



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ

**Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

**«Εφαρμογή και επίδραση μικροβιακών στελεχών απομονωμένων από
μελισσόψωμο στη ζύμωση γύρης και μελισσοτροφών»**

**«Application and effect of microbial strains isolated from bee bread on the
fermentation of pollen and bee feeds»**

Κιαβουρίδου Αφεντούλα του Ιορδάνη

Λάρισα 2025

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ(Επιβλέπων): Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΠΑΤΕΡΑΚΗ ΧΡΥΣΑΝΘΗ: Επίκουρη καθηγήτρια Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΑΣΟΥΤΗΣ-ΔΙΔΑΡΑΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ: Μόνιμος υπάλληλος ΕΦΕΤ, Κτηνίατρος.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων-Μοριακής Βακτηριολογίας- Ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη στον επιβλέποντα της εργασίας μου κ. Μόσιαλο Δημήτριο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον και επίκαιρο ερευνητικό θέμα. Η επιστημονική του γνώση, η καθοδήγηση του και η συνεχής του στήριξη αποτέλεσαν βασικό πυλώνα στην επιτυχή ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Χάρη στην υποστήριξή του, είχα την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα επιστημονικά ενδιαφέρον αντικείμενο, μέσα από το οποίο ανέπτυξα ουσιαστικές δεξιότητες τόσο στο θεωρητικό όσο και στο εργαστηριακό πεδίο.

Θα ήθελα επίσης, να ευχαριστήσω θερμά την συνεπιβλέπουσα μου Κ. Πατεράκη Χρυσάνθη, για τη συνεχή και ακούραστη παρουσία της δίπλα μου σε κάθε στάδιο της πειραματικής διαδικασίας. Με την εμπειρία της, την μεταδοτικότητα της και την προθυμία της να μοιραστεί τις γνώσεις της, συνέβαλε καθοριστικά τόσο στην εξοικείωση μου με το εργαστήριο όσο και στην ουσιαστική εξέλιξη της εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον Κ. Ασούτη - Διδάρα Νικόλαο ο οποίος στάθηκε αρωγός σε κάθε απορία, με υπομονή και προθυμία να απαντά σε κάθε μου ερώτηση, κάτι το οποίο αποτέλεσε για εμένα σημείο αναφοράς. Η συμβολή του υπήρξε καθοριστική, προσφέροντάς μου πολύτιμες γνώσεις και εμπειρίες, οι οποίες εμπλούτισαν ουσιαστικά την ερευνητική μου πορεία.

Ολοκληρώνοντας, ευχαριστώ από καρδιάς τους γονείς μου, οι οποίοι στάθηκαν δίπλα μου σε όλη αυτή τη διαδρομή, συνοδοιπόροι, προσφέροντας μου απλόχερα απεριόριστη αγάπη, στήριξη, ενθάρρυνση και κατανόηση. Η συνεχής υποστήριξη τους υπήρξε πηγή έμπνευσης και δύναμης για την ολοκλήρωση αυτής της πτυχιακής εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αυτή η μελέτη διερευνά πώς η χρήση μικροβιακών στελεχών που απομονώθηκαν από το μελισσόψωμο επηρεάζει τη ζύμωση της γύρης και άλλων τροφών για μέλισσες, αξιοποιώντας την τεχνική ζύμωσης στερεής κατάστασης (Solid-State Fermentation). Το μελισσόψωμο, ένα θρεπτικό προϊόν της κυψέλης, σχηματίζεται όταν οι μέλισσες συνδυάζουν τη γύρη με νέκταρ, μέλι και ωφέλιμους μικροοργανισμούς. Η διαδικασία της ζύμωσης ενισχύει την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών από τις μέλισσες. Στη μελέτη, εκτιμήθηκε η δραστηριότητα διαφόρων ενζύμων (όπως πρωτεάσες, γλυκοαμυλάσες και ξυλανάσες) που παράγονται κατά τη ζύμωση από τέσσερα είδη μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από το μελισσόψωμο (*Apilactobacillus kunkeei* 530, *Bacillus* sp. 94, *Bacillus licheniformis* 108, *Zygosacccharomyces siamensis* 449), καθώς και οι αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες και η περιεκτικότητα σε υγρασία υποστρώματων (ο ηλιάνθος, η γύρη και η σόγια). Πριν τον εμβολιασμό, στα στερεά υποστρώματα, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια και μετά παρατηρήθηκε η αύξηση της οπτικής πυκνότητας, έτσι ώστε να προσδιοριστεί το χρονικό σημείο στο οποίο κάθε στέλεχος βρισκόταν στη δική του εκθετική φάση ανάπτυξης. Η εύρεση της εκθετικής φάσης ήταν απαραίτητη και σημαντική διότι εξασφάλισε ότι όλα τα στελέχη εμβολιάστηκαν στο ίδιο φυσιολογικό επίπεδο ανάπτυξης και ξεκίνησε η ζύμωση στερεής κατάστασης. Με βάση αυτή τη προετοιμασία, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι μικροοργανισμοί παρουσίασαν διαφορετική δυναμική ανάπτυξης ανάλογα με το υπόστρωμα, με τη γύρη να ευνοεί ιδιαίτερα την παραγωγή πρωτεάσης και της γλυκοαμυλάσης, τον ηλιάνθο την παραγωγή πρωτεάσης και σε μικρότερο βαθμό την γλυκοαμυλάση και τη σόγια την παραγωγή πρωτεάσης, ενώ η ξυλάνση ανιχνεύθηκε σε χαμηλά επίπεδα σχεδόν σε όλα τα υποστρώματα. Επιπλέον, καταγράφηκε σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα, ενισχύοντας την ένδειξη ότι το μελισσόψωμο διαθέτει βιοδραστικές ιδιότητες με πιθανές προβιοτικές εφαρμογές.

Συμπερασματικά, η εργασία καταδεικνύει ότι το μελισσόψωμο αποτελεί πλούσια πηγή μικροοργανισμών με έντονη ενζυμική και αντιοξειδωτική δράση. Τα ευρήματα αυτά υπογραμμίζουν τη σημασία του ως λειτουργικό τρόφιμο και αναδεικνύουν τις προοπτικές αξιοποίησής του τόσο στη διατροφή όσο και στη φαρμακευτική βιοτεχνολογία.

Λέξεις-κλειδιά: μελισσόψωμο, , μικροβιακά στελέχη(*Apilactobacillus kunkeei* 530, *Bacillus* sp. 94, *Bacillus licheniformis* 108, *Zygosacccharomyces siamensis* 449), ενζυμική δραστηριότητα, αντιοξειδωτική ικανότητα, αντιμικροβιακή ικανότητα, ζύμωση στερεής κατάστασης

ABSTRACT

This study investigates how the application of microbial strains isolated from bee bread affects the fermentation of pollen and other bee feeds, implementing a solid-state fermentation (SSF) technique. Bee bread, a nutritious hive product, is produced when bees combine pollen with nectar, honey, and beneficial microorganisms. The fermentation process enhances the bioavailability of nutrients by bees. The present study determined the activities of various enzymes (such as proteases, glycoamylases, and xylanases) produced during fermentation by four strains of microorganisms isolated from bee bread (*Apilactobacillus kunkeei* 530, *Bacillus* 94, *Bacillus* 108, *Zygosaccharomyces siamensis* 449), as well as the antioxidant and antimicrobial properties and moisture of substrates such as sunflower, pollen, and soy. Prior to inoculation, microbial cultures were grown on solid media, and the temporal changes in optical density were rigorously monitored to precisely determine the point at which each strain entered its exponential growth phase. Finding the exponential phase was essential as it ensured that all strains were inoculated at the same growth phase and solid-state fermentation began simultaneously. Based on this preparation, the results showed that the microorganisms exhibited different growth dynamics depending on the substrate with pollen particularly favored the production of protease and glucoamylase, sunflower supported mainly protease production and to a lesser extent glucoamylase, and soybean promoted the production of protease activity. Xylanase, however, was detected at very low levels across almost all substrates. In addition, a significant antioxidant capacity was recorded, reinforcing the evidence that bee bread possesses bioactive properties with potential probiotic applications.

In conclusion, the present study demonstrates that bee bread is a rich source of microorganisms exerting strong enzymatic and antioxidant activity. These findings highlight its importance as a functional food and reveal its potential applications in both nutrition and pharmaceutical biotechnology.

Keywords: Bee bread, fermentation, microbial strains (*Apilactobacillus kunkeei* 530, *Bacillus* sp. 94, *Bacillus licheniformis* 108, *Zygosaccharomyces siamensis* 449), enzymatic activity, antioxidant capacity, antimicrobial activity, pollen, Solid-state fermentation (SSF)

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Τα προϊόντα της κυψέλης	8
1.2 Διαφορές ανάμεσα στο μέλι και στο μελισσόψωμο	11
1.2.1.Χημική σύσταση της γύρης.....	11
1.2.2.Χημική σύσταση του μελισσόψωμου	12
1.2.3.Εξέλιξη των μελισσών και οργάνωση της κυψέλης.....	12
1.3.Το μικροβίωμα του μελισσόψωμου	13
1.4.Βιοδραστικότητα και ιδιότητες	14
1.5.Παραδοσιακές χρήσεις και φαρμακευτικές εφαρμογές	15
1.6.Τι το κάνει πολύτιμο λειτουργικό τρόφιμο;	15
1.7.Δυσκολίες στην εξαγωγή του Μελισσόψωμου	16
1.8. Ζύμωση στερεής κατάστασης.....	16
1.9. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	17
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	18
3. Μέθοδοι.....	19
3.1. Προσδιορισμός ελεύθερου αζώτου αμινοξέων (FAN (free amino nitrogen)):	19
3.2. Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων με χρήση DNS.....	19
3.3. Προσδιορισμός της Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (MIC)- (Minimum Inhibition Concentration)(Stagos et al. 2018)	20
3.4. Προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC) ...	20
3.5. Αξιολόγηση της ικανότητας εξουδετέρωσης των ελεύθερων ρίζων με την δοκιμή DPPH(2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζύλ) (Stagos et al. 2018)	21
3.6. Καλλιέργειες μικροοργανισμών <i>Apilactobacillus kunkeei</i> 530, <i>Bacillus sp.</i> 94, <i>Bacillus licheniformis</i> 108, <i>Zygosaccharomyces siamensis</i> 449.....	22
3.6.1. Μονάδες Σχηματισμού Αποικιών-CFU (colony forming units).....	22
3.6.2. Μέτρηση οπτικής πυκνότητας (OD)-Optical Density	22
3.6.3. Μέτρηση ξηρού βάρους- (DCW)-Dry Cell Weight	23
3.7. Καλλιέργεια μικροοργανισμών σε στερεά υποστρώματα	23
3.8. Διαδικασία καλλιέργειας μικροοργανισμών σε τρυβλίο	24
3.8.1 Χρώση κατά Gram.....	24
3.9. Εμβολιασμός μικροοργανισμών σε υγρή καλλιέργεια	25
3.10. Εμβολιασμός στερεής κατάστασης (solid state fermentation).....	26
3.11. Προετοιμασία ρυθμιστικών διαλυμάτων	28
3.11.1 Δειγματοληψία και ενζυμική ανάλυση	29
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	31
4.1. Ανάπτυξη των μικροοργανισμών βάσει της οπτικής πυκνότητας(OD).....	31
4.2. Μεταβολή του pH κατά την ανάπτυξη της καλλιέργειας	40

4.3. Ενζυμική δραστικότητα γλυκοαμυλάσης και ξυλανάσης σε διαφορετικά υποστρώματα	43
4.4. Ανάλυση αποτελεσμάτων πρωτεολυτικής δραστηριότητας κατά τη ζύμωση (μέθοδος FAN).....	46
4.5. Ανάλυση αποτελεσμάτων δοκιμής αντιοξειδωτικής ικανότητας DPPH...	50
4.6. Αποτελέσματα χρώσης gram:	53
4.7. Αποτελέσματα δράσης MIC, MBC.....	54
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	57
6. ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	61
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:	62

Πίνακας Περιεχομένων Εικόνων:

Εικόνα 1: Γύρη μελισσών (εικόνα από τον ιστότοπο bestbees.com).....	9
Εικόνα 2: Μελισσόψωμο (εικόνα από τον ιστότοπο nordicfoodlab.org)	10
Εικόνα 3& 4 : Gram Θετικά	53
Εικόνα 5 & 6: Gram Αρνητικά	54
Εικόνα 7, 8 & 9: Αποτελέσματα της μεθόδου MBC	55
Εικόνα 10, 11 & 12: Αποτελέσματα MIC μετά από 24ωρη επώαση.....	56

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Τα προϊόντα της κυψέλης

Αρχικά θα γίνει μία αναφορά στα βασικά προϊόντα της κυψέλης και τη σημασία τους για την βιοτεχνολογία και την βιοχημεία. Αυτά είναι το μέλι, το μελισσόψωμο και η γύρη μελισσών.

α) Το μέλι

Το μέλι αποτελεί φυσικό προϊόν που προκύπτει από τη διαδικασία μετατροπής του φυτικού νέκταρος από τις μέλισσες *Apis mellifera*. Η χημική του σύσταση χαρακτηρίζεται κυρίως από μονοσακχαρίτες, με τη φρουκτόζη (περίπου 38%) και τη γλυκόζη (περίπου 31%) να αποτελούν τα επικρατέστερα σάκχαρα, ενώ σε μικρότερες συγκεντρώσεις απαντώνται δισακχαρίτες και ολιγοσακχαρίτες (Bogdanov et al. 2008). Επιπλέον, περιέχει οργανικά οξέα, αμινοξέα, ένζυμα όπως καταλάση και γλυκοξειδάση, βιταμίνες (π.χ. του συμπλέγματος Β και βιταμίνη C), ανόργανα στοιχεία όπως κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο και ψευδάργυρο, καθώς και φυτοχημικές ενώσεις όπως φαινολικά οξέα και φλαβονοειδή (Da Silva et al. 2016).

Η βιολογική του δράση οφείλεται σε συνδυασμό φυσικοχημικών και βιοδραστικών παραγόντων. Η αντιμικροβιακή του αποτελεσματικότητα αποδίδεται στη χαμηλή τιμή pH (3,2–4,5), στην υψηλή ωσμωτικότητα που περιορίζει την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών, αλλά και στην παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου μέσω της ενζυμικής δράσης της γλυκοξειδάσης (Nolan et al. 2019). Σε ορισμένες ποικιλίες μελιού, όπως το Manuka, η παρουσία μεθυλογλυοξάλης ενισχύει περαιτέρω την αντιμικροβιακή δράση (Mandal and Mandal 2011).

Όσον αφορά την αντιφλεγμονώδη δράση, μελέτες δείχνουν ότι το μέλι μπορεί να μειώσει την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών, όπως IL-1β, IL-6 και TNF-α, περιορίζοντας την ιστική φλεγμονή και προάγοντας την επούλωση (Rao et al. 2016). Παράλληλα, η αντιοξειδωτική του ικανότητα σχετίζεται με την παρουσία φαινολικών ενώσεων, όπως καφεϊκό, φερουλικό και γαλλικό οξύ, καθώς και φλαβονοειδών όπως η κερκετίνη, η καμφερόλη και η λουτεολίνη, που δρουν δεσμεύοντας ελεύθερες ρίζες και προστατεύοντας τα λιπίδια από την υπεροξειδωση (Gheldof et al. 2002).

Συνολικά, το μέλι μπορεί να θεωρηθεί λειτουργικό τρόφιμο, δεδομένου ότι συνδυάζει αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ιδιότητες, προσφέροντας έτσι οφέλη τόσο στη διατροφή όσο και σε πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές.

β) Γύρη μελισσών

Η γύρη είναι πολύτιμη για τη διατροφική της αξία, καθώς περιέχει πρωτεΐνες, αμινοξέα, σάκχαρα και λιπαρά οξέα, βιταμίνες και βιοδραστικές ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Συλλέγεται από τις μέλισσες και έχει ενεργά συστατικά, όπως οι πολυφαινόλες, που ενισχύουν τις ευεργετικές τους ιδιότητες (El Ghouizi et al. 2023). Η προσθήκη γύρης στη διατροφή ζώων βελτιώνει την ανάπτυξη και την ανοσία, αποτελώντας εναλλακτική λύση στα



Εικόνα 1: Γύρη μελισσών (εικόνα από τον ιστότοπο bestbees.com)

αντιβιοτικά (Jannesar et al. 2017). Η γύρη χρησιμοποιείται στην μελισσοθεραπεία για διάφορες παθήσεις (Kostić et al. 2020) και αποτελεί βασική πηγή θρεπτικών συστατικών για το μέλισσι, ενώ το απόθεμά της στην κυψέλη κυμαίνεται ανάλογα με τις συνθήκες (Campos et al. 2003).

γ) Το μελισσόψωμο

Το μελισσόψωμο δημιουργείται από τη γύρη που συλλέγουν οι μέλισσες από τα φυτά και την τοποθετούν σε κελιά στην κηρήθρα. Η γύρη αναμειγνύεται με το νέκταρ και μικροοργανισμούς από το σάλιο των μελισσών. Οι μικροοργανισμοί βοηθούν στην ζύμωση της γύρης η οποία αποθηκεύεται στα άδεια κελιά και θα χρησιμοποιηθεί ως τροφή για τον γόνο (Bakour et al. 2022). Οι μέλισσες στην συνέχεια προσθέτουν και μέλι και άλλες εκκρίσεις και πιέζουν και σπρώχνουν τα σφαιρίδια της γύρης βαθιά μέσα στα κελιά, βοηθώντας ακόμη περισσότερο την ζύμωσή τους. Η γύρη θα μετατραπεί σε μελισσόψωμο μια θρεπτική τροφή, που είναι πλούσια σε πρωτεΐνες και άλλα συστατικά (Bakour et al. 2022).

Το μελισσόψωμο θεωρείται ένα προϊόν της μελισσοκομίας με μεγάλη αξία. Τεχνολογικά η παρασκευή του μελισσόψωμου απαιτεί διαδικασίες ζύμωσης και αποθήκευσης της γύρης (URCAN et al. 2017).



Εικόνα 2: μελισσόψωμο (εικόνα από τον ιστότοπο nordicfoodlab.org)

1.2 Διαφορές ανάμεσα στο μέλι και στο μελισσόψωμο

Το μέλι είναι προϊόν που προέρχεται από το νέκταρ των λουλουδιών και αποτελεί γλυκαντικό με κυρίως υδατάνθρακες και αντιμικροβιακές ιδιότητες.

Το μελισσόψωμο είναι η ζυμωμένη γύρη, πλούσια σε πρωτεΐνες, βιταμίνες και βιοδραστικές ουσίες, και θεωρείται πιο πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά με πολλαπλές ευεργετικές δράσεις. (Ilie et al. 2024).

Χαρακτηριστικό	Μέλι	Μελισσόψωμο (Bee Bread)
Προέλευση	Παράγεται από τις μέλισσες που συλλέγουν νέκταρ από λουλούδια και το επεξεργάζονται στα κυψελωτά κελιά.	Προέρχεται από τη ζύμωση και οργανοποίηση της γύρης από τις μέλισσες, που αποθηκεύεται στα κυψελωτά κελιά μαζί με μέλι και ένζυμα.
Σύνθεση	Περιέχει κυρίως υδατάνθρακες (σάκχαρα), νερό, μικρές ποσότητες βιταμινών, ανόργανων στοιχείων και αντιοξειδωτικών.	Περιέχει πρωτεΐνες, βιταμίνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, αντιοξειδωτικά και άλλα βιολογικά ενεργά συστατικά.
Χρησιμότητα / Χρήσεις	Χρησιμοποιείται ως φυσικό γλυκαντικό και φαρμακευτικό προϊόν για τις αντιβακτηριακές, αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές του ιδιότητες.	Πολλές φορές θεωρείται συμπλήρωμα διατροφής, που ενισχύει το ανοσοποιητικό σύστημα και αποδίδεται τουλάχιστον ίση ή μεγαλύτερη βιοδραστικότητα από το μέλι.
Βιοδιαθεσιμότητα και βιοδραστικότητα	Περιέχει αντιβακτηριακές ουσίες, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου, και άλλα φυτικά και χημικά συστατικά.	Έχει πλούσια βιοδραστικά συστατικά, όπως πρωτεΐνες, μέταλλα και αντιοξειδωτικές ουσίες, που ενισχύουν τις ευεργετικές επιδράσεις του.
Διαδικασία παραγωγής	Συλλέγεται από τις μέλισσες ως νέκταρ και υφίσταται αερόβια ζύμωση, εμπλουτισμό με ένζυμα και αφυδάτωση.	Παράγεται από τη ζύμωση της γύρης, που γίνεται φυσικά από την οξείδωση και την επεξεργασία από τις μέλισσες.

Πίνακας 1: διαφορές ανάμεσα σε μέλι και μελισσόψωμο (κείμενο από δημοσιεύσεις(Ilie et al. 2024) και (Sharaf El-Din et al. 2025).

1.2.1.Χημική σύσταση της γύρης

Η γύρη των ανθέων αποτελεί ένα από τα πιο θρεπτικά προϊόντα της φύσης, καθώς περιέχει ένα πλήθος ουσιών που είναι απαραίτητες για την καλή υγεία του οργανισμού. Συγκεκριμένα, περιέχει υψηλής βιολογικής αξίας πρωτεΐνες και αμινοξέα, που αποτελούν τα δομικά στοιχεία των κυττάρων και των ιστών, καθώς και σημαντικά λιπαρά οξέα, όπως τα ωμέγα-3 και ωμέγα-6, τα οποία παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της καρδιαγγειακής υγείας και στην υποστήριξη του ανοσοποιητικού συστήματος. Οι υδατάνθρακες που περιέχει, κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη, παρέχουν άμεση ενέργεια στον οργανισμό, γεγονός που την καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμη για άτομα με αυξημένες ενεργειακές ανάγκες, όπως αθλητές, φοιτητές ή εργαζόμενους σε απαιτητικά περιβάλλοντα.(Aylanc et al. 2023)

Η γύρη είναι επίσης πλούσια σε βιταμίνες, όπως οι βιταμίνες του συμπλέγματος Β, η βιταμίνη C, η βιταμίνη Α και η βιταμίνη Ε, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη διατήρηση της καλής υγείας, την ενίσχυση των αμυντικών μηχανισμών του οργανισμού και τη σωστή λειτουργία των κυττάρων. Παράλληλα, περιέχει σημαντικά ιχνοστοιχεία, όπως σίδηρο, μαγνήσιο, ψευδάργυρο και σελήνιο, τα οποία συμβάλλουν στη ρύθμιση διαφόρων μεταβολικών διεργασιών, στην παραγωγή ενέργειας και στη διατήρηση της υγείας του δέρματος, των μαλλιών και των νυχιών.

Επιπλέον, η γύρη περιέχει φυτοχημικά συστατικά, όπως φλαβονοειδή και τερπένια, που διαθέτουν ισχυρές αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Αυτά τα συστατικά βοηθούν στην προστασία των κυττάρων από τη βλάβη που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες, μειώνουν το οξειδωτικό στρες και συμμετέχουν στην πρόληψη χρόνιων παθήσεων, όπως φλεγμονώδεις νόσοι, καρδιαγγειακά προβλήματα και ορισμένες μορφές καρκίνου (Jannesar et al. 2017)

Συνολικά, η γύρη αποτελεί ένα φυσικό, θρεπτικό και λειτουργικό τρόφιμο που μπορεί να ενσωματωθεί εύκολα στη διατροφή, είτε ως συμπλήρωμα είτε ως συστατικό σε ποτά, smoothies, δημητριακά ή γιαούρτι, προσφέροντας σημαντικά οφέλη για την υγεία. Η ποικιλία των θρεπτικών στοιχείων που περιέχει και οι βιολογικές της ιδιότητες την καθιστούν ένα προϊόν με πολυδιάστατη χρησιμότητα, που μπορεί να υποστηρίξει τόσο την καθημερινή διατροφή όσο και ειδικές ανάγκες υγείας.

1.2.2.Χημική σύσταση του μελισσόψωμου

Χημικά, το μελισσόψωμο περιέχει πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας και απαραίτητα αμινοξέα, τα οποία υποστηρίζουν την ανάπτυξη των κυττάρων και των ιστών του γόνου των μελισσών, καθώς και τη σωστή λειτουργία του μεταβολισμού τους. Επιπλέον, περιέχει σημαντικά λιπίδια, όπως τα ωμέγα-3 και ωμέγα-6, που είναι απαραίτητα για τη νευρική λειτουργία, τη διατήρηση της κυτταρικής μεμβράνης και την παραγωγή ενέργειας (Karlan et al. 2016). Οι υδατάνθρακες, κυρίως γλυκόζη και φρουκτόζη, προσφέρουν άμεση ενέργεια στους αναπτυσσόμενους γόνους και αποτελούν σημαντική πηγή καυσίμου για την καθημερινή δραστηριότητα της κυψέλης. (Bakour et al. 2022)

Επιπλέον, το μελισσόψωμο περιέχει βιταμίνες (όπως οι βιταμίνες του συμπλέγματος Β, η βιταμίνη C, η βιταμίνη Α και η βιταμίνη Ε), μέταλλα και ιχνοστοιχεία, όπως σίδηρο, μαγνήσιο, ψευδάργυρο και σελήνιο, τα οποία ενισχύουν την ανοσολογική άμυνα και συμμετέχουν στη ρύθμιση του μεταβολισμού και της ανάπτυξης των μελισσών. Παράλληλα, τα φλαβονοειδή και τα τερπένια που περιέχει, εκτός από αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές δράσεις, φαίνεται ότι συμβάλλουν και στην πρόληψη οξειδωτικών βλαβών στα κύτταρα του γόνου, διασφαλίζοντας τη σωστή ανάπτυξή του και την υγεία της κυψέλης. (Didaras et al. 2021)

1.2.3.Εξέλιξη των μελισσών και οργάνωση της κυψέλης

Οι μέλισσες εξελικτικά προέκυψαν από σφήκες και διαχωρίστηκαν από αυτές πριν από εκατομμύρια χρόνια, πιθανώς κατά το Μειόκαινο. Δημιούργησαν κοινωνικές δομές και συμπεριφορές που τις κάνουν αποτελεσματικούς επικονιαστές και αποτελούν σημαντικό κρίκο στην οικολογική αλυσίδα (Martinson et al. 2011).

Ακολουθεί η οργάνωση της κυψέλης (Seeley 2010):

Περιοχή	Περιγραφή	Ρόλοι / Λειτουργίες
Περιοχή της Βασίλισσας	Το μέρος όπου ζει και εκκολάπτεται η βασίλισσα.	Υπεύθυνη για την αναπαραγωγή και την εκκόλαψη αυγών.
Περιοχή των Εργατριών	Περιοχές όπου οι εργάτριες συγκεντρώνονται για συλλογή, αποθήκευση και φροντίδα.	Συλλογή γύρης και μελιού, φύλαξη, καθαρισμός, φροντίδα νεαρών, αποθήκευση τροφών.
Περιοχή των Κηφήνων	Ξεχωριστές περιοχές όπου ζουν και αναπαράγονται οι αρσενικοί.	Γονιμοποίηση της βασίλισσας, αποχώρηση μετά την αναπαραγωγική περίοδο.
Οργάνωση και Κατανομή Πληθυσμού	Η διανομή του πληθυσμού δημιουργεί μια ομαλή και αποδοτική λειτουργία της κυψέλης.	Οι μεγαλύτερες σε ηλικία εργάτριες στην περιφέρεια, νεότερες και αυτές με ρόλο αναπαραγωγής πιο κεντρικά.

1.3. Το μικροβίωμα του μελισσόψωμου

Οι έρευνες της Martha Gilliam αποτέλεσαν θεμέλιο για τη μελέτη του μικροβιώματος των μελισσών, καθώς υπήρξε πρωτοπόρος στην απομόνωση και ταυτοποίηση μικροοργανισμών από γύρη και αποθηκευμένο μελισσόψωμο. Στη μελέτη της για τις ζύμες κατέγραψε 113 στελέχη ζυμομυκήτων από γύρη λουλουδιών, γύρη που μετέφεραν οι μέλισσες και μελισσόψωμο μετά από διαφορετικούς χρόνους αποθήκευσης, αναδεικνύοντας τον ρόλο τους στη διαδικασία της ζύμωσης (Gilliam and Bee 1979). Σε επόμενη εργασία της, επικεντρώθηκε στα βακτήρια του γένους *Bacillus*, απομονώνοντας στελέχη όπως *B. subtilis*, *B. megaterium* και *B. licheniformis* από τα ίδια υποστρώματα, τεκμηριώνοντας έτσι την ποικιλοπλοκότητα και τη σημασία τους για τη σταθερότητα του μελισσόψωμου (Gilliam and Bee 1979). Μετά τις πρώτες απομονώσεις ζυμομυκήτων και βακτηρίων του γένους *Bacillus*, η επιστημονική κοινότητα εστίασε περισσότερο στον ρόλο των μικροοργανισμών αυτών στη ζύμωση της γύρης, στη βιοσύνθεση θρεπτικών συστατικών και στην ενίσχυση της άμυνας των μελισσών έναντι παθογόνων. Οι εργασίες αυτές άνοιξαν τον δρόμο για πιο σύγχρονες μοριακές προσεγγίσεις, οι οποίες επιβεβαίωσαν ότι το μικροβίωμα του εντέρου και του μελισσόψωμου συμβάλλει καθοριστικά στη διατροφική υγεία, την ανοσολογική λειτουργία και τη συνολική βιωσιμότητα των αποικιών (Engel et al. 2012; Anderson et al. 2013a). Έτσι, το έργο της Gilliam όχι μόνο έθεσε τις βάσεις για την κατανόηση της μικροβιακής οικολογίας των μελισσών, αλλά εξακολουθεί να αποτελεί σημείο αναφοράς στη μελισσοκομική έρευνα.

Ακόμη, από συγκριτικές μελέτες που έγιναν στο μικροβίωμα το προγονικό και το σύγχρονο φαίνεται να εμφανίζονται διαφορές στις μικροβιακές κοινότητες του εντέρου των μελισσών. Οι ενήλικες εργάτριες μέλισσες φιλοξενούν ένα σταθερό σύνολο βασικών βακτηρίων που αποτελούν τη πλεινότητα του μικροβιώματός τους (Engel et al. 2016). Το μελισσόψωμο σε αντίθεση αποτελεί την κύρια τροφή του γόνου, και φαίνεται να παρουσιάζει ένα αυτόνομο μικροβίωμα με το έντερο της μέλισσας, υποδεικνύοντας ότι το μικροβίωμά του δεν προέρχεται άμεσα από το πεπτικό σύστημα (Saraiva et al. 2015). Βακτηριακά είδη όπως τα *Lactobacillaceae* και *Fructobacillus* διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δομή και την ανάπτυξη του μικροβιώματος (Rokop et al. 2015).

Η πιο χαρακτηριστική ομάδα μικροοργανισμών που συναντάται στο μελισσόψωμο είναι τα γαλακτικά βακτήρια(Asoutis Didaras et al. 2024). Μεταξύ αυτών, το είδος *Apilactobacillus kunkeei* καταγράφεται ως το πλέον αντιπροσωπευτικό. Ο ρόλος του είναι ιδιαίτερα σημαντικός, καθώς εκκρίνει οργανικά οξέα και αντιμικροβιακές ενώσεις, συμβάλλοντας τόσο στη διαδικασία της ζύμωσης όσο και στην προστασία του προϊόντος από παθογόνους μικροοργανισμούς. Σημαντική είναι και η συμβολή του *Fructobacillus fructosus*, το οποίο αξιοποιεί τα σάκχαρα του νέκταρ και της γύρης, δημιουργώντας ένα όξινο περιβάλλον που εμποδίζει την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροβίων. Τα βακτήρια αυτά θεωρούνται κομβικά για την προβιοτική δράση του μελισσόψωμου, καθώς ενισχύουν τη μικροβιακή ισορροπία και προάγουν τη βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας αντιοξειδωτικών ουσιών και πολυφαινολών.

Στο μελισσόψωμο συναντάται και ένα ευρύ φάσμα σπορογόνων βακτηρίων του γένους *Bacillus*. Ανάμεσά τους αναφέρονται είδη όπως τα *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus safensis* και άλλα συγγενικά. Τα βακτήρια αυτά έχουν την ικανότητα να παράγουν ποικιλία ενζύμων, μεταξύ των οποίων πρωτεάσες, αμυλάσες, λιπάσες και κυτταρινάσες. Τα ένζυμα αυτά διευκολύνουν τη διάσπαση των ανθεκτικών τοιχωμάτων των κόκκων γύρης, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση πρωτεϊνών, λιπαρών οξέων και άλλων θρεπτικών στοιχείων. Επιπλέον, αρκετά είδη *Bacillus* είναι σε θέση να συνθέτουν αντιμικροβιακές ουσίες, ενισχύοντας την προστασία του μελισσόψωμου από πιθανές μικροβιακές επιμολύνσεις.(Asoutis Didaras et al. 2024)

Σε μικρότερη αναλογία ανιχνεύονται και άλλοι μικροοργανισμοί, όπως είδη των γενών *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter* και *Sphingomonas*, τα οποία εμφανίζονται κυρίως στα αρχικά στάδια της ζύμωσης και μειώνονται όσο το προϊόν ωριμάζει. Αυτοί οι μικροοργανισμοί φαίνεται να συμμετέχουν συμπληρωματικά στη μετατροπή της γύρης σε μελισσόψωμο, χωρίς όμως να κυριαρχούν στη μικροβιακή κοινότητα του ώριμου προϊόντος.(Asoutis Didaras et al. 2024)

Εκτός από τα βακτήρια, σημαντικό ρόλο κατέχουν και οι ζύμες. Στα πρώτα στάδια της ζύμωσης, είδη όπως η *Hanseniaspora unvarum* συμβάλλουν στη διάσπαση σακχάρων και στην παραγωγή αρωματικών ουσιών, ενώ στο ώριμο μελισσόψωμο επικρατεί κυρίως το *Zygosaccharomyces siamensis*, μια ζύμη με μεγάλη ανθεκτικότητα στις όξινες και υψηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα συνθήκες. Άλλοι μύκητες που έχουν καταγραφεί, όπως οι *Cladosporium*, *Aspergillus* και *Starmerella* (*Candida*), εμφανίζονται σε μικρότερες ποσότητες και διαφοροποιούνται ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης. Οι ζύμες συμβάλλουν στη ζύμωση, στην αύξηση της θρεπτικής αξίας και στην παραγωγή ουσιών με αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση.(Asoutis Didaras et al. 2024)

Η συνεργιστική παρουσία όλων αυτών των μικροοργανισμών καθιστά το μελισσόψωμο μοναδικό. Τα γαλακτικά βακτήρια και τα *Bacillus* δημιουργούν ένα ασφαλές, όξινο και σταθερό μικροβιακό περιβάλλον, πλούσιο σε ένζυμα και μεταβολίτες που ενισχύουν τη διατροφική αξία και προστατεύουν από παθογόνα. Οι ζύμες προσφέρουν πρόσθετη υποστήριξη στη διαδικασία ζύμωσης και εμπλουτίζουν το προϊόν με νέα βιοδραστικά μόρια. Συνολικά, το μικροβίωμα του μελισσόψωμου διαμορφώνει τις μοναδικές ιδιότητές του, συμβάλλοντας τόσο στη διατήρηση της υγείας της μέλισσας όσο και στη δυνατότητα αξιοποίησής του ως λειτουργικό τρόφιμο για τον άνθρωπο.(Asoutis Didaras et al. 2024)

1.4.Βιοδραστικότητα και ιδιότητες

Η γύρη και το μελισσόψωμο έχουν σημαντικές βιοδραστικές ιδιότητες. Διαθέτουν αντιοξειδωτικές ουσίες , όπως φλαβονοειδή και φαινολικά, αλλά έχουν βρεθεί και

αντιβακτηριακές ουσίες , όπως κερκετίνη, καμπφερόλη, που δείχνουν να καταστέλλουν τα παθογόνα και προκαλούν μείωση της φλεγμονής (Bakour et al. 2022). Πολλές διεθνείς μελέτες και κλινικές δοκιμές επιβεβαιώνουν τις θεραπευτικές τους εφαρμογές σε χρόνια φλεγμονώδη νοσήματα, το ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς και σε ηπατικές και καρδιαγγειακές καταστάσεις (Bakour et al. 2022).

1.5.Παραδοσιακές χρήσεις και φαρμακευτικές εφαρμογές

Στην Ελλάδα και στην Ανατολική Ευρώπη, το μελισσόψωμο παραδοσιακά χρησιμοποιείται ως φυσικό τονωτικό και ανοσοδιαμορφωτικό προϊόν . Επιπλέον, λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του, θεωρείται φυσικό αντιβιοτικό και χρησιμοποιείται σε αλοιφές και εκχυλίσματα για τη θεραπεία τραυμάτων, αφθών και αλλεργικών δερματικών αντιδράσεων(Mărgăoan et al. 2019).

1.6.Τι το κάνει πολύτιμο λειτουργικό τρόφιμο;

Το μελισσόψωμο θεωρείται σήμερα ένα από τα πλέον σημαντικά λειτουργικά τρόφιμα, καθώς συνδυάζει υψηλή θρεπτική αξία με βιοδραστικές ιδιότητες. Η πλούσια σύστασή του περιλαμβάνει φαινολικές ενώσεις και φλαβονοειδή με ισχυρή αντιοξειδωτική δράση, καθώς και απαραίτητα λιπαρά οξέα και βιταμίνες που συμβάλλουν στη συνολική θρεπτική του αξία (Mărgăoan et al. 2019). Παράλληλα, η παραδοσιακή γνώση και οι σύγχρονες επιστημονικές μελέτες αναδεικνύουν τις αντιμικροβιακές, αντιφλεγμονώδεις και ανοσορρυθμιστικές του ιδιότητες, γεγονός που το καθιστά ιδιαίτερα ελκυστικό ως φυσικό «οπλοστάσιο υγείας» (Komosinska-Vassev et al. 2015; Kieliszek et al. 2018).

Πέρα από τη χημική του σύνθεση, καθοριστικό ρόλο για τις ιδιότητές του παίζει και η διαδικασία της ζύμωσης, κατά την οποία μικροοργανισμοί του μελισσοκομικού μικροβιώματος παράγουν οργανικά οξέα και ένζυμα που αυξάνουν τη βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών. Τα γαλακτικά βακτήρια, όπως το *Apilactobacillus kunkeei* και το *Fructobacillus fructosus*, δημιουργούν όξινο περιβάλλον και εκκρίνουν αντιμικροβιακές ενώσεις, προστατεύοντας το μελισσόψωμο από αλλοίωση και προσδίδοντάς του προβιοτικές ιδιότητες (Anderson et al. 2013b; Disayathanoowat et al. 2020). Παράλληλα, τα σπορογόνα βακτήρια του γένους *Bacillus* παράγουν ένζυμα που διασπούν τα ανθεκτικά τοιχώματα της γύρης, απελευθερώνοντας πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα και πολυσακχαρίτες (Anjum et al. 2019).

Η συνεργιστική δράση των μικροοργανισμών αυτών εξηγεί την ιδιαίτερη βιοδραστικότητα του μελισσόψωμου. Οι πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή που απελευθερώνονται κατά τη ζύμωση λειτουργούν ως ισχυρά αντιοξειδωτικά, προστατεύοντας από το οξειδωτικό στρες και μειώνοντας τον κίνδυνο εμφάνισης χρόνιων νοσημάτων (Pasupuleti et al. 2017). Η αντιφλεγμονώδης δράση του έχει συσχετιστεί με πιθανές εφαρμογές στην αντιμετώπιση παθήσεων που σχετίζονται με τη χρόνια φλεγμονή, όπως καρδιαγγειακά νοσήματα και μεταβολικό σύνδρομο (Jaya et al. 2020). Επιπλέον, η αντιμικροβιακή του δράση, που προκύπτει τόσο από τα φαινολικά συστατικά όσο και από τα οργανικά οξέα, καθιστά το μελισσόψωμο υποψήφιο για χρήση ως φυσικό συντηρητικό σε τρόφιμα ή ως συμπλήρωμα για την πρόληψη λοιμώξεων(Mohammad et al. 2020).

Η πολύπλευρη δράση του μελισσόψωμου το καθιστά πρότυπο λειτουργικού τροφίμου. Δεν περιορίζεται απλώς στην κάλυψη βασικών διατροφικών αναγκών, αλλά συνεισφέρει ενεργά στην προαγωγή της υγείας και στην πρόληψη παθήσεων. Η συνεχώς αυξανόμενη ερευνητική δραστηριότητα γύρω από το μελισσόψωμο δείχνει ότι η μελλοντική αξιοποίησή του μπορεί να επεκταθεί τόσο στον χώρο της ανθρώπινης διατροφής και της φαρμακολογίας όσο και στη

μελισσοκομία, συμβάλλοντας στην προστασία της υγείας των μελισσών και στη βιωσιμότητα της παραγωγής.

1.7.Δυσκολίες στην εξαγωγή του Μελισσόψωμου

Η συλλογή και εμπορία του μελισσόψωμου παρουσιάζουν πολλές τεχνικές και νομικές δυσκολίες. Για να εξαχθεί το μελισσόψωμο απαιτεί μεγάλη προσοχή, γιατί η συλλογή και από τα κελιά είναι χρονοβόρα και ο εξοπλισμός που χρειάζεται είναι πολύ συγκεκριμένος. Λόγω της ευαισθησίας του μελισσόψωμου για να διατηρηθεί η ποιότητα και η τυποποίηση ,απαιτούνται συγκεκριμένες συνθήκες αποθήκευσης και μεταφοράς. Επίσης βασικό παράγοντα που δυσκολεύει την διάθεσή τους στις διάφορες χώρες είναι οι κανονισμοί που ισχύουν και τα πρότυπα ποιότητας και πιστοποίησης της οργανικής ύλης. Αυτό μπορεί να περιορίσει την αξία και τις εξαγωγικές δυνατότητες του προϊόντος (Bose and Padmavati 2024).

1.8. Ζύμωση στερεής κατάστασης

Η ζύμωση στερεής κατάστασης (SSF) αποτελεί μια τεχνολογία βιομετατροπής, που περιλαμβάνει την ανάπτυξη μικροοργανισμών πάνω σε στερεά υποστρώματα με χαμηλή υγρασία (Soccol et al. 2017). Η προσέγγιση της SSF προσομοιάζει με τις φυσικές διεργασίες αποσύνθεσης οργανικών υλικών που συμβαίνουν στο περιβάλλον, και χαρακτηρίζεται από την αποτελεσματική αξιοποίηση τοπικών και φθηνών αγροτικών αποβλήτων. Η τεχνολογία αυτή έχει κεντρικό ρόλο στην παραγωγή διαφόρων βιολογικών προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων ενζύμων όπως αμυλάσες, πρωτεάσες και λιπάσες, οργανικών οξέων και δευτερογενών μεταβολιτών.

Η επιλογή του μικροοργανισμού , η μορφή και η σύσταση των υποστρωμάτων, η θερμοκρασία το pH και το μέγεθος των σωματιδίων επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της SSF (Soccol et al. 2017). Η εξέλιξη των SSF αναμένεται να επηρεάσει την εφαρμογή αυτής της τεχνολογίας σε ευρεία κλίμακα.

1.9. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση του ελληνικού μελισσόψωμου, δηλαδή ενός φυσικά ζυμωμένου προϊόντος υψηλής βιολογικής αξίας που δημιουργείται από τη ζύμωση της γύρης, με τη βοήθεια μικροοργανισμών, μέσα στα κελιά της κηρήθρας. Μέσα στο πλαίσιο της πειραματικής έρευνας, πραγματοποιήθηκε σύγκριση του μελισσόψωμου με άλλα ζυμωμένα προϊόντα φυτικής προέλευσης (γύρη, σόγια, ηλίανθος) προκειμένου να αναδειχθούν ομοιότητες και διαφορές στη θρεπτική του σύσταση και στο όφελος για τους ζώντες οργανισμούς (λειτουργικό τρόφιμο, ζωοτροφή). Παράλληλα, μελετήθηκε η βιοδραστικότητα των ενζύμων που απελευθερώνονται από τους μικροοργανισμούς του μικροβιώματος της μέλισσας κατά την διαδικασία της ζύμωσης των υποστρωμάτων (γύρη, σόγια, ηλίανθος). Η ενζυμική δραστηριότητα είναι σημαντική καθώς τα ένζυμα αυτά δεν συμβάλλουν μόνο στην βιομετατροπή αλλά και στη δημιουργία προϊόντων με ισχυρή θρεπτική αξία, τα οποία μπορούν να προσφέρουν εφαρμογές τόσο στον τομέα της διατροφής όσο και στον τομέα της βιοτεχνολογίας (βιομηχανία τροφίμων, προβιοτικά προϊόντα, φαρμακευτικές και κοσμετολογικές εφαρμογές) προσφέροντας νέες προοπτικές για την παραγωγή φυσικών προϊόντων.

Έτσι, ολοκληρώνοντας αυτή την προσέγγιση, η πτυχιακή εργασία αποσκοπούσε στο να εμπλουτίσει τη γνώση γύρω από το ελληνικό μελισσόψωμο, στο να αναδείξει την αξία των ζυμωμένων προϊόντων με πολλές δυνατότητες εφαρμογής και στο να αναδείξει τον ρόλο του μικροβιώματος της μέλισσας.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Εργαλεία

- Μικροβιολογικός κρίκος
- Μεταλλικό τρίγωνο επίστρωσης(spreader)
- Ογκομετρικός κύλινδρος
- Φλόγιστρο Bunsen
- Γυάλινα ποτήρια ζέσεως
- Κωνικές φιάλες
- Θερμόμετρο
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Duran
- Microplate replicator
- Πιπέτες των 2-20ml, 20-200ml, 100-1000ml

Αναλώσιμα υλικά

- Tips πιπετών διαφόρων μεγεθών
- Eppendorf 1,5ml , 2ml
- Falcon 15ml, 50ml
- Τρυβλία petri στρογγυλά και τετράγωνα
- Αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες
- Αποστειρωμένα φίλτρα σύριγγας 0.45μm Branchia
- Κυψελίδες
- Πλάκες καλλιέργειας 96 θέσεων(96 well plate)

Μηχάνηματα

- Υδατόλουτρο(waterbath)
- Φωτόμετρο Colo LabExperts (MAVRICA-VEG Educational VIS Spectrophotometer)
- 96 well plate
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας
- Κλίβανος επώασης με δυνατότητα ανάδευσης
- Κλίβανος επώασης χωρίς ανάδευση
- Vortex

- Μικροσκόπιο Wilovert 30 hund Wetzlar
- Φυγόκεντρος για Eppendorf 5424Θάλαμος Κάθετης Νηματικής Ροής Bioair Instruments
- Πεχάμετρο HI98103 Checker from HANNA Instruments with HI1270 pH electrode
- Γκαζάκι

3. Μέθοδοι

3.1. Προσδιορισμός ελεύθερου αζώτου αμινοξέων (FAN (free amino nitrogen)):

Η μέθοδος προσδιορισμού ελεύθερου αζώτου αμινοξέων χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των ελεύθερων αμινομάδων κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Lie 1973). Το άζωτο που υπάρχει διαθέσιμο είναι απαραίτητο θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη μικροοργανισμών στη ζύμωση. Η μεταβολή των επιπέδων FAN στις διαφορετικές μέρες της ζύμωσης σχετίζεται με την ικανότητα των μικροοργανισμών να διασπούν τα πρωτεϊνικά συστατικά και να εμπλουτίζουν το υπόστρωμα (γύρη, σόγια, ηλίανθος) με βιοδιαθέσιμα αμινοξέα, τα οποία είναι πολύ σημαντικά στη διατροφή των μελισσών. Στηρίζεται στη χημική αντίδραση των ελεύθερων αμινομάδων με το αντιδραστήριο της νινυδρίνης, έχοντας ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας έγχρωμης ένωσης. Είναι μία φωτομετρική μέθοδος και μετριέται σε μήκος κύματος 570nm και είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των αμινομάδων στο δείγμα.

Η διαδικασία της μεθόδου έχει ως εξής:

- Λαμβάνεται δείγμα και γίνονται οι κατάλληλες αραιώσεις σε δοκιμαστικούς σωλήνες και ανάδευση με vortex.
- Λαμβάνεται 1mL αραιωμένου δείγματος και προστίθενται 0.5mL χρωμογόνο αντιδραστήριο(color reagent) και αναδεύεται με vortex.
- Θέρμανση σε υδατόλουτρο (100 βαθμοί κελσίου), αυστηρώς για 16 λεπτά και στη πορεία ψύχονται σε παγωμένο νερό για 20 λεπτά. Στο παγόλουτρο προστίθενται 2.5mL dilution reagent και ανάδευση με vortex για 20 δευτερόλεπτα.
- Φωτομέτρηση στα 570nm μηδενισμός με το blank το οποίο είναι 1mL απιονισμένο νερό. Η σύγκριση των δειγμάτων γίνεται με καμπύλη βαθμονόμησης της γλυκίνης (0.2 – 2 mg/L FAN).

3.2. Προσδιορισμός αναγωγικών σακχάρων με χρήση DNS

Η μέθοδος προσδιορισμού αναγωγικών σακχάρων (γλυκόζη, ξυλόζη) είναι μία χρωματομετρική μέθοδος που βασίζεται στη χημική αντίδραση των αναγωγικών σακχάρων με το 3,5,-Δινιτροσαλκυλικό οξύ(DNS). Αυτά περιέχουν ελεύθερες αλδευδικές ή κετονικές ομάδες που έχουν την δυνατότητα να ανάγουν ενώσεις, όπως το DNS (Detns et al.). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε με σκοπό τη διεύρυνση της ικανότητας μικροβιακών στελεχών που απομονώθηκαν από μελισσόψωμο να καταναλώνουν αναγωγικά σάκχαρα κατά τη ζύμωση γύρης και μελισσοτροφών. Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παρατηρήθηκε ότι τα μικροβιακά στελέχη μεταβολίζουν σάκχαρα όπως γλυκόζη, ξυλόζη και αμινοξέα, τα οποία αποτελούν κύρια πηγή ενέργειας για την ανάπτυξή τους. Ο προσδιορισμός των σακχάρων έγινε

σε διαφορετικά χρονικά σημεία (μέρες) έτσι ώστε να παρατηρείται η κατανάλωση από τους μικροοργανισμούς.

Η μέθοδος έχει ως εξής:

- Πραγματοποιούνται οι κατάλληλες αραιώσεις (στα 500μL) σε δοκιμαστικούς σωλήνες, προστίθενται 0.5ml διάλυμα DNS και γίνεται ανάδευση με vortex.
- Μεταφέρονται οι δοκιμαστικοί σωλήνες σε βραστό νερό για 5 λεπτά και μόλις ολοκληρωθούν τα 5 λεπτά, μπαίνουν σε παγόλουτρο προσθέτοντας απευθείας 5mL νερό.
- Φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 540nm μηδενίζοντας με απιονισμένο νερό. Η σύγκριση των δειγμάτων γίνεται με καμπύλη βαθμονόμησης της γλυκόζης και της ξυλόζης (0.1- 10 g/L DNS).

3.3. Προσδιορισμός της Ελάχιστης Ανασταλτικής Συγκέντρωσης (MIC)- (Minimum Inhibition Concentration)(Stagos et al. 2018)

Η μέθοδος βασίζεται στη χρήση διαδοχικών αραιώσεων γύρης, σόγιας, ηλίανθου για την εύρεση της ελάχιστης αραιώσης να μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη των βακτηρίων.

Ο προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) των εξεταζόμενων υποστρωμάτων πραγματοποιήθηκε σε στείρες πλάκες μικροτιτλοδότησης πολυστυρενίου 96 θέσεων(Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Γερμανία), χρησιμοποιώντας φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό.

Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε φρέσκια βακτηριακή καλλιέργεια *S.aureus* η οποία επώαστηκε περίπου 18 ώρες στους 37 βαθμούς κελσίου σε συγκεκριμένο θρεπτικό ζωμό Mueller-Hinton(NEOGEN, Heywood, UK). Προσαρμόστηκαν σε 0,5 McFarland (~1,5x10⁸ CFU/mL). Αραιώθηκε σε αναλογία 1:10 ώστε η απορρόφηση να είναι περίπου 0,13 και έπειτα πραγματοποιήθηκε αραιώση πάλι 1:10. Προστέθηκαν σε κάθε πηγαδάκι 10μL παθογόνο και 90 μL θρεπτικό ζωμό Mueller-Hinton (NEOGEN, Heywood, UK) και 100μL φιλτραρισμένο δείγμα(γύρη, σόγια, ηλίανθο) από κάθε αραιώση που είχε δημιουργηθεί. Τα φρεάτια αρνητικού μάρτυρα περιείχαν 100μL θρεπτικό ζωμό Mueller-Hinton(NEOGEN, Heywood, UK) και 100μL από τις αραιώσεις των υποστρωμάτων. Τα φρεάτια θετικού μάρτυρα περιείχαν θρεπτικό ζωμό Mueller-Hinton(NEOGEN, Heywood, UK) 190μL εμβολιασμένο με 10μL βακτήρια.

Η οπτική πυκνότητα(OD) προσδιορίστηκε στα 630nm χρησιμοποιώντας τη συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκων EL x808 Absorbance (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) ακριβώς πριν από την επώαση στο t=0 και ύστερα από 24 ώρες επώασης στους 37 βαθμούς κελσίου στο t=24. Ο υπολογισμός γίνεται αφαιρώντας την OD 24 ωρών του αρνητικού μάρτυρα από την OD του αντίστοιχου πηγαδιού ίδιας αραιώσης του δείγματος που περιέχει τα βακτήρια σε t=24.

Η αναστολή ανάπτυξης από κάθε αραιώση προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας τον τύπο: **% αναστολή = 1 (OD φρεατίου δοκιμής δείγματος- OD του αντίστοιχου αρνητικού φρεατίου) x100**. Η τιμή MIC προσδιορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση που έχει ως αποτέλεσμα 100% αναστολή βακτηριακής ανάπτυξης.

3.4. Προσδιορισμός της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC)

Η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση των υποστρωμάτων γύρης, σόγιας, ηλίανθου που θα μπορούσε να σκοτώσει τα παθογόνα βακτήρια. Η MBC προσδιορίστηκε με μεταφορά μικρής ποσότητας δείγματος που περιέχεται στα φρεάτια των πλακών μικροτιτλοδότησης με τη χρήση replicator, σε τετράγωνα αποστειρωμένα τρυβλία

που περιέχουν αποστειρωμένο άγαρ Mueller Hinton (NEOGEN, Heywood, UK). Οι πλάκες επωάστηκαν στους 37 βαθμούς κελσίου για 24 ώρες. Η τιμή MBC προσδιορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία δεν παρατηρούνται αναπτυγμένες αποικίες. (Asoutis Didaras et al. 2024)

3.5. Αξιολόγηση της ικανότητας εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών με την δοκιμή DPPH(2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζύλ) (Stagos et al. 2018)

Αραιώσεις δείγματος

Η δραστηριότητα των υποστρωμάτων γύρης, σόγιας και ηλίανθου αξιολογήθηκε με αυτό τον τρόπο:

- Αρχικά, ζυγίστηκαν 0,0095g σκόνης DPPH (Sigma Aldrich) και τη διέλυσαν σε 11,78mL μεθανόλης (Riedel-de Haen) προκειμένου να φτιαχτεί το διάλυμα οξειδωτικής ρίζας DPPH και να είναι φρέσκο για τις μετρήσεις. Για τη δοκιμή, πραγματοποιήθηκαν σε πρώτο βήμα διαδοχικές αραιώσεις (υποδιπλάσιες) των υποστρωμάτων σε καθαρή μεθανόλη. Δηλαδή, από το εκχύλισμα (zero) απομονώθηκαν 500 μL δείγμα και διαλύθηκαν σε 500μL μεθανόλη.
- Ανάδευση με vortex και από την συγκεκριμένη αραιώση απομονώνονται 500 μL και διαλύονται σε 500μL μεθανόλη (3^η αραιώση). Έτσι προκύπτουν οι υποδιπλάσιες αραιώσεις και πραγματοποιήθηκε το ίδιο συνολικά για 6 αραιώσεις, κοκ.

Αναγωγή της ρίζας DPPH

Για κάθε αραιώση γίνονται στον ίδιο χρόνο τρεις δοκιμές. Σε καθένα από τα 3 erpendorf των 1.5mL τοποθετούμε 900 μL καθαρή μεθανόλη, 50 μL από την αραιώση του δείγματος και 50μL από το πρόσφατα παρασκευασμένο μεθανολικό διάλυμα ρίζας DPPH.

Χρώμα δείγματος

Για κάθε αραιώση του δείγματος γίνονται στον ίδιο χρόνο δύο δοκιμές. Σε καθένα από τα 2 erpendorf τοποθετούνται 950μL καθαρή μεθανόλη και 50 μL από την αραιώση του δείγματος. Η απορρόφηση του χρώματος αφαιρείται από την αντίστοιχη απορρόφηση κατά την εξουδετέρωση της ρίζας.

Control

Φτιάχνουμε τρία erpendorf που το καθένα περιέχει 950μL καθαρή μεθανόλη και 50 μL από το διάλυμα DPPH.

Blank

Φτιάχνουμε 2 erpendorf που το καθένα περιέχει 1mL καθαρή μεθανόλη.

Επώαση

Όλα τα erpendorf αναμίχθηκαν έντονα με vortex και επωάζονται για 20 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Φωτομέτρηση

Η διαδικασία της φωτομέτρησης γίνεται σε OD: 517nm. Το φωτόμετρο μηδενίζεται με την καθαρή μεθανόλη. Το ποσοστό εξουδετέρωσης της οξειδωτικής ρίζας σε κάθε αραιώση υπολογίζεται από τη σχέση: $RSC(\%) = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$. Όπου RSC(%) είναι: the percentage of radical scavenging capacity (το ποσοστό της ικανότητας απομάκρυνσης ριζών). Επιπλέον, προκειμένου να συγκριθεί η αποτελεσματικότητα εξουδετέρωσης ριζών των

δειγμάτων, η τιμή IC₅₀ που δείχνει τη συγκέντρωση που προκάλεσε εξουδετέρωση 50% της ρίζας DPPH υπολογίστηκε από τη γραφική παράσταση του ποσοστού της RSC έναντι της συγκέντρωσης του δείγματος. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν 3 φορές σε 2 διαφορετικές χρονικές στιγμές.

3.6. Καλλιέργειες μικροοργανισμών *Apilactobacillus kunkeei* 530, *Bacillus sp.* 94, *Bacillus licheniformis* 108, *Zygosaccharomyces siamensis* 449

Τα μικροβιακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, απομονώθηκαν από το μελισσόψωμο στα πλαίσια της διδακτορικής διατριβής του κ. Ασουτή-Διδάρα Νικόλαου. (Διδακτορική διατριβή 2023: Διερεύνηση της βιοδραστικότητας και του μικροβιώματος του ελληνικού μελλισσόψωμου)

3.6.1. Μονάδες Σχηματισμού Αποικιών-CFU (colony forming units)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για να μετρήσουμε βιώσιμα κύτταρα που μπορούν να σχηματίσουν αποικίες σε πλάκα. Από την καλλιέργεια λαμβάνεται 1mL υγρό και γίνονται δεκαδικές αραιώσεις με διάλυμα ringer 0,9% NaCl διαλυμένο σε νερό μέχρι 10⁸ ή και 10⁹. Η διαδικασία έχει ως εξής:

- Λαμβάνεται 1mL από το δείγμα και προστίθενται 9mL διάλυμα ringer (αυτή είναι η πρώτη αραιώση). Από την ήδη υπάρχουσα αραιώση λαμβάνεται 1mL και το διαλύεται ξανά σε 9mL διαλύματος ringer κι έτσι προκύπτει η δεύτερη αραιώση.
- Πραγματοποιείται η ίδια διαδικασία μέχρι να γίνουν 9 αραιώσεις.
- Λαμβάνονται 200 μL έπειτα από καλή ανάδευση (vortex), τοποθετούνται στο τρυβλίο και τα επιστρώνονται με το τρίγωνο (το οποίο βρίσκεται μέσα στην αιθανόλη) αφού πρώτα έχει περάσει από την φλόγα για να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις.
- Επιστρώθηκαν οι αραιώσεις 8,6,4 και 3 με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε. Οι *Bacillus sp.* 94, *Bacillus licheniformis* 108 επώστηκαν για 24 ώρες στους 36 βαθμούς ενώ ο *Apilactobacillus kunkeei* 530 για 1 εβδομάδα στους 36 βαθμούς και ο *Zygosaccharomyces siamensis* 449 για 48 ώρες στους 28 βαθμούς και ύστερα μετρήθηκαν οι αποικίες τους.

Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά θρεπτικά στα τρυβλία:

- για τους *Bacillus sp.* 94, *Bacillus licheniformis* 108 και *Apilactobacillus kunkeei* 530 PCA Agar
- για τη *Zygosaccharomyces siamensis* 449 PDA Agar.

3.6.2. Μέτρηση οπτικής πυκνότητας (OD)-Optical Density

Η οπτική πυκνότητα είναι ένας σημαντικός δείκτης θολερότητας ανάλογος της μικροβιακής ανάπτυξης. Είναι μία χρησιμοποιούμενη μεταβλητή στις καμπύλες ανάπτυξης (λανθάνουσα, εκθετική, στατική, φάση θανάτου) για την έκφραση της ανάπτυξης της μικροβιακής καλλιέργειας. Δείχνει γραμμική σχέση με τη βακτηριακή συγκέντρωση μόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις καθώς σύμφωνα με τον νόμο Beer-Lambert οι κατάλληλες ενδείξεις στο φωτόμετρο ότι υπάρχει ανάπτυξη είναι 0,2-0,8 (αραιώση 1:4). Όταν η κυτταρική πυκνότητα είναι υψηλή, η σχέση χάνει τη γραμμικότητα της και απαιτείται αραιώση για να ληφθούν μετρήσεις με υψηλότερη ακρίβεια. Στην περίπτωση που το φωτόμετρο δείξει πάνω από 1,2 πρέπει να γίνει αραιώση 1:10 και στην περίπτωση που το φωτόμετρο δείξει πάνω από 1,8, η αραιώση που πρέπει να γίνει είναι 1:20. Οτιδήποτε απορρόφηση και να πάρω πρέπει να πολλαπλασιάσω με αυτό που αραιώσα (πχ 10) για να δω την πραγματική τιμή. Εφαρμόζουμε

το δείγμα σε μία κυψελίδα και μηδενίζοντας με απιονισμένο νερό, φωτομετρούμε σε μήκος κύματος 660nm.

3.6.3. Μέτρηση ξηρού βάρους- (DCW)-Dry Cell Weight

Είναι ένα μέτρο της συγκέντρωσης των μικροοργανισμών σε έναν βιοαντιδραστήρα, δηλαδή το πόση μάζα μικροοργανισμών έχουμε φτιάξει. Το ξηρό βάρος λαμβάνεται με φυγοκέντρωση.

Η διαδικασία είναι ως εξής:

- σε ένα προζυγισμένο erpendorf που περιέχεται η καλλιέργεια του μικροοργανισμού γίνεται φυγοκέντρωση, απορρίπτεται το υπερκείμενο και στο ίζημα που απομένει προστίθενται 1ml νερό, αναδεύεται, ξανά φυγοκεντρείτε και απορρίπτεται το υπερκείμενο.
- Στη συνέχεια, ξανά προστίθεται 1ml νερό στο ίζημα, αναδεύεται και ξανά φυγοκεντρείτε απορρίπτοντας το υπερκείμενο. Έπειτα, προστίθεται 0,5ml ακετόνη στο ίζημα, αναδεύεται, φυγοκεντρείται και απορρίπτεται το υπερκείμενο. Το ίζημα που απομένει, μεταφέρεται στο φούρνο για 24 ώρες.
- Αφού παρέλθουν οι 24 ώρες, μεταφέρεται στο discator για να απομακρυνθεί η υγρασία και μετά ζυγίζεται για να φανεί η διαφορά.

3.7. Καλλιέργεια μικροοργανισμών σε στερεά υποστρώματα

Επιλέχθηκαν οι μικροοργανισμοί που θα χρησιμοποιηθούν : *Bacillus sp.* 94, *Bacillus licheniformis* 108, *Zygosaccharomyces siamensis* 449, *Apilactobacillus kunkeei* 530 και κατασκευάστηκαν τα κατάλληλα θρεπτικά για τους συγκεκριμένους μικροοργανισμούς. Για τα βακτήρια *Bacillus licheniformis* 108, *Bacillus sp.* 94 και *Apilactobacillus kunkeei* 530 χρησιμοποιήθηκε το Plate Count Agar (PCA) 23.5g/l (Neogen, Heywood, UK) το οποίο περιέχει

- Enzymatic Digest of casein 5g/l
- Yeast Extract 2.5g/l
- Dextrose(glucose) 1.0g/l
- Agar 15.0g/l

Αντίστοιχα, για τη ζύμη *Zygosaccharomyces siamensis* 449 χρησιμοποιήθηκε το PDA Agar 24gr/l (Biolab Diagnostics Laboratory Inc.) το οποίο περιέχει

- Potato Extract 4g/l
- Dextrose 20g/l
- pH 5.1
- Agar 15g/l

Και επιπλέον προστέθηκαν 5gr Bacteriological Agar(Biolife Italiana srl).

Από το PCA Agar(Neogen, Heywood, UK) φτιάχτηκαν 500mL. Είναι 23,5 στα 1000mL άρα στα 500mL είναι 11,75g σκόνη PCA Agar διαλυμένη σε 500mL απιονισμένο νερό. Από το PDA Agar(Biolab Diagnostics Laboratory Inc.) φτιάχτηκαν επίσης 250mL. Είναι 24g στα 1000mL άρα στα 250mL είναι 6g σκόνη PDA(Biolab Diagnostics Laboratory Inc.) και 5g σκόνη Agar διαλυμένη σε 250mL νερό.

3.8. Διαδικασία καλλιέργειας μικροοργανισμών σε τρυβλίο

Αφού παρασκευάστηκαν τα θρεπτικά, αποστειρώθηκαν και όταν ολοκληρώθηκε η αποστείρωση τοποθετήθηκαν αυτά μαζί με τα αποστειρωμένα τρυβλία στο laminar flow, αυστηρώς για 20 λεπτά, προκειμένου να καταστραφούν πιθανοί μικροοργανισμοί. Μετά το πέρας των 20 λεπτών και την αποστείρωση των χεριών, φτιάχτηκαν τα τρυβλία, έτοιμα για την καλλιέργεια των μικροοργανισμών. Σε αποστειρωμένο περιβάλλον είτε σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής είτε σε αναμμένο γκαζάκι με αποστειρωμένες οδοντογλυφίδες ή κρίκο γίνεται λήψη μιας αποικίας από το παλαιότερο τρυβλίο και επανασπορά στο νέο τρυβλίο είτε με streaking για απομόνωση αποικιών και έλεγχο επιμόλυνσης είτε με απλή επάλειψη για γενική ανάπτυξη. Γίνεται επώαση των *Bacillus sp.* 94, *Bacillus licheniformis* 108 στους 36 βαθμούς κελσίου για 24 ώρες, του *Apilactobacillus kunkeei* 530 στους 36 βαθμούς κελσίου για 7 μέρες και του *Zygosaccharomyces siamensis* 449 στους 28 βαθμούς για 48 ώρες. Μόλις αναπτυχθεί η πρώτη καλλιέργεια, γίνεται επανακαλλιέργεια σε άλλο τρυβλίο για περισσότερη ασφάλεια.

3.8.1 Χρώση κατά Gram

Η χρώση κατά Gram αποτελεί μία από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους στη μικροβιολογία για τη μελέτη των βακτηρίων. Εφευρέθηκε από τον Δανό μικροβιολόγο Hans Christian Gram και από τότε χρησιμοποιείται στα εργαστήρια για την ταξινόμηση και την ταυτοποίηση των βακτηρίων. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει το διαχωρισμό των βακτηρίων σε 2 ομάδες: τα Gram θετικά (Gram+) και τα Gram αρνητικά (Gram -).

Για την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιούνται 4 διαλύματα:

- 1) Κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet)(Merck)- χρωματίζει όλα τα βακτήρια μωβ.
- 2) Διάλυμα ιωδίνης (Lugol)(Heremco) - λειτουργεί ως στερεωτικό(παγιδεύει το χρώμα του κρυσταλλικού ιώδες μέσα στα κύτταρα, στο εσωτερικό του βακτηρίου).
- 3) Αλκοόλη ή αιθανόλη 95%(Mek.Pure Panreac)- αποχρωματίζει
- 4) Σαφρανίνη(Merck)-δευτερογενές χρώμα, βάφει ροζ τα βακτήρια που έχασαν το αρχικό μωβ χρώμα.

Η διαδικασία χρώσης των μικροοργανισμών είναι η εξής:

- Προετοιμάζονται τα δείγματα δημιουργώντας επιχρίσματα, είτε μεμονωμένα είτε σε μείγμα και απλώνονται πάνω σε αντικειμενοφόρους πλάκες.
- Στη συνέχεια, εφαρμόζονται τα 4 διαλύματα με τη σειρά που αναφέρθηκαν και στο τέλος, στεγνώνεται η αντικειμενοφόρος πλάκα σε απορροφητικό χαρτί και παρατηρείται στο μικροσκόπιο.
- Αν τα βακτήρια παραμένουν μωβ, επειδή συγκρατούν το κρυσταλλικό ιώδες σημαίνει ότι είναι Gram θετικά βακτήρια. Αν φαίνονται ροζ ή κόκκινα επειδή αποχρωματίστηκαν και πήραν τη σαφρανίνη σημαίνει ότι είναι Gram αρνητικά βακτήρια.

Η βασική διαφορά των Gram θετικών και των Gram αρνητικών βακτηρίων εντοπίζεται στο κυτταρικό τους τοίχωμα. Τα Gram θετικά έχουν παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης και γι' αυτό το λόγο συγκρατείται το μωβ χρώμα μετά τον αποχρωματισμό με αλκοόλη και παρατηρείται μωβ ή μπλε χρώμα στο μικροσκόπιο. Τα Gram αρνητικά έχουν λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης και μια εξωτερική μεμβράνη που περιέχει λιποπολυσακχαρίτες(LPS) και γ' αυτό το λόγο δεν συγκρατείται το μωβ χρώμα όταν αποχρωματίζονται με αλκοόλη και βάφονται με σαφρανίνη.

Ψευδώς Gram αρνητικά βακτήρια: Τα Gram θετικά μπορεί να φανούν ως ψευδώς αρνητικά αν είναι παλιά ή νεκρά κύτταρα ή αν έχει γίνει λάθος στη διαδικασία με υπερβολικό αποχρωμάτισμα.

3.9. Εμβολιασμός μικροοργανισμών σε υγρή καλλιέργεια

Για τα βακτήρια *Bacillus sp.*94, *Bacillus licheniformis* 108 , *Apilactobacillus kunkeei* 530 χρησιμοποιήθηκε το Nutrient Broth 8g/l(Neogen, Heywood, UK) το οποίο περιείχε μέσα

- Beef extract 3.0g
- Enzymatic Digest of gelatin 5.0g

Και το εμπλουτίσαμε έξτρα με

- Yeast Extract 0.5g (Neogen, Heywood, UK)
- Glucose 0.5g (Biolab Diagnostics Laboratory Inc.)

Για τη ζύμη *Zygosaccharomyces siamensis* 449 χρησιμοποιήθηκε το Yeast Glucose το οποίο περιείχε

- Yeast Extract 5g/l(Neogen, Heywood, UK)
- Glucose 20g/L (Biolab Diagnostics Laboratory Inc.)

Για το Nutrient Broth παρασκευάστηκαν 300mL και χωρίστηκαν σε 6 κωνικές φιάλες (2 για κάθε μικροοργανισμό) από 50mL η καθεμία. Εφόσον περιέχει 8g/L Nutrient Broth και Yeast Extract 0.5g/100mL και Glucose .5g/100mL , για τα 300mL χρειάστηκε 2.4g/L Nutrient Broth και 1.5g/l Yeast extract και 1.5g/L glucose διαλυμένα σε 300mL νερό. Για το Yeast Glucose κατασκευάστηκαν 100mL και χωρίστηκε σε 2 κωνικές φιάλες από 50mL η καθεμία. Εφόσον, περιέχει 5g/l yeast extract για τα 100ml θα χρειαστεί 0,5g και glucose 2g διαλυμένα σε 100mL απιονισμένο νερό.

Αφού έγιναν τα υγρά θρεπτικά και χωρίστηκαν στις κωνικές μου φιάλες, τα έβαλα για αποστείρωση. Μόλις ολοκληρωθεί η αποστείρωση, μεταφέρονται στον πάγκο που είχε απολυμανθεί με αιθανόλη. Χρησιμοποιούμε το γκαζάκι προκειμένου να διατηρηθεί στείρο το περιβάλλον. Με τον κρίκο, που πυρακτώνεται μέχρι να κοκκινίσει , ανοίγεται το τρυβλίο και κρυώνεται στην άκρη στο σημείο που δεν έχει μικροοργανισμό. Αφού κρυώσει ο κρίκος, λαμβάνεται δείγμα από τον μικροοργανισμό από την άκρη και μεταφέρεται στην κωνική φιάλη, η οποία προηγουμένως έχει περάσει το στόμιο της από τη φωτιά. Έτσι, ολοκληρώθηκε ο εμβολιασμός και μπήκε για επώαση στους 30 βαθμούς υπό ανάδευση για 24 ώρες οι *Bacillus licheniformis* 108, *Bacillus sp.*94 , για 7 ημέρες *Apilactobacillus kunkeei* 530,48 ώρες *Zygosaccharomyces siamensis* 449.

Για να δούμε αν οι μικροοργανισμοί που εμβολιάστηκαν, αναπτύσσονται, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις οπτικής πυκνότητας μέχρι να βρεθεί το σημείο κορύφωσης τους ,δηλαδή η εκθετική φάση ανάπτυξης τους, πριν μουν στη φάση θανάτου. Η απορρόφηση που παίρναμε σε αυτό το στάδιο ήταν μεταξύ 0,3-0,8.

- Στο πρώτο πείραμα που εμβολιάστηκε μόνο ο ηλιάνθος

Apilactobacillus kunkeei 530 έφτασε στην εκθετική φάση ανάπτυξής του περίπου στις 168 ώρες με οπτική πυκνότητα 0,593.

Bacillus sp. 94 στις 24 ώρες έφτασε στην εκθετική του φάση με οπτική πυκνότητα 0,646.

Bacillus licheniformis 108 ,πάλι στις 24 ώρες με οπτική πυκνότητα 0,4 και ο *Zygosaccharomyces siamensis* 449 με οπτική πυκνότητα περίπου 0,6. Ήταν σημαντικό να δούμε το σημείο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης τους προκειμένου να εμβολιαστούν στη στερεή καλλιέργεια.

3.10. Εμβολιασμός στερεής κατάστασης (solid state fermentation)

Προκειμένου να ξεκινήσουμε τη διαδικασία της στερεής κατάστασης έπρεπε να ελεγχθούν κάποια βασικά βήματα. Αρχικά, η υγρασία αποτελεί ένα σημαντικό και αναπόσπαστο κομμάτι της ζύμωσης. Γινόταν λήψη δείγματος των υποστρωμάτων, δηλαδή, γύρης, σόγιας, ηλίανθου(όπως ήταν σε σκόνη χωρίς κάποια επεξεργασία) , ζυγίζονται 5g και ξηραίνονται σε φούρνο στους 60 βαθμούς κελσίου για 24 ώρες. Αφού ολοκληρωνόταν το 24ωρο, μεταφέρονταν στο discator για να απομακρυνθεί η υγρασία και με υπολογισμούς βρέθηκε το ποσοστό υγρασίας που περιείχε κάθε υπόστρωμα. Παρατηρήθηκε ότι ο ηλίανθος είχε 10,80% υγρασία, η σόγια 4,40% και η γύρη 18,20%.

Στη συνέχεια, με τη γνώση του ποσοστού υγρασίας, καθώς και του ποσοστού πρωτεΐνης που περιέχεται σε κάθε είδος τροφής, ήταν δυνατόν να καθοριστεί η ποσότητα του υποστρώματος (τροφής) με υγρασία που θα ζυγιζόταν στη κωνική φιάλη, έτσι ώστε να επιτευχθούν συγκεκριμένες τιμές υγρασίας, πρωτεΐνης και ξηρού βάρους τροφής (5 γραμμάρια). Παρατίθενται τα αποτελέσματα σχετικά με τα ζυγισμένα γραμμάρια τροφής, συμπεριλαμβανομένης της υγρασίας (wet basis). Για τον ηλίανθο, η ζύγιση πραγματοποιήθηκε σε 5,61 γραμμάρια, για τη γύρη σε 6,11 γραμμάρια και για τη σόγια σε 5,23 γραμμάρια.

Περιεκτικότητα νερού							
Πρώτη ύλη	Δισκάκι	Δείγμα + δισκάκι (πριν)	Δείγμα + Δισκάκι (μετά)	Δείγμα (πριν)	Δείγμα (μετά)	Αρχική υγρασία(%)	Μέσος όρος
Ηλίανθος	7,895	14,857	14,105	6,962	6,21	10,80%	11%
Σόγια	2,22	7,22	7	5	4,78	4,40%	4%
Γύρη	2,204	7,204	6,294	5	4,09	18,20%	18%

Πίνακας 1

Πρώτη ύλη	MSW(υγρή βάση)	Αρχικά διαλύματα	Περιεχόμενο υγρασίας %	Ξηρό περιεχόμενο %	Περιεχόμενο πρωτεΐνης %
Ηλίανθος	5,61	5,0	10,8%	89%	33,7%
Σόγια	5,23	5,0	4,4%	96%	60%
Γύρη	6,11	5,0	18%	82%	25%

Πίνακας 2

Μετά την ακριβή ζύγιση της ποσότητας στη κωνική φιάλη, αυτή καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκε σε συνθήκες αποστείρωσης, προκειμένου να καταστραφούν πιθανώς μικροοργανισμοί και να διατηρηθεί η στείρα κατάσταση, η οποία ήταν απαραίτητη πριν τον εμβολιασμό των επιλεγόμενων μικροοργανισμών. Ήταν αναγκαίο να επιτευχθεί περιεχόμενο υγρασίας 50% στη παραγόμενη τροφή για τις μέλισσες, συνεπώς κατά τη διαδικασία εμβολιασμού, προστέθηκε η αντίστοιχη ποσότητα αποστειρωμένου νερού.

Πριν τον εμβολιασμό, η οπτική πυκνότητα των μικροοργανισμών μετρήθηκε, ώστε να διασφαλιστεί ότι βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξής τους. Ο *Apilactobacillus kunkeei*

530 παρουσίασε οπτική πυκνότητα 0,294 χωρίς αραίωση, μετά από επώαση 7 ημερών στους 30°C χωρίς ανάδευση. Ο *Zygosaccharomyces siamensis* 449 είχε οπτική πυκνότητα 0,468, με αραίωση 1:4, ύστερα από 48 ώρες επώαση στους 32°C με ανάδευση στους 220 rpm. Ο *Bacillus sp.* 94 είχε οπτική πυκνότητα 0,395 με αραίωση 1:10, μετά από 24 ώρες επώαση στους 32°C με ανάδευση στους 220 rpm. Ο *Bacillus licheniformis* 108 παρουσιάστηκε με οπτική πυκνότητα 0,670, με αραίωση 1:4, επίσης μετά από 24 ώρες επώαση στους 32°C και ανάδευση στους 220 rpm.

Μετά την εξακρίβωση ότι οι μικροοργανισμοί βρισκόταν σε κατάλληλο στάδιο ανάπτυξης, αυτοί εμβολιάστηκαν ώστε να συνεχίσουν την ανάπτυξή τους. Για τον σκοπό αυτό, εμβολιάστηκαν διαφορετικές ποσότητες από κάθε μικροοργανισμό, δεδομένου ότι ο *Apilactobacillus kunkeei* 530 αναπτύσσεται αργά, ο *Zygosaccharomyces siamensis* 449 σχετικά γρήγορα, και οι *Bacillus sp.* 94, *Bacillus licheniformis* 108 πολύ γρήγορα. Συγκεκριμένα, εμβολιάστηκαν 10⁸ κύτταρα *Apilactobacillus kunkeei* 530 ανά γραμμάριο πρωτεΐνης που περιέχεται, 10⁶ κύτταρα *Zygosaccharomyces siamensis* 449 ανά γραμμάριο πρωτεΐνης και 10⁴ κύτταρα *Bacillus sp.* 94, *Bacillus licheniformis* 108 ανά γραμμάριο πρωτεΐνης.

Σε αποστειρωμένες συνθήκες, μέσα σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, μεταφέρθηκαν όλες οι κωνικές φιάλες που περιείχαν το υπόστρωμα, το αποστειρωμένο νερό, καθώς και τα tips χρωμάτων μπλε, κίτρινου και λευκού, και αφέθηκαν αυστηρώς για 20 λεπτά.

Μετά το πέρας του χρόνου, τοποθετήθηκαν, σε αποστειρωμένο περιβάλλον, οι υγρές καλλιέργειες των μικροοργανισμών και ξεκίνησε η διαδικασία εμβολιασμού σε στερεή κατάσταση.

- Στον ηλίανθο φτιάχτηκαν 8 κωνικές φιάλες η οποία καθεμία περιείχε 2mL νερό αποστειρωμένο, 1,2mL καλλιέργειας *Apilactobacillus kunkeei* 530, 1,1mL καλλιέργειας *Zygosaccharomyces siamensis* 449, 20μL *Bacillus sp.* 94 και 40mL *Bacillus licheniformis* 108.
- Στη σόγια, 8 κωνικές φιάλες η οποία καθεμία περιείχε 0,5mL νερό αποστειρωμένο, 2,25mL καλλιέργειας *Apilactobacillus kunkeei* 530, 2mL καλλιέργειας *Zygosaccharomyces siamensis* 449, 100μL *Bacillus sp.* 94 και 200 μL *Bacillus licheniformis* 108.
- Στη γύρη φτιάχτηκαν 8 κωνικές φιάλες η οποία καθεμία περιείχε 2,1mL νερό αποστειρωμένο, 900μL καλλιέργειας *Apilactobacillus kunkeei* 530, 800μL καλλιέργειας *Zygosaccharomyces siamensis* 449, 100μL *Bacillus sp.* 94 και 200μL *Bacillus licheniformis* 108.

Μικροοργανισμός	Οπτική πυκνότητα-OD	Μονάδα σχηματισμού αποικιών-CFU (κύτταρα/mL)	Στόχος συγκέντρωσης(κύτταρα/γρ περιεχόμενης πρωτεΐνης)	mL καλλιέργεια
<i>Apilactobacillus kunkeei</i> 530 (168h)	0,886	4,00E+07	1,00E+07	0,421
<i>Zygosaccharomyces siamensis</i> 449 (49h)	11,85	1,50E+07	1,00E+07	1,123
<i>Bacillus sp.</i> 94 (24h)	6,46	5,00E+09	1,00E+05	0,0000337
<i>Bacillus licheniformis</i> 108 (24h)	1,296	2,50E+08	1,00E+05	0,0006740
Ηλίανθος				1,5453

<i>Apilactobaccilus kunkeei</i> 530	0,294	1,33E+07	1,00E+07	1,264
<i>Zygosaccharomyces siamensis</i> 449	1,872	1,50E+06	1,00E+06	1,123
<i>Bacillus sp.</i> 94	3,95	2,50E+09	1,00E+04	0,0000067
<i>Bacillus licheniformis</i> 108	2,68	5,00E+08	1,00E+04	0,0000337
Σόγια				2,3871
<i>Apilactobaccilus kunkeei</i> 530	0,294	1,33E+07	1,00E+07	2,250
<i>Zygosaccharomyces siamensis</i> 449	1,872	1,50E+06	1,00E+06	2,000
<i>Bacillus sp.</i> 94	3,95	2,50E+09	1,00E+04	0,000012
<i>Bacillus licheniformis</i> 108	2,68	5,00E+08	1,00E+04	0,000060
Γόρη				4,2501
<i>Apilactobaccilus kunkeei</i> 530	0,294	1,33E+07	1,00E+07	0,938
<i>Zygosaccharomyces siamensis</i> 449	1,872	1,50E+06	1,00E+06	0,833
<i>Bacillus sp.</i> 94	3,95	2,50E+09	1,00E+04	0,00001
<i>Bacillus licheniformis</i> 108	2,68	5,00E+08	1,00E+04	0,00003
				1,7709

Πίνακας 3

Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία του εμβολιασμού, έκλεισε το πόμα με βαμβάκι και μεταφέρθηκαν στο φούρνο στους 30 βαθμούς κελσίου για να ξεκινήσει η διαδικασία της ζύμωσης. Από την επόμενη μέρα, ξεκίνησε η δειγματοληψία μίας κωνικής φιάλης. Πήρα δείγμα την 4^η μέρα της ζύμωσης, την 5^η, την 6^η, την 8^η και την 11^η στην οποία παρατηρήθηκε η ολοκλήρωση της ζύμωσης λόγω πτώσης της FAN.

3.11. Προετοιμασία ρυθμιστικών διαλυμάτων

Για να γίνει η ενζυμική ανάλυση χρειάζεται να παρασκευαστούν τα ρυθμιστικά διαλύματα(buffer) του κάθε ενζύμου. Γίνεται διερεύνηση σε υδρολυτικά ένζυμα (γλυκοαμυλάση, ξυλανάση και πρωτεάση), τα οποία είναι πρωτεΐνες που διασπούν ένα υπόστρωμα και απελευθερώνουν νερό. Παρασκευάστηκαν με συγκέντρωση 0.2M ώστε τελική συγκέντρωση στην αντίδραση να είναι 0.1M. Παράλληλα, έπρεπε να ελέγχεται και το pH διότι δεν έπρεπε να διαφέρει από το αναγραφόμενο.

- Για την ξυλανάση το pH είναι 5
- για την πρωτεάση το pH είναι 7 και
- για τη γλυκοαμυλάση το pH είναι 4.6.

Επομένως για να φτιαχτούν τα buffer χρησιμοποιήθηκαν 2 διαλύματα, ένα οξύ και μία βάση.

1. Για την γλυκοαμυλάση και την ξυλανάση η βάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Sodium acetate (CH_3COONa)(Sigma-Aldrich) με μοριακό βάρος 82,0343g/mol και το οξύ το

Acetic acid(CH_3COOH) (Sigma-Aldrich) με μοριακό βάρος 60,05g/mol. Το Sodium acetate (CH_3COONa) με συγκέντρωση 16,40686g/L παρασκευάστηκε στα 100ml άρα ζυγίστηκε 1,6 g/100mL H_2O καθώς και το Acetic acid(CH_3COOH) με συγκέντρωση 12,01g/L παρασκευάστηκε στα 100mL άρα ζυγίστηκε 1,2g/100mL H_2O . Παρασκευάστηκε μεγαλύτερη ποσότητα για τα δύο ένζυμα και για την γλυκοαμυλάση και για την ξυλανάση. Για την γλυκοαμυλάση ο όγκος που χρησιμοποιήθηκε από το οξύ και τη βάση ήταν 25mL+25mL ενώ για την ξυλανάση ο όγκος της βάσης ήταν 70mL και ο όγκος του οξέος ήταν 30mL. Συνολικά ήταν 100mL τα οποία χωρίστηκαν σε 2 duran των 50mL. Για την γλυκοαμυλάση χρειαζόμαστε 2% άμυλο άρα στον τελικό όγκο 50mL πρέπει να υπάρχει 1g άμυλο και για την ξυλανάση χρειαζόμαστε 0.2% ξυλάνη άρα στο τελικό όγκο 50mL θέλουμε 0,1g ξυλάνη.

2. Για την πρωτεάση βάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4) (Sigma-Aldrich) με μοριακό βάρος 141,96 g/mol και το οξύ το Sodium di-hydrogen phosphate (NaH_2PO_4) (Sigma-Aldrich) με μοριακό βάρος 119,98 g/mol. Το Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4) με συγκέντρωση 28,4g/L φτιάχτηκε στα 100mL άρα ζύγισα 2,84 g/100mL H_2O καθώς και το Sodium di-hydrogen phosphate (NaH_2PO_4) με συγκέντρωση 23,4g/L το έφτιαξα στα 100mL άρα ζύγισα 2,34g/100mL H_2O . Για την πρωτεάση ο όγκος της βάσης ήταν 100mL το ίδιο και ο όγκος του οξέος. Συνολικά προκύπτουν 200mL τα οποία χωρίστηκαν σε 2 duran των 100mL. Για την πρωτεάση χρειαζόμαστε 2% καζεΐνη άρα στον τελικό όγκο 100mL θέλουμε 2g καζεΐνη.

Το άμυλο διατηρήθηκε στο ψυγείο ενώ η καζεΐνη και η ξυλάνη στην κατάψυξη.

3.11.1 Δειγματοληψία και ενζυμική ανάλυση

Η διαδικασία περιλαμβάνει γάντια, μικρό ζυγό, τρυβλία και falcon.

- Ζυγίζεται το άδειο τρυβλίο και στη συνέχεια προστίθενται 2,5g δείγματος,
- Ξήρανση και έπειτα μέτρηση της υγρασίας του.
- Στη συνέχεια, σε ένα δοχείο τοποθετείται ένα falcon και μηδενίζεται ο ζυγός. Προστίθεται το υπόλοιπο δείγμα που απέμεινε στην κωνική μου φιάλη και ζυγίζεται. Έπειτα, προστίθεται 30mL νερό και γίνεται ανάδευση με vortex για 10 λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 24 βαθμούς κελσίου στα 9000rpm. Το υπερκείμενο υγρό(δείγμα) που προκύπτει μεταγγίζεται προσεκτικά σε καθαρό falcon και τοποθετείται στο παγόλoutρο.
- Παράλληλα, τοποθετούνται στο παγόλoutρο δοκιμαστικοί σωλήνες για την ενζυμική ανάλυση. Πραγματοποιούνται 2 τεχνικές επαναλήψεις.
- Για το άμυλο , 2 δοκιμαστικούς σωλήνες που θα περιέχουν και το δείγμα και 1 δοκιμαστικό σωλήνα blank που θα περιέχει μόνο το buffer.
- Για τη καζεΐνη , 2 δοκιμαστικούς σωλήνες που θα περιέχουν και το δείγμα και 1 δοκιμαστικό σωλήνα blank που θα περιέχει μόνο το buffer και το ίδιο και για τη ξυλάνη. Τοποθετείται 1mL δείγμα σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες, εκτός τους blank , και 1mL buffer σε κάθε δοκιμαστικό.
- Για το άμυλο προστίθεται 1mL άμυλο, για τη καζεΐνη 1mL και για τη ξυλάνη 1mL ξυλάνη. Στους δοκιμαστικούς σωλήνες του blank τοποθετούνται 1mL buffer και 1mL απιονισμένου νερού. Έπειτα τοποθετούνται στο υδατόλoutρο (waterbath) το οποίο είναι στους 50 βαθμούς κελσίου και παραμένει εκεί το άμυλο για 10 λεπτά, η καζεΐνη

για 20 λεπτά και η ξυλάνη για 1 ώρα. Αφού ολοκληρωθεί ο χρόνος για κάθε σωλήνα, μεταφέρονται για 5 λεπτά σε βρασμό στους 100 βαθμούς κελσίου.

- Δημιουργούνται δοκιμαστικοί σωλήνες οι οποίοι περιέχουν μόνο δείγμα(zero) και πηγαίνουν κατευθείαν για βρασμό.
- Τέλος, μετά το βρασμό μεταφέρω τα δείγματα σε erppendorf και τα καταψύχω για τις αναλύσεις.

Ενζυμα Ref (Ladakis et al. 2022)

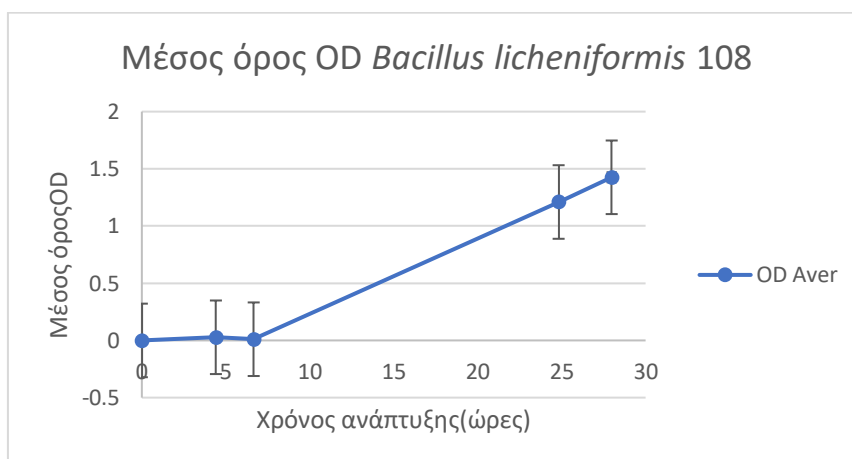
(Didaras et al. 2021)

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Ανάπτυξη των μικροοργανισμών βάσει της οπτικής πυκνότητας(OD)

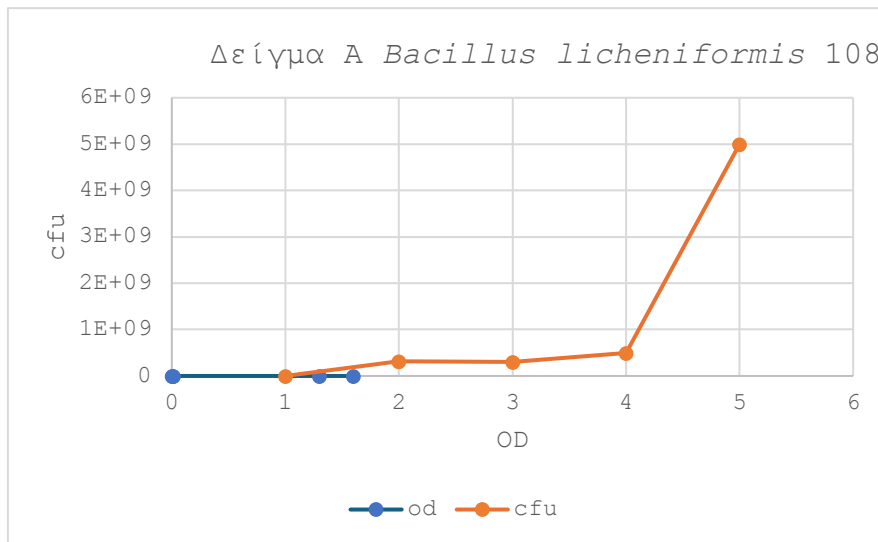
Στη συγκεκριμένη ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάπτυξης των μικροοργανισμών μέσω μέτρησης της οπτικής πυκνότητας στα 660nm και σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Τα διαγράμματα που παρουσιάζονται είναι του μέσου όρου της οπτικής πυκνότητας(οπτική πυκνότητα*αραίωση) σε σχέση με το χρόνο.

Αρχικά στον *Bacillus licheniformis* 108, την πρώτη μέρα δειγματοληψίας, έγιναν μετρήσεις ανά 2 ώρες περίπου μετά τον εμβολιασμό. Ο εμβολιασμός διεξήχθη στις 11:05 το πρωί και δειγματοληψίες έγιναν στις 13:15, 15:30 και στις 17:45 το απόγευμα. Στις παρούσες μετρήσεις παρατηρήθηκε ότι ήταν αρκετά χαμηλές και χωρίς καμία αραίωση, άρα βρισκόταν στην λανθάνουσα φάση ανάπτυξης, δηλαδή δεν υπήρχε ακόμη ανάπτυξη. Την επόμενη μέρα, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία και ύστερα από 24 ώρες επώαση άρχισε να παρατηρείται αύξηση(με αραίωση πλέον 1:4), δεδομένου ότι η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας άρχισε να βρίσκεται εντός του εύρους($OD=0.3$). Η κορύφωση της εκθετικής φάσης ανάπτυξης φάνηκε στις 27 ώρες($OD=0.35$) και τέλος σταθεροποιήθηκε.

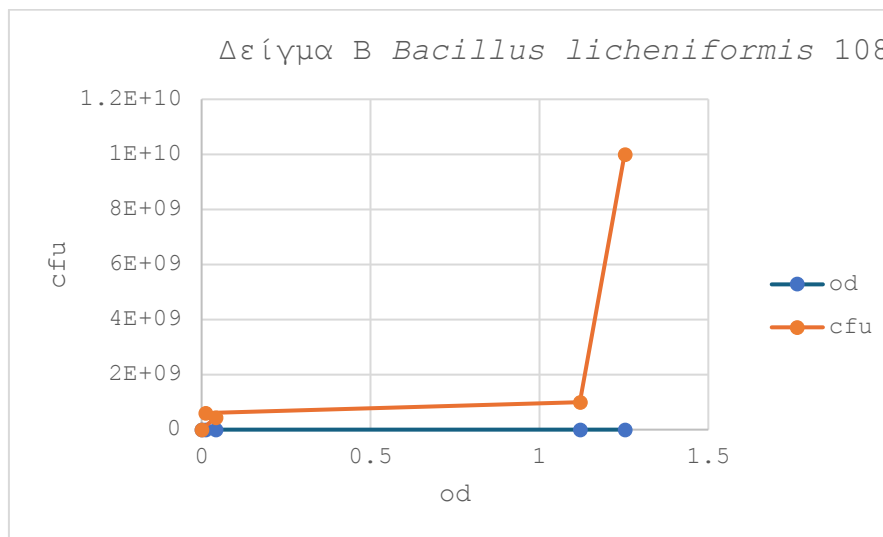


Γράφημα 1: Απεικόνιση ανάπτυξης *Bacillus licheniformis* 108

Στα παρακάτω γραφήματα (2,3) οπτική πυκνότητα*αραίωση ($OD \cdot Dil$), φαίνεται η εξέλιξη του αριθμού βιώσιμων κυττάρων(CFU/ml) σε σχέση με την οπτική πυκνότητα κατά την εκθετική φάση. Οι τιμές CFU προέκυψαν από καλλιέργειες διαφορετικών αραιώσεων του δείγματος και υποδεικνύουν το σημείο αραίωσης στο οποίο καταγράφηκε μετρήσιμος αριθμός αποικιών. Το γινόμενο $OD \cdot Dilution$ εκτιμά τον ακριβή βιώσιμο μικροβιακό πληθυσμό. Για τη μετατροπή της οπτικής πυκνότητας σε πραγματικό αριθμό ζωντανών κυττάρων, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση αποικιών(CFU/ml) μέσω σποράς και συσχέτιση με την οπτική πυκνότητα. Σε κάθε δειγματοληψία, γινόταν λήψη 2 δειγμάτων(σε περίπτωση σφάλματος του ενός).

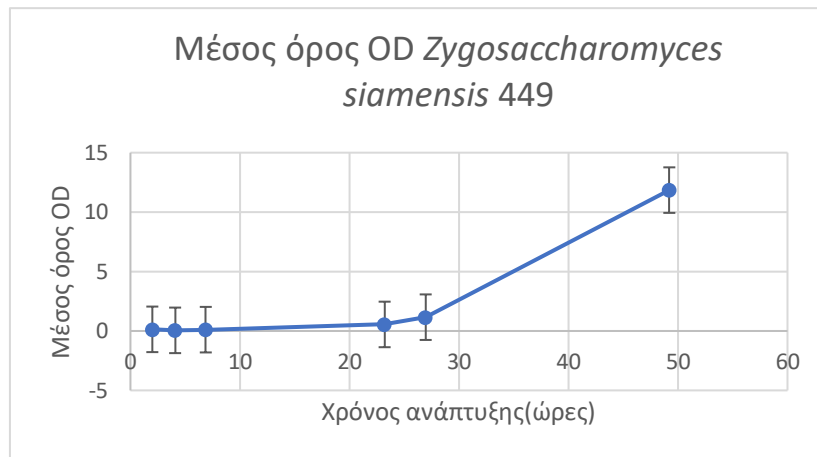


Γράφημα 2: Συσχέτιση CFU/ml-ODA*Dilution



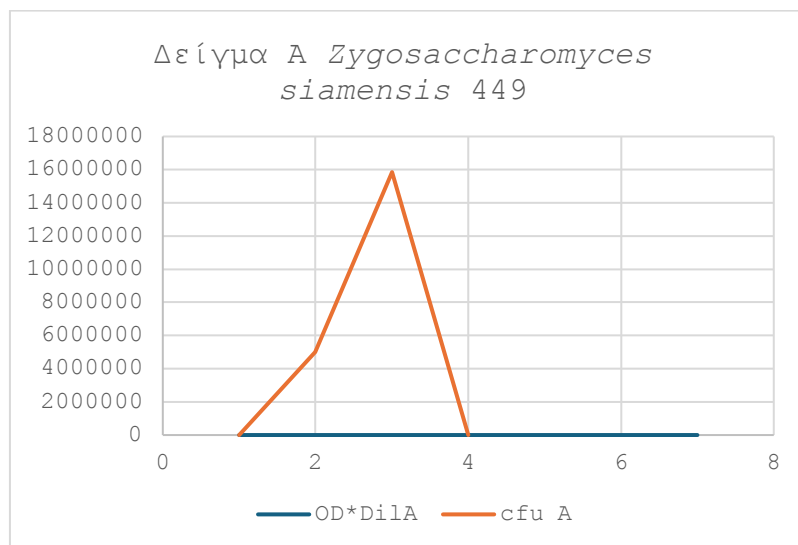
Γράφημα 3: Συσχέτιση CFU/ml-ODB*Dilution

Το γράφημα 4 δείχνει την εξέλιξη της ανάπτυξης του *Zygosaccharomyces siamensis* 449 σε σχέση με το χρόνο. Την ημέρα του εμβολιασμού πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες ανά 2 ώρες (η τελευταία δειγματοληψία ανά 3 ώρες) και αυτό που παρατηρείται είναι ότι βρίσκεται στην αρχική φάση λανθάνουσας ανάπτυξης. Μετά από 24 ώρες ανάπτυξης, σταδιακά, ενσωματωνόταν στην εκθετική φάση με τη μέγιστη οπτική πυκνότητα να καταγράφεται στις 49 ώρες.

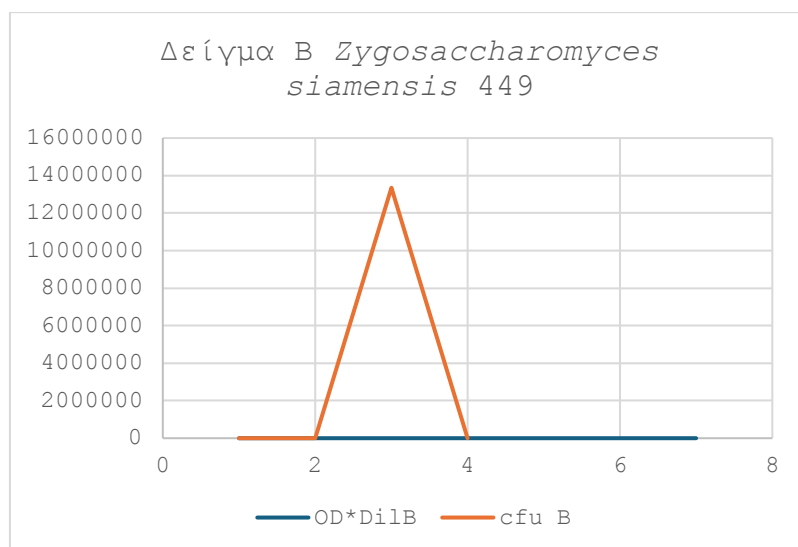


Γράφημα 4: Απεικόνιση ανάπτυξης *Zygosaccharomyces siamensis* 449

Στο *Zygosaccharomyces siamensis* 449 η επιφανειακή σπορά έδειξε παρόμοια αποτελέσματα και στα 2 δείγματα.

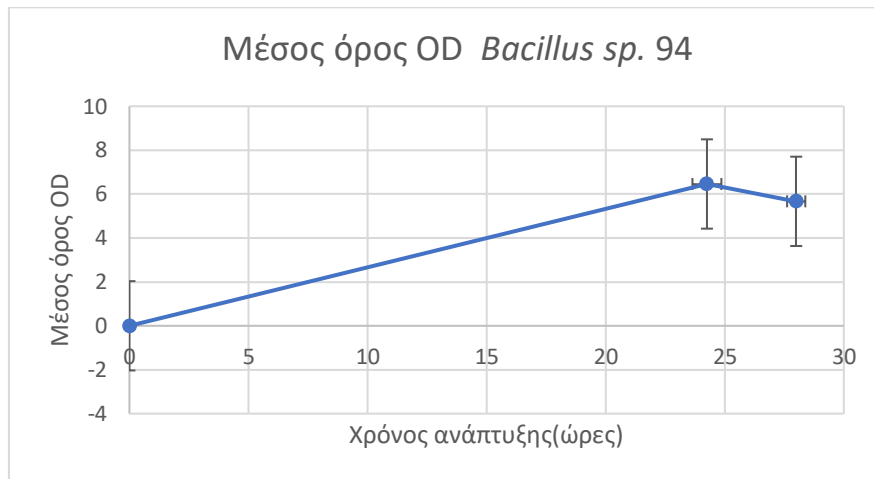


Γράφημα 5: Συσχέτιση CFU/ml-ODA*Dilution



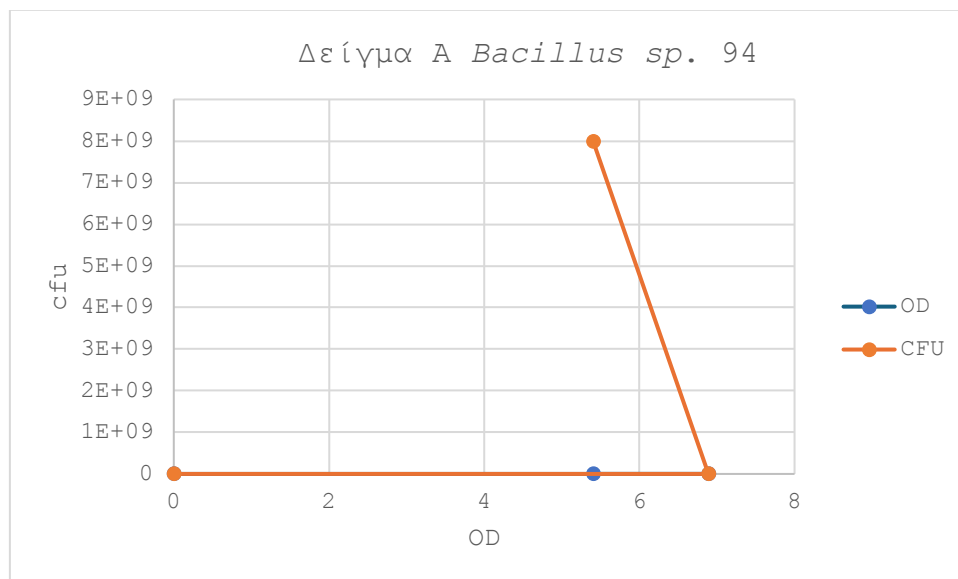
Γράφημα 6: Συσχέτιση CFU/ml-ODB*Dilution

Δεδομένου ότι ο *Bacillus sp.* 94 αναπτύσσεται στον ίδιο χρόνο με τον *Bacillus licheniformis* 108, έγινε δειγματοληψία κατευθείαν μετά από 24 ώρες επώασης και παρατηρήθηκε ότι ήταν στην κορυφή της εκθετικής φάσης (OD=0.65). Τέλος, παρατηρούμε και τη φάση θανάτου που στα συγκεκριμένα βακτήρια επέρχεται μετά από μία μέρα επώασης, στις 28 ώρες (OD=0.5). Αντιλαμβανόμαστε τη φάση θανάτου διότι παρατηρείται πτώση της οπτικής πυκνότητας. Αυτό συμβαίνει γιατί υπάρχει προοδευτική μείωση του βιώσιμου πληθυσμού των κυττάρων.

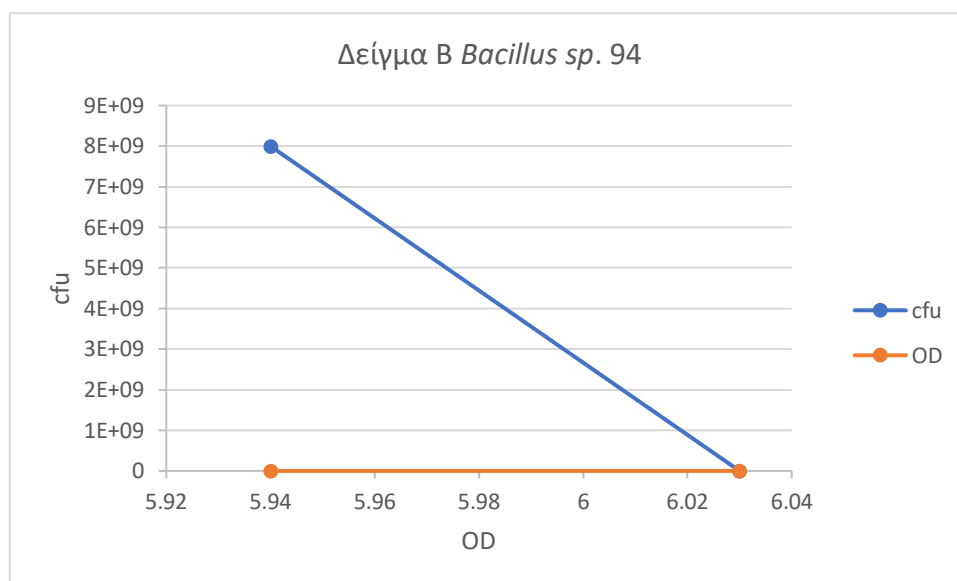


Γράφημα 7: Απεικόνιση ανάπτυξης *Bacillus sp.* 94

Παρακάτω απεικονίζεται το γράφημα σύγκρισης οπτικής πυκνότητας σε σχέση με τις μονάδες σχηματισμού αποικιών.

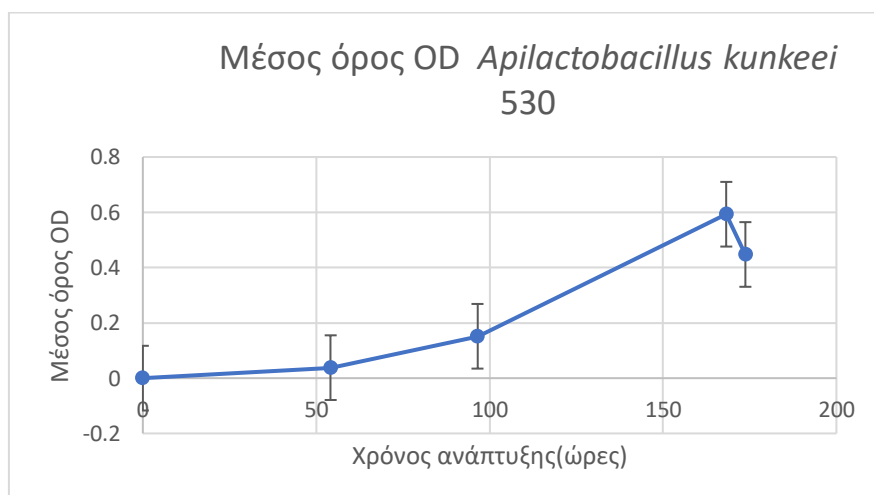


Γράφημα 8: Συσχέτιση CFU/ml-ODA*Dilution



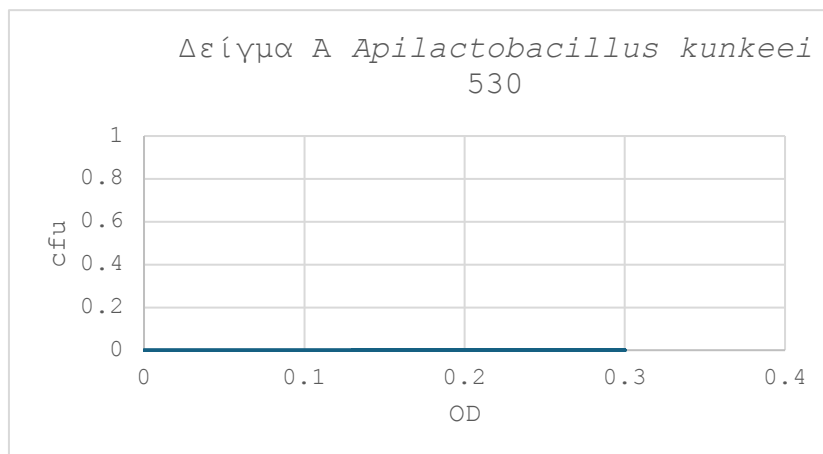
Γράφημα 9: Συσχέτιση CFU/ml-ODB*Dilution

Στο συγκεκριμένο γράφημα απεικονίζεται ο μικροοργανισμός *Apilactobacillus kunkeei* 530, ο οποίος έχει πολύ αργή και σταδιακή ανάπτυξη. Στις δύομιση περίπου μέρες (54 ώρες) μετά τον εμβολιασμό, ο μικροοργανισμός βρισκόταν ακόμη σε αρχικά στάδια ανάπτυξης (OD=0.005), με πολύ περιορισμένη αύξηση της βιομάζας, γεγονός που υποδηλώνει καθυστέρηση στην είσοδο στη φάση εκθετικής ανάπτυξης. Στις 96 ώρες, ακόμη δεν είχε παρατηρηθεί θόλωση, άρα βρισκόταν ακόμη στη λανθάνουσα φάση. Όμως, είχε αναπτυχθεί λίγο περισσότερο από το προηγούμενο δείγμα (OD=0.150). Την 7^η μέρα, πλέον, είχε φτάσει στην μέγιστη εκθετική ανάπτυξη με OD=0,59 και 6 ώρες μετά πέρασε στη φάση θανάτου με την οπτική πυκνότητα να μειώνεται, όπως παρατηρείται και στο γράφημα.



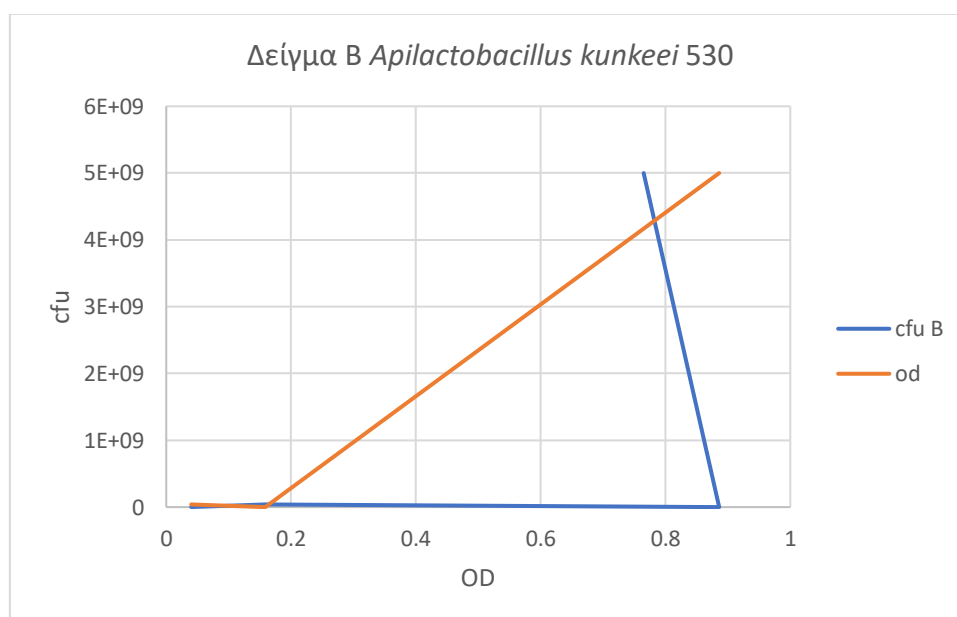
Γράφημα 10: Απεικόνιση ανάπτυξης *Apilactobacillus kunkeei* 530

Στον *Apilactobacillus kunkeei* 530 η πρώτη επιφανειακή σπορά δεν έδωσε αποτελέσματα αποικιών, σύμφωνα με την ODA.



Γράφημα 11: Συσχέτιση CFU/ml με ODA*Dilution

Στη δεύτερη επιφανειακή σπορά καταμετρήθηκαν αποικίες. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι παρατηρήθηκαν ζωντανά κύτταρα (CFU) στο σημείο όπου η οπτική πυκνότητα αποδεικνύει την είσοδο του μικροοργανισμού στη φάση θανάτου. Σε αυτό το σημείο παρατηρούμε και διαφοροποιούμε την οπτική πυκνότητα από τη μέθοδο CFU. Η OD καταγράφει το σύνολο της κυτταρικής μάζας(και ζωντανά και νεκρά κύτταρα), ενώ η μέθοδος CFU μετράει μόνο τα βιώσιμα κύτταρα που σχηματίζουν αποικίες.

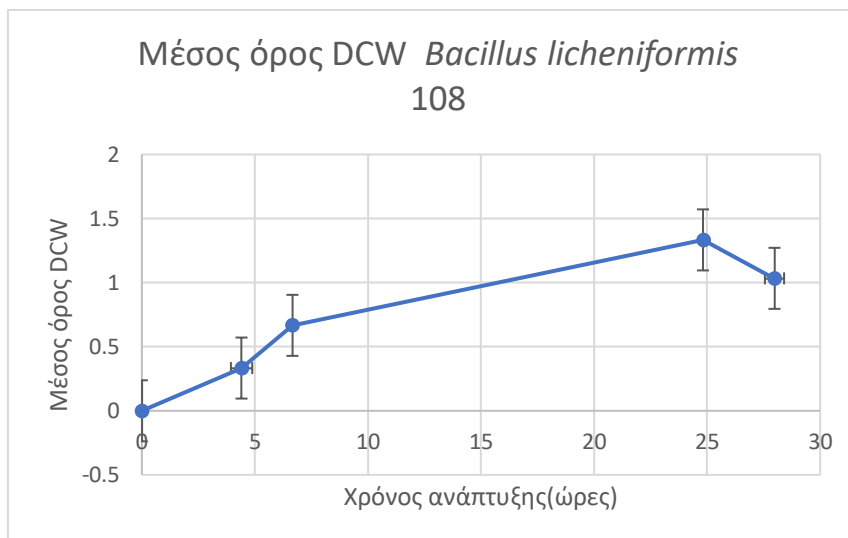


Γράφημα 12: Συσχέτιση CFU/ml με ODB*Dilution

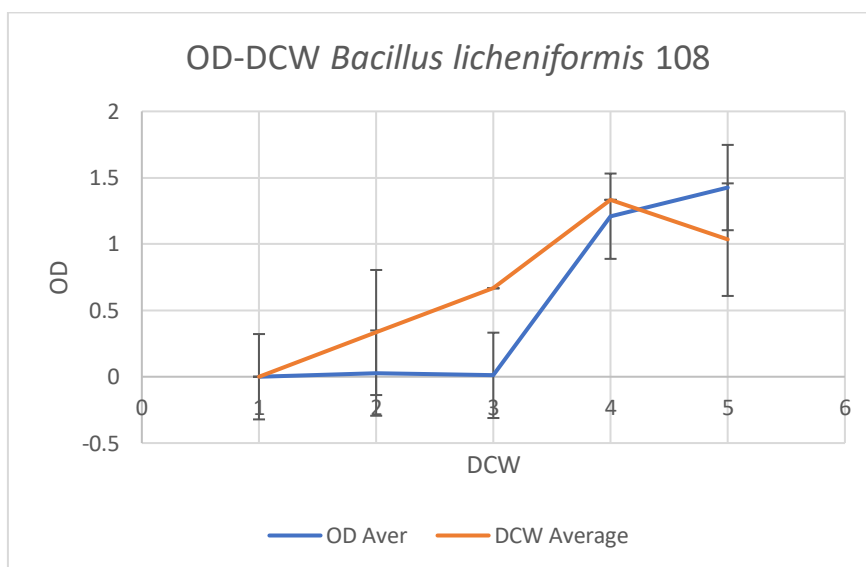
Προκειμένου να εκτιμηθεί η συνολική κυτταρική βιομάζα, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του ξηρού βάρους σε μερικά χρονικά σημεία της καλλιέργειας. Είναι ένας αξιόπιστος δείκτης κυτταρικής ανάπτυξης καθώς προσδιορίζει την συνολική παραγόμενη βιομάζα του μικροοργανισμού. Παρατίθενται δύο ειδών γραφήματα για το κάθε μικροοργανισμό, ένα μόνο με το ξηρό βάρος και ένα σε σύγκριση με την οπτική πυκνότητα.

Στο γράφημα του *Bacillus licheniformis* 108, απεικονίζεται η μεταβολή του ξηρού βάρους σε σχέση με το χρόνο καλλιέργειας. Παρατηρείται σταδιακή αύξηση του ξηρού βάρους με το υψηλότερο σημείο στις 24 ώρες, γεγονός που δείχνει ενεργή βιομάζα και φάση εκθετικής ανάπτυξης. Στο σημείο των 28 ωρών περίπου, παρατηρείται πτώση της τιμής του ξηρού βάρους(0,73g/L), υποδηλώνοντας την έναρξη της φάσης θανάτου.

Παράλληλα, στο άλλο γράφημα συσχετίζεται καλά η οπτική πυκνότητα με το ξηρό βάρος. Δείχνει γραμμική τάση, με αύξηση της οπτικής πυκνότητας να αντιστοιχεί σε αύξηση του ξηρού βάρους. Άρα, η OD μπορεί να εκτιμήσει την ανάπτυξη για αυτό το στέλεχος.

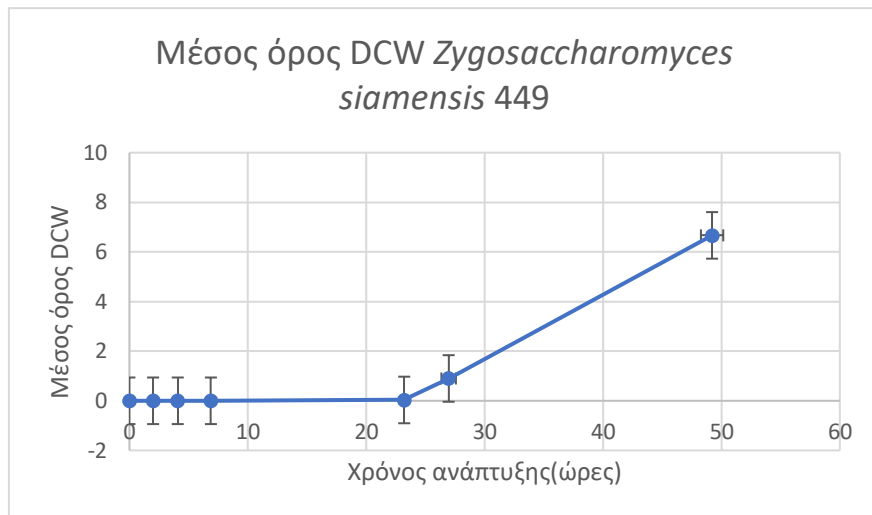


Γράφημα 13: Μέσος όρος DCW *Bacillus licheniformis* 108

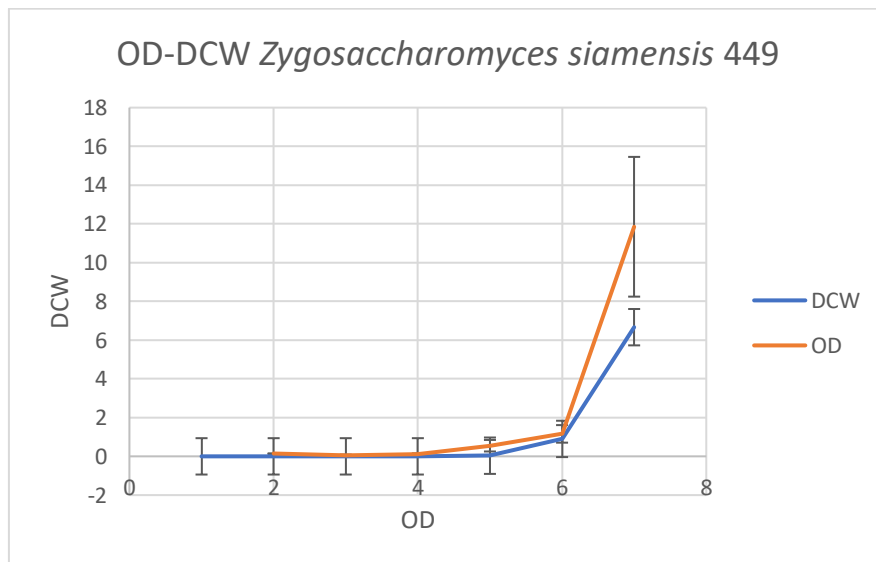


Γράφημα 14: OD-DCW *Bacillus licheniformis* 108

Το γράφημα του ξηρού βάρους του *Zygosaccharomyces siamensis* 449 παρουσιάζει σταδιακή αύξηση στη πάροδο του χρόνου με το υψηλότερο σημείο να είναι στις 49 ώρες. Έτσι, με αυτό το τρόπο, παρατηρείται συσχέτιση με την οπτική πυκνότητα καθώς και στο γράφημα της οπτικής πυκνότητας αποδεικνύεται η κορύφωση της εκθετικής φάσης ανάπτυξης στις 49 ώρες. Άρα, εκτιμάται η ανάπτυξη του στελέχους αυτού με την οπτική πυκνότητα.

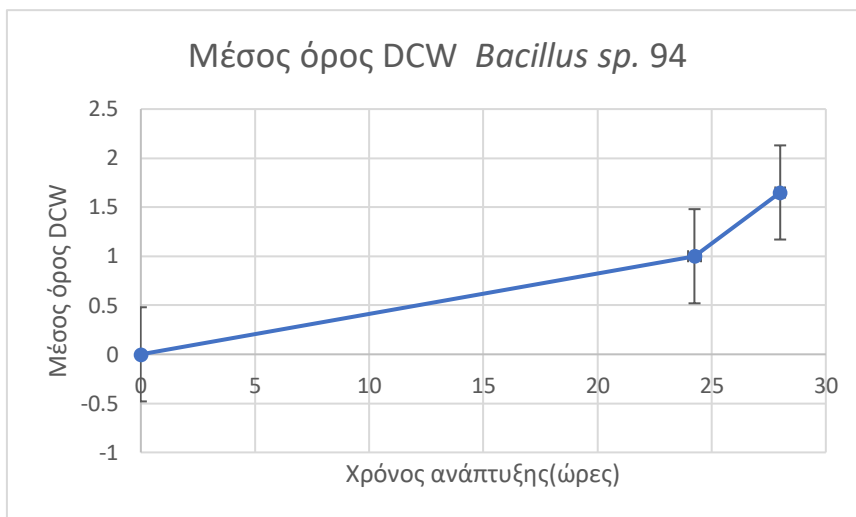


Γράφημα 15: Μέσος όρος DCW *Zygosaccharomyces siamensis* 449

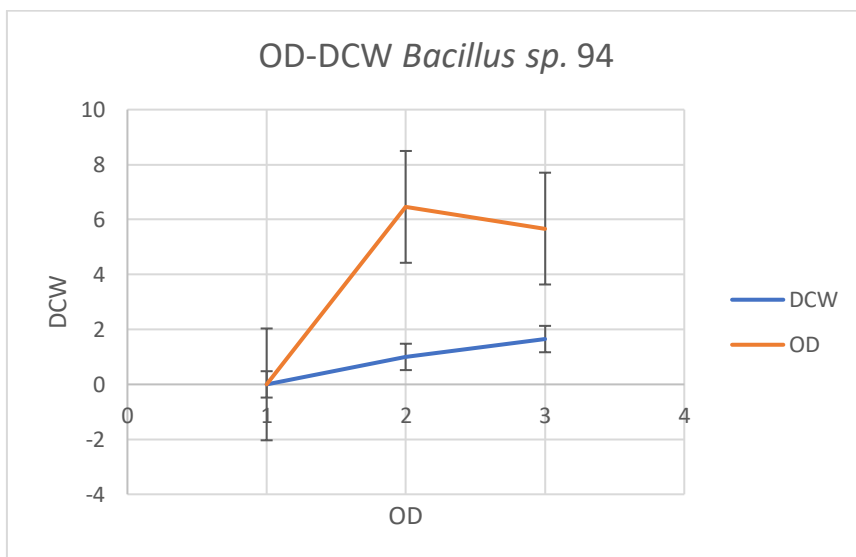


Γράφημα 16: OD-DCW *Zygosaccharomyces siamensis* 449

Η παρούσα μέτρηση πραγματοποιήθηκε απευθείας στις 24 ώρες δεδομένου ότι έχει τον ίδιο ρυθμό ανάπτυξης με τον *Bacillus licheniformis* 108. Η εκθετική φάση ανάπτυξης του ξηρού βάρους αρχίζει στις 24 ώρες ενώ το μέγιστο απεικονίζεται στις 28 ώρες. Στη σύγκριση με την οπτική πυκνότητα φαίνεται ότι όταν μεγιστοποιείται η οπτική πυκνότητα, αρχίζει να αυξάνεται η βιομάζα. Δεν είναι απολύτως γραμμική και δεν θα μπορούσε να θεωρηθεί αξιόπιστος δείκτης η οπτική πυκνότητα στο συγκεκριμένο στέλεχος καθώς η οπτική πυκνότητα δείχνει ότι στις 28 ώρες επέρχεται η φάση θανάτου, ενώ αυτό ανατρέπεται με το ξηρό βάρος διότι παρατηρείται ότι στις 28 ώρες υπάρχει ακόμη βιομάζα.

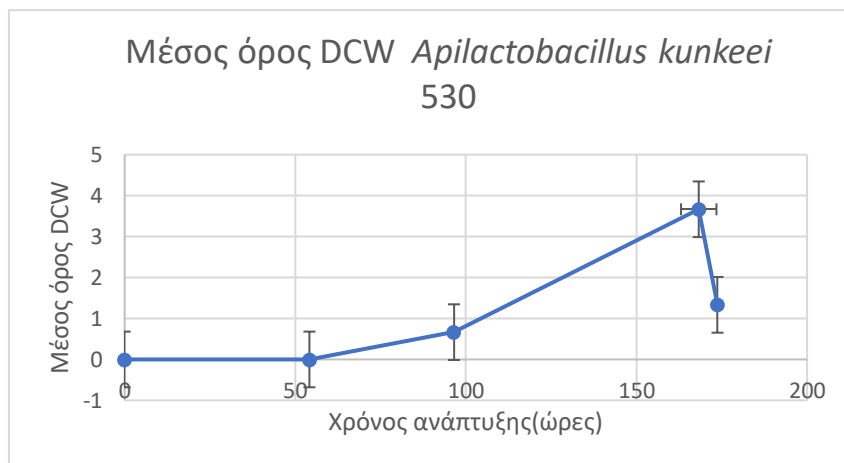


Γράφημα 17: Μέσος όρος DCW *Bacillus sp. 94*

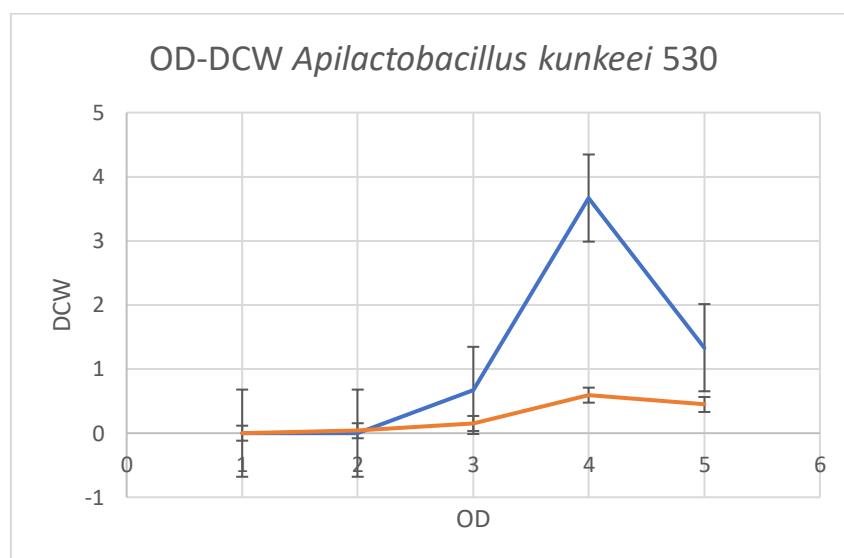


Γράφημα 18: OD-DCW *Bacillus 94*

Στα γραφήματα του *Apilactobacillus kunkeei* 530, υπάρχει σταθερή αύξηση του ξηρού βάρους με το χρόνο, φτάνοντας στο μέγιστο στις 168 ώρες. Η συσχέτιση OD-DCW είναι γραμμική, υποστηρίζοντας την οπτική πυκνότητα για την παρακολούθηση της ανάπτυξης. Στο μέγιστο της οπτικής πυκνότητας, υπάρχει και μέγιστη ανάπτυξη της παραγόμενης βιομάζας.



Γράφημα 19: Μέσος όρος DCW *Apilactobacillus kunkeei* 530



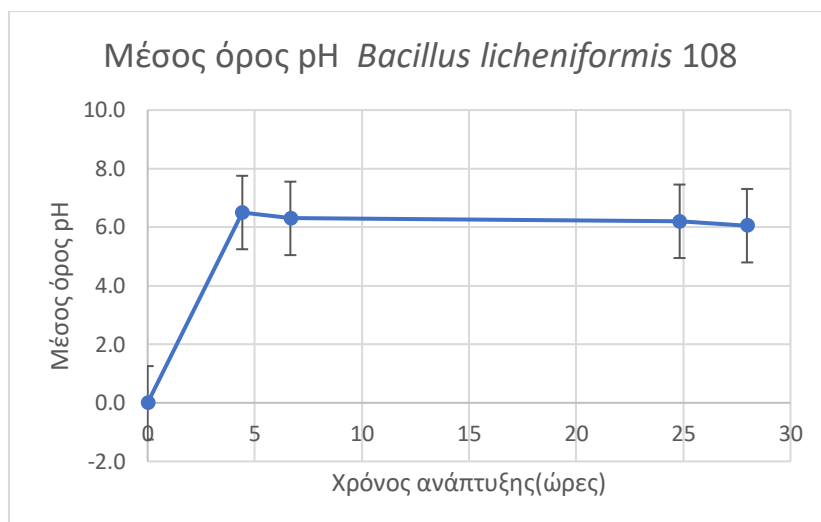
Γράφημα 20: OD-DCW *Apilactobacillus kunkeei* 530

Από την παραπάνω ανάλυση των δεδομένων παρατηρείται μια θετική και αξιόπιστη συσχέτιση μεταξύ της οπτικής πυκνότητας(OD) και του ξηρού βάρους(DCW), κάτι που υποδεικνύει ότι η OD μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της παραγόμενης βιομάζας. Ωστόσο, στο *Bacillus sp.* 94, η συσχέτιση αυτή δεν είναι ακριβώς γραμμική πιθανώς λόγω μεταβολών στη μορφολογία ή στο τρόπο κατανάλωσης των θρεπτικών συστατικών. Ο συνδυασμός και των δύο παραμέτρων επιτρέπει την καλύτερη παρακολούθηση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών.

4.2. Μεταβολή του pH κατά την ανάπτυξη της καλλιέργειας

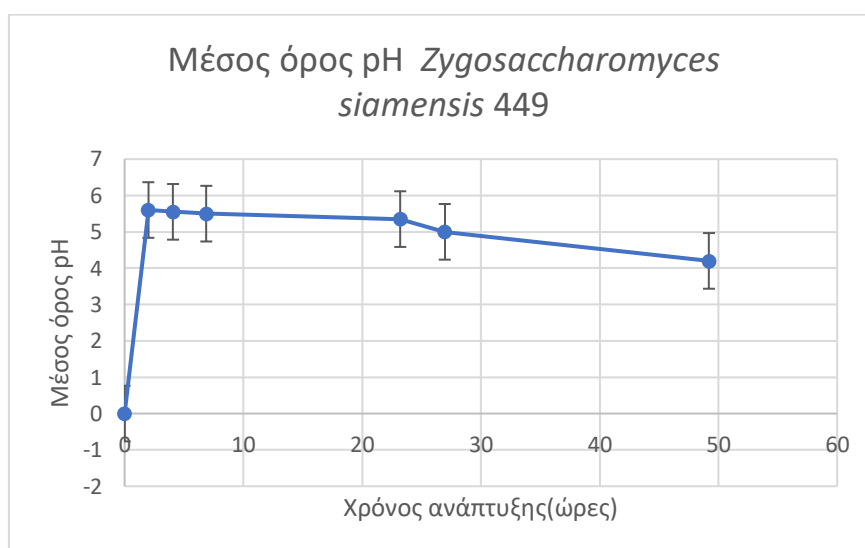
Στα παρακάτω γραφήματα παρουσιάζεται η μεταβολή του pH κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας των μικροοργανισμών. Το pH είναι πολύ σημαντικό να καταγράφεται διότι με αυτό το τρόπο παρατηρείται η μεταβολική δραστηριότητα των θρεπτικών στο υπόστρωμα. Γενικά, το pH στις πρώτες δειγματοληψίες παραμένει σχετικά σταθερό, δεδομένου ότι γίνεται η κατανάλωση των θρεπτικών συστατικών από τους μικροοργανισμούς. Όσο προχωράει η ανάπτυξη των μικροοργανισμών και εντάσσονται στην εκθετική φάση, παρατηρείται μείωση του pH λόγω παραγωγής μεταβολικών παραπροϊόντων. Αυτό συμβαίνει σε όλους τους μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν και παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα.

Στο *Bacillus licheniformis* 108 παρατηρείται σταδιακή μείωση με χαμηλότερες τιμές στο τέλος του χρόνου επώασης.



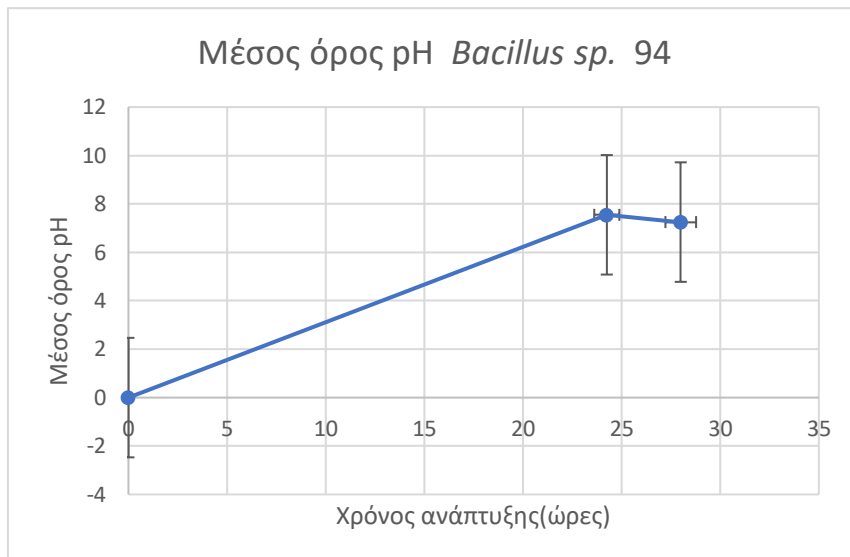
Γράφημα 21: Μέσος όρος pH *Bacillus licheniformis* 108

Στο *Zygosaccharomyces siamensis* 449 παρατηρήθηκε σχετική σταθερότητα στις πρώτες μετρήσεις με σταδιακή μείωση μετά τις 20 ώρες.



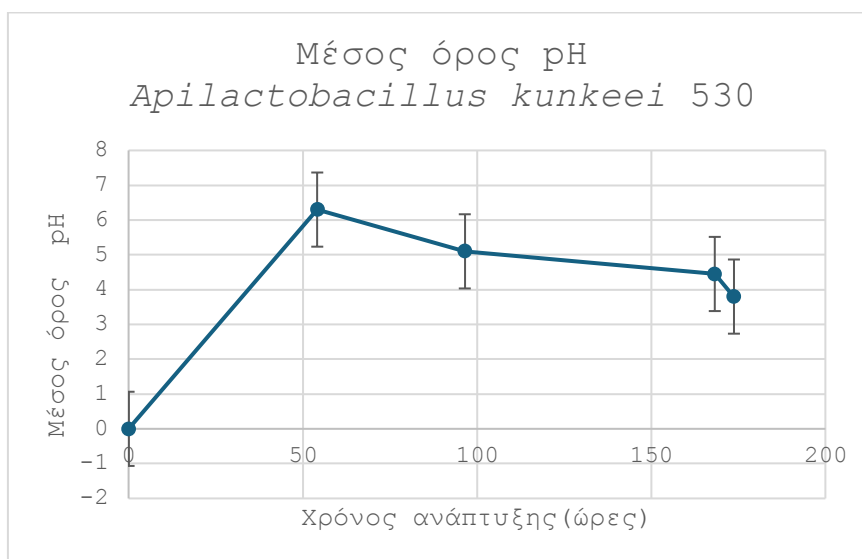
Γράφημα 22: Μέσος όρος pH *Zygosaccharomyces siamensis* 449

Στο *Bacillus* sp. 94 παρατηρείται κι εδώ πτώση, στο σημείο εκείνο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, όταν δηλαδή καταναλώνονται τα θρεπτικά συστατικά.



Γράφημα 23: Μέσος όρος pH *Bacillus sp. 94*

Στον *Apilactobacillus kunkeei* 530, ενώ στην αρχή παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση του pH, μετά όταν βρισκόταν στο εύρος της εκθετικής ανάπτυξης, ακολούθησε έντονη πτώση, γεγονός το οποίο δείχνει παραγωγή οργανικών οξέων (πχ γαλακτικό οξύ).

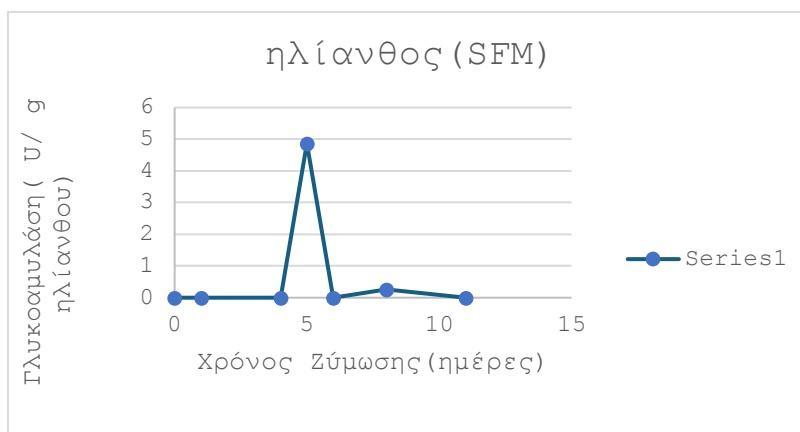


Γράφημα 24: Μέσος όρος pH *Apilactobacillus kunkeei* 530

4.3. Ενζυμική δραστικότητα γλυκοαμυλάσης και ξυλανάσης σε διαφορετικά υποστρώματα

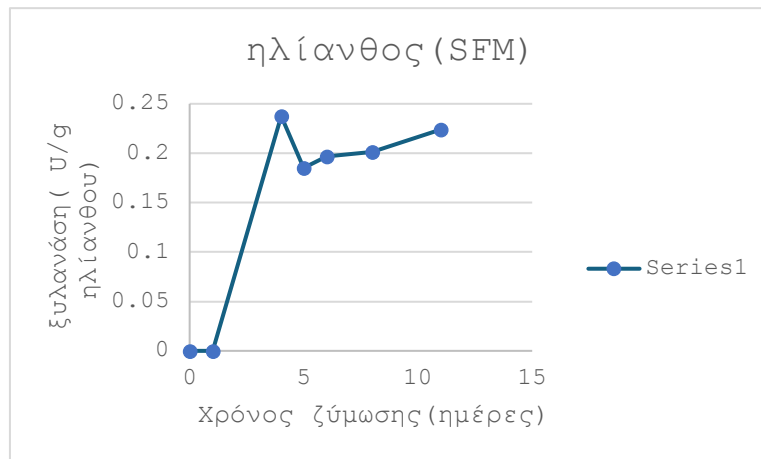
Η ενζυμική δραστικότητα μετρήθηκε με τη μέθοδο DNS κατά τη ζύμωση σε διαφορετικές μέρες. Η μέθοδος DNS μετρά αναγωγικά σάκχαρα όπως γλυκόζη και ξυλόζη, τα προϊόντα της υδρόλυσης. Χρησιμοποιήθηκαν 3 ειδών υποστρώματα τα οποία ήταν ο ηλίανθος, η γύρη και η σόγια και παρακάτω παρατίθενται γραφήματα με τις μεταβολές της δραστικότητας των ενζύμων γλυκοαμυλάση και ξυλανάση σε μονάδες (U/g υποστρώματος). Τα ένζυμα αυτά διαφέρουν στη λειτουργία τους ανάλογα με το υπάρχον υπόστρωμα αλλά και τη διάρκεια ζύμωσης.

Στο πρώτο γράφημα παρουσιάζεται το υπόστρωμα του ηλίανθου με την παραγωγή του ενζύμου της γλυκοαμυλάσης. Στα αρχικά στάδια παρατηρούμε ότι δεν παράγεται κάτι. Από την 4^η μέρα παρατηρείται η ενεργοποίηση της παραγωγής ενζύμων από τους μικροοργανισμούς που εμβολιάστηκε το υπόστρωμα, οι οποίοι φαίνεται να μεταβολίζουν το άμυλο του υποστρώματος. Την 5^η μέρα, η μικροβιακή ανάπτυξη είναι στο μέγιστο σημείο, με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ενζύμων, δηλαδή οι μικροοργανισμοί είναι πιο ενεργοί στη διάσπαση αμύλου σε γλυκόζη. Στην πορεία, από την 5^η μέρα και μετά παρατηρείται πτώση, μείωση της δραστικότητας, πιθανώς λόγω ανεπάρκειας διαθέσιμου αμύλου καθώς και συσσώρευση μεταβολιτών οι οποίοι φαίνεται να δρουν ανασταλτικά στη δραστηριότητα της γλυκοαμυλάσης. Όσο προχωράνε οι μέρες της ζύμωσης παρατηρείται και πτώση του pH κάτι που επηρεάζει επίσης τη λειτουργία του ενζύμου.



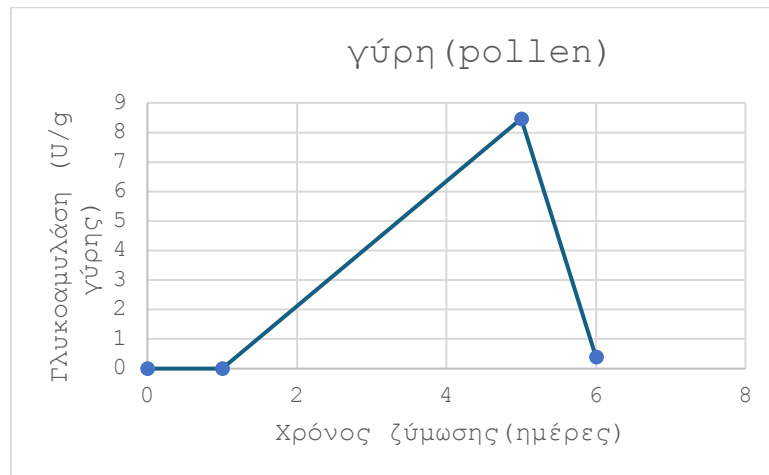
Γράφημα 25: Ηλίανθος U Γλυκοαμυλάση

Στο γράφημα αυτό φαίνεται επίσης το υπόστρωμα του ηλίανθου με το ένζυμο της ξυλανάσης. Το υπόστρωμα του ηλίανθου περιέχει ξυλάνες το οποίο ενεργοποιεί τη δραστικότητα της ξυλανάσης και απεικονίζεται στο γράφημα μέχρι την 3^η μέρα. Μετά, προς την 5^η μέρα παρατηρείται μία πτώση όπου στη πορεία παραμένει σχετικά σταθερή. Αυτό δείχνει τη διατήρηση της παραγωγής των ενζύμων σε σταθερό ρυθμό ή τη σταδιακή εξάντληση του θρεπτικού υποστρώματος.



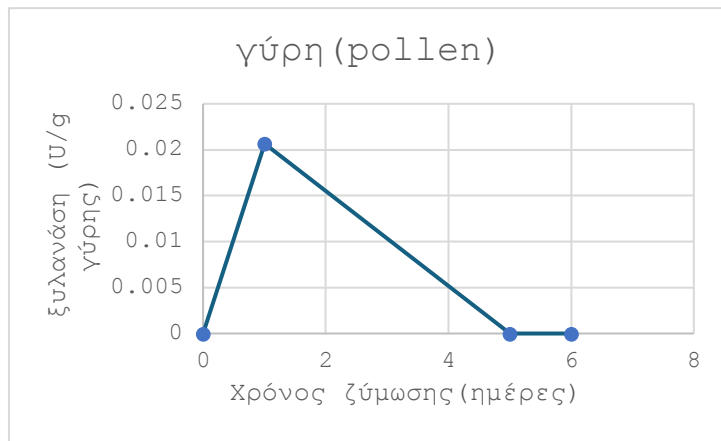
Γράφημα 26: Ηλίανθος U Ξυλανάση

Το υπόστρωμα της γύρης σε αυτό το γράφημα δείχνει θεαματική αύξηση στην 5^η μέρα, το οποίο σημαίνει ότι άρχισαν οι μικροοργανισμοί να έχουν πρόσβαση στο θρεπτικό υπόστρωμα του αμύλου και να παράγουν ένζυμο. Η μείωση σημαίνει ότι σταδιακά καταναλώθηκαν τα θρεπτικά κι έτσι σταματάει και η παραγωγή τους.



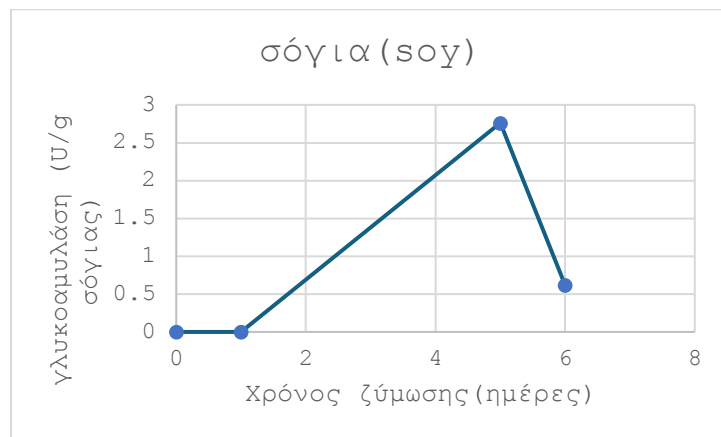
Γράφημα 27: Γύρη U Γλυκοαμυλάση

Η γύρη δε φαίνεται να περιέχει σημαντικές ποσότητες ξυλάνης διότι παρατηρείται μια συνεχής σταδιακή μείωση κι αυτό οφείλεται στη πιθανή αναστολή της παραγωγής της από άλλες ενώσεις της γύρης.



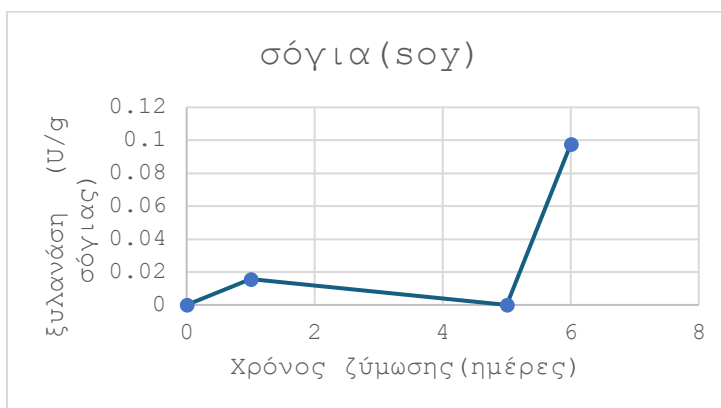
Γράφημα 28: Γύρη U Ξυλανάση

Η σόγια περιέχει χαμηλότερο άμυλο από όλα τα άλλα υποστρώματα κι αυτό φαίνεται στο γράφημα καθώς δεν επάγεται η παραγωγή της μετά την 5^η μέρα που παρατηρείται μια σταδιακή αύξηση. Αυτό σημαίνει ότι οι μικροοργανισμοί δεν λειτουργούν καλά διότι δεν μπορούν να ανταπεξέλθουν με το υπόστρωμα.



Γράφημα 29: Σόγια U Γλυκοαμυλάση

Η παραγωγή ξυλανάσης ξεκινάει την 6^η μέρα και σε σχετικά μικρές ποσότητες. Αυτό πιθανώς συμβαίνει λόγω αναστολής δράσης από άλλα συστατικά του υποστρώματος (πχ πρωτεΐνες).



Γράφημα 30: Σόγια U Ξυλανάση

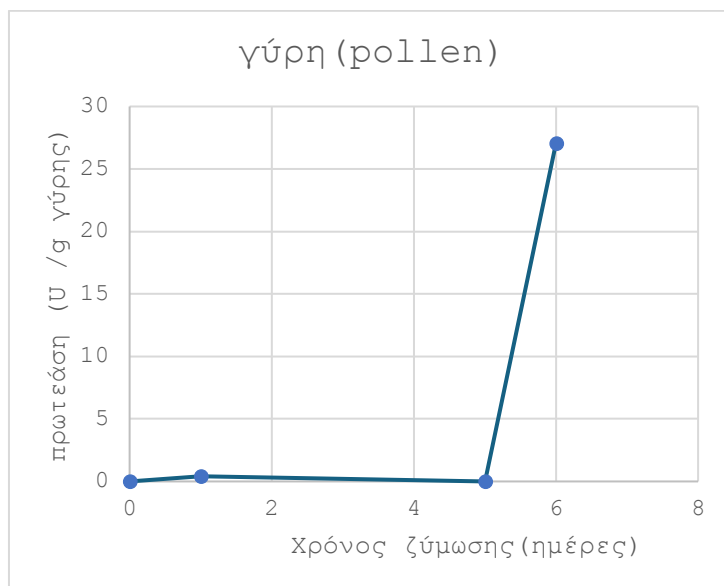
Συμπερασματικά, η ενζυμική δραστηριότητα είναι χαμηλή ή μηδενική διότι οι μικροοργανισμοί βρίσκονται σε φάση αδράνειας και δεν έχουν προσαρμοστεί ακόμα στην παραγωγή των

ενζύμων. Στην πορεία, όσο ανεβαίνει η καμπύλη στο γράφημα, σημαίνει ότι αυξάνεται η δραστηριότητα του ενζύμου και άρα η παραγωγή των σακχάρων. Τέλος, μετά από κάποιο σημείο αν μειωθεί η καμπύλη αποδεικνύει την εξάντληση των θρεπτικών υποστρωμάτων ή τη συσσώρευση κάποιων μεταβολιτών που εμποδίζουν τη δράση των ενζύμων. Στην περίπτωση, που υπάρξει σταθεροποίηση σημαίνει ότι συνεχίζεται κανονικά η παραγωγή των ενζύμων.

4.4. Ανάλυση αποτελεσμάτων πρωτεολυτικής δραστηριότητας κατά τη ζύμωση (μέθοδος FAN)

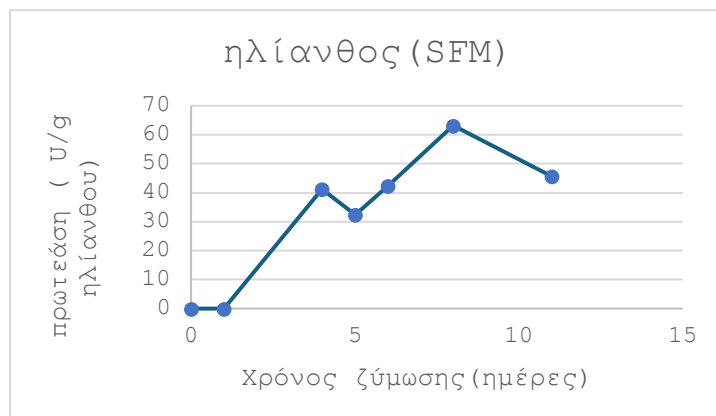
Με αυτή τη μέθοδο, μελετάται η παραγωγή πρωτεολυτικών ενζύμων κατά τη διάρκεια ζύμωσης σε τρία διαφορετικά υποστρώματα (γύρη, σόγια, ηλίανθο). Είναι πολύ σημαντικό να αξιολογηθεί η ενζυμική απόδοση σε κάθε υπόστρωμα, δηλαδή ποιο υπόστρωμα ευνοεί περισσότερο την παραγωγή πρωτεάσης (ενεργοποίηση μικροοργανισμών) καθώς και να εντοπιστεί ο βέλτιστος χρόνος ζύμωσης για τη μέγιστη παραγωγή πρωτεάσης.

Στη γύρη παρατηρείται σχεδόν μηδενική δραστηριότητα μέχρι την 5^η μέρα, πιθανώς λόγω καθυστερημένης ενζυμικής παραγωγής. Στην 6^η μέρα, παρατηρείται έντονη αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας και παραγωγής πρωτεάσων οι οποίες διασπούν τις πρωτεΐνες σε αμινοξέα.



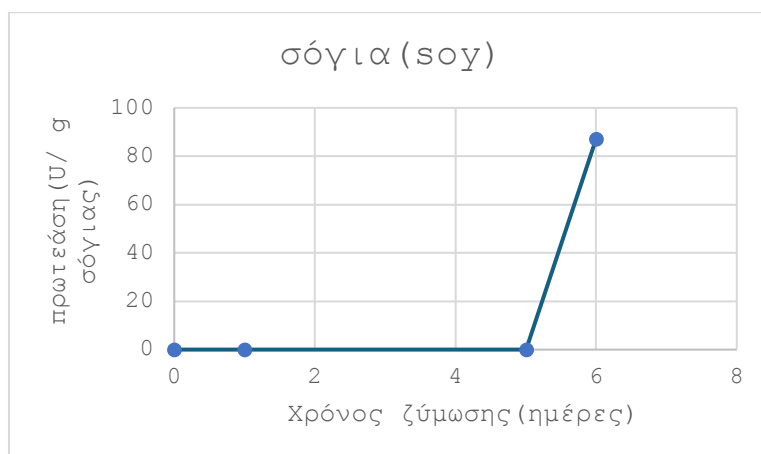
Γράφημα 31: Γύρη U Πρωτεάση

Στον ηλίανθο, παρατηρήθηκε πιο γρήγορη παραγωγή πρωτεάσης σε σχέση με άλλα υποστρώματα και παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση με το μέγιστο σημείο να είναι την 8^η μέρα. Αυτό δείχνει συνεχή δραστηριότητα των μικροοργανισμών στο υπόστρωμα άρα και συνεχή παραγωγή ενζύμων.



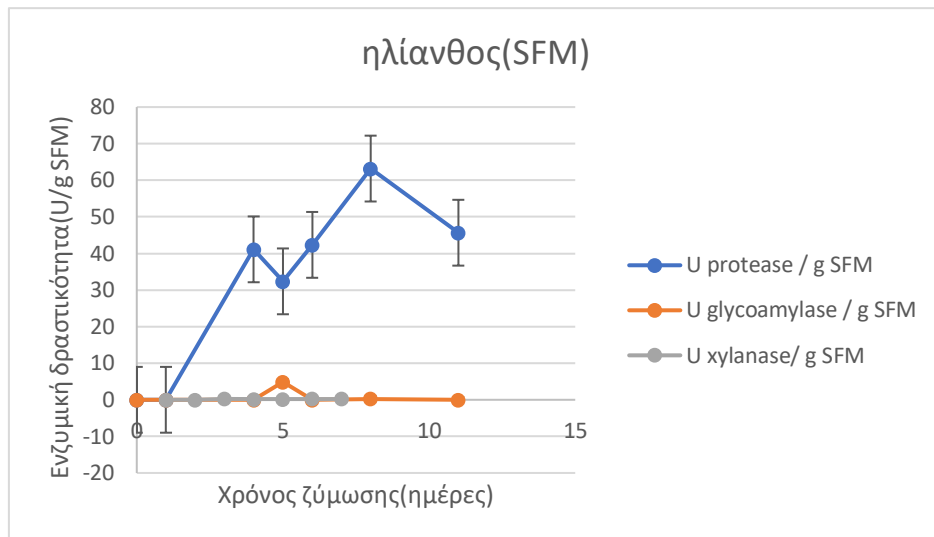
Γράφημα 32: Ηλίανθος U Πρωτεάση

Η σόγια, είναι το πιο πλούσιο υπόστρωμα σε πρωτεΐνες σε σχέση με την γύρη και τον ηλίανθο. Δεν παράγεται καθόλου ένζυμο για τις 4 πρώτες μέρες και έπειτα την 5^η μέρα παρατηρείται εκθετική αύξηση φτάνοντας τα 87,2 U/g. Οι μικροοργανισμοί ενεργοποιούνται για να τη διασπάσουν σε πεπτίδια και αμινοξέα.

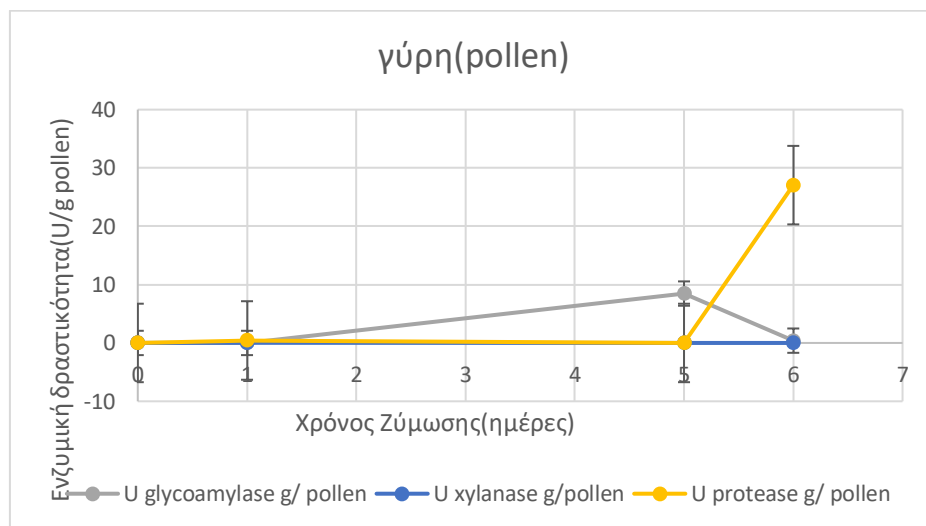


Γράφημα 33: Σόγια U Πρωτεάση

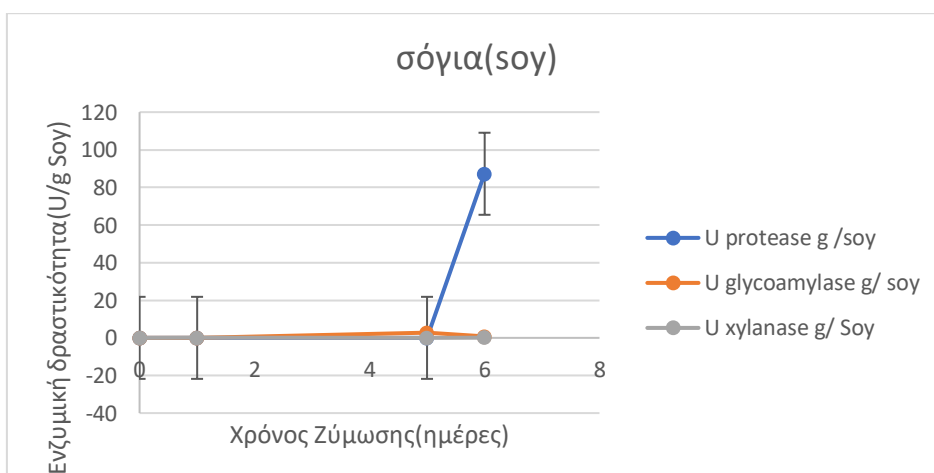
Παρατίθενται παρακάτω γραφήματα με τη συνολική σύγκριση των ενζυμικών δραστηριοτήτων. Από αυτά, καταλαβαίνουμε ότι κάθε υπόστρωμα ενεργοποιεί την παραγωγή διαφορετικών ενζύμων από τους μικροοργανισμούς, ανάλογα με τη χημική τους σύσταση. Πιο συγκεκριμένα η πρωτεάση παράγεται περισσότερο στο υπόστρωμα της σόγιας.



Γράφημα 34: Ηλίανθος Βιοδραστικότητα Ενζύμων



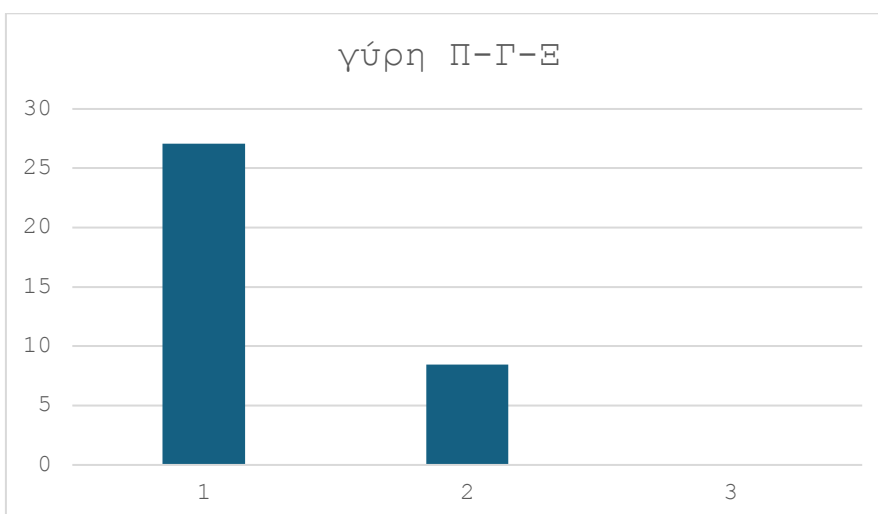
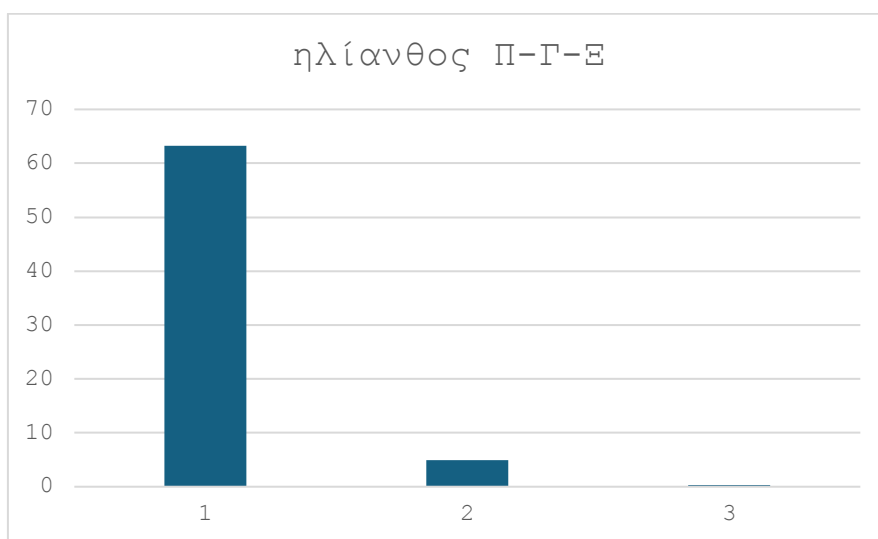
Γράφημα 35: Γύρη Βιοδραστικότητα Ενζύμων

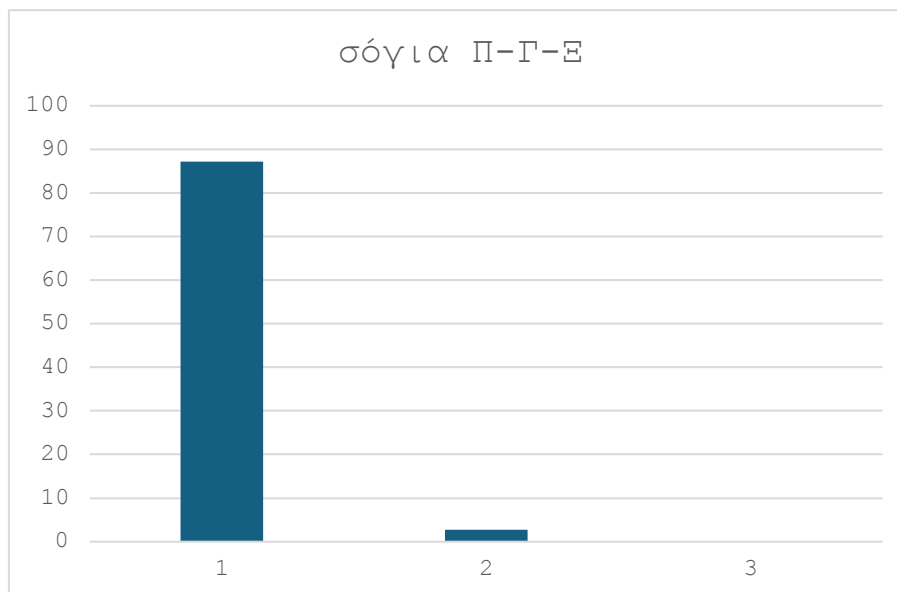


Γράφημα 36: Σόγια Βιοδραστικότητα Ενζύμων

Δημιουργώντας γραφήματα με τις υψηλότερες ενζυμικές δραστηριότητες, παρατηρήθηκε ότι η πρωτεάση είναι το ένζυμο που παράγεται σε όλα τα υποστρώματα και σε υψηλές ποσότητες.

Το αμέσως επόμενο ένζυμο είναι η γλυκοαμυλάση η οποία παράγεται περισσότερο στη γύρη και σε μικρότερη ποσότητα στον ηλίανθο. Τέλος, η ξυλανάση είναι οριακά ανύπαρκτη σε όλα τα υποστρώματα γεγονός που αποδεικνύει την χαμηλή περιεκτικότητα του υποστρώματος σε ξυλάνη.

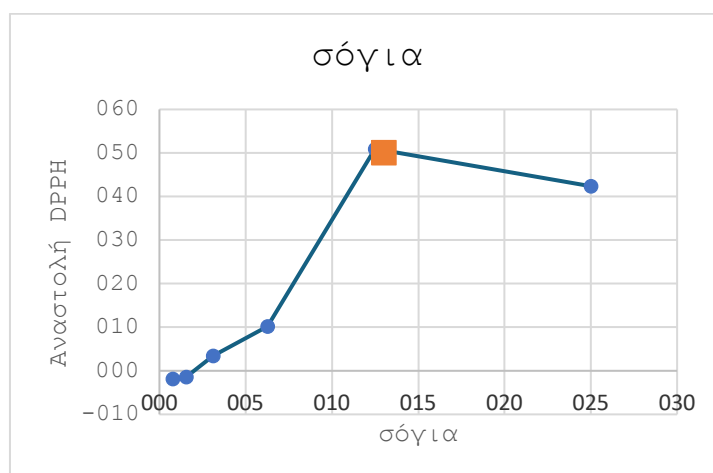




Γράφημα 37: Συγκριτικά αποτελέσματα Πρωτεΐνης, Γλυκοαμυλάσης και Ξυλανάσης στα τρία υποστρώματα

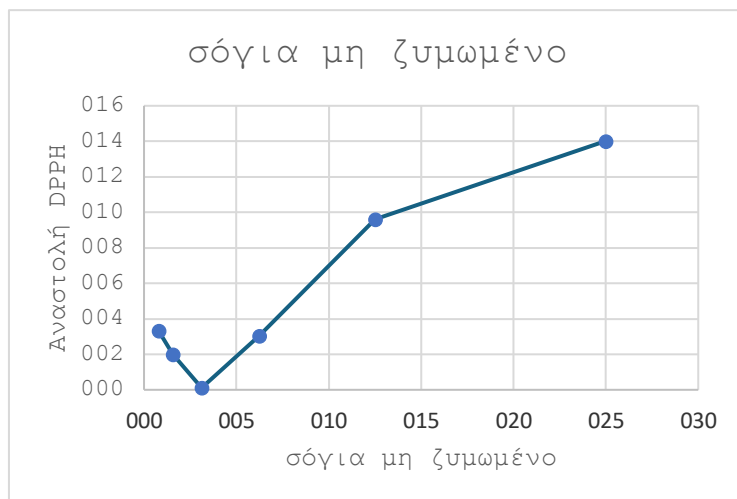
4.5. Ανάλυση αποτελεσμάτων δοκιμής αντιοξειδωτικής ικανότητας DPPH

Στο ζυμωμένο εκχύλισμα σόγιας παρατηρείται ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση, αυξάνεται και η ικανότητα δέσμευσης των ελεύθερων ριζών. Η μέγιστη δράση αναστολής φτάνει το 50% με την τιμή IC_{50} να είναι στα 13 mg/mL. Έτσι, το δείγμα αυτό έχει μέτρια αντιοξειδωτική δράση.



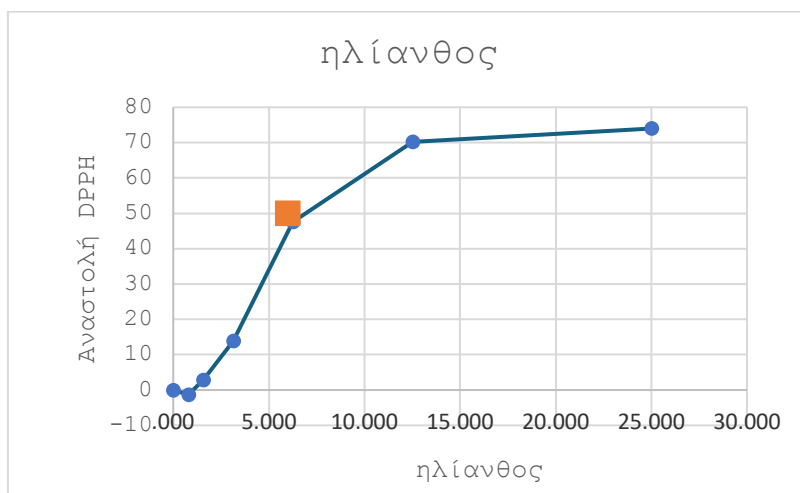
Γράφημα 38: Αναστολή DPPH στη σόγια

Το μη ζυμωμένο εκχύλισμα σόγιας έχει μέγιστη αναστολή του DPPH 14,02%. Αυτή η τιμή είναι πολύ χαμηλότερη από το 50%, που είναι το όριο για τον υπολογισμό της τιμής IC_{50} . Επομένως δεν είναι δυνατός ο υπολογισμός της κάτι το οποίο δείχνει πολύ χαμηλή αντιοξειδωτική ικανότητα. Άρα, η ζύμωση επιδρά καλύτερα στην αντιοξειδωτική ικανότητα.



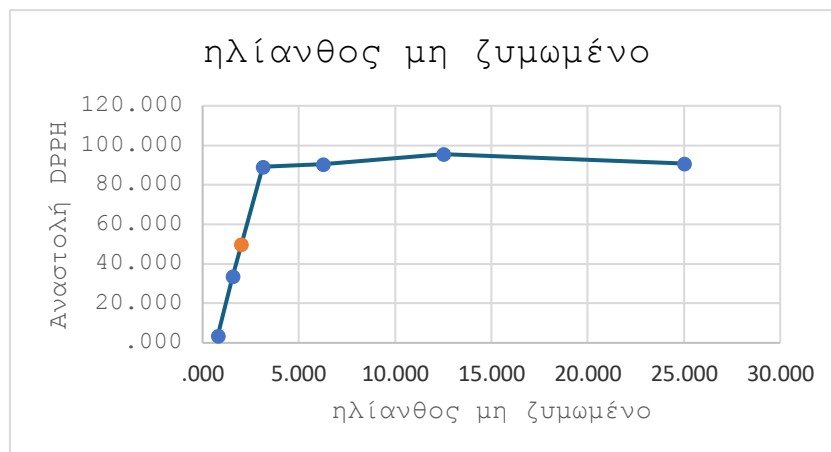
Γράφημα 39: Αναστολή DPPH σε μη ζυμωμένη σόγια

Ο ηλίανθος παρουσιάζει υψηλή αντιοξειδωτική δράση καθώς σε σχετικά χαμηλή συγκέντρωση φτάνει στο 50% της αναστολής. Η τιμή IC_{50} είναι στα 6mg/ml.



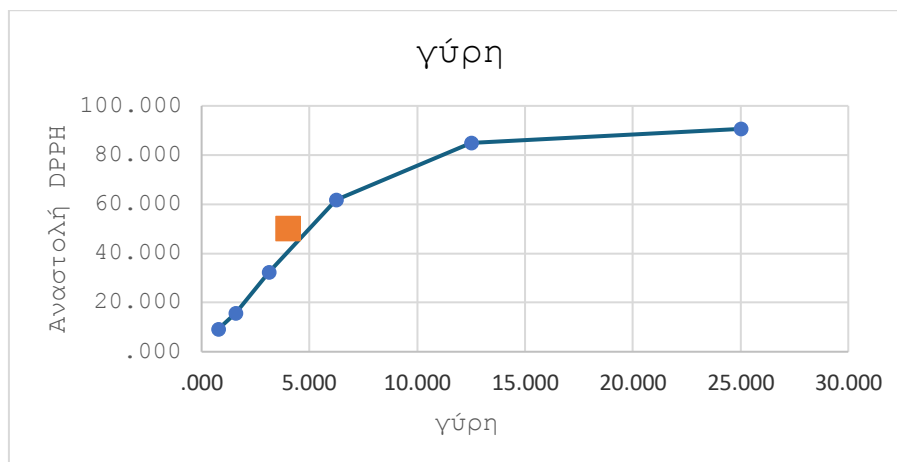
Γράφημα 40: Αναστολή DPPH στον Ηλίανθο

Το μη ζυμωμένο δείγμα του ηλίανθου δείχνει ακόμα πιο υψηλή αντιοξειδωτική δράση καθώς είναι σε χαμηλότερη συγκέντρωση με τιμή $IC_{50}=2\text{mg/ml}$. Είναι αξιοσημείωτο διότι το μη ζυμωμένο δίνει καλύτερα αποτελέσματα από το ζυμωμένο.



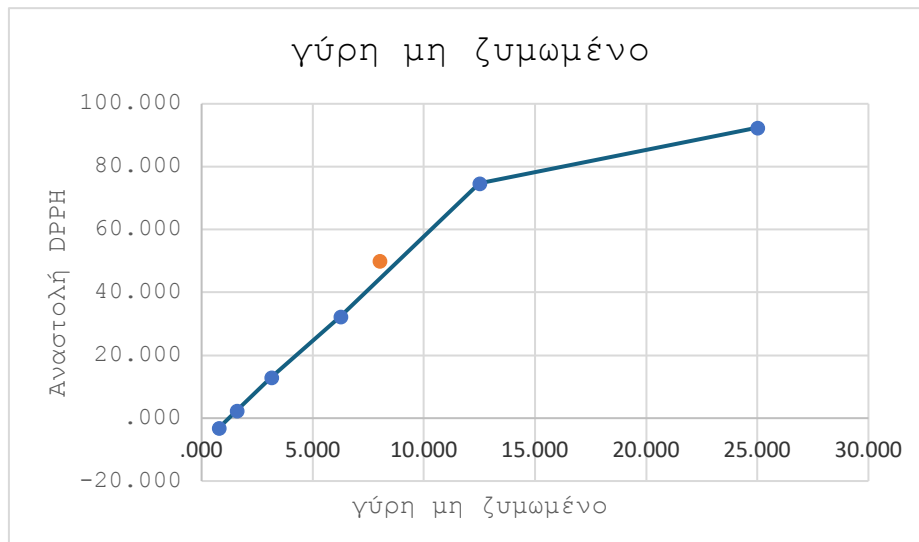
Γράφημα 41: Αναστολή DPPH στον μη ζυμωμένο Ηλίανθο

Το ζυμωμένο εκχύλισμα γύρης παρουσιάζει εξίσου ισχυρή αντιοξειδωτική δράση με IC_{50} κοντά στο 4mg/ml, κάτι που δείχνει ότι χρειάζεται αρκετά μικρή ποσότητα για να επιτευχθεί 50% αναστολή. Η ικανότητα δέσμευσης των ελεύθερων ριζών αυξάνεται όσο αυξάνεται και η συγκέντρωση, φτάνοντας το 98%.



Γράφημα 42: Αναστολή DPPH στη γύρη

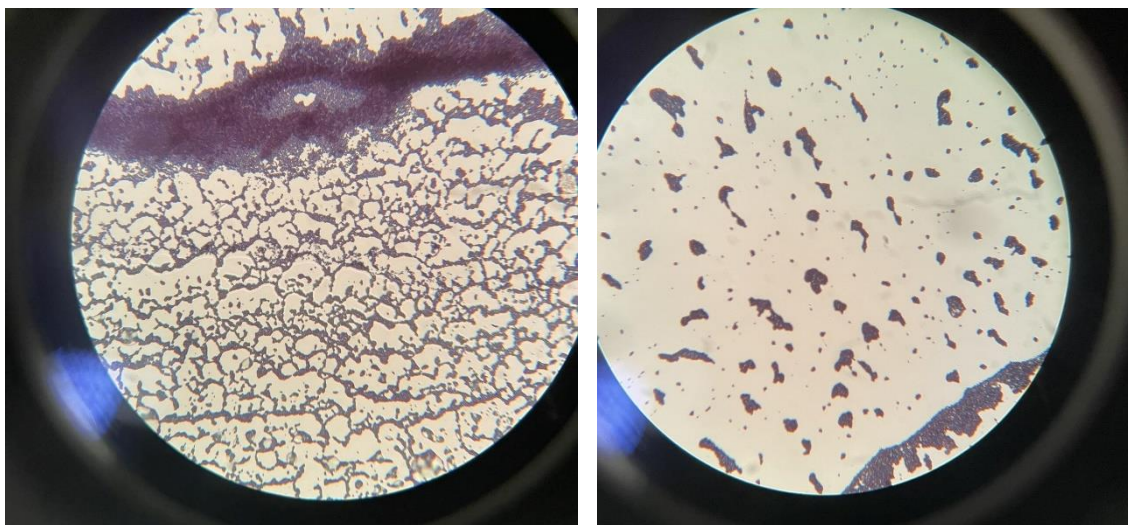
Το μη ζυμωμένο εκχύλισμα γύρης αποδεικνύει επίσης υψηλή αντιοξειδωτική δράση με τιμή IC_{50} 8mg/ml. Το αποτέλεσμα δείχνει ότι η ζύμωση της γύρης ενισχύει σημαντικά την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών.



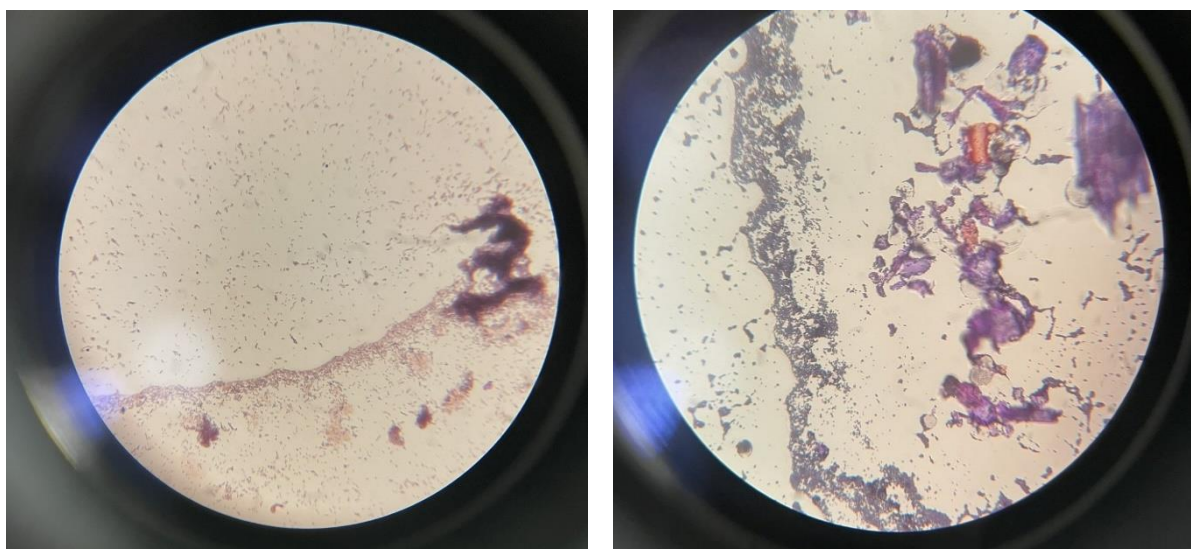
Γράφημα 43: Αναστολή DPPH σε μη ζυμωμένη γύρη

4.6. Αποτελέσματα χρώσης gram:

Η χρώση Gram πραγματοποιήθηκε στο δείγμα *Bacillus licheniformis* 108 καθώς υπήρξε αμφιβολία για τις αποικίες που είχαν σχηματιστεί. Η χρώση παρόλα αυτά έδειξε αποτελέσματα χαρακτηριστικά των Gram-θετικών βακτηρίων, δηλαδή, με έντονο ιώδες χρώμα(μωβ). Επίσης, από τη μικροσκοπική παρατήρηση επιβεβαιώθηκε η παρουσία Gram-θετικών βακτηρίων όπως το *Bacillus licheniformis* 108 λόγω του σχήματος τους(ράβδοι) είτε σε αλυσίδες είτε μεμονωμένοι.



Εικόνα 3 & 4: Gram Θετικά



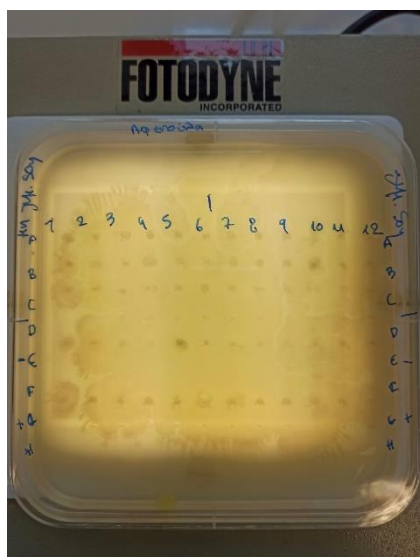
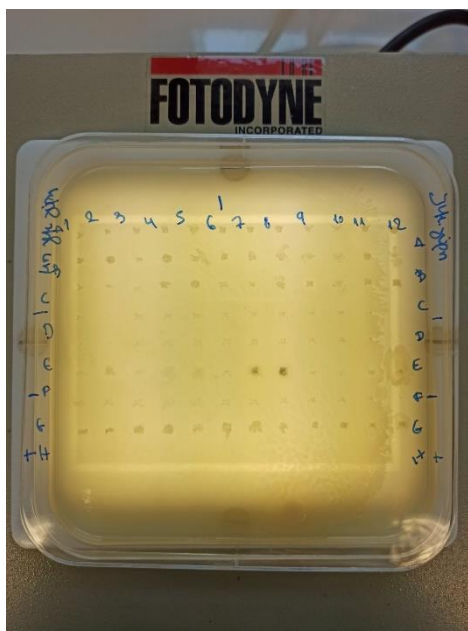
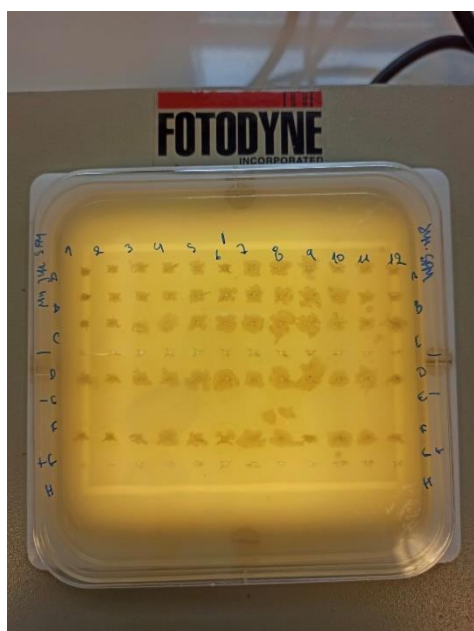
Εικόνα 5 & 6: Gram Αρνητικά

Βέβαια, κάποιες αποικίες από το τρυβλίο έδειξαν διαφορετικά αποτελέσματα (Gram αρνητικά) πιθανώς κάποια επιμόλυνσης με διαφορετικό στέλεχος.

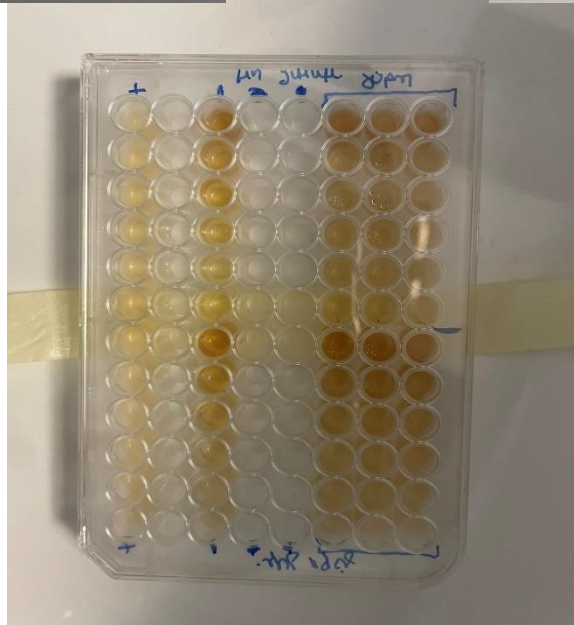
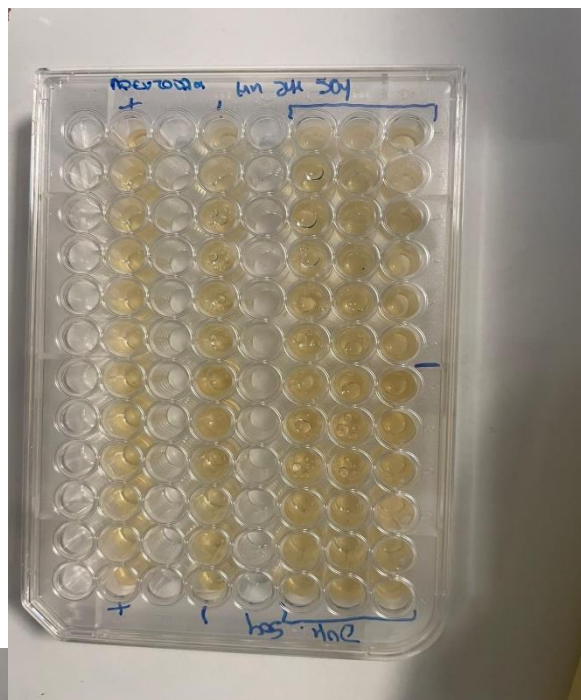
Γι' αυτό το λόγο προκειμένου να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις, ξανά καλλιέργησα σε πλήρως στείρες συνθήκες τον *Bacillus licheniformis* 108 από το stock.

4.7. Αποτελέσματα δράσης MIC, MBC

Οι μέθοδοι αυτοί διεξάχθηκαν σύμφωνα με το καθιερωμένο πρωτόκολλο και παρατηρήθηκε ότι κανένα δείγμα δεν είχε κάποια αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Staphylococcus aureus* καθώς δεν υπήρξε ούτε μικροβιοκτόνος δράση στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις που πραγματοποιήθηκε το πείραμα ούτε ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη μικροοργανισμών. Αυτό συμβαίνει λόγω του ότι το υπόστρωμα περιείχε ενδογενείς μικροοργανισμούς, οι οποίοι βρίσκουν πρόσφορο έδαφος και αναπτύχθηκαν. Η ανάπτυξη αποικιών, κατά τη διάρκεια της επώασης, στο αρνητικό control αποδίδεται επίσης στην παρουσία ενδογενών μικροοργανισμών στο υπόστρωμα.



Εικόνα 7, 8 & 9 Αποτελέσματα της μεθόδου MBC



Εικόνα 10, 11 & 12 Αποτελέσματα MIC μετά από 24ωρη επώαση

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η εφαρμογή και επίδραση μικροβιακών στελεχών απομονωμένων από το μελισσόψωμο, στη ζύμωση της γύρης και μελισσοτροφών. Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή το μελισσόψωμο, ένα σημαντικό προϊόν της κυψέλης, δημιουργείται από τη γύρη που συλλέγουν οι μέλισσες από διάφορα φυτά και την αποθηκεύουν κοντά στον γόνο, για τη διατροφή του (Bakour et al. 2022). Η γύρη αυτή εμπλουτίζεται με νέκταρ, μέλι και μικροοργανισμούς από το μικροβίωμα της μέλισσας, και υποβάλλεται σε μια διαδικασία ζύμωσης (Kostić et al. 2020).

Το μελισσόψωμο αποτελεί βασική πηγή πρωτεϊνών, λιπών, βιταμινών και ιχνοστοιχείων για τις μέλισσες. Η ζύμωση αυξάνει τη βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών που περιέχονται στη γύρη, καθιστώντας τα πιο εύκολα απορροφήσιμα (Bakour et al. 2022). Κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, οι μικροοργανισμοί του μικροβιώματος της μέλισσας διασπούν τη γύρη μέσω των ενζύμων που παράγουν, διευκολύνοντας έτσι την πρόσβαση και την αφομοίωση των υδατανθράκων και των πρωτεϊνών από τις μέλισσες (Aksoy et al. 2024). Το μικροβίωμα της μέλισσας διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στη διαδικασία ζύμωσης της γύρης και στην πέψη των φυτικών υλικών που καταναλώνει η μέλισσα. Οι μικροοργανισμοί που συμβιώνουν στο πεπτικό σύστημα της μέλισσας παράγουν ενεργά ένζυμα τα οποία διασπούν σύνθετους υδατάνθρακες σε απλούστερα σάκχαρα και θρεπτικά συστατικά, καθιστώντας τη γύρη πιο εύπεπτη και θρεπτική (Engel et al. 2016). Συνολικά, η παραγωγή και η δραστηριότητα των ενζύμων αυτών από τους μικροοργανισμούς καθιστούν τη γύρη πιο θρεπτική και συμβάλλουν στη διατήρηση της καλής κατάστασης της κυψέλης (Bakour et al. 2022).

Φαίνεται ότι η ζύμωση πραγματοποιείται σε διαβαθμισμένη συγκέντρωση οξυγόνου, και ότι τα βακτηριακά στελέχη που συμμετέχουν σε αυτή είναι υποχρεωτικά αναερόβια ή δυνητικά αναερόβια (Mattila et al. 2012).

Η γύρη ως τροφή στην κυψέλη είναι ευπαθής, λόγω της υγρασίας που περιέχει και το ζεστό περιβάλλον της κυψέλης μπορεί να την αλλοιώσει πολύ γρήγορα. (Kostić et al. 2020). Η μετατροπή της γύρης σε μελισσόψωμο (ζυμωμένη γύρη), βοηθά στην διατήρησή της στην κυψέλη για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Το μελισσόψωμο επίσης φαίνεται να είναι πιο θρεπτικό και βιοδραστικό από την γύρη.

Από τα πειράματα που διεξήχθησαν κατά την διάρκεια του εργαστηριακού μέρους της παρούσας μελέτης προκύπτουν αρκετά στοιχεία:

α) για την **επίδραση των ενζύμων** που παράγονται στην διάρκεια της ζύμωσης από τους μικροοργανισμούς, και τα οποία είναι κυρίως πρωτεάσες, αμυλάσες, ξυλανάσες.

β) της **αντιοξειδωτικής ικανότητας**, στην δέσμευση των ελεύθερων ριζών με δοκιμή DPPH

γ) της **αντιμικροβιακής δράσης**

Χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά υποστρώματα:

1) Ηλίανθος

2) Γύρη

3) Σόγια

Σε καθένα από αυτά τα υποστρώματα προστέθηκαν 4 διαφορετικά στελέχη μικροοργανισμών που είχαν αναπτυχθεί προηγουμένως στο εργαστήριο σε καλλιέργειες και έχουν απομονωθεί από το μελισσόψωμο. Έπειτα έγινε ανίχνευση των ενζύμων που παράγονταν από τους

μικροοργανισμούς κατά την διαδικασία της ζύμωσης, και μελέτη της επίδρασής τους στα υποστρώματα αυτά.

Συνοπτικά για τα ένζυμα που ανιχνεύτηκαν από τους μικροοργανισμούς στα 3 υποστρώματα:

- η πρωτεάση είναι το ένζυμο που παράγεται σε όλα τα υποστρώματα και σε υψηλές ποσότητες
- η γλυκοαμυλάση η οποία παράγεται περισσότερο στη γύρη, λιγότερη στην σόγια και σε μικρότερη ποσότητα στον ηλίανθο
- η ξυλανάση δεν ανιχνεύεται σε όλα τα υποστρώματα, παρά μόνο στον ηλίανθο σε ελάχιστη ποσότητα, γεγονός που αποδεικνύει την χαμηλή περιεκτικότητα των υποστρωμάτων σε ξυλάνη.

Στην μελέτη (Asoutis Didaras et al. 2024) περιγράφονται τα ένζυμα που παράγονται από το μικροβίωμα της μέλισσας. Από 309 βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από μελισσόψωμο, βρέθηκε ότι: 41 παρήγαγαν ημικυλλουλάσες, 13 κυτταρινάσες, 39 αμυλάσες, 132 πρωτεϊνάσες, 85 ένζυμα αποικοδόμησης της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue, 72 ένζυμα αποικοδόμησης της Malachite Green.

Το μικροβίωμα έχει υψηλό βιοσυνθετικό δυναμικό και μπορεί να διασπά πολύπλοκα συστατικά της γύρης. Το μελισσόψωμο δεν είναι απλώς αποθηκευμένη γύρη. Η ενζυμική δραστηριότητα των μικροβίων του παίζει καθοριστικό ρόλο στη διάσπαση πολύπλοκων μορίων, στην απελευθέρωση θρεπτικών ουσιών και στην ενίσχυση της βιοδραστικότητας (αντιοξειδωτική, αντιβακτηριακή, αντιφλεγμονώδης).

Η ενζυμική δραστηριότητα του μελισσόψωμου αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους μηχανισμούς μέσω των οποίων το μικροβίωμα του προϊόντος συμβάλλει στη βιοδραστικότητα και στη θρεπτική του αξία. Το μικροβίωμα του, αποτελείται κυρίως από στελέχη γαλακτικών βακτηρίων (*Apilactobacillus*, *Fructobacillus*) και διάφορα είδη *Bacillus*, διαθέτει πλούσιο βιοσυνθετικό δυναμικό και είναι ικανή να εκκρίνει ένζυμα που διασπούν πολύπλοκα μακρομόρια της γύρης. Έχει βρεθεί ότι απομονωμένα βακτηριακά στελέχη παρουσιάζουν δραστηριότητα για ημικυτταρινάσες, κυτταρινάσες, αμυλάσες, πρωτεάσες και ένζυμα αποικοδόμησης χρωστικών, αποκαλύπτοντας μια πολυμορφία ενζυμικών λειτουργιών.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι πρωτεάσες και οι ξυλανάσες, καθώς συνδέονται άμεσα με τη βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών. Οι πρωτεάσες συμμετέχουν στην υδρόλυση των πρωτεϊνικών συστατικών της γύρης, οδηγώντας στην απελευθέρωση πεπτιδίων και ελεύθερων αμινοξέων, τα οποία είναι ευκολότερα αξιοποιήσιμα από τις μέλισσες και συμβάλλουν στη βελτίωση του διατροφικού προφίλ του μελισσόψωμου. Από την άλλη πλευρά, οι ξυλανάσες (ένζυμα ημικυτταρινικής διάσπασης) παίζουν καίριο ρόλο στη ρήξη του ανθεκτικού εξωτερικού τοιχώματος της γύρης, το οποίο περιέχει σύνθετες πολυσακχαριδικές δομές. Με τη δράση τους διευκολύνουν την απελευθέρωση εγκλωβισμένων βιοδραστικών μορίων, όπως οι πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή, ενισχύοντας την αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση του προϊόντος.

Η συγκριτική ανάλυση αυτών των δύο κατηγοριών ενζύμων δείχνει ότι, ενώ οι πρωτεάσες επικεντρώνονται κυρίως στην αξιοποίηση των θρεπτικών συστατικών που σχετίζονται με την ανάπτυξη και τον μεταβολισμό (πρωτεΐνες, αμινοξέα), οι ξυλανάσες συμβάλλουν περισσότερο στη διάθεση βιοδραστικών μορίων με προστατευτικό και θεραπευτικό χαρακτήρα. Συνεπώς, η συνεργιστική δράση τους είναι καθοριστική: οι πρωτεάσες υποστηρίζουν τη διατροφική αξία, ενώ οι ξυλανάσες ενισχύουν τη βιοδραστικότητα και την προστασία έναντι παθογόνων μικροοργανισμών.

Σε μια ακόμη μελέτη των (Bakour et al. 2022), περιγράφει ότι κατά τη διαδικασία της ζύμωσης, ένζυμα που προέρχονται τόσο από τους υποφαρυγγικούς αδένες των μελισσών (όπως η αμυλάση, η ινβερτάση και η γλυκόζη-οξειδάση) όσο και από το μικροβίωμα του μελισσόψωμου (*Lactobacillus*, *Bacillus spp.*) καταλύουν τη διάσπαση πολύπλοκων μακρομορίων σε πιο απλές και βιοδιαθέσιμες μορφές.

Κύρια ένζυμα που έχουν εντοπιστεί: Αμυλάση, Ινβερτάση, Φωσφατάσες, Τρανσφεράσες, Γλυκόζη-οξειδάση, Καταλάση

Τα γαλακτικά βακτήρια και άλλοι μικροοργανισμοί εκκρίνουν συμπληρωματικά ένζυμα (π.χ. πρωτεάσες, λιπάσες, γλυκοσιδάσες), που ενισχύουν τη ζύμωση και τη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων της γύρης. Τα ένζυμα στο μελισσόψωμο δρουν ως “καταλύτες μετασχηματισμού” που μετατρέπουν την γύρη από μια δύσπεπτη πρώτη ύλη σε ένα λειτουργικό προϊόν, πλούσιο σε θρεπτικά και βιοδραστικά συστατικά, με πολλαπλά οφέλη για την υγεία τόσο των μελισσών όσο και του ανθρώπου.

Η αντιοξειδωτική ικανότητα μετρήθηκε σε δείγματα ζυμωμένα και μη ζυμωμένα για τα τρία υποστρώματα με την τεχνική DPPH η οποία είναι από τις πιο γνωστές και απλές δοκιμές για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας ενός δείγματος. Χρησιμοποιήθηκε ως βασική δοκιμή αξιολόγησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας των υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στο εργαστήριο (σόγια, γύρη και ηλίανθο). Με γνώμονα τον υπολογισμό της τιμής IC_{50} (συγκέντρωση που απαιτείται για να εξουδετερώσει το 50% των ριζών DPPH) γίνεται ποσοτική μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας. Όσο χαμηλότερη είναι η τιμή IC_{50} τόσο πιο μεγάλη είναι η αντιοξειδωτική ικανότητα του δείγματος.

Σε σχέση με την αντιοξειδωτική ικανότητα που μετρήθηκε σε δείγματα ζυμωμένα και μη ζυμωμένα για τα τρία υποστρώματα με την τεχνική DPPH έχουμε τα εξής:

Σόγια : στην ζυμωμένη σόγια το ποσοστό αναστολής είναι πάνω από το 50 % σε τιμή IC_{50} στα 13 mg/mL. Στην μη ζυμωμένη σόγια το ποσοστό αναστολής είναι πάνω από το 50 % σε τιμή IC_{50} στα 14,02mg/mL. Παρατηρείται ότι η αναστολή είναι μεγαλύτερη σε δείγματα που έχουν ζυμωθεί.

Ηλίανθος: Στον ζυμωμένο ηλίανθο το ποσοστό αναστολής είναι IC_{50} στα 6mg/mL. Το μη ζυμωμένο δείγμα του ηλίανθου δείχνει ακόμα πιο υψηλή αντιοξειδωτική δράση καθώς είναι σε χαμηλότερη συγκέντρωση με τιμή IC_{50} στα 2mg/mL. Είναι αξιοσημείωτο διότι ο μη ζυμωμένος δίνει καλύτερα αποτελέσματα από τον ζυμωμένο.

Γύρη: Το ζυμωμένο εκχύλισμα γύρης παρουσιάζει εξίσου ισχυρή αντιοξειδωτική δράση με IC_{50} κοντά στο 4mg/ml, γεγονός που υποδεικνύει ότι απαιτείται αρκετά μικρή ποσότητα για να επιτευχθεί 50% αναστολή. Το μη ζυμωμένο εκχύλισμα γύρης παρουσιάζει υψηλή αντιοξειδωτική δράση με τιμή IC_{50} 8mg/ml. Το αποτέλεσμα δείχνει ότι η ζύμωση της γύρης ενισχύει σημαντικά την εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι τα ζυμωμένα υποστρώματα παρουσιάζουν καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα σε σχέση με τα μη ζυμωμένα.

Στην μελέτη (Didaras et al. 2021), τα περισσότερα ελληνικά δείγματα έδειξαν έντονη δράση στην εξουδετέρωση ελευθέρων ριζών, με το δείγμα που προερχόταν από κάστανο να ξεχωρίζει, καθώς εμφάνισε την ισχυρότερη αντιοξειδωτική αποτελεσματικότητα και μπορεί να θεωρηθεί ένα από τα πιο δραστικά αντιοξειδωτικά τρόφιμα. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε μελισσόψωμο ως φυσικό προϊόν της κυψέλης. Τα περισσότερα δείγματα ελληνικού μελισσόψωμου (bee bread) που εξετάστηκαν έδειξαν ότι παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα με τιμές που κυμαίνονταν από 0,18-1,8mg/mL. Το μονοανθικό δείγμα καστανιάς

(18) ξεχώρισε, με $IC_{50} = 0,18 \text{ mg/mL}$, κατατάσσοντάς το ανάμεσα στα πιο ισχυρά αντιοξειδωτικά τρόφιμα. Η ισχυρή δράση του σχετίζεται πιθανότατα με την υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, φλαβονοειδή και κινארενικό οξύ του κάστανου. Τα περισσότερα δείγματα εμφάνισαν IC_{50} κάτω από 1 mg/mL , γεγονός που δείχνει ότι το ελληνικό μελισσόψωμο μπορεί να θεωρηθεί λειτουργικό τρόφιμο με αξιολογημένη αντιοξειδωτική δράση. Στην παρούσα μελέτη το μελισσόψωμο είχε ξηρανθεί όποτε και οι τιμές DPPH αναμένονται να είναι διαφορετικές από ότι στο νωπό μελισσόψωμο.

Σε μια ακόμη μελέτη (Milek et al. 2023) η μέτρηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με τη δοκιμή DPPH ανέδειξε ότι η εργαστηριακά ζυμωμένη γύρη μπορεί να προσφέρει δράση συγκρίσιμη με εκείνη του φυσικού μελισσόψωμου. Οι τιμές που καταγράφηκαν ήταν κοντά τόσο στο αρχικό δείγμα γύρης όσο και στα φυσικά δείγματα μελισσόψωμου και μη ζυμωμένης γύρης, γεγονός που δείχνει ότι η ελεγχόμενη ζύμωση δεν μειώνει σημαντικά τη βιοδραστικότητα. Αν και παρατηρήθηκαν διαφοροποιήσεις στην περιεκτικότητα σε πολυφαινολικές ενώσεις, η ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών παρέμεινε υψηλή, στοιχείο που υποδηλώνει ότι και τα δύο προϊόντα αποτελούν αξιόλογες πηγές αντιοξειδωτικών. Επιπλέον, η εργαστηριακά ζυμωμένη γύρη προσφέρει το πλεονέκτημα της τυποποίησης και της καλύτερης ελεγχόμενης ποιότητας σε σχέση με το φυσικό προϊόν, το οποίο επηρεάζεται από παράγοντες όπως η βοτανική προέλευση και οι συνθήκες αποθήκευσης. Συνεπώς, η εφαρμογή τεχνικών ζύμωσης για την παραγωγή «bee-bread-like» προϊόντων φαίνεται να αποτελεί μια καινοτόμα και υποσχόμενη στρατηγική για την ανάπτυξη λειτουργικών τροφίμων με σταθερή και αξιόπιστη αντιοξειδωτική δράση.

Η μελέτη των (Can et al. 2024) αξιολογεί την αντιοξειδωτική δραστηριότητα και το φαινολικό περιεχόμενο 15 δειγμάτων μελισσόψωμου από διάφορες περιοχές της Τουρκίας, χρησιμοποιώντας τη τεχνική DPPH. Τα δείγματα μελισσόψωμου του συγκεκριμένου πειράματος παρουσιάζουν μεσαία έως υψηλή αντιοξειδωτική δραστηριότητα, με σημαντικές διαφορές ανάλογα με την προέλευση ή την σύνθεση των δειγμάτων.

Όσο αφορά την αντιμικροβιακή δράση, τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δεν έδειξαν κάποια αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Staphylococcus aureus*, ούτε μικροβιοκτόνο δράση στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις που πραγματοποιήθηκε το πείραμα ούτε ανασταλτική επίδραση στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών.

Συμφωνα με την έρευνα (Didaras et al. 2021) εξετάστηκαν δείγματα μελισσόψωμου και αναλύθηκαν για τις αντιβακτηριακές και αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες, καθώς και για τη συνολική περιεκτικότητά τους σε φαινολικά (TPC) και φλαβονοειδή (TFC). Η αντιμικροβιακή δράση κάθε δείγματος αξιολογήθηκε απέναντι στους *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* και *S. Typhimurium*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα δείγματα επιδεικνύουν ανασταλτική δράση και ότι τα περισσότερα εμφανίζουν βακτηριοκτόνο δράση τουλάχιστον έναντι δύο από τα εξεταζόμενα παθογόνα.

6. ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Το μελισσόψωμο αποτελεί ένα λειτουργικό τρόφιμο με σημαντικές διατροφικές και βιοδραστικές ιδιότητες, αποτέλεσμα της γαλακτικής ζύμωσης που πραγματοποιείται από το μικροβίωμα της μέλισσας. Κατά τη διάρκεια αυτής της ζύμωσης, μικροοργανισμοί όπως γαλακτικά βακτήρια και ζύμες παράγουν οργανικά οξέα και ένζυμα (πρωτεάσες, αμυλάσες, λιπάσες) που διασπούν τα τοιχώματα των κόκκων γύρης, αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών. Η χρήση διαφορετικών υποστρωμάτων, όπως γύρη από διάφορες φυτικές πηγές, μπορεί να επηρεάσει τόσο τη σύνθεση όσο και την ενζυμική δραστηριότητα του μελισσόψωμου, προσφέροντας ποικιλία θρεπτικών στοιχείων και βελτιώνοντας τις βιοδραστικές του ιδιότητες.

Οι εφαρμογές του μελισσόψωμου είναι ποικίλες και πολυλειτουργικές:

- **Διατροφικά συμπληρώματα:** Μπορεί να ενσωματωθεί σε κάψουλες ή σκόνες για ενίσχυση του ανοσοποιητικού και προστασία από οξειδωτικό στρες.
- **Λειτουργικά τρόφιμα:** Προσθήκη σε γιαούρτια, smoothies, μπάρες δημητριακών ή μέλι, αυξάνοντας τη θρεπτική αξία και τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες.
- **Φυσικά συντηρητικά τροφίμων:** Χρήση για τη φυσική συντήρηση τροφίμων όπως τυριά ή αρτοσκευάσματα, μειώνοντας την ανάγκη για χημικά πρόσθετα.
- **Καλλυντικά και προϊόντα περιποίησης δέρματος:** Αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση για προστασία του δέρματος από ελεύθερες ρίζες και μικροβιακή μόλυνση.

Για περαιτέρω αξιοποίηση του μελισσόψωμου, προτείνεται η διερεύνηση εναλλακτικών υποστρωμάτων, η ανάλυση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά τη ζύμωση, η αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας με πολλαπλές δοκιμές και η εξέταση της αντιμικροβιακής δράσης σε περισσότερα παθογόνα βακτήρια και μύκητες. Η ενδεδειγμένη μελέτη του μελισσόψωμου μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων λειτουργικών τροφίμων με αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και ενισχυμένες προστατευτικές ιδιότητες, προωθώντας τη δημόσια υγεία και τη διατροφική ασφάλεια.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

- Aksoy A, Altunatmaz SS, Aksu F, Tokatlı Demirok N, Yazıcı K, Yıkılmış S (2024) Bee Bread as a Functional Product: Phenolic Compounds, Amino Acid, Sugar, and Organic Acid Profiles. *Foods* 13. <https://doi.org/10.3390/foods13050795>
- Anderson KE, Sheehan TH, Mott BM, Maes P, Snyder L, Schwan MR, Walton A, Jones BM, Corby-Harris V (2013a) Microbial Ecology of the Hive and Pollination Landscape: Bacterial Associates from Floral Nectar, the Alimentary Tract and Stored Food of Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS One* 8:e83125. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0083125>
- Anderson KE, Sheehan TH, Mott BM, Maes P, Snyder L, Schwan MR, Walton A, Jones BM, Corby-Harris V (2013b) Microbial Ecology of the Hive and Pollination Landscape: Bacterial Associates from Floral Nectar, the Alimentary Tract and Stored Food of Honey Bees (*Apis mellifera*). *PLoS One* 8:e83125. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0083125>
- Anjum SI, Ullah A, Khan KA, Attaullah M, Khan H, Ali H, Bashir MA, Tahir M, Ansari MJ, Ghramh HA, Adgaba N, Dash CK (2019) Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi J Biol Sci* 26:1695–1703. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2018.08.013>
- Asoutis Didaras N, Karaïskou I, Nikolaidis M, Siaperopoulou C, Georgi I, Tsadila C, Karatasou K, Amoutzias GD, Mossialos D (2024) Contribution of Microbiota to Bioactivity Exerted by Bee Bread. *Pharmaceuticals* 17:761. <https://doi.org/10.3390/PH17060761/S1>
- Aylanc V, Falcão SI, Vilas-Boas M (2023) Bee pollen and bee bread nutritional potential: Chemical composition and macronutrient digestibility under in vitro gastrointestinal system. *Food Chem* 413:135597. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2023.135597>
- Bakour M, Laaroussi H, Ousaaïd D, El Ghouizi A, Es-Safi I, Mechchate H, Lyoussi B (2022) Bee Bread as a Promising Source of Bioactive Molecules and Functional Properties: An Up-To-Date Review. *Antibiotics* 2022, Vol 11, Page 203 11:203. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11020203>
- Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P (2008) Honey for nutrition and health: a review. *J Am Coll Nutr* 27:677–689. <https://doi.org/10.1080/07315724.2008.10719745>
- Bose D, Padmavati M (2024) Honey Authentication: A review of the issues and challenges associated with honey adulteration. *Food Biosci* 61:105004. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2024.105004>
- Campos MG, Webby RF, Markham KR, Mitchell KA, Da Cunha AP (2003) Age-Induced Diminution of Free Radical Scavenging Capacity in Bee Pollens and the Contribution of Constituent Flavonoids. *J Agric Food Chem* 51:742–745. <https://doi.org/10.1021/JF0206466>
- Can Z, Gıdık B, Kara Y, Kolaylı S (2024) Antioxidant activity and phenolic content of bee breads from different regions of Türkiye by chemometric analysis (PCA and HCA). *European Food Research and Technology* 250:2961–2971. <https://doi.org/10.1007/S00217-024-04597-7/FIGURES/5>
- Da Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa ACO, Fett R (2016) Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem* 196:309–323. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.09.051>
- Detns RC, Taken S, Co FS, Smith F, Co C, Titrim- F Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar

- Didaras NA, Kafantaris I, Dimitriou TG, Mitsagga C, Karatasou K, Giavasis I, Stagos D, Amoutzias GD, Hatjina F, Mossialos D (2021) Biological properties of bee bread collected from apiaries located across Greece. *Antibiotics* 10:555. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10050555/S1>
- Disayathanoowat T, Li H, Supapimon N, Suwannarach N, Lumyong S, Chantawannakul P, Guo J (2020) Different Dynamics of Bacterial and Fungal Communities in Hive-Stored Bee Bread and Their Possible Roles: A Case Study from Two Commercial Honey Bees in China. *Microorganisms* 2020, Vol 8, Page 264 8:264. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8020264>
- El Ghouizi A, Bakour M, Laaroussi H, Ousaaïd D, El Menyiy N, Hano C, Lyoussi B (2023) Bee Pollen as Functional Food: Insights into Its Composition and Therapeutic Properties. *Antioxidants* 2023, Vol 12, Page 557 12:557. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX12030557>
- Engel P, Kwong WK, McFrederick Q, Anderson KE, Barribeau SM, Chandler JA, Cornman RS, Dainat J, De Miranda JR, Doublet V, Emery O, Evans JD, Farinelli L, Flenniken ML, Granberg F, Grasis JA, Gauthier L, Hayer J, Koch H, Kocher S, Martinson VG, Moran N, Munoz-Torres M, Newton I, Paxton RJ, Powell E, Sadd BM, Schmid-Hempel P, Schmid-Hempel R, Song SJ, Schwarz RS, van Engelsdorp D, Dainat B (2016) The Bee Microbiome: Impact on Bee Health and Model for Evolution and Ecology of Host-Microbe Interactions. *mBio* 7. <https://doi.org/10.1128/MBIO.02164-15>
- Engel P, Martinson VG, Moran NA (2012) Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:11002–11007. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1202970109>
- Gheldof N, Wang XH, Engeseth NJ (2002) Identification and Quantification of Antioxidant Components of Honeys from Various Floral Sources. *J Agric Food Chem* 50:5870–5877. <https://doi.org/10.1021/JF0256135>
- Gilliam M, Bee CH (1979) MICROBIOLOGY OF POLLEN AND BEE BREAD : THE GENUS BACILLUS. *Apidologie* 10:269–274. <https://doi.org/10.1051/APIDO:19790304>
- Ilie CI, Spoiala A, Geana EI, Chircov C, Ficai A, Ditu LM, Oprea E (2024) Bee Bread: A Promising Source of Bioactive Compounds with Antioxidant Properties—First Report on Some Antimicrobial Features. *Antioxidants* 2024, Vol 13, Page 353 13:353. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX13030353>
- Jannesar M, Shoushtari MS, Majd A, Pourpak Z (2017) Bee Pollen Flavonoids as a Therapeutic Agent in Allergic and Immunological Disorders. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 16:171–182
- Jaya F, Rosyidi D, Radiati LE, Minarti S, Mustakim, Susilo A, Muslimah RH, Husolli M (2020) Antioxidant activity and microbiological quality of bee bread collected from three different species honey bee. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* 475:012033. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/475/1/012033>
- Kaplan M, Karaoglu Ö, Eroglu N, Silici S (2016) Fatty Acid and Proximate Composition of Bee Bread. *Food Technol Biotechnol* 54:497. <https://doi.org/10.17113/FTB.54.04.16.4635>
- Kieliszek M, Piwowarek K, Kot AM, Błażej S, Chlebowska-Śmigiel A, Wolska I (2018) Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends Food Sci Technol* 71:170–180. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2017.10.021>

- Komosinska-Vassev K, Olczyk P, Kaźmierczak J, Mencner L, Olczyk K (2015) Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2015:297425. <https://doi.org/10.1155/2015/297425>
- Kostić A, Milinčić DD, Barać MB, Shariati MA, Tešić ŽL, Pešić MB (2020) The Application of Pollen as a Functional Food and Feed Ingredient—The Present and Perspectives. Biomolecules 10:84. <https://doi.org/10.3390/BIOM10010084>
- Ladakis D, Stylianou E, Ioannidou SM, Koutinas A, Pateraki C (2022) Biorefinery development, techno-economic evaluation and environmental impact analysis for the conversion of the organic fraction of municipal solid waste into succinic acid and value-added fractions. Bioresour Technol 354. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127172>
- Lie S (1973) THE EBC-NINHYDRIN METHOD FOR DETERMINATION OF FREE ALPHA AMINO NITROGEN. Journal of the Institute of Brewing. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1973.tb03495.x>
- Mandal MD, Mandal S (2011) Honey: its medicinal property and antibacterial activity. Asian Pac J Trop Biomed 1:154–160. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60016-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60016-6)
- Mărgăoan R, Stranț M, Varadi A, Topal E, Yücel B, Cornea-Cipcigan M, Campos MG, Vodnar DC (2019) Bee Collected Pollen and Bee Bread: Bioactive Constituents and Health Benefits. Antioxidants 8:568. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX8120568>
- Martinson VG, Danforth BN, Minckley RL, Rueppell O, Tingek S, Moran NA (2011) A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. Mol Ecol 20:619–628. <https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2010.04959.X>
- Mattila HR, Rios D, Walker-Sperling VE, Roeselers G, Newton ILG (2012) Characterization of the Active Microbiotas Associated with Honey Bees Reveals Healthier and Broader Communities when Colonies are Genetically Diverse. PLoS One 7:e32962. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0032962>
- Milek M, Mołoń M, Kula-Maximenko M, Sidor E, Zagula G, Dżugan M (2023) Chemical Composition and Bioactivity of Laboratory-Fermented Bee Pollen in Comparison with Natural Bee Bread. Biomolecules 2023, Vol 13, Page 1025 13:1025. <https://doi.org/10.3390/BIOM13071025>
- Mohammad SM, Mahmud-Ab-Rashid NK, Zawawi N (2020) Probiotic properties of bacteria isolated from bee bread of stingless bee *Heterotrigona itama*. J Apic Res 60:172–187. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1801152>
- Nolan VC, Harrison J, Cox JAG (2019) Dissecting the Antimicrobial Composition of Honey. Antibiotics 8:251. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS8040251>
- Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, Gan SH (2017) Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. Oxid Med Cell Longev 2017:1259510. <https://doi.org/10.1155/2017/1259510>
- Rao PV, Krishnan KT, Salleh N, Gan SH (2016) Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. Revista Brasileira de Farmacognosia 26:657–664. <https://doi.org/10.1016/J.BJP.2016.01.012>
- Rokop ZP, Horton MA, Newton ILG (2015) Interactions between Cooccurring Lactic Acid Bacteria in Honey Bee Hives. Appl Environ Microbiol 81:7261. <https://doi.org/10.1128/AEM.01259-15>

- Saraiva MA, Zemolin APP, Franco JL, Boldo JT, Stefenon VM, Triplett EW, de Oliveira Camargo FA, Roesch LFW (2015) Relationship between honeybee nutrition and their microbial communities. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 107:921–933. <https://doi.org/10.1007/S10482-015-0384-8/METRICS>
- Seeley TD (2010) Honeybee democracy. *Honeybee Democracy* 1–273. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.02.020>
- Sharaf El-Din MG, Farrag AFS, Wu L, Huang Y, Wang K (2025) Health benefits of honey: A critical review on the homology of medicine and food in traditional and modern contexts. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences* 12:147–164. <https://doi.org/10.1016/J.JTCMS.2025.03.015>
- Soccol CR, Costa ESF da, Letti LAJ, Karp SG, Woiciechowski AL, Vandenberghe LP de S (2017) Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation* 1:52–71. <https://doi.org/10.1016/J.BIORI.2017.01.002>
- Stagos D, Soulitsiotis N, Tsadila C, Papaeconomou S, Arvanitis C, Ntontos A, Karkanta F, Adamou-Androulaki S, Petrotos K, Spandidos DA, Kouretas D, Mossialos D (2018) Antibacterial and antioxidant activity of different types of honey derived from Mount Olympus in Greece. *Int J Mol Med* 42:726–734. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2018.3656/HTML>
- URCAN AC, MARGHITAS L AI, DEZMIREAN DS, BOBIS O, BONTA V, MURESAN CI, MARGAOAN R (2017) Chemical Composition and Biological Activities of Beebread – Review. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca Animal Science and Biotechnologies* 74:6. <https://doi.org/10.15835/BUASVMCN-ASB:12646>
- Διδακτορική διατριβή: Διερεύνηση της βιοδραστικότητας και του μικροβιώματος του ελληνικού μελλισόψωμου(2023)