

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑΣ

ΔΠΜΣ «ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ
ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ»

ΤΩΝ ΣΥΝΕΡΓΑΖΟΜΕΝΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΤΟΥ ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΑΘΗΝΩΝ (ΓΠΑ)

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Διερεύνηση των πιθανών μεταβολών της
σύστασης των κυττάρων του *Lactococcus lactis*
ssp. cremoris MG1363 κατά την προσαρμογή
του σε συνθήκες στρες με την εφαρμογή
φασματοσκοπίας FT-IR»

ΚΑΖΟΥ Α. ΜΑΡΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: Ε. Τσακαλίδου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2013

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑΣ

ΔΠΜΣ «ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ
ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ»

ΤΩΝ ΣΥΝΕΡΓΑΖΟΜΕΝΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΚΑΙ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΤΟΥ ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΑΘΗΝΩΝ (ΓΠΑ)

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

«Διερεύνηση των πιθανών μεταβολών της
σύστασης των κυττάρων του *Lactococcus lactis*
ssp. cremoris MG1363 κατά την προσαρμογή
του σε συνθήκες στρες με την εφαρμογή
φασματοσκοπίας FT-IR»

ΚΑΖΟΥ Α. ΜΑΡΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: Ε. Τσακαλίδου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ

ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2013

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**«Διερεύνηση των πιθανών μεταβολών της
σύστασης των κυττάρων του *Lactococcus lactis*
ssp. cremoris MG1363 κατά την προσαρμογή
του σε συνθήκες στρες με την εφαρμογή
φασματοσκοπίας FT-IR»**

KAZOY A. MARIA

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: Ε. Τσακαλίδου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Σ. Χαδιώ, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

Π. Σκανδάμης, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στελέχη του είδους *Lactococcus lactis* χρησιμοποιούνται ευρέως ως εναρκτήριες καλλιέργειες στην παρασκευή τυριών, ζυμώμενων γαλάτων και κρασιού. Με βάση τον κρίσιμο ρόλο των στελεχών του είδους αυτού σε βιομετασχηματισμούς στη βιομηχανία τροφίμων, τα στελέχη αυτά θεωρούνται μικροοργανισμοί μοντέλα για τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Στην παρούσα μελέτη, το στέλεχος *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 υποβλήθηκε σε συνθήκες στρες προκειμένου να επιτευχθεί ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των προσαρμοσμένων στο στρες κυττάρων του για κάθε περίπτωση. Τα περιβαλλοντικά στρες που εφαρμόστηκαν ήταν το όξινο (pH 5.5) και το ωσμωτικό (παρουσία 2.5% w/v NaCl) στρες, καθώς επίσης και εφαρμογή μεγαλύτερης (45°C) ή μικρότερης (20°C) θερμοκρασίας επώασης από τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Επιπροσθέτως μελετήθηκαν και οι συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών (διαλύματα χωρίς γλυκόζη). Η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την διερεύνηση των μεταβολών στα βασικά δομικά συστατικά των προσαρμοσμένων στο στρες κυττάρων του *L. Lactis*. Η ανάλυση των κύριων συνιστωσών των μετασχηματισμένων ως προς τη δεύτερη παράγωγο φασμάτων έδειξε σημαντικές ομαδοποιήσεις των κυττάρων βάσει των συνθηκών στρες που υποβλήθηκαν. Τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούν να υποδείξουν παρόμοιους μηχανισμούς αυτοπροστασίας των βακτηρίων κάτω από διαφορετικές συνθήκες στρες, οι οποίοι πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω προκειμένου να διευκολυνθεί η ορθολογική χρήση του *L. lactis* στη βιομηχανία τροφίμων.

Επιστημονική περιοχή της εργασίας: Αθήνα

Λέξεις κλειδιά: *Lactococcus lactis*, προσαρμογή σε στρες, FT-IR

SUMMARY

Lactococcus lactis is commonly used as a starter culture for the manufacture of cheese, fermented milks, and wine products. Based on its crucial role in food biotransformations, it is considered to be the model organism of lactic acid bacteria. In our study, *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 was subjected to various stressful conditions in order to accomplish the phenotypic characterization of the adapted *L. lactis* cells. Environmental stresses comprised of acid (pH 5.5), osmotic (presence of 2% w/v NaCl), heat (45°C), and cold (20°C) stress, as well as responses of *L. lactis* cells during starvation (media without carbohydrate source). Fourier transformed infrared spectroscopy (FT-IR) was applied in order to evaluate the changes in the cellular composition of *L. lactis* adapted cells. Principal component analysis of the second derivative transformed spectra revealed different groups of *L. lactis* cells corresponding to each stressful condition applied in the study for all characteristic spectral regions. These observations may indicate similar self-protection mechanisms of the bacterium under different stressful conditions that need to be further investigated in order to shed new light on the rational use of *L. lactis* in the food industry.

Keywords: *Lactococcus lactis*; stress responses; FT-IR

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κ. Έφη Τσακαλίδου, για τη βοήθεια και την υποστήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής αυτής μελέτης. Την ευχαριστώ ιδιαίτερος γιατί πίστεψε σε μένα και μου έδωσε την ευκαιρία να συνεργαστώ με αξιόλογους ανθρώπους και να αποκτήσω πολύτιμες εμπειρίες. Αποτελεί λαμπρό παράδειγμα ολοκληρωμένου ερευνητή και πρότυπο για τη νέα γενιά.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω είναι η κ. Γεωργία Ζουμποπούλου, η οποία στάθηκε δίπλα μου και με βοήθησε τόσο πειραματικά όσο και ψυχολογικά για την ολοκλήρωση αυτής της μελέτης. Η συμβολή της καθοριστική, καθώς ήταν ανά πάσα στιγμή διαθέσιμη για οποιαδήποτε απορία ή δυσκολία αντιμετώπιζα, μεταδίδοντάς μου απλόχερα τις γνώσεις της.

Αμέριστη ευγνωμοσύνη νοιώθω και για τον κ. Κώστα Παπαδημητρίου, καθώς η επιβλητική του παρουσία σε συνδυασμό με το αίσθημα ασφάλειας και σιγουριάς που με έκανε να νοιώθω, ήταν η κινητήριος δύναμη για να ανταπεξέλθω σε προβλήματα που φάνταζαν άλυτα.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μόσχο Πολυσίου καθώς και τον κ. Πέτρο Ταραντίλη, διότι μου έδωσαν τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσω το εργαστήριό τους, ενώ παράλληλα με συμβούλευαν σε όποιες δυσκολίες συναντούσα. Ευχαριστίες στην κ. Μαρίνα Γεωργαλάκη και κ. Ράνια Αναστασίου, για τη βοήθεια και τη γλυκύτητά τους, καθώς και στο υπόλοιπο προσωπικό του εργαστηρίου γαλακτοκομίας για τη συνεργασία. Τέλος, ευχαριστώ θερμά την κ. Στυλιανή Χαδιώ και τον κ. Παναγιώτη Σκανδάμη, για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1	Οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB).....	6
1.1.1	Οξυγαλακτικά βακτήρια και τρόφιμα.....	7
1.1.2	Λειτουργικότητα και εφαρμογές οξυγαλακτικών βακτηρίων.....	8
1.1.3	Εναρκτήριες καλλιέργειες οξυγαλακτικών βακτηρίων.....	8
1.1.4	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363.....	8
1.2	Οξυγαλακτικά βακτήρια και στρες.....	10
1.2.1	Όξινο στρες.....	11
1.2.2	Στρες χαμηλής θερμοκρασίας.....	12
1.2.3	Θερμικό στρες.....	13
1.2.4	Ασιτία.....	14
1.2.5	Ωσμωτικό στρες.....	15
1.2.6	Συμπεράσματα για το στρες και τις αποκρίσεις των οξυγαλακτικών βακτηρίων.....	16
1.3	Σημασία της μελέτης και της κατανόησης των αποκρίσεων στα στρες των οξυγαλακτικών βακτηρίων.....	17
1.4	Μελέτη μικροοργανισμών με χρήση υπέρυθρης φασματοσκοπίας με μετασχηματισμό κατά Fourier (FT-IR).....	18
1.4.1	Υπέρυθρη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό κατά Fourier (FT-IR).....	18
1.4.2	Χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR για τη μελέτη μικροοργανισμών.....	19
1.5	Σκοπός της μελέτης και πειραματικός σχεδιασμός.....	21
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	22
2.1	Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες ανάπτυξης.....	22
2.2	Έλεγχος καθαρότητας και χρώση Gram.....	23
2.3	Καμπύλη ανάπτυξης και μέτρηση pH του <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363.....	23

2.4	Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός της προσαρμογής του <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363 σε συνθήκες στρες.....	24
2.4.1	Όξινο στρες.....	24
2.4.2	Ωσμωτικό στρες.....	24
2.4.3	Θερμικό στρες.....	25
2.4.4	Στρες χαμηλής θερμοκρασίας.....	25
2.4.5	Ασιτία.....	25
2.5	Παρασκευή δειγμάτων για ανάλυση με φασματοσκοπία FT-IR.....	26
2.6	Φασματοσκοπία FT-IR.....	26
2.7	Επεξεργασία δεδομένων και στατιστική ανάλυση.....	26
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	28
3.1	Καμπύλη ανάπτυξης και μέτρηση pH του <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> MG1363.....	28
3.2	Όξινο στρες.....	29
3.2.1	Επιλογή όξινου στρες.....	29
3.2.2	Φάσματα FT-IR.....	30
3.2.3	Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για το διαχωρισμό των φασμάτων.....	33
3.3	Ωσμωτικό στρες.....	39
3.3.1	Επιλογή ωσμωτικού στρες.....	39
3.3.2	Φάσματα FT-IR.....	40
3.3.3	Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για το διαχωρισμό των φασμάτων.....	42
3.4	Θερμικό στρες.....	47
3.4.1	Επιλογή θερμικού στρες.....	47
3.4.2	Φάσματα FT-IR.....	48
3.4.3	Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για το διαχωρισμό των φασμάτων.....	50

3.5	Στρες χαμηλής θερμοκρασίας.....	55
3.5.1	Επιλογή στρες χαμηλής θερμοκρασίας.....	55
3.5.2	Φάσματα FT-IR.....	56
3.5.3	Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για το διαχωρισμό των φασμάτων.....	58
3.6	Ασιτία.....	63
3.6.1	Έλλειψη θρεπτικών συστατικών.....	63
3.6.1.1	Επιλογή συνθηκών ασιτίας.....	63
3.6.1.2	Φάσματα FT-IR.....	64
3.6.1.3	Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για το διαχωρισμό των φασμάτων.....	66
3.6.2	Έλλειψη όλων των συστατικών.....	71
3.6.2.1	Επιλογή συνθηκών ασιτίας.....	71
3.6.2.2	Φάσματα FT-IR.....	72
3.6.2.3	Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για το διαχωρισμό των φασμάτων.....	74
3.7	Συνδυασμός όλων των συνθηκών στρες	79
3.7.1	Φάσματα FT-IR.....	79
3.7.2	Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για το διαχωρισμό των φασμάτων.....	81
4	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	86
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	88

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια (*Lactic Acid Bacteria, LAB*)

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν μια ετερογενή ομάδα βακτηρίων και συναντώνται σε ποικίλα περιβάλλοντα, από το σώμα των ανθρώπων και των ζώων, μέχρι και τα φυτά. Τα βακτήρια αυτά χρησιμοποιούνται για την παραγωγή διαφόρων τροφίμων ζύμωσης, ζωικής (γάλα, κρέας, ψάρι) ή φυτικής (λαχανικά, κρασί, ελιές) προέλευσης (Stiles, 1996). Σε παγκόσμιο επίπεδο συνιστούν την πλειονότητα των εμπορικών εναρκτήριων καλλιεργειών τόσο σε ποσότητα όσο και σε αξία, με τη μέγιστη χρήση τους να αφορά στη βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων (Hansen, 2002). Για το λόγο αυτό οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι πλέον από τους καλύτερα μελετημένους.

Σε μια κλασική προσέγγιση, ο Orla-Jensen (1942) όρισε τα οξυγαλακτικά βακτήρια ως θετικούς κατά Gram, μη σποριογόνους οργανισμούς (ραβδία ή κόκκους) που ζυμώνουν τους υδατάνθρακες και τις ανώτερες αλκοόλες, κυρίως προς γαλακτικό οξύ. Παρόλο που για τις σύγχρονες προσεγγίσεις ο ορισμός αυτός θεωρείται μονοσήμαντος, παραμένει γενικά αποδεκτός (Axelsson, 2004; Stiles and Holzapfel, 1997).

Σήμερα πλέον είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε ότι ένα τυπικό οξυγαλακτικό βακτήριο είναι θετικό κατά Gram, μη σποριογόνο, αρνητικό στη δοκιμή καταλάσης, στερούμενο κυτοχρωμάτων, αεροάντοχο αλλά όχι αερόβιο, οξυάντοχο, απαιτητικό σε θρεπτικά συστατικά και αυστηρώς ζυμωτικό, με το γαλακτικό οξύ να είναι το κύριο τελικό προϊόν της ζύμωσης σακχάρων. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ανήκουν στην Κλάση III (Bacilli) του Φύλου Firmicutes, το οποίο περιέχει συνολικά τρεις Κλάσεις: Clostridia (Κλάση I), Mollicutes (Κλάση II) και Bacilli (Κλάση III). Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ταξινομούνται στην Τάξη II της Κλάσης III, που ονομάζεται *Lactobacillales* και περιλαμβάνει σήμερα έξι Οικογένειες (*Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, *Streptococcaceae*) (Garrity and Holt, 2001).

Η αναλογία G+C (γουανίνη + κυτοσίνη) στο μόριο του DNA τους είναι μικρότερη του 55% (Axelsson, 2004; Klein *et al.*, 1998) ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους κυμαίνεται στους 30-40°C. Είναι ανθεκτικά στα οξέα (έχει σημειωθεί

ανάπτυξη ορισμένων ειδών ακόμα και σε pH 3.5) παρόλο που έχουν βέλτιστη τιμή ανάπτυξης την ελαφρώς όξινη περιοχή (5.0-7.0). Αντιθέτως στην αλκαλική περιοχή ο ρυθμός ανάπτυξής τους μειώνεται σημαντικά (Tannock, 1999).

1.1.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια και τρόφιμα

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν μία μικροβιακή ομάδα μέγιστης σημασίας για την παραγωγή προϊόντων ζύμωσης από το γάλα, το κρέας, τα λαχανικά και τα δημητριακά, λόγω της οξίνισης που επιφέρουν, η οποία έχει ως τελικό αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ζωής των προϊόντων. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που σχετίζονται με τα τρόφιμα ανήκουν συνήθως στα γένη *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus* και *Carnobacterium*.

Τα βακτήρια αυτά συμβάλλουν στη συντήρηση του προϊόντος, μέσω ανταγωνισμού με τους αλλοιωγόνους και παθογόνους μικροοργανισμούς των τροφίμων, κυρίως λόγω της παραγωγής γαλακτικού οξέος, οξικού οξέος, αλκοόλης, CO₂, H₂O₂ και βακτηριοσινών. Επιπλέον, συμβάλλουν στη βελτίωση της ποιότητας, αφού συμμετέχουν στη διαμόρφωση του αρώματος, της γεύσης και της υφής του προϊόντος. Με τη ζύμωση των προϊόντων, βελτιώνεται η πεπτικότητά τους, καθώς και η θρεπτική τους αξία, αφού εμπλουτίζονται με απαραίτητα αμινοξέα, λιπαρά οξέα και βιταμίνες.

Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναπτυχθεί νέες εφαρμογές των οξυγαλακτικών βακτηρίων, όπως αυτές σε προβιοτικά τρόφιμα (Schiffrin et al., 2001), σε προϊόντα με φαρμακευτικές ιδιότητες και ως ζωντανά εμβόλια (Wells et al., 1996; Mercenier et al., 2000). Στις εφαρμογές αυτές, τα βακτήρια καταναλώνονται ζωντανά και παραμένουν μεταβολικά ενεργά στο γαστρεντερικό σωλήνα, δημιουργώντας αποικίες στο βλεννογόνο του εντέρου, όπου και εκδηλώνουν τις εξειδικευμένες προβιοτικές λειτουργίες τους (van de Guchte et al., 2002; Lorca and Font de Valdez, 2009). Στον πεπτικό σωλήνα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια δρουν ανταγωνιστικά ως προς την εντερική μικροχλωρίδα, συμβάλλουν στη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος, στη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης και στην καλύτερη λειτουργία του εντέρου, ενώ υπάρχει και το ενδεχόμενο εκδήλωσης αντικαρκινικής δράσης.

1.1.2 Λειτουργικότητα και εφαρμογές οξυγαλακτικών βακτηρίων

Τα οξυγαλακτικά είναι τα πιο σημαντικά βακτήρια για τις ζυμώσεις των τροφίμων είτε αυτές αφορούν τα γαλακτοκομικά προϊόντα, είτε άλλα τρόφιμα, όπως τα προϊόντα ζύμωσης του κρέατος, των λαχανικών και των δημητριακών. Οι καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται στις ζυμώσεις πρέπει να καλύπτουν προδιαγραφές από την άποψη τόσο της ασφάλειας, όσο και της τεχνολογικής απόδοσης. Επιπλέον, ανάλογα με τη συγκεκριμένη εφαρμογή (είδος τροφίμου), σημασία έχουν οι εξειδικευμένες ιδιότητες αυτών των μικροοργανισμών. Ως εκ τούτου, τα κριτήρια επιλογής των καλλιεργειών εξαρτώνται από τα χαρακτηριστικά της πρώτης ύλης, από τον τύπο και τα επιθυμητά χαρακτηριστικά του τελικού προϊόντος, καθώς και την εφαρμοζόμενη τεχνολογία. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια διαθέτουν ένα μακρόχρονο και ασφαλές ιστορικό εφαρμογής στα τρόφιμα (Carlice and Fitzgerald, 1999).

1.1.3 Εναρκτήριες καλλιέργειες οξυγαλακτικών βακτηρίων

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

1.1.4 *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363

Ο *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, ένα μεσόφιλο ομοζυμωτικό οξυγαλακτικό βακτήριο, είναι ένας πολύ σημαντικός βιομηχανικός μικροοργανισμός, με

εκτεταμένη και πολλαπλή χρήση στις ζυμώσεις τροφίμων. Στελέχη του *L. lactis* ssp. *cremoris* χρησιμοποιούνται ως εναρκτήριες καλλιέργειες σε συνδυασμό με άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια, για την παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων ζύμωσης. Από την μακροχρόνια εμπειρική εφαρμογή στα γαλακτοκομικά ζυμούμενα από τον άνθρωπο, ο *L. lactis* ssp. *cremoris* προσαρμόστηκε στο περιβάλλον του γάλακτος και συμβάλλει στη διαμόρφωση της γεύσης και της υφής των γαλακτοκομικών προϊόντων (Klein and Lortal, 1999; van Hylckama et al., 2006; van Kranenburg et al., 2002). Το 1985 οι «γαλακτοκομικοί στρεπτόκοκκοι» κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο νέα υποείδη του *L. lactis*: το είδος *L. lactis* ssp. *lactis* (πρώην *Streptococcus lactis*) και το είδος *L. lactis* ssp. *cremoris* (πρώην *Streptococcus cremoris*), ώστε να διαχωρίζονται από τους πραγματικούς στρεπτόκοκκους, που περιλαμβάνουν πολλά παθογόνα (Schleifer, 1987; Schleifer et al., 1985).

Ο *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 είναι ο αναγνωρισμένος μικροοργανισμός-μοντέλο για τη γενετική των οξυγαλακτικών βακτηρίων και η γνώση που αποκομίζεται συνεχώς από την έρευνα πάνω σε αυτό το στέλεχος έχει αξιοποιηθεί τόσο σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές, όσο και σε θέματα βασικής έρευνας. Το μητρικό στέλεχος του *L. lactis* είναι ο *L. lactis* NCDO712, του οποίου το πλασμιδιακό DNA αφαιρέθηκε, με εφαρμογή υπερϊώδους ακτινοβολίας, στις αρχές της δεκαετίας του 1980 (Gasson, 1983). Το στέλεχος που προέκυψε, ελεύθερο πλασμιδίων, είναι ο *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363, στέλεχος εύρωστο και επιδεκτικό σε γενετικές δοκιμές. Το γεγονός αυτό διευκολύνει κατά πολύ την ανάλυση των εισαγόμενων σε αυτό τμημάτων ομόλογου ή ετερόλογου DNA και έχουν αναπτυχθεί σύγχρονες τεχνικές για την έκφραση πρωτεϊνών και πεπτιδίων σε αυτό το στέλεχος. Ο *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 έχει χρησιμοποιηθεί ως κυτταρικό εργοστάσιο παραγωγής μιας μεγάλης ποικιλίας ετερόλογων προϊόντων. Η σημασία αυτών των εξελίξεων στον τομέα της βιοτεχνολογίας και της μικροβιολογικής έρευνας είναι τεράστια, καθώς πολλά από τα εργαλεία που αρχικά αναπτύχθηκαν για τον *L. lactis* φαίνεται ότι είναι εφαρμόσιμα σε όλα τα άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια (Kleerebezem et al., 1997). Η ανάλυση και η επεξεργασία του μεταβολισμού των λακτόκοκκων, έχει επικεντρωθεί στον *L. lactis* και έχει επιτρέψει εφαρμογές βιοχημικής μηχανικής για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, μέσω επαναπροσανατολισμού των μεταβολικών του οδών (de Vos and Hugenholtz, 2003; Smid et al., 2005).

1.2 Οξυγαλακτικά βακτήρια και στρες

Ως στρες μπορεί να οριστεί η μεταβολή στο γονιδίωμα, στις παραγόμενες πρωτεΐνες ή στο περιβάλλον, η οποία έχει ως συνέπεια τη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης ή η μείωση της επιβίωσης ενός μικροοργανισμού (Spano and Massa, 2006; Sugimoto et al., 2008). Παρ' όλο που το στρες είναι κάτι που αρχικά γίνεται αντιληπτό με την αρνητική έννοια, είναι μία από τις κινητήριες δυνάμεις της βακτηριακής εξέλιξης και προσαρμογής, προκαλώντας το φαινόμενο της βιοποικιλότητας και τη δημιουργία νέων ειδών.

Οι επεξεργασίες παραγωγής τροφίμων υποβάλλουν τους μικροοργανισμούς σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες (οξίνιση, θέρμανση ή ψύξη, οξειδωτικό ή ωσμωτικό στρες, ασιτία, τοξικές ενώσεις κ.τ.λ.) στις οποίες ανταποκρίνονται με την ανάπτυξη μηχανισμών προσαρμογής (van de Guchte et al., 2002) οι οποίοι με τη σειρά τους επηρεάζουν την επιβίωση και την τεχνολογική απόδοση των βακτηρίων. Οι παράγοντες που προκαλούν το στρες μπορεί να είναι χημικοί, φυσικοί ή βιολογικοί. Κάποιοι σχετίζονται με το περιβάλλον, όπως η θερμοκρασία, η ωσμωτική πίεση, το pH, η συγκέντρωση αιθανόλης και το διαθέσιμο οξυγόνο, ενώ άλλοι μπορεί να προέρχονται από τον ίδιο το μικροοργανισμό, όπως η οξύτητα, η χαμηλή διαθεσιμότητα σε θρεπτικά συστατικά ως συνέπεια του μεταβολισμού και η παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (van de Guchte et al. 2002; Miyoshi et al. 2003; Spano and Massa 2006; Bruno-Bárcena et al. 2010).

Συνεπώς, τόσο η φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων, όσο και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν το μηχανισμό απόκρισης στο στρες. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν αναπτύξει μηχανισμούς ώστε να ανιχνεύουν το στρες και να ενεργοποιούν άμυνες, που τους επιτρέπουν να αντέξουν τις αντίξοες συνθήκες ή τις απότομες μεταβολές του περιβάλλοντός τους (van de Guchte et al., 2002; Spano and Massa, 2006; Lorca and Font de Valdez, 2009).

Εξαιτίας της μεγάλης βιομηχανικής αλλά και της οικονομικής σημασίας των οξυγαλακτικών βακτηρίων, η μελέτη της απόκρισής τους στα διάφορα στρες είναι εξαιρετικά σημαντική, καθώς διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη της οργανοληπτικής ποιότητας και της υγιεινής των προϊόντων ζύμωσης. Προκειμένου λοιπόν να ολοκληρωθεί η ζύμωση και να αναπτυχθεί το επιθυμητό τελικό προϊόν, είναι απαραίτητο οι μικροοργανισμοί αυτοί να μπορούν να αντισταθούν στις

δυσμενείς συνθήκες που απαντώνται στις βιομηχανικές διεργασίες, όπως για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια του χειρισμού και της αποθήκευσης των εναρκτηρίων καλλιεργειών. Η ανάπτυξη νέων εφαρμογών, όπως τα ζωντανά εμβόλια και τα προβιοτικά τρόφιμα ενισχύει την ανάγκη για ανθεκτικά οξυγαλακτικά βακτήρια, καθώς αυτά θα πρέπει να επιβιώσουν μέσα στην πεπτική οδό, να ανταγωνιστούν στην εντερική μικροχλωρίδα και, τελικά να αποικίσουν τον πεπτικό ή τον ουρογεννητικό βλεννογόνο. Επιπλέον, τα βακτήρια δεν εκτίθενται μόνο σε δυνητικά στρεσογόνες περιβαλλοντικές αλλαγές στις βιομηχανικές διεργασίες, αλλά και στη φύση, όπου η ικανότητα ταχείας απόκρισης στα διάφορα στρες είναι απαραίτητη για την επιβίωσή τους (Stortz et al., 2000).

Παρά το γεγονός ότι ένας μικροοργανισμός θα μπορούσε, θεωρητικά, να έχει συγκεκριμένα ρυθμιστικά δίκτυα συνυφασμένα με κάθε γονιδίο του και να προσαρμόζει την έκφρασή τους ανάλογα με το περιβάλλον, κάτι τέτοιο θα αποτελούσε ένα τεράστιο γενετικό φορτίο. Αντί για αυτό, τα ρυθμιστικά δίκτυα συνήθως ελέγχουν ταυτόχρονα αρκετά γονίδια και κάποιες φορές ελέγχουν και άλλα ρυθμιστικά δίκτυα (VanBogelen et al., 1999). Οι βακτηριακές αποκρίσεις στο στρες βασίζονται στη συγχρονισμένη έκφραση των γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων τροποποιούν διάφορες κυτταρικές διαδικασίες (κυτταρική διαίρεση, μεταβολισμός DNA, σύνθεση μεμβρανών κλπ) και δρουν συντονισμένα, ώστε να βελτιωθεί η βακτηριακή αντοχή στο στρες (Stortz et al., 2000). Η ενεργοποίηση αυτών των αποκρίσεων επιτυγχάνεται μέσω των ρυθμιστικών δικτύων.

Η αναγνώριση των γονιδίων που συμμετέχουν στις αποκρίσεις του στρες είναι πολύ σημαντική, όταν ο στόχος είναι ο έλεγχος και η πρόβλεψη της συμπεριφοράς των οξυγαλακτικών βακτηρίων, σε συνθήκες στρες. Η τρέχουσα γνώση για τις αποκρίσεις στα περιβαλλοντικά στρες των οξυγαλακτικών βακτηρίων ποικίλλει μεταξύ των ειδών και ανάλογα με τον τύπο του στρες (van de Guchte et al. 2002).

1.2.1 'Οξινο στρες

Η ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων χαρακτηρίζεται από την παραγωγή όξινων τελικών προϊόντων ζύμωσης, που συσσωρεύονται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Η παραγωγή οργανικών οξέων δημιουργεί ένα δυσμενές περιβάλλον για πολλούς άλλους μικροοργανισμούς με το χαρακτηριστικό αυτό να είναι η βάση

πολυάριθμων μεθόδων συντήρησης ζυμούμενων τροφίμων. Με την άνοδο στον τομέα των προβιοτικών τροφίμων, το όξινο στρες είναι το πιο βασικό στρες που θα αντιμετωπίσουν τα οξυγαλακτικά βακτήρια, όταν φτάσουν στο περιβάλλον του στομάχου, λόγω της παρουσίας του υδροχλωρικού οξέος.

Εκτός από κάποια είδη των γενών *Lactobacillus*, *Leuconostoc* και *Oenococcus*, τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι ουδετερόφιλα, με βέλτιστο pH μεταξύ 5 και 9. Οι επιπτώσεις του όξινου στρες στη φυσιολογία τους δεν είναι γνωστές λεπτομερώς. Είναι όμως γνωστό ότι τα οξέα διαχέονται παθητικά μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και, μετά την είσοδό τους στο κυτταρόπλασμα, δίστανται σε πρωτόνια και τα αντίστοιχα ανιόντα, στα οποία η κυτταρική μεμβράνη είναι αδιαπέραστη (De Angelis and Gobbetti, 2004). Η ενδοκυτταρική συσσώρευση πρωτονίων μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του ενδοκυτταρικού pH και, με αυτόν τον τρόπο, να επηρεάσει τη διαμεμβρανική διαφορά pH (ΔpH), η οποία συνεισφέρει στην πρωτονιογενετική δύναμη (Proton Motive Force, PMF), και καθορίζεται από τη διαβάθμιση της συγκέντρωσης πρωτονίων εκατέρωθεν μιας μεμβράνης. Η δύναμη αυτή αποτελεί πηγή ενέργειας για τα βακτήρια, μεταβάλλει τις ενζυμικές δραστηριότητες, μετουσιώνει τις πρωτεΐνες και καταστρέφει τα νουκλεϊκά οξέα (Champomier-Verges et al., 2002). Η εσωτερική οξίνιση, επίσης, μειώνει τη δραστηριότητα ενζύμων ευαίσθητων στις όξινες συνθήκες και προξενεί βλάβες στις πρωτεΐνες και στο DNA.

Έρευνες πάνω στις αποκρίσεις προσαρμογής των γαλακτοβακίλλων στο όξινο στρες, έχουν δείξει την επαγωγή ενός μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών όξινου στρες (Acid Stress Proteins, ASP) αλλά επίσης και κάποιων πρωτεϊνών θερμικού στρες (Heat Shock Proteins, HSP) αν και η ταυτότητα των πρωτεϊνών αυτών διαφέρει από είδος σε είδος (De Angelis and Gobbetti, 2004).

1.2.2 Στρες χαμηλής θερμοκρασίας

Ανάλογα με τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους, τα οξυγαλακτικά βακτήρια θεωρούνται είτε μεσόφιλα, είτε θερμόφιλα. Κατά τη διάρκεια των βιομηχανικών επεξεργασιών, όπως είναι η αποθήκευση σε κατάψυξη των εναρκτήριων καλλιιεργειών, οι χαμηλές θερμοκρασίες ζύμωσης κατά την ωρίμανση των τυριών και η αποθήκευση σε ψύξη των προϊόντων ζύμωσης, τα οξυγαλακτικά βακτήρια εκτίθενται σε θερμοκρασίες πολύ χαμηλότερες των βέλτιστων

θερμοκρασιών ανάπτυξης (De Angelis and Gobbetti, 2004). Η καλύτερη επιβίωσή τους κατά την κατάψυξη και τις ψυχρές μεταχειρίσεις συνεισφέρει στη βιομηχανική απόδοση των στελεχών, οπότε η κατανόηση των αποκρίσεων στις χαμηλές θερμοκρασίες μπορεί να οδηγήσει στην βελτιστοποίηση των διεργασιών ζύμωσης, της αποθήκευσης των προϊόντων και των συνθηκών συντήρησης.

Όταν ζωντανά κύτταρα εκτίθενται σε θερμοκρασιακή μεταβολή προς χαμηλότερες θερμοκρασίες, υφίστανται σημαντικές φυσιολογικές μεταβολές, όπως μείωση της ρευστότητας της κυτταρικής μεμβράνης και σταθεροποίηση δευτερογενών δομών RNA και DNA, με συνέπεια τη μειωμένη αποδοτικότητα της μετάφρασης, μεταγραφής και αντιγραφής του DNA. Για να ξεπεράσουν αυτές τις δυσκολίες, οι μικροοργανισμοί έχουν αναπτύξει μια βραχυπρόθεσμη απόκριση προσαρμογής σε χαμηλές θερμοκρασίες. Ο *L. lactis* ssp. *cremoris*, στη φάση εκθετικής ανάπτυξης, συνεχίζει να αναπτύσσεται με μειωμένο ρυθμό, μετά από πτώση της θερμοκρασίας 20°C κάτω από τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης, ενώ μεγαλύτερη πτώση θερμοκρασίας οδηγεί στην αναστολή της αύξησής του (van de Guchte et al., 2002).

1.2.3 Θερμικό στρες

Το κύριο πρόβλημα που αντιμετωπίζουν τα κύτταρα στις υψηλές θερμοκρασίες, είναι η μετουσίωση των πρωτεϊνών και η ακόλουθη συσσωμάτωσή τους (Somero, 1995). Επιπλέον, παρατηρείται αποσταθεροποίηση μακρομορίων, όπως είναι τα ριβοσώματα και το RNA, καθώς και μεταβολές στη ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης (Earnshaw et al., 1995; Teixeira et al., 1997; Hansen et al., 2001).

Η απόκριση στο θερμικό σοκ έχει μελετηθεί στο *E. coli* και στον *B. subtilis*, τους μικροοργανισμούς-μοντέλα των αρνητικών και των θετικών κατά Gram βακτηρίων, αντίστοιχα (Whitaker et al., 1991). Φυσιολογικές μελέτες στα οξυγαλακτικά βακτήρια (π.χ. *L. lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus faecalis*, *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus bulgaricus*) έχουν δείξει ότι οι αντίστοιχες αποκρίσεις τους είναι όμοιες με αυτές των άλλων θετικών κατά Gram βακτηρίων.

Επιπλέον, παρατηρείται το φαινόμενο, πολλές από τις πρωτεΐνες που παράγονται κατά το θερμικό στρες, να παράγονται και κατά το ωσμωτικό στρες (van de Guchte et al., 2002).

1.2.4 Ασιτία

Τα βακτήρια καταναλώνουν τον περισσότερο χρόνο τους στη στατική φάση. Η αναστολή της ανάπτυξής τους και η είσοδος στη στατική φάση μπορεί να προκληθεί από πολλές στρεσογόνες συνθήκες, όπως είναι οι χαμηλές ή οι υψηλές θερμοκρασίες, η ωσμωτική πίεση, το οξειδωτικό ή το όξινο στρες, καθώς και η ασιτία. Από όλες αυτές τις καταστάσεις, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών είναι η πιο συχνή, καθώς η βακτηριακή ανάπτυξη από μόνη της συμβάλλει στην εξάλειψη των θρεπτικών συστατικών από το περιβάλλον μέσο. Ακόμα, κάποιες ακραίες συνθήκες περιβάλλοντος, εκτός από τις άμεσες συνέπειες στα κύτταρα, μπορούν επίσης να τους στερήσουν θρεπτικές ουσίες. Για παράδειγμα, ακραίες όξινες συνθήκες μπορεί να μειώσουν την ενεργότητα κάποιων μεταφορέων, επομένως να ελαττώσουν τη διαθεσιμότητα σημαντικών θρεπτικών συστατικών. Έτσι, οι στρεσογόνες συνθήκες μπορούν να προκαλέσουν, εμμέσως, ασιτία ή απώλεια ενέργειας για το κύτταρο, ανεξάρτητη από την εξωκυτταρική ποσότητα υποστρώματος (Poolman et al., 1987; Konings et al., 1997). Αυτές οι καταστάσεις ενέργειας ή στέρξης σημαντικών συστατικών, μπορούν να γίνουν επιβλαβείς για τη μακροπρόθεσμη ζωτικότητα του κυττάρου.

Πολλά βακτήρια, όμως, έχουν προσαρμοστεί, ώστε να επιβιώνουν στην παρατεταμένη ασιτία. Κάποια βακτήρια μπορούν και εισέρχονται σε μια διαδικασία σχηματισμού σπορίων, ανθεκτικών στο στρες. Άλλα, συμπεριλαμβανομένων και των οξυγαλακτικών βακτηρίων, δε διαθέτουν αυτήν την ικανότητα, αλλά αναπτύσσουν άλλες στρατηγικές. Σε αυτά τα βακτήρια, η έλλειψη θρεπτικών στοιχείων που οδηγεί στην αναστολή της ανάπτυξης γενικά είναι συνυφασμένη με τη μεταβολή της μορφολογίας του κυττάρου.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι μια ετερογενής ομάδα, που αναπτύσσεται σε διαφορετικά μέσα, επομένως, δεν αντιμετωπίζουν πανομοιότυπες καταστάσεις ασιτίας, γι' αυτό και υπάρχει ποικιλία στις αποκρίσεις τους. Γενικά, οι μηχανισμοί αντοχής τους διαφέρουν από αυτούς που έχουν περιγραφεί για το *E.coli* και τον *B.subtilis*. Η επιβίωση των οξυγαλακτικών βακτηρίων στη στατική φάση στηρίζεται στην ικανότητα που έχουν να διατηρούν μια ενεργή μεταβολική κατάσταση. Στη φάση αυτή, η ρύθμιση του μεταβολισμού τους, με έμφαση στον καταβολισμό των αμινοξέων, είναι πολύ σημαντική. Τέλος, όπως συμβαίνει και σε άλλες στρεσογόνες

συνθήκες, η έλλειψη γλυκόζης μπορεί να επάγει ανθεκτικότητα σε πολλά άλλα στρες (van de Guchte et al., 2002).

1.2.5 Ωσμωτικό στρες

Για να προκύψει ο ενεργός μεταβολισμός στο κύτταρο, πρέπει οι ενδοκυτταρικές συνθήκες να παραμένουν σχετικά σταθερές, ως προς την ιονική ισχύ, το pH και τα επίπεδα των μεταβολιτών (Csonka et al., 1991). Επιπροσθέτως, η διατήρηση συνεχούς θετικής πίεσης που ασκεί το εσωτερικό του κυττάρου στο κυτταρικό τοίχωμα, λόγω ωσμωτικής πίεσης, θεωρείται η κινητήρια δύναμη για τη σπαργή του κυττάρου. Καθώς το νερό μπορεί να εισέρχεται και να εξέρχεται από το κύτταρο, μια αλλαγή στην ωσμωμοριακότητα του περιβάλλοντος θα μπορούσε να επηρεάσει ταχύτατα ουσιώδεις κυτταρικές λειτουργίες, οπότε το βακτήριο θα πρέπει να προσαρμοστεί στην αλλαγή αυτή, για να επιζήσει. Γενικά, σε υπερτονικές συνθήκες, το κύτταρο συσσωρεύει ωσμωλύτες, είτε με πρόσληψη από το περιβάλλον ή μέσω της απευθείας σύνθεσής τους, για να εξισορροπήσει τη διαφορά ωσμωμοριακότητας. Εκτός από την επίδρασή τους στην ωσμωτική ισορροπία, οι ωσμωλύτες μπορούν, επίσης, να σταθεροποιήσουν κάποια ένζυμα και να παρέχουν, επομένως, προστασία από το ωσμωτικό στρες, αλλά και από τις υψηλές θερμοκρασίες, την ψύξη, την κατάψυξη, την απόψυξη και την ξήρανση (Kets et al., 1996; Poolman et al., 1998; Panoff et al., 2000).

Στις πολλαπλές εφαρμογές τους στη βιομηχανία τροφίμων, τα οξυγαλακτικά βακτήρια μπορεί να εκτεθούν σε ωσμωτικό στρες, όταν προστεθούν στο προϊόν σημαντικές ποσότητες αλατιού ή ζάχαρης. Αντίθετα με τον *B. subtilis*, τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν περιορισμένη ή και καθόλου ικανότητα σύνθεσης ωσμωλυτών (Poolman et al., 1998), οπότε βασίζονται πρωτίστως στην πρόσληψη τέτοιων ενώσεων από το θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας. Η διαδικασία αυτή, η οποία διασφαλίζει μία ταχεία απόκριση στο στρες από τη μεταβολή των ωσμωτικών συνθηκών, έχει μελετηθεί κυρίως στο *Lactobacillus plantarum* και στον *L. lactis*.

Έχει παρατηρηθεί ότι το KCl και το NaCl αναστέλλουν την ανάπτυξη των προαναφερθέντων βακτηρίων πολύ περισσότερο από ισομοριακές συγκεντρώσεις σακχαρόζης ή λακτόζης. Η γλυκίνη-βεταΐνη έχει επαγωγική δράση μόνο σε περιπτώσεις ωσμωτικού στρες που προκαλείται από αλάτι. Αυτό μπορεί να

ερμηνευθεί από το γεγονός ότι η σακχαρόζη και η λακτόζη επιβάλλουν ένα προσωρινό μόνο ωσμωτικό στρες, καθώς οι εξωτερικές και οι εσωτερικές συγκεντρώσεις σακχάρων έρχονται σε ισορροπία γρήγορα (Glaasker et al., 1998). Σε αντίθεση με το *E. coli*, στο οποίο η ταχεία συσσώρευση ιόντων K^+ συνιστά μια πρώτη απόκριση σε υπερωσμωτικό στρες, ο *L. lactis* είναι ανίκανος να αντιδράσει επαρκώς με συσσώρευση ιόντων K^+ και Na^+ σε επίπεδα μεγαλύτερα από αυτά που υπάρχουν ήδη στο αρχικό κύτταρο.

Όταν το θρεπτικό μέσο εμφανίζει υψηλή ωσμωμοριακότητα, παρατηρείται συσσώρευση των αμινοξέων γλουταμινικό οξύ και προλίνη, καθώς και του τετραεδρικού αμμωνίου, που είναι συστατικό της γλυκίνης-βεταΐνης, όταν αυτή παρέχεται στο υπόστρωμα. Στην περίπτωση που αυτή δεν παρέχεται, τότε η συσσώρευση γλουταμινικού οξέος και προλίνης είναι πολύ μεγαλύτερη.

Η γλυκίνη-βεταΐνη, η οποία αυξάνει τελικά την ωσμωανθεκτικότητα στο *L. lactis*, υπόκειται σε ωσμωρύθμιση σε δύο επίπεδα, έκφρασης γονιδίων και ενεργού μεταφοράς. Έχουν ταυτοποιηθεί τα γονίδια που κωδικοποιούν αυτό το σύστημα μεταφοράς, και συγκεκριμένα έναν ABC μεταφορέα (Obis et al., 1999; Bouvier et al., 2000; Van der Heide et al., 2000), καθώς και ένα μεταγραφικό ρυθμιστή της έκφρασής του, που ονομάζεται OpuA ή BusR (Romeo et al., 2003).

Μεγάλο μέρος των πρωτεϊνών που παράγονται κατά το ωσμωτικό στρες, είναι ίδιο με αυτές που παράγονται κατά το στρες θέρμανσης, παρ' ότι οι παράγοντες της επαγωγής είναι διαφορετικοί (Kilstrup et al., 1997).

Τέλος, εκτός από το ρυθμό ανάπτυξης και τη λιπιδιακή σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης, η ωσμωμοριακότητα του θρεπτικού μέσου της καλλιέργειας μπορεί να επηρεάσει τους εξωπολυσακχαρίτες που συνθέτει ο *L. lactis*, καθώς και την παραγωγή βακτηριοσίνης (Liu et al., 1998; Uguen et al., 1999).

1.2.6 Συμπεράσματα για το στρες και τις αποκρίσεις των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Συμπερασματικά, φαίνεται ότι η κυτταρική μεμβράνη διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αντοχή στους διάφορους τύπους στρες. Εν πρώτοις, η ίδια η μεμβράνη μπορεί να μεταβληθεί, έτσι ώστε το κύτταρο να προσαρμοστεί στις περιβαλλοντικές συνθήκες και αυτές οι μεταβολές να συνεισφέρουν στην προστασία

του βακτηρίου. Επιπλέον, στην κυτταρική μεμβράνη λαμβάνουν χώρα πολλές διαδικασίες που σχετίζονται με την επαγωγή ανθεκτικότητας, οι οποίες δεν τροποποιούν άμεσα τη δομή της λιπιδικής διπλοστοιβάδας. Ένα πλήθος πρωτεϊνών, για παράδειγμα πρωτεΐνες που δρουν ως μεταφορείς και αισθητήρες, συνδέονται με την κυτταρική μεμβράνη και παίζουν και αυτές ρόλο στην επαγωγή ανθεκτικότητας στα διάφορα στρες.

Όπως και σε άλλα βακτήρια, έτσι και στα οξυγαλακτικά, οι αποκρίσεις στους διάφορους τύπους στρες είναι μια συνηθισμένη λειτουργία. Η αλληλοεπικάλυψη της ανθεκτικότητας σε πολλαπλά στρες (cross-protection) δίνει πολλά πλεονεκτήματα, όταν τα βακτήρια εκτίθενται σε συνδυασμό από διαφορετικούς τύπους στρες, όμως διαφέρει από είδος σε είδος. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι μοριακές βάσεις των αποκρίσεων προσαρμογής είναι εξειδικευμένες, ή τουλάχιστον σε κάποιο ποσοστό, ανά είδος ή ακόμα και ανά υποείδος (species or subspecies specific). Είναι απαραίτητες περαιτέρω μελέτες των γονιδίων που επάγονται κατά την προσαρμογή, ώστε να αποσαφηνιστεί η εξειδίκευση αυτή και το αν αυτή συσχετίζεται με τον περιβάλλον ανάπτυξης και το γενικότερο τρόπο διαβίωσης των βακτηρίων.

1.3 Σημασία της μελέτης και της κατανόησης των αποκρίσεων στα στρες των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν ζωτική σημασία στην παραγωγή τροφίμων και στην ανθρώπινη υγεία, ενώ, αντίθετα, άλλα θετικά κατά Gram βακτήρια μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες, από τερηδόνα στα δόντια έως πιθανώς θανατηφόρες γαστρεντερικές μολύνσεις. Η απόκριση στους διάφορους τύπους στρες θεωρείται μια λειτουργική ιδιότητα και, άρα, ένα ωφέλιμο γνώρισμα για τις εναρκτήριες οξυγαλακτικές καλλιέργειες, όμως μια τέτοια ιδιότητα θα επέτρεπε την επιβίωση παθογόνων, όπως είναι η *Listeria monocytogenes*, καθιστώντας την ιδιότητα αυτή μολυσματικό παράγοντα. Οι αποκρίσεις στους διάφορους τύπους στρες των βιομηχανικά σημαντικών οξυγαλακτικών βακτηρίων και των προβιοτικών θεωρούνται ωφέλιμες, διότι αυτά χρησιμοποιούνται εδώ και χιλιάδες χρόνια στην παραγωγή τροφίμων, ενώ δε φαίνεται παρουσία μολυσματικών παραγόντων και υπάρχει χαμηλό ποσοστό συσχέτισής τους με ανθρώπινες μολύνσεις (Franz et al., 2010).

Υπάρχουν δύο στρατηγικές που μπορούν να υιοθετηθούν, για να εξασφαλιστεί ότι οι οξυγαλακτικές καλλιέργειες ή τα προβιοτικά στελέχη όντως επιβιώνουν και, μάλιστα, σε μεγάλο βαθμό, ώστε να διατηρούν τα λειτουργικά χαρακτηριστικά τους. Σύμφωνα με την πρώτη, η επιβίωσή τους ενισχύεται με κατάλληλο σχεδιασμό μεθόδων μεταχείρισης, αποθήκευσης ή παραγωγής και σύμφωνα με τη δεύτερη, με διαλογή των ανθεκτικών στελεχών, τα οποία θα επιβιώσουν στις συνθήκες που θα συναντήσουν, από την παραγωγή μέχρι την τελική εφαρμογή. Μία πιο ευρεία στρατηγική, περιλαμβάνει τις δύο προηγούμενες, δηλαδή, επιλογή στελεχών που είναι σχετικά ανθεκτικά και προσαρμογή των συνθηκών μεταχείρισης, αποθήκευσης και παραγωγής, για να καταστεί ικανή η επαρκής επιβίωση (Franz et al., 2010).

1.4 Μελέτη μικροοργανισμών με χρήση υπέρυθρης φασματοσκοπίας με μετασχηματισμό κατά Fourier (FT-IR)

1.4.1 Υπέρυθη φασματοσκοπία με μετασχηματισμό κατά Fourier (FT-IR)

Η υπέρυθη φασματοσκοπία (Infra Red spectroscopy-IR) αποτελεί μια από τις πλέον σημαντικές φασματοσκοπικές τεχνικές με πολλές εφαρμογές. Τα φάσματα μπορούν να λαμβάνονται σχετικά εύκολα και να συγκρίνονται μεταξύ τους σε όλο το εύρος τους ή σε μεμονωμένες περιοχές ανάλογα με την περίπτωση και τον πειραματικό σχεδιασμό.

Η υπέρυθη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος βρίσκεται μεταξύ του ορατού τμήματος και της περιοχής των μικροκυμάτων (0,75-1000 μm) και χωρίζεται σε τις τρεις βασικές περιοχές: την άπω υπέρυθη (Far IR, 50-1000 μm), τη μέση υπέρυθη (Mid IR 2,5-50 μm) και την εγγύς υπέρυθη (Near IR, 0,75-2,5 μm). Συμήθως όμως στην υπέρυθη ακτινοβολία αντί του μήκους κύματος ή της συχνότητας χρησιμοποιείται η έννοια του κυματαριθμού, ο οποίος ορίζεται ως το πηλίκο της συχνότητας της ακτινοβολίας προς την ταχύτητα του φωτός. Με βάση τα παραπάνω, η συνήθως χρησιμοποιούμενη περιοχή του MIR καλύπτει την περιοχή 4000-400 cm^{-1} (με πλέον αξιοποιήσιμη αυτή από 4000-600 cm^{-1}). Στην περιοχή 4000-600 cm^{-1} , η ευαισθησία του φασματοφωτόμετρου είναι περιορισμένη και οι εντάσεις των απορροφήσεων πολύ μικρές, με αποτέλεσμα να υπάρχουν προβλήματα στα

φάσματα απορρόφησης (Davis and Mauer, 2010). Η αδυναμία αυτή των κοινών φασματοφωτομέτρων υπερνικήθηκε με τη φασματοσκοπία IR με μετασχηματισμό κατά Fourier (Fourier Transform Infra Red spectroscopy, FT-IR).

Η φασματοσκοπία FT-IR στηρίζεται στην απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας, η οποία προκαλεί διέγερση των ατόμων ενός μορίου. Όταν ένα μόριο απορροφά υπέρυθρη ακτινοβολία, η μοριακή δόνηση που έχει συχνότητα ίδια με εκείνη της ακτινοβολίας αυξάνει το πλάτος της (διεγείρεται). Κάθε συχνότητα δηλαδή που απορροφάται από ένα μόριο αντιστοιχεί σε μια προκαθορισμένη μοριακή κίνηση και συνεπώς να μπορούν να διαπιστωθούν οι κινήσεις του μορίου μελετώντας το φάσμα IR. Οι κινήσεις αυτές οφείλονται σε διεγέρσεις δονήσεως, παραμόρφωσης και περιστροφής των δεσμών των μορίων. Από την ερμηνεία αυτών των κινήσεων μπορεί να εξαχθούν συμπεράσματα σε σχέση με το είδος των δεσμών και των λειτουργικών (χαρακτηριστικών) ομάδων που υπάρχουν στο μόριο (Le Gal et al., 1991).

Όταν εφαρμόζεται σε ολόκληρα μικροβιακά κύτταρα, το φάσμα υπέρυθρου που προκύπτει περιέχει ποιοτικές πληροφορίες για την ολική βιοχημική σύσταση του κυττάρου. Πιο συγκεκριμένα, τα φάσματα βακτηρίων περιέχουν πληροφορίες για τη σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταρικής μεμβράνης (φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα, πεπτιδογλυκάνη, λιποπολυσακχαρίτες), όσο και του κυτταροπλάσματος (λιπαρά οξέα, πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και νουκλεϊνικά οξέα) (Helm et al., 1991, Naumann et al., 1991). Για το λόγο αυτό, η φασματοσκοπία FT-IR έχει βρει εφαρμογή στην ανίχνευση και ταυτοποίηση διαφόρων βακτηρίων όπως των γενών *Lactobacillus* (Oust et al., 2004a, Bosch et al., 2006), *Enterococcus* (Kirshner et al., 2001, Sandt et al., 2006), *Streptococcus* (Van der Mei et al., 1993) καθώς και του γένους *Pseudomonas* (Al-Qadiri et al., 2006a).

1.4.2 Χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR για τη μελέτη μικροοργανισμών

Το 1952 έγινε μια πρώτη προσπάθεια χρήσης της φασματοσκοπίας FT-IR για τη μελέτη βιολογικού υλικού όταν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα φάσματα διαφορετικών βακτηρίων, οι οποίες συνέβαλλαν στην ταυτοποίηση των βακτηρίων αυτών (Stevenson and Bolduan, 1952). Για πολλά χρόνια όμως δεν υπήρξαν άλλες μελέτες στην κατεύθυνση αυτή, με αποτέλεσμα επόμενη χρήση της

φασματοσκοπίας FT-IR για μελέτη βιολογικού υλικού να πραγματοποιηθεί πολλά χρόνια αργότερα (Nichols et al., 1985). Στην περίπτωση αυτή, η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε σε μια προσπάθεια μελέτης πολλών διαφορετικών ειδών βακτηρίων, τη δημιουργία μιας βάσης δεδομένων σύμφωνα με τα φάσματά τους και τη χρησιμοποίηση αυτής για τη γρήγορη αξιολόγηση της ύπαρξης των ίδιων ειδών σε περιβάλλοντικά δείγματα. Στα επόμενα χρόνια ακολούθησε η μελέτη της δομής των λιποπολυσακχαριτών και των λιπιδίων συνθετικών κυτταρικών μεμβρανών των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων με χρήση της φασματοσκοπίας FT-IR (Naumann et al., 1988). Λίγα χρόνια αργότερα η ίδια ομάδα ερευνητών χρησιμοποίησε την ίδια τεχνική για την *in vivo* μελέτη των κυτταρικών μεμβρανών ζωντανών αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Schultz and Naumann, 1991). Παράλληλα έγιναν μελέτες για χρήση της μεθόδου στην ταυτοποίηση μικροοργανισμών (Lipkus et al., 1990, Helm et al., 1991).

Με βάση τα παραπάνω είναι φανερό ότι στις αρχές της δεκαετίας του 1990 άρχισε να γίνεται όλο και πιο ευρεία η χρήση της τεχνικής για τη μελέτη των μικροοργανισμών. Πράγματι, στελέχη του είδους *Caulobacter crescentus*, ενός είδους που απαντάται ευρέως στο φυσικό περιβάλλον και είναι γνωστό για τις προσδετικές του ικανότητες σε διάφορες επιφάνειες, μελετήθηκαν με FT-IR. Μάλιστα η μελέτη αυτή χρησιμοποίησε τα φάσματα για την παρακολούθηση της προσκόλλησης/πρόσδεσης του βακτηρίου σε επιφάνειες και τη δημιουργία βιο-υμενίων (Nivens et al., 1993). Την ίδια περίοδο μελετήθηκαν διαφορές στα φάσματα του βακτηρίου *Bradyrhizobium japonicum* ανάλογα με τις συνθήκες καλλιέργειάς του (Zeroual et al., 1994), ανοίγοντας το δρόμο για μια ακόμη προοπτική στη χρήση της τεχνικής.

Ακολούθησαν και άλλες μελέτες για την ταυτοποίηση βακτηρίων με FT-IR (Van der Mei et al., 1993, Goodacre et al., 1996). Μάλιστα υπήρξε και μελέτη για την ταυτοποίηση ζυμών σχετικών με τα τρόφιμα (Kummerle et al., 1998). Σημαντικό όμως βήμα για τη διάδοση της τεχνικής ήταν η συνειδητοποίηση της πιθανής εκτεταμένης χρήσης της στην ιατρική βιολογία (Franck et al., 1998) για τη μελέτη κυττάρων αλλά και ολόκληρων ιστών. Επίσης, υπάρχει και μελέτη, στην οποία έγινε ποσοτικοποίηση των πληθυσμών διαφορετικών μικροοργανισμών σε μίγματα με χρήση FT-IR (Oberreuter et al., 2002) και μάλιστα αποδείχτηκε ότι είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση με την προϋπόθεση ότι η συγκέντρωση των κυττάρων δεν είναι ιδιαίτερα χαμηλή.

Τα τελευταία χρόνια οι αναφορές χρήσης της φασματοσκοπίας FT-IR για τη μελέτη βιολογικού υλικού και συγκεκριμένα μικροοργανισμών συνεχώς αυξάνονται. Η φασματοσκοπία FT-IR χρησιμοποιείται σήμερα κυρίως για τη διάκριση βακτηρίων που βρίσκονται στα τρόφιμα αλλά και την ταυτοποίηση μικροοργανισμών. Σε μικρότερη κλίμακα χρησιμοποιείται για τη μελέτη αλλαγών των συστατικών της κυτταρικής μεμβράνης και του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων από περιβαλλοντικές αλλαγές ή από τη δράση αντιμικροβιακών ενώσεων, ακτινοβολίας και διαφορετικών θρεπτικών υποστρωμάτων (Davis and Mauer, 2010). Πιο συγκεκριμένα, η φασματοσκοπία FT-IR έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των βιοχημικών χαρακτηριστικών διαφορετικών φαινοτύπων όξινης ανθεκτικότητας του *S. macedonicus* παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες για τις μεταβολές των κυτταρικών συστατικών (Papadimitriou et al., 2008). Η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση μεταβολών στα κύρια κυτταρικά συστατικά του παθογόνου στελέχους *Salmonella typhimurium* SL 1433, έπειτα από τη δράση αντιμικροβιακών ενώσεων, παραγόμενων από οξυγαλακτικά βακτήρια, στα κύτταρα του ευαίσθητου στελέχους (Zoumproulou et al., 2010). Επίσης, συστηματικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί από την ερευνητική ομάδα Al-Qadiri et al. σχετικά με τη μελέτη της μεταβολής των κυτταρικών συστατικών με τη μέθοδο FT-IR. Ενδεικτικά αναφέρονται η επίδραση της χλωρίωσης στα βακτήρια *E. coli* και *Pseudomonas aeruginosa*, τα οποία εντοπίζονται στο νερό (Al-Qadiri et al., 2008a) και η επίδραση της θερμικής επεξεργασίας στα κυτταρικά συστατικά των *Salmonella enteritica* και *Listeria monocytogenes* (Al-Qadiri et al., 2008b).

1.5 Σκοπός της μελέτης και πειραματικός σχεδιασμός

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε έχοντας σαν στόχο τη διερεύνηση των πιθανών μεταβολών της σύστασης των κυττάρων του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 κατά την προσαρμογή του σε διάφορες συνθήκες στρες με την εφαρμογή φασματοσκοπίας FT-IR. Τα περιβαλλοντικά στρες που εφαρμόστηκαν ήταν το όξινο στρες (pH 5.5), το ωσμωτικό στρες (παρουσία 2.5% w/v NaCl), καθώς επίσης και η εφαρμογή υψηλότερης (45°C) ή χαμηλότερης (20°C) θερμοκρασίας επώασης από τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Επιπλέον, μελετήθηκαν και δύο συνθήκες ασιτίας, η έλλειψη θρεπτικών συστατικών (θρεπτικό μέσο χωρίς

γλυκόζη) όσο και η έλλειψη όλων των συστατικών (χρήση ρυθμιστικού διαλύματος). Η προσαρμογή των βακτηρίων σε συνθήκες στρες είναι συνήθως ένα γρήγορο φαινόμενο που λαμβάνει χώρα στα πρώτα λεπτά έκθεσης του μικροοργανισμού στις μη βέλτιστες συνθήκες. Για το λόγο αυτό, επιλέξαμε ως χρόνο έκθεσης του *L. lactis* στα στρες που προαναφέρθηκαν, τη 1 h.

Η διεξαγωγή των πειραμάτων άρχισε με το φαινοτυπικό χαρακτηρισμό των συνθηκών προσαρμογής του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 στα διάφορα στρες, ενώ εν συνεχεία λήφθηκε το φάσμα FT-IR τόσο των φυσιολογικών όσο και των προσαρμοσμένων στο στρες κυττάρων. Κάθε φάσμα αποτελείται από πολλαπλές, σύνθετες και αλληλεπικαλυπτόμενες ζώνες απορρόφησης διαφορετικών καταστάσεων δόνησης των συστατικών του κυττάρου, καθιστώντας δύσκολη την κατανόηση όλων των μεμονωμένων ζωνών. Για το λόγο αυτό, έγινε μαθηματική ανάλυση των φασμάτων με τη χρήση της δεύτερης παραγώγου του φάσματος FT-IR, η οποία επικεντρώθηκε σε συγκεκριμένες περιοχές του φάσματος που αντιστοιχούν σε απορροφήσεις κύριων συστατικών του κυττάρου. Για τη συγκριτική μελέτη των φασμάτων FT-IR εφαρμόστηκε η ανάλυση πρωτευόντων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) και με τον τρόπο αυτόν εντοπίστηκαν οι μεταβολές της σύστασης των κυττάρων του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 κατά την προσαρμογή του σε συνθήκες στρες.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βακτηριακά στελέχη και συνθήκες ανάπτυξης

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη, είναι ο *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363, ο οποίος αναπτυσσόταν σε θρεπτικό μέσο M17 (Oxoid, England) ενισχυμένο με 180 mM MOPS (3-N-morpholino propanesulfonic acid, Sigma-Aldrich, Germany) και 0.5% w/v γλυκόζη (AppliChem, Germany) (GM17-MOPS, pH 7.2). Η ανάπτυξη του γινόταν σε κλίβανο θερμοκρασίας 30°C για 18 h. Για τη συντήρησή του χρησιμοποιήθηκαν ειδικά φιαλίδια (Nalgen Company, USA) με υγρό θρεπτικό μέσο M17 και 0.5% w/v

γλυκόζη, εμπλουτισμένο με 20% v /v γλυκερόλη, τα οποία διατηρούνταν σε θερμοκρασία -80°C.

2.2 Έλεγχος καθαρότητας και χρώση Gram

Για τον έλεγχο της καθαρότητας, πραγματοποιήθηκε επιφανειακή εξάπλωση καλλιέργειας 18 h του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 σε τρυβλία με M17 και 0.5% γλυκόζη. Τα τρυβλία επώστηκαν στους 30° C για 48 h. Παρατηρήθηκε ανάπτυξη μόνο των κυττάρων του *L. lactis* σε χαρακτηριστικές λευκές και στρογγυλές αποικίες.

Για τη χρώση Gram χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα από αποικίες 48 h του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363, τα οποία μεταφέρθηκαν και επιστρώθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Ακολούθησε χρώση με κρυσταλλικό ιώδες (Crystal violet, Sigma) για 1 min, χρώση με ιώδιο (Lugol, Sigma-Aldrich, Germany) για 30 sec, έκπλυση με αιθανόλη και προσθήκη σαφρανίνης (Safranin, Sigma-Aldrich, Germany) για 20 sec. Σε κάθε στάδιο χρώσης ακολουθούσε και έκπλυση των κυττάρων με απιονισμένο νερό. Μετά την παραπάνω διαδικασία ακολούθησε μικροσκοπική εξέταση με τη χρήση ελαιοκαταδυτικού φακού (x100) σε μικροσκόπιο (OLYMPUS BX40) και επιβεβαίωση του στελέχους ως θετικού κατά Gram βακτηρίου, λόγω του μπλε-ιώδους χρώματος των κυττάρων.

2.3 Καμπύλη ανάπτυξης και μέτρηση pH του *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363

Η κινητική ανάπτυξης μελετήθηκε σε θρεπτικό μέσο M17 (Oxoid, England) ενισχυμένο με 180 mM MOPS και 0.5% w/v γλυκόζη (GM17-MOPS, pH 7.2) σε θερμοκρασία 30°C, εμβολιασμένο (1% v /v) από καλλιέργεια 18 h του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363 στο ίδιο υπόστρωμα. Οι τιμές για την απορρόφηση (A) λαμβάνονταν ανά μισή ώρα για συνολικό διάστημα 24 h. Το δείγμα τοποθετούνταν σε κυψελίδα (Starna, UK) και η απορρόφηση μετρίοταν σε φωτόμετρο (Perkin Elmer, UV/VIS Spectrometer, Lambda 20). Παράλληλα με τη μέτρηση της απορρόφησης, σε κάθε δείγμα γινόταν και καταγραφή της τιμής του pH.

2.4 Φαινοτυπικός χαρακτηρισμός της προσαρμογής του *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363 σε συνθήκες στρες

Τα στρες τα οποία εφαρμόστηκαν στον *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω (Παράγραφος 1.5) ήταν αρχικά το όξινο και το ωσμωτικό στρες. Επιπλέον εφαρμόστηκε υψηλότερη ή χαμηλότερη θερμοκρασία επώασης από τη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Επιπλέον μελετήθηκαν και δύο συνθήκες ασιτίας. Για το λόγο αυτό μελετήθηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης του *L. lactis* στις διάφορες συνθήκες στρες. Η απορρόφηση μετρήθηκε χρησιμοποιώντας τρυβλία μικροτιτλοδότησης 96 κυψελών σε φωτόμετρο (TECAN, Austria).

2.4.1 Όξινο στρες

Για το όξινο στρες μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα κυττάρων λογαριθμικής φάσης του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363. Κύτταρα καλλιέργειας με O.D. 0.6-0.8 συλλέγονταν με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιωρούνταν σε θρεπτικό μέσο M17 σε τιμές pH 6, 5.5 και 5 στους 30°C. Το pH ρυθμιζόταν με τη χρήση πυκνού διαλύματος HCl. Ως μάρτυρας χρησιμοποιούνταν κύτταρα της ίδιας καλλιέργειας επαναιωρημένα σε GM17-MOPS. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας γινόταν κάθε 10 min για συνολικό χρόνο 2 h, μέχρις ότου ο *L. lactis* να περάσει στη στατική φάση.

2.4.2 Ωσμωτικό στρες

Για το ωσμωτικό στρες μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα κυττάρων λογαριθμικής φάσης του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363. Κύτταρα καλλιέργειας με O.D. 0.6-0.8 συλλέγονταν με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιωρούνταν σε θρεπτικό μέσο M17 σε συγκεντρώσεις άλατος 2, 2.5 και 3% w /v NaCl. Ως μάρτυρας χρησιμοποιούνταν κύτταρα της ίδιας καλλιέργειας επαναιωρημένα σε GM17-MOPS. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας γινόταν κάθε 10 min για συνολικό χρόνο 2 h, μέχρις ότου ο *L. lactis* να περάσει στη στατική φάση.

2.4.3 Θερμικό στρες

Για το θερμικό στρες μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα κυττάρων λογαριθμικής φάσης του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363. Κύτταρα καλλιέργειας με O.D. 0.6-0.8 συλλέγονταν με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιωρούνταν σε θρεπτικό μέσο M17 σε θερμοκρασίες 42, 45, 48, 50 και 52°C. Ως μάρτυρας χρησιμοποιούνταν κύτταρα της ίδιας καλλιέργειας επαναιωρημένα σε GM17-MOPS. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας γινόταν κάθε 10 min για συνολικό χρόνο 2 h, μέχρις ότου ο *L. lactis* να περάσει στη στατική φάση.

2.4.4 Στρες χαμηλής θερμοκρασίας

Για το στρες χαμηλής θερμοκρασίας μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα κυττάρων λογαριθμικής φάσης του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363. Κύτταρα καλλιέργειας με O.D. 0.6-0.8 συλλέγονταν με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιωρούνταν σε θρεπτικό μέσο M17 σε θερμοκρασίες 4 και 20°C. Ως μάρτυρας χρησιμοποιούνταν κύτταρα της ίδιας καλλιέργειας επαναιωρημένα σε GM17-MOPS. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας γινόταν κάθε 10 min για συνολικό χρόνο 2 h, μέχρις ότου ο *L. lactis* να περάσει στη στατική φάση.

2.4.5 Ασιτία

Στην περίπτωση της ασιτίας, μελετήθηκαν δύο συνθήκες, αρχικά η έλλειψη θρεπτικών συστατικών (θρεπτικό μέσο χωρίς γλυκόζη), ενώ εν συνεχεία η έλλειψη όλων των συστατικών (χρήση ρυθμιστικού διαλύματος). Η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε και για τις δύο περιπτώσεις, σε κύτταρα λογαριθμικής φάσης του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363.

Στην πρώτη περίπτωση, κύτταρα καλλιέργειας με O.D. 0.6-0.8 συλλέγονταν με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιωρούνταν σε θρεπτικό μέσο M17. Ως μάρτυρας χρησιμοποιούνταν κύτταρα της ίδιας καλλιέργειας επαναιωρημένα σε GM17-MOPS. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας γινόταν κάθε 10 min για συνολικό χρόνο 2 h, μέχρις ότου ο *L. lactis* να περάσει στη στατική φάση.

Στη δεύτερη περίπτωση, κύτταρα καλλιέργειας με O.D. 0.6-0.8 συλλέγονταν με φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιωρούνταν σε ρυθμιστικό διάλυμα (KPBS-MOPS). Ως μάρτυρας χρησιμοποιούνταν κύτταρα της ίδιας καλλιέργειας επαναιωρημένα σε GM17-MOPS. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας γινόταν κάθε 10 min για συνολικό χρόνο 2 h, μέχρις ότου ο *L. lactis* να περάσει στη στατική φάση.

2.5 Παρασκευή δειγμάτων για ανάλυση με φασματοσκοπία FT-IR

Δείγματα από τις καλλιέργειες όγκου 1 ml συλλέχθηκαν μετά από φυγοκέντρηση (12000 g, 10 min 28 °C) και επαναιωρήθηκαν σε ίσο όγκο αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού. Η διαδικασία έκπλυσης επαναλήφθηκε τρεις φορές προκειμένου να απομακρυνθεί πλήρως κάθε ίχνος από το θρεπτικό υλικό. Μετά την τελική έκπλυση, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 30-50 μl δις απιονισμένου H₂O και 20-30 μl του εναιωρήματος που προέκυψε τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια δισκίου ZnSe. Για τη δημιουργία ενός ομοιογενούς στρώματος στεγνών κυττάρων, ο δίσκος τοποθετήθηκε για 1 h σε θάλαμο νηματικής ροής, σε θερμοκρασία δωματίου.

2.6 Φασματοσκοπία FT-IR

Για την καταγραφή των φασμάτων FT-IR των βακτηριακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Nicolet (Magna IR 750). Τα φάσματα καταγράφηκαν στην περιοχή 4000-600 cm⁻¹ με διαχωριστική ικανότητα 4 cm⁻¹. Για κάθε μία από τις εξεταζόμενες συνθήκες στρες του *L. lactis* έγινε συλλογή φασμάτων από έξι ανεξάρτητα πειράματα. Για τη λήψη του κάθε φάσματος πραγματοποιήθηκαν 100 "σαρώσεις" του δείγματος.

2.7 Επεξεργασία δεδομένων και στατιστική ανάλυση

Η επεξεργασία των φασμάτων που συλλέχθηκαν έγινε με το λογισμικό OMNIC (Thermo Electron Inc., California, U.S.A.). Τις περισσότερες φορές τα φάσματα μιγμάτων ή φυσικών προϊόντων παρουσιάζουν θόρυβο και η βασική τους γραμμή αποτελείται από σημεία, των οποίων η ένταση δεν είναι μηδέν. Επίσης, υπάρχει

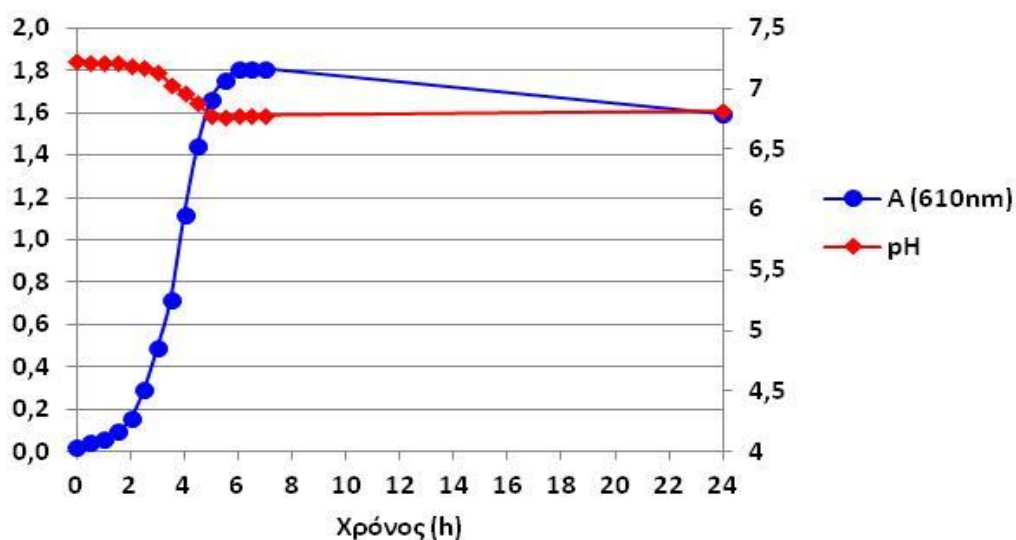
αλληλοεπικάλυψη των κορυφών που οφείλονται σε διαφορετικές λειτουργικές (χαρακτηριστικές) ομάδες με αποτέλεσμα να εμφανίζονται ως μια κορυφή. Για τους παραπάνω λόγους είναι αναγκαία η επεξεργασία τέτοιων φασμάτων (Huang et al., 2001, Zoumproulou et al., 2010). Στην παρούσα μελέτη η επεξεργασία αυτή περιελάμβανε την εξομάλυνση (smoothing) των φασμάτων, η οποία καταργεί τον υψηλής συχνότητας θόρυβο του οργάνου υπολογίζοντας το μέσο όρο γειτονικών μετρήσεων, τη διόρθωση της γραμμής φάσματος, καθώς και τον υπολογισμό της δεύτερης παραγώγου του φάσματος για το διαχωρισμό των επικαλυπτόμενων ζωνών απορρόφησης (Lin et al., 2005).

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με την τεχνική της ανάλυσης των κύριων συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA). Η τεχνική αυτή έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στο παρελθόν για τη διάκριση φασμάτων υπερύθρου από μικροοργανισμούς (Rodriguez-Saona et al., 2001, Lin et al., 2005, Al-Qadiri et al., 2006b, Zoumproulou et al., 2010). Η ανάλυση των κυρίων συνιστωσών αποτελεί μια στατιστική επεξεργασία, η οποία μετατρέπει έναν αριθμό πιθανά συσχετισμένων μεταβλητών σε ένα μικρότερο αριθμό μη συσχετισμένων μεταβλητών, οι οποίες ονομάζονται κύριες συνιστώσες (Principal Components, PCs) (Al-Qadiri et al., 2008a, Papadimitriou et al., 2008). Στηρίζεται στον υπολογισμό των πιο βασικών χαρακτηριστικών ενός πολυδιάστατου συνόλου πληροφοριών, αφαιρώντας τυχαίες διακυμάνσεις (θόρυβο), και συγκρατεί τις κύριες συνιστώσες διατηρώντας τη στατιστική διακύμανση των δειγμάτων (Goodacre et al., 1996). Η επεξεργασία της πολυδιάστατης πληροφορίας γίνεται με τεχνικές ελαχίστων τετραγώνων και κατλήγει σε μια σειρά ορθογώνιων ιδιοδιανυσμάτων (eigenvectors) του πίνακα συνδιασποράς των δειγμάτων. Η τεχνική ανάλυσης των κύριων συνιστωσών (PCA) δείχνει εάν υπάρχουν φυσικές ομάδες των αποτελεσμάτων και περιγράφει ομοιότητες ή διαφορές πολυπαραμετρικών πληροφοριών (Nilsen et al., 2002, Al-Qadiri et al., 2006a). Η πρώτη κύρια συνιστώσα αποδίδει τη μεγαλύτερη ποσότητα της πληροφορίας, ακολουθούμενη από τη δεύτερη κ.ο.κ. Η ανάλυση αυτή εφαρμόστηκε στην παρούσα μελέτη, στη δεύτερη παράγωγο συγκεκριμένων περιοχών των φασμάτων FT-IR των βακτηρίων, οι οποίες είναι γνωστό ότι αντιστοιχούν σε περιοχές απορρόφησης βασικών κυτταρικών συστατικών. Η επεξεργασία έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού Statgraphics Centurion (version XV), με την επιλογή του υπολογισμού του ελάχιστου αριθμού κύριων συνιστωσών.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Καμπύλη ανάπτυξης και μέτρηση pH του *L. lactis* ssp. *cremoris* MG1363

Στο Σχήμα 1 παρουσιάζεται η καμπύλη ανάπτυξης του *L. lactis*, στην οποία φαίνεται ότι τα κύτταρα βρίσκονται στη λογαριθμική τους φάση σε απορρόφηση (A) 0.6-0.8 ύστερα από περίπου 3 h και 15 min. Παράλληλα με την καμπύλη ανάπτυξης πραγματοποιήθηκε και η μέτρηση του pH, το οποίο παραμένει σε τιμές κοντά στο ουδέτερο pH καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης.

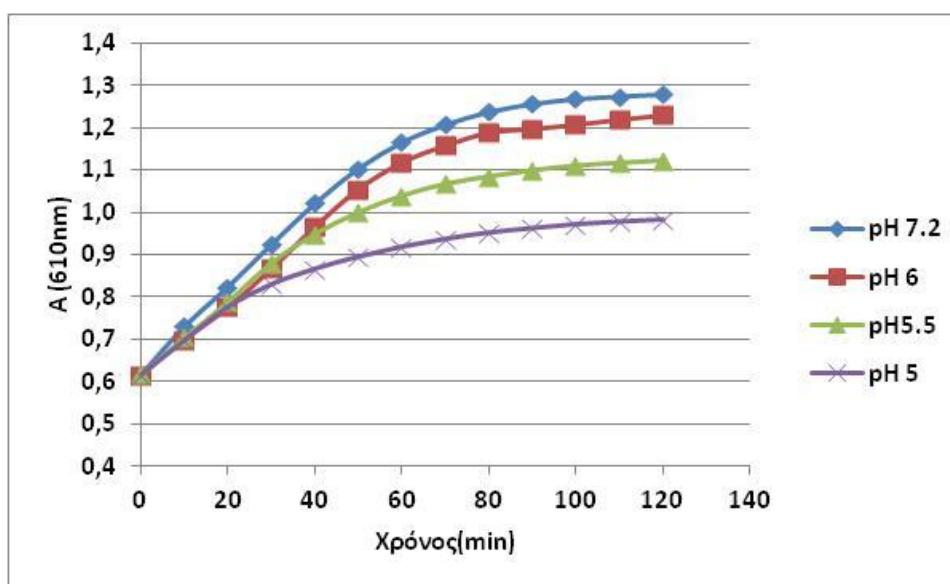


Σχήμα 1: Καμπύλη ανάπτυξης του *L. lactis* σε θρεπτικό μέσο GM17-MOPS, pH 7.2 και θερμοκρασία 30°C. Μέτρηση pH του *L. lactis* σε θρεπτικό μέσο GM17-MOPS, θερμοκρασία 30°C και ρυθμισμένο pH 7.2.

3.2 Όξινο στρες

3.2.1 Επιλογή όξινου στρες

Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 2.4.1, η ανάπτυξη του *L. lactis* σε τιμές pH 6, 5.5 και 5 συγκρίθηκε με την ανάπτυξή του στην τιμή pH 7.2. Η τιμή εκείνη στην οποία υπήρξε παρεμπόδιση της ανάπτυξης στη 1 h, είναι η τιμή pH 5.5 (Σχήμα 2). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι μέχρι και τα 100 min ο *L. lactis* παρουσίαζε ανάπτυξη στο pH 5.5 με μειωμένο ρυθμο σε σχέση με το μάρτυρα, γεγονός που υποδηλώνει την προσαρμογή των κυττάρων στο όξινο στρες. Στη 1 h σε pH 5.5 και σε τιμή απορρόφησης κοντά στο 1, έγινε δειγματοληψία και τα κύτταρα του *L. lactis* αναλύθηκαν με τη φασματοσκοπία FT-IR. Οι άλλες δύο τιμές pH που μελετήθηκαν δεν παρουσίασαν την επιθυμητή κινητική ανάπτυξης, καθώς σε pH 6 τα κύτταρα του *L. lactis* παρουσίασαν παρόμοια κινητική σε σχέση με τα κύτταρα του μάρτυρα, ενώ σε pH 5 η ανάπτυξή τους τερματιζόταν πρόωρα.



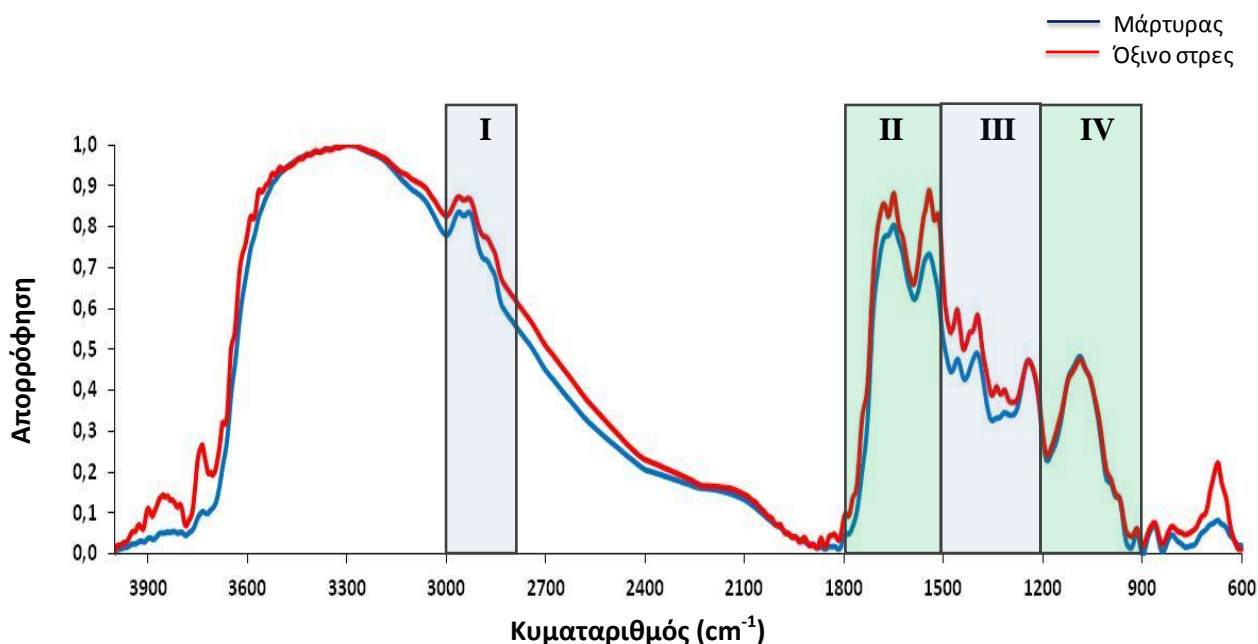
Σχήμα 2: Καμπύλη ανάπτυξης του *L. lactis* σε pH 6, 5.5 και 5 (όξινο στρες) και pH 7.2 (μάρτυρας).

3.2.2 Φάσματα FT-IR

Στο Σχήμα 3.1 παρουσιάζονται τα φάσματα FT-IR ($4000-600\text{ cm}^{-1}$) από μη προσαρμοσμένα στο όξινο περιβάλλον κύτταρα μάρτυρες λογαριθμικής φάσης του *L. lactis* και από κύτταρα του φαινοτύπου όξινης ανθεκτικότητας του βακτηρίου που προέκυψαν ύστερα από επώαση στους $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 1 h σε pH 5.5. Τα φάσματα που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος από έξι ανεξάρτητες επαναλήψεις. Τα φάσματα παρουσίασαν έντονη απορρόφηση στις τέσσερις χαρακτηριστικές, για τη βιοχημική σύσταση των κυττάρων, περιοχές του υπέρυθρου, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3.2 (Naumann et al., 1991, Papadimitriou et al., 2008).

Η πρώτη χαρακτηριστική περιοχή του φάσματος (Περιοχή I, $3000-2800\text{ cm}^{-1}$) διαμορφώνεται κυρίως από τις απορροφήσεις των αλυσίδων των λιπαρών οξέων της κυτταρικής μεμβράνης. Οι κορυφές που παρατηρήθηκαν στα 2964 cm^{-1} και στα 2929 cm^{-1} των φασμάτων του *L. lactis*, οφείλονται στις ασύμμετρες δονήσεις τάσης των δεσμών άνθρακα-υδρογόνου των μεθυλίων ($-\text{CH}_3$) και των μεθυλενομάδων ($-\text{CH}_2$) των λιπαρών οξέων αντίστοιχα της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ οι κορυφές στα 2862 cm^{-1} στις συμμετρικές δονήσεις των ίδιων ομάδων (Papadimitriou et al., 2008, Davis and Mauer, 2010).

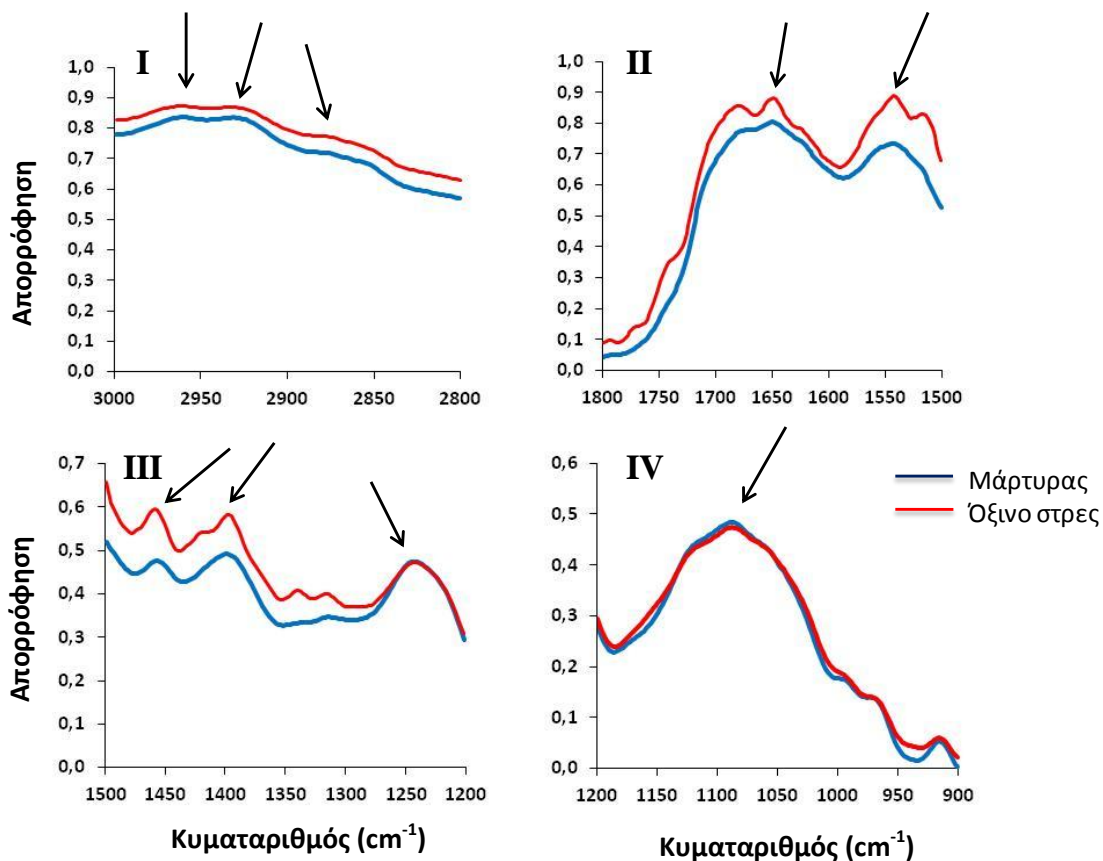
Στη δεύτερη περιοχή του φάσματος (Περιοχή II, $1800-1500\text{ cm}^{-1}$) απορροφούν οι αμιδικοί δεσμοί των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων των κυττάρων (Davis and Mauer, 2010). Στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκαν δύο έντονες απορροφήσεις στα 1649 cm^{-1} και στα 1543 cm^{-1} . Η πρώτη είναι χαρακτηριστική για τους αμιδικούς δεσμούς I, δηλαδή προκύπτει από τη δόνηση τάσης του δεσμού ($\text{C}=\text{O}$) και από τη δόνηση παραμόρφωσης ή κάμψης των δεσμών ($\text{C}-\text{N}$) και ($\text{N}-\text{H}$). Η δεύτερη είναι χαρακτηριστική για τους αμιδικούς δεσμούς II και προκύπτει από τη δόνηση παραμόρφωσης ή κάμψης του δεσμού ($\text{N}-\text{H}$) και από τη δόνηση τάσης του δεσμού ($\text{C}-\text{N}$) των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων (Al-Qadiri et al., 2008b; Kansiz et al., 1999; Bosch et al., 2006b).



Σχήμα 3.1: Φάσματα FT-IR (4000-600 cm^{-1}) του φαινοτύπου όξινης προσαρμογής του *L.lactis*.

Φάσματα FT-IR των προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε όξινο στρες (pH 5.5). Οι ζώνες I, II, III και IV αντιστοιχούν σε περιοχές του φάσματος που απορροφούν βασικά συστατικά του κυττάρου.

Στην τρίτη περιοχή του φάσματος (Περιοχή III, 1500-1200 cm^{-1}), η οποία διαμορφώνεται τόσο από τις απορροφήσεις των πρωτεϊνών όσο και των λιπαρών οξέων των κυττάρων, στα φάσματα των εξεταζόμενων κυττάρων του *L. lactis*, παρατηρήθηκαν τρεις έντονες απορροφήσεις. Η πρώτη κορυφή στα 1458 cm^{-1} οφείλεται κυρίως στις συμμετρικές δονήσεις παραμόρφωσης των δεσμών άνθρακα-υδρογόνου των μεθυλίων ($-\text{CH}_3$) και μεθυλενομάδων ($-\text{CH}_2$) των πρωτεϊνών. Η δεύτερη κορυφή στα 1398 cm^{-1} έχει συνδεθεί με τις συμμετρικές δονήσεις παραμόρφωσης των ίδιων δεσμών. Επιπλέον, οι συμμετρικές δονήσεις τάσης των δεσμών άνθρακα-οξυγόνου (C-O, C=O) των καρβοξυλικών ομάδων (COO^-) συνεισφέρουν στην απορρόφηση στα 1398 cm^{-1} . Στην ίδια περιοχή του φάσματος, η κορυφή στα 1244 cm^{-1} είναι χαρακτηριστική των ασύμμετρων δονήσεων τάσης των φωσφοδιεστερικών δεσμών ($>\text{P}=\text{O}$), οι οποίοι απαντώνται μεταξύ των νουκλεοτιδίων στα μόρια του DNA και RNA καθώς επίσης και στα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών (Al-Qadiri et al., 2008b, Davis and Mauer, 2010).



Σχήμα 3.2: Φάσματα FT-IR (4000-600 cm^{-1}) του φαινοτύπου όξινης προσαρμογής του *L.lactis*.

Φάσματα FT-IR των προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε όξινο στρες (pH 5.5). Οι ζώνες I, II, III και IV αντιστοιχούν σε περιοχές του φάσματος που απορροφούν βασικά συστατικά του κυττάρου. Τα βέλη επισημαίνουν χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος, όπως αυτές αναφέρονται στο κείμενο.

Η τέταρτη περιοχή του φάσματος (Περιοχή VI, $1200-900\text{cm}^{-1}$) διαμορφώνεται κυρίως από τις απορροφήσεις των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων. Στα φάσματα των κυττάρων του *L. lactis*, η κορυφή στα 1080cm^{-1} είναι χαρακτηριστική των απορροφήσεων των συμμετρικών δονήσεων τάσης των φωσφοδιεστερικών δεσμών (P=O) των μορίων DNA και RNA. Οι απορροφήσεις όμως στην ευρεία περιοχή από $1100-900\text{cm}^{-1}$ αποδίδονται στις δονήσεις τάσης των δεσμών C-OH και C-O-C, αλλά και στις δονήσεις τάσης των δεσμών C-O-P και P-O-P των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος (Al-Qadiri et al., 2006). Τέλος, οι απορροφήσεις στην περιοχή του φάσματος από $900-700\text{cm}^{-1}$, η οποία αποκαλείται αληθινό δακτυλικό αποτύπωμα του μικροοργανισμού, δεν έχουν αποδοθεί σε κάποιες

λειτουργικές ομάδες (Davis and Mauer, 2010) και για το λόγο αυτό δεν αποτελούν αντικείμενο της παρούσας μελέτης.

Στις περισσότερες μελέτες, τα φάσματα FT-IR του ίδιου μικροοργανισμού είναι παρόμοια εξαιτίας των μικρών σχετικά αλλαγών των κυτταρικών συστατικών (Al-Qadiri et al., 2006b). Στην περίπτωση των φασμάτων των προσαρμοσμένων και μη, στο όξινο στρες, κυττάρων του *L. lactis*, οι διαφορές ήταν εμφανείς ακόμα και πριν από την περαιτέρω ανάλυση. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στα Σχήματα 4.1 και 4.2, οι διαφορές που εντοπίστηκαν στην περιοχή $1200-900\text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή IV) ήταν λιγότερο εμφανείς σε σχέση με τις υπόλοιπες. Αντίθετα, στις περιοχές $1500-1200\text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή III), $1800-1500\text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή II), αλλά και $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή I), παρατηρήθηκαν έντονες διαφορές μεταξύ των φασμάτων, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι κατά την προσαρμογή των κυττάρων στο όξινο περιβάλλον, προκαλούνται αλλαγές καίριων συστατικών του κυττάρου.

3.2.3 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για το διαχωρισμό των φασμάτων

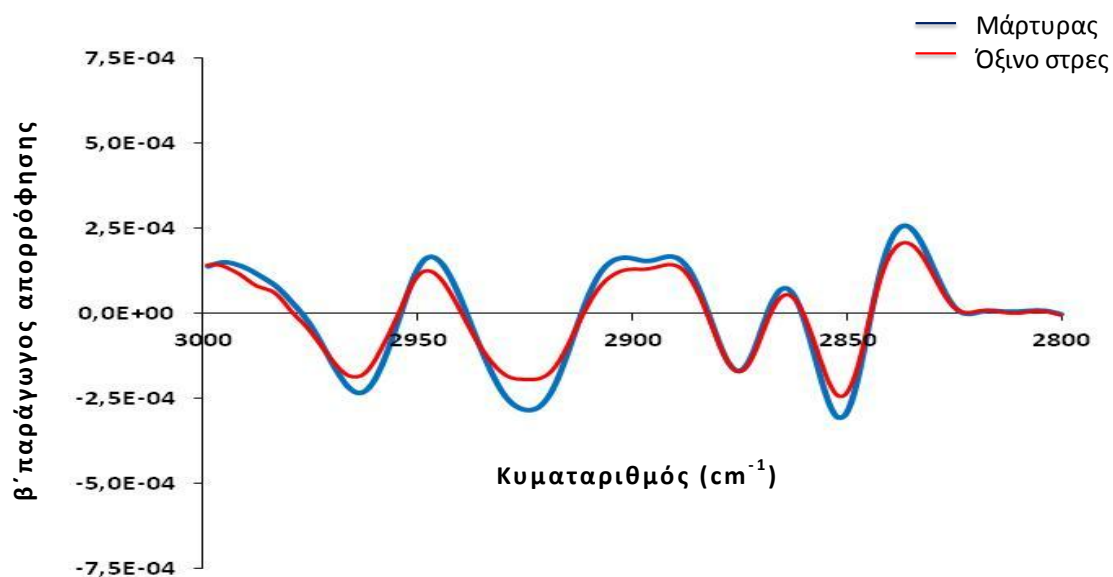
Λαμβάνοντας υπόψιν τις διαφορές των φασμάτων των κυττάρων του *L. lactis*, με σκοπό την πιο λεπτομερή διερεύνησή τους, έγινε υπολογισμός της δεύτερης παραγώγου όλων των φασμάτων. Ο υπολογισμός της δεύτερης παραγώγου θεωρείται ένα από τα πιο σημαντικά βήματα πριν την αξιολόγηση των φασμάτων. Ουσιαστικά, με τη δεύτερη παράγωγο εξασφαλίζεται ο διαχωρισμός των αλληλοεπικαλυπτόμενων ζωνών του αρχικού φάσματος και μειώνεται η ποικιλομορφία λόγω μετατόπισης της βασικής γραμμής τους (Lin et al., 2004; Al Qadiri et al., 2006b).

Μετά τον υπολογισμό της δεύτερης παραγώγου, εφαρμόστηκε η τεχνική της πολυπαραμετρικής ανάλυσης PCA για να εντοπιστεί η στατιστική διακύμανση μεταξύ των φασμάτων των διαφορετικών φυσιολογικών καταστάσεων του *L. lactis* και να ομαδοποιηθούν οι πληθυσμοί με παρόμοια χαρακτηριστικά στα φάσματά τους, τα οποία στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι αποτέλεσμα των αλλαγών των βασικότερων κυτταρικών συστατικών (Al Qadiri et al., 2006). Η ανάλυση PCA εφαρμόστηκε ξεχωριστά για κάθε μία από τις χαρακτηριστικές περιοχές (I, II, III, IV) του φάσματος, στις οποίες απορροφούν δεσμοί γνωστών συστατικών του κυττάρου. Η τεχνική PCA έχει ως τελικό αποτέλεσμα τη γραφική απεικόνιση των διαφορών και των ομοιοτήτων από την επεξεργασία των φασμάτων (Al Qadiri et al., 2006b).

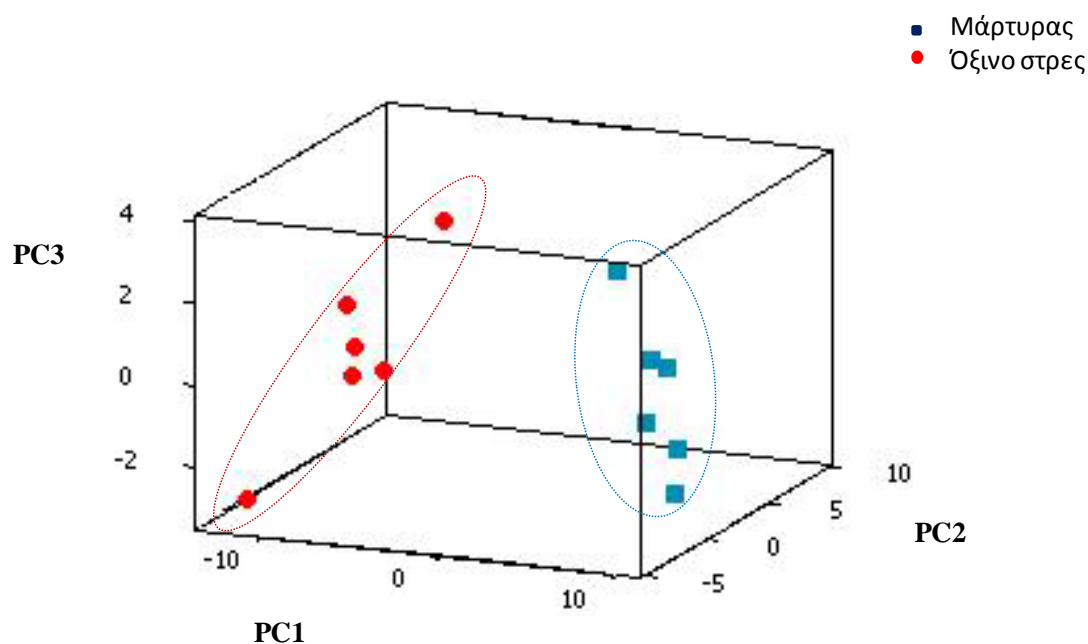
Η ανάλυση της Περιοχής I ($3000-2800\text{ cm}^{-1}$) η οποία διαμορφώνεται από τις απορροφήσεις των λιπαρών οξέων των κυτταρικών μεμβρανών, αποκάλυψε σημαντικές διαφορές μεταξύ των φασμάτων των κυττάρων του *L. lactis* (Σχήμα 3.3). Η δεύτερη παράγωγος οδήγησε στον εντοπισμό σημαντικού αριθμού αλληλοεπικαλυπτόμενων ζωνών απορρόφησης (Σχήμα 3.3 A), ενώ η ανάλυση PCA έδειξε ισχυρή τάση ομαδοποίησης των διαφορετικών φυσιολογικών καταστάσεων του *L. lactis* στη συγκεκριμένη περιοχή του φάσματος FT-IR. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας τις τρεις πρώτες κύριες συνιστώσες της ανάλυσης PCA (Σχήμα 3.3 B), τα προσαρμοσμένα κύτταρα του *L. lactis* στο όξινο στρες μπόρεσαν να διαχωριστούν πλήρως και να ομαδοποιηθούν διαφορετικά σε σχέση με τα κύτταρα του μάρτυρα. Τα αποτελέσματα τόσο της δεύτερης παραγώγου όσο και της ανάλυσης PCA, έρχονται σε συμφωνία με την παρατήρηση που προέκυψε από τα φάσματα FT-IR στην παράγραφο 3.1.2 όπου οι διαφορές τους ήταν εμφανείς.

Παρόμοια αποτελέσματα είχαμε και κατά την ανάλυση των υπολοίπων περιοχών του φάσματος (Περιοχή II $1800-1500\text{ cm}^{-1}$, Περιοχή III $1500-1200\text{ cm}^{-1}$ και Περιοχή IV $1200-900\text{ cm}^{-1}$), (Σχήμα 3.4, Σχήμα 3.5 και Σχήμα 3.6), καθώς η δεύτερη παράγωγος των φασμάτων οδήγησε στον εντοπισμό σημαντικού αριθμού αλληλοεπικαλυπτόμενων ζωνών απορρόφησης και στις περιοχές αυτές (Σχήμα 3.4A, Σχήμα 3.5A και Σχήμα 3.6A). Όπως παρατηρήθηκε και για την Περιοχή I του φάσματος, έτσι και για τις υπόλοιπες, τα προσαρμοσμένα κύτταρα του *L. lactis* στο όξινο στρες διαχωρίστηκαν πλήρως και ομαδοποιήθηκαν διαφορετικά σε σχέση με τα κύτταρα του μάρτυρα (Σχήμα 3.4B, Σχήμα 3.5B και Σχήμα 3.6B). Για μία ακόμη φορά, τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τις παρατηρήσεις των φασμάτων FT-IR που έγιναν στην παράγραφο 3.1.2.

A.



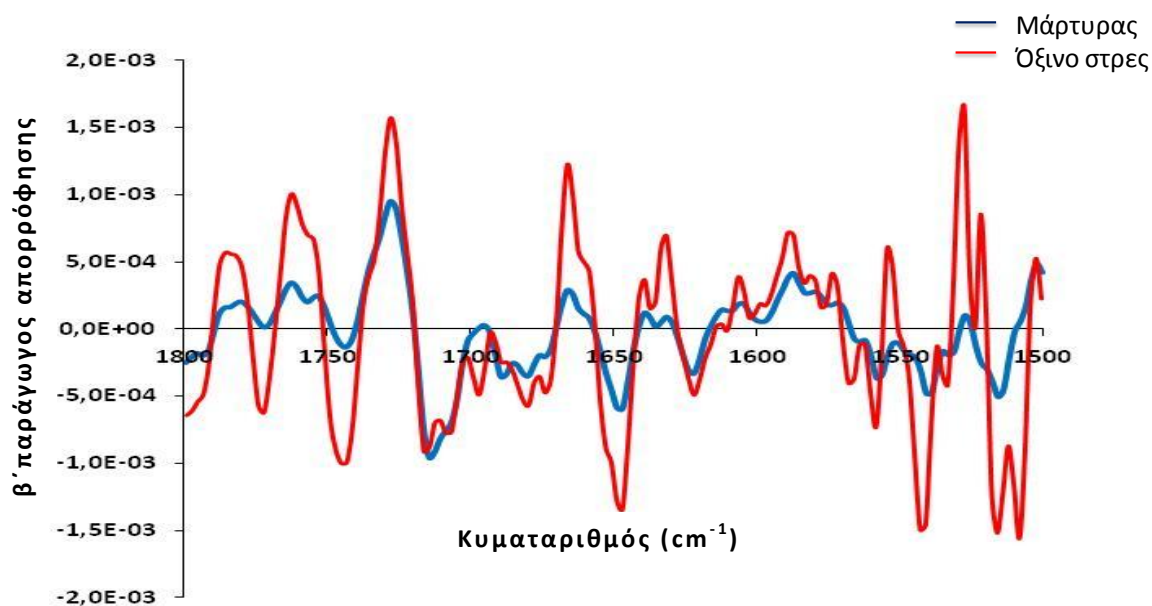
B.



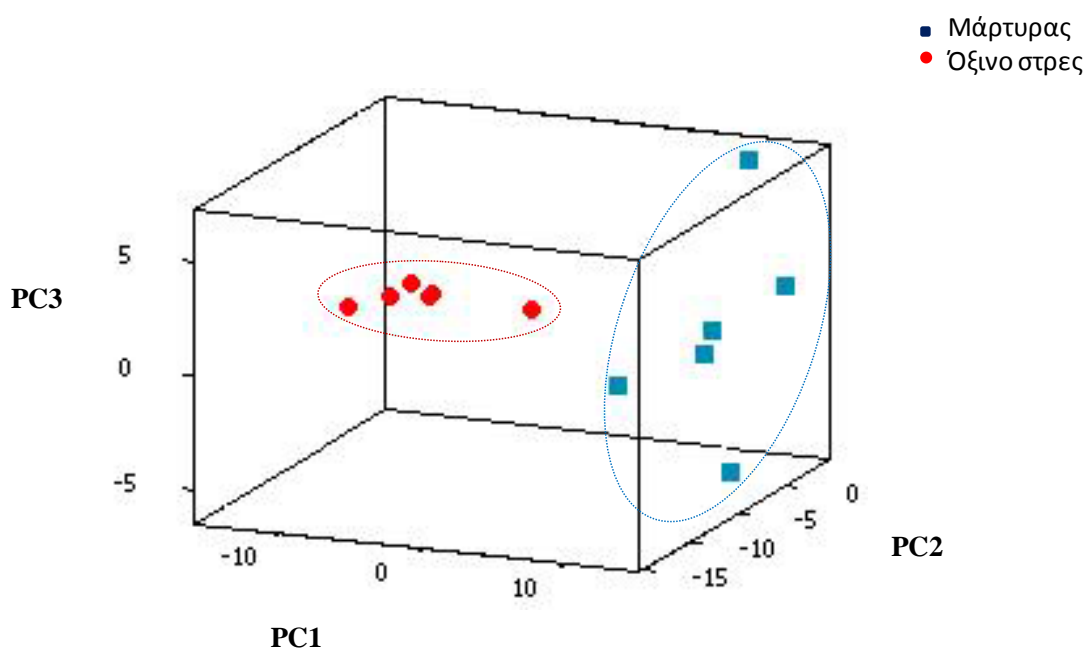
Σχήμα 3.3: Ανάλυση PCA της περιοχής $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή I) του φάσματος FT-IR του φαινοτύπου όξινης προσαρμογής του *L.lactis*.

(A) β' παράγωγος της περιοχής $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε όξινο στρες (pH 5.5). (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.

A.



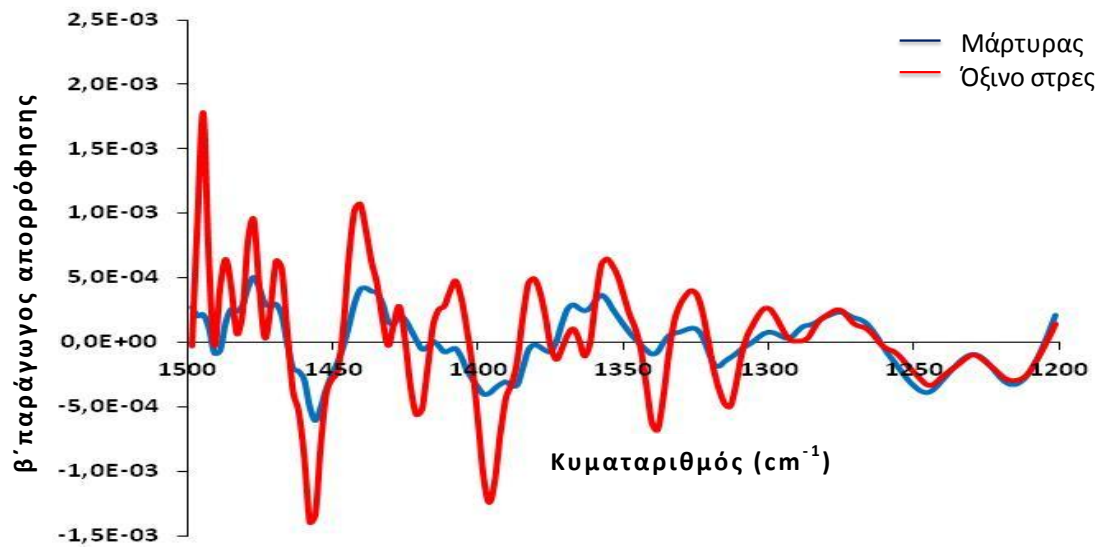
B.



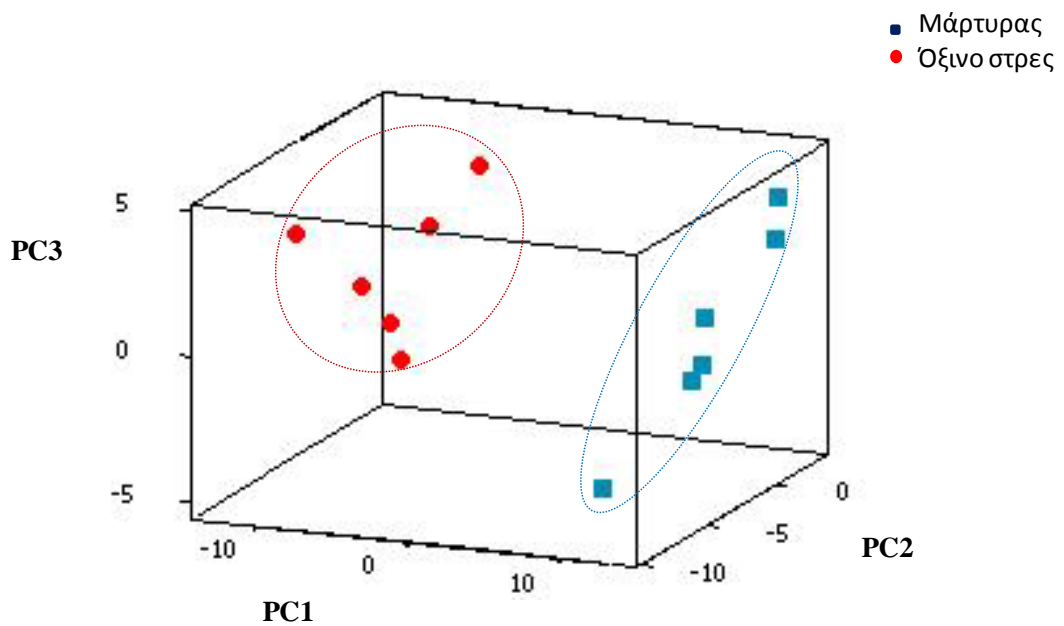
Σχήμα 3.4: Ανάλυση PCA της περιοχής 1800-1500 cm⁻¹ (Περιογή II) του φάσματος FT-IR του φαινοτύπου όξινης προσαρμογής του *L.lactis*.

(A) β' παράγωγος της περιοχής 1800-1500 cm⁻¹ του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε όξινο στρες (pH 5.5). (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.

A.

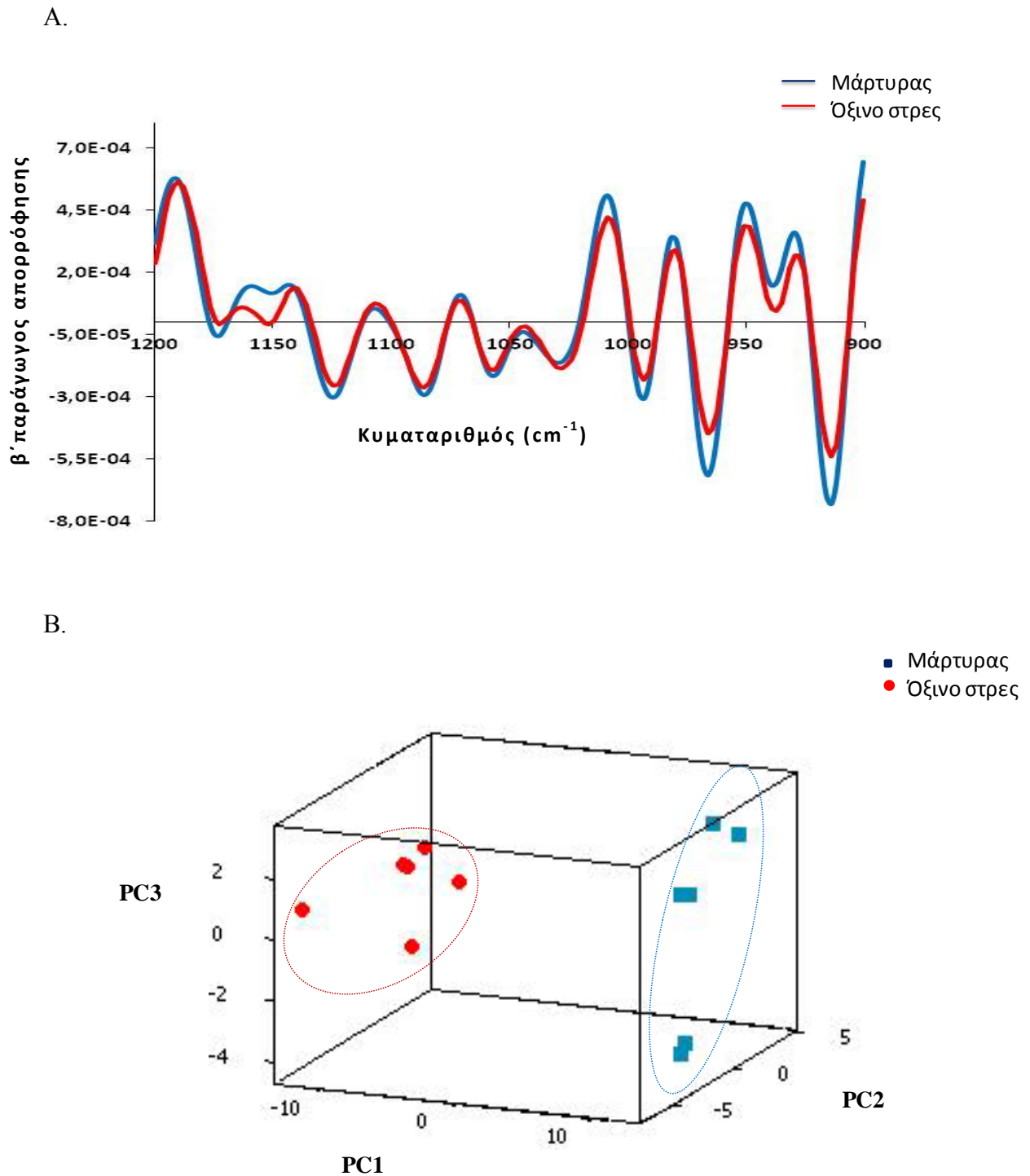


B.



Σχήμα 3.5: Ανάλυση PCA της περιοχής $1500\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ (Περιογή III) του φάσματος FT-IR του φαινοτύπου όξινης προσαρμογής του *L.lactis*.

(A) β' παράγωγος της περιοχής $1500\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε όξινο στρες (pH 5.5). (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.



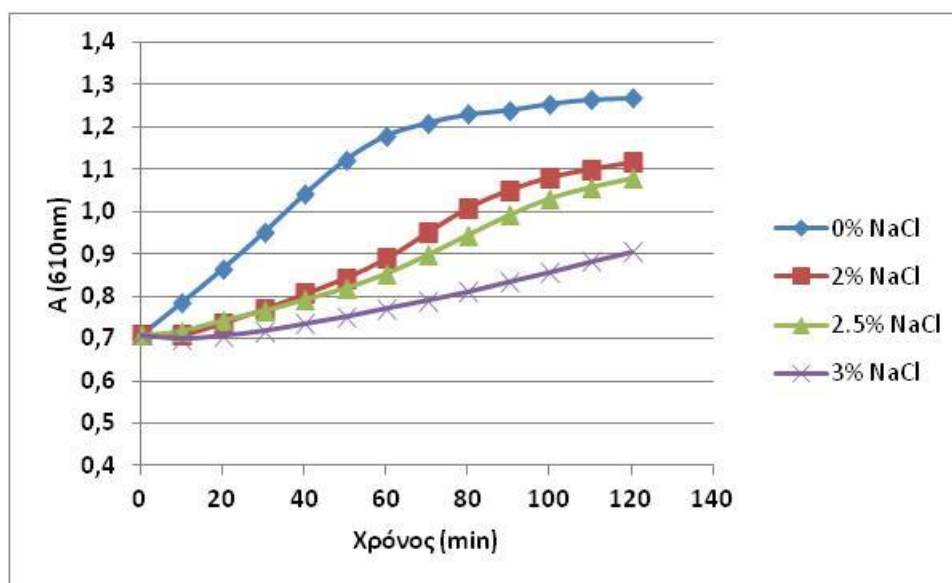
Σχήμα 3.6: Ανάλυση PCA της περιοχής $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή IV) του φάσματος FT-IR του φαινοτύπου όξινης προσαρμογής του *L.lactis*.

(A) β' παράγωγος της περιοχής $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* MG1363 σε όξινο στρες (pH 5.5). (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.

3.3 Ωσμωτικό στρες

3.3.1 Επιλογή ωσμωτικού στρες

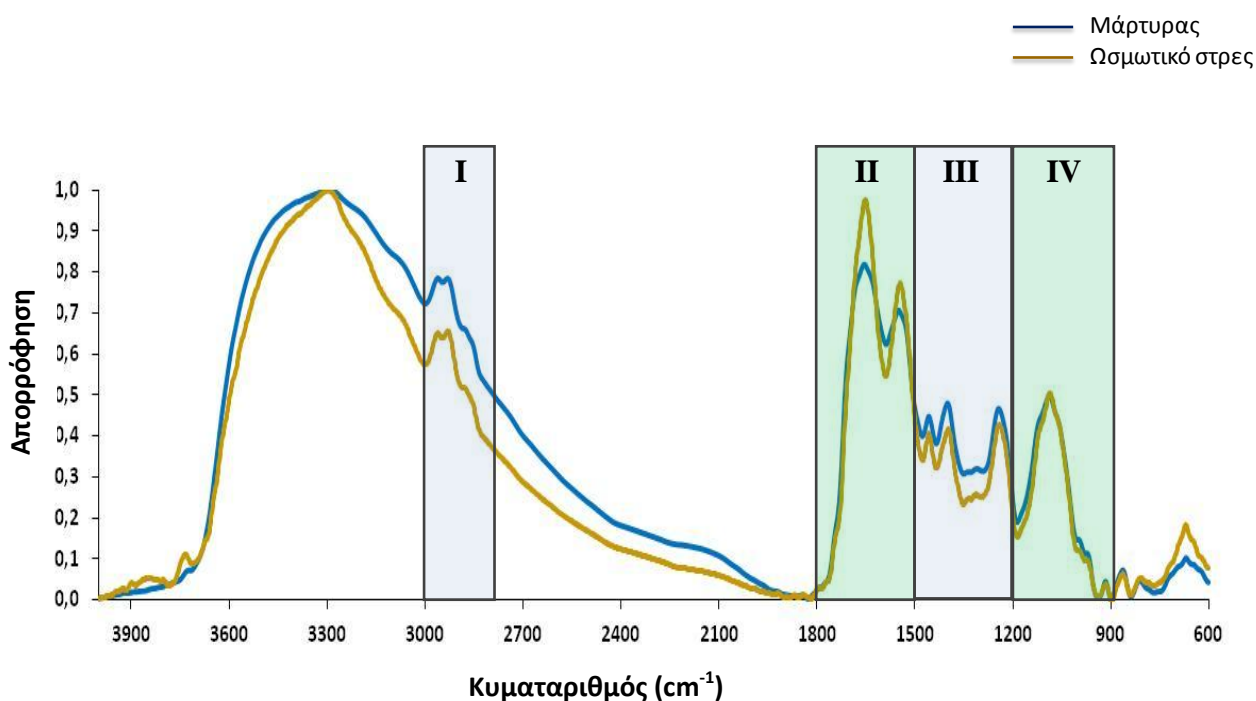
Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 2.4.2, για το ωσμωτικό στρες του *L. lactis* μελετήθηκαν οι συγκεντρώσεις άλατος 2, 2.5 και 3% w /v NaCl. Οι τιμές εκείνες, στις οποίες υπήρξε παρεμπόδιση της ανάπτυξης στη 1 h, είναι στο 2 και στο 2.5 % w /v NaCl (Σχήμα 4). Από τις δύο αυτές συνθήκες, επιλέξαμε τελικά το 2.5 % w /v NaCl λόγω μεγαλύτερης ωσμωμοριακότητας. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι καθ'όλη τη διάρκεια των μετρήσεων ο *L. lactis* παρουσίαζε ανάπτυξη με μειωμένο ρυθμο σε σχέση με το μάρτυρα, γεγονός που υποδηλώνει την προσαρμογή των κυττάρων στο ωσμωτικό στρες. Στη 1 h και σε τιμή απορρόφησης κοντά στο 0.9, έγινε δειγματοληψία και τα κύτταρα του *L. lactis* αναλύθηκαν με τη φασματοσκοπία FT-IR. Δεν επιλέχθηκε η τιμή 3 % w /v NaCl, διότι τα κύτταρα του *L. lactis* φαίνεται να σταμάτησαν τον πολλαπλασιασμό τους για το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, μέχρι τη 1 h.



Σχήμα 4: Καμπύλη ανάπτυξης του *L. lactis* σε 2, 2.5 και 3% w /v NaCl (ωσμωτικό στρες) και 0% w /v NaCl (μάρτυρας).

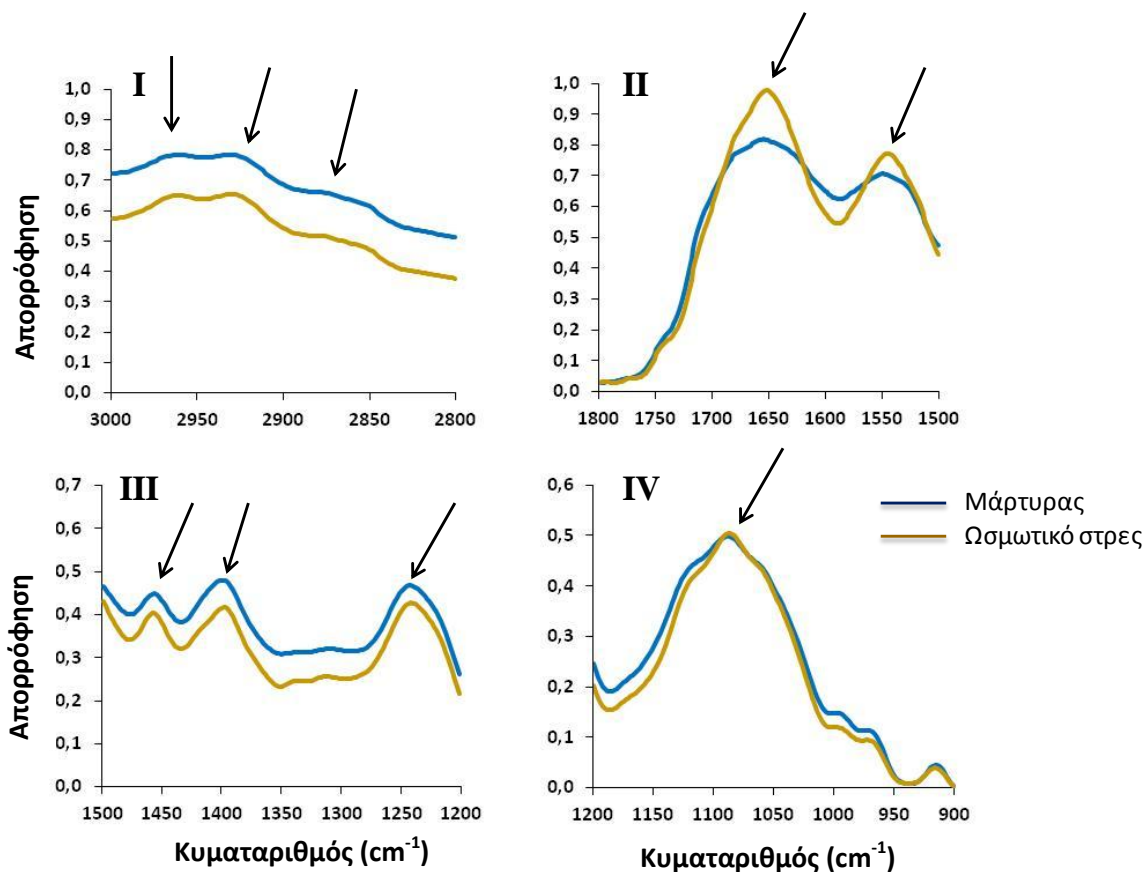
3.3.2 Φάσματα FT-IR

Στο Σχήμα 5.1 παρουσιάζονται τα φάσματα FT-IR ($4000-600\text{ cm}^{-1}$) από μη προσαρμοσμένα στο ωσμωτικό στρες κύτταρα μάρτυρες, λογαριθμικής φάσης του *L. lactis* και από κύτταρα λογαριθμικής φάσης του φαινοτύπου ωσμωτικής προσαρμογής του βακτηρίου, τα οποία προέκυψαν ύστερα από επώαση στους 30°C για 1 h σε 2.5% w/v NaCl. Τα φάσματα που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος από έξι ανεξάρτητες επαναλήψεις. Τα φάσματα παρουσίασαν έντονη απορρόφηση στις τέσσερις χαρακτηριστικές, για τη βιοχημική σύσταση των κυττάρων, περιοχές του υπέρυθρου, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 5.2 (Naumann et al., 1991, Papadimitriou et al., 2008).



Σχήμα 5.1: Φάσματα FT-IR ($4000-600\text{ cm}^{-1}$) του φαινοτύπου ωσμωτικής προσαρμογής του *L.lactis*.

Φάσματα FT-IR των προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε ωσμωτικό στρες (2.5% w/v NaCl). Οι ζώνες I, II, III και IV αντιστοιχούν σε περιοχές του φάσματος που απορροφούν βασικά συστατικά του κυττάρου.



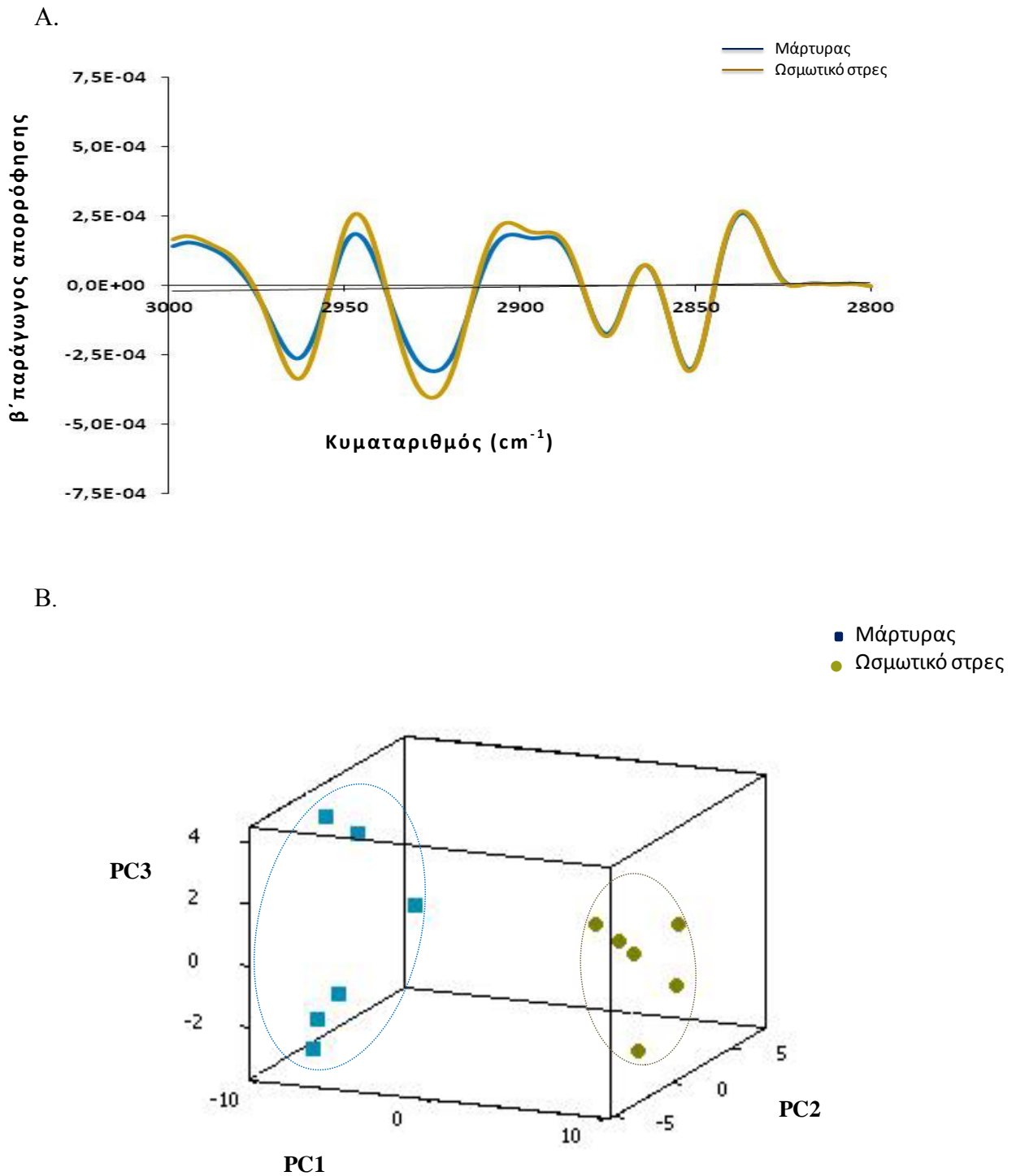
Σχήμα 5.2: Φάσματα FT-IR ($4000-600\text{ cm}^{-1}$) του φαινοτύπου ωσμωτικής προσαρμογής του *L.lactis*.

Φάσματα FT-IR των προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε ωσμωτικό στρες (2.5% w/v NaCl). Οι ζώνες I, II, III και IV αντιστοιχούν σε περιοχές του φάσματος που απορροφούν βασικά συστατικά του κυττάρου. Τα βέλη επισημαίνουν χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος, όπως αυτές αναφέρονται στο κείμενο.

Κατά τη διάρκεια της μελέτης των φασμάτων FT-IR του *L. lactis* σε ωσμωτικό στρες, καταλήξαμε σε παρόμοια αποτελέσματα με αυτά από το όξινο στρες, στα οποία οι διαφορές ήταν έντονες ακόμα και πριν από την περαιτέρω ανάλυση σε τρεις από τις συνολικά τέσσερις χαρακτηριστικές περιοχές που εξετάστηκαν. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται και στα Σχήματα 5.1 και 5.2, οι διαφορές που εντοπίστηκαν στην περιοχή $1200-900\text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή IV) ήταν αρκετά μικρές, σε αντίθεση με τις περιοχές $1500-1200\text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή III), $1800-1500\text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή II), αλλά και $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή I), όπου παρατηρήθηκαν έντονες διαφορές μεταξύ των φασμάτων.

3.3.3 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για το διαχωρισμό των φασμάτων

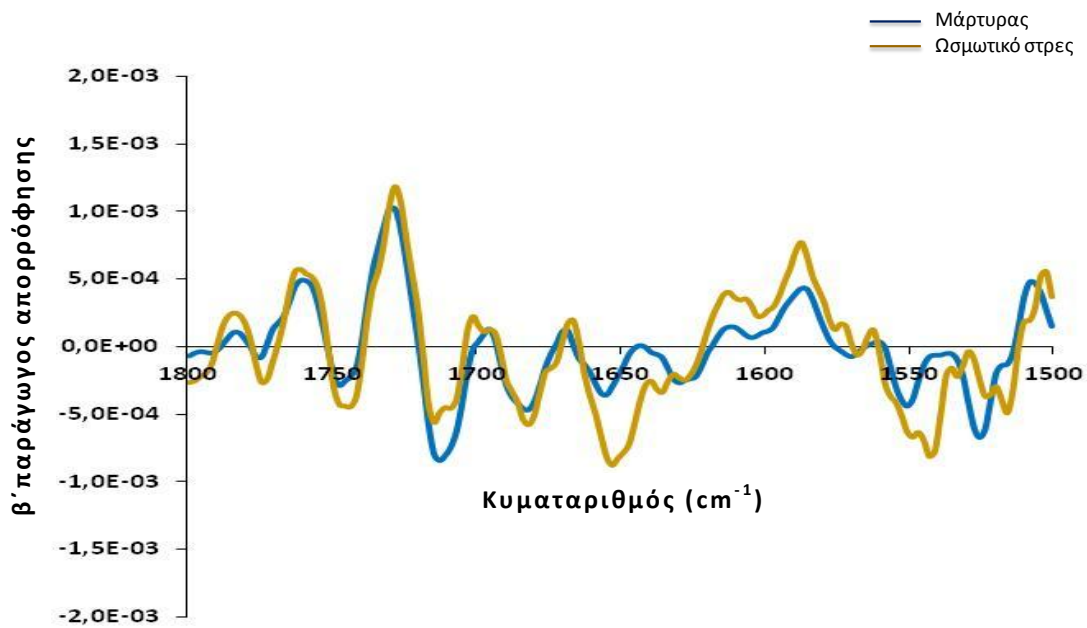
Η ανάλυση και των τεσσάρων περιοχών του φάσματος οδήγησε σε παρόμοια αποτελέσματα με αυτά που παρατηρήθηκαν στο όξινο στρες. Η δεύτερη παράγωγος οδήγησε στον εντοπισμό σημαντικού αριθμού αλληλοεπικαλυπτόμενων ζωνών απορρόφησης, ενώ η ανάλυση PCA έδειξε ισχυρή τάση ομαδοποίησης των διαφορετικών φυσιολογικών καταστάσεων του *L. lactis* (Σχήμα 5.3, Σχήμα 5.4, Σχήμα 5.5 και Σχήμα 5.6)



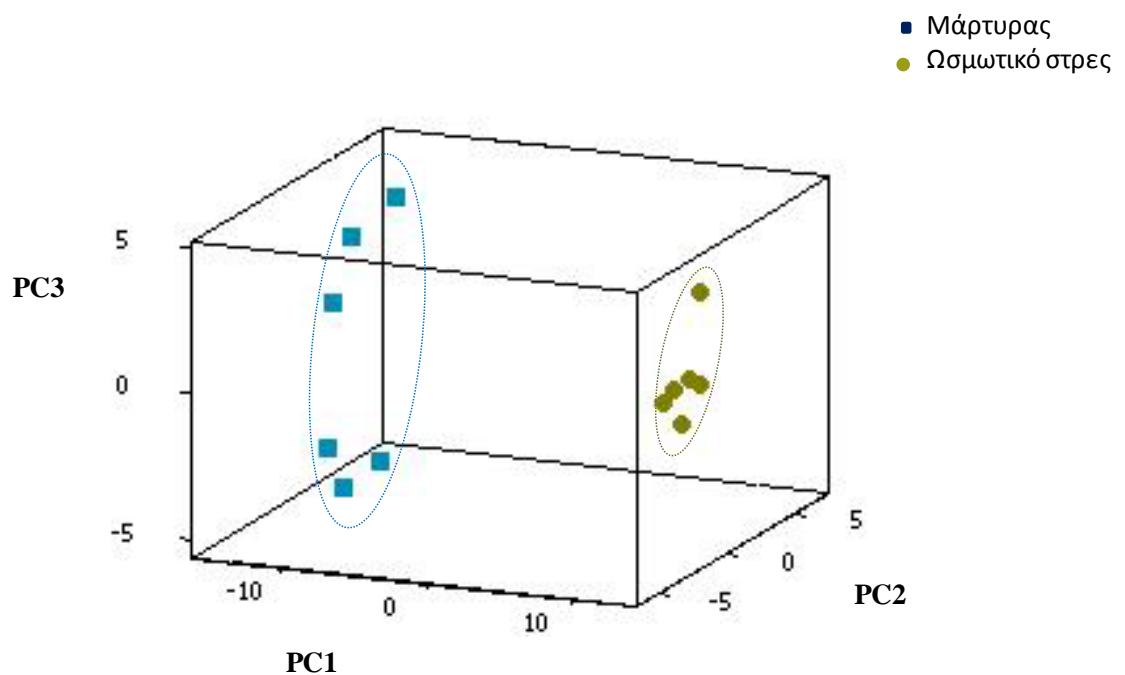
Σχήμα 5.3: Ανάλυση PCA της περιοχής $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή I) του φάσματος FT-IR του φαινοτύπου ωσμωτικής προσαρμογής του *L.lactis*.

(A) β' παράγωγος της περιοχής $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε ωσμωτικό στρες (2.5% w/v NaCl). (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.

A.

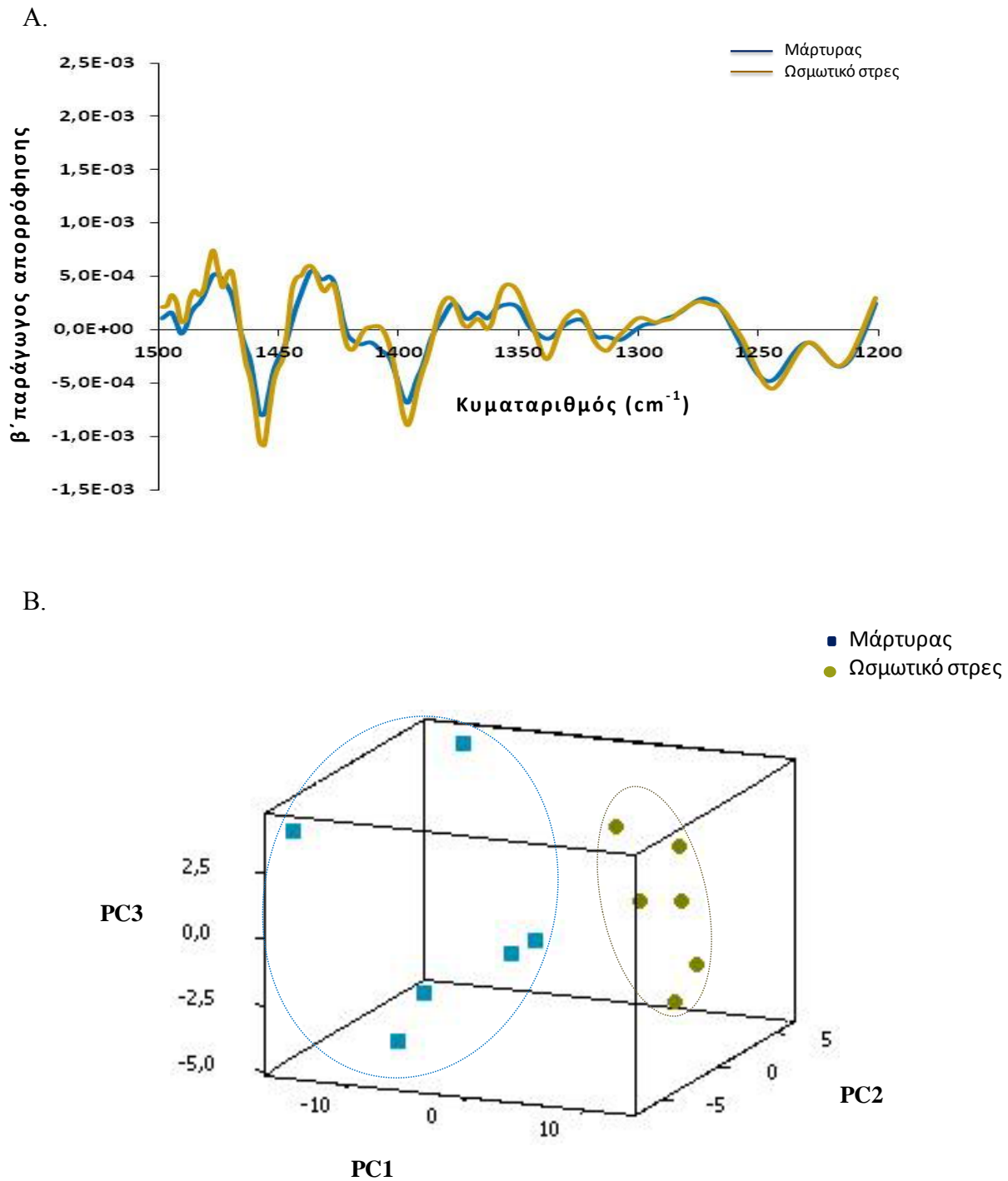


B.



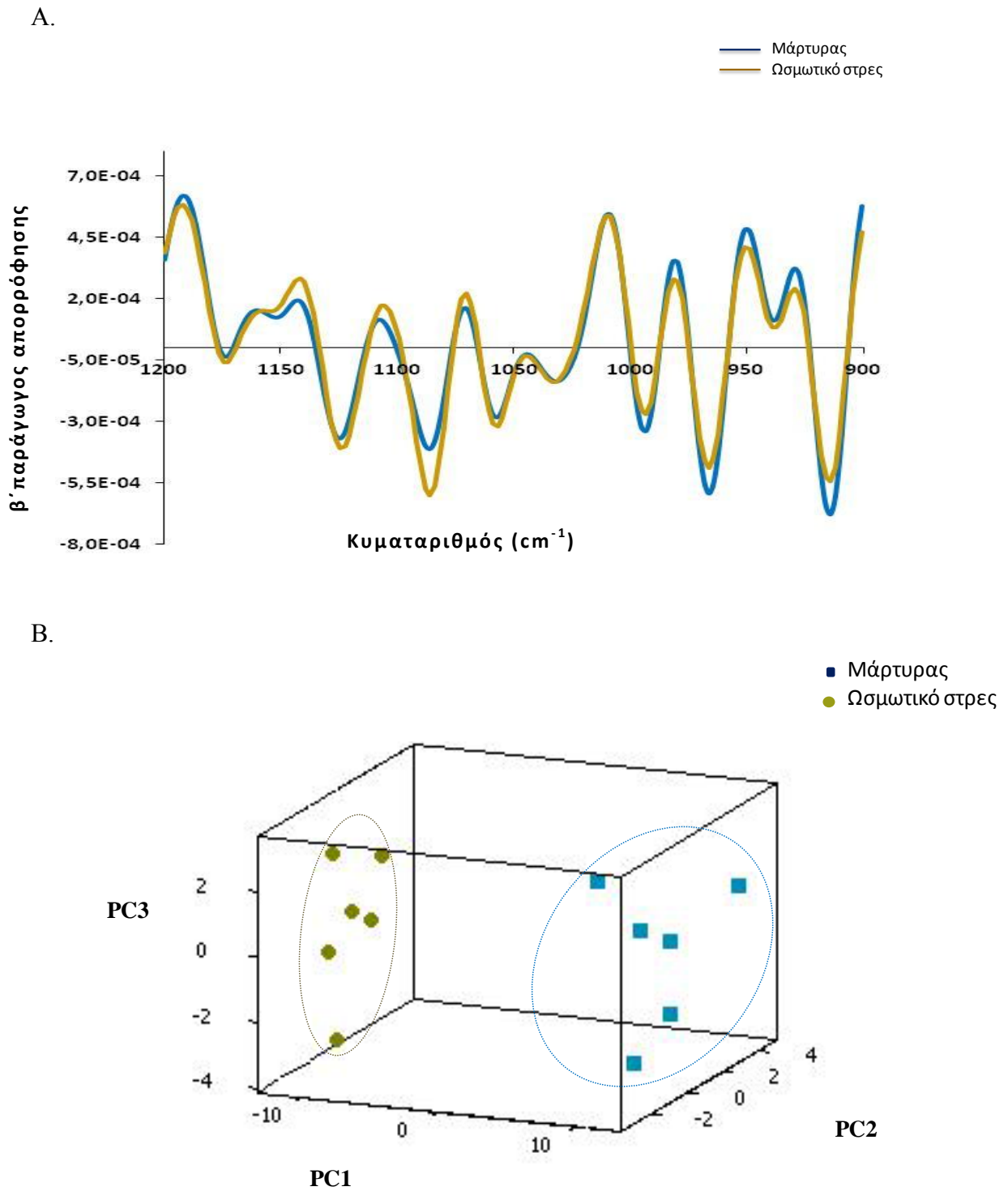
Σχήμα 5.4: Ανάλυση PCA της περιοχής 1800-1500 cm⁻¹ (Περιοχή II) του φάσματος FT-IR του φαινοτύπου ωσμωτικής προσαρμογής του *L.lactis*.

(A) β' παράγωγος της περιοχής 1800-1500 cm⁻¹ του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε ωσμωτικό στρες (2.5% w/v NaCl). (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.



Σχήμα 5.5: Ανάλυση PCA της περιοχής 1500-1200 cm^{-1} (Περιογή III) του φάσματος FT-IR του φαινοτύπου ωσμωτικής προσαρμογής του *L.lactis*.

(A) β' παράγωγος της περιοχής 1500-1200 cm^{-1} του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε ωσμωτικό στρες (2.5% w/v NaCl). (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.



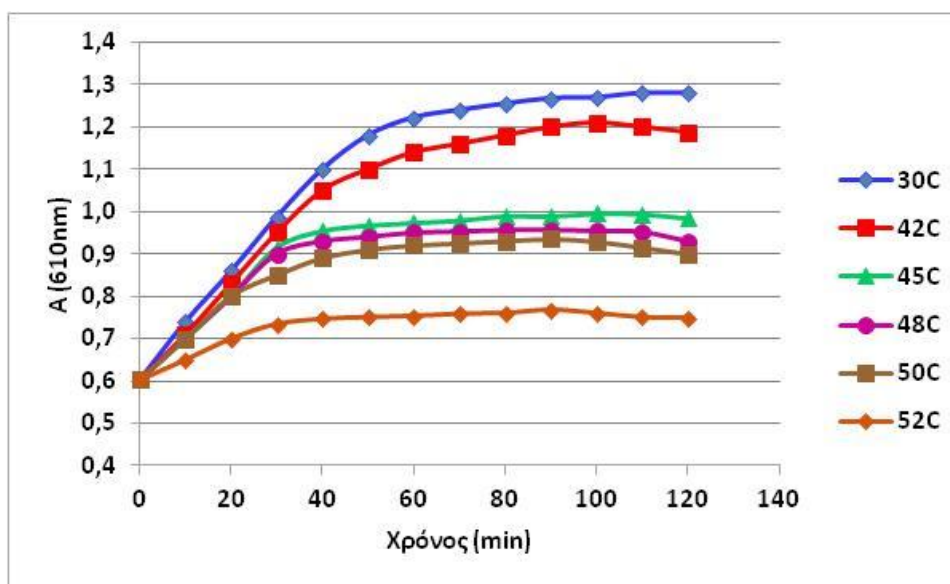
Σχήμα 5.6: Ανάλυση PCA της περιοχής 1200-900 cm^{-1} (Περιοχή IV) του φάσματος FT-IR του φαινοτύπου ωσμωτικής προσαρμογής του *L.lactis*.

(A) β' παράγωγος της περιοχής 1200-900 cm^{-1} του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε ωσμωτικό στρες (2.5% w/v NaCl). (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.

3.4 Θερμικό στρες

3.4.1 Επιλογή θερμικού στρες

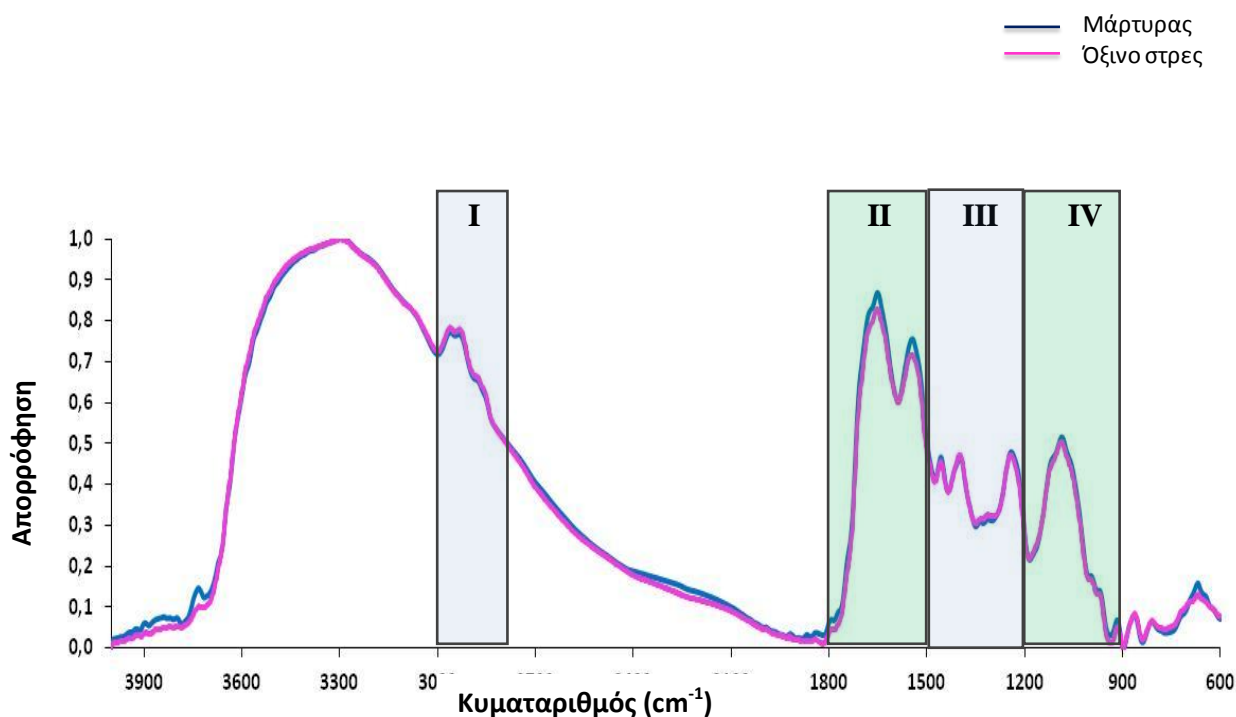
Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 2.4.3, για το θερμικό στρες του *L. lactis* μελετήθηκαν οι θερμοκρασίες 42, 45, 48, 50 και 52 °C. Οι τιμές εκείνες της θερμοκρασίας στις οποίες υπήρξε παρεμπόδιση της ανάπτυξης στη 1 h, είναι ≥ 45 °C (Σχήμα 6). Από τις συνθήκες αυτές επιλέξαμε τους 45 °C διότι τα κύτταρα του *L. lactis* παρουσίασαν οριακά καλύτερη ανάπτυξη από τις άλλες θερμοκρασίες. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στο θερμικό στρες, τα κύτταρα του *L. lactis* είχαν πάντως να πολλαπλασιάζονται πριν την ολοκλήρωση της 1 h έκθεσης. Παρ'όλα αυτά για να είναι όμως συγκρίσιμα τα φάσματα των κυττάρων που εκτέθηκαν σε υψηλή θερμοκρασία, με αυτά των άλλων στρες, πραγματοποιήσαμε ξανά τη δειγματοληψία στη 1 h.



Σχήμα 6: Καμπύλη ανάπτυξης του *L. lactis* σε θερμοκρασίες 42, 45, 48, 50 και 52°C (θερμικό στρες) και 30 °C (μάρτυρας).

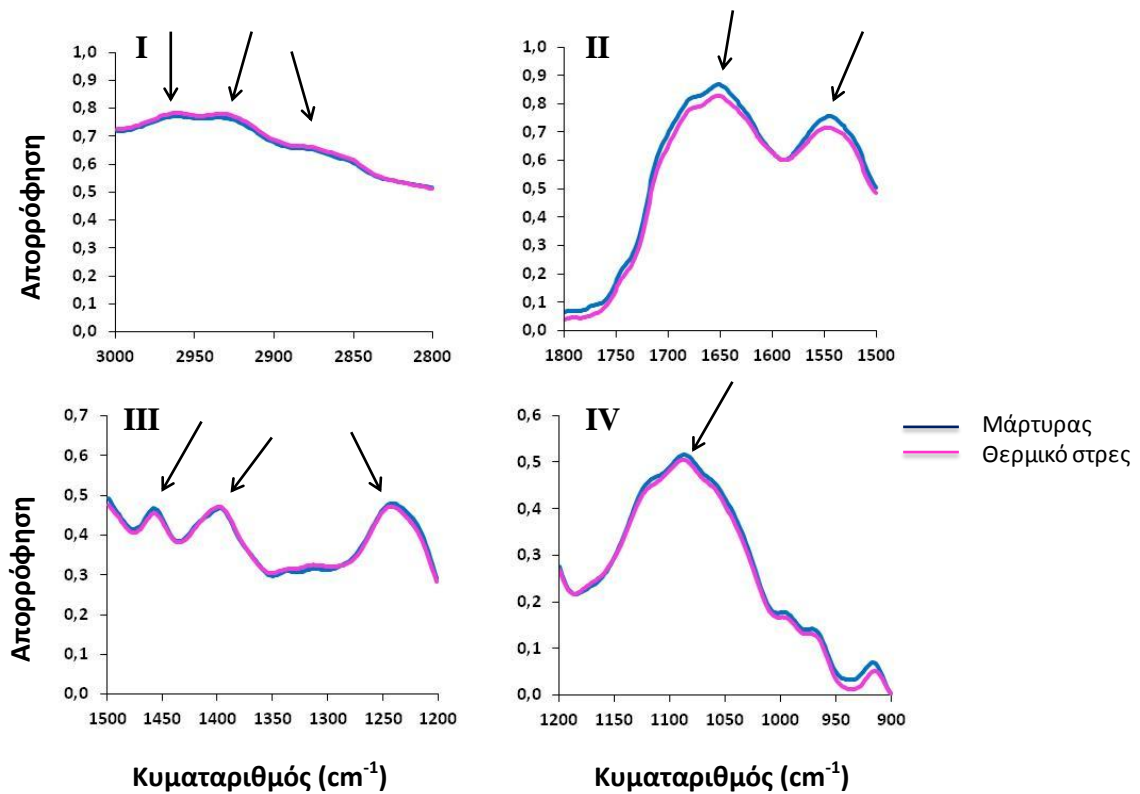
3.4.2 Φάσματα FT-IR

Στο Σχήμα 6.1 παρουσιάζονται τα φάσματα FT-IR ($4000-600\text{ cm}^{-1}$) από μη προσαρμοσμένα στο θερμικό στρες κύτταρα μάρτυρες, λογαριθμικής φάσης του *L. lactis* και από κύτταρα λογαριθμικής φάσης του φαινοτύπου θερμικής προσαρμογής του βακτηρίου, τα οποία προέκυψαν ύστερα επώαση στους 45°C για 1 h. Τα φάσματα που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος από έξι ανεξάρτητες επαναλήψεις. Τα φάσματα παρουσίασαν έντονη απορρόφηση στις τέσσερις χαρακτηριστικές, για τη βιοχημική σύσταση των κυττάρων, περιοχές του υπέρυθρου, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 6.2 (Naumann et al., 1991, Papadimitriou et al., 2008).



Σχήμα 6.1: Φάσματα FT-IR ($4000-600\text{ cm}^{-1}$) του φαινοτύπου θερμικής προσαρμογής του *L.lactis*.

Φάσματα FT-IR των προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε θερμικό στρες (45°C). Οι ζώνες I, II, III και IV αντιστοιχούν σε περιοχές του φάσματος που απορροφούν βασικά συστατικά του κυττάρου.



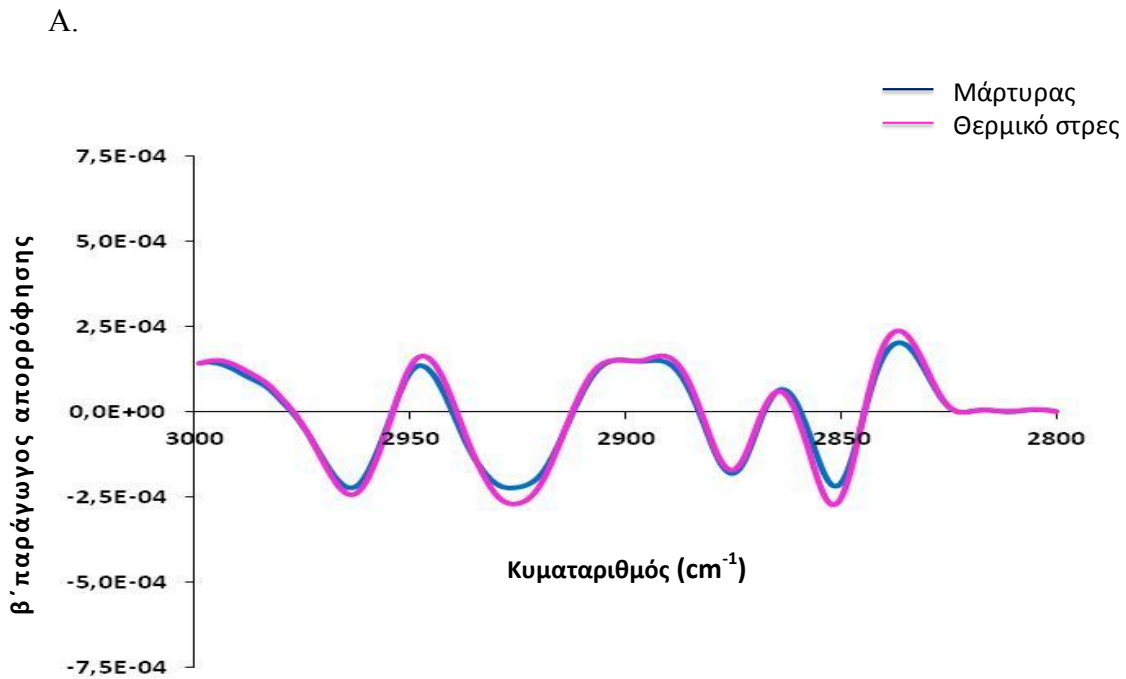
Σχήμα 6.2: Φάσματα FT-IR ($4000-600\text{ cm}^{-1}$) του φαινοτύπου θερμικής προσαρμογής του *L.lactis*.

Φάσματα FT-IR των προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε θερμικό στρες ($45\text{ }^{\circ}\text{C}$). Οι ζώνες I, II, III και IV αντιστοιχούν σε περιοχές του φάσματος που απορροφούν βασικά συστατικά του κυττάρου. Τα βέλη επισημαίνουν χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος, όπως αυτές αναφέρονται στο κείμενο.

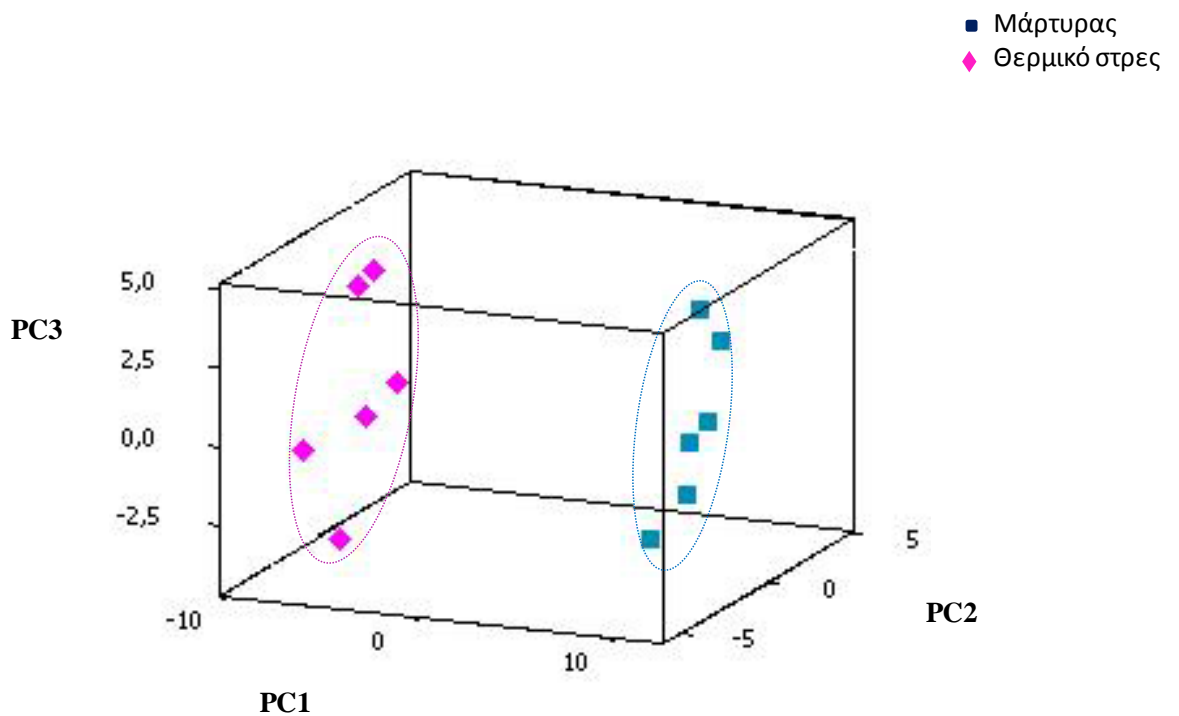
Στην περίπτωση των φασμάτων των κυττάρων του *L.lactis* σε θερμικό στρες, οι διαφορές που παρατηρήθηκαν σε αυτό το στάδιο της ανάλυσης ήταν έντονες μονάχα στην Περιοχή II ($1800-1500\text{ cm}^{-1}$) του φάσματος.

3.3.3 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για το διαχωρισμό των φασμάτων

Η ανάλυση και των τεσσάρων περιοχών του φάσματος οδήγησε σε παρόμοια αποτελέσματα με αυτά που παρατηρήθηκαν και στα προηγούμενα στρες. Η δεύτερη παράγωγος οδήγησε στον εντοπισμό σημαντικού αριθμού αλληλοεπικαλυπτόμενων ζωνών απορρόφησης, ενώ η ανάλυση PCA έδειξε ισχυρή τάση ομαδοποίησης των διαφορετικών φυσιολογικών καταστάσεων του *L. lactis* (Σχήμα 6.3, Σχήμα 6.4, Σχήμα 6.5 και Σχήμα 6.6)

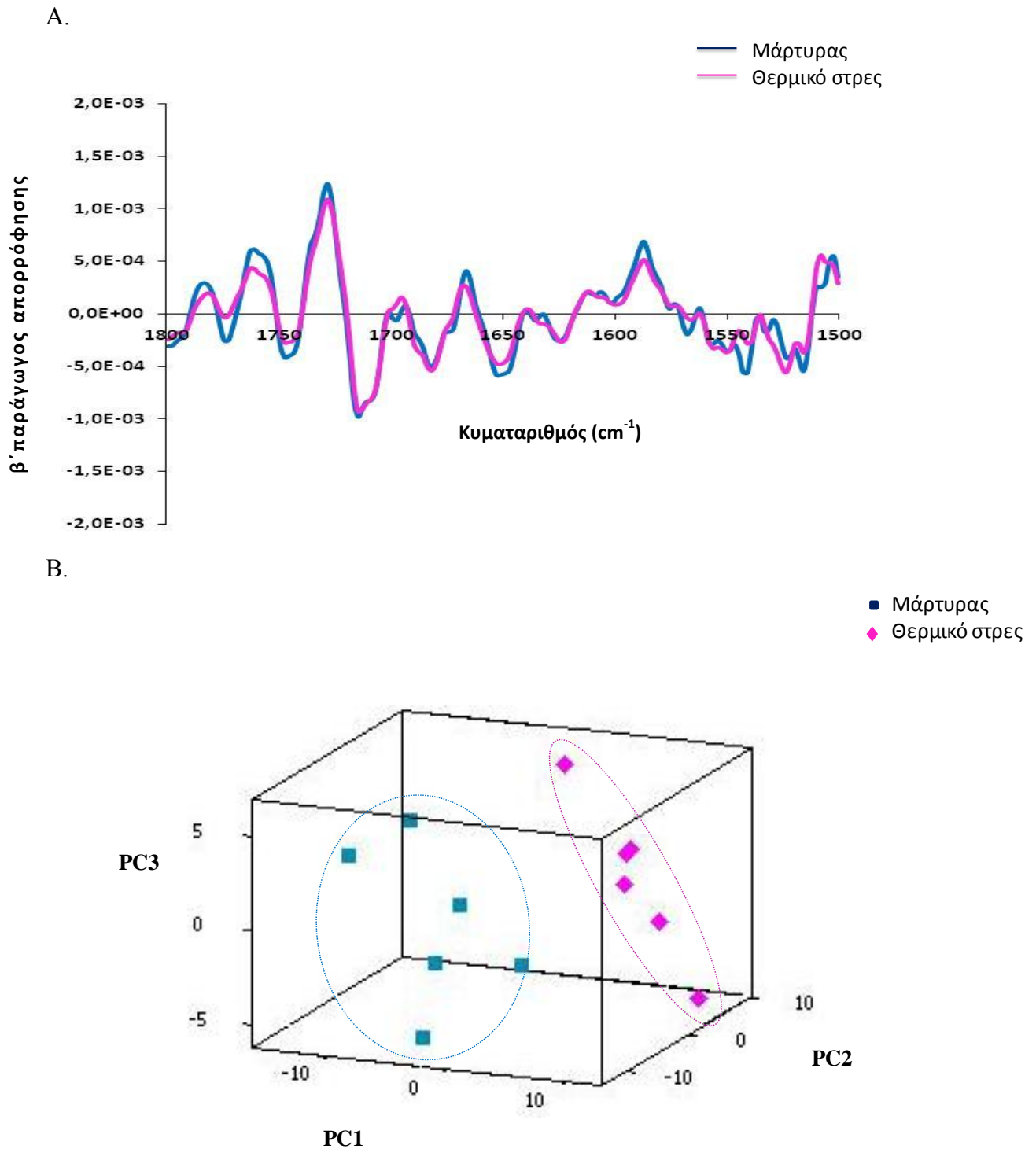


B.



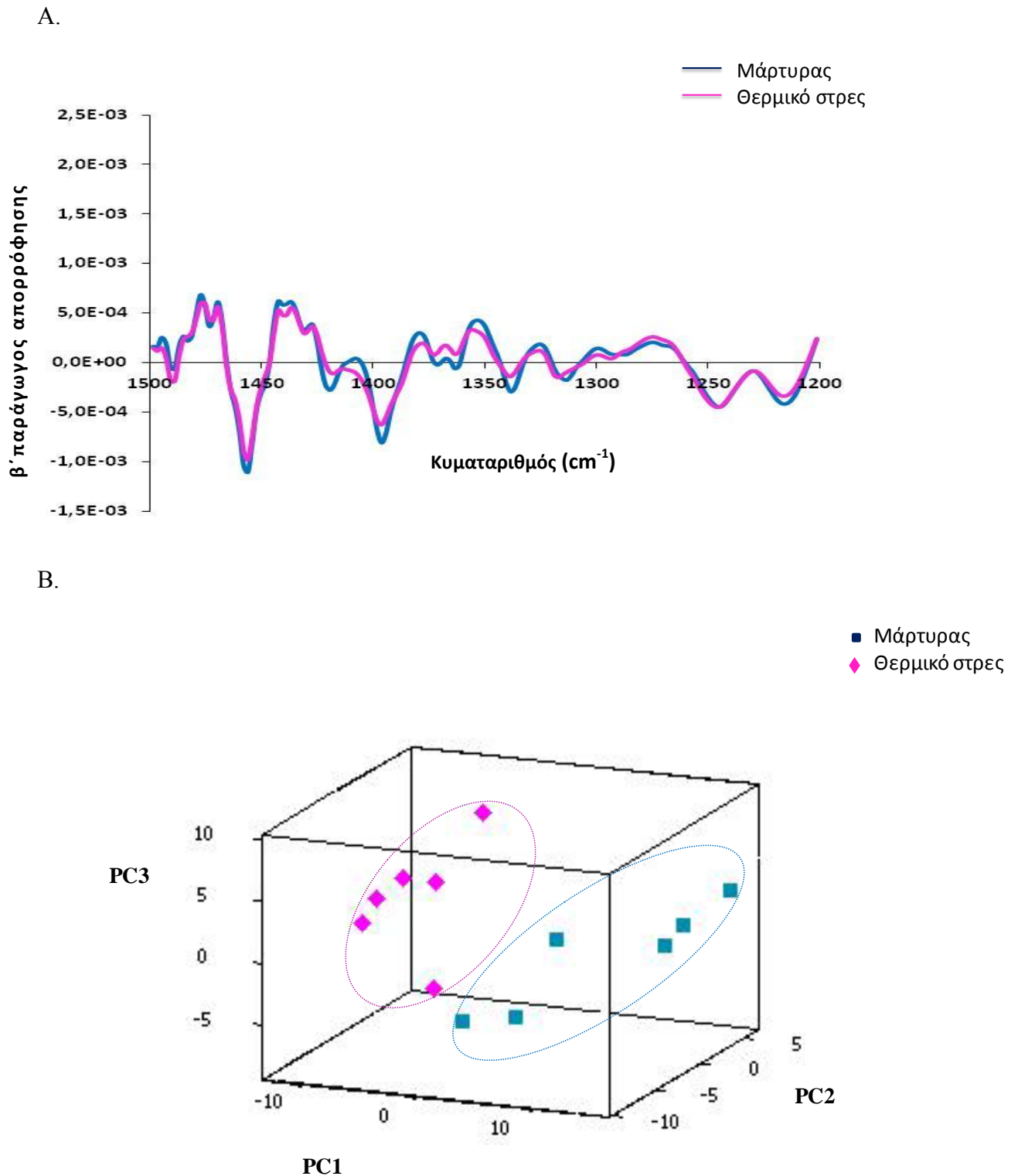
Σχήμα 6.3: Ανάλυση PCA της περιοχής $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή I) του φάσματος FT-IR του φαινοτύπου θερμικής προσαρμογής του *L.lactis*.

(A) β' παράγωγος της περιοχής $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε θερμικό στρες ($45\text{ }^{\circ}\text{C}$). (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.



Σχήμα 6.4: Ανάλυση PCA της περιοχής $1800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή II) του φάσματος FT-IR του φαινοτύπου θερμικής προσαρμογής του *L.lactis*.

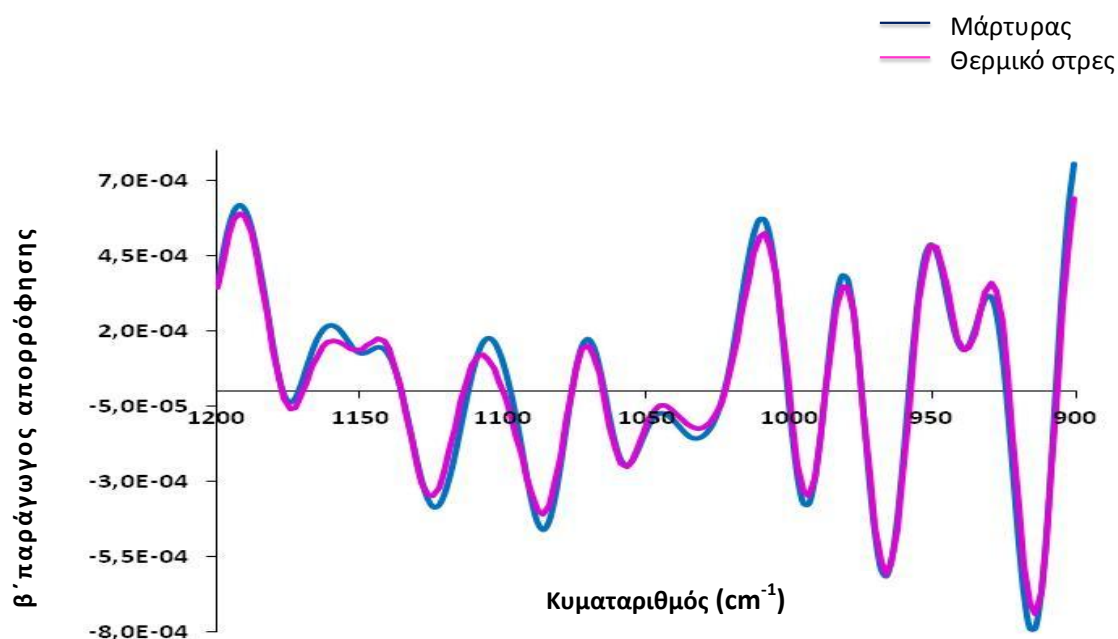
(A) β' παράγωγος της περιοχής $1800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε θερμικό στρες ($45\text{ }^{\circ}\text{C}$). (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.



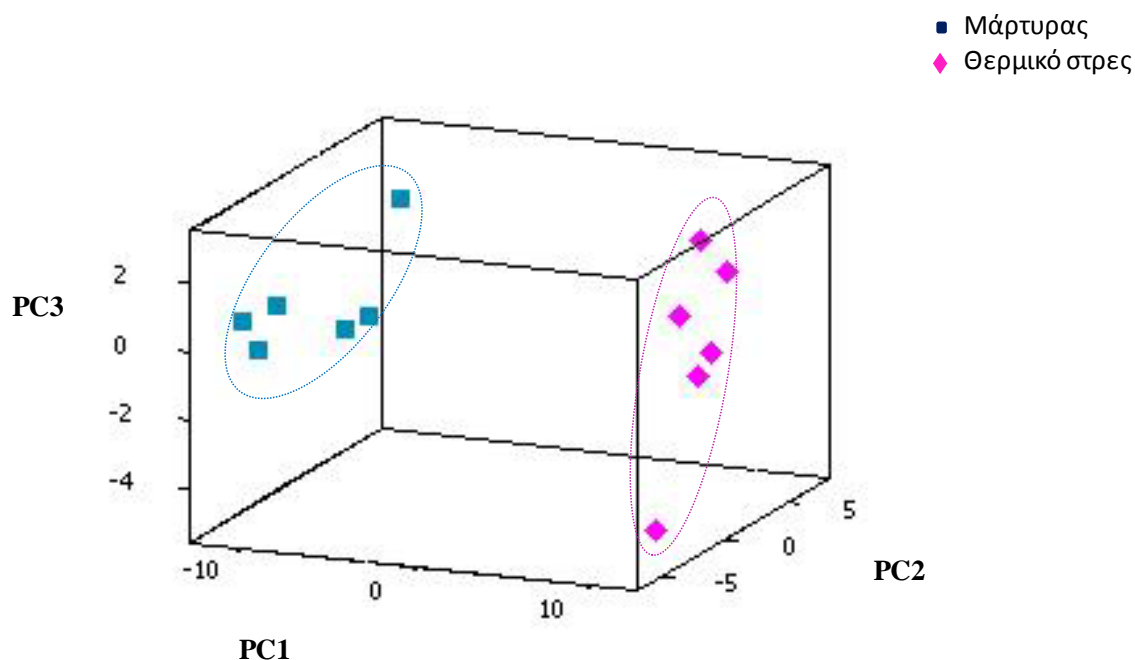
Σχήμα 6.5: Ανάλυση PCA της περιοχής 1500-1200 cm^{-1} (Περιοχή III) του φάσματος FT-IR του φαινοτύπου θερμικής προσαρμογής του *L.lactis*.

(A) β' παράγωγος της περιοχής 1500-1200 cm^{-1} του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε θερμικό στρες (45 °C). (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.

A.



B.



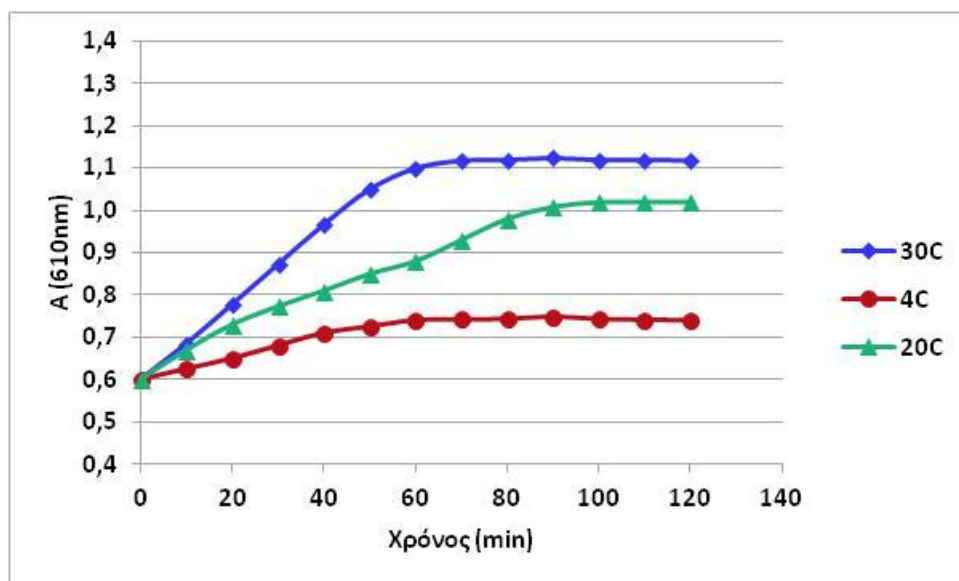
Σχήμα 6.6: Ανάλυση PCA της περιοχής $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή IV) του φάσματος FT-IR του φαινοτύπου θερμικής προσαρμογής του *L.lactis*.

(A) β' παράγωγος της περιοχής $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε θερμικό στρες ($45\text{ }^{\circ}\text{C}$). (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.

3.5 Στρες χαμηλής θερμοκρασίας

3.5.1 Επιλογή στρες χαμηλής θερμοκρασίας

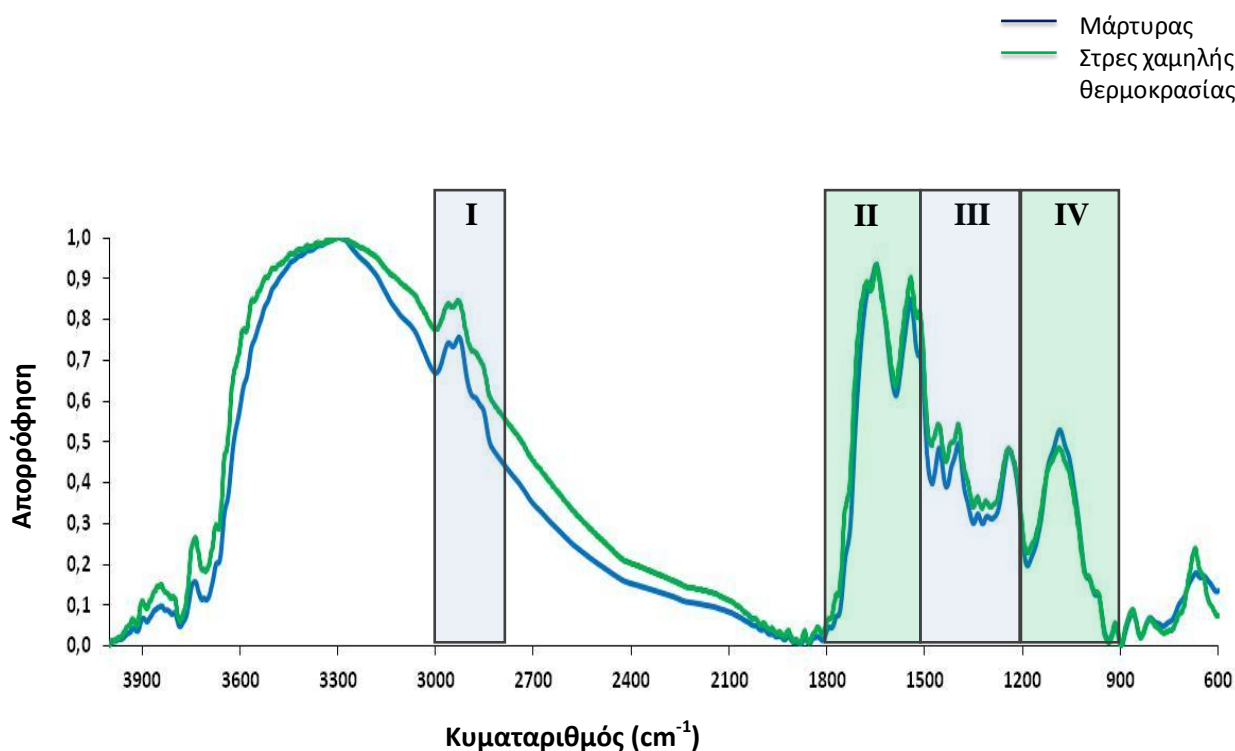
Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 2.4.4, για το στρες χαμηλής θερμοκρασίας του *L. lactis* μελετήθηκαν οι θερμοκρασίες 4 και 20 °C. Η θερμοκρασία εκείνη στην οποία υπήρξε παρεμπόδιση της ανάπτυξης στη 1 h, είναι οι 20 °C (Σχήμα 7). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι μέχρι και τα 100 min ο *L. lactis* παρουσίαζε ανάπτυξη στους 20 °C με μειωμένο ρυθμό σε σχέση με το μάρτυρα, γεγονός που υποδηλώνει την προσαρμογή των κυττάρων στο ψυχρό στρες. Στη 1 h και σε τιμή απορρόφησης κοντά στο 0.9, έγινε δειγματοληψία και τα κύτταρα του *L. lactis* αναλύθηκαν με τη φασματοσκοπία FT-IR. Στους 4 °C η ανάπτυξη των κυττάρων του *L. lactis* τερματιζόταν πρόωρα.



Σχήμα 7: Καμπύλη ανάπτυξης του *L. lactis* σε θερμοκρασίες 4 και 20 °C (στρες χαμηλής θερμοκρασίας) και 30 °C (μάρτυρας).

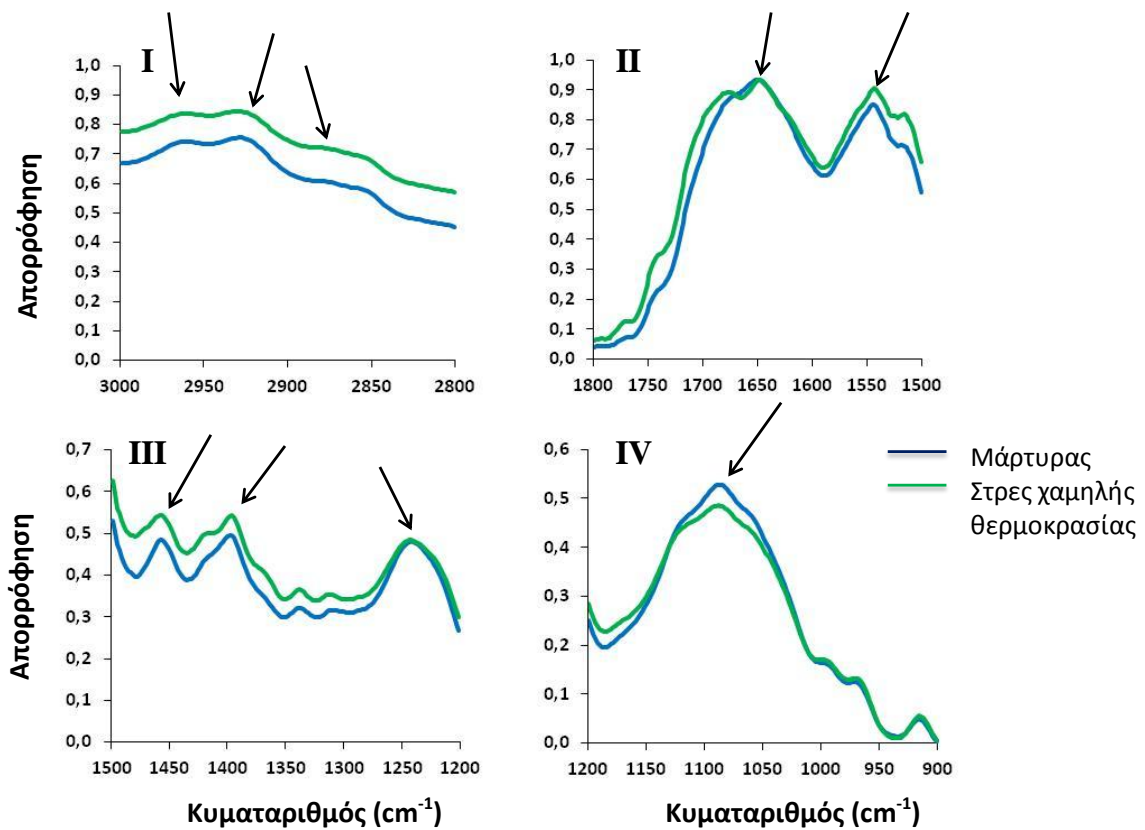
3.5.2 Φάσματα FT-IR

Στο Σχήμα 7.1 παρουσιάζονται τα φάσματα FT-IR ($4000-600\text{ cm}^{-1}$) από μη προσαρμοσμένα στο ψυχρό στρες κύτταρα μάρτυρες, λογαριθμικής φάσης του *L. lactis* και από κύτταρα λογαριθμικής φάσης του φαινοτύπου ψυχρής προσαρμογής του βακτηρίου, τα οποία προέκυψαν ύστερα επώαση στους $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 1 h. Τα φάσματα που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος από έξι ανεξάρτητες επαναλήψεις και τα οποία παρουσίασαν έντονη απορρόφηση στις τέσσερις χαρακτηριστικές, για τη βιοχημική σύσταση των κυττάρων, περιοχές του υπέρυθρου, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 7.2 και (Naumann et al., 1991, Papadimitriou et al., 2008).



Σχήμα 7.1: Φάσματα FT-IR ($4000-600\text{ cm}^{-1}$) του φαινοτύπου ψυχρής προσαρμογής του *L.lactis*.

Φάσματα FT-IR των προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε στρες χαμηλής θερμοκρασίας ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Οι ζώνες I, II, III και IV αντιστοιχούν σε περιοχές του φάσματος που απορροφούν βασικά συστατικά του κυττάρου.



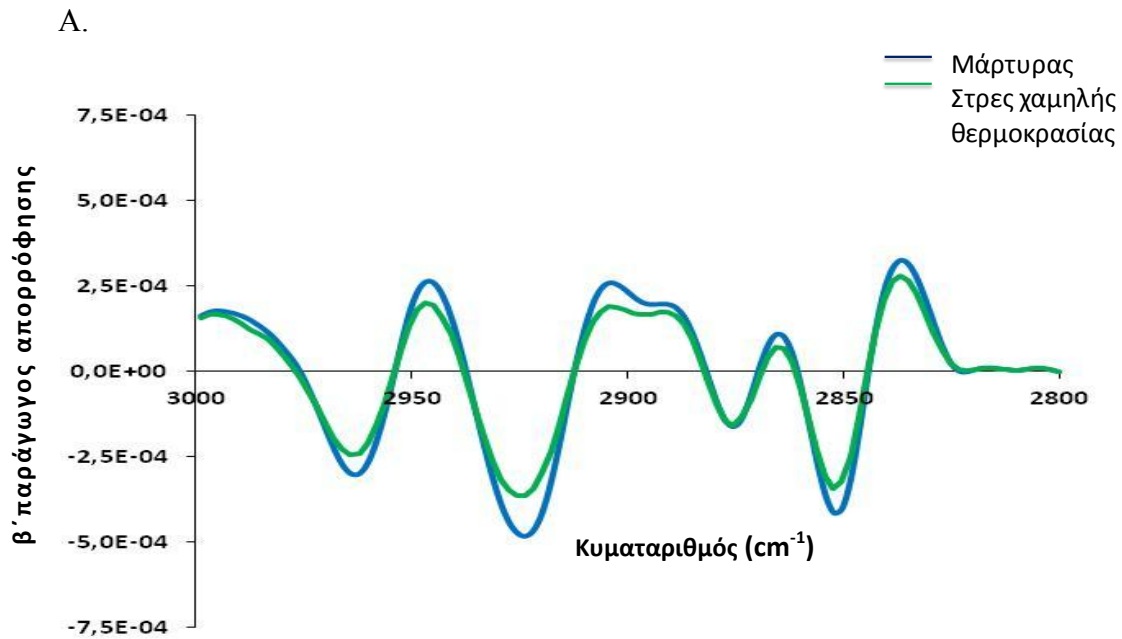
Σχήμα 7.2: Φάσματα FT-IR ($4000-600\text{ cm}^{-1}$) του φαινοτύπου ψυχρής προσαρμογής του *L.lactis*.

Φάσματα FT-IR των προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε στρες χαμηλής θερμοκρασίας ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Οι ζώνες I, II, III και IV αντιστοιχούν σε περιοχές του φάσματος που απορροφούν βασικά συστατικά του κυττάρου. Τα βέλη επισημαίνουν χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος, όπως αυτές αναφέρονται στο κείμενο.

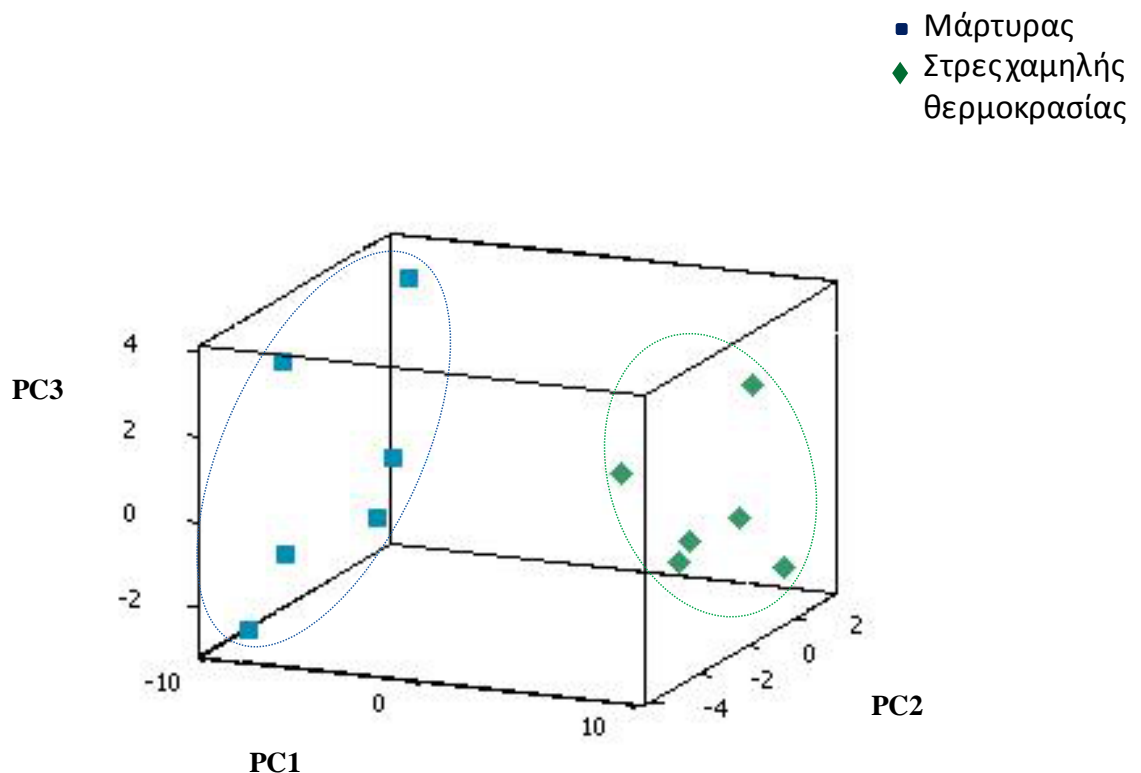
Στην περίπτωση των φασμάτων των κυττάρων του *L.lactis* κατά τη διάρκεια του ψυχρού στρες, οι διαφορές στα φάσματα που παρατηρήθηκαν στο στάδιο αυτό της ανάλυσης ήταν ιδιαίτερα εμφανείς και στις τέσσερις χαρακτηριστικές περιοχές.

3.5.3 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για το διαχωρισμό των φασμάτων

Η ανάλυση και των τεσσάρων περιοχών του φάσματος αποκάλυψε σημαντικές διαφορές μεταξύ των φασμάτων των κυττάρων του *L. lactis*, ενώ η δεύτερη παράγωγος οδήγησε στον εντοπισμό σημαντικού αριθμού αλληλοεπικαλυπτόμενων ζωνών. Η ανάλυση PCA έδειξε ισχυρή τάση ομαδοποίησης μεταξύ των διαφορετικών φυσιολογικών καταστάσεων του *L. lactis* και στις τέσσερις περιοχές του φάσματος FT-IR όπως ακριβώς έγινε και στα προηγούμενα στρες (Σχήμα 7.3, Σχήμα 7.4, Σχήμα 7.5 και Σχήμα 7.6).

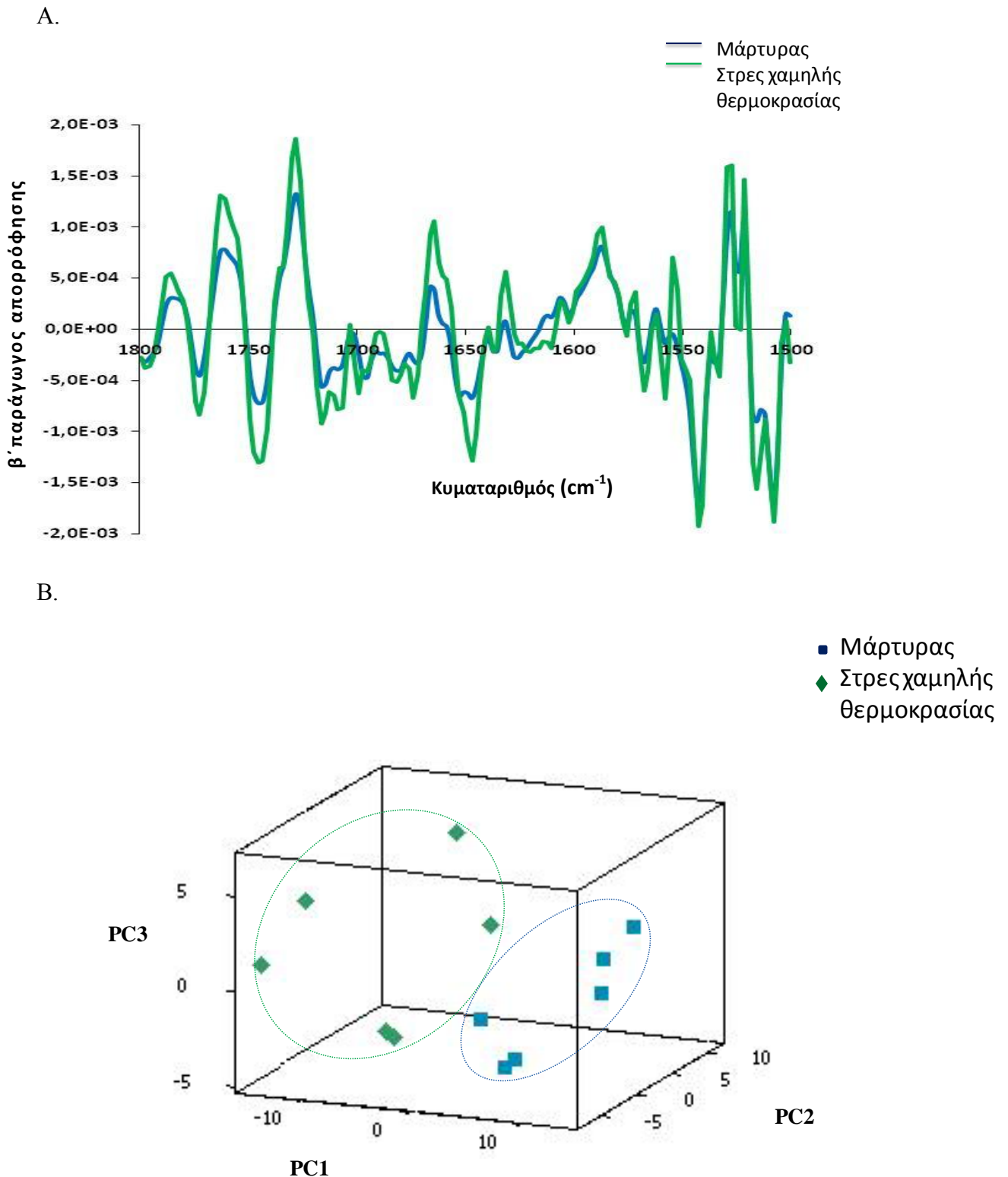


B.



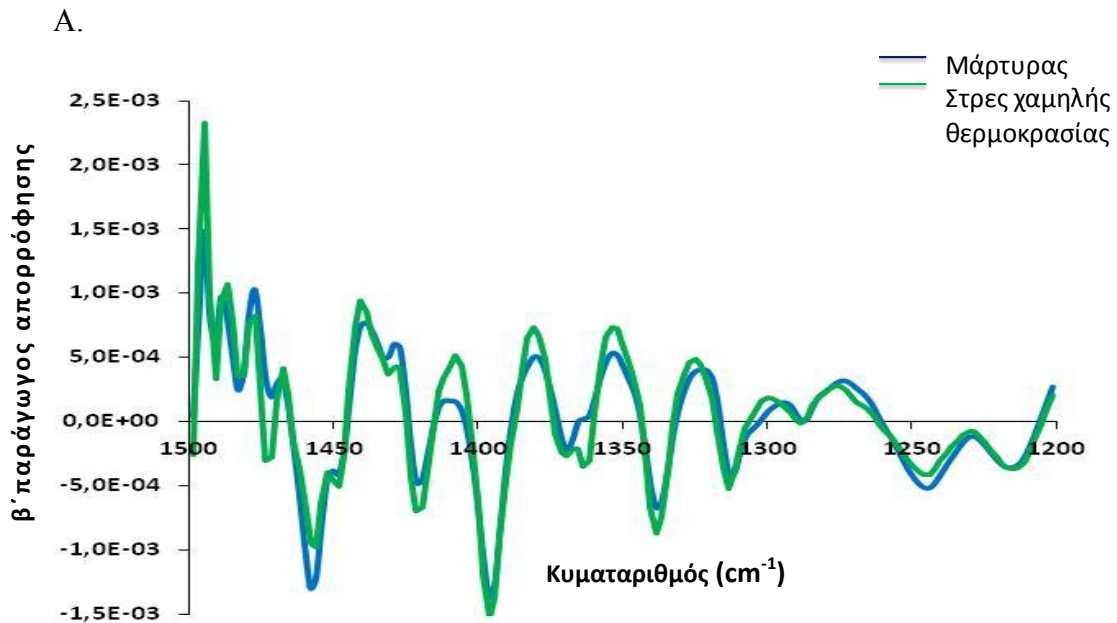
Σχήμα 7.3: Ανάλυση PCA της περιοχής $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ (Περιογή I) του φάσματος FT-IR του φαινοτύπου ψυχρής προσαρμογής του *L.lactis*.

(A) β' παράγωγος της περιοχής $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε ψυχρό στρες ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$). (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.

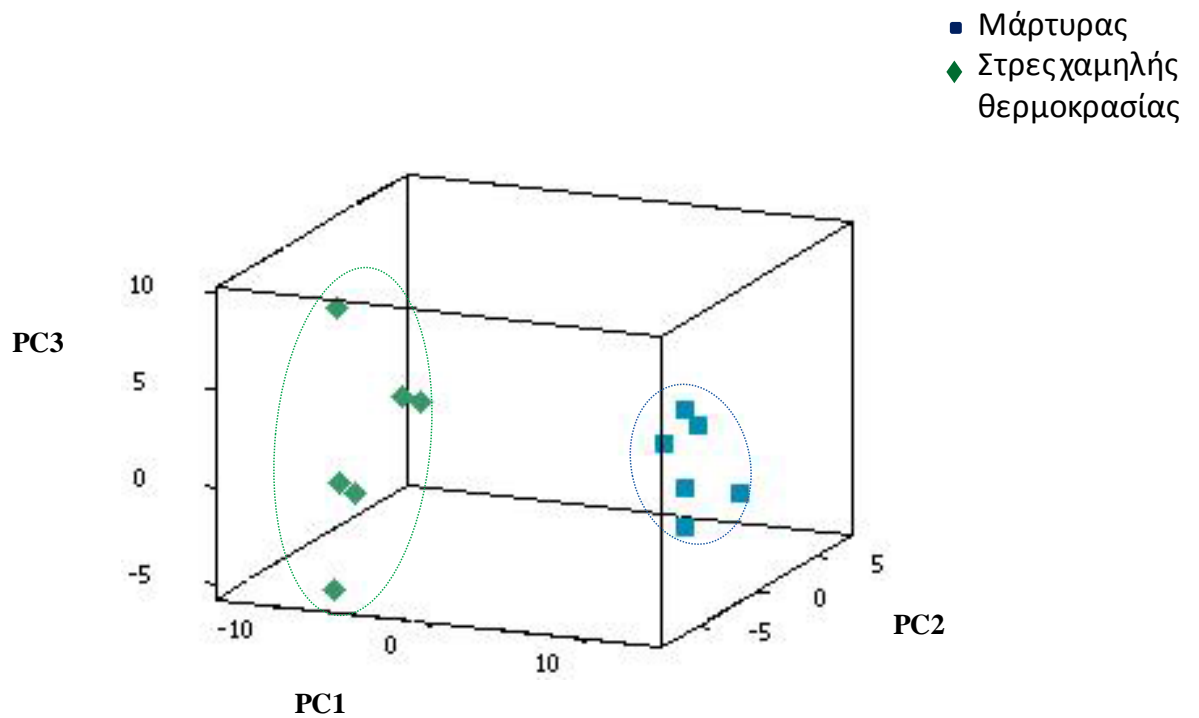


Σχήμα 7.4: Ανάλυση PCA της περιοχής 1800-1500 cm⁻¹ (Περιοχή II) του φάσματος FT-IR του φαινοτύπου ψυχρής προσαρμογής του *L.lactis*.

(A) β' παράγωγος της περιοχής 1800-1500 cm⁻¹ του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε ψυχρό στρες (20 °C). (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.

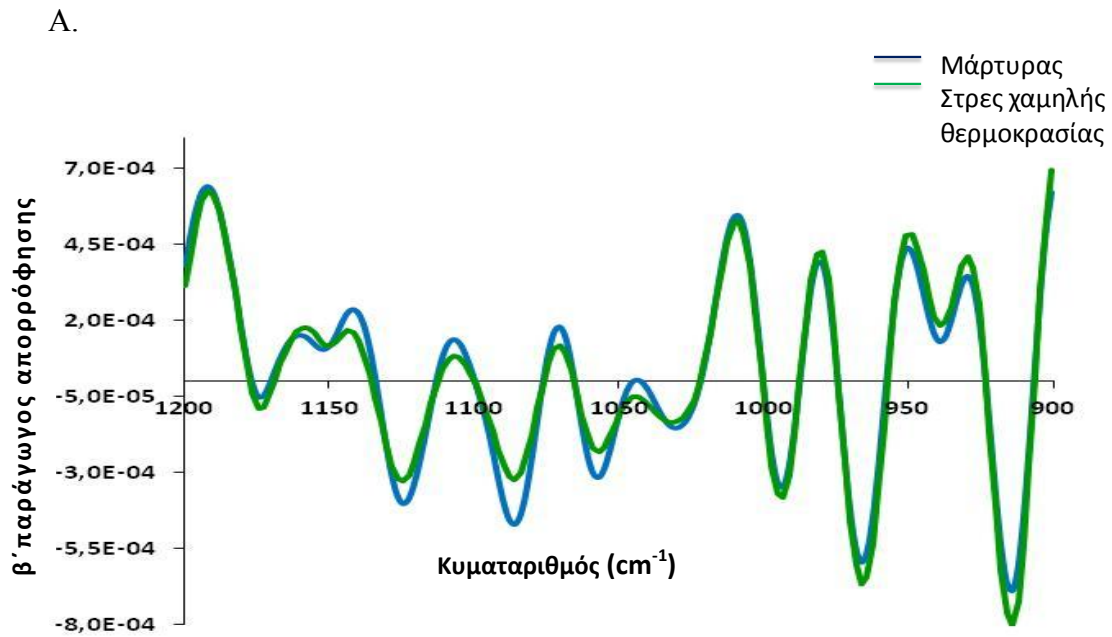


B.

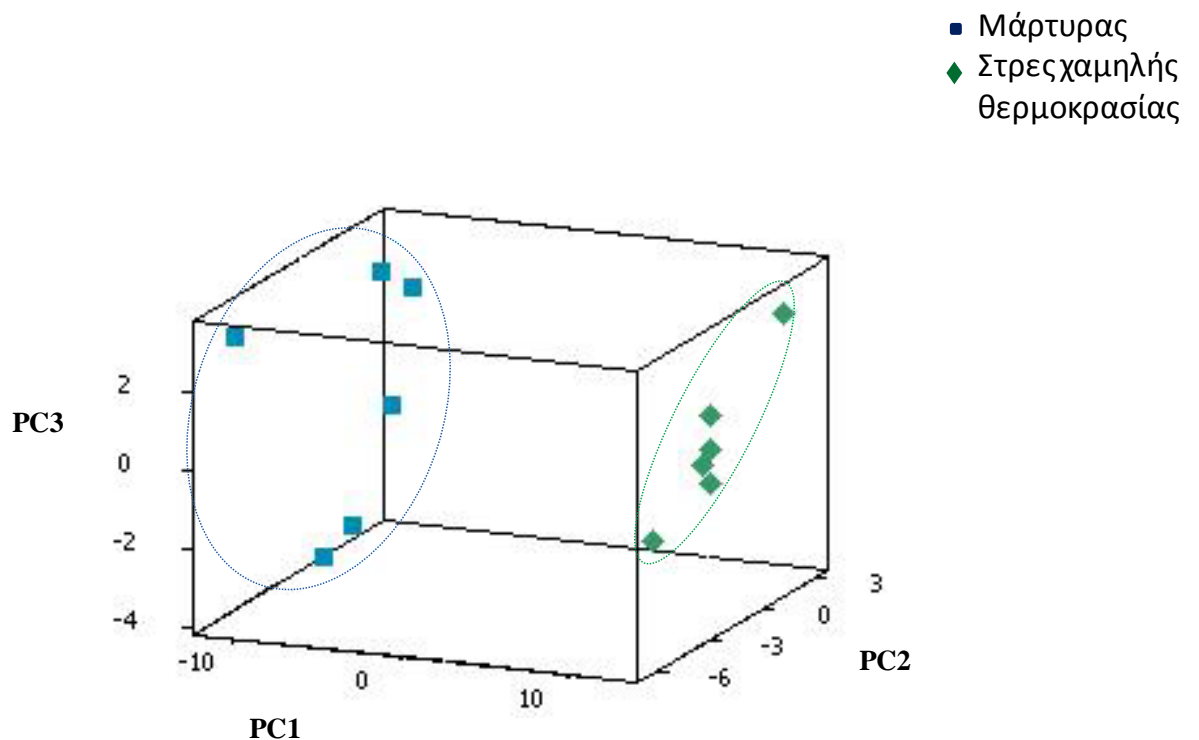


Σχήμα 7.5: Ανάλυση PCA της περιοχής $1500\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ (Περιογή III) του φάσματος FT-IR του φαινοτύπου ψυχρής προσαρμογής του *L.lactis*.

(A) β' παράγωγος της περιοχής $1500\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε ψυχρό στρες ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$). (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.



B.



Σχήμα 7.6: Ανάλυση PCA της περιοχής $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή IV) του φάσματος FT-IR του φαινοτύπου ψυχρής προσαρμογής του *L.lactis*.

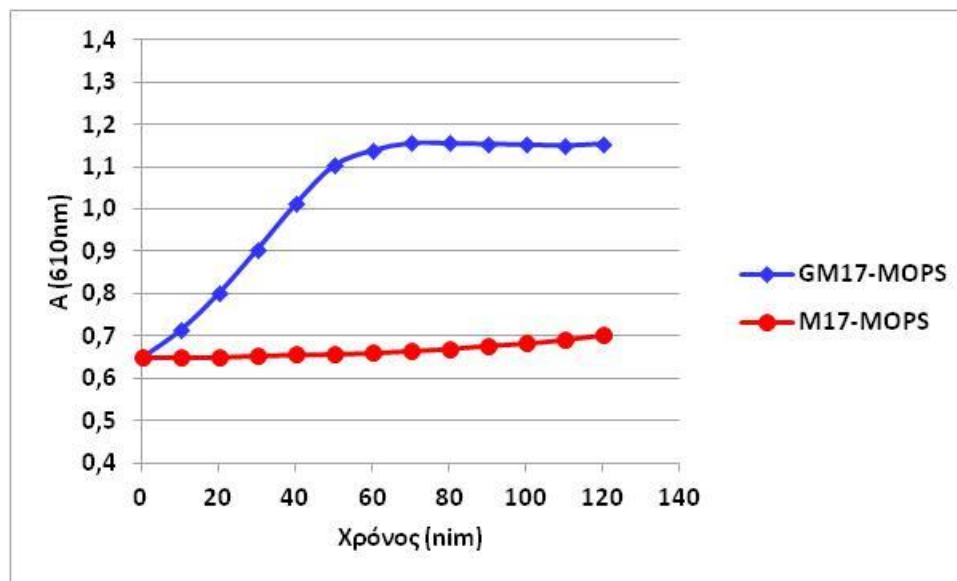
(A) β' παράγωγος της περιοχής $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε ψυχρό στρες ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$). (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.

3.6 Ασιτία

3.6.1 Έλλειψη θρεπτικών συστατικών

3.6.1.1 Επιλογή συνθηκών ασιτίας

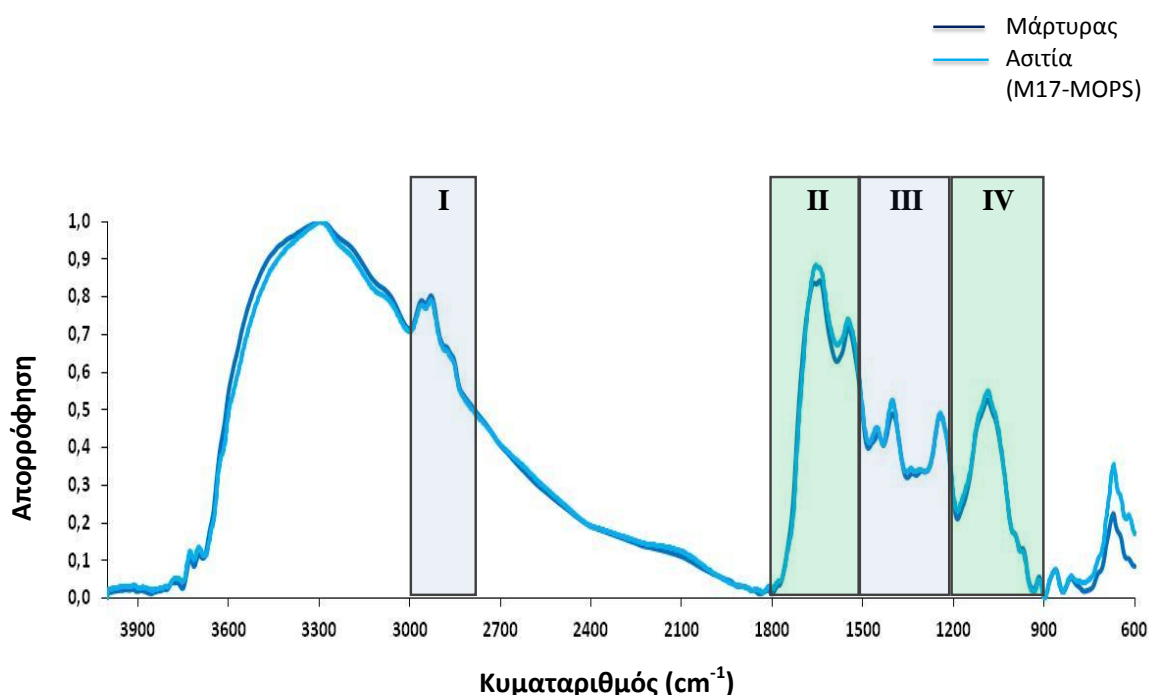
Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 2.4.5, στην περίπτωση της ασιτίας του *L. lactis* μελετήθηκαν δύο συνθήκες. Στην περίπτωση κατά την οποία υπήρχε έλλειψη γλυκόζης στο θρεπτικό μέσο, κύτταρα λογαριθμικής φάσης του *L. lactis* επωάστηκαν για 1 h στους 30 °C και στη συνέχεια μελετήθηκαν με τη φασματοσκοπία FT-IR (Σχήμα 8).



Σχήμα 8: Καμπύλη ανάπτυξης κυττάρων του *L. lactis* σε συνθήκες ασιτίας με θρεπτικό μέσο χωρίς γλυκόζη (M17-MOPS) και κυττάρων σε θρεπτικό μέσο M17 και γλυκόζη (GM17-MOPS) χρησιμοποιούμενο ως μάρτυρας.

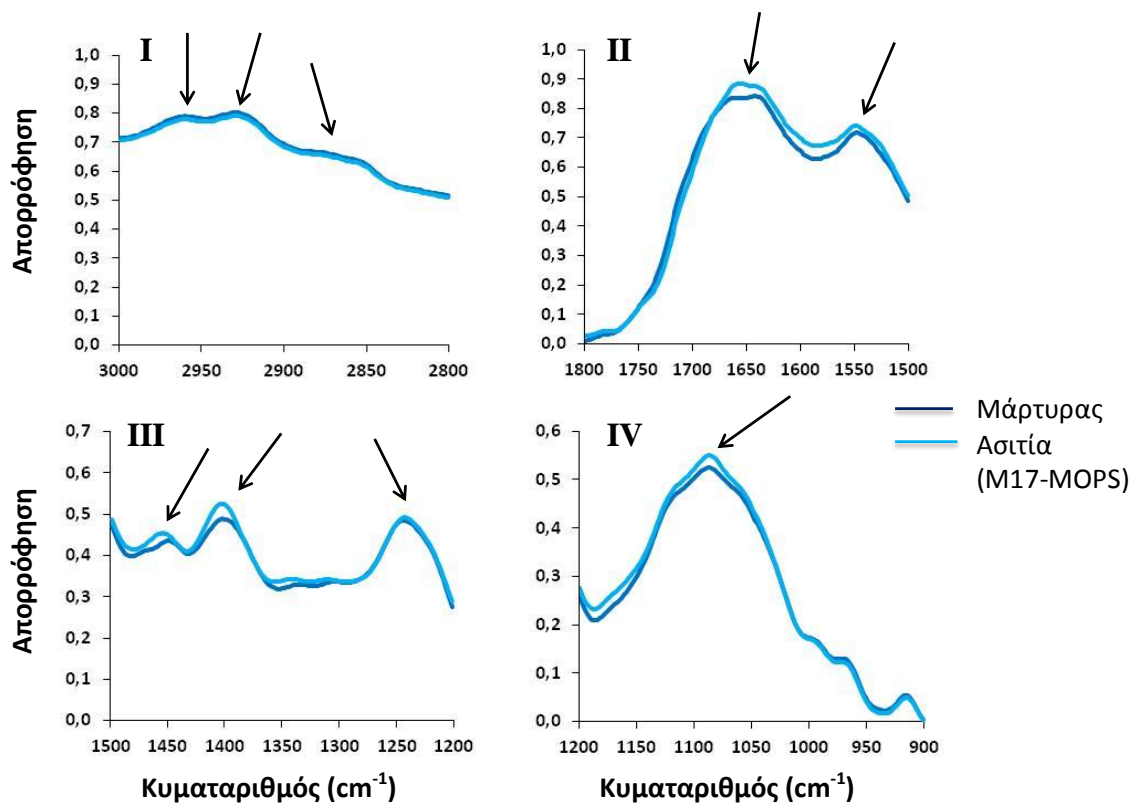
3.6.1.2 Φάσματα FT-IR

Στο Σχήμα 8.1 παρουσιάζονται τα φάσματα FT-IR ($4000-600\text{ cm}^{-1}$) από μη προσαρμοσμένα στο στρες της ασιτίας κύτταρα μάρτυρες, λογαριθμικής φάσης του *L. lactis* και από κύτταρα λογαριθμικής φάσης του φαινοτύπου προσαρμογής του βακτηρίου σε συνθήκες ασιτίας, τα οποία προέκυψαν ύστερα επώαση στους $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 1 h. Τα φάσματα που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος από έξι ανεξάρτητες επαναλήψεις, παρουσιάζοντας έντονη απορρόφηση στις τέσσερις χαρακτηριστικές, για τη βιοχημική σύσταση των κυττάρων, περιοχές του υπέρυθρου όπως φαίνεται και στο Σχήμα 8.2 (Naumann et al., 1991, Papadimitriou et al., 2008).



Σχήμα 8.1: Φάσματα FT-IR ($4000-600\text{ cm}^{-1}$) του φαινοτύπου του *L.lactis* κατά την προσαρμογή του σε συνθήκες ασιτίας.

Φάσματα FT-IR των προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε συνθήκες ασιτίας (M17-MOPS). Οι ζώνες I, II, III και IV αντιστοιχούν σε περιοχές του φάσματος που απορροφούν βασικά συστατικά του κυττάρου.



Σχήμα 8.2: Φάσματα FT-IR (4000-600 cm^{-1}) του φαινοτύπου του *L.lactis* κατά την προσαρμογή του σε συνθήκες ασιτίας.

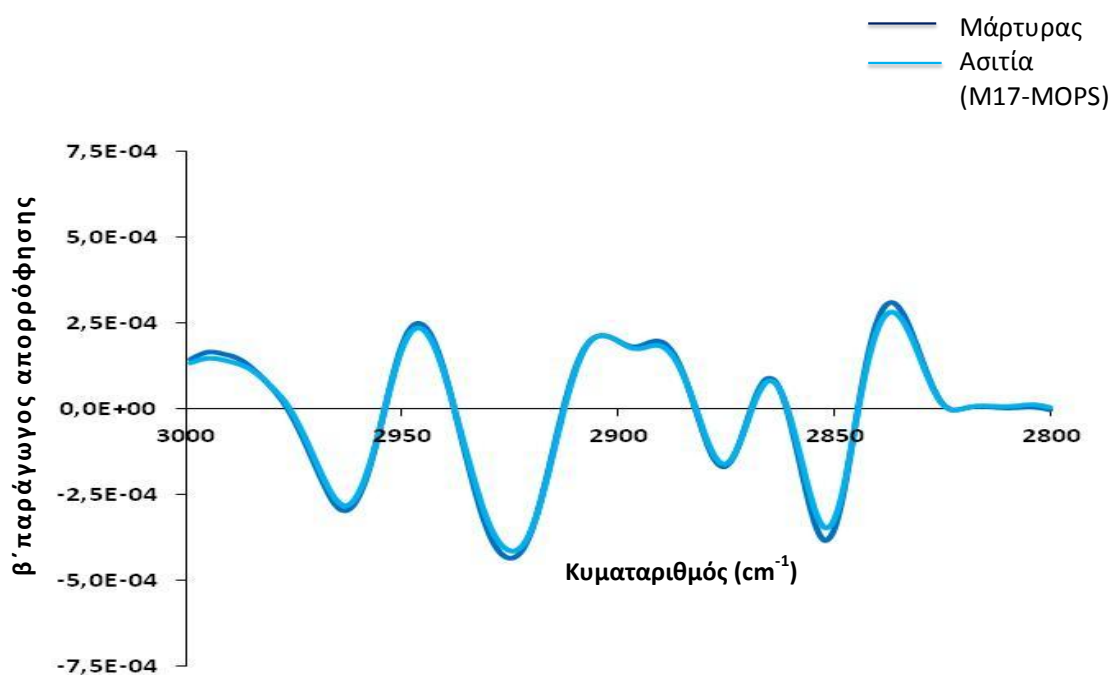
Φάσματα FT-IR των προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε συνθήκες ασιτίας (M17-MOPS). Οι ζώνες I, II, III και IV αντιστοιχούν σε περιοχές του φάσματος που απορροφούν βασικά συστατικά του κυττάρου. Τα βέλη επισημαίνουν χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος, όπως αυτές αναφέρονται στο κείμενο.

Στην περίπτωση των φασμάτων των κυττάρων του *L.lactis* σε συνθήκες ασιτίας, παρατηρήθηκε ότι οι διαφορές τους ήταν ιδιαίτερα εμφανείς κυρίως στις περιοχές $1800\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή II), $1500\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή III) και $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή IV) του φάσματος.

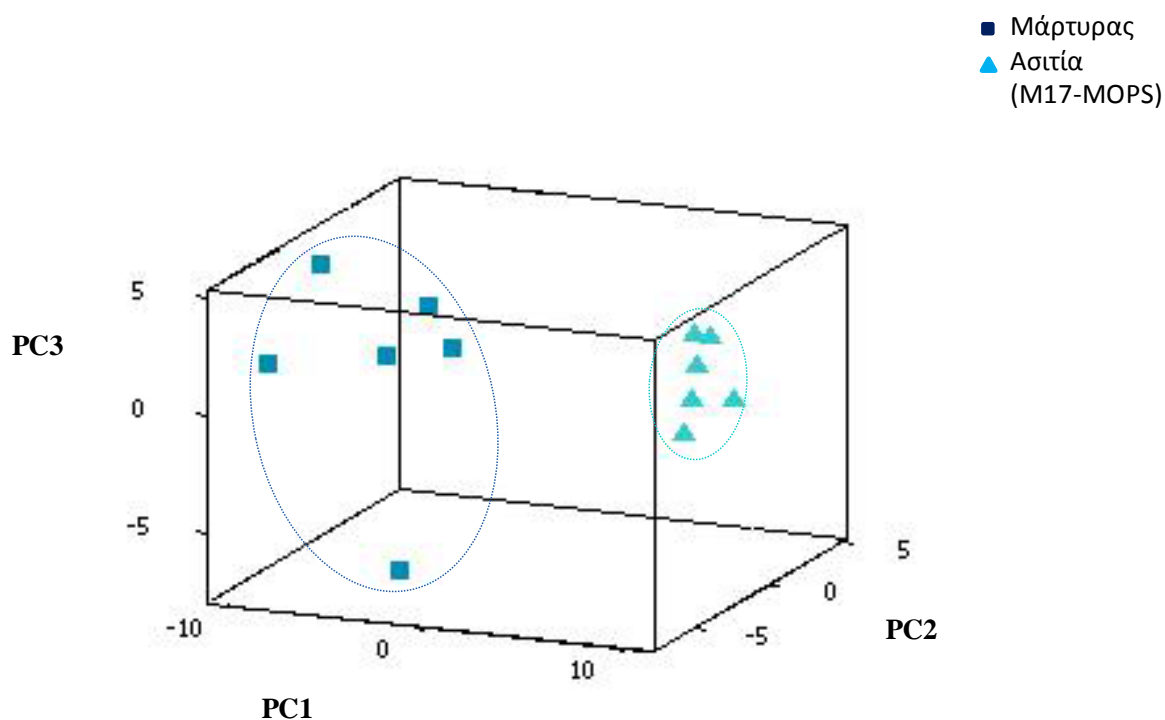
3.6.1.3 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για το διαχωρισμό των φασμάτων

Η ανάλυση και των τεσσάρων περιοχών του φάσματος αποκάλυψε σημαντικές διαφορές μεταξύ των φασμάτων των κυττάρων του *L. lactis*, ενώ η δεύτερη παράγωγος οδήγησε στον εντοπισμό σημαντικού αριθμού αλληλοεπικαλυπτόμενων ζωνών. Η ανάλυση PCA έδειξε ισχυρή τάση ομαδοποίησης μεταξύ των διαφορετικών φυσιολογικών καταστάσεων του *L. lactis* και στις τέσσερις περιοχές του φάσματος FT-IR, όπως ακριβώς έγινε και στα προηγούμενα στρες (Σχήμα 8.3, Σχήμα 8.4, Σχήμα 8.5 και Σχήμα 8.6).

A.

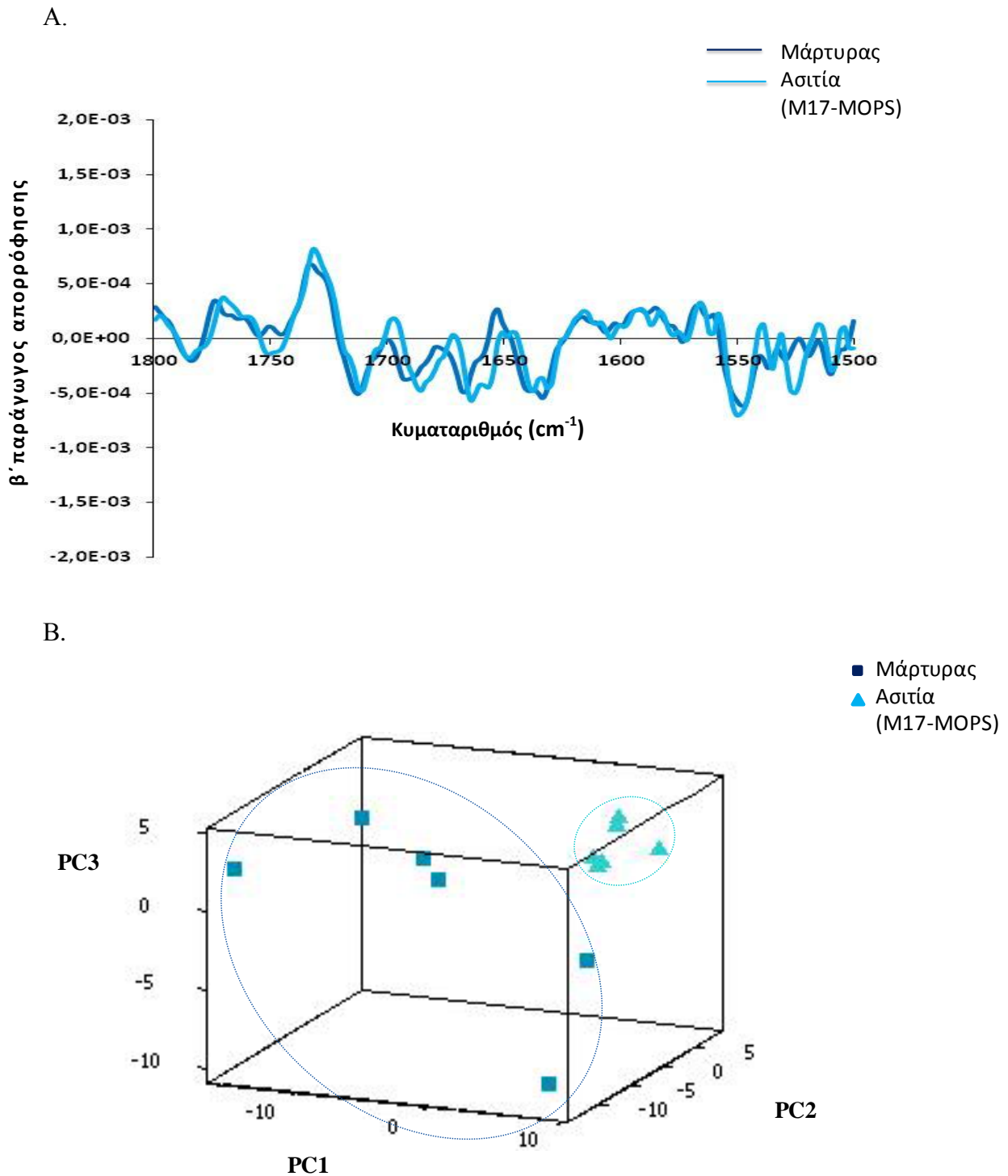


B.



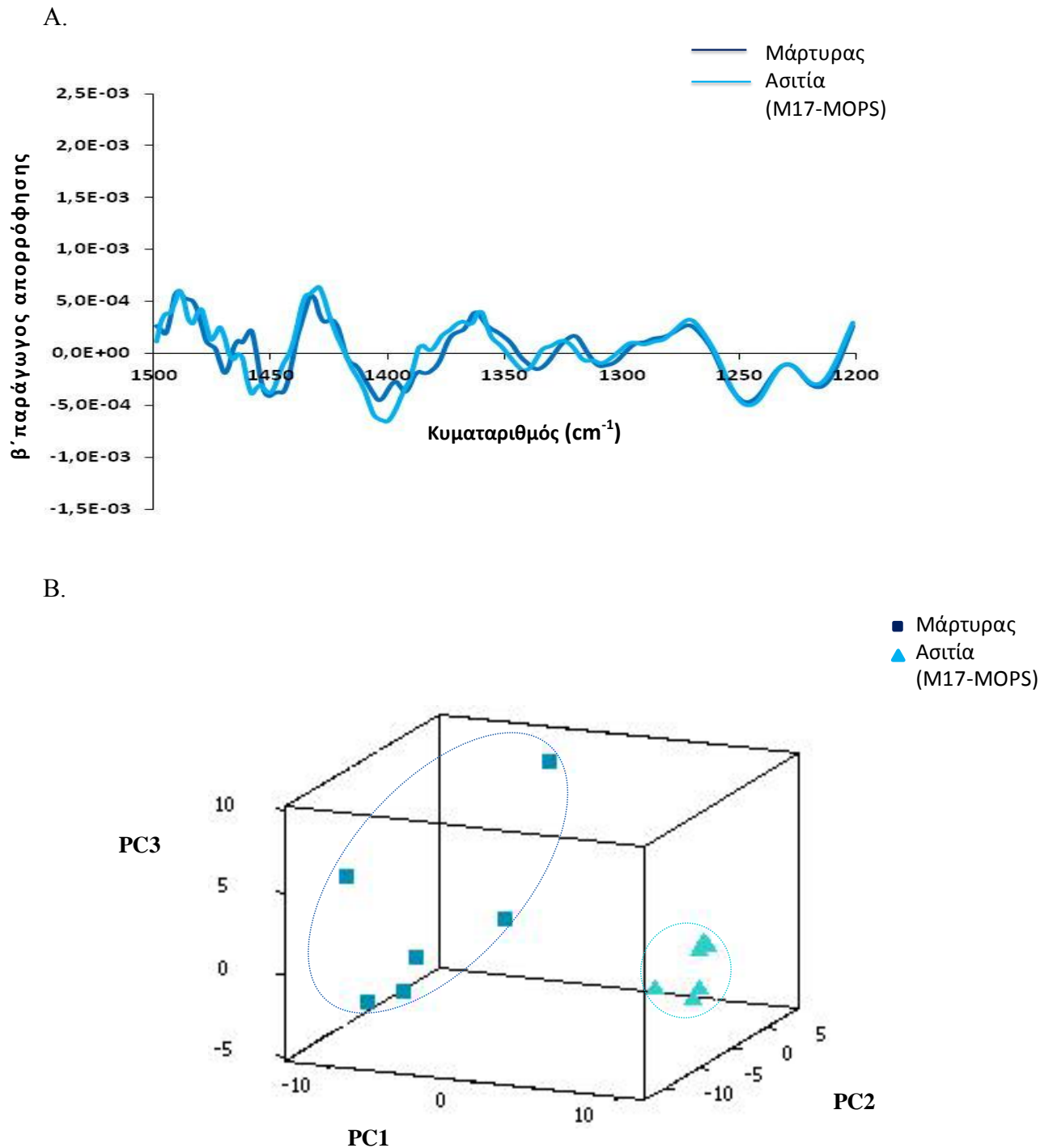
Σχήμα 8.3: Ανάλυση PCA της περιοχής 3000-2800 cm⁻¹ (Περιοχή I) του φάσματος FT-IR του φαινοτύπου του *L.lactis* κατά την προσαρμογή του σε συνθήκες ασιτίας.

(A) β' παράγωγος της περιοχής 3000-2800 cm⁻¹ του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε συνθήκες ασιτίας (M17-MOPS). (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.



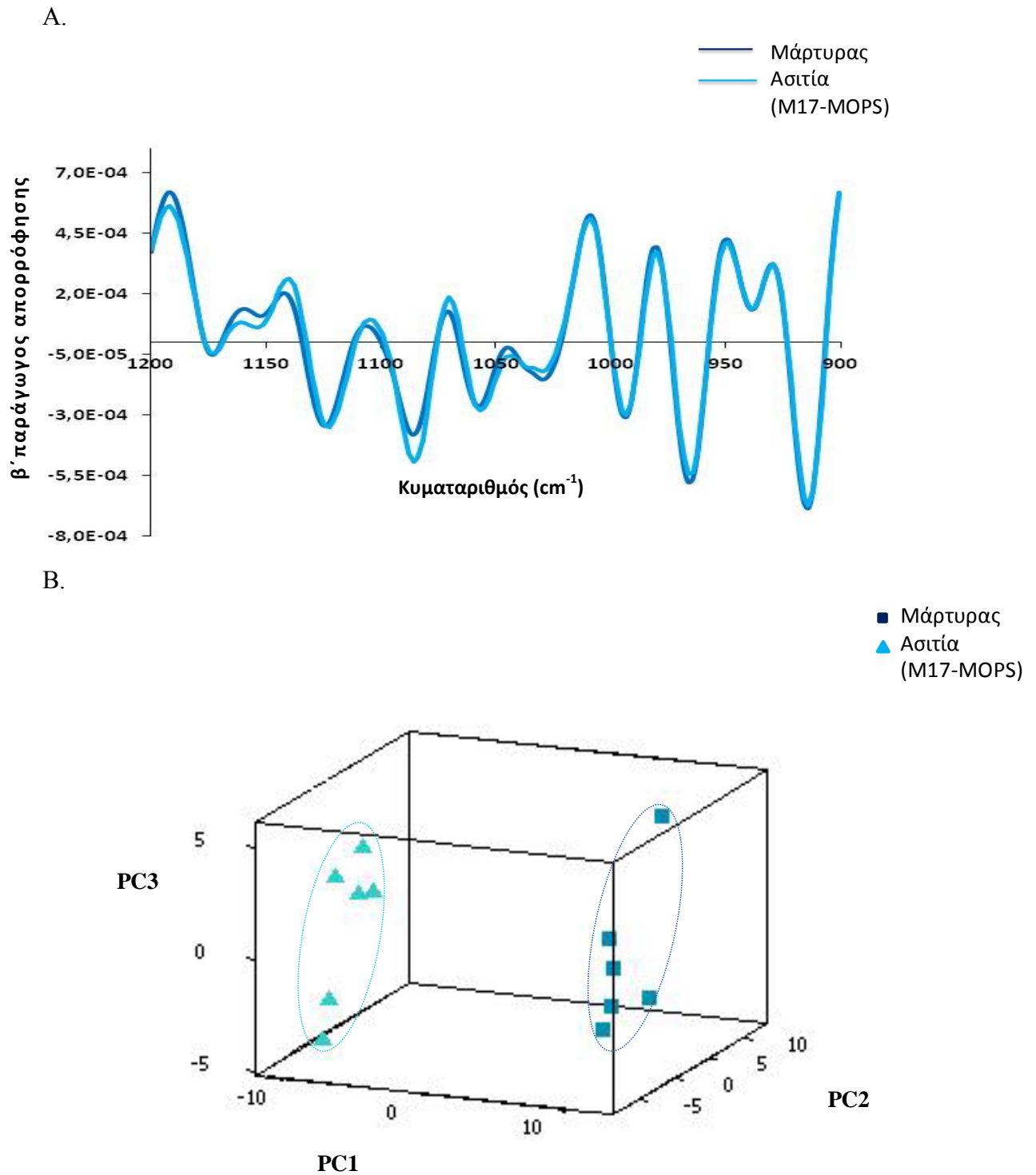
Σχήμα 8.4: Ανάλυση PCA της περιοχής 1800-1500 cm^{-1} (Περιοχή II) του φάσματος FT-IR του φαινοτύπου του *L.lactis* κατά την προσαρμογή του σε συνθήκες ασιτίας.

(A) β' παράγωγος της περιοχής 1800-1500 cm^{-1} του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε συνθήκες ασιτίας (M17-MOPS). (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.



Σχήμα 8.5: Ανάλυση PCA της περιοχής 1500-1200 cm⁻¹ (Περιογή III) του φάσματος FT-IR του φαινοτύπου του *L.lactis* κατά την προσαρμογή του σε συνθήκες ασιτίας.

(A) β' παράγωγος της περιοχής 1500-1200 cm⁻¹ του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε συνθήκες ασιτίας (M17-MOPS). (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.



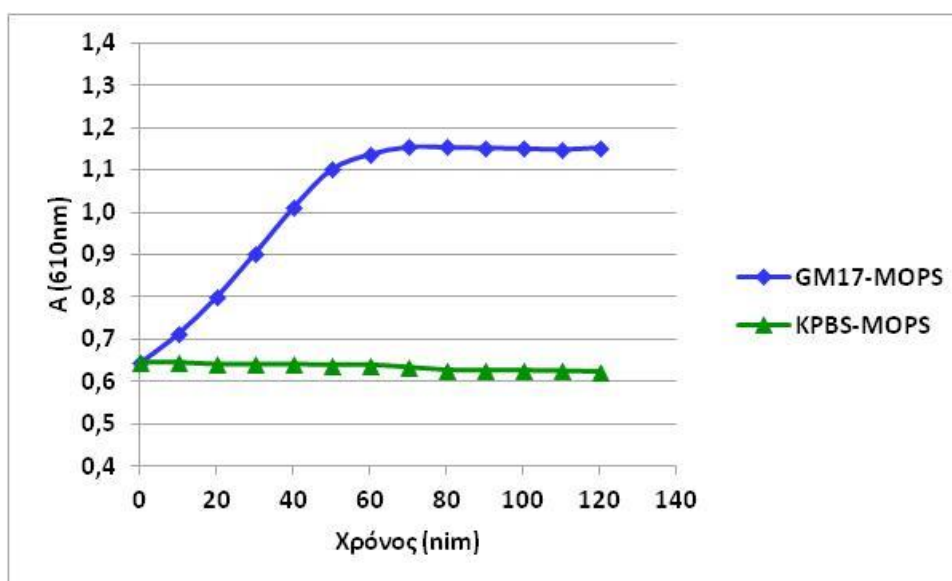
Σχήμα 8.6: Ανάλυση PCA της περιοχής $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή IV) του φάσματος FT-IR) του φαινοτύπου του *L.lactis* κατά την προσαρμογή του σε συνθήκες ασιτίας.

(A) β' παράγωγος της περιοχής $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε συνθήκες ασιτίας (M17-MOPS). (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.

3.6.2 Έλλειψη όλων των συστατικών

3.6.2.1 Επιλογή συνθηκών ασιτίας

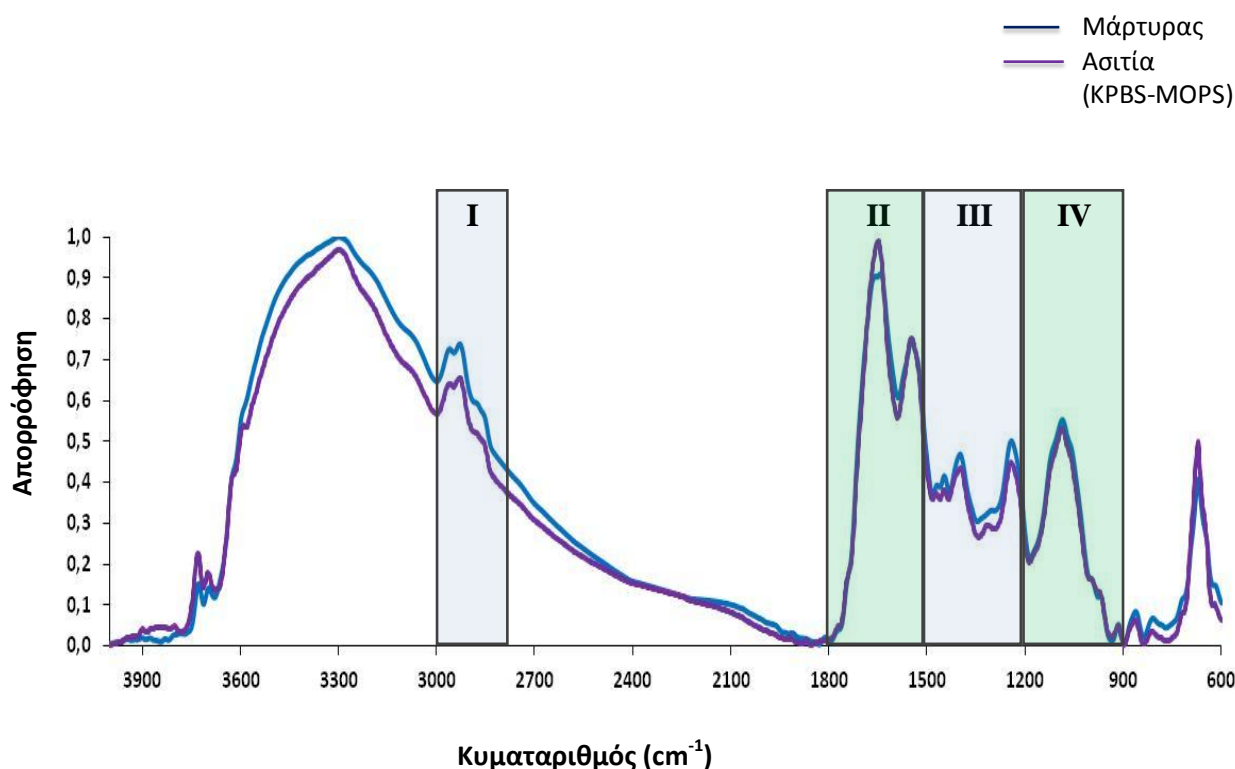
Στη δεύτερη περίπτωση ασιτίας, μετρήθηκε η οπτική πυκνότητα κυττάρων λογαριθμικής φάσης του *L. lactis* σε ρυθμιστικό διάλυμα (KPBS-MOPS), όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 2.4.5. Τα κύτταρα του *L. lactis* επώαστηκαν για 1 h στους 30 °C και στη συνέχεια μελετήθηκαν με τη φασματοσκοπία FT-IR (Σχήμα 9).



Σχήμα 9: Καμπύλη ανάπτυξης κυττάρων του *L. lactis* σε συνθήκες ασιτίας με έλλειψη όλων των συστατικών (KPBS-MOPS) και κυττάρων σε θρεπτικό μέσο M17 και γλυκόζη (GM17-MOPS) χρησιμοποιούμενο ως δείγμα μάρτυρα.

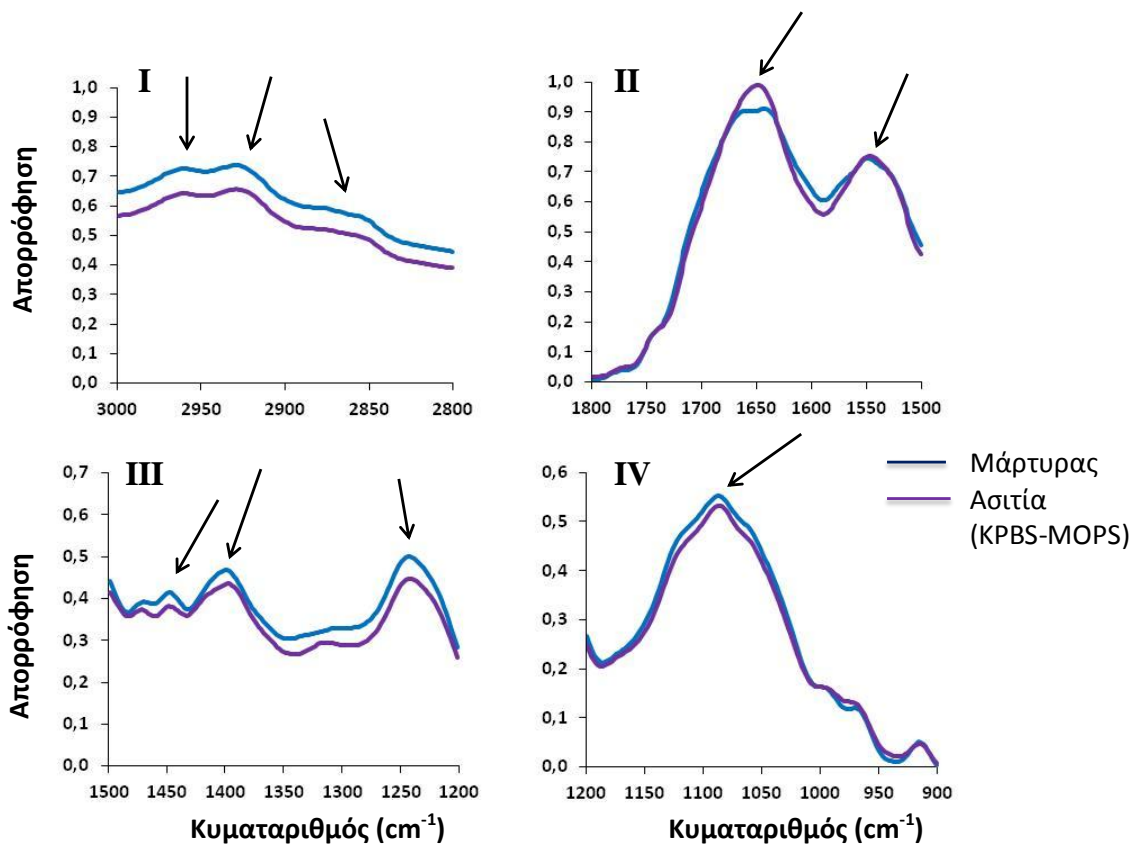
3.6.2.2 Φάσματα FT-IR

Στο Σχήμα 9.1 παρουσιάζονται τα φάσματα FT-IR ($4000-600\text{ cm}^{-1}$) από μη προσαρμοσμένα στο στρες της ασιτίας κύτταρα μάρτυρες, λογαριθμικής φάσης του *L. lactis* και από κύτταρα λογαριθμικής φάσης του φαινοτύπου προσαρμογής του βακτηρίου σε συνθήκες ασιτίας, τα οποία προέκυψαν ύστερα επώαση στους $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 1 h. Τα φάσματα που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος από έξι ανεξάρτητες επαναλήψεις. Τα φάσματα παρουσίασαν έντονη απορρόφηση στις τέσσερις χαρακτηριστικές, για τη βιοχημική σύσταση των κυττάρων, περιοχές του υπέρυθρου, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 9.2 (Naumann et al., 1991, Papadimitriou et al., 2008).



Σχήμα 9.1: Φάσματα FT-IR ($4000-600\text{ cm}^{-1}$) του φαινοτύπου του *L.lactis* κατά την προσαρμογή του σε συνθήκες ασιτίας.

Φάσματα FT-IR των προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε συνθήκες ασιτίας (KPBS-MOPS). Οι ζώνες I, II, III και IV αντιστοιχούν σε περιοχές του φάσματος που απορροφούν βασικά συστατικά του κυττάρου.



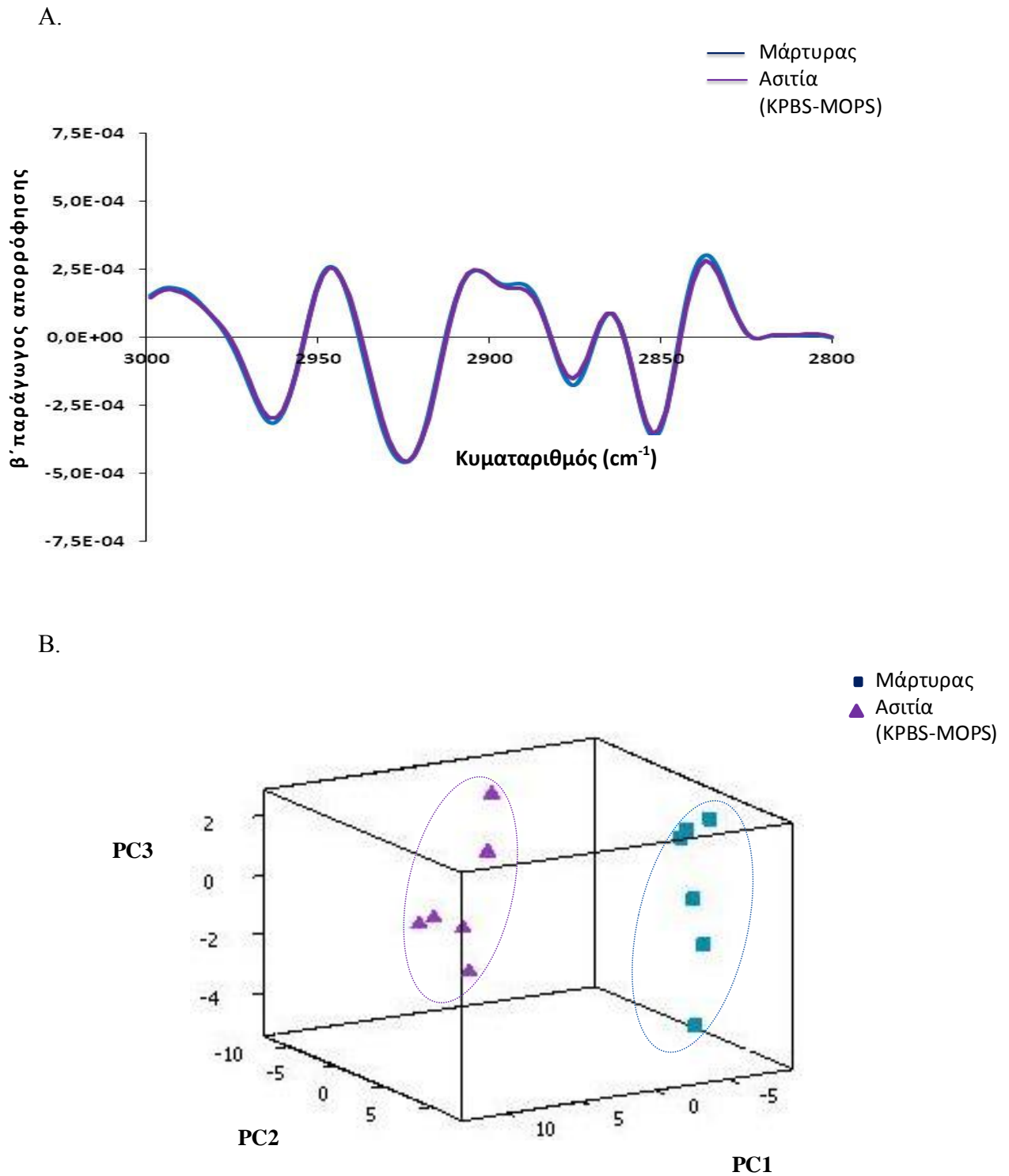
Σχήμα 9.2: Φάσματα FT-IR (4000-600 cm^{-1}) του φαινοτύπου του *L.lactis* κατά την προσαρμογή του σε συνθήκες ασιτίας.

Φάσματα FT-IR των προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε συνθήκες ασιτίας (KPBS-MOPS). Οι ζώνες I, II, III και IV αντιστοιχούν σε περιοχές του φάσματος που απορροφούν βασικά συστατικά του κυττάρου. Τα βέλη επισημαίνουν χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος, όπως αυτές αναφέρονται στο κείμενο.

Στην περίπτωση των φασμάτων των κυττάρων του *L.lactis* σε συνθήκες ασιτίας, παρατηρήθηκε ότι οι διαφορές τους και στις τέσσερις περιοχές του φάσματος ήταν ιδιαίτερα εμφανείς.

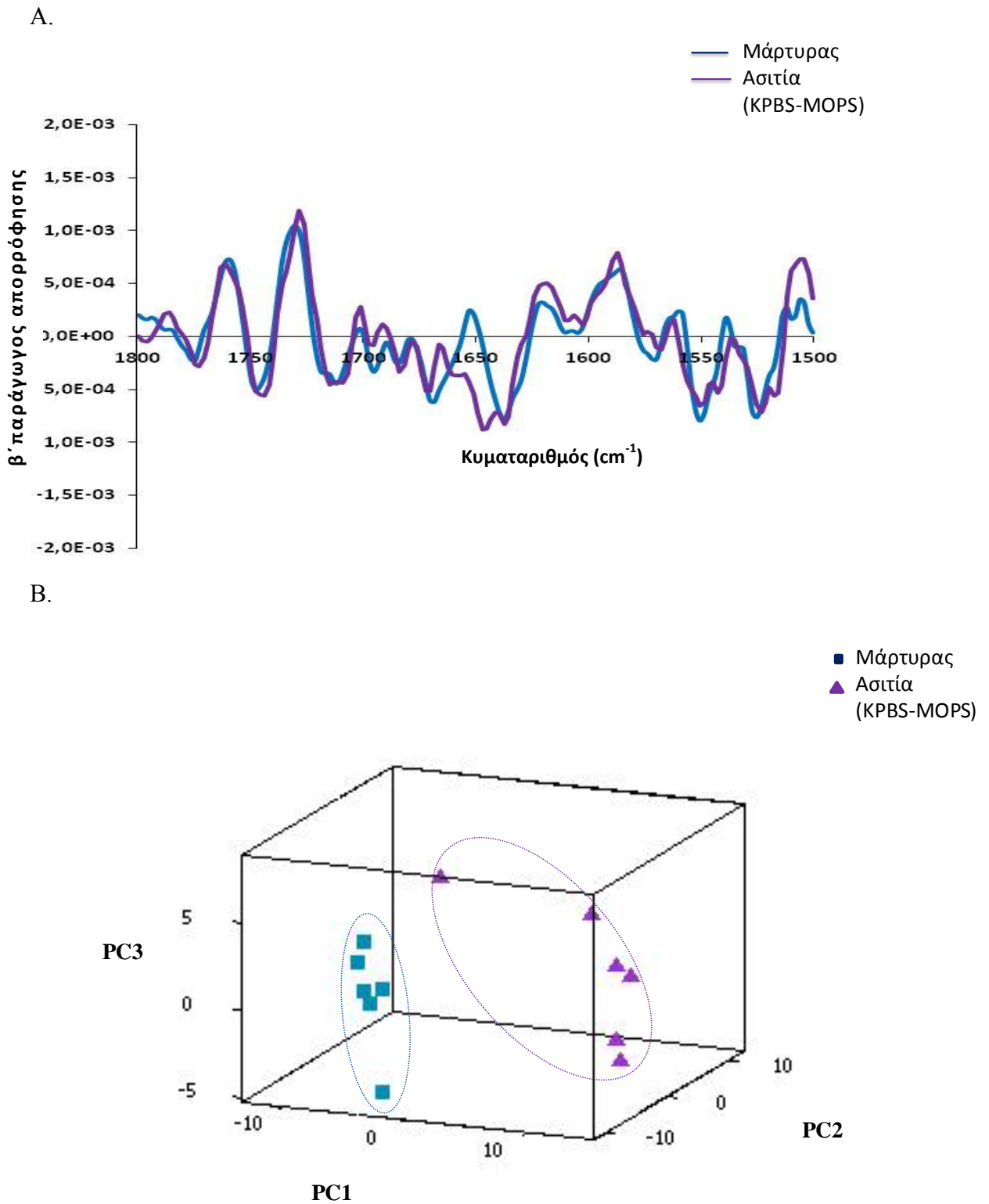
3.6.2.3 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για το διαχωρισμό των φασμάτων

Η ανάλυση και των τεσσάρων περιοχών του φάσματος αποκάλυψε σημαντικές διαφορές μεταξύ των φασμάτων των κυττάρων του *L. lactis*, ενώ η δεύτερη παράγωγος οδήγησε στον εντοπισμό σημαντικού αριθμού αλληλοεπικαλυπτόμενων ζωνών. Η ανάλυση PCA έδειξε ισχυρή τάση ομαδοποίησης μεταξύ των διαφορετικών φυσιολογικών καταστάσεων του *L. lactis* και στις τέσσερις περιοχές του φάσματος FT-IR (Σχήμα 9.3, Σχήμα 9.4, Σχήμα 9.5 και Σχήμα 9.6).



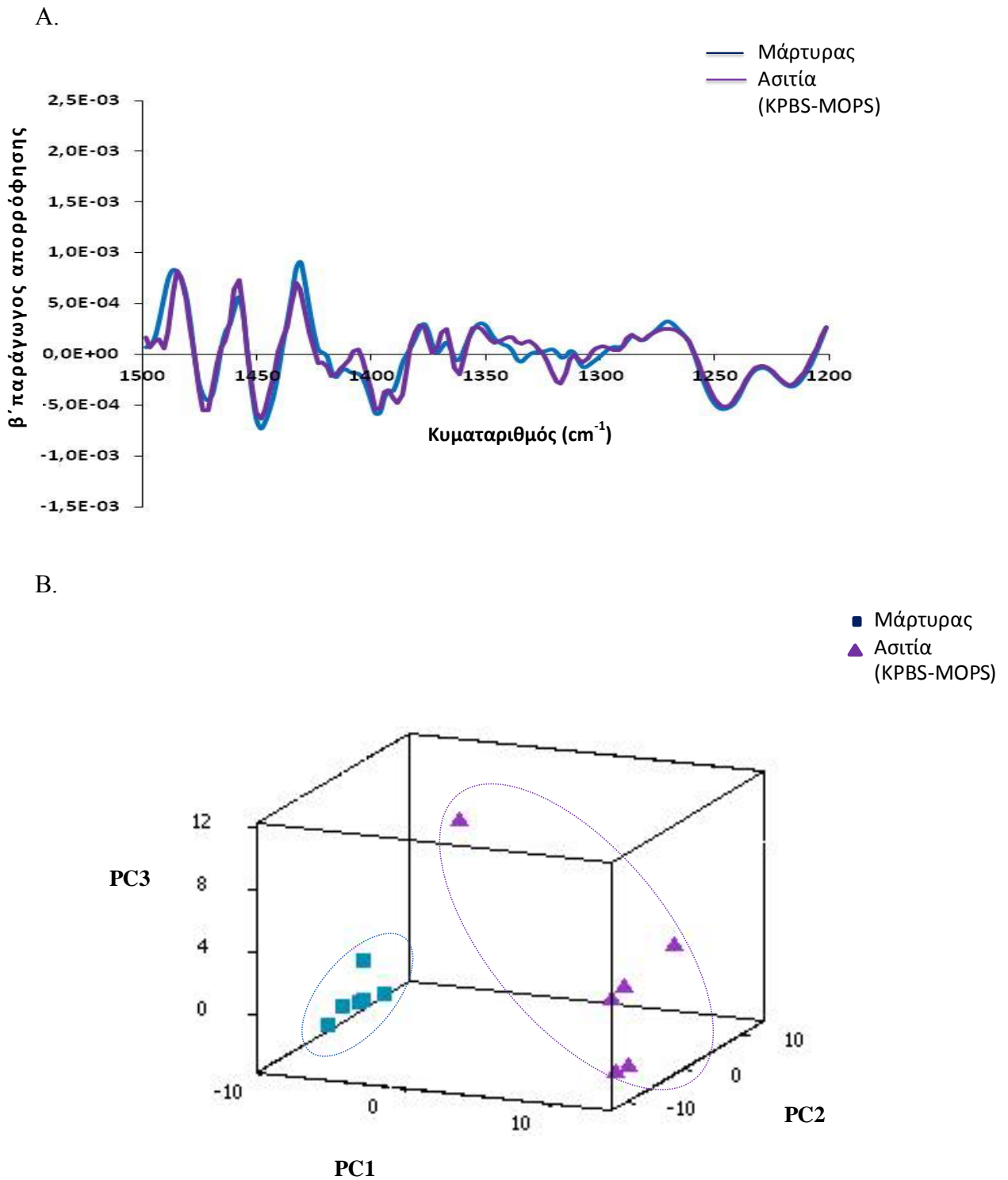
Σχήμα 9.3: Ανάλυση PCA της περιοχής 3000-2800 cm⁻¹ (Περιογή Ι) του φάσματος FT-IR του φαινοτύπου του *L.lactis* κατά την προσαρμογή του σε συνθήκες ασιτίας.

(A) β' παράγωγος της περιοχής 3000-2800 cm⁻¹ του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε συνθήκες ασιτίας (KPBS-MOPS). (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.



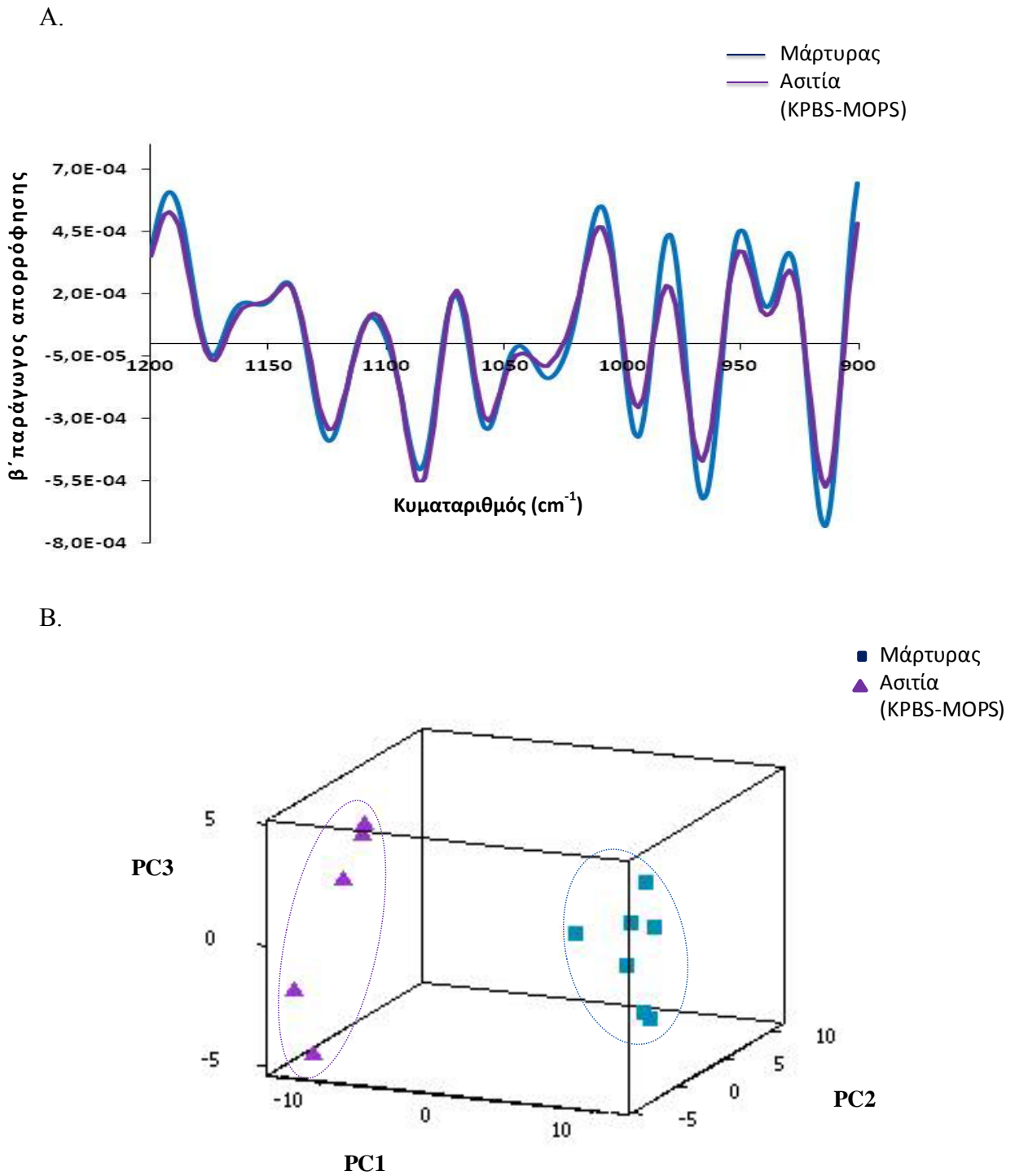
Σχήμα 9.4: Ανάλυση PCA της περιοχής 1800-1500 cm⁻¹ (Περιοχή II) του φάσματος FT-IR του φαινοτύπου του *L.lactis* κατά την προσαρμογή του σε συνθήκες ασιτίας.

(A) β' παράγωγος της περιοχής 1800-1500 cm⁻¹ του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε συνθήκες ασιτίας (KPBS-MOPS). (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.



Σχήμα 9.5: Ανάλυση PCA της περιοχής $1500\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή III) του φάσματος FT-IR του φαινοτύπου του *L.lactis* κατά την προσαρμογή του σε συνθήκες ασιτίας.

(A) β' παράγωγος της περιοχής $1500\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε συνθήκες ασιτίας (KPBS-MOPS). (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.



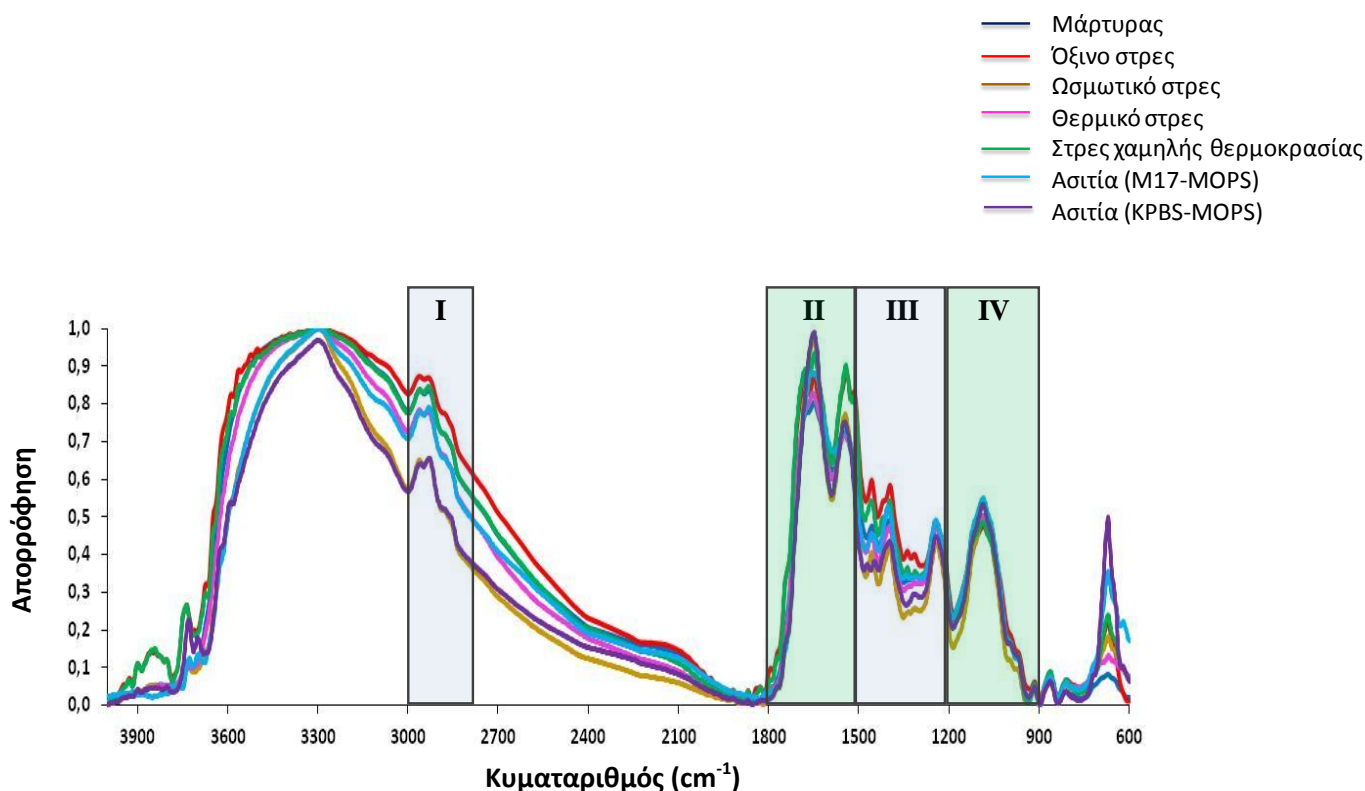
Σχήμα 9.6: Ανάλυση PCA της περιοχής $1200-900 \text{ cm}^{-1}$ (Περιογή IV) του φάσματος FT-IR του φαινοτύπου του *L.lactis* κατά την προσαρμογή του σε συνθήκες ασιτίας.

(A) β' παράγωγος της περιοχής $1200-900 \text{ cm}^{-1}$ του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε συνθήκες ασιτίας (KPBS-MOPS). (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.

3.7 Συνδιασμός όλων των συνθηκών στρες

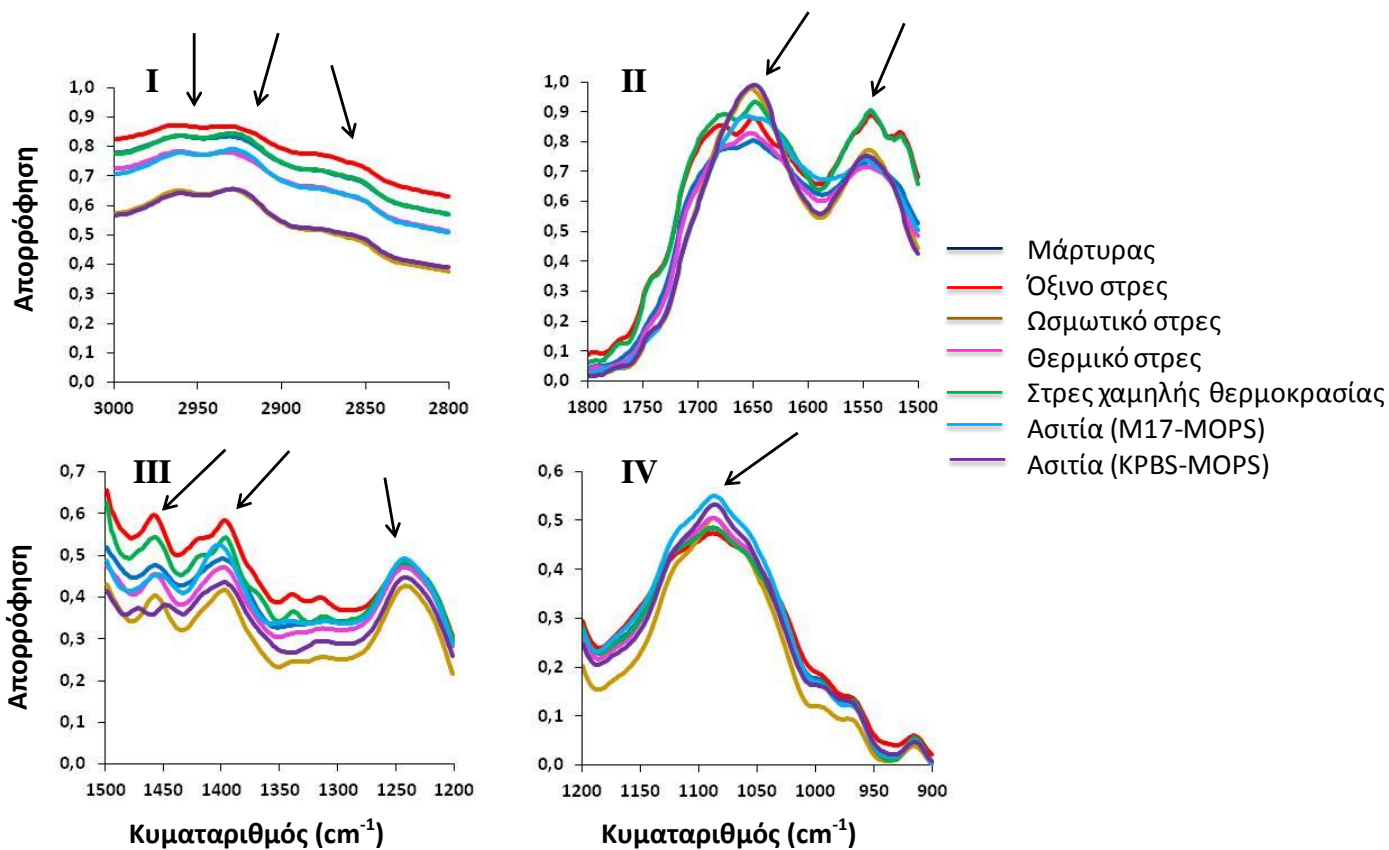
3.7.1 Φάσματα FT-IR

Στο Σχήμα 10.1 παρουσιάζονται τα φάσματα FT-IR ($4000-600\text{ cm}^{-1}$) των κυττάρων του *L. lactis* σε όλες τις συνθήκες στρες που μελετήθηκαν, συγκρινόμενα με το φάσμα FT-IR του μάρτυρα. Τα φάσματα που παρουσιάζονται είναι ο μέσος όρος από έξι ανεξάρτητες επαναλήψεις. Τα φάσματα παρουσίασαν έντονη απορρόφηση στις τέσσερις χαρακτηριστικές, για τη βιοχημική σύσταση των κυττάρων, περιοχές του υπέρυθρου, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 10.2 (Naumann et al., 1991, Papadimitriou et al., 2008).



Σχήμα 10.1: Φάσματα FT-IR ($4000-600\text{ cm}^{-1}$) του *L.lactis* κατά την προσαρμογή του στις διάφορες συνθήκες στρες.

Φάσματα FT-IR των προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* στις διάφορες συνθήκες στρες. Οι ζώνες I, II, III και IV αντιστοιχούν σε περιοχές του φάσματος που απορροφούν βασικά συστατικά του κυττάρου.



Σχήμα 10.2: Φάσματα FT-IR (4000-600 cm^{-1}) του *L.lactis* κατά την προσαρμογή του στις διάφορες συνθήκες στρες.

Φάσματα FT-IR των προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* στις διάφορες συνθήκες στρες. Οι ζώνες I, II, III και IV αντιστοιχούν σε περιοχές του φάσματος που απορροφούν βασικά συστατικά του κυττάρου. Τα βέλη επισημαίνουν χαρακτηριστικές κορυφές του φάσματος, όπως αυτές αναφέρονται στο κείμενο.

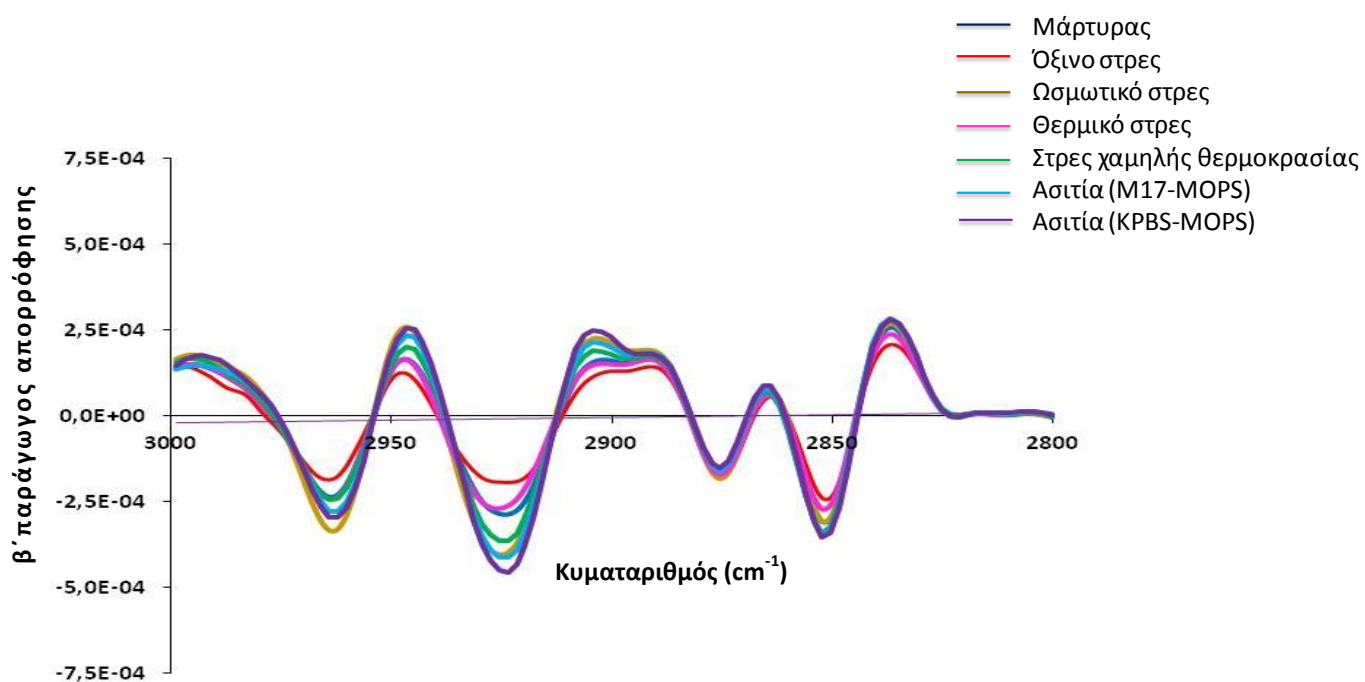
Στην πρώτη χαρακτηριστική περιοχή 3000-2800 cm^{-1} (Περιοχή I), παρατηρούνται τέσσερις διαφορετικές ομαδοποιήσεις των φασμάτων FT-IR. Πιο συγκεκριμένα, τα φάσματα των κυττάρων του *L.lactis* κατά την προσαρμογή τους στο ωσμωτικό στρες αλλά και σε συνθήκες ασιτίας (KPBS-MOPS), παρουσιάζουν μικρές διαφορές σε αυτό το στάδιο της ανάλυσης. Παρόμοιες παρατηρήσεις γίνονται και στα φάσματα των κυττάρων κατά την προσαρμογή τους στο θερμικό στρες και σε συνθήκες ασιτίας (M17-MOPS). Μικρές διαφορές έχουν και το φάσμα των κυττάρων του μάρτυρα συγκριτικά με αυτό των κυττάρων σε ψυχρό στρες, ενώ τέλος το φάσμα των κυττάρων σε όξινο στρες παρουσιάζει έντονες διαφορές σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα. Στη δεύτερη χαρακτηριστική περιοχή 1800-1500 cm^{-1} (Περιοχή II), μόνο τα φάσματα των κυττάρων κατά την προσαρμογή τους στο ωσμωτικό στρες αλλά και

σε συνθήκες ασιτίας (KPBS-MOPS), παρουσίασαν μικρές διαφορές σε αυτό το στάδιο της ανάλυσης, με τα υπόλοιπα φάσματα να έχουν έντονες διαφορές. Στην τρίτη χαρακτηριστική περιοχή $1500-1200\text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή III) παρατηρούνται έντονες διαφορές στα φάσματα, ενώ τέλος στην τελευταία περιοχή $1200-900\text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή IV), μικρές διαφορές φαίνεται να έχουν μονάχα τα φάσματα των κυττάρων του μάρτυρα και αυτών κατά το όξινο και ψυχρό στρες.

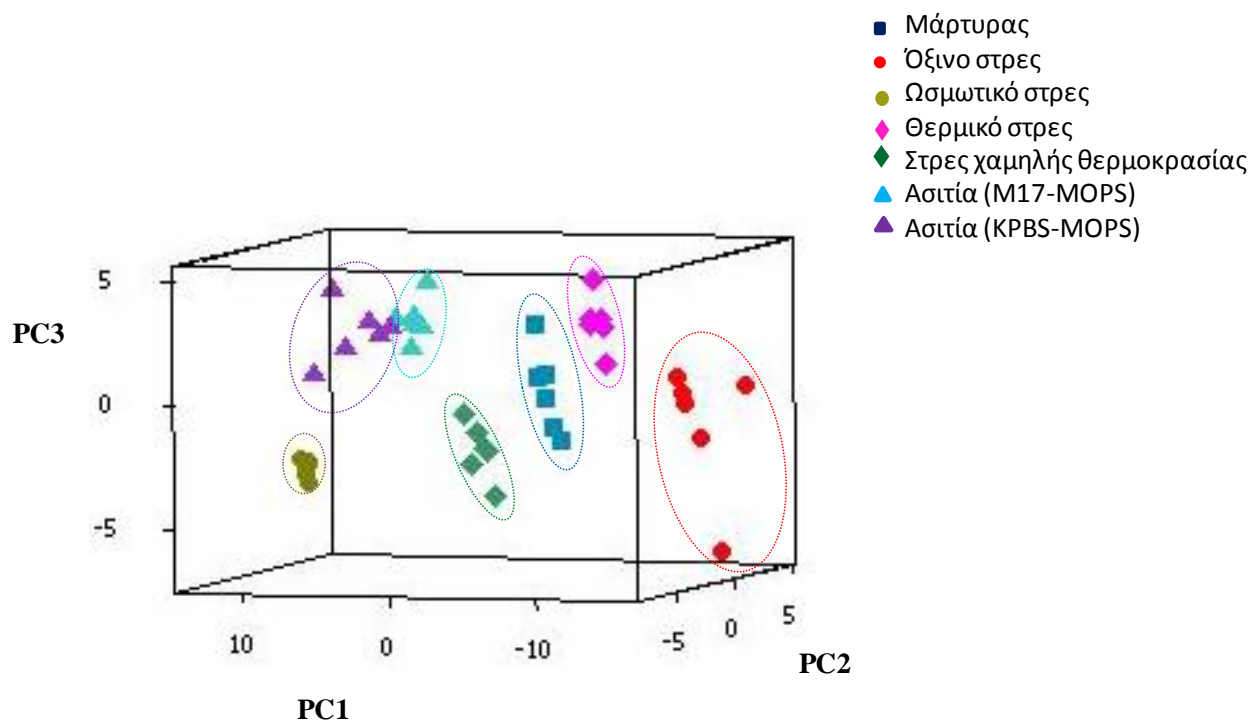
3.7.2 Ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) για το διαχωρισμό των φασμάτων

Η ανάλυση και των τεσσάρων περιοχών αποκάλυψε σημαντικές διαφορές μεταξύ των φασμάτων των κυττάρων του *L. lactis* όπως φαίνεται στα παρακάτω σχήματα. Η δεύτερη παράγωγος των φασμάτων οδήγησε στον εντοπισμό σημαντικού αριθμού αλληλοεπικαλυπτόμενων ζωνών απορρόφησης, ενώ η ανάλυση PCA έδειξε ισχυρή τάση ομαδοποίησης μεταξύ των διαφορετικών φυσιολογικών καταστάσεων του *L. lactis* (Σχήμα 10.3, Σχήμα 10.4, Σχήμα 10.5 και Σχήμα 10.6).

A.

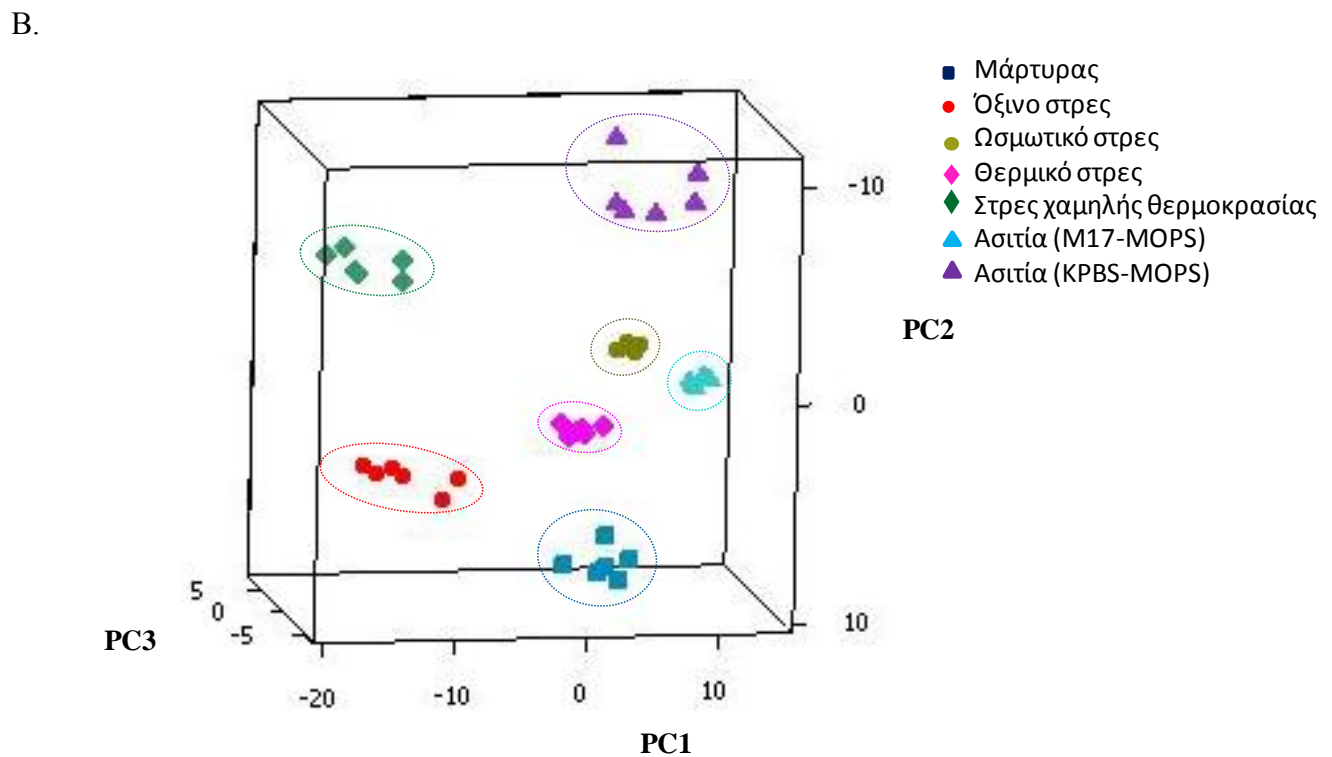
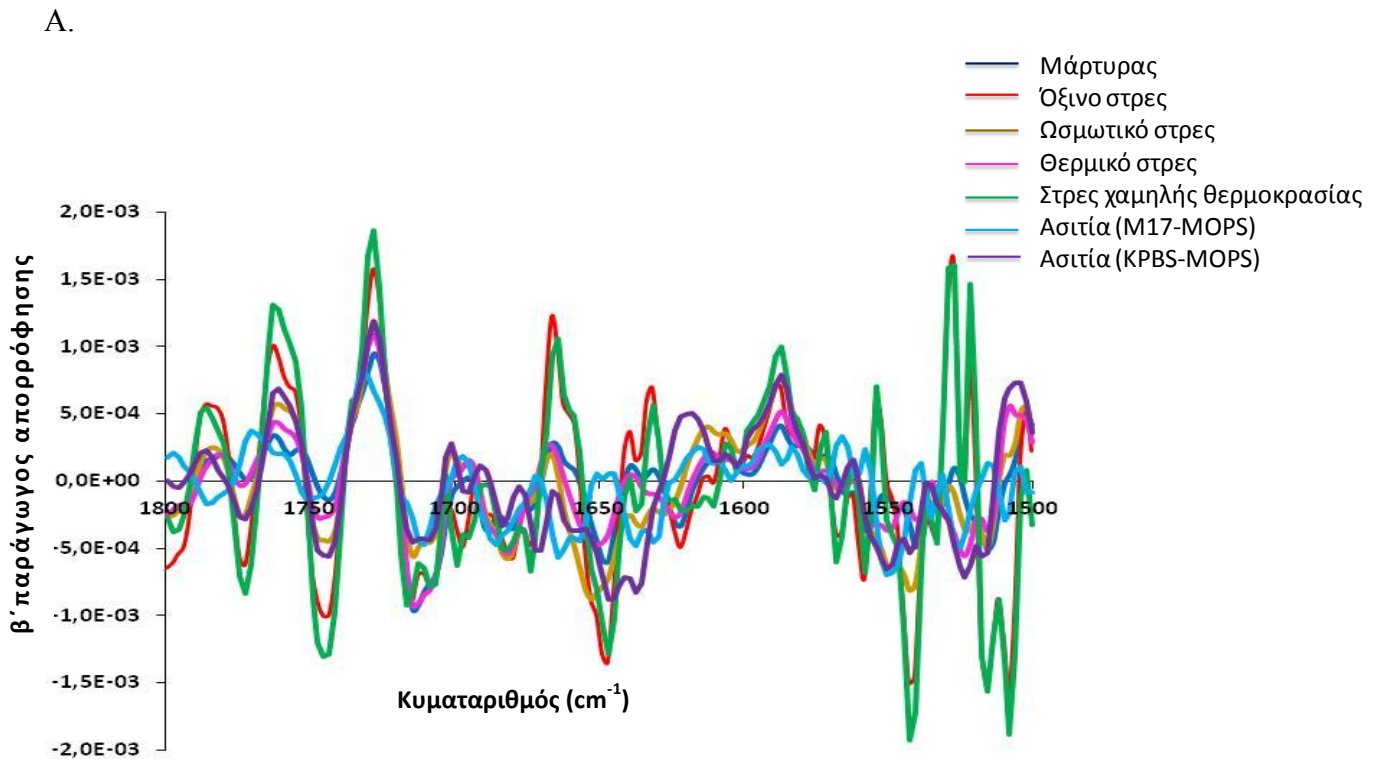


B.



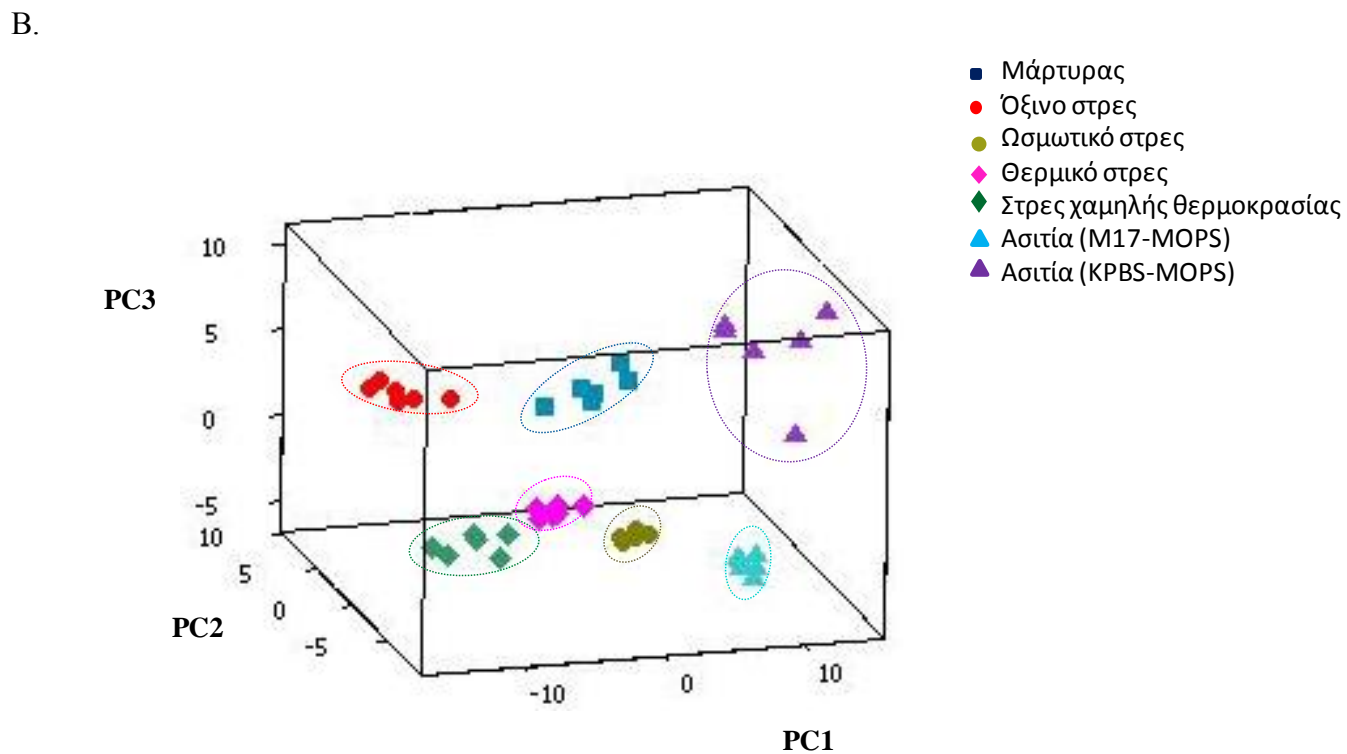
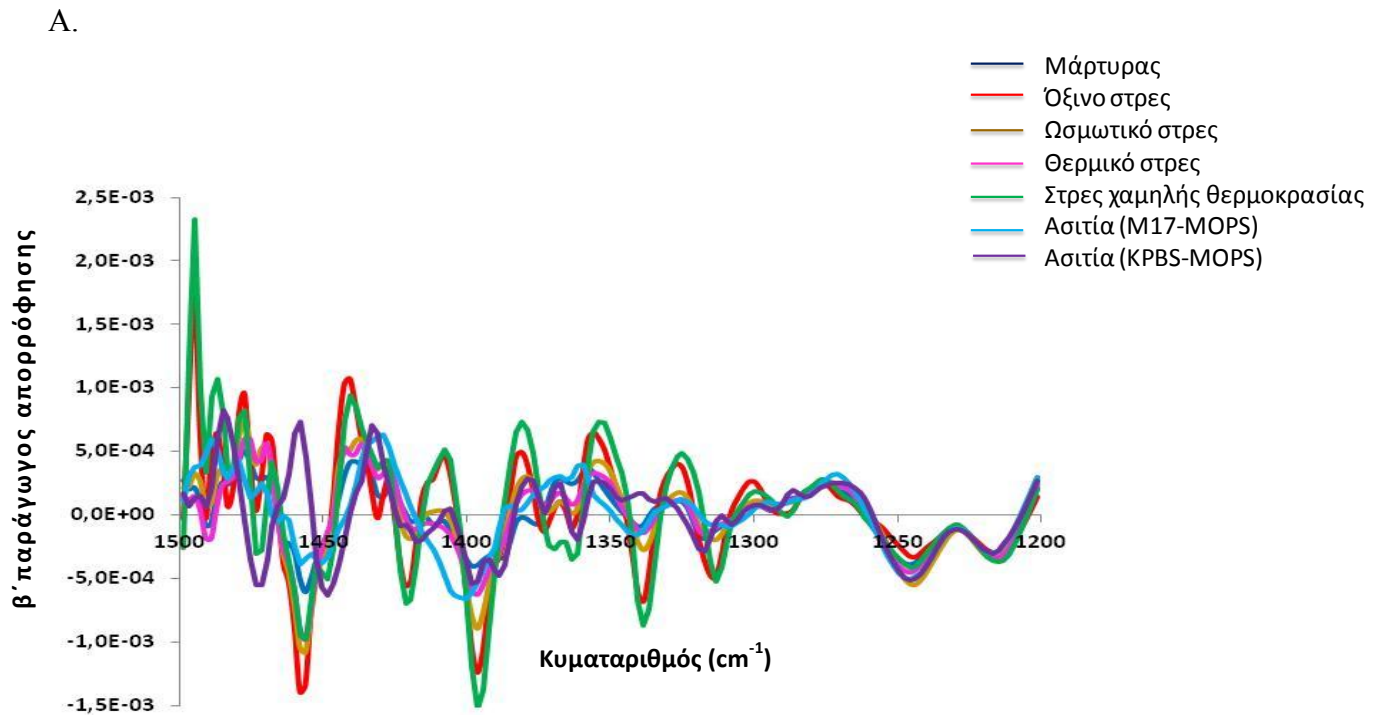
Σχήμα 10.3: Ανάλυση PCA της περιοχής $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή I) του φάσματος FT-IR) των κυττάρων του *L.lactis* κατά την προσαρμογή του σε διάφορες συνθήκες στρες.

(A) β' παράγωγος της περιοχής $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε διάφορες συνθήκες στρες. (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.



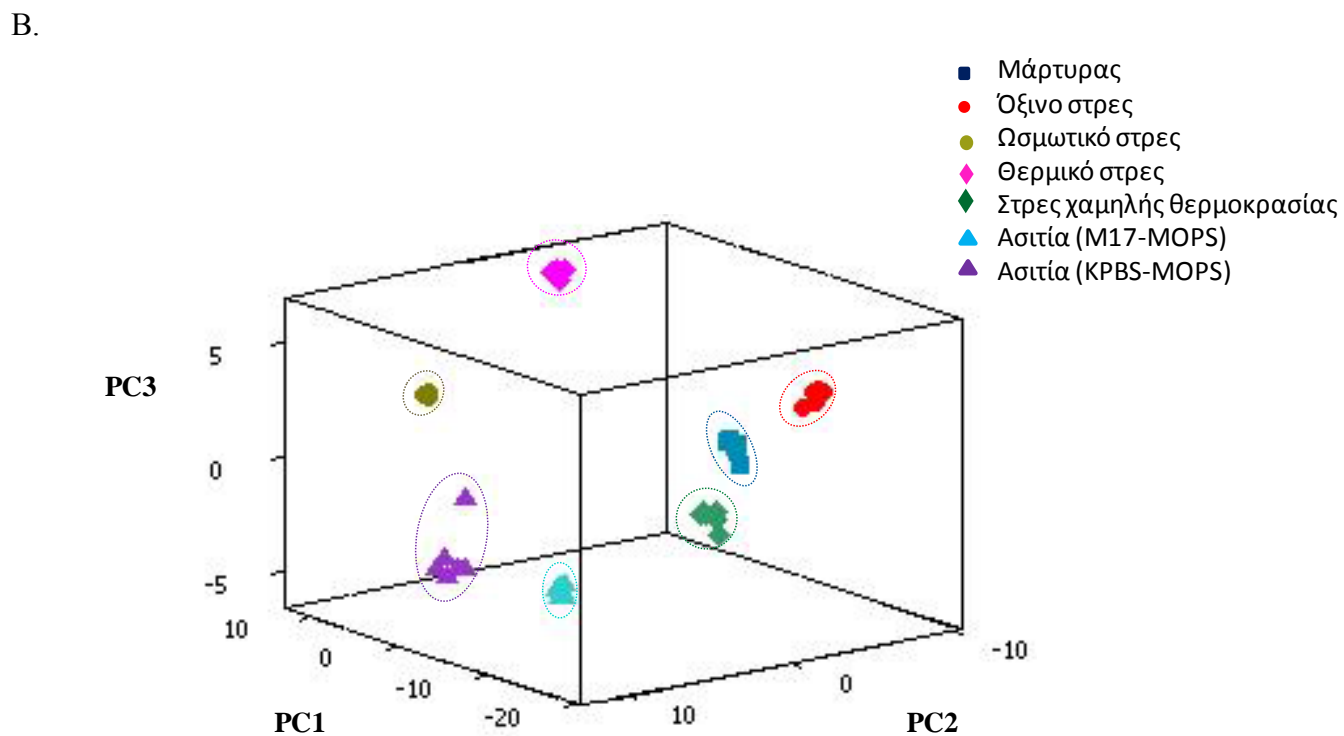
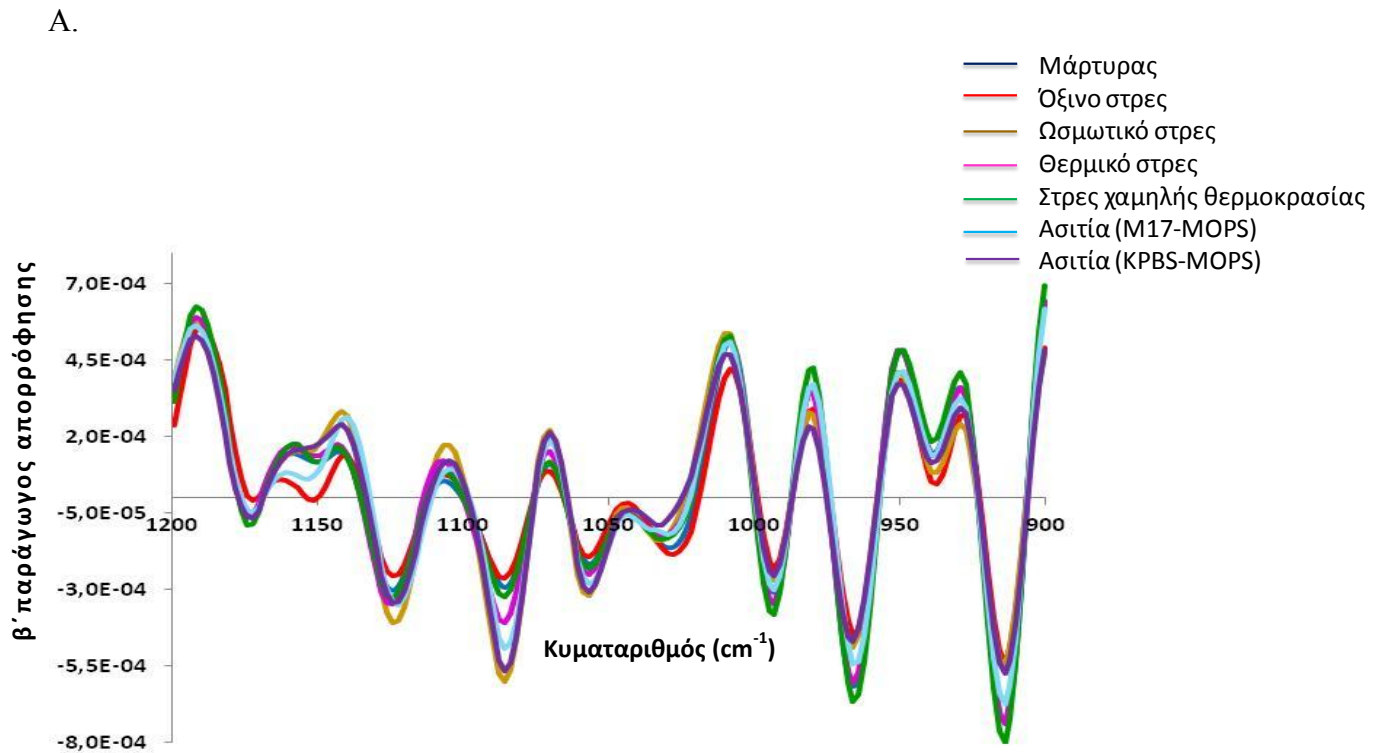
Σχήμα 10.4: Ανάλυση PCA της περιοχής $1800-1500 \text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή II) του φάσματος FT-IR των κυττάρων του *L.lactis* κατά την προσαρμογή του σε διάφορες συνθήκες στρες.

(A) β' παράγωγος της περιοχής $1800-1500 \text{ cm}^{-1}$ του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε διάφορες συνθήκες στρες. (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.



Σχήμα 10.5: Ανάλυση PCA της περιοχής $1500-1200 \text{ cm}^{-1}$ (Περιοχή III) του φάσματος FT-IR) των κυττάρων του *L.lactis* κατά την προσαρμογή του σε διάφορες συνθήκες στρες.

(A) β' παράγωγος της περιοχής $1500-1200 \text{ cm}^{-1}$ του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε διάφορες συνθήκες στρες. (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.



Σχήμα 10.6: Ανάλυση PCA της περιοχής $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ (Περιογή IV) του φάσματος FT-IR) των κυττάρων του *L.lactis* κατά την προσαρμογή του σε διάφορες συνθήκες στρες.

(A) β' παράγωγος της περιοχής $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ του φάσματος FT-IR προσαρμοσμένων και μη κυττάρων του *L.lactis* σε διάφορες συνθήκες στρες. (B) Διάγραμμα σκέδασης των τριών πρώτων κύριων συνιστωσών των κυττάρων του *L.lactis*.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* είναι ένα οξυγαλακτικό βακτήριο μεγάλης τεχνολογικής και οικονομικής σημασίας, με εκτεταμένη και πολλαπλή χρήση στις ζυμώσεις τροφίμων. Δεδομένου ότι υπόκειται σε πολλούς τύπους στρες που επικρατούν στις διεργασίες παρασκευής τροφίμων, έχει αναπτύξει και διάφορους μηχανισμούς προσαρμογής. Λόγω της αυξημένης σημασίας του *L. lactis*, είναι πολύ σημαντική η κατανόηση των μηχανισμών αυτών για να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί ακόμα και σε απαγορευτικά στρεσογόνες συνθήκες.

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε έχοντας ως στόχο τη διερεύνηση των πιθανών μεταβολών της σύστασης των κυττάρων του *L. lactis* κατά την προσαρμογή τους σε διάφορες συνθήκες στρες με την εφαρμογή φασματοσκοπίας FT-IR. Η ανάλυση PCA της δεύτερης παραγωγού των φασμάτων FT-IR για τη σύγκρισή τους αποκάλυψε σημαντικές αλλαγές στα κύρια συστατικά των κυττάρων. Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκαν διαφορές στους πολυσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος, στους αμιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών και πεπτιδίων των κυττάρων, στις πρωτεΐνες και λιπαρά οξέα που απαρτίζουν το κύτταρο, αλλά και στις αλυσίδες των λιπαρών οξέων των κυτταρικών μεμβρανών. Οι μεταβολές αυτές λαμβάνουν χώρα σε όλες τις συνθήκες στρες που μελετήθηκαν, καθώς τα κύτταρα του μάρτυρα διαχωρίζονται πλήρως από τα προσαρμοσμένα στο στρες κύτταρα του *L. lactis* στην ανάλυση PCA.

Όταν εξετάστηκαν όλες οι συνθήκες στρες μαζί με το μάρτυρα, παρατηρήθηκε και πάλι διαχωρισμός των φυσιολογικών καταστάσεων του *L. lactis*. Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης PCA, φαίνεται ότι οι αλλαγές στα συστατικά των κυττάρων είναι ειδικές για κάθε στρες. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η αντίδραση προσαρμογής του *L. lactis*, παρουσιάζει μία πλαστικότητα έτσι ώστε να μπορεί να αντιμετωπίζει τις ιδιαίτερες επιπτώσεις κάθε στρες. Παρ' όλες τις διαφορές που εντοπίστηκαν, μπορεί να υποστηριχθεί ότι τα διαφορετικά στρες ίσως και να προκαλούν και παρόμοιες αλλαγές στα συστατικά του κυττάρου. Το γεγονός αυτό προκύπτει από το ότι η κατανομή ως προς μία ή περισσότερες κύριες συνιστώσες δειγμάτων από διαφορετικά στρες ήταν αλληλεπικαλυπτόμενες. Η υπόθεση αυτή χρήζει περισσότερης έρευνας.

Συμπερασματικά, με την παρούσα μελέτη προσπαθήσαμε για πρώτη φορά να διερευνήσουμε τις μεταβολές της σύστασης των κυττάρων του *L. lactis* κατά την

προσαρμογή τους σε συνθήκες στρες. Δεδομένου ότι ο *L. lactis* διαφέρει σημαντικά από τα βακτήρια μοντέλα που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της φυσιολογίας του στρες (*E. coli* και *B. Subtilis*), η μελέτη αυτή μπορεί να αποτελέσει τη βάση για την καλύτερη κατανόηση της φυσιολογίας του οργανισμού αυτού.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Al-Qadiri H.M., Al-Holy, M.A., Lin M., Alami N.I., Cavinato A.G., Rasco B.A.,** (2006a) Rapid detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* as pure and mixed cultures in bottled drinking water using Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 5749-5754.
2. **Al-Qadiri H.M., Lin M., Cavinato A.G., Rasco B.A.,** (2006b) Fourier transform infrared spectroscopy, detection and identification of *Escherichia coli* O157:H7 and *Alicyclobacillus* strains in apple juice. *International Journal of Food Microbiology* **111**, 73–80.
3. **Al-Qadiri H.M., Al-Alami, N.I, Al-Holy M.A. and Rasco B.A.,** (2008a) Using Fourier Transform Infrared (FT-IR) Absorbance Spectroscopy and Multivariate Analysis to Study the Effect of Chlorine-Induced Bacterial Injury in Water. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **56**, 8992-8997.
4. **Al-Qadiri H.M., Lin, M., Al-Holy, M.A., Cavinato, A.G. and Rasco, B.A.** (2008b) Detection of Sublethal Thermal Injury in *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium and *Listeria monocytogenes* using Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy (4000-600 cm⁻¹). *Journal of Food Science, Food Microbiology and Safety* **73**, M54-M61.
5. **Axelsson L.,** (2004). Lactic acid bacteria:classification and physiology. In: Salminen S., von Wright A., Ouwehand A. (Eds.), Lactic acid bacteria. Microbiological and Functional Aspects, third ed. Marcel Dekker, New York, pp.1-66.
6. **Beresford T.P., Fitzsimons N.A. Brennan N.L. and Cogan T.M.,** (2001).Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* **11**: 259-274.
7. **Bosch A., Golowczyc M.A., Abraham A.G., Garrote G.L., De Antoni G.L. and Yantorno O.,** (2006a) Rapid discrimination of lactobacilli isolated from kefir grains by FT-IR spectroscopy. *International Journal of Food Microbiology* **111**, 280-287.
8. **Bosh, A., Serra D., Prieto C., Schmitt J., Naumann D. and Yantorno O.,** (2006b). Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**:736-747

9. **Bruno-Barcena J.M., Azcarate-Peril M.A. and Hansen H.M.,** (2010). Role of antioxidant enzymes in bacterial resistance to organic acids, *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 2747-2753
10. **Bouvier G., Bordes P., Romeo Y., Fourcans A., Bouvier I. and Gutierrez C.,** (2000). Characterization of OpuA, a glycine-betaine uptake system of *Lactococcus lactis*, *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **2**: 199-205
11. **Caplice E. and Fitzgerald G.F.,** (1999). Food fermentation: Role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* **50**: 131-149.
12. **Champomier-Verges M.C., Maguin E. Mistou M.Y., Anglade P. and Chich J.F.,** (2002). Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **771(1-2)**: 329-42.
13. **Csonka L.N. and Hanson A.D.,** (1991). Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology, *Annual Review of Microbiology* **62**: 259-261
14. **Davis R., and Mauer L.J.,** (2010). Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: a rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Mendez-Vilas Editions.*
15. **De Angelis M. and Gobbetti M.,** (2004). Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics* **4(1)**: 106-22.
16. **de Vos W. and Hugenholtz J.,** (2003). Engineering metabolic highways in lactococci and other lactic acid bacteria, *Trends in Microbiology* **22**: 72-79
17. **Earnshaw R.G., Appleyard J. and Hurst R.M.,** (1995). Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure, *International Journal of Food Microbiology* **28**: 197-219
18. **Franck P., Nabet P. and Nouisset B.,** (1998). Applications of infrared spectroscopy to medical biology. *Cellular and Molecular Biology* **44**, 273-275.
19. **Franz CMAP, Cho G.Y., Holzapfel W.H. et al.** (2010). Safety of lactic acid bacteria. In: Mozzi F., Vignolo G., Raya R., *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications*, Wiley-Blackwell, Ames
20. **Garrity G.M. and Holt J.G.,** (2001). The road map to the manual. In: Boone D. R., Castenholz R. W., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer Verlag, New York

21. **Gasson M.J.**, (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO712 and other lactic Streptococci after protoplast-induced curing. *Journal of Bacteriology* **154**: 1-9
22. **Glaasker E., Tjan F.S., Ter Steeg P.F., Konings W.N. and Poolman B.**, (1998). Physiological response of *Lactobacillus plantarum* to salt and nonelectrolyte stress. *Journal of Bacteriology* **180**: 4718-4723
23. **Goodacre R., Prasas J., Smart J. and Gill H.S.**, (1996). Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and artificial neural networks. *FEMS Microbiology Letters* **140**, 233-239.
24. **Gunn J.S.**, (2000). Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes and Infection* **2**: 907-913
25. **Hansen M.C., Nielsen A.K., Molin S., Hammer K., Kilstrup M., Palmer Jr R.J., Udsen C. and White D.C.**, (2001). Changes in rRNA levels during stress invalidates results from mRNA blotting: fluorescence in situ rRNA hybridization permits renormalization for estimation of cellular mRNA levels. *Journal of Bacteriology* **183**: 4747-4751
26. **Hansen E.B.**, (2002). Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology* **78**: 119-131.
27. **Helm D., Labischinski H., Schallehn G. and Naumann**, (1991). Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal of General Microbiology* **137**, 69-79.
28. **Huang Y., Rogers T.M., Wenz M.A., Gavinato A.G., Mayes D.M., Bledsoe G.E. and Rasco B.A.**, (2001). Detection of sodium chloride in cured salmon roe by SW-NIR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 4161-4167.
29. **Kansiz M., Heraud P., Wood B., Burden F., Beardall J. and McNaughton D.**, (1999). Fourier transform infrared microspectroscopy and chemometrics as a tool for the discrimination of cyanobacterial strains. *Phytochemistry* **52**: 407-417
30. **Kets E.P.W., Teunissen P.J.M. and De Bont J.A.M.**, (1996). Effect of compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 259-261

31. **Kilstrup M., Jacobsen S., Hammer K. and Vogensen F.K.,** (1997). Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 1826-1837
32. **Kirschner C., Maquelin K., Pina P., Ngo Thi N.A., Choo-Smith L.P., Sockalingum G.D., Sandt C., Ami D., Orsini F., Doglia S.M., Allouch P., Mainfait M., Puppels G.J., Naumann D.,** (2001). Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 1763-1770.
33. **Kleerebezem M., Beerthuyzen M.M., Vaughan E., de Vos W.M. and Kuipers O.P.,** (1997). Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc* and *Lactobacillus* sp. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4581-4584.
34. **Klein G., Pack A. and Reuter G.,** (1998). Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 1825-1830.
35. **Klein N. and Lortal S.,** (1999). Attenuated starters: an efficient means to influence cheese ripening-a review. *International Dairy Journal* **9**: 751-762.
36. **Konings W.N., Lolkema J.S., Bolhuis H., van Veen H.W., Poolman B. and Driessen A.J.,** (1997). The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. Energy transduction and multidrug resistance, *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**: 117-128.
37. **Kummerle M., Scherer S. and Seiler H.,** (1998). Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 2207-2214.
38. **Le Gal J., Manfait M., Theophanides T.,** (1991). Applications of FT-IR spectroscopy in structural studies of cell and bacteria. *Journal of Molecular Structure* **242**: 397-407.
39. **Lin, M., Al-Holy M., Al Qadiri H., Kang D.H., Cavinato A.G., Huang Y. and Rasco B.A.,** (2004). Discrimination of intact and injured *Listeria monocytogenes* by Fourier transform infrared spectroscopy and principal component analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**:5769-5772.
40. **Lin M., Al-Holy M., Chang S.S., Huang Y., Cavinato A.G., Kang D.H., Rasco B.A.,** (2005). Rapid discrimination of *Alicyclobacillus* strains in apple juice by

- Fourier transform infrared spectroscopy. *International Journal of Food Microbiology* **105**: 369-76.
41. **Lipkus A.H., Chittur K.K., Vesper S.J., Robinson J.B., Pierce G.E.,** (1990). Evaluation of infrared spectroscopy as a bacterial identification method. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **6**: 71-75.
 42. **Liu S., Asmundson R.V., Gopal P.K., Holland R. and Crow V.L.,** (1998). Influence of reduced water activity on lactose metabolism by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* at different pH values. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 2111-2116.
 43. **Lorca G.L. and Font de Valdez G.,** (2009). *Lactobacillus* stress responses, In: Ljungh A., Waldstrom T., *Lactobacillus* molecular biology, Caister Academic Press, Norfolk
 44. **Mercenier A., Muller-Alouf H. and Grangette C.,** (2000). Lactic acid bacteria as live vaccins. *Current Issues in Molecular Biology* **2**: 17-25.
 45. **Miyoshi A., Rochat T., Gratadoux J-J et al.,** (2003). Oxidative stress in *Lactococcus lactis*. *Genetics and Molecular Research* **2**: 348-359.
 46. **Nauman D., Schultz C., Born J., Rogge F. and Labischinski H.,** (1988). Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and X-ray diffraction-tools for probing lipopolysaccharide and lipid membranes from gram negative bacteria. *Mikrochimica Acta* **94**: 379-383.
 47. **Naumann D., Helm D. and Labischinski,** (1991). Microbiological characterization by FT-IR spectroscopy. *Nature* **351**: 81-82.
 48. **Nichols P.D., Henson J.M. and Guckert J.B.,** (1985). Fourier transform infrared spectroscopic methods for microbial ecology: Analysis of bacteria, bacteria-polymer mixtures and biofilms. *Journal of Microbiological Methods* **4**: 79-94.
 49. **Nilsen H., Assaiasen M., Heia K. and Sigernes F.,** (2002). Visible/Near-infrared spectroscopy: a new tool for the evaluation of fish freshness. *Journal of Food Science* **67**: 1821-1826.
 50. **Nivens D.E., Chambers J.K. Andersson T.R., Tunlid A., Smit J and White D.C.,** (1993). Monitoring Microbial adhesion and biofilm formation by attenuated total reflection/Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods* **17**: 199-213.

51. **Oberreuter H., Mertens F., Seiler H. and Scherer S.,** (2002). Quantification of microorganisms in binary mixed populations by Fourier transform infrared spectroscopy. *Letters in Applied Microbiology* **30**: 85-89.
52. **Obis D., Guillot A., Gripon J.C., Renault P., Bolotin A. and Mistou M.Y.,** (1999). Genetic and biochemical characterization of a high-affinity betaine uptake system (BusA) in *Lactococcus lactis* reveals a new functional organization within bacterial ABC transporters. *Journal of Bacteriology* **181**: 6238-6246.
53. **Orla-Jensen S.,** (1942). *The lactic acid bacteria*, 2nd ed. Copenhagen: Ejnar Munksgaard.
54. **Oust A., Moretro T., Kirschner C., Narvhus J.A., and Kohler A.,** (2004). FT-IR spectroscopy for identification of closely related lactobacilli. *Journal of Microbiological Methods* **59**: 149-162.
55. **Panoff J.M., Thammavongs B. and Guegeuen M.,** (2000). Cryoprotectants lead to phenotypic adaptation to freeze-thaw stress in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIP101027T. *Cryobiology* **40**: 264-269.
56. **Papadimitriou K., Boutou E., Zoumpopoulou G., Tarantilis P.A., Polissiou M., Vorgias C.E. and Tsakalidou E.,** (2008). RNA arbitrarily Primed PCR and Fourier Transform Infrared spectroscopy reveal plasticity in the acid tolerance response of *Streptococcus macedonicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**: 6068-6076.
57. **Poolman B., Smid E.J., Veldkamp H. and Konings W.,** (1987). Bioenergetic consequences of lactose starvation for continuous by cultured *Streptococcus cremoris* and *Streptococcus lactis*. *Journal of Bacteriology* **169**: 1460-1468.
58. **Poolman B. and Glaasker E.,** (1998). Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Molecular Microbiology* **29**: 397-407.
59. **Rodriguez-Saona L.E., Khambaty F.M., Fry F.S. and Calvey E.M.,** (2001). Rapid detection and identification of bacterial strains by Fourier transform near-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 574-579.
60. **Romeo Y., Gutierrez C. and Mistou M.Y.,** (2003). Osmoregulation in *Lactococcus lactis*. BusR, a transcriptional repressor of the glycine-betaine uptake system BusA. *Molecular Microbiology* **47**: 1135-1147.
61. **Russel D.W. and Setchell K.D.,** (1992). Bile acid biosynthesis. *Biochemistry* **31**: 4737-4749.

62. **Sandt C., Madoulet C., Kohler A., Allouch P., De Champs C., Manfait M and Sockalingum G.D.,** (2006). FT-IR microspectroscopy for early identification of some clinically relevant pathogens. *Journal of Applied Microbiology* **101**: 785-797.
63. **Schiffrin E.J. and Blum S.,** (2001). Food processing: probiotic microorganisms for beneficial foods. *Current Opinion in Biotechnology* **12**: 499-502.
64. **Schleifer K.H.,** (1987). Recent changes in taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology-Review* **46**: 201-203.
65. **Schleifer K.H., Kraus J., Dvorak C., Kilpperblaz R., Collins M.D. and Fischer W.,** (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related *Streptococci* to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology* **6**: 183-195.
66. **Schultz C. and Naumann D.,** (1991). *In vivo* study of the state of order of the membranes of Gram negative bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). *FEBS Letters* **294**: 43-46.
67. **Smid E.J., Molenaar D., Hugenholtz J., de Vos W.M. and Tensink B.,** (2005). Functional ingredient production: application of global metabolic models. *Current Opinion In Biotechnology* **16**: 190-197.
68. **Somero G.N.,** (1995). Proteins and temperature. *Annual Review of Physiology* **57**: 43-68.
69. **Spano G. and Massa S.,** (2006). Environmental stress response in wine lactic acid bacteria. Beyond *Bacillus subtilis*. *Critical Reviews in Microbiology* **32**: 77-8
70. **Stevenson H.J.R. and Bolduan O.E.A.,** (1952). Infrared spectroscopy as a means for identification of bacteria. *Science* **289**: 1352-1355.
71. **Stiles M.E.,** (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**: 331-345.
72. **Stiles M.E. and Holzappel W.H.,** (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* **36**: 1-29.
73. **Stortz G. and Hengge-Aronis R.,** (2000). Bacterial Stress Responses p. 485, ASM Press, Washington DC.
74. **Sugimoto S., Al-Mahim A. and Sonomoto K.,** (2008). Molecular chaperones in lactic acid bacteria: physiological consequences and biochemical properties. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **106**: 324-336.

75. **Tannock G.W.**, (1999). Identification of lactobacilli and bifidobacteria. *Current Issues Molecular Biology* **1**:53-64.
76. **Teixera P., Castro H., Mohacsi-Farkas C. and Kirby R.**, (1997). Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. *Journal of Applied Microbiology* **83**: 219-226.
77. **Uguen P., Hamelin J., Le Pennec J.P. and Blanco C.**, (1999). Influence of osmolarity and the presence of an osmoprotectant on *Lactococcus lactis* growth and bacteriocin production. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 291-293.
78. **VanBogelen R.A., Greis K.D., Blumenthal M., Tani T.H. and Matthews R.**, (1999). Mapping regulatory networks in microbial cells. *Trends in Microbiology* **7**: 320-328.
79. **van de Guchte M., Serror P., Chervaux C., Smokvina T., Ehrlich S. D and Maguin E.**, (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**: 187-216.
80. **Van der Heide T. and Poolman B.**, (2000). Osmoregulated ABC-transport system of *Lactococcus lactis* senses water stress via changes in the physical state of the membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**: 7102-7106.
81. **Van der Mei H.C., Naumann D. and Busscher H.J.**, (1993). Grouping of oral streptococcal species using Fourier-transform infrared spectroscopy in comparison with classical microbiological identification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **38**: 1013-1019.
82. **van Hylckama V., J.E.T., Rademaker J.L.W., Bachmann H., Molenaar D., Kelly W.J. and Siezen R.J.**, (2006). Natural diversity and adaptive responses of *Lactococcus lactis*. *Current Opinion on Biotechnology* **17**: 183-190.
83. **van Kranenburg R., Kleerebezem M., van Hylckama V., Ursing B.M., Boekhorst J., Smit B.A., Ayad E.H.E., Smit G. and Siezen R.J.**, (2002). Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal* **12**: 111-121.
84. **Warriner K.S.R. and Morris J.G.**, (1995). The effects of aeration on the bioreductive abilities of some heterofermentative lactic acid bacteria. *Lett Appl Microbiol* **20**: 323-327.

85. **Wells J.M., Robinsin K., Chamberlain L.M., Schofield K.M. and LePage R.W.**, (1996). Lactic acid bacteria as vaccine delivery vehicles. *Antonie Van Leeuwenhoek* **70**: 317-330.
86. **Whitaker R.D. and Batt C.A.C.**, (1991). Characterization of the heat shock response in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* **57**: 1408-1412.
87. **Zeroual W., Choisy C., Doglia S.M., Bobichon H., Angiboust J.F. and Manfait M.** (1994). Monitoring of bacterial growth and structural analysis as probed by FT-IR spectroscopy removal. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **122**: 171-178.
88. **Zoumpopoulou G., Foligne B., Christodoulou K., Granette C., Pot B. and Tsakalidou E.** (2008). *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential *in vitro* and protects against TNBS-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models. *International Journal of Food Microbiology* **121**: 18-26.