

«ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ»
«Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας»

«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

Καραϊσκού Ιωάννα

«Διερεύνηση της παραγωγής ενζύμων βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος από βακτήρια ελληνικού μελισσόψωμου»



2022

«Διερεύνηση της παραγωγής ενζύμων βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος
από βακτήρια ελληνικού μελισσόψωμου»

«Investigation on the production of biotechnologically interesting
enzymes by bacteria isolated from Greek beebread»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Μόσιαλος Δημήτριος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Αμούτζιας Γρηγόριος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοπληροφορικής, με έμφαση στην Μικροβιολογία, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δημητρίου Τηλέμαχος

Εργαστηριακό Διδακτικό προσωπικό (Ε.ΔΙ.Π), του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΗΡΙΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Μόσιαλο Δημήτρη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, την πολύτιμη βοήθεια και την καθοδήγησή του, κατά τη διάρκεια υλοποίησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης, οφείλω να ευχαριστήσω και όλα τα μέλη του εργαστηρίου, τον κ. Δημητρίου Τηλέμαχο, τον κ. Διδαρά Ασούτη Νίκο, την κ. Τσαδήλα Χριστίνα, τον κ. Καφαντάρη Ιωάννη και την κ. Σιαπεροπούλου Χριστίνα, για την βοήθεια, τις χρήσιμες συμβουλές τους και τη συμπαράσταση που μου έδειξαν καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου.

Τέλος ευχαριστώ πολύ την οικογένειά μου για τη στήριξη και την αγάπη που μου έδειξαν όλη αυτήν την περίοδο.

Περίληψη

Το αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της παραγωγής ενζύμων βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος, από βακτήρια μελισσόψωμου, με τόπο προέλευσης το Πήλιο. Το μελισσόψωμο είναι ένα προϊόν που χαρακτηρίζεται από ένα πλούσιο μικροβίωμα. Με τη βοήθεια εκλεκτικών θρεπτικών υποστρωμάτων, απομονώθηκαν συνολικά 186 βακτήρια, τα οποία ελέγχθηκαν για την παραγωγή διαφόρων ενζύμων, όπως κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, πρωτεϊνάσες, αμυλάσες και ένζυμα που διασπούν χρωστικές (λακκάσες, οξειδάσες της λιγνίνης, οξειδάσες του μαγγανίου). Τα ένζυμα αυτά βρίσκουν εφαρμογές σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς, όπως στον τομέα των τροφίμων, στην κλωστούφαντουργία, στη βιομηχανία χαρτιού, στην βιοαποκατάσταση, στη βιομηχανία απορρυπαντικών κ.α. Αποτελούν μία οικονομικότερη λύση και φιλική προς το περιβάλλον για τις επιχειρήσεις. Η συγκεκριμένη έρευνα, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση συγκεκριμένων χρωστικών που προστέθηκαν στο θρεπτικό υπόστρωμα. Από αυτή τη μελέτη, φάνηκε η πιθανή ύπαρξη των παραπάνω ενζύμων σε αξιόλογα ποσοστά. Ενδεικτικά, η παρουσία πρωτεϊνάσης φάνηκε στο 50% των βακτηριών που απομονώθηκαν, η παρουσία ενζύμων που διασπούν χρωστικές στο 30%, η παρουσία αμυλάσης στο 10%, η παρουσία κυτταρινάσης στο 3% και τέλος στο 2% των βακτηριών η παρουσία ημικυτταρινάσης. Στη συνέχεια, για την ταυτοποίηση των παραγόμενων ενζύμων ακολούθησε *in vitro* μοριακή ανάλυση, μέσω PCR και αλληλούχηση κατά Sanger. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη βοήθεια του BLAST, όπου επιβεβαιώθηκε η παρουσία όλων των παραπάνω ενζύμων, από αρκετά βακτήρια που απομονώθηκαν από το δείγμα. Τέλος τα βακτήρια με το επιθυμητό φαινοτυπικό προφίλ ταυτοποιήθηκαν μετά από ενίσχυση της γονιδιωματικής περιοχής 16S rRNA. Από τη συγκεκριμένη έρευνα φαίνεται, πως το μελισσόψωμο είναι ένα προϊόν που μπορεί να παράξει ένζυμα με μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον και γι' αυτό το λόγω απαιτείται περαιτέρω έρευνα.

Λέξεις κλειδιά: γύρη, μελισσόψωμο, υγεία, μικροβίωμα, θρεπτική αξία, κυτταρινάσες, ημικυτταρινάσες, λακκάσες, οξειδάσες του μαγγανίου, οξειδάσες της λιγνίνης, πρωτεϊνάσες και αμυλάσες, βιοτεχνολογικές εφαρμογές.

Abstract

The purpose of this study is to investigate biotechnologically interesting enzymes produced by bacteria isolated from bee bread. The bee bread sample was obtained from Pelion. Bee bread is a product characterized by a rich microbiome. A number of selective nutrient substrates were used and 186 isolates were successfully isolated and tested for the production of various enzymes, such as cellulases, hemicelluloses, proteinases, amylases and enzymes that break down pigments (laccases, lignin oxidases, manganese oxidases). These enzymes find applications in various industrial sectors, such as food industry, textiles, paper industry, bioremediation, detergents, etc. Enzymes are a more economical and environmentally friendly solution for businesses. This test was performed using specific dyes added to the nutrient substrate. The results showed a great percentage, of the possible existence of the above enzymes. Indicatively, the presence of proteinases was found in 50% of the isolated bacteria, the presence of enzymes that break down pigments in 30%, the presence of amylase in 10%, the presence of cellulase in 3% and finally in 2% the presence of hemicelluloses. In order to identify the produced enzymes, in vitro Molecular Method of PCR Analysis was performed, followed by the Sanger sequencing. The analysis of the results was held with the Blast search engine, where several of the bacteria who were isolated from the sample of bee bread, appeared to produce the expected enzymes. Finally, the bacteria with the desired phenotypic profile were identified after amplification of the 16S rRNA gene. This research shows, that bee bread is a product, that can produce enzymes of great biotechnological interest, which is why further research is required.

Keywords: pollen, bee bread, health, microbiota, nutritional value, cellulases, hemicelluloses, laccases, manganese oxidases, lignin oxidases, proteinases, amylases, biotechnological applications.

Πίνακας περιεχομένων

Εισαγωγή.....	12
1° Κεφάλαιο	14
Γύρη και μελισσόψωμο	14
1.1. Η γύρη και η σημασία της.....	14
1.2. Μετατροπή της γύρης σε μελισσόψωμο	17
1.3. Θρεπτική αξία γύρης και μελισσόψωμου	19
1.4. Μικροβίωμα μελισσόψωμου	21
1.5. Μελισσόψωμο και υγεία	23
1.6. Η χρήση των ενζύμων στον τομέα της βιομηχανίας	25
1.6.1. Αμυλάσες	25
1.6.2. Πρωτεάσες	27
1.6.3. Ημικυτταρινάσες– Ξυλανάσες	31
1.6.4. Κυτταρινάσες.....	33
1.6.5. Ένζυμα που διασπούν χρωστικές.....	36
Στόχος διπλωματικής διατριβής.....	41
2° Κεφάλαιο	42
Υλικά και μέθοδοι	42
2.1. Μηχανήματα και υλικά.....	42
2.2. Μέθοδοι.....	44
2.2.1. Συλλογή και προετοιμασία δείγματος	44
2.2.2. Καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό	45
2.2.3. Καθαρισμός βακτηρίων - Ανακαλλιέργειες	46
2.2.4. Δημιουργία υγρών καλλιιεργειών	46
2.2.5. Έλεγχος ενζυμικής δράσης	47

2.2.6. Μοριακή ανάλυση.....	49
3° Κεφάλαιο	58
Αποτελέσματα.....	58
3.1. Ανάπτυξη βακτηρίων σε PCA, MRS, PDA και BBL MacConkey II Agar.....	58
3.2. Φαινοτυπικός έλεγχος ενζυμικής δράσης αμυλάσης και πρωτεΐνάσης.....	59
3.3. Φαινοτυπικός έλεγχος για ένζυμα που διασπούν τις χρωστικές (λακκάσες, οξειδάσες της λιγνίνης, οξειδάσες του μαγγανίου)	60
3.4. Φαινοτυπικός και μοριακός έλεγχος παρουσίας εξωκυτταρικής ημικυτταρινάσης.....	63
3.5. Φαινοτυπικός και μοριακός έλεγχος παρουσίας κυτταρινάσης.....	65
3.6. Ταυτοποίηση με τη χρήση της γονιδιακής περιοχής 16S rRNA.....	67
4° Κεφάλαιο	69
Συζήτηση αποτελεσμάτων	69
Βιβλιογραφικές αναφορές	74

Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 1: Γύρη λουλουδιών (Mohammad et al., 2021)	14
Εικόνα 2: Δομή κόκκου γύρης (Aylanc et al., 2021)	16
Εικόνα 3: Τρικολπική γύρη <i>Betonica officinalis</i> (Božič & Šiber, 2020).....	16
Εικόνα 4: Γύρη στα πίσω πόδια της μέλισσας (Mohammad et al., 2021).....	18
Εικόνα 5: Μελισσόψωμο https://melissokomianet.gr/melissopsomo-bee-bread/	18
Εικόνα 6: Ιπποκράτης https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/7c/Hippocrates.jpg/300px-Hippocrates.jpg	23
Εικόνα 7: Τρισδιάστατη δομή αμυλάσης https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%91%CE%BC%CF%85%CE%BB%CE%AC%CF%83%CE%B7	25
Εικόνα 8: Αφαίρεση λεκέδων με μόριο απορρυπαντικού ενσωματωμένο σε πρωτεάση (Gurumalles et al., 2019)	29
Εικόνα 9: Εφαρμογές πρωτεασών στην υγεία (Gurumalles et al., 2019).....	30
Εικόνα 10: Ημικυτταρινάσες που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση ξυλάνης (Mamo, 2019) .	31
Εικόνα 11: Εφαρμογή κυτταρινασών στη βιομηχανία των τροφίμων(Ejaz et al., 2021).....	36
Εικόνα 12: Κλίβανος επώασης	42
Εικόνα 13: Vortex	42
Εικόνα 14: Φυγόκεντρος.....	42
Εικόνα 15: Συσκευή ηλεκτροφόρησης	42
Εικόνα 16: Τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.....	42
Εικόνα 17: Φυγόκεντρος.....	42
Εικόνα 18: PCR.....	43
Εικόνα 19: Υδατόλουτρο.....	43
Εικόνα 20: Hood.....	43
Εικόνα 22: Δημιουργία διαυγούς ζώνης γύρω από τις αποικίες λόγω πιθανής παρουσίας πρωτεΐνάσης	59
Εικόνα 21: Δημιουργία διαυγούς ζώνης γύρω από την αποικία λόγω πιθανής παρουσίας αμυλάσης	59
Εικόνα 23: Διάσπαση χρωστικής γύρω από την αποικία	60
Εικόνα 24: Διάσπαση χρωστικής γύρω από τις αποικίες	61
Εικόνα 25: Δημιουργία κιτρινωπής ζώνης γύρω από τις αποικίες	61
Εικόνα 26: Πιθανή οξειδωση γουαϊακόλης.....	62

Εικόνα 27: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρηση (Λακκάσες).....	62
Εικόνα 28: Διάσπαση χρωστικής γύρω από τις αποικίες λόγω πιθανής παρουσίας ημικυτταρινάσης.	64
Εικόνα 29: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης (Ημικυτταρινάσες).....	64
Εικόνα 30: Διάσπαση χρωστικής γύρω από τις αποικίες λόγω πιθανής παρουσίας κυτταρινάσης.....	66
Εικόνα 31: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης (Κυτταρινάση).....	66
Εικόνα 32: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης (16S rRNA).....	67

Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1: Φυσικοχημική σύνθεση γύρης και μελισσόψωμου (Aylanc et al., 2021) .	19
Πίνακας 2: Έλεγχος ενζυμικής δράσης.....	48
Πίνακας 3: Εκκινητές	51
Πίνακας 4: Τα συστατικά της αντίδρασης PCR με το ζεύγος εκκινητών GH11F/GH11R	51
Πίνακας 5: Τα συστατικά της αντίδρασης PCR με το ζεύγος εκκινητών Cu1AF/Cu2R	54
Πίνακας 6: Ζεύγος εκκινητών για 16S rRNA	56
Πίνακας 7: Αποτελέσματα BLASTN και BLASTX (Λακκάσες)	63
Πίνακας 8: Αποτελέσματα BLASTN και BLASTX (Ημικυτταρινάσες).....	65

Εισαγωγή

Από την αρχαιότητα τα προϊόντα κυψέλης, όπως το μέλι, η γύρη, ο βασιλικός πολτός, η πρόπολη, το δηλητήριο, το κερι μέλισσών και το μελισσόψωμο, αποτελούσαν ένα σημαντικό κομμάτι της παραδοσιακής ιατρικής (Didaras et al., 2021). Κατά καιρούς χρησιμοποιήθηκαν για την αντιμετώπιση αρκετών ασθενειών, πιο συγκεκριμένα για την καταπολέμηση του έλκους στομάχου, εντερικών προβλημάτων, καθώς και για την επούλωση των τραυμάτων.

Η μελισσοκομία άρχισε να αναπτύσσεται κατάλληλα όταν ο άνθρωπος έμαθε πως να διατηρεί τις μέλισσες στις κυψέλες και να τις διαχειρίζεται, προκειμένου να παράξει μέλι και να συλλέξει τα υπόλοιπα προϊόντα. Σημαντικές εξελίξεις άρχισαν να εμφανίζονται από τον 16ο αιώνα, όμως η πραγματική προέλευση των προϊόντων κυψέλης υπήρξε στην αφάνεια μέχρι πριν από μερικούς αιώνες, ενώ η λεπτομερής χημική τους σύνθεση καθορίστηκε στα τέλη του 1900 (Ayhan et al., 2021).

Ένα από τα προϊόντα κυψέλης που εμφανίζει μεγάλο ενδιαφέρον είναι το μελισσόψωμο, που χαρακτηρίζεται από υψηλή θρεπτική αξία, λόγω των μικρο και μακροθρεπτικών συστατικών, των φαινολικών οξέων και των πολυφαινολών που περιέχει. Θεωρείται λειτουργικό τρόφιμο, καθώς προάγει την υγεία των ανθρώπων και χαρακτηρίζεται από αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Didaras et al., 2021).

Το μελισσόψωμο περιλαμβάνει ένα πλούσιο μικροβίωμα που ποικίλει, ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή στην οποία παράγεται, τις κλιματολογικές συνθήκες, το είδος της μέλισσας κ.α. Τα διάφορα βακτήρια και μύκητες που το αποτελούν είναι υπεύθυνα για την παραγωγή διαφόρων ενζύμων με τεράστιο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον (Ejaz et al., 2021). Τα ένζυμα είναι βιολογικά μακρομόρια που παράγονται από ένα ζωντανό οργανισμό, ο οποίος δρα ως καταλύτης μιας βιοχημικής αντίδρασης. Συμβάλλουν στην επιτάχυνση των βιολογικών ή βιοχημικών αντιδράσεων εντός και εκτός του κυττάρου γι' αυτό και ονομάζονται «Βιοκαταλύτες» (Gurung et al., 2013).

Η χρήση των ενζύμων στις βιομηχανίες, αποτελεί μία πρακτική χαμηλότερου κόστους, μεγαλύτερης ασφάλειας, υψηλής απόδοσης και αποτελεσματικού ελέγχου των διαδικασιών. Επιπλέον είναι μία μέθοδος φιλική προς το περιβάλλον σε σχέση με τη χρήση διαφόρων χημικών. Τα ένζυμα, έχουν πιθανές εφαρμογές στη βιομηχανία χαρτιού, φαρμακευτικών προϊόντων, απορρυπαντικών, τροφίμων, ποτών, ζωοτροφών κ.α. (Ejaz et al., 2021).

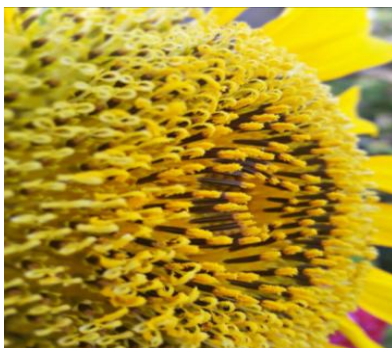
Με τη συμβολή της βιοτεχνολογίας σήμερα, ανακαλύπτονται συνεχώς διαφορετικά είδη ενζύμων, με νέες ιδιότητες και προσαρμοστικότητα σε νέες συνθήκες, οδηγώντας στην αύξηση της χρήσης τους σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς (Gurung et al., 2013).

1^ο Κεφάλαιο

Γύρη και μελισσόψωμο

1.1. Η γύρη και η σημασία της

Η γύρη είναι υψίστης σημασίας για την επιβίωση μίας αποικίας μελισσών, καθώς αποτελεί τη μόνη πηγή πρωτεϊνών και λιπιδίων και την κύρια πηγή μακρο- και μικροστοιχείων (Didaras et al., 2020). Είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη της μέλισσας, τόσο κατά το προνυμφικό στάδιο, όσο και κατά την ενηλικίωση (Aylanc et al., 2021). Βρίσκεται στον ανθήρα (σποριάγγειο) του στήμονα, στα αγγειόσπερμα φυτά και συλλέγεται από τις εργάτριες μέλισσες. Ενδεικτικά, μια αποικία μελισσών, μπορεί να συλλέξει από 50 έως 250 gr γύρης ημερησίως ή από 15 έως 40 κιλά γύρης ετησίως (Thakur & Nanda, 2020).



Εικόνα 1: Γύρη λουλουδιών (Mohammad et al., 2021)

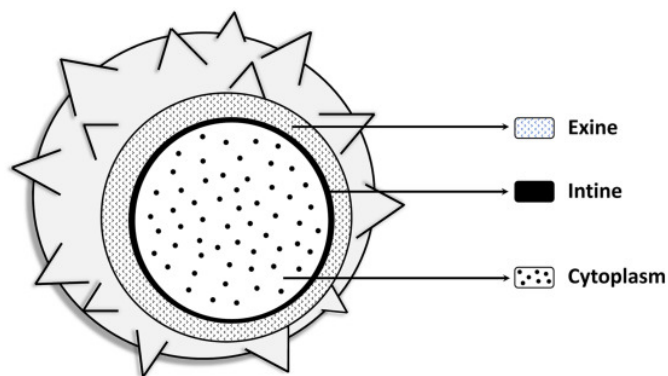
Η γύρη αποτελείται από τα αρσενικά αναπαραγωγικά κύτταρα των φυτών και είναι μικροσκοπικά σώματα (20-250 μm) με μεταβλητή μορφολογία (Kieliszek et al., 2018; Mora-Adames et al., 2021). Οι διαφορές του σχήματος και του μεγέθους των κόκκων της γύρης εξαρτώνται από το είδος του φυτού από το οποίο προέρχονται. Σε ξηρή κατάσταση το σχήμα τους είναι κυρίως σφαιρικό ή ατρακτοειδές, ενώ μετά τη διόγκωση (προσρόφηση υγρών) μπορεί να είναι στρογγυλό, τριγωνικό ή

κυλινδρικό. Η διάμετρος τους κυμαίνεται από 0,01 έως 0,05 mm. Το χρώμα του φορτίου της γύρης είναι μεταβλητό, καθώς αντικατοπτρίζει την ποικιλία των φυτικών ειδών από τα οποία προέρχεται και ποικίλει σε διάφορες αποχρώσεις του κίτρινου, του γκρι-λευκού, του πορτοκαλί, του κόκκινου, του πράσινου και του μπλε (Kieliszek et al., 2018).

Όσον αφορά τη σύνθεση της γύρης, εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως τη φυτική προέλευση, τις κλιματολογικές συνθήκες, τον τύπο του εδάφους, τις δραστηριότητες των μελισσοκόμων και τη διαδικασία επεξεργασίας και αποθήκευσης, όταν αναφερόμαστε στην εμπορική παραγωγή (Ares et al., 2018).

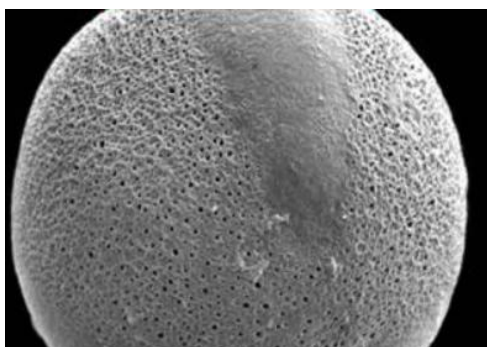
Αποτελεί ένα προϊόν υψηλής θρεπτικής αξίας, καθώς περιέχει υδατάνθρακες, όπως αναγωγικά σάκχαρα, πολυσακχαρίτες, άμυλο και διαλυτές και μη διαλυτές ίνες, πρωτεΐνες, απαραίτητα αμινοξέα, λιπαρά οξέα (οξέα, στερόλες και τριγλυκερίδια, συμπεριλαμβανομένων των ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων), βιταμίνες, μακρο και μικροστοιχεία (Ares et al., 2018; Didaras et al., 2021). Επιπλέον, περιέχει πληθώρα βιοενεργών ενώσεων όπως πολυφαινόλες, τριτερπένια, καροτενοειδή, φωσφολιπίδια, φυτοστερόλες, βιοενεργά πεπτίδια, οργανικά οξέα, πρεβιοτικά και προβιοτικά. Παρ'όλα αυτά, ο προσδιορισμός της βιοδιαθεσιμότητας αυτών των ενώσεων είναι αρκετά περίπλοκος, καθώς περικλείονται μέσα στα τοιχώματα των κόκκων γύρης, τα οποία είναι δύσκολο να αφομοιωθούν.

Το τοίχωμα του κόκκου της γύρης αποτελείται από δύο στρώματα, τα οποία δεν είναι ομοιογενή σε όλο το κέλυφος (Božič & Šiber, 2020). Το εξωτερικό (exine) και το εσωτερικό (intine). Το εξωτερικό έχει εύκαμπτη και στερεή δομή και αποτελείται από τη σποροπενίνη, ένα ανθεκτικό βιοπολυμερές, ενώ το εσωτερικό έχει πιο ευαίσθητη δομή και αποτελείται από κυτταρίνη και ελαστικά μικροφίλμ πηκτικής (Didaras et al., 2021).



Εικόνα 2: Δομή κόκκου γύρης (Aylanc et al., 2021)

Η ανομοιογένεια στη δομή και στη μορφολογία του τοιχώματος του κελύφους έγκειται στο εξωτερικό στρώμα, το οποίο είτε απουσιάζει ορισμένες φορές, είτε έχει μειωμένο πάχος, δημιουργώντας πόρους. Συνηθέστερα εμφανίζονται με τη μορφή σφαιρικού αυλού (colpus ή sulcus), ή μιας κυκλικής περιοχής (porus ή ulcus) ή ακόμα και με το συνδυασμό και των δύο (colporus) (Božič & Šiber, 2020).



Εικόνα 3: Τρικολπική γύρη *Betonica officinalis* (Božič & Šiber, 2020)

Γενικά το εξωτερικό και το εσωτερικό στρώμα, προστατεύουν τους κόκκους της γύρης από φυσικούς και χημικούς παράγοντες. Επιπλέον η πολυεπίπεδη δομή που παρουσιάζουν, διασφαλίζει την ανθεκτικότητα των κόκκων γύρης έναντι στα βακτήρια και διατηρεί το περιεχόμενο της γύρης έναντι περιβαλλοντικών παραγόντων όπως η θερμοκρασία, οι μεταβολές του pH ή η υπεριώδης ακτινοβολία.

Όταν η γύρη καταναλωθεί από τον άνθρωπο, παρατηρείται μείωση της αποτελεσματικότητας της πέψης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι απουσιάζουν από

το γαστρεντερικό σωλήνα (GIT) του ανθρώπου, συγκεκριμένα ένζυμα που βοηθούν στην πέψη των πολλαπλών στρωμάτων που περιβάλλουν τους κόκκους της γύρης. Ένας άλλος παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει τον βαθμό πεπτικότητας των μελισσοκομικών προϊόντων είναι η βοτανική προέλευση της γύρης και η δομή των κόκκων της. Εκείνοι με τους μεγαλύτερους πόρους ενδέχεται να αφομοιώνονται ευκολότερα και γρηγορότερα, καθώς τα πεπτικά ένζυμα μπορούν να διεισδύσουν στο κυτταροπλασματικό περιεχόμενο με περισσότερη άνεση, οδηγώντας στην αποτελεσματική απελευθέρωση του εσωτερικού περιεχομένου τους. Από την άλλη πλευρά, η γύρη με λεπτότερα στρώματα καταστρέφεται πιο εύκολα από βακτήρια ζύμωσης, με αποτέλεσμα ο βαθμός βιοπροσιότητάς τους να είναι υψηλότερος (Aylanc et al., 2021).

Ως εκ τούτου, προκειμένου να αυξηθεί η πεπτικότητα της γύρης και η βιοδιαθεσιμότητα των θρεπτικών και βιοδραστικών μορίων της, έχει επιχειρηθεί ζύμωση με γύρη και έχουν αναπτυχθεί διάφορα προϊόντα διατροφής όπως γιαούρτι από αγελαδινό, κασικίσιο και πρόβειο γάλα, γλυκό πράσινο τσάι, λευκά κρασιά κ.α. (Amores-Arrocha et al., 2018; Didaras et al., 2021; Karabagias et al., 2018; Uçoiu et al., 2018)

1.2. Μετατροπή της γύρης σε μελισσόψωμο

Οι μέλισσες συλλέγουν τη γύρη, τα αρσενικά αναπαραγωγικά κύτταρα των ανθοφόρων φυτών και την ανακατεύουν με τις δικές τους εκκρίσεις, προκειμένου να υγρανθεί και να πάρει τη μορφή σφαιριδίου. Το σφαιρίδιο αυτό κολλάει στα πίσω πόδια των μελισσών και μεταφέρεται στην κυψέλη, όπου και αποθηκεύεται. Έπειτα αναμιγνύεται με πεπτικά ένζυμα που εκκρίνουν οι μέλισσες, μέλι και οργανικά οξέα (Aylanc et al., 2021). Υπό αναερόβιες πλέον συνθήκες, πραγματοποιείται γαλακτική ζύμωση, από ορισμένους μικροοργανισμούς που εμφανίζονται στις κηρήθρες και με αυτόν τον τρόπο η γύρη μετατρέπεται σε μελισσόψωμο.



Εικόνα 4: Γύρη στα πίσω πόδια της μέλισσας (Mohammad et al., 2021)

Η γαλακτική ζύμωση προκαλείται κυρίως από βακτήρια (*Pseudomonas spp.* και *Lactobacillus spp.*) και ζύμες (*Saccharomyces spp.*). Προστατεύει το προϊόν, διατηρώντας τις ιδιότητές του και αυξάνοντας το περιεχόμενό του σε νέες ενώσεις, χάρη στους ενζυματικούς μετασχηματισμούς που λαμβάνουν χώρα. Αρχικά αναπτύσσονται μικροοργανισμοί όπως βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB), αερόβια βακτήρια και ζυμομύκητες. Στη συνέχεια τα θρεπτικά συστατικά καταναλώνονται από τα βακτήρια και ακολουθεί πτώση του pH. Το επόμενο στάδιο αφορά μεταβολές μικροβιακών ειδών και τέλος επέρχεται ο θάνατος των βακτηρίων γαλακτικού οξέος και ορισμένων ζυμών, λόγω διαφόρων μεταβολιτών (Aylanc et al., 2021; Mărgăoan et al., 2020). Το επίπεδο του pH μειώνεται από 4-6 που είναι στη γύρη σε 4,2 στο μελισσόψωμο. Προκαλείται μικροβιακή διαδοχή και ξεκινά η ωρίμανση του μελισσόψωμου.



Εικόνα 5: Μελισσόψωμο <https://melissokomianet.gr/melissopsomo-bee-bread/>

Η διαδικασία της ωρίμανσης είναι μια διαδικασία που αυξάνει τη θρεπτική αξία του προϊόντος, λόγω της προσθήκης των διαφόρων ενζύμων από τις μέλισσες και των παραγόμενων ενζύμων από το μικροβίωμα του μελισσόψωμου, τα οποία συμβάλλουν στην πρόπεψη των κόκκων της γύρης. Το μικροβίωμα του μελισσόψωμου, παράγει όχι μόνο ένζυμα αλλά και αμινοξέα, πρωτεΐνες, βιταμίνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, φαινολικά οξέα, πολυφαινόλες και αντιμικροβιακές ενώσεις σε υψηλότερη περιεκτικότητα απ' ό,τι η γύρη, ενισχύοντας έτσι τη βιοδραστικότητά του. Παραδείγματος χάρη, το μελισσόψωμο έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε βιταμίνη Κ, που προκύπτει από την αποικοδόμηση της γύρης (Aylanc et al., 2021; Didaras et al., 2021). Οι Vásquez και Olofsson πρότειναν ότι τα βακτήρια που εμπλέκονται στη ζύμωση του μελισσόψωμου είναι βακτήρια γαλακτικού οξέος από το στομάχι των μελισσών και ενδέχεται να είναι υπεύθυνα για τη βελτίωση της θρεπτικής του αξίας παράγοντας βιταμίνες (Vásquez & Olofsson, 2015).

1.3. Θρεπτική αξία γύρης και μελισσόψωμου

Εδώ και εκατομμύρια χρόνια οι μέλισσες ζυμώνουν τη γύρη που παίρνουν από τα ανθοφόρα φυτά, παράγοντας αυτό που σήμερα ονομάζουμε μελισσόψωμο. Ένα γεγονός που φανερώνει τη θρεπτική του αξία, είναι το ότι οι μέλισσες για να τροφοδοτήσουν στις αρχές της άνοιξης τις πρώτες γέννες μετά το χειμώνα, χρησιμοποιούν το αποθηκευμένο μελισσόψωμο. Επιπλέον, οι Beutler και Orfinger παρατήρησαν ότι οι μέλισσες που τρέφονταν με μελισσόψωμο ζούσαν περισσότερο σε σύγκριση με τις μέλισσες που τρέφονταν με γύρη (Didaras et al., 2020). Στον Πίνακα 1 παρουσιάζεται η φυσικοχημική σύνθεση της γύρης και του μελισσόψωμου σύμφωνα με τη μελέτη των Aylanc et al. (Aylanc et al., 2021).

Πίνακας 1: Φυσικοχημική σύνθεση γύρης και μελισσόψωμου (Aylanc et al., 2021)

Σύνθεση	Γύρη μελισσών	Ψωμί μελισσών
Υδατάνθρακες	13–55%	24–35%
Πρωτεΐνες	10–40%	14–23%
Λιπίδια	1–13%	2–14%

Φυτικές ίνες	14-31%	3–20%
Βιταμίνες	0,02-0,7%	0,4–3%
Οργανικά οξέα	1%	0.4
Γαλακτικό οξύ	0,6%	3%
Ελεύθερη οξύτητα (mEq / kg)	105–146	400
pH	4–6.3	3.8–4.2

Η σύνθεση του μελισσόψωμου είναι βιοχημικά παρόμοια με τη σύνθεση της γύρης από την οποία παράγεται. Το μελισσόψωμο παρουσιάζει μεγαλύτερη θρεπτική αξία απ' ό,τι η γύρη, προσφέρει καλύτερη πέψη και χαρακτηρίζεται από πλούσια χημική σύνθεση. Λόγω των αναλογιών των συστατικών του, μπορεί να συμπληρώσει την έλλειψη βιταμινών και θρεπτικών συστατικών του ανθρώπινου οργανισμού και να δράσει σε διαφορετικές κατευθύνσεις για την ενίσχυση και την αποκατάσταση της σωστής λειτουργίας του οργανισμού. Επιπλέον, απορροφάται καλύτερα από το ανθρώπινο σώμα απ' ό,τι η γύρη, αφού τα συστατικά από τα οποία αποτελείται, ζυμώνονται μερικώς και αφομοιώνονται πιο εύκολα.

Αναλυτικότερα, το μελισσόψωμο περιέχει μεγαλύτερες ποσότητες πεπτιδίων και ελεύθερων αμινοξέων σε σχέση με τη γύρη και χαρακτηρίζεται από καλύτερη σύνθεση ακόμα και από προϊόντα που περιέχουν ζωικές πρωτεΐνες, λόγω της παρουσίας όλων των απαραίτητων αμινοξέων (γλουταμινικό οξύ, ασπαρτικό οξύ, προλίνη, αργινίνη, βαλίνη, ιστιδίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, λυσίνη, μεθειονίνη, τρυπτοφάνη, φαινυλαλανίνη, θρεονίνη, κυστεΐνη, τυροσίνη, αλανίνη, γλυκίνη και σερίνη). Επιπλέον η περιεκτικότητα σε σάκχαρα είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με της γύρης και το άμυλο πολύ λιγότερο. Είναι πλούσιο σε βιταμίνη Β, καθώς και βιταμίνη Κ, η οποία δεν υπάρχει στη φρέσκια γύρη (Kieliszek et al., 2018). Επιπλέον σύμφωνα με τους Hryniowick et al., το μελισσόψωμο είναι πλούσιο σε α-τοκοφερόλη και περιέχει σχετικά μικρές ποσότητες συνενζύμου Q10, ένα από τα σημαντικότερα κυτταρικά αντιοξειδωτικά (Didaras et al., 2020). Οι υδατάνθρακες ποικίλουν από 24 έως 35%, όπου κατά τη ζύμωση της γύρης, μεταβολίζονται από *Lactobacillus spp.* και παράγεται γαλακτικό οξύ έως και 3,2% (Didaras et al., 2020; Kieliszek et al., 2018). Τα λιπίδια κυμαίνονται από 2 έως 14% και το μελισσόψωμο

θεωρείται μία πολύ καλή πηγή ακόρεστων λιπαρών οξέων που του χαρίζουν αντιφλεγμονώδεις, αντιθρομβωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες (Aylanc et al., 2021; Kieliszek et al., 2018). Τα κυρίαρχα μέταλλα στο μελισσόψωμο είναι το κάλιο, ακολουθούμενο από φώσφορο, ασβέστιο, μαγνήσιο, σίδηρο, νάτριο, ψευδάργυρο και μαγγάνιο.

Μερικά από τα ένζυμα που συναντάμε είναι η αμυλάση, η ινβεργτάση, οι τρανσφεράσες της φωσφατάσης και η οξειδάση της γλυκόζης καθώς και ενζυματικούς συμπαραγόντες όπως βιοτίνη, γλουταθειόνη, NAD και ορισμένα νουκλεοτίδια.

Το φαινολικό προφίλ του μελισσόψωμου είναι πανομοιότυπο με αυτό της γύρης. Παρά τις βιοχημικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα κατά τη ζύμωση της γύρης, οι φαινολικές ενώσεις δεν φαίνεται να επηρεάζονται. Ορισμένα φλαβονοειδή που υπάρχουν στο μελισσόψωμο είναι η κερσετίνη, η καμπερόλη και οι γλυκοσιδικές τους μορφές, καθώς επίσης και οι λευκοανθοκυανιδίνες και οι κατεχίνες (Didaras et al., 2020).

1.4. Μικροβίωμα μελισσόψωμου

Τα μικρόβια που κυριαρχούν στο μελισσόψωμο είναι κυρίως μύκητες και βακτήρια. Βέβαια δεν μπορούμε να τα χαρακτηρίσουμε με σιγουριά καθώς το μικροβίωμα ποικίλει και αυτή η ποικιλομορφία εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως το κλίμα, η γεωγραφική περιοχή και το είδος της μέλισσας.

Σε μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε ανάλυση δειγμάτων γύρης και μελισσόψωμου διαφορετικής ηλικίας, αλλά προερχόμενα από το ίδιο φυτικό είδος, φάνηκε να συμβαίνουν αλλαγές στη μικροβιολογική σύνθεση της γύρης αμέσως μετά τη συλλογή της από τη μέλισσα. Όσον αφορά το μελισσόψωμο, κυριαρχούσαν οι μύκητες σε ποσοστό 85% από τα συνολικά απομονωμένα στελέχη του προϊόντος, ενώ στη γύρη, οι μύκητες αποτελούσαν το 55%. Τα βακτήρια στο μελισσόψωμο

αποτελούσαν το 4% της μικροχλωρίδας, με κυρίαρχο το γένος *Bacillus spp.*, ενώ στη γύρη το 49%.

Από διάφορες άλλες μελέτες έχουν βρεθεί ότι τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) που συναντάμε συνήθως στο μελισσόψωμο ανήκουν στα είδη *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Αυτά τα βακτήρια μπορούν να θεωρηθούν ως καλλιέργεια εκκίνησης της ζύμωσης της γύρης, καθώς τα συναντάμε και εκεί. Επιπλέον παράγουν αντιμικροβιακές ενώσεις, οι οποίες διατηρούν το μελισσόψωμο και προστατεύουν τις μέλισσες από διάφορες ασθένειες. Σε μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε δείγμα μελισσόψωμου, γύρης, μελιού, βασιλικού πολτού και δείγμα από το στομάχι των μελισσών, φάνηκε ότι το κυρίαρχο γένος ήταν το γένος *Lactobacillus*.

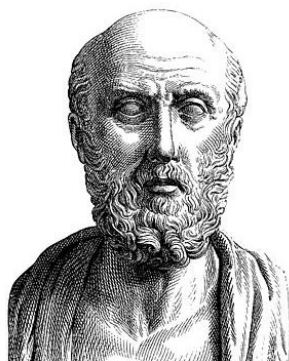
Άλλα βακτήρια γαλακτικού οξέος που έχουν βρεθεί στο μελισσόψωμο είναι τα βακτήρια του γένους *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, καθώς και *Enterobacteria* (*Enterobacter*, *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella* και *Serratia*), τα οποία είναι προαιρετικά ή υποχρεωτικά αναερόβια. Στο μελισσόψωμο μπορούν να συνυπάρξουν και τα δύο βακτηριακά είδη καθώς το προϊόν είναι στρωματοποιημένο όσον αφορά την ποσότητα του οξυγόνου (Didaras et al., 2020). Τα προϊόντα κυψέλης είναι μια πολύ καλή πηγή απομόνωσης βακτηρίων, με ευεργετικές δράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Ορισμένα γένη βακτηρίων που σχετίζονται με τα προϊόντα κυψέλης και λειτουργούν ευεργετικά έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών είναι τα γένη *Bacillus* και *Streptomyces* (Ngalimat et al., 2019).

Επίσης υπάρχουν και πολλές ομάδες *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *α-Proteobacteria*, *β-Proteobacteria* και *γ-Proteobacteria*. Η οικογένεια *Enterobacteriaceae* είναι η πιο άφθονη οικογένεια, των δυνητικά αναερόβιων αρνητικών κατά Gram βακίλων, που βρέθηκαν στο μελισσόψωμο. Το βακτηριακό φύλλο που εντοπίστηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό είναι τα Πρωτεοβακτήρια, ακολουθούμενα από έναν μικρό πληθυσμό *Firmicutes*.

Έχει αποδειχθεί ότι καθώς το pH μειώνεται στο μελισσόψωμο, το ίδιο συμβαίνει με τους βακτηριακούς πληθυσμούς, ενώ οι πληθυσμοί των μυκήτων παραμένουν σταθεροί (Didaras et al., 2020).

1.5. Μελισσόψωμο και υγεία

Οι θεραπευτικές ιδιότητες των προϊόντων κυψέλης χρονολογούνται από τα αρχαία χρόνια, καθώς αναφέρονται στις ελληνικές, ρωμαϊκές, αιγυπτιακές και κινέζικες ιατρικές πρακτικές. Ο Ιπποκράτης χρησιμοποίησε το μέλι, για την ενίσχυση της ανθρώπινης υγείας και ως καλλυντικό. Κατά καιρούς τα μελισσοκομικά προϊόντα έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία και την πρόληψη ασθενειών όπως διαβητικό έλκος ποδιού, εγκαύματα, πληγές, αλλεργική ρινίτιδα, υπερλιπιδαιμία και ρευματοειδής αρθρίτιδα (Khalifa et al., 2020).



Εικόνα 6: Ιπποκράτης <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/7c/Hippocrates.jpg/300px-Hippocrates.jpg>

Τα μελισσοκομικά προϊόντα χαρακτηρίζονται ως φυσικές ουσίες πολλών συστατικών, απαραίτητων για τη σωστή λειτουργία του οργανισμού. Το μέλι, η γύρη και τα εκχυλίσματα που προέρχονται από αυτό, δηλαδή το μελισσόψωμο, η πρόπολη, ο βασιλικός πολτός και το δηλητήριο της μέλισσας, επιδεικνύουν ένα ευρύ φάσμα θεραπευτικών λειτουργιών. Αυξάνουν το επίπεδο ATP, εξουδετερώνοντας έτσι την επίδραση πολλών τοξικών παραγόντων, αυξάνουν την ανοσία ενός οργανισμού και βελτιώνουν την ενεργειακή ισορροπία των ιστών. Συμμετέχουν σε πολλά στάδια του μεταβολισμού των πρωτεϊνών, στη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων και είναι απαραίτητα για τη σωστή λειτουργία του κυκλοφορικού συστήματος των ζωντανών οργανισμών (Kieliszek et al., 2018).

Πιο συγκεκριμένα το μελισσόψωμο, ανάλογα με τη βοτανική προέλευση της γύρης από την οποία προέρχεται, παρουσιάζει αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι πολυανθεκτικών βακτηρίων, παθογόνων και ιών. Οι φυτοχημικές συγκεντρώσεις όπως τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα, τα λιπαρά οξέα και οι φυτοστερόλες ποικίλουν ανάλογα με το είδος του φυτού. Σημαντικό ρόλο επίσης παίζει η μεθοδολογία, δηλαδή ο τρόπος δειγματοληψίας, αποθήκευσης και η διαδικασία της εκχύλισης. Η αντιμικροβιακή δράση του μελισσόψωμου φαίνεται να είναι πιο ισχυρή έναντι των θετικών κατά Gram βακτηρίων, πιθανώς λόγω της απλούστερης δομής του κυτταρικού τους τοιχώματος, παρά των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Didaras et al., 2020). Για παράδειγμα, οι Abouda, Zerdani, Kalalou, Faid και Ahami (2011) εξέτασαν την αντιβακτηριακή δράση των εκχυλισμάτων μελισσόψωμου έναντι παθογόνων βακτηρίων (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* και *Pseudomonas aeruginosa*). Όλα τα δείγματα εμφάνισαν εξέχουσα επίδραση έναντι των δοκιμαζόμενων βακτηριακών στελεχών. Τα θετικά κατά gram βακτήρια ήταν πιο ευαίσθητα στο μελισσόψωμο από τα αρνητικά κατά gram (Khalifa et al., 2020).

Επιπλέον, περιέχει φαινολικές ενώσεις, οι οποίες είναι ένα από τα πιο σημαντικά φυσικά αντιοξειδωτικά. Απομακρύνουν τις ελεύθερες ρίζες και τις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), που προκαλούν βλάβες στο DNA, τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Συνεπώς, μειώνεται η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου και φλεγμονής. Οι αντιοξειδωτικές δραστηριότητες εξαρτώνται επίσης από το έτος συλλογής γύρης, τη βοτανική προέλευση, το είδος της μέλισσας και τον χρόνο αποθήκευσης. Επιπλέον, επηρεάζεται από την εκχύλιση με διαλύτη (Mohammad et al., 2021).

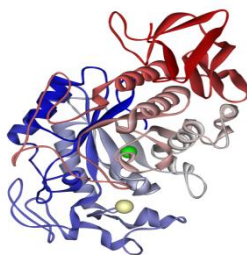
Σε άλλες μελέτες έχει αναφερθεί ότι το μελισσόψωμο μπορεί να μειώσει τη φλεγμονή. Παραδείγματος χάρη, με τη χορήγηση εκχυλισμάτων αιθανολίου από τις μέλισσες *Melipona fasciculata* και *Scaptotrigona affinis postica*, σε ποντικούς με επαγόμενο οίδημα, φάνηκε μετά από 5 ώρες να μειώνεται ο όγκος στο πόδι των ποντικών, όπως θα μειωνόταν με τη φαρμακευτική αγωγή της ινδομεθακίνης (αντιφλεγμονώδες) και της κυπροεπταδίνης (αντιισταμινικό) (Mohammad et al., 2021).

1.6. Η χρήση των ενζύμων στον τομέα της βιομηχανίας

Όπως προαναφέρθηκε, το μελισσόψωμο χαρακτηρίζεται από ένα πλούσιο μικροβίωμα. Τα διάφορα βακτήρια που το αποτελούν, ενδέχεται να παράγουν ένζυμα σημαντικού βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος. Όπως είναι γνωστό τα ένζυμα είναι βιολογικά μόρια παραγόμενα από έμβια όντα και χαρακτηρίζονται ως «βιοκαταλύτες». Στις μέρες μας, η ζήτηση των ενζύμων στο βιομηχανικό τομέα αυξάνεται ολοένα και περισσότερο, καθώς γίνεται μία προσπάθεια αντικατάστασης των επικίνδυνων χημικών ουσιών με προσεγγίσεις πράσινης χημείας. Σε αυτό το πλαίσιο, η διαθεσιμότητα των οικονομικά αποδοτικών υποστρωμάτων των ενζύμων είναι πολύ σημαντική για να καταστεί εφικτή μια παραγωγή χημικών μεγάλης κλίμακας (Ejaz et al., 2021).

1.6.1. Αμυλάσες

Οι αμυλάσες ταξινομούνται ως προς το μηχανισμό δράσης τους σε α , β και γ -αμυλάσες και καταλύουν την υδρόλυση των γλυκοσιδικών δεσμών του αμύλου, γι' αυτό ονομάζονται και γλυκοσιδικές υδρολάσες. Υπάρχουν σε αφθονία στα ζωντανά συστήματα και δρουν σε συγκεκριμένα υποστρώματα. Όλες οι α -αμυλάσες δρουν στο άμυλο (πολυσακχαρίτης) ως το κύριο υπόστρωμα και αποδίδουν μικρές μονάδες γλυκόζης (μονοσακχαρίτης) και μαλτόζης (δισακχαρίτης). Οι πιο μελετημένες αμυλάσες είναι η α -αμυλάση και η β -αμυλάση, με την πρώτη να έχει ταχύτερη δράση από τη δεύτερη.



Εικόνα 7: Τρισδιάστατη δομή αμυλάσης

<https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%91%CE%BC%CF%85%CE%BB%CE%AC%CF%83%CE%B7>

Οι αμυλάσες παράγονται από διάφορες πηγές όπως φυτά, ζώα και μικρόβια. Οι μικροβιακές αμυλάσες εμφανίζουν πλεονεκτήματα έναντι των υπολοίπων. Η πιο κοινή μέθοδος για τη μελέτη παραγωγής αμυλάσης είναι μέσω απομόνωσης στελέχους με σειριακή αραιώση. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται εύκολη επιλογή, αφού μέσω των αραιώσεων ελαχιστοποιείται ο αριθμός των αποικιών. Μία άλλη μέθοδος είναι μέσω της επιλογής υποστρώματος, όπου τα αποτελεσματικά στελέχη απομονώνονται ανάλογα με τη συγγένεια τους για ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Η αμυλάση εκκρίνεται από διάφορα βακτηριακά είδη όπως *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. polymyxa*, *B. mesentericus*, *B. vulgaris*, *B. megaterium*, *B. Cereus*, *B. Halodurans* και *Bacillus sp. Ferdowsicus*). Το συγκεκριμένο ένζυμο παράγεται και από ορισμένους μύκητες. Το πλεονέκτημα σε σχέση με εκείνες που παράγονται από βακτηριακά είδη είναι ότι εκκρίνονται εξωκυτταρικά. Επιπλέον, η ικανότητα των μυκήτων να δεισδύουν σε σκληρά υποστρώματα, διευκολύνει τη διαδικασία υδρόλυσης. Διάφορα είδη μυκήτων που παράγουν αμυλάση περιλαμβάνουν αυτά του γένους *Aspergillus* (*A. oryzae*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. fumigatus*, *A. kawachii*, και *A. flavus*), *Penicillium* (*P. brunneum*, *P. Fallutanum*, *P. expansum*, *P. chrysogenum*, *P. roqueforti*, *P. janthinellum*, *P. camemberti*, και *P. olsonii*), *Streptomyces rimosus*, *Thermomyces lanuginosus*, *Pycnoporus sanguineus*, *Cryptococcus flavus*, *Thermomonospora curvata*, και *Mucor sp.*

Η αμυλάση αποτελεί περίπου το 25% της παγκόσμιας αγοράς ενζύμων (Gopinath et al., 2017). Στη βιομηχανία των τροφίμων χρησιμοποιείται η α-αμυλάση (*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stearothermophilus* ή *Bacillus licheniformis*) για την υδροποίηση του αμύλου, προκειμένου να παραχθούν σιρόπια γλυκόζης και φρουκτόζης. Η ενζυμική μετατροπή του αμύλου περιλαμβάνει τη ζελατινοποίηση, όπου οι κόκκοι του αμύλου διαλύονται και σχηματίζεται ένα παχύρευστο εναιώρημα, την υδροποίηση, όπου πραγματοποιείται μερική υδρόλυση και απώλεια ιξώδους και τέλος τη σακχαροποίηση, όπου μέσω περαιτέρω υδρόλυσης παράγεται γλυκόζη και μαλτόζη. Επίσης, χρησιμοποιούνται και στην αρτοποιία, καθώς προστίθενται στη ζύμη, αποικοδομούν το άμυλο σε μικρότερες δεξτρίνες οι οποίες ζυμώνονται από τη

μαγιά. Ενισχύεται έτσι ο ρυθμός της ζύμωσης, μειώνεται το ιξώδες με αποτέλεσμα τη βελτίωση του όγκου και της υφής του προϊόντος. Οι αμυλάσες που χρησιμοποιούνται στην αρτοποιία προέρχονται από το βακτήριο *Bacillus stearothermophilus*.

Στη βιομηχανία των απορρυπαντικών οι αμυλάσες (*Bacillus* ή *Aspergillus*) χρησιμοποιούνται για ενίσχυση της αποτελεσματικότητας στην αφαίρεση των λεκέδων, καθώς αποικοδομούν τα υπολείμματα αμυλούχων τροφών σε δεξτρίνες και άλλους μικρότερους ολιγοσακχαρίτες. Μπορούν να δράσουν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες και αλκαλικό pH, διατηρώντας τις συνθήκες του απορρυπαντικού (που χρησιμοποιείται σε ένα οξειδωτικό περιβάλλον πλύσης) σταθερές.

Η χρήση των α-αμυλασών στη βιομηχανία χαρτοπολτού και χαρτιού είναι για την παραγωγή αμύλου χαμηλού ιξώδους και υψηλού μοριακού βάρους, κάνοντας την επιφάνεια του χαρτιού αρκετά λεία και ισχυρή, βελτιώνοντας έτσι την ποιότητα γραφής. Το ιξώδες του φυσικού αμύλου είναι πολύ υψηλό για το μέγεθος του χαρτιού και αυτό μπορεί να μεταβληθεί με μερική αποικοδόμηση του πολυμερούς με α-αμυλάσες (Souza & Magalhães, 2010).

1.6.2. Πρωτεάσες

Οι πρωτεάσες υδρολύουν τους πεπτιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών ή των πολυπεπτιδίων και σύμφωνα με τον καταλυτικό τους μηχανισμό ταξινομούνται σε εξωπεπτιδάσες και ενδοπεπτιδάσες (Chakrabarty et al., 2018; Gurumalles et al., 2019). Οι εξωπεπτιδάσες υδρολύουν τα τερματικά σημεία αζώτου ή άνθρακα της αλυσίδας ενός πολυπεπτιδίου και ανάλογα με την εξειδίκευση (το μέγεθος του θραύσματος, την ταυτότητα του ελευθερωμένου θραύσματος, το άκρο της προέλευσης και τον περιορισμό του μεγέθους του μήκους της ειδικής πεπτιδικής αλυσίδας) διακρίνονται σε αμινοπεπτιδάσες και καρβοξυπεπτιδάσες. Οι ενδοπεπτιδάσες υδρολύουν τους πεπτιδικούς δεσμούς, μεταξύ συγκεκριμένων αμινοξέων, που βρίσκονται ενδιάμεσα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και όχι στα άκρα της. Ανάλογα με το χημικό είδος της ομάδας που είναι υπεύθυνη για την

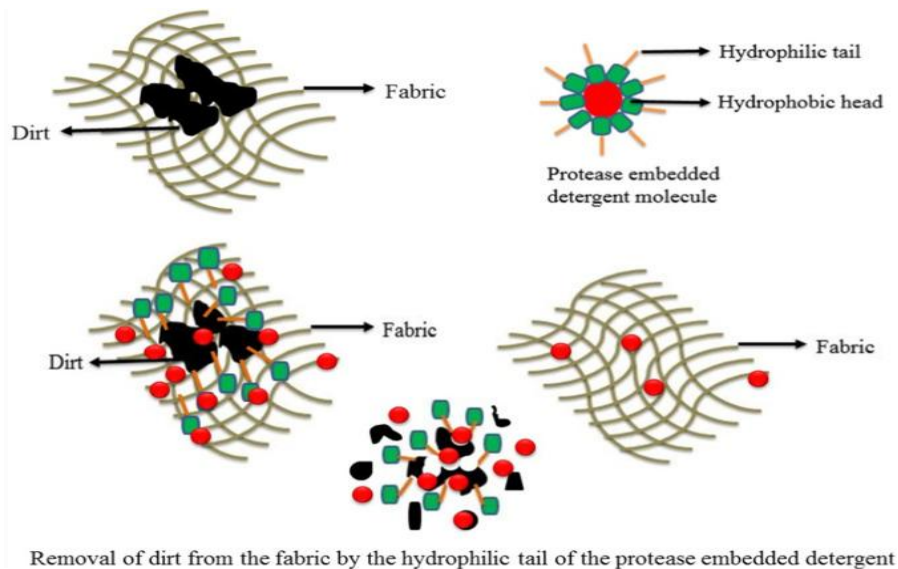
καταλυτική δραστηριότητα, χωρίζονται σε πρωτεάσες κυστεΐνης, σερίνης, θρεονίνης, γλουταμινικού οξέος, ασπαρτικού οξέος και μεταλλοπρωτεάσες.

Ο τύπος της πρωτεάσης εξαρτάται από τον ξενιστή και την προσαρμοστικότητα του στο άμεσο περιβάλλον. Οι πρωτεάσες εμφανίζονται στα φυτά ως ενδοπεπτιδάσες κυστεΐνης (βρωμελίνη, παπαΐνη, φικίνη και κερατινάσες). Επίσης, μερικές προέρχονται από ζωικά είδη όπως η χυμοθρυψίνη, η παγκρεατική θρυψίνη, οι πεψίνες και η ρενίνη. Τέλος παράγονται και από διάφορους μικροοργανισμούς όπως βακτήρια, μύκητες και ακτινομύκητες.

- Βακτήρια που παράγουν πρωτεάσες: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megatarium*, *Bacillus circulans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Geobacillus caldoproteolyticus*, *Bacillus laterosporus* και *Pseudomonas fluorescens*.
- Μύκητες που παράγουν πρωτεάσες: *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Pleurotus citrinopileatus*, *Rhizopusoryzae*, *Lentinus citrinus*, *Rhizomucor nainitalensis*, *Beauveria feline*, *Penicillium godlewskii* SBSS 25.
- Ακτινομύκητες που παράγουν πρωτεάσες: *Streptomyces nogalator*

Οι μικροβιακές πρωτεάσες αποτελούν τα δύο τρίτα σχεδόν των βιομηχανικά απαραίτητων πρωτεασών, όμως μόνο ορισμένοι μικροοργανισμοί παράγουν πρωτεάσες με τις επιθυμητές ιδιότητες. Παράγονται σε μεγάλες ποσότητες κατά τη ζύμωση των μικροοργανισμών σε βιοαντιδραστήρα, είτε με τη ζύμωση στερεάς κατάστασης, είτε με τη βυθισμένη ζύμωση.

Οι αμυλάσες και οι πρωτεάσες είναι τα δύο ένζυμα που χρησιμοποιούνται εκτενώς στη σύνθεση απορρυπαντικών για την αφαίρεση ρύπων με βάση το άμυλο και τις πρωτεΐνες. Το πρώτο απορρυπαντικό με βάση τα ένζυμα ήταν το Brunus το οποίο παρασκευάστηκε το 1913. Στις μέρες μας, η Novozymes και η Genencor είναι οι κύριοι προμηθευτές ενζύμων απορρυπαντικών. Μια από τις πρωτεάσες που έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή απορρυπαντικών είναι η ενδοκυτταρική πρωτεάση σερίνης που έχει απομονωθεί από το *Bacillus megaterium*. Φάνηκε να είναι πολύ αποτελεσματική στην υδρόλυση της καζεΐνης και της αιμοσφαιρίνης.



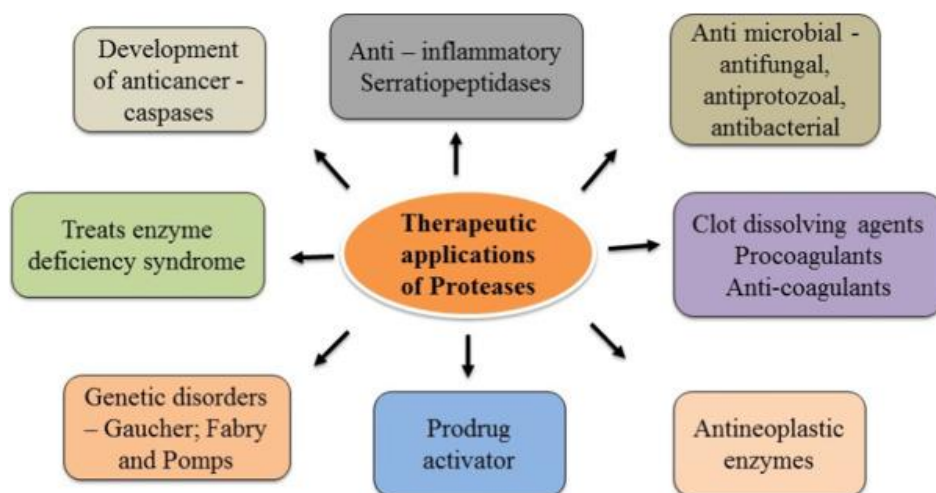
Εικόνα 8: Αφαίρεση λεκέδων με μόριο απορρυπαντικού ενσωματωμένο σε πρωτεάση (Gurumallesh et al., 2019)

Η χρήση των πρωτεασών βρίσκει εφαρμογή και στη βιομηχανία δέρματος στη διαδικασία της αποτρίχωσης. Στη συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιούνται χημικές ουσίες όπως το θειούχο νάτριο, δημιουργώντας ζητήματα ρύπανσης του περιβάλλοντος. Με τη χρήση της πρωτεάσης η διαδικασία γίνεται πιο φιλική με το περιβάλλον, προσφέρει μεγαλύτερη αντοχή και καλύτερη ποιότητα στο προϊόν.

Στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών, πολύ σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζει η αμινοπεπτιδάση της προλίνης, που απομονώνεται από βακτήρια γαλακτικού οξέος. Είναι μια πρωτεάση σερίνης που μπορεί να αποικοδομήσει το κολλαγόνο και με αυτόν τον τρόπο να μαλακώσει το κρέας. Επιπλέον, προκειμένου να βελτιωθεί η ποιότητα του σιταριού για την προετοιμασία της ζύμης, στον τομέα της αρτοποιίας, χρησιμοποιούνται διάφορες πρωτεάσες για την αποικοδόμηση της γλουτένης. Η Neutrase είναι μια μεταλλοπρωτεάση που απομονώνεται από το *Bacillus amyloliquefaciens* και παίζει ζωτικό ρόλο στην τροποποίηση της επεξεργασίας της ζύμης για την παρασκευή μπισκότων και κράκερ. Τέλος γίνονται προσπάθειες για παραγωγή μπίρας χωρίς γλουτένη και η πρωτεάση που από μία μελέτη φαίνεται πολύ αποτελεσματική, είναι η ειδική ανασυνδυασμένη

προλίνη προλυλ - ενδοπεπτιδάση απομονωμένη από *Sphaerobacter thermophiles*. Η απομονωμένη ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη προστέθηκε στο κριθάρι κατά τη διάρκεια της βυνοποίησης με αποτέλεσμα την παραγωγή μπίρας υψηλής ποιότητας χωρίς γλουτένη.

Στον τομέα της υγείας τα συγκεκριμένα ένζυμα ενισχύουν τις μη επεμβατικές θεραπευτικές διαδικασίες, για τη θεραπεία ανθρώπινων ασθενειών και διαταραχών. Χάρη στην εξειδίκευση των ενζύμων προς συγκεκριμένα υποστρώματα, ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, το ποσοστό επιτυχίας μιας τέτοιας θεραπείας είναι τεράστιο. Η ομάδα των ενζύμων κολλαγενάσης είναι μεταλλοπρωτεϊνάσες μήτρας που μπορούν να θεραπεύσουν καταστάσεις όπως η νόσος του Dupuytren, η νόσος του Peyronie, η επούλωση τραυμάτων, τα εγκαύματα, το γλαύκωμα, η κήλη μεσοσπονδύλιου δίσκου, η υποβάθμιση του ανθρώπινου κατακρατημένου πλακούντα, η αποκατάσταση χόνδρου, ο πόνος της θηλής, το χηλοειδές, η υαλοειδεκτομή, η κυτταρίτιδα, οι χρόνιες ολικές αποφράξεις, η παράδοση γονιδίων ινομύματα της μήτρας. Οι αλκαλικές πρωτεάσες από το *Bacillus subtilis* χρησιμοποιούνται αποτελεσματικά στη διαδερμική χορήγηση φαρμάκων για δερματολογικές θεραπείες. Τέλος η γλυκοπρωτεΐνη κυστεϊνικών πρωτεασών που απομονώθηκε από το *Zingiber montanum* αποδείχθηκε ότι είναι ένα πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό (Gurumalles et al., 2019).

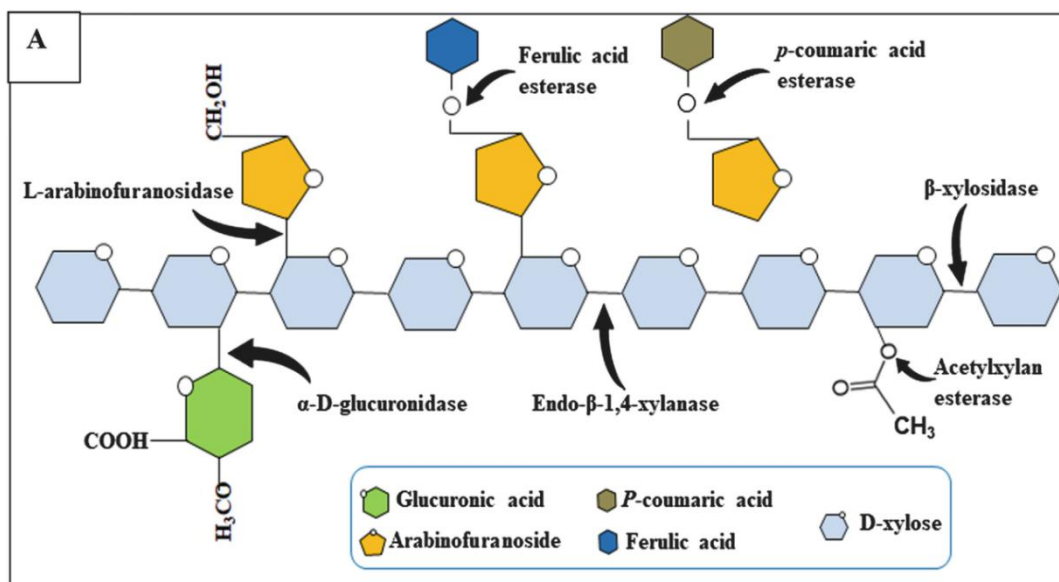


Εικόνα 9: Εφαρμογές πρωτεασών στην υγεία (Gurumalles et al., 2019)

1.6.3. Ημικυτταρινάσες– Ξυλανάσες

Οι ημικυτταρινάσες, ανήκουν στην οικογένεια των ενζύμων υδρολάσης, που αποικοδομούν την ξυλάνη σε ξυλόζη και ολιγοσακχαρίτες ξυλάνης. Ανάλογα με τη δράση τους σε διαφορετικά υποστρώματα, ταξινομούνται σε:

- ενδο-1,4-β-ξυλανάσες, που υδρολύουν την κύρια αλυσίδα της ξυλάνης δημιουργώντας ολιγοσακχαρίτες.
- 1,4-β-ξυλοσιδάσες, που απελευθερώνουν ξυλόζη από το αναγωγικό άκρο του σκελετού.
- β-d-ξυλοσιδάσες,
- α-l-αραβινοφουρανοσιδάσες,
- εστεράσες ακετυλξυλάνης,
- εστεράσες φερουλικού οξέος,
- α-γλυκουρονιδάσες και
- p-κουμαρικές εστεράσες (Alves-Prado et al., 2009; Kaushal et al., 2021; Mamo, 2019).



Εικόνα 10: Ημικυτταρινάσες που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση ξυλάνης (Mamo, 2019)

Οι μικροοργανισμοί που δρουν στο φυτικό κυτταρικό τοίχωμα και προκαλούν την αποικοδόμησή του, είναι υπεύθυνοι για την παραγωγή της ξυλανάσης. Οι ενδο-(1, 4)-β-ξυλανάσες που είναι ευρέως χρησιμοποιούμενες σε βιομηχανικές διεργασίες αποικοδομούν το πολυμερές της ξυλάνης, παράγοντας διακλαδισμένους και γραμμικούς ξυλο-ολιγοσακχαρίτες με χαμηλό βαθμό πολυμερισμού (DP). Ορισμένα βακτήρια που τις παράγουν είναι *Clostridium*, *Streptomyces* και είδη *Bacillus* με το τελευταίο να έχει μελετηθεί περισσότερο, καθώς παρουσιάζει υψηλή δραστικότητα ξυλανάσης. Επιπλέον παρουσιάζουν υψηλή θερμική σταθερότητα (ενεργό στους 70°C περίπου) γεγονός που τις καθιστά ευνοϊκές για βιομηχανική χρήση. Επίσης ορισμένοι μύκητες και ζυμομύκητες που έχουν μελετηθεί για την παραγωγή ξυλανάσης προέρχονται από τα είδη *Aspergillus* και *Trichoderma* και *Pichia stipitis* και *Cryptococcus* αντίστοιχα. Σε σύγκριση με τη βακτηριακή ξυλανάση, η οποία παράγεται εύκολα σε αλκαλικό και ουδέτερο pH, οι μυκητιακές ξυλανάσες έχουν ορισμένους περιορισμούς λόγω της απαίτησης χαμηλότερου pH που καθιστά πιο δύσκολη την εξαγωγή του ενζύμου.

Λόγω της θερμοανεκτικότητας που εμφανίζει η ξυλανάση σε ακραίες συνθήκες, βρίσκει εφαρμογή σε διάφορους τομείς βιομηχανικής παραγωγής. Παραδείγματος χάρη, στην αρτοποιία για τη βελτίωση των χαρακτηριστικών της ζύμης. Όπως είναι γνωστό, το σιτάρι αποτελείται από ημικυτταρινάσες, όπως η αραβινοξυλάνη η οποία δεν εκχυλίζεται με το νερό. Η ξυλανάση τη διαλυτοποιεί συμβάλλοντας στην ομοιόμορφη κατανομή του νερού, βελτιώνοντας έτσι το δίκτυο γλουτένης σε όλη τη ζύμη. Επίσης συμβάλει στην απαλότητα, την ελαστικότητα και στον όγκο του ψωμιού (Kaushal et al., 2021).

Στις βιομηχανίες ζυθοποιίας, το ιξώδες που δημιουργείται από τις διαλυτές αραβινοξυλάνες μπορεί να δημιουργήσει προβλήματα κατά το φιλτράρισμα και θολερότητα στη μπίρα. Η χρήση ξυλανασών που αποικοδομούν τις υδατοδιαλυτές αραβινοξυλάνες μειώνει το ιξώδες του ζυθογλεύκου και οδηγεί σε αυξημένο ρυθμό διήθησης και μειωμένο σχηματισμό θολερότητας. Οι ξυλανάσες μαζί με την κυτταρινάση και την πηκτινάση χρησιμοποιούνται εκτός από τη διαύγαση του μούστου και των χυμών και στην υγροποίηση φρούτων και λαχανικών. Αυτή η ενζυματική επεξεργασία βοηθά στη σταθεροποίηση του πολτού των φρούτων, στη

μείωση του ιξώδους και στην απομάκρυνση ουσιών που μπορεί να προκαλέσουν θόλωση στο συμπύκνωμα (Mamo, 2019).

Στη βιομηχανία χαρτιού και χαρτοπολτού, βρίσκει εφαρμογή στη διαδικασία απομάκρυνσης της λιγνίνης από τον ξυλοπολτό προκειμένου να παραχθεί ένα φωτεινό και εξ ολοκλήρου λευκό χαρτί. Επιπλέον χρησιμοποιείται στην παραγωγή βιοκαυσίμου, για τη μετατροπή της γλωσσοκυτταρικής βιομάζας (LCB) σε αιθανόλη, παράγοντας φιλικές προς το περιβάλλον ανανεώσιμες πηγές ενέργειας (Kaushal et al., 2021).

Οι ημικυτταρινάσες είναι επίσης σημαντικές στη διαχείριση των απορριμμάτων. Εκτός από τα υπολείμματα γεωργικών και αστικών στερεών αποβλήτων, διάφορες αγροβιομηχανίες, βιοδιυλιστήρια, εργοστάσια παραγωγής χαρτιού και χαρτοπολτού κ.λπ. δημιουργούν τεράστιες ποσότητες αποβλήτων που περιέχουν ημικυτταρίνη. Ως εκ τούτου, οι ξυλανάσες και οι μαννάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διαχείριση τέτοιων αποβλήτων. Έτσι αποφεύγεται η καύση, η απελευθέρωση σε υδάτινα σώματα ή η απόσβεση αποβλήτων που περιέχουν ημικυτταρίνη, γεγονός που την καθιστά μια φιλική προς το περιβάλλον μέθοδο (Mamo, 2019).

1.6.4. Κυτταρινάσες

Η κυτταρίνη είναι ένα μείγμα τριών ενζύμων, της β-γλυκοσιδάσης, που δρα στα μη αναγωγικά άκρα της κυτταροβιόζης και της κυτταροδεξτρίνης, της ενδο-1,4-β-D-γλυκανάσης (ενδογλυκανάση), που δρα στις εσωτερικές θέσεις ολιγοσακχαριτών που βρίσκονται στην καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη, σε κύτταρο ολιγοσακχαρίτες ή σε άμορφη κυτταρίνη και τέλος της εξω-1,4-β-D-γλυκανάσης (εξωγλυκανάση), που υδρολύει τα μη αναγωγικά άκρα της κρυσταλλικής κυτταρίνης και σχηματίζει την κυτταροβιόζη ή τη γλυκόζη ως κύρια τελικά προϊόντα. Αυτά τα τρία ένζυμα εμπλέκονται στην υδρόλυση της κυτταρίνης με συνεργική δράση.

Ο πιο μελετημένος κυτταρολυτικός μύκητας, ο *Trichoderma reesei*, παράγει β-γλυκοσιδάσες, ενδο-β-1,4-γλυκανάση και κυτταροβιοϋδρολάση. Άλλα είδη τέτοιων μυκήτων είναι ο *Aspergillus terreus*, ο *Aspergillus fumigatus*, ο *Humicola insolens*, ο *Trichoderma citrinoviride*, ο *Dipodascaceae* και ο *Phaffomycetaceae*. Τα πιο συνηθισμένα κυτταρινολυτικά βακτήρια είναι *Thermobifida fusca*, *Thermonospora sp.*, *Streptomyces sp.*, *Ruminococcus albus*, *Thermobisporabisporea*, *Erwinia chrysanthemi*, *Clostridium sp.*, *Cellulomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Acetivibriocellulolyticus*, *Pseudomonas coleopterorum*, *Herbinixhemicellulosilytica*, *Caldicellulosiruptor changbaiensis*, *chartisolvens Anaerobacterium*, *Alicyclobacillus cellulosityticus*, *Bacteroides luti*, *Ornatilinea apprima*, *Kallotenuerapyrolyticum* και *Streptomyces abietis*.

Οι κυτταρινάσες για περισσότερες από τρεις δεκαετίες, χρησιμοποιούνται σε ευρεία κλίμακα στο βιομηχανικό τομέα και αυτό τις κατατάσσει στη δεύτερη θέση στην παγκόσμια βιομηχανική αγορά ενζύμων. Η δομή και ο τρόπος δράσης αυτού του ενζύμου έχει μελετηθεί εκτενώς. Στην παραγωγή βιοκαυσίμου η κυτταρίνη υδρολύει τη βιομάζα σε απλά σάκχαρα (είτε πεντόζη είτε εξόζες), τα οποία στη συνέχεια ζυμώνονται σε καύσιμο ή βιοαιθανόλη. Οι κυτταρίνες εμπλέκονται κυρίως στη βιομετατροπή της ανανεώσιμης λιγνοκυτταρινικής βιομάζας. Η αποδόμηση μιας τέτοιας βιομάζας αποτελείται από 3 στάδια. Την προεπεξεργασία της βιομάζας, τη σακχαροποίηση στην οποία εμπλέκονται ένζυμα και τη ζύμωση. Υπολογίζεται ότι η βιοεπεξεργασία της βιομάζας από κυτταρολυτικούς μικροοργανισμούς μπορεί να μειώσει κατά 40% το κόστος της διαδικασίας.

Ένας αναδυόμενος τομέας της χρήσης της κυτταρινάσης είναι στη βιομηχανία του χαρτιού και του χαρτοπολτού. Η πολτοποίηση πραγματοποιείται με μηχανικές ή βιοχημικές μεθόδους, αποδίδοντας πολύ με υψηλή ακαμψία, όγκο και υψηλή περιεκτικότητα σε λεπτά σωματίδια. Με τη χρήση όμως της κυτταρινάσης, εξοικονομείται από 20% έως 40% ενέργεια. Έχει αναφερθεί από τους Kuhad et al. ότι η χρήση της κυτταρινάσης προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με την ξυλανάση, όπως η βελτίωση της φωτεινότητας και η ενίσχυση της λευκανσιμότητας του πολτού. Για το σκοπό αυτό οι κυτταρινάσες που χρησιμοποιούνται, προέρχονται κυρίως από τους μύκητες *Aspergillus niger* και *Trichoderma reesei*.

Η πιο γνωστή και επιτυχημένη εφαρμογή των κυτταρινασών είναι στη βιομηχανία κλωστοϋφαντουργίας όπου χρησιμοποιούνται για τη βιο-λίθρωση των υφασμάτων και για τη βελτίωση της εμφάνισής τους. Επίσης στη βιομηχανία των απορρυπαντικών, ιδιαίτερα η αλκαλική κυτταρινάση βελτιώνει τη φωτεινότητα του χρώματος και απομακρύνει τη βρωμιά από το ύφασμα.

Η ανάγκη για παραγωγή τροφίμων με καλύτερη υφή, γεύση και χρώμα, έχει οδηγήσει στη μελέτη της χρήσης ορισμένων ενζύμων και στον τομέα των τροφίμων. Ωστόσο, η εφαρμογή των κυτταρινασών δεν έχει ακόμη αναγνωριστεί ευρέως σε αυτόν τον τομέα. Η κυτταρινάση από τα βακτήρια *Paenibacillus* και *Bacillus* και τους μύκητες *Trichoderma* και *Aspergillus* χρησιμοποιούνται δυνητικά στη βιομηχανία τροφίμων. Ορισμένες χρήσεις του ενζύμου αυτού είναι η ακόλουθη.

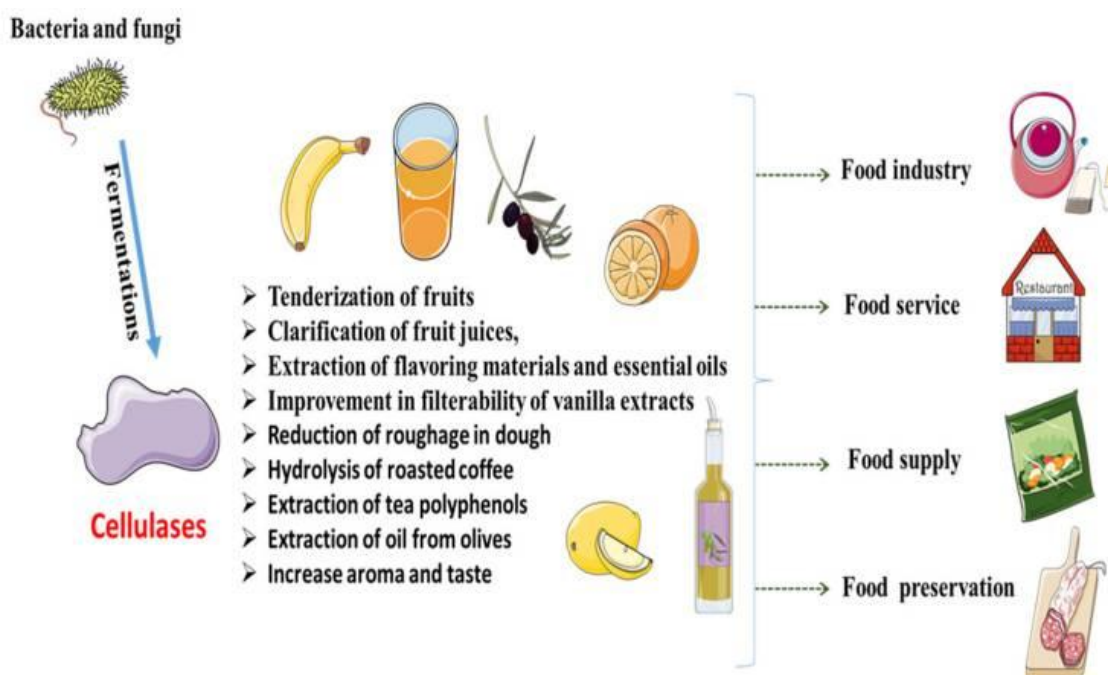
Στην οينوποίηση χρησιμοποιούνται για την παραγωγή οίνου καλής ποιότητας. Στη φύση, τα περισσότερα σάκχαρα υπάρχουν ως ημικυτταρίνη και κυτταρίνη. Επομένως, η κυτταρινική βιομάζα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή αλκοόλης. Τα κυτταρινικά βιοϋλικά μπορούν να μετατραπούν με την κυτταρινάση σε ζυμώσιμα σάκχαρα. Τα σάκχαρα στη συνέχεια μετατρέπονται σε αλκοόλη από τη μαγιά. Η χρήση της κυτταρινάσης στην οينوποίηση εκτός από τη βελτίωση της ποιότητας προσφέρει σταθερότητα στο κρασί, διαύγαση, καλύτερη ανάπτυξη χρώματος και βελτιωμένη διαβροχή. Η κυτταρίνη μειώνει επίσης το ιξώδες του μούστου. Επιπλέον η β-γλυκοσιδάσες ενισχύουν το άρωμα των κρασιών μέσω της υδρόλυσης γλυκοζυλιωμένων πρόδρομων ουσιών σε γλυκόζη και αγλυκόνες.

Οι κυτταρινάσες χρησιμοποιούνται επίσης, για την εκχύλιση ελαίου από τις ελιές. Η εφαρμογή τους έχει ως αποτέλεσμα λιγότερη σπατάλη, χαμηλότερη τάση για τάγγιση, αύξηση των αντιοξειδωτικών συστατικών, καλύτερη ποιότητα και απόδοση της εκχύλισης. Το εμπορικό ενζυμικό παρασκεύασμα Olivex (ξυλανάση, κυτταρινάση και πηκτινάση από το *Aspergillus aculeatus*) ήταν το πρώτο κοκτέιλ ενζύμων που χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή ελαιολάδου.

Το ψήσιμο επηρεάζεται επίσης από την καθαρή μορφή της κυτταρίνης, επομένως, οι κυτταρινάσες από *Humicola insolens*, *Trichoderma reesi* και *Aspergillus niger* χρησιμοποιήθηκαν για τη μείωση της χονδροειδούς

ουσίας στη ζύμη, καθώς μετατρέπει τα πολυμερή κυτταρίνης σε μονομερή γλυκόζη. Η κυτταρίνη μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ενζυματική υδρόλυση του καβουρδισμένου καφέ που χρησιμοποιεί λιγότερη ενέργεια και είναι φθηνότερη σε σύγκριση με τη θερμική υδρόλυση.

Οι ίνες που υπάρχουν στους χυμούς προκαλούν ένα άλλο πρόβλημα στις βιομηχανίες, αφού λόγω της αδιαλυτότητάς τους μπορεί να φράξουν τη γραμμή παραγωγής. Καθώς οι ίνες είναι κυτταρινικής φύσης, η προσθήκη κυτταρινασών αφαιρεί τις ίνες και διευκολύνει το φιλτράρισμα των χυμών. Η προσθήκη κυτταρινασών είναι επίσης γνωστό ότι βελτιώνει το άρωμα και τη γεύση των εσπεριδοειδών. Τα τρόφιμα που περιέχουν ίνες μπορούν επίσης να προσφέρουν οφέλη για την υγεία, όπως μείωση του κινδύνου ορισμένων τύπων καρκίνου, διαβήτη, καρδιακών παθήσεων και επίσης να βοηθήσουν στη διατήρηση ενός υγιούς σωματικού βάρους. Ωστόσο, οι υπερβολικές ίνες στη διατροφή μπορεί να έχουν κάποιες παρενέργειες στην υγεία του ανθρώπου (Ejaz et al., 2021).



Εικόνα 11: Εφαρμογή κυτταρινασών στη βιομηχανία των τροφίμων (Ejaz et al., 2021)

1.6.5. Ένζυμα που διασπούν χρωστικές

Οι λακκάσες, καθώς και η οξειδάσες της λιγνίνης και του μαγγανίου, ανήκουν στην κατηγορία ενζύμων πολυχαλκού. Έχουν την δυνατότητα να οξειδώνουν μία ποικιλία από φαινολικές και μη φαινολικές ενώσεις, λόγω της χαμηλής ειδικότητας του υποστρώματός τους. Χρησιμοποιούν ως δέκτη ηλεκτρονίων το οξυγόνο και παράγουν νερό ως υποπροϊόν. Παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα βιομηχανικών και βιοτεχνολογικών εφαρμογών, καθώς παρέχουν αποδοτικότερες οικονομικά λύσεις και η χρήση τους αποτελεί μια πιο φιλική μέθοδο με το περιβάλλον (Arregui et al., 2019; Biko et al., 2020; Zeng et al., 2018). Ωστόσο, η εκμετάλλευσή τους από τις βιομηχανίες συναντά διάφορα εμπόδια, κυρίως λόγω της σπανιότητάς τους και του υψηλού κόστους των εμπορικών παρασκευασμάτων (Biko et al., 2020).

Λακκάσες

Οι λακκάσες (βενζολοδιόλη : οξειδοοξειδοκτάση οξυγόνου, EC 1.10.3.2) αποτελούν μέρος μιας ευρείας ομάδας ενζύμων που ονομάζονται οξειδάσες πολυφαινόλης. Την αντίδραση της οξειδωσης καταλύουν τέσσερα άτομα χαλκού τα οποία συγκρατούνται σε τέσσερις περιοχές δέσμευσης χαλκού, πλούσιες σε ιστιδίνη και γι' αυτό ονομάζονται και οξειδάσες πολυχαλκού (Arregui et al., 2019; Ausec et al., 2011). Περιέχουν τρεις τύπους ατόμων χαλκού εκ των οποίων ο ένας είναι υπεύθυνος για το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα. Οι λακκάσες που δεν διαθέτουν το παραπάνω άτομο χαλκού, ονομάζονται κίτρινες ή λευκές (Brijwani et al., 2010).

Τα ένζυμα αυτά εκφράζονται ευρέως στη φύση και μπορεί να ληφθούν από φυτά, μύκητες, βακτήρια, έντομα, ζύμες και ζυμομύκητες (Gupta et al., 2017). Πιο συγκεκριμένα, οι λακκάσες κατανέμονται σε ασκομύκητες, δευτερομύκητες, βασιδιομύκητες, και σε πολλούς μύκητες λευκής σήψης που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της λιγνίνης.

- Βακτήρια που παράγουν λακκάσες: *Azospillum*, *Lipoferum*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Proteobacterium* και *Marinomonas*.

- Μύκητες που παράγουν λακκάσες: *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* και *Coprinus cinereus* (Arregui et al., 2019).

Οι βακτηριακές λακκάσες παρουσιάζουν υψηλότερη σταθερότητα σε μεταβλητό pH (ουδέτερο έως αλκαλικό) και θερμοκρασία (πολύ σταθερές σε υψηλές θερμοκρασίες), καθώς και σε διαφορετικούς οργανικούς διαλύτες (υψηλή αντοχή σε διαφορετικούς διαλύτες) και διαφορετικής συγκέντρωσης άλατα (μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου) (Arregui et al., 2019). Όμως απαιτούν μεσολαβητές υψηλού κόστους, λόγω του χαμηλού δυναμικού οξειδοαναγωγής τους, το οποίο εμποδίζει τη χρήση τους σε βιομηχανικό επίπεδο (Gupta et al., 2017). Μπορούν να οξειδώσουν ενώσεις που σχετίζονται με τη λιγνίνη και εξαιρετικά ανθεκτικούς περιβαλλοντικούς ρύπους. Επιπλέον, οι λακκάσες δεν απαιτούν συμπαραγόντες όπως το NAD(P)H και δεν παράγουν τοξικά ενδιάμεσα υπεροξειδία. Αυτά τα χαρακτηριστικά των λακκασών τις τοποθετούν ως πιθανά βιομηχανικά οξειδωτικά ένζυμα (Arregui et al., 2019). Από την άλλη μεριά οι μυκητιακές λακκάσες, έχουν υψηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής και γι' αυτό το λόγω βρίσκουν βιοτεχνολογικές εφαρμογές κυρίως στην αποδόμηση της λιγνίνης (Brijwani et al., 2010)

Μέχρι σήμερα, πολλά από αυτά τα ένζυμα έχουν εφαρμοστεί σε διαδικασίες όπως η ηλεκτροκατάλυση, η απολίπωση και η παραγωγή αιθανόλης. Χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία για την επεξεργασία μολυσμένων αποβλήτων, όπως κλωστοϋφαντουργικά απόβλητα που έχουν υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού και αλκαλικό pH. Οι Liu et al. ανέφερε μια θερμοσταθερή και σταθερή στο pH λακκάση *Klebsiella pneumoniae* η οποία αποικοδομεί διάφορες χρωστικές που χρησιμοποιούνται σε βιομηχανικές διεργασίες (όπως το αντιδραστικό μπλε λαμπρό X-BR, το αντιδραστικό σκούρο μπλε M-2GE, το κόκκινο του Κονγκό, το μπλε βρωμοφαινόλης και το πράσινο του μαλαχίτη, μεταξύ άλλων) σε σύντομους χρόνους αντίδρασης (90 λεπτά) κάτω από διαφορετικές τιμές pH στους 70 °C (Arregui et al., 2019).

Δεδομένου ότι η λακκάση είναι ικανή να αποικοδομεί τις φαινολικές ενώσεις, η χρήση για τη βιοαποκατάσταση των λυμάτων της βιομηχανίας τροφίμων είναι

ζωτικής σημασίας. Κατά τη βιοαποκατάσταση γίνεται βιομετατροπή ενός αλλοιωμένου από ρύπους περιβάλλοντος, προκειμένου να επανέλθει στην αρχική του κατάσταση (Brijwani et al., 2010). Σύμφωνα με την έρευνα των Minussi et al., στέφτηκε με επιτυχία η απομάκρυνση των ξενοβιοτικών καθώς και των αρωματικών ενώσεων, από υδατικά εναιωρήματα, με τη συμβολή ακινητοποιημένης λακκάσης σε υπόστρωμα οργανογέλης (Minussi et al., 2007). Στη βιομηχανία παραγωγής μπύρας, τα λύματα που δημιουργούνται περιέχουν μεγάλες ποσότητες πολυφαινόλων, συνεπώς η βιοαποκατάσταση με τη βοήθεια της λακκάσης θα μπορούσε να έχει επιτυχία (Brijwani et al., 2010). Οι Yagüe et al. βρήκαν ότι η λακκάση που παράγεται από τον μύκητα λευκής σήψης *Corioloropsis gallica* ήταν ικανή να αποικοδομεί τις πολυφαινόλες που υπάρχουν στα λύματα (Yagu et al., 2000).

Στη βιομηχανία των τροφίμων, εφαρμόζονται στην αρτοποιία, στην επεξεργασία χυμών και στη σταθεροποίηση του κρασιού, προκειμένου να βελτιωθεί η λειτουργικότητα των προϊόντων και τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Πιο αναλυτικά, στην αρτοποιία χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση της υφής, του όγκου, τις γεύσης, της φρεσκάδας του ψωμιού και της επεξεργασίας της ζύμης. Το ένζυμο της λακκάσης χάρη στην οξειδωτική του δράση, βελτιώνει την αντοχή των δομών της γλουτένης στη ζύμη (Brijwani et al., 2010).

Όσον αφορά τη βιομηχανία των χυμών φρούτων, φαίνεται από μια μελέτη των Giovanelli και Ravasini, πως οι λακκάσες μπορούν να αφαιρούν τις φαινόλες καλύτερα από ότι η μέθοδος του ενεργού άνθρακα (Giovanelli & Ravasini, 1993). Πολλοί χυμοί φρούτων περιέχουν φυσικές φαινολικές ουσίες και τα προϊόντα οξειδωσής τους, τα οποία συμβάλλουν στο χρώμα και τη γεύση του προϊόντος. Οι φυσικές αντιδράσεις πολυμερισμού και συνοξειδωσης φαινολικών και πολυφαινόλων με την πάροδο του χρόνου έχουν ως αποτέλεσμα ανεπιθύμητες αλλαγές στο χρώμα και το άρωμα. Όμως με τη χρήση του ενζύμου αυξήθηκε η σταθερότητα στο χρώμα και τη γεύση του χυμού.

Κατά την οينوποίηση, η υψηλή συγκέντρωση πολυφαινόλων από τους μίσχους, τους σπόρους και το δέρμα συμβάλλει στο χρώμα και τη στυπτικότητα και εξαρτώνται από την ποικιλία των σταφυλιών και τις συνθήκες οينوποίησης. Με το πέρασμα του χρόνου οι πολυφαινόλες οξειδώνονται, με αποτέλεσμα την αλλοίωση

της γεύσης και την εντατικοποίηση του χρώματος στα κόκκινα κρασιά (Brijwani et al., 2010). Ωστόσο, η έρευνα των Minussi et al. έφερε στο φως ότι οι λακκάσες μπορούν αν απομακρύνουν τις πολυφαινόλες, όμως αν η απομάκρυνση αυτή γίνει χωρίς έλεγχο μπορεί να οδηγήσει σε ανεπιθύμητα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Επιπλέον, διαπίστωσαν ότι η επεξεργασία των λευκών οίνων με λακκάση είναι εφικτή και θα μπορούσε να μειώσει το κόστος επεξεργασίας και να αυξήσει τη δυνατότητα αποθήκευσης των λευκών οίνων για εκτεταμένες χρονικές περιόδους (Minussi et al., 2007).

Στόχος διπλωματικής διατριβής

Τα τελευταία χρόνια, το επιστημονικό ενδιαφέρον στρέφεται στην παραγωγή ενζύμων βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος. Τα ένζυμα αυτά χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς, αντικαθιστώντας τη χρήση διαφόρων χημικών ουσιών. Το γεγονός αυτό αποτελεί μία προσέγγιση φιλική προς το περιβάλλον και προσφέρει μεγαλύτερο οικονομικό όφελος στις επιχειρήσεις. Ο στόχος της παρούσας διπλωματικής διατριβής, είναι η διερεύνηση τέτοιων ενζύμων που παράγονται από το μικροβίωμα του μελισσόψωμου.

2^ο Κεφάλαιο

Υλικά και μέθοδοι

2.1. Μηχανήματα και υλικά



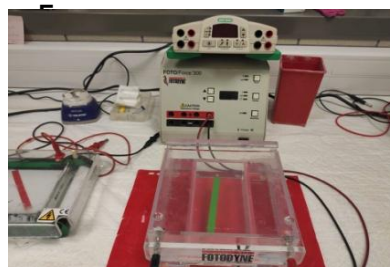
Εικόνα 12: Κλίβανος επώασης



Εικόνα 13: Vortex



Εικόνα 14: Φυγόκεντρος



Εικόνα 15: Συσκευή ηλεκτροφόρησης



Εικόνα 16: Τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας



Εικόνα 17: Φυγόκεντρος



Εικόνα 18: PCR



Εικόνα 19: Υδατόλουτρο



Εικόνα 20: Hood

- Τζάρες
- Δοκιμαστικοί σωλήνες Falcon των 50 ml
- Tubestων 200 μl, 1,5 και 2 ml
- Τρυβλία petri (100 mm)
- Πιπέτες
- Tips
- Eppendorfs και Falcon
- Αποστειρωμένοι ξύλινοι στυλεοί
- Αποστειρωμένα καλαμάκια με έμβολο
- Γυάλινη πιπέτα με πουάρ των 10 ml
- Μεταλλική τριγωνική ράβδος
- Κωνική φιάλη
- Εκμαγείο

Αντιδραστήρια:

- Γλυκερόλη
- Megazyme AZCL-XYLAN
- Megazyme AZCL-HE-CELLULOSE
- Θειικό αμμώνιο
- Coomassie Brilliant Blue R
- Coomassie Brilliant Blue G
- Mikroskopie Malachite Green
- 2-Methoxyphenol, 98+ %C₇H₈O₂
- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE
- Αγαρόζη
- Βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 0,5 μg/ml
- Μπλε της βρωμοφαινόλης και κυανούν του ξυλενίου (loading buffer)

Θρεπτικά Υποστρώματα:

- PCA Agar (Plate Count Agar)
- MRS Agar (DE MAN, ROGOSA and SHARPE)
- MRS + CaCO₃
- To Potato Dextrose Agar (PDA)
- Nutrient Broth + 50% γλυκερόλη
- BBL MacConkey II Agar

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Συλλογή και προετοιμασία δείγματος

Το δείγμα μελισσόψωμου (BB) που ελέγχθηκε είχε τόπο προέλευσης το Πήλιο. Από διάφορα σημεία της κυψέλης συλλέχθηκαν στο σύνολο 10 gr μελισσόψωμου (BB) με αποστειρωμένα καλαμάκια που φέρουν ένα έμβολο και τοποθετήθηκαν σε Falcon των 50 ml. Έπειτα προστέθηκε αποστειρωμένος

φυσιολογικός ορός μέχρι τα 50 ml και ακολούθησε ανακίνηση μέχρις ότου να διαλυθεί το δείγμα BB.

Με τη χρήση γυάλινης πιπέτας με πουάρ, τοποθετήθηκαν 9 ml φυσιολογικού ορού σε τρία ακόμα falcon. Από το αρχικό Falcon με το δείγμα BB, πάρθηκε 1 ml και προστέθηκε στο 1^ο Falcon, προκειμένου να γίνει η αραιώση 10⁻¹. Από το falcon της αραιώσης 10⁻¹ πάρθηκε 1 ml και προστέθηκε στο επόμενο για την αραιώση 10⁻². Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την αραιώση 10⁻³. Το δείγμα που περίσσεψε αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη στους -80^οC, αφού πρώτα προστέθηκε Nutrient Broth και 50% γλυκερόλη για τη διατήρησή του.

2.2.2. Καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό

Προκειμένου να απομονωθούν τα βακτήρια και οι ζύμες που περιέχονταν στο αρχικό δείγμα, παρασκευάστηκαν πέντε θρεπτικά υποστρώματα με βάση τις οδηγίες που αναγράφονται πάνω στη συσκευασία.

- ✓ Το Plate Count Agar (PCA), που αποτελεί γενικό υπόστρωμα.
- ✓ Το DEMAN, ROGOSA and SHARPE (MRS Agar), που αποτελεί υπόστρωμα για την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων και είναι μέτρια εκλεκτικό υπόστρωμα για το γένος *Lactobacillus* (Chen et al., 2006; Syed Yaacob et al., 2018).
- ✓ Το DEMAN, ROGOSA and SHARPE (MRS Agar) + 1% CaCO₃, όπου η πιθανή δημιουργία διαυγούς ζώνης γύρω από την αποικία οφείλεται σε διάσπαση της λακτόζης άρα και την πιθανή παρουσία *Lactobacillus*.
- ✓ Το BBL MacConkey II Agar, που αποτελεί εκλεκτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, επίσης ανιχνεύει την ζύμωση λακτόζης από εντερικά βακτήρια (*MacConkey Agar-Composition, Principle, Uses, Preparation and Colony Morphology*, n.d.).
- ✓ Το Potato Dextrose Agar (PDA), που αποτελεί εκλεκτικό υπόστρωμα για την απομόνωση μυκήτων (ζυμομύκητες και μούχλες) (*Potato*

Dextrose Agar (PDA) - Principle, Uses, Procedure & Characteristics, n.d.).

Ακολούθησε αποστείρωση για 20 λεπτά και επίστρωση σε τρυβλία petri.

Από την κάθε αραιώση που πραγματοποιήθηκε στο αρχικό δείγμα, πάρθηκαν με πιπέτα 100 μl και ακολούθησε εμβολιασμός σε τρία τρυβλία με PCA, τρία με MRS και τρία με Mc. Για την επίστρωση χρησιμοποιήθηκε μεταλλική τριγωνική ράβδος. Ακολούθησε αναερόβια επώαση των τρυβλίων στους 30 °C, σε τζάρα με τη χρήση δείκτη ρεζαζουρίνης για 4 ημέρες. Όσον αφορά τον έλεγχο παρουσίας μυκήτων, παρασκευάστηκε υπόστρωμα με υψηλή περιεκτικότητα σακχάρων το οποίο εμβολιάστηκε και επώαστηκε στους 37 °C για 7 περίπου ημέρες.

2.2.3.Καθαρισμός βακτηρίων - Ανακαλλιέργειες

Προκειμένου να δημιουργηθούν αμιγείς καλλιέργειες, έγινε επιλεκτική δειγματοληψία με αποστειρωμένους ξύλινους στυλεούς, των μεμονωμένων αποικιών και ακολούθησε επίστρωση σε τρυβλία petri με τα ακόλουθα υποστρώματα PCA, MRS και PDA. Πραγματοποιήθηκε επώαση στους 30°C για τα βακτήρια του θρεπτικού υποστρώματος PCA για 2-3 ημέρες, για του PDA για 7 ημέρες και τέλος για του MRS στην ίδια θερμοκρασία υπό αναερόβιες συνθήκες για 4-5 ημέρες και. Για το MRS σε περιπτώσεις όπου η ανάπτυξη των βακτηρίων ήταν ελάχιστη, συνεχίστηκε η επώαση για άλλες 4 ημέρες στους 37°C. Στα τρυβλία όπου δεν υπήρχαν αποικίες από ένα είδος βακτηρίων, με την ίδια διαδικασία, πραγματοποιήθηκαν ανακαλλιέργειες έως ότου να δημιουργηθούν αμιγείς καλλιέργειες.

2.2.4.Δημιουργία υγρών καλλιεργειών

Προετοιμάστηκε ένα υγρό θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε Nutrient Broth, 0,5% Yeast Extract και 0,5% γλυκόζη. Από το θρεπτικό αυτό προστέθηκαν 700 μl σε tubes των 2 ml και έπειτα έγινε ο εμβολιασμός με αποστειρωμένους ξύλινους στυλεούς όλων των βακτηρίων. Επωάστηκαν στους 37°C για 24 ώρες, προκειμένου να υπάρξει ανάπτυξη. Έπειτα προστέθηκαν 700 μl nutrient broth με 50% γλυκερόλη στο κάθε tube και παρέμειναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για μία ώρα. Τέλος έγινε ανακίνηση (vortex) των tubes και αποθήκευση στην κατάψυξη στους -80°C.

2.2.5. Έλεγχος ενζυμικής δράσης

Προετοιμασία μάρτυρα και protein extract

Για το protein extract τοποθετήθηκαν, σε tubes των 2 ml, 0,8 gr από το αρχικό μας δείγμα και προστέθηκε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό έως τα 2 ml. Ακολούθησε ανακίνηση για περίπου 45 λεπτά προκειμένου να διαλυθεί και μετά φυγοκέντρηση στα 10,000 G για 10 λεπτά. Συλλέχθηκε το υπερκείμενο με σύριγγα και προστέθηκε 50% θειικό αμμώνιο για να διαλυθεί. Σκοπός ήταν να γίνει κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Ακολούθησε αποθήκευση στους 4°C στο ψυγείο για 12-16 ώρες και έπειτα φυγοκέντρηση στα 12,000 G για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο πετάχτηκε και το ίζημα διαλύθηκε σε buffer που περιείχε 0,9% NaCl + απιονισμένο νερό (ddH₂O). Το ίδιο buffer αποτέλεσε και το μάρτυρα του πειράματος.

Έλεγχος παραγωγής ενζύμων:

Προετοιμάστηκε υπόστρωμα Plate Count Agar, με βάση τις οδηγίες της συσκευασίας, και προστέθηκαν τα κατάλληλα αντιδραστήρια όπως περιγράφονται στον Πίνακα 2. Το κάθε ένα αντιδραστήριο χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί η παραγωγή του ανάλογου ενζύμου από τα βακτήρια του BB που αποτέλεσε το δείγμα.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αποστείρωση και επίστρωση του θρεπτικού υποστρώματος σε τρυβλία petri. Τα τρυβλία με το θρεπτικό χωρίστηκαν σε 8 τμήματα και στο κέντρο του κάθε τμήματος τοποθετήθηκαν με αποστειρωμένους ξύλινους στυλεούς, οι καθαρές αποικίες των βακτηρίων που απομονώθηκαν από την προηγούμενη διαδικασία. Σε δύο από αυτά τα 8 τμήματα τοποθετήθηκαν ο μάρτυρας (το buffer) και το protein extract. Ακολούθησε επώαση στους 37⁰C για περίπου 4-7 ημέρες.

Πίνακας 2: Έλεγχος ενζυμικής δράσης

Υποστρώματα:	Παρατηρήσεις:
Έλεγχος για εξωκυτταρικές ημικυτταρινάσες (ξυλανάσες)	<p>Το Megazyme AZCL-XYLAN περιέχει μια χρωστική η οποία δίνει μία μπλε ζώνη όταν το βακτήριο παράγει ημικυτταρινάσες.</p>
Έλεγχος για κυτταρινάσες (σελουλάσες)	<p>Το Megazyme AZCL-HE-CELLULOSE περιέχει μία χρωστική που δίνει μία χαρακτηριστική μπλε ζώνη όταν το βακτήριο παράγει κυτταρινάσες.</p>
Έλεγχος για ένζυμα που διασπούν τις χρωστικές (λακκάσες):	<p>1. PCA + 0,02 % COOMASSIE 2. BRILLIANT BLUE R-250 (Yang et al., 2016) 3. PCA + 0,02% COOMASSIE BRILLIANT BLUE G (Salami et al., 2018) 4. PCA + 0,02% MIKROSKOPIE MALACHITE GREEN (Salami et al., 2018) 5. PCA + 2-Methoxyphenol,98+ %C₇H₈O₂ (Abd El Monssef et</p> <p>Με την έκκριση διαφόρων ενζύμων από τα βακτήρια, διασπάται η χρωστική γύρω από την αποικία και η περιοχή γίνεται διαυγής.</p> <p>Εάν το βακτήριο παράγει οξειδοαναγωγικά ένζυμα, η αποικία γίνεται καφέ.</p>

	al., 2016)	
* Έλεγχος για παρουσία πρωτεΐνάσης:	PCA + 3% γάλα (αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη στιγμιαίας διάλυσης) (Elham Sharief Dawood, 1994)	Η παραγωγή πρωτεΐνάσης από τα βακτήρια υποδηλώνεται με μία διαυγή ζώνη γύρω από την αποικία.
Έλεγχος για παρουσία αμυλάσης:	PCA + 1% άμυλο (corn flour) (Akcan, 2011)	Η παραγωγή αμυλάσης από τα βακτήρια υποδηλώνεται με μία διαυγή ζώνη γύρω από την αποικία.

* Προετοιμάστηκε θρεπτικό υπόστρωμα PCA και ακολούθησε αποστείρωση. Στη συνέχεια προστέθηκαν γάλα σε περιεκτικότητα 3% και τοποθετήθηκε στο υδατόλουτρο στους 60°C περίπου για ήπια παστερίωση.

2.2.6. Μοριακή ανάλυση

Για τη μοριακή ανάλυση έγινε επιλογή των βακτηρίων που εμφάνισαν τα καλύτερα αποτελέσματα με βάση το φαινότυπο, όσον αφορά τη κάθε μία κατηγορία ενζύμων. Προετοιμάστηκαν τα extracts των βακτηρίων, ακολούθησε PCR για έλεγχο ύπαρξης γονιδίων που κωδικοποιούν τα αντίστοιχα, υπό μελέτη ένζυμα. Για τα βακτήρια στα οποία ανιχνεύθηκαν τα γονίδια αυτά, τα προϊόντα των PCR στάλθηκαν για αλληλούχηση κατά Sanger στην CeMIA στη Λάρισα και ταυτοποιήθηκαν μετά από μελέτη του χρωματογραφήματος και ανάλυση των αλληλουχιών τους μέσω εργαλείων βιοπληροφορικής (BLAST) (*BLAST: Basic Local Alignment Search Tool*, n.d.) . Στην συνέχεια, επιλέχθηκαν ορισμένα βακτήρια με τον επιθυμητό φαινότυπο, για τα οποία πραγματοποιήθηκε ενίσχυση και αλληλούχηση του 16S rRNA γονιδίου τους, με στόχο την ταυτοποίησή τους.

Εκχύλιση DNA

1^{ος} Τρόπος:

Σε tubes τοποθετήθηκαν 20 μl Lysis buffer (0,25% w/v sodium dodecyl sulfate + 0,05 ml NaOH + ddH₂O) και στη συνέχεια μεταφέρθηκε με αποστειρωμένο ξύλινο στυλεό, μία μόνο αποικία από το κάθε υπό μελέτη βακτήριο. Τα tubes τοποθετήθηκαν στους 95⁰C για 15 λεπτά και στη συνέχεια προστέθηκαν 180 μl ddH₂O. Τα tubes φυλάχθηκαν στους -20⁰C, για μελλοντική χρήση (Karakasidou et al., 2018).

2^{ος} Τρόπος:

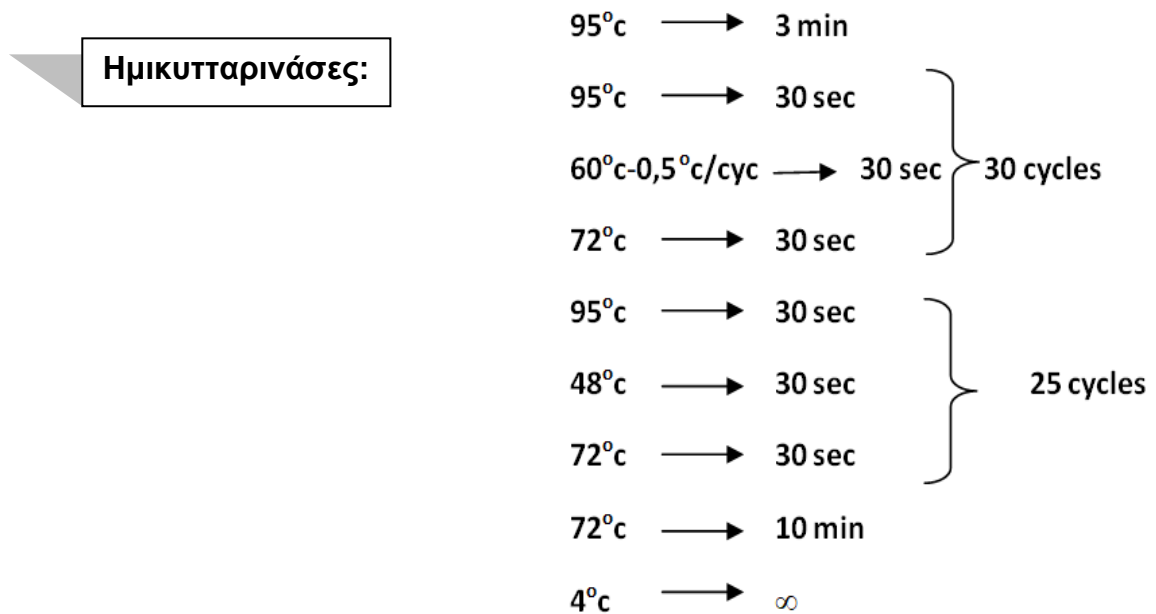
Το extraction πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του kit Extract με της εταιρίας Blirt σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

PCR

Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση μέσω Touch down PCR για γονίδια που κωδικοποιούν ημικυτταρινάσες και κυτταρινάσες και μέσω απλής PCR για γονίδια που κωδικοποιούν λακκάσες, με την βοήθεια κατάλληλων εκκινήτων. Στον Πίνακα 3 παρατίθενται οι εκκινήτες με τις αλληλουχίες τους και το μέγεθος του προϊόντος, καθώς και το πρωτόκολλο της PCR που ακολουθήθηκε κάθε φορά. Για την επαλήθευση της σωστής λειτουργίας της αντίδρασης PCR χρησιμοποιήθηκε DNA του βακτηρίου *Pseudomonas aeruginosa*, ως "Positive control". Ενώ για τον έλεγχο ύπαρξης επιμολύνσεων χρησιμοποιήθηκε "Negative control" (χωρίς το DNA- μήτρα, με ddH₂O).

Πίνακας 3: Εκκινητές

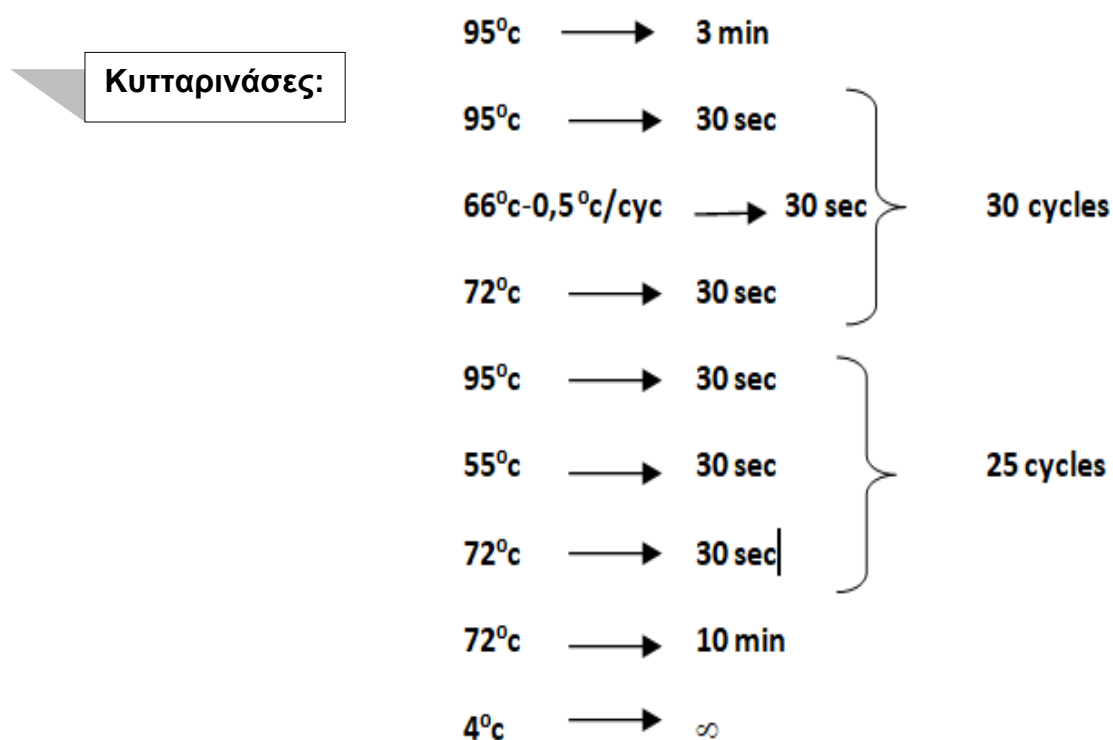
Ένζυμο	Αλληλουχία (5' – 3') εκκινητή	Μέγεθος προϊόντος	Βιβλιογραφικές Αναφορές
Ημικυτταρινάσες	GH11F: TAYMTGDSNSTBTAYGGBTGG GH11R: TRCCVTNCTYTKRTAVCCYTC	336 bp	(Sheng et al., 2015)
Κυτταρινάσες	GH45F: ACCMGITAYTGGGAYTGTYG GH45R: AAGRYICCNVICCNCCICCNNGG	377-413 bp	
Λακκάσες	Cu1AF: ACMWCBGTYCAYTGGCAYGG Cu2R: GRCTGTGGTACCAGAANGTNCC	142 bp	(Ausec et al., 2011)



Πίνακας 4: Τα συστατικά της αντίδρασης PCR με το ζεύγος εκκινητών GH11F/GH11R

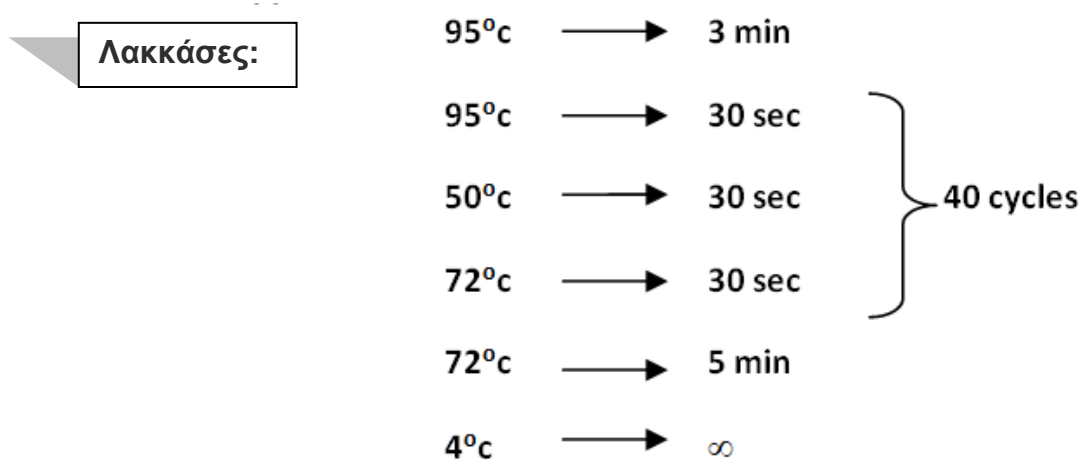
Τελική Συγκέντρωση	Τελικός όγκος
--------------------	---------------

dNTPs	1mM	5μl
Buffer A	1X	5μl
MgCl₂	0,5mM	1μl
GH11R	25pmol	2,5μl
GH11F	25pmol	2,5μl
ddH₂O		30,7 μl
Fast Gene Taq	1,5 U	0,3 μl
DNA		3μl



Πίνακας5: Τα συστατικά της αντίδρασης PCR με το ζεύγος εκκινητών GH45F/GH45R

	Τελική Συγκέντρωση	Τελικός όγκος
dNTPs	1mM	5μl
Buffer A	1X	5μl
MgCl₂	0,5mM	1μl
GH45R	25pmol	2,5μl
GH45F	25pmol	2,5μl
ddH₂O		30,7 μl
Fast Gene Taq	1,5 U	0,3 μl
DNA		3μl



Πίνακας 5: Τα συστατικά της αντίδρασης PCR με το ζεύγος εκκινητών Cu1AF/Cu2R

	Τελική Συγκέντρωση	Τελικός όγκος
dNTPs	1mM	5μl
Buffer A	1X	5μl
MgCl₂	0,5mM	1μl
Cu1AF	25pmol	0,5μl
Cu2R	25pmol	0,5μl
ddH₂O		34,8μl
Fast Gene Taq	1 U	0,2μl
DNA		3μl

Ηλεκτροφόρηση

Παρασκευάστηκε το πήκτωμα αγαρόζης με συγκέντρωση 2,5% και 2% ανάλογα με το μέγεθος των μορίων του DNA που επρόκειτο να ηλεκτροφορηθούν κάθε φορά. Ανάλογα με την επιθυμητή συγκέντρωση, ζυγίστηκε η κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης και προστέθηκε σε κωνική φιάλη. Έπειτα προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα TBE και το μίγμα θερμάνθηκε, μέχρις ότου να διαλυθεί η αγαρόζη και το διάλυμα να γίνει διαυγές. Στη συνέχεια η κωνική φιάλη ψύχθηκε και προστέθηκε η χρωστική βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 0,5 μg/ml για την παρακολούθηση του DNA. Το διάλυμα τοποθετήθηκε στο εκμαγείο, το οποίο φέρει τα χτένια, έως ότου να δημιουργηθεί ένα πήκτωμα.

Το πήκτωμα μεταφέρθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα και αφαιρέθηκαν τα χτένια. Έπειτα τα προϊόντα PCR που επρόκειτο να ηλεκτροφορηθούν αναμίχθηκαν με ένα διάλυμα φόρτωσης (Μπλε της βρωμοφαινόλης, κυανού του ξυλενίου και γλυκερόλη) και 10 μl τοποθετήθηκαν στα πηγαδάκια με τη χρήση πιπέτας. Σε ένα από τα πηγαδάκια τοποθετήθηκε και ο ladder 100 bp.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε ηλεκτρική τάση στα 130 V έως ότου να γίνει ο διαχωρισμός των μορίων DNA. Έπειτα το πήκτωμα μεταφέρθηκε σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας σε σκοτεινό χώρο και με το φθορισμό των μορίων του DNA παρατηρήθηκαν οι ζώνες.

Προετοιμασία προϊόντων PCR για αλληλούχηση

Μετά την ηλεκτροφόρηση έγινε επιλογή των προϊόντων PCR που είχαν το επιθυμητό μέγεθος βάσεων (bp) και ακολούθησε PCR Clean up, στην περίπτωση που το προϊόν είχε μία ζώνη, ενώ ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του GEL Clean up όταν το προϊόν είχε πάνω από μία ζώνες. Το kit που χρησιμοποιήθηκε ήταν το “ISOLATE II PCR and GEL kit” της BIOLINE. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας τα προϊόντα PCR Clean up στάλθηκαν στην CeMIA για αλληλούχηση.

Ακολούθησε ανάλυση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του εργαλείου βιοπληροφορικής BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) και πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των γονιδίων (*BLAST: Basic Local Alignment Search Tool*, n.d.).

Ενίσχυση γονιδιωματικής περιοχής 16S rRNA

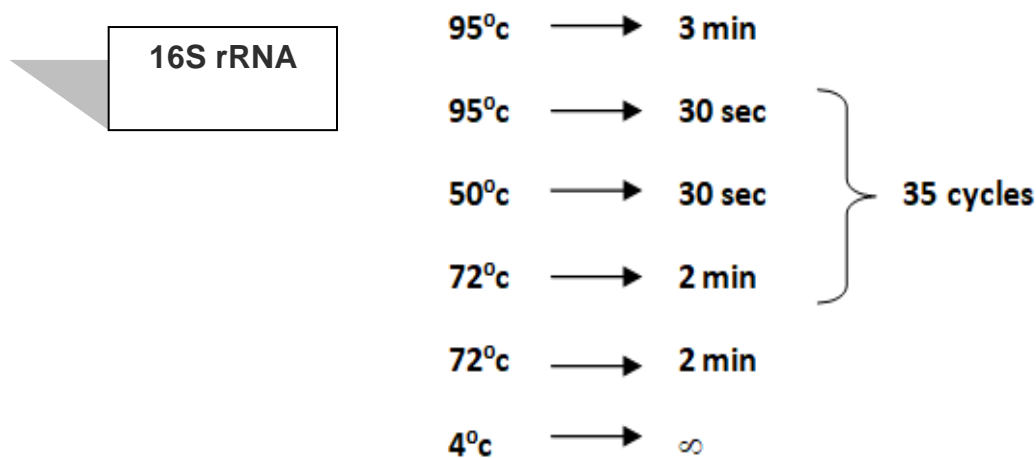
Μετά από τη μελέτη των αποτελεσμάτων, επιλέχθηκαν κάποια από τα βακτήρια τα οποία ταυτοποιήθηκαν μέσω ενίσχυσης της γονιδιωματικής περιοχής 16S rRNA. Προετοιμάστηκαν τα extractions, με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω και ακολούθησε PCR με ζεύγος εκκινητών 27F/1492R. Το μέγεθος του προϊόντος ήταν στις 1500 bp και το ένζυμο της αντίδρασης η Fast Gene Taq DNA Polymerase.

Πίνακας 6: Ζεύγος εκκινητών για 16S rRNA

Εκκινητές	Αλληλουχία (5' – 3') εκκινητή	Μέγεθος προϊόντος	Βιβλιογραφικές αναφορές
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1400 bp	(Heo et al., 2020)
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT		

Πίνακας 8: Τα συστατικά της αντίδρασης PCR με το ζεύγος εκκινητών 27F/1462R

	Τελική Συγκέντρωση	Τελικός όγκος
dNTPs	1mM	5μl
Buffer A	1X	5μl
1492R	25pmol	0,5μl
27F	25pmol	0,5μl
ddH ₂ O		35,8μl
Fast Gene Taq	1U	0,2μl
DNA		3μl



Στη συνέχεια, στα προϊόντα της PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση στα 130 V και οι επιθυμητές ζώνες, καθαρίστηκαν με το kit της Biotin όπως προαναφέρθηκε. Τα καθαρισμένα πλέον προϊόντα τοποθετήθηκαν σε πλάκα 96 θέσεων και στάλθηκαν για αλληλούχηση κατά Sanger στην εταιρία MacroGene Europe. Η ποιότητα των χρωματογραφημάτων αλληλούχησης ελέγχθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Chromas version 2.6.6 software (Technelysium Pty Ltd, Australia, www.technelysium.com.au). Για το κάθε βακτήριο το ενισχυμένο 16S rRNA γονίδιο αλληλουχήθηκε και με τους δύο εκκινητές (27F και 1492R) και οι δύο αλληλουχίες ενώθηκαν με τη βοήθεια των προγραμμάτων MEGA X version 10.1.6 software και Gene Runner version 6.5 software. Στη συνέχεια ακολούθησε ανάλυση της κάθε αλληλουχίας με τη χρήση του BlastN με στόχο την ταυτοποίησή της.

3^ο Κεφάλαιο

Αποτελέσματα

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ελέγχου παραγωγής, από τις απομονωμένες βακτηριακές αποικίες του μελισσόψωμου, ενζύμων βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος. Τα ένζυμα που ερευνήθηκαν ήταν:

- Αμυλάσες
- Πρωτεϊνάσες
- Ένζυμα που διασπούν χρωστικές (λακκάσες, οξειδάσες της λιγνίνης, οξειδάσες του μαγγανίου)
- Εξωκυτταρικές ημικυτταρινάσες
- Κυτταρινάσες

Τα στάδια της μελέτης αφορούσαν το φαινοτυπικό προφίλ των βακτηρίων, το μοριακό έλεγχο ύπαρξης των γονιδίων των συγκεκριμένων ενζύμων και την μοριακή ταυτοποίησή τους.

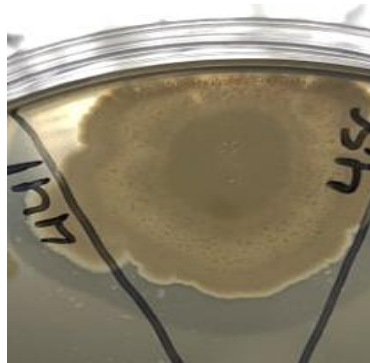
3.1. Ανάπτυξη βακτηρίων σε PCA, MRS, PDA και BBL MacConkey II Agar

Από το δείγμα του μελισσόψωμου που μελετήθηκε, βρέθηκαν συνολικά 186 απομονωμένες βακτηριακές αποικίες. Από αυτές οι 34 αναπτύχθηκαν σε MRS και MRS + CaCO₂, οι 9 σε PDA και οι 143 σε PCA, ενώ στο MacConkey II Agar δεν υπήρξε ανάπτυξη.

3.2. Φαινοτυπικός έλεγχος ενζυμικής δράσης αμυλάσης και πρωτεΐνάσης

Αμυλάση

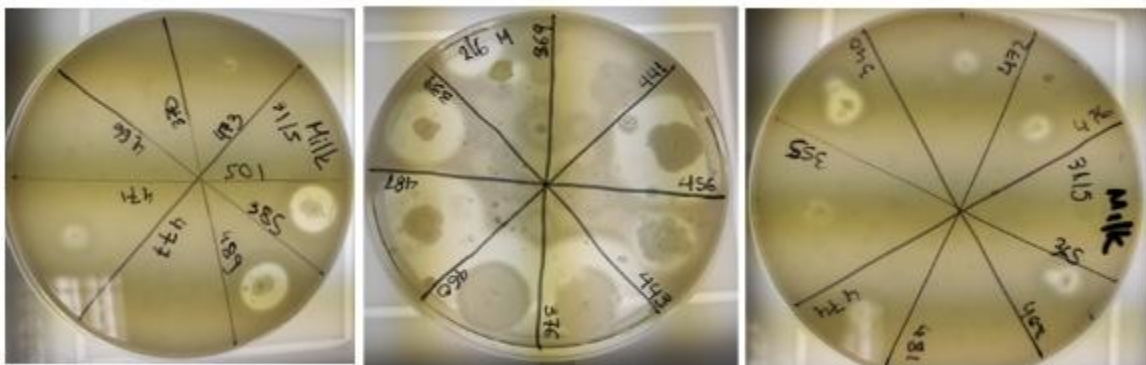
Από τις 186 απομονωμένες βακτηριακές αποικίες, οι 19 (10,22%) φάνηκε να παράγουν αμυλάση.



Εικόνα 21: Δημιουργία διαυγούς ζώνης γύρω από την αποικία λόγω πιθανής παρουσίας αμυλάσης

Πρωτεΐνάση

Από τις 186 απομονωμένες βακτηριακές αποικίες, οι 93 (50%) φάνηκε να παράγουν πρωτεΐνάση.



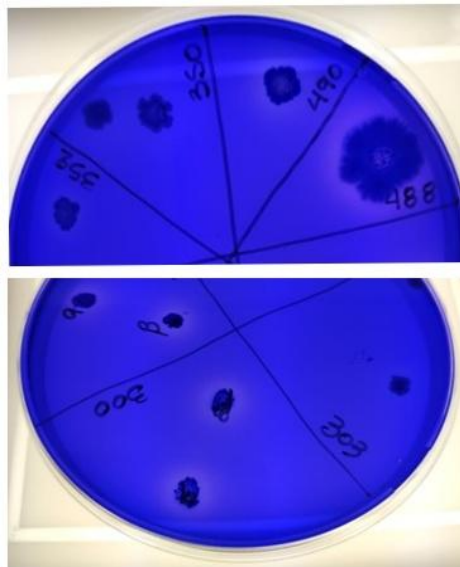
Εικόνα 22: Δημιουργία διαυγούς ζώνης γύρω από τις αποικίες λόγω πιθανής παρουσίας πρωτεΐνάσης

3.3. Φαινοτυπικός έλεγχος για ένζυμα που διασπούν τις χρωστικές (λακκάσες, οξειδάσες της λιγνίνης, οξειδάσες του μαγγανίου)

Προκειμένου να διαπιστωθεί η παρουσία ενζύμων που διασπούν χρωστικές, στις απομονωμένες βακτηριακές αποικίες από το μελισσόψωμο, παρασκευάστηκαν τέσσερα υποστρώματα και ακολούθησε εμβολιασμός με τα βακτήρια.

1. PCA + 0,02 % COYMASSIE BRILLIANT BLUE R-250

Από τις 186 απομονωμένες βακτηριακές αποικίες, οι 76 (40,86%) φάνηκε να διασπούν τη συγκεκριμένη χρωστική.



Εικόνα 23: Διάσπαση χρωστικής γύρω από την αποικία

2. PCA + 0,02% COYMASSIE BRILLIANT BLUE G

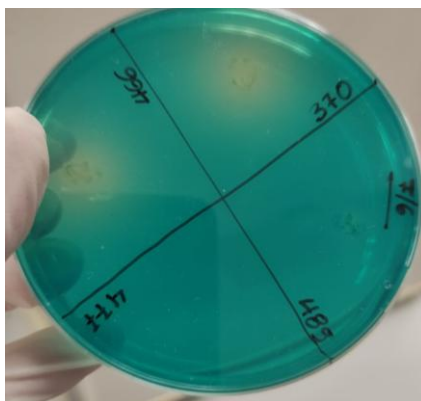
Από τις 186 απομονωμένες βακτηριακές αποικίες, οι 35 (18,82%) φάνηκε να διασπούν τη συγκεκριμένη χρωστική.



Εικόνα 24: Διάσπαση χρωστικής γύρω από τις αποικίες

3. PCA + 0,02% ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΕ MALACHITE GREEN

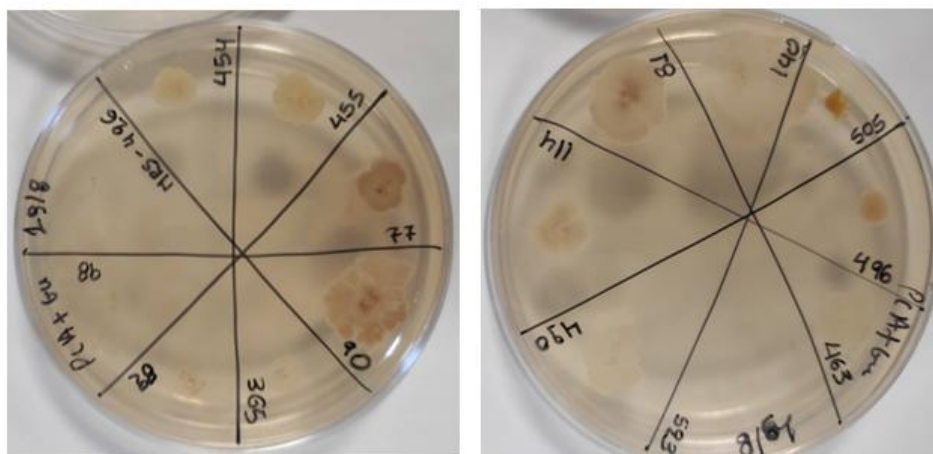
Από τις 186 απομονωμένες βακτηριακές αποικίες, οι 51 (27,42%) φάνηκε να διασπούν τη συγκεκριμένη χρωστική.



Εικόνα 25: Δημιουργία κιτρινωπής ζώνης γύρω από τις αποικίες

4. PCA + 0,02% 2-Methoxyphenol, 9898+ %C₇H₈O₂

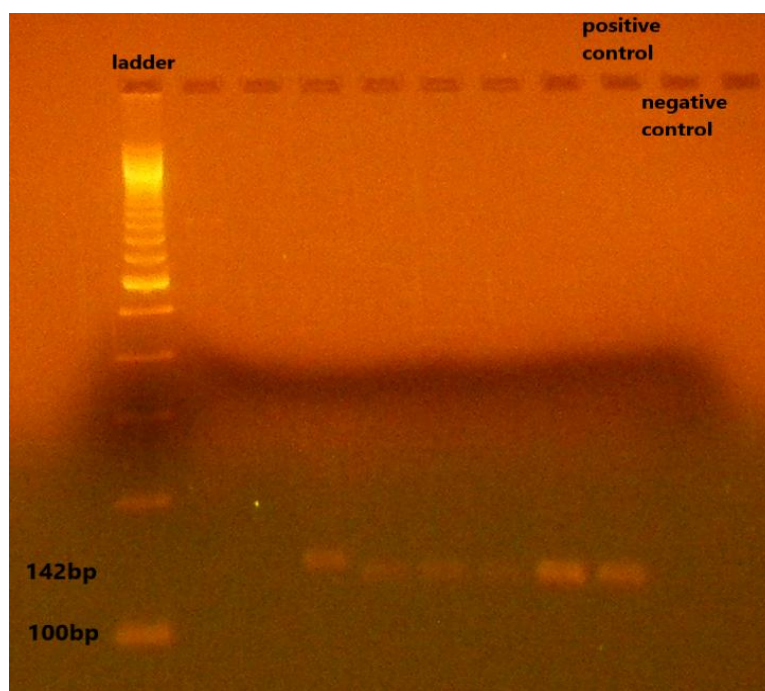
Στην προκειμένη περίπτωση ελέγχθηκαν 49 βακτηριακές αποικίες από το δείγμα μελισσόψωμου, οι οποίες επελέγησαν βάση των προηγούμενων αποτελεσμάτων. Από τις 186 απομονωμένες βακτηριακές αποικίες, στις 17 (34,69%) από αυτές φάνηκε να αλλάζει το χρώμα της αποικίας σε καφέ.



Εικόνα 26: Πιθανή οξείδωση γουαϊακόλης

Μοριακή ανάλυση

Ελέγχθηκαν 29 απομονωμένες βακτηριακές αποικίες από το μελισσόψωμο και έδωσαν τον επιθυμητό φαινότυπο. Στα 8 από τα 29 προϊόντα ενισχύθηκε η επιθυμητή ζώνη στις 142 bp (Εικόνα 27).



Εικόνα 27: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης (Λακκάσες)

Τα προϊόντα ορισμένων δειγμάτων στάλθηκαν ενδεικτικά για αλληλούχηση κατά Sanger και τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα.

Πίνακας 7: Αποτελέσματα BLASTN και BLASTX (Λακκάσες)

sample	BLASTN	query covery	e-value	Identity
1	Colletotrichum scovillei multicopper oxidase (HER10_EVM0012056) partial mRNA	81%	8,00e-09	78,95%
2	Bacillus thuringiensis strain HER1410 chromosome, complete genome	94%	4e-28	95,24%
3	Bacillus wiedmannii strain SR52 chromosome, complete genome	94%	5e-27	94,19%
4	Sphingomonas sp. FARSPH plasmid p01, complete sequence	96%	3e-20	87,91%

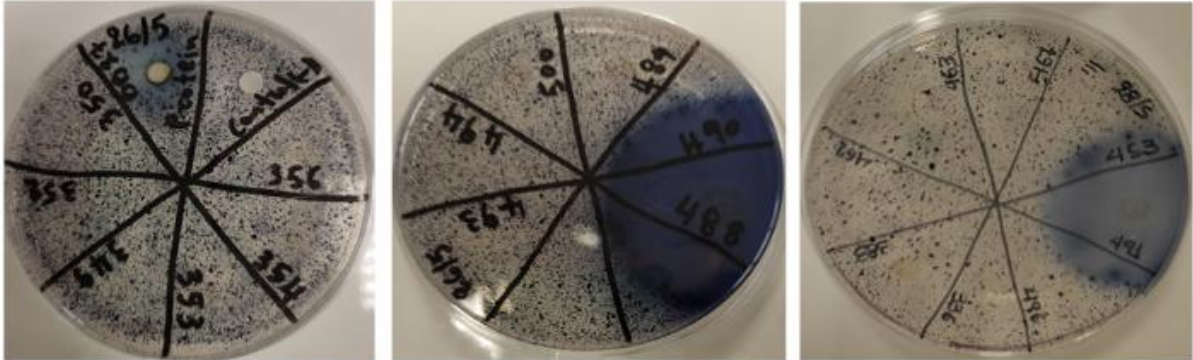
sample	BLASTX	query covery	e-value	Identity
1	Multicopper oxidase, integral membrane protein with similarity to Fet3p [Komagataella phaffii GS115]	91%	2e-34	68,00%
2	Multicopper oxidase [Bacillus cereus 172560W]	97%	2e-11	96,55%
3	Multicopper oxidase [Bacillus cereus Rock4-2]	66%	8e-06	95,00%
4	No results			

Από τα παραπάνω αποτελέσματα της αλληλούχησης, που επιβεβαίωσαν την παρουσία λακκάσης, θεωρούμε ότι όλα προϊόντα που βρίσκονται στις 142bp περιέχουν λακκάσες.

3.4. Φαινοτυπικός και μοριακός έλεγχος παρουσίας εξωκυτταρικής ημικυτταρινάσης

Ενζυμική δράση

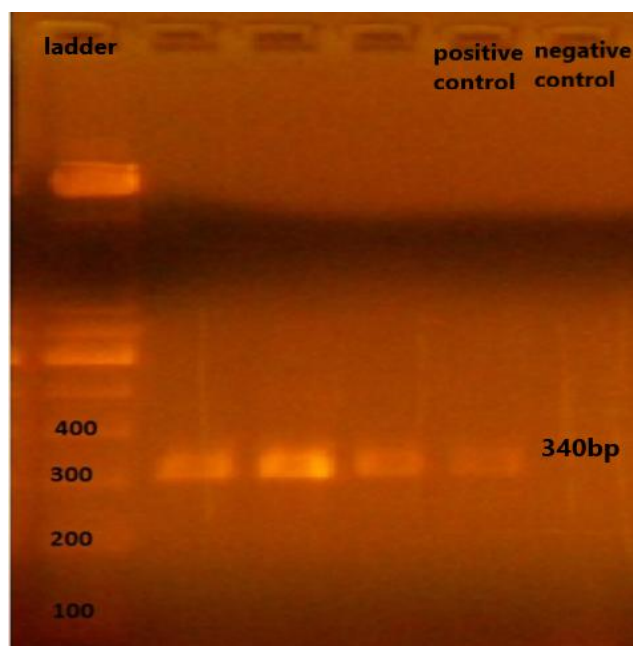
Από τις 186 απομονωμένες βακτηριακές αποικίες από το δείγμα μελισσόψωμου, οι 4 (2,15%) φάνηκε να παράγουν ημικυτταρινάση. Επίσης θετικό αποτέλεσμα έδωσε και το protein extract.



Εικόνα 28: Διάσπαση χρωστικής γύρω από τις αποικίες λόγω πιθανής παρουσίας ημικυτταρινάσης.

Μοριακή ανάλυση

Ελέγχθηκαν και οι τέσσερις απομονωμένες βακτηριακές αποικίες που έδωσαν τον επιθυμητό φαινότυπο και στις τρεις από αυτές ενισχύθηκε η επιθυμητή ζώνη στις 340bp (Εικόνα 29)



Εικόνα 29: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης (Ημικυτταρινάσες)

Τα προϊόντα ορισμένων δειγμάτων στάλθηκαν ενδεικτικά για αλληλούχηση κατά Sanger και τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα.

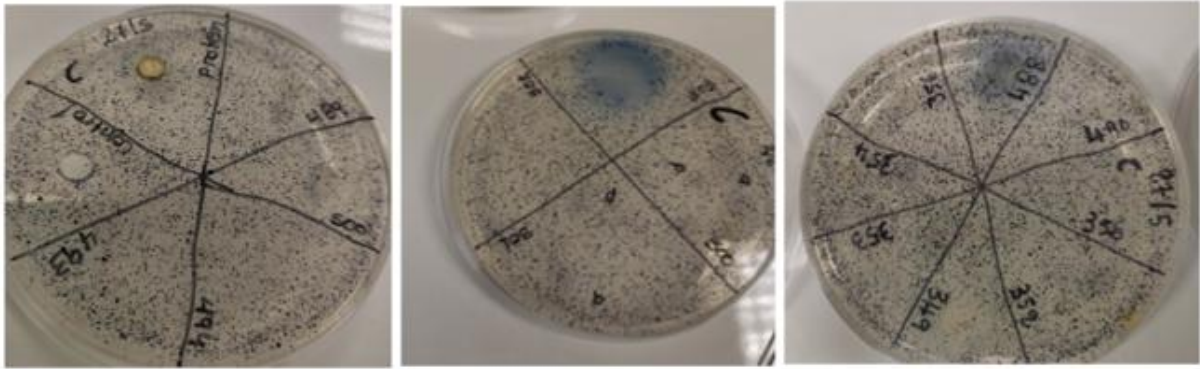
Πίνακας 8: Αποτελέσματα BLASTN και BLASTX (Ημικυτταρινάσες)

sample	BLASTN			query covery	e-value	Identity	
1	Bacillus	safensis	strain	TCCC111022	100%	1,0e-121	98,8%
	xylanase gene, complete cds						
3	Bacillus	safensis	strain	TCCC111022	96%	6,0e136	96,28%
	xylanase gene, complete cds						
4	Bacillus	safensis	strain	TCCC111022	89%	3,0e129	96,72%
	xylanase gene, complete cds						
sample	BLASTX			query covery	e-value	Identity	
1	glycoside	hydrolase	family	98%	2,0e-34	98,08%	
	11 protein [Bacillus safensis]						
3	glycoside	hydrolase	family	96%	2,0e-41	94,59%	
	11 protein [Bacillus safensis]						
4	glycoside	hydrolase	family	92%	1,0e-52	89,36%	
	11 protein [Bacillus safensis]						

3.5. Φαινοτυπικός και μοριακός έλεγχος παρουσίας κυτταρινάσης

Ενζυμική δράση

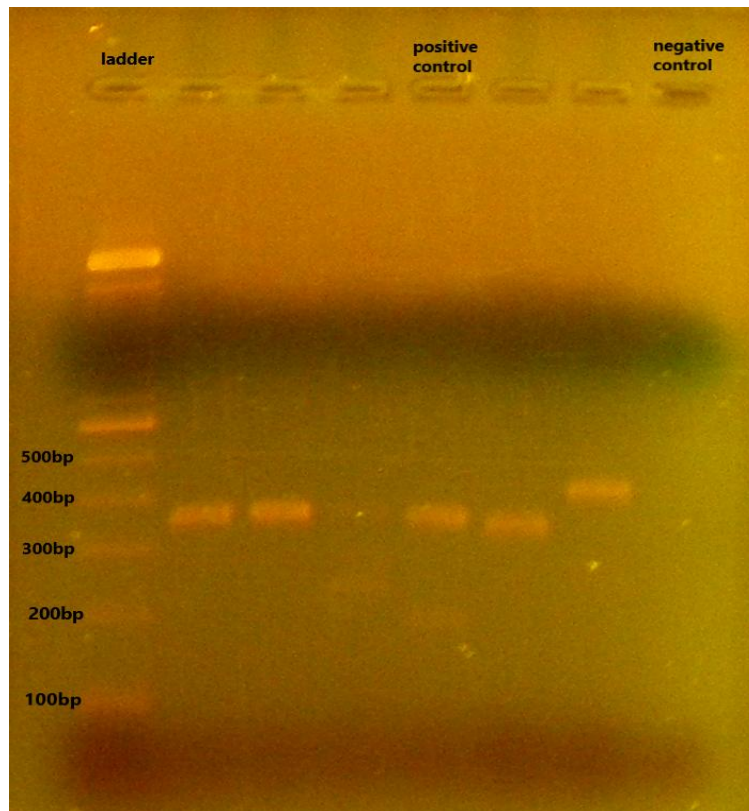
Από τις 186 απομονωμένες βακτηριακές αποικίες που ελέγχθηκαν, θετικά αποτελέσματα έδωσαν οι 6 (3,23%). Επίσης θετικό αποτέλεσμα έδωσε και το protein extract.



Εικόνα 30: Διάσπαση χρωστικής γύρω από τις αποικίες λόγω πιθανής παρουσίας κυτταρινάσης

Μοριακή ανάλυση

Ελέγχθηκαν ενδεικτικά οι 4 από τις 6 απομονωμένες βακτηριακές αποικίες, που έδωσαν τον επιθυμητό φαινότυπο και στις 5 από αυτές ενισχύθηκε η επιθυμητή ζώνη στις 340bp (Εικόνα 36).

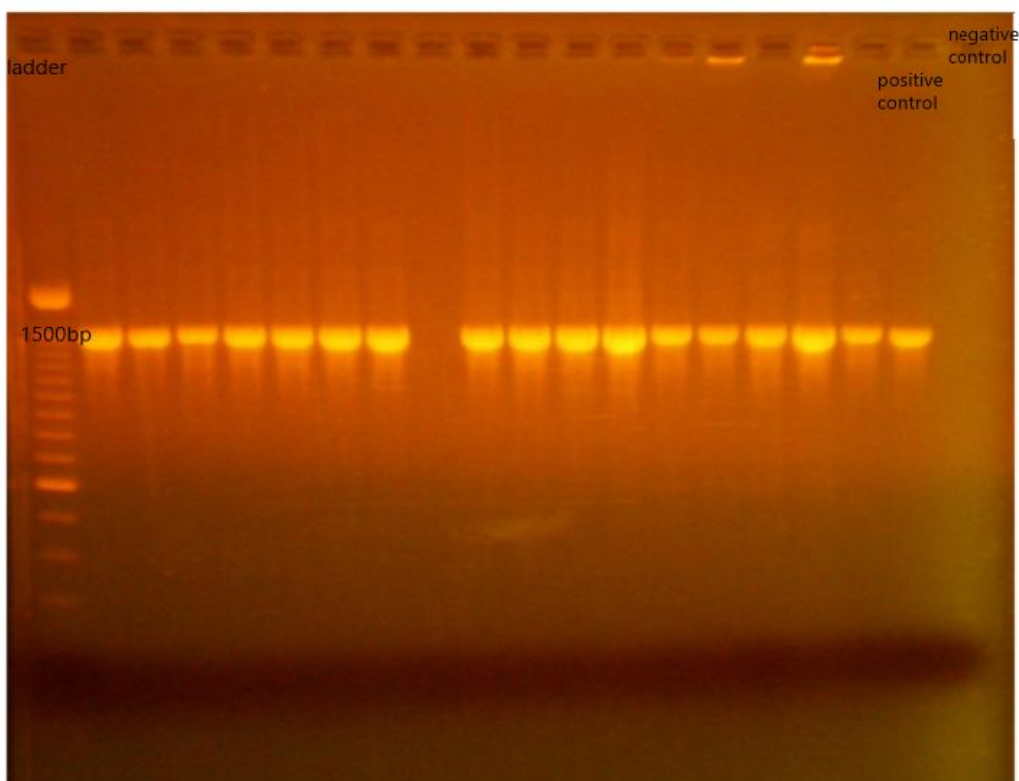


Εικόνα 31: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης (Κυτταρινάση).

Τα προϊόντα ορισμένων δειγμάτων στάλθηκαν ενδεικτικά για αλληλούχηση κατά Sanger. Όμως πιθανώς λόγω κακής ποιότητας χρωματογραφήματος, δεν επιτεύχθηκε η ανάλυση των αποτελεσμάτων μέσω του προγράμματος βιοπληροφορικής Blast.

3.6. Ταυτοποίηση με τη χρήση της γονιδιακής περιοχής 16S rRNA

Μετά τη συγκέντρωση και τη μελέτη όλων των αποτελεσμάτων, επιλέχθηκαν 28 απομονωμένες βακτηριακές αποικίες από το δείγμα μελισσόψωμου. Προετοιμάστηκαν τα εκχυλίσματα DNA extractions και ακολούθησε PCR με τη χρήση ζεύγους εκκινητών 27F/1492R. Το μέγεθος των PCR Products είναι 1500bp και το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση ήταν η Fast Gene Taq DNA Polymerase. Από αυτές τις 28, ενισχύθηκε το συγκεκριμένο γονίδιο στις 22.



Εικόνα 32: Ενδεικτική εικόνα ηλεκτροφόρησης (16S rRNA)

Ακολούθησε το PCR clean up με το kit της BLirt και τα καθαρισμένα προϊόντα στάλθηκαν για ταυτοποίηση στη MacroGene, όπου τα αποτελέσματα αναμένονται.

4^ο Κεφάλαιο

Συζήτηση αποτελεσμάτων

Το μελισσόψωμο αποτελεί ένα προϊόν κυψέλης, άγνωστο ακόμα στους περισσότερους καταναλωτές και όχι και τόσο μελετημένο από τους ερευνητές. Παρ' όλα αυτά, χαρακτηρίζεται από ενδιαφέρουσες βιολογικές ιδιότητες που το καθιστούν ευεργετικό για την ανθρώπινη υγεία. Από διάφορες πρόσφατες μελέτες έχει ξεχωρίσει για τις αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές του ιδιότητες και γι' αυτό το λόγο θεωρείται λειτουργικό τρόφιμο (Didaras et al., 2020; Peřka, Ořłowska, et al., 2021; Suleiman et al., 2021; Urcan et al., 2018).

Επιπλέον, το συγκεκριμένο προϊόν φαίνεται να αποτελείται από ένα πλούσιο και ενδιαφέρον μικροβίωμα. Χαρακτηριστικά σε μία ερευνητική μελέτη αναφέρεται, ότι τα μικρόβια που κυριαρχούν στο δείγμα μελισσόψωμου μίας εβδομάδας είναι μύκητες, σε ποσοστό 85%, ενώ το 15% τις μικροχλωρίδας αποτελούν βακτήρια, με το είδος *Bacillus spp.* να καταλαμβάνει το μεγαλύτερο ποσοστό (Gilliam & Bee, 1979). Καθώς το μελισσόψωμο είναι ένα προϊόν κυψέλης που προέρχεται από τη ζύμωση της γύρης, είναι λογικό να αποτελείται από ένα μεγάλο ποσοστό ζυμών και ζυμομυκήτων.

Στη συγκεκριμένη έρευνα, που γίνεται για πρώτη φορά στην Ελλάδα, χρησιμοποιώντας διάφορα θρεπτικά υποστρώματα, εκ των οποίων κάποια εκλεκτικά, πραγματοποιήθηκε μια πρώτη μελέτη του μικροβιώματος ενός δείγματος μελισσόψωμου προερχόμενο από το Πήλιο. Πιο συγκεκριμένα με τη βοήθεια του θρεπτικού υποστρώματος MRS + CaCO₃ απομονώθηκαν βακτήρια, όπου γύρω από την αποικία δημιούργησαν μία διαυγή ζώνη, η οποία υποδηλώνει διάσπαση ανθρακικού ασβεστίου και κατ' επέκταση την πιθανή παρουσία λακτοβακίλλων (Chen et al., 2006; Syed Yaacob et al., 2018). Οι μικροοργανισμοί που απομονώθηκαν από το συγκεκριμένο υπόστρωμα αποτελούν το 18,28% του συνόλου, ποσοστό καθόλου αμελητέο. Η ύπαρξη λακτοβακίλλων στο μελισσόψωμο επαληθεύεται και σε διάφορες άλλες έρευνες, όπως εκείνη των Vasquez και Olofsson, οι οποίοι μελέτησαν και

βρήκαν ότι περίπου δώδεκα είδη που ανήκουν στην κατηγορία των βακτηρίων γαλακτικού οξέος, ήταν *Lactobacillus* και *Bifidobacteria* σε μελισσόψωμο δύο εβδομάδων (Vásquez & Olofsson, 2015). Επιπλέον, οι Asama et al. αναφέρουν ότι το γένος *Lactobacillus* ήταν το κυρίαρχο γένος σε δείγματα μελισσόψωμου, σε ποσοστό 83,9%, με το *Lactobacillus kunkeei* να είναι το πιο άφθονο είδος σε ποσοστό 99,5% (Asama et al., 2015).

Εκτός από τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος που φαίνεται να υπάρχουν στο μελισσόψωμο, υπάρχουν και άλλα βακτηριακά φύλα. Παραδείγματος χάρη, οι Donkersley et al. μετά από ανάλυση σε διάφορα δείγματα μελισσόψωμου ανακάλυψαν περίπου δεκατρία βακτηριακά φύλα, μερικά από τα οποία ήταν *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, α -*Proteobacteria*, β -*Proteobacteria* και γ -*Proteobacteria*. Η οικογένεια βακτηρίων που κυριαρχούσε ήταν η οικογένεια *Enterobacteriaceae*, με 96 βακτηριακά γένη εκ' των οποίων τα πιο κοινά ήταν τα *Pseudomonas* (32,4%), *Arsenophonus* (13,0%), *Lactobacillus* (8,2%), *Erwinia* (7,7%) και *Acinetobacter* (5,2%) (Donkersley et al., 2018). Στην παρούσα μελέτη, για τον έλεγχο παρουσίας εντεροβακτηρίων στο δείγμα μελισσόψωμου, χρησιμοποιήθηκε το εκλεκτικό υπόστρωμα MacConcey Agar, όμως δεν υπήρξε κάποια ανάπτυξη στο συγκεκριμένο δείγμα (*MacConkey Agar- Composition, Principle, Uses, Preparation and Colony Morphology*, n.d.).

Τέλος προκειμένου να διερευνηθεί η πιθανή παρουσία ζυμών και ζυμομυκήτων, χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό μέσο γενικής χρήσης για ζυμομύκητες και μούχλες PDA (*Potato Dextrose Agar (PDA)- Principle, Uses, Procedure & Characteristics*, n.d.). Στο συγκεκριμένο υπόστρωμα υπήρξε ανάπτυξη σε ποσοστό 4,84%. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με άλλες μελέτες, είναι πολύ πιθανό οι μύκητες και οι ζυμομύκητες να αποτελούν ένα σημαντικό μέρος του μικροβιώματος του μελισσόψωμου. Πιο συγκεκριμένα, οι Disayathanoowat et al. αναφέρουν την παρουσία μυκήτων, με κυρίαρχο γένος το *Ascomycota* σε ποσοστό 93,55%, με τον ασκομύκητα *Cladosporium* σε ποσοστό 52,20%. Το γένος που ακολουθούσε ήταν εκείνο του *Basidiomycota* σε μικρότερο ποσοστό 5,65%, με το *Rhodosporidium*, να αντιπροσώπευε το 2,65% της συνολικής μικροβιακής κοινότητας (Disayathanoowat et al., 2020).

Το πλούσιο μικροβίωμα από το οποίο αποτελείται το μελισσόψωμο, δημιουργεί την ανάγκη διερεύνησης τόσο των αντιμικροβιακών ενώσεων όσο και των ενζύμων που μπορεί να παράγονται. Αυτή η εικασία αποτελεί και το έναυσμα διεξαγωγής της συγκεκριμένης μελέτης. Όπως προαναφέρθηκε, στη διαδικασία μετατροπής της γύρης σε μελισσόψωμο, συμβάλλουν διάφορα ένζυμα και βακτήρια που προέρχονται από τους αδένες και το σάλιο των μελισσών αντίστοιχα. Παρόλο που δεν είναι ακόμη γνωστός ο ακριβής μηχανισμός αυτής της διεργασίας, γνωρίζουμε ότι τα ένζυμα των μελισσών όπως η αμυλάσες, που είναι υπεύθυνες για την υδρόλυση του αμύλου και τα βακτήρια κυρίως γαλακτικού οξέος, είναι κρίσιμα για αυτή τη διαδικασία (Peřka, Ořhowska, et al., 2021).

Όσον αφορά την αξιολόγηση της ενζυματικής δραστηριότητας των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών από δείγμα μελισσόψωμου, υπάρχει μόνο μία μελέτη παγκοσμίως, εκείνη των Peřka, Worobo, et al., 2021. Μετά από διερεύνηση για παρουσία λακκάσης, δεν βρέθηκε κανένα από τα στελέχη να είναι ικανό να παράγει το συγκεκριμένο ένζυμο. Από την άλλη μεριά, ορισμένα από τα βακτηριακά στελέχη που μελετήθηκαν φάνηκε να παράγουν αμυλάση, πρωτεάση και κυτταρινάση (Peřka, Worobo, et al., 2021).

Στην ερευνά μου, μέσω της χρήσης του γενικού υποστρώματος Plate Count Agar (PCA) και τις προσθήκης ορισμένων χρωστικών, μιας φαινολικής ένωσης, σκόνης γάλακτος και corn flour, έγινε μια πρώτη έρευνα της παρουσίας ενζύμων που διασπούν χρωστικές, κυτταρινασών, ημικυτταρινασών, πρωτεΐνασών και αμυλασών αντίστοιχα. Η μελέτη αυτή αφορούσε την παραγωγή των συγκεκριμένων ενζύμων από βακτήρια που απομονώθηκαν από το μελισσόψωμο, καθώς και από το ίδιο το εκχύλισμα του προϊόντος. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την παραγωγή των παραπάνω ενζύμων από τα βακτήρια του μελισσόψωμου.

Πιο αναλυτικά, με την χρήση PCA + 2% γάλα (αποβουτυρομένο γάλα σε σκόνη στιγμιαίας διάλυσης), φάνηκε η πιθανή παραγωγή πρωτεΐνάσης στο 50% των βακτηρίων που απομονώθηκαν από το μελισσόψωμο, ενώ με τη χρήση PCA + 1% άμυλο (corn flour), υπήρξε πιθανή παραγωγή αμυλάσης στο 10,22% των βακτηρίων (Akcan, 2011; Elham Sharief Dawood, 1994). Αντίστοιχα στην έρευνα των Peřka,

Worobo, et al., 2021, οι πρωτεάσες βρέθηκαν σε ποσοστό 48%, ενώ οι αμυλάσες σε ποσοστό 3,7% (Peřka, Worobo, et al., 2021).

Όσον αφορά τον έλεγχο παρουσίας κυτταρινάσης και ημικυτταρινάσης, χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα Plate Count Agar με την προσθήκη των χρωστικών PCA + 0,02% Megazyme AZCL-HE-CELLULOSE και PCA + 0,02% Megazyme AZCL-XYLAN αντίστοιχα (Hong NGUYEN et al., 2014). Εκτός από τον έλεγχο των βακτηρίων που απομονώθηκαν από το δείγμα μελισσόψωμου, ελέγχθηκε και το πρωτεϊνικό εκχύλισμα του προϊόντος όπου εμφάνισε ενζυμική δράση, καθώς φάνηκε η διάσπαση της χρωστικής γύρω του, γεγονός που φανερώνει ότι το προϊόν έχει ενζυμική ενεργότητα. Η παραγωγή κυτταρινάσης υπήρξε σε ποσοστό 3,23% στα βακτήρια που βρέθηκαν στο μελισσόψωμο, ενώ της ημικυτταρινάσης 2,15%. Προκειμένου να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα αυτά, χρησιμοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR, με ειδικούς εκκινητές για κάθε ενζυμική ομάδα, ενώ τα δείγματα που έδωσαν τις επιθυμητές ζώνες στάλθηκαν για αλληλούχηση κατά Sanger. Όσον αφορά τις κυτταρινάσες πιθανώς λόγω κακής ποιότητας χρωματογραφήματος τα αποτελέσματα δεν ήταν αξιοποιήσιμα. Αντίστοιχα για τις ημικυτταρινάσες, τα αποτελέσματα της αλληλούχησης επιβεβαίωσαν την παρουσία του συγκεκριμένου ενζύμου. Από την άλλη μεριά, τα αποτελέσματα της μελέτης των Peřka, Worobo, et al., 2021, δείχνουν παραγωγή κυτταρινάσης στο 67% των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών, ενώ δεν πραγματοποιήθηκε έλεγχος για παρουσία ημικυτταρινάσης (Peřka, Worobo, et al., 2021).

Τέλος για τον έλεγχο παραγωγής ενζύμων που διασπούν χρωστικές χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα Plate Count Agar με την προσθήκη της φαινολικής ένωσης 2-Methoxyphenol, 98+ %C₇H₈O₂ σε συγκέντρωση 0,02% και των ακόλουθων χρωστικών (Abd El Monssef et al., 2016):

- 0,02 % COYMASSIE BRILLIANT BLUE R-250 (Yang et al., 2016)
- 0,02% COYMASSIE BRILLIANT BLUE G
- 0,02% MIKROSKOPIE MALACHITE GREEN (Salami et al., 2018)

Το ποσοστό των βακτηρίων που απομονώθηκαν από το δείγμα και παράγουν ένζυμα που διασπούν χρωστικές ανέρχεται σε:

- 40,86% για τη χρωστική COYMASSIE BRILLIANT BLUE R-250
- 18,82% για τη χρωστική COYMASSIE BRILLIANT BLUE G
- 27,42% για τη χρωστική MIKROSKOPIE MALACHITE GREEN και
- 34,69% για τη φαινολική ένωση 2-Methoxyphenol, 98+ %C₇H₈O₂.

Ο μοριακός έλεγχος και η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε μόνο για τις λακκάσες και τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την παρουσία του ενζύμου. Αντίστοιχα, στην έρευνα των Peřka, Worobo, et al., 2021, έγινε προσπάθεια ελέγχου παρουσίας λακκάσης, όμως δεν φάνηκε να υπάρχει (Peřka, Worobo, et al., 2021). Συνεπώς η συγκεκριμένη έρευνα είναι η πρώτη που αναφέρει την ενζυματική δραστηριότητα της λακκάσης σε απομονωμένα βακτηριακά στελέχη από μελισσόψωμο.

Συνοψίζοντας, όπως είναι φανερό το μελισσόψωμο είναι ένα προϊόν κυψέλης όχι τόσο γνωστό, αλλά που ξεχωρίζει τόσο για το πλούσιο μικροβίωμα που το χαρακτηρίζει, όσο και για τα ένζυμα τα οποία μπορεί να περιέχει ή και να παράξει. Ένζυμα με πολύ σημαντικές βιοτεχνολογικές εφαρμογές, ανοίγοντας έτσι νέους δρόμους με περισσότερα οφέλη στον τομέα της βιομηχανίας. Αξίζει λοιπόν περαιτέρω έρευνα και μελέτη, προκειμένου να υπάρξουν περισσότερα στοιχεία για την ενζυμική δραστηριότητα του συγκεκριμένου προϊόντος.

Βιβλιογραφικές αναφορές

- Abd El Monssef, R. A., Hassan, E. A., & Ramadan, E. M. (2016). Production of laccase enzyme for their potential application to decolorize fungal pigments on aging paper and parchment. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1), 145–154. <https://doi.org/10.1016/J.AOAS.2015.11.007>
- Akcan, N. (2011). High Level Production of Extracellular α -Amylase from *Bacillus licheniformis* ATCC 12759 in Submerged Fermentation. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(6).
- Alves-Prado, H. F., Pavezzi, F. C., Leite, R. S. R., de Oliveira, V. M., Sette, L. D., & DaSilva, R. (2009). Screening and Production Study of Microbial Xylanase Producers from Brazilian Cerrado. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2009 161:1, 161(1), 333–346. <https://doi.org/10.1007/S12010-009-8823-5>
- Amores-Arrocha, A., Roldán, A., Jiménez-Cantizano, A., Caro, I., & Palacios, V. (2018). Evaluation of the use of multiflora bee pollen on the volatile compounds and sensorial profile of Palomino fino and Riesling white young wines. *Food Research International*, 105, 197–209. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2017.11.013>
- Ares, A. M., Valverde, S., Bernal, J. L., Nozal, M. J., & Bernal, J. (2018). Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 110–124. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2017.08.009>
- Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C. E., Santos, M. H. de los, Levin, L., Rojo-Domínguez, A., Romero-Martínez, D., Saparrat, M. C. N., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2019). Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microbial Cell Factories*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/S12934-019-1248-0>
- Asama, T., Arima, T. H., Gomi, T., Keishi, T., Tani, H., Kimura, Y., Tatefuji, T., & Hashimoto, K. (2015). *Lactobacillus kunkeei* YB38 from honeybee products enhances IgA production in healthy adults. *Journal of Applied Microbiology*, 119(3), 818–826. <https://doi.org/10.1111/JAM.12889>
- Ausec, L., van Elsas, J. D., & Mandic-Mulec, I. (2011). Two- and three-domain bacterial laccase-like genes are present in drained peat soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(5), 975–983. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2011.01.013>
- Aylanc, V., Falcão, S. I., Ertosun, S., & Vilas-Boas, M. (2021). From the hive to the table: Nutrition value, digestibility and bioavailability of the dietary phytochemicals present in the bee pollen and bee bread. *Trends in Food Science & Technology*, 109, 464–481. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.01.042>
- Biko, O. D. V., Viljoen-Bloom, M., & van Zyl, W. H. (2020). Microbial lignin peroxidases: Applications, production challenges and future perspectives. *Enzyme and Microbial Technology*, 141, 109669. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2020.109669>
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool*. (n.d.). Retrieved February 11, 2022, from <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

- Božič, A., & Šiber, A. (2020). Mechanical design of apertures and the infolding of pollen grain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(43), 26600. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2011084117>
- Brijwani, K., Rigdon, A., & Vadlani, P. V. (2010). Fungal laccases: Production, function, and applications in food processing. *Enzyme Research*, 2010. <https://doi.org/10.4061/2010/149748>
- Chakrabarty, S., Kahler, J. P., de Plassche, M. A. T. van, Vanhoutte, R., & Verhelst, S. H. L. (2018). Recent Advances in Activity-Based Protein Profiling of Proteases. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 420, 253–281. https://doi.org/10.1007/82_2018_138
- Chen, Y. S., Yanagida, F., & Hsu, J. S. (2006). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from dochi (fermented black beans), a traditional fermented food in Taiwan. *Letters in Applied Microbiology*, 43(2), 229–235. <https://doi.org/10.1111/J.1472-765X.2006.01922.X>
- Detry, R., Simon-Delso, N., Bruneau, E., & Daniel, H.-M. (2020). Specialisation of Yeast Genera in Different Phases of Bee Bread Maturation. *Microorganisms* 2020, Vol. 8, Page 1789, 8(11), 1789. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8111789>
- Didaras, N. A., Kafantaris, I., Dimitriou, T. G., Mitsagga, C., Karatasou, K., Giavasis, I., Stagos, D., Amoutzias, G. D., Hatjina, F., & Mossialos, D. (2021). Biological Properties of Bee Bread Collected from Apiaries Located across Greece. *Antibiotics*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10050555>
- Didaras, N. A., Karatasou, K., Dimitriou, T. G., Amoutzias, G. D., & Mossialos, D. (2020). Antimicrobial Activity of Bee-Collected Pollen and Beebread: State of the Art and Future Perspectives. *Antibiotics*, 9(11), 1–29. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS9110811>
- 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*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8020264>
- Donkersley, P., Rhodes, G., Pickup, R. W., Jones, K. C., & Wilson, K. (2018). Bacterial communities associated with honeybee food stores are correlated with land use. *Ecology and Evolution*, 8(10), 4743. <https://doi.org/10.1002/ECE3.3999>
- Ejaz, U., Sohail, M., & Ghanemi, A. (2021). Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications. *Biomimetics*, 6(3). <https://doi.org/10.3390/BIOMIMETICS6030044>
- Elham Sharief Dawood. (1994). *Production of amylolytic enzymes by Bacillus spp.* [Faculty of Science University]. https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/30/050/30050960.pdf
- Gilliam, M., & Bee, C. H. (1979). MICROBIOLOGY OF POLLEN AND BEE BREAD : THE GENUS BACILLUS. *Apidologie*, 10(3), 269–274. <https://doi.org/10.1051/APIDO:19790304>
- Giovanelli, G., & Ravasini, G. (1993). Apple Juice Stabilization by Combined Enzyme—Membrane Filtration Process. *LWT - Food Science and Technology*, 26(1), 1–7. <https://doi.org/10.1006/FSTL.1993.1001>
- Gopinath, S. C. B., Anbu, P., Arshad, M. K. M., Lakshmipriya, T., Voon, C. H.,

- Hashim, U., & Chinni, S. V. (2017). Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1272193>
- Gupta, V., Capalash, N., Gupta, N., & Sharma, P. (2017). Bio-Prospecting Laccases in the Bacterial Diversity of Activated Sludge From Pulp and Paper Industry. *Indian Journal of Microbiology*, 57(1), 75. <https://doi.org/10.1007/S12088-016-0624-2>
- Gurumalles, P., Alagu, K., Ramakrishnan, B., & Muthusamy, S. (2019). A systematic reconsideration on proteases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 128, 254–267. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.01.081>
- Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013). A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/329121>
- Heo, J., Kim, S. J., Kim, J. S., Hong, S. B., & Kwon, S. W. (2020). Comparative genomics of *Lactobacillus* species as bee symbionts and description of *Lactobacillus bombintestini* sp. nov., isolated from the gut of *Bombus ignitus*. *Journal of Microbiology* 2020 58:6, 58(6), 445–455. <https://doi.org/10.1007/S12275-020-9596-3>
- Hong NGUYEN, N., Maruset, L., Uengwetwanit, T., Mhuantong, W., Harnpicharnchai, P., Champreda, V., Tanapongpipat, S., Jira Jaroenrat, K., Rakshit, S. K., Eurwilaichitr, L., & Pongpattanakitsote, S. (2014). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry Identification and Characterization of a Cellulase-Encoding Gene from the Buffalo Rumen Metagenomic Library*. <https://doi.org/10.1271/bbb.110786>
- Karabagias, I. K., Karabagias, V. K., Gatzias, I., & Riganakos, K. A. (2018). Bio-Functional Properties of Bee Pollen: The Case of “Bee Pollen Yoghurt.” *Coatings* 2018, Vol. 8, Page 423, 8(12), 423. <https://doi.org/10.3390/COATINGS8120423>
- Karakasidou, K., Nikolouli, K., Amoutzias, G. D., Pournou, A., Manassis, C., Tsiamis, G., & Mossialos, D. (2018). Microbial diversity in biodeteriorated Greek historical documents dating back to the 19th and 20th century: A case study. *MicrobiologyOpen*, 7(5), 596. <https://doi.org/10.1002/MBO3.596>
- Kaushal, J., Khatri, M., Singh, G., & Arya, S. K. (2021). A multifaceted enzyme conspicuous in fruit juice clarification: An elaborate review on xylanase. *International Journal of Biological Macromolecules*. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.10.194>
- Khalifa, S. A. M., Elashal, M., Kieliszek, M., Ghazala, N. E., Farag, M. A., Saeed, A., Xiao, J., Zou, X., Khatib, A., Göransson, U., & El-Seedi, H. R. (2020). Recent insights into chemical and pharmacological studies of bee bread. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 300–316. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2019.08.021>
- Kieliszek, M., Piwowarek, K., Kot, A. M., Błażej, S., Chlebowska-Śmigiel, A., & Wolska, I. (2018). Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 170–180. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2017.10.021>
- MacConkey Agar- Composition, Principle, Uses, Preparation and Colony Morphology. (n.d.). Retrieved February 2, 2022, from <https://microbiologyinfo.com/macconkey-agar-composition-principle-uses-preparation-and-colony-morphology/>

- Mamo, G. (2019). Alkaline Active Hemicellulases. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 172, 245–291. https://doi.org/10.1007/10_2019_101
- Mărgăoan, R., Cornea-Cipcigan, M., Topal, E., & Kösoğlu, M. (2020). Impact of Fermentation Processes on the Bioactive Profile and Health-Promoting Properties of Bee Bread, Mead and Honey Vinegar. *Processes* 2020, Vol. 8, Page 1081, 8(9), 1081. <https://doi.org/10.3390/PR8091081>
- Minussi, R. C., Rossi, M., Bologna, L., Rotilio, D., Pastore, G. M., & Durán, N. (2007). Phenols removal in musts: Strategy for wine stabilization by laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 45(3–4), 102–107. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCATB.2006.12.004>
- Mohammad, S. M., Mahmud-Ab-Rashid, N.-K., & Zawawi, N. (2021). Stingless Bee-Collected Pollen (Bee Bread): Chemical and Microbiology Properties and Health Benefits. *Molecules*, 26(4). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26040957>
- Mora-Adames, W. I., Fuenmayor, C. A., Benavides-Martín, M. A., Algecira-Enciso, N. A., & Quicazán, M. C. (2021). Bee pollen as a novel substrate in pilot-scale probiotic-mediated lactic fermentation processes. *LWT*, 141, 110868. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2021.110868>
- Ngalimat, M. S., Rahman, R. N. Z. R. A., Yusof, M. T., Syahir, A., & Sabri, S. (2019). Characterisation of bacteria isolated from the stingless bee, *Heterotrigona itama*, honey, bee bread and propolis. *PeerJ*, 7(8). <https://doi.org/10.7717/PEERJ.7478>
- Pełka, K., Otlowska, O., Worobo, R. W., & Szweda, P. (2021). Bee Bread Exhibits Higher Antimicrobial Potential Compared to Bee Pollen. *Antibiotics* 2021, Vol. 10, Page 125, 10(2), 125. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10020125>
- Pełka, K., Worobo, R. W., Walkusz, J., & Szweda, P. (2021). Bee Pollen and Bee Bread as a Source of Bacteria Producing Antimicrobials. *Antibiotics* 2021, Vol. 10, Page 713, 10(6), 713. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10060713>
- Potato Dextrose Agar (PDA)- Principle, Uses, Procedure & Characteristics*. (n.d.). Retrieved February 2, 2022, from <https://microbiologyinfo.com/potato-dextrose-agar-pda-principle-uses-composition-procedure-and-colony-characteristics/>
- Salami, F., Habibi, Z., Yousefi, M., & Mohammadi, M. (2018). Covalent immobilization of laccase by one pot three component reaction and its application in the decolorization of textile dyes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 144–151. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.08.077>
- Sheng, P., Li, Y., Marshall, S. D. G., & Zhang, H. (2015). High Genetic Diversity of Microbial Cellulase and Hemicellulase Genes in the Hindgut of *Holotrichia parallela* Larvae. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 16545. <https://doi.org/10.3390/IJMS160716545>
- Souza, P. M. de, & Magalhães, P. de O. (2010). Application of microbial α -amylase in industry – A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 850. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>
- Suleiman, J. B., Mohamed, M., Abu Bakar, A. B., Nna, V. U., Zakaria, Z., Othman, Z. A., & Aroyehun, A. B. (2021). Chemical Profile, Antioxidant Properties and Antimicrobial Activities of Malaysian *Heterotrigona itama* Bee Bread. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 4943, 26(16), 4943. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26164943>
- Syed Yaacob, S. N., Huyop, F., Kamarulzaman Raja Ibrahim, R., & Wahab, R. A. (2018). Identification of *Lactobacillus* spp. and *Fructobacillus* spp. isolated from

- fresh *Heterotrigena itama* honey and their antagonistic activities against clinical pathogenic bacteria. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1428047>, 57(3), 395–405. <https://doi.org/10.1080/00218839.2018.1428047>
- Thakur, M., & Nanda, V. (2020). Composition and functionality of bee pollen: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 98, 82–106. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.02.001>
- Urcan, A., Criste, A., Dezmirean, D., Bobiș, O., Mărghițaș, L., Mărgăoan, R., & Hrinca, A. (2018). Antimicrobial Activity of Bee Bread Extracts Against Different Bacterial Strains. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 75(2), 1843–536. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-asb>
- Uțoiu, E., Matei, F., Toma, A., Diguță, C. F., Ștefan, L. M., Mănoiu, S., Vărăjmașu, V. V., Moraru, I., Oancea, A., Israel-Roming, F., Cornea, C. P., Constantinescu-Aruxandei, D., Moraru, A., & Oancea, F. (2018). Bee Collected Pollen with Enhanced Health Benefits, Produced by Fermentation with a Kombucha Consortium. *Nutrients*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/NU10101365>
- Vásquez, A., & Olofsson, T. C. (2015). The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.48.3.07>, 48(3), 189–195. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.48.3.07>
- Yagu, S., Âa, M., Terro Ân, C., Gonza Âlez, T., Zapico, E., Bocchini, P., Galletti, G. C., & Gonza Âlez, A. E. (2000). Biotreatment of tannin-rich beer-factory wastewater with white-rot basidiomycete *Coriolopsis gallica* monitored by pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry. *COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY Rapid Commun. Mass Spectrom*, 14, 905–910. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(20000530\)14:10](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(20000530)14:10)
- Yang, J., Yang, X., Ye, X., & Lin, J. (2016). Optimal parameters for laccase-mediated destaining of Coomassie Brilliant Blue R-250-stained polyacrylamide gels. *Data in Brief*, 7, 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.DIB.2016.01.029>
- Zeng, X., Zhang, M., Liu, Y., & Tang, W. (2018). Manganese(II) oxidation by the multi-copper oxidase CopA from *Brevibacillus panacihumi* MK-8. *Enzyme and Microbial Technology*, 117, 79–83. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2018.04.011>