγηση του Fe-S συμπλόκου	94/146 (65%)	3e ⁻⁴⁸
	και του <i>nifU</i> (<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334)	και δεσουλφουράση της κυστεΐνης (<i>Lactobacillus ruminis</i> ATCC 25644)	67/98 (69%)	2e ⁻³²
2	τμήμα του LRHM_0401	ΠΒ υπομονάδα του ειδικού μεταφορέα μαννόζης/σορβόζης του PTS	140/158 (89%)	1e ⁻⁷²
	και του LRHM_0402 (<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG)	και ΠΑ υπομονάδα του ειδικού μεταφορέα μαννόζης/σορβόζης του PTS (<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG)	84/107 (79%)	1e ⁻⁴¹
3	τμήμα του <i>orf8</i> του πλασμιδίου pWCFS103 (<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1)	υποθετική πρωτεΐνη (<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1)	29/31 (93%)	1e ⁻⁰⁷
4	τμήμα του LSA0457 (<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K)	περμεάση γενικής λειτουργίας (<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K)	49/89 (83%)	6e ⁻²⁴
5	τμήμα του LSL_0141 (<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118)	ABC μεταφορέας πρόσδεσης υποστρώματος (<i>Lactobacillus salivarius</i> UCC118)	103/136 (76%)	7e ⁻⁵⁵
6	τμήμα του limg_0252 (<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363)	δεαλογενάση/υδρολάση αλοξικών οξέων (<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> MG1363)	43/75 (58%)	3e ⁻¹⁶

Η ζώνη 1 (cDNA) είχε μεγαλύτερη ομοιότητα με τμήματα των γονιδίων *nifU* και του *csdA* που ανήκουν στο χρωμόσωμα του *Enterococcus faecalis* V583, καθώς και με τμήμα του γονιδίου *nifU* του *Lactobacillus casei* ATCC 334 (Γράφημα 4.2.A). Η ανάλυση BLASTX έδειξε ότι το τμήμα αυτό κωδικοποιεί μέρος των πιθανών πρωτεϊνών NifU (που εμπλέκεται στη συναρμολόγηση του συμπλόκου Fe-S) και της δεσουλφουράσης της κυστεΐνης με βάση την ομολογία ως προς τις αντίστοιχες πρωτεΐνες του *Lactobacillus ruminis* ATCC 25644 (Γράφημα 4.2.B και Γ).



B.

<i>Lb. acidipiscis</i>	310	MALSKLSNLYRQVIMDHAKHPHNNQPLPQADHEIELRNPTCGDVLTVQLKIQDDKIIDAA	489
		MALS+L NLYRQ+I++HA HPH++ L +DH++ELRNPTCGDVL +QLK++D K+ D A	
<i>Lb. ruminis</i>	1	MALSRLDNLYRQMILEHADHPHHHGVLENSDHQLELRNPTCGDVLILQLKMEDGKVS DIA	60
<i>Lb. acidipiscis</i>	490	YTG TGCTISQASASMMTDQIKGKTTAEVEK MVLGFS DMVLGK--EVPDMERLLGEAAILQ	663
		++G GCTISQASASMMTD++ GKT E+EKMV+ FSDMV GK D + +LG+A+IL+	
<i>Lb. ruminis</i>	61	FSGEGCTISQASASMMTDEVI GKT PNEIEK M VVAFSDMVTGKAETEEDYDEILGDASILE	120
<i>Lb. acidipiscis</i>	664	SVAQFPARIKCATLAWKAAYQAIEES	741
		VAQFPARIKCATLAWKA YQA+ E+	
<i>Lb. ruminis</i>	121	GVAQFPARIKCATLAWKAIYQALGEN	146

Γ.

<i>Lb. acidipiscis</i>	24	PSFKKYP ELKIYGPSDPDIRTGVLSFNLTGIHPHDLASALDMDGVAVRAGHHCAQPLMKY	203
		P + L +YGP +PD TGV+SFNL GIHPHD+A+ALDM+GVAVRAGHHCAQPLMKY	
<i>Lb. ruminis</i>	314	PKLLQIDGLTVYGPKEPKHTGVISFNLDGIHPHDVATALDMEGVAVRAGHHCAQPLMKY	373
<i>Lb. acidipiscis</i>	204	LGVGATARASFYLYNTKADADLFINAILEAKEFFSNGS	317
		L + AT RASFY YNTKADAD I AIL KEFF +G+	
<i>Lb. ruminis</i>	374	LKIPATVRASFYFYNTKADADQLIEAILATKEFFKHGT	411

Γράφημα 4.2.

(A). Σχηματική παρουσίαση της νουκλεοτιδικής ομοιότητας της ζώνης 1 (cDNA) με τα τμήματα των γονιδίων *nifU* και *csdA* του χρωμοσώματος του *E. faecalis* V583 και του *Lb. casei* (B). Στοιχισμός των αμινοξικών αλληλουχιών μεταξύ αυτών που κωδικοποιούνται από το cDNA της ζώνης 1 (ένα από τα έξι ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης) και της πρωτεΐνης IscU του *Lb. ruminis* ATCC 25644 και (Γ) της δεσουλφουράσης της κυστεΐνης του ίδιου οργανισμού που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ομολογία (ανάλυση BLASTX).

Τα γονίδια *nif* συμμετέχουν στη δέσμευση του αζώτου. Παρόλα αυτά, συχνά συναντώνται και σε βακτήρια που δεν είναι αζωτοδεσμευτικά και κατά συνέπεια έχουν ενδεχομένως ευρύτερη σημασία για το κύτταρο. Οι αντίστοιχες πρωτεΐνες φαίνεται να αποτελούν το πλαίσιο για τη συναρμολόγηση του συμπλόκου σιδήρου-θείου (Mühlhoff *et al.*, 2003). Τα σύμπλοκα σιδήρου-θείου (Fe-S) αποτελούν σημαντικούς συμπαράγοντες σε διάφορες πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μεταφορά ηλεκτρονίων, κ.α. (Barras *et al.*, 2005). Μέχρι στιγμής, έχουν προσδιοριστεί τρεις μηχανισμοί συναρμολόγησης Fe-S: το σύστημα ISC (Iron Sulfur Clustering), το SUF (αφομοίωσης θείου) και το NIF (Nitrogen Fixation) (Barras *et al.*, 2005).

Το σύστημα ISC είναι συντηρημένο στα βακτήρια και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, έχει ευρεία εξειδίκευση στοχεύοντας γενικές Fe-S πρωτεΐνες και κωδικοποιείται από το οπερόνιο *isc* (Lill *et al.*, 2006, Fontecave *et al.*, 2005). Το σύστημα SUF αποτελεί εναλλακτικό μονοπάτι του συστήματος ISC και λειτουργεί κάτω από συνθήκες έλλειψης σιδήρου και οξειδωτικού στρες. Συναντάται δε στα βακτήρια, στα αρχαία και στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και κωδικοποιείται από το οπερόνιο *suf* (Sendra *et al.*, 2007). Στο σύστημα NIF απαιτούνται οι πρωτεΐνες NifU και NifS τόσο για το σχηματισμό των μεταλλο-συμπλόκων της νιτρογενάσης στον *Azotobacter vinelandii* και σε άλλους οργανισμούς, όσο και για την ωρίμανση των πρωτεϊνών FeS. Η νιτρογενάση καταλύει τη δέσμευση του αζώτου. Η NifS είναι μια δεσουλφεράση της κυστεΐνης, ενώ η NifU δεσμεύει ένα άτομο σιδήρου στο αμινοτελικό της άκρο συναρμολογώντας το σύμπλοκο Fe-S το οποίο μεταφέρεται στις νιτρογενάσες/αποπρωτεΐνες (Seidler *et al.*, 2001). Οι πρωτεΐνες Nif που συμμετέχουν στα σύμπλοκα Fe-S απαντώνται και σε οργανισμούς που δεν δεσμεύουν το άζωτο (Hwang *et al.*, 1996). Η δεύτερη πρωτεΐνη που φέρεται να κωδικοποιείται από τη ζώνη 1 είναι μια δεσουλφουράση της κυστεΐνης που εξαρτάται από το συμπαράγοντα πυριδοξάλης-5'-φωσφορικού οξέος (Pyridoxal-5'-Phosphate, PLP). Αυτό το ένζυμο καταλύει τη μεταφορά θείου και σεληνίου από την κυστεΐνη και τη σελινο-κυστεΐνη σε διάφορους αποδέκτες και κατέχει σημαντικό ρόλο στην προσθήκη θείου στο tRNA, στη συναρμολόγηση και επιδιόρθωση των συμπλόκων θείου-σιδήρου (Fe-S) αλλά και στη δημιουργία διαφόρων άλλων πρωτεϊνών που εξαρτώνται από το θείο ή το σελήνιο (Mihara *et al.*, 2002). Ο ακριβής μηχανισμός της μεταφοράς θείου μέσω των βακτηριακών δεσουλφουρασών της κυστεΐνης δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως μέχρι σήμερα (Mihara *et al.*, 2002).

Διάφορα γονίδια *nif* έχει αναφερθεί ότι επάγονται σε συνθήκες ωσμωτικού στρες σε ριζόβια βακτήρια όπως τα *Brazyrhizobium japonicum*, *Sinorhizobium meliloti* και *Mesorhizobium loti* (Chang *et al.*, 2007). Επισημαίνεται σε αυτό το σημείο, ότι αν και οι δυο πρωτεΐνες απαντώνται, βάσει αναζητήσεων ομοιότητας στο NCBI, σε πλήθος οξυγαλακτικών βακτηρίων, δεν υπάρχει βιβλιογραφική αναφορά που να περιγράφει τη πραγματική λειτουργία τους στα συγκεκριμένα βακτήρια που δεν είναι ικανά να δεσμεύουν το άζωτο. Συνεπώς, ο ρόλος των γονιδίων αυτών, τα οποία στη παρούσα μελέτη φαίνονται να επάγονται σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, χρήζει περαιτέρω μελέτης.

Η ζώνη 3 (cDNA) είχε υψηλή ομοιότητα με το *orf8* του πλασμιδίου pWCFS103 του *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Η αναζήτηση BLASTX έδειξε ότι κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη ομόλογη υποθετικής πρωτεΐνης αυτού του πλασμιδίου. Στη συγκεκριμένη πρωτεΐνη δεν έχει αποδοθεί γνωστή λειτουργία και επιπλέον δεν υπάρχουν πειραματικά και βιβλιογραφικά δεδομένα. Η αλληλουχία της δε δεν φέρει συντηρημένες δομές. Ο εντοπισμός αυτής της πρωτεΐνης πιθανώς υποδηλώνει την ύπαρξη πλασμιδιακού DNA στο γονιδίωμα του *Lb. acidiphiscis*. Το συγκεκριμένο γονίδιο της ζώνης 3 που έχει υψηλή ομοιότητα με το *orf8* του πλασμιδίου pWCFS103, φέρεται να μειορυθμίζεται σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, πλην όμως, βάσει των υπάρχοντων δεδομένων, δεν μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για το ρόλο του συγκεκριμένου γονιδίου και συνεπώς απαιτείται περαιτέρω έρευνα.

Το δεύτερο γονίδιο, για το οποίο παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων της έκφρασής του σε υπερωσμωτικές συνθήκες (ζώνη 6, Εικόνα 4.2) κωδικοποιεί μια δεαλογενάση/υδρολάση αλοξικών οξέων, σύμφωνα με τις αναζητήσεις BLASTN και BLASTX (Πίνακας 4.2) και την ομοιότητα με την αντίστοιχη πρωτεΐνη του *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 (Γράφημα 4.3). Το ένζυμο αυτό ανήκει σε μια μεγάλη υπεροικογένεια των αφυδρογονάσεων αλοξικών οξέων, η οποία περιλαμβάνει φωσφατάσες, δεαλογενάσες κ.α. που συμμετέχουν σε διάφορες κυτταρικές λειτουργίες από τη βιοσύνθεση αμινοξέων μέχρι και την αποτοξινόηση ξενοβιοτικών ή μεταβολικών παραπροϊόντων. Επίσης, περιλαμβάνει και πολλές μη χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες (6805 πρωτεΐνες στις βάσεις δεδομένων, Kuznetsova *et al.*, 2006).

Lb. acidipiscis	4	EATKSRGLSYIANSENLLREETAAFDGHNDLPMLTSVGTPIVMGNALDVIKTAGKFVTK	183
		EA K++ + +IA E L + E AAFGD NDL ML +VG PIVM NA D +K GK +TK	
Lc. lactis	191	EAQKAKAVQFIAQRERLEQRELAAFDGNENDLSMLKAVGLPIVMANASDDLKKGKIITK	250
Lb. acidipiscis	184	TNEDGVAYGIETYI	228
		+N EDGVAYGI+ YI	
Lc. lactis	251	SNTEDGVAYGIQKYI	265

Γράφημα 4.3.

Στοιχισή των αμινοξικών αλληλουχιών (δεαλογενάση/υδρολάση αλοξικών οξέων) μεταξύ αυτών που κωδικοποιούνται από το cDNA της ζώνης 6 και από το γονίδιο LLMG_0252 του *Lc. lactis* subsp. *cremoris* MG1363.

Οι πρωτεΐνες αυτές απαντώνται σε βακτήρια, αρχαία και ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Koonin & Tatusov, 1994). Οι δεαλογενάσες καταλύουν την υδρόλυση του δεσμού C-αλογόνου των οργανικών αλογονιδίων και τα τελευταία χρόνια έχουν κεντρίσει το επιστημονικό ενδιαφέρον σε σχέση με τη χημική και φαρμακευτική βιομηχανία, καθώς οι αλογονιωμένες οργανικές ενώσεις αποτελούν μολυσματικές ουσίες του περιβάλλοντος (Janssen *et al.*, 2001). Γονίδια που πιθανώς κωδικοποιούν αυτές τις πρωτεΐνες έχουν χαρακτηριστεί με βάση τις αλληλουχικές ομοιότητες σε διάφορα οξυγαλακτικά βακτήρια, παρόλα αυτά δεν υπάρχουν έρευνες μέχρι στιγμής που να αναλύουν τη λειτουργικότητα τους σε αυτή την ομάδα βακτηρίων, ενώ επίσης δεν υπάρχει καμία αναφορά που να τις εμπλέκει με την απόκριση βακτηριακών ειδών σε συνθήκες ωσμωτικού στρες.

Τα υπόλοιπα τρία γονίδια που ταυτοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη αφ' ενός βρέθηκαν όλα να επάγονται και αφ' ετέρου κωδικοποιούν όλα πρωτεΐνες μεταφοράς. Στα οξυγαλακτικά βακτηρία το ποσοστό των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες μεταφοράς φτάνει το 18% (Lorca *et al.*, 2007). Οι διαδικασίες μεταφοράς παίζουν καθοριστικό ρόλο στην επιβίωση των κυττάρων σε συνθήκες όπου η ενέργεια αποτελεί περιοριστικό παράγοντα ή σε περιβάλλοντα όπου υπάρχουν τοξικές ενώσεις (Konings *et al.*, 1997). Η ενεργοποίηση δε των μεταφορέων αντιπροσωπεύει τον πρωταρχικό μηχανισμό άμυνας σε συνθήκες ωσμωτικού στρες (Poolman, 2002).

Συγκεκριμένα, το τέταρτο γονίδιο που ταυτοποιήθηκε (ζώνη 4) κωδικοποιεί μια πιθανή πρωτεΐνη μεταφοράς με βάση την ομοιότητα με την αντίστοιχη του *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 23K (Γράφημα 4.4). Η πρωτεΐνη αυτή είναι μια πιθανή περμεάση γενικής λειτουργίας και ενώ εντοπίζεται σε διάφορα βακτήρια δεν της έχει αποδοθεί πραγματική λειτουργία. Το γονίδιο αυτό φαίνεται να επάγεται σε

συνθήκες ωσμωτικού στρες. Ωστόσο δεν μπορεί να εξαχθεί συμπέρασμα για το ρόλο του από τη στιγμή που η πιθανή πρωτεΐνη δεν έχει χαρακτηριστεί.

Το πέμπτο γονίδιο που ταυτοποιήθηκε (ζώνη 5) κωδικοποιεί έναν ABC μεταφορέα πρόσδεσης υποστρώματος με βάση την ομοιότητα με την αντίστοιχη του *Lactobacillus salivarius* UCC118 (Γράφημα 4.5).

Lb. acidipiscis	1	ATSNLMMGVTAASATVYFFNGSIKPEIAAPLAIGILVGATIGSRIMQHLQANF	162
		ATSNLMMGVTAASATVYFF+G+I PEIAAPLA+GIL GAT+GSRIMQHLQ F	
Lb. sakei	203	ATSNLMMGVTAASATVYFFSGAILPEIAAPLALGILAGATVGSRIMQHLQPKF	256
Lb. acidipiscis	162	LRKIFIPVLFILIGLQMFLLKGFV	230
		+R IFIP+L +GLQM LKGFV	
Lb. sakei	257	IRMIFIPILLYMGLQMVLLKGFV	279

Γράφημα 4.4.

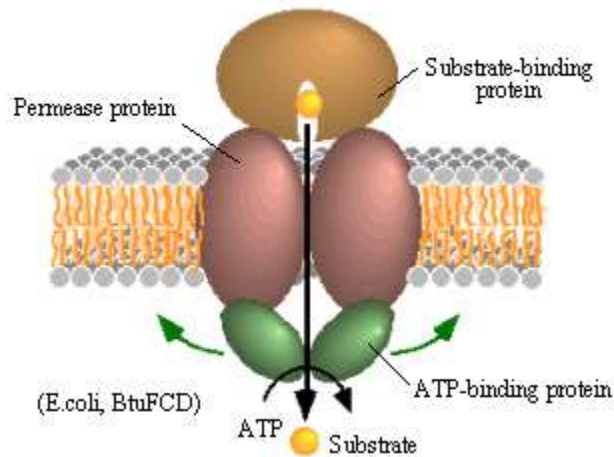
Στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών (πιθανή περμεάση) μεταξύ αυτών που κωδικοποιούνται από το cDNA της ζώνης 4 και από το γονίδιο LSA0457 του *Lb. sakei* subsp. *sakei* 23K.

Lb. acidipiscis	1	NVADYGRVLQIFRDAGLITIKKGVNLETATFDDIATNKKNLKFKHTYEAKLMPKLYESNE	180
		NV+DYGR+L IF+DAGLIT+KKG N+ETA F+DIATNKK+LKFKH++EAKLMP+LY+ +	
Lb. salivarius	136	NVSDYGRILITIFKFDAGLITLKKGTNIETANFNNDIATNKKHLKFKHSFEAKLMPRLYKEGK	195
Lb. acidipiscis	181	AAATVINANYAVQAGLNPPKDSIALEKKSSPYVNVVAVRKGDTKKPAIKKLMKALQSNST	360
		AA VINANYAVQAGLNP KD+IALEKKSSPY N++AVRK D KPAIKKL+KAL+S T	
Lb. salivarius	196	DAAYVINANYAVQAGLNPSKDAIALEKKSSPYANI IAVRKADKNKPAIKKLVKALESKDT	255
Lb. acidipiscis	361	QNWIKKQYKGGVLPK	408
		QNWIKK++KGGVLPK	
Lb. salivarius	256	QNWIKKEFKGGVLPK	271

Γράφημα 4.5.

Στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών (ABC μεταφορέας) μεταξύ αυτών που κωδικοποιούνται από το cDNA της ζώνης 5 και από το τμήμα του γονιδίου LSL_0141 του *Lb. salivarius* UCC118.

Οι μεταφορείς κασέτας ATP-πρόσδεσης (ATP-binding cassette, ABC) ανακαλύφθηκαν αρχικά τη δεκαετία του 1960 ως ωσμοευαίσθητοι μεταφορείς και εκ τότε έχουν εντοπιστεί σε πληθώρα βακτηρίων και αρχαίων. Η κυτταρική τους λειτουργία ξεπερνά κατά πολύ την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών καθώς έχουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ακεραιότητας των κυττάρων, στους μηχανισμούς απόκρισης σε συνθήκες στρες, στην επικοινωνία κυττάρου-κυττάρου αλλά και στην παθογένεια (Eitinger *et al.*, 2011). Οι μεταφορείς ABC αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια μεμβρανικών πρωτεϊνικών συμπλόκων που χρησιμοποιούν την πρόσδεση και υδρόλυση του ATP για να ενεργοποιήσουν τη μεταφορά διαλυτών δια μέσου της μεμβράνης (Facey & Kuhn, 2010, Davidson & Maloney, 2007, Higgins 1992). Οι μεταφορείς ABC συγκροτούνται από τρία επιμέρους συστήματα: την περιπλασματική πρωτεΐνη πρόσδεσης υποστρώματος, μια διαμεμβρανική υπομονάδα μεταφοράς και το κυτταροπλασματικό συστατικό πρόσδεσης του ATP (Γράφημα 4.6). Αυτοί οι πρωτογενείς μεταφορείς συμμετέχουν κυρίως στην απορρόφηση σακχάρων και αμινοξέων αλλά κάποιοι φέρονται να εξάγουν λιπο-ολιγοσακχαρίτες, λιπίδια και τειχοϊκά οξέα (Facey & Kuhn, 2010, Paulsen *et al.*, 1997). Στα οξυγαλακτικά βακτήρια η πιο μεγάλη κατηγορία πρωτογενών συστημάτων μεταφοράς είναι μακράν οι μεταφορείς ABC (Poolman, 2002). Ο Poolman (2002) αναφέρει ότι για τη συσσώρευση συμβατών ωσμολυτών σε υπερωσμωτικές συνθήκες, ο *Lc. lactis* ενεργοποιεί το μεταφορέα ABC για τη γλυκίνη-βεταΐνη, ενώ παρόμοια συστήματα εντοπίζονται και σε άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια. Είναι προφανές ότι η επαγωγή των γονιδίων τόσο της πιθανής περμεάσης όσο και του μεταφορέα ABC του *Lb. acidiphiscis* που παρατηρήθηκε σε υπερωσμωτικές συνθήκες είναι σε συμφωνία με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Ενδεχομένως τα συστήματα αυτά εμπλέκονται στη μεταφορά ωσμολυτών από το εξωκυτταρικό περιβάλλον στο κυτταρόπλασμα, η ταυτότητα των οποίων όμως παραμένει άγνωστη.



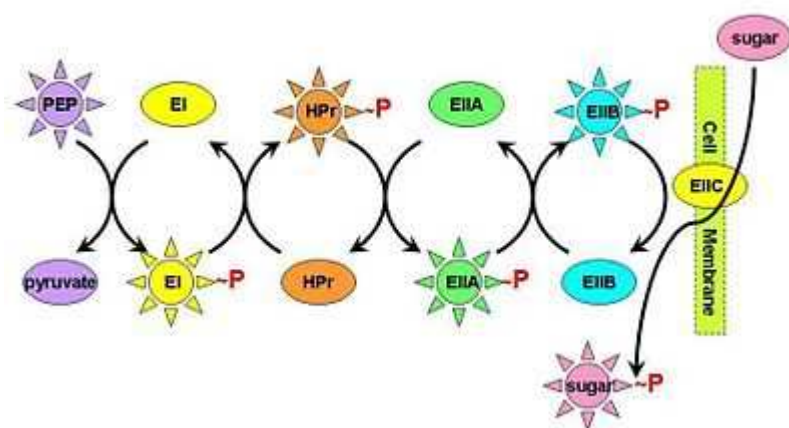
Γράφημα 4.6.

Σχηματική απεικόνιση του ABC μεταφορέα BtuFCD του *E. coli* (Locher *et al.*, 2002).

Η αλληλουχία του cDNA της ζώνης 2 παρουσίασε τη μεγαλύτερη ομοιότητα με τμήμα του χρωμοσώματος του *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), μήκους 746 bp που φέρει μέρος των γονιδίων LGG_00415 και LGG_00416 (Γράφημα 4.7). Τα δύο αυτά γονίδια κωδικοποιούν τα συστατικά ΠΒ και ΠΑ του ειδικού μεταφορέα μαννόζης/σορβόζης του συστήματος PTS που εξαρτάται από το φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό οξύ (Phosphoenolpyruvate, PEP). Το σύστημα PEP-PTS αποτελεί ένα σημαντικό μηχανισμό που χρησιμοποιείται από τα βακτήρια για την πρόσληψη υδατανθράκων, κυρίως εξοζών, εξιτολών και δισακχαριτών και στο οποίο η πηγή ενέργειας πηγάζει από το PEP. Στα συστήματα αυτά λαμβάνει χώρα η συνδυασμένη μεταφορά και φωσφορυλίωση των υδατανθράκων από το εξωκυτταρικό περιβάλλον στο εσωτερικό του κυττάρου και αποτελούνται από δυο γενικές υπομονάδες [το ένζυμο I, (EI) και τη φωσφομεταφορέα-πρωτεΐνη ιστιδίνης (HPr)] και τις μεμβρανικές περμεάσες που είναι εξειδικευμένες ως προς το σάκχαρο [ένζυμο II (EII)]. Κάθε σύμπλοκο EII αποτελείται από μια ή δύο υδρόφοβες μεμβρανικές περιοχές (C και D) και δυο υδρόφιλες περιοχές (A και B) που είτε υπάρχουν ως διακριτές πρωτεΐνες είτε ως μια πρωτεΐνη πολλαπλών δομικών περιοχών (domains).

Το φωσφο-ενολο-πυροσταφυλικό οξύ (PEP) αποτελεί το δότη της φωσφορικής ομάδας (μέσω ενός μονοπατιού μεταφοράς σήματος) στο ένζυμο I (EI), που με τη σειρά του τη μεταφέρει στην πρωτεΐνη ιστιδίνης (HPr). Το επόμενο στάδιο του συστήματος αφορά την εξειδικευμένη πρόσδεση του σακχάρου στο σύμπλοκο

της μεμβράνης, το ένζυμο II (EII) που μεταφέρει το σάκχαρο εντός του κυττάρου και την περμεάση του σακχάρου που καταλύει τις αντιδράσεις μεταφοράς. Έτσι, το EIIA καταλύει τη μεταφορά της φωσφορικής ομάδας από την HPr στην ιστιδίνη ή στην κυστεΐνη του EIIB ενώ το σάκχαρο μεταφέρεται μέσω της κυτταρικής μεμβράνης με το EIIC και φωσφορυλιώνεται από το κατάλληλο εξειδικευμένο ως προς το σάκχαρο EIIB (Postma *et al.*, 1993) (Γράφημα 4.7).



Γράφημα 4.7.

Σχηματική απεικόνιση του συστήματος PEP-PTS

(<http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/Image:Pts.jpg#file>).

Ανάμεσα στους υπόλοιπους PTS μεταφορείς, το σύστημα PEP-PTS της μαννόζης είναι μοναδικό από πολλές απόψεις: 1) Είναι το μόνο που διαθέτει μια πρωτεΐνη IID, 2) είναι το μόνο που το συστατικό του IIB φωσφορυλιώνεται σε ιστιδίνη και όχι σε κυστεΐνη και 3) συνήθως έχει ευρεία εξειδίκευση απέναντι σε διάφορα σάκχαρα αντί να είναι εξειδικευμένο σε ένα ή λίγα σάκχαρα. Για παράδειγμα, ο φωσφομεταφορέας της μαννόζης του *E. coli* δύναται να μεταφέρει τη γλυκόζη, τη μαννόζη, τη φρουκτόζη, τη γλυκοζαμίνη, τη Ν-ακετυλο-γλυκοζαμίνη και άλλα σάκχαρα (Postma *et al.*, 1993).

Στην παρούσα μελέτη το cDNA της ζώνης 2 κωδικοποιεί τις υπομονάδες IIB και IIA του συγκεκριμένου μεταφορέα PTS της μαννόζης/σορβόζης που φέρονται να επάγονται σε συνθήκες ωσμωτικού στρες. Η υπομονάδα IIB είναι απαραίτητη για τη μεταφορά των υδατανθράκων κατά μήκος της κυτταροπλασματικής μεμβράνης και τη φωσφορυλίωσή τους. Το ενεργό κέντρο (ιστιδίνη) υποδέχεται τη φωσφορική ομάδα από την υπομονάδα IIA και τη μεταφέρει στο υπόστρωμα. Οι πρωτεΐνες του PTS φαίνεται ότι συμμετέχουν στις αποκρίσεις των βακτηρίων σε συγκεκριμένα στρες.

Κάποιες PTS υπομονάδες αναφέρονται είτε να υπερπαράγονται ή να υποπαράγονται σε διάφορες συνθήκες στρες. Για παράδειγμα, η HPr του *Lc. lactis* μειώνεται ή και εξαφανίζεται σε κύτταρα που έχουν εκτεθεί σε pH 5.5 ή 4.5, αντίστοιχα (Frees *et al.*, 2003). Αντίθετα, το ωσμωτικό στρες βρέθηκε να αυξάνει την ποσότητα της EIIA του PTS συστήματος μαννόζης στη *Listeria monocytogenes* (Duché *et al.*, 2002). Επίσης, οι Prasad *et al.* (2003) αναφέρουν ότι ο *Lb. rhamnosus* υπερεκφράζει την πρωτεΐνη φωσφομεταφορέα HPr (πρωτεΐνη ιστιδίνης) σε συνθήκες ωσμωτικού στρες.

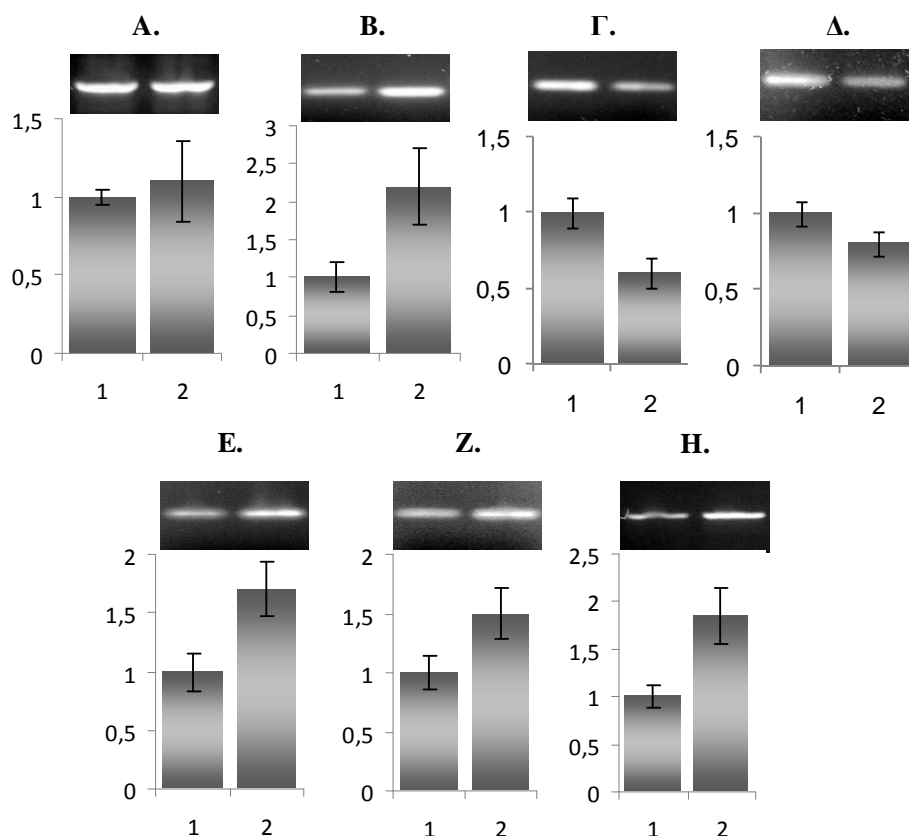


Γράφημα 4.7.

(A). Σχηματική παρουσίαση της νουκλεοτιδικής ομοιότητας της ζώνης 2 (cDNA) με τα τμήματα των γονιδίων *LRHM_0401* και *LRHM_0402* του χρωμοσώματος του *Lb.rhamnosus* GG (ATCC 53103). (B). Στοιχισμός των αμινοξικών αλληλουχιών μεταξύ αυτών που κωδικοποιούνται από το cDNA της ζώνης 2 (ένα από τα έξι ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης) και της υπομονάδας IIB του *Lb.rhamnosus* GG και (Γ) της υπομονάδας IIB του ίδιου οργανισμού που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη ομολογία (ανάλυση BLASTX).

4.3.3. Επιβεβαίωση των διαφορικής έκφρασης των γονιδίων με τη μέθοδο RT-PCR

Η επιβεβαίωση της διαφορικής έκφρασης των έξι προϊόντων RAP-PCR πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο RT-PCR (Γράφημα 4.8) τα αποτελέσματα της οποίας έδειξαν τα ίδια προφίλ μεταγραφικών αλλαγών με αυτά που παρατηρήθηκαν στα αποτυπώματα RAP-PCR (Εικόνα 4.2). Όπως ήταν αναμενόμενο, τα επίπεδα έκφρασης του 16S rRNA γονιδίου ήταν ίδια μεταξύ των δειγμάτων.



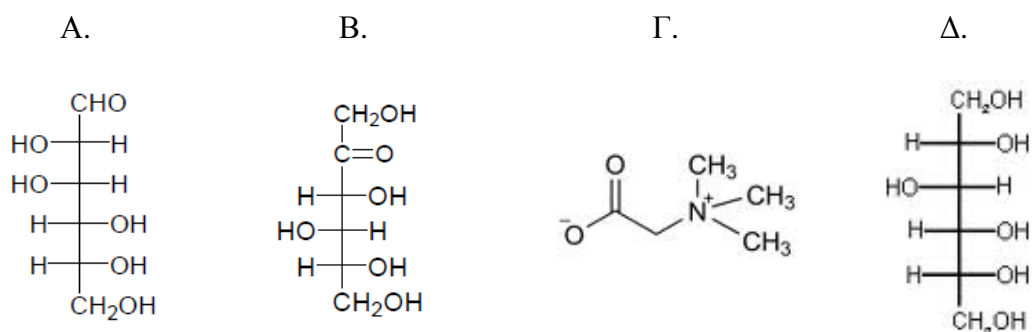
Γράφημα 4.8.

Επιβεβαίωση της διαφορικής έκφρασης γονιδίων με τη μέθοδο RT-PCR σε δείγματα RNA από καλλιέργειες του *Lb. acidiphiscis* σε 0 και 10% NaCl (w/v) (δείγματα 1 και 2, αντίστοιχα), χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1 για τα γονίδια που κωδικοποιούν: (A) το 16S rRNA, (B) την πρωτεΐνη NifU, (Γ) την υποθετική πρωτεΐνη, (Δ) τη δεαλογενάση/υδρολάση αλοξικών οξέων, (E) την πιθανή περμεάση, (Z) τον ABC μεταφορέας πρόσδεσης υποστρώματος και (H) την ΠΒ και ΠΑ υπομονάδα του ειδικού PEP-PTS μεταφορέα μαννόζης/σορβόζης. Η ένταση κάθε ζώνης σε σχέση με την αντίστοιχη του μάρτυρα-δείγμα 1 (πρώτη ζώνη σε κάθε περίπτωση), υπολογίστηκε με το πρόγραμμα Gel-Pro Analyzer. Για τον προσδιορισμό του επιπέδου σημαντικότητας ($P < 0.05$) μεταξύ των διαφορών των σχετικών εντάσεων των ζωνών εφαρμόστηκε το Student's t τεστ (Statgraphics Centurion). Μόνο στην περίπτωση A οι σχετικές εντάσεις των ζωνών δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά ($P > 0.05$).

4.3.4. Η μαννόζη/σορβόζη ως πιθανοί ωσμωλύτες για τον *Lb. acidipiscis*

Από τη μελέτη της διαφορικής έκφρασης γονιδίων του *Lb. acidipiscis* σε υπερωσμωτικές συνθήκες (Παράγραφος 4.3.2) εντοπίστηκαν έξι πιθανά διαφορετικά εκφραζόμενα γονίδια. Παρόλα αυτά, οι δυο υπομονάδες (ΠΒ και ΠΑ) του μεταφορέα PEP-PTS της μαννόζης/σορβόζης που φέρονται να επάγονται σε υψηλή αλατότητα στοχοποίησαν αυτούς τους δυο μονοσακχαρίτες ως πιθανούς ωσμωλύτες για το συγκεκριμένο βακτήριο. Αυτή η υπόθεση αποτέλεσε το έναυσμα για τη διερεύνηση της ικανότητας ανάπτυξης του στελέχους σε υψηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου παρουσία των δυο σακχάρων.

Η μαννόζη είναι ένας μονοσακχαρίτης (αλδοεξόζη, επιμερές της γλυκόζης) που απαντάται συνήθως στη φύση με τη D-διαμόρφωση (Γράφημα 4.9.A). Η σορβόζη είναι επίσης μονοσακχαρίτης (κετοεξόζη) (Γράφημα 4.9.B) και σε αντίθεση με τα περισσότερα σάκχαρα στη φύση συναντάται ως επί το πλείστον με την L-διαμόρφωση. Μεταφέρεται δε από διάφορα βακτήρια μέσω ενός συστήματος PTS. Η εισαγωγή μέσω του PTS αποδίδει 1-φωσφορική-L-σορβόζη που διασπάται μέσω μιας αναγωγάσης σε 6-φωσφορική-γλυσιτόλη και μέσω μιας αφυδρογονάσης σε 6-φωσφορική-φρουκτόζη (Postma *et al.*, 1993).



Γράφημα 4.9.

Προβολή κατά Fischer της μαννόζης (A) και της σορβόζης (B). Τα μόρια της γλυκίνης-βεταΐνης (Γ) και της σορβιτόλης (Δ).

Η γλυκίνη-βεταΐνη (*N-N-N*-τριμεθυλο-γλυκίνη) (Γράφημα 4.9.Γ) αποτελεί τη συμβατή διαλυτή ουσία που χρησιμοποιείται από την πλειοψηφία των προκαρυωτικών οργανισμών, αλλά και τον πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο ωσμωλύτη

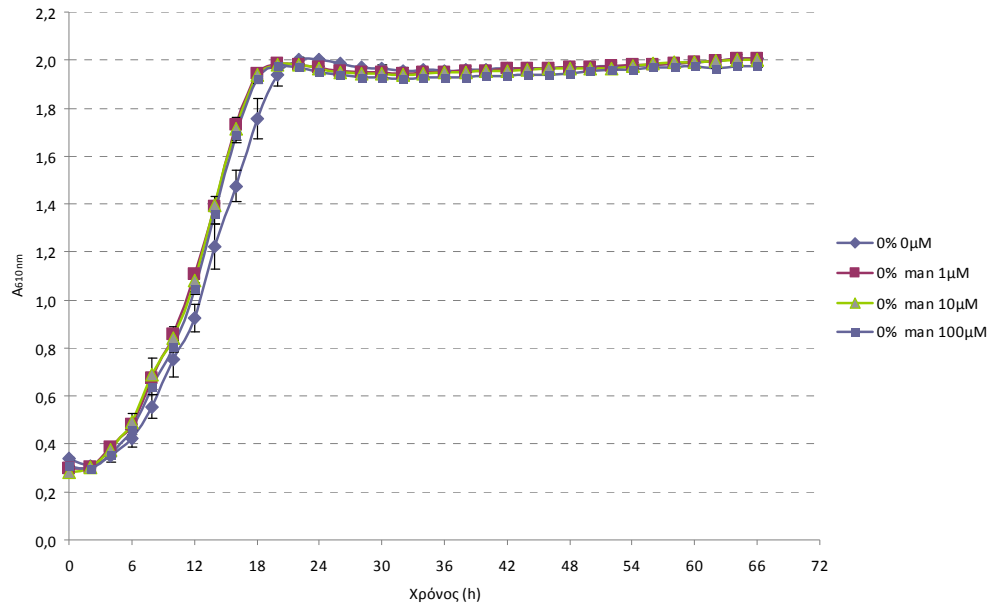
για το φυτικό και ζωικό βασίλειο. Η πρώτη αναφορά για την ωσμοπροστατευτική δράση της γλυκίνης-βεταΐνης στα βακτήρια τοποθετείται το 1960 από τους Sakaguchi *et al.* για τον *Tetragenococcus halophilus* (πρώην *Pediococcus soyae*). Ωστόσο, το πλήρες δυναμικό της ένωσης ως μια δραστική και πολύπλευρη συμβατή διαλυτή ουσία, τόσο για τους προκαρυωτικούς όσο και για τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, διαπιστώθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 1980 (Sleator & Hill, 2001).

Η σορβιτόλη είναι μια πολυόλη (αλκοόλη σακχάρων) (Γράφημα 4.9.Δ) που αποτελεί γνωστό ωσμωλύτη των ευκαρυωτικών κυττάρων (Rosas-Rodríguez & Valenzuela-Soto, 2010).

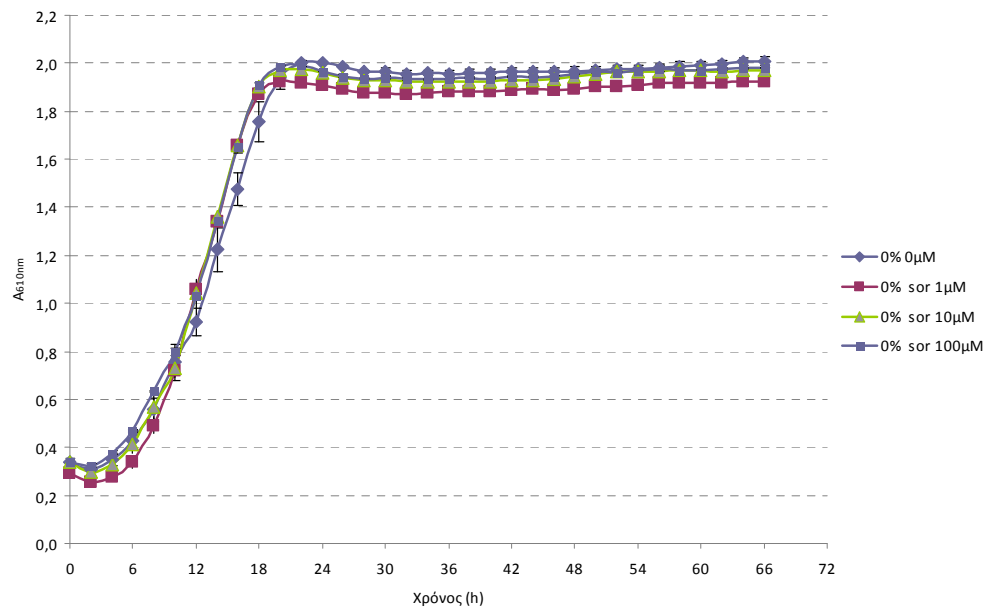
Προηγουμένως, αναφέρθηκε ότι ο *Lb. acidipiscis* παρουσίασε ανάπτυξη ακόμα και σε 10% (w/v) NaCl (Γράφημα 4.1). Η συγκέντρωση αυτή θεωρείται υψηλή, παρά το γεγονός ότι οι γαλακτοβάκιλλοι είναι γενικά από τα πιο αλοανθεκτικά οξυγαλακτικά βακτήρια (με εξαίρεση κάποια στελέχη *Tetragenococcus muriaticus* και *Tetragenococcus halophilus* που αναπτύσσονται μέχρι και σε 18% NaCl, w/v, Holley *et al.* 2002). Μάλιστα, σε μια πρόσφατη έρευνα οι Parente *et al.* (2010) αναφέρουν ότι από 63 στελέχη γαλακτοβακίλλων κανένα δεν μπόρεσε να αναπτυχθεί σε 10% NaCl, ενώ μόλις ένα στέλεχος *Lactobacillus pentosus* παρουσίασε ανάπτυξη σε 7.5%.

Στα Γραφήματα 4.10.A και B παρουσιάζεται η κινητική της ανάπτυξης του *Lb. acidipiscis* σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα MRS χωρίς χλωριούχο νάτριο (0%, w/v NaCl), με προσθήκη μαννόζης και σορβόζης, αντίστοιχα, σε τελική συγκέντρωση 0, 1, 10 και 100 μM. Όπως είναι φανερό η προσθήκη των δυο σακχάρων δεν επηρέασαν την ανάπτυξη του βακτηρίου, ενώ το ίδιο παρατηρήθηκε και στις περιπτώσεις όπου στο μέσο είχαν προστεθεί γλυκίνη-βεταΐνη και σορβιτόλη στις ίδιες συγκεντρώσεις (Γραφήματα 4.10.Γ και Δ, αντίστοιχα).

A.



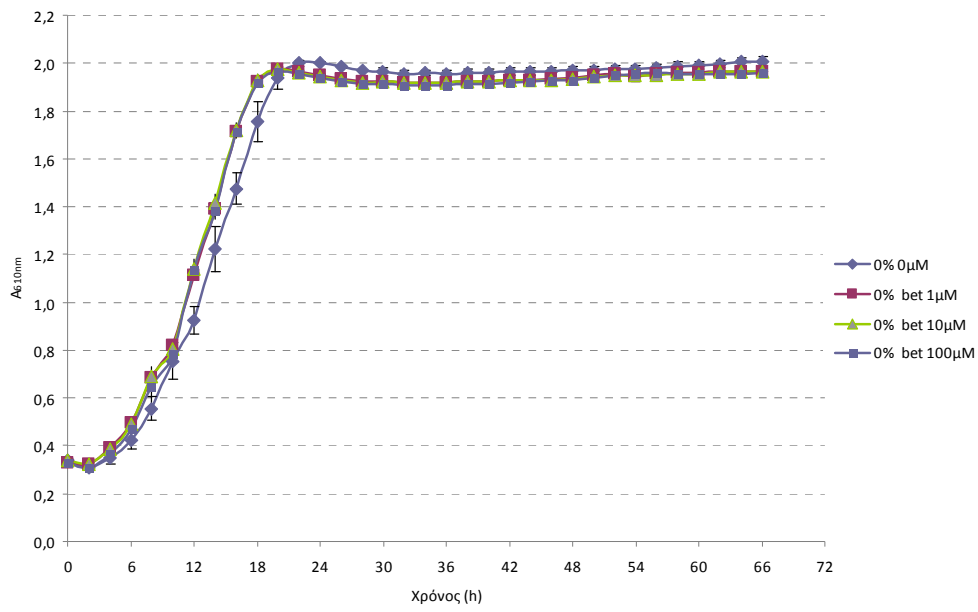
B.



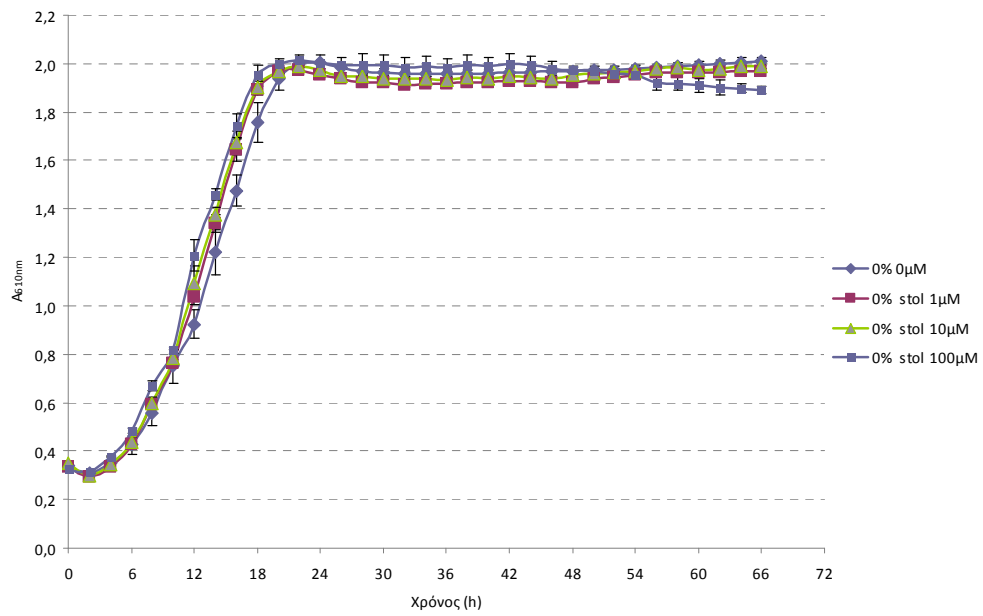
Γράφημα 4.10.

Κινητική ανάπτυξης του *Lb. acidipiscis* σε MRS broth (0%, w/v NaCl) με προσθήκη μαννόζης (A), σορβόζης (B), γλυκίνης-βεταΐνης (Γ) και σορβιτόλης (Δ) σε τελική συγκέντρωση 0, 1, 10 και 100 μM (όπως φαίνεται στη δεξιά λεζάντα της γραφικής παράστασης) (συνέχεια στην επόμενη σελίδα).

Γ.



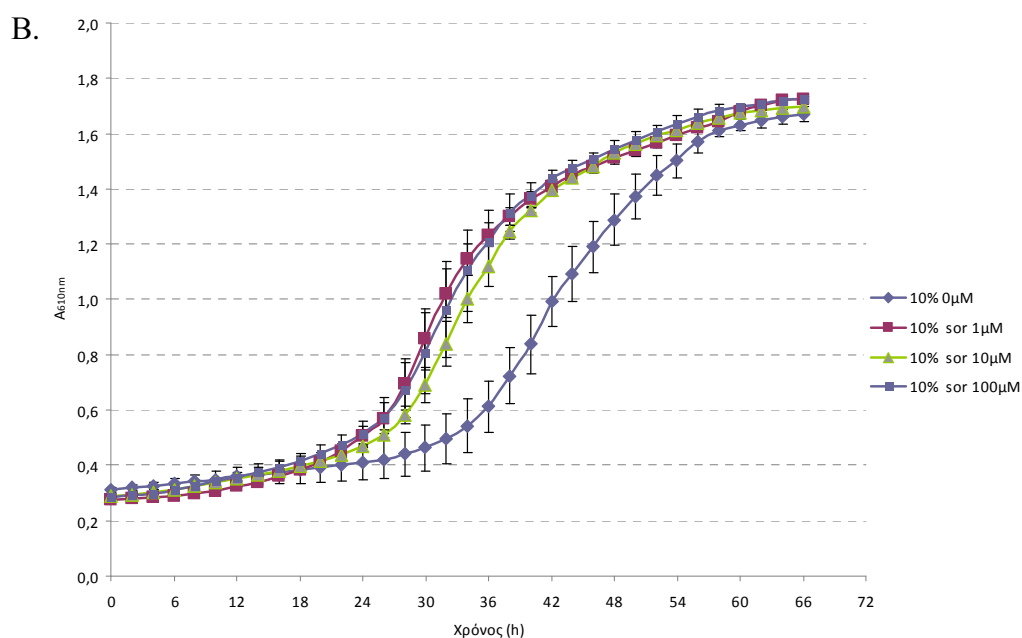
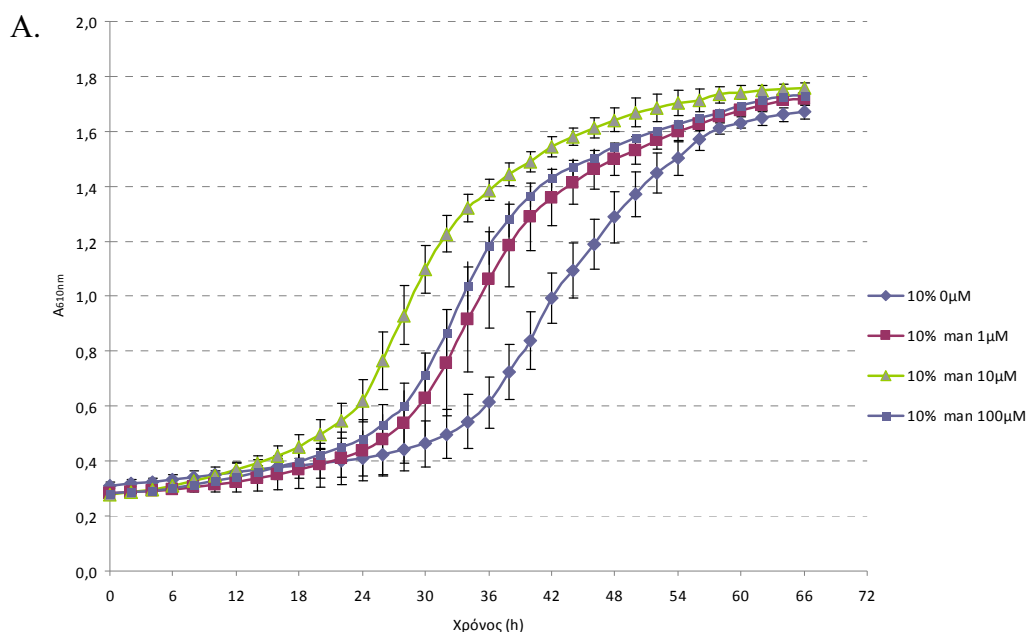
Δ.



Γράφημα 4.10.

Συνέχεια του Γραφήματος της προηγούμενης σελίδας.

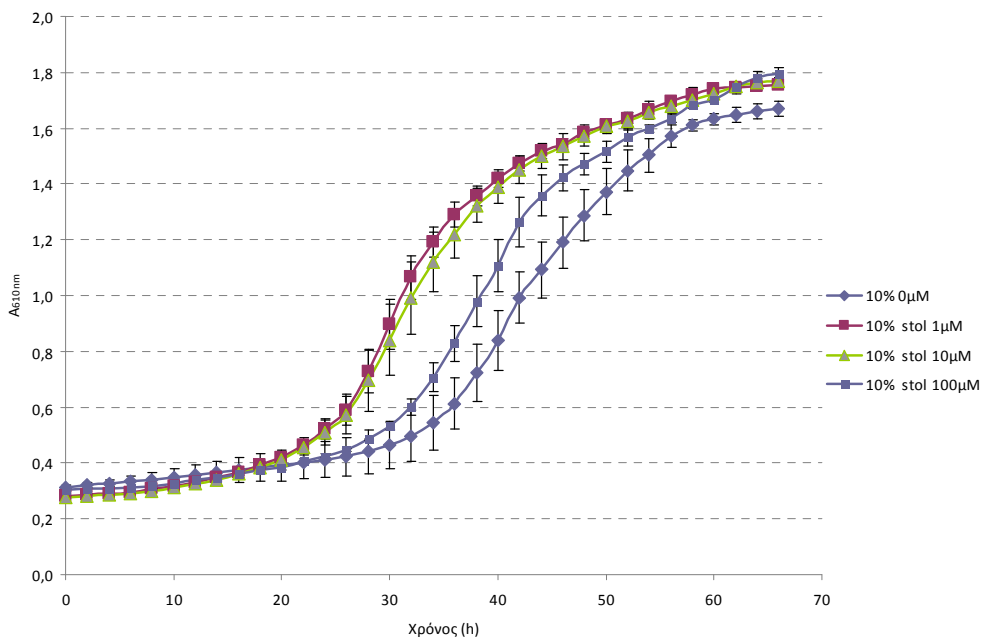
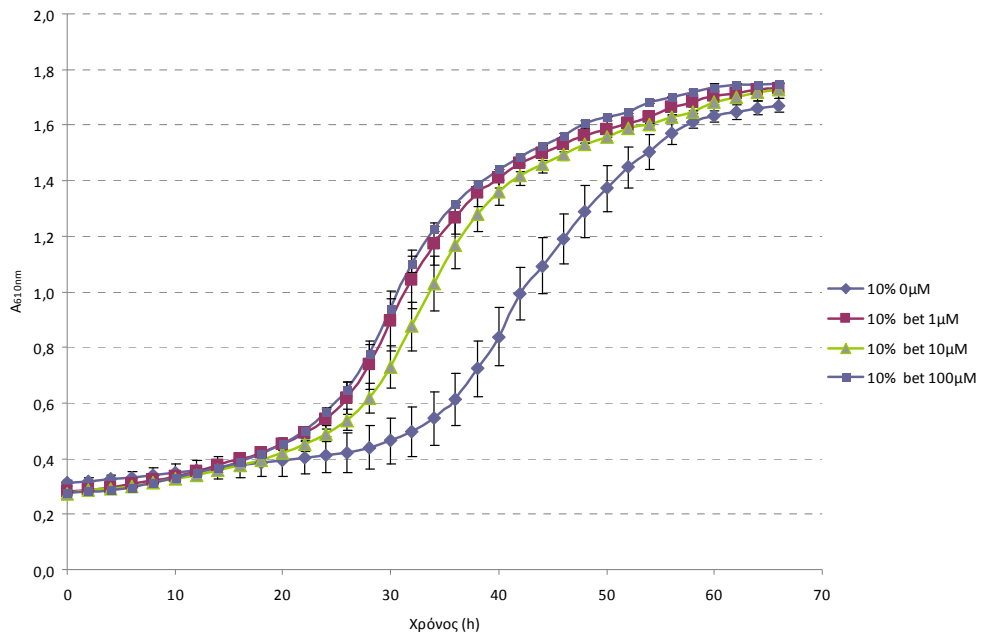
Στη συνέχεια εκτιμήθηκε η ικανότητα ανάπτυξης του *Lb. acidipiscis* σε υπερωσμωτικές συνθήκες (MRS με 10%, w/v NaCl) παρουσία των μαννόζη, σορβόζη, γλυκίνη-βεταΐνη και σορβιτόλη στις ίδιες συγκεντρώσεις, που αναφέρονται προηγουμένως (Γραφήματα 4.11.A, B, Γ και Δ).



Γράφημα 4.11.

Κινητική ανάπτυξης του *Lb. acidipiscis* σε υπερωσμωτικές συνθήκες (MRS broth με 10%, w/v NaCl) με προσθήκη μαννόζης (A), σορβόζης (B), γλυκίνης-βεταΐνης (Γ) και σορβιτόλης (Δ) σε τελική συγκέντρωση 0, 1, 10 και 100 μM (όπως φαίνεται στη δεξιά λεζάντα της γραφικής παράστασης) (συνέχεια στην επόμενη σελίδα).

Γ.



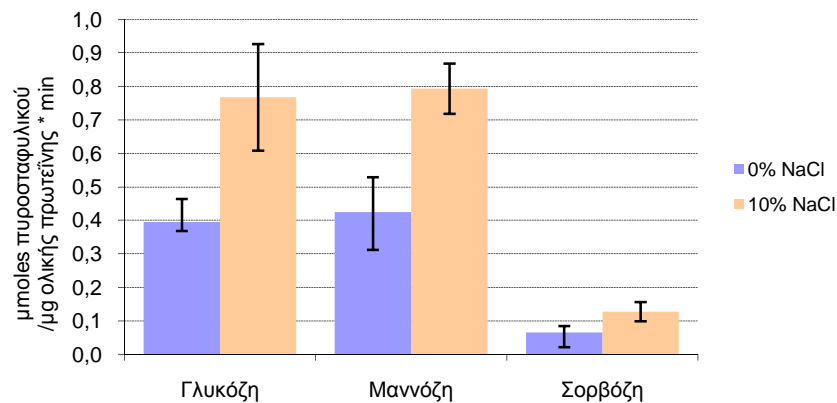
Γράφημα 4.11.

Συνέχεια του Γραφήματος της προηγούμενης σελίδας.

Από τα **Γραφήματα 4.11.A και B** είναι εμφανής η βελτίωση της ανάπτυξης του *Lb. acidipiscis* παρουσία των δυο σακχάρων (μαννόζης και σορβόζης) σε συνθήκες υψηλής αλατότητας (10% w/v NaCl) σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, σε σύγκριση με τους μάρτυρες (καλλιέργεια σε MRS με 10% NaCl αλλά χωρίς σάκχαρα). Ποιοτικά, η βελτίωση της ανάπτυξης περιλαμβάνει τόσο τη μείωση της φάσης προσαρμογής όσο και την αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης, επιβεβαιώνοντας έτσι ότι οι δυο αυτοί μονοσακχαρίτες συνεισφέρουν στην ωσμωπροστασία του βακτηρίου. Μάλιστα, η επίδραση των δύο ενώσεων στην κινητική της ανάπτυξης ήταν παρόμοια με αυτή της γλυκίνης-βεταΐνης και της σορβιτόλης που αποτελούν γνωστούς και καλά χαρακτηρισμένους ωσμωλύτες (**Γραφήματα 4.11.Γ και Δ**).

4.3.5. Ενζυμική ενεργότητα του συστήματος PEP-PTS μαννόζης/σορβόζης

Στην προηγούμενη παράγραφο δείχθηκε ότι η προσθήκη μαννόζης και σορβόζης στο θρεπτικό μέσο βελτίωσε την ανάπτυξη του *Lb. acidipiscis* σε υπερωσμωτικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τη διαπίστωση της Παραγράφου 4.3.2 ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες ΠΒ και ΠΑ του μεταφορέα PEP-PTS μαννόζης/σορβόζης επάγονται σε υψηλή αλατότητα. Στη συνέχεια μελετήθηκε η ενεργότητα του συστήματος PEP-PTS σε ενζυμικό επίπεδο. Για να προσδιοριστούν οι υδατάνθρακες που μεταφέρονται εντός του κυττάρου με το σύστημα PTS μετρήθηκαν τα επίπεδα φωσφορυλίωσης της γλυκόζης, της μαννόζης και της σορβόζης παρουσία PEP σε διάτρητα κύτταρα του *Lb. acidipiscis*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **Γράφημα 4.12**. Η ενεργότητα του PEP-PTS συστήματος μαννόζης αυξήθηκε κατά προσέγγιση επί 1.8 φορές σε κύτταρα που είχαν εκτεθεί σε υψηλή συγκέντρωση NaCl σε σχέση με τα κύτταρα-μάρτυρες. Το ίδιο παρατηρήθηκε και για το PEP-PTS μεταφορέα της γλυκόζης (αύξηση κατά προσέγγιση επί 1.8 φορές) και οι τιμές που παρατηρήθηκαν είναι αντίστοιχες με εκείνες του μεταφορέα της μαννόζης. Στην περίπτωση της σορβόζης οι διαφορές της ενεργότητας μεταξύ των κυττάρων από καλλιέργεια χωρίς NaCl και των κυττάρων από καλλιέργεια με 10% ήταν επίσης της τάξης του 1.8 κατά προσέγγιση αλλά οι τιμές ήταν πολύ χαμηλές σε σχέση με αυτές που λήφθηκαν για τη γλυκόζη και τη μαννόζη γεγονός που υποδεικνύει τη μικρή εξειδίκευση που πιθανώς έχει ο συγκεκριμένος μεταφορέας για τη σορβόζη.



Γράφημα 4.12.

Ενζυμική ενεργότητα του μεταφορέα PEP-PTS απέναντι στα σάκχαρα γλυκόζη, μαννόζη και σορβόζη σε διάτρητα κύτταρα του *Lb. acidiphilicis* από καλλιέργειες σε 0 και 10% (w/v) NaCl. Στο Γράφημα παρουσιάζονται οι μέσες τιμές τριών επαναλήψεων με τις τυπικές αποκλίσεις.

Σε γενικές γραμμές τα συστήματα PTS επάγονται από το κύριο υπόστρωμα-σάκχαρο. Το προτιμώμενο υπόστρωμα (η γλυκόζη εν προκειμένω) εμποδίζει την πρόσληψη και το μεταβολισμό των υπόλοιπων σακχάρων μειώνοντας την ενεργότητα των αντίστοιχων μεταφορέων σε ένα φαινόμενο που ονομάζεται καταστολή καταβολιτών (Postma *et al.*, 1993). Παρόλα αυτά στη συγκεκριμένη μελέτη φάνηκε ότι το σύστημα PEP-PTS της μαννόζης είναι ενεργό και μάλιστα επάγεται σε συνθήκες υψηλής αλατότητας δίνοντας ενεργότητες παρόμοιες με αυτές που λήφθηκαν στην περίπτωση της γλυκόζης. Από την άλλη πλευρά το συγκεκριμένο σύστημα μεταφοράς της μαννόζης έχει σχετικά ευρεία εξειδίκευση καθώς μπορεί να μεταφέρει υποστρώματα όπως η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη, η 2-δεοξυ-γλυκόζη, αλλά αυτό εξαρτάται από το μικροοργανισμό (Castro *et al.*, 2009). Για παράδειγμα, στη *Salmonella typhimurium* το PTS της μαννόζης και το PTS της γλυκόζης προσλαμβάνουν το ίδιο αποτελεσματικά τη γλυκόζη, ενώ στο *E. coli* K-12 το PTS της μαννόζης είναι δευτερεύον σύστημα για την εισαγωγή γλυκόζης (Postma *et al.*, 1993).

4.4. Συμπεράσματα

Ο *Lb. acidipiscis* εμφάνισε έναν ενδιαφέροντα αλοανθεκτικό φαινότυπο. Η μελέτη των μεταγραφικών αλλαγών σε ισο- και υπερωσμωτικές συνθήκες με τη μέθοδο RAP-PCR κατέδειξε έξι πιθανά γονίδια με διαφορεική έκφραση. Από τα γονίδια που βρέθηκαν να επάγονται σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, έντονο ενδιαφέρον παρουσίασε το σύστημα μεταφοράς PEP-PTS της μαννόζης/σορβόζης. Πράγματι, η παρουσία της μαννόζης και της σορβόζης βελτίωσε σημαντικά την ανάπτυξη του *Lb. acidipiscis* σε υπερωσμωτικές συνθήκες, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι ενώσεις αυτές αποτελούν δυο νέους ωσμωλύτες. Αυτό επιβεβαιώθηκε περαιτέρω και από την αύξηση της ενζυμικής ενεργότητας του συστήματος PEP-PTS της μαννόζης/σορβόζης κάτω από τις ίδιες ωσμωτικές συνθήκες.

Βιβλιογραφία

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., et al. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-402.
- Barras, F., Loiseau, L., & Py, B. 2005. How *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* build Fe/S proteins. *Adv Microb Physiol*, 50, 41-101.
- Benson, N. R., Wong, R. M., & McClelland, M. 2000. Analysis of the SOS response in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium using RNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. *J Bacteriol*, 182, 3490-3497.
- Bidle, K. A. 2003. Differential expression of genes influenced by changing salinity using RNA arbitrarily primed PCR in the archaeal halophile *Haloferax volcanii*. *Extremophiles*, 7, 1-7.
- Chang, K. C., Komm, B., Arnold, N. B., & Korc, M. 2007. The application of differential display as a gene profiling tool. *Methods Mol Biol*, 383, 31-40.
- Davidson, A. L., & Maloney, P. C. 2007. ABC transporters: how small machines do a big job. *Trends Microbiol*, 15(10), 448-55.
- Du, L. D., & Kolenbrander, P. E. 2000. Identification of saliva-regulated genes of *Streptococcus gordonii* DL1 by differential display using random arbitrarily primed PCR. *Infect Immun*, 68, 4834-4837.
- Duché, O., Trémoulet, F., Namane, A., & Labadie, J. 2002. A proteomic analysis of the salt stress response of *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett*, 215(2), 183-8.
- Eitinger, T., Rodionov, D. A., Grote, M., & Schneider, E. 2011. Canonical and ECF-type ATP-binding cassette importers in prokaryotes: diversity in modular organization and cellular functions. *FEMS Microbiol Rev*, 35(1), 3-67.
- Facey, S. J., Kuhn, A. 2010. Biogenesis of bacterial inner-membrane proteins. *Cell Mol Life Sci*, 67(14), 2343-62.
- Fleming, J. T., Yao, W. H., & Sayler, G. S. 1998. Optimization of differential display of prokaryotic mRNA: application to pure culture and soil microcosms. *Appl Environ Microbiol*, 64, 3698-3706.
- Fontecave, M., Choudens, S. O., Py, B., & Barras, F. 2005. Mechanisms of iron-sulfur cluster assembly: the SUF machinery. *J Biol Inorg Chem*, 10(7), 713-21.
- Fozo, E. M., Kajfasz, J. K., & Quivey, R. G. Jr. 2004. Low pH-induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 238, 291-295.
- Frees, D., Vogensen, F. K. & Ingmer, H. 2003. Identification of proteins induced at low pH in *Lactococcus lactis*. *Int J Food Microbiol*, 87, 293-300.
- Frias-Lopez, J., Bonheyo, G. T., & Fouke, B. W. 2004. Identification of differential gene expression in bacteria associated with coral black band disease by using RNA-arbitrarily primed PCR. *Appl Environ Microbiol*, 70, 3687-3694.
- Higgins, C. F. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol*, 8, 67-113.
- Holley, R. A., Guan, T. Z., Peirson, M., & Yost, C. K. 2002. *Carnobacterium viridans* sp. nov., an alkaliphilic, facultative anaerobe isolated from refrigerated, vacuum-packed bologna sausage. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52, 1881-1885.
- Hwang, D. M., Dempsey, A., Tan, K. T., & Liew C. C. 1996. A modular domain of NifU, a nitrogen fixation cluster protein, is highly conserved in evolution. *J Mol Evol*, 43(5), 536-40.
- Janssen, D. B., Oppentocht, J. E., & Poelarends, G. J. 2001. Microbial dehalogenation. *Curr Opin Biotechnol*, 12(3), 254-8.

- Konings, W. N., Lolkema, J. S., Bolhuis, H., van Veen, H. W., Poolman, B., & Driessen, A. J. 1997. The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. Energy transduction and multidrug resistance. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 71(1-2), 117-28.
- Koonin, E. V., & Tatusov, R. L. 1994. Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity. Application of an iterative approach to database search. *J Mol Biol*, 244(1), 125-32.
- Kuznetsova, E., Proudfoot, M., Gonzalez, C. F., Brown, G., Omelchenko, M. V., Borozan, I., Carmel, L., Wolf, Y. I., Mori, H., Savchenko, A. V., Arrowsmith, C. H., Koonin, E. V., Edwards, A. M., & Yakunin, A. F. 2006. Genome-wide analysis of substrate specificities of the *Escherichia coli* haloacid dehalogenase-like phosphatase family. *J Biol Chem*, 281(47), 36149-61.
- Li S, Xiao X, Li J, Luo J, Wang F. 2006. Identification of genes regulated by changing salinity in the deep-sea bacterium *Shewanella* sp. WP3 using RNA arbitrarily primed PCR. *Extremophiles*, 10(2), 97-104.
- Liang, P., & Pardee, A. B. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257(5072), 967-71.
- Lill, R., Dutkiewicz, R., Elsässer, H. P., Hausmann, A., Netz, D. J., Pierik, A. J., Stehling, O., Urzica, E., & Mühlenhoff, U. 2006. Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochim Biophys Acta*, 1763(7), 652-67.
- Locher, K. P., Lee, A. T., & Rees, D. C. 2002. The *E. coli* BtuCD structure: framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science*, 296(5570), 1091-1098.
- Lorca, G. L., Barabote, R. D., Zlotopolski, V., Tran, C., Winnen, B., Hvorup, R. N., Stonestrom, A. J., Nguyen, E., Huang, L. W., Kim, D. S., & Saier, M. H. Jr. 2007. Transport capabilities of eleven gram-positive bacteria: comparative genomic analyses. *Biochim Biophys Acta*, 1768(6), 1342-66.
- McClelland, M., Mathieu-Daude, F., & Welsh, J. 1995. RNA fingerprinting and differential display using arbitrarily primed PCR. *Trends Genet*, 11(6), 242-6.
- Mihara, H., & Esaki, N. 2002. Bacterial cysteine desulfurases: their function and mechanisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60(1-2), 12-23.
- Mühlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N., & Lill, R. 2003. Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J*, 22(18), 4815-25.
- Papadimitriou, K., Boutou, E., Zoumpoulou, G., Tarantilis, P. A., Polissiou, M., Vorgias, C. E., & Tsakalidou, E. 2008. RNA arbitrarily primed PCR and fourier transform infrared spectroscopy reveal plasticity in the acid tolerance response of *Streptococcus macedonicus*. *Appl Environ Microbiol*, 74(19), 6068-76.
- Papadimitriou, K., Pratsinis, H., Nebe-von-Caron, G., Kletsas, D., & Tsakalidou, E. 2007. Acid tolerance of *Streptococcus macedonicus* as assessed by flow cytometry and single-cell sorting. *Appl Environ Microbiol*, 73(2), 465-76.
- Parente, E., Ciocia, F., Ricciardi, A., Zotta, T., Felis, G. E., & Torriani, S. 2010. Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: A multivariate screening study. *Int J Food Microbiol*, 144(2), 270-9.
- Paulino, L. C., de Mello, M. P., & Ottoboni, L. M. M. 2002. Differential gene expression in response to copper in *Acidithiobacillus ferrooxidans* analyzed by

- RNA arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Electrophoresis*, 23, 520-527.
- Paulsen, I. T., Beness, A. M., & Saier, M. H. Jr. 1997. Computer-based analyses of the protein constituents of transport systems catalysing export of complex carbohydrates in bacteria. *Microbiology*, 143(Pt 8), 2685-99.
- Phan, T. N., Nguyen, P. T., Abranches, J., & Marquis, R. E. 2002. Fluoride and organic weak acids as respiration inhibitors for oral streptococci in acidified environments. *Oral Microbiol Immunol*, 17, 119-124.
- Poolman, B. 2002. Transporters and their roles in LAB cell physiology. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 147-64.
- Postma, P. W., Lengeler, J. W., & Jacobson, G. R. 1993. Phosphoenolpyruvate : carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol Rev*, 57(3), 543-94.
- Prasad, J., McJarrow, P., & Gopal, P. 2003. Heat and osmotic stress responses of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in relation to viability after drying. *Appl Environ Microbiol*, 69(2), 917-25.
- Rosas-Rodríguez, J. A., & Valenzuela-Soto, E. M. 2010. Enzymes involved in osmolyte synthesis: how does oxidative stress affect osmoregulation in renal cells? *Life Sci*, 87(17-18), 515-20.
- Sakaguchi, K. 1960. Betaine as a growth factor for *Pedicoccus soyae*. VIII. Studies on the activities of bacteria in soy sauce brewing. *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.* 24, 489-496.
- Seidler, A., Jaschkowitz, K., Wollenberg, M. 2001. Incorporation of iron-sulphur clusters in membrane-bound proteins. *Biochem Soc Trans*, 29(Pt 4), 418-21.
- Sendra, M., Ollagnier de Choudens, S., Lascoux, D., Sanakis, Y., & Fontecave, M. 2007. The SUF iron-sulfur cluster biosynthetic machinery: sulfur transfer from the SUFS-SUFE complex to SUFA. *FEBS Lett*, 581(7), 1362-8.
- Shepard, B. D., & Gilmore, M. S. 1999. Identification of aerobically and anaerobically induced genes in *Enterococcus faecalis* by random arbitrarily primed PCR. *Appl Environ Microbiol*, 65, 1470-1476.
- Sleator, R. D., & Hill, C. 2001. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence.
- Tanasupawat, S., Shida, O., Okada, S., & Komagata, K. 2000. *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50 Pt 4, 1479-85.
- 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(1-4), 187-216.
- Welsh, J., Chada, K., Dalal, S. S., Cheng, R., Ralph, D., & McClelland, M. 1992. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res*, 20(19), 4965-70.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Διερεύνηση του πλασμιδιακού προφίλ
οξυγαλακτικών βακτηρίων των ειδών

Lactobacillus acidipiscis,

Lactobacillus rennini και

Pediococcus pentosaceus

5.1. Εισαγωγή

Το πλασμιδιακό περιεχόμενο των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι εξαιρετικά σημαντικό καθώς έχει πολλάκις αναφερθεί σε έρευνες ότι τα πλασμιδικά γονίδια εμπλέκονται σε σημαντικά τεχνολογικές ιδιότητες, όπως για παράδειγμα ο καταβολισμός λακτόζη/γαλακτόζης, η πρωτεόλυση, η μεταφορά ολιγοπεπτιδίων, ο καταβολισμός του κιτρικού οξέος, η παραγωγή βακτηριοσινών και αλλά και μηχανισμοί απόκρισης σε συνθήκες στρες (Schroeter & Klaenhammer, 2009). Εναλλακτικά, τα πλασμιδικά γονίδια ενδέχεται να συμμετέχουν αποκλειστικά στο πολλαπλασιασμό των πλασμιδίων και να μη συνεισφέρουν άλλα χαρακτηριστικά στο φαινότυπο του βακτηρίου. Ακόμα και η ανακάλυψη τέτοιων πλασμιδίων που ορίζονται ως κρυπτικά, έχει βρει βιοτεχνολογική εφαρμογή στην κατασκευή παλίνδρομων φορέων (shuttle vector) οξυγαλακτικών βακτηρίων.

Επιπλέον, η βιολογία των πλασμιδίων προσελκύει ολοένα και μεγαλύτερο επιστημονικό ενδιαφέρον σε σχέση με τη συνεισφορά τους στην εξελικτική διαδικασία συναρμολόγησης, καθώς τα μόρια αυτά αποτελούν πιθανούς φορείς οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (Toomey *et al.*, 2009, Thomas & Nielsen, 2005). Η απόκτηση ξένων γονιδίων μέσω της οριζόντιας μεταφοράς (Horizontal Gene Transfer, HGT) είναι εξέχουσας σημασίας για την κατανόηση της αρχιτεκτονικής των γονιδιωμάτων των οξυγαλακτικών βακτηρίων, τόσο από εξελικτικής όσο και από τεχνολογικής σκοπιάς. Είναι τεκμηριωμένο ότι ορισμένα οξυγαλακτικά είδη ή στελέχη παρουσιάζουν βελτιωμένες τεχνολογικές ιδιότητες εξαιτίας αυτού του φαινομένου (Liu *et al.*, 2009, Zhu *et al.*, 2009, Makarova *et al.*, 2006). Η HGT μέσω πλασμιδίων είναι κοινός μηχανισμός στα βακτήρια. Σε αυτό το μηχανισμό, το ξένο γονίδιο γίνεται "κινητή μονάδα" αφού πρώτα αποκτηθεί από ένα πλασμίδιο, που στη συνέχεια διαβιβάζεται ανάμεσα σε είδη με φυσικό μετασχηματισμό ή σύζευξη (Toomey *et al.*, 2009, Thomas & Nielsen, 2005). Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός παραδειγμάτων στη βιβλιογραφία όπου τέτοιες "κινητές μονάδες" έχουν ανιχνευτεί σε πλασμίδια οξυγαλακτικών βακτηρίων (O'Connor *et al.*, 2007, Siezen *et al.*, 2005).

Μια ακόμα πολύ σημαντική ιδιότητα των πλασμιδίων είναι ότι αρκετά από αυτά φέρουν γονίδια που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα σε διάφορες συνθήκες στρες. Υπάρχουν αρκετές αναφορές για πλασμίδια οξυγαλακτικών βακτηρίων που φέρονται να παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην φυσιολογία του στρες των ξενιστών

τους (Siezen *et al.*, 2005, Somkuti & Steinberg, 1999). Τα τελευταία χρόνια, η φυσιολογία των οξυγαλακτικών βακτηρίων κάτω από συνθήκες στρες αποτελεί πεδίο εκτεταμένης έρευνας. Κατά την επεξεργασία των τροφίμων τα βακτήρια αυτά αντιμετωπίζουν ένα αντίξοο περιβάλλον που προορίζεται να είναι βακτηριοστατικό/βακτηριοκτόνο για τους αλλοιωγόνους και τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Μάλιστα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια συμμετέχουν ενεργά στη δημιουργία αυτού του περιβάλλοντος στα ζυμούμενα τρόφιμα μέσω της οξίνισης και της παραγωγής αντιμικροβιακών ενώσεων. Συνεπώς, για τις εναρκτήριες και συμπληρωματικές οξυγαλακτικές καλλιέργειες απαιτείται ένα σχετικός βαθμός ανθεκτικότητας στις συνθήκες στρες έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η επιθυμητή και ολοκληρωμένη ζύμωση.

Σήμερα, η εξέλιξη της γονιδιωματικής επιστήμης, συμπεριλαμβανομένων της αλληλούχησης και του χαρακτηρισμού ολόκληρων γονιδιωμάτων και της συγκριτικής και λειτουργικής γονιδιωματικής και πρωτεωμικής έχουν συνεισφέρει λεπτομερείς πληροφορίες όσον αφορά τις αποκρίσεις (γενικές και ειδικές) διαφόρων ειδών σε συνθήκες στρες (Zhu *et al.*, 2009, de Vos *et al.*, 2004, Champomier-Verges *et al.*, 2002). Με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία προκύπτει μια σημαντική διαφορά ανάμεσα στα οξυγαλακτικά βακτήρια και το μικροοργανισμό-μοντέλο των Gram-θετικών βακτηρίων *Bacillus subtilis*. Αυτή η διαφορά αφορά στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με το στρες. Στον *B. subtilis* αλλά και σε πολλά άλλα είδη, όπως οι *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* και *Staphylococcus aureus*, ο εναλλακτικός παράγοντας σ^B ευθύνεται για την ανακατεύθυνση της RNA πολυμεράσης σε συνθήκες στρες έτσι ώστε να μεταγραφεί ένα σύνολο γονιδίων που ονομάζεται ρεγουλόνιο γενικού στρες (van Schaik & Abee, 2005). Εν αντιθέσει, τα οξυγαλακτικά βακτήρια στερούνται γονιδίων ορθόλογων του σ^B και αντί αυτών έχουν εξελίξει άλλους ρυθμιστικούς μηχανισμούς (Sugimoto *et al.*, 2008, van de Guchte *et al.*, 2002, Yother *et al.*, 2002). Μεταξύ των γονιδίων του ρεγουλονίου σ^B βρίσκεται και το γονίδιο που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη και που επάγεται σε συνθήκες έλλειψης γλυκόζης (glucose starvation inducible protein B, *gsiB*) (Maul *et al.*, 1995). Είναι δε τεκμηριωμένο ότι το γονίδιο *gsiB* ενεργοποιείται σε διάφορες συνθήκες στρες, όπως η έλλειψη θρεπτικών στοιχείων, η έκθεση των κυττάρων σε υψηλή θερμοκρασία, σε οξέα, σε αιθανόλη, σε υψηλή αλατότητα κ.τ.λ. (Brigulla *et al.*, 2003, Kovacs *et al.*, 1998, Maul *et al.*, 1995). Η πρωτεΐνη GsiB παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς ανήκει στην οικογένεια πρωτεϊνών

εμβρυογένεσης τελικού σταδίου (late embryogenesis abundant, LEA). Οι πρωτεΐνες LEA χαρακτηρίστηκαν αρχικά σε φυτά, στα οποία βρέθηκαν να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα των ώριμων σπόρων απέναντι στη ξήρανση, αλλά και των βλαστικών οργάνων σε συνθήκες έλλειψης νερού (Battaglia *et al.*, 2008, Wise & Tunnacliffe, 2004). Μάλιστα, η GsiB του *B. subtilis* αποτελεί την πρώτη προκαρυωτική πρωτεΐνη LEA (ομάδας 1) που αναφέρθηκε (Stacy & Aalen, 1998). Σήμερα, η οικογένεια πρωτεϊνών LEA ανήκει στις υδροφιλίνες, μια υπερ-οικογένεια, η οποία περιλαμβάνει ποικίλες πρωτεΐνες εξαιρετικά υδρόφιλες και με μεγάλο ποσοστό σε γλυκίνη ή άλλα μικρά αμινοξέα (Reyes *et al.*, 2008, Garay-Arroyo *et al.*, 2000). Αυτές οι πρωτεΐνες είναι αρκετά διαδεδομένες και εντοπίζονται σε διάφορους οργανισμούς, ευκαρυωτικούς και προκαρυωτικούς, ενώ φαίνεται ότι η λειτουργία τους που αφορά την προστασία των κυττάρων σε συνθήκες αφυδάτωσης είναι συντηρημένη ανάμεσα στα είδη (Garay-Arroyo *et al.*, 2000).

Η μελέτη των πλασμιδίων των οξυγαλακτικών βακτηρίων έχει βασικά επικεντρωθεί στα καλά χαρακτηρισμένα είδη και στελέχη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γένος *Lactobacillus*, καθώς επί του παρόντος υπάρχουν 76 πλασμιδιακές αλληλουχίες κατατεθειμένες στη βάση δεδομένων του NCBI που έχουν απομονωθεί από μόνο 18 είδη σε σύνολο 120 ειδών του γένους *Lactobacillus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Ως εκ τούτου, απαιτείται πιο εκτεταμένη έρευνα των οξυγαλακτικών πλασμιδίων έτσι ώστε να εκτιμηθεί καλύτερα η εξέλιξη και η διαφοροποίηση των πλασμιδίων σε αυτά τα οικονομικά σημαντικά βακτήρια.

Σε αυτό το Κεφάλαιο περιγράφεται η απομόνωση, η κλωνοποίηση, η αλληλούχηση και ο χαρακτηρισμός των πλασμιδίων pLAC1, pREN και pPS1, απομονωμένων από τους *Lactobacillus acidipiscis* ACA-DC 1533, *Lactobacillus rennini* ACA-DC 1534 και *Pediococcus pentosaceus* ACA-DC 3431, αντίστοιχα.

5.2. Υλικά και μέθοδοι

5.2.1. Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες ανάπτυξης

Οι *Lb. acidipiscis* ACA-DC 1533, *Lb. rennini* ACA-DC 1534 και *P. pentosaceus* ACA-DC 3431 αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS (Oxoid) στους 30° C. Στην περίπτωση του *Lb. rennini* το MRS περιείχε 2.5% NaCl (w/v). Για

τους μετασχηματισμούς του DNA χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Escherichia coli* Mach1™ (Invitrogen) ως ξενιστής, το οποίο αναπτύχθηκε με αερόβια επώαση (250 rpm) σε θρεπτικό υπόστρωμα Luria-Bertani στους 37° C και όταν ήταν απαραίτητο προστίθετο αμικικιλίνη (Sigma) σε τελική συγκέντρωση 100 µg/mL.

5.2.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Το πλασμιδιακό DNA απομονώθηκε από τα κύτταρα των *Lb. acidipiscis*, *Lb. rennini*, *P. pentosaceus* και *E. coli* χρησιμοποιώντας τη τυποποιημένη συσκευασία NucleoSpin Plasmid Kit (Macherey-Nagel) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, 10 mL υγρής καλλιέργειας (1.5 mL για το *E. coli*) φυγοκεντρήθηκαν (14000 rpm για 30 sec) σε φιαλίδιο τύπου erpendorf (όγκου 2 mL) και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Το ίζημα (βιομάζα) επαναδιαλύθηκε σε 250 µL διαλύματος επαναιώρησης. Προστέθηκαν 250 µL διαλύματος λύσης με προσεκτική ανάδευση και το μίγμα επώαστηκε για 5 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε προσθήκη 300 µL διαλύματος εξουδετέρωσης (με προσεκτική ανάδευση) και φυγοκέντρωση (14000 rpm για 5 min). Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε στήλη δέσμευσης και καθαρισμού DNA (Nucleospin® Plasmid column) και μετά από νέα φυγοκέντρωση (14000 rpm για 1 min) η έκλουση απομακρύνθηκε. Στη στήλη προστέθηκαν 500 µL διαλύματος έκπλυσης (προθερμασμένου στους 50° C) και ακολούθησε νέα φυγοκέντρωση (14000 rpm για 1 min) και απομάκρυνση της έκπλυσης. Εκ νέου, πραγματοποιήθηκε προσθήκη 600 µL αιθανολικού διαλύματος έκπλυσης και νέα φυγοκέντρωση (14000 rpm για 1). Η στήλη στεγνώθηκε με φυγοκέντρωση (14000 rpm για 2 min) και το πλασμιδιακό DNA συλλέχθηκε σε νέο φιαλίδιο erpendorf μετά από προσθήκη 50 µL διαλύματος έκπλυσης και φυγοκέντρωση. Στην περίπτωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων ενσωματώθηκαν ορισμένες τροποποιήσεις στο αρχικό πρωτόκολλο ούτως ώστε να εξασφαλιστεί η σωστή λύση των κυττάρων. Συγκεκριμένα, στο διάλυμα λύσης προστέθηκαν λυσοζύμη (10 mg/mL) και μουτανολυσίνη (100 U/mL) της εταιρίας Sigma και το μίγμα επώαστηκε στους 37° C για 1 h. Όλες οι φυγοκεντρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα διαλύματα επαναιώρησης, λύσης, εξουδετέρωσης, έκπλυσης και έκλουσης παρέχονται με την τυποποιημένη συσκευασία.

Το πλασμιδιακό εκχύλισμα του κάθε βακτηρίου υποβλήθηκε στη συνέχεια σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης (0.8% w/v) και η ζώνη του DNA που

αντιστοιχούσε στο εκάστοτε υπό εξέταση πλασμίδιο, απομακρύνθηκε από την πηκτή με το QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αναλυτικά, η επιθυμητή ζώνη αποκόπηκε από την πηκτή αγαρόζης με χειρουργικό νυστέρι, μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο erpendorf όπου προστέθηκε διάλυμα διαλυτοποίησης της αγαρόζης (3 όγκοι διαλύματος προς 1 όγκο του τεμαχίου της πηκτής) και 30 μL εναιωρήματος σφαιριδίων πρόσδεσης DNA QIAEX II. Το διάλυμα διαλυτοποίησης της αγαρόζης επιτρέπει και την πρόσδεση του DNA στα σφαιρίδια. Ακολούθησε επώαση στους 50°C για 30 min για να επιτευχθεί η διαλυτοποίηση της αγαρόζης και η πρόσδεση του DNA. Μετά από φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκειμένου, το ίζημα σφαιριδίων υποβλήθηκε σε έκπλυση μια φορά με 500 μL διαλύματος πρόσδεσης και δυο φορές με 500 μL αιθανολικού διαλύματος έκπλυσης. Το ίζημα στεγνώθηκε για 20 min και επαναιωρήθηκε σε 20 μL διαλύματος έκλουσης. Μετά από φυγοκέντρηση παραλήφθηκε το υπερκείμενο που περιείχε το καθαρό DNA το οποίο και μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο erpendorf. Το διάλυμα διαλυτοποίησης της αγαρόζης και πρόσδεσης DNA, το αιθανολικό διάλυμα έκπλυσης και το εναιώρημα σφαιριδίων πρόσδεσης DNA παρέχονται από το kit.

Η συγκέντρωση του DNA προσδιορίστηκε φωτομετρικά (φωτόμετρο UV/Vis, Lambda 20) μετρώντας την απορρόφηση διαλύματος σε H_2O (1:200 αραίωση) σε μήκος κύματος 260 nm. Η δε καθαρότητα του δείγματος καθορίστηκε από το λόγο $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ (σε σχέση με προσμίξεις από πρωτεΐνες).

5.2.3. Πέψεις του πλασμιδιακού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, αντιδράσεις σύνδεσης των μορίων DNA και κλωνοποίηση

Τα καθαρά πλασμιδιακά DNA υποβλήθηκαν σε πολλαπλές αντιδράσεις περιοριστικών ενζύμων (NEB) έτσι ώστε να εξακριβωθούν οι πιθανές θέσεις περιορισμού στις άγνωστες αλληλουχίες. Οι πέψεις του DNA πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο αντίδρασης 20 μL , ως εξής: 17 μL εκχυλίσματος DNA (~ 1.0 μg) αναμίχθηκαν με 2 μL ρυθμιστικού διαλύματος πέψης (10X, με σύσταση ανάλογη με το χρησιμοποιούμενο ένζυμο) και 1 μL ενζύμου. Το μίγμα επώαστηκε στη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του κάθε ενζύμου για 3 h. Η ίδια διαδικασία πέψης ακολουθήθηκε και για το πλασμίδιο-φορέα pUC18. Για τη δράση ορισμένων ενζύμων απαιτείτο η προσθήκη βόειας αλβουμίνης ορού (Bovine Serum Albumin, BSA) σε τελική συγκέντρωση 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Η απενεργοποίηση των ενζύμων πραγματοποιήθηκε με θέρμανση στη προτεινόμενη θερμοκρασία που αναφέρει η εταιρεία για 20 min.

Η αντίδραση σύνδεσης (ligation) χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή των προϊόντων ενζυμικής πέψης των πλασμιδίων στο φορέα pUC18 με στόχο την κλωνοποίησή τους μέσω του μετασχηματισμού των κυττάρων. Για την κατασκευή ανασυνδυασμένων μορίων DNA χρησιμοποιήθηκε το ενζύμου T4 DNA λιγάση (NEB) το οποίο καταλύει το σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ των 5' φωσφορικών ομάδων και των 3' υδροξυλομάδων. Με τον τρόπο αυτό συνδέονται τμήματα DNA με συμπληρωματικά ή τυφλά άκρα. Οι αντιδράσεις σύνδεσης έγιναν ως εξής: 1 μL πλασμιδίου-φορέα pUC18 (που είχε υποστεί πέψη, ~ 50 ng) και 3 μL προϊόντων πέψης των πλασμιδίων (~ 150 ng) αναμίχθηκαν με 1 μL διαλύματος αντίδρασης σύνδεσης (10x) και 1 μL T4 DNA λιγάση, ενώ ο όγκος συμπληρώθηκε μέχρι τα 10 μL με sddH_2O . Το μίγμα επώαστηκε στους 8° C για 18 h και τερματίστηκε με θέρμανση στους 70° C για 10 min.

Οι κλωνοποιήσεις των ανασυνδυασμένων μορίων DNA πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα χημικώς παρασκευασμένα δεκτικά (competent) κύτταρα *E. coli* Mach1™, σύμφωνα με τους Sambrook *et al.* (1989). Πέντε μL της αντίδρασης σύνδεσης (ligation) προστέθηκαν σε φιαλίδιο που περιείχε 50 μL κυττάρων και το μίγμα επώαστηκε στο πάγο για 30 min. Στη συνέχεια, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ (42° C για 30 sec) και αμέσως το φιαλίδιο μεταφέρθηκε στον πάγο. Ακολούθησε προσθήκη 250 μL θρεπτικού μέσου SOC και επώαση στους 37° C για 1 h υπό συνεχή ανάδευση (250 rpm). 50 μL των μετασχηματισμένων κυττάρων εμβολιάστηκαν με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα LB που είχαν προθερμανθεί στους 37° C. Το υπόστρωμα LB περιείχε αμπικιλίνη (τελική συγκέντρωση 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) καθώς και 40 μL X-gal (40 mg/mL σε διμεθυλο-φορμαμίδιο). Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37° C για 48 h και οι λευκές αποικίες που αναπτύχθηκαν επιλέχθηκαν για περαιτέρω ανάλυση. Οι συγκεκριμένες αποικίες επιλέχθηκαν εξαιτίας της ικανότητάς τους να επιβιώνουν στο αντιβιοτικό επιλογής (εν προκειμένω την ανθεκτικότητα τους στην αμπικιλίνη, το γονίδιο αντίστασης της οποίας κωδικοποιείται από τον πλασμίδιο-φορέα), αλλά και του λευκού τους χρώματος, πράγμα που σήμαινε ότι το αμινο-τελικό τμήμα του γονιδίου της β -γαλακτοζιδάσης (*lacZ*) που κωδικοποιείται από το πλασμίδιο-φορέα ήταν ανενεργό. Το τμήμα αυτό του *lacZ* βρίσκεται κατά μήκος της περιοχής κλωνοποίησης του φορέα και διακόπτεται αν το τμήμα του DNA που επιδιώκεται να κλωνοποιηθεί εισάγεται σε αυτή την περιοχή. Οι λευκές αποικίες που επιλέχθηκαν εμβολιάστηκαν σε 5 mL υγρού υποστρώματος LB που περιείχε 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ αμπικιλίνης. Το

πλασμιδιακό DNA των καλλιιεργειών απομονώθηκε χρησιμοποιώντας το NucleoSpin Plasmid kit (Macherey-Nagel), όπως αναλυτικά περιγράφεται στην Παράγραφο 4.2.2. Οι αντιδράσεις αλληλούχησης των κλώνων πραγματοποιήθηκε με τους γενικούς εκκινητές (universal primers) M13F(-20), M13R-pUC(-40) από την εταιρία MacroGen Inc. (Seoul, Korea). Η πλήρης αλληλουχία των πλασμιδίων προσδιορίστηκε με την τεχνική της διαδοχικής αλληλούχησης (primer-walking) μεταξύ των τμημάτων DNA των κλώνων.

5.2.4. Βιοπληροφορική ανάλυση της αλληλουχίας των πλασμιδίων και σχολιασμός πιθανών γονιδίων

Η πλήρης αλληλουχία των πλασμιδίων εξακριβώθηκε με τη στοίχιση και σύνδεση των νουκλεοτιδικών τμημάτων, όπως αυτά προέκυψαν από τις αντιδράσεις αλληλούχησης των κλώνων, με χρήση του προγράμματος CAP3 Sequence Assembly Program (Huang & Madan, 1999). Η *ab initio* πρόβλεψη και ο σχολιασμός των πιθανών *orfs* πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διαφόρων εργαλείων βιοπληροφορικής και συγκεκριμένα των GeneMark™ (Besemer & Borodovsky, 1999), FGENESB (www.softberry.com) και MetaGeneAnnotator (Noguchi *et al.*, 2006). Στην περαιτέρω ανάλυση κρατήθηκαν τα *orfs* που προβλέφθηκαν κοινώς και από τα τρία προγράμματα αλλά επίσης και αυτά που έλαβαν μεγάλες πιθανότητες ύπαρξης. Οι πιθανές θέσεις πρόσδεσης ριβοσωμάτων (Ribosome Binding Sites, RBS) αναλύθηκαν με το λογισμικό MetaGeneAnnotator, ενώ η αλληλουχία υποκινητής (promoter) και τερματισμού (terminator) εκτιμήθηκαν με τα προγράμματα BPROM και FindTerm, αντίστοιχα (www.softberry.com). Η εύρεση ομολογίας των νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών με γνωστές αλληλουχίες της βάσης δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα BLAST (Altschul *et al.*, 1997) από την ιστοσελίδα του NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Τα δεδομένα που προέκυψαν από τα προαναφερθέντα βιοπληροφορικά εργαλεία εισήχθησαν στο λογισμικό Kodon (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Το εν λόγω πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του γενετικού χάρτη των πλασμιδίων και την πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής του DNA. Οι επιλογές ομαδοποίησης και σύγκρισης των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών που παρέχει το Kodon χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκριτική χαρτογράφηση των πλασμιδίων. Για την ανάλυση αυτή όλα τα υπό εξέταση πλασμίδια συγχρονίστηκαν ούτως ώστε το πρώτο νουκλεοτίδιο A του

κωδικονίου έναρξης (ATG) του *rep* γονιδίου να αποτελέσει το σημείο 1 των αλληλουχιών.

5.2.5. Στοιχίση πολλαπλών αλληλουχιών και φυλογενετική ανάλυση

Μετά από τη σύγκριση των αλληλουχιών στη βάση δεδομένων (BLAST) επιλέχθηκαν οι αλληλουχίες που παρουσίασαν αναμενόμενη τιμή, $e\text{-value} < 1.0 \times 10^{-10}$, οι οποίες στη συνέχεια υποβλήθηκαν στην πολλαπλή στοιχίση αλληλουχιών (Multiple Sequence Alignment, MSA). Οι αναλύσεις MSA έγιναν με το πρόγραμμα MUSCLE (Edgar, 2004) και απεικονίστηκαν με το Jalview (Waterhouse *et al.*, 2009) σύμφωνα με τις προεπιλεγμένες παραμέτρους. Η φυλογενετική ανάλυση έγινε μέσω της ιστοσελίδας διαδικτύου Phylogeny.fr (<http://www.phylogeny.fr/>) (Dereeper *et al.*, 2008) που περιλαμβάνει το πρόγραμμα MUSCLE για τη MSA, το Gblocks για το αυτοματοποιημένη επιδιόρθωση (curation) της στοιχίσης (Castresana, 2000), το PhyML για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων (Guindon & Gascuel, 2003) και το TreeDyn για την απεικόνισή τους (Chevenet *et al.*, 2006). Ο στατιστικός έλεγχος των φυλογενετικών δέντρων έγινε με το τεστ aLRT (approximate likelihood-ratio test) (Anisimova & Gascuel, 2006) ή με το εύρος διαστήματος εμπιστοσύνης (bootstrap) με 1000 επαναλήψεις.

5.2.6. Αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής συνδεδεμένη με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Reverse Transcription - Polymerase Chain reaction, RT-PCR)

Το ολικό RNA απομονώθηκε από κύτταρα λογαριθμικής φάσης ($OD_{610} \sim 0.7$) του *Lb. acidipiscis* ACA-DC 1533 με τα RNeasy και RNAProtect Kit (Qiagen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή και όπως περιγράφεται αναλυτικά στην Παράγραφο 4.2.1. Οι αντιδράσεις RT-PCR πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την αντίστροφη μεταγραφάση SuperScriptTM II (Invitrogen) και την DNA πολυμεράση DyNAzymeTM EXT (NEB) με 200 ng ολικού RNA ως εκμαγείο. Οι εκκινητές της αντίδρασης σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να πολλαπλασιάσουν τμήμα μήκους 100 bp του *rep* γονιδίου (REP_F: 5'-AGT ATG CTT TGG CTG GTA C-3' και REP_R: 5'-ACT AAG TCA CCC TTA TCA AC-3'), τμήμα μήκους 90 bp του *orf2* γονιδίου (ORF2_F: 5'-AAT GGT TTT GAT GTT GAT-3' και ORF2_R: 5'-TAC TTT TCC CTT TTC AAT-3') και τμήμα μήκους 156 bp του *orf3* γονιδίου (ORF3_F: 5'-TAC GAT GAG CAT GAC TTA G-3' και ORF3_R: 5'-GAC TTC CGC TTT AAC AAC-3'). Χρησιμοποιώντας τους εκκινητές REP_F του *rep* γονιδίου και

ORF3_R του *orf3* γονιδίου εξετάστηκε το αν τα τρία γονίδια συν-μεταγράφονται. Σε όλες τις περιπτώσεις ελέγχθηκε η ύπαρξη υπολειμματικού DNA χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα αρνητικά δείγματα ελέγχου.

5.2.7. Υβριδισμός κατά Southern για την ανίχνευση μονόκλωνων μορίων DNA (single-stranded DNA - ssDNA)

Ο υβριδισμός κατά Southern επιστρατεύτηκε για την ανίχνευση μονόκλωνων μορίων DNA, σύμφωνα με τους [Leenhouts et al. \(1991\)](#). Συγκεκριμένα, οι *Lb. acidiphiscis* και *P. pentosaceus* αναπτύχθηκαν μέχρι τη λογαριθμική φάση (OD₆₁₀ ~0.7) με ή χωρίς την προσθήκη ριφαμπικίνης (Sigma) και στη συνέχεια εκχυλίστηκε το ολικό DNA. Η ριφαμπικίνη προστέθηκε στις καλλιέργειες σε τελική συγκέντρωση 100 µg/mL (για 45 min). Το εκχυλισμένο DNA (από τις καλλιέργειες χωρίς την προσθήκη ριφαμπικίνης) επώαστηκε με το ένζυμο S1 νουκλεάση (2500 U/mL; Fermentas, St Leon-Rot, Germany) στους 37° C για 30 min. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση του DNA σε πηκτή αγαρόζης 0.8% (w/v) σε μη μετουσιωτικές συνθήκες και μεταφορά του αποτυπώματος σε θετικά φορτισμένη νάιλον μεμβράνη (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany). Ο ιχνηλάτης υβριδοποίησης (hybridization probe) ήταν τμήμα του γονιδίου *rep* και επισημάνθηκε χρησιμοποιώντας το PCR DIG probe synthesis Kit (Roche) με τους εκκινητές 5'-GCT AAG AAG TTC ATT GCG AGT T-3' (forward) και 5'-ACC CTT ATC AAC GTC CTC-3' (reverse) για το πλασμίδιο pLAC1 και 5'-AGG GTA TGT TCG TTC TAC TG-3' (forward) και 5'-GGT TCT GGC AAT TCT TCC-3' (reverse) για το πλασμίδιο pPS1. Ο υβριδισμός και η ανίχνευση των αποτυπωμάτων των νουκλεϊκών οξέων πραγματοποιήθηκε με το DIG Nucleic Acid Detection Kit (Roche), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή.

5.2.8. Προσδιορισμός του σχετικού αριθμού αντιγράφων των πλασμιδιακών μορίων

Ο σχετικός αριθμός αντιγράφων των πλασμιδίων (Plasmid Copy Number, PCN) προσδιορίστηκε με τη ποσοτική μέθοδο PCR πραγματικού χρόνου (real-time Q-PCR) σύμφωνα με τους [Skulj et al. \(2008\)](#). Ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν αυτά που υπάρχουν σε ένα μόνο αντίγραφο στα γονιδιώματα των βακτηρίων. Συγκεκριμένα για τον *Lb. acidiphiscis* ACA-DC 1533 πολλαπλασιάστηκε ένα τμήμα 61 bp του γονιδίου *nifU* με τους εκκινητές (forward) 5'-AGC TCT GAC

AGC AAC TCC ATC C-3' και (reverse) 5'-CGG TAT CCA TCC CCA TGA TCT-3', ενώ για τον *P. pentosaceus* ACA-DC 3431 πολλαπλασιάστηκε ένα τμήμα 61 bp του γονιδίου της D-γαλακτικής δεϋδρογενάσης (*ldhA*) με τους εκκινητές (forward) 5'-TTC GCA CAG ATG CAT GAT GG-3' και (reverse) 5'- TGT CAA TCA AGC TAC CGC GAG-3' που σχεδιάστηκαν με βάση την αλληλουχία του γονιδίου *ldhA* του *Pediococcus pentosaceus* ATCC 25745. Για τα πλασμίδια επιλέχθηκε τμήμα του γονιδίου *rep* που πολλαπλασιάστηκε με τους εκκινητές (forward) 5'-GAG CCA GTT GTG CAT GTT GAA A-3' και (reverse) 5'-GCA GAG AAC CAG TAC CTT TGC G-3' για το pLAC1 και τους εκκινητές (forward) 5'- ATT GGC TAT GGC GGC TTA CTG-3' και (reverse) 5'- ATC ACC GTT ATC GGC ATC GTC -3' για το pPS1. Οι αντιδράσεις έγιναν στη συσκευή MX3005P (Stratagene, La Jolla, CA) χρησιμοποιώντας το Power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο σχετικός αριθμός των πλασμιδιακών αντιγράφων προσδιορίστηκε με την εξίσωση $PCN = (E_c)^{C_{tc}} / (E_p)^{C_{tp}}$ που λαμβάνει υπ' όψιν τις διαφορετικές αποδόσεις της αντίδρασης (efficiency, E) αλλά και τη διαφορά των ορίων κύκλου (Cycle Threshold, C_T) μεταξύ των δυο αμπλικονίων (χρωμοσωμικού-c και πλασμιδιακού-p). Το πείραμα επαναλήφθηκε σε τρία ανεξάρτητα δείγματα και παρουσιάζονται οι μέσες τιμές.

5.3. Αποτελέσματα και συζήτηση

5.3.1. Χαρακτηρισμός του πλασμιδίου pLAC1 του *Lactobacillus acidipiscis* ACA-DC 1533

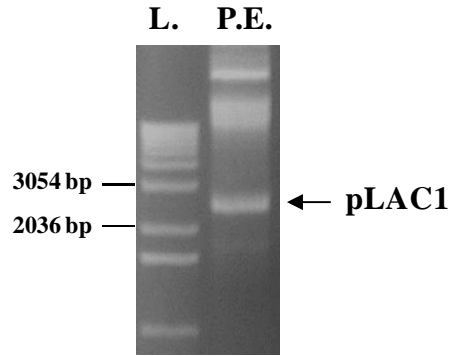
5.3.1.1. Ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και σχολιασμός του pLAC1

Σε αυτή την Παράγραφο, παρουσιάζεται η απομόνωση, κλωνοποίηση και αλληλούχηση του πλασμιδίου pLAC1 από τον *Lb. acidipiscis* ACA-DC 1533. Επιπλέον, παρουσιάζεται η συγκριτική ανάλυση του pLAC1 με συγγενικά του πλασμίδια του γένους *Lactobacillus*.

Στο Κεφάλαιο 2 αναφέρθηκε η απομόνωση του *Lb. acidipiscis* από το δείγμα της παραδοσιακής Κοπανιστής που είχε παρασκευαστεί από νοπό αγελαδινό γάλα. Το στέλεχος αυτό παρουσίασε ενδιαφέρουσες βιοχημικές ιδιότητες, κυρίως όσον αφορά την παραγωγή πτητικών ενώσεων που είναι σημαντικές για την ανάπτυξη του αρώματος στα τυριά αλλά επίσης παρουσίασε έναν ευδιάκριτο αλοανθεκτικό φαινότυπο. Στο Κεφάλαιο 4 αναφέρθηκε η μελέτη των μεταγραφικών αλλαγών του στελέχους *Lb. acidipiscis* ACA-DC 1533 σε υπερωσμωτικές συνθήκες. Ένα από τα διαφορικά εκφραζόμενα γονίδια βρέθηκε να έχει ομοιότητα με τμήμα γονιδίου του πλασμιδίου pWCFS103 που ανήκει στον *Lactobacillus plantarum*. Λαμβάνοντας υπόψη αυτό το αποτέλεσμα, η ενότητα αυτή επικεντρώθηκε στη διερεύνηση του πλασμιδιακού περιεχόμενο αυτού του στελέχους.

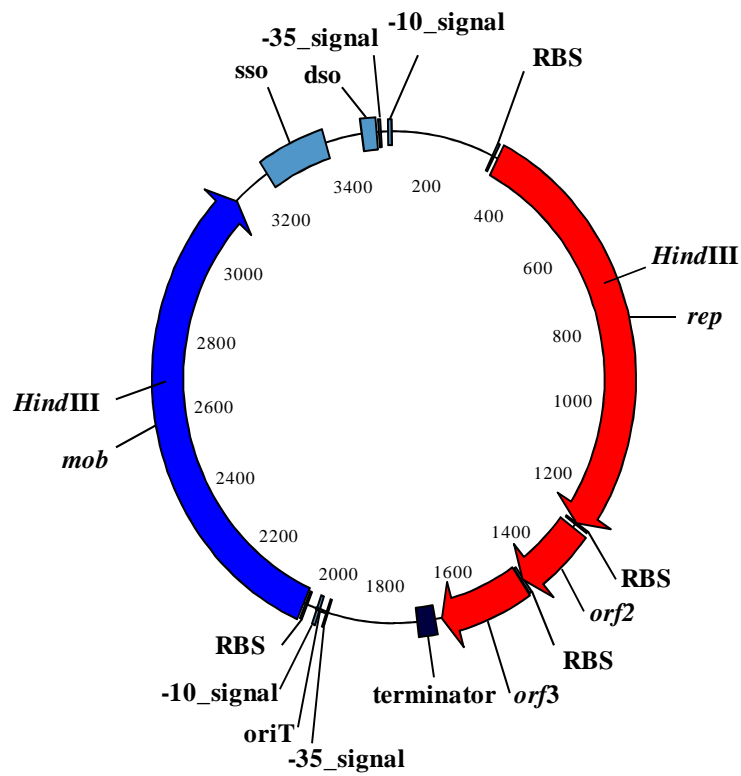
Στην **Εικόνα 5.1** φαίνεται το πλασμιδιακό κλάσμα του *Lb. acidipiscis* ACA-DC 1533. Το καθαρό πλασμίδιο pLAC1 υποβλήθηκε σε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *Hind*III και τα δύο νουκλεοτιδικά τμήματα που προέκυψαν (κατά προσέγγιση 1.6 και 2.0 kb) συνδέθηκαν στο φορέα pUC18.

Η ανάλυση της αλληλουχίας του πλασμιδίου pLAC1 έδειξε ότι πρόκειται για ένα κυκλικό μόριο DNA μεγέθους 3478 bp με 37.2% ποσοστό G+C. Η αλληλουχία του πλασμιδίου pLAC1 κατατέθηκε στη βάση δεδομένων EMBL με αριθμό κατοχύρωσης (accession number) FN667595. Ο γενετικός χάρτης του pLAC1 παρουσιάζεται στο **Γράφημα 5.1**. Μετά από την *ab initio* ανάλυση προσδιορίστηκαν τέσσερα πιθανά *orfs* με τον ίδιο προσανατολισμό. Το *orf1* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη-εκκινητή αντιγραφής (replication initiation protein, Rep) μήκους 318 αμινοξέων ενώ



Εικόνα 5.1.

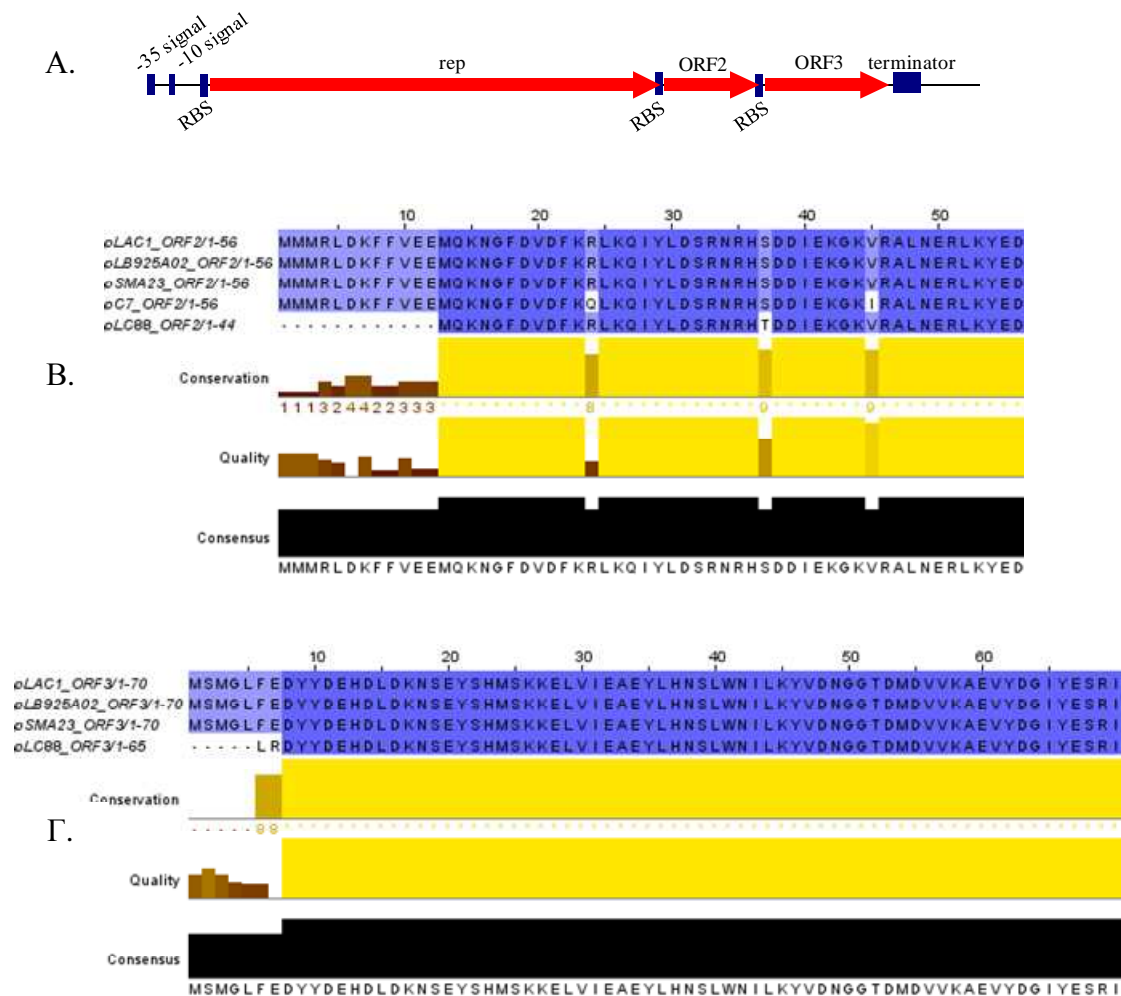
Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης του πλασμιδιακού DNA του *Lb. acidipiscis* ACA-DC 1533 (διαδρομή P.E.). Διαδρομή L: 1 kb DNA ladder (Invitrogen).



Γράφημα 5.1.

Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pLAC1 με τα δομικά του στοιχεία.

το *orf4* μια πρωτεΐνη κινητοποίησης (mobilization protein, Mob) μήκους 362 αμινοξέων, σύμφωνα με την ομολογία τους με ήδη χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες από άλλα πλασμίδια οξυγαλακτικών βακτηρίων. Στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που προηγούνται των κωδικονίων έναρξης ATG, τόσο του *rep* όσο και του *mob* γονιδίου, ανιχνεύτηκαν πιθανοί υποκινητές (promoters, -35 και -10 αλληλουχίες) αλλά και σημεία πρόσδεσης ριβοσωμάτων (Ribosome Binding Sites, RBS) (Γράφημα 5.1). Τα *orf2* και *orf3* εντοπίστηκαν στη περιοχή μετά το *rep* γονίδιο σε διαδοχική διάταξη. Για κανένα από αυτά τα δύο *orfs* δεν βρέθηκαν υποκινητές αλλά αναγνωρίστηκαν πιθανά RBS, τα οποία αλληλεπικαλύπτονταν με τα κωδικόνια τερματισμού των προηγούμενων γονιδίων. Επίσης προσδιορίστηκε μια αλληλουχία τερματισμού ακολούθως του *orf3*. Η ανάλυση της περιοχής *rep*, *orf2* και *orf3* του πλασμιδίου pLAC1 με το λογισμικό FGENESB πρόβλεψε την ύπαρξη τυπικής δομής οπερονίου. Οι προκύπτουσες πρωτεΐνες των *orf2* και *orf3* δεν έδειξαν σημαντική ομολογία με άλλες γνωστές πρωτεΐνες κατά τη αναζήτηση BLASTP. Παρόλα αυτά, όταν επιχειρήθηκε η ανάλυση TBLASTN και για τα δυο *orfs*, ανιχνεύτηκαν αλληλουχίες που δυνητικά κωδικοποιούν ομόλογες πρωτεΐνες με τις πιθανές Orf2 και/ή Orf3 στο πλασμίδιο pLB925A02 που απομονώθηκε από τον *Lactobacillus brevis* (Wada *et al.*, 2009), στα pSMA23 και pLC88 που απομονώθηκαν από τον *Lactobacillus casei* (Sudhamani *et al.*, 2008, GenBank Acc. No. U31333 - άμεση κατάθεση στη βάση δεδομένων GenBank) και στο pC7 που απομονώθηκε από τον *Lactobacillus paraplantarum* (Park *et al.*, 2004). Σύμφωνα με τον αρχικό σχολιασμό των πλασμιδίων, όπως αυτός είναι κατατεθειμένος στη βάση δεδομένων GenBank, δεν περιγράφονται αυτά τα δυο πιθανά *orfs*. Παρόλα αυτά, η ύπαρξη παρόμοιων αλληλουχιών με τα *orf2* και *orf3* έχει αναφερθεί για τα πλασμίδια pSMA23 και pLC88 (Sudhamani *et al.*, 2008). Η προηγούμενη ανάλυση αυτών των αλληλουχιών έδειξε μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου και πρόωρο τερματισμό και για τα δυο *orfs* στην περίπτωση του pSMA23 σε σχέση με το pLC88 (Sudhamani *et al.*, 2008). Για αυτό το λόγο, οι ερευνητές αυτής της μελέτης υποστήριζαν ότι οι πιθανές πρωτεΐνες των δυο *orfs* ενδεχομένως να μην είναι λειτουργικές στο pSMA23. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε εκ νέου σχολιασμός των πλασμιδίων αυτών, ο οποίος και απέδειξε την ύπαρξη των *orf2* και *orf3* σε όλες τις περιπτώσεις ενώ επίσης προσδιορίστηκε μια παρόμοια δομή οπερονίου των *rep*, *orf2* και *orf3* για τα πλασμίδια pLB925A02, pSMA23 και pLC88 με εξαίρεση το pC7, όπου το *orf3* δεν υπάρχει (Γράφημα 5.2.A).



Γράφημα 5.2.

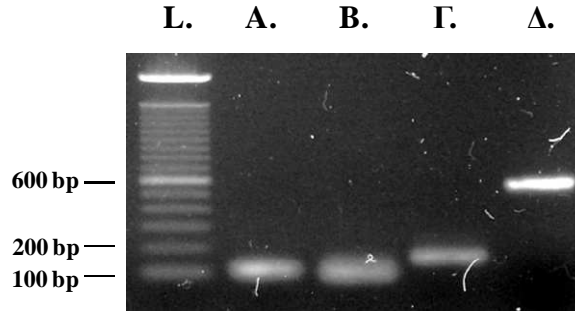
Προβλεπόμενη δομή του οπερονίου των *rep*, *orf2* και *orf3* γονιδίων (Α). Στοίχιση πολλαπλών ακολουθιών των αμινοξικών προϊόντων των *orf2* (Β) και *orf3* (Γ) με τις συγγενικές προκύπτουσες πρωτεΐνες, όπως αυτή πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα MUSCLE και απεικονίστηκε με το πρόγραμμα Jalview.

Η MSA ανάλυση των Orf2 (Γράφημα 5.2.Β) έδειξε ότι αυτές οι πρωτεΐνες είναι ακριβώς ίδιες στα πλασμίδια pLAC1, pLB925A02 και pSMA23 ενώ για το pC7 βρέθηκαν δυο συντηρημένες μεταλλάξεις [θέση 24: αργινίνη (R) με γλουταμίνη (Q) και θέση 45: βαλίνη (V) με ισολευκίνη (I)]. Η Orf2 πρωτεΐνη του πλασμιδίου pLC88 ήταν κατατεταγμένη κατά 12 αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο της ενώ το υπόλοιπο πολυπεπτίδιο ήταν ακριβώς ίδιο με τις υπό εξέταση πρωτεΐνες με μια συντηρημένη μετάλλαξη [θέση 37: σερίνη (S) με θρεονίνη (T)]. Η πρωτεΐνη Orf3 ήταν πανομοιότυπη στα πλασμίδια pLAC1, pLB925A02 and pSMA23 και κατατεταγμένη κατά πέντε αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο για το pLC88 (Γράφημα 5.2.Γ). Επιπλέον,

η Orf3 του pLC88 είχε δυο μη συντηρημένες μεταλλάξεις [θέση 6: φαινυλαλανίνη (F) με λευκίνη (L) και θέση 7: γλουταμινικό οξύ (E) με αργινίνη (R)] με την πρώτη να οφείλεται στο διαφορετικό κωδικόνιο έναρξης TTG. Συνεπώς, σε αντίθεση με ό,τι έχει ήδη αναφερθεί ([Sudhamani et al., 2008](#)), τα προαναφερθέντα ευρήματα δείχνουν σαφώς ότι οι πρωτεΐνες Orf2 και Orf3 του pSMA23 ακολουθούν τη συναινετική αμινοξική αλληλουχία (consensus sequence) και ότι οι Orf2 και Orf3 του pLC88 διαφοροποιούνται από την περικοπή τους στο αμινοτελικό άκρο.

Η προηγούμενη ανάλυση έδειξε με σαφή τρόπο ότι τα *rep*, *orf2* και/ή *orf3* αποτελούν μέρος ενός λειτουργικού οπερονίου στα πλασμίδια pLAC1, pLB925A02, pSMA23, pLC88 και pC7. Για την επιβεβαίωση αυτής της *in silico* πρόβλεψης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RT-PCR με ζεύγη εκκινητών σχεδιασμένα και για τα τρία γονίδια ([Εικόνα 5.2](#)). Και στις τρεις περιπτώσεις ανιχνεύτηκαν ζώνες DNA του αναμενόμενου μεγέθους αποκαλύπτοντας συνεπώς ότι τα τρία γονίδια εκφράζονται. Επιπρόσθετα, όταν στο cDNA χρησιμοποιήθηκαν οι ακραίοι εκκινητές REP_F και ORF3_R τότε πολλαπλασιάστηκε ένα τμήμα DNA 573 bp που εκτείνεται και στα τρία γονίδια, επιβεβαιώνοντας ότι αυτά μεταγράφονται σε ένα πολυσιστρονικό μόριο mRNA. Θα πρέπει να υπογραμμισθεί ότι επί του παρόντος δεν μπορεί να εξαχθεί πρόβλεψη για τη λειτουργικότητα των Orf2 και Orf3 καθώς καμία από αυτές δεν παρουσιάζει ομοιότητα με άλλες γνωστές πρωτεΐνες. Παρόλα αυτά, το γεγονός ότι ανήκουν στο ίδιο οπερόνιο με την Rep πρωτεΐνη οδηγεί στην υπόθεση ότι ενδεχομένως συμμετέχουν κατά κάποιο τρόπο στον πολλαπλασιασμό του πλασμιδίου που αποτελεί μια διαδικασία, της οποίας ο έλεγχος για το pLAC1 και τα συγγενικά πλασμίδια παραμένει άγνωστος ([Wada et al., 2009](#), [del Solar et al., 1998](#)) και χρήζει πειραματικής επιβεβαίωσης.

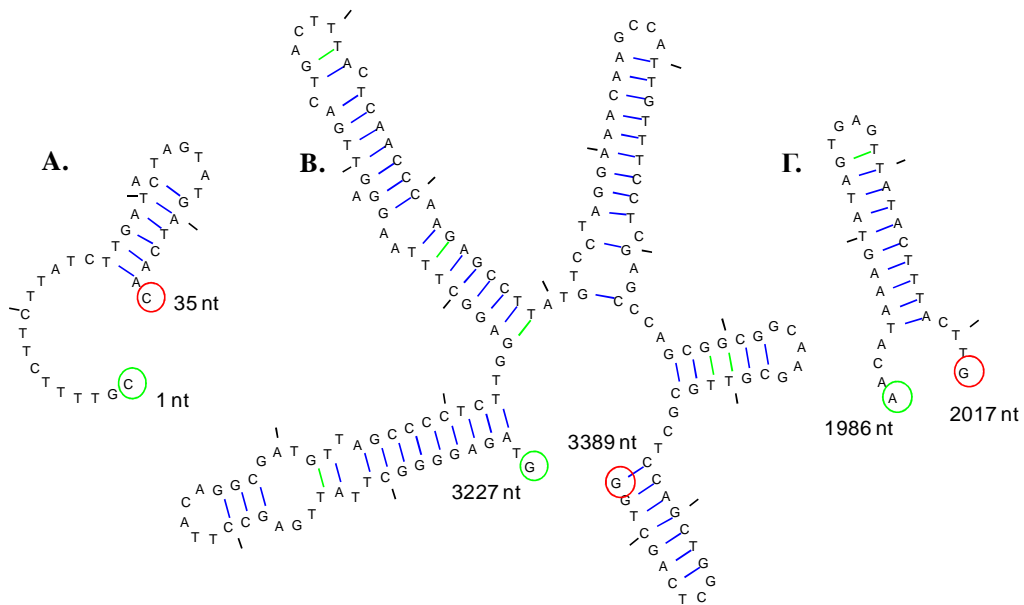
Περαιτέρω ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του pLAC1 οδήγησε στην ανίχνευση σημαντικών *cis*-ενεργούντων στοιχείων. Έτσι, εντοπίστηκε ένα πιθανό σημείο έναρξης αναδιπλασιασμού της διπλής αλυσίδας (putative double-strand origin, dso) στην περιοχή που προηγείται του γονιδίου *rep* μήκους 35 nt που είχε υψηλή ομοιότητα με τα αντίστοιχα των πλασμιδίων pLB925A02, pSMA23 και pLC88. Η αντιστραμμένη επανάληψη που βρέθηκε στην περιοχή αυτή μαζί με τη χαρακτηριστική δομή φουρκέτας (με -1.8 kcal/mol ελεύθερη ενέργεια, ΔG), παρουσιάζεται στο [Γράφημα 5.3.A](#). Επιπρόσθετα, πριν από το dso προβλέφθηκε το σημείο έναρξης αντιγραφής της μονής αλυσίδας (single-strand origin, sso) με αρκετές αντιστραμμένες επαναλήψεις και $\Delta G = -68.6$ kcal/mol ([Γράφημα 5.3.B](#)), όπως επίσης



Εικόνα 5.2.

Η πειραματική επιβεβαίωση της ύπαρξης του *rep-orf2-orf3* οπερονίου με τη μέθοδο RT-PCR. Διαδρομή L: 100 bp DNA ladder (Invitrogen). Διαδρομές A μέχρι Δ: εσωτερικά τμήματα των γονιδίων *rep*, *orf2*, *orf3* και του οπερονίου *rep-orf2-orf3*.

έχει αναφερθεί για τα πλασμίδια pSMA23 και pLC88. Τέλος, ανιχνεύτηκε το πιθανό σημείο έναρξης μεταφοράς (origin of transfer, *oriT*) μήκους 32 bp στην περιοχή πριν από το γονίδιο *mob*, το οποίο ήταν σχεδόν ταυτόσημο με το *oriT* του πλασμιδίου pSMA23. Το *oriT* αποτελείται από μια αντιστραμμένη επανάληψη ($\Delta G = -6.8$ kcal/mol), ο βρόγχος της οποίας φέρει τη θέση εγκοπής του DNA (TGA'G) (Γράφημα 5.3.Γ).

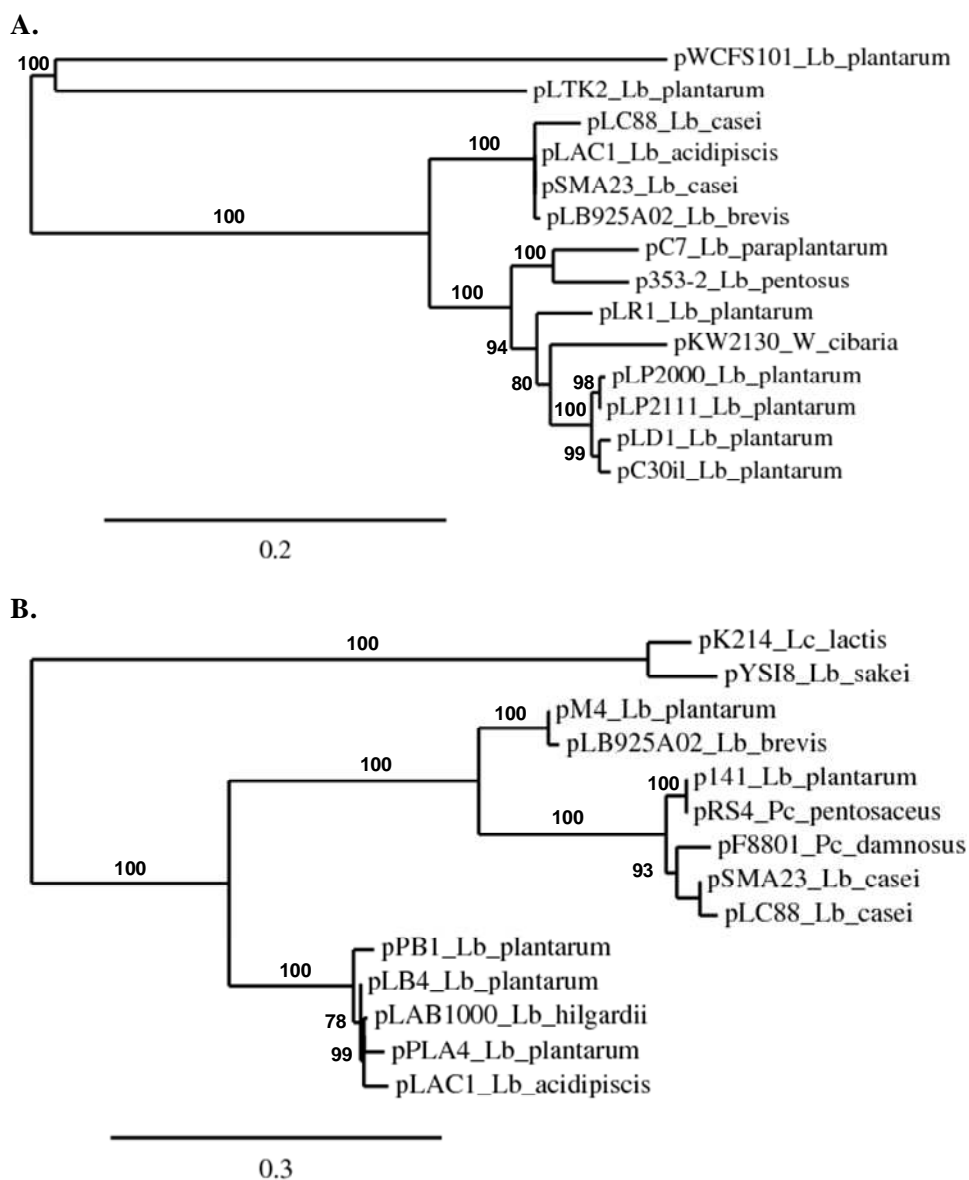


Γράφημα 5.3.

Προσομοίωση της δευτεροταγούς δομής της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των πιθανών *dso* (A), *sso* (B) και *oriT* (Γ), όπως αυτή προβλέφθηκε με το πρόγραμμα Kodon. Οι αντιστραμμένες επαναλήψεις με τους βρόγχους παρουσιάζονται ως φουρκέττες.

5.3.1.2. Συγκριτική ανάλυση του pLAC1 με τα συγγενικά του πλασμίδια

Η αναζήτηση BLASTP της πρωτεΐνης Rep του pLAC1 κατέδειξε 100% ομοιότητα με την αντίστοιχη του πλασμιδίου pSMA23. Η φυλογενετική ανάλυση των πρωτεϊνών Rep ομαδοποίησε την Rep του pLAC1 με τις αντίστοιχες των πλασμιδίων pSMA23, pLB925A02 και pLC88 (Γράφημα 5.4.A). Αυτά τα πλασμίδια έχουν χαρακτηριστεί σε προηγούμενες μελέτες ως μέλη της οικογένειας πλασμιδίων pC194 που πολλαπλασιάζονται με το μηχανισμό κυλιόμενης αντιγραφής (rolling-circle replicating, RCR). Η ομολογία της πρωτεΐνης Rep αλλά και της αλληλουχίας dso, υποδηλώνει ότι και το pLAC1 ανήκει στην ίδια οικογένεια (Khan, 1997). Η ανάλυση MSA της πρωτεΐνης Mob του pLAC1 με τις συγγενικές της, σύμφωνα με τις BLASTP ομολογίες, αποκάλυψε την ύπαρξη τριών συντηρημένων μοτίβων (Μοτίβο I: GxxxHxxR, Μοτίβο II: NYD/EL, Μοτίβο III: HxDExxPHMHxGxxP), κατατάσσοντας με αυτόν τον τρόπο την Mob στον Κλάδο A της υπεριοικογένειας ρελαξασών pMV158 (Francia *et al.*, 2004). Το φυλογενετικό δέντρο της πρωτεΐνης Mob (Γράφημα 5.4.B) έδειξε ότι σε αντίθεση με την Rep, η Mob του pLAC1 παρουσίασε μέγιστη συγγένεια με τις αντίστοιχες των πλασμιδίων pLAB1000 (απομονωμένου από τον *Lactobacillus hilgardii*, Josson *et al.*, 1990) και pLB4, pPLA4 και pPB1 (όλα απομονωμένα από τον *Lactobacillus plantarum*, Bates & Gilbert, 1989, de las Rivas *et al.*, 2004, Van Reenen *et al.*, 2006). Αυτό το γεγονός αποτελεί ένα σημαντικό εύρημα καθώς τα pLB4 και pPB1 ανήκουν στην οικογένεια pE194 των πλασμιδίων RCR, το pPLA4 πολλαπλασιάζεται με το μηχανισμό θήτα αντιγραφής και μόνο το pLAB1000 είναι μέλος της pC194 οικογένειας. Αυτά τα δυο διαφορετικά πρότυπα ομοιότητας των πρωτεϊνών Rep and Mob του pLAC1, υποδηλώνουν ότι αυτές οι δυο πλασμιδιακές περιοχές ενδεχομένως προήλθαν από διαφορετικές πηγές ως αποτέλεσμα μιας εξελικτικής διαδικασίας συναρμολόγησης.



Γράφημα 5.4.

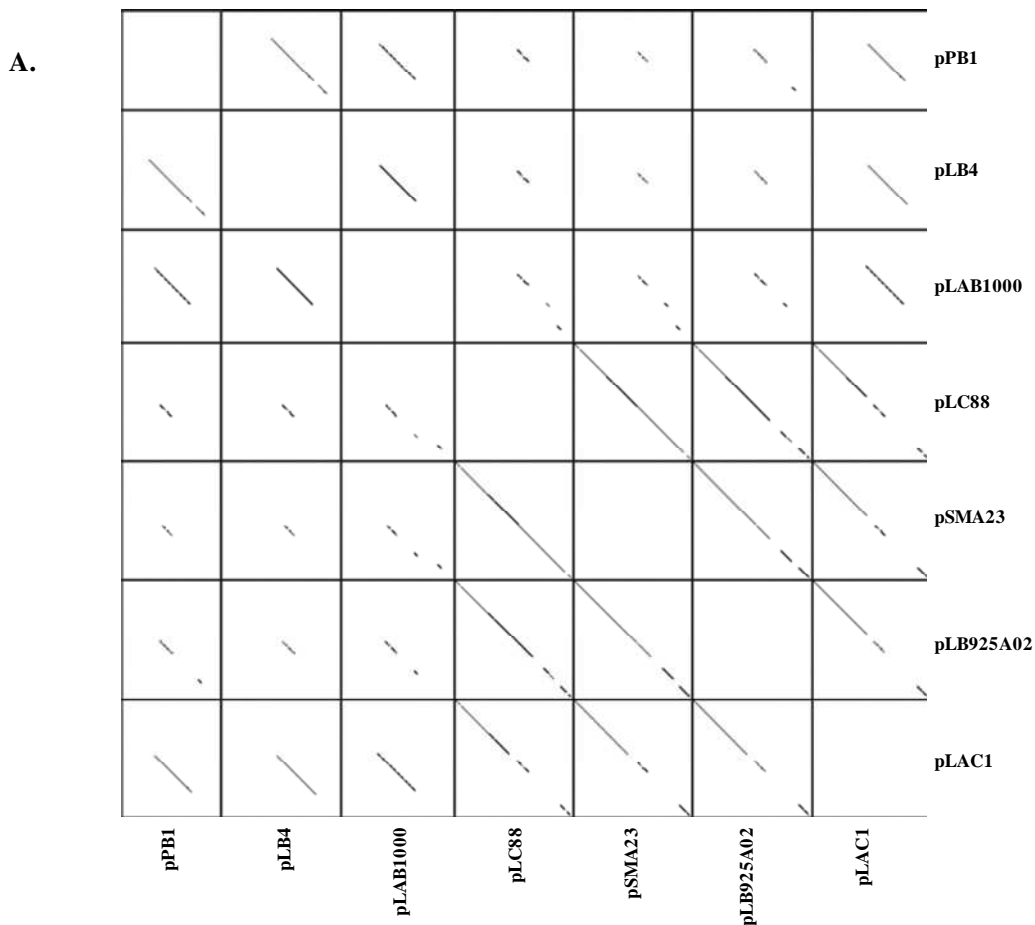
Φυλογενετικό δέντρο των πρωτεϊνών Rep (A) και Mob (B) κατασκευασμένο με το πρόγραμμα PhyML (μέθοδος μεγίστης πιθανότητας, maximum likelihood). Ο στατιστικός έλεγχος των φυλογενετικών δέντρων για την εμπιστοσύνη των κλάδων (branch support %) πραγματοποιήθηκε με το παραμετρικό τεστ aLRT χρησιμοποιώντας το μοντέλο υποκατάστασης WAG.

Για την περαιτέρω διαλεύκανση αυτής της παρατήρησης πραγματοποιήθηκε διερεύνηση ολόκληρου του μήκους της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των πλασμιδίων. Για το σκοπό αυτό ακολουθήθηκε μια συγκριτική προσέγγιση προκειμένου να εξεταστεί η σχέση του pLAC1 με τα πλασμίδια pSMA23, pLB925A02 και pLC88, (των οποίων οι πρωτεΐνες Rep εμφάνισαν μεγάλη ομοιότητα με την Rep του pLAC1),

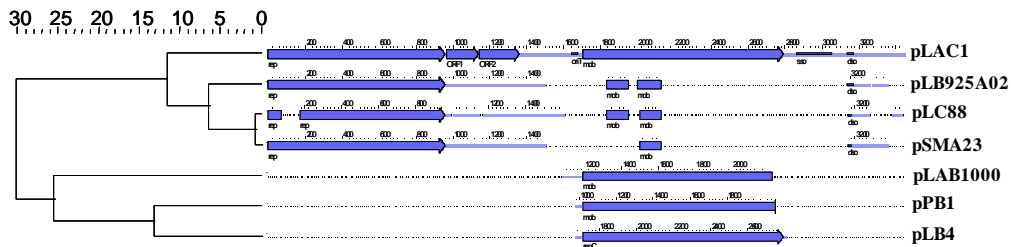
καθώς και με τα pLAB1000, pLB4 και pPB1 (των οποίων οι πρωτεΐνες Mob ήταν ομόλογες με την αντίστοιχη του pLAC1). Η ανάλυση επικεντρώθηκε σε πλασμίδια με παρόμοιο γονιδιακό περιεχόμενο και μέγεθος μορίου (και συγκεκριμένα 2-4 γονίδια, ~3.5 kb) εξαιρώντας έτσι το pPLA4 που διέφερε και στους δύο τομείς (6 γονίδια, ~8 kb). Οι μήτρες σημειακών γραφημάτων (dot plot matrices) χρησιμοποιήθηκαν για την απεικόνιση των περιοχών που παρουσίασαν υψηλή ομοιότητα μεταξύ των πλασμιδιακών αλληλουχιών (Γράφημα 5.5.A). Με την ανάλυση αυτή προσδιορίστηκαν ευδιάκριτες ομοιότητες αλλά και διαφορές στην αρχιτεκτονική των πλασμιδίων. Η περιοχή του pLAC1 ρεπλικονίου (*rep* γονίδιο και *dso*) έδειξε εκτεταμένη ομοιότητα με τα πλασμίδια pLB925A02, pSMA23 και pLC88 (σε όλες τις περιπτώσεις $\geq 97\%$). Εν αντιθέσει, η περιοχή του pLAC1 που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Mob, αποδείχθηκε σχεδόν ταυτόσημη με τις αντίστοιχες περιοχές των pLAB1000, pLB4 και pPB1 (σε όλες τις περιπτώσεις ομοιότητα $\geq 96\%$). Επισημαίνεται, ότι ενώ τα pLB925A02, pSMA23 και pLC88 ήταν παρόμοια στο σύνολο της αλληλουχίας τους, τα πλασμίδια pLAB1000, pLB4 και pPB1 παρουσίασαν ομολογία μόνο στην έκταση της *mob* περιοχής.

Στο Γράφημα 5.5.B παρουσιάζεται η ομαδοποίηση των πλασμιδίων κατά UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) βάση των βαθμολογιών της συστοίχισης κατά ζεύγη (pairwise alignment scores). Επιπλέον, η στοίχιση του πλήρους μήκους των συγχρονισμένων αλληλουχιών δείχνει τις εκτάσεις ομολογίας για τις περιοχές που κωδικοποιούν αλλά και τις μη κωδικοποιούσες περιοχές έχοντας το pLAC1 ως αλληλουχία αναφοράς. Όπως ήταν αναμενόμενο, η πρώτη ομάδα που περιλαμβάνει τις αλληλουχίες των πλασμιδίων pLAC1, pLB925A02, pSMA23 και pLC88 είχε υψηλό ποσοστό ομοιότητας ($\geq 97\%$) στα πρώτα 1450 νουκλεοτίδια που αντιστοιχούν στο *rep-orf2-orf3* οπερόνιο.

Στην περιοχή του γονιδίου *mob* εντοπίστηκαν μόνο δύο καθορισμένα όμοια τμήματα (κατά προσέγγιση 150-200 bp, ομοιότητα $\geq 80\%$). Αυτά τα τμήματα ενδεχομένως αντανακλούν ένα σχετικό βαθμό συντήρησης σε νουκλεοτιδικό επίπεδο καθώς σε αμινοξικό επίπεδο όλες αυτές οι πρωτεΐνες ανήκουν στην υπεροικογένεια των ρελαξασών pMV158 (Francia *et al.*, 2004). Μια σχεδόν πανομοιότυπη περιοχή, μεταβλητού μήκους ωστόσο, βρέθηκε επίσης στο *dso* και στην επακόλουθη του αλληλουχία. Η δεύτερη ομάδα εμφάνισε υψηλή ομοιότητα ($\geq 96\%$) αποκλειστικά στην περιοχή των γονιδίων *mob* των pLAB1000, pLB4 και pPB1 παρουσιάζοντας μια



B.



Γράφημα 5.5.

Μήτρες σημειακών γραφημάτων των συγχρονισμένων πλασμιδιακών αλληλουχιών (A). Κάθε κελί παριστά τη σχέση των δυο αλληλουχιών με την μια αλληλουχία να αναφέρεται στον άξονα X και την άλλη στον άξονα Y. Τα μαύρα σημεία αντιπροσωπεύουν την ομολογία των δυο αλληλουχιών. (B). Η στοίχιση και η ομαδοποίηση των συγχρονισμένων πλασμιδιακών αλληλουχιών με τα δομικά τους στοιχεία. Η ομαδοποίηση των πλασμιδίων βασίστηκε στις τιμές ομοιότητας κατά ζεύγη (pairwise identity scores), χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο UPGMA. Όλες οι αλληλουχίες συγχρονίστηκαν έχοντας σαν αρχή το νουκλεοτίδιο A του ATG κωδικονίου έναρξης του γονιδίου *rep*. Τα κοινά γονίδια των πλασμιδίων παρουσιάζονται με το ίδιο χρώμα. Το pLAC1 αποτέλεσε το πλασμίδιο αναφοράς.

πλήρη επικάλυψη στην περιοχή του *oriT* ανάμεσα στα πλασμίδια pLAC1 και pLAB1000.

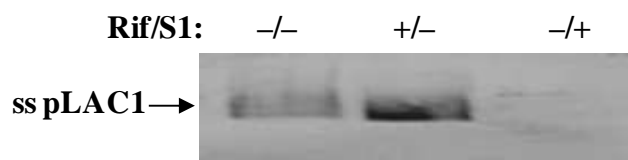
Αυτά τα δεδομένα αποδεικνύουν ότι το pLAC1 φέρει έναν πολύ παρόμοιο σκελετό αντιγραφής με τα πλασμίδια pLB925A02, pSMA23 και pLC88 και ότι απέκτησε το γονίδιο *mob* από μια διαφορετική πηγή, πιθανώς μέσω ενός προγονικού συμβάντος ανασυνδυασμού. Σε αντιπαράθεση, ο σκελετός αντιγραφής των pLAB1000, pLB4 και pPB1 δεν παρουσιάζει ομοιότητα μεταξύ τους αλλά ούτε και με τον αντίστοιχο του pLAC1. Εν τούτοις, το γεγονός ότι η πρωτεΐνη Mob των συγκεκριμένων πλασμιδίων παρουσιάζει υψηλό ποσοστό ομολογίας που επεκτείνεται και σε επίπεδο γονιδίων υποστηρίζει το γεγονός ότι όχι μόνο το pLAC1 αλλά και τα πλασμίδια pLAB1000, pLB4 και pPB1 εισήγαγαν ξεχωριστά το γονίδιο *mob* στην αλληλουχία τους και ότι η εν λόγω απόκτηση πιθανώς προέρχεται από κοινή πηγή.

Τα ευρήματα αυτά είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες. Πιο αναλυτικά, οι [de las Rivas et al. \(2004\)](#) αναφέρουν ότι το pPB1 είναι χίμαιρα που αποτελείται από δύο υπομονάδες, μια απορρέουσα από το πλασμίδιο pC1411 στην περιοχή *rep* και μια από το pLB4 στην περιοχή *mob*. Μάλιστα, η συγκεκριμένη *mob* υπομονάδα φέρεται να έχει μοιραστεί και ανάμεσα στα πλασμίδια pLAB1000 και pPB1, αλλά και στο πλέον αποκλίνον πλασμίδιο pPLA4 θήτα αντιγραφής ([Van Reenen et al., 2006](#)). Επιπλέον, για τα πλασμίδια pSMA23 και pLC88 έχει δειχθεί ότι αν και είναι σχεδόν ταυτόσημα, τα γονίδια τους *mob* και *rep* προέρχονται από διαφορετικές πηγές ([Sudhamani et al., 2008](#)). Τέλος, οι [Alegre et al. \(2005\)](#) υποστηρίζουν ότι το pRS4 έχει σχηματιστεί από τα pLC88 και pWCFS101.

5.3.1.3. Ανίχνευση μονόκλωνων μορίων DNA με εφαρμογή του υβριδισμού κατά Southern

Η σύνθεση ενδιάμεσων μονόκλωνων μορίων DNA που είναι ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των πλασμιδίων RCR ([del Solar et al., 1998](#)) επιβεβαιώθηκε από το θετικό σήμα στο δείγμα DNA που δεν είχε υποστεί επεξεργασία με την S1 νουκλεάση και το αρνητικό σήμα στο αντίστοιχο επεξεργασμένο DNA με το ίδιο ένζυμο ([Εικόνα 5.3](#)). Όταν το βακτήριο αναπτύχθηκε σε μέσο που περιείχε ριφαμπικίνη, τότε το θετικό σήμα έγινε πολύ πιο έντονο. Αυτό αποδεικνύει ξεκάθαρα ότι η αναστολή της δράσης της RNA πολυμεράσης του κυττάρου από το συγκεκριμένο αντιβιοτικό οδηγεί στη συσσώρευση μονόκλωνων μορίων DNA εμποδίζοντας τη μετατροπή τους

σε δίκλιωνα μόρια κατά τη διαδικασία αντιγραφής του πλασμιδίου, επιβεβαιώνοντας έτσι τον RCR μηχανισμό αντιγραφής του pLAC1.



Εικόνα 5.3.

Ανίχνευση μονόκλωνων μορίων DNA του pLAC1 με τη μέθοδο του υβριδισμού κατά Southern. Η επεξεργασία των δειγμάτων με ριφαμπικίνη (Rif) ή με S1 νουκλεάση υποδεικνύεται με (+).

5.3.1.4. Προσδιορισμός του αριθμού αντιγράφων του pLAC1

Ο σχετικός αριθμός αντιγράφων των πλασμιδίων (PCN) προσδιορίστηκε με την εξίσωση $PCN = (E_c)^{C_{tc}} / (E_p)^{C_{tp}}$ που λαμβάνει υπ' όψιν τις διαφορετικές αποδόσεις της αντίδρασης (efficiency, E) αλλά και τη διαφορά των ορίων κύκλου (Cycle Threshold, C_T) μεταξύ των δυο αμπλικονίων (χρωμοσωμικού-c και πλασμιδιακού-p) (Skulj *et al.*, 2008). Πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις στο ολικό DNA του *Lb. acidipiscis* που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή καμπυλών αναφοράς για τα γονίδια *rep* και *nifU*. Αυτές οι καμπύλες ήταν γραμμικές ($R^2 > 0.99$) μέσα στο φάσμα συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκε και οι κλίσεις τους ήταν 3.451 and 3.412, αντίστοιχα. Το εκτιμώμενο PCN βρέθηκε να είναι 39 αντίγραφα ανά κύτταρο. Πρέπει να αναφερθεί ότι η φυσική σταθερότητα ενός παρόμοιου με το pLAC1 ρεπλικονίου και συγκεκριμένα του pSMA23 έχει μελετηθεί σε προηγούμενη έρευνα και με βάση την αλληλουχία αυτή κατασκευάστηκαν δυο φορείς για ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών σε γαλακτοβακίλλους (Sudhamani *et al.*, 2008). Στην προαναφερθείσα μελέτη οι *E. coli* - *Lactobacillus* φορείς που έφεραν το γονίδιο *rep* και το *ori* του pSMA23 (π.χ. ο pL11) αναπαράγονταν αποτελεσματικά σε άλλους γαλακτοβακίλλους, όπως στους *Lb. casei* και *Lactobacillus gasseri*. Οι τιμές σταθερότητας για το pL11 ήταν μικρότερες από αυτές που έχουν αναφερθεί για παράγωγα του pWCFS101, αλλά μεγαλύτερες από αυτές του ρεπλικονίου pLTK2 και συνεπώς θεωρήθηκαν ικανοποιητικές για βιοτεχνολογικούς σκοπούς (Sudhamani *et*

al., 2008). Οι ερευνητές αυτοί επίσης συμπέραναν ότι το *mob* γονίδιο δεν είναι απαραίτητο για τον πολλαπλασιασμό των πλασμιδίων στους γαλακτοβακίλλους.

5.3.1.5. Συμπεράσματα

Στην ενότητα περιγράφεται ο χαρακτηρισμός του νέου RCR πλασμιδίου pLAC1 που απομονώθηκε από τον *Lb. acidipiscis* ACA-DC 1533. Η *in silico* ανάλυση υπέδειξε την ύπαρξη ενός νέου οπερονίου που αποτελείται από τα γονίδια *rep*, *orf2* και *orf3*, όχι μόνο στο pLAC1 αλλά και στα πλασμίδια pSMA23, pLC88, pLB925A02 και pC7. Αυτή η πρόβλεψη επιβεβαιώθηκε πειραματικά με την RT-PCR δείχνοντας ότι το οπερόνιο υπάρχει πραγματικά και ότι τα τρία αυτά γονίδια μεταγράφονται πολυσιστρονικά. Η συγκριτική ανάλυση του pLAC1 με τα συγγενικά του πλασμίδια άλλων γαλακτοβακίλλων αποκάλυψε τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ τους και υποδήλωσε την εξελικτική διαδικασία συναρμολόγησης ως μηχανισμό της ποικιλομορφίας στα οξυγαλακτικά βακτήρια.

Η σωστή ταυτοποίηση της πρωτεΐνης Mob ως μονάδας συναρμολόγησης είναι πολύ σημαντική καθώς έχει προταθεί ότι οι περιοχές κινητοποίησης μπορεί να αποδειχθούν πολύ χρήσιμες στο πλαίσιο της ορθότερης ταξινόμησης των κινητοποιήσιμων πλασμιδίων, υπερτερώντας των ισχυόντων κριτηρίων, όπως οι ομολογίες των πρωτεϊνών Rep και των dso (Francia *et al.*, 2004). Στη βιβλιογραφία υπάρχει μια σαφής τάση να εντοπίζονται οι πιθανοί δότες και αποδέκτες των μονάδων συναρμολόγησης. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα τέτοιων εγχειρημάτων επηρεάζονται σοβαρά από τον αριθμό των πλήρως αλληλουχημένων πλασμιδίων που είναι διαθέσιμα κατά τη δεδομένη χρονική στιγμή που λαμβάνει χώρα η ανάλυση. Επί παραδείγματι, σε αντίθεση με ότι έχει αναφερθεί σε προηγούμενη έρευνα (Sudhamani *et al.*, 2008), τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν ότι τα πλασμίδια pSMA23 και pLC88 δεν προήλθαν από συναρμολόγηση αλλά πιθανώς αποτέλεσαν τα ίδια τους δότες.

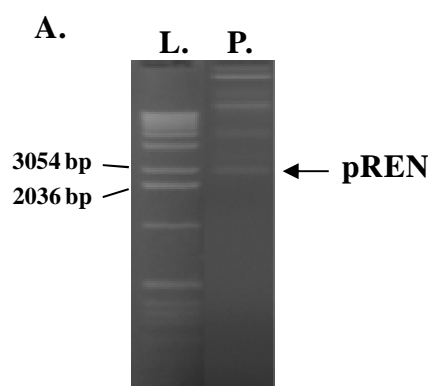
Συμπερασματικά προκύπτει ότι για να σχηματιστεί μια πιο ακριβής άποψη για την εξελικτική διαδικασία συναρμολόγησης των πλασμιδίων είναι απαραίτητο να χαρακτηριστούν περισσότερα τέτοια μόρια.

5.3.2. Χαρακτηρισμός του πλασμιδίου pREN του *Lactobacillus rennini* ACA-DC 1534

Σε αυτήν την ενότητα αναφέρεται η απομόνωση, κλωνοποίηση και χαρακτηρισμός του νέου πλασμιδίου pREN από τον *Lb. rennini* ACA-DC 1534. Ο *Lb. rennini* απομονώθηκε από το δείγμα της Μάνας, όπως αναλυτικά περιγράφεται στο Κεφάλαιο 2. Αποτελεί δε, ένα καινούργιο είδος των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Chenoll *et al.*, 2006) που απομονώθηκε από αλλοιωμένη πυτιά και το πλασμιδιακό του περιεχόμενο δεν έχει διερευνηθεί ποτέ. Επίσης, θα πρέπει να αναφερθεί ότι το συγκεκριμένο είδος πέρα της αρχικής του περιγραφής δεν έχει απομονωθεί στο παρελθόν από καμία πηγή με εξαίρεση την παρούσα μελέτη και ως εκ τούτου δεν υπάρχει κανένα βιβλιογραφικό δεδομένο.

5.3.2.1. Ανάλυση της αλληλουχίας του πλασμιδίου pREN

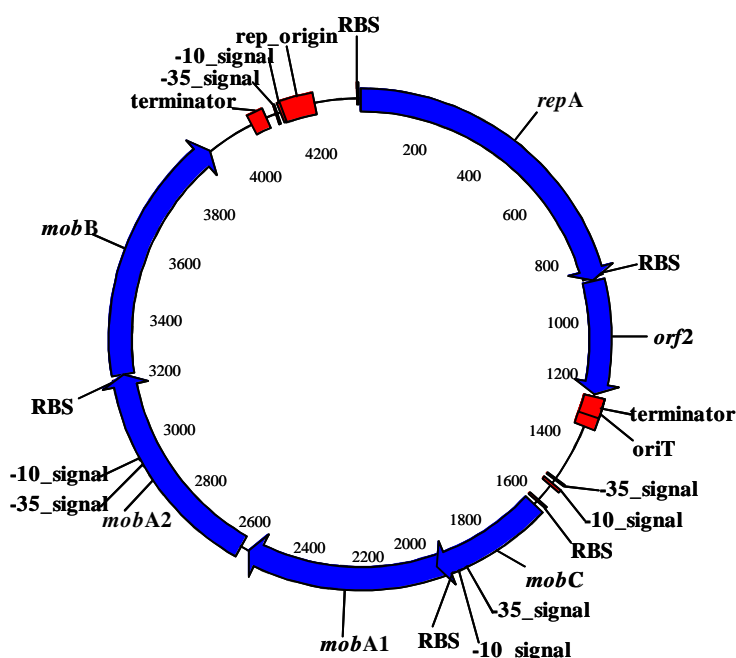
Ο *Lb. rennini* ACA-DC 1534 περιλαμβάνει περισσότερα από ένα πλασμίδια όπως φαίνεται στην **Εικόνα 5.4** και το πλασμίδιο που ορίστηκε ως pREN απομονώθηκε και αναλύθηκε. Το πλασμίδιο υποβλήθηκε σε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *Xba*I ή σε διπλή πέψη με τα *Xba*I και *Eco*88I.



Εικόνα 5.4.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης του πλασμιδιακού DNA του *Lb. rennini* ACA-DC 1534 (διαδρομή P). Διαδρομή L: 1 kb DNA ladder (Invitrogen).

Το pREN είναι ένα κυκλικό μόριο μεγέθους 4371 bp με περιεχόμενο G+C 43.3%. Η *ab initio* ανάλυση έδειξε ότι το pREN φέρει έξι πιθανά γονίδια τοποθετημένα πάνω στην ίδια αλυσίδα του DNA (Γράφημα 5.6). Η περιοχή που περιλαμβάνει τα γονίδια (σύνολο 3513 νουκλεοτίδια) αντιστοιχεί σε ~80% του μεγέθους του πλασμιδίου. Το πρόγραμμα FGENSEB πρόβλεψε ότι τα *orf1* (921 bp) και *orf2* (330 bp) αποτελούν ένα οπερόνιο. Η περαιτέρω ανάλυση αυτής της περιοχής υποστήριξε αυτήν την πρόβλεψη. Τα δύο *orfs* έχουν κοινό υποκινητή (-35 και -10 αλληλουχίες) που βρίσκεται πριν το *orf1*.



Γράφημα 5.6.

Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pREN με τα δομικά του στοιχεία.

Μετά το τέλος του *orf2* προσδιορίστηκε μια αλληλουχία τερματισμού ενώ και των δύο *orfs* προηγούνται τυπικές αλληλουχίες RBS. Το *orf1* είναι ένα γονίδιο που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη-εκκινητή αντιγραφής. Το προκύπτον αμινοξικό προϊόν έδειξε μεγαλύτερη ομοιότητα με την πρωτεΐνη RepA του πλασμιδίου pLJ42, απομονωμένου από τον *Lb. plantarum* (89% ομοιότητα, e -value $6e^{-161}$) (Acc. No.: [DQ099911](#), απευθείας υποβολή στη βάση δεδομένων). Η αναζήτηση BLASTP της

πρωτεΐνης Orf2 αποκάλυψε μακρινή σχέση με μια υποθετική πρωτεΐνη του πλασμιδίου pMCCL1 του *Macrococcus caseolyticus* (49% ομοιότητα, e -value $5e^{-3}$) (Baba *et al.*, 2009). Παρόλα αυτά, μετά από την ανάλυση TBLASTN ανιχνεύτηκαν δυο πιθανές περιοχές στα πλασμίδια pLJ42 και pLB925A03 (το τελευταίο έχει απομονωθεί από τον *Lb. brevis*, Wada *et al.*, 2009) που δυνητικά κωδικοποιούν πρωτεΐνες με υψηλή ομοιότητα προς την Orf2. Δεδομένου του γεγονότος ότι το *orf2* δεν είχε συμπεριληφθεί στην αρχική αναφορά των δυο εν λόγω πλασμιδίων, πραγματοποιήθηκε εκ νέου σχολιασμός με χρήση των ίδιων εργαλείων βιοπληροφορικής, όπως και για το pREN. Με αυτόν τον τρόπο το *orf2* πράγματι προβλέφθηκε και στα δυο πλασμίδια (θέσεις 5170-5499 nt για το pLB925A03 και 2415-2744 nt για το pLJ42). Τα προκύπτοντα προϊόντα των *orf2* έδειξαν μεγάλο βαθμό συντήρησης καθ' όλο το μήκος τους (Γράφημα 5.7.A). Πρέπει να σημειωθεί ότι ενώ στην αρχική αναφορά του πλασμιδίου pLJ42 ήταν κατατεθειμένη μια πιθανή αλληλουχία τερματισμού που εμπίπτει στην περιοχή του γονιδίου *orf2* (θέση 2515-2579 nt), το πρόγραμμα FindTerm δεν υποστήριξε την ύπαρξή της. Μάλιστα, το *orf2* εντοπίστηκε στην περιοχή που έπεται του γονιδίου *repA* και επίσης μετά από αυτό βρέθηκε μια αλληλουχία τερματισμού τόσο στο πλασμίδιο pLJ42 όσο και στο pLB925A03, με αποτέλεσμα την ύπαρξη μιας συντηρημένης δομής οπερονίου, όπως και στην περίπτωση του pREN.

Τα υπόλοιπα τέσσερα *orfs* βρέθηκαν να κωδικοποιούν διαφορετικές πρωτεΐνες κινητοποίησης. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη του *orf3* είχε τη μεγαλύτερη ομοιότητα σε αμινοξικό επίπεδο με την MobC του pLJ42 (100% ομοιότητα, e -value $8e^{-58}$). Οι πρωτεΐνες Orf4 και Orf5 προσδιορίστηκαν ως MobA (MobA1 και MobA2, αντίστοιχα), καθώς έλαβαν τις υψηλότερες ομοιότητες με την MobA του pLB925A03 (100% ομοιότητα με e -value $2e^{-76}$ και 97% ομοιότητα με e -value $4e^{-114}$, αντίστοιχα). Αρχικά, η ανάλυση απέκλεισε το ενδεχόμενο ενός γονιδιακού διπλασιασμού. Το πρόγραμμα InterProScan έδειξε ότι ενώ η MobA1 φέρει ένα σημαντικό ποσοστό του αμινοτελικού άκρου του σήματος της οικογένειας ρελαξασών pfam03432, η MobA2 φέρει την υπόλοιπη αλληλουχία του καρβοξυτελικού άκρου. Η στοίχιση αυτών των πρωτεϊνών με την MobA του pLB925A03 που φέρει ολόκληρο το σήμα pfam03432, έδειξε ότι οι MobA1 και MobA2 αποτελούσαν αρχικά ένα πλήρες πολυπεπτιδίο (Γράφημα 5.7.B). Η διερεύνηση του γονιδίου *mobA1* έδειξε ότι αυτό έχει υποστεί μια μετάλλαξη μετατόπισης πλαισίου στη θέση 2339 nt προκαλώντας πρόωρο τερματισμό στη θέση 2526 nt.

A.

```

orf2_pREN      1 MNELEK I EOLEKQLKARKRE ALKKGYEKLRGKFYKKTGAKNITTAENMLDHTPVFEKRETASPTLTTEQF 70
orf2_pLJ42    1 MNELEK I EOLEKQLKARKRE ALKKGYEKLRGKFYKKTGAKNITTAENMLDHTPVFEKRETASPTLTTEQF 70
orf2_pLB925A03 1 MTELEK I AKLEKQKLVKRRKALAKEYEKLRGKFYKKTGAKNITTAENMLDHTPVFEKRETASPTLTTEQF 70

orf2_pREN      71 DQLQNI ANAMTYNGNFWK IEDLKDVSOQLSOFRTENEQS 109
orf2_pLJ42    71 DQLQNI ANAMTYNGNFWK IEDLKDVSOQLSOFRTENEQS 109
orf2_pLB925A03 71 DQLQNI ANAMTYNGNFWK IEDLKDVSOQLSOFRTENEQS 109

```

B.

```

MobA1_pREN    1 MATIAKVTNGAS AASALDYALGKDKPLHEHTERWLEENRLELDALKDCRAVAVGGTNGIDPVI AKEQFK 70
MobA_pLB925A03 1 MATIAKVTNGAS AASALDYALGKDKPLHEHTERWLEENRLELDALKDCRAVAVGGTNGIDPVI AKEQFK 70
MobA2_pREN    -----

MobA1_pREN    71 AVQQAFNOTARRNOVLR I TOSFALNELDPTNTRDWORANDLGCE LAEKLYPDYQTAVYTHLDGQ I TFCTT 140
MobA_pLB925A03 71 AVQQAFNOTARRNOVLR I TOSFALNELDPTNTRDWORANDLGCE LAEKLYPDYQTAVYTHLDGQNHILHN 140
MobA2_pREN    -----

MobA1_pREN    141 TSSSTRS I FKLVKSLMSVVRVLLNLVLEMPMTKFPKSKAGKSLNPCVNTSPEQNR----- 195
MobA_pLB925A03 141 HI I IINKVNLQTKK LDERKGS AVERARNANDE I SKEQGWV I E VREHOSRTEODLTKKGGQYS YMHDLRG 210
MobA2_pREN    1 ----- MRDLRG 6

MobA1_pREN    -----
MobA_pLB925A03 211 RIDTTMQDTS I CDFKTFSDVLRASGVNVSVRGQNVSYAF LDANKQRRRARGKRLGTDYEKET I LNELERR 280
MobA2_pREN    77 RIDTTMQDTS I CDFKTFSDVLRASGVNVSVRGQNVSYAF LDANKQRRRARGKRLGTDYEKET I LNELERR 76

MobA1_pREN    -----
MobA_pLB925A03 281 TRRTAQQLDREDQSRATELVRETTSDTDALEQRERQAQSRKPR I DQLRNAVKP I ADHLQHFTGAVREF A 350
MobA2_pREN    77 TRRTAQQLDREDQSRATELVRETTSDTDALEQRERQAQSRKPR I DQLRNAVKP I ADHLQHFTGAVREF A 146

MobA1_pREN    -----
MobA_pLB925A03 351 GKVEQRV I DSKLYKDVASRFKADLAKQEQARONA I KQDLAKRMAPKK OPOQPSYYREPEGRSR 415
MobA2_pREN    147 GKVEQRV I DSKLYKDVASRFKADLAKQEQARONA I KQDLAKRMAPKK --- OPOKSYREPEGRSR 208

```

Γ.

```

MobB_pREN_Lb_rennini      1 MSQNEE LARQ I L LAYANGKVDLSKVPELOSTS I L LAYANGKVDLSKVPELQRI VKEAAAEQMA 63
MobB_pLJ42_Lb_plantarum  1 MSQNEE LAKQ I L TAYAN----- GQVLTNVPDLQKMKKEAAAEQMA 41
MobB_pLB925A03_Lb_brevis 1 MSQNEE LARQ I L LAYAN----- GKVDLSKVPELQRI VKEAAAEQMA 41
MobB_Enterococcus_sp_7L76 1 MNKDEQLV VQV L NAYK I ----- GK I D FSHVPELDR L V RQEVNKF - 40
MobB_pNZ4000_L_lactis_subsp_cremoris 1 MNKDEQLV VQV L NAYK I ----- GK I D FSHVPELET L V RQEVNKEF - 40

MobB_pREN_Lb_rennini      64 YTVNTND LQK QADALKRSE IWLNEQA --- HAR L DAI NPDOLK QEFVTSVEDYERR I KAQQS 122
MobB_pLJ42_Lb_plantarum  42 HTYSTTD F HAK QEEAL AHEKAWYHQE I DR I LQEK L TE I EPKTLKGA VTDQLKQQLAD L EHQQA 104
MobB_pLB925A03_Lb_brevis 42 YTVNTND LQK QADALKRSE IWLNEQA --- HAR L DAI NPDOLK QEFVTSVEDYERR I KAQQS 100
MobB_Enterococcus_sp_7L76 41 ----- R D YQEK I EAVA ----- NQK I ESA I QEQ L HRLEAEN L KAT I LKD I QVEKQAL L ALKK 91
MobB_pNZ4000_L_lactis_subsp_cremoris 41 ----- R D YQEK I EAVA ----- SQKMESA I QEQ L HRLEAEN L KAD I LKE I QDEKQEL I TLKK 91

MobB_pREN_Lb_rennini      123 ELKSLL E QSEKSR RQOFWRNLMP T I AGS AVCLLLVAV I FFFVLEK L I YQGIWQWGLHKL YATV 185
MobB_pLJ42_Lb_plantarum  105 EFEATYERAKSTGNRQFWSL I PVL I AGTSVCLLLVAV I FFFVLEK L I YQGLWQWGLHKL YNVV 167
MobB_pLB925A03_Lb_brevis 101 ELESLL E QSEKSR RQOFWRNLMP T I AGS AVCLLLVAV I FFFVLEK L I YQGIWQWGLHKL YATV 163
MobB_Enterococcus_sp_7L76 92 ELNEQKE Q I KADRKRE I VERY - G I L I AN I VCLFCFLVVG I L I GRW I YKG I WDWGLH I LYDTV 153
MobB_pNZ4000_L_lactis_subsp_cremoris 92 ELNEHOE Q I KVDKHA I VEHY - S I L I VN I I CLFCFLVVG I L I GRW I YKG I WDWGLH I LYDTV 153

MobB_pREN_Lb_rennini      186 LA I QPOHPYGA I VLGLLGFVLLAGAL YASFVLLV HVVQQLVDFQF --- SKLLFWRK HDNPR - 243
MobB_pLJ42_Lb_plantarum  168 MA I QPOHPYGA I VLG I LGFVLL I AGA I YASFVLLV HAVQQLVDFKPFKPSKLLFWKQNNTRW 229
MobB_pLB925A03_Lb_brevis 164 LA I QPOHPYGA I VLGLLGFVLLAGAL YASFVLLV HAVQQLVDFKPFKPSKLLFWKQNNTRW 222
MobB_Enterococcus_sp_7L76 154 ME I RPKH I PYGAV I LGLGFG I L I GAG I YGSFR L M - YTASTWF DQR - K I F K R I FPKK - - - - - 207
MobB_pNZ4000_L_lactis_subsp_cremoris 154 ME I RPKH I PYGAV I LGLGFG I L I GAG I YGSFR L M - YTASTWF DQR - K I F K R I FPKK - - - - - 207

```

Γράφημα 5.7.

Στοιχισή πολλαπλών αλληλουχιών με το πρόγραμμα MUSCLE των προκυπτουσών πρωτεϊνών των γονιδίων *orf2* (A), *mobA* (B) και *mobB* (Γ) του πλασμιδίου pREN με τις συγγενικές τους πρωτεΐνες. Στην στοιχισή η διαβάθμιση του χρώματος αντανακλά το επίπεδο συντήρησης των αμινοξέων. Οι υποθετικές πρωτεΐνες MobA1 και MobA2 του pREN ευθυγραμμίστηκαν με την πλήρη αλληλουχία της πρωτεΐνης MobA του πλασμιδίου pLB925A03 (B). Τα υπογραμμισμένα αμινοξέα αντιστοιχούν στο συντηρημένο σήμα rfam03432 ρελαξασών. Τα αμινοξέα που βρίσκονται εντός του μαύρου πλαισίου αντιπροσωπεύουν την τροποποιημένη αλληλουχία της MobA1 που οφείλεται στη μετάλλαξη μετατόπισης πλαισίου στη θέση 2339 nt που προκαλεί πρόωρο τερματισμό του γονιδίου στη θέση 2526 nt. Στο (Γ) τα κόκκινα πλαίσια περιλαμβάνουν τα αμινοξέα των προβλεπόμενων διαμεμβρανικών περιοχών της εκάστοτε πρωτεΐνης MobB.

Επιπρόσθετα, το *orf6* βρέθηκε ότι είναι ένα γονίδιο *mobB*. Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες Mob του pREN, η MobB εντοπίστηκε σε πολύ περιορισμένο αριθμό βακτηρίων εκ των οποίων όλα είναι οξυγαλακτικά. Αυτές οι πρωτεΐνες υποβλήθηκαν σε σύγκριση των αλληλουχιών τους, η οποία έδειξε έναν σημαντικό βαθμό συντήρησης ιδιαίτερα στο καρβοξυτελικό άκρο (Γράφημα 5.7.Γ).

Ο χαρακτηρισμός του συγκεκριμένου γονιδίου βασίστηκε στην αμινοξική ομοιότητα σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη (van Kranenburg *et al.*, 2000), κατά την οποία το πρωτεϊνικό παράγωγο ενός *orf* του πλασμιδίου pNZ4000 του *Lactococcus lactis* είχε μέτρια ομολογία με την MobB του πλασμιδίου pC223 του *Staphylococcus aureus* (Smith & Thomas, 2004). Παρόλα αυτά, στην παρούσα μελέτη επαναλήφθηκε η αναζήτηση BLASTP τόσο για την πιθανή MobB πρωτεΐνη του pNZ4000 όσο και για την Orf6 του pREN και σε καμία περίπτωση δεν επαληθεύτηκε οποιαδήποτε σχέση με την MobB του πλασμιδίου pC223. Επίσης, η διερεύνηση των αλληλουχιών με το πρόγραμμα InterProScan δεν οδήγησε στην ανίχνευση συντηρημένων μοτίβων ή περιοχών σε καμία από τις MobB πρωτεΐνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων, πλην όμως κατέδειξε την ύπαρξη δυο διαμεμβρανικών περιοχών τοποθετημένων σε παραπλήσιες θέσεις στα πλασμίδια. Ως εκ τούτου, προκύπτει ότι η ταυτοποίηση της Orf6 και των σχετικών της πρωτεϊνών απαιτεί περαιτέρω εξέταση.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί ότι το πρόγραμμα FGENESB πρόβλεψε ότι τα τέσσερα *mob* γονίδια ανήκουν σε ένα οπερόνιο. Εν τούτοις, αυτή η πρόβλεψη δεν επιβεβαιώθηκε καθώς όλα τα γονίδια προηγούνται από ξεχωριστούς υποκινητές και RBS αλληλουχίες, εκτός του *mobA2* που στερούνταν και τα δυο αυτά *cis*-ενεργούντα στοιχεία. Επιπλέον, μια τυπική αλληλουχία *oriT* εντοπίστηκε στην περιοχή πριν το *mobC* γονίδιο (θέση 1261-1355 nt) που ήταν σχεδόν ταυτόσημη με την αντίστοιχη του πλασμιδίου pLJ42 (96% ομοιότητα).

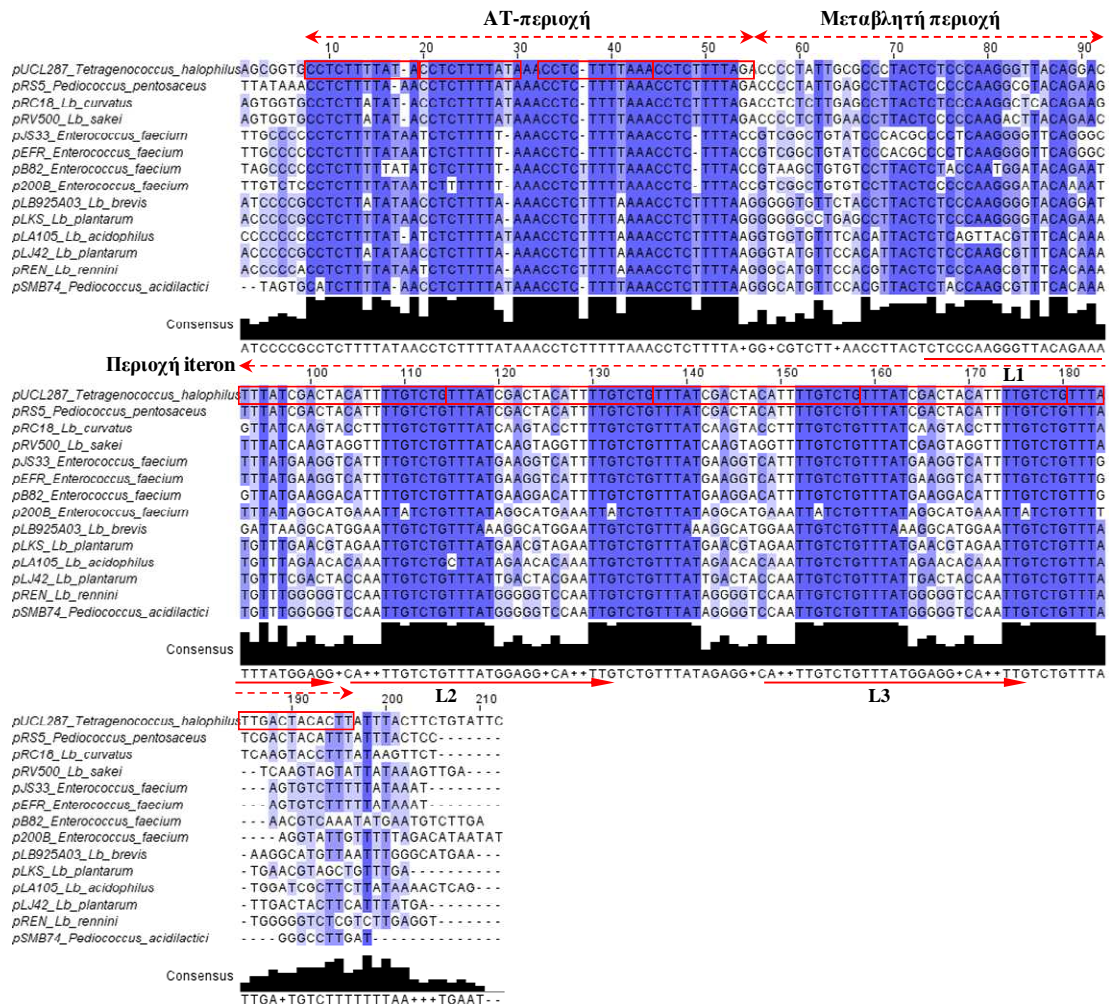
5.3.2.2. Χαρακτηριστικά του σημείου έναρξης αντιγραφής (*ori*) της οικογένειας πλασμιδίων pUCL287 που πολλαπλασιάζονται με μηχανισμό θήτα

Ανάμεσα στα πρώτα αποτελέσματα της αναζήτησης BLASTP για την πρωτεΐνη RepA του pREN, βρέθηκε η αντίστοιχη του πλασμιδίου pUCL287 απομονωμένου από τον *Tetragenococcus halophilus* (πρώην *Pediococcus halophilus*) (69% ομοιότητα με *e*-value $7e^{-121}$). Το pUCL287 αποτελεί το πρότυπο μιας οικογένειας ρεπλικονίων που πολλαπλασιάζονται με μηχανισμό θήτα (Benachour *et*

al., 1997, Benachour *et al.*, 1995). Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της οικογένειας pUCL287, εκτός από την αλληλουχία της πρωτεΐνης Rep, είναι και η ξεχωριστή δομή της περιοχής έναρξης της αντιγραφής (*ori*) (Benachour *et al.*, 1997). Στο pUCL287 το *ori* εκτείνεται σε μήκος 187 bp και βρίσκεται πριν από το γονίδιο *repA*. Η *ori* αλληλουχία είναι οργανωμένη σε τρεις διαφορετικές περιοχές (Γράφημα 5.8). Η πρώτη έχει μεγάλο ποσοστό αδενίνης/θυμίνης (περιοχή AT) που απαιτείται για την τήξη του δίκλωνου DNA κατά την αντιγραφή του πλασμιδίου και η οποία περιλαμβάνει τέσσερις 11-μερείς επαναλήψεις. Η τρίτη περιοχή αποτελεί το σημείο πρόσδεσης της πρωτεΐνης Rep και αποτελείται από 22-μερή ιερόνια που επαναλαμβάνονται διαδοχικά κατά 4.5 φορές (περιοχή *iteron*). Αυτές οι δύο περιοχές διαχωρίζονται από μια αλληλουχία 37 bp (μεταβλητή περιοχή). Πράγματι, στο πλασμίδιο pREN ανιχνεύτηκε μια *ori* αλληλουχία που πληροί κατ' ουσίαν όλα τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά. Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκε ένας συγκεκριμένος βαθμός απόκλισης από τις αναμενόμενες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες τόσο στην περίπτωση του pREN όσο και στα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας, γεγονός που έχει αναφερθεί και για το πλασμίδιο pUCL287 (Benachour *et al.*, 1997). Για αυτό το λόγο διερευνήθηκε η συναινετική αλληλουχία (consensus sequence) για την περιοχή αυτή. Έτσι εφαρμόστηκε η μέθοδος MSA στα *oris* της οικογένειας pUCL287 (Γράφημα 5.8). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η περιοχή AT καθ' όλο το μήκος της ήταν εξαιρετικά συντηρημένη ανάμεσα στα πλασμίδια της οικογένειας και σύμφωνα με τη συναινετική αλληλουχία περιείχε το 9-μερές CCTCTTTT(A/T) σε τέσσερις διαδοχικές επαναλήψεις. Στη μεταβλητή περιοχή των 37 bp δεν βρέθηκαν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, εν τούτοις παρατηρήθηκε ένα σημαντικός αριθμός συντηρημένων θέσεων δείχνοντας ότι η συγκεκριμένη περιοχή ενδέχεται να μην είναι μεταβλητή. Η περιοχή με τα *iterons* που βρίσκεται αμέσως μετά, χαρακτηρίστηκε από την ύπαρξη τεσσάρων διαδοχικών και σχεδόν πανομοιότυπων 12-μερών (TTGTCTGTTTAT). Αυτές οι τέσσερις επαναλήψεις διαχωρίζονταν από μια σχετικά μεταβλητή μεταξύ των πλασμιδίων 10-μερή αλληλουχία που όμως ήταν ακριβώς η ίδια για κάθε πλασμίδιο και η οποία σε κάθε περίπτωση εντοπίστηκε και πριν από το πρώτο 12-μερές. Η προσομοίωση της αναδίπλωσης DNA του *ori* του πλασμιδίου pREN αποκάλυψε την ύπαρξη μιας πιθανής φουρκέτας στη μεταβλητή περιοχή καθώς και δύο ίδιους βρόγχους στην περιοχή *iteron* (Γράφημα 5.9).

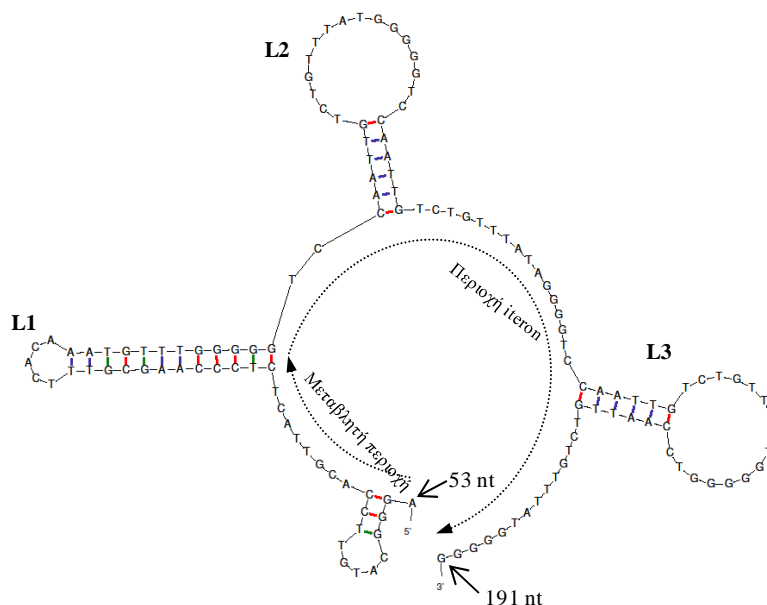
Παρόμοια οργάνωση της δευτεροταγούς δομής παρατηρήθηκε και στα *oris* όλων των άλλων πλασμιδίων της οικογένειας. Ενώ η σημασία των δομών αυτών

παραμένει αντικείμενο μελλοντικής διερεύνησης, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η ομοιότητα στις δευτεροταγείς δομές μεταξύ των πλασμιδίων υπαγορεύεται σαφώς από την ύπαρξη συντηρημένων ακολουθιών (Γράφημα 5.8).



Γράφημα 5.8.

Στοιχισή πολλαπλών αλληλουχιών με το πρόγραμμα MUSCLE των αλληλουχιών *ori* των ρεπλικονίων της οικογένειας pUCL287. Στη στοιχισή η διαβάθμιση του χρώματος αντανακλά το επίπεδο συντήρησης των νουκλεοτιδίων. Τα διπλής όψεως διακεκομμένα, κόκκινα βέλη δείχνουν τις τρεις διαφορετικές περιοχές των *ori* όπως αναλύονται στο κείμενο. Τα τέσσερα πρώτα πλαίσια αντιστοιχούν στα επαναλαμβανόμενα 11-μερή στην περιοχή AT, ενώ τα πέντε εναπομείναντα αντιστοιχούν στα 22-μερή ιτερόνια.

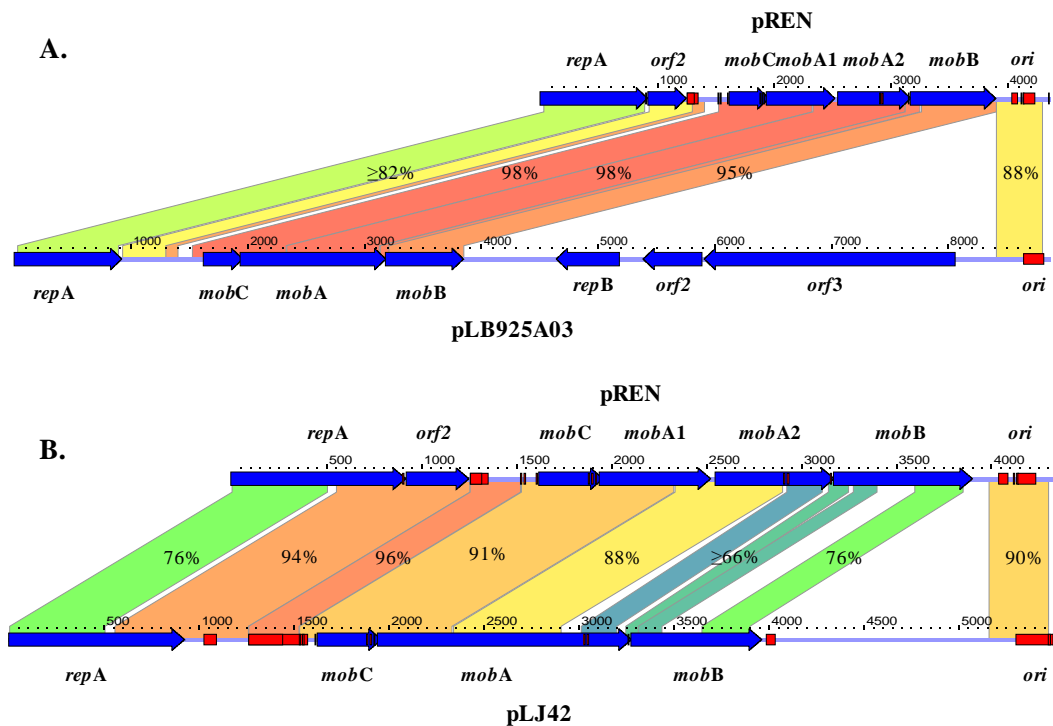


Γράφημα 5.9.

Προσομοίωση της δευτεροταγούς δομής του DNA της περιοχής *ori* του πλασμιδίου pREN (μεταβλητή και iteron περιοχή). Η αρίθμηση των θέσεων είναι ανάλογη με τη συναινετική αλληλουχία. Οι βρόγχοι L1, L2 και L3 και οι αντίστοιχες περιοχές στην αλληλουχία παρουσιάζονται επίσης στο Γράφημα 4.8 ως βέλη.

5.3.2.3. Συγκριτική ανάλυση του pREN με μέλη της pUCL287 οικογένειας πλασμιδίων θήτα αντιγραφής και εξελικτικές προεκτάσεις

Η συνολική αρχιτεκτονική του pREN εκτιμήθηκε σε σχέση με εκείνη των άλλων μελών της οικογένειας πλασμιδίων pUCL287. Ενώ ο σκελετός αντιγραφής του pREN (*ori* και γονίδιο *repA*) ήταν εξαιρετικά συντηρημένος, η αναζήτηση BLASTN για ολόκληρη την πλασμιδιακή ακολουθία έδωσε μόνο δυο αποτελέσματα και συγκεκριμένα τα pLB925A03 και pLJ42. Το πλασμίδιο pLB925A03 έχει μήκος 8881 bp και φέρει επτά *orfs*, δυο εκ των οποίων είναι γονίδια που συμμετέχουν στη διαδικασία της αντιγραφής (*repA* και *repB*), τρία είναι γονίδια κινητοποίησης και δυο είναι γονίδια άγνωστης λειτουργίας. Το πλασμίδιο pLJ42 (μήκους 5529 bp) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη αντιγραφής (RepA) και τρεις πρωτεΐνες κινητοποίησης (MobA, MobB and MobC). Τα εν λόγω πλασμίδια συγχρονίστηκαν έτσι ώστε να έχουν ως θέση 1 το πρώτο νουκλεοτίδιο του γονιδίου *repA* και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στοίχιση ολόκληρης της πλασμιδιακής αλληλουχίας (Γράφημα 5.10). Η συγκριτική χαρτογράφηση των πλασμιδίων έδειξε ότι έχουν κοινή



Γράφημα 5.10.

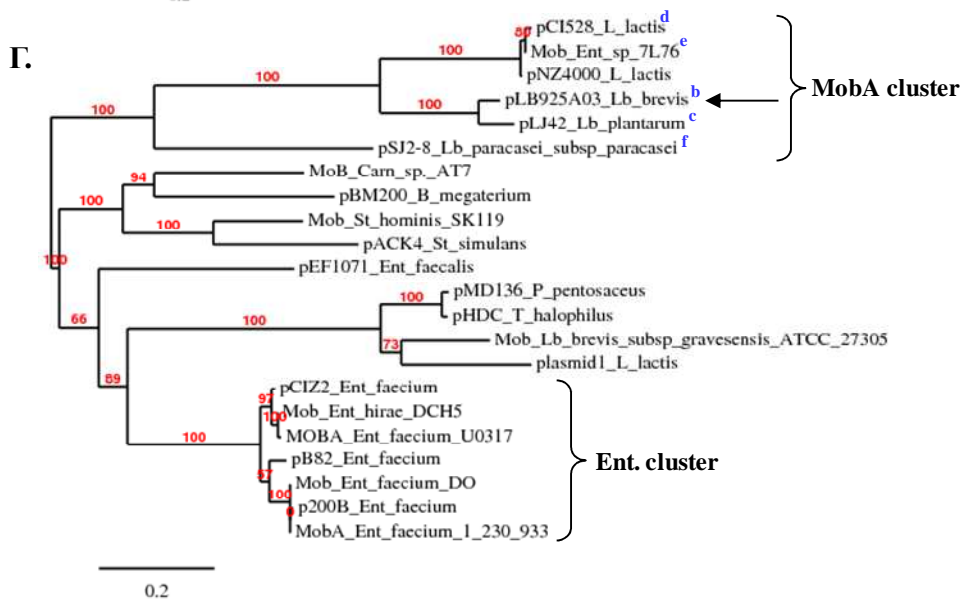
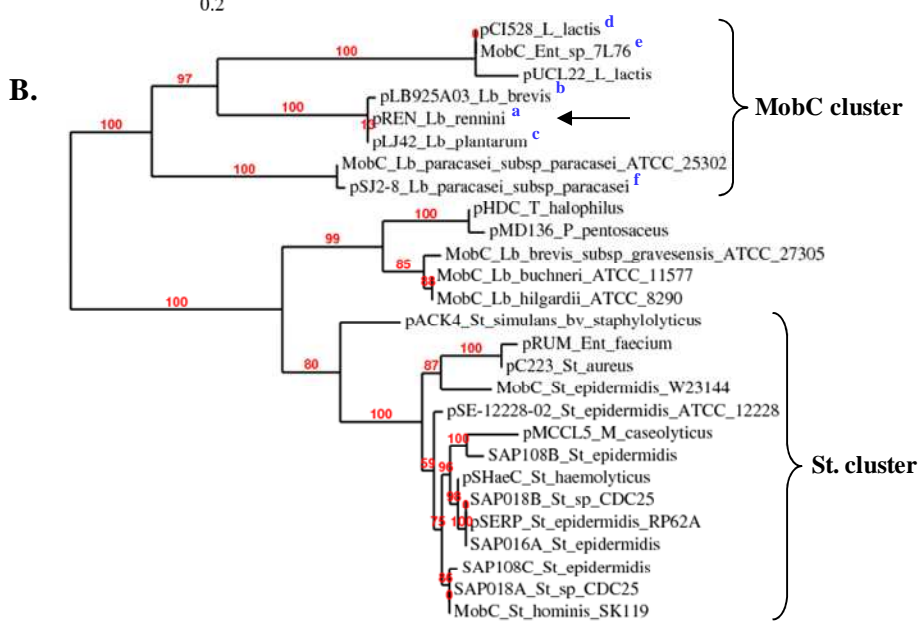
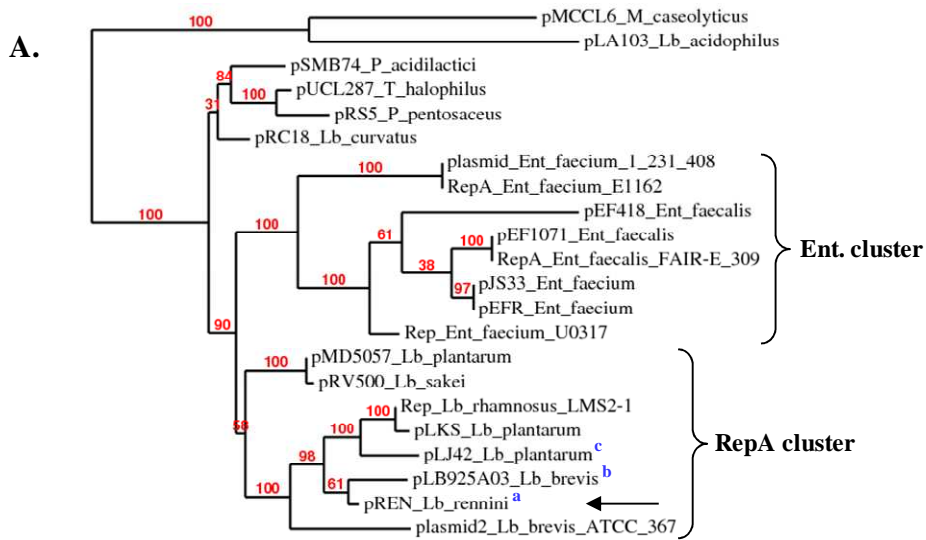
Συγκριτική χαρτογράφηση των πλασμιδίων pREN και pLB925A03 (A), και pREN και pLJ42 (B). Τα υπό εξέταση πλασμίδια συγχρονίστηκαν ως προς το πρώτο νουκλεοτίδιο του γονιδίου *repA*. Οι χρωματιστές περιοχές μεταξύ των πλασμιδίων αντιπροσωπεύουν την ομολογία σαν ποσοστό ομοιότητας.

οργάνωση όχι μόνο όσον αφορά το σκελετό αντιγραφής (οπερόνιο *repA-orf2* και αλληλουχίες *ori*), αλλά και το σκελετό κινητοποίησης. Τα τρία διαδοχικά γονίδια *mob* παρουσίασαν μεγάλο βαθμό ομοιότητας μεταξύ των πλασμιδίων, με εξαίρεση το pREN στο οποίο το *mobA* διαχωρίστηκε σε δυο κατατετμημένα (truncated) ψευδογονίδια εξαιτίας μιας μετάλλαξης μετατόπισης πλαισίου, όπως αναφέρεται στην Παράγραφο 5.3.2.1. Αυτή ή οργάνωση των στοιχείων αντιγραφής και κινητοποίησης φαίνεται να είναι μοναδική εντός της οικογένειας pUCL287. Σύμφωνα με την παρούσα ανάλυση, μόνο το pREN και το pLJ42 διαθέτουν το βασικό κορμό για αυτόν τον τύπο πλασμιδίων καθώς στην αλληλουχία του pLB925A03 έχουν ενσωματωθεί κατά προσέγγιση 4500 bp στην περιοχή που ακολουθεί τα γονίδια *mob*. Η προσθήκη αυτή δύναται να έχει πραγματοποιηθεί μέσω γενετικού ανασυνδυασμού. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι τα τρία γονίδια που εκτείνονται σε αυτή την περιοχή, δηλαδή τα *repB*, *orf2* και *orf3*, είναι ταυτόσημα με τα αντίστοιχα των πλασμιδίων pCD01, pCD02 (απομονωμένα από τον *Lactobacillus paracasei* subsp.

paracasei NFBC338) (Desmond *et al.*, 2005) και το χρωμόσωμα του *Lb. casei* BL23 (Maze *et al.*, 2010), αντίστοιχα.

Επιπλέον διερευνήθηκε η φυλογενετική σχέση των πρωτεϊνών RepA, MobC και MobA. Η MobB αποκλείστηκε από την ανάλυση, δεδομένου ότι βρέθηκε σε μόνο πέντε άλλα βακτήρια, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Στην περίπτωση της MobA, οι δυο κατατεταμημένες πρωτεΐνες του pREN (MobA1 και MobA2) δεν συμπεριλήφθηκαν στα φυλογενετικά δέντρα και τα συμπεράσματα που παρατίθενται στη συνέχεια βασίζονται στην αλληλουχία της MobA πρωτεΐνης του πλασμιδίου pLB925A03. Η RepA του πλασμιδίου pREN ομαδοποιήθηκε με αντίστοιχες πρωτεΐνες πλασμιδίων από γαλακτοβακίλλους (Γράφημα 5.11.A). Ωστόσο, υπήρξε μια σαφής σχέση της ομάδας αυτής με πρωτεΐνες-εκκινητές αντιγραφής των εντεροκόκκων. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την υψηλή αλληλουχική ομοιότητα των *oris* μεταξύ των γαλακτοβακίλλων και των εντεροκόκκων της οικογένειας pUCL287 υποδηλώνει ότι ο σκελετός αντιγραφής των δυο γενών ενδεχομένως προήλθε από ένα κοινό προγονικό πλασμίδιο. Οι πρωτεΐνες MobC και MobA έδειξαν ένα εντελώς διαφορετικό μοτίβο εξέλιξης σε σχέση με την RepA. Οι πρωτεΐνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων που ομαδοποιήθηκαν με την MobC του pREN προέρχονται από τα ίδια πλασμίδια που προέρχονται και οι MobA πρωτεΐνες που ομαδοποιήθηκαν με την MobA του pLB925A03 (Γράφημα 5.11.B και 5.11.Γ).

Αντίθετα, οι RepA των pREN, pLB925A03 και pLJ42 ομαδοποιήθηκαν με πρωτεΐνες οξυγαλακτικών βακτηρίων εντελώς διαφορετικής προέλευσης. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα πλασμίδια pREN, pLB925A03 και pLJ42 έχουν αποκτήσει τις MobC και MobA ως ενιαία μονάδα κατά την εξελικτική διαδικασία συναρμολόγησης. Αυτή η υπόθεση επιβεβαιώθηκε επιπλέον από τις αναζητήσεις TBLASTX με τις οποίες εντοπίστηκε η συντηρημένη περιοχή *mobCA* σε όλα τα πλασμίδια που ανήκαν στις ομάδες των πρωτεϊνών MobC and MobA των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Από την τοπολογία των φυλογενετικών δέντρων μπορεί επίσης να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η συσχέτιση των μονάδων MobC και MobA πραγματοποιήθηκε σε ένα προγονικό πλασμίδιο, καθώς οι MobC συνδέονται με αντίστοιχες των σταφυλοκόκκων, ενώ οι MobA συνδέονται με αντίστοιχες των εντεροκόκκων.



Γράφημα 5.11.

Φυλογενετικό δέντρο κατασκευασμένο με το πρόγραμμα PhyML των pREN RepA (A), pREN MobC (B) και pLB925A03 MobA (Γ). Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση αποτέλεσαν τα πρώτα αποτελέσματα μετά από αναζητήσεις BLASTP, ευθυγραμμίστηκαν δε με το πρόγραμμα MUSCLE και υπέστησαν επιδιόρθωση (curation) με το πρόγραμμα Gblocks. Οι φυλογενετικές σχέσεις προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο της μέγιστης πιθανότητας χρησιμοποιώντας το μοντέλο υποκατάστασης WAG και ελέγχθηκαν με το παραμετρικό τεστ aLRT. Ο βαθμός εμπιστοσύνης των κλάδων παρουσιάζεται ως %. Τα βέλη καταδεικνύουν τις πρωτεΐνες, στις οποίες βασίστηκαν οι αναζητήσεις BLASTP. Οι αγκύλες περιλαμβάνουν τις ομάδες όπως περιγράφονται στο κείμενο. Οι πρωτεΐνες της ίδιας πλασμιδιακής προέλευσης μεταξύ των RepA, MobC και MobA ομάδων παρουσιάζονται με τον ίδιο εκθέτη. Η σύντμηση των γενών είναι όπως ακολούθως: Lb: *Lactobacillus*, Ent: *Enterococcus*, St: *Staphylococcus*, L: *Lactococcus*, P: *Pediococcus*, M: *Macrococcus*, B: *Bacillus*, Carn: *Carnobacterium* και T: *Tetragenococcus*.

5.3.2.4. Συμπεράσματα

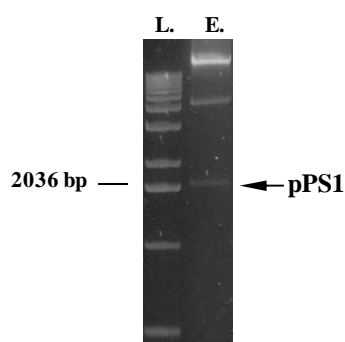
Σε αυτήν την ενότητα παρουσιάστηκε η ανάλυση της αλληλουχίας και ο χαρακτηρισμός του πλασμιδίου pREN, το οποίο αποτελεί νέο μέλος της οικογένειας πλασμιδίων pUCL287 που πολλαπλασιάζονται με μηχανισμό θήτα αντιγραφής. Διερευνήθηκε δε λεπτομερώς το γονιδιακό περιεχόμενο, η αρχιτεκτονική και η εξέλιξη αυτού του μορίου.

Η συγκεκριμένη οικογένεια πλασμιδίων φέρει τυπικά χαρακτηριστικά στην περιοχή έναρξης της αντιγραφής που παρουσιάζονται στην παρούσα μελέτη για πρώτη φορά με συγκριτική προσέγγιση. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι τα πλασμίδια pREN, pLB925A03 και pLJ42 είναι μοναδικά μέσα στην οικογένεια όσον αφορά το συνδυασμό των σκελετών αντιγραφής και κινητοποίησης. Τέλος, αυτά τα τρία πλασμίδια έχουν προκύψει από μια εξελικτική διαδικασία συναρμολόγησης και με σκοπό τη διερεύνηση αυτού του φαινομένου εκτιμήθηκαν οι πολύπλοκες φυλογενετικές τους σχέσεις.

Συνολικά, η παρούσα μελέτη αντανάκλα την αντίληψη ότι η διερεύνηση πλασμιδίων από ασυνήθιστα οξυγαλακτικά βακτήρια, όπως στη συγκεκριμένη περίπτωση από τον *Lb. rennini*, συνεισφέρει σημαντικά στην επιστημονική κατανόηση της βιολογίας, της εξέλιξης και της ποικιλομορφίας των οξυγαλακτικών πλασμιδίων.

5.3.3. Χαρακτηρισμός του πλασμιδίου *pPS1* του *Pentosaceus pentosaceus* ACA-DC 3431 και *in silico* απόδειξη της οριζόντιας μεταφοράς του σ^B ρυθμιζόμενου γονιδίου *gsiB* στα οξυγαλακτικά βακτήρια

Κατά τη διερεύνηση του πλασμιδιακού περιεχομένου του στελέχους *P. pentosaceus* ACA-DC 3431 που απομονώθηκε από το δείγμα της παραδοσιακής Φορμαέλλας (Κεφάλαιο 2), το πλασμίδιο *pPS1* επιλέχθηκε για περαιτέρω ανάλυση (Εικόνα 5.5). Το *pPS1* υποβλήθηκε σε πέψη περιορισμού με το ένζυμο *Hind*III ή σε διπλή αντίδραση πέψης με τα *Hind*III και *Kpn*I. Η πλήρης αλληλουχία του μαζί με τον σχολιασμό του πλασμιδίου, κατατέθηκε στη βάση δεδομένων EMBL με αριθμό κατοχύρωσης (Acc. No.) FN869858.

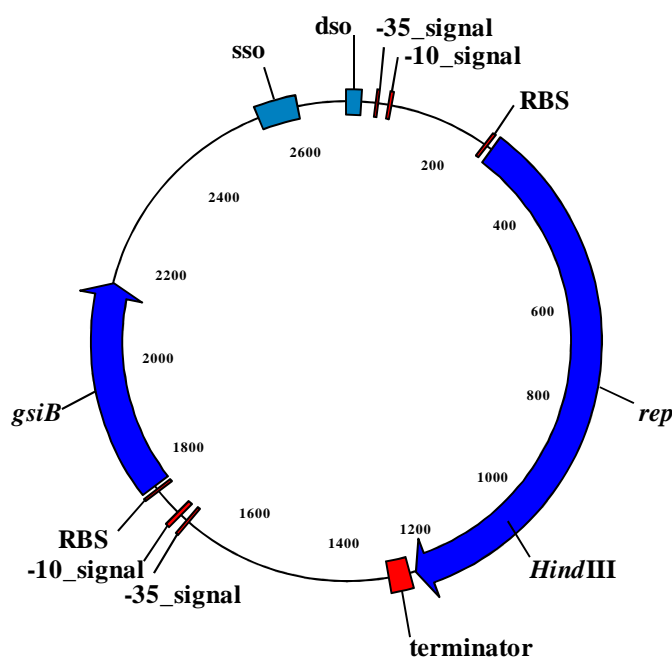


Εικόνα 5.5.

Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης του πλασμιδιακού DNA του *P. pentosaceus* ACA-DC 3431 (διαδρομή E). Διαδρομή L: 1 kb DNA ladder (Invitrogen).

5.3.3.1. Χαρακτηρισμός και ανάλυση της αλληλουχίας του πλασμιδίου *pPS1*

Το *pPS1* είναι ένα κυκλικό μόριο μήκους 2721 bp, το οποίο έχει 37.7% ποσοστό G+C. Ο γενετικός χάρτης του μορίου παρουσιάζεται στο [Γράφημα 5.12](#). Στο *pPS1* εντοπίστηκε μια τυπική αλληλουχία *dso* που είχε υψηλή ομοιότητα με γνωστά *dso* άλλων πλασμιδίων RCR. Το *dso* φέρει το σημείο εγκοπής (nick site, TG'AT) το οποίο είναι συντηρημένο και σε άλλα πλασμίδια θετικών κατά Gram βακτηρίων ([Kaneko et al., 2000](#)). Επίσης, ανιχνεύτηκε μια περιοχή 74 bp πριν από το *dso*, στην οποία σχηματίζονται διαδοχικοί βρόγχοι ($\Delta G = -28.6$ kcal/ mol) και η οποία αποτελεί το πιθανό *ss0* ([Alegre et al., 2005](#)). Το πρώτο νουκλεοτίδιο του *dso* θεωρήθηκε αυθαίρετα ως η θέση 1 του πλασμιδίου.



Γράφημα 5.12.

Γενετικός χάρτης του πλασμιδίου pPS1 με τα δομικά του στοιχεία.

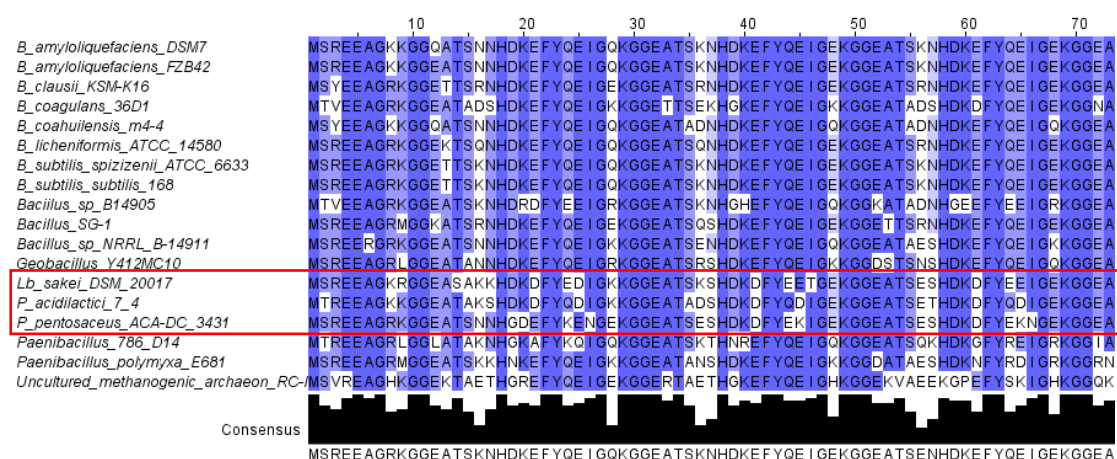
Η υπολογιστική ανάλυση πρόβλεψε την ύπαρξη δυο πιθανών *orfs* που μεταγράφονται από τον ίδιο κλώνο του DNA (Γράφημα 5.12). Το *orf1* που αρχίζει με το κωδικόνιο TTG, βρίσκεται στην περιοχή 280 με 1236 bp και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 318 αμινοξέων. Η προκύπτουσα Orf1 είναι μια πρωτεΐνη αντιγραφής (Rep) και παρουσιάζει 93% ομοιότητα (e -value $1.0e^{-159}$) με την αντίστοιχη του πλασμιδίου pLTK2, απομονωμένου από τον *Lb. plantarum* (Kaneko *et al.*, 2000). Η εξέταση της περιοχής που προηγείται του *orf1* αποκάλυψε έναν πιθανό υποκινητή (TTGACA αλληλουχία -35, στη θέση 55-60 nt και TATTATT αλληλουχία -10 στη θέση 77-83 nt). Επιπλέον, ένα πιθανό RBS εντοπίστηκε μεταξύ των θέσεων 266 και 271 (GAGGAG), ενώ το πρόγραμμα FindTerm πρόβλεψε μια αλληλουχία τερματισμού στην περιοχή 1248 - 1287 nt.

Το *orf2* ήταν στη θέση 1763-2149 nt και στην περιοχή που προηγείται εντοπίστηκαν τυπικά σήματα -35 (TTTACT), -10 (TGATAATAT) και RBS (AGGAGG). Η αναζήτηση BLASTP για το πολυπεπίδιο Orf2 (128 αμινοξέα) αποκάλυψε ένα ενδιαφέρον μοτίβο ομοιότητας. Τα πρώτα αποτελέσματα, μέχρι την πρώτη πρωτεΐνη μη βακτηριακής προέλευσης, ταξινομήθηκαν σε δυο κατηγορίες. Τα

δύο πρώτα αποτελέσματα ήταν πρωτεΐνες οξυγαλακτικών βακτηρίων και συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη γενικού στρες (Gsp) του πλασμιδίου pLS141-1 από τον *Lactobacillus sakei* (ομοιότητα 93% με e -value $6.0e^{-44}$) (Acc. No.: AB109041, απευθείας υποβολή στη βάση δεδομένων) και η πρωτεΐνη GsiB από το χρωμοσωμικό τμήμα του ημιτελούς γονιδιώματος του *Pediococcus acidilactici* 7_4 (ομοιότητα 92% με e -value $6.0e^{-43}$) (Acc. No.: NZ_GG730087, απευθείας υποβολή στη βάση δεδομένων). Τα υπόλοιπα αποτελέσματα ήταν επίσης πρωτεΐνες GsiB κυρίως από διάφορα είδη της τάξης *Bacillales*, με το ποσοστό ομοιότητας να είναι σε όλες τις περιπτώσεις $\geq 84\%$ (e -value $\leq 5.0e^{-17}$). Τα δεδομένα αυτά δείχνουν σαφώς ότι η πιθανή πρωτεΐνη του *orf2* γονιδίου του pPS1, η Gsp του πλασμιδίου pLS141-1 και η GsiB του *P. acidilactici* 7_4 είναι ομόλογες με τις πρωτεΐνες GsiB των *Bacillales*. Θα πρέπει να τονιστεί ότι επί του παρόντος από όλα τα στελέχη του είδους *P. pentosaceus* μόνο το γονιδίωμα του στελέχους ATCC 25745 έχει αλληλουχηθεί και δημοσιευτεί και στο συγκεκριμένο γονιδίωμα δεν βρέθηκε γονίδιο που να κωδικοποιεί την πρωτεΐνη GsiB.

5.3.3.2. In silico ανάλυση της πρωτεΐνης GsiB του πλασμιδίου pPS1

Τα προγράμματα MUSCLE και Gblocks χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία της στοίχισης πολλαπλών ακολουθιών της GsiB του πλασμιδίου pPS1 με τις συγγενικές της πρωτεΐνες (Γράφημα 5.13).

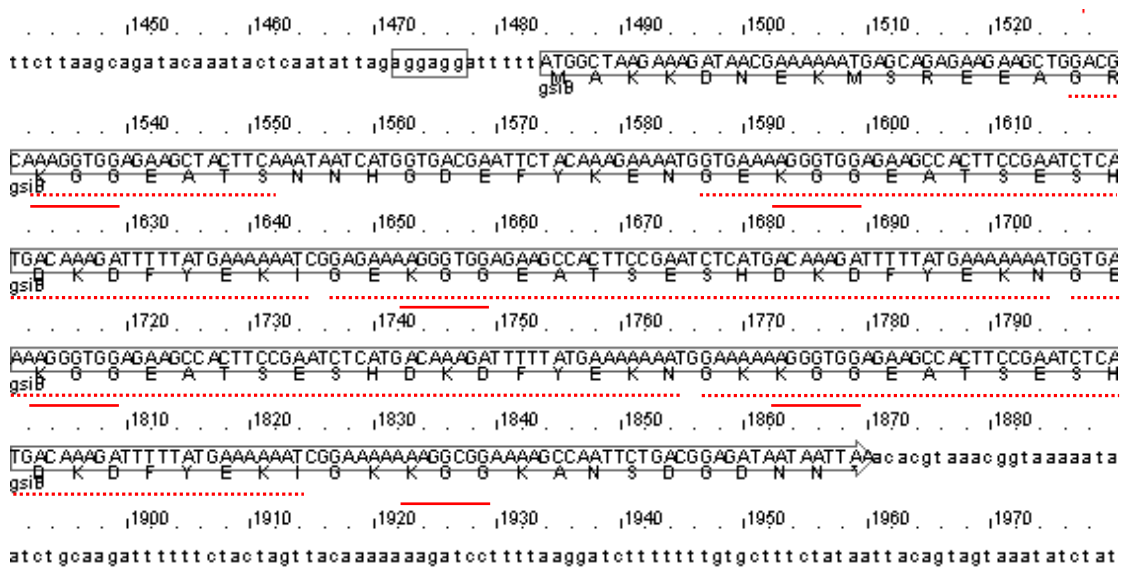


Γράφημα 5.13.

Στοίχιση πολλαπλών αλληλουχιών με το πρόγραμμα MUSCLE της πρωτεΐνης GsiB του pPS1 με τις συγγενικές της πρωτεΐνες. Στην στοίχιση η διαβάθμιση του χρώματος αντανακλά το επίπεδο συντήρησης των αμινοξέων.

Η ανάλυση επιβεβαίωσε την ύπαρξη ενός μεγάλου βαθμού συντήρησης για τα περισσότερα αμινοξέα. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι αντικαταστάσεις των αμινοξέων στις αλληλουχίες των οξυγαλακτικών βακτηρίων εντοπίζονταν και σε τουλάχιστον μια από τις υπόλοιπες μη οξυγαλακτικές αλληλουχίες και μόνο η συντηρημένη μετάλλαξη στη θέση 41 (E με D) διαφοροποίησε τις πρώτες από τις δεύτερες.

Μετά από λεπτομερή εξέταση της αλληλουχίας της πρωτεΐνης GsiB του πλασμιδίου rPS1, εντοπίστηκαν πέντε διαδοχικές επαναλήψεις εκ των οποίων οι τέσσερις αποτελούνται από 20 αμινοξέα (GE/KKGGEATSESHDKDFYEKI/N), ενώ η πρώτη επανάληψη είναι κατατετμημένη κατά εννιά αμινοξέα στο αμινοτελικό της άκρο (Γράφημα 5.14). Η συγκεκριμένη οργάνωση της αλληλουχίας της GsiB του rPS1 είναι πολύ παρόμοια με αυτήν που έχει αναφερθεί για την GsiB του *B. subtilis* με την εξαίρεση ότι η τελευταία φέρει πέντε πλήρεις 20-μερείς επαναλήψεις (Stacy & Aalen, 1998).



Γράφημα 5.14.

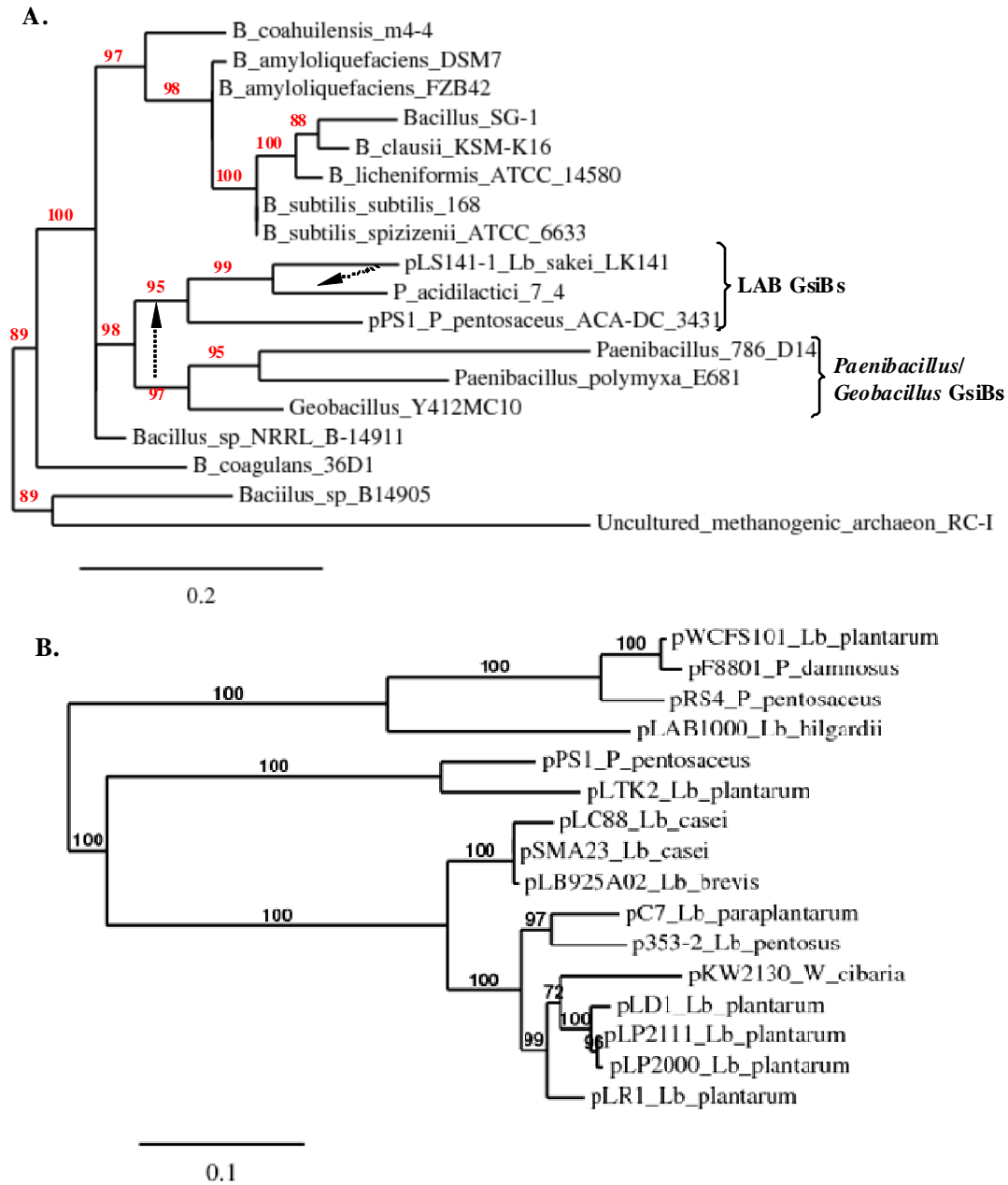
Η αλληλουχία του γονιδίου *gsiB* του rPS1 με την αναρροϊκή και καταρροϊκή περιοχή καθώς και η προκύπτουσα αμινοξική αλληλουχία κάτωθι από το αντίστοιχο κωδικόνιο (κώδικας ενός γράμματος). Οι διαδοχικές επαναλήψεις υπογραμμίζονται από διακεκομμένες κόκκινες γραμμές ενώ οι κανονικές κόκκινες γραμμές καταδεικνύουν τα επαναλαμβανόμενα μοτίβα KGG.

Το πρόγραμμα InterProScan αναγνώρισε δύο μοτίβα LEA στην αλληλουχία της GsiB του pPS1 που εκτείνονται στις περιοχές 13-67 και 76-124. Αυτή η διαπίστωση είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες όπου αναφέρεται ότι οι διαδοχικές επαναλήψεις της πρωτεΐνης GsiB του *B. subtilis* παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με τις πρωτεΐνες LEA φυτικής προέλευσης της ομάδας 1 (Stacy & Aalen, 1998). Επιπλέον, εντοπίστηκαν έξι μοτίβα KGG, όλα εκ των οποίων συμπεριλαμβάνονται στις δυο περιοχές LEA. Το μοτίβο KGG αποτελεί χαρακτηριστική επαναλαμβανόμενη αλληλουχία πρωτεϊνών που επάγονται σε συνθήκες στρες (Robbe-Saule *et al.*, 2007) και εντοπίζεται εσωτερικά των διαδοχικών επαναλήψεων στις πρωτεΐνες LEA της ομάδας 1 (Wise & Tunnacliffe, 2004).

5.3.3.3. Η οριζόντια μεταφορά του γονιδίου *gsiB* στα οξυγαλακτικά βακτήρια

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η πρωτεΐνη GsiB εντοπίστηκε στα οξυγαλακτικά βακτήρια σε μόνο τρεις περιπτώσεις και συγκεκριμένα στα πλασμίδια pPS1 και pLS141-1 καθώς και στο χρωμόσωμα του *P. acidilactici* 7_4. Ο χαρακτηρισμός της αλληλουχίας και η αναζήτηση BLASTP έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες GsiB των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι ομόλογες με τις αντίστοιχες των *Bacillales*. Σε αυτό το σημείο μελετήθηκε η εξελικτική σχέση των πρωτεϊνών GsiB των οξυγαλακτικών βακτηρίων σε σχέση με τις υπόλοιπες GsiBs με σκοπό να εκτιμηθεί η πιθανή προέλευσή τους. Επίσης αναζητήθηκε η εξελικτική πορεία των πρωτεϊνών Rep των πλασμιδίων pPS1 and pLS141-1. Η Rep του pPS1 βρέθηκε να σχετίζεται με αντίστοιχες πρωτεΐνες από άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια με πιο κοντινή την Rep του πλασμιδίου pLTK2 απομονωμένου από τον *Lb. plantarum* (Γράφημα 5.15.B). Αντίθετα, οι GsiBs των οξυγαλακτικών βακτηρίων διαμόρφωσαν ένα ξεχωριστό κλάδο μέσα στο φυλογενετικό δέντρο που περιβαλλόταν αποκλειστικά από πρωτεΐνες που απορρέουν από *Bacillales* (Γράφημα 5.15.A). Στο συγκεκριμένο φυλογενετικό δέντρο δεν υπήρχε καμία άλλη πρωτεΐνη οξυγαλακτικών βακτηρίων, δεδομένου ότι ακόμα και η αναζήτηση PSI-BLAST δεν επέστρεψε κανένα αποτέλεσμα οξυγαλακτικών βακτηρίων ούτε ακόμα ενός μακρινού ομολόγου. Η φυλογενετική ανάλυση υποστηρίζει το γεγονός ότι η GsiB των οξυγαλακτικών βακτηρίων μοιράζεται κοινό πρόγονο με τις GsiBs των *Bacillales*. Η φυλογενετική απόσταση μεταξύ των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των *Bacillales* είναι προφανής και δεδομένη. Παρόλα αυτά, η στενή σχέση των πρωτεϊνών GsiBs που αυτοί οι μικροοργανισμοί φέρουν, υποδηλώνει φαινόμενο οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων

(HGT). Η εν γένει τοπολογία των οξυγαλακτικών GsiBs συνιστά το ότι ο προγονικός δότης ήταν κάποιος οργανισμός *Bacillales*.



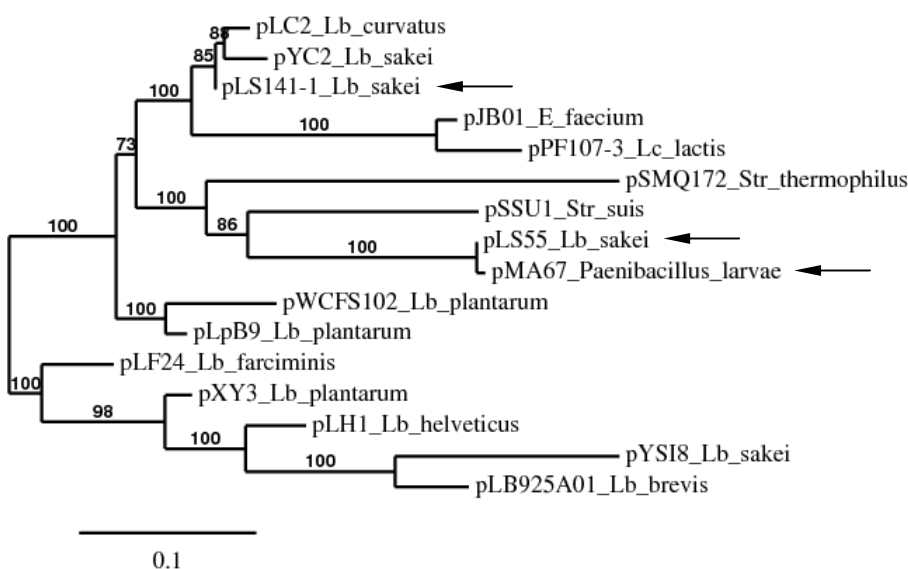
Γράφημα 5.15.

Φυλογενετική ανάλυση της πρωτεΐνης GsiB του πλασμιδίου pPS1 (A) και της πρωτεΐνης Rep του πλασμιδίου pPS1 (B) με τις συγγενικές τους πρωτεΐνες. Και στις δυο περιπτώσεις τα φυλογενετικά δέντρα κατασκευάστηκαν όπως περιγράφεται στο κείμενο. Τα διακεκομμένα βέλη στο (A) υποδεικνύουν τις περιπτώσεις HGT όπως αυτές προβλέφθηκαν με το πρόγραμμα T-REX. Οι αγκύλες και τα κανονικά βέλη σημειώνουν τη θέση σημαντικών κλάδων ή πρωτεϊνών που αναφέρονται στο κείμενο.

Με σκοπό να διερευνηθεί αναλυτικότερα το φαινόμενο της HGT, χρησιμοποιήθηκε το T-REX, ένα πρόγραμμα το οποίο ανιχνεύει διαφοροποιήσεις στην τοπολογία του φυλογενετικού δέντρου ενός γονιδίου/πρωτεΐνης σε σχέση με το αντίστοιχο δέντρο των ειδών και υπολογίζει πιθανά σενάρια HGT κατά την εξέλιξη των συγκεκριμένων οργανισμών (Makarenkov, 2001).

Κατά συνέπεια, το T-REX πρόβλεψε τις πιθανές περιπτώσεις οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων αναλύοντας τις διαφορές μεταξύ του φυλογενετικού δέντρου της πρωτεΐνης GsiB και του αντίστοιχου 16S rDNA δέντρου ειδών. Ανάμεσα στις πιθανές περιπτώσεις HGT που εντοπίστηκαν ήταν η μεταφορά του γονιδίου *gsiB* από τον κλάδο των *Paenibacillus/Geobacillus* στον κλάδο των οξυγαλακτικών βακτηρίων καθώς και η διασπορά του γονιδίου από το πλασμίδιο pLS141-1 του *Lb. sakei* στο χρωμόσωμα του *P. acidilactici* (Γράφημα 5.15.A).

Αυτά τα δύο πιθανά γεγονότα της οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων υποστηρίχθηκαν επιπλέον από την περαιτέρω ανάλυση του πλασμιδίου pLS141-1. Τα πιο κοντινά αποτελέσματα του φυλογενετικού δέντρου της πρωτεΐνης Rep του pLS141-1, όπως ήταν αναμενόμενο, ήταν οξυγαλακτικά βακτήρια, πλην όμως ανάμεσά τους βρέθηκε η πρωτεΐνη Rep του πλασμιδίου pMA67 του *Paenibacillus larvae* (89% ομοιότητα, e -value $8.0e^{-99}$) και του πλασμιδίου pLS55 του *Lb. sakei* (90% ομοιότητα, e -value $2.0e^{-99}$) (Γράφημα 5.16).

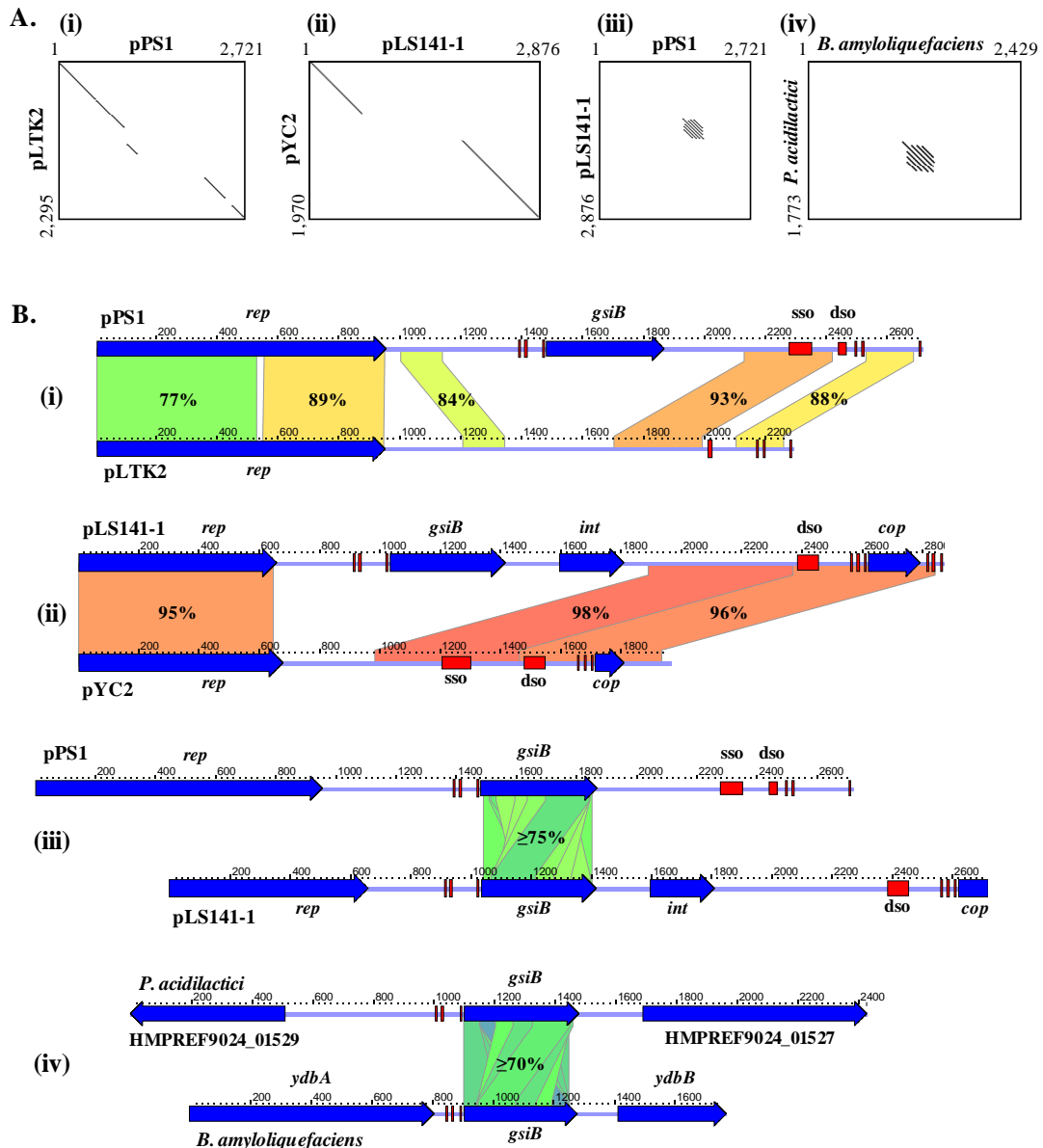


Γράφημα 5.16.

Φυλογενετική ανάλυση της πρωτεΐνης Rep του πλασμιδίου pLS141-1 με τις συγγενικές του πρωτεΐνες.

Το pMA67 είναι ένα κινητοποιήσιμο πλασμίδιο που φέρει ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη (Murray *et al.*, 2007) ενώ το πλασμίδιο pLS55, το οποίο απομονώθηκε πρόσφατα από τον *Lb. sakei* (Ammor *et al.*, 2008) είναι όμοιο με το pMA67 (μόνο 7 νουκλεοτίδια διαφέρουν από συνολικά 5030). Η απόκτηση του pMA67/pLS55 ρεπλικονίου τόσο από τον *P. larvae* όσο και από τον *Lb. sakei* έχει προταθεί ότι ευθύνεται για το φαινόμενο HGT του γονιδίου *tetL* που φέρουν (Ammor *et al.*, 2008). Με βάση τα δεδομένα της παρούσας μελέτης αλλά και την υπάρχουσα βιβλιογραφία σχηματίστηκε η εξής υπόθεση όσον αφορά τη μεταφορά της πρωτεΐνης GsiB στα οξυγαλακτικά βακτήρια. Σε πρώτο στάδιο το γονίδιο της GsiB έγινε κινητή μονάδα μέσω ενσωμάτωσης σε πλασμίδιο ενός οργανισμού *Bacillales*. Το πλασμίδιο αυτό έπρεπε να είναι σε θέση να αναπαράγεται τόσο στους *Bacillales* όσο και στα οξυγαλακτικά βακτήρια (π.χ. όπως το πλασμίδιο pLS141-1 που φέρει σκελετό αντιγραφής παρόμοιο με τα pMA67 και pLS55). Το εν λόγω πλασμίδιο στη συνέχεια μεταφέρθηκε από κάποιον προγονικό μικροοργανισμό-δότη στα οξυγαλακτικά βακτήρια, όπου είτε παρέμεινε ως ρεπλικόνιο, είτε μεταδόθηκε με ανασυνδυασμό σε άλλα οξυγαλακτικά πλασμίδια (π.χ. στο pPS1) ή στο χρωμόσωμά τους (π.χ. στο γονιδίωμα του *P. acidilactici* 7_4).

Με σκοπό να υποστηριχθεί αυτή η υπόθεση με περισσότερες δεδομένα, η μελέτη επεκτάθηκε σε νουκλεοτιδικό επίπεδο. Όλες οι υπό εξέταση πλασμιδιακές αλληλουχίες συγχρονίστηκαν ως προς το πρώτο νουκλεοτίδιο του γονιδίου *rep*. Σύμφωνα με τις αναζητήσεις BLASTN, τα πλασμίδια pLTK2 and pYC2 (Yang & Chang, 2009) έδειξαν την υψηλότερη ομοιότητα με τις αλληλουχίες των pPS1 και pLS141-1, αντίστοιχα και συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση σύγκρισης κατά ζεύγη. Οι μήτρες σημειακών γραφημάτων (dot plot matrices) μεταξύ των πλασμιδιακών αλληλουχιών pPS1 και pLTK2, καθώς επίσης και μεταξύ των pLS141-1 και pYC2, έδειξαν ένα παρόμοιο μοτίβο ομολογίας που εκτείνεται στην αρχή και στο τέλος των συγχρονισμένων πλασμιδίων (Γράφημα 5.17.A.i και ii). Η συγκριτική χαρτογράφηση μεταξύ των pPS1 και pLTK2 κατέδειξε ότι τα τμήματα υψηλής ομοιότητας (> 70%) περιορίστηκαν στον σκελετό αντιγραφής και ότι η κύρια διαφορά τους ήταν ένα τμήμα εισαγωγής (1 kb κατά προσέγγιση) στην περιοχή μετά το γονίδιο *rep* του pPS1 που περιλαμβάνει το γονίδιο *gsiB* (Γράφημα 5.17.B.i). Όσον αφορά τα πλασμίδια pLS141-1 και pYC2, η ομοιότητα του σκελετού αντιγραφής ήταν ακόμα πιο εμφανής και επίσης το *gsiB* εντοπίστηκε μετά το γονίδιο *rep* στο pLS141-1 στο τμήμα εισαγωγής (1.3 kb κατά προσέγγιση) (Γράφημα 5.17.B.ii).



Γράφημα 5.17.

(A). Μήτρες σημειακών γραφημάτων κατά τη σύγκριση μεταξύ των (i) pPS1 (*P. pentosaceus*) και pLTK2 (*Lb. plantarum*), (ii) pLS141-1 (*Lb. sakei*) και pYC2 (*Lb. sakei*), (iii) pPS1 και pLS141-1 και (iv) των χρωμοσωμικών τμημάτων του γονιδίου *gsiB* με τις αναρροϊκές και καταρροϊκές περιοχές των *B. amyloliquefaciens* FZB42 και *P. acidilactici* 7_4. (B). Στοιχισή των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών κατά ζεύγη (όπως αυτά αναφέρονται στις συγκρίσεις 4Ai, ii, iii και iv) όπου οι περιοχές ομολογίας μεταξύ των αλληλουχιών αποτυπώνονται με διαβάθμιση χρώματος που αντικατοπτρίζει το ποσοστό ομοιότητας. Το ακριβές ποσοστό ομοιότητας παρουσιάζεται μέσα στις χρωματισμένες περιοχές. Τα δομικά στοιχεία των ακολουθιών επισημαίνονται ανάλογα στο Γράφημα. Τα κόκκινα τετράγωνα αντιστοιχούν στις αλληλουχίες -35, -10 και RBS του επικείμενου γονιδίου (από δεξιά προς τα αριστερά).

Οι αλληλουχίες των pPS1 και pLS141-1 είχαν μια περιοχή πλήρους ομολογίας που έφερε αρκετά τμήματα επικάλυψης αποκλειστικά στο γονίδιο *gsiB* (Γράφημα 5.17.A.iii και Γράφημα 5.17.B.iii). Αυτό το περίεργο μοτίβο ομοιότητας οφείλεται στην 20-μερή αμινοξική αλληλουχία που επαναλαμβάνεται διαδοχικά στην πρωτεΐνη GsiB και το οποίο είναι συντηρημένο και σε επίπεδο νουκλεοτιδίων. Το ίδιο μοτίβο ομοιότητας λήφθηκε όταν συγκρίθηκαν οι χρωμοσωμικές περιοχές του *B. amyloliquefaciens* FZB42 και του *P. acidilactici* 7_4 που φέρουν το γονίδιο *gsiB*, μαζί με τα αναρροϊκά και καταρροϊκά γονίδια του (Γράφημα 5.17.A.iv και Γράφημα 5.17.B.iv). Επιπλέον, η σύγκριση BLASTN των γονιδίων *rep* των pLS141-1 και pYC2 έδειξε υψηλή ομοιότητα με το αντίστοιχο γονίδιο του πλασμιδίου pMA67, γεγονός που επιβεβαιώθηκε και με την αναζήτηση BLASTP σε επίπεδο πρωτεϊνών. Αυτή η παρατήρηση υποστηρίζει την κοινή προέλευση των εν λόγω πλασμιδίων.

Η ανωτέρα ανάλυση σε νουκλεοτιδικό επίπεδο υποστήριξε την αρχική υπόθεση για το μηχανισμό της οριζόντιας μεταφοράς του γονιδίου *gsiB* στα οξυγαλακτικά βακτήρια. Η κοινή προέλευση των pMA67 και pLS141-1 υποδηλώνει ότι το δεύτερο πλασμίδιο ή κάποια προγονική μορφή του θα μπορούσε να αποτελέσει το πιθανό 'όχημα' μεταφοράς γονιδίων μεταξύ των οξυγαλακτικών βακτηρίων και των *Bacillales*. Η ύπαρξη των pPS1- και pLS141-1- κενών φορέων (δηλαδή των pLTK2 και pYC2, αντίστοιχα) υποδεικνύει ότι το γονίδιο *gsiB* αποκτήθηκε από τα πλασμίδια αυτά με ανασυνδυασμό. Επιπλέον, τα pPS1 and pLS141-1 θα μπορούσαν να αποτελέσουν πιθανούς δότες του *gsiB* στο χρωμόσωμα του *P. acidilactici* 7_4. Τέλος, θα πρέπει να τονιστεί, ότι ενώ το γονίδιο *gsiB* του *B. amyloliquefaciens* FZB42 κατέχει ένα τυπικό σ^B υποκινητή (Petersohn *et al.*, 1999), τέτοια αλληλουχία δεν εντοπίστηκε ούτε στο χρωμόσωμα του *P. acidilactici* 7_4 ούτε στα πλασμίδια pPS1 και pLS141-1 (Γράφημα 5.18). Αυτή η διαπίστωση δείχνει ότι ανεξάρτητα από την πραγματική εξελικτική διαδικασία απόκτησης του *gsiB* από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, ο υποκινητής σ^B απορρίφθηκε, καθώς δεν θα είχε καμία χρησιμότητα στη ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου *gsiB* σε αυτά τα βακτήρια, τα οποία στερούνται ενός ορθόλογου σ^B γονιδίου.

-35
-10
RBS

pPS1: AACCGTTACTTAAAAAATTACGTGATAATATAGCGTTAGTAGAAGAAATTGTTCTTAAGCAGATACAAATACTCAATATTAGAGGAGGATTTTATG

pLS141-1: AATTTCCTAAAACCTAAGCATAATGTTGTGGTCTAGTAAGAAAGCGCTTAATATAAGACCGTAGAAGAAATCAAATTTTAGGAGGAAAGAGAAATG

P. acidilactici 7_4: TTTTCGAGCATCTGCAAGCGTTAAATTTGTAATCGCTTAAAAAGCATTTAACATAACACTCGTAGAAAAAACTAACTCAAGGAGGAATGAAATATG

B. subtilis str. 168: TTTTPTTAGTGGAACATACCCAATGTGTTTGTGTTGTTTAAAGAATTGTGAGCGGGAATACAACAACCAACCAATTAAGGAGGAATTCAAATG

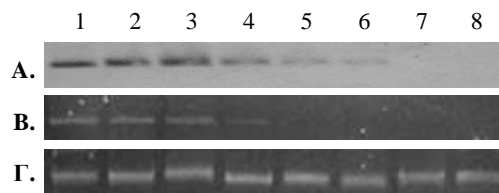
TTTAAAGAATTGTGAGCGGGAATACAACAACCAACCAATTAAGGAGGAATTCAAATG
 σ^B promoter

Γράφημα 5.18.

Υποκινητές των γονιδίων *gsiB* των οξυγαλακτικών βακτηρίων και του *B. subtilis* str. 168. Στα οξυγαλακτικά βακτήρια δεν εντοπίστηκαν υποκινητές σ^B που να καλύπτουν τις προϋποθέσεις της σ^B συναινετικής αλληλουχίας GTTTaa (-35 περιοχή) και GGG(A/T)A(A/T) (-10 περιοχή) όπως περιγράφεται σε προηγούμενη έρευνα (Petersohn *et al.*, 1999). Ο υποκινητής σ^B ανιχνεύτηκε μόνο στον *B. subtilis*. Στις υπόλοιπες περιπτώσεις οι υπόλοιποι υποκινητές και τα σημεία RBS προβλέφθηκαν όπως αναφέρεται στην Παράγραφο 4.2.4. Το δεξί βέλος δείχνει το κωδικόνιο έναρξης των γονιδίων.

5.3.3.4. Η ριφαμικίνη προκαλεί την αφαίρεση του πλασμιδίου pPS1

Το πλασμίδιο pPS1 βρέθηκε ότι ανήκει στην οικογένεια των RCR πλασμιδίων pC194/pUB110, σύμφωνα με τις ομολογίες των αλληλουχιών του *rep* και *dso* με τις αντίστοιχες άλλων οξυγαλακτικών πλασμιδίων, όπως το pLTK2 (Kaneko *et al.*, 2000, Khan, 1997). Με σκοπό να επιβεβαιωθεί ο RCR μηχανισμός αντιγραφής του pPS1, εκτιμήθηκε η συσσώρευση ενδιάμεσων μονόκλωνων μορίων DNA μετά από αναστολή της δράσης της RNA πολυμεράσης με προσθήκη ριφαμικίνης (Εικόνα 5.6). Η επεξεργασία με τη S1 νουκλεάση του ολικού DNA απομονωμένου από κύτταρα *P. pentosaceus* μέσης λογαριθμικής φάσης, είχε ως αποτέλεσμα την πλήρη εξαφάνιση των μονόκλωνων μορίων DNA (αρνητικός μάρτυρας). Παραδόξως, μετά από έκθεση των κυττάρων σε συγκέντρωση 100 μg/mL ριφαμικίνης για 30 min, δεν εντοπίστηκε σήμα μονόκλωνου DNA (ssDNA). Στη συνέχεια μελετήθηκε η δοσο-εξαρτώμενη σχέση που έδειξε μια οριακή συσσώρευση ssDNA μόνο στις χαμηλές συγκεντρώσεις του αναστολέα (1 μg/mL σε έκθεση για 15 και 30 min) σε σχέση με το μάρτυρα (κύτταρα που δεν είχαν εκτεθεί σε ριφαμικίνη). Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις οδήγησαν σε σταδιακή μείωση και τελική εξαφάνιση των ssDNA (10 και 100 μg/mL για 15 και 30 min). Αυτή η αρνητική επίδραση της ριφαμικίνης στην παρουσία μορίων ssDNA έχει αναφερθεί και προηγουμένως αλλά σε δύο μόνο μελέτες που αφορούσαν τα πλασμίδια pBAA1 και pLG των *Bacillus* sp. (Wu *et al.*, 2003, Seery & Devine, 1993).



Εικόνα 5.6.

(Α). Ανίχνευση μονόκλωνων μορίων DNA του pPS1 με τη μέθοδο του υβριδισμού κατά Southern. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν μέχρι τη μέση λογαριθμική φάση σε MRS χωρίς ριφαμπικίνη (διαδρομή 1), με προσθήκη ριφαμπικίνης 1 μg/mL για 15 min (διαδρομή 2) ή 30 min (διαδρομή 3), 10 μg/mL για 15 min (διαδρομή 4) ή 30 min (διαδρομή 5) και 100 μg/mL για 15 min (διαδρομή 6) ή 30 min (διαδρομή 7). Κλάσμα του ολικού DNA υποβλήθηκε σε αντίδραση με S1 νουκλεάση (διαδρομή 8). (Β). Τα δίκλινα μόρια του πλασμιδίου pPS1 σύμφωνα με τις διαδρομές του (Α). (Γ). Επιβεβαίωση της ίσης φόρτωσης δείγματος για την ανάλυση του υβριδισμού κατά Southern χρησιμοποιώντας το χρωμοσωμικό DNA σαν δείγμα αναφοράς.

Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε επίσης ότι η ποσότητα των δίκλωνων μορίων DNA μειώθηκε παράλληλα με τα μονόκλινα μόρια DNA, μέχρι τελικής εξαφάνισης σε υψηλές συγκεντρώσεις ριφαμπικίνης. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ενώ το εν λόγω αντιβιοτικό σε χαμηλές συγκεντρώσεις προκαλεί συσσώρευση ssDNA καθώς αναστέλλει την RNA πολυμεράση, σε υψηλές συγκεντρώσεις επιφέρει την αφαίρεση του πλασμιδίου pPS1 στον *P. pentosaceus*. Σύμφωνα με τους [Wu et al., 2007](#) και [Seery & Devine, 1993](#) αυτό το φαινόμενο αποδίδεται σε μια ιδιαιτερότητα στο μηχανισμό αντιγραφής ορισμένων πλασμιδίων, η οποία παρόλα αυτά παραμένει άγνωστη.

5.3.3.5. Ο σχετικός αριθμός αντιγράφων του πλασμιδίου pPS1

Ο σχετικός αριθμός των αντιγράφων του pPS1 εκτιμήθηκε με την ποσοτική ανάλυση του πλασμιδιακού και χρωμοσωμικού DNA σε εκχυλίσματα ολικού DNA κυττάρων στατικής φάσης (καλλιέργεια 16 h) του *P. pentosaceus*, με τη μέθοδο real-time Q-PCR. Ο υπολογισμός βασίστηκε στην αναλογία των δυο κλασμάτων. Οι καμπύλες αναφοράς των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων του ολικού DNA (εκμαγείο) απέδωσαν κλίσεις 3.375 and 3.473 για το χρωμοσωμικό γονίδιο *ldhA* και για το πλασμιδιακό γονίδιο *rep*, αντίστοιχα ($R^2 > 0.99$ και στις δυο περιπτώσεις). Ο σχετικός αριθμός υπολογίστηκε ότι είναι 106 ± 6 αντίγραφα ανά χρωμόσωμα. Παρότι

μέχρι τώρα δεν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα για το σχετικό αριθμό αντιγράφων των πλασμιδίων pLTK2 και pLS141-1 (το πρώτο φέρει παρόμοιο σκελετό αντιγραφής και το δεύτερο ομόλογο *gsiB* γονίδιο με το pPS1) για να συγκριθούν τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, μπορεί σαφώς να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι το pPS1 του *P. pentosaceus* θεωρείται πλασμίδιο υψηλού αριθμού αντιγράφων και συνεπώς η πρωτεΐνη GsiB δύναται να παράγεται σε μεγάλες ποσότητες στα κύτταρα του συγκεκριμένου βακτηρίου.

5.3.3.6. Συμπεράσματα

Σε αυτήν την ενότητα περιγράφηκε και χαρακτηρίστηκε το πλασμίδιο pPS1 από τον *P. pentosaceus* ACA-DC 3431. Το pPS1 αποτελεί ένα νέο μέλος της RCR οικογένειας pC194/pUB110 και αποτελεί πλασμίδιο υψηλού αριθμού αντιγράφων (106 ± 6). Φέρει δε το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη GsiB, του οποίου η έκφραση ελέγχεται από τον παράγοντα σ^B στα βακτήρια *Bacillales*. Με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία, η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη αναφορά για την ύπαρξη μιας ομόλογης πρωτεΐνης GsiB αλλά και τον εντοπισμό LEA υδροφιλικών στα οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία ως γνωστόν στερούνται του παράγοντα σ^B .

Επίσης, παρουσιάζεται ο πιθανός μηχανισμός της οριζόντιας μεταφοράς του γονιδίου *gsiB* από τους οργανισμούς *Bacillales* στα οξυγαλακτικά βακτήρια. Η οριζόντια μεταφορά γονιδίων μέσω πλασμιδίων αποτελεί συχνό φαινόμενο στα βακτήρια. Σε αυτό το μηχανισμό απαιτείται το πλασμίδιο-φορέας να δύναται να αναπαράγεται σε ένα ευρύ φάσμα ξενιστών ώστε να παρακάμπτει το φράγμα των ειδών (Thomas & Nielsen, 2005). Το πλασμίδιο pLS141-1 καλύπτει τις προϋποθέσεις ενός φορέα *Paenibacillus/Lactobacillus* καθώς φέρει σκελετό αντιγραφής όμοιο με αυτόν των ρεπλικονίων pMA67/pLS55 που αναπαράγονται τόσο στα οξυγαλακτικά βακτήρια όσο και στους οργανισμούς *Bacillales*. Συνεπώς, το pLS141-1 ή κάποια προγονική του μορφή, αποτέλεσε τον αποδέκτη του *gsiB* στα *Bacillales* που στην πορεία απέδωσε με ανασυνδυασμό είτε στο χρωμόσωμα (π.χ. *P. acidilactici* 7_4) είτε σε πλασμίδια (π.χ. pPS1) οξυγαλακτικών βακτηρίων. Οι Yother *et al.* (2002) αναφέρουν ότι το γονίδιο *gsiB* μεταφέρθηκε στον *B. subtilis* από τα φυτά με οριζόντια μεταφορά και αυτή η παρατήρηση υποστηρίζεται επιπλέον από το γεγονός ότι το συγκεκριμένο γονίδιο απουσιάζει από τον *B. cereus* (Battaglia *et al.*, 2008).

Κάτω από αυτήν την σκοπιά, τα οξυγαλακτικά βακτήρια ενδεχομένως αποτελούν αποδέκτες του συγκεκριμένου γονιδίου μετά από μια οριζόντια μεταφορά που ξεκίνησε από τα φυτά.

Βιβλιογραφία

- Alegre, M. T., Rodriguez, M.C., & Mesas, J.M. 2005. Nucleotide sequence, structural organization and host range of pRS4, a small cryptic *Pediococcus pentosaceus* plasmid that contains two cassettes commonly found in other lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 250, 151-156.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., et al. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-3402.
- Ammor, M.S., Gueimonde, M., Danielsen, M., Zagorec, M., van Hoek, A.H., de Los Reyes-Gavilan, C.G., Mayo, B., & Margolles, A. 2008. Two different tetracycline resistance mechanisms, plasmid-carried *tet(L)* and chromosomally located transposon-associated *tet(M)*, coexist in *Lactobacillus sakei* Rits 9. *Appl Environ Microbiol*, 74, 1394-1401.
- Anisimova, M., & Gascuel, O. 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol*, 55, 539-552.
- Baba, T., Kuwahara-Arai, K., Uchiyama, I., Takeuchi, F., Ito, T., & Hiramatsu, K., 2009. Complete genome sequence of *Macrococcus caseolyticus* strain JCSCS5402, [corrected] reflecting the ancestral genome of the human-pathogenic staphylococci. *J Bacteriol*, 191, 1180-1190.
- Bates, E. E., & Gilbert, H. J. 1989. Characterization of a cryptic plasmid from *Lactobacillus plantarum*. *Gene*, 85, 253-258.
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F., & Covarrubias, A.A. 2008. The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol*, 148, 6-24.
- Benachour, A., Frère, J., Flahaut, S., Novel, G., & Auffray, Y. 1997. Molecular analysis of the replication region of the theta-replicating plasmid pUCL287 from *Tetragenococcus (Pediococcus) halophilus* ATCC33315. *Mol Gen Genet*, 255, 504-513.
- Benachour, A., Frère, J., & Novel, G. 1995. pUCL287 plasmid from *Tetragenococcus halophila (Pediococcus halophilus)* ATCC 33315 represents a new theta-type replicon family of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 128, 167-175.
- Besemer, J., & Borodovsky, M. 1999. Heuristic approach to deriving models for gene finding. *Nucleic Acids Res*, 27, 3911-3920.
- Brigulla, M., Hoffmann, T., Krisp, A., Volker, A., Bremer, E., & Volker, U. 2003. Chill induction of the SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and its contribution to low-temperature adaptation. *J Bacteriol*, 185, 4305-4314.
- Castresana, J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol*, 17, 540-552.
- 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.
- Chenoll, E., Macián, M.C., & Aznar, R. 2006. *Lactobacillus rennini* sp. nov., isolated from rennin and associated with cheese spoilage. *Int J Syst Evol Microbiol*, 56, 449-452.
- Chevenet, F., Brun, C., Banuls, A. L., Jacq, B., & Christen, R. 2006. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics*, 7, 439.

- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J.M., & Gascuel, O. 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res*, *36*, W465-9.
- Desmond, C., Ross, R.P., Fitzgerald, G., & Stanton, C. 2005. Sequence analysis of the plasmid genome of the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* NFBC338 which includes the plasmids pCD01 and pCD02. *Plasmid*, *54*, 160-175.
- de las Rivas, B., Marcobal, A., & Munoz, R. 2004. Complete nucleotide sequence and structural organization of pPB1, a small *Lactobacillus plantarum* cryptic plasmid that originated by modular exchange. *Plasmid*, *52*, 203-211.
- de Vos, W. M., Bron, P.A., & Kleerebezem, M. 2004. Post-genomics of lactic acid bacteria and other food-grade bacteria to discover gut functionality. *Curr Opin Biotechnol*, *15*, 86-93.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M. J., Espinosa, M., & Diaz-Orejas, R. 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*, *62*, 434-464.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, *32*, 1792-7.
- Francia, M. V., Varsaki, A., Garcillan-Barcia, M. P., Latorre, A., Drainas, C., & de la Cruz, F. 2004. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev*, *28*, 79-100.
- Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J.M., Garcarrubio, A., & Covarrubias, A.A. 2000. Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J Biol Chem*, *275*, 5668-74.
- Guindon, S., & Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol*, *52*, 696-704.
- Huang, X., & Madan, A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res*, *9*, 868-77.
- Josson, K., Soetaert, P., Michiels, F., Joos, H., & Mahillon, J. 1990. *Lactobacillus hilgardii* plasmid pLAB1000 consists of two functional cassettes commonly found in other gram-positive organisms. *J Bacteriol*, *172*, 3089-3099.
- Kaneko, Y., Kobayashi, H., Kiatpapan, P., Nishimoto, T., Napitupulu, R., Ono, H., & Murooka, Y. 2000. Development of a host-vector system for *Lactobacillus plantarum* L137 isolated from a traditional fermented food produced in the Philippines. *J Biosci Bioeng*, *89*, 62-7.
- Khan, S. A. 1997. Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*, *61*, 442-455.
- Kovacs, T., Hargitai, A., Kovacs, K.L., & Mecs, I. 1998. pH-dependent activation of the alternative transcriptional factor sigmaB in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett*, *165*, 323-8.
- Leenhouts, K. J., Tolner, B., Bron, S., Kok, J., Venema, G., & Seegers, J. F. 1991. Nucleotide sequence and characterization of the broad-host-range lactococcal plasmid pWVO1. *Plasmid*, *26*, 55-66.
- Liu, M., Siezen, R.J., & Nauta, A. 2009. *In silico* prediction of horizontal gene transfer events in *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* reveals protooperation in yogurt manufacturing. *Appl Environ Microbiol*, *75*, 4120-9.
- Makarenkov, V. 2001. T-REX: reconstructing and visualizing phylogenetic trees and reticulation networks. *Bioinformatics*, *17*, 664-668.

- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J. H., Diaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., & Mills, D. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 15611-15616.
- Maul, B., Volker, U., Riethdorf, S., Engelmann, S., & Hecker, M. 1995. sigma B-dependent regulation of *gsiB* in response to multiple stimuli in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet*, 248, 114-120.
- Maze, A., Boël, G., Zúñiga, M., Bourand, A., Loux, V., Yebra, M.J., Monedero, V., Correia, K., Jacques, N., Beaufils, S., Poncet, S., Joyet, P., Milohanic, E., Casarégola, S., Auffray, Y., Pérez-Martínez, G., Gibrat, J.F., Zagorec, M., Francke, C., Hartke, A., & Deutscher, J. 2010. Complete genome sequence of the probiotic *Lactobacillus casei* strain BL23. *J Bacteriol*, 192, 2647-2648.
- Murray, K.D., Aronstein, K.A., & de Leon, J.H. 2007. Analysis of pMA67, a predicted rolling-circle replicating, mobilizable, tetracycline-resistance plasmid from the honey bee pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Plasmid*, 58, 89-100.
- Noguchi, H., Park, J., & Takagi, T. 2006. MetaGene: prokaryotic gene finding from environmental genome shotgun sequences. *Nucleic Acids Res*, 34, 5623-5630.
- O'Connor, E. B., O'Sullivan, O., Stanton, C., Danielsen, M., Simpson, P.J., Callanan, M.J., Ross, R.P., & Hill, C. 2007. pEOC01: a plasmid from *Pediococcus acidilactici* which encodes an identical streptomycin resistance (*aadE*) gene to that found in *Campylobacter jejuni*. *Plasmid*, 58, 115-126.
- Park, W. J., Lee, K. H., Lee, J. M., Lee, H. J., Kim, J. H., Lee, J. H., et al. 2004. Characterization of pC7 from *Lactobacillus paraplantarum* C7 derived from Kimchi and development of lactic acid bacteria-Escherichia coli shuttle vector. *Plasmid*, 52, 84-88.
- Petersohn, A., Bernhardt, J., Gerth, U., Hoper D., Koburger, T., Volker, U., & Hecker, M. 1999. Identification of sigma(B)-dependent genes in *Bacillus subtilis* using a promoter consensus-directed search and oligonucleotide hybridization. *J Bacteriol*, 181, 5718-5724.
- Reyes, J. L., Campos, F., Weim H., Aroram R., Yangm Y., Karlsonm D.T., & Covarrubias, A.A. 2008. Functional dissection of hydrophilins during in vitro freeze protection. *Plant Cell Environ*, 31, 1781-90.
- Robbe-Saule, V., Lopes, M.D., Kolb, A., & Norel, F. 2007. Physiological effects of *Crl* in *Salmonella* are modulated by sigmaS level and promoter specificity. *J Bacteriol*, 189, 2976-2987.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Schroeter, J., & Klaenhammer, T. 2009. Genomics of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 292, 1-6.
- Seery, L., & Devine, K.M.. 1993. Analysis of features contributing to activity of the single-stranded origin of *Bacillus* plasmid pBAA1. *J Bacteriol*, 175, 1988-1994.

- Siezen, R. J., Renckens, B., van Swam, I., Peters, S., van Kranenburg, R., Kleerebezem, M., & de Vos, W.M. 2005. Complete sequences of four plasmids of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 reveal extensive adaptation to the dairy environment. *Appl Environ Microbiol*, 71, 8371-8382.
- Skulj, M., Okrslar, V., Jalen, S., Jevsevar, S., Slanc, P., Strukelj, B., et al. 2008. Improved determination of plasmid copy number using quantitative real-time PCR for monitoring fermentation processes. *Microb Cell Fact*, 7, 6.
- Smith, M.C., & Thomas, C.D., 2004. An accessory protein is required for relaxosome formation by small staphylococcal plasmids. *J Bacteriol*, 186, 3363-3373.
- Somkuti, G. A., & Steinberg, D.H. 1999. Distribution of plasmid-borne stress protein genes in *Streptococcus thermophilus* and other lactic acid bacteria. *Curr Microbiol*, 38, 43-47.
- Stacy, R.A., & Aalen, R.B. 1998. Identification of sequence homology between the internal hydrophilic repeated motifs of group 1 late-embryogenesis-abundant proteins in plants and hydrophilic repeats of the general stress protein GsiB of *Bacillus subtilis*. *Planta*, 206, 476-478.
- Sudhamani, M., Ismaiel, E., Geis, A., Batish, V., & Heller, K. J. 2008. Characterisation of pSMA23, a 3.5 kbp plasmid of *Lactobacillus casei*, and application for heterologous expression in *Lactobacillus*. *Plasmid*, 59, 11-19.
- 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.
- Thomas, C.M., & Nielsen, K.M. 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 3, 711-721.
- Toomey, N., Monaghan, A., Fanning, S., & Bolton, D.J. 2009. Assessment of horizontal gene transfer in Lactic acid bacteria - a comparison of mating techniques with a view to optimising conjugation conditions. *J Microbiol Methods*, 77, 23-28.
- 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 Kranenburg, R., Kleerebezem, M., & de Vos, W.M. 2000. Nucleotide sequence analysis of the lactococcal EPS plasmid pNZ4000. *Plasmid*, 43, 130-136.
- van Reenen, C. A., Van Zyl, W. H., & Dicks, L. M. 2006. Expression of the immunity protein of plantaricin 423, produced by *Lactobacillus plantarum* 423, and analysis of the plasmid encoding the bacteriocin. *Appl Environ Microbiol*, 72, 7644-7651.
- van Schaik, W., & Abee, T. 2005. The role of sigmaB in the stress response of Gram-positive bacteria - targets for food preservation and safety. *Curr Opin Biotechnol*, 16, 218-224.
- Wada, T., Noda, M., Kashiwabara, F., Jeon, H. J., Shirakawa, A., Yabu, H., et al. 2009. Characterization of four plasmids harboured in a *Lactobacillus brevis* strain encoding a novel bacteriocin, brevicin 925A, and construction of a shuttle vector for lactic acid bacteria and *Escherichia coli*. *Microbiology*, 155, 1726-1737.
- Wise, M. J., & Tunnacliffe, A. 2004. POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends Plant Sci*, 9, 13-17.
- Wu, E., Jun, L., Yuan, Y., Yan, J., Berry, C., & Yuan, Z. 2007. Characterization of a cryptic plasmid from *Bacillus sphaericus* strain LP1-G. *Plasmid*, 57, 296-305.

- Yang, E.J., & Chang, H.C. 2009. Analysis of pYC2, a cryptic plasmid in *Lactobacillus sakei* BM5 isolated from kimchi. *Biotechnol Lett*, 31, 123-130.
- Yother, J., Trieu-Cuot, P., Klaenhammer, T.R., & De Vos, W.M. 2002. Genetics of *streptococci*, *lactococci*, and *enterococci*: review of the sixth international conference. *J Bacteriol*, 184, 6085-6092.
- Zhu, Y., Zhang, Y., & Li, Y. 2009. Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. *Appl Microbiol Biotechnol*, 83, 597-610.

Περίληψη

Ο σκοπός της πρώτης ενότητας της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της μικροχλωρίδας παραδοσιακών Ελληνικών τυριών Π.Ο.Π., η απομόνωση νέων στελεχών και η μελέτη των βιοχημικών/τεχνολογικών τους ιδιοτήτων που σχετίζονται με το δυναμικό εφαρμογής τους ως εναρκτήριοι καλλιέργειες σε ζυμώσεις τυριών. Έτσι, διερευνήθηκε η μικροβιακή χλωρίδα των τυριών Φορμαέλλα, Κοπανιστή, Φέτα και Μάνα (Κοπανιστής). Από αυτά τα δείγματα απομονώθηκαν 133 'άγρια' οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία ταυτοποιήθηκαν με φαινοτυπικές μεθόδους. Οι μεσόφιλοι γαλακτοβάκιλλοι αποτέλεσαν την κυρίαρχη μικροχλωρίδα. Στη συνέχεια μελετήθηκαν οι βιοχημικές/τεχνολογικές ιδιότητες των απομονώσεων. Τα θερμοφιλά στελέχη (γαλακτοβάκιλλοι και κόκκοι) παρουσίασαν την καλύτερη οξυπαραγωγική ικανότητα, ενώ οι θερμοφιλοι γαλακτοβάκιλλοι αποτέλεσαν τα πιο πρωτεολυτικά στελέχη. Οι θερμοφιλοι κόκκοι είχαν τις υψηλότερες πεπτιδολυτικές αλλά και εστερολυτικές δραστηριότητες. Μόνο πέντε στελέχη ήταν λιπολυτικά και κανένα από τα υπό εξέταση στελέχη δεν βρέθηκε να καταβολίζει το κιτρικό οξύ ως μοναδική πηγή άνθρακα. Η ανάλυση των παραγόμενων μεταβολιτών των απομονώσεων με τη μέθοδο GC-MS σε συνδυασμό με την επακόλουθη στατιστική ανάλυση των κυρίων συνιστωσών, διαχώρισαν τις απομονώσεις σε ομάδες, οι οποίες μάλιστα συμπίπτουν με την φαινοτυπική ομαδοποίηση. Η ανάλυση των πτητικών ενώσεων μέσω της ανάλυσης 'e-nose' επέδειξε παρόμοια αποτελέσματα. Η μέθοδος SDS-PAGE, PFGE και η αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA, έδειξε ότι οι *Lb. rennini* και *Lb. acidipiscis* ήταν τα μοναδικά μικροβιακά είδη που απομονώθηκαν από τα δείγματα της Κοπανιστής και της Μάνας. Αυτά τα στελέχη παρήγαγαν αλκοόλες και αλδεΐδες ως κύριες πτητικές ενώσεις, οι οποίες προέρχονται από δευτερογενή καταβολισμό αμινοξέων και οι οποίες έχουν σημαντική συνεισφορά στο σχηματισμό του αρώματος και της γεύσης στα τυριά.

Στη συνέχεια εξετάστηκε η δυναμική τεσσάρων 'άγριων' οξυγαλακτικών βακτηρίων (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* και *E. faecalis*), απομονωμένων από το προηγούμενο στάδιο και επιλεγμένων με βάση τα αποτελέσματα των βιοχημικών/τεχνολογικών ιδιοτήτων τους, στην πιλοτική παραγωγή ενός τυριού παρασκευασμένου από γίδινο γάλα. Το τυρί αναλύθηκε μικροβιολογικά, φυσικοχημικά και οργανοληπτικά κατά τη διάρκεια

της ωρίμανσης (30 ημερών). Οι πληθυσμοί των εναρκτήριων καλλιεργειών αυξήθηκαν τις πρώτες 24 h και μετά παρέμειναν σταθεροί κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Το τελικό προϊόν ήταν ένα μαλακό τυρί με ήπιο άρωμα/γεύση, καλή υφή και καλά μικροβιολογικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά.

Η δεύτερη ενότητα της παρούσας μελέτης αφορά τη διερεύνηση της απόκρισης του *Lb. acidipiscis* σε συνθήκες ωσμωτικού στρες. Ο *Lb. acidipiscis* ACA-DC 1533 που απομονώθηκε από το δείγμα της παραδοσιακής Κοπανιστής (πρώτη ενότητα) παρουσίασε έναν ευδιάκριτο αλοανθεκτικό φαινότυπο. Ο σκοπός αυτής της ενότητας ήταν ο εντοπισμός μηχανισμών που ενεργοποιούνται στο βακτήριο αυτό σε συνθήκες ωσμωτικού στρες, καθώς και ο προσδιορισμός των πιθανών εμπλεκόμενων ωσμωλυτών. Οι μεταγραφικές αλλαγές των κυττάρων του *Lb. acidipiscis* σε ισο- και υπερωσμωτικές συνθήκες μελετήθηκαν με τη μέθοδο RAP-PCR, χρησιμοποιώντας ένα αυθαίρετο εκκινητή για να ενισχυθεί το ολικό RNA. Το παραγόμενο cDNA αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση. Ακολούθησε σύγκριση των αποτυπωμάτων RNA που προέκυψαν, μεταξύ των κυττάρων που είχαν υποβληθεί σε υπερωσμωτικό στρες και των κυττάρων μαρτύρων και οι ζώνες που παρουσίασαν ποσοτικές διαφορές, κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν. Η σύγκριση των αλληλουχιών στις βάσεις δεδομένων επέτρεψε το χαρακτηρισμό έξι γονιδίων διαφορετικής έκφρασης, καθώς και την ανίχνευση πλασμιδιακού DNA που φέρει το στέλεχος. Η τεχνική της RT-PCR χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση των αλλαγών στα προφίλ του RNA του στελέχους. Ανάμεσα στα γονίδια που βρέθηκαν να επάγονται στην υψηλή ωσμωμοριακότητα ήταν και αυτά που κωδικοποιούν την ΠΒ και ΠΑ υπομονάδα του συστήματος PEP-PTS της μαννόζης/σορβόζης. Η ανάπτυξη του *Lb. acidipiscis* σε 10% (w/v) NaCl παρουσίασε σημαντική βελτίωση όταν προστέθηκε στο μέσο μαννόζη ή/και σορβόζη ακόμα και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις της τάξης των 1 μΜ. Η ωσμωπροστατευτική δράση αλλά και η συγκέντρωση στην οποία αυτή επιτεύχθηκε ήταν συγκρίσιμες με τις αντίστοιχες άλλων γνωστών βακτηριακών ωσμωλυτών όπως η γλυκίνη-βεταΐνη. Αυτό το γεγονός υποδεικνύει ότι η μαννόζη και η σορβόζη αποτελούν δυο νέους ωσμωλύτες. Επιπλέον, σε ενζυμικό επίπεδο η ενεργότητα του συστήματος μαννόζης/σορβόζης αυξήθηκε κατά προσέγγιση επί 1.8 φορές σε κύτταρα που είχαν εκτεθεί σε υψηλή συγκέντρωση NaCl σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρες.

Στο τρίτο στάδιο της μελέτης διερευνήθηκε το πλασμιδιακό περιεχόμενο τριών 'άγριων' οξυγαλακτικών βακτηρίων (απομονωμένων όπως περιγράφεται στην

πρώτη ενότητα), με σκοπό τον εντοπισμό γονιδίων που πιθανώς να συνεισφέρουν σε τεχνολογικές ιδιότητες. Αρχικά χαρακτηρίστηκε το πλασμίδιο pLAC1 του στελέχους *Lb. acidipiscis* ACA-DC 1533 που απομονώθηκε από το δείγμα της Κοπανιστής. Το pLAC1 έχει μέγεθος 3478 bp και η *ab initio* ανάλυση έδειξε τέσσερα *orfs*. Τα *orf1* και *orf4* βρέθηκαν να κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη-εκκινητή αντιγραφής (Rep) και μια πρωτεΐνη κινητοποίησης (Mob), αντίστοιχα. Οι προκύπτουσες πρωτεΐνες των *orf2* και *orf3* δεν έδειξαν σημαντική ομολογία με άλλες γνωστές πρωτεΐνες. Παρόλα αυτά, η *in silico* εξέταση της πλασμιδιακής αλληλουχίας πρόβλεψε την ύπαρξη ενός νέου οπερονίου που περιλαμβάνει τα *rep*, *orf2* και *orf3* του πλασμιδίου pLAC1 αλλά επίσης έδειξε ότι αυτό το οπερόνιο είναι συντηρημένο και στα συγγενικά του πλασμίδια. Η αντίδραση RT-PCR επιβεβαίωσε το γεγονός ότι αυτά τα τρία γονίδια συν-μεταγράφονται ως ένα πολυσιστρονικό μόριο mRNA. Επιπλέον, η φυλογενετική ανάλυση των πρωτεϊνών Rep και Mob του πλασμιδίου pLAC1 έδειξε ότι αυτές οι δυο πρωτεΐνες πιθανώς προέρχονται από διαφορετικές πλασμιδιακές πηγές, υποδηλώνοντας ότι το pLAC1 αποτελεί προϊόν συναρμολόγησης κατά την εξελικτική διαδικασία. Από τη συγκριτική ανάλυση της ολικής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του pLAC1 με τα συγγενικά του πλασμίδια φάνηκε ότι το pLAC1 πιθανώς απέκτησε το *mob* ως αποτέλεσμα ενός προγονικού ανασυνδυασμού γονιδίων. Αυτά τα συμπεράσματα συμβάλουν στην καλύτερη εκτίμηση της διαφοροποίησης και της εξέλιξης των πλασμιδίων στα οξυγαλακτικά βακτήρια.

Στη συνέχεια, απομονώθηκε το πλασμίδιο pREN από τον *Lb. rennini* ACA-DC 1534 το οποίο αλληλουχίστηκε και χαρακτηρίστηκε. Η *ab initio* ανάλυση του pREN (μεγέθους 4371 bp) αποκάλυψε την ύπαρξη έξι πιθανών *orfs* πάνω στον ίδιο κλώνο του DNA, με τα *orf1* και *orf2* να σχηματίζουν ένα νέο οπερόνιο. Το *orf1* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη RepA ενώ το προκύπτον πεπτίδιο του *orf2* δεν εμφάνισε ομοιότητα με άλλες γνωστές πρωτεΐνες. Σύμφωνα με την ανάλυση TBLASTN, αυτή η δομή του οπερονίου *repA-orf2* εντοπίστηκε επίσης στα πλασμίδια pLB925A03 και pLJ42. Τα υπόλοιπα τέσσερα *orfs* βρέθηκαν να κωδικοποιούν διαφορετικές πρωτεΐνες Mob σε διαδοχική διάταξη (*mobC*, *mobA1*, *mobA2* και *mobB*). Περαιτέρω ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των *mobA1* και *mobA2* αποκάλυψε μια μετάλλαξη μετατόπισης πλαισίου στο γονίδιο *mobA* που είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αυτών των δυο ψευδογονιδίων. Στην περιοχή της αλληλουχίας που προηγείται του γονιδίου *repA*, εντοπίστηκε το πιθανό σημείο έναρξης της αντιγραφής (*ori*) που περιλαμβάνει μια περιοχή με μεγάλο ποσοστό αδενίνης και θυμίνης με

επαναλαμβανόμενα 11-μερή (περιοχή AT), ακολουθούμενη από τις 22-μερείς επαναλήψεις (iteron). Αυτές οι δυο περιοχές διαχωρίζονται από ένα μεσοδιάστημα μήκους 37 bp που αποτελεί την ενδιάμεση, μεταβλητή περιοχή. Η συγκεκριμένη οργάνωση του σημείου *ori* σε συνδυασμό με το μοτίβο ομοιότητας της πρωτεΐνης RepA, καθιστά το πλασμίδιο pREN ως ένα νέο μέλος της οικογένειας πλασμιδίων pUCL287 που πολλαπλασιάζονται με το μηχανισμό αντιγραφής θήτα. Η μέθοδος στοίχισης πολλαπλών ακολουθιών εφαρμόστηκε στις περιοχές *oris* των πλασμιδίων της οικογένειας pUCL287 και τα αποτελέσματα έδειξαν ένα υψηλό επίπεδο συντήρησης στην περιοχή AT, ένα σημαντικό επίπεδο συντήρησης στη μεταβλητή περιοχή και τέσσερα χαρακτηριστικά επαναλαμβανόμενα 10-μερή στην iteron περιοχή που ήταν σχεδόν πανομοιότυπα. Η ανάλυση προσομοίωσης της αναδίπλωσης του DNA εμφάνισε τρεις δυνητικούς βρόγχους (έναν στη μεταβλητή περιοχή και δύο ίδιους στην iteron περιοχή) του πεδίου *ori* τόσο στο pREN όσο και στα υπόλοιπα πλασμίδια της ίδιας οικογένειας. Αυτές οι δευτεροταγείς δομές προκύπτουν από τις συντηρημένες αλληλουχίες της περιοχής *ori*. Η συγκριτική ανάλυση της αλληλουχίας των pREN, pLB925A03 και pLJ42 κατέδειξε ότι αυτά τα πλασμίδια διατηρούν μια διαφορετική δομή του σκελετού αντιγραφής και κινητοποίησης μέσα στην οικογένεια pUCL287. Η φυλογενετική ανάλυση των πρωτεϊνών του πλασμιδίου pREN, καθώς και των pLB925A03 και pLJ42 αποδεικνύει ότι αυτά τα μόρια απέκτησαν τα γονίδια *mob* κατόπιν μιας εξελικτικής πορείας συναρμολόγησης. Επιπρόσθετα, όλα τα προαναφερόμενα πλασμίδια φαίνονται να έχουν κοινό προγονικό μόριο με πλασμίδια από εντερόκοκκους.

Τέλος, αναλύθηκε και μελετήθηκε το νέο πλασμίδιο pPS1 απομονωμένο από το στέλεχος *P. pentosaceus* ACA-DC 3431. Το πλασμίδιο αυτό φέρει το γονίδιο που κωδικοποιεί μια ομόλογη πρωτεΐνη επαγόμενη από έλλειψη γλυκόζης στα βακτήρια *Bacillalles* (GsiB). Η GsiB είναι μια χαρακτηριστική πρωτεΐνη απόκρισης σε γενικευμένα στρες και ανήκει στο σίγμα-B (σ^B) ρεγουλόνιο σε πολλά Gram θετικά βακτήρια. Η GsiB του pPS1 βρέθηκε να είναι παρόμοια με την πρωτεΐνη Gsp του πλασμιδίου pLS141-1, απομονωμένου από τον *Lb. sakei* καθώς και την GsiB του χρωμοσωμικού τμήματος του *P. acidilactici* 7_4. Η πρωτεΐνη GsiB δεν ανιχνεύτηκε σε άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία στερούνται τον παράγοντα σ^B . Η εξέταση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της GsiB αποκάλυψε την ύπαρξη χαρακτηριστικών μοτίβων των φυτικών πρωτεϊνών εμβρυογένεσης τελικού σταδίου (late-embryogenesis-abundant proteins, LEA). Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι τα

οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν αποκτήσει τις πρωτεΐνες GsiB από έναν κοινό πρόγονο με τους *Paenibacillus/Geobacillus*. Αυτό υποδηλώνει ότι οι GsiB πρωτεΐνες αποκτήθηκαν με οριζόντια μεταφορά γονιδίων (Horizontal Gene Transfer, HGT) και ότι πιθανότατα ο αρχικός δότης ήταν οργανισμός που ανήκει στην οικογένεια *Bacillales*. Τα δεδομένα αυτά συνηγορούν στο ότι η GsiB αποτέλεσε μια "κινητή μονάδα" στο πλασμίδιο pLS141-1 ή σε κάποια προγονική μορφή του. Αυτό το πλασμίδιο φαίνεται ότι ήταν σε θέση να ξεπεράσει το φράγμα των ειδών, δεδομένου ότι σχετίζεται άμεσα με τα ρεπλικόνια των pMA67/pLS55 που αναπαράγονται τόσο σε οξυγαλακτικά όσο και σε βακτήρια *Bacillales*. Συνεπώς, η GsiB ενδεχομένως να μεταφέρθηκε μετά από ανασυνδυασμό σε άλλα πλασμίδια οξυγαλακτικών βακτηρίων, όπως το pPS1, ή και στο χρωμόσωμα κυττάρων-δεκτών, π.χ. το γονιδίωμα του *P. acidilactici* 7_4. Αυτή η εργασία αποτελεί την πρώτη έκθεση για την ύπαρξη της πρωτεΐνης GsiB σε οξυγαλακτικά βακτήρια.

Είναι πλέον τεκμηριωμένο ότι η 'άγρια' μικροβιακή χλωρίδα των τροφίμων αυθόρμητης ζύμωσης αποτελεί μια σημαντική πηγή ανεξερεύνητων μικροοργανισμών. Αυτό επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα μελέτη καθώς από δείγματα παραδοσιακών Ελληνικών τυριών καταφέραμε να απομονώσουμε δυο εξαιρετικά σπάνια οξυγαλακτικά βακτήρια που μάλιστα έχουν σχετικά πρόσφατα περιγραφεί. Οι *Lb. rennini* και *Lb. acidipiscis* παρουσίασαν ενδιαφέρουσες τεχνολογικές ιδιότητες όσον αφορά την παραγωγή καρβονυλικών πτητικών ενώσεων. Επιπλέον, ο *Lb. acidipiscis* έδειξε ένα σημαντικό αλοανθεκτικό φαινότυπο καθώς βρέθηκε να αναπτύσσεται ακόμα και σε συγκέντρωση 10% χλωριούχου νατρίου. Η περαιτέρω διερεύνηση των πιθανών μηχανισμών απόκρισης αυτού του βακτηρίου σε υπερωσμωτικές συνθήκες, οδήγησε στον προσδιορισμό της μαννόζης και της σορβόζης ως δυο νέων ωσμωλυτών. Τέλος, από τη μελέτη του πλασμιδιακό περιεχόμενο επιλεγμένων άγριων οξυγαλακτικών βακτηρίων, προέκυψαν σημαντικά συμπεράσματα όσον αφορά την εξέλιξη και διαφοροποίηση των μορίων αυτών. Επιπρόσθετα, το πλασμίδιο pPS1 φέρει το γονίδιο *gsiB* και αυτή η μελέτη αποτελεί την πρώτη αναφορά ύπαρξης αυτού του γονιδίου στα οξυγαλακτικά βακτήρια ενώ ταυτόχρονα αναλύεται ο πιθανός μηχανισμός με τον οποίο αυτά τα βακτήρια το απέκτησαν.

Abstract

The aim of the first section of this study was to explore the microbiota of traditional Greek P.D.O. cheeses, the isolation of new strains and the investigation of their biochemical/technological properties that are related to their potential application as starter cultures in cheese production. Therefore, the microbiota of Formaella, Kopanisti and Feta cheeses, and also of Mana was explored. From these samples, a total of 133 wild lactic acid bacteria were isolated and phenotypically characterised. Mesophilic lactobacilli were the most abundant group. Concerning their technological properties, thermophilic strains (lactobacilli and cocci) were the best milk acidifiers, whereas thermophilic lactobacilli were the most proteolytic isolates. Higher peptidolytic and esterolytic activities were obtained with thermophilic cocci. Only five isolates were lipolytic, whereas none was able to catabolize citrate as a sole carbon source. GC-MS analysis of the metabolites produced and subsequent principal components analysis revealed segregated clusters of isolates in accordance with the phenotypic groups. E-nose analysis revealed similar results, but the alignment with phenotypic groups was not as strong. The SDS-PAGE, the PFGE analysis and the 16S rRNA gene sequencing, revealed that *Lb. rennini* and *Lb. acidipiscis* were the sole microbial species in Kopanisti cheese and Mana. The major volatile compounds produced by these strains were alcohols and aldehydes deriving from secondary amino acid catabolism that are important flavor compounds in cheeses.

The potential application of four wild strains of lactic acid bacteria (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *S. thermophilus*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* και *E. faecalis*) as starter cultures was surveyed in a pilot-scale cheese making using goat's milk. These strains were isolated as described previously and were selected on the basis of their technological properties. The cheese was analysed microbiologically, physicochemically and organoleptically through a 30-day period of ripening. Counts of the starter cultures increased in the first 24h and then remained stable during ripening. The end product was a soft cheese characterized by a mild, aromatic taste, a smooth structure, as well as good microbiological and physicochemical properties.

The second section of this study involved the assessment of the response mechanism of *Lb. acidipiscis* under osmotic stress. *Lb. acidipiscis* ACA-DC 1533 that was isolated from traditional Kopanisti cheese (first section) exhibited a significant

halotolerant phenotype. The aim of this part was to identify putative mechanisms that are activated in this bacterium under conditions of high osmolarity and also to determine compounds that could act as osmolytes. The transcriptional changes of the bacterium due to adaptation to hypertonic environments were studied with the RAP-PCR method, using an arbitrary primer so as to amplify total RNA. The produced cDNA produced was resolved by electrophoresis. The resulting fingerprints were compared and bands exhibiting differences in abundance between control and stressed cells were excised, cloned and sequenced. BLAST searched resulted in the identification of six differentially expressed genes as well as the trace of plasmid DNA carried by the strain. RT-PCR verified the transcriptional changes of the total RNA profiles. Growth of *Lb. acidipiscis* in the presence of 10% (w/v) NaCl was significantly enhanced by the addition of mannose or sorbose at concentrations as low as 1 μ M in the growth medium. The osmoprotective effect as well as the concentration required, were comparable to those of well known bacterial osmolytes like glycine-betaine. Furthermore, mannose/sorbose PTS activity was increased approximately by 1.8-fold in cells exposed to high NaCl concentrations in comparison to control cells.

In the third section of this study the plasmid content of three 'wild' lactic acid bacteria (isolated as described in the first section) was investigated so as to identify genes that may contribute to the technological properties of these bacteria.

Firstly, the pLAC1 plasmid of *Lb. acidipiscis* ACA-DC 1533, a strain isolated from traditional Kopanisti cheese, was characterised. Nucleotide sequence analysis revealed a molecule of 3478 bp and *ab initio* annotation indicated four putative *orfs*. *orf1* and *orf4* were found to encode a replication initiation protein (Rep) and a mobilization protein (Mob), respectively. The deduced products of *orf2* and *orf3* revealed no significant homology to other known proteins. However, *in silico* examination of the plasmid sequence supported the existence of a novel operon that includes *rep*, *orf2* and *orf3* in pLAC1 and that this operon is highly conserved also in its related plasmids. RT-PCR experiments verified that these three genes are co-transcribed as a single polycistronic mRNA species. Furthermore, phylogenetic analysis of pLAC1 Rep and Mob proteins demonstrated that they may have derived from different plasmid origins, suggesting that pLAC1 is a product of a modular evolution process. Comparative analysis of full length nucleotide sequences of pLAC1 and related plasmids showed that pLAC1 acquired *mob* probably via an

ancestral recombination event. These conclusions contribute to the better evaluation of the divergence and evolution of plasmids in lactic acid bacteria.

Plasmid pREN deriving from *Lb. rennini* ACA-DC 1534, isolated from traditional Kopanisti cheese, was sequenced and characterized. pREN was found to be a molecule of 4371 bp and *ab initio* orf calling revealed that the plasmid carries six putative genes located on the same DNA strand. *orf1* and *orf2* were predicted to form a novel operon with *orf1* coding for a replication initiation protein (RepA), while the deduced product of *orf2* showed no similarity to other known proteins. According to our analysis, the *repA-orf2* operon structure could also be detected in plasmids pLB925A03 and pLJ42. The four remaining *orfs* were all found to encode different mobilization proteins in a sequential fashion, namely *mobC*, *mobA1*, *mobA2* and *mobB*. Further inspection of the *mobA1* and *mobA2* sequences revealed that a frameshift mutation in the *mobA* gene resulted in the generation of these two pseudogenes. A putative origin of replication (*ori*) was detected that contained an AT-rich region with 11-mer repeats followed by 22-mer iterons. The two regions were separated by a 37 bp spacer called the variable region. This organization of the pREN *ori* along with the similarity pattern of its RepA clearly demonstrated that the plasmid belongs to the pUCL287 family of theta-replicating plasmids. Multiple sequence alignment of the *oris* of pUCL287 family demonstrated a high degree of conservation throughout the AT-rich region, a significant degree of conservation in the variable region and four characteristic 10-mer repeats in the iteron region that were almost identical among the plasmids. Three stem loops, one in the variable region and two identical in the iteron region were predicted in the *ori* of pREN after DNA folding simulations. Similar secondary structures were also present in the *oris* of all plasmids of the family that were mostly driven by the conserved sequences among them. Comparative analysis of pREN, pLB925A03 and pLJ42 showed that they retain a unique combination in the architecture of their replication and mobilization elements within the pUCL287 family. Phylogenetic analysis of the pREN proteins established that this plasmid as well as pLB925A03 and pLJ42 have undergone a modular evolutionary process in order to acquire their *mob* genes. In addition, all three plasmids were found to have a common ancestor with several enterococcal plasmids. Our work highlights the need to characterise plasmids from uncommon lactic acid bacteria in order to better explore their evolution and divergence.

Finally, plasmid pPS1, isolated from *Pediococcus pentosaceus* ACA-DC 3431, was found to carry a gene encoding a homolog to the *Bacillaceae* glucose starvation-inducible protein B (GsiB). GsiB is a characteristic general stress protein (Gsp) of the σ^B regulon in several Gram-positive bacteria. Very similar to pPS1 GsiB was Gsp on plasmid pLS141-1 isolated from *Lactobacillus sakei* and GsiB on a chromosomal contig of *Pediococcus acidilactici* 7_4. No other sequences related to pPS1 GsiB could be identified in lactic acid bacteria (LAB), a group of bacteria devoid of σ^B . Inspection of the protein sequence revealed the existence of highly hydrophilic 20-amino acid tandem repeats that are typical for Group 1 late-embryogenesis-abundant (LEA) plant proteins. Phylogenetic analysis demonstrated that LAB GsiBs share a common ancestor with the GsiB of *Paenibacillus/Geobacillus*, suggesting that the former proteins were acquired through horizontal gene transfer (HGT) and that most probably the original donor was a *Bacillales* organism. Our data support that GsiB became a ‘mobile unit’ in plasmid pLS141-1 or an ancestral version of it. This plasmid seems to be able to overcome the species barrier, as it is related to the pMA67/pLS55 replicon that efficiently replicates in both LAB and *Bacillales*. We propose that the *gsiB* could have been transferred from this point on by recombination to other LAB plasmids, like pPS1, or to the chromosome of recipient cells, e.g. the genome of *P. acidilactici* 7_4. This is the first report for the existence of GsiB in LAB.

It is now well documented that the “wild” microbiota of naturally fermented foods comprises a major source of undiscovered microorganisms. This was also confirmed in this study as we managed to isolate from Greek cheeses two extremely rare lactic acid bacteria species, which have been described quite recently. *Lb. rennini* and *Lb. acidipiscis* showed interesting technological properties regarding the production of volatile carbonyl compounds. Furthermore, *Lb. acidipiscis* exhibited a significant osmotolerant phenotype as it could grow at even 10% (w/v) concentration of sodium chloride. Further inspection of the possible response mechanisms of this bacterium under hyperosmotic conditions, led to the identification of mannose and sorbose as two novel osmolytes. Finally, the study of plasmid content of selected wild lactic acid bacteria reached important conclusions about the evolution and diversification of these molecules. Additionally, plasmid pPS1 carries the *gsiB* gene and this study is the first report of the existence of this gene in lactic acid bacteria and

at the same time the putative mechanism by which these bacteria acquired it is being proposed.

Λέξεις κλειδιά

Οξυγαλακτικά βακτήρια

Τεχνολογικές ιδιότητες

Ωσμωτικό στρες

RAP-PCR

PEP-PTS μαννόζης

Φυλογενετική ανάλυση

Πλασμίδια

Γονίδιο *gsiB*

Key words

Lactic acid bacteria

Technological properties

Osmotic stress

RAP-PCR

Mannose PEP-PTS

Phylogenetic analysis

Plasmids

gsiB gene