

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΑΛΑΚΤΟΚΟΜΙΑΣ

---

Μεταπτυχιακή Διατριβή

*«Διερεύνηση της μικροχλωρίδας της Στάκας -  
Ταυτοποίηση βακτηρίων με την πρωτεωμική τεχνολογία της  
Φασματομετρίας Μαζών»*

***Λάππα Ιλιάδα***

**Εξεταστική επιτροπή:**

Έφη Τσακαλίδου, Καθηγήτρια ΓΠΑ (**επιβλέπουσα**)  
Ελευθέριος Δροσινός, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ  
Ευστάθιος Πανάγου, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Αθήνα  
Μάιος 2012

## **Ευχαριστίες**

Ξεκινώντας αυτή τη σελίδα ο πρώτος άνθρωπος που θα ήθελα να ευχαριστήσω είναι η Καθηγήτρια μου Έφη Τσακαλίδου. Τόσο για την ευκαιρία που μου πρόσφερε να ασχοληθώ με την έρευνα όσο και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου την εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής μελέτης, μέσω της οποίας εκπροσωπούσα τόσο την ίδια όσο και το εργαστήριο κατά την τετράμηνη φιλοξενία μου από το Πανεπιστήμιο της Γάνδης. Θεωρώ, πως το ταξίδι μου αυτό, το οποίο και άλλαξε την ζωή μου, το χρωστώ σε εκείνη. Τέλος, την ευχαριστώ για την κατανόηση της όσες φορές δεν μπόρεσα για τον οποιοδήποτε λόγο να ανταπεξέλθω στις προσδοκίες της αλλά και για την αναντικατάστατη καθοδήγηση της όλο αυτό το διάστημα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή ΓΠΑ Ελευθέριο Δροσινό και τον Επίκουρο Καθηγητή ΓΠΑ Ευστάθιο Πανάγου, για την τιμή που μου έκαναν όντες μέλη της εξεταστική επιτροπής της παρούσας εργασίας αλλά και για την σημαντική συμβολή τους στη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας αλλά κυρίως, την Ευγενία Μανολωπούλου για την πολύτιμη βοήθειά της στις πειραματικές διαδικασίες αλλά και για το ευχάριστο και ζεστό κλίμα που με περίμενε κάθε πρωί που θα πήγαινα στο εργαστήριο. Ευχαριστώ πολύ την Μαρίνα Γεωργαλάκη η όποια ήταν πάντα πρόθυμη να βοηθήσει σε οτιδήποτε χρειαστώ και ήταν χαρά μου που βρέθηκα έστω και για λίγο στον ίδιο χώρο μαζί της.

Θέλω ακόμη να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που γνώρισα στο Βέλγιο και που συνέβαλλαν καθοριστικά όσον αφορά στην επιστημονική μου κατάρτιση αλλά και στον τρόπο θεώρησης μου των πραγμάτων σχετικά με την έρευνα. Τον Καθηγητή Dr. Peter Vandamme του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου της Γάνδης, για την άμεση αποδοχή μου στην ομάδα του, και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ όλη τη διάρκεια της δουλειάς μου εκεί. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στον Maarten Aerts, Post- Doctoral researcher του Εργαστηρίου,

για την άψογη συνεργασία που είχαμε, για τη φιλοξενία του και για την κάθε δυνατή του προσπάθεια να νιώσω όσο το δυνατόν καλύτερα κατά την παραμονή μου στο εργαστήριο. Τέλος στις Enie De Brandt και Margo Snockaert, μέλη τεχνικού και εργαστηριακού προσωπικού, για την αμέριστη βοήθειά τους στο εργαστηριακό κομμάτι της μελέτης και για το γλυκό τους χαμόγελο που μου πρόσφεραν απλόχερα.

Δεν θα μπορούσα να μην αναφέρω τα φιλαράκια μου εκεί που έκαναν τα πάντα για να με ξεκουράζουν με την συντροφιά τους (αλλά και να με ξενουχτάνει!) ώστε να περάσω υπέροχα τους μήνες αυτούς σ' αυτήν την ξένη αλλά πολύ αγαπημένη πλέον χώρα.

Πολλά ευχαριστώ στους δικούς μου ανθρώπους Αντρέα, Δώρα, Κατερίνα, προπάντων για τη φιλία τους αλλά και για τη στήριξή τους τόσο όσο βρισκόμουν μακριά όσο και κατά τη διάρκεια της δουλείας μου εδώ, που με βοήθησαν με κάθε ηθικό αλλά και πρακτικό τρόπο σε κάθε δύσκολη στιγμή της εκπόνηση αυτής της εργασίας. Στη Βίκη, που στέκεται πάντα δίπλα μου και ενθαρρύνει κάθε μου επιλογή και προσπάθεια.

Στους συμφοιτητές μου Νατάσσα, Βάσω, Άννα, Άγγελο για όλες τις ωραίες στιγμές που μου χάρισαν τα 2 αυτά χρόνια των σπουδών μας και για τη συμπαράσταση τους σε κάθε ακαδημαϊκό ή μη θέμα.

Πόσο θα μπορούσα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τον αδερφό μου, που ανέχτηκαν την γκρίνια μου και τα νεύρα μου κάθε φορά που πιεζόμουν και που μου έδωσαν κάθε μορφής στήριξη που θα μπορούσα να έχω όλα αυτά τα χρόνια των σπουδών μου.

Το τελευταίο μου ευχαριστώ το οφείλω στον Κυριάκο, για την αγάπη του, που αποτελεί πάντα την κινητήριο δύναμη σε ότι κάνω..

## Περιεχόμενα

Σελίδες

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	6

### **Κεφάλαιο 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

1.1 Οξυγαλακτικά Βακτήρια.....	8
1.1.1 Ταξινόμηση.....	9
1.1.2 Πηγές.....	12
1.1.3 Σημασία στα τρόφιμα.....	12
1.1.4 Μεταβολικό σύστημα.....	17
1.1.5 Μέθοδοι Ταυτοποίησης.....	22
1.2 Εισαγωγή στην πρωτεωμική .....	25
1.2.1 Φασματομετρία μαζών.....	27
1.2.2 Αρχές και λειτουργία Maldi-Tof.....	29
1.3 Στάκα.....	34
1.4 Σκοπός μελέτης.....	35

### **Κεφάλαιο 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

2.1 Στελέχη.....	37
2.2 Πειραματική διαδικασία Maldi-Tof.....	40
2.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων.....	41
2.2.2 Απομόνωση πρωτεϊνών.....	41
2.2.3 Μετρήσεις Maldi-Tof .....	42
2.2.4 Βιοπληροφορική ανάλυση φασμάτων.....	44
2.3.1 Αλληλούχηση ενζύμου PheS.....	46
2.3.2 Αλληλούχηση γονιδίου 16S.....	50

### **Κεφάλαιο 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

3.1 Απομόνωση και αρχικός φαινοτυπικός χαρακτηρισμός στελεχών.....	54
3.2.1 Ταυτοποίηση Γαλακτοβακίλλων.....	55
3.2.1 Ταυτοποίηση Κόκκων.....	61
3.2 Συζήτηση.....	67

### **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**

Πίνακες Αντιδραστηρίων.....	76
-----------------------------	----

<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>78</b>
--------------------------	-----------

## Περίληψη

Η παρούσα μελέτη αφορά στη διερεύνηση της μικροχλωρίδας της Στάκας, ενός παραδοσιακού γαλακτοκομικού προϊόντος της Κρήτης, και στην ταυτοποίηση των απομονωθέντων βακτηρίων με την πρωτεωμική τεχνολογία της Φασματοσκοπίας Μαζών, και συγκεκριμένα της μεθόδου Maldi-TOF MS (matrix assisted laser desorption/ionization – Time Of Flight – Mass Spectroscopy)

Από τα δείγματα του τυριού απομονώθηκαν 106 ‘άγρια’ στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων, τα οποία αρχικά χαρακτηρίστηκαν και ομαδοποιήθηκαν με φαινοτυπικές μεθόδους.

Για την ταυτοποίηση με τη μέθοδο Maldi-TOF MS, έγιναν διαδοχικές ανακαλλιέργειες των βακτηριακών στελεχών μέχρι την 3<sup>η</sup> γενιά, λύση των κυττάρων και συλλογή των κυτταρικών πρωτεϊνών. Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες ενσωματώθηκαν με περίσσεια υποστρώματος (matrix) και εισήχθησαν στο φασματογράφο όπου ιονίστηκαν με παλμούς laser. Κάθε στέλεχος έδωσε ένα διακριτό φάσμα μαζών. Η τελική ανάλυση των παραγόμενων φασμάτων μάζας έγινε με εργαλεία Βιοπληροφορικής. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Bionumerics (Applied Maths) και εφαρμόστηκε η στατιστική μέθοδος Ανάλυση κατά Συστάδες με τη μέθοδο ομαδοποίησης μη σταθμισμένων ζευγών (UPGMA, Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean). Για τη φυλογενετική ταξινόμηση, χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου της Γάνδης (LMG, Βέλγιο) που περιλαμβάνει περί τα 30.000 φάσματα μικροοργανισμών.

Για τα στελέχη για τα οποία η Maldi-TOF MS δεν έδωσε σαφή αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές αλληλούχησης του γονιδίου του ενζύμου *PheS* και αλληλούχησης γονιδίου 16S rRNA.

Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 101 από τα 106 απομονωθέντα στελέχη. Αναγνωρίστηκαν 9 διαφορετικά είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων: *L. plantarum* (24), *L. paraplantarum* (10), *L. paracasei* (20), *E. durans* (21), *E. Faecalis* (11), *E. Faecium* (2), *S. thermophilus* (8), *Aerococcus sp.* (1).

## Abstract

This study concerns the exploration of microbiota of Staka, which is a peculiar dairy product prepared in Crete, and the identification of bacterial isolates using the Proteomic technology of Mass Spectrometry.

From these cheese samples a total of 106 wild lactic acid bacteria were isolated and phenotypically characterized. Lactobacilli were the most abundant group. For the sample preparation the bacterial strains submitted to successive revivals until their 3<sup>rd</sup> gen. Firstly performed cell lysis and then proteins extraction.

The bacterial samples analyzed by Maldi-TOF MS. The protein's molecules are mixed with the matrix solution, introduced in the vacuum area into mass spectrometer and exposed to a laser beam. Each strain gave transmitted a unique signal.

The final analysis of the above mass spectra took place with Bioinformatics' tools. We used Bionumerics (Applied Maths) software in which applied Cluster Analysis according to UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean). Concerning the Phylogenetic taxonomy, spectras compared to each other and classified hierarchically according to mass signal and intense and creating dendrograms. For the identifications the same software had been used with specific algorithm and the resulting fingerprints were compared with the approximately 30000 entries of LMG's lab (University of Gent, Belgium).

The strains, for which Maldi-TOF MS didn't give clear taxonomy, were identified through *PheS* and 16SrRNA gene sequence analysis.

They were identified 101 for 106 isolated strains, from which 9 different species of lactic acid bacteria occurred. *L. plantarum* (24), *L. paraplantarum* (10), *L. paracasei* (20), *E.durans* (21), *E. Faecalis* (11), *E. Faecium* (2), *S. thermophilus* (8), *Aerococcus sp.* (1).

## **Λέξεις Κλειδιά**

Οξυγαλακτικά βακτήρια

Ταυτοποίηση

Φασματομετρία μάζας

Maldi-TOF

PheS

Στάκα

## **Key words**

Lactic acid bacteria

Identification

Mass Spectrometry

Maldi-TOF

PheS

Staka

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Οξυγαλακτικά βακτήρια

Οι μικροοργανισμοί όπως είναι τα βακτήρια, και ειδικότερα τα οξυγαλακτικά βακτήρια, εμπλέκονται στην παρασκευή των τροφίμων εδώ και χιλιάδες χρόνια. Η παρασκευή ζυμούμενων προϊόντων είναι μια από τις αρχαιότερες τεχνολογίες τροφίμων. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (Lactic Acid Bacteria, LAB) αποτελούν την κυριότερη ομάδα μικροοργανισμών, οι οποίοι είτε απαντώνται ως αυτόχθονη μικροχλωρίδα είτε χρησιμοποιούνται ως εναρκτήριες καλλιέργειες. Όλα ξεκίνησαν με την απόδειξη από τον Γάλλο βιοχημικό Louis Pasteur πως οι ζυμώσεις των τροφίμων είναι αποτέλεσμα δράσης μικροοργανισμών. Ακολουθώντας τη θεωρία του, ο Joseph Lister σε μια προσπάθεια απόδειξης της γαλακτικής ζύμωσης δημοσιεύει τα αποτελέσματα της ερευνάς που αφορά στην απομόνωση του πρώτου βακτηρίου υπεύθυνου για την οξίνιση του γάλακτος το οποίο ονομάζει *Bacterium lactis*. Η παρουσία των οξυγαλακτικών βακτηρίων εντοπίστηκε για πρώτη φορά εμπορικά ως εναρκτήριες καλλιέργειες στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα. Έκτοτε η χρήση τους μεγιστοποιήθηκε βιομηχανικά σε παγκόσμιο επίπεδο και αυτό ήταν το έναυσμα ώστε τα οξυγαλακτικά βακτήρια να είναι πλέον από τους καλύτερα μελετημένους μικροοργανισμούς, ειδικά όσον αφορά τον τομέα των τροφίμων.



### 1.1.1 Ταξινόμηση

Ο όρος οξυγαλακτικά βακτήρια εδραιώθηκε προοδευτικά από τις αρχές του 20ου αιώνα (Carol et al., 2010). Η κλασική ταξινόμηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων βασίζεται σε μορφολογικά, φυσιολογικά και οικολογικά χαρακτηριστικά (Orla S., 1919), στα οποία αργότερα συμπεριλήφθηκαν χημειοταξινομικές ιδιότητες (khalisanni K., 2011). Ο Orla-Jensen το 1942 έδωσε τον ορισμό στα οξυγαλακτικά βακτήρια, ως θετικούς κατά Gram, μη σποριογόνους μικροοργανισμούς, οι οποίοι ζυμώνουν τους υδατάνθρακες και τις ανώτερες αλκοόλες κυρίως προς γαλακτικό οξύ. Ενώ πλέον, η ταξινομική αυτή ανάλυση είναι περιορισμένη, παρόλα αυτά ο ορισμός παραμένει γενικά αποδεκτός (Axelsson L., 2004). Σήμερα γνωρίζουμε ότι τα οξυγαλακτικά βακτήρια είναι αναερόβια αλλά και αερο-ανθεκτικά, είναι αρνητικά στη δοκιμή της καταλάσης, στερούνται κυτοχρώματος και αυτόνομης κίνησης, είναι οξεάντοχα αλλά και απαιτητικά σε διατροφικά στοιχεία (Axelsson L., 1993; Klein et al., 1998)

Φυλογενετικά τα οξυγαλακτικά βακτήρια ανήκουν στην κλωστριδιακή υποομάδα των Gram + βακτηρίων, τα οποία είναι βάκιλοι ή κόκκοι που περιέχουν λιγότερο από 55% G + C / mol στο DNA τους (Salminen et al., 2004). Αυτό ξεχωρίζει τα κλασικά οξυγαλακτικά βακτήρια από τα Bifidobacteria, που περιέχουν περισσότερο από 55% G + C / mol στο DNA τους και πλησιάζουν φυλογενετικά τους ακτινομύκητες (Schleifer & Ludwig., 1995). Το γένος των *Bifidobacterium* αν και φυλογενετικά ανήκει στο φύλο *Acinetobacter*, εξετάζεται συνήθως με τα οξυγαλακτικά βακτήρια λόγω της στενής του συγγένειας με αυτά αναφορικά με φυσιολογικές αλλά και βιοχημικές ιδιότητες, καθώς και γιατί απαντώνται σε ίδια οικοσυστήματα, όπως π.χ. το γαστρεντερικό σύστημα ανθρώπων και ζώων (Vandamme et al., 1996).

Μετά από πολλές δεκαετίες, η εξέλιξη των μοριακών τεχνικών έφερε μεγάλες αλλαγές στη συστηματική των βακτηρίων. Πρόσφατα σε μεθόδους ταξινόμησης, έχουν προστεθεί και τα μοριακά χαρακτηριστικά των οξυγαλακτικών βακτηρίων, όπως η ποσοστιαία ανά γραμμάριο περιεκτικότητα του DNA σε βάσεις

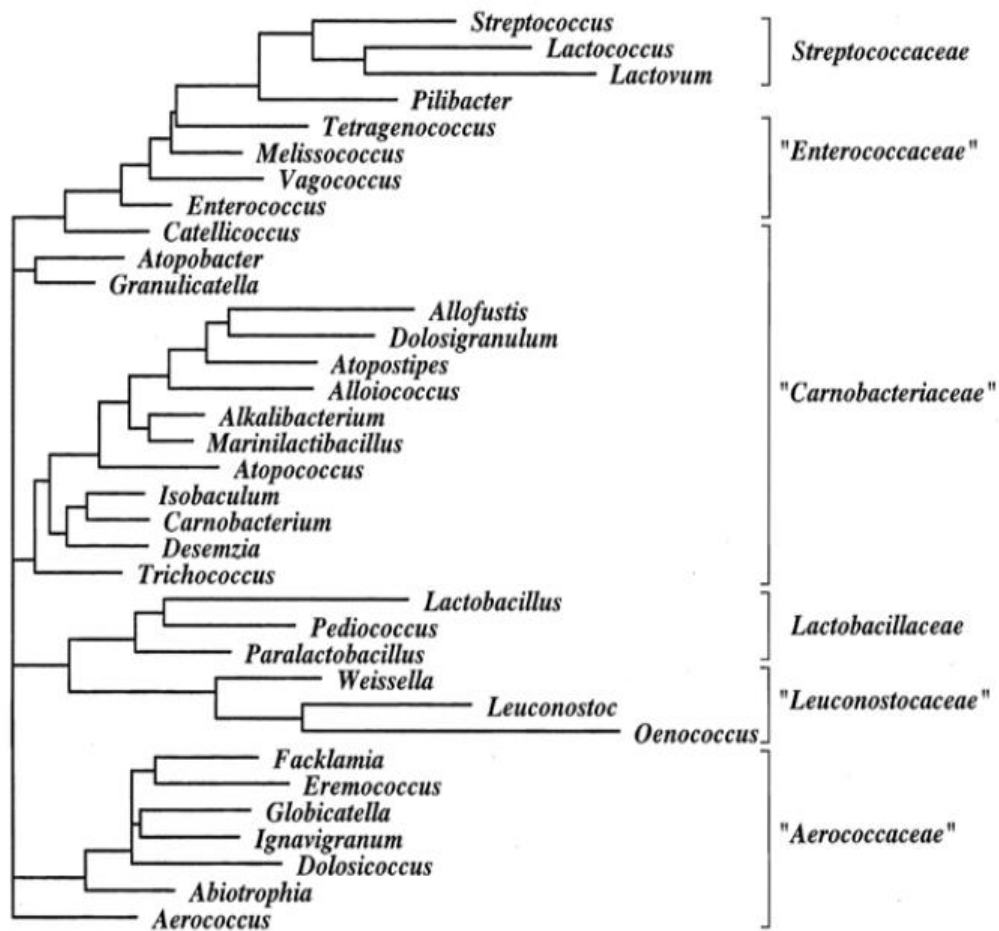
γουανίνης και κυτοσίνης που αναφέρθηκε παραπάνω, οι DNA-DNA υβριδισμοί, οι ηλεκτροφορητικές ιδιότητες των προϊόντων των γονιδίων κ.α (Tenover et al., 1995).

Επίσης ο εμπλουτισμός των βάσεων δεδομένων με αλληλουχίες 16S rRNA γονιδίων συντέλεσε καθοριστικά στην διαμόρφωση της ταξινομικής αλλαγής. Τα rRNA γονίδια είναι παρόντα σε όλους τους έμβιους οργανισμούς και περιέχουν σταθερά αλλά και μεταβλητά τμήματα. Έτσι θεωρούνται πολύτιμα εξελικτικά χρονόμετρα ώστε να διαφωτίσουν τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των βακτηριακών ειδών (Vandamme et al., 1996). Βάσει των 16S και 23S rRNA ακολουθιών τα βακτήρια έχουν χωριστεί σε 17 φύλα. Οι Schleifer και Ludwig το 1995 χρησιμοποίησαν συγκριτική γονιδιακή αλληλουχία με 16S rRNA για να διαχωρίσουν φυλογενετικά τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Ένα πιο πρόσφατο σύστημα ταξινόμησης παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.1 (Garrity et al., 2004). Ωστόσο, λόγω χαμηλού ρυθμού εξέλιξης των rRNA γονιδίων, αρκετά είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων παρουσιάζουν σχεδόν πλήρη πανομοιότυπα 16S rRNA γονίδια, περιπλέκοντας την οριοθέτηση των βακτηριακών ειδών και την ανάλυση των φυλογενετικών δέντρων (Vandamme et al., 1996, Woese et al., 1987).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια ανήκουν στην τάξη *Lactobacillales* της κλάσης *Bacilli* του φύλου *Firmicutes* (Garrity & Holt, 2001). Μέχρι σήμερα περιλαμβάνει 6 οικογένειες που απαρτίζονται από περίπου 40 γένη. Συγκεκριμένα έχουν περιγραφεί 7 γένη για την οικογένεια *Aerococcaceae*, 16 γένη για την οικογένεια *Carnobacteriaceae*, 7 γένη για την οικογένεια *Enterococcaceae*, 3 γένη για την οικογένεια *Lactobacillaceae*, 4 γένη για την οικογένεια *Leuconostocaceae* και 3 γένη για την οικογένεια *Streptococcaceae*. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που σχετίζονται με τα τρόφιμα περιλαμβάνουν είδη που ανήκουν στα γένη *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus* και *Carnobacterium*. Από αυτά το γένος του *Lactobacillus* είναι η πιο ετερογενής ομάδα που περιλαμβάνει περίπου 135 είδη και 27 υποείδη, τα οποία συχνά υποβάλλονται σε ταξινομική αναδιάταξη (Bernardeau et al., 2008).

Τις τελευταίες δεκαετίες μετά την ανάπτυξη μεθόδων ταξινόμησης που βασίζονται στο DNA, η βακτηριακή συστηματική έχει εξελιχθεί σε ένα συνεχώς αναπτυσσόμενο τομέα της μικροβιολογίας. Λόγω της υψηλής βιο-διαφοροποίησης τους και της συνεχούς απομόνωσης νέων στελεχών, η κατάταξη των οξυγαλακτικών

βακτηρίων απαιτεί πλέον την εφαρμογή σύγχρονων πολυφασικών ταξινομικών προσεγγίσεων.



**Σχήμα 1.1** Φυλογενετικό δένδρο ταξινόμηση οικογενειών οξυγαλακτικών βακτηρίων

(Πηγή: Garrity et al, 2004)

### **1.1.2 Πηγές**

Οι οξυγαλακτικά βακτήρια απαντώνται σε πολλά οικοσυστήματα, οπουδήποτε υπάρχουν διαθέσιμα υποστρώματα πλούσια σε υδατάνθρακες. Ως εκ τούτου συνδέονται άμεσα με τα φυτά και κυρίως αποσυντιθέμενα φύλλα, σε περιβάλλον απορριμμάτων, ακόμα και τα νερά των υπονόμων. Δεν θεωρείται ότι βρίσκονται σε μεγάλους πληθυσμούς και σε μεγάλη ποικιλία σε υδάτινα οικοσυστήματα, παρόλα αυτά κάποια είδη έχουν βρεθεί και σε ψάρια αλλά και στα περιβάλλοντα διαβίωσης τους (Sahnouni et al., 2012). Είναι ευρέως διαδεδομένα στη φύση όσο και στα τρόφιμα.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια απαντώνται στα ζυμούμενα τρόφιμα και είτε αποτελούν μέρος της φυσικής μικροβιακής χλωρίδας του τροφίμου, είτε προστίθενται σ' αυτό ως εναρκτηρίες καλλιέργειες προκειμένου να εξασφαλιστεί η ασφάλεια και η σταθερότητα της ζύμωσης. Κατέχουν σημαντικό μέρος στην τεχνολογία κρέατος αλλά και σε φυτικά προϊόντα και στην παραγωγή κρασιού, συνεισφέροντας στη βελτίωση γεύσης, αρώματος, μορφής και διάρκειας ζωής. Σε παγκόσμιο επίπεδο η μέγιστη χρήση τους αφορά τη βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων (Hansen E., 2002). Επίσης τα οξυγαλακτικά βακτήρια βρίσκονται στη αναπνευστική και γαστρεντερική οδό ανθρώπου και ζώων καθώς και σε διάφορα σημεία του σώματος, όπως στον βλεννογόνο της στοματικής κοιλότητας, το έντερο και τον κόλπο (Mitsouokat T., 1992).

### **1.1.3 Σημασία στα τρόφιμα**

#### ***Εναρκτηρίες και μη εναρκτηρίες καλλιέργειες οξυγαλακτικών βακτηρίων***

Όσον αφορά το ρόλο τους στην διαδικασία παραγωγής, τα οξυγαλακτικά βακτήρια διαθέτουν ένα μακρόχρονο ιστορικό εφαρμογής στα τρόφιμα. Η συνεισφορά τους στην τεχνολογία τροφίμων που αφορούν τα ζυμούμενα προϊόντα αποτελούν ένα σημαντικό κλάδο της βιομηχανίας τροφίμων.

Ως καλλιέργειες εκκίνησης ορίζεται το παρασκεύασμα ενός τουλάχιστον μικροοργανισμού, το οποίο προστίθεται σε φρέσκο υλικό, με σκοπό την παραγωγή προϊόντος ζύμωσης μέσω καθοδηγούμενης επιτάχυνσης της ζυμωτικής λειτουργίας. Η πρωταρχική τους δράση είναι η παραγωγή οξέος. Μέσω αυτής διαμορφώνονται τα οργανοληπτικά προϊόντα των τελικών προϊόντων και επιτυγχάνεται η συντήρηση και η μικροβιακή σταθερότητα, λόγω των φαινομένων πρωτεόλυσης και λιπόλυσης που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης.

Αναφορικά με τους εκκινητές της βιομηχανίας γάλακτος και συγκεκριμένα των τυριών, η χρήση των οξυγαλακτικών βακτηρίων οφείλεται στην ικανότητά τους να ζυμώνουν τη λακτόζη προς παραγωγή γαλακτικού οξέος (κυρίως). Έτσι συμβάλουν στην παραγωγή αρώματος και γεύσεως του τελικού προϊόντος αλλά και στην πήξη του γάλακτος.

Ως εναρκτήριοι καλλιέργειες οξυγαλακτικών βακτηρίων ορίζονται εκείνες που παράγουν οξύ το οποίο μπορεί να προκαλέσει μείωση του pH του γάλακτος κάτω από 5.3 σε 6 ώρες στους 30-37°C και αναπτύσσονται σε πληθυσμό της τάξης των  $10^8$  cfu/g μέσα σε λίγες ώρες κατά την παρασκευή. Τα πλέον χρησιμοποιούμενα ανήκουν στα γένη *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* (Beresford et al., 2001).

Η κατηγορία των μη εναρκτήριων οξυγαλακτικών (Non Starter Lactic Acid Bacteria, NSLAB) βακτηρίων αφορά στους μεσόφιλους γαλακτοβακίλλους και πεδιόκοκκους. Χρησιμοποιούνται ως συμπληρωματικές καλλιέργειες καθώς διαθέτουν χαμηλή ικανότητα οξίνισης του γάλακτος και συνήθως απαρτίζουν τη μικροχλωρίδα που αναπτύσσεται δευτερογενώς κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Τέτοια στελέχη ανήκουν στα είδη *Lactobacillus casei/paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus* (Beresford et al., 2001).

Παρόλα αυτά, στην παρούσα μελέτη το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στις αυθόρμητες ζυμώσεις, εξαιτίας της ανάπτυξης της φυσικής αυτόχθονης μικροχλωρίδας.

## **Λειτουργικά οξυγαλακτικά βακτήρια**

Παρά το γεγονός πως μέχρι πρόσφατα η έρευνα αφορούσε κυρίως τις λειτουργικές ιδιότητες των οξυγαλακτικών σχετικά με τις ζυμώσεις και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων προϊόντων, στις μέρες μας κινείται στους τομείς των διατροφικών αξιών των τροφίμων και την προώθηση της υγείας του ανθρώπου.

Η σημαντικότερη εφαρμογή των οξυγαλακτικών σήμερα στη βιομηχανία τροφίμων είναι η προσθήκη προβιοτικών σε διάφορα προϊόντα. Πολλοί ορισμοί έχουν προταθεί για τα προβιοτικά παρόλα αυτά πιο ευρέως χρησιμοποιείται εκείνος του FAO «Ζωντανοί οργανισμοί, που όταν χορηγούνται σε επαρκής ποσότητες, επιφέρουν ευεργετικά αποτελέσματα στην υγεία του ξενιστή». Παρότι δεν αναφέρεται συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων, είναι γενικότερα αποδεκτό, ότι ο οργανισμός πρέπει να λαμβάνει  $10^9$  ζωντανά κύτταρα ημερησίως (Ouwehand et al., 2002). Επίσης, νεότερες μελέτες έχουν δείξει ότι ακόμη και οι μη προβιοτικοί οργανισμοί ή οι κυτταρικές τους δομές, πιθανόν να δρουν ευεργετικά, δίνοντας μια νέα κατεύθυνση στην έρευνα και τη μελλοντική χρήση των προβιοτικών (Lee et al., 1999; Saminen et al., 1999).

Οι προβιοτικές επιδράσεις των (προβιοτικών) οξυγαλακτικών βακτηρίων έχουν τεκμηριωθεί σε αρκετά μεγάλο βαθμό (Salminen et al., 1996, Mortomi M., 1996). Η δράση τους οφείλεται στη βελτίωση της πέψης της λακτόζης (Sanders M., 1993), στην ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος (Schiffirin et al., 1995) και στη μείωση αλλεργικών αντιδράσεων (Wang, 2004). Ιδιαίτερα σημαντική θεωρείται η επίδρασή τους στη λειτουργία του πεπτικού συστήματος καθώς η προσκόλληση τους πάνω στον βλεννογόνο του εντέρου παρεμποδίζει την εκδήλωση παθογόνων δράσεων και βοηθά στην επούλωση ελκών. Τα προβιοτικά οξυγαλακτικά βακτήρια παρουσιάζουν αντοχή στα οξέα, τα χολικά άλατα και τα παγκρεατικά ένζυμα και έτσι μπορούν να επιβιώσουν κατά τη διέλευση τους στο γαστρεντερικό σωλήνα (Ouwehand et al., 2002). Τα βακτήρια που χορηγούνται συχνότερα σαν προβιοτικά ανήκουν στα γένη *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* (Ouwehand et al., 2002)

Πολλές φορές μπορεί να προκύψει το φαινόμενο αλληλεπίδρασης μεταξύ προβιοτικών και καλλιιεργειών εκκίνησης. Αυτό μπορεί να συμβεί εξαιτίας της συνεργιστικής ή ανταγωνιστικής δράσης των χρησιμοποιούμενων στελεχών. Η παράμετρος αυτή γίνεται ακόμη πιο σημαντική στην περίπτωση που υπάρχει μεταβολισμός που καταστέλλει ή αδρανοποιεί συγγενή ή μη, ήδη βακτηρίων και κυρίως την παραγωγή βακτηριοσινών. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποτελέσει περιοριστικό παράγοντα για τη χρήση και το συνδυασμό των οξυγαλακτικών βακτηρίων καθώς έχει μελετηθεί η ικανοποιητική παραγωγή βακτηριοσινών είναι επιθυμητή ιδιότητα των προβιοτικών οργανισμών.

Οι βακτηριοσίνες των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι μικρού μοριακού πεπτίδια ή πρωτεΐνες με αντιμικροβιακή δράση έναντι σε συγγενή Gram θετικά βακτήρια. Αρκετές μελέτες έχουν καταλήξει σε θετικά αποτελέσματα ως προς τη δυνατότητα των οξυγαλακτικών βακτηρίων να παράγουν βακτηριοσίνες και εντός του τροφίμου με συνέπεια ανασταλτική δράση σε αλλοιογόνα και παθογόνα βακτήρια. Η ασφάλεια των τροφίμων κερδίζει συνεχώς όλο και μεγαλύτερο επιστημονικό ενδιαφέρον. Τα οξυγαλακτικά εκτός της παραγωγής βακτηριοσινών, συντελούν επίσης στο πεδίο αυτό ως εναρκτήριες καλλιέργειες, καθώς παράγουν και άλλες αντιμικροβιακές ενώσεις, όπως οργανικά οξέα (γαλακτικό, οξικό, φορμικό), διοξείδιο του άνθρακα, υπεροξείδιο του υδρογόνου, διακετύλιο και αιθανόλη.

Η χρήση προβιοτικών οργανισμών στα τρόφιμα αποτέλεσε το εφελτήριο της βιομηχανίας για την ανάπτυξη των 'λειτουργικών τροφίμων' (functional foods), με σκοπό την ενίσχυση της ανθρώπινης υγείας εκμεταλλευόμενοι τις ευεργετικές επιδράσεις τους στη γαστρεντερική οδό.

Για παράδειγμα, κάποια οξυγαλακτικά βακτήρια που χρησιμοποιούνται σαν καλλιέργειες εκκίνησης όπως ο *Lb. delbruckii* subsp. *bulgaricus* και ο *S. thermophilus*, μπορούν να παράγουν βιταμίνες όπως το φυλικό οξύ, γεγονός που οδηγεί στην παραγωγή εμπλουτισμένων γαλακτοκομικών προϊόντων (Wouters, 2002). επίσης, ο *L. helveticus* προκαλεί διάσπαση των πρωτεϊνών του γάλακτος σε μικρά πεπτίδια, μερικά από τα οποία είναι βιολογικά ενεργά και ονομάζονται βιοενεργά πεπτίδια. Τα πεπτίδια αυτά έχουν σχετιστεί με τη βελτίωση

απορρόφησης μετάλλων και ειδικότερα Ca αλλά και ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος κα. (Meisel & Bockelmann, 1999).

## **Ασφάλεια**

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια κατέχουν σημαντική θέση στη βιομηχανία τροφίμων γιατί είναι παραγωγοί γεύσεως, οργανοληπτικών συστατικών αλλά και αντιμικροβιακών ενώσεων. Παράλληλα όμως κάποια από αυτά μπορεί να θεωρηθούν αλλοιογόνα για κάποιες ζυμώσεις τροφίμων ή ακόμη και παθογόνα για τον άνθρωπο. Η επικράτησή τους στα τρόφιμα έχει επιφέρει το ερώτημα για το πώς κυμαίνεται ο λόγος όφελος προς ρίσκο αναφορικά με την ασφάλεια όταν χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία. Τα περισσότερα οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία έχουν μια μακρά παράδοση χρήσης τους στα ζυμούμενα τρόφιμα θεωρούνται ασφαλή για κατανάλωση και αναφέρονται σαν 'GRAS' (generally recognized as safe).

Μια παρόμοια προσέγγιση έχει πρόσφατα τεθεί σε εφαρμογή από Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας Τροφίμων (EFSA) έχοντας εφελτήριο τη θεωρία περί QPS (qualified presumption of safety). Στην προσέγγιση αυτή η υποτιθέμενη ασφάλεια ενός στελέχους καταγράφεται με βάση έναν αριθμό κριτηρίων όπως για παράδειγμα πιθανοί λοιμογόνοι παράγοντες, παρουσία μεταβιβάσιμων παραγόντων αντιμικροβιακής αντίστασης.

Παρόλα αυτά τα οξυγαλακτικά βακτήρια μπορεί να συνδέονται και με ευκαιριακές λοιμώξεις. Ως εκ τούτου, η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός τους, εάν είναι δυνατόν και σε επίπεδο στελέχους, είναι κρίσιμης σημασίας ώστε να επικυρωθεί η ασφάλειά τους χρήση και τα τεχνολογικά οφέλη του που είναι σχετικά με την ασφάλεια τροφίμων και τη διασφάλιση της ποιότητας.



#### **1.1.4 Μεταβολικό σύστημα οξυγαλακτικών βακτηρίων**

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αντλούν την ενέργεια που χρειάζονται για το μεταβολισμό τους από την οξείδωση χημικών ενώσεων, με εκείνη των σακχάρων να αποτελεί τη βασική πηγή (Khalisanni K., 2011). Για να αναπτυχθούν χρειάζονται υποστρώματα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά. Έχουν τη δυνατότητα να προσαρμόζουν το μεταβολισμό τους ανάλογα με τις συνθήκες του περιβάλλοντός αξιοποιώντας διάφορες ουσίες. Όταν βρίσκονται σε κάποιο τεχνητό υπόστρωμα χρησιμοποιούν διάφορες πηγές άνθρακα και αζώτου από αυτό. Όταν όμως απαντούν σε φυσικά περιβάλλοντα, όπως π.χ. το γάλα, ένα υπόστρωμα πλούσιο σε σάκχαρα, χρησιμοποιούν τη λακτόζη και το λίπος ως πηγή άνθρακα και τις πρωτεΐνες ως πηγή αζώτου. Τα παραπάνω συστατικά υφίστανται μια σειρά βιοχημικών μετατροπών που σχετίζονται με τις κύριες τεχνολογικές/βιοχημικές ιδιότητες των οξυγαλακτικών βακτηρίων (McSweeney et al., 2000).

Η μικροβιακή ζύμωση παίζει έναν πολύ συγκεκριμένο ρόλο στην ζύμωση των τροφίμων. Η διάσπαση σακχάρων και πρωτεϊνών οδηγεί στην παραγωγή οργανικών ενώσεων που διαμορφώνουν τη μορφή, τη γεύση και το άρωμα, καθώς και τη συντήρηση του προϊόντος μέσω της οξίνισης (Hugenholtz et al., 1999).

#### ***Μεταβολισμός σακχάρων***

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν διάφορους υδατάνθρακες με κύριο τελικό προϊόν το γαλακτικό οξύ. Ως κύριο χαρακτηριστικό του μεταβολισμού τους αναφέρεται η ζύμωση της λακτόζης. Για τα οξυγαλακτικά βακτήρια η λακτόζη είναι η κύρια πηγή άνθρακα στο γάλα και η ζύμωση της αποτελεί τον καλύτερα μελετημένο δισακχαρίτη.

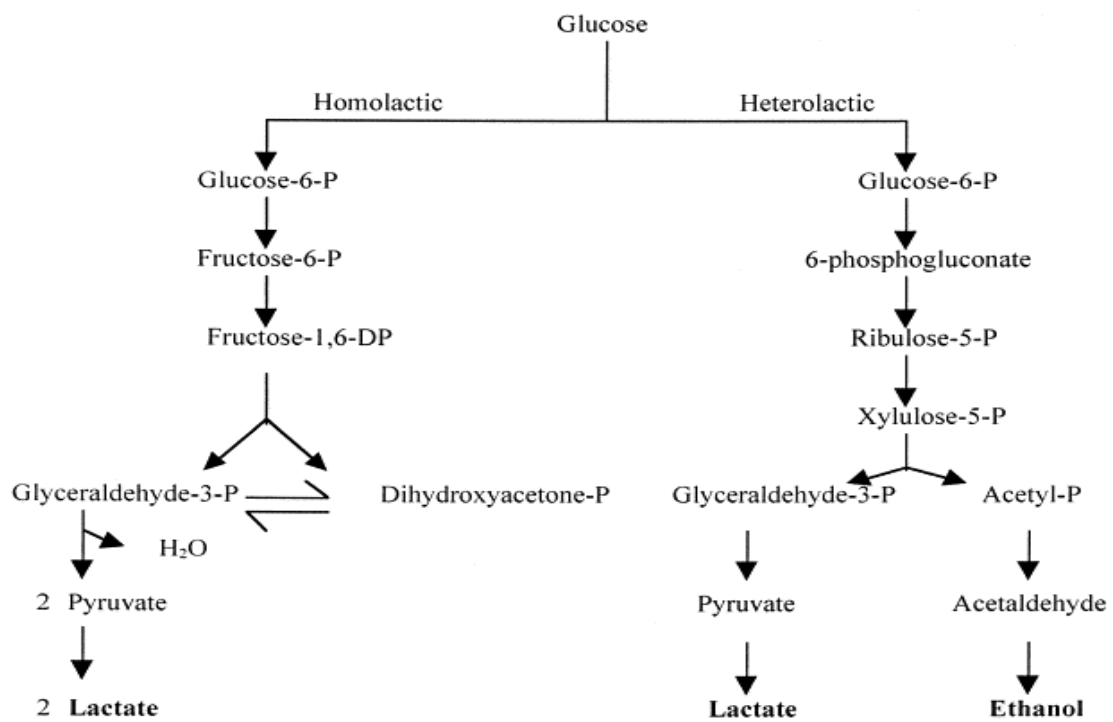
Ο μεταβολισμός της λακτόζης ξεκινά με την πρόσληψη της από τα κύτταρα, η οποία στα οξυγαλακτικά βακτήρια γίνεται με 2 βασικούς μηχανισμούς (Monnet et al., 1996). Στον πρώτο που αναφέρεται ως PEP-PTS (phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system) συμμετέχουν οι πρωτεΐνες της μεμβράνης και το σάκχαρο φωσφορυλιώνεται κατά τη μεταφορά του μέσω της κυτταροπλασματικής



πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο στη συνέχεια παράγει γαλακτικό οξύ με τη μεσολάβηση της γαλακτικής αφυδρογονάσης



Από 1 mole γλυκόζης παράγονται θεωρητικά ισοδύναμες ποσότητες (1 mole) γαλακτικού οξέος, οξικού οξέος ή αιθανόλης,  $CO_2$  και ATP.



**Σχήμα 1.2:** Κύριες μεταβολικές οδοί των οξυγαλακτικών βακτηρίων

Πηγή: Caplice & Fitzgerald, 1999

## Πρωτεολυτικό σύστημα

Η πρωτεόλυση θεωρείται μια ουσιαστική διαδικασία στη διαμόρφωση γεύσης και αρώματος των γαλακτοκομικών προϊόντων κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης, γεγονός μεγάλης σημασίας για τη βιομηχανία τροφίμων (Hugenholtz et al., 1999). Τα τελικά προϊόντα της πρωτεολυτικής δραστηριότητας των οξυγαλακτικών βακτηρίων είναι τα ελεύθερα αμινοξέα, οι συγκεντρώσεις των οποίων εξαρτώνται από το είδος και την ποικιλία του τυριού (αναφερόμενοι στα γαλακτοκομικά). Στη διαδικασία ζύμωσης του γάλακτος το πρωτεολυτικό σύστημα των οξυγαλακτικών βακτηρίων παίζει σημαντικό ρόλο καθώς τα καθιστά ικανά να αναπτυχθούν στο γάλα υδrolύοντας τις καζεΐνες και εξασφαλίζοντας έτσι μια επιτυχημένη ζύμωση (Savijoki et al., 2006).

Το πρώτο στάδιο για τη διάσπαση των καζεϊνών πραγματοποιείται από τις πρωτεϊνάσες του κυτταρικού φακέλου (Cell Envelope Proteinases, CEP) που διασπούν τις πρωτεΐνες σε ολιγοπεπτίδια, δι- και τρι-πεπτίδια καθώς και ελεύθερα αμινοξέα. Έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί πέντε διαφορετικοί τύποι αυτών των ενζύμων στα οξυγαλακτικά βακτήρια: η PtrP του *Lactococcus lactis* και του *Lb. paracasei*, η PrtH του *Lb. helveticus*, η PrtR του *Lb. rhamnosus*, η PrtS του *S. thermophilus* και η PrtB του *Lb. bulgaricus* (Savijoki et al., 2006).

Το δεύτερο στάδιο αποδόμησης των πρωτεϊνών περιλαμβάνει τη μεταφορά των πεπτιδίων και των ελεύθερων αμινοξέων που παράγονται από τη δράση των CEP εντός του κυττάρου μέσω εξειδικευμένων συστημάτων μεταφοράς. Τα συστήματα αυτά ανήκουν σε μια υπερ-οικογένεια ATP-εξαρτώμενων μεταφορέων που μεσολαβούν για την πρόσληψη των πεπτιδίων και των ελεύθερων αμινοξέων που προέρχονται από την καζεΐνη (Doeven et al., 2005).

Το τρίτο μέρος του πρωτεολυτικού συστήματος των οξυγαλακτικών βακτηρίων αφορά στις ενδοκυτταρικές πεπτιδάσες που διασπούν τα πεπτίδια προς αμινοξέα (Law B., 1997). Από τις πεπτιδάσες, οι αμινοπεπτιδάσες (PepN, PepC και PepX) θεωρούνται πιο σημαντικές για την ανάπτυξη αρώματος και γεύσης στα γαλακτοκομικά προϊόντα, δεδομένου ότι είναι αυτές που απελευθερώνουν αμινοξέα. Γενικά η ενεργότητα των πρωτεολυτικών ενζύμων παρουσιάζουν

διαφορές τόσο μεταξύ των διαφόρων ειδών όσο και μεταξύ στελεχών του ίδιου είδους (Williams et al., 1997).

## **Λιπόλυση**

Λιπόλυση ονομάζεται η υδρόλυση του λίπους του γάλακτος προς ελεύθερα λιπαρά οξέα. Μπορεί να είναι αποτέλεσμα της δράσης της ενδογενούς λιποπρωτεΐνης-λιπάσης του γάλακτος που δεν έχει αδρανοποιηθεί από την παστερίωση αλλά και των λιπολυτικών ενζύμων όλων των μικροβιακών ομάδων που βρίσκονται στο τυρί (Liu et al., 2010). Η διάσπαση αυτή του λίπους προκαλείται από τα λιπολυτικά ένζυμα των μικροοργανισμών που είτε προστίθενται με την οξυγαλακτική καλλιέργεια είτε από αυτούς που ανευρίσκονται τυχαία στο μίγμα (McSweeney et al., 2004).

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια κατέχουν ένζυμα με εστερολυτική και λιπολυτική δράση, με τα λιπολυτικά ένζυμα να είναι ενδοκυτταρικά (Fernandez et al., 2000) και να είναι ικανά να υδρολύουν εστέρες λιπαρών οξέων όπως π.χ. σε 2-, 3- και μονο-ακυλογλυκερίδια. Με λίγες εξαιρέσεις, η ιδανική θερμοκρασία βρίσκεται γύρω στους 35°C και τα ένζυμα είναι πιο ενεργά σε υποστρώματα που περιέχουν μικρής αλύσου λιπαρά οξέα. Ενώ οι λακτόκοκκοι και λακτοβάκιλλοι θεωρούνται ελάχιστα λιπολυτικοί (Collins et al., 2003), παρόλα αυτά χάρις στη παρουσία τους σε μεγάλους πληθυσμούς κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των τυριών, συμβάλλουν στην παραγωγή σημαντικών επιπέδων ελεύθερων λιπαρών οξέων, των οποίων οι ανθρακικές αλυσίδες που ποικίλουν ανάλογα με το είδος του λίπους του γάλακτος, επηρεάζουν άμεσα το άρωμα των τυριών (Liu et al, 2004).

### **1.1.5 Μέθοδοι Ταυτοποίησης**

Για δεκαετίες η συμβατική προσέγγιση απομόνωσης και καλλιέργειας των μικροοργανισμών βασίζεται σε τεχνικά μέσα ανάπτυξης που ακολουθούνται από ταυτοποίηση περιορισμένου αριθμού στελεχών καθαρών αποικιών χρησιμοποιώντας φαινοτυπικά ή γενοτυπικά χαρακτηριστικά.

Τόσο η φαινοτυπική όσο και η μοριακή προσέγγιση αφορούν κυρίως την ταξινομική ανάλυση. Τα φαινοτυπικά συστήματα ταξινόμησης των οξυγαλακτικών βακτηρίων δεν ανταποκρίνονται πάντα στη φυλογενετική τοποθέτηση με βάση τις ακολουθίες rRNA. Ως εκ τούτου η ενσωμάτωση γενοτυπικών και φαινοτυπικών φυλογενετικών πληροφοριών σ' ένα πολυφασικό χημειοταξονομικό σύστημα έχει προταθεί για ισχυρή διαφοροποίηση και ταυτοποίηση των βακτηρίων (Vandamme et al., 1996).

#### ***Φαινοτυπικές και Γενοτυπικές μέθοδοι***

Οι μέθοδοι που βασίζονται στην καλλιέργεια φαίνεται να υποτιμούν την πραγματική μικροβιακή χλωρίδα του οικοσυστήματος. Τα φαινοτυπικά τεστ για την ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων συνήθως βασίζονται σε μορφολογικά, φυσιολογικά, βιοχημικά χαρακτηριστικά, όπως θερμοκρασία ανάπτυξης, pH, ανάγκη σε οξυγόνο, τύπος ζύμωσης, τύπο γαλακτικού ισομερούς που παράγει (D και L), ακόμα και από τις ιδιότητες πήξεως του γάλακτος (Coeuret et. al, 2003). Παρόλα αυτά για πολλά οξυγαλακτικά βακτήρια αλλά και άλλες βακτηριακές ομάδες, η ταξινομική ανάλυση με αυτές τις μεθόδους είναι περιορισμένη (Ostile et al., 2005). Έτσι τα τελευταία χρόνια οι γνώσεις μας πάνω στη μικροβιακή ποικιλότητα μικτών μικροβιακών κοινοτήτων έχει βελτιωθεί σημαντικά χάρη στη χρήση της γενοτυπικής μοριακής προσέγγισης. Βασίζονται στην ανάλυση αλληλουχίας DNA και RNA και ειδικότερα στην ανάλυση μικρότερων αλληλουχιών οι οποίες είναι μοναδικές για ένα συγκεκριμένο είδος βακτηρίων. Το 1987 ο Woese προτείνει μια αναδόμηση της βακτηριακής φυλογενετικότητας βασισμένη σε συγκρίσεις ριβοσωμικών RNA ακολουθιών με αλληλούχηση του γονιδίου 16S.

Έκτοτε για την ταυτοποίηση χρησιμοποιείται ακόμα σαν ρουτίνα και το 23S rRNA γονίδιο όπου δομεί ένα φυλογενετικό πλαίσιο για τη βακτηριακή ταξινόμηση.

Ειδικά για την κατηγορία των τυριών η 16S ενώ είναι ευρέως διαδεδομένη για την ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων (Abriouel et al., 2008; Aronte et al., 2008), κάποιες φορές αποτυγχάνει να τα διακρίνει μεταξύ συγγενών ειδών ή υποειδών (Dellagio & Felis, 2005). Παρόλα σύντομα φάνηκε πως η αλληλούχηση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν γονίδια είναι πιο αποτελεσματική από την 16S rRNA για την ταυτοποίηση. Η PheS κωδικοποιεί την φαινυλαλανίνη-tRNA συνθετάση (η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη) όπως και η groA που κωδικοποιεί την DNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση. Έχει βρεθεί πως τα γονίδια των παραπάνω ενζύμων παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά απόκλισης από τα ριβοσωμικά γονίδια και κατά συνέπεια εμφανίζουν υψηλότερη ταξινομική ανάλυση. Ως εκ τούτου παρέχουν μια καλύτερη διάκριση σε συγγενικά είδη των οξυγαλακτικών βακτηρίων, τα οποία μοιράζονται περισσότερα κοινά χαρακτηριστικά, αν όχι και ταυτόσημες 16S rRNA γονιδιακές ακολουθίες (De Bruyne et al., 2007; Naser et al., 2007). Οι ακολουθίες DNA είναι από τα μεγαλύτερα επιτεύγματα προτύπων για το χαρακτηρισμό βακτηρίων αλλά δεν εφαρμόζεται εύκολα για γρήγορη ταξινόμηση και ταυτόχρονη ταυτοποίηση αλλά σαν τεχνική επιβεβαίωσης.

Ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για την ταυτοποίηση οξυγαλακτικών βακτηρίων σε τυριά φαίνεται να είναι επίσης η Multiplex PCR, που χρησιμοποιεί ειδικούς εκκινητές για ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών ομάδων βακτηρίων.

Τέλος να αναφέρουμε και τη χρήση της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών, στη μικροβιολογία τροφίμων (Knut et al., 2002). Οι μικροσυστοιχίες έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση οξυγαλακτικών βακτηρίων (Bae et al., 2005) και την ανάλυση των οικοσυστημάτων τους (Weckx et al., 2008), γεγονός που θα μπορούσε να ενισχύσει την ανάπτυξη για μια ακόμη πρακτική ανίχνευση των μικροβιακών κοινοτήτων των τυριών.

Οι παραδοσιακές μέθοδοι που βασίζονται στην ανάλυση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών συμπληρώνονται από πιο εξελιγμένες μεθόδους που κερδίζουν όλο και περισσότερο έδαφος και χαρακτηρίζονται από λιγότερο απαιτούμενο χρόνο και κόστος και υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία.

Πολλές μελέτες έχουν γίνει για την ταυτοποίηση γαλακτικών βακτηρίων με χρήση πολλών μοριακών μεθόδων και έχουν καταλήξει ότι μόνο ένας συνδυασμός μπορεί να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα.

Η επιλογή της μεθόδου για τη διερεύνηση της ετερογένειας των στελεχών βασίζεται σε πολλούς παράγοντες όπως η πραγματική ανάγκη της μελέτης, η διακριτική ικανότητα, η ευαισθησία, η ταχύτητα, η ευκολία στο χειρισμό, το κόστος, αλλά ακόμη και η προοπτική αυτοματοποίησης και στατιστικής ανάλυσης.

### **Χημειοταξονομικές μέθοδοι**

Οι μέθοδοι αυτές ταυτοποίησης βασίζονται σε χημειοταξονομικά αποτυπώματα. Αφορούν σε διαφορές και ομοιότητες χημικών δεικτών όπως η σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος (αλληλουχία αμινοξέων πεπτιδογενάσης, πολυσακχαρίτες), η ηλεκτροφορητική κινητικότητα (D-, L-) της γαλακτικής αφυδρογενάσης, η παρουσία λιπαρών οξέων (Vandamme et al., 1996), ολικές κυτταρικές πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν τεχνικές όπως GC, SDS-PAGE, Raman spectroscopy, Maldi-TOF, ESI MS. Το 1975 οι Anhatt και Feuslam χρησιμοποίησαν πρώτοι την φασματομετρία μαζών (mass spectrometry, MS) για την ταυτοποίηση βακτηρίων, προσεγγίζοντας την ιδέα να χρησιμοποιήσουν κορυφές μαζών που εμφανίζονται να είναι συγκεκριμένες, σαν βιοδείκτες γένους, είδους ή στελέχους για κάθε οργανισμό. Το 1994, ο Cain αναφέρει τη χρήση χρωματογραφίας σε συνδυασμό με το Maldi-TOF MS για να διαφοροποιήσει βακτήρια με βάση την ανάλυση πρωτεϊνών. Πρόσφατες μελέτες υπέδειξαν ότι βακτήρια διαφορετικών ειδών και στελεχών μπορούν γρήγορα να αναγνωριστούν και να διαχωριστούν με το Maldi-TOF (Vergha et al., 2006; Bright et al., 2002) και μια μεγάλη πρόοδος επιτεύχθηκε με την εισαγωγή του. Η MS έχει γίνει ένα ισχυρό εργαλείο στην γρήγορη ταυτοποίηση μικροοργανισμών καθώς το μοναδικό πρωτεϊνικό αποτύπωμα διαφορετικών στελεχών μπορεί να διακριθεί το ένα από το άλλο από τις διαφορετικές τιμές μάζας/φορτίο ( $m/z$ ). Η μεθοδολογίες της που έχουν χρησιμοποιηθεί και έχουν δώσει αποτελέσματα εκτός από το Maldi-TOF αναφέρονται σε αέρια χρωματογραφία, ατομικό βομβαρδισμό MS, πυρόλυση MS



και ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI). Η φασματομετρία μαζών έχει καθιερωθεί σήμερα ως μια γρήγορη και υψηλής απόδοσης μέθοδος ταυτοποίησης που εισήχθη στη βακτηριακή ταξινόμηση και εφαρμόζεται επιτυχώς σε ένα μεγάλο αριθμό ταξινομικών κατηγοριών.

Σήμερα συστήνεται όλο και περισσότερο η πολυφασική προσέγγιση που περιλαμβάνει παραδοσιακές μεθόδους ταξινόμησης, μοριακές μεθόδους, όπως νουκλεοτιδικές αναλύσεις και σύγχρονες χημειοταξινομικές τεχνικές για μια πετυχημένη βακτηριακή ταυτοποίηση (Mazzeo et al., 2006)

Εύστοχη είναι η περιγραφή της διαδικασίας της πολυφασικής ταξινόμησης, από τους Vandamme et al. (1996) πως «οι διαφορετικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην πολυφασική ταξινόμηση μπορούν να θεωρηθούν ως διαφορετικά παράθυρα μέσα από τα οποία βλέπουμε το ίδιο τοπίο».

## **1.2 Εισαγωγή στην πρωτεομική**

Είναι γνωστό πως η έκφραση διαφορετικών γονιδίων και κατά συνέπεια η σύνθεση διαφορετικών πρωτεϊνών είναι υπεύθυνη για την κυτταρική διαφοροποίηση και οι λειτουργίες ενός ζωντανού κυττάρου είναι συνήθως το αποτέλεσμα της δυναμικής του συνόλου των πρωτεϊνών. Η χαρτογράφηση των γονιδιωμάτων πολλών οργανισμών (συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου) ήταν μια τεράστια επανάσταση στο πεδίο της βιολογίας. Παρόλα αυτά η γνώση αυτή δεν μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για βασικούς βιολογικούς μηχανισμούς. Αυτό συμβαίνει γιατί το γονιδίωμα είναι μια σταθερή και αμετάβλητη οντότητα και έτσι τα γονιδιακά δεδομένα, παρότι είναι θεμελιώδη για την κατανόηση του κυτταρικού μεταβολισμού και της φυσιολογίας, δεν παρέχουν μια πλήρη εικόνα των λειτουργιών του και των αλληλεπιδράσεων με το περιβάλλον (Monteoliva et al., 2004). Αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη του πεδίου της Πρωτεωμικής.

Η πρωτεωμική (Proteomics) είναι η μελέτη της σύνθεσης, της δομής, της λειτουργίας και των αλληλεπιδράσεων όλων των πρωτεϊνών μέσα σε ένα κύτταρο (Liebler D., 2002.). Η έκφραση του γονιδιώματος του κυττάρου αποτελεί το πρωτέωμα. Ενώ αρχικά η βιολογική έρευνα επικεντρώθηκε στη μελέτη του γονιδιακού περιεχομένου με αποτέλεσμα την ανάπτυξη του κλάδου της γονιδιωματικής ή γενομικής (genomics), με την πάροδο των χρόνων το ενδιαφέρον της βιολογικής έρευνας στράφηκε προς τη μελέτη των ίδιων των πρωτεϊνών. Έτσι κατ' αναλογία με τον όρο genomics, εισήχθη ο όρος *proteomics* (Wilkins M., 1997). Ίσως η μεγαλύτερη ποικιλία εφαρμογών με την εντυπωσιακότερη ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια, με κύρια εφαρμογή τη δυνατότητα προσδιορισμού των πρωτεϊνών που εκφράζονται σε ένα κύτταρο. Αναφέρονται σε μεγάλης κλίμακα ανάλυση των πρωτεϊνών όσον αφορά την ταυτοποίηση αλλά και την ποσοτικοποίηση και λειτουργίας τους. Παρέχουν σημαντικά στοιχεία πάνω στη στοιχειακή σύσταση του προς εξέταση δείγματος, τη δομή ανόργανων και οργανικών βιολογικών μορίων, την ποιοτική, ποσοτική σύσταση μιγμάτων, τη δομή και τη σύσταση επιφανειών όπως και την αναλογία ισότοπων στοιχείων.

Ο όρος προκύπτει από τη λέξη **proteome** (*PROTEin complement of the genOME*), που ορίζεται ως το πλήρες πρωτεϊνικό σύνολο που εκφράζεται από έναν οργανισμό ή κύτταρο. Το proteome (στα ελληνικά συναντάμε και τους όρους πρωτέωμα και πρωτεϊνωμα) εκφράζεται σε ένα βιολογικό δείγμα σε μια συγκεκριμένη χρονική στιγμή και κατάσταση (Cash P., 2002). Η εξόρυξη (mining) της πληροφορίας αφορά στην ταυτοποίηση όλων ή όσο το δυνατόν περισσότερων πρωτεϊνών σε ένα δείγμα. Η ουσία είναι να καταγραφεί άμεσα το πρωτέωμα, από το να γίνεται περιγραφή της σύνθεσής του από τα δεδομένα έκφρασης γονιδίων.

Η εξέλιξη της πρωτεωμικής τα τελευταία χρόνια και η σημαντική της διαφορά από τις προηγουμένως υπάρχουσες τεχνικές είναι ότι δεν προσδιορίζει τις πρωτεΐνες μια προς μια αλλά με έναν αυτοματοποιημένο μεγάλης κλίμακας τρόπο. Ένα από τα σημαντικότερα πεδία εφαρμογής των πρωτεωμικών εργαλείων αφορά στην ταυτοποίηση πρωτεϊνών από μικροοργανισμούς. Η χρήση των εργαλείων επιτρέπει τη σφαιρική και δυναμική μελέτη των πρωτεϊνών που εκφράζονται από βακτήρια. Χρησιμοποιούνται πλέον ευρέως για την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό οξυγαλακτικών βακτηρίων, τα οποία ανευρίσκονται σε πληθώρα

ζυμούμενων προϊόντων, μέσω της ταυτοποίησης των πρωτεϊνών που αυτά εκφράζουν. Στον τομέα των τροφίμων ιδιαίτερη εφαρμογή βρίσκει στην περίπτωση των γαλακτοκομικών και συγκεκριμένα των τυριών σαν ένα παράδειγμα τροφίμου με πολύπλοκο υπόστρωμα (Manso et al., 2005).

Το αντικείμενο των proteomics είναι ευρύ και αφορά στη μελέτη του πρωτεώματος χρησιμοποιώντας προσεγγίσεις υψηλής απόδοσης. Η πρώτη προσέγγιση έγινε με την πειραματική τεχνική της 2D polyacrylamide gel electrophoresis (2DE), η οποία καθιερώθηκε ως μια από τις βασικότερες τεχνικές. Έκτοτε το πεδίο της πρωτεωμικής έχει εξελιχθεί και πλέον περιλαμβάνει σχεδόν κάθε τύπο τεχνολογίας που εστιάζει στη μελέτη των πρωτεϊνών, με την Φασματομετρία μαζών να παίζει τον πρωταρχικό ρόλο ως η πιο διαδεδομένη τεχνική για τον προσδιορισμό πρωτεϊνών.

Η ιστορία της πρωτεωμικής τεχνολογίας ξεκινάει από τον Τόμσον που δημιουργεί ένα πρότυπο φασματογράφου μάζας για τη μέτρηση του λόγου μάζας προς φορτίο ενός ηλεκτρονίου και του απονέμεται βραβείο Νόμπελ το 1906. Τέλος πρέπει να αναφερθεί η άρρηκτη σχέση της πρωτεωμικής με τον τομέα της βιοπληροφορικής όσον αφορά την τελική ταυτοποίηση και σε στάδια όπως, η ανάλυση και η μετάφραση δεδομένων των πειραμάτων, η δημιουργία και η αποθήκευση αποτελεσμάτων σε βάσεις δεδομένων, η εικονοποίηση δεδομένων, η σύγκριση αποτελεσμάτων μετά από αναζήτηση στις βάσεις και συνδυασμός δεδομένων από άλλες πηγές.

### **1.2.1 Φασματομετρία μαζών**

Η φασματομετρία μαζών (Mass spectrometry, MS) είναι ένα εργαλείο της πρωτεωμικής τεχνολογίας που στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται ως μέθοδος ταυτοποίησης βακτηριών μέσω των αναγνώρισης των πρωτεϊνών τους. Είναι μια οικογένεια τεχνικών προσδιορισμού δομής ενώσεων και στοιχείων, οι οποίες βασίζονται στην παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων και την καταγραφή της έντασης του ρεύματος που αντιστοιχεί σε κάθε λόγο μάζας προς φορτίο.

Η εφαρμογή της φασματομετρίας μαζών στην πρωτεωμική ανάλυση δειγμάτων τροφίμων αποτελεί σημαντική ανάπτυξη στην ανάλυση των πρωτεϊνών. Ως ένα ισχυρό εργαλείο, δίνει τη δυνατότητα για ταυτόχρονη ανάλυση αρκετών εκατοντάδων πρωτεϊνών από πολύπλοκα μίγματα (Manso et al., 2005). Η αρχή της βασίζεται στο ότι κάθε οργανική ένωση έχει ένα μοναδικό φάσμα που οδηγεί στην ταυτοποίηση της. Σήμερα οι φασματογράφοι θεωρούνται ως τα πιο ισχυρά εργαλεία στην οργανική χημεία αλλά και στον ευρύτερο τομέα της σύγχρονης μικροβιολογίας και η μέθοδος ως μια από τις αναλυτικότερες στη μέτρηση ατομικών/μοριακών βαρών βιομορίων. Η τεχνολογία για μια τέτοια ανάλυση περιλαμβάνει είτε τεχνικές διαχωρισμού των πρωτεϊνών είτε απομόνωσής τους, αναλυτικές τεχνικές για τον προσδιορισμό των μορίων αυτών και τον τομέα της βιοπληροφορικής για τη διαχείριση των δεδομένων.

Η ανάπτυξη 'ήπιων' τεχνικών ιονισμού στη δεκαετία τους 1980, ήταν καθοριστική για τη χρήση της φασματομετρίας μαζών στις βιολογικές επιστήμες και επέτρεψε την ανάλυση βιομορίων συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών (Karas et al., 1988). Μετά από την ανάπτυξη αυτή έχουν προκύψει διάφοροι τύποι φασματομέτρων μαζών συμβατών για πρωτεϊνική ανάλυση. Σε γενικές γραμμές όλα τα όργανα της φασματομετρίας μαζών αποτελούνται από 3 μέρη: μια πηγή ιόντων, έναν φασματογράφο και έναν ανιχνευτή.

Οι δύο συνηθέστερες τεχνικές που χρησιμοποιούνται και επικρατούν σήμερα στην ανάλυση και ταυτοποίηση πρωτεϊνών, είναι του ESI (electrosprey ionization) που ειδικεύεται στην εύρεση της πεπτιδικής ακολουθίας και του MALDI (Matrix Assisted Lazer desorption/ionization) όπου ειδικεύεται στις μετρήσεις μάζας των πρωτεϊνών. Στην MS τα μόρια ιονίζονται στην αέρια φάση. Το ESI χρησιμοποιείται για μόρια που είναι παρόντα στην υγρή φάση ενώ στο MALDI τα μόρια κρυσταλλώνονται με ειδικό υπόστρωμα. Οι φασματογράφοι που χρησιμοποιούνται συνηθέστερα είναι οι τετραπολικοί (quadrupol, Q), χρόνου πτήσης (time of flight, TOF), παγίδας ιόντων (ion trap, IT) και το κύκλοτρο μετασχηματισμού κατά Φουριέ (FT-ICR). Τέλος, ο τύπος του ανιχνευτή παρέχεται με σκοπό να είναι συμβατός με τον αναλυτή. Οι πιο γνωστοί τύποι είναι photomultiplier, electron multiplier και micro-channel plate ανιχνευτές.

Η φασματομετρία μαζών ως γενική αρχή προσδιορισμού και ταυτοποίησης χημικών ενώσεων όπως οι πρωτεΐνες χρησιμοποιείται πάνω από μισό αιώνα, ενώ νέες εφαρμογές εξελίσσονται διαρκώς και δημιουργούν νέες προοπτικές στον τομέα των βιοεπιστημών. Η μέθοδος ιονισμού Maldi σε συνδυασμό με τον ανιχνευτή ToF, θεωρείται πλέον μια από τις πιο υποσχόμενες τεχνολογίες καθώς δίνει έγκυρες μετρήσεις μοριακών μαζών από άθικτες πρωτεΐνες. Η καθολική αυτή προσέγγιση ενός ολόκληρου κυττάρου δίνει τη δυνατότητα στην ταυτοποίηση βακτηριακών ειδών σε ένα μικτό οικοσύστημα (Hsieh et al, 2008).

### **1.2.2 Maldi-Tof MS : Αρχές Λειτουργίας**

Στην παρούσα ερευνητική μελέτη εφαρμόστηκε η μέθοδος της Φασματομετρίας Μαζών Maldi-Tof (Matrix-assisted laser desorption/ionization-Time of flight. Η Maldi-Tof MS είναι μια αναδύομη τεχνική, η οποία προσφέρει γρήγορα και με ακρίβεια τον προσδιορισμό μεγάλου αριθμού χαρακτηριστικών του προς εξέταση δείγματος (Gantt et al., 1999). Ο όρος MALDI αναφέρεται στη διαδικασία, με την οποία παράγονται τα ιόντα (μέθοδος ιονισμού) ενώ ο όρος TOF αναφέρεται στον αναλυτή της μεθόδου που είναι αναλυτής χρόνου πτήσης. Η ανάπτυξη του ToF αναλυτή και της συμβατότητας του με αυτή τη μέθοδο ιονισμού οδήγησε γρήγορα στην καθιέρωση του Maldi-Tof ως στερεότυπο φασματογράφο μάζας.

Στην συγκεκριμένη εργασία η τεχνική της Maldi-Tof MS χρησιμοποιήθηκε σε μικροβιολογικά πλαίσια για την ταυτοποίηση βακτηριακών στελεχών. Αυτή βασίζεται στην ανίχνευση χαρακτηριστικών για κάθε μικροοργανισμό κορυφών που αντιστοιχούν σε συγκεκριμένα πρωτεϊνικά φάσματα, τα οποία συγκρινόμενα με τις υπάρχουσες βάσεις δεδομένων ήδη ταυτοποιημένων μικροοργανισμών, κατατάσσει το υπό εξέταση δείγμα σε επίπεδο γένους, είδους ή και στελέχους. Ένα από τα βασικά πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι επιτρέπει τον προσδιορισμό μεγάλου αριθμού πολυμερών όπως οι πρωτεΐνες χωρίς όμως να απαιτεί την αποκωδόμηση τους.

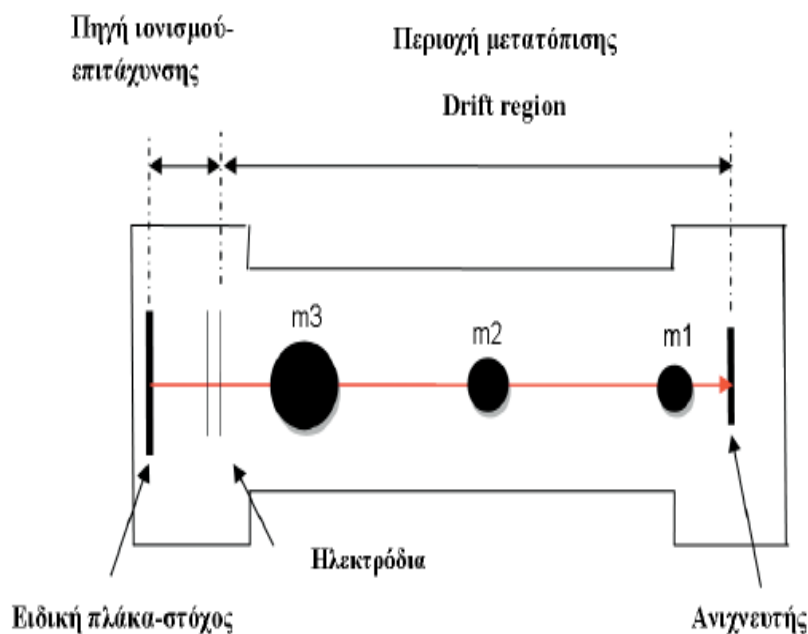
Η βασική της αρχή της φασματομετρίας μαζών είναι η μέτρηση του λόγου της μάζας προς το φορτίο -mass to charge ratio ( $m/z$ ) μορίων που έχουν μετατραπεί σε θετικά ή αρνητικά φορτισμένα ιόντα (Bruyne et al., 2011). Ως μονάδα μέτρησης των μαζών χρησιμοποιείται το Dalton (Da) και 1 Da ισούται με το 1/12 της μάζας του ατόμου του άνθρακα  $^{12}\text{C}$ , ενώ ως μονάδα μέτρησης του φορτίου χρησιμοποιείται τα  $e^-$ , το θεμελιώδες φορτίο ενός ηλεκτρονίου. Συνεπώς το φορτίο ενός ιόντος ορίζεται από έναν ακέραιο αριθμό  $z$ , ο οποίος δηλώνει πολλαπλάσια του θεμελιώδους φορτίου. Επομένως ο λόγος μάζας προς φορτίο δηλώνεται ως  $m/z$  τιμή και αντιστοιχεί σε μάζα προς θεμελιώδες φορτίο.

Η μέθοδος ιονισμού όπως δηλώνει και το ακρωνύμιο της είναι βασισμένη στην ανάμιξη του δείγματος με μια χημική μήτρα (matrix). Η μήτρα αυτή προστίθεται πάνω στο δείγμα με αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες προσκολλούνται σ' αυτήν. Όταν το μίγμα ξηρανθεί, είναι έτοιμο για ανάλυση στο φασματογράφο. Η περίσσεια του υποστρώματος αυτού (matrix), με την οποία ενσωματώνεται το δείγμα, παρουσιάζει μια ισχυρή απορρόφηση στο μετρούμενο μήκος κύματος laser. Η ενέργεια δεν μεταδίδεται απευθείας πάνω στα μόρια του δείγματος αλλά οι κρύσταλλοι του matrix απορροφούν ενέργεια και τη μετατρέπουν σε θερμότητα που οδηγεί σε εντοπισμένη «έκρηξη» του δείγματος. Τα πρωτόνια μεταφέρονται με αποτέλεσμα τη δημιουργία θετικά φορτισμένων ιόντων ( $\text{MH}^+$ ) σε αέρια φάση, τα οποία επιτυγχάνονται από ένα ηλεκτρικό πεδίο στον αναλυτή.

Η εισαγωγή των προς εξέταση δειγμάτων γίνεται σε περιοχή ιονισμού με υψηλές συνθήκες κενού αέρα. Αυτό είναι καθοριστική σημασίας για τη διαδικασία καθώς η εφαρμογή κενού είναι απαραίτητη κατά τη διάρκεια της μέτρησης, έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα συγκρούσεων μεταξύ των ιονισμένων μορίων του δείγματος και των μορίων του αέρα. Επιπλέον, η απουσία αέρα αποτρέπει την εκφόρτηση υψηλών δυναμικών που χρησιμοποιούνται για την επιτάχυνση και τη μεταφορά των ιόντων στη θέση ανίχνευσης και περιορίζει την πιθανότητα επιμόλυνσης ή ανάμιξης των δειγμάτων. Παραγόμενα κατά κύματα ιόντα σχηματίζονται με την εφαρμογή παλμικής μορφής προσπίπτουσας ενέργειας – laser, καθώς προκαλείται μερική ατμοποίηση του υποστρώματος κατά ώσεις και επακολουθεί μεταφορά των ιοντισμένων μορίων του δείγματος στην αέρια φάση. Τα ιόντα αυτά επιταχύνονται γρήγορα με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου και

περνώντας σε μια 'ελεύθερου πεδίου' περιοχή (drift region) αποκαλούμενη σωλήνας πτήσης, κινούνται ευθύγραμμα και ομαλά μετά την αρχική τους επιτάχυνση προς τον ανιχνευτή και διακρίνονται ανάλογα με τη μάζα τους.

Στην Εικόνα 1.1 παρουσιάζεται σχηματικά η λειτουργία της μεθόδου.



**Εικόνα 1.1** Γραμμική λειτουργία αναλυτή χρόνου-πτήσης, linear TOF ( $m_3 > m_2 > m_1$ ).

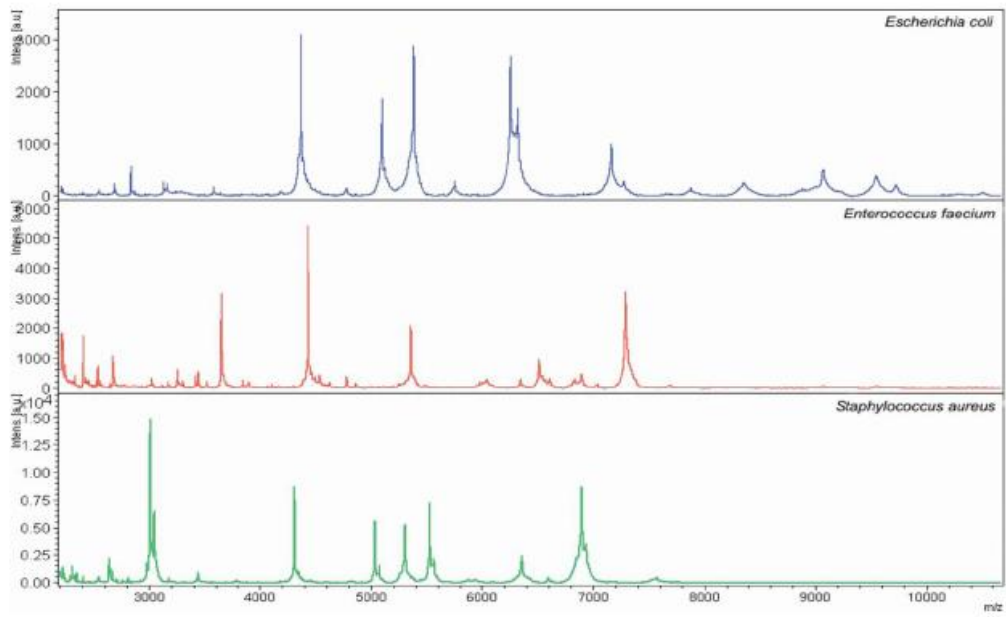
Οι αναλυτές ToF είναι πλάκες μικροδιοδίων που αποτελούνται από μια συστοιχία γυάλινων τριχοειδών σωλήνων επιστρωμένων με κατάλληλο υλικό. Έτσι όταν τα ιόντα προσπέσουν στον ανιχνευτή και διαχωριζόμενα σε ομάδες ίδιου  $m/z$ , όπως αναλύθηκε προηγουμένως, με βάση τον αριθμό και την κινητική τους κατάσταση προκαλείται εκπομπή ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα την παραγωγή ηλεκτρικού ρεύματος το οποίο ενισχύεται και παρουσιάζεται ως φάσμα μαζών. Οι ToF αναλυτές, αντίθετα με συσκευές ανίχνευσης όπως τα τετράπολα, διαχωρίζουν τα ιόντα με βάση το χρόνο πτήσης. Στηρίζουν τη λειτουργία τους στη σχέση μεταξύ λόγου μάζας προς φορτίο ενός φορτισμένου σωματιδίου και του χρόνου που απαιτείται για να διανύσει μια συγκεκριμένη απόσταση όταν επιταχύνονται διαμέσω σταθερού πεδίου. Έτσι ο αναλυτής διαχωρίζει τα ιόντα με βάση το λόγο  $m/z$ ,

υπολογίζοντας τις διαφορές χρόνου διέλευσης από την ιοντική πηγή μέσω του σωλήνα ορισμένου μήκους και εστιάζοντας στις δέσμες ιόντων του ανιχνευτή (Guilhaus et al., 1995).

Ο ανιχνευτής ενός φασματογράφου είναι το όργανο εκείνο που ελέγχει τη ροή των ιόντων και αφού την ενισχύει μεταδίδει το σήμα αυτό σε ένα σύστημα δεδομένων, όπου και καταγράφεται ως φάσμα μάζας (mass spectrum). Οι τιμές των λόγων μάζας/φορτίο ( $m/z$  values) αναπαρίστανται γραφικά συναρτήσει των εντάσεων του, έτσι ώστε να φανεί ο αριθμός των συστατικών του δείγματος και το μοριακό του βάρος. Η βασική τους αρχή είναι απλή και αναφέρεται στη μετατροπή της δυναμικής ενέργειας των ιόντων σε κινητική. Η δυναμική ενέργεια λόγω του πεδίου είναι  $U=zV$  και η κινητική  $E=1/2mu^2$ . Εφόσον όλα τα μεγέθη της εξίσωσης είναι γνωστά και σταθερά ο υπολογισμός του χρόνου από τη στιγμή που το ιόν εισέρχεται στο σωλήνα κενού μέχρι τη στιγμή που προσπίπτει στον ανιχνευτή προσδιορίζει μονοσήμαντα το  $m/z$  του ιόντος αυτού. Εάν θεωρηθεί πως η κινητική ενέργεια των ιόντων είναι σταθερή πριν εισέλθουν στο πεδίο τότε θα ισχύει  $U=E$ ,  $U=I/t$  όπου  $l$  το μήκος του σωλήνα κενού. Ισχύει η εξίσωση  $m/z=2vt^2/l^2$  όπου ο  $m/z$  είναι ανάλογος του χρόνου πτήσης. Η τεχνική του αναλυτή βασίζεται στο ότι ο χρόνος που χρειάζεται ένα ιόν για να φτάσει στον ανιχνευτή εξαρτάται από τη μάζα του. Όσο μεγαλύτερη είναι η μάζα του, τόσο μεγαλύτερος και ο χρόνος που χρειάζεται (Sauer et al., 2008).

Όλοι οι φασματογράφοι είναι συνδεδεμένοι με έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή όπου και γίνεται η παρουσίαση του φάσματος. Από την ηλεκτρονική αυτή καταγραφή προκύπτουν κορυφές ποικίλου εύρους και διαφορετικής θέσης και ύψους. Κάθε ιόν αντιστοιχεί σε μια κορυφή της οποίας το ύψος είναι ανάλογο με τη σχετική αφθονία του ιόντος που αντιπροσωπεύει και αφορά στον κατακόρυφο άξονα, ενώ η θέση στον οριζόντιο άξονα δείχνει τον επιζητούμενο λόγο μάζας προς φορτίο του ιόντος όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.2. Συνεπώς η διαδικασία ανίχνευσης και ταυτοποίησης μιας ουσίας όπως οι πρωτεΐνες μέσω του Maldi-Tof, έχει σαν τελικό στάδιο την προβολή των κορυφών αυτών ως φασματικό προφίλ. Η περαιτέρω επεξεργασία των αποτελεσμάτων βαίνει στα πλαίσια της Βιοπληροφορικής.





**Εικόνα 1.2** Φάσματα MALDI-TOF MS διαφόρων βακτηριακών ειδών

### **1.3 Στάκα**

Η Στάκα είναι ένα παραδοσιακό γαλακτοκομικό προϊόν με προέλευση το νησί της Κρήτης. Παράγεται από κυρίως πρόβειο γάλα ή αλλά και κατσικίσιο χρησιμοποιείται. Για την παραγωγή αυτού του ιδιαίτερου τυριού, του το γάλα μετά την θέρμανση αφήνεται για μερικές ώρες ώστε να αναπτυχθεί στην επιφάνεια του μια κρεμώδης κρούστα. Η κρούστα αυτή οποία αποτελείται από πρωτεΐνες και λίπη του γάλακτος. Η κρούστα συλλέγεται και αποθηκεύεται σε συνθήκες ψύξης όπου υπόκειται σε ένα είδος ζύμωσης και δημιουργείται έτσι η Στάκα.

Για τη Στάκα αυτή είναι η πρώτη αναφορά που γίνεται για την εν γένει μικροβιακή της βιοποικιλότητα και συγκεκριμένα οξυγαλακτική της μικροχλωρίδα. Έτσι δεν υπάρχει σύγκριση συμφωνίας με προηγούμενες μελέτες. Παρόλα αυτά αποτελεί ενδιαφέρον η εξερεύνηση ενός νέου οικοσυστήματος στον τομέα των γαλακτοκομικών προϊόντων και δη των παραδοσιακών ιδιαίτερα λόγω του μεγάλου ερευνητικού προσανατολισμού που υπάρχει σήμερα όσον αφορά την αυτόχθονη μικροβιακή χλωρίδα.

## **1.4 Σκοπός μελέτης**

Η Ελλάδα είναι μια χώρα με μεγάλη παραγωγή πρόβειου και κατσικίσιου γάλακτος όπως και προϊόντων τους. Τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν τους κυριότερους πληθυσμούς για την παραγωγή ζυμούμενων τροφίμων. Σε παγκόσμιο επίπεδο συνιστούν την πλειονότητα των εμπορικών εναρκτήριων καλλιεργειών τόσο σε ποσότητα όσο και σε αξία με τη μέγιστη χρήση τους να αφορά τη βιομηχανία γαλακτοκομικών. Παρά το γεγονός ότι σήμερα η γενετική τροποποίηση του είναι εφικτή και επιτρέπει την κατασκευή στελεχών με συγκεκριμένες λειτουργικές ιδιότητες, η εφαρμογή τους δεν είναι επιτρεπτή από την υπάρχουσα Ευρωπαϊκή Νομοθεσία. Έτσι ακόμη και σήμερα η αναζήτηση εναρκτήριων καλλιεργειών βασίζεται στην εξέταση αριθμού στελεχών απομονωμένων από ζυμούμενα τρόφιμα αυθόρμητης ζύμωσης. Η εξέταση της μικροχλωρίδας ενός παραδοσιακού τυριού με την απομόνωση των επικρατέστερων γαλακτικών βακτηρίων και την ταυτοποίησή τους, παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για το προϊόν καθώς και για την επίδραση της αυτόχθονης μικροχλωρίδας του στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των τυριών. Τα NSLAB, που είναι κυρίως προαιρετικά ετεροζυμωτικά βακτήρια πιστεύεται πως παίζουν σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση των τροφίμων ζύμωσης. Τα στελέχη των οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώνονται από ζυμούμενα προϊόντα γάλακτος, στα οποία δεν έχει προστεθεί κάποια καλλιέργεια, χαρακτηρίζονται ως άγρια στελέχη (Wouters et al., 2002).

Στη χώρα μας υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία παραδοσιακών τυριών σε έντονα διαφοροποιημένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά, τα οποία αποδίδονται κυρίως στο γάλα, τις συνθήκες επεξεργασίας αλλά και σε αυτήν αυτόχθονη 'άγρια' μικροχλωρίδα η οποία συμβάλλει στη διαμόρφωση των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών με ξεχωριστές βιοχημικές τους δράσεις. Πολλά από αυτά τα τυριά παραμένουν επιστημονικά ανεξερεύνητα και συνεπώς μπορούν να θεωρηθούν ως μια νέα πηγή μικροοργανισμών με πολύτιμες λειτουργικές ιδιότητες (Angelakis et al., 2011)

Ένα από αυτά τα τυριά είναι και η Στάκα που όπως αναφέρθηκε μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα όσον αφορά την μικροβιακή της χλωρίδα. Η διερεύνηση της οξυγαλακτικής μικροχλωρίδας των παραδοσιακών τυριών δίνει τη δυνατότητα για γνωριμία και ταυτοποίηση των τυριών με αποτέλεσμα την απομόνωση νέων στελεχών για την χρησιμοποίησή τους στην τυροκομία. Η χρήση επιλεγμένων στελεχών από τα παραδοσιακά τυριά για την παρασκευή του έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση των ποιοτικών του χαρακτηριστικών.

Με βάση τα προηγούμενα, **σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της μικροχλωρίδας της Στάκας, ως μια νέα και ανεξερεύνητη δεξαμενή νέων στελεχών, τα οποία θα μπορούσαν να αποτελέσουν μελλοντικές εναρκτήριες καλλιέργειες στην παρασκευή τυριών, χρησιμοποιώντας για το σκοπό αυτό ένα από τα πιο αναδυόμενα εργαλεία της πρωτεωμικής τεχνολογίας που απαντούν στη σύγχρονη μικροβιολογία.** Πλέον τα ερευνητικά εργαλεία τα οποία επιτρέπουν τη διερεύνηση τέτοιων φυσικών δεξαμενών μικροοργανισμών έχουν εξελιχθεί και ένα από τα πιο αναδυόμενα είναι η Maldi-TOF MS.

## Κεφάλαιο 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Στελέχη

Συνολικά μελετήθηκαν 106 βακτηριακά στελέχη, τα οποία φαίνονται στον Πίνακα 2.1, και είχαν απομονωθεί στο Εργαστήριο Γαλακτοκομίας του ΓΠΑ από δείγμα Στάκας, στα πλαίσια σχετικού ερευνητικού προγράμματος. Τα στελέχη ανήκουν στη Συλλογή ACA-DC του Εργαστηρίου Γαλακτοκομίας του ΓΠΑ. Τα στελέχη συντηρούνταν σε vials που περιείχαν θρεπτικό υλικό MRS για τους βακίλους και M17 για τους κόκκους και 20% γλυκερόλη, στους -80°C. Στα πλαίσια του προαναφερθέντος προγράμματος, τα στελέχη είχαν ήδη χαρακτηρισθεί ως προς τη χρώση Gram, την παραγωγή καταλάσης, τη μορφολογία αποικιών και κυττάρων, και τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης.

**Πίνακας 2.1 Βακτηριακά στελέχη Στάκας**

A/A	ACA-DC number	Growth conditions	Morphology	Isolation medium (agar)	Isolation conditions
1	ACA-DC 3858	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 42°C, 48h, anaerobic
2	ACA-DC 3859	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 42°C, 48h, anaerobic
3	ACA-DC 3860	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 42°C, 48h, anaerobic
4	ACA-DC 3861	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 42°C, 48h, anaerobic
5	ACA-DC 3862	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 42°C, 48h, anaerobic
6	ACA-DC 3863	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 42°C, 48h, anaerobic
7	ACA-DC 3864	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 42°C, 48h, anaerobic
8	ACA-DC 3865	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 42°C, 48h, anaerobic
9	ACA-DC 0318	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 42°C, 48h, anaerobic
10	ACA-DC 0319	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 42°C, 48h, anaerobic
11	ACA-DC 0320	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 42°C, 48h, anaerobic
12	ACA-DC 0321	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 42°C, 48h, anaerobic
13	ACA-DC 0322	MRS, 37°C	<i>coccus</i>	MRS	pH 5.4, 42°C, 48h, anaerobic
14	ACA-DC 0323	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 42°C, 48h, anaerobic
15	ACA-DC 0324	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 42°C, 48h, anaerobic

A/A	ACA-DC number	Growth conditions	Morphology	Isolation medium (agar)	Isolation conditions
15	ACA-DC 0324	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 42°C, 48h, anaerobic
16	ACA-DC 0325	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 42°C, 48h, anaerobic
17	ACA-DC 0326	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 22°C, 48h, anaerobic
17	ACA-DC 0327	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 22°C, 48h, anaerobic
18	ACA-DC 0328	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 22°C, 48h, anaerobic
20	ACA-DC 0329	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 22°C, 48h, anaerobic
21	ACA-DC 0330	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 22°C, 48h, anaerobic
22	ACA-DC 0331	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 22°C, 48h, anaerobic
23	ACA-DC 0332	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 22°C, 48h, anaerobic
24	ACA-DC 0333	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 22°C, 48h, anaerobic
25	ACA-DC 0334	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 22°C, 48h, anaerobic
26	ACA-DC 0335	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 22°C, 48h, anaerobic
27	ACA-DC 0336	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 22°C, 48h, anaerobic
28	ACA-DC 0337	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 22°C, 48h, anaerobic
29	ACA-DC 0338	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 22°C, 48h, anaerobic
30	ACA-DC 0339	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 22°C, 48h, anaerobic
31	ACA-DC 0340	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS	pH 5.4, 42°C, 48h, anaerobic
32	ACA-DC 0370	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS vancomycin	30°C, 72h
33	ACA-DC 0371	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS vancomycin	30°C, 72h
34	ACA-DC 0372	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS vancomycin	30°C, 72h
35	ACA-DC 0373	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS vancomycin	30°C, 72h
36	ACA-DC 0374	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS vancomycin	30°C, 72h
37	ACA-DC 0375	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS vancomycin	30°C, 72h
38	ACA-DC 0376	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS vancomycin	30°C, 72h
39	ACA-DC 0377	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS vancomycin	30°C, 72h
40	ACA-DC 0378	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS vancomycin	30°C, 72h
41	ACA-DC 0379	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS vancomycin	30°C, 72h
42	ACA-DC 0380	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS vancomycin	30°C, 72h
43	ACA-DC 0381	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS vancomycin	30°C, 72h
44	ACA-DC 0382	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS vancomycin	30°C, 72h
45	ACA-DC 0383	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS vancomycin	30°C, 72h
46	ACA-DC 0384	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	MRS vancomycin	30°C, 72h
47	ACA-DC 0385	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	Rogosa	30°C, 72h, anaerobic
48	ACA-DC 0386	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	Rogosa	30°C, 72h, anaerobic
49	ACA-DC 0387	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	Rogosa	30°C, 72h, anaerobic
50	ACA-DC 0388	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	Rogosa	30°C, 72h, anaerobic
51	ACA-DC 0389	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	Rogosa	30°C, 72h, anaerobic
51	ACA-DC 0390	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	Rogosa	30°C, 72h, anaerobic
53	ACA-DC 0391	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	Rogosa	30°C, 72h, anaerobic
53	ACA-DC 0392	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	Rogosa	30°C, 72h, anaerobic
55	ACA-DC 0393	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	Rogosa	30°C, 72h, anaerobic

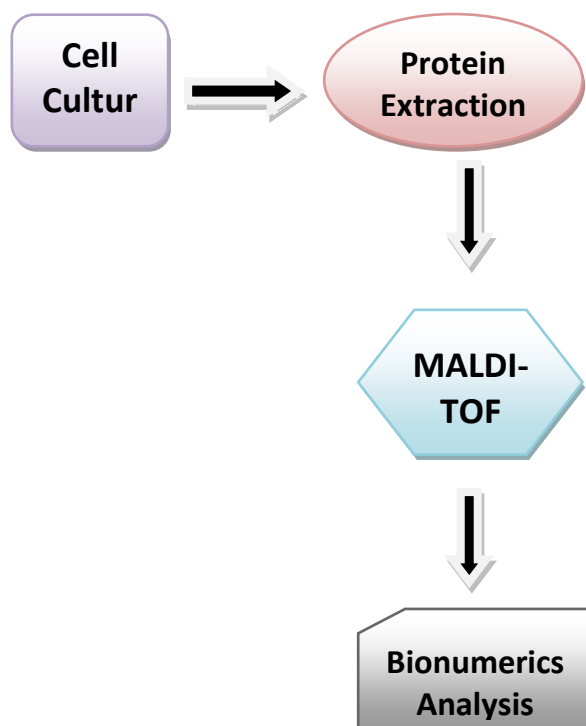
A/A	ACA-DC number	Growth conditions	Morphology	Isolation medium (agar)	Isolation conditions
56	ACA-DC 0394	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	Rogosa	30°C, 72h, anaerobic
57	ACA-DC 0395	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	Rogosa	30°C, 72h, anaerobic
58	ACA-DC 0396	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	Rogosa	30°C, 72h, anaerobic
59	ACA-DC 0397	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	Rogosa	30°C, 72h, anaerobic
60	ACA-DC 0398	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	Rogosa	30°C, 72h, anaerobic
61	ACA-DC 0399	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	Rogosa	30°C, 72h, anaerobic
62	ACA-DC 0341	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	42°C, 48h
63	ACA-DC 0342	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	42°C, 48h
64	ACA-DC 0343	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	42°C, 48h
65	ACA-DC 0344	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	42°C, 48h
66	ACA-DC 0345	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	42°C, 48h
67	ACA-DC 0346	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	42°C, 48h
68	ACA-DC 0347	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	42°C, 48h
69	ACA-DC 0348	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	42°C, 48h
70	ACA-DC 0349	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	42°C, 48h
71	ACA-DC 0350	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	42°C, 48h
72	ACA-DC 0351	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	42°C, 48h
73	ACA-DC 0352	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	42°C, 48h
74	ACA-DC 0353	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	42°C, 48h
75	ACA-DC 0354	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	42°C, 48h
76	ACA-DC 0355	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	22°C, 48h
77	ACA-DC 0356	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	22°C, 48h
78	ACA-DC 0357	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	22°C, 48h
79	ACA-DC 0358	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	22°C, 48h
80	ACA-DC 0359	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	22°C, 48h
81	ACA-DC 0360	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	22°C, 48h
82	ACA-DC 0361	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	22°C, 48h
83	ACA-DC 0362	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	22°C, 48h
84	ACA-DC 0363	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	22°C, 48h
85	ACA-DC 0364	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	22°C, 48h
86	ACA-DC 0365	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	22°C, 48h
87	ACA-DC 0366	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	22°C, 48h
88	ACA-DC 0367	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	22°C, 48h
89	ACA-DC 0368	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	M17	22°C, 48h
90	ACA-DC 0369	M17, 37°C	<i>coccus</i>	M17	22°C, 48h
91	ACA-DC 0400	M17, 37°C	<i>coccus</i>	KAA	37°C, 24h
92	ACA-DC 0401	M17, 37°C	<i>coccus</i>	KAA	37°C, 24h
93	ACA-DC 0402	M17, 37°C	<i>coccus</i>	KAA	37°C, 24h
94	ACA-DC 0403	M17, 37°C	<i>coccus</i>	KAA	37°C, 24h
95	ACA-DC 0404	M17, 37°C	<i>coccus</i>	KAA	37°C, 24h
96	ACA-DC 0405	M17, 37°C	<i>coccus</i>	KAA	37°C, 24h
97	ACA-DC 0406	M17, 37°C	<i>coccus</i>	KAA	37°C, 24h
98	ACA-DC 0407	M17, 37°C	<i>coccus</i>	KAA	37°C, 24h

A/A	ACA-DC number	Growth conditions	Morphology	Isolation medium (agar)	Isolation conditions
99	ACA-DC 0408	M17, 37°C	<i>coccus</i>	KAA	37°C, 24h
100	ACA-DC 0409	M17, 37°C	<i>coccus</i>	KAA	37°C, 24h
101	ACA-DC 0410	M17, 37°C	<i>coccus</i>	KAA	37°C, 24h
102	ACA-DC 0411	MRS, 37°C	<i>bacillus</i>	KAA	37°C, 24h
103	ACA-DC 0412	M17, 37°C	<i>coccus</i>	KAA	37°C, 24h
104	ACA-DC 0413	M17, 37°C	<i>coccus</i>	KAA	37°C, 24h
105	ACA-DC 0414	M17, 37°C	<i>coccus</i>	KAA	37°C, 24h
106	ACA-DC 0415	M17, 37°C	<i>coccus</i>	KAA	37°C, 24h

## 2.2 Συνολική πειραματική διαδικασία Maldi-TOF-MS

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε περιλαμβάνει τα εξής βασικά στάδια:

1. Καλλιέργεια των κυττάρων και απομόνωση των κυτταρικών πρωτεϊνών.
2. Εναπόθεση του δείγματος των πρωτεϊνών στην πλάκα του maldi και λήψη του φάσματος μαζών.
3. Εξαγωγή των δεδομένων από το φασματογράφο και επεξεργασία των αποτελεσμάτων σε ειδικό λογισμικό.





### **2.2.1 Προετοιμασία δειγμάτων**

Σύμφωνα με το SOP (Standard Operation Protocol, Εργαστήριο Μικροβιολογίας, Πανεπιστήμιο Γάνδης, Βέλγιο), ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- Έγινε εμβολιασμός 50 μl σε 5 ml MRS broth (Oxoid CM0359) για τα στελέχη των βακίλλων και M17 broth (Oxoid CM0817) για τα στελέχη των κόκκων.
- Οι καλλιέργειες επωάστηκαν για 48 ώρες στους 27°C (μικροαερόφιλα).
- στη συνέχεια ακολούθησαν 3 διαδοχικές αναπτύξεις των στελεχών, σε τρυβλία, ώστε να φτάσουμε στην 3<sup>η</sup> γενιά καλλιέργειας.

Ως μέθοδος επιφανειακής επίστρωσης των τρυβλίων εφαρμόστηκε η εξάπλωση με μικροβιολογικό κρίκο (streaking). Μετά τον πρώτο ενοφθαλμισμό παρατηρήθηκε η ανάπτυξη των αποικιών στο μικροσκόπιο, για την ομοιογένεια και την καθαρότητα των καλλιεργειών από τυχόν επιμολύνσεις. Στον δεύτερο ενοφθαλμισμό, έγινε μαζική παραγωγή των κυττάρων και στον τρίτο επιδιώχθηκε ο σχηματισμός μεμονωμένων αποικιών, έτσι ώστε να μπορούν να συλλεχθούν για τη διαδικασία της απομόνωσης των πρωτεϊνών. Οι συνθήκες επώασης παρέμειναν στις 48 ώρες στους 27°C, μικροαερόφιλα.

### **2.2.2 Απομόνωση πρωτεϊνών**

Από την απομόνωση των πρωτεϊνών απαιτούνται  $10^5$ - $10^7$  βακτηριακά κύτταρα, για μια αποτελεσματική ανίχνευση με το Maldi-TOF MS. Η διαδικασία για κάθε δείγμα ήταν η εξής:

- Από τα τρυβλία 3<sup>ης</sup> γενιάς (παράγραφος 2.2.1) επιλέχθηκε μια μεσαίου μεγέθους μεμονωμένη αποικία και τα κύτταρα αιωρήθηκαν σε 300 μl νερού milli-Q μέσα σε μικροσωλήνες erpendorf των 2ml στη συνέχεια προσετέθησαν 900 μl αιθανόλης για την αδρανοποίηση και θανάτωση των κυττάρων.

- το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 14000 rpm για 3 λεπτά στους 4°C.
- το υπερκείμενο αποχύθηκε και έγινε επανάληψη της φυγοκέντρωσης υπό ίδιες συνθήκες, για την πλήρη απομάκρυνση της υπολειπόμενης αιθανόλης.
- Κατόπιν στο ίζημα των κυττάρων προστέθηκαν 50 μl 70% μυρμηκικού οξέος (formic acid) και το δείγμα αναδεύτηκε πολύ καλά με συσκευή vortex με αποτέλεσμα την λύση των κυττάρων και την απελευθέρωση των πρωτεϊνών.
- Τέλος, προστέθηκαν 50 μl ακετονιτριλίου (acetonitrile) και το δείγμα αναμείχθηκε με vortex και φυγοκεντρήθηκε ξανά στις 14000 rpm για 3 λεπτά στους 4°C.
- συλλέχτηκε το ανώτερο στρώμα του υπερκειμένου (80 μl δείγματος πρωτεϊνών) και μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα eppendorf 1,5 ml.

Για κάθε στέλεχος έγιναν 3 επαναλήψεις για την απομόνωση των πρωτεϊνών αυξάνοντας έτσι τα δείγματα προς φασματοσκοπική ανάλυση σε 300. Στη συνέχεια, κάθε πρωτεϊνικό εκχύλισμα εναποτέθηκε σε 4 σημεία της μεταλλικής πλάκας οδηγώντας έτσι σε 1200 φασματικά προφίλ.

### 2.2.3 Ανάλυση Maldi-TOF-MS

Η προετοιμασία του προς εξέταση δείγματος βασίστηκε στην ανάμιξη του με ένα χημικό υπόστρωμα (μήτρα, matrix), που ήταν ήδη διαλυμένο σε κατάλληλο διαλύτη και την τοποθέτηση του μίγματος και την ξήρανση σε ειδική πλάκα από ανοξείδωτο ατσάλι (target place), Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα το α-CHCA (α-cyano-4-hydroxycinnamic).

Συγκεκριμένα, 2,5 mg α-CHCA αναμίχτηκαν με 500 μl διαλύτη Acetonitrile:milli-Q:TFA (50:48:2) και κατόπιν:

- 1 μl δείγματος πρωτεϊνών τοποθετήθηκε με μικροπιπέτα στην ειδική μεταλλική πλάκα σε 4 διαφορετικά σημεία και αφέθηκε να ξηραθεί.
- κατόπιν με τον ίδιο τρόπο τοποθετείται επάνω στο δείγμα το χημικό υπόστρωμα της μήτρας ώστε να καλύψει το δείγμα.
- αφήνεται για περίπου 10 λεπτά για ξήρανση.

Η διαδικασία αυτή εκτελέστηκε σε γρήγορους ρυθμούς, για την αποφυγή οξείδωσης των πρωτεϊνών και σε συνθήκες υγρασίας αέρα θαλάμου - 50% και θερμοκρασία δωματίου περίπου 15°C. Το υπόλοιπο δείγμα πρωτεϊνών αποθηκεύτηκε στους -20°C ώστε να υπάρχει η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του εφόσον χρειαστεί.

Η αξιοπιστία της μεθόδου εξαρτάται σε πολύ σημαντικό βαθμό από την βαθμονόμηση τόσο των δειγμάτων (εσωτερική) όσο και του φασματογράφου (εξωτερική). Στην παρούσα μελέτη δεν διενεργήθηκε εσωτερική βαθμονόμηση καθώς τα σήματα θα παρενέβαιναν στα φάσματα των άγνωστων δειγμάτων. Για τον λόγο αυτό, η εξωτερική βαθμονόμηση έγινε με την ανάλυση πρότυπου δείγματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε ένα πεπτιδικό μίγμα (calibration samples) που περιείχε: adrenocorticotrophic hormone (ACTH), insulin (bovine), ubiquitine και cytochrome c. Το μίγμα αυτό των πεπτιδίων – calibration standard - αναμίχθηκε με το διάλυμα της μήτρας πάνω στην μεταλλική πλάκα σε αναλογία 1:1 (1μl:1μl) και αφέθηκε μέχρι να επέλθει η ξήρανση τους. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε και το πρωτεϊνικό εκχύλισμα στελέχους αναφοράς. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το πρωτεϊνικό εκχύλισμα του στελέχους *E.coli* (*E.coli* DH5αr1ha, Brucker Company) που χρησιμοποιείται ευρέως στην ανάλυση βακτηρίων με μέθοδο του MALDI-TOF MS (inter-laboratory comparison). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η συσκευή 4800 Plus MALDI TOF/TOF™ της εταιρίας Applied Biosystems (Framingham, MA, USA). Η μεταλλική πλάκα εισήχθη στο φασματογράφο ώστε να περιέλθει σε συνθήκες κενού αέρα υψηλής πίεσης. Ενεργοποιήθηκε το υψηλής τάσης ηλεκτρικό ρεύμα και ελέγχθηκε η ευθυγράμμιση της πλάκας συναρτήσει του μηχανικού συστήματος.

Στο φασματογράφο χρησιμοποιήθηκε laser συχνότητας 200 Hz το οποίο λειτουργεί σε μήκος κύματος 355 nm με διάρκεια παλμών 1-5 ns. Τα ιόντα που δημιουργήθηκαν επιταχύνθηκαν στα 20 kV μέσω ενός ηλεκτρικού πεδίου 18 kV της περιοχής drift στον ανιχνευτή.

Για κάθε 50 τυχαίες θέσεις πάνω στο κάθε δείγμα της πλάκας δημιουργούνται υποφάσματα, τα οποία εμφανίστηκαν ως ένα ενιαίο κυρίως φάσμα.

Τα φάσματα αυτά που δημιουργήθηκαν κάλυπταν ένα εύρος μαζών 2-20 kDa. Η ένταση του laser ρυθμίστηκε μεταξύ 3800 και 4000 V δημιουργώντας εντάσεις σήματος μεταξύ  $5 \times 10^2$  και  $1 \times 10^4$ . Μετά από όλη αυτή τη διεργασία ρυθμίσεων και παραμέτρων του φασματογράφου, η καταγραφή των φασμάτων για την ταυτοποίηση εκτελέστηκε αυτόματα.

Στο τελικό στάδιο της εκτέλεσης του πειράματος ανακτήθηκαν εκατοντάδες φάσματα για κάθε δείγμα (για την ακρίβεια 1200 όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.2.2). Οι πρωτεΐνες που φτάνουν στον ανιχνευτή απεικονίζονται στο φάσμα ως κορυφές (peaks) και είναι ουσιαστικά οι περιοχές που μας ενδιαφέρουν. Στην πράξη τα πρωτεϊνικά δεδομένα εμφανίζουν σημαντικές ιδιαιτερότητες, όπως κορυφές τυχαίες που δεν έχουν σχέση με το δείγμα και που έχουν προκληθεί από ηλεκτρικές και άλλες φυσικοχημικές πηγές. Επίσης, η ευαισθησία του μηχανήματος αλλά και ο μη ιονισμός ορισμένων μορίων μπορεί να προκαλέσει θόρυβο που απεικονίζεται και αλλοιώνει την εικόνα του φάσματος. Για να αυξηθεί ο λόγος σήματος προς θόρυβο (signal noise ratio: SNR) για το παραγόμενο φάσμα, το δείγμα αρχικά σαρώθηκε πολλές φορές και υπολογίστηκε η μέση τιμή των παραγόμενων φασμάτων.

#### **2.3.4 Ανάλυση φασμάτων**

Τα φάσματα που ανακτώνται με την ανάλυση στο Madli-TOF MS είναι ακατέργαστα (raw spectra). Η ανάλυση των πρωτεϊνικών δεδομένων είναι αρκετά απαιτητική. Η διαδικασία εξαγωγής της επιζητούμενης πληροφορίας από τα πρωτεϊνικά δεδομένα έγινε σε 2 στάδια:

- την προεπεξεργασία των δεδομένων
- εφαρμογή ειδικού αλγόριθμου ταξινόμησης των φασμάτων και την ανάλυση των τελικών δεδομένων

### ***Προεπεξεργασία δεδομένων***

Τα ακατέργαστα δεδομένα αρχικά υφίστανται επεξεργασία για να δημιουργηθεί ένα σύνολο κορυφών και εντάσεων κορυφών. Σημαντικό στάδιο όπως προαναφέρθηκε είναι η αφαίρεση του θορύβου που προέκυψε κατά την εκτέλεση του πειράματος με τους σωστούς χειρισμούς ώστε να αποφευχθεί η απώλεια της βιολογικής πληροφορίας. Δεδομένα με κορυφές  $MB < 2.000Da$  θεωρούμε ότι αντιπροσωπεύουν θόρυβο.

Η εξαγωγή των ακατέργαστων δεδομένων από τον αναλυτή Maldi-TOF MS έγινε σε φακέλους t2d\* που εισήχθησαν στα πρόγραμμα Data Explorer 4.0 (Applied Biosystems, CA, USA) και μετασχηματίστηκαν σε αρχεία κειμένου. Τα αρχεία αυτά αποτελούνται από μια συστοιχία που περιλαμβάνει την ένταση του σήματος για κάθε τιμή 0.5 του λόγου μάζα προς φορτίο ( $m/z$ ) και διαμορφώνουν τις λίστες κορυφών. Ο Data Explorer 4.0 εξάγει τη λίστα κορυφών που έχει προκύψει από κάθε δείγμα σε ξεχωριστά νέα αρχεία κειμένου τα οποία χρησιμοποιούνται σαν αρχεία εισαγωγής για το πακέτο λογισμικού Bionumerics 6.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latern, Belgium.)

### ***Εφαρμογή ειδικού αλγόριθμου ταξινόμησης των φασμάτων και ανάλυση των τελικών δεδομένων***

Για την ταυτοποίηση των άγνωστων στελεχών, τα δεδομένα των φασμάτων από τα αρχεία εισαγωγή μεταφέρθηκαν στο λογισμικό Bionumerics και αναλύθηκαν από πρότυπο αλγόριθμο αντιστοίχισης μαζών. Η αντιστοίχιση όλων των αποτυπωμάτων μάζας των άγνωστων δειγμάτων συγκρίθηκε με όλες τις καταχωρήσεις της βάσης δεδομένων του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου της Γάνδης (LMG, Βέλγιο) και αριθμεί τις 30.000.

Για την αναγνώριση των στελεχών σε επίπεδο είδους εφαρμόστηκε ειδικός αλγόριθμος, ενώ για τη φυλογενετική ταξινόμηση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ανάλυσης συστάδων (Cluster analysis). Η ταυτοποίηση είναι ουσιαστικά η ομαδοποίηση δειγμάτων με κοινές ιδιότητες μεταξύ του συνόλου της βάσης δεδομένων και η δημιουργία υποσυνόλων με βάση τις ιδιότητες αυτές. Για όλες τις αναλύσεις η δημιουργία συστάδων (clusters) έγινε με τη μέθοδο ομαδοποίησης μη σταθμισμένων ζευγών, UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean), η οποία είναι ένας γνωστός συγκεντρωτικός αλγόριθμος που υιοθετεί τη γραφική αναπαράσταση κατηγοριοποιημένων δεδομένων και κατασκευάζει δενδρογράμματα που φανερώνουν τις αποστάσεις ομοιότητας. Το μέτρο της απόστασης είναι οι διαφορές που προκύπτουν από τις ανά ζεύγη συστοιχίες. Η ιεραρχική κατηγοριοποίηση διαχωρίζει τα δεδομένα σε συστάδες με παρόμοια πρότυπα έκφρασης. Έτσι οι ιεραρχικές συστάδες δημιουργούνται από οργανισμούς που μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά και φτιάχνουν ένα δενδρόγραμμα όπου γίνεται ομαδοποίηση των δειγμάτων αναφορικά με τους συντελεστές ομοιότητας. Για την εκτίμηση των μετρήσεων ομοιότητας και για τον τελικό χαρακτήρα της σειράς δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν οι ευκλείδειες αποστάσεις (Eukclidean distances).

Η περιγραφή της ανάλυσης δεδομένων χρησιμοποιώντας το λογισμικό Bionumerics 6.0 περιλαμβάνει ειδικές τεχνολογίες και προγραμματισμό (για λεπτομερείς πληροφορίες Bionumerics manual ([www.applied-maths.com](http://www.applied-maths.com))).

### **2.3.1 Αλληλούχηση του γονιδίου ενζύμου *PheS***

Για την ταυτοποίηση των στελεχών, για τα οποία το Maldi-TOF MS δεν έδωσε σαφή ταξινομικά αποτελέσματα, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλληλούχησης του γονιδίου του ενζύμου *PheS* (phenylalanyl-tRNA synthetase).

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Naser et al. (2005) που περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

#### **Αλκαλική λύση των κυττάρων για απομόνωση του DNA**

- Μια μεμονωμένη αποικία κυττάρων τοποθετήθηκε σε σωληνάριο τύπου Eppendorf των 1,5 ml.
- Προστέθηκαν 20 μl ρυθμιστικού διαλύματος (lysis buffer; 2,5 ml 10% SDS + 5,0 ml 1M NaOH + 92,5 ml MQ)
- Ακολούθησε θέρμανση στους 95°C για 15 λεπτά.
- Έγινε φυγοκέντρηση για μερικά δευτερόλεπτα στις 13000 rpm
- Στη συνέχεια προστέθηκαν 180 μl MQ – H<sub>2</sub>O
- Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε ξανά στις 13000 rpm για 5 λεπτά

#### **Ενίσχυση τμήματος DNA**

Σε σωληνάριο τύπου Eppendorf αναμίχθηκαν:

- 16,5 μl MQ-H<sub>2</sub>O
- 2,5 μl 10 x ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης
- 2,5 μl dNTP (2μM)
- 0,25 μl εκκινητής Forward (50μM) /**pheS-21-F**
- 0,25 μl εκκινητής Reverse (50μM) /**pheS-22-R**
- 0,5 μl AmpliTaq DNA πολυμεράση (1U/μl)
- 2,5 μl μήτρας DNA (alkalisch extract)

Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε στη συσκευή Gene Amp PCR system 9600 thermocycler (Applied Biosystems). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

- Αρχική αποδιάταξη DNA στους 95°C για 5 λεπτά
  - Αποδιάταξη στους 95°C για 1 λεπτό
  - Υβριδισμός εκκινητών στους 50 °C για 15 δευτερόλεπτα
  - Επιμήκυνση στους 72 °C για 1 λεπτό
- } 3 κύκλοι

- Αποδιάταξη 95°C στους για 35 δευτερόλεπτα
  - Υβριδισμός εκκινητών στους 50 °C για 15 δευτερόλεπτα
  - Επιμήκυνση στους 72 °C για 1 λεπτό
  - Τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 7 λεπτά
- } 30 κύκλοι

### **Ηλεκτροφόρηση του τμήματος του DNA σε πηκτή αγαρόζης**

Τα προϊόντα της PCR διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% (RESult 1% LE Agarose – Biozym). Σε κωνική φιάλη αναμίχτηκε 1 g αγαρόζης με 100 ml διαλύματος 1XTBE (Tris borate EDTA). Στα 'πηγαδάκια' φορτώθηκαν:

- Μάρτυρας μοριακών βαρών 5 μl (smart ladder)
- Προϊόν PCR με το ενισχυμένο DNA 5 μl + 2 μl loading dye
- Θετικό control PCR από γνωστό δείγμα 7 μl
- Κενό δείγμα χωρίς DNA (blank) 7 μl

Η ηλεκτροφόρηση έτρεξε για 45 λεπτά υπό σταθερή σε τάση 75 volt. Εν συνεχεία, η πηκτή τοποθετήθηκε σε διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) για 30 λεπτά και η ανίχνευση έγινε κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

### **Καθαρισμός προϊόντων PCR**

Όλα τα προϊόντα της PCR έδωσαν ευδιάκριτες ζώνες και κατόπιν καθαρίστηκαν με το automatic PCR clean-up membrane system Nucleofast 96 Kit (Macherey-Nagel). Για την έκπλυση τους, 20 μl κάθε δείγματος τοποθετήθηκαν σε ειδικό πλακίδιο μεμβρανών και με την προσθήκη 100 μl MQ-H<sub>2</sub>O ανά δείγμα υποβλήθηκαν σε συνθήκες κενού αέρα υπό ανάδευση για 7 λεπτά, με σκοπό την απομάκρυνση αλάτων αλλά και άλλων ανεπιθύμητων πρόσθετων από τις αντιδράσεις PCR και την ανάκτηση καθαρού DNA.

### **Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τμημάτων DNA (sequencing)**

Χρησιμοποιήθηκε το πακέτο ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix Version 3.1 (Applied Biosystems). Δημιουργήθηκαν 2 ξεχωριστά μίγματα όσον αφορά τις F και R αντιδράσεις που περιελάμβαναν:



- 0,286 μl ABI prism Big Dye Terminator
- 3 μl εκκινητή (4μM)
- 1,857 μl ρυθμιστικό διάλυμα (sequencing buffer)
- 1,857 μl MQ-H<sub>2</sub>O

Σε νέα erpendorf τοποθετήθηκαν:

- 3 μl από το καθαρό DNA PCR προϊόν
- 7 μl από το παραπάνω μίγμα αντίδρασης

Η αλληλούχηση έγινε στη συσκευή Gene Amp PCR system 9600 thermocycler (Applied Biosystems) και το θερμοκρασιακό πρόγραμμα περιελάμβανε:

- 30 κύκλους x 15sec στους 96 °C - αποδιάταξη
- 1sec στους 35 °C - υβριδισμός
- 4min στους 60 °C - επιμήκυνση

### ***Καθαρισμός προϊόντων αλληλούχησης***

Χρησιμοποιήθηκε το BigDye®XTerminator purification Kit. Στο ειδικό πιάτο (plate) του Kit τοποθετήθηκαν:

- 45 μl SAM + 10 μl XTerminator
- 10 μl προϊόν PCR

Ακολούθησε ανάδευση για 30 λεπτά και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 3 λεπτά στις 3575 rpm.

Ο διαχωρισμός των τμημάτων του DNA έγινε με τον ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### ***Ανάλυση αλληλουχιών***

Τα αποτελέσματα των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μεταφέρθηκαν στη βάση δεδομένων του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας του Πανεπιστημίου της Γάνδης (LMG sequence data base, Βέλγιο.) Η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα Bionumerics (Applied Maths) και κατόπιν εστάλησαν ηλεκτρονικά για

ταυτοποίηση στο EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory- European Bioinformatics Institute).

### **2.3.2 Αλληλούχηση του γονιδίου 16S rRNA**

#### ***Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA***

Η απομόνωση του χρωμοσωμικού DNA πραγματοποιήθηκε με το GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma) με τα παρακάτω βήματα:

- 1) Προετοιμάστηκε διάλυμα λυσοζύμης 10 mg/ml. Για κάθε δείγμα χρειάστηκαν 200 μl λυσοζύμης.
- 2) 1.5 ml από στατική καλλιέργεια (24 ώρες στους 37.5°C σε θρεπτικό υπόστρωμα κατάλληλο για τον αντίστοιχο μικροοργανισμό) φυγοκεντρήθηκε σε 12,000-16,000 g για 2 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίφθηκε.
- 3) Το ίζημα (κύτταρα) επαναιωρήθηκε σε 200 μl λυσοζύμης και επώαστηκε για 30 λεπτά στους 37°C. Σε αυτό το στάδιο η λυσοζύμη έδρασε στο κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων υδρολύοντάς το. Προστέθηκαν 20 μl από διάλυμα RNάσης (RNase A Solution) και έγινε επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να υδρολυθούν τυχόν υπολείμματα RNA.
- 4) Προστέθηκαν 20 μl από το διάλυμα πρωτεϊνάσης K (Proteinase K solution) για την πέψη των κυτταρικών πρωτεϊνών και 200 μl από το διάλυμα λύσης (Lysis Solution C). Έγινε ισχυρή ανάδευση για περίπου 15 δευτερόλεπτα και τα δείγματα επώαστηκαν στους 55°C για 10 λεπτά. Στο στάδιο αυτό επήλθε η λύση των κυττάρων και σχηματίστηκε ένα ομογενές μίγμα.
- 5) Σε κάθε στήλη GenElute Miniprep Binding Column που τοποθετήθηκε μέσα σε σωλήνες συλλογής των 2ml προστέθηκαν 500 μl από το διάλυμα ενεργοποίησης στήλης (Column Preparation Solution), έγινε φυγοκέντρηση σε 12,000 g για 1 λεπτό

και απορρίφθηκε το διήθημα. Το διάλυμα ενεργοποίησης μεγιστοποιεί τη δέσμευση του DNA στη μεμβράνη της στήλης και δίνει μεγαλύτερες αποδόσεις.

6) Προστέθηκαν 200 μl αιθανόλης (95-100%) στο λύμα των κυττάρων και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση για 5-10 δευτερόλεπτα. Προέκυψε ομοιογενές μίγμα. Η αιθανόλη αφυδάτωσε το DNA, το οποίο έτσι δεσμεύθηκε στη μεμβράνη της στήλης.

7) Μεταφέρθηκε όλο το περιεχόμενο των σωλήνων, δηλαδή τα λυμένα κύτταρα, μέσα στη στήλη. Έγινε φυγοκέντρηση σε  $\geq 6,500$  g για 1 λεπτό. Απορρίφθηκε ο σωλήνας συλλογής που περιείχε το διάλυμα της έκλουσης και η στήλη τοποθετήθηκε σε νέο σωλήνα συλλογής.

8) Προστέθηκαν 500 μl από το διάλυμα έκπλυσης 1 (Wash Solution 1) στη στήλη και έγινε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε  $\geq 6,500$  g. Απορρίφθηκε ο σωλήνας συλλογής και αντικαταστάθηκε από έναν νέο. Στο στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκε η πρώτη έκπλυση, για να απομακρυνθούν όλα τα άλλα συστατικά των κυττάρων, εκτός από το DNA.

9) Προστέθηκαν 500 μl από το διάλυμα έκπλυσης (Wash Solution) στη στήλη για να γίνει η δεύτερη έκπλυση και έγινε φυγοκέντρηση για 3 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα (12,000-16,000 g) για να στεγνώσει η στήλη από την αιθανόλη που περιείχε το διάλυμα έκπλυσης. Η στήλη έπρεπε να είναι απαλλαγμένη από κάθε ίχνος αιθανόλης πριν την έκλυση του DNA. Έγινε πρόσθετη φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα για την απομάκρυνση υπολειμμάτων αιθανόλης. Τελικά, η στήλη τοποθετήθηκε σε ένα νέο σωλήνα συλλογής.

10) Προστέθηκαν 70 μl από το διάλυμα έκλουσης (Elution Solution) ακριβώς στο κέντρο της στήλης, έγινε επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση σε  $\geq 6,500$  g για 1 λεπτό για να γίνει η έκλυση του DNA.

Το προϊόν της έκλουσης περιείχε καθαρό χρωμοσωμικό DNA, το οποίο αποθηκεύτηκε στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Η συγκέντρωση του DNA μετρήθηκε σε φωτόμετρο NanoDrop (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA)

### **Ταυτοποίηση μικροοργανισμών με αλληλούχιση του γονιδίου 16S rRNA**

Πραγματοποιήθηκε Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR, PCR) με στόχο την ενίσχυση του γονιδίου 16S rRNA. Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές σχεδιασμένοι με βάση την αλληλουχία του 16S rRNA γονιδίου του μικροοργανισμού *Escherichia coli* (Ntougias et al. 2006).

Στο σωληνάριο της PCR προστέθηκαν:

- 5 μl από το ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης
- 1 μl διαλύματος dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP,) 5 mM, τελικής συγκέντρωσης 0.2 mM
- 1 μl εκκινητή Forward (**PrimerF**)
- 1 μl εκκινητή Reverse (**Primer R**)
- x μl χρωμοσωμικού DNA ώστε η ποσότητα να είναι 200 ng
- 1 μl πολυμεράσης
- νερό, μέχρι τελικό όγκο 50 μl

Το χρωμοσωμικό DNA αρχικά αποδιατάχθηκε, στους 94° C για 2 λεπτά. Ακολούθησε παραμονή στους 94° C για 30 δευτερόλεπτα, η θερμοκρασία μειώθηκε στους 56° C για 30 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια αυξήθηκε στους 72° C για 1 λεπτό και 20 δευτερόλεπτα. Πραγματοποιήθηκαν 30 τέτοιοι κύκλοι. Με επιπλέον παραμονή στους 72° C για 2 λεπτά ολοκληρώθηκε η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων DNA από τα ελεύθερα νουκλεοτίδια.

Στη συνέχεια, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων του 16S PCR σε πηκτική αγαρόζη 1% w/v, ως εξής:

- Σε 40 ml του διαλύματος ηλεκτροφόρησης 1 x TAE (0.004 M Tris-acetate, 1 mM EDTA) προστέθηκαν 0.4 g αγαρόζης
- Το διάλυμα θερμάνθηκε μέχρι να διαλυτοποιηθεί η αγαρόζη
- Το διάλυμα ψύχθηκε μέχρι τους 60°C και προστέθηκαν 2 μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου

- Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης, τοποθετήθηκε η χτένα και έπηξε σε θερμοκρασία δωματίου σχηματίζοντας την πηκτή
- Απομακρύνθηκε η χτένα και η πηκτή βυθίστηκε σε διάλυμα 1 x TAE. Στα σχηματιζόμενα από τη χτένα κενά τοποθετήθηκαν τα δείγματα, στα οποία είχε προστεθεί ποσότητα από το ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (loading buffer-0.25% w/v Bromophenol blue, 0.25% Xylene cyanol, 40% w/v glycerol). Ακόμα, χρησιμοποιήθηκε δείκτης μοριακών βαρών (marker) μεγέθους 1 kb.
- Η πηκτή έτρεξε στα 90 V, για περίπου μισή ώρα.

Ακολούθησε κόψιμο της ζώνης της αγαρόζης που περιείχε το προϊόν της PCR αντίδρασης (1600 bp) και καθαρισμός του DNA με το NucleoSpin® Extract II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany, σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρείας. Πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση του γονιδίου από την εταιρεία VBC-BIOTECH Service GmbH (Αυστρίας) και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έρευνα ομολογίας της αλληλουχίας του γονιδίου με άλλες αλληλουχίες με το πρόγραμμα Blast του NCBI server (Altschul et al. 1990).

## Κεφάλαιο 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### **3.1 Απομόνωση και αρχικός φαινοτυπικός χαρακτηρισμός των στελεχών**

Με σκοπό την απομόνωση των στελεχών συλλέχθηκαν αποικίες από επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα των οξυγαλακτικών μικροβιακών ομάδων. Με τον τρόπο αυτό ελήφθησαν οι 106 απομονώσεις που ήταν όλες θετικές κατά Gram και αρνητικές στη δοκιμή της καταλάσης. Αυτές οι καλλιέργειες όντας ‘καθαρές’ υποβλήθηκαν σε φαινοτυπικό χαρακτηρισμό από όπου και προήλθε ο διαχωρισμός τους. Η αρχική διαφοροποίηση επιτεύχθηκε με βάση τη μορφολογία των κυττάρων αλλά και τις φαινοτυπικές τους ιδιότητες και συγκεκριμένα την παραγωγή διοξειδίου του άνθρακα από το μεταβολισμό γλυκόζης, την ανάπτυξη σε διάφορες θερμοκρασίες και pH. Ο βασικός του διαχωρισμός έγινε σε βακίλους και κόκκους. Συνολικά ταυτοποιήθηκαν 101 στελέχη από τα 106 με τη μέθοδο της Maldi-TOF MS και συμπληρωματικά από τις μεθόδους αλληλούχησης PheS και 16S rRNA (Πίνακας 2.1, Κεφάλαιο 2. Μέθοδοι και Υλικά).

### 3.1.1 Ταυτοποίηση Γαλακτοβακίλλων

Στον Πίνακα 3.1 παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των γαλακτοβακίλλων. Με μέθοδο της Maldi-TOF MS ταυτοποιήθηκαν πλήρως 53 στελέχη γαλακτοβακίλλων, ενώ για 5 στελέχη η μέθοδος δεν έδωσε σαφή ταξινομικά αποτελέσματα.

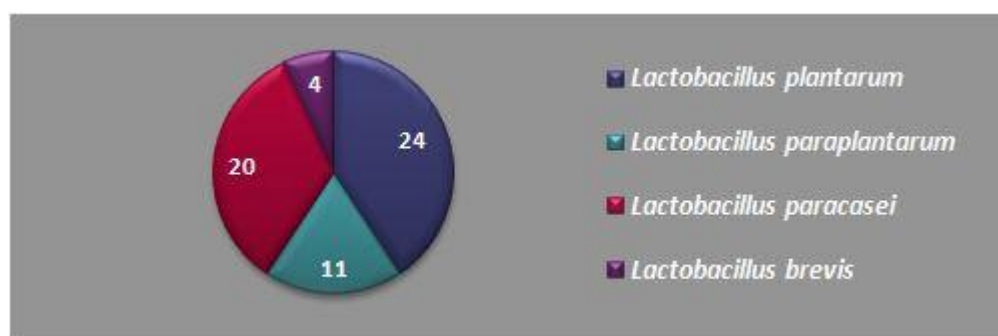
Πιο συγκεκριμένα, 2 στελέχη του είδους *L. plantarum*, 3 στελέχη του είδους *L. paraplantarum* και 1 στέλεχος του είδους *L. brevis*, ταξινομήθηκαν σε περισσότερα από ένα clusters διαφορετικών ειδών, ενώ ένα στέλεχος το οποίο παρέμεινε πλήρως αταυτοποίητο.

Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η μοριακή τεχνική αλληλούχησης του γονιδίου ενζύμου *PheS* για την σαφή ταυτοποίησή τους. Από τα 58 στελέχη γαλακτοβακίλλων που ταυτοποιήθηκαν, 24 στελέχη που ανήκουν στο είδος *L. plantarum*, 11 στελέχη στο είδος *L. paraplantarum*, 19 στελέχη ανήκουν στο είδος *L. paracasei* και 4 στο είδος *L. brevis* (Γράφημα 3.1)

**Πίνακας 3.1** Συγκεντρωτικός πίνακας ταυτοποίησης βακίλλων με τη μέθοδο Maldi-TOF και *PheS*

ACA-DC	Identification MALDI	Similarity %	Identification Sequencing	Similarity %	IDENTIFICATION FINAL
3861	<i>L.plantarum</i>	97	–		<i>Lactobacillus plantarum</i>
3862	<i>L.plantarum</i>	97	–		<i>Lactobacillus plantarum</i>
3863	<i>L.plantarum</i>	91.7	–		<i>Lactobacillus plantarum</i>
3864	<i>L.plantarum</i>	91.7	–		<i>Lactobacillus plantarum</i>
319	<i>L.plantarum</i>	94.5	–		<i>Lactobacillus plantarum</i>
321	clustered with <i>paraplantarum</i>	<75.9	<b>PheS</b> ----> <i>L.plantarum</i>	100	<i>Lactobacillus plantarum</i>
323	clustered with <i>paraplantarum</i>	<75.9	<b>PheS</b> ----> <i>L.plantarum</i>	100	<i>Lactobacillus plantarum</i>
326	<i>L.plantarum</i>	87.8	–		<i>Lactobacillus plantarum</i>
327	<i>L.plantarum</i>	87.8	–		<i>Lactobacillus plantarum</i>
328	<i>L.plantarum</i>	87.8	–		<i>Lactobacillus plantarum</i>
329	<i>L.plantarum</i>	87.8	–		<i>Lactobacillus plantarum</i>
331	<i>L.plantarum</i>	91.4	–		<i>Lactobacillus plantarum</i>
332	<i>L.plantarum</i>	87.8	–		<i>Lactobacillus plantarum</i>
333	<i>L.plantarum</i>	87.8	–		<i>Lactobacillus plantarum</i>
334	<i>L.plantarum</i>	88.3	–		<i>Lactobacillus plantarum</i>
337	<i>L.plantarum</i>	88.3	–		<i>Lactobacillus plantarum</i>
338	<i>L.plantarum</i>	–	–		<i>Lactobacillus plantarum</i>
340	<i>L.plantarum</i>	87.8	–		<i>Lactobacillus plantarum</i>
371	<i>L.plantarum</i>	88.3	–		<i>Lactobacillus plantarum</i>
373	<i>L.plantarum</i>	88.3	–		<i>Lactobacillus plantarum</i>
374	<i>L.plantarum</i>	87.8	–		<i>Lactobacillus plantarum</i>
376	<i>L.plantarum</i>	87.8	–		<i>Lactobacillus plantarum</i>

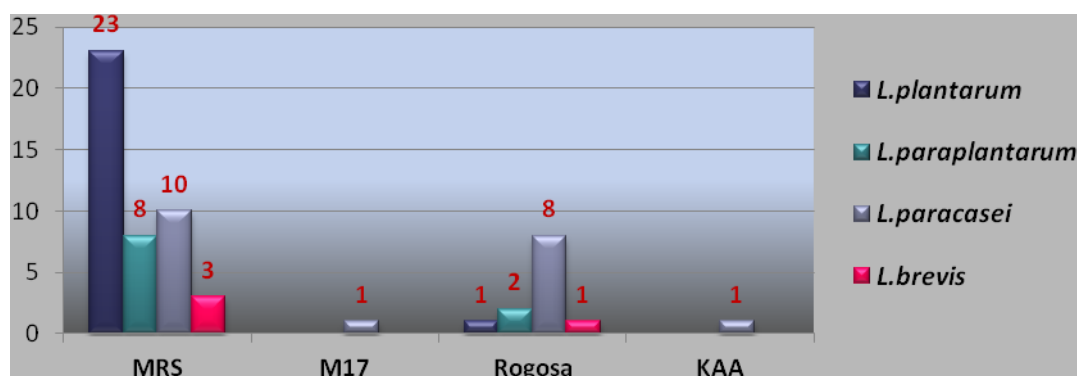
ACA-DC	Identification MALDI	Similarity %	Identification Sequencing	Similarity %	IDENTIFICATION FINAL
378	<i>L.plantarum</i>	87.8	—		<i>Lactobacillus plantarum</i>
3865	<i>L.paraplantarum</i>	—	—		<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
330	<i>L.paraplantarum</i>	—	—		<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
335	not identified	—	PheS -----> <i>L.paraplantarum</i>	98	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
336	<i>L.paraplantarum</i>	80.9	—		<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
339	<i>L.paraplantarum</i>	—	—		<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
377	<i>L.paraplantarum</i>	small	PheS -----> <i>L.paraplantarum</i>	98	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
379	<i>L.paraplantarum</i>	—	—		<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
	<i>clustered with paraplantarum and pentosus</i>				
380	<i>L.paraplantarum</i>	—	PheS -----> <i>L.paraplantarum</i>	97	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
386	<i>L.paraplantarum</i>	—	—		<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
389	<i>L.paraplantarum</i>	—	—		<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
3858	<i>L.paracasei</i>	87.3	—		<i>Lactobacillus paracasei</i>
3859	<i>L.paracasei</i>	88.3	—		<i>Lactobacillus paracasei</i>
318	<i>L.paracasei</i>	87.4	—		<i>Lactobacillus paracasei</i>
320	<i>L.paracasei</i>	90.2	—		<i>Lactobacillus paracasei</i>
324	<i>L.paracasei</i>	—	—		<i>Lactobacillus paracasei</i>
325	<i>L.paracasei</i>	87.3	—		<i>Lactobacillus paracasei</i>
370	<i>L.paracasei</i>	88.7	—		<i>Lactobacillus paracasei</i>
372	<i>L.paracasei</i>	83.7	—		<i>Lactobacillus paracasei</i>
384	<i>L.paracasei</i>	83.4	—		<i>Lactobacillus paracasei</i>
385	<i>L.paracasei</i>	83.7	—		<i>Lactobacillus paracasei</i>
387	<i>L.paracasei</i>	88.3	—		<i>Lactobacillus paracasei</i>
392	<i>L.paracasei</i>	—	—		<i>Lactobacillus paracasei</i>
394	<i>L.paracasei</i>	—	—		<i>Lactobacillus paracasei</i>
395	<i>L.paracasei</i>	—	—		<i>Lactobacillus paracasei</i>
396	<i>L.paracasei</i>	—	—		<i>Lactobacillus paracasei</i>
397	<i>L.paracasei</i>	88.7	—		<i>Lactobacillus paracasei</i>
398	<i>L.paracasei</i>	88.3	—		<i>Lactobacillus paracasei</i>
368	<i>L.paracasei</i>	88.7	—		<i>Lactobacillus paracasei</i>
411	<i>L.paracasei</i>	88.3	—		<i>Lactobacillus paracasei</i>
381	<i>L.brevis</i>	86.8	—		<i>Lactobacillus brevis</i>
382	<i>not only clustered with brevis</i>	86.8	PheS -----> <i>L.brevis</i>	99	<i>Lactobacillus brevis</i>
383	<i>L.brevis</i>	86.8	—		<i>Lactobacillus brevis</i>
389	<i>L.brevis</i>	89.3	—		<i>Lactobacillus brevis</i>



Γράφημα 3.1 Κατανομή ειδών γαλακτοβακίλλων



Όπως απεικονίζεται αναλυτικά στο Γράφημα 3.2 η πλειονότητα των γαλακτοβακίλλων απομονώθηκε από το θρεπτικό υπόστρωμα MRS, και κατόπιν από το Rogosa. Όλα τα στελέχη του *L.plantarum* απομονώθηκαν από το MRS με εξαίρεση 1 στέλεχος που απομονώθηκε από το υπόστρωμα Rogosa. Οι *L. paraplantarum* απομονώθηκαν επίσης από αυτά τα δύο επιλεκτικά, όπως και ο *L.brevis*. Σε αντίθεση με τον *L. paracasei* που βρέθηκε και στα 4 επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα.

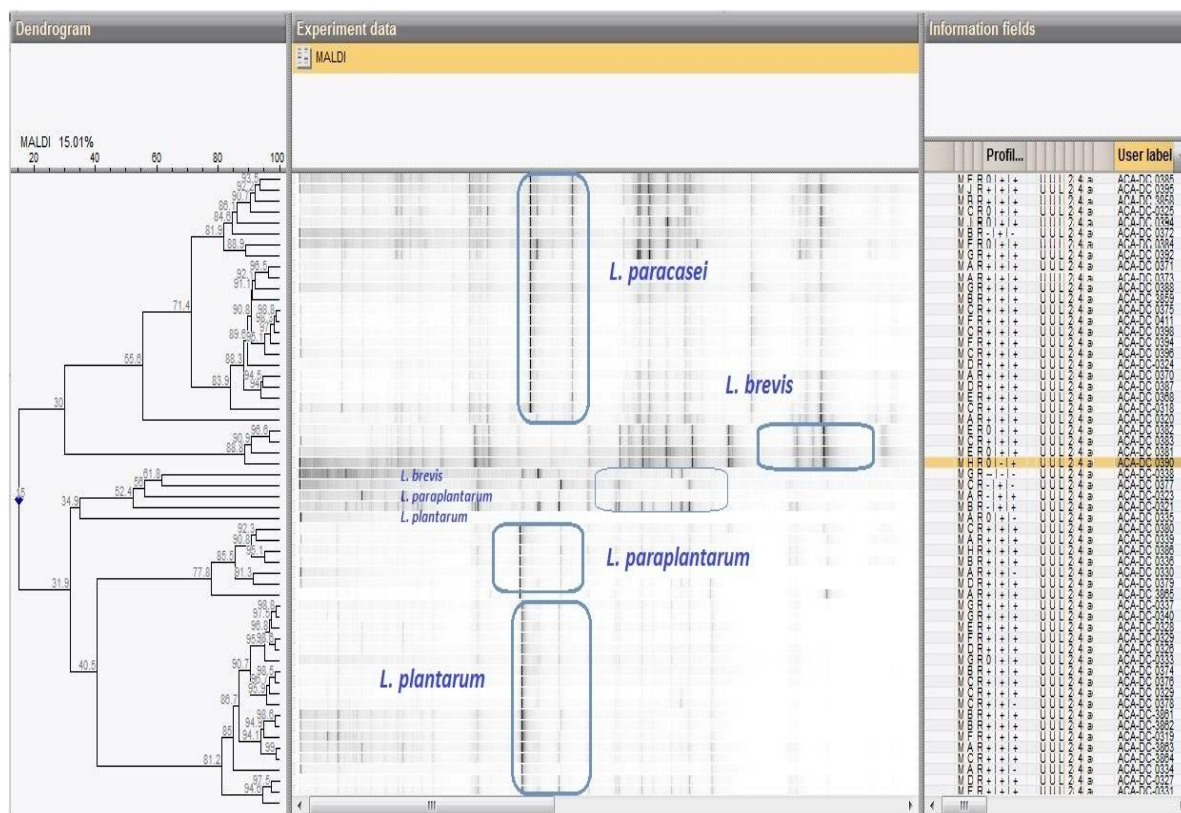


**Γράφημα 3.2** Κατανομή ειδών γαλακτοβακίλλων ανά υπόστρωμα απομόνωσης

Στο δενδρόγραμμα της Εικόνας 3.1 που ακολουθεί απεικονίζεται η συνολική φυλογενετική ταξινόμηση των στελεχών στην οποία εφαρμόζεται η ιεραρχική ομαδοποίηση σε συστάδες. Ο διαχωρισμός τους γίνεται αναφορικά με τους συντελεστές ομοιότητας, καθώς διακρίνεται και η διαφοροποίηση των κορυφών των πρωτεϊνικών φασμάτων.

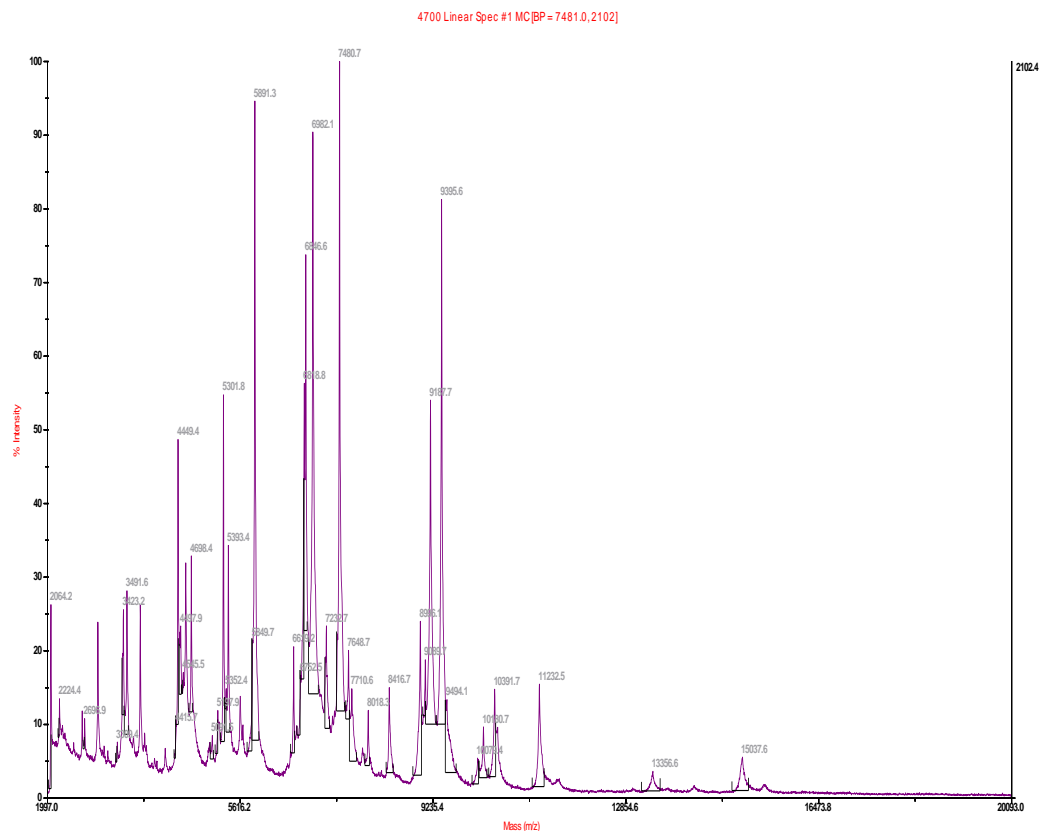
Όπως αναγράφεται και στο δενδρόγραμμα, ως αριθμητικό μέτρο του μεγέθους συσχέτισης μεταξύ δύο τιμών εφαρμόστηκε ο συντελεστής Pearson correlation με τιμές από 0.0%-100%.

**Εικόνα 3.1** Δενδρογράμμα ομαδοποίησης γαλακτοβακίλλων κατά συστάδες

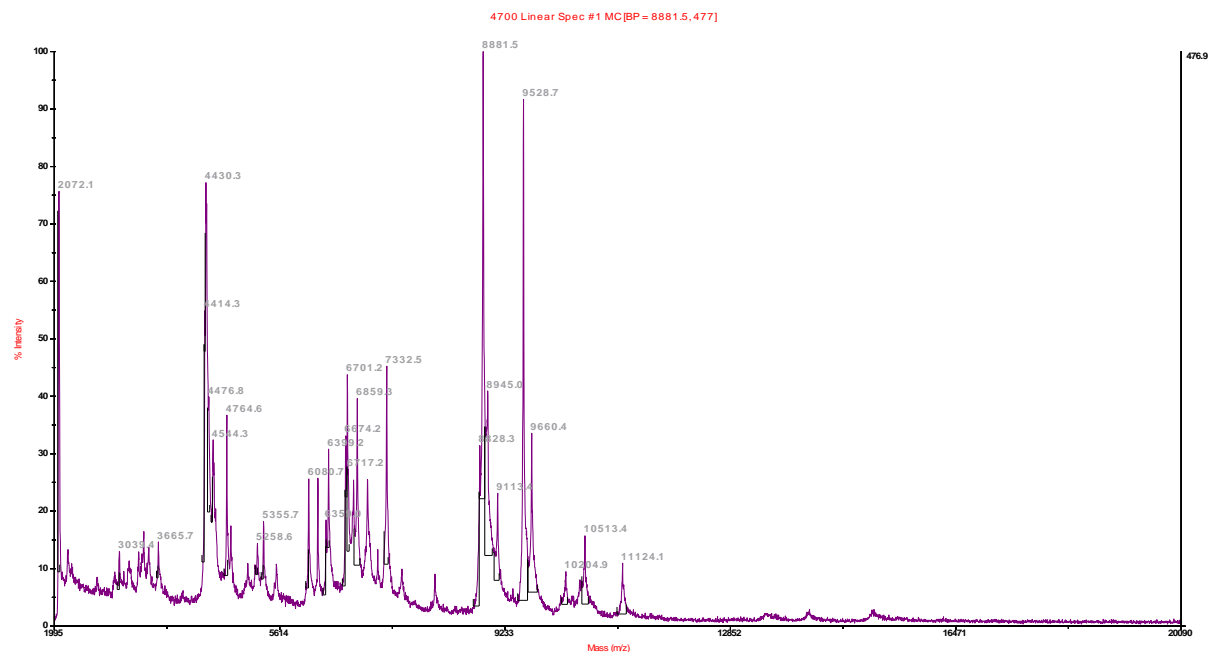


**Πρωτεϊνικά φάσματα των 4 ειδών γαλακτοβακίλλων που ταυτοποιήθηκαν στη Στάκα.**

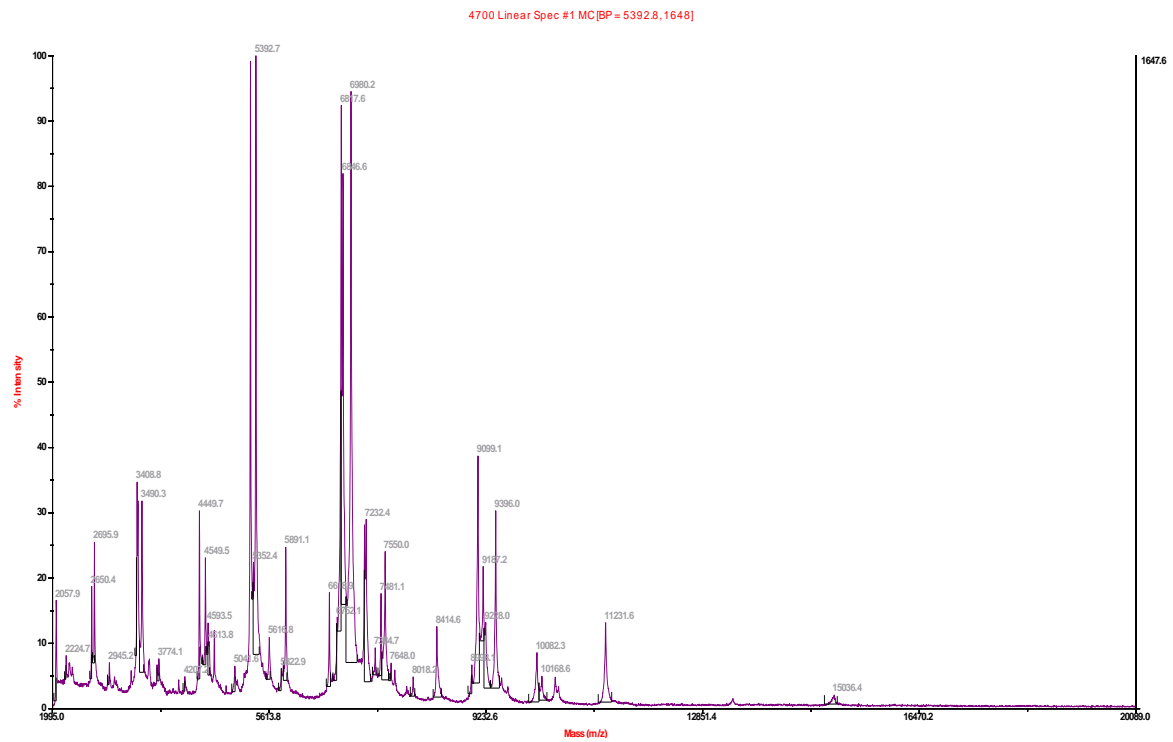
Οι εικόνες που παρατίθενται ανήκουν στα μοναδικά φάσματα του κάθε είδους των γαλακτοβακίλλων τα οποία και οδήγησαν στην ταυτοποίησή τους . Κάθε κορυφή εκφράζει μια πρωτεΐνη της οποίας ο αντίστοιχος λόγος  $m/z$  αναγράφεται στον οριζόντιο άξονα. Ένα κύτταρο παράγει περί τις 1000 πρωτεΐνες, παρόλα αυτά κάποιες είναι πιο εμφανείς ανάλογα την έντασή τους όπως μετράται στο κατακόρυφο άξονα. Είναι διακριτό το πως και τα 4 φάσματα των αντίστοιχων μικροοργανισμών ξεχωρίζουν εμφανώς μεταξύ τους.



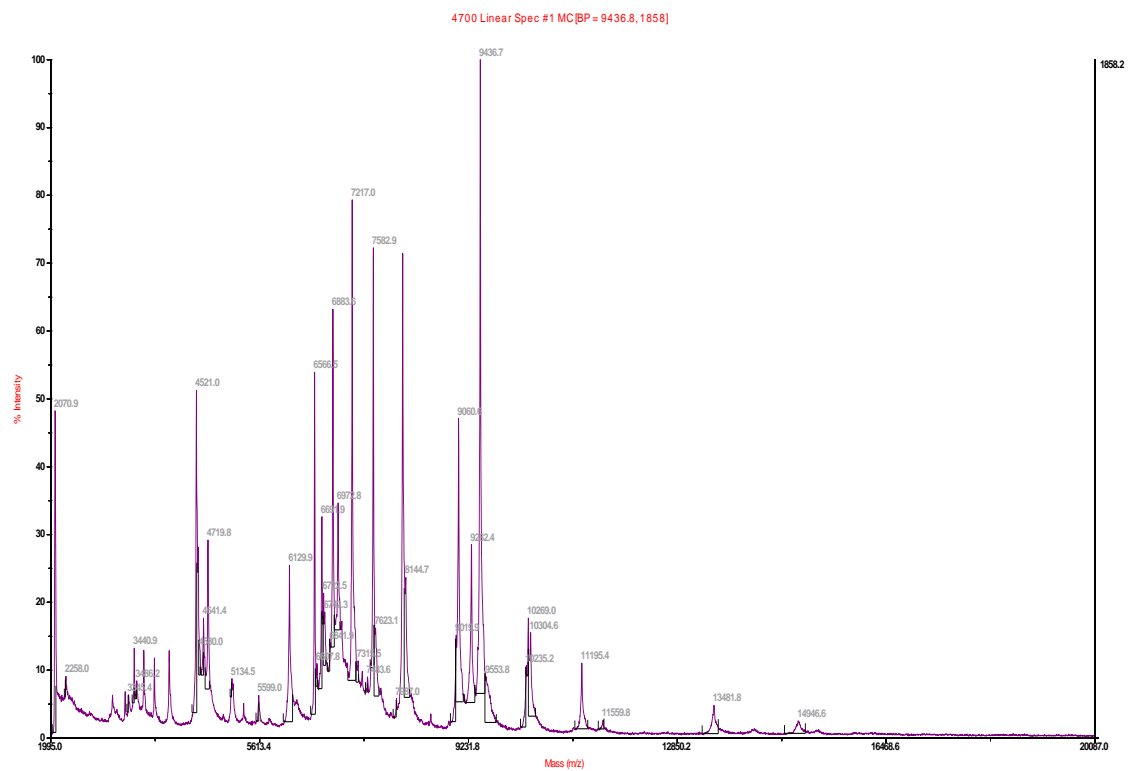
**Εικόνα 3.2** Αντιπροσωπευτικό φάσμα MALDI-TOF-MS στελέχους του είδους *L. plantarum*



**Εικόνα 3.3** Αντιπροσωπευτικό φάσμα MALDI-TOF-MS στελέχους του είδους *L. paraplantarum*



**Εικόνα 3.4** Αντιπροσωπευτικό φάσμα MALDI-TOF-MS στελέχους του είδους *L. paracasei*



**Εικόνα 3.5** Αντιπροσωπευτικό φάσμα MALDI-TOF-MS στελέχους του είδους *L. brevis*

### **3.1.2 Ταυτοποίηση κόκκων**

Στον Πίνακα 3.2 παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των 43 στελεχών κόκκων. Με μέθοδο της Maldi-TOF MS ταυτοποιήθηκαν πλήρως 13 στελέχη κόκκων. Για 9 στελέχη η μέθοδος δεν έδωσε καμία ταυτοποίηση, ενώ για τα υπόλοιπα 21 τα κατέταξε με πολύ χαμηλό ποσοστό στο κάποιο συγγενικό είδος.

Συγκεκριμένα με την Maldi-TOF MS ταυτοποιήθηκαν πλήρως τα στελέχη που αφορούν στο είδος του *E.faecium* και με μικρότερο ποσοστό, αλλά επαρκώς αποδεκτό, τα στελέχη που αφορούν στο είδος *E.faecalis*. Παρόλα αυτά για την επικύρωση της μεθόδου δείγμα από κάθε είδος εντερόκοκκου ταυτοποιήθηκε και με την μέθοδο της αλληλούχησης του 16S rRNA γονιδίου.

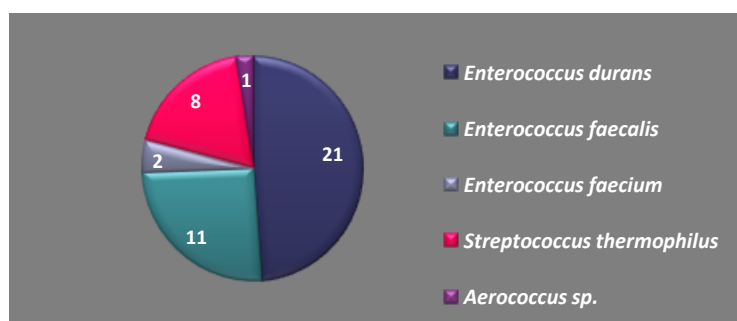
Για τα στελέχη των *E.durans* και *S.thermophilus* η μέθοδος της Maldi-TOF MS έδωσε αποτελέσματα σε επίπεδο ταξιμόνησης των στελεχών σε συστάδες με πολύ μεγάλο συντελεστή ομοιότητας μεταξύ τους αλλά όχι σε επίπεδο ταυτοποίησης. Η μη ταυτοποίηση των στελεχών αυτών από το Maldi-TOF οφείλεται ότι η βάση δεδομένων δεν περιείχε τα συγκεκριμένα είδη ώστε να γίνει συγκριτική ταξινόμηση και ταυτοποίηση.

Για την ομάδα που προσδιορίστηκε ως *Pediococci* αλλά με μη αποδεκτό συντελεστή ομοιότητας χρησιμοποιήθηκε σαν μέθοδος ταυτοποίησης η αλληλούχηση *PheS*, ενώ για την ομάδα των μη ταυτοποιημένων στελεχών, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της 16S rRNA όπου και τελικά προσδιορίστηκαν να ανήκουν στο είδος *S.thermophilus*.

Με τη χρήση 3 μεθόδων ταυτοποιήθηκαν συνολικά 21 στελέχη που ανήκουν στο είδος *E. durans*, 11 στελέχη στο είδος *E.faecalis*, 2 στελέχη ανήκουν στο είδος *E.faecium* και 8 στελέχη στο είδος *S. Thermophilus* όπως απεικονίζονται στο Γράφημα 3.3 Στο γένος των *Aerococcus* κατατάχθηκε 1 στέλεχος χωρίς όμως την ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους.

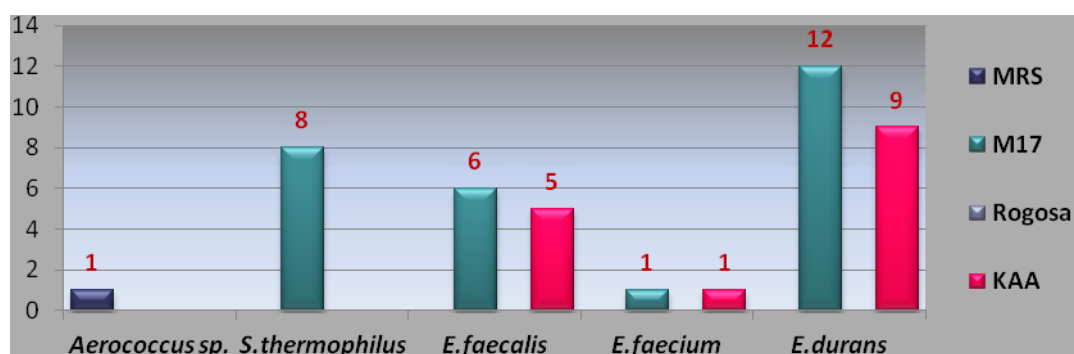
**Πίνακας 3.2** Συγκεντρωτικός πίνακας ταυτοποίησης κόκκων με τη μέθοδο Maldi-TOF, PheS και 16SrRNA

ACA-DC	Identification MALDI	Similarity %	Identification Sequencing	Similarity %	IDENTIFICATION FINAL
322	unidentified	–	<b>PheS + 16S</b> ----> <i>Aerococcus.sp</i>	99	<i>Aerococcus sp.</i>
342	<i>Pediococci</i>	67	<i>E.durans</i>		<i>Enterococcus durans</i>
344	<i>Pediococci</i>	68	<b>PheS</b> ----> <i>E.durans</i>	98	<i>Enterococcus durans</i>
347	<i>Pediococci</i>	68	<i>E.durans</i>		<i>Enterococcus durans</i>
349	<i>Pediococci</i>	68	<i>E.durans</i>		<i>Enterococcus durans</i>
355	<i>Pediococci</i>	68	<i>E.durans</i>		<i>Enterococcus durans</i>
360	<i>Pediococci</i>	68	<b>PheS</b> ----> <i>E.durans</i>	98	<i>Enterococcus durans</i>
361	<i>Pediococci</i>	68	<i>E.durans</i>		<i>Enterococcus durans</i>
362	<i>Pediococci</i>	68	<i>E.durans</i>		<i>Enterococcus durans</i>
363	<i>Pediococci</i>	68	<i>E.durans</i>		<i>Enterococcus durans</i>
364	<i>Pediococci</i>	68	<i>E.durans</i>		<i>Enterococcus durans</i>
366	<i>Pediococci</i>	68	<i>E.durans</i>		<i>Enterococcus durans</i>
367	<i>Pediococci</i>	68	<i>E.durans</i>		<i>Enterococcus durans</i>
400	<i>Pediococci</i>	68	<i>E.durans</i>		<i>Enterococcus durans</i>
404	<i>Pediococci</i>	68	<i>E.durans</i>		<i>Enterococcus durans</i>
405	<i>Pediococci</i>	68	<i>E.durans</i>		<i>Enterococcus durans</i>
406	<i>Pediococci</i>	68	<i>E.durans</i>		<i>Enterococcus durans</i>
407	<i>Pediococci</i>	68	<b>PheS</b> ----> <i>E.durans</i>	98	<i>Enterococcus durans</i>
410	<i>Pediococci</i>	68	<i>E.durans</i>		<i>Enterococcus durans</i>
412	<i>Pediococci</i>	68	<i>E.durans</i>		<i>Enterococcus durans</i>
413	<i>Pediococci</i>	68	<i>E.durans</i>		<i>Enterococcus durans</i>
414	<i>Pediococci</i>	68	<i>E.durans</i>		<i>Enterococcus durans</i>
351	<i>E.faecalis</i>	75.9	–		<i>Enterococcus faecalis</i>
352	<i>E.faecalis</i>	75.9	–		<i>Enterococcus faecalis</i>
357	<i>E.faecalis</i>	75.9	–		<i>Enterococcus faecalis</i>
359	<i>E.faecalis</i>	75.9	–		<i>Enterococcus faecalis</i>
365	<i>E.faecalis</i>	75.9	–		<i>Enterococcus faecalis</i>
369	<i>E.faecalis</i>	75.9	<b>16S</b> ----> <i>E.faecialis</i>	100	<i>Enterococcus faecalis</i>
401	<i>E.faecalis</i>	75.9	–		<i>Enterococcus faecalis</i>
402	<i>E.faecalis</i>	75.9	–		<i>Enterococcus faecalis</i>
403	<i>E.faecalis</i>	75.9	–		<i>Enterococcus faecalis</i>
408	<i>E.faecalis</i>	75.9	–		<i>Enterococcus faecalis</i>
409	<i>E.faecalis</i>	75.9	–		<i>Enterococcus faecalis</i>
364	<i>E.faecium</i>	91.4	<b>16S</b> ----> <i>E.faecium</i>	99	<i>Enterococcus faecium</i>
415	<i>E.faecium</i>	81.7	–		<i>Enterococcus faecium</i>
343	non identification		<i>S.thermophilus</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>
345	non identification	όλα	<i>S.thermophilus</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>
346	non identification	στο	<i>S.thermophilus</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>
348	non identification	ίδιο	<b>16S</b> ----> <i>S.thermophilus</i>	99	<i>Streptococcus thermophilus</i>
350	non identification	cluster	<i>S.thermophilus</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>
353	non identification		<i>S.thermophilus</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>
354	non identification		<b>16S</b> ----> <i>S.thermophilus</i>	99	<i>Streptococcus thermophilus</i>
356	non identification		<i>S.thermophilus</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>



**Γράφημα 3.3** Αποτελέσματα ταυτοποίησης στελεχών κόκκων

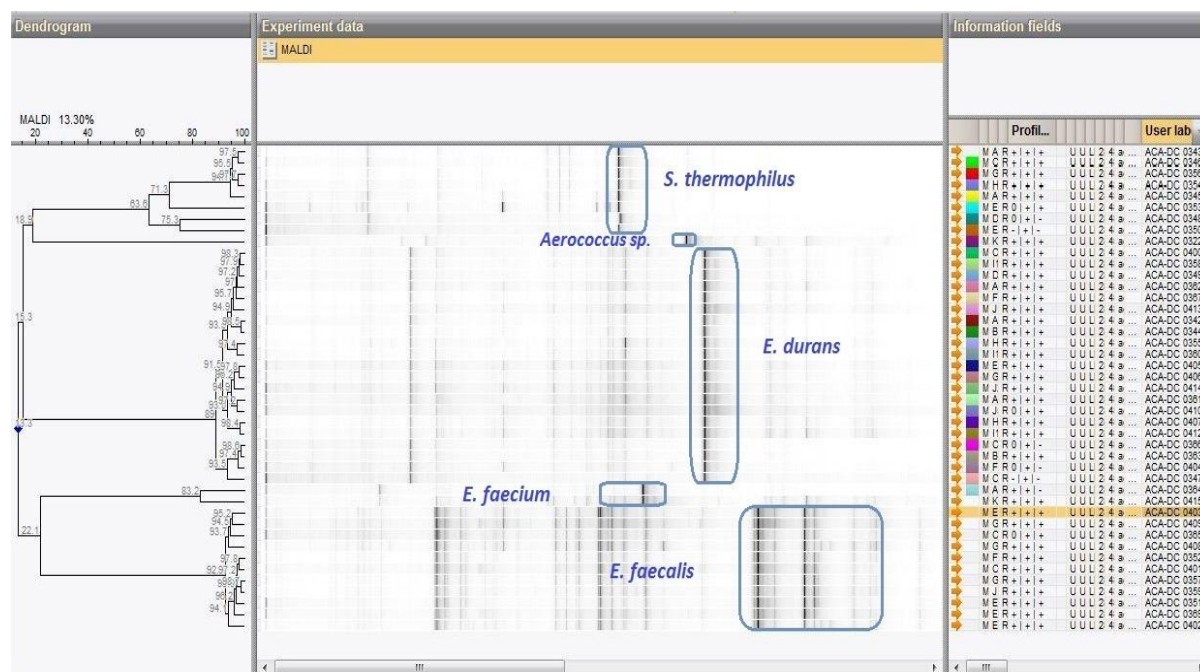
Όπως απεικονίζεται αναλυτικά στο Γράφημα 3.4 εδώ η πλειονότητα των κόκκων απομονώθηκε από το θρεπτικό υπόστρωμα M17, με δεύτερο το υπόστρωμα ΚΑΑ. Τα στελέχη του *S. thermophilus* απομονώθηκαν από το MRS ενώ οι *E. faecialis*, *E. faecium* και *E. durans* απομονώθηκαν από το υπόστρωμα M17 και ΚΑΑ. Το ένα και μοναδικό στέλεχος του *Aerococcus* που ταυτοποιήθηκε απομονώθηκε από υπόστρωμα MRS, ενώ από το υπόστρωμα Rogosa δεν υπήρχε κάποια απομόνωση κόκκου.



**Γράφημα 3.4** Ταυτοποίηση κόκκων ανά υπόστρωμα απομόνωσης

Στο δενδρόγραμμα της Εικόνας 3.6 που ακολουθεί φαίνεται η απεικόνιση των κορυφών των φασμάτων όλων των στελεχών των κόκκων και η ταξινόμηση τους σε συστάδες που δημιουργούνται ομαδοποιώντας τα στελέχη με τους αντίστοιχους συντελεστές ομοιότητας, όπως παρουσιάζεται από το λογισμικό Bionumerics. Τα 5 είδη των κόκκων έχουν διακριθεί μεταξύ τους σε 5 πολύ ευκρινή clusters.

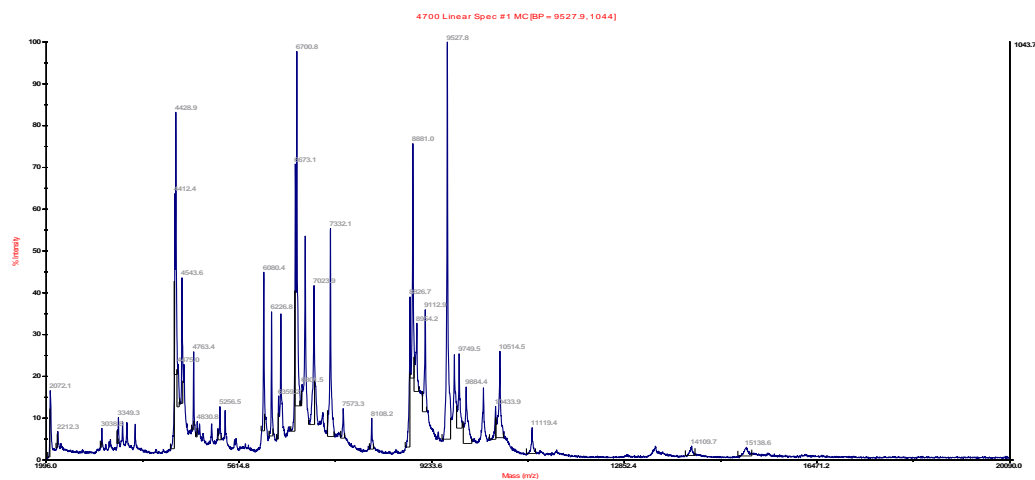
**Εικόνα 3.6** Δενδρόγραμμα ομαδοποίησης κόκκων ανά συστάδες



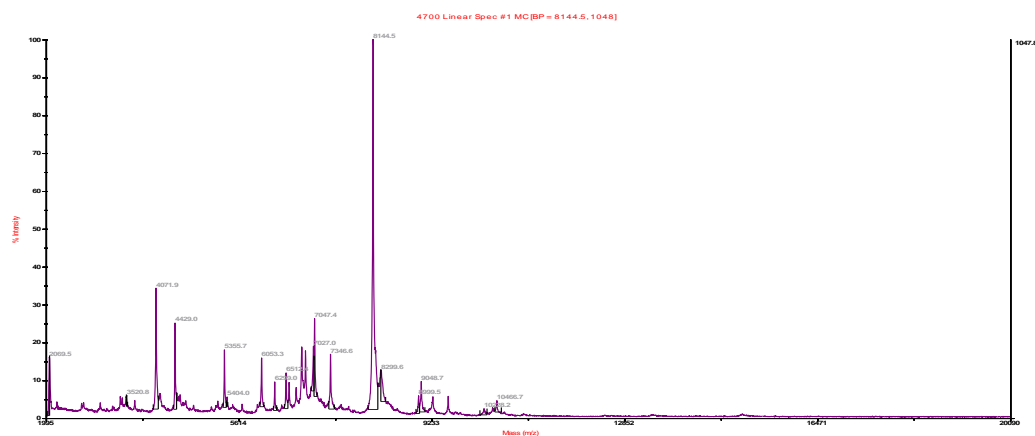
**Πρωτεϊνικά φάσματα των 5 ειδών κόκκων που ταυτοποιήθηκαν στη Στάκα.**

Οι εικόνες που παρατίθενται ανήκουν στα μοναδικά φάσματα του κάθε είδους των κόκκων τα οποία και οδήγησαν στην ταυτοποίησή τους. Είναι διακριτό το πως και τα 5 φάσματα των αντίστοιχων μικροοργανισμών ξεχωρίζουν εμφανώς μεταξύ τους.

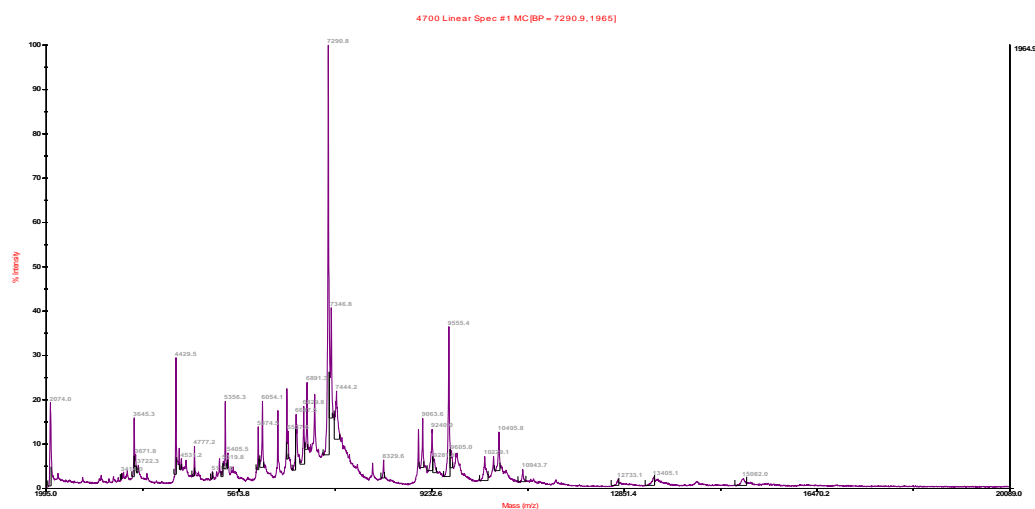




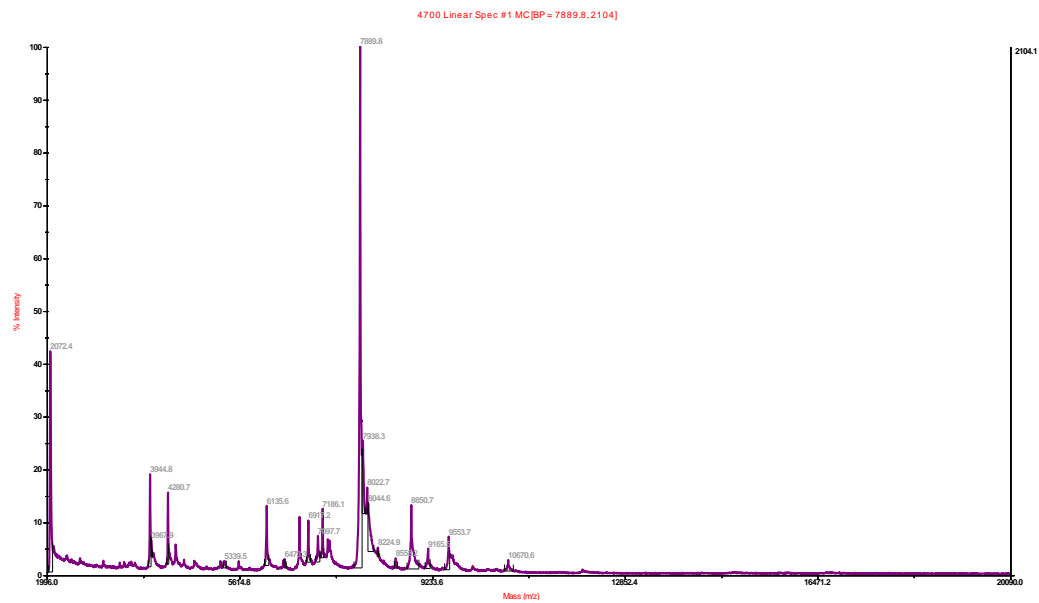
Εικόνα 3.7 Αντιπροσωπευτικό φάσμα MALDI-TOF-MS στελέχους του είδους *Enterococcus faecalis*



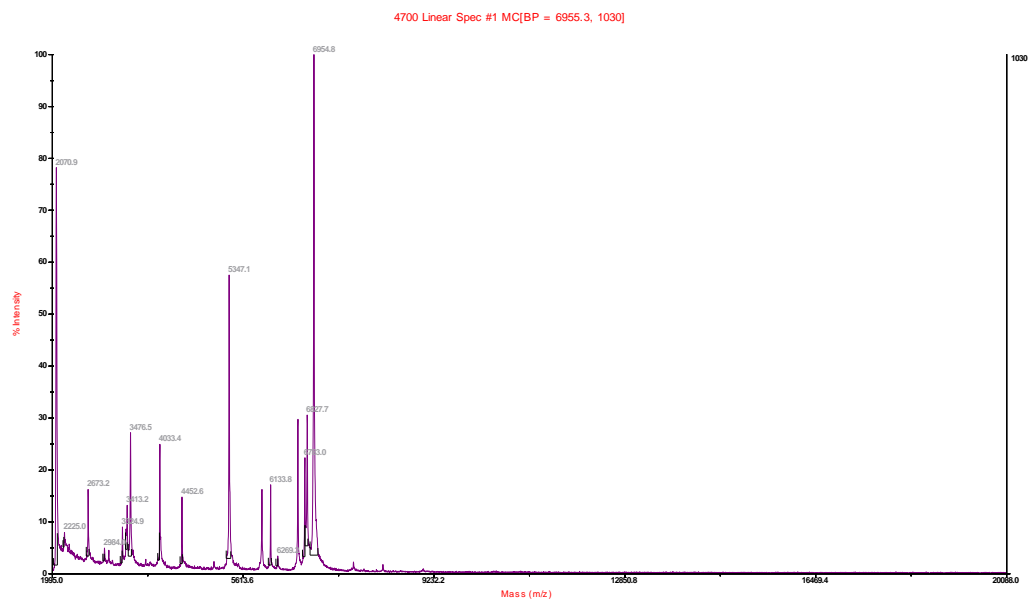
Εικόνα 3.8 Αντιπροσωπευτικό φάσμα MALDI-TOF-MS στελέχους του είδους *Enterococcus durans*



Εικόνα 3.9 Αντιπροσωπευτικό φάσμα MALDI-TOF-MS στελέχους του είδους *Enterococcus faecium*



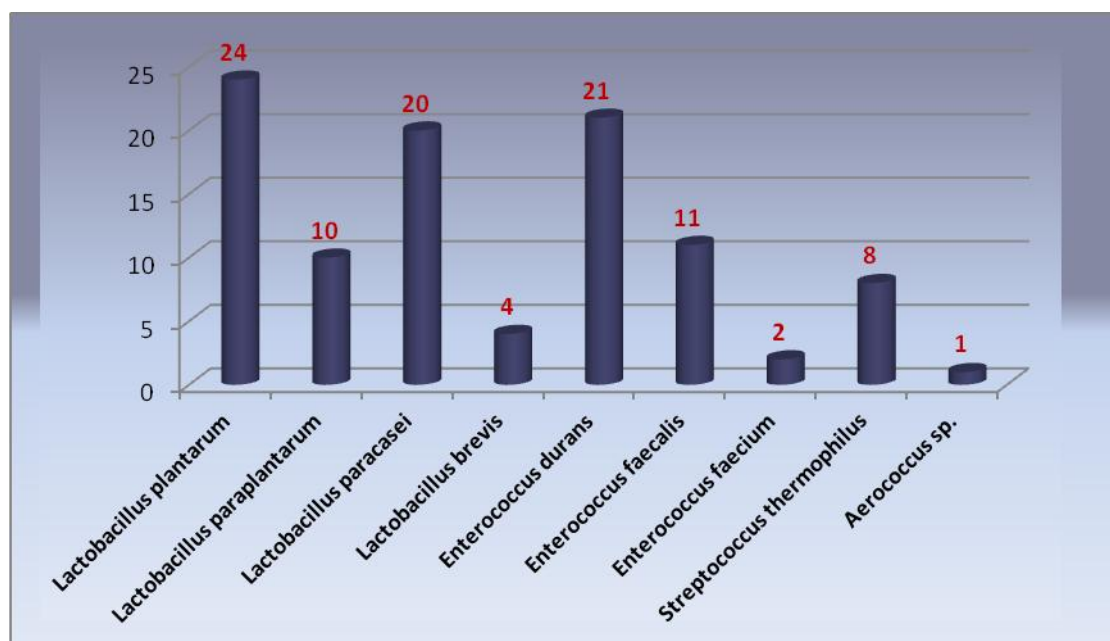
**Εικόνα 3.10** Αντιπροσωπευτικό φάσμα MALDI-TOF-MS στελέχους του είδους *Aerococcus sp.*



**Εικόνα 3.11** Αντιπροσωπευτικό φάσμα MALDI-TOF-MS στελέχους του είδους *Streptococcus thermophilus*

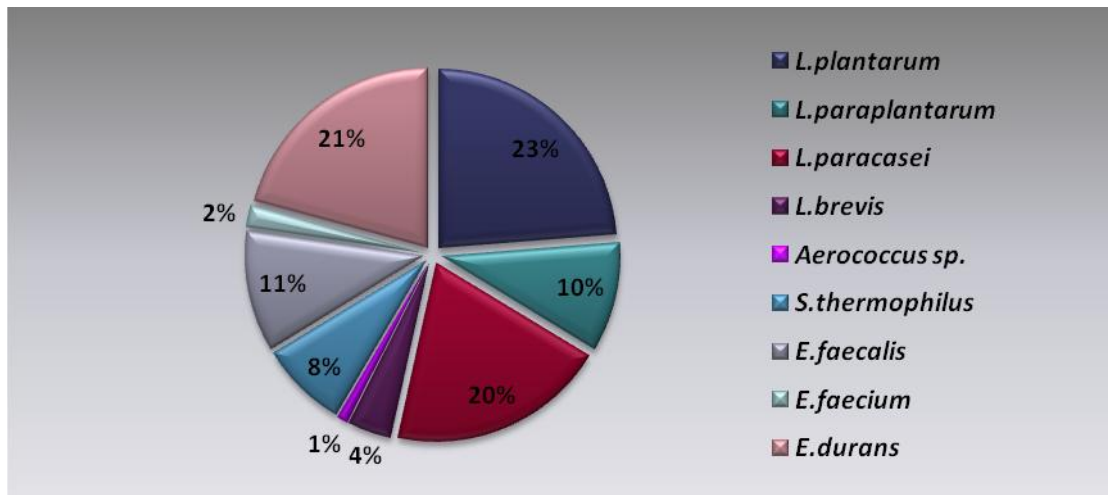
### 3.2 Συζήτηση

Οι πληθυσμοί των μικροβιακών ομάδων που προσδιορίστηκαν στα δείγματα απεικονίζονται στο Γράφημα 3.5. Από την ταυτοποίηση των στελεχών που απομονώθηκαν βρέθηκε ότι τα κυριότερα είδη των οξυγαλακτικών βακτηρίων που απαντούν στη Στάκα είναι, γαλακτοβάκιλλοι και εντερόκοκκοι.



**Γράφημα 3.5** Είδη οξυγαλακτικών βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν στη Στάκα

Όπως παρουσιάζεται και στο Γράφημα 3.6 οι γαλακτοβάκιλλοι είναι οι επικρατέστεροι μικροοργανισμοί και αποτελούν το 57% του πληθυσμού των οξυγαλακτικών βακτηρίων ενώ οι εντερόκοκκοι το 33% και σε ένα μικρό ποσοστό του 8% *S. thermophilus*. Στο δείγμα παρατηρήθηκε πλήρης απουσία λακτοκοκκών, ενώ ταυτοποιήθηκε και παρουσία ενός αερόκοκκου η οποία δεν έχει ξανά αναφερθεί για ελληνικά τυριά.



**Γράφημα 3.6** Κατανομή ειδών στο δείγμα της Στάκας

Όσον αφορά τις ταυτοποιήσεις στα διάφορα επιλεκτικά υποστρώματα, οι λακτοβάκιλλοι αντιπροσωπεύουν το 75% των συνολικών απομονώσεων από το υπόστρωμα MRS με τους *L. plantarum* να αποτελούν το 56%. Οι εντερόκοκκοι αντιπροσωπεύουν το 55% των απομονώσεων από το M17. Ο *L. paracasei* αποτελεί το 66% του υποστρώματος Rogosa, ενώ το 56% των απομονώσεων του υποστρώματος KAA ταυτοποιήθηκε ως *E. Durans*. Στο Γράφημα 3.7 απεικονίζονται ο πληθυσμός των ταυτοποιήσεων κάθε επιλεκτικού θρεπτικού υλικού.



**Γράφημα 6.** Το πλήθος των ταυτοποιήσεων ανά υπόστρωμα απομόνωσης

Όπως προκύπτουν από τα παραπάνω αποτελέσματα όσον αφορά τη Maldi-TOF MS, στον Πίνακα 3.3 παρουσιάζεται η ανάλυση από τα 106 στελέχη που απομονώθηκαν:

**Πίνακας 3.3** Αριθμητικά αποτελέσματα ταυτοποίησης Maldi-TOF MS

Αρχικές καλλιέργειες		106
Δεν ανταποκρίθηκαν στην ανανέωση καλλιέργειας για ανάλυση		5
Φασματομετρήθηκαν		101
Ταυτοποιήθηκαν	(identified)	65
Δεν ταυτοποιήθηκαν	(unidentified)	10
‘Εσφαλμένη’ ταυτοποίηση	(misidentified)	26

Με βάση τον παραπάνω πίνακα μπορούμε να υπολογίσουμε το ποσοστό επιτυχίας ταυτοποίησης της μεθόδου, το οποίο θα ήταν όμως πλασματικό αν δεν λαμβάναμε υπόψην κάποιες σημαντικές παραμέτρους:

- 9 από τα 10 μη ταυτοποιήσιμα στελέχη, αναφερόμενοι στον *S. thermophilus* (8) και στο γένος *Aerococcus* (1) δεν υπήρχαν καταχωρημένα στη βάση δεδομένων ώστε να γίνει σύγκριση των πρωτεϊνικών τους φασμάτων.
- 21 από τα 26 στελέχη για τα οποία προέκυψε εσφαλμένη ταυτοποίηση, αναφερόμενοι στον *E. Durans* (21), επίσης δεν ήταν παρόντα στη βάση δεδομένων και έτσι ταξινομήθηκαν με χαμηλό ποσοστό ομοιότητας σε ένα άλλο είδος.

Εκτιμώντας λοιπόν τα στοιχεία αυτά, για ένα ποσοστό που θα αντιπροσωπεύει την πραγματικότητα θα πρέπει να εξαιρέσουμε από τον υπολογισμό τα 30 στελέχη των οποίων τα πρωτεϊνικά αποτυπώματα δεν υπήρχαν στην βάση δεδομένων και συνεπώς καθιστούσαν αδύνατη την ταυτοποίηση. Έτσι το ποσοστό αποτελεσματικότητας της μεθόδου βρίσκεται 90.3 %

Όπως αναφέρεται στους συγκεντρωτικούς πίνακες ταυτοποίησης, για τα στελέχη της 'εσφαλμένης' ταυτοποίησης εφαρμόστηκε η τεχνική *PheS*. Ο όρος παρόλα αυτά δεν είναι ακριβής καθώς δεν υπήρξε κάποια εσφαλμένη ταυτοποίηση ταξινόμηση των στελεχών αυτών σε 2 ή 3 διαφορετικών ειδών clusters ταυτόχρονα. Αυτό είχε ως συνέπεια την ανάγκη εφαρμογής μια άλλης μεθόδου ώστε να βρεθεί η ακριβής ταυτότητά τους.

Σύμφωνα με τους Naser et al. (2007), η αλληλούχηση του ενζύμου *PheS* αποτελεί ένα δυνατό εργαλείο για την ταυτοποίηση των ειδών του γένους *Lactobacillus* και μια εναλλακτική γενωμική προσέγγιση στην τεχνική αλληλούχησης του 16S rRNA γονιδίου, και φαίνεται να παρουσιάζει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα και αξιοπιστία ταυτοποίησης μεταξύ των ειδών αυτών. Πολλές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των οξυγαλακτικών βακτηρίων όπως η SDS-PAGE των συνολικών κυτταρικών πρωτεϊνών, η RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) και η ALFP (amplified fragment length polymorphism), με κυρίαρχη την αλληλούχηση του 16S rRNA γονιδίου που θεωρείται από τις πιο αξιόπιστες μεθόδους διαχωρισμού βάσει φυλογενετικών δεικτών. Παρόλα αυτά η μέθοδος 16S rRNA φαίνεται να μην επιτρέπει τη διάκριση μεταξύ πολύ κοντινών συγγενικών ειδών του συγκεκριμένου γένους. Η αλληλούχηση του 16S rRNA γονιδίου έχει βρεθεί ότι δεν είναι κατάλληλη για να διαφοροποιήσει και να προσδιορίσει τα είδη *L. plantarum*, *L. paraplantarum* και *L. pentosus* (Collins et al., 1999; Torriani et al., 2001).

Η *PheS* έχει επίσης αποδειχθεί ένα εύρωστο σύστημα για την ταυτοποίηση όλων των ειδών του γένους *Enterococcus* (Naser et al., 2005). Παρόλο που η αλληλούχηση του 16S rRNA γονιδίου είναι από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των εντερόκοκκων έχει περιορισμένη διακριτική ικανότητα για πολλά συγγενή είδη όπως ο *E. faecium* και ο *E. faecalis*. Αντίθετα, η αλληλούχηση *PheS* σε αξιολόγηση της χρησιμότητάς του έδειξε την υπεροχή του απέναντι στο 16SrRNA παραθέτοντας μεγαλύτερη διάκριση ανάμεσα στα είδη.

Στον Πίνακα 3.4 παρατίθενται τα αποτελέσματα από τις μοριακές αναλύσεις ταυτοποίησης.

**Πίνακας 3.4** Αποτελέσματα των ταυτοποιήσεων με τις μεθόδους *PheS* και 16SrRNA

Όνομα	Τεχνική	Γένος	είδος	Blast score (%)	nBLAST NCBI		
ACA-DC-0321	<i>PheS</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	100	nr/nt	*	
ACA-DC-0322	<i>PheS</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>viridens</i>	No BLAST identification		*(98.2%)	LMG 14796
ACA-DC-0322	16S rRNA	<i>Aerococcus</i>	<i>viridens/urinaeequi</i>	99			
ACA-DC-0323	<i>PheS</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>	100	nBLAST NCBI nr/nt	*	
ACA-DC-0335	<i>PheS</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>paraplantarum</i>	98	nBLAST NCBI nr/nt	*	
ACA-DC-0344	<i>PheS</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>durans</i>	100	nBLAST NCBI nr/nt	*	
ACA-DC-0348	16S rRNA	<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	100	nBLAST NCBI nr/nt		
ACA-DC-0354	16S rRNA	<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	100	nBLAST NCBI nr/nt		
ACA-DC-0360	<i>PheS</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>durans</i>	100	nBLAST NCBI nr/nt	*	
ACA-DC-0377	<i>PheS</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>paraplantarum</i>	98	nBLAST NCBI nr/nt	*	
ACA-DC-0380	<i>PheS</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>paraplantarum</i>	97	nBLAST NCBI nr/nt	*	
ACA-DC-0382	<i>PheS</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	100	nBLAST NCBI nr/nt	*	
ACA-DC-0407	<i>PheS</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>durans</i>	100	nBLAST NCBI nr/nt	*	
ACA-DC-0407	16S rRNA	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>	100			

Παρότι η εφαρμογή της Φασματοσκοπίας Μαζών στην ταυτοποίηση μικροοργανισμών είναι αρκετά πρόσφατη και τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά περιορισμένα, τα αποτελέσματα της μεθόδου μπορούν να εκτιμηθούν και να τεκμηριωθούν.

Η διαγνωστική ακρίβεια της Maldi-TOF MS μεταξύ μοριακών χημικών μεθόδων επιβεβαιώνεται από πολλές σημερινές αναφορές. Σε μελέτη σύγκριση μεταξύ της Maldi-TOF MS και πέντε ακόμη βιοχημικών μοριακών μεθόδων οι Benagli et al. (2011) αναφέρουν ταυτοποίηση πάνω από 98% σε 1019 δείγματα και οι Bessede et al. (2010) αναφέρουν ταυτοποίηση 99% σε επίπεδο γένους και 97.3% σε επίπεδο είδους όπως επίσης και την υψηλή και ταχύτητά της.

Οι συγγραφείς σε όλες τις ανωτέρω αναφορές επισημαίνουν πως τα βακτήρια που δεν ταυτοποιήθηκαν αφορούν στο γεγονός ότι τα πρωτεώματα των μικροοργανισμών απουσίαζαν από τη βάση δεδομένων. Συνεπώς μια ενημέρωση των πρωτεϊνικών βάσεων δεδομένων βελτιώνει τη μέθοδο ακόμα περισσότερο και της δίνει τη δυνατότητα να αυξήσει τη δυναμική της σύμφωνα με τους Iroha et al.

(2011), καθώς οι ίδιοι απέδειξαν πως σε σύγκριση με τις συμβατικές βιοχημικές μεθόδους η χρήση της Maldi-TOF MS παρέχει πιο αξιόπιστη και ταχύτερη ταυτοποίηση βακτηριακών ειδών.

Οι Seng et al. (2009) καταγράφουν ποσοστό ταυτοποίησης σε επίπεδο είδους μεγαλύτερο από 95% εφαρμόζοντας τη Maldi-TOF MS και έχουν τεκμηριώσει τα αποτελέσματα με την αλληλούχηση 16S rRNA. Επίσης στη μελέτη τους δεν είχαν αποκλίσεις ως προς τη φαινοτυπική ταυτοποίηση που είχε προηγηθεί και προτείνουν ακόμα ότι η χρώση κατά Gram ίσως είναι περιττή στη συγκεκριμένη μέθοδο. Σύμφωνα με αυτή τη μελέτη ο φαινοτυπικός χαρακτηρισμός σε συγκεκριμένο στέλεχος βρέθηκε να ταυτοποιείται διαφορετικά από την Maldi-TOF MS κάτι το οποίο επιβεβαιώθηκε με την τεχνική της 16S rRNA, γεγονός που αναδεικνύει την αξιοπιστία της.

Μια ακόμη τεκμηρίωση της μεθόδου παρουσιάζεται από τους Chavagnat et al. (2002), με την επικύρωση της από τη τεχνική του 16S rRNA, σε όλα τα οξυγαλακτικά βακτήρια που είχαν αρχικά ταυτοποιηθεί με το Maldi-TOF MS.

Οι van Veen et al., (2010) επικυρώνουν την υψηλή ευαισθησία της μεθόδου στην ταυτοποίηση μεταξύ Gram θετικών κόκκων. Έχει ήδη αναφερθεί μεγάλος αριθμός ερευνών οξυγαλακτικών όπως για εντεροκόκκους (Giard et al., 2001).

Ταυτοποίηση οξυγαλακτικών βακτηρίων μέσω των εκφραζόμενων πρωτεϊνών τους με Maldi-TOF MS έχει ήδη γίνει επιτυχώς σε γαλακτοκομικά προϊόντα όπως τυρί και γιαούρτι (Angelakis et al., 2011).

Ένα από τα προβλήματα του Maldi-TOF MS θα λέγαμε πως είναι η ποιότητα των φασμάτων. Πολλές φορές υπάρχει το ενδεχόμενο φάσματα από τον ίδιο μικροοργανισμό να μην είναι ακριβώς πανομοιότυπα και έτσι οι η ταυτοποίηση να δυσχεράνει. Παρόλα αυτά έχει τεκμηριωθεί πως η ταυτοποίηση σε κάθε περίπτωση είναι θετική. Αυτό δεν είναι κάτι αξιοπερίεργο δεδομένου ότι όλα τα φάσματα αντανακλούν την παρουσία εκφρασμένων πρωτεϊνών από ένα γονιδίωμα.

Αρκετοί είναι οι παράμετροι μπορούν να επηρεάσουν την αναπαραγωγικότητα των πρωτεϊνικών μαζών των βακτηρίων. Η προετοιμασία του δείγματος, η φάση ανάπτυξης των κυττάρων, οι συνθήκες ανάπτυξης, η διαφοροποίηση μεταξύ των οργάνων της φασματομετρίας (Freiwald et al., 2009).



Σε κάθε περίπτωση συστήνεται να συγκρίνονται πρωτεΐνες μικροοργανισμών, οι οποίοι έχουν αναπτυχθεί σε παρόμοιες συνθήκες, όσον αφορά κυρίως το μέσο και το χρόνο ανάπτυξης έτσι ώστε να εξαλειφθεί η περιπλοκότητα των δειγμάτων.

Έχει βρεθεί πως η παραλλαγή του υποστρώματος ανάπτυξης διαφοροποιεί την ποσοτικά και ποιοτικά το φάσμα κορυφών, κάτι που αντανακλά το γεγονός πως τα στοιχεία κάθε υποστρώματος καταστέλλουν ή προκαλούν τη σύνθεση συγκεκριμένων πρωτεϊνών.

Η κατάλληλες συνθήκες επεξεργασίας και τοποθέτησης του δείγματος στην πλάκα του Maldi-TOF MS, η επιλογή του κατάλληλου χημικού υποστρώματος αλλά και του διαλύτη, είναι ουσιώδη για την ακρίβεια του τελικού αποτελέσματος της μικροβιολογικής ταυτοποίησης καθώς επιδρούν στην ποιότητα του φάσματος. (Wunschel et al., 2005)

Θεμιτή είναι η κατά το δυνατόν ισχυρότερη οξύτητα του διαλύτη, δεδομένου ότι μέσω αυτού προάγεται ο ιονισμός των πρωτεϊνών και κατά συνέπεια η ένταση των λαμβανόμενων σημάτων. (Vargha et al., 2006)

Τυχόν όμως τέτοια προβλήματα μπορούν να περιοριστούν σημαντικά με την εκτέλεση πρωτοκόλλων αναφορικά με τις ειδικές διαδικασίες και απαιτήσεις της μεθόδου καθώς επίσης και την ανάπτυξη και χρήση πιο προηγμένων εργαλείων βιοπληροφορικής με πιο εξειδικευμένα λογισμικά ανάλυσης δεδομένων

### Πλεονεκτήματα μεθόδου που προκύπτουν:

- Γρήγορη και αυτοματοποιημένη μέθοδος με την μικρότερη προετοιμασία των δειγμάτων προς ανάλυση και χωρίς να προϋποθέτει παρά ελάχιστες πληροφορίες για αυτά (De Bruyne et al., 2011).
- Γρήγορη τεχνική, ικανή να ανιχνεύσει την παρουσία μικροοργανισμών σε ένα δείγμα χωρίς τη χρήση προκαθορισμένων στόχων (SDS-PAGE, primers) όπως γίνεται συνήθως κατά της εφαρμογή μοριακών τεχνικών.
- Μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα ανάλυσης από τις κλασσικές βιοχημικές μεθόδους ρουτίνας καθώς μπορεί να ανιχνεύσει και να ταυτοποιήσει ταυτόχρονα πολύ μεγάλο αριθμό δειγμάτων (Romanus et al., 2011).
- Μη ευαισθησία του φασματογράφου σε προσμίξεις μειώνει το συνολικό χρόνο ανάλυσης του δείγματος αφού δεν επιβάλλεται διαδικασία απομάκρυνσής τους όπως σε άλλες μεθόδους (Bright et al., 2002).
- Μεταξύ των τεχνικών της φασματομετρίας μαζών ο φασματογράφος Maldi-TOF MS πλεονεκτεί στο γεγονός ότι μπορεί να αναλύσει ανεπεξέργαστες πρωτεΐνες (crude proteins), υψηλού και χαμηλού μοριακού βάρους, που αποτελούν ένα σημαντικό μέρος της ξηρής μάζας των βακτηρίων (Jarman et al., 1999; Bright et al., 2002) και έτσι μπορούν να διακριθούν χωρίς αρχικό διαχωρισμό.

Τα βακτήρια είναι μια πηγή εγγενών πρωτεϊνικών δεικτών. Οι πεπτιδικές μάζες μπορούν σήμερα να χρησιμοποιηθούν για ακριβή ταξινόμηση και ταυτοποίηση των βακτηρίων (Freiwald et al., 2009).

Η Maldi-TOF MS σε αντίθεση με μεθόδους που βασίζονται στο DNA, στην ανίχνευση των πρωτεϊνών δεν απαιτεί ανάλυση ακολουθιών. Οι διαφορετικές μάζες εκπροσωπούν ένα συγκεκριμένο αποτύπωμα πρωτεΐνης και όλες μαζί δημιουργούν ένα φασματικό προφίλ που αντιπροσωπεύει ένα συγκεκριμένο μικροοργανισμό.

Υπάρχει μια συνεχής ανάγκη για βελτίωση των υπάρχουσών διαγνωστικών τεχνικών ή ανάπτυξη νέων που να προσφέρουν γρήγορη και αξιόπιστη ανίχνευση και ταυτοποίηση των μικροοργανισμών. Ενώ η τρέχουσα χρήση της Maldi-TOF MS παραμένει σχετικά περιορισμένη, παρουσιάζει σημαντική δυναμική στηριζόμενη σε σύγχρονες αναφορές που εμφανίζονται ιδιαίτερα ενθαρρυντικές ως προς την εξέλιξη της μεθόδου. Η διερεύνηση των διαθέσιμων βάσεων που πραγματοποιείται με τη συνεχή χρήση της μεθόδου και την τελική κατοχύρωση χαρακτηριστικών φασμάτων (spectral fingerprints) (Vanlaere et al., 2008; Lasch et al., 2008) για κάθε μικροοργανισμό, είναι θεμελιώδους σημασίας για την τεχνολογία τροφίμων.

### **Συμπεράσματα μελέτης**

- Στο σύνολο των 106 απομονώσεων από τη Στάκα κυριάρχησαν οι γαλακτοβάκιλλοι, οι εντερόκοκκοι και οι στρεπτόκοκκοι
- Η ταυτοποίηση δεν οδήγησε στην ανεύρεση κάποιου νέου είδους οξυγαλακτικού βακτηρίου. Παρόλα αυτά η βιοποικιλότητα της Στάκας, με την απουσία των λακτόκοκκων και παράλληλα την παρουσία του στελέχους του γένους *Aerococcus*, φαίνεται να είναι άκρως ενδιαφέρουσα για περαιτέρω διερεύνηση.
- Η εφαρμογή της Maldi-TOF MS για την ταυτοποίηση των βακτηριακών δειγμάτων οδήγησε στην ταυτοποίηση πάνω από το 95% των στελεχών. Συγκριτικά με τον όγκο των απομονώσεων, η ταχύτητα αλλά και η διακριτική της ικανότητα αποδείχθηκε άκρως ικανοποιητική.

## Παράρτημα

### Αντιδραστήρια Maldi-Tof

<i>Προϊόν</i>	<i>Εταιρία</i>	<i>Νο προϊόντος</i>	<i>Περιγραφή</i>
<b>Milli-Q</b>	Merck	1.11727.1000	Milli-Q water from Milli-Q Gradient 5 <sup>th</sup> floor: autoclaving + filtration Nalgene CN-filter
<b>Ethanol</b>	Merck	1.11670.1000	Ethanol, Gradient Grade for Liquid Chromatography, LiChrosolv <sup>®</sup>
<b>Formic acid</b>	Merck	1.11670.1000	Formic acid 98-100%, Suprapur <sup>®</sup>
<b>Acetonitrile</b>	Fluka	34967-1l	Acetonitrile, LC-MS CHROMASOLV <sup>®</sup> , >99,9%
<b>TFA</b>	Sigma-Aldrich	T62200-5ml	Trifluoroacetic acid, ReagentPlus <sup>®</sup> , 99%
<b>α-CHCA</b>	Fluka	70990-1g-F	α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid, puriss. p.a., matrix substance for MALDI-MS, 99.0% (HPLC)
<b>ACTH Fragment 18-39 Maldi-MS Standard</b>	Sigma	A8346-5x1VL	ProteoMass ACTH Fragment 18-39 MALDI-MS Standard, vial of 10 nmol, monoisotopic mol wt 2,464.1989 Da
<b>Insulin</b>	Sigma	I-5500	Insulin, from bovine pancreas, >27 units/mg (HPLC), monoisotopic mol wt 5733.49 Da
<b>Ubiquitin</b>	Sigma	U6253-5MG	Ubiquitin, from bovine red blood cells, minimum 90% (SDS-PAGE), monoisotopic mol wt 8560 Da
<b>Cytochrome C</b>	Sigma	C-7752	Cytochrom C, from horse heart, purity 99% based on watercontent, monoisotopic mol wt 12361.96 Da
<b>Myoglobin</b>	Sigma	M0630-250MG	Myoglobin, from equine skeletal muscle, 95-100%, essentially salt-free, monoisotopic mol wt 16952.50 Da
<b>Bacterial Test Standard (BTS)</b>	Bruker - Daltonics	#255343	Bruker Bacterial Test Standard, 5 Tubes
<b>Methanol</b>	BDH Prolabo	20864.320	Methanol Gradient Grade HiPerSolv CHROMANORM for HPLC
<b>2-Propanol</b>	Merck	1.01040.1000	2-Propanol, Gradient Grade for Liquid Chromatography, LiChrosolv <sup>®</sup>

<b>Προϊόν</b>	<b>Εταιρία</b>	<b>Νο προϊόντος</b>	<b>Περιγραφή</b>
<b>70% Formic acid</b>	Self made	-	70ml Formic acid + 30ml Milli-Q + 2ml TFA
<b>Acetonitrile:MQ:TFA (50:42:2)</b>	Self made	-	50ml Acetonitrile + 48ml Milli-Q + 2ml TFA
<b>0,1% Formic acid</b>		-	900μl Milli-Q + 100μl Formic acid
<b>ACTH (20pmol/μl)</b>	Self made	-	1 tube ACTH Fragment 18-39 MALDI-MS Standard + 500μl 0,1% Formic acid
<b>Insulin (348,76pmol/μl)</b>	Self made	-	1mg Insulin + 500μl 0,1% Formic acid
<b>Ubiquitin (233,48 pmol/μl)</b>	Self made	-	1mg Ubiquitin + 500μl 0,1% Formic acid
<b>Cytochrome (808,96 pmol/μl)</b>	Self made	-	5mg Cytochrome C + 500μl 0,1% Formic acid
<b>Myoglobin (589,88 pmol/μl)</b>	Self made	-	5mg Myoglobin + 500μl 0,1% Formic acid
<b>Stock Calibration Standard</b>	Self made	-	25μl ACTH (20pmol/μl) + 5,7 μl Insulin (418,51pmol/μl) + 8,6μl Ubiquitin (163,44pmol/μl) + 6,2μl Cytochrome (970,79pmol/μl) + 25,4μl Myoglobin (613,48pmol/μl) + 429,1μl 0,1% Formic acid
<b>Calibration Standard</b>	Self made	-	25μl Stock Calibration Standard + 75μl 0,1% Formic acid
<b>BTS stock solution</b>	Self made	-	500μl Acetonitrile + 475μl Milli-Q + 0,1% Formic acid
<b>Control Sample</b>	Self made	-	1 tube Bacterial Bacterial Test Standard (BTS) + 50μl BTS stock solutions

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abriouel, H., Martín-Platero, A., Maqueda, M., Valdivia, E., and Martínez-Bueno, M. 2008. Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* 127:200-208
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J., 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215, 403-10
- Angelakis, E., Million, M., Henry, M., and Raoult, D. 2011. Rapid and Accurate Bacterial Identification in Probiotics and Yoghurts by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Journal of Food Science* \_ Vol. 76, Nr. 8, 568-572
- Aponte, M., Fusco, V., Andolfi, R., and Coppola, S. 2008. Lactic acid bacteria occurring during manufacture and ripening of Provolone del Monaco cheese: Detection by different analytical approaches. *Int. Dairy J.* 18:403-413
- Axelsson, L. 1993. Lactic acid bacteria : classification and physiology in *Lactic Acid Bacteria*, Vol. 1, eds Salminen, S., von Wright , A., Dekkeren M., New York , pp. 1-63
- 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
- Bae, J.W., Rhee, S.K., Park, J.R., Chung, W.H., Nam, Y.D., Lee, I., Kim, H., and Park, Y.H. 2005. Development and evaluation of genome-probing microarrays for monitoring lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:8825-8835
- Benagli, C., Rossi, V., Dolina, M., Tonolla, M., Petrini, O. 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS ONE* (6),1
- 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
- Bernardeau, M., Vernoux, J.P., Henri-Dubernet, S., and Guéguen, M. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126:278-285
- Bessede, E., Angla-Gre, M., Delagarde, Y., Sep Hieng, S., Menard, A., Megraud, F. 2011. Matrix-assisted laser-desorption/ionization biotyper: experience in the routine of a University hospital. *Clin Microbiol Infect.*, 17:533-538
- Bright, J.J., Claydon, M.A., Soufian, M., Gordon, D.B. 2002. Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software. *J. Microbiol. Methods* 48:127–138

- Caplice, E., and Fitzgerald, G.F. 1999. Food fermentation : Role of microorganisms in food production and preservation . *Int J Food Microbiol*, 50 , 131-149
- Carol, AR, Leon MTD. 2010. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? *Archives of Microbiology* 193(3), 157-168
- Cash, P. 2002. Proteomics: the protein revolution. *Biologist (London)*, 49: 58-62
- Chavagnat, F., Haueter, M., Jimeno, J., Casey, M.G. 2002. Comparison of partial tuf gene sequences for the identification of lactobacilli. *FEMS Microbiol Lett* 217:177-83
- Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M., and Vernoux, J.P. 2003. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait* 83:269-306
- Collins, Y.F., McSweeney, P.L.H., and Wilkinson, M.G., 2003 . Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese : a review of current knowledge . *International Dairy Journal*, 13 , 841-866
- Collins, M. D., Rodrigues, U., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J. A. E, Martinez-Murcia, A., Phillips, B. A., Williams, A. M. and Wallbanks, S. 1999. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol Lett* 153, 5-12
- De Bruyne, K., Slabbinck, B., Waegeman, W., Vauterin, P., De Baets, B. and Vandamme, P. 2011. Bacterial species identification from MALDI-TOF mass spectra through data analysis and machine learning. *Systematic and Applied Microbiology* 34, 20-29
- De Bruyne, K., Schillinger, U., Caroline, L., Boehringer, B., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., DeVuyt, L., Franz, C.M.A.P., and Vandamme, P. 2007. *Leuconostoc holzapfelii* sp. nov., isolated from Ethiopian coffee fermentation and assessment of sequence analysis of housekeeping genes for delineation of *Leuconostoc* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:2952-2959
- Dellaglio, F. and Felis, G.E., 2005. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria, p. 25-50. In: Tannock, G. W. (Ed.), *Probiotics and prebiotics: scientific aspects*. Caister Academic Press, Wymondham, United Kingdom
- Doeven, M.K., Kok J. and Poolman B. 2005. Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Mol Microbio.*, 57(3), 640-649
- Fernandez, S., Ayora, S. and Alonso, J.C. 2000). *Bacillus subtilis* homologous recombination: genes and products. *Res Microbiol*, 151, 481-486
- Fernandez-Guerrero, M.L., Herrero, L., Bellver, M., Gadea, I., Roblas, R.F. and de Gorgolas, M. 2002. Nosocomial enterococcal endocarditis: a serious hazard for hospitalized patients with enterococcal bacteraemia. *J Intern Med* 252, 510-515

- Freiwald, A., Sauer, S. 2009. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *NATURE PROTOCOLS* VOL. 4 NO.5, 732-742
- Gantt, S., Valentine, N., Saenz, A., Kingsley M., Wahl, K. 1999. Use of an internal control for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of bacteria. *J Am Soc Mass Spectrom*, 10:1131-1137
- Garrity, G.M., and Holt, J.G. 2001. The road map to the manual . In : Boone DR, Castenholz RW (eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer Verlag, New York
- Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T.G., 2004. Taxonomic outline of the *Procaroyotes*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd edn. Vol. 2. New York, USA: Springer
- Giard, J. C., Laplace, J. M., Rincé, A., Pichereau, V., Benachour, A., Leboeuf, C., Flahaut, S., Auffray, Y. and Hartke, A. 2001. The stress proteome of *Enterococcus faecalis*. *Electrophoresis* 22, 2947-2954.
- Guilhaus, M. 1995. Principles and Instrumentation in Time-of-flight Mass Spectrometry, Physical and Instrumental Concepts. *Journal of Spectrometry* VOL.30 1519-1532
- Hansen, E.B. 2002. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology* , 78, 119-131
- Hsieh, S.Y., Tseng, C.L., Lee, Y.S., Kuo, A.J., Sun, C.F., Lin, Y.H., and Chen, J.K. 2008. Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS. *Mol. Cell. Proteomics* 7:448-456
- Hughenoltz, J., Kleerebezem, M. 1999. Metabolic engineering of lactic acid bacteria: overview of the approaches and results of pathway rerouting involved in food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology*, 10:492-497
- Jarman, H.K., Daly, S.D., Petersen, E.C., Saenz, J.A., Valentine, B.N., Wahl, L.K. 1999. Extracting and visualizing matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectral fingerprints. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 13:158-1594
- Karas, M. and Hillenkamp F. 1998. "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10.000 daltons." *Anal Chem* 60(20):2299-301
- Khalissani, K. 2011. An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences (IJB)*. Vol. 1, No. 3, p. 1-13, ISSN: 2220-6655 (Print) 2222-5234 (Online) <http://www.innspub.net>
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., and Reuter, G. 1998. Taxonomy and physiology of probioticlactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 41:103-125
- Knut, R., Flateland, S.L., Hanssen, J.F., Bengtsson, G., and Nissen, H. 2002. Development and evaluation of a 16S ribosomal DNA array-based approach for describing complex microbial communities in ready-to-eat vegetable salads packed in a modified atmosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1146-1156



- Lasch, P., Nattermann H, Erhard M., Stammier, M., Grunow, R., Bannert, N., et al. 2008. MALDI-TOF mass spectrometry compatible inactivation method for highly pathogenic microbial cells and spores. *Anal Chem*, 80:2026-2034
- Law, B.A (Ed.), 1997. Microbiology and Biochemistry of cheese and fermented milk. Second Edition. Blackie academic & professional. London. UK.
- Law, B.A. 2001 . Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for the technologies. *International Dairy Journal*, 11 , 383-398
- Lee, Y., Nomoto, K., Salimen, S., Gorbach S. 1999. Handbook of Probiotics. Jhon Wiley & Sons. Inc. New York. USA
- Liebler, D.C. 2002 Peptide sequence motif analysis of tandem MS data with the SALSA algorithm. *Anal. Chem.* 74, 203–210
- Lister, Joseph. 1878. On the lactic fermentation and its bearings on pathology. *Transactions of the Pathological Society of London*, Vol. 29, pages 425-7
- Liu, M., Bayjanov, J.R., Renckens, B., Nauta, A., J Siezen, R., et al. 2010. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics*, 11:36 <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/36>
- Liu, S.Q., Holland, R., and Crow, V.L. 2004. Esters and their biosynthesis in fermented dairy products : a review . *International Dairy Journal* , 14 (11) , 923-945
- Manso, M.A., Leonil, J., Jan, G., Gagnaire, V. 2005. Application of proteomics to the characterization of milk and dairy products. *International Dairy Journal* 15:845-855
- Marrilley, L., and Casey , M.G. 2004. Flavours of cheese products : metabolic pathways , analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology* , 90, 139-159
- Mazzeo, M.F., Sorrentino, A., Gaita, M., Cacace, G., Di Stasio, M., Facchiano, A., Comi, G., Malorni, A. & Siciliano, R.A. 2006. "Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry for the discrimination of food-borne microorganisms." *Applied and Environmental Microbiology* 72(2): 1180-1189
- McSweeney, P.L.H., and Fox , P.F. 2004 . Metabolism of residual lactose and lactate and of citrate. In *Cheese : Chemistry Physics and Microbiology* , vol 1 : General Aspects 3<sup>rd</sup> edn, pp 361-372. Fox P F McSweeney P L H Cogan T M and Guinee T P eds. London : Elsevier
- Meisel, H., and Bockelman, M. 1999. Bioactive peptides encrypted in milk proteins, proteolytic activation and thropho-functional properties. *Antoine van Leeuwenhoek*, 76-207
- Mitsuoka, T. 1992. The human gastrointestinal tract (Chapter 4). The lactic acid bacteria : *The lactic acid bacteria in health and disease*, Vol 1 (Wood BJB, ed). p. 76. Elsevier Science Publishers, Essex

- Monnet, V., Condon, S., Cogan, T.M., Gripon, J.C. 1996. Metabolism of starter cultures . In Dairy starter cultures , ed. T. M. Cogan and J. P. Accolas, VCH Publishers, Inc, New York, p. 47-99
- Monteoliva L., Pablo Albar J. 2004. Differential proteomics: An overview of gel and nongel based approaches BRIEFINGS IN FUNCTIONAL GENOMICS AND PROTEOMICS. VOL 3. NO 3. 220–239
- Mortomi, M. 1996. Properties of *Lactobacillus casei* Shirota strains as probiotics. *Asia Pac. J. Clin Nutr.* 5, 29-30.
- Naser, S.M., Dawyndt, P., Hoste, B., Gevers, D., Vandemeulebroecke, K., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., and Swings, J. 2007. Identification of lactobacilli by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:2777-2789
- Naser, S.M., Thomson, F.L., Hoste, B., Gevers, D., Dawyndt, P., Vancanneyt, M. and Swings, J. 2005b. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *PheS* genes. *Microbiology* 151, 2141-2150.
- Ntougias, S., G.I. Zervakis, C. Ehaliotis, N. Kavroulakis and K.K. Papadopoulou. 2006. Ecophysiology and molecular phylogeny of bacteria isolated from alkaline two-phase olive mill wastes. *Res. in Microbiol.* 157, 376-385
- Orla-Jensen, S. 1919. The lactic acid bacteria. *Memoirs of the Royal Academy of Sciences in Denmark Section of Sciences Series* 8(5): 81-197
- Østlie, H.M., Eliassen, L., Florvaag, A., and Skeie, S. 2005. Phenotypic and PCR-based characterization of the microflora in Präst cheese during ripening. *Int. Dairy J.* 15:911-920
- Ouweland, A.C., Salminen, S., Isolauri, E. 2002. Probiotics : an overview of beneficial effects . *Antoine van Leeuwenhoek* 82, 279-289
- Romanus, I. I., Thomas, Eze A., Egwu, O. A., Ngozi, A. F. and Chidiebube, N. A. 2011. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (Maldi-Tof MS) with conventional culture and biochemical method of bacteria identification to species level. *Journal of Medical Laboratory and Diagnosis* Vol.2(1) pp. 1-4
- Sahnouni, F., Matallah-Boutiba, A., Chemlal, D. and Boutiba, Z. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of marine fish in the Oran Algeria coast. 2012. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6(13), pp. 3125-3133, Available online at <http://www.academicjournals.org/AJMR>
- Salminen, S., Isolauri, E., 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier : successful strains and future challenges . *Antoine Van Leeuwenhoek* 70, 347-358

- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., Lee, Y.K. 1999. Probiotics : how should they be defined ? *Food Sci. Technol.* 10 , , 107-110
- Sanders, M. 2008. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clin Infect Dis* 46 (Suppl 2):S58-61
- Sanders, M.E. 1993. Summary of the conclusions from a consensus panel of experts on health attributes on lactic cultures : significance to fluid milk products containing cultures *J Dairy Sci.* 76, 1819-1828
- Sauer, S., Freiwald, A., Maier, T., Kube, M., Reinhardt, R., Kostrzewa, M., Geider, K. 2008. Classification and Identification of Bacteria by Mass Spectrometry and Computational Analysis. *PLoS ONE*, Volume3, Issue 7
- Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 71:394-406
- Shiffrin, E., Rochat, F., Link-Amster, H., et al. 1995. Immunomodulation of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci* 78, 491-497
- Schleifer, K.H., and Ludwig, W. 1995. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Syst. Appl. Microbiol.* 18:461-467
- Seng, P., Drancourt, M., Gourié, F., La Scola, B., Fournie, P., Rolain, J. and Raoult, D. 2009. Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clinical Infectious Diseases*, 49:543-51
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.D., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing D.H., Swaminathan B. 1995. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *Journal of clinical microbiology*, 33(9): p. 2233–2239
- Torriani, S., Felis, G. E. and Dellaglio, F. 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl Environ Microbiol* 67, 3450-3454.
- Van Veen, S.Q., Claas, E.C.J., Kuijper, E.J. 2010. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol.*, 48:900-907
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., and Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews* 60:407-438
- Vanlaere, E., Sergeant, K., Dawyndt, P., Kallow, W., Erhard, M., Sutton, H., Et al. 2008. Matrix assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry of intact cells allows rapid identification of *Burkholderia cepacia* complex. *J Microbiol Methods*, 75:279-286

- Vargha, M., Takáts, Z., Konopka, A. & Nakatsu, C.H. 2006. "Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates." *Journal of Microbiological Methods* 66(3): 399-409
- Wang, K.Y, Li, S.N, Liu, C.S, Perng, D.S, Su, Y.C, Wu, D.C, Jan, C.M, Lai, C.H, Wang, T.N, Wang, W.M. 2004. Effects of ingesting Lactobacillus and Bifidobacterium – containing yogurt in subjects with colonized Helicobacter pylori. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, , 737-741.
- Weckx, S., Allemeersch, J., Van der Meulen, R., Vrancken, G., Scheirlinck, I., Huys, G., Vandamme, P., Van Hummelen, P., and De Vuyst, L. 2008. Metatranscriptome analyses of lactic acid bacteria ecosystems using a species-independent functional gene microarray. 9th Symposium on Lactic Acid Bacteria: Health, Evolution and Systems Biology, August 31-September 4, Egmond aan Zee, The Netherlands
- Wilkins, M.R. (eds) 1997. *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*, Springer-Verlag
- Williams, A.G., Banks, J.M. 1997 Proteolytic and other hydrolytic enzyme activities in non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese manufactured in the United Kingdom. *International Dairy Journal* 7: 763-774
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 51:221-271
- Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., Smit, G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal* 12: 91-109
- Wunschel, S.C., Jarman, K.H., Petersen, CE, Valentine, N.B., Wahl, K.L., Schauki, D., Jackman, J., Nelson, C.P., White, et. 2005. Bacterial analysis by MALDI-TOF mass spectrometry: an inter-laboratory comparison. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16:456-462