



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Τίτλος πτυχιακής εργασίας

**ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ  
ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ**

Συγγραφέας:

**ΚΛΑΟΥΝΤΙΟ ΛΟΚΑ**

A.M.: 18684067

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

**ΧΟΥΧΟΥΛΑ ΔΗΜΗΤΡΑ**

**Αθήνα, Ιούλιος 2022**



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA**  
**SCHOOL OF FOOD SCIENCES**  
**DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY**

Diploma Thesis

**IDENTIFICATION OF LACTIC ACID  
BACTERIA METABOLITES**

Student name and surname:

**KLAUDIO LOKA**

Registration number: 18684067

Supervisor name and surname:

**HOUHOULA DIMITRA**

**Athens, July 2022**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Τίτλος πτυχιακής εργασίας

**ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ**  
**ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ**

Η πτυχιακή εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

<b>A/a</b>	<b>ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ</b>	<b>ΒΑΘΜΙΑΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ</b>	<b>ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ</b>
1.	ΧΟΥΧΟΥΛΑ ΔΗΜΗΤΡΑ	ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ	
2.	ΜΠΑΤΡΙΝΟΥ ΑΝΘΙΜΙΑ	ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΚΗΤΡΙΑ	
3.	ΖΟΥΜΠΟΥΛΑΚΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ	ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ	


## ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο κάτωθι υπογεγραμμένος Κλαούντιο Λόκα του Άρμπεν, με αριθμό μητρώου 18684067 φοιτητής του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Ο δηλών



## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Δήμητρα Χούχουλα για την ανάθεση του εξαιρετικά ενδιαφέροντος θέματος, μέσω του οποίου αποκόμισα σπουδαίες γνώσεις και εμπειρίες.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Υποψήφια Διδάκτορα Δέσποινα Βουγιουκλάκη (εργαστήριο Ελέγχου Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων και Ποτών), για την καθοδήγησή της, την καθημερινή υποστήριξή της στην οργάνωση και εκτέλεση των πειραματικών δοκιμών και αναλύσεων, καθώς επίσης και την πολύτιμη συμβολή της στην αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ζύμωση διαφόρων τροφίμων από τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος αποτελεί μια από τις παλαιότερες μορφές βιοσυντήρησης, που εφαρμόζεται στην ανθρωπότητα. Οι ανταγωνιστικές σχέσεις μεταξύ των βακτηρίων αποτελούν ένα φαινόμενο γνωστό για πάνω από έναν αιώνα, τα τελευταία, όμως, χρόνια έχουν λάβει περισσότερη επιστημονική προσοχή, ιδιαίτερα όσον αφορά τη χρήση διαφόρων στελεχών των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος. Ένα κοινό χαρακτηριστικό πολλών οξυγαλακτικών βακτηρίων αποτελεί η ικανότητα τους να παράγουν μεταβολίτες. Οι μεταβολίτες παρουσιάζουν διάφορες λειτουργίες μεταξύ των οποίων είναι και η αντιμικροβιακή τους δράση. Ουσίες, οι οποίες αποτελούν μεταβολίτες των οξυγαλακτικών βακτηρίων, είναι τα οργανικά οξέα, το διοξειδίο του άνθρακα, το υπεροξειδίο του υδρογόνου και οι ελεύθερες ρίζες, η ακεταλδεΐδη, το διακετύλιο, οι βακτηριοσίνες και ενώσεις μικρού μοριακού βάρους μη πρωτεϊνικής δομής. Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον γι' αυτές τις ενώσεις έχει αυξηθεί σημαντικά λόγω της πιθανής χρήσης τους ως φυσικό υποκατάστατο των χημικών συντηρητικών, για την παραγωγή τροφίμων με αυξημένη διάρκεια ζωής ή/και ασφάλεια. Ο καταναλωτής, σήμερα, εκφράζει έντονα την επιθυμία του για συσχέτιση της διατροφής με την υγεία. Πρόσφατα επιστημονικά δεδομένα παρουσιάζουν τις θετικές επιδράσεις των προβιοτικών των οξυγαλακτικών βακτηρίων στην ανθρώπινη υγεία. Στόχος, λοιπόν, της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η ταυτοποίηση των μεταβολιτών που παράγονται από ένα συγκεκριμένο οξυγαλακτικό βακτήριο, το *Lactobacillus gasseri*, μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων που παρακολουθεί ταυτόχρονα όλο το φάσμα της περιοχής UV (HPLC-UV/DAD). Οι μεταβολίτες που ταυτοποιήθηκαν ανήκουν στα οργανικά οξέα. Με βάση τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, οι κύριοι μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν στο *Lactobacillus gasseri* ήταν DL-p-Hydroxyphenyllactic acid, 1,2-Dihydroxybenzene και Benzoic acid. Αυτή η μελέτη παρέχει μια διαφορετική εναλλακτικές προσεγγίσεις για τα μόρια που εμπλέκονται στην αντιμικροβιακή δράση των ζυμούμενων, από μικροοργανισμούς, τροφίμων. Αυτά τα μόρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιμικροβιακά συστατικά στη βιομηχανία τροφίμων αντί για τα συμβατικά χημικά συντηρητικά.

## ABSTRACT

The fermentation of various foods by lactic acid bacteria is one of the oldest forms of biopreservation, released to mankind. Competitive relationships between bacteria have been a well-known phenomenon for over a century, but in recent years more scientific attention has been paid, especially to the use of different strains of lactic acid bacteria (LAB). A common feature of many LAB is their ability to produce metabolites. Metabolites have various functions, including their antimicrobial activity. Substances that are metabolites of lactic acid bacteria are organic acids, carbon dioxide, hydrogen peroxide and free radicals, acetaldehyde, diacetyl, bacteria and low molecular weight non-protein compounds. In recent years, interest in these compounds has increased significantly due to their potential use as a natural substitute for chemical preservatives, for the production of foods with increased shelf life and / or safety. The consumer, today, strongly expresses his desire for a correlation between diet and health. Recent scientific data show the positive effects of probiotic lactic acid bacteria on human health. The aim of this dissertation is therefore to identify the metabolites produced by a specific lactic acid bacterium, *Lactobacillus gasseri*. by high pressure liquid chromatography with a photodiode detector array that simultaneously monitors the entire UV spectrum (HPLC-UV / DAD). The metabolites identified belong to organic acids. Based on the results of this study, the major metabolites detected in *Lactobacillus gasseri* were DL-p-Hydroxyphenyllactic acid, 1,2-Dihydroxybenzene and Benzoic acid. This study provides a different alternative approach to the others involved in the antimicrobial activity of food fermented by microorganisms. These molecules can be used as antimicrobial ingredients in the food industry instead of conventional chemical preservatives.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
II. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ.....	15
1.1 Περὶ οξυγαλακτικῶν βακτηρίων.....	15
1.2 Μεταβολισμὸς των LAB.....	16
1.3 Μεταβολίτες που παράγονται ἀπὸ τα οξυγαλακτικά βακτήρια.....	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΟ ΓΕΝΟΣ LACTOBACILLUS.....	25
2.1 Γενικά.....	25
2.2 Μορφολογία και γενικά χαρακτηριστικά του γένους <i>Lactobacillus</i> .....	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: <i>Lactobacillus gasseri</i> .....	27
3.1 Γενικά.....	27
3.2 Αντιμικροβιακή δράση και παραγωγή βακτηριοσινῶν.....	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΙ HPLC.....	32
4.1 Ορισμὸς Χρωματογραφίας.....	32
4.2 Ιστορική αναδρομή.....	32
4.3 Αρχή λειτουργίας.....	32
4.4 Βασική αρχή και ορολογία χρωματογραφίας εκλούσεως.....	32
4.4 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλῆς Πίεσης (HPLC).....	34
4.4.1 Οργανολογία HPLC.....	35
III. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	37
IV. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ.....	38
1.1 Συσκευές.....	38
1.2 Υλικά.....	38
1.3 Διαλύματα.....	39
1.4 Καλλιέργεια οξυγαλακτικῶν βακτηρίων.....	46
1.5 Απομόνωση του DNA.....	46
1.5.1 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμὸς απομονωμένου DNA.....	47
1.5.2 Ενίσχυση τμήματος DNA με τη μέθοδο της Αλυσιδωτῆς Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction).....	47
1.5.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτὴ αгарόζης.....	49
1.6 Ανίχνευση αντιμικροβιακῆς δράσης <i>Lactobacillus gasseri</i> .....	51
1.7 Μέθοδος καθαρισμὸς του ζυμοῦ.....	51
1.8 Ανάλυση του ελαίου με HPLC.....	52
1.8.1 Παρασκευὴ πρότυπων διαλυμάτων.....	54



1.9 Ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης των προτύπων ουσιών .....	54
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	55
2.1 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης.....	55
2.2 Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης <i>Lactobacillus gasseri</i> . ....	56
2.3 Ποιοτικός προσδιορισμός μεταβολιτών.....	59
2.4 Ποσοτικός προσδιορισμός μεταβολιτών.....	62
2.5 Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης των προτύπων ουσιών .....	66
<b>V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ</b> .....	67
<b>Βιβλιογραφία</b> .....	69

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1:</b> Εφαρμογές οξυγαλακτικών βακτηρίων (Florou-Paneri, 2013).....	16
<b>Εικόνα 2:</b> Ομοζυμωτική διάσπαση της γλυκόζης κατά Embdaen-Mayerhot (Βάσσος, 2009). .....	18
<b>Εικόνα 3:</b> Ετεροζυμωτική διάσπαση της γλυκόζης (Βάσσος, 2009).....	19
<b>Εικόνα 4:</b> Οι κύριες αντιμικροβιακές ενώσεις που εκκρίνονται από τα LAB και οι κύριες δράσεις τους (Rathod, 2021). ....	24
<b>Εικόνα 5:</b> Καλλιεργήσιμα επίπεδα <i>Lactobacillus gasseri</i> σε όλο τον ανθρώπινο βλεννογόνο (Selle, 2013). ....	28
<b>Εικόνα 6:</b> Πιθανοί μηχανισμοί ανταγωνισμού από το <i>L. gasseri</i> μέσω της παραγωγής αντιμικροβιακών ενώσεων (Selle, 2013).....	29
<b>Εικόνα 7:</b> Χρωματογραφική διαδικασία (ΙΩΑΝΝΗΣ, 2013).....	34
<b>Εικόνα 8:</b> Τυπική διάταξη Υγρού Χρωματογράφου Υψηλής Πίεσης (Σαμανίδου, 2001).....	36
<b>Εικόνα 9:</b> Αναλυτικός ζυγός.....	40
<b>Εικόνα 10:</b> Συσκευή ηλεκτροφόρησης.....	40
<b>Εικόνα 11:</b> Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης.....	41
<b>Εικόνα 12:</b> Φυγόκεντρος.....	41
<b>Εικόνα 13:</b> Συσκευή με λάμπα UV.....	42
<b>Εικόνα 14:</b> Φασματοφωτόμετρο.....	42
<b>Εικόνα 15:</b> Θερμομπλόκ.....	43
<b>Εικόνα 16:</b> Θερμοκυκλοποιητής.....	43
<b>Εικόνα 17:</b> Vortex.....	44
<b>Εικόνα 18:</b> Περιστροφικός εξατμιστήρας.....	44
<b>Εικόνα 19:</b> Σύστημα HPLC με DAD ανιχνευτή.....	45
<b>Εικόνα 20:</b> Σχηματική αναπαράσταση ενός κύκλου PCR.....	47
<b>Εικόνα 21:</b> Ηλεκτροφόρηση στην οποία φαίνονται τα προϊόντα PCR (175 bp) σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου. Ladder: 100 bp.....	55
<b>Εικόνα 22:</b> Τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των μεταβολιτών του <i>L. gasseri</i> έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού <i>S. enterica</i> .....	57
<b>Εικόνα 23:</b> Τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των μεταβολιτών του <i>L. gasseri</i> έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού <i>S. aureus</i> .....	57
<b>Εικόνα 24:</b> Τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των μεταβολιτών του <i>L. gasseri</i> έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού <i>E. coli</i> .....	58
<b>Εικόνα 25:</b> Τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των μεταβολιτών του <i>L. gasseri</i> έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού <i>Kl. pneumoniae</i> .....	58
<b>Εικόνα 26:</b> Τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των προτύπων B, H, M έναντι του παθογόνου <i>S. enterica</i> .....	66
<b>Εικόνα 27:</b> Τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των προτύπων B, H, M έναντι του παθογόνου <i>S. aureus</i> .....	66

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1:</b> Χαρακτηριστικά αναλυτικού ζυγού.....	40
<b>Πίνακας 2:</b> Χαρακτηριστικά συσκευής.....	40
<b>Πίνακας 3:</b> Χαρακτηριστικά τροφοδοτικού.....	41
<b>Πίνακας 4:</b> Χαρακτηριστικά φυγόκεντρου.....	41
<b>Πίνακας 5:</b> Χαρακτηριστικά συσκευής με λάμπα UV.....	42
<b>Πίνακας 6:</b> Χαρακτηριστικά φασματοφωτομέτρου.....	42
<b>Πίνακας 7:</b> Χαρακτηριστικά θερμομπλόκ.....	43
<b>Πίνακας 8:</b> Χαρακτηριστικά θερμοκυκλοποιητή.....	43
<b>Πίνακας 9:</b> Χαρακτηριστικά Vortex.....	44
<b>Πίνακας 10:</b> Χαρακτηριστικά περιστροφικού.....	44
<b>Πίνακας 11:</b> Χαρακτηριστικά συστήματος HPLC.....	45
<b>Πίνακας 12:</b> Αλληλουχία εκκινητών <i>L. gasseri</i> .....	48
<b>Πίνακας 13:</b> Σύσταση μίγματος αντίδρασης PCR.....	49
<b>Πίνακας 14:</b> Παρασκευή πηκτής αγαρόζης 2%.....	49
<b>Πίνακας 15:</b> Χρωματογραφικές συνθήκες (HPLC-UV/DAD).....	53
<b>Πίνακας 16:</b> Η αναστολή ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών από δραστικές αντιμικροβιακές ουσίες που παράγονται από το <i>L. gasseri</i> .....	56
<b>Πίνακας 17:</b> Εμβαδά χρωματογραφικών κορυφών των προτύπων διαλυμάτων (B) έπειτα από προσδιορισμό σε UV/DAD ανιχνευτή.....	62
<b>Πίνακας 18:</b> Εμβαδά χρωματογραφικών κορυφών των προτύπων διαλυμάτων (H) έπειτα από προσδιορισμό σε UV/DAD ανιχνευτή.....	63
<b>Πίνακας 19:</b> Εμβαδά χρωματογραφικών τεχνικών των προτύπων διαλυμάτων (H) έπειτα από προσδιορισμό σε UV/DAD ανιχνευτή.....	64
<b>Πίνακας 20:</b> Συγκέντρωση (σε rpm) των μεταβολιτών που παράχθηκαν από το <i>Lactobacillus gasseri</i> .....	65

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<b>Σχήμα 1:</b> Χρωματογράφημα <i>Lactobacillus gasserii</i> ύστερα από 5 ημέρες επώαση.....	60
<b>Σχήμα 2:</b> Χρωματογράφημα <i>Lactobacillus gasserii</i> ύστερα από 10 ημέρες επώαση.....	60
<b>Σχήμα 3:</b> Χρωματογράφημα <i>Lactobacillus gasserii</i> ύστερα από 30 ημέρες επώαση.....	61
<b>Σχήμα 4:</b> Καμπύλη αναφοράς των συγκεντρώσεων (X) προτύπων διαλυμάτων (B) σε συνάρτηση με τα εμβαδά (Y) των χρωματογραφικών κορυφών τους σε UV/DAD ανιχνευτή. .....	62
<b>Σχήμα 5:</b> Καμπύλη αναφοράς των συγκεντρώσεων (X) προτύπων διαλυμάτων (H) σε συνάρτηση με τα εμβαδά (Y) των χρωματογραφικών κορυφών τους σε UV/DAD ανιχνευτή. .....	63
<b>Σχήμα 6:</b> Καμπύλη αναφοράς των συγκεντρώσεων (X) προτύπων διαλυμάτων (M) σε συνάρτηση με τα εμβαδά (Y) των χρωματογραφικών κορυφών τους σε UV/DAD ανιχνευτή. .....	64

## I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η συντήρηση των τροφίμων σε υγιή και ασφαλή κατάσταση αποτελούσε για πολλά χρόνια, και συνεχίζει να αποτελεί μια διαρκή πρόκληση για τους ανθρώπους. Η ξήρανση, το αλάτισμα και η ζύμωση αποτελούν τις παραδοσιακές μεθόδους συντήρησης. Η κονσερβοποίηση και η κατάψυξη αποτελούν πρόσφατες εξελίξεις (Reis, "Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications.", 2012; Schnürer, 2005). Τα τελευταία χρόνια, η προσθήκη χημικών συντηρητικών έχει προκαλέσει δυσαρέσκεια στους καταναλωτές, οι οποίοι αναζητούν υψηλής ποιότητας, λιγότερα επεξεργασμένα, πιο φυσικά (χωρίς τεχνητά πρόσθετα) και ασφαλέστερα τρόφιμα (Eady, 2019). Από την άλλη πλευρά, τα μη επεξεργασμένα τρόφιμα μπορούν να φιλοξενούν επικίνδυνους παθογόνους μικροοργανισμούς, μερικοί από τους οποίους έχουν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται υπό ψύξη και απουσία οξυγόνου. Μια διαφυγή σε αυτό το δίλημμα αποτελεί η βιοσυντήρηση, ή πιο συγκεκριμένα η χρήση αντιμικροβιακών μεταβολιτών ζυμωτικών μικροοργανισμών, όπως αυτά των βακτηρίων του γαλακτικού οξέος (Lactic Acid Bacteria-LAB) (Reis, 2012; Fadda, 2010). Πολλές αντιμικροβιακές χημικές ουσίες χρησιμοποιούνταν για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς γνωστές δυσμενείς επιπτώσεις. Ταυτόχρονα, πολλές από τις οργανικές ενώσεις που έχουν προκαλέσει ενδιαφέρον είναι αντιμικροβιακοί μεταβολίτες βακτηρίων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ή συνδέονται με τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση.

Με τον όρο βιοσυντήρηση νοείται η παράταση της διάρκειας ζωής και η ενισχυμένη ασφάλεια των τροφίμων με τη χρήση φυσικών και ελεγχόμενων μικροβίων ή/και αντιμικροβιακών ενώσεων (Ananou, 2007; Gálvez, "Bacteriocin-based strategies for food biopreservation.", 2007). Έχουν γίνει μεγάλες προσπάθειες για τη χρήση της δράσης των προβιοτικών μικροοργανισμών και των αντιμικροβιακών τους προϊόντων, ως στρατηγική για τον έλεγχο και τη βιοσυντήρηση των τροφίμων (Gálvez, 2010; Kos, "Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry.", 2008).

Αρκετοί μικροοργανισμοί, ιδίως τα LAB, με αντιμικροβιακά χαρακτηριστικά έχουν συσχετιστεί με τα τρόφιμα. Τα LAB είναι μια ομάδα θετικών κατά Gram μικροοργανισμών, ορισμένοι από τους οποίους έχουν ταξινομηθεί ως "Γενικά Αναγνωρισμένοι ως Ασφαλείς (GRAS)" από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια Τροφίμων (EFSA) και τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών (FAO) (Dangour, 2006). Η χρήση των στελεχών των LAB ως προβιοτικά και ως βιοπροστατευτικές καλλιέργειες σε προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση έχει διερευνηθεί ευρέως (Kos, 2008). Σύμφωνα με τον ορισμό που έδωσαν ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (FAO/WHO), τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί που, όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, προσφέρουν όφελος για την υγεία στον ξενιστή (Sánchez, 2017; Hill, 2014).

Ως εκ τούτου, είναι κατανοητό ότι τα βακτήρια γαλακτικού οξέος χρησιμοποιούνται εκτενώς στη ζύμωση μιας ποικιλίας προϊόντων διατροφής και είναι γνωστά για τις θεραπευτικές και συντηρητικές τους επιδράσεις. Αυτή η ανασταλτική δράση των βακτηρίων έναντι των παθογόνων οφείλεται κυρίως στην παραγωγή γαλακτικού οξέος και μεταβολιτών, όπως αιθανόλη, πεπτίδια, υπεροξειδίο του υδρογόνου, αρκετά ένζυμα και βακτηριοσίνες (Bartkiene, 2019; Reis, 2012; Cáliz-Lara, 2014). Οι μεταβολίτες είναι ενδιάμεσα ή τελικά προϊόντα του μεταβολισμού. Παρουσιάζουν μια ποικιλία λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένης της δομής, των ανασταλτικών επιδράσεων στα ένζυμα, της δικής τους καταλυτικής δραστηριότητας, της άμυνας και της αλληλεπίδρασης με άλλους οργανισμούς. Ωστόσο, ο χαρακτηρισμός των παραγόμενων μεταβολιτών από τα LAB, δεν έχει ακόμη διερευνηθεί πλήρως.

Ο στόχος της μελέτης αυτής, ήταν ο προσδιορισμός συγκεκριμένων μεταβολιτών που παράγονται από το στέλεχος του οξυγαλακτικού βακτηρίου *Lactobacillus gasseri* και η διερεύνηση της πιθανής αντιμικροβιακής τους δράσης έναντι κοινών παθογόνων μικροοργανισμών των τροφίμων. Λαμβάνοντας υπόψιν ότι τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος παρουσιάζουν παρόμοια αποτελέσματα *in vitro* και ότι οι μεταβολίτες τους μπορεί να στοχεύουν και να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον ανταγωνιστικό αποκλεισμό παθογόνων μικροοργανισμών, η παρούσα μελέτη είχε ως σκοπό τον έλεγχο ενός βακτηρίου που παράγει αρκετά αντιμικροβιακά πεπτίδια και οξέα και τα οποία μπορεί να είναι αποτελεσματικά βιοσυντηρητικά για προϊόντα διατροφής.

## II. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

#### 1.1 Περί οξυγαλακτικών βακτηρίων

Οι οξυγαλακτικοί μικροοργανισμοί έχουν πάρει το όνομα τους από το κύριο προϊόν της ζυμώσεως της λακτόζης που είναι το γαλακτικό οξύ, με μια από τις τρεις στερεοχημικές μορφές του: D(-), L(+) και DL(ρακεμική). Το σχήμα τους λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας τους ποικίλει από σφαιρικό έως ραβδόμορφο με όλες τις ενδιάμεσες καταστάσεις. Οι διατάξεις των κυττάρων επίσης ποικίλουν ανάλογα με το γένος, από μεμονωμένα κύτταρα, ζεύγη κυττάρων, τετράδες σε δύο επίπεδα και αλύσεις βραχείες ή επιμήκεις.

Παρουσιάζουν μικρή πρωτεολυτική και λιπολυτική δραστηριότητα. Είναι Gram θετικά βακτήρια, μη σπορογόνα, ακίνητα, στερούμενα βλεφαρίδων, εκτός από μεμονωμένες περιπτώσεις στρεπτόκοκκων, αρνητικά στη δοκιμή καταλάσης. Οι αποικίες τους είναι γαλακτόχρες λόγω της απουσίας κυτοχρωμάτων από τα κύτταρα.

Συνθέτουν ATP μέσω των ζυμώσεων των υδατανθράκων και όχι μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας, λόγω της αδυναμίας τους να συνθέτουν κυτόχρωμα και άλλα συστατικά με συστατικό την αίμη και έτσι δε μπορούν να χρησιμοποιήσουν το οξυγόνο ως τελικό δέκτη των ηλεκτρονίων και να αποδεσμεύσουν μέσω οξειδώσεως το σύνολο της ενέργειας που εγκλείουν οι υδατάνθρακες.

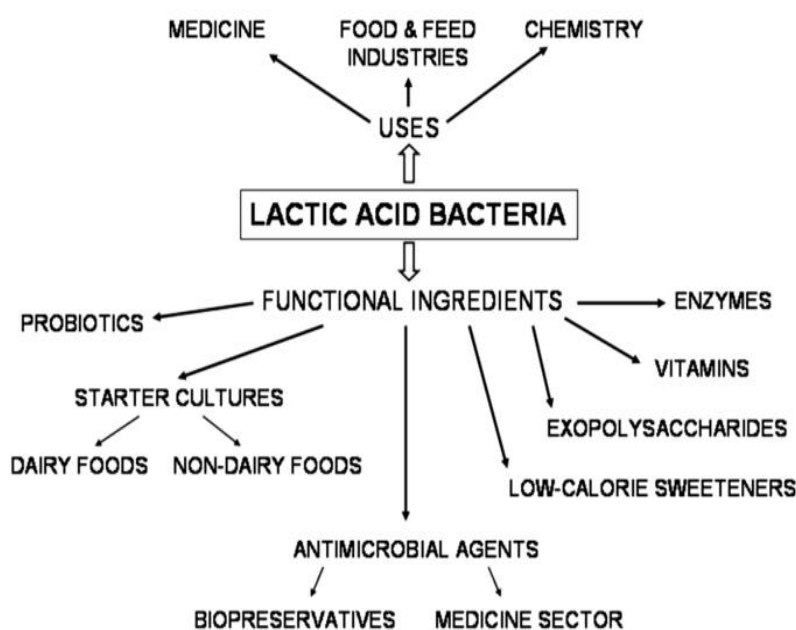
Είναι προαιρετικά αναερόβια με περιορισμένες ικανότητες βιοσύνθεσης και με μεγάλες διατροφικές απαιτήσεις σε αμινοξέα, βιταμίνες πουρίνες και πυριδίνες και μερικά συγκεκριμένα πεπτίδια για την ανάπτυξη τους.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται στην παραγωγή πλήθους προϊόντων τροφίμων, όπως (Axelsson, 2004) (Ashenafi, 1991) (Lindgren, Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations, 1990):

- γαλακτομικά προϊόντα,
- ζυμωμένα αλλαντικά,
- ζυμωμένα φυτικά προϊόντα,
- κρασί,
- αρτοσκευάσματα,
- ζωοτροφές,
- υδατοκαλλιέργειες, ως εναλλακτικός τρόπος θεραπείας των νοσημάτων των αλιευμάτων, με στόχο τ μείωση των αντιβιοτικών.

Η χρήση των οξυγαλακτικών βακτηρίων για την παραγωγή και συντήρηση των τροφίμων ξεκίνησε αιώνες πριν, χωρίς, οι άνθρωποι να γνωρίζουν το επιστημονικό υπόβαθρο γύρω από αυτές τις διαδικασίες. Ως προς το ιστορικό του θέματος, φαίνεται πως τρόποι ζύμωσης των λαχανικών ήταν ήδη γνωστοί τον 3ο π.Χ. αιώνα στην Κίνα, ενώ μέθοδοι ζύμωσης του κρέατος είχαν ήδη αναπτυχθεί

στην Κίνα και την Βαβυλωνία τον 15ο π.Χ. αιώνα. Επίσης, πριν 80 αιώνες φαίνεται να παρασκευάστηκε το πρώτο τυρί στη κοιλάδα μεταξύ Ευφράτη και Τίγρη. Πέρα από τα τρόφιμα, τα οξυγαλακτικά βακτήρια χρησιμοποιούνται και σε άλλους κλάδους, όπως η χημεία, η φαρμακολογία και η βιοτεχνολογία. Στη βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιούνται ως καλλιέργειες επηρεάζοντας τα οργανοληπτικά και τεχνολογικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων προϊόντων, ενώ συμβάλλουν και στη συντήρηση των τροφίμων μέσω των αντιμικροβιακών ουσιών που παράγουν. Τέλος, να σημειωθεί ότι έχουν συμβάλει μέσω των θεραπευτικών και ευεργετικών τους ιδιοτήτων, όντας προβιοτικά, να δημιουργήσουν νέα προϊόντα γνωστά ως «λειτουργικά τρόφιμα».



**Εικόνα 1:** Εφαρμογές οξυγαλακτικών βακτηρίων (Florou-Paneri, 2013).

## 1.2 Μεταβολισμός των LAB

Τα LAB από πλευράς μεταβολισμού, διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

- 1) Τα ομοζυμωτικά (homofermenters) τα οποία μετατρέπουν τις εξόζες σχεδόν στοιχειομετρικά προς γαλακτικό οξύ.
- 2) Τα ετεροζυμωτικά (heterofermenters) τα οποία μετατρέπουν τις εξόζες προς ισομοριακές ποσότητες γαλακτικού οξέος, αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα.

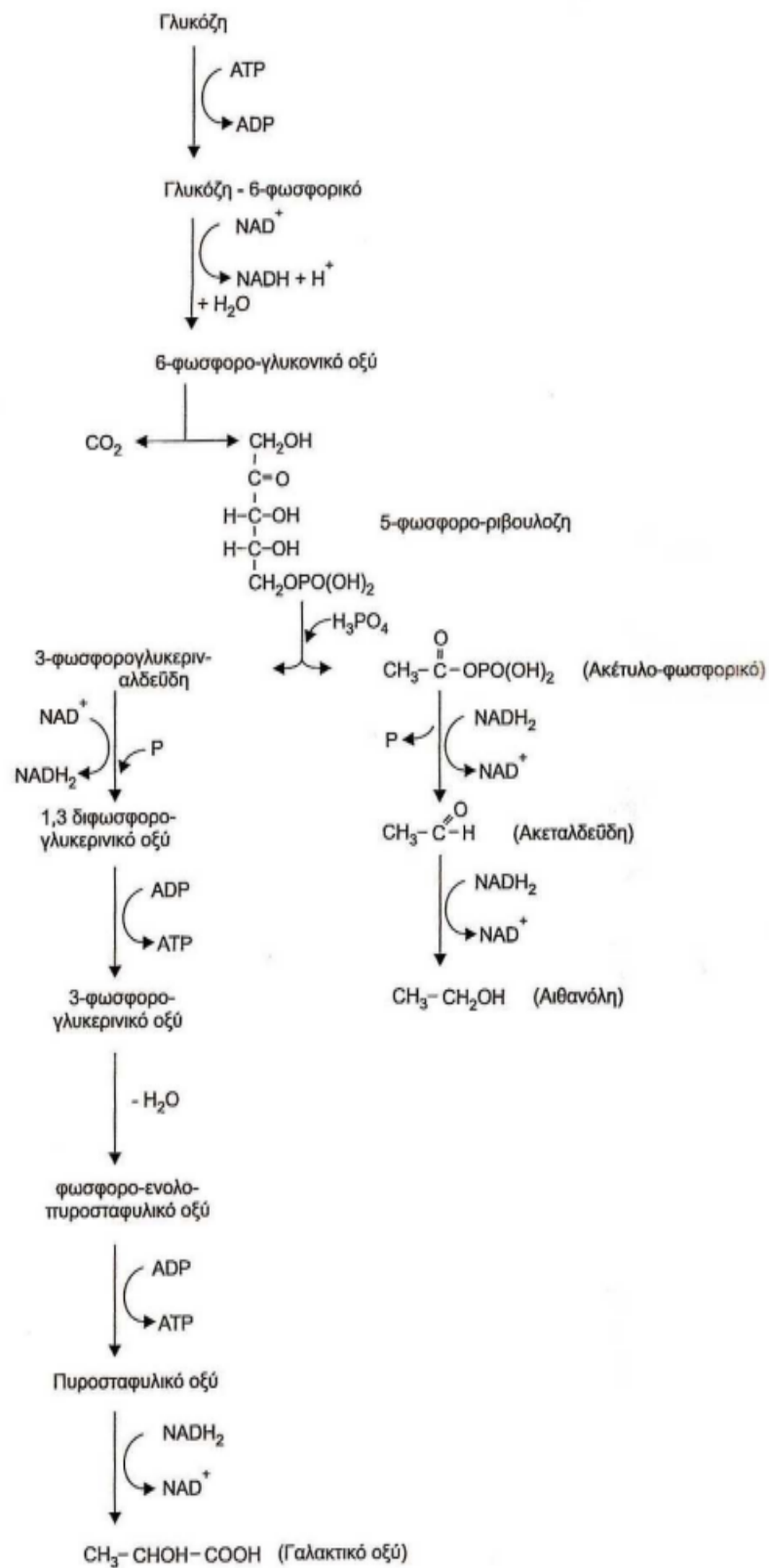
Τα δύο βασικά σχήματα μεταβολισμού φαίνονται στις εικόνες 1, 2.

Τα ομοζυμωτικά γαλακτοβακτήρια συνθέτουν το ένζυμο φρουκτοζο-διφωσφορο-αλδολάση με την παρέμβαση του οποίου διασπών τη

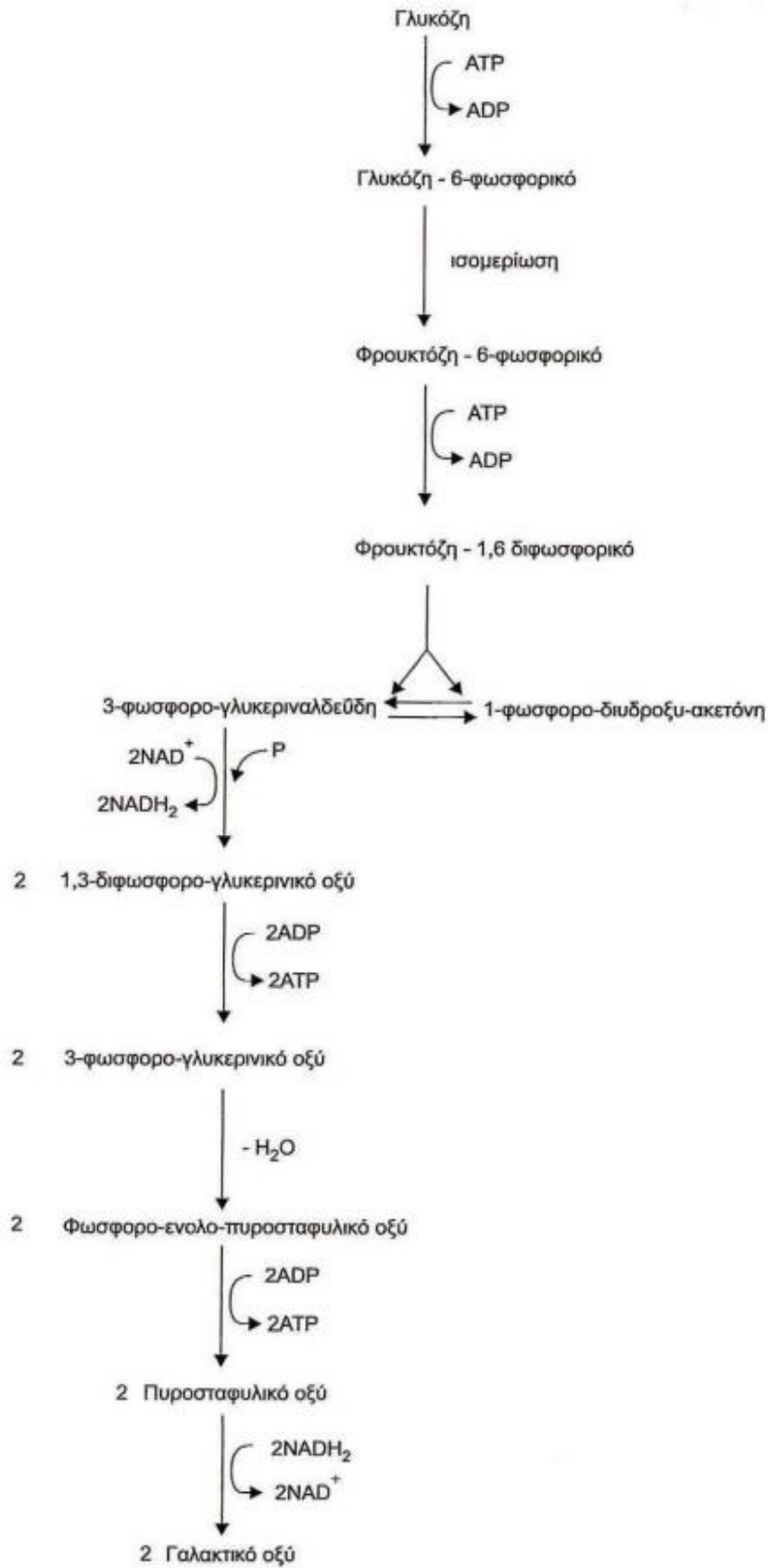


διφωσφορυλιωμένη φρουκτόζη προς δύο τριόζες, τις 3-φωσφορο-γλυκεριναλδεΐδη και 1-φωσφοροδιοξυακετόνη. Στη συνέχεια η 3-φωσφορο-γλυκεριναλδεΐδη με τη δράση της γαλακτικής αφυδρογονάσης(NADH<sub>2</sub>) αρχικά ζυμώνεται προς πυροσταφυλικό οξύ και τέλος ανάγεται σε γαλακτικό οξύ το οποίο είναι και το μοναδικό τελικό προϊόν αυτής της διάσπασης κατά Embdaen-Mayerhof.

Αντίθετα, τα ετεροζυμωτικά γαλακτοβακτήρια δεν συνθέτουν φρουκτοδιφωσφορική αλδολάση και δεν διασπών την εξόζη προς δύο τριόζες. Έτσι με οξειδώδη σχηματίζουν σε πρώτο στάδιο γλυκονικό οξύ και στη συνέχεια διασπών το μόριο προς διοξειδίο του άνθρακα και 5-φωσφορο-ριβουλόζη. Η τελευταία διασπάται προς ένα μόριο τριόζης (3-φωσφορο-γλυκεριναλδεΐδη) και ένα μόριο ακετυλοφωσφορικού οξέος. Το τελευταίο μετατρέπεται προς αιθανόλη με δύο επάλληλες αναγωγές, που αντισταθμίζουν τις δύο προηγούμενες οξειδώσεις μετατροπής της εξόζης προς πεντόζη και διοξειδίο του άνθρακα. Αξιοθαύμαστο είναι το γεγονός ότι στην ακολουθία αυτή των αντιδράσεων το ακετυλοφωσφορικό οξύ μετέχει στο σχηματισμό της αιθανόλης χωρίς να αυξάνει τα ενεργειακά αποθέματα του μικροοργανισμού. Έτσι, λοιπόν, στην ετερογαλακτική ζύμωση ένα μόριο εξόζης μετατρέπεται προς ισομοριακό μείγμα γαλακτικού οξέος, αιθανόλης και διοξειδίου του άνθρακα τα οποία αποτελούν και τα τελικά προϊόντα της ζύμωσης. Όσον αφορά της τριόζης προς γαλακτικό οξύ, αυτή γίνεται με τον ίδιο τρόπο όπως και στην ομογαλακτική ζύμωση. Τέλος, να σημειωθεί ότι η ομογαλακτική ζύμωση εξασφαλίζει στον μικροοργανισμό δύο φωσφορικούς δεσμούς υψηλής ενέργειας ανά μόριο εξόζης . ενώ η ετεροζυμωτική εξασφαλίζει μόνο ένα.



Εικόνα 2: Ομοζυμοτική διάσπαση της γλυκόζης κατά Embdaen-Mayerhot (Βάσσο, 2009).



Εικόνα 3: Ετεροζυμωτική διάσπαση της γλυκόζης (Βάσσης, 2009).

### 1.3 Μεταβολίτες που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια

Ο όρος μεταβολίτης χρησιμοποιείται για μικρά μόρια που αποτελούν ένα ενδιάμεσο ή τελικό προϊόν του μεταβολισμού. Οι μεταβολίτες παρουσιάζουν διάφορες λειτουργίες μεταξύ των οποίων είναι και η αντιμικροβιακή τους δράση. Ουσίες, οι οποίες αποτελούν μεταβολίτες των οξυγαλακτικών βακτηρίων, είναι οι εξής (Axelsson, 2004; Lindgren, Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations, 1990; Ashenafi, 1991):

- α) Οργανικά οξέα
- β) Διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>)
- γ) Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και οι ελεύθερες ρίζες
- δ) Ακεταλδεΐδη
- ε) Διακετύλιο
- στ) Μεταβολίτες πρωτεϊνικής φύσεως που χαρακτηρίζονται ως βακτηριοσίνες
- ζ) Μεταβολίτες μικρού μοριακού βάρους μη πρωτεϊνικής δομής

Οι μεταβολίτες αυτοί παρέχουν σταθερότητα και ασφάλεια στα ζυμωμένα τρόφιμα, και η συντηρητικότητα που προσφέρουν τα οξυγαλακτικά βακτήρια στηρίζεται κατά ένα ποσοστό στους συγκεκριμένους μεταβολίτες. Οι μεταβολίτες αυτοί συγκεντρώνονται σε παρεμποδιστικά επίπεδα για την ανάπτυξη των παθογόνων βακτηρίων στα διάφορα τρόφιμα. Η αντιμικροβιακή δράση όλων των παραπάνω ουσιών είναι συνήθως συνεργατική (Ashenafi, 1991; Lindgren, Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations, 1990).

Ορισμένοι από τους παραπάνω μεταβολίτες των οξυγαλακτικών βακτηρίων έχουν γίνει δεκτοί στα τρόφιμα ως συντηρητικά τροφίμων, όπως το γαλακτικό οξύ, το οξικό οξύ, το προπιονικό οξύ και το διακετύλιο (Κώδικας Τροφίμων και Ποτών). Επιπλέον, η βακτηριοσίνη “νισίνη” που παράγεται από το στέλεχος *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, χρησιμοποιείται σε πολλές χώρες ως ένα αντιμικροβιακό βιολογικό συντηρητικό σε πολλά τρόφιμα (Chikindas, 2001; Ashenafi, 1991; Jay, 1982). Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένες πληροφορίες για τους μεταβολίτες.

#### α) Οργανικά οξέα

Το γαλακτικό, κυρίως, αλλά και το προπιονικό και το οξικό οξύ αποτελούν τα οργανικά οξέα που παράγονται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Οι ενώσεις αυτές αποτελούν έναν από τους σημαντικότερους και αποτελεσματικότερους παράγοντες στα όξινα τρόφιμα (Lindgren, Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations, 1990; Axelsson, 2004). Τα οργανικά οξέα εμποδίζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων με δύο τρόπους, με τη μείωση της τιμής του pH και με την παρουσία της αδιάστατης μορφής τους (Ouweland, 1990; Lindgren, Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations, 1990; Adams M. R., 1990; Adams M. R., 1988). Με τη μείωση του pH, αυξάνεται η οξύτητα με αποτέλεσμα να δημιουργούνται μη ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη των περισσότερων

βακτηρίων. Ο βαθμός ανάπτυξης του εκάστοτε βακτηρίου εξαρτάται από τον βαθμό ευαισθησίας του στο χαμηλό pH. Είναι γνωστό το γεγονός ότι όλοι οι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν μια μέγιστη, μια άριστη και μια ελάχιστη περιοχή pH για την ανάπτυξη τους. Γενικότερα τα βακτήρια προτιμούν ένα pH γύρω στην ουδέτερη περιοχή, δηλαδή 6,5 έως 7,5, ενώ παρουσιάζουν ανοχή σε ένα εύρος pH 4 έως 9. Οι ζύμες παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε όξινο περιβάλλον σε σύγκριση με τα βακτήρια, ενώ οι μύκητες αναπτύσσονται σε ένα μεγαλύτερο εύρος pH (Adams M. R., 1990; Adams M. R., 1988).

Η παρεμπόδιση των παθογόνων μικροοργανισμών εξαρτάται και από άλλους παράγοντες όπως το είδος του οργανικού οξέος, η συγκέντρωση του και ο χρόνος επαφής του με τον παθογόνο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί επιδεικνύουν μια διαφορετική ανοχή στα διάφορα οργανικά οξέα.

Η αδιάστατη μορφή των οργανικών οξέων μπορεί να εμποδίσει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, λόγω της ικανότητας που τους δίνει η μορφή αυτή να διέλθουν εύκολα δια μέσου της λιπόφιλης κυτταρικής μεμβράνης του βακτηριακού κυττάρου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται το pH στο εσωτερικό του κυττάρου. Η παρεμποδιστική ικανότητα ενός οργανικού οξέος εξαρτάται από τη σταθερά διαστάσεως (pKa). Όσο πιο χαμηλή είναι αυτή, τόσο πιο χαμηλό το ποσοστό του οξέος που παραμένει αδιάστατο για δεδομένη τιμή pH, άρα τόσο χαμηλότερη και η δραστηριότητα του (Adams M. R., 1990).

## **β) Διοξείδιο του άνθρακα**

Το διοξείδιο του άνθρακα είναι ένα από τα τελικά προϊόντα της ζύμωσης των εξοζών από τα ετεροζυμωτικά οξυγαλακτικά βακτήρια.

Η συσσώρευση CO<sub>2</sub> συμβάλλει στη συντήρηση του τροφίμου με δύο διαφορετικούς τρόπους (Genigeorgis, 1985). Ο ένας αφορά τη δημιουργία αναερόβιων συνθηκών λόγω αντικατάστασης του ατμοσφαιρικού οξυγόνου με CO<sub>2</sub>. Ταυτόχρονα, το ίδιο το CO<sub>2</sub> αποτελεί αντιμικροβιακό παράγοντα (Dixon, 1989). Υψηλές συγκεντρώσεις CO<sub>2</sub> παρεμποδίζουν την ανάπτυξη ορισμένων μικροοργανισμών, ενώ χαμηλές συγκεντρώσεις αυτού ευνοούν την ανάπτυξη άλλων (Genigeorgis, 1985).

Ο τρόπος με τον οποίο το διοξείδιο του άνθρακα δρα δεν έχει προσδιορισθεί ακριβώς. Ωστόσο, υπάρχουν δύο πιθανές θεωρήσεις. Η μία υποστηρίζει ότι, όταν το CO<sub>2</sub> συσσωρεύεται στην λιπιδιακή στρώση της κυτταρικής μεμβράνης δημιουργεί προβλήματα στη λειτουργικότητα της (Dixon, 1989). Η άλλη δε, υποστηρίζει ότι το CO<sub>2</sub> δρα ως παρεμποδιστικός παράγοντας στις αντιδράσεις καρβοξυλίωσης (KING JR, 1975).

## **γ) Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και οι ελεύθερες ρίζες**

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου και οι ελεύθερες ρίζες δρουν συνεργαστικά (Condon, 1987; Piard, 1992). Ουσιαστικά, η αντιβακτηριακή τους δράση είναι αποτέλεσμα των μεταβολών που προκαλούν στο βακτηριακό DNA. Συγκεκριμένα, αυτό που κάνουν είναι να προσβάλλουν ειδικές περιοχές

του βακτηριακού DNA και να προκαλούν αντιστρεπτές ή μη βλάβες σε αυτό, όπως η απελευθέρωση νουκλεοτιδίων ή απομάκρυνση ολόκληρων τεμαχίων DNA (Ananthaswamy, 1977; Byczkowski, 1988). Η παραγωγή H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> από τα οξυγαλακτικά βακτήρια εξαρτάται από την παρουσία οξυγόνου στο μέσο ανάπτυξης και το είδος των στελεχών (Juven, 1988; LUCKE, 2012). Σύμφωνα με μελέτες, ο *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* μπορεί να εμποδίσει την *Pseudomonas fluorescens*, μέσω της παραγωγής υπεροξειδάσης, σε θερμοκρασία ψύξης. Γενικότερα, οι Price et Lee (1990) έδειξαν ότι το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μπορούσε να εμποδίσει την ανάπτυξη των στελεχών των γενών *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* και *Proteus sp.* από τον *Lactobacillus plantarum* (LUCKE, 2012).

#### δ) Ακεταλδεΐδη

Η ακεταλδεΐδη δρα ανασταλτικά στους Gram αρνητικούς μικροοργανισμούς (Lindgren, 1990). Παράγεται κατά τη παρασκευή γιαουρτιού μέσω της μετατροπής της θρεονίνης σε ακεταλδεΐδη και γλυκίνη, με τη δράση του ενζύμου αλδολάση. Το ένζυμο αυτό παράγεται από τον *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*.

#### ε) Διακετύλιο

Το διακετύλιο αποτελεί το πιο γνωστό τελικό μεταβολικό προϊόν που συντίθεται από το πυροσταφιλικό οξύ τόσο αναερόβια όσο και αερόβια (Condon, 1987). Διάφορα στελέχη των LAB, που ζυμώνουν το κίτρινο οξύ, όπως *Pediococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Lactobacillus sp.* και *Lactococcus sp.*, παράγουν την ένωση αυτή (Γ., 2006). Σύμφωνα με μελέτες, το διακετύλιο λειτουργεί έντονη παρεμποδιστική δράση έναντι των Gram αρνητικών βακτηρίων, όπως *Yersinia enterocolytica*, *Salmonella anatum*, *Aeromonas hydrophila*, *Mycobacterium tuberculosis* (Motlagh, Viability loss of foodborne pathogens by starter culture metabolites.", 1991).

#### στ) Μεταβολίτες πρωτεϊνικής φύσεως που χαρακτηρίζονται ως βακτηριοσίνες

Οι βακτηριοσίνες αποτελούν αντιβακτηριακές ενώσεις, οι οποίες παράγονται από πλήθος μικροοργανισμών, μεταξύ των οποίων και τα οξυγαλακτικά βακτήρια. Η παραγωγή τους εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν στο χώρο ανάπτυξης των βακτηρίων, όπως τα θρεπτικά συστατικά, το pH και η θερμοκρασία. Μερικοί από τους διαχωρισμούς, που γίνονται ως προς τις βακτηριοσίνες, αφορούν το μοριακό τους βάρος, τη δομή τους και τη θερμοανθεκτικότητα τους (Motlagh, 1991). Επίσης, οι βακτηριοσίνες, που βρίσκονται στη στατική φάση ανάπτυξης, παρουσιάζουν μικρότερη βακτηριοκτόνο δράση από αυτά που βρίσκονται στη λογαριθμική φάση (Davey G. P., 1981; Davey G. P., 1981; Zajdel, 1985). Γενικότερα, αυτό που ισχύει για τις βακτηριοσίνες που παράγονται από τα LAB, είναι ότι η δράση τους περιορίζεται μόνο στα στελέχη της ίδιας οξυγαλακτικής χλωρίδας. Τον ισχυρισμό αυτό έρχονται να διαψεύσουν ορισμένες βακτηριοσίνες, η παρεμποδιστική δράση των οποίων επεκτείνεται και σε

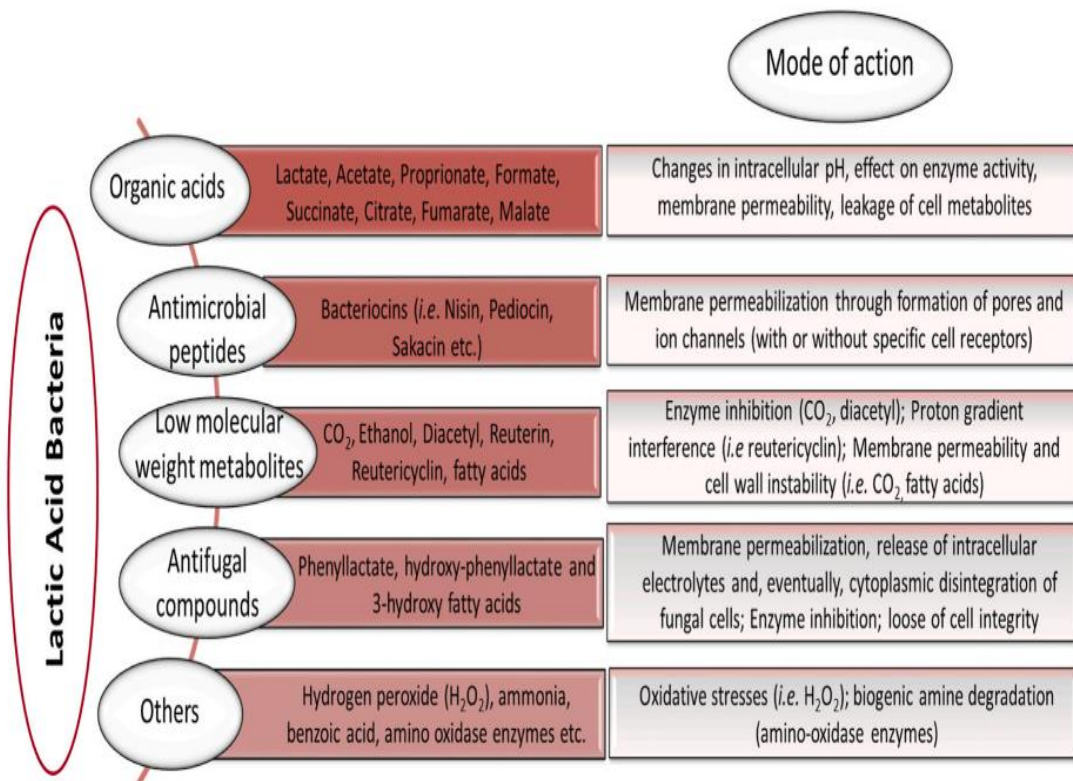
αρκετούς Gram θετικούς παθογόνους μικροοργανισμούς (Klaenhammer, 1988). Γίνεται, επομένως, κατανοητό ότι οι επιστήμονες στοχεύουν στο να εκμεταλλευτούν την ιδιότητα αυτή των βακτηριοσινών για την παραγωγή τροφίμων συντηρούμενων με φυσικό τρόπο. Αυτό συνεπάγεται τη χρήση των LAB, ως προστατευτικές καλλιέργειες ή των μεταβολικών τους προϊόντων, κυρίως βακτηριοσινών (Klaenhammer, 1988; Venema, 1993; van Belkum, 1992; Cintas, 2001).

Οι βακτηριοσίνες που χρησιμοποιούνται στη τεχνολογία τροφίμων, είναι κυρίως αυτές που παράγονται από τα LAB. Ορισμένα από τα γένη οξυγαλακτικών βακτηρίων που παράγουν βακτηριοσίνες είναι τα εξής: *Enterococcus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Leuconostoc sp.*, *Carnobacterium sp.*, *Lactococcus sp.* και *Lactobacillus sp.* Η παρεμποδιστική δράση των περισσότερων περιορίζεται σε συγκεκριμένη μικροχλωρίδα (Klaenhammer, 1988; Cintas, 2001).

### ζ) Μεταβολίτες μικρού μοριακού βάρους μη πρωτεϊνικής δομής

Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται ορισμένοι εξωπολυσακχαρίτες και η reuterin, που παράγονται από συγκεκριμένα στελέχη και χαρακτηρίζονται από ένα ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δράσης (Ακτύπης, 1999). Οι σημαντικότερες από αυτές είναι: Υπάρχουν διάφοροι πολυσακχαρίτες

- Μια ουσία που παράγεται από στέλεχος του *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, με παρεμποδιστική δράση έναντι των στελεχών *L. lactis*, *E. coli*, *Pseudomonas sp.*, *Shigella sp.*, *S. typhimurium.*, *Bacillus sp.* (Pulusani, 1979).
- Μια ουσία από το στέλεχος του *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, με παρεμποδιστική δράση έναντι των *S. aureus*, *Achromobacter liquefaciens*, *Pseudomonas fragi* (ABDEL-BAR, 1987).
- Η reuterin, η οποία παράγεται από το *Lactobacillus reuteri* και παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση. Η παρεμποδιστική της δράση προσδιορίζεται τόσο σε Gram θετικά όσο και Gram αρνητικά βακτήρια, καθώς και σε ζύμες και μύκητες (Chung, 1989). Λόγω του ευρύ φάσματος στο οποίο επεκτείνεται η παρεμποδιστική δράση της συγκεκριμένης ένωσης έχει προταθεί η χρήση της ως φυσικό συντηρητικό στα τρόφιμα (Lindgren, 1990; Talarico, 1989).



**Εικόνα 4:** Οι κύριες αντιμικροβιακές ενώσεις που εκκρίνονται από τα LAB και οι κύριες δράσεις τους (Rathod, 2021).



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΟ ΓΕΝΟΣ LACTOBACILLUS

### 2.1 Γενικά

Το γένος *Lactobacillus* ανήκει στο φύλο Firmicutes, στην κλάση *Bacilli*, στην τάξη *Lactobacillales* και στην οικογένεια *Lactobacillaceae*. Περιλαμβάνει 106 είδη και αποτελεί το μεγαλύτερο γένος μεταξύ των 13 γενών των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Περιεγράφηκε για πρώτη φορά το 1901 από τον Beijerinck (Bernardeau, 2006). Βάση της ταξινόμησης του Orla-Jensen (1919) οι γαλακτοβάκιλλοι χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

- *Betabacterium*,
- *Streptobacterium*,
- *Thermobacterium*.

Το κριτήριο για αυτό τον διαχωρισμό αποτέλεσε ο μεταβολισμός της εξόζης κατά τη διαδικασία ζύμωσης και η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης (Bernardeau, 2006; Klein, 1998).

Ένας άλλος τρόπος ταξινόμησης αφορά τον τρόπο διάσπασης των υδατανθράκων. Σύμφωνα με αυτό τον τρόπο οι γαλακτοβάκιλλοι διακρίνονται σε τρεις ομάδες (Weiss, 1986):

- Ομάδα I, στην οποία κατατάσσονται τα υποχρεωτικά ομοζυμωτικά,
- Ομάδα II, στην οποία κατατάσσονται τα υποχρεωτικά ετεροζυμωτικά,
- Ομάδα III, στην οποία κατατάσσονται τα προαιρετικά ετεροζυμωτικά.

Σύμφωνα, όμως, με φυλογενετικές και χημειοταξινομικές μελέτες, οι οποίες βασίζονται στην ανάλυση του 16S rRNA, έχουν αποδείξει ότι υπάρχουν σημαντικές αλληλοεπικαλύψεις μεταξύ των γενών *Pediococcus*, *Leuconostoc* και *Lactobacillus*. Το γεγονός αυτό, έκανε επιτακτική την ανάγκη ταξινόμησης των γαλακτοβακίλλων σε τρεις ακόμη ομάδες (Felis G.E., 2007):

- Ομάδα *Leuconostoc*, στην οποία εντάσσονται κάποιοι υποχρεωτικά ετεροζυμωτικοί γαλακτοβάκιλλοι και υποδιαιρείται στα εξής τρία γένη *Weissella*, *Oenococcus*, *Leuconostoc*,
- Ομάδα *Lactobacillus casei-Pediococcus*, στην οποία εντάσσονται υποχρεωτικά ομοζυμωτικοί, υποχρεωτικά και προαιρετικά ετεροζυμωτικοί γαλακτοβάκιλλοι,
- Ομάδα *Lactobacillus delbrueckii*, στην οποία εντάσσονται, κυρίως, οι ομοζυμωτικοί γαλακτοβάκιλλοι.

## 2.2 Μορφολογία και γενικά χαρακτηριστικά του γένους *Lactobacillus*

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια του γένους *Lactobacillus* είναι Gram θετικά, μη σποριογόνα, και αρνητικά στη δοκιμή καταλάσης βακτήρια. Στερούνται κίνησης, ε Όσον αφορά τη μορφή τους, πρόκειται για λεπτά και μακρά ραβδία, με εξαίρεση ορισμένα είδη που είναι μικρότερα και προσεγγίζουν το σχήμα κορυνόμορφου κοκκοβάκιλου. Γενικότερα όμως, η κυρτότητα και το μήκος των βακίλων εξαρτάται από τη σύνθεση του υποστρώματος ανάπτυξης και την ηλικία της καλλιέργειας. Ταυτόχρονα, πολλές φορές σχηματίζουν αλυσίδες. Το άθροισμα των αζωτούχων βάσεων του DNA τους εκφρασμένο ως προς mol%, παρουσιάζει μια διακύμανση μεταξύ 32 και 53.

Τα βακτήρια αυτού του γένους αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 30 και 34 °C. Χαρακτηρίζονται ως αεροάντοχα, παρουσιάζουν, όμως, βέλτιστη ανάπτυξη σε αναερόβιες συνθήκες ή συνθήκες χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου. Επίσης, παρουσιάζουν αυξημένες απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά, όπως πεπτίδια, βιταμίνες, άλατα, λιπαρά οξέα και αμινοξέα, ενώ αναπτύσσονται σε τιμές pH μεταξύ 5.5 και 6.2, με βέλτιστη αυτή χαμηλότερη του 5. Σε ουδέτερες ή αλκαλικές συνθήκες παρατηρείται μείωση του ρυθμού ανάπτυξης. Πρόκειται για υποχρεωτικά σακχαροζυμωτικά βακτήρια, με προϊόντα μεταβολισμού το γαλακτικό οξύ, σε ποσοστό που φτάνει το 50%, καθώς και αιθανόλη, διοξείδιο του άνθρακα, οξικό οξύ, μυρμηγκικό οξύ και ηλεκτρικό οξύ.

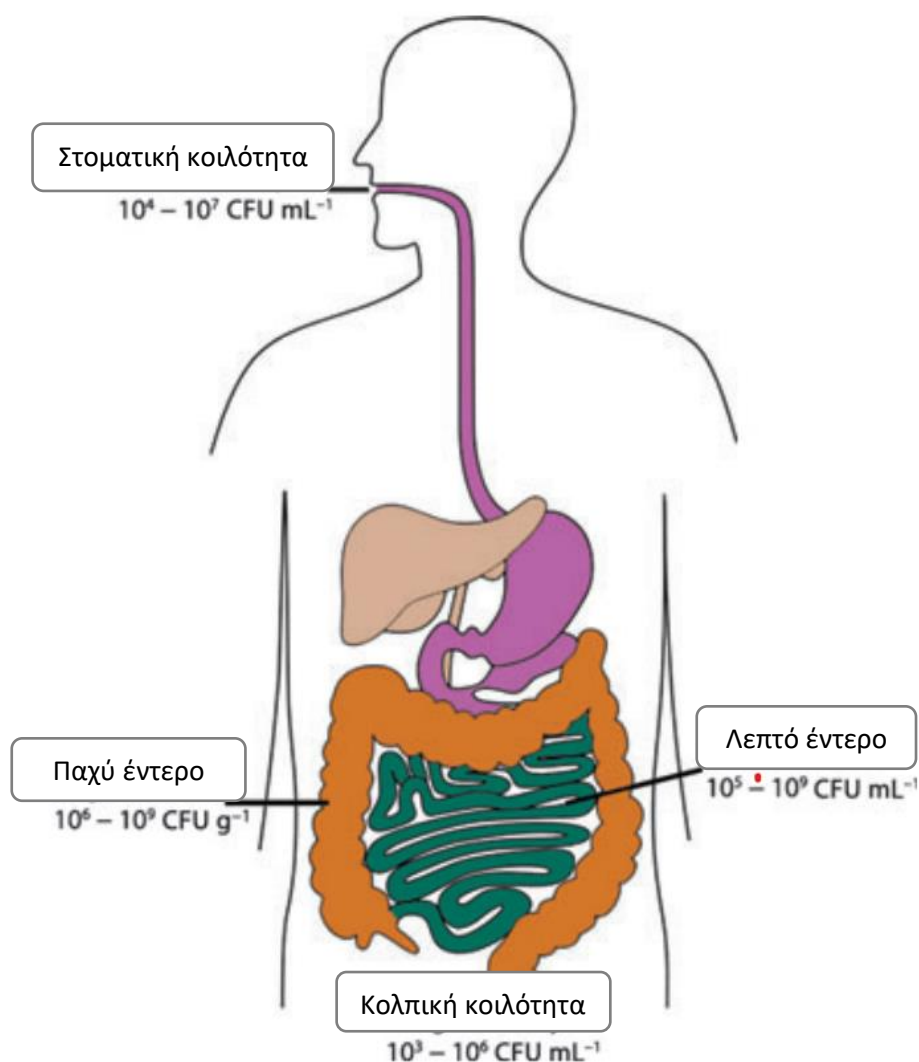
Οι γαλακτοβάκιλλοι χρησιμοποιούνται για τη ζύμωση διαφόρων προϊόντων τροφίμων, όπως το γάλα και τα γαλακτομικά προϊόντα, τα φρούτα, οι χυμοί φρούτων, το κρέας και τα ζυμωμένα αλλαντικά κτλ. Επομένως, γίνεται κατανοητό ότι δεν πρόκειται για παθογόνους μικροοργανισμούς. Τέλος, να σημειωθεί ότι, οι γαλακτοβάκιλλοι εντοπίζονται στη φυσική μικροχλωρίδα του κόλπου, του πεπτικού σωλήνα και της στοματικής κοιλότητας του ανθρώπου και των ομοιόθερμων ζώων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: *Lactobacillus gasseri*

### 3.1 Γενικά

Ο *Lactobacillus gasseri* ανακαλύφθηκε στις αρχές του 1970, όταν μια ομάδα 7 στελεχών, που μέχρι εκείνη τη στιγμή ανήκε στο είδος *Lactobacillus acidophilus*, θεωρήθηκε ότι σχηματίζει ένα νέο είδος, το οποίο ονομάστηκε *Lactobacillus gasseri* sp. nov. Ο *L. gasseri* δε μπορεί να διακριθεί από το *L. acidophilus* με κλασικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά. Ωστόσο, το *L. gasseri* βρέθηκε ότι διαφέρει από το *L. acidophilus* από την ηλεκτροφορητική κινητικότητα του LDH του και από τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος του (Gasser F, 1970). Η LDH ή γαλακτική αφυδρογονάση είναι ο καταλύτης που συμβάλλει στη μετατροπή του γαλακτικού οξέος σε πυροσταφυλικό οξύ στο κύκλο της γλυκόλυσεως. Η δυσκολία ως προς τη διάκριση των *L. acidophilus* και *L. gasseri* με κριτήριο την κυτταρική τους μορφολογία και με βιοχημικά μέσα κατέστησε αναγκαία την ανάπτυξη πρακτικών τεχνικών υβριδισμού που θα μπορούσαν να διαφοροποιήσουν αυτά τα δύο είδη (Luchansky JB, 1991; Pot B, 1993). Ο *L. gasseri* ορίστηκε ως ξεχωριστός μικροοργανισμός με βάση τεχνικές υβριδισμού DNA-DNA (Lauer & Kandler, 1980; Lauer E, 1980). Έκτοτε, άλλες μέθοδοι με βάση το νουκλεϊκό οξύ έχουν αναπτυχθεί για τη διάκριση μεταξύ στενά συνδεδεμένων μελών του οξεόφιλου συμπλέγματος, μεταξύ των οποίων η σύγκριση της μεταβλητής περιοχής εντός του γονιδίου 16S rRNA και η *rep*-PCR, χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς για του γαλακτοβάκιλλους (Kullen MJ, 2000; Gevers D, 2001). Ωστόσο, η χρησιμότητα των αλληλουχιών του γονιδίου 16S rRNA στη διάκριση του *L. gasseri* από τον *L. acidophilus* και τον *L. johnsonii* είναι περιορισμένη λόγω της υψηλής ομοιότητας της ακολουθίας του 16S rRNA μεταξύ των ειδών. Αντιθέτως, ο σχεδιασμός συγκεκριμένων εκκινητών για την δημιουργία αμπλικονίων μοναδικών για τον *L. gasseri*, προσφέρει μεγαλύτερη διάκριση από άλλους οξεόφιλους σύνθετους μικροοργανισμούς (Klaenhammer TR, 2005).

Ο *Lactobacillus gasseri* είναι ένας γόνιμος, αυτόχθονος μικροοργανισμός που αποικίζει στο γαστρεντερικό σωλήνα, τη στοματική κοιλότητα και τον κόλπο του ανθρώπου. Ο *L. gasseri* μπορεί να συμβάλλει ή να ενισχύσει την προβιοτική δραστηριότητα στις περιοχές αυτές. Υπάρχει ένας αυξανόμενος όγκος αποδεικτικών στοιχείων που υποδηλώνουν ότι ο *L. gasseri* έχει σημαντικές δυνατότητες για την εφαρμογή του ως προβιοτικό. Τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι όταν χορηγούνται σε επαρκείς ποσότητες, προσφέρουν οφέλη για την υγεία του ανθρώπου (FAO/WHO, 2002). Σημαντικά κριτήρια για την υποψηφιότητα του προβιοτικού είναι η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα (Gasser, 1994). Ο εκτεταμένος αποικισμός των βλεννογόνων κογχών από το *L. gasseri*, υποδεικνύει τον συσχετισμό του με υγιή άτομα (**Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**), ενώ η απουσία οποιασδήποτε συσχέτισης με βλάβες στην ανθρώπινη υγεία επιβεβαιώνει την ασφάλεια της (De Backer E, 2007).

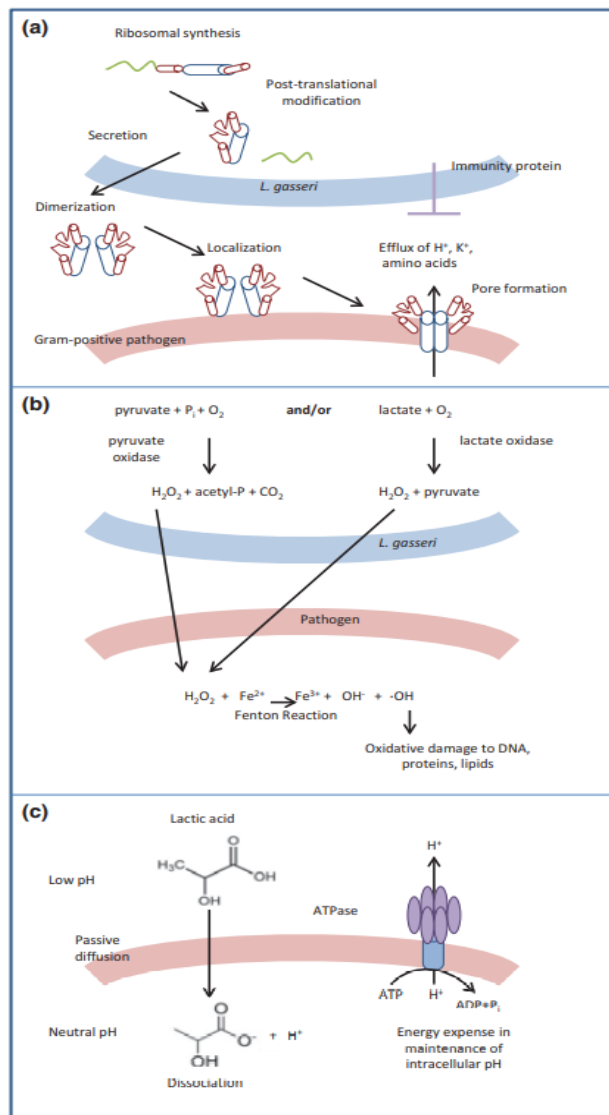


**Εικόνα 5:** Καλλιεργήσιμα επίπεδα *Lactobacillus gasseri* σε όλο τον ανθρώπινο βλεννογόνο (Selle, 2013).

Στην πραγματικότητα, ο *L. gasseri* εντοπίζεται στα βρέφη και αποτελεί ένα από τα κυρίαρχα είδη που εμπλέκεται στον αποικισμό του γαστρεντερικού σωλήνα, βρισκόμενος εκεί σε όλη την ενηλικίωση (Wall R, 2007). Η γονιδιωματική αλληλουχία του *L. gasseri* ATCC 33323 αποκάλυψε την απουσία μεταδοτικών γονιδίων στα αντιβιοτικά και άλλα δυσάρεστα γονίδια, πέρα από τα εξειδικευμένα γονίδια που διευκολύνουν την προσκόλληση ή τα συστήματα εκροής τοξινών και φαρμάκων (Azcarate-Peril MA, 2008). Παρόλα αυτά, δε μπορεί να υποστηριχθεί ότι όλα τα στελέχη του *L. gasseri* στερούνται μεταδοτικών γονιδίων αντίστασης στα αντιβιοτικά. Για τον λόγο αυτό απαιτείται η αξιολόγηση της αντοχής στα αντιβιοτικά και ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του γονιδιώματος για κάθε πιθανό προβιοτικό στέλεχος πριν από την εμπορευματοποίηση.

### 3.2 Αντιμικροβιακή δράση και παραγωγή βακτηριοσινών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, πολλά LAB επιδεικνύουν αντιμικροβιακή δράση σε ένα ευρύ φάσμα άλλων βακτηρίων μέσω της παραγωγής πολλών ανταγωνιστικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των οργανικών οξέων, του υπεροξειδίου του υδρογόνου και των βακτηριοσινών (Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.). Οι βακτηριοσίνες είναι πρωτεϊνούχες αντιμικροβιακές ενώσεις που σκοτώνουν στενά συγγενείς παθογόνους μικροοργανισμούς. Μερικές επιλεγμένες βακτηριοσίνες όπως η νισίνη, η πεδιοκίνη και λακτικήνη, παρουσιάζουν ευρύ φάσμα δράσης έναντι Gram- θετικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των παθογόνων (Abee T, 1995; Delves-Broughton J, 1996).



**Εικόνα 6:** Πιθανοί μηχανισμοί ανταγωνισμού από το *L. gasseri* μέσω της παραγωγής αντιμικροβιακών ενώσεων (Selle, 2013).

Στην **Εικόνα 6** παρουσιάζονται παρουσιάζονται τρεις διαφορετικοί μηχανισμοί παραγωγής αντιμικροβιακών ενώσεων. Παρακάτω αναλύεται ο κάθε μηχανισμός:

- I. Στον μηχανισμό αυτό απεικονίζεται η κυκλική σύνθεση της βακτηριοσίνης και ο πιθανός τρόπος δράσης της γκασερικής Α. Η γκασερική Α παράγεται από το *L. gasseri* LA 39, που απομονώθηκε από βρεφικά περιττώματα (Toba T, 1991). Η γκασερική Α είναι μια κυκλική πρωτεΐνη με το 74% των αμινοξέων της να είναι υδρόφοβα (Kawai Y S. T., 1998a; Kawai Y S. T., 1998b). Είναι θερμικά σταθερή και ανθεκτική στην αποικοδόμηση από πρωτεάσες, λόγω της συμπαγούς δευτερογενούς δομής τους, που αποτελείται κυρίως από α-έλικες (Kawai Y S. T., 1998a; Kawai Y S. T., 1998b; 2008). Οι βακτηριοσίνες συντίθενται ριβοσωμικά και συχνά υποβάλλονται σε μετα-μεταφραστική επεξεργασία, όπως η υδρόλυση των αρχικών πεπτιδίων. Η έκκριση αυτών των βακτηριοσινών επιτυγχάνεται με τη χρήση ενός αποκλειστικού μεταφορέα ABC, ενώ η κυκλοποίηση πραγματοποιείται ενζυματικά. Το κύτταρο ξενιστής συνθέτει μια πρωτεΐνη ανοσίας, η οποία περιέχει διαμεμβρανικές περιοχές που προβλέπεται να εντοπίζουν κατιονικά υπολείμματα στην κυτταρική επιφάνεια και να αναστέλλουν την εναπόθεση της βακτηριοσίνης στη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή αποτρέποντας τη διαπερατότητα της μεμβράνης του κυττάρου παραγωγού. Οι κυκλικές βακτηριοσίνες θεωρείται ότι διμερίζονται και εντοπίζονται στη κυτταρική μεμβράνη των Gram (+) παθογόνων. Συγκεκριμένα, υφίστανται διαμορφωτικές αλλαγές και ενσωματώνονται με τη μορφή υδρόφοβων α-ελικών στην κυτταρική μεμβράνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό πόρων και τον κυτταρικό θάνατο, λόγω διάχυσης της κινητήριας δύναμης πρωτονίων (PMF) και εκροής καλίου και αμινοξέων. Η δραστηριότητα αυτών των βακτηριοσινών περιορίζεται στα Gram (+) βακτήρια, λόγω εξωτερικού φράγματος που διαθέτουν τα Gram (-) βακτήρια.
- II. Ως προς την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου, έχουν ταυτοποιηθεί δύο πιθανές οδοί στο γονιδίωμα του *L. gasseri* ATCC 33323. Η παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι γνωστό ότι αποτελεί ένα μη ειδικό αντιμικροβιακό, αλλά έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στη θανάτωση παθογόνων *in vitro*. Οι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν διαφορετική ευαισθησία ως προς υπεροξείδιο του υδρογόνου, ανάλογα με τον είναι ή αρνητικά στην καταλάση. Σε ορισμένες περιπτώσεις μόνο το υπεροξείδιο του υδρογόνου δεν επαρκεί για τη θανάτωση των μικροοργανισμών στόχων, αλλά απαιτείται συνδυασμός αντιμικροβιακών ουσιών από τους γαλακτοβάκιλλους. Οι μηχανισμοί για τον κυτταρικό θάνατο από το υπεροξείδιο του υδρογόνου διευκολύνονται σε μεγάλο βαθμό από την παθητική διάχυση στο κύτταρο του  $Fe^{2+}$  και τη πραγματοποίηση της αντίδρασης Fenton. Μέσω της αντίδρασης αυτής παράγονται ρίζες υδροξυλίου, οι οποίες προκαλούν βλάβη στο DNA, μετουσίωση των πρωτεϊνών και διαταραχή της κυτταρικής μεμβράνης.

- III. Η αντιμικροβιακή δράση των οργανικών οξέων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το  $pK_a$  και το  $pH$  του περιβάλλοντος, αφού η παθητική διάχυση στο κύτταρο επιτυγχάνεται μόνο με το πρωτονιωμένο οξύ. Μόλις τα οργανικά οξέα αποπρωτονιωθούν στο ουδέτερο  $pH$  του κυτταροπλάσματος, προκαλούν ενδοκυτταρική οξύνιση. Τα κύτταρα πρέπει να ξοδέψουν ενέργεια μέσω της ATP-άσης, ούτως ώστε να οδηγήσουν στην εκροή των πρωτονίων και να διατηρήσουν ουδέτερο το  $pH$  στο εσωτερικό τους.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΙ HPLC

### 4.1 Ορισμός Χρωματογραφίας

Η χρωματογραφία είναι ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μείγματος μέσω διαφορικής προσρόφησης μεταξύ μιας στατικής και μιας κινητής φάσης (Σαμανίδου, 2001).

### 4.2 Ιστορική αναδρομή

Η λέξη «χρωματογραφία», που σημαίνει «γράφω» με «χρώμα», επινοήθηκε και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Ρώσο βοτανολόγο Tswett, το 1903, σε μια προσπάθεια να διαχωρίσει τις χρωστικές των φύλλων. Ουσιαστικά αυτό που έκανε ήταν να εκχυλίσει τα πράσινα μέρη των φύλλων σε πετρελαϊκό αιθέρα και διαβίβασε το εκχύλισμα μέσα από στήλη από από κονιοποιημένο  $\text{CaCO}_3$ , οπότε οι χλωροφύλλες διαχωρίστηκαν σε διακριτές έγχρωμες ζώνες.

Σήμερα, η χρωματογραφία αποτελείται από μια διαφορετική συλλογή μεθόδων διαχωρισμού. Οι Martin και Synge το 1941 ανακάλυψαν τη χρωματογραφία κατανομής. Το 1944 ανακαλύφθηκε η χρωματογραφία χάρτου από τους Consden, Gordon και Martin. Ακολούθησε η ανακάλυψη της αέριας χρωματογραφίας από τους Martin και James το 1952. Τέλος, το 1967 οι Huber και Hulsman ανακάλυψαν την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) (Ebet, 1996).

### 4.3 Αρχή λειτουργίας

Ο διαχωρισμός των συστατικών ενός δείγματος πραγματοποιείται με την κατανομή τους μεταξύ δύο μη μιγνυόμενων φάσεων, εκ των οποίων η μία είναι στατική και η άλλη είναι κινητή. Το είδος της χρωματογραφικής τεχνικής καθορίζεται από την επιλογή των δύο φάσεων και τη φύση των δυνάμεων που καθορίζουν την κατανομή ανάμεσα στις φάσεις. Υπάρχουν αρκετές ιδιότητες των συστατικών του μείγματος πάνω στις οποίες θα μπορούσε να στηριχθεί ο διαχωρισμός, όπως το σημείο ζέσεως, τα ηλεκτρικά φορτία, το μέγεθος των μορίων, η πολικότητα κ.α. (Σαμανίδου, 2001).

### 4.4 Βασική αρχή και ορολογία χρωματογραφίας εκλούσεως

Ορισμένη ποσότητα δείγματος δύο συστατικών, A και B, προστίθενται στην κινητή φάση στην αρχή ή κορυφή της στήλης. Ενώ το δείγμα μετακινείται στη στήλη, τα συστατικά του κατανέμονται, με κάποιο μηχανισμό, μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσεως. Το κλάσμα κάθε συστατικού που εντοπίζεται στη κινητή φάση, μετακινείται στη στήλη και έρχεται σε επαφή με το νέο τμήμα της στατικής φάσεως. Δημιουργείται, επομένως, μια νέα κατανομή. Ταυτόχρονα, το κλάσμα του συστατικού, που βρισκόταν στη στατική φάση, έρχεται σε επαφή με νέο τμήμα της κινητής φάσεως, οπότε υφίσταται περαιτέρω κατανομή. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται πολλές



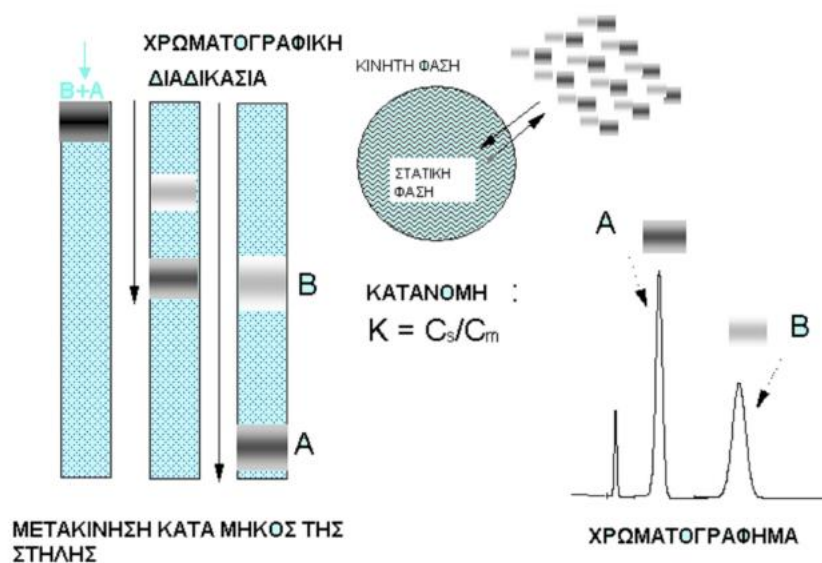
φορές, καθώς διαβιβάζεται συνεχώς και με σταθερή παροχή νέα κινητή φάση στη στήλη. Τα συστατικά μετακινούνται μέσα από τη στήλη, μόνο όταν βρίσκονται στη κινητή φάση και η ταχύτητα με την οποία μετακινούνται εξαρτάται από το κλάσμα του χρόνου παραμονής τους σε αυτή, το οποίο είναι συνάρτηση του συντελεστή κατανομής τους στις δύο φάσεις. Μ' αυτό τον τρόπο, συστατικά που παρουσιάζουν διαφορετικούς συντελεστές κατανομής, θα μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσα από τη στήλη. Αυτό θα έχει σαν αποτέλεσμα να διαχωρίζονται σε ζώνες. Στο τέλος, τα διαχωρισμένα συστατικά εξέρχονται από τη στήλη, όπου μπορούν συλλεγούν ή και να ανιχνευθούν.

Η κινητή φάση, η οποία μπορεί να είναι υγρό ή αέριο, ονομάζεται υγρό ή αέριο εκλούσεως, αντίστοιχα, ενώ το διάλυμα που εξέρχεται από τη στήλη αποτελεί το έκλουσμα. Η διαβίβαση υγρού ή αέριου εκλούσεως μέσα από τη χρωματογραφική στήλη, ονομάζεται έκλουση και εάν αυτό πραγματοποιείται με σταθερή παροχή, τότε πρόκειται για γραμμική έκλουση. Στο τέλος της στήλης τοποθετείται ένας ανιχνευτής, ο οποίος έχει τη δυνατότητα να παρακολουθεί μία αναλυτική ιδιότητα του εκλούσματος και να παράγει ένα σήμα κάθε φορά που εκλύεται ένα συστατικό (χρωματογραφική κορυφή). Το διάγραμμα αυτού του σήματος ως συνάρτηση του όγκου του υγρού ή αέριου εκλούσεως ονομάζεται χρωματογράφημα. Στην περίπτωση γραμμικής εκλούσεως, αντί του όγκου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο χρόνος. Τα χρωματογραφήματα εκλούσεως παρέχουν πληροφορίες, που είναι χρήσιμες για τη ποσοτική και ποιοτική ανάλυση, διότι ο χρόνος που απαιτείται έτσι ώστε ένα συστατικό να εκλουσθεί, είναι χαρακτηριστικό για το συστατικό αυτό, ενώ το ύψος ή η ολοκληρωμένη επιφάνεια της κορυφής του σήματος μπορεί να συσχετισθεί με τη συγκέντρωση του συστατικού.

Η βάση της χρωματογραφίας εκλούσεως είναι η κατανομή των συστατικών ενός δείγματος μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσεως, δηλαδή πρόκειται για μια διαδικασία ισορροπίας και περιγράφεται με το λόγο ή συντελεστή κατανομής  $K$ . Ο συντελεστής κατανομής  $K$  ορίζεται από τη σχέση:

$$K=C_S/C_M$$

Όπου  $C_S$  και  $C_M$  είναι οι συγκεντρώσεις του συστατικού στη στατική (S) και κινητή (M) φάση, αντίστοιχα (ΙΩΑΝΝΗΣ, 2013).



Εικόνα 7: Χρωματογραφική διαδικασία (ΙΩΑΝΝΗΣ, 2013).

#### 4.4 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC)

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) αποτελεί εξέλιξη της κλασικής χρωματογραφίας στήλης, η οποία βασίζεται σε φαινόμενα κατανομής. Σε σχέση με την κλασική χρωματογραφία διαφέρει στο γεγονός ότι εφαρμόζονται μεγάλες πιέσεις και χρησιμοποιούνται μικρά υλικά πλήρωσης. Το πλεονέκτημα της ως προς τη κλασική χρωματογραφία στήλης είναι ότι επιτυγχάνει ταχύτερους και καλύτερους διαχωρισμούς. Γενικά η χρωματογραφία κατανομής βασίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ της κινητής και της υγρής στατικής φάσης. Οι κυριότερες αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι ηλεκτροστατικής φύσης και σχετίζονται με τη πολικότητα μεταξύ δείγματος, κινητής και στατικής φάσης.

Δεδομένου ότι η HPLC κατατάσσεται στις χρωματογραφικές τεχνικές, γίνεται κατανοητό ότι το αποτέλεσμα της απορρέει από τη συνδυαστική δράση μιας στατικής και μιας κινητής φάσης. Η αρχή λειτουργίας της βασίζεται στο γεγονός ότι το δείγμα εισάγεται στη κορυφή της στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης τα συστατικά του μετακινούνται διαμέσου της στατικής φάσης με τη μορφή ζωνών και τελικά εκλύονται το ένα μετά το άλλο. Ένα χαρακτηριστικό της HPLC είναι ότι επιτρέπεται η χρήση μίγματος διαλυτών καθώς και η βαθμιαία μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης. Ένα ακόμη σημαντικό της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης είναι ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν αναλυτικές στήλες σε σειρά, επιτυγχάνοντας με αυτό τον τρόπο καλύτερο διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος. Συνοψίζοντας, λοιπόν, η HPLC αποτελεί μια γρήγορη, ευαίσθητη, ποσοτική και ποιοτική αναλυτική τεχνική που υπερέρχει έναντι των άλλων χρωματογραφικών τεχνικών.

#### 4.4.1 Οργανολογία HPLC

Το σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC) της επωνυμίας Hitachi LaChrom Elite περιλαμβάνει:

α) **Φιάλες αποθήκευσης διαλυτών κινητής φάσης.** Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το νερό που περιείχε 0,1% φορμικό οξύ και η μεθανόλη που επίσης περιείχε 0,1% φορμικό οξύ. Όπως γίνεται κατανοητό η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται με καθορισμένο πρόγραμμα, επομένως πρόκειται για μια βαθμιδωτή έκλυση.

β) **Αντλία** τύπου Hitachi LaChrom Elite Pump για την προώθηση διαλύτη με ροή 0,500 ml/min. Πρόκειται για ένα σύστημα παροχής της κινητής φάσης, το οποίο δίνει τη δυνατότητα της βαθμιαίας μεταβολής της συστάσεως της κινητής φάσεως. Επομένως, πρόκειται για μια βαθμιδωτή έκλυση και όχι ισοκρατική. Ο ρόλος των αντλιών είναι η άντληση της κινητής φάσης και η ώθηση της στη στήλη.

γ) **Μονάδα εισαγωγής δείγματος** τύπου Hitachi LaChrom Elite Autosampler. Η μονάδα εισαγωγής δείγματος στο σύστημα HPLC παρεμβάλλεται μεταξύ της αντλίας και της χρωματογραφικής στήλης επιτυγχάνοντας την εισαγωγή του χωρίς αραίωση καθώς και τον διαχωρισμό χωρίς διασπορά. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με αυτόματο δειγματολήπτη. Ο αυτόματος δειγματολήπτης αποτελείται από το περιστρεφόμενο δίσκο, στον οποίο τοποθετούνται τα δείγματα, τα φιαλίδια που περιέχουν τα δείγματα, τη βαλβίδα εισαγωγής, το βρόχο δείγματος και τη σύριγγα. Μόλις το δείγμα εισαχθεί, ο δίσκος περιστρέφεται μέχρις ότου το προγραμματισμένο φιαλίδιο βρεθεί κάτω από τη μικροσύριγγα. Ακολουθεί εισαγωγή της τελευταίας στη φιάλη του δείγματος όπου λαμβάνεται μια ορισμένη ποσότητα δείγματος και συγκεκριμένα 20  $\mu\text{L}$ , η οποία ποσότητα διοχετεύεται στο βρόχο της βαλβίδας.

δ) **Χρωματογραφική στήλη** τύπου SVEA C18 Gold column (150x4.6 mm 5 $\mu\text{m}$ , Σουηδία). Πρόκειται για μια στήλη της οποίας είναι επιστρωμένη από ODS (octadecylsilyl silical gel) πηκτή πυριτίας. Οι ομάδες της μακράς αλυσίδας του υδρογονάνθρακα ευθυγραμμίζονται παράλληλα η μία προς την άλλη και κάθετα προς την επιφάνεια των σωματιδίων της σίλικα δίνοντας τη δομή ψύκτρας. Τα μόρια των αναλυτών στη κινητή φάση δεσμεύονται μέσα στις λιπόφιλες αλυσίδες των χημικά συνδεδεμένων στατικών φάσεων και αποδεσμεύονται από αυτές με τη διέλυση της κινητής φάσης.

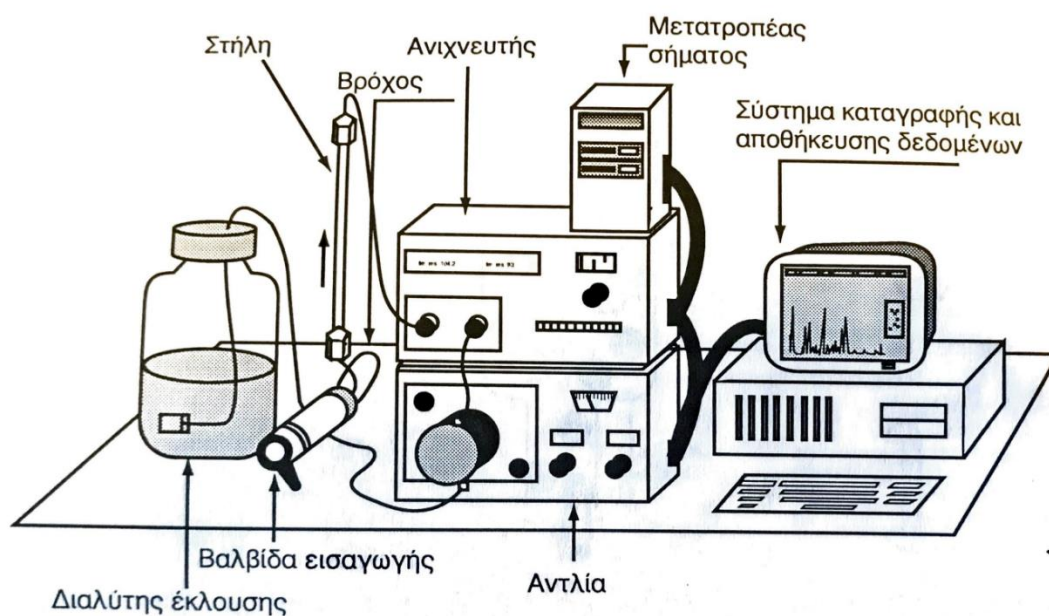
ε) **Θερμοστάτες στήλης** τύπου Hitachi LaChrom Elite Oven. Πρόκειται για θερμοστάτες τύπου αέρα, οι οποίοι μπορούν να θερμοστατήσουν αρκετές στήλες μαζί, παρέχουν σταθερότητα στη θερμοκρασία, εύκολη πρόσβαση στη στήλη και είναι ευέλικτοι στις μεταβολές της θερμοκρασίας. Στους συγκεκριμένους θερμοστάτες ο αέρας διοχετεύεται με μεγάλη ταχύτητα, περίπου 5m/s, ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερη μετάδοση της θερμότητας. Η μέγιστη θερμοκρασία της στήλης στο συγκεκριμένο πείραμα ρυθμίστηκε στους 35°C.

ε) **Ανιχνευτή** τύπου Hitachi LaChrom Elite Diode Array Detector (DAD). Ο ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων (DAD) αποτελεί έναν προηγμένο ανιχνευτή τύπου UV με το πλεονέκτημα να παρακολουθεί ταυτόχρονα όλο το φάσμα της περιοχής UV.

Το δείγμα δέχεται ακτινοβολία ολόκληρου του φάσματος και η ακτινοβολία που βγαίνει από τη κυψελίδα προσπίπτει σε παράταξη φωτοδίοδων με μεγάλο αριθμό φωτοευαίσθητων στοιχείων. Κάθε δίοδος προσφέρει διαχωριστική ικανότητα ενός και μόνο nm και το σήμα που παράγεται, ενισχύεται και στη συνέχεια μετατρέπεται σε ψηφιακό ούτως ώστε να αποθηκευτεί στον υπολογιστή. Ο συγκεκριμένος ανιχνευτής δίνει τη δυνατότητα κατασκευής τρισδιάστατων χρωματογραφημάτων (χρόνος, απορροφηση, μήκος κύματος) καθώς και της ποσοτικής εκτίμησης της ανάλυσης σε ένα εύρος μηκών κύματος.

ζ) **Σύστημα συλλογής και καταγραφής δεδομένων και αποτελεσμάτων.** Πρόκειται για ένα ηλεκτρονικό υπολογιστή με λογισμικό κατάλληλο για την επεξεργασία των χρωματογραφικών δεδομένων. Το ηλεκτρικό σήμα του ανιχνευτή με τη βοήθεια ειδικών επεξεργασιών, καταγράφεται ως ένα σύνολο κορυφών, καμπύλες του Gauss, που αποτελούν το χρωματογράφημα.

Ο ολοκληρωτής αποδίδει το χρωματογράφημα στο οποίο σημειώνεται ο χρόνος κατακράτησης κάθε υπό ανάλυση συστατικού. Επιπλέον σημειώνεται για κάθε κορυφή το ύψος αυτής, για να πραγματοποιηθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός των αντιβιοτικών. Ο ολοκληρωτής έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύει αυτόματα τις κορυφές, να μετρά τους χρόνους έκλουσης των ουσιών και να υπολογίζει τα ύψη αυτών. Ακόμη μπορεί να αποθηκεύει δεδομένα στη μνήμη για να είναι εφικτή η επανειλημμένη επεξεργασία αυτών χωρίς να απαιτείται η ανάλυση του δείγματος για περισσότερες της μιας φορές. Να σημειωθεί εδώ ότι είναι απαραίτητη η παρουσία ειδικού μετατροπέα για τη μετατροπή του αναλογικού σήματος σε ψηφιακό.



**Εικόνα 8:** Τυπική διάταξη Υγρού Χρωματογράφου Υψηλής Πίεσης (Σαμανίδου, 2001).

### III. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το γένος *Lactobacillus* αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα γένη των οξυγαλακτικών βακτηρίων και το μεγάλο τεχνολογικό ενδιαφέρον των γαλακτοβακίλλων γίνεται αντιληπτό από το υψηλό αριθμό ερευνών που έχουν γίνει και αφορούν τη φυσιολογία, την ύπαρξη προβιοτικών ιδιοτήτων και τη παραγωγή αντιμικροβιακών ενώσεων.

Το στέλεχος *Lactobacillus gasseri* είτε παραλαμβάνεται από νοσοκομιακές καλλιέργειες είτε απομονωνόταν από προβιοτικά. Από μελέτες και προκαταρκτικά πειράματα, που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει διαπιστωθεί ότι, το συγκεκριμένο στέλεχος παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση εναντίον διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών, τόσο Gram (+) όσο και Gram (-), όπως *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Salmonella enterica* ATCC14028 και *Escherichia coli* ATCC 25922. Ωστόσο δεν έχει ταυτοποιηθεί η αντιμικροβιακή ένωση που παράγεται από αυτό το στέλεχος. Η διερεύνηση και ο προσδιορισμός της αντιμικροβιακής ένωσης του *Lactobacillus gasseri* αποτελεί ιδιαίτερα σημαντικό εγχείρημα και γίνεται στα πλαίσια της έρευνας των προβιοτικών ιδιοτήτων του και της χρήσης του στην παραγωγή και βιοσυντήρηση ζυμωμένων τροφίμων.

Ο σκοπός της παρούσας προπτυχιακής μελέτης ήταν η ανίχνευση των αντιμικροβιακών μεταβολιτών που παράγονται από το βακτηριακό στέλεχος *Lactobacillus gasseri* καθώς και η μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης.

## IV. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

#### 1.1 Συσκευές

- Αναλυτικός ζυγός
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης
- Φυγόκεντρος
- Αυτόματες ρυθμιζόμενες μικροπιπέτες-PIPETMAN GILSON Classic
- Συσκευή με λάμπα UV
- Φασματοφωτόμετρο
- Θερμομπλοκ
- Θερμοκυκλοποιητής
- Συσκευή Vortex
- Φούρνος μικροκυμάτων
- Επωαστικός κλίβανος
- Περιστροφικός εξατμιστήρας κενού
- Συσκευή Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης με ανιχνευτή UV-DAD

#### 1.2 Υλικά

- Κωνική φιάλη των 250 μl
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 100ml
- Πλαστικά erpendorf των 1.5 ml
- Πλαστικά tips
- Γυάλινα vial τω 1.5 ml
- Falcon των 50 ml
- PCR tubes
- PCR plates
- Γάντια
- Αγαρόζη
- Μάρτυρας μοριακών μεγεθών (ladder DNA 100 bp)
- Σύριγγα
- Φίλτρο με πόρους διαμέτρου 0,22 μm
- Χρωματογραφική στήλη SVEA C18 (150x4.6mm 5μm)
- Εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα
- 0.5 Mc Farland

### 1.3 Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 10x
- Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) 10mg/ml
- Υγρό ηλεκτροφόρησης (για την παρασκευή 300 ml διαλύματος προσθέτουμε 30 ml TBE και 270 ml απεσταγμένο νερό)
- NaCl (χλωριούχο νάτριο)
- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (θειικό νάτριο)
- CH<sub>3</sub>COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (αιθανικός αιθυλεστέρας)
- HCOOH (μυρμηκικό οξύ)
- MRS Broth
- Υπερκάθαρο νερό, αποστειρωμένο, για HPLC
- Μεθανόλη για HPLC
- 0.5 Mc Farland

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά αναλυτικού ζυγού.



Εικόνα 9: Αναλυτικός ζυγός.

<b>Μοντέλο</b>	Precisa-202A
<b>Εταιρία</b>	Precisa
<b>Χώρα Προέλευσης</b>	Γερμανία

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά συσκευής Ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 10: Συσκευή ηλεκτροφόρησης.

<b>Μοντέλο</b>	MultiSUB Midi-96
<b>Εταιρία</b>	Cleaver Scientific
<b>Χώρα Προέλευσης</b>	Ηνωμένο Βασίλειο



**Πίνακας 3:** Χαρακτηριστικά τροφοδοτικού ηλεκτροφόρησης.



<b>Μοντέλο</b>	Lively 300V Power supply, MP-310
<b>Εταιρία</b>	Major science
<b>Χώρα Προέλευσης</b>	Η.Π.Α.

**Εικόνα 11:** Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης.

**Πίνακας 4:** Χαρακτηριστικά φυγόκεντρου.



<b>Μοντέλο</b>	SL 16 Centrifuge
<b>Εταιρία</b>	Thermo Scientific TM
<b>Χώρα Προέλευσης</b>	Ελλάδα

**Εικόνα 12:** Φυγόκεντρος.

Πίνακας 5: Χαρακτηριστικά συσκευής με λάμπα UV.



<b>Μοντέλο</b>	MiniBis Pro
<b>Εταιρία</b>	Bio Imaging Systems
<b>Χώρα Προέλευσης</b>	Ισραήλ

Εικόνα 13: Συσκευή με λάμπα UV.

Πίνακας 6: Χαρακτηριστικά φασματοφωτόμετρου.



<b>Μοντέλο</b>	Epoch™ Microplate Spectrometer
<b>Εταιρία</b>	Biotek
<b>Χώρα Προέλευσης</b>	Η.Π.Α.

Εικόνα 14: Φασματοφωτόμετρο.

Πίνακας 7: Χαρακτηριστικά θερμομπλόκ.



<b>Μοντέλο</b>	M503-HBD
<b>Εταιρία</b>	Artiglass
<b>Χώρα Προέλευσης</b>	Ιταλία

Εικόνα 15: Θερμομπλόκ.

Πίνακας 8: Χαρακτηριστικά θερμοκυκλοποιητή.



<b>Μοντέλο</b>	Verti Dx Thermal Cycler
<b>Εταιρία</b>	Thermo Fisher Scientific
<b>Χώρα Προέλευσης</b>	Αυστρία

Εικόνα 16: Θερμοκυκλοποιητής.



Εικόνα 17: Vortex.

Πίνακας 9: Χαρακτηριστικά Vortex.

<b>Μοντέλο</b>	Vortex V-1 plus
<b>Εταιρία</b>	Biosan
<b>Χώρα Προέλευσης</b>	Λετονία

Πίνακας 10: Χαρακτηριστικά περιστροφικού εξατμιστήρα.



Εικόνα 18: Περιστροφικός εξατμιστήρας.

<b>Μοντέλο</b>	RV 10 digital V
<b>Εταιρία</b>	IKA Rotary Evaporators
<b>Χώρα Προέλευσης</b>	Γερμανία

Πίνακας 11: Χαρακτηριστικά συστήματος HPLC.



Εικόνα 19: Σύστημα HPLC με DAD ανιχνευτή.

<b>Μοντέλο</b>	LaChrom Elite HPLC System
<b>Εταιρία</b>	Hitachi
<b>Χώρα Προέλευσης</b>	Τσεχία

## 1.4 Καλλιέργεια οξυγαλακτικού βακτηρίου

Για το συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν προβιοτικά που περιείχαν το στελέχος *L.gasseri*. Για την ανάπτυξη του οξυγαλακτικού βακτηρίου, έγινε εμβολιασμός ορισμένης ποσότητας του σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (MRS Broth).

Για την προετοιμασία του υγρού υποστρώματος ζυγίζονται 55,15 g σκόνης σε 1000 mL απεσταγμένου νερού, με ταυτόχρονη ήπια θέρμανση και ανάδευση. Ακολουθεί ο διαμοιρασμός σε κωνικές φιάλες (500ml) η αποστείρωση στον κλίβανο στους 121°C για 15 λεπτά. Μετά την προετοιμασία του θρεπτικού υποστρώματος πάρθηκε ορισμένη ποσότητα από το στέλεχος του οξυγαλακτικού βακτηρίου και εμβολιάστηκε στο MRS Broth. Ακολουθεί επώαση στους 32 °C για 72 ώρες υπό αερόβιες συνθήκες.

## 1.5 Απομόνωση του DNA

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού DNA από τις καλλιέργειες του οξυγαλακτικού βακτηρίου *L.gasseri*, με τη χρήση του εμπορικού kit απομόνωσης Monarch Genomic DNA Purification Kit Protocol, που περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Απομονώνεται μία αποικία η οποία περιέχει  $1 \times 10^4$ - $5 \times 10^6$  κύτταρα. Η αποικία φυγοκεντρείται στα 1,000 x g για 1 λεπτό και ανασυντίθεται με προσθήκη 100 μl νερού κάνοντας ανακίνηση πάνω-κάτω με τη πιπέτα.
2. Προστίθεται 1 μl πρωτεϊνάση στην ανασυσταμένη αποικία και γίνεται ανάδευση σε vortex για λίγο, ούτως ώστε να εξασφαλιστεί ότι τα ένζυμα διασκορπίζονται.
3. Προστίθενται 100 μL Cell Lysis Buffer και γίνεται ανάδευση σε vortex, αμέσως και διεξοδικά. Το διάλυμα γίνεται παχύρευστο.
4. Ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά στους 56°C σε μια θερμαντική πλάκα και ταυτόχρονη ανάδευση σε vortex περιστασιακά.
5. Προστίθενται 100 μl gDNA Binding Buffer στο δείγμα και γίνεται ανάδευση με τη χρήση vortex για 5-10 δευτερόλεπτα.
6. Μεταφέρεται το μίγμα λύματος/ρυθμιστικού διαλύματος δέσμησης σε μια στήλη καθαρισμού γονιδιωματικού DNA που έχει προηγουμένως εισαχθεί σε σωλήνα συλλογής χωρίς να ακουμπάει το ανώτερο τμήμα της στήλης.
7. Κλείνεται το πώμα και φυγοκεντρείται. Αρχικά για 3 λεπτά στα 1,000 x g για να δεσμευτεί το γονιδιωματικό DNA και στη συνέχεια για 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα για να καθαριστεί η μεμβράνη. Ο σωλήνας συλλογής μαζί με το διάλυμα απορρίπτονται.
8. Η στήλη μεταφέρεται σε μια νέα στήλη συλλογής και προστίθενται 500 μl gDNA Wash Buffer. Κλείνεται το πώμα και αναστρέφεται μερικές φορές ούτως ώστε το ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης να φτάσει στο καπάκι. Ακολουθεί

φυγοκέντριση για 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα και τέλος απόρριψη του διαλύματος.

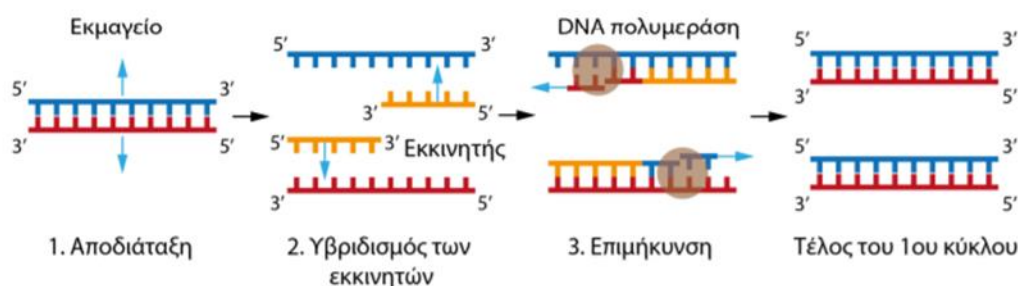
9. Τοποθετείται η στήλη στο σωλήνα συλλογής. Προστίθενται 500 μl gDNA Wash Buffer και κλείνεται το πόμα. Γίνεται φυγοκέντριση για 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα. Ο σωλήνας με το διάλυμα απορρίπτονται.
10. Η στήλη καθαρισμού γονιδιωματικού DNA τοποθετείται σε ένα σωληνάριο μικροφυγοκέντρου 1,5 ml που δεν περιέχει DNAase. Προστίθενται 50 μl προθερμασμένο (60°C) gDNA Ellution Buffer, κλείνεται το πόμα και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό.
11. Φυγοκεντρείται για 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα (>14,000 x g) για να εκλουσθεί το γονιδιωματικό DNA.
12. Το DNA απομακρύνθηκε από το φίλτρο του high pure filter tube και αποθηκεύτηκε σε νέο microtube στους 4°C για άμεση χρήση και στους -20°C για μελλοντική.
13. Το εκχυλισμένο DNA που συλλέχθηκε, ελέγχθηκε ως προς τη συγκέντρωση και την καθαρότητά του με φωτομέτρηση.

#### 1.5.1 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός απομονωμένου DNA

Μετά το πέρας της απομόνωσης, το DNA ελέγχεται ποιοτικά και ποσοτικά με φωτομέτρηση στα 260/280 nm ελέγχοντας την ποσότητα και την καθαρότητα του δείγματος που απομονώθηκε. Όλα τα δείγματα είχαν καθαρότητα από 1.6-2.0 και ποσότητα 10.0 ng-50.0 ng/μL.

#### 1.5.2 Ενίσχυση τμήματος DNA με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)

Η PCR (Polymerase Chain Reaction) είναι μία τεχνική που επινοήθηκε τη δεκαετία του 1980, επέφερε επανάσταση στον τρόπο με τον οποίο αναλύεται το DNA και το RNA. Η τεχνική μπορεί να πολλαπλασιάσει οποιαδήποτε νουκλεοτιδική αλληλουχία ταχύτατα και επιλεκτικά με τη δράση του ενζύμου DNA πολυμεράση. Χάρη στην ευαισθησία, την ταχύτητα και την ευχρηστία, η PCR έχει πολλές εφαρμογές στη μοριακή βιολογία. Η αντίδραση PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια, τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά (**Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.**).



Εικόνα 20: Σχηματική αναπαράσταση ενός κύκλου PCR.

Κάθε κύκλος της μεθόδου αποτελείται από τρία στάδια:

1. **Αποδιάταξη DNA:** το μίγμα θερμαίνεται αρχικά στους 95°C για περίπου 4 λεπτά. Σ' αυτή τη θερμοκρασία τα δίκλιωνα μόρια DNA-στόχου αποδιατάσσονται.
2. **Υβριδοποίηση των εκκινητών:** η θερμοκρασία μειώνεται, ούτως ώστε οι εκκινητές να υβριδοποιηθούν με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο μόριο-στόχο.
3. **Επιμήκυνση της αλυσίδας:** η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C, η οποία αποτελεί βέλτιστη θερμοκρασία για την Taq DNA πολυμεράση, ώστε να επιμηκύνει τις αλληλουχίες των υβριδισμένων εκκινητών με κατεύθυνση 5'→3', χρησιμοποιώντας ως μήτρα τον DNA στόχο.

Στο τέλος κάθε κύκλου, η ποσότητα των προϊόντων της PCR διπλασιάζεται. Η όλη διαδικασία διεξάγεται σε έναν προγραμματισμένο θερμικό κυκλοποιητή και ολοκληρώνεται μετά από 35 κύκλους, με αποτέλεσμα την εκθετική αύξηση του συνολικού αριθμού των αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου.

Χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι εκκινητές έτσι ώστε να ενισχυθεί το γονίδιο του οξυγαλακτικού βακτηρίου *L.gasseri*, χρησιμοποιώντας την αλληλουχία αναφοράς από τη βάση δεδομένων. Το τμήμα του DNA που ενισχύεται με τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση έχει μέγεθος 175 bp. Οι αλληλουχίες των δύο εκκινητών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 12:** Αλληλουχία εκκινητών *L. gasseri*.

Όνομασία	Αλληλουχία εκκινητών
Gasseri-F	5'- TCA AGA GCT GTT AAG GCT GT -3'
Gasseri-R	5'- CTA TCG CTT CAA GTG CTT TC -3'

Η μέθοδος της PCR περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Το αρχικό υλικό για την αντίδραση PCR είναι το δείγμα DNA, που περιέχει την αλληλουχία-στόχο. Έτσι, πρώτα προστίθενται 10 μl του προτύπου DNA στο erpendorf 1.5 ml.
2. Οι εκκινητές (**Πίνακας 12**) ήταν αποθηκευμένοι στους -20°C σε συγκέντρωση 100 pmol/μl. Από αυτούς, ένα μέρος αραιώθηκε σε τελική συγκέντρωση 10 pmol/μl για χρήση στα πειράματα της PCR. Συγκεκριμένα, σε σωληνάρια τύπου erpendorf 1.5 ml, προστέθηκαν 5 μl του αντίστοιχου εκκινητή και 95 μl H<sub>2</sub>O.
3. Ακολουθεί η προσθήκη του διαλύματος master mix, το οποίο περιέχει όλα τα συστατικά που χρειάζονται για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση της PCR , όπως Taq DNA polymerase, reaction buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP, nuclease-free water.



4. Ο συνολικός όγκος της σύστασης μίγματος της αντίδρασης PCR είναι 50  $\mu\text{l}$  (Πίνακας 13).
5. Τέλος, εκτελείται το κατάλληλο πρόγραμμα. Η θερμοκρασία υβριδισμού (annealing temperature), εξαρτάται από τη σύσταση και το μήκος των εκκινητών. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, αυτή είναι ίση με 94°C.

#### Συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου.

- Στάδιο 1 → Αρχική αποδιάταξη: 95°C για 2 min.
- Στάδιο 2 → Αποδιάταξη: 95°C για 16 sec.
- Υβριδοποίηση: 54°C για 15 sec.
- Επιμήκυνση: 72°C για 50 sec.
- Στάδιο 3 → Τελική επιμήκυνση: 72°C για 7 min.
- } X35 κύκλους

**Πίνακας 13:** Σύσταση μίγματος αντίδρασης PCR.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O	13
Primer Gasseri-F ()	1
Primer Gasseri-R ()	1
Mix	25
Δείγμα	10

**Πίνακας 14:** Παρασκευή πηκτής αγαρόζης 2%.

Υλικά	Δοσολογία (%)
TBE	10 ml
agarose	2 gr
Βρωμιούχο αιθίδιο	10 $\mu\text{l}$
Απεσταγμένο νερό	90 ml

#### 1.5.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την απομόνωση, τον χαρακτηρισμό και τον διαχωρισμό τμημάτων DNA.

Κατά την ηλεκτροφόρηση διοχετεύεται ηλεκτρικό ρεύμα μέσω ηλεκτροδίων σε ένα μέσο (πήκτωμα) που πάνω του έχει τοποθετηθεί (ή/και) ενσωματωθεί, σε ένα σημείο, το προς ανάλυση δείγμα. Το αποτέλεσμα είναι ότι τα φορτισμένα σωματίδια κινούνται προς τα ηλεκτρόδια με ταχύτητες διαφορετικές ανάλογα με το φορτίο τους και αντιστρόφως ανάλογα με το μέγεθος τους. Έτσι τα περισσότερο φορτισμένα και μικρότερα μόρια απομακρύνονται από το αρχικό σημείο, ενώ τα μεγαλύτερα και λιγότερα φορτισμένα λιγότερο, οπότε διέρχεται διαχωρισμός. Στην προκειμένη περίπτωση, τα νουκλεϊκά οξέα που είναι αρνητικά φορτισμένα σε ουδέτερο pH, λόγω των φωσφορικών ομάδων που διαθέτουν στον φωσφοδιεστερικό σκελετό, μετακινούνται προς την άνοδο. Η συγκέντρωση της αгарόζης καθορίζει το μέγεθος των πόρων που θα σχηματιστούν στο πήκτωμα (Campbell, 2010).

Καθώς τα μόρια του DNA μετακινούνται, σχηματίζουν χαρακτηριστικές ζώνες σε διαφορετικές περιοχές στο πήκτωμα αгарόζης. Οι ζώνες αυτές δεν είναι ορατές κατά την πορεία της ηλεκτροφόρησης. Προκειμένου να γίνουν ορατές προστίθεται στο πήκτωμα αгарόζης μια χρωστική (EtBr) που δεσμεύεται στα μόρια του DNA και φθορίζει όταν θα εκτεθεί στο μηχάνημα της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) (Campbell, 2010).

Ταυτόχρονα, η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης χρησιμοποιείται και για τον ποσοτικό προσδιορισμό δειγμάτων DNA σε σύγκριση με έναν πιστοποιημένο μάρτυρα (ladder). Ο πιστοποιημένος μάρτυρας περιέχει κομμάτια DNA γνωστού μεγέθους και συγκέντρωσης. Έτσι, μπορεί να γίνει προσδιορισμός της καθαρότητας και της ποιότητας του DNA και να γίνει σύγκριση των ποσοτήτων δειγμάτων DNA ή RNA μεταξύ τους (Campbell, 2010).

Η ποσοτικοποίηση στην οπτική εκτίμηση του φθορισμού που παράγεται από τα μόρια του EtBr υπό UV φως. Το EtBr μπορεί και ενσωματώνεται στα νουκλεϊκά οξέα σε ποσότητα, η οποία εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους. Με αυτό τον τρόπο, συγκρίνοντας τον φθορισμό που εκπέμπεται από τα άγνωστα δείγματα με τον φθορισμό που εκπέμπεται από δείγμα γνωστής συγκέντρωσης και μεγέθους, επιτυγχάνεται η ποσοτικοποίηση των αγνώστων δειγμάτων (Campbell, 2010).

Για την προετοιμασία της πηκτής αгарόζης ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Προετοιμασία του εκμαγείου στο οποίο θα στερεοποιηθεί η πηκτή.
2. Προετοιμασία της πηκτής. Χρησιμοποιήθηκαν 2 g αгарόζης και 90 ml απεσταγμένο νερό. Θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων για 3 λεπτά.
3. Το διάλυμα ανακινείται μέχρι να κρυώσει.
4. Προστίθενται 10 μl βρωμιούχο αιθίδιο.
5. Τοποθέτηση του διαλύματος στο εκμαγείο.
6. Εισάγεται το ειδικό χτενάκι στην πηκτή για να σχηματιστούν οι θέσεις (πηγάδια) στις οποίες θα εισαχθεί το DNA.
7. Μεταφορά της πηκτής στο ψυγείο για περίπου 20 λεπτά.

8. Όταν η πηκτή σταθεροποιηθεί αφαιρείται τα το χτενάκι και τα πλάγια τοιχώματα.
9. Τοποθέτηση της πηκτής μαζί με τη μήτρα σε μία συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει TAE 1X μέχρι να καλυφθεί το πήκτωμα.
10. Τα δείγματα του DNA εισάγονται στις θέσεις της πηκτής. Αφού τοποθετηθούν 17 µl από το κάθε δείγμα, εισάγονται στο αμέσως επόμενο «πηγάδι» από το τελευταίο δείγμα DNA, 8 µl 100 bpDNA Ladder.
11. Κλείνουμε την συσκευή, τη συνδέουμε με το ρεύμα και ρυθμίζουμε τη τάση στα 161V. Η ύπαρξη φυσαλίδων είναι ενδεικτικές της ροής του ρεύματος και το DNA μετακινείται προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Μετά από περίπου 30 λεπτά είναι δυνατή η παρατήρηση των ζωνών του DNA στην πηκτή. Η ορατότητα των δειγμάτων DNA οφείλεται στο βρωμιούχο αιθίδιο που προστέθηκε, το οποίο μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία φθορίζει. Για την οπτικοποίηση των τμημάτων του DNA στο πήκτωμα, το τελευταίο τοποθετείται σε ειδική συσκευή απεικόνισης.

### **1.6 Ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης *Lactobacillus gasseri***

Για τον έλεγχο της ύπαρξης ή όχι αντιμικροβιακής ικανότητας των μεταβολιτών του *L. gasseri* χρησιμοποιήθηκαν παθογόνοι μικροοργανισμοί οι οποίοι επώαστηκαν στους 30 °C για 48h. Οι χρησιμοποιούμενοι παθογόνοι ήταν οι εξής: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Salmonella enterica* ATCC14028 και *Escherichia coli* ATCC 25922. Η μελέτη διεξήχθη για συγκεντρώσεις παθογόνων  $10^8$ , με τη μέθοδο 0.5 Mc Farland.

Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Λήψη ποσότητας 1.5 ml ζωμού *L. gasseri* και φυγοκέντρηση του στα 13000 rpm για 10 min για την απομάκρυνση των κυττάρων του στελέχους.
2. 250 µL από το υπερκείμενο που περιέχει τους μεταβολίτες του βακτηριού τοποθετούνται σε eppendorf (συνολικού όγκου 1.5 mL).
3. Προσθήκη 125 µl παθογόνου μικροοργανισμού.
4. Επώαση στους 37°C για 24 h.
5. Επίστρωση σε στερεό εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για το κάθε παθογόνο στέλεχος. Το τρυβλίο διαιρείται στα δύο. Στο ένα τμήμα επιστρώνεται ποσότητα παθογόνου μικροοργανισμού και στο άλλο του υπερκείμενου μαζί με τον παθογόνο.

### **1.7 Μέθοδος καθαρισμού του ζωμού**

Η μέθοδος καθαρισμού του ζωμού περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Με μια πιπέτα λαμβάνεται ορισμένη ποσότητα (5mL) από την καλλιέργεια του βακτηρίου που αναπτύσσεται στο ζωμό και διαμοιράζεται σε 5 erpendorf tubes των 1 mL.
2. Στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετούνται στη φυγόκεντρο και φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά στα 13000 rpm. Η φυγοκέντρωση γίνεται ούτως ώστε να γίνει διαχωρισμός των βαρέων συστατικών, δηλαδή των βακτηριακών κυττάρων, τα οποία συγκεντρώνονται στον πυθμένα (ίζημα), από τον ζωμό στον οποίο έχουν παραχθεί οι μεταβολίτες.
3. Όσο πραγματοποιείται η φυγοκέντρωση, ζυγίζονται σε έναν αναλυτικό ζυγό 1g NaCl (χλωριούχο νάτριο) και 4g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (θειικό νάτριο).
4. Μόλις ολοκληρωθεί η φυγοκέντρωση, με μια πιπέτα λαμβάνεται το υπερκείμενο ενώ το ίζημα απορρίπτεται. Το υπερκείμενο τοποθετείται σε πλαστικά, βιδωτά, κωνικά σωληνάκια, τύπου Falcon, τα οποία είναι κατασκευασμένα από πολυπροπυλένιο (PP) και διαθέτουν αριθμηση.
5. Προστίθενται τα προ ζυγισμένα NaCl και Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, καθώς επίσης 10 mL CH<sub>3</sub>COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (αιθανικός αιθυλεστέρας) και 1 mL HCOOH (μυρμηκικό οξύ).
6. Ακολουθεί εκ νέου φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στα 4000 rpm.
7. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρωσης, με μια πιπέτα λαμβάνεται η πάνω φάση (οργανική) που περιέχει τους μεταβολίτες, οι οποίοι και μας ενδιαφέρουν, ενώ η κάτω φάση που περιέχει το MRS Broth και άλλες ανόργανες ουσίες απορρίπτεται.
8. Η οργανική φάση, με τους μεταβολίτες, που απομονώθηκε, τοποθετείται στον περιστροφικό εξατμιστήρα ώστε να γίνει εξάτμιση των οργανικών διαλυτών και να παραμείνει στη σφαιρική φιάλη μόνο το έλαιο που περιέχει τους μεταβολίτες. Το έλαιο αυτό διαθέτει ελαφρώς κιτρινωπό χρώμα. Η θερμοκρασία στο υδατόλουτρο ρυθμίζεται στους 40°C και ταυτόχρονα 130 rpm. Η διαδικασία ολοκληρώνεται μόλις εμφανιστεί το κιτρινωπό έλαιο.
9. Πραγματοποιείται ανασύσταση του ελαίου με τους διαλύτες Meth/H<sub>2</sub>O και αναλογία 90/10, αντίστοιχα.
10. Το ανασυσταμένο έλαιο, με μια σύριγγα, μεταφέρεται σε vial τελικού όγκου 1.5 mL. Κατά την έξοδο του ελαίου από τη βελόνα, διέρχεται από ένα φίλτρο με πόρους διαμέτρου 0,22 μm με σκοπό να απομακρυνθούν και οι τελευταίες προσμίξεις που μπορεί να έχουν απομείνει. Τέλος, γίνεται αποθήκευση στο ψυγείο στη θερμοκρασία των 4°C, για μελλοντική χρήση.

## 1.8 Ανάλυση του ελαίου με HPLC

Στην Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης, το δείγμα εισάγεται στην κορυφή της στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης τα συστατικά του μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκκλούνται το ένα μετά το άλλο. Οι αναλυόμενες ουσίες κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης με αποτέλεσμα να

μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες κατά μήκος της στήλης. Στην Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης είναι δυνατή η χρήση μίγματος διαλυτών καθώς και η βαθμιαία μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης. Στον

**Πίνακας 15** αναφέρεται το μίγμα διαλυτών καθώς και η μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης.

**Πίνακας 15:** Χρωματογραφικές συνθήκες (HPLC-UV/DAD).

min	H <sub>2</sub> O	Methanol
0	90	10
10	70	30
20	60	40
25	60	40
40	0	100
45	0	100
50	10	90
55	90	10

Όπως γίνεται κατανοητό και από τον πίνακα, πρόκειται για μια χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, καθώς η κινητή φάση αποτελεί μίγμα του οργανικού διαλύτη μεθανόλη με το νερό. Επομένως, η κινητή φάση είναι περισσότερο πολική από τη στατική. Η κινητή φάση διέρχεται μέσω της χρωματογραφικής στήλης SVEA C18 (150x4.6mm 5μm, Σουηδία), στην οποία είναι επιστρωμένη η στατική φάση. Η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 30°C. Ο όγκος του δείγματος που εισάγεται στη συσκευή της HPLC είναι 20 μL. Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στα 0.500 mL/min. Η διαδικασία από την εισαγωγή του δείγματος, το διαχωρισμό των συστατικών και το σχηματισμό του χρωματογραφήματος διαρκεί 60 min. Να σημειωθεί ότι πάντα πριν την εισαγωγή οποιουδήποτε δείγματος, σαν πρώτο δείγμα χρησιμοποιείται το νερό ούτως ώστε να ρυθμιστεί η συσκευή. Τέλος, για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών γίνεται αντιστοιχία του εμβαδού των κορυφών με την συγκέντρωση. Για να επιτευχθεί, βέβαια, η ποσοτικοποίηση θα πρέπει να κατασκευαστούν πρότυπες καμπύλες των ενώσεων. Μέσω της εξίσωσης της ευθείας που θα προκύπτει από τις πρότυπες καμπύλες και του εμβαδού της κορυφής της ένωσης στο δείγμα (Peak Area-P.A.) θα υπολογίζεται η συγκέντρωση (μg/ml ή ppm). Επομένως, απαιτείται η εισαγωγή διαφορετικών συγκεντρώσεων των πρότυπων ενώσεων στην HPLC-UV/DAD στις ίδιες συνθήκες με αυτές του δείγματος.

### 1.8.1 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων.

Για την ανάπτυξη του ποσοτικού προσδιορισμού των μεταβολιτών και την χάραξη καμπυλών αναφοράς τους, παρασκευάστηκε μια σειρά προτύπων διαλυμάτων σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία: 300 μg των πρότυπων ουσιών που ταυτοποιήθηκαν, ζυγίστηκαν επακριβώς σε σκαφίδιο ζύγισης και μεταφέρθηκαν ποσοτικά σε Falcon όγκου 50 ml, αντίστοιχα. Το Falcon, στη συνέχεια, συμπληρώθηκε με 20 ml διαλύτη και πιο συγκεκριμένα 18 ml νερό και 2 ml ακετονιτρίλιο. Ακολουθεί ανακίνηση της πρότυπης ένωσης μαζί με τους διαλύτες. Αυτό αποτελεί το μητρικό διάλυμα της πρότυπης ένωσης συγκέντρωσης 15 ppm. Στη συνέχεια, με βάση το μητρικό διάλυμα και τον νόμο της αραιώσης μπορούν να δημιουργηθούν και άλλες συγκεντρώσεις. Οι αραιώσεις που έγιναν ήταν οι εξής: 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm.

### 1.9 Ανίχνευση αντιμικροβιακής δράσης των προτύπων ουσιών

Δύο τυποποιημένα στελέχη ATCC από εργαστηριακές μητρικές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης των προτύπων ενώσεων, που βρέθηκαν ότι περιέχονται στους μεταβολίτες του *L. gasseri*, μέσω της ανάλυσης σε HPLC-UV/DAD. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε η αντιμικροβιακή τους δράση σ' ένα Gram (+) και ένα Gram (-), δηλαδή: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 και *Salmonella enterica* ATCC14028 Η μελέτη διεξήχθη για συγκεντρώσεις παθογόνων  $10^8$ , με τη μέθοδο 0.5 Mc Farland.

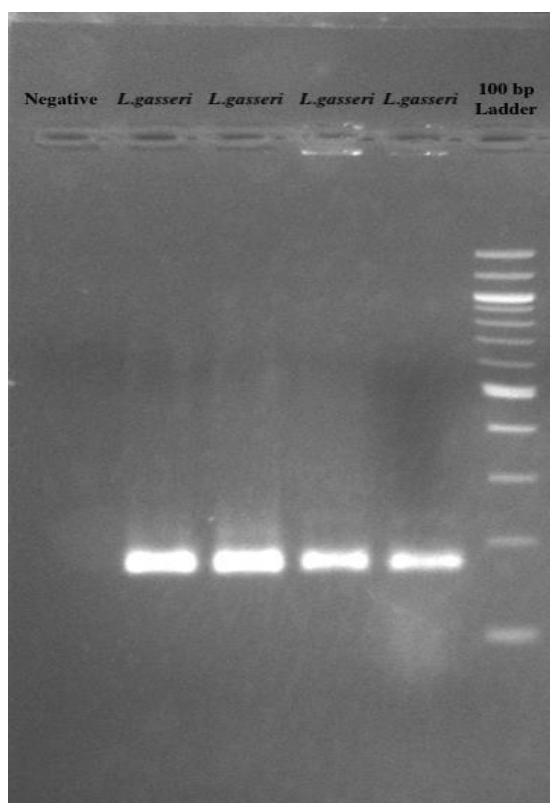
Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Λήψη ποσότητας 83.3 ml των τριών πρότυπων ενώσεων (συνολικός όγκος αντιμικροβιακής ουσίας 250 mL).
2. Τοποθέτηση των ποσοτήτων όλων των προτύπων ενώσεων σε erpendorf (συνολικού όγκου 1.5 ml).
3. Προσθήκη 125 μl παθογόνου μικροοργανισμού.
4. Επώαση στους 37°C για 24h.
5. Επίστρωση σε στερεό εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για τον κάθε παθογόνο. Στο ένα τμήμα του τρυβλίου επιστρώνονται 20 μl παθογόνου μικροοργανισμού και σε ένα άλλο 20 μl των πρότυπων ενώσεων μαζί με τον παθογόνο.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 2.1 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης

Το DNA που συλλέχθηκε, ελέγχθηκε ως προς τη συγκέντρωση και την καθαρότητα του με φωτομέτρηση. Όλα τα δείγματα είχαν συγκέντρωση 10.0-50.0 ng/μL και καθαρότητα 1.6-2.0. Στη συνέχεια, έγινε ενίσχυση τμήματος του γονιδίου του τμήματος του *L. Gasseri* με τους κατάλληλους εκκινητές (Πίνακας 12). Για την επαλήθευση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2%. Κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR προστέθηκε και ένας μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους 100 bp (ladder), ώστε να υπολογιστεί το μοριακό μέγεθος του τμήματος. Τα τμήματα που ενισχύθηκαν είχαν μέγεθος 175 bp. Στην φαίνεται ένα τυπικό αποτελέσματα μιας PCR ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου που μελετήθηκε.



**Εικόνα 21:** Ηλεκτροφόρηση στην οποία φαίνονται τα προϊόντα PCR (175 bp) σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου. Ladder: 100 bp.

## 2.2 Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης *Lactobacillus gasseri*.

Ο έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης του *L. gasseri* πραγματοποιήθηκε για διαφορετικούς χρόνους επώασης των μεταβολιτών του *L. gasseri* με τους παθογόνους μικροοργανισμούς, ούτως ώστε να προσδιοριστεί μετά από πόσες ημέρες αναστέλλεται πλήρως η ανάπτυξη του παθογόνου μικροοργανισμού στη κάθε περίπτωση. Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω.

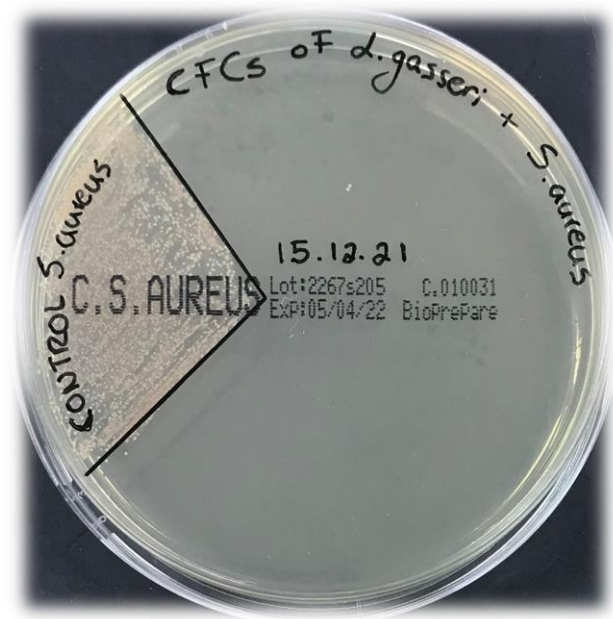
**Πίνακας 16:** Η αναστολή ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών από δραστικές αντιμικροβιακές ουσίες που παράγονται από το *L. gasseri*.

Όνομα παθογόνου στελέχους	Μεταβολίτες του <i>L. gasseri</i>		
	Χρόνος επώασης 1 ημέρα	Χρόνος επώασης 3 ημέρες	Χρόνος επώασης 5 ημέρες
<i>Salmonella enterica</i> ATCC14028 (cfu/mL)	10 <sup>8</sup>	10 <sup>3</sup>	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213 (cfu/mL)	10 <sup>7</sup>	10 <sup>2</sup>	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922 (cfu/mL)	10 <sup>7</sup>	10 <sup>2</sup>	0
<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC700603 (cfu/mL)	10 <sup>8</sup>	10 <sup>3</sup>	0





**Εικόνα 22:** Τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των μεταβολιτών του *L. gasseri* έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού *S. enterica*.



**Εικόνα 23:** Τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των μεταβολιτών του *L. gasseri* έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού *S. aureus*.



**Εικόνα 24:** Τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των μεταβολιτών του *L. gasseri* έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli*.



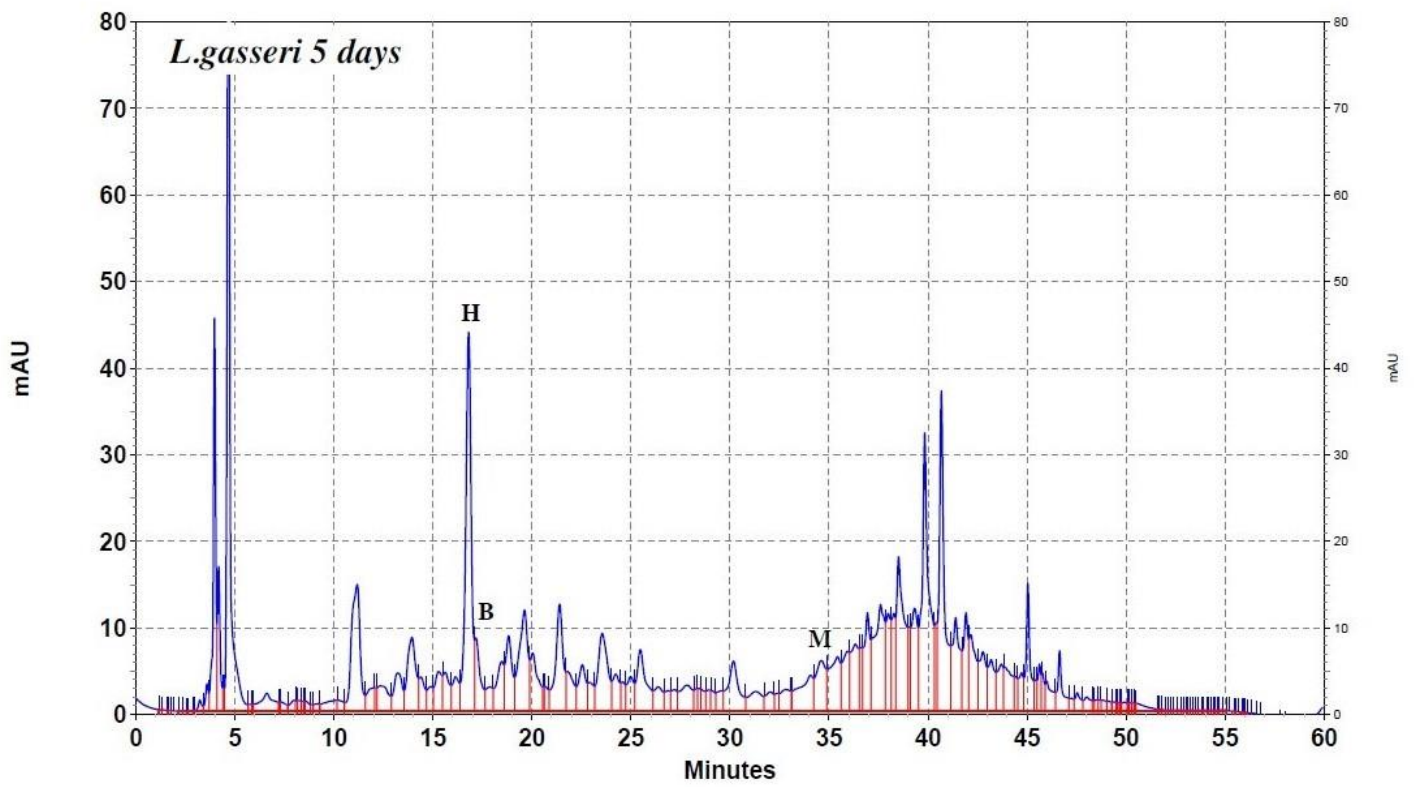
**Εικόνα 25:** Τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των μεταβολιτών του *L. gasseri* έναντι του παθογόνου μικροοργανισμού *Kl. pneumoniae*.

### 2.3 Ποιοτικός προσδιορισμός μεταβολιτών

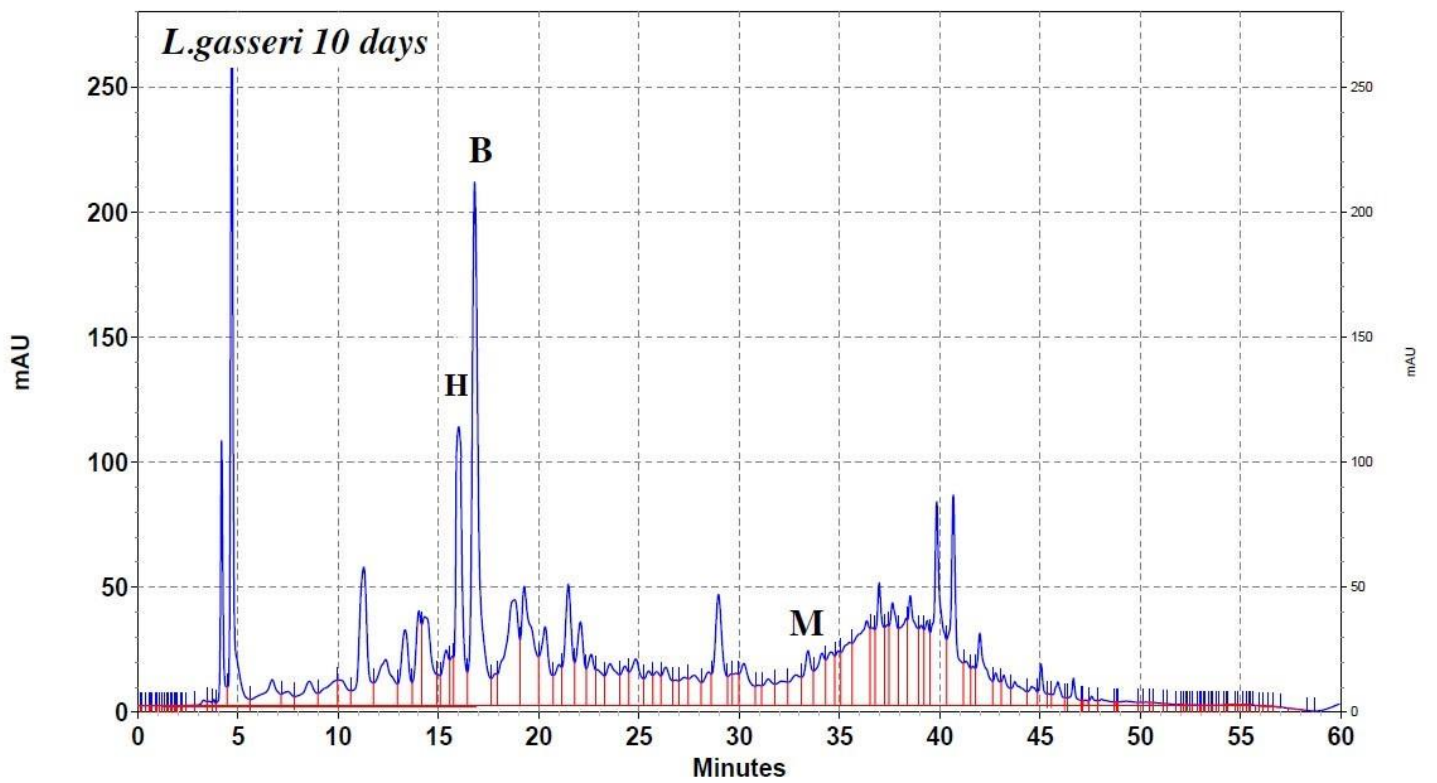
Για τον ποιοτικό προσδιορισμό των μεταβολιτών που παράγονται από το *L. gasserii* πραγματοποιήθηκε σύγκριση των χρόνων απόκρισης αυτών στο χρωματογράφημα που προέκυψε από την ανάλυση του ελαίου σε HPLC με τους χρόνους απόκρισης 14 πρότυπων ενώσεων που εντοπίστηκαν ύστερα από βιβλιογραφική ανασκόπηση.

**Πίνακας 17:** Μέγιστη απορρόφηση ( $\lambda_{\max}$ ) 14 πρότυπων ενώσεων που προσδιορίστηκαν με HPLC-UV/DAD (Vougiouklaki, 2022).

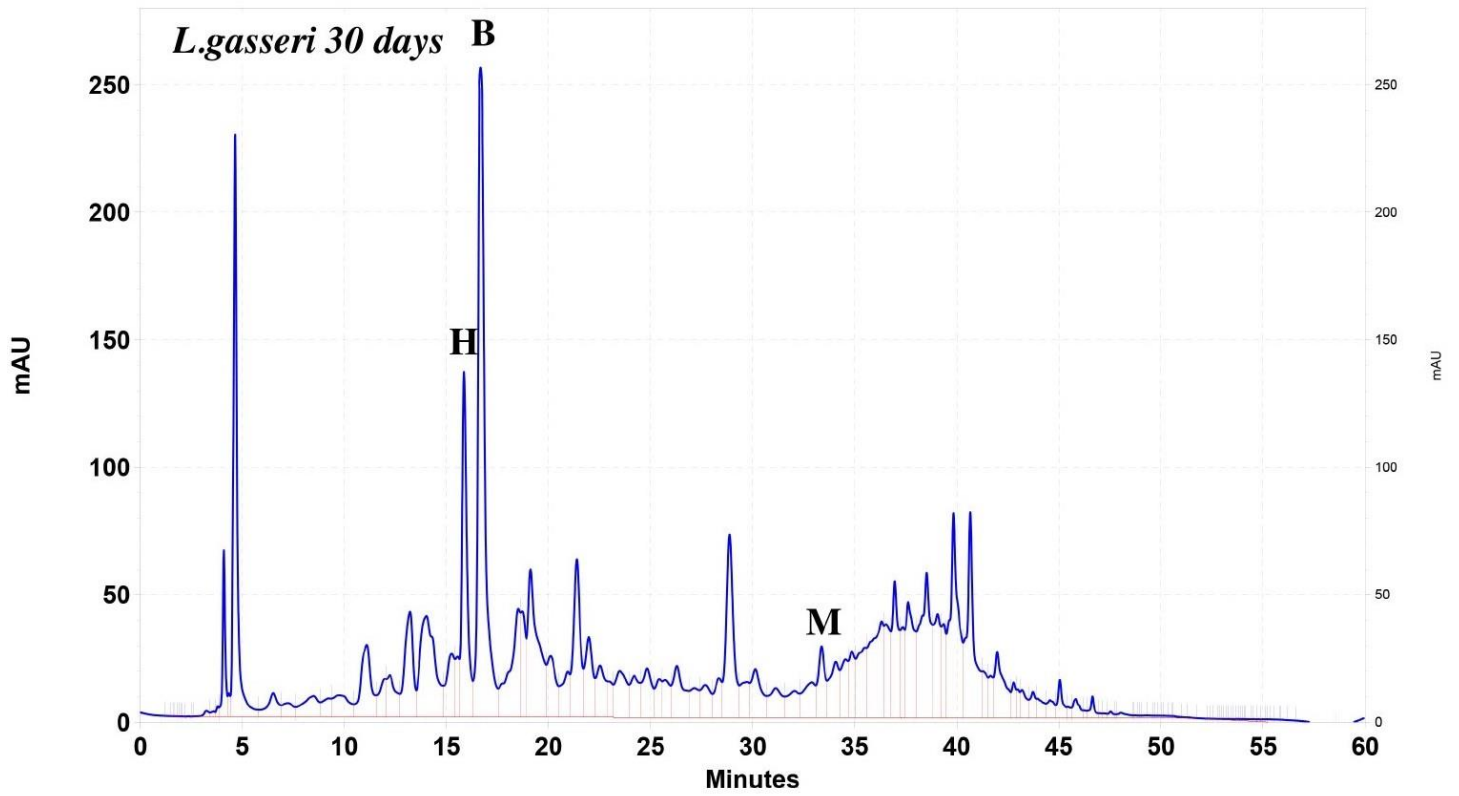
Πρότυπες Ενώσεις	UV(nm)	Χρόνος Κατακράτησης (min)
(A) 4-Hydroxybenzoic acid	251, 269, 344	19.3
<b>(B) DL-p-Hydroxyphenyllactic acid</b>	228, 274, 395	<b>16.3</b>
(C) 3-(4-Hydroxyphenyl) propionic acid	216, 255, 394	28
(D) 3-(4-Hydroxyphenyl) propionic acid	235, 277, 342	26.4
(E) Hydrocinnamic acid	220, 255, 315	38
(F) Methylcinnamic acid	251, 270, 293	41.3
(G) Salicylic acid	235, 302, 386	36
<b>(H) 1,2-Dihydroxybenzene</b>	229, 271, 390	<b>15.7</b>
(I) 3,4-Dihydrocinnamic acid	222, 324, 314	21.7
(J) Vanillic acid	253, 268, 294	21.3
(K) 3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid	222, 255, 323	45.3
(L) Ferulic acid	225, 234, 322	28.7
<b>(M) Benzoic acid</b>	230, 273, 388	<b>34.2</b>
(O) 4-Hydroxycinnamic acid	227, 239, 310	27.4



Σχήμα 1: Χρωματογράφημα *Lactobacillus gasseri* μετά από 5 ημέρες επώαση.



Σχήμα 2: Χρωματογράφημα *Lactobacillus gasseri* μετά από 10 ημέρες επώαση.



Σχήμα 3: Χρωματογράφημα *Lactobacillus gasseri* μετά από 30 ημέρες επώαση.

## 2.4 Ποσοτικός προσδιορισμός μεταβολιτών

Για τον έλεγχο της γραμμικότητας που αφορά τον προσδιορισμό με UV/DAD ανιχνευτή χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα διαλύματα. Τα πρότυπα διαλύματα όλων των ουσιών αναλύθηκαν εις διπλούν και τα αναγραφόμενα παρακάτω εμβαδά αντιστοιχούν στον μέσο όρο των μετρήσεων κάθε ουσίας.

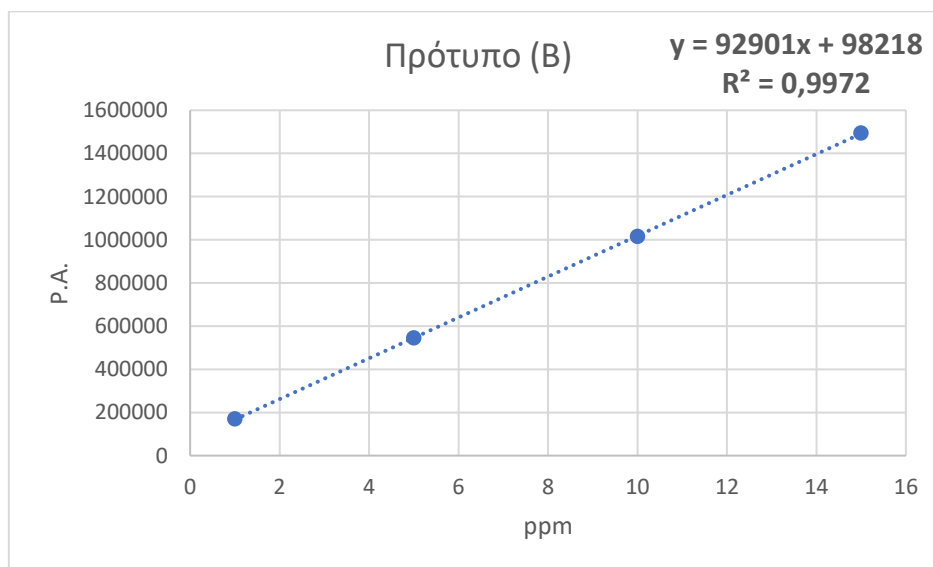
### (B) DL-p-Hydroxyphenyllactic acid

Στον **Πίνακα 17** καταγράφονται οι συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων (B) (DL-p-Hydroxyphenyllactic acid) και τα εμβαδά των αντίστοιχων κορυφών τους σε UV/DAD ανιχνευτή.

**Πίνακας 17:** Εμβαδά χρωματογραφικών κορυφών των προτύπων διαλυμάτων (B) έπειτα από προσδιορισμό σε UV/DAD ανιχνευτή.

Συγκέντρωση (μg/ml)	Εμβαδόν κορυφής
1	169442
5	544352
10	1014671
15	1494346

Στο **Σχήμα 4** απεικονίζεται η καμπύλη βαθμονόμησης των προτύπων διαλυμάτων (B).



**Σχήμα 4:** Καμπύλη αναφοράς των συγκεντρώσεων (X) προτύπων διαλυμάτων (B) σε συνάρτηση με τα εμβαδά (Y) των χρωματογραφικών κορυφών τους σε UV/DAD ανιχνευτή.

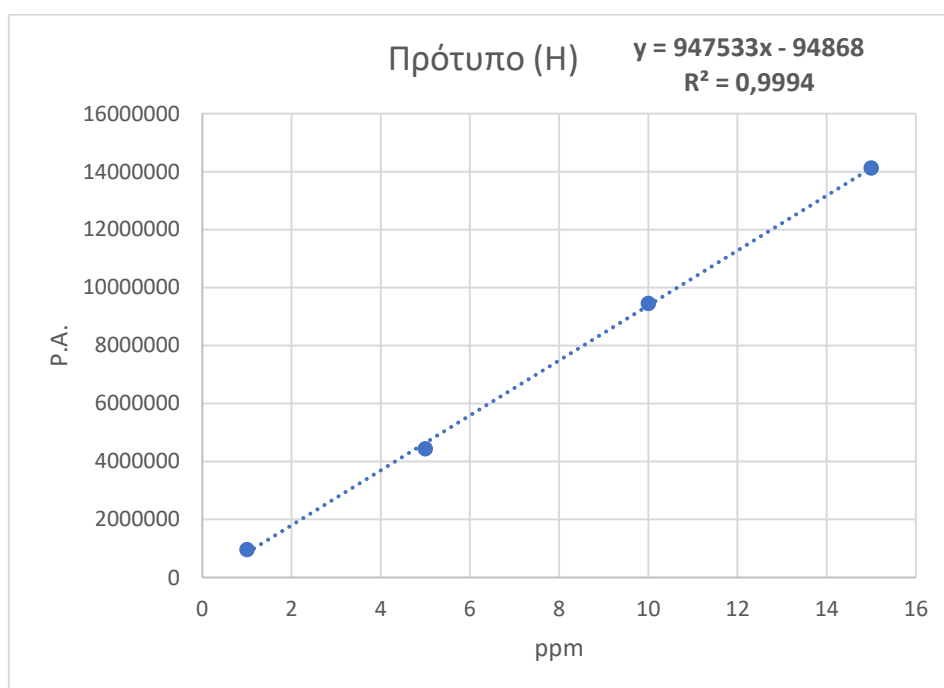
### (H) 1,2-Dihydroxybenzene

Στον **Πίνακα 18** καταγράφονται οι συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων (H) (1,2-Dihydroxybenzene) και τα εμβαδά των αντίστοιχων κορυφών τους σε UV/DAD ανιχνευτή.

**Πίνακας 18:** Εμβαδά χρωματογραφικών κορυφών των προτύπων διαλυμάτων (H) έπειτα από προσδιορισμό σε UV/DAD ανιχνευτή.

Συγκέντρωση (μg/ml)	Εμβαδόν κορυφής
1	962160
5	4450233
10	9458999
15	14122653

Στο **Σχήμα 5** απεικονίζεται η καμπύλη βαθμονόμησης των προτύπων διαλυμάτων (H).



**Σχήμα 5:** Καμπύλη αναφοράς των συγκεντρώσεων (X) προτύπων διαλυμάτων (H) σε συνάρτηση με τα εμβαδά (Y) των χρωματογραφικών κορυφών τους σε UV/DAD ανιχνευτή.

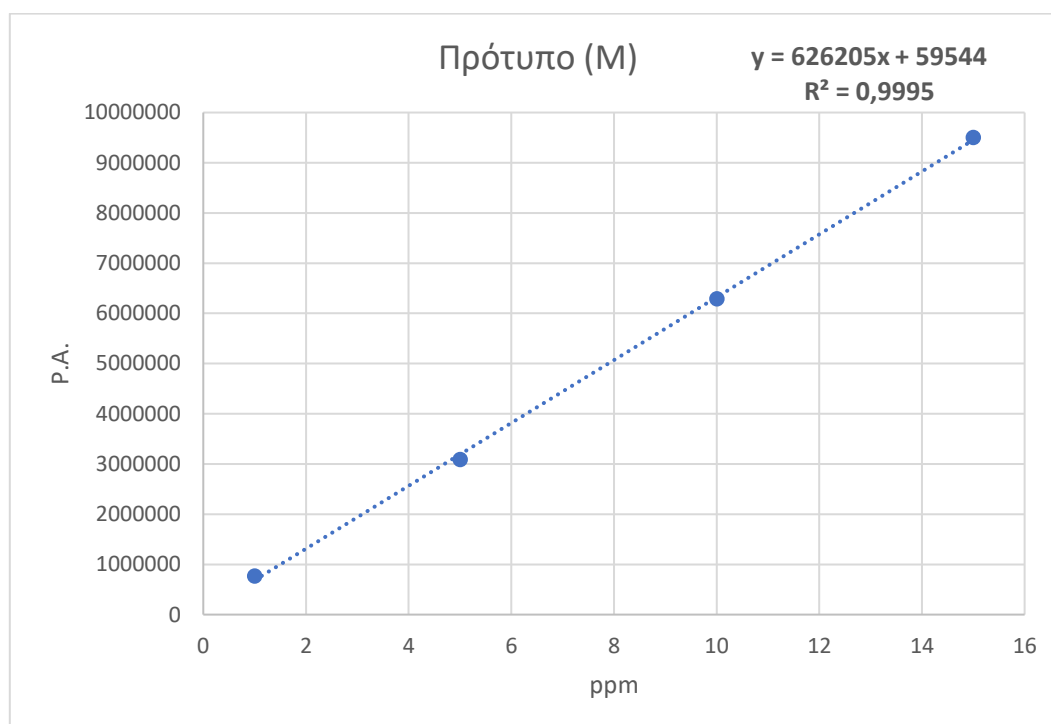
(M) Benzoic acid

Στον **Πίνακα 19** καταγράφονται οι συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων (M) (H) (1,2-Dihydroxybenzene) και τα εμβαδά των αντίστοιχων κορυφών τους σε UV/DAD ανιχνευτή.

**Πίνακας 19:** Εμβαδά χρωματογραφικών τεχνικών των προτύπων διαλυμάτων (H) έπειτα από προσδιορισμό σε UV/DAD ανιχνευτή.

Συγκέντρωση (μg/ml)	Εμβαδόν κορυφής
1	767855
5	3091359
10	6290127
15	9501204

Στο **Σχήμα 6** απεικονίζεται η καμπύλη βαθμονόμησης των προτύπων διαλυμάτων (M).



**Σχήμα 6:** Καμπύλη αναφοράς των συγκεντρώσεων (X) προτύπων διαλυμάτων (M) σε συνάρτηση με τα εμβαδά (Y) των χρωματογραφικών κορυφών τους σε UV/DAD ανιχνευτή.



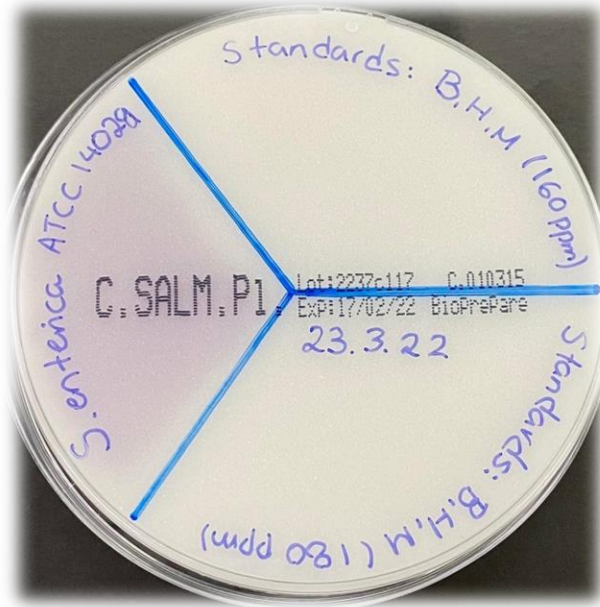
Για να ελεγχθεί κατά πόσο ο χρόνος επώασης του *L. gasseri* επηρεάζει τη συγκέντρωση των μεταβολιτών, πραγματοποιήθηκαν καθαρισμοί του ζωμού στον οποίο αναπτύσσεται ο μικροοργανισμός σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Συγκεκριμένα, ελέγχθηκε η συγκέντρωση των μεταβολιτών για έξι διαφορετικούς χρόνους επώασης του οξυγαλακτικού βακτηρίου. Τα προκύπτοντα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 20:** Συγκέντρωση (σε ppm) των μεταβολιτών που παράχθηκαν από το *Lactobacillus gasseri*.

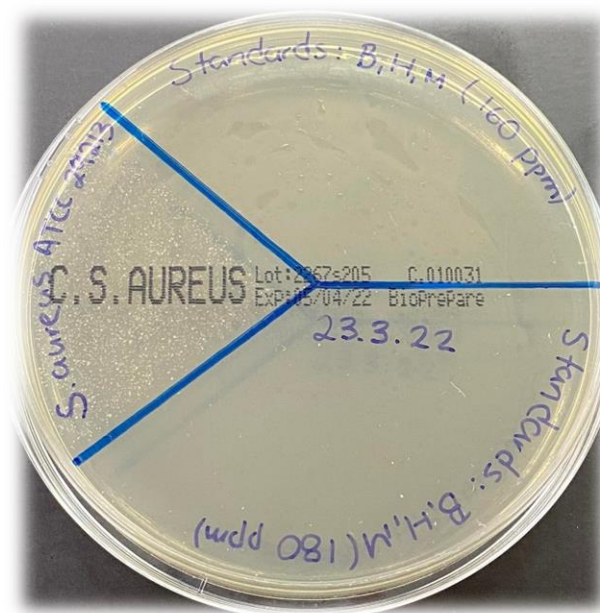
Όνομα στελέχους	cfu/mL	Χρόνος επώασης (μέρες)	DL-p-Hydroxyphenyllactic acid (ppm)	1,2-Dihydroxybenzene (ppm)	Benzoic Acid (ppm)
<i>Lactobacillus gasseri</i>	10 <sup>8</sup>	5	6.0	3.73	2.31
	10 <sup>5</sup>	10	200.0	9.84	7.32
	10 <sup>5</sup>	15	247.2	10.23	7.65
	10 <sup>4</sup>	20	251.6	11.42	7.65
	10 <sup>3</sup>	25	252.7	11.47	7.82
	10 <sup>2</sup>	30	253.0	12.68	7.83

## 2.5 Αποτελέσματα αντιμικροβιακής δράσης των προτύπων ουσιών

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν ύστερα από τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης των προτύπων ενώσεων Β, Η και Μ, για συγκεντρώσεις 160 και 180 ppm, έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών *Salmonella enterica* ATCC14028 και *Staphylococcus aureus* ATCC29213 παρουσιάζονται παρακάτω.



**Εικόνα 26:** Τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των προτύπων Β, Η, Μ έναντι του παθογόνου *S. enterica*.



**Εικόνα 27:** Τα αποτελέσματα της αντιμικροβιακής δράσης των προτύπων Β, Η, Μ έναντι του παθογόνου *S. aureus*.

## V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Στις μέρες μας οι καταναλωτές ανησυχούν για τις συνθετικές χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά στα τρόφιμα, με αποτέλεσμα να υπάρχει τάση προς λιγότερο επεξεργασμένα τρόφιμα. Από την άλλη πλευρά, τα μη επεξεργασμένα τρόφιμα μπορούν να φιλοξενούν επικίνδυνα παθογόνα που μπορούν να πολλαπλασιαστούν υπό ψύξη και χωρίς οξυγόνο. Μια διαφυγή σε αυτό το δίλημμα είναι η χρήση αντιμικροβιακών μεταβολιτών ζυμωτικών μικροοργανισμών, όπως αυτών των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Πολλές αντιμικροβιακές χημικές ουσίες χρησιμοποιούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς γνωστές δυσμενείς επιπτώσεις. Πολλές από τις οργανικές ενώσεις που έχουν προκαλέσει ενδιαφέρον είναι αντιμικροβιακοί μεταβολίτες βακτηρίων που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ή συνδέονται με τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση.

Η παρούσα εργασία είχε σχεδιαστεί με τέτοιο τρόπο ώστε να μελετηθεί ως προς την αντιμικροβιακή του δράση το αυτόχθονο οξυγαλακτικό στέλεχος *Lactobacillus gasseri*. Η αντιμικροβιακή δράση του στελέχους φαίνεται ότι οφείλεται στους μεταβολίτες και πιο συγκεκριμένα τα οργανικά οξέα που παράγει και όχι στο ίδιο το βακτηριακό κύτταρο.

Η παραγωγή οργανικών οξέων είναι αναμφίβολα ο καθοριστικός παράγοντας αύξησης της ασφάλειας και της διάρκειας ζωής του τελικού προϊόντος. Η οξίνιση είναι μια ιδιαίτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος συντήρησης κατά τη παραγωγή πολλών ειδών τροφίμων. Η αναστολή της παθογόνου μικροχλωρίδας και της αλλοίωσης εξαρτάται ακόμη από τον γρήγορο και επαρκή σχηματισμό αυτών των οργανικών ενώσεων.

Από την μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης του υπερκείμενου υγρού, ελεύθερο από βακτηριακά κύτταρα, προέκυψε ότι εμφανίζει *in vitro* αξιολογητή δράση έναντι των στελεχών : *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Salmonella enterica* ATCC14028 και *Escherichia coli* ATCC 25922. Η δράση αυτή είναι το ίδιο αξιολογητή με εκείνη που επέδειξαν οι πρότυπες ουσίες που υποβλήθηκαν στις ίδιες δοκιμασίες. Συνεπώς το στέλεχος *Lactobacillus gasseri* παρουσιάζει αξιολογητή (*in vitro* τουλάχιστον) αντιμικροβιακή δράση, η οποία οφείλεται στους μεταβολίτες που παράγει.

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης μπορούν να θεωρηθούν αξιόπιστα αν συγκριθούν με τα αποτελέσματα μιας άλλης έρευνας, στην οποία ταυτοποιήθηκαν οι μεταβολίτες που παράγονται από κάποια άλλα οξυγαλακτικά βακτήρια. Ο Brosnan et. al., 2014, (Brosnan, 2014) ανέπτυξε ένα πρωτόκολλο που επιτρέπει στους μεταβολίτες των LAB να αξιολογηθούν εύκολα και με ακρίβεια, τόσο ποιοτική όσο και ποσοτική, μέσω HPLC-UV/DAD. Εφάρμοσε μια εξαιρετική μέθοδο εκχύλισης για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών ορισμένων οξυγαλακτικών βακτηρίων, διαφορετική από αυτή που εφαρμόστηκε στη συγκεκριμένη μελέτη. Ιερέυνησε τους μεταβολίτες στους οποίους οφείλεται η αντιμικροβιακή δράση τριών στελεχών οξυγαλακτικών βακτηρίων: *Lactobacillus amylovorus* A, *Lactobacillus plantarum* B, *Weissella cibaria* C. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι ο *L.*

*amylovorus* A παράγει 1,2-Dihydroxybenzene, DL-p-Hydroxyphenyllactic acid, 4-Hydroxybenzoic acid, 3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid, Caffeic acid, 3-(4-hydroxyphenyl) – propionic acid, Phenyllactic acid, p-Coumaric acid, 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propanoic acid, Benzoic acid, Ferulic acid, Hydrocinnamic acid. Ο *L. plantarum* B παράγει 1,2-Dihydroxybenzene, DL-p-Hydroxyphenyllactic acid, 4-Hydroxybenzoic acid, 3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid, Caffeic acid, Phenyllactic acid, p-Coumaric acid, 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) propanoic acid, Benzoic acid, Ferulic acid. Ο *W. cibaria* C παράγει DL-p-Hydroxyphenyllactic acid, 4-Hydroxybenzoic acid, 3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid, Caffeic acid, 3-(4-hydroxyphenyl) – propionic acid, Phenyllactic acid, p-Coumaric acid, 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) propanoic acid, Benzoic acid, Ferulic acid.

Παρατηρείται ότι οι μεταβολίτες DL-p-Hydroxyphenyllactic acid και Benzoic acid ταυτοποιούνται και στα τέσσερα στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων. Το οργανικό οξύ 1,2-Dihydroxybenzene δεν παράγεται μόνο από το *W. cibaria* C. Επομένως, προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι μεταβολίτες που παράγονται από το *Lactobacillus gasserii* ταυτοποιήθηκαν με αρκετά μεγάλη ακρίβεια, και πιθανόν, μάλιστα, να παράγονται και άλλοι μεταβολίτες μεταξύ των δεκατεσσάρων προτύπων που δεν προσδιορίστηκαν. Ο λόγος που δεν προσδιορίστηκαν ίσως να οφείλεται στην μέθοδο εκχύλισης του ζωμού που εφαρμόστηκε.

## Βιβλιογραφία

- ABDEL-BAR, N. A. (1987). "Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*". *Journal of Food Science* 52.2, σσ. 411-415.
- Abee T, K. L. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int J Food Microbiol* 28, σσ. 169-185.
- Adams, M. R. (1988). "Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures.". *International Journal of Food Science & Technology* 23.3, σσ. 287-292.
- Adams, M. R. (1990). "Topical aspects of fermented foods.". *Trends in Food Science & Technology* 1, σσ. 140-144.
- Ananou, S. e. (2007). "Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods." . *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology* 1.2, σσ. 475-487.
- Ananthaswamy, H. N. (1977). "Repair of hydrogen peroxide-induced single-strand breaks in *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid.". *Journal of bacteriology* 130.1, pp. 187-191.
- Ashenafi, M. (1991). Growth of *Listeria monocytogenes* in fermenting tempeh made of various beans and its inhibition by *Lactobacillus plantarum*. *Food Microbiology* 8.4, pp. 303-310.
- Axelsson, L. (2004). *Lactic acid bacteria: classification and physiology* (Third εκδ.). New York: Marcel Dekker.
- Azcarate-Peril MA, A. E. (2008). Analysis of the genome sequence of *Lactobacillus Gasseri* ATCC 33323 reveals the molecular basis of an autochthonous intestinal organism. *Appl Environ Microbiol* 74, σσ. 4610-4625.
- Bartkiene, E. e. (2019). "Lactic acid bacteria isolation from spontaneous sourdough and their characterization including antimicrobial and antifungal properties evaluation.". *Microorganisms* 8.1, σ. 64.
- Baumann, E. (1938). "Ueber bactericide Wirkung verschiedener Stoffe auf Tuberkelbacillen.". *Klinische Wochenschrift* 17.11, σσ. 382-386.
- Bernardeau, M. M. (2006). "Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments." . *FEMS Microbiology Reviews* 30.4 , σσ. 487-513.
- Brosnan, B. e. (2014). "The QuEChERS approach in a novel application for the identification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria cultures.". *Talanta* 129, σσ. 364-373.
- Byczkowski, J. Z. (1988). "Biological role of superoxide ion-radical.". *International Journal of Biochemistry* 20.6 , σσ. 569-580.
- Cálix-Lara, T. F. (2014). "Inhibition of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* on spinach and identification of antimicrobial substances produced by a commercial Lactic Acid Bacteria food safety intervention.". *Food microbiology* 38, σσ. 192-200.

- Campbell, N. a. (2010). *ΒΙΟΛΟΓΙΑ*. Ηράκλειο, Κρήτης: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Chikindas, M. L. (2001). *Control of foodborne microorganisms*. CRC Press.
- Chung, K.-T. J. (1989). "Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat." *Applied and Environmental Microbiology* 55.6, σσ. 1329-1333.
- Cintas, L. M. (2001). "Bacteriocins of lactic acid bacteria." *Food Science and Technology International* 7.4, σσ. 281-305.
- Condon, S. (1987). "Responses of lactic acid bacteria to oxygen." *FEMS Microbiology Reviews* 3.3, σσ. 269-289.
- Dangour, A. D.-L. (2006). Food and health in Europe: a new basis for action. *EUROPEAN JOURNAL OF PUBLIC HEALTH*, p. 451.
- Davey, G. P. (1981). "Mode of action of diplococcin, a bacteriocin from *Streptococcus cremoris* 346 [milk products]." *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*.
- Davey, G. P. (1981). "Purification and some properties of diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346." *Applied and Environmental Microbiology* 41.1, σσ. 84-89.
- De Backer E, V. R. (2007). Quantitative determination by real-time PCR of four vaginal *Lactobacillus* species, *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* indicates an inverse relationship between *L. gasseri* and *L. iners*. *BMC Microbiol* 7, σ. 115.
- Delves-Broughton J, B. P. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, σσ. 193-202.
- Dixon, N. M. (1989). "A review—the inhibition by CO<sub>2</sub> of the growth and metabolism of microorganisms." *Journal of Applied Bacteriology* 67, pp. 109-136.
- Eady, J. (2019). *Additive Alert: Your Guide to Safer Shopping*. Woodslane Press.
- Ebete, K.-O. (1996). Χρωματογραφική συμπεριφορά και ποσοτικός προσδιορισμός αντισταμινικών φαρμάκων με πιπεριδινικό δακτύλιο σε σκευάσματα και βιολογικά υγρά με ΥΧΥΑ, Διδακτορική διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη.
- Fadda, S. C. (2010). "Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers." *Meat science* 86.1, σσ. 66-79.
- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.
- Felis G.E., D. F. (2007). Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 8, σσ. 44-61.
- Florou-Paneri, P. E. (2013). "Lactic acid bacteria as source of functional ingredients." *Lactic acid bacteria-R & D for food, health and livestock purposes*.
- Gálvez, A. e. (2007). "Bacteriocin-based strategies for food biopreservation." *International journal of food microbiology* 120.1-2, σσ. 51-70.

- Gálvez, A. e. (2010). "Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol." . *Current opinion in biotechnology* 21.2, σσ. 142-148.
- Gasser F, D. M. (1970). Purification and properties of NAD-dependent lactic dehydrogenases of different species of lactobacillus. *J Gen Microbiol* 62, σσ. 241-250.
- Gasser, F. (1994). "Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections [opportunistic bacteria, various infections". *Bulletin de l'Institut Pasteur* .
- Genetic features of circular bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. (2008). *FEMS Microbiol Rev* 32, σσ. 2-22.
- Genigeorgis, C. A. (1985). "Microbial and safety implications of the use of modified atmospheres to extend the storage life of fresh meat and fish." . *International Journal of Food Microbiology* 1.5, σσ. 237-251.
- Gevers D, H. G. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of Lactobacillus species. *FEMS Microbiol Lett* 205, σσ. 31-36.
- Hill, C. e. (2014). "Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic." . *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*.
- Hurst, A. a. (1993). "*Nisin In Antimicrobials in Foods*." . New York: Marcel Dekker.
- Jay, J. M. (1982). "Antimicrobial properties of diacetyl." . *Applied and Environmental Microbiology* 44.3, pp. 525-532.
- Juven, B. J. (1988). "Detection of hydrogen peroxide produced by meat lactic starter cultures." . *Journal of Applied Bacteriology* 65.5, pp. 357-360.
- Kawai Y, S. T. (1998a). Gassericin A; an uncommon cyclic bacteriocin produced by Lactobacillus gasseri LA39 linked at N- and C-terminal ends. *Biosci Biotechnol Biochem* 62, σσ. 2438-2440.
- Kawai Y, S. T. (1998b). Sequence analysis by cloning of the structural gene of gassericin A, a hydrophobic bacteriocin produced by Lactobacillus gasseri LA39. *Biosci Biotechnol Biochem* 62, σσ. 887-892.
- KING JR, A. D. (1975). "Influence of carbon dioxide upon the metabolism of Pseudomonas aeruginosa." . *Journal of Food Science* 40.2, σσ. 362-366.
- Klaenhammer TR, B. R.-P. (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol Rev* 29, σσ. 393-409.
- Klaenhammer, T. R. (1988). "Bacteriocins of lactic acid bacteria." *Biochimie* 70.3. σσ. 337-349.
- Klein, G. e. (1998). "Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria." . *International journal of food microbiology* 41.2, σσ. 103-125.
- Kos, B. e. (2008). "Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry." . *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24.5, σσ. 699-707.

- Kos, B. e. (2008). "Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry.". *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24.5, σσ. 699-707.
- Kullen MJ, S.-D. R. (2000). Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *J Appl Microbiol* 89, σσ. 511-516.
- Lauer, E., & Kandler, O. (1980). *Lactobacillus gasseri* sp. nov., a new species of the subgenus *Thermobacterium*. *Zentralbl Bakteriol* 1C, σσ. 75-78.
- Lauer E, H. C. (1980). Heterogeneity of the species *Lactobacillus acidophilus* (Moro) Hansen and Moquot as revealed by biochemical characteristics and DNA-DNA hybridisation. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkde. Infektionskrankh. Hyg. Abt. 1 Orig. C 1*, σσ. 150-168.
- Lindgren, S. E. (1990). "Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations.". *FEMS microbiology reviews* 7.1-2, σσ. 149-163.
- Lindgren, S. E. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS microbiology reviews*, pp. 149-163.
- Luchansky JB, T. M. (1991). Molecular cloning and deoxyribonucleic acid polymorphisms in *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus gasseri*. *J Dairy Sci* 74, σσ. 3293-3302.
- LUCKE, F. (2012). "14 Fermented sausages.". *Microbiology of Fermented Foods*, p. 441.
- Motlagh, A. M. (1991). "Viability loss of foodborne pathogens by starter culture metabolites.". *Journal of food protection* 54.11, σσ. 337-354.
- Motlagh, A. M. (1991). Viability loss of foodborne pathogens by starter culture metabolites.". *Journal of food protection* 54.11, σσ. 873-878.
- Ouwehand, A. C. (1990). "Probiotics: mechanisms and established effects.". *International dairy journal* 9.1, pp. 43-52.
- Piard, J.-C. e. (1992). "Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481.". *Applied and Environmental Microbiology* 58.1, σσ. 279-284.
- Pot B, H. C. (1993). Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri* and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization. *J Gen Microbiol* 139, σσ. 513-517.
- Pruitt, K. M. (1982). "Lactoperoxidase-catalyzed oxidation of thiocyanate: a polarographic study of the oxidation products.". *Biochemistry* 21.3, σσ. 562-567.
- Pulusani, S. R. (1979). "Antimicrobial activity of lactic cultures: partial purification and characterization of antimicrobial compound (s) produced by *Streptococcus thermophilus*". *Journal of Food Science* 44.2, σσ. 575-578.
- Rathod, N. B. (2021). "Recent advances in bio-preservatives impacts of lactic acid bacteria and their metabolites on aquatic food products.". *Food Bioscience* 44.



- Reis, J. A. (2012). "Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications." . *Food Engineering Reviews* 4.2, σσ. 124-140.
- Reis, J. A. (2012). "Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications." . *Food Engineering Reviews* 4.2, σσ. 124-140.
- Reis, J. A. (2012). "Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications." . *Food Engineering Reviews* 4.2, σσ. 124-140.
- Reiter, B. a. (1984). "Lactoperoxidase antibacterial system: natural occurrence, biological functions and practical applications." . *Journal of Food Protection* 47.9 , σσ. 724-732.
- Sánchez, B. e. (2017). "Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease." . *Molecular nutrition & food research* 61.1.
- Schnürer, J. a. (2005). "Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives." . *Trends in Food Science & Technology* 16.1-3, σσ. 70-78.
- Selle, K. a. (2013). "Genomic and phenotypic evidence for probiotic influences of *Lactobacillus gasseri* on human health." . *FEMS microbiology reviews* 37.6, σσ. 915-935.
- Talarico, T. L. (1989). "Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*." . *Antimicrobial agents and chemotherapy* 33.5, σσ. 674-679.
- Toba T, Y. E. (1991). Potential of *Lactobacillus gasseri* isolated from infant faeces to produce bacteriocin. *Lett Appl Microbiol* 12, σσ. 228-231.
- van Belkum, M. J. (1992). "Lactococcal bacteriocins: genetics and mode of action." . *Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics.*, σσ. 59-69.
- Venema, K. e. (1993). "Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis*." . *Applied and environmental Microbiology* 59.4, σσ. 1041-1048.
- Vougiouklaki, D. e. (2022). "Characterization of *Lactocaseibacillus rhamnosus*, *Levilactobacillus brevis* and *Lactiplantibacillus plantarum* Metabolites and Evaluation of Their Antimicrobial Activity against Food Pathogens." . *Applied Sciences* 12.2, σ. 660.
- Wall R, F. G. (2007). Genomic diversity of cultivable *Lactobacillus* populations residing in the neonatal and adult gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol Ecol* 59, σσ. 127-137.
- Weiss, K. a. (1986). Genus *Lactobacillus*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*.
- Zajdel, J. K. (1985). "Mechanism of action of lactostrepcin 5, a bacteriocin produced by *Streptococcus cremoris* 202." . *Applied and Environmental Microbiology* 49.4, σσ. 969-974.
- Ακτύπης. (1999). Παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών από στελέχη οξυγαλακτικών καλλιεργειών που απομονώθηκαν από ελληνικά παραδοσιακά προϊόντα. Εργαστήριο Γαλακτομίας Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Βάσσοις, Δ. (2009). *Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των θερμόφιλων οξυγαλακτικών βακτηρίων που απομονώθηκαν από παραδοσιακά γαλακτοκομικά προϊόντα της*

*Ηλείρου*. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Σχολή Ιατρικής. Τμήμα Ιατρικής. Τομέας  
Λειτουργικός-Κλινικοεργαστηριακός. Εργαστήριο Φυσιολογίας.

Γ., Μ. (2006). *Μικροβιολογία Τροφίμων*. Αθήνα: Έμβρυο.

ΙΩΑΝΝΗΣ, Α. (2013). ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ . ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ, ΤΟΜΕΑΣ  
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ.

Σαμανίδου, Ι. Ν. (2001). *ΕΝΟΡΓΑΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ*. ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ : ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΗΓΑΣΟΣ  
2000.