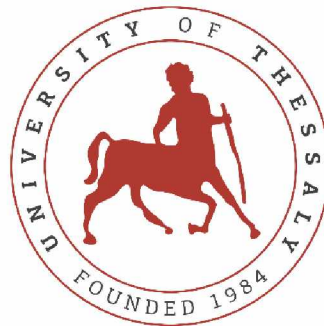




ΤΜΗΜΑ

**Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ
ΑΠΟΜΟΝΩΜΕΝΩΝ ΑΠΟ ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΜΕΛΙΣΣΟΨΩΜΟ»**

**“INVESTIGATION ON THE BIOSYNTHETIC POTENTIAL OF BACTERIA
ISOLATED FROM GREEK BEE BREAD”**



**Σιαπεροπούλου Χριστίνα
του Γεωργίου**

Λάρισα, 2021

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Μόσιαλος Δημήτριος (επιβλέπων): Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Αμούτζιας Γρηγόριος: Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοπληροφορικής με έμφαση στην Μικροβιολογία του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δημητρίου Τηλέμαχος: Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό του εργαστηρίου Μικροβιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

«Διερεύνηση του Βιοσυνθετικού Δυναμικού Βακτηρίων
Απομονωμένων από Ελληνικό Μελισσόψωμο»

“Investigation of the bacterial biosynthetic potential of isolated
of Greek Bee Bread”

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Με το πέρας της εργασίας αυτής, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα άτομα που συνέβαλαν, άμεσα ή έμμεσα στην ολοκλήρωσή της.

Πρωτίστως, θα ήθελα ευχαριστήσω θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μόσιαλο Δημήτριο για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο του, αλλά και για εμπιστοσύνη, την υπομονή, τις συμβουλές και την στήριξή όλο αυτό το διάστημα.

Θα ήθελα επίσης, να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Αμούτζια Γρηγόριο για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ε.ΔΙ.Π. Δημητρίου Τηλέμαχο για την συνεχή υποστήριξη και καθοδήγηση του, αλλά και για την συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

Η ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας δεν θα ήταν δυνατή χωρίς την αμέριστη βοήθεια του υποψήφιου διδάκτορα Ασούτη Νίκου. Τον ευχαριστώ λοιπόν για την καθημερινή του καθοδήγηση και που ήταν εκεί για κάθε απορία μου.

Οφείλω ακόμη να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Τσαδήλα Χριστίνα, τόσο για τις συμβουλές, την ενθάρρυνση της, τις επιστημονικές γνώσεις που μου προσέφερε, αλλά και για το φιλικό κλίμα που δημιουργούσε στο εργαστήριο καθ' όλη τη διάρκεια του προγράμματος.

Η διαδρομή της πτυχιακής μου εργασίας ήταν παράλληλη με της Καραϊσκού Ιωάννας, δεν θα μπορούσα λοιπόν να μην την ευχαριστήσω για την άριστη συνεργασία που είχαμε.

Φυσικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου που ήταν πάντα πρόθυμα να με βοηθήσουν.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω στην οικογένειά μου και στους φίλους μου για την ενθάρρυνση και την υποστήριξη τους.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	7
Abstract	8
Εισαγωγή.....	9
Η μελισσοκομία στην αρχαιότητα.....	9
Προϊόντα της μέλισσας	10
Μέλι	10
Πρόπολη.....	11
Βασιλικό Πολτό	11
Γύρη μελισσών (Bee Pollen, BP)	12
Μελισσόψωμο (Bee Bread, BB)	12
Από την γύρη των λουλουδιών στην γύρη των μελισσών	13
Μετατροπή γύρης σε μελισσόψωμο.....	15
Χημικές Σύνθεση του μελισσόψωμου.....	17
Περιεκτικότητα σε νερό και pH.....	17
Υδατάνθρακες.....	18
Πρωτεΐνη.....	18
Λιπίδια.....	18
Φαινολικές Ενώσεις	19
Βιταμίνες και Μέταλλα	19
Μικροβίωμα του Μελισσόψωμου	20
Ένζυμα.....	22
Κυτταρινάσες.....	22
Ημικυτταρινάσες	23
Ένζυμα που συμμετέχουν στην αποδόμηση της Λιγνίνης.....	25
Υπεροξειδάσες του Μαγγανίου (MnP).....	27
Υπεροξειδάση της Λιγνίνης (LiP).....	28
Εφαρμογές Ενζύμων που αποδομούν την Λιγνίνη	30
Αμυλάσες.....	31
Πρωτεϊνάσες	32
Μελλοντικές προοπτικές του μελισσόψωμου.....	33
Σκοπό της εργασίας.....	35
Πειραματικό Μέρος	36
Υλικά και Μέθοδοι.....	36
Υλικά	36

Εργαστηριακά μηχανήματα και εξοπλισμός	36
Παρασκευή Στερεών θρεπτικών Υλικών	37
Δείγματα Μελισσόψωμου- Εξαγωγή-προετοιμασία- Απομόνωση αποικιών	37
Έλεγχος για Ενζυμική Φαινοτύπηση	39
A. Έλεγχος για ημικυτταρινάσες	39
B. Έλεγχος για κυτταρινάσες	39
C. Έλεγχος για ένζυμα που διασπούν χρωστικές	40
D. Έλεγχος για αμυλάσες	40
E. Έλεγχος για πρωτεΐνάσες	41
Διατήρηση σε γλυκερόλη	41
Μοριακή Ανίχνευση Γονιδίων	42
1. Εξαγωγή DNA από μικροβιακή αποικία	42
2. Ενίσχυση γονιδιακών περιοχών με τη χρήση PCR χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα ζεύγη εκκινητών και συνθηκών ανά είδος ενζύμου.	42
3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	49
4. Καθαρισμός των προϊόντων PCR – PCR clean up	49
5. Αλληλούχηση κατά Sanger και ανάλυση των αλληλουχιών με προγράμματα βιοπληροφορικής	49
6. Ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου Βακτηρίων του που απομονώθηκαν από ελληνικό μελισσόψωμο	50
Αποτελέσματα	52
Ημικυτταρινάσες	53
Ενζυμική Φαινοτύπηση	53
Μοριακή Ταυτοποίηση	53
Ανάλυση των αλληλουχιών	54
Κυτταρινάσες	56
Ενζυμική Φαινοτύπηση	56
Μοριακή Ταυτοποίηση	56
Αποτέλεσμα Κλωνοποίησης	57
Ανάλυση των αλληλουχιών	57
Ένζυμα που διασπούν χρωστική	58
Ενζυμική Φαινοτύπηση	58
Μοριακή Ταυτοποίηση	60
Ανάλυση των αλληλουχιών	60
Αμυλάσες	61
Ενζυμική Φαινοτύπηση	61
Πρωτεΐνάσες	62

Ενζυμική Φαινοτύπηση.....	62
Αποτελέσματα ανάλυσης του 16s rRNA.....	63
Ανάλυση των αλληλουχιών του 16s rRNA.....	63
Συνολικά αποτελέσματα.....	64
Συζήτηση.....	69
Βιβλιογραφία.....	73

Περίληψη

Τα προϊόντα μέλισσας χρησιμοποιούνται από την αρχαιότητα. Σημαντικές εξέλιξης στην μελισσοκομία παρατηρήθηκαν από τον 16^ο αιώνα, ωστόσο η λεπτομερής χημική τους σύνθεση προσδιορίστηκε μόλις στα τέλη του 1900. Μέχρι και σήμερα, υπάρχουν προϊόντα κυψέλης που βρίσκονται στην αφάνεια και δεν είναι επαρκώς μελετημένα, ένα από αυτά είναι και το Μελισσόψωμο (Bee Bread, BB).

Το μελισσόψωμο, αποτελεί την συλλεγόμενη γύρη από την μέλισσα, η οποία αναμιγνύεται με αδενικές εκκρίσεις και αποθηκεύεται στην κυψέλη. Η μελέτη του μικροβιώματος του μελισσόψωμου είναι ελάχιστη, έχει παρατηρηθεί όμως ότι περιέχει ένα πλούσιο μικροβίωμα που αποτελείται από ποικίλους μικροοργανισμούς οι οποίοι παράγουν ένζυμα αμινοξέα, πρωτεΐνες, λιπίδια κλπ.

Όλα τα παραπάνω κίνησαν το ενδιαφέρον για την διερεύνηση του βιοσυνθετικού δυναμικού βακτηρίων που περιέχονται στο μελισσόψωμο.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε απομόνωση βακτηρίων ελληνικού μελισσόψωμου από δείγματα που παρήλθαν από διαφορετικές περιοχές και βοτανικές πηγές, συγκεκριμένα μελετήθηκε δείγμα Πηλίου και Ρεθύμνου.

Η ανάπτυξη των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με κλασσικές τεχνικές μικροβιολογίας που βασίζονται στις καλλιέργειες βακτηριακών αποικιών σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα. Οι πιθανές βακτηριακές αποικίες που είχαν απομονωθεί ελέγχθηκαν για την παραγωγή συγκεκριμένων ενζύμων. Τα ένζυμα που αποτέλεσαν σημείο έρευνας στην εργασία αυτή ήταν οι **Κυτταρινάσες, Εξωκυτταρικές Ημικυτταρινάσες, Αμυλάσες, Πρωτεΐνάσες** και **ένζυμα που διασπούν χρωστικές (Λακκάσες)**. Ακολούθησαν μοριακές τεχνικές που στοχεύουν στην ανίχνευση συγκεκριμένων γονιδίων των ενζύμων που μελετήθηκαν, με την εφαρμογή PCR και στάλθηκαν για αλληλούχηση. Στόχος είναι και η ταυτοποίηση των απομονωμένων βακτηρίων μέσω αλληλούχησης του 16s rRNA γονιδίου.

Τέλος, η ικανότητα αυτών των βακτηριακών αποικιών να παράγουν τα παραπάνω ένζυμα κάνει το μελισσόψωμο ένα προϊόν με υψηλό βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον.

Λέξεις Κλειδιά: Μελισσόψωμο, Γύρη μελισσών, Μικροβίωμα, Κυτταρινάσες, Ημικυτταρινάσες, Λακκάσες, Αμυλάσες, Πρωτεΐνάσες

Abstract

Bee products have been used since antiquity. Significant developments in beekeeping have been observed since the 16th century, however their detailed chemical composition was not determined until the late 1900s. To this day, there are bee products that are in obscurity and they are not significantly studied, Bee Bread (BB) is one of them.

Bee bread is the bee pollen collected by the bees, that is mixed with glandular secretions and is stored in the beehive. The studies about bee bread microbiome are minimal, but it has been observed that it consists of a rich microbiome that is composed from various microorganisms producing enzymes, amino acids, proteins, lipids etc.

All the above sparked the interest of exploring the biosynthetic potential of the bacteria that are included in the bee bread.

In the present thesis, Greek bee bread bacteria were isolated from samples of different areas and botanical sources, in particular samples from Pelion and Rethymnon were studied.

The bacterial growth was conducted by standard microbiology techniques that are based on cultures of bacterial colonies on a suitable nutrient medium. The potential isolated bacterial colonies were tested for the production of specific enzymes. The enzymes that were the subject of this research were Cellulases, Extracellular Hemicelluloses, Amylases, Proteases, and enzymes that break down pigments (Laccases). Molecular techniques that aimed at detecting specific genes of the studied enzymes were followed by PCR and sent for sequencing. The aim is also the identification of the isolated bacteria by sequencing the 16s rRNA gene.

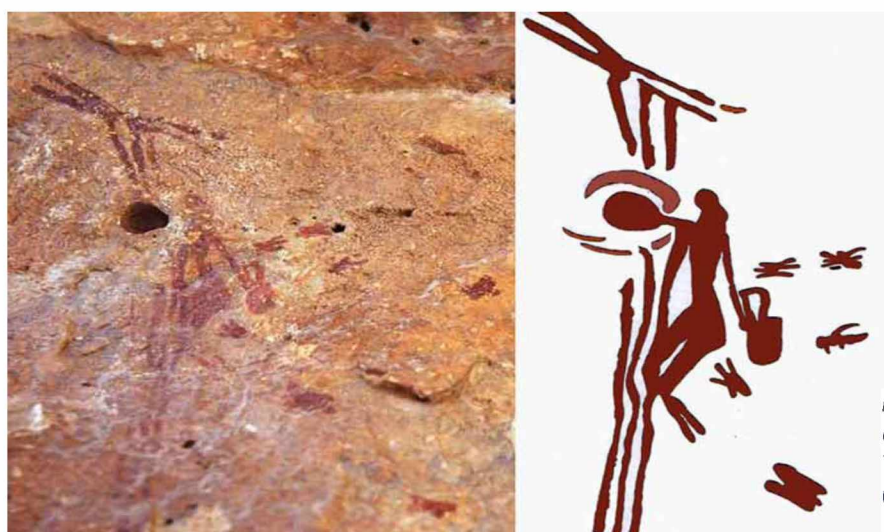
Finally, the ability of these bacterial colonies to produce the above enzymes, makes the bee bread a product of high biotechnological interest.

Key Words: Bee Bread, Bee Pollen, Microbiome, Cellulases, Xylanases, Laccases, Amylases, Proteases

Εισαγωγή

Η μελισσοκομία στην αρχαιότητα

Το πότε ακριβώς ξεκίνησε η μελισσοκομία και η χρήση προϊόντων κυψέλης από τον άνθρωπο είναι άγνωστο μέχρι και σήμερα. Τα πρώτα ίχνη προήλθαν από τοιχογραφίες στην Ισπανία στο Cave Spider (Cuevas de la Araña), η περιοχή αυτή βρίσκεται δίπλα στον ποταμό Cazunta κοντά στη Βαλένθια **Εικόνα 1-1**. Το έργο αυτό εκτιμάται πως δημιουργήθηκε το 8000–5000 π.Χ., δηλαδή κατά την Νεολιθική Εποχή και δείχνει ένα άτομο να συλλέγει μέλι από άγριες μέλισσες (Nayik et al., 2014).



Εικόνα 1-1 Αναπαράσταση αλληλεπίδρασης ανθρώπου και μέλισσας. Τοιχογραφία το 8000-5000 π.Χ, Βαλένθια. (Nayik et al., 2014)

Η ιστορία των προϊόντων κυψέλης ξεκίνησε από την αρχαιότητα. Ο Ιπποκράτης, ο Πλίνιος ο Πρεσβύτερος και ο Πυθαγόρας πίστευαν ότι η γύρη έχει θεραπευτική δράση. Το μέλι δεν θεωρούνταν μόνο τρόφιμο ή γλυκαντικό, αλλά το χρησιμοποιούσαν επίσης ως φάρμακο για την επούλωση τραυμάτων, την αναγέννηση των ιστών και την ανακούφιση των γαστρεντερικών διαταραχών, αλλά και σε διάφορες άλλες παθήσεις (Cianciosi et al., 2018; Alvarez-Suarez et al., 2010).

Οι Έλληνες πίστευαν ότι το μέλι και η γύρη είναι η «τροφή των βασιλιάδων», καθώς προσφέρει νεότητα και είναι πηγή μακροζωίας (Kieliszek et al., 2018).

Όλα τα παραπάνω δείχνουν την αξία των προϊόντων κυψέλης και τον λόγο που εξακολουθεί να χρησιμοποιείται και να μελετάται μέχρι και σήμερα.

Προϊόντα της μέλισσας

Η ζωή των μελισσών εξακολουθεί να αποτελεί αντικείμενο επιστημονικού ενδιαφέροντος και πηγή έμπνευσης για τους καλλιτέχνες και οι μέλισσες παραμένουν το σύμβολο της εργατικότητας και της οικονομίας (Kieliszek et al., 2018). Η μέλισσα, αποτελεί έναν από τους θησαυρούς της φύσης. Καθ' όλη τη διάρκεια της ημέρας, εργάζεται ακατάπαυστα, ώστε να εξασφαλίσει την τροφή, την υγιεινή και την ασφάλεια, τόσο για την ίδια, όσο και για ολόκληρη τη κυψέλη. Κάθε κυψέλη αποτελείται από μερικές χιλιάδες άτομα (10.000-40.000) τα οποία έχουν διαφοροποιηθεί σε τρεις τάξεις, τη βασίλισσα, τους κηφήνες και τις εργάτριες.

Ο μελισσοκόμος αξιοποιεί τα προϊόντα της μέλισσας με ιδιαίτερη προσοχή ώστε να μην διαταράσσει τις ισορροπίες στην κυψέλη. Όπως αναφέρθηκε και προηγούμενος πρόκειται για προϊόντα υψηλής διατροφικής αξίας Error! Reference source not found. και στην συνέχεια ορισμένα από αυτά θα περιγράψουν αναλυτικότερα.

Μέλι

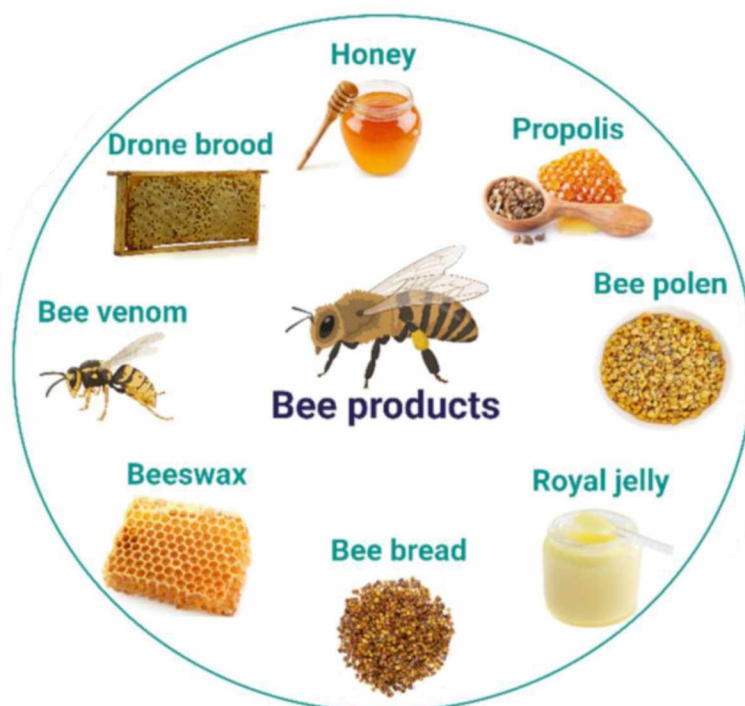
Το μέλι, είναι ένα φυσικό γλυκό προϊόν γνωστό για τη θρεπτική του αξία και τις ευεργετικές του ιδιότητες στην υγεία. Παράγεται από μέλισσες (*Apis mellifera* L.) που συλλέγουν άμεσα νέκταρ από φυτά ή από εκκρίματα εντόμων που απορροφούν φυτά. Το μέλι είναι ουσιαστικά ένα συμπυκνωμένο υδατικό διάλυμα υδατανθράκων, κυρίως φρουκτόζης και γλυκόζης. Εκτός από υδατάνθρακες, το μέλι περιέχει ένζυμα (π.χ. οξειδάση γλυκόζης και καταλάση), πρωτεΐνες, βιταμίνες (π.χ. βιταμίνες C και E), οργανικά οξέα, λιπίδια, μέταλλα (Bogdanov et al., 2008).

Παρουσιάζει επίσης, ισχυρή αντιβακτηριακή και αντιοξειδωτική δράση. Η αντιβακτηριακή δράση αποδίδεται σε διαφορετικούς παράγοντες, όπως υπεροξειδίου του υδρογόνου, χαμηλό pH και υψηλή οσμωτικότητα. Η αντιοξειδωτική δράση του μελιού αποδίδεται κυρίως στις πολυφαινόλες και αντιοξειδωτικά ένζυμα (Badolato et al., 2017). Τα συστατικά αυτά συμβάλλουν σημαντικά στις ευεργετικές επιδράσεις του στην υγεία.

Ωστόσο, η χημική σύνθεση μεταξύ διαφορετικών τύπων μελιού ποικίλλει σημαντικά λόγω της βοτανικής και εντομολογικής πηγής, καθώς και των κλιματικών και περιβαλλοντικών συνθηκών, αν και οι συνθήκες συγκομιδής, επεξεργασίας και αποθήκευσης μπορεί να επηρεάσουν τις αντιβακτηριακές ιδιότητες του μελιού (Kus et al., 2016; Stagos et al., 2018).

Πρόπολη

Η πρόπολη παρασκευάζεται από τις μέλισσες συλλέγοντας φυτικές ρητίνες από φλοιό των δέντρων, των οφθαλμών των φύλλων και άλλες βοτανικές πηγές και αναμειγνύοντάς τες με κερί, γύρη και μέλι. Χρησιμοποιείται, τόσο για τη μόνωση και την προστασία της κυψέλης από εισβολείς ή κρύες καιρικές συνθήκες, όσο και για την απολύμανση της κυψέλης και την αποστείρωση των κελιών στα οποία γεννάει η βασίλισσα. Η πρόπολη παρουσιάζει μια ποικιλία βιολογικών ιδιοτήτων, συμπεριλαμβανομένων αντιβακτηριακών, αντιμυκητιασικών, αντιϊκών καθώς και αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών και αντικαρκινικών ιδιοτήτων (Burdock, 1998; Didaras et al., 2020).



*Εικόνα 1-2 Προϊόντα Μέλισσας.
(Nainu et al., 2021)*

Βασιλικό Πολτό

Βασιλικός πολτός είναι το μίγμα των εκκρίσεων από τους υποφαρυγγικούς και γναθικούς αδένες των εργατριών μελισσών του είδους *Apis mellifera* L. Σε κανονική θερμοκρασία έχει κρεμώδη ή ζελατινώδη υφή και είναι γαλακτόχρωμο ή υποκίτρινο ιριδίζον. Η οσμή του είναι οξεία και διαπεραστική και η γεύση του είναι δριμεία και πικάντικη. Αποτελεί τροφή των νεαρών προνυμφών και των ενήλικων βασιλισσών.

Ο βασιλικός πολτός είναι πλούσιος σε πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, βιταμίνες και μέταλλα. Επιπλέον είναι γνωστός, τόσο για την αντιφλεγμονώδη, όσο και για την αντιμικροβιακή του δράση (Didaras et al., 2020).

Γύρη μελισσών (Bee Pollen, BP)

Η γύρη των μελισσών αποτελεί ένα μείγμα από εκκρίσεις μελισσών, νέκταρ και γύρη λουλουδιών το οποίο συλλέγεται από τις εργάτριες μέλισσες. Αποτελεί την βασική τροφή για την ανάπτυξη των προνυμφών. Η χημική σύνθεση της γύρης μεταβάλλεται ανάλογα την γεωγραφική προέλευση. Παρακάτω θα γίνει αναλυτική περιγραφή (Nayik et al., 2014; Nainu et al., 2021).

Μελισσόψωμο (Bee Bread, BB)

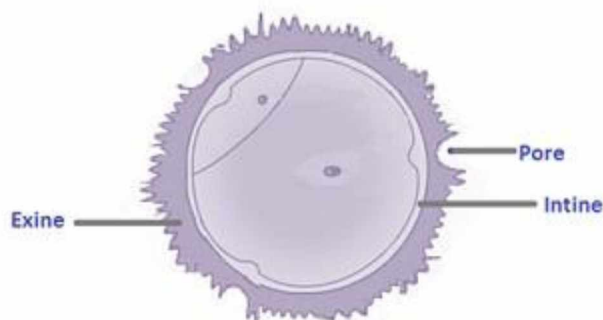
Ο όρος «μελισσόψωμο» αναφέρεται στη συλλεγμένη γύρη που επεξεργάζεται από τις μέλισσες, ζυμώνεται και αποθηκεύεται στην κυψέλη (Didaras et al., 2020). Το μελισσόψωμο είναι προϊόν της κυψέλης που δεν έχει, μελετηθεί από πολλούς μελισσοκόμους, οι οποίοι δεν συλλέγουν αυτό το προϊόν, λόγω μερικής καταστροφής της κηρήθρας κατά τη συγκομιδή (Bakour et al., 2019). Με το προϊόν αυτό θα ασχοληθούμε εκτενέστερα στην συνέχεια.

Από την γύρη των λουλουδιών στην γύρη των μελισσών

Η παραγωγή της γύρης πραγματοποιείται στους ανθήρες σε διάφορες ποσότητες, οι οποίοι είναι το αρσενικό μέρος του άνθους και αποτελείται από μικροσπόρια. Μέσο της γύρης γίνεται μεταφορά του αρσενικού γενετικού υλικού των φυτών από τους στήμονες (αρσενικό μέρος του άνθους) στον ύπερο (θηλυκό μέρος του άνθους), με στόχο να γίνει η γονιμοποίηση. Κατά την επικονίαση η γύρη μεταφέρεται από τον άνεμο ή από έντομα, μεταξύ των οποίων οι μέλισσες έχουν κυρίαρχο ρόλο (Denisow & Denisow-Pietrzyk, 2016).

Οι κόκκοι της γύρης, ανάλογα με το είδος των φυτών, διαφέρουν ως προς το σχήμα, το χρώμα, το μέγεθος και το βάρος. Τα σχήματα των κόκκων μπορεί να είναι στρογγυλό, κυλινδρικό, τριγωνικό ή σε σχήμα καμπάνας. Το βάρος των κόκκων τους είναι ίσο με αρκετές δεκάδες μικρογραμμάρια. Οι κόκκοι της γύρης έχουν διάμετρο περίπου 2,5-250 μm. Το χρώμα της γύρης ποικίλλει από έντονο κίτρινο έως μαύρο. Η πλειοψηφία των γυρών αποτελείται από μεμονωμένους κόκκους οι οποίοι μερικές φορές ενώνονται με δύο ή περισσότερους κόκκους (Komosinska-Vassev et al., 2015).

Το τοίχωμα της γύρης έχει τρία διαφορετικά στρώματα. Το εξωτερικό στρώμα του τοιχώματος της γύρης αποτελείται κυρίως από ουδέτερα λιπίδια, υδρογονάνθρακες, τερπενοειδή και καροτενοειδή. Ακολουθεί το εξωτερικό τοίχωμα (exine). Το τοίχωμα αυτό αποτελείται από σποροπολενίνη και αντιστέκεται σε μεγάλο βαθμό στη φθορά και την πέψη. Το εσωτερικό τοίχωμα (intine) αποτελείται κυρίως από κυτταρίνη και πηκτίνη, αντιστέκεται επίσης στη φθορά και την πέψη και αποτελεί τον τελικό φραγμό για το πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά κυτταρόπλασμα. Το εξωτερικό τοίχωμα είναι το πιο δύσκολο στρώμα που πρέπει να αφομοιωθεί από τις μέλισσες και τα ζώα **Εικόνα 1-3**Error! Reference source not found. (Mohammad et al., 2021;Roulston & Cane, 2000).



Εικόνα 1-3 Δομή κόκκων γύρης.

(During an Excavation Assignment, Scientists Collected Pollen Grains of a Plant Preserved, n.d.)

Η γύρη των μελισσών, είναι προϊόν φυτικής προέλευσης, που ποικίλλει στη χημική της σύνθεση. Η σύνθεση της γύρης εξαρτάται από τη χλωρίδα που υπάρχει σε διάφορες κλιματικές ζώνες (Rzepecka-Stojko et al., 2015).

Μια μεμονωμένη αποικία μελισσών, μπορεί να συλλέξει 15-40 κιλά γύρη ετησίως. Οι μέλισσες προσθέτουν στην γύρη των λουλουδιών εκκρίσεις από τους σιελογόνους αδένες και νέκταρ. Το προϊόν αυτό χρησιμοποιείται στην συνέχεια από τις μέλισσες ως η κύρια πηγή πρωτεϊνών. Η μέλισσα τοποθετεί τη γύρη στο «καλαθάκι», στο τρίτο ζεύγος ποδιών της και το μεταφέρει στην κυψέλη για να αποθηκευτεί στα κελιά της κηρήθρας **Εικόνα 1-4** (Thakur & Nanda, 2020; Khalifa et al., 2020).

Η γύρη που συλλέγεται από μέλισσες περιέχει θρεπτικές ουσίες όπως υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, αμινοξέα, λιπίδια, βιταμίνες, ανόργανες ουσίες και ιχνοστοιχεία, αλλά και σημαντικές ποσότητες πολυφαινολικών ουσιών κυρίως φλαβονοειδών. Λαμβάνεται μέσω παγίδων γύρης και μετά την ξήρανση, γίνεται πρώτη ύλη για φαρμακευτική, καλλυντική ή διατροφική χρήση. Αλκοόλ, υδατικά εκχυλίσματα αλλά και συμπληρώματα διατροφής μπορούν να παρασκευαστούν επίσης από αυτή (Rzepecka-Stojko et al., 2015; Kroyer & Hegedus, 2001). Όσον αφορά τη χρήση της κατά διάφορων ασθενειών, η γύρη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία σοβαρών δερματικών παθήσεων, χρόνιων ηπατικών βλαβών, οξείας χρόνιας ηπατίτιδας, πόνου στο στομάχι και διάφορων εντερικών διαταραχών. Παρουσιάζει επίσης, αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιβακτηριακή δράση (Abdelnour et al., 2019).

Μετατροπή γύρης σε μελισσόψωμο

Στην κυψέλη, η διατροφή των μελισσών βασίζεται σε δύο κύριες πηγές φυτικής προέλευσης, το νέκταρ και τη γύρη. Το νέκταρ μεταφέρεται στην κυψέλη και μετατρέπεται σε μέλι και παρέχει στις μέλισσες μια πηγή υδατανθράκων, ενώ η γύρη από τα λουλούδια μετατρέπεται σε μελισσόψωμο που παρέχει στις μέλισσες υδατάνθρακες, πρωτεΐνη και άλλα θρεπτικά συστατικά (λιπίδια, μέταλλα και βιταμίνες) (Kieliszek et al., 2018; Didaras et al., 2020; Mohammad et al., 2021). Το μεγαλύτερο μέρος της γύρης καταναλώνεται από παραμάνες μέλισσες με στόχο την παραγωγή βασιλικού πολτού πλούσιου σε αμινοξέα (Detry et al., 2020).

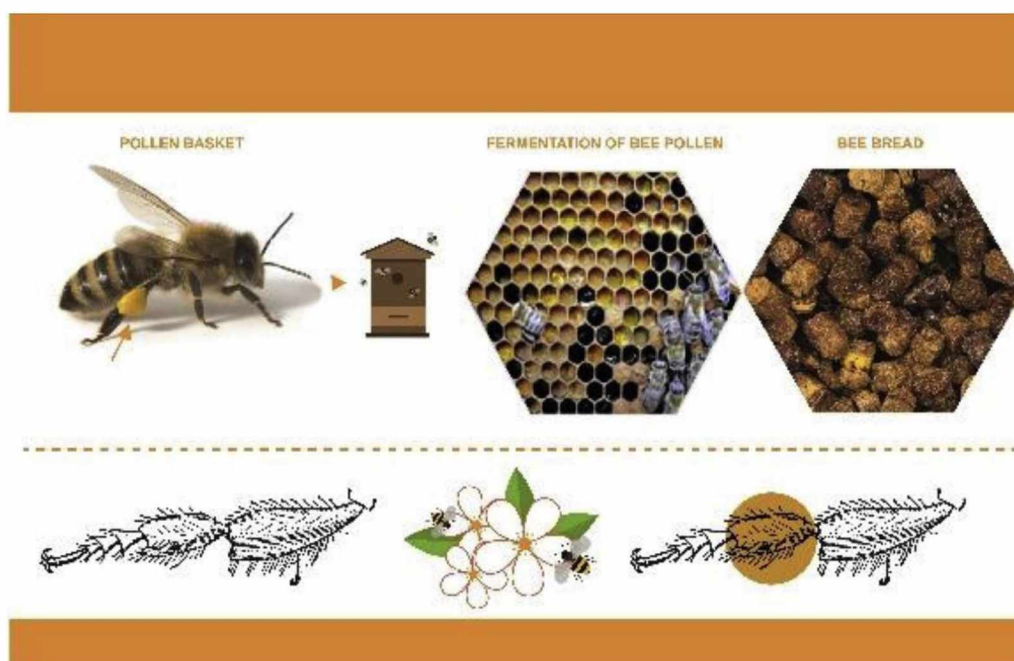
Όπως αναφέρθηκε και προηγούμενος, οι μέλισσες συλλέγουν γύρη λουλουδιών, την αναμειγνύουν με σιελογόνες εκκρίσεις και νέκταρ, με στόχο να υγρανθεί, να αποκτήσει σφαιρική μορφή και να αποθηκευτεί στην κυψέλη **Εικόνα 1-4** (Thakur & Nanda, 2020).

Η γύρη που μεταφέρουν στην κυψέλη οι μέλισσες έχει ως αποτέλεσμα ένα πολύτιμο προϊόν το «μελισσόψωμο» που δημιουργείται με την προσθήκη μελιού, πεπτικών ενζύμων και ζύμωσης γαλακτικού οξέος κατά την αποθήκευση στην κηρήθρα **Εικόνα 1-4** (Mărgăoan et al., 2020).

Η διαδικασία της γαλακτικής ζύμωσης της γύρης προκαλείται από ορισμένους μικροοργανισμούς που βρίσκονται στις κηρήθρες, υπό αναερόβιες και μικροαερόφιλες συνθήκες. Οι μικροοργανισμοί αυτοί αφορούν κυρίως βακτήρια (*Pseudomonas*, *Lactobacillus*) αλλά και ζύμες (*Saccharomyces*) (Khalifa et al., 2020).

Ο ακριβής μηχανισμός μετατροπής της συλλεγόμενης γύρης από μέλισσες σε μελισσόψωμο παραμένει μέχρι και σήμερα ασαφής. Δεν είναι ακόμα επιβεβαιωμένο ποια είναι η διαδικασία μετατροπής της γύρης σε μελισσόψωμο. Η ζύμωση πραγματοποιείται κυρίως από λακτοβάκιλλους και ζύμες. Καθώς παράγεται γαλακτικό οξύ παρατηρείται μείωση του pH, παράλληλα ορισμένοι μικροοργανισμοί πεθαίνουν και αναπτύσσονται άλλοι. Μερικές έρευνες αναφέρουν πως η διαδικασία αυτή διαρκεί περίπου επτά ημέρες και χαρακτηρίζεται από την ανάπτυξη βακτηρίων γαλακτικού οξέος, ζυμομυκήτων, βακτηρίων που παράγουν ινδόλη (*Escherichia*), και αερόβια βακτήρια. Η μετατροπή σε μελισσόψωμο στις μελέτες αυτές αναφέρεται πως περιλαμβάνει διάφορες φάσεις. Η **πρώτη φάση** διαρκεί 12 ώρες κατά τη διάρκεια της

οποίας η αναπτύσσονται διάφοροι μικροοργανισμοί συμπεριλαμβανομένων και ζυμών. Ακολουθεί η **δεύτερη φάση**, όπου αναερόβια βακτήρια γαλακτικού οξέος (*Streptococcus*) χρησιμοποιούν θρεπτικά συστατικά που παράγονται από ζυμομύκητες και μειώνουν το pH της γύρης. Στην **τρίτη φάση**, παρατηρείται απώλεια των βακτηρίων *Streptococcus* και ανάπτυξη των βακτηρίων *Lactobacillus*. Η **τέταρτη φάση**, η οποία ξεκινά στο τέλος της εβδομης ημέρας, περιλαμβάνει την απώλεια βακτηρίων γαλακτικού οξέος και ορισμένων ζυμών λόγω ορισμένων μεταβολιτών που παράγονται όπως το γαλακτικό οξύ (Khalifa et al., 2020; Mărgăoan et al., 2020). Η περιγραφή αυτή δεν είναι ακόμα πλήρως επιβεβαιωμένη.



Εικόνα 1-4 Μετατροπή γύρης σε Μελισσόψωμο.
(Khalifa et al., 2020)

Το μελισσόψωμο, λόγω της ζύμωσής που υφίσταται παρουσιάζει χρώμα καραμέλας, μια πικάντικη γεύση που δίνεται από τα εσπεριδοειδή, τα άνθη του ή άλλες γεύσεις φρούτων. Το μελισσόψωμο είναι η κύρια τροφή για το μελίσι, και ιδιαίτερα για τις προνύμφες και τις νεαρές μέλισσες που παράγουν βασιλικό πολτό (Dranca et al., 2020).

Η γύρη μελισσών και το μελισσόψωμο έχουν παρόμοια σύνθεση λόγω της κοινής προέλευσης της γύρης των φυτών. Ωστόσο παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές. Η διάσπαση του σύνθετου τοιχώματος της γύρης κατά τη ζύμωση πιθανόν να καθιστά το μελισσόψωμο πιο εύπεπτο, με αποτέλεσμα να παρουσιάζει υψηλότερο βαθμό απορρόφησης από τα ανθρώπινα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα. Επιπλέον, πραγματοποιείται διάσπαση της κυτταρίνης που υπάρχει στη γύρη μειώνοντας έτσι την

αναλογία κυτταρίνης του μελισσόψωμου σε σχέση με αυτήν της γύρης μελισσών. Παράλληλα, κατά την μετατροπή αυτή παρατηρούνται ορισμένες διαφορές στην περιεκτικότητα τους σε θρεπτικά συστατικά. Για παράδειγμα, μερικές από τις πρωτεΐνες που βρίσκονται στην γύρη μελισσών διασπώνται από ορισμένα πεπτικά ένζυμα. Έτσι παρατηρείται υψηλότερη περιεκτικότητα αμινοξέων στο μελισσόψωμο (Aylanc et al., 2021).

Χημική Σύνθεση του μελισσόψωμου

Παρόλο που έγιναν σημαντικές εξελίξεις στην μελισσοκομία τον 16ο αιώνα, η πραγματική προέλευση των μελισσοκομικών προϊόντων δεν ήταν γνωστή μέχρι πριν από μερικούς αιώνες. Η λεπτομερής χημική τους σύνθεση προσδιορίστηκε μόλις στα τέλη του 1900 (Aylanc et al., 2021).

Οι μελέτες σχετικά με τη χημική σύνθεση του μελισσόψωμου έδειξαν ότι αποτελείται από νερό, πρωτεΐνες, αμινοξέα, υδατάνθρακες, λίπη και βιταμίνες. Η θρεπτική αξία του μελισσόψωμου είναι υψηλότερη από τη γύρη των μελισσών και είναι πιο εύπεπτη λόγω της παρουσίας υψηλότερης περιεκτικότητας σε ελεύθερα αμινοξέα και εύκολα αφομοιώσιμα σάκχαρα (Kieliszek et al., 2018). Είναι δύσκολο να γενικευθούν οι διατροφικές αξίες του μελισσόψωμου, διότι διάφοροι παράγοντες όπως η βοτανική και γεωγραφική προέλευση, η κλιματική κατάσταση, ο τύπος εδάφους και οι συνθήκες αποθήκευσης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο. Συγκριτικά με άλλα προϊόντα μελισσών, οι μελέτες για το μελισσόψωμο είναι σπάνιες και περιορισμένες ειδικά όσον αφορά τη χημική τους σύνθεση (Didaras et al., 2020; Mohammad et al., 2021). Το μελισσόψωμο έχει χαρακτηριστεί ως «πλήρες φαγητό» λόγω των θρεπτικών συστατικών του (Mohammad et al., 2021).

Περιεκτικότητα σε νερό και pH

Το μελισσόψωμο έχει αποδειχθεί ότι έχει υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία, αυτό αποδίδεται στις υγροσκοπικές ιδιότητες της γύρης, η οποία προσελκύει νερό από το περιβάλλον. Το μελισσόψωμο επίσης συσσωρεύει νερό από το περιβάλλον μέσω της προσθήκης σιελогόνων εκκρίσεων και μελιού. Η αποθήκευση του στα κελιά αποτρέπει την απώλεια υγρασίας από το μελισσόψωμο. Η υψηλή περιεκτικότητα υγρασίας του μελισσόψωμου παρέχει ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη των βακτηρίων, μυκήτων και ζυμών.

Στην γύρη οι τιμές του pH κυμαίνονται από 4,9-5,9, ενώ οι τιμές του pH για το μελισσόψωμο κυμαίνονται από 3,28-4,13. Η τιμή του pH μειώνεται καθώς η περιεκτικότητα σε γαλακτικό οξύ στο μελισσόψωμο αυξάνεται, υποδηλώνοντας ζύμωση γαλακτικού οξέος από βακτήρια και ζύμες. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός παραμένει ακόμα άγνωστος (Mohammad et al., 2021).

Υδατάνθρακες

Η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες στο μελισσόψωμο κυμαίνεται από 10,85% έως 59,94%. Οι υδατάνθρακες βρίσκονται κυρίως στο μελισσόψωμο λόγω της προσθήκης νέκταρ κατά την μετατροπή της γύρης σε μελισσόψωμο. Τα κύρια σάκχαρα στο μελισσόψωμο αφορούν κυρίως τη φρουκτόζη, τη γλυκόζη, τη σακχαρόζη, τη μαννιτόλη. Σε μικρότερη ποσότητα βρέθηκαν και άλλοι ολιγοσακχαρίτες όπως η σορβιτόλη, η σελοβιόζη, η ισομαλτόζη και η μαλτόζη. Κατά την διαδικασία της μετατροπής της γύρης σε μελισσόψωμο η μέλισσα εκκρίνει από τους σιελογόνο αδένες ινβερτάση, αμυλάση και γλυκοσιδάση. Η μέλισσα μπορεί να αφομοιώσει τους πολυσακχαρίτες αυτούς χρησιμοποιώντας ένζυμα όπως α και β-αμυλάση και α-γλυκοσιδάση (Mohammad et al., 2021).

Πρωτεΐνη

Το μελισσόψωμο είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες, καθιστώντας έτσι την κύρια πηγή πρωτεΐνης για την ανάπτυξη των μελισσών. Τα επίπεδα πρωτεΐνης ποικίλλουν σε διαφορετικές γεωγραφικές τοποθεσίες και μεταξύ ειδών μελισσών (10,19-47,4%). Η συγκέντρωση πρωτεΐνης στη γύρη είναι υψηλότερη από εκείνη στο μελισσόψωμο, ενώ οι συγκέντρωση αμινοξέων είναι υψηλότερη ή σταθερή στο μελισσόψωμο. Το μελισσόψωμο παρατηρήθηκε πως περιέχει όλα τα απαραίτητα αμινοξέα που δεν μπορούν να συντεθούν από έναν οργανισμό (Mohammad et al., 2021).

Λιπίδια

Η περιεκτικότητα σε λιπίδια κυμαίνεται μεταξύ 0,46% και 14,43%. Η προσθήκη αδενικών ενζύμων μέλισσας σε φρέσκια γύρη θα μπορούσε να αλλάξει τη λιπιδική σύνθεση που είναι διαθέσιμη στη γύρη και στο μελισσόψωμο.

Το μελισσόψωμο έχει ποικίλα προφίλ λιπαρών οξέων, το οποίο παρέχει οφέλη στη διατροφή των μελισσών αλλά και στην ανθρώπινη υγεία. Τα πιο άφθονα λιπαρά οξέα στο μελισσόψωμο είναι το λινολεϊκό (ωμέγα-6) ακολουθούμενο από το α-λινολενικό (ωμέγα-3) και το παλμιτικό οξύ. Η σύνθεση λιπαρών οξέων δεν διαφέρει πολύ μεταξύ γύρης μελισσών και μελισσόψωμου (Mohammad et al., 2021).

Φαινολικές Ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις είναι δευτερογενείς φυτικοί μεταβολίτες που βρίσκονται ευρέως στα φυτά ως προστατευτικός μηχανισμός όταν αντιμετωπίζουμε βιοτικό ή αβιοτικό στρες. Περιλαμβάνουν φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, προανθοκυανιδίνες και άλλα. Η πρόσληψη τροφής που περιέχει φαινολικές ενώσεις επιδιώκει να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης χρόνιων ασθενειών λόγω των αντιοξειδωτικών και αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων του. Η γύρη μελισσών και το μελισσόψωμο έχουν παρόμοιο φαινολικό προφίλ. Η περιεκτικότητα σε φλαβονοειδή κυμαίνεται μεταξύ 0,2-2,5% (κυρίως φλαβονόλες, ρουτίνη, κατεχίνη, μυρικετίνη, λευκοτριίνες και φαινολικά οξέα) (Mohammad et al., 2021).

Βιταμίνες και Μέταλλα

Η ανάλυση της περιεκτικότητας των βιταμινών στο μελισσόψωμο είναι ελάχιστη. Οι βιταμίνες είναι μια ομάδα οργανικών ενώσεων με ποικίλους βιοχημικούς ρόλους και ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Παρόλο που οι βιταμίνες περιλαμβάνονται στη διατροφή του ανθρώπου σε πολύ μικρές ποσότητες, είναι ζωτικής σημασίας (Mohammad et al., 2021).

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η συλλεγόμενη γύρη και το μελισσόψωμο έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνες. Συγκεκριμένα περιέχουν λιποδιαλυτές βιταμίνες (A, D, E και K) και υδατοδιαλυτές βιταμίνες (σύμπλεγμα C και B), καθώς και άλλες βιταμίνες όπως η βιταμίνη P (Badolato et al., 2017).

Τα κυρίαρχα μέταλλα που βρίσκονται στο μελισσόψωμο είναι κάλιο, φώσφορο, ασβέστιο, μαγνήσιο, σίδηρο, νάτριο, ψευδάργυρο και μαγγάνιο. Έχει παρατηρηθεί ότι η περιεκτικότητα σε ασβέστιο, κάλιο, φώσφορο, μαγνήσιο και σίδηρο είναι υψηλότερη στο μελισσόψωμο από ότι στη γύρη που συλλέγεται από μέλισσες. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στον μικροβιακό μεταβολισμό που λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης της γύρης σε μελισσόψωμο (Didaras et al., 2020).

Μικροβίωμα του Μελισσόψωμου

Η χημική σύνθεση και το μικροβίωμα της γύρης που συλλέγεται από μέλισσες και του μελισσόψωμου, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη βοτανική και γεωγραφική προέλευση, το κλίμα, τον τύπο του εδάφους, την εποχή, τις καιρικές συνθήκες κατά τη συλλογή και τον τρόπο αποθήκευσης. Έχει παρατηρηθεί ότι το μεγαλύτερο μέρος της συλλεγμένης γύρης προέρχεται από λίγα είδη φυτών.

Το μικροβίωμα του μελισσόψωμου παίζει κεντρικό ρόλο στη διατροφή και την ανάπτυξη των μελισσών. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι οι μικροοργανισμοί του μελισσόψωμου διευκολύνουν την ενζυμική προ-πέψη των κόκκων γύρης, αυξάνοντας έτσι την περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά και την πεπτικότητα του (Didarag et al., 2020).

Στην έρευνα των Donkersley et al. παρατηρήθηκε ότι κάθε δείγμα μελισσόψωμου περιέχει κατά μέσο όρο 96 γένη βακτηρίων. Τα πιο συχνά ήταν *Pseudomonas* (32,4%), *Arsenophomus* (13,0%), *Lactobacillus* (8,2%), *Erwinia* (7,7%) και *Acinetobacter* (5,2%), και σε μικρότερο ποσοστό υπήρχαν *Orbus*, *Saccharibacter*, *Raoultella*, *Tatumella*, *Massilia* και *Sphingomonas*. Έχει παρατηρηθεί λοιπόν ένα μικροβίωμα παρόμοιο με αυτό του εντέρου των μελισσών. Επίσης, μέλη των *Lactobacillus*, *Enterobacter*, *Actinobacteria* έχουν βρεθεί στο νέκταρ των λουλουδιών αλλά και στην επιφάνεια των κόκκων της γύρης. Η πιο άφθονη οικογένεια που βρέθηκε στο μελισσόψωμο στην παρούσα μελέτη ήταν τα *Enterobacteriaceae*. Τα οποία σχετίζονται με ζώα και φυτά και βρίσκονται συνήθως στην επιφάνεια των κόκκων γύρης, και ορισμένα έχουν δείξει αντιβιοτική δράση. Οι *Snodgrassella alvi* και *Gilliamella apicola* είναι βασικά μέλη του μικροβιώματος του βασικού εντέρου των μελισσών και συνδράμουν στο μεταβολισμό των υδατανθράκων. Τα είδη *Orbus* (οικογένεια *Pasteurellaceae*) είναι άφθονα στο εντερικό μικροβίωμα πολλών ειδών εντόμων που τρέφονται με φρούτα και λουλούδια, έχουν επίσης ανιχνευθεί στο μικροβίωμα του εντέρου των μελισσών. Αυτοί οι οργανισμοί μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και υδατάνθρακες στο μελισσόψωμο. Τα *S. alvi* και *G. apicola* μπορεί να προστατεύουν τις μέλισσες από λοιμώξεις, αλλά αυτό το αποτέλεσμα εξαρτάται από την ηλικία του μελισσόψωμου, τη σύνθεση της βακτηριακής κοινότητας και την ικανότητα του ξενιστή (Donkersley et al., 2018).

Από τους Gilliam et al. αποδείχθηκε ότι οι *Aspergillus*, *Mucor* και *Rhizopus* που απομονώθηκαν από το μελισσόψωμο είχαν τη δυνατότητα να αναστείλουν την ανάπτυξη της ασκοσφαίρωσης (ασθένεια Chalkbrood). Επίσης οι *Lactobacillus* βρέθηκε να είναι το κυρίαρχο γένος σε δείγματα μελισσόψωμου και συμβάλουν στην ζύμωση της γύρης. Παράγουν αντιμικροβιακές ενώσεις που διατηρούν το μελισσόψωμο και το προστατεύουν από ασθένειες. Ωστόσο έχει παρατηρηθεί ότι μετά από 72 ώρες, ο πληθυσμός των βακτηρίων στο μελισσόψωμο, μειώνεται σημαντικά (Donkersley et al., 2018).

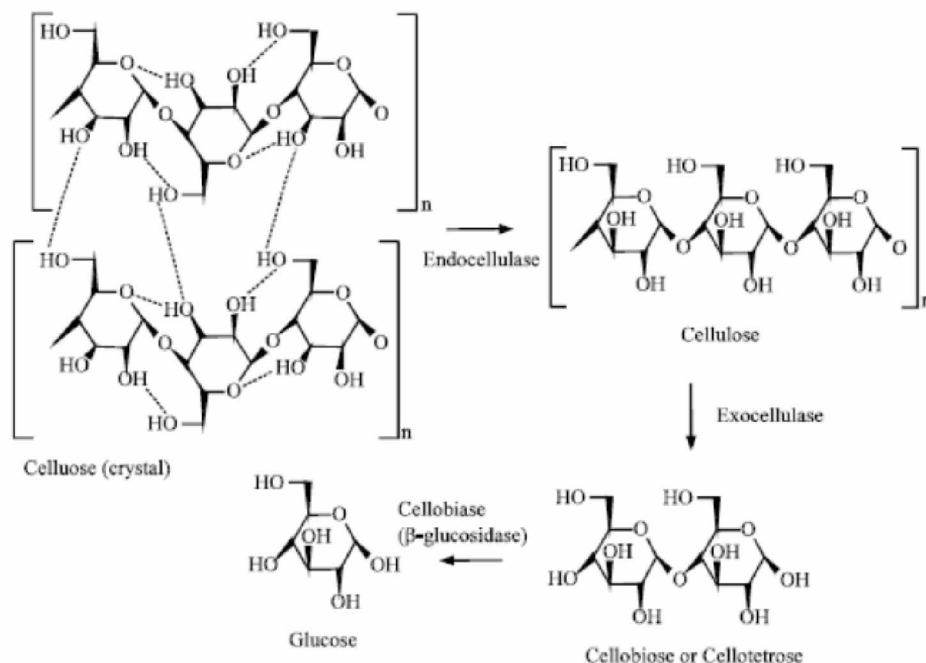
Αναμφίβολα όμως το μελισσόψωμο αποτελεί ένα προϊόν με πλούσιο μικροβίωμα και πολλές μελλοντικές προοπτικές. Πολλά ένζυμα που βρίσκονται σε αυτό δείχνει να έχουν ποικίλες βιοτεχνολογικές και όχι μόνο εφαρμογές, για αυτό σε αυτήν την εργασία θα αξιολογηθεί το ενζυμικό δυναμικό του μελισσόψωμου.

Ένζυμα

Κυτταρινάσες

Οι κυτταρινάσες (cellulases) είναι ένζυμα που διασπούν κυτταρίνη, ένα μη διακλαδισμένο πολυμερές γλυκόζης που αποτελείται από μονομερή D-γλυκοπυρανόζης ενωμένα με β-1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς **Εικόνα 1-5** (O. S. Ramos & Malcata, 2011).

Οι κυτταρινάσες παράγονται από διάφορα βακτήρια και μύκητες, τα οποία περιλαμβάνουν αερόβια είδη όπως *Pseudomonas* και *Actynomicetes*, προαιρετικά αναερόβια όπως *Bacillus* και *Cellulomonas*, και υποχρεωτικά αναερόβιων όπως *Clostridium* (Jayasekara & Ratnayake, 2019).

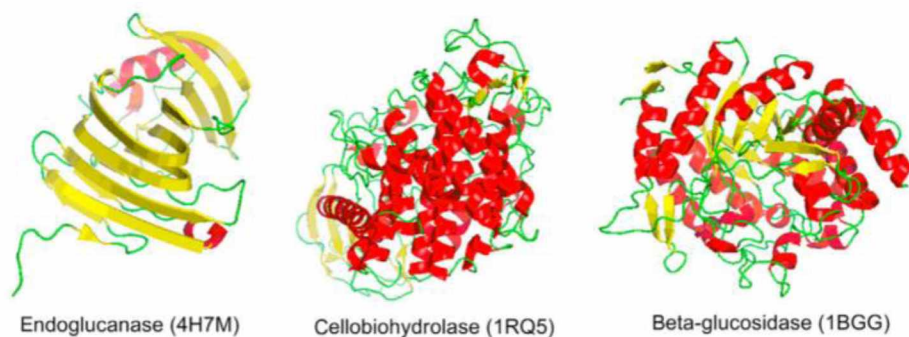


Εικόνα 1-5 Δομή κυτταρίνης και οι τρεις τύποι αντιδράσεων που καταλύονται από κυτταρινάσες. (Current Trends in Research and Application of Microbial Cellulases, n.d.)

Τρεις κύριοι τύποι ενζύμων συμμετέχουν στην υδρόλυση της κυτταρίνης, οι ενδογλυκανάσες, οι εξωγλυκανάσες και οι β-γλυκοσιδάσες **Εικόνα 1-6**. Η πλήρης υδρόλυση της κυτταρίνης πραγματοποιείται από το συνδυασμό αυτών των τριών βασικών τύπων ενζύμων (Jayasekara & Ratnayake, 2019).

Οι **ενδογλυκανάσες** (EC 3.2.1.4) υδρολύουν συνήθως άμορφες εσωτερικές περιοχές της κυτταρίνης, παράγοντας ολιγοσακχαρίτες διαφορετικών μηκών. Λόγω της δημιουργίας ολιγοσακχαριτών, αυξάνεται ο αριθμός των διαθέσιμων άκρων πάνω στα οποία μπορούν να δράσουν οι εξωγλυκανάσες. Η τυχαία υδρόλυση αυτού του ενζύμου

και η παραγωγή ολιγοσακχαριτών δημιουργεί νέα διαθέσιμα άκρα αλυσίδας, τα οποία προσβάλλονται εύκολα από άλλους τύπους ενζύμων. Οι **εξωγλυκανάσες** (EC 3.2.1.91) διασπούν τους β-1,4-γλυκοσιδικούς δεσμούς των ολιγοσακχαριτών που σχηματίζονται από την δράση των ενδογλυκανασών και σχηματίζουν μόρια γλυκόζης και σελλοβιόζης. Υπάρχουν δύο είδη εξωγλυκανασών, αυτές που δρουν είτε στο αναγωγικό (EC 3.2.1.176), είτε στο μη αναγωγικό (EC 3.2.1.91) άκρο της αλυσίδας. Οι **β-γλυκοσιδάσες** (EC 3.2.1.21) υδρολύουν περαιτέρω τη σελλοβιόζη σε γλυκόζη. Οι ενδογλυκανάσες διαφέρουν από τις εξωγλυκανάσες επειδή είναι συνήθως πολύ δραστικές έναντι κρυσταλλικών υποστρωμάτων κυτταρίνης (X. Liu & Kokare, 2017; Jayasekara & Ratnayake, 2019a; O. L. Ramos & Malcata, 2017).



*Εικόνα 1-6 Δομή ενδογλυκανάσων, εξωγλυκανάσων και β-γλυκοσιδάσων.
(Liu & Kokare, 2017)*

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι εφαρμόζεται όλο και περισσότερο η κυτταρινάση στο τομέα της βιομηχανίας. Αναλυτικότερα, χρησιμοποιείται στην κλωστοϋφαντουργία και στην παραγωγή χαρτιού. Επιπλέον, βρίσκει εφαρμογή του στην επεξεργασία των τροφίμων και των ποτών για παραγωγή κρασιού και χυμού φρούτων. Η κυτταρινάση αναγνωρίζεται επίσης ως μια αποτελεσματική εναλλακτική λύση, με στόχο την καταπολέμηση βακτηρίων ανθεκτικά στα αντιβιοτικά που αποτελεί μείζον πρόβλημα στον τομέα της υγειονομικής περίθαλψης (Jayasekara & Ratnayake, 2019).

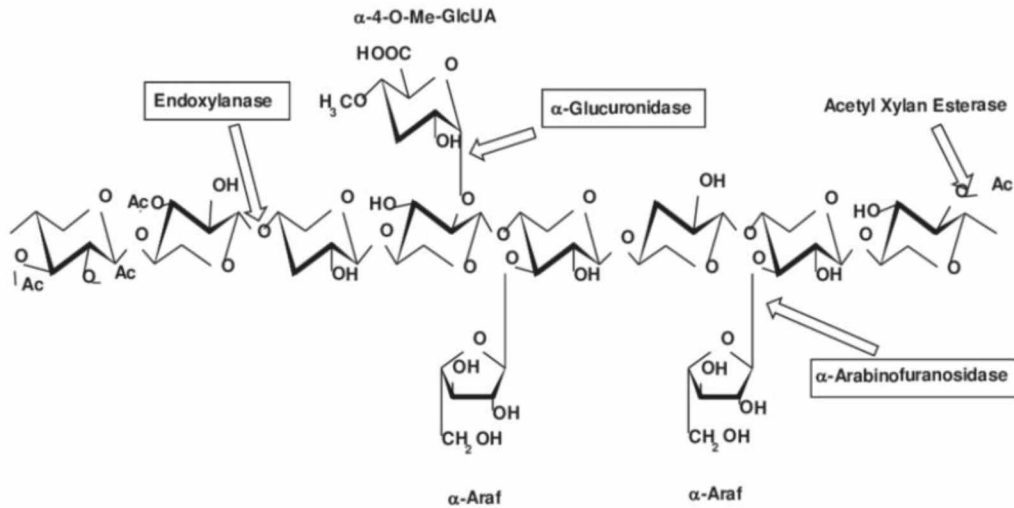
Ημικυτταρινάσες

Η ημικυτταρίνη είναι ο δεύτερος πιο άφθονος πολυσακχαρίτης και αποτελεί σημαντικό συστατικό των φυτικών κυττάρων (Kamble & Jadhav, 2012). Οι ημικυτταρίνες είναι πολυσακχαρίτες και αποτελούνται κυρίως από σάκχαρα όπως πεντόζες (D-ξυλόζη, L-αραβινόζη), εξόζες (D- και L-γαλακτόζη, D-μαννόζη) και ουρονικά οξέα (D-γλυκουρονικό οξύ και D – γαλακτουρονικό οξύ) (Collins et al., 2005). Οι

ημικυτταρινάσες είναι ένζυμα που βρίσκονται συνήθως σε μικροοργανισμούς, θαλάσσια φύκια, πρωτόζωα, σαλιγκάρια, έντομα, σπόρους, φυτά και άλλες φυσικές πηγές.

Το πιο διαδεδομένο ημικυτταρινούχο πολυμερές είναι η ξυλάνη (Xylan). Είναι γραμμικό ομοπολυμερές που περιέχει μονομερή D -ξυλόζης συνδεδεμένα με β -1, 4 - γλυκοζυλιτικούς δεσμούς. Τα μονομερή αυτά μπορεί να είναι υποκατεστημένα με διαφορετικές πλευρικές ομάδες. Οι ημικυτταρίνες λόγω της πολυπλοκότητας στη δομή τους, χρειάζονται μεγάλη ποικιλία ενζύμων για την πλήρη υδρόλυση τους. Τα ένζυμα αυτά ονομάζονται ημικυτταρινάσες και δρουν συνεργατικά **Εικόνα 1-7** (Chakdar et al., 2016).

Τα σημαντικότερα ένζυμα για την υδρόλυση των ημικυτταρινών είναι **οι β -1,4-ενδοξυλανάσες** (endo-1,4- β -xylanases, EC 3.2.1.8), διασπών τυχαία τους β -1,4-γλυκοζιτικούς δεσμούς της κύριας αλυσίδας της ξυλάνης. Με τον τρόπο αυτό η ξυλάνη αποικοδομείται σε μικρότερους ολιγοσακχαρίτες, εκ των οποίων μερικοί είναι ξυλο-ολιγοσακχαρίτες μικρού μοριακού βάρους και μονομερή ξυλόζης, ξυλοβιόζης και ξυλοτριόζης. Σημαντική είναι επίσης η δράση των **β -ξυλοζιδάσων** (xylan 1,4- β -xylosidases, EC 3.2.1.37), υδρολύουν τους παραγόμενους ξυλο-ολιγοσακχαρίτες μικρού μοριακού βάρους προς μόρια D-ξυλόζης, απελευθερώνοντας μονάδες β -D-ξυλοπυρανόζη. Η β -ξυλοζιδάση υδρολύει τα ανωτέρω προϊόντα, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο την αποτελεσματικότητα της αποικοδόμησης της ξυλάνης. Για την πλήρη αποικοδόμηση της ξυλάνης, είναι απαραίτητα και άλλα ένζυμα, τα οποία υδρολύουν τους δεσμούς μεταξύ των πλευρικών υποκαταστατών. Ορισμένα από τα ένζυμα αυτά είναι **α -L-αραβινοφουρανοσιδάση, α -D-γλυκουρονιδάση, γαλακτοσιδάση** **Εικόνα 1-7** (Subramaniyan & Prema, 2002) .



Εικόνα 1-7 Δομή της ξυλάνης και οι ημικυτταρινάσες που εμπλέκονται στην αποδόμησή της. (Motta et al., 2013)

Οι ημικυτταρινάσες είναι ένζυμα που βρίσκονται συνήθως σε μικροοργανισμούς, θαλάσσια φύκια, πρωτόζωα, σαλιγκάρια, έντομα, σπόρους, φυτά και άλλες φυσικές πηγές. Παρατηρείται μεγάλο βιομηχανικό ενδιαφέρον για τις ημικυτταρινάσες στο τομέα της λεύκανσης, στην παραγωγή χαρτιού, στην παραγωγή τροφίμων και ποτών, στη διατροφή των ζώων και στην παραγωγή βιοαιθανόλης (Basit et al., 2020).

Ένζυμα που συμμετέχουν στην αποδόμηση της Λιγνίνης

Η λιγνίνη είναι ένα άμορφο, ακανόνιστο τρισδιάστατο και εξαιρετικά διακλαδισμένο φαινολικό πολυμερές. Οι λειτουργίες της λιγνίνης στο κυτταρικό τοίχωμα του φυτού είναι να συμβάλει στην ακαμψία του φυτού, να μεταφέρουν νερό και θρεπτικά συστατικά και να προστατεύει το φυτό από παράσιτα και παθογόνα. Επιπλέον είναι αδιάλυτη στο νερό (Lu et al., 2017; Mišurcová et al., 2012).

Η λιγνίνη είναι ένας από τους σημαντικότερους δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγεται από τη μεταβολική οδό φαινυλαλανίνης/τυροσίνης στα φυτικά κύτταρα. Είναι το δεύτερο πιο άφθονο βιοπολυμερές που αντιπροσωπεύει το 30% της περιεκτικότητας σε οργανικό άνθρακα στη βιόσφαιρα. Η βιοσύνθεση της λιγνίνης είναι ένα πολύ περίπλοκο δίκτυο που χωρίζεται σε τρεις διαδικασίες: (i) βιοσύνθεση μονομερών λιγνίνης μεταφορά και (iii) πολυμερισμός (Q. Liu et al., 2018).

Το ενζυμικό σύστημα της αποδόμησης της λιγνίνης περιλαμβάνει διαφορετικές κατηγορίες ενζύμων, όπως **Λακκάσες**, **Υπεροξειδάσες Λιγνίνης (LiP)** και

Υπεροξειδάσες Μαγγανίου (MnP). Οι μύκητες που αποικοδομούν το ξύλο, όπως για παράδειγμα οι μύκητες λευκής σήψης, είναι από τους λίγους μικροοργανισμούς για τους οποίους είναι γνωστό ότι αποικοδομούν εκτενώς τη λιγνίνη (Martínez, 2002).

Λακκάσες

Οι λακκάσες (benzenediol: oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2) είναι ένζυμα τα οποία περιέχουν άτομα χαλκού στο ενεργό τους κέντρο (multicopper oxidases). Οι λακκάσες χρησιμοποιούν το μοριακό οξυγόνο για να οξειδώνουν ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων τόσο φαινολικών όσο και μη φαινολικών παράγοντας νερό ως παραπροϊόν.

Οι λακκάσες περιέχουν τέσσερα ενεργά κέντρα, όπου το κάθε ένα περιέχει ένα άτομα χαλκού οργανωμένα σε τρεις διακριτές θέσεις Error! Reference source not found.. Αναλυτικότερα, ο τύπος χαλκού 1 (T1) εμπλέκεται στην πρόσληψη και μεταφορά ηλεκτρονίων και προσδίδει το τυπικό μπλε χρώμα στην πρωτεΐνη. Ο τύπος 2 (T2) ενεργοποιεί το μοριακό οξυγόνο και ο τύπος 3 (T3) είναι υπεύθυνος για τη δέσμευση του οξυγόνου και αποτελείται από 2 ιόντα Cu^{2+} . Ο τύπος 1 (T1) και ο τύπος 3 (T3) χαρακτηρίζονται από απορρόφηση στα ~ 600 και 330 nm, αντίστοιχα (Dwivedi et al., 2011; Santhanam et al., 2011).

Υπεροξειδάσες του Μαγγανίου (MnP)

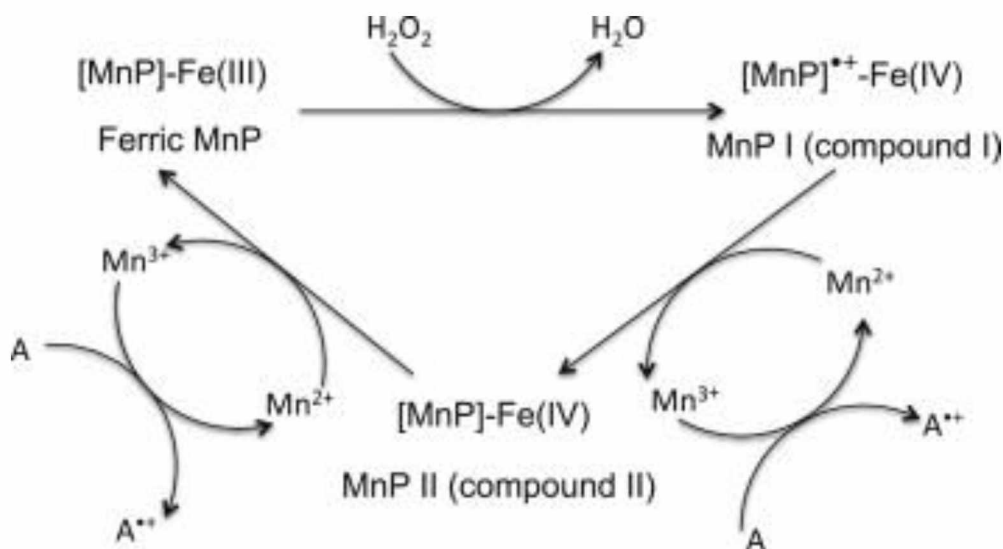
Οι Υπεροξειδάσες του Μαγγανίου (Mn(II):H₂O₂ oxidoreductases, MnP, EC 1.11.1.13) είναι ένζυμα γνωστά για την δράση τους στην αποικοδόμηση τη λιγνίνης. Είναι ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια των οξειδοαναγωγασών και βρίσκονται εξωκυτταρικά. Συγκεκριμένα τα ένζυμα αυτά είναι γλυκοπρωτεΐνες που περιέχουν αίμη και οξειδώνουν το κατιόν Mn²⁺ σε Mn³⁺, το οποίο με τη σειρά του οξειδώνει φαινολικές ενώσεις (Q. Liu et al., 2018).

Οι υπεροξειδάσες του Μαγγανίου (MnP) ανακαλύφθηκαν πρώτη φορά στο *P. Chrysosporium*. Αποδείχθηκε ότι τα ένζυμα αυτά εκκρίνονται κυρίως από βασιδιομυκητες, περιλαμβανομένων και μύκητων λευκής σήψης και μυκήτων αποδομήσεις ρύπων που βρίσκονται στο έδαφος. Οι μύκητες λευκής σήψης εκκρίνουν MnP κυρίως σε πολλαπλές μορφές. Για παράδειγμα, έχουν περιγραφεί έως και 11 διαφορετικές ισομορφές MnP στο *C. Subvermispora* (Abdel-Hamid et al., 2013).

Ο καταλυτικός κύκλος των υπεροξειδάσων του Μαγγανίου είναι παρόμοιος με άλλων υπεροξειδάσων που περιέχουν αίμη, για παράδειγμα των υπεροξειδάσων της λιγνίνης. Ωστόσο, είναι μοναδικό στη χρήση του Mn²⁺ ως δότη ηλεκτρονίων **Εικόνα 1-9**.

Ο καταλυτικός κύκλος αρχίζει με την αντίδραση του φυσικού τρισθενούς σιδήρου του ένζυμου και H₂O₂ για να σχηματίσει MnP I (Ένωση I). Ένα ιόν Mn²⁺ δίνει ένα ηλεκτρόνιο στο ενδιάμεσο προϊόν για τον σχηματισμό της Ένωση II και οξειδώνεται σε Mn³⁺. Το προϊόν Mn³⁺ έχει υψηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό και δημιουργεί σύμπλοκα με χηλικούς οργανικούς διαλύτες, επιτρέποντας την οξείδωση διαφόρων φαινολικών υποστρωμάτων, όπως απλές φαινόλες, αμίνες, βαφές, καθώς και φαινολικές δομές λιγνίνης (Abdel-Hamid et al., 2013).

Σε αντίθεση με τις υπεροξειδάσες της λιγνίνης, οι υπεροξειδάσες του μαγγανίου έχουν χαμηλότερο οξειδοαναγωγικό δυναμικό, για αυτό οξειδώνουν κυρίως φαινολικές ενώσεις. Έχει επίσης αναφερθεί ότι το MnP μπορεί να διασπάσει μη φαινολικές δομές λιγνίνης μέσω της δράσης μικρών διαμεσολαβητών, όπως οι ρίζες ή λιπιδίων.



Εικόνα 1-9 Η καταλυτική αντίδραση του MnP.

Υπεροξειδάση της Λιγνίνης (LiP)

Η υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP, , diaryl-propane oxygenase, EC 1.11.1.14), είναι μια εξωκυτταρική αιμοπρωτεΐνη, με μοριακή μάζα περίπου 40 kDa. Η υπεροξειδάση της λιγνίνης καταλύει την οξειδωτική αποικοδόμηση της λιγνίνης, εξαρτώμενη από το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Η βέλτιστη ενεργότητα για τις υπεροξειδάσες της λιγνίνης συναντάται σε χαμηλά pH, μεταξύ 2,5 και 3, ενώ το ισοηλεκτρικό σημείο εντοπίζεται μεταξύ του εύρους pI 3-5 (BRENDA, n.d.).

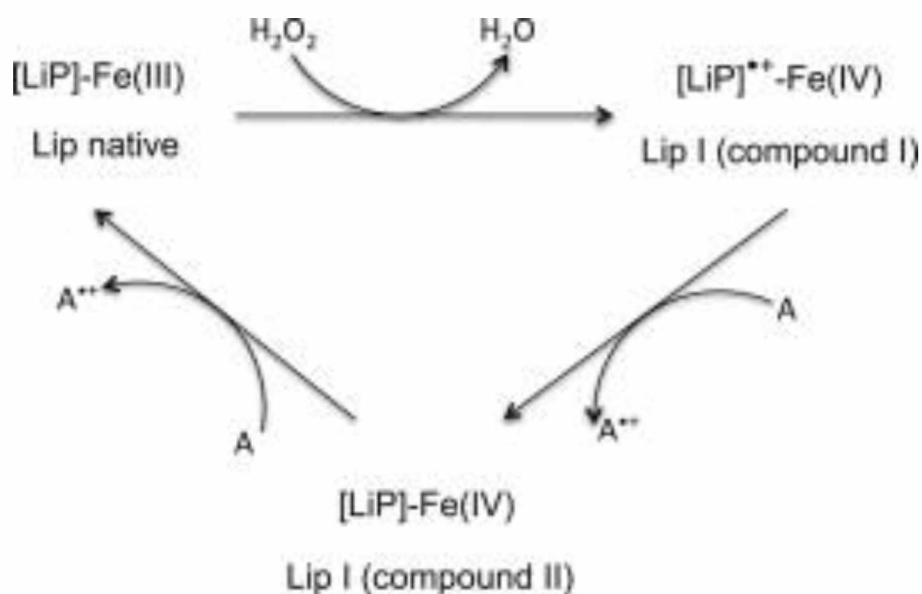
Το LiP ανακαλύφθηκε για πρώτη φορά στο εξωκυττάριο μέσο του μύκητα λευκής σήψης, *P. Chrysosporium*. Διάφορες ισομορφές LiP έχουν απομονωθεί και από άλλους οργανισμούς όπως στο *P. chrysosporium* και σε άλλους μύκητες λευκής σήψης όπως *T. Versicolor*, *Phanerochaete sordida*, *Phlebia radiata*, και *Phlebia tremellosa* (Abdel-Hamid et al., 2013).

Οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης (LiP) παρουσιάζουν έναν τυπικό καταλυτικό κύκλο υπεροξειδάσης. Ο γενικός μηχανισμός του καταλυτικού κύκλου LiP απεικονίζεται στην Εικόνα 1-10. Στην πρώτη αντίδραση οξειδωμένος σίδηρος ενώνεται με το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και σχηματίζει ένα ενδιάμεσο σύμπλοκο (Ένωση I). Στη δεύτερη αντίδραση, η ένωση I ανάγεται από ένα αναγωγικό υπόστρωμα, όπως το μη φαινολικό αρωματικό υπόστρωμα (A) και λαμβάνει ένα ηλεκτρόνιο και σχηματίζει το δεύτερο σύμπλοκο (ένωση II) (οξειδωμένη μορφή ενός ηλεκτρονίου). Στην τρίτη αντίδραση ο σίδηρος της αίμης επανέρχεται στην αρχική του

μορφή, καθώς το δεύτερο σύμπλοκο αντιδρά με το δεύτερο μόριο του υποστρώματος, ώστε να ολοκληρωθεί ο κύκλος της οξειδωσης (Abdel-Hamid et al., 2013).

Στο τρίτο βήμα, η ένωση II λαμβάνει ένα δεύτερο ηλεκτρόνιο από το μειωμένο υπόστρωμα επιστρέφοντας το ένζυμο στην φυσική κατάσταση οξειδωσης του σιδήρου για να ολοκληρώσει τον κύκλο οξειδωσης (Abdel-Hamid et al., 2013).

Δεδομένου ότι το LiP έχει υψηλότερο δυναμικό οξειδοαναγωγής από τις λακκάσες και το MnP, μπορεί να οξειδώσει τόσο τις φαινολικές όσο και τις μη φαινολικές δομές της λιγνίνης ακόμη και απουσία διαμεσολαβητών, και ως εκ τούτου φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική από τη λακκάση (Wang et al., 2018).



Εικόνα 1-10 Η καταλυτική αντίδραση του LiP.

Εφαρμογές Ενζύμων που αποδομούν την Λιγνίνη

Τα λιγνινολυτικά ένζυμα παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον για την εφαρμογή τους σε εύρος διεργασιών. Πιθανή βιομηχανική και βιοτεχνολογική εφαρμογή λιγνινολυτικών ενζύμων αποτελεί η εφαρμογή τους στην **βιομηχανία τροφίμων**. Συγκεκριμένα, εφαρμόζονται για την εξάλειψη των ανεπιθύμητων φαινολικών ενώσεων σε χυμούς φρούτων, μπύρα και κρασί. Η υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP) και η υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP) έχουν τη δυνατότητα να παράγουν φυσικές αρωματικές γεύσεις (Maciel et al., 2010).

Τα ένζυμα αυτά μπορούν να βρουν εφαρμογή και στην **βιομηχανία υφασμάτων**, πλαστικών, χαρτιού και χαρτοπολτού. Η ταχεία εξέλιξη στον βιομηχανικό τομέα,

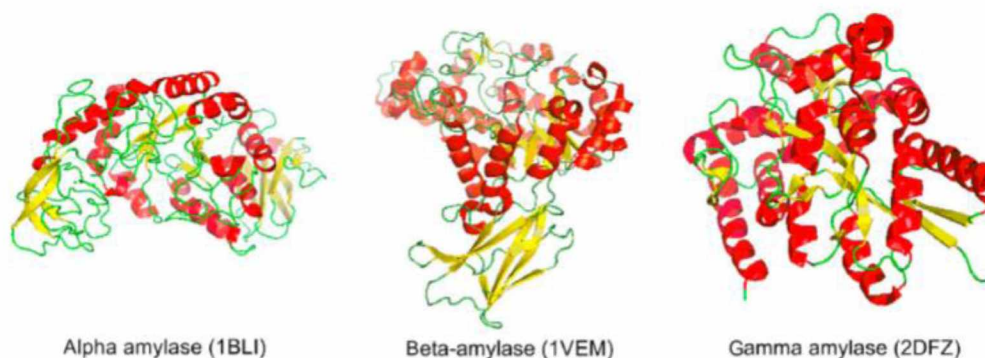
οδήγησε στην αύξηση της πολυπλοκότητας των εργοστασιακών αποβλήτων, τα οποία είναι δύσκολο να επεξεργαστούν. Τα απόβλητα αυτά είναι εξαιρετικά δύσκολο να επεξεργαστούν αποτελεσματικά, καθώς αποτελούνται από σύνθετες ουσίες. Οι λακκάσες, οι υπεροξειδάσες λιγνίνης (LiP) και μαγγανίου (MnP) μπορούν να αποτελέσουν μέρος της βιοεξυγίανσης τέτοιων αποβλήτων και ρυπών. Τα λιγνολυτικά ένζυμα μπορούν να μετατρέψουν μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, σε λιγότερο τοξικά παράγωγα. Συγκεκριμένα, οι λακκάσες αποπολυμερίζουν τη λιγνίνη και ομογενοποιούν πολύ χαρτιού χωρίς την προσθήκη χλωρίου στη διαδικασία της βιολογικής πολτοποίησης. Οι υπεροξειδάσες της λιγνίνης (LiP) και η υπεροξειδάσες του μαγγανίου (MnP) παρατηρήθηκε πως συμβάλουν στον αποχρωματισμό διάφορων συνθετικών χρωμάτων και στον αποχρωματισμό των εκροών των εργοστασίων. Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAH), που προέρχονται από κοιτάσματα φυσικού πετρελαίου και τη χρήση ορυκτών καυσίμων, διασπώνται επίσης από λακκάσες. Πολλοί PAH έχουν χαρακτηριστεί από κυτταροτοξικές, μεταλλαξιγόνες και καρκινογόνες ιδιότητες, που αποτελούν σοβαρό κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Παράλληλα, τα λιγνολυτικά ένζυμα παρουσιάζουν αποτελεσματική δράση στην αποικοδόμηση ενώσεων όπως διχλωροδιφαινυλοτριχλωροαιθάνιο (1,1,1-trichloro-2,2-bis-(4-chlorophenyl) ethane, DDT) και 2,4,6-τρινιτροτολουόλιο (2,4,6-trinitrotoluene, TNT)(Yadav & Yadav, 2015; Maciel et al., 2010).

Αμυλάσες

Οι αμυλάσες είναι μια κατηγορία ενζύμων που καταλύουν την υδρόλυση του αμύλου σε σάκχαρα όπως γλυκόζη και μαλτόζη. Διαχωρίζονται σε τρεις υποκατηγορίες, α-β-γ-αμυλάση ανάλογα με τον τύπο του δεσμού που μπορούν να διασπάσουν **Εικόνα 1-**. Η α-αμυλάση μπορεί να βρεθεί σε ανθρώπους, ζώα, φυτά και μικροοργανισμούς. Η β-αμυλάση βρίσκεται στα μικροοργανισμούς και τα φυτά. Η γ-αμυλάση βρίσκεται σε ζώα και φυτά (Azzopardi et al., 2016).

Οι **α-αμυλάσες** (EC 3.2.1.1) καταλύουν την υδρόλυση των εσωτερικών α-1,4 - γλυκοζιτικών δεσμών σε τυχαίες θέσεις. Οι περισσότερες οι α-αμυλάσες είναι μεταλλοένζυμα και η δραστηρότητά τους εξαρτάται από ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}). Οι α-αμυλάσες δεν διασπών α-1,6 γλυκοζιτικούς δεσμούς (Zhang et al., 2017). Οι **β-αμυλάσες** (EC 3.2.1.2) είναι εξωυδρολάσες που υδρολύουν τους α-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς της αμυλόζης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αφαιρούνται μόρια μαλτόζης από

το μη αναγωγικό άκρο. Οι β-αμυλάσες αδυνατούν να διασπάσουν διακλαδισμένους δεσμούς που υπάρχουν στους διακλαδισμένους πολυσακχαρίτες, όπως το γλυκογόνο. Οι **γ-αμυλάσες** (EC 3.2.1.3) διασπούν τους τελευταίους α-1,4-γλυκοζιδικής δεσμούς στο μη αναγωγικό άκρο της αμυλάσης και της αμυλοπηκτίνης για να δώσουν γλυκόζη. Επίσης, διασπούν τους α-1-6-γλυκοσιδικούς δεσμούς. Σε σύγκριση με τις α και β-αμυλάσες, η γ-αμυλάσες είναι πιο αποτελεσματικές σε όξινα περιβάλλοντα (βέλτιστο pH 3)(X. Liu & Kokare, 2017).



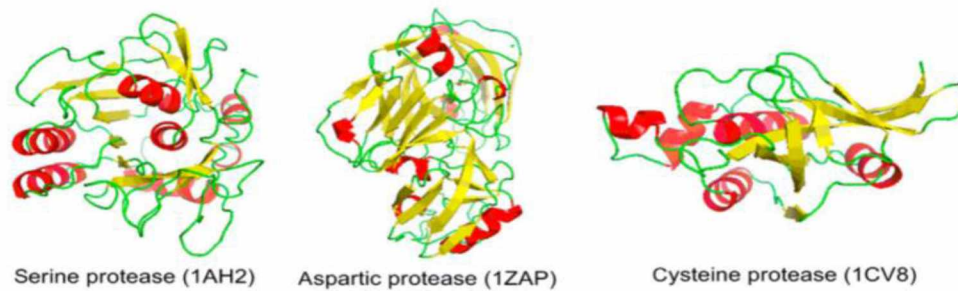
*Εικόνα 1-11 Δομή της α-β-γ αμυλάσης.
(Liu & Kokare, 2017)*

Οι αμυλάσες έχουν δυνητική εφαρμογή σε μεγάλο αριθμό βιομηχανικών διαδικασιών, όπως βιομηχανίες τροφίμων, ζύμωσης, κλωστοϋφαντουργίας, χαρτιού, απορρυπαντικών και φαρμάκων(de Souza & de Oliveira Magalhães, 2010).

Πρωτεΐνάσες

Οι πρωτεΐνάσες (EC 3: 4) είναι γνωστές και ως πεπτιδάσες ή πρωτεάσες, αποτελούν μια πολύ μεγάλη και πολύπλοκη ομάδα ενζύμων που καταλύουν την υδρόλυση ομοιοπολικών πεπτιδικών δεσμών. Οι πρωτεάσες μπορούν να ταξινομηθούν με βάση το pH, την εξειδίκευση του υποστρώματος, την ομοιότητα με καλά χαρακτηρισμένα ένζυμα και το ενεργό κέντρο.

Με βάση το βέλτιστο **pH**, αναφέρονται ως όξινες, ουδέτερες ή αλκαλικές πρωτεΐνάσες. Επιπλέον με βάση τον τόπο δράσης τους σε πρωτεϊνικά **υποστρώματα**, οι πρωτεάσες ταξινομούνται ευρέως ως ενδο- ή εξωένζυμα. Κατηγοριοποιούνται περαιτέρω ως πρωτεάσες σερίνης, ασπαρτικές πρωτεάσες, πρωτεάσες κυστεΐνης ή πρωτεάσες μετάλλων ανάλογα με το **ενεργό τους κέντρο** **Εικόνα 1**. Οι πρωτεΐνάσες αλκαλικής σερίνης είναι η πιο διαδεδομένη ομάδα πρωτεΐνασών που παράγονται από βακτήρια, μύκητες, ζυμομύκητες και ακτινομύκητες (X. Liu & Kokare, 2017).



Εικόνα 1-12 Δομή πρωτεϊνών που ταξινομούνται με βάση το ενεργό κέντρο.
(Liu & Kokare, 2017)

Μελλοντικές προοπτικές του μελισσόψωμου

Αναμφίβολα τα προϊόντα της μέλισσας, κυρίως το μελισσόψωμο είναι πολλά υποσχόμενα για μελλοντική χρήση σε διάφορους τομείς. Παρόλα αυτά είναι σημαντικό να γνωρίζουμε ότι τα χαρακτηριστικά του μελισσόψωμου είναι μεταβλητά. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διαφορές στη χημική σύνθεση και στο μικροβίωμα του που σχετίζεται άμεσα με τη βοτανική προέλευση της γύρης. Σήμερα, οι καταναλωτές ενδιαφέρονται ολοένα και περισσότερο για φυσικά προϊόντα και τροφές υψηλής διατροφικής αξίας. Δεν υπάρχει καμία αμφιβολία ότι το μελισσόψωμο ανήκει σε αυτές. Το μελισσόψωμο είναι πλούσιο σε υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπίδια, μέταλλα, βιταμίνες, φαινολικές ενώσεις και απαραίτητα αμινοξέα για αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα διατροφής. Πολλές μελέτες παρουσιάζουν το μελισσόψωμο πιο εύπεπτο από την γύρη, λόγω πολλών ενζύμων που βρίσκονται σε αυτό, έτσι απορροφώνται σε μεγαλύτερο βαθμό τα θρεπτικά συστατικά που περιέχει. Το μελισσόψωμο μπορεί να συνδράμει θετικά στην παρασκευή νέων προϊόντων. Έχουν ήδη πραγματοποιηθεί μελέτες για την ζύμωση γιαουρτιού με μελισσόψωμο. Η έρευνα αυτή χρήζει επιπλέον μελέτη για την παραγωγή προϊόντος στις βέλτιστες συνθήκες (pH, γεύση, οσμή, υφή) και για τα μελλοντικά οφέλη που θα προσφέρει το μελισσόψωμο στο προϊόν (Bayram et al., 2021; Didaras et al., 2020c; Mărgăoan et al., 2020; Mohammad et al., 2021).

Μια άλλη σημαντική ερευνητική κατεύθυνση θα πρέπει να επικεντρωθεί στις επιδράσεις του μελισσόψωμου στο εντερικό μικροβίωμα του ανθρώπου, αλλά και να διεξαχθούν λεπτομερείς μελέτες σχετικά με την αφομοίωση των συστατικών του (Mohammad et al., 2021).

Αν και το μικροβίωμα του μελισσόψωμου χρήζει επιπλέον έρευνα, έχει ήδη αποδειχθεί ότι το μελισσόψωμο περιέχει συστατικά ωφέλιμα για την υγεία. Είναι προφανές ότι το

μελισσόψωμο διαθέτη μια πολλά υποσχόμενη αντιμικροβιακή δράση συνήθως υψηλότερη έναντι των Gram-θετικών σε σύγκριση με των Gram-αρνητικών βακτηρίων. Περαιτέρω έρευνα για την αντιμικροβιακή δράση των βακτηρίων που υπάρχουν στο μελισσόψωμο θα οδηγήσει σε φαρμακευτικές εφαρμογές. Μελλοντικό στόχο μπορεί να αποτελέσει η εφαρμογή μικροοργανισμών που βρίσκονται στο μελισσόψωμο για την καταπολέμηση βακτηρίων ανθεκτικά στα αντιβιοτικά. Το μελισσόψωμο έχει παρατηρηθεί ότι περιέχει αντιοξειδωτικές ενώσεις όπως φαινολικές ενώσεις και βιταμίνη C, μελλοντικά θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνηθεί η ικανότητά του να απομακρύνει τις ελεύθερες ρίζες. Το μελισσόψωμο μπορεί να έχει μελλοντικές εφαρμογές στον τομέα της υγείας, καθώς έχει αναφερθεί ότι παρουσιάζει αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιβακτηριακές, αντιγηραντικές και, κατά της αθηροσκλήρωσης, ιδιότητες και μπορεί μελλοντικά να δράσει ως ηπατοπροστατευτικό (Kieliszek et al., 2018). Παράλληλα γίνεται έρευνα για την συμβολή του στην μείωση της παχυσαρκίας, των επίπεδων της ολικής χοληστερόλης (TC) και της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL)(Mohammad et al., 2021).

Μελλοντική έρευνα πρέπει να διερευνήσει περαιτέρω το μικροβίωμα του μελισσόψωμου όχι μόνο ως πηγή αντιμικροβιακών και άλλων φαρμακευτικών εφαρμογών, αλλά από βιοτεχνολογική σκοπιά. Τα ένζυμα που παρατηρούνται στο μικροβίωμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά τόσο στην κλωστοϋφαντουργία και στην παραγωγή χαρτιού, όσο στην απορρύπανση και στην βιοεξυγίανση που αποτελούν ένα μείζον θέμα της εποχής (de Souza & de Oliveira Magalhães, 2010; Jayasekara & Ratnayake, 2019).

Σκοπό της εργασίας

Η παρούσα πτυχιακή εργασία στοχεύει στην διερεύνηση του βιοσυνθετικού δυναμικού βακτηρίων που απομονώθηκαν από μελισσόψωμο Πηλίου και Ρεθύμνου. Για να επιτευχθεί αυτό πραγματοποιήθηκε τόσο φαινοτυπική ενζυμική ανάλυση, όσο και μοριακή. Η ενζυμική ανίχνευση βασίστηκε σε κλασικές τεχνικές καλλιέργειας βακτηρίων σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα. Οι μοριακές τεχνικές αφορούσαν την ανίχνευση γονιδίων με χρήση PCR και ταυτοποίηση με 16s rRNA. Απαραίτητη ήταν και η χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής.

Τα απαραίτητα πειράματα για τη διεξαγωγή της εργασίας έλαβαν χώρα στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Πειραματικό Μέρος

Υλικά και Μέθοδοι

Κατά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα υλικά και εργαστηριακά μηχανήματα:

Υλικά

- Τρυβλία Petri (100 mm)
- Πιπέτες των 2-20μl, 20-200μl και 100-1000μl
- Tips
- Eppendorfs (1,5 ml)
- Falcon 50ml
- Γυάλινη πιπέτα Pasteur
- Λύχνος Bunsen
- Εύλινοι Στυλεοί
- Πουαρ

Εργαστηριακά μηχανήματα και εξοπλισμός

- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας
- Υδατόλουτρο
- Κλίβανος επώασης με ανάδευση
- Απλός κλίβανος επώασης
- Αναδευτήρας Vortex

- Μηχάνημα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης PCR

Παρασκευή Στερεών Θρεπτικών Υλικών

Αρχικά ζυγίστηκε το θρεπτικό μέσο που ήταν σε μορφή σκόνης στον ηλεκτρονική ζυγαριά ακρίβειας και διαλύθηκε σε απεσταγμένο νερό με βάση τις αναλογίες που αναγράφονται στην συσκευασία. Έγινε αποστείρωση αυτού μέσα σε αυτόκαυστο για 20 λεπτά. Όταν έφτασε σε θερμοκρασία περίπου 50°C μοιράστηκε η ποσότητα του θρεπτικού σε τρυβλία petri υπό ασηπτικές συνθήκες. Η διαδικασία παρασκευής είναι ίδια για όλα τα θρεπτικά μέσα και τροποποιούνται οι αναλογίες με βάση τις οδηγίες που αναγράφονται στην συσκευασία.

Δείγματα Μελισσόψωμου- Εξαγωγή-προετοιμασία- Απομόνωση αποικιών

Για την διεξαγωγή της εργαστηριακής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα μελισσόψωμου, που προέρχονται από την περιοχή του Πηλίου (δείγμα 22-5) και του Ρεθύμνου (δείγμα 28).

Το δείγμα του Πηλίου (22-5) είναι Φθινοπωρινό δείγμα του 2020 (18/10/20-21/11/20). Οι ανθοφορίες της εποχής ήταν: Φθινοπωρινό ερείκι, κουμαριά, ακονιζά. Στις 18/10/20 τοποθετήθηκε κενή πλαισιοκηρήθρα εντός της κυψέλης ώστε να είναι γνωστή η ημέρα που οι μέλισσες ξεκίνησαν να βάζουν σε αυτό γύρη. Η ηλικία του μελισσόψωμου είναι 34 ημερών και η πλαισιοκηρήθρα επιπλέον είχε απομονωθεί από τις μέλισσες εντός της κυψέλης για 21 ημέρες ώστε αυτό το διάστημα να μην μπορούν να προσθέσουν καινούργια γύρη **Εικόνα 2-1**.

Το δείγμα του Ρεθύμνου (δείγμα 28) είναι ανοιξιάτικο του 2021. Το πλαίσιο ήταν πλήρες και η εξαγωγή του μελισσόψωμου έγινε στο εργαστήριο σε άσηπτες συνθήκες. Συλλέχθηκαν 10g μελισσόψωμου με την χρήση αποστειρωμένου πλαστικού σωλήνα και στη συνέχεια κάθε δείγμα απομακρύνθηκε από τον σωλήνα χρησιμοποιώντας έμβολο. Τα δείγματα του μελισσόψωμου μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένο σωλήνα Falcon των 50 ml και προστέθηκε αποστειρωμένος φυσιολογικός ορός μέχρι τελικού όγκου 50 ml.

Σε κάθε δείγμα δόθηκε ένας μοναδικός αριθμός αναφοράς και λεπτομέρειες σχετικά με τη γεωγραφική θέση και καταγράφηκε επίσης η ημερομηνία συγκομιδής.

Κωδικός δείγματος	Αριθμός βακτηρίων που απομονώθηκαν	Γεωγραφική Προέλευση	Περιγραφή
BB28	38	Ρέθυμνο	Ανοιξιάτικο (2021)
BB22-5	65	Πήλιο	Φθινοπωρινό (2020)

Πίνακας 2-1 Χαρακτηριστικά δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

Ακολούθησαν 3 διαδοχικές αραιώσεις:

- 10^{-1} (1ml δείγματος και 9g αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού)
- 10^{-2} (1ml από την αραιώση 10^{-1} και 9g αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού)
- 10^{-3} (1ml από την αραιώση 10^{-2} και 9g αποστειρωμένου φυσιολογικού ορού)

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε επίστρωση των αραιώσεων αυτών σε 4 διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα.

- Plate Count Agar (PCA) της εταιρίας Neogen
- MacConkey Agar (MC)
- MRS Agar
- *Bacillus cereus* Agar

Τα επιστρωμένα τρυβλία τοποθετήθηκαν ανεστραμμένα στο θάλαμο επώασης σε θερμοκρασία 30 και 37°C για πέντε ημέρες. Τα τρυβλία με MRS Agar επώαστηκαν για δέκα ημέρες στους 37°C σε αναερόβιες συνθήκες (με τη χρήση δείκτη ρεζαζουρίνης) και επιπλέον 5 ημέρες σε αερόβιες. Ανά δύο ημέρες άλλαζε το υλικό δημιουργίας αναερόβιων συνθηκών. Τα τρυβλία διατηρήθηκαν σε συνθήκες περιβάλλοντος στη συνέχεια για να συλλεχθούν αποικίες βακτηρίων που τυχόν αναπτύσσονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες.

Ακολούθησε η λήψη αποικιών και η δημιουργία καθαρών αποικιών με τη μέθοδο επίστρωσης σε γραμμές σε τρυβλία που περιείχαν PCA με χρήση αποστειρωμένων ξύλινων στυλεών. Με την μέθοδο αυτή πραγματοποιείται διασπορά και απομόνωση αποικιών από μια καλλιέργεια μικροοργανισμών. Έτσι έχουμε διακριτή απομόνωση

αποικιών, όπου κάθε αποικία έχει προέλθει από ένα και μόνο κύτταρο μικροοργανισμού. Τα επιστρωμένα τρυβλία τοποθετήθηκαν ανεστραμμένα στο θάλαμο επώασης σε θερμοκρασία 37°C έως ότου παρατηρηθεί ικανοποιητική ανάπτυξη.

Αφού πραγματοποιήθηκε η διακριτή απομόνωση των αποικιών των βακτηρίων από τα δύο δείγματα μελισσόψωμου έγινε έλεγχος της ενζυμικής τους δραστηριότητας.

Έλεγχος για Ενζυμική Φαινοτύπηση

A. Έλεγχος για ημικυτταρινάσες Προετοιμασία καλλιέργειας

Παρασκευή θρεπτικού μέσου για την ανίχνευσή του ενζύμου:

- PCA + 0,02% Magazyme AZCL-XYLAN

Το κάθε τρυβλίο χωρίστηκε σε 8 μέρη και έγινε ενοφθαλμισμός των βακτηρίων με την χρήση ξύλινου αποστειρωμένου στυλεού και λύχνου Bunsen. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν ανεστραμμένα στο θάλαμο επώασης σε θερμοκρασία 37°C για 5 μέρες. Το Megazyme AZCL-XYLAN περιέχει ημικυτταρίνη συνδεδεμένη με μία χρωστική, η οποία όταν παράγονται ημικυτταρινάσες διασπάται και δίνει μία μπλε ζώνη.

B. Έλεγχος για κυτταρινάσες Προετοιμασία καλλιέργειας

Παρασκευή θρεπτικού μέσου για την ανίχνευσή του ενζύμου:

- PCA + 0,02% Magazyme AZCL-HE-CELLULOSE

Τα τρυβλία χωρίστηκαν σε 8 μέρη και έγινε επίστρωση των βακτηρίων με την χρήση ξύλινου αποστειρωμένου στυλεού και λύχνου Bunsen. Τα επιστρωμένα τρυβλία τοποθετήθηκαν ανεστραμμένα στο θάλαμο επώασης σε θερμοκρασία 37°C για 5 μέρες. Το Megazyme AZCL-HE-CELLULOSE περιέχει κυτταρίνη συνδεδεμένη με μία χρωστική που δίνει χαρακτηριστική μπλε ζώνη όταν παράγονται κυτταρινάσες.

C. Έλεγχος για ένζυμα που διασπούν χρωστικές Προετοιμασία καλλιέργειας

Παρασκευή θρεπτικού μέσου για την ανίχνευση του ενζύμου:

- PCA + 0,02% COOMASSIE BRILLIANT BLUE G
- PCA + 10% MIKROSKOPIE MALACHITE GREEN

Με την έκκριση διαφόρων ενζύμων από τα βακτήρια, διασπάται η χρωστική γύρω από την αποικία και η περιοχή γίνεται διαυγής.

- PCA + 0,02% 2-Methoxyphenol, 98+ % C₇H₈O₂

Εάν το βακτήριο παράγει οξειδωαναγωγικά ένζυμα, η αποικία γίνεται καφέ.

Το κάθε τρυβλίο χωρίστηκε σε 8 μέρη και έγινε ενοφθαλμισμός των βακτηρίων με την χρήση ξύλινου αποστειρωμένου στυλεού και λύχνου Bunsen. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν ανεστραμμένα στο θάλαμο επώασης σε θερμοκρασία 37°C για 5-7 μέρες.

D. Έλεγχος για αμυλάσες Προετοιμασία καλλιέργειας

Παρασκευή θρεπτικού μέσου για την ανίχνευση του ενζύμου:

- PCA + 1% άμυλο (corn flour)

Το κάθε τρυβλίο χωρίστηκε σε 8 μέρη και έγινε ενοφθαλμισμός των βακτηρίων με την χρήση ξύλινου αποστειρωμένου στυλεού και λύχνου Bunsen. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν ανεστραμμένα στο θάλαμο επώασης σε θερμοκρασία 37°C για 24-48ώρες. Μετά την ανάπτυξη των βακτηρίων, προστέθηκε ποσότητα ιωδίου για την επιβεβαίωση και οπτικοποίηση της διάσπασης του αμύλου με τη δημιουργία διαυγούς φωτοδιαπερατής ζώνης περιμετρικά της αποικίας.

Ε. Έλεγχος για πρωτεΐνάσες

Προετοιμασία καλλιέργειας

Παρασκευή θρεπτικού μέσου για την ανίχνευσή του ενζύμου:

- PCA + 2% γάλα (αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη στιγμιαίας διάλυσης)

Το κάθε τρυβλίο χωρίστηκε σε 8 μέρη και έγινε ενοφθαλμισμός των βακτηρίων με την χρήση ξύλινου αποστειρωμένου στυλεού και λύχνου Bunsen. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν ανεστραμμένα στο θάλαμο επώασης σε θερμοκρασία 37°C για 24-48 ώρες. Μετά την ανάπτυξη των βακτηρίων διαπιστώθηκε η ύπαρξη πρωτεΐνάσης με τη δημιουργία διαυγούς ζώνης περιμετρικά της αποικίας λόγω διάσπασης της καζεΐνης.

Διατήρηση σε γλυκερόλη

Όσα βακτήρια απομονώθηκαν από τα δύο αρχικά δείγματα του μελισσόψωμου αποθηκεύτηκαν στους -80°C, ώστε να είναι δυνατή η ανακαλλιέργειά τους, όποτε αυτό ήταν αναγκαίο.

Για την δημιουργία του στοκ γλυκερόλης παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα θρεπτικά μέσα:

- Nutrient Broth με 0,5% Yeast Extract και 0,5% γλυκόζη
- Nutrient Broth με 50% γλυκερόλη

Το θρεπτικό μέσο αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο για 20 λεπτά.

Σε αποστειρωμένα erpendorfs 1,5ml προστέθηκαν 700μL του θρεπτικού μέσου (Nutrient Broth με 0,5% Yeast Extract και 0,5% γλυκόζη) και ενοφθαλμίστηκε σε αυτά υλικό από τις πρόσφατα αναπτυγμένες αποικίες των βακτηρίων. Ακολούθησε, επώαση για 24-48 ώρες στους 37°C, με στόχο την ανάπτυξη των βακτηρίων. Στην συνέχεια προστέθηκαν 700μL από το θρεπτικό μέσο που περιέχει 50% γλυκερόλη. Πραγματοποιήθηκε ανάδευση και τα erpendorfs παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 1 τουλάχιστον ώρα, στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

Μοριακή Ανίχνευση Γονιδίων

Πραγματοποιήθηκε μοριακή ταυτοποίηση σε ορισμένα από τα βακτήρια που είχαν θετικά αποτελέσματα στην ενζυμική φαινοτύπηση. Η ταυτοποίηση των βακτηρίων που απομονώθηκαν από το μελισσόψωμο πραγματοποιήθηκε με τις ακόλουθες διαδικασίες.

1. Εξαγωγή DNA από μικροβιακή αποικία

Επιλογή δειγμάτων από κάθε κατηγορία ενζύμων

Κατηγορία Ενζύμου	Αριθμός Δειγμάτων
Ημικυτταρινάσες	32β 69 70 71 72 74 75 77 82 87 90 91 92 93 94 95 96 98 99 107 108 115 128 130 140 154 504 505 541
Κυτταρινάσες	74 85 93 99 108 115 128 130 140
Λακκάσες	12 39 69 70 71 77 82 90 91 97 94 120 140 128 130 505

Πίνακας 2-2 Επιλογή δειγμάτων.

Το extraction DNA των βακτηρίων έγινε σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο.

Σε tube των 2ml προστέθηκαν 20μL Lysis Buffer (0,25% W/V SDS, 0,05M NaOH). Στην συνέχεια τοποθετήθηκε μια μικρή ποσότητα από τη βακτηριακή αποικία με την χρήση ξύλινου αποστειρωμένου στυλεού. Ακολούθησε επώαση για 15 λεπτά στους 95°C και μετά προστέθηκαν 180μL αποστειρωμένου καθαρού νερού. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C.

2. Ενίσχυση γονιδιακών περιοχών με τη χρήση PCR χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα ζεύγη εκκινητών και συνθηκών ανά είδος ενζύμου.

A. Ημικυτταρινάσες

Πραγματοποιήθηκε TouchDown PCR για την ενίσχυση του γονιδίου Endo-xylanase των βακτηρίων, μήκους 336bp χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές GH11F με αλληλουχία 5'-TAYMTGDSNSTBTAYGGBTGG-3' και GH11R με αλληλουχία 5'-TRCCVCTVCTYTKRTAVCCYTC-3' (Sheng et al., 2015). Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 50 μL.

Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον **Πίνακα 2-3** και οι συνθήκες αναγράφονται στον **Πίνακα 2-4**.

	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση
dNTPs	10mM	1mM
Buffer A	10X	1X
MgCl ₂	25mM	0,5mM
GH11R	10pmol/μl	25pmol
GH11F	10pmol/μl	25pmol
ddH ₂ O		
Fast Gene Taq	5U/μl	1,5 U
DNA		

Πίνακας 2-3 Οι αρχικές και οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR.

Θερμοκρασίες	χρόνος	
95°C	3min	} 30 κύκλοι
95°C	30sec	
60°C-0,5 °c/cyc	30sec	
72°C	30sec	
95°C	30sec	} 25 κύκλοι
48°C	30sec	
72°C	30sec	
72°C	10min	
4°C	∞	

Πίνακας 2-4 Θερμοκρασίες αντίδρασης touchdown PCR.

B. Κοτταρινάσες

Πραγματοποιήθηκε TouchDown PCR για την ενίσχυση του γονιδίου β-1,4 Endoglucanase των βακτηρίων, μήκους 377-413bp χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές GH45R με αλληλουχία 5'-AAGRYICCNNAVICCNCCICCNCGG-3' και GH45F με αλληλουχία 5'-ACCMGITAYTAYTGGGAYTGTYTG-3' (Sheng et al., 2015). Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 50μl.

Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον **Πίνακα 2-5** και οι συνθήκες αναγράφονται στον **Πίνακα 2-6**.

	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση
dNTPs	10mM	1mM
Buffer A	10X	1X
MgCl ₂	25mM	0,5mM
GH45R	10pmol/μl	25pmol
GH45F	10pmol/μl	25pmol
ddH ₂ O		
Fast Gene Taq	5U/μl	1,5 U
DNA		

Πίνακας 2-5 Οι αρχικές και οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR.

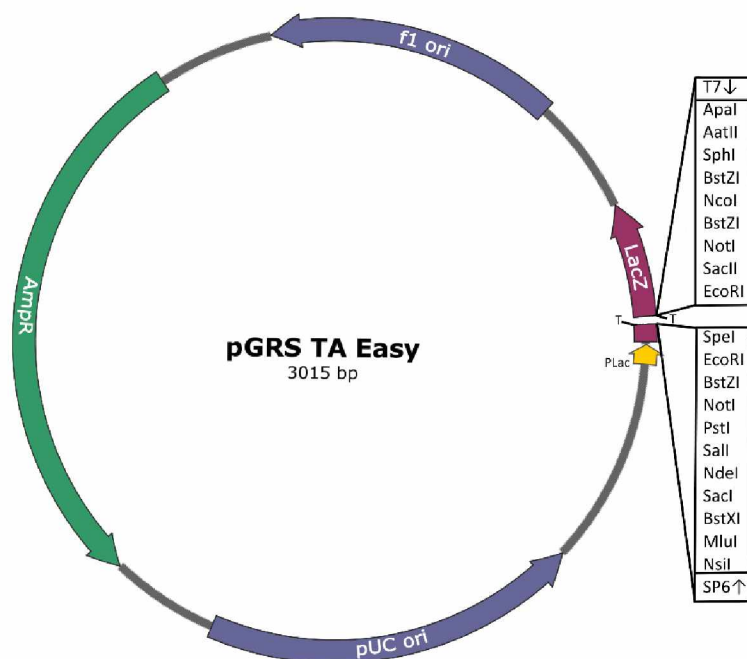
Θερμοκρασίες	χρόνος	
95°C	3min	} 30 κύκλοι
95°C	30sec	
66°C-0,5 °c/cyc	30sec	
72°C	30sec	
95°C	30sec	} 25 κύκλοι
55°C	30sec	
72°C	30sec	
72°C	10min	
4°C	∞	

Πίνακας 2-6 Θερμοκρασίες αντίδρασης touchdown PCR.

Κλωνοποίηση των PCR προϊόντων για την ανίχνευση γονιδίων κυτταρινάσης

Το κιτ κλωνοποίησης “Xpert TA Easy” έχει σχεδιαστεί για την σύνδεση θραυσμάτων PCR που περιέχουν άκρα 3’-A. Τα άκρα αυτά δημιουργούνται με τη χρήση πολυμερασών DNA χωρίς διορθωτική δράση, όπως Taq Και συνδέονται γραμμικό φορέα.

Ο φορέας παρασκευάζεται με πέψη του pGRS TA Easy cloning vector με EcoRV και την προσθήκη μίας θυμιδίνης σε καθένα από τα 3’-άκρα. Ο φορέας pGRS TA Easy (3015bp) περιέχει το γονίδιο β-γαλακτοσιδάση με αποτέλεσμα την αντοχή στην αμπικιλίνη, ώστε να πραγματοποιηθεί η κατάλληλη επιλογή **Εικόνα 2-1**.



Εικόνα 2-1 Χάρτης του φορέα pGRS TA-Easy, όπου παρατηρείται η θέση έναρξης αντιγραφής (ori), το γονίδιο β λακταμάση (ανθεκτικότητα στην Amp (Amp^R)), το οπερόνιο της λακτόζης κ.λ.π.

Πραγματοποιήθηκε Nested PCR για την ενίσχυση του γονιδίου β-1,4 Endoglucanase των βακτηρίων, μήκους 377-413bp χρησιμοποιήθηκαν, εκκινητές GH45R με αλληλουχία 5'-AAGRYICCNNAVICCNCCICCNNGG-3' και GH45F με αλληλουχία 5'-ACCMGITAYTAYTGGGAYTGYTG-3' (Sheng et al., 2015). Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 50μl.

Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον **Πίνακα 2-7** και οι συνθήκες αναγράφονται στον **Πίνακα 2-8**.

	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση
dNTPs	10mM	1mM
Buffer A	10X	1X
MgCl ₂	25mM	0,5mM
GH45R	10pmol/μl	25pmol
GH45F	10pmol/μl	25pmol
ddH ₂ O		
Fast Gene Taq	5U/μl	1,5 U
DNA		

Πίνακας 2-7 Οι αρχικές και οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR.

Θερμοκρασίες	Χρόνος
95°c	3min
95°c	30sec
55°c	30sec
72°c	30sec
72°c	10min
4°c	∞

25 κύκλοι

Πίνακας 2-8 Θερμοκρασίες αντίδρασης Nested PCR.

Καθαρισμός των προϊόντων PCR – PCR clean up

Για τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε το kit “ISOLATE II PCR and GEL Kit” (BIOLINE). Στόχος η αποφυγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων.

Δημιουργία ανασυνδιασμένου φορέα με την τεχνική του Ligation

Το Ligation πραγματοποιήθηκε με το kit κλωνοποίησης “Xpert TA Easy”. Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάδευση και φυγοκέντριση σε όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν. Με βάση τον ακόλουθο Πίνακα 2-9, έγινε προετοιμασία για την αντίδραση σε πάγο. Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε πάγο.

Τα συστατικά της αντίδρασης αναγράφονται στον Πίνακα 2-9. Τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 10 μ L.

Συστατικά	Cloning reaction
pGRS TA Easy cloning vector (50ng/ μ L)	1 μ L
T4 DNA ligase (5 Weiss U/ μ L)	1 μ L
T4 DNA ligase Buffer (5X)	2 μ L
PCR product	X μ L
dH ₂ O	μέχρι τα 10 μ L

Πίνακας 2-9 Συστατικά για την αντίδραση του Ligation.

Η βέλτιστη αναλογία ένθετου: φορέα είναι περίπου 3: 1. Για να προσδιοριστεί ο απαιτούμενος όγκος του ενθέτου, πρέπει πρώτα να προσδιοριστεί η συγκέντρωση DNA του καθαρισμένου προϊόντος της αντίδρασης PCR .

Για τον υπολογισμό της ποσότητας του προϊόντος της PCR χρησιμοποιήθηκε ο ακόλουθος τύπος:

$$\text{ng of insert} = 3x [(50\text{ng pGRS TA Easy}) \times \text{size insert (bp)} / (3015\text{bp (size vector)})]$$

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν **4ng ενθέματος**.

Μετασηματισμός ευαίσθητων κυττάρων

Ο μετασηματισμός πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο του “Xpert TA Easy cloning kit”.

Διαδικασία μετασηματισμού:

- Προσθήκη 10 μl από την αντίδραση του Ligation σε 200μl δεκτικά κύτταρα E.coli JM109 (competent cells), τοποθετημένα σε πάγο
 - Ανάδευση με ήπια ανακίνηση
 - Επώαση για 30 λεπτά σε πάγο
 - Επώαση για 90 δευτερόλεπτα στους 42 ° C
- } θερμικό σοκ
- Άμεση επανατοποθέτηση κυττάρων στον πάγο για 2 λεπτά.
 - Προσθήκη 250 μl LB Broth
 - Επώαση στους 37° C με ανάδευση για 1 ώρα
 - Φυγοκέντριση 8000 rpm, για 1 λεπτό
 - Αφαίρεση 700μL από το υπερκείμενο, επαναδιαλυτοποίηση
 - Επίστρωση 100μL σε LB άγαρ που περιέχει 1 μL/ml αμπικιλίνη για επιλογή και προσθήκη 12μL X-gal για μπλε - λευκό έλεγχο. Η επίστρωση πραγματοποιείται σε ασηπτικές συνθήκες με την χρήση λύχνου Bunsen
 - Επώαση στους 37 ° C, overnight (12-16 ώρες) με έντονη ανάδευση
 - Επιλογή άσπρων αποικιών

Έλεγχος- Επιλογή αποικιών

Η επιλογή των μετασηματισμένων κλώνων ή μη, γίνεται με βάση την αμπικιλίνη (χρήση αντιβιοτικού) που περιέχει το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε. Για την επιλογή βακτηρίων που περιέχουν το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο παρατηρείται διάσπαση του lacZ' γονιδίου και **καταργείται** έτσι η δράση της β-γαλακτοσιδάσης του οπερονίου της λακτόζης, που έχει την ικανότητα να υδρολύει το X-gal. Επομένως, όταν έχουμε επιτυχή ένθεση του DNA στο φορέα “pGRS TA Easy” το X-gal δεν μεταβολίζεται και ως αποτέλεσμα οι

αποικίες που παράγονται έχουν λευκό χρώμα. Αντίθετα, αν το πλασμίδιο δεν έχει ανασυνδιαστεί, το γονίδιο LacZ εκφράζεται κανονικά και μεταβολίζεται η ουσία X-gal και παρατηρούνται μπλε αποικίες.

Έλεγχος λευκών αποικιών με PCR

Για να επιβεβαιωθεί η ένθεση επιλέχθηκαν τυχαίες λευκές αποικίες και πραγματοποιήθηκε “Colony PCR”.

Σε κάθε PCR tube που περιέχει την αντίδραση PCR προστίθεται με τη βοήθεια αποστειρωμένου ξύλινου στυλεού μικρή ποσότητα από κάθε λευκή αποικία που επιλέχθηκε. Για την συγκεκριμένη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε η Taq DNA polymerase και η αντίδραση έγινε σε τελικό όγκο 25μl.

C. Λακκάσες

Πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση του γονιδίου, μήκους 142bp χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές Cu1AF με αλληλουχία 5'-ACMWCB GTYCA Y TGG CAYGG-3' και Cu2R με αλληλουχία 5'-G RCTGTGGTA CCA GAA NGT NCC-3' (Gurta et al., 2017). Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 50μl.

Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 2-10 και οι συνθήκες αναγράφονται στον Πίνακα 2-11.

	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση
dNTPs	10mM	1mM
Buffer B	10X	1X
MgCl ₂	25mM	0,5mM
Cu1AF	50pmol/μl	25pmol
Cu2R	50pmol/μl	25pmol
ddH ₂ O		
Polymerase KAPPA	5U/μl	1 U
DNA		

Πίνακας 2-10 Οι αρχικές και οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR.

Θερμοκρασίες	χρόνος	
95°c	3min	} 30 κύκλοι
95°c	30sec	
50°c	30sec	
72°c	30sec	
72°c	5min	
4°c	∞	

Πίνακας 2-11 Θερμοκρασίες αντίδρασης PCR.

Ο αρνητικός Μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις αντιδράσεις PCR, έχει στόχο, τόσο τον έλεγχο της ορθής λειτουργίας της PCR, όσο και την ύπαρξη επιμολύνσεων.

3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Όλα τα PCR προϊόντα ελέγχονται μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στον διαχωρισμό των τμημάτων DNA με βάση το μοριακό τους βάρος.

Η συγκέντρωση της αγαρόζης εξαρτάται από το μοριακό βάρος του προϊόντος. Συγκεκριμένα, για τα δείγματα που προέρχονται από λακκάσες το πήκτωμα αγαρόζης έχει συγκέντρωση 2,5%, ενώ τα δείγμα από κυτταρινάσες και ημικυτταρινάσες 2%. Σε αυτό το πείραμα χρησιμοποιήθηκε δείκτης μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκε (100bp -) (invitrogene).

4. Καθαρισμός των προϊόντων PCR – PCR clean up

Για τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε το kit “ISOLATE II PCR and GEL Kit” (BIOLINE).

5. Αλληλούχηση κατά Sanger και ανάλυση των αλληλουχιών με προγράμματα βιοπληροφορικής

Τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR αλληλουχήθηκαν από Cemía, Λάρισα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης πραγματοποιήθηκε με την χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) με στόχο την ταυτοποίηση των γονιδίων.

6. Ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου Βακτηρίων του που απομονώθηκαν από ελληνικό μελισσόψωμο

Ενίσχυση του 16s rRNA με τη χρήση PCR

Πραγματοποιήθηκε PCR για την ενίσχυση του 16S rRNA γονιδίου των βακτηρίων χρησιμοποιήθηκαν οι παγκόσμιοι εκκινητές 27F με αλληλουχία (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') (Lane et al. 1991) και 1492R με αλληλουχία (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Turner et al. 1999). Για την αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση Fast Gene Taq (Nippon). Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 50μl.

Οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 2-12 και οι συνθήκες αναγράφονται στον Πίνακα 2-13.

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση
dNTPs	10mM	1mM
Buffer A	10X	1X
1492R	50pmol/μl	25pmol
27F	50pmol/μl	25pmol
Fast Gene Taq	5U/μl	1 U

Πίνακας 2-12 Οι αρχικές και οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων της PCR.

Θερμοκρασίες	Χρονος
95°C	3min
95°C	30sec
50°C	30sec
72°C	2min
72°C	5min
4 °C	∞

35 κύκλοι

Πίνακας 2-13 Θερμοκρασίες αντίδρασης PCR.

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Τα PCR προϊόντα που προέκυψαν από την ενίσχυση του 16s rRNA ελέγχθηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στον διαχωρισμό των τμημάτων DNA με βάση το μοριακό τους βάρος. Η συγκέντρωση της αγαρόζης ήταν 1,5% και χρησιμοποιήθηκε δείκτης μοριακού βάρους (100bp -) (in vitro gene).

Καθαρισμός των προϊόντων PCR – PCR clean up

Για τον καθαρισμό των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε το kit “ISOLATE II PCR and GEL Kit” (BIOLINE).

Αλληλούχηση κατά Sanger και ανάλυση των αλληλουχιών με προγράμματα βιοπληροφορικής

Επιλέχθηκαν 48 καθαρισμένα προϊόντα της PCR και αλληλουχήθηκαν από Cemía, Λάρισα. Η αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε με χρήση των εκκινητών 27F και 1492R.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης πραγματοποιήθηκε με την χρήση εργαλείων βιοπληροφορικής, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) με στόχο την ταυτοποίηση του 16s rRNA γονιδίου.

Αποτελέσματα

Σε αυτό το κεφάλαιο θα παρουσιαστούν αναλυτικά τα αποτελέσματα της ενζυμικής και της μοριακής ταυτοποίησης για τα δείγματα BB28 (Ρεθύμνου), BB22-5 (πηλίου).

Μετά την αρχική επίστρωση του αραιωμένου μελισσόψωμου σε PCA άγαρ και σε *Bacillus cereus* άγαρ, είχαμε τρυβλία με πολλαπλές αποικίες **Εικόνα 3-1**. Οι αποικίες αυτές χρησιμοποιήθηκαν μελλοντικά για την απομόνωση των βακτηριακών αποικιών. Όμοια αποτελέσματα είχαμε και στα δύο δείγματα.



Εικόνα 3-1 Ανάπτυξη αρχικών αποικιών σε PCA άγαρ.

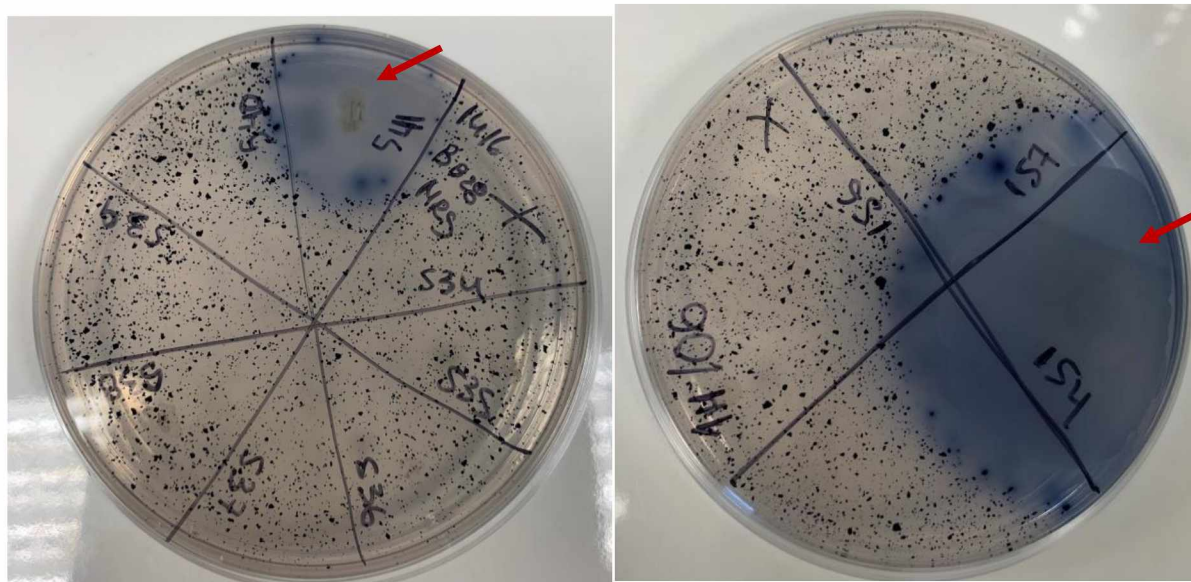
Κατά την επίστρωση του αραιωμένου μελισσόψωμου σε MRS άγαρ, στο τρυβλίο που τοποθετήθηκε δείγμα από το BB22-5, δεν παρατηρήθηκε καμία ανάπτυξη. Αντίθετα, στα τρυβλία που είχαν δείγμα από BB28, υπήρχε ανάπτυξη βακτηριακών αποικιών. Ενδεχόμενος οι λακτοβάκιλλοι δεν επέζησαν στο BB22-5 διότι ήταν 34 ημερών.

Από την επίστρωση του αραιωμένου μελισσόψωμου σε MacConkey άγαρ, δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη σε κανένα από τα δύο δείγματα μελισσόψωμου. Επομένως, δεν υπήρχε ανάπτυξη εντεροβακτηριδίων στο μελισσόψωμο.

Ημικυτταρινάσες

Ενζυμική Φαινοτύπηση

Κατά την δοκιμασία αυτή παρουσίασαν θετικό φαινότυπο 4 αποικίες στο δείγμα BB28 και 33 στο BB22-5. Συνολικά είχαν 38,11% θετικό φαινότυπο **Εικόνα 3-2**. Διάσπαση ημικυτταρίνης οδηγεί σε απελευθέρωση χρωστικής.

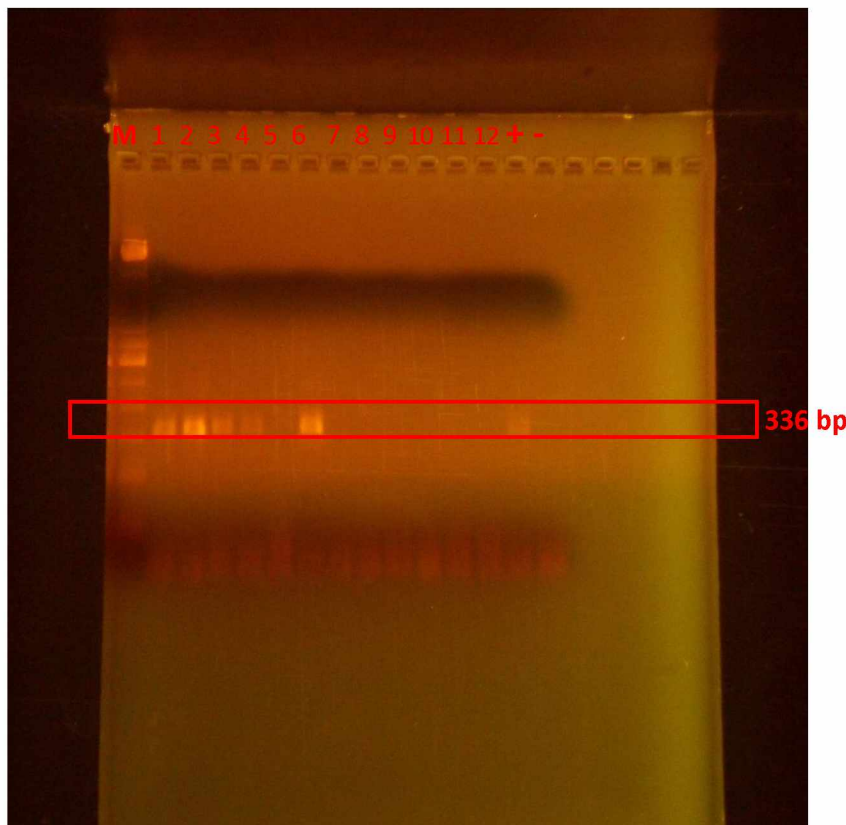


Εικόνα 3-2 Καλλιέργεια σε θρεπτικό PCA + 0,02% Magazyme AZCL-XYLAN. Με κόκκινο βέλος παρουσιάζεται το θετικό αποτέλεσμα.

Μετά την ενζυμική φαινοτύπηση επιλέχθηκαν οι αποικίες με τα καλύτερα αποτελέσματα για μοριακή ανάλυση.

Μοριακή Ταυτοποίηση

Για να μελετηθούν οι ημικυτταρινάσες στα δείγματα του μελισσόψωμου ήταν απαραίτητο να ενισχυθούν με PCR τα γονίδιά τους. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης παρατίθενται στην **Εικόνα 3-3**.



Εικόνα 3-3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης. Από αριστερά προς δεξιά φαίνονται: ο μάρτυρας μοριακού βάρους στην 1η θέση, τα προϊόντα των αντιδράσεων της PCR, το θετικό control στην 13^η θέση, το αρνητικό control στην 14η θέση.

Πήκτωμα αгарόζης 2% με τα προϊόντα της PCR. **Είναι εμφανείς οι ζώνες στα 336 bp, το οποίο σημαίνει πως υπήρξε ενίσχυση του γονιδίου *Endo-xylanase*.** Η εικόνα είναι ενδεικτική, καθώς πραγματοποιήθηκαν επιπλέον αντιδράσεις PCR στην συνέχεια.

Ανάλυση των αλληλουχιών

Όπως αναφέρθηκε στο Πειραματικό Μέρος τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR εστάλησαν για αλληλούχηση. Η αλληλούχηση των 6 PCR προϊόντων έγινε με τον εκκινητή GH11F.

Οι αλληλουχίες αναλύθηκαν με εργαλεία βιοπληροφορικής και συγκεκριμένα με BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Στον **Πίνακα 3-1** φαίνονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το BLASTN και BLASTX. Το Identity στο BLASTN κυμαίνεται από 96,72%-100%, ενώ στο BLASTX από 89,39%-100%.

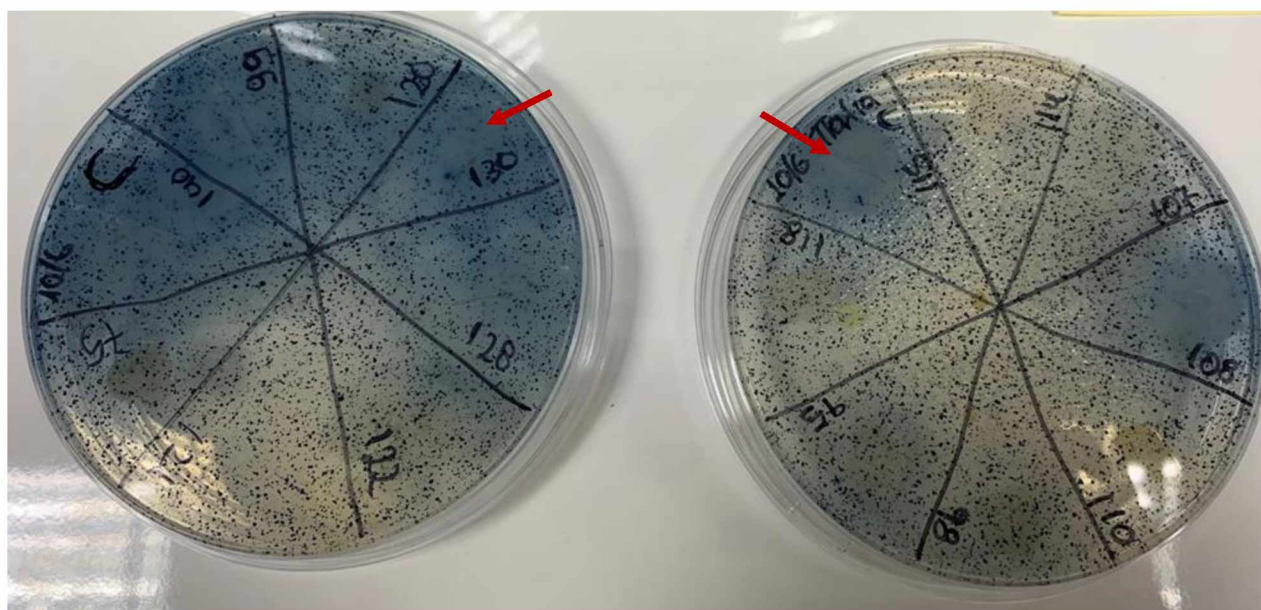
Sample	Quality	BLASTN	query covery	e-value	Identity
541	good	Bacillus safensis strain TCCC111022 xylanase gene, complete cds	100%	4,0e-127	100%
71	not so good	Bacillus safensis strain TCCC111022 xylanase gene, complete cds	100%	1,0e-121	98,8%
75	bad				
82	good	Bacillus safensis strain TCCC111022 xylanase gene, complete cds	86%	2,0e-131	99,24%
95	good	Bacillus safensis strain TCCC111022 xylanase gene, complete cds	96%	6,0e136	96,28%
107	good	Bacillus safensis strain TCCC111022 xylanase gene, complete cds	89%	3,0e129	96,72%
sample	Quality	BLASTX	query covery	e-value	Identity
541	good	glycoside hydrolase family 11 protein [Bacillus safensis]	98%	9,0e-53	100%
71	not so good	glycoside hydrolase family 11 protein [Bacillus safensis]	98%	2,0e-34	98,08%
75	bad				
82	good	glycoside hydrolase family 11 protein [Bacillus safensis]	90%	6,0e-57	96,74%
95	good	glycoside hydrolase family 11 protein [Bacillus safensis]	96%	2,0e-41	94,59%
107	good	glycoside hydrolase family 11 protein [Bacillus safensis]	92%	1,0e-52	89,36%

Πίνακας 3-1 Αποτελέσματα BLASTN και BLASTX για ημικυτταρίνες.

Κυτταρινάσες

Ενζυμική Φαινοτύπηση

Κατά την δοκιμασία αυτή παρουσίασαν θετικό φαινότυπο 8 αποικίες στο δείγμα BB22-5 και καμία στο δείγμα BB22-5. Συνολικά θετικό αποτέλεσμα παρουσίασε το 7,21% των βακτηριακών αποικιών. **Εικόνα 3-4** διάσπαση της κυτταρίνης λόγω παραγωγής κυτταρίνασης, δίνει μία χαρακτηριστική μπλε αποικία.

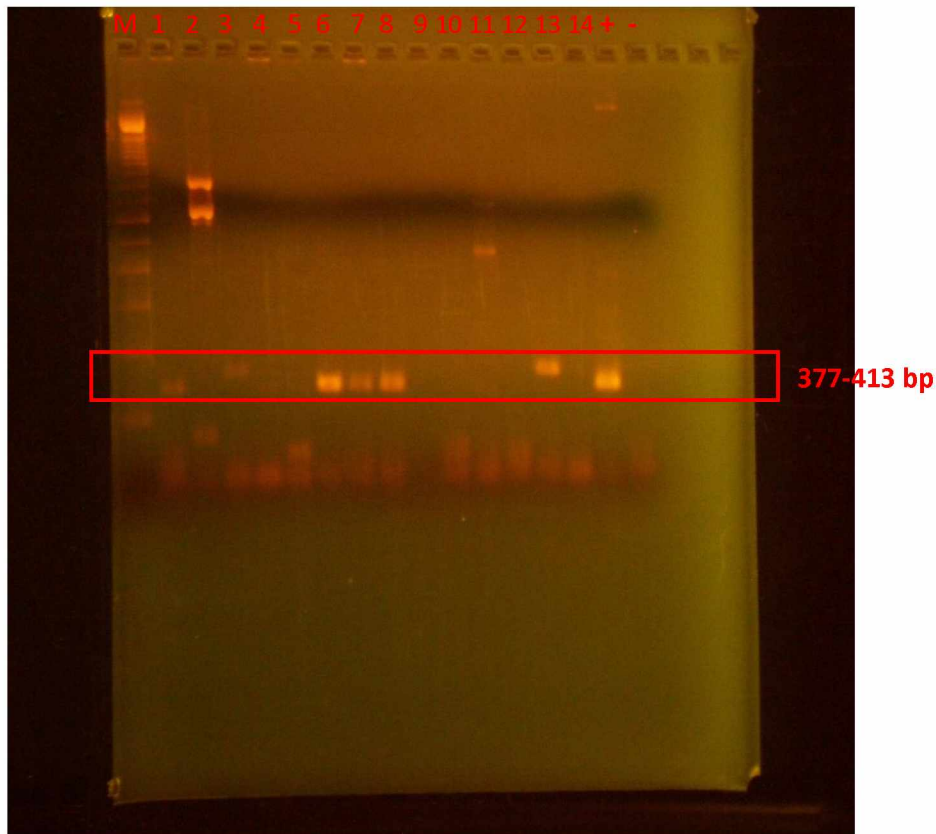


Πίνακας 3-4 Καλλιέργεια σε θρεπτικό που περιέχει PCA + 0,02% Magazyme AZCL-HE-CELLULOSE. Με κόκκινο βέλος παρουσιάζονται ενδεικτικά τα θετικά αποτελέσματα.

Μετά την ενζυμική φαινοτύπηση επιλέχθηκαν οι αποικίες με τα καλύτερα αποτελέσματα για μοριακή ανάλυση.

Μοριακή Ταυτοποίηση

Για να μελετηθούν οι κυτταρινάσες στα δείγματα του μελισσόψωμου ήταν απαραίτητο να ενισχυθούν με PCR τα γονίδια τους. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης παρατίθενται στην παρακάτω **Εικόνα 3-5**.



Πίνακας 3-5 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Από αριστερά προς δεξιά φαίνονται: ο μάρτυρας μοριακού βάρους στην 1η θέση, τα προϊόντα των αντιδράσεων της PCR, το θετικό control στην 16η θέση, το αρνητικό control στην 17η θέση.

Πήκτωμα αγαρόζης 2% με τα προϊόντα της PCR. **Είναι εμφανείς οι ζώνες στα 377-413 bp, το οποίο σημαίνει πως υπήρξε ενίσχυση του γονιδίου της β -1,4 *Endoglucanase*.** Η εικόνα είναι ενδεικτική, καθώς πραγματοποιήθηκαν επιπλέον αντιδράσεις PCR στην συνέχεια.

Στην περίπτωση αυτή παρατηρήθηκαν παραπροϊόντα και ακολούθησε η διαδικασία της κλωνοποίησης για απομόνωση της επιθυμητής ζώνης

Αποτέλεσμα Κλωνοποίησης

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι σε εξέλιξη.

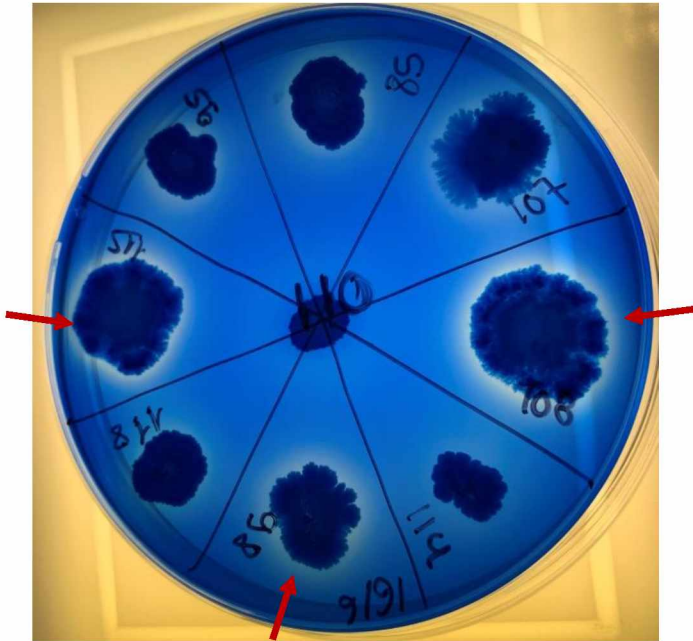
Ανάλυση των αλληλουχιών

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι σε εξέλιξη.

Ένζυμα που διασπούν χρωστική

Ενζυμική Φαινοτύπηση

Κατά την δοκιμασία με θρεπτικό PCA + 0,02% COOMASSIE BRILLIANT BLUE G παρουσίασαν θετικό φαινότυπο 12 αποικίες στο δείγμα BB28 και 38 στο BB22-5. Συνολικά παρουσίασε το 51,5% θετικό φαινότυπο. Με την παραγωγή του επιθυμητού ενζύμου, παρατηρείται διάσπαση της χρωστικής. Δημιουργία διαυγής ζώνης **Εικόνα 3-6**.

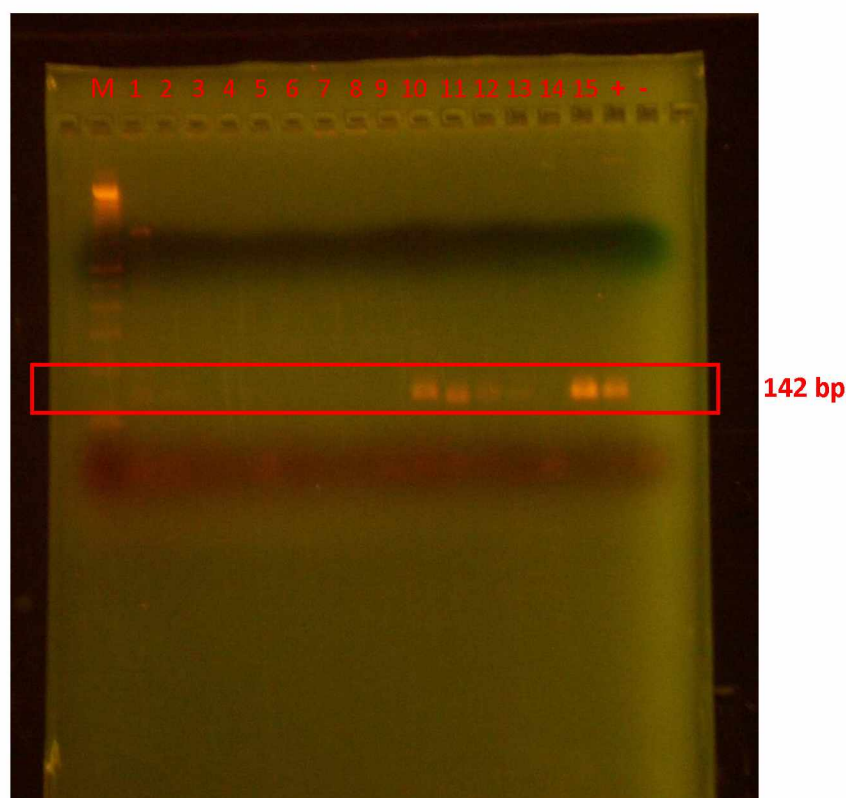


Πίνακας 3-6 Καλλιέργεια σε θρεπτικό που περιέχει PCA + 0,02% COOMASSIE BRILLIANT BLUE G. Με κόκκινο βέλος παρουσιάζονται ενδεικτικά τα θετικά αποτελέσματα.

Στην συνέχεια, στην δοκιμασία PCA + 10% Malachite Green (oxalate) παρουσίασαν θετικό φαινότυπο 4 αποικίες στο δείγμα BB28 και 18 στο BB22-5. Συνολικά είχαν 26,66% θετικό φαινότυπο **Εικόνα 3-7**.

Μοριακή Ταυτοποίηση

Για να μελετηθούν οι Λακκάσες στα δείγματα του μελισσόψωμου ήταν απαραίτητο να ενισχυθούν με PCR τα γονίδια τους. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης παρατίθενται στην παρακάτω **Εικόνα 3-9**.



Πίνακας 3-9 Από αριστερά προς δεξιά φαίνονται: ο μάρτυρας μοριακού βάρους στην 2η θέση, τα προϊόντα των αντιδράσεων της PCR, το θετικό control στην 18η θέση, το αρνητικό control στην 19η θέση.

Πήκτωμα αγρότης 2,5% με τα προϊόντα της PCR. Είναι εμφανείς οι ζώνες στα 142 bp, το οποίο σημαίνει πως υπήρξε ενίσχυση του γονιδίου της λακκάσης. Η εικόνα είναι ενδεικτική, καθώς πραγματοποιήθηκαν επιπλέον αντιδράσεις PCR στην συνέχεια.

Ανάλυση των αλληλουχιών

Όπως αναφέρθηκε στο Πειραματικό Μέρος τα καθαρισμένα προϊόντα της PCR εστάλησαν για αλληλούχηση. Η αλληλούχηση των 6 PCR προϊόντων έγινε με τον CU1AF.

Οι αλληλουχίες αναλύθηκαν με εργαλεία βιοπληροφορικής και συγκεκριμένα με BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Στον **Πίνακα 3-2** φαίνονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το BLASTN και BLASTX. Το Identity στο BLASTN κυμαίνεται από 76,85%-97,62%.

Sample	Quality	BLASTN	query covery	e-value	Identity
3	bad				
7	good	Bacillus thuringiensis strain HER1410 chromosome, complete genome (multicopper oxidase family protein)	97%	4,00E-32	97.62%
9	bad	Pseudomonas luteola strain FDAARGOS_637 plasmid unnamed1, complete sequence (copper resistance system multicopper oxidase)	100%	6,00E-18	76.85%
Sample	quality	BLASTX	query covery	e-value	Identity
3	bad				
7	good	multicopper oxidase family protein [Bacillus cereus ATCC 4342]	97%	3,00E-11	100%
9	bad				

Πίνακας 3-2 Αποτελέσματα BLASTN και BLASTX για Λακκάσες.

Αμυλάσες

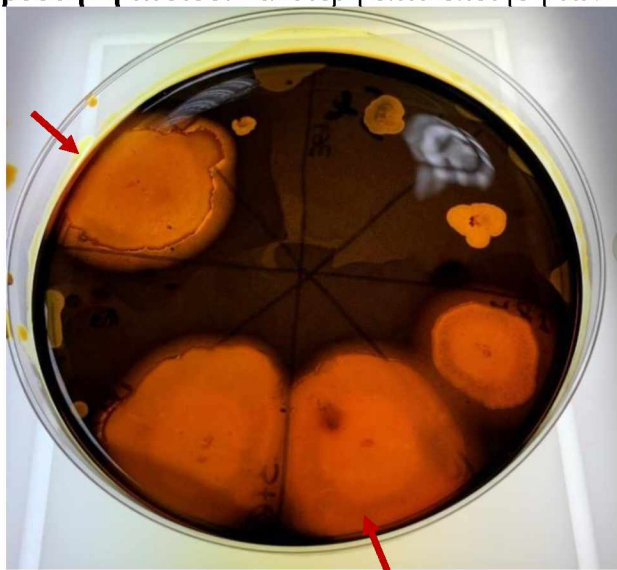
Ενζυμική Φαινοτύπηση

Κατά την δοκιμασία αυτή παρουσίασαν θετικό φαινότυπο 2 αποικίες στο δείγμα BB28 και 18 στο BB22-5. Συνολικά είχαν 20,6% θετικό φαινότυπο. Η έκφραση του ενζύμου της αμυλάσης, δημιουργεί διαυγή ζώνη γύρω από την βακτηριακή αποικία **Εικόνα 3-9**.



Πίνακας 3-9 Καλλιέργεια σε θρεπτικό που περιέχει PCA + 1% άμυλο. Με κόκκινο βέλος παρουσιάζονται ενδεικτικά τα θετικά αποτελέσματα.

Προσθήκη ιωδίου: καλύτερη οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

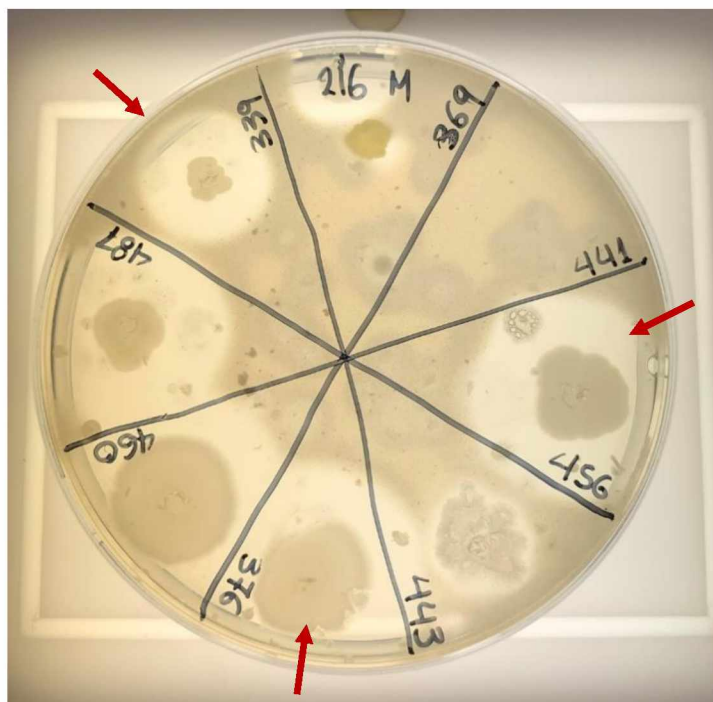


Πίνακας 3-10 Προσθήκη ιωδίου σε θρεπτικό με PCA + 1% άμυλο.

Πρωτεΐνάσες

Ενζυμική Φαινοτύπηση

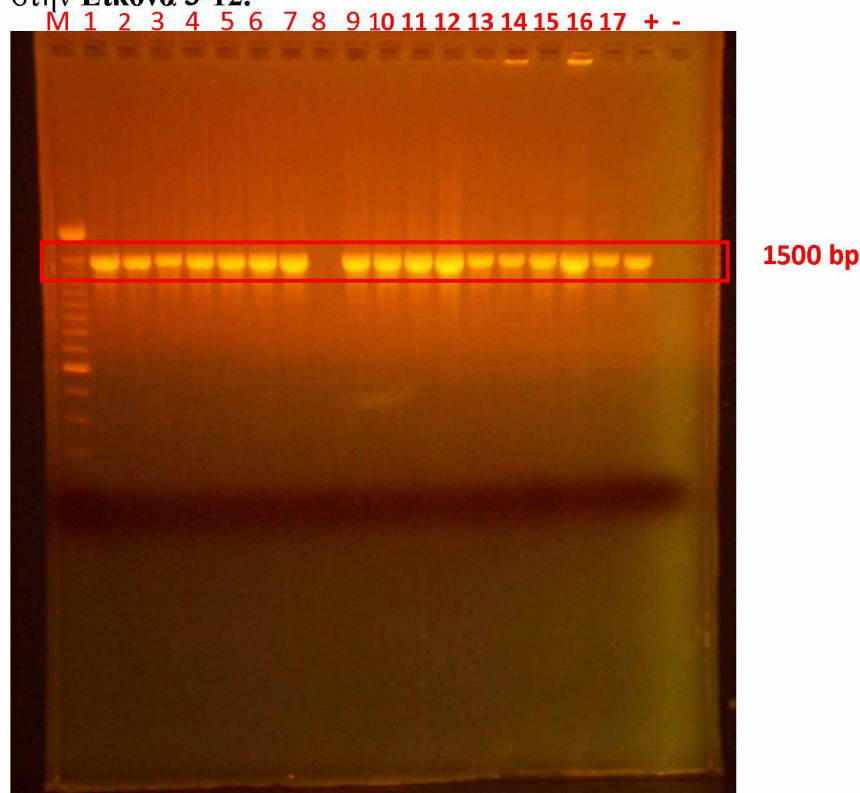
Κατά την δοκιμασία αυτή παρουσίασαν θετικό φαινότυπο 9 αποικίες στο δείγμα BB28 και 30 στο BB22-5. Συνολικά είχαν 43,17% θετικό φαινότυπο. Η έκφραση του ενζύμου της λακκάσης, δημιουργεί διαυγή ζώνη γύρω από την βακτηριακή αποκία **Εικόνα 3-11**.



Πίνακας 3-11 Καλλιέργεια σε θρεπτικό που περιέχει PCA + 2% γάλα. Με κόκκινο βέλος παρουσιάζονται ενδεικτικά τα θετικά αποτελέσματα.

Αποτελέσματα ανάλυσης του 16s rRNA

Για να μελετηθεί το 16s rRNA γονίδιο στα δείγματα του μελισσόψωμου ήταν απαραίτητο να ενισχυθεί με PCR. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης παρατίθενται στην **Εικόνα 3-12**.



Εικόνα 3-12 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Από αριστερά προς δεξιά φαίνονται: ο μάρτυρας μοριακού βάρους στην 1η θέση, τα προϊόντα των αντιδράσεων της PCR, το θετικό control στην 19^η θέση, το αρνητικό control στην 20^η θέση.

Πήκτωμα αγαρόζης 1,5% με τα προϊόντα της PCR. **Είναι εμφανείς οι ζώνες στα 1500bp, το οποίο σημαίνει πως υπήρξε ενίσχυση του 16s rRNA γονιδίου.** Η εικόνα είναι ενδεικτική, καθώς πραγματοποιήθηκαν επιπλέον αντιδράσεις PCR στην συνέχεια. Ακολούθως, επιλέχθηκαν 48 πιθανές βακτηριακές αποικίες για να σταλούν για αλληλούχηση του 16s rRNA γονιδίου.

Ανάλυση των αλληλουχιών του 16s rRNA

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι σε εξέλιξη.

Συνολικά αποτελέσματα

Στον πίνακα που ακολουθεί αναγράφονται συνολικά τα θετικά αποτελέσματα που προέκυψαν από τις φαινοτυπικές δοκιμασίες. Με κόκκινο παρατηρούνται ποια από αυτά είχαν θετικό αποτέλεσμα και στην μοριακή ανάλυση με χρήση PCR.

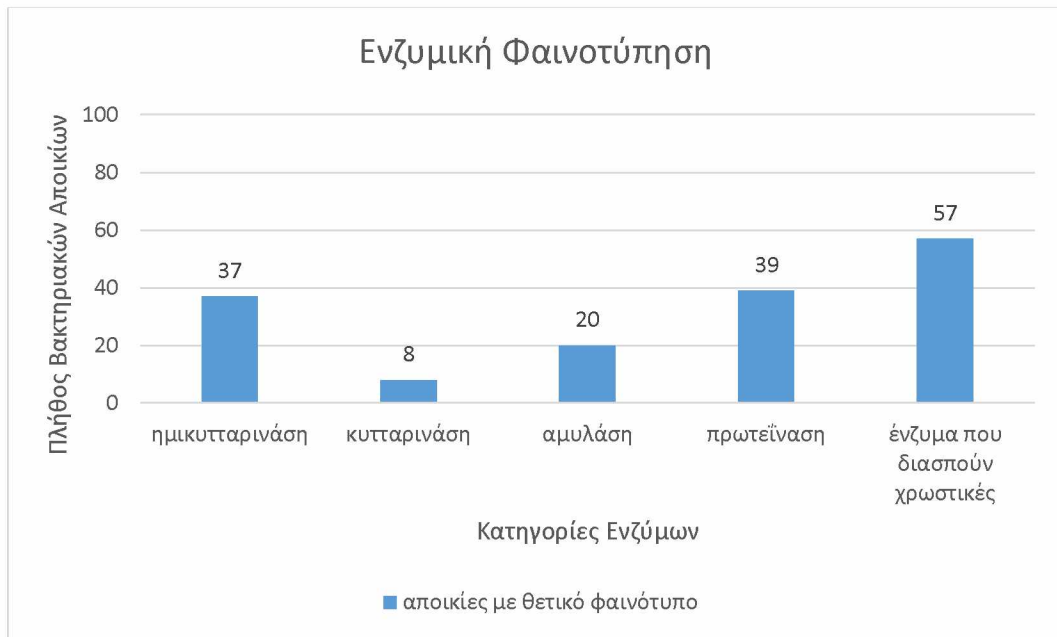
ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ		ΗΜΙΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΗ	ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΗ	ΑΜΥΛΑΣΗ	ΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗ	COYMASSIE BLUE G	MALACHITE GREEN	Συνδυαστική Δράση
		<u>37°C</u>	<u>37°C</u>	<u>37°C</u>	<u>37°C</u>	<u>37°C</u>	<u>37°C</u>	
12	BB22-5					✓		1
13	BB22-5					✓	✓	2
27	BB22-5			✓	✓	✓	✓	4
32	BB22-5	✓		✓	✓	✓	✓	5
39	BB22-5			✓	✓	✓		3
58	BB22-5	✓						1
69	BB22-5	✓			✓	✓		3
70	BB22-5	✓			✓	✓		3
71	BB22-5	✓			✓	✓	✓	4
72	BB22-5	✓			✓	✓		3
73	BB22-5	✓			✓	✓		3
74	BB22-5	✓		✓	✓	✓		4
75	BB22-5	✓			✓	✓		3
76	BB22-5						✓	1
77	BB22-5			✓		✓	✓	3
81	BB22-5			✓	✓	✓		3
82	BB22-5	✓			✓	✓		3
83	BB22-5	✓		✓	✓	✓	✓	5
85	BB22-5		✓		✓	✓		3
86	BB22-5	✓				✓		2
87	BB22-5	✓		✓		✓		3
90	BB22-5	✓		✓		✓		3
91	BB22-5	✓		✓		✓	✓	4
92	BB22-5	✓			✓	✓		3
93	BB22-5	✓	✓	✓	✓		✓	5
94	BB22-5	✓			✓	✓		3

95	BB22-5	√			√	√		3
96	BB22-5	√				√		2
97	BB22-5	√				√		2
98	BB22-5	√		√		√		3
99	BB22-5	√	√		√			3
107	BB22-5	√		√		√		3
108	BB22-5	√	√	√		√	√	5
110	BB22-5						√	1
111	BB22-5				√			1
114	BB22-5				√		√	2
115	BB22-5	√	√	√		√		4
118	BB22-5	√				√	√	3
120	BB22-5	√			√	√		3
122	BB22-5	√				√	√	3
128	BB22-5	√	√		√	√	√	5
130	BB22-5	√	√		√		√	4
140	BB22-5	√	√	√	√	√	√	6
148	BB22-5			√	√	√		3
149	BB22-5			√	√	√		3
154	BB22-5	√			√			2
156	BB22-5				√	√	√	3
157	BB22-5				√		√	2
250	BB22-5			√	√	√		3
504	BB28	√						1
505	BB28	√		√		√		3
510	BB28			√	√		√	2
515	BB28				√			1
516	BB28				√	√		2
517	BB28	√						1

526	BB28				√			1
530	BB28				√			1
533	BB28				√			1
535	BB28				√			1
538	BB28				√			1
540	BB28				√			1
541	BB28	√						1
ΣΥΝΟΛΟ		37	8	20	39	50	22	

Πίνακας 3-3 Αναλυτικά θετικά αποτελέσματα κάθε δείγματος. Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται όσα ελέγχθηκαν και με PCR. Στην τελευταία στήλη αναγράφεται σε πόσα ενζυμικά τεστ είχαμε τον επιθυμητό φαινότυπο σε κάθε βακτηριακή αποικία.

Στο διάγραμμα που απεικονίζεται, παρατηρούνται συνοπτικά τα θετικά δείγματα σε κάθε ενζυμικό έλεγχο.



Διάγραμμα 3-1 Συνολικά θετικά αποτελέσματα

Συζήτηση

Τα προϊόντα της μέλισσας χρησιμοποιούνται ευρέως από την αρχαιότητα. Στις μέρες μας υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον όσον αφορά τα προϊόντα μελισσών, για εφαρμογή στον βιοτεχνολογικό αλλά και στον ιατρικό τομέα. Ωστόσο, υπάρχουν μέχρι και σήμερα προϊόντα μέλισσας που γνωρίζουμε ελάχιστες πληροφορίες για αυτά. Ένα τέτοιο προϊόν είναι και το μελισσόψωμο.

Με τον όρο μελισσόψωμο απευθυνόμαστε στην γύρη που συλλέγεται από τη μέλισσα και προστίθεται νεκτάρ και σιελογόνες εκκρίσεις της μέλισσας και στην συνέχεια υφίσταται ζύμωση γαλακτικού οξέος στην κηρήθρα. Έπειτα, ακολουθεί η ωρίμανση του μελισσόψωμου και έτσι δημιουργείται ένα προϊόν υψηλής θρεπτικής αξίας. Ο ακριβής μηχανισμός μετατροπής της συλλεγόμενης γύρης από μέλισσες σε μελισσόψωμο παραμένει μέχρι και σήμερα ασαφής. Ωστόσο, είναι γνωστό ότι βακτήρια που βρίσκονται στις αδενικές εκκρίσεις των μελισσών αλλά και στην επιφάνεια των κόκκων της γύρης διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο σε αυτήν την διαδικασία.

Η αύξηση του ενδιαφέροντος για το μελισσόψωμο οφείλεται στην υψηλή του θρεπτική αξία, καθώς περιέχει βιταμίνες, μέταλλα, αμινοξέα, λιπαρά οξέα και πολυφαινόλες (αντιοξειδωτικά). Ωστόσο οι πληροφορίες για το μικροβίωμα του μελισσόψωμου είναι λιγοστές. Το μικροβίωμα του μελισσόψωμου έχει παρατηρηθεί πως συμβάλει σε διάφορες σημαντικές πτυχές: **(Α)** στην μετατροπή της συλλεγόμενης γύρης από της μέλισσες σε μελισσόψωμο, **(Β)** στην μακροχρόνια αποθήκευση του μελισσόψωμου στην κυψέλη, καθώς η γύρη μελισσών είναι επιρρεπής σε μικροβιακή αλλοίωση (κυρίως ανάπτυξη μούχλας), **(Γ)** κύρια τροφή των προνυμφών, **(Δ)** θετική επίδραση στην υγεία των ατόμων που την καταναλώνουν (Peřka et al., 2021).

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η διερεύνηση το βιοσυνθετικού δυναμικού των βακτηρίων που έχουν απομονωθεί από δύο δείγματα ελληνικού μελισσόψωμου. Το πρώτο μέρος της εργασίας αφορούσε την ταυτοποίηση της ενζυμικής δράσης βακτηριακών αποικιών που απομονώθηκαν από τα δείγματα του μελισσόψωμου, ενώ το δεύτερο μέρος αφορούσε την μοριακή ταυτοποίηση των γονιδίων των ενζύμων που μελετήθηκαν.

Η σύγκριση δεδομένων και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών μελετών για το μελισσόψωμο δεν είναι εφικτή. Η έρευνα του μελισσόψωμου είναι ακόμα σε αρχικό στάδιο. Επίσης η σύγκριση με άλλες έρευνες είναι δύσκολη, λόγω διαφορετικών μεθοδολογιών δειγματοληψίας, συνθηκών αποθήκευσης, διαδικασιών εκχύλισης με τη χρήση διαφόρων διαλυτών και πρωτοκόλλων.

Όπως αναφέρεται αναλυτικά στο κεφάλαιο «Αποτελέσματα», στον ενζυμικό έλεγχο που πραγματοποιήθηκε με κλασσικές τεχνικές μικροβιολογίας που βασίζονται στις καλλιέργειες βακτηριακών αποικιών απομονώθηκαν συνολικά **103 βακτηριακές αποικίες**. Τα θετικά αποτελέσματα στον έλεγχο αυτό ήταν τα εξής: 37 ημικυτταρινάση, 8 κυτταρινάση, 20 αμυλάση, 39 πρωτεϊνάση, 57 ένζυμα που διασπών χρωστική.

Στην παρούσα εργασία δεν μπορούμε ακόμα να ταυτοποιήσουμε πλήρως τα βακτήρια που υπάρχουν στο μελισσόψωμο, καθώς τα αποτελέσματα του 16s rRNA βρίσκονται υπό εξέταση. Ωστόσο, από την αλληλούχηση των προϊόντων της PCR για την ενίσχυση γονιδίων ημικυτταρινασών, παρατηρείται πως ανήκουν στο γένος *Bacillus spp.*. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει την έρευνα Pelka et al. (2021), που έχει παρατηρηθεί ότι τα απομονωμένα βακτηριακά στελέχη που εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση ανήκαν στο γένος *Bacillus spp.* και εντοπίστηκαν πέντε διαφορετικά είδη (*B. subtilis*, *B. Licheniformis*, *B. Pumilus*, *B. altitudinis*, και *B. Safensis*). Προηγούμενες μελέτες δεν είχαν δείξει την παρουσία *Bacillus spp.* σε δείγμα μελισσόψωμου. Η διαφορά αυτή ενδεχομένως οφείλεται στην ηλικία του δείγματος του μελισσόψωμου και στον τρόπο αποθήκευσης και μεταφοράς του (Pelka et al., 2021).

Προσδιορίστηκε επίσης έντονη διαφορά στα θετικά αποτελέσματα στον έλεγχο για ημικυτταρινάσες, στα δείγματα του BB28 και του BB22-5. Συγκεκριμένα, στο BB28 θετικά ήταν μόνο το 10,5% (4 από τα 38), ενώ στο BB22-5 50,7% (33 από τα 65). Η διαφορά αυτή ίσως αποδίδεται στην επιβίωση τελικά συγκεκριμένων βακτηριακών ειδών. Επομένως, παρατηρείτε μια έντονη μετατόπιση της μικροβιακής κοινωνίας (μικροβιώματος) κατά την ωρίμανση του μελισσόψωμου. Ενδεχομένως τα είδη αυτά επιβίωσαν λόγω έλλειψης τροφής, ίσως επιβίωσαν βακτήρια που είναι σπορογόνα (π.χ. βάκιλλοι).

Στην εργασία αυτή παρατηρήθηκαν θετικά αποτελέσματα για την ύπαρξη λακκασών στο μελισσόψωμο τόσο στην ενζυμική, όσο και στην μοριακή ανάλυση. Σημαντικό είναι ότι το αποτέλεσμα αυτό δεν έχει αναφερθεί σε άλλη έρευνα μέχρι σήμερα.

Αναμένονται τα αποτελέσματα του 16s rRNA για την επιβεβαίωση της ύπαρξης λακκασών, ωστόσο για μια πρώτη εκτίμηση από τα αποτελέσματα της αλληλούχησης του προϊόντος της PCR που ενισχύθηκε το γονίδιο της λακκάσης, φάνηκε πως όντως υπάρχουν οξειδάσες στο δείγμα.

Η παραγωγή αυτών των ενζύμων πιθανών είναι σημαντική για την δημιουργία θρεπτικών συστατικών, όπως αμινοξέα, λιπαρά οξέα και γλυκόζη από συστατικά που υπάρχουν στους κόκκους γύρης, δηλαδή από πρωτεΐνες, λιπίδια και κυτταρίνη. Το κατά πόσο λαμβάνει χώρα η προ-πέψη των κόκκων γύρης από ένζυμα του μελισσόψωμου είναι αμφιλεγόμενο.

Παραμένει ακόμη ασαφές ποια είδη βακτηρίων συμμετέχουν στην ωρίμανση του μελισσόψωμου. Ωστόσο, τα αποτελέσματα αρκετών ερευνών έχουν δείξει ότι κυρίαρχο ρόλο διαδραματίζουν τα βακτήρια γαλακτικού οξέος. Αυτό επιβεβαιώνεται και με την έρευνα των Vasquez & Olofsson (2009), όπου παρατήρησαν έντονη ανάπτυξη αυτών των βακτηρίων κατά την ωρίμανση του μελισσόψωμου (Vásquez & Olofsson, 2009).

Πιθανώς τα βακτήρια γαλακτικού οξέος εισάγονται στο μελισσόψωμο από τις αδενικές εκκρίσεις των μελισσών, καθώς αποτελεί μέρος της εντερικής χλωρίδας των μελισσών. Τα βακτήρια αυτά αναστέλλουν αποτελεσματικά την ανάπτυξη παθογόνων και άλλων μικροοργανισμών που μπορούν να αλλοιώσουν το προϊόν. Αυτό οφείλεται κυρίως στην παραγωγή γαλακτικού οξέος. Η άποψη αυτή αποδεικνύεται και στην έρευνα των Iorizzo et al. (2020), όπου απομόνωσαν λακτοβάκιλλους (*Lactobacillus kunkeei* και το *Lactiplantibacillus plantarum*) από τον γαστρεντερικό σωλήνα των μελισσών και παρατήρησαν ανασταλτική δράση έναντι παθογόνων (Iorizzo et al., 2020).

Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι ορισμένοι ζυμομυκήτες συμμετέχουν στην μετατροπή του μελισσόψωμου. Ωστόσο, τα επίπεδα τους μειώνονται σημαντικά κατά την αποθήκευση του μελισσόψωμου (Detry et al., 2020).

Τα φυτοχημικά που υπάρχουν στην πρώτη ύλη και στο μέλι που προστίθενται για την δημιουργία του μελισσόψωμου, καθώς και οι μεταβολίτες των βακτηρίων που αναπτύσσονται στο προϊόν που ωριμάζει, πιθανόν να σχηματίζουν ένα δυσμενές περιβάλλον για την ανάπτυξη των περισσότερων μικροοργανισμών. Έτσι, αναπτύσσονται κυρίως πολύ ανθεκτικά βακτήρια, π.χ. *Bacillus* spp. που σχηματίζουν σπόρια και μπορούν να επιβιώσουν κάτω από αυτές τις συνθήκες (Peřka et al., 2021).

Η έρευνα του μελισσόψωμου είναι σημαντικό να συνεχιστεί σε διάφορους τομείς. Πρωτίστως, είναι σημαντικό να μελετηθούν τα βακτήρια του μικροβιώματος του μελισσόψωμου, ώστε να ερευνηθούν μελλοντικά τα συνολικά χαρακτηριστικά των ενζύμων κάθε βακτηρίου (π.χ. κινητική των ενζύμων). Η παραγωγή ενζύμων από βακτήρια προσφέρει ποικίλα πλεονεκτήματα καθώς το μέγεθος του γονιδιώματος του είναι μικρό, οι γενετικοί χειρισμοί και η ανασυνδυασμένη έκφραση σημαντικών ενζύμων μεγάλης κλίμακας και μπορεί να πραγματοποιηθεί με μεγαλύτερη ευκολία. Αφού ολοκληρωθεί η μελέτη του μικροβιώματος και όχι μόνο του μελισσόψωμο, τα ένζυμα που παράγονται θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διάφορους τομείς. Αναλυτικότερα, στην **φαρμακοβιομηχανία** για παραγωγή αντιμικροβιακών και αντιοξειδωτικών. Στην **βιομηχανία υφασμάτων, χαρτιού και πλαστικού** καθώς παράγουν ένζυμα που διασπούν την λιγνίνη (λακκάσες, υπεροξειδάση λιγνίνης (LiP) και υπεροξειδάση μαγγανίου (MnP)). Σημαντικές μελλοντικές εφαρμογές αφορούν τον τομέα των τροφίμων με την χρήση είτε αυτούσιου του μελισσόψωμου ως προϊόν υψηλής θρεπτικής αξίας (βιταμίνες, μέταλλα, αμινοξέα, λιπαρά οξέα και πολυφαινόλες), είτε με εφαρμογές στην βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή ποτών (μείωση θολερότητας με την εφαρμογή παραγόμενων ενζύμων) και τροφίμων.

Βιβλιογραφία

- Abdel-Hamid, A. M., Solbiati, J. O., & Cann, I. K. O. (2013). Chapter One—Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. In S. Sariaslani & G. M. Gadd (Eds.), *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 82, pp. 1–28). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407679-2.00001-6>
- Abdelnour, S. A., El-Hack, M. E. A., Alagawany, M., Farag, M. R., & Elnesr, S. S. (2019). Beneficial impacts of bee pollen in animal production, reproduction and health. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *103*(2), 477–484. <https://doi.org/10.1111/jpn.13049>
- Alvarez-Suarez, J., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E., & Battino, M. (2010). Contribution of honey in nutrition and human health: A review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, *3*, 15–23. <https://doi.org/10.1007/s12349-009-0051-6>
- 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>
- Azzopardi, E., Lloyd, C., Teixeira, S. R., Conlan, R. S., & Whitaker, I. S. (2016). Clinical applications of amylase: Novel perspectives. *Surgery*, *160*(1), 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2016.01.005>
- Badolato, M., Carullo, G., Cione, E., Aiello, F., & Caroleo, M. C. (2017). From the hive: Honey, a novel weapon against cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *142*, 290–299. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.064>
- Bakour, M., Fernandes, Â., Barros, L., Sokovic, M., Ferreira, I. C. F. R., & Badiia Iyousi. (2019). Bee bread as a functional product: Chemical composition and bioactive properties. *LWT*, *109*, 276–282. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.02.008>
- Basit, A., Jiang, W., & Rahim, K. (2020). Xylanase and Its Industrial Applications. In *Biotechnological Applications of Biomass*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.92156>
- Bayram, N. E., Gercek, Y. C., Çelik, S., Mayda, N., Kostić, A. Ž., Dramićanin, A. M., & Özkök, A. (2021). Phenolic and free amino acid profiles of bee bread and bee pollen with the same botanical origin – similarities and differences. *Arabian Journal of Chemistry*, *14*(3), 103004. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103004>
- Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., & Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: A review. *Journal of the American College of Nutrition*, *27*(6), 677–689. <https://doi.org/10.1080/07315724.2008.10719745>
- *BRENDA - Information on EC 1.11.1.14—Lignin peroxidase and Organism(s) Phanerochaete chrysosporium and UniProt Accession P06181*. (n.d.). Retrieved September 17, 2021, from <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.11.1.14&UniProtAcc=P06181&OrganismID=1380>

- Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36(4), 347–363. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)00145-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(97)00145-2)
- Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, P. L., & Srivastava, A. K. (2016). Bacterial xylanases: Biology to biotechnology. *3 Biotech*, 6(2), 150. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0457-z>
- Cianciosi, D., Forbes-Hernández, T. Y., Afrin, S., Gasparrini, M., Reboredo-Rodriguez, P., Manna, P. P., Zhang, J., Bravo Lamas, L., Martínez Flórez, S., Agudo Toyos, P., Quiles, J. L., Giampieri, F., & Battino, M. (2018). Phenolic Compounds in Honey and Their Associated Health Benefits: A Review. *Molecules*, 23(9), 2322. <https://doi.org/10.3390/molecules23092322>
- Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 3–23. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005>
- de Souza, P. M., & de Oliveira Magalhães, P. (2010). Application of microbial α -amylase in industry – A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 850–861. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>
- Denisow, B., & Denisow-Pietrzyk, M. (2016). Biological and therapeutic properties of bee pollen: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(13), 4303–4309. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7729>
- Detry, R., Simon-Delso, N., Bruneau, E., & Daniel, H.-M. (2020). Specialisation of Yeast Genera in Different Phases of Bee Bread Maturation. *Microorganisms*, 8(11), 1789. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111789>
- 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), 811. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110811>
- Donkersley, P., Rhodes, G., Pickup, R. W., Jones, K. C., & Wilson, K. (2018a). Bacterial communities associated with honeybee food stores are correlated with land use. *Ecology and Evolution*, 8(10), 4743–4756. <https://doi.org/10.1002/ece3.3999>
- Dranca, F., Ursachi, F., & Oroian, M. (2020). Bee Bread: Physicochemical Characterization and Phenolic Content Extraction Optimization. *Foods*, 9(10), 1358. <https://doi.org/10.3390/foods9101358>
- Dwivedi, U. N., Singh, P., Pandey, V. P., & Kumar, A. (2011). Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(2), 117–128. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.11.002>
- 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), 75–82. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0624-2>

- Iorizzo, M., Lombardi, S. J., Ganassi, S., Testa, B., Ianiro, M., Letizia, F., Succi, M., Tremonte, P., Vergalito, F., Cozzolino, A., Sorrentino, E., Coppola, R., Petrarca, S., Mancini, M., & De Cristofaro, A. (2020). Antagonistic Activity against *Ascosphaera apis* and Functional Properties of *Lactobacillus kunkeei* Strains. *Antibiotics*, *9*(5), 262. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050262>
- Jayasekara, S., & Ratnayake, R. (2019). Microbial Cellulases: An Overview and Applications. In *Cellulose*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84531>
- Kamble, R. D., & Jadhav, A. R. (2012). Isolation, Purification, and Characterization of Xylanase Produced by a New Species of *Bacillus* in Solid State Fermentation. *International Journal of Microbiology*, *2012*, e683193. <https://doi.org/10.1155/2012/683193>
- 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., Błażejczak, 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>
- Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L., & Olczyk, K. (2015). Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, *2015*, 297425. <https://doi.org/10.1155/2015/297425>
- Kroyer, G., & Hegedus, N. (2001). Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *2*(3), 171–174. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(01\)00039-X](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(01)00039-X)
- Kuś, P. M., Szweda, P., Jerković, I., & Tuberoso, C. I. G. (2016). Activity of Polish unifloral honeys against pathogenic bacteria and its correlation with colour, phenolic content, antioxidant capacity and other parameters. *Letters in Applied Microbiology*, *62*(3), 269–276. <https://doi.org/10.1111/lam.12541>
- Liu, Q., Luo, L., & Zheng, L. (2018). Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(2), 335. <https://doi.org/10.3390/ijms19020335>
- Maciel, M. J. M., Silva, A. C. e, & Ribeiro, H. C. T. (2010). Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, *13*(6), 14–15.
- Mandić, M., Djokić, L., Nikolaivits, E., Prodanović, R., O'Connor, K., Jeremić, S., Topakas, E., & Nikodinović-Runic, J. (2019). Identification and Characterization of New Laccase Biocatalysts from *Pseudomonas* Species Suitable for Degradation of Synthetic Textile Dyes. *Catalysts*, *9*(7), 629. <https://doi.org/10.3390/catal9070629>
- Mărgăoan, R., Cornea-Cipcigan, M., Topal, E., & Kösoğlu, M. (2020a). Impact of Fermentation Processes on the Bioactive Profile and Health-Promoting Properties of

- Bee Bread, Mead and Honey Vinegar. *Processes*, 8(9), 1081.
<https://doi.org/10.3390/pr8091081>
- Martínez, A. T. (2002). Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(4), 425–444.
[https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00521-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00521-X)
 - Mišurcová, L., Škrovánková, S., Samek, D., Ambrožová, J., & Machů, L. (2012). Chapter 3—Health Benefits of Algal Polysaccharides in Human Nutrition. In J. Henry (Ed.), *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 66, pp. 75–145). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394597-6.00003-3>
 - 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), 957. <https://doi.org/10.3390/molecules26040957>
 - Motta, F., C P Andrade, C., & Santana, M. H. (2013). A Review of Xylanase Production by the Fermentation of Xylan: Classification, Characterization and Applications. *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization*, 251–275. <https://doi.org/10.5772/53544>
 - Nainu, F., Masyita, A., Bahar, M. A., Raihan, M., Prova, S. R., Mitra, S., Emran, T. B., & Simal-Gandara, J. (2021). Pharmaceutical Prospects of Bee Products: Special Focus on Anticancer, Antibacterial, Antiviral, and Antiparasitic Properties. *Antibiotics*, 10(7), 822. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070822>
 - Nayik, G. A., Shah, T. R., Muzaffar, K., Wani, S. A., Gull, A., Majid, I., & Bhat, F. M. (2014). Honey: Its history and religious significance: A review. *Universal Journal of Pharmacy*, 3(1), 5–8. Scopus.
 - Pełka, K., Worobo, R. W., Walkusz, J., & Szweda, P. (2021). Bee Pollen and Bee Bread as a Source of Bacteria Producing Antimicrobials. *Antibiotics*, 10(6), 713. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060713>
 - Ramos, O. L., & Malcata, F. X. (2017). 3.48—Food-Grade Enzymes☆. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)* (pp. 587–603). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.09173-1>
 - Roulston, T. H., & Cane, J. H. (2000). Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution*, 222(1–4), 187–209. Scopus.
<https://doi.org/10.1007/BF00984102>
 - Rzepecka-Stojko, A., Stojko, J., Kurek-Górecka, A., Górecki, M., Kabała-Dzik, A., Kubina, R., Moździerz, A., & Buszman, E. (2015). Polyphenols from Bee Pollen: Structure, Absorption, Metabolism and Biological Activity. *Molecules*, 20(12), 21732–21749. <https://doi.org/10.3390/molecules201219800>
 - Santhanam, N., Vivanco, J. M., Decker, S. R., & Reardon, K. F. (2011). Expression of industrially relevant laccases: Prokaryotic style. *Trends in Biotechnology*, 29(10), 480–489. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.04.005>
 - Sheng, P., Li, Y., Marshall, S., & 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, 16545–16559.
<https://doi.org/10.3390/ijms160716545>

- Stagos, D., Soultisiotis, N., Tsadila, C., Papaeconomou, S., Arvanitis, C., Ntontos, A., Karkanta, F., Adamou-Androulaki, S., Petrotos, K., Spandidos, D. A., Kouretas, D., & Mossialos, D. (2018). Antibacterial and antioxidant activity of different types of honey derived from Mount Olympus in Greece. *International Journal of Molecular Medicine*, 42(2), 726–734. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3656>
- Subramaniyan, S., & Prema, P. (2002). Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology, and Application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22(1), 33–64. <https://doi.org/10.1080/07388550290789450>
- 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>
- Vásquez, A., & Olofsson, T. C. (2009). The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *Journal of Apicultural Research*, 48(3), 189–195. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.48.3.07>
- Wang, X., Yao, B., & Su, X. (2018). Linking Enzymatic Oxidative Degradation of Lignin to Organics Detoxification. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3373. <https://doi.org/10.3390/ijms19113373>
- Yadav, M., & Yadav, H. S. (2015). Applications of ligninolytic enzymes to pollutants, wastewater, dyes, soil, coal, paper and polymers. *Environmental Chemistry Letters*, 13(3), 309–318. <https://doi.org/10.1007/s10311-015-0516-4>
- Zhang, Q., Han, Y., & Xiao, H. (2017). Microbial α -amylase: A biomolecular overview. *Process Biochemistry*, 53, 88–101. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.11.012>