

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ & ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΟΞΙΝΗΣ  
ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΗΣ ΚΑΤΑΠΙΟΝΗΣΗΣ  
ΣΤΗΝ ΟΞΕΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΤΟ ΠΡΩΤΕΩΜΑ  
ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ *Listeria monocytogenes* Scott A**



**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ  
ΝΙΚΟΛΑΟΥ Δ. ΑΝΔΡΙΤΣΟΥ**

**ΑΘΗΝΑ**

**2008**

**Εικόνες εξωφύλλου:**

Αριστερά: Τρυβλίο με αποικίες *Listeria* spp. σε θρεπτικό υλικό BBL CHROMagar, όπου έχει εφαρμοστεί η τεχνική της γραμμωτής ράβδωσης (streaking) για την απομόνωση των αποικιών.

Το BBL CHROMagar είναι ένα στερεό, εκλεκτικό υπόστρωμα κατάλληλο για απομόνωση, διαχωρισμό και ταυτοποίηση των ειδών *Listeria monocytogenes* και *Listeria ivanovii* από τρόφιμα, αλλά και από λαμβανόμενα περιβαλλοντικά δείγματα.

Άνω δεξιά: Συσκευή ισοηλεκτρικού εστιασμού Bio-Rad Protean IEF cell.

Κάτω δεξιά: Συσκευή ηλεκτροφόρησης Bio-Rad Protean II.

# ΝΙΚΟΛΑΟΣ Δ. ΑΝΔΡΙΤΣΟΣ

Υπότροφος του Κοινοφελούς Ιδρύματος Αλέξανδρος Σ. Ωνάσης

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

*ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΟΞΙΝΗΣ ΚΑΙ  
ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΚΗΣ ΚΑΤΑΠΟΝΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΟΞΕΟΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ  
ΚΑΙ ΤΟ ΠΡΩΤΕΩΜΑ ΤΟΥ ΠΑΘΟΓΟΝΟΥ *Listeria monocytogenes* Scott A*

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Π.Μ.Σ.)

«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

Επιβλέπων καθηγητής: Δροσινός Ελευθέριος

Εξεταστική Επιτροπή: Δροσινός Ελευθέριος

Σκανδάμης Παναγιώτης

Κωμαΐτης Μιχαήλ

Πανάγου Ευστάθιος

Παπανικολάου Σεραφείμ

Στον αδελφικό μου φίλο  
Αποστόλη

Για πολλούς οι «ευχαριστίες» στην αρχή μιας οποιασδήποτε εργασίας θεωρούνται ως κάτι το αναγκαίο και αναπόφευκτο, κομμάτι μιας τυπικής διαδικασίας το οποίο οφείλει να υπάρχει προκειμένου να προσδώσει στην εργασία μια αίσθηση ολοκλήρωσης. Αυτός είναι κι ο λόγος για τον οποίο η πλειονότητα των «ευχαριστιών» ενσωματώνεται συνήθως στον πρόλογο της κάθε εργασίας.

Σε αντίθεση με τα παραπάνω, από τη θέση αυτή, αισθάνομαι την ανάγκη να αναφερθώ, συνάμα δε την υποχρέωση να αφιερώσω έναν ξεχωριστό χώρο, στους ανθρώπους εκείνους που συνέβαλαν με τον έναν ή τον άλλο τρόπο στην εκπόνηση αυτής της μελέτης. Αρχικά λοιπόν, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Κοινοφελές Ίδρυμα Αλέξανδρος Σ. Ωνάσης για την τιμή που μου έκανε να με χρίσει υπότροφό του και να υποστηρίξει οικονομικά αλλά και ηθικά τις μεταπτυχιακές σπουδές μου, μέχρι και την εκπόνηση της παρούσας εργασίας. Ακόμη, ευχαριστώ ιδιαίτερος τον επιβλέποντα αυτής της μεταπτυχιακής ερευνητικής μελέτης, αλλά και γενικότερα της όλης μου πορείας μέχρι τώρα στο Π.Μ.Σ. «Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφή του Ανθρώπου», Επίκουρο Καθηγητή κ. Δροσινό Ελευθέριο, ο οποίος στάθηκε συνεχώς δίπλα μου κατά τη διάρκεια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών. Ένα μεγάλο ευχαριστώ επίσης, στον Λέκτορα κ. Σκανδάμη Παναγιώτη, μέλος της πενταμελούς συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής, για τις σημαντικές και καθοριστικές συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μελέτης. Εξάλλου, ειδική μνεία οφείλω να κάνω στον συνάδελφο Δρ. Παραμυθιώτη Σπυρίδων, μέλος του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για τη βοήθειά του και την πολύτιμη συμβολή του στην εκπόνηση αυτής της εργασίας. Χωρίς την ανεκτίμητη προσφορά του η παρούσα δεν θα μπορούσε να λάβει την τελική της μορφή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του εργαστηρίου και όλους όσοι άμεσα ή έμμεσα συνετέλεσαν στην ολοκλήρωση αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης. Μέσα σε αυτούς ξεχωριστή θέση κατέχει ο συνάδελφος Δρ. Ματαράγκας Μάριος, ο οποίος συνεισέφερε αποφασιστικά στην ευόδωση αυτής της προσπάθειας με την πρόθυμη και ανιδιοτελή συμμετοχή του στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Νικόλαος Δ. Ανδρίτσος

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	1
<b>SUMMARY</b>	2
<b>1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ</b>	3
<b>2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	5
<b>2.1. Ταξινόμηση και ταυτοποίηση <i>Listeria spp.</i></b> .....	5
2.1.1. Ταξινόμηση.....	5
2.1.2. Ταυτοποίηση.....	6
<b>2.2. <i>Listeria monocytogenes</i></b> .....	7
2.2.1. Εισαγωγικές πληροφορίες.....	7
2.2.2. Γενικά χαρακτηριστικά μικροοργανισμού.....	8
2.2.3. Επιδημιολογικά στοιχεία.....	9
2.2.4. Παθογένεια.....	12
2.2.5. Νοσολογία του ανθρώπου.....	13
2.2.6. Προληπτικά μέτρα.....	13
<b>2.3. Μηχανισμοί επιβίωσης <i>Listeria monocytogenes</i> υπό αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες</b> .....	15
2.3.1. Επιβίωση σε χαμηλές θερμοκρασίες.....	15
2.3.1.1. Αλλαγές στη σύσταση της μεμβράνης.....	15
2.3.1.2. Αλλαγές στην έκφραση γονιδίων και στην επαγωγή πρωτεϊνών	16
2.3.1.3. Συμβατικές ουσίες ως κρυοπροστατευτικές.....	17
2.3.1.4. Ο ρόλος του γενικού παράγοντα καταπόνησης "σίγμα" ( $\sigma^B$ ).....	18
2.3.2. Επιβίωση υπό όξινη καταπόνηση.....	18
2.3.2.1. Επαγωγή πρωτεϊνών.....	18
2.3.2.2. Ομοιόσταση του pH.....	19
2.3.2.3. Το σύστημα αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού.....	20
2.3.2.4. Ο ρόλος του γενικού παράγοντα καταπόνησης "σίγμα" ( $\sigma^B$ ).....	21
2.3.2.5. Ρυθμιστικά συστήματα δύο συστατικών.....	22

	Σελίδα
<b>2.4. Πρωτεομική.....</b>	<b>22</b>
2.4.1. Πρωτεομικές τεχνικές.....	23
2.4.1.1. Ηλεκτροφόρηση πηκτής δύο διαστάσεων.....	25
2.4.1.2. Φασματομετρία μάζας.....	27
2.4.2. Εφαρμογές στην επιστήμη και τεχνολογία τροφίμων.....	27
2.4.2.1. Η πρωτεομική στην επιστήμη του κρέατος.....	28
2.4.2.2. Η πρωτεομική στην επιστήμη των σιτηρών.....	29
2.4.2.3. Η πρωτεομική στην τεχνολογία τροφίμων.....	30
<b>2.5. Σκοπός της μελέτης.....</b>	<b>31</b>
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>32</b>
<b>3.1. Χρησιμοποιούμενα υλικά.....</b>	<b>32</b>
3.1.1. Ανόργανα και οργανικά χημικά αντιδραστήρια.....	32
3.1.2. Συστατικά θρεπτικών υποστρωμάτων.....	33
3.1.3. Θρεπτικά υποστρώματα.....	34
<b>3.2. Χρησιμοποιούμενος εργαστηριακός εξοπλισμός.....</b>	<b>34</b>
3.2.1. Όργανα και συσκευές.....	34
3.2.2. Σκεύη.....	34
<b>3.3. Χρησιμοποιούμενο στέλεχος.....</b>	<b>36</b>
<b>3.4. Πειραματική διαδικασία.....</b>	<b>36</b>
3.4.1. Λήψη στελέχους.....	36
3.4.2. Ανανέωση του μικροοργανισμού.....	36
3.4.3. Ενοφθαλμισμός.....	38
3.4.4. Χειρισμός βιομάζας.....	38
3.4.5. Διαδικασία όξινης πρόκλησης.....	39
3.4.6. Έκπλυση βιομάζας.....	42
3.4.7. Λύση κυττάρων.....	42
3.4.8. Μέθοδος Bradford.....	43

	Σελίδα
3.4.9. Κατακρήμνιση με τριχλωροξικό οξύ.....	44
3.4.10. Ανάκτηση πρωτεΐνης.....	45
3.4.11. Διαδικασία ηλεκτροφόρησης πηκτής δύο διαστάσεων.....	45
3.4.11.1. Προετοιμασία δείγματος.....	45
3.4.11.2. Ισοηλεκτρικός εστιασμός.....	46
3.4.11.3. Προετοιμασία για τη δεύτερη διάσταση.....	47
3.4.11.4. SDS-PAGE.....	49
3.4.12. Εμφάνιση πρωτεϊνών.....	50
3.4.12.1. Χρώση.....	50
3.4.12.2. Αποχρωματισμός.....	51
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>52</b>
<b>4.1. Γενικά.....</b>	<b>52</b>
<b>4.2. Επίδραση στην οξεοανθεκτικότητα.....</b>	<b>52</b>
4.2.1. Όξινη προσαρμογή.....	53
4.2.2. Θερμοκρασιακή προσαρμογή.....	54
4.2.3. Συνθήκες μη προσαρμογής.....	55
4.2.4. Σύγκριση μεταξύ συνθηκών προσαρμογής και μη προσαρμογής.....	56
<b>4.3. Επίδραση στο πρωτέωμα.....</b>	<b>57</b>
4.3.1. Δείκτης μοριακών βαρών.....	58
4.3.2. Αποτύπωση πρωτεϊνών.....	59
4.3.2.1. Όξινη προσαρμογή.....	59
4.3.2.2. Θερμοκρασιακή προσαρμογή.....	60
4.3.2.3. Συνθήκες μη προσαρμογής.....	60
4.3.2.4. Σύγκριση μεταξύ συνθηκών προσαρμογής και μη προσαρμογής.....	61
4.3.3. Ταυτοποίηση πρωτεϊνών.....	65
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>75</b>
<b>6. ΕΠΙΛΟΓΟΣ</b>	<b>77</b>



	<i>Σελίδα</i>
<b>7. ΠΙΝΑΚΕΣ - ΣΧΗΜΑΤΑ - ΕΙΚΟΝΕΣ</b>	78
<b>8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - ΑΡΘΡΟΓΡΑΦΙΑ</b>	81

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι ο προσδιορισμός του πρωτεϊνικού περιεχομένου κυττάρων του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* Scott A, τα οποία έχουν υποστεί διαφορετικού είδους προσαρμογή (όξινη και θερμοκρασιακή). Παράλληλα, αντικείμενο της παρούσας εργασίας αποτελεί η διερεύνηση της επίδρασης των προαναφερόμενων συνθηκών προσαρμογής στη φυσιολογία των εν λόγω κυττάρων του μικροοργανισμού, σε συνθήκες ισχυρά όξινης καταπόνησης.

Για τον προσδιορισμό του πρωτεϊνικού περιεχομένου κυττάρων του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* Scott A, γίνεται αρχικά απομόνωση των πρωτεϊνών από τις κυτταρικές καλλιέργειες του μικροοργανισμού, ενώ στη συνέχεια ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2-D electrophoresis), η οποία τελικά οδηγεί στην αποτύπωση της πρωτεϊνικής σύστασης του μικροοργανισμού πάνω σε πηκτή, υπό μορφή πρωτεϊνικού «χάρτη», για τις διαφορετικές συνθήκες προσαρμογής.

Όσον αφορά τη διερεύνηση της επίδρασης των προηγούμενων συνθηκών στη φυσιολογία των κυττάρων του συγκεκριμένου στελέχους, πραγματοποιείται έκθεση του μικροοργανισμού σε χαμηλές τιμές pH (3.0, 3.5, 4.0) με ταυτόχρονο προσδιορισμό της ανθεκτικότητάς του. Κάτι τέτοιο επιτυγχάνεται με τη βοήθεια της κλασικής μέτρησης/προσδιορισμού του μικροοργανισμού με χρήση τρυβλίων, τεχνική που οδηγεί σε κάθε περίπτωση στη δημιουργία των αντίστοιχων καμπύλων θανάτωσης, μέσω της σύγκρισης των κινητικών παραμέτρων των οποίων μπορούν να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα.

## SUMMARY

The purpose of this study is the determination of the protein composition of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes* Scott A, after acid and temperature adaptation, respectively. Furthermore, the study focuses on the effect that the previous conditions seem to have on the physiology of this particular strain, under acid stress conditions.

In every case, for the determination of the protein composition of *Listeria monocytogenes* Scott A, protein isolation is performed at first, which is then followed by two-dimensional electrophoresis, resulting finally in the fixing of the cell proteins onto a polyacrylamide gel.

Regarding the effect on physiology, cells of the above strain are exposed on low pH values (3.0, 3.5, 4.0) and their resistance is assessed through the use of the plate count method, which leads on modelling resistance of the strain for every single case. Comparison between the kinetic parameters of the models can lead to useful conclusions.

# 1

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τις τελευταίες τρεις δεκαετίες οι επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν αύξηση του αριθμού των τροφιογενών νοσημάτων. Ειδικότερα, αναφέρεται ότι ποσοστό 10-15% του πληθυσμού των ανεπτυγμένων χωρών, αντιμετωπίζει μια φορά το χρόνο κάποιο πρόβλημα τροφοδιαταραχής (Kaferstein, 2003). Πρόσφατα δεδομένα ανεβάζουν το ποσοστό αυτό για τις Η.Π.Α., περίπου στο 25%, όπου κατά προσέγγιση 76 εκατομμύρια άνθρωποι νοσούν, με συνέπεια να παρατηρούνται περί τις 325,000 περιπτώσεις νοσηλείας για παροχή ιατρικής περίθαλψης και 5,000 θάνατοι κάθε χρόνο (Mead et al., 1999· Anonymous, 2002· Rocourt et al., 2003). Το πρόβλημα οξύνεται στις αναπτυσσόμενες χώρες, όπου τα τροφιογενή νοσήματα και οι λοιμώξεις που οφείλονται σε νερό που δεν έχει υποστεί εξυγίανση αποτελούν το κύριο αίτιο πρόκλησης ασθενειών και θανάτων, ενώ είναι υπεύθυνες για το θάνατο περίπου 2 εκατομμυρίων ατόμων ετησίως, εκ των οποίων το μεγαλύτερο ποσοστό είναι παιδιά (Schlundt, 2002). Σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO) των Ηνωμένων Εθνών, μόνο το 2005, 1.8 εκατομμύρια άνθρωποι έχασαν τη ζωή τους εξαιτίας διαρροϊκών συνδρόμων, με την πλειοψηφία των περιπτώσεων αυτών να αποδίδεται σε τροφιογενή αίτια (Anonymous, 2002).

Κι όμως, παρόλα τα παραπάνω, δυστυχώς μόνον ένα πολύ μικρό ποσοστό, της τάξης του 5-10%, των συνολικών τροφιογενών νοσημάτων μικροβιολογικής αιτιολογίας γίνεται γνωστό και δηλώνεται στις επίσημες στατιστικές, διότι για να καταγραφεί μια περίπτωση θα πρέπει: το άτομο αφού μολυνθεί, να νοσήσει, να καταφύγει σε θεράποντα ιατρό, αυτός να ζητήσει εργαστηριακές εξετάσεις ώστε να απομονωθεί και να ταυτοποιηθεί ο υπεύθυνος μικροοργανισμός, να δηλωθεί το κρούσμα στις αρμόδιες υγειονομικές υπηρεσίες και τέλος να δημοσιευθούν τα στατιστικά στοιχεία. Εξάλλου, η έλλειψη οργανωμένης επιδημιολογικής παρατήρησης και συχνά η ήπια μορφή των συμπτωμάτων, που έχει ως αποτέλεσμα οι ασθενείς να μην επισκέπτονται τους γιατρούς,

είναι στοιχεία που συντελούν στην περαιτέρω μείωση του ποσοστού των καταγεγραμμένων τροφιμογενών νοσημάτων (Mossel et al., 1995· Βάσσος, 2004· Γενηγιώργης 2004).

Το κόστος των συνεπειών των τροφιμογενών ασθενειών είναι τεράστιο και αφορά, εκτός από τον άνθρωπο σε ατομικό επίπεδο, την κοινωνία γενικότερα (ιατρικές δαπάνες, απώλεια παραγωγικότητας, θάνατοι κ.λπ.), καθώς και τη βιομηχανία τροφίμων (απόσυρση τεραστίων ποσοτήτων προϊόντων, επιπλέον εργαστηριακοί έλεγχοι, απώλεια της αγοράς, νομικές δαπάνες για πρόστιμα, αμοιβές δικηγόρων, αποζημιώσεις κ.λπ.). Στις Η.Π.Α. υπολογίζεται ότι το ιατρικό κόστος και η απώλεια παραγωγικότητας μόνο από τα κύρια τροφιμογενή νοσήματα, ανέρχεται σε 37.1 δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως. Στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Ε.) το κόστος των διαταραχών που οφείλονται σε βιολογικούς παράγοντες υπολογίζεται σε 8.3 δισεκατομμύρια ευρώ ετησίως (Βάσσος, 2004).

Τα παραδοσιακά παθογόνα μικρόβια *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Shigella* spp., *Escherichia coli* και *Clostridium botulinum* αποτελούν τα κύρια αίτια τροφιμογενών νοσημάτων, η σημασία των οποίων διαφέρει από χώρα σε χώρα. Εντούτοις, νέοι, «αναδυόμενοι» ('emerging') παθογόνοι παράγοντες, οι οποίοι έχουν εμφανιστεί τις τρεις τελευταίες δεκαετίες, όπως η *Listeria monocytogenes*, έχουν παγκοσμίως θέσει σε συναγερμό τη βιομηχανία παραγωγής και προσφοράς τροφίμων.

# 2

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 2.1. Ταξινόμηση και ταυτοποίηση *Listeria* spp.

#### 2.1.1. Ταξινόμηση

Η συστηματική κατάταξη των *Listeria* spp. περιλαμβάνει την ταξινόμησή τους εντός του γένους *Listeria* στο οποίο και αντιστοιχούν. Το γένος *Listeria* ανήκει στην κλάση των βακίλλων (Bacilli), όπου εκεί μεταξύ άλλων ανευρίσκεται πληθώρα γνωστών γενών, όπως είναι τα γένη *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* και *Brochothrix*. Αυτή η φυλογενετική κατάταξη του *Listeria* sp. είναι συνεπής με τη χαμηλή περιεκτικότητα (36-42%) του DNA σε βάσεις G+C.

Το γένος ονομάστηκε προς τιμήν του Άγγλου χειρουργού Joseph Lister (1827-1912), εκ των θερμών υποστηρικτών της ασηπτικής χειρουργικής, ο οποίος εισήγαγε τη χρήση της φαινόλης (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH) για την απολύμανση των χειρουργικών οργάνων και τον καθαρισμό των πληγών. Το γένος *Listeria* περιλαμβάνει έξι είδη. Η *L. monocytogenes* είναι το ένα από αυτά τα έξι είδη, ενώ τα υπόλοιπα είναι τα *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri* και *L. grayi* (Rocourt, 1999). Ειδικότερα, εντός του είδους *L. ivanovii*, διακρίνουμε τα υποείδη *L. ivanovii* ssp. *ivanovii* και *L. ivanovii* ssp. *londoniensis* (Boerlin et al., 1992). Παλαιότερα υπήρχε ως ξεχωριστό είδος και το *L. murrayi*, το οποίο όμως σήμερα εντάσσεται στο *L. grayi* (Rocourt et al., 1992). Εξάλλου, στηριζόμενοι στα αποτελέσματα υβριδισμού DNA-DNA, της πολλαπλής ενζυμικής ανάλυσης και της αλληλουχίας του ριβοσωμικού RNA (rRNA) της 16S υπομονάδας του προκαρυωτικού ριβοσώματος, τα παραπάνω έξι είδη του *Listeria* sp. κατατάσσονται σε δύο ξεχωριστές κατηγορίες: α) την κατηγορία που περιλαμβάνει την *L. monocytogenes* και τα συγγενή με αυτήν είδη *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* και β) την κατηγορία όπου εντάσσεται η *L. grayi*. Όλα τα προηγούμενα είδη είναι ευρέως διαδεδομένα στο περιβάλλον, μόνον όμως η *L. monocytogenes* θεωρείται σημαντικό παθογόνο του ανθρώπου και των ζώων. Παρ' όλα αυτά, έχουν αναφερθεί σποραδικές

περιπτώσεις ανθρώπινης μόλυνσης με *L. ivanovii* και *L. seeligeri* (Gilot & Content, 2002), αν και η πρώτη από τις προαναφερόμενες δύο ευθύνεται κυρίως για αποβολές στα πρόβατα.

### 2.1.2. Ταυτοποίηση

Η ταυτοποίηση *Listeria* spp. βασίζεται σε έναν περιορισμένο αριθμό βιοχημικών δοκιμών, μεταξύ των οποίων σημαντική θέση καταλαμβάνει η αιμόλυση. Η ικανότητα αιμόλυσης χρησιμοποιείται για τη διάκριση ανάμεσα στην παθογόνο *L. monocytogenes* και στη *L. innocua*, το συχνότερα απαντώμενο μη παθογόνο είδος του *Listeria* sp. Η αιμόλυση όμως, το κατ' εξοχήν χαρακτηριστικό διαφοροποίησης *Listeria* spp., σε αρκετές περιπτώσεις μπορεί να είναι δύσκολο να διαπιστωθεί (ιδιαίτερα όταν αναφέρεται σε απομονώσεις από δείγματα τροφίμων και περιβάλλοντος). Η δοκιμή API για τη λιστέρια (API-*Listeria* test) (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) σχεδιάστηκε αποκλειστικά για το γένος *Listeria* και αποτελείται από δέκα επιμέρους βιοχημικές δοκιμές διαφοροποίησης, ενσωματωμένες μέσα σ' έναν μικροσωλήνα. Μια από αυτές τις δέκα επιμέρους δοκιμές του API-*Listeria* test είναι η "DIM", η οποία βασίζεται στην απουσία ή την παρουσία αρυλαμιδάσης, ενζύμου με το οποίο και επιτυγχάνεται η διάκριση ανάμεσα στη *L. monocytogenes* και στη *L. innocua* χωρίς επιπρόσθετες δοκιμές για διαπίστωση τυχόν αιμολυτικής ενεργότητας (Bille et al., 1992). Η ενεργότητα πεπτιδάσης επί αμινοξέων, όπως η αλανίνη και η γλυκίνη, προκαλεί παρόμοιες με την DIM αντιδράσεις και μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατά τον εργαστηριακό έλεγχο αντί της δοκιμής API (Clark and McLauchlin, 1997· McLauchlin 1997b).

Οι χρησιμοποιούμενες βιοχημικές δοκιμές για τον διαχωρισμό των *Listeria* spp. εμπλέκουν την παραγωγή οξέος από διαφορετικές πηγές άνθρακα, όπως D-ξυλόζη, L-ραμνόζη, α-μεθυλο-D-μαννόζη και D-μαννιτόλη. Η βιοχημική ταυτοποίηση των διαφόρων ειδών του γένους *Listeria* βάσει των προηγούμενων πηγών άνθρακα, φαίνεται στον Πίνακα 1. Δίχως τη χρήση της επιμέρους δοκιμής DIM, η αξιολόγηση της αιμολυτικής ικανότητας του εξεταζόμενου είδους είναι απαραίτητη, όπως προείπαμε, για τη διάκριση ανάμεσα στη *L. monocytogenes* και στη *L. innocua*.

Τα διάφορα στελέχη *Listeria* spp. διακρίνονται σε ορότυπους βάσει των σωματικών (O) και βλεφαριδικών (H) αντιγόνων τους (Seeliger & Jones, 1986· Allerberger, 2003).

Μέχρι σήμερα, για τη *L. monocytogenes* είναι γνωστοί οι ακόλουθοι 13 ορότυποι: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e και 7. Παρόμοια χαρτογραφημένα αντιγόνα ανευρίσκονται μεταξύ των ειδών *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri* και *L. welshimeri*. Η ορολογική τυποποίηση, μολονότι δεν επιτρέπει την ταυτοποίηση αυτού καθ' αυτού του είδους, εξυπηρετεί τόσο την επιβεβαίωση της διάγνωσης του *Listeria* sp. όσο και επιδημιολογικούς σκοπούς. Η εισαγωγή ενός εμπορικού σκευάσματος για την ορολογική τυποποίηση της λιστέριας (Denka Seiken, Tokyo, Japan) βελτίωσε αισθητά τη διαθεσιμότητα και χρήση της μεθόδου.

**Πίνακας 1:** Βιοχημικός διαχωρισμός των ειδών του γένους *Listeria* (Allerberger, 2007)

	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>
D-ξυλόζη	-	+	+	-	+	-
L-ραμνόζη	+	-	-	V	V	V
α-μεθυλο- D-μαννόζη	+	-	-	+	+	+
D-μαννιτόλη	-	-	-	-	-	+

+: θετική αντίδραση, -: αρνητική αντίδραση, V: μεταβλητή (variable) αντίδραση

## 2.2. *Listeria monocytogenes*

### 2.2.1. Εισαγωγικές πληροφορίες

Το βακτήριο *Listeria monocytogenes* (ελληνιστί Λιστέρια μονοκυτταρογόνος ή απλά λιστέρια), είναι το παθογόνο αίτιο της ασθένειας **λιστερίωση** (listeriosis). Η λιστέρια περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1923, ενώ τρία χρόνια αργότερα, το έτος 1926, απομονώθηκε για πρώτη φορά από τους Murray, Webb και Swann (Burrows, 1955), από αίμα ποντικών που έπασχαν από μηνιγγίτιδα. Χαρακτηριστικό της ήταν ο εξαναγκασμός του πάσχοντος τρωκτικού να σχηματίζει μεγάλο αριθμό μονοπύρηνων λευκοκυττάρων στο αίμα. Ονομάστηκε για το λόγο αυτό αρχικά *Bacterium monocytogenes* και στη συνέχεια *Listeria monocytogenes*. Την ίδια περίοδο διαπιστώθηκε ότι το βακτήριο ήταν παθογόνο και για τον άνθρωπο. Το 1927 οι Murray και Pirie, πειραματιζόμενοι ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο πάνω σε παρατηρούμενες εξάρσεις λιστερίωσης μεταξύ εργαστηριακών κουνελιών και ινδικών χοιριδίων αντίστοιχα, κατάφεραν να



απομονώσουν εκ νέου το βακτήριο (Rocourt, 1999). Η πρώτη καταγεγραμμένη περίπτωση ανθρώπινης λιστερίωσης αφορά έναν στρατιώτη στα τέλη του Α΄ Παγκοσμίου Πολέμου, ο οποίος έπασχε από μηνιγγίτιδα (McLauchlin, 1997a).

Οι προσβολές του ανθρώπου από το παθογόνο ήταν ασυνήθεις και μέχρι το 1955 ο συνολικός αριθμός περιπτώσεων για τις Η.Π.Α. έφθανε τις είκοσι. Πηγή μόλυνσεως θεωρήθηκαν από τότε τα τρωκτικά, τα οποία ρυπαίνουν τα τρόφιμα και έτσι μεταφέρουν το παθογόνο στον άνθρωπο. Η προκύπτουσα λιστερίωση θεωρήθηκε όμως ως εξόχως ενδιαφέρουσα πάθηση, γιατί εκτός από τη σοβαρότητά της και το μεγάλο ποσοστό θνητότητας, οδηγούσε στη μονοπυρηνογένεση. Πριν το 1982 η *L. monocytogenes* ενοχοποιούνταν για αποβολές και εγκεφαλίτιδες σε πολλά ζώα, ιδίως στα βοοειδή και στα πρόβατα, και συσχετιζόνταν με τη μίανση των ζωοτροφών. Παρόλο που εξ αρχής το βακτήριο είχε αναγνωριστεί ως παράγοντας πρόκλησης νόσου στον άνθρωπο, μόλις το 1981 έγινε κοινά αποδεκτός ο συσχετισμός του μικροοργανισμού με τα τρόφιμα.

Κατά τα τελευταία χρόνια, η λιστερίωση έχει συγκεντρώσει την προσοχή τόσο του ιατρικού κόσμου όσο και του καταναλωτικού κοινού, γιατί υπήρξαν κρούσματα ομαδικής προσβολής από *L. monocytogenes* τροφιμογενούς προέλευσης με οδυνηρές επιπτώσεις.

### 2.2.2. Γενικά χαρακτηριστικά μικροοργανισμού

Η *L. monocytogenes* είναι ένα μικρό σε σχήμα κοκκοβάκιλλου ή βάκιλλου, θετικό κατά Gram βακτήριο, μη σπορογόνο, δυνητικά αναερόβιο, κινητό στους 20-25°C και ακίνητο σε θερμοκρασίες άνω των 30°C. Αναπτύσσεται σε ευρέα όρια θερμοκρασίας, μεταξύ 1-45°C (είναι ψυχρότροφος μικροοργανισμός με άριστη ανάπτυξη στους 37°C) (Κοτζεκίδου-Ρουκά, 1993· Βάσσο, 2004) και pH από 4.4 έως 9.4 (με optimum τιμή pH 7.0) (Wederquist et al., 1994· Harris, 2002). Αντέχει στην ξηρασία, στην ψύξη και στη μεγάλη συγκέντρωση αλάτων (ανάπτυξη σε 10% NaCl ή 200 ppm NaNO<sub>3</sub> και επιβίωση σε 20-30% NaCl) (Harris, 2002). Με εξαίρεση ορισμένα στελέχη του, ο μικροοργανισμός παράγει καταλάση, ενώ και η δοκιμή οξειδάσης είναι θετική (Elsner et al., 1996). Πέραν τούτου, ο μικροοργανισμός διακρίνεται για την ικανότητα προσκόλλησής του σε επιφάνειες, με συνέπεια τον σχηματισμό βιοϋμενίων (biofilms), γεγονός που συμβάλλει στη διατήρηση του βακτηρίου ακόμη κι υπό αντίξοες συνθήκες

(Pritchard et al., 1995· Lewis, 2001· Mah & O' Toole, 2001· Midelet & Carpentier, 2002).

### 2.2.3. Επιδημιολογικά στοιχεία

Η *L. monocytogenes* απαντάται ευρέως στο φυσικό περιβάλλον (Harris, 2002· Allerberger, 2007). Πηγή των λιστεριών είναι το έδαφος, η βλάστηση, τα επιφανειακά νερά λιμνών και ποταμών, τα λύματα, η λάσπη των βιολογικών καθαρισμών και τα κόπρανα ανθρώπων και ζώων. Η επιβίωση του βακτηρίου στο έδαφος και στο νερό μπορεί να διαρκέσει χρονικό διάστημα μεγαλύτερο του έτους, κατά το οποίο είναι δυνατόν να μεταφέρεται από τις πηγές αυτές στις τροφές των ζώων και των ανθρώπων. Η επιβίωση της λιστέριας στα κόπρανα των ζώων μπορεί να διαρκέσει περισσότερο από δύο χρόνια.

Ο μικροοργανισμός απομονώνεται από θηλαστικά, πτηνά, τρωκτικά, ερπετά, ψάρια, ακόμη και έντομα. Η λιστέρια προσβάλλει πάνω από 50 είδη οικόσιτων και άγριων ζώων, πτηνών και ψαριών, μεταξύ των οποίων τις αγελάδες, τα πρόβατα, τις αίγες, του χοίρους και τα πουλερικά.

Δεξαμενή των λιστεριών αποτελούν τα άγρια θηλαστικά, από τα οποία μολύνονται κατοικίδια ζώα και άνθρωποι. Στα ζώα συχνά προκαλείται λοίμωξη του κεντρικού νευρικού συστήματος υπό μορφή εγκεφαλομυελίτιδας και αποβολές. Ιδιαίτερα ευπρόσβλητα είναι τα πρόβατα. Η εγκεφαλίτιδα λόγω λιστερίωσης στις αγελάδες συνδυάστηκε με αρκετές από τις επιδημίες λιστερίωσης στον άνθρωπο που μελετήθηκαν κατά την τελευταία δεκαετία (Βάσσος, 2004).

Ο κύριος τρόπος μετάδοσης του μικροοργανισμού στον άνθρωπο, εκτός από την άμεση μετάδοση από τα προσβεβλημένα ζώα, είναι τα μiasμένα τρόφιμα, όπου κατά καιρούς έχουν ενοχοποιηθεί το απαστερίωτο αλλά και το παστεριωμένο γάλα, τα γαλακτοκομικά προϊόντα (π.χ. μαλακά τυριά, παγωτό, βούτυρο κ.ά.), το κρέας και διάφορα κρεατοσκευάσματα (π.χ. λουκάνικα, ζυμούμενα αλλαντικά, πατέ κ.ά.), οι ωμές σαλάτες και τα λαχανικά (π.χ. ραπανάκια, μαρούλι, λάχανο), τα πουλερικά, τα ψάρια και τα οστρακοειδή (Farber & Daley, 1994· Mossel et al., 1995· Rocourt & Cossart, 1997· Heinritz & Johnson, 1998).

Ο μικροοργανισμός μιαίνει τα προαναφερόμενα τρόφιμα με έναν από τους ακόλουθους τρόπους:

- Μέσω της διασποράς του με τα κόπρανα ανθρώπων και ζώων στο περιβάλλον, οπότε συναντάται στο χώμα και στο νερό. Με τον τρόπο αυτό μιαίνονται εύκολα τα λαχανικά, τα ψάρια, τα οστρακοειδή, αλλά και έμμεσα τα άλλα τρόφιμα.
- Με την απευθείας μίανση προϊόντων προερχόμενων από μολυσμένα ζώα (π.χ. γάλα, τυρί, κρέας, πουλερικά, ψάρια, οστρακοειδή).
- Από ατυχείς χειρισμούς κατά την παρασκευή και διανομή των τροφίμων.

Σημαντικοί λόγοι που έχουν σχέση με την ανθεκτικότητα της *L. monocytogenes* και συνηγορούν για την αυξημένη επικινδυνότητά της είναι:

1. Η ικανότητά της να πολλαπλασιάζεται ακόμη και σε θερμοκρασίες ψυγείου (2-4°C). Για το λόγο αυτό τα τρόφιμα, εφόσον είναι μiasμένα, δεν προστατεύονται με την ψύξη (Harris, 2002· Βάσσος, 2004· Δροσινός, 2004).
2. Η σχετική ανθεκτικότητά της στη θέρμανση (Δροσινός, 2004· Μπαλατσούρας, 2006), με αποτέλεσμα το βακτήριο να επιβιώνει σε μια ήπια θερμική επεξεργασία (Αμβροσιάδης, 2005).
3. Η ανάπτυξή της σε συγκέντρωση διαλύματος NaCl μέχρι 10% (Harris, 2002), όταν η συνήθης συγκέντρωση του NaCl στα τυριά κυμαίνεται μεταξύ 2-5%.
4. Η ισχυρή λοιμογόνος δύναμή της, δεδομένου ότι αρκούν μόνο 100 κύτταρα του μικροοργανισμού ανά γραμμάριο (100 cfu/g) τροφίμου για να προκαλέσουν νόσο στον άνθρωπο (Harris, 2002· Βάσσος, 2004· Δροσινός, 2004· Κανονισμός 2073/2005/EK).

Τα στοιχεία που προωθήθηκαν στο WHO/Berlin σχετικά με τις καταγεγραμμένες τροφοδιαταραχές στη χώρα μας, δείχνουν, για την περίοδο 1993-1998, μόνο ένα (1) κρούσμα λιστερίωσης και αυτό το 1998 (Schmidt & Tirado, 2000), ενώ για τα έτη 1999 και 2000, επτά (7) και έξι (6) κρούσματα αντίστοιχα (Schmidt & Gervelmeyer, 2003). Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται συνοπτικά κρούσματα λιστεριώσεων που αναφέρθηκαν κατά τόπους, κατά την περίοδο 1976-2002.

**Πίνακας 2:** Κρούσματα τροφιμογενών λιστεριώσεων κατά τα έτη 1976-2002 (Αρβανιτογιάννης και συν., 2001· Ανδρίτσος και συν., 2008)

<i>Έτος</i>	<i>Ενεχόμενο Τρόφιμο</i>	<i>Χώρα</i>	<i>Κρούσματα</i>	<i>Θάνατοι</i>
1976	Ωμή σαλάτα	Η.Π.Α.	20	0
1978-1979	Ωμά λαχανικά	Αυστραλία	12	0
1979	Ωμά λαχανικά ή τυρί	Η.Π.Α.	20	3
1980	Νωπά ιχθυηρά	Νέα Ζηλανδία	22	6
1981	Διάφορα γαλακτοκομικά	Αγγλία	11	5
1981	Ωμά λαχανικά (κυρίως λαχανοσαλάτα)	Καναδάς	41	17
1983	Παστεριωμένο γάλα	Η.Π.Α.	49	14
1983-1987	Τυρί Vacherin Mont d' Or	Ελβετία	122	34
1985	Τυρί μεξικάνικου τύπου (από απαστερίωτο γάλα)	Η.Π.Α.	142	48
1986	Απαστερίωτο γάλα, ωμά λαχανικά	Αυστρία	28	5
1986-1987	Παγωτό, σαλάμι, τυρί Brie	Η.Π.Α.	36	16
1986-1987	Ωμά αβγά	Η.Π.Α.	2	άγνωστο
1987	Βούτυρο	Η.Π.Α.	11	άγνωστο
1987-1989	Πατέ & επαλειφόμενα προϊόντα κρέατος	Αγγλία	355	94
1989	Γαρίδες	Η.Π.Α.	2	0
1989-1990	Ημίσκληρα τυριά	Δανία	23	0
1990	Πατέ & επαλειφόμενα προϊόντα κρέατος	Αυστραλία	11	6
1991	Καπνιστά μύδια	Αυστραλία	4	0
1992	Καπνιστά μύδια	Νέα Ζηλανδία	4	0
1992	Πηκτή χοιρινού	Γαλλία	280	63
1993	Πατέ	Γαλλία	38	11
1994-1995	Καπνιστά ιχθυηρά	Σουηδία	9	2
1995	Μαλακά τυριά με >50% υγρασία (Brie, Camembert, Φέτα, Mozzarella)	Γαλλία	33	4
1997	Τυρί Pon l' Eveque	Γαλλία	14	0
1998-1999	Βούτυρο	Φινλανδία	25	6
1999	Πατέ	Η.Π.Α.	11	άγνωστο
1999-2000	Πηκτή χοιρινού	Γαλλία	26	7
2000	Έτοιμα προς κατανάλωση κρεατοσκευάσματα	Η.Π.Α.	29	7
2000-2001	Τυρί μεξικάνικου τύπου (από απαστερίωτο γάλα)	Η.Π.Α.	12	5
2002	Έτοιμα προς κατανάλωση κρεατοσκευάσματα	Η.Π.Α.	63	3

#### 2.2.4. Παθογένεια

Η *L. monocytogenes* είναι ένα ενδοκυτταρικό παράσιτο. Οι παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την παθογένειά της είναι η λιστεριολυσίνη O (LLO), η ειδική φωσφολιπάση της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης και η λεκιθινάση (Myers et al., 1993). Ο μικροοργανισμός εισάγεται στο κύτταρο μέσω των φαγοσωμάτων. Όταν το φαγόσωμα εισαχθεί στο κύτταρο, η μεμβράνη του λύεται και η *L. monocytogenes* απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα, όπου μπορεί να πολλαπλασιαστεί. Στη διαδικασία λύσης της μεμβράνης του φαγοσώματος εμπλέκονται τα ένζυμα που αναφέρθηκαν παραπάνω. Σημαντικό στοιχείο της παθογένειας είναι η ικανότητα του μικροοργανισμού να μεταδίδεται απευθείας από κύτταρο σε κύτταρο. Για να το επιτύχει αυτό, το βακτήριο χρησιμοποιεί τους μηχανισμούς του κυττάρου-ξενιστή για τη δημιουργία βλεφαρίδας, στον έναν από τους δύο πόλους του κυττάρου του. Αυτή η βλεφαρίδα εξυπηρετεί στην προώθηση του μικροοργανισμού κατά μήκος του κυτταροπλάσματος και στη μετατόπιση και τοποθέτησή του δίπλα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή. Εκεί εξαιτίας της υφιστάμενης ώθησης από τον μικροοργανισμό, δημιουργείται μια προεκβολή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, η οποία μπορεί να εισαχθεί σε ένα γειτονικό κύτταρο. Όπως και στην περίπτωση του φαγοσώματος, ακολουθεί λύση της κυτταροπλασματικής μεμβράνης της προεκβολής, που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του παθογόνου στο κυτταρόπλασμα του νεοπροσβληθέντος κυττάρου (Harris, 2002· Allerberger 2007).

Αρχικά λοιπόν, η λιστέρια αναπτύσσεται στο έντερο, ενώ στη συνέχεια τα κύτταρά της διηθούν τον εντερικό βλεννογόνο και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, αφού πρώτα εισδύσουν στα φαγοσώματα, μεταφέρονται στα διάφορα όργανα (όπως συκώτι, σπλήνα κ.ά.) και στους ιστούς γενικά (Μπαλατσούρας, 2006). Περαιτέρω διασπορά του μικροοργανισμού, πάντα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, στον εγκέφαλο ή τον πλακούντα των εγκύων γυναικών, δύναται να προκύψει, προκαλώντας σοβαρές παθολογικές καταστάσεις, ενίοτε μοιραίες, ιδιαίτερα αν η αντοχή του προσβαλλόμενου οργανισμού είναι μειωμένη.

### 2.2.5. Νοσολογία του ανθρώπου

Η τροφιμογενής λιστερίωση εμφανίζεται στον άνθρωπο με μορφή σποραδικών κρουσμάτων ή επιδημιών.

Η περίοδος επώασης της ασθένειας εξαρτάται από την ευπάθεια του προσβεβλημένου ατόμου και τον λαμβανόμενο με το τρόφιμο πληθυσμό του μικροοργανισμού. Ως εκ τούτου η περίοδος αυτή ποικίλλει σημαντικά, ενώ έχουν καταγραφεί περίοδοι επώασης από 24 ώρες έως και 91 ημέρες. Άλλοι λόγοι, εκτός των δύο που μόλις αναφέραμε, οι οποίοι να δικαιολογούν αυτή την παρατηρούμενη ευρύτητα φάσματος της περιόδου επώασης, δεν είναι γνωστοί (Harris, 2002).

Τα συμπτώματα μπορεί να είναι ήπια με τη μορφή τοπικής λοίμωξης του δέρματος ή να μοιάζουν με εκείνα της γρίπης, με εντόπιση κυρίως στο αναπνευστικό σύστημα. Συνήθως όμως η λιστερίωση παρουσιάζεται ως μηνιγγοεγκεφαλίτιδα με μικροβιαμία (Βάσσος, 2004· Allerberger, 2007). Σε γενικές γραμμές, τα συμπτώματα από προσβολή από *Listeria spp.* συνίστανται στην εμφάνιση μηνιγγίτιδων και γενικά διαταραχών του νευρικού συστήματος (Γενηγιώργης, 2004).

Το τυπικότερο σύμπτωμα είναι η πολυμορφοπύρηνη λευκοκυττάρωση (polymorphonuclear leukocytosis) και αργότερα η μονοπύρηνη λευκοκυττάρωση. Στα κανονικής ηλικίας άτομα η λιστερίωση εκδηλώνεται σε ποσοστό 55% ως μηνιγγίτιδα, 25% ως βακτηριαιμία και 7% άτυπες νοσηρές καταστάσεις (Μπαλατσούρας, 2006). Η θνητότητα της νόσου είναι μεγάλη και κυμαίνεται σε υψηλά επίπεδα (20-35% των προσβεβλημένων ατόμων) (Harris, 2002· Δροσινός, 2004) και ανάλογα με τις περιπτώσεις προσβάλλονται οι μήνιγγες, ο σπλήνας, το ήπαρ, ο θυρεοειδής αδένας κ.λπ., με συνέπεια την εμφάνιση φλεγμονών και νεκρωτικών τόπων. Στις ομάδες ειδικού κινδύνου στη νόσο, όπως τα νεογνά, οι ηλικιωμένοι και οι ανοσοκατεσταλμένοι, το ποσοστό θνητότητας εκτοξεύεται σε επίπεδα που μπορεί να φτάσουν και το 65% (Βάσσος, 2004).

### 2.2.6. Προληπτικά μέτρα

Για το γενικό πληθυσμό, που περιλαμβάνει και το καταναλωτικό κοινό, είναι αναγκαία η τήρηση των ακόλουθων προληπτικών μέτρων για την αποφυγή προσβολής από *L. monocytogenes* και την πρόκληση τροφιμογενούς λιστερίωσης (Βάσσος, 2004):

- Καθαριότητα και υγιεινή των ατόμων, ιδιαίτερα όσων έρχονται σε επαφή με ζώα λόγω επαγγέλματος ή λόγω του ότι διατηρούν οικιακά ζώα.
- Αποφυγή κατανάλωσης και χρήσης απαστερωτού γάλακτος.
- Καλό πλύσιμο των λαχανικών, ιδιαίτερα αυτών που προορίζονται να καταναλωθούν ωμά σε σαλάτες και γενικά καλό πλύσιμο όλων των τροφίμων πριν μαγειρευτούν.
- Ικανοποιητική θέρμανση των μαγειρεμένων τροφίμων μέχρι του κέντρου της μάζας τους.
- Διατήρηση των ωμών τροφίμων (π.χ. λαχανικά, τυριά, κρέατα κ.λπ.) καλά καλυμμένων, μακριά από μαγειρεμένα φαγητά.
- Λήψη μέτρων υγιεινής στην κουζίνα, που μεταξύ άλλων θα περιλαμβάνουν οπωσδήποτε το καλό πλύσιμο των εργαλείων και σκευών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον χειρισμό ωμών τροφίμων.

Επιπλέον, εκτός από τα μέτρα που απευθύνονται στο γενικό πληθυσμό, πρέπει να λαμβάνονται και άλλα πιο ειδικά, όπως τα παρακάτω:

- Εξυγίανση του ζωικού πληθυσμού από τη νόσο.
- Βελτίωση των συνθηκών επεξεργασίας και παραγωγής των τροφίμων και αναζήτηση των κρίσιμων σημείων ελέγχου της υγιεινολογικής επιβάρυνσης (HACCP) με *Listeria monocytogenes*, κατά την παραγωγική διαδικασία του προϊόντος. Πρέπει να σημειωθεί ότι, λόγω της ευρείας εξάπλωσής της στο περιβάλλον και της αυξημένης ανθεκτικότητας που παρουσιάζει, η λιστέρια μπορεί εύκολα να επιβιώσει εντός των εγκαταστάσεων παραγωγής τροφίμων, ευρισκόμενη προσκολλημένη σε δάπεδα, επιφάνειες ή/και τμήματα μηχανολογικού εξοπλισμού επεξεργασίας τροφίμων, ενοφθαλμίζοντας κατ' αυτόν τον τρόπο συνεχώς τα παραγόμενα τελικά προϊόντα.
- Μικροβιολογικός έλεγχος των προϊόντων, προτού αυτά αποδοθούν προς κατανάλωση.
- Ενημέρωση του καταναλωτικού κοινού και ιδιαίτερα των ευπαθών ατόμων για την οικολογία της *L. monocytogenes* και ενδεχόμενους κινδύνους που παρουσιάζουν ορισμένα τρόφιμα.
- Προστασία των ομάδων ειδικού κινδύνου από συμπεριφορές δυνητικής μετάδοσης της μόλυνσης, ήτοι αποφυγή εισόδου στο περιβάλλον τους πασχόντων ζώων, αποφυγή κατανάλωσης μαλακών τυριών (π.χ. Brie, Camabert, Φέτα κ.λπ.) και

ανεπαρκώς ψημένων κρεάτων ή προπαρασκευασμένων τροφών που διατηρούνται στο ψυγείο επί μακρόν κ.λπ.

### **2.3. Μηχανισμοί επιβίωσης *Listeria monocytogenes* υπό αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες**

#### **2.3.1. Επιβίωση σε χαμηλές θερμοκρασίες**

Όπως είδαμε και προηγουμένως (παρ. 2.2.2.), η *L. monocytogenes* έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε ευρέα όρια θερμοκρασίας (1-45°C). Ως εκ τούτου, η αρχική επιβίωση και η εν συνεχεία παρατηρούμενη ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε θερμοκρασίες ψυγείου (2-4°C), είναι δύο εκ των πολλών παραγόντων που καθιστούν δύσκολο τον έλεγχο του τροφιμογενούς αυτού παθογόνου παράγοντα (Rocourt & Cossart, 1997). Δεδομένου ότι η ψύξη είναι ίσως ο περισσότερο κοινός τρόπος αύξησης του χρόνου εμπορίας των τροφίμων, η κατανόηση των μηχανισμών επιβίωσης και ανάπτυξης σε χαμηλές θερμοκρασίες, θα παρείχε χρήσιμες πληροφορίες προς την κατεύθυνση εύρεσης αποτελεσματικότερων μεθόδων ελέγχου του συγκεκριμένου παθογόνου.

##### **2.3.1.1. Αλλαγές στη σύσταση της μεμβράνης**

Τα λιπίδια στις μεμβράνες των βακτηριακών κυττάρων βρίσκονται σε μια υγρή, ταυτοχρόνως δε, κρυσταλλική φάση και αυτή η φυσική κατάσταση (υγροκρυσταλλική) είναι σημαντική για τη διατήρηση της ρευστότητας και λειτουργικότητας της μεμβράνης. Ενδεχόμενες θερμοκρασιακές μεταβολές οδηγούν σε τροποποίηση της λιπιδικής σύστασης της μεμβράνης, έτσι ώστε να διατηρηθεί η ιδανική ρευστότητά της που απαιτείται για την κατάλληλη ενζυμική ενεργότητα και τη μεταφορά ουσιών κατά μήκος αυτής. Η κυτταρική μεμβράνη των διαφόρων *Listeria* spp. χαρακτηρίζεται από μια υψηλή αναλογική συμμετοχή ίσο- (iso), αντίσο- (anteiso), διακλαδισμένων και με περιττό αριθμό ατόμων άνθρακα, λιπαρών οξέων (Annous et al., 1997). Οι αλλαγές που επισυμβαίνουν στη σύσταση των λιπαρών οξέων της μεμβράνης της *L. monocytogenes*, ως αποτέλεσμα της έκθεσής της σε χαμηλή θερμοκρασία, έχουν εκτεταμένα μελετηθεί. Μια από τις κυριότερες αλλαγές είναι η αύξηση του ποσοστού των κορεσμένων λιπαρών



οξέων με 15 άτομα άνθρακα στην αλειφατική ανθρακική τους αλυσίδα ( $C_{15:0}$ ), εις βάρος εκείνων των λιπαρών οξέων που έχουν αντίστοιχα 17 άτομα άνθρακα ( $C_{17:0}$ ), όταν η θερμοκρασία μειώνεται κάτω από τους  $7^{\circ}C$ . Επίσης, η ανάπτυξη σε χαμηλές θερμοκρασίες έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του βαθμού ακορεστότητας των λιπαρών οξέων, γεγονός που συντελεί στην επαύξηση της ρευστότητας της μεμβράνης (Beales, 2004). Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι μείωση της θερμοκρασίας ανάπτυξης από τους  $20^{\circ}C$  στους  $5^{\circ}C$ , εκτός από την κατεύθυνση σύνθεσης λιπαρών οξέων μικρότερης ανθρακικής αλυσίδας, με ταυτόχρονη μείωση στη σύνθεση των  $C_{17:0}$ , επιφέρει και μετατροπή των διακλαδισμένων ίσο- (iso) λιπαρών οξέων σε διακλαδισμένα αντίσο- (anteiso) (συγκεκριμένα i- $C_{15:0}$  σε a- $C_{15:0}$ ) (Annous et al., 1997· Παραμέρα και συν., 2005). Τα αποτελέσματα των προηγούμενων ερευνών, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι αντιβακτηριακοί παράγοντες που επηρεάζουν τον μεταβολισμό των διακλαδισμένων λιπαρών οξέων, θα μπορούσαν κάλλιστα να αποτελέσουν μια δυναμική προσέγγιση για τον έλεγχο της ανάπτυξης της *L. monocytogenes* σε χαμηλές θερμοκρασίες (Παραμέρα και συν., 2005). Εξάλλου, η μείωση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας των λιπαρών οξέων, ελαττώνει την αλληλεπίδραση μεταξύ ατόμων άνθρακα γειτονικών αλυσίδων στην κυτταρική μεμβράνη και αυτό βοηθά στη διατήρηση του βέλτιστου βαθμού ρευστότητας της μεμβράνης, για ανάπτυξη σε χαμηλές θερμοκρασίες (Beales, 2004).

### 2.3.1.2. Αλλαγές στην έκφραση γονιδίων και στην επαγωγή πρωτεϊνών

Η *L. monocytogenes*, ως αποτέλεσμα της απότομης έκθεσής της σε χαμηλές θερμοκρασίες, παράγει κάποιες εξειδικευμένες πρωτεΐνες, γνωστές ως πρωτεΐνες ψυχρής κατάπληξης (cold shock proteins, Csps), ενώ κατά την προσαρμογή και ισορροπημένη ανάπτυξή της στις εν λόγω θερμοκρασίες, συνθέτει τις λεγόμενες πρωτεΐνες ψυχρού εγκλιματισμού (cold acclimation proteins, Caps) (Bayles et al., 1996). Οι Bayles et al. (1996) υπέβαλλαν την *L. monocytogenes* σε μια θερμοκρασιακή κατάπληξη από τους  $37^{\circ}C$  στους  $5^{\circ}C$  και χρησιμοποίησαν την ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (2-D electrophoresis) για την ταυτοποίηση των επαγόμενων, εκ της ψυχρής κατάπληξης, πρωτεϊνών. Βρέθηκε λοιπόν, ότι περί τις 12 πρωτεΐνες (Csps) επάχθηκαν στις θερμοκρασιακά καταπληγέντες καλλιέργειες του μικροοργανισμού, ενώ επιπλέον 4 πρωτεΐνες (Caps που αναγνωρίστηκαν κι αυτές ως Csps) παρήχθησαν κατά τη διάρκεια

ισορροπημένης ανάπτυξης στους 5°C συγκριτικά με τους 37°C (Bayles et al., 1996). Ο ψυχρός εγκλιματισμός ενός παθογόνου συνοδεύεται από αλλαγές στην έκφραση του μικροβιακού γονιδιώματος. Οι Liu et al. (2002) ταυτοποίησαν μόρια RNA, τα οποία συντίθενται σε υψηλότερα επίπεδα όταν η *L. monocytogenes* αναπτύσσεται στους 10°C απ' ότι στους 37°C. Η αυξημένη έκφραση mRNA για σύνθεση πρωτεασών, όπως η GroEL, η ClpP και η ClpB, υποδηλοί την πιθανή εμπλοκή αυτών των ενζύμων στην αποδιάταξη αφύσικων ή «τραυματισμένων» πολυπεπτιδίων που προκύπτουν ένεκα της ανάπτυξης σε χαμηλές θερμοκρασίες (Liu et al., 2002).

### 2.3.1.3. Συμβατικές ουσίες ως κρυοπροστατευτικές

Η ικανότητα της *L. monocytogenes* να συσσωρεύει συμβατικές ουσίες, όπως η γλυκίνη ( $C_2H_5NO_2$ ), η βεταΐνη και η καρνιτίνη ( $C_7H_{15}NO_3$ ), καθώς και ο κρυοπροστατευτικός ρόλος αυτών των συστατικών, είναι δεδομένα που έχουν ευρύτατα μελετηθεί. Οι Angelidis and Smith (2003) διερεύνησαν την αντίληψη της ύπαρξης και τη συσσώρευση συμβατικών ουσιών σε κύτταρα, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης αυτών των κυττάρων σε θερμοκρασίες ψύξης. Δημιουργήθηκαν μεταλλάξεις της *L. monocytogenes* για τη μελέτη του ρόλου τριών συστημάτων συμβατικών ουσιών: του μεταφορέα I γλυκίνης-βεταΐνης (BetL), του μεταφορέα II γλυκίνης-βεταΐνης (Gbu) και του μεταφορέα καρνιτίνης (OpuC). Κατά βάση, η μεταφορά της βεταΐνης εντός του κυττάρου διεξάγεται διαμέσω του Gbu. Η διά ουσιών παρεχόμενη κρυοπροστατευτική δράση, επάγει την ανάπτυξη κυττάρων που έχουν υποστεί ψυχρή κατάπληξη. Μικρά ποσά βεταΐνης μεταφέρθηκαν επίσης διαμέσω του BetL και του OpuC. Για την καρνιτίνη, η αυξημένη αντίληψη ύπαρξής της καθώς και η είσοδός της στο κύτταρο οφείλεται στον OpuC, με τον Gbu και τον BetL να ευθύνονται για τη μεταφορά μικρών μόνο ποσοτήτων της ουσίας, παρέχοντας ουσιαστικά στο κύτταρο ασθενή κρυοπροστασία (Angelidis & Smith, 2003). Πέραν τούτου, οι Wemekamp-Kamphuis et al. (2004) απέδειξαν ότι ενδεχόμενη απαλοιφή των προαναφερόμενων ωσμωτικών μεταφορέων, μειώνει την ικανότητα ανάπτυξης της λιστέριας σε χαμηλές θερμοκρασίες (Wemekamp-Kamphuis et al., 2004).

#### 2.3.1.4. Ο ρόλος του γενικού παράγοντα καταπόνησης "σίγμα" ( $\sigma^B$ )

Η επιβίωση των βακτηρίων υπό αντίξοες συνθήκες περιβάλλοντος σχετίζεται με μεταβολές κατά τη διαδικασία μεταγραφής των γονιδίων, η οποία και είναι εφικτή λόγω της παρατηρούμενης συσχέτισης των επιμέρους εναλλακτικών παραγόντων "σίγμα" με την ζωτικής σημασίας πολυμεράση του RNA. Ένας τέτοιος επιμέρους εναλλακτικός παράγοντας "σίγμα" είναι και ο  $\sigma^B$ , η παρουσία του οποίου επιβεβαιώθηκε σε θετικά κατά Gram βακτήρια, όπως τα *Bacillus subtilis* και *L. monocytogenes*. Στην περίπτωση της *L. monocytogenes*, ο γενικός παράγοντας καταπόνησης  $\sigma^B$  διεγείρεται σε πιθανή θερμοκρασιακή μείωση και το μεταλλαγμένο στέλεχος *sigB* αποτυγχάνει να συσσωρεύσει κρυοπροστατευτικές ουσίες, όπως βεταΐνη και καρνιτίνη (Becker et al., 2000). Το γεγονός αυτό, αβίαστα οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η συσσώρευση ουσιών με κρυοπροστατευτική δράση, είναι μια από τις λειτουργίες του  $\sigma^B$  κατά την ανάπτυξη σε χαμηλή θερμοκρασία.

#### 2.3.2. Επιβίωση υπό όξινη καταπόνηση

Σε αρκετές περιπτώσεις η *L. monocytogenes* συναντά ένα δυσμενές γι' αυτήν περιβάλλον, το οποίο χαρακτηρίζεται από μεγάλη συγκέντρωση ιόντων  $H^+$ , συνεπεία της οποίας είναι το χαμηλό pH αυτού του περιβάλλοντος. Χαρακτηριστικές τέτοιες περιπτώσεις χαμηλού pH αφορούν τα όξινα τρόφιμα, τη διέλευση από το στόμαχο, καθώς και το εσωτερικό στο φαγόσωμα του μακροφάγου (Cotter & Hill, 2003). Αυτά τα δυσμενή λοιπόν περιβάλλοντα, το παθογόνο τα αντιπαρέρχεται επιτυχώς και επιβιώνει, κινητοποιώντας πλειάδα προσαρμοστικών μηχανισμών στις υφιστάμενες καταπονήσεις. Η έκθεση της *L. monocytogenes* στο μετρίως όξινο pH 5.5 (1 M γαλακτικού οξέος) επάγει την ανεκτικότητα στο οξύ (**acid tolerance response, ATR**), οπότε τα κύτταρα καθίστανται ανθεκτικά σε ακραία όξινη συνθήκες (O' Driscoll et al., 1996).

##### 2.3.2.1. Επαγωγή πρωτεϊνών

Η ανταπόκριση στο οξύ κατά την έκθεση κυττάρων σε όξινο pH, επιφέρει πολλές αλλαγές σε κυτταρικό επίπεδο. Οι Phan-Thanh and Mahouin (1999) μελέτησαν την έκφραση πρωτεϊνών, εκθέτοντας κύτταρα αφενός σε ένα θανατηφόρο όξινο pH (**όξινη καταπόνηση** ή **καταπόνηση με χρήση οξέος, acid stress**), αφετέρου δε σε ένα μη

θανατηφόρο όξινο pH (όξινη προσαρμογή ή προσαρμογή παρουσία οξέος, **acid adaptation**). Παρόλο που επάχθηκαν περισσότερες πρωτεΐνες κατά την έκθεση κυττάρων στο θανατηφόρο pH, η πλειοψηφία των επαγόμενων πρωτεϊνών ήταν κοινές και για τις δύο περιπτώσεις pH που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη. Όμοια με την ανάπτυξη λιστέριας σε χαμηλή θερμοκρασία, η πρωτεΐνη GroEL παρουσίασε αυξημένη σύνθεση υπό όξινη καταπόνηση. Οι επαγόμενες πρωτεΐνες περιλαμβάνουν και τη συνθετάση του ATP καθώς και ποικίλλους ρυθμιστές της μεταγραφής γονιδίων (Phan-Thanh & Mahouin, 1999). Η προσαρμοσμένη στο οξύ *L. monocytogenes* (pH 5.2, 2h) παρουσιάζει αυξημένη ανθεκτικότητα, τόσο σε θερμική (52°C) όσο και σε ωσμωτική κατάπληξη (25-30% NaCl), καθώς και σε αλκοολική καταπόνηση, γεγονός που υποδεικνύει ότι η όξινη προσαρμογή παρέχει επίσης προστασία έναντι άλλων παραγόντων καταπόνησης (Phan-Thanh et al., 2000). Αυτή η προστασία των όξινα προσαρμοσμένων κυττάρων έναντι άλλων καταπονήσεων, έχει σημαντικές επιπτώσεις στη βιομηχανία τροφίμων, ιδιαίτερα δε αν αναλογιστούμε το γεγονός πως κατά την επεξεργασία των τροφίμων συναντάται πληθώρα υποθανάτιων όξινων μεταχειρήσεων (van Schaik et al., 1999).

### 2.3.2.2. Ομοίωση του pH

Οι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να διατηρούν σταθερό το ενδοκυτταρικό τους pH μέσω ενός μηχανισμού ομοίωσης, ο οποίος περιλαμβάνει τη μεταφορά πρωτονίων κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης. Στους αερόβιους οργανισμούς, η ενεργός μεταφορά ιόντων  $H^+$  συνδυάζεται με τη μεταφορά ηλεκτρονίων που προκύπτουν κατά τη διαδικασία της αναπνοής. Από την άλλη μεριά, στα αναερόβια βακτήρια η μεταφορά των ιόντων  $H^+$  εκτός του κυττάρου διεξάγεται με τη βοήθεια μορίων  $H^+$ -ATPασών, χρησιμοποιώντας ενέργεια από την υδρόλυση του ATP. Επειδή η *L. monocytogenes* είναι ένα δυνητικά αναερόβιο βακτήριο, μπορεί να χρησιμοποιήσει και τις δύο προηγούμενες διαδικασίες για την επίτευξη ομοίωσης του pH της (Shabala et al., 2002). Η  $F_0F_1$ -ATPάση είναι ένα ένζυμο με πολλές υπομονάδες, που εξυπηρετεί σαν δίοδος την μεταφορά πρωτονίων κατά μήκος της κυτταρικής μεμβράνης, κινητοποιώντας ATP. Το συγκεκριμένο ένζυμο διατηρείται σε μεγάλο βαθμό και έχει εκτεταμένα μελετηθεί στην *Escherichia coli*. Το τμήμα  $F_1$  του ενζύμου αποτελείται από πέντε

υπομονάδες  $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ - ενώ το τμήμα  $F_0$  συντάσσουν οι υπομονάδες  $a$ ,  $b_2$ ,  $c_{10}$ . Η ροή των πρωτονίων (βαθμίδωση πρωτονίων) προκαλεί την περιστροφική κίνηση πρώτα του τμήματος  $F_0$  και μετά του  $F_1$ , οδηγώντας κατ' αυτόν τον τρόπο στη σύνθεση ATP. Κατά την αντίστροφη αντίδραση, η υδρόλυση του ATP προκαλεί την περιστροφή του τμήματος  $F_0$  κατά την αντίθετη φορά (Yoshida et al., 2001). Οι Cotter et al. (2000) διεξήγαγαν πειράματα χρησιμοποιώντας  $N, N'$ -δικυκλοεξυλκαρβοδιαμίδιο ( $N-N'$ -dicyclohexylcarbodiimide, DCCD), το οποίο παρεμποδίζει την εξώθηση πρωτονίων από την  $F_0F_1$ -ATPάση, για να διαπιστώσουν το ρόλο του ενζύμου στην ανεκτικότητα στο οξύ (ATR) της λιστέριας. Η μεταχείριση λοιπόν των κυττάρων *L. monocytogenes* με τον παρεμποδιστή DCCD, πριν και κατά τη διάρκεια διαδικασίας όξινης πρόκλησης (acid challenge), έδειξε τελικώς επαύξηση της ευαισθησίας των όξινα προσαρμοσμένων κυττάρων στο οξύ. Η παρατηρούμενη μείωση κατά τρεις λογαριθμικούς κύκλους του παθογόνου, υπαινίσσεται την εμπλοκή της  $F_0F_1$ -ATPάσης στην όξινη προσαρμογή της λιστέριας (Cotter et al., 2000).

### 2.3.2.3. Το σύστημα αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού

Για την επιβίωση από όξινη καταπόνηση, εκτός των άλλων, η *L. monocytogenes* κινητοποιεί το σύστημα αποκαρβοξυλάσης του γλουταμινικού (glutamate decarboxylase system, GAD). Το σύστημα αυτό συνθέτουν τρία γονίδια: τα *gadA*, *gadB* και *gadC*. Τα δύο πρώτα κωδικοποιούν δύο αποκαρβοξυλάσες του γλουταμινικού, ενώ το γονίδιο *gadC* κωδικοποιεί μια αντλία γλουταμινικού/Υ-αμινοβουτυρικού οξέος (Cotter et al., 2001). Έχει προταθεί ότι το γλουταμινικό οξύ εισάγεται στο κύτταρο μέσω ενός ειδικού μεταφορέα, οπότε και αποκαρβοξυλιώνεται στο κυτταρόπλασμα, παράγοντας σε πρώτη φάση Υ-αμινοβουτυρικό οξύ και καταλήγοντας στην κινητοποίηση ενός ενδοκυτταρικού πρωτονίου. Εν συνεχεία, το Υ-αμινοβουτυρικό οξύ με τη βοήθεια αντλίας εντοπισμένης στην κυτταρική μεμβράνη, εξάγεται από το κύτταρο. Η απώλεια πρωτονίου απ' το κύτταρο απολήγει σε αύξηση του pH του κυτταροπλάσματος, ενώ η απελευθέρωση του αλκαλικού Υ-αμινοβουτυρικού οξέος στο περιβάλλον του μικροοργανισμού οδηγεί σε ελαφρά αύξηση του εξωτερικού pH (Small & Waterman, 1998). Οι Cotter et al. (2001) μελέτησαν το ρόλο που διαδραματίζει το σύστημα GAD στην ανθεκτικότητα στο οξύ που παρουσιάζει η *L. monocytogenes* κατά τη γαστρική διέλευση, χρησιμοποιώντας

συνθετικό ανθρώπινο και χοίρειο γαστρικό υγρό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσθήκη γλουταμινικού αύξησε την ικανότητα επιβίωσης στο γαστρικό υγρό στα αγρίου τύπου στελέχη, γεγονός που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τα τρόφιμα που περιέχουν γλουταμινικό οξύ. Περαιτέρω, απαλοιφές των γονιδίων *gadA*, *gadB* και *gadC* οδήγησαν σε επαύξηση της ευαισθησίας του στελέχους στο χαμηλό pH. Επίσης και το μεταλλαγμένο στέλεχος *gadAB* παρουσίασε μειωμένο ρυθμό επιβίωσης στο γαστρικό υγρό. Τα ανωτέρω συντείνουν στο γεγονός ότι ένα λειτουργικό σύστημα GAD είναι ζωτικής σημασίας για την ανθεκτικότητα στο οξύ της *L. monocytogenes*, ώστε η τελευταία να διέλθει επιτυχώς το περιβάλλον του στομάχου και να φθάσει στο λεπτό έντερο (Cotter et al., 2001).

#### 2.3.2.4. Ο ρόλος του γενικού παράγοντα καταπόνησης "σίγμα" ( $\sigma^B$ )

Οι Wiedmann et al. (1998) διεξήγαγαν μελέτες για τον καθορισμό του ρόλου του γενικού παράγοντα καταπόνησης και μεταγραφής γονιδίων  $\sigma^B$ , επί της όξινης ανθεκτικότητας της *L. monocytogenes*. Σε αυτές φάνηκε η μειωμένη ανθεκτικότητα που παρουσίασε στη στάσιμη φάση το μεταλλαγμένο στέλεχος *sigB* συγκρινόμενο με το αγρίου τύπου στέλεχος. Τα ευρήματά αυτών των μελετών οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η επιβίωση της *L. monocytogenes* κατά την έκθεσή της σε όξινο περιβάλλον, εξαρτάται άμεσα από την έκφραση πρωτεϊνών που σχετίζονται με τον παράγοντα  $\sigma^B$  (Wiedmann et al., 1998). Διερευνώντας τον ρόλο του παράγοντα  $\sigma^B$  στην εξαρτώμενη από τη φάση ανάπτυξης όξινη ανθεκτικότητα και προσαρμοστική ανεκτικότητα (ATR), τόσο σε αγρίου τύπου στελέχη όσο και σε μεταλλάξεις *sigB*, οι Ferreira et al. (2003) απέδειξαν την παρουσία  $\sigma^B$ -εξαρτώμενων και  $\sigma^B$ -ανεξάρτητων μηχανισμών όξινης ανθεκτικότητας, κατά τις διάφορες φάσεις της ανάπτυξης. Η επιβίωση και η αυξημένη ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν στο γαστρικό χυμό τα ευρισκόμενα στη λογαριθμική φάση κύτταρα της *L. monocytogenes*, τα οποία έχουν πρώτα εκτεθεί σε μετρίως όξινες συνθήκες, είναι γεγονότα που έχουν συνδεθεί με τον παράγοντα  $\sigma^B$  (Ferreira et al., 2003). Οι Kazmierczak et al. (2003) παρείχαν περαιτέρω απόδειξη για τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων της *L. monocytogenes* που μεταγράφονται μέσω  $\sigma^B$ -εξαρτώμενων εκκινητών. Ο εναλλακτικός παράγοντας καταπόνησης "σίγμα" ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου *gadB* που εμπλέκεται στην όξινη καταπόνηση και του *OpuC*, ενός μεταφορέα

καρνιτίνης, ο οποίος όπως είδαμε ενεργοποιείται με το ψύχος. Αυτές οι μελέτες έριξαν φως στο διττό ρόλο του  $\sigma^B$  στην επιβίωση της λιστέριας υπό συνθήκες όξινης καταπόνησης. Επιπρόσθετα, ο ανταποκρινόμενος στην καταπόνηση παράγοντας  $\sigma^B$  ρυθμίζει επίσης και την έκφραση γονιδίων παθογονικότητας στο συγκεκριμένο τροφιμογενές παθογόνο (Kazmierczak et al., 2003).

### 2.3.2.5. Ρυθμιστικά συστήματα δύο συστατικών

Επιπλέον των όσων αναφέρθηκαν στις προηγούμενες παραγράφους, στη *L. monocytogenes* έχει ανακαλυφθεί η ύπαρξη ενός ρυθμιστικού συστήματος αποτελούμενου από δύο συστατικά, με τη βοήθεια του οποίου ο μικροοργανισμός είναι σε θέση να αντιλαμβάνεται αλλαγές στο περιβάλλον του, όπως τη μείωση του pH, αλλά και οξειδωτικές ή/και αλκοολικές καταπονήσεις. Το σύστημα αυτό αποτελούν τα γονίδια *lisR* και *lisK*, τα οποία κωδικοποιούν αντίστοιχα έναν ρυθμιστή απόκρισης και μια κινάση ιστιδίνης. Μέσω της σχετιζόμενης με την κυτταρική μεμβράνη κινάσης ιστιδίνης, ο μικροοργανισμός λαμβάνει το ερέθισμα, ενώ στη συνέχεια μεσολαβεί ο ρυθμιστής απόκρισης, με τον οποίο καθίσταται δυνατή η ανταπόκριση του κυττάρου στο λαμβανόμενο ερέθισμα, μέσω αλλαγής στη γονιδιακή έκφραση (Cotter et al., 1999). Η μελέτη από τους Cotter et al. (1999) έδειξε ότι το σύστημα μεταγωγής σήματος LisRK εμπλέκεται στην απόκριση της λιστέριας σε καταπονήσεις, όπως είναι η μείωση του pH, καθώς και στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων παθογονικότητας.

## 2.4. Πρωτεομική

Η καταγραφή του ανθρώπινου γονιδιώματος και οι δοθείσες απαντήσεις σε θεμελιώδη ερωτήματα της ζωής (Lander et al., 2001· Venter et al., 2001· Tachikawa & Briggs, 2006), αποτέλεσαν για τους επιστήμονες το εφαλτήριο για την αναζήτηση εξηγήσεων σε πολυπλοκότερα ζητήματα, με τους βιολόγους όλο και περισσότερο να επικεντρώνονται πλέον στην προσπάθεια κατανόησης του τρόπου λειτουργίας των γονιδίων και τον λειτουργικό ρόλο των εξ αυτών κωδικοποιούμενων πρωτεϊνών. Το εγχείρημα αυτό απαιτεί τον ορισμό των δομικών χαρακτηριστικών των πρωτεϊνών, καθώς και την κατανόηση της χωροχρονικής τοποθέτησής τους στο εσωτερικό του κυττάρου, συμπεριλαμβανομένου επίσης και των περίπλοκων μηχανισμών με τους

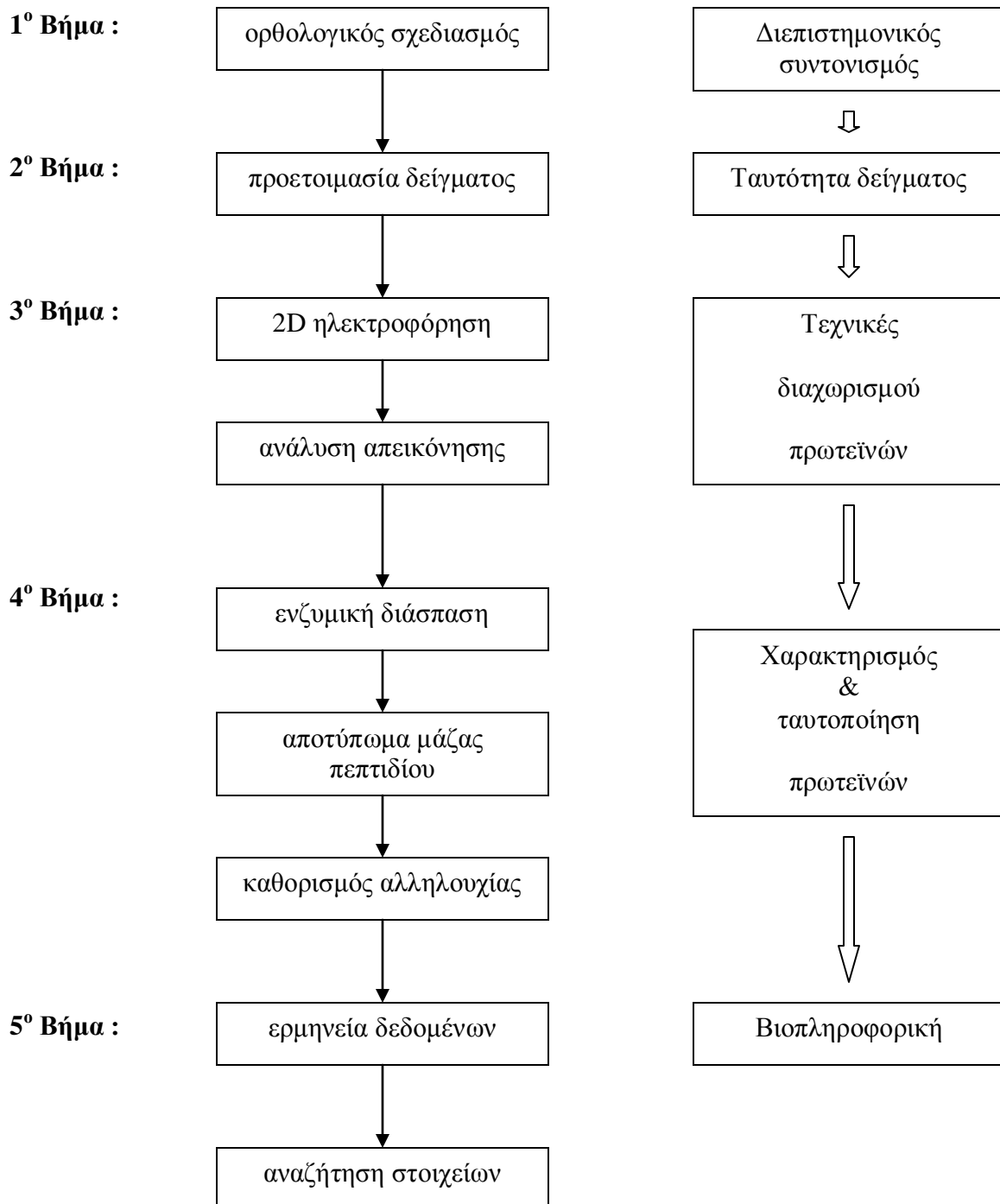
οποίους οι πρωτεΐνες αυτές αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (Porubleva & Chitnis, 2000· Zivy & de Vienne, 2000· Benett et al., 2002· Komatsu, 2005).

Απαντήσεις και λύσεις στο παραπάνω εγχείρημα ήρθε να δώσει η αναλυτική χημεία των πρωτεϊνών ή **πρωτεομική** (proteomics) όπως είναι ευρύτερα γνωστή σήμερα. Η πρωτεομική μέθοδος περιλαμβάνει τη μελέτη για το συνολικό χαρακτηρισμό και ταυτοποίηση των αλλαγών στο πρωτέωμα (πρωτεϊνική κατατομή), που είναι υπεύθυνες για ένα δεδομένο βιολογικό σενάριο (Jeon et al., 2007· Lyakhovich et al., 2007· Weinreb et al., 2007). Στο σημείο αυτό οφείλουμε να διευκρινήσουμε ότι με τον όρο **πρωτέωμα** (proteome) ή πρωτεϊνική κατατομή (protein profile), εννοούμε το σύνολο των πρωτεϊνών και τα επίπεδα που αυτές απαντώνται σε δεδομένες συνθήκες. Το πρωτέωμα ενός κυττάρου ή οργανιδίου, παρέχει λοιπόν πληροφορίες σχετικά με το σύνολο και τις εκφραζόμενες πρωτεΐνες του αναφερόμενου κυττάρου ή υποκυτταρικού σχηματισμού, υπό δεδομένες φυσιολογικές συνθήκες και σε συγκεκριμένο χρόνο (Wasinger et al., 1995· Wilkins et al., 1996). Η πρωτεομική σχετίζεται με πρωτεΐνες προερχόμενες όχι μόνο από φυσικές πηγές, αλλά και από τεχνολογίες ανασυνδυασμού, γεγονός που υποδεικνύει τη δυνατότητα χρησιμοποίησής της σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές (Liu, 2000). Εξάλλου, η συγκεκριμένη μέθοδος παρέχει τη δυνατότητα αποσαφήνισης βιοχημικών και φυσιολογικών μηχανισμών σύνθετων ασθενειών σε μοριακό επίπεδο (Dunn, 2000).

#### 2.4.1. Πρωτεομικές τεχνικές

Για την ανάλυση του μεταγραφόμενου γενετικού υλικού αναπτύχθηκαν διάφορα εργαλεία μέτρησης του RNA, όπως η διαφορική αποτύπωση, η μεταγραφική απεικόνιση και οι μικροακτίνες DNA. Μολαταύτα, οι τεχνικές αυτές δεν προσφέρουν πάντα μια ξεκάθαρη εικόνα για την ποσότητα και την ποιότητα των τελικών προϊόντων των γονιδίων, δηλαδή των πρωτεϊνών (Gygi et al., 1999). Αυτό είχε ως αποτέλεσμα, μετά τη μορφοποίηση της πρωτεομικής θεωρίας το 1995, πληθώρα πρωτεομικών τεχνικών να αναπτυχθούν και να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη του πρωτέωματος σε ιστούς, κύτταρα και οργανίδια. Άλλωστε, υπάρχει μια κοινή σύμπλευση όσον αφορά τις χρησιμοποιούμενες τεχνικές, οι οποίες βασίζονται κυρίως στην **ηλεκτροφόρηση πηκτής δύο διαστάσεων** (two-dimensional gel electrophoresis, 2D-GE), καθώς και στη στρατηγική προσέγγισης του πρωτέωματος (Σχήμα 1) (Kellner, 2000).



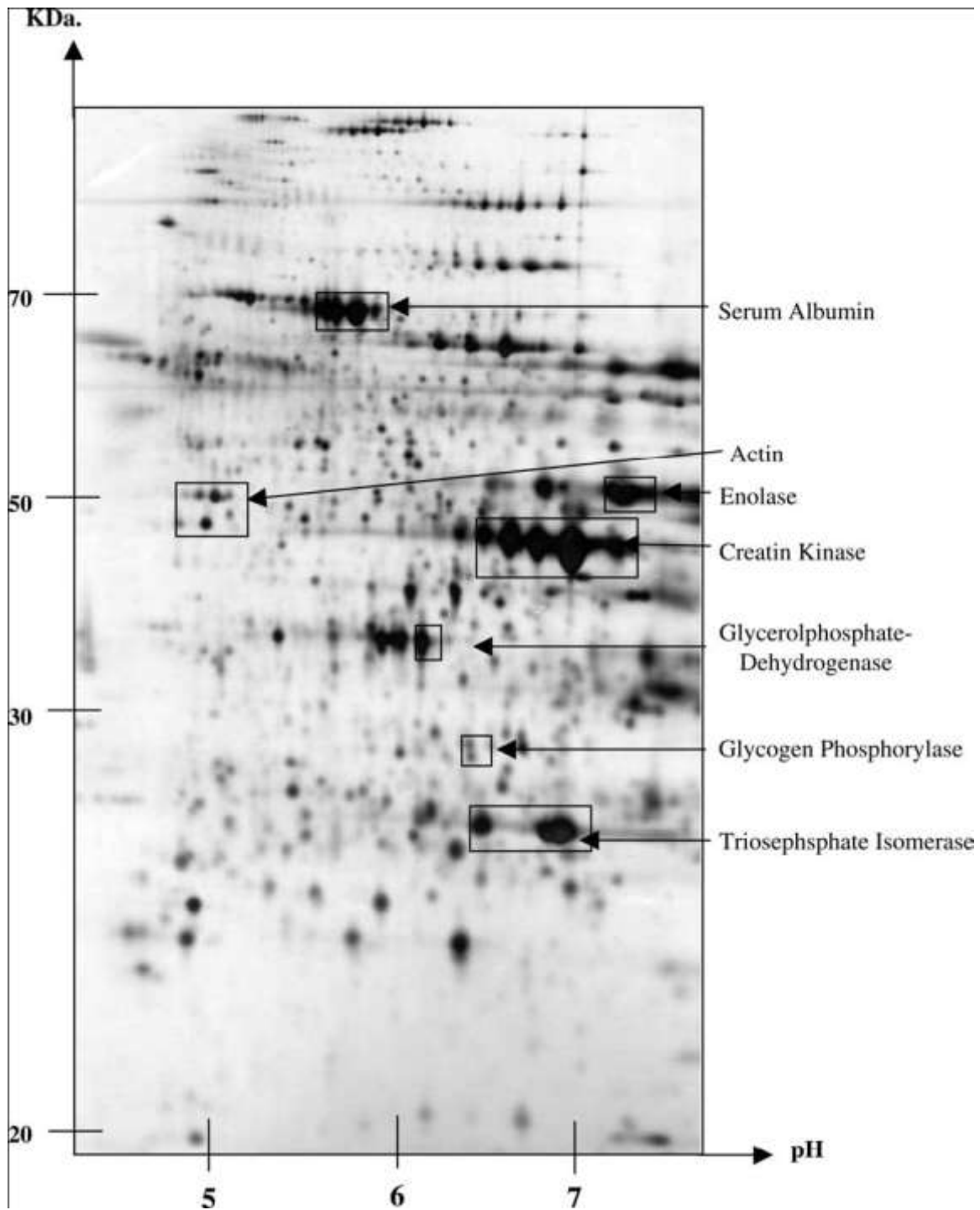


**Σχήμα 1:** Γενική στρατηγική προσέγγισης του πρωτεόματος, βασισμένη στην ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων (Han & Wang, 2008).

Η θεώρηση του πρωτεώματος βασίζεται σε μια σχετικά παλιά τεχνική, αυτήν του πρωτεϊνικού διαχωρισμού. Η συμβατική 2D-GE (Vercauteren et al., 2004), σε συνδυασμό με εξελιγμένες τεχνικές φασματομετρίας μάζας, έχει διευκολύνει τον γρήγορο χαρακτηρισμό χιλιάδων πρωτεϊνών σε μία και μόνον πηκτή πολυακρυλαμίδιου (Kislinger et al., 2006).

#### **2.4.1.1. Ηλεκτροφόρηση πηκτής δύο διαστάσεων**

Η κλασική ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων με βαθμίδωση του pH, αποτέλεσμα της χρήσης αμφολυτών, ήταν μια τεχνική μάλλον περιορισμένων δυνατοτήτων, καθώς παρουσίαζε σοβαρά μειονεκτήματα όσον αφορά τη διαχωριστική ικανότητα, την επαναληψιμότητα και τη χωρητικότητα κατά τη φόρτωση του πρωτεϊνικού δείγματος. Αντιθέτως, με τη χρησιμοποίηση μοντέρνων τεχνικών 2D-GE σε σύνθετα μείγματα πρωτεϊνών, οι τελευταίες διαχωρίζονται ηλεκτροφορητικά με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI), χρησιμοποιώντας ακινητοποιημένες βαθμιδώσεις pH (immobilized pH gradients, IPG), κι ακολούθως βάσει του μοριακού τους βάρους, μέσω ενός διαδοχικού συνδυασμού **ισοηλεκτρικού εστιασμού** (isoelectric focusing, IEF) και **ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμίδιου-δωδεκυλοθειικού νατρίου** (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) (Vercauteren et al., 2006). Η ένταση κάθε ξεχωριστού πρωτεϊνικού στίγματος (spot) είναι δηλωτική της ποσότητας της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Στην Εικόνα 1 φαίνεται ένα τυπικό πρωτέωμα, προερχόμενο από δείγμα μυός χοίρου (Bendixen, 2005). Τα προκύπτοντα πρωτεϊνικά στίγματα προσανατολίζονται σύμφωνα με το καρτεσιανό σύστημα συντεταγμένων (Εικόνα 1). Ως εκ τούτου, πρωτεΐνες με χαμηλά (όξινα) ισοηλεκτρικά σημεία ανευρίσκονται προς τα αριστερά του συστήματος, ενώ εκείνες με χαμηλά μοριακά βάρη συγκεντρώνονται στην βάση του συστήματος. Ανάλογα με την επιθυμητή εφαρμογή της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων, δύναται να χρησιμοποιηθούν πηκτές διαφορετικής σύστασης, διαφορετικά εύρη pH και διαφορετικές μέθοδοι ανίχνευσης (Fichman & Westermeier, 1999). Στις μέρες μας, η τεχνική 2D-GE παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην πρωτεομική έρευνα που αφορά την επιστήμη και τεχνολογία των τροφίμων.



**Εικόνα 1:** Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης πηκτής δύο διαστάσεων πρωτεϊνικού δείγματος χοίρου, από το *μν Longissimus dorsi*. Η 2D-GE πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ακινητοποιημένη βαθμίδωση pH (IPG) 3-9 και SDS-PAGE με 11%T (Han & Wang, 2008).

#### 2.4.1.2. Φασματομετρία μάζας

Η **φασματομετρία μάζας** (mass spectrometry, MS) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται σχεδόν σε όλα τα πρωτεομικά πειράματα, καθώς αποτελεί εργαλείο «κλειδί» στην ανάλυση πρωτεϊνών (Suckau et al., 2003). Η σημασία της δε σε αυτό το πεδίο έρευνας αναγνωρίστηκε ακόμα και στο βραβείο Νόμπελ για τη Χημεία του 2002 (<http://www.nobel.se/chemistry/laureates/2002/public.html>). Η εφαρμογή τεχνικών φασματομετρίας μάζας για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό πρωτεωμάτων έχει ένα σημαντικό αντίκτυπο στην κατανόηση των κυτταρικών λειτουργιών (Guerrera & Kleiner, 2005). Πιθανότατα η πρωτεομική χωρίς τη χρήση πηκτών, η οποία θα βασίζεται στη φασματομετρία μάζας, θα καταλάβει έναν κεντρικό ρόλο στη βιολογική έρευνα, παρέχοντας ακριβείς μετρήσεις των αλλαγών στις βιολογικές λειτουργίες, οι οποίες με τη σειρά τους θα μπορούν να κωδικοποιηθούν απλά από τους ερευνητές ως αλλαγές στη μοριακή μάζα (Cañas et al., 2006).

#### 2.4.2. Εφαρμογές στην επιστήμη και τεχνολογία τροφίμων

Λαμβάνοντας υπόψη την ολοένα και αυξανόμενη σημασία της διατροφής στην ανάπτυξη χρόνιων νοσημάτων, τόσο η ακαδημαϊκή κοινότητα όσο και η βιομηχανία τροφίμων αντιμετωπίζουν μια νέα πρόκληση. Η πρόκληση αυτή συνίσταται στην ανάγκη ανάπτυξης στρατηγικών και προϊόντων που, πέραν της δεδομένης ασφάλειας κατά την κατανάλωση, θα συνεισφέρουν επίσης στη διατήρηση της υγείας του καταναλωτή ή ακόμη θα δύνανται να αποτρέψουν την εμφάνιση συγκεκριμένων ασθενειών. Ο πλούτος των πληροφοριών που προκύπτουν από τη χρήση της πρωτεομικής μεθόδου, μαζί με την πληθώρα των διαθέσιμων πρωτεομικών τεχνικών και συστημάτων μοντελοποίησης, συνθέτουν ένα ευρύ φάσμα εργαλείων που μπορούν να εφαρμοστούν στους τομείς της επιστήμης και της τεχνολογίας των τροφίμων. Οι πρωτεομικές τεχνικές προσφέρουν μια καθ' όλα ελπιδοφόρα προσέγγιση προς την κατεύθυνση ταυτοποίησης πρωτεϊνών σε τρόφιμα, καθώς και στη μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών μεταξύ τους, τόσο σε ωμά ή νωπά προϊόντα όσο και σε τρόφιμα που έχουν υποστεί κάποιου είδους επεξεργασία. Εκτός αυτού, οι ίδιες τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών με άλλα συστατικά του τροφίμου (Carbonaro, 2004).

#### 2.4.2.1. Η πρωτεομική στην επιστήμη του κρέατος

Η πρωτεομική αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο και δυνατό εργαλείο, με το οποίο δύναται να ταυτοποιηθούν εκείνα τα προϊόντα γονιδίων που πιθανόν εμπλέκονται-και είναι δηλωτικά μεταβολών-στην ποιότητα του κρέατος (Carbonaro, 2004). Μελέτες πρωτεωμάτων προερχόμενα από μεταβολισμό, αύξηση και ανάπτυξη μυϊκών ιστών σε κτηνοτροφικά ζώα, αλλά και σε κλασικά πειραματόζωα, όπως είναι τα ποντίκια, παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες όσον αφορά τη μελέτη του μυός και του κρέατος στο γενικότερο πλαίσιο της επιστήμης και τεχνολογίας τροφίμων. Η ποιότητα του κρέατος είναι ένα πολυσύνθετο χαρακτηριστικό, το οποίο επηρεάζεται από γενετικούς παράγοντες, τη μεταχείριση του ζώου κατά τη μεταφορά, αλλά και τη μεταχείριση κατά τη διαδικασία πριν, στη διάρκεια και μετά τη σφαγή. Συγκρίνοντας τα πρωτεώματα δειγμάτων μυών τα οποία λήφθηκαν με χρήση ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων αμέσως μετά τη σφαγή (ώρα μηδέν), με εκείνα που λήφθηκαν 4, 8, 24 και 48 ώρες μετά τη σφαγή, προσδιορίστηκαν οι σχετικές αλλαγές μεμονομένων μυϊκών πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια συντήρησης του σφάγιου (Lametsch & Bendixen, 2001). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η ανάλυση με 2D-GE εφαρμόζεται επιτυχώς στη μελέτη των πρωτεϊνικών αλλαγών που επισυμβαίνουν στους μύς του χοίρου κατά τη συντήρηση του σφάγιού του. Επίσης, η πρωτεομική χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη της βόειας υπερτροφίας (Bouley et al., 2005). Αυτή η μελέτη περιέγραψε μοριακούς δείκτες οι οποίοι και συσχετίστηκαν με μια διεξαχθήσα απαλοιφή έντεκα βάσεων στο γονίδιο που κωδικοποιεί τη μυοστατίνη. Το αποτέλεσμα αυτής της μεταλλαγής ήταν η έκφραση κανονικών επιπέδων μυοστατίνης. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί μελέτες πρωτεωμάτων για την ανάπτυξη των μυών σε κοτόπουλα (Doherty et al., 2004). Παρόλο που οι αναφορές αυτές δεν συσχέτισαν αρχικά τις μελέτες μυϊκής ανάπτυξης με χαρακτηριστικά ποιότητας του κρέατος, οι παρατηρήσεις του πρωτεώματος ίσως αποδειχθούν χρήσιμες για την κατανόηση της ρύθμισης της σκελετικής μυϊκής ανάπτυξης, ενώ θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε μελλοντικές μελέτες σε σχετικά μοντέλα ποιότητας του κρέατος (Bendixen, 2005).

#### 2.4.2.2. Η πρωτεομική στην επιστήμη των σιτηρών

Η ανάλυση των πρωτεωμάτων στην επιστήμη των σιτηρών παρέχει πληροφορίες όσον αφορά την πρόβλεψη της μετάφρασης και της σχετικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένης της έκτασης της τροποποίησης, στοιχεία τα οποία δεν μπορούν να προβλεφθούν επακριβώς γνωρίζοντας μόνον την αλληλουχία του DNA (Amiour et al., 2002· Bae et al., 2003· Heazlewood et al., 2003· Chinnasamy & Rampitsch, 2006· Zang & Komatsu, 2007). Είναι γνωστό το πόσο σημαντική θεωρείται η καλλιέργεια ρυζιού για την Ασία, με το ρύζι να θεωρείται ως κατεξοχήν φυτικό πειραματικό μοντέλο για γενετικές και μοριακές μελέτες. Άλλωστε, είναι το κύριο και βασικό τρόφιμο για πάνω από το μισό πληθυσμό της γης (Sasaki & Burr, 2000). Για την καλύτερη κατανόηση του πρωτεώματος του ρυζιού, είναι επιτακτική η ανάγκη ξεχωριστής ανάλυσης των πρωτεϊνών εκείνων που δεν έχουν ακόμα χαρακτηριστεί στους ποικίλους ιστούς και οργανίδια του φυτού. Οι Imin et al. (2001) χρησιμοποίησαν ανθήρες ρυζιού από το νεαρό μικροσπορικό στάδιο ανάπτυξης του φυτού, για διενέργεια πρωτεομικής ανάλυσης (Imin et al., 2001). Οι Koller et al. (2002) παρουσίασαν μια αναλυτική και συστηματική ανάλυση του πρωτεώματος ιστών ρυζιού (Koller et al., 2002). Τα πρωτεώματα από το φύλλο, τη ρίζα και το σπόρο του ρυζιού έχουν αναλυθεί εκτεταμένα με τη χρησιμοποίηση 2D-PAGE και τεχνολογίας πολυδιάστατης πρωτεϊνικής ταυτοποίησης. Η πρωτεομική προσέγγιση προσέφερε χρησιμότερες πληροφορίες όσον αφορά τη συσχέτιση μεταξύ των πρωτεϊνικών συστατικών του ρυζιού και την ποιότητα του παραγόμενου εξ αυτού ψωμιού. Επομένως, το πρωτέωμα του ρυζιού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της ποιότητας του παραγόμενου τροφίμου. Επιπρόσθετα, έλαβε χώρα πρωτεομική ανάλυση των αμφίφιλων πρωτεϊνών του ενδοσπερμίου του σιταριού, ώστε να αντληθούν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη φυσιολογική και τεχνολογική τους λειτουργία (Amiour et al., 2002· Flæte et al., 2005· Skylas et al., 2005· Chinnasamy & Rampitsch, 2006). Τα δεδομένα από την ανάλυση του πρωτεώματος των σιτηρών, παρέχουν βασικές πληροφορίες στον παραγωγό και έτσι προάγουν την ικανότητα κατανόησης διαχείρισης της ποιότητας των παραγόμενων τροφίμων.

#### 2.4.2.3. Η πρωτεομική στην τεχνολογία τροφίμων

Η κατανόηση των επαγόμενων πρωτεϊνικών αλλαγών κατά τη διάρκεια τεχνολογικών διεργασιών και της μεταβλητότητας του αποτελέσματος της επεξεργασίας, είναι στοιχεία που θα βοηθήσουν σε μεγάλο βαθμό τη βελτίωση των εφαρμοζόμενων τεχνολογικών διαδικασιών. Η λεπτομερής γνώση της πρωτεομικής σε είδη διατροφής χρειάζεται στην τεχνολογία τροφίμων (Kanemaki et al., 2003), για την αποφυγή παραγωγής ανεπιθύμητων πρωτεϊνικών κατατομών. Η κινητοποίηση προστιθέμενων ή ενδογενών πρωτεασών κατά τη βιοεπεξεργασία τροφίμων (Wiseman & Woods, 2003) οφείλει πλέον να βασίζεται σε μια πρωτεομική προσέγγιση, με την οποία εξυπηρετείται η συνοδεία σημαντικών πρωτεϊνών από άλλες (συνοδές) πρωτεΐνες, οι οποίες και προστατεύουν τις πρώτες από ενδεχόμενη ενζυμική προσβολή και μετουσίωση, είτε λόγω ακραίων συνθηκών pH, είτε λόγω θέρμανσης ή ωσμωτικότητας. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, έχουν δημοσιευθεί πολλοί πρωτεϊνικοί «χάρτες» προερχόμενοι από ηλεκτροφορήσεις δύο διαστάσεων διαφόρων ειδών και ιστών, συμπεριλαμβανομένου των μυών χοίρου (Lametsch et al., 2002· Morzel et al., 2004), βοδινού (Bouley et al., 2004) και κοτόπουλου (Doherty et al., 2004). Κάποιοι από αυτούς τους πρωτεϊνικούς «χάρτες» έχουν χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση μοριακών δεικτών ως χαρακτήρων ποιότητας του κρέατος, αλλά και για την απόκτηση βαθειάς γνώσης επί των σημείων ελέγχου της επεξεργασίας του κρέατος.

Ποικίλα διατροφικά σκάνδαλα και κρίσεις, όπως εκείνα που σχετίζονταν με τη *Salmonella*, τη *Listeria* και τη σπογγόμορφη εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών (bovine spongiform encephalopathy, BSE), είχαν ως αποτέλεσμα την εγρήγορση και ευαισθητοποίηση του καταναλωτικού κοινού σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων (Shaw, 2004). Οι πρωτεΐνες είναι κεφαλαιώδη και αναπόσπαστα συστατικά των τροφίμων, τόσο διατροφικά όσο και λειτουργικά. Συνεπώς, η εφαρμογή πρωτεομικών τεχνολογιών θα συνεισφέρει στους επόμενους τομείς έρευνας της επιστήμης και τεχνολογίας τροφίμων:

- Αξιολόγηση της ασφάλειας
- Μεταβολισμός των συστατικών των τροφίμων και κατεύθυνσή τους εντός του σώματος (Kvasnička, 2003)
- Εντοπισμός και έλεγχος της αλλοίωσης των τροφίμων

- Παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών (Washburn and Yates, 2000).

Περαιτέρω, τα πρωτεώματα συγκεκριμένων τροφίμων (π.χ. σιτάρι, κρασί, ψάρι) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίηση της προέλευσης ενός συγκεκριμένου προϊόντος ή της ποιότητάς του κατά την παραγωγική του διαδικασία (Iwahashi & Hosoda, 2000· Quaranta et al., 2001· Carbonaro et al., 2003). Τέλος, το πρωτέωμα ή/και το αποτέλεσμα μεταβολισμού (metabolome) εναρκτήριων καλλιεργειών σε διεργασίες ζύμωσης (όπως σε μύρα, τυρί κ.λπ.), μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της ποιότητας του ζυμούμενου τελικού προϊόντος.

## 2.5. Σκοπός της μελέτης

Από τα ως άνω εκτεθέντα καθίσταται σαφές λοιπόν, ότι όλες οι μέθοδοι και τεχνολογίες που εφευρέθηκαν μετά τη "γονιδιακή επανάσταση" και την καταγραφή του DNA, επέφεραν δραματικές αλλαγές στις πειραματικές προσεγγίσεις πολύπλοκων βιολογικών συστημάτων. Η πρωτεομική μέθοδος, με ταυτόχρονη χρησιμοποίηση της ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμιδίου δύο διαστάσεων και της φασματομετρίας μάζας, δίδει τη δυνατότητα παρακολούθησης και καταγραφής των συνολικών αλλαγών που λαμβάνουν χώρα στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο ιστών και υποκυτταρικών οργανιδίων.

Σε συνέχεια όλων των προηγούμενων και υπό το πρίσμα της πρωτεομικής, η πειραματική αυτή εργασία επικεντρώνει την προσπάθειά της στην κατανόηση της συμπεριφοράς του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* Scott A, τόσο σε συνθήκες όξινης και θερμοκρασιακής προσαρμογής, που προσιδιάζουν σε πληθώρα τροφίμων, όσο και διαδοχικά σε συνθήκες ισχυρά όξινης καταπόνησης. Η παρουσία του συγκεκριμένου μικροοργανισμού σε μεγάλη ποικιλία τροφίμων, αλλά και τα ενδογενή χαρακτηριστικά του, δημιουργούν σωρεία προβλημάτων στη βιομηχανία τροφίμων, η οποία καλείται να βρει αποτελεσματικούς τρόπους αντιμετώπισης του αναδυόμενου αυτού παθογόνου παράγοντα, με του οποίους θα αποφευχθεί η πρόκληση τροφιμογενούς λιστερίωσης στον καταναλωτή και οι δυσάρεστες συνέπειες της νόσου. Αυτή είναι και η κατεύθυνση προς την οποία κινείται η παρούσα μεταπτυχιακή ερευνητική μελέτη.



# 3

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.1. Χρησιμοποιούμενα υλικά

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε πλειάδα υλικών, μεταξύ των οποίων ανόργανα και οργανικά χημικά αντιδραστήρια, απομονωμένα θρεπτικά συστατικά υλικών ανάπτυξης, αλλά και συνθετικά υλικά (synthetic media) ή αλλιώς τυποποιημένα σκευάσματα θρεπτικών υποστρωμάτων (substrates).

#### 3.1.1. Ανόργανα και οργανικά χημικά αντιδραστήρια

Από ανόργανα χημικά αντιδραστήρια, χρησιμοποιήθηκε το χλωριούχο νάτριο (sodium chloride) (SDS 1380517, Peyrin, France), το όξινο φωσφορικό κάλιο (dipotassium hydrogen phosphate) (MERCK 1.05104.1000, Darmstadt, Germany), το ένυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο (sodium dihydrogen phosphate) (MERCK 1.06346.0500), το διϋδρικό όξινο φωσφορικό νάτριο (disodium hydrogen phosphate) (MERCK 1.06580.1000) και το υπερθειικό αμμώνιο (ammonium persulfate, APS) (SERVA 13375, Heidelberg, Germany). Εξάλλου, από οργανικά χημικά αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν τα:

1. αγαρόζη χαμηλού σ.τ. (certified™ low melt agarose) (BIO-RAD 161-3111, Milan, Italy)
2. ακετόνη (acetone) (LAB-SCAN, A01C11X)
3. ακρυλαμίδιο (acrylamide) (SERVA 10675)
4. αλβουμίνη και συγκεκριμένα το κλάσμα V αυτής (albumin fraction V) (APPLICHEM A 1391,0025, Darmstadt, Germany)
5. αμφολύτες Bio-Lyte® 3/10 (BIO-RAD 163-2094)
6. γλυκερόλη (glycerol) (SERVA 231176)
7. γλυκίνη (glycine) (SERVA 23390)

8. δείκτης μοριακών βαρών (size marker) Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range (BIO-RAD 161-0318)
9. διθειοθρεϊτόλη (dithiothreitol, DTT) (APPLICHEM A 1666,0025)
10. δωδεκυλοθειικό νάτριο (sodium dodecyl sulfate, SDS) (SIGMA L4390, St. Louis, USA)
11. DL-γαλακτικό οξύ (DL-lactic acid) (SIGMA L1250), με περιεκτικότητα 85% (w/w)
12. ιωδοακεταμίδιο (iodoacetamide) (Applichem A 1666,0025)
13. *N,N'* μεθυλενο-bis-ακρυλαμίδιο (*N,N'*-methylenebisacrylamide) (SERVA 29195)
14. *N,N,N',N'*-τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη (*N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine, TEMED) (SERVA 35925)
15. μπλε βρωμοφαινόλης (bromophenol blue) (APPLICHEM A 2331,0005)
16. ορυκτό έλαιο (mineral oil) (BIO-RAD 163-2129)
17. ουρία (urea) (APPLICHEM A 1049,1000)
18. τριυδροξυμεθυλοαμινομεθάνιο (trishydroxymethylaminomethane ή tris-base) (SERVA 37180)
19. τριχλωροξικό οξύ (trichloroacetic acid, TCA) (APPLICHEM A 1431,0250)
20. 3-[(3-χολαμιδοπροπυλ)διμεθυλαμμωνιο]-1-προπανοσουλφονικό οξύ {3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, CHAPS} (APPLICHEM A 4011,0005)
21. χρωστική Bio-Safe Coomassie (G250 stain) (BIO-RAD 161-0786)

### 3.1.2. Συστατικά θρεπτικών υποστρωμάτων

Τα απομονωμένα θρεπτικά συστατικά υλικών ανάπτυξης αφορούσαν κατά βάση οργανικές μορφές αζώτου. Έτσι, χρησιμοποιήθηκε η τρυπτόνη (tryptone) (Biolife 4122902, Milan, Italy), η οποία είναι πεπτίδιο που σχηματίζεται από την πέψη της καζεΐνης του γάλακτος με δράση του ενζύμου θρυψίνη. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε η πεπτόνη σόγιας (soy peptone) (Biolife 4123252), η οποία προέρχεται από την πρωτεολυτική διάσπαση της πλούσιας σε πρωτεΐνη σόγιας. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε και εκχύλισμα ζύμης (yeast extract) (Biolife 412220).

### 3.1.3. Θρεπτικά υποστρώματα

Στην ακολουθούμενη πειραματική διαδικασία εμπλέκεται το στερεό, γενικό θρεπτικό υπόστρωμα Brain Heart Infusion (BHI) Agar (Biolife 4012352), καθώς και το υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα πεπτόνης (buffered peptone water). Το τελευταίο δεν είναι ακριβώς θρεπτικό υπόστρωμα με την αυστηρή έννοια του όρου, αλλά χρησιμοποιείται συνήθως κατά τη διαδικασία εμπλουτισμού για την απομόνωση μικροοργανισμών (κυρίως *Salmonella* spp.) από δείγματα τροφίμων. Η μεγάλη ρυθμιστική ικανότητα του εν λόγω υγρού υποστρώματος βοηθά στην ανάκτηση της ζωτικότητας των καταπονημένων και τραυματισμένων, σε υποθανάτιες συνθήκες, βακτηρίων, προτού αυτά τοποθετηθούν σε εκλεκτικό υπόστρωμα ανάπτυξης.

## 3.2. Χρησιμοποιούμενος εργαστηριακός εξοπλισμός

Σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας υπεισήλθε η χρήση ενός ή περισσοτέρων από τα όργανα ή/και σκεύη που περιγράφονται παρακάτω.

### 3.2.1. Όργανα και συσκευές

Για την εκτέλεση του πειράματος έγινε χρήση των οργάνων και συσκευών που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

### 3.2.2. Σκεύη

Τα σκεύη τα οποία ενεπλάκησαν στην εκτελούμενη πειραματική διαδικασία ήταν μεταξύ άλλων:

1. γυάλινες φιάλες duran
2. γυάλινα φιαλίδια universal
3. δοκιμαστικοί σωλήνες
4. κωνικές φιάλες
5. λαβίδες
6. λύχνος Bunsen
7. μαγνήτες αναδεύσεως (διαφόρων μεγεθών)
8. μικροβιολογικός κρίκος
9. μικροβιολογικό τρίγωνο

10. ογκομετρικοί κύλινδροι
11. πλαστικοί περιέκτες erpendorf (χωρητικότητας 1,5 ml)
12. πλαστικοί περιέκτες falcon (χωρητικότητας 15 ml)
13. ποτήρια ζέσεως
14. ρύγχη (tips) των 100  $\mu$ l (=0,1 ml), 1000  $\mu$ l (=1 ml) και 10 ml για τις πιπέττες μεταβλητού όγκου
15. στατό δοκιμαστικών σωλήνων

**Πίνακας 3:** Χρησιμοποιούμενα εργαστηριακά όργανα και συσκευές

<i>No</i>	<i>Όργανο-συσκευή</i>	<i>Μοντέλο</i>	<i>Εταιρεία</i>
1	Ανακινούμενη επωαστική τράπεζα	KS 130 Basic	IKA
2	Αναλυτικοί ζυγοί	Mark (0,01 g) BP 3105 (0,001 g)	BEL ENGINEERING Sartorius
3	Επωαστικοί θάλαμοι	BE 500	Memmert
4	Έτοιμες βαθμιδώσεις pH 4-7 υπό μορφή λωρίδας (Ready IPG strips)	L 1632015	BIO-RAD
5	Θάλαμος κάθετης νηματικής ροής	NU-425-400E	NuAire
6	Κλίβανος αποστείρωσης	OT 4060	nüve
7	Μετρητής αποικιών	C5	Stuart Scientific
8	Πεχάμετρο	pH 526	WTW
9	Πιπέττες μεταβλητού όγκου	Labopette (20-200 $\mu$ l) (100-1000 $\mu$ l) HC (1-10 ml)	HIRSCHMANN LABORGERÄTE LABMATE+
10	Συσκευή ανάμιξης	K-550-GE	Vortex-GENIE
11	Συσκευή ανάδευσης με θέρμανση	ARE	VELP Scientifica
12	Συσκευή ισοηλεκτρικού εστιασμού	Protean IEF cell	BIO-RAD
13	Συσκευή ηλεκτροφόρησης	Protean II	BIO-RAD
14	Συσκευή τροφοδοσίας συνεχούς ρεύματος ηλεκτροφόρησης	Power Pac 1000	BIO-RAD
15	Συσκευή σάρωσης-μέτρησης οπτικής πυκνότητας πηκτών ηλεκτροφόρησης	GS-800	BIO-RAD
16	Συσκευή υπερήχων	UP50H	hielscher
17	Υδατόλουτρο	WB 14	Memmert
18	Φυγόκεντροι	Megafuge 1.0 R Mini Spin Eppendorf	Heraeus instruments Milian
19	Φωτόμετρα	6100 Spectrophotometer Sunrise Remote	JENIWAY TECAN

### 3.3. Χρησιμοποιούμενο στέλεχος

Η παρούσα εργασία μελετά τη συμπεριφορά του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* Scott A, υπό ορισμένες συνθήκες. Η επιλογή του συγκεκριμένου στελέχους έγινε εξαιτίας της συχνής χρησιμοποίησής του στις μελέτες απόκρισης σε χαμηλή θερμοκρασία ή/και σε διαδικασία όξινης πρόκλησης (acid challenge), ένεκα της κλινικής προέλευσης και της ισχυρής επιδημιολογικής συσχέτισης του εν λόγω ορότυπου 4b με την ανθρώπινη λιστερίωση (Lianou et al., 2006). Σημειωτέον ότι το στέλεχος απομονώθηκε από σημειωθείσα εκδήλωση της νόσου στον άνθρωπο.

### 3.4. Πειραματική διαδικασία

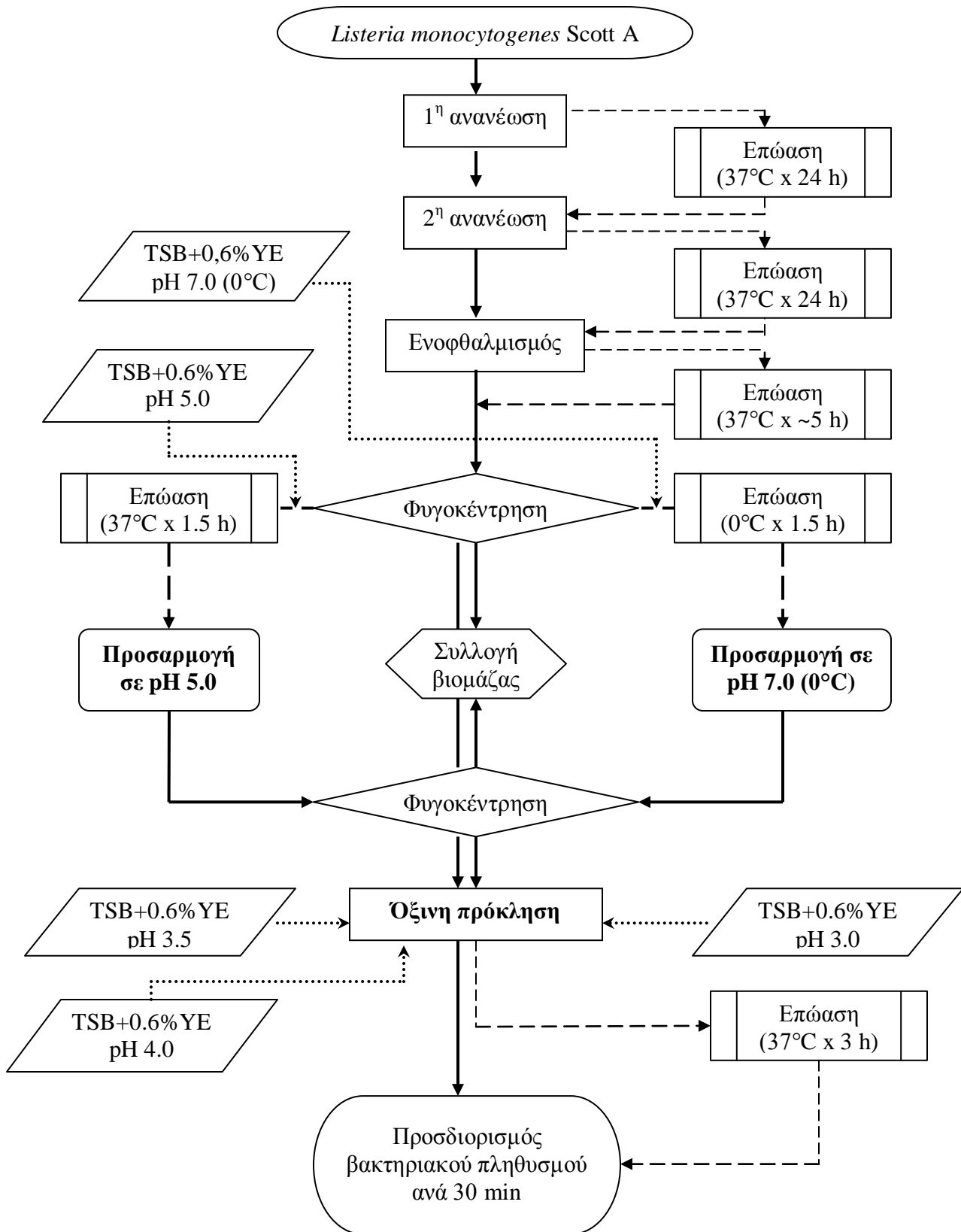
Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται συνοπτικά στα σχετικά διαγράμματα ροής (Σχήματα 2 & 3). Στη συνέχεια, παρατίθεται αναλυτική περιγραφή των κυριότερων σταδίων αυτής. Εξυπακούεται ότι όλοι οι περιγραφόμενοι μικροβιακοί χειρισμοί διενεργούνται υπό ασηπτικές συνθήκες. Επίσης, περιττό είναι να σημειωθεί ότι η επαναληψιμότητα της πειραματικής διαδικασίας θεωρείται ως εκ των ουκ άνευ. Για το λόγο αυτό πραγματοποιείται διπλή επανάληψη (τουλάχιστον) του όλου πειράματος.

#### 3.4.1. Λήψη στελέχους

Το στέλεχος Scott A προέρχεται από συλλογή απομονωθέντων βακτηριακών στελεχών που διατηρεί το Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων (Gounadaki et al., 2007). Ο μικροοργανισμός συντηρείται στους -20°C σε Nutrient broth, παρουσία γλυκερόλης σε ποσοστό 50% του συνολικού όγκου.

#### 3.4.2. Ανανέωση του μικροοργανισμού

Πρόκειται για στάδιο το οποίο μεσολαβεί πριν από τον ενοφθαλμισμό του μικροοργανισμού σε κάποιο υπόστρωμα, προκειμένου ο τελευταίος να ανακτήσει τη ζωτικότητα του και να καταστεί άμεσα έτοιμος για ανάπτυξη. Η ανανέωση διαρκεί συνήθως 24 ώρες, ενώ κατ' αυτήν λαμβάνει χώρα τοποθέτηση του μικροοργανισμού σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (broth) με ακόλουθη επώαση στη βέλτιστη (optimum) θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού. Είθισται πριν τον ενοφθαλμισμό να γίνονται δύο ανανεώσεις.



Σχήμα 2: Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας

Προκειμένου για το εξεταζόμενο στέλεχος, πραγματοποιήθηκαν δύο ανανεώσεις με τοποθέτηση κάθε φορά σε 10 ml Tryptone Soy Broth (TSB), υπόστρωμα που παρασκευάστηκε από τα μεμονωμένα υλικά ως τα εξ'ων συνετέθει, παραλείποντας όμως τη γλυκόζη και προσθέτοντας επιπλέον 0,6% Yeast Extract (YE), δίνοντας έτσι TSBYE. Στο προκύπτον θρεπτικό υπόστρωμα έγινε ρύθμιση του pH στην τιμή 7.0, με γαλακτικό οξύ 85% (w/w). Ακολούθησε σε κάθε περίπτωση επώαση στους 37°C για 24 ώρες.

### 3.4.3. Ενοφθαλμισμός

Ποσότητα ενοφθαλμίσματος ίση κάθε φορά με 0,1 ml (=1%  $V_{\text{τελ}}$ ), λαμβάνεται από την τελευταία ανανέωση του μικροοργανισμού και μεταφέρεται διαδοχικά σε πλαστικούς περιέκτες falcon, έκαστος των οποίων περιέχει 10 ml TSBYE. Οι ενοφθαλμισθείσες ποσότητες των 10 ml επωάζονται για 5 ώρες στους 37°C. Στο χρονικό αυτό διάστημα παρακολουθείται η πορεία ανάπτυξης και εκτιμάται η φάση στην οποία βρίσκεται ο μικροοργανισμός, μέσω μετρήσεων της οπτικής πυκνότητας (optical density, O.D) ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Μετά το πέρας των 5 ωρών ο μικροοργανισμός βρίσκεται εις το επιθυμητό μέσον της εκθετικής φάσης αναπτύξεώς του (mid-exponential phase). Τότε και μόνον σταματά η επώαση, οπότε οι καλλιέργειες του στελέχους που περιέχονται στους περιέκτες falcon, αφού πρώτα ισοζυγιστούν, φυγοκεντρώνται (3800 rpm x 15 min, 4°C) ώστε τα περιεχόμενα σε αυτές βακτηριακά κύτταρα να κατακρημινιστούν και υπό μορφή ιζήματος να συλλεχθεί η σχηματισθείσα βιομάζα (τάξης  $10^8$  cfu/ml).

### 3.4.4. Χειρισμός βιομάζας

Η συλλεχθείσα βιομάζα οδεύει προς τέσσερις διαφορετικές κατευθύνσεις. Ένα τμήμα αυτής τοποθετείται απευθείας στους -20°C για βραχυχρόνια αποθήκευση πριν την ηλεκτροφόρηση πηκτής δύο διαστάσεων που θα επακολουθήσει. Το πρωτεϊνικό περιεχόμενο του τμήματος αυτού θα χρησιμεύσει ως μάρτυρας κατά τη συγκριτική μελέτη των πρωτεωμάτων που θα προκύψουν μετά την προσαρμογή στις υποβληθείσες συνθήκες όξινης και θερμοκρασιακής καταπόνησης. Σε ένα άλλο τμήμα της βιομάζας ακολουθείται **διαδικασία όξινης πρόκλησης ή ισχυρά όξινης καταπόνησης (acid challenge)**, η οποία για τη συγκεκριμένη περίπτωση (κύτταρα σε TSBYE με pH 7.0) συνιστά ταυτοχρόνως και διαδικασία όξινης κατάπληξης. Η διαδικασία αυτή

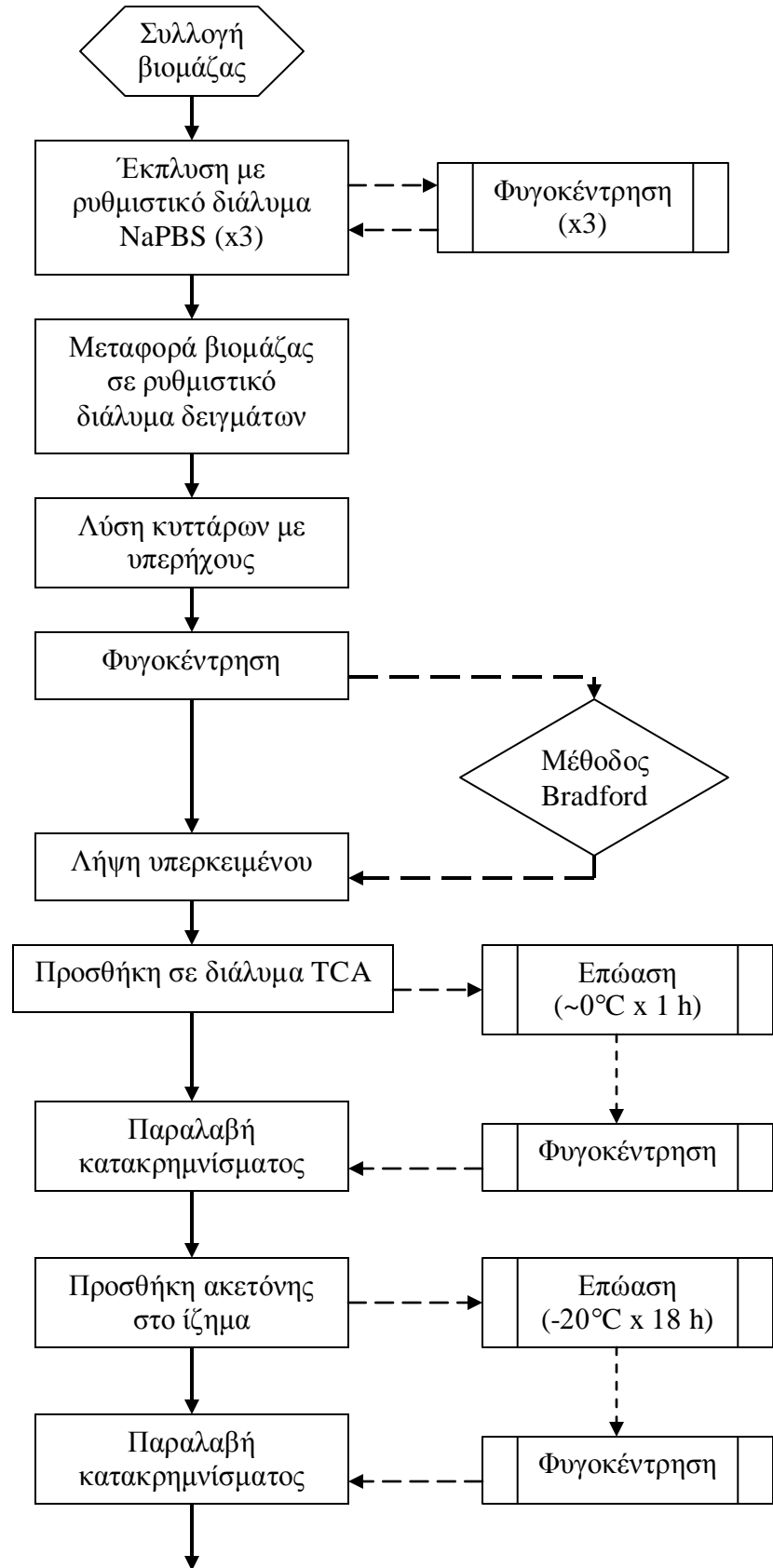
περιλαμβάνει διαδοχικά την τμηματική προσθήκη ποσότητας 10 ml TSBYE ανά περιέκτη falcon, με τιμές pH 3.0, 3.5 και 4.0 αντίστοιχα και επώση στους 37°C για 3 ώρες. Για αυτό το χρονικό διάστημα, ανά 30 λεπτά γίνεται προσδιορισμός του βακτηριακού πληθυσμού, ακολουθώντας διαδικασία που θα περιγραφεί στη συνέχεια.

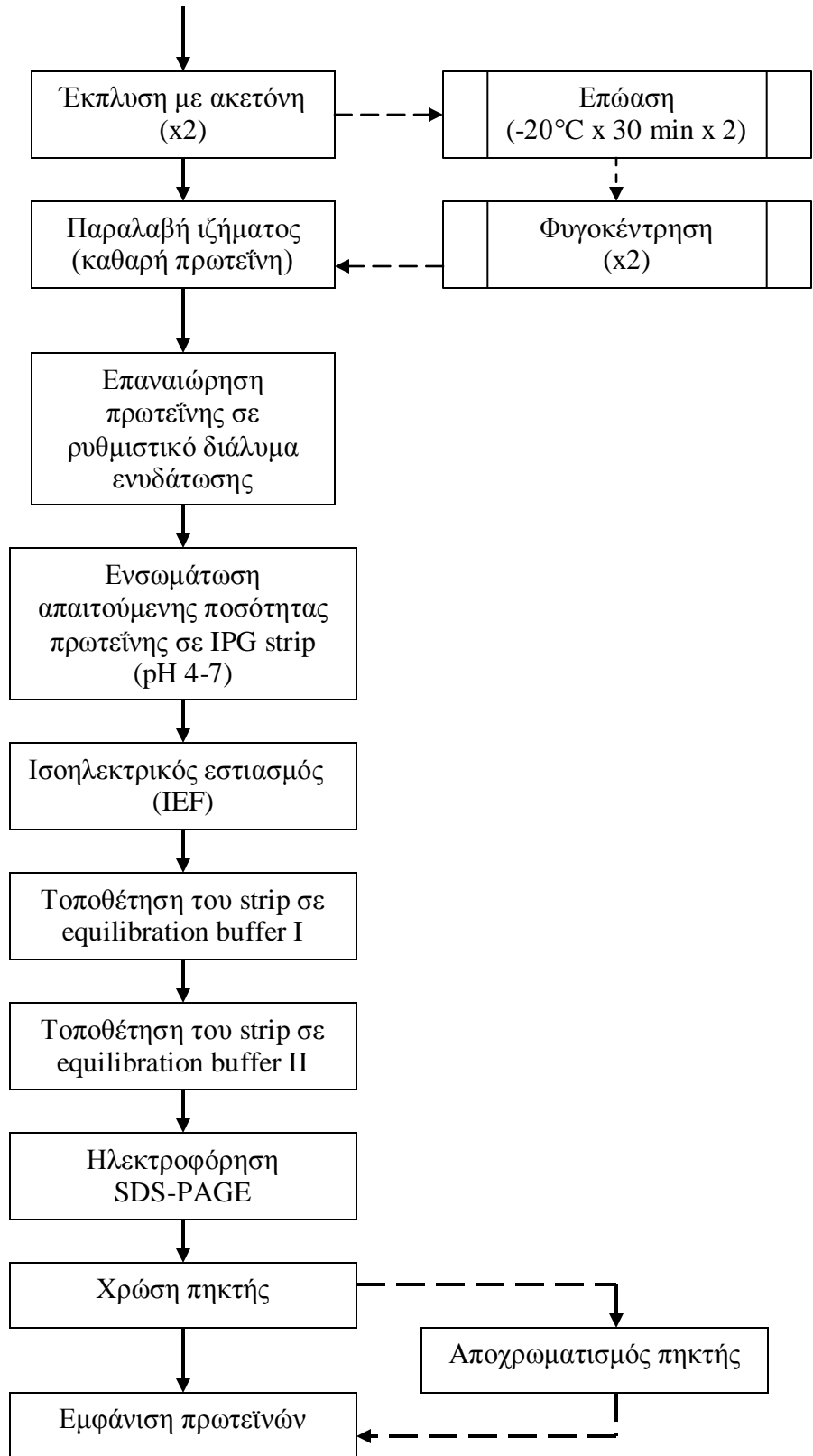
Τέλος, το υπόλοιπο της βιομάζας χωρίζεται σε δύο επιμέρους τμήματα, όπου στο ένα προστίθεται TSBYE με pH 5.0 του οποίου η τιμή έχει ρυθμιστεί από πριν κατά τον ίδιο τρόπο όπως και προηγούμενα (δηλ. με γαλακτικό οξύ περιεκτικότητας 85% (w/w)), στο δε άλλο προστίθεται TSBYE με pH 7.0 και θερμοκρασία 0°C. Τα δύο αυτά τμήματα τοποθετούνται σε διαφορετικούς επωαστικούς θαλάμους για το ίδιο όμως χρονικό διάστημα. Έτσι, το μεν πρώτο επωάζεται στους 37°C το δε δεύτερο στους 0°C, με το χρονικό διάστημα να είναι σε κάθε περίπτωση ίσο με 1½ ώρα.

#### **3.4.5. Διαδικασία όξινης πρόκλησης**

Η διαδικασία αυτή αφορά περιγραφόμενα στην προηγούμενη παράγραφο τμήματα βιομάζας. Συγκεκριμένα, αφορά αφενός μεν μέρη των επιμέρους εκείνων τμημάτων βιομάζας που έχουν υποστεί όξινη και θερμοκρασιακή προσαρμογή μέσω αντίστοιχης καταπόνησης με χρήση οξέος και ψύχους, αφετέρου δε το προερχόμενο μετά τον ενοφθαλμισμό τμήμα της βιομάζας, που περιέχει κύτταρα ευρισκόμενα στο μέσον της εκθετικής φάσης αναπτύξεως του μικροοργανισμού. Όπως είδαμε και παραπάνω (παρ. 3.4.4.), η εκτέλεση αυτής της διαδικασίας συνίσταται στην προσθήκη, στο αντίστοιχο τμήμα βιομάζας του οποίου τη συμπεριφορά θέλουμε να μελετήσουμε, TSBYE με διαφορετικές τιμές pH (3.0, 3.5, 4.0) κάθε φορά και προσδιορισμό του βακτηριακού πληθυσμού ανά 30 λεπτά για διάστημα 3 ωρών. Ο εν λόγω προσδιορισμός διεξάγεται με ταχεία λήψη δείγματος (1 ml) από την αντίστοιχη μικροβιακή καλλιέργεια που μας ενδιαφέρει, ακολουθεί η γνωστή διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων σε υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα πεπτόνης μέχρι την επιθυμητή αραιώση, ενώ ο προσδιορισμός ολοκληρώνεται με την τεχνική της επιφανειακής επίστρωσης (spread plate technique) σε BHI agar, την τοποθέτηση των τρυβλίων προς επώση στους 37°C για 24-48 ώρες και την καταμέτρηση τελικά των αποικιών του στελέχους.







Σχήμα 3: Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας (συνέχεια)

### 3.4.6. Έκπλυση βιομάζας

Προχωρώντας στον προσδιορισμό του πρωτεϊνικού περιεχομένου των κυττάρων του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* Scott A και στο πλαίσιο της απομόνωσης των πρωτεϊνών από τις κυτταρικές καλλιέργειες του μικροοργανισμού, κύτταρα που συλλέχθηκαν στο μέσον της εκθετικής φάσης ανάπτυξης του βακτηριακού στελέχους, καθώς και ένα μέρος της προκύπτουσας βιομάζας μετά την προσαρμογή σε συνθήκες όξινης (pH 5.0) και θερμοκρασιακής (0°C) καταπόνησης, υφίστανται διαδικασία έκπλυσης, ώστε να απομακρυνθούν τελικά προϊόντα μεταβολισμού (Samelis et al., 2003· Koutsoumanis & Sofos, 2004) που τυχόν βρίσκονται δεσμευμένα επί των κυττάρων του μικροοργανισμού. Η έκπλυση γίνεται με προσθήκη, σε κάθε πλαστικό περιέκτη falcon, 10 ml φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (NaPBS), του οποίου η σύσταση δίδεται στον Πίνακα 4, ενώ ακολουθεί φυγοκέντρηση (3500 rpm x 10 min, 4°C). Η διαδικασία έκπλυσης επαναλαμβάνεται εις τριπλούν. Μετά την έκπλυση, το σύνολο της βιομάζας για κάθε διαφορετική περίπτωση συλλέγεται και μεταφέρεται σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος δειγμάτων (sample buffer), περιεκτικότητας 20mmol/l σε Tris-HCl με pH 8.8.

**Πίνακας 4:** Σύσταση 20 mmol/l φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (NaPBS) με pH 6.5 (Mauriello et al., 2004)

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
Ένυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο	0.1928 % (w/v)
Επταϋδρικό όξινο φωσφορικό νάτριο*	0.1616 % (w/v)

\*Ενεκα της μη διαθεσιμότητας του συγκεκριμένου άλατος στο Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου και Υγιεινής Τροφίμων, υπό μορφή έτοιμου εμπορικού σκευάσματος, η διδόμενη περιεκτικότητα του επταϋδρικού όξινου φωσφορικού νατρίου υπολογίστηκε ότι ισοδυναμεί με προσθήκη 0,1073 % (w/v) διϋδρικού όξινου φωσφορικού νατρίου.

### 3.4.7. Λύση κυττάρων

Στο εσωτερικό των βακτηριακών κυττάρων που περιέχονται στο ρυθμιστικό διάλυμα δειγμάτων, εκτός των επιθυμητών πρωτεϊνών περιέχονται και πολλά άλλα βιολογικά μόρια (π.χ. νουκλεϊκά οξέα). Σε κάθε περίπτωση τα συστατικά αυτά απελευθερώνονται στο διάλυμα, μέσω της λύσης των κυττάρων η οποία προκαλείται εξαιτίας της

αποδιάταξης του κυτταρικού περιβλήματος. Το περίβλημα αυτό συνθέτουν το τοίχωμα αλλά και η μεμβράνη του κυττάρου.

Διακρίνουμε δύο κατηγορίες μεθόδων αποδιάταξης του κυτταρικού περιβλήματος, τις μηχανικές και τις μη μηχανικές. Προς το παρόν τουλάχιστον, η έξοδος των ενδοκυτταρικών προϊόντων από το εσωτερικό των μικροοργανισμών γίνεται κυρίως με μηχανικές μεθόδους, όπου το περίβλημα του κυττάρου αποδιοργανώνεται με φυσικό τρόπο, χωρίς την παρουσία πρόσθετων χημικών ή άλλων παραγόντων, οι οποίοι δύνανται να επηρεάσουν στη συνέχεια το αποτέλεσμα της πειραματικής διαδικασίας. Για το λόγο αυτό, κατά τη διεξαγωγή του εν λόγω σταδίου χρησιμοποιήθηκαν υπέρηχοι (50 W x 5 min) για τη λύση των κυττάρων.

Οι υπέρηχοι αποτελούν μια ευρύτατα χρησιμοποιούμενη μηχανική μέθοδο λύσης κυττάρων. Πρόκειται για ήχους υψηλής συχνότητας παραγόμενους ηλεκτρονικά, οι οποίοι μεταφέρονται μέσω ενός μεταλλικού ρύγχους σε κυτταρικό εναιώρημα κατάλληλης συγκέντρωσης. Η φιλοσοφία της λύσης με υπερήχους στηρίζεται στη δημιουργία κοιλοτήτων στο κυτταρικό εναιώρημα (Tzannis, 1991). Εντούτοις, εφιστάται η προσοχή κατά την εφαρμογή της μεθόδου, καθότι παρατηρείται ανάπτυξη υψηλών θερμοκρασιών, ικανών να προκαλέσουν ανεπιθύμητες μεταουσιώσεις στις πρωτεΐνες. Αυτός είναι κι ο λόγος που η όλη διαδικασία λύσης διεξάγεται υπό ψύξη σε λουτρό υπερήχων, με ενδιάμεσες διακοπές ενός λεπτού για κάθε ένα από τα 5 min που διαρκεί η λύση.

#### **3.4.8. Μέθοδος Bradford**

Η μέθοδος Bradford είναι μια φασματοσκοπική αναλυτική διαδικασία προσδιορισμού πρωτεϊνών, με την οποία μετράται η συγκέντρωση πρωτεΐνης σε διάλυμα. Πρόκειται για μια εξ' ολοκλήρου αντικειμενική μέθοδο προσδιορισμού πρωτεϊνών, καθόσον υπάρχει άμεση εξάρτηση από τη σύσταση σε αμινοξέα της προσδιοριζόμενης πρωτεΐνης.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη χρωματική αλλαγή σε συνδυασμό με την αλλαγή στην παρατηρούμενη απορρόφηση της χρωστικής Coomassie, όταν η πρόδρομος κόκκινη μορφή της χρωστικής αλλάζει και σταθεροποιείται σε μορφή χρώματος μπλε (Coomassie blue) με τη δέσμευση επί της πρωτεΐνης. Η ποσότητα του συμπλόκου

πρωτεΐνης-χρωστικής στο διάλυμα αποτελεί μέτρο της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης. Ο προσδιορισμός γίνεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 595 nm. Η επιλογή του συγκεκριμένου μήκους κύματος αντιστοιχεί στο μέγιστο της απορρόφησης του προαναφερόμενου συμπλόκου.

Όπως συμβαίνει με όλες τις φασματοσκοπικές μεθόδους, είναι απαραίτητη η δημιουργία πρότυπης καμπύλης, μέσω της οποίας επιτυγχάνεται ο ποσοτικός προσδιορισμός. Η καμπύλη είναι γραμμική για ένα μικρό εύρος τιμών, το οποίο εκτείνεται από 2 µg/ml μέχρι 120 µg/ml.

Επειδή η μέθοδος Bradford βασικά μετράει την ποσότητα αργινίνης και κατάλοιπα υδρόφοβων αμινοξέων, η σύσταση της πρωτεΐνης σε αμινοξέα μπορεί να αλλάξει την καμπύλη απορρόφησης-συγκέντρωσης, ανάλογα με το ποσοστό συμμετοχής της αργινίνης ή των υδρόφοβων αμινοξέων σε κάθε πρωτεΐνη. Επομένως, καθίσταται αναγκαία η χρήση ενός προτύπου (π.χ. βόεια αλβουμίνη ορού, Bovine Serum Albumin ή BSA) του οποίου η πρωτεΐνη θα ομοιάζει σε μεγάλο βαθμό με τη σύσταση της προσδιοριζόμενης πρωτεΐνης. Ωστόσο, κατά την εκτέλεση της μεθόδου θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πιθανότητα συστηματικού λάθους, εξαιτίας διαφορετικής σύστασης σε αμινοξέα για όλες τις προσδιοριζόμενες πρωτεΐνες.

Η μέθοδος λαμβάνει χώρα μετά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων και αφού πρώτα τα ελαιώδη εντός των ρυθμιστικών διαλυμάτων δειγμάτων φυγοκεντρηθούν (12000 rpm x 20 min, 4°C), ούτως ώστε να διαχωριστούν κυτταρικά υπολείμματα και τμήματα του κυτταρικού τοιχώματος από το υπόλοιπο διάλυμα, το οποίο και περιέχει τις πρωτεΐνες που απελευθερώθηκαν από το εσωτερικό του κυττάρου.

#### **3.4.9. Κατακρήμιση με τριχλωροξικό οξύ**

Μετά την τελευταία φυγοκέντρωση, απαιτείται η εύρεση ενός τρόπου διαχωρισμού μεταξύ των πρωτεϊνών και των εναπομείναντων κυτταρικών συστατικών που βρίσκονται στο υπερκείμενο. Ένας τέτοιος τρόπος είναι η κατακρήμιση με τριχλωροξικό οξύ.

Το τριχλωροξικό οξύ (TCA) είναι ένα ανάλογο του οξικού οξέος, στο οποίο τα τρία υδρογόνα της μεθυλομάδας έχουν αντικατασταθεί από άτομα χλωρίου. Χρησιμοποιείται ευρέως στη βιοχημεία για την κατακρήμιση μακρομορίων (πρωτεϊνών, DNA και RNA). Το TCA ελαττώνει τη διηλεκτρική σταθερά του μέσου διασποράς και προκαλεί

αφυδάτωση, οπότε οι πρωτεΐνες γίνονται αδιάλυτες και καθιζάνουν. Επειδή οι οργανικοί διαλύτες μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες, η κατακρήμνιση διεξάγεται σε θερμοκρασίες γύρω στους 0°C, οπότε και χρειάζεται μικρότερο ποσό του διαλύτη εξαιτίας της ελάττωσης της διαλυτότητας των πρωτεϊνών στις χαμηλές θερμοκρασίες. Έτσι χρησιμοποιείται διάλυμα τριχλωροξικού οξέος με τελική περιεκτικότητα 10% (w/v) σε TCA. Η κατακρήμνιση γίνεται με λήψη του υπερκειμένου της φυγοκέντρωσης και τοποθέτησή του στο αναφερθέν διάλυμα TCA για 1 ώρα.

#### **3.4.10. Ανάκτηση πρωτεΐνης**

Το ίζημα που προκύπτει από την ως άνω διαδικασία κατακρήμνισης δεν αποτελείται αποκλειστικά από πρωτεΐνη, καθώς περιλαμβάνει τόσο κάποια δεσμευμένα μόρια TCA όσο κι άλλα κατακρημνισθέντα, όπως είδαμε προτύτερα, βιολογικά μακρομόρια (όπως DNA και RNA). Προκειμένου λοιπόν το ίζημα να απαλλαχθεί από την παρουσία των νουκλεϊκών οξέων και του TCA, προστίθεται σε αυτό ακετόνη. Ακολούθως, το ίζημα αφήνεται για περίπου 18 ώρες στους -20°C ώστε η ακετόνη να εκχυλίσει πλήρως τα προαναφερόμενα ανεπιθύμητα συστατικά. Μετά το πέρας των 18 ωρών και την απαραίτητη φυγοκέντρωση (12000 rpm x 15 min, 4°C), το ίζημα εκπλένεται δις με ακετόνη, με την παραμονή στο διαλύτη να διαρκεί 30 λεπτά κάθε φορά. Τελικά, μετά από διαδοχικές εκπλύσεις με ακετόνη και αντίστοιχες φυγοκεντρήσεις, λαμβάνεται καθαρή πρωτεΐνη υπό μορφή ιζήματος.

#### **3.4.11. Διαδικασία ηλεκτροφόρησης πηκτής δύο διαστάσεων**

Μετά την παραλαβή πρωτεϊνικού ιζήματος απαλλαγμένου από κάθε είδους πρόσμειξη, ακολουθεί η διαδικασία ηλεκτροφόρησης πηκτής δύο διαστάσεων που περιγράφεται παρακάτω.

##### **3.4.11.1. Προετοιμασία δείγματος**

Σε πρώτη φάση είναι αναγκαία η επαναιώρηση της ληφθείσας ποσότητας καθαρής πρωτεΐνης. Η επαναιώρηση συνίσταται στη διάλυση της πρωτεϊνικής ποσότητας σε ρυθμιστικό διάλυμα ενυδάτωσης (rehydration buffer), το οποίο προστίθεται στο πρωτεϊνικό ίζημα. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος ενυδάτωσης φαίνεται στον

Πίνακα 5. Κατόπιν, η διαλυθείσα πρωτεϊνική ποσότητα κατανέμεται και εξαπλώνεται σε ειδικό δίσκο ενυδάτωσης/εξισορρόπησης (rehydration/equilibration tray), εντός των διαλύσεων της οποίας τοποθετούνται έτοιμες βαθμιδώσεις pH 4-7 υπό μορφή λωρίδας (ready IPG strips) μήκους 11 cm. Ακολούθως, η βαθμιδωτή λωρίδα pH επικαλύπτεται με ορυκτό έλαιο (mineral oil) για την παρεμπόδιση εξάτμισης κατά τη διαδικασία ενυδάτωσης. Τέλος, το σύστημα αφού πρώτα καλυφθεί με παρεχόμενο πλαστικό κάλυμα το οποίο εφαρμόζει κατάλληλα στο δίσκο, αφήνεται για 11-16 ώρες έτσι ώστε η περιεχόμενη πρωτεΐνη να διαχυθεί και να ενσωματωθεί στη βαθμιδωτή λωρίδα pH 4-7.

**Πίνακας 5:** Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ενυδάτωσης πρωτεϊνών (BIO-RAD)

<i>ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ</i>	<i>ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ</i>
Ουρία	48% (w/v)
CHAPS	2% (w/v)
Διθειοθρεϊτόλη	1% (w/v)
Αμφολύτες Bio-Lyte <sup>®</sup> 3/10	0.2% (w/v)
Μπλε βρωμοφαινόλης	ίχνος

Στο σημείο αυτό οφείλουμε να διευκρινήσουμε, ότι για τον ευκρινή εν τέλει διαχωρισμό των πρωτεϊνικών στιγμάτων και την επιτυχία της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων, απαιτείται ποσότητα 250 μg πρωτεΐνης, ενώ ο ενδεικνυόμενος όγκος διαλυθείσας πρωτεϊνικής ποσότητας για το δεδομένο μήκος της βαθμιδωτής λωρίδας του pH (11cm) είναι 185 μl.

#### **3.4.11.2. Ισοηλεκτρικός εστιασμός**

Ο ισοηλεκτρικός εστιασμός (IEF) είναι μια ηλεκτροφορητική μέθοδος διαχωρισμού των συστατικών ενός μίγματος. Κατ' αυτήν τα συστατικά διαχωρίζονται με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI). Έτσι, ταυτόχρονα με το διαχωρισμό επιτυγχάνεται και ο προσδιορισμός του ισοηλεκτρικού τους σημείου. Με τη μέθοδο αυτή, οι πρωτεΐνες κινούνται σε ένα υπόστρωμα με βαθμίδωση pH (strip) στο οποίο έχει εφαρμοστεί διαφορά δυναμικού (V), μέχρι να συναντήσουν το pH στο οποίο τα θετικά τους φορτία εξισώνονται με τα αρνητικά (pI), οπότε η κίνησή τους σταματά, ακινητοποιούνται και εστιάζονται σε στενές ζώνες.

Αφού λοιπόν παρέλθει το προβλεπόμενο χρονικό διάστημα (11-16 h) και η πρωτεϊνική ποσότητα έχει ενσωματωθεί πλήρως στη βαθμιδωτή λωρίδα του pH, λαμβάνει χώρα ο ισοηλεκτρικός εστιασμός των πρωτεϊνών. Ο τελευταίος διεξάγεται στους 20°C, με τη βοήθεια συσκευής (Εικόνα 2) η οποία και προγραμματίζεται σύμφωνα με ένα πρωτόκολλο τριών σταδίων (Πίνακας 6). Σε κάθε περίπτωση το μέγιστο του διερχόμενου ρεύματος είναι 50  $\mu\text{A}/\text{strip}$ .

**Πίνακας 6:** Πρόγραμμα ισοηλεκτρικού εστιασμού πρωτεϊνών, για IPG strip μήκους 11 cm με pH 4-7 (BIO-RAD)

<i>ΒΗΜΑ</i>	<i>ΔΙΑΦΟΡΑ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ (V)</i>	<i>ΧΡΟΝΟΣ</i>	<i>VOLT-HOURS</i>	<i>ΡΥΘΜΟΣ</i>
1 <sup>ο</sup>	250	20 min	-	Γραμμικός
2 <sup>ο</sup>	8,000	2.5 h	-	Γραμμικός
3 <sup>ο</sup>	8,000	-	20,000	Ταχύς
Σύνολο		5.3 h	~30,000	

### 3.4.11.3. Προετοιμασία για τη δεύτερη διάσταση

Μετά την ολοκλήρωση του ισοηλεκτρικού εστιασμού (1<sup>η</sup> διάσταση 2D-GE) και προτού προχωρήσουμε στην SDS-PAGE (2<sup>η</sup> διάσταση 2D-GE), είναι απαραίτητο να έχει γίνει μια προεργασία. Κατ' αρχήν θα πρέπει να έχουν ετοιμαστεί εκ των προτέρω οι πηκτές (gels) πολυακρυλαμιδίου που θα χρησιμοποιηθούν για την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών. Οι πηκτές αυτές έχουν περιεκτικότητα 12,5%T. Επίσης, θα πρέπει να έχει προετοιμαστεί, ανάλογα με τις ανάγκες, επαρκής ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροδίων (electrode or running buffer), η σύσταση του οποίου παρουσιάζεται στον Πίνακα 7. Τόσο για τις πηκτές πολυακρυλαμιδίου όσο και για το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων, ακολουθείται αναλυτική διαδικασία παρασκευής τους (Ανδρίτσος, 2006).

**Πίνακας 7:** Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροδίων, pH 8.3 (BIO-RAD)

<i>ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ</i>	<i>ΠΟΣΟΤΗΤΑ</i>
Τριδροξυμεθυλοαμινομεθάνιο (Tris-base)	15 g/l
Γλυκίνη	72 g/l
SDS	5 g/l



Εξάλλου, πριν την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών, είναι αναγκαία η διαδοχική τοποθέτηση των βαθμιδωτών λωρίδων pH σε 4 ml δύο ρυθμιστικών διαλυμάτων εξισορρόπησης (equilibration buffers), με τα οποία και επιτυγχάνεται η επίτευξη των απαραίτητων συνθηκών για μετάβαση στην SDS-PAGE. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης I (equilibration buffer I) δίνεται στον Πίνακα 8.

**Πίνακας 8:** Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης I (BIO-RAD)

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ
Ουρία	36% (w/v)
SDS	2% (w/v)
Tris-HCl, pH 8.8	5.9% (v/v)
Γλυκερόλη	20% (v/v)
Διθειοθρεϊτόλη*	2% (w/v)

\*Το ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης II (equilibration buffer II) έχει ακριβώς την ίδια σύσταση με το πρώτο, μόνον που σε αυτό δεν προστίθεται διθειοθρεϊτόλη.

Τα προηγούμενα ρυθμιστικά διαλύματα παρασκευάζονται περίπου 15 λεπτά πριν από τη χρήση τους. Μετά την τοποθέτηση των βαθμιδωτών λωρίδων pH στα ρυθμιστικά διαλύματα εξισορρόπησης (I και II) ακολουθεί ήπια ανακίνηση για 10 λεπτά. Στο χρονικό αυτό διάστημα και αμέσως μετά την τοποθέτηση των λωρίδων (strips) στο ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης I, γίνεται προσθήκη 0,5 g ιωδοακεταμιδίου στο δεύτερο ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης, με ακόλουθη ανάδευση για την πλήρη διαλυτοποίησή του.



**Εικόνα 2:** Συσκευή ισοηλεκτρικού εστιασμού Bio-Rad Protean IEF Cell (BIO-RAD)

#### 3.4.11.4. SDS-PAGE

Στα πλαίσια της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης πηκτής δύο διαστάσεων, χρησιμοποιείται η μέθοδος SDS-PAGE με την οποία και επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών βάσει του μεγέθους τους, καθώς οι τελευταίες περνούν διά μέσου των πόρων της πηκτής. Οι πρωτεΐνες μετουσιώνονται υπό την επίδραση δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS) και διθειοθρεϊτόλης (DTT). Η μέθοδος δίνει καλούς διαχωρισμούς και επιτρέπει την εκτίμηση του μοριακού βάρους των διαχωριζόμενων πρωτεϊνών, εάν παράλληλα μαζί με τα εξεταζόμενα δείγματα, υποστεί ηλεκτροφόρηση και ένα μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (δείκτης μοριακών βαρών).

Μετά την έξοδό τους λοιπόν από τα ρυθμιστικά διαλύματα εξισορρόπησης, οι πρωτεΐνες των βαθμιδωτών λωρίδων pH είναι έτοιμες να περάσουν στη δεύτερη διάσταση της 2D-GE και να διαχωριστούν σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος. Έτσι, με προσεκτικούς χειρισμούς, οι ακινητοποιημένες βαθμιδώσεις του pH, αφού πρώτα εμβαπτιστούν σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων, ενσωματώνονται στο άνω μέρος των πηκτών, χρησιμοποιώντας αγαρόζη για την επικάλυψη και στεγανοποίησή τους. Στη συνέχεια επέρχεται η συναρμολόγηση της συσκευής ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 3) και η πλήρωση των δεξαμενών αυτής με ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροδίων.



**Εικόνα 3:** Συσκευή ηλεκτροφόρησης *Bio-Rad Protean II*

Το τμήμα ψύξης της συσκευής ηλεκτροφόρησης συνδέεται με παροχή νερού και τα ηλεκτρόδια με συσκευή τροφοδοσίας συνεχούς ρεύματος.

Μετά απ' όλα αυτά ξεκινά η ηλεκτροφόρηση με ρύθμιση του ρεύματος στα 8 mA ανά πηκτή και σταθερή παροχή νερού. Με τη συμπλήρωση μιας ώρας από την έναρξη της ηλεκτροφόρησης, η οποία χρονικά συμπίπτει με τη μετάβαση του ορατού μετώπου της ηλεκτροφόρησης από το τμήμα της πηκτής συσσώρευσης (stacking gel) στο τμήμα της διαχωριστικής πηκτής (separating gel) της συνολικής πηκτής (Ανδρίτσος, 2006), η ένταση του ρεύματος αυξάνεται στα 20 mA και διατηρείται μέχρι το τέλος της ηλεκτροφορητικής διαδικασίας (περίπου 4-5 ώρες επιπλέον από την έναρξη, δηλ. σύνολο περίπου 5-6 ώρες). Επαναλαμβάνεται ότι η μετατόπιση του μετώπου του μπλε της βρωμοφαινόλης, που είναι παρούσα στο προαναφερθέν διάλυμα αгарόζης, χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της προόδου της ηλεκτροφόρησης.

#### **3.4.12. Εμφάνιση πρωτεϊνών**

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το οποίο ειρήσθω εν παρόδω καθορίζεται από τη μετακίνηση του μετώπου των ρεουσών πρωτεϊνών στο τμήμα διαχωρισμού της πηκτής, η παροχή του ρεύματος διακόπτεται και η συσκευή αποσυναρμολογείται. Η ενιαία πηκτή αποκολλάται προσεκτικά από τις πλάκες ηλεκτροφόρησης και το τμήμα πηκτής συσσώρευσης (stacking gel) αποκόπτεται και απορρίπτεται. Η εναπομείνουσα διαχωριστική πηκτή (separating gel) υφίσταται ειδική επεξεργασία για την εμφάνιση των διαχωρισθέντων, υπό μορφή στιγμάτων, πρωτεϊνών.

##### **3.4.12.1 Χρώση**

Η χρώση των πηκτών της ηλεκτροφόρησης γίνεται με χρησιμοποίηση της χρωστικής Bio-Safe Coomassie (G250 stain) της BIO-RAD. Η συγκεκριμένη χρωστική ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των χρωστικών Coomassie (γνωστές και ως χρωστικές Coomassie Brilliant), που γενικά χρησιμοποιούνται στη χρώση διαχωρισθέντων ηλεκτροφορητικά πρωτεϊνών. Από το σύνολο των χρωστικών της οικογένειας (R250, G250, R150) η G250 είναι η πιο ευαίσθητη, παρουσιάζοντας κατά 10 φορές χαμηλότερο όριο ανιχνευσιμότητας σε σχέση με την κοινά χρησιμοποιούμενη R250. Η αρχή

προσδιορισμού της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε διάλυμα είναι η ίδια για όλες τις χρωστικές της οικογένειας και περιγράφηκε σε προηγούμενη παράγραφο (παρ. 3.4.8.).

Η διαδικασία χρώσης με τη χρωστική G250 περιλαμβάνει αρχικά την έκπλυση της πηκτής με απιονισμένο νερό. Η έκπλυση γίνεται υπό ήπια ανακίνηση, διαρκεί 5 λεπτά και επαναλαμβάνεται τρεις φορές. Σε κάθε έκπλυση χρησιμοποιείται νέα ποσότητα νερού. Έπειτα, σειρά έχει η προσθήκη αρκετής ποσότητας χρωστικής ώστε να καλυφθεί κάθε πηκτή. Οι πηκτές τοποθετούνται σε ανακινούμενη επωαστική τράπεζα για τουλάχιστον 1 ώρα.

#### **3.4.12.2. Αποχρωματισμός**

Με την παραπάνω διαδικασία η χρωστική διαχέεται εντός της πηκτής, όμως συνδέεται μόνιμα μόνον με τις πρωτεΐνες. Η εμφάνιση των πρωτεϊνικών στιγμάτων δεν είναι δυνατή αν δεν επέλθει ο αποχρωματισμός της πηκτής, ο οποίος και συνίσταται στην απομάκρυνση της χρωστικής από τις περιοχές εκείνες όπου δεν παρατηρείται σύνδεση με τις πρωτεΐνες. Μετά τη χρώση λοιπόν, οι πηκτές εκπλένονται με απιονισμένο νερό για 15-30 λεπτά, πάντα υπό ήπια ανακίνηση. Η έκπλυση επαναλαμβάνεται δύο φορές. Σημειώτεον ότι είναι πιθανόν να χρειαστούν μεγαλύτερης διάρκειας εκπλύσεις για την απομάκρυνση της εναπομείνουσας χρωστικής. Στο τέλος οι πηκτές συντηρούνται σε απιονισμένο νερό για μερικές ημέρες.

# 4

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1. Γενικά

Στο προηγούμενο κεφάλαιο, είδαμε αναλυτικά την πειραματική διαδικασία που ακολουθείται για τον προσδιορισμό του βακτηριακού πληθυσμού του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* Scott A, κατά την ισχυρά όξινη καταπόνησή του. Ακόμη, περιγράφηκε λεπτομερώς η διαδικασία απομόνωσης των πρωτεϊνών από τις κυτταρικές καλλιέργειες του στελέχους.

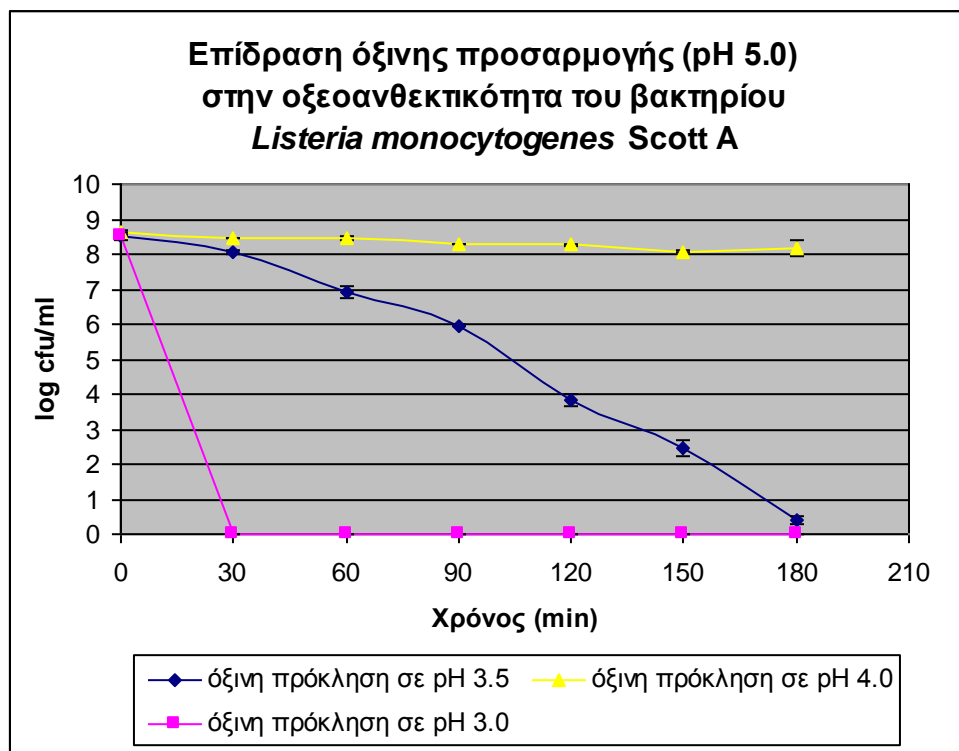
Οι προηγούμενες δύο διαδικασίες ναι μεν αποτελούν ξεχωριστά τμήματα ενός ενιαίου πειράματος, ωστόσο η συνδυαστική μελέτη τους παρέχει χρήσιμα συμπεράσματα, δίνοντας μια ολοκληρωμένη εικόνα της συμπεριφοράς του τροφιμογενούς παθογόνου παράγοντα *L. monocytogenes* Scott A υπό διαφορετικές συνθήκες. Εξάλλου, σε κάθε μια από τις διαδικασίες αυτές διακρίνουμε τρεις περιπτώσεις, οι οποίες αφορούν αντιστοίχως την προτέρα προσαρμογή σε συνθήκες όξινης και θερμοκρασιακής καταπόνησης, καθώς και τη μη προσαρμογή σε οποιοδήποτε είδους καταπόνηση. Η τελευταία αυτή περίπτωση χρησιμεύει ως μάρτυρας, κατά τη συγκριτική μελέτη των αποτελεσμάτων που θα προκύψουν μετά την προσαρμογή στις προαναφερόμενα υποβληθείσες συνθήκες όξινης και θερμοκρασιακής καταπόνησης.

### 4.2. Επίδραση στην οξεοανθεκτικότητα

Η επίδραση των διαφορετικών συνθηκών προσαρμογής στην οξεοανθεκτικότητα του βακτηρίου *L. monocytogenes* Scott A, αξιολογείται με τη βοήθεια της διαδικασίας όξινης πρόκλησης (παρ. 3.4.5.).

#### 4.2.1. Όξινη προσαρμογή

Μετά την προσαρμογή του στελέχους Scott A σε συνθήκες ήπιας καταπόνησης με χρήση γαλακτικού οξέος (pH 5.0), ακολουθεί ο προσδιορισμός της οξεοανθεκτικότητάς του με μέτρηση της αντοχής του σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος (pH 3.0, pH 3.5, pH 4.0). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από μια τέτοια διαδικασία όξινης πρόκλησης, φαίνονται στο παρακάτω σχήμα.



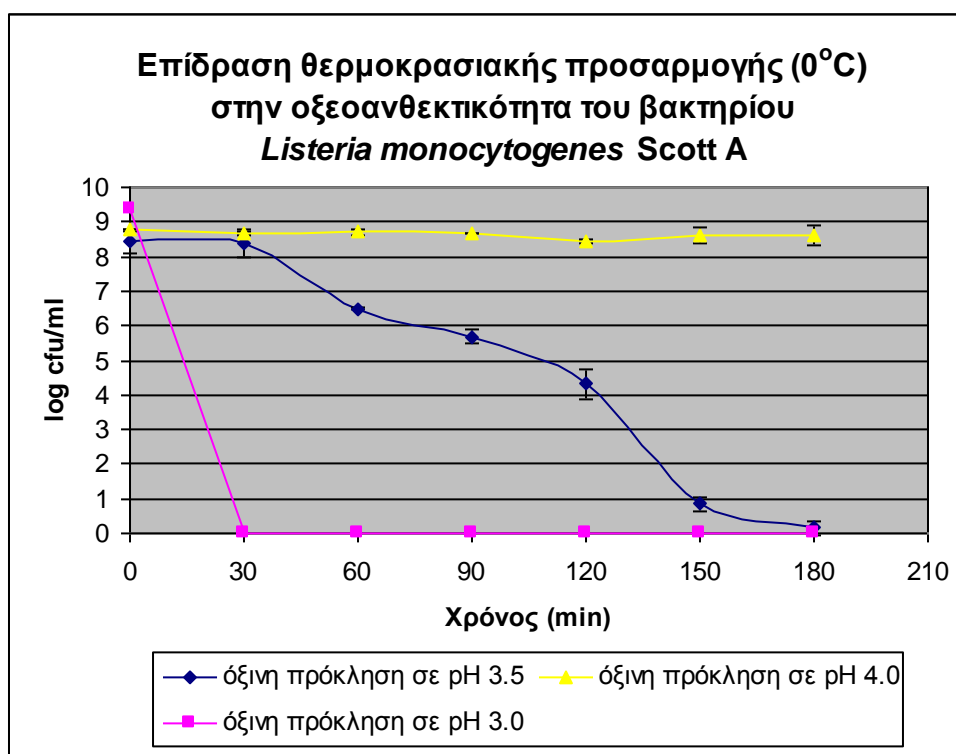
**Σχήμα 4:** Επίδραση όξινης προσαρμογής σε pH 5.0, στην οξεοανθεκτικότητα του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* Scott A, κατά την όξινη πρόκληση σε pH 3.0, pH 3.5 και pH 4.0

Από την ανάλυση του πιο πάνω διαγράμματος (Σχήμα 4) προκύπτουν χρήσιμες παρατηρήσεις. Έτσι, για το μελετώμενο χρονικό διάστημα των 3 ωρών μετά την έκθεση του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* Scott A στις ακραία όξινες συνθήκες, φαίνεται ξεκάθαρα η θανατηφόρος επίδραση του γαλακτικού οξέος στις τιμές pH 3.0 και 3.5, σε αντίθεση με την τιμή pH 4.0 όπου το στέλεχος παρουσιάζει εμφανή ανεκτικότητα στο οξύ, με τον βακτηριακό πληθυσμό στην περίπτωση αυτή να διατηρείται σχεδόν αμετάβλητος. Ειδικότερα, μεταξύ συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος με pH 3.0 και pH 3.5

αντίστοιχα, η πρώτη τιμή είναι περισσότερο θανατηφόρα, καθώς, όπως βλέπουμε, μόλις από το πρώτο ημίωρο μετά την έκθεση στο οξύ το σύνολο των βακτηριακών κυττάρων θανατώνεται, ενώ αντιθέτως στην τιμή pH 3.5 χρειάζεται να παρέλθει το χρονικό διάστημα των 3 ωρών για να μηδενιστεί ο πληθυσμός.

#### 4.2.2. Θερμοκρασιακή προσαρμογή

Πέραν της προσαρμογής σε συνθήκες όξινης καταπόνησης, το στέλεχος Scott A υφίσταται μεμονωμένη προσαρμογή και σε συνθήκες θερμοκρασιακής καταπόνησης. Μετά την προσαρμογή του στελέχους σε χαμηλή θερμοκρασία (0°C), ακολουθεί ο προσδιορισμός της οξεοανθεκτικότητάς του, κατά τον ίδιο τρόπο όπως και στην περίπτωση της όξινης προσαρμογής που είδαμε προηγουμένως. Τα αποτελέσματα αυτής της διαδικασίας, φαίνονται στο σχήμα που ακολουθεί.

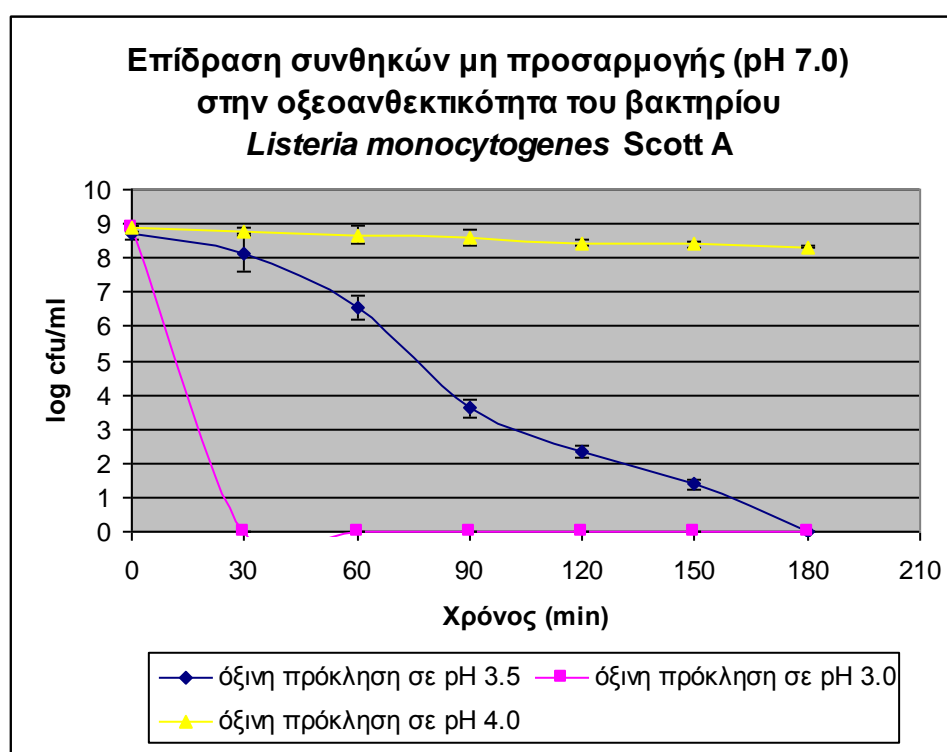


**Σχήμα 5:** Επίδραση θερμοκρασιακής προσαρμογής στους 0°C, στην οξεοανθεκτικότητα του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* Scott A, κατά την όξινη πρόκληση σε pH 3.0, pH 3.5 και pH 4.0

Από τις καμπύλες θανάτωσης/ανεκτικότητας του προηγούμενου διαγράμματος (Σχήμα 5), παρατηρείται ταύτιση με τα όσα αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο (παρ. 4.2.1.) περί θανατηφόρου επίδρασης του χρησιμοποιούμενου γαλακτικού οξέος.

#### 4.2.3. Συνθήκες μη προσαρμογής

Η απευθείας έκθεση του στελέχους Scott A στις χρησιμοποιούμενες, κατά τη διαδικασία όξινης πρόκλησης, χαμηλές τιμές pH, χωρίς προτέρα προσαρμογή σε συνθήκες ήπιας καταπόνησης, επιφέρει τα πιο κάτω αποτελέσματα (Σχήμα 6).



**Σχήμα 6:** Επίδραση συνθηκών μη προσαρμογής (pH 7.0), στην οξεοανθεκτικότητα του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* Scott A, κατά την όξινη πρόκληση σε pH 3.0, pH 3.5 και pH 4.0

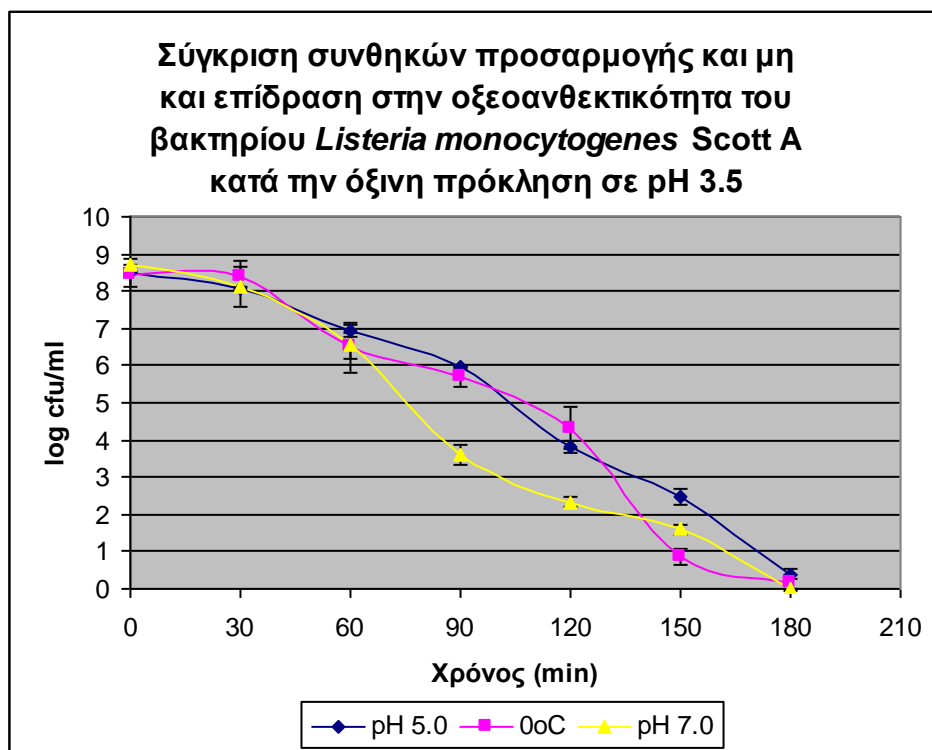
Όπως και στις δύο περιπτώσεις που περιγράφησαν προηγούμενα (παρ. 4.2.1. & 4.2.2.), ισχύουν οι ίδιες διαπιστώσεις και εδώ για το ρυθμό θανάτωσης στις τιμές pH 3.0 και 3.5, ενώ ομοίως παρουσιάζεται εμφανής ανεκτικότητα του στελέχους στην τιμή pH 4.0. Μολαταύτα, όπως φαίνεται και από την αντίστοιχη καμπύλη του άνωθεν διαγράμματος (Σχήμα 6), ο βακτηριακός πληθυσμός κατά τη μεταχείριση με γαλακτικό οξύ τιμής pH



4.0 παρουσιάζει αργή αλλά σταθερή μείωση. Το γεγονός αυτό θεωρείται αναμενόμενο αν αναλογιστούμε ότι η συγκεκριμένη μεταχείριση συνιστά ταυτοχρόνως και κατάπληξη (shock) του βακτηρίου, με δεδομένο ότι ο μικροοργανισμός δεν έχει προλάβει να προσαρμοστεί προηγούμενα σε κάποιες συνθήκες.

#### 4.2.4. Σύγκριση μεταξύ συνθηκών προσαρμογής και μη προσαρμογής

Ύστερα από την παράθεση των αποτελεσμάτων απόκρισης του στελέχους Scott A σε χαμηλές τιμές pH, μετά την προσαρμογή ή μη σε μεμονωμένες συνθήκες ήπιας καταπόνησης (όξινης και θερμοκρασιακής), εξάχθηκε το συμπέρασμα ότι ο μικροοργανισμός σε κάθε περίπτωση ανταποκρίνεται κατά παρόμοιο τρόπο στα όρια του μελετώμενου εύρους pH (τιμές pH 3.0 και 4.0). Ενδιαφέρον όμως παρουσιάζει η απόκριση του στελέχους στο ενδιάμεσο των προηγούμενων ορίων. Για το λόγο αυτό, παρατίθεται ενδεικτικά στη συνέχεια συγκριτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων απόκρισης του Scott A σε pH 3.5.



**Σχήμα 7:** Συγκριτική παρουσίαση μετά την προσαρμογή ή μη σε μεμονωμένες συνθήκες ήπιας καταπόνησης (όξινης και θερμοκρασιακής), της οξεοανθεκτικότητας του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* Scott A, κατά την όξινη πρόκληση σε pH 3.5

Από τη μελέτη του προηγούμενου διαγράμματος (Σχήμα 7) προκύπτει πληθώρα χρήσιμων διαπιστώσεων. Εν πρώτοις, θα πρέπει να επισημανθεί το γεγονός ότι εντός της πρώτης ώρας από την έκθεση του στελέχους στο pH 3.5 δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στο ρυθμό θανάτωσης, ο οποίος παραμένει ίδιος για κάθε διαφορετική μελετούμενη περίπτωση. Από εκεί και έπειτα, μέχρι και το πέρας της διαδικασίας προσδιορισμού του βακτηριακού πληθυσμού στις 3 ώρες, ο ρυθμός θανάτωσης διαφέρει αρκετά ανάλογα με την περίπτωση. Συγκεκριμένα, για το χρονικό διάστημα μεταξύ πρώτης και δεύτερης ώρας, είναι φανερό ότι ο ρυθμός θανάτωσης είναι μεγαλύτερος στην περίπτωση απουσίας προσαρμογής σε μεμονωμένες συνθήκες ήπιας καταπόνησης, συγκριτικά με τον παρατηρούμενο ρυθμό θανάτωσης μετά από όξινη και θερμοκρασιακή προσαρμογή. Μεταξύ των τελευταίων δύο αυτών συνθηκών προσαρμογής και για το προαναφερόμενο χρονικό διάστημα (60-120 min), με δεδομένη και μια αναμενόμενη λογική απόκλιση, ο ρυθμός θανάτωσης φαίνεται να είναι παρόμοιος, αν όχι ο ίδιος, και για τις δύο μελετούμενες περιπτώσεις. Τέλος, ο ρυθμός θανάτωσης μεταβάλλεται εκ νέου για κάθε περίπτωση, στην τρίτη και τελευταία ώρα διεξαγωγής της διαδικασίας όξινης πρόκλησης. Εντός του χρονικού αυτού διαστήματος (120-180 min), ο όξινα προσαρμοσμένος μικροοργανισμός σε pH 5.0 δείχνει μια περισσότερο αυξημένη ανθεκτικότητα σε σχέση με τις άλλες δύο περιπτώσεις (θερμοκρασιακή προσαρμογή στους 0°C και μη προσαρμογή σε συνθήκες ήπιας καταπόνησης), παρουσιάζοντας κατά συνέπεια ένα συγκριτικά μειωμένο ρυθμό θανάτωσης.

### 4.3. Επίδραση στο πρωτέωμα

Η επίδραση των διαφορετικών συνθηκών προσαρμογής επί του πρωτεώματος του βακτηρίου *L. monocytogenes* Scott A, αξιολογείται με χρήση ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμιδίου δύο διαστάσεων (παρ. 2.4.1.1. & 3.4.11.), σε συνδυασμό με το πρόγραμμα λογισμικού (software) για ηλεκτρονικό υπολογιστή (H/Y) PDQuest Advanced-8.0.1 (BIO-RAD) και τη βοήθεια συσκευής σάρωσης-μέτρησης οπτικής πυκνότητας πηκτών ηλεκτροφόρησης (GS-800 Calibrated Densitometer).

### 4.3.1. Δείκτης μοριακών βαρών

Για την εκτίμηση του μοριακού βάρους των διαχωριζόμενων πρωτεϊνικών στιγμάτων και το συνακόλουθο ποιοτικό προσδιορισμό των εξ αυτών προερχόμενων πρωτεϊνών του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* Scott A, χρησιμοποιείται ένα μίγμα πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, αποκαλούμενο δείκτης μοριακών βαρών (size marker). Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιείται ο δείκτης μοριακών βαρών Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range της BIO-RAD, ο οποίος περιέχει τις πρωτεΐνες του Πίνακα 9.

**Πίνακας 9:** Σύσταση δείκτη μοριακών βαρών *Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range* (BIO-RAD)

<i>ΠΡΩΤΕΪΝΗ</i>	<i>ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ</i>	<i>ΜΟΡΙΑΚΟ ΒΑΡΟΣ (kDa)</i>
Μυοσίνη	σκελετικός μυς κουνελιού	207.345
β-γαλακτοζιδάση	<i>E. coli</i>	114.363
Βόεια αλβουμίνη ορού	πλάσμα αίματος βοός	78.444
Οβαλβουμίνη	ασπράδι αυγού	53.086
Ανθρακική ανυδράση	ερυθροκύτταρα βοός	35.719
Παρεμποδιστής τρυψίνης σόγιας	σόγια	28.329
Λυσοζύμη	ασπράδι αυγού	19.325
Απροτινίνη	πάγκρεας βοός	6.973

Όπως βλέπουμε στον παραπάνω πίνακα (Πίνακας 9), ο χρησιμοποιούμενος δείκτης μοριακών βαρών αποτελείται από οκτώ πρωτεϊνικά μόρια εκ των οποίων τα τρία είναι απλές πρωτεΐνες (μυοσίνη, βόεια αλβουμίνη ορού, οβαλβουμίνη), τα δύο είναι πρωτεϊνικοί παρεμποδιστές ενζύμων (παρεμποδιστής τρυψίνης σόγιας, απροτινίνη), ενώ τα υπόλοιπα τρία παρουσιάζουν ενζυμική δράση, πρόκειται δηλαδή για ένζυμα (β-γαλακτοζιδάση, ανθρακική ανυδράση, λυσοζύμη).

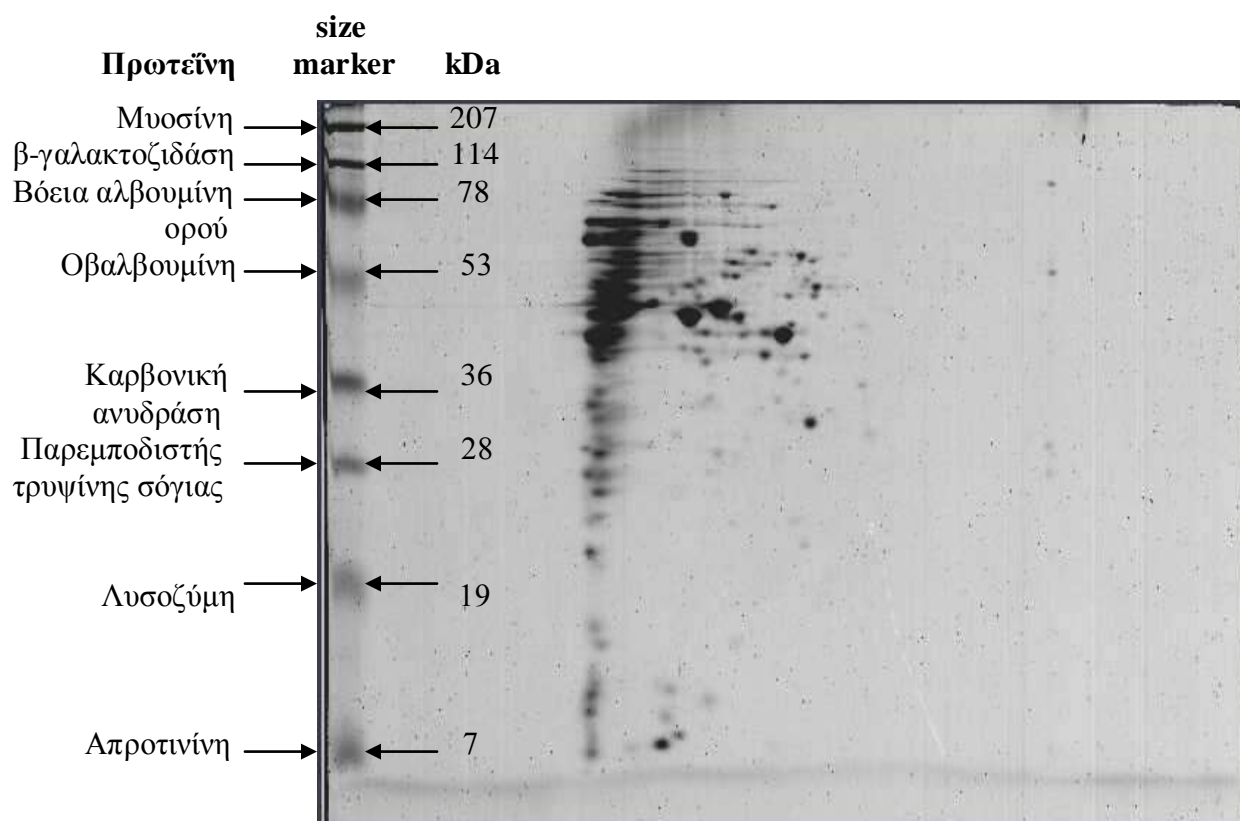
Στο σημείο αυτό οφείλει να επισημανθεί το γεγονός ότι εξαιτίας της σύστασης της πηκτής σε μονομερές και bis-ακρυλαμίδιο (12.5%T), η μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνη απροτινίνη του ως άνω δείκτη εμφανίζεται πάνω στο μέτωπο της ηλεκτροφόρησης.

### 4.3.2. Αποτύπωση πρωτεϊνών

Η διαδικασία αποχρωματισμού (παρ. 3.4.12.2.), που έπεται της χρώσης των πηκτών ηλεκτροφόρησης, οδηγεί στην αποτύπωση της πρωτεϊνικής σύστασης του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* Scott A επί της πηκτής, υπό μορφή πρωτεϊνικού «χάρτη», για τις διαφορετικές συνθήκες προσαρμογής.

#### 4.3.2.1. Όξινη προσαρμογή

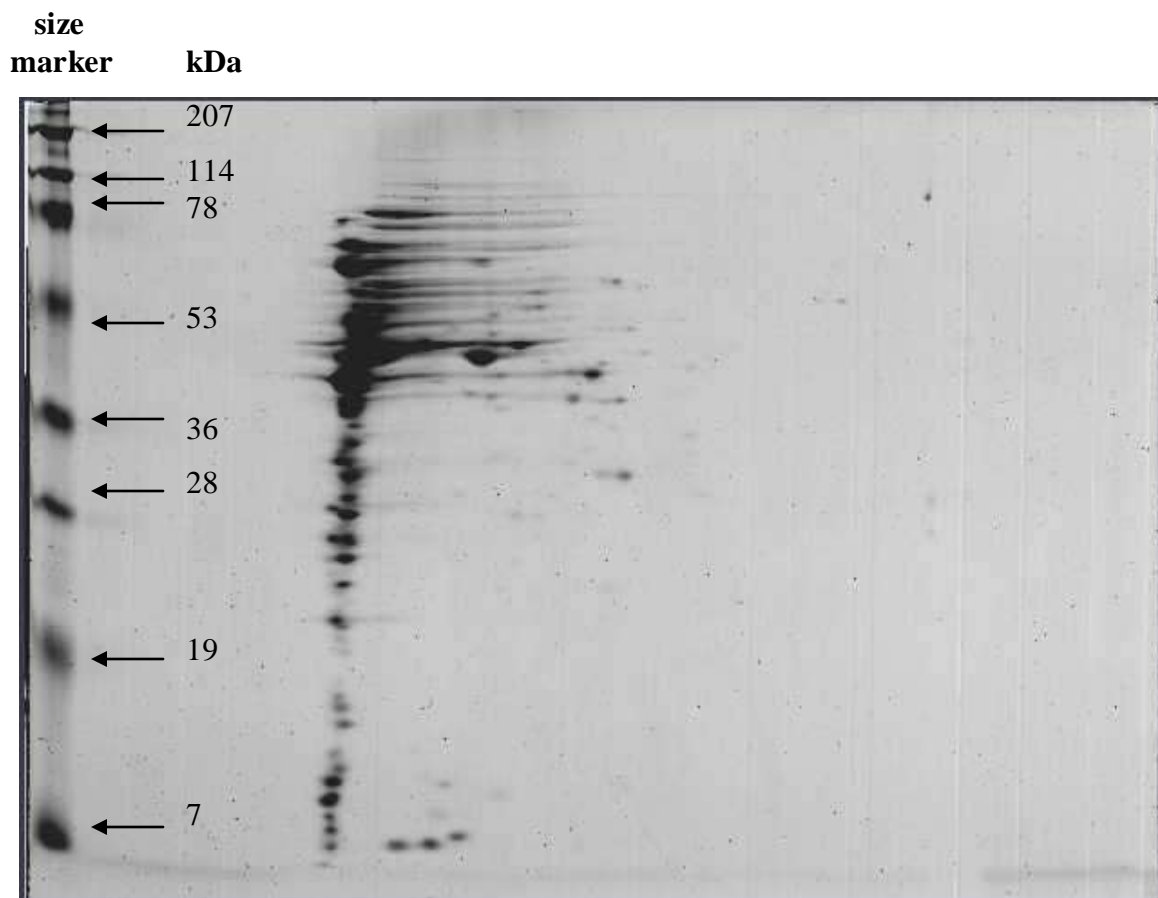
Αμέσως μετά την προσαρμογή σε συνθήκες ήπιας καταπόνησης με χρήση γαλακτικού οξέος (pH 5.0), το στέλεχος Scott A παρουσιάζει την ακόλουθη εικόνα (Εικόνα 4) όσον αφορά το πρωτέωμά του.



**Εικόνα 4:** Επίδραση όξινης προσαρμογής σε pH 5.0, στο πρωτέωμα του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* Scott A, μετά από ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου δύο διαστάσεων

#### 4.3.2.2. Θερμοκρασιακή προσαρμογή

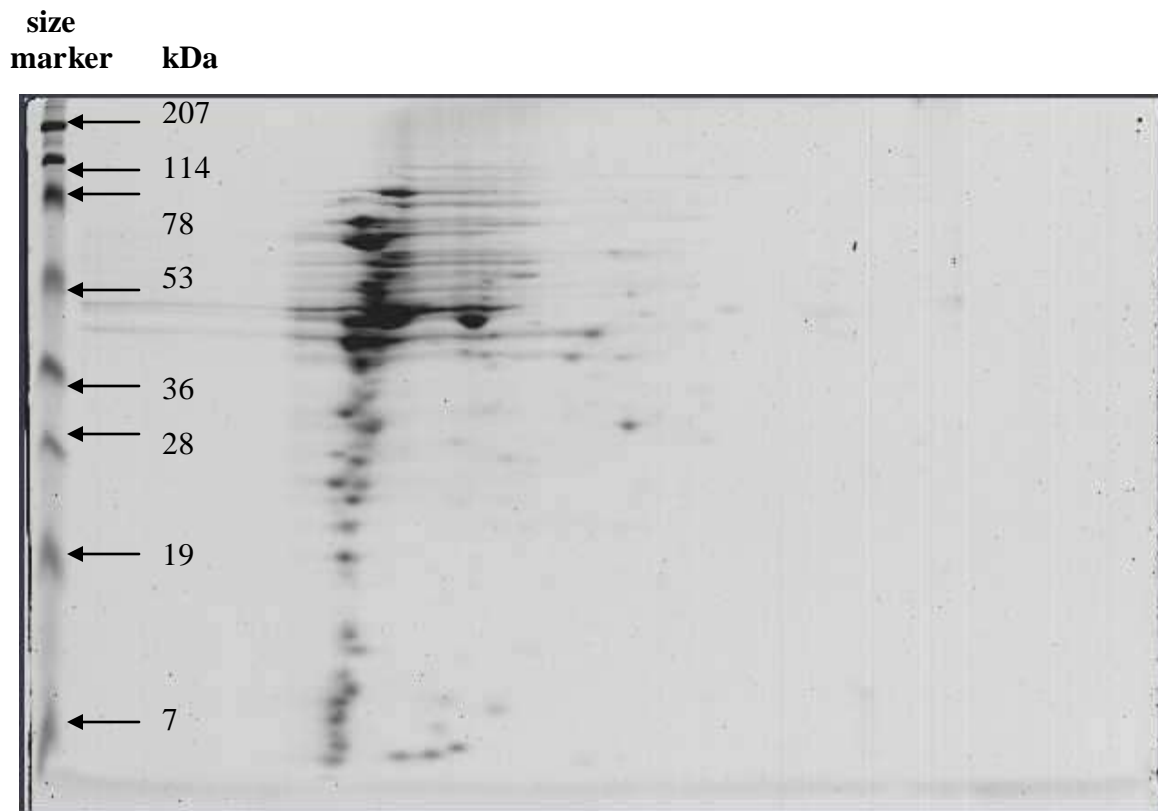
Μετά την προσαρμογή του στελέχους Scott A σε χαμηλή θερμοκρασία (0°C), το σύνολο των πρωτεϊνών, καθώς και τα επίπεδα που αυτές απαντώνται στις δεδομένες συνθήκες θερμοκρασιακής προσαρμογής, φαίνεται στην Εικόνα 5.



**Εικόνα 5:** Επίδραση θερμοκρασιακής προσαρμογής στους 0°C, στο πρωτέωμα του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* Scott A, μετά από ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδιου δύο διαστάσεων

#### 4.3.2.3. Συνθήκες μη προσαρμογής

Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων των ευρισκόμενων εις το μέσον της λογαριθμικής φάσης αναπτύξεως κυττάρων του Scott A, χωρίς προηγούμενη προσαρμογή σε συνθήκες ήπιας καταπόνησης, παρουσιάζεται στην Εικόνα 6 που ακολουθεί.

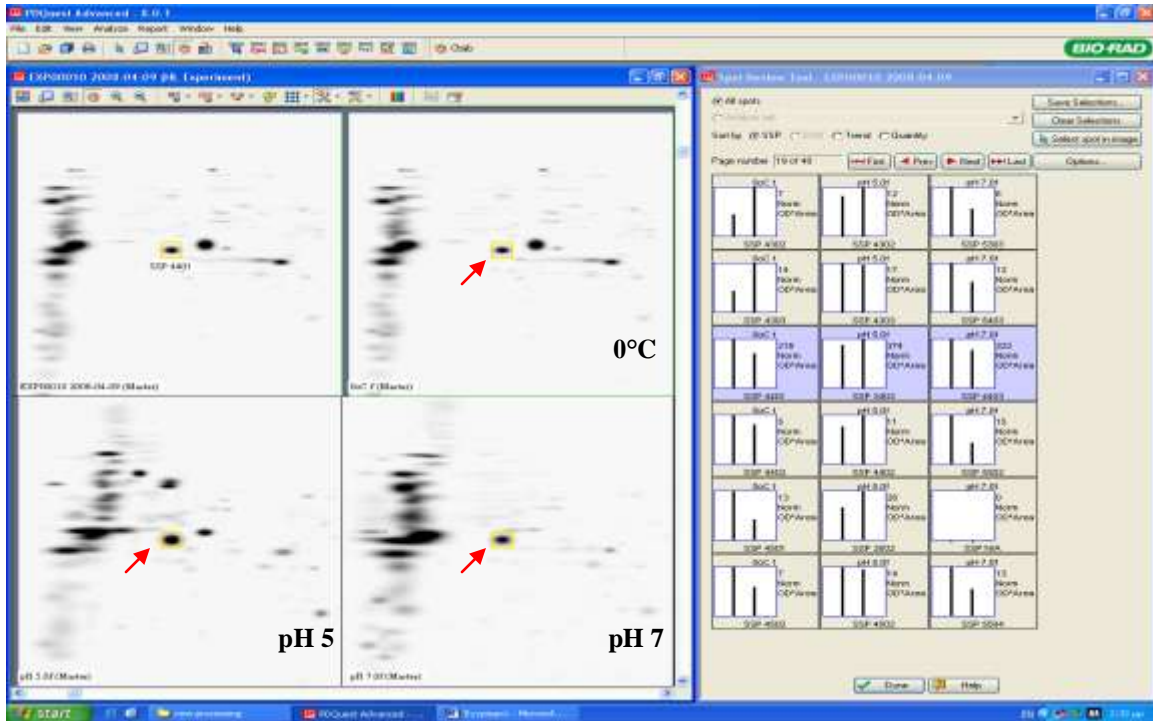


**Εικόνα 6:** Επίδραση συνθηκών μη προσαρμογής (pH 7.0), στο πρωτέωμα του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* Scott A, μετά από ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου δύο διαστάσεων

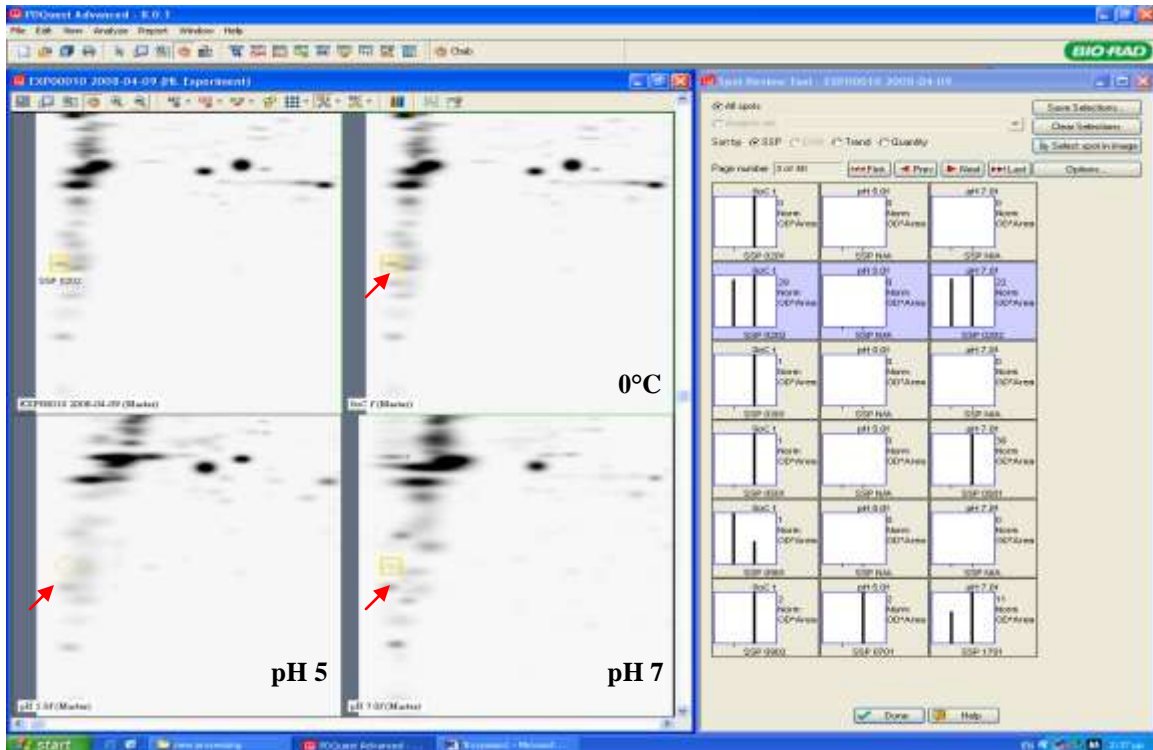
#### 4.3.2.4. Σύγκριση μεταξύ συνθηκών προσαρμογής και μη προσαρμογής

Η σάρωση (scanning) και η ταυτόχρονη επεξεργασία των πρωτεωμάτων επί των πηκτών της ηλεκτροφόρησης με το πρόγραμμα λογισμικού PDQuest Advanced-8.0.1 της BIO-RAD, μας επιτρέπει να συγκρίνουμε τα αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων δύο διαστάσεων και να προσδιορίσουμε κατ' αυτόν τον τρόπο ενδεχόμενες ομοιότητες, αλλά και διαφορές όσον αφορά την εμφάνιση ή μη ορισμένων πρωτεϊνών, μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών προσαρμογής και μη προσαρμογής. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων περιπτώσεων εμφανίζονται στην Εικόνα 7.

(α)

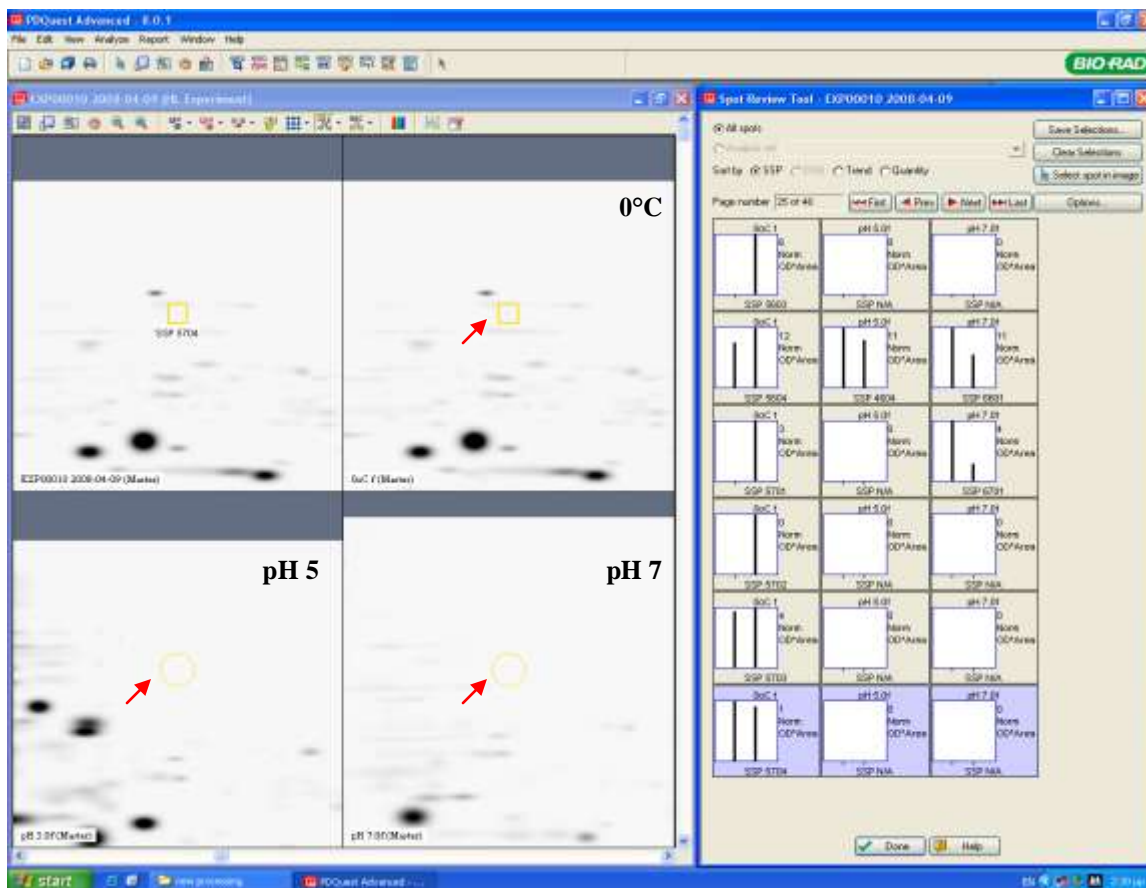


(β)





(γ)



**Εικόνα 7:** Σύγκριση μεταξύ συνθηκών προσαρμογής και μη προσαρμογής, μετά τις ηλεκτροφορήσεις πηκτών πολυακρυλαμιδίου δύο διαστάσεων, για τον εντοπισμό ομοιοτήτων ή διαφορών στα προκύπτοντα πρωτεώματα του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* Scott A. Η σύγκριση έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος για H/Y PDQuest Advanced-8.0.1.

- (α) Κοινά απαντώμενο πρωτεϊνικό στίγμα για τις δεδομένες συνθήκες όξινης και θερμοκρασιακής προσαρμογής, καθώς και για τις συνθήκες μη προσαρμογής.
- (β) Πρωτεϊνικό στίγμα απαντώμενο τόσο σε συνθήκες θερμοκρασιακής προσαρμογής όσο και σε συνθήκες μη προσαρμογής, αλλά απών από συνθήκες όξινης προσαρμογής.
- (γ) Πρωτεϊνικό στίγμα απαντώμενο μόνο υπό συνθήκες θερμοκρασιακής προσαρμογής, η παρουσία του οποίου δεν παρατηρείται υπό συνθήκες όξινης προσαρμογής, αλλά ούτε και υπό συνθήκες μη προσαρμογής



Αξίζει να σημειωθεί ότι οι επαγόμενες πρωτεΐνες, για τις δύο περιπτώσεις προσαρμογής, έφτασαν γύρω στις 41. Από αυτές, περί τις 21 αναφέρονται σε πρωτεΐνες ψυχρής κατάπληξης και ψυχρού εγκλιματισμού (Csps μαζί με Caps, παρ. 2.3.1.2.), παραγόμενες κατά τη θερμοκρασιακή προσαρμογή (0°C) του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* Scott A, ενώ οι υπόλοιπες 20 περίπου προέκυψαν ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης του στελέχους σε συνθήκες ήπιας κατάπονησης με χρήση γαλακτικού οξέος (pH 5.0).

Σε καθένα από τα προηγούμενα παραδείγματα της Εικόνας 7 διακρίνονται τα αποτελέσματα της επεξεργασίας για τις τρεις διαφορετικές περιπτώσεις ύπαρξης ή μη προτέρας προσαρμογής. Έτσι, τα σημειωθέντα επί των πηκτών κίτρινα τετραγωνίδια ανταποκρίνονται σε πρωτεϊνικά στίγματα, τα οποία υπάρχουν στις αντίστοιχες πηκτές. Αντίθετα, οι κίτρινες κυκλικές επισημάνσεις δηλώνουν την απουσία των συγκεκριμένων πρωτεϊνικών στιγμάτων από τις εξεταζόμενες πηκτές. Η πρώτη εκ των τεσσάρων πηκτών, καλούμενη master gel, που παρουσιάζεται άνω δεξιά σε κάθε παράδειγμα της Εικόνας 7, αντιστοιχεί στο αποτέλεσμα της σύνθεσης των τριών προαναφερόμενων συνθηκών (προσαρμογή ή μη). Περαιτέρω, στα δεξιά του κάθε παραδείγματος παρουσιάζονται τρία σκιασμένα ραβδογράμματα. Το κάθε ραβδόγραμμα αντιστοιχεί σε μία εκ των τριών πηκτών και αποτελείται από δύο στήλες, μία για κάθε επανάληψη. Η παρουσία και το ύψος της στήλης είναι δηλωτικά της παρουσίας και της ποσότητας του πρωτεϊνικού στίγματος αντιστοίχως.

Από τη στιγμή που μια πρωτεΐνη έχει εντοπιστεί και διαχωριστεί επάνω στην πηκτή της ηλεκτροφόρησης δύο διαστάσεων υπό μορφή στίγματος (spot), βασικό χαρακτηριστικό αποτελεί η εμφάνιση αυτού του στίγματος. Συγκεκριμένα, ενδιαφέρον παρουσιάζει το μέγεθος και η ένταση του προκύπτοντος στίγματος. Τα μεγάλα και έντονα στίγματα υποδηλώνουν μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνης, σε αντίθεση με τα μικρά και ισχνά, τα οποία δηλώνουν την παρουσία μικρών ποσοτήτων της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Εντούτοις, αυτό το τελευταίο δεν είναι και απόλυτο, αφού η καθεμία πρωτεΐνη ξεχωριστά δεσμεύει ποσότητες χρωστικής οι οποίες διαφέρουν από μόριο σε μόριο, με αποτέλεσμα η ένταση του πρωτεϊνικού στίγματος να ποικίλει. Επίσης, η εμφάνιση ενός μεγάλου πρωτεϊνικού στίγματος σε ένα πρωτέωμα, μπορεί να υποδεικνύει την ταυτόχρονη παρουσία αρκετών πρωτεϊνών με μικρές μόνο διαφορές στα μοριακά τους

βάρη, οι οποίες, λόγω και της συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου, συσσωρεύονται και σχηματίζουν ένα ενιαίο πρωτεϊνικό στίγμα.

### 4.3.3. Ταυτοποίηση πρωτεϊνών

Μέχρι τώρα είδαμε ότι καθένα από τα εμφανισθέντα στίγματα επί της πηκτής αντιστοιχεί σε μία ή περισσότερες πρωτεΐνες, με γνωστά στοιχεία το ισοηλεκτρικό σημείο (pI) και το μοριακό βάρος (Mw) του κάθε στίγματος. Οι αντιστοιχούσες πρωτεΐνες κάθε στίγματος δύνανται να ταυτοποιηθούν και να προσδιοριστούν επακριβώς με χρήση φασματομετρίας μάζας (MS).

Ένεκα αντικειμενικών και τεχνικών δυσκολιών κατά την εκτέλεση της παρούσας πειραματικής εργασίας, δεν κατέσται δυνατός ο ποιοτικός προσδιορισμός των προκύπτοντων πρωτεϊνικών στιγμάτων μέσω MS. Αντ' αυτού χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτρονική βάση δεδομένων EXPASY (<http://ca.expasy.org/tools/tagident.html>), στην οποία έχει καταχωρηθεί μεγάλος όγκος πληροφοριών για πληθώρα πρωτεϊνών. Ειδικότερα, η αναζήτηση στην εν λόγω βάση δεδομένων αφορούσε τόσο τις επαγόμενες πρωτεΐνες όσο και τις πρωτεΐνες εκείνες των οποίων τα στίγματα ήσαν μοναδικά και αντιπροσωπευτικά για κάθε περίπτωση προσαρμογής. Τα αποτελέσματα αυτής της αναζήτησης φαίνονται στους Πίνακες 10 έως 14.

**Πίνακας 10:** Αποτελέσματα αναζήτησης (EXPASY) για τον ποιοτικό προσδιορισμό των επαγόμενων πρωτεϊνών του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* Scott A, μετά από προσαρμογή σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (pH 5.0)

Κωδικός στίγματος	Στοιχεία στίγματος		Πιθανές πρωτεΐνες	Στοιχεία πρωτεΐνης			
	pI	Mw (kDa)		Αμινοξέα	pI	Mw (kDa)	Γονίδιο
2202	4.52	47.81	Χωροταξική πρωτεΐνη CBS	444	4.53	49.739	?
			Πρωτεΐνη Lmo0181	418	4.53	46.634	?
2807	4.67	120.24	IspD	1073	4.70	115.724	ispD
			Πρωτεΐνη οικογένειας εντοπισμένης στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος	1047	4.65	112.671	?
3402	4.80	67.62	Συνθετάση Προλυλ-tRNA (EC 6.1.1.15)	568	4.79	63.354	proS
			Κινάση ιστιδίνης	601	4.80	68.448	?

Πίνακα 10: (συνέχεια)

Κωδικός στίγματος	Στοιχεία στίγματος		Πιθανές πρωτεΐνες	Στοιχεία πρωτεΐνης			
	pI	Mw (kDa)		Αμινοξέα	pI	Mw (kDa)	Γονίδιο
			Πεπτιδάση, οικογένεια M3	602	4.79	68.688	?
			Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	580	4.79	63.478	?
			Ολιγοενδοπεπτιδάση F (EC 3.4.24.-)	601	4.80	68.551	pepF
			Πρωτεΐνη οικογένειας εντοπισμένης στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος	634	4.79	68.996	?
			Πεπτιδάση, οικογένεια M3	602	4.79	68.704	?
			Κινάση ιστιδίνης	601	4.80	68.418	?
			Πρωτεΐνη οικογένειας εντοπισμένης στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος	580	4.79	63.493	?
			Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	580	4.79	63.478	?
			Πρωτεΐνη θεωρούμενη δεσμευμένη στο στρώμα της πεπτιδογλυκάνης	626	4.80	68.196	?
			Πρωτεΐνη Lmo1493	602	4.79	68.794	?
			Πρωτεΐνη θεωρούμενη δεσμευμένη στο στρώμα της πεπτιδογλυκάνης	571	4.80	62.373	?
3803	4.83	113.15	?	-	-	-	-
3705	4.86	89.33	Ιντερναλίνη A	800	4.86	86.612	inlA
			Ιντερναλίνη A	797	4.87	86.418	inlA
			Πρωτεΐνη Ser/Thr οικογένειας πρωτεϊνικής φωσφατάσης	782	4.87	82.264	?
			Εξειδικευμένη εξονουκλεάση για την μια αλυσίδα του DNA (EC 3.1.-.-)	783	4.87	87.724	recJ
4202	4.94	43.17	Πεπτιδάση T (EC 3.4.11.4)	410	4.95	45.681	pepT
			Επαγόμενη πρωτεΐνη έναντι θεωρούμενης καταπόνησης	414	4.95	45.708	cinA
			Ομοσερίνη O- ακετυλτρανσφεράση (EC 2.3.1.31)	368	4.94	40.906	metX
			Πρωτεΐνη UPF0210	451	4.94	46.911	?

Πίνακα 10: (συνέχεια)

Κωδικός στίγματος	Στοιχεία στίγματος		Πιθανές πρωτεΐνες	Στοιχεία πρωτεΐνης			
	pI	Mw (kDa)		Αμινοξέα	pI	Mw (kDa)	Γονίδιο
			UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνη 1- καρβοξυβινυλτρανσφεράση-1 (EC 2.5.1.7)	430	4.95	45.979	murA1
			Συνθετάση S-αδενοσυλμεθιονίνης	399	4.95	43.551	metK
			Πρωτεΐνη UPF0210	451	4.94	46.883	lmo0534
			Επαγόμενη πρωτεΐνη CinA έναντι θεωρούμενης κατα- πόνησης	414	4.95	45.708	?
			Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	451	4.94	46.911	?
			Μεταφορέας σακχάρων	408	4.95	45.360	?
			Διπεπτιδάση προλίνης (EC 3.4.13.9)	365	4.94	40.359	pepQ
			Πρωτεΐνη Lmo2476	353	4.94	39.960	?
			Πρωτεΐνη Lmo0845	367	4.95	41.860	?
			Πρωτεΐνη Lmo0618	380	4.95	42.737	?
			Πρωτεΐνη Lmo0618	379	4.95	41.181	dapE
5601	5.02	83.95	Συνθετάση λευκυλ-tRNA (EC 6.1.1.4)	803	5.03	91.939	leuS
			Συνθετάση μεθιονυλ-tRNA (EC 6.1.1.10)	665	5.03	75.768	metG
			Μεταλλοπρωτεάση FtsH εξαρτώμενη από ATP	691	5.03	76.178	ftsH
			Πρωτεΐνη Lmo1509	798	5.03	90.096	?
5301	5.06	62.23	Συνθετάση αργινυλ-tRNA (EC 6.1.1.19)	556	5.05	62836	argS
			Πρωτεΐνη οικογένειας εντοπισμένης στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος	562	5.05	60.701	?
			Πρωτεΐνη οικογένειας εντοπισμένης στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος	562	5.05	60.687	?
			Πρωτεΐνη αίσθησης (EC 2.7.13.3)	596	5.05	66.700	resE
			Πρωτεΐνη Lmo0865	557	5.07	61.947	?
5603	5.06	80.98	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	705	5.05	83.263	?

Πίνακα 10: (συνέχεια)

Κωδικός στίγματος	Στοιχεία στίγματος		Πιθανές πρωτεΐνες	Στοιχεία πρωτεΐνης			
	pI	Mw (kDa)		Αμινοξέα	pI	Mw (kDa)	Γονίδιο
			ATP-άση μεταφοράς κατιόντων	705	5.05	76.481	?
			Γλυκοζυλ-τρανσφεράση	637	5.05	73.841	?
			α-γλυκοζιδάση (EC 3.2.1.20)	763	5.05	86.551	?
5702	5.10	101.10	Πολυμεράση DNA (EC 2.7.7.7)	875	5.11	98.496	polA
			Γλυκοζυλ-υδρολάση	800	5.11	91.005	?
5402	5.11	71.13	Πρωτεΐνη Lmo2073	650	5.11	74.388	?
5604	5.12	80.58	Πρωτεάση εξαρτώμενη από ATP	724	5.12	80.186	clpE
5501	5.13	78.86	Πρωτεΐνη βιοσύνθεσης μαστιγίου FlhA	691	5.13	76.207	flhA
			Πρωτεΐνη Lmo0680	691	5.13	76.234	?
5502	5.14	75.14	Αρνητικός ρυθμιστής της γενετικής ικανότητας ClpC/MecB	622	5.13	69.275	?
			Πρωτεΐνη Tkt	664	5.13	71.826	Tkt
			Πρωτεΐνη βιοσύνθεσης μαστιγίου FlhA	691	5.13	76.207	flhA
			Πρωτεΐνη Lmo0680	691	5.13	76.234	?
5704	5.20	106.15	Δικινάση πυροσταφυλικού, φωσφορικού οξέος	879	5.19	97.040	ppdK
6501	5.29	75.82	B αλυσίδα ATP-άσης μεταφοράς καλίου (EC 3.6.3.12)	681	5.30	72.369	kdpB
			Πρωτεΐνη B συστήματος UvrABC	658	5.28	75.562	uvrB
6702	5.42	88.96	?	-	-	-	-
6503	5.44	78.62	Πρωτεΐνη Lmo0898	725	5.44	81.567	?
			Πρωτεΐνη Lmo0680	683	5.45	75.543	?
6103	5.51	34.77	3'-5' εξοριβονουκλεάση yhaM	313	5.50	35.369	yhaM
			Καταστολέας γονιδίου κινητικότητας mogR	306	5.50	35.354	mogR
			Πρωτεΐνη HD	313	5.50	36.493	?
			Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	321	5.50	36.431	?

Πίνακα 10: (συνέχεια)

Κωδικός στίγματος	Στοιχεία στίγματος		Πιθανές πρωτεΐνες	Στοιχεία πρωτεΐνης			
	pI	Mw (kDa)		Αμινοξέα	pI	Mw (kDa)	Γονίδιο
			Οξειδορεδουκτάση πυριδινικής νουκλεοτιδικής-δισουλφιδικής οικογένειας πρωτεϊνών	331	5.50	36.507	?
			Μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	310	5.51	34.024	?
			Μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	308	5.51	34.759	?
			Πρωτεΐνη Lmo2227	301	5.50	33.977	?
7703	5.59	92.46	Άλφα υπομονάδα ριβονουκλεοζιδικής- διφοσφορικής ρεδουκτάσης (EC1.17.4.1)	763	5.59	87.395	nrdA
7303	5.87	63.19	Μεταφορέας ABC, πρωτεΐνη συνδεδεμένη με ATP	574	5.86	64.103	cydC
			Μεταφορέας ABC, πρωτεΐνη συνδεδεμένη με ATP	574	5.88	64.023	?
			Πρωτεΐνη Lmo2760	536	5.86	60.745	?
			Πρωτεΐνη Lmo1131	571	5.88	63.897	?

**Πίνακας 11:** Αποτελέσματα αναζήτησης (EXPASY) για τον ποιοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών προερχόμενων από αντιπροσωπευτικά πρωτεϊνικά στίγματα του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* Scott A, μετά από προσαρμογή σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (pH 5.0)

Κωδικός στίγματος	Στοιχεία στίγματος		Πιθανές πρωτεΐνες	Στοιχεία πρωτεΐνης			
	pI	Mw (kDa)		Αμινοξέα	pI	Mw (kDa)	Γονίδιο
201	4.14	42.63	Πλούσια σε λευκίνη επαναλαμβανόμενη πρωτεΐνη	402	4.15	44.670	?
101	4.15	33.09	Πρωτεΐνη TPR	222	4.15	25.155	?
1201	4.22	39.41	Πλούσια σε λευκίνη επαναλαμβανόμενη πρωτεΐνη	361	4.23	40.129	?
			Πλούσια σε λευκίνη επαναλαμβανόμενη πρωτεΐνη	361	4.23	40.115	?
1104	4.37	29.94	Λιποπρωτεΐνη, θεωρούμενη	289	4.38	32.396	?
			Πρωτεΐνη Lmo0487	242	4.37	26.994	?
1205	4.38	44.95	Πρωτεΐνη οικογένειας εντοπισμένης στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος	418	4.37	45.023	?
1407	4.38	65.24	Πρωτεΐνη οικογένειας εντοπισμένης στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος	618	4.38	67.871	?
			Πρωτεΐνη Lmo0331	633	4.38	69.487	?
1206	4.39	41.37	Πρωτεΐνη οικογένειας εντοπισμένης στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος	422	4.40	45.474	?
1303	4.40	60.74	?	-	-	-	-
1304	4.40	51.23	Ιντερναλίνη G	490	4.40	53.322	inlG
1005	4.41	21.80	Υδρολάση	211	4.41	23.516	?
			Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	187	4.40	22.884	?
			Πρωτεΐνη Lmo2315	198	4.40	23.064	?
			Πρωτεΐνη Lmo2253	209	4.40	23.280	?
2201	4.56	48.52	GTP-άση τροποποίησης tRNA	457	4.57	50.415	trmE
4702	4.83	91.75	inlA	800	4.83	86600	inlA
			Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	858	4.83	86.631	?
			Ιντερναλίνη A	797	4.83	86.327	inlA

**Πίνακας 12:** Αποτελέσματα αναζήτησης (EXPASY) για τον ποιοτικό προσδιορισμό των επαγόμενων πρωτεϊνών του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* Scott A, μετά από προσαρμογή σε συνθήκες θερμοκρασιακής καταπόνησης (0°C)

Κωδικός στίγματος	Στοιχεία στίγματος		Πιθανές πρωτεΐνες	Στοιχεία πρωτεΐνης			
	pI	Mw (kDa)		Αμινοξέα	pI	Mw (kDa)	Γονίδιο
4	4.00	3.36	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	31	4.01	3.538	?
1202	4.07	35.19	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	272	4.07	31.566	?
			Πρωτεΐνη Lmo2388	272	4.07	31.569	?
1204	4.08	30.25	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	272	4.09	31.589	?
			Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	272	4.07	31.566	?
			Πρωτεΐνη Lmo2388	272	4.07	31.569	?
2102	4.43	6.88	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	57	4.42	6.699	?
3301	4.53	66.10	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	55	4.54	6.031	?
3902	4.57	192.01	?	-	-	-	-
3904	4.63	192.34	?	-	-	-	-
4501	4.73	100.81	Πρωτεΐνη οικογένειας εντοπισμένης στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος	993	4.73	107.297	?
5901	4.95	208.50	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	1959	4.94	216.041	?
5902	4.96	194.46	?	-	-	-	-
5703	5.01	164.52	Πρωτεΐνη οικογένειας εντοπισμένης στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος	1529	5.00	167.947	?
			Πρωτεΐνη smc	1186	5.00	134.058	smc
5704	5.02	183.87	?	-	-	-	-
5903	5.03	194.77	?	-	-	-	-
5705	5.07	164.10	?	-	-	-	-
6702	5.16	163.11	?	-	-	-	-
6901	5.21	193.45	Διαρροϊκή τοξίνη	1497	5.20	169.482	?
			Διαρροϊκή τοξίνη	1498	5.20	169.162	?



Πίνακα 12: (συνέχεια)

Κωδικός στίγματος	Στοιχεία στίγματος		Πιθανές πρωτεΐνες	Στοιχεία πρωτεΐνης			
	pI	Mw (kDa)		Αμινοξέα	pI	Mw (kDa)	Γονίδιο
8401	5.89	69.65	Μεταφορέας ABC, Πρωτεΐνη CydC δεσμευτική του ATP	574	5.88	64.023	CydC
			Πρωτεΐνη Lmo1131	571	5.88	63.897	?
8402	6.03	80.39	Χωροταξική πρωτεΐνη PRD/PTS του συστήματος ΠΑ 2	632	6.04	73.502	?
			Χωροταξική πρωτεΐνη PRD/PTS του συστήματος ΠΑ 2	632	6.04	73.528	?
			Πρωτεΐνη parE	655	6.04	73.015	parE
8904	6.63	203.75	?	-	-	-	-
8702	6.97	163.42	?	-	-	-	-

**Πίνακας 13:** Αποτελέσματα αναζήτησης (EXPASY) για τον ποιοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών προερχόμενων από αντιπροσωπευτικά πρωτεϊνικά στίγματα του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* Scott A, μετά από προσαρμογή σε συνθήκες θερμοκρασιακής καταπόνησης (0°C)

Κωδικός στίγματος	Στοιχεία στίγματος		Πιθανές πρωτεΐνες	Στοιχεία πρωτεΐνης			
	pI	Mw (kDa)		Αμινοξέα	pI	Mw (kDa)	Γονίδιο
5	4.00	3.13	?	-	-	-	-
8	4.00	5.22	?	-	-	-	-
202	4.00	28.33	Επαναλαμβανόμενη χωροταξική πρωτεΐνη πλούσια σε λευκίνη	314	4.00	34.498	?
			Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	189	4.01	21.544	?
1402	4.12	90.47	?	-	-	-	-
2002	4.30	2.79	?	-	-	-	-
2004	4.50	3.44	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	33	4.50	3.984	?
3002	4.54	4.27	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	33	4.54	3.820	?
4101	4.81	16.51	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	246	4.80	17.446	?
			Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	128	4.80	15.049	?
			Πρωτεΐνη Lmo2078	153	4.80	17.509	?
			Πρωτεΐνη Lmo1126	150	4.80	17.353	?
			Πρωτεΐνη Lmo0379	151	4.80	17.385	?
5101	4.88	19.55	Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	154	4.88	18.094	?
			Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	157	4.88	18.538	?
			Θεωρούμενος ρυθμιστής μεταγραφής απόκρισης αντιεξόντωσης	190	4.87	21.253	?
			Θεωρούμενη Gr1	157	4.88	18.538	?
			Πρωτεΐνη χαμηλής θερμοκρασίας C	166	4.87	18.333	ltrC
			Πρωτεΐνη Lmo0602	166	4.87	19.125	?
			Πρωτεΐνη Lmo1257	154	4.88	18.094	?

**Πίνακας 14:** Αποτελέσματα αναζήτησης (EXPASY) για τον ποιοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών προερχόμενων από αντιπροσωπευτικά πρωτεϊνικά στίγματα του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* Scott A, κατά την ανάπτυξή του σε συνθήκες μη προσαρμογής (pH 7.0)

Κωδικός στίγματος	Στοιχεία στίγματος		Πιθανές πρωτεΐνες	Στοιχεία πρωτεΐνης			
	pI	Mw (kDa)		Αμινοξέα	pI	Mw (kDa)	Γονίδιο
1205	4.10	49.75	Επαναλαμβανόμενη χωροταξική πρωτεΐνη πλούσια σε λευκίνη	353	4.09	39.723	?
1407	4.38	65.24	Πρωτεΐνη οικογένειας εντοπισμένης στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος	618	4.38	67.871	?
			Πρωτεΐνη Lmo0331	633	4.38	69.487	?
1206	4.39	41.37	Πρωτεΐνη οικογένειας εντοπισμένης στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος	422	4.40	45.474	?
1303	4.40	60.74	?	-	-	-	-
1304	4.40	51.23	Ιντερναλίνη G	490	4.40	53.322	inLG
1005	4.41	21.80	Υδρολάση	211	4.41	23.516	?
			Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	187	4.40	22.884	?
			Πρωτεΐνη Lmo2315	198	4.40	23.064	?
			Πρωτεΐνη Lmo2253	209	4.40	23.280	?
4702	4.83	91.75	InlA	800	4.83	86.600	inlA
			Θεωρούμενη μη ταυτοποιημένη πρωτεΐνη	858	4.83	92.200	?
			Ιντερναλίνη A	797	4.83	86.327	inlA

Με συνδυαστική μελέτη και επεξεργασία των πινάκων που παρατέθηκαν προηγουμένως (Πίνακες 10 έως 14), μπορούν να προκύψουν χρήσιμα συμπεράσματα όσον αφορά την πρωτεϊνική σύσταση του μελετώμενου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* Scott A, για τις διαφορετικές συνθήκες όξινης και θερμοκρασιακής προσαρμογής.

# 5

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η προσαρμογή του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* Scott A σε συνθήκες είτε όξινης, είτε θερμοκρασιακής καταπόνησης, εκτός των επιφερόμενων μεταβολών στην οξεοανθεκτικότητα και το πρωτέωμα, που παρουσιάστηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο, οδηγεί σε μια πληθώρα χρήσιμων συμπερασμάτων.

Είναι προφανές ότι ο μικροοργανισμός στην προσπάθειά του να επιβιώσει των δυσμενών συνθηκών του περιβάλλοντός του, κινητοποιεί ποικίλους προσαρμοστικούς μηχανισμούς με σκοπό την επαγωγή της ανθεκτικότητάς του, έτσι ώστε αρχικά να καταστεί ικανός για παραμονή και έπειτα να μπορέσει να αναπτυχθεί στις δεδομένες συνθήκες. Σημαντικό ρόλο στην όλη αυτή διαδικασία διαδραματίζει το είδος του οργανικού οξέος που χρησιμοποιείται, καθώς η υφιστάμενη σχέση μεταξύ δισταμένης και μη δισταμένης μορφής του οξέος καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τη δράση του τελευταίου επί των μικροβιακών κυττάρων. Φαίνεται λοιπόν ότι στην περίπτωση όξινης προσαρμογής (pH 5.0) με χρήση γαλακτικού οξέος, μετέπειτα αύξηση της συγκέντρωσης μέχρι την αντίστοιχη τιμή pH 4.0, δεν έχει καμία θανατηφόρο επίδραση στον μελετούμενο μικροοργανισμό. Αντιθέτως, έκθεση σε περισσότερο όξινες συνθήκες (pH 3.0 και pH 3.5) επιφέρει μείωση στον μετρούμενο βακτηριακό πληθυσμό, με τη μείωση να είναι ταχύτερη στην περίπτωση του pH 3.0. Οι ίδιες παρατηρήσεις ισχύουν και για την περίπτωση της θερμοκρασιακής προσαρμογής (0°C) σε pH 7.0.

Σχετικά με το πρωτέωμα του στελέχους Scott A, η μελέτη του Πίνακα 10 που αφορά την προσαρμογή σε συνθήκες όξινης καταπόνησης, δείχνει μεταξύ άλλων την εμφάνιση πολλών ενζύμων εντός του συνόλου των αντιπροσωπευτικών, για τη συγκεκριμένη περίπτωση προσαρμογής, προσδιοριζόμενων πρωτεϊνών. Το γεγονός αυτό πιθανότατα υποδηλώνει εμπλοκή των προηγούμενων ενζύμων σε μεταβολικές διεργασίες σχετιζόμενες με την έκφραση γονιδίων και την επαγωγή πρωτεϊνών.

Εξάλλου, σε συνέχεια των προηγούμενων καταδεικνύεται το γεγονός ότι, ο μικροοργανισμός δεν είναι σε θέση, αρχικά τουλάχιστον, να διακρίνει το είδος της καταπόνησης που υφίσταται (όξινη ή θερμοκρασιακή), με αποτέλεσμα να προβαίνει στη σύνθεση εν πολλοίς όμοιων πρωτεϊνών μεταξύ των διαφόρων περιπτώσεων προσαρμογής (Εικόνα 7 & Πίνακες 10 έως 14)..

Η ικανότητα του αναδύομενου τροφιμογενούς παθογόνου παράγοντα *L. monocytogenes* αρχικά να επιβιώνει και εν συνεχεία να αναπτύσσεται τόσο σε χαμηλές θερμοκρασίες όσο και υπό όξινες συνθήκες, καταδεικνύει την προσαρμοστικότητα που παρουσιάζει ο μικροοργανισμός σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών. Η παρατηρούμενη ανάπτυξη στις κοινά χρησιμοποιούμενες θερμοκρασίες ψύξης καθώς και σε μετρίως όξινες συνθήκες, είναι θέματα που σχετίζονται άμεσα με τη συντήρηση των έτοιμων προς κατανάλωση προϊόντων, τα οποία δεν υφίστανται κανενός είδους περαιτέρω επεξεργασία πριν από την κατανάλωσή τους. Σε πολλά τρόφιμα το όξινο pH θεωρείται ως ένας σημαντικός παράγοντας ασφάλειας από υγιεινολογικής άποψης. Ωστόσο, η επαγόμενη ανεκτικότητα στο οξύ (ATR) η οποία παρατηρείται στη *L. monocytogenes*, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον κατά την επεξεργασία των τροφίμων, καθόσον ενδεχόμενη έκθεση του παθογόνου σε ήπια όξινες συνθήκες μπορεί να επιφέρει ανθεκτικότητα σε περισσότερο ακραία όξινες συνθήκες. Αποτέλεσμα των όσων εκτέθηκαν παραπάνω είναι ότι, τα τυριά και δη τα μαλακά, διάφορα κρεατοσκευάσματα και ειδικότερα ζυμούμενα, αλλά και καπνιστά προϊόντα κρέατος, καθώς και τα θαλασσινά, είναι τα περισσότερο δυνητικώς επικίνδυνα τρόφιμα (potentially hazardous foods, PHF) για εμφάνιση κρουσμάτων λιστερίωσης.

# 6

## ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Η ανάδυση του τροφιμογενούς παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* στα τέλη του 20<sup>ου</sup> αιώνα, έδωσε το έναυσμα για την εμφάνιση πολλών κρουσμάτων λιστεριώσεων κατά τα τελευταία χρόνια. Ο οικονομικός αντίκτυπος εξαιτίας πολλαπλών ανακλήσεων προϊόντων, του υψηλού ρυθμού θνητότητας, καθώς και των υψηλών δαπανών νοσηλείας λόγω του αρκετά μεγάλου αριθμού των προσβεβλημένων ατόμων και της σοβαρότητας της προκληθείσας νόσου, έχει προκαλέσει το έντονο ενδιαφέρον των ερευνητών, ενώ έχει στρέψει την προσπάθεια στη λήψη προληπτικών μέτρων αντιμετώπισης της εξάπλωσης του παθογόνου. Στις μέρες μας, η έρευνα έχει στραφεί στην αποκρυπτογράφηση των μηχανισμών που ρυθμίζουν την ικανότητα του μικροοργανισμού να επιβιώνει και να αναπτύσσεται υπό αντίξοες συνθήκες, όπως είναι η χαμηλή θερμοκρασία και το όξινο pH. Η σε βάθος κατανόηση της φυσιολογίας του βακτηρίου, η καθιέρωση του συστήματος HACCP από τη βιομηχανία των τροφίμων, ο καθιερωμένος δειγματοληπτικός έλεγχος από τις αρμόδιες αρχές, μαζί με καλύτερα συστήματα εντοπισμού και παρακολούθησης για την αναφορά και καταγραφή τροφιμογενών εξάρσεων, είναι μερικά πολύτιμα μέσα για τον έλεγχο του παθογόνου. Η αυξανόμενη ζήτηση από τους καταναλωτές για όσο το δυνατόν λιγότερο επεξεργασμένα, έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, καθώς και η παγκοσμιοποίηση της αγοράς τροφίμων, μπορούν να συνεισφέρουν στην αύξηση της εμφάνισης των τροφιμογενών ασθενειών, όπως είναι η λιστερίωση. Παρ' όλα αυτά, συντονισμένες προσπάθειες τόσο από την πλευρά της πανεπιστημιακής κοινότητας όσο και από εκείνη της κυβέρνησης και της βιομηχανίας τροφίμων, σε συνδυασμό πάντα με το ενδιαφέρον του καταναλωτή, μπορούν να αποδειχθούν ευεργετικές για την ανάπτυξη καινοτόμων στρατηγικών ελέγχου της λιστερίας σε τρόφιμα και εγκαταστάσεις τροφίμων, ώστε να ικανοποιηθούν οι απαιτήσεις του καταναλωτή σε έτοιμα προς κατανάλωση προϊόντα, χωρίς απώλειες σε οργανοληπτικά και θρεπτικά χαρακτηριστικά.

# 7

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ - ΣΧΗΜΑΤΩΝ - ΕΙΚΟΝΩΝ

	Σελίδα
<u>Πίνακας 1:</u> Βιοχημικός διαχωρισμός των ειδών του γένους <i>Listeria</i>	7
<u>Πίνακας 2:</u> Κρούσματα τροφιμογενών λιστεριώσεων κατά τα έτη 1976-2002	11
<u>Πίνακας 3:</u> Χρησιμοποιούμενα εργαστηριακά όργανα και συσκευές	35
<u>Πίνακας 4:</u> Σύσταση 20 mmol/l φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος (NaPBS) με pH 6.5	42
<u>Πίνακας 5:</u> Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ενυδάτωσης πρωτεϊνών	46
<u>Πίνακας 6:</u> Πρόγραμμα ισοηλεκτρικού εστιασμού πρωτεϊνών, για IPG strip μήκους 11 cm με pH 4-7	47
<u>Πίνακας 7:</u> Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροδίων, pH 8.3	47
<u>Πίνακας 8:</u> Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος εξισορρόπησης I	48
<u>Πίνακας 9:</u> Σύσταση δείκτη μοριακών βαρών Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range	58
<u>Πίνακας 10:</u> Αποτελέσματα αναζήτησης (EXPASY) για τον ποιοτικό προσδιορισμό των επαγόμενων πρωτεϊνών του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A, μετά από προσαρμογή σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (pH 5.0)	65
<u>Πίνακας 11:</u> Αποτελέσματα αναζήτησης (EXPASY) για τον ποιοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών προερχόμενων από αντιπροσωπευτικά πρωτεϊνικά στίγματα του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A, μετά από προσαρμογή σε συνθήκες όξινης καταπόνησης (pH 5.0)	70
<u>Πίνακας 12:</u> Αποτελέσματα αναζήτησης (EXPASY) για τον ποιοτικό προσδιορισμό των επαγόμενων πρωτεϊνών του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A, μετά από προσαρμογή σε συνθήκες θερμοκρασιακής καταπόνησης (0°C)	71
<u>Πίνακας 13:</u> Αποτελέσματα αναζήτησης (EXPASY) για τον ποιοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών προερχόμενων από αντιπροσωπευτικά πρωτεϊνικά στίγματα του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A, μετά από προσαρμογή σε συνθήκες θερμοκρασιακής καταπόνησης (0°C)	73

	Σελίδα
<u>Πίνακας 14:</u> Αποτελέσματα αναζήτησης (EXPASY) για τον ποιοτικό προσδιορισμό πρωτεϊνών προερχόμενων από αντιπροσωπευτικά πρωτεϊνικά στίγματα του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A, σε συνθήκες μη προσαρμογής (pH 7.0)	74
<u>Σχήμα 1:</u> Γενική στρατηγική προσέγγισης του πρωτεώματος, βασιζόμενη στην ηλεκτροφόρηση δύο διαστάσεων	24
<u>Σχήμα 2:</u> Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας	37
<u>Σχήμα 3:</u> Διάγραμμα ροής πειραματικής διαδικασίας (συνέχεια)	40-41
<u>Σχήμα 4:</u> Επίδραση όξινης προσαρμογής σε pH 5.0, στην οξεοανθεκτικότητα του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A, κατά την όξινη πρόκληση σε pH 3.0, pH 3.5 και pH 4.0	53
<u>Σχήμα 5:</u> Επίδραση θερμοκρασιακής προσαρμογής στους 0°C, στην οξεοανθεκτικότητα του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A, κατά την όξινη πρόκληση σε pH 3.0, pH 3.5 και pH 4.0	54
<u>Σχήμα 6:</u> Επίδραση συνθηκών μη προσαρμογής (pH 7.0), στην οξεοανθεκτικότητα του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A, κατά την όξινη πρόκληση σε pH 3.0, pH 3.5 και pH 4.0	55
<u>Σχήμα 7:</u> Συγκριτική παρουσίαση μετά την προσαρμογή ή μη σε μεμονωμένες συνθήκες ήπιας καταπόνησης (όξινης και θερμοκρασιακής), της οξεοανθεκτικότητας του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A, κατά την όξινη πρόκληση σε pH 3.5	56
<u>Εικόνα 1:</u> Αποτέλεσμα ηλεκτροφόρησης πηκτής δύο διαστάσεων πρωτεϊνικού δείγματος χοίρου, από το μυ <i>Longissimus dorsi</i> . Η 2D-GE πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ακινητοποιημένη βαθμίδωση pH (IPG) 3-9 και SDS-PAGE με 11%T	26
<u>Εικόνα 2:</u> Συσσκευή ισοηλεκτρικού εστιασμού Bio-Rad Protean IEF cell	48
<u>Εικόνα 3:</u> Συσσκευή ηλεκτροφόρησης Bio-Rad Protean II	49
<u>Εικόνα 4:</u> Επίδραση όξινης προσαρμογής σε pH 5.0, στο πρωτέωμα του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A, μετά από ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου δύο διαστάσεων	59



	Σελίδα
<u>Εικόνα 5:</u> Επίδραση θερμοκρασιακής προσαρμογής στους 0°C, στο πρωτέωμα του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A, μετά από ηλεκτροφόρηση πηκτικής πολυακρυλαμιδίου δύο διαστάσεων	60
<u>Εικόνα 6:</u> Επίδραση συνθηκών μη προσαρμογής (pH 7.0), στο πρωτέωμα του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A, μετά από ηλεκτροφόρηση πηκτικής πολυακρυλαμιδίου δύο διαστάσεων	61
<u>Εικόνα 7:</u> Σύγκριση μεταξύ συνθηκών προσαρμογής και μη προσαρμογής, μετά τις ηλεκτροφορήσεις πηκτών πολυακρυλαμιδίου δύο διαστάσεων, για τον εντοπισμό ομοιοτήτων ή διαφορών στα προκύπτοντα πρωτεώματα του βακτηρίου <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A. Η σύγκριση έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος για H/Y PDQuest Advanced-8.0.1	62-63

# 8

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - ΑΡΘΡΟΓΡΑΦΙΑ

1. Αμβροσιάδης, Ι. (2005). *Εφαρμογή και Έλεγχος του Συστήματος HACCP*. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη.
2. Ανδρίτσος, Ν. Δ. (2006). *Ταυτοποίηση Ειδών Κρέατος στα Τρόφιμα Ζωικής Προέλευσης με Ηλεκτροφόρηση Πηκτής Πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)*. Πτυχιακή Μελέτη. Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, Γ.Π.Α., Αθήνα.
3. Ανδρίτσος, Ν. (2007). *Λιστερίωση*. Σε: *Ανασκόπηση Τροφικών Λοιμώξεων Οφειλόμενων σε Βακτήρια*. (Ανδρίτσος, Ν., Αντωνίου Ι., Παπαδόπουλος, Η.). Μεταπτυχιακή Εργασία., Π.Μ.Σ. «Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφή του Ανθρώπου». Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, Γ.Π.Α., Αθήνα, σελ. 30-35.
4. Ανδρίτσος, Ν., Παραμυθιώτης, Σ., Δροσινός, Ε. Χ. (2008). *Λιστέρια: Ένας Πονοκέφαλος για τις Επιχειρήσεις Τροφίμων*. Meat Point, **12**, 52-55.
5. Αρβανιτογιάννης, Ι. Σ., Σάνδρου, Δ., Κούρτης, Λ. (2001). *Ασφάλεια Τροφίμων: Εφαρμογή της Ανάλυσης Επικινδυνότητας και Κρίσιμων Σημείων Ελέγχου (HACCP) στις Βιομηχανίες Τροφίμων και Ποτών*. 1<sup>η</sup> Έκδοση. Εκδόσεις Επιστημονικών Βιβλίων & Περιοδικών University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
6. Βάσσος, Δ. Β. (2004). *Τρόφιμα και Υγεία του Καταναλωτή (Τροφογενείς Διαταραχές)*. 1<sup>η</sup> Έκδοση. Εκδόσεις Παπασωτηρίου, Αθήνα.
7. Γενηγιώργης, Κ. (2004). *Βιολογικοί Κίνδυνοι: Η Σημερινή Κατάσταση*. 3<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συμπόσιο Υγιεινής & Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα. Πρακτικά Συμποσίου, Τόμος Β', σελ. 236-248.
8. Δροσινός, Ε. Χ. (2004). *Υγιεινή & Ασφάλεια Τροφίμων: Παραδόσεις Προπτυχιακού Μαθήματος*. Εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, Γ.Π.Α., Αθήνα.

9. Κανονισμός 2073/2005/ΕΚ της Επιτροπής (2005). *Μικροβιολογικά Κριτήρια για τα Τρόφιμα*. Επίσημη Εφημερίδα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, αριθμ. L 338/1.
10. Κοτζεκίδου-Ρουκά, Π. (1993). *Μικροβιολογία Τροφίμων*. Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Υγιεινής Τροφίμων, Τομέας Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Γεωπονίας, Α.Π.Θ., Θεσσαλονίκη.
11. Μπαλατσούρας, Γ. (2006). *Μικροβιολογία Τροφίμων*. 2<sup>η</sup> Έκδοση. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.
12. Παπαγεωργίου, Κ., Ιωσηφίδου, Ε. (2004). *Τροφοδηλητηριάσεις: Σύγχρονα Δεδομένα*. 3<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συμπόσιο Υγιεινής & Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα. Πρακτικά Συμποσίου, Τόμος Β', σελ. 446-449.
13. Παραμέρα, Ε., Παπασταύρου, Π., Αρβανίτης, Ν., Καραλιώτα, Α., Μαγιάτης, Π., Ρέχοβα, Ν., Λίτος, Χ., Χαιρόπουλος, Γ., Μαστρονικολή, Σ. (2005). *Μελέτη του Μηχανισμού Μεταβολών στο Ψύχος των Λιποειδών του Βακτηρίου των Τροφίμων *Listeria monocytogenes* κατά την Προσαρμογή του στους 5°C – Προοπτικές Εφαρμογών στην Ασφάλεια των Τροφίμων*. 1<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Βιοτεχνολογίας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Αθήνα. Πρακτικά Συνεδρίου, σελ. 218-222.
14. Allerberger, F. (2003). *Listeria: Growth, Phenotypic Differentiation and Molecular Microbiology*. FEMS Immunology and Medical Microbiology, **35**, 183-189.
15. Allerberger, F. (2007). *Listeria*. In: *Foodborne Diseases* (Simjee, S., eds.). 1<sup>st</sup> Edition. Infectious Disease, Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 27-39 (Chapter2).
16. Amiour, N., Merlino, M., Leroy, P., Branlard, G. (2002). *Proteomic Analysis of Amphiphilic Proteins of Hexaploid Wheat Kernels*. Proteomics, **2**, 632-663.
17. Angelidis, A. S., Smith, G. M. (2003). *Role of the Glycine Betaine and Carnitine Transporters in Adaptation of *Listeria monocytogenes* to Chill Stress in Defined Medium*. Applied Environmental Microbiology, **69** (12), 7492-7498.
18. Annous, B. A., Becker, L. A., Bayles, D. O., Labeda, D. P., Wilkinson, B. J. (1997). *Critical Role of anteiso-C<sub>15:0</sub> Fatty Acid in the Growth of *Listeria monocytogenes* at Low Temperatures*. Applied Environmental Microbiology, **63** (10), 3887-3894.

19. Anonymous (2002). *Food Safety and Foodborne Illness*. Fact Sheet N°237, WHO. Βρίσκεται στην ηλεκτρονική διεύθυνση (τελευταία ενημέρωση Μάρτιος 2007): <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/index.html> .
20. Bae, M. S., Cho, E. J., Choi, E-Y., Park, O. K. (2003). *Analysis of the Arabidopsis Nuclear Proteome and its Response to Cold Stress*. Plant Journal, **36**, 652-663.
21. Bayles, D. O., Annous, B. A., Wilkinson, B. J. (1996). *Cold Stress Proteins Induced in Listeria monocytogenes in Response to Temperature Downshock and Growth at Low Temperatures*. Applied Environmental Microbiology, **62** (3), 1116-1119.
22. Beales, N. (2004). *Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A review*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, **3** (1), 1-20.
23. Becker, L.A., Evans, S. N., Hutkins, R. W., Benson, A. K. (2000). *Role of SigmaB in Adaptation of Listeria monocytogenes to Growth at Low Temperature*. Journal of Bacteriology, **182** (24), 7083-7087.
24. Bendixen, E. (2005). *The Use of Proteomics in Meat Science*. Meat Science, **71**, 138-149.
25. Bennett, K. L., Stensballe, A., Podtelejnikov, A. V., Moniatte, M., Jensen, O. N. (2002). *Phosphopeptide Detection and Sequencing by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, **37**, 179-190.
26. Bille, J., Catimel, B., Bannerman, E., Jacquet, C., Yersin, M. N., Caniaux, I., Monget, D., Rocourt, J. (1992). *API-Listeria, a New and Promising One-Day System to Identify Listeria Isolates*. Applied Environmental Microbiology, **58**, 1857-1860.
27. Boerlin, P., Rocourt, J., Grimont, F., Grimont, P. A. D., Jacquet, C., Piffaretti, J. C. (1992). *Listeria ivanovii subspecies londoniensis*. International Journal of Systematic Bacteriology, **15**, 42-46.
28. Bouley, J., Chambon, C., Picard, B. (2004). *Mapping of Bovine Skeletal Muscle Proteins Using Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry*. Proteomics, **4**, 1811-1824.

29. Bouley, J., Meunier, B., Chambon, C., De Smet, S., Hocquette, J. H., Picard, B. (2005). *Proteomic Analysis of Bovine Skeletal Muscle Hypertrophy*. *Proteomics*, **5**, 450-490.
30. Burrows, W. (1955). *Textbook of Microbiology*. W. B. Saunders Company, Philadelphia and London.
31. Cañas, B., López-Ferrer, D., Ramos-Fernández, A., Gamafeita, E. (2006). *Mass Spectrometry Technologies for Proteomics*. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, **4**, 295-320.
32. Carbonaro, M. (2004). *Proteomics: Present and Future in Food Quality Evaluation*. *Trends in Food Science and Technology*, **15**, 209-216.
33. Carbonaro, M., Sondergaard, I., Bukhave, K. (2003). *Proteomics Applied to Bioavailability Studies: Traceability of In Vivo Gastrointestinal Pattern of Milk Proteins*. In NFIF 2003 Conference, Copenhagen, 9-11 April, 2003.
34. Chinnasamy, G., Rampitsch, C. (2006). *Efficient Solubilization Buffers for Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Acidic and Basic Proteins Extracted from Wheat Seeds*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, **1764**, 641-644.
35. Clark, A. G., McLauchlin, J. (1997). *A Simple Colour Test Based on an Alanine Peptidase Reaction which Differentiates Listeria monocytogenes from Other Listeria Species*. *Journal of Clinical Microbiology*, **35**, 2155-2156.
36. Cotter, P. D., Hill, C. (2003). *Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67** (3), 429-453 (table).
37. Cotter, P. D., Emerson, N., Gahan, C. G., Hill, C. (1999). *Identification and Disruption of LisRK, a Genetic Locus Encoding a Two-Component Signal Transduction System Involved in Stress Tolerance and Virulence in Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, **181** (21), 6840-6843.
38. Cotter, P. D., Gahan, C. G., Hill, C. (2000). *Analysis of the Role of the Listeria monocytogenes F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase Operon in the Acid Tolerance Response*. *International Journal of Food Microbiology*, **60** (2-3), 137-146.

39. Cotter, P. D., Gahan, C. G., Hill, C. (2001). *A Glutamate Decarboxylase System Protects Listeria monocytogenes in Gastric Fluid*. *Molecular Microbiology*, **40** (2), 465-475.
40. Cotter, P. D., Ryan, S., Gahan, C. G. M., Hill, C. (2005). *Presence of GadD1 Glutamate Decarboxylase in Selected Listeria monocytogenes Strains Is Associated with an Ability to Grow at Low pH*. *Applied Environmental Microbiology*, **71** (6), 2832-2839.
41. Dodd, C. E. R., Sharman, R. L., Bloomfield, S. F., Booth, I. R., Steward, G. S. A. B. (1997). *Inimical Processes: Bacterial Self-Destruction and Sub-Lethal Injury*. *Trends in Food Science and Technology*, **8**, 238-241.
42. Doherty, M. K., McLean, L., Hayter, J. R., Pratt, J. M., Robertson, D. H., El Shafei, A. (2004). *The Proteome of Chicken Skeletal Muscle: Changes in Soluble Protein Expression during Growth in a Layer Strain*. *Proteomics*, **4**, 2082-2093.
43. Dunn, M. J. (2000). *Studying Heart Disease Using the Proteomic Approach*. *Drug Discovery Today*, **5**, 76-84.
44. Elsner, H.-A., Sobottka, I., Bubert, A., Albrecht, H., Laufs, R., Mack, D. (1996). *Catalase-Negative Listeria monocytogenes Causing Lethal Sepsis and Meningitis in an Adult Hematologic Patient*. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*, **15**, 965-967.
45. Farber, J. M., Daley, E. (1994). *Presence and Growth of Listeria monocytogenes in Naturally-Contaminated Meats*. *International Journal of Food Microbiology*, **22**, 33-42.
46. Ferreira, A., Sue, D., O'Byrne, C. P., Boor, K. J. (2003). *Role of Listeria monocytogenes SigmaB in Survival of Lethal Acidic Conditions and in the Acquired Acid Tolerance Response*. *Applied Environmental Microbiology*, **69** (5), 2692-2698.
47. Fichmann, J., Westermeier, R. (1999). *2-D Protein Gel Electrophoresis: An Overview*. In: *2-D Proteome Analysis Protocols* (Link, A. J. eds.). *Methods in Molecular Biology*, Vol. 112, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, pp. 1-8 (Chapter 1).

48. Flæte, N. E. S., Hollung, K., Ruud, L., Sogn, T., Færgestad, E. M., Skarpeid, H. J., Magnus, E. M., Uhlen, A. K. (2005). *Combined Nitrogen and Sulphur Fertilisation and its Effect on Wheat Quality and Protein Composition Measured by SE-FPLC and Proteomics*. Journal of Cereal Science, **41**, 357-369.
49. Gandhi, M., Chikindas, M. L. (2007). *Listeria: A Foodborne Pathogen that Knows How to Survive*. International Journal of Food Microbiology, **113**, 1-15.
50. Gilot, P., Content, J. (2002). *Species Identification of Listeria welshimeri and Listeria monocytogenes by PCR Assays Targeting a Gene Encoding a Fibronectin-Binding Protein*. Journal of Clinical Microbiology, **40**, 698-703.
51. Gounadaki, A. S., Skandamis, P. N., Drosinos, E. H., Nychas, G.-J., E. (2007). *Effect of Packaging and Storage Temperature on the Survival of Listeria monocytogenes Inoculated Postprocessing on Sliced Salami*. Journal of Food Protection, **70** (10), 58-65.
52. Guerrero, I. C., Kleiner, O. (2005). *Application of Mass Spectrometry in Proteomics*. Bioscience Reports, **25**, 71-93.
53. Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R., Aebersold, R. (1999). *Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast*. Molecular and Cellular Biology, **19**, 1720-1730.
54. Han, J-Z., Wang, Y-B. (2008). *Proteomics: Present and Future in Food Science and Technology*. Trends in Food Science and Technology, **19** (1), 26-30.
55. Harris, L. J. (2002). *Listeria monocytogenes*. In: *Foodborne Diseases* (Cliver, D. O., Riemann, H. P., eds.). 2<sup>nd</sup> Edition. Food Science and Technology, International Series, Academic Press, Elsevier Science, California & London, pp. 137-150 (Chapter 10).
56. Heazlewood, J. L., Howell, K. A., Whelan, J., Millar, A. H. (2003). *Towards an Analysis of the Rice Mitochondrial Proteome*. Plant Physiology, **132**, 230-242.
57. Heinitz, M. L., Johnson, J. M. (1998). *The Incidence of Listeria spp., Salmonella spp. and Clostridium botulinum in Smoked Fish and Shellfish*. Journal of Food Protection, **61**, 318-323.

58. Imin, N., Kerim, T., Weinman, J. J., Rolfe, B. G. (2001). *Characterization of Rice Anthers Proteins Expressed at the Young Microspore Stage*. *Proteomics*, **1**, 1149-1161.
59. Ingham, S. C., Buege, D. R., Dropp, B. K., Losinski, J. A. (2004). *Survival of Listeria monocytogenes during Storage of Ready-to-Eat Meat Products Processed by Drying, Fermentation, and/or Smoking*. *Journal of Food Protection*, **67** (12), 2698-2702.
60. Iwahashi, Y., Hosoda, H. (2000). *Effect of Heat Stress on Tomato Fruit Protein Expression*. *Electrophoresis*, **21**, 1766-1771.
61. Jeon, H. B., Choi, E. S., Yoon, J. H., Hwang, J. H., Chang, J. W., Lee, E. K., Choi, H. W., Park, Z. Y., Yoo, Y. Z. (2007). *A Proteomics Approach to Identify the Ubiquitinated Proteins in Mouse Heart*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **357**, 731-736.
62. Kaferstein, F. K. (2003). *Actions to Reverse the Upward Curve of Foodborne Illness*. *Food Control*, **14**, 101-109.
63. Kanemaki, M., Sanchez-Diaz, A., Gambus, A., Labib, K. (2003). *Functional Proteomic Identification of DNA-Replication Proteins Induced by Proteolysis in Vivo*. *Nature*, **423**, 720-724.
64. Kathariou, S. (2002). *Listeria monocytogenes Virulence and Pathogenicity, a Food Safety Perspective: A Review*. *Journal of Food Protection*, **65** (11), 1811-1829.
65. Kazmierczak, M. J., Mithoe, S. C., Boor, K. J., Wiedmann, M. (2003). *Listeria monocytogenes SigmaB Regulates Stress Response and Virulence Functions*. *Journal of Bacteriology*, **185** (19), 5722-5734.
66. Kellner, R. (2000). *Proteomics: Concepts and Perspectives*. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **366**, 517-524.
67. Kislinger, T., Cox, B., Kannan, A., Chung, C., Hu, P., Ignatchenko, A., Scott, M. S., Gramolini, A. O., Morris, Q., Hallett, M. T., Rossant, J., Hughes, T. R., Frey, B., Emili, A. (2006). *Global Survey of Organ and Organelle Protein Expression in Mouse: Combined Proteomic and Transcriptomic Profile*. *Cell*, **125**, 173-186.



68. Koller, A., Washburn, M. P., Lange, B. M., Andon, N. L., Deciu, C., Haynes, P.A., Hays, L., Schieltz, D., Ulaszek, R., Wei, J., Wolters, D., Yates, J. R. (2002). *Proteomic Survey of Metabolic Pathways in Rice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 99, 11969-11974.
69. Komatsu, S. (2005). *Rice Proteome Database: A Step toward Functional Analysis of the Rice Genome*. Plant Molecular Biology, **59**, 179-190.
70. Koutsoumanis, K. P., Sofos, J. N. (2004). *Comparative Acid Stress Response of Listeria monocytogenes, Escherichia coli O157:H7 and Salmonella Typhimurium after Habituation at Different pH Conditions*. Letters in Applied Microbiology, **38**, 321-326
71. Kvasnička, F. (2003). *Proteomics: General Strategies and Application to Nutritionally Relevant Proteins*. Journal of Chromatography B, **787**, 77-89.
72. Lametsch, R., Bendixen, E. (2001). *Proteome Analysis Applied to Meat Science: Characterizing Post Mortem Changes in Porcine Muscle*. Journal of Agricultural Food Chemistry, **49**, 4531-4537.
73. Lametsch, R., Roepstorff, P., Bendixen, E. (2002). *Identification of Protein Degradation during Postmortem Storage of Pig Meat*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, **50**, 5508-5512.
74. Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B. (2001). *Initial Sequencing and Analysis of the Human Genome*. Nature, **409**, 860-921.
75. Lewis, K. (2001). *Riddle of Biofilm Resistance*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **45** (4), 999-1007.
76. Lianou, A., Stopforth, J. D., Yoon, Y., Wiedmann, M., Sofos, J. N. (2006). *Growth and Stress Resistance Variation in Culture Broth among Listeria monocytogenes Strains of Various Serotypes and Origins*. Journal of Food Protection, **69**, 2640-2647.
77. Lianou, A., Sofos, J. N. (2007). *A Review of the Incidence and Transmission of Listeria monocytogenes in Ready-to-Eat Products in Retail and Food Service Environments*. Journal of Food Protection, **70** (9), 2172-2198.
78. Liu, T. Y. (2000). *Natural and Biotech-Derived Therapeutic Proteins: What is the Future?* Electrophoresis, **21**, 1914-1917.

79. Liu, S., Graham, J. E., Bigelow, L., Morse, P. D., Wilkinson, B. J. (2002). *Identification of Listeria monocytogenes Genes Expressed in Response to Growth at Low Temperature*. Applied Environmental Microbiology, **68** (4), 1697-1705.
80. Lyakhovich, A., Canals, F., Nosov, M., Suralles, J. (2007). *A DIGE-Based Approach to Study Interacting Proteins*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, **70**, 693-695.
81. Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G., Villani, F. (2004). *Isolation and Technological Properties of Coagulase Negative Staphylococci from Fermented Sausages on Southern Italy*. Meat Science, **67**, 149-158.
82. Mah, T. F., O' Toole, G. A. (2001). *Mechanisms of Biofilm Resistance to Antimicrobial Agents*. Trends in Microbiology, **9** (1), 34-39.
83. McLauchlin, J. (1997a). *The Discovery of Listeria*. PHLS Microbiology Digest, **14**, 76-78.
84. McLauchlin, J. (1997b). *The Identification of Listeria Species*. International Journal of Food Microbiology, **38**, 77-81.
85. Mead, P. S., Wilson, J. B., Martin, S. W., Clarke, R. C., McEwen, S. A., Gyles, C. L. (1999). *Food-Related Illness and Death in the United States*. Emerging Infectious Diseases, **5**, 607-625.
86. Midelet, G., Carpentier, B. (2002). *Transfer of Microorganisms, Including Listeria monocytogenes, from Various Materials to Beef*. Applied Environmental Microbiology, **68** (8), 4015-4024.
87. Morzel, M., Chambon, C., Hamelin, M., Sante'-Lhoutellier, T., Sayd, T., Monin, G. (2004). *Proteome Changes during Pork Meat Ageing Following Use of Two Different Pre-Slaughter Handling Procedures*. Meat Science, **67**, 689-696.
88. Mossel, D. A. A., Corry, J. E. L., Struijk, C. B., Baird, R. M. (1995). *Essentials of the Microbiology of Foods: A Textbook for Advanced Studies*. John Wiley & Sons, England.
89. Myers, E. R., Dalmier, A. W., Martin, S. E. (1993). *Sodium Chloride, Potassium Chloride and Virulence in Listeria monocytogenes*. Applied Environmental Microbiology, **59**, 7, 2082-2086.

90. O' Driscoll, B., Gahan, C. G., Hill, C. (1996). *Adaptive Acid Tolerance Response in Listeria monocytogenes: Isolation of an Acid-Tolerant Mutant which Demonstrates Increased Virulence*. Applied Environmental Microbiology, **62** (5), 1693-1698.
91. Phan-Thanh, L., Mahouin, F. (1999). *A Proteomic Approach to Study the Acid Response in Listeria monocytogenes*. Electrophoresis, **20** (11), 2214-2224.
92. Phan-Thanh, L., Mahouin, F., Alige, S. (2000). *Acid Responses of Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, **55** (1-3), 121-126.
93. Porubleva, L., Chitnis, P. R. (2000). *Proteomics: A Powerful Tool in the Post-Genomic Era*. Indian journal of Biochemistry and Biophysics, **37**, 360-368.
94. Pritchard, T. J., Flanders, K. J., Donnelly, C. W. (1995). *Comparison of the Incidence of Listeria on Equipment Versus Environmental Sites Within Dairy Processing Plants*. International Journal of Food Microbiology, **26** (3), 375-384.
95. Quaranta, S., Giuffrida, M. G., Gavaletto, M., Giunta, C., Godovac-Zimmermann, J., Cañas, B., Fabris, C., Bertino, E., Mombro, M., Conti, A. (2001). *Human Proteome Enhancement: High-Recovery Method and Improved Two-Dimensional Map of Colostral Fat Globule Membrane Proteins*. Electrophoresis, **22**, 1810-1818.
96. Rocourt, J. (1999). *The Genus Listeria and Listeria monocytogenes: Phylogenetic Position, Taxonomy, and Identification*. In: *Listeria, Listeriosis and Food Safety* (Ryer, E. T., Marth, E. H., eds.). 2<sup>nd</sup> Edition. Marcel Dekker, New York, pp.1-20.
97. Rocourt, J., Boerlin, P., Grimont, F., Jacquet, C., Piffaretti, J. C. (1992). *Assignment of Listeria grayi and Listeria murrayi to a Single Species, Listeria grayi, with a Revised Description to Listeria grayi*. International Journal of Systematic Bacteriology, **42**, 69-73.
98. Rocourt, J., Cossart, P. (1997). *Listeria monocytogenes*. In: *Food Microbiology – Fundamentals and Frontiers* (Doyle, M. P., Buechat, L. R., Montville, T. J., eds.). American Society for Microbiology (ASM) press, Washington DC, pp. 337-352.
99. Rocourt, J., Moy, G., Vierk, K., Schlundt, J. (2003). *The Present State of Foodborne Disease in OECD Countries*. Food Safety Department, WHO, Geneva. Βρίσκεται στην ηλεκτρονική διεύθυνση: [http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne\\_disease/oecd/en/index.html](http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/oecd/en/index.html).

100. Samelis, J., Iked, J. S., Sofos, J. N. (2003). *Evaluation of the pH-Dependent, Stationary Phase Acid Resistance of Listeria monocytogenes and Salmonella Typhimurium DT 104 Induced by Culturing in Media with 1% Glucose: A Comparative Study with Escherichia coli O157:H7*. Journal of Applied Microbiology, **95**, 563-575.
101. Sasaki, T., Burr, B. (2000). *International Rice Genome Sequencing Project: The Effort to Completely Sequence the Rice Genome*. Current Opinion in Plant Biology, **3**, 138-141.
102. Schlundt, J. (2002). *New Directions in Foodborne Disease Prevention*. International Journal of Food Microbiology, **78**, 3-17.
103. Schmidt, K., Tirado, C. (2000). *WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe*. 7<sup>th</sup> Report 1993-1998. BGVV-FAO/WHO Collaborating Centre for Research and Training in Food Hygiene and Zoonoses, Berlin.
104. Schmidt, K., Gervelmeyer, A. (2003). *WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe*. 8<sup>th</sup> Report 1999-2000. BfR-FAO/WHO Collaborating Centre for Research and Training in Food Hygiene and Zoonoses, Berlin.
105. Seeliger, H. P. R., Jones, D. (1986). *Genus Listeria Pirie, 1940, 383AL*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Sneath, P. H., Mair, N. S., Sharp, M. E., Holt, J. G., eds.). Volume 2. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, pp.1235-1245.
106. Shabala, L. Budde, B., Ross, T., Siegumfeldt, H., McMeekin, T. (2002). *Responses of Listeria monocytogenes to Acid Stress and Glucose Availability Monitored by Measurements of Intracellular pH and Viable Counts*. International Journal of Food Microbiology, **75** (1-2), 89-97.
107. Shaw, A. (2004). *Discourses of Risk in Lay Accounts of Microbiological Safety and BSE: A Qualitative Interview Study*. Health, Risk and Society, **6**, 151-171.
108. Skandamis, P. N., Yoon, Y., Stopforth, J. D., Kendall, P.A., Sofos, J. N. (2008). *Heat and Acid Tolerance of Listeria monocytogenes after Exposure to Single and Multiple Sublethal Stresses*. Food Microbiology, **25**, 294-303.

109. Skylas, D. J., Van Dyk, D., Wringley, C. W. (2005). *Proteomics of Wheat Grain*. Journal of Cereal Science, **41**, 165-179.
110. Small, P. L. C., Waterman, S. R. (1998). *Acid Stress, Anaerobiosis and gadCB lessons from Lactococcus lactis and Escherichia coli*. Trends in Microbiology, **6** (6), 214-216.
111. Suckau, D., Resemann, A., Schuerenberg, M., Hufnagel, P., Franzen, J., Holle, A. (2003). *A Novel MALD LIFT-TOF/TOF Mass Spectrometer for Proteomics*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, **376**, 952-965.
112. Tachikawa, K., Briggs, S. P. (2006). *Targeting the Human Genome*. Current Opinion in Biotechnology, **17**, 659-665.
113. Tzannis, S. T. (1991). *Tutorial on Cell Disruption*. RPI. Βρίσκεται στην ηλεκτρονική διεύθυνση (τελευταία ενημέρωση 3 Ιουνίου 2007): <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/DOWNSTREAM/disrupt.htm>.
114. van Schaik, W., Gahan, C. G., Hill, C. (1999). *Acid-Adapted Listeria monocytogenes Displays Enhanced Tolerance Against the Lantibiotics Nisin and Lacticin 3147*. Journal of Food Protection, **62** (5), 536-539.
115. Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. C. (2001). *The Sequence of the Human Genome*. Science, **291**, 1304-1351.
116. Vercauteren, F. G., Bergeron, J. J., Vandesande, F., Arckens, L., Quirion, R. (2004). *Proteomic Approaches in Brain Research and Neuropharmacology*. European Journal of Pharmacology, **500**, 385-398.
117. Vercauteren, F. G. G., Arckens, L., Quirion, R. (2006). *Applications and Current Challenges of Proteomic Approaches, Focusing on Two-Dimensional Electrophoresis*. Amino Acids, **31**, 485-488.
118. Washburn, M. P., Yates, J. R. (2000). *Analysis of the Microbial Proteome*. Current Opinion in Microbiology, **3**, 292-297.
119. Wasinger, V., Cordwell, S. J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J. X., Gooley, A. A., Wilkins, M. R., Duncan, M. W., Harris, R., Williams, K. L., Humphery-Smith, I. (1995). *Progress with Gene-Product Mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium*. Electrophoresis, **16**, 1090-1094.

120. Wederquist, J., Sofos, J. N., Schmidt, G. R. (1994). *Listeria monocytogenes Inhibition in Refrigerated Vacuum Packaged Turkey Bologna by Chemical Additives*. Journal of Food Science, **59**, 498-500.
121. Weinreb, O., Amit, T., Youdim, M. B. H. (2007). *A Novel Approach of Proteomics and Transcriptomics to Study the Mechanism of Action of the Antioxidant-Iron Chelator, Green Tea Polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate*. Free Radical Biology and Medicine, **43** (4), 546-556.
122. Wemekamp-Kamphuis, H. H., Sleator, R. D., Wouters, J. A., Hill, C., Abee, T. (2004). *Molecular and Physiological Analysis of the Role of Osmolyte Transporters BetL, Gbu and OpuC in Growth of Listeria monocytogenes at Low Temperatures*. Applied Environmental Microbiology, **70** (5), 2912-2918.
123. Wiedmann, M., Arvik, T. J., Hurley, R. J., Boor, K. J. (1998). *General Stress Transcription Factor SigmaB and its Role in Acid Tolerance and Virulence of Listeria monocytogenes*. Journal of Bacteriology, **180** (14), 3650-3656.
124. Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D. F., Williams, K. L. (1996). *Progress with Proteome Projects: Why All Proteins Expressed by a Genome Should be Identified and How to Do it*. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, **13**, 19-50.
125. Wiseman, A., Woods, L. F. J. (2003). *Deleterious Outcome of Bioprocesses: Unless Ecobuffering can be Effluent-Incorporated by the Utilization of Immobilized Enzymes*. Enzyme and Microbial Technology, **32**, 194-196.
126. Yoshida, M., Muneyuki, E., Hisabori, T. (2001). *ATP Synthase – A Marvellous Rotary Engine of the Cell*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, **2** (9), 669-677.
127. Zang, X., Komatsu, S. (2007). *A Proteomics Approach for Identifying Osmotic-Stress-Related Proteins in Rice*. Phytochemistry, **68**, 426-437.
128. Zivy, M., de Vienne, D. (2000). *Proteomics: A Link between Genomics, Genetics and Physiology*. Plant Molecular Biology, **44**, 575-580.

