

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑΣ

Δ. Π. Μ. Σ.:

«ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ
ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ»

«Καθαρισμός και χαρακτηρισμός των αντιμικροβιακών ουσιών
που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια
***Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 και**
***Lactobacillus rennini* ACA-DC 565»**

ΑΜΑΛΙΑ Γ. ΝΙΠΗ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Όνομα επιβλέποντος: Καθ. Ε. Τσακαλίδου

Αθήνα 2014

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑΣ

Δ. Π. Μ. Σ.:
«ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ
ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ»

«Καθαρισμός και χαρακτηρισμός των αντιμικροβιακών ουσιών
που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια
***Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 και**
***Lactobacillus rennini* ACA-DC 565»**

ΑΜΑΛΙΑ Γ. ΝΙΠΗ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Όνομα επιβλέποντος: Καθ. Ε. Τσακαλίδου

Αθήνα 2014

**«Καθαρισμός και χαρακτηρισμός των αντιμικροβιακών ουσιών
που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια
Lactobacillus fermentum ACA-DC 179 και
Lactobacillus rennini ACA-DC 565»**

**ΑΜΑΛΙΑ Γ. ΝΙΠΗ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

Όνομα επιβλέποντος: Καθ. Ε. Τσακαλίδου
Εξεταστική επιτροπή: Καθ. Ε. Τσακαλίδου
Όνομα Α' μέλους Τριμελούς: Επικ. Καθ. Κ. Μουντζούρης
Όνομα Β' μέλους Τριμελούς: Λέκτορας Α. Ακτύπης

Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες σε όσους συνέβαλαν στην πραγματοποίησή της

Καταρχήν, οφείλω θερμές ευχαριστίες και ευγνωμοσύνη στην επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κ. Έφη Τσακαλίδου που με δέχτηκε στο εργαστήριό και μου εμπιστεύτηκε την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης και που με την καθοδήγησή της συνέβαλε στη διεξαγωγή των πειραμάτων. Επίσης θα ήθελα να την ευχαριστήσω για το χρόνο που αφιέρωσε, το αμέριστο ενδιαφέρον και τις καίριες υποδείξεις της και για τη συγγραφή της διατριβής.

Επιπροσθέτως, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην Δρ. Μαρίνα Γεωργαλάκη, η οποία με την επιστημονική κατάρτιση και τις υποδείξεις της με βοήθησε σημαντικά τόσο κατά το πειραματικό μέρος όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας. Την ευχαριστώ βαθύτατα για την ηθική υποστήριξη και το συνεχές και αμείωτο ενδιαφέρον της σε όλα τα στάδια πραγματοποίησης της μελέτης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστώ την Δρ. Ράνια Αναστασίου, διότι ήταν συνεχώς δίπλα μου όποτε την χρειάστηκα και για το ενδιαφέρον που έδειξε για τη διεξαγωγή του πειράματος.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου για την πολύ καλή συνεργασία που είχα μαζί τους.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	2
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια	3
1.2 Ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων	3
1.3 Το γένος <i>Lactobacillus</i>	4
1.3.1 Μορφολογία και γενικά χαρακτηριστικά	5
1.3.2 <i>Lactobacillus fermentum</i>	6
1.4 Εφαρμογές και χρήσεις των Οξυγαλακτικών βακτηρίων	6
1.5 Βακτηριοσίνες	11
1.5.1 Κατάταξη Βακτηριοσινών Οξυγαλακτικών Βακτηρίων	13
1.5.2 Τρόπος δράσης βακτηριοσινών	16
1.5.3 Εφαρμογές των βακτηριοσινών	17
1.5.4 Μέθοδοι καθαρισμού Βακτηριοσινών	22
1.5.5 Παράγοντες που επηρεάζουν τον καθαρισμό	23
2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	24
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	26
3.1 Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες ανάπτυξης	26
3.2 Ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης και προσδιορισμός της ενεργότητας	27
3.3 Λυοφιλίωση	28
3.4 Μέθοδοι καθαρισμού της αντιμικροβιακής ένωσης	29
3.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με χρήση SDS (SDS-PAGE)	31
3.6 Προσδιορισμός πρωτεΐνης κατά Bradford	32
3.7 Ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης σε συγκαλλιέργεια του <i>Lactobacillus fermentum</i> ACA-DC 179 και του <i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 4	33
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	36
4.1 Επιλογή θρεπτικού υποστρώματος για την ανάπτυξη του <i>Lactobacillus fermentum</i> ACA-DC 179.	36
4.2 Καθαρισμός αντιμικροβιακής ένωσης που παράγεται από τον <i>Lactobacillus fermentum</i> ACA-DC 179.	37
4.2.1 Πρώτο πρωτόκολλο καθαρισμού	37
4.2.2 Δεύτερο πρωτόκολλο καθαρισμού	49
4.2.3 Τρίτο πρωτόκολλο καθαρισμού	53
4.3 Ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης σε συγκαλλιέργεια του <i>Lactobacillus fermentum</i> ACA-DC 179 και του <i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 4	57
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	63
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	65

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο καθαρισμός και χαρακτηρισμός των μορίων που ευθύνονται για την αντιμικροβιακή δράση του οξυγαλακτικού βακτηρίου *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179. Το στέλεχος αυτό έχει απομονωθεί από Κασέρι και παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση έναντι διάφορων οξυγαλακτικών αλλά και παθογόνων βακτηρίων.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη του στελέχους σε διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα με στόχο την εύρεση του θρεπτικού υποστρώματος, το οποίο παράγει τη μέγιστη αντιμικροβιακή δράση. Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν τρία διαφορετικά πρωτόκολλα καθαρισμού της αντιμικροβιακής ένωσης που παράγεται από αυτό το στέλεχος. Χρησιμοποιήθηκαν συνδυασμοί κατακρήμνισης με θειικό αμμώνιο με διάφορες μεθόδους χρωματογραφίας και συγκεκριμένα, χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής, χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης και χρωματογραφίας μοριακής διήθησης. Σε κάθε πρωτόκολλο καθαρισμού έγινε ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών και μέτρηση της αντιμικροβιακής ενεργότητας, ενώ για τον έλεγχο της καθαρότητας της αντιμικροβιακής ουσίας πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών. Μετά την ολοκλήρωση των καθαρισμών πραγματοποιήθηκε ανάλυση Φασματοσκοπίας Μαζών (MS) και MS/MS στο τμήμα Βιοχημείας και Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου Ghent, Βέλγιο, με σκοπό τον προσδιορισμό της Μοριακής Μάζας και την αλληλουχία της αμινοξικής αλληλουχίας.

Στο τελικό στάδιο της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκε συγκαλλιέργεια του παραγωγού με το ευαίσθητο στέλεχος με στόχο να διαπιστωθεί αν το ευαίσθητο στέλεχος επάγει την παραγωγή της αντιμικροβιακής δράσης, το οποίο δεν φάνηκε να συμβαίνει.

Συμπερασματικά, προέκυψε ότι η αντιμικροβιακή ένωση που παράγεται από το *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 είναι πιθανό να μην αντιστοιχεί σε βακτηριοσίνη, αλλά σε αντιμικροβιακό πεπτίδιο (BLIP, Bacteriocin Like Peptide).

Λέξεις κλειδιά: *Lactobacillus fermentum*, βακτηριοσίνες, (BLIP)

ABSTRACT

The aim of the present study was the purification and characterization of a compound which is responsible for the antimicrobial activity of the lactic acid bacterium, *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179. This strain was isolated from Kasser cheese and exhibited antimicrobial activity against other lactic acid bacteria, as well as pathogenic bacteria.

Firstly, the strain was grown in different growth media in order to determine in which one the highest activity is produced. Afterwards, three different purification protocols were performed. A combination of ammonium sulfate precipitation with various chromatographical methods, namely Anion-exchange Chromatography, Reversed Phase Chromatography and Size exclusion Chromatography was applied. In every protocol the protein concentration and the antimicrobial activity were determined, while electrophoresis was used to control the purity of the antimicrobial compounds. Moreover, tandem mass spectrometric (MS/MS) and mass spectrometric (MS) analyses were carried out in the Department of Biochemistry and Microbiology at Ghent University in Belgium, in order to determine the molecular mass and the amino acid sequence of the antimicrobial compound.

In the last section of this study a co-culture of the producer strain with the sensitive strain was performed, in order to investigate if the sensitive strain induces the production of the antimicrobial activity, which was not finally observed.

In conclusion, it was found that the antimicrobial compound produced by *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 is probably not a bacteriocin, but it could rather correspond to a Bacteriocin Like Peptide (BLIP).

Key Words : *Lactobacillus fermentum*, bacteriocins, BLIPs

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (LAB) είναι Gram θετικά βακτήρια που έχουν κοινά μορφολογικά, μεταβολικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά (Cintas et al., 2001), Αναλυτικότερα, είναι βακτήρια με κύτταρα μορφολογίας κόκκου ή βακίλλου, τα οποία είναι μη σπορογόνα, στερούνται κίνησης και είναι αρνητικά στην καταλάση. Αναπτύσσονται υπό μικροαερόφιλες έως αυστηρά αναερόβιες συνθήκες (Klein et al., 1998).

1.2 Ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Η κλασική (φαινοτυπική) ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων βασίζεται σε μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Ως προς τη μορφολογία των κυττάρων κατατάσσονται σε βάκιλλους (*Lactobacillus*, *Carnobacterium*) και σε κόκκους (τα υπόλοιπα γένη), ενώ με κριτήριο τα τελικά προϊόντα της ζύμωσης των υδατανθράκων διακρίνονται σε 2 κύριες κατηγορίες, τα ομοζυμωτικά και τα ετεροζυμωτικά βακτήρια. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τα βακτήρια, τα οποία παράγουν ως τελικό προϊόν ζύμωσης το γαλακτικό οξύ (>85%) ενώ στην δεύτερη υπάγονται τα βακτήρια τα οποία εκτός από το γαλακτικό οξύ παράγουν και άλλους μεταβολίτες, όπως αιθανόλη, οξικό οξύ, CO₂. Άλλα κριτήρια ταξινόμησης είναι η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης, βάσει της οποίας τα οξυγαλακτικά βακτήρια διακρίνονται σε μεσόφιλα (βέλτιστη θερμοκρασία 30 °C) και σε θερμόφιλα (βέλτιστη θερμοκρασία 45 °C), η ανάπτυξη σε υψηλές συγκεντρώσεις NaCl, η αντοχή τους σε όξινες ή σε αλκαλικές συνθήκες, η διαμόρφωση των διαφόρων ισομερών μορφών (L-γαλακτικό οξύ, D-γαλακτικό οξύ) του γαλακτικού οξέος που παράγεται κατά τη γαλακτική ζύμωση και η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά. Με τη χρήση όμως μοριακών μεθόδων κατέστη εφικτή η ταξινόμηση των βακτηρίων βάση του % ποσοστό γουανίνης και κυτοσίνης στο DNA (mol % G+C), των rRNA ακολουθιών και ιδίως αυτή του γονιδίου του 16S rRNA.

Τα γένη των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι τα *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* και *Weissella*. Το γένος *Bifidobacterium* επίσης έχει επικρατήσει να θεωρείται ότι ανήκει στα οξυγαλακτικά βακτήρια, διότι παρουσιάζει παρόμοια φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο φυλογενετικά αποτελεί διαφορετικό γένος, καθώς όλα τα Gram θετικά βακτήρια χαρακτηρίζονται από χαμηλό περιεχόμενο σε G+C (<50%), αντίθετα τα *Bifidobacterium* έχουν υψηλό περιεχόμενο σε G+C (>50%).

1.3 Το γένος *Lactobacillus*

Το γένος *Lactobacillus* ανήκει στο φύλλο Firmicutes, στην κλάση *Bacilli*, στην τάξη *Lactobacillales* και στην οικογένεια *Lactobacillaceae*. Μεταξύ των 13 γενών των οξυγαλακτικών βακτηρίων, το γένος *Lactobacillus* είναι το μεγαλύτερο περιλαμβάνοντας 106 είδη. Περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1901 από τον Beijerinck (Bernardeau et al., 2006). Σύμφωνα με την ταξινόμηση του Orla-Jensen (1919) οι γαλακτοβάκιλλοι κατατάσσονταν σε τρεις κατηγορίες, *Thermobacterium*, *Streptobacterium* και *Betabacterium*, με βάση την βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης και το μεταβολισμό της εξόζης κατά τη διαδικασία της ζύμωσης (Bernardeau et al., 2006; Klein et al., 1998). Με τον κλασικό τρόπο ταξινόμησης οι γαλακτοβάκιλλοι διακρίνονται με βάση τον τρόπο διάσπασης των υδατανθράκων σε τρεις κατηγορίες που είναι οι εξής: Ομάδα I υποχρεωτικά ομοζυμωτικά, Ομάδα II υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά και Ομάδα III προαιρετικά ετεροζυμωτικά (Kandler & Weiss, 1986). Χημειοταξινομικές και φυλογενετικές μελέτες ωστόσο βασιζόμενες στην ανάλυση του γονιδίου του 16S rRNA έχουν αποδείξει ότι υπάρχουν σημαντικές αλληλοεπικαλύψεις μεταξύ των γενών *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, και *Pediococcus* γι' αυτό προτάθηκε η κατάταξη του γένους *Lactobacillus* σε τρεις ομάδες: 1) η ομάδα *Lactobacillus delbrueckii* που περιλαμβάνει κυρίως, αν και όχι αποκλειστικά, τους ομοζυμωτικούς γαλακτοβακίλλους 2) η ομάδα *Lactobacillus casei-Pediococcus*, που περιλαμβάνει υποχρεωτικά ομοζυμωτικούς, υποχρεωτικά και προαιρετικά ετεροζυμωτικούς γαλακτοβακίλλους 3) η ομάδα *Leuconostoc*, η οποία περιλαμβάνει κάποιους υποχρεωτικά ετεροζυμωτικούς γαλακτοβακίλλους και

υποδιαιρείται σε τρία γένη *Leuconostoc*, *Oenococcus* και *Weissella* (Stiles et al., 1997; Claesson et al., 2007; Felis & Dellaglio, 2007).

1.3.1 Μορφολογία και γενικά χαρακτηριστικά

Τα κύτταρα είναι μακρά και λεπτά ραβδία, που σε ορισμένα είδη μερικές φορές είναι μικρότερα και φθάνουν το σχήμα κορυνόμορφου κοκκοβάκιλλου, ενώ συχνά σχηματίζουν αλυσίδες. Ωστόσο το μήκος των βακίλλων και ο βαθμός κυρτότητας εξαρτάται από την ηλικία της καλλιέργειας και τη σύνθεση του υποστρώματος. Είναι μη σποριογόνα και κατά κανόνα δεν κινούνται με εξαίρεση ορισμένες περιπτώσεις που φέρουν περίτριχες βλεφαρίδες. Είναι Gram θετικά βακτήρια, αρνητικά στην καταλάση και το άθροισμα των αζωτούχων βάσεων του DNA τους (mol% G+C) κυμαίνεται μεταξύ 32 και 53.

Όσον αφορά την ανάπτυξή τους έχουν αυξημένες απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά (αμινοξέα, πεπτίδια, βιταμίνες, λιπαρά οξέα, άλατα) και η θερμοκρασία ανάπτυξης κυμαίνεται από 2 έως 52 °C με βέλτιστη μεταξύ 30 και 40 °C. Αναπτύσσονται καλύτερα σε όξινο περιβάλλον (pH 5.5-6.2) με βέλτιστη τιμή χαμηλότερη του 5, ενώ ο ρυθμός ανάπτυξης μειώνεται σε ουδέτερες ή ελαφρώς αλκαλικές συνθήκες. Είναι αεροάντοχα, αν και αναπτύσσονται καλύτερα υπό μικροαερόφιλες ή αναερόβιες συνθήκες. Από πλευρά μεταβολισμού είναι υποχρεωτικά σακχαροζυμωτικοί και τουλάχιστον η μισή ποσότητα του τελικού προϊόντος είναι γαλακτικό οξύ. Άλλα προϊόντα μεταβολισμού μπορεί να είναι το οξικό οξύ, η αιθανόλη, το CO₂, το μυρμηγκικό οξύ ή το ηλεκτρικό οξύ. Πτητικά οξέα με περισσότερα από δύο άτομα άνθρακα δεν παράγονται.

Οι γαλακτοβάκιλλοι δεν είναι παθογόνοι μικροοργανισμοί και απομονώνονται από διάφορα τρόφιμα, όπως το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, το κρέας και τα ζυμωμένα αλλαντικά, τα ψάρια, τα φρούτα, τα αλκοολούχα ποτά (μπύρα, κρασί), οι χυμοί φρούτων, τα τουρσιά λαχανικών και το ξινολάχανο (sauerkraut), η μαγιά, το νερό. Είναι μικροοργανισμοί υπεύθυνοι για τη ζύμωση και την παραγωγή πολλών προϊόντων, ενώ παράλληλα επηρεάζουν και συμβάλλουν στη βελτίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους. Επίσης

αποτελούν μέρος της φυσικής μικροχλωρίδας της στοματικής κοιλότητας, του πεπτικού σωλήνα και του κόλπου των ομοιόθερμων ζώων και του ανθρώπου. Τα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* χρησιμοποιούνται επίσης ως προβιοτικές καλλιέργειες.

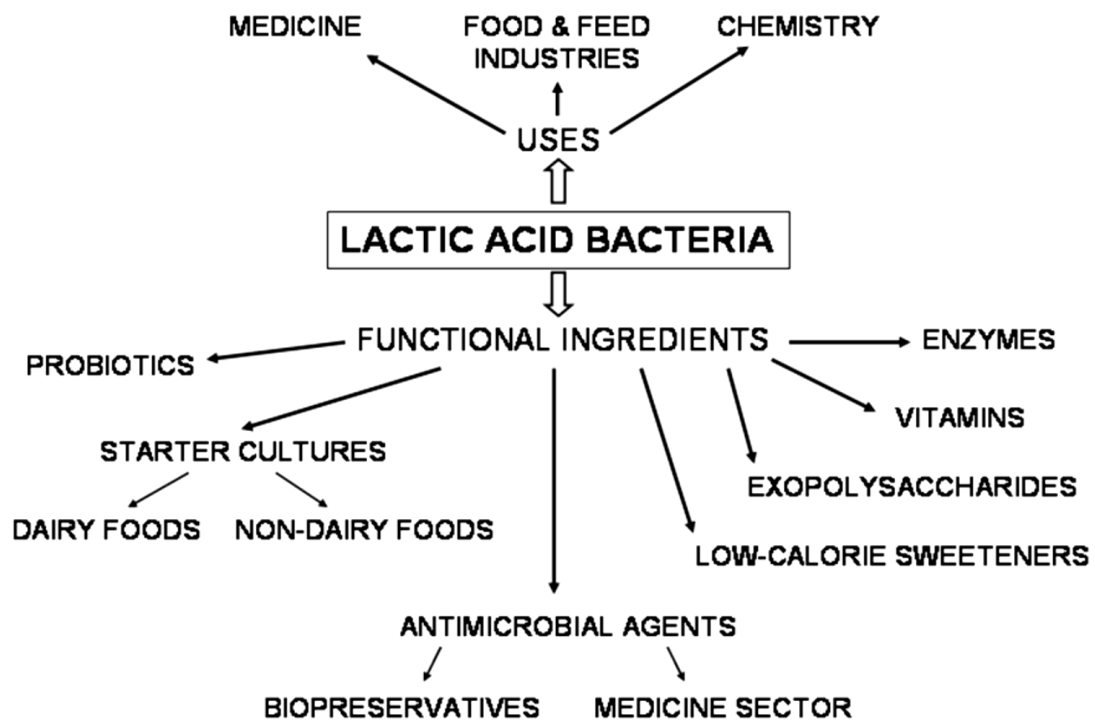
1.3.2 *Lactobacillus fermentum*

Ο *Lactobacillus fermentum* ανακαλύφτηκε το 1901 και έχει απομονωθεί από γαλακτοκομικά προϊόντα, προζύμι, κοπριά, καθώς και τη στοματική κοιλότητα και τα κόπρανα ανθρώπων (Woo et al., 2007). Από πλήθος ερευνών που έχουν γίνει έχει αποδειχθεί ότι διάφορα στελέχη του *Lactobacillus fermentum* εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι διάφορων παθογόνων μικροοργανισμών και παρουσιάζουν προβιοτικές ιδιότητες (Mikelsaar & Zilmer, 2009; Woo et al., 2007; Zoumproulou et al., 2013 ; Kaur et al., 2013 ; Zeng et al., 2011; Shieha et al., 2011).

1.4 Εφαρμογές και χρήσεις των Οξυγαλακτικών βακτηρίων

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια θεωρούνται από τις πιο σημαντικές κατηγορίες μικροοργανισμών και διαδραματίζουν πρωτεύοντα ρόλο στη βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή πολλών ζυμούμενων προϊόντων, όπως ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα (τυριά, γιαούρτι, βούτυρο), ζυμούμενα προϊόντα κρέατος (π.χ σαλάμι), κρασί, ψάρια, ζυμούμενα λαχανικά (ελιές, ξινό λάχανο, ψωμί (sourdough bread). Χωρίς να κατανοούν την επιστημονική βάση, οι άνθρωποι χιλιάδες χρόνια πριν χρησιμοποιούσαν αυτή την ομάδα βακτηρίων για τη παραγωγή και συντήρηση των τροφίμων. Αν και δεν είναι βέβαιο, πιστεύεται ότι το πρώτο τυρί παρασκευάστηκε στην κοιλάδα μεταξύ Τίγρη και Ευφράτη πριν 8.000 χρόνια. Μέθοδοι ζύμωσης του κρέατος είχαν αναπτυχθεί ήδη από τον 15ο π.Χ. αιώνα στην Κίνα και στη Βαβυλωνία , ενώ τρόποι ζύμωσης λαχανικών ήταν ήδη γνωστοί στην Κίνα τον 3ο π.Χ. αιώνα Εκτός από τη βιομηχανία τροφίμων διάφορα στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων χρησιμοποιούνται στον κλάδο της φαρμακολογίας και της χημείας, ενώ μέσω του κλάδου της Βιοτεχνολογίας έχει προταθεί η χρήση των οξυγαλακτικών για την αντιμετώπιση της μόλυνσης του περιβάλλοντος. Όσον

αφορά τη βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο ως καλλιέργειες (εναρκτήριες και μη εναρκτήριες) επηρεάζοντας τα τεχνολογικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων προϊόντων, ενώ μέσω των αντιμικροβιακών ουσιών που παράγουν συμβάλλουν στη συντήρηση των τροφίμων. Επιπρόσθετα οι ευεργετικές και θεραπευτικές ιδιότητες των προβιοτικών οδήγησαν στην παρασκευή νέων προϊόντων που είναι γνωστά ως «λειτουργικά τρόφιμα».



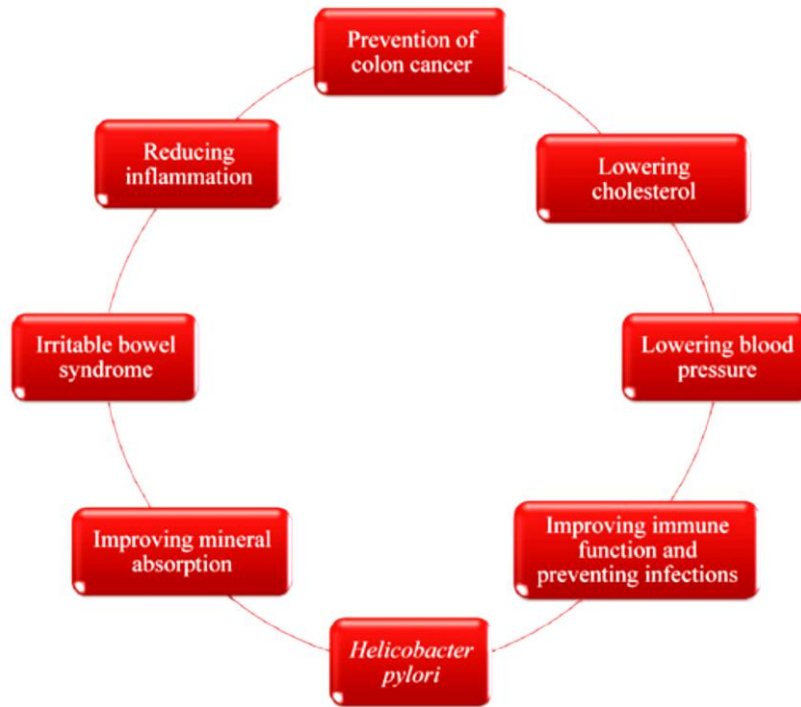
Σχήμα 1.1 Εφαρμογές Οξυγαλακτικών βακτηρίων (Florou-Paneri et.al, 2013)

Γαλακτοκομικά προϊόντα

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο ως εναρκτήριες καλλιέργειες που στόχος τους είναι η παραγωγή γαλακτικού οξέος. Τα πιο σημαντικά γένη οξυγαλακτικών που χρησιμοποιούνται στην τυροκομία είναι τα *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* και *Enterococcus*. Γενικά χρησιμοποιούνται μεσόφιλες καλλιέργειες, όπως τα είδη *Lactococcus lactis* subsp *lactis* και *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* ή θερμόφιλες όπως, τα είδη *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus herveticus*, *Lactobacillus .delbrueckii* subsp.*bulgaricus*. Στην περίπτωση που επιθυμείται η παρασκευή μαλακών τυριών χρησιμοποιούνται οι μεσόφιλες, ενώ στην περίπτωση των σκληρών κατάλληλες είναι οι θερμόφιλες. (Carlice & Fitzgerald, 1999). Εκτός από τις εναρκτήριες καλλιέργειες, υπάρχουν επίσης και μη εναρκτήριες καλλιέργειες (NSLAB, non-starter lactic acid bacteria). Οι καλλιέργειες αυτές δεν αποτελούν μέρος των καλλιεργειών εκκίνησης και δεν συμβάλλουν στην πήξη του γάλακτος. Αποτελούν μικροχλωρίδα του γάλακτος και η παρουσία τους οφείλεται κυρίως σε ελλιπή παστερίωση ή επιμόλυνση του γάλακτος ή του τυροπήγματος κατά την διαδικασία της τυροκόμησης (Beresford et al., 2001). Ανευρίσκονται κυρίως στελέχη του γένους *Lactobacillus*, π.χ *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus parabuchneri* και *Lactobacillus brevis*, καθώς επίσης και στελέχη του γένους *Pediococcus*, π.χ. *Pediococcus acidilactici* και *Pediococcus pentosaceus* (Settanni & Moschetti, 2010). Τόσο οι εναρκτήριες όσο και οι μη εναρκτήριες καλλιέργειες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο στάδιο της ωρίμανσης, διότι συμβάλλοντας στην πρωτεόλυση και στη λιπόλυση επηρεάζουν την υφή, το άρωμα και τη γεύση των τυριών. Το γιαούρτι είναι επίσης ένα από τα πιο δημοφιλή γαλακτοκομικά προϊόντα και για την παρασκευή του χρησιμοποιούνται τα θερμόφιλα οξυγαλακτικά βακτήρια *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus*. Το άρωμα και η γεύση του γιαουρτιού οφείλονται στην ακεταλδεΰδη που παράγεται από το *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Χρήση των οξυγαλακτικών ως προβιοτικά

Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας (WHO) τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί που, όταν καταναλωθούν σε επαρκή ποσότητα, ωφελούν την υγεία και βοηθούν στην αντιμετώπιση ορισμένων παθήσεων. Τα βακτήρια που έχουν χαρακτηριστεί ως προβιοτικοί μικροοργανισμοί ανήκουν στα γένη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* και *Enterococcus*. Οι μηχανισμοί που τα προβιοτικά επηρεάζουν την υγεία είναι ποικίλοι. Προκαλούν μείωση των φλεγμονωδών και αλλεργικών αντιδράσεων, διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα μέσω της αύξησης της παραγωγής IgA και της αύξησης της φαγοκυτταρικής δραστηριότητας, συμβάλλουν στην πρόληψη των εντερικών λοιμώξεων και έχουν γενικότερα ευεργετική επίδραση στην εντερική χλωρίδα. Επίσης, από μελέτες που έχουν γίνει έχει βρεθεί ότι έχουν αντι-υπερτασική δράση, πιθανώς αντικαρκινική (στο παχύ έντερο), μετριάζουν την δυσανεξία στη λακτόζη και μειώνουν τη συγκέντρωση των λιπιδίων στο αίμα. Τέλος, σε κλινικές μελέτες σε παιδιά παρατηρήθηκε μείωση της τερηδόνας ενώ έχει βρεθεί ότι διάφορα προβιοτικά συμβάλλουν στη μείωση των περιστατικών λοίμωξης από *Helicobacter pylori* (Toomula et al., 2011; Bernardeau et al., 2006). Εξαιτίας των ευεργετικών επιδράσεων τους, τα τελευταία χρόνια παρασκευάζονται προϊόντα και ιδίως γαλακτοκομικά που περιέχουν βακτήρια με προβιοτική δράση.



Σχήμα 1.2 Ωφέλιμες δράσεις των προβιοτικών

Αντιμικροβιακές ενώσεις από τα οξυγαλακτικά βακτήρια

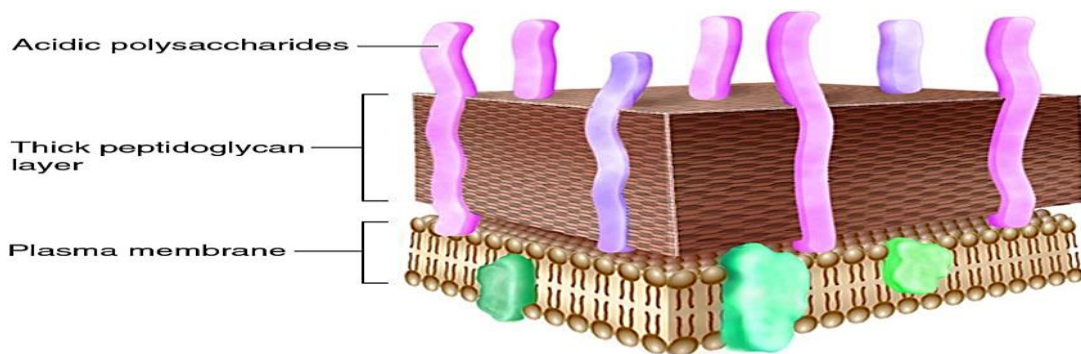
Τα οξυγαλακτικά βακτήρια παράγουν διάφορες αντιμικροβιακές ενώσεις. Καταρχήν παράγονται οργανικά οξέα και (κυρίως γαλακτικό οξύ), υπεροξειδίο του υδρογόνου, διοξειδίο του άνθρακα (CO₂), διακετύλιο, D-ισομερή αμινοξέα, η ουσία ροϊτερίνη (reuterin) και βακτηριοσίνες. Η παραγωγή αυτών των αντιμικροβιακών ενώσεων αποτελεί φυσικό μηχανισμό μέσω του οποίου τα οξυγαλακτικά βακτήρια επικρατούν σε ένα οικολογικό θώκο ή παρεμποδίζουν την ανάπτυξη ανταγωνιστικών μικροοργανισμών. Η ιδιότητα αυτή των οξυγαλακτικών βρίσκει εφαρμογή στη συντήρηση των τροφίμων (Holzapfel et al., 1995 ; Helander et al., 1997). Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης θα γίνει εκτενέστερη αναφορά στις βακτηριοσίνες στη συνέχεια.

1.5.Βακτηριοσίνες

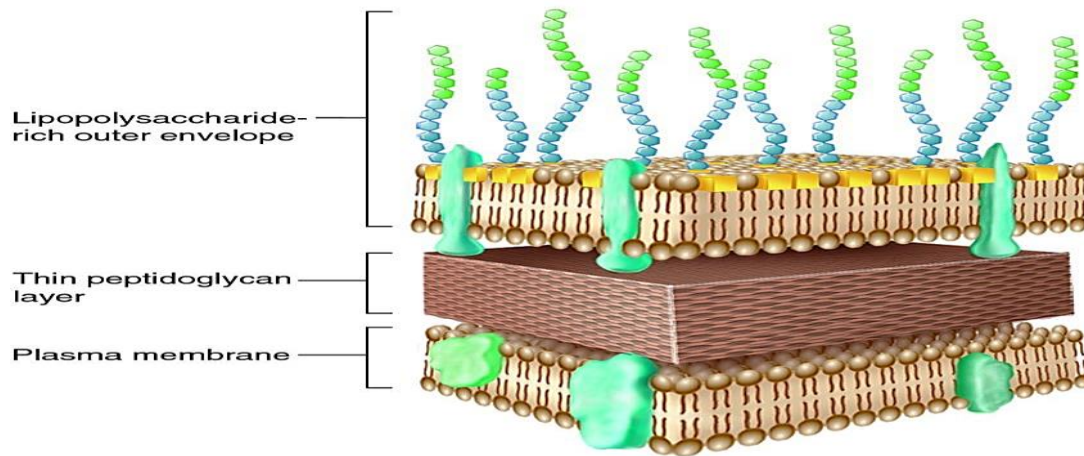
Οι βακτηριοσίνες είναι πεπτίδια ή πρωτεΐνες που συντίθενται στα ριβοσώματα των βακτηρίων και έχουν αντιμικροβιακή δράση έναντι κυρίως μικροοργανισμών, που είναι φυλογενετικά συγγενείς (Calo-Mata et al., 2008; Klaenhammer, 1988; Cintas et al., 2001). Είναι μια ετερογενής ομάδα που ποικίλει ως προς το μοριακό βάρος, το αντιμικροβιακό φάσμα, τον τρόπο δράσης, τις βιοχημικές ιδιότητες και τη γενετική τους προέλευση (Abee et al., 1995). Βακτηριοσίνες έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί από Gram θετικά και αρνητικά βακτήρια καθώς επίσης και από τα Αρχαία (ή Αρχαιοβακτήρια). Οι πρώτες βακτηριοσίνες που ανακαλύφθηκαν ήταν οι κολισίνες από Gram αρνητικά βακτήρια και συγκεκριμένα ο Gratia (1925) ταυτοποίησε την πρώτη κολισίνη από τον μικροοργανισμό *Escherichia coli* (Balciunas et al., 2013). Από τα Αρχαία παράγονται βακτηριοσίνες που είναι γνωστές ως archaeocins και οι μόνες που έχουν χαρακτηριστεί είναι οι halocins που παράγονται από τα halobacteria (Balciunas et al., 2013 ; Riley & Wertz, 2002). Από τα Gram θετικά ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι βακτηριοσίνες που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, διότι μπορούν να βρουν εφαρμογή στη βιομηχανία τροφίμων ως φυσικό συντηρητικό (Rodriguez et al., 2003 ; Zacharof et al., 2012).

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να επισημανθεί ότι τα Gram αρνητικά βακτήρια είναι ανθεκτικά έναντι των βακτηριοσινών σε σύγκριση με τα Gram θετικά. Αυτή η διαφορά οφείλεται στη διαφορετική σύνθεση των κυτταρικών τους τοιχωμάτων. Και στους δυο τύπους η κυτταροπλασματική μεμβράνη που συνδέει το κυτταρόπλασμα με το εξωτερικό περιβάλλον περικλείεται από ένα στρώμα πεπτιδογλυκανίου, το οποίο είναι λεπτότερο στα Gram αρνητικά βακτήρια. Επιπλέον τα Gram αρνητικά έχουν ένα ακόμη περίβλημα, την επονομαζόμενη εξωτερική μεμβράνη, η οποία αποτελείται από φωσφολιπίδια, πρωτεΐνες και λιποπολυσακχαρίτες (LPS). Το περίβλημα αυτό είναι μη διαπερατό από τα περισσότερα μόρια. Όμως η παρουσία πόρων σε αυτό επιτρέπει την ελεύθερη διάχυση των μορίων με μοριακή μάζα μικρότερη των 600 Da. Οι μικρότερες βακτηριοσίνες που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν μοριακή μάζα περίπου 3KDa και άρα είναι πολύ

μεγάλες για να πετύχουν το στόχο τους, δηλαδή την κυτταροπλασματική μεμβράνη. (Abee et al., 1995; Juodeikiene et al., 2012). Το πρόβλημα αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη χρήση χηλικών ενώσεων (EDTA), οι οποίες δεσμεύουν τα ιόντα Mg από τους λιποπολυσακχαρίτες της εξωτερικής στοιβάδας επηρεάζοντας έτσι τη διαπερατότητά της. Επομένως με αυτό τον τρόπο τα Gram αρνητικά βακτήρια καθίστανται ευαίσθητα στη δράση των βακτηριοσινών (Deegan et al., 2006 ; Holzapfel et al., 1995).



(a) Gram-positive: thick cell wall, no outer envelope



(b) Gram-negative: thinner cell wall, with outer envelope

Σχήμα1.3 Κυτταρικό τοίχωμα Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων

1.5.1 Κατάταξη Βακτηριοσινών Οξυγαλακτικών Βακτηρίων

Έχουν γίνει αρκετές προτάσεις σχετικά με την ταξινόμηση των βακτηριοσινών. Ανάλογα με τα γενετικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά τους οι βακτηριοσίνες κατανέμονται σε τέσσερις κύριες ομάδες, την Κλάση I (Class I), την Κλάση II (Class II), την Κλάση III (Class III) και την Κλάση IV (Class IV). (Balciunas et al., 2013, Mc Auliffe et al., 2000; Metaxopoulos et al., 2002).

Αναλυτικότερα, η **Κλάση I** (Lantibiotics) περιλαμβάνει, χαμηλής μοριακής μάζας (<5KDa, 19-38 αμινοξέα) πολυκυκλικά θερμοάντοχα πεπτίδια (Cintas et al., 2001), τα οποία χαρακτηρίζονται από την παρουσία ασυνήθιστων αμινοξέων, όπως η λανθειονίνη (Lan) και η β-μεθυλο-λανθειονίνη (Melan) και από έναν αριθμό αφυδατωμένων αμινοξέων, επίσης, τα λαντιβιοτικά υφίστανται μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις (posttranslational modifications) κατά το σχηματισμό των αμινοξέων λανθειονίνη και β-μεθυλο-λανθειονίνη (Zacharof et al., 2012).

Η **Κλάση I** χωρίζεται περαιτέρω σε δυο υποκατηγορίες βάσει της δομής των βακτηριοσινών. Στην πρώτη ομάδα, **τύπος A** (Type A), ανήκουν τα λαντιβιοτικά που έχουν γραμμικό σχήμα, είναι υδρόφοβα, θετικά φορτισμένα και σχηματίζουν πόρους στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του κυττάρου στόχου, ενώ η δεύτερη ομάδα, **τύπος B** (Type B), περιλαμβάνει σφαιρικά αρνητικά ή ουδέτερα λαντιβιοτικά (Cleveland et al., 2001), τα οποία παρεμβαίνουν σε διάφορες ενζυμικές αντιδράσεις του κυττάρου-στόχου. (Zacharof et al., 2012). Η πιο χαρακτηριστική βακτηριοσίνη αυτής της κλάσης είναι η νισίνη (nisin), η οποία ανήκει στον τύπο A και παράγεται από στελέχη του *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Η **Κλάση II** (non Lantibiotics) περιλαμβάνει μικρά (< 10 KDa), σχετικά θερμοάντοχα, μη τροποποιημένα πεπτίδια που δεν περιέχουν λανθειονίνη στο μόριο τους (Cleveland et al., 2001 ; Zacharof et al., 2012). Είναι κατιονικά και συχνά αμφίφιλα μόρια με ελικοειδές σχήμα. Σε αυτή την ιδιότητα τους άλλωστε οφείλεται και η ικανότητα τους να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων-στόχων. Επίσης, έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε μικρά αμινοξέα, όπως η γλυκίνη (Cintas et al., 2001). Η Κλάση II υποδιαιρείται σε 3 υποομάδες.

- a) Class II a (βακτηριοσίνες του τύπου πεδιοσίνες, Pediocin-like και ισχυρά αντιλιστεριακές βακτηριοσίνες). Οι βακτηριοσίνες που υπάγονται σε αυτή την κατηγορία έχουν μελετηθεί περισσότερο και παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι έχουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι του παθογόνου *Listeria monocytogenes*, που ως γνωστό σε αυτό οφείλονται τα κρούσματα της λιστερίωσης. Αποτελούνται από 37-48 αμινοξέα και χωρίζονται σε δύο τμήματα, στο κατιονικό υδρόφιλο αμινοτελικό άκρο, το οποίο παρουσιάζει την ακολουθία YGNVXC με ομοιότητα σε ποσοστό 38%-80% και την παρουσία τουλάχιστον δυο κυστεϊνών που συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό και στο υδρόφοβο καρβοξυτελικό άκρο. Η παρουσία του αμινοξέος κυστεΐνη στο αμινοτελικό άκρο αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα, καθώς οι βακτηριοσίνες των άλλων υποομάδων περιέχουν μόνο ένα μόριο κυστεΐνης ή κανένα (Ennahar et al., 2000). Στο καρβοξυλικό άκρο εντοπίζεται επίσης δισουλφιδικός δεσμός, ο οποίος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα της δομής της βακτηριοσίνης και επηρεάζει την ενεργότητά της. Βακτηριοσίνες της Class IIa παράγονται από διάφορα είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων, όπως *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* και *Carnobacterium*. Η πιο γνωστή είναι η Πεδιοσίνη PA-1.
- b) Class IIb (two - peptide bacteriocins). Χαρακτηριστικό αυτής της υποομάδας είναι ότι απαιτείται η συνεργιστική δράση δυο πεπτιδίων για να υπάρξει η μέγιστη ενεργότητα της βακτηριοσίνης. Η λακτοκοκκίνη G (lactococcin G) ήταν η πρώτη βακτηριοσίνη που απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε ως βακτηριοσίνη που αποτελείται από δύο πεπτίδια. Η ενεργότητα αυτής της βακτηριοσίνης εξαρτάται απόλυτα από την παρουσία και των δυο πεπτιδίων (α και β πεπτίδιο). Αναλυτικότερα, ενώ είναι δυνατή η πρόσδεση και των δυο πεπτιδίων στην κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου-στόχου, για να υπάρξει αντιμικροβιακή δράση θα πρέπει τα δύο πεπτίδια να βρίσκονται σε στοιχειομετρική αναλογία 1:1. Σε άλλες περιπτώσεις η παρουσία ενός από τα δύο πεπτίδια είναι δυνατόν να προκαλέσει αντιμικροβιακή δράση, όμως η μέγιστη ενεργότητα θα επιτευχθεί μόνο με τη συνεργιστική δράση και των

δύο μορίων (Nes et al., 2007, Nissen-Meyer et al., 2010). Άλλες βακτηριοσίνες αυτής της κατηγορίας είναι η λακτασίνη F (lactacin F), η λακτοκοκκίνη M (lactococcin M), η πλανταρισίνη S (plantaricin S), οι πλανταρισίνες EF και JK (plantaricins EF και JK), η θερμοφιλίνη 13 (thermophilin 13) και οι εντεροσίνες L50 (enterocins L50).

- c) Class IIc. Σε αυτήν την ομάδα ανήκουν βακτηριοσίνες που απαιτούν ανηγμένα μόρια κυστεΐνης για την εκδήλωση της δραστικότητάς τους. Παράδειγμα αποτελεί η λακτοκοκκίνη B (lactococcin B).
- d) Class II d. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι βακτηριοσίνες που δεν μπορούν να ταξινομηθούν σε καμία από τις 2 προηγούμενες ομάδες.

Η **Κλάση III** περιλαμβάνει βακτηριοσίνες υψηλής μοριακής μάζας (>30 kDa), οι οποίες δεν είναι σταθερές στη θέρμανση και αδρανοποιούνται σε υψηλές θερμοκρασίες (π.χ 60-100 °C για 10-15 λεπτά) (Cintas et al., 2001). Η πιο αντιπροσωπευτική βακτηριοσίνη αυτής της ομάδας είναι η ελβετισίνη J (helveticin J).

Η **Κλάση IV** τέλος, περιλαμβάνει σύνθετες βακτηριοσίνες που αποτελούνται από ένα πρωτεϊνικό τμήμα και από ένα υδατανθρακικό ή λιπαρό τμήμα, το οποίο απαιτείται για την εκδήλωση της βιολογικής τους δράσης

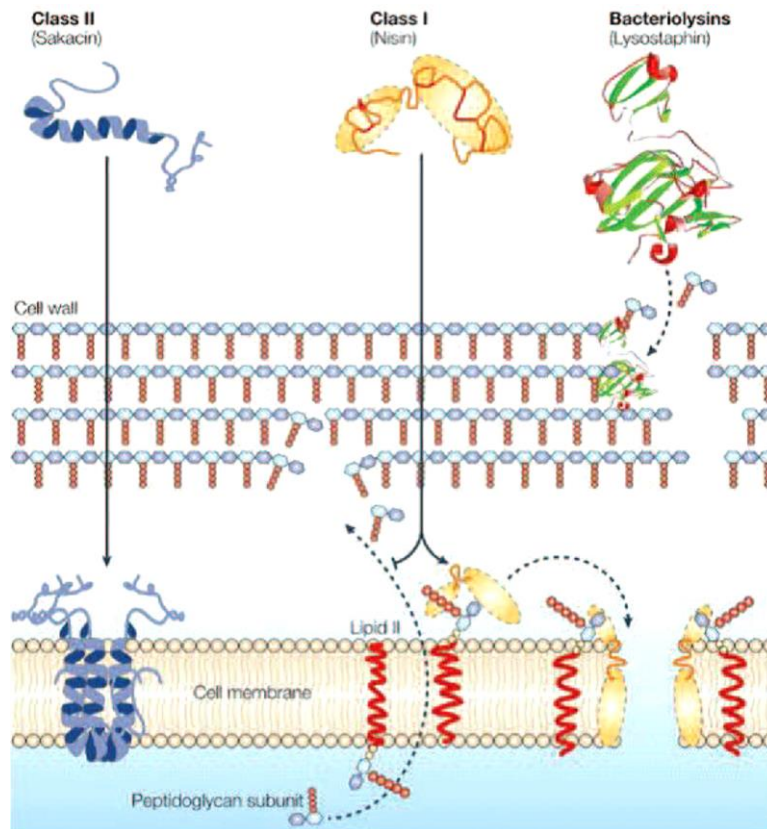
Πίνακας 1. 1 Κατάταξη των βακτηριοσινών (Dicks et al., 2011)

Classes	Characteristics
Class I	Lantibiotics
Class Ia	Small (19-38 amino acids), elongated, positively charged peptides that form pores
Class Ib	Globular peptides that interfere with essential enzymes
Class II	Nonlanthionine containing bacteriocins
Class IIa	Pediocin-like peptides that contain YGNGVXCXXXXVXV consensus sequence in their N-terminal
Class IIb	Two-peptide bacteriocins, require both peptides for activity
Class IIc	Cyclic peptides, N- and C-terminal are covalently linked
Class II d	Single nonpediocin- like peptides

1.5.2 Τρόπος δράσης βακτηριοσινών

Οι βακτηριοσίνες έχουν βακτηριοκτόνο ή βακτηριοστατική δράση έναντι των ευαίσθητων κυττάρων. Η διαφοροποίηση αυτή επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι η ποσότητα της βακτηριοσίνης, ο βαθμός καθαρισμού, οι πειραματικές συνθήκες, (π.χ θερμοκρασία, pH, η παρουσία άλλων αντιμικροβιακών ενώσεων), η φυσιολογική κατάσταση του ευαίσθητου στελέχους (π.χ. η φάση ανάπτυξης) (Cintas et al., 2001). Γενικά όμως οι περισσότερες βακτηριοσίνες παρουσιάζουν βακτηριοκτόνο δράση, αν και υπάρχουν εξαιρέσεις όπως η λευκοσίνη A UAL 187 (leucocin A UAL 187), η λευκοσίνη S (leucocin S) και η λακτοσίνη 27 (lactocin 27) που έχουν βακτηριοστατική δράση (Cintas et al., 2001; Gautam et al., 2009; Holzapfel et al., 1995).

Ο μηχανισμός δράσης τους εναντίον των ευαίσθητων στελεχών μπορεί να διακριθεί σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η προσρόφηση της βακτηριοσίνης σε εξειδικευμένους ή μη υποδοχείς του κυτταρικού τοιχώματος. Αυτό το στάδιο είναι αντιστρεπτό και δεν παρατηρείται καμία φυσιολογική αλλοίωση στο κύτταρο, ενώ είναι επίσης εφικτή η απομάκρυνση της βακτηριοσίνης χωρίς να προκληθούν βλάβες στο κύτταρο. Το δεύτερο στάδιο είναι μη αντιστρεπτό και περιλαμβάνει αλλοιώσεις στο κύτταρο-στόχο, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για κάθε βακτηριοσίνη (Tagg et al., 1976).



Σχήμα 1.4 Τρόποι δράσης βακτηριοσινών (Juodeikiene et al., 2012)

1.5.3 Εφαρμογές των βακτηριοσινών

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται έντονο ενδιαφέρον για τη μελέτη των βακτηριοσινών και εστιάζεται κυρίως στο κλάδο επεξεργασίας των τροφίμων και στον κλάδο της υγείας.

A) Βιοσυντήρηση τροφίμων

Σήμερα, ολοένα και περισσότεροι καταναλωτές στρέφονται στην αγορά βιολογικών προϊόντων εξαιτίας της αλόγιστης χρήσης χημικών πρόσθετων και συντηρητικών ουσιών κατά την επεξεργασία των τροφίμων. Γι' αυτό το λόγο οι βιομηχανίες τροφίμων αναζητούν εναλλακτικές λύσεις για τη βιοσυντήρηση των προϊόντων. Οι βακτηριοσίνες που παράγονται από οξυγαλακτικά βακτήρια θεωρούνται κατάλληλες να χρησιμοποιηθούν για αυτό τον σκοπό καθώς πληρούν

τα παρακάτω κριτήρια i) είναι γενικά αναγνωρισμένες ως ασφαλή πρόσθετα (GRAS, generally recognized as safe), ii) είναι μη τοξικές και μη δραστικές στα ευκαρυωτικά κύτταρα, iii) αδρανοποιούνται από πρωτεάσες του πεπτικού συστήματος και επηρεάζουν σε μικρό βαθμό την εντερική μικροχλωρίδα, iv) είναι θερμοάντοχες και εμφανίζουν αντοχή σε μεγάλο εύρος pH, v) έχουν σχετικά ευρύ αντιμικροβιακό φάσμα έναντι παθογόνων που προκαλούν αλλοιώσεις στα τρόφιμα και τροφιμογενών παθογόνων, vi) δεν εμφανίζουν διασταυρούμενη ανθεκτικότητα, δηλαδή δεν δημιουργούνται εύκολα ανθεκτικά στελέχη, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των αντιβιοτικών, vii) γενετικά κωδικοποιούνται συχνά από πλασμιδιακά γονίδια και ακολούθως πραγματοποιούνται ευκολότερα οι γενετικοί χειρισμοί τους. Στην πράξη έχει αποδειχθεί ότι η χρησιμοποίηση των βακτηριοσινών έχει πλεονεκτήματα όπως, η επέκταση του χρόνου ζωής των τροφίμων, η μείωση του κινδύνου μεταφοράς τροφιμογενών παθογόνων μέσω της τροφικής αλυσίδας, η ελάττωση των οικονομικών απωλειών που οφείλονται σε αλλοιώσεις των τροφίμων, η μειωμένη χρήση χημικών συντηρητικών και ο περιορισμός της θερμικής επεξεργασίας χωρίς να επηρεάζεται η ασφάλεια των τροφίμων. Με αυτόν τον τρόπο δεν καταστρέφονται τα θρεπτικά συστατικά και οι βιταμίνες και δεν επηρεάζονται δυσμενώς τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά (Gálvez et al., 2007).

Όσον αφορά την προσθήκη τους στα τρόφιμα, αυτή μπορεί να επιτευχθεί με τρεις τρόπους (Chen & Hoover, 2007; Schillinger et al., 1996).

- 1) Με εμβολιασμό ενός τροφίμου με οξυγαλακτικά βακτήρια (εναρκτήριες ή προστατευτικές καλλιέργειες), τα οποία παράγουν βακτηριοσίνες. (παραγωγή *in situ*). Ωστόσο σε αυτή την περίπτωση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο η ικανότητα ανάπτυξης των οξυγαλακτικών και η επαρκής παραγωγή των βακτηριοσινών
- 2) Η προσθήκη καθαρών ή μερικώς καθαρών βακτηριοσινών ως πρόσθετα
- 3) Η προσθήκη στελέχους που παράγει βακτηριοσίνη σε τρόφιμο που έχει υποστεί προηγουμένως ζύμωση.

Στα γαλακτοκομικά προϊόντα

Κατά την ωρίμανση των τυριών (κατά βάση σκληρών και ημίσκληρων) εγκυμονεί ο κίνδυνος να αναπτυχθούν αναερόβιοι μικροοργανισμοί που μεταβολίζουν το γαλακτικό οξύ προς βουτυρικό, με αποτέλεσμα να προκαλείται όψιμο φούσκωμα στα τυριά, το οποίο αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα ελαττώματα της εμφάνισής τους. Οφείλεται σε βακτήρια του γένους *Clostridium* και κυρίως στο *Clostridium tyrobutyricum*. Για την αντιμετώπιση αυτού το προβλήματος γίνεται προσθήκη στο γάλα της τυροκόμησης νιτρικών αλάτων., τα οποία όμως είναι δυνατόν σε υψηλές συγκεντρώσεις να θέσουν σε κίνδυνο την υγεία του ανθρώπου. Μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με τη χρησιμοποίηση βακτηριοσινών για την αποφυγή ανάπτυξης κλωστριδίων έχουν δώσει θετικά αποτελέσματα. Αναλυτικότερα ο συνδυασμός της νισίνης με καλλιέργειες εκκίνησης που είναι ανθεκτικές σε αυτήν παρεμποδίζει την ανάπτυξη των κλωστριδίων (O'Sullivan et al., 2002). Επίσης, προσθήκη βακτηριοσινών, όπως η νισίνη και η λακτισίνη 3147 στις καλλιέργειες εκκίνησης αναστέλλει την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών όπως η *Listeria. monocytogenes*, το *Clostridium sporogenes* και ο *Staphylococcus aureus*. Η χρήση βακτηριοσινών στη διαδικασία τυροκόμησης επηρεάζει επίσης θετικά την ωρίμανση των τυριών, καθώς συμβάλλει στην απελευθέρωση ενζύμων στην μάζα του τυριού και την επακόλουθη αύξηση της συγκέντρωσης των πηκτικών ενώσεων, ως γνωστόν είναι υπεύθυνες για το άρωμα και τη γεύση του τελικού προϊόντος (Garcia et al., 2010). Επιπλέον, οι βακτηριοσίνες επιταχύνουν τη λύση των κυττάρων της καλλιέργειας, με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται περισσότερα πρωτεολυτικά ένζυμα. Οι Morgan et al (2002) παρατήρησαν ότι η εφαρμογή τριών βακτηριακών στελεχών κατά την παρασκευή τυριού Cheddar αύξησε τη συγκέντρωση των ελεύθερων αμινοξέων και την αυτόλυση των κυττάρων και μείωσε την πικρή γεύση στο τυρί.

Μια άλλη σημαντική εφαρμογή είναι η συμβολή στην αύξηση του χρόνου συντήρησης του γάλακτος. Με τη θερμική επεξεργασία του γάλακτος επιτυγχάνεται η θανάτωση των παθογόνων και των αλλοιωγόνων, όμως οι υψηλές θερμοκρασίες που εφαρμόζονται αλλοιώνουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και μειώνουν τη θρεπτική τους αξία. Μία εναλλακτική μέθοδος είναι η προσθήκη νισίνης. Από

μελέτες που έχουν γίνει έχει αποδειχθεί ότι με την προσθήκη της βακτηριοσίνης αυτής απαιτείται χαμηλότερη θερμοκρασία και χρόνος κατά τη θερμική επεξεργασία (O'Sullivan et al., 2002).

B) Συμβολή των βακτηριοσινών στην υγεία

Εκτός από τη βιομηχανία τροφίμων οι βακτηριοσίνες βρίσκουν εφαρμογή και στο κλάδο της υγείας. Τα τελευταία χρόνια έχει διαπιστωθεί ότι η μικροβιακή αντοχή (Antimicrobial resistance, AMR) των αντιβιοτικών έχει αυξηθεί σημαντικά εξαιτίας της μη ενδεδειγμένης και πολλές φορές αλόγιστης χορήγησης τους τόσο στον ανθρώπινο όσο και στο ζωικό πληθυσμό. Η αύξηση της ανθεκτικότητας και ιδίως η παρουσία των πολυανθεκτικών παθογόνων καθιστά τα αντιβιοτικά αναποτελεσματικά για την αντιμετώπιση διάφορων ασθενειών και κατά συνέπεια κρίνεται επιτακτική η ανάγκη να ληφθούν τα κατάλληλα μέτρα. Μια λύση για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος είναι η χρησιμοποίηση βακτηριοσινών και άλλων αντιμικροβιακών ενώσεων αντί για αντιβιοτικά. Ιδιαίτερα οι βακτηριοσίνες που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια ενδείκνυται για τη χρήση τους ως αντιβιοτικές ουσίες, διότι θεωρούνται ασφαλείς για τον άνθρωπο, εφόσον χρησιμοποιούνται εδώ και χιλιάδες χρόνια για τη ζύμωση πολλών τροφίμων. Οι βακτηριοσίνες διαφοροποιούνται από τα αντιβιοτικά καταρχήν διότι έχουν μικρότερο αντιμικροβιακό φάσμα και είναι τοξικές κυρίως σε βακτήρια που είναι φυλογενετικά συγγενή, σε αντίθεση με τα αντιβιοτικά που έχουν ευρύτερο αντιμικροβιακό φάσμα δράσης. Άλλες σημαντικές διαφορές είναι ο τρόπος βιοσύνθεσης (οι βακτηριοσίνες συντίθεται στα ριβοσώματα ενώ τα αντιβιοτικά είναι δευτερογενείς μεταβολίτες), ο τρόπος δράσης και ο μηχανισμός τοξικότητάς τους (Cleveland et al., 2001).

Από μελέτες που έχουν διεξαχθεί γνωρίζουμε ότι υπάρχουν βακτηριοσίνες που παρεμποδίζουν το παθογόνο *Helicobacter pylori*, το οποίο προκαλεί διάφορες ασθένειες του στομάχου. Επίσης οι βακτηριοσίνες salivaricin A και B, οι οποίες παράγονται από το βακτηριακό στέλεχος *Streptococcus salivarius* K12 συμβάλλουν στη θεραπεία λοιμώξεων του αναπνευστικού συστήματος που προκαλούνται από στρεπτόκοκκους (Gillor et al., 2008). Επίσης πολλές βακτηριοσίνες, όπως η λακτισίνη

3147, η μερσασιδίνη και η λευκοσίνη A παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι σε βακτηριακά στελέχη μικροοργανισμών όπως, οι εντερόκοκκοι (VRE) και ο παθογόνος μικροοργανισμός *Staphylococcus aureus* (MRSA), οι οποίοι είναι ανθεκτικοί στα αντιβιοτικά (Sang & Blecha, 2008).

Στο παρελθόν τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνταν ευρέως στη διατροφή των παραγωγικών ζώων ως πρόσθετη ύλη καθώς συμβάλλουν στην αύξηση του σωματικού βάρους, στην βελτίωση του συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής και στη μείωση της θνητότητας και θνησιμότητας λόγω λοιμώξεων. Σήμερα όμως έχει απαγορευθεί η χρήση των αντιβιοτικών στις περισσότερες χώρες. Οι βακτηριοσίνες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και σε αυτήν την περίπτωση ως εναλλακτική λύση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χρήση βακτηριοσινών για την αντιμετώπιση της μαστίτιδας. Η εμφάνιση μαστίτιδας σε μια μονάδα γαλακτοπαραγωγής συνεπάγεται σημαντικές οικονομικές απώλειες, καθώς το μαστιτικό γάλα λόγω της παρουσίας των αντιβιοτικών θεωρείται ακατάλληλο για κατανάλωση και μεταποίηση. Η χρησιμοποίηση της νισίνης και της λακτισίνης 3147 ως μικροβιοκτόνα για την απολύμανση των θηλών των ζώων ή και την καταπολέμηση της μαστίτιδας είχε θετικά αποτελέσματα (Sears et al., 1992 ; Cao et al., 2007). Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η προσθήκη νισίνης στο σιτηρέσιο των μηρυκαστικών επιφέρει αλλαγές στο βακτηριακό πληθυσμό του πεπτικού συστήματός τους, οι οποίες οδηγούν στη μείωση της παραγωγής μεθανίου, στο λόγο οξικού προς προπιονικό και στην παραγωγή αμμωνίας (Russell et al., 2002; Joerger et al., 2003) επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο την αποτελεσματικότητα της διατροφής. Σε *in vitro* πειράματα παρατηρήθηκε ότι η νισίνη επηρεάζει την μικροβιακή πέψη με παρόμοιο τρόπο με αυτόν του ιοντοφόρου αντιβιοτικού μονενσίνη (monensin) (Mantovani et al, 2011) Έχει βρεθεί επίσης ότι οι βακτηριοσίνες λακτισίνη 3147, μερσασιδίνη και λευκοσίνη A εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση έναντι βακτηριακών στελεχών, που είναι ανθεκτικά σε αντιβιοτικά, όπως η βανκομυκίνη και η methicillin (Sang et al., 2008; Sears et al., 1992). Οι Svetoch και Stern (2010) τέλος βρήκαν ότι σε πτηνά η χορήγηση βακτηριοσινών είχε θετικά αποτελέσματα για τον έλεγχο των *Campylobacter* spp .

1.5.4 Μέθοδοι καθαρισμού Βακτηριοσινών

Εξαιτίας της ετερογένειας των βακτηριοσινών χρησιμοποιούνται διάφορα πρωτόκολλα και μέθοδοι καθαρισμού ανάλογα με το είδος της βακτηριοσίνης.

Το πρώτο βήμα καθαρισμού είναι η συμπύκνωση της βακτηριοσίνης, καθώς πολλές βακτηριοσίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων παράγονται σε μικρές ποσότητες. Γι' αυτόν το σκοπό εφαρμόζονται διάφορες τεχνικές για την παραλαβή του κυτταρικού εκχυλίσματος που περιέχει τη βακτηριοσίνη. Οι πιο διαδεδομένες είναι οι εξής : η κατακρήμνιση με τη χρήση αλάτων, όπως το θειικό αμμώνιο, η εκχύλιση με οργανικό διαλύτη (ακετόνη, αιθανόλη), η μέθοδος προσρόφησης-εκρόφησης, διάφορες χρωματογραφικές μέθοδοι, όπως η χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής, υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, η μοριακή διήθηση και η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Σαν πρώτο βήμα καθαρισμού πιο διαδεδομένη μέθοδος είναι η κατακρήμνιση με θειικό αμμώνιο καθώς είναι απλή στην εφαρμογή της (Saavedra & Sesma, 2011; Pingitore et al., 2007). Το επόμενο στάδιο καθαρισμού είναι η εφαρμογή χρωματογραφίας ή ο συνδυασμός χρωματογραφιών. Σε ένα ιδανικό πρωτόκολλο καθαρισμού θα πρέπει η απόδοση της βακτηριοσίνης να είναι πάνω από 50% και η καθαρότητα περίπου στο 90% (Parada et al., 2007).

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει επίσης να επισημανθεί ότι όσο αυξάνεται ο βαθμός καθαρότητας μιας βακτηριοσίνης τόσο πιο ασταθής γίνεται. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η μεσεντερισίνη Y105 και η λευκοσίνη A-UAL 187. Το πρόβλημα της σταθερότητας των βακτηριοσινών δεν οφείλεται στην πρωτεόλυση, αλλά πιθανώς σε ειδική επίδραση σε κάποια καταλυτική θέση αυτών, όπως η απώλεια κάποιου συνενζύμου ή σε τροποποιήσεις ομοιοπολικών δεσμών. Η σταθερότητα είναι μεγαλύτερη σε χαμηλό pH (Carolissen-Mackay et al., 1997). Τέλος, η μέγιστη παραγωγή της βακτηριοσίνης σημειώνεται κατά τη διάρκεια της λογαριθμικής φάσης και στην αρχή της στατικής φάσης.

1.5.5 Παράγοντες που επηρεάζουν τον καθαρισμό

Η ποσότητα της βακτηριοσίνης που παράγεται

Πολλές φορές η ποσότητα της βακτηριοσίνης που παράγεται από ορισμένα βακτηριακά στελέχη είναι μικρή και ως εκ τούτου ανιχνεύεται μικρή ενεργότητα. Η απόδοση των ενεργών βακτηριοσινών επηρεάζεται από τις συνθήκες επώασης, όπως η θερμοκρασία, το pH και ο χρόνος ανάπτυξης. Γι' αυτόν το λόγο είναι σημαντικό να προσδιορίζονται αρχικά οι βέλτιστες συνθήκες επώασης και να πραγματοποιούνται μελέτες ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη παραγωγή τους. Το άριστο pH για την παραγωγή των βακτηριοσινών είναι μεταξύ 6-7 ενώ η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης διαφέρει ανάμεσα στα διάφορα βακτηριακά στελέχη όμως στις περισσότερες περιπτώσεις κυμαίνεται από 30-37 °C (Gautam et al., 2009).

Η σύνθεση του θρεπτικού υποστρώματος

Η σύνθεση του θρεπτικού μέσου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παραγωγή των βακτηριοσινών. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι απαιτητικοί μικροοργανισμοί και κατά κανόνα για την ανάπτυξή τους χρησιμοποιούνται πολύπλοκα θρεπτικά μέσα, όπως είναι το MRS, το Elliker broth (ELB), το M17 και το All Purpose Tween (APT). Όλα αυτά τα θρεπτικά υποστρώματα ωστόσο περιέχουν σημαντικές ποσότητες πεπτιδίων με μοριακή μάζα παρόμοια με αυτές των βακτηριοσινών (3000-6000 Da) με αποτέλεσμα να δημιουργούνται προβλήματα στην διαδικασία καθαρισμού τους. Επίσης, ένα άλλο πρόβλημα είναι ότι ορισμένα μόρια βακτηριοσινών έχουν την τάση να ενώνονται με άλλα συστατικά των θρεπτικών υποστρωμάτων και να εμφανίζουν υψηλό βαθμό υδροφοβίας, καθώς δημιουργούν πρωτεϊνικά συσσωματώματα.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το γένος *Lactobacillus* αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα γένη των οξυγαλακτικών βακτηρίων και το μεγάλο τεχνολογικό ενδιαφέρον των γαλακτοβακίλλων αντικατοπτρίζεται στο μεγάλο αριθμό ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί και αφορούν τη φυσιολογία, τη παραγωγή βακτηριοσινών και την ύπαρξη προβιοτικών ιδιοτήτων.

Το στέλεχος *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 ανήκει στη συλλογή ACA-DC του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και έχει απομονωθεί από τυρί Κασέρι. Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έχει διαπιστωθεί ότι, το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση εναντίον του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella spp.* Επιπλέον, από δοκιμές *in vivo* έχει διαπιστωθεί ότι ο *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση έναντι διαφόρων οξυγαλακτικών αλλά και παθογόνων βακτηρίων, όπως ο *Streptococcus oralis* και ο *Streptococcus pneumoniae*. Ωστόσο δεν έχει ταυτοποιηθεί η αντιμικροβιακή ένωση που παράγεται από αυτό το στέλεχος. Η διερεύνηση και ο προσδιορισμός της αντιμικροβιακής ένωσης του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 αποτελεί ιδιαίτερα σημαντικό εγχείρημα και γίνεται στα πλαίσια της έρευνας των προβιοτικών ιδιοτήτων του και της χρήσης του στην παραγωγή και βιοσυντήρηση ζυμωμένων τροφίμων.

Το στέλεχος *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 ανήκει επίσης στη συλλογή του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και έχει απομονωθεί από δείγμα Κοπανιστής. Από προκαταρκτικά πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί, παρατηρήθηκε ότι παρεμποδίζει Gram αρνητικούς μικροοργανισμούς.

Ο σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης ήταν ο καθαρισμός και ο χαρακτηρισμός της αντιμικροβιακής ένωσης που παράγεται τόσο όσο από το βακτηριακό στέλεχος *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 όσο και από το βακτηριακό στέλεχος *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565.

Τελικά όμως ο καθαρισμός και ο χαρακτηρισμός του στελέχους *Lactobacillus rennini* ACA-DC 565 δεν πραγματοποιήθηκε, διότι παρουσιάστηκαν προβλήματα

επιμόλυνσης του στελέχους, τα οποία δεν ήταν εφικτό να επιλυθούν εντός του χρονικού διαστήματος της παρούσας μελέτης.

3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες ανάπτυξης

Το βακτηριακό στέλεχος που εξετάστηκε για την παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων ήταν ο *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179. Πρόκειται για στέλεχος της συλλογής ACA-DC του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, το οποίο έχει απομονωθεί από Ελληνικό τυρί Κασέρι (Zoumproulou et al., 2008) και φυλάσσονταν στους -80 °C. Πριν από κάθε πείραμα ο μικροοργανισμός αναπτύχθηκε δύο φορές (εμβόλιο 1% v/v) σε MRS broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) στους 37 °C για 24 h. Η τελική ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε στις ίδιες συνθήκες σε τρία διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα (εμβόλιο 1% v/v), MRS broth, SMRS broth (Τροποποιημένο MRS), το οποίο περιείχε όλα τα συστατικά του MRS broth εκτός από το γαλακτωματοποιητή Polysorbate 80 (Tween 80) και σε MRS-DO, το οποίο περιείχε όλα τα συστατικά του MRS broth εκτός από το Tween 80 καθώς και ελαϊκό οξύ (oleic acid) σε αναλογία 0,1% v/v.

Ως ευαίσθητο στέλεχος χρησιμοποιήθηκε ο *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4. Το στέλεχος αυτό έχει απομονωθεί από παραδοσιακό γιαούρτι. Αρχικά, ανανεώθηκε (εμβόλιο 1% v/v) σε γάλα (Skim Milk Powder, 10% w/v, Oxoid, Hampshire, England) που περιέχει 0,3% w/v εκχύλισμα ζύμης (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). Η δεύτερη ανανέωση έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα M17 broth (Biokar Diagnostics, Beauvais, France). Η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε στους 37 °C για 24 h. Ο μικροοργανισμός φυλάσσονταν στους -80 °C σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS, το οποίο περιείχε 20% (v/v) γλυκερόλη.

Πίνακας 3.1 Συστατικά των θρεπτικών υποστρωμάτων

Σύσταση MRS		Σύσταση SMRS		Σύσταση DO-MRS		Σύσταση MRS-MOPS	
Συστατικά	(g/L)	Συστατικά	(g/L)	Συστατικά	(g/L)	Συστατικά	(g/L)
Πολυπεπτό νη	10	Πολυπεπτό νη	10	Πολυπεπτό νη	10	Πολυπεπτό νη	10
Εκχύλισμα κρέατος	10	Εκχύλισμα κρέατος	10	Εκχύλισμα κρέατος	10	Εκχύλισμα κρέατος	10
Εκχύλισμα ζύμης	5	Εκχύλισμα ζύμης	5	Εκχύλισμα ζύμης	5	Εκχύλισμα ζύμης	5
Γλυκόζη	20	Γλυκόζη	20	Γλυκόζη	20	Γλυκόζη	20
Tween 80	1.08	Tween 80	1.08	Tween 80	1.08	Tween 80	1.08
K ₂ HPO ₄	2	K ₂ HPO ₄	2	K ₂ HPO ₄	2	K ₂ HPO ₄	2
Sodium acetate	5	Sodium acetate	5	Sodium acetate	5	Sodium acetate	5
Ammonium citrate	2	Ammonium citrate	2	Ammonium citrate	2	Ammonium citrate	2
MgSO ₄	0.2	MgSO ₄	0.2	MgSO ₄	0.2	MgSO ₄	0.2
Mn SO ₄	0.05	Mn SO ₄	0.05	Mn SO ₄	0.05	Mn SO ₄	0.05
				Oleic acid	0.1% v/v	MOPS	180 mM

3.2 Ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης και προσδιορισμός της ενεργότητας

Για την ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της διάχυσης σε τρυβλία (Well Diffusion Assay, WDA) (Tagg & McGiven, 1971). Το ευαίσθητο στέλεχος, *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4 (εμβόλιο 1% v/v ή 0,1% v/v από φρέσκια καλλιέργεια που είχε ανανεωθεί 2 φορές) εμβολιάστηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα M17 (1.3% w/v άγαρ, Agar Bacteriologique type E Biokar Diagnostics, Beauvais, France). Στο σταθεροποιημένο υπόστρωμα ανοίχτηκαν οπές με αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur (διαμέτρου περίπου 5mm) και έγινε έγχυση 50 μl δείγματος σε κάθε οπή. Τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37 °C για 24 h. Μετά το πέρας των 24h έγινε παρατήρηση των τρυβλίων για εμφάνιση άλους, δηλαδή διαυγούς ζώνης γύρω από τις οπές (halo). Η παρουσία της ζώνης υποδηλώνει την

παρεμπόδιση ανάπτυξης του ευαίσθητου στελέχους και κατ' επέκταση την ύπαρξη αντιμικροβιακής δράσης. Τέλος έγινε μέτρηση της διαμέτρου της ζώνης.

Στα δείγματα που εμφάνισαν ζώνες παρεμπόδισης της ανάπτυξης στην μέθοδο διάχυσης σε τρυβλία υπολογίστηκε η ενεργότητα. Τα υπό εξέταση δείγματα αραιώθηκαν με διαδοχικές δυαδικές αραιώσεις σε απιονισμένο νερό και εφαρμόστηκε η ίδια διαδικασία με τη μέθοδο WDA, η οποία περιγράφηκε προηγουμένως. Η ενεργότητα υπολογίστηκε σε αυθαίρετες μονάδες AU/ml (Arbitrary Units/ml) από τον ακόλουθο τύπο: $20 \times 2^x \text{AU/ml}$, όπου x η μεγαλύτερη αραιώση του δείγματος που εμφάνισε ζώνη παρεμπόδισης.

3.3 Λυοφιλίωση

Η λυοφιλίωση αποτελεί μια μέθοδο συμπύκνωσης και βασίζεται στο φαινόμενο της εξάχνωσης, κατά την οποία μια ουσία μεταβαίνει από την στερεά κατάσταση κατευθείαν στην αέρια, χωρίς να περάσει από την υγρή. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε για την συμπύκνωση δειγμάτων μεταξύ των βημάτων καθαρισμού.

Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στις ειδικές φιάλες λυοφιλίωσης. Αρχικά οι φιάλες εμβαπτίστηκαν σε μεθανόλη (100% v/v) για να παγώσουν και κατόπιν παρέμειναν στους $-80\text{ }^\circ\text{C}$ για 24 h. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στις ειδικές θέσεις του λυοφιλιωτή (Ehmist Alpha I - 12), ο οποίος αρχικά είχε ψυχθεί στους $-40\text{ }^\circ\text{C}$ και είχε παραμείνει για 15 λεπτά υπό κενό (πίεση χαμηλότερη από αυτήν του τριπλού σημείου - συνύπαρξη και των τριών καταστάσεων δηλαδή στερεάς, υγρής και αέριας). Σε αυτήν τη χαμηλή πίεση το νερό απομακρύνεται μέσω της εξάχνωσης ενώ το υπόλοιπο δείγμα βρίσκεται στη στερεή φάση. Τα δείγματα μετά την τοποθέτησή τους παρέμειναν για 24 h στο μηχάνημα.

3.4 Μέθοδοι καθαρισμού της αντιμικροβιακής ένωσης

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκαν τρία διαφορετικά πρωτόκολλα καθαρισμού της αντιμικροβιακής ένωσης που παράγεται από το στέλεχος *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179. Όλα τα στάδια καθαρισμού πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -20 °C μέχρι την πραγματοποίηση των επόμενων αναλύσεων.

Πρώτο πρωτόκολλο καθαρισμού

Το παραγωγό στέλεχος αναπτύχθηκε σε δύο διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα, MRS (1 L) και SMRS (1 L) με εμβόλιο 1% v/v, στα οποία εφαρμόστηκαν τα ίδια στάδια καθαρισμού που περιγράφονται στη συνέχεια. Μετά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε σε ψυχόμενη φυγόκεντρο Sorvall (Wilmington, Delaware, USA) με κεφαλή GS-3 για 20 min στα 7000 g και συλλέχτηκε το υπερκείμενο που αντιστοιχεί στο ακαθάριστο κυτταρικό εκχύλισμα και θα αναφέρεται ως Crude.

Αφού το pH ρυθμίστηκε στο 6,5 με 10 N NaOH, προστέθηκε **θειικό αμμώνιο** (Applichem, Darmstadt, Germany) με βαθμό κορεσμού 60% (390 g/L) για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Η προσθήκη του θειικού αμμωνίου έγινε σταδιακά ενώ το διάλυμα ήταν υπό συνεχή ανάδευση. Μετά από ανάδευση των δειγμάτων στους 4 °C για 18 h τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στους 4°C για 40 min στα 7000 g. Το ίζημα της φυγοκέντρωσης, που θα αναφέρεται ως ASP (Ammonium Sulfate Precipitate), επαναιωρήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris (pH 7.5) σε όγκο 1/10 του αρχικού όγκου (1 L), και διηθήθηκε (ηθμός Regenerated Cellulose με διάμετρο πόρου 0,2μm, Whatman, Dassel, Germany) με χρήση αντλίας.

Το επόμενο βήμα ήταν η **χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής** (Anion exchange Chromatography, RQ) με τη στήλη Resource Q (16 mm i.d x 30 mm, Pharmacia Biotech, Stockholm, Sweden) με υλικό πλήρωσης τα πολυμερή στυρένιου/δι-βινυλο-βενζόλιο και υλικό κατασκευής των τμημάτων της το Peek (polyetheretherketone). Η ταχύτητα ροής που χρησιμοποιήθηκε ήταν 2 ml/min. Το υλικό της στήλης αναγεννήθηκε με το ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris HCl, 1M NaCl,

pH 7,5 (ρυθμιστικό διάλυμα B της Resource Q), ενώ η εξισορρόπηση της έγινε με το ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM Tris HCl, pH 7.5 (ρυθμιστικό διάλυμα A της Resource Q). Αφού το δείγμα διοχετεύθηκε στη στήλη παραλήφθηκε το μη κατακρατηθέν μέρος της κινητής φάσης (Non Retained, NR). Η έκλουση πραγματοποιήθηκε με γραμμική διαβάθμιση συγκέντρωσης NaCl (Gradient, διαλύτης B 0-100%, δηλαδή NaCl 0 - 1 M) και παραλήφθηκαν 60 κλάσματα.

Το μη κατακρατηθέν (NR) και τα θετικά κλάσματα της RQ λυοφιλιώθηκαν, επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα TFA 0.1% v/v σε H₂O, διηθήθηκαν και στη συνέχεια διεξήχθη **χρωματογραφία αντίστροφης φάσης** (Reversed Phase Chromatography, RPC) με τη στήλη Resource 15RPC (6,4 mm i.d.x 100 mm, Pharmacia Biotech, Stockholm, Sweden). Το υλικό πλήρωσης της στήλης ήταν πολυμερή στυρένιου/διβινυλο-βενζόλιο και το υλικό κατασκευής των τμημάτων της ήταν το Peek (polyetheretherketone). Η ταχύτητα ροής στη συγκεκριμένη στήλη ήταν 1 ml/min. Η στήλη αναγεννήθηκε με συνεχή διαβάθμιση από το διάλυμα TFA 0.1% v/v σε ακετονιτρίλιο (διάλυμα B της Resource 15RPC) στο διάλυμα TFA 0.1% v/v σε H₂O (διάλυμα A της Resource 15RPC) και η εξισορρόπηση έγινε με το διάλυμα A. Αφού διοχετεύτηκε το δείγμα έγινε η συλλογή του NR. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η έκλουση με γραμμική διαβάθμιση από 0 σε 100% ρυθμιστικό διάλυμα B της στήλης και η συλλογή 45 κλασμάτων.

Τέλος, το NR και τα θετικά κλάσματα από την RPC λυοφιλιώθηκαν επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα 20 mM φωσφορικού καλίου με 0,25 M NaCl, pH 6.0 διηθήθηκαν και ακολούθησε **χρωματογραφία μοριακής διήθησης** (Molecular Sieving Chromatography). Χρησιμοποιήθηκε η στήλη Superdex Peptide HR 10/30 (6,4 mm i.d.x100 mm, Pharmacia Biotech, Stockholm, Sweden). Το υλικό πλήρωσης της στήλης ήταν πολυμερή δεξτράνιου σε πορώδη σφαιρίδια αγαρόζης. Η ροή ήταν 0,5 ml / min. Η εξισορρόπηση πραγματοποιήθηκε με το διάλυμα 20 mM φωσφορικού καλίου με 0,25 M NaCl, pH 6.0 (διάλυμα A της Superdex Peptide). Στο επόμενο στάδιο διοχετεύτηκε το δείγμα και μετά την ολοκλήρωση αυτής της διαδικασίας, η στήλη πλύθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα A και έγινε η συλλογή του NR. Έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι εκλούσεις με ρυθμιστικό διάλυμα A και η συλλογή των 60 κλασμάτων.

Δεύτερο πρωτόκολλο καθαρισμού

Ο *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 αναπτύχθηκε μόνο στο θρεπτικό υπόστρωμα SMRS (2 L). Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με το πρώτο πρωτόκολλο, με τη διαφοροποίηση ότι δεν έλαβε χώρα η χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Superdex Peptide HR 10/30).

Τρίτο πρωτόκολλο καθαρισμού

Ομοίως με το δεύτερο πρωτόκολλο, αλλά το δείγμα φορτώθηκε κατευθείαν σε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, δηλαδή παραλήφθηκε η χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής.

3.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με χρήση SDS (SDS-PAGE)

Για τον προσδιορισμό της μοριακής μάζας των δειγμάτων και για τον έλεγχο της καθαρότητάς τους χρησιμοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση και συγκεκριμένα, η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου με χρήση SDS (sodium dodecyl sulfate, δωδεκακυλοθειικό νάτριο) (Schägger & Von Jagow, 1987), η οποία επιτρέπει το διαχωρισμό ενώσεων με χαμηλή μοριακή μάζα. Η ηλεκτροφόρηση βασίζεται στο γεγονός ότι πρωτεΐνες διαφορετικής μοριακής μάζας κινούνται κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού φορτίου με διαφορετικές ταχύτητες. Σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η παρουσία του το SDS (δωδεκακυλοθειικό νάτριο), ένα ανιονικό επιφανειοενεργό, το οποίο δεσμεύεται στις πρωτεΐνες, τις αποδιάσσει και τις φορτίζει αρνητικά με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες να διαχωρίζονται με βάση τη μοριακή τους μάζα και όχι λόγω του φορτίου τους.

Τα δείγματα αραιώθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα δείγματος (σε αναλογία 1:2), θερμάνθηκαν στους 40 °C για 30 min παρουσία μερκαπτοαιθανόλης με σκοπό την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και φορτώθηκαν στη συσκευή με τη χρήση βελόνας Hamilton. Για κάθε δείγμα φορτώθηκαν περίπου 30 μl και 10 μl από τον μάρτυρα. Η

ηλεκτροφόρηση αρχικά έγινε για 1 h στα 30 mA και μετά στα 60 mA μέχρι το πέρας της διαδικασίας (περίπου 5 h).

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης αφαιρέθηκαν οι δυο πηκτές. Στη μία πηκτή ακολουθήθηκε η διαδικασία χρώσης ώστε να επιτευχθεί η οπτικοποίηση των ζωνών, ενώ στη δεύτερη έγινε μετα-ηλεκτροφορητική ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης (Παράγραφος 3.2). Επίσης, πραγματοποιήθηκε χρώση με νιτρικό άργυρο, η οποία είναι μια εναλλακτική μέθοδος για την ανίχνευση πρωτεϊνών σε πηκτή ηλεκτροφόρησης. Η μέθοδος αυτή είναι πιο ευαίσθητη (περίπου 100 φορές) από τη χρώση Coomassie Brilliant Blue, διότι μπορεί να ανιχνεύει μέχρι και 1 ng πρωτεΐνης (Merritt et al., 1981). Στηρίζεται στην αντίδραση των ιόντων αργύρου με τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων και κυρίως με τις σουλφιδρυλικές και καρβοξυλικές ομάδες. Τα ιόντα αργύρου που έχουν δεθεί με τις πρωτεΐνες ανάγονται στη μεταλλική τους μορφή που είναι αδιάλυτη και ορατή.

3.6 Προσδιορισμός πρωτεΐνης κατά Bradford

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Bradford. Η μέθοδος στηρίζεται στο γεγονός ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 αλλάζει χρώμα όταν σε όξινο διάλυμα συνδεθεί με πρωτεΐνες. Αναλυτικότερα, η δημιουργία του συμπλόκου χρωστικής με πρωτεΐνη προκαλεί μετατόπιση της μέγιστης απορρόφησης από τα 470 nm στα 595 nm με αποτέλεσμα το χρώμα της χρωστικής να μετατρέπεται από καφέ σε μπλε. Η αλλαγή του χρώματος είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München, Germany). Η μέτρηση της απορρόφησης έλαβε χώρα σε φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer (Massachusetts, USA) στα 595 nm και ο υπολογισμός της συγκέντρωσης έγινε βάσει καμπύλης αναφοράς, στην οποία χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα αλβουμίνης βοείου ορού (BSA). Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις για κάθε δείγμα.

3.7 Ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης σε συγκαλλιέργεια του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 και του *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4

(A) Αρχικά, μελετήθηκε η ανάπτυξη του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 για 7 μέρες σύμφωνα με την ακόλουθη πειραματική πορεία. Ο *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS (εμβόλιο 1% v/v) και επώαστηκε στους 37 °C. Ανά 24 h έγινε λήψη δείγματος (2 ml), το οποίο φυγοκεντρήθηκε για 5 min στα 7000 g στους 22°C. Το υπερκείμενο από τη φυγοκέντρηση (Crude) χωρίστηκε σε 2 δείγματα αφού πρώτα το pH ρυθμίστηκε στο 6,5. Το πρώτο δείγμα (0,5 ml), που αποτελούσε το Crude, αποθηκεύτηκε στους -20 °C. Στο δεύτερο δείγμα (1 ml) προστέθηκαν σταδιακά 0,39 g θειικού αμμωνίου για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, ποσότητα που αντιστοιχεί σε ποσοστό κορεσμού 60% και παρέμεινε στους 4 °C για 18 h. Κατόπιν, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 40 min στα 11.000 g στους 4 °C. Στη συνέχεια το ίζημα από τη φυγοκέντρηση (ASP) διαλύθηκε σε 100 ml διαλύματος TFA 0.1% v/v σε H₂O (διάλυμα A της Resource 15RPC) και αποθηκεύτηκε στους -20 °C. Όταν ολοκληρώθηκε η διαδικασία και για τις 7 μέρες έγινε ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης για όλα τα δείγματα, Crude και ASP με τη μέθοδο WDA με ευαίσθητο στέλεχος το *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4 με δυο διαφορετικά εμβόλια 1% και 0,1% v/v (Παράγραφος 3.2). Συνολικά πραγματοποιήθηκαν δυο επαναλήψεις.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε αρίθμηση αποικιών με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης. Για κάθε δείγμα έγιναν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε διάλυμα Ringer (0,9% NaCl) και κάθε αραιώση ενσωματώθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε κλίβανο στους 37°C για 48 h.

(B) Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη του *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4 σε θρεπτικό υπόστρωμα M17 στους 37°C για 2 μέρες. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την παραλαβή του Crude και του ASP της καλλιέργειας του στελέχους αυτού ήταν παρόμοια με αυτή που περιγράφηκε προηγουμένως. Ακολούθησε ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης με τη μέθοδο WDA με ευαίσθητο στέλεχος το *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 (εμβόλιο 1% και 0,1% v/v).

(Γ) Τέλος, μελετήθηκε η ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης σε **συγκαλλιέργεια του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 και του *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4** για 7 μέρες. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν 3 ενότητες.

Η πρώτη ενότητα ήταν η μονοκαλλιέργεια του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179, η δεύτερη η μονοκαλλιέργεια καλλιέργεια του *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4 και η τρίτη ενότητα ήταν η συγκαλλιέργεια των δύο βακτηριακών στελεχών.

Η ανάπτυξη των καλλιεργειών (εμβόλιο 1% v/v) έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS-MOPS (Paradimitriou et al., 2007), που περιείχε ποσότητα 180 mM MOPS. Η πειραματική πορεία περιελάμβανε την παραλαβή του Crude και του ASP, όπως περιγράφηκε προηγουμένως, τόσο από την μονοκαλλιέργεια του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 όσο και από την συγκαλλιέργεια των δυο βακτηριακών στελεχών με στόχο την ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης που παράγεται από το *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179. Η ανίχνευση της αντιμικροβιακής δράσης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο WDA (εμβόλιο 1% και 0.1% v/v) με ευαίσθητο στέλεχος τον *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4. σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS

Επιπλέον, και στις τρεις ενότητες πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των πληθυσμών με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης. Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως, με τη διαφορά ότι η καταμέτρηση των πληθυσμών της συγκαλλιέργειας έλαβε χώρα σε δυο διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα, σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS και σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS, στο οποίο είχε προστεθεί το αντιβιοτικό βανκομυκίνη. Στην πρώτη περίπτωση επιτεύχθηκε η καταμέτρηση και των δύο πληθυσμών, ενώ στη δεύτερη λόγω της παρουσίας του αντιβιοτικού έγινε η καταμέτρηση μόνο του πληθυσμού του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179. Βάσει της υπάρχουσας βιβλιογραφίας (Ζουμποπούλου, 2008) είναι ήδη γνωστό ότι ο *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 είναι ανθεκτικός έναντι του αντιβιοτικού βανκομυκίνη σε ποσότητα >128 MICs $\mu\text{g}/\text{mL}$. Για τον *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4 όμως δεν υπήρχαν δεδομένα και για αυτό πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ανθεκτικότητας έναντι του συγκεκριμένου αντιβιοτικού. Για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας εξετάστηκαν η καλλιέργεια του

Lactobacillus fermentum ACA-DC 179, η καλλιέργεια του *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4 και η συγκαλλιέργεια των δυο βακτηριακών στελεχών και ελέγχθηκαν οι εξής διαδοχικές δυαδικές συγκεντρώσεις της βανκομυκίνης (Sigma, Missouri, USA): 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml και 31,25 µg/ml. Εν συντομία, 20 µl των καλλιεργειών μεταφέρθηκαν στις κυψέλες των τρυβλίων μικροτιτλοδότησης, στη συνέχεια προστέθηκαν 20 µl από το αντιβιοτικό βανκομυκίνη και στο τέλος προστέθηκαν 160 µl MRS, ώστε ο τελικός όγκος κάθε κυψέλης να είναι 200 µl. Το τρυβλίο επώαστηκε υπό μικροαερόφιλες συνθήκες στους 37 °C για 24 h. Την επόμενη μέρα έγινε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 610 nm (OD_{610}).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Επιλογή θρεπτικού υποστρώματος για την ανάπτυξη του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179.

Για την ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης στα θρεπτικά υποστρώματα MRS, SMRS και DO-MRS ελέγχθηκαν τα δείγματα Crude και ASP με τη μέθοδο WDA και προσδιορίστηκε επίσης η ενεργότητά τους.

Πίνακας 4.1: Προσδιορισμός της ενεργότητας της αντιμικροβιακής ένωσης που παράγεται από το *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 στα τρία διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα

Προσδιορισμός Ενεργότητας (AU/ml)		
<u>Υπόστρωμα</u>	<u>Crude</u>	<u>ASP</u>
MRS	40	80
SMRS	20	20
DO-MRS	10	80

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 4.1, όταν το παραγωγό στέλεχος αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS εμφάνισε τις υψηλότερες ενεργότητες, ενώ όταν αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα SMRS εμφάνισε τις χαμηλότερες.

Τα αποτελέσματα συμπίπτουν και με άλλες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε διάφορες βακτηριοσίνες. Σύμφωνα με τους Huot et al. (1991) παρουσία του Tween 80 ευνοείται η παραγωγή και αυξάνεται η ενεργότητα της βακτηριοσίνης που παράγεται από το *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J46, ενώ οι Daba et al. (1993) επισήμαναν ότι η απόδοση της βακτηριοσίνης mesenterocin 5 ήταν υψηλότερη όταν το παραγωγό στέλεχος αναπτύχθηκε σε MRS. Ωστόσο από έρευνες που έχουν γίνει, έχει αποδειχθεί ότι το συστατικό Tween 80 δημιουργεί προβλήματα στη διαδικασία καθαρισμού μιας βακτηριοσίνης (Mortvedt et al., 1991) και για αυτό το λόγο έχουν γίνει προσπάθειες να αντικατασταθεί με άλλο συστατικό. Οι Kawai et al. (1994) χρησιμοποίησαν για την παραγωγή βακτηριοσίνης θρεπτικό υπόστρωμα MRS, στο οποίο το Tween 80 είχε αντικατασταθεί με ελαϊκό οξύ (DO-MRS).

Στην παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε αρχικά ο *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 και στα τρία θρεπτικά υποστρώματα αλλά στη συνέχεια αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθούν μόνο το MRS και το SMRS στα πρωτόκολλα καθαρισμού της αντιμικροβιακής ένωσης. Το DO-MRS, παρά το γεγονός ότι η ενεργότητα του ASP ήταν υψηλή δεν χρησιμοποιήθηκε επειδή απαιτούνταν χρονοβόρα στάδια εκχύλισης και απομάκρυνσης του ελαϊκού οξέος.

4.2 Καθαρισμός αντιμικροβιακής ένωσης που παράγεται από τον *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179.

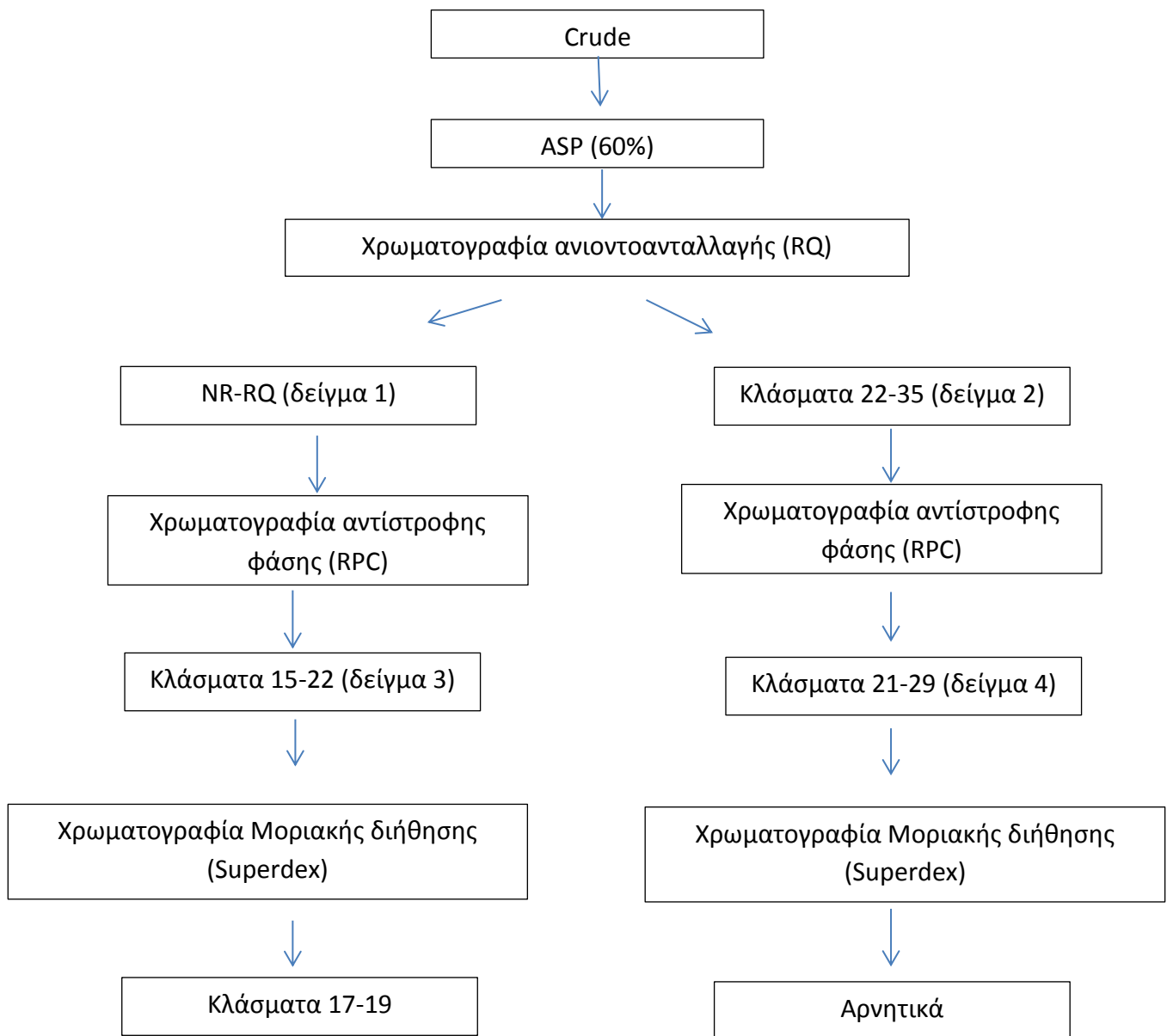
4.2.1 Πρώτο πρωτόκολλο καθαρισμού

Στην πρώτη μέθοδο καθαρισμού χρησιμοποιήθηκαν 2 θρεπτικά υποστρώματα, MRS (1 L) και SMRS (1 L) και εφαρμόστηκαν 3 είδη χρωματογραφιών, της ανιοντοανταλλαγής, της αντίστροφης φάσης και της μοριακής διήθησης. Μετά από κάθε χρωματογραφία πραγματοποιήθηκε WDA με στόχο την ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης και τον προσδιορισμό της ενεργότητας (AU/ml). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης (mg/ml) και υπολογίστηκε η Ολική Πρωτεΐνη των δειγμάτων (Total mg), η Ολική Ενεργότητα (Total AU), η Ειδική Ενεργότητα (AU/mg), η Απόδοση (%) και ο Βαθμός Καθαρισμού.

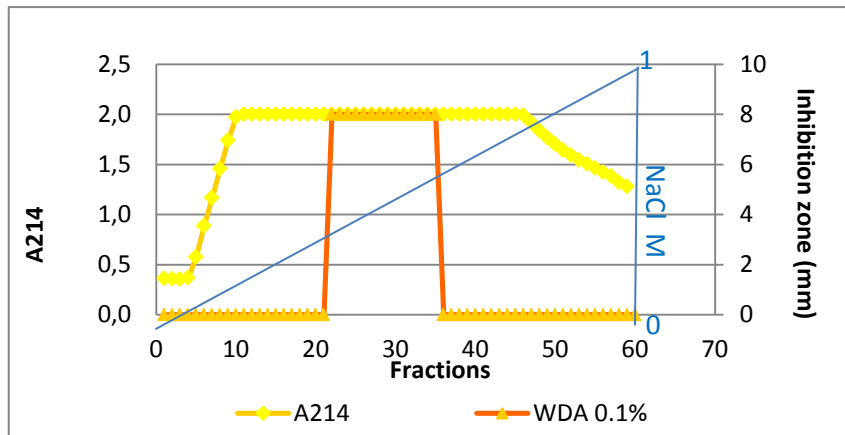
α) Ανάπτυξη καλλιέργειας με θρεπτικό υπόστρωμα MRS

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.4. Στο Διάγραμμα 4.1 που παραθέτεται στη συνέχεια αναφέρονται επιγραμματικά τα στάδια καθαρισμού και τα ενεργά κλάσματα από κάθε χρωματογραφία που πραγματοποιήθηκε. Στο Σχήμα 4.1 δίνεται το χρωματογράφημα και η αντιμικροβιακή ενεργότητα (mm) από τη χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής, στα Σχήματα 4.2 και 4.3 που ακολουθούν παραθέτονται τα χρωματογραφήματα και η αντιμικροβιακή ενεργότητα (mm) των κλασμάτων από τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης, ενώ στο Σχήμα 4.4 παραθέτεται το χρωματογράφημα της τελευταίας χρωματογραφικής μεθόδου,

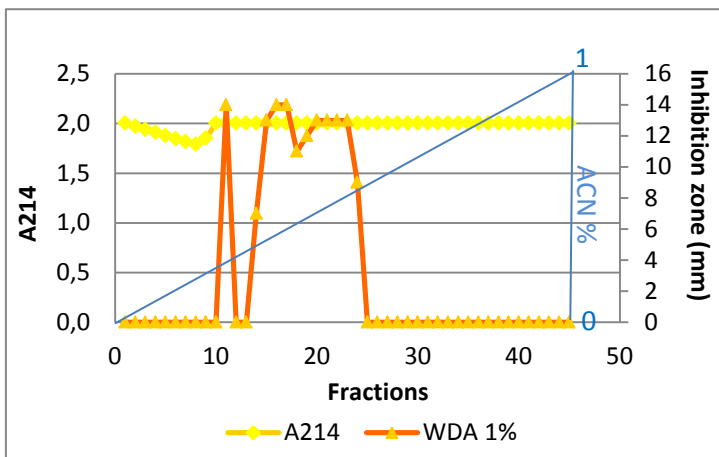
δηλαδή της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης. Τέλος, στον Πίνακα 4.2 αναφέρεται το πρωτόκολλο καθαρισμού.



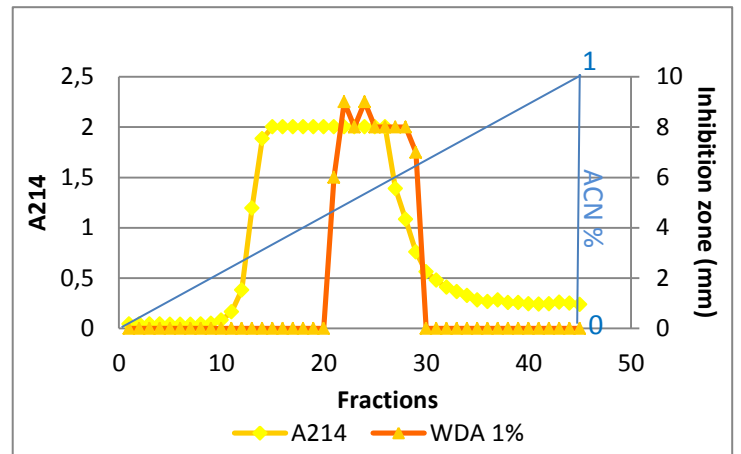
Διάγραμμα 4.1 Στάδια Καθαρισμού από το 1^ο πρωτόκολλο σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS



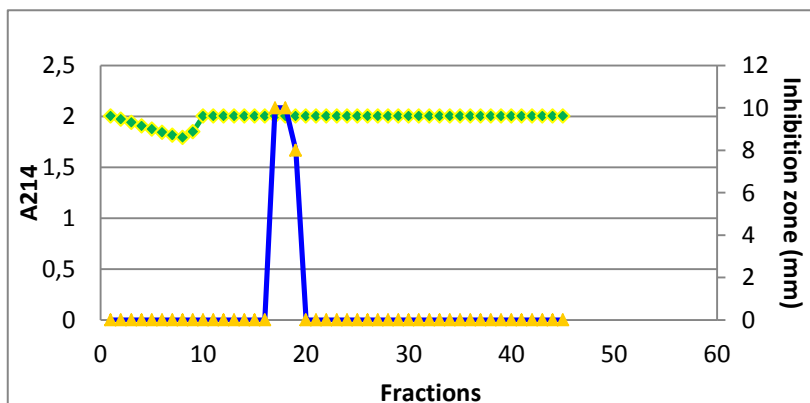
Σχήμα 4.1 Χρωματογράφημα της στήλης RQ και αντιμικροβιακή ενεργότητα (mm) από το 1^ο καθαρισμού, με θρεπτικό υπόστρωμα το MRS



Σχήμα 4.2 Χρωματογράφημα της στήλης RPC και αντιμικροβιακή ενεργότητα (mm) του NR της στήλης RQ (δείγμα 1) από το 1^ο πρωτόκολλο καθαρισμού, με θρεπτικό υπόστρωμα το MRS



Σχήμα 4.3 Χρωματογράφημα της στήλης RPC και αντιμικροβιακή ενεργότητα (mm) των κλασμάτων 22-35 της στήλης RQ (δείγμα 2) από 1^ο πρωτόκολλο καθαρισμού, με θρεπτικό υπόστρωμα το MRS



Σχήμα 4.4 Χρωματογράφημα της στήλης Superdex και αντιμικροβιακή ενεργότητα (mm) των κλασμάτων 15-22 της στήλης RPC (δείγμα 3) από το 1^ο πρωτόκολλο καθαρισμού, με θρεπτικό υπόστρωμα το MRS

Πίνακας 4.2 Πρώτο Πρωτόκολλο καθαρισμού της αντιμικροβιακής ένωσης που παράγεται από τον *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179, σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS

Δείγμα	Όγκος (ml)	Συγκ. Πρωτεΐνης (mg/ml)	Ενεργότητα (AU/ml)	Ολική Πρωτεΐνη (Total mg)	Ολική Ενεργότητα (Total AU)	Ειδική Ενεργότητα (AU/mg)	Απόδοση (%)	Βαθμός Καθαρισμού
Crude	980	0,079	40	77,42	39200	506	100	1
ASP	100	0,316	80	31,60	8000	253	20	0,50
RQ NR (δείγμα 1)	101	0,200	80	20,20	8080	400	21	0,79
LYOF	30	0,287	160	8,61	4800	557	12	1,10
RPC fr 15-22 (δείγμα 3)	8	0,603	320	4,82	2560	531	7	1,05
LYOF	1	1,544	640	1,54	640	415	2	0,82
SUPERDEX FR 17-19	1,5	0	20	-	-	-	-	-
RQ fr 22-35 (δείγμα 2)	28	0,031	40	0,87	1120	1290	3	2,55
LYOF	20	0,022	40	0,44	800	1818	2	3,59
RPC fr 21-29 (δείγμα 4)	9	0,002	20	0,02	180	10000	0,5	19,75
LYOF	0,8	δ.ε	δ.ε	δ.ε				
SUPERDEX	0	-	0	-	-	-	-	-

Το δείγμα (100 ml) υποβλήθηκε σε χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής. Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 4.1, η περιοχή των κλασμάτων 12-46 ήταν πλούσια σε πρωτεΐνες, ενώ από τα 60 κλάματα που συλλέχθηκαν θετικά για αντιμικροβιακή δράση ήταν το NR και τα κλάσματα 22-35. Η μεγαλύτερη ζώνη αναστολής (11 mm) εμφανίστηκε στο NR, ενώ το γεγονός ότι το NR βρέθηκε θετικό οφείλεται στο ότι δεν μπόρεσε να δεθεί όλη η ποσότητα του δείγματος στη συγκεκριμένη στήλη. Όσον αφορά την ενεργότητα του NR (80 AU/ml) και των θετικών κλασμάτων 22-35 (40 AU/ml) δεν παρατηρήθηκε αύξηση σε σχέση με τις ενεργότητες της αρχικής φάσης καθαρισμού, όπου το Crude είχε 40 AU/ml και το ASP 80 AU/ml.

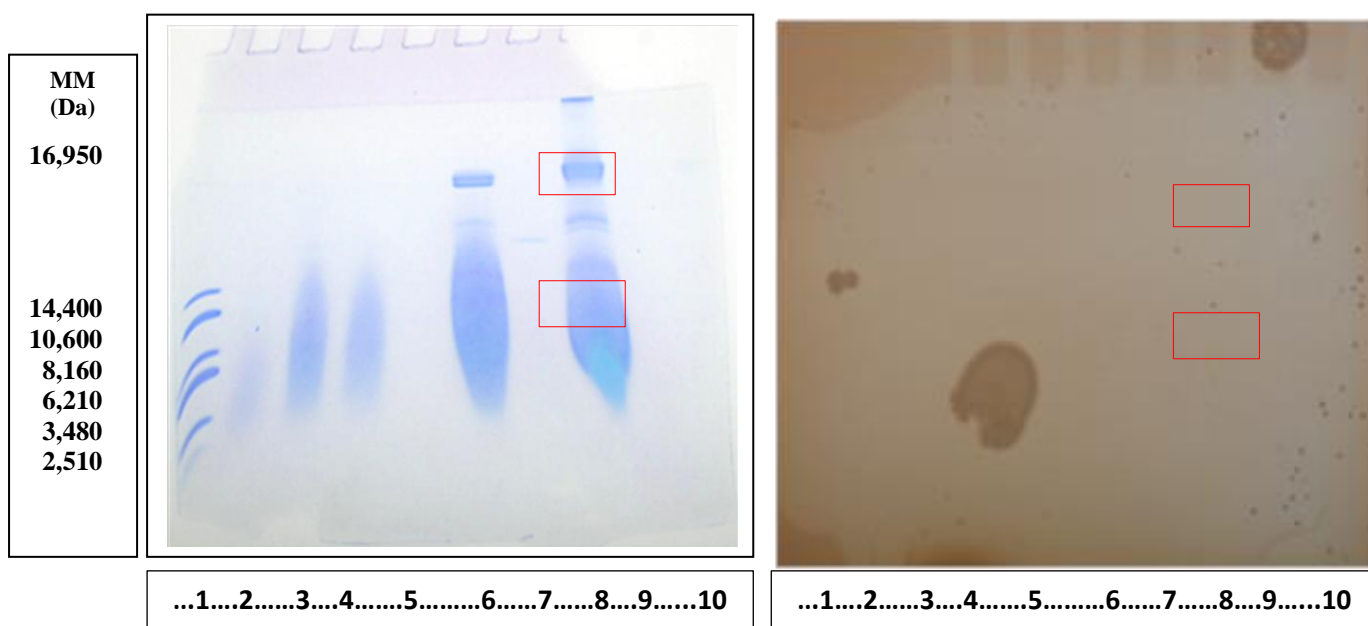
Το NR (**δείγμα 1**, 101 ml) λυοφιλιώθηκε, επαναιωρήθηκε σε διάλυμα TFA 0.1% v/v σε H₂O (ρυθμιστικό διάλυμα A της χρωματογραφίας RPC) με τελικό όγκο 30 ml και εφαρμόστηκε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Όπως φαίνεται από το Σχήμα 4.2 από τη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης του NR της χρωματογραφίας

ανιοντοανταλλαγής (δείγμα 1) θετικά ήταν τα κλάσματα 11 και 14-24, ενώ το NR ήταν αρνητικό. Ωστόσο για τον προσδιορισμό της ενεργότητας και για τον περαιτέρω καθαρισμό από τα θετικά κλάσματα επιλέχθηκαν τα κλάσματα 15-22, διότι τα κλάσματα 14, 23 και 24 σχημάτιζαν θολή ζώνη αναστολής. Παρατηρώντας στον Πίνακα 4.2 τα αποτελέσματα του πρώτου πρωτοκόλλου καθαρισμού της αντιμικροβιακής ένωσης που παράγεται από τον *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179, σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS διαπιστώνεται ότι η ενεργότητα των κλασμάτων 15-22 ήταν 320 AU/ml και 640 AU/ml (μετά από λυοφιλίωση), η τιμή που είναι τετραπλάσια σε σχέση με την προηγούμενη χρωματογραφία. Το συγκεκριμένο δείγμα είχε επίσης και την υψηλότερη τιμή πρωτεΐνης, 0,603 mg/ml και 1,544 mg/ml στη λυοφιλιωμένη του μορφή. Τέλος, τα κλάσματα 15-22 (δείγμα 3), τα οποία ενοποιήθηκαν, λυοφιλιώθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM φωσφορικού καλίου με 0,25 M NaCl (8 ml), υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία μοριακής διήθησης, τα αποτελέσματα της οποίας δίνονται στο Σχήμα 4.4. Από αυτή τη χρωματογραφία ενεργά βρέθηκαν τα κλάσματα 17-19.

Όσον αφορά τα θετικά κλάσματα 22-35 της χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής, τα οποία αποτέλεσαν το **δείγμα 2** (28 ml) λυοφιλιώθηκαν, επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα TFA με τελικό όγκο 20 ml και έλαβε χώρα χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Το χρωματογράφημα που προέκυψε από αυτό το στάδιο καθαρισμού δίνεται στο Σχήμα 4.3, από το οποίο γίνεται αντιληπτό ότι η υψηλότερη απορρόφηση εμφανίστηκε στη περιοχή των κλασμάτων 15-26, ενώ από τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής δράσης με τη μέθοδο WDA θετικά ήταν τα κλάσματα 21-29 (9 ml) (δείγμα 4), ενώ το NR ήταν αρνητικό. Τα κλάσματα 21-29, αφού ενοποιήθηκαν, λυοφιλιώθηκαν και επαναιωρήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα 20 mM φωσφορικού καλίου με 0,25 M NaCl, υποβλήθηκαν στο τελευταίο στάδιο καθαρισμού, δηλαδή τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Από τη τελευταία χρωματογραφική μέθοδο, δεν ανιχνεύτηκε κανένα ενεργό κλάσμα. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι δεν προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, λόγω του μικρού όγκου του δείγματος. Γενικά, ο καθαρισμός των θετικών κλασμάτων 22-35 της χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής (δείγμα 2) δεν παρουσίασε σημαντικές αλλαγές στην ενεργότητα, η οποία κυμαινόταν στις 40

AU/ml. Ωστόσο σημειώθηκε αύξηση της ειδικής ενεργότητας από 1290 σε 10000 AU/mg. Ο βαθμός καθαρισμού ήταν χαμηλός, για το NR 0,82 και για τα κλάσματα 22-35 19,75.

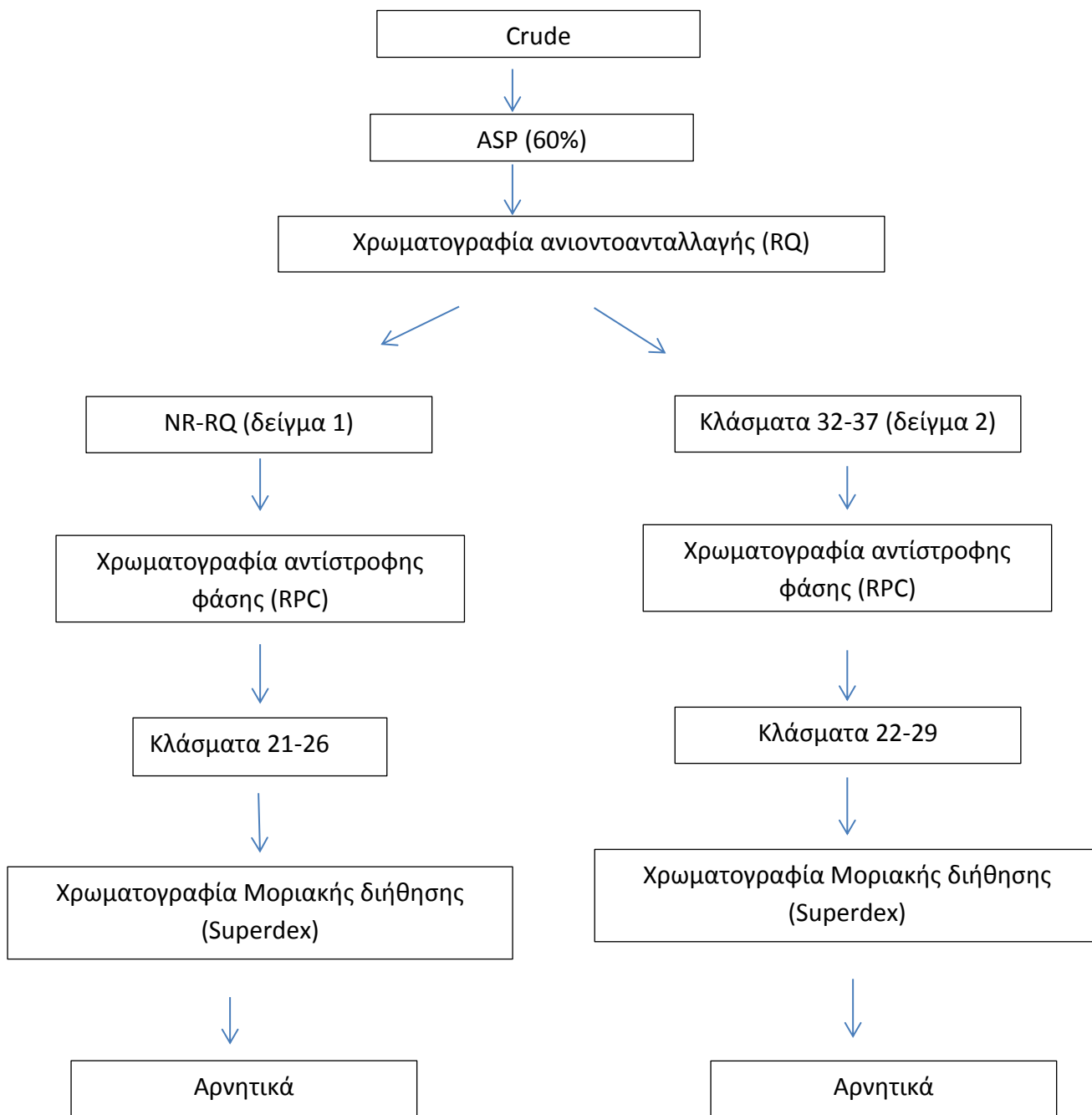
Μετά την ολοκλήρωση του πρώτου πρωτοκόλλου καθαρισμού έγινε έλεγχος της καθαρότητας με την πραγματοποίηση SDS-PAGE ηλεκτροφόρησης και πραγματοποιήθηκε επίσης μετα-ηλεκτροφορητική ανίχνευση της αντιμικροβιακής δράσης, τα αποτελέσματα των οποίων δίνονται στο Σχήμα 4.5. Από το συγκεκριμένο πρωτόκολλο ελέγχθηκαν τρία δείγματα, τα κλάσματα 15-22 της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης του NR της χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής (δείγμα 3), τα κλάσματα 21-29 της χρωματογραφία αντίστροφης φάσης των κλασμάτων 22-35 από τη χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής (δείγμα 4) και τα κλάσματα 17-19 από τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Από αυτά τα δείγματα που εξετάστηκαν μόνο στο δείγμα από τα κλάσματα 15-22 εντοπίστηκαν δυο ζώνες με μοριακή μάζα περίπου 17.000 και 15.000 Da αντίστοιχα. Περαιτέρω ανάλυση για την ηλεκτροφόρηση θα γίνει στο επόμενο πρωτόκολλο καθαρισμού.



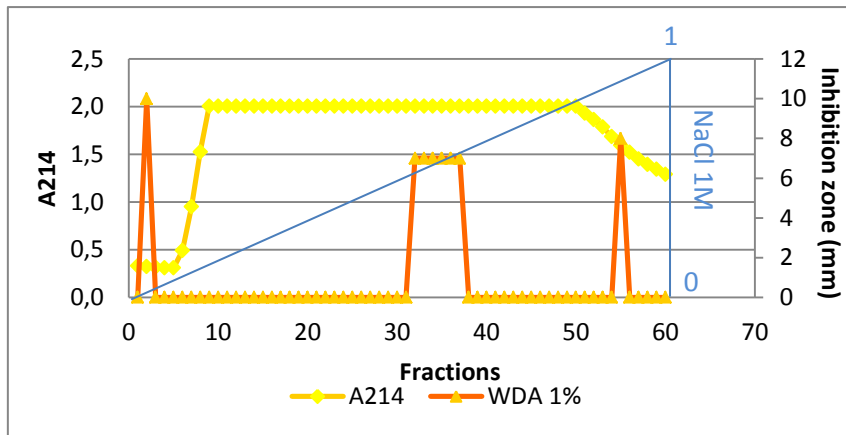
Σχήμα 4.5 Ηλεκτροφόρηση και μετα-ηλεκτροφορητική ανίχνευση ενεργότητας από το 1^ο πρωτόκολλο καθαρισμού. **1**=μάρτυρας, **2**=Crude (SMRS), **3**=ASP (SMRS), **4**= NR RQ (SMRS), **5**= Fr 32-37 RQ (SMRS), **6**=RPC Fr 21-26 lyof (SMRS), **7**= RPC Fr. 22-29 lyof (SMRS), **8**= RPC Fr. 15-22 lyo (MRS), **9**= RPC Fr. 21-29 lyo (MRS), **10**= Superdex Fr. 17-19 (MRS)

β) Ανάπτυξη καλλιέργειας με θρεπτικό υπόστρωμα SMRS

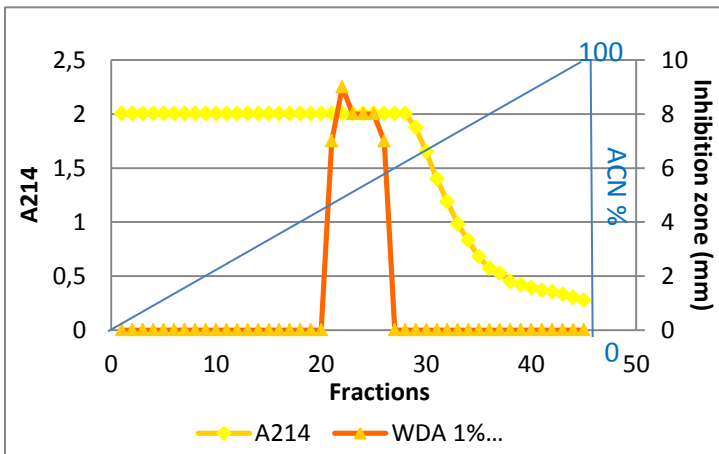
Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.4. Στο Διάγραμμα 4.2 που παραθέτεται στη συνέχεια αναφέρονται επιγραμματικά τα στάδια καθαρισμού και τα ενεργά κλάσματα από κάθε χρωματογραφία που πραγματοποιήθηκε, στο Σχήμα 4.6 δίνεται το χρωματογράφημα και η αντιμικροβιακή ενεργότητα από τη χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής, ενώ στα Σχήματα 4.7 και 4.8 που ακολουθούν δίνονται τα χρωματογραφήματα και η αντιμικροβιακή ενεργότητα των κλασμάτων από τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Τέλος, τα αποτελέσματα του πρωτοκόλλου καθαρισμού συνοψίζονται στον Πίνακα 4.3.



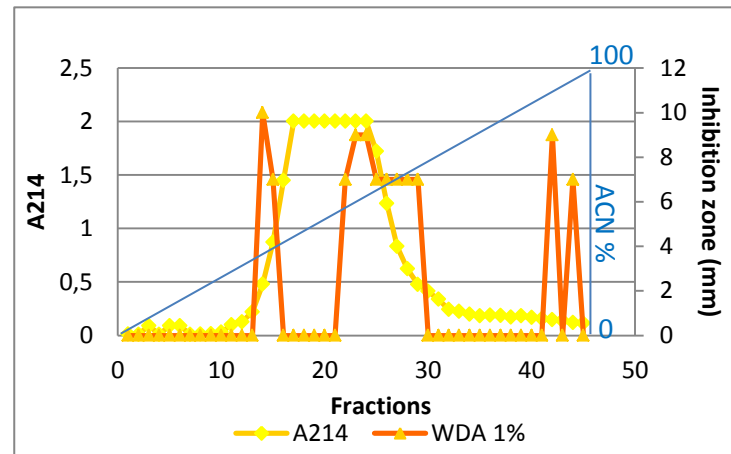
Διάγραμμα 4.2 Στάδια καθαρισμού από το 1^ο πρωτόκολλο σε θρεπτικό υπόστρωμα SMRS



Σχήμα 4.6 Χρωματογράφημα της στήλης RQ και αντιμικροβιακή ενεργότητα (mm) από το 1^ο πρωτόκολλο καθαρισμού, με θρεπτικό υπόστρωμα το SMRS



Σχήμα 4.7 Χρωματογράφημα της στήλης RPC και αντιμικροβιακή ενεργότητα (mm) του NR της στήλης RQ (δείγμα 1) από το 1^ο πρωτόκολλο καθαρισμού, με θρεπτικό υπόστρωμα το SMRS



Σχήμα 4.8 Χρωματογράφημα της στήλης RPC και αντιμικροβιακή ενεργότητα (mm) των κλασμάτων 32-37 της στήλης RQ (δείγμα 2) από το 1^ο πρωτόκολλο καθαρισμού, με θρεπτικό υπόστρωμα το SMRS

Πίνακας 4.3 Πρώτο Πρωτόκολλο καθαρισμού της αντιμικροβιακής ένωσης που παράγεται από τον *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179, σε θρεπτικό υπόστρωμα SMRS

Δείγμα	Όγκος (ml)	Συγκ. Πρωτεΐνης (mg/ml)	Ενεργότητα (AU/ml)	Ολική Πρωτεΐνη (Total mg)	Ολική Ενεργότητα (Total AU)	Ειδική Ενεργότητα (AU/mg)	Απόδοση (%)	Βαθμός Καθαρισμού
Crude	970	0,106	20	102,82	19400	189	100	1
ASP	100	0,489	20	48,90	2000	41	20	0,22
RQ NR (δείγμα 1)	82	0,329	40	26,98	3280	122	21	0,64
LYOF	30	0,32	80	9,60	2400	250	12	1,33
RPC fr 21-26	6	0,13	40	0,78	240	308	7	1,63
LYOF	1	0,055	80	0,06	80	1455	2	7,71
SUPERDEX	0	δε	0		0			
RQ fr 32-37 (δείγμα 2)	12	0,001	20	0,01	240	20000	3	106,00
LYOF	15	0,001	20	0,02	300	20000	2	106,00
RPC fr 22-29	8	0,001	20	0,01	160	20000	0,5	106,00
LYOF	0.3	δε	δε	-	-	-	-	
SUPERDEX	0	-	0	-	-	-	-	

Στο δείγμα από την καλλιέργεια σε θρεπτικό υπόστρωμα SMRS (100 ml) έλαβε χώρα χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής, στην οποία αντιμικροβιακή δράση ανιχνεύτηκε στο NR (100 ml) και στα κλάσματα 2, 32-37 (12 ml) και 55. Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας και για τα επόμενα στάδια καθαρισμού επιλέχθηκαν το NR και η περιοχή των κλασμάτων 32-37. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τη χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής με την αντίστοιχη που πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS διαπιστώνεται ότι τα ενεργά κλάσματα ανιχνεύτηκαν σε διαφορετική περιοχή και ότι οι ενεργότητες ήταν χαμηλότερες τόσο για το NR όσο και για τα κλάσματα. Πιο συγκεκριμένα, οι ενεργότητες ήταν για το NR 40 AU/ml και για τα κλάσματα 32-37 20 AU/ml, ενώ από τον προηγούμενο καθαρισμό ήταν 80 και 40 AU/ml αντίστοιχα.

Εν συνεχεία, στο λυοφιλωμένο NR (δείγμα 1, 30 ml) εφαρμόστηκε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, από την οποία θετικά ήταν τα κλάσματα 21-26 με ενεργότητα 40 AU/ml και συγκέντρωση πρωτεΐνης 0,13 mg/ml. Και σε αυτό το

στάδιο καθαρισμού ανιχνεύτηκε αντιμικροβιακή δράση σε διαφορετική περιοχή κλασμάτων από την περίπτωση που το παραγωγό στέλεχος αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS. Τα ενοποιημένα και λυοφιλιωμένα κλάσματα 21-26 (1 ml) εισήλθαν στη συνέχεια σε στήλη χρωματογραφίας μοριακής διήθησης, στην οποία όμως δεν υπήρχαν ενεργά κλάσματα. Το γεγονός ότι όλα τα κλάσματα από τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης ήταν αρνητικά έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα του προηγούμενου καθαρισμού, όπου βρέθηκαν θετικά τα κλάσματα 17-19, όπως ήδη έχει αναφερθεί παραπάνω.

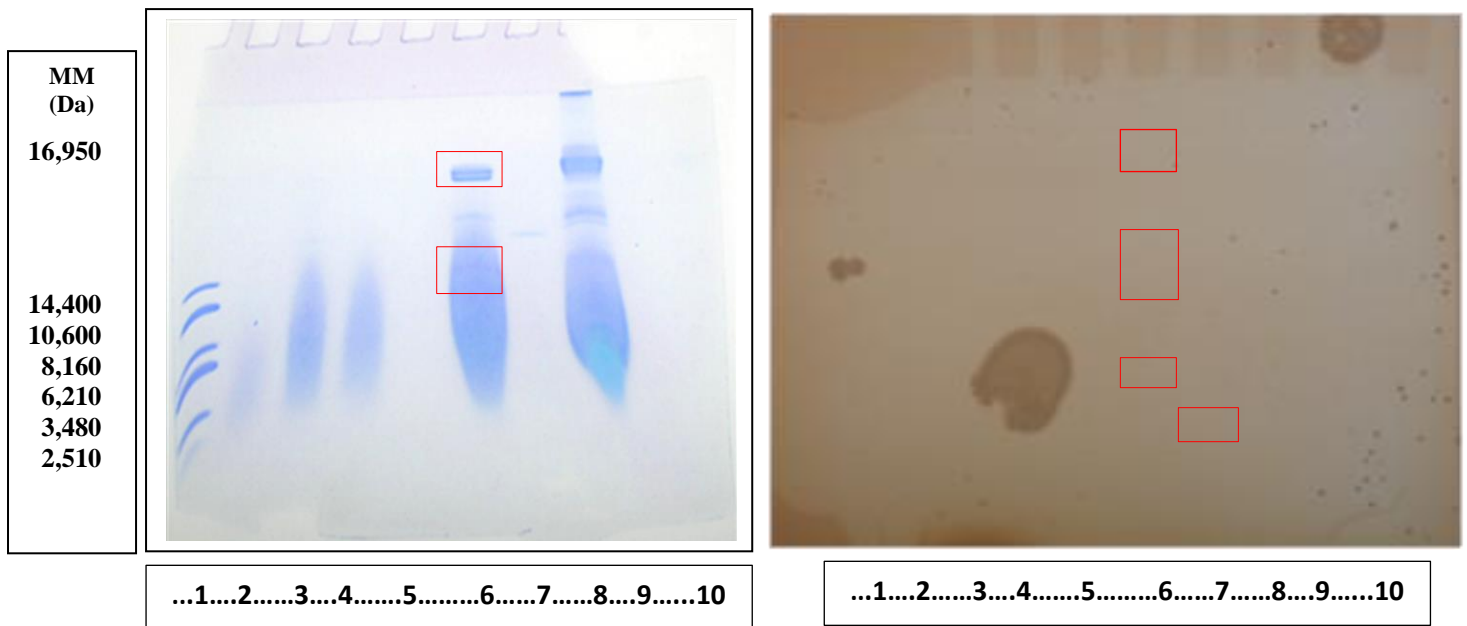
Όσον αφορά τα στάδια καθαρισμού των θετικών κλασμάτων 32-37 της χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής, τα οποία αποτέλεσαν το δείγμα 2 (15 ml), αφού ενοποιήθηκαν και λυοφιλιώθηκαν, υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Όπως παρατηρείται και στο Σχήμα 4.8 θετικά ήταν τα κλάσματα 14,15,22-29,42 και 44, από τα οποία όμως για τον προσδιορισμό της ενεργότητας και για τον περαιτέρω καθαρισμό επιλέχθηκαν μόνο τα κλάσματα 22-29. Τα υπόλοιπα ενεργά κλάσματα (14, 15, 42 και 44) δεν επιλέχθηκαν καθώς αποτελούσαν μεμονωμένα κλάσματα και δεν εντάσσονταν στην περιοχή των κλασμάτων που εμφάνιζαν αντιμικροβιακή δράση σε σύγκριση με την αντίστοιχη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης του πρώτου πρωτοκόλλου σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS. Το τελευταίο στάδιο καθαρισμού ήταν η χρωματογραφία μοριακής διήθησης, η οποία έλαβε χώρα για τα επιλεγμένα κλάσματα 22-29, στην οποία όμως δεν εντοπίστηκαν θετικά κλάσματα. Όσον αφορά το βαθμό καθαρισμού, για το NR ήταν 7,71 και για τα κλάσματα 32-37 ήταν 106, οι τιμές αυτές είναι υψηλότερες από τις τιμές καθαρισμού όταν το θρεπτικό υπόστρωμα ήταν το MRS

Συνοψίζοντας λοιπόν όλα τα παραπάνω στοιχεία, γίνεται κατανοητό ότι όταν ο *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS εμφάνισε τις υψηλότερες τιμές ενεργότητας, από την από την άλλη πλευρά όμως ο βαθμός καθαρισμού ήταν αρκετά χαμηλότερος σε σύγκριση με το πρωτόκολλο καθαρισμού σε θρεπτικό υπόστρωμα SMRS. Μια εξίσου σημαντική παρατήρηση που αφορά την ανάπτυξη στα δυο διαφορετικά θρεπτικά μέσα, όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι ότι όταν το παραγωγό στέλεχος αναπτύχθηκε σε MRS θρεπτικό

υπόστρωμα η αντιμικροβιακή δράση ανιχνεύτηκε στην περιοχή των κλάσμάτων 22-35 της χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής, ενώ όταν αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα SMRS η αντιμικροβιακή δράση εντοπίστηκε στα κλάσματα 32-37.

Μετά την ολοκλήρωση του καθαρισμού έλαβε χώρα ηλεκτροφόρηση, στην οποία εξετάστηκαν τα εξής δείγματα, Crude, το ASP, το NR και τα κλάσματα 32-37 της χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής καθώς επίσης και τα κλάσματα 21-26 και 22-29 από τις χρωματογραφίες αντίστροφης φάσης. Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 4.9, τα δείγματα από τα αρχικά στάδια καθαρισμού (Crude, ASP) και αυτά από την πρώτη χρωματογραφική μέθοδο, δηλαδή την χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής δεν εμφάνισαν καμία ζώνη. Το δείγμα όμως από τα κλάσματα 21-26 της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης παρουσίασε ζώνη που αντιστοιχεί σε ένωση με μοριακή μάζα περίπου 17.000 Da. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε μετα-ηλεκτροφορητική ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης, στην οποία εμφανίστηκε επίσης ζώνη παρεμπόδισης στα 3.5000, 6.000 Da. Είναι γνωστό ότι οι βακτηριοσίνες που παράγονται από τους γαλακτοβακίλλους έχουν χαμηλή μοριακή μάζα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η βακτηριοσίνη που έχει απομονωθεί από το στέλεχος *Lactobacillus fermentum* L23 και έχει μοριακή μάζα χαμηλότερη των 7.000 Da (Pascual et al., 2008), το οποίο έρχεται σε συμφωνία με τη μοριακή μάζα που ανιχνεύτηκε στην παρούσα μελέτη. Η ανίχνευση όμως των μεγαλομοριακών ενώσεων οφείλεται ενδεχομένως στην παρουσία πολυμερών ενώσεων που προερχόταν από το θρεπτικό υπόστρωμα, όπως το Tween 80.

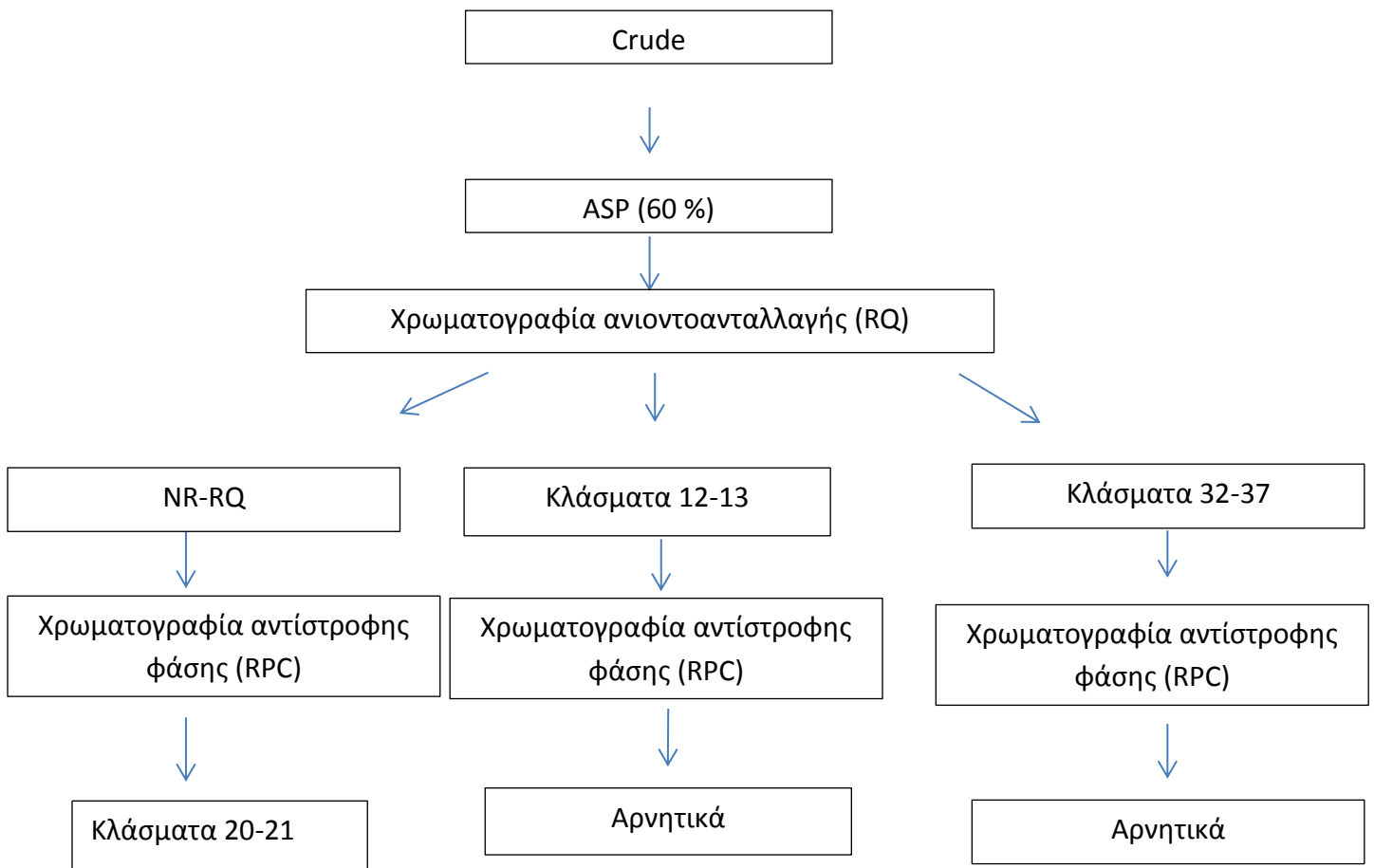
Από τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα ότι η αντιμικροβιακή ένωση που παράγεται από το *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 έχει χαμηλή μοριακή μάζα.



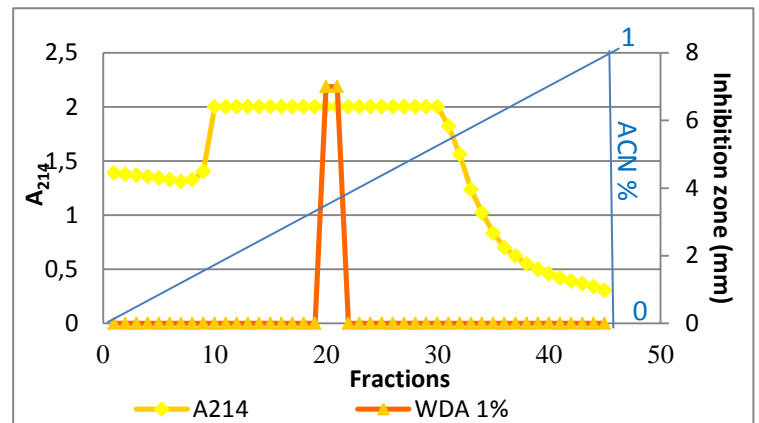
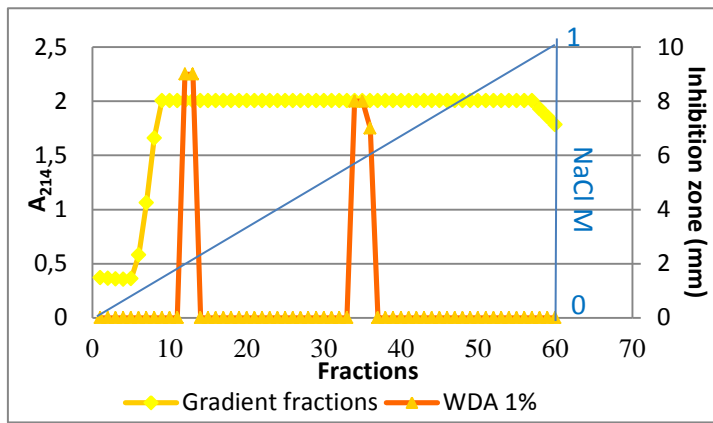
Σχήμα 4.9 Ηλεκτροφόρηση και μεταηλεκτροφορητική ανίχνευση ενεργότητας από το 1^ο πρωτόκολλο καθαρισμού. **1**=μάρτυρας, **2**=Crude (SMRS), **3**=ASP (SMRS), **4**= NR RQ (SMRS), **5**= Fr 32-37 RQ (SMRS), **6**=RPC Fr 21-26 Iyof (SMRS), **7**= RPC Fr. 22-29 Iyof (SMRS), **8**= RPC Fr. 15-22 Iyof (MRS), **9**= RPC Fr. 21-29 Iyof (MRS), **10**= Superdex Fr. 17-19 (MRS)

4.2.2 Δεύτερο πρωτόκολλο καθαρισμού

Στο δεύτερο πρωτόκολλο καθαρισμού χρησιμοποιήθηκε μόνο το SMRS ως (2 L) ως θρεπτικό υπόστρωμα και χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη χρωματογραφίας, της ανιοντοανταλλαγής και της αντίστροφης φάσης. Τα στάδια καθαρισμού αναφέρονται επιγραμματικά στο Διάγραμμα 4.3, ενώ στα Σχήματα 4.10 και 4.11 δίνονται τα χρωματογραφήματα και η αντιμικροβιακή ενεργότητα (mm) από τη χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής και μοριακής διήθησης αντίστοιχα. Στον Πίνακα 4.4 παραθέεται αναλυτικά το πρωτόκολλο από το δεύτερο καθαρισμό.



Διάγραμμα 4.3 Στάδια Καθαρισμού από το 2^ο πρωτόκολλο σε θρεπτικό υπόστρωμα SMRS



Σχήμα 4.10 Χρωματογράφημα της στήλης RQ και αντιμικροβιακή ενεργότητα (mm) από το 2^ο πρωτόκολλο καθαρισμού σε θρεπτικό υπόστρωμα SMRS

Σχήμα 4.11 Χρωματογράφημα της στήλης RPC και αντιμικροβιακή ενεργότητα (mm) του NR της στήλης RQ απ το 2^ο πρωτόκολλο καθαρισμού σε θρεπτικό υπόστρωμα SMRS

Πίνακας 4.4 Δεύτερο Πρωτόκολλο καθαρισμού της αντιμικροβιακής ένωσης που παράγεται από τον *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179, σε θρεπτικό υπόστρωμα SMRS

Δείγμα	Όγκος (ml)	Συγκ. Πρωτεΐνης (mg/ml)	Ενεργότητα (AU/ml)	Ολική Πρωτεΐνη (Total mg)	Ολική Ενεργότητα (Total AU)	Ειδική Ενεργότητα (AU/mg)	Απόδοση (%)	Βαθμός Καθαρισμού
Crude	1980	0,116	20	229,68	39600	172	100	1
ASP	200	0,493	20	98,60	4000	41	10	0,08
RQ NR	200	0,590	40	118,00	16000	68	40	0,13
LYOF	80	0,662	80	52,96	1600	121	4	0,24
RPC fr 20-21	2	1,997	20	3,99	40	10	0,10	0,02
RQ fr 32-37	24	0,025	20	0,60	480	800	1	1,58
LYOF	30	0,02	20	0,60	600	1000	2	1,98
RPC	0	δε	0	-	-	-	-	-
RQ fr 12-13	8	0,037	20	0,30	160	541	0,4	1,07
LYOF	5	0,04	20	0,20	100	500	0,3	0,99
RPC	0	δ.ε	0	-	-	-	-	-

Στο δεύτερο πρωτόκολλο καθαρισμού χρησιμοποιήθηκε μόνο το SMRS (2 L) ως θρεπτικό υπόστρωμα και χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη χρωματογραφίας, της ανιοντοανταλλαγής και της αντίστροφης φάσης. Τα στάδια καθαρισμού αναφέρονται επιγραμματικά στο Διάγραμμα 4.3, ενώ στα Σχήματα 4.10 και 4.11 δίνονται τα χρωματογραφήματα και η αντιμικροβιακή ενεργότητα (mm) από τη χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής και μοριακής διήθησης αντίστοιχα. Στον Πίνακα 4.4 παραθέτεται αναλυτικά το δεύτερο πρωτόκολλο καθαρισμού.

Λόγω της περιορισμένης ικανότητας πρόσδεσης των πρωτεϊνών της στήλης RQ, το δείγμα χωρίστηκε σε δύο ισόποσα μέρη, που χρωματογραφήθηκαν ξεχωριστά. Από την πρώτη χρωματογραφία θετικά ήταν το NR, τα κλάσματα 12,13, και 33-36, ενώ από τη δεύτερη θετικά ήταν το NR και τα κλάσματα 11, 12 και 34-36. Η ενεργότητα του NR ήταν 40 AU/ml, αποτέλεσμα που συμπίπτει με το πρώτο πρωτόκολλο καθαρισμού. Ωστόσο μια διαφορά που παρατηρήθηκε με το προηγούμενο πρωτόκολλο ήταν η παρουσία των ενεργών κλασμάτων 12-13 και για

αυτό το λόγο αποφασίστηκε να αποτελέσουν ξεχωριστό δείγμα για περαιτέρω καθαρισμό.

Στη συνέχεια τα NR από τις δύο χρωματογραφίες ανιοντοανταλλαγής (200 ml), ενοποιήθηκαν, λυοφιλιώθηκαν, επαναιωρήθηκαν και υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Όπως παρατηρείται και στο Σχήμα 4.11 θετικά ήταν τα κλάσματα 20-21. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με αυτά του πρώτου πρωτοκόλλου καθαρισμού σε θρεπτικό υπόστρωμα SMRS, γίνεται αντιληπτό ότι η περιοχή των ενεργών κλασμάτων είναι σχεδόν παρόμοια (21-26 vs 20-21). Θα πρέπει όμως να σημειωθεί ότι η συγκέντρωση πρωτεΐνης των κλασμάτων 20-21 ήταν 1,997 mg/ml, τιμή που είναι αρκετά υψηλότερη σε σύγκριση με το πρώτο πρωτόκολλο, στο οποίο στα θετικά κλάσματα 21-26 η συγκέντρωση πρωτεΐνης ήταν 0,13 mg/ml.

Από τις δύο χρωματογραφίες ανιοντοανταλλαγής ενοποιήθηκαν επίσης τα κλάσματα 12-13 (8 ml), τα οποία αποτέλεσαν το επόμενο δείγμα που υποβλήθηκε σε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, από την οποία όμως δεν ανιχνεύτηκαν ενεργά κλάσματα.

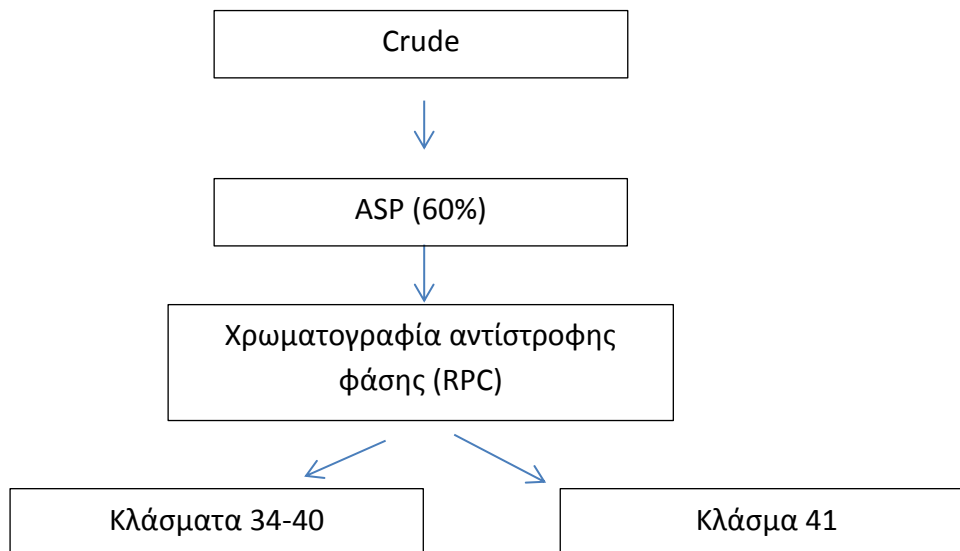
Τέλος, για το περαιτέρω καθαρισμό των θετικών κλασμάτων 34-36 της χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής αποφασίστηκε να ενοποιηθούν από τις δύο χρωματογραφίες η περιοχή των κλασμάτων 32-37 (24 ml), καθώς σε αυτή την περιοχή ανιχνεύτηκε αντιμικροβιακή δράση στο πρώτο πρωτόκολλο καθαρισμού σε θρεπτικό υπόστρωμα SMRS. Η ενεργότητα των κλασμάτων 32-37 ήταν ίδια με αυτή του πρώτου πρωτοκόλλου, δηλαδή, 20 AU/ml. Στα κλάσματα 32-37 εφαρμόστηκε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, στην οποία όμως δεν ανιχνεύτηκαν θετικά κλάσματα. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με το προηγούμενο πρωτόκολλο, στο οποίο είχαν ανιχνευθεί θετικά κλάσματα (κλάσματα 22-29). Ο βαθμός καθαρισμού αυτού του πρωτοκόλλου ήταν αρκετά χαμηλός, για NR 0,02 και για τα κλάσματα 32-37 1,98.

Συνοψίζοντας λοιπόν τα παραπάνω και παρατηρώντας τα δεδομένα από τους Πίνακες 4.3 και 4.4, γίνεται αντιληπτό ότι για τα στάδια καθαρισμού του NR τα αποτελέσματα στο πρώτο και δεύτερο πρωτόκολλο είναι επαναλήψιμα. Επίσης, διαπιστώνεται ότι η αντιμικροβιακή ένωση που παράγεται από τον *Lactobacillus*

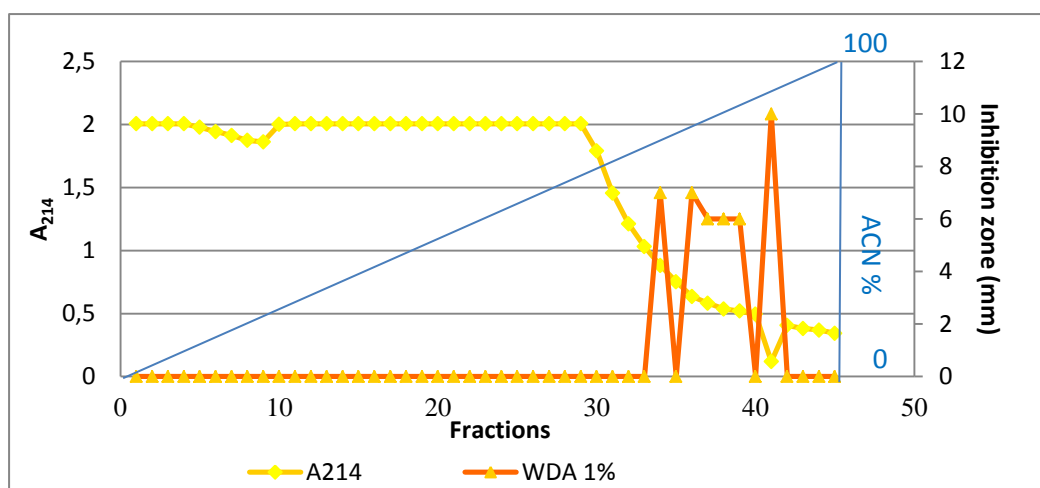
fermentum ACA-DC 179 εντοπίζεται στην περιοχή των κλασμάτων 32-37 της χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής.

4.2.3 Τρίτο πρωτόκολλο καθαρισμού

Στο τρίτο πρωτόκολλο καθαρισμού χρησιμοποιήθηκε μόνο το SMRS (2 L) και εφαρμόστηκε μόνο χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Στο Διάγραμμα 4.4 δίνονται επιγραμματικά τα στάδια καθαρισμού και στο Σχήμα 4.12 παραθέεται το χρωματογράφημα από τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης. Τέλος, στον Πίνακα 4.5 παραθέεται αναλυτικά το πρωτόκολλο καθαρισμού.



Διάγραμμα 4.4 Στάδια Καθαρισμού από το 3^ο πρωτόκολλο σε θρεπτικό υπόστρωμα SMRS



Σχήμα 4.12 Χρωματογράφημα της στήλης RPC και αντιμικροβιακή ενεργότητα (mm) από τον 3^ο πρωτόκολλο καθαρισμού σε θρεπτικό υπόστρωμα SMRS

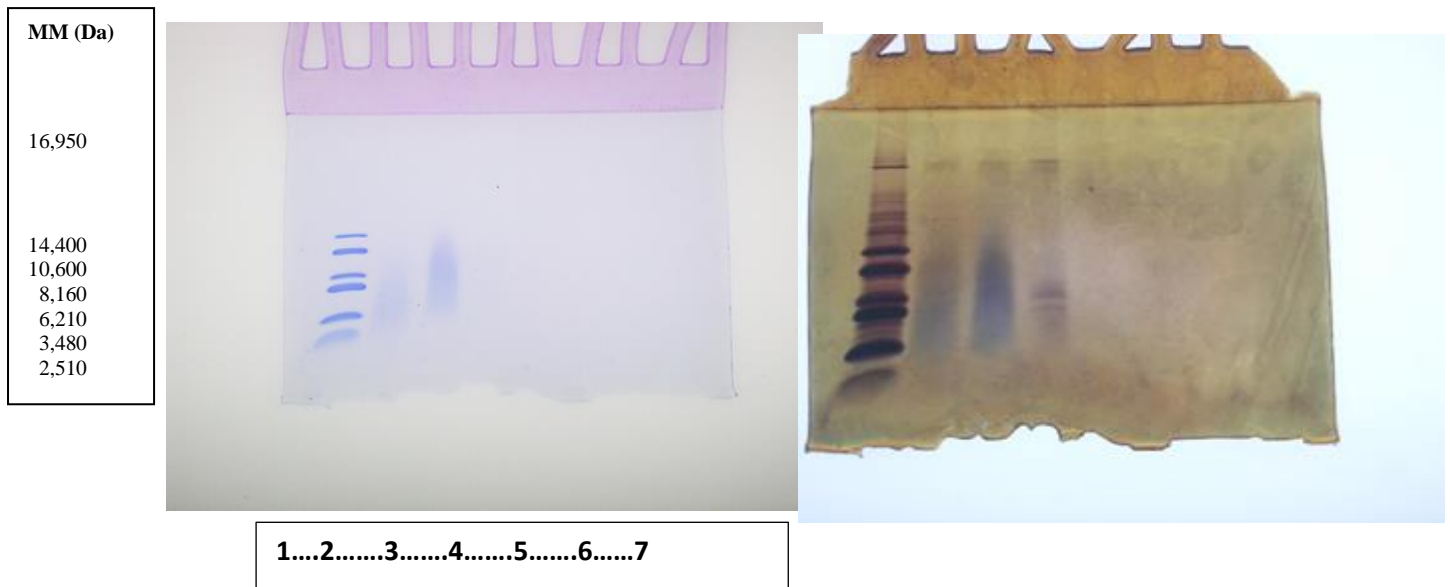
Πίνακας 4.5 Τρίτο Πρωτόκολλο καθαρισμού της αντιμικροβιακής ένωσης που παράγεται από τον *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179, σε θρεπτικό υπόστρωμα SMRS

Δείγμα	Όγκος (ml)	Συγκ. Πρωτεΐνης (mg/ml)	Ενεργότητα (AU/ml)	Ολική Πρωτεΐνη (Total mg)	Ολική Ενεργότητα (Total AU)	Ειδική Ενεργότητα (AU/mg)	Απόδοση (%)	Βαθμός Καθαρισμού
Crude	1950	0,096	20	187,20	39000	208	100	1
ASP	200	0,322	20	64,40	4000	62	10	0,12
RPC fr 34-40	28	0,45	20	12,60	560	44	1	0,09
LYOF	0,6	0,55	20	0,33	12	36	0,03	0,07
RPC fr 41	4	0,006	20	0,02	80	3333	0,20	6,58

Το δείγμα (200 ml) φορτώθηκε τέσσερις φορές (50 ml την κάθε φορά). Από αυτή τη χρωματογραφική μέθοδο θετικά ήταν τα κλάσματα 34, 36-39 και το 41. Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας και για τις υπόλοιπες αναλύσεις ενοποιήθηκαν από τις τέσσερις χρωματογραφίες τα κλάσματα 34-40 (28 ml), ενώ το κλάσμα 41 (4 ml) αποτέλεσε ξεχωριστό δείγμα. Όπως διαπιστώνεται και από τα δεδομένα του Πίνακα 4.5 η ενεργότητα σε αυτό το πρωτόκολλο παρέμεινε σταθερή σε όλα τα στάδια καθαρισμού, στα οποία ανιχνεύτηκε η ελάχιστη τιμή, 20 AU/ml, ενώ παρατηρήθηκε μια πτωτική πορεία στην ειδική ενεργότητα, η οποία μειώθηκε από 39000 σε 80 Total AU. Τέλος, η συγκέντρωση πρωτεΐνης και ο βαθμός καθαρισμού είχαν αρκετά χαμηλές τιμές. Παρά το γεγονός ότι τα θετικά κλάσματα δεν βρέθηκαν

στην ίδια περιοχή με τα προηγούμενα πρωτόκολλα, εντάσσονται όμως στην περιοχή μεταξύ 30-41, όπως παρατηρήθηκε και στα δυο προηγούμενα πρωτόκολλα. Ωστόσο από το τρίτο πρωτόκολλο, γίνεται σαφές ότι η εφαρμογή της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης, χωρίς να έχει προηγηθεί προηγουμένως η χρωματογραφία ανιοντοανταλλαγής δεν ήταν αποτελεσματική, λόγω των χαμηλών τιμών στις ενεργότητες και στο βαθμό καθαρισμού.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε και σε αυτό το πρωτόκολλο SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση, χρώση των πηκτών με τη μέθοδο Νιτρικού Αργύρου και μετα-ηλεκτροφορητική ανίχνευση της αντιμικροβιακής δράσης της αντιμικροβιακήςζένωσης. Όπως αναφέρεται και στο Σχήμα 4.13 εξετάστηκε το Crude, το ASP, τα ενοποιημένα κλάσματα 34-40 και το κλάσμα 41. Σε αυτή την ηλεκτροφόρηση παρατηρήθηκαν ζώνες μόνο στα δείγματα από το Crude και το ASP με μοριακή μάζα που κυμαινόταν περίπου στα 15.000 Da. Με τη χρώση Νιτρικού Αργύρου εμφανίστηκε μια επιπλέον ζώνη στο δείγμα από τα κλάσματα 34-40 με χαμηλή μοριακή μάζα (περίπου 7000 Da), αποτέλεσμα που συμπίπτει με την ηλεκτροφόρηση από το πρώτο πρωτόκολλο καθαρισμού. Ωστόσο δεν ανιχνεύτηκε ενεργότητα σε κανένα από τα δείγματα.



Σχήμα 4.13 Ηλεκτροφόρηση και χρώση Νιτρικού αργύρου από το τρίτο πρωτόκολλο καθαρισμού, 2 =μάρτυρας, 3 = Crude, 4= ASP, 5= RPC Fr. 34-40, 6= RPC1,2 Fr. 41, 7= RPC3,4 Fr. 41

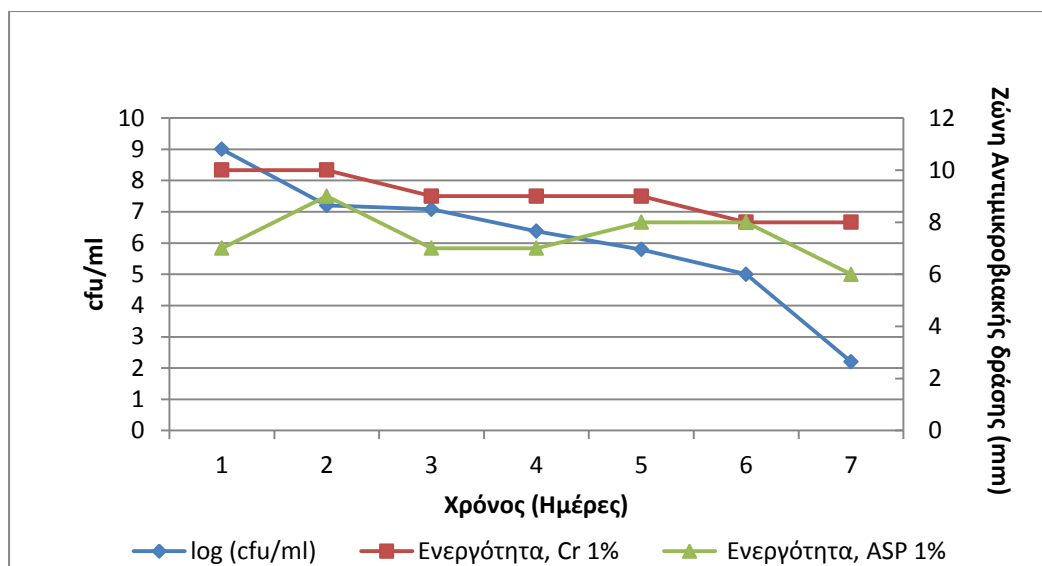
Μετά την ολοκλήρωση των τριών πρωτοκόλλων καθαρισμού επιλέχθηκαν ορισμένα δείγματα με σκοπό τον προσδιορισμό της Μοριακής Μάζας και της αμινοξικής αλληλουχίας των ενώσεων αντίστοιχα. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν από το πανεπιστήμιο Ghent στο Βέλγιο, Τμήμα Βιοχημείας και Μικροβιολογίας. Από τις αναλύσεις αυτές βρέθηκαν δύο αλληλουχίες, η VQLIGFGNFEVR (DNA binding protein) και η AYLGGDYSAANQER (LysM, peptide glycan binding protein) στα λυοφιλιωμένα κλάσματα από την RPC 21-26 (πρώτος καθαρισμός, σε SMRS), που δεν αντιστοιχούν ωστόσο σε βακτηριοσίνες.

Συνοψίζοντας, από τα πρωτόκολλα καθαρισμού που χρησιμοποιήθηκαν διαπιστώθηκε ότι ο *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση, το οποίο επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες που έχουν γίνει (Pascual et al., 2008; Zhang et al., 2010 ; Yong et al., 2010). Το ίδιο ισχύει και για το συγκεκριμένο στέλεχος (Zoumproulou et al., 2008). Επίσης έχει απομονωθεί βακτηριοσίνη από το στέλεχος *Lactobacillus fermentum* Beijerinck CCRC (Yan et al., 1997). Πρόκειται για τη fermenticin B, η οποία έχει στενό αντιμικροβιακό φάσμα με μέγιστη ενεργότητα 20,000 AU/ml.

Δεν έχει ωστόσο προσδιορισθεί η αμινοξική αλληλουχία. για καμία από τις ουσίες αυτές. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον όμως παρουσιάζει η πρωτεΐνη LysM (Lysin motif), που ανιχνεύτηκε στην παρούσα μελέτη. Πρόκειται για περιοχή πρωτεΐνης που εμπλέκεται στη λύση του κυτταρικού τοιχώματος και παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση. (Bateman & Bycroft, 2000, Hu et., 2010). Η παρουσία της αποτελεί ένδειξη ότι η αντιμικροβιακή δράση του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 ενδεχομένως να μην οφείλεται στην παρουσία βακτηριοσίνης αλλά στη δράση ενδολυσίνης που παράγεται από το βακτηριακό στέλεχος.

4.3 Ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης σε συγκαλλιέργεια του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 και του *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4

Στο συγκεκριμένο πείραμα μελετήθηκε αρχικά η παραγωγή της αντιμικροβιακής ουσίας του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 σε μονοκαλλιέργεια. Το παραγωγό στέλεχος αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS στους 37°C για επτά ημέρες. Η αντιμικροβιακή δράση προσδιορίστηκε με την μέθοδο WDA με ευαίσθητο στέλεχος το *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4 (εμβόλια, 1% και 0,1%), ενώ παράλληλα έγινε παρακολούθηση της ανάπτυξης με καταμέτρηση του πληθυσμού κάθε μέρα (cfu/ml). Συνολικά έλαβαν χώρα 2 επαναλήψεις του πειράματος. Στη συνέχεια παραθέτονται τα αποτελέσματα.



Σχήμα 4.14 Ανάπτυξη του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 για 7 μέρες σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS στους 37 °C και ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 (MRS) με τη μέθοδο WDA με ευαίσθητο στέλεχος το *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4

Πίνακας 4.6 Ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS στους 37 °C και pH 7, με τη μέθοδο WDA με ευαίσθητο στέλεχος το *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4

Ημέρα	Ζώνη αντιμικροβιακής δράσης του <i>Lactobacillus fermentum</i> ACA-DC 179 (WDA, εμβόλιο 1%) Διάμετρος (mm) ^a		Ζώνη αντιμικροβιακής δράσης του <i>Lactobacillus fermentum</i> ACA-DC 179 (WDA, εμβόλιο 0,1%) Διάμετρος (mm) ^a	
	Crude	ASP	Crude	ASP
1	10	7	9	0
2	10	9	10	0
3	9	7	10	6
4	9	7	11	9
5	9	8	11	10
6	8	8	10	10
7	8	6	10	10

^a οι τιμές είναι μέσοι όροι των αποτελεσμάτων των δύο πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν

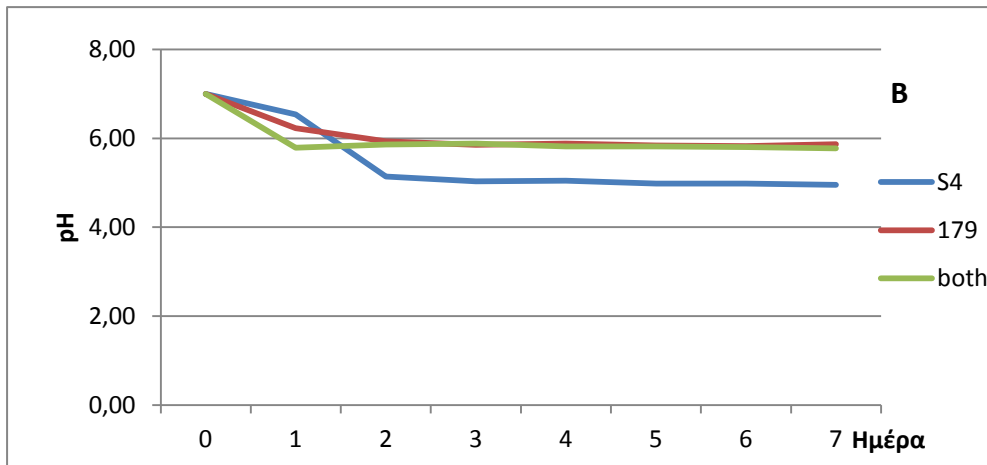
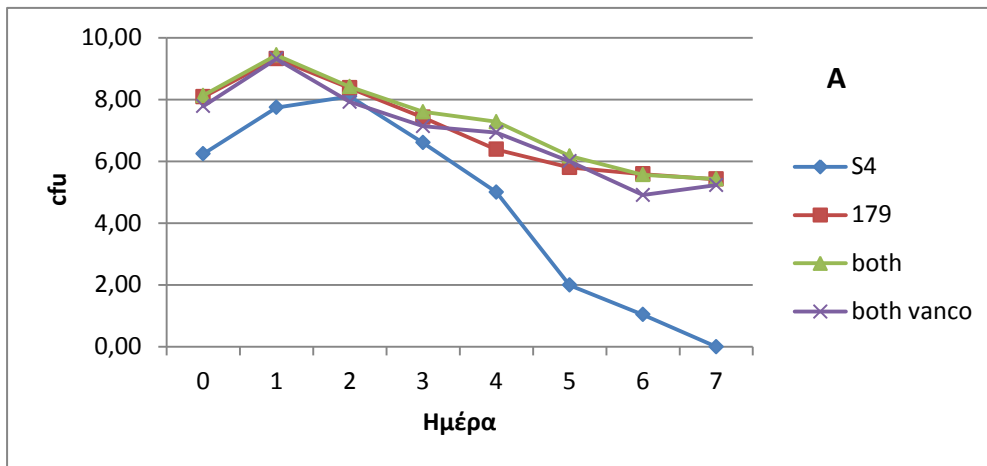
Από τα δεδομένα του Πίνακα 4.6, είναι φανερό ότι τόσο στο Crude όσο και στο ASP παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση της παραγωγής της αντιμικροβιακής ουσίας με την πάροδο των ημερών (εμβόλιο 0,1%), ενώ θα πρέπει να επισημανθεί

ότι στην περίπτωση που το εμβόλιο του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 ήταν 1% στο ASP παρατηρήθηκε τη 2^η μέρα η μεγαλύτερη ζώνη αναστολής (9mm).

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης πειραματικής πορείας κρίθηκε αναγκαίο να ελεγχθεί επίσης αν το ευαίσθητο στέλεχος, δηλαδή ο *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4 παρεμποδίζει την ανάπτυξη του παραγωγού *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179. Τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά και για το Crude και για το ASP επιβεβαιώνοντας έτσι ότι ο *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4 δεν παρεμποδίζει τον *Lactobacillus fermentum* 179.

Τέλος, για τον προσδιορισμό της επίδρασης του ευαίσθητου στελέχους στην παραγωγή της αντιμικροβιακής ουσίας πραγματοποιήθηκε το πείραμα της συγκαλλιέργειάς τους για επτά ημέρες (δύο επαναλήψεις).

Στο συγκεκριμένο πείραμα εξετάστηκε αρχικά η ανθεκτικότητα των δύο βακτηριακών στελεχών και της συγκαλλιέργειας αυτών στο αντιβιοτικό βανκομυκίνη με στόχο την επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης του αντιβιοτικού για τη συνέχεια του πειράματος. Σύμφωνα με την Ζουμποπούλου(2008) το στέλεχος *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 είναι ανθεκτικό στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό σε τιμές μεγαλύτερες από 128 MICs (μg/ml). Γι' αυτό ορίστηκαν οι εξής συγκεντρώσεις για τη μέτρηση της οπτικής ενεργότητας: 1=500 μg/ml, 2=250 μg/ml, 3=125 μg/ml, 4=62,5 μg/ml, 5=31,25 μg/ml. Βάσει των αποτελεσμάτων αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί το αντιβιοτικό σε συγκέντρωση 125 μg/ml. Τα αποτελέσματα από τα δυο πειράματα συγκαλλιέργειας παραθέτονται στη συνέχεια.



Σχήμα 4.15 A) Καταμέτρηση των πληθυσμών του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179, του *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4 και της συγκαλλιέργειας του σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS MOPS (pH 7.0, 37 °C) για 7 μέρες, με τη μέθοδο της ενσωμάτωσης σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS **B)** Μέτρηση του pH της καλλιέργειας του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179, της καλλιέργειας του *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4 και της συγκαλλιέργειας, (οι τιμές είναι μέσοι όροι των αποτελεσμάτων των δύο πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν)
όπου, 4 = *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4, 179= *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179, both= συγκαλλιέργεια των δύο στελεχών, both vanco= συγκαλλιέργεια των δύο στελεχών , σε MRS που περιείχε βανκομυκίνη (συγκέντρωση 125 μg/ml)

Όπως φαίνεται από τις παραπάνω γραφικές παραστάσεις (Σχήματα 4.15) σημειώθηκε πτωτική πορεία στις τιμές του pH και ιδίως στο στέλεχος του *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4. Όσον αφορά την καταμέτρηση των πληθυσμών, ο *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4. παρουσίασε τη μεγαλύτερη τιμή τη 2^η μέρα, ενώ ακολούθησε σταδιακή μείωση μέχρι που μηδενίστηκε τη 5^η μέρα. Αυτό ενδεχομένως οφειλόταν στο γεγονός, ότι ο *Streptococcus thermophilus* ACA-DC αναπτύχθηκε σε MRS-MOPS, το οποίο δεν αποτελεί το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα για το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος, το οποίο αναπτύσσεται σε M17.

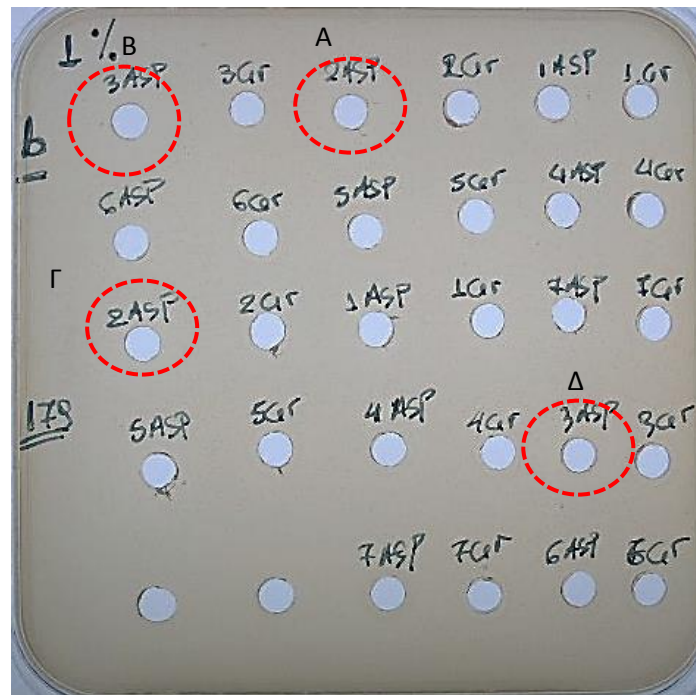
Πίνακας 4.7 Ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 και της συγκαλλιέργειας του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 και του *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4 σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS-MOPS στους 37 °C με τη μέθοδο WDA με ευαίσθητο στέλεχος τον *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4 (εμβόλιο 1% και 0,1%)

Ζώνη αντιμικροβιακής δράσης Διάμετρος (mm) ^a								
Ημέρα	<i>Lactobacillus fermentum</i> ACA-DC				Συγκαλλιέργεια των <i>Lactobacillus fermentum</i> ACA-DC 179 και <i>Streptococcus thermophilus</i> ACA-DC 4			
	Crude (1%)	Crude (0.1%)	ASP (1%)	ASP (0.1%)	Crude (1%)	Crude (0.1%)	ASP (1%)	ASP (0.1%)
1	7	7	7	7	7	7	7	7
2	7,5	7	8,5	7,5	7,5	8	12,5	7,5
3	7,5	7	10	8	8	7,5	13	8
4	7,5	7,5	7,5	7	7,5	7	7,5	7
5	7,5	7	8	7	7	7	8	7
6	7,5	8	7,5	7	7,5	8	7,5	7
7	7,5	8	7	7	7,5	7,5	7	7

a οι τιμές είναι μέσοι όροι των αποτελεσμάτων των δύο πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν

Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 4.7, από την ανίχνευση της αντιμικροβιακής δράσης με τη μέθοδο WDA στη συγκαλλιέργεια διαπιστώθηκε ότι η μέγιστη παραγωγή της λαμβάνει χώρα τη δεύτερη και την τρίτη μέρα. Ωστόσο παρατηρήθηκαν επίσης στο δείγμα από το ASP του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC

179 εξίσου μεγάλες ζώνες αναστολής. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ενδεχομένως η ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης δεν οφείλεται στην παρουσία ενδολυσίνης αλλά πρόκειται για πεπτικό που να μοιάζει με βακτηριοσίνη (BLIP) και επειδή είναι δευτερογενής μεταβολίτης δεν παράγεται κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης της ανάπτυξης.



Εικόνα 4.1 Απεικόνιση των ζωνών αναστολής από το δεύτερο πείραμα συγκαλλιέργειας με τη μέθοδο WDA (εμβόλιο 1%) με ευαίσθητο στέλεχος το *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4. Επισημαίνονται οι ζώνες αναστολής από τα εξής δείγματα: **A)** το ASP της 2^{ης} μέρας από τη συγκαλλιέργεια του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 και *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4 σε MRS-MOPS στους 37 °C **B)** το ASP 3^{ης} μέρας από τη συγκαλλιέργεια του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 και *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 4 σε MRS-MOPS στους 37 °C **Γ)** το ASP της 2^{ης} μέρας από την καλλιέργεια του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 σε MRS-MOPS στους 37 °C **Δ)** το ASP 3^{ης} μέρας από την καλλιέργεια του *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 σε MRS-MOPS στους 37 °C

5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη είχε ως στόχο τον καθαρισμό και το χαρακτηρισμό της αντιμικροβιακής ένωσης που παράγεται από το βακτηριακό στέλεχος *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179.

Από το είδος *Lactobacillus fermentum* έχει στο παρελθόν απομονωθεί η βακτηριοσίνη fermenticin B (Yan et al., 1997) για την οποία ωστόσο δεν έχει προσδιορισθεί η αμινοξική αλληλουχία. Το συγκεκριμένο στέλεχος, *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 έχει μελετηθεί στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας για την αντιμικροβιακή δράση του και έχει διαπιστωθεί ότι αυτή ανιχνεύεται έναντι στελεχών του γένους *Streptococcus*, εκ των οποίων δυο στελέχη, είναι παθογόνα, το στέλεχος *Streptococcus oralis* LMG 14532^T και το στέλεχος *Streptococcus pneumoniae* LMG 14545^T (Ζουμπρούλου et al., 2008 ; Ζουμπρούλου et al., 2013). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι έχει αντιμικροβιακή δράση έναντι στελεχών του γένους *Salmonella*, καθώς και προβιοτικές ιδιότητες (Ζουμπρούλου et al., 2008).

Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη είναι τα εξής:

- Από τα τρία πρωτόκολλα καθαρισμού που χρησιμοποιήθηκαν, στο πρώτο πρωτόκολλο με θρεπτικό υπόστρωμα το MRS παρατηρήθηκαν οι υψηλότερες τιμές ενεργότητας και πρωτεΐνης. Ωστόσο ο βαθμός καθαρισμού ήταν χαμηλός σε σύγκριση με τα υπόλοιπα πρωτόκολλα.
- Το στέλεχος *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση που εντοπίστηκε στα κλάσματα 32-37 (σε έκλυση συγκέντρωσης 0,57 M NaCl) της χρωματογραφίας ανιοντοανταλλαγής, σε θρεπτικό υπόστρωμα SMRS.
- Το στέλεχος *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση, που πιθανώς δεν οφείλεται όμως στην παρουσία βακτηριοσίνης.
- Η ταυτοποίηση της πρωτεΐνης LysM (lysin motif) και το γεγονός ότι το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση πέρα των 24 h ανάπτυξης αποτελούν βάσιμες ενδείξεις ότι πρόκειται για πεπτίδιο που μοιάζει με βακτηριοσίνη, BLIP.

Καθώς η παραγωγή αντιμικροβιακής δράσης από ένα οξυγαλακτικό βακτήριο, όπως ο *Lactobacillus fermentum* έχει μεγάλη σημασία για την παραγωγή τροφίμων και ιδιαίτερα των γαλακτοκομικών προϊόντων, απαιτείται περαιτέρω έρευνα για να προσδιοριστεί και να χαρακτηριστεί η αντιμικροβιακή ουσία που παράγεται από το *Lactobacillus fermentum* ACA-DC.179.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abee, T., Krockel, L., Hill, C., 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology* 28, 169-185.

Ananou, S., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., Valdivia, E., 2007. Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods. In A. Méndez-Vilas (Ed.), *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* (pp 745-486) Spain: Formatex.

Asaduzzaman, S. M., Sonomoto, K., 2009. Lantibiotics: Diverse activities and unique modes of action. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 107, 475 – 487

Bakkal, S., Robinson, S.M., Riley, M.A., 2012. Bacteriocins of Aquatic Microorganisms and Their Potential Applications in the Seafood Industry. In Edmir Daniel Carvalho, Gianmarco Silva David and Reinaldo J. Silva (Eds) *Health and Environment in Aquaculture* (pp 303-328). Croatia In Tech.

Balciunas, E.M., Castillo Martinez, F.A., Todorov, S.D., Gombossy de Melo Franco, B.D., Converti, A., Pinheiro de Souza Oliveira, R., 2013. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*. 32, 134 – 142.

Barefoot, S. and Klaenhammer, T.R., 1984. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* Bacteriocin lactacin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 26, 328-334.

Batmann, A. and Bycroft, M., 2000. The Structure of a LysM Domain from E. coli Membrane-bound Lytic Murein Transglycosylase D (MltD). *Journal of Molecular Biology* 299, 1113-1119.

Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.B., Cogan, T.M., 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* 11, 259–274.

Bernardeau, M., Gueguen, M., Vernoux, J.P., 2006. Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiology Reviews* 30 , 487–513.

Bernardeau, M., Vernoux, J.P., Henri- Dubernet, S., Gueguen, M., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology* 126, 278-285.

Bromberg, R., Moreno, I., Zaganini, C.L., Delboni, R.R., Oliveira, J., 2004. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. *Brazilian Journal of Microbiology* 35, 137-144.

Buckenhiiskes, H. J., 1993. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiology Reviews* 12, 253-272.

Calo-Mata, P., Arlindo, S., Boehme, K., de Miguel, T., Pascoal, A., Barros- Velazquez, J., 2008. Current Applications and future trends of lactic acid bacteria and their

bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food Bioprocess Technology* 1, 43-63.

Cao, L.T., Wu, J.Q., Xie, F., Hu, S.H., Mo, Y., 2007. Efficacy of nisin in treatment of clinical mastitis in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90, 3980-3985.

Caplice, E. and Flitzgerald, G.F., 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50, 131-149.

Carroll, J., Draper, L. A., O'Connor, P. M., Coffey, A., Hill, C., Ross, R. P., Cotter P. D., O'Mahony, J., 2010. Comparison of the activities of the lantibiotics nisin and lactacin 3147 against clinically significant mycobacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* 36, 132 - 136.

Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L., van der Donk, W. A, 2005. Biosynthesis and mode of Action of lantibiotics. *Chemical Reviews* 105, 633 – 683.

Chen, H. and Hoover, D.G., 2003. bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food science and Food Safety* 2, 82-100.

Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F., Hernandez, P.E., 2001. Review: Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology International* 7: 281-305.

Claesson, M.J., Sinderen D.V., O'Toole P.W., 2007. The genus *Lactobacillus* - a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiol Letters* 269, 22-28.

Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I.F., Chikindas, M. L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 71, 1 – 20.

Daba, H., Lacroix, C., Huang, J., Simard, R., 1993 Influence of growth conditions on production and activity of mesenterocin 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteroides*. *Applied Microbiology Biotechnology* 39, 166-173

Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, P., 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal* 16, 1058 - 1071

De Vuyst, L., Leroy, F., 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food application. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 13, 194 – 199.

Dicks, L.M.T., Heunis, T.D.J., D.A. van Staden, Brand, A., Noll, K., Suttyak, Chikindas, M.L., 2011. Medical and personal care applications of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. In D. Drider and S. Rebuffat (Eds.), *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications* (pp 391-421). USA :Springer.

Dufour, A., Hindre, T., Haras, D., Le Pennec, J.P., 2007. The biology of lantibiotics from the lactacin 481 group is coming of age. *FEMS Microbiology Reviews*. 31, 134 – 167.

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A., 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiology Reviews* 24, 85-106.

Fadda, S., Lopez, C., Vignolo, G., 2010. Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: Peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers. *Meat Science* 86, 66–79.

Felis G.E., Dellaglio, F., 2007. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 8, 44-61.

Florou-Paneri, P., Christaki, E., 2013. Bonos E., Lactic acid bacteria as source of functional ingredients. In Kongo, M.(Eds), *Lactic Acid Bacteria – R & D for Food, Health and Livestock Purposes* (589-614). Croatia: In Tech.

Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L., Omar ,N.B., 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* 120, 51 – 70.

Garcia, P., Rodriguez, L., Rodriguez, A., Martinez, B., 2010. Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science & Technology* 21, 373-382.

Carolissen-Mackay, V., Arendse, G.,Hastings, J.W., 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *International Journal of Food Microbiology* 34, 1-16.

Gautam, N., Sharma, N.,2009. Bacteriocin: safest approach to preserve food products. *Indian Journal of Microbiology* 49, 204-211.

Gillor, O., Etzion, A., Riley, M.A., 2008. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81, 591-606.

Giri, S., Singh, J., 2013. New face in the row of human therapeutics: Bacteriocins . *Journal of Microbiology Research* 3, 71-78.

Hammes, W.P., Hertel, C., 2006. The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In Dworkin, M., Falkow,S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H, Stackebrandt(Eds), *The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria*Vol. 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria (pp 320–403). USA: Springer.

Hansen, E.B., 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology* 78 , 119– 131.

Helander, I.M, von Wright, A., Mattila-Sandholm, T.M., 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *And Trends in Food Science and Technology* 8, 146-150.

Holzappel, W.H., Geisen, R., Schillinger, U., 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 24, 343-362.

Hu, S., Kong, J., Kong, W., Guo, T., Ji, M., 2010. Characterization of a novel LysM Domain from *Lactobacillus fermentum* bacteriophage endolysin and its use as an anchor to display heterologous proteins on the surfaces of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2410-2418

Hugas, M., 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation meat and meat products. *Meat Science* 49,139-150

- Hugas, M., Monfort, J.Ma., 1997. Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry* 59, 547-554.
- Joerger, R.D., 2003. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Science* 82:640–647.
- Juodeikiene, G., Bartkiene, E., Viskelis, P., Urbonaviciene, D., Eidukonyte, D., Bobinas, C., 2012. Fermentation processes using lactic acid bacteria producing bacteriocins for preservation and improving functional properties of food products. In Marian Petre (Eds), *Advances in Applied Biotechnology* (pp 63-100).Croatia : In Tech
- Kaur, B., Balgir, P., Mittu, B., Chauhan, A., Kumar, B., 2013. Purification and physicochemical characterization of anti-gardnerella vaginalis bacteriocin HV6b produced by *Lactobacillus fermentum* Isolate from human vaginal ecosystem. *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 3, 91-100.
- Kawai,Z., Saito, T., Toba, T., Samant,S.K., Itoh, T., 1994. Isolation and Characterization of Highly Hydrophobic New Bacteriocin (Gassericin A) from *Lactobacillus gasseri* LA39. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* 58, 1218-1221.
- Klaenhammer, T. R., 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70, 337 – 349.
- Klein G., Pack, A., Bonaparte, C., 1998. Reuter, G., Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 41, 103–125.
- Knorr, D.,1998. Technology aspects related to microorganisms in functional foods. *Trends in Food Science & Technology* 9, 295-306.
- Mantovani,H.C., Cruz,A.M.O., Paiva,A.D. ,2011. Bacteriocin activity and resistance in livestock pathogens. In A. Mendez-Vilas(Eds), *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* (pp 853-863).Spain: Formatex.
- Leroy, F. and De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as fuctional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* 15, 67 – 78
- Lindgren, S.E., Dobrogosz, W.J., 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews* 87, 149-164.
- McAuliffe, O., Ross, R. P.,Hill, C., 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 285 – 308.
- Merrit, C. R., Dunau, M. L., Golgman, D., 1981. A rapid sensitive silver stain for polypeptides in Polyactilamide Gels. *Analytical Biochemistry* 110, 201 – 207.
- Metaxopoulos, J., Mataragas, M., Drosinos, E.H.,2003. Bacteriocins: Classification, properties, production and mode of action (I). *Journal of the hellenic veterinary medical society* 53,335-344.
- Metaxopoulos, J., Mataragas, M., Drosinos, E.H., 2003. Bacteriocins of lactic acid bacteria and their application on food as biopreservatives. (II). *Journal of the hellenic veterinary medical society* 54,69-77.

- Mikelsaar, M., Zilmer, M., 2009. *Lactobacillus fermentum* ME-3 an antimicrobial and antioxidative probiotic. *Microbial Ecology in Health and Disease* 21, 1-27.
- Morgan, S.M., O'Sullivan, L., Ross, R.P., Hill, C., 2002. The design of a three strain starter system for Cheddar cheese manufacture exploiting bacteriocin-induced starter lysis. *International Dairy Journal* 12, 985–993.
- Mortvedt, C., Nissen-Meyer, J., Sletten, K., Nes, I.F., 1991. Purification and Amino Acid Sequence of Lactocin S, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus sake* L45,57,1829-1834.
- Nes, I.F., Yoon, S.S., Diep, D.B., 2007. Ribosomally Synthesized Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food Science and Biotechnology* 16, 675-690.
- Nishant, T., Sathish Kumar, D., Arun Kumar, R., Hima Bindu, K., Raviteja, Y., 2011. Bacteriocin producing probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Microbial and Biochemical Technology* 3, 121-124.
- Nissen-Meyer, J., Oppega, C., Rogne, P., Haugen, H.S., Kristiansen, P.E., 2010. Structure and Mode-of-Action of the Two-peptide (Class-IIb) bacteriocins. *probiotics and antimicrobial proteins* 2, 52-60.
- O'Sullivan, L., Ross, R.P., Hill, C., 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie* 84, 593–604
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 465-476.
- Parada, J.L., Caron, C.R., Medeiros A.B.P., Soccol, C.R., 2007 Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50, 521-542.
- Parente, E., Ricciardi, A., 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52, 628-638.
- Pascual, L. M., Daniele, M. B., Giordano, W., Pajaro, M. C., Barberis I. L., 2008. Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 Produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Current Microbiology* 56, 397 – 402.
- Pawlowska, A.M., Zannini, E., Coffey, A., Arendt, E., 2012. "Green Preservatives": Combating fungi in the food and feed industry by applying antifungal lactic acid bacteria. In Jeyakumar H. (Eds), *Advances in Food and Nutrition Research* 66, (pp2-244). USA: Elsevier.
- Riaz, S., Nawaz, S.K., Hasnain, S., 2010. Bacteriocins produced by *L. fermentum* and *L. acidophilus* can inhibit cephalosporin resistant *E. Coli*. *Brazilian Journal of Microbiology* 41, 643-648.
- Pieterse, R., Todorov, S.D., 2010. Bacteriocins-exploring alternatives to antibiotics in mastitis treatment. *Brazilian Journal of Microbiology* 41, 542-562.

- Pingitore, E.V., Salvucci, E., Sesma, F., Nader-Macías, M E.,2007. Different strategies for purification of antimicrobial peptides from Lactic Acid Bacteria (LAB). In A. Mendey-Vilas (Eds) *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* (pp 557-568). Spain: Formatex.
- Riley, M.A., Wertz, J.E.,2002. Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annual Review of Microbiology* 56, 117-137.
- Rodriguez, J.M., Martinez, M.I., Horn, N., Dodd, H.M., 2003. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 80, 101– 116.
- Rolfe, R.D., 2000. The Role of Probiotic Cultures in the Control of Gastrointestinal Health. *The Journal of Nutrition* 130.396-402.
- Rönnqvist, D., Forsgren-Brusk,U., Husmark, U., Grahn-Hansson, E., 2007. *Lactobacillus fermentum* Ess-1 with unique growth inhibition of vulvo-vaginal candidiasis pathogens. *Journal of Medical Microbiology*, 56, 1500-1504.
- Ross, R. P., Morgan, S. and Hill, C.,2002. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology* 79, 3 – 16.
- Russell, J.B.,Mantovani., H.C.,2002. The bacteriocins of ruminal bacteria and their potential as an alternative to antibiotics. *Journal of Molecular and Microbiology and Biotechnology* 4.347-355.
- Sang, Y., Blecha, F., 2008. Antimicrobial peptides and bacteriocins: alternatives to traditional antibiotics. *Animal Health Research Reviews* 9, 227-235.
- Schägger, H., Von Jagow, G., 1987. Tricine – Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166. 368 – 379.
- Schillinger, U., Geisen, R., Holzapfel, W.H., 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends in Food Science & Technology* 7, 158-164.
- Sears, P.M., Smith, B.S., Stewart, W.K., Gonzalez, R.N., Rubino,S.D., Gusik,S.A., Kulisek, E.S., Projan, S.J., Blackburn, P., 1992. Evaluation of a nisin-based germicidal formulation on teat skin of live cows. *Journal of Dairy Science* 75, 3185-3190.
- Settanni,L., Moschetti,G., 2010. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology* 27, 691-697.
- Shieha, M.J., Shang, H.F., Lia, F.H., Chiena Y.W., 2011. *Lactobacillus fermentum* improved intestinal bacteria flora by reducing *Clostridium perfringens* e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism 6, 59-63.
- Smith, L., Hillman, JD., 2008. Therapeutic potential of type A (I) lantibiotics, a group of cationic peptide antibiotics. *Current Opinion in Microbiology* 11, 401–408.

- Sobrino-Lopez ,A., Martin-Belloso, O., 2008. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal* 18, 329–343.
- Soomro, A.H., Masud, T., Anwaar, K., 2002. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health – A Review. *Pakistan Journal of Nutrition* 1, 20-24.
- Stiles, M., Holzapfel, W., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36, 1 – 29.
- Svetoch, E.A., Stern, N.J., 2010. Bacteriocins to control *Campylobacter* spp. in poultry-A review. *Poultry Science* 89 , 1763–1768.
- Tagg, J. R.,Mc Given, A. R., 1971. Assay system for bacteriocins. *American Society for Microbiology*. 21, 943.
- Tagg, J. R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W., 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews* 40,722-756.
- Talon, R., Leroy, S., Lebert, 2007. I., Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: The importance of indigenous starters. *Meat Science* 77 ,55–62.
- Toomula, N., Kumar, S., Kumar, A., Bindu, H., Raviteja, Y., 2011. Bacteriocin producing probiotic lactic acid bacteria. *Microbial & Biochemical Technology* 3,121-124
- Urbach, G., 1995. Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *International Dairy Journal* 5, 877-903.
- Vandenbergh, P.A., 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews* 12, 222-238.
- Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Lin, A.W.C, Cureem, S.O.T., Fung, A.M.Y., Yuen, K.Y., 2007. Surgical site abscess caused by *Lactobacillus fermentum* identified by 16S ribosomal RNA gene sequencing. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 58,251-254.
- Yan, T.R.,Lee, C.S., 1997. Characterization of a partially purified bacteriocin, Fermentcin B, from *Lactobacillus fermentum*. *Biotechnology Letters* 19.741-744
- Yang, M.C., Kim, D.S.,Ma J.Y., 2012. Bioconversion composition of ssanghwa-tang fermented by *Lactobacillus fermentum*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 17, 84-92.
- Zacharof, M.P., Lovitt, R.W., 2012. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: A Review Article. *APCBEE Procedia* 2, 50-56.
- Zasloff, M.,2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395.
- Zeng, X.Q., Pan D.D., Zhou,P.D.,2011. Functional Characteristics of *Lactobacillus fermentum* F1. *Current Microbiology* 62,27-31.
- Zhang, Y., Liu, Y., Bao, Y., Zhang H. 2010. Influence of pH, Heat and Enzymatic Treatments on the Activity of Aantibacterial Substance in MRS and Milk Media Produced by *Lactobacillus fermentum* F6. *Agricultural Science in China*9 , 911 – 920.

Ζουμποπούλου, Γ., 2008 *Προβιοτικές ιδιότητες οξυγαλακτικών βακτηρίων. In vitro και in vivo μελέτη της αντιμικροβιακής και ανοσορρυθμιστικής τους δράσης.* Διδακτορική Διατριβή, ΓΠΑ., Αθήνα, Ελλάδα.

Zoumpoulou, G., Foligne, B., Christodoulou, K., Grangette, C., Pot Bruno, Tsakalidou E., 2008. *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models. *International Journal of Food Microbiology* 121, 18 – 26.

Zoumpoulou, G., Pepelassi, E., Papaioannou, W., Georgalaki, M., Maragkoudakis, P. A., Tarantilis, P. A. Polissiou M., Tsakalidou, E., Papadimitriou, K. 2013. Incidence of Bacteriocins Producers by Food-Related Lactic Acid Bacteria Active towards Oral Pathogens. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 4640 – 4654.