



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Ενζυμικά καταλυόμενες διεργασίες για τον στοχευμένο  
βιομετασχηματισμό φυσικών προϊόντων με στόχο την  
αναβάθμιση των ιδιοτήτων τους**

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ ΧΑΤΖΗΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ**  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα  
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,  
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση  
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης







**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Ενζυμικά καταλυόμενες διεργασίες για τον στοχευμένο  
βιομετασχηματισμό φυσικών προϊόντων με στόχο την  
αναβάθμιση των ιδιοτήτων τους**

**ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ ΧΑΤΖΗΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ**  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2020**



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα  
**Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,  
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση**  
Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης





«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος»



«Η διδακτορική διατριβή υλοποιήθηκε με υποτροφία του ΙΚΥ η οποία χρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).»





### Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

**Χαράλαμπος Σταμάτης – Καθηγητής (Επιβλέπων)**

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**Ανδρέας Τζάκος – Αναπληρωτής Καθηγητής**

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**Ιωάννης Γεροθανάσης- Ομότιμος Καθηγητής**

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

### Επταμελής εξεταστική επιτροπή

**Χαράλαμπος Σταμάτης – Καθηγητής (Επιβλέπων)**

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**Ανδρέας Τζάκος – Αναπληρωτής Καθηγητής**

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**Ιωάννης Γεροθανάσης- Ομότιμος Καθηγητής**

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**Δημήτριος Γουρλής – Καθηγητής**

Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**Πέτρος Καταπόδης – Επίκουρος Καθηγητής**

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**Επαμεινώνδας Βουτσάς – Καθηγητής**

Σχολής Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ. Πολυτεχνείου

**Ιωάννης Παυλίδης- Επίκουρος Καθηγητής**

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Σταμάτη Χαράλαμπου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα μου Καθηγητή κ. Χαράλαμπο Σταμάτη για την εμπιστοσύνη και την στήριξη που μου προσφέρει από τα προπτυχιακά μου ακόμα χρόνια και σε κάθε μου βήμα, μέχρι και σήμερα. Τον ευχαριστώ πολύ για την επιστημονική καθοδήγηση και την ηθική και υλική βοήθεια, σε επαγγελματικό και προσωπικό επίπεδο, που μου έχει προσφέρει όλα αυτά τα χρόνια. Υπήρξε μέντοράς μου, με έκανε να αγαπήσω την έρευνα και την Βιοτεχνολογία και να ακολουθήσω τα όνειρά μου. Για όλα αυτά νιώθω απέραντη ευγνωμοσύνη.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Τζάκο Ανδρέα, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, για την όμορφη συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια. και για την φιλοξενία του στο εργαστήριο Οργανικής χημείας του Τμήματος Χημείας για την εκπόνηση μέρους των πειραμάτων μου, καθώς και για την καθοδήγησή του όποτε την χρειάστηκα. Η συμβολή του στην εκπόνηση της διατριβής μου ήταν καθοριστική.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Γεροθανάση Ιωάννη, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, για το άμεσο ενδιαφέρον και τη ευχάριστη συνεργασία μας καθώς επίσης και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του στον κόσμο του Πυρηνικού Μαγνητικού συντονισμού. Η συμβολή του ήταν καθοριστική για τις μελέτες NMR που διεξάχθηκαν κατά την διατριβή μου. Επίσης τον ευχαριστώ γιατί πάντα είχε χρόνο να αφιερώσει στις απορίες μου και για να μου προσφέρει τις σημαντικές υποδείξεις και γνώσεις του.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Καθηγητή κ. Γουρνή Δημήτριο, μέλος της εξεταστικής επιτροπής, για την άψογη συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια. Η συνεργασία μαζί του άνοιξε τον δρόμο στον κόσμο των νανοϋλικών, και αποτέλεσε ένα μεγάλο και αναπόσπαστο κομμάτι της διδακτορικής μου διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Πέτρο Καταπόδη για την υπέροχη συνεργασία μας και την βοήθεια που παρείχε όποτε την χρειάστηκα. Τον Καθηγητή κ. Επαμεινώνδα Βουτσά επίσης για την όμορφη συνεργασία που έχει προκύψει τα τελευταία χρόνια και με μεγάλη μου χαρά θα συνεχιστεί και τα επόμενα. Και τέλος, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Ιωάννη Παυλίδη για την πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθειά του όποτε την χρειάστηκα και την στήριξή του από τα προπτυχιακά μου ακόμα χρόνια μέχρι και σήμερα.

Ένα επίσης πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Δρ. Αγγελική Πολύδερα μέλος Ε.ΔΙ.Π. του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας, για την πολύτιμη στήριξή της όλα αυτά τα χρόνια και το όμορφο περιβάλλον που μου εξασφάλισε. Επίσης την ευχαριστώ για την συνεργασία μας και τις αναλύσεις με τη μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (RSM).

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Δρ. Κοντογιάννη Βασιλική για την βοήθεια και λήψη των φασμάτων LC-MS καθώς και για την συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια. Τον Δρ. Κων/νο Τσιαφούλη, προσωπικό του Κέντρου NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, για την βοήθεια στη λήψη φασμάτων NMR. Τον Ευγένιο Στύλο για την λήψη φασμάτων μάζας και την βοήθειά του όποτε την χρειάστηκα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας από το 2015 έως και σήμερα: την Αθηνά Παπαδοπούλου, την Μαρία Κατσούρα, τον Γιώργο Ορφανάκη, Δήμητρα Καραγεώργου, τη Νικολίνα Βούρβου, την Κωνσταντίνα Τζιμοπούλου, την Κωνσταντίνα Νάκου, την Έλενα Γκάντζου, την Σύλβια Πρίσκα, την Αρχοντούλα Γιαννακοπούλου, την Ρένια Φωτιάδου, την Ματίνα Σπύρου. και όλους τους προπτυχιακούς φοιτητές που πέρασαν από το εργαστήριο, για τη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα του εργαστηρίου αλλά και για την φιλία που αναπτύχθηκε με πολλούς από αυτούς και ομόρφυνε την ζωή μου. Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην Μιχαέλα Πατήλα μια υπέροχη συνάδελφο και φίλη που με βοήθησε και με στήριξε όλα αυτά τα χρόνια σε επαγγελματικό και προσωπικό επίπεδο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη του Εργαστηρίου Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου, Ελένη Θώμου και Νικόλαο Χαλμπέ για την συνεργασία μας όσο αφορά την σύνθεση και τον χαρακτηρισμό των νανοϋλικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Κωνσταντίνο Σπύρου για την υπέροχη συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια, για την φιλική διάθεση, την πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθειά του, αλλά και για τον κόπο και τον χρόνο που κατέβαλε στην ανάλυση των νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων που αναπτύχθηκαν στην παρούσα μελέτη. Η συμβολή του ήταν καθοριστική στην εκπόνηση της παρούσας μελέτης.

Ευχαριστώ πολύ και τα μέλη του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας του Τμήματος Χημείας Ρένο Βρετό, Χρήστο Χατζηγιάννη, Δημήτρη Διαμαντή, Αντώνη Τσαϊλάνη, Χριστίνα Παπαεμανουήλ και Ανδρονίκη Κωσταγιάννη για την συνεργασία και βοήθειά τους όλα αυτά τα χρόνια.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα μέλη του εργαστηρίου Φυσιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και ιδιαίτερα τον Ιωάννη Σίμο για την όμορφη συνεργασία του και για τις μελέτες κυτταροτοξικότητας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ σε όλους του φίλους και τους ανθρώπους που ήταν δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια. Που με στήριξαν με την αγάπη και την φιλία τους και που δεν θα τα είχα καταφέρει χωρίς αυτούς. Ευχαριστώ την Ελένη Σαγγάρη, την Στεφανία Χαραλαμπίδου, την Δήμητρα Κελεσενλή, την Στέλλα Τσιάγκα, την Μάρω Ζαράνη, την Μαρία Χατζηθαασασιάδου, την Μαριάννα Σακκά, την Βασιλική Κοντογιάννη, την Αλεξάνδρα Πριμηκύρη, τον Παναγιώτη Ευσταθόπουλο και τον Κωνσταντίνο Βαρδή για την αγάπη την φιλία τους και τις πολύ όμορφες στιγμές.

Τέλος, το ευχαριστώ είναι λίγο για να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου Ιωάννα Καστανιώτη και Βασίλη Χατζηκωνσταντίνου αλλά και στην πολυαγαπημένη μου αδερφή Ελένη, για την αμέριστη συμπαράστασή τους όλα αυτά τα χρόνια. Τους ευχαριστώ που στάθηκαν δίπλα μου όχι μόνο ηθικά και οικονομικά αλλά και για την παρότρυνση και στήριξή τους να ακολουθήσω τα ενδιαφέροντα και τις σπουδές μου. Τους ευχαριστώ πάνω απ'όλα για τι είναι αστείρευτη πηγή αγάπης στη ζωή μου!!!. Σ' αυτούς και σε όλους όσους με στήριξαν αφιερώνω τη διατριβή μου με όλη μου την αγάπη.

## ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής προέκυψαν:

### Οι ακόλουθες δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά

1. Alexandra V. Chatzikonstantinou, Angeliki C. Polydera, Eleni Thomou, Nikolaos Chalmpes, Turki N. Baroud, Enotiadis Apostolos, Luiz Estevez, Michaela Patila, Mohamed Amen Hammami, Konstantinos Spyrou, Emmanuel P. Giannelis, Andreas G. Tzakos, Dimitrios Gournis, Haralambos Stamatis, "Lipase immobilized on magnetic hierarchically porous carbon materials as a versatile tool for the synthesis of bioactive quercetin derivatives", *Bioresource Technology Reports*, In press.
2. Alexandra V. Chatzikonstantinou, Antonis Tsiailanis, Ioannis P. Gerothanassis, Haralambos Stamatis, Enrico Ravera, Marco Fragai, Claudio Luchinat, Giacomo Parigi, Andreas G. Tzakos, 'The NMR Tube Bioreactor', *Methods in Enzymology*, Elsevier Inc., In press.
3. Alexandra V. Chatzikonstantinou, Elena Gkantzou, Eleni Thomou, Nikolaos Chalmpes, Kyriaki-Marina Lyra, Vasiliki G. Kontogianni, Konstantinos Spyrou, Michaela Patila, Dimitrios Gournis and Haralambos Stamatis, "Enzymatic Conversion of Oleuropein to Hydroxytyrosol Using Immobilized  $\beta$ -Glucosidase on Porous Carbon Cuboids", *Nanomaterials* 2019, 9 (8), 1–19.
4. Alexandra V. Chatzikonstantinou, Elena Gkantzou, Dimitrios Gournis, Michaela Patila, Haralambos Stamatis, "Stabilization of laccase through immobilization on functionalized GO-derivatives", *Methods in Enzymology*; Elsevier Inc., 2018; Vol. 609, pp 47–81..
5. Orfanakis, G., Patila, M., Chatzikonstantinou, A. V., Lyra, K., Kouloumpis, A., Spyrou, K., Katapodis P, Paipetis A., Rudolf P., Gournis D., Stamatis H. "Hybrid Nanomaterials of Magnetic Iron Nanoparticles and Graphene Oxide as Matrices for the Immobilization of  $\beta$  -Glucosidase : Synthesis, Characterization, and Biocatalytic Properties", *Frontiers in Materials*, 2018, 5, 1–11..
6. Chatzikonstantinou AV, Chatziathanasiadou MV, Ravera E, Fragai M, Parigi G, Gerothanassis IP, Luchinat C, Stamatis H, Tzakos AG, "Enriching the biological space of natural products and charting drug metabolites, through real time biotransformation monitoring: The NMR tube bioreactor", 2017, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 2018, 1868 (1), 1–8.

### **Δίπλωμα Ευρεσιτεχνίας**

Πανελλήνιο Δίπλωμα Ευρεσιτεχνίας: Α. Τζάκος, Χ. Σταμάτης, Ι. Γεροθανάσης, Α. Χατζηκωνσταντίνου, Μ. Χατζηαθανασιάδου, “Σύστημα και Μέθοδος για την παρασκευή, ταυτοποίηση και βιολογική αξιολόγηση φυσικών αναλόγων” Οργανισμός Βιομηχανικής Ιδιοκτησίας 2016, κωδικός 1009100.

### **Δημοσίευση σε πρακτικά συνεδρίων με κρίση**

A Tzakos, A Chatzikonstantinou, I Gerothanassis, M Chatziathanasiadou, C Stamatis, N Sayyad, “Enriching the biologically relevant space sampled by natural products through biotransformations: speeding up the natural-product based drug discovery process”, *Planta Medica*, 11/2015, Volume 81, Issue 16 SL3B\_05.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπό της παρούσας διατριβής αποτελεί η ανάπτυξη ενζυμικά καταλυόμενων διεργασιών για τον στοχευμένο βιομετασχηματισμό φυσικών προϊόντων, με στόχο την αναβάθμιση των ιδιοτήτων τους. Τα νανοδομημένα υλικά με βάση τον άνθρακα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα πεδία της νανοβιοκατάλυσης και της ενζυμικής βιοτεχνολογίας. Οι ιδιαίτερες ιδιότητες που εμφανίζουν, όπως η αυξημένη ειδική επιφάνεια, η εξαιρετική μηχανική σταθερότητα, η ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα και οι εξειδικευμένες οπτικές ιδιότητες ανάλογα με το είδος του νανοϋλικού έχουν προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον.

Τα νανοϋλικά που χρησιμοποιήθηκαν με βάση των άνθρακα ήταν τα νανοδομημένα υλικά ιεραρχημένου πορώδους άνθρακα (hierarchically porous carbon materials, HPCs) και οι κυβοειδείς πορώδεις άνθρακες (porous carbon cuboids, PCCs). Τα υλικά αυτά παρουσιάζουν ιεραρχημένο πορώδες, μεγάλη διαθέσιμη επιφάνεια και ιδιαίτερες ιδιότητες μεταφοράς μάζας και χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς για την ακινητοποίηση ενός οξειδωαναγωγικού ενζύμου, της λακάσης και δύο υδρολυτικών ενζύμων, της λιπάσης και της β-γλυκοσιδάσης. Τα νανοϋλικά αυτά χρησιμοποιήθηκαν στην απλή τους μορφή και μετά από χημική επεξεργασία, είτε για να αποκτήσουν λειτουργικές ομάδες οξυγόνου (κυρίως υδροξυλομάδες και καρβοξυλομάδες), είτε για να αποκτήσουν μαγνητικές ιδιότητες με την προσθήκη νανοσωματιδίων σιδήρου. Η ακινητοποίηση των ενζύμων πραγματοποιήθηκε με δύο τρόπους, με απλή προσρόφηση ή με τη δημιουργία ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ των ελεύθερων αμινομάδων των ενζύμων και των καρβοξυλομάδων ή υδροξυλομάδων των νανοϋλικών. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν διάφορες φασματοσκοπικές και μικροσκοπικές μέθοδοι, για τον χαρακτηρισμό των νανοβιοκαταλυτών ως προς τη δομή τους και την καταλυτική τους συμπεριφορά.

Η χημεία της επιφάνειας των νανοϋλικών παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση τους με τις πρωτεΐνες, επηρεάζοντας τόσο το ποσοστό ακινητοποίησης όσο και την καταλυτική δραστικότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων. Ομοίως, οι προσεγγίσεις ακινητοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν, φάνηκε να επιδρούν στην καταλυτική δραστικότητα, καθώς και στη θερμική και λειτουργική σταθερότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων. Οι νανοβιοκαταλύτες που αναπτύχθηκαν επέδειξαν υψηλή καταλυτική δραστικότητα και σταθερότητα. Πιο συγκεκριμένα, η ακινητοποιημένη λακάση σε οξειδωμένα HPCs παρουσίασε περίπου 5 φορές καλύτερη σταθερότητα από το ελεύθερο ένζυμο και μετά από 5 κύκλους επαναχρησιμοποίησης διατήρησε το 50 % της δραστικότητάς της. Αντίστοιχα, η ακινητοποιημένη λιπάση σε μαγνητικά HPCs διατήρησε σχεδόν το 100 % της δραστικότητάς της μετά από επώαση 24 h στους 40 °C, σε οργανικό διαλύτη. Η λειτουργική της σταθερότητα είναι επίσης υψηλή, καθώς μετά από 10 κύκλους επαναχρησιμοποίησης διατηρεί το 98 % την δραστικότητάς της. Στην περίπτωση της β-γλυκοσιδάσης, ακινητοποιήθηκαν β-γλυκοσιδάσες από δύο διαφορετικούς οργανισμούς (από αμύγδαλα και από *Thermotoga maritima*), σε PCCs και σε οξειδωμένα PCCs, με ομοιοπολικό και μη ομοιοπολικό τρόπο. Η μελέτη έδειξε ότι η ικανότητα ακινητοποίησης, η καταλυτική δραστικότητα και η σταθερότητα των δύο ενζύμων επηρεάστηκε από το είδος του φορέα και τον τρόπο ακινητοποίησης. Οι νανοβιοκαταλύτες αυτοί παρουσίασαν επίσης υψηλή θερμική και λειτουργική σταθερότητα, με αξιοσημείωτη την ακινητοποιημένη β-γλυκοσιδάση από *Thermotoga maritima* η οποία, μετά από 10 συνεχόμενους κύκλους επαναχρησιμοποίησης, διατήρησε πάνω από το 90 % της δραστικότητάς της.

Οι νανοβιοκαταλύτες που αναπτύχθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για την βιομετατροπή διάφορων φυσικών προϊόντων με σκοπό την βελτίωση της βιολογικής τους δράσης. Η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη είναι φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται κυρίως στο λάδι και το κρασί. Είναι γνωστές για τις ποικίλες βιολογικές τους δράσεις όπως αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντικαρκινική κ.α. Το νανοβιοκαταλυτικό σύστημα που περιείχε ακινητοποιημένη λακάση χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για την τροποποίηση αυτών των φαινολών. Η τροποποίηση αυτή οδήγησε στη δημιουργία κυρίως διμερών παραγώγων της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης, οι οποίες εμφάνισαν αυξημένη αντιμικροβιακή δράση έναντι δύο βακτηρίων, και καλύτερη ικανότητα αναστολής λιπάσης και λιποξυγονάσης σε σχέση με τις πρόδρομες ενώσεις. Στη συνέχεια, οι ακινητοποιημένες β-γλυκοσιδάσες χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς για την παραγωγή υδροξυτυροσόλης από πρότυπη ένωση ελευρωπαΐνης, καθώς και για τον εμπλουτισμό εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε υδροξυτυροσόλη με σκοπό τη βελτίωση της βιολογικής τους δράσης. Η υδροξυτυροσόλη βρίσκεται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στη φύση, έχει χαμηλή απόδοση εκχύλισης από φυσικές πηγές και είναι δύσκολο να συντεθεί χημικά, καθιστώντας τη σύνθεση καθαρής υδροξυτυροσόλης μια διεργασία υψηλού κόστους. Η ελευρωπαΐνη είναι ένα αντιοξειδωτικό που βρίσκεται σε όλα τα μέρη του δέντρου ελιάς και το κύριο προϊόν αποικοδόμησής της είναι η υδροξυτυροσόλη. Επομένως, η σύνθεση υδροξυτυροσόλης από την ελευρωπαΐνη των φύλλων ελιάς αποτελεί μια οικονομικά αποδοτική μέθοδο για την παραγωγή της δυσεύρετης αυτής ένωσης. Οι νανοβιοκαταλύτες β-γλυκοσιδάσης που αναπτύχθηκαν παρουσίασαν υψηλή απόδοση τροποποίησης της ελευρωπαΐνης – πάνω από 90 % μετά από 24 h αντίδρασης. Τα εμπλουτισμένα σε υδροξυτυροσόλη εκχυλίσματα φύλλων ελιάς εμφάνισαν καλύτερη αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δράση. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε κλιμάκωση (Scale-up) της χημειοενζυμικής τροποποίησης των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς από όγκο αντίδρασης 1 mL σε σωληνάρια errendorf σε όγκο αντίδρασης 2 L σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου.

Τέλος, αναπτύχθηκε ο “NMR-tube βιοαντιδραστήρας”, μία μέθοδος τριών σταδίων που έχει διεξαχθεί ολοκληρωτικά μέσα σε ένα σωλήνα NMR 5 mm. Αυτή η απλή μεθοδολογία επιτρέπει: α) την πρόβλεψη της ικανότητας ενός φυσικού προϊόντος ή ενός μείγματος προϊόντων να λειτουργήσουν ως υπόστρωμα για συγκεκριμένα ένζυμα, β) τον γρήγορο έλεγχο διαφορετικών συνθηκών για τη βελτιστοποίηση την απόδοσης της ενζυμικής δράσης, γ) την καταγραφή της εξέλιξης της αντίδρασης βιοτροποποίησης προϊόντος/ών σε πραγματικό χρόνο, χωρίς κανένα προηγούμενο στάδιο κλασματοποίησης ή καθαρισμού, και δ) τον έλεγχο της αλληλεπίδρασης των προϊόντων με πρωτεΐνες στόχους φαρμακευτικού ενδιαφέροντος. Με την χρήση του ‘NMR-tube βιοαντιδραστήρα’ μελετήθηκαν και τροποποιήθηκαν ενζυμικά, από την λιπάση Β από *Pseudozyma (Candida) antarctica*, διάφορα φλαβονοειδή. Από την ενζυμική τροποποίηση προέκυψε μια ποικιλία ακετυλιωμένων παραγώγων των φλαβονοειδών, τα οποία έδειξαν βελτιωμένη αλληλεπίδραση, σε σχέση με τις πρόδρομες ενώσεις, με την αλβουμίνη από ορό βοδιού που χρησιμοποιήθηκε ως πρωτεΐνη φορέας. Η προσέγγιση του NMR-tube βιοαντιδραστήρα χρησιμοποιεί χαμηλές ποσότητες διαλύτη (ο οποίος είναι κυρίως υδατικός) και παραλείπει όλα τα χρονοβόρα ενδιάμεσα στάδια του καθαρισμού σε μια κλασική συνθετική προσέγγιση. Η χρήση του NMR δίνει τη δυνατότητα ταυτοποίησης ενώσεων ενώ ταυτόχρονα η χρήση των ενζύμων εξαλείφει την ανάγκη για προστασία/αποπροστασία και εξασφαλίζει ήπιες



συνθήκες αντίδρασης. Έτσι αποτελεί μια πράσινη, χρονικά και οικονομικά αποδοτική διαδικασία που παρέχει μια απλή διαδρομή από τα φυσικά προϊόντα στη σύνθεση προϊόντων με ενισχυμένη βιολογική-φαρμακευτική δράση.

Συμπερασματικά, τα νανοδομημένα υλικά με βάση τον άνθρακα αποτελούν αποτελεσματικούς φορείς ακινητοποίησης ενζύμων, καθώς βελτιώνουν τις καταλυτικές και λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών, οδηγώντας στη δημιουργία ισχυρών βιοκαταλυτικών συστημάτων. Από την άλλη πλευρά, η τροποποίηση φυσικών προϊόντων με βιοτεχνολογικά εργαλεία αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη κατευθυντήρια γραμμή για την σύνθεση ενώσεων με πλούσια βιολογική δράση. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής καταδεικνύουν τα σημαντικά πλεονεκτήματα που προκύπτουν από την εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στην ανάπτυξη βιοκαταλυτικών συστημάτων, κατευθύνοντας την έρευνα προς τον τομέα της νανοβιοτεχνολογίας, έναν κλάδο που μπορεί να προσφέρει μία πληθώρα νέων και εναλλακτικών εφαρμογών.



## ABSTRACT

The current PhD thesis aims at developing enzyme-catalyzed processes for the targeted biotransformation of natural products with the purpose to improve their properties. Carbon-based nanostructured materials play an important role in the fields of nanobiocatalysis and enzyme biotechnology. Their special properties, such as the increased specific surface area, the exceptional mechanical stability, the electrical and thermal conductivity as well as their characteristic optical properties depending on the type of nanomaterial used, have attracted considerable research interest.

In this study, nanostructured hierarchically porous carbon materials (HPCs) and porous carbon cuboids (PCCs) were employed. These types of nanomaterials possess hierarchical porous structure, large surface area and special mass transport properties and were used as carriers for the immobilization of different enzymes - laccase, an oxidoreductase and two hydrolases, namely lipase and  $\beta$ -glucosidase. The nanomaterials used were either in their bare form or chemically modified, in order to obtain functional oxygen groups (mainly hydroxyl- and carboxyl- groups) or to gain magnetic properties after incorporation of ferrous nanoparticles. Enzyme immobilization was carried out in two different methods – by adsorption or by covalent linkage between free amino groups of the enzyme and either carboxyl- or hydroxyl- groups of the nanocarrier. Finally, different spectroscopic and microscopic techniques were employed for the nanobiocatalysts characterization in terms of their structure and catalytic behavior.

Surface chemistry of nanomaterials is of fundamental importance regarding their interaction with biomolecules, affecting both immobilization yield and catalytic activity of immobilized enzymes. Similarly, the immobilization techniques that were utilized seem to affect the catalytic activity, as well as the thermal and operational stability of the immobilized enzymes. The developed nanobiocatalysts exhibited remarkable catalytic activity and stability. In detail, immobilized laccase on oxidized HPCs was proved 5-fold more stable than the enzyme in its free form and retained 50 % of its catalytic activity after 5 cycles of use. Correspondingly, immobilized lipase on magnetic HPCs retained almost 100 % of its activity after incubation at 40 °C for 24 h, in an organic solvent. This system also exhibits high operational stability, since it remains active in a rate of 98 % after 10 cycles of continuous use. In the case of  $\beta$ -glucosidase enzyme, two distinct  $\beta$ -glucosidase enzymes from different organisms (almonds and *Thermotoga maritima*) were immobilized both on PCCs and oxidized PCCs, employing covalent and non-covalent immobilization methods. The study showed that the immobilization efficiency, the catalytic activity and the stability of the two different  $\beta$ -glucosidases were affected by the type of the nanosupport and the immobilization method used. These nanobiocatalysts were also proved highly stable, with  $\beta$ -glucosidase from *Thermotoga maritima* being most notable since it retained over 90 % of catalytic activity after 10 continuous cycles of use.

The nanobiocatalytic systems developed under the scope of the present thesis were subsequently utilized for the biotransformation of various natural products aiming at the improvement of their biological activity. Tyrosol and hydroxytyrosol consist phenolic compounds found mainly in oil and wine. They are widely known for their variety of biological activities, such as antioxidant, antimicrobial, anticancer etc. The nanobiocatalytic system employing immobilized laccase was successively used for the modification of these phenols. The modification process led

mainly to dimeric derivatives of tyrosol and hydroxytyrosol, which demonstrated increased antimicrobial activity towards two different bacterial strains as well as better lipase and lipoxygenase inhibition activity compared to the parent compounds. Following, the immobilized  $\beta$ -glucosidases were successfully employed for the production of hydroxytyrosol from the standard oleuropein compound, while they were also applied for the enrichment of olive leaves extracts in hydroxytyrosol with the purpose to improve their biological activity. Hydroxytyrosol can only be found in minor amounts in nature, has low extract yield from natural sources and is difficult to be chemically synthesized, making the synthesis of pure hydroxytyrosol a costly process. Oleuropein is an antioxidant found in all parts of the olive tree and hydroxytyrosol consists its main degradation product. Therefore, hydroxytyrosol production from oleuropein found in olive leaves can be an efficient process from an economical point of view. The  $\beta$ -glucosidase nanobiocatalysts developed, exhibited high yield of oleuropein modification – over 90 % after 24 h of reaction. The hydroxytyrosol enriched olive leaves extracts demonstrated improved antioxidant, antimicrobial and anticancer activity. Furthermore, scale-up of the chemoenzymatic modification process was carried out, moving from 1 mL Eppendorf tubes to a 2 L batch bioreactor system.

Lastly, an “NMR-tube bioreactor” system was developed, as a three-step method carried out entirely in a 5 mm NMR tube. This simple procedure enables: a) the prediction of the ability of a natural product or a mixture of products to perform as a substrate for particular enzymes, b) the fast evaluation of different conditions in order to optimize the performance of the enzyme, c) the real time monitoring of the biotransformation, with no need of previous fractionation or purification stages, and d) the investigation of interaction of different products with a target protein of pharmaceutical interest. The “NMR-tube bioreactor” was used to study different flavonoids and enzymatically modify them with the use of lipase B from *Pseudozyma (Candida) antarctica*. Following the enzymatic modification, a variety of acetylated flavonoids derivatives were produced, which demonstrated improved interaction with the carrier protein – bovine serum albumin. The “NMR-tube bioreactor” method utilizes small amounts of solvents (which are mainly aqueous) and skips the time-consuming intermediate stages of purification that are encountered in a classical synthetic approach. The NMR technique provides the ability to identify distinct compounds while the incorporation of enzymes eliminates the need for protection/deprotection steps and reassures mild reaction conditions. Thus, it consists a green, timely and economically effective process which provides a simple route from natural products to the production of products with improved biological/pharmaceutical action.

As a conclusion, carbon-based nanostructured materials consist efficient carriers for enzyme immobilization, since they were proved to improve the catalytic and operational properties of proteins, leading to the formation of robust biocatalytic systems. On the other hand, modification of natural compounds with biotechnology tools is a much promising guideline for the synthesis of compounds with enriched biological activity. The results of the present thesis indicate the important benefits which arise from the incorporation of nanotechnology in the development of biocatalytic systems, directing the research to the field of nanobiotechnology, with a plethora of new and alternative applications.

## Συντμήσεις & Συμβολισμοί

ABTS	2,2-Δις αζινο-(3-αιθυλοβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ)
AcCN	Ακετονιτρίλιο
AFM	Μικροσκόπιο ατομικών δυνάμεων
Albgl	β-γλυκοσιδάση από αμύγδαλα
BSA	Αλβουμίνη από ορό βοδιού
CaLB	Λιπάση από <i>Pseudozyma (Candida) antarctica</i>
CD	Κυκλικός διχρωισμός
Cyt-c	Κυτόχρωμα c C107T yeast iso-1
DMSO	Αιμεθυλοσουλφοξείδιο
DPPH	2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο
CRL	Λιπάση από <i>Candida rugosa</i>
EDC	Χλωρίδιο του 1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)καρβοδιιμιδίου
FTIR	Φασματοσκοπία υπεράυθρου με μετασχηματισμό Fourier
HEPES	4-(20 υδροξυαιθυλ)πιπεραζινο-1-αιθανοσουλφονικό οξύ
HPC	Υλικά ιεραρχημένου πορώδους άνθρακα
HPCFe	Μαγνητικά υλικά ιεραρχημένου πορώδους άνθρακα
HPCox	Οξειδωμένα υλικά ιεραρχημένου πορώδους άνθρακα
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης
HSQC	Ετεροπυρηνική συσχέτιση μέσω απλού κβάντου
HMBC	Ετεροπυρηνική συσχέτιση μέσω πολλαπλών δεσμών
HT	Υδροξυτυροσόλη
<i>K<sub>m</sub></i>	Σταθερά Michaelis-Menten
LC-MS	Υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας
PCC	Πορώδεις Κυβοειδείς άνθρακες
PCCox	Οξειδωμένοι Πορώδεις Κυβοειδείς άνθρακες
p-NPB	Βουτυρικός εστέρας της 4-νιτροφαινόλης
p-NPG	Γλυκοπυρανοζίτης της 4-νιτροφαινόλης
MTBE	Τριτοταγής- βουτυλο μεθυλο αιθέρας
NHS	N-υδροξυσουκινιμίδιο
NMR	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
OLE	Ελευρωπαΐνη
RSM	Μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης
SLA	Λινελαϊκό οξύ
SLO	Λιποξυγονάση τύπου I από το φυτό <i>Glycine max</i> (σόγια)
STD	Διαφορά μεταφοράς κορεσμού
<i>t</i> <sub>1/2</sub>	Χρόνος ημίσειας ζωής
Tmbgl	β-γλυκοσιδάση από <i>Thermotoga maritima</i>
TvL	Λακάση από <i>Trametes versicolor</i>
Tween 20	Μονολαουρικός εστέρας της πολυοξυ-αιθυλενο-σορβιτάνης
TR	Τυροσόλη
UV-vis	Υπεριώδες-ορατό
<i>V<sub>max</sub></i>	Μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης
XPS	Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X



## Πίνακας περιεχομένων

<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b> .....	1
<b>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	3
<b>2. Οξειδοαναγωγάσες</b> .....	7
2.1. Λακάση .....	7
2.1.1 Δομή .....	8
2.1.2 Μηχανισμοί αντίδρασης λακάσης: .....	9
2.1.3. Βιοτεχνολογικές εφαρμογές των λακασών .....	11
<b>3. Υδρολάσες</b> .....	13
3.1. Λιπάσες .....	13
3.1.1 Δομή .....	13
3.1.2 Καταλυτικός μηχανισμός λιπασών .....	15
3.1.3 Εφαρμογές της <i>Candida antartica</i> λιπάσης Β .....	16
3.2. β-Γλυκοσιδάσες .....	18
3.2.1. Δομή .....	18
3.2.2. Μηχανισμός δράσης .....	19
3.2.3. Εφαρμογές των β-γλυκοσιδασών .....	19
<b>4. Νανοβιοτεχνολογία</b> .....	21
4.1. Νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα .....	21
4.1.1 Ιεραρχημένου πορώδους άνθρακες (HPC) .....	22
4.1.2 Πορώδεις κυβοειδείς άνθρακες (PCC) .....	23
4.2. Ακίνητοποίηση ενζύμων σε νανοϋλικά .....	25
4.2.1. Ακίνητοποίηση ενζύμων .....	25
4.2.2 Μέθοδοι και τεχνικές ακίνητοποίησης ενζύμων .....	25
4.2.2.1. Φυσικές μέθοδοι ακίνητοποίησης .....	26
4.2.2.3. Ακίνητοποίηση ενζύμων σε νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα .....	27
4.2.2.3.1. Ακίνητοποίηση ενζύμων σε νανοϋλικά μέσω φυσικής προσρόφησης .....	28
4.2.2.3.2. Ομοιοπολική ακίνητοποίηση ενζύμων σε νανοϋλικά μέσω ενεργοποίησης της επιφάνειάς τους με τελικές καρβοξυλομάδες .....	28
4.2.2.4. Δομή ενζύμων ακίνητοποιημένων σε νανοϋλικά .....	29
4.2.2.4.1. Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων-Χ, XPS .....	30
4.2.2.4.2. Μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων, AFM .....	30
4.2.2.4.3. Κυκλικός διχρωισμός, CD .....	31
4.2.2.4.4. Φασματοσκοπία φθορισμού .....	32
4.2.2.4.5. Φασματοσκοπία υπέρυθρου, FTIR .....	32

<b>5. Φυσικά προϊόντα-Βιοδραστικές ενώσεις</b> .....	33
5.1. Τα φυσικά προϊόντα στην ανακάλυψη φαρμάκων .....	35
5.2. Η ελιά .....	36
5.2.1. Φαινολικές ενώσεις στα φύλλα ελιάς .....	36
5.2.1.1. Φαινολικές ενώσεις .....	36
5.2.1.2. Κύριες φαινολικές ενώσεις στα φύλλα ελιάς .....	37
5.2.2. Ελευρωπαΐνη .....	37
5.2.3. Υδροξυτυροσόλη .....	38
5.2.4. Τυροσόλη .....	39
5.2.5. Μέθοδοι ανάλυσης της σύστασης φυσικών προϊόντων και φυτικών εκχυλισμάτων ...	39
5.2.5.1. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) .....	39
5.2.5.2. Φασματομετρία μάζας (MS) .....	40
5.2.5.3. Υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS, ή HPLC-MS) .....	41
5.2.5.4. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) .....	41
5.2.5.4.1. Η φασματοσκοπία NMR στην μελέτη φυσικών προϊόντων .....	41
5.2.5.4.2. Η φασματοσκοπία NMR στην μελέτη αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνικών μορίων με φυσικά προϊόντα .....	43
<b>6. In vitro μεθοδολογίες προσδιορισμού βιολογικής δράσης</b> .....	44
6.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο μελέτης σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH* .....	44
6.2. Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης .....	44
6.2.1. Βακτηριακά στελέχη για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης .....	45
6.3. Μελέτη αναστολής ενζύμων .....	45
6.3.1. Αναστολή ενζυμικής δραστηριότητας της λιποξυγονάσης τύπου I από το φυτό σόγια ..	46
6.3.2. Αναστολή ενζυμικής δραστηριότητας της λιπάσης από <i>Candida rugosa</i> .....	46

<b>Κεφάλαιο 1: Ενίσχυση της βιολογικής δράσης της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης μέσω της βιοτροποποίησής τους από ακινητοποιημένη λακάση σε τροποποιημένο υλικό ιεραρχημένου πορώδους άνθρακα</b> .....	47
<b>1.1 Εισαγωγή</b> .....	47
<b>1.2. Υλικά και Μέθοδοι</b> .....	49
1.2.1. Υλικά .....	49
1.2.2. Μέθοδοι .....	51
1.2.2.1. Ομοιοπολική ακινητοποίηση της TvL σε HPCox .....	51
1.2.2.2. Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X .....	51



1.2.2.3. Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier .....	51
1.2.2.4. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού .....	52
1.2.2.5. Φασματοσκοπία φθορισμού .....	52
1.2.2.6. Προσδιορισμός απόδοσης ακινητοποίησης .....	53
1.2.2.7. Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης λακάσης.....	53
1.2.2.8. Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων της λακάσης TvL.....	53
1.2.2.9. Μελέτη επαναχρησιμοποίησης του νανοβιοκαταλύτη HPCox-TvL.....	54
1.2.2.10. Μελέτη σταθερότητας της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης TvL .....	54
1.2.2.11. Ενζυμική τροποποίηση της τυροσόλης.....	54
1.2.2.12. Ενζυμική τροποποίηση της υδροξυτυροσόλης.....	54
1.2.2.13. Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης.....	55
1.2.2.14. Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός.....	55
1.2.2.15. Έλεγχος αναστολής της δραστηριότητας λιποξυγονάσης τύπου I από το φυτό σόγια από την τυροσόλη και την υδροξυτυροσόλη πριν και μετά την ενζυμική τους τροποποίηση .....	55
1.2.2.16. Έλεγχος αναστολής της δραστηριότητας λιπάσης από <i>Candida rugosa</i> από την τυροσόλη και την υδροξυτυροσόλη πριν και μετά την ενζυμική τους τροποποίηση .....	56
1.2.2.17. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης πριν και μετά την ενζυμική τους τροποποίηση σε βακτηριακούς πληθυσμούς .....	56
<b>1.3. Αποτελέσματα-Συζήτηση .....</b>	<b>58</b>
1.3.1. Μελέτη αλληλεπίδρασης της λακάσης TvL με τα νανοϋλικά HPC και HPCox.....	58
1.3.2. Προετοιμασία και χαρακτηρισμός του νανοβιοκαταλύτη HPCox-TvL .....	61
1.3.3. Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης λακάσης.....	64
1.3.4. Μελέτη σταθερότητας της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης TvL .....	65
1.3.5. Μελέτη επαναχρησιμοποίησης της ακινητοποιημένης TvL σε HPCox.....	66
1.3.6. Ενζυμική τροποποίηση της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης από τον νανοβιοκαταλύτη HPCox-TvL.....	67
1.3.7. Μελέτη της αναστολής της δράσης της λιποξυγονάσης από το φυτό σόγια και της λιπάσης από <i>Candida rugosa</i> από την τυροσόλη και την υδροξυτυροσόλη πριν και μετά την ενζυμική τους τροποποίησή. ....	69
1.3.8. Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης, πριν και μετά την ενζυμική τους τροποποίηση, σε βακτηριακούς πληθυσμούς .....	72
<b>1.4. Συμπεράσματα .....</b>	<b>75</b>

**Κεφάλαιο 2: Λιπάση κινητοποιημένη σε μαγνητικό υλικό ιεραρχημένου πορώδους άνθρακα ως βιοτεχνολογικό εργαλείο για την σύνθεση βιοδραστικών παραγώγων κερσετίνης .....77**

<b>2.1 Εισαγωγή</b> .....	77
<b>2.2. Υλικά και Μέθοδοι</b> .....	79
2.2.1. Υλικά .....	79
2.2.2. Μέθοδοι .....	80
2.2.2.1. Ομοιοπολική ακινητοποίηση της CaLB σε HPCFe .....	80
2.2.2.2. Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X και φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier .....	81
2.2.2.3. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού .....	81
2.2.2.4. Προσδιορισμός απόδοσης ακινητοποίησης .....	81
2.2.2.5. Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας του νανοβιοκαταλύτη .....	81
2.2.2.6. Προσδιορισμός σταθερότητας της CaLB σε οργανικούς διαλύτες .....	82
2.2.2.7. Σύνθεση της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης (PQ) .....	82
2.2.2.8. Αλκοόλυση της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης από τον νανοβιοκαταλύτη HPCFe-CaLB .....	82
2.2.2.9. Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης .....	82
2.2.2.10. Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός .....	83
2.2.2.11. Πειραματικός σχεδιασμός και στατιστική ανάλυση .....	83
2.2.2.12. Μελέτη επαναχρησιμοποίησης της ακινητοποιημένης CaLB σε HPCFe .....	84
<b>2.3. Αποτελέσματα-Συζήτηση</b> .....	85
2.3.1. Προετοιμασία και χαρακτηρισμός του νανοβιοκαταλύτη HPCFe-CaLB .....	85
2.3.2. Δομικές μελέτες της ακινητοποιημένης λιπάσης .....	88
2.3.3. Βελτιστοποίηση της σύνθεσης του αναλόγου 3,5,7-τριακετοξυ-3',4'-διυδροξυφλαβόνης (P1) με την χρήση της μεθοδολογίας επιφάνειας απόκρισης. ....	90
2.3.4. Επαναχρησιμοποίηση του νανοβιοκαταλύτη HPCFe-CaLB .....	98
<b>2.4. Συμπεράσματα</b> .....	99

**Κεφάλαιο 3: Εμπλουτισμός εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε υδροξυτυροσόλη μέσω της ενζυμικής τροποποίησης της ελευρωπαϊνης από ακινητοποιημένη β-γλυκοσιδάση σε πορώδεις κυβοειδείς άνθρακες και βιολογική αξιολόγηση των εκχυλισμάτων αυτών .....101**

<b>3.1. Εισαγωγή</b> .....	101
<b>3.2. Υλικά και Μέθοδοι</b> .....	104
3.2.1. Υλικά .....	104
3.2.2. Μέθοδοι .....	105
3.2.2.1. Φασματοσκοπία φθορισμού .....	105

3.2.2.2. Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων Χ και φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier .....	106
3.2.2.3. Ομοιοπολική ακινητοποίηση των β-γλυκοσιδασών σε PCC και PCCox .....	106
3.2.2.4. Μη ομοιοπολική ακινητοποίηση των β-γλυκοσιδασών σε PCC και PCCox .....	106
3.2.2.5. Προσδιορισμός απόδοσης ακινητοποίησης .....	107
3.2.2.6. Προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας των νανοβιοκαταλυτών .....	107
3.2.2.7. Προσδιορισμός θερμικής σταθερότητας των ελεύθερων και ακινητοποιημένων β-γλυκοσιδασών .....	107
3.2.2.8. Επεξεργασία φύλλων ελιάς .....	108
3.2.2.9. Παρασκευή υδατικών εκχυλισμάτων από φύλλα ελιάς .....	108
3.2.2.10. Χημειοενζυμική μετατροπή της ελευρωπαϊκής σε υδροξυτυροσόλη .....	108
3.2.2.11. Μελέτη επαναχρησιμοποίησης των ακινητοποιημένων β-γλυκοσιδασών .....	108
3.2.2.12. Χημειοενζυμική τροποποίηση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς .....	109
3.2.2.13. Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης .....	109
3.2.2.14. Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός .....	109
3.2.2.15. Φωτομετρικός προσδιορισμός ολικών φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς .....	110
3.2.2.16. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης πρότυπων ενώσεων και εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς, με τη δοκιμή σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH* .....	110
3.2.2.17. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης πρότυπων ενώσεων και εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε βακτηριακούς πληθυσμούς .....	111
<b>3.3. Αποτελέσματα-Συζήτηση .....</b>	<b>112</b>
3.3.1. Αποτελεσματικότητα ακινητοποίησης και δραστηριότητα των ακινητοποιημένων β-γλυκοσιδασών .....	112
3.3.2. Χαρακτηρισμός των νανοβιοκαταλυτών .....	114
3.3.3. Θερμική σταθερότητα της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης β-γλυκοσιδάσης ....	118
3.3.4. Χημειο ενζυμική μετατροπή της ελευρωπαϊκής σε υδροξυτυροσόλη από β-γλυκοσιδάση .....	119
3.3.5. Μελέτη επαναχρησιμοποίησης της ακινητοποιημένης β-γλυκοσιδάσης .....	120
3.3.6. Χημειοενζυμική τροποποίηση εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς .....	121
3.3.7. Κλιμάκωση (Scale-up) της χημειοενζυμικής τροποποίησης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς .....	124
3.3.8. Μελέτη προσδιορισμού των ολικών φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς, .....	127
3.3.9. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς και των κύριων ενώσεων τους .....	128

3.3.10. Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς και των κύριων ενώσεων τους σε βακτηριακούς πληθυσμούς.....	129
3.3.11. Μελέτη κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς.....	131
3.3.13. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών (σε κύτταρα LMS).....	134
<b>3.4. Συμπεράσματα.....</b>	<b>135</b>

#### **Κεφάλαιο 4: Ανάπτυξη του NMR-tube βιοαντιδραστήρα για την παρασκευή, ταυτοποίηση και βιολογική αξιολόγηση αναλόγων φυσικών προϊόντων.....**

<b>4.1. Εισαγωγή.....</b>	<b>137</b>
<b>4.2. Υλικά και Μέθοδοι.....</b>	<b>139</b>
4.2.1. Υλικά.....	139
4.2.1.1. Βιοκαταλύτες-Πρωτεΐνες.....	139
4.2.1.2. Υποστρώματα.....	139
4.2.1.3. Διαλύτες.....	139
4.2.1.4. Λοιπά αντιδραστήρια.....	139
4.2.1.5. Οργανολογία.....	140
4.2.2. Μέθοδοι.....	140
4.2.2.1. Μελέτη αλληλεπίδρασης διάφορων φλαβονοειδών με την CaLB μέσω ανάλυσης STD NMR.....	140
4.2.2.2. Μελέτη αλληλεπίδρασης πυρογαλλόλης με το Cyt-c μέσω ανάλυσης STD NMR.....	140
4.2.2.3. <i>In situ</i> καταγραφή της ακετυλίωσης των φλαβονοειδών μέσα στον NMR-tube βιοαντιδραστήρα με NMR.....	141
4.2.2.4. Ακίνητοποίηση του Cyt-c σε celite μέσω προσρόφησης.....	141
4.2.2.5. <i>In situ</i> καταγραφή της οξειδωσης της πυρογαλλόλης μέσα στον NMR-tube βιοαντιδραστήρα με NMR.....	141
4.2.2.6. Σύνθεση της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης.....	142
4.2.2.7. Αλκοόλυση της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης από την CaLB.....	142
4.2.2.8. Μελέτη αλληλεπίδρασης προϊόντων βιοτροποποίησης με την BSA μέσω ανάλυσης STD NMR.....	142
4.2.2.9. 2D $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ SOFAST HMQC.....	143
<b>4.3. Αποτελέσματα-Συζήτηση.....</b>	<b>144</b>
4.3.1. 1 <sup>ο</sup> Βήμα: Ταχεία πρόβλεψη της ικανότητας των φυσικών προϊόντων να αποτελούν υποστρώματα ενζύμων μέσω ανάλυσης STD NMR και της τοποεκλεκτικότητας της βιοτροποποίησης.....	144
4.3.2. 2 <sup>ο</sup> Βήμα: Καταγραφή σε πραγματικό χρόνο του βιομετασχηματισμού φυσικών προϊόντων μέσα στον NMR-tube βιοαντιδραστήρα.....	147

4.3.3. 3 <sup>ο</sup> Βήμα: Άμεσος έλεγχος των προϊόντων βιοτροποποίησης ως προς την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες φαρμακευτικού ενδιαφέροντος.....	152
<b>4.4. Συμπεράσματα .....</b>	<b>156</b>
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>157</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>161</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι-ΙV</b>	



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Βιοτεχνολογικές διεργασίες, έχουν διεισδύσει δυναμικά, εδώ και πολλές δεκαετίες, στον τομέα της υγείας, της γεωργίας, και σε ένα πεδίο της σύγχρονης βιοτεχνολογίας, της «λευκή βιοτεχνολογία». Η λευκή βιοτεχνολογία αποτελεί την εφαρμογή της σύγχρονης βιοτεχνολογίας για την βιώσιμη παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας από ανανεώσιμες πρώτες ύλες, μέσω της χρήσης ζωντανών κυττάρων ή/και απομονωμένων ενζύμων. Μεταξύ των διαφόρων εφαρμογών που έχουν αναπτυχθεί στα πλαίσια της λευκής βιοτεχνολογίας, η βιοκαταλυτική τροποποίηση φυσικών βιοδραστικών ενώσεων με σκοπό της βελτίωση της βιολογικής τους δράσης, προσελκύει έντονο ενδιαφέρον ως μία βιώσιμη, περιβαλλοντικά φιλική εναλλακτική, που εφαρμόζονται στη βιομηχανία. Η βιοκαταλυτική τροποποίηση της δομής των φυσικών προϊόντων μπορεί να συμβάλλει αφενός στη τροποποίηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ενώσεων αυτών και αφετέρου στη σύνθεση νέων βιοδραστικών παραγώγων με βελτιωμένες βιολογικές δράσεις.

Με βάση τα παραπάνω σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η ανάπτυξη ενζυμικά καταλυόμενων διεργασιών για τον στοχευμένο βιομετασχηματισμό φυσικών προϊόντων, με στόχο την αναβάθμιση των ιδιοτήτων τους. Για την ανάπτυξη νέων βιοκαταλυτικών συστημάτων χρησιμοποιήθηκαν νανοδομημένα υλικά με βάση τον άνθρακα, που παρουσιάζουν σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον στο πεδίο της νανοβιοκαταλυτικής και ενζυμικής βιοτεχνολογίας. Οι νανοβιοκαταλύτες που αναπτύχθηκαν μελετήθηκαν ως προς τα καταλυτικά και δομικά τους χαρακτηριστικά και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για την ενζυμική τροποποίηση φυσικών προϊόντων. Τέλος, μελετήθηκε η βιολογική δράση των φυσικών προϊόντων πριν και μετά την ενζυμική τους τροποποίηση.

Η παρούσα διατριβή διαρθρώνεται σε έξι βασικές ενότητες οι οποίες περιλαμβάνουν το θεωρητικό μέρος, τέσσερα αυτοτελή κεφάλαια τα οποία αποτελούνται από μια μικρή εισαγωγή, τα υλικά και τις μεθόδους, μια εκτενή συζήτηση των αποτελεσμάτων, και μια σύνοψη των συμπερασμάτων του κάθε κεφαλαίου και τέλος τα κύρια συμπεράσματα που προέκυψαν από όλη τη διατριβή.

Στο θεωρητικό μέρος επιχειρείται η θεωρητική και βιβλιογραφική προσέγγιση του θέματος, παραθέτοντας τις απαραίτητες πληροφορίες για την κατανόηση βασικών εννοιών και φαινομένων που παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή. Αναλυτικότερα αρχικά στο κεφάλαιο 1 γίνεται αναφορά για την σημαντικότητα την ενζυμικής βιοτεχνολογίας και στη συνέχεια στα κεφάλαια 2 και 3 γίνεται μια εκτενής αναφορά στα οξειδοαναγωγικά και υδρολυτικά ένζυμα. Αυτά τα ένζυμα παρουσιάζουν πολυάριθμες εφαρμογές στη βιομηχανία και αποτελούν τους βιοκαταλύτες ενδιαφέροντος στην παρούσα διατριβή. Στο κεφάλαιο 4 επιχειρείται μια θεωρητική εισαγωγή στα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα, και ιδιαίτερα στις κατηγορίες των ιεραρχημένου πορώδους ανθράκων και των πορώδους κυβοειδών ανθράκων, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Παρουσιάζονται επίσης, τα πλεονεκτήματα και οι ιδιότητες των νανοδομημένων υλικών με βάση τον άνθρακα, ενώ παρατίθεται και μια μικρή ανασκόπηση όσο αναφορά τις προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται ευρέως για την ακινητοποίηση ενζύμων στα νανοϋλικά αυτά. Επιπλέον, γίνεται μια εισαγωγή στις βασικές αρχές των μικροσκοπικών και φασματοσκοπικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται για το χαρακτηρισμό των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών και τη μελέτη της δομής τους. Στο κεφάλαιο 5 του

θεωρητικού μέρους γίνεται μια εκτενής αναφορά των φυσικών προϊόντων και της σημασίας τους στην ανακάλυψη φαρμάκων. Παρατίθενται πληροφορίες για τις κατηγορίες, τη δομή και την προέλευσή τους αλλά και για τις βιολογικές δράσεις που παρουσιάζουν. Τέλος, γίνεται μια εισαγωγή στις βασικές αρχές των φασματοσκοπικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό και τον χαρακτηρισμό των φυσικών προϊόντων.

Μετά το θεωρητικό μέρος αναπτύσσονται τέσσερις μελέτες σχετιζόμενες με το θέμα της διατριβής, οι οποίες περιγράφονται σε ξεχωριστά κεφάλαια. Στο 1<sup>ο</sup> κεφάλαιο περιγράφεται η μελέτη της ενίσχυσης της βιολογικής δράσης της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης μέσω της βιοτροποποίησής τους από ακινητοποιημένη λακάση σε τροποποιημένο υλικό ιεραρχημένου πορώδους άνθρακα. Αρχικά γίνεται μια εισαγωγή στο θεωρητικό υπόβαθρο της μελέτης. Στη συνέχεια περιγράφονται τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν. Ακολουθεί μια εκτενής συζήτηση των αποτελεσμάτων, και μια σύνοψη των συμπερασμάτων του συγκεκριμένου κεφαλαίου.

Στο 2<sup>ο</sup> κεφάλαιο περιγράφεται η ανάπτυξη ενός νανοβιοκαταλύτη και πιο συγκεκριμένα μιας λιπάσης κινητοποιημένης σε μαγνητικό υλικό ιεραρχημένου πορώδους άνθρακα, ως βιοτεχνολογικό εργαλείο για την σύνθεση βιοδραστικών παραγώγων κερσετίνης. Αρχικά γίνεται μια εισαγωγή στο θεωρητικό υπόβαθρο της μελέτης και στη συνέχεια περιγράφονται τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν. Ακολουθεί μια εκτενής συζήτηση των αποτελεσμάτων, και μια σύνοψη των συμπερασμάτων του συγκεκριμένου κεφαλαίου.

Στο 3<sup>ο</sup> κεφάλαιο περιγράφεται ο εμπλουτισμός εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε υδροξυτυροσόλη μέσω της ενζυμικής τροποποίησης της ελευρωπαΐνης από ακινητοποιημένη β-γλυκοσιδάση, σε πορώδεις κυβοειδείς άνθρακες και η βιολογική αξιολόγηση των εκχυλισμάτων αυτών. Αρχικά γίνεται μια εισαγωγή στο θεωρητικό υπόβαθρο της μελέτης και στη συνέχεια περιγράφονται τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν. Ακολουθεί μια εκτενής συζήτηση των αποτελεσμάτων, και μια σύνοψη των συμπερασμάτων του συγκεκριμένου κεφαλαίου.

Στο 4<sup>ο</sup> κεφάλαιο περιγράφεται ο η ανάπτυξη του NMR-tube βιοαντιδραστήρα για την παρασκευή, ταυτοποίηση και βιολογική αξιολόγηση αναλόγων φυσικών προϊόντων. Αρχικά γίνεται μια εισαγωγή στο θεωρητικό υπόβαθρο της μελέτης και στη συνέχεια περιγράφονται τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν. Ακολουθεί μια εκτενής συζήτηση των αποτελεσμάτων, και μια σύνοψη των συμπερασμάτων του συγκεκριμένου κεφαλαίου.

Στην τελευταία ενότητα αναπτύσσονται τα κύρια συμπεράσματα των πειραμάτων της παρούσας μελέτης.



## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 1. Τα ένζυμα στη βιοτεχνολογία

Βιοτεχνολογία είναι η εφαρμογή βιολογικών συστημάτων σε τεχνολογικό επίπεδο με στόχο τη βιομηχανική παραγωγή προϊόντων υψηλής αξίας και την ανάπτυξη υπηρεσιών. Βασίζεται σε επιστημονικούς κλάδους όπως η βιοχημεία, η μικροβιολογία, η γενετική μηχανική και υποστηρίζεται από τη βιομηχανική χημεία και τη χημική μηχανική. Οι βιοδιεργασίες που αναπτύσσονται για την παραγωγή βιοτεχνολογικών προϊόντων βασίζονται στη χρήση είτε ζωντανών κυττάρων (μικροβιακά, φυτικά ή ζωικά), είτε ενζύμων που προέρχονται από αυτά τα κύτταρα. Οι βιοτεχνολογικές μετατροπές κατηγοριοποιούνται σε ποικίλες επιμέρους διεργασίες (ζύμωση, βιομετατροπές, ενζυμική κατάλυση), ανάλογα με τον αριθμό των απαραίτητων βημάτων και την πολυπλοκότητα των υποστρωμάτων. Ο όρος βιοκατάλυση συμπεριλαμβάνει τις βιομετατροπές και την ενζυμική κατάλυση. Υπό αυτή την έννοια, βιοκαταλυτικές διεργασίες ορίζονται οι μετατροπές ενός ή περισσότερων υποστρωμάτων σε ένα ή περισσότερα προκαθορισμένα προϊόντα μέσω ενός ή περισσότερων ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων (Bommarius and Riebel-Bommarius, 2004).

Τις τελευταίες δεκαετίες, η σημαντική πρόοδος στην κατανόηση της σχέσης δομής-λειτουργίας πρωτεΐνης έχουν αυξήσει το φάσμα των βιοκαταλυτικών εφαρμογών. Τα ένζυμα (βιοκαταλύτες) δρουν με τη μείωση του ενεργειακού φραγμού των βιοχημικών αντιδράσεων, χωρίς να μεταβάλλονται, ως συνέπεια της αντίδρασης που προάγουν. Ωστόσο, τα ένζυμα προσφέρουν μερικά μοναδικά χαρακτηριστικά έναντι των συμβατικών καταλυτών (Πίνακας 1)(Johannes et al., 2006). Το πιο σημαντικό πλεονέκτημα ενός βιοκαταλύτη είναι η υψηλή εκλεκτικότητά του. Αυτή η εκλεκτικότητα είναι συχνά στέρεο-εκλεκτικότητα, τόπο-εκλεκτικότητα και χήμειο-εκλεκτικότητα. Η υψηλή εκλεκτικότητα είναι σημαντικό πλεονέκτημα στην χημική σύνθεση καθώς μπορεί να προσφέρει αρκετά οφέλη όπως, τη μείωση ή την εξάλειψη των προστατευτικών ομάδων, την ελαχιστοποίηση των παράπλευρων αντιδράσεων, τον ευκολότερο διαχωρισμό των προϊόντων και τη μείωση της επιβάρυνσης του περιβάλλοντος. Άλλα πλεονεκτήματα όπως η υψηλή καταλυτική απόδοση και οι ήπιες λειτουργικές συνθήκες κάνουν την βιοκατάλυση ελκυστική σε εμπορικές εφαρμογές.

**Πίνακας 1.** Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της βιοκατάλυσης σε σύγκριση με τη χημική κατάλυση.

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ	ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ
Γενικά πιο αποδοτική (απαιτείται χαμηλότερη συγκέντρωση ενζύμου)	Ευαίσθητη στην αναστολή υποστρώματος ή προϊόντος
Τα ένζυμα μπορούν να τροποποιηθούν ώστε να αυξηθεί η εκλεκτικότητα, η σταθερότητα και η δραστικότητά τους	Συνήθης διαλύτης το νερό (υψηλό σημείο βρασμού και θερμότητας εξάτμισης)
Πιο εκλεκτική (στεreo-εκλεκτικότητα, τόπο-εκλεκτικότητα, χήμειο-εκλεκτικότητα, εναντιο-εκλεκτικότητα)	Τα ένζυμα βρίσκονται στην φύση σε μόνο μία εναντιομερή μορφή
Ηπιότερες συνθήκες αντίδρασης (pH 5-8, θερμοκρασία (20-40 °C)	Περιορισμένη λειτουργική περιοχή (τα ένζυμα μετουσιώνονται σε υψηλές τιμές θερμοκρασίας και pH)
Φιλική προς το περιβάλλον	Τα ένζυμα μπορούν να προκαλέσουν αλλεργικές αντιδράσεις.

Τα ένζυμα ταξινομούνται σε επτά πλέον οικογένειες. Αρχικά η ταξινόμηση ήταν σε έξι κατηγορίες σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές της επιτροπής ονοματολογίας της Διεθνούς Ένωσης Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (IUBMB) το 1961, με βάση τον τύπο της αντίδρασης που καταλύουν. Ένας τετραψήφιος αριθμός αντιστοιχεί σε κάθε ένζυμο από την επιτροπή ενζύμων (EC) του IUBMB που κάθε αριθμός δηλώνει: τάξη, υποτάξη, υπο-υποτάξη, και εξειδίκευση (υπόστρωμα) (Illanes, 2008). Ωστόσο, έχει καταστεί προφανές ότι καμία από τις έξι κατηγορίες δεν μπορούσε να περιγράψει τη σημαντική ομάδα ενζύμων που καταλύουν την κίνηση ιόντων ή μορίων στις μεμβράνες ή τον διαχωρισμό τους μέσα στις μεμβράνες. Τον Αύγουστο του 2018, η Διεθνής Ένωση Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας ταξινόμησε αυτά τα ένζυμα με μια νέα έβδομη κατηγορία ενζύμων. Οι επτά οικογένειες είναι:

- **E.C.1 Οξειδοαναγωγάσες:** Τα ένζυμα αυτά καταλύουν αντιδράσεις οξείδωσης και αναγωγής, δηλαδή αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων ή ατόμων υδρογόνου ή οξυγόνου. Υπάρχουν 22 υποκατηγορίες οξειδοαναγωγασών και μεταξύ αυτών αρκετές τεχνολογικής σημασίας.
- **E.C.2 Μεταφοράσες:** Τα ένζυμα αυτά καταλύουν τη μεταφορά μιας λειτουργικής ομάδας από έναν δότη σε έναν κατάλληλο αποδέκτη. Υπάρχουν εννέα υποομάδες μεταφορασών ανάλογα με τη χημική φύση της ομάδας που μεταφέρουν. Αυτά τα ένζυμα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των κυττάρων. Μεταξύ αυτών είναι οι: μεθυλο-μεταφοράσες, οι ακυλο-μεταφοράσες κ.α.
- **E.C.3 Υδρολάσες:** Τα ένζυμα αυτά καταλύουν τις αντιδράσεις της υδρόλυσης, δηλαδή της διάσπασης ενός χημικού δεσμού με τη δράση του νερού. Υπάρχουν 12 υποομάδες

υδρολασών ανάλογα με τον τύπο του δεσμού που υδρολύουν. Αυτά τα ένζυμα είναι σημαντικά για τον καταβολισμό, καθώς παρέχουν αφομοιώσιμες θρεπτικές ουσίες στο κύτταρο. Τα περισσότερα από τα ένζυμα τεχνολογικής σημασίας ανήκουν σε αυτήν την οικογένεια όπως οι εστεράσες, οι πρωτεάσες και οι γλυκοσιδάσες.

- **E.C.4 Λυάσες.** Τα ένζυμα αυτά καταλύουν αντιδράσεις μη υδρολυτικής και μη οξειδωτικής διάσπασης χημικών δεσμών. Είναι χωρισμένα σε επτά υποομάδες, σύμφωνα με το τύπο του δεσμού που διασπούν: C-C, C-O, C-N. Τα ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια αυτή εκτελούν διαφορετικές μεταβολικές λειτουργίες που σχετίζονται όχι μόνο με τον καταβολισμό των κυττάρων αλλά και με τη βιοσύνθεση όταν δρουν αντίστροφα.
- **E.C.5 Ισομεράσες.** Τα ένζυμα αυτά καταλύουν αντιδράσεις μετατροπής ενός υποστρώματος σε ένα ισομερές, δηλαδή σε ουσία με τον ίδιο αριθμό και τύπο ατόμων. Υπάρχουν έξι υποομάδες ισομεράσεων ανάλογα με τον τύπο του παραγόμενου ισομερούς: ρακεμάσες και επιμεράσες, cis-trans-ισομεράσες, ενδομοριακές τρανσφεράσες (μουτάσες), ενδομοριακές λυάσες και άλλες ισομεράσες.
- **E.C.6 Λιγάσες ή συνθετάσες.** Τα ένζυμα αυτά καταλύουν αντιδράσεις ομοιοπολικής σύνδεσης δύο μορίων. Αυτά είναι τα ένζυμα που ευθύνονται για τον αναβολισμό των κυττάρων και ως εκ τούτου εκτελούν ένα βασικό ρόλο στις αντιδράσεις της σύνθεσης μέσα στο κύτταρο (μερικές φορές είναι ονομαζόμενες συνθετάσες). Υπάρχουν έξι υποομάδες λιγασών σύμφωνα με τον τύπο του δεσμού που σχηματίζεται: C-O, C-S, C-N, C-C.
- **E.C.7 Τρανσλοκάσες.** Αυτά τα ένζυμα καταλύουν την κίνηση ιόντων ή μορίων στις μεμβράνες ή τον διαχωρισμό τους μέσα στις μεμβράνες. Η αντίδραση χαρακτηρίζεται ως μεταφορά από τη «πλευρά 1» στην «πλευρά 2». Οι υποκατηγορίες προσδιορίζουν τους τύπους των μεταφερθέντων στοιχείων και οι υπό-υποκατηγορίες υποδεικνύουν τις διαδικασίες αντίδρασης που παρέχουν την κινητήρια δύναμη για τη μετατόπιση. Οι τρανσλοκάσες είναι το πιο συνηθισμένο σύστημα έκκρισης σε Gram θετικά βακτηρίδια.

Πλέον η βιομηχανία ενζύμων, που είναι το αποτέλεσμα της ταχείας ανάπτυξης της μοντέρνας βιοτεχνολογίας, παράγει ένζυμα για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Με την ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA και της γενετικής μηχανικής, η δυνατότητα παραγωγής σε μεγάλη κλίμακα των ενζύμων είναι σήμερα εφικτή, γεγονός που διευρύνει τη χρήση των ενζύμων σε πλήθος βιομηχανικών διεργασιών, όπως στη βιομηχανία απορρυπαντικών, την κλωστοϋφαντουργία, την αρτοποιεία, τις ζωοτροφές, τη βιομηχανία τροφίμων, τη φαρμακοβιομηχανία και την ιατρική. Στον Πίνακα 2. παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποιες εφαρμογές ενζύμων στη βιομηχανία και στην ιατρική.

**Πίνακας 2.** Ενδεικτικές εφαρμογές ενζύμων σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς.

Ένζυμο	Πηγή	Εφαρμογή
α-αμυλάση	Μούχλα, βακτήρια	Αρτοποιία, ζαχαροπλαστική, αραίωση αραβοσίτου, απορρυπαντικά, κλωστοϋφαντουργία
β-αμυλάση	Φυτά, βακτήρια	Ζαχαροπλαστική
Κυταρινάση	Μύκητες	Εξόρυξη χυμού φρούτων, κλωστοϋφαντουργία, απορρυπαντικά
Λακτάση	Ζύμη, Μύκητες	Γαλακτοβιομηχανία
Ιμβερτάση	Ζύμη, Μύκητες	Ζαχαροπλαστική
β-γλυκανάση	Μύκητες	Διατροφή ζώων, ζυθοποιία
Πρωτεάσες	Παπία, ανανά, ζύμη, μύκητες	Αρτοποιία, γαλακτοβιομηχανία, φαρμακευτική
Υδρολάσες	Ζώα, μούχλα, ζύμη, βακτήρια	Βιομηχανία τροφίμων
Ισομεράση γλυκόζης	Βακτήρια, μύκητες,	Παραγωγή σιροπιού φρουκτόζης
Οξειδάση γλυκόζης	Μύκητες	Βιομηχανία τροφίμων
Καταλάση	Βακτήρια	Βιομηχανία τροφίμων
β-γλυκοσιδάση	Μύκητες	Ιατρική, (Pompe's disease)
β-γαλακτοσιδάση	Φυτά	Ιατρική, απομάκρυνση γαλακτόζης
Ασπαραγινάση	Βακτήρια	Ιατρική, θεραπεία λευχαιμίας

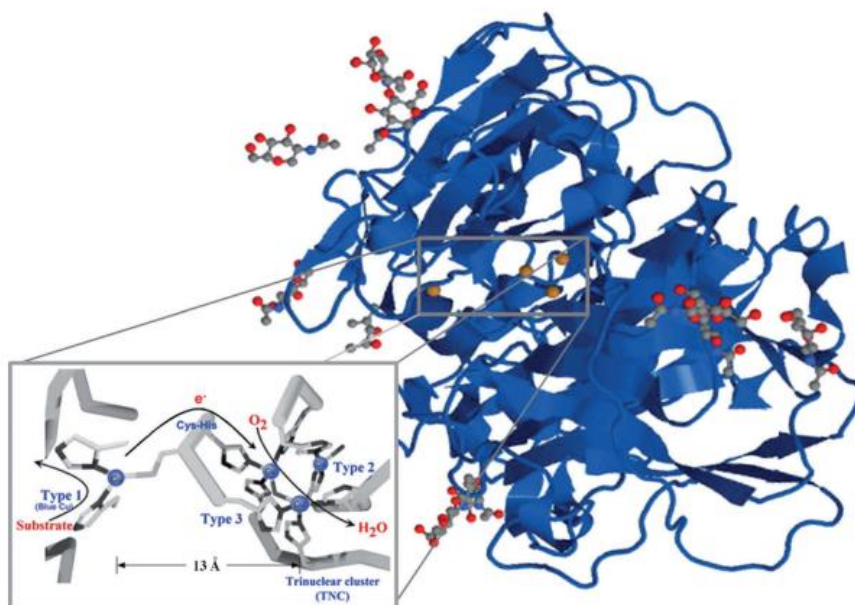
## 2. Οξειδοαναγωγάσες

Οι οξειδοαναγωγάσες (E.C.1.) είναι ένζυμα που κατανέμονται ευρέως μεταξύ μικροβιακών, φυτικών, και ζωικών οργανισμών. Καταλύουν την ανταλλαγή ηλεκτρονίων ή ισοδύναμων οξειδοαναγωγής μεταξύ ενός μορίου δότη και ενός μορίου δέκτη, σε αντιδράσεις που περιλαμβάνουν μεταφορά ηλεκτρονίων, αφαίρεση πρωτονίων, αφαίρεση υδρογόνου, μεταφορά υδριδίου, εισαγωγή οξυγόνου κ.α. Ουσιαστικά δυο βήματα λαμβάνουν χώρα μία οξείδωση και μία αναγωγή σε τουλάχιστον δύο υποστρώματα ένα αναγωγικό και ένα οξειδωτικό. Οι οξειδοαναγωγάσες βρίσκουν πολλές εφαρμογές στην κλωστοϋφαντουργεία, σε προϊόντα τροφίμων, σε βιομηχανικές-τεχνολογικές εφαρμογές, στην προστασία του περιβάλλοντος, σε βιοαισθητήρες κ.α. (Χυ, 2005). Ανάλογα με τη λειτουργία τους χωρίζονται στις ακόλουθες τέσσερις κύριες ομάδες: οξειδάσες, υπεροξειδάσες, οξυγονάσες και αφυδρογονάσες. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο λακάση από την οικογένεια των οξειδάσων, οι οποίες καταλύουν αντιδράσεις οξείδωσης ή αναγωγής χρησιμοποιώντας το μοριακό οξυγόνο (O<sub>2</sub>) ως δέκτη ηλεκτρονίων.

### 2.1. Λακάση

Οι λακάσες (EC 1.10.3.2) είναι μια οικογένεια οξειδάσων που περιέχουν πολλαπλά μόρια χαλκού στο ενεργό τους κέντρο και βρίσκονται σε μια ποικιλία βακτηρίων, μυκήτων, εντόμων και φυτών. Είναι γνωστές και ως μπλε οξειδάσες και ανακαλύφθηκαν πρώτη φορά στα εκκρίματα του ιαπωνικού δέντρου *Rhus verniczfera* (Yoshida, 1883). Η πλειοψηφία των λακασών που περιγράφονται στη βιβλιογραφία έχουν απομονωθεί από ανώτερους μύκητες. Οι πιο κοινοί παραγωγοί λακασών είναι σχεδόν όλοι οι μύκητες που βλαστάνουν στα δέντρα, όπως *Trametes versicolor*, *Trametes hirsuta*, *Trametes ochracea* κ.α.. Η βιολογική τους λειτουργία καθορίζεται από την προέλευσή τους και το στάδιο ζωής του οργανισμού που τις παράγει (Mate and Alcalde, 2017).

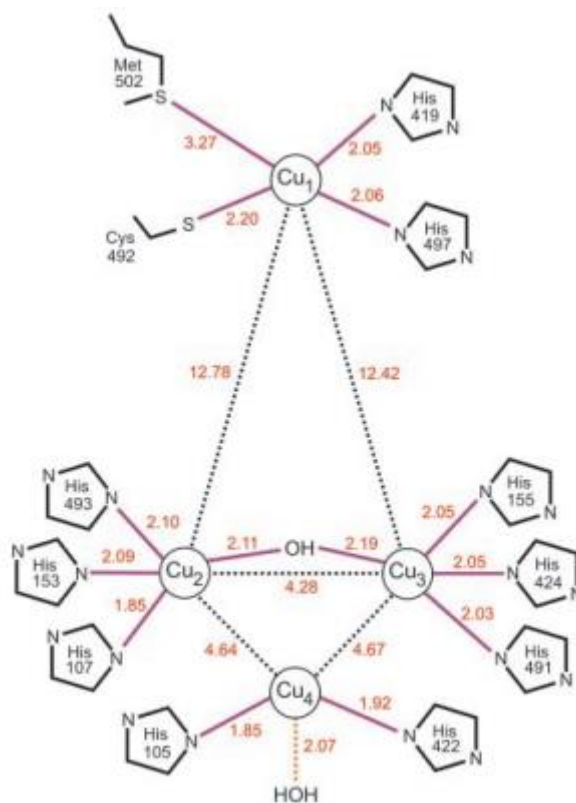
Οι λακάσες είναι ικανές να καταλύσουν άμεσα την οξείδωση όρθο- και πάρα-διφαινολών, αμινοφαινολών, πολυφαινολών, πολυαμινών και αρυλο-διαμινών όπως και μερικών ανόργανων υποστρωμάτων. Ο ρόλος τους έγκειται στη σύζευξη των αντιδράσεων οξείδωσης των τεσσάρων μονήρων ηλεκτρονίων του αναγωγικού υποστρώματος με την αναγωγική διάσπαση των τεσσάρων ηλεκτρονίων του δεσμού του μοριακού οξυγόνου, χρησιμοποιώντας τα τέσσερα άτομα χαλκού που βρίσκονται κατανεμημένα σε τρεις περιοχές του ενζύμου (Solomon et al., 1996). Το ενεργό τους κέντρο αποτελείται από ένα άτομο χαλκού τύπου 1 (T1) υψηλού δυναμικού, που βρίσκεται κοντά στη θέση δέσμευσης του υποστρώματος, και μία ομάδα τριών ατόμων χαλκού (τύπου 2 (T2) και τύπου 3 (T3)), που βρίσκονται στο εσωτερικό της πρωτεϊνικής δομής (Εικόνα 1). Το άτομο T1 λειτουργεί ως ο πρωταρχικός υποδοχέας ηλεκτρονίων που τα μεταφέρει στη συνέχεια στην ομάδα T2/T3 και έτσι το διατομικό οξυγόνο ανάγεται πλήρως σε νερό χωρίς την απελευθέρωση του ενδιάμεσου υπεροξειδίου. Το άτομο χαλκού T1 παρουσιάζει ισχυρή απορρόφηση στα 600 nm, προσδίδοντας το χαρακτηριστικό μπλε χρώμα της πρωτεΐνης (μπλε οξειδάσες) (Betancor et al., 2013).



**Εικόνα 1.** Τρισδιάστατη δομή του ενζύμου λακάση από το μύκητα *Trametes versicolor* από την τράπεζα δεδομένων πρωτεϊνών RCSB (1GYB). Τα άτομα χαλκού που σχηματίζουν το ενεργό κέντρο απεικονίζονται με πορτοκαλί χρώμα. Ένθετο: κατανομή των ατόμων χαλκού T1 και T2/T3 και αναπαράσταση της αντίδρασης που καταλύεται από τις λακάσες (Betancor et al., 2013). Τα βέλη σηματοδοτούν τη ροή των υποστρωμάτων, των ηλεκτρονίων και του O<sub>2</sub> (Solomon et al., 2008).

### 2.1.1 Δομή

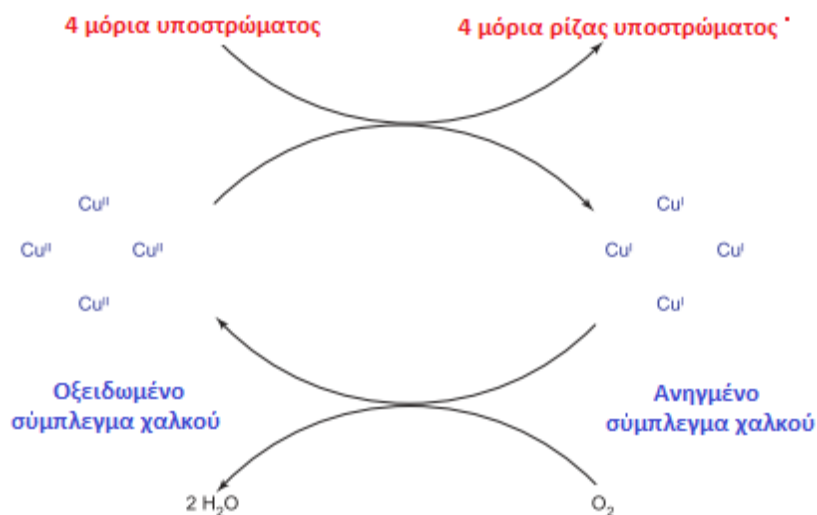
Οι μυκητιακές λακάσες απαντώνται ως ισοένζυμα που ολιγομερίζονται ώστε να σχηματίσουν σύμπλοκα με πολλά μέρη. Το μοριακό βάρος των μονομερών ποικίλει από 50 έως 100 kDa. Η καταλυτική δράση της λακάσης στηρίζεται στην ύπαρξη ατόμων χαλκού (ελάχιστος αριθμός ατόμων τέσσερα ανά μονάδα ενεργής πρωτεΐνης). Ο T1 σχηματίζει μία τριγωνική διάταξη με δύο αμινοξέα ιστιδίνης (His) και μία κυστεΐνη (Cys) ως προσδέτες σε ισημερινή θέση ενώ επιπλέον διαθέτει έναν αξονικό προσδέτη, ο οποίος ποικίλει και συνήθως είναι μεθειονίνη (Met) στις βακτηριακές λακάσες, και λευκίνη (Leu) ή φαινυλαλανίνη (Phe) στις μυκητιακές (Εικόνα 2.). Ο T1 χαλκός προσδίδει το τυπικό μπλε χρώμα στις πρωτεΐνες με πολλά άτομα χαλκού, το οποίο είναι αποτέλεσμα της έντονης ηλεκτρονιακής απορρόφησης που προκαλείται από την ομοιοπολική σύνδεση Cu-Cys. Εξαιτίας του υψηλού οξειδοαναγωγικού δυναμικού του (περιπου +790 mV), ο T1 χαλκός είναι το σημείο που συμβαίνει η οξείδωση του υποστρώματος. Ο T2 χαλκός (Cu<sub>2</sub>) δεν απορροφά στην ορατή περιοχή του φάσματος ενώ εμφανίζει παραμαγνητικές ιδιότητες σε μελέτες EPR. Ο Cu<sub>2</sub> στρατηγικά είναι τοποθετημένος κοντά στον T3 χαλκό (Cu<sub>3</sub>), ένα διπύρρνο κέντρο το οποίο φασματοσκοπικά χαρακτηρίζεται από απορρόφηση στα 330 nm (η οξειδωμένη μορφή). Ο Cu<sub>2</sub> και οι δύο Cu<sub>3</sub>, όπως αναφέρεται και παραπάνω σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα τριών πυρήνων, το οποίο είναι υπεύθυνο για την αναγωγή του οξυγόνου και την απελευθέρωση των μορίων νερού (Kumar et al., 2003).



**Εικόνα 2.** Σχήμα των περιοχών χαλκού T1 (Cu<sub>1</sub>) και T2/T3 (Cu<sub>4</sub>/Cu<sub>2</sub>-Cu<sub>3</sub>) της λακάσης από *Bacillus subtilis*, που δείχνει τις αποστάσεις μεταξύ των σημαντικότερων ατόμων (Enguita et al., 2003).

### 2.1.2 Μηχανισμοί αντίδρασης λακάσης:

**Αναγωγή του O<sub>2</sub> σε H<sub>2</sub>O:** Τα διαφορετικά κέντρα Cu της λακάσης οδηγούν ηλεκτρόνια από διάφορα αναγωγικά υποστρώματα στο μοριακό οξυγόνο. Αυτό επιτυγχάνεται από τέσσερις μονοηλεκτρονιακές οξειδώσεις του υποστρώματος, καταλυόμενες από τον τύπου-1 Cu. Στη συνέχεια τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται μέσω του εξαιρετικά συντηρημένου τριπεπτιδίου His-Cys-His στο σύμπλεγμα των τριών πυρήνων (Cu<sub>2</sub>/2Cu<sub>3</sub>) όπου συμβαίνει η αναγωγή του μοριακού οξυγόνου και η απελευθέρωση του νερού (Εικόνα 3.). Η αναγωγή του O<sub>2</sub> γίνεται σε δύο στάδια, με το 1<sup>ο</sup> να είναι το καθοριστικό για την αντίδραση και το 2<sup>ο</sup> το γρήγορο (Claus, 2004).



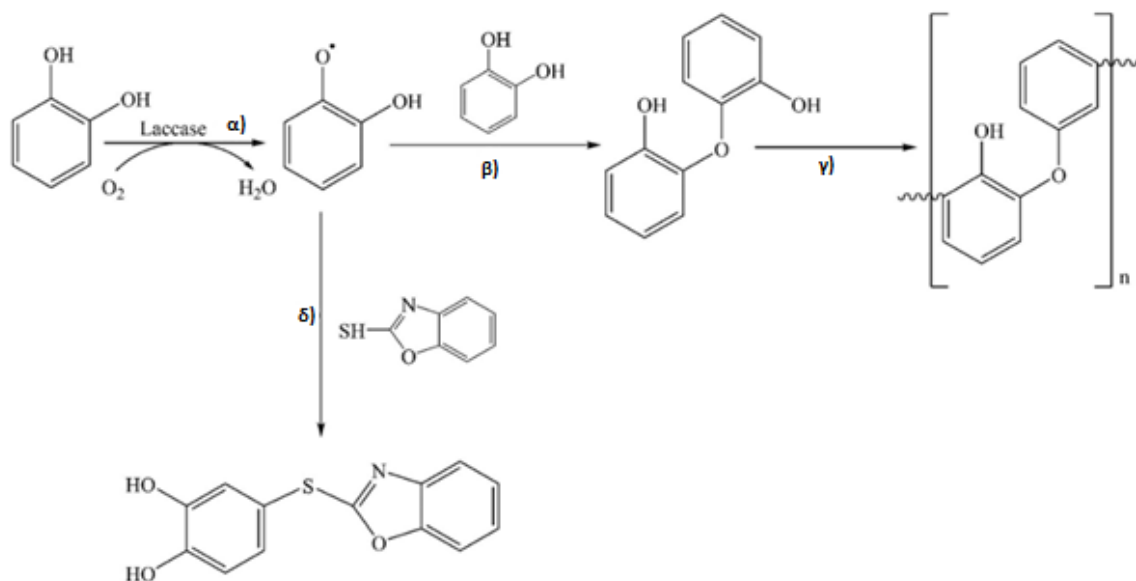
**Εικόνα 3.** Σχηματική αναπαράσταση ενός καταλυτικού κύκλου λακάσης που παράγει δύο μόρια νερού από την αναγωγή ενός μορίου μοριακού οξυγόνου και την ταυτόχρονη οξείδωση (στην θέση χαλκού T1) τεσσάρων μορίων υποστρώματος, στις αντίστοιχες ρίζες.

**Διαμοριακή σύνδεση μονομερών:** Η ενζυμική οξείδωση φαινολικών υποστρωμάτων και ανιλινών δημιουργεί ελεύθερες ρίζες που αντιδρούν μεταξύ τους σχηματίζοντας διμερή, ολιγομερή ή πολυμερή ομοιοπολικά συζευγμένα με δεσμούς C-C, C-O, C-N. (Εικόνα 4.). Η ικανότητα αυτή της λακάσης είναι η βάση για τη χρήση τους στη σύνθεση νέων βιοδραστικών ενώσεων (Kudanga et al., 2017).

**Αποδόμηση πολυμερών:** Οι λακάσες εμπλέκονται στην αποδόμηση σύνθετων φυσικών πολυμερών, όπως η λιγνίνη. Οι ελεύθερες ρίζες που δημιουργούν οδηγούν στην διάσπαση ομοιοπολικών δεσμών και στην απελευθέρωση μονομερών (Claus et al., 2002).

**Διάσπαση αρωματικού δακτυλίου:** Η αντίδραση αυτή βρίσκει βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον στην αποδόμηση ξενοβιοτικών όπως νιτροαρωματικά και συνθετικές χρωστικές καθώς και πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) (Durán and Esposito, 2000).





**Εικόνα 4.** Ο συνθετικός μηχανισμός δράσης της λακάσης, που περιλαμβάνει α) μια καταλυόμενη από λακάση οξειδωση του υποστρώματος για να σχηματίσει ρίζες, β) οι ρίζες υφίστανται οξειδωτική σύζευξη για να παράγουν διμερή, η περαιτέρω σύζευξη έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό πολυμερών μέσω πολυμερισμού και δ) σύζευξη με κάποιο υπόστρωμα για σχηματισμό προϊόντων διασταυρούμενης σύζευξης (Kudanga et al., 2017).

### 2.1.3. Βιοτεχνολογικές εφαρμογές των λακασών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι λακάσες αποτελούν εξαιρετικούς βιοκαταλύτες για βιοτεχνολογικές και περιβαλλοντικές εφαρμογές εξαιτίας της μεγάλης δραστηριότητάς τους, της εκλεκτικότητας και της ειδικότητάς τους, ικανότητες οι οποίες τους επιτρέπουν να επιδεικνύουν σύνθετες χημικές διαδικασίες σε πειραματικές και φυσικές συνθήκες (Mateo et al., 2007). Για τον λόγο αυτό οι λακάσες έχουν βρει πληθώρα εφαρμογών σε πεδία όπως η ηλεκτροχημεία για τη κατασκευή βιοαισθητήρων, η βιομηχανία του χαρτιού για αποχρωματισμό και απολιγνιτοποίηση, στην ανίχνευση φαινόλων σε λύματα και στη βιομηχανία τροφίμων, σε καλλυντικά, στη φαρμακοβιομηχανία κ.α. (Kunamneni et al., 2008; Riva, 2006).

Ωστόσο η χρήση ενζύμων σε πρακτικές εφαρμογές είναι ακόμα περιορισμένη εξαιτίας της χαμηλής σταθερότητας τους και του υψηλού κόστους παραγωγής τους (Hu et al., 2007). Με την μέθοδο της ακινητοποίησης των λακασών είναι εφικτό να ξεπεραστούν κάποιοι από τους παραπάνω περιορισμούς, βελτιώνοντας ταυτόχρονα κάποιες από τις ιδιότητές τους. Τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα της ακινητοποίησης της λακάσης είναι αύξηση της θερμοσταθερότητας και της αντοχής του ενζύμου σε ακραίες συνθήκες. Επιπλέον το ακινητοποιημένο ενζυμικό σύστημα είναι πιο εύκολο να διαχωριστεί από τα προϊόντα της αντίδρασης, επιτρέποντας την επαναχρησιμοποίηση του (Arica et al., 2009; Georgieva et al., 2008). Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται ορισμένες από τις εφαρμογές βιοκαταλυτικών συστημάτων λακάσης.

**Πίνακας 3.** Εφαρμογές βιοκαταλυτικών συστημάτων λακάσης.

<b>Πηγή λακάσης</b>	<b>Φορέας</b>	<b>Εφαρμογή</b>
<i>Trametes versicolor</i>	Πορώδεις νανοσωλήνες άνθρακα	Κυψέλη βιοκαυσίμων
<i>Polyborus rubidus</i>	Σφαιρίδια αλγινικού νατρίου	Αποχρωματισμό χρωστικών
<i>Trametes versicolor</i>	Sol-gel του διγλυκερυσιλάνιου	Βιοαισθητήρες
<i>Trametes versicolor</i>	Σφαιρίδια αλουμίνας	Βιομηχανία χαρτιού
<i>Cerrena unicolor</i>	Sol-gel silica. Glass and polymethyl-2-methylpropenoate (Plexiglass®)	Κυψέλη βιοκαυσίμων
<i>Trametes versicolor</i>	Ηλεκτρόδιο γραφίτη	Βιοαισθητήρες
<i>Trametes versicolor</i>	Poly(hydroxyethylmethacrylate) films-glycidymethacrylate: PHEMA-g-GMA	Αποδόμηση ξενοβιοτικών
<i>Trametes versicolor</i>	Σφαίριδια CPC-silica	Αποχρωματισμό χρωστικών
<i>Corioloopsis gallica</i>	Ηλεκτρόδιο γραφενίου	Κυψέλη βιοκαυσίμων
<i>Coriolus versicolor</i>	Χιτοζάνη	Αποχρωματισμό χρωστικών
<i>Trametes versicolor</i>	Καολινίτης	Αποδόμηση ξενοβιοτικών
<i>Trametes versicolor</i>	Μεμβράνες νάilon με with glycidyl methacrylate	Αποδόμηση ξενοβιοτικών

### 3. Υδρολάσες

Οι υδρολάσες καταλύουν τις αντιδράσεις της υδρόλυσης δηλαδή της διάσπασης ενός χημικού δεσμού με τη δράση του νερού. Υπάρχουν 12 υποομάδες υδρολασών ανάλογα με τον τύπο του δεσμού που υδρολύουν. Αυτά τα ένζυμα είναι σημαντικά για τον καταβολισμό, παρέχοντας αφομοιώσιμα θρεπτικά συστατικά στο κύτταρο. Τα περισσότερα από τα ένζυμα τεχνολογικής σημασίας ανήκουν σε αυτήν την οικογένεια όπως οι εστεράσες, οι πρωτεάσες και οι γλυκοσιδάσες. Υπό κατάλληλες συνθήκες, οι υδρολάσες μπορούν να καταλύουν τις αντίστροφες αντιδράσεις σχηματισμού δεσμού, όταν βρίσκονται σε περιβάλλον με εξάλειψη του νερού, αυτός ο τύπος αντιδράσεων βρίσκει πολλές εφαρμογές (Illanes, 2008).

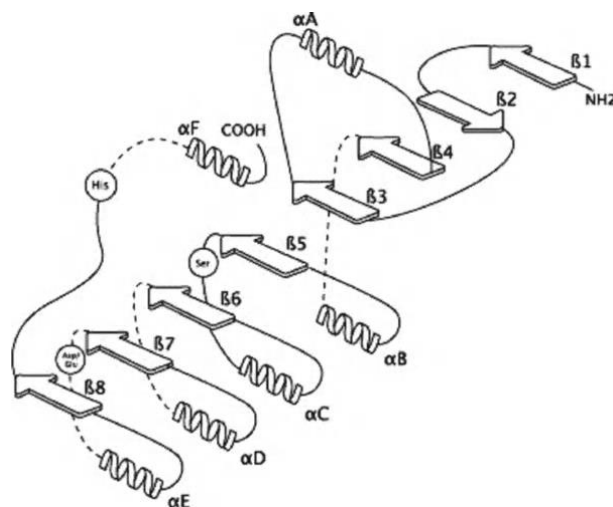
#### 3.1. Λιπάσες

Οι λιπάσες (υδρολάσες ακυλο-τριάκυλγλυκερίνης, EC 3.1.1.3) είναι ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση των λιπών και των ελαίων με απελευθέρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων, κατά την πέψη. Στους ανθρώπους και τα μονογαστρικά είδη των ζώων, οι λιπάσες απαντώνται φυσικά στο στομάχι και το πάγκρεας, όπου λειτουργούν για την πέψη λιπών και λιπιδίων. Μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις μεγάλες ομάδες: λιπάσες θηλαστικών (π.χ. χοίρεια παγκρεατική λιπάση), λιπάσες από μύκητες (οικογένεια *Candida rugosa* και *Rhizomucor*) και βακτηριακές λιπάσες (οικογένεια *Staphylococcus* και *Pseudomonas*). Τα ένζυμα αυτά ανήκουν στην κατηγορία των υδρολασών σερίνης και δρουν κυρίως κοντά σε περιοχές διεπιφανειών νερού-ελαίου, ένα φαινόμενο γνωστό ως διεπιφανειακή ενεργοποίηση (Neves Petersen et al., 2001). Το φαινόμενο της διεπιφανειακής ενεργοποίησης αποδόθηκε στη συσπείρωση υδρόφοβων μορίων του υποστρώματος και στη δημιουργία συσσωματωμάτων, όπου η τοπική συγκέντρωση του υποστρώματος είναι υψηλή, άρα και η πιθανότητα σύγκρουσης του ενζύμου με το υπόστρωμα θα είναι αυξημένη στην περιοχή της διεπιφάνειας (Brockman et al., 1973). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, σε οργανικά μη υδατικά μέσα, τα ένζυμα αυτά έχουν την δυνατότητα να αντιστρέψουν την αντίδραση και να καταλύουν συνθετικές αντιδράσεις, όπως για παράδειγμα εστεροποίηση, οξείδωση αλκοόλυση και μετεστεροποίηση. Οι λιπάσες μπορούν να ενεργούν υπό ήπιες συνθήκες, ενώ παράλληλα είναι εξαιρετικά σταθερές σε οργανικούς διαλύτες, δείχνουν ευρεία εξειδίκευση υποστρώματος και παρουσιάζουν υψηλή τόπο- και στέρεο-εκλεκτικότητα (Anobom et al., 2014)(Viskupicova et al., 2009).

##### 3.1.1 Δομή

Από δομικής άποψης οι λιπάσες χαρακτηρίζονται από ένα κοινό μοτίβο αναδίπλωσης α/β υδρολάσης και μία συντηρητική καταλυτική τριάδα. Οι περισσότερες λιπάσες διαθέτουν επίσης το μοτίβο Gly-X<sub>1</sub>-Ser-X<sub>2</sub>-Gly. Η α/β αναδίπλωση υδρολάσης γενικά αποτελείται από ένα κεντρικό β-φύλλο από οκτώ β-κλώνους, με μόνο τον δεύτερο αντιπαράλληλο (β<sub>2</sub>). Οι κλώνοι β<sub>3</sub> και β<sub>8</sub> συνδέονται με α-έλικες διευθετημένες στις πλευρές του κεντρικού β φύλλου (Εικόνα 5). Έχουν βρεθεί και κάποιες παραλλαγές αυτού του μοτίβου σε διάφορες λιπάσες οι οποίες κυρίως αφορούν διαφορές στην ποσότητα α-έλικας και β-φύλλου, στο μήκος της θηλιάς και στην αρχιτεκτονική της θέσης πρόσδεσης υποστρώματος. Οι λιπάσες επίσης χαρακτηρίζονται από την παρουσία δισουλφιδικών δεσμών που σταθεροποιούν το ένζυμο και συμμετέχουν στην

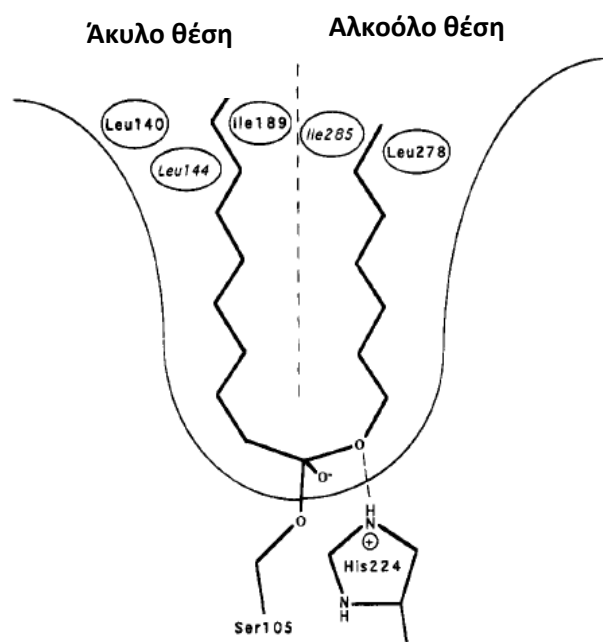
καταλυτική του δράση. Η καταλυτική τριάδα, η οποία είναι συντηρημένη μεταξύ των λιπασών, αποτελείται από μία σερίνη ως το πυρηνόφιλο κατάλοιπο, ένα ασπαρτικό/γλουταμινικό ως το όξινο και μία ιστιδίνη. Στην αναδίπλωση α/β υδρολάσης η καταλυτική σερίνη βρίσκεται μετά από τον κλώνο β<sub>5</sub> και πριν από την επόμενη έλικα, το ασπαρτικό/γλουταμινικό βρίσκεται μετά από τον β<sub>7</sub> κλώνο και η ιστιδίνη σε ένα βρόχο μετά από τον κλώνο β<sub>8</sub>. Το τετραεδρικό ενδιάμεσο που σχηματίζεται κατά την διάρκεια του καταλυτικού μηχανισμού των λιπασών σταθεροποιείται από την παρουσία δεσμών υδρογόνου με δύο αμινοξέα που σχηματίζουν την λεγόμενη οξιονική οπή (Sandoval, 2012; Schrag and Mirosław, 1997). Το ενεργό κέντρο των λιπασών καλύπτεται από ένα επιφανειακά κινούμενο δομικό στοιχείο, αποκαλούμενο “καπάκι” (lid). Πρόκειται για μια ολιγοπεπτιδική ομάδα, αποτελούμενη από μια ή δυο α-έλικες ή από ένα τμήμα βρόχου, συνδεδεμένη με το ένζυμο μέσω ευέλικτων δομικών στοιχείων. Με την σύνδεση του ενζύμου στην διεπιφάνεια νερού-ελαίου το καπάκι (lid) κινείται μακριά, μετατρέποντας την “κλειστή” μορφή του ενζύμου σε “ανοιχτή” μορφή, με το ενεργό κέντρο να είναι προσιτό από τον διαλύτη, την ίδια στιγμή μία μεγάλη υδρόφοβη επιφάνεια εκτίθεται η οποία πιστεύεται ότι διευκολύνει την πρόσδεση του ενζύμου στην διεπιφάνεια. Πιο πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η παρουσία της δομής που μοιάζει με κάλυμμα δεν σχετίζεται απαραίτητα με την διεπιφανειακή ενεργοποίηση καθώς λιπάσες όπως *Pseudomonas aeruginosa*, *B. glumae* και *Candida antarctica* B δεν εμφανίζουν διεπιφανειακή ενεργοποίηση παρόλα αυτά έχουν αμφίφυλο καπάκι που καλύπτει το ενεργό κέντρο τους (Jaeger and Reetz, 1998).



**Εικόνα 5.** Η αναδίπλωση α/β υδρολάσης, όπου με βέλος απεικονίζονται οι β-κλώνοι και με σπείρες οι α-έλικες. Η θέση των δραστικών καταλοίπων υποδεικνύεται με κύκλο. Πηγή, (Sandoval, 2012).

Η *Candida antarctica* λιπάση B (CaLB) είναι ένας αποτελεσματικός καταλύτης για υδρόλυση σε νερό και εστεροποίηση σε οργανικούς διαλύτες. Η CaLB αποτελείται από 317 αμινοξέα και έχει μοριακή μάζα 33 kDa. Αυτή η λιπάση ανήκει στην οικογένεια των α/β υδρολασών (Uppenberg et al., 1994) και αρχικά απομονώθηκε από τον μύκητα *Candida antarctica*. Όπως προαναφέραμε δεν εμφανίζει διεπιφανειακή ενεργοποίηση. Η καταλυτική τριάδα της CaLB αποτελείται από Ser 105 - His 224 - Asp 187 (Εικόνα 6.). Το περιορισμένο ενεργό

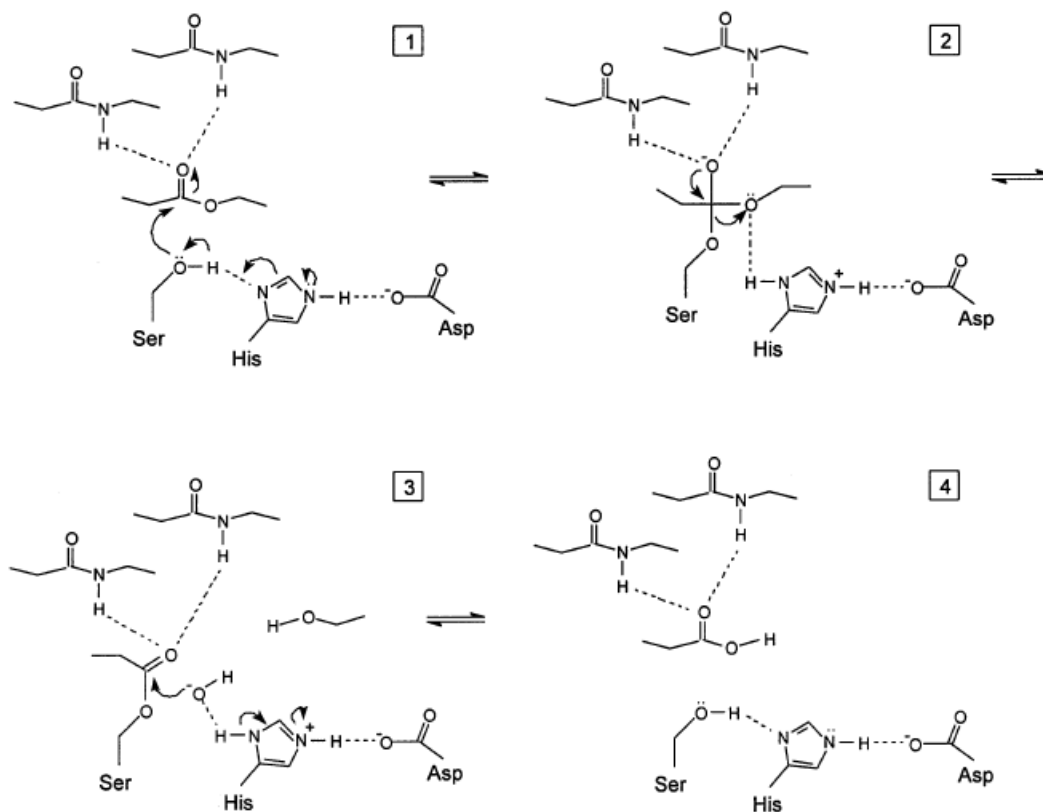
κέντρο της CALB μπορεί να εξηγήσει την προτίμηση που δείχνει σε δευτεροταγής αλκοόλες και σε πρωτοταγής αμίνες (Gotor-Fernández et al., 2006a; Otto et al., 2000; Uppenberg et al., 1995).



**Εικόνα 6.** Το ενεργό κέντρο της CaLB μπορεί να χωριστεί σε δύο πλευρές, σε αυτή της άκυλο ομάδας και σε αυτή της αλκοόλης, όπου τα αντίστοιχα μέρη των υποστρωμάτων βρίσκονται κατά την διάρκεια της κατάλυσης. Αυτός ο διαμορφωτικός περιορισμός έχει ως αποτέλεσμα την μεταφορά ενός πρωτονίου μεταξύ του οξυγόνου της αλκοόλης και του NH- της ιστοιδίνης του ενεργού κέντρου κατά την διάρκεια της αντίδρασης (Uppenberg et al., 1995)

### 3.1.2 Καταλυτικός μηχανισμός λιπασών

Ο καταλυτικός μηχανισμός των λιπασών όπως φαίνεται και στην Εικόνα 7. Ξεκινά με μία ακυλίωση. Το βήμα αυτό προκύπτει από την μεταφορά ενός πρωτονίου μεταξύ του ασπαρτικού, της ιστοιδίνης και της σερίνης της λιπάσης προκαλώντας την ενεργοποίηση της υδροξυλικής ομάδας της καταλυτικής σερίνης. Στη συνέχεια το υπόλειμμα του υδροξυλίου της σερίνης προσβάλλει την καρβονυλομάδα του υποστρώματος. Το πρώτο τετραεδρικό ενδιάμεσο σχηματίζεται με ένα αρνητικό φορτίο στο οξυγόνο της καρβονυλικής ομάδας. Η οξιονική οπή σταθεροποιεί την κατανομή του φορτίου και μειώνει την ενεργειακή κατάσταση του τετραεδρικού ενδιάμεσου με σχηματισμό τουλάχιστον δύο δεσμών υδρογόνου. Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα το βήμα από-ακετυλίωσης όπου ένα πυρηνόφιλο προσβάλλει το ένζυμο, ως αποτέλεσμα απελευθερώνεται το προϊόν και αναγεννάτε το ένζυμο. Αυτό το πυρηνόφιλο μπορεί να είναι είτε νερό στην περίπτωση της υδρόλυσης είτε αλκοόλη στην περίπτωση της αλκοόλυσης. Το ενεργό κέντρο των λιπασών βρίσκεται στο εσωτερικό ενός θύλακα επί της κορυφής του κεντρικού β-φύλλου της δομής της πρωτεΐνης. Η επιφάνεια των ορίων του θύλακα αποτελείται κυρίως από υδρόφοβα κατάλοιπα προκειμένου να αλληλεπιδρά με υδρόφοβα υποστρώματα. Τα ενεργά κέντρα των λιπασών διαφέρουν ως προς το σχήμα, το μέγεθος, το βάθος και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αμινοξέων του θύλακα (Anobom et al., 2014) (Sandoval, 2012)(Jaeger et al., 1999).



**Εικόνα 7.** Καταλυτικός μηχανισμός λιπασών. [1] Η δέσμευση του λιπιδίου, ενεργοποίηση του πυρηνόφιλου της σερίνης από τη γειτονική ιστιδίνη και την πυρηνόφιλη προσβολή του καρβονυλικού άνθρακα του υποστρώματος από Ser O<sup>-</sup>. [2] Παροδικό τετραεδρικού ενδιάμεσου, με O<sup>-</sup> το οποίο σταθεροποιείται με αλληλεπιδράσεις με NH ομάδες δύο πεπτιδίων. Η ιστιδίνη δίνει ένα πρωτόνιο στην αποχωρούσα ομάδα αλκοόλης του υποστρώματος. [3] Το ομοιοπολικό ενδιάμεσο («ακυλο ένζυμο»), στο οποίο το όξινο συστατικό του υποστρώματος έχει εστεροποιηθεί στο υπόλειμμα σερίνης του ενζύμου. Το εισερχόμενο μόριο του νερού ενεργοποιείται από το γειτονικό υπόλειμμα ιστιδίνης, και το προκύπτον υδροξυλικό ιόν εκτελεί μια πυρηνόφιλη προσβολή επί του ατόμου άνθρακα του καρβονυλίου του ομοιοπολικού ενδιάμεσου. [4] Η ιστιδίνη δίνει ένα πρωτόνιο στο άτομο οξυγόνου της σερίνης, ο εστερικός δεσμός μεταξύ σερίνης και του άκυλο υπολείμματος έχει σπάσει και το άκυλο προϊόν απελευθερώνεται (Jaeger et al., 1999).

### 3.1.3 Εφαρμογές της *Candida antarctica* λιπάσης B

Η *Candida antarctica* λιπάση B έχει αναγνωριστεί ως ένα ισχυρό βιοκαταλύτης εξαιτίας της ικανότητάς της να καταλύει μία ποικιλία υποστρωμάτων. Οι αποκλειστικές ιδιότητες της ακινητοποιημένης CaLB όπως είναι η εύκολη ανάκτηση, η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης, η υψηλή σταθερότητα και αντιδραστικότητα, το ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, η εναντιοεκλεκτικότητα, το αποτελεσματικό κόστος παραγωγής και το ότι είναι φιλική προς το περιβάλλον την καθιστούν ελκυστική για ευρείας κλίμακας εφαρμογές σε φαρμακευτικά προϊόντα, στην τεχνολογία τροφίμων, στην οργανική σύνθεση και στη βιομηχανία χαρτιού και καθαριστικών ρούχων. Η αμινόλυση, η αλκοόλυση, η υδρόλυση, η εστεροποίηση και η μετεστεροποίηση είναι μερικές τυπικές αντιδράσεις που καταλύονται από CaLB. Η ακινητοποίηση της CaLB μπορεί να βελτιώσει τις απαιτούμενες προϋποθέσεις για την σύνθεση

εστέρα. Επιπλέον, η ακινητοποιημένη CaLB μπορεί να χρησιμοποιηθεί στα καλλυντικά, σε χημικές και φαρμακευτικές βιομηχανίες ως καταλύτης. Μερικές από τις εφαρμογές τις είναι η σύνθεση παραγώγων φλαβονοειδών (Mellou et al., 2005), ο πολυμερισμός διάνοιξης δακτυλίου, η σύνθεση αλκανολαμιδίων (επιλεκτική αμινόλυση) και σύνθεση πολυγαλακτικού οξέος (Idris and Bukhari, 2012).

### 3.2. β-Γλυκοσιδάσες

Οι β-γλυκοζιδάσες (EC 3.2.1.21) υδρολύουν τον Ο-γλυκοζυλο δεσμό των τελικών, μη-αναγωγικών β-D-γλυκόζυλο-καταλοίπων με την ταυτόχρονη απελευθέρωση β-D-γλυκόζης, σε δι- και ολιγο-γλυκοσακχαρίτες και σε πολλά άλλα γλυκοσυζεύγματα. Αυτά τα ένζυμα είναι ευρέως καταναμημένα και έχουν σημαντικούς ρόλους σε πολλές βιολογικές διεργασίες. Στους μικροοργανισμούς η β-γλυκοσιδάση εμπλέκεται στην επαγωγή και την υδρόλυση της κυτταρίνης. Στα φυτά, το ένζυμο εμπλέκεται στη σύνθεση β-γλυκάνης κατά την ανάπτυξη του κυτταρικού τοιχώματος, στο μεταβολισμό χρωστικών, στην ωρίμανση των καρπών και στους αμυντικούς μηχανισμούς. Σε ανθρώπους και άλλα θηλαστικά το ένζυμο εμπλέκεται στην υδρόλυση των γλυκοζυλο-κεραμιδίων. Η ανεπάρκεια του ενζύμου οδηγεί στη νόσο του Gauchers. Όπως και πολλές υδρολάσες, τα ένζυμα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση μιας ποικιλίας γλυκοσυζευγμάτων όπως οι αλκυλο γλυκοζίτες, οι αμινογλυκοσίδες και για τα ειδικά δισακχαρίδια των ολιγοσακχαριτών φυτοαλεξινών-εκλεκτών, που εμπλέκονται σε αμυντικούς μηχανισμούς φυτών και μικροβίων (Khan and Akhtar, 2010).

Οι β-γλυκοσιδάσες είναι κοινές μεταξύ των φυτών, των μυκήτων και των βακτηρίων και έχουν μεγάλη ομοιότητα σε σχέση με τις αλληλουχίες και τις δομές τους. Μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τη δραστηριότητα υποστρώματος ή της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τους. Χρησιμοποιείται επίσης ένα εναλλακτικό σύστημα ταξινόμησης για τις υδρολάσες γλυκοσιδίων με βάση την αλληλουχία των αμινοξέων και τη δομική ομοιότητα (Henrissat and Davies, 2016). Σε αυτό το σύστημα, τα ένζυμα με συνολική ομοιότητα αλληλουχίας αμινοξέων και καλά διατηρημένα μοτίβα ακολουθίας ανήκουν σε μία μόνο οικογένεια. Προς το παρόν, απαριθμούνται 133 οικογένειες υδρολάσες γλυκοσιδίων (GH) στην επικαιροποιημένη ιστοσελίδα Ενεργειακών Ενζύμων (<http://www.cazy.org>). Οι οικογένειες με παρόμοιες δομές καταλυτικού τομέα και διατηρημένα καταλυτικά αμινοξέα, που υποδηλώνουν κοινή καταγωγή και καταλυτικό μηχανισμό. Η ομάδα GH-A περιέχει τον μεγαλύτερο αριθμό οικογενειών συμπεριλαμβανομένων των οικογενειών που περιέχουν β-γλυκοσιδάση GH1, GH5 και GH30. Ο μεγαλύτερος αριθμός χαρακτηρισμένων β-γλυκοσιδασών ανήκει στην οικογένεια GH1. Η οικογένεια GH1 περιλαμβάνει β-γλυκοσιδάσες από αρχαϊκά βακτήρια, φυτά και θηλαστικά (Cairns and Esen, 2010)(Krisch et al., 2010).

#### 3.2.1. Δομή

Η β-γλυκοζιδάση από αμύγδαλα (β-glucosidase from almond, Albgl) έχει αποτελέσει αντικείμενο μελετών περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη γλυκοζιδάση, κυρίως λόγω της εύκολης απομόνωσής της από ένα ιδιαίτερα διαθέσιμο υλικό και της μεγάλης εμπορικής της διαθεσιμότητας. Το ένζυμο αυτό είναι γνωστό ότι υπάρχει σε ένα πλήθος ισομορφών. Η β-γλυκοζιδάση από γλυκά αμύγδαλα κατατάσσεται στις γλυκοζιδάσες της Οικογένειας 1 (GH1), με το πυρηνόφιλο του ενεργού της κέντρου να περιέχεται στην ακολουθία Ile-Thr-Glu-Asn-Gly (He and Withers, 1997). Δεν έχει διερευνηθεί η κρυσταλλογραφική δομή της συγκεκριμένης β-γλυκοζιδάσης. Παρολαυτά, θεωρείται ότι υπάρχει μια διατήρηση μεταξύ των γλυκοζιδασών της Οικογένειας 1. Από την άλλη πλευρά η β-γλυκοσιδάση από τον οργανισμό *Thermotoga maritima* είναι επίσης μία γλυκοσιδάση που ανήκει στην Οικογένεια 1, και έχει απομονωθεί και χαρακτηριστεί κρυσταλλογραφικά. Η δομή σχηματίζει έναν κλασικό (α/β)<sub>8</sub> βαρέλι με το



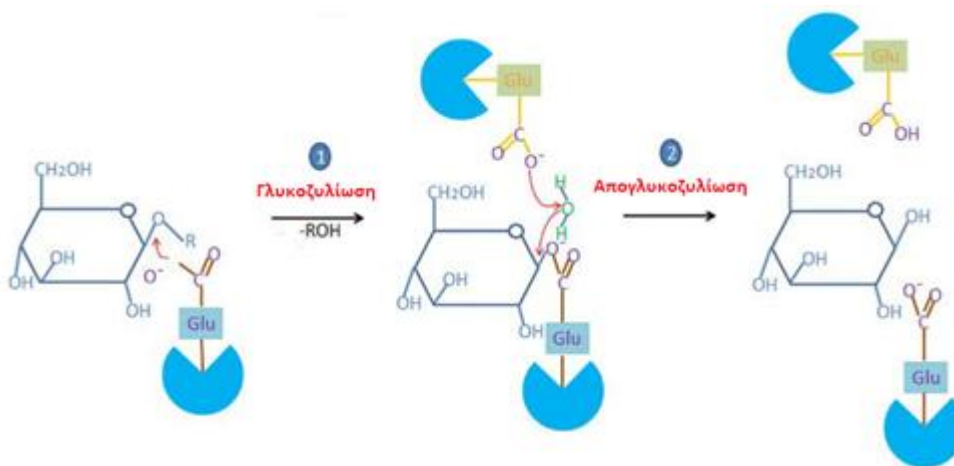
κατάλοιπο οξέος/βάσης (Glu166), στον κλώνο 4 και το νουκλεόφιλο (Glu351) στον κλώνο 7, όπως αναμένεται για αυτή την κατηγορία β-γλυκοσιδασών (GH-A) (Cairns and Esen, 2010). Το ενεργό κέντρο βρίσκεται σε βάθος 15-20 Å σε έναν θύλακα και αποτελείται από τα κατάλοιπα Gln20, Glu405 και Trp406. Το κατάλοιπο Glu351 αποτελεί το πυρηνόφιλο στην αντίδραση (Zechel et al., 2003).

### 3.2.2. Μηχανισμός δράσης

Οι περισσότερες β-γλυκοσιδάσες που έχουν χαρακτηριστεί (GH1, GH3 και GH30) είναι ένζυμα που έχουν διατηρηθεί και πραγματοποιούν καταλύσεις σε δύο στάδια, το στάδιο της γλυκοζυλίωσης και το στάδιο της απογλυκοζυλίωσης. Ο καταλυτικός τους μηχανισμός περιγράφεται διαγραμματικά στην Εικόνα 8 (Singh et al., 2016). Το γλουταμικό (Glu) είναι το βασικό κατάλοιπο του ενεργού κέντρου και είναι συντηρημένο μεταξύ όλων των αναφερόμενων β-γλυκοσιδασών. Δύο κατάλοιπα γλουταμινικού διεξάγουν τη συνολική καταλυτική δράση της β-γλυκοσιδάσης. Το ένα ενεργεί ως πυρηνόφιλο και το δεύτερο κατάλοιπο λειτουργεί ως ένας γενικός καταλύτης οξέος/βάσης.

**Βήμα 1<sup>ο</sup>:** Στο αρχικό στάδιο (γλυκοζυλίωσης), το γλουταμινικό, το οποίο δρα ως πυρηνόφιλο, υφίσταται μια πυρηνόφιλη προσβολή επί του ανωμερικού άνθρακα και καταλήγει σε ενδιάμεσο προϊόν ενζύμου-γλυκόζης.

**Βήμα 2<sup>ο</sup>:** Στο δεύτερο βήμα (απογλυκοζυλίωσης), ένα μόριο νερού, το οποίο ενεργοποιείται από το κατάλοιπο του γλουταμινικού που είναι καταλύτης οξέος/βάσης, δρα ως πυρηνόφιλο και διασπά το γλυκοσιδικό δεσμό για την απελευθέρωση της γλυκόζης.



**Εικόνα 8.** Προτεινόμενος μηχανισμός υδρόλυσης β-γλυκοσιδικού δεσμού από τις β-γλυκοσιδάσες (Singh et al., 2016).

### 3.2.3. Εφαρμογές των β-γλυκοσιδασών

Οι β-γλυκοσιδάσες χρησιμοποιούνται ευρέως σε διάφορες βιοτεχνολογικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής βιοκαυσίμων και αιθανόλης από τα κυτταρινικά γεωργικά απόβλητα και τη σύνθεση χρήσιμων β-γλυκοσίδων (D. Li et al., 2013). Αυτά τα ένζυμα χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία για την υδρόλυση των πικρών ενώσεων κατά την εκχύλιση

του χυμού και την απελευθέρωση του αρώματος από τα σταφύλια. Είναι τα βασικά ένζυμα στην ενζυμική απελευθέρωση αρωματικών ενώσεων που υπάρχουν στα φρούτα και τα προϊόντα ζύμωσης και έχουν εφαρμογή σε βιομηχανίες επεξεργασίας για την ενίσχυση της γεύσης (D. Li et al., 2013)(Singh et al., 2016). Επίσης, οι β-γλυκοσιδάσες χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση ολιγοσακχαριτών και αλκυλο-γλυκοσίδων (Bankova et al., 2006). Οι ολιγοσακχαρίτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως θεραπευτικοί παράγοντες, διαγνωστικά εργαλεία και παράγοντας προαγωγής της ανάπτυξης.

#### **4. Νανοβιοτεχνολογία**

Η νανοτεχνολογία είναι ο επιστημονικός κλάδος που πραγματοποιεί έρευνα και τεχνολογική ανάπτυξη σε νανοκλίμακα, δηλαδή στη κλίμακα διαστάσεων από 1-100 nm. Στόχος της νανοτεχνολογίας είναι η δημιουργία και ο χειρισμός δομών, συσκευών και συστημάτων που έχουν νέες ιδιότητες και λειτουργίες ως αποτέλεσμα του μεγέθους τους. Η κατασκευή νανοδομών με συγκεκριμένες ιδιότητες γίνεται μέσω χημικών και/ή φυσικών μεθόδων. Οι νανοδομές, εξαιτίας του μεγέθους τους, παρουσιάζουν βελτιωμένες ιδιότητες, όπως πολύ μεγάλη ελεύθερη επιφάνεια, μεγάλη μηχανική αντοχή, βελτιωμένη ικανότητα διάχυσης, μεγάλη ειδική θερμότητα, υψηλή ηλεκτρική αντίσταση και βελτιωμένες μαγνητικές ιδιότητες (Houde et al., 2004; Suryanarayana and Koch, 2000).

Η νανοβιοτεχνολογία αποτελεί έναν αναδυόμενο τομέα που εισάγει τη νανοκλίμακα σε εφαρμογές της Βιοτεχνολογίας και χρησιμοποιεί νανοδομές και νανοσυστήματα για τη μελέτη βιοσυστημάτων. Οι κύριοι στόχοι της νανοβιοτεχνολογίας είναι η ανάπτυξη εφαρμογών και διεργασιών σε επίπεδο νανοκλίμακας με τη χρήση βιολογικών συστημάτων. Ορισμένες από αυτές τις εφαρμογές αφορούν τομείς όπως τα ηλεκτρονικά και οι υπολογιστές, ενώ άλλες εφαρμόζονται στη βιολογία ή την ιατρική.

Τα νανοϋλικά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με πολλούς τρόπους. Ένας από αυτούς είναι με βάση το είδος τους. Ορισμένες ομάδες κατάταξης είναι: α) υλικά με βάση τον άνθρακα, β) μεταλλικά υλικά γ) δενδρομερή δ) σύνθετα νανοϋλικά. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν νανοϋλικά με βάση των άνθρακα.

##### **4.1. Νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα**

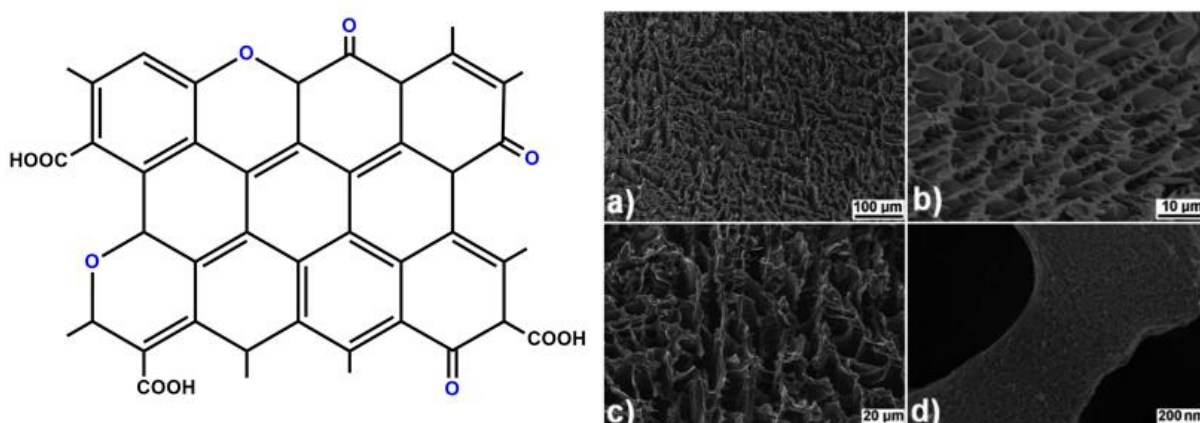
Ο άνθρακας, είναι ένα από τα πιο άφθονα υλικά στη γη, και βρίσκεται στη φύση με την στοιχειώδη μορφή του όπως ο γραφίτης, το διαμάντι και ο άνθρακας. Η παραγωγή του είναι περίπου 9 Gt /έτος, για τεχνολογικές εφαρμογές, αποτελώντας την υψηλότερη παραγωγή σε σύγκριση με όλα τα άλλα στοιχεία. Οι νανοδομημένες αλλοτροπικές μορφές άνθρακα έχουν μελετηθεί πολύ τις τελευταίες δεκαετίες εξαιτίας των μοναδικών ιδιοτήτων τους όσο αφορά τον υβριδισμό και λόγο της ευαισθησίας τους στις διαταραχές κατά τη διάρκεια της σύνθεσης, επιτρέποντας τον λεπτό χειρισμό των ιδιοτήτων του υλικού. Συγκεκριμένα, ο άνθρακας μπορεί να βρεθεί σε πολλές διαφορετικές καταστάσεις υβριδισμού, καθεμία από τις οποίες έχει μοναδικές ιδιότητες. Στην πραγματικότητα, οι χημικές, μηχανικές, θερμικές και ηλεκτρικές ιδιότητες των διαφορετικών αλλοτροπικών μορφών συσχετίζονται άμεσα με τη δομή και την κατάσταση υβριδισμού τους, επιτρέποντας τη χρήση του ίδιου υλικού για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών (Notarianni et al., 2016). Τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα έχουν τραβήξει ιδιαίτερα την προσοχή ανάμεσα στα νανοδομημένα υλικά λόγω των μοναδικών αυτών ιδιοτήτων καθώς και της βιοσυμβατότητά τους, και βρίσκουν εφαρμογή σε ηλεκτρονικές συσκευές, κυψέλες καυσίμων, ως φορείς για στοχευμένη μεταφορά φαρμάκων και ως φορείς για ακινητοποίηση βιομορίων (Pavlidis et al., 2012b).

Η χημική τροποποίηση των νανοϋλικών είναι μία καθιερωμένη τεχνική για την εισαγωγή επιθυμητών λειτουργικών ομάδων στη επιφάνειά τους ώστε να δημιουργηθούν νανοϋλικά με επιθυμητές ιδιότητες. Η χημεία επιφανείας των τροποποιημένων νανοϋλικών μπορεί να

επηρεάσει την ικανότητα διασποράς τους και τις αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια όπως οι πρωτεΐνες, μεταβάλλοντας έτσι τη βιολογική δραστηριότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων. Παρόλο που έχουν γίνει πολυάριθμες προσπάθειες για την πρόσδεση ενζύμων και άλλων βιομορίων σε νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα (Horn et al., 2012; Q. Li et al., 2013; Mu et al., 2008; Pang et al., 2015), υπάρχουν ακόμα πολλά ερωτήματα σχετικά με την επίδραση των ιδιοτήτων των νανοϋλικών (όπως η σύσταση, η μορφολογία και η χημεία επιφάνειας) που ασκούν στη δομή και τη λειτουργία των συζευγμένων πρωτεϊνών. Η διερεύνηση της δομής και της λειτουργίας των πρωτεϊνών που ακινητοποιούνται στα νανοϋλικά θα είναι κρίσιμη για την καλύτερη κατανόηση των αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-νανοϋλικού και το σχεδιασμό λειτουργικών νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων (Pavlidis et al., 2012b).

#### 4.1.1 Ιεραρχημένου πορώδους άνθρακες (HPC)

Τα υλικά ιεραρχημένου πορώδους άνθρακα (Hierarchical Porous Carbons, HPC) έχουν τραβήξει πρόσφατα μεγάλο ενδιαφέρον. Η δυνατότητα χρήσης μιας πολύτροπης κατανομής μεγέθους πόρων σε διάφορες κλίμακες μήκους έχει αποδειχθεί ότι είναι χρήσιμη σε διάφορες εφαρμογές (Estevez et al., 2018, 2017; Xu et al., 2019). Τα υλικά αυτά διαθέτουν καλά καθορισμένους μακροπόρους και διασυνδεδεμένους μεσο- και μικροπόρους (Εικόνα 9.). Οι μακροπόροι (διάμετρος >50 nm) μπορούν να λειτουργήσουν ως μικρο-δεξαμενές που ελαχιστοποιούν τις αποστάσεις διάχυσης. Με τους μεσοπόρους παρέχεται μεγαλύτερη επιφάνεια πρόσβασης καθώς και μικρότερη αντίσταση στη μεταφορά ιόντων. Οι μικροπόροι (διάμετρος <2 nm) διαθέτουν τα οφέλη της εκλεκτικότητας σχήματος και μεγέθους για τα εισερχόμενα μόρια. Παρέχουν επίσης υψηλή ειδική επιφάνεια μαζί με ισχυρή ικανότητα προσρόφησης (Gong et al., 2014). Τέτοιοι άνθρακες ιεραρχημένων πόρων παρέχουν καλύτερη προσβασιμότητα και ενεργά κέντρα για πολλές ενεργειακές και περιβαλλοντικές εφαρμογές που περιλαμβάνουν υλικά ηλεκτροδίων για μπαταρίες, υπερπυκνωτές, κυψέλες καυσίμων και προσροφητές για την παγίδευση CO<sub>2</sub> (Estevez et al., 2013).



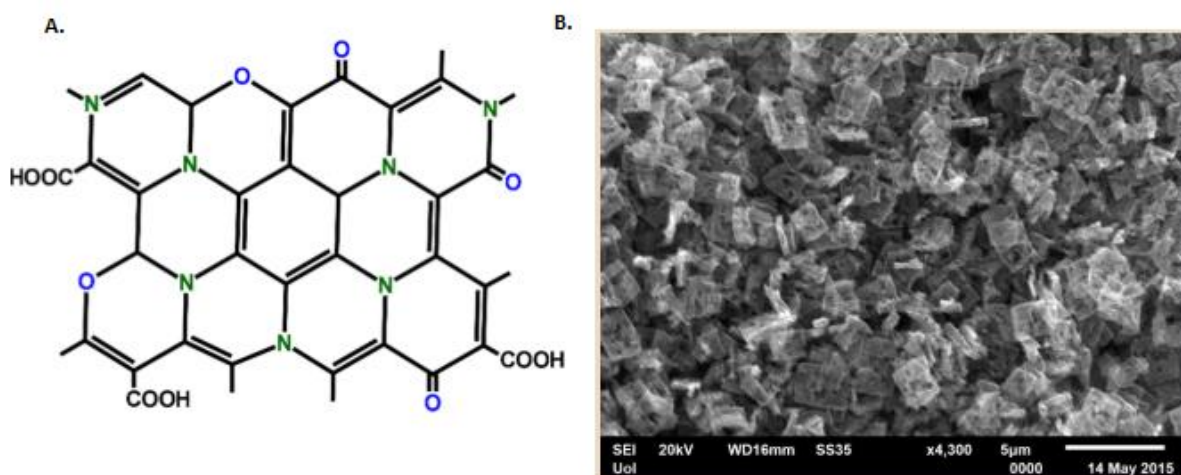
**Εικόνα 9.** Αριστερά απεικονίζεται η δομή των υλικών HPC. Δεξιά εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) του υλικού HPC. Οι εικόνες παρουσιάζουν: a) τον μονολιθικό χαρακτήρα των HPC, b) και c) την διασυνδεδεμένη δομή των μακροπόρων και d) το μεσοπορώδες.

Η έρευνα γύρω από τα υλικά αυτά έχει επικεντρωθεί στις διαφορετικές μεθόδους με τις οποίες μπορεί να γίνει η σύνθεση τέτοιων υλικών. Οι διάφορες μέθοδοι βελτιώνονται χρόνο με το χρόνο ώστε να παρέχουν άνθρακες με υψηλή ειδική επιφάνεια, μεγάλους όγκους πόρων αλλά και ρυθμιζόμενο πορώδες και των τριών κλιμακών μεγέθους: μακρο-μεσο- και μικρο, σε μία απλή πλατφόρμα. Επίσης, η τροποποίηση της επιφάνειας αυτών των υλικών για την προσθήκη λειτουργικών ομάδων όπως καρβοξυλομάδων και υδροξυλομάδων μπορεί να διευρύνει ακόμα περισσότερο τις ιδιότητες και τις εφαρμογές τους.

#### 4.1.2 Πορώδεις Κυβοειδείς άνθρακες (PCC)

Τα υλικά πορώδους κυβοειδούς άνθρακα (Porous Carbon Cuboids, PCC) (Εικόνα 10) αποτελούν μία κλάση νέων υλικών πορώδους άνθρακα με ασυνήθιστες εξαιρετικά υδρόφιλες ιδιότητες, πάνω στις οποίες μεγιστοποιούνται οι συνεργιστικές επιδράσεις μεταξύ της ετερογένειας της επιφάνειας και της αρχιτεκτονικής των μικροπόρων. Συνδυάζουν μια σειρά από ενδιαφέρουσες ιδιότητες, όπως ελαφρύ βάρος, μεγάλη σταθερότητα, ετερογένεια επιφάνειας και υψηλό ιεραρχημένο πορώδες (Hao et al., 2015). Τα υλικά πορώδους άνθρακα έχουν τραβήξει την προσοχή τα τελευταία χρόνια εξαιτίας των εφαρμογών τους σε πολλά πεδία, όπως ο αέριος διαχωρισμός, η προσρόφηση μικρών αέριων μορίων, η κατάλυση, η αποθήκευση ενέργειας και οι πυκνωτές. Οι άνθρακες που έχουν χρησιμοποιηθεί σε τέτοιες εφαρμογές είναι κυρίως μικροπορώδεις (Chowdhury et al., 2019).

Αν και το μέγεθος των μικροπόρων είναι πολύ μικρότερο από το μέγεθος των μεσοπόρων, τα μικροπορώδη υλικά έχουν μοναδικά χαρακτηριστικά και επιδόσεις στη βιοτεχνολογία που αξίζει ιδιαίτερη προσοχή. Έχει διαπιστωθεί ότι η παρουσία μικροπόρων στην επιφάνεια νανοϋλικών, όπως των νανοζεολιτών, διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην προσρόφηση, στην διαμόρφωση και στην δραστικότητα ενζύμων (Wu et al., 2013).



**Εικόνα 10.** Α) Η δομή του υλικού PCC και Β) εικόνα ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) του υλικού PCC όπου φαίνονται οι χαρακτηριστικές κυβοειδείς μορφές.

Η επιφανειακή τροποποίηση των υλικών πορώδους άνθρακα είναι κρίσιμη όχι μόνο για την ανάπτυξη και εφαρμογή υβριδικών πορωδών υλικών αλλά και για την αλλαγή του υδρόφοβου και υδρόφιλου χαρακτήρα της επιφάνειας των υλικών ώστε να καταστούν διαθέσιμα ως καλοί προσροφητές ή καταλύτες για την επιλεκτική απομάκρυνση οργανικών ρυπαντών και βιοϋλικών (Vinu et al., 2007). Η τροποποίηση της ανθρακικής επιφάνειας με καρβοξυλομάδες και υδροξυλομάδες προσδίδει στο υλικό νέες βελτιωμένες ιδιότητες (Karageorgou et al., 2019) και καθιστούσε την επιφάνεια ενεργή για την ομοιοπολική ακινητοποίηση πρωτεϊνών βελτιώνοντας την απόδοση της ακινητοποίησης και την δραστικότητα του βιοκαταλύτη (Chatzikonstantinou et al., 2019).

## **4.2. Ακίνητοποίηση ενζύμων σε νανούλικά**

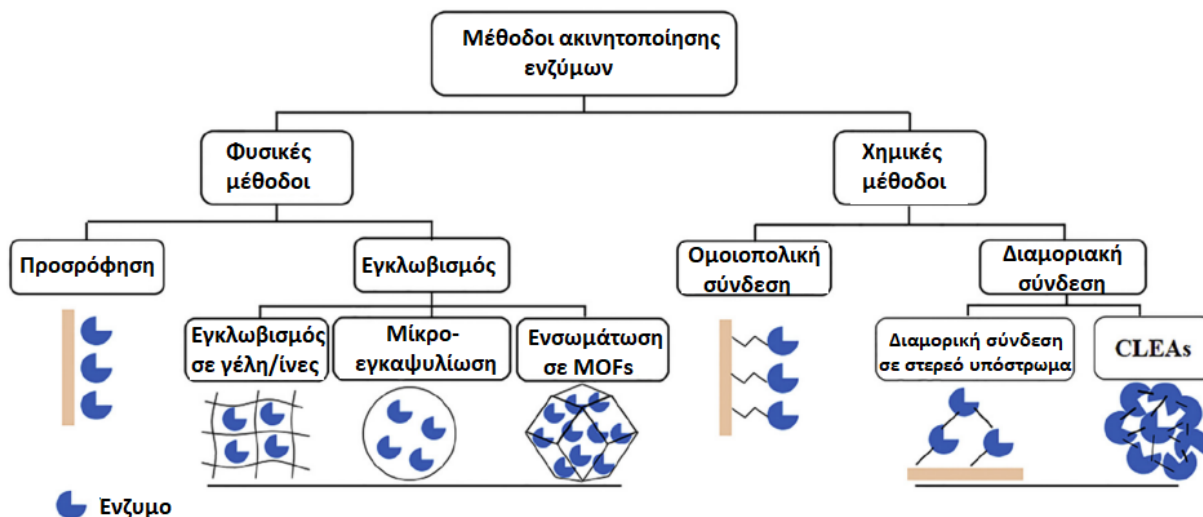
### **4.2.1. Ακίνητοποίηση ενζύμων**

Με τον όρο ακίνητοποίηση (immobilization) ενζύμων αναφερόμαστε στον περιορισμό τους σε μια τεχνητή στερεά φάση (αδιάλυτο-υλικό υπόστρωμα στήριξης), στην οποία διατηρούνται οι καταλυτικές ιδιότητες και η σταθερότητα τους, έτσι ώστε το βιοκαταλυτικό αυτό σύστημα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί επαναλαμβανόμενα και συνεχώς. Η ακίνητοποίηση γίνεται με τέτοιο τρόπο, ώστε να επιτρέπεται η αμφίδρομη μεταφορά αντιδρώντων, προϊόντων, οξυγόνου κ.λ.π. μεταξύ της βιοκαταλυτικής φάσης και μιας κύριας υγρής φάσης.

Τα πλεονεκτήματα της ακίνητοποίησης των ενζύμων ποικίλουν. Τα ακινητοποιημένα ένζυμα σε σύγκριση με τα ελεύθερα είναι γενικά πιο σταθερά και πιο εύκολα στο χειρισμό. Εμφανίζουν ανοχή στις μεταβολές της θερμοκρασίας και του pH. Επιπροσθέτως, ο διαχωρισμός των ακινητοποιημένων ενζύμων από το μείγμα της αντίδρασης είναι εύκολος και επομένως ο καθορισμός των προϊόντων το ίδιο, πλεονέκτημα πολύ σημαντικό για την βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων. Η ακίνητοποίηση ενός ενζύμου μπορεί να οδηγήσει σε βελτιωμένα χαρακτηριστικά όπως: σταθερότητα σε οργανικούς διαλύτες, ανοχή σε μεταβολές του pH, επιλεκτικότητα και θερμοσταθερότητα. Η αύξηση της δομικής ακαμψίας της πρωτεΐνης προστατεύει την πρωτεΐνη από απενεργοποίηση λόγω αποδιάταξης. Τέλος, το ακινητοποιημένο ένζυμο μπορεί να ανακτηθεί και να επαναχρησιμοποιηθεί σε πολλαπλούς κύκλους αντίδρασης χωρίς την ανάγκη για επαναλαμβανόμενες, χρονοβόρες και δαπανηρές διαδικασίες εκχύλισης και καθαρισμού (Ahmad and Sardar, 2015a). Υπάρχουν παρόλα αυτά και κάποια μειονεκτήματα κατά την ακίνητοποίηση ενός ενζύμου όπως: μεταβολές στη στερεοδιάταξη, στερεοχημικοί περιορισμοί και απώλεια ενζυμικής δραστηριότητας.

### **4.2.2 Μέθοδοι και τεχνικές ακίνητοποίησης ενζύμων**

Η ακίνητοποίηση των βιοκαταλυτών σε φορείς αδιάλυτους στο νερό επιτυγχάνεται τόσο με χημικές όσο και με φυσικές μεθόδους, οι οποίες περιλαμβάνουν διάφορες τεχνικές (Εικόνα 11.) (D. M. Liu et al., 2018). Στις φυσικές μεθόδους ανήκουν α) η προσρόφηση και ιοντική σύνδεση και β) ο εγκλωβισμός σε πλέγμα και ο εγκλωβισμός ή ενθυλάκωση σε μεμβράνες και λιποσώματα. Στις χημικές μεθόδους ανήκουν α) η ομοιοπολική σύνδεση και η διαμοριακή σύνδεση (cross-linking). Στην παρούσα μελέτη οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η φυσική προσρόφηση και η ομοιοπολική σύνδεση.



Εικόνα 11. Μέθοδοι ακινητοποίησης ενζύμων.

#### 4.2.2.1. Φυσικές μέθοδοι ακινητοποίησης

**Προσρόφηση** Αυτή η μέθοδος ακινητοποίησης βασίζεται στη προσρόφηση του ενζύμου στην επιφάνεια ενός μη υδατοδιαλυτού φορέα. Κατά την απλή προσρόφηση το ένζυμο προσκολλάται στον φορέα μέσω μη ειδικών φυσικών αλληλεπιδράσεων όπως είναι δεσμοί υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, δυνάμεις van der Waals και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Εξαιτίας της φύσης των δυνάμεων που εμπλέκονται, η μη ομοιοπολική ακινητοποίηση του ενζύμου στο φορέα είναι άμεσα εξαρτώμενη από παραμέτρους όπως pH, θερμοκρασία, ιοντική ισχύς, πολικότητα του διαλύτη κ.α.. Κύριο πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι το χαμηλό κόστος, καθώς και το γεγονός ότι οι περισσότεροι βιοκαταλύτες διατηρούν τη φυσική τους διαμόρφωση και κατά συνέπεια τις καταλυτικές τους ιδιότητες. Ωστόσο, βασικό μειονέκτημα αποτελεί η ασθενής φύση του δεσμού μεταξύ φορέα και βιοκαταλύτη, που συχνά μπορεί να οδηγήσει σε αποδέσμευση του βιοκαταλύτη από την επιφάνεια ακινητοποίησης (Jesionowski et al., 2014).

#### Ομοιοπολική σύνδεση ενζύμου σε ενεργοποιημένο φορέα

Η μέθοδος της ομοιοπολικής σύνδεσης του βιοκαταλύτη (ένζυμο) με τον φορέα βασίζεται στο σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των καταλοίπων των αμινοξέων του ενζύμου και δραστικών χημικών ομάδων του φορέα. Οι ελεύθερες χημικές ομάδες ενός πρωτεϊνικού μορίου, που συμμετέχουν στο σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών με το φορέα ακινητοποίησης, είναι η ε-αμινομάδα (-NH<sub>2</sub>) της Lys, η α-αμινομάδα του αμινοτελικού άκρου του πρωτεϊνικού μορίου, η σουλφυδρολομάδα (-SH) της Cys, οι υδροξυλομάδες (-OH) των Tyr, Ser και Thr, οι καρβοξυλομάδες (-COOH) των Asp και Glu, καθώς και η γουανιδινομάδα της Arg.

Κατά την ομοιοπολική σύνδεση, τα βιομόρια βρίσκονται σε μια κατάσταση που μοιάζει με το φυσικό τους περιβάλλον, με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν υψηλή ενεργότητα, μεγάλους χρόνους ημιζωής και έχουν το πρόσθετο πλεονέκτημα της μη αντιστρεπτής πορείας ακινητοποίησης κατά τη μεταβολή διαφόρων παραμέτρων, όπως το pH, η θερμοκρασία, η ιοντική ισχύς και ο διαλύτης. Η πορεία ακινητοποίησης με ομοιοπολική σύνδεση περιλαμβάνει



τρία βασικά στάδια: την ενεργοποίηση της επιφάνειας του φορέα, την ομοιοπολική σύνδεση του βιομορίου και την απομάκρυνση της ποσότητας του βιομορίου που δεν έχει ακινητοποιηθεί. Η ομοιοπολική ακινητοποίηση του βιομορίου στο φορέα γίνεται απευθείας ή μέσω μορίων σύνδεσης το οποίο έχει ήδη συνδεθεί στην επιφάνεια του υλικού στήριξης (Dwevedi, 2016; Mohamad et al., 2015). Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η πολυπλοκότητα της διαδικασίας, η οποία απαιτεί την ενεργοποίηση της επιφάνειας του φορέα με υψηλής δραστηριότητας αντιδραστήρια, γεγονός που συχνά οδηγεί σε μερική απώλεια της ενζυμικής δραστηριότητας, ως αποτέλεσμα ανεπιθύμητων αντιδράσεων με τις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων.

#### **4.2.3. Ακινητοποίηση ενζύμων σε νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα**

Με την έλευση της νανοτεχνολογίας και την έμφαση στη σμίκρυνση, τα νανοϋλικά τράβηξαν την προσοχή των ερευνητών που μελετούσαν την ακινητοποίηση ενζύμων. Τα υλικά νανοκλίμακας με τεράστια επιφάνεια και μικρό μέγεθος που περιλαμβάνουν νανοϊνες, νανομόρια, sol-gel σίλικα, μεσοπορώδη υλικά, διασταυρούμενα συσσωματώματα ενζύμων (CLEAs) και μικροσφαιρίδια αλγινικού υποστρώματος, έχουν αναδειχθεί ως εξαιρετικοί φορείς ακινητοποίησης ενζύμων, λόγω των μοναδικών φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων (Hyeon et al., 2016).

Έναν από τους βασικότερους λόγους αποτέλεσε η υψηλή αναλογία επιφάνειας προς όγκο που προσφέρουν τα νανομόρια, κάνοντας δυνατή τη φόρτωση μεγαλύτερης ποσότητας βιοκαταλύτη ανά μονάδα βάρους του φορέα. Με τον τρόπο αυτό παρατηρείται αύξηση της βιολογικής δραστηριότητας των πρωτεϊνών (απόδοση ακινητοποίησης) καθώς αυξάνεται ο αριθμός μορίων ενζύμου που προσδένονται σε μία δεδομένη επιφάνεια (Gurta et al., 2011). Επιπλέον, πολλές μελέτες για την ακινητοποίηση ενζύμων σε νανοϋλικά έχουν αναφέρει γενική βελτίωση στην ενζυμική σταθερότητα κάτω από ακραίες συνθήκες, καθώς και βελτιωμένη επαναχρησιμοποίηση ενζύμου (Hyeon et al., 2016). Στις περισσότερες περιπτώσεις, η χρονο-εξαρτώμενη απώλεια ενζυμικής σταθερότητας προκαλείται από αλλαγές στη διαμόρφωση των ενζύμων. Η ακινητοποίηση συνήθως σταθεροποιεί τα ένζυμα, καθώς είναι πιο δύσκολο να προκύψουν αλλαγές στη διαμόρφωση όταν τα ένζυμα είναι προσδεμένα στις επιφάνειες στερεών υλικών. Θεωρείται επίσης ότι η πολυσημειακή ομοιοπολική σύνδεση στα υλικά μπορεί να βελτιώσει τη σταθερότητα των ενζύμων σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τη φυσική προσρόφηση. Πράγματι, φαίνεται λογικό ότι ο περιορισμός ενός ενζυμικού μορίου σε ένα χώρο συγκρίσιμου μεγέθους μπορεί να περιορίσει το τρισδιάστατο περιβάλλον που είναι διαθέσιμο για την αποδιάταξη του ενζύμου, παρέχοντας συνεπώς ένα μηχανισμό ενζυμικής σταθεροποίησης διαφορετικό από τον αντίστοιχο των μακροσκοπικών υλικών (Wang, 2006).

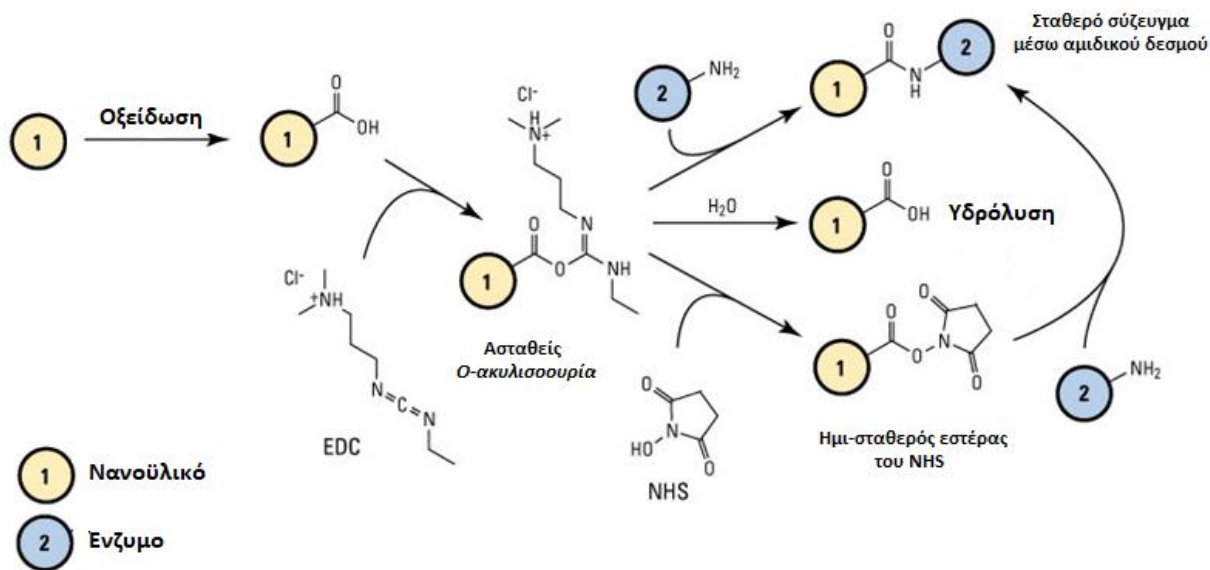
Η πρόσφατη έρευνα έχει αρχίσει να διευκρινίζει τους υποκείμενους φυσικοχημικούς μηχανισμούς πίσω από τη συμπεριφορά των ενζύμων που ακινητοποιούνται σε νανοϋλικά. Παρόλο που οι αλληλεπιδράσεις και οι καταλυτικοί μηχανισμοί κάθε συστήματος ενζύμου-νανομορίου είναι περίπλοκες, συγκεκριμένα χαρακτηριστικά των νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων έχουν συσχετιστεί με τη βελτίωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Τέτοια χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν την ενζυμική πυκνότητα, τη μεταφορά μάζας, τη μορφολογία του νανομορίου, τη χημεία επιφάνειας του νανομορίου και τον προσανατολισμό του ενζύμου (Ding et al., 2015).

#### **4.2.3.1. Ακίνητοποίηση ενζύμων σε νανοϋλικά μέσω φυσικής προσρόφησης**

Η φυσική προσρόφηση των ενζύμων σε νανοϋλικά με βάση των άνθρακα βασίζεται σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις και σε ηλεκτροστατικές ή van der Waals δυνάμεις ή σε δεσμούς υδρογόνου (Gao and Kyrtziz, 2008a; Patila et al., 2013a). Η δέσμευση είναι σχετικά ασθενής και τυπικά δεν αλλάζει τη φυσική δομή του ενζύμου. Έτσι το ενεργό κέντρο του ενζύμου δεν αλλάζει, επιτρέποντας το ένζυμο να διατηρήσει τη δραστηριότητά του. Για την επιτυχή προσρόφηση του ενζύμου, πρέπει να πληρούνται κάποιες συγκεκριμένες προϋποθέσεις, μεταξύ των οποίων οι φυσικοχημικές παράμετροι του φορέα. Πιο συγκεκριμένα πρέπει να ληφθούν υπόψη: η επιφάνεια, το μέγεθος των σωματιδίων, η δομή των πόρων και ο τύπος των λειτουργικών ομάδων που υπάρχουν στην επιφάνεια του φορέα. Η δομή και το μέγεθος των πόρων παίζει πολύ σημαντικό ρόλο τόσο την ικανότητα του ενζύμου να ακινητοποιηθεί όσο και στα χαρακτηριστικά του ακινητοποιημένου ενζύμου, όπως η καταλυτική του ικανότητα και η σταθερότητά του. Από την άλλη, η συγγένεια ενζύμου-φορέα, παίζει επίσης καθοριστικό ρόλο στην ακινητοποίηση του ενζύμου. Η συγγένεια εξασφαλίζεται από την παρουσία ειδικών δραστικών ομάδων στην επιφάνεια του φορέα, οι οποίες επιτρέπουν την αλληλεπίδραση ενζύμου-φορέα (Bayne et al., 2013; Jesionowski et al., 2014).

#### **4.2.3.2. Ομοιοπολική ακινητοποίηση ενζύμων σε νανοϋλικά μέσω ενεργοποίησης της επιφάνειάς τους με τελικές καρβοξυλομάδες**

Το EDC (1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)καρβοδιμίδιο) είναι αντιδραστήριο, το οποίο ανήκει στη κατηγορία των καρβοδιμιδίων και χρησιμοποιείται ευρέως στην ακινητοποίηση πρωτεϊνικών μορίων σε νανοϋλικά με ελεύθερες καρβοξυλομάδες (ή υδροξυλομάδες). Οι αντιδράσεις σύνδεσης μεταξύ νανοϋλικού και πρωτεϊνικού μορίου γίνονται σε δύο στάδια (Εικόνα 12.). Το EDC πρώτα αντιδρά με τις καρβοξυλικές (ή υδροξυλικές) ομάδες που βρίσκονται στην επιφάνεια του φορέα, δημιουργώντας ένα ασταθές ενδιάμεσο (Ο-ακυλισσοουρία), ενώ στη συνέχεια αντιδρά με μια από τις αμινομάδες του πρωτεϊνικού μορίου σχηματίζοντας ένα σταθερό αμιδικό δεσμό. Το ενδιάμεσο που προκύπτει στο τέλος του πρώτου σταδίου είναι αρκετά ασταθές και ευαίσθητο στην υδρόλυση. Για τον λόγο αυτό γίνεται η προσθήκη του αντιδραστηρίου NHS (N-υδροξυσουκινιμίδιο), το οποίο σταθεροποιεί το ενδιάμεσο σύμπλοκο μετατρέποντάς το σε ένα ημι-σταθερό NHS εστέρα. Η σταθεροποίηση αυτή αυξάνει την απόδοση της ακινητοποίησης (Gao and Kyrtziz, 2008b)(Shen et al., 2010).



**Εικόνα 12.** Σύνδεση ενζύμων με νανοϋλικά που περιέχουν καρβοξυλομάδες με βάση τον άνθρακα μέσω της χρήσης EDC, παρουσία ή απουσία NHS.

#### 4.2.4. Δομή ενζύμων ακινητοποιημένων σε νανοϋλικά

Ο προσανατολισμός και η τρισδιάστατη δομή των ακινητοποιημένων ενζύμων είναι ζωτικής σημασίας για την εξασφάλιση υψηλής ενζυμικής σταθερότητας και δραστηριότητας. Στις διαδικασίες ακινητοποίησης δεν είναι εύκολο να ελεγχθεί ο προσανατολισμός με τον οποίο θα ακινητοποιηθεί ένα ένζυμο, με αποτέλεσμα να είναι αναπόφευκτη η έλλειψη προσβασιμότητας στο ενεργό τους κέντρο. Τα ένζυμα υφίστανται ουσιαστικές αλλαγές στο μικροπεριβάλλον της επιφάνειάς τους, στη διαμόρφωση και στην αναδίπλωση της πρωτεϊνικής τους αλυσίδας μετά από μια διαδικασία ακινητοποίησης. Αυτό εξηγεί τη μειωμένη δραστηριότητα που παρατηρείται συνήθως μετά την ακινητοποίηση καθώς και τις διαφορές που παρατηρούνται στα χαρακτηριστικά των ενζύμων μετά την ακινητοποίησή τους. Συνεπώς, η μελέτη της δομής των ακινητοποιημένων ενζύμων, του προσανατολισμού τους στις επιφάνειες, της λειτουργικότητά τους, καθώς και μορφολογικών χαρακτηριστικών του συστήματος φορέας-ένζυμο μπορεί να είναι το κλειδί για την ανάπτυξη βιοκαταλυτών, με επιθυμητές ιδιότητες, για ένα ευρύ φάσμα βιοτεχνολογικών εφαρμογών (Mohamad et al., 2015).

Η μελέτη του συστήματος φορέα ενζύμου μπορεί να γίνει με ένα πλήθος μικροσκοπικών και φασματοσκοπικών μεθόδων. Στην παρούσα μελέτη σημαντικές πληροφορίες για τον τρόπο σύνδεσης του ενζύμου με τον φορέα διεξάχθηκαν μέσω της φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων ακτίνων Χ. Ενώ για τον μορφολογικό χαρακτηρισμό του ακινητοποιημένου ενζύμου χρησιμοποιήθηκε η μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων. Τέλος, πληροφορίες για την δομή του ακινητοποιημένου ενζύμου συλλέχθηκαν με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού, με φασματοσκοπία φθορισμού και με φασματοσκοπία υπερώθρου.

#### 4.2.4.1. Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων-X, XPS

Η φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων-X (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για τη χημική ανάλυση και την ταυτοποίηση της χημικής κατάστασης των στοιχείων που βρίσκονται στην επιφάνεια ενός στερεού δείγματος. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ενεργειακή ανάλυση των ηλεκτρονίων, που εξάγονται κυρίως από εσωτερικές ηλεκτρονικές στάθμες των ατόμων του στερεού, όταν αυτό εκτίθεται σε ακτίνες-X συγκεκριμένης ενέργειας. Στη φασματοσκοπία XPS το δείγμα εκτίθεται, υπό συνθήκες υπερυψηλού κενού, σε μία μονοχρωματική δέσμη ακτίνων X που προκαλεί φωτοϊοντισμό και εκπομπή φωτοηλεκτρονίων. Το φάσμα XPS απεικονίζει το ενεργειακό φάσμα των εκπεμπόμενων φωτοηλεκτρονίων και αποτελείται από μία σειρά από διακριτές ταινίες που ανταποκρίνονται στις χαρακτηριστικές στοιβάδες της ηλεκτρονικής δομής του ατόμου. Η ενέργεια δέσμευσης των φωτοηλεκτρονίων προσδιορίζεται μέσω της εξίσωσης:

$$E_k = h\nu - E_b + \Delta\Phi$$

όπου  $E_k$  είναι η κινητική ενέργεια των φωτοηλεκτρονίων,  $h$  η σταθερά του Planck,  $\nu$  η συχνότητα της ακτινοβολίας,  $E_b$  η ενέργεια δέσμευσης του φωτοηλεκτρονίου που προέρχεται από εσωτερική στοιβάδα, και  $\Delta\Phi$  η διαφορά του έργου εξόδου ανάμεσα στο στερεό και τον ανιχνευτή.

Κάθε στοιχείο παρουσιάζει διαφορετική ενέργεια δέσμευσης, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη χρήση της XPS για την ανίχνευση διαφορετικών στοιχείων σε μια επιφάνεια. Με την τεχνική αυτή είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του κάθε στοιχείου στην επιφάνεια του δείγματος. Επιπλέον, οι μικρές μετατοπίσεις στην ενέργεια δέσμευσης (χημικές μετατοπίσεις) παρέχουν πληροφορίες για τη χημική σύνθεση του δείγματος.

Η φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων-X χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό νανοδομημένων υλικών, καθώς και για τον προσδιορισμό στοιχείων στην επιφάνεια νανοϋλικών μετά την ακινητοποίηση ενζύμων (Ren et al., 2011) (Pavlidis et al., 2012c) (Patila et al., 2016b) (Chatzikonstantinou et al., 2019).

#### 4.2.4.2. Μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων, AFM

Το μικροσκόπιο ατομικών δυνάμεων (Atomic Force Microscopy, AFM) είναι ένα τύπος μικροσκοπίου σάρωσης ακίδας. Σκοπός αυτών των μικροσκοπιών είναι η μελέτη της επιφάνειας των υλικών σε νανοκλίμακα. Το AFM λειτουργεί στηριζόμενο στη σάρωση που εκτελεί μια μικρή κεραμική, ή από ημιαγώγιμο υλικό, ακίδα στην υπό μελέτη επιφάνεια. Η αιχμή της ακίδας τοποθετείται στην άκρη ενός μοχλοβραχίονα (πρόβολος) που μπορεί να ταλαντεύεται ενώ είναι στερεωμένος στο άλλο άκρο. Οι κύριες τεχνικές σάρωσης που χρησιμοποιούνται είναι η στατική μέθοδος (συνεχούς επαφής), δυναμικές μέθοδοι (περιοδικής επαφής και μη επαφής) και η τεχνική ελαφρών χτυπημάτων.

Αρχικά η ακίδα σαρώνει το δείγμα, ενώ λόγω των ανωμαλιών στην επιφάνεια, ασκούνται διαφορετικές δυνάμεις (van der Waals, ηλεκτροστατικές, μαγνητικές κ.α.) που αναγκάζουν τον πρόβολο, που είναι φτιαγμένος από πυρίτιο ή νιτρίδιο του πυριτίου, να λυγίζει. Λόγω αυτής της

κάμψης του προβόλου από το σύνολο των δυνάμεων που δέχεται η ακίδα, η δέσμη laser που προσπίπτει πάνω σε αυτόν, εκτρέπεται και η ανάκλασή της, ανιχνεύεται από τη φωτοδίοδο και καταγράφεται υπό τη μορφή τάσης. Με αυτόν τον τρόπο καταγράφεται η κίνηση της ακίδας η οποία είναι άμεσα σχετιζόμενη με τη μορφολογία της επιφάνειας που μελετάται. Καθώς η παραπάνω συλλεγόμενη τάση οδηγείται σε έναν ελεγκτή, αυτός επικοινωνεί με το σαρωτή ώστε να μετακινηθεί κάθετα και να αποκατασταθεί η δύναμη ακίδας – επιφάνειας. Τα δεδομένα της μετατόπισης κατά z για δεδομένη θέση x, y συλλέγονται από έναν Η/Υ και έτσι καταγράφεται η τοπολογία της εκάστοτε επιφάνειας.

Η μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων παρουσιάζει πολύ σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως ο σχεδιασμός εικόνας τριών διαστάσεων, η μεγάλη ανάλυση στις εικόνες, η δυνατότητα μελέτης μη αγώγιμων υλικών, και η λειτουργία σε υδάτινο περιβάλλον, ενώ κάποια από τα μειονεκτήματα αυτής της τεχνικής είναι η μικρή σε μέγεθος εικόνα ανάλυσης, η μικρή ταχύτητα σάρωσης, η ευαισθησία της διάταξης σε δονήσεις και η πιθανότητα καταστροφής του δείγματος κατά τη συνεχή σάρωση. Για αυτούς τους λόγους, η μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές για τη μορφολογική μελέτη και χαρακτηρισμό τόσο νανοδομημένων υλικών (Rao et al., 2007)(Kouloumpis et al., 2017)(Karageorgou et al., 2019) όσο και ακινητοποιημένων σε αυτά ενζύμων (Patila et al., 2016)(Orfanakis et al., 2018a) (Chatzikonstantinou et al., 2019).

#### **4.2.4.3. Κυκλικός διχρωισμός, CD**

Ο κυκλικός διχρωισμός (Circular dichroism, CD) είναι μία φασματοσκοπική μέθοδος που στηρίζεται στην αλληλεπίδραση του επίπεδου πολωμένου φωτός (PPL) με ένα ασύμμετρο μόριο και στη διαφορική απορρόφηση του αριστερά και δεξιά κυκλικά πολωμένου φωτός. Ο βαθμός της διαφοράς απορρόφησης εξαρτάται από το μήκος κύματος του φωτός. Η διαφορετική μοριακή απορροφητικότητα στις δύο συνιστώσες της επίπεδα πολωμένης ακτινοβολίας έχει ως αποτέλεσμα την ελλειπτική πόλωση της ακτινοβολίας, η οποία καταγράφεται στον ανιχνευτή ως ελλειπτικότητα (σε χιλιοστά της μοίρας) συναρτήσει του μήκους κύματος της ακτινοβολίας

Ο κυκλικός διχρωισμός είναι μια εξαιρετική μέθοδος προσδιορισμού της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών. Όλα τα αμινοξέα, εκτός από τη γλυκίνη, είναι οπτικώς ενεργά λόγω της ασυμμετρίας τους. Ο πεπτιδικός δεσμός της πρωτεΐνης, τα αρωματικά αμινοξέα της καθώς και προσθετικές ομάδες στη δομή τους δίνουν χαρακτηριστικά φάσματα κυκλικού διχρωισμού σε διάφορες περιοχές. Όταν τα χρωμοφόρα των αμιδίων της πολυπεπτιδικής ραχοκοκαλιάς των πρωτεϊνών ευθυγραμμίζονται σε συστοιχίες, οι οπτικές μεταβάσεις τους μετατοπίζονται ή διαιρούνται σε πολλαπλές μεταβάσεις, λόγω αλληλεπιδράσεων. Το αποτέλεσμα είναι ότι διαφορετικά δομικά στοιχεία έχουν χαρακτηριστικά φάσματα CD. Για παράδειγμα, οι πρωτεΐνες με  $\alpha$ -έλικα έχουν αρνητικές κορυφές στα 222 nm και 208 nm και μια θετική κορυφή στα 193 nm. Ενώ οι πρωτεΐνες με καλά καθορισμένα αντιπαράλληλα  $\beta$ -φύλλα έχουν αρνητικές κορυφές στα 218 nm και θετικές κορυφές στα 195 nm, ενώ οι διαταραγμένες πρωτεΐνες έχουν πολύ χαμηλή ελλειπτικότητα πάνω από 210 nm και αρνητικές κορυφές κοντά στα 195 nm (Greenfield, 2009). Ο κυκλικός διχρωισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη της επίδρασης των νανοϋλικών σε πρωτεϊνικά μόρια (Chatzikonstantinou et al., 2018b; Patila et al., 2016b, 2013b).

#### 4.2.4.4. Φασματοσκοπία φθορισμού

Ο φθορισμός είναι μία διαδικασία τριών σταδίων, η οποία λαμβάνει χώρα σε συγκεκριμένα μόρια (συνήθως πολυαρωματικούς ή ετεροκυκλικούς υδρογονάνθρακες), τα οποία ονομάζονται φθορισμοφόρα. Τα φθορισμοφόρα μετά από διέγερση, εκπέμπουν ακτινοβολία με μήκος κύματος μεγαλύτερο από εκείνο της διεγείρουσας ακτινοβολίας.

Ο φθορισμός των πρωτεϊνών οφείλεται σε τρία αμινοξέα με ιδιότητες εσωτερικού φθορισμού, τη φαινυλαλανίνη (Phe), την τυροσίνη (Tyr) και την τρυπτοφάνη (Trp), από τα οποία η τρυπτοφάνη και η τυροσίνη χρησιμοποιούνται ευρέως, διότι οι κβαντικές τους αποδόσεις είναι αρκετά υψηλές για να δώσουν ένα καλό σήμα φθορισμού. Η περιεκτικότητα των πρωτεϊνών σε αυτά τα τρία αμινοξέα είναι πάρα πολύ χαμηλή. Πιο συγκεκριμένα, η τρυπτοφάνη, που είναι το κυρίαρχο αμινοξύ με εσωτερικό φθορισμό, εμπεριέχεται περίπου σε ποσοστό 1 % mole στις πρωτεΐνες (Lakowicz, 2006). Η Trp και η Tyr διεγείρονται στα 280 nm, ενώ η επιλεκτική διέγερση της Trp γίνεται στα 295 nm. Τα κατάλοιπα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση δομικών αλλαγών μιας πρωτεΐνης, όπως η αναδίπλωση ή η αποδιάταξη, διότι οι ιδιότητες φθορισμού τους είναι ευαίσθητες ως προς το περιβάλλον τους. Η φασματοσκοπία φθορισμού βρίσκει εφαρμογές στην μελέτη πρωτεϊνών και στην αλληλεπίδρασή τους με νανοϋλικά (Chatzikonstantinou et al., 2019; Pavlidis et al., 2012a).

#### 4.2.4.5. Φασματοσκοπία υπερύθρου, FTIR

Η φασματοσκοπία υπερύθρου (Fourier transform infrared, FTIR) θεωρείται μια σημαντική φασματοσκοπική τεχνική στην Οργανική Χημεία, λόγω της ευκολίας λήψης φασμάτων και της σύγκρισής τους με φάσματα γνωστών οργανικών ενώσεων.

Η FTIR χρησιμοποιείται για τη μελέτη λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια των υλικών χρησιμοποιώντας τα διακριτά επίπεδα ενέργειας για τις δονήσεις των ατόμων σε αυτές τις ομάδες. Όταν το φως μιας συγκεκριμένης ενέργειας, μεταδίδεται μέσω του δείγματος, μπορεί να απορροφηθεί από ομάδες ατόμων στο υλικό. Αυτό συμβαίνει όταν η συχνότητα του εισερχόμενου φωτός αντιστοιχεί στη συχνότητα των δονήσεων, στους δεσμούς μεταξύ των ατόμων. Η ενέργεια των δονήσεων εξαρτάται από τις μάζες και το χημικό περιβάλλον των ατόμων καθώς και τον τύπο της δόνησης. Με σάρωση σε ένα εύρος μήκους κύματος ( $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ) και την καταγραφή του μεταδιδόμενου φωτός για κάθε μήκος κύματος είναι δυνατόν να προσδιοριστούν οι λειτουργικές ομάδες υπάρχουν στην επιφάνεια του υλικού.

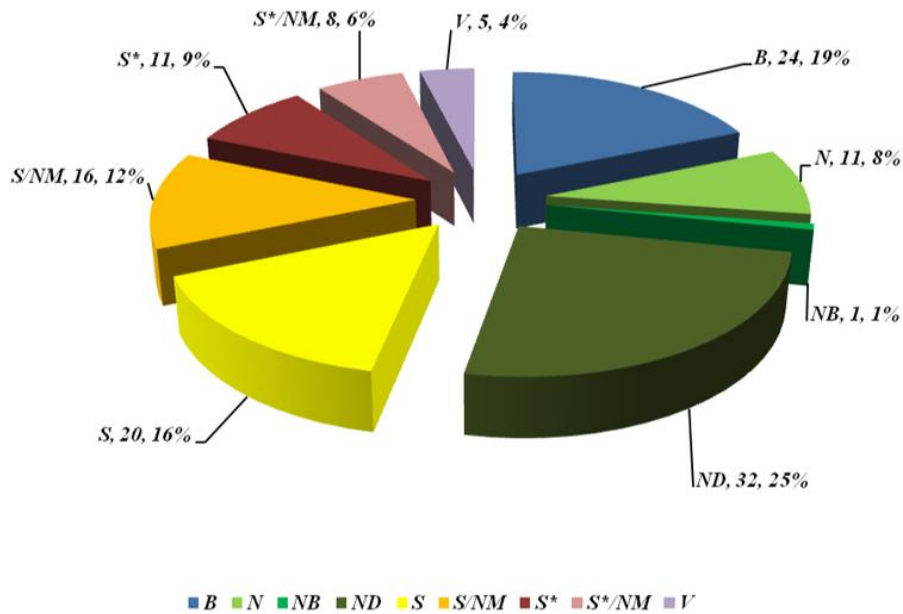
Η υπέρυθη φασματοσκοπία αποτελεί ένα πολύτιμο εργαλείο για τη διερεύνηση για την ανάλυση της δευτερογενούς δομή πολυπεπτιδίων και πρωτεϊνών. Τα πολυπεπτίδια και οι πρωτεΐνες δημιουργούν εννέα χαρακτηριστικές ζώνες απορρόφησης IR, τις Amide A, B και I-VII. Από αυτές, οι ζώνες Amide I και II είναι οι δύο πιο σημαντικές ζώνες δονήσεων της πρωτεϊνικής ραχοκοκαλιάς. Η Amide I είναι η πιο σημαντική ζώνη ( $1700-1600 \text{ cm}^{-1}$ ), η οποία οφείλεται σχεδόν εξ ολοκλήρου σε δονήσεις έκτασης C=O των πεπτιδικών δεσμών και σχετίζονται άμεσα με τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών. Η Amide II, αντίθετα, προέρχεται κυρίως από τις δονήσεις κάμψης NH και παρουσιάζουν πολύ λιγότερη ευαισθησία στην διαμόρφωση της πρωτεΐνης (Barth, 2007; Kong and Yu, 2007). Η FTIR αποτελεί μια μέθοδο που χρησιμοποιείται ευρέως για την μελέτη της επίδρασης των νανοϋλικών σε πρωτεϊνικά μόρια (Chatzikonstantinou et al., 2018b; Patila et al., 2016b; Pavlidis et al., 2012c; Tziaila et al., 2010).

## 5. Φυσικά προϊόντα-Βιοδραστικές ενώσεις

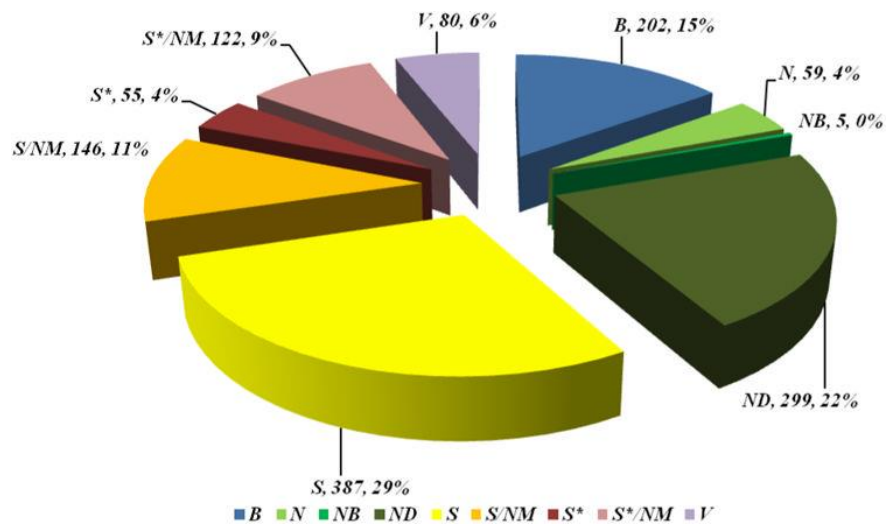
Μέσα στους αιώνες η ανθρωπότητα έχει βασιστεί στην φύση για τις βασικές ανάγκες της και όχι μόνο, σε φάρμακα. Τα φυτά αποτελούν την βάση των παραδοσιακών θεραπευτικών μεθόδων εδώ και χιλιάδες χρόνια. Οι πρώτες γραπτές αναφορές γραμμένες σε πηλό χρονολογούνται περίπου 2600 π.Χ. χρόνια στην περιοχή της Μεσοποταμίας, ενώ ανάλογες αναφορές υπάρχουν από την Αίγυπτο, την Κίνα, την Ινδία, την Ρώμη, την Ελλάδα κ.α. (Petersen.F. and Amstutz.R., 2008).

Ένα φυσικό προϊόν είναι μία χημική ένωση ή ουσία που παράγεται από ένα ζωντανό οργανισμό ή βρίσκεται στη φύση και συνήθως έχει μία φαρμακολογική ή βιολογική δράση, τέτοια ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ανακάλυψη και στον σχεδιασμό φαρμάκων. Αυτό το προϊόν μπορεί να θεωρηθεί ως τέτοιο, ακόμη και αν αυτό μπορεί να παρασκευασθεί διαολικής συνθέσεως. Τα φυσικά προϊόντα, είναι δυνατόν να προέρχονται από τους ιστούς των χερσαίων φυτών, θαλάσσιων οργανισμών ή από ζυμούς ζύμωσης μικροοργανισμών. Ένα ακατέργαστο εκχύλισμα από οποιαδήποτε από αυτές τις πηγές περιέχει τυπικά νέες, δομικά ποικίλες χημικές ενώσεις (Lahlou, 2013).

Τα φυσικά προϊόντα εξακολουθούν να αποτελούν άμεσες και έμμεσες πηγές φαρμάκων τόσο για την αντιμετώπιση του καρκίνου όσο και για άλλες παθήσεις όπως αυτές του ανοσοποιητικού και νευρολογικού συστήματος αλλά και της υπέρτασης και των μολύνσεων, γεγονός που αποδεικνύεται από την 30ετούς έρευνα των David J. Newman και Gordon M. Cragg όπως φαίνεται και στις Εικόνες 13 και 14 (D. Newman and Cragg, 2013). Το μεγαλύτερο ποσοστό των αντικαρκινικών φαρμάκων προέρχεται, είτε από φυσικά προϊόντα, είτε από παράγωγα ή μίμηση των δομών των φυσικών προϊόντων Εικόνα 13 Άλλα και όσο αφορά άλλες ασθένειες τα φυσικά προϊόντα και τα παράγωγα αυτών πρωταγωνιστούν στην αντιμετώπισή τους όπως φαίνεται στην Εικόνα 14.



**Εικόνα 13.** Όλα τα αντικαρκινικά φάρμακα, 1981-2010. (B) Βιολογικό, συνήθως μεγάλο πεπτικό ή πρωτεΐνη απομονωμένα από οργανισμούς/κυτταρικές σειρές ή παρασκευασμένα από βιοτεχνολογικά μέσα, (N) Φυσικά προϊόντα, (NB) Φυσικά προϊόντα από βότανα, (ND) προκύπτει από φυσικό προϊόν και συνήθως έχει τροποποιηθεί χημικά, (S) Συνθετικό φάρμακο, (S\*) Έχει συντεθεί χημικά αλλά το φαρμακοφόρο προέρχεται από φυσικό προϊόν, (V) Εμβόλιο (D. Newman and Cragg, 2013).



**Εικόνα 14.** Όλα τα νέα εγκεκριμένα φάρμακα. (B) Βιολογικό, συνήθως μεγάλο πεπτικό ή πρωτεΐνη απομονωμένα από οργανισμούς/κυτταρικές σειρές ή παρασκευασμένα από βιοτεχνολογικά μέσα, (N) Φυσικά προϊόντα, (NB) Φυσικά προϊόντα από βότανα, (ND) προκύπτει από φυσικό προϊόν και συνήθως έχει τροποποιηθεί χημικά, (S) Συνθετικό φάρμακο, (S\*) Έχει συντεθεί χημικά αλλά το φαρμακοφόρο προέρχεται από φυσικό προϊόν, (V) Εμβόλιο (D. Newman and Cragg, 2013).



### 5.1. Τα φυσικά προϊόντα στην ανακάλυψη φαρμάκων

Τα φυσικά προϊόντα όχι μόνο συμπληρώνουν τα συνθετικά μόρια αλλά παρουσιάζουν και φαρμακευτικά χαρακτηριστικά αξεπέραστα από τα συνθετικά μόρια. Ένα από τα βασικότερα πλεονεκτήματά τους είναι, η τεράστια δομική ποικιλομορφία τους γεγονός που τα καθιστά τις κύριες πηγές βιοδραστικών ενώσεων και πρωταγωνιστές στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων. Στην πραγματικότητα, περίπου το 40 % των χημικών δομών που βρέθηκαν σε φυσικά προϊόντα απουσιάζουν από την ιατρική χημεία σήμερα και επομένως λειτουργούν συμπληρωματικά προς μόρια που παράγονται συνθετικά. Ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα των φυσικών προϊόντων είναι η βιολογική τους ιστορία. Η βιοσύνθεση των φυσικών προϊόντων συμπεριλαμβάνει επανειλημμένη αλληλεπίδραση με ένζυμα και η πραγματική βιολογική λειτουργία πολλών φυσικών προϊόντων συμπεριλαμβάνει τη σύνδεσή τους με άλλες πρωτεΐνες. Έτσι, η ικανότητα τους να αλληλεπιδρούν με άλλα μόρια, αποτελεί την απαραίτητη προϋπόθεση για να καταστούν ένα αποτελεσματικό φάρμακο, θα μπορούσε να θεωρηθεί ως καταλληλότητα βιολογικά ελεγχόμενη. Είναι έκπληξη, αλλά συχνά παραβλέπεται το γεγονός ότι πολλά φυσικά προϊόντα παρουσιάζουν προηγμένα χαρακτηριστικά δέσμευσης σε σύγκριση με τα συνθετικά μόρια, σε αυτό συμβάλλει η στερεοχημικά πιο πολύπλοκη δομή των φυσικών προϊόντων. Επιπλέον, τα φυσικά προϊόντα έχουν υψηλότερα μοριακά βάρη, ενσωματώνοντας λιγότερο άζωτο, αλογόνο, ή άτομα θείου, αλλά περισσότερα άτομα οξυγόνου και είναι στερεοχημικά περισσότερο πολύπλοκα, με περισσότερες γέφυρες τετραεδρικών ατόμων άνθρακα, δακτυλίους και χηλικά κέντρα.

Η επιτυχία των φυσικών προϊόντων ως φάρμακα σχετίζεται με την δύναμη της χημείας τους. Η μοριακή και κυτταρική βιολογία, η συνθετική και αναλυτική χημεία, η βιοχημεία και η φαρμακολογία πρέπει να εκμεταλλευτούν την τεράστια ποικιλομορφία των χημικών δομών και βιολογικών δράσεων αυτών των ενώσεων. Μία πιθανή εξήγηση της επιτυχίας των φυσικών προϊόντων ως φαρμάκων, είναι η κατάταξη τους ως τις λεγόμενες προνομιακές δομές. Η έννοια αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι οι χημικές ουσίες που παράγονται από ζωντανούς οργανισμούς (ιδιαίτερα δευτερογενείς μεταβολίτες) έχουν εξελιχθεί μέσω χιλιετιών υπό την εξελικτική πίεση και επομένως είναι πιο πιθανό να έχουν μια ειδική βιολογική δράση από τις «τυχαίες» συνθετικές ενώσεις που παράγονται. Παρά το τεράστιο δυναμικό, μόνο ένα μικρό μέρος των ζωντανών ειδών του πλανήτη έχει ποτέ δοκιμαστεί για οποιαδήποτε βιολογική δράση. Για παράδειγμα, περίπου μόνο 10 % όλων των υφιστάμενων φυτικών ειδών έχει δοκιμαστεί και στην περίπτωση των μικροβίων η τιμή είναι ακόμη χαμηλότερη (Lahlou, 2013).

## 5.2. Η ελιά

Η ελιά ανήκει στην οικογένεια φυτών *Oleaceae*, είναι ένα μικρό αειθαλές. Ο καρπός της ελιάς (*Olea europaea*), το λάδι και τα φύλλα της έχουν πλούσιο ιστορικό θεραπευτικών και φαρμακευτικών χρήσεων. Παρά την συνηθισμένη μορφολογία της ελιάς, η χημική της σύνθεση και οι οργανοληπτικές της ιδιότητες είναι μοναδικές και θεωρείται από τους επιστήμονες ότι προσφέρουν σημαντικά οφέλη στην υγεία (Granados-Princiral et al., 2010). Τα φύλλα ελιάς έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως σε παραδοσιακές θεραπείες σε ευρωπαϊκές και μεσογειακές χώρες όπως η Ελλάδα, η Ισπανία, η Ιταλία, η Γαλλία, η Τουρκία, το Ισραήλ, το Μαρόκο και η Τυνησία. Έχουν χρησιμοποιηθεί στη διατροφή του ανθρώπου ως εκχύλισμα, τσάι βοτάνων και σκόνη και περιέχουν πολλές δυνητικά βιοδραστικές ενώσεις που μπορεί να έχουν αντιοξειδωτικές, αντιυπερτασικές, αντι-αθηρογενείς, αντιφλεγμονώδεις, υπογλυκαιμικές και υποχοληστερολαιμικές ιδιότητες (El and Karakaya, 2009).

### 5.2.1. Φαινολικές ενώσεις στα φύλλα ελιάς

#### 5.2.1.1. Φαινολικές ενώσεις

Ο μεταβολισμός των φυτών διαιρείται σε πρωτογενή και δευτερογενή. Οι ουσίες που είναι κοινές στα έμβια όντα και είναι απαραίτητες για τη συντήρηση των κυττάρων (λιπίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και νουκλεϊκά οξέα) προέρχονται από τον πρωτογενή μεταβολισμό. Από την άλλη πλευρά, οι ουσίες που προέρχονται από διάφορες βιοσυνθετικές οδούς και περιορίζονται σε καθορισμένες ομάδες οργανισμών είναι αποτελέσματα του δευτερογενούς μεταβολισμού. Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες και πιο διαδεδομένες ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών στα φυτά (Reis Giada, 2016).

Δομικά, οι φαινολικές ενώσεις περιλαμβάνουν έναν αρωματικό δακτύλιο που φέρει έναν ή περισσότερους υποκαταστάτες υδροξυλίου και ποικίλουν από απλά φαινολικά μόρια έως πολυμερείς ενώσεις. Παρόλη αυτή τη δομική ποικιλομορφία, η ομάδα των ενώσεων αυτών συχνά αναφέρεται ως «πολυφαινόλες» (Balasundram et al., 2006). Ένα άλλο χαρακτηριστικό αυτών των ενώσεων είναι ότι παρουσιάζονται συνήθως συνδεδεμένες με άλλα μόρια, συχνά με σάκχαρα και πρωτεΐνες. Η ύπαρξη φαινολικών ενώσεων σε ελεύθερη μορφή είναι λιγότερο συνηθισμένη στους φυτικούς ιστούς, πιθανώς επειδή είναι τοξικές όταν βρίσκονται στην ελεύθερη κατάσταση και αποτοξινώνονται, τουλάχιστον εν μέρει, όταν δεσμεύονται (Reis Giada, 2016).

Οι φαινολικές ενώσεις εντάσσονται σε πολλές λειτουργίες στα φυτά, όπως στις αισθητικές ιδιότητες (χρώμα, άρωμα, γεύση και στυπτικότητα), τη δομή, την επικοινωνία, την αντοχή σε παράσιτα και αρπακτικά ζώα καθώς και την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή (Reis Giada, 2016). Οι κύριες κατηγορίες των φαινολικών ενώσεων είναι: τα φαινολικά οξέα, τα φλαβονοειδή και οι λιγνάνες. Διάφορες επιστημονικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι οι φαινολικές ενώσεις παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα ευεργετικών επιδράσεων, όπως αντιαθηρογόνες, αντιαλλεργιογόνες, αντιφλεγμονώδεις, αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές, αντιθρομβωτικές και καρδιοπροστατευτικές (Balasundram et al., 2006).

### 5.2.1.2. Κύριες φαινολικές ενώσεις στα φύλλα ελιάς

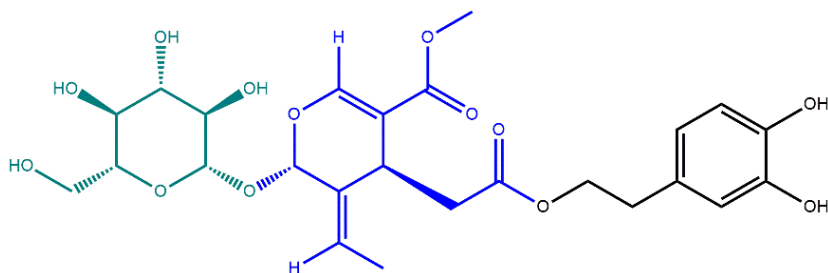
Τα φύλλα ελιάς είναι φθηνά υποπροϊόντα της ελαιοκαλλιέργειας και των ελαιοτριβείων. Κάθε χρόνο, 25 κιλά φύλλων αφαιρούνται ανά ελαιόδενδρο κατά το κλάδεμα δέντρων. Το συνολικό βάρος των φύλλων σε ολόκληρη τη βιομηχανία αγγίζει περίπου το 10 % του συνολικού βάρους των ελιών που συλλέγονται (M. Liu et al., 2018). Οι φαινολικές ενώσεις είναι παρούσες σε όλα τα μέρη του ελαιοκομικού φυτού, αλλά η φύση και η συγκέντρωσή τους ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων ιστών (Omar, 2010). Οι πολυφαινόλες των φύλλων ελιάς είναι αποτέλεσμα της αντιδραστικότητας του φυτού στις επιθέσεις από παθογόνους μικροοργανισμούς και στην απόκρισή του σε τραυματισμούς από έντομα. Η φαινολική σύνθεση των φύλλων της εξαρτάται από την ποικιλία της ελιάς, την εποχή της συγκομιδής, την καλλιεργητική ζώνη, τις αγρονομικές πρακτικές, την ηλικία των δέντρων, την ωριμότητα των φύλλων και τις συνθήκες αποθήκευσης (Athanasiadis et al., 2018).

Οι πέντε ομάδες φαινολικών ενώσεων που υπάρχουν κυρίως στα φύλλα ελιάς είναι οι παρακάτω (El and Karakaya, 2009):

- Σεκοϊριδοειδή (ελευρωπαΐνη)
- Φλαβόνες (7-Ο-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, 7-Ο-γλυκοζίτης της απιγενίνης, λουτεολίνη)
- Φλαβονόλες (ρουτίνη)
- Φλαβαν-3-όλες (κατεχίνη)
- Υποκατεστημένες φαινόλες (τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη, βανιλικό οξύ και καφεϊκό οξύ)

### 5.2.2. Ελευρωπαΐνη

Στις αρχές του 1900, μια φαινολική ένωση που υπάρχει σε όλη την έκταση της ελιάς και στο λάδι, απομονώθηκε από τα φύλλα ελιάς (Soler-rivas et al., 2000). Ονομάστηκε ελευρωπαΐνη και πρόκειται για έναν γλυκοσιδικό εστέρα ελενολικού οξέος και 3,4-διυδροξυ-φαινυλαιθανόλης (υδροξυτυροσόλης) (Εικόνα 15.). Η ελευρωπαΐνη αποτελεί μια πικρής γεύσης φαινολική ένωση που υπάρχει σε όλα τα τμήματα της ελιάς (Le Tutour and Guedon, 1992). Ανήκει στα σεκοϊριδοειδή, τα οποία είναι άφθονα στα φυτά της οικογένειας *Oleaceae*. Άλλες φυσικές πηγές της ελευρωπαΐνης εκτός από την οικογένεια *Oleaceae* είναι οι *Fraxinus*, *Syringa*, *Philyrea* και *Ligustrum* (Omar, 2010). Η ελευρωπαΐνη είναι η πολυφαινόλη που βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα φύλλα ελιάς με την περιεκτικότητά της να κυμαίνεται μεταξύ 10 % -17 % της ξηρής μάζας των φύλλων (M. Liu et al., 2018). Η βιοσύνθεση της ελευρωπαΐνης στα φυτά της οικογένειας *Oleaceae* προχωρά μέσω διακλάδωσης στο μονοπάτι των μεβαλονικών οξέων από τον δευτερογενή μεταβολισμό, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ελαιοσιδίων. Πολλές φαρμακολογικές δράσεις της ελευρωπαΐνης έχουν αποκαλυφθεί, συμπεριλαμβανομένων των αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών, αντικαρκινικών, καρδιοπροστατευτικών, νευροπροστατευτικών και υπολιπιδαιμικών (Nikolaivits et al., 2017).

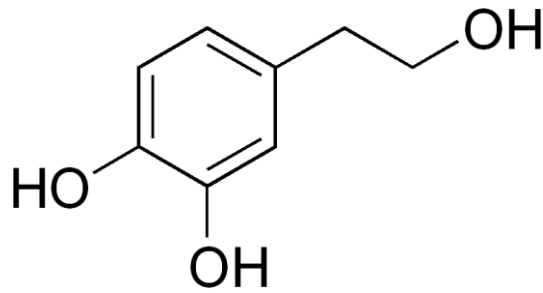


**Εικόνα 15.** Η ελευρωπαΐνη και οι επιμέρους ενώσεις που την αποτελούν (γλυκόζη, ελενολικό οξύ και υδροξυτυροσόλη).

### 5.2.3. Υδροξυτυροσόλη

Η υδροξυτυροσόλη (3,4-διυδροξυ-φαινυλαιθανόλη) (Εικόνα 16) είναι ένα από τα υδροξυ-αρωματικά συστατικά των σεκοϊριδοειδών. Πρόκειται για μια πολύ βιοενεργή αλκοολική ορθο-διφαινόλη. Η φυσική υδροξυτυροσόλη είναι σπάνια σε ελεύθερη μορφή στη φύση με εξαίρεση τις ώριμες ελιές, όπου συμβαίνει η υδρόλυση της ελευρωπαΐνης (De Leonardis et al., 2008). Βέβαια και σε αυτήν την περίπτωση, η συγκέντρωσή της εξαρτάται από την ποικιλία της ελιάς, τον βαθμό ωρίμανσής της και από την μέθοδο επεξεργασίας που θα ακολουθηθεί (Vilarlana-Pérez et al., 2014). Η περιεκτικότητα σε φυσική ελεύθερη υδροξυτυροσόλη των φύλλων ελιάς είναι πολύ χαμηλή, μικρότερη από 0,8 % της ξηρής μάζας των φύλλων (M. Liu et al., 2018). Η υδροξυτυροσόλη συναντάται είτε γλυκοζυλιωμένη είτε ως σεκοϊριδοειδές (Rodríguez-Morató et al., 2016). Συνεπώς, για την παραγωγή υδροξυτυροσόλης απαιτείται ενζυμική ή χημική υδρόλυση των σύνθετων φαινολών που την περιέχουν (Rodríguez-Morató et al., 2016). Στην βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές αναφορές για παραγωγή υδροξυτυροσόλης μέσω υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης χρησιμοποιώντας χημικές διαδικασίες. Εντούτοις, η ενζυμική προσέγγιση είναι ιδανική, καθώς οδηγεί σε φιλικά προς το περιβάλλον και ασφαλή προϊόντα μέσω εκλεκτικής υδρόλυσης (Nikolaivits et al., 2017). Οι ενζυμικές μέθοδοι εμφανίζουν πολλαπλά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών χημικών μεθόδων μετατροπής όπως ηπιότερες συνθήκες αντίδρασης, μικρότερη περιβαλλοντική μόλυνση και υψηλότερα ποσοστά απόδοσης (M. Liu et al., 2018).

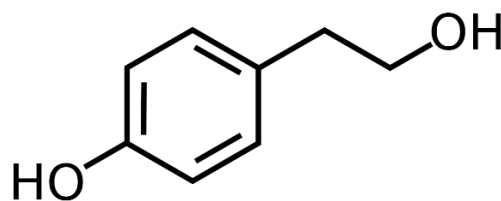
Η υδροξυτυροσόλη θεωρείται ως ένα από τα ισχυρότερα αντιοξειδωτικά στην φύση (Achmon and Fishman, 2015). Πολλές *in vivo* και *in vitro* μελέτες έχουν αποδείξει ότι η υδροξυτυροσόλη μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης πολλών ασθενειών, λόγω των αντικαρκινικών, αντιφλεγμονωδών και αντιμικροβιακών δράσεών της. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί προστατευτικές ιδιότητές εναντίον της υψηλής χοληστερόλης, των πεπτικών διαταραχών, των μεταβολικών ασθενειών και του οξειδωτικού στρες (M. Liu et al., 2018).



Εικόνα 16. Δομή υδροξυτυροσόλης.

#### 5.2.4. Τυροσόλη

Η τυροσόλη (4-υδροξυ-φαινυλοαιθανόλη) (Εικόνα 17) είναι, επίσης, μιας φυσικής προέλευσης φαινολική ένωση που εντοπίζεται κυρίως στο ελαιόλαδο και στο κρασί, είτε με γλυκοζυλιωμένη μορφή είτε ως σεκοϊριδοειδές. Ο ρόλος της στη φύση έγκειται στην προστασία του φυτού από παθογόνους μικροοργανισμούς και φυτοφάγα. Η ένωση αυτή, έχει συσχετιστεί με διάφορες ευεργετικές επιδράσεις που αφορούν το μεταβολικό σύνδρομο, τον καρκίνο και τις νευροεκφυλιστικές νόσους (Rodríguez-Morató et al., 2016). Επιπλέον έχει μελετηθεί για την αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη της δράση *in vitro* (Chakroun et al., 2013), ενώ φαίνεται να παρουσιάζει και αντιμικροβιακή δράση έναντι διάφορων μικροοργανισμών (Cordeiro et al., 2015; Monteiro et al., 2015; Shaymaa and Dina, 2016).



Εικόνα 17. Δομή τυροσόλης.

#### 5.2.5. Μέθοδοι ανάλυσης της σύστασης φυσικών προϊόντων και φυτικών εκχυλισμάτων

##### 5.2.5.1. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την ποιοτική και συχνά για την ποσοτική ανάλυση της σύστασης φαινολικών ενώσεων και φυτικών εκχυλισμάτων (Jandera, 2008; Kalili and De Villiers, 2011; Mateos et al., 2001). Η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης γίνεται με τη χρήση αντλιών υψηλής πίεσης και η στατική φάση αποτελείται από πολύ μικρής διαμέτρου και επομένως μεγάλης αντιστάσεως, σωματίδια υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Μία συσκευή HPLC αποτελείται από τα εξής τμήματα: α) δοχείο κινητής φάσης-διαλύτη, β) αντλία υψηλής πίεσης (14-6000 psi), γ) σύστημα εισαγωγής δείγματος, δ) στήλη, στ) ανιχνευτή και ζ) καταγραφέα.

Όσο αφορά το υλικό πλήρωσης της στήλης ως προς τη φύση του μπορεί να είναι α) πορώδες, με βάση την πυριτική γη (silica), β) μη πορώδες (pellicular), γ) σκληρή πηκτή, με βάση

το πολυστυρόλιο. Η HPLC ανάλογα με την πολικότητά της στατικής και της κινητής φάσης διακρίνεται σε: α) κανονικής φάσης (normal phase), κατά την οποία η υγρή στατική φάση είναι πολική, η κινητή φάση σχετικά μη πολική και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό πολικών ουσιών, οι οποίες εκλούνται τελευταίες από τη στήλη και β) ανεστραμμένης φάσης (reversed phase), όπου η υγρή στατική φάση είναι μη πολική, η κινητή φάση πολική και χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μη πολικών ουσιών.

Σχετικά με τον ανιχνευτή, ο πιο συνηθισμένος τύπος ανιχνευτή είναι το φωτόμετρο UV-Vis. Οι ουσίες που αναλύονται με αυτόν τον τύπο ανιχνευτή απορροφούν ακτινοβολία στην περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος μεταξύ 190 – 600 nm. Επίσης ο ανιχνευτής μπορεί να είναι φασματογράφος μάζας, οπότε σε αυτή την περίπτωση έχουμε σύστημα LC/MS που αποτελεί ισχυρότατο μέσο ταυτοποίησης φαινολικών μειγμάτων.

#### **5.2.5.2. Φασματομετρία μάζας (MS)**

Η φασματομετρία μάζας είναι μία ευαίσθητη τεχνική για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό χημικών ενώσεων. Βασίζεται στον διαχωρισμό των μαζών φορτισμένων σωματιδίων (κυρίως κατιόντων) με την βοήθεια κατάλληλης διάταξης (μαγνητική, τετραπόλου, χρόνου πτήσης) και την εύρεση της αντιστοιχίας των μαζών των λαμβανομένων ιόντων με την δομή της πρόδρομης ένωσης. Η αντιστοιχία αυτή προϋποθέτει την γνώση των διαδικασιών ιονισμού και επιπλέον του μηχανισμού της πιθανής θραυσματοποίησης των ιόντων. Ο φασματογράφος μάζας αποτελείται από τα ακόλουθα βασικά τμήματα:

α) Περιοχή ιονισμού: Η περιοχή ιονισμού είναι ο χώρος στον οποίο ένα μέρος του δείγματος (στις περισσότερες τεχνικές ιονισμού απαιτείται να βρίσκεται στην αέρια φάση) ιονίζεται και τα παραγόμενα ιόντα οδηγούνται στο φίλτρο μαζών.

β) Φίλτρο μαζών: Ο σκοπός του φίλτρου μαζών είναι ο διαχωρισμός των ιόντων σύμφωνα με την μοριακή τους μάζα και την επιλογή των ιόντων με μάζα σε συγκεκριμένη περιοχή (με εύρος συνήθως 1 amu, διακριτική ικανότητα 1 amu) τα οποία συνεχίζουν την πορεία τους στον ανιχνευτή ιόντων.

γ) Ανιχνευτής ιόντων: Ο ανιχνευτής συλλαμβάνει τα προσπίπτοντα ιόντα, ενισχύει το λαμβανόμενο ασθενές σήμα και το οδηγεί στην κεντρική συσκευή ελέγχου και μέτρησης.

Η φασματομετρία μαζών (MS) μπορεί να εφαρμοστεί «on-line» συζευγμένη με όργανα χρωματογραφίας παρέχοντας εξαιρετικές δυνατότητες στην ταυτοποίηση και στη διευκρίνιση της δομής των φυτοχημικών. Υπάρχουν δυο κύριοι τύποι τεχνικών ιονισμού για τις φυτοχημικές ενώσεις, οι τεχνικές ιονισμού-ψεκασμού όπως ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization-ESI), ο θερμοψεκασμός (thermospray) και ο χημικός ιοντισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (atmospheric pressure chemical ionization-APCI) και οι τεχνικές ιονισμού- εκρόφησης που περιλαμβάνουν τον ιονισμό βομβαρδισμού με άτομα μεγάλης ταχύτητας (fast atom bombardment-FAB), ο ιοντισμός εκρόφησης πλάσματος (plasma desorption-PD) και ο ιοντισμός εκρόφησης με λέιζερ με τη βοήθεια υλικού μήτρας (matrix-assisted laser desorption ionization-MALDI). Οι τεχνικές ESI και APCI είναι οι πιο ευρέως διαδεδομένες τεχνικές ιονισμού για τα φυτοχημικά και τα περισσότερα εμπορικά όργανα χρωματογραφίας σε σύζευξη με φασματομετρία μαζών (LCMS) μπορούν να προσαρμόσουν και τις δυο τεχνικές.

### **5.2.5.3. Υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS, ή HPLC-MS)**

Η υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS, ή εναλλακτικά HPLC-MS) είναι μια αναλυτική χημική τεχνική που συνδυάζει τις φυσικές ικανότητες διαχωρισμού της υγρής χρωματογραφίας (ή HPLC) με τις αναλυτικές δυνατότητες της φασματομετρίας μάζας (MS). Η φασματομετρία LC-MS είναι μια τεχνική που χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και επιλεκτικότητα και έτσι είναι χρήσιμη σε πολλές εφαρμογές. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εφαρμογή της μεθόδου στο διαχωρισμό, στην ανίχνευση και στην ταυτοποίηση χημικών ουσιών σε πολύπλοκα μείγματα, π.χ. εκχυλισμάτων φυσικών προϊόντων. Το σύστημα της παρασκευαστικής LC-MS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ταχύ καθαρισμό και ποσοτικό προσδιορισμό βασισμένο στην διαφορά μάζας ουσιών μειγμάτων που είναι σημαντικά στη βασική έρευνα, στη βιομηχανία φαρμάκων, αγροχημικών, τροφίμων κλπ (Vassiliki G Kontogianni et al., 2013; Kontogianni and Gerotheranassis, 2012).

### **5.2.5.4. Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR)**

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) υψηλής διακριτικής ικανότητας είναι μία ευρέως αναγνωρισμένη και αξιόπιστη μεθοδολογία προσδιορισμού δομών οργανικών μορίων και βιολογικών μακρομορίων σε κατάσταση διαλύματος και σε στερεό. Αυτό, προϋποθέτει συγκεκριμένα σήματα του NMR να μπορούν να προσδιοριστούν και να ταυτοποιηθούν με κάθε υδρογόνο (και άνθρακα/άζωτο) του μορίου (Neil.E.Jacobsen, 2007).

Ένα φάσμα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού προκύπτει από διεγερμένους μαγνητικά πυρήνες, οι οποίοι βρίσκονται υπό την επίδραση ισχυρού ομογενούς μαγνητικού πεδίου. Κατά την παρουσία ενός ισχυρού εξωτερικού μαγνητικού πεδίου παρατηρείται απορρόφηση συγκεκριμένων ραδιοσυχνοτήτων από τον εξεταζόμενο πυρήνα μέσα στο μόριο. Όταν ασκηθεί ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο σε κάποιο μόριο, τα ηλεκτρόνια δημιουργούν τα δικά τους μικροσκοπικά τοπικά μαγνητικά πεδία, έτσι ώστε το πραγματικό πεδίο στον πυρήνα να είναι κατά τι μικρότερο από το εξωτερικό. Περιγράφοντας αυτό το φαινόμενο μπορούμε να πούμε ότι οι πυρήνες προστατεύονται από την πλήρη επίδραση του εφαρμοζόμενου πεδίου, λόγω των ηλεκτρονίων από τα οποία περιβάλλονται. Επειδή κάθε συγκεκριμένος πυρήνας ενός μορίου βρίσκεται σε κάπως διαφορετικό ηλεκτρονικό περιβάλλον, προστατεύεται και σε κάπως διαφορετική έκταση, με αποτέλεσμα το πραγματικό εφαρμοζόμενο μαγνητικό πεδίο να μην είναι ίδιο για κάθε πυρήνα. Έτσι, οι μικροδιαφορές του πραγματικά εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου σε κάθε πυρήνα είναι δυνατό να ανιχνευθούν, οπότε λαμβάνεται διαφορετικό σήμα NMR για κάθε χημικά διακριτό πυρήνα άνθρακα ή υδρογόνου δεδομένου μορίου. Έτσι, το φάσμα NMR μιας οργανικής ένωσης χαρτογραφεί αποτελεσματικά το δίκτυο σύνδεσης ανθράκων-υδρογόνων.

#### **5.2.5.4.1. Η φασματοσκοπία NMR στην μελέτη φυσικών προϊόντων**

Η φασματοσκοπία NMR έχει αποδειχθεί ότι είναι μία πολύτιμη τεχνική για την ταυτοποίηση ενώσεων όπως για παράδειγμα σακχάρων και οργανικών οξέων καθώς και μικρού μοριακού βάρους ενώσεων, όπως αμινοξέων και φαινολικών ενώσεων σε φυσικά μείγματα όπως είναι οι

χυμοί φρούτων. Εκτός από ποιοτικές πληροφορίες με την χρήση NMR μπορούμε να έχουμε και ποσοτικές πληροφορίες, σχετικά με το δείγμα, καθώς η ένταση ενός σήματος είναι ευθέως ανάλογη με τον αριθμό των πυρήνων που παράγουν το σήμα. Η ακρίβεια της ποσοτικοποίησης καθορίζεται από την ακρίβεια των ολοκληρωμάτων η οποία εξαρτάται από: (α) το επίπεδο θορύβου του φάσματος, (β) το εύρος του σήματος (line width), (γ) την ποιότητα ομογενοποίησης του σήματος, (δ) την επιλογή των μαθηματικών συναρτήσεων στην επεξεργασία των σημάτων (window function) και (ε) τις διορθώσεις της φάσης και της βασικής γραμμής του φάσματος. Η ακρίβεια της ανάλυσης μπορεί εύκολα να υποβαθμιστεί όταν αυξάνεται η πολυπλοκότητα των δειγμάτων, καθώς αλληλεπικαλύπτονται οι κορυφές του φάσματος καθιστώντας δύσκολη ή και αδύνατη την ολοκλήρωσή τους. Ωστόσο, μερικές φορές με την αλλαγή του διαλύτη, του pH ή με την προσθήκη αντιδραστηρίων χημικής μετατόπισης (shift reagents), μπορεί να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των κορυφών (del Campo et al., 2006). Όταν αυτό δεν είναι δυνατό τότε γίνεται χρήση φασμάτων NMR δύο διαστάσεων (2D NMR), όπου μπορούν να ληφθούν περισσότερες πληροφορίες για το δείγμα.

Για τον χαρακτηρισμό των ενώσεων χρησιμοποιείται ένας συνδιασμός 1D και 2D φασμάτων NMR. Οι πληροφορίες που μπορούν να ληφθούν από ένα φάσμα 1D  $^1\text{H}$  NMR συνοψίζονται στις παρακάτω (Αθ.Βαλαβανίδης, 2008)(Γεροθανάσης, 1998).

- **Ο αριθμός των σημάτων** που εμφανίζεται σε ένα φάσμα NMR δίνει τον αριθμό των χημικά μη ισοδύναμων πρωτονίων.
- **Η σχάση spin-spin** ενός πρωτονίου, η οποία προκαλείται από την σύζευξη των πυρηνικών spin γειτονικών ατόμων, δίνει πληροφορίες για τον αριθμό των γειτονικών πρωτονίων. Τις περισσότερες φορές ισχύει ο γενικός κανόνας  $n + 1$ , όπου πρωτόνια με  $n$  ισοδύναμα γειτονικά πρωτόνια εμφανίζουν  $n + 1$  κορυφές στο φάσμα NMR.
- **Το εμβαδόν** που περικλείει κάθε κορυφή (ολοκλήρωμα της κορυφής) είναι ανάλογο προς τον αριθμό των πρωτονίων που προκαλούν την κορυφή.
- **Οι χημικές μετατοπίσεις** δίνουν πληροφορίες για το ηλεκτρονιακό περιβάλλον των υδρογόνων κάποιου μορίου. Πιο συγκεκριμένα οι πυρήνες που προστατεύονται περισσότερο από τα ηλεκτρόνια εντοπίζονται σε μικρότερες τιμές  $\delta$  σε ένα φάσμα NMR, ενώ πυρήνες που προστατεύονται λιγότερο αποτελεσματικά συντονίζονται σε μεγαλύτερες τιμές  $\delta$  του γραφήματος NMR.

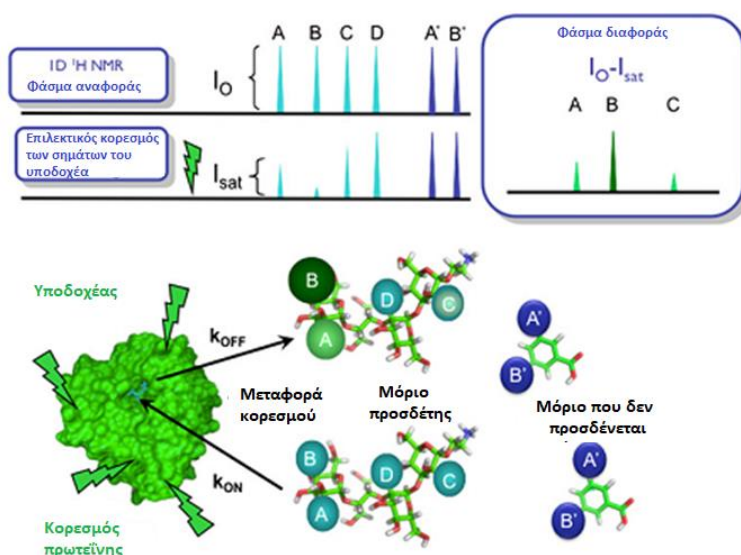
Τα φάσματα NMR δύο διαστάσεων (2D-NMR), επιτρέπουν την μελέτη πολύπλοκων μορίων και την αποφυγή επικαλυπτόμενων κορυφών, με την προσθήκη επιπλέον πειραματικών μεταβλητών και επομένως την εισαγωγή μιας δεύτερης διάστασης στο προκύπτον φάσμα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ευκολότερη ερμηνεία των φασμάτων και την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων. Η ετεροπυρηνική 2D Φασματοσκοπία συσχέτισης μέσω απλού κβάντου HSQC (Heteronuclear Single Quantum Corelation, HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) συσχετίζει την χημική μετατόπιση πρωτονίων με τη χημική μετατόπιση του άμεσα συνδεδεμένου άνθρακα. Η ετεροπυρηνική δισδιάστατη φασματοσκοπία συσχέτισης μέσω πολλαπλών δεσμών  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Corellation  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC NMR) συσχετίζει πυρήνες  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  που συζευγνύονται μέσω πολλαπλών δεσμών, ( $J = 2\text{-}15$  Hz).



#### 5.2.5.4.2. Η φασματοσκοπία NMR στην μελέτη αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνικών μορίων με φυσικά προϊόντα

Η φασματοσκοπία NMR διαφοράς μεταφοράς κορεσμού (Saturation Transfer Difference STD NMR) χρησιμοποιείται στον χαρακτηρισμό των συμπλόκων υποκαταστάτη-πρωτεΐνης και στηρίζεται στην παρατήρηση του πυρηνικού φαινομένου Overhauser των σημάτων συντονισμού του υποκαταστάτη. Ο όρος «επίτοπος πρόσδεσης» χρησιμοποιείται συχνά στη φασματοσκοπία NMR για τον χαρακτηρισμό των υδρογόνων του υποκαταστάτη που βρίσκονται πιο κοντά στην πρωτεΐνη κατά την πρόσδεση (Mayer and Meyer, 2001a). Με την τεχνική αυτή μπορούν να προκύψουν πολύ σημαντικές πληροφορίες για τις αλληλεπιδράσεις που αφορούν την ταυτοποίηση των τμημάτων του υποκαταστάτη που βρίσκονται σε άμεση επαφή με τον υποδοχέα λόγω μεταφοράς κορεσμού, ενώ είναι δυνατή και η ομαδική χαρτογράφηση του επίτοπου.

Το πείραμα αυτό βασίζεται στο ότι σε έναν προσδεμένο υποκαταστάτη, με σταθερά αποσύνδεσης,  $K_D$ ,  $10^{-7}$  ως  $10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, υπάρχει ανταλλαγή μεταξύ της προσδεμένης και της ελεύθερης κατάστασης του μορίου. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιείται η αφαίρεση ενός φάσματος στο οποίο η πρωτεΐνη ακτινοβολείται επιλεκτικά σε μια περιοχή που περιέχει μόνο κορυφές συντονισμού της πρωτεΐνης (π.χ. από τα 0 έως τα -1 ppm) με ένταση κορυφών  $I_{SAT}$  (εντός συντονισμού φάσμα), από ένα φάσμα που καταγράφεται χωρίς κορεσμό της πρωτεΐνης (εκτός συντονισμού), με ένταση κορυφών  $I_0$ . Στο φάσμα διαφοράς ( $I_{STD} = I_0 - I_{SAT}$ ) παραμένουν μόνο τα σήματα του υποκαταστάτη που έχουν λάβει μεταφορά κορεσμού από την πρωτεΐνη μέσω διάχυσης spin λόγω πυρηνικού φαινομένου Overhauser (Εικόνα 18). Η διαφορά στην ένταση των κορυφών λόγω μεταφοράς κορεσμού μπορεί να ποσοτικοποιηθεί και να αποτελέσει ένδειξη της ισχύος πρόσδεσης (Viegas et al., 2011a).

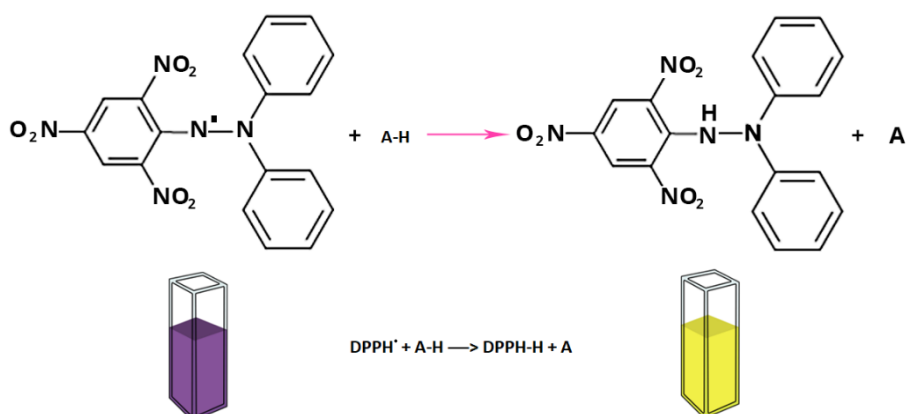


Εικόνα 18. Ο μηχανισμός πειραμάτων STD NMR.

## 6. In vitro μεθοδολογίες προσδιορισμού βιολογικής δράσης

### 6.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης με τη μέθοδο μελέτης σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH<sup>•</sup>

Η ρίζα DPPH<sup>•</sup> (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο) (Εικόνα 19) είναι μια σταθερή οργανική ρίζα που περιέχει άζωτο και έχει ένα βαθύ μωβ χρώμα. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στη μέτρηση της αναγωγικής δραστηριότητας της υπό μελέτη ένωσης-αντιοξειδωτικό προς τη ρίζα DPPH<sup>•</sup>. Η δραστηριότητα μπορεί να αξιολογηθεί μετρώντας τη μείωση της απορρόφησής της ρίζας DPPH<sup>•</sup>. Η δοκιμασία αποχρωματισμού αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τον Brand Williams και συνεργάτες (Brand-Williams et al., 1995). Οι δοκιμές αντιοξειδωτικών βασίζονται στη μέτρηση της απώλειας του χρώματος της ρίζας DPPH<sup>•</sup> στα 515 nm, μετά την αντίδρασή της με τις υπό μελέτη. Το διάλυμα αλλάζει από ένα βαθύ μωβ μπλε /κόκκινο διάλυμα σε απαλό κίτρινο και η αντίδραση καταγράφεται φασματοσκοπικά στα 515 nm (Bondet et al., 1997). Η μέθοδος μελέτης της ρίζας DPPH<sup>•</sup> θεωρείται ότι βασίζεται κυρίως σε μία αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίων, ενώ η αφαίρεση ατόμων υδρογόνου είναι μια δευτερεύουσα οδός αντίδρασης. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 19., η σταθερή ρίζα DPPH<sup>•</sup> αντιδρά με το (AH), το αντιοξειδωτικό μόριο, για να σχηματίσει το μόριο DPPH-H. Η ικανότητα δωρεάς ατόμου H, αξιολογείται με τον προσδιορισμό του δείκτη SC<sub>50</sub> (Scavenging Capacity), ο οποίος προσδιορίζει τη συγκέντρωση που απαιτείται για τη μείωση του 50 % της ρίζας DPPH<sup>•</sup>.



**Εικόνα 19.** Η αντίδραση της ρίζας DPPH<sup>•</sup> με το αντιοξειδωτικό μόριο (AH), και ο σχηματισμός του μορίου DPPH-H.

### 6.2. Μελέτη αντιμικροβιακής δράσης

Μετά την επανάσταση στη «χρυσή εποχή», όταν ανακαλύφθηκαν σχεδόν όλες οι ομάδες σημαντικών αντιβιοτικών (τετρακυκλίνες, κεφαλοσπορίνες, αμινογλυκοσιδοειδή και μακρολίδες), η ιστορία επαναλαμβάνεται σήμερα και αυτές οι συναρπαστικές ενώσεις κινδυνεύουν να χάσουν την αποτελεσματικότητά τους λόγω της αύξησης της μικροβιακής αντοχής. Σήμερα, έχει καταστεί γενικό ενδιαφέρον για τη δημόσια υγεία, οι αποτυχημένες θεραπείες που συνδέονται με ανθεκτικά, στα πολλαπλά φάρμακα, βακτηρίδια. Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια, υπάρχει ένα αυξανόμενο ενδιαφέρον για την έρευνα και την ανάπτυξη νέων αντιμικροβιακών παραγόντων από διάφορες πηγές για την καταπολέμηση της μικροβιακής αντοχής (Balouiri et al., 2016).

Τα φυσικά προϊόντα εξακολουθούν να αποτελούν μία από τις σημαντικότερες πηγές νέων μορίων φαρμάκων σήμερα. Προέρχονται από προκαρυωτικά βακτηρίδια, ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς, φυτά και διάφορους ζωικούς οργανισμούς. Τα μικροβιακά και φυτικά προϊόντα καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος των αντιμικροβιακών ενώσεων που ανακαλύφθηκαν μέχρι τώρα (Berdy, 2005). Τα φυτά και άλλες φυσικές πηγές μπορούν να προσφέρουν μια τεράστια ποικιλία σύνθετων και δομικά διαφορετικών ενώσεων. Πρόσφατα, πολλοί ερευνητές έχουν επικεντρωθεί στη διερεύνηση φυτικών και μικροβιακών εκχυλισμάτων, αιθέριων ελαίων, καθαρών δευτερογενών μεταβολιτών και νέων συνθετικών μορίων ως πιθανών αντιμικροβιακών (Mabona et al., 2013; Nazzaro et al., 2013; Runyoro et al., 2006).

### 6.2.1.. Βακτηριακά στελέχη για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης

Το στέλεχος BL21(DE3) προέρχεται από το στέλεχος *E. coli* B και αποτελεί ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο. Το *Escherichia coli* αποτελεί το σημαντικότερο μέλος της οικογένειας του γένους *Escherichia*. Ζει και αναπτύσσεται στο εσωτερικό του εντέρου των θηλαστικών. Τα βακτηριακά κύτταρα παρουσιάζουν ραβδόμορφο σχήμα μήκους 2 μm και διαμέτρου 0.25-1 μm. Όπως προαναφέρθηκε ο μικροοργανισμός αυτός ανήκει στους Gram αρνητικούς, είναι προαιρετικά αερόβιος ενώ δεν σχηματίζει σπόρια. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 37 °C και η αντίστοιχη τιμή του pH είναι 7 παρόλο που παρουσιάζετε και ικανότητα αύξησης σε τιμή pH 4.4. Αν και τα *E.coli* είναι συμβιωτικοί μικροοργανισμοί και χρησιμοποιούνται ευρέως εργαστηριακά, υπάρχουν αρκετά διαφορετικά στελέχη που προκαλούν ποικίλες εντερικές και εξωγενείς ασθένειες (Kaper et al., 2012).

Το βακτηριακό στέλεχος *Corynebacterium* ανήκει στην τάξη των Ακτινοβακτηρίων (actinobacteria) και στην οικογένεια *Corynebacteriaceae*. Πρόκειται για μικρά σε μέγεθος κύτταρα (0.5 \* 3-5 μm) και θετικά κατά Gram κύτταρα, που σχηματίζουν κατά κύριο λόγο βακίλους, είναι αερόβια και δεν εμφανίζουν κίνηση. Συχνά αποκαλούνται και ως «διφθεροειδή» και απαντώνται στην μικροχλωρίδα των ζώων καθώς επίσης και του ανθρώπου (Murphy, 1996). Γενικά έχουν χαρακτηριστεί ως αβλαβή, όμως συνέχεια αυξάνεται ο αριθμός των σημαντικών μολύνσεων των οποίων αποτελούν αιτιολογία καθώς μπορούν εκμεταλλευόμενα την άτυπη πρόσβαση τους σε ιστούς να προκαλέσουν ασθένειες στον άνθρωπο καθώς επίσης και αποδυνάμωση της άμυνας του ξενιστή (Bernard, 2012). Χαρακτηριστική ασθένεια που προκαλούν στον άνθρωπο αποτελεί διφθερίτιδα.

### 6.3. Μελέτη αναστολής ενζύμων

Ουσίες, οι οποίες μειώνουν τη δραστικότητα μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης, είναι γνωστές ως αναστολείς και ενεργούν είτε άμεσα είτε έμμεσα επηρεάζοντας τις καταλυτικές ιδιότητες του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Οι αναστολείς μπορεί να είναι ουσίες ξένες προς το κύτταρο ή να αποτελούν φυσικά του συστατικά και λειτουργούν εκλεκτικά, αλληλεπιδρώντας με λίγες και συγκεκριμένες θέσεις δεσμεύσεως επί του ενζυμικού μορίου (Robinson et al., 2015). Οι αναστολείς διακρίνονται σε αντιστρεπτούς και μη αντιστρεπτούς. Στην κλασική ενζυμική κινητική διακρίνονται διάφορα είδη αναστολής τα κυριότερα από τα οποία είναι: η αντιστρεπτή αναστολή, όπου αναστολείς δεσμεύονται κατά τρόπο αντιστρέψιμο με το ένζυμο, οπότε το

τελευταίο μπορεί να αποκτήσει πλήρως τη δραστικότητα του όταν αφαιρεθεί ο αναστολέας και η μη αντιστρεπτή αναστολή, όπου οι αναστολές δεσμεύονται κατά τρόπο μόνιμο, οπότε το ένζυμο αδρανοποιείται, συνήθως οριστικά.

### **6.3.1. Αναστολή ενζυμικής δραστικότητας της λιποξυγονάσης τύπου I από το φυτό σόγια**

Οι λιποξυγονάσες (EC 1.13.11.12) είναι διοξυγονάσες που δρουν σε λιπαρά οξέα που περιέχουν ένα ή περισσότερα τμήματα 1,4-Z-Z πενταδιενίου για να σχηματίσουν Z, E-συζευγμένα υδροϋπεροξειδία. Οι λιποξυγονάσες τόσο από ζωικούς όσο και από φυτικούς ιστούς παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία των οργανισμών αυτών. Πιο συγκεκριμένα τα υδροϋπεροξειδία που σχηματίζουν αποτελούν πρόδρομα μόρια ειδικών ρυθμιστικών μορίων, όπως των λευκοτριενίων και των λιποξινών στα ζώα, και του ιασμονικού οξέος και της τραυματίνης στα φυτά. Από την ανακάλυψη του ρόλου των λιποξυγονάσεων στη βιοσύνθεση ισχυρών τελεστών που είναι κρίσιμοι στη φυσιολογία των ζώων και των φυτών, αναπτύχθηκε το ενδιαφέρον για την εύρεση αποτελεσματικών αναστολέων της δραστικότητάς τους (Maccarrone et al., 1995).

Οι περισσότερες μελέτες για την εύρεση αναστολέων έχουν χρησιμοποιήσει τη λιποξυγονάση τύπου I, από το φυτό *Glycine max* (σόγια) (SLO). Αυτή η λιποξυγονάση είναι ένα ομόλογο λιποξυγονάσης θηλαστικών, και γι αυτό το λόγο χρησιμοποιείται ως πρωτεΐνη μοντέλο στις μελέτες αναστολής λιποξυγονάσης (Detsi et al., 2007; Serpen and Gökmen, 2007). Έχουν μελετηθεί διάφορες ενώσεις ως προς την ανασταλτική τους δράση στη λιποξυγονάση όπως, τερπενοειδή, флаβονοειδή και αντιοξειδωτικά όπως το ασκορβικό οξύ και παράγωγά του (Amagata et al., 2003; Gutierrez-Lugo et al., 2004; Maccarrone et al., 1995).

### **6.3.2. Αναστολή ενζυμικής δραστικότητας της λιπάσης από *Candida rugosa***

Οι εξωκυττάρια λιπάσες ορισμένων μικροοργανισμών βελτιώνουν την ικανότητα τους να αποικίζουν την εξωτερική επιφάνεια του ξενιστή (Girra et al., 1999). Οι πιθανοί ρόλοι των εξωκυττάρια λιπασών περιλαμβάνουν την πέψη λιπιδίων για την πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, την προσκόλληση σε κύτταρα και ιστούς του ξενιστή, τη συνεργειακή δράση με άλλα ένζυμα, τη μη ειδική υδρόλυση λόγω επιπρόσθετων φωσφολιπολυτικών ενεργειών, την έναρξη φλεγμονοδών διεργασιών που επηρεάζουν το ανοσοποιητικό σύστημα, και την αυτοάμυνα που προκαλείται από τη λύση της ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας (Khedidja and Abderrahman, 2011). Οι εξωκυττάρια λιπάσες του γένους *Candida* έχουν προταθεί ότι είναι πιθανοί λοιμογόνοι παράγοντες (Gácsér et al., 2007). Ο μύκητας *Candida* έχει 163 αναγνωρισμένα είδη που υπάρχουν σε διαφορετικούς βιότοπους (Singh and Urhekar, 2013). Ορισμένα είδη του γένους *Candida* αποτελούν μέρος του φυσιολογικού μικροβιώματος της στοματικής κοιλότητας, της γαστρεντερικής οδού και του κόλπου του ανθρώπου (Sardi et al., 2013). Το είδος *Candida rugosa* απαντάται συχνότερα σε περιβαλλοντικές πηγές και εμφανίζεται ως αιτιολογικός παράγοντας ανθρώπινων μολυσματικών ασθενειών σε διάφορα μέρη του κόσμου (Padovan et al., 2013). Τις τελευταίες δεκαετίες χρόνια, μελετιούνται ολοένα και περισσότερες φυσικές ενώσεις που θεωρείται ότι μπορούν να δράσουν ως αναστολής της δράσης της λιπάσης από *Candida rugosa*, μεταξύ αυτών συμπεριλαμβάνονται φυσικές φαινολικές ενώσεις και φυσικά εκχυλίσματα, που έχουν αποδειχθεί σε αρκετές περιπτώσεις ότι έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με τη λιπάση και να προκαλούν αναστολή της δράσης της (Ruiz et al., 2006).

## Κεφάλαιο 1: Ενίσχυση της βιολογικής δράσης της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης μέσω της βιοτροποποίησής τους από ακινητοποιημένη λακάση σε τροποποιημένο υλικό ιεραρχημένου πορώδους άνθρακα

### 1.1 Εισαγωγή

Η ανάγκη για ενώσεις θεραπευτικής αξίας αυξάνεται συνεχώς κυρίως λόγω των νέων εφαρμογών των βιοδραστικών ενώσεων στην ιατρική, στη φαρμακευτική, τη γεωργία και τη βιομηχανία τροφίμων. Οι νέες έρευνες επικεντρώνονται στις βιολογικές δράσεις των φυτοχημικών, ιδιαίτερα στις αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες των φαινολικών ενώσεων, οι οποίες είναι γνωστό ότι ασκούν προληπτική δράση έναντι μολυσματικών και εκφυλιστικών νόσων, φλεγμονών και αλλεργιών, μέσω αντιοξειδωτικών, αντιμικροβιακών και μηχανισμών αναστολής ενζύμων. Οι φαινόλες, διαθέτουν ένα αρωματικό δακτύλιο που φέρει μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες και η δομή τους μπορεί να κυμαίνεται από εκείνη ενός απλού φαινολικού μορίου προς εκείνη ενός σύνθετου πολυμερούς υψηλού μοριακού βάρους. Είναι ευρέως διαδεδομένες σε ανθοφόρα φυτά, που απαντώνται σε όλα τα βλαστικά όργανα, καθώς και σε άνθη, φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, σπόρους και ποτά (Ozcan and Delikanli, 2014).

Η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη είναι δυο από τις κύριες φαινολικές ενώσεις που βρίσκονται στον καρπό και στα φύλλα ελιάς καθώς και στο κρασί. Έχουν ξεχωρίσει για τις ποικίλες βιολογικές δράσεις που παρουσιάζουν και το θετικό τους αντίκτυπο στην υγεία του ανθρώπου. Η υδροξυτυροσόλη έχει χαρακτηριστεί ως το ισχυρότερο αντιοξειδωτικό της φύσης, ενώ παράλληλα εμφανίζει ένα πλήθος βιολογικών δράσεων όπως αντιμικροβιακή, αντικαρκινική καρδιο- και νευρο- προστατευτική, αντιδιαβητική κ.α. (Markoní et al., 2019). Η τυροσόλη από την άλλη, έχει επίσης ξεχωρίσει για την αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή και αντιφλεγμονώδη της δράση (Markoní et al., 2019). Τις τελευταίες δεκαετίες υπάρχει μια τάση για την ενζυμική τροποποίηση των φαινολικών ενώσεων προς βελτίωση των βιολογικών τους δράσεων. Για τον σκοπό αυτό έχουν χρησιμοποιηθεί ολόκληροι μικροοργανισμοί (Vinciguerra et al., 1997) ή διάφορα ένζυμα όπως υπεροξειδάση, λιπάση, εστεράση κ.α. (Figuerosa-Espinoza and Villeneuve, 2005; Peng et al., 2009). Το ένζυμο λακάση (EC 1.10.3.2) φαίνεται να έχει ξεχωρίσει στην τροποποίηση φαινολικών ενώσεων καθώς οδηγεί σε προϊόντα με βελτιωμένη βιολογική δράση σε σχέση με τις πρόδρομες ενώσεις (Adelakun et al., 2012; Kudanga et al., 2017; Ponzoni et al., 2007). Λακάσες από *Trametes trogii* και από *Trametes pubescens* έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για την τροποποίηση της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης, αντίστοιχα, και έχουν οδηγήσει στον σχηματισμό κυρίως διμερών ενώσεων με βελτιωμένη βιολογική δράση (Chakroun et al., 2013; Zwane et al., 2012).

Η εφαρμογή των ενζύμων στις βιομηχανικές διεργασίες γίνεται πιο ελκυστική όταν ο βιοκαταλύτης είναι σε ακινητοποιημένη μορφή, επιτρέποντας τον εύκολο διαχωρισμό του μετά την αντίδραση. Η ακινητοποίηση του ενζύμου παρέχει ένα πλήθος πλεονεκτημάτων όπως η υψηλή σταθερότητα, η επαναχρησιμοποίηση και σε πολλές περιπτώσεις η βελτιωμένη δραστηριότητα του βιοκαταλύτη (Chatzikonstantinou et al., 2018b; Skoronski et al., 2017). Τα πλεονεκτήματα της ακινητοποίησης ενζύμων σε συνδυασμό με την χρήση νανοϋλικών ως φορείς ακινητοποίησης, έχει κερδίσει το ενδιαφέρον τις τελευταίες δεκαετίες (Hong et al., 2019). Τα

νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα έχουν κυριαρχήσει στην ακινητοποίηση ενζύμων, καθώς συνδυάζουν την αποτελεσματικότητα και την βιο-συμβατότητα (Adeel et al., 2018; Pavlidis et al., 2012c). Τα νανοδομημένα υλικά ιεραρχημένου πορώδους άνθρακα (hierarchically porous carbon materials, HPC) έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια λόγω του καλά καθορισμένου και διασυνδεδεμένου πορώδους που διαθέτουν, με διαφορετικά μήκη που κυμαίνονται από μακροπορώδες (> 50nm), μεσοπορώδες (2-50 nm) και μικροπορώδες (< 2 nm). Λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους σε σύγκριση με άλλα νανοϋλικά, όπως το υψηλό ποσοστό επιφάνειας, η μεγάλη χωρητικότητα αποθήκευσης και οι ιδιαίτερες ιδιότητες μεταφοράς μάζας, τα HPC έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορες εφαρμογές, από την νανοτεχνολογία μέχρι την κατάλυση, τον διαχωρισμό, την ανίχνευση, τη βιοϊατρική, την αποθήκευση, καθώς και άλλες βιομηχανικές εφαρμογές (Estevez et al., 2018, 2017, 2013; Sun et al., 2016; Vinu et al., 2007; Xu et al., 2019; Zhou and Hartmann, 2013).

Σε αυτό το κεφάλαιο, περιγράφεται η ανάπτυξη ενός καινοτόμου νανοβιοκαταλυτικού συστήματος με την ομοιοπολική ακινητοποίηση σε οξειδωμένα HPCs, του ενζύμου λακάση από *Trametes versicolor*, που χρησιμοποιείται ευρέως σε βιοκαταλυτικές διεργασίες βιομηχανικού ενδιαφέροντος (Imran et al., 2012). Χρησιμοποιήθηκε ένας συνδυασμός φασματοσκοπικών και βιοχημικών τεχνικών για την μελέτη της αλληλεπίδρασης του ενζύμου με τα HPCs και τον χαρακτηρισμό αυτού του νέου νανοβιοκαταλύτη, σε σχέση με την καταλυτική του συμπεριφορά. Τέλος, ο νανοβιοκαταλύτης που αναπτύχθηκε, μελετήθηκε ως προς την ικανότητά του να καταλύει την βιοκαταλυτική τροποποίηση της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης και στη συνέχεια μελετήθηκε η βιολογική δράση αυτών των ενώσεων πριν και μετά την ενζυμική τους τροποποίηση.

## 1.2. Υλικά και Μέθοδοι

### 1.2.1. Υλικά

#### 1.2.1.1. Ένζυμα

Σε αυτό το κεφάλαιο χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα ένζυμα-βιοκαταλύτες:

- Η λακάση από *Trametes versicolor* (TvL) 1 U mg<sup>-1</sup>, της εταιρείας Merck KGaA.
- Η λιποξυγονάση τύπου I από το φυτό *Glycine max* (σόγια) (SLO) 205716 U mg<sup>-1</sup>, της εταιρείας Merck KGaA.
- Η λιπάση από *Candida rugosa* (CRL) Type VII, 724 U mg<sup>-1</sup>, της εταιρείας Merck KGaA.

#### 1.2.1.2. Υποστρώματα

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το κεφάλαιο ήταν εμπορικά διαθέσιμα και ήταν τα εξής:

- Το 2,2-Δις αζινο-(3-αιθυλοβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ), (2,20-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), ABTS) που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της δραστηριότητας της λακάσης, της εταιρείας Merck KGaA.
- Η τυροσόλη της εταιρείας Merck KGaA
- Η υδροξυτυροσόλη της εταιρείας TOKYO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD (TCI).
- Το λινελαϊκό οξύ (SLA) που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της λιποξυγενάσης (SLO), της εταιρείας Merck KGaA.
- Ο βουτυρικός εστέρας της 4-νιτροφαινόλης (*p*-NPB) που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της λιπάσης CRL, της εταιρείας Merck KGaA.

#### 1.2.1.3. Αντιδραστήρια ακινητοποίησης

- Το χλωρίδιο του 1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)καρβοδιμιδίου (EDC) και
- το N-υδροξυσουκινιμίδιο (NHS) που χρησιμοποιήθηκαν ως παράγοντες σύζευξης αλλά και
- το 4-(20 υδροξυαιθυλ)πιπεραζινο-1-αιθανοσουλφονικό οξύ (HEPES) που χρησιμοποιήθηκε ως ρυθμιστικό διάλυμα στην ακινητοποίηση του ενζύμου της εταιρείας Merck KGaA.

#### 1.2.1.4. Διαλύτες

Οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν κεφάλαιο ήταν όλοι καθαρότητας αναλυτικής βαθμίδας και η προμήθειά τους έγινε από τις εταιρείες Merck KGaA, Honeywell Research Chemicals και Panreac Quimica SA. Ο δευτεριωμένος διαλύτης διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d<sub>6</sub>) ήταν υψηλής καθαρότητας  $\geq 99.9\%$  της εταιρείας Deutero (Kastellaun, Germany).

#### 1.2.1.5. Νανοϋλικά

Νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς ακινητοποίησης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν νανοδομημένα υλικά ιεραρχημένου πορώδους άνθρακα (HPC) σε οξειδωμένη (HPCox) και μη μορφή. Η παρασκευή και ο χαρακτηρισμός των νανοϋλικών HPC και HPCox πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών του Τμήματος Μηχανικής της Επιστήμης των Υλικών σύμφωνα με τους (Estevez et al., 2017, 2013), και περιγράφεται στο Παράρτημα Ι, παράγραφος 1).

#### 1.2.1.6. Λοιπά αντιδραστήρια

- Ο μονολαυρικός εστέρας της πολυοξυ-αιθυλενο-σορβιτάνης (Tween 20) της εταιρείας Honeywell Research Chemicals.
- Το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας LB Broth που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια βακτηρίων της εταιρείας Lab M Ltd.

#### 1.2.1.7. Οργανολογία

- Η λήψη φασμάτων NMR πραγματοποιήθηκε στον φασματογράφο NMR Bruker AV-500 του Κέντρου Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Ο φασματογράφος Bruker AV-500 είναι συζευγμένος με υποδοχέα ΤΧΙ κρυογενικής (cryogenic) τεχνολογίας. Η λήψη και η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού TopSpin 2.1.
- Οι μετρήσεις φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων ακτίνων Χ (X-Ray Photoelectron Spectroscopy, XPS) πραγματοποιήθηκαν σε SPECS GmbH φασματοόμετρο εξοπλισμένο με μονοχρωματική πηγή MgK $\alpha$  ( $h\nu = 1253.6$  eV) και έναν ημισφαιρικό αναλυτή Phoibos-100 (Berlin, Germany). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, του Πανεπιστημίου Cornell της Νέας Υόρκης (Cornell University, Ithaca, NY, USA).
- Οι αναλύσεις φασματοσκοπίας υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR) πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο FTIR-8400 (Shimadzu, Tokyo, Japan) εξοπλισμένο με ανιχνευτή δευτεριωμένης θεικής τριγλυκίνης (DTGS) detector. του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
- Οι λήψεις φασμάτων κυκλικού διχρωισμού (Circular dichroism spectroscopy, CD) πραγματοποιήθηκαν σε φασματοπολωσίμετρο Jasco J-1500 (Tokyo, Japan) εξοπλισμένο



με σύστημα ρύθμισης θερμοκρασίας Peltier του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

## **1.2.2. Μέθοδοι**

### **1.2.2.1. Ομοιοπολική ακινητοποίηση της TvL σε HPCox**

Η λακάση TvL ακινητοποιήθηκε ομοιοπολικά στο νανοϋλικό HPCox με τη βοήθεια παραγόντων σύζευξης όπως είναι το EDC και το NHS. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να συνδέσουν τις υδροξυλομάδες και καρβοξυλομάδες του νανοϋλικού με τις ελεύθερες αμινομάδες του ενζύμου (Lau et al., 2014; Sehgal and Vijay, 1994). Για την ακινητοποίηση του ενζύμου έγινε διασπορά 3 mg HPCox, σε 6 mL διαλύματος HEPES (50 mM, pH 7.0) και το μείγμα επώαστηκε σε λουτρό υπερήχων για 30 min. Μετά τη διασπορά των υβριδικών νανοσωματιδίων, προστέθηκαν 1.2 mL υδατικού διαλύματος EDC (από αρχικό διάλυμα 10 mg mL<sup>-1</sup>) και 2.3 mL υδατικού διαλύματος NHS (από αρχικό διάλυμα 50 mg mL<sup>-1</sup>) και ακολούθησε επώαση του μείγματος στους 30 °C για 30 min υπό ανάδευση. Για να απομακρυνθεί η περίσσια των παραγόντων σύζευξης EDC και NHS, το νανοϋλικό απομακρύνθηκε με φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 10 min και ακολούθησε έκπλυση, με διάλυμα HEPES (50 mM, pH 5.0), τρεις φορές. Πραγματοποιήθηκε επανα-διασπορά του ενεργοποιημένου πλέον νανοϋλικού σε 6 mL διαλύματος HEPES (50 mM, pH 5.0). Στη συνέχεια ακολούθησε η προσθήκη 30 mg mL<sup>-1</sup> TvL και το μείγμα επώαστηκε στους 30 °C για 1 h. Ο νανοβιοκαταλύτης που σχηματίστηκε συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε για προσδιορισμό πρωτεϊνικού φορτίου. Για να απομακρυνθεί η περίσσια ενζύμου που δεν ακινητοποιήθηκε ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις με διάλυμα HEPES (50 mM, pH 5.0) και το δείγμα αφυδατώθηκε σε άνυδρο πήκτωμα πυριτίου (silica gel) στους 4 °C. Ο νανοβιοκαταλύτης επισημαίνεται ως HPCox-TvL.

### **1.2.2.2. Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X**

Οι μετρήσεις φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (X-Ray Photoelectron Spectroscopy, XPS) πραγματοποιήθηκαν σε συνθήκες εξαιρετικά υψηλού κενού, σε πίεση βάσης 5 10<sup>-10</sup> mbar σε SPECS GmbH φασματόμετρο εξοπλισμένο με μονοχρωματική πηγή MgKα (hν = 1253.6 eV) και έναν ημισφαιρικό αναλυτή Phoibos-100 (Berlin, Germany). Η λήψη των φασμάτων έγινε σε κανονική εκπομπή και ανάλυση ενέργειας όπου η ανάλυση ενέργειας ορίστηκε στα 1.16 eV για να ελαχιστοποιηθεί ο χρόνος μέτρησης. Όλες οι ενέργειες δέσμησης είχαν ως αναφορά επιπέδου ενέργειας τον πυρήνα C1s στα 284.6 eV. Η ανάλυση των φασμάτων περιλάμβανε αφαίρεση υπόβαθρου Shirley και αποσυνέλεξη των κορυφών χρησιμοποιώντας μικτές λειτουργίες Gaussian-Lorentzian, σε ένα πρόγραμμα τοποθέτησης καμπύλης ελάχιστων τετραγώνων (WinSpec) που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο Laboratoire Interdisciplinaire de Spectroscopie Electronique, στο Πανεπιστήμιο του Ναμούρ στο Βέλγιο.

### **1.2.2.3. Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier**

Οι αναλύσεις φασματοσκοπίας υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR) πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο FTIR-8400 (Shimadzu, Tokyo,

Japan) εξοπλισμένο με ανιχνευτή δευτεριωμένης θειικής τριγλυκίνης (DTGS). Η καταγραφή των φασμάτων πραγματοποιήθηκε σε εύρος 400 – 4.000  $\text{cm}^{-1}$  σε θερμοκρασία δωματίου και κάθε μέτρηση ήταν ο μέσος όρος 32 σαρώσεων (scans). Κάθε δείγμα ήταν σε μορφή δισκίων KBr περιεκτικότητας ~2 wt % του νανοϋλικού (HPCox) ή του νανοβιοκαταλύτη (HPCox-TvL).

Προκειμένου να προσδιοριστεί η ομοιότητα μεταξύ δύο φασμάτων FTIR, υπολογίσθηκε ο συντελεστής συσχέτισης,  $r$ , σύμφωνα με την εξίσωση (1.1) (Prestrelski et al., 1993; Secundo et al., 2007, 2005; Tziaila et al., 2010),

$$r = \sum x_i y_i / \sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2} \quad (1.1)$$

Όπου το  $x$  και  $y$  είναι οι τιμές απορρόφησης της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης λακάσης αντίστοιχα. Για τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης αρχικά η χαρακτηριστική περιοχή των πρωτεϊνών Amide I ( $1700\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$ ) απομονώθηκε από το φάσμα και η επεξεργασία έγινε με το λογισμικό Origin 8.6 (OriginLab). Πιο συγκεκριμένα ο θόρυβος των φασμάτων αφαιρέθηκε ύστερα από εξομάλυνση των φασμάτων με το φίλτρο Savitsky-Golay 11 σημείων (Serefoglou et al., 2008a), και χρησιμοποιήθηκε γραμμή αναφοράς μεταξύ των ακραίων σημείων ώστε η κορυφή να ευθυγραμμιστεί με τον άξονα των κυματαριθμών. Για πανομοιότυπα φάσματα ο συντελεστής συσχέτισης αναμένεται να είναι ίσο με ένα ( $r = 1$ ).

#### 1.2.2.4. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού

Οι μετρήσεις φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού (Circular dichroism spectroscopy, CD) πραγματοποιήθηκαν σε φασματοπολωσίμετρο Jasco J-1500 (Tokyo, Japan) εξοπλισμένο με σύστημα ρύθμισης θερμοκρασίας Peltier. Η λήψη όλων των φασμάτων πραγματοποιήθηκε σε κυψελίδα χαλαζία, με μήκος διαδρομής 1.0 cm στους 30 °C, με ταχύτητα σάρωσης 50  $\text{nm min}^{-1}$  και εύρος φάσματος (bandwidth) 2 nm. Σε κάθε περίπτωση έγινε λήψη φάσματος αναφοράς που αφαιρέθηκε από το φάσμα του υπό μελέτη δείγματος. Η συγκέντρωση του καθαρού ενζύμου ήταν 13  $\mu\text{g mL}^{-1}$  σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού οξέος, συγκέντρωσης 0.20 mM και pH 5. Η συγκέντρωση των νανοϋλικών HPC και HPCox ήταν 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  για την ελαχιστοποίηση οποιωνδήποτε οπτικών φαινομένων που θα μπορούσαν να μειώσουν την αναλογία σήματος προς θόρυβο. Κάθε μέτρηση ήταν ο μέσος όρος τουλάχιστον 2 σαρώσεων. Για την επεξεργασία των φασμάτων και τον προσδιορισμό στοιχείων δευτεροταγούς δομής χρησιμοποιήθηκε το πακέτο εφαρμογής Dichroprot βασισμένο στον αλγόριθμο K2D.

#### 1.2.2.5. Φασματοσκοπία φθορισμού

Η καταγραφή των φασμάτων φθορισμού πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο φωταύγειας Jasco-8300 (Tokyo, Japan). Στην περίπτωση μελέτης της αλληλεπίδρασης των νανοϋλικών με το ένζυμο χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα. Το ένζυμο λακάση TvL χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 0.2  $\text{mg mL}^{-1}$ , σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού οξέος (100 mM, pH 5) και η λήψη φασμάτων εκπομπής φθορισμού πραγματοποιήθηκε απουσία και παρουσία των νανοϋλικών HPC και HPCox, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (5-25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Στην περίπτωση μελέτης της ακινητοποιημένης λακάσης χρησιμοποιήθηκε φορέας στερεών δειγμάτων. Η

ακίνητοποιημένη λακάση χρησιμοποιήθηκε σε υδατικά διαλύματα σε συγκέντρωση  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , ενώ το ελεύθερο ένζυμο TvL σε συγκέντρωση  $0.04 \text{ mg mL}^{-1}$ . Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε δίσκους πυριτίου (silicon wafers)(P/Bor, single side polished) με εναπόθεση σταγόνας (drop-casting), από τα παραπάνω υδατικά διαλύματα. Και στις δύο περιπτώσεις τα φάσματα εκπομπής φθορισμού καταγράφηκαν από 300 έως 400 nm μετά από διέγερση στα 280 nm, με ταχύτητα σάρωσης  $100 \text{ nm min}^{-1}$ , σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πλάτη σχισμής (Slit widths) με διέλευση ζώνης των 5 nm χρησιμοποιήθηκαν τόσο για την ακτινοβολία διέγερσης όσο και εκπομπής.

#### **1.2.2.6. Προσδιορισμός απόδοσης ακινητοποίησης**

Για να προσδιοριστεί η απόδοση της ακινητοποίησης υπολογίστηκε η ποσότητα της πρωτεΐνης στο υπερκείμενο πριν και μετά την διαδικασία της ακινητοποίησης με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976). Η ποσότητα της ακινητοποιημένης TvL στο νανοϋλικό HPCox υπολογίστηκε ως η διαφορά της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο υπερκείμενο πριν και μετά την ακινητοποίηση. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

#### **1.2.2.7. Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης λακάσης**

Η δραστηριότητα λακάσης προσδιορίστηκε καταγράφοντας φωτομετρικά την αντίδραση οξειδωσης του ABTS, στα 405 nm. Το μείγμα της αντίδρασης περιείχε  $0.84 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  ελεύθερου ενζύμου ή  $0.25 \text{ mg}$  του νανοβιοκαταλύτη HPCox-TvL σε τελικό όγκο  $200 \text{ } \mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και κιτρικού οξέος  $100 \text{ mM}$ , pH 5. Στην περίπτωση της μελέτης επίδρασης των νανοϋλικών HPC και HPCox στο μείγμα της αντίδρασης προστέθηκαν τα νανοϋλικά αυτά σε συγκεντρώσεις  $5\text{-}25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . Η έναρξη της αντίδρασης έγινε με την προσθήκη  $1 \text{ mM}$  ABTS, διαλυτοποιημένου στο αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα. Η καταγραφή του σχηματισμού της ρίζας  $\text{ABTS}^{\bullet}$  πραγματοποιήθηκε στα 405 nm κάθε  $1 \text{ min}$  για  $10 \text{ min}$ . Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Ως μία μονάδα ενεργότητας, unit, λακάσης ορίστηκε η ποσότητα του ενζύμου που καταλύει τον σχηματισμό  $1 \text{ mmol}$  της ρίζας  $\text{ABTS}^{\bullet}$  σε  $1 \text{ min}$  υπό τις συνθήκες που περιγράφηκαν παραπάνω. Ο συντελεστής απόσβεσης του  $\text{ABTS}^{\bullet}$  στα 405 nm, σε pH 4.58 σε θερμοκρασία δωματίου είναι  $36.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

#### **1.2.2.8. Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων της λακάσης TvL**

Για τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων  $K_m$  και  $V_{max}$  της λακάσης TvL ελεύθερη και ακινητοποιημένη στο νανοϋλικό HPCox, η δραστηριότητα της TvL προσδιορίστηκε μέσω της οξειδωσης του ABTS, στις συνθήκες της ενζυμικής τροποποίησης της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης, δηλαδή σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού οξέος ( $100 \text{ mM}$ , pH 5) min στους  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Αρχικά, σε μικροπηγάδακι πλακιδίου Elisa προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού οξέος ( $100 \text{ mM}$ , pH 5) και στη συνέχεια το ένζυμο σε συγκέντρωση  $2.75 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  στην περίπτωση του ελεύθερου ενζύμου και  $32.8 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  στην περίπτωση του νανοβιοκαταλύτη HPCox-TvL. Η αντίδραση ξεκινούσε με την προσθήκη του ABTS σε συγκεντρώσεις  $0.01\text{-}2 \text{ mM}$  και καταγραφόταν η σύνθεση της ρίζας  $\text{ABTS}^{\bullet}$  στα 405 nm ανά

30 sec για 10 min. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Graphpad με τη βοήθεια του οποίου εφαρμόστηκε στα δεδομένα καμπύλη κινητικής Michaelis-Menten.

#### **1.2.2.9. Μελέτη επαναχρησιμοποίησης του νανοβιοκαταλύτη HPCox-TvL**

Για την μελέτη επαναχρησιμοποίησης του νανοβιοκαταλύτη HPCox-TvL χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση οξειδωσης του ABTS<sup>+</sup> όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 1.2.2.7. Μετά από κάθε κύκλο αντίδρασης πραγματοποιήθηκαν πλύσεις του νανοβιοκαταλύτη με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού οξέος, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα υποστρωμάτων και προϊόντων και ο νανοβιοκαταλύτης επαναχρησιμοποιήθηκε σε φρέσκο μείγμα αντίδρασης.

#### **1.2.2.10. Μελέτη σταθερότητας της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης TvL**

Για τη μελέτη της σταθερότητας της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης λακάσης, επώαστηκε το ελεύθερο και το ακινητοποιημένο ένζυμο στις συνθήκες τροποποίησης της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης, δηλαδή σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού οξέος 100 mM, pH 5.0, στους 30 °C για 24 h. Η ποσότητα του ενζύμου ήταν 0.84 μg mL<sup>-1</sup> και 0.1 mg mL<sup>-1</sup> για την ελεύθερη TvL και για τον νανοβιοκαταλύτη HPCox-TvL, αντίστοιχα. Η εναπομένουσα ενζυμική δραστηριότητα της λακάσης προσδιορίστηκε σε διαφορετικούς χρόνους, μέσω της οξειδωσης του ABTS, όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 1.2.2.7, όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

#### **1.2.2.11. Ενζυμική τροποποίηση της τυροσόλης**

Για την ενζυμική τροποποίηση της τυροσόλης, 1 mg ένωσης (7.5 mM) διαλυτοποιήθηκε σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και κιτρικού οξέος pH 5, 100 mM. Στη συνέχεια προστέθηκε ο νανοβιοκαταλύτης HPCox-TvL σε συγκέντρωση 1 mg mL<sup>-1</sup> και το μείγμα επώαστηκε στους 30°C, για περίπου 24 h υπό ανάδευση (750 rpm). Μετά το πέρας των 24 h ο νανοβιοκαταλύτης απομακρύνθηκε από το μείγμα με διήθηση, και είτε ακολούθησε ανάλυση HPLC, είτε το δείγμα λυοφιλιοποιήθηκε και στη συνέχεια αναλύθηκε με NMR ή χρησιμοποιήθηκε στα βιολογικά τεστ (όπως περιγράφεται στις αντίστοιχες παραγράφους).

#### **1.2.2.12. Ενζυμική τροποποίηση της υδροξυτυροσόλης**

Για την ενζυμική τροποποίηση της υδροξυτυροσόλης, 1 mg ένωσης (6.5 mM) διαλυτοποιήθηκε σε 1 mL μείγμα ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και κιτρικού οξέος pH 5, 100 mM και μεθανόλης σε αναλογία 1:1. Στη συνέχεια προστέθηκε ο νανοβιοκαταλύτης HPCox-TvL σε συγκέντρωση 1 mg mL<sup>-1</sup> και το μείγμα επώαστηκε στους 30°C, για περίπου 24 h υπό ανάδευση (750 rpm). Μετά το πέρας των 24 h, ο νανοβιοκαταλύτης απομακρύνθηκε από το μείγμα με διήθηση, και είτε ακολούθησε ανάλυση HPLC, είτε το δείγμα λυοφιλιοποιήθηκε και στη συνέχεια αναλύθηκε με φασματοσκοπία μάζας ή χρησιμοποιήθηκε στα βιολογικά τεστ (όπως περιγράφεται στις αντίστοιχες παραγράφους).

#### 1.2.2.13. Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης

Για την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης και των αντίστοιχων προϊόντων της ενζυμικής τροποποίησης χρησιμοποιήθηκε συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (High performance liquid chromatography, HPLC) Shimadzu (Kyoto, Japan), με ανιχνευτή παράταξης φωτοδιοδίων. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε στήλη ανάστροφης φάσης, C18 (μBondapak) της εταιρείας Waters (Ιρλανδία) με διαστάσεις 3.9 x 300 mm, μέγεθος σωματιδίων 10 μm και μέγεθος πόρων 125 Å.

Για την έκλουση της τυροσόλης και των προϊόντων της χρησιμοποιήθηκε σύστημα βαθμιδωτής εναλλαγής φάσης. Οι αρχικές συνθήκες της κινητής φάσης ήταν 20:80 % (v/v) ακετονιτρίλιο/H<sub>2</sub>O (με 0.1 % οξικό οξύ) και το σύστημα έκλουσης είχε ως εξής: 0–10 min, 20–80 % (v/v) ακετονιτρίλιο/H<sub>2</sub>O, 10–20 min, 100–0 % (v/v) ακετονιτρίλιο/H<sub>2</sub>O και 20–30 min, 20–80 % (v/v) ακετονιτρίλιο/H<sub>2</sub>O, στους 27 °C, με σταθερή ροή 1 mL min<sup>-1</sup> ενώ η ανίχνευση έγινε στα 280 nm.

Για την έκλουση της υδροξυτυροσόλης και των προϊόντων της χρησιμοποιήθηκε σύστημα βαθμιδωτής εναλλαγής φάσης. Οι αρχικές συνθήκες της κινητής φάσης ήταν 5:95 % (v/v) ακετονιτρίλιο/H<sub>2</sub>O (με 0.1 % οξικό οξύ) και το σύστημα έκλουσης είχε ως εξής: 0–2 min, 5–95 % (v/v) ακετονιτρίλιο/H<sub>2</sub>O, 2–25 min, 80–20 % (v/v) ακετονιτρίλιο/H<sub>2</sub>O, 25–30 min, 100–0 % (v/v) ακετονιτρίλιο/H<sub>2</sub>O και 30–40 min, 5–95 % (v/v) ακετονιτρίλιο/H<sub>2</sub>O, στους 30 °C, με σταθερή ροή 1 mL min<sup>-1</sup> ενώ η ανίχνευση έγινε στα 280 nm.

#### 1.2.2.14. Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός

Η δομή των προϊόντων διμερισμού της τυροσόλης προσδιορίστηκε με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) και πιο συγκεκριμένα με τη λήψη φασμάτων 1D <sup>1</sup>H-NMR και 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC-HMBC NMR. Μετά τον τερματισμό της αντίδρασης απομακρύνθηκε, ο βιοκαταλύτης με διήθηση και ο διαλύτης με λυοφιλίωση. Στη συνέχεια τα δείγματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 500 μL DMSO-d<sub>6</sub> και μεταφέρθηκαν σε σωληνάκια NMR 5 mm. Η λήψη φασμάτων NMR πραγματοποιήθηκε στο φασματογράφο NMR Bruker AV-500 στους 298 K.

#### 1.2.2.15. Έλεγχος αναστολής της δραστηριότητας λιποξυγονάσης τύπου I από το φυτό σόγια από την τυροσόλη και την υδροξυτυροσόλη πριν και μετά την ενζυμική τους τροποποίηση

Η λιποξυγονάση τύπου I από το φυτό *Glycine max* (σόγια) (SLO) αποτελεί μία φυτική 15- λιποξυγονάση η οποία καταλύει την οξειδωση του λινελαϊκού οξέος προς 13-υδροϋπεροξυ-οκταδεκαδιενοϊκό οξύ (13-HPODE). Η δραστηριότητα της λιποξυγονάσης προσδιορίζεται φωτομετρικά μέσω της καταγραφής της σύνθεσης του 13-υδροϋπεροξυ-λινελαϊκού οξέος, στα 234 nm (Paradopolou et al., 2013).

Για τον υπολογισμό της ικανότητας αναστολής της δραστηριότητας της λιποξυγονάσης τύπου I από το φυτό σόγια (SLO) ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία: Αρχικά, παρασκευάστηκαν διαλύματα ενζύμου λιποξυγονάσης τύπου I (SLO) συγκέντρωσης 1 mg mL<sup>-1</sup> και υποστρώματος

λινελαϊκού οξέος (SLA) συγκέντρωσης 1 mM, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, pH 6.8 το οποίο περιέχει 1 % Tween 20. Όλα τα υπό μελέτη δείγματα ήταν υδατικά διαλύματα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, pH 6.8. Για την αντίδραση, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 15 mM, pH 6.8 τελικού όγκου 1 mL προστίθενται 90 μM SLA και διαφορετικές συγκεντρώσεις τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης πριν και μετά την ενζυμική τους τροποποίηση σε εύρος συγκεντρώσεων 0-100 μg mL<sup>-1</sup>. Για την έναρξη της αντίδρασης προστίθενται 0.1 mg mL<sup>-1</sup> ενζύμου SLO. Το μείγμα επώαστηκε στους 37 °C και καταγράφηκε η σύνθεση του 13-υδροπεροξυλινελαϊκού οξέος για 10 min ανά 30 sec, στα 234 nm. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και τα αποτελέσματα δίνονται ως ο μέσος όρος αυτών των μετρήσεων.

Η αναστολή της SLO υπολογίστηκε με βάση τη μείωση της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης ( $V_0$ ) και εκφράζεται ως επί τοις εκατό ποσοστό (%) της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης απουσία των υπό μελέτη αναστολέων. Στο τέλος προσδιορίστηκε η τιμή IC<sub>50</sub>, δηλαδή η συγκέντρωση της υπό μελέτη ουσίας που απαιτείται για να αναστείλει τη δραστηριότητα της SLO κατά 50 %, με την βοήθεια του προγράμματος Graphpad και την επιλογή μιας μη γραμμικής λογιστικής δοσο-εξαρτώμενης καμπύλης τεσσάρων παραγόντων.

#### **1.2.2.16. Έλεγχος αναστολής της δραστηριότητας λιπάσης από *Candida rugosa* από την τυροσόλη και την υδροξυτυροσόλη πριν και μετά την ενζυμική τους τροποποίηση**

Η λιπάση από *Candida rugosa* (CRL) καταλύει την αντίδραση της υδρόλυσης του βουτυρικού εστέρα της 4-νιτροφαινόλης (*p*-NPB) κατά την οποία παράγεται βουτυρικό οξύ και 4-νιτροφαινόλη, η οποία απορροφά στα 405 nm. Η δραστηριότητα της λιπάσης προσδιορίζεται φωτομετρικά μέσω της καταγραφής της απελευθέρωσης της 4-νιτροφαινόλης, στα 405 nm.

Για τον υπολογισμό της ικανότητας αναστολής της λιπάσης σε μια τυπική διαδικασία το μείγμα της αντίδρασης περιέχει 25 μg mL<sup>-1</sup> CRL σε τελικό όγκο 150 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 15 mM, pH 7. Στη συνέχεια προστίθενται διαφορετικές συγκεντρώσεις τυροσόλης και υδροξυτυροσόλης πριν και μετά την ενζυμική τους τροποποίηση σε εύρος συγκεντρώσεων 0-5 mg mL<sup>-1</sup>. Ακολουθεί επώαση του μείγματος για 10 min στους 25 °C. Η έναρξη της αντίδρασης έγινε με την προσθήκη 2.5 mM *p*-NPB (διαλυτοποιημένο σε DMSO), ακολουθούμενη από επώαση του μείγματος στους 40 °C. Η καταγραφή της απελευθέρωσης της 4-νιτροφαινόλης (*p*-NP) πραγματοποιήθηκε στα 405 nm κάθε 1 min για 10 min. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και τα αποτελέσματα δίνονται ως ο μέσος όρος αυτών των μετρήσεων. Η αναστολή της CRL υπολογίστηκε όπως περιγράφεται για την περίπτωση της αναστολής της SLO στην παράγραφο 1.2.2.15

#### **1.2.2.17. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης πριν και μετά την ενζυμική τους τροποποίηση σε βακτηριακούς πληθυσμούς**

Ο έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης πριν και μετά την ενζυμική τους τροποποίηση πραγματοποιήθηκε σε ένα κατά gram θετικό και ένα αρνητικό βακτηριακό στέλεχος, *E.coli* BL21(DE3) και *Corynebacterium* αντίστοιχα, σύμφωνα με τους, (Karageorgou et al., 2019). Πιο συγκεκριμένα ο έλεγχος έγινε μετά από αλληλεπίδραση των υπό μελέτη εκχυλισμάτων με συγκεκριμένο αριθμό βακτηριακών κυττάρων, απουσία θρεπτικού

μέσου, ώστε να μην υπάρχει δυνατότητα πολλαπλασιασμού των βακτηρίων και κατά συνέπεια να διατηρείτε σταθερή η αναλογία βακτηριακού πλυθισμού-εκχυλισμάτων. Μελετήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλισμάτων σε συγκεκριμένο αριθμό βακτηριακών κυττάρων. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είχε ως εξής:

- Προετοιμασία προκαλλιέργειας βακτηρίων: εμβολιασμός μονής αποικίας σε 5 mL φρέσκου θρεπτικού μέσου.
- Επώαση της προκαλλιέργειας στους 37 °C, O/N, υπό ανάδευση, 180 rpm.
- Μέτρηση της απορρόφησης της προκαλλιέργειας στα 600 nm και αραίωση της με φρέσκο θρεπτικό μέσο ώστε να έχει απορρόφηση περίπου 0.080.
- Επώαση της νέας καλλιέργειας στους 37 °C για 2 h, ώστε να φτάσει ο βακτηριακός πληθυσμός στην εκθετική φάση με απορρόφηση από 0.2 ως 0.5.
- Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας για 5 λεπτά στις 4.000 rpm.
- Απόρριψη του υπερκείμενου και επανα-διαλυτοποίηση του βακτηριακού ιζήματος σε φυσιολογικό ορό (0.9% NaCl).
- Διαδοχικές πλύσεις του βακτηριακού ιζήματος (3 πλύσεις) με φυσιολογικό ορό, μέσω φυγοκέντρησης και τελική επανα-διαλυτοποίηση του σε ίσο όγκο (με αυτόν της καλλιέργειας) φυσιολογικού ορού.
- Επώαση βακτηριακών κυττάρων  $10^7$  CFU/mL παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων για την τυροσόλη 0 έως  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  και για την υδροξυτυροσόλη 0 έως  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , στους 37 °C, για ~ 12 h, υπό ανάδευση, 180 rpm.
- Εμβολιασμός 25  $\mu\text{L}$  από τα παραπάνω δείγματα σε 225  $\mu\text{L}$  φρέσκου θρεπτικού μέσου LB, σε πηγαδάκια πλάκας ELISA.
- Επώαση των μικροκαλλιιεργειών στους 37 °C και μέτρηση της απορρόφησης τους στα 600 nm, για χρόνο 0 h και κάθε μία ώρα.
- Κατασκευή της καμπύλης ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών παρουσία των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς και σύγκριση με την πρότυπη καμπύλη ανάπτυξης του βακτηριακού πληθυσμού απουσία των υπό μελέτη εκχυλισμάτων. \* Όλες οι παραπάνω διεργασίες πραγματοποιήθηκαν σε στείρες συνθήκες.

### 1.3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

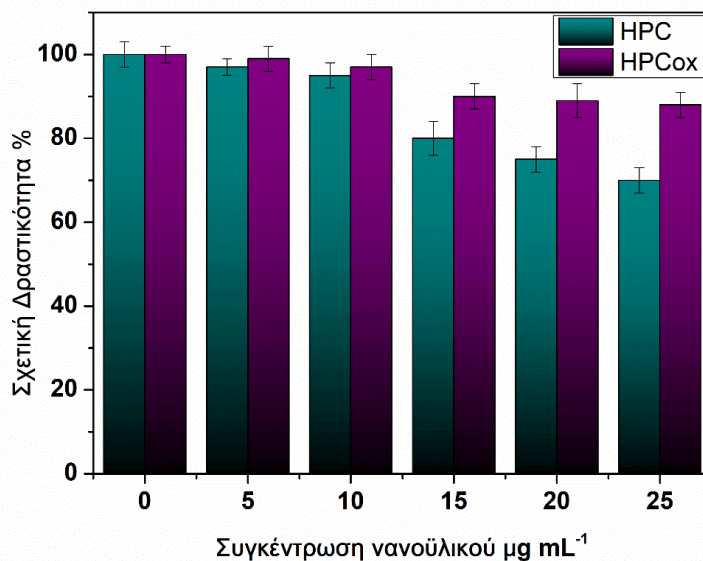
Σε αυτό το κεφάλαιο περιγράφεται η ανάπτυξη ενός νανοβιοκαταλύτη ως αποτελεσματικό εργαλείο για την τροποποίηση φαινολών προς βελτίωση της βιολογικής τους δράσης. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε αρχικά η αλληλεπίδραση της λακάσης από *Trametes versicolor* με ιεραρχημένου πορώδους άνθρακες σε οξειδωμένη και μη μορφή (HPCox και HPC αντίστοιχα). Στη συνέχεια ακινητοποιήθηκε ομοιοπολικά η λακάση στο νανοϋλικό HPCox και μελετήθηκαν οι βιοχημικές και δομικές ιδιότητες του νέου νανοβιοκαταλύτη. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς αυτός ο νέος νανοβιοκαταλύτης, στην τροποποίηση της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης και μελετήθηκε οι βιολογική τους δράση πριν και μετά την τροποποίησή τους.

#### 1.3.1. Μελέτη αλληλεπίδρασης της λακάσης TvL με τα νανοϋλικά HPC και HPCox.

Η αλληλεπίδραση των ενζύμων με νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα είναι ζωτικής σημασίας για τη λειτουργία των βιομορίων και συνεπώς για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη αποτελεσματικών νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων. Η επίδραση των νανοϋλικών στην καταλυτική συμπεριφορά και στη δομή των ενζύμων εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του νανοϋλικού, όπως η δομή και οι λειτουργικές ομάδες που διαθέτει (Patila et al., 2013b; Pavlidis et al., 2012a).

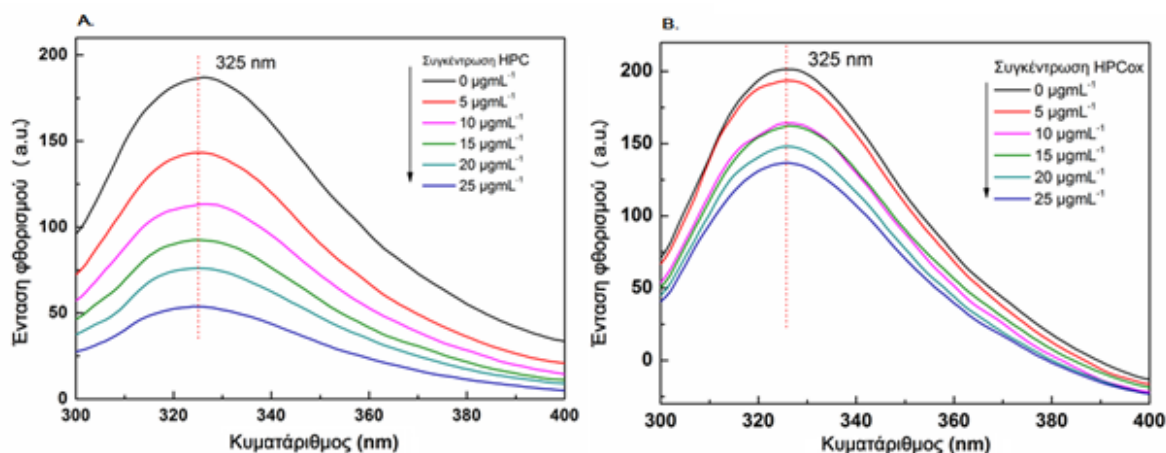
Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση των νανοϋλικών HPC και HPCox στην δραστικότητα της λακάσης μέσω της αντίδρασης οξειδωσης του ABTS, όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 1.2.2.7. Η δραστικότητα της λακάσης προσδιορίστηκε απουσία και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ( $5-25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) των νανοϋλικών και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 1.1. Η παρουσία των νανοϋλικών φαίνεται να επιδρά αρνητικά στη δραστικότητα της λακάσης (Εικόνα 1.1). Πιο συγκεκριμένα για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από  $15 \mu\text{g mL}^{-1}$  η παρουσία των νανοϋλικών μειώνει μέχρι και 30 % τη δραστικότητα της λακάσης στην περίπτωση του νανοϋλικού HPCox. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα δύο υλικά φαίνεται να επιδρούν με διαφορετικό τρόπο στην δραστικότητα του ενζύμου. Η οξειδωμένη μορφή του νανοϋλικού επιδρά λιγότερο στην δραστικότητα της λακάσης καθώς παρουσία της μεγαλύτερης συγκέντρωσης HPCox η λακάση διατηρεί το 90% της δραστικότητά της. Αντίθετα παρουσία της ίδιας συγκέντρωσης HPC η λακάση διατηρεί το 70 % της δραστικότητά της. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την θεωρία ότι οι λειτουργικές ομάδες στην επιφάνεια των νανοϋλικών παίζουν καθοριστικό ρόλο στον τρόπο αλληλεπίδρασής τους με πρωτεϊνικά μόρια. Βιβλιογραφικά έχει δειχθεί ότι νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα φαίνεται να επιδρούν στην καταλυτική ικανότητα των ενζύμων. Η επίδραση αυτή εξαρτάται από χαρακτηριστικά των νανοϋλικών όπως η δομή, η χημεία επιφάνειας, η φόρτιση και η υδροφοβικότητα (Patila et al., 2013b; Pavlidis et al., 2012a).





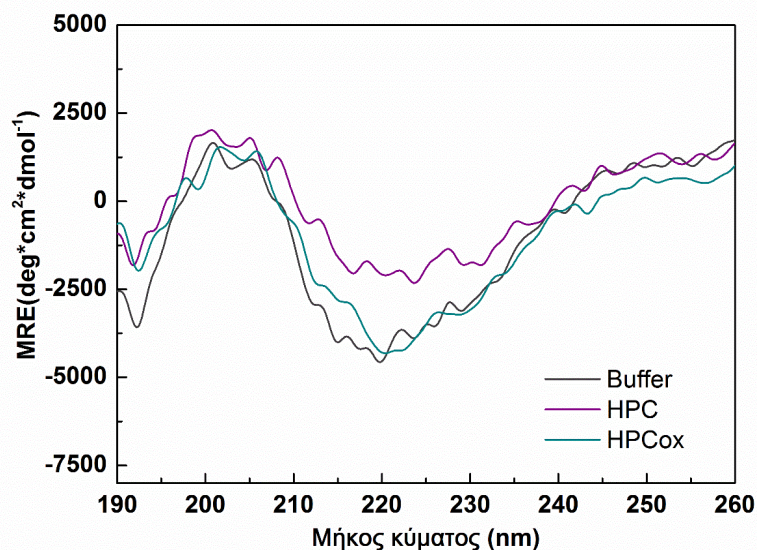
**Εικόνα 1.1.** Επίδραση της συγκέντρωσης των ναουϋλικών HPC και HPCox στην οξειδοαναγωγική δράση της TnL. Ως 100 % ορίστηκε η ταχύτητα της λακάσης απουσία ναουϋλικών.

Η φασματοσκοπία φθορισμού θεωρείται κατάλληλη τεχνική για την μελέτη αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνικών μορίων με διάφορες ενώσεις ή υλικά, καθώς η διέγερση των μορίων έχει πολύ μικρή διάρκεια (μερικά δευτερόλεπτα), συνεπώς βρίσκεται σε ίδια κλίμακα χρόνου με την αλληλεπίδραση των μορίων και τις δομικές αλλαγές των πρωτεϊνών (Gratton et al., 1984). Μελετήθηκε, λοιπόν, ο φθορισμός της λακάσης απουσία και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των ναουϋλικών HPC και HPCox (5-25 µg mL<sup>-1</sup>). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.2. παρατηρήθηκε μείωση του φθορισμού την λακάσης TnL παρουσία και των δύο ναουϋλικών, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική μετατόπιση του  $\lambda_{max}$ . Η απόσβεση φθορισμού της λακάσης από την παρουσία των ναουϋλικών HPC και HPCox φαίνεται να εξαρτάται από την συγκέντρωση του ναουϋλικού, καθώς αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης. Παρόλα αυτά, τα δύο ναουϋλικά αλληλεπιδρούν με διαφορετικό τρόπο με την λακάση, καθώς εμφανίζουν διαφορετικό βαθμό απόσβεσης. Το ναουϋλικό HPC προκαλεί μεγαλύτερη απόσβεση στον φθορισμό της λακάσης σε σχέση με το ναουϋλικό HPCox. Τα αποτελέσματα αυτά περιγράφονται και από τις τιμές της σταθερά pseudo Stern – Volmer,  $K_{sv}$  (10<sup>-3</sup> L mg<sup>-1</sup>) που είναι ίση με 93 και 14 για το ναουϋλικό HPC και HPCox αντίστοιχα. Και από αυτή τη μελέτη συμπεραίνεται λοιπόν, ότι η χημεία της επιφάνειας των ναουϋλικών παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον τρόπο αλληλεπίδρασής τους με πρωτεϊνικά μόρια. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και για την αλληλεπίδραση άλλων ενζύμων με ναουϋλικά με βάση τον άνθρακα. Η απόσβεση φθορισμού έχει σχετιστεί με διαμορφωτικές αλλαγές στο μόριο του ενζύμου και τη δημιουργία συμπλόκου της πρωτεΐνης με την ένωση-αποσβέστη (Mu et al., 2008; Pavlidis et al., 2012a).



**Εικόνα 1.2.** Η επίδραση των νανοϋλικών HPC και HPCox στην ένταση του φάσματος εκπομπής φθορισμού της λακάσης TvL.

Για να μελετηθεί περαιτέρω η αλληλεπίδραση της λακάσης TvL με τα νανοϋλικά HPC και HPCox χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού, CD. Πραγματοποιήθηκε λήψη φασμάτων CD της λακάσης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού οξέος, συγκέντρωσης 0.20 mM και pH 5, στους 30 °C απουσία και παρουσία των νανοϋλικών HPC και HPCox σε συγκέντρωση 25 µg mL<sup>-1</sup>. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, όπως συνοψίζονται στην Εικόνα 1.3. και στον Πίνακα 1.2., παρατηρούνται διαφοροποιήσεις στα φάσματα κυκλικού διχρωισμού παρουσία των νανοϋλικών, οι οποίες σχετίζονται με τις δομικές αλλαγές που συμβαίνουν στο μόριο της πρωτεΐνης και συμφωνούν με τα αποτελέσματα της φθορισμομετρίας. Πιο συγκεκριμένα, παρουσία του νανοϋλικού HPC το φάσμα CD της λακάσης αλλάζει έντονα και οι αλλαγές αυτές σχετίζονται με την μείωση της α-έλικας στο μόριο της πρωτεΐνης, σύμφωνα με την ποσοτική εκτίμηση (%) των στοιχείων δευτεροταγούς δομής που παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.1. Αντίθετα, παρουσία του νανοϋλικού HPCox οι αλλαγές στη δομή της λακάσης είναι αμελητέες. Σύμφωνα με τις παραπάνω μελέτες αλληλεπίδρασης της λακάσης με τα νανοϋλικά HPC και HPCox, φαίνεται ότι η οξειδωμένη μορφή του συγκεκριμένου νανοϋλικού επηρεάζει λιγότερο την δραστικότητα και την δομή της λακάσης, συνεπώς φαίνεται να είναι καταλληλότερο υπόστρωμα για την ακινητοποίηση του συγκεκριμένου ενζύμου.



**Εικόνα 1.3.** Φάσματα κυκλικού διχρωισμού της λακάσης TvL σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού οξέος 0.20 mM, pH 5, στους 30°C, απουσία και παρουσία των νανοϋλικών HPC και HPCox σε συγκέντρωση 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

**Πίνακας 1.1.** Ποσοτική εκτίμηση (%) των στοιχείων δευτεροταγούς δομής της TvL, από τα αντίστοιχα φάσματα κυκλικού διχρωισμού.

Δείγμα	$\alpha$ -helix %	$\beta$ -sheet %	Τυχαίο σπείραμα
TvL Buffer	11	42	47
HPC	0.6	46	47
HPCox	12	40	48

### 1.3.2. Προετοιμασία και χαρακτηρισμός του νανοβιοκαταλύτη HPCox-TvL

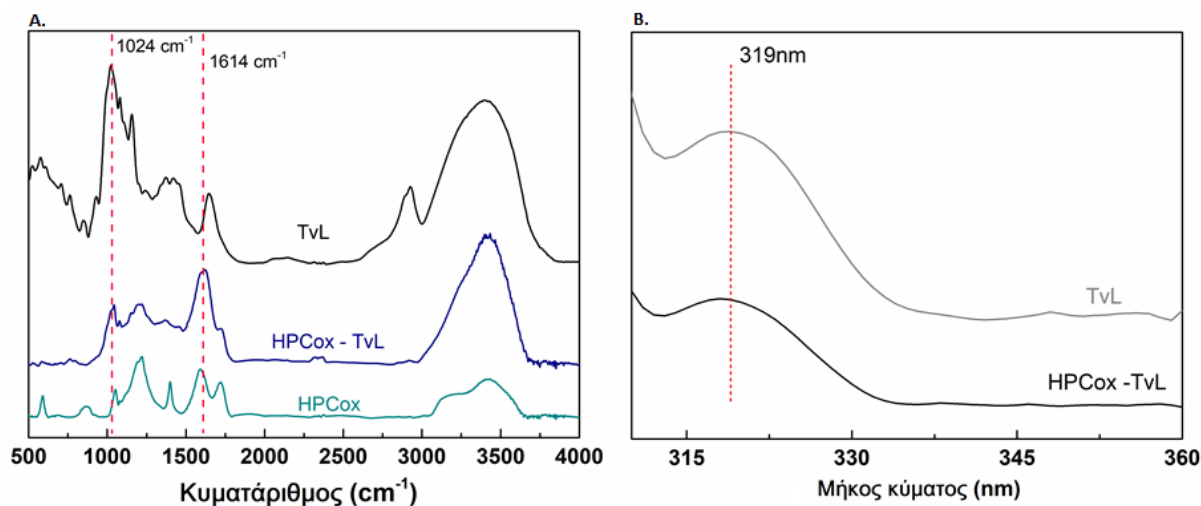
Μετά από τις μελέτες αλληλεπίδρασης της λακάσης με τα νανοϋλικά HPC και HPCox, επιλέχθηκε η οξειδωμένη μορφή του νανοϋλικού, η οποία φέρει στην επιφάνεια πολλές λειτουργικές ομάδες οξυγόνου, όπως καρβοξυλομάδες και υδροξυλομάδες, ως φορέας ακινητοποίησης της λακάσης TvL. Το νανοϋλικό HPCox χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ως φορέας ακινητοποίησης ενζύμου. Η λακάση TvL ακινητοποιήθηκε ομοιοπολικά στις ελεύθερες καρβοξυλομάδες και υδροξυλομάδες του υλικού με την βοήθεια των παραγόντων σύζευξης EDC και NHS, όπου σχηματίζονται σταθεροί αμιδικοί δεσμοί μεταξύ του ενζύμου και του νανοϋλικού (Gao and Kyrtziz, 2008a).

Αρχικά πραγματοποιήθηκε μελέτη βελτιστοποίησης της ακινητοποίησης της λακάσης στο HPCox, όπου χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου, διαφορετική αναλογία φορέα-ενζύμου και τέλος διαφορετικές συγκεντρώσεις των παραγόντων σύζευξης EDC και NHS

(τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται). Στις βέλτιστες συνθήκες (3 mg HPCox, 30 mg TvL και αναλογία EDC/NHS, 6.5/100 όπως παρουσιάζονται και στην Παράγραφο 1.2.2.1. πραγματοποιήθηκε η ακινητοποίηση της λακάσης TvL στο υλικό HPCox με απόδοση ακινητοποίησης 60 % και καταλυτική δραστικότητα του νανοβιοκαταλύτη HPCox-TvL  $0.4 \text{ Umg}^{-1}_{\text{ενζύμου}}$ . Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί κατά την ακινητοποίηση της TvL σε νανοϋλικά γραφίτη με διάφορες λειτουργικές ομάδες (Chatzikonstantinou et al., 2018b; Patila et al., 2016a).

Για να επιβεβαιωθεί η παρουσία του ενζύμου στο νανοϋλικό μετά την ακινητοποίηση χρησιμοποιήθηκαν οι φασματοσκοπίες FTIR και φθορισμού. Στην Εικόνα 1.4A παρουσιάζεται το φάσμα FTIR της ελεύθερης TvL και είναι ένα τυπικό φάσματα λακάσης που εμφανίζει μεταξύ άλλων και τρεις κύριες κορυφές, μία κορυφή απορρόφησης στα  $1024 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1416 \text{ cm}^{-1}$  και μία στα  $1614 \text{ cm}^{-1}$ . Οι κορυφές που παρατηρούνται στην περιοχή των  $1024 \text{ cm}^{-1}$  και  $1416 \text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχούν στις δονήσεις έκτασης των ομάδων C=C και C-N και σχετίζονται με την χαρακτηριστική περιοχή Amide I. Η κορυφή που παρατηρείται στην περιοχή των  $1614 \text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχεί στις δονήσεις έκτασης των ομάδων C=O και σχετίζεται με την χαρακτηριστική περιοχή Amide II. Οι περιοχές αυτές συνδέονται άμεσα με τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης και πιο συγκεκριμένα με την δευτεροταγή δομή (α-έλικα, β-φύλλα, β-στροφές, τυχαίο σπείραμα). Όμοια χαρακτηριστικά έχουν αναφερθεί για τις λακάσες και στην βιβλιογραφία (Senthivelan et al., 2019). Το φάσμα του νανοβιοκαταλύτη HPCox-TvL εμφάνισε επίσης τις κορυφές στην περιοχή  $1024 \text{ cm}^{-1}$  και  $1614 \text{ cm}^{-1}$ , επιβεβαιώνοντας την επιτυχή ακινητοποίηση του ενζύμου στο νανοϋλικό HPCox.

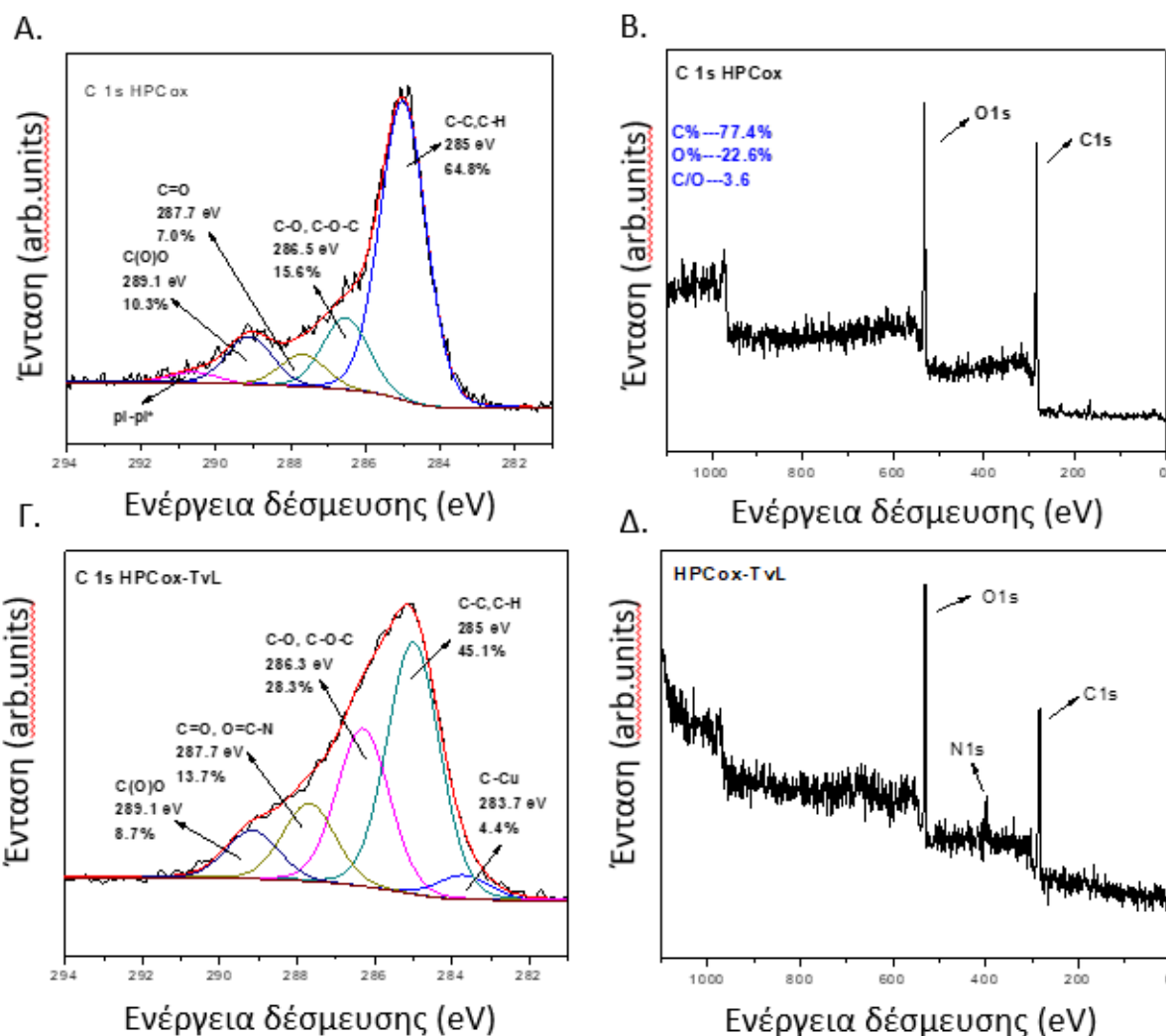
Η φασματοσκοπία φθορισμού έχει χρησιμοποιηθεί και στο παρελθόν για να επιβεβαιώσει την παρουσία ενζύμου σε ένα στερεό υλικό (Ayoub and Caseli, 2017; Junior and Caseli, 2017). Πραγματοποιήθηκε καταγραφή φασμάτων εκπομπής φθορισμού ελεύθερου και ακινητοποιημένου ενζύμου προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρουσία της λακάσης TvL στο νανοϋλικό HPCox (Εικόνα 1.4.). Το μήκος διέγερσης ρυθμίστηκε στα 280 nm και η ένταση εκπομπής καταγράφηκε στην περιοχή 300 έως 400 nm. Το μήκος κύματος μέγιστης εκπομπής της ελεύθερης λακάσης προσδιορίστηκε στα 319 nm. Το φάσμα φθορισμού του νανοϋλικού HPCox καταγράφηκε στις ίδιες συνθήκες και δεν παρατηρήθηκε εκπομπή στο εύρος 300 με 400 nm (Παράρτημα I, παράγραφο 2). Στην Εικόνα 1.4., φαίνεται ότι το φάσμα φθορισμού του νανοβιοκαταλύτη εμφανίζει μέγιστη εκπομπή σε μήκος 319 nm, υποδεικνύοντας την παρουσία λακάσης και συνεπώς την επιτυχή ακινητοποίησης του ενζύμου.



**Εικόνα 1.4.** Α) Φάσματα FTIR της ακινητοποιημένης λακάσης HPCox-TvL σε σύγκριση με το ελεύθερο ένζυμο και το νανούλικό HPCox. Β) Φάσμα φθορισμού της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης TvL σε HPCox.

Για να διερευνηθεί ο τρόπος με τον οποίο ακινητοποιήθηκε το ένζυμο στο νανούλικό χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία XPS. Πιο συγκεκριμένα η φασματοσκοπία XPS μπορεί να παρέχει ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες σχετικές με την στοιχειακή σύσταση του νανοβιοκαταλύτη. Συγκρίνοντας το φάσμα φωτοηλεκτρονίων C1s του νανούλικού HPCox και του νανοβιοκαταλύτη HPCox-TvL (Εικόνα 1.5 Α και Γ) διακρίνονται διαφορές στις χημικές ομάδες εξαιτίας της ακινητοποίησης της TvL στο νανούλικό. Οι ομάδες C-O αυξήθηκαν από 15.6 % για το υλικό HPCox σε 28.3 % για τον νανοβιοκαταλύτη εξαιτίας της ύπαρξης των δεσμών C-N του ενζύμου και των C-O και C-O-C λειτουργικών ομάδων της TvL. Οι αμιδικού δεσμοί παρατηρούνται στα 287.7 eV και παρατηρείται αύξηση για την κορυφή του δεσμού C=O από 7 % σε 13.7 % εξαιτίας της δημιουργίας αμιδικού δεσμού που δημιουργείται κατά την ομοιοπολική σύνδεση των αμινομάδων της TvL με τις υδροξυλομάδες και καρβοξυλομάδες του νανούλικού (Awada et al., 2012; Tawil et al., 2013), η κορυφή των καρβοξυλομάδων και των αμιδικών δεσμών συνυπάρχουν σε αυτά τα eV. Η ανάλυση XPS επιβεβαιώνει την επιτυχή ακινητοποίηση του ενζύμου στο νανούλικό.

Από την Εικόνα 1.5.B αποκαλύπτονται οι χαρακτηριστικές κορυφές C1s και O1s. Η κορυφή των O1s είναι έντονη και αυτό είναι απόδειξη οξειδωσης του νανούλικού. Το ποσοστό % της περιεκτικότητας σε άνθρακα και οξυγόνο εκτιμήθηκε να είναι 77.4 % και 22.6 % αντίστοιχα. Η αναλογία άνθρακα προς οξυγόνο είναι 3.6 (C/O = 3.6). Από τα φάσματα φωτοεκπομπής C1s μπορούν να διακριθούν οι διάφορες καταστάσεις οξυγόνου του άνθρακα μετά την οξείδωση. Η κορυφή C-C αντιπροσωπεύει το 64.8 % του συνολικού φάσματος άνθρακα ενώ οι δεσμοί C-O και C-O-C αντιπροσωπεύουν το 15.6 %. Οι ομάδες καρβονιλίου αντιπροσωπεύουν 7.0 %, ενώ πολύ σημαντική είναι η παρουσία καρβοξυλικών ομάδων στα 289.1 eV (10.3 %).



**Εικόνα 1.5** Φάσμα φωτοεκπομπής X-ray των A) C 1s HPCox, B) C 1s HPCox, Γ) C 1s of HPCox-TvL, και Δ) C1s of HPCFe-CaLB

### 1.3.3. Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης λακάσης.

Οι κινητικές παράμετροι  $K_m$  και  $V_{max}$  για την ελεύθερη και την ακινητοποιημένη λακάση στο νανοϋλικό HPCox εκτιμήθηκε μέσω του κινητικού μοντέλου Michaelis-Menten, χρησιμοποιώντας το ABTS ως υπόστρωμα σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 0.01-2 mM. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.2., η τιμή  $K_m$  για την ακινητοποιημένη λακάση ήταν 0.03 mM, η οποία ήταν τρεις φορές υψηλότερη από εκείνη για το ελεύθερο ένζυμο (0.09 mM). Σε σύγκριση με την αύξηση της σταθεράς  $K_m$ , η  $V_{max}$  της ακινητοποιημένης λακάσης μειώθηκε σε  $0.05 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  βιοκαταλύτη από  $0.7 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  βιοκαταλύτη για το ελεύθερο ένζυμο. Αυτή η μετατόπιση της τιμής  $K_m$  και της  $V_{max}$  υποδηλώνει ότι το ακινητοποιημένο ένζυμο εμφανίζει μικρότερη συγγένεια για το υπόστρωμα από εκείνη του ελεύθερου ενζύμου. Όμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί μετά από την ακινητοποίηση της λακάσης και σε άλλα υλικά όπως σε μαγνητικό μεσοπορώδη άνθρακα και σε μαγνητικά νανοσωματίδια. Τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να οφείλονται σε μικρές διαμορφωτικές αλλαγές που μπορεί να έχουν

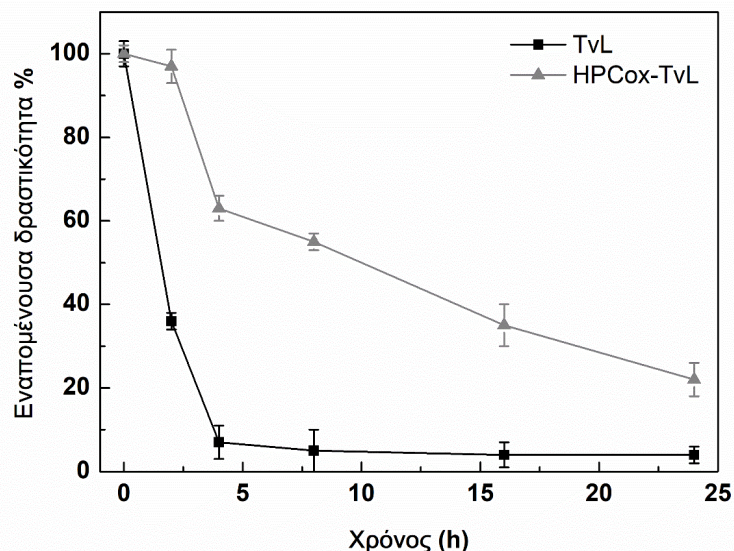
προκληθεί στο ένζυμο μετά την ομοιοπολική σύνδεσή του με το νανοϋλικό HPCox, με αποτέλεσμα την περιορισμένη διαθεσιμότητα του ενεργού κέντρου του ενζύμου (Fortes et al., 2017; Liu et al., 2012).

**Πίνακας 1.2.** Προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων  $K_m$  και  $V_{max}$  της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης λακάσης.

Δείγμα	$K_m$ (mM)	$V_{max}$ ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ βιοκαταλύτη)
HPCox-TvL	0.03	0.05
TvL	0.09	0.7

### 1.3.4. Μελέτη σταθερότητας της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης TvL

Μελετήθηκε η σταθερότητα της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης λακάσης και προσδιορίστηκε ο χρόνος ημι-ζωής (δηλαδή ο χρόνος που απαιτείται για να χάσει το ένζυμο το 50 % της αρχικής του δραστηριότητας), στις συνθήκες θερμοκρασίας και pH που θα χρησιμοποιηθεί ο νανοβιοκαταλύτης που αναπτύχθηκε για την ενζυμική τροποποίηση φαινολών. Η λακάση σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή επώαστηκε στους 30 °C, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού οξέος 100 mM, pH 5.0 για 24 h. Στην Εικόνα 1.6. παρουσιάζεται η εναπομένουσα δραστηριότητα της λακάσης σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή μετά από επώαση για διάφορα χρονικά διαστήματα στις συνθήκες που προαναφέραμε. Αξίζει να σημειωθεί ότι η σταθερότητα της λακάσης μετά την ακινητοποίηση, αυξήθηκε σημαντικά αφού ο χρόνος ημι-ζωής του νανοβιοκαταλύτη HPCox-TvL υπολογίστηκε να είναι περίπου 10 h, ενώ ο χρόνος ημι-ζωής της ελεύθερης λακάσης είναι μόλις 1.8 h, συνεπώς η σταθερότητα του ενζύμου αυξήθηκε κατά τουλάχιστον 5 φορές. Παρόμοια αύξηση στη σταθερότητα της λακάσης έχει αναφερθεί μετά από ακινητοποίησή της σε διάφορα υλικά όπως σε τροποποιημένο οξείδιο του γραφενίου, σε μαγνητικά νανοσωματίδια σιδήρου, σε μεσοπορώδη άνθρακα κ.α. (Fortes et al., 2017; Liu et al., 2012; Patila et al., 2016a).

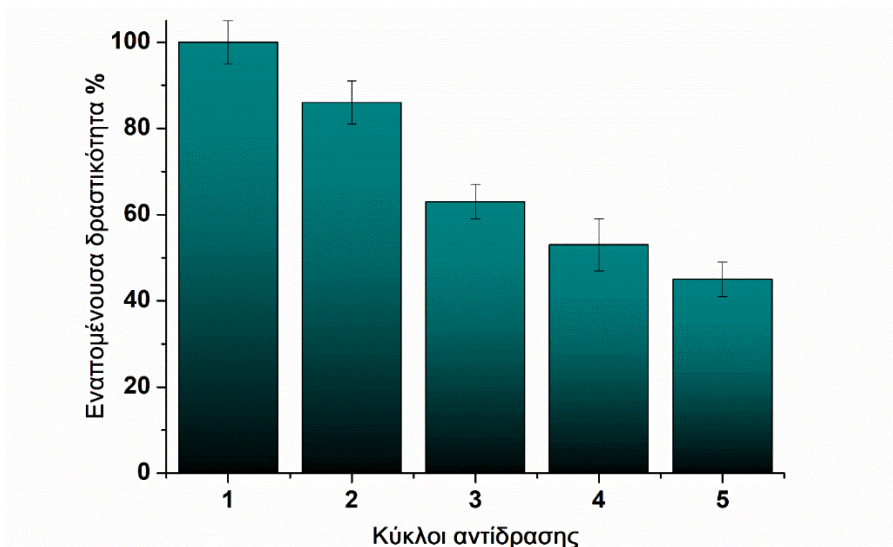


**Εικόνα 1.6.** Σταθερότητα της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης TvL σε HPCox μετά από επώαση σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού οξέος 100 mM pH 5 στους 30 °C για 24 h. Ως 100 % ορίζεται η δραστηριότητα της λακάσης σε t=0 min.

### 1.3.5. Μελέτη επαναχρησιμοποίησης της ακινητοποιημένης TvL σε HPCox

Η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης ενός βιοκαταλύτη είναι μείζονος σημασίας ιδιαίτερα σε διεργασίες βιομηχανικού ενδιαφέροντος, κυρίως από οικονομικής άποψης. Μελετήθηκε η λειτουργική σταθερότητα του νανοβιοκαταλύτη HPCox-TvL σε πολλαπλούς κύκλους αντίδρασης της οξειδωσης του ABTS. Κάθε κύκλος αντίδρασης πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού οξέος 100 mM σε pH 5.0 στους 30°C. Μετά από κάθε κύκλο, ο νανοβιοκαταλύτης διαχωρίστηκε από το μείγμα της αντίδρασης με φυγοκέντρηση και πλύθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα για να απομακρυνθούν υπολείμματα υποστρώματος και προϊόντος και στην συνέχεια επαναχρησιμοποιήθηκε σε φρέσκο μείγμα αντίδρασης. Η Εικόνα 1.7. απεικονίζει την εναπομένουσα δραστηριότητα της ακινητοποιημένης λακάσης μετά από κάθε κύκλο αντίδρασης. Μετά από πέντε κύκλους επαναχρησιμοποίησης, η ακινητοποιημένη λακάση διατήρησε το 50 % της αρχικής της δραστηριότητας. Η ομοιοπολική ακινητοποίηση της λακάσης έχει σημαντική επίδραση στη σταθερότητα του ενζύμου, περιορίζοντας την αποδέσμευση ενζύμου ή την απενεργοποίηση κατά τη διαδικασία της αντίδρασης και πλύσης κατά την επαναχρησιμοποίηση. Σε αντίστοιχες μελέτες επαναχρησιμοποίησης της ακινητοποιημένης λακάσης σε μαγνητικά νανουλικά, μετά από πέντε κύκλους αντίδρασης οξειδωσης του ABTS το ακινητοποιημένο ένζυμο διατήρησε 60 % και 70 % της αρχικής του δραστηριότητας (Fortes et al., 2017; Liu et al., 2012).

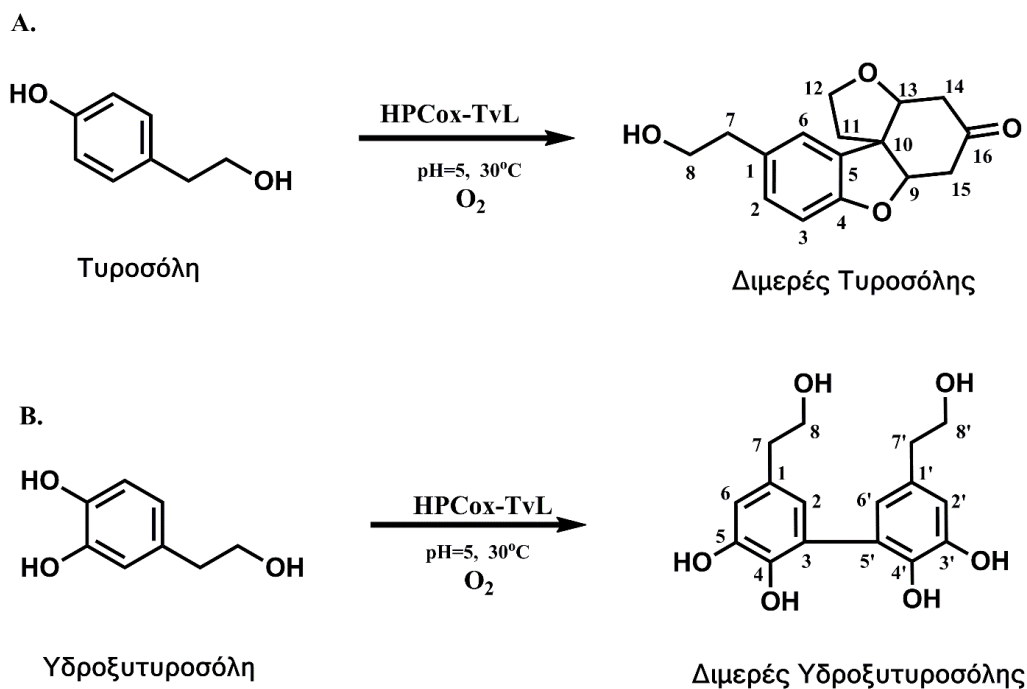




**Εικόνα 1.7.** Επαναχρησιμοποίηση της ακινητοποιημένης λακάσης TnL σε HPCox, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού οξέος 100 mM pH 5 στους 30 °C.

### 1.3.6. Ενζυμική τροποποίηση της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης από τον νανοβιοκαταλύτη HPCox-TnL

Η λακάση καταλύει την οξείδωση φαινολικών ενώσεων όπως η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη δημιουργώντας ασταθείς ρίζες οι οποίες στη συνέχεια υποβάλλονται σε ομο- και ετερο-σύζευξη και σχηματίζουν προϊόντα διμερούς, τριμερούς, ολιγομερούς, πολυμερούς ή διασταυρούμενης σύζευξης (Kudanga et al., 2017). Στη μελέτη του Chacroun et al, τροποποίησαν της τυροσόλη με λακάση από *Trametes trogii* και ταυτοποίησαν ως κύριο προϊόν της βιοτροποποίησης το διμερές της τυροσόλης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.8A. Αντίστοιχα, στις μελέτες των Zwane et al και των Burton και Davids τροποποίησαν την υδροξυτυροσόλη με λακάση *Trametes pubescens* και ταυτοποίησαν ως κύριο προϊόν το διμερές της υδροξυτυροσόλης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.8B και σε λιγότερο ποσοστό το τριμερές (Burton and Davids, 2012; Zwane et al., 2012).

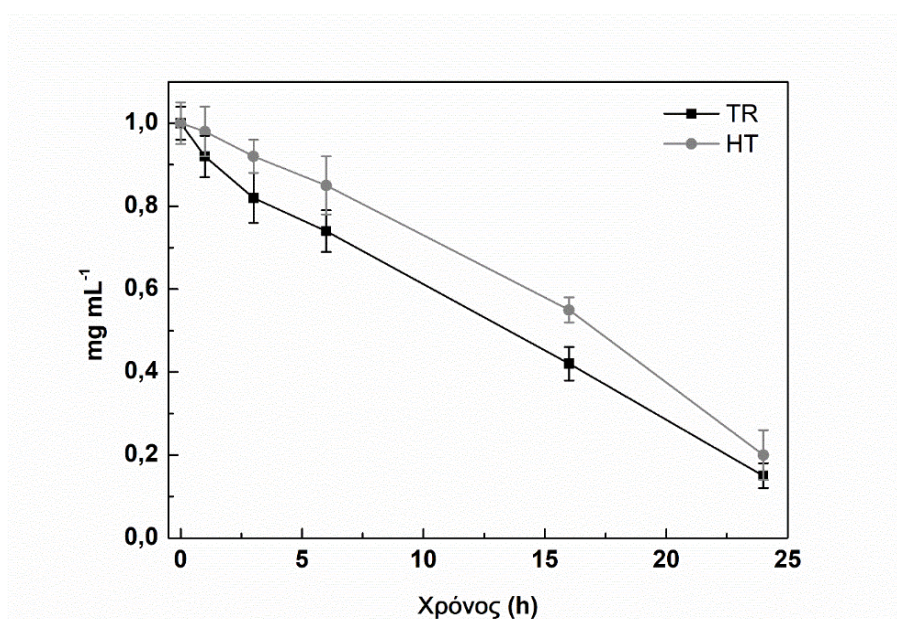


**Εικόνα 1.8.** Ενζυμική τροποποίηση A) της τυροσόλης και B) της υδροξυτυροσόλης από τον νανοβιοκαταλύτη HPCox-TvL.

Ο νανοβιοκαταλύτης HPCox-TvL χρησιμοποιήθηκε για την ενζυμική τροποποίηση της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης. Χρωματογραφία HPLC χρησιμοποιήθηκε για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της τυροσόλης, της υδροξυτυροσόλης και των προϊόντων της βιοκατάλυσης (Παράρτημα I, παράγραφος 2). Ο σχηματισμός του διμερούς της τυροσόλης και του διμερούς της υδροξυτυροσόλης ταυτοποιήθηκε στη συνέχεια με φασματοσκοπία NMR ή φασματοσκοπία μάζας όπως περιγράφεται στο Παράρτημα I στις παραγράφους 3 και 4. Στην Εικόνα 1.9 απεικονίζεται η εξέλιξη της ενζυμικής τροποποίησης της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης, από τον νανοβιοκαταλύτη HPCox-TvL, σε συνάρτηση με τον χρόνο. Υπολογίστηκε ο αρχικός ρυθμός αντίδρασης και η % τροποποίηση των δύο φαινολών και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.3. Ο νανοβιοκαταλύτης HPCox-TvL παρουσίασε μεγαλύτερο αρχικό ρυθμό αντίδρασης στην περίπτωση της τυροσόλης κατά ένα παράγοντα 1.6. Πιθανά η έλλειψη μιας υδροξυλομάδας στο μόριο της τυροσόλης να ευνοεί την αλληλεπίδραση της ένωσης με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Αξίζει να σημειωθεί ότι και στις δύο περιπτώσεις μετά από επώαση 24 h το ποσοστό τροποποίησης ήταν μεγαλύτερο από 80 %, υποδεικνύοντας την αποτελεσματικότητα του νανοβιοκαταλύτη HPCox-TvL στην τροποποίηση φαινολικών ενώσεων.

**Πίνακας 1.3.** Αρχικοί ρυθμοί αντίδρασης της ακινητοποιημένης TvL σε HPCox για την τροποποίηση της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης και η % απόδοση τροποποίηση τους μετά από 24 h επώασης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού 100 mM, pH 5.0, στους 30 °C (το τυπικό σφάλμα ήταν μικρότερο από 5 % σε όλες τις περιπτώσεις).

Ένωση	Αρχικός ρυθμός αντίδρασης mM h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> βιοκαταλύτη	% Τροποποίηση
Τυροσόλη	0.29	85
Υδροξυτυροσόλη	0.18	80



**Εικόνα 1.9.** Η πορεία της ενζυμικής τροποποίησης της τυροσόλης (TR) και της υδροξυτυροσόλης (HT) από τον νανοβιοκαταλύτη HPCox-TvL σε συνάρτηση με τον χρόνο.

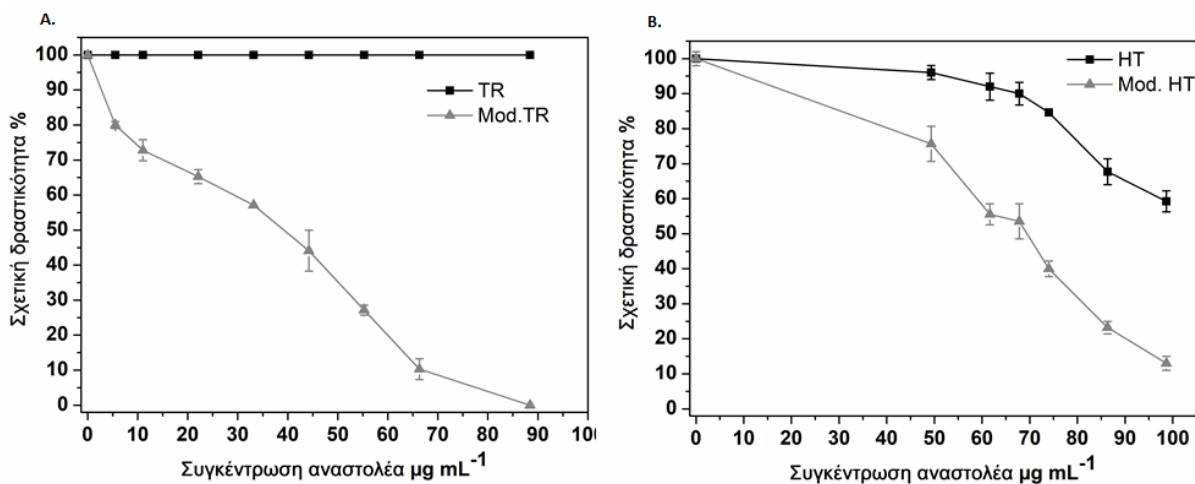
### 1.3.7. Μελέτη της αναστολής της δράσης της λιποξυγονάσης από το φυτό σόγια και της λιπάσης από *Candida rugosa* από την τυροσόλη και την υδροξυτυροσόλη πριν και μετά την ενζυμική τους τροποποίηση.

Η τυροσόλη και η υδροξυτυροσόλη πριν και μετά την ενζυμική τους τροποποίηση, από τον νανοβιοκαταλύτη HPCox-TvL, εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα τους να αναστέλλουν την δραστηριότητα της λιπάσης από *Candida rugosa* (CRL) και της λιποξυγονάσης τύπου I από το φυτό *Glycine max* (σόγια) (SLO). Όσο αφορά την λιποξυγονάση SLO, μελετήθηκε η ικανότητα των υπό μελέτη ενώσεων να αναστέλλουν την SLO κατά την οξείδωση του λινελαϊκού οξέος προς 13-υδροϋπεροξυ-οκταδεκαδιενοϊκό οξύ. Οι τιμές IC<sub>50</sub>, δηλαδή η συγκέντρωση της υπό μελέτη ουσίας που απαιτείται για να αναστείλει τη δραστηριότητα της SLO κατά 50 % προσδιορίστηκε όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 1.2.2.15 και οι τιμές IC<sub>50</sub> και η επίδραση των υπό μελέτη ενώσεων στη σχετική δραστηριότητα % της SLO, συναρτήσκει των συγκεντρώσεων των αναστολέων, παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.4 και στην Εικόνα 1.10 αντίστοιχα.

**Πίνακας 1.4.** Αναστολή της λιποξυγονάσης SLO και της λιπάσης CRL από την τυροσόλη και την υδροξυτυροσόλη πριν και μετά την τροποποίησή τους (TR, Mod. TR και HT, Mod. HT, αντίστοιχα).

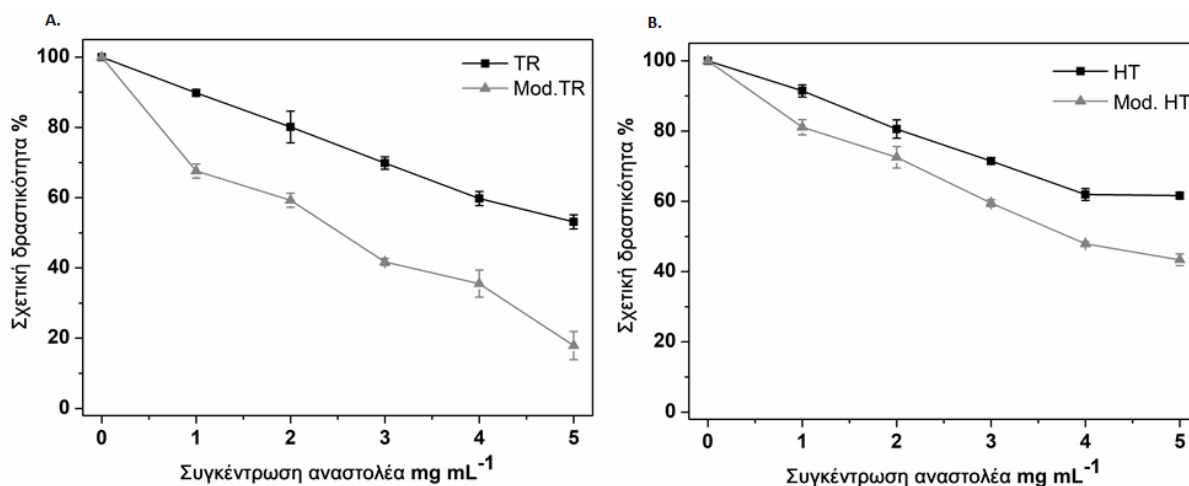
Αναστολέας	IC <sub>50</sub> (μg mL <sup>-1</sup> )	
	SLO	CRL
TR	>> 100	4198 ±56
Mod. TR	45 ±2	2057 ±63
HT	100 ±2	4682 ±68
Mod. HT	60 ±2	3063 ±89

Η υδροξυτυροσόλη παρουσίασε υψηλή ικανότητα να αναστέλλει την SLO καθώς υπολογίστηκε να έχει τιμή IC<sub>50</sub> ίση με 100 μg mL<sup>-1</sup> ενώ μέχρι αυτή τη συγκέντρωση η τυροσόλη δεν εμφάνισε καθόλου ανασταλτική δράση. Ομοίως σε μελέτη των De La Puerta et al, σε λιποξυγονάση αρουραίου βρέθηκε ότι η υδροξυτυροσόλη εμφανίζει 33 φορές μεγαλύτερη ανασταλτική δράση από την τυροσόλη (De La Puerta et al., 1999). Έχει συσχετιστεί βιβλιογραφικά ο αριθμός των υδροξυλομάδων των φλαβονοειδών και των φαινολικών ενώσεων με την ικανότητα αναστολής των λιποξυγονασών, μεγαλύτερος αριθμός υδροξυλομάδων φαίνεται να οδηγεί σε καλύτερη ανασταλτική δράση (Laughton et al., 1991). Η θεωρία αυτή επιβεβαιώνεται και από τα δικά μας αποτελέσματα. Εντυπωσιακά ήταν τα αποτελέσματα μετά την ενζυμική τροποποίηση και των δύο ενώσεων, από τον νανοβιοκαταλύτη HPCox-TnL, καθώς αυξήθηκε η ανασταλτική δράση και στις δύο περιπτώσεις. Πιο συγκεκριμένα η τροποποιημένη υδροξυτυροσόλη έδειξε 40 % καλύτερη ικανότητα να αναστέλλει το ένζυμο SLO, ενώ στην περίπτωση της τροποποιημένης τυροσόλης τα αποτελέσματα ήταν πιο εντυπωσιακά καθώς η πρότυπη ένωση μέχρι την συγκέντρωση των 100 μg mL<sup>-1</sup> δεν έδειξε καθόλου ανασταλτική δράση, ενώ για την τροποποιημένη τυροσόλη υπολογίστηκε τιμή IC<sub>50</sub> ίση με 45 μg mL<sup>-1</sup>. Πιθανά η αύξηση του αριθμού των υδροξυλομάδων που αναλογούν σε κάθε μόριο μετά των διμερισμό να οδηγεί στην καλύτερη ανασταλτική δράση της SLO. Οι Shingai et al, μελέτησαν την ικανότητα 22 φαινολικών ενώσεων να αναστέλλουν την λιποξυγονάση πριν και μετά την χημική τους οξείδωση. Στις περισσότερες περιπτώσεις, και στην περίπτωση της υδροξυτυροσόλης, η χημική οξείδωση οδήγησε σε προϊόντα με χαμηλότερη ικανότητα να αναστέλλουν την λιποξυγονάση, υπογραμμίζοντας την σημαντικότητα της ενζυμικής τροποποίησης των φαινολών (έναντι της χημικής) για την βελτίωση των βιολογικών τους δράσεων (Shingai et al., 2011).



**Εικόνα 1.10.** Επίδραση της Α) τυροσόλης (TR) και Β) υδροξυτυροσόλης (HT) πριν και μετά την ενζυμική τους τροποποίηση, στη σχετική δραστηριότητα % της SLO συναρτήσει των συγκεντρώσεων των αναστολέων. Ως δραστηριότητα 100 % ορίζεται η δραστηριότητα της SLO απουσία αναστολέα.

Όσο αφορά την λιπάση CRL, μελετήθηκε η ικανότητα των υπό μελέτη ενώσεων να αναστέλλουν την CRL κατά την κατάλυση της υδρόλυσης του βουτυρικού εστέρα της 4-νιτροφαινόλης (*p*-NPB). Οι τιμές  $IC_{50}$ , δηλαδή η συγκέντρωση της υπό μελέτη ουσίας που απαιτείται για να αναστείλει τη δραστηριότητα της CRL κατά 50 % προσδιορίστηκε όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 1.2.2.15 και οι τιμές  $IC_{50}$  και η επίδραση των υπό μελέτη ενώσεων στη σχετική δραστηριότητα % της CRL συναρτήσει των συγκεντρώσεων των αναστολέων παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.4 και στην Εικόνα 1.11 αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα, τόσο η υδροξυτυροσόλη όσο και η τυροσόλη παρουσιάζουν σχετικά μειωμένη ικανότητα να αναστέλλουν την λιπάση καθώς παρουσιάζουν σχετικά υψηλές τιμές  $IC_{50}$  στα  $4682 \mu\text{g mL}^{-1}$  και  $4198 \mu\text{g mL}^{-1}$ , αντίστοιχα. Η τυροσόλη φαίνεται να έχει ελαφρώς καλύτερη ανασταλτική δράση σε σχέση με την υδροξυτυροσόλη, η οποία πιθανόν να οφείλεται στην παρουσία μιας επιπλέον υδροξυλομάδας άμεσα συνδεδεμένης στο βενζολικό δακτύλιο της υδροξυτυροσόλης. Αξίζει να σημειωθεί ότι μετά την ενζυμική τροποποίηση των φαινολών αυτών με λακάση, η ανασταλτική τους δράση φαίνεται να βελτιώνεται και πιο συγκεκριμένα να διπλασιάζεται στην περίπτωση της τυροσόλης και να αυξάνεται κατά ένα παράγοντα 1.5 στην περίπτωση της υδροξυτυροσόλης. Σε μελέτη των Martinez-Gonzalez είχε αναφερθεί ότι οι κύριες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της παγκρεατικής λιπάσης και των πολυφαινολών είναι κυρίως υδρόφοβες και μάλιστα είχε προκύψει ότι το *p*-κουμαρικό οξύ επέφερε καλύτερη ανασταλτική δράση στο ένζυμο σε σχέση με το καφεϊκό οξύ με το οποίο διαφέρουν ως προς μια υδροξυλομάδα στην χημική τους δομή. Ομοίως θα μπορούσε να ισχύει και στην περίπτωση της λιπάσης από *Candida rugosa* (Martinez-Gonzalez et al., 2017).



**Εικόνα 1.11.** Επίδραση της Α) τυροσόλης (TR) και Β) υδροξυτυροσόλης (HT) στη σχετική δραστηριότητα % της CRL συναρτήσει των συγκεντρώσεων των αναστολέων. Ως δραστηριότητα 100 % ορίζεται η δραστηριότητα της CRL απουσία αναστολέα.

### 1.3.8. Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης, πριν και μετά την ενζυμική τους τροποποίηση, σε βακτηριακούς πληθυσμούς

Για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης των ενώσεων τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη, πριν και μετά την ενζυμική τους τροποποίηση, χρησιμοποιήθηκαν δύο βακτηριακά στελέχη, το *E.coli* BL21(DE3) αρνητικό κατά Gram και το *Corynebacterium* θετικό κατά Gram. Πιο συγκεκριμένα ο έλεγχος έγινε μετά από αλληλεπίδραση των υπό μελέτη δειγμάτων με συγκεκριμένο αριθμό βακτηριακών κυττάρων, απουσία θρεπτικού μέσου, ώστε να μην υπάρχει δυνατότητα πολλαπλασιασμού των βακτηρίων και κατά συνέπεια να διατηρείται σταθερή η αναλογία βακτηριακού πληθυσμού-δείγματος. Αρχικά, συγκρίθηκε ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης κατά την εκθετική φάση, των βακτηρίων που δεν είχαν προ-επωαστεί με τα υπό μελέτη δείγματα και ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των βακτηρίων που είχαν προ-επωαστεί με διαφορετικές συγκεντρώσεις κάθε εξεταζόμενης ένωσης. Διαπιστώθηκε, ότι σε κάθε περίπτωση παρέμενε περίπου σταθερός ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για βακτηριοκτόνο και όχι για βακτηριοστατική δράση των βιοδραστικών συστατικών.

Η αντιμικροβιακή δράση προσδιορίστηκε με την βοήθεια του προγράμματος Graphpad και την εφαρμογή μιας μη γραμμικής λογιστικής δοσο-εξαρτώμενης καμπύλης τεσσάρων παραμέτρων. Για τον υπολογισμό της αντιβακτηριακής ικανότητας των υπό μελέτη ενώσεων υπολογίστηκε, κατά την εκθετική φάση, η ποσοστιαία ανάπτυξη των βακτηρίων που είχαν προεπωαστεί με διαφορετικές συγκεντρώσεις των υπό μελέτη ενώσεων, σε σύγκριση με την ανάπτυξη των βακτηρίων απουσία ενώσεων. Σε κάθε περίπτωση υπολογίστηκε η συγκέντρωση της υπό μελέτης ένωσης/ή εκχυλίσματος που χρειάζεται για να θανατωθεί το 50 % του βακτηριακού πληθυσμού (Lethal Concentration, LC<sub>50</sub>). Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 1.5.

**Πίνακας 1.5.** Αντιμικροβιακή δράση τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης πριν και μετά την ενζυμική τους τροποποίηση (TR, Mod. TR και HT, Mod. HT αντίστοιχα).

Δείγμα	<i>E.coli</i>	<i>Corynebacterium</i>
	LC <sub>50</sub> μg mL <sup>-1</sup>	LC <sub>50</sub> μg mL <sup>-1</sup>
TR	>>20	>>20
Mod. TR	4 ±0.8	5 ±0.6
HT	8 ±2.0	3 ±0.5
Mod. HT	2 ±0.6	1 ±0.5

Οι φαινολικές ενώσεις έχουν μελετηθεί διεξοδικά ως προς τις αντιμικροβιακές τους ιδιότητες. Η αντιμικροβιακή τους δράση φαίνεται να σχετίζεται με τις υδροξυλομάδες που διαθέτουν (τον αριθμό και την θέση) και με την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με την μεμβράνη των μικροοργανισμών. Υποστηρίζεται ότι οι φαινολικές ενώσεις διεισδύουν στις δομικά διαφορετικές κυτταρικές μεμβράνες και των Gram-αρνητικών και των θετικών κατά Gram βακτηρίων. Οι φαινολικές και αντιοξειδωτικές ενώσεις είναι γνωστό ότι προκαλούν διάσπαση των πεπτιδογλυκανών των κυττάρων ή βλάπτουν την κυτταρική μεμβράνη ή και τα δύο. Αυτές οι ενώσεις μπορεί να απενεργοποιούν τα βασικά ένζυμα ή να διαταράσσουν λειτουργικά το γενετικό υλικό και να διαταράσσουν έτσι την παραγωγή ενέργειας και τη σύνθεση των δομικών συστατικών (Tural and Turhan, 2018; Widsten et al., 2010). Η υδροξυτυροσόλη έχει μελετηθεί ως προς τις αντιμικροβιακές της ιδιότητες έναντι ενός πλήθους παθογόνων για τον άνθρωπο μικροοργανισμών, αλλά και έναντι ευεργετικών για τον άνθρωπο μικροοργανισμών. Πιο συγκεκριμένα η υδροξυτυροσόλη έχει παρουσιάσει εντυπωσιακή αντιμικροβιακή δράση έναντι των παθογόνων *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* και *Propionibacterium acnes* κ.α. (Bisignano et al., 1999b; Markoníć et al., 2019). Η τυροσόλη φαίνεται να παρουσιάζει λιγότερο ενδιαφέρον ως προς τις αντιμικροβιακές της ιδιότητες, παρόλα αυτά υπάρχουν αναφορές που φαίνεται να αναστέλλει την ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus*, της μούχλας και τον σχηματισμό βιοφίλμ που σχηματίζονται από σημαντικά παθογόνα του (Arias et al., 2016; Gourama et al., 1989; Shaymaa and Dina, 2016).

Σύμφωνα με τον Πίνακα 1.5, η υδροξυτυροσόλη εμφανίζει πολύ ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι τόσο του *E.coli* όσο και του *Corynebacterium* με LC<sub>50</sub> = 8 μg mL<sup>-1</sup> και LC<sub>50</sub> = 9 μg mL<sup>-1</sup> αντίστοιχα. Αντίστοιχες μελέτες δείχνουν την αντιμικροβιακή δράση της υδροξυτυροσόλης και άλλων φαινολικών ενώσεων τόσο σε Gram – αρνητικά όσο και σε Gram θετικά βακτήρια (Bisignano et al., 1999a; Friedman et al., 2013), ενώ σε άλλη μελέτη η υδροξυτυροσόλη εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση για αρνητικούς κατά Gram μικροοργανισμούς αλλά όχι για κατά Gram θετικούς, όπως το *Corynebacterium* (Capasso et al., 1995). Αντίθετα, η τυροσόλη μέχρι την μέγιστη συγκέντρωση που μελετήθηκε δεν εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση για κανέναν από τους δύο οργανισμούς, αποτελέσματα που συμφωνούν με παρόμοιες μελέτες (Capasso et al., 1995). Υπάρχουν μελέτες οι οποίες συσχετίζουν την βακτηριοκτόνο δράση των φαινολικών ενώσεων με τον αριθμό των υδροξυλομάδων ενώ άλλες που απορρίπτουν αυτήν την εκδοχή. Με

βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, θα μπορούσαμε να εξάγουμε το συμπέρασμα ότι η ύπαρξη μιας επιπλέον υδροξυλομάδας στο μόριο της υδροξυτυροσόλης σε σχέση με την τυροσόλη έχει ως αποτέλεσμα μια αδιαμφισβήτητη διαφορά ως προς την αντιβακτηριακή τους δράση. Φαίνεται, ότι η αύξηση του αριθμού των υδροξυλομάδων συνεπάγεται αύξηση της υδροφιλικότητας των ενώσεων και την καλύτερη αλληλεπίδραση με την κυτταρική μεμβράνη (Widsten et al. 2010).

Εντυπωσιακά είναι τα αποτελέσματα των ενζυμικά τροποποιημένων ενώσεων από τον νανοβιοκαταλύτη HPCox-TnL, τόσο στην περίπτωση της τυροσόλης όσο και στην περίπτωση της υδροξυτυροσόλης. Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 1.5, μετά την ενζυμική τους τροποποίηση εμφανίζουν βελτιωμένη αντιβακτηριακή δράση. Πιο συγκεκριμένα στην περίπτωση της υδροξυτυροσόλης μετά την ενζυμική τροποποίηση, η αντιμικροβιακή δράση τετραπλασιάστηκε στην περίπτωση του *E.coli* και τριπλασιάστηκε στη περίπτωση του *Corynebacterium*. Ακόμα πιο εντυπωσιακά ήταν τα αποτελέσματα για την τυροσόλη όπου η πρότυπη ένωση μέχρι την μέγιστη συγκέντρωση  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  δεν εμφάνισε αντιμικροβιακή δράση και στους δύο μικροοργανισμούς, ενώ η τροποποιημένη τυροσόλη εμφάνισε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση με  $\text{LC}_{50}$  4 και  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  για το *E.coli* και το *Corynebacterium* αντίστοιχα. Στην μελέτη των Chakroun et al. 2013, είχε δειχθεί ότι η τροποποιημένη με λακάση τυροσόλη με κύρια ένωση το διμερές της, παρουσίασε εξαιρετικά βελτιωμένη αντιβακτηριακή δράση σε σχέση με την πρότυπη ένωση, εναντίον στελέχους του αρνητικού κατά Gram βακτηρίου *E.coli*.



#### 1.4. Συμπεράσματα

Στο παρόν κεφάλαιο μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των νανοϋλικών HPC και HPCox με τη λακάση από *Trametes versicolor* και επιλέχθηκε το υλικό HPCox για την ακινητοποίησή της. Η χημεία της επιφάνειας του νανοϋλικού φάνηκε να παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση του με την πρωτεΐνη. Το νανοϋλικό HPCox χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για την ακινητοποίηση της λακάσης, ενισχύοντας την σταθερότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου. Ο νανοβιοκαταλύτης που αναπτύχθηκε εμφάνισε υψηλή λειτουργική σταθερότητα και ικανότητα να καταλύει την βιοτροποποίηση της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης, σχηματίζοντας διμερή μόρια. Τέλος η τροποποιημένη τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη εμφάνισαν αυξημένη αντιμικροβιακή δράση και αυξημένη ικανότητα αναστολής λιπάσης και λιποξυγονάσης σε σχέση με τις πρόδρομες ενώσεις.



## Κεφάλαιο 2: Λιπάση κινητοποιημένη σε μαγνητικό υλικό ιεραρχημένου πορώδους άνθρακα ως βιοτεχνολογικό εργαλείο για την σύνθεση βιοδραστικών παραγώγων κερσετίνης

### 2.1 Εισαγωγή

Η κερσετίνη (3,3',4',5,7-πέντο-υδροξυφλαβόνη) είναι το φλαβονοειδές που απαντάται περισσότερο από κάθε άλλο στη φύση και το πιο καλά μελετημένο. Αυτή η φυσική ένωση έχει συνδεθεί με πλήθος βιολογικών δράσεων όπως η αντιοξειδωτική, η αντιυπερτασική, η αντιδιαβητική, η αντιυπερχοληστερολεμική και η αντιαθηροσκληρωτική (Anand David et al., 2016). Η κερσετίνη παρουσιάζει επίσης αντικαρκινική δράση, επάγοντας τη δράση προ-αποπτωτικών πρωτεϊνών σε καρκινικά κύτταρα, εμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξή τους (Gibellini et al., 2011; Kellici et al., 2016; Primikyri et al., 2014). Πιο συγκεκριμένα, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η κερσετίνη και τα προϊόντα της αναστέλλουν την ανάπτυξη σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού (Agharour et al., 2018; Li et al., 2018; Wu et al., 2018). Παρόλα αυτά, όπως πολλά φλαβονοειδή έτσι και η κερσετίνη παρουσιάζει χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα και περιορισμένη διαλυτότητα στο νερό (Cai et al., 2013), χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την παρουσία ελεύθερων υδροξυλομάδων. Αυτές οι ομάδες είναι υπεύθυνες για την ευαισθησία που παρουσιάζει η κερσετίνη σε τροποποιήσεις όπως γλυκουρονιδίωση, οξειδωση κ.α. μέσα στον οργανισμό, εμποδίζοντάς την έτσι να περάσει ανέπαφη στη συστηματική κυκλοφορία (Otake et al., 2002). Η επιλεκτική τροποποίηση της κερσετίνης αναμένεται να επηρεάσει τις βιολογικές και φαρμακολογικές της ιδιότητες και να παράγει ανάλογα που μπορεί να είναι χρήσιμα στη μελέτη σχέσεων δομής-δραστικότητας. Για παράδειγμα τα μεθυλιωμένα και ακετυλιωμένα παράγωγα της κερσετίνης είναι περισσότερο σταθερά σε διαδικασίες του μεταβολισμού και παρουσιάζουν υψηλότερη απορρόφηση από το έντερο, οδηγώντας έτσι στη δημιουργία ισχυρότερων βιοδραστικών ενώσεων (Bernini et al., 2011; Rubio et al., 2007; Sakao et al., 2009). Βέβαια, οι υδροξυλομάδες των φλαβονοειδών είναι υψίστης σημασίας για την βιολογική τους δράση, για αυτό το λόγο η τοποεκλεκτική τροποποίηση αυτών των ομάδων αποτελεί την πλέον κατάλληλη προσέγγιση (Heijnen et al., 2001; Kongpichitchoke et al., 2015; Mellou et al., 2005).

Οι λιπάσες είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη κατηγορία ενζύμων για την επιλεκτική βιοτροποποίηση φυσικών ενώσεων με βιολογική δράση (Chebil et al., 2007; Sereti et al., 2001; Theodosiou et al., 2014; Vanΐκονά et al., 2015). Πρόσφατα έχει μελετηθεί, από την ομάδα μας, η επιλεκτική τροποποίηση της κερσετίνης από λιπάση B, σε οργανικό διαλύτη, που οδήγησε στον σχηματισμό τριών ακετυλιωμένων παραγώγων της κερσετίνης. Τα παράγωγα αυτά εμφάνισαν αντιπολλαπλασιαστική δράση σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού (MCF-7, T47D και SKBR-3) (Kyriakou et al., 2018). Είναι αξιοσημείωτο ότι η αντιπολλαπλασιαστική δράση φάνηκε να εξαρτάται από τον βαθμό και την θέση ακετυλίωσης του μορίου της κερσετίνης.

Προκειμένου να δημιουργηθούν οικονομικά ανταγωνιστικές διεργασίες για την εμπορική εκμετάλλευση προϊόντων που προέρχονται από βιοδιεργασίες, αυτές θα πρέπει να επικεντρωθούν σε συστήματα ακινητοποιημένων ενζύμων (DiCosimo et al., 2013). Ανάμεσα από ένα πλήθος φορέων ακινητοποίησης, τα νανοδομημένα υλικά έχουν ξεχωρίσει ως εναλλακτικοί

φορείς για την ακινητοποίηση ενζύμων. Ο λόγος είναι οι άριστες θερμικές και μηχανικές τους ιδιότητες καθώς και η ικανότητά τους να χειρίζονται-τροποποιούν το περιβάλλον των ενζύμων και επομένως την καταλυτική τους λειτουργία και τη σταθερότητά τους (Ahmad and Sardar, 2015b). Τα νανοδομημένα υλικά ενισχύουν την βιοκαταλυτική αποτελεσματικότητα μειώνοντας τους περιορισμούς διάχυσης και αυξάνοντας το ποσοστό ακινητοποίησης του ενζύμου εξαιτίας της μεγάλης επιφάνειας ανά μονάδα μάζας που διαθέτουν. Αυτές οι μοναδικές ιδιότητες των νανοδομημένων υλικών μαζί με άλλες επιθυμητές ιδιότητες, όπως ο μαγνητισμός, δίνουν την δυνατότητα ανάπτυξης αποτελεσματικών νανοβιοκαταλυτών για να εφαρμοστούν σε απλές βιοκαταλυτικές διεργασίες και σε διεργασίες συνεχόμενης ροής (Misson et al., 2015). Τα νανοδομημένα υλικά ιεραρχημένου πορώδους άνθρακα (hierarchically porous carbon materials, HPC), όπως αναφέραμε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια λόγω του καλά καθορισμένου και διασυνδεδεμένου πορώδους που διαθέτουν, με διαφορετικά μήκη που κυμαίνονται από μακροπορώδες (> 50nm), μεσοπορώδες (2-50 nm) και μικροπορώδες (<2 nm). Λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους σε σύγκριση με άλλα νανοϋλικά, όπως το υψηλό ποσοστό επιφάνειας, η μεγάλη χωρητικότητα αποθήκευσης και οι ιδιαίτερες ιδιότητες μεταφοράς μάζας, τα HPC έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορες εφαρμογές, στο πεδίο της νανοτεχνολογίας στην κατάλυση, τον διαχωρισμό, την ανίχνευση, τη βιοϊατρική, την αποθήκευση, καθώς και άλλες βιομηχανικές εφαρμογές (Estevez et al., 2018, 2017, 2013; Sun et al., 2016; Vinu et al., 2007; Xu et al., 2019; Zhou and Hartmann, 2013).

Σε αυτό το κεφάλαιο, με σκοπό την ενζυμική σύνθεση βιοδραστικών ακετυλιωμένων παραγώγων της κερσετίνης, αναπτύχθηκε ένας κενοτόμος μαγνητικός νανο-βιοκαταλύτης, ικανός να καταλύει την επιλεκτική από-ακετυλίωση της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης σε μη υδατικά μέσα (Εικόνα 2.7). Ο νανο-βιοκαταλύτης αναπτύχθηκε μέσω της ομοιοπολικής ακινητοποίησης της λιπάσης από *Pseudozyma (Candida) antarctica* (CaLB), σε υβρικά HPCs που περιέχουν νανοσωματίδια μαγνητικού σιδήρου ((HPCFe). Αυτές οι μαγνητικές νανοδομές, HPCFe, μπορούν εύκολα να διαχωρισθούν με την εφαρμογή ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου (Εικόνα 2.4), διευκολύνοντας την επαναχρησιμοποίηση του βιοκαταλύτη. Για να χαρακτηριστεί, ως προς τη δομή του και την καταλυτική του συμπεριφορά, αυτός ο νανοβιοκαταλύτης που αναπτύχθηκε, χρησιμοποιήθηκαν διάφορες βιοχημικές, φασματοσκοπικές και μικροσκοπικές μέθοδοι. Επιπλέον, μελετήθηκε η ικανότητα του να καταλύει την σύνθεση βιοδραστικών αναλόγων της κερσετίνης μέσω της αντίδρασης από-ακετυλίωσης της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος επιφάνειας απόκρισης (Response surface methodology, RSM) για να βελτιστοποιηθεί η ενζυμική σύνθεση του τρι-ακέτυλου παραγώγου της κερσετίνης (3,5,7-τριακετοξυ-3',4'-διδροξυφλαβόνη, P1). Αυτό το ανάλογο εμφάνισε την υψηλότερη αντιπολλαπλασιαστική δράση, σε ανθρώπινα κύτταρα καρκίνου του μαστού, μεταξύ των υπόλοιπων ακέτυλο παραγώγων της κερσετίνης (Kyriakou et al., 2018).

## **2.2. Υλικά και Μέθοδοι**

### **2.2.1.Υλικά**

#### **2.2.1.1.Βιοκαταλύτες- Ένζυμα**

Σε αυτό το κεφάλαιο χρησιμοποιήθηκε η λιπάση από *Pseudozyma (Candida) antarctica*, Lipozyme CaLB (CaLB) και ήταν ευγενική χορηγία της εταιρείας Novozymes.

#### **2.2.1.2. Υποστρώματα**

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το κεφάλαιο ήταν εμπορικά διαθέσιμα και μη:

- Ο βουτυρικός εστέρας της 4-νιτροφαινόλης (*p*-nitrophenyl butyrate, *p*-NPB) που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο δραστηριότητας της λιπάσης της εταιρείας Merck KGaA.
- Η υπερακετυλιωμένη κερσετίνη συντέθηκε από εμάς σύμφωνα με τους (Kyriakou et al., 2018)(Παράγραφος 2.2.2.8.).

#### **2.2.1.3. Αντιδραστήρια ακινητοποίησης**

- Το χλωρίδιο του 1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)καρβοδιμιδίου (EDC) και
- το N-υδροξυσουκινιμίδιο (NHS) που χρησιμοποιήθηκαν ως παράγοντες σύζευξης αλλά και
- το 4-(20υδροξυαιθυλ)πιπεραζινο-1-αιθανοσουλφονικό οξύ (HEPES) που χρησιμοποιήθηκε ως ρυθμιστικό διάλυμα στην ακινητοποίηση του ενζύμου της εταιρείας Merck KGaA.

#### **2.2.1.4. Διαλύτες**

Οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν κεφάλαιο ήταν όλοι καθαρότητας αναλυτικής βαθμίδας και προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Merck KGaA, Fluka Chemie GmbH και Panreac Quimica SA. Ο δευτεριωμένος διαλύτης διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d<sub>6</sub>) ήταν υψηλής καθαρότητας ≥ 99.9% της εταιρείας Deutero (Kastellaun, Germany).

#### **2.2.1.5. Λοιπά αντιδραστήρια**

- 1-βουτανόλη που χρησιμοποιήθηκε ως δότης ομάδας OH στην αλκοόλυση της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης της εταιρείας PanReac Applichem

### 2.2.1.6. Νανοϋλικά

Νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς ακινητοποίησης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν νανοδομημένα υβριδικά υλικά ιεραρχημένου πορώδους άνθρακα (hierarchically porous carbon materials, HPC) που περιέχουν νανοσωματίδια μαγνητικού σιδήρου (HPCFe). Η παρασκευή και ο χαρακτηρισμός των υβριδικών νανοϋλικών HPCFe πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών του Τμήματος Μηχανικής της Επιστήμης των Υλικών σύμφωνα με τους Estevez et al, (Estevez et al., 2017, 2013), και περιγράφεται στο Παράρτημα II, παράγραφο 1).

### 2.2.1.7. Οργανολογία

- Για τις αναλύσεις πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων ακτίνων Χ (XPS), φασματοσκοπίας υπερύθρου (FTIR) και φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού (CD) χρησιμοποιήθηκε ο εξοπλισμός όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 1, Παράγραφο 1.2.1.7.

## 2.2.2. Μέθοδοι

### 2.2.2.1. Ομοιοπολική ακινητοποίηση της CaLB σε HPCFe

Το ένζυμο CaLB ακινητοποιήθηκε ομοιοπολικά στο υβριδικό μαγνητικό νανοϋλικό HPCFe με τη βοήθεια παραγόντων σύζευξης όπως είναι το EDC και το NHS. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να συνδέσουν τις υδροξυλομάδες και καρβοξυλομάδες του νανοϋλικού με τις ελεύθερες αμινομάδες του ενζύμου (Lau et al., 2014; Sehgal and Vijay, 1994). Για την ακινητοποίηση του ενζύμου έγινε διασπορά 4 mg HPCFe, σε 6 mL διαλύματος HEPES (50 mM, pH 7.0) και το μείγμα επώαστηκε σε λουτρό υπερήχων για 30 min. Μετά τη διασπορά των υβριδικών νανοσωματιδίων, προστέθηκαν 1.2 mL υδατικού διαλύματος EDC (από αρχικό διάλυμα 10 mg mL<sup>-1</sup>) και 2.3 mL υδατικού διαλύματος NHS (από αρχικό διάλυμα 50 mg mL<sup>-1</sup>) και ακολούθησε επώαση του μείγματος στους 30 °C για 30 min υπό ανάδευση. Για να απομακρυνθεί η περίσσια των παραγόντων σύζευξης EDC και NHS, το νανοϋλικό απομακρύνθηκε με την εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου (είτε με φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 10 min) και ακολούθησε έκπλυση, με διάλυμα HEPES (50 mM, pH 7.0), τρεις φορές. Πραγματοποιήθηκε επανα-διασπορά του ενεργοποιημένου πλέον υβριδικού νανοσωματιδίου σε 6 mL διαλύματος HEPES (50 mM, pH 7.0). Στη συνέχεια ακολούθησε η προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων του ενζύμου CaLB (0.3-3mg mL<sup>-1</sup>) και το μείγμα επώαστηκε στους 30 °C για 1h. Ο νανοβιοκαταλύτης που σχηματίστηκε συλλέχθηκε με την εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου (είτε με φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 10 min). Το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε για προσδιορισμό πρωτεϊνικού φορτίου. Για να απομακρυνθεί η περίσσια ενζύμου που δεν ακινητοποιήθηκε ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις με διάλυμα HEPES (50 mM, pH 7.0) και το δείγμα αφυδατώθηκε σε άνυδρο πήκτωμα πυριτίου (silica gel) στους 4 °C. Ο νανοβιοκαταλύτης επισημαίνεται ως HPCFe-CaLB.

### **2.2.2.2. Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων Χ και φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier**

Οι αναλύσεις φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων ακτίνων Χ και φασματοσκοπίας υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 1 στις Παραγράφους 1.2.2.2. και 1.2.2.3.

### **2.2.2.3. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού**

Οι μετρήσεις φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού (Circular dichroism spectroscopy, CD) πραγματοποιήθηκαν σε φασματοπολωσίμετρο Jasco J-1500 (Tokyo, Japan) εξοπλισμένο με σύστημα ρύθμισης θερμοκρασίας Peltier. Η λήψη όλων των φασμάτων πραγματοποιήθηκε σε κυψελίδα χαλαζία, με μήκος διαδρομής 1.0 cm στους 40 °C, με ταχύτητα σάρωσης 50 nm min<sup>-1</sup> και εύρος φάσματος (bandwidth) 2 nm. Σε κάθε περίπτωση έγινε λήψη φάσματος αναφοράς που αφαιρέθηκε από το φάσμα του υπό μελέτη δείγματος. Η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν 5 μg mL<sup>-1</sup> σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, συγκέντρωσης 0.25 mM και pH 7.5. Η συγκέντρωση των μαγνητικών νανοσωματιδίων HPCFe ήταν 25 μg mL<sup>-1</sup> για την ελαχιστοποίηση οποιωνδήποτε οπτικών φαινομένων που θα μπορούσαν να μειώσουν την αναλογία σήματος προς θόρυβο. Κάθε μέτρηση ήταν ο μέσος όρος τουλάχιστον 2 σαρώσεων. Για την επεξεργασία των φασμάτων και τον προσδιορισμό στοιχείων δευτεροταγούς δομής χρησιμοποιήθηκε το πακέτο εφαρμογής Dichroprot βασισμένο στον αλγόριθμο K2D (Pavlidis et al., 2012a).

### **2.2.2.4. Προσδιορισμός απόδοσης ακινητοποίησης**

Για να προσδιοριστεί η απόδοση της ακινητοποίησης υπολογίσθηκε η ποσότητα της πρωτεΐνης στο υπερκείμενο πριν και μετά την διαδικασία της ακινητοποίησης με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976). Η ποσότητα της ακινητοποιημένης CaLB στο νανοϋλικό HPCFe υπολογίστηκε ως η διαφορά της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο υπερκείμενο πριν και μετά την ακινητοποίηση. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

### **2.2.2.5. Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας του νανοβιοκαταλύτη**

Η δραστηριότητα λιπάσης προσδιορίστηκε καταγράφοντας φωτομετρικά την αντίδραση υδρόλυσης του βουτυρικού εστέρα της 4-νιτροφαινόλης (*p*-NPB) στα 405 nm. Σε μια τυπική διαδικασία το μείγμα της αντίδρασης περιέχει 0.01 mg του νανοβιοκαταλύτη HPCFe-CaLB σε τελικό όγκο 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 50 mM, pH 7.5. Η έναρξη της αντίδρασης έγινε με την προσθήκη 1 mM *p*-NPB, διαλυτοποιημένου σε 2-προπανόλη, ακολουθούμενη από επώαση του μείγματος στους 40 °C. Η καταγραφή της απελευθέρωσης της 4-νιτροφαινόλης (*p*-NP) πραγματοποιήθηκε στα 405 nm κάθε 1 min για 10 min. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Ως μία μονάδα ενεργότητας, unit, λιπάσης ορίστηκε η ποσότητα του ενζύμου που καταλύει την απελευθέρωση 1 mmol *p*-NP σε 1 min υπό τις συνθήκες που περιγράφηκαν παραπάνω. Ο συντελεστής απόσβεσης του *p*-NP στα 405 nm, σε pH 7.5 στους 40 °C είναι 12.7 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> όπως προσδιορίστηκε πειραματικά

#### **2.2.2.6. Προσδιορισμός σταθερότητας της CaLB σε οργανικούς διαλύτες**

Η σταθερότητα της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης λιπάσης σε οργανικούς διαλύτες μελετήθηκε επάζοντας 1mg λυοφυλιομένης ή ακινητοποιημένης CaLB σε 1 mL τριτοταγούς-βουτυλο-μεθυλο αιθέρα (MTBE) για διαφορετικά χρονικά διαστήματα, στους 40 °C. Στα υπό μελέτη χρονικά διαστήματα πραγματοποιούνταν δειγματοληψία κατά την οποία λαμβάνονταν 20 μL ενζυμικού διαλύματος, απομακρύνονταν ο διαλύτης με εμφύσηση σταθερού ρεύματος αέριου αζώτου και προσδιοριζόταν η εναπομείνουσα δραστηριότητα όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο 2.2.2.6.

#### **2.2.2.7. Σύνθεση της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης (PQ)**

Η χημική σύνθεση της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους (Kyriakou et al., 2018). Εν συντομία, 200 mg κερσετίνης (0.662 mmol), 1.251 mL οξικού ανυδρίτη (13.23 mmol) και 15 mL πυριδίνης θερμάνθηκαν με αναρροή (reflux) υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Η εξέλιξη της αντίδρασης καταγράφηκε με TLC (σε σύστημα διαλυτών CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH, 99:1). Η αντίδραση τερματίστηκε με προσθήκη παγόνερου (20 g), και το ίζημα ξεπλύθηκε με παγωμένο μείγμα οξικού αιθυλεστέρα και διαιθυλεθέρα. Μετά από ξήρανση υπό κενό προέκυψε ένα ωχροκίτρινο στερεό.

#### **2.2.2.8. Αλκοόλυση της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης από τον νανοβιοκαταλύτη HPCFe-CaLB**

Η αλκοόλυση της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης (PQ) (Εικόνα 2.7.) πραγματοποιήθηκε σε τριτοταγή-βουτυλο-μεθυλο αιθέρα (MTBE) χρησιμοποιώντας τον νανοβιοκαταλύτη HPCFe-CaLB. Πιο αναλυτικά, 0.016 mmol της PQ διαλυτοποιήθηκαν σε 500 μL MTBE, που περιείχαν 0.030 mmol 1-βουτανόλης, (το μείγμα διαλύτη/βουτανόλης είχε αφυδατωθεί με μοριακά κόσκινα 4 Å πριν την χρήση). Στη συνέχεια προστέθηκαν στο μείγμα της αντίδρασης 2 mg mL<sup>-1</sup> του νανοβιοκαταλύτη HPCFe-CaLB και ακολούθησε επώαση στους 40 °C υπό ανάδευση (750 rpm) για 8 h. Με το πέρας των 8 h, ο νανοβιοκαταλύτης διαχωρίστηκε από το μείγμα με την εφαρμογή μαγνητικού πεδίου. Ο οργανικός διαλύτης απομακρύνθηκε με εμφύσηση σταθερού ρεύματος αέριου αζώτου και η αντίδραση αναλύθηκε με NMR ή με HPLC όπως περιγράφεται στις αντίστοιχες παραγράφους.

#### **2.2.2.9. Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης**

Για την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης και των ακετυλιωμένων παραγώγων της κερσετίνης χρησιμοποιήθηκε συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (High performance liquid chromatography, HPLC) Shimadzu (Kyoto, Japan), με ανιχνευτή παράταξης φωτοδιοδίων. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε στήλη ανάστροφης φάσης, C18 (μBondapak) της εταιρείας Waters (Ιρλανδία) με διαστάσεις 3.9 x 300 mm, μέγεθος σωματιδίων 10 μm και μέγεθος πόρων 125 Å. Για την έκλυση των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε σύστημα βαθμιδωτής εναλλαγής φάσης. Οι αρχικές συνθήκες της κινητής φάσης ήταν 10:90 % (v/v) ακετονιτρίλιο/H<sub>2</sub>O (με 0.1 % οξικό οξύ) και το σύστημα έκλυσης είχε ως εξής: 0–25min, 100–0% (v/v) ακετονιτρίλιο/H<sub>2</sub>O, στους 27 °C, με σταθερή ροή 1 mL min<sup>-1</sup> ενώ η ανίχνευση έγινε στα 254 nm (Kyriakou et al., 2018).



### 2.2.2.10. Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός

Η δομή των ακετυλιωμένων παραγώγων της κερσετίνης προσδιορίστηκε με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) και πιο συγκεκριμένα με τη λήψη φασμάτων 1D  $^1\text{H-NMR}$  και 2D  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  HSQC-HMBC NMR (Κυριακού et al., 2018). Η % μετατροπή της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης καθώς και η % απόδοση σχηματισμού των ακετυλιωμένων προϊόντων προσδιορίστηκε με  $^1\text{H-NMR}$  (Παράρτημα II, παράγραφο 4). Μετά τον τερματισμό της αντίδρασης απομακρύνθηκε, ο βιοκαταλύτης με την εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου (ή με φιλτράρισμα) και ο διαλύτης με εμφύσηση σταθερού ρεύματος αέριου αζώτου. Στη συνέχεια τα δείγματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 500  $\mu\text{L}$  DMSO- $d_6$  και μεταφέρθηκαν σε σωληνάκια NMR 5 mm. Η λήψη φασμάτων NMR πραγματοποιήθηκε στο φασματογράφο NMR Bruker AV-500 στους 298 K.

### 2.2.2.11. Πειραματικός σχεδιασμός και στατιστική ανάλυση

Η μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM) χρησιμοποιήθηκε για την βελτιστοποίηση της τοποεκλεκτικής σύνθεσης του ακετυλιωμένου αναλόγου της κερσετίνης P1 (Εικόνα 2.7) μέσω της αλκοόλυσης της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης (PQ). Η συγκέντρωση του αναλόγου P1 καθώς και το % ποσοστό μετατροπής της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης μοντελοποιήθηκαν συναρτήσει διαφόρων παραγόντων.

Η διεξαγωγή των πειραμάτων βασίστηκε σε ένα σύνθετο κεντρικό σχεδιασμό (Central Composite Face Design, CCF) που περιγράφεται από τρία επίπεδα-τριών μεταβλητών και αποτελείται από ένα παραγοντικό σχεδιασμό (factorial design) και από ακραία σημεία που βρίσκονται στην επιφάνεια των εδρών του κύβου του πειραματικού σχεδιασμού (Design region) (MODDE 7.0, Umetrics AB, Umeå, Sweden). Ο σχεδιασμός περιλαμβάνει 17 πειράματα (14 παραγοντικά σημεία και 3 κεντρικά). Επιλέχθηκαν τρεις ανεξάρτητες μεταβλητές, η συγκέντρωση του ενζύμου, η μοριακή αναλογία υποστρωμάτων (1-βουτανόλη:PQ) και ο χρόνος αντίδρασης, ως οι πιο σημαντικοί παράμετροι για να μελετηθεί η επίδρασή τους στην σύνθεση του αναλόγου P1, από την αλκοόλυση της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης.

Το εύρος τιμών των μεταβλητών που μελετήθηκαν (τα επίπεδα τους κωδικοποιούνται ως -1, 0 και 1), καθώς και οι πειραματικές τιμές της απόκρισης (συγκέντρωση του αναλόγου P1 και της % μετατροπής της PQ) παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.. Προκειμένου να εκτιμηθεί το καθαρό σφάλμα, στα κεντρικά σημεία πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις (πειράματα 15-17). Η ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA) για τον πειραματικό σχεδιασμό παρουσιάζεται στους Πίνακες 2.3. και 2.4.

Πολλαπλή ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης (multiple linear regression, MLR) πραγματοποιήθηκε (MODDE 7.0, Umetrics AB, Umeå, Sweden) ώστε οι πειραματικές τιμές της απόκρισης να αποδοθούν από το ακόλουθο τετραγωνικό πολυωνυμικό μοντέλο:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j>i}^3 \beta_{ij} x_i x_j \quad (2.2.)$$

όπου  $y$  είναι η απόκριση,  $x_i$  και  $x_j$  οι ανεξάρτητες μεταβλητές και  $\beta_0$ ,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  και  $\beta_{ij}$  οι συντελεστές παλινδρόμησης του μοντέλου (τομή, γραμμικό, δευτεροβάθμιος και συντελεστές αλληλεπίδρασης, αντίστοιχα).

Τέλος, σχεδιάστηκαν επιφάνειες απόκρισης και διαγράμματα ισοϋψών για να απεικονίσουν τις κύριες και διαδραστικές επιδράσεις των παραμέτρων στις αποκρίσεις καθώς και τις βέλτιστες συνθήκες για τη σύνθεση του αναλόγου P1. Ο προσδιορισμός των παραμέτρων της αντίδρασης για την επίτευξη της μέγιστης συγκέντρωσης του αναλόγου P1 έγινε με χρήση της αριθμητικής λειτουργίας βελτιστοποίησης του λογισμικού (software's numerical optimization function). Η % απόδοση μετατροπής της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης επίσης υπολογίστηκε από την εξίσωση (2.4) σε αυτές τις βέλτιστες συνθήκες.

#### **2.2.2.12. Μελέτη επαναχρησιμοποίησης της ακινητοποιημένης CaLB σε HPCFe**

Για την μελέτη επαναχρησιμοποίησης του νανοβιοκαταλύτη HPCFe-CaLB χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση αλκοόλυσης της PQ στις βέλτιστες συνθήκες (όπως προσδιορίστηκαν από την ανάλυση RSM). Αρχικά 0.015 mmol της PQ διαλυτοποιήθηκαν σε 500  $\mu\text{L}$  MTBE. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2.9  $\text{mg mL}^{-1}$  HPCFe-CaLB και 0.027 mmol 1-βουτανόλης. Το μείγμα της αντίδρασης επωάστηκε στους 40°C υπό ανάδευση (750 rpm) για 4.3 h. Με το πέρας των 4.3 h, το ένζυμο διαχωρίστηκε από το μείγμα με την εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου (ή με φιλτράρισμα) και το μείγμα αναλύθηκε με HPLC. Μετά από κάθε κύκλο αντίδρασης πραγματοποιήθηκαν πλύσεις του νανοβιοκαταλύτη με MTBE ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα υποστρωμάτων και προϊόντων και ο νανοβιοκαταλύτης επαναχρησιμοποιήθηκε σε φρέσκο μείγμα αντίδρασης.

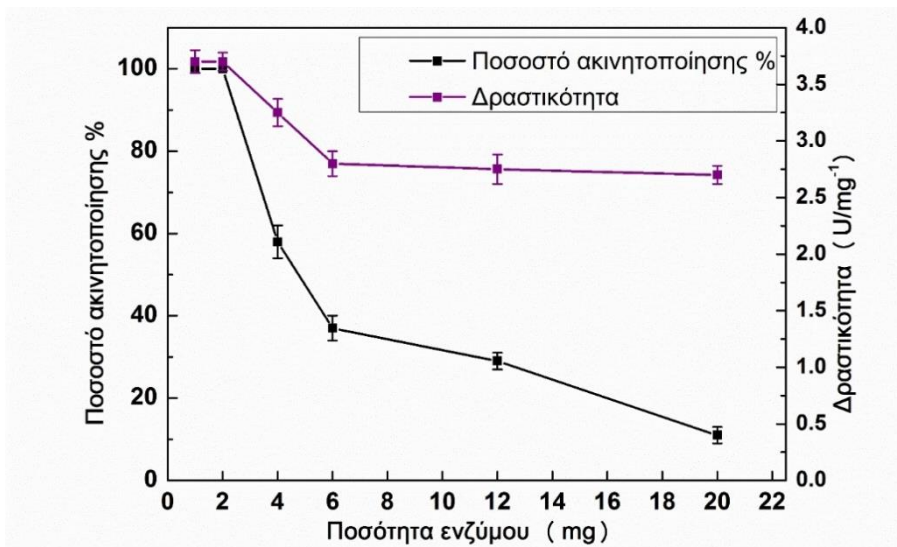
## 2.3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

### 2.3.1. Προετοιμασία και χαρακτηρισμός του νανοβιοκαταλύτη HPCFe-CaLB

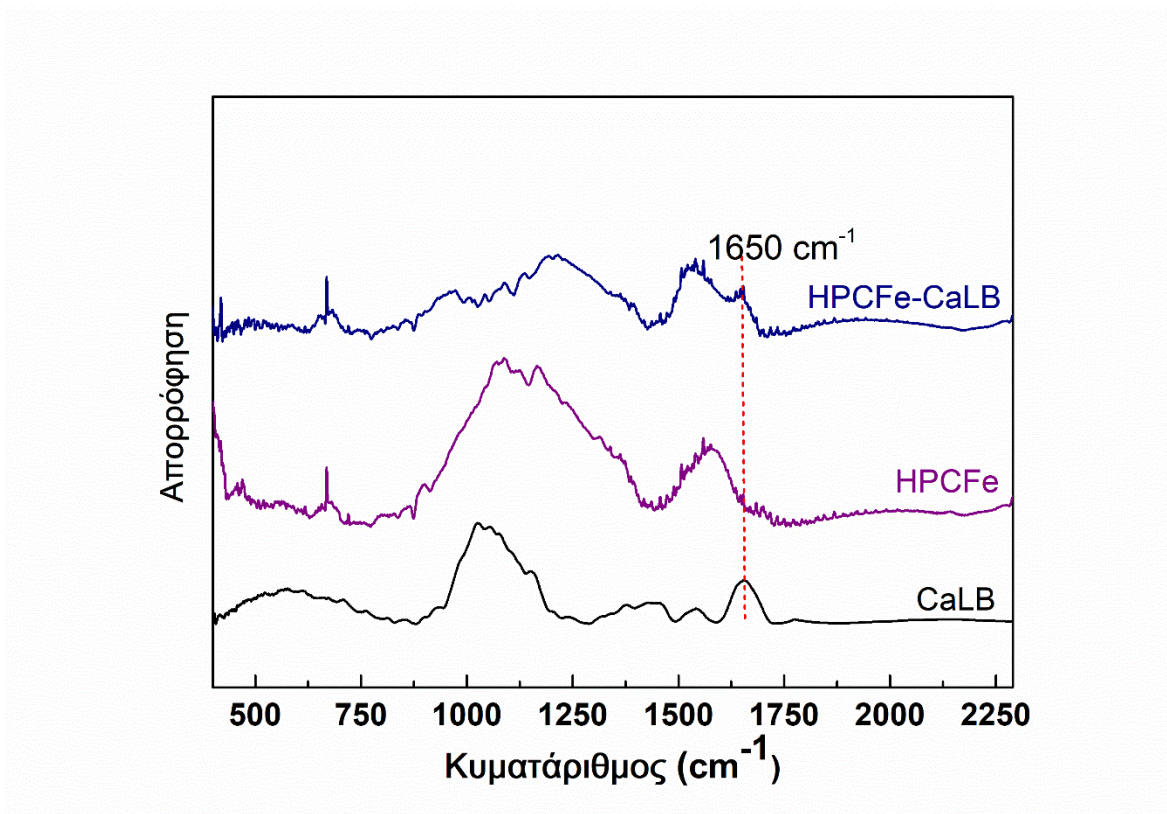
Σε αυτό το κεφάλαιο περιγράφεται η ανάπτυξη ενός νανοβιοκαταλύτη με δράση λιπάσης μέσω της ακινητοποίησης της CaLB σε μαγνητικά νανοδομημένα υλικά ιεραρχημένου πορώδους άνθρακα, HPCFe. Το ένζυμο ακινητοποιήθηκε ομοιοπολικά στις ελεύθερες καρβοξυλομάδες και υδροξυλομάδες του υλικού χρησιμοποιώντας ως παράγοντα σύζευξης το EDC.

Η απόδοση της ακινητοποίησης και η καταλυτική δραστηριότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.1. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η απόδοση της ακινητοποίησης καθώς και η καταλυτική δραστηριότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου φαίνεται να εξαρτώνται-επηρεάζονται έντονα από τον λόγο μάζας του ενζύμου προς το υλικό. Το υψηλότερο ποσοστό ακινητοποίησης, ~100 %, που παρατηρήθηκε για χαμηλό λόγο μάζας ενζύμου προς υλικό, είναι σημαντικά υψηλότερο σε σύγκριση με τα ποσοστά ακινητοποίησης που έχουν παρατηρηθεί κατά την ακινητοποίηση της CaLB σε άλλα υλικά (Pavlidis et al., 2012b; Tziaila et al., 2010). Το ποσοστό ακινητοποίησης του ενζύμου μειώνεται όσο αυξάνεται ο λόγος μάζας ενζύμου-υλικού. Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να συσχετιστούν με την περιορισμένη διαθεσιμότητα υδροξυλομάδων και καρβοξυλομάδων που είναι απαραίτητες για την ομοιοπολική σύνδεση του ενζύμου στο νανοδομημένο υλικό HPCFe. Επιπλέον, καθώς ο λόγος μάζας ενζύμου-υλικού αυξάνεται η καταλυτική δραστηριότητα της ακινητοποιημένης CaLB μειώνεται, όμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί και σε άλλα συστήματα ενζύμου-φορέα ακινητοποίησης (Wang et al., 2010). Αυτή η παρατήρηση θα μπορούσε να αποδοθεί στο σχηματισμό μιας διαμοριακής παρεμπόδισης που δημιουργείται από την υψηλή ποσότητα ενζύμου που έχει συνδεθεί στο νανοϋλικό και περιορίζει τη διάχυση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ακινητοποιημένου ενζύμου (Hu et al., 2009; Wang et al., 2010).

Για να επιβεβαιωθεί η παρουσία του ενζύμου στο νανοϋλικό μετά την ακινητοποίηση χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία FTIR. Το φάσμα της ελεύθερης CaLB (Εικόνα 2.2) είναι ένα τυπικό φάσμα πρωτεΐνης που εμφανίζει μία κορυφή απορρόφησης στα  $1650\text{ cm}^{-1}$ . Η κορυφή αυτή σχετίζεται με την περιοχή χαρακτηριστική Amide I και προέρχεται από τις δονήσεις έκτασης του C=O του πεπτιδικού δεσμού και συνδέεται άμεσα με τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης και πιο συγκεκριμένα με την δευτεροταγή δομή (α-έλικα, β-φύλλα, β-στροφές, τυχαίο σπείραμα). Το δείγμα του νανοβιοκαταλύτη HPCFe-CaLB εμφάνισε επίσης την κορυφή της περιοχής χαρακτηριστική Amide I στα  $1650\text{ cm}^{-1}$ , επιβεβαιώνοντας την επιτυχή ακινητοποίηση του ενζύμου στο νανοϋλικό HPCFe.

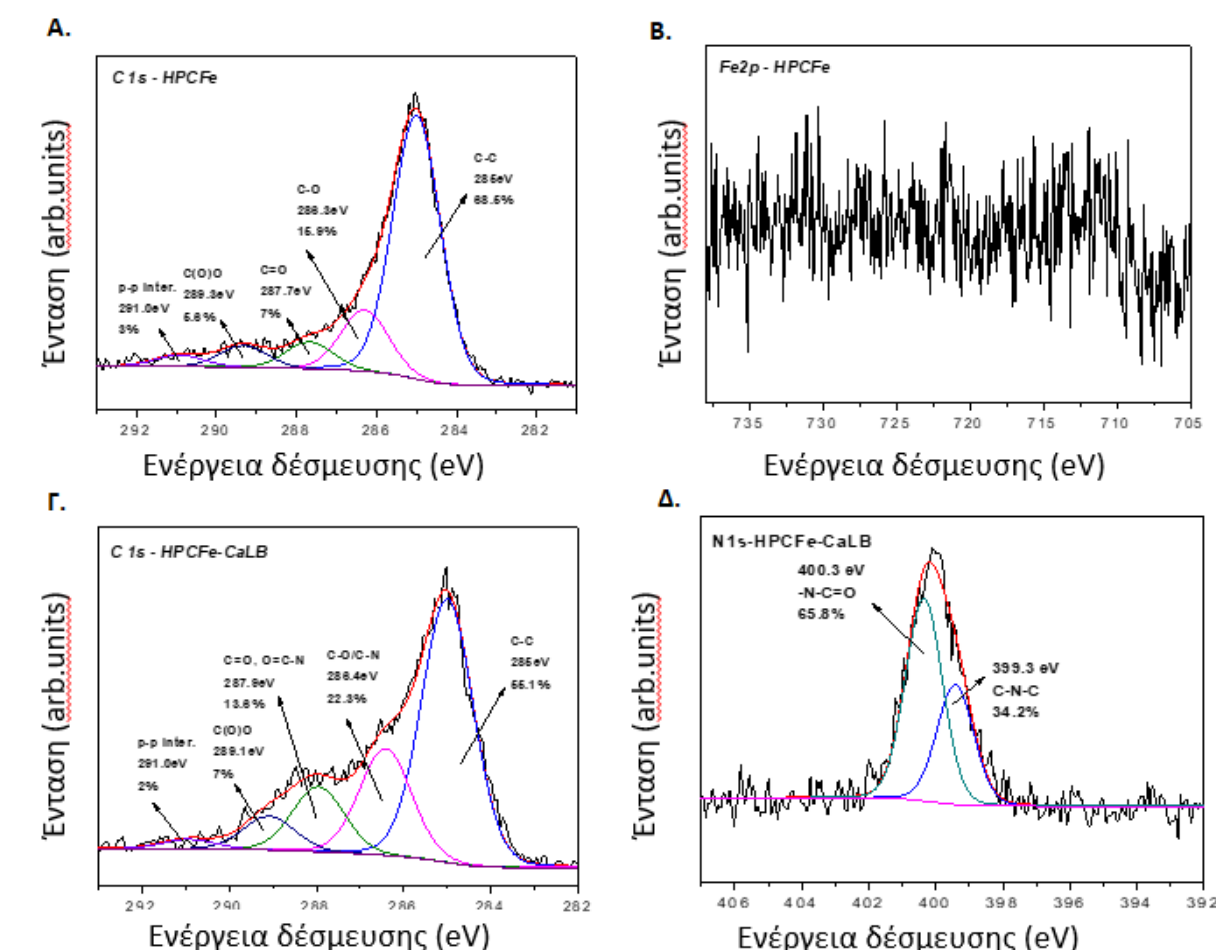


**Εικόνα 2.1.** Επίδραση της ποσότητας του ενζύμου στο % ποσοστό ακινητοποίησης και στην καταλυτική δραστικότητα του νανοβιοκαταλύτη, για σταθερή ποσότητα νανοϋλικού (4 mg).



**Εικόνα 2.2.** Φάσμα FTIR του νανοβιοκαταλύτη HPCFe-CaLB σε σύγκριση με τα φάσματα της ελεύθερης CaLB και του νανοφορέα HPCFe.

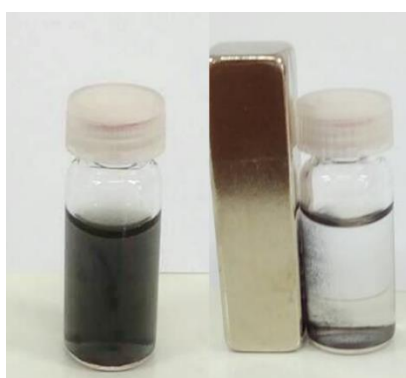
Για να διερευνηθεί ο τρόπος με τον οποίο ακινητοποιήθηκε το ένζυμο στο νανοϋλικό χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία XPS. Πιο συγκεκριμένα η φασματοσκοπία XPS μπορεί να παρέχει ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες σχετικές με την στοιχειακή σύσταση του νανοβιοκαταλύτη. Συγκρίνοντας το φάσμα φωτοηλεκτρονίων C1s του νανοϋλικού HPCFe και του νανοβιοκαταλύτη HPCFe-CaLB (Εικόνα 2.3 Α και Γ) διακρίνονται διαφορές στις χημικές ομάδες εξαιτίας της ακινητοποίησης της CaLB στο νανοϋλικό. Οι ομάδες C-O αυξήθηκαν από 15.9 για το υλικό HPCFe σε 22.3 για τον νανοβιοκαταλύτη εξαιτίας της ύπαρξης των δεσμών C-N του ενζύμου. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε αύξηση στο ποσοστό των ομάδων C=O (από 7 % σε 13.6 %) και καρβοξυλομάδων (από 5.6% σε 7%). Η μικρή μετατόπιση που παρατηρήθηκε στην κορυφή των ομάδων C=O από 287.7 eV σε 287.9 eV σε συνδυασμό με την σημαντική αύξηση του ποσοστού αυτών των κορυφών συνεπάγεται την ύπαρξη αμιδικών δεσμών (O=C-N) (Awada et al., 2012; Tawil et al., 2013) εξαιτίας της ομοιοπολικής σύνδεσης των αμινομάδων της CaLB με τις υδροξυλομάδες και καρβοξυλομάδες του νανοϋλικού HPCFe, επιβεβαιώνοντας την επιτυχή ακινητοποίηση του ενζύμου στο νανοϋλικό.



**Εικόνα 2.3.** Φάσμα φωτοεκπομπής X-ray των Α) C 1s HPCFe, Β) Fe 2p HPCFe, Γ) C 1s of HPCFe-CaLB, και Δ) N1s of HPCFe-CaLB

Από τις κορυφές φωτοηλεκτρονίων N1s (Εικόνα 3 Δ) συμπεραίνεται η ύπαρξη δύο τύπων αμιδικού δεσμού: ο ένας τύπος, στα 399.3 eV, σχετίζεται με τους δεσμούς C-N του ενζύμου που αντιπροσωπεύουν το 34.2 % της συνολικής ποσότητας του αζώτου, ενώ στα 400.3 eV (He et al., 2017; Ruelle et al., 2007) εμφανίζεται η κορυφή λόγω του σχηματισμού αμιδίου που αλληλεπιδρά με τις υδροξυλομάδες και καρβοξυλομάδες του νανοϋλικού HPCFe, επιβεβαιώνοντας την επιτυχή ακινητοποίηση και τον τύπο σύνδεσης του ενζύμου με το πορώδες νανοϋλικό.

Στην Εικόνα 2.4 παρουσιάζεται η επιτυχής ενσωμάτωση των μαγνητικών νανοσωματιδίων Fe στη πορώδη δομή του υλικού HPC. Ο νανοβιοκαταλύτης HPCFe-CaLB μαγνητίζεται αποτελεσματικά σε υδατικό διάλυμα μέσω χρήσης απλού μαγνήτη.



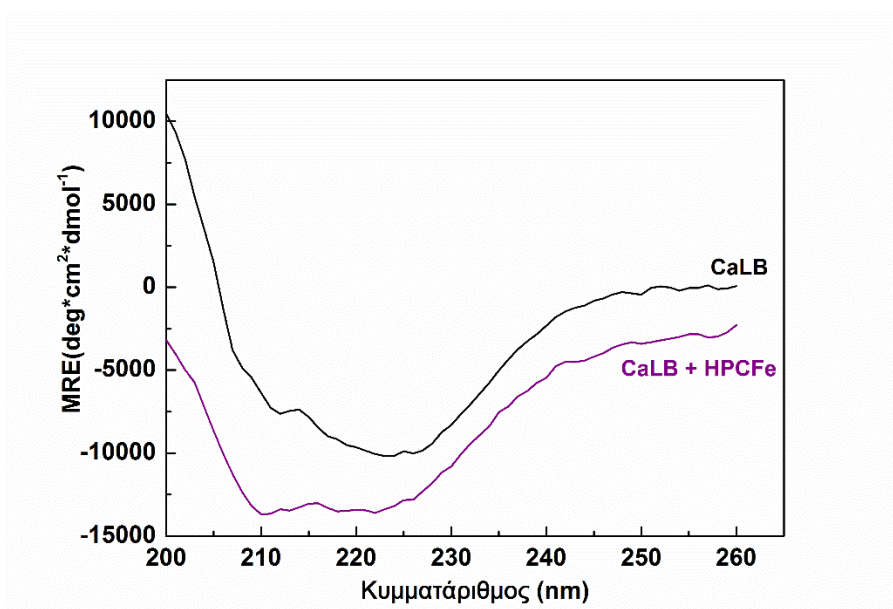
**Εικόνα 2.4.** Μαγνητικός διαχωρισμός του νανοβιοκαταλύτη HPCFe-CaLB σε υδατικό διάλυμα.

### 2.3.2. Δομικές μελέτες της ακινητοποιημένης λιπάσης

Οι δομικές αλλαγές του ενζύμου μετά την ακινητοποίησή του στα νανοδομημένα υλικά HPCFe σε σύγκριση με την δομή του ελεύθερου ενζύμου μελετήθηκαν με τις φασματοσκοπίες FTIR και CD. Προκειμένου να αξιολογηθούν οι διαφορές μεταξύ των FTIR φασμάτων της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης CaLB, συγκρίθηκε η τιμή του συντελεστή συσχέτισης  $r$  (Chiaradia et al., 2016; Secundo et al., 2007; Tziaila et al., 2010). Όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο 2.2.2.3. για τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης  $r$ , χρησιμοποιείται η περιοχή Amide I ( $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ ) του φάσματος, που σχετίζεται άμεσα με την δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο συντελεστής  $r$  για τον νανοβιοκαταλύτη HPCFe-CaLB ήταν 0.98, το οποίο υποδεικνύει ότι η δομή του ενζύμου δεν μεταβλήθηκε ιδιαίτερα μετά την ακινητοποίηση.

Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθούν περαιτέρω η δομικές αλλαγές της ακινητοποιημένης CaLB, σε υδατικό διάλυμα (σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, 0.25 mM pH 7.5), κατά την αλληλεπίδρασή της με το νανοϋλικό HPCFe. Για να υπολογισθεί η δευτεροταγή δομή του ενζύμου επιβεβαιώθηκε ότι το νανοϋλικό HPCFe δεν συμβάλει στο φάσμα CD. Το φάσμα CD υπεριώθρου (far-UV) του ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα εμφανίζει δύο αρνητικές κορυφές με μέγιστη τιμή γύρω στα 222 και 210 nm (Εικόνα 2.5.), οι οποίες σχετίζονται με τη δομή  $\alpha$ -έλικας, η οποία αποτελεί το κύριο στοιχείο δευτεροταγούς δομής της CaLB (37 % σύμφωνα με κρυσταλλογραφικά δεδομένα)(Rabbani et al., 2015;

Uppenberg et al., 1994). Η ανάλυση των φασμάτων κυκλικού διχρωισμού επιβεβαίωσε ότι το νανοϋλικό HPCFe προκαλεί περιορισμένες διαμορφωτικές αλλαγές στο ένζυμο (Πίνακας 2.1). Η περιεκτικότητα του στοιχείου της  $\alpha$ -έλικας είναι ένας καλός δείκτης της σωστής αναδίπλωσης του ενζύμου (η μη μεταβολή του ποσοστού της  $\alpha$ -έλικας δεν εγγυάται ότι το ένζυμο είναι δραστικό παρόλα αυτά η απώλεια αυτού του στοιχείου οδηγεί στην απενεργοποίηση του ενζύμου). Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 2.1 παρατηρείται μια μικρή αύξηση στην περιεκτικότητα της δομής σε  $\alpha$ -έλικα και μία μικρή μείωση σε περιεκτικότητα σε  $\beta$ -φύλλα που μπορούν να συσχετιστούν με ειδικές αλληλεπιδράσεις του μορίου του ενζύμου με το υβριδικό νανοϋλικό. Αυτή η μικρή αύξηση της περιεκτικότητας σε  $\alpha$ -έλικα έχει παρατηρηθεί και κατά την ακινητοποίηση της CaLB σε οργανοτροποποιημένους αργίλους και μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη υδροφοβικότητα του νανοϋλικού (Tziaila et al., 2010). Όπως έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά η αυξημένη υδροφοβικότητα των υποστρωμάτων ακινητοποίησης ενός ενζύμου μπορεί να οδηγήσει στην αύξηση της περιεκτικότητας σε  $\alpha$ -έλικα και στην ενίσχυση της καταλυτικής δράσης του ενζύμου (Mena et al., 2008). Αντίθετα αποτελέσματα έχουν βρεθεί κατά την αλληλεπίδραση αυτού του ενζύμου με νανοσωληνές άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων και με οξείδιο του γραφενίου (Pavlidis et al., 2012a, 2012b).



**Εικόνα 2.5.** CD φάσμα της CaLB ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) σε ρυθμιστικό διάλυμα και παρουσία του νανοϋλικού HPCFe σε συγκέντρωση  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$

**Πίνακας 2.1.** Ποσοτική εκτίμηση (%) των στοιχείων δευτεροταγούς δομής της CaLB, από τα αντίστοιχα φάσματα CD, σε ρυθμιστικό διάλυμα και παρουσία 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  HPCFe.

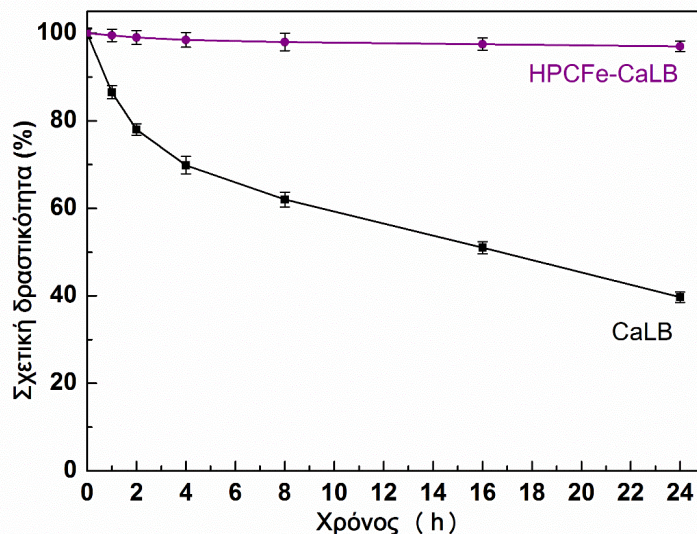
Δείγμα		$\alpha$ -έλικα %	$\beta$ -φύλλα %	Άλλα
CaLB	Ρυθμιστικό δ/μα	34	18	48
	HPCFe	35	15	50

### 2.3.3. Βελτιστοποίηση της σύνθεσης του αναλόγου 3,5,7-τριακετοξυ-3',4'-διυδροξυφλαβόνης (P1) με την χρήση της μεθοδολογίας επιφάνειας απόκρισης.

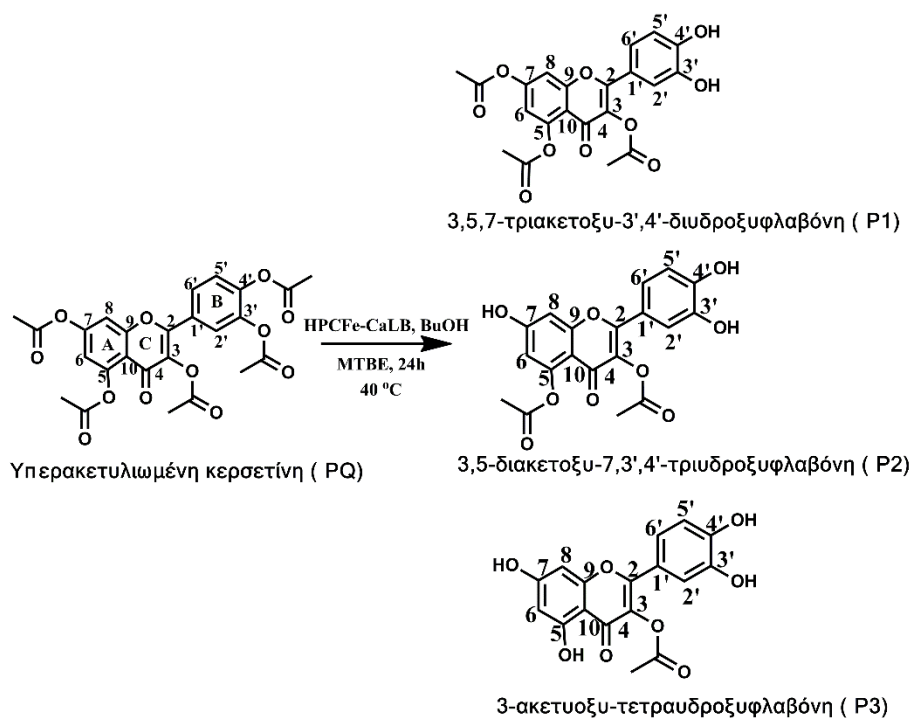
Η ικανότητα του νανοβιοκαταλύτη HPCFe-CaLB να καταλύει την αλκοόλυση της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης (PQ) για την σύνθεση βιοενεργών ακετυλιωμένων παραγώγων μελετήθηκε σε διάφορους οργανικούς διαλύτες όπως σε τριτοταγής αμυλ-αλκοόλη, ακετονιτρίλιο, τριτοταγής βουτυλο-μεθυλο αιθέρα, και εξάνιο. Ο νανοβιοκαταλύτης εμφάνιζε πολύ καλή διασπορά σε όλους τους διαλύτες. Ο υψηλότερος ρυθμός μετατροπής ( $6 \text{ mM h}^{-1}$  ανά  $\text{mg}$  νανοβιοκαταλύτη) της αλκοόλυσης της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης παρατηρήθηκε στον τριτοταγή βουτυλο-μεθυλο αιθέρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο ρυθμός μετατροπής ήταν περίπου 5 φορές υψηλότερος από αυτόν που παρατηρήθηκε όταν ως βιοκαταλύτης χρησιμοποιήθηκε η κοινώς χρησιμοποιούμενη CaLB Novozyme 435 στις ίδιες συνθήκες αντίδρασης (Kyriakou et al., 2018). Αυτό το ενδιαφέρον αποτέλεσμα θα μπορούσε να εξηγηθεί αφενός, από την υψηλότερη περιεκτικότητα σε ένζυμο του νανοβιοκαταλύτη HPCFe-CaLB ( $\sim 0.3 \text{ mg}$  ένζυμο ανά  $\text{mg}$  νανοβιοκαταλύτη) σε σύγκριση με το εμπορικό σκεύασμα ( $\sim 0.1 \text{ mg}$  ένζυμο ανά  $\text{mg}$  βιοκαταλύτη) και αφετέρου, από την καλύτερη διασπορά του νανοβιοκαταλύτη στο μέσο της αντίδρασης. Επιπλέον, η παρουσία του πολύ καλά καθορισμένου μακροπορώδους και του διασυνδεδεμένου μέσο- και μικρο-πορώδους στο υβριδικό νανοϋλικό HPCFe, αναμένεται να προσφέρει υψηλή επιφάνεια και ανώτερη μεταφορά μάζας των υποστρωμάτων και των προϊόντων προς και από το ακινητοποιημένο ένζυμο, διευκολύνοντας την βιοκαταλυτική διεργασία (Parlett et al., 2013).

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ο νανοβιοκαταλύτης HPCFe-CaLB παρουσιάζει άριστη σταθερότητα στον τριτοταγή βουτυλο-μεθυλο αιθέρα, καθώς διατηρεί σχεδόν το 100 % της αρχικής καταλυτικής δραστητικότητάς του ακόμα και μετά από 24 h επώασης στους 40 °C. Το μη ακινητοποιημένο ένζυμο στις ίδιες συνθήκες διατήρησε μόλις το 40 % της αρχικής καταλυτικής δραστητικότητάς του (Εικόνα 2.6).





**Εικόνα 2.6.** Σταθερότητα της ελεύθερης και ακινητοποιημένης σε HPCFe CaLB, σε MTBE στους 40 °C. Ως 100 % ορίζεται η καταλυτική δραστηριότητα της CaLB σε t = 0h.

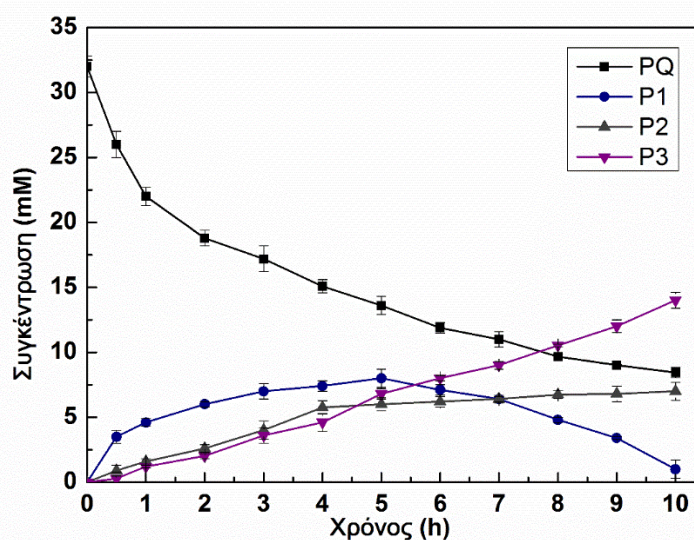


**Εικόνα 2.7.** Ενζυμική αλκοόλυση της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης που καταλύεται από τον νανοβιοκαταλύτη HPCFe-CaLB.

Κατά την ενζυμική αλκοόλυση της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης που καταλύεται από τον νανοβιοκαταλύτη HPCFe-CaLB, ανιχνεύονται τρία προϊόντα με ανάλυση HPLC και NMR (Παράρτημα II, παράγραφοι 3 και 4). Η δομή αυτών των προϊόντων προσδιορίστηκε με ανάλυση NMR όπως περιγράφηκε στην παράγραφο Γλυκά και Μέθοδοι. Η ανάλυση έδειξε ότι τα προϊόντα είναι μερικώς ακετυλιωμένα παράγωγα της κερσετίνης και πιο συγκεκριμένα είναι τα: 3,5,7-

τριακετοξυ-3',4'-διυδροξυφλαβόνη (P1), 3,5-διακετοξυ-7,3',4'-τριυδροξυφλαβόνη (P2) και 3-ακετοξυ-τετραυδροξυφλαβόνη (P3) αντίστοιχα (Εικόνα 2.7). Ο πλήρης χαρακτηρισμός των παραπάνω προϊόντων με NMR δίνεται επίσης στο Παράρτημα II.

Η εξέλιξη της αντίδρασης και ο σχηματισμός των προϊόντων καταγράφηκε με φασματοσκοπία NMR. Η ανάλυση των φασμάτων <sup>1</sup>H-NMR έδειξε ότι αρχικά διασπώνται οι ακέτυλο ομάδες στις θέσεις C4' και C3' της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης σχηματίζοντας το τριακετυλιωμένο παράγωγο, P1. Καθώς η αντίδραση εξελίσσεται, λαμβάνει χώρα η διάσπαση των ακετυλο ομάδων στις θέσεις C7 και C5 σχηματίζοντας το διακετυλιωμένο και μονοακετυλιωμένο παράγωγο P2 και P3 αντίστοιχα, ενώ ταυτόχρονα μειώνεται η ποσότητα του παραγώγου P1 (Εικόνα 2.8). Στην Εικόνα 2.8. απεικονίζεται ο σχηματισμός των τριών προϊόντων που προκύπτουν από την αλκοόλυση της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης, σε συνάρτηση με τον χρόνο. Όπως φαίνεται, ο σχηματισμός των διακετυλο (P2) και μονο ακέτυλο (P3) παραγώγων συνδέεται με την κατανάλωση του τριακέτυλο παραγώγου (P1).



**Εικόνα 2.8.** Η εξέλιξη της αντίδρασης της ενζυμικής αλκοόλυσης της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης (32 mM) με 1-βουτανόλη (60 mM) που καταλύεται από τον HPCFe-CaLB σε MTBE στους 40 °C. Υπερακετυλιωμένη κερσετίνη (PQ), 3,5,7-τριακετοξυ-3',4'-διυδροξυφλαβόνη (P1), 3,5-διακετοξυ-7,3',4'-τριυδροξυφλαβόνη (P2) και 3-ακετοξυ-τετραυδροξυφλαβόνη (P3)

Το τριακετυλιωμένο παράγωγο (P1) της κερσετίνης έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζει υψηλότερη αντιπολλαπλασιαστική δράση σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές σε σχέση με την κερσετίνη, την υπερακετυλιωμένη κερσετίνη και τα υπόλοιπα ακετυλιωμένα παράγωγα που σχηματίστηκαν (P2 and P3) (Κυριακού et al., 2018). Η μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (RSM) χρησιμοποιήθηκε για την βελτιστοποίηση την ενζυμικής σύνθεσης του αναλόγου P1 με την ενισχυμένη βιολογική δράση, ως συνάρτηση διαφόρων παραμέτρων της αντίδρασης όπως ο χρόνος αντίδρασης (RT), η μοριακή αναλογία (MR) των υποστρωμάτων (1-βουτανόλη: PQ) και η συγκέντρωση του ενζύμου (E). Στον Πίνακα 2.2 παρουσιάζετε ο πλήρης πειραματικός σχεδιασμός της μελέτης, καθώς και οι παρατηρούμενες και προβλεπόμενες τιμές των αποκρίσεων του σχεδιασμού.

Για να περιγραφεί τόσο η συγκέντρωση του παραγώγου P1 στον μείγμα της αντίδρασης όσο και % μετατροπή της PQ ως συνάρτηση των παραγώγων που χρησιμοποιούνται στον πειραματικό σχεδιασμό, ένα τετραγωνικό πολυωνυμικό μοντέλο προσαρμόστηκε στις αντίστοιχες πειραματικές τιμές των αποκρίσεων. Τα εμπειρικά μοντέλα που προέκυψαν, μετά την εκτίμηση των συντελεστών παλινδρόμησης της εξίσωσης (2.2) μέσω ανάλυσης πολλαπλής γραμμικής παλινδρομικής, περιγράφονται από τις εξισώσεις (2.3) και (2.4):

$$y_{P1} = -0,896 + 1,185E + 0,010MR + 1,134RT - 0,160E^2 - 0,098RT^2 + 0,094E*MR - 0,107E*RT \quad (2.3)$$

όπου,  $y_{P1}$  είναι η συγκέντρωση του αναλόγου P1

$$y_T = -17,052 + 31,377E + 2,650MR + 7,237RT - 6,307E^2 - 0,387RT^2 + 0,822E*RT \quad (2.4)$$

όπου,  $y_T$  είναι η % μετατροπή του PQ κατά την ενζυμική της αλκοόλυση.

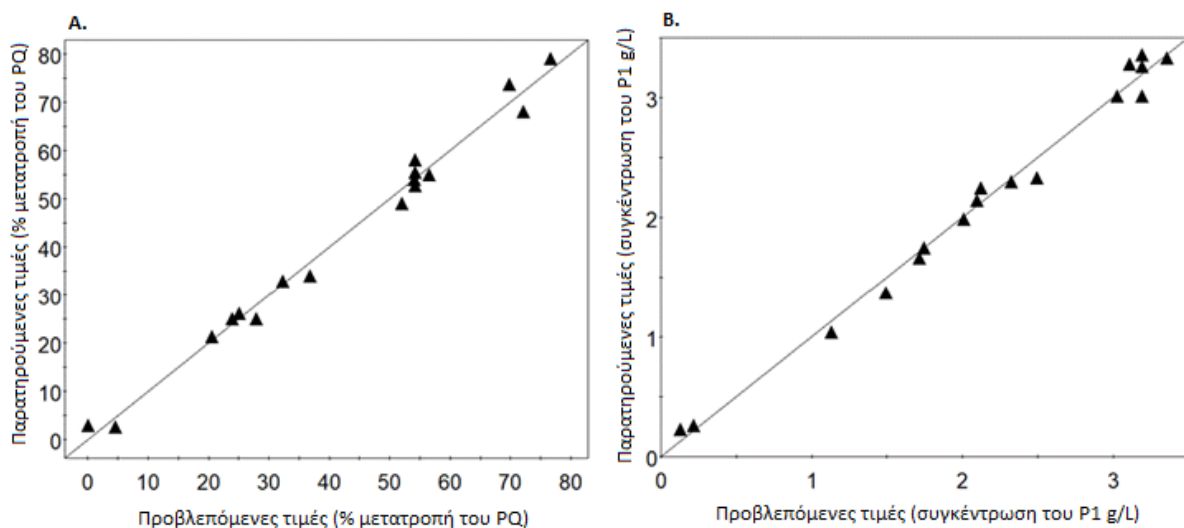
Όλοι οι συντελεστές των εξισώσεων (2.3) και (2.4) προσδιορίστηκαν σε ένα διάστημα εμπιστοσύνης 95% με τιμή-p <0.05. Οι όροι  $MR^2$  και  $RT * MR$  δεν περιλαμβάνονται στην εξίσωση (2.3), καθώς δεν ήταν στατιστικά σημαντικοί (τιμή-p > 0.05). Ομοίως, οι όροι  $MR^2$ ,  $RT * MR$  και  $E * MR$  παραλείπονται από την εξίσωση (2.4). Το κλάσμα της απόκλισης της απόκρισης που μπορεί να προβλεφθεί από το μοντέλο ( $Q^2$ ) εκτιμήθηκε ως 0.96 και στις δύο περιπτώσεις, ενώ οι συντελεστές συσχέτισης  $R^2$  βρέθηκαν να είναι 0.98 και στις δύο περιπτώσεις, δείχνοντας μια καλή προσαρμογή των μοντέλων στην πειραματικά δεδομένα. Υπολογίσθηκε καλή αναπαραγωγικότητα και για τα δύο μοντέλα και πιο συγκεκριμένα 0.97 για το μοντέλο που περιγράφεται από την εξίσωση (2.3) και 0,99 για το μοντέλο που περιγράφεται από την εξίσωση (2.4).

Η καλή συσχέτιση μεταξύ των προβλεπθέντων και των πειραματικών τιμών, τόσο για την συγκέντρωση του αναλόγου P1 όσο και για την % μετατροπή του PQ, φαίνεται στην Εικόνα 2.9 και στον Πίνακα 2.2, υποδεικνύοντας ότι τα εμπειρικά μοντέλα από την ανάλυση RSM μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να περιγράψουν επαρκώς τη σχέση μεταξύ των αποκρίσεων και των παραμέτρων της αντίδρασης. Η καλή προσαρμογή και η στατιστική σημαντικότητα και των δύο μοντέλων επιβεβαιώνονται μέσω ενός στατιστικού ελέγχου F (F-test) (Πίνακες 2.3 και 2.4).

**Πίνακας 2.2.** Πειραματικός σχεδιασμός της μελέτης της επίδρασης της συγκέντρωσης του ενζύμου (E), του λόγου μάζας της 1-βουτανόλης προς PQ (MR) και του χρόνου της αντίδρασης (RT) στην συγκέντρωση του παραγώγου P1 και στην % μετατροπή του PQ κατά την αλκοόλυση της PQ από τον νανοβιοκαταλύτη HPCFe-CaLB.

A/A	E*(mg ml <sup>-1</sup> )	MR*	RT*(h)	Συγκέντρωση του P1 (g L <sup>-1</sup> )		Απόδοση μετατροπής της PQ (%)	
				Παρατηρούμενη	Προβλεπόμενη	Παρατηρούμενη	Προβλεπόμενη
1	0.44(-1)	0.3(-1)	0.5(-1)	1.02	1.12	3.0	2.03
2	3.55(1)	0.3(-1)	0.5(-1)	1.75	1.75	21.4	20.6
3	0.44(-1)	2(1)	0.5(-1)	0.26	0.22	2.7	4.5
4	3.55(1)	2(1)	0.5(-1)	2.30	2.31	26.1	25.1
5	0.44(-1)	0.3(-1)	8(1)	1.99	2.01	32.9	32.3
6	3.55(1)	0.3(-1)	8(1)	1.04	1.13	68.0	72.1
7	0.44(-1)	2(1)	8(1)	2.14	2.09	34.0	36.8
8	3.55(1)	2(1)	8(1)	1.66	1.71	79.0	76.6
9	0.44(-1)	1.15(0)	4.25(0)	2.33	2.49	25.0	23.9
10	3.55(1)	1.15(0)	4.25(0)	3.28	3.10	54.0	54.1
11	2.00(0)	0.3(-1)	4.25(0)	3.01	3.03	49.0	52.0
12	2.00(0)	2(1)	4.25(0)	3.33	3.36	55.0	56.5
13	2.00(0)	1.15(0)	0.5(-1)	1.37	1.49	25.0	27.9
14	2.00(0)	1.15(0)	8(1)	2.25	2.12	73.7	69.8
15	2.00(0)	1.15(0)	4.25(0)	3.01	3.19	52.8	54.3
16	2.00(0)	1.15(0)	4.25(0)	3.36	3.19	55.5	54.3
17	2.00(0)	1.15(0)	4.25(0)	3.26	3.19	58.0	54.3

Συνθήκες αντίδρασης: Θερμοκρασία 40 °C, διαλύτης MTBE, συγκέντρωση PQ 0.015 mmol, 750gpm Πραγματικές τιμές και κωδικοποιημένα επίπεδα (στην παρένθεση) των παραμέτρων της αντίδρασης.



**Εικόνα 2.9.** Παρατηρούμενες και προβλεπόμενες τιμές για Α. την % μετατροπή της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης (PQ) και Β. την συγκέντρωση του αναλόγου P1 (g /L).

**Πίνακας 2.3.** Ανάλυση διακύμανσης (Analysis of variance, ANOVA) για τον πειραματικό σχεδιασμό της συγκέντρωσης της σύνθεσης του αναλόγου P1 μέσω της ενζυμικής αλκοόλυσης της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης.

Πηγή μεταβλητότητας	Βαθμοί ελευθερίας	Άθροισμα τετραγώνων	Μέσω τετράγωνο (variance)	F-τεστ	p
Ολική (Total)	17	95.10	5.59		
Παλινδρόμησης(Regression)	7	16.25	2.32	115.83 <sup>a</sup>	0.00 <sup>c</sup>
Υπόλοιπα (Residuals)	9	0.18	0.02		
Έλλειψη προσαρμογής (Lack of Fit)	7	0.11	0.02	0.50 <sup>b</sup>	0.79 <sup>c</sup>
Καθαρό σφάλμα (Pure Error)	2	0.06	0.03		

Ισχύει ότι,  $R^2=0.989$ ,  $F_{0.95, 7,9} = 3.29$  και  $F_{0.95, 7, 2} =19.35$

<sup>a</sup>F-ratio (παλινδρόμηση/υπόλοιπο).

<sup>b</sup>F-ratio (έλλειψη προσαρμογής/καθαρό σφάλμα).

<sup>c</sup>Σημαντικότητα για  $p < 0.05$ .

**Πίνακας 2.4..** Ανάλυση διακύμανσης (Analysis of variance, ANOVA) για τον πειραματικό σχεδιασμό της συγκέντρωσης της % μετατροπής της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης.

Πηγή μεταβλητότητας	Βαθμοί ελευθερίας	Άθροισμα τετραγώνων	Μέσω τετράγωνο (variance)	F-τεστ	p
Ολική (Total)	17	38519.4	2265.85		
Παλινδρόμησης(Regression)	6	8337.79	1389.63	140.93 <sup>a</sup>	0 <sup>c</sup>
Υπόλοιπα (Residuals)	10	98.60	9.86		
Έλλειψη προσαρμογής (Lack of Fit)	8	85.07	10.63	1.57 <sup>b</sup>	0.45 <sup>c</sup>
Καθαρό σφάλμα (Pure Error)	2	13.53	6.76		

*Ισχύει ότι,  $R^2=0.988$ ,  $F_{0.95, 6,10} = 3.22$  και  $F_{0.95, 8, 2} = 19.37$*

<sup>a</sup>F-ratio (παλινδρόμηση/υπόλοιπο).

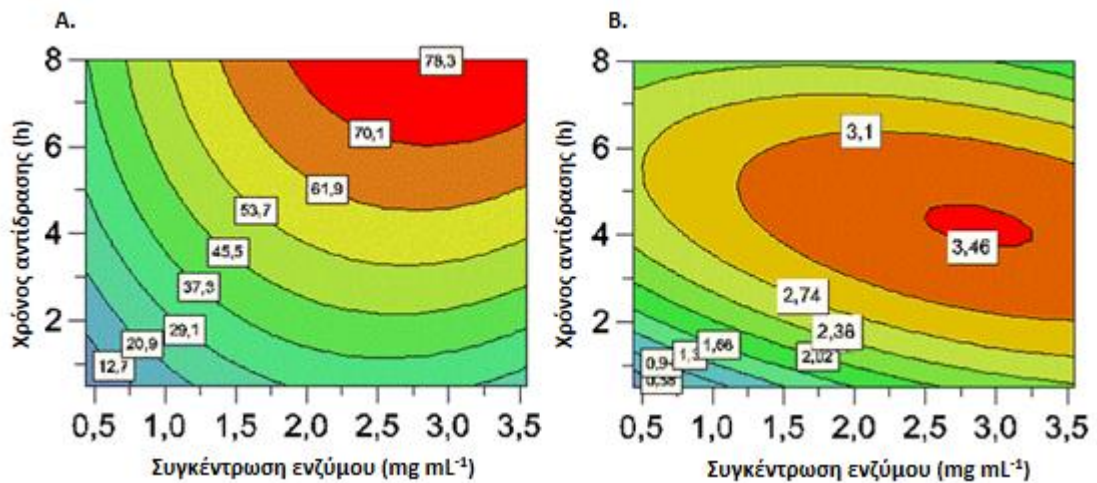
<sup>b</sup>F-ratio (έλλειψη προσαρμογής/καθαρό σφάλμα).

<sup>c</sup>Σημαντικότητα για  $p < 0.05$ .

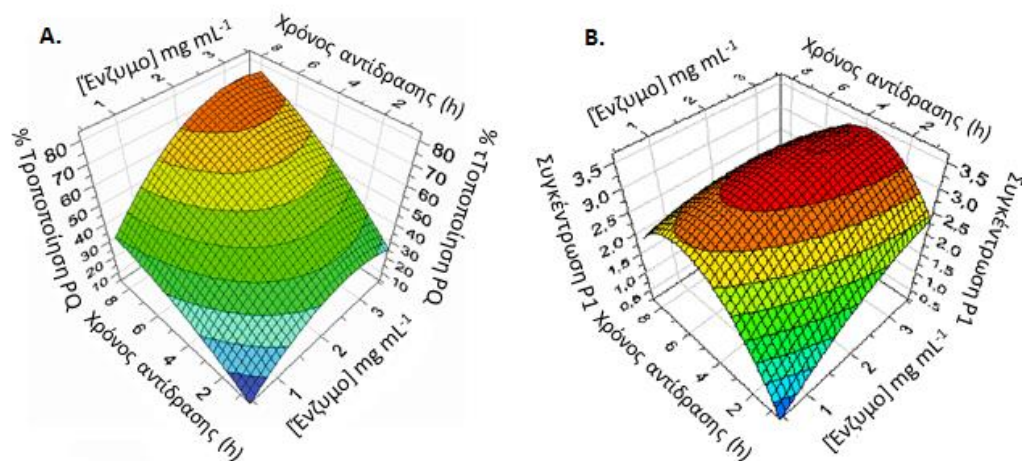
Και οι τρεις παράμετροι, RT και MR που μελετήθηκαν σε αυτή τη μελέτη, επηρεάζουν με διαφορετική έκταση την μετατροπή της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης και την ποσότητα του βιοενεργού παραγώγου της κερσετίνης P1, όπως υποδεικνύεται από τις θετικές τιμές της επίδρασής τους ( $E=30.186$ ,  $RT=41.879$ ,  $MR=4.506$  για την μετατροπή της PQ και  $E=0.616$ ,  $RT=0,634$ ,  $MR=0.33$  για την συγκέντρωση του P1). Η θετική επίδραση αυτών των παραμέτρων στην μετατροπή της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης είναι όμοια με αυτή που έχει παρατηρηθεί κατά την ενζυμική τροποποίηση άλλων φλαβονοειδών σε διάφορα μη υδατικά μέσα (Aïssa et al., 2007; Chebil et al., 2007; Katsoura et al., 2007). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο χρόνος της αντίδρασης, RT και η συγκέντρωση του ενζύμου, E φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη επίδραση στην μετατροπή της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης και στην συγκέντρωση του αναλόγου P1 σε σύγκριση με τον μοριακό λόγο των υποστρωμάτων, MR.

Για να απεικονιστεί η % απόδοση μετατροπής της αλκοόλυσης της PQ και η συγκέντρωση του αναλόγου P1 στο μείγμα της αντίδρασης ως συνάρτηση του RT και της E, σχεδιάστηκαν 2D και 3D διαγράμματα ισοϋψών για συγκεκριμένες συνθήκες αντίδρασης (Εικόνες 2.10 και 2.11). Η μοριακή αναλογία διατηρείται σταθερή και ίση με την υψηλότερη τιμή ( $MR = 2$ ). Κάθε καμπύλη περιγράμματος αντιπροσωπεύει την απόκριση που προκύπτει από την δεύτερης τάξης τετραγωνική εξίσωση για έναν άπειρο αριθμό συνδυασμών τιμών των δύο υπό μελέτη παραγόντων εντός του εύρους που μελετώνται. Στην Εικόνα 2.10 φαίνεται ότι η αύξηση είτε της συγκέντρωσης του ενζύμου, E είτε του χρόνου αντίδρασης, RT οδηγεί σε αύξηση της % μετατροπής της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης, ενώ οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αντίστοιχων παραμέτρων είναι αμελητέες. Όσον αφορά την επίδραση των ίδιων παραμέτρων στη σύνθεση του παραγώγου P1, μια έντονη αλληλεπίδραση μεταξύ τους υποδεικνύεται από την γραφική παράσταση ελλειπτικού περιγράμματος (Εικόνα 2.10). Επιπλέον, φαίνεται ότι η αύξηση του E ή του RT οδηγεί σε αύξηση της συγκέντρωσης του P1 μέχρι μία μέγιστη τιμή, ενώ

οποιαδήποτε περαιτέρω αύξηση έχει αρνητικό αποτέλεσμα. Αυτό το αποτέλεσμα θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι καθώς η αντίδραση εξελίσσεται, η συγκέντρωση του P1 (που είναι το πρώτο προϊόν που προκύπτει από την αποακετυλίωση της PQ) μειώνεται λόγω της περαιτέρω αποακετυλίωσής του στα παράγωγα P2 και P3 όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Εικόνα 2.10).



**Εικόνα 2.10.** Διάγραμμα ισοϋψών για Α. την % μετατροπή της PQ και Β. την συγκέντρωση του αναλόγου P1, ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης και της συγκέντρωσης του ενζύμου, για σταθερή τιμή του μοριακού λόγου των υποστρωμάτων ίση με 2.



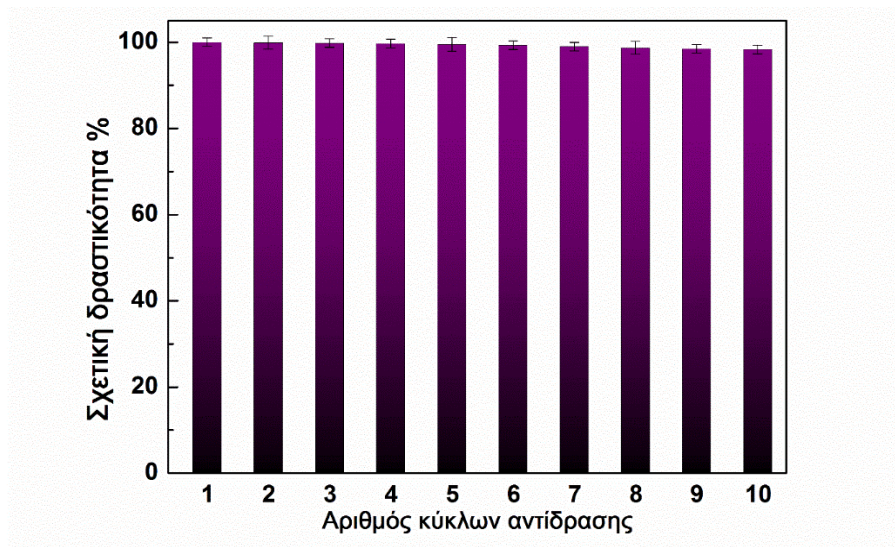
**Εικόνα 2.11.** Τρισδιάστατο διάγραμμα ισοϋψών για Α. την % μετατροπή της PQ και Β. την συγκέντρωση του αναλόγου P1, ως συνάρτηση του χρόνου αντίδρασης και της συγκέντρωσης του ενζύμου, για σταθερή τιμή του μοριακού λόγου των υποστρωμάτων ίση με 2.

Οι βέλτιστες συνθήκες για τη σύνθεση του αναλόγου P1 υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας το εργαλείο βελτιστοποίησης του προγράμματος MODDE. Οι βέλτιστες συνθήκες προσδιορίστηκαν ως εξής: 2.9 mg mL<sup>-1</sup> για τη συγκέντρωση του ενζύμου, 1.8 για τη μοριακή αναλογία των υποστρωμάτων και 4.3 h για τον χρόνο αντίδρασης. Στις βέλτιστες συνθήκες η μοριακή αναλογία των μερικώς ακετυλιωμένων παραγώγων της κερσετίνης (P1: P2: P3) είναι 1: 0.7: 0.5. Η μέγιστη συγκέντρωση του αναλόγου P1 που επιτυγχάνεται κάτω από αυτές τις συνθήκες ήταν 3.48 g L<sup>-1</sup> όπως φαίνεται στις Εικόνες 2.10. και 2.11., ενώ η % μετατροπή της PQ στις ίδιες συνθήκες υπολογίστηκε μέσω της εξίσωσης 2.4 ίση με 60%. Για να προσδιοριστεί η εγκυρότητα και των δύο μοντέλων, πραγματοποιήθηκαν τρία πειράματα στις βέλτιστες συνθήκες. Η μέση τιμή της πειραματικής συγκέντρωσης του αναλόγου P1 και της % μετατροπής της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης σε αυτές τις συνθήκες βρέθηκε να είναι 3.3 ± 0.4 g L<sup>-1</sup> και 62 ± 3% αντίστοιχα, οι οποίες είναι πολύ κοντά στις προβλεπόμενες τιμές από τα μοντέλα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ποσότητα του βιοενεργού αναλόγου P1 που επιτυγχάνεται στην παρούσα μελέτη είναι περίπου 13 φορές υψηλότερη σε σύγκριση με εκείνη που αναφέρθηκε πρόσφατα χρησιμοποιώντας ένα εμπορικό διαθέσιμο ακινητοποιημένο βιοκαταλύτη (Kyriakou et al., 2018).

#### **2.3.4. Επαναχρησιμοποίηση του νανοβιοκαταλύτη HPCFe-CaLB**

Η επαναχρησιμοποίηση των ενζύμων, ειδικά για τις βιοκαταλυτικές διεργασίες μεγάλης κλίμακας, έχει αποδειχθεί πολύ σημαντική κυρίως από οικονομικής άποψης. Σε αυτό το κεφάλαιο περιγράφεται η μελέτη της επαναχρησιμοποίησης του νανοβιοκαταλύτη HPCFe-CaLB, ο οποίος μπορεί εύκολα να απομονωθεί με τη χρήση ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου και να επαναχρησιμοποιηθεί για πολλαπλούς κύκλους αντίδρασης, στη σύνθεση του αναλόγου P1 μέσω της ενζυμικής αλκοόλυσης της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε MTBE στις βέλτιστες συνθήκες που προσδιορίστηκαν για την σύνθεση του P1 (4.3 h χρόνος αντίδρασης, 2.9 mg mL<sup>-1</sup> συγκέντρωση ενζύμου, 1.8 μοριακός λόγος, στους 40 °C). Μετά από κάθε κύκλο ο νανοβιοκαταλύτης απομονώθηκε μαγνητικά, ακολουθούσε πλύση και επαναχρησιμοποίηση σε φρέσκο διάλυμα αντίδρασης. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.12, μετά από 10 κύκλους αντίδρασης (43 h συνεχόμενης λειτουργίας), η εναπομένουσα καταλυτική δραστηριότητα της ακινητοποιημένης λιπάσης ήταν 98 %, και είναι ανάμεσα στις υψηλότερες που έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά για ακινητοποιημένη λιπάση σε διάφορα νανοϋλικά (Chiaradia et al., 2016; Nicolás et al., 2018; Pavlidis et al., 2012b). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι ο νανοβιοκαταλύτης HPCFe-CaLB είναι πολύ σταθερός και μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά σε οργανικά μέσα για την βιοκαταλυτική σύνθεση βιοενεργών αναλόγων διάφορων φλαβονοειδών.





**Εικόνα 2.12.** Επαναχρησιμοποίηση της ακινητοποιημένης CaLB σε νανοδομημένο υλικό HPCFe.

#### 2.4. Συμπεράσματα

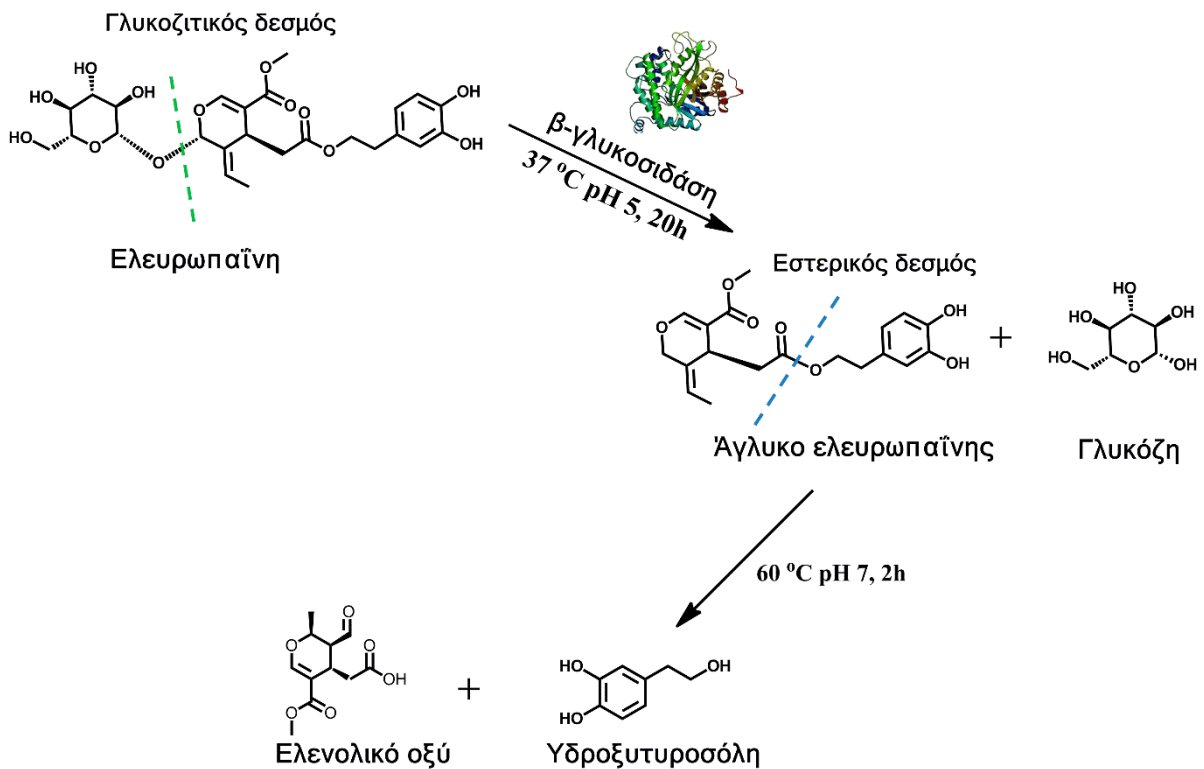
Στο παρόν κεφάλαιο δείξαμε ότι τα μαγνητικά υβριδικά νανοσωματίδια HPC αποτελούν ένας αποτελεσματικός φορέας για την ομοιοπολική ακινητοποίηση ενζύμων βιομηχανικού ενδιαφέροντος όπως η λιπάση από *Pseudozyma antarctica*. Δομικές και βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι τα νανοϋλικά HPCFe δημιουργούν ένα μικροπεριβάλλον που σταθεροποιεί τη δομή του ενζύμου, με αποτέλεσμα την αυξημένη καταλυτική δραστηριότητα και τη σταθερότητα παρουσία οργανικών διαλυτών. Η ακινητοποιημένη λιπάση καταλύει αποτελεσματικά την αλκόλυση της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης προς το σχηματισμό μερικώς ακετυλιωμένων βιοενεργών παραγώγων κερσετίνης, σε υψηλές αποδόσεις. Η εύκολη ανάκτηση και η εξαιρετική λειτουργική σταθερότητα υποδηλώνουν ότι αυτός ο νέος μαγνητικός νανοβιοκαταλύτης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για διάφορες τοποεκλεκτικές βιομετατροπές.



### **Κεφάλαιο 3: Εμπλουτισμός εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε υδροξυτυροσόλη μέσω της ενζυμικής τροποποίησης της ελευρωπαϊνης από ακινητοποιημένη β-γλυκοσιδάση σε πορώδεις κυβοειδείς άνθρακες και βιολογική αξιολόγηση των εκχυλισμάτων αυτών**

#### **3.1. Εισαγωγή**

Τα φύλλα ελιάς είναι φθηνά παραπροϊόντα και βρίσκονται σε μεγάλες ποσότητες στις βιομηχανίες ελαιολάδου (10% του συνολικού βάρους των ελιών) και συσσωρεύονται κατά το κλάδεμα των ελαιόδεντρων (25 κιλά φύλλων αφαιρούνται ανά ελαιόδενδρο). Τα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς είναι πλούσια σε πολυφαινόλες όπως τα σεκοριδοειδή, τα φλαβονοειδή και οι απλές φαινολικές ενώσεις, οι οποίες έχουν αποδειχθεί ότι είναι ιδιαίτερα ευεργετικές για την ανθρώπινη υγεία (M. Liu et al., 2018). Η ελευρωπαϊνή είναι ένα υδρόφιλο αντιοξειδωτικό που βρίσκεται σε όλα τα μέρη του δέντρου ελιάς, με υψηλότερη συγκέντρωση σε εκχυλίσματα φύλλων ελιάς και σε απόβλητα ελαιουργείων, αποτελείται από τρία μέρη: ένα μόριο γλυκόζης, ελενολικό οξύ και υδροξυτυροσόλη. Η υδροξυτυροσόλη είναι το κύριον προϊόν αποικοδόμησης της ελευρωπαϊνης, η οποία θεωρείται ότι είναι ένα από τα ισχυρότερα αντιοξειδωτικά της φύσης με ενισχυμένη βιολογική δράση σε σύγκριση με την ελευρωπαϊνή (Turck et al., 2017; Vilaplana-Pérez et al., 2014). Η υδροξυτυροσόλη χρησιμοποιείται ως πρόσθετο τροφίμων και καλλυντικών. Επιπλέον, θεωρείται ότι είναι ένα ισχυρό φάρμακο λόγω της αντιφλεγμονώδους, αντικαρκινικής, νευροπροστατευτικής και αντιαποπρωτικής δράσης της (Achmon and Fishman, 2015). Παρόλα αυτά, η υδροξυτυροσόλη βρίσκεται σε επολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στη φύση, έχει χαμηλή απόδοση εκχύλισης από φυσικές πηγές και είναι δύσκολο να συντεθεί χημικά. Γι' αυτό, η σύνθεση καθαρής υδροξυτυροσόλης είναι μια διεργασία υψηλού κόστους (Zhang et al., 2012). Επομένως, η ανάπτυξη βιοτεχνολογικών διεργασιών για την σύνθεση της υδροξυτυροσόλης έχει μεγάλο ενδιαφέρον. Η σύνθεση της υδροξυτυροσόλης μέσω της μετατροπής της ελευρωπαϊνης (Εικόνα 3.1) από φύλλα ελιάς θα μπορούσε να είναι μια κατεύθυνση για μια οικονομικά αποδοτική παραγωγή υδροξυτυροσόλης (Achmon and Fishman, 2015). Μια ποικιλία υδρολυτικών ενζύμων έχει μελετηθεί για την μετατροπή της ελευρωπαϊνης σε υδροξυτυροσόλη όπως εστεράσες, λιπάσες, ξυλανάσες, κυτταρινάσες και ημι-κυτταρινάσες (Liu and Yong, 2018). Οι φυσικές ή ανασυνδυασμένες β-γλυκοσιδάσες έχουν αποδειχθεί ότι είναι τα βασικά ένζυμα για την υδρόλυση της ελευρωπαϊνης και έχουν χρησιμοποιηθεί σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή.



**Εικόνα 3.1.** Μετατροπή της ελευρωπαΐνης σε υδροξυτυροσόλη.

Τα πλεονεκτήματα της ακινητοποίησης ενζύμων σε συνδυασμό με την χρήση νανοϋλικών ως φορείς ακινητοποίησης, έχει κερδίσει το ενδιαφέρον τις τελευταίες δεκαετίες (Hong et al., 2019). Τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα έχουν κυριαρχήσει στην ακινητοποίηση ενζύμων, καθώς συνδυάζουν την αποτελεσματικότητα και την βιο-συμβατότητα (Adeel et al., 2018; Pavlidis et al., 2012c). Υπάρχει πλέον ένα πολύ ευρύ φάσμα νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα, με μεγάλη ποικιλομορφία τόσο στο σχήμα όσο και στο μέγεθος, με το καθένα να ανταγωνίζεται το άλλο για την θετική τους επίδραση στην απόδοση των ενζύμων. Είναι ευρέως γνωστό ότι τα δομικά χαρακτηριστικά των νανοϋλικών, όπως το μέγεθος, το σχήμα, το πορώδες και η χημεία της επιφάνειάς τους μπορούν να επηρεάσουν την ακινητοποίηση και την καταλυτική συμπεριφορά των ακινητοποιημένων ενζύμων. Τα νανοϋλικά πορώδους άνθρακα έχουν κερδίσει το ενδιαφέρον ως φορείς ακινητοποίησης για ένζυμα εξαιτίας των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους που αφορούν την ακινητοποίηση ενζύμων, όπως η αυξημένη επιφάνεια και ο όγκος των πόρων που διαθέτουν, χαρακτηριστικά τα οποία επιτρέπουν την ακινητοποίηση μεγαλύτερης ποσότητας πρωτεϊνών ενώ δεν δημιουργούν περιορισμούς στα μόρια των ενζύμων (Bayne et al., 2013; Li et al., 2010; Wan et al., 2018). Το πορώδες φαίνεται επίσης να επηρεάζει τον βιοκαταλύτη καθώς διευκολύνει την πρόσβαση των υποστρωμάτων στο ενεργό κέντρο (Luangon et al., 2012; Wu et al., 2013). Τροποποιημένα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα ξεχωρίζουν για τις μοναδικές ιδιότητες που τους προσδίδουν οι λειτουργικές τους ομάδες. Διάφορα είδη τροποποίησης των νανοϋλικών, αλλάζουν τις ιδιότητές τους και μπορούν να επηρεάσουν την αλληλεπίδρασή τους με τις πρωτεΐνες και κατά συνέπεια τα καταλυτικά χαρακτηριστικά των ακινητοποιημένων ενζύμων (Patila et al., 2013a; Pavlidis et al., 2010). Διάφορες μελέτες δείχνουν ότι η τροποποίηση των νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα ενισχύουν

όχι μόνο την αποτελεσματικότητα ακινητοποίησης και την καταλυτική δραστηριότητα, αλλά επίσης την λειτουργική και θερμική σταθερότητα του βιοκαταλύτη (Jin et al., 2012; Pavlidis et al., 2014).

Ένα νέο μέλος της οικογένειας άνθρακα, το οποίο συνδυάζει το πορώδες και την ικανότητα να δέχεται λειτουργικές ομάδες στην επιφάνεια του, αναφέρθηκε πρόσφατα ως υλικό υψηλής απόδοσης (Hao et al., 2015). Αυτή η νέα νανοδομή αφορά τους πορώδεις κυβοειδείς άνθρακες (porous carbon cuboids, PCCs) και συνδυάζει μια σειρά από ενδιαφέρουσες ιδιότητες όπως, η ασυνήθιστη υπερ-υδρόφιλη συμπεριφορά, η μεγάλη σταθερότητα, η ετερογένεια επιφάνειας και το πολύ υψηλό ιεραρχημένο πορώδες (εκτιμάται περίπου  $800-900 \text{ m}^2 \text{ gr}^{-1}$ ) (Hao et al., 2015). Σε αντίθεση με το γραφένιο, τα PCC δεν χρειάζεται να περάσουν από διαδικασία οξείδωσης λόγω του μεγάλου αριθμού λειτουργικών ομάδων που έχουν στην επιφάνειά τους, γεγονός που τα καθιστά ιδιαίτερα υδρόφιλα. Τα PCC εμφανίζουν σημαντικό αριθμό ενεργών θέσεων N: C και O: C, οι οποίες, σε συνδυασμό με τη στενή κατανομή μεγέθους μικροπόρων, συνιστούν ένα πολλά υποσχόμενο προσροφητικό υλικό. Το πλεονέκτημα που παρουσιάζουν έναντι άλλων υλικών άνθρακα είναι το γεγονός ότι είναι σταθερά έως τους  $400^\circ\text{C}$ , ενώ τα περισσότερα από αυτά δεν μπορούν να λειτουργούν σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από  $300^\circ\text{C}$ . Με περαιτέρω επεξεργασία των PCCs με ισχυρούς οξειδωτικούς παράγοντες (χρησιμοποιώντας μια τροποποιημένη μέθοδο του Staudenmaier), μπορούν να εισαχθούν πολλαπλές λειτουργικές ομάδες οξυγόνου (όπως καρβόξυλο, υδρόξυλο και έποξυ- ομάδες), γεγονός που αυξάνει τον αριθμό των ενεργών θέσεων (Gengler et al., 2010; Karageorgou et al., 2019; Liaros et al., 2016; Staudenmaier, 1898; Stergiou et al., 2010). Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι τα PCC σε οξειδωμένη και μη μορφή, έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με βακτήρια και άλγη (Karageorgou et al., 2019).

Σε αυτό το κεφάλαιο, περιγράφεται η ανάπτυξη καινοτόμων νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων με την ομοιοπολική και μη ομοιοπολική ακινητοποίηση, σε PCCs και οξειδωμένα ανάλογα των PCCs (ομάδες  $-\text{COOH}$  και  $-\text{OH}$ ), δύο  $\beta$ -γλυκοσιδασών (από αμύγδαλα και από *Thermotoga maritima*) που χρησιμοποιούνται ευρέως σε βιοκαταλυτικές διεργασίες βιομηχανικού ενδιαφέροντος (Ahmed et al., 2017; Singh et al., 2016). Χρησιμοποιήθηκε ένας συνδυασμός φασματοσκοπικών, μικροσκοπικών και βιοχημικών τεχνικών για τον χαρακτηρισμό αυτών των νέων νανοβιοκαταλυτών, σε σχέση με την καταλυτική τους συμπεριφορά. Επιπλέον, διερευνήθηκε η επίδραση της επιφανειακής χημείας των PCCs και των προσεγγίσεων ακινητοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν, στην καταλυτική δραστηριότητα καθώς και στη θερμική και λειτουργική σταθερότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων. Τέλος, οι νανοβιοκαταλύτες που αναπτύχθηκαν, μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να καταλύουν την βιοκαταλυτική τροποποίηση της ελευρωπαΐνης σε υδροξυτυροσόλη και χρησιμοποιήθηκαν για τον εμπλουτισμό εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε υδροξυτυροσόλη με σκοπό την βελτίωση της βιολογικής τους δράσης.

## 3.2. Υλικά και Μέθοδοι

### 3.2.1. Υλικά

#### 3.2.1.1. Βιοκαταλύτες- Ένζυμα

Σε αυτό το κεφάλαιο χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εμπορικά διαθέσιμοι βιοκαταλύτες:

- Η β-γλυκοσιδάση από αμύγδαλα (Albgl),  $9.5 \text{ U mg}^{-1}$  της εταιρείας Merck KGaA.
- Η β-γλυκοσιδάση από *Thermotoga maritima* (Tmbgl),  $85 \text{ U mg}^{-1}$  της εταιρείας Megazyme (Chicago, IL, USA).

#### 3.2.1.2. Υποστρώματα

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το κεφάλαιο ήταν εμπορικά διαθέσιμα:

- Ο γλυκοπυρανοζίτης της 4-νιτροφαινόλης (4-Nitrophenyl β-D-glucopyranoside, p-NPG) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της β-γλυκοσιδάσης, της εταιρείας Merck KGaA.
- Η ελευρωπαΐνη και η υδροξυτυροσόλη της εταιρείας Extrasynthese (Lyon, France).

#### 3.2.1.3. Αντιδραστήρια ακινητοποίησης

- Το χλωρίδιο του 1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)καρβοδιμιδίου (EDC) και
- το N-υδροξυσουκινιμίδιο (NHS) που χρησιμοποιήθηκαν ως παράγοντες σύζευξης αλλά και
- το 4-(20υδροξυαιθυλ)πιπεραζινο-1-αιθανοσουλφονικό οξύ (HEPES) που χρησιμοποιήθηκε ως ρυθμιστικό διάλυμα στην ακινητοποίηση του ενζύμου, όλα της εταιρείας Merck KGaA.

#### 3.2.1.4. Διαλύτες

Οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν κεφάλαιο ήταν όλοι καθαρότητας αναλυτικής βαθμίδας και προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Merck KGaA, Honeywell Research Chemicals και Panreac Quimica SA. Ο δευτεριωμένος διαλύτης διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO- $d_6$ ) ήταν υψηλής καθαρότητας  $\geq 99.9\%$  της εταιρείας Deutero (Kastellaun, Germany).

### 3.2.1.5. Λοιπά αντιδραστήρια

- Το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας LB Broth που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια βακτηρίων ήταν της εταιρείας Lab M Ltd.
- Το 2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο (DPPH) ήταν της εταιρείας Merck KGaA.
- Το αντιδραστήριο Follin-Ciocalteu (Μείγμα φωσφομολυβδαινικών και φωσφοβολφραμικών ετεροπολυμερών οξέων) ήταν της εταιρείας Merck KGaA.

### 3.2.1.6. Φύλλα ελιάς

Τα φυτικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν ανήκουν στην οικογένεια Oleaceae και πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε δείγμα φύλλων ελιάς (*Olea europaea*) τα οποία συλλέχθηκαν από περιοχή των Σερρών, τον Απρίλιο του 2016. Το αποξηραμένο δείγμα φύλλων ήταν εμπορικός διαθέσιμος από την εταιρεία συμπληρωμάτων διατροφής Solgar (Olive leaf, Solgar).

### 3.2.1.7. Νανοϋλικά

Νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς ακινητοποίησης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν πορώδεις κυβοειδείς άνθρακες (Porous Carbon Cuboids) σε οξειδωμένη (PCCox) και μη μορφή (PCC). Η παρασκευή και ο χαρακτηρισμός των υβριδικών νανοϋλικών HPCFe πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών του Τμήματος Μηχανικής της Επιστήμης των Υλικών σύμφωνα με τους (Chatzikonstantinou et al., 2019) και περιγράφεται στο Παράρτημα III, παράγραφος 1.

### 3.2.1.8. Οργανολογία

- Για τις αναλύσεις πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS), φασματοσκοπίας υπερύθρου (FTIR) και φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού (CD) χρησιμοποιήθηκε ο εξοπλισμός όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 1, Παράγραφο 1.2.1.7.
- Η λήψη των εικόνων AFM πραγματοποιήθηκε σε μικροσκόπιο ατομικής δύναμης (Atomic force microscopy, AFM) Bruker Multimode Nanoscope 3D του τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

## 3.2.2. Μέθοδοι

### 3.2.2.1. Φασματοσκοπία φθορισμού

Οι μετρήσεις φθορισμού πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο φωταύγειας Jasco-8300 (Tokyo, Japan) χρησιμοποιώντας ένα φορέα στερεών δειγμάτων. Η ακινητοποιημένη β-γλυκοσιδάση χρησιμοποιήθηκε σε υδατικά διαλύματα σε συγκέντρωση  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , ενώ τα ελεύθερα ένζυμα Albgl και Tmbgl σε συγκέντρωση  $0.13 \text{ mg mL}^{-1}$ . Τα δείγματα εναποτίθενται σε

δίσκους πυριτίου (silicon wafers) (P/Bor, single side polished) με εναπόθεση σταγόνας (drop-casting) από υδατικά διαλύματα. Τα φάσματα εκπομπής φθορισμού καταγράφηκαν από 300 έως 400 nm μετά από διέγερση στα 280 nm, με ταχύτητα σάρωσης  $100 \text{ nm min}^{-1}$ , σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πλάτη σχισμής (Slit widths) με διέλευση ζώνης των 5 nm χρησιμοποιήθηκαν τόσο για την ακτινοβολία διέγερσης όσο και εκπομπής.

### **3.2.2.2. Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X και φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier**

Οι αναλύσεις φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X και φασματοσκοπίας υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier, των νανοϋλικών PCC και PCCox ή των νανοβιοκαταλυτών PCC-Albgl-con, PCCox-Albgl-con, PCC-Tmbgl-con, και PCCox-Tmbgl-con, πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 1 στις Παραγράφους 1.2.2.2. και 1.2.2.3.

### **3.2.2.3. Ομοιοπολική ακινητοποίηση των β-γλυκοσιδασών σε PCC και PCCox**

Οι β-γλυκοσιδάσες Albgl και Tmbgl ακινητοποιήθηκαν ομοιοπολικά στα νανοϋλικά PCC και PCCox με τη βοήθεια παραγόντων σύζευξης όπως είναι το EDC και το NHS. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να συνδέσουν τις υδροξυλομάδες και καρβοξυλομάδες του νανοϋλικού με τις ελεύθερες αμινομάδες του ενζύμου (Lau et al., 2014; Sehgal and Vijay, 1994). Για την ακινητοποίηση των ενζύμων έγινε διασπορά 4 mg των νανοϋλικών, σε 6 mL διαλύματος HEPES (50 mM, pH 7.0) και το μείγμα επώαστηκε σε λουτρό υπερήχων για 30 min. Μετά τη διασπορά των νανοϋλικών, προστέθηκαν 1.2 mL υδατικού διαλύματος EDC (από αρχικό διάλυμα  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) και 2.3 mL υδατικού διαλύματος NHS (από αρχικό διάλυμα  $50 \text{ mg mL}^{-1}$ ) και ακολούθησε επώαση του μείγματος στους 30 °C για 30 min υπό ανάδευση. Για να απομακρυνθεί η περίσσεια των παραγόντων σύζευξης EDC και NHS, το νανοϋλικό απομακρύνθηκε με φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 10 min και ακολούθησε έκπλυση, με διάλυμα HEPES (50 mM, pH 5.0 και pH 6.5 για την Albgl και την Tmbgl, αντίστοιχα), τρεις φορές. Πραγματοποιήθηκε επανα-διασπορά των ενεργοποιημένων νανοϋλικών σε 6 mL διαλύματος HEPES (50 mM, pH 5.0 και pH 6.5 για την Albgl και την Tmbgl, αντίστοιχα). Στη συνέχεια ακολούθησε η προσθήκη 0.3 mg ενζύμου (υπολογισμένο με τη μέθοδο Bradford assay) και το μείγμα επώαστηκε στους 30 °C για 1 h. Οι νανοβιοκαταλύτες που σχηματίστηκαν συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε για προσδιορισμό πρωτεϊνικού φορτίου. Για να απομακρυνθεί η περίσσεια ενζύμου που δεν ακινητοποιήθηκε ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις με διάλυμα HEPES (50 mM, pH 5.0 και pH 6.5 για την Albgl και την Tmbgl, αντίστοιχα) και τα δείγματα αφυδατώθηκαν σε σίλικα (silica gel) στους 4 °C. Οι νανοβιοκαταλύτες ονομάστηκαν PCC-Albgl-con, PCCox-Albgl-con, PCC-Tmbgl-con, και PCCox-Tmbgl-con.

### **3.2.2.4. Μη ομοιοπολική ακινητοποίηση των β-γλυκοσιδασών σε PCC και PCCox**

Οι β-γλυκοσιδάσες Albgl και Tmbgl ακινητοποιήθηκαν και με φυσική προσρόφηση στα νανοϋλικά PCC και PCCox. Για την ακινητοποίηση των ενζύμων έγινε διασπορά 4 mg των νανοϋλικών, σε 6 mL διαλύματος HEPES (50 mM, pH 5.0 και pH 6.5 για την Albgl και την Tmbgl, αντίστοιχα) και το



μείγμα επώαστηκε σε λουτρό υπερήχων για 30 min. Στη συνέχεια ακολούθησε η προσθήκη 0.3 mg ενζύμου (υπολογισμένο με τη μέθοδο Bradford assay) και το μείγμα επώαστηκε στους 30 °C για 1 h. Οι νανοβιοκαταλύτες που σχηματίστηκαν συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε για προσδιορισμό πρωτεϊνικού φορτίου. Για να απομακρυνθεί η περίσσια ενζύμου που δεν ακινητοποιήθηκε ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις με διάλυμα HEPES (50 mM, pH 5.0 και pH 6.5 για την AlbgI και την Tmbgl, αντίστοιχα) και τα δείγματα αφυδατώθηκαν σε σίλικα (silica gel) στους 4°C. Οι νανοβιοκαταλύτες ονομάστηκαν PCC-AlbgI-nc, PCCox-AlbgI-nc, PCC-Tmbgl-nc, και PCCox-Tmbgl-nc.

### 3.2.2.5. Προσδιορισμός απόδοσης ακινητοποίησης

Για να προσδιοριστεί η απόδοση της ακινητοποίησης υπολογίστηκε η ποσότητα της πρωτεΐνης στο υπερκείμενο πριν και μετά την διαδικασία της ακινητοποίησης με τη μέθοδο Bradford (Bradford, 1976). Η ποσότητα της ακινητοποιημένης β-γλυκοσιδάσης στα νανοϋλικά PCC και PCCox υπολογίστηκε ως η διαφορά της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο υπερκείμενο πριν και μετά την ακινητοποίηση. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

### 3.2.2.6. Προσδιορισμός της ενζυμικής δραστηριότητας των νανοβιοκαταλυτών

Η υδρολυτική δράση β-γλυκοσιδάσης προσδιορίστηκε φωτομετρικά, υπολογίζοντας την απελευθέρωση της 4-νιτροφαινόλης (p-NP) από την υδρόλυση του p-NPG στα 410 nm (Orfanakis et al., 2018b). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού οξέος 100 mM, pH 5.0, και pH 6.5 για την AlbgI και την Tmbgl, αντίστοιχα, στους 50 °C για 10 min. Η αντίδραση ξεκίνησε με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ακινητοποιημένης β-γλυκοσιδάσης (0.1 ή 0.01 mg mL<sup>-1</sup>) σε υδατικό διάλυμα p-NPG (2 mM). Με το πέρας των 10 min η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη 0.5 mL διαλύματος 10 % w/v Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> και το προϊόν της αντίδρασης (p-NP) μετρήθηκε στα 410 nm. Η ποσότητα του p-NP που απελευθερώθηκε ποσοτικοποιήθηκε χρησιμοποιώντας πρότυπη καμπύλη της ένωσης p-NP. Ως μία μονάδα ενεργότητας, unit (U), β-γλυκοσιδάσης ορίστηκε η ποσότητα σε μmol min<sup>-1</sup> του προϊόντος p-NP που ελευθερώθηκε από 1 mg ακινητοποιημένης β-γλυκοσιδάσης υπό τις συνθήκες που περιγράφηκαν παραπάνω.

### 3.2.2.7. Προσδιορισμός θερμικής σταθερότητας των ελεύθερων και ακινητοποιημένων β-γλυκοσιδασών

Για τις μελέτες θερμικής σταθερότητας των β-γλυκοσιδασών επώαστηκαν τα ελεύθερα και ακινητοποιημένα ένζυμα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού οξέος 100 mM, pH 5.0, και pH 6.5 για την AlbgI και την Tmbgl, αντίστοιχα, στους 60 °C για 24 h. Η ποσότητα του ενζύμου ήταν 0.01 mg mL<sup>-1</sup> ή 0.01 μL mL<sup>-1</sup> για την AlbgI και την Tmbgl, αντίστοιχα, σε ελεύθερη μορφή, και 1 mg mL<sup>-1</sup> της ακινητοποιημένης β-γλυκοσιδάσης σε όλες τις περιπτώσεις. Η εναπομείνουσα υδρολυτική δραστηριότητα της β-γλυκοσιδάσης προσδιορίστηκε σε διαφορετικούς χρόνους, μέσω της υδρόλυσης του p-NPG, όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 3.2.2.7. όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

### 3.2.2.8. Επεξεργασία φύλλων ελιάς

Η συγκομιδή των φύλλων ελιάς έγινε από την περιοχή της Μακεδονίας και πιο συγκεκριμένα των Σερρών, τον Απρίλιο του 2016. Τα φύλλα ξεπλύθηκαν δύο φορές με νερό βρύσης και άλλες δύο φορές με απιονισμένο νερό, ώστε να απομακρυνθούν περιττά στοιχεία και στην συνέχεια ακολούθησε ξηράνση στον αέρα. Τέλος, συλλέχθηκαν και αποθηκεύτηκαν σε σκοτεινό και στεγνό μέρος, μέχρι την επεξεργασία τους.

### 3.2.2.9. Παρασκευή υδατικών εκχυλισμάτων από φύλλα ελιάς

Αρχικά 50 g αποξηραμένων φύλλων ελιάς από την περιοχή Σερρών (που θρυμματίστηκαν σε μικρότερα κομμάτια) ή 30 g σκόνης αποξηραμένων φύλλων ελιάς εμπορικά διαθέσιμων, εμποτίστηκαν σε 250 mL υπερκάρθρου νερού, ώστε να καλύπτονται πλήρως. Στη συνέχεια ακολούθησε βρασμός για 1 h. Το διάλυμα που προέκυψε, χρώματος σκούρο κεραμιδί, φιλτραρίστηκε δύο φορές με διηθητικό χαρτί, ώστε να απομακρυνθούν τα στερεά υπολείμματα. Στην συνέχεια, το κάθε διάλυμα μεταφέρθηκε σε προζυγισμένα δοχεία και αποθηκεύτηκε στους  $-20^{\circ}\text{C}$  ώστε να ακολουθήσει η λυοφιλίωσή τους. Μετά την λυοφιλίωση, συλλέχθηκε η σκόνη που προέκυψε (χρώματος σκούρο κεραμιδί) από το κάθε δείγμα και αποθηκεύτηκε σε σκοτεινό και ξηρό δοχείο στο ψυγείο ή στην κατάψυξη.

### 3.2.2.10. Χημειοενζυμική μετατροπή της ελευρωπαϊνης σε υδροξυτυροσόλη

Η ενζυμική υδρόλυση της ελευρωπαϊνης πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού οξέος 100 mM, pH 5.0, και pH 6.5 για την Albgl και την Tmbgl, αντίστοιχα. 1 mg νανοβιοκαταλύτη προστέθηκε σε 2 mg mL<sup>-1</sup> διάλυμα ελευρωπαϊνης (3.7 mM), και ακολούθησε επώαση για 24 h στους 37°C υπό ανάδευση (750 rpm). Μετά την ενζυμική υδρόλυση της ελευρωπαϊνης κατά την οποία σπάει ο γλυκοσιδικός δεσμός, (βήμα 1<sup>ο</sup>) (Εικόνα 3.1.), ακολούθησε ένα δεύτερο μη ενζυμικό βήμα ώστε να σχηματιστεί η υδροξυτυροσόλη. Στο 2<sup>ο</sup> βήμα, το μείγμα της αντίδρασης επώαστηκε στους 60°C, pH 7.0 για 2 h υπό ανάδευση (750 rpm). Με το πέρας των 2 h, ο νανοβιοκαταλύτης απομακρύνθηκε από το μείγμα με φιλτράρισμα, και ακολούθησε ανάλυση HPLC, LC-MS και NMR (όπως περιγράφεται στις αντίστοιχες παραγράφους).

### 3.2.2.11. Μελέτη επαναχρησιμοποίησης των ακινητοποιημένων β-γλυκοσιδασών

Η επαναχρησιμοποίηση των ακινητοποιημένων β-γλυκοσιδασών εκτιμήθηκε με την εκτέλεση διαδοχικών κύκλων της υδρόλυσης της ελευρωπαϊνης, όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Κάθε κύκλος αντίδρασης διεξήχθη για 24 h στους 37°C υπό ανάδευση (750 rpm). Μετά από κάθε δοκιμή, το ακινητοποιημένο ένζυμο διαχωρίστηκε από το μείγμα της αντίδρασης με φυγοκέντρηση και πλύθηκε επιμελώς με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού-κιτρικού οξέος 100 mM, pH 5.0 και pH 6.5 για την Albgl και την Tmbgl, αντίστοιχα, και στη συνέχεια επαναχρησιμοποιήθηκε. Όλα τα πειράματα εκτελέστηκαν εις τριπλούν.

### 3.2.2.12. Χημειοενζυμική τροποποίηση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς

Η χημειοενζυμική τροποποίηση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού οξέος 100 mM, pH 5.0. 1 mg νανοβιοκαταλύτη προστέθηκε σε 5 mg mL<sup>-1</sup> διάλυμα εκχυλίσματος και ακολούθησε επώαση για 24 h στους 37°C υπό ανάδευση (750 rpm). Μετά την ενζυμική υδρόλυση της ελευρωπαϊνης κατά την οποία διασπάται ο γλυκοσιδικός δεσμός, (βήμα 1<sup>ο</sup>) (Εικόνα 3.1.), ακολούθησε ένα δεύτερο μη ενζυμικό βήμα ώστε να σχηματιστεί η υδροξυτυροσώλη. Στο 2<sup>ο</sup> βήμα, το μείγμα της αντίδρασης επωάζεται στους 60°C, pH 7.0 για 1 h υπό ανάδευση (750 rpm). Με το πέρας της 1 h, ο νανοβιοκαταλύτης απομακρύνθηκε από το μείγμα με φιλτράρισμα, και είτε ακολούθησε ανάλυση HPLC, LC-MS και NMR (όπως περιγράφεται στις αντίστοιχες παραγράφους), είτε το δείγμα λυοφιλοποιήθηκε για να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια σε βιολογικά τεστ.

### 3.2.2.13. Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης

Για τις αναλύσεις υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (High performance liquid chromatography, HPLC) χρησιμοποιήθηκε συσκευή Shimadzu (Kyoto, Japan), με ανιχνευτή παράταξης φωτοδιοδίων. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε στήλη ανάστροφης φάσης, C18 (μBondapak) της εταιρείας Waters (Ιρλανδία) με διαστάσεις 3.9 x 300 mm, μέγεθος σωματιδίων 10 μm και μέγεθος πόρων 125 Å.

Για την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση της ελευρωπαϊνης και της υδροξυτυροσώλης χρησιμοποιήθηκε σύστημα βαθμιδωτής εναλλαγής φάσης. Οι αρχικές συνθήκες της κινητής φάσης ήταν 20:80 % (v/v) ακετονιτρίλιο/H<sub>2</sub>O (με 0.1 % οξικό οξύ) και το σύστημα έκλουσης είχε ως εξής: 0–30min, 50–50 % (v/v) ακετονιτρίλιο/H<sub>2</sub>O, 30–35min, 50–50 % (v/v) ακετονιτρίλιο/H<sub>2</sub>O και 35–40min, 20–80 % (v/v) ακετονιτρίλιο/H<sub>2</sub>O στους 27°C, με σταθερή ροή 1 mL min<sup>-1</sup>, ενώ η ανίχνευση έγινε στα 280 nm.

Για την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των φαινολών στα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς χρησιμοποιήθηκε σύστημα βαθμιδωτής εναλλαγής φάσης. Οι αρχικές συνθήκες της κινητής φάσης ήταν 05:95 % (v/v) ακετονιτρίλιο/H<sub>2</sub>O (με 0.1 % οξικό οξύ) και το σύστημα έκλουσης είχε ως εξής: 0–20min, 05–95 % (v/v) ακετονιτρίλιο/H<sub>2</sub>O, 20–40min, 25–75 % (v/v) ακετονιτρίλιο/H<sub>2</sub>O, 50–55 min, 20–80 % (v/v) ακετονιτρίλιο/H<sub>2</sub>O και 55–60 min, 05–95 % (v/v) ακετονιτρίλιο/H<sub>2</sub>O στους 27 °C, με σταθερή ροή 0.9 mL min<sup>-1</sup>, ενώ η ανίχνευση έγινε στα 280 nm.

### 3.2.2.14. Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός

Ο χημειο-ενζυμικός εμπλουτισμός των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε υδροξυτυροσώλη προσδιορίστηκε και με πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) και πιο συγκεκριμένα με τη λήψη φασμάτων 1D <sup>1</sup>H-NMR. Μετά τον τερματισμό της αντίδρασης απομακρύνθηκε, ο βιοκαταλύτης με διήθηση, στη συνέχεια ακολούθησε λυοφιλίωση του μείγματος της αντίδρασης για να απομακρυνθεί το νερό. Τέλος, τα δείγματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 500 μL DMSO-d<sub>6</sub> και μεταφέρθηκαν σε σωληνάκια NMR 5 mm. Η λήψη φασμάτων NMR πραγματοποιήθηκε στο φασματογράφο NMR Bruker AV-500 στους 298 K.

### **3.2.2.15. Φωτομετρικός προσδιορισμός ολικών φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς**

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών ενώσεων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο Folin-Ciocalteu (Kontogianni et al., 2013). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην οξειδωση των φαινολικών συστατικών σε αλκαλικό περιβάλλον με μείγμα φωσφοβολφραμικού και φωσφομολυβδαινικού οξέος. Αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι ο σχηματισμός κυανών προϊόντων. Η ένταση του κυανού χρώματος, με μέγιστο στα 725 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των φαινολικών συστατικών.

Για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολικών ενώσεων, σε σωληνάρια Erpendorf των 1.5 mL μεταφέρθηκαν 830  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  και 20  $\mu\text{L}$  δείγματος ή πρότυπου διαλύματος. Ακολούθησε προσθήκη 50  $\mu\text{L}$  διαλύματος Follin-Ciocalteu και μετά από επώαση 3 min, προσθήκη 100  $\mu\text{L}$  κορεσμένου υδατικού διαλύματος ανθρακικού νατρίου ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  20% w/v), έτσι ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 1 mL. Μετά από επώαση για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι, μετρήθηκαν οι απορροφήσεις σε μήκος κύματος 725 nm. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται εις διπλούν.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαινολικών συστατικών στα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς με πρότυπο καφεϊκό οξύ. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από 0 έως 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  και για τον προσδιορισμό ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία.

### **3.2.2.16. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης πρότυπων ενώσεων και εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς, με τη δοκιμή σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH\***

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH\* (Vassiliki G. Kontogianni et al., 2013). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών ενώσεων να δεσμεύουν τη ρίζα DPPH\* και οφείλεται στην ικανότητά τους να αποδίδουν το φαινολικό υδρογόνο στην ελεύθερη ρίζα. Η ελεύθερη ρίζα DPPH\* (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζύλιο) είναι μια σταθερή ελεύθερη ρίζα η οποία έχει ένα μη συζευγμένο ηλεκτρόνιο σθένους σε ένα άτομο γέφυρας αζώτου. Όταν ένα μεθανολικό διάλυμα DPPH\*, που εμφανίζει σκούρο μωβ χρώμα, αναμιγνύεται με ένα υπόστρωμα που μπορεί να δώσει ένα άτομο H, η ρίζα DPPH\* ανάγεται από το υπόστρωμα και παράγεται η μη ριζική μορφή της (2,2-διφαινυλο-1-πικρυλυδραζίνη), φαινόμενο το οποίο ανιχνεύεται φασματοσκοπικά στα 517 nm με την μετατροπή του αρχικού μωβ χρώματος του διαλύματος DPPH\* σε κίτρινο.

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης των τροποποιημένων και μη εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς, αρχικά παρασκευάστηκαν υδατικά stock εκχυλισμάτων, συγκέντρωσης 1  $\text{mg mL}^{-1}$ , και μεθανολικό διάλυμα DPPH\*, συγκέντρωσης 1 mM. Για καθένα από τα εκχυλίσματα, μελετήθηκε εύρος συγκεντρώσεων 5-100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Σε σωληνάρια Erpendorf των 1.5 mL προστέθηκαν οι κατάλληλοι όγκοι νερού, μεθανόλης, διαλύματος υδατικού εκχυλίσματος και τέλος 100  $\mu\text{L}$  μεθανολικού διαλύματος DPPH\*, έτσι ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 1 mL σε αναλογία νερού-μεθανόλης 1-1.

Μετά την προσθήκη του DPPH\*, ακολούθησε επώαση των δειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min και φωτομέτρηση στα 517 nm. Η αντιοξειδωτική δράση υπολογίστηκε από την εξίσωση:

$$\text{Αντιοξειδωτική δράση \% (scavenging capacity)} \\ = 100 - [(A_{\text{δείγματος}} - A_{\text{τυφλού}}) * 100 / A_{\text{μάρτυρα}}]$$

όπου  $A_{\text{μάρτυρα}}$  = η απορρόφηση DPPH και μεθανόλης, απουσία εκχυλίσματος στα 517 nm και  $A_{\text{τυφλού}}$  = απορρόφηση εκχυλίσματος και διαλύτη, στα 517 nm.

Για την έκφραση της αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιείται ο συντελεστής  $SC_{50}$  που ορίζεται ως η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού ή του εκχυλίσματος στην οποία παρατηρείται το 50 % της δέσμευσης της ρίζας όπως προσδιορίζεται από τη μείωση της απορρόφησης στα 517 nm. Για τον υπολογισμό του  $SC_{50}$  έγιναν αραιώσεις ενός πυκνού διαλύματος πρότυπων ενώσεων ή εκχυλίσματος στις οποίες προστέθηκε σταθερή ποσότητα διαλύματος ρίζας, μετρήθηκε η απορρόφηση αυτών μετά από 30 min και οι τιμές απορρόφησης με τις συγκεντρώσεις τοποθετήθηκαν σε διάγραμμα από το οποίο υπολογίστηκε το  $SC_{50}$ .

### **3.2.2.17. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης πρότυπων ενώσεων και εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε βακτηριακούς πληθυσμούς.**

Ο έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς πριν και μετά την χημειο-ενζυμική τους τροποποίηση πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται αναλυτικά στο Κεφάλαιο 1, στην Παράγραφο 1.2.2.17. Η επώαση βακτηριακών κυττάρων  $10^7$  CFU/mL πραγματοποιήθηκε παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων εκχυλισμάτων από 0 έως  $320 \mu\text{g mL}^{-1}$ , στους  $37^\circ\text{C}$ , για  $\sim 12$  h, υπό ανάδευση, 180 rpm.

### 3.3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

Σε αυτό το κεφάλαιο περιγράφεται η ανάπτυξη νανοβιοκαταλυτών ως αποτελεσματικά εργαλεία για ποικίλες βιοκαταλυτικές διεργασίες. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η ακινητοποίηση β-γλυκοσιδασών σε PCCs και σε τροποποιημένα PCCs με -COOH και -OH. Τα ένζυμα ακινητοποιήθηκαν τόσο με ομοιοπολικό όσο και με μη ομοιοπολικό τρόπο. Η ομοιοπολική ακινητοποίηση πραγματοποιήθηκε μέσω παραγώγων σύζευξης EDC/NHS ενώ η μη ομοιοπολική ακινητοποίηση πραγματοποιήθηκε με φυσική προσρόφηση. Με αυτό τον τρόπο ήταν δυνατόν να μελετηθεί πως ο τρόπος ακινητοποίησης και η χημεία της επιφάνειας των νανοϋλικών επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της ακινητοποίησης, καθώς επίσης και την καταλυτική συμπεριφορά των ακινητοποιημένων β-γλυκοσιδασών. Οι νανοβιοκαταλύτες αυτοί στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για την τροποποίηση της πρότυπης ελευρωπαΐνης σε υδροξυτυροσόλη αλλά και για την τροποποίηση εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς, με σκοπό τον εμπλουτισμό τους σε υδροξυτυροσόλη και την βελτίωση των βιολογικών τους δράσεων.

#### 3.3.1. Αποτελεσματικότητα ακινητοποίησης και δραστικότητα των ακινητοποιημένων β-γλυκοσιδασών

Χρησιμοποιήθηκαν νανοϋλικά PCCs και τροποποιημένα PCCs με πολλαπλές λειτουργικές ομάδες οξυγόνου (PCCox), για πρώτη φορά, ως υπόστρωμα για την ακινητοποίηση ενζύμων. Είναι ευρέως γνωστό ότι η τροποποίηση των νανοϋλικών με βάση των άνθρακα με λειτουργικές ομάδες, παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη αλληλεπιδράσεων μεταξύ των νανοϋλικών και των μορίων των ενζύμων, επηρεάζοντας την καταλυτική τους συμπεριφορά (Patila et al., 2016c, 2013a; Pavidis et al., 2012c). Η ακινητοποίηση της Albgl και της Tmbgl πραγματοποιήθηκε μέσω φυσικής προσρόφησης και μέσω ομοιοπολικής ακινητοποίησης. Η φυσική προσρόφηση των ενζύμων σε νανοϋλικά με βάση των άνθρακα βασίζεται σε υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις και σε ηλεκτροστατικές ή van der Waals δυνάμεις ή σε δεσμούς υδρογόνου (Gao and Kyrtzizis, 2008a; Patila et al., 2013a). Η ομοιοπολική σύνδεση των ενζύμων στις ομάδες -OH και -COOH αυτών των νανοϋλικών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τους παράγοντες σύνδεσης EDC και NHS. Σε αυτήν την περίπτωση, σχηματίζονται σταθεροί αμιδικοί δεσμοί μεταξύ του ενζύμου και του νανοϋλικού (Gao and Kyrtzizis, 2008a). Δεν μπορεί βέβαια να αποκλειστεί και η συνύπαρξη φυσικής προσρόφησης του ενζύμου.

Στον Πίνακα 3.1. παρουσιάζεται η απόδοση ακινητοποίησης % της Albgl και της Tmbgl στα νανοϋλικά PCC και PCCox. Σε όλες τις περιπτώσεις ο μοριακός λόγος ενζύμου-υλικού ήταν 0.1. Η Tmbgl ακινητοποιήθηκε επιτυχώς για πρώτη φορά σε νανοϋλικά. Η απόδοση της ακινητοποίησης της Tmbgl δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τον τρόπο ακινητοποίησης ή από τη χημεία της επιφάνειας του νανοϋλικού. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.1., επιτυγχάνονται υψηλά ποσοστά ακινητοποίησης (>90 %) για την Tmbgl σε όλες τις περιπτώσεις. Έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά ότι η β-γλυκοσιδάση από *Thermotoga maritima* έχει ακινητοποιηθεί επιτυχώς σε σφαιρίδια χιτίνης και χρησιμοποιήθηκε στην υδρόλυση της λακτόζης (Xue et al., 2015). Από την άλλη, η ακινητοποίηση της Albgl σε PCC και PCCox πραγματοποιήθηκε επίσης με επιτυχία, όμως σε αυτή την περίπτωση η απόδοση ακινητοποίησης φάνηκε να επηρεάζεται τόσο από την μέθοδο ακινητοποίησης όσο και από τη χημεία της επιφάνειας του νανοϋλικού που χρησιμοποιήθηκε. Το υψηλότερο ποσοστό ακινητοποίησης (90 %) παρατηρήθηκε όταν

χρησιμοποιήθηκε ως φορέας το PCCox για την ομοιοπολική ακινητοποίηση της Albgl, αναδεικνύοντας έτσι την σημαντικότητα της τροποποίησης των PCCs. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η ομοιοπολική ακινητοποίηση σε λειτουργικές ομάδες στην επιφάνεια των νανοϋλικών, μπορούν να αυξήσουν την απόδοση της ακινητοποίησης (Lee et al., 2006; Pavlidis et al., 2010). Όσο αφορά την μη ομοιοπολική ακινητοποίηση, υψηλότερη απόδοση ακινητοποίησης παρατηρείται στην περίπτωση που τα PCCs χρησιμοποιούνται ως φορείς. Η παρουσία των λειτουργικών ομάδων οξυγόνου μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλότερες αποδόσεις ακινητοποίησης σε νανοϋλικά με βάση των άνθρακα όπως έχει αναφερθεί από τους Patila et al, (Patila et al., 2016c). Όμοια και σε μερικές περιπτώσεις χαμηλότερα ποσοστά ακινητοποίησης έχουν αναφερθεί για την ακινητοποίηση β-γλυκοσιδάσης σε διάφορα νανοϋλικά, όπως σε νανοσωλήνες άνθρακα μονών και πολλαπλών τοιχωμάτων και σε υβριδικά μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του γραφενίου (Çelik et al., 2016; Gómez et al., 2005; Orfanakis et al., 2018a).

**Πίνακας 3.1.** Απόδοση ακινητοποίησης (%) και ενζυμική δραστηριότητα της ακινητοποιημένης και ελεύθερης β-γλυκοσιδάσης σε PCC και PCCox μετά από ομοιοπολική και μη ομοιοπολική ακινητοποίηση (το τυπικό σφάλμα σε όλες τις περιπτώσεις ήταν μικρότερο από 5 %).

Δείγμα	Απόδοση ακινητοποίησης %-(Δραστηριότητα U mg <sup>-1</sup> ενζύμου)			
	Albgl		Tmbgl	
	Ομοιοπολική	Μη ομοιοπολική	Ομοιοπολική	Μη ομοιοπολική
PCC	72-(0.8)	80-(0.5)	95-(24)	94-(18)
PCCox	90-(5)	62-(9)	93-(35)	94-(37)
Ελεύθερο ένζυμο	9.5		45	

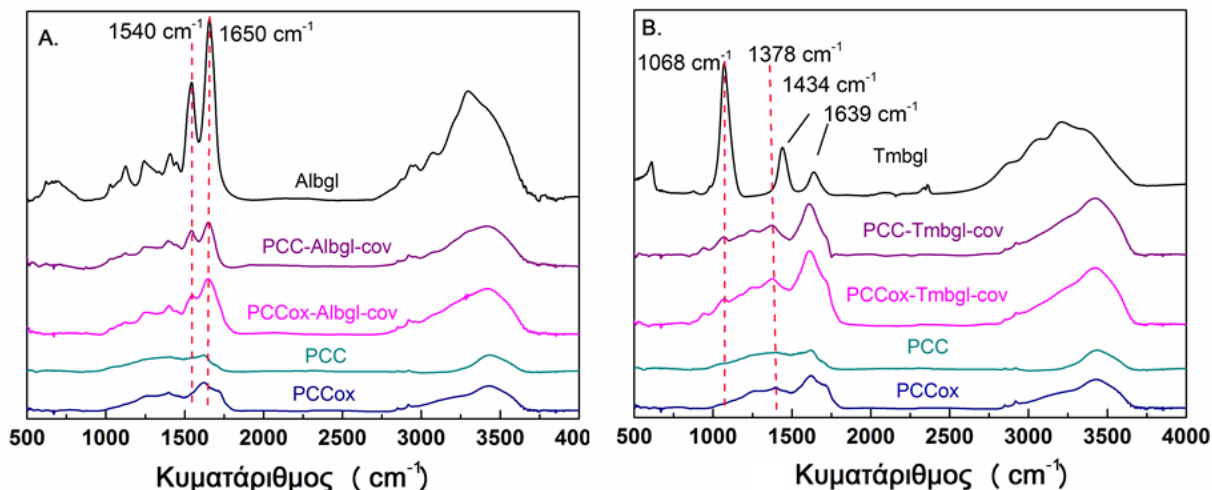
Μελετήθηκε η υδρολυτική δραστηριότητα των νανοβιοκαταλυτών και οι αρχικοί ρυθμοί αντίδρασης παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1. Η καταλυτική δραστηριότητα της ελεύθερης β-γλυκοσιδάσης είναι υψηλότερη από το ακινητοποιημένο ένζυμο. Αυτή η μείωση στη δραστηριότητα είναι σε συμφωνία με ότι έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία για την β-γλυκοσιδάση και άλλα ένζυμα, και μπορεί να συσχετιστεί με διαμορφωτικές αλλαγές στο μόριο του ενζύμου μετά την ακινητοποίηση ή σε φαινόμενα μεταφοράς μάζας, που μπορούν να μειώσουν την καταλυτική αποτελεσματικότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου (Orfanakis et al., 2018b; Patila et al., 2016a). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η καταλυτική δραστηριότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου δεν φαίνεται να σχετίζεται με την ποσότητα του ενζύμου που ακινητοποιήθηκε, αλλά φαίνεται να σχετίζεται με τη χημεία της επιφάνειας του νανοϋλικού. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.1., όταν χρησιμοποιείται ως φορέας ακινητοποίησης το νανοϋλικό PCCox, οι νανοβιοκαταλύτες παρουσιάζουν υψηλότερη υδρολυτική δραστηριότητα σε όλες τις περιπτώσεις. Η μειωμένη δραστηριότητα που παρατηρείται στην περίπτωση όπου ως φορέας ακινητοποίησης χρησιμοποιείται το νανοϋλικό PCC, μπορεί να οφείλεται στην αλληλεπίδραση

των ενζύμων με την υδρόφοβη επιφάνεια των νανοϋλικών που μπορεί να οδηγήσει σε διαμορφωτικές αλλαγές στο μόριο των ενζύμων και συνεπώς σε απώλεια της καταλυτικής τους δράσης. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί κατά την ακινητοποίηση της λιπάσης σε νανοσωλήνες άνθρακα και σε νανοϋλικά γραφενίου (Pavlidis et al., 2012c). Επιπλέον, αναμένεται ένα σημαντικό ποσοστό του ακινητοποιημένου ενζύμου να προσροφάται στο μεσο-πορώδες των PCCs, προκαλώντας περιορισμένη διάχυση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο των ακινητοποιημένων μορίων ενζύμου (Li et al., 2010). Από την άλλη, η οξείδωση των PCCs αναμένεται ότι μειώνει το πορώδες των νανοϋλικών αυτών, εμποδίζοντας έτσι την προσρόφηση των μορίων του ενζύμου στους πόρους του νανοϋλικού. Επιπλέον, στην περίπτωση που ως φορέας χρησιμοποιούνται τα PCCox το ένζυμο αναμένεται να συνδέεται στις λειτουργικές ομάδες οξυγόνου του υλικού. Η παρουσία αυτών των λειτουργικών ομάδων μπορεί να δημιουργεί ένα πιο υδρόφιλο μικροπεριβάλλον γύρω από τα μόρια του ακινητοποιημένου ενζύμου, που διευκολύνει τη διάχυση του υποστρώματος στα ενεργά κέντρα των μορίων του ενζύμου αυξάνοντας την καταλυτική του δράση (Patila et al., 2018).

### 3.3.2. Χαρακτηρισμός των νανοβιοκαταλυτών

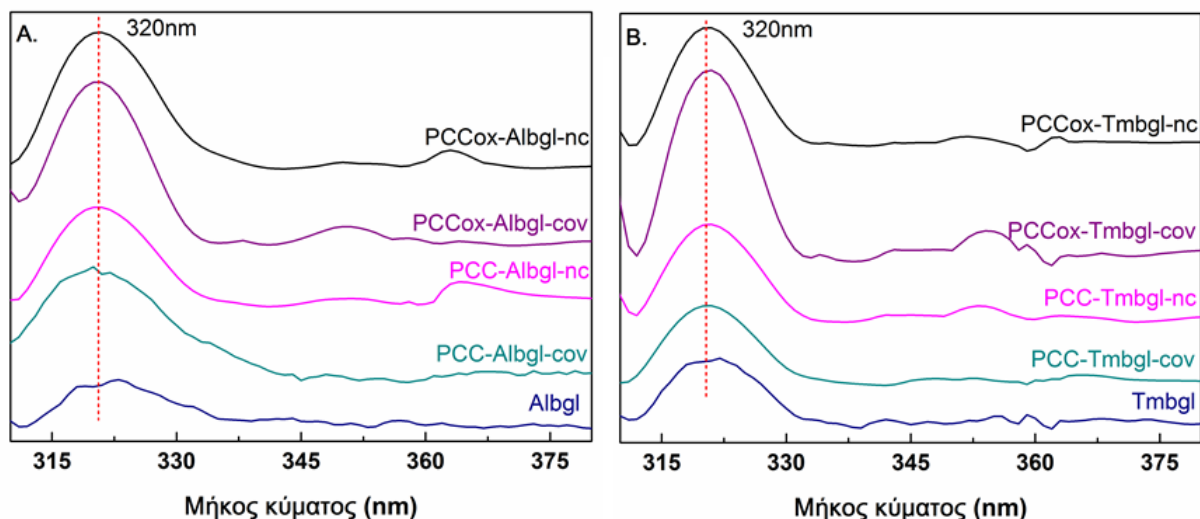
Για να επιβεβαιωθεί η ακινητοποίηση των ενζύμων στα νανοϋλικά PCC και PCCox χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία FTIR. Στην Εικόνα 3.2. παρουσιάζονται τα φάσματα FTIR των ελεύθερων και ακινητοποιημένων β-γλυκοσιδασών. Το φάσμα της ελεύθερης Albgl είναι ένα τυπικό φάσμα β-γλυκοσιδάσης και παρουσιάζει δύο κορυφές απορρόφησης στα  $1540\text{ cm}^{-1}$  και στα  $1650\text{ cm}^{-1}$  (J. Zhou et al., 2013), που σχετίζονται με την χαρακτηριστική περιοχή Amide I και προέρχονται από τις δονήσεις έκτασης του C=O του πεπτιδικού δεσμού και συνδέονται άμεσα με τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης και πιο συγκεκριμένα με την δευτεροταγή δομή ( $\alpha$ -έλικα,  $\beta$ -φύλλα,  $\beta$ -στροφές, τυχαίο σπείραμα). Τα δείγματα της ακινητοποιημένης Albgl στα νανοϋλικά PCCs και PCCox επίσης εμφανίζουν αυτές τις δύο κορυφές στα  $1540\text{ cm}^{-1}$  και στα  $1650\text{ cm}^{-1}$ , υποδηλώνοντας της επιτυχή σύνδεση του ενζύμου στα νανοϋλικά. Το φάσμα της ελεύθερης Tmbgl εμφανίζει τρεις κορυφές απορρόφησης στα  $1378\text{ cm}^{-1}$ ,  $1343\text{ cm}^{-1}$ , και στα  $1639\text{ cm}^{-1}$  που σχετίζονται με την χαρακτηριστική περιοχή Amide I. Τα δείγματα της ακινητοποιημένης Tmbgl επίσης εμφανίζουν κορυφές απορρόφησης στα  $1068\text{ cm}^{-1}$  και στα  $1378\text{ cm}^{-1}$ , η οποία είναι ελαφρός μετατοπισμένη σε σύγκριση με την ελεύθερη. Αυτές οι κορυφές υποδεικνύουν την παρουσία της Tmbgl στα νανοϋλικά PCC και PCCox και συνεπώς την επιτυχή ακινητοποίησή της. Η ανάλυση FTIR χρησιμοποιήθηκε επίσης για τη διερεύνηση των μεταβολών της διαμόρφωσης των ενζύμων μετά την ακινητοποίησή τους στα PCC και PCCox σε σύγκριση με την δομή των ελεύθερων ενζύμων. Για να εκτιμηθεί η διαφορά μεταξύ των φασμάτων FTIR των ελεύθερων και των ακινητοποιημένων β-γλυκοσιδασών, υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης  $r$  (Chiaradia et al., 2016; Secundo et al., 2007; Tziaila et al., 2010). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο συντελεστής συσχέτισης  $r$ , για την ακινητοποιημένη Albgl και την Tmbgl είναι 0.99 και 0.98, αντίστοιχα, υποδεικνύοντας ότι η δομή του ακινητοποιημένου ενζύμου δεν μεταβάλλεται.





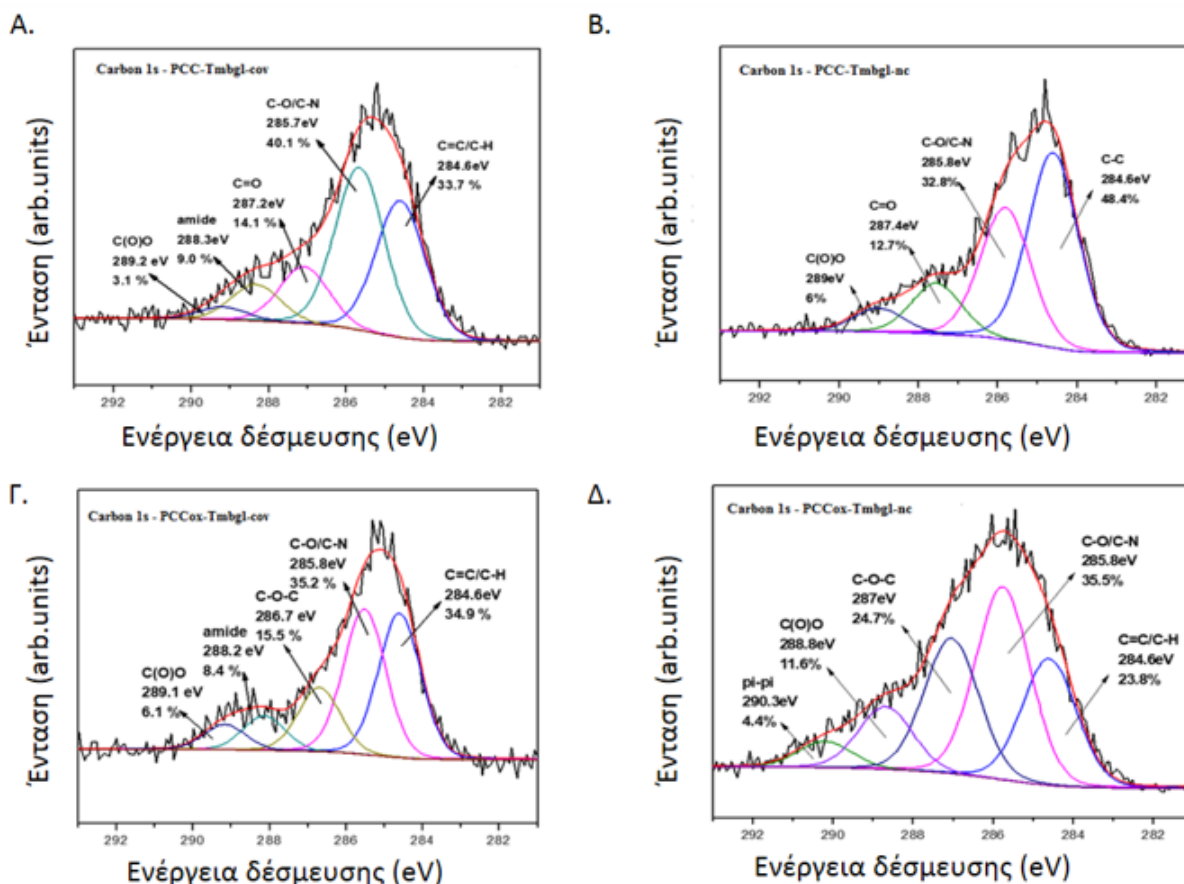
**Εικόνα 3.2.** Φάσματα FTIR των (A) PCC-AlbgI-cov και PCCox-AlbgI-cov σε σύγκριση με το ελεύθερο ένζυμο και τα νανοϋλικά PCC και PCCox, (B) PCC-Tmbgl-cov και PCCox-Tmbgl-cov σε σύγκριση με το ελεύθερο ένζυμο και τα νανοϋλικά PCC και PCCox.

Η φασματοσκοπία φθορισμού έχει χρησιμοποιηθεί και στο παρελθόν για να επιβεβαιώσει την παρουσία ενζύμου σε ένα στερεό υλικό (Ayoub and Caseli, 2017; Junior and Caseli, 2017). Πραγματοποιήθηκε καταγραφή φασμάτων εκπομπής φθορισμού ελεύθερου και ακινητοποιημένου ενζύμου προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παρουσία β-γλυκοσιδάσης στα νανοϋλικά PCC και PCCox (Εικόνα 3.3). Το μήκος διέγερσης ρυθμίστηκε στα 280 nm και η ένταση εκπομπής καταγράφηκε στην περιοχή 300 έως 400 nm. Το μήκος κύματος μέγιστης εκπομπής της ελεύθερης β-γλυκοσιδάσης προσδιορίστηκε στα 320 nm και για τα δύο ένζυμα (AlbgI και Tmbgl). Το φάσμα φθορισμού των νανοϋλικών PCC και PCCox καταγράφηκε στις ίδιες συνθήκες και δεν παρατηρήθηκε εκπομπή στο εύρος 300 με 400 nm (Εικόνα III3, Παράρτημα). Όπως μπορεί να παρατηρηθεί στην Εικόνα 3.3, σε όλες τις περιπτώσεις, το φάσμα φθορισμού των νανοβιοκαταλυτών εμφανίζει μέγιστη εκπομπή σε μήκος 320 nm, υποδεικνύοντας την παρουσία β-γλυκοσιδάσης και συνεπώς την επιτυχή ακινητοποίηση του ενζύμου.



**Εικόνα 3.3.** Φάσμα φθορισμού (A) της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης AlbgI σε PCC και PCCox, και (B) της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης TmbglI σε PCC και PCCox.

Προκειμένου να διερευνηθεί ο τρόπος αλληλεπίδρασης (ομοιοπολικός ή μη ομοιοπολικός) των ακινητοποιημένων ενζύμων με τα νανοϋλικά PCC και PCCox χρησιμοποιήθηκε η λήψη φασμάτων φασματοσκοπία XPS. Από το φάσμα φωτοηλεκτρονίων του άνθρακα 1s του νανοβιοκαταλύτη PCC-TmbglI-con (Εικόνα 3.4. A), προκύπτει η συνεισφορά πέντε ειδών δεσμού άνθρακα: από τον δεσμό C=C/C-H στα 284.6 eV (33.7%), από τον δεσμό C-O/C-N, από τις λειτουργικές ομάδες C-O του υλικού PCC και από τους δεσμούς C-N και C-O του ενζύμου, που αντιπροσωπεύει το 40.1 % του συνολικού φάσματος του άνθρακα. Στα 287.2 eV, ανιχνεύεται ο δεσμός C=O bonds (14.1%), ενώ μία μοναδική κορυφή που ανιχνεύεται στα 288.3 eV, επιβεβαιώνει τον ομοιοπολικό δεσμό μεταξύ του ενζύμου TmbglI και του υλικού PCC, και οφείλεται στην δημιουργία αμιδικών δεσμών (Seretoglou et al., 2008b) και αντιπροσωπεύει το 9.0 % του ποσοστού του άνθρακα. Τέλος, η κορυφή στα 289.2 eV οφείλεται στις καρβοξυλομάδες. Αυτή η κορυφή αντιπροσωπεύει μόνο το 3.1 % γιατί οι ομάδες αυτές συμμετέχουν στην δημιουργία αμιδικών δεσμών με το ένζυμο. Αναλόγως, από το φάσμα φωτοηλεκτρονίων άνθρακα 1s για το δείγμα PCC-TmbglI-nc (Εικόνα 3.4. B), μπορούν να διακριθούν μόνο τέσσερα ήδη δεσμών: οι δεσμοί C=C/C-H στα 284.6 eV που αποτελούν το 48.4 % του φάσματος άνθρακα, του δεσμούς C-O/C-N στα 285.8 eV (32.8 %), τις καρβοξυλικές ομάδες στα 287.4 eV (12.7%), και τέλος η κορυφή στα 289.0 eV εξαιτίας των υδροξυλομάδων που αντιπροσωπεύουν το 6.0 % της ολικής ποσότητας του άνθρακα. Δεν διακρίνεται κορυφή που να αντιστοιχεί στη δημιουργία αμιδικών δεσμών του ενζύμου με το νανοϋλικό, ενώ η κορυφή των καρβοξυλομάδων είναι αρκετά υψηλότερη σε σχέση με την κορυφή του δείγματος PCC-TmbglI-con, υποδεικνύοντας την απουσία αμιδικού δεσμού μεταξύ της TmbglI και του νανοϋλικού PCC.

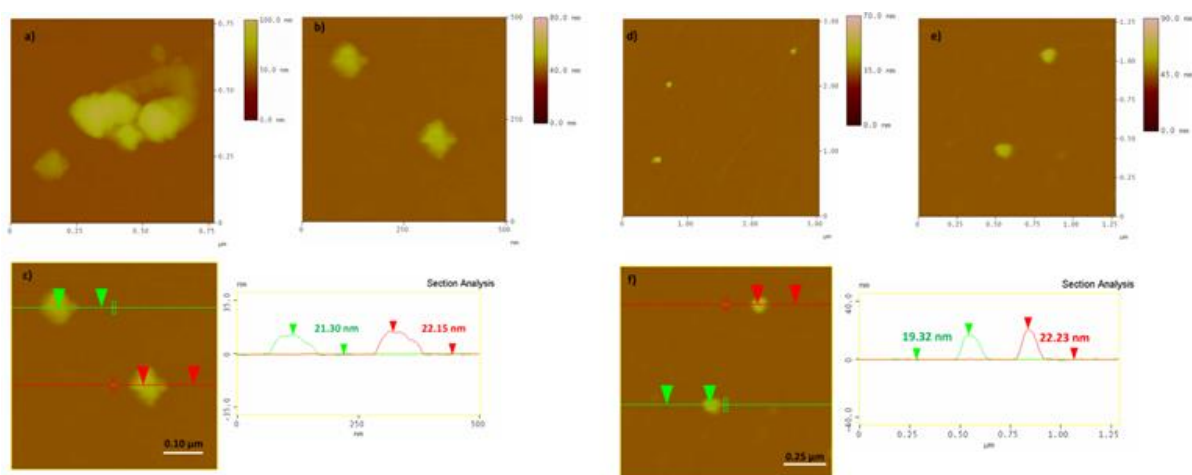


**Εικόνα 3.4.** Φάσμα φωτοεκπομπής X-ray άνθρακα C1s των Α) PCC-Tmbgl-con, Β) PCC-Tmbgl-nc, Γ) PCCox-Tmbgl-con, και Δ) PCCox-Tmbgl-nc.

Τα φάσματα XPS του βιοκαταλύτη PCCox-Tmbgl-con εμφανίζονται στην Εικόνα 3.4Γ. Στην κορυφή φωτοηλεκτρονίων C1s φαίνεται ότι συμβάλλουν 5 διαφορετικά είδη δεσμών: οι δεσμοί C=C/C-N στα 284.6 eV (34.9%), οι δεσμοί C-O/C-N στα 285.8 eV (35.2%), και η κορυφή στα 286.7 eV που οφείλεται στις εποξυ ομάδες, εξαιτίας της οξείδωσης που έχει υποστεί το νανοϋλικό PCC και αντιπροσωπεύουν το 15.5 % του φάσματος του άνθρακα. Οι αμιδικοί δεσμοί εξαιτίας του ομοιοπολικού δεσμού του ενζύμου με το υλικό και οι καρβοξυλομάδες του PCCox εμφανίζονται στα (8.4%), ενώ κάποιες καρβοξυλομάδες που δε συμμετέχουν σε δεσμό εμφανίζονται στα 289.4 eV (6.1%). Τέλος, για τον νανοβιοκαταλύτη PCCox-Tmbgl-nc (Εικόνα 3.4 Δ), εμφανίζονται οι κορυφές για τους δεσμούς C=C/C-H στα 284.6 eV (23.8%), για τους C-O/C-N στα 285.8 eV (35.5%), και για τις εποξυ ομάδες στα 287.0 eV (24.7%). Δεν υπάρχει κορυφή που να αντιστοιχεί στη δημιουργία αμιδικού δεσμού, υποδεικνύοντας την μη ομοιοπολικής φύσης ακινητοποίηση του ενζύμου με το νανοϋλικό. Η κορυφή στα 289.0 eV οφείλεται στις καρβοξυλομάδες και αντιστοιχεί στο 11.6 % του άνθρακα. Σε σύγκριση με αυτό του νανοβιοκαταλύτη PCCox-Tmbgl-con, η συμβολή από τις καρβοξυλομάδες είναι υψηλότερη γιατί δεν δημιουργείται ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ των αμιδικών ομάδων του ενζύμου και αυτών των καρβοξυλομάδων. Μία κορυφή στα 290.3 eV μπορεί να οφείλεται σε π-π αλληλεπιδράσεις μεταξύ του μορίων του ενζύμου και μορίων του νανοϋλικού ή μεταξύ μορίων ενζύμου (Srgrou

et al., 2015). Το % ποσοστό των ατόμων C, O, N και ο λόγος C / N της ομοιοπολικά ή μη ομοιοπολικά ακινητοποιημένης Tmbgl στα PCC και PCCox παρουσιάζονται στο Παράρτημα III, παράγραφο 2.

Η ακινητοποίηση της β- γλυκοσιδάσης σε οξειδωμένα και μη PCCs επιβεβαιώθηκε και μέσω εικόνων AFM (Εικόνα 3.5.). Αντιπροσωπευτικές εικόνες AFM δείχνουν ότι μόρια β- γλυκοσιδάσης συνδέονται στην επιφάνεια των PCC και των PCCox. Όπως φαίνεται από την ανάλυση του τοπογραφικού προφίλ, το μέγεθος των PCC αυξάνεται σημαντικά, υποδηλώνοντας την επιτυχή σύζευξη του ενζύμου. Ο μέσος όρος του πάχους του νανοβιοκαταλύτη PCC-Tmbgl-con είναι από 20 έως 25 nm. Επίσης, το μέσο πάχος του PCCox-Tmbgl-con είναι ελαφρώς μειωμένο και κυμαίνεται από 18 έως 23 nm. Από αυτές τις εικόνες, είναι φανερό ότι η οξείδωση του νανοϋλικού PCCox επηρεάζει τον μέσο όρο του μεγέθους των νανοσωματιδίων και του υπολογιζόμενου μεγέθους του νανοβιοκαταλύτη.



**Εικόνα 3.5.** Εικόνες AFM ύψους και τοπογραφικό προφίλ του PCC-Tmbgl (Εικόνες a–c) και του PCCox - Tmbgl (Εικόνες d–f).

### 3.3.3. Θερμική σταθερότητα της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης β-γλυκοσιδάσης

Μελετήθηκε η θερμική σταθερότητα της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης β-γλυκοσιδάσης και προσδιορίστηκε ο χρόνος ημι-ζωής (δηλαδή ο χρόνος που απαιτείται για να χάσει το ένζυμο το 50 % της αρχικής του δραστηριότητας) μετά από επώαση στους 60 °C, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού οξέος 100 mM, pH 5.0, και pH 6.5 για την Albgl και την Tmbgl, αντίστοιχα. Στον Πίνακα 3.2. παρουσιάζονται οι χρόνοι ημι-ζωής και φαίνεται ότι ο χρόνος ημι-ζωής της ομοιοπολικά ακινητοποιημένης Albgl αυξάνεται περίπου κατά 50 %. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν αυξημένη αντίσταση στην θερμική μετουσίωση που μπορεί να προκληθεί από θέρμανση. Παρόμοια αύξηση στη θερμική σταθερότητα έχει αναφερθεί για ακινητοποιημένη β-γλυκοσιδάση σε διάφορα υλικά (Chen et al., 2014; Orfanakis et al., 2018a; Verma et al., 2013). Στην περίπτωση της Tmbgl, το ένζυμο τόσο σε ελεύθερη όσο και σε ακινητοποιημένη μορφή παρουσίασε υψηλή σταθερότητα στους 60°C, όπως ήτανε

αναμενόμενο, καθώς είναι γνωστή η θερμοσταθερότητα του συγκεκριμένου ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα η ομοιοπολικά ακινητοποιημένη Tmbgl σε PCC και PCCox διατήρησε περισσότερο από το 95% της αρχικής της δραστηριότητας, μετά από επώαση για 24 h στους 60°C.

**Πίνακας 3.2.** Χρόνος ημι-ζωής της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης Albgl σε PCC και PCCox μετά από επώαση στους 60 °C σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού οξέος 100 mM pH 5.0.

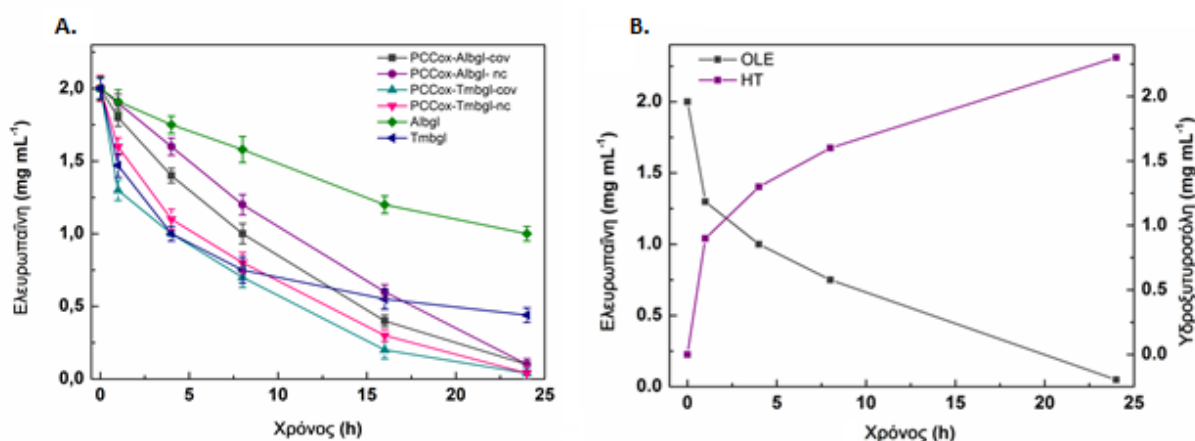
Δείγμα	Χρόνος ημι-ζωής (h)
Albgl	0.61 ± 0.04
PCC-Albgl-cov	0.92 ± 0.10
PCC-Albgl-nc	0.71 ± 0.07
PCCox-Albgl-cov	0.91 ± 0.06
PCCox-Albgl-nc	0.83 ± 0.05

### 3.3.4. Χημειο ενζυμική μετατροπή της ελευρωπαΐνης σε υδροξυτυροσόλη από β-γλυκοσιδάση

Ελεύθερη και ακινητοποιημένη β-γλυκοσιδάση σε PCCox χρησιμοποιήθηκε στην χημειοενζυμική τροποποίηση της ελευρωπαΐνης σε υδροξυτυροσόλη. Πιο συγκεκριμένα, όπως περιγράφεται στην Εικόνα 3.1, η β-γλυκοσιδάση καταλύει την υδρόλυση της ελευρωπαΐνης σχηματίζοντας το άγλυκο προϊόν της ελευρωπαΐνης (1<sup>ο</sup> Βήμα), το οποίο στη συνέχεια σε υδατικό διάλυμα σε pH 7.0 στους 60°C, υφίσταται μια γρήγορη χημική αναδιάταξη, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό της υδροξυτυροσώλης (Achmon and Fishman, 2015; Briante et al., 2001). Χρωματογραφία HPLC χρησιμοποιήθηκε για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της ελευρωπαΐνης και της υδροξυτυροσώλης. Ο σχηματισμός της υδροξυτυροσώλης μελετήθηκε επίσης με ανάλυση υγρής χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μαζών (LC-MS) (Παράρτημα III, παράγραφος 4). Στην Εικόνα 3.6A απεικονίζεται η εξέλιξη της ενζυμικής υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης από ελεύθερη και ακινητοποιημένη β-γλυκοσιδάση. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.3, η ελεύθερη β-γλυκοσιδάση εμφανίζει χαμηλότερο ρυθμό τροποποίησης από το ακινητοποιημένο ένζυμο, το οποίο μπορεί να συσχετιστεί με την υψηλότερη σταθερότητα που εμφανίζει η ακινητοποιημένη β-γλυκοσιδάση σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο (Πίνακας 3.3). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο νανοβιοκαταλύτης PCCox-Tmbgl εμφανίζει υψηλότερη υδρολυτική δραστηριότητα από τον PCCox-Albgl, το οποίο συμφωνεί με τα αποτελέσματα που περιγράφονται στον Πίνακα 3.3 για την υδρόλυση του *p*-NPG. Σε όλες τις περιπτώσεις η % απόδοση υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης μετά από 24 h επώασης φτάνει σε τιμές ~ 90 %, τιμή υψηλότερη από αυτές που αναφέρονται βιβλιογραφικά σε παρόμοιες συνθήκες (Liu and Yong, 2018). Ο σχηματισμός της υδροξυτυροσώλης μετά την υδρόλυση της ελευρωπαΐνης και την επώαση στους 60°C σε pH 7.0, σε συνάρτηση με τον χρόνο, περιγράφεται στην Εικόνα 3.6B. Η χημειοενζυμική τροποποίηση της ελευρωπαΐνης οδήγησε στον σχηματισμό 2.4 g L<sup>-1</sup> υδροξυτυροσώλης, συγκέντρωση η οποία είναι ανάμεσα στις υψηλότερες συγκεντρώσεις που αναφέρονται βιβλιογραφικά (Hamza and Sayadi, 2015; Khoufi et al., 2011; Liu and Yong, 2018).

**Πίνακας 3.3.** Αρχικοί ρυθμοί αντίδρασης της ακινητοποιημένης β-γλυκοσιδάσης σε PCC και PCCox για την υδρόλυση της ελευρωπαϊνης (OLE) και η % απόδοση τροποποίησης της ελευρωπαϊνης μετά από 24 h επώασης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού 100 mM, pH 5.0, και pH 6.5 για την Albgl και την Tmbgl, αντίστοιχα στους 37°C (το τυπικό σφάλμα ήταν μικρότερο από 5 % σε όλες τις περιπτώσεις).

Βιοκαταλύτης	Αρχικός ρυθμός αντίδρασης mM h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> βιοκαταλύτη	% απόδοση τροποποίησης της OLE
Ελεύθερη Albgl	0.05	50
PCCox-Albgl-cov	0.18	92
PCCox-Albgl-nc	0.16	90
Ελεύθερη Tmbgl	0.14	78
PCCox-Tmbgl-cov	0.20	98
PCCox-Tmbgl-nc	0.19	95

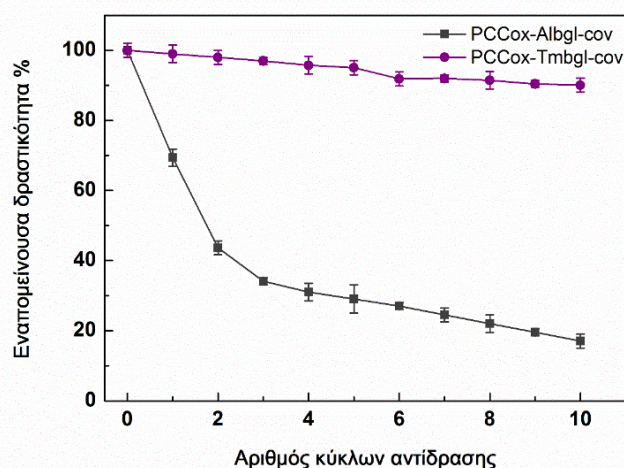


**Εικόνα 3.6.** Α) Η πορεία υδρόλυσης της ελευρωπαϊνης, από ελεύθερη και ακινητοποιημένη β-γλυκοσιδάση, σε συνάρτηση με τον χρόνο. Η ποσότητα του ενζύμου ήταν 0.15 mg mL<sup>-1</sup> και 0.07 g mL<sup>-1</sup> για την Albgl και την Tmbgl αντίστοιχα. Β) Η πορεία υδρόλυσης της ελευρωπαϊνης από την PCCox-Tmbgl-con και ο σχηματισμός της υδροξυτυροσόλης σε συνάρτηση με τον χρόνο (το τυπικό σφάλμα ήταν μικρότερο από 5 % σε όλες τις περιπτώσεις).

### 3.3.5. Μελέτη επαναχρησιμοποίησης της ακινητοποιημένης β-γλυκοσιδάσης

Η επαναχρησιμοποίηση των βιοκαταλυτών σε μεγάλης κλίμακας βιοκαταλυτικές διεργασίες είναι πολύ σημαντική ιδιαίτερα από οικονομικής άποψης. Εδώ μελετήθηκε η λειτουργική σταθερότητα των νανοβιοκαταλυτών που αναπτύχθηκαν και έδειξαν την καλύτερη υδρολυτική δραστηριότητα, PCCox-Albgl-con και PCCox-Tmbgl-con σε πολλαπλούς κύκλους αντίδρασης υδρόλυσης της ελευρωπαϊνης. Κάθε κύκλος αντίδρασης πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού οξέος 100 mM σε pH 5.0 και pH 6.5 για την Albgl και την

Tmbgl, αντίστοιχα, στους 37°C για 24 h. Μετά από κάθε κύκλο, ο βιοκαταλύτης διαχωρίστηκε από το μείγμα της αντίδρασης με φυγοκέντρηση, ακολούθησαν πλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα και μετά επαναχρησιμοποίηση σε φρέσκο μείγμα αντίδρασης. Η Εικόνα 3.7. απεικονίζει την εναπομένουσα δραστηριότητα των ακινητοποιημένων β-γλυκοσιδασών μετά από κάθε κύκλο. Μετά από δέκα κύκλους επαναχρησιμοποίησης (240 h συνεχόμενης χρήσης), η εναπομένουσα δραστηριότητα της ακινητοποιημένης Albgl μειώθηκε στο 20 %, αποτελέσματα όμοια με αυτά που έχουν παρατηρηθεί για την Albgl ακινητοποιημένη σε άλλα νανοϋλικά (Chang et al., 2013; Chen et al., 2014; Orfanakis et al., 2018a; Xue et al., 2015). Μετά την επαναχρησιμοποίηση χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία FTIR ώστε να μελετηθούν πιθανές διαμορφωτικές αλλαγές στο ακινητοποιημένο ένζυμο. Ο συντελεστής συσχέτισης  $r$  των φασμάτων FTIR της PCCox-Albgl-con πριν και μετά την επαναχρησιμοποίηση είναι 0.94, υποδεικνύοντας ότι μία μικρή αλλαγή στην διαμόρφωση μπορεί να έχει συμβεί στο ακινητοποιημένο ένζυμο μετά την επαναχρησιμοποίηση, η οποία πιθανά να εξηγεί την απώλεια της δραστηριότητας μετά την επανειλημμένη χρήση. Από την άλλη, η εναπομένουσα δραστηριότητα της ακινητοποιημένης Tmbgl είναι υψηλότερη από 90 % μετά από δέκα κύκλους συνεχόμενης χρήσης. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι ο νανοβιοκαταλύτης PCCox-Tmbgl-con είναι πολύ σταθερός και μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά στην βιοτροποποίηση φυσικών προϊόντων όπως η ελευρωπαΐνη ή εκχυλίσματα φύλλων ελιάς.



**Εικόνα 3.7.** Επαναχρησιμοποίηση των ομοιοπολικά ακινητοποιημένων β-γλυκοσιδασών σε PCCox, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού οξέος 100 mM pH 5.0 και pH 6.5 για την Albgl και την Tmbgl, αντίστοιχα, στους 37°C.

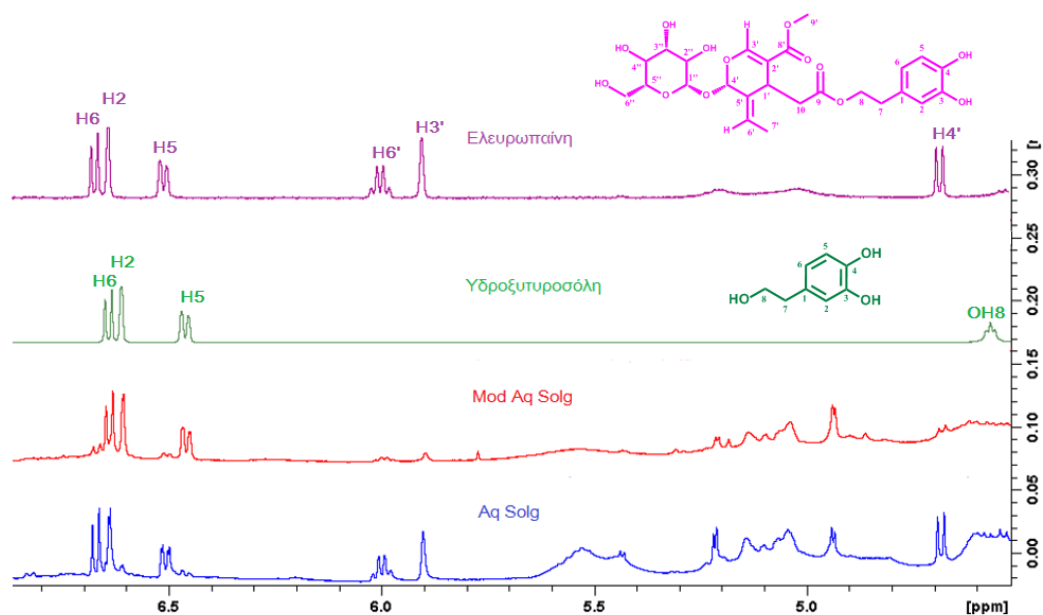
### 3.3.6. Χημειοενζυμική τροποποίηση εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς

Για την χημειοενζυμική τροποποίηση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς, με σκοπό τον εμπλουτισμό τους σε υδροξυτυροσόλη χρησιμοποιήθηκε ο νανοβιοκαταλύτης PCCox-Tmbgl-con που έδειξε την βέλτιστη καταλυτική ικανότητα, στην υδρόλυση της ελευρωπαΐνης, όπως φαίνεται από τον Πίνακα 3.4. Χρησιμοποιήθηκαν υδατικά εκχυλίσματα από φύλλα ελιάς που συλλέχθηκαν από την περιοχή των Σερρών και από αποξηραμένο δείγμα φύλλων

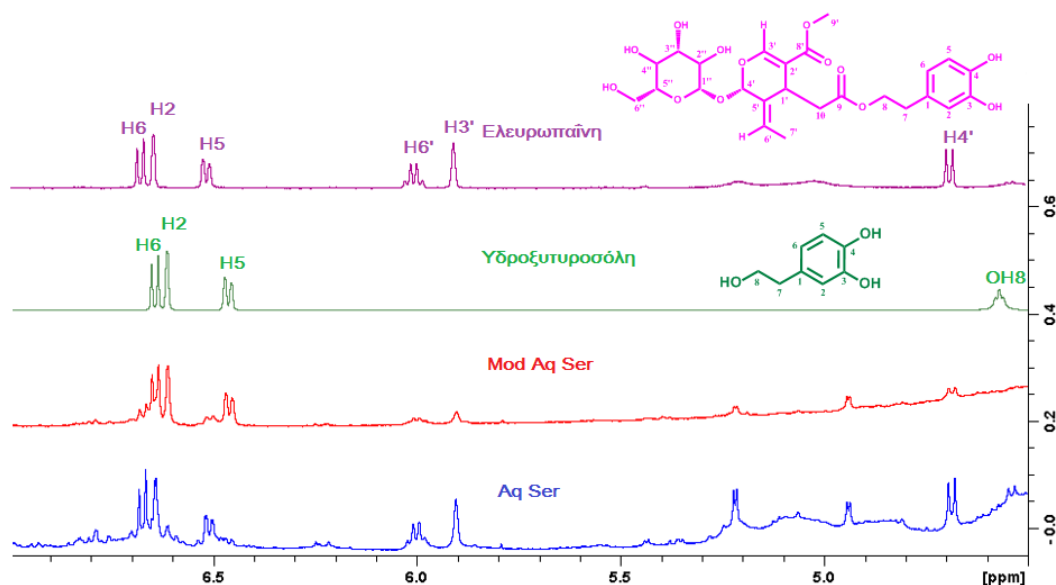
που ήταν εμπορικώς διαθέσιμο από την εταιρεία Solgar (Aq Ser και Aq Solg αντίστοιχα). Το φαινολικό προφίλ των εκχυλισμάτων πριν και μετά την τροποποίηση καθώς και η ποσοτικοποίηση της ελευρωπαΐνης και της υδροξυτυροσόλης πραγματοποιήθηκε με ανάλυση υγρής χρωματογραφίας-φασματοσκοπίας μαζών (LC-MS) (Παράρτημα III, παράγραφος 4). Για την ποιοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς πριν και μετά την τροποποίησή τους χρησιμοποιήθηκαν χρωματογραφία HPLC (Παράρτημα III, παράγραφος 3) και φασματοσκοπία NMR. Στην Εικόνα 3.8 φαίνεται επιλεγμένη περιοχή της υπέρθεσης, των  $^1\text{H-NMR}$  φασμάτων του εκχυλίσματος Aq Solg πριν και μετά την χημειοενζυμική του τροποποίηση από την PCCox-Tmbgl-con και των πρότυπων ενώσεων ελευρωπαΐνη και υδροξυτυροσόλη. Αρχικά κύρια ένωση του εκχυλίσματος είναι η ελευρωπαΐνη, όπως φαίνεται από τις χαρακτηριστικές κορυφές των πρωτονίων H6 (6.67 ppm), H2 (6.64 ppm), H5 (6.51 ppm), H6' (6.00 ppm), H3' (5.9 ppm) και H4' (4.68 ppm). Μετά την χημειοενζυμική τροποποίηση των εκχυλισμάτων, είναι φανερό ότι πλέον η κύρια ένωση είναι η υδροξυτυροσόλη καθώς σχεδόν εξαφανίζονται, από το φάσμα του εκχυλίσματος, οι χαρακτηριστικές κορυφές της ελευρωπαΐνης και πλέον κυριαρχούν οι χαρακτηριστικές κορυφές της υδροξυτυροσόλης των, μετατοπισμένων σε σχέση με των αντίστοιχων πρωτονίων της ελευρωπαΐνης, H6 (6.64 ppm), H2 (6.60 ppm), H5 (6.46 ppm) και της υδροξυλομάδας OH8 (4.56 ppm), αποδεικνύοντας την επιτυχή μετατροπή της ελευρωπαΐνης σε υδροξυτυροσόλη.

Όμοια εικόνα έχουμε και στην περίπτωση του εκχυλίσματος από φύλλα ελιάς της περιοχής των Σερρών. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.9 η κύρια ένωση του εκχυλίσματος είναι η ελευρωπαΐνη, όπως φαίνεται από τις χαρακτηριστικές κορυφές των πρωτονίων H6 (6.66 ppm), H2 (6.65 ppm), H5 (6.52 ppm), H6' (6.03 ppm), H3' (5.8 ppm) και H4' (4.67 ppm). Μετά την χημειοενζυμική τροποποίηση του εκχυλίσματος από την PCCox-Tmbgl-con, είναι φανερό ότι πλέον η κύρια ένωση είναι η υδροξυτυροσόλη καθώς σχεδόν εξαφανίζονται, από το φάσμα του εκχυλίσματος, οι χαρακτηριστικές κορυφές της ελευρωπαΐνης και πλέον κυριαρχούν οι χαρακτηριστικές κορυφές της υδροξυτυροσόλης των, μετατοπισμένων σε σχέση με των αντίστοιχων πρωτονίων της ελευρωπαΐνης, H6 (6.64 ppm), H2 (6.61 ppm), H5 (6.45 ppm) και της υδροξυλομάδας OH8 (4.55 ppm), επιβεβαιώνοντας την επιτυχή μετατροπή της ελευρωπαΐνης σε υδροξυτυροσόλη. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από τις αναλύσεις HPLC και LC-MS και για τα δύο εκχυλίσματα (Παράρτημα III, παραγράφους 4 και 5).





**Εικόνα 3.8.** Επιλεγμένη περιοχή των  $^1\text{H-NMR}$  φασμάτων του εκχυλίσματος Solgar πριν και μετά την χημειοενζυμική του τροποποίηση (Aq Solg και Mod Aq Solg αντίστοιχα) από την PCCox-Tmbgl-con και των πρότυπων ενώσεων ελευρωπαΐνη και υδροξυτυροσόλη.



**Εικόνα 3.9.** Επιλεγμένη περιοχή των  $^1\text{H-NMR}$  φασμάτων του εκχυλίσματος από φύλλα ελιάς της περιοχής Σερρών πριν και μετά την χημειοενζυμική του τροποποίηση (Aq Ser και Mod Aq Ser αντίστοιχα) από την PCCox-Tmbgl-con και των πρότυπων ενώσεων ελευρωπαΐνη και υδροξυτυροσόλη.

Στον Πίνακα 3.4 παρατήθητε τα αποτελέσματα ποσοτικοποίησης της ελευρωπαΐνης και της υδροξυτυροσόλης στα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς πριν και μετά την τροποποίησή τους που υπολογίστηκαν με ανάλυση LC-MS. Το εκχύλισμα Solgar φαίνεται να έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ελευρωπαΐνη σε σχέση με το εκχύλισμα από φύλλα ελιάς Σερρών ( $132 \text{ mg g}^{-1}$

και 86 mg g<sup>-1</sup> αντίστοιχα). Και στις δύο περιπτώσεις μετά από 24 h επώσης των εκχυλισμάτων με τον νανοβιοκατάλυτη PCCox-Tmbgl-con στους 37°C, η μετατροπή της ελευρωπαΐνης ήταν μεγαλύτερη από 90 %. Η τελική συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης στα εκχυλίσματα μετά την χημειοενζυμική τροποποίηση σχεδόν τριπλασιάστηκε και στα δύο εκχυλίσματα. Σε αντίστοιχες μελέτες όπου τροποποιήθηκαν ενζυμικά υδατικά ή οργανικά εκχυλίσματα φύλλων ελιάς, με διάφορα υδρολυτικά ένζυμα όπως η β-γλυκοσιδάση, η κυτταρινάση κ.α., παρατηρήθηκε σε άλλες περιπτώσεις λιγότερος και σε άλλες μεγαλύτερος εμπλουτισμός των εκχυλισμάτων σε υδροξυτυροσόλη, επιβεβαιώνοντας την πολυπλοκότητα του συστήματος και την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη (Liu and Yong, 2018; Nikolavits et al., 2017; Yuan et al., 2015).

**Πίνακας 3.4.** Ποσοτική ανάλυση της περιεκτικότητας των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε ελευρωπαΐνη (OL) και υδροξυτυροσόλη (HYD) και η % απόδοση της τροποποίησης της ελευρωπαΐνης μετά από επώαση με τον νανοβιοκατάλυτη PCCox-Tmbgl-con για 24h στους 37°C.

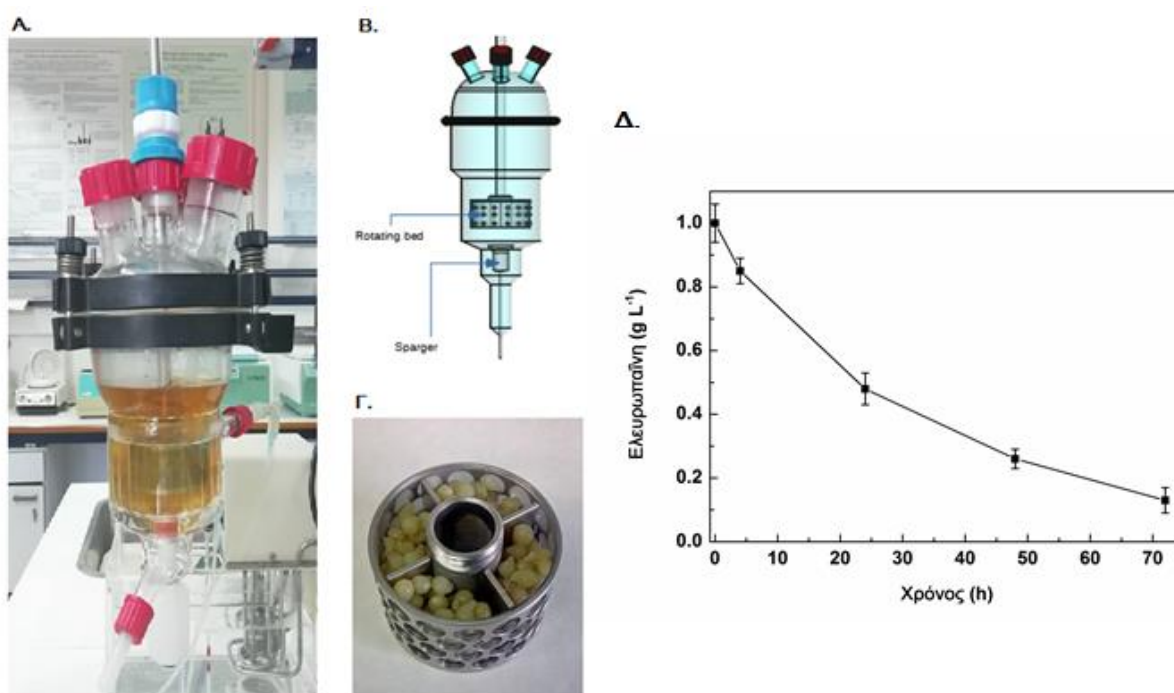
Δείγμα	OL mg / g εκχυλίσματος	% Μετατροπή της OL	HYD mg / g εκχυλίσματος
Aq Solg	132	-	3.0
Mod. Aq Solg	9	93	8.3
Aq Ser	86	-	3.8
Mod. Aq Ser	4	95	8.8

### 3.3.7. Κλιμάκωση (Scale-up) της χημειοενζυμικής τροποποίησης εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς

Η βιοκατάλυση έχει πλέον ενσωματωθεί στις βιομηχανικές διεργασίες, όπως στην βιομηχανία φαρμάκων, τροφίμων και ποτών, καθώς τα ένζυμα ως βιομηχανικοί βιοκαταλύτες προσφέρουν πολυάριθμα πλεονεκτήματα σε σχέση με τις παραδοσιακές χημικές διεργασίες, τόσο στη βιωσιμότητα όσο και στην αποτελεσματικότητα αυτών των διεργασιών (Charman et al., 2018; Tufvesson et al., 2010). Απαραίτητη προϋπόθεση για να χρησιμοποιηθούν τα ένζυμα ως καταλύτες στην βιομηχανία είναι η κλιμάκωση/scale-up των ενζυμικών βιοδεδρασιών που μελετώνται στο εργαστήριο. Σε αυτό το κεφάλαιο περιγράφεται μία προσπάθεια για κλιμάκωση της χημειοενζυμικής τροποποίησης των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς, από ακινητοποιημένη β-γλυκοσιδάση, από αντίδραση όγκου 1 mL σε σωληνάρια Erpendorf, σε αντίδραση όγκου 300 mL σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου περιστρεφόμενης κλίνης (continuous rotating bed-reactor, CRBR) και τέλος σε αντίδραση όγκου 2 Lt σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου πλήρους ανάδευσης (continuous stir-tank reactor, CSTR).

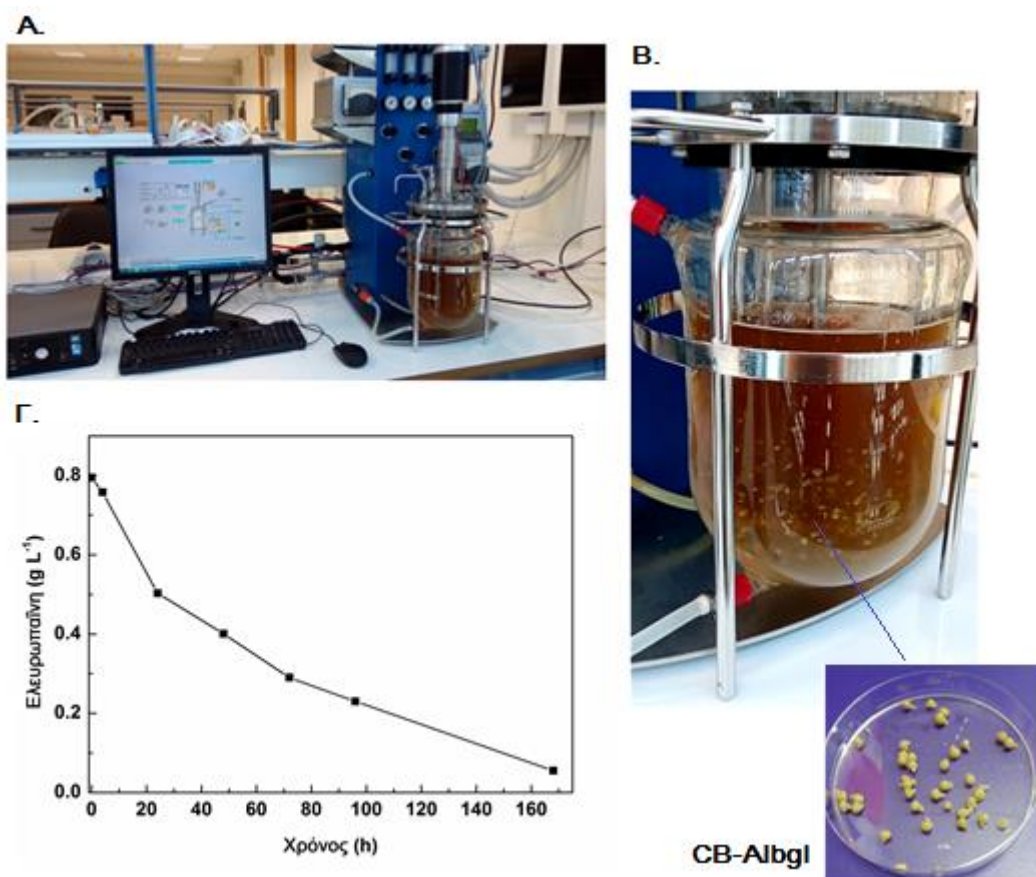
Το πρώτο βήμα για την κλιμάκωση της παραγωγής εμπλουτισμένου σε υδροξυτυροσόλη εκχυλίσματος φύλλων ελιάς, μέσω χημειοενζυμικής τροποποίησης με ακινητοποιημένη β-γλυκοσιδάση, πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου περιστρεφόμενης κλίνης όγκου 300 mL (Εικόνα 3.10). Ο βιοαντιδραστήρας περιστρεφόμενης κλίνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρίας SpinChem (SpinChem-Rotating-bed-reactor). Ως βιοκαταλύτης

χρησιμοποιήθηκε η β-γλυκοσιδάση AlbgI ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια χιτοζάνης (CB-AlbgI) (Παράρτημα III, παράγραφος 5), για να μπορέσει να τοποθετηθεί ο βιοκαταλύτης στην περιστρεφόμενη κλίνη, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.10Γ. Συνολικά ακινητοποιήθηκαν 30 mg AlbgI σε σφαιρίδια χιτοζάνης και χρησιμοποιήθηκαν για την τροποποίηση 3 g υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε τελικό όγκο αντίδρασης 300 mL (η τελική συγκέντρωση του ενζύμου ήταν  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ). Η ενζυμική τροποποίηση πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού οξέος 100 mM, pH 5.0, στους  $37^\circ\text{C}$  με ανάδευση 300 rpm. Σε διαφορετικούς χρόνους γινόταν δειγματοληψία και ανάλυση HPLC για την ποσοτικοποίηση της ελευρωπαϊνης στο μείγμα. Στην Εικόνα 3.10 απεικονίζεται η πορεία υδρόλυσης της ελευρωπαϊνης του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε συνάρτηση με τον χρόνο. Μετά από επώαση για 72 h τροποποιήθηκε το 87 % της ελευρωπαϊνης με αρχικό ρυθμό αντίδρασης  $0.38 \text{ mM h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  βιοκαταλύτη (Πίνακας 3.5). Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση του μείγματος της αντίδρασης στους  $60^\circ\text{C}$  για 1 h σε pH 7.0 για να σχηματιστεί η υδροξυτυροσώλη (Εικόνα 3.1). Στο τέλος της τροποποίησης το εκχύλισμα είχε υδροξυτυροσώλη σε συγκέντρωση  $2.5 \text{ mg g}^{-1}$ , έναντι του  $1 \text{ mg g}^{-1}$  που είχε πριν την τροποποίηση, επομένως η περιεκτικότητα σε υδροξυτυροσώλη στο εκχύλισμα αυξήθηκε κατά ένα παράγοντα 2.5.



**Εικόνα 3.10.** Α) Αντίδραση τροποποίησης εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου περιστρεφόμενης κλίνης. Β) Σχηματική αναπαράσταση βιοαντιδραστήρα περιστρεφόμενης κλίνης. Γ) Σφαιρίδια χιτοζάνης με ακινητοποιημένης β-γλυκοσιδάση στην περιστρεφόμενη κλίνη (rotating bed). Δ) Η πορεία υδρόλυσης της ελευρωπαϊνης από εκχύλισμα φύλλων ελιάς, καταλυόμενη από ακινητοποιημένη β-γλυκοσιδάση, σε συνάρτηση με τον χρόνο, σε 300 mL βιοαντιδραστήρα περιστρεφόμενης κλίνης, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού 100 mM, pH 5.0, στους  $37^\circ\text{C}$ . Η συγκέντρωση του ενζύμου ήταν  $100 \text{ mg L}^{-1}$ .

Το δεύτερο βήμα για την κλιμάκωση της παραγωγής εμπλουτισμένου σε υδροξυτυροσόλη εκχυλίσματος φύλλων ελιάς, μέσω χημειοενζυμικής τροποποίησης με ακινητοποιημένη β-γλυκοσιδάση, πραγματοποιήθηκε σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου πλήρους ανάδευσης όγκου 2 L (Εικόνα 3.11.). Ο βιοαντιδραστήρας ήταν της εταιρίας Bioengineering. Ως βιοκαταλύτης και σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η β-γλυκοσιδάση Albgl ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια χιτοζάνης (CB-Albgl) (για τον εύκολο διαχωρισμό από το μείγμα της αντίδρασης) τα οποία προστέθηκαν μέσα στον βιοαντιδραστήρα Εικόνα 3.11B. Συνολικά ακινητοποιήθηκαν 80 mg Albgl σε σφαιρίδια χιτοζάνης και χρησιμοποιήθηκαν για την τροποποίηση 20 g υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε τελικό όγκο αντίδρασης 2 L (η τελική συγκέντρωση του ενζύμου ήταν  $40 \text{ mg L}^{-1}$ ). Η ενζυμική τροποποίηση πραγματοποιήθηκε σε όμοιες συνθήκες με αυτές που περιγράφηκαν παραπάνω, δηλαδή σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού οξέος 100 mM, pH 5.0, στους 37°C με ανάδευση 250 rpm. Σε διαφορετικούς χρόνους γινόταν δειγματοληψία και ανάλυση HPLC για την ποσοτικοποίηση της ελευρωπαΐνης στο μείγμα.



**Εικόνα 3.11.** A-B) Αντίδραση τροποποίησης εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου πλήρους ανάδευσης. Γ) Η πορεία υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης από εκχύλισμα φύλλων ελιάς, καταλύομενη από ακινητοποιημένη β-γλυκοσιδάση, σε συνάρτηση με τον χρόνο, σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου πλήρους ανάδευσης, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού 100 mM, pH 5.0, στους 37 °C. Η ποσότητα του ενζύμου ήταν  $40 \text{ mg L}^{-1}$ .

Στην Εικόνα 3.11 απεικονίζεται η πορεία υδρόλυσης της ελευρωπαϊίνης του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σε συνάρτηση με τον χρόνο. Μετά από επώαση για 168 h τροποποιήθηκε το 90 % της ελευρωπαϊίνης με αρχικό ρυθμό αντίδρασης  $0.57 \text{ mM h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  βιοκαταλύτη (Πίνακας 3.5). Για να σχηματιστεί η υδροξυτυροσόλη, ακολούθησε επώαση του μείγματος της αντίδρασης στους  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  για 1 h σε pH 7.0 (Εικόνα 3.1.). Η συγκέντρωση της υδροξυτυροσόλης στο εκχύλισμα μετά την τροποποίηση ήταν  $1.8 \text{ mg g}^{-1}$ , έναντι του  $0.8 \text{ mg g}^{-1}$  που είχε πριν την τροποποίηση, επομένως η περιεκτικότητα σε υδροξυτυροσόλη στο εκχύλισμα αυξήθηκε κατά ένα παράγοντα 2. Τα παραπάνω αποτελέσματα περιγράφουν τη δυνατότητα κλιμάκωσης της χημειοενζυμικής τροποποίησης των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς για τον εμπλουτισμό τους σε υδροξυτυροσόλη. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι βιοκαταλυτική διεργασία εξαρτάται από πολλούς παράγοντες οι οποίοι μεταβάλλονται κατά τη διαδικασία της κλιμάκωσης και απαιτούνται εκτεταμένες μελέτες για την βελτιστοποίηση αυτών των βιοδιεργασιών σε βιοαντιδραστήρες μεγάλου όγκου.

**Πίνακας 3.5.** Αρχικοί ρυθμοί αντίδρασης της CB-Albgl για την υδρόλυση της ελευρωπαϊίνης (OLE) από εκχύλισμα φύλλων ελιάς, η % απόδοση τροποποίησης της ελευρωπαϊίνης στο τελικό προϊόν δηλαδή μετά από 72 h επώασης για τον CRBR και μετά από 168 h για τον CSTR σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού  $100 \text{ mM}$ , pH 5.0, στους  $37^\circ\text{C}$  (το τυπικό σφάλμα ήταν μικρότερο από 5 % σε όλες τις περιπτώσεις) και η συγκέντρωση υδροξυτυροσόλης (HT) στο τελικό τροποποιημένο εκχύλισμα.

Τύπος βιοαντιδραστήρα	Αρχικός ρυθμός αντίδρασης $\text{mM h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ βιοκαταλύτη	% απόδοση τροποποίησης της OLE	mg HT/g extract
CRBR	0.38	87	2.5
CSTR	0.57	90	2

### 3.3.8. Μελέτη προσδιορισμού των ολικών φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ολικών φαινολικών ενώσεων στα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς πριν και μετά την τροποποίηση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Follin-Ciocalteu. Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε φαινόλες έγινε με την βοήθεια καμπύλης αναφοράς, με πρότυπη ένωση το καφεϊκό οξύ. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 3.6. Το εκχύλισμα από τα φύλλα ελιάς που συλλέχθηκαν από την περιοχή των Σερρών είχε 20 % υψηλότερη περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις. Μετά την χημειοενζυμική τροποποίηση των εκχυλισμάτων η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις μειώθηκε μόνο κατά 5-6 %, υποδεικνύοντας ότι ο στοχευμένος χημειοενζυμικός εμπλουτισμός των εκχυλισμάτων σε υδροξυτυροσόλη διατηρεί σε μεγάλο ποσοστό την περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε φαινολικές ενώσεις, οι οποίες προσδίδουν στα εκχυλίσματα τις πολυάριθμες βιολογικές τους δράσεις (El and Karakaya, 2009; Goulas et al., 2009; Pereira et al., 2007; Vogel et al., 2015).

### 3.3.9. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς και των κύριων ενώσεων τους

Η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς, πριν και μετά την χημειοενζυμική τους τροποποίηση καθώς και των κύριων ενώσεών τους, δηλαδή της ελευρωπαΐνης και της υδροξυτυροσόλης, εκτιμήθηκε με τη μέθοδο σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH\* και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.6. Είναι γνωστό ότι η αντιοξειδωτική δράση των φαινολών εξαρτάται από τη θέση και τον αριθμό των υδροξυλομάδων που φέρουν στον φαινολικό δακτύλιο (Tripoli et al., 2005). Η αντιοξειδωτική δράση είναι σημαντικά ενισχυμένη όταν υπάρχει αυξημένος αριθμός υδροξυλομάδων καθώς μεγαλύτερος αριθμός τέτοιων ομάδων στην ένωση (που λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίων) συνεπάγεται ένα σταθερό προϊόν ρίζας και καλύτερη αντιοξειδωτική δράση (Xie et al., 2015). Έτσι, τόσο η υδροξυτυροσόλη όσο και η ελευρωπαΐνη εμφανίζουν πολύ καλή αντιοξειδωτική δράση με  $SC_{50}$  στα 3 και 9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  αντίστοιχα, όπως έχει αναφερθεί και βιβλιογραφικά (Nenadis and Tsimidou, 2002; Visioli et al., 1998). Το γεγονός ότι η υδροξυτυροσόλη εμφανίζει τριπλάσια αντιοξειδωτική δράση από την ελευρωπαΐνη είναι μόνο ένας από τους λόγους που μελετάμε τον χημειοενζυμικό εμπλουτισμό των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε υδροξυτυροσόλη. Η διαφορά στην αντιοξειδωτική δράση μεταξύ της υδροξυτυροσόλης και της ελευρωπαΐνης οφείλεται στην παρουσία του γλυκοζυλιωμένου ελενολικού οξέος στην δεύτερη, με αποτέλεσμα την στερεοχημική παρεμπόδιση της δωρεάς του δεύτερου H του τμήματος της υδροξυτυροσόλης (Visioli et al., 1998).

**Πίνακας 3.6.** Συγκέντρωση ολικών φαινολικών ενώσεων και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς πριν και μετά την χημειοενζυμική τους τροποποίηση.

Εκχύλισμα	mg φαινολικών / g εκχυλίσματος	$SC_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
Aq Ser	114 $\pm$ 1.7	44 $\pm$ 1
Mod Aq Ser	107 $\pm$ 1.7	38 $\pm$ 3
Aq Solg	91 $\pm$ 0.2	45 $\pm$ 0.4
Mod Aq Solg	86 $\pm$ 0.3	39 $\pm$ 1
Ελευρωπαΐνη	-	9 $\pm$ 0,2
Υδροξυτυροσόλη	-	3 $\pm$ 0,1

Τα δύο εκχυλίσματα φύλλων ελιάς φαίνεται να έχουν όμοια αντιοξειδωτική δράση τόσο πριν όσο και μετά την τροποποίησή τους, όπως αυτή μελετήθηκε με τη μέθοδο DPPH\* (Πίνακας 3.6). Αξίζει να σημειωθεί ότι μετά των εμπλουτισμό των εκχυλισμάτων η αντιοξειδωτική ικανότητά τους αυξάνεται κατά ένα παράγοντα περίπου 14 %. Όπως αναφέρθηκε η αντιοξειδωτική δράση της υδροξυτυροσόλης είναι τριπλάσια από αυτή της ελευρωπαΐνης και η ποσότητα της πρώτης στα εκχυλίσματα είναι τουλάχιστον τριπλάσια μετά τον εμπλουτισμό τους,

παρόλα αυτά η αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης των τροποποιημένων εκχυλισμάτων δεν είναι ανάλογη της αύξησης της περιεκτικότητάς τους σε υδροξυτυροσόλη. Τα αποτελέσματα αυτά μπορούν να εξηγηθούν από το γεγονός ότι η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων εξαρτάται όχι μόνο από τις επιμέρους φαινολικές ενώσεις αλλά και από συνολικό φαινολικό τους προφίλ (Xie et al., 2015). Σε αντίστοιχη μελέτη όπου πραγματοποιήθηκε ενζυμική τροποποίηση εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς με διάφορα υδρολυτικά ένζυμα αυξήθηκε σημαντικά η αντιοξειδωτική δράση μετά την τροποποίηση (Hamza et al., 2012). Αντίθετα, σε άλλη έρευνα, μετά την τροποποίηση με υδρολυτικά ένζυμα μειώθηκε σημαντικά η περιεκτικότητα σε φαινολικές ενώσεις, με αποτέλεσμα να μειωθεί και η αντιοξειδωτική δράση παρόλο που έγινε εμπλουτισμός των εκχυλισμάτων σε υδροξυτυροσόλη (Yuan et al., 2015).

### **3.3.10. Αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς και των κύριων ενώσεών τους σε βακτηριακούς πληθυσμούς.**

Για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης των πρότυπων ενώσεων ελευρωπαΐνη και υδροξυτυροσόλη και των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς πριν και μετά την χημειοενζυμική τους τροποποίηση χρησιμοποιήθηκαν δύο βακτηριακά στελέχη, το *E.coli* BL21(DE3) αρνητικό κατά Gram και το *Corynebacterium* θετικό κατά Gram. Πιο συγκεκριμένα ο έλεγχος έγινε μετά από αλληλεπίδραση των υπό μελέτη δειγμάτων με συγκεκριμένο αριθμό βακτηριακών κυττάρων, απουσία θρεπτικού μέσου, ώστε να μην υπάρχει δυνατότητα πολλαπλασιασμού των βακτηρίων και κατά συνέπεια να διατηρείτε σταθερή η αναλογία βακτηριακού πληθυσμού-δείγματος. Αρχικά, συγκρίθηκε ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης κατά την εκθετική φάση, των βακτηρίων που δεν είχαν προ-επωαστεί με τα υπό μελέτη δείγματα και ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης των βακτηρίων που είχαν προ-επωαστεί με διαφορετικές συγκεντρώσεις κάθε εξεταζόμενης ένωσης. Διαπιστώθηκε ότι σε κάθε περίπτωση παρέμενε περίπου σταθερός ο ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για βακτηριοκτόνο και όχι για βακτηριοστατική δράση των βιοδραστικών συστατικών.

Η αντιμικροβιακή δράση προσδιορίστηκε με την βοήθεια του προγράμματος Graphpad και την εφαρμογή μιας μη γραμμικής λογιστικής δοσο-εξαρτώμενης καμπύλης τεσσάρων παραμέτρων. Για τον υπολογισμό της αντιβακτηριακής ικανότητας των υπό μελέτη ενώσεων υπολογίστηκε, κατά την εκθετική φάση, η ποσοστιαία ανάπτυξη των βακτηρίων που είχαν προεπωαστεί με διαφορετικές συγκεντρώσεις των υπό μελέτη ενώσεων σε σύγκριση με την ανάπτυξη των βακτηρίων απουσία ενώσεων. Σε κάθε περίπτωση υπολογίστηκε η συγκέντρωση της υπό μελέτης ένωσης/ή εκχυλίσματος που χρειάζεται για να θανατωθεί το 50 % του βακτηριακού πληθυσμού (Lethal Concentration, LC<sub>50</sub>). Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 3.7.

**Πίνακας 3.7.** Αντιμικροβιακή δράση των τροποποιημένων και μη εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς.

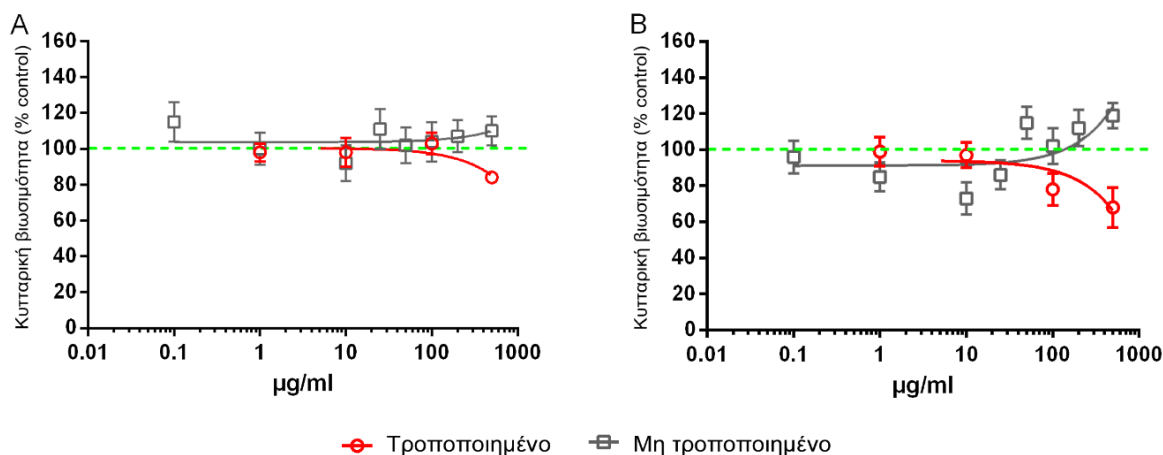
Δείγμα	<i>E.coli</i>	<i>Corynebacterium</i>
	LC <sub>50</sub> µg mL <sup>-1</sup>	LC <sub>50</sub> µg mL <sup>-1</sup>
Aq Ser	172 ±30	107 ±18
Mod Aq Ser	25 ±1	32 ±3
Aq Solg	180 ±25	184 ±22
Mod Aq Solg	63 ±6	54 ±8
Ελευρωπαΐνη	186 ±54	280 ±34
Υδροξυτυροσόλη	8 ±2	3 ±0.5

Είναι γνωστό ότι τα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς εμφανίζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες εξαιτίας του πλούσιου φαινολικού τους περιεχομένου (Bisignano et al., 1999b; Pereira et al., 2007). Η ελευρωπαΐνη και η υδροξυτυροσόλη έχουν πρωταγωνιστικό ρόλο στη δράση αυτή. Σύμφωνα με τους Bisignano et al., η υδροξυτυροσόλη παρουσιάζει ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με την πρόδρομη ένωσή της, την ελευρωπαΐνη, σε μία σειρά από παθογόνους για τον άνθρωπο μικροοργανισμούς (όπως *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* κ.α.). Μάλιστα σε κάποιες περιπτώσεις η υδροξυτυροσόλη έδειξε καλύτερη αντιμικροβιακή δράση και από το γνωστό αντιβιοτικό, την αμπικιλίνη (Bisignano et al., 1999b). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα στα βακτηριακά στελέχη που περιγράφονται σε αυτό το κεφάλαιο, η υδροξυτυροσόλη εμφανίζει πολύ υψηλότερη αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με την ελευρωπαΐνη και πιο συγκεκριμένα ~20 φορές υψηλότερη δράση στην περίπτωση του *E.coli* και ~90 φορές υψηλότερη στην περίπτωση του *Corynebacterium* (Πίνακας 3.7). Όσο αφορά τη σύγκριση των δύο εκχυλισμάτων και τα δύο φαίνεται να έχουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι του *E.coli* και του *Corynebacterium* και όμοια μεταξύ τους. Είναι εντυπωσιακό ότι μετά την χημειοενζυμική τους τροποποίηση η αντιμικροβιακή δράση στην περίπτωση του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς Σερρών αυξήθηκε κατά επτά φορές ενώ στην περίπτωση του εκχυλίσματος των εμπορικά διαθέσιμων φύλλων ελιάς, η αντιμικροβιακή δράση τριπλασιάστηκε. Ο εμπλουτισμός των εκχυλισμάτων σε υδροξυτυροσόλη αιτιολογεί την αύξηση της αντιμικροβιακής δράσης των τροποποιημένων εκχυλισμάτων. Παρόλα αυτά το γεγονός ότι πριν τη τροποποίηση τα δύο εκχυλίσματα είχαν όμοια δράση ενώ μετά την τροποποίηση το εκχύλισμα από τα φύλλα ελιάς Σερρών εμφανίζει καλύτερη δράση από το εκχύλισμα Solgar υποδεικνύει ότι η αντιμικροβιακή δράση των εκχυλισμάτων επηρεάζεται και από το φαινολικό τους προφίλ και όχι μόνο από τις επιμέρους ενώσεις. Σε μελέτη των Korukluoglu et al., (Korukluoglu et al., 2010) είχαν προκύψει ανάλογα αποτελέσματα για οργανικά και υδατικά εκχύλιστα φύλλων ελιάς εναντίον ενός διαφορετικού στελέχους *E.coli*.

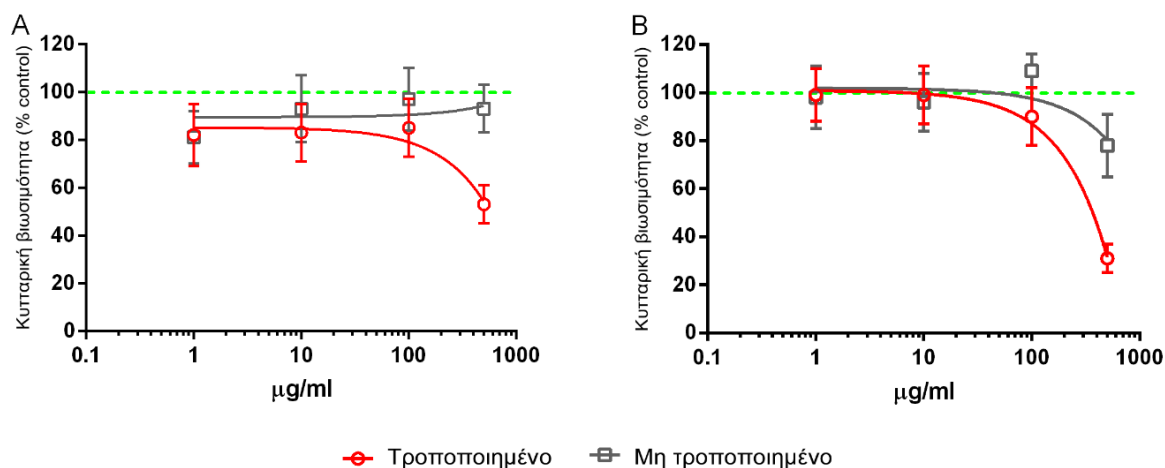


### 3.3.11. Μελέτη κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς

Η ελευρωπαΐνη, η υδροξυτυροσόλη και τα εκχυλίσματα από φύλλα ελιάς εμπλουτισμένα σε αυτές τις ενώσεις φαίνεται να εμφανίζουν αντιπολλαπλασιαστική ή κυτταροτοξική δράση σε διάφορες καρκινικές (Bali et al., 2014; Bouallagui et al., 2011; Han et al., 2009; Marchetti et al., 2015). Για την μελέτη της κυτταροτοξικότητας των τροποποιημένων και μη φύλλων ελιάς χρησιμοποιήθηκε μια φυσιολογική (ανθρώπινα εμβρυικά κύτταρα νεφρού, HEK293) και μια καρκινική σειρά (νεοπλασματικά κύτταρα λειομυοσαρκώματος επίμυος Wistar, LMS) κυττάρων (η μεθοδολογία περιγράφεται στο Παράρτημα III). Σε κύτταρα LMS το μη τροποποιημένο υδατικό εκχύλισμα Σερρών δεν παρουσίασε κυτταροτοξική δράση ως τη συγκέντρωση των 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  μετά από 24 h επώασης με κύτταρα LMS. Και το τροποποιημένο εκχύλισμα Σερρών δεν εμφάνισε ικανότητα αναστολής του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων ως τη συγκέντρωση των 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , ωστόσο στη συγκέντρωση των 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , μείωσε το κυτταρικό πληθυσμό κατά 15 %, σε σχέση με το control (Εικόνες 3.12A). Ακόμη και μετά από 48 h επώασης, η κυτταροτοξικότητα του μη τροποποιημένου υδατικού εκχυλίσματος Σερρών δεν μεταβάλλεται και η επιβίωση των κυττάρων παραμένει κοντά στο 100 % του control για ένα εύρος συγκεντρώσεων από 0.1 ως 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Όμως διαφορές παρατηρούνται, σε σχέση με τη μέτρηση 24 ώρου, στο τροποποιημένο υδατικό εκχύλισμα καθώς η κυτταρική επιβίωση στη συγκέντρωση των 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  μειώνεται από 84 % σε 68 % (Εικόνα 3.12B).



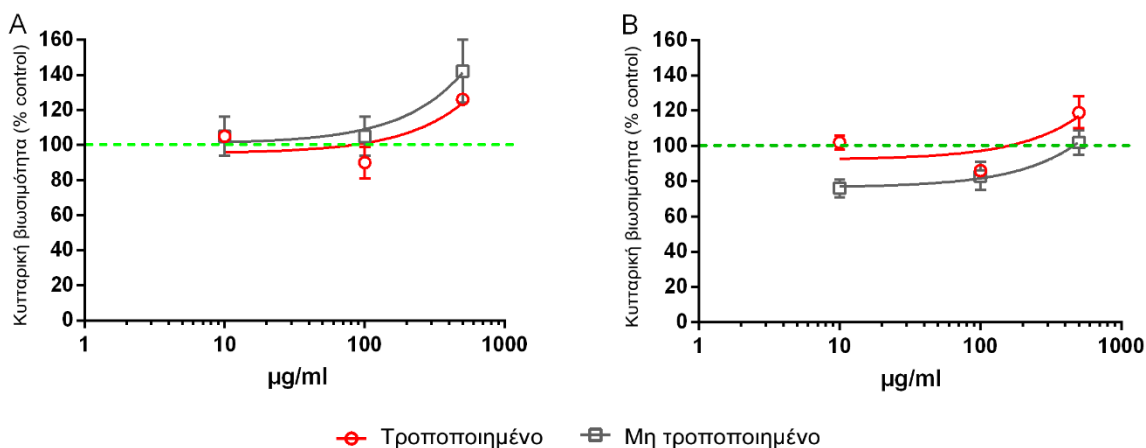
**Εικόνα 3.12.** Διάγραμμα επιβίωσης των κυττάρων LMS μετά από επώαση για 24 A) και 48 ώρες B) με αυξανόμενες συγκεντρώσεις μη τροποποιημένου και τροποποιημένου υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς από τις Σέρρες



**Εικόνα 3.13.** Διάγραμμα επιβίωσης των κυττάρων LMS μετά από επώαση για 24 h A) και 48 h B) με αυξανόμενες συγκεντρώσεις μη τροποποιημένου και τροποποιημένου εκχυλίσματος Solgar.

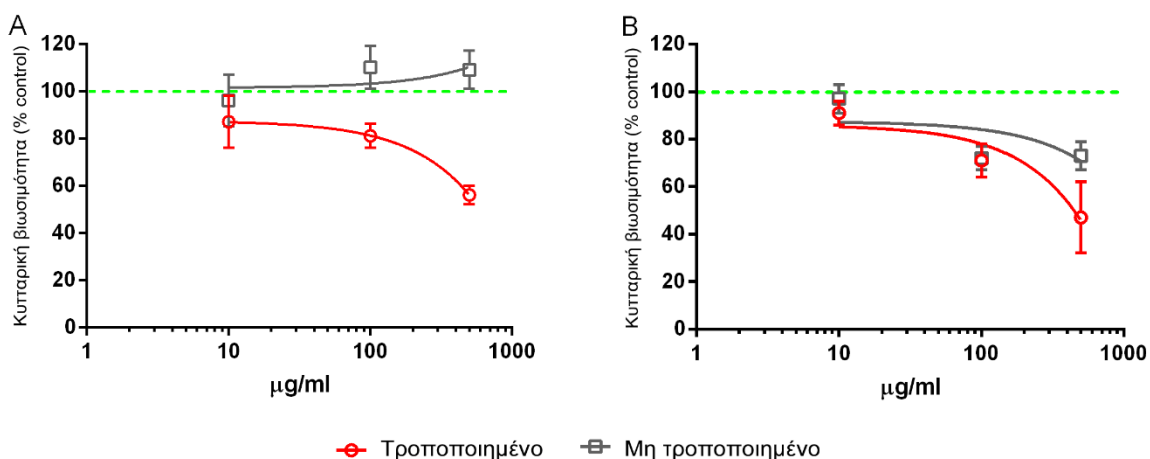
Σημαντικές διαφορές παρατηρούνται στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων LMS μετά από επώαση για 24 και 48 ώρες με τροποποιημένο και μη Solgar, ιδιαίτερα στις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.13A η επώαση των κυττάρων για 24 h με το μη τροποποιημένο Solgar προκαλεί μικρή αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων σε όλος το εύρος των συγκεντρώσεων, από τη μικρότερη ως τη μεγαλύτερη, της τάξεως του 10 % περίπου. Το τροποποιημένο εκχύλισμα παρουσιάζει ανάλογη εικόνα ως τη συγκέντρωση των 100 µg mL<sup>-1</sup> ωστόσο ο θάνατος των κυττάρων είναι σημαντικά μεγαλύτερος στη συγκέντρωση των 500 µg mL<sup>-1</sup> όπου αγγίζει το 50 %. Η αύξηση του χρόνου επώασης με το τροποποιημένο και μη Solgar οδηγεί και σε μείωση της βιωσιμότητας των καρκινικών κυττάρων στην υψηλότερη συγκέντρωση, η οποία ανέρχεται στο 31 ± 6 % για το τροποποιημένο (από 53 ± 8% στις 24 h) και 78 ± 13% για το μη τροποποιημένο Solgar (από 93 ± 10 % στις 24 h) (Εικόνα 3.13B).

Σε κύτταρα HEK293 τα τροποποιημένα και μη, υδατικά εκχυλίσματα φύλλων ελιάς Σερρών δεν παρουσίασαν κυτταροτοξική δράση έναντι των φυσιολογικών κυττάρων HEK293 ενώ φαίνεται ότι στις υψηλές συγκεντρώσεις προκαλούν ήπια επαγωγή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Η αύξηση του χρόνου έκθεσης των φυσιολογικών κυττάρων HEK293, στο τροποποιημένο και μη υδατικό εκχύλισμα Σερρών δεν επηρεάζει την ανάπτυξη τους (Εικόνα 3.14).



**Εικόνα 3.14.** Διάγραμμα επιβίωσης των κυττάρων HEK293 μετά από επώαση για 24 h A) και 48 h B) με αυξανόμενες συγκεντρώσεις μη τροποποιημένου και τροποποιημένου υδατικού εκχυλίσματος φύλλων ελιάς από τις Σέρρες

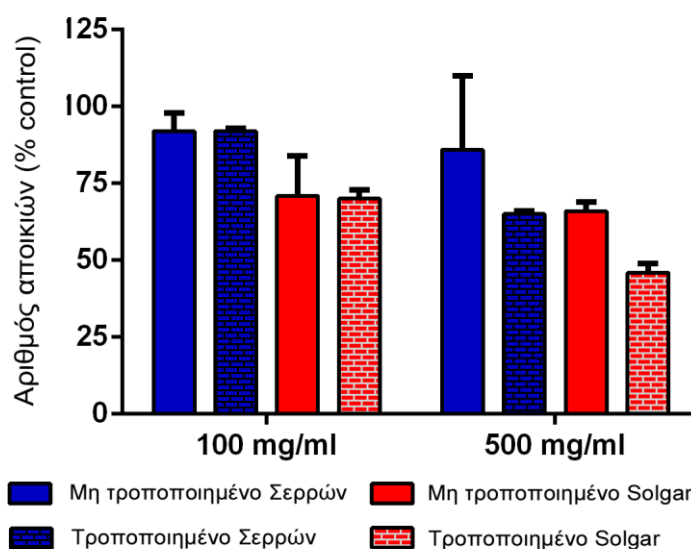
Ανάλογη εικόνα με τα καρκινικά κύτταρα LMS παρατηρείται και στα φυσιολογικά κύτταρα HEK293 όπου η δράση του τροποποιημένου και μη Solgar μετά από 24 ώρες επώασης είναι ήπια για συγκέντρωση ως  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Ο αριθμός των νεκρών κυττάρων αυξάνεται σημαντικά μετά από έκθεση στη συγκέντρωση των  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  τροποποιημένου Solgar (44 %) (Εικόνα 3.15A). Η κυτταροτοξική δράση του τροποποιημένου και μη Solgar αυξάνεται με την αύξηση του χρόνου έκθεσης (48 ώρες) και ανέρχεται στη μέγιστη συγκέντρωση των  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  σε 27 % και 53 % (για το μη τροποποιημένο και το τροποποιημένο εκχύλισμα Solgar, αντίστοιχα) (Εικόνα 3.15B).



**Εικόνα 3.15.** Διάγραμμα επιβίωσης των κυττάρων HEK293 μετά από επώαση για 24 h A) και 48 h B) με αυξανόμενες συγκεντρώσεις μη τροποποιημένου και τροποποιημένου Solgar

### 3.3.13. Ικανότητα σχηματισμού αποικιών (σε κύτταρα LMS)

Δε παρατηρήθηκαν διαφορές στην ικανότητα σχηματισμού αποικιών των LMS κυττάρων που επιβίωσαν μετά από έκθεση για 48 h με  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  τροποποιημένου και μη εκχυλίσματος Solgar ή υδατικού εκχυλίσματος Σερρών. Ωστόσο συγκριτικά με το τροποποιημένο και μη υδατικό εκχύλισμα Σερρών ο αριθμός των αποικιών που αναπτύσσονται με το τροποποιημένο και μη Solgar είναι μικρότερος (κατά 20 % περίπου). Τα κύτταρα που εκτέθηκαν στο τροποποιημένο υδατικό εκχύλισμα Σερρών αναπτύχθηκαν σε ποσοστό 65 % του control ενώ αυτά που επώαστηκαν με μη τροποποιημένο υδατικό εκχύλισμα κατά 86 %, γεγονός που υποδηλώνει ότι στα καρκινικά κύτταρα LMS που επιβιώνουν μετά από 48 ώρες επώασης με το τροποποιημένο υδατικό εκχύλισμα Σερρών προκαλούνται σημαντικές, μη αντιστρεπτές κυτταρικές βλάβες με αποτέλεσμα να χάνουν την ικανότητα να πολλαπλασιαστούν και να αναπτυχθούν, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.16. Οι βλάβες που προκαλούνται στα κύτταρα LMS που επιβιώνουν μετά από έκθεση σε  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  τροποποιημένου Solgar φαίνεται ότι είναι πολύ πιο σοβαρές και μη αντιστρεπτές καθώς η ικανότητα των κυττάρων να σχηματίζουν αποικίες περιορίζεται σε ποσοστό μικρότερο του 50 % του control (συγκεκριμένα 46 %). Εν αντιθέσει με το τροποποιημένο εκχύλισμα φύλλων ελιάς Solgar, η αύξηση της συγκέντρωσης από τα 100 στα  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  δεν επηρεάζει την ικανότητα των LMS κυττάρων να σχηματίζουν αποικίες καθώς αναπτύχθηκαν σε ανάλογο βαθμό ( $71 \pm 13$  % έναντι  $66 \pm 3$  %, αντίστοιχα) (Εικόνα 3.16).



**Εικόνα 3.16.** Διάγραμμα ικανότητας των κυττάρων LMS, που επιβίωσαν μετά από 48 h έκθεση σε 100 και  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  μη τροποποιημένων και τροποποιημένων εκχυλισμάτων, στο να σχηματίζουν αποικίες.

### 3.4. Συμπεράσματα

Τα νανοϋλικά PCC και PCCox χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς για την ανάπτυξη νανοβιοκαταλυτών μέσω της ομοιοπολικής και μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης δύο β-γλυκοσιδασών από διαφορετικούς μικροοργανισμούς. Η οξειδωτική κατάσταση των νανοϋλικών που χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς καθώς και η μέθοδος ακινητοποίησης φαίνεται να επηρεάζει την απόδοση της ακινητοποίησης και την καταλυτική δραστηριότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων. Η χρήση των οξειδωμένων PCCs ως φορέα ακινητοποίησης ενισχύει την καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου, υπογραμμίζοντας την σημασία τροποποίησης των νανοϋλικών με λειτουργικές ομάδες. Το ακινητοποιημένο ένζυμο διατηρεί η εμφανίζει υψηλότερη θερμική σταθερότητα από το ελεύθερο ένζυμο, αλλά αυτή η ενίσχυση στην σταθερότητα δεν φαίνεται να εξαρτάται από τον βαθμό οξείδωσης του νανοϋλικού. Οι νανοβιοκαταλύτες που αναπτύχθηκαν κατάλυσαν επιτυχώς την υδρόλυση της ελευρωπαϊνης που οδήγησε στον σχηματισμό υψηλής ποσότητας υδροξυτυροσόλης. Η ακινητοποιημένη Tmbgl σε PCCox παρουσίασε υψηλή λειτουργική σταθερότητα, υποδεικνύοντας μαζί με την άριστη θερμική σταθερότητα, ότι αυτός ο νανοβιοκαταλύτης είναι ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την βιοτροποποίηση της ελευρωπαϊνης και άλλων φυσικών προϊόντων βιομηχανικού ενδιαφέροντος. Όσο αφορά την βιολογική δράση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική, η αντιμικροβιακή και η κυτταροτοξική και στις περισσότερες περυπτώσεις βελτιώθηκε η βιολογική δράση μετά την χημειοενζυμική τροποποίηση των εκχυλισμάτων, υπογραμμίζοντας την σημαντικότητα της τροποποίησης αυτής.



## Κεφάλαιο 4: Ανάπτυξη του NMR-tube βιοαντιδραστήρα για την παρασκευή, ταυτοποίηση και βιολογική αξιολόγηση αναλόγων φυσικών προϊόντων

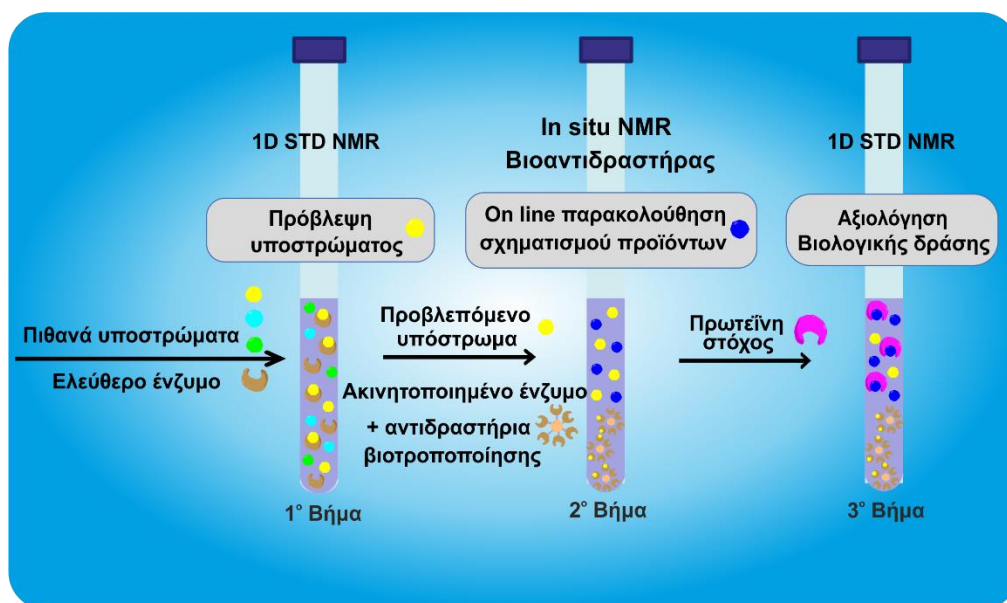
### 4.1. Εισαγωγή

Η ανακάλυψη φαρμάκων είναι μια εγγενώς διεπιστημονική προσπάθεια που συνδυάζει τη σύνθεση και τον χαρακτηρισμό ενώσεων καθώς και τον έλεγχο της αλληλεπίδρασής τους με πρωτεϊνικούς στόχους φαρμακευτικού ενδιαφέροντος. Σ' αυτήν την προσπάθεια, τα φυσικά προϊόντα αποτελούν ένα ευρύ φάσμα θεραπευτικών ενώσεων, κύριο πλεονέκτημα των οποίων είναι ότι το μεγαλύτερο μέρος της πολύπλοκης χημείας που απαιτείται για τη σύνθεσή τους έχει ήδη πραγματοποιηθεί από τη φύση. Ως αποτέλεσμα, ένα μεγάλο μέρος φαρμάκων που υπάρχουν ήδη είναι είτε φυσικά προϊόντα είτε τροποποιήσεις αυτών (Cragg et al., 2009; D. Newman and Cragg, 2013). Για παράδειγμα, στον τομέα του καρκίνου περισσότερο από το 49% των μικρών μορίων που έχουν εγκριθεί ως φάρμακα είναι είτε φυσικά προϊόντα είτε προέρχονται άμεσα από αυτά (Newman and Cragg, 2016). Η επιτυχία της εφαρμογής των φυσικών προϊόντων ως φάρμακα οφείλεται στο γεγονός ότι τα φυσικά προϊόντα έχουν επιλεγεί από την εξελικτική χημεία της φύσης να αλληλεπιδρούν με πολλαπλούς βιολογικούς στόχους και να είναι συμβατά με ζωντανούς οργανισμούς (Janga and Tzakos, 2009). Ωστόσο, η πολυπλοκότητα της δομής των φυσικών προϊόντων και η σχετική δυσκολία να τροποποιηθούν χημικά, κάνει τη χρήση τους, μια χρονικά απαιτητική και αναποτελεσματική από πλευράς κόστους διαδικασία, και αυτό θέτει υπό αμφισβήτηση τη γόνιμη ενσωμάτωσή τους στην ανάπτυξη φαρμάκων (Koehn and Carter, 2005).

Η απάντηση έχει δοθεί για άλλη μια φορά από τη φύση η οποία έχει εξελίξει τα ένζυμα, ένα πλήθος φυσικών καταλυτών που μπορεί να πραγματοποιήσουν πολύπλοκες χημικές αντιδράσεις υπό ήπιες συνθήκες, με υψηλή επιλεκτικότητα, ακρίβεια, αποδοτικότητα και οικονομία ατόμων. Τα ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να τροποποιήσουν τοποεκλεκτικά και στερεοεκλεκτικά τα φυσικά προϊόντα, αποφεύγοντας τόσο τις σκληρές συνθήκες αντίδρασης, όσο και τα πολλαπλά στάδια προστασίας/αποπροστασίας και καθαρισμού. Αυτοί οι εγγενώς πράσινοι καταλύτες έχουν εποικοδομητικά ενσωματωθεί σε πλήθος διεργασιών (Ran et al., 2008; Terreni et al., 2002; Vila et al., 2016). Πολλές σύγχρονες βιομηχανίες έχουν ενσωματώσει τα ένζυμα στη σύνθεση φαρμάκων (U. T. Bornscheuer et al., 2012; Choi et al., 2015; Gotor-Fernández et al., 2006b; Kontogianni et al., 2016; Patel, 2017; Sun et al., 2017; Tao and Xu, 2009). Έχουν ήδη επισημανθεί τα πλεονεκτήματα της βιοκατάλυσης υπέρ της συμβατικής χημικής σύνθεσης στον υβριδισμό ενός αντικαρκινικού φαρμάκου με φυσικό αντιοξειδωτικό: τα στάδια καθαρισμού και απομόνωσης του προϊόντος ελαχιστοποιούνται, επιταχύνοντας τη διαδικασία σύνθεσης και μειώνοντας το περιβαλλοντικό της αποτύπωμα (Geromichalou et al., 2015). Ο βιομετασχηματισμός μπορεί εποικοδομητικά να βοηθήσει τη διαδικασία ανάπτυξης φαρμάκων (U T Bornscheuer et al., 2012; Filice et al., 2012; Gall et al., 2014), αλλά υπάρχουν πολλές προκλήσεις.

Σε αυτό το κεφάλαιο περιγράφεται η ανάπτυξη μιας απλής και χρονικά-αποδοτικής διαδικασίας, ο 'NMR-tube βιοαντιδραστήρας', μία μεθοδολογία τριών σταδίων που έχει διεξαχθεί ολοκληρωτικά μέσα σε ένα σωλήνα NMR 5 mm. Το πρωτόκολλο αυτό δίνει την ικανότητα να: (i) προβλεφθεί ποιο συστατικό ενός μείγματος φυσικών προϊόντων μπορεί να

τροποποιηθεί ενζυμικά, (ii) να καταγράφεται *in situ* σε πραγματικό χρόνο η αποτελεσματικότητα της βιοτροποποίησης και η τοποεκλεκτικότητά της σε ακατέργαστα μείγματα βιοτροποποίησης πολλαπλών υποστρώματων χωρίς κλαματοποίηση και καθαρισμό και (iii) ταυτοχρόνως να ελέγχεται διεξοδικά η αλληλεπίδραση των προϊόντων βιομετασχηματισμού με φαρμακευτικούς πρωτεϊνικούς στόχους. Μια παράλληλη σύγκριση της κλασικής διαδικασίας και της παρούσας βελτιστοποιημένης διαδικασίας, του NMR tube βιοαντιδραστήρα απεικονίζεται στην Εικόνα IV1 του Παραρτήματος IV.



**Εικόνα 4.1.** Ο τριών σταδίων NMR-tube βιοαντιδραστήρας. 1° Βήμα: Πρόβλεψη της ικανότητας των φυσικών προϊόντων να αποτελούν ενζυμικά υποστρώματα μέσω φασματοσκοπίας 1D STD NMR. 1° Βήμα: Η καταγραφή σε πραγματικό χρόνο της βιοτροποποίησης των φυσικών προϊόντων, που πραγματοποιείται μέσα στον NMR-tube βιοαντιδραστήρα, από ακινητοποιημένο ένζυμο μέσω 1D  $^1\text{H}$ -NMR. 3° Βήμα: Έλεγχος της βιολογικής δράσης των προϊόντων της βιοτροποποίησης, μέσω 1D STD NMR, έναντι πρωτεϊνικών στόχων με φαρμακευτικό ενδιαφέρον. Αυτό το βήμα μπορεί να πραγματοποιηθεί ακόμη και στο ίδιο NMR σωληνάκι που προκύπτει από το 2° βήμα, παρουσία του ακινητοποιημένου ενζύμου μετά την τιτλοδότηση της πρωτεΐνης στόχου. Με αυτή τη διαδικασία αποφεύγονται τα κουραστικά και χρονοβόρα βήματα προστασίας/αποπροστασίας, απομόνωσης, καθαρισμού και χαρακτηρισμού των προϊόντων της βιοτροποποίησης σε σχέση με τις συμβατικές προσεγγίσεις.

Ως υποστρώματα μελετήθηκαν διάφορα φλαβονοειδή λόγω της πολυπλοκότητας της δομής τους και της δυσκολίας τους να τροποποιηθούν αλλά και λόγω της ποικιλίας βιολογικών δράσεων που παρουσιάζουν. Ως βιοκαταλύτης έχει χρησιμοποιηθεί η λιπάση Β από *Pseudozyma (Candida) antarctica* (CaLB) για την ακετυλίωση διάφορων γλυκοζυλιωμένων και μη φλαβονοειδών. Επιπλέον, μελετήθηκε και η βιοτροποποίηση της πυρογαλλόλης σε περπουλογαλλίνη, (μία ένωση με ποικίλες βιολογικές δράσεις) από το κυτόχρωμα c. Τα προϊόντα βιομετασχηματισμού αξιολογήθηκαν στη συνέχεια ως προς την αλληλεπίδρασή τους με την πρότυπη πρωτεΐνη φορέα αλβουμίνη από ορό χοίρου (BSA).



## 4.2. Υλικά και Μέθοδοι

### 4.2.1. Υλικά

#### 4.2.1.1. Βιοκαταλύτες-Πρωτεΐνες

Σε αυτό το κεφάλαιο χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εμπορικά διαθέσιμοι και μη βιοκαταλύτες και πρωτεΐνες:

- Η λιπάση από *Pseudozyma (Candida) antarctica* (CaLB) λυοφιλωμένο σκεύασμα, 64,00TBU/g, της εταιρείας c-LEcta GmbH, Perlickstrase.
- Η λιπάση από *Pseudozyma (Candida) antarctica* (CaLB) ακινητοποιημένη σε ακρυλική ρητίνη (Novozyme 435) ήταν ευγενική χορηγία της εταιρείας Novozymes.
- Το κυτόχρωμα c C107T yeast iso-1 (Cyt-c) υπερεκφράστηκε και απομονώθηκε όπως περιγράφεται από τους Barker et al, (Barker et al., 2001) από την Giotto Biotech ([www.giottobiotech.com](http://www.giottobiotech.com)).
- Η αλβουμίνη από ορό βοδιού (Bovine Serum Albumin BSA) της εταιρείας Merck KGaA.
- Η α-συνουκλεΐνη υπερεκφράστηκε και απομονώθηκε όπως περιγράφεται από τους Bertini et al, (Bertini et al., 2007) από την Giotto Biotech ([www.giottobiotech.com](http://www.giottobiotech.com)).

#### 4.2.1.2. Υποστρώματα

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το κεφάλαιο για τις βιοτροποποιήσεις ήταν εμπορικά διαθέσιμα και μη:

- Τα φλαβονοειδή (κερσετίνη, ρουτίνη, 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, ναρινγενίνη και ναριγκίνη) της εταιρείας Extrasynthese με καθαρότητα  $\geq 99\%$ .
- Η πυρογαλλόλη από την εταιρεία Merck KGaA, με καθαρότητα  $\geq 99\%$ .
- Η υπερακετυλιωμένη κερσετίνη συντέθηκε από εμάς σύμφωνα με τους Kyriakou et al, (Kyriakou et al., 2018)(Παράγραφος 2.2.2.7).

#### 4.2.1.3. Διαλύτες

Οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν κεφάλαιο ήταν όλοι καθαρότητας αναλυτικής βαθμίδας και προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Merck KGaA και Honeywell Research Chemicals. Οι δευτεριωμένοι διαλύτες όπως το ακετονιτρίλιο-d<sub>3</sub> (AcCN-d<sub>3</sub>) και το δευτεριωμένο οξείδιο (D<sub>2</sub>O) ήταν υψηλής καθαρότητας  $\geq 99.9\%$  και προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Deutero (Kastellaun, Germany).

#### 4.2.1.4. Λοιπά αντιδραστήρια

- Το βινυλικό οξύ που χρησιμοποιήθηκε ως άκυλο δότης στις ακυλίωση των φλαβονοειδών της εταιρείας Merck KGaA.

- n-βουτανόλη που χρησιμοποιήθηκε ως δότης ομάδας OH στην αλκόλυση της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης της εταιρείας PanReac Applichem.
- Η γη διατόμων ή διατομίτης (Celite 501) που χρησιμοποιήθηκε στην ακινητοποίηση-προσρόφηση του Cyt-c της εταιρείας Honeywell Research Chemicals.

#### 4.2.1.5. Οργανολογία

- Η λήψη φασμάτων NMR πραγματοποιήθηκε στους φασματογράφους NMR Bruker AV-400 και Bruker AV-500 του Κέντρου Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Ο φασματογράφος Bruker AV-500 είναι συζευγμένος με υποδοχέα TXI κρυογενικής (cryogenic) τεχνολογίας. Η λήψη και η επεξεργασία των φασμάτων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού TopSpin 2.1.
- Η λήψη φασμάτων 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  SOFAST HMQC NMR πραγματοποιήθηκε σε φασματογράφο Bruker Avance III, με 22.3 T μαγνήτη, στα 950 MHz, με  $^1\text{H}$  Larmor frequency, συζευγμένος με υποδοχέα TXI κρυογενικής (cryogenic) τεχνολογίας του κέντρου πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Magnetic Resonance Center, CERM), και του κέντρου μαγνητικού συντονισμού για μεταλλοπρωτεΐνες (Interuniversity Consortium for Magnetic Resonance in MetalloProteins, CIRMMP), του Πανεπιστημίου της Φλωρεντίας στην Ιταλία.

#### 4.2.2. Μέθοδοι

##### 4.2.2.1. Μελέτη αλληλεπίδρασης διάφορων φλαβονοειδών με την CaLB μέσω ανάλυσης STD NMR

2 mM από το κάθε φλαβονοειδές (κερσετίνη, ρουτίνη, 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, ναρινγενίνη, και ναριγγίνη) διαλυτοποιήθηκαν σε 500  $\mu\text{L}$  μείγματος διαλύτη 65% v/v ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (phosphate buffer saline, PBS) 10 mM pD = 7.0 σε  $\text{D}_2\text{O}$ , και 35% v/v  $\text{AcCN-d}_3$  και το μείγμα μεταφέρθηκε σε σωληνάκι NMR 5mm. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2.2 mg (~ 0.02 mM πρωτεΐνης) ή 4.4 mg (~0.04 mM πρωτεΐνης), στην περίπτωση μελέτης του μείγματος των φλαβονοειδών, της CaLB (c-Lecta). Η λήψη των φασμάτων STD NMR πραγματοποιήθηκε στο φασματογράφο NMR Bruker AV-500 στους 298 K με τη χρήση της παλμικής ακολουθίας stddiffesgr.3. Πραγματοποιήθηκε επιλεκτικός κορεσμός του δείγματος με μια σειρά παλμών τύπου Gaussian (Gaussian-shaped) με 1% περικοπή ο καθένας με διάρκεια 50 ms που διαχωρίζονται με χρονική καθυστέρηση 1 ms. Ο χρόνος κορεσμού ορίστηκε στα 2s. Το δείγμα ακτινοβολήθηκε στο εντός συντονισμού πείραμα στα 1.03 ppm, όπου δεν εμφανίζονται σήματα των υποκαταστατών, και στο εκτός συντονισμού φάσμα στα 40 ppm όπου δεν εμφανίζεται κάποιο σήμα NMR (Viegas et al., 2011b). Η διάρκεια του πειράματος ήταν ~ 1 h (128 scans).

##### 4.2.2.2. Μελέτη αλληλεπίδρασης πυρογαλλόλης με το Cyt-c μέσω ανάλυσης STD NMR

5 mM πυρογαλλόλης διαλυτοποιήθηκαν σε 500  $\mu\text{L}$  ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 20 mM pD = 6.8 σε  $\text{D}_2\text{O}$  και το μείγμα μεταφέρθηκε σε σωληνάκι NMR 5 mm. Στη συνέχεια προστέθηκαν 0.05 mM Cyt-c (C107T yeast iso-1). Η λήψη των φασμάτων STD NMR πραγματοποιήθηκε στο

φασματογράφο NMR Bruker AV-500 στους 298 K με τη χρήση της παλμικής ακολουθίας *stddiffesgr.3*. Πραγματοποιήθηκε επιλεκτικός κορεσμός του δείγματος με μια σειρά παλμών τύπου Gaussian (Gaussian-shaped) με 1% περικοπή ο καθένας με διάρκεια 50 ms που διαχωρίζονται με χρονική καθυστέρηση 1 ms. Ο χρόνος κορεσμού ορίστηκε στα 2s. Το δείγμα ακτινοβολήθηκε στο εντός συντονισμού πείραμα στα 0.88 ppm, όπου δεν εμφανίζονται σήματα των υποκαταστατών, και στο εκτός συντονισμού φάσμα στα 40 ppm όπου δεν εμφανίζεται κάποιο σήμα NMR (Viegas et al., 2011b). Η διάρκεια του πειράματος ήταν ~ 1 h (128 scans).

#### **4.2.2.3. *In situ* καταγραφή της ακετυλίωσης των φλαβονοειδών μέσα στον NMR-tube βιοαντιδραστήρα με NMR**

16 mM από κάθε φλαβονοειδές (κερσεΐνη, ρουΐνη, 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, ναρινγενΐνη, και ναριγγΐνη) διαλυτοποιήθηκαν σε 500 μL AcCN-d<sub>3</sub>. Στη συνέχεια προστέθηκαν 125 μL του άκυλο δότη βινυλικού οξέος και το μείγμα μεταφέρθηκε σε ένα σωλήνα NMR 5mm. Μέσα στο σωλήνακι προστέθηκαν 15 mg του βιοκαταλύτη CaLB Novozyme 435. Ο NMR-tube βιοαντιδραστήρας επώαστηκε στους 60 °C υπό ανάδευση (600 rpm). Για χρόνο 0h και κάθε 24h καταγράφηκε *in situ* η πορεία της αντίδρασης μέσω λήψης φασμάτων <sup>1</sup>H-NMR, διάρκεια πειράματος ~ 15 min (64 scans) (ή 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC NMR φασμάτων όταν κρίθηκε απαραίτητο). Η λήψη φασμάτων NMR πραγματοποιήθηκε στο φασματογράφο NMR Bruker AV-500 στους 282 K.

#### **4.2.2.4. Ακίνητοποίηση του Cyt-c σε celite μέσω προσρόφησης**

180 μL διαλύματος Cyt-c προστέθηκαν σε 18 mg celite και ακολούθησε ήπια ανάδευση. Το μείγμα επώαστηκε σε πάγο για 30 min με ήπια ανάδευση σε τακτά χρονικά διαστήματα. Ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις του μείγματος με 800 μL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH=6.8, 20 mM, για να απομακρυνθεί η περίσσια του βιοκαταλύτη που δεν ακίνητοποιήθηκε. Τέλος, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 5 min σε 12.000 rpm, στους 4°C. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα που προέκυψε ήταν το ακίνητοποιημένο Cyt-c στον celite που χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για την *in situ* βιοτροποποίηση της πυρογαλλόλης.

#### **4.2.2.5. *In situ* καταγραφή της οξειδωσης της πυρογαλλόλης μέσα στον NMR-tube βιοαντιδραστήρα με NMR**

5 mM πυρογαλλόλης διαλύθηκαν σε 500 μL μείγματος διαλυτών 70 % v/v ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 20 mM pH 6.8 σε D<sub>2</sub>O και 30 % AcCN-d<sub>3</sub>. Στη συνέχεια προστέθηκαν 5 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και το μείγμα μεταφέρθηκε σε ένα σωληνάκι NMR 5 mm. Μέσα στο σωληνάκι προστίθενται 18 mg του Cyt-c ακίνητοποιημένο σε celite (64.9 μg πρωτεΐνης). Ο NMR-tube βιοαντιδραστήρας επώαστηκε στους 25°C υπό ανάδευση (600 rpm). Για χρόνο 0 h και κάθε 24 h καταγράφηκε *in situ* η πορεία της αντίδρασης μέσω λήψης φασμάτων <sup>1</sup>H-NMR, διάρκεια πειράματος ~ 15 min (64 scans) (ή 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC NMR φασμάτων όταν κρίθηκε απαραίτητο). Η λήψη φασμάτων NMR πραγματοποιήθηκε στο φασματογράφο NMR Bruker AV-500 στους 282 K.

#### 4.2.2.6. Σύνθεση της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης

Η χημική σύνθεση της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Kyriakou et al, (Kyriakou et al., 2018). Εν συντομία, 200 mg κερσετίνης (0.662 mmol), 1.251 mL οξικού ανυδρίτη (13.23 mmol) και 15 mL πυριδίνης θερμάνθηκαν με αναρροή (reflux) υπό ατμόσφαιρα αζώτου. Η πορεία την αντίδρασης καταγράφηκε με TLC (σε σύστημα διαλυτών CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH, 99:1). Η αντίδραση τερματίστηκε με προσθήκη παγόνερου (20 g), και το ίζημα εκπλύθηκε με παγωμένο μείγμα οξικού αιθυλεστέρα και διαιθυλεθέρα. Μετά από ξήρανση υπό κενό προέκυψε ένα ωχροκίτρινο στερεό.

#### 4.2.2.7. Αλκοόλυση της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης από την CaLB

30 mM υπερακετυλιωμένης κερσετίνης, 1.78 mL n-βουτανόλης και 30 mg of CaLB Novozyme 435 προστέθηκαν σε 500 mL τριτοταγή-βουτυλο μεθυλο αιθέρα. Ακολούθησε επώαση του μείγματος στους 40°C υπό ανάδευση (600 rpm) για 24 h.

#### 4.2.2.8. Μελέτη αλληλεπίδρασης προϊόντων βιοτροποποίησης με την BSA μέσω ανάλυσης STD NMR

Σε αυτό το βήμα χρησιμοποιήθηκε το σωληνάκι που προέκυψε από το 2<sup>ο</sup> βήμα (Παράγραφοι 4.2.2.3. και 4.2.2.5.) το οποίο περιείχε το μείγμα των βιοτροποποιήσεων και τον ακινητοποιημένο βιοκαταλύτη. Στην περίπτωση:

- i. των φλαβονοειδών απομακρύνθηκε ο διαλύτης AcCN-d<sub>3</sub> μέσω εξάτμισης υπό κενό, αφού πρώτα απομακρύνθηκε ο βιοκαταλύτης με φιλτράρισμα. Στο μείγμα προστέθηκαν 500 μL μείγματος διαλυτών 65 % v/v ρυθμιστικού διαλύματος PBS 10 mM pH = 7.0 σε D<sub>2</sub>O, και 35 % v/v AcCN-d<sub>3</sub>. Τέλος προστέθηκαν 0.1 mM της BSA.
- ii. της πυρογαλλόλης κατευθείαν στον NMR-tube βιοαντιδραστήρα του 2<sup>ου</sup> βήματος προστέθηκαν 0.1 mM της BSA.

Η λήψη των φασμάτων STD NMR πραγματοποιήθηκε στο φασματογράφο NMR Bruker AV-500 στους 298 K με τη χρήση της παλμικής ακολουθίας stddiffesgp.3. Πραγματοποιήθηκε επιλεκτικός κορεσμός του δείγματος με μια σειρά παλμών τύπου Gaussian (Gaussian-shaped) με 1 % περικοπή ο καθένας με διάρκεια 50 ms που διαχωρίζονται με χρονική καθυστέρηση 1 ms. Ο χρόνος κορεσμού ορίστηκε στα 2s. Το δείγμα ακτινοβολήθηκε στο εντός συντονισμού πείραμα στα 1.03 ppm, όπου δεν εμφανίζονται σήματα των υποκαταστατών, και στο εκτός συντονισμού φάσμα στα 40 ppm όπου δεν εμφανίζεται κάποιο σήμα NMR (Viegas et al., 2011b). Η διάρκεια του πειράματος ήταν ~ 1 h (128 scans).

#### 4.2.2.9. 2D $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ Band-Selective Optimized Flip Angle Short Transient Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation (SOFAST HMQC)

Σε αυτό το βήμα χρησιμοποιήθηκε μείγμα της αντίδρασης αλκοόλυσης της υπερακετυλιωμένης κερσεΐνης (όπως αναφέρετε στην Παράγραφο 4.2.2.7.) όπου ο διαλύτης απομακρύνθηκε μέσω εξάτμισης υπό κενό και στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα α-συνουκλείνης σε 500  $\mu\text{L}$   $\text{D}_2\text{O}$  σε αναλογία 1:6 (πρωτεΐνη:προϊόντα). Η λήψη 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  SOFAST (Επιλεκτική ζώνη με βελτιστοποιημένη γωνιακή κλίση) HMQC (Ετεροπυρηνική συσχέτιση μέσω πολλαπλών δεσμών) φασμάτων πραγματοποιήθηκε σε Bruker Avance III φασματογράφο με 22.3 T μαγνήτη, στα 950 MHz, με  $^1\text{H}$  Larmor συχνότητα. Έγινε λήψη φασμάτων με 2048 σημεία στην άμεση διάσταση και 128 σημεία στην έμμεση διάσταση με 16 scans (~10 min). Ο χρόνος κορεσμού ορίστηκε στα 0.3 s με  $90^\circ$  παλμό διέγερσης.

### 4.3. Αποτελέσματα-Συζήτηση

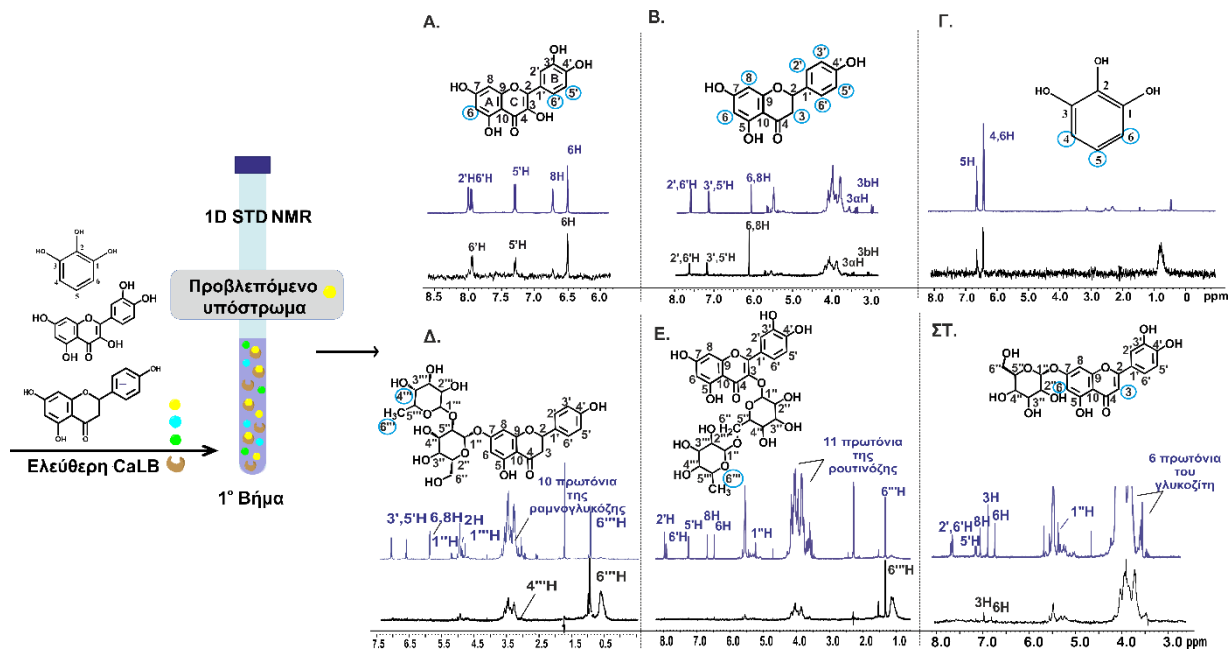
#### 4.3.1. 1<sup>ο</sup> Βήμα: Ταχεία πρόβλεψη της ικανότητας των φυσικών προϊόντων να αποτελούν υποστρώματα ενζύμων μέσω ανάλυσης STD NMR και της τοποεκλεκτικότητας της βιοτροποποίησης.

Η πρόβλεψη της ικανότητας μιας ένωσης να αποτελεί υπόστρωμα για ένα ένζυμο και η ταυτόχρονη πρόβλεψη της πιθανής τοποεκλεκτικότητας της τροποποίησης αυτής της ένωσης από το ένζυμο είναι υψίστης σημασίας. Η φασματοσκοπία NMR διαφοράς μεταφοράς κορεσμού (Saturation Transfer Difference STD NMR) αποτελεί ένα εξαιρετικό εργαλείο για την μελέτη αλληλεπίδρασης ή τον χαρακτηρισμό των συμπλόκων υποκαταστάτη-πρωτεΐνης καθώς προσφέρει πολυάριθμα πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών μεθόδων. Όχι μόνο παρέχει πληροφορίες για την πιθανή αλληλεπίδραση ενός υποκαταστάτη με την πρωτεΐνη αλλά επίσης αποκαλύπτει τον «επίτοπο πρόσδεσης» δηλαδή τα τμήματα του υποκαταστάτη που μετέχουν στην πρόσδεση. Συνεπώς, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του σημείου σύνδεσης ενός πιθανού υποκαταστάτη σε μία πρωτεΐνη. Στην περίπτωση των ενζύμων μπορεί να προσφέρει κρίσιμες πληροφορίες για την τοποεκλεκτικότητα μιας ενζυμικής τροποποίησης. Επιπροσθέτως, αυτή η τεχνική παρέχει έναν γρήγορο έλεγχο μιας βιβλιοθήκης ενώσεων ενώ ταυτόχρονα επιτρέπει την χρήση μικρών συγκεντρώσεων πρωτεϊνών εξαιτίας της υψηλής ευαισθησίας της (Calle et al., 2011; Mayer and Meyer, 2001b; Pellecchia et al., 2008; Politi et al., 2005). Σε συνδυασμό με τεχνικές NMR που δίνουν πληροφορίες για το ποιες περιοχές της πρωτεΐνης αλληλεπιδρούν με τον υποκαταστάτη, όπως είναι η χαρτογράφηση της μεταβολής της χημικής μετατόπισης με <sup>15</sup>N HSQC, μπορεί διαμορφωθεί μια γενική εικόνα για την αλληλεπίδραση υποκαταστάτη-πρωτεΐνης σε σύντομο χρονικό διάστημα.

Στο 1<sup>ο</sup> βήμα του NMR-tube βιοαντιδραστήρα πραγματοποιείται η χρήση της φασματοσκοπίας STD NMR σε πιθανά υποστρώματα απουσία των απαραίτητων στοιχείων για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Συνεπώς, με την ανάλυση STD NMR θα διερευνηθεί κατά πόσο μία ένωση αλληλεπιδρά με το ένζυμο και άρα μπορεί να αποτελέσει υπόστρωμά του και θα προσδιοριστούν οι «επίτοποι πρόσδεσης», δηλαδή τα πρωτόνια του υποκαταστάτη που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με το ένζυμο, ώστε να επιτευχθεί μια πιθανή χαρτογράφηση της τοποεκλεκτικότητας της ενζυμικής αντίδρασης. Οι ενώσεις που θα επιλεχθούν σε αυτό το βήμα θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια στο 2<sup>ο</sup> βήμα του NMR-tube βιοαντιδραστήρα (Εικόνα 4.1) ώστε να μελετηθεί η ενζυμική τροποποίηση αυτών των ενώσεων.

Για να επιβεβαιωθεί ότι είναι δυνατή η πρόβλεψη των ενζυμικών υποστρωμάτων στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δύο ένζυμα, μία υδρολάση η λιπάση από *Pseudozyma (Candida) antarctica* (CaLB) και μία πρωτεΐνη με δράση υπεροξειδάσης, το κυτόχρωμα c iso-1 C107T1 (Cyt-c). Η CaLB είναι ένα ευέλικτο ένζυμο που μπορεί να καταλύσει μία ευρεία γκάμα αντιδράσεων όπως η ακετυλίωση (Kazlauskas and Bornscheuer, 1998), η αλκοόλυση (Kyriakou et al., 2018), καθώς και η σύνθεση εστέρων (Paradouridou et al., 2013). Ως εναλλακτική επιλογή χρησιμοποιήθηκε το κυτόχρωμα c, το οποίο αποτελεί μία πρωτεΐνη κλειδί στην ενεργοποίηση της κυτταρικής απόπτωσης και επίσης έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει ρίζες. Το κυτόχρωμα c είναι μία από τις πολύ καλά χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες που παρουσιάζει υψηλή δραστηριότητα υπεροξειδάσης *in vitro*. Επιπλέον, βρίσκει πολλές εφαρμογές στην βιοκατάλυση και την νανοϊατρική, σε μελέτες κατανόησης του μοριακού μηχανισμού *in vivo* (Patila et al., 2018).

Ανάλυση STD NMR πραγματοποιήθηκε για να μελετηθεί η αλληλεπίδραση διάφορων φλαβονοειδών (όπως της κερσετίνης, της ναρινγενίνης, της ρουτίνης, του 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης και της ναριγκίνης) με το ένζυμο CaLB, με στόχο στη συνέχεια να πραγματοποιηθεί η ακετυλίωση αυτών των ενώσεων. Το ένζυμο σε αυτό το βήμα χρησιμοποιείται σε ελεύθερη μορφή αφενός για να μπορέσει να αλληλεπιδράσει καλύτερα με τα υποψήφια υποστρώματα (υποκαταστάτες) και αφετέρου για να ακτινοβοληθεί επιλεκτικά και να λάβει χώρα η μεταφορά κορεσμού με τα τμήματα του υποκαταστάτη που συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης STD NMR έδειξαν μια ειδική αλληλεπίδραση των φλαβονοειδών με την CaLB. Πιο συγκεκριμένα στην περίπτωση της κερσετίνης φαίνεται να αλληλεπιδρούν με το ένζυμο τα πρωτόνια 5'Η και 6'Η του δακτύλιου Β. Αυτό επισημαίνει ότι το κυρίως τμήμα αλληλεπίδρασης της κερσετίνης με το ένζυμο βρίσκεται στον δακτύλιο Β (Εικόνα 4.2.). Μέσω αυτού του πειράματος έγινε εμφανές ότι υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ της κερσετίνης και της CaLB και ότι σε αυτή την αλληλεπίδραση συμμετέχει συγκεκριμένη περιοχή του υποστρώματος. Συνεπώς φαίνεται ότι μπορεί προβλεφθεί η ικανότητα της κερσετίνης να λειτουργήσει ως υπόστρωμα για το συγκεκριμένο ένζυμο και επίσης φαίνεται ότι η βιοτροποποίηση πιθανόν να λάβει χώρα τοποεκλεκτικά στον δακτύλιο Β, γεγονός που στηρίζεται και βιβλιογραφικά (Κυριακού et al., 2012). Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση STD NMR για να μελετηθεί η αλληλεπίδραση της ναρινγενίνης με την CaLB. Η ναρινγενίνη αν και έχει παρόμοια δομή με την κερσετίνη, της λείπει η ομάδα OH στη θέση C3 και ένας διπλός δεσμός στον δακτύλιο C (Εικόνα 4.2). Η ανάλυση STD NMR έδειξε ότι όλα τα αρωματικά πρωτόνια της ναρινγενίνης αλληλεπιδρούν με την CaLB. Αυτά τα αποτελέσματα μπορούν να εξηγηθούν από την υψηλή ευκαμψία που παρουσιάζει το μόριο της ναρινγενίνης εξαιτίας της έλλειψης του διπλού δεσμού μεταξύ των ανθράκων C2 και C3, επιτρέποντας έτσι καλύτερη προσαρμογή στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Εικόνα 4.2). Ανάλυση STD NMR πραγματοποιήθηκε επίσης και για γλυκοζυλιωμένα φλαβονοειδή όπως ο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, η ναριγκίνη και η ρουτίνη. Και σε αυτές τις περιπτώσεις τα αποτελέσματα έδειξαν ειδική αλληλεπίδραση των ενώσεων με την CaLB (Εικόνες 4.2).



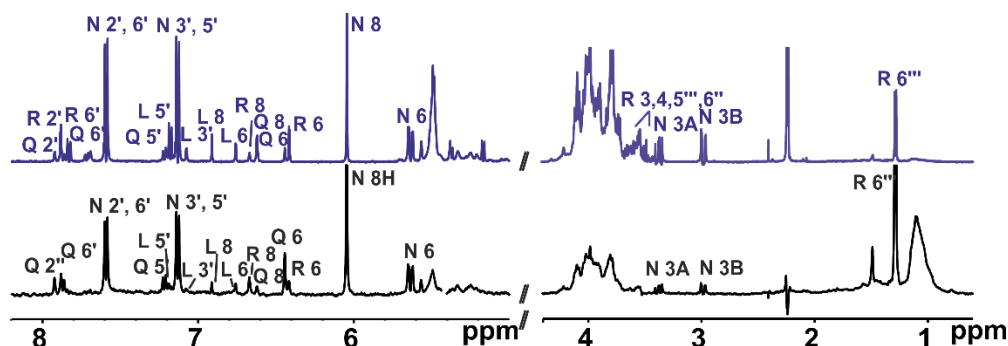
**Εικόνα 4.2.** Επιλεγμένη περιοχή των φασμάτων STD NMR A) της κερσετίνης B) της ναρινγενίνης Δ) της ναριγκίνης, E) της ρουτίνης και ΣΤ) του 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης με ελεύθερη CaLB σε 65 % ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM, pH = 7.0 σε D<sub>2</sub>O και 35 % AcCN-d<sub>3</sub> στους 298 K. ΣΤ) Της πυρογαλλόλης με ελεύθερο Cyt-c σε 70 % ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 20 mM, pH = 6.8 σε D<sub>2</sub>O και 30 % AcCN-d<sub>3</sub> στους 298 K. Τα <sup>1</sup>H NMR φάσματα αναφοράς αποτυπώνονται με μπλε ενώ τα STD φάσματα διαφοράς με μαύρο. Τα πρωτόνια των ενώσεων που φαίνεται να αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη επισημαίνονται με γαλάζιο κύκλο. Αριστερά της εικόνας παρουσιάζεται μία σχηματική παρουσίαση του 1<sup>ου</sup> βήματος του NMR-tube βιοαντιδραστήρα.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η αλληλεπίδραση της πυρογαλλόλης με το Cyt-c. Ο βιομετασχηματισμός της πυρογαλλόλης σε πουρπουρογαλλίνη από το Cyt-c (Ono and Goto, 2006) είναι μία αντίδραση που έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον καθώς το προϊόν της βιοτροποποίησης, η πουρπουρογαλλίνη, είναι μία ένωση με πλήθος βιολογικών δράσεων (Caruana et al., 2011; Inamori et al., 1997). Πραγματοποιήθηκε λοιπόν η λήψη STD NMR φάσματος της πυρογαλλόλης παρουσία του Cyt-c, όπου όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.2 όλα τα αρωματικά πρωτόνια φαίνεται να αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη καθώς η πυρογαλλόλη είναι ένα μικρό μόριο και έχει εύκολη πρόσβαση στο ενεργό κέντρο.

Τέλος, για να δείξουμε τη δυναμική της μεθόδου να χρησιμοποιηθεί σε ένα μείγμα πιθανών ενζυμικών υποστρωμάτων πραγματοποιήθηκε ανάλυση STD NMR σε ένα μείγμα τεσσάρων γλυκοζυλιωμένων και μη φλαβονοειδών (κερσετίνη, ναρινγενίνη, ρουτίνη και 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης) μέσα στο ίδιο NMR σωληνάκι παρουσία της CaLB σε ελεύθερη μορφή. Σε αυτά τα τέσσερα φλαβονοειδή υπάρχουν συνολικά 23 ομάδες OH που θα μπορούσαν να τροποποιηθούν ενζυμικά. Παρόλα αυτά σύμφωνα με την βιβλιογραφία η CaLB τροποποιεί αυτά τα φλαβονοειδή μόνο στις έξι ομάδες OH (Εικόνα 4.3)(Chebil et al., 2006; De Oliveira et al., 2010; Mellou et al., 2005; Viskuricova et al., 2009). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης STD NMR έδειξαν ότι μέσω του 1<sup>ου</sup> βήματος του NMR-tube βιοαντιδραστήρα ακόμα και όταν αυτό εφαρμόζεται σε ένα μείγμα υποψήφιων υποστρωμάτων είναι δυνατόν να ανιχνευθούν οι ειδικές αλληλεπιδράσεις της κάθε



ένωσης με την πρωτεΐνη όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.3, αναδεικνύοντας την δυναμική της μεθόδου να εφαρμοσθεί σε μείγματα φυσικών προϊόντων όπως για παράδειγμα σε διάφορα φυτικά εκχυλίσματα.



**Εικόνα 4.3.** Επιλεγμένη περιοχή του φάσματος STD NMR του μείγματος των ενώσεων κερσετίνη (Q), ναρινγενίνη (N), ρουτίνη (R) και 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης (L) παρουσία της CaLB σε ελεύθερη μορφή σε 65% ρυθμιστικό διάλυμα PBS 10 mM pH = 7 σε D<sub>2</sub>O και 35% AcCN-d<sub>3</sub>. Το <sup>1</sup>H NMR φάσμα αναφοράς αποτυπώνεται με μπλε ενώ τα STD φάσματα διαφοράς με μαύρο.

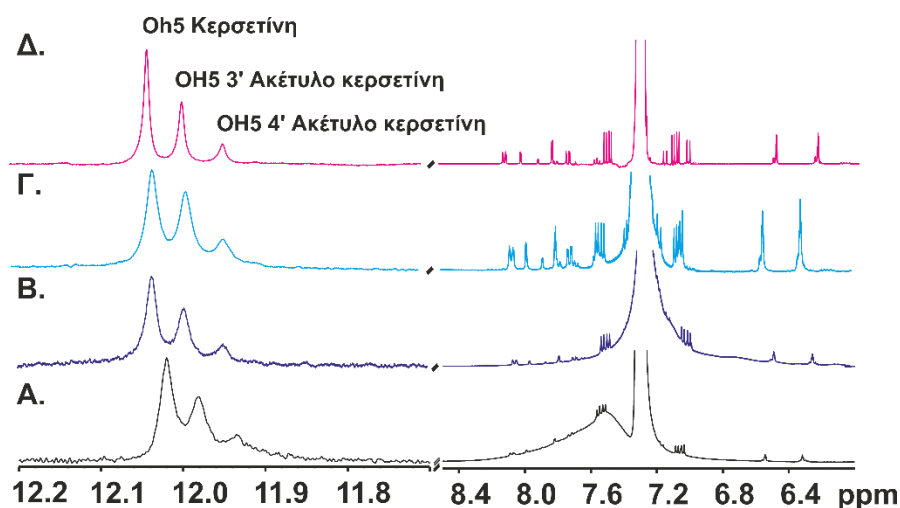
#### 4.3.2. 2<sup>ο</sup> Βήμα: Καταγραφή σε πραγματικό χρόνο του βιομετασχηματισμού φυσικών προϊόντων μέσα στον NMR-tube βιοαντιδραστήρα.

Στο 1<sup>ο</sup> βήμα του NMR-tube βιοαντιδραστήρα μελετήθηκαν οι ενώσεις που μπορούν να λειτουργήσουν ως υπόστρωμα της CaLB με STD NMR. Στο 2<sup>ο</sup> βήμα καταγράφεται *in situ* με <sup>1</sup>H-NMR ο βιομετασχηματισμός αυτών των ενώσεων από την CaLB που πραγματοποιείται μέσα στον NMR-σωληνάκι.

Σε μια συμβατική μέθοδο καταγραφής και χαρακτηρισμού των προϊόντων της βιοτροποποίησης, πρέπει αρχικά να απομακρυνθεί το ένζυμο από το μείγμα της αντίδρασης, να κλασματοποιηθούν τα προϊόντα και στην συνέχεια να απομονωθούν, ώστε να γίνει ο πλήρης χαρακτηρισμός τους με μεθόδους όπως οι φασματοσκοπίες NMR και MS (Εικόνα 4.4. Παράρτημα). Για να επιταχύνουμε αυτή τη διαδικασία η αντίδραση βιοτροποποίησης πραγματοποιείται μέσα σε ένα σωληνάκι NMR 5 mm και καταγράφεται *in situ* σε πραγματικό χρόνο με την λήψη 1D <sup>1</sup>H-NMR (και 2D <sup>13</sup>C HSQC-HMBC όταν κρίνεται απαραίτητο) φασμάτων (Εικόνα 4.4.). Η καταγραφή σε πραγματικό χρόνο της εξέλιξης μιας ενζυμικής αντίδρασης μπορεί να προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες για την απόδοση της αντίδρασης, την βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης με στόχο τη μεγιστοποίηση της απόδοσης και πληροφορίες για την κινητική και τον μηχανισμό της βιοτροποποίησης (Chatzikonstantinou et al., 2018a).

Στον NMR-tube βιοαντιδραστήρα, όπως αναφέρθηκε, η καταγραφή της εξέλιξης της βιοτροποποίησης πραγματοποιείται με τη λήψη 1D <sup>1</sup>H-NMR (και 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC όταν κρίθηκε απαραίτητο) φασμάτων. Για να επιτευχθεί η καταγραφή φασμάτων υψηλής ανάλυσης πρέπει αρχικά να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες της βιοτροποποίησης καθώς και οι συνθήκες λήψης των φασμάτων NMR. Αρχικά για να αποφευχθεί η παρουσία σήματος NMR από τον βιοκαταλύτη η χρήση ακινητοποιημένου βιοκαταλύτη κρίνεται απαραίτητη. Το ένζυμο σε

ακίνητοποιημένη μορφή περιορίζεται στον πυθμένα του σωλήνα NMR έξω από την ενεργό όγκο του πηνίου NMR αποφεύγοντας έτσι τις παρεμβολές από τα σήματα της πρωτεΐνης. Σε μία συμβατική αντίδραση ακετυλίωσης φλαβονοειδών όπως η κερσετίνη (η ναρινγενίνη, η ρουτίνη, η ναριγκίνη και ο 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης) από την CaLB, οι συνθήκες αντίδρασης έχουν ως εξής: 16 mM του κάθε φλαβονοειδούς και 250  $\mu\text{L}$  του άκυλο δότη βινυλικού οξέος προστίθενται σε 0.5 mL ακετονιτρίλιο, παρουσία 60  $\text{mg mL}^{-1}$  CaLB Novorprime 435 (ακίνητοποιημένη σε ακρυλική ρητίνη). Το μείγμα της αντίδρασης στη συνέχεια επωάζεται σε θερμοστατούμενο αναδευτήρα στους 333 K υπό ανάδευση (750 rpm)(Κυριακού et al., 2012).

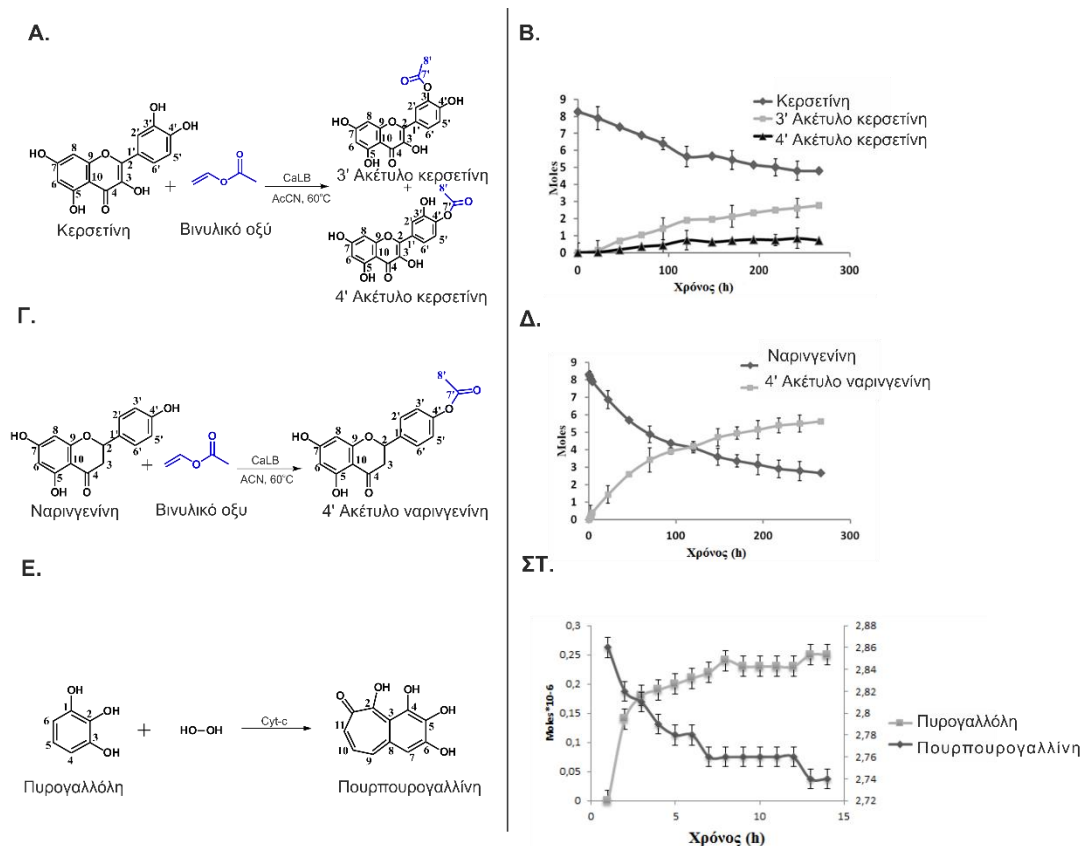


**Εικόνα 4.5.** Φάσματα  $^1\text{H}$  NMR της ακετυλίωσης της κερσετίνης από την CaLB που πραγματοποιείται στον NMR-tube βιοαντιδραστήρα. Α) λήψη φάσματος σε Bruker AV-400 φασματόμετρο, στους 333 K, παρουσία 60  $\text{mg mL}^{-1}$  CaLB και 250  $\mu\text{L}$  βινυλικού οξέος. Β) λήψη φάσματος σε Bruker AV-400 φασματόμετρο, στους 298 K, παρουσία 60  $\text{mg mL}^{-1}$  CaLB και 250  $\mu\text{L}$  βινυλικού οξέος. Γ) λήψη φάσματος σε Bruker AV-400 φασματόμετρο, στους 298 K, παρουσία 30  $\text{mg mL}^{-1}$  CaLB και 125  $\mu\text{L}$  βινυλικού οξέος. Δ) λήψη φάσματος σε Bruker AV-500 φασματόμετρο, στους 282 K, παρουσία 30  $\text{mg mL}^{-1}$  CaLB και 125  $\mu\text{L}$  βινυλικού οξέος.

Στην Εικόνα 4.5 παρουσιάζεται η διαδικασία βελτιστοποίησης της λήψης φασμάτων  $^1\text{H}$ -NMR σε πραγματικό χρόνο της ακετυλίωσης της κερσετίνης καταλυόμενη από την CaLB. Για να επιτευχθεί η λήψη φασμάτων υψηλής ανάλυσης με οξείες κορυφές μειώνεται η συγκέντρωση του ακίνητοποιημένου βιοκαταλύτη και του άκυλο δότη (30  $\text{mg mL}^{-1}$  και 125  $\mu\text{L}$ ). Επιπλέον, η λήψη φασμάτων NMR πραγματοποιείται σε μεγαλύτερου πεδίου NMR φασματόμετρο (AV 500 MHz) και σε χαμηλότερη θερμοκρασία (282 K). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.5 μετά τη βελτιστοποίηση, το πλάτος των αρχικά διευρυμένων κορυφών συντονισμού των ομάδων OH στη θέση C5 έχει μειωθεί κατά ένα συντελεστή δύο (από 8 Hz στα 4 Hz Εικόνα 4.5A και 4.5D αντίστοιχα).

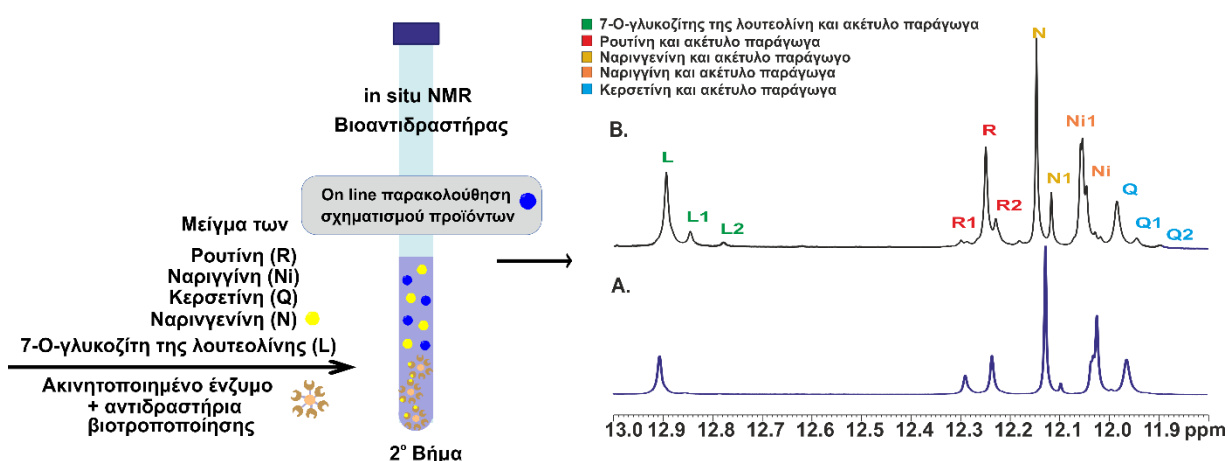
Μετά τη βελτιστοποίηση των συνθηκών λειτουργίας της καταγραφής *in situ* της βιοτροποποίησης των φλαβονοειδών στον NMR-tube βιοαντιδραστήρα, πραγματοποιήθηκε η ακετυλίωση της κερσετίνης και της ναρινγενίνης στις βέλτιστες συνθήκες. Η πορεία των αντιδράσεων καταγράφηκε σε πραγματικό χρόνο με την λήψη φασμάτων 1D  $^1\text{H}$  NMR (και 2D  $^1\text{H}$

H-<sup>13</sup>C HSQC, 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC όταν κρίθηκε απαραίτητο) υψηλής ανάλυσης. Στην περίπτωση του Cyt-c το ένζυμο αρχικά ακινητοποιήθηκε σε celite ώστε να περιοριστεί ο βιοκαταλύτης στον πυθμένα του NMR-tube βιοαντιδραστήρα και να μελετηθεί *in situ* η βιοτροποποίηση της πυρογαλλόλης. Η ανάλυση των φασμάτων NMR αφενός επέτρεψε την καταγραφή της κατανάλωσης των υποστρωμάτων και του ταυτόχρονου σχηματισμού των προϊόντων συναρτήσει του χρόνου (Εικόνα 4.6), δίνοντας πληροφορίες για την απόδοση και την κινητική της αντίδρασης και αφετέρου επέτρεψε τον χαρακτηρισμό των προϊόντων της αντίδρασης (Παράρτημα IV).



**Εικόνα 4.6.** Α) και Γ) Η ακετυλίωση της κερσετίνης και την ναρινγενίνης αντίστοιχα από την CaLB και Ε) η οξείδωση της πυρογαλλόλης από το Cyt-c. Β), Δ) και Ζ) Η εξέλιξη της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο της κατανάλωσης των υποστρωμάτων και της σύνθεσης των προϊόντων συναρτήσει του χρόνου, κατά τον βιομετασχηματισμό της κερσετίνης, της ναρινγενίνης και της πυρογαλλόλης αντίστοιχα.

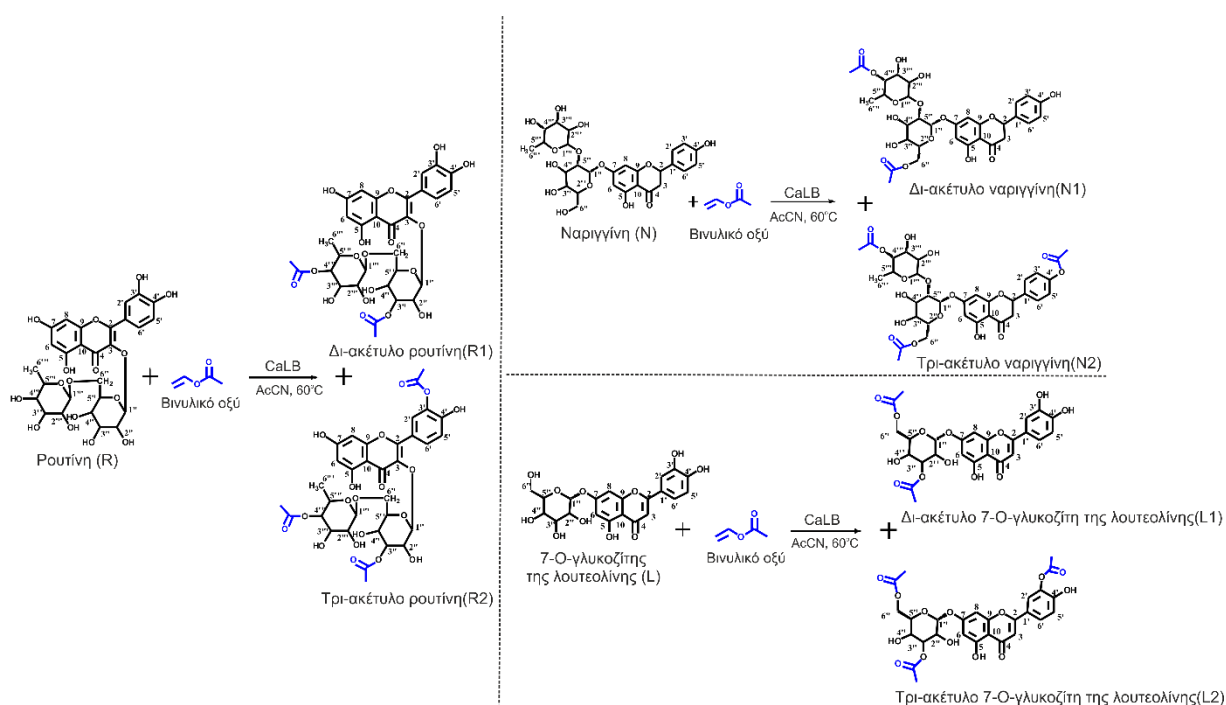
Για να διερευνηθούν οι δυνατότητες αυτής της μεθόδου εφαρμόσαμε τον NMR-tube βιοαντιδραστήρα στην αντίδραση ακετυλίωσης ενός μείγματος 5 φλαβονοειδών (κερσετίνη, ναρινγενίνη, 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης, ναριγκίνη και ρουτίνη) από την CaLB. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4.7 ήταν δυνατό να καταγράψουμε σε πραγματικό χρόνο τον σχηματισμό οκτώ διαφορετικών προϊόντων. Αξίζει να σημειωθεί ότι αν και στο μείγμα τις αντίδρασης υπήρχαν 13 ενώσεις (5 υποστρώματα και 8 προϊόντα) καταγράφηκαν NMR φάσματα υψηλής ανάλυσης παρουσία του βιοκαταλύτη. Όπως φαίνεται μέσω αυτής της διεργασίας μπορούν να διερευνηθούν πολυάριθμα πιθανά ενζυμικά υποστρώματα για ένα ένζυμο και να μελετηθεί σε πραγματικό χρόνο η βιοτροποποίησή τους.



**Εικόνα 4.7.** Επιλεγμένη περιοχή (των ομάδων OH της θέσης C5) των  $^1\text{H}$  NMR φασμάτων της βιοτροποποίησης μείγματος 5 φλαβονοειδών (κερσετίνη (Q), ναρινγενίνη (N), ρουτίνη (R) 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης (L) και ναριγκίνη(Ni)) (A), μετά από 240 h και (B), μετά από 48 h, σε  $\text{AcCN-d}_3$  στους 282 K. Στα αριστερά φαίνεται μια σχηματική αναπαράσταση του 2<sup>ου</sup> βήματος του NMR-tube βιοαντιδραστήρα.

Μέσω αυτή της διαδικασίας προσδιορίστηκε η τοποεκλεκτική βιοτροποποίηση της κερσετίνης και της ναρινγενίνης από την CaLB, τα αποτελέσματα των οποίων συμφωνούν με την βιβλιογραφία (Kyriakou et al., 2012). Αξίζει να σημειωθεί, ότι μέσω του NMR-tube βιοαντιδραστήρα προσδιορίστηκαν προϊόντα ακετυλίωσης τα οποία δεν έχουν ξανά αναφερθεί στην βιβλιογραφία (Εικόνα 4.8). Πιο συγκεκριμένα αν και τα προϊόντα βιοτροποποίησης των γλυκοζυλιωμένων φλαβονοειδών ρουτίνη, 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης και ναριγκίνη από το ένζυμο CaLB έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία, μέσω του NMR-tube βιοαντιδραστήρα ταυτοποιήθηκαν καινούρια ακετυλιωμένα παράγωγα αυτών των ενώσεων (Εικόνα 4.8). Στην περίπτωση της ρουτίνης είναι γνωστό από την βιβλιογραφία ότι οι ομάδες OH που τροποποιούνται από την CaLB είναι αυτές στις θέσεις C4' και C3' (Chebil et al., 2006; De Oliveira et al., 2010; Viskuricova et al., 2009). Παρόλα αυτά, στη συγκεκριμένη μελέτη αποδείχθηκε ότι μία επιπλέον ομάδα OH είναι δυνατόν να τροποποιηθεί από την CaLB (ομάδα OH στη θέση C3'), οδηγώντας στον σχηματισμό ενός δια-ακέτυλο και ενός τρι-ακέτυλο παραγώγου της ρουτίνης όπως φαίνονται στην Εικόνα 4.8. Ομοίως στην περίπτωση της ναριγκίνης η ομάδα OH στη θέση C6' είναι γνωστό ότι τροποποιείται από την CaLB (Chebil et al., 2006; Mellou et al., 2005; Viskuricova et al., 2009). Μέσου του NMR-tube βιοαντιδραστήρα δύο επιπλέον ομάδες OH της

ναριγκίνης, οι οποίες δεν έχουν ξανά αναφερθεί να τροποποιούνται, βρέθηκε ότι τροποποιούνται από την CaLB (οι ομάδες OH στις θέσεις C4'' και C4') σχηματίζοντας ένα δι-ακέτυλο και ένα τρι-ακέτυλο παράγωγο της ναριγκίνης (Εικόνα 4.8). Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και στην περίπτωση του 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης. Η πρωτοταγής ομάδα OH στη θέση C6' έχει αναφερθεί ότι τροποποιείται από την CaLB (Chebil et al., 2006; Viskuricova et al., 2009), αλλά στην παρούσα μελέτη οι ομάδες OH στις θέσεις C3'' και C3 OH φάνηκε ότι επίσης τροποποιούνται και προκύπτει ένα δι-ακέτυλο και ένα τρι-ακέτυλο παράγωγο του 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης (Εικόνα 4.8). Ο πλήρης NMR χαρακτηρισμός των παραπάνω προϊόντων αναφέρεται στο Παράρτημα.



**Εικόνα 4.8.** Η ακετυλίωση της (A) ρουτίνης, (B) ναριγκίνης και (C) του 7-O-γλυκοζίτη της λουτεολίνης από την CaLB σε AcCN, στους 60 C<sup>o</sup>, ως άκυλο δότης χρησιμοποιήθηκε το βινυλικό οξύ.

#### **4.3.3. 3<sup>ο</sup> Βήμα: Άμεσος έλεγχος των προϊόντων βιοτροποποίησης ως προς την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες φαρμακευτικού ενδιαφέροντος.**

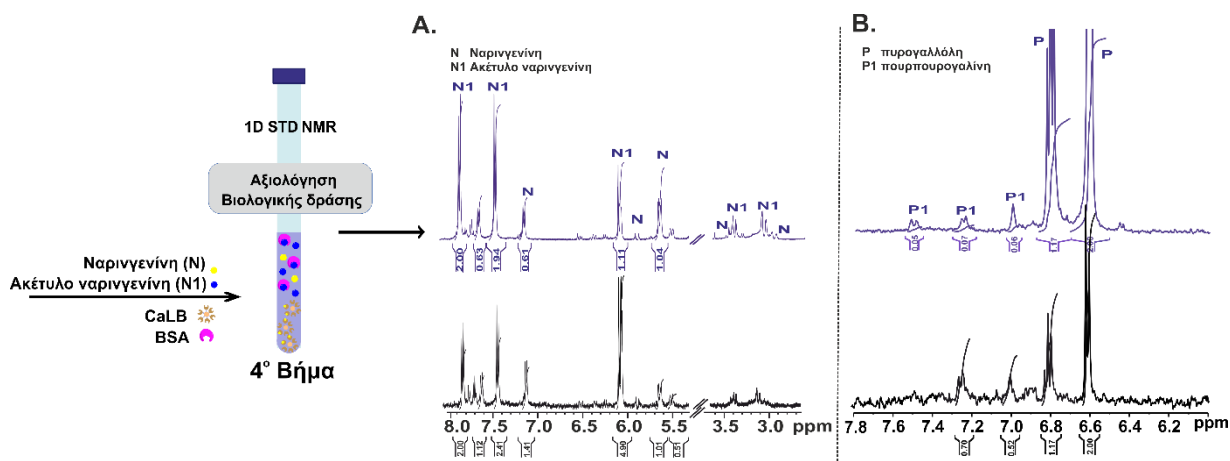
Στο τελευταίο (3<sup>ο</sup>) βήμα μέσω του NMR-tube βιοαντιδραστήρα μπορεί να πραγματοποιηθεί ο έλεγχος της ικανότητας των προϊόντων βιοτροποποίησης να αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες φαρμακευτικού ενδιαφέροντος. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με δύο τρόπους, αφενός μελετώντας κατευθείαν ποιες περιοχές του υποκαταστάτη αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη στόχο και αφετέρου μελετώντας της επίδραση του υποκαταστάτη στην πρωτεΐνη. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η CaLB μπορεί να καταλύσει τόσο αντιδράσεις ακετυλίωσης όσο και αντιδράσεις αλκοόλυσης. Σε αυτό το κεφάλαιο θα παρουσιάσουμε τη μελέτη αλληλεπίδρασης υποκατάστατη-πρωτεΐνης τόσο από την σκοπιά το υποκαταστάτη όσο και από την σκοπιά της πρωτεΐνης. Για αυτό τον σκοπό θα μελετήσουμε τα παράγωγα ακετυλίωσης διάφορων φλαβονοειδών και τα παράγωγα αλκοόλυσης της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης με δύο πρωτεΐνες στόχους φαρμακευτικού ενδιαφέροντος.

Η αλβουμίνη από ορό βοδιού (BSA) λειτουργεί ως φορέας φαρμάκων και χρησιμοποιείται ευρέως ως μοντέλο στην μελέτη αλληλεπιδράσεων της αλβουμίνης με πιθανές φαρμακευτικές ενώσεις (Sułkowska, 2002). Επιπλέον, η BSA χρησιμοποιείται για την ικανότητά της να αλληλεπιδρά με μεγάλο αριθμό αρωματικών και υδρόφοβων μορίων της κυκλοφορίας του αίματος (Goodman, 1958; Ravera et al., 2014). Οι αλληλεπιδράσεις των προϊόντων ακετυλίωσης της CaLB με την BSA μπορεί να μελετηθεί μέσω της φασματοσκοπίας STD NMR. Μετά το 2<sup>ο</sup> βήμα εφόσον ο ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης βρίσκεται περιορισμένος στον πυθμένα του NMR σωλήνα, η πρωτεΐνη στόχος, στην συγκεκριμένη περίπτωση η BSA μπορεί να προστεθεί κατευθείαν στον NMR-tube βιοαντιδραστήρα όπου βρίσκονται ο ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης και το μείγμα των προϊόντων της βιοτροποποίησης. Στην περίπτωση που δεν υπάρχει συμβατότητα στον διαλύτη που είναι απαραίτητος για την εφαρμογή των βημάτων 2 και 3, τότε μπορεί εύκολα να απομακρυνθεί ο διαλύτης του 2<sup>ου</sup> βήματος μέσω εξάτμισης υπό κενό, αφού πρώτα απομακρυνθεί ο βιοκαταλύτης με φιλτράρισμα, και να προστεθεί ο κατάλληλος διαλύτης για το 3<sup>ο</sup> βήμα.

Στην περίπτωση της ακετυλίωσης των φλαβονοειδών πραγματοποιήθηκε η αλλαγή διαλύτη στο μείγμα της αντίδρασης και στη συνέχεια προστέθηκε κατάλληλη ποσότητα της πρωτεΐνης φορέα BSA και ακολούθησε καταγραφή STD NMR φασμάτων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, στην περίπτωση της ακετυλίωσης της ναρινγενίνης, τόσο η πρόδρομη (ναρινγενίνη) ένωση όσο και το ακετυλιωμένο παράγωγο αλληλεπιδρούν με την BSA (Εικόνα 4.9). Αξίζει να σημειωθεί ότι το προϊόν της βιοτροποποίησης φαίνεται να αλληλεπιδρά ισχυρότερα με την BSA σε σύγκριση με την πρόδρομη ένωση όπως φαίνεται από τα ενισχυμένα STD σήματα καθώς η αναλογία των ολοκληρωμάτων του προϊόντος προς την πρόδρομη ένωση έχει αυξηθεί από 0,31 σε 0,56 (Εικόνα 4.9).

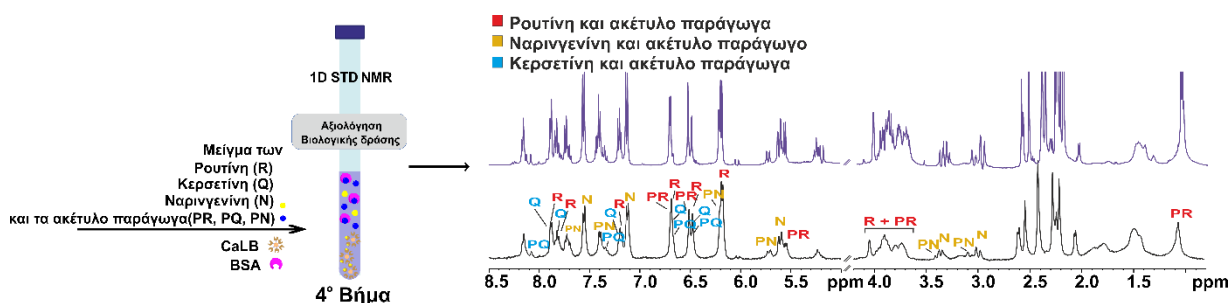
Αντίθετα στην περίπτωση της βιοτροποποίησης της πυρογαλλόλης προστέθηκε κατευθείαν στο μείγμα της αντίδρασης, που προέκυψε από το 2<sup>ο</sup> βήμα, κατάλληλη ποσότητα της BSA, παρουσία του ακινητοποιημένου Cyt-c στον πυθμένα του σωλήνα και πραγματοποιήθηκε λήψη STD NMR φάσματος. Τα αποτελέσματα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4.9 έδειξαν ότι τόσο η πρόδρομη ένωση (πυρογαλλόλη) όσο και το προϊόν (πυροπουρογαλλίνη) αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη φορέα BSA. Και σε αυτήν την περίπτωση αξίζει να σημειωθεί ότι το προϊόν της

βιοτροποποίησης φαίνεται να αλληλεπιδρά ισχυρότερα με την BSA σε σύγκριση με την πρόδρομη ένωση, όπως φαίνεται από τα ενισχυμένα STD σήματα καθώς η αναλογία των ολοκληρωμάτων του προϊόντος προς την πρόδρομη ένωση έχει αυξηθεί αισθητά από 0.04 σε 0,.. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν την πεποίθηση ότι η βιοτροποποίηση φυσικών προϊόντων οδηγεί στην σύνθεση ενώσεων με ενισχυμένη βιολογική δράση.



**Εικόνα 4.9.** Επιλεγμένη περιοχή του STD NMR φάσματος του μείγματος της αντίδρασης Α) ακετυλίωσης της ναρινγενίνης από την CaLB με την BSA σε 65 % ρυθμιστικό διάλυμα PBS σε D<sub>2</sub>O, και 35 % AcCN-d<sub>3</sub>. Β) της οξειδωσης της πυρογαλλόλης από το Cyt-c, σε 70 % ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε D<sub>2</sub>O και 30 % AcCN-d<sub>3</sub>. Το <sup>1</sup>H NMR φάσμα αναφοράς αποτυπώνεται με μπλε ενώ το STD φάσμα διαφοράς με μαύρο.

Για να αναδείξουμε για άλλη μια φορά την δυναμική του NMR-tube βιοαντιδραστήρα το 3<sup>ο</sup> βήμα εφαρμόστηκε στο μείγμα τριών διαφορετικών φλαβονοειδών (ρουτίνη (R), ναρινγενίνη (N) και κερσετίνη (Q)) και των ακετυλιωμένων παραγώγων τους (συμβολίζονται ως PR, PN και PQ αντίστοιχα), που προέκυψαν από την βιοτροποποίηση με την CaLB. Όπως απεικονίζεται από την Εικόνα 4.10 με τη λήψη STD NMR φάσματος ήταν δυνατός ο προσδιορισμός της αλληλεπίδρασης με την BSA τόσο των πρόδρομων ενώσεων όσο και των προϊόντων της βιοτροποποίησης.

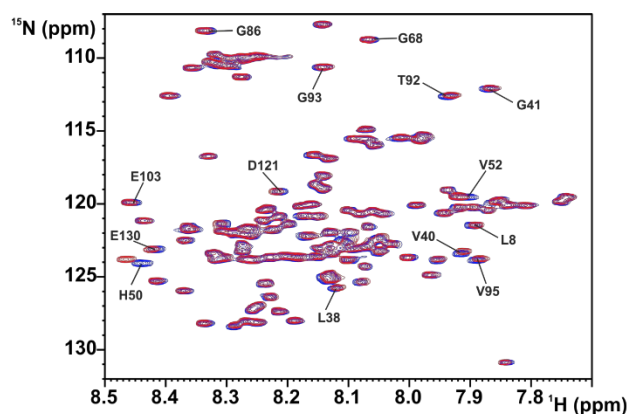


**Εικόνα 4.10.** Επιλεγμένη περιοχή του STD NMR φάσματος του μείγματος της κερσετίνης (Q), ναρινγενίνης (N) και ρουτίνης (R) και των ακετυλιωμένων παραγώγων τους (PQ, PN, PR) με την BSA σε 65 % ρυθμιστικό διάλυμα PBS σε D<sub>2</sub>O και 35 % AcCN-d<sub>3</sub>. Το <sup>1</sup>H NMR φάσμα αναφοράς αποτυπώνεται με μπλε ενώ το STD φάσμα διαφοράς με μαύρο.

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση των προϊόντων βιοτροποποίησης σε μία διαφορετική πρωτεΐνη-φαρμακευτικό στόχο την εγγενώς διαταραγμένη πρωτεΐνη (intrinsically disordered protein IDP) α-συνουκλεΐνη. Η α-συνουκλεΐνη και πιο συγκεκριμένα η αμυλοείδωση που σχετίζεται με την συσώρευση α-συνουκλεΐνης παίζει σημαντικό ρόλο σε περισσότερες από 40 νευρολογικές παθήσεις συμπεριλαμβανομένης των νόσων Alzheimer's, Parkinson's και Huntington's (Chiti and Dobson, 2006; Herrera et al., 2008; Oh et al., 2014) και η ταυτοποίηση πιθανόν υποκαταστατών είναι σημαντική. Η εγγενής έλλειψη δομής των ODPs καθιστά δύσκολο τον σχεδιασμό φαρμάκων με βάση τη δομή γι' αυτό θεωρούνται δύσκολοι στόχοι (Dunker and Uversky, 2010; Lee et al., 2014; Oldfield and Dunker, 2014). Τα φλαβονοειδή και τα προϊόντα τους έχουν μελετηθεί με επιτυχία ως αναστολείς αμυλοειδών (De Toma et al., 2014, 2012; Poronvych et al., 2012; Suzuki et al., 2012). Για αυτό το λόγο μελετήθηκε η επίδραση παραγώγων της κερσετίνης στην δομή της α-συνουκλεΐνης. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα η υπερακετυλιωμένη κερσετίνη για την τοποεκλεκτική αλκοόλυσή της από το ένζυμο CaLB. Σχηματίστηκαν τρία ακέτυλο παράγωγα της κερσετίνης τα οποία έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζουν αντι-πολλαπλασιαστική ικανότητα έναντι τριών κυτταρικών σειρών καρκίνου του μαστού (Kyriakou et al., 2018). Το μείγμα αυτών των προϊόντων μελετήθηκε ως προς τις επίδραση που μπορεί να έχει στη δομή της α-συνουκλεΐνης. Για να μπορέσει να μελετηθεί η επίδραση που έχουν τα ακετυλιωμένα παράγωγα της κερσετίνης στην α-συνουκλεΐνη έπρεπε πρώτα να γίνει επισήμανση της πρωτεΐνης με  $^{13}\text{N}$  ώστε στη συνέχεια να μπορέσει να μελετηθεί η δομή της μέσω φασμάτων 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  SOFAST HMQC NMR. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε χαρτογράφηση της μεταβολής των χημικών μετατοπίσεων της α-συνουκλεΐνης παρουσία και απουσία των ακετυλιωμένων παραγώγων της κερσετίνης, σε διαφορετικές μοριακές αναλογίες, με λήψη 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  SOFAST HMQC NMR φασμάτων. Στην Εικόνα 4.11 παρουσιάζεται η υπέρθεση των φασμάτων της α-συνουκλεΐνης μόνης της και της α-συνουκλεΐνης παρουσία των ακετυλιωμένων προϊόντων σε μοριακή αναλογία 1:6. Τα πιο σημαντικά τμήματα της αλληλουχίας της α-συνουκλεΐνης που σχετίζονται με την αμυλοείδωση είναι τα αμινοξέα 61-95 (η λεγόμενη περιοχή NAC), 14-31,37-57 καθώς και η αμινοτελική και καρβοξυτελική ουρά (Sivanesan et al, 2015). Παρουσία των ακετυλιωμένων παραγώγων την κερσετίνης παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στην χημική μετατόπιση αρκετών από αυτές τις περιοχές (για παράδειγμα H50, E130, V52, T92 κ.α.). Μάλιστα παρατηρήθηκε παρόμοια εικόνα με αυτήν της μελέτης αναστολής της α-συνουκλεΐνης από την επιγαλοκατεχίνη (Konijnenberg et al., 2016; Sivanesan et al, 2015) αναδεικνύοντας τη σημαντική βιολογική δράση των ενζυμικά τροποποιημένων φυσικών προϊόντων.



A.



B.



**Εικόνα 4.11.** Το 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  SOFAST HMQC φάσμα της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης. α, Επιλεγμένη περιοχή της υπέρθεσης του 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  SOFAST HMQC φάσματος στους 283 K της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης απουσία των προϊόντων (κόκκινο φάσμα) και παρουσία των ακετυλιωμένων προϊόντων της κερσεΐνης σε μοριακή αναλογία 1:6 (μπλε φάσμα) και β, σχήμα των αμινοξέων της  $\alpha$ -συνουκλεΐνης που αλληλεπιδρούν με τα ακετυλιωμένα παράγωγα την κερσεΐνης, με κόκκινα βέλη επισυμμένονται οι περιοχές που είναι σημαντικές για την αμυλοειδογένεση. Η μεταβολή των χημικών μετατοπίσεων υπολογίστηκε από τον τύπο  $\frac{1}{2}\sqrt{\delta_H^2 + \delta_N^2/25}$ , όπου  $\delta_H^2$  και  $\delta_N^2$  είναι οι μεταβολές στην χημική μετατόπιση των κορυφών στη διάσταση των υδρογόνων και των αζώτων αντίστοιχα (Grzesiek et al., 1996).

#### 4.4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε ο 'NMR-tube βιοαντιδραστήρας', μία μέθοδος τριών σταδίων που έχει διεξαχθεί ολοκληρωτικά μέσα σε ένα σωλήνα NMR 5mm. Αυτό το απλό πρωτόκολλο επιτρέπει: α) την πρόβλεψη της ικανότητας ενός φυσικού προϊόντος ή ενός μείγματος προϊόντων να λειτουργήσουν ως υπόστρωμα για συγκεκριμένα ένζυμα, β) τον γρήγορο έλεγχο διαφορετικών συνθηκών για να βελτιστοποιήσουν την απόδοση της ενζυμικής δράσης, γ) την καταγραφή της εξέλιξης της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο της βιοτροποποίησης προϊόντος/ών, χωρίς κανένα προηγούμενο στάδιο κλασματοποίησης ή καθαρισμού, και δ) έλεγχος της αλληλεπίδρασης των προϊόντων με πρωτεΐνες στόχους φαρμακευτικού ενδιαφέροντος. Η προσέγγιση του NMR-tube βιοαντιδραστήρα χρησιμοποιεί χαμηλές ποσότητες διαλύτη (ο οποίος είναι κυρίως υδαρής) και αποφεύγει όλα τα χρονοβόρα και ενδιάμεσα στάδια του καθαρισμού σε μια κλασική συνθετική προσέγγιση. Η χρήση του NMR δίνει τη δυνατότητα ταυτοποίησης ενώσεων ενώ ταυτόχρονα η χρήση των ενζύμων εξαλείφει την ανάγκη για προστασία/αποπροστασία και εξασφαλίζει ήπιες συνθήκες αντίδρασης. Συμπερασματικά αναπτύχθηκε μια πράσινη, χρονικά, και οικονομικά αποδοτική διαδικασία που παρέχει μια απλή διαδρομή από τα φυσικά προϊόντα στη σύνθεση προϊόντων με ενισχυμένη βιολογική-φαρμακευτική δράση.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή περιγράφεται η ανάπτυξη και η μελέτη βιοκαταλυτικών συστημάτων για την τροποποίηση φυσικών προϊόντων προς βελτίωση της βιολογικής τους δράσης. Για την ανάπτυξη των συστημάτων αυτών χρησιμοποιήθηκαν νανοϋλικά που ανήκουν στην κατηγορία νανοδομημένων υλικών με βάση τον άνθρακα. Τα ένζυμα-βιοκαταλύτες μπορούν να ακινητοποιηθούν πάνω στα νανοϋλικά και να επιδείξουν αλλαγές στα δομικά και καταλυτικά χαρακτηριστικά τους. Η κατανόηση της σχέσης δομής και λειτουργίας των ενζύμων με τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα μπορεί να οδηγήσει στον ορθολογικό σχεδιασμό βιοκαταλυτικών διεργασιών, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην ανάπτυξη αποτελεσματικών νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων.

Στη συγκεκριμένη διατριβή τα νανοϋλικά που χρησιμοποιήθηκαν με βάση των άνθρακα ήταν τα νανοδομημένα υλικά ιεραρχημένου πορώδους άνθρακα (hierarchically porous carbon materials, HPCs) και οι πορώδεις κυβοειδείς άνθρακες (porous carbon cuboids, PCCs). Τα HPCs, έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια λόγω του καλά καθορισμένου και διασυνδεδεμένου πορώδους που διαθέτουν, με διαφορετικά μήκη που κυμαίνονται από μακρο-, μεσο- και μικροπορώδες. Έχουν μοναδικές ιδιότητες σε σύγκριση με άλλα νανοϋλικά, όπως το υψηλό ποσοστό επιφάνειας, η μεγάλη χωρητικότητα αποθήκευσης και οι ιδιαίτερες ιδιότητες μεταφοράς μάζας, και έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορες εφαρμογές, στο πεδίο της νανοτεχνολογίας της κατάλυσης. Αντίστοιχα τα PCCs συνδυάζουν μια σειρά από ενδιαφέρουσες ιδιότητες όπως, η ασυνήθιστη υπερ-υδρόφιλη συμπεριφορά, η μεγάλη σταθερότητα, η ετερογένεια επιφάνειας και το πολύ υψηλό ιεραρχημένο πορώδες. Τα υλικά αυτά υπέστησαν χημική τροποποίηση ώστε είτε να αποκτήσουν λειτουργικές ομάδες οξυγόνου (κυρίως υδροξυλομάδες και καρβοξυλομάδες), είτε να αποκτήσουν μαγνητικές ιδιότητες με την προσθήκη νανοσωματιδίων μαγνητικού σιδήρου. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς για την ακινητοποίηση ενός οξειδωαναγωγικού ενζύμου, της λακάσης και δύο υδρολυτικών ενζύμων, της λιπάσης και της β-γλυκοσιδάσης. Και τέλος οι νανοβιοκαταλύτες που αναπτύχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν στην τροποποίηση φυσικών προϊόντων.

Στο πρώτο κεφάλαιο μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των νανοϋλικών HPC και των οξειδωμένων υλικών HPCox με τη λακάση από *Trametes versicolor*. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα και τα δύο υλικά παρουσιάζουν αρνητική επίδραση στην καταλυτική δράση της λακάσης. Παρόλα, αυτά η οξειδωμένη μορφή του υλικού HPC φάνηκε να επηρεάζει την δραστηριότητα της λακάσης 20 % λιγότερο από την μη οξειδωμένη μορφή. Τα αποτελέσματα αυτά στηρίχθηκαν και από δομικές μελέτες με φασματοσκοπία φθορισμού και κυκλικού διχρωισμού όπου φάνηκε ότι η αλληλεπίδραση του ενζύμου λακάση με την οξειδωμένη μορφή των HPCs είχε ως αποτέλεσμα μικρές διαμορφωτικές αλλαγές στη δομή του ενζύμου. Αντίθετα αποτελέσματα έδειξε η μελέτη αλληλεπίδρασης της λακάσης με το υλικό HPC, όπου υπήρχαν έντονες αλλαγές στην δευτεροταγή δομή του ενζύμου, καθώς μειώθηκε η περιεκτικότητα σε α-έλικα κατά 90 %. Τα παραπάνω αποτελέσματα τονίζουν ότι η χημεία της επιφάνειας των νανοϋλικών παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον τρόπο αλληλεπίδρασής τους με πρωτεϊνικά μόρια. Για τους ανωτέρω λόγους ως φορέας ακινητοποίησης της λακάσης επιλέχθηκε το υλικό HPCox. Πραγματοποιήθηκε ομοιοπολική ακινητοποίηση της λακάσης (TnL) στις καρβοξυλομάδες και στις υδροξυλομάδες του υλικού με την βοήθεια των παραγόντων σύζευξης EDC και NHS, όπου σχηματίζονται

σταθεροί αμιδικοί δεσμοί μεταξύ του ενζύμου και του νανοϋλικού. Η ακινητοποίηση του ενζύμου στο νανοϋλικό επιβεβαιώθηκε με διάφορες φασματοσκοπίες όπως υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier, φθορισμού και φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X. Επιτεύχθηκε σχετικά υψηλό ποσοστό ακινητοποίησης ~60 % και υψηλή ενζυμική δραστηριότητα ίση με  $0.4 \text{ U mg}^{-1}_{\text{ενζύμου}}$ . Ο νέος νανοβιοκαταλύτης (HPCox-TvL) υπέδειξε υψηλή σταθερότητα σε σχέση με την ελεύθερη λακάση, σε θερμοκρασίας 30°C, σε pH 5, αφού εμφάνισε σημαντικά υψηλότερο χρόνο ημι-ζωής (10 h), έναντι του ελεύθερου ενζύμου που εμφάνισε χρόνο ημι-ζωής μόλις 1.8 h. Η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του νέου νανοβιοκαταλύτη μελετήθηκε επίσης, και μετά από 5 κύκλους αντίδρασης διατήρησε το 50 % της αρχικής του δραστηριότητας.

Σε συνέχεια του πρώτου κεφαλαίου ο νανοβιοκαταλύτης HPCox-TvL χρησιμοποιήθηκε για την τροποποίηση δύο φυσικών προϊόντων, της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης. Οι ενώσεις αυτές είναι γνωστές για πλήθος βιολογικών δράσεων όπως, αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή αντιφλεγμονώδη κ.α. Η ενζυμική τους τροποποίηση από λακάσες στοχεύει στην δημιουργία ολιγομερών με βελτιωμένες βιολογικές δράσεις. Η ενζυμική τροποποίηση αυτών των ενώσεων από τον νανοβιοκαταλύτη HPCox-TvL ήταν επιτυχής, με ποσοστό τροποποίησης μετά από 24 h μεγαλύτερο από 80%. Η τροποποίηση αυτή οδήγησε στη δημιουργία κυρίως διμερών αυτών των ενώσεων. Οι τροποποιημένη τυροσόλη και υδροξυτυροσόλη εμφάνισαν αυξημένη αντιμικροβιακή δράση έναντι δύο βακτηρίων, μέχρι και τέσσερις φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την πρόδρομη ένωση. Επιπλέον, μετά την τροποποίηση τους οι ενώσεις αυτές έδειξαν καλύτερη ικανότητα αναστολής λιπάσης και λιποξυγονάσης σε σχέση με τις πρόδρομες ενώσεις.

Στο δεύτερο κεφάλαιο χρησιμοποιήθηκε το μαγνητικό νανοϋλικό HPCFe για την ακινητοποίηση της λιπάσης B από *Pseudozyma (Candida) antarctica* (CaLB) με σκοπό την ανάπτυξη ενός ισχυρού νανοβιοκαταλύτη, για την ενζυμική σύνθεση ακετυλιωμένων παραγώγων της κερσετίνης, με ισχυρή αντικαρκινική δράση. Η CaLB ακινητοποιήθηκε ομοιοπολικά στις καρβοξυλομάδες και στις υδροξυλομάδες του υλικού με την βοήθεια των παραγόντων σύζευξης EDC και NHS. Η ακινητοποίηση του ενζύμου στο νανοϋλικό επιβεβαιώθηκε με διάφορες φασματοσκοπίες όπως υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier, και φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X. Για την ακινητοποίηση χρησιμοποιήθηκε ένα εύρος τιμών λόγου μάζας ενζύμου προς υλικό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μετά από μια τιμή όπου επιτυγχάνεται 100 % ακινητοποίηση και μέγιστη δραστηριότητα, η αύξηση της ποσότητας του ενζύμου οδηγεί στη μείωση του ποσοστού ακινητοποίησης και στη μείωση την ενζυμικής δραστηριότητας του νανοβιοκαταλύτη. Ο νέος νανοβιοκαταλύτης (HPCFe-CaLB) υπέδειξε υψηλή σταθερότητα σε οργανικούς διαλύτες αφού μετά από επώασης στους 40°C για 24 h, διατήρησε σχεδόν τον 100 % της δραστηριότητάς του. Δομικές μελέτες με φασματοσκοπίες υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier και κυκλικού διχρωισμού έδειξαν ότι τα νανοϋλικά HPCFe δημιουργούν ένα μικροπεριβάλλον που σταθεροποιεί τη δομή του ενζύμου

Στη συνέχεια η ακινητοποιημένη λιπάση χρησιμοποιήθηκε για την αλκοόλυση της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης προς το σχηματισμό μερικώς ακετυλιωμένων βιοενεργών παραγώγων κερσετίνης. Ο νανοβιοκαταλύτης HPCFe-CaLB έδειξε ρυθμό μετατροπής περίπου 5 φορές υψηλότερο από αυτόν που παρατηρήθηκε όταν ως βιοκαταλύτης χρησιμοποιήθηκε η κοινώς χρησιμοποιούμενη και εμπορικά διαθέσιμη CaLB Novozyme 435. Κατά την αλκοόλυση της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης προκύπτουν τρία προϊόντα. Η τριακέτυλο κερσετίνη (P1), η διακέτυλο κερσετίνη (P2) και η μονοακέτυλο κερσετίνη (P3). Σε προηγούμενη δουλειά δείξαμε

ότι η τριακέτυλο κερσετίνη (P1) εμφανίζει ισχυρότερη ακτινοκαρκινική δράση από τα άλλο δύο προϊόντα και την κερσετίνη. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (RSM) για την βελτιστοποίηση την ενζυμικής σύνθεσης του αναλόγου P1 με την ενισχυμένη βιολογική δράση, ως συνάρτηση διαφόρων παραμέτρων της αντίδρασης όπως ο χρόνος αντίδρασης (RT), η μοριακή αναλογία (MR) των υποστρωμάτων (1-βουτανόλη: PQ) και η συγκέντρωση του ενζύμου (E). Οι βέλτιστες συνθήκες για τη σύνθεση του αναλόγου P1 βρέθηκαν να είναι οι εξής:  $2.9 \text{ mg mL}^{-1}$  για τη συγκέντρωση του ενζύμου, 1.8 για τη μοριακή αναλογία των υποστρωμάτων και 4.3 h για τον χρόνο αντίδρασης. Στις βέλτιστες συνθήκες η μέγιστη συγκέντρωση του αναλόγου P1 που επιτυγχάνεται είναι  $3.48 \text{ g L}^{-1}$ , ενώ η % μετατροπή της PQ στις ίδιες συνθήκες υπολογίστηκε να είναι ίση με 60 %. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ποσότητα του βιοενεργού αναλόγου P1 που επιτυγχάνεται στην παρούσα μελέτη είναι περίπου 13 φορές υψηλότερη σε σύγκριση με εκείνη που αναφέρθηκε πρόσφατα χρησιμοποιώντας την εμπορικής διαθέσιμη CaLB Novozyme 435. Τέλος, ο νανοβιοκαταλύτης HPCFe-CaLB παρουσίασε πολύ υψηλή λειτουργική σταθερότητα καθώς μετά από 10 κύκλους (και συνολικά 43 h συνεχόμενης χρήσης), η εναπομένουσα καταλυτική δραστηριότητα της ακινητοποιημένης λιπάσης ήταν 98 %.

Στο τρίτο κεφάλαιο περιγράφεται η ανάπτυξη καινοτόμων νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων με την ομοιοπολική και μη ομοιοπολική ακινητοποίηση, σε νανοϋλικά PCCs και οξειδωμένα ανάλογα των PCCs, δύο β-γλυκοσιδασών (από αμύγδαλα και από *Thermotoga maritima*). Με αυτόν τον τρόπο διερευνήθηκε η επίδραση της επιφανειακής χημείας των PCCs και των προσεγγίσεων ακινητοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν, στην καταλυτική δραστηριότητα καθώς και στη θερμική και λειτουργική σταθερότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων. Σκοπός της ανάπτυξης των νανοβιοκαταλυτών ήταν να χρησιμοποιηθούν στην βιοκαταλυτική τροποποίηση της ελευρωπαΐνης σε υδροξυτυροσόλη και στον εμπλουτισμό εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε υδροξυτυροσόλη με σκοπό την βελτίωση της βιολογικής τους δράσης. Τόσο η χημεία της επιφάνειας του νανοϋλικού όσο και η μέθοδος ακινητοποίησης έδειξαν να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ακινητοποίηση και στην καταλυτική δράση των δύο β-γλυκοσιδασών. Η οξειδωμένη μορφή των PCCs φάνηκε να ευνοεί τόσο την ακινητοποίηση όσο και την καταλυτική δραστηριότητα στις περισσότερες περιπτώσεις. Η ακινητοποίηση του ενζύμου στο νανοϋλικό επιβεβαιώθηκε με διάφορες φασματοσκοπίες όπως υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier, φθορισμού και φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X, αλλά και με μικροσκοπία AFM. Οι νανοβιοκαταλύτες που αναπτύχθηκαν έδειξαν βελτιωμένη θερμοσταθερότητα στους  $60^\circ\text{C}$ .

Στη συνέχεια του τρίτου κεφαλαίου οι νανοβιοκαταλύτες που εμφάνισαν την καλύτερη δραστηριότητα, χρησιμοποιήθηκαν στην χημειοενζυμική τροποποίηση της ελευρωπαΐνης σε υδροξυτυροσόλη. Μετά από 24 h σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε τροποποίηση μεγαλύτερη από 90 %, ενώ μεγαλύτερο αρχικό ρυθμό αντίδρασης παρουσίασε η ομοιοπολική ακινητοποιημένη β-γλυκοσιδάση από *Thermotoga maritima* σε PCCox (PCCox-Tmbgl-cov). Ο συγκεκριμένος νανοβιοκαταλύτης εμφάνισε και την υψηλότερη λειτουργική σταθερότητα, καθώς μετά από 10 κύκλους επαναχρησιμοποίησης (240 h συνεχόμενης χρήσης) διατήρησε το 90 % της δραστηριότητάς της. Για τους παραπάνω λόγους ο βιοκαταλύτης PCCox-Tmbgl-cov χρησιμοποιήθηκε στην χημειοενζυμική τροποποίηση εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς με σκοπό την μετατροπή της ελευρωπαΐνης των εκχυλισμάτων σε υδροξυτυροσόλη, για την βελτίωση της βιολογικής τους δράσης. Ο εμπλουτισμός των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς σε υδροξυτυροσόλη ήταν επιτυχής αυξάνοντας την συγκέντρωση σε υδροξυτυροσόλη κατά ένα παράγοντα 2.5. Τα

εμπλουτισμένα σε υδροξυτυροσόλη εκχυλίσματα έδειξαν καλύτερη αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δράση. Τέλος, πραγματοποιήθηκε κλιμάκωση (Scale-up) της χημειοενζυμικής τροποποίησης των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς από όγκο αντίδρασης 1 mL σε σωληνάρια errendorf σε όγκο αντίδρασης 2 L σε βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου.

Στο τέταρτο κεφάλαιο περιγράφεται η ανάπτυξη μίας απλής και χρονικά-αποδοτικής διαδικασίας, του 'NMR-tube βιοαντιδραστήρα', που αποτελεί μία μεθοδολογία τριών σταδίων που έχει διεξαχθεί ολοκληρωτικά μέσα σε ένα σωλήνα NMR 5mm. Αυτή η μεθοδολογία επιτρέπει: α) την πρόβλεψη της ικανότητας ενός φυσικού προϊόντος ή ενός μείγματος προϊόντων να λειτουργήσουν ως υπόστρωμα για συγκεκριμένα ένζυμα, β) τον γρήγορο έλεγχο διαφορετικών συνθηκών για να βελτιστοποιήσουν την απόδοση της ενζυμικής δράσης, γ) την καταγραφή της εξέλιξης της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο της βιοτροποποίησης προϊόντος/ών, χωρίς κανένα προηγούμενο στάδιο κλασματοποίησης ή καθαρισμού, και δ) έλεγχος της αλληλεπίδρασης των προϊόντων με πρωτεΐνες στόχους φαρμακευτικού ενδιαφέροντος. Πιο συγκεκριμένα αρχικά μελετήθηκε η αλληλεπίδραση δύο βιοκαταλυτών, της λιπάση CaLB και του κυτόχρωμα c με διάφορα φλαβονοειδή (φυσικά προϊόντα με πλούσιες βιολογικές δράσεις) και την πυρογαλλόλη αντίστοιχα, και εντοπίστηκαν οι επίτοποι, δηλαδή τα πρωτόνια που αλληλεπιδρούν με τους παραπάνω βιοκαταλύτες μέσω ανάλυσης STD-NMR. Στο δεύτερο βήμα πραγματοποιήθηκε η καταγραφή σε πραγματικό χρόνο του βιομετασχηματισμού των υπό μελέτη φυσικών προϊόντων με ανάλυση  $^1\text{H-NMR}$ . Η βιομετατροπή αυτών των ενώσεων πραγματοποιήθηκε εξ ολοκλήρου σε σωλήνα NMR 5mm. Όσο αφορά την τροποποίηση των φλαβονοειδών από την λιπάση προέκυψαν διάφορα ακετυλιωμένα παράγωγα των φλαβονοειδών αυτών, τα οποία ταυτοποιήθηκαν με την χρήση 2D NMR. Όσο αφορά την τροποποίηση της πυρογαλλόλης από το κυτόχρωμα c, σχηματίστηκε περπουρογαλλίνη, μία ένωση με ποικίλες βιολογικές δράσεις. Τέλος, στο τρίτο βήμα πραγματοποιήθηκε η βιολογική αξιολόγηση των προϊόντων βιοτροποποίησης, μέσα στον ίδιο σωλήνα NMR, με την πρότυπη πρωτεΐνη φορέα αλβουμίνη από ορό χοίρου (BSA). Η βιολογική αξιολόγηση πραγματοποιήθηκε μέσω ανάλυσης STD NMR όπου μελετήθηκε η αλληλεπίδραση των προϊόντων της βιοτροποποίησης με την πρωτεΐνη φορέα BSA. Σε όλες τις περιπτώσεις τα προϊόντα αλληλεπίδρασαν καλύτερα με την BSA. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο 'NMR-tube βιοαντιδραστήρας' αποτελεί μια αποτελεσματική μεθοδολογία για την παρασκευή, ταυτοποίηση και βιολογική αξιολόγηση αναλόγων φυσικών προϊόντων, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε μείγματα πολλαπλών υποστρωμάτων και προϊόντων.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής καταδεικνύουν τη σημασία της νανοτεχνολογίας στη βιοκατάλυση και ιδιαίτερα στο νέο πεδίο της νανοβιοκατάλυσης. Τα συστήματα πρωτεΐνης-νανοϋλικών, ενισχύουν τα καταλυτικά χαρακτηριστικά των ενζύμων, οδηγώντας στη δημιουργία νέων βιοκαταλυτικών συστημάτων με ενδιαφέρουσες ιδιότητες. Τα νανοβιοκαταλυτικά συστήματα που αναπτύχθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορες βιοτροποποιήσεις φυσικών προϊόντων με σκοπό την βελτίωση των ιδιοτήτων τους. Ο έλεγχος της βιολογικής δράσεις των φυσικών προϊόντων πριν και μετά την τροποποίησή τους έδειξε ότι τα προϊόντα βιοτροποποίησης εμφανίζουν βελτιωμένες βιολογικές δράσεις. Όλα τα παραπάνω καταδεικνύουν την συμβολή της ενζυμικής νανοβιοτεχνολογίας στην ανακάλυψη ενώσεων με πλούσιες βιολογικές δράσεις.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Achmon, Y., Fishman, A., 2015. The antioxidant hydroxytyrosol: biotechnological production challenges and opportunities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1119–1130.
- Adeel, M., Bilal, M., Rasheed, T., Sharma, A., Iqbal, H.M.N., 2018. Graphene and graphene oxide: Functionalization and nano-bio-catalytic system for enzyme immobilization and biotechnological perspective. *Int. J. Biol. Macromol.* 120, 1430–1440. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.144>
- Adelakun, O.E., Kudanga, T., Parker, A., Green, I.R., Le Roes-Hill, M., Burton, S.G., 2012. Laccase-catalyzed dimerization of ferulic acid amplifies antioxidant activity. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 74, 29–35.
- Aghapour, F., Moghadamnia, A.A., Nicolini, A., Kani, S.N.M., Barari, L., Morakabati, P., Rezazadeh, L., Kazemi, S., 2018. Quercetin conjugated with silica nanoparticles inhibits tumor growth in MCF-7 breast cancer cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 500, 860–865. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.174>
- Ahmad, R., Sardar, M., 2015a. Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. *Biochem. Anal. Biochem.* 04, 2–8. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000178>
- Ahmad, R., Sardar, M., 2015b. Enzyme Immobilization : An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. *Biochem. Anal. Biochem.* 4, 1–9. <https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000178>
- Ahmed, A., Nasim, F. ul-H., Batool, K., Bibi, A., 2017. Microbial  $\beta$ -Glucosidase: Sources, Production and Applications. *J Appl Env. Microbiol* 5, 31–46. <https://doi.org/10.12691/JAEM-5-1-4>
- Aissa, I., Bouaziz, M., Ghamgui, H., Kamoun, A., Miled, N., Sayadi, S., Gargouri, Y., 2007. Optimization of Lipase-Catalyzed Synthesis of Acetylated Tyrosol by Response Surface Methodology. *Agric. Food Chem.* 55, 10298–10305. <https://doi.org/10.1021/jf071685q>
- Amagata, T., Whitman, S., Johnson, T.A., Stessman, C.C., Loo, C.P., Lobkovsky, E., Clardy, J., Crews, P., Holman, T.R., 2003. Exploring sponge-derived terpenoids for their potency and selectivity against 12-human, 15-human, and 15-soybean lipooxygenases. *J. Nat. Prod.* 66, 230–235. <https://doi.org/10.1021/np020462l>
- Anand David, A., Arulmoli, R., Parasuraman, S., 2016. Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacogn. Rev.* 10, 84–89. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.194044>
- Anobom et al., C., 2014. From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases. *Biomed Res. Int.* 2014, 684506.
- Arias, L.S., Delbem, A.C.B., Fernandes, R.A., Barbosa, D.B., Monteiro, D.R., 2016. Activity of tyrosol against single and mixed-species oral biofilms. *J. Appl. Microbiol.* 120, 1240–1249. <https://doi.org/10.1111/jam.13070>
- Arica, M.Y., Altintas, B., Bayramođlu, G., 2009. Immobilization of laccase onto spacer-arm attached non-porous poly(GMA/EGDMA) beads: Application for textile dye degradation. *Bioresour. Technol.* 100, 665–669. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.07.038>
- Athanasiadis, V., Grigorakis, S., Lalas, S., Makris, D.P., 2018. Highly Efficient Extraction of Antioxidant Polyphenols from *Olea europaea* Leaves Using an Eco-friendly Glycerol/Glycine Deep Eutectic Solvent. *Waste and Biomass Valorization* 9, 1985–1992.

<https://doi.org/10.1007/s12649-017-9997-7>

- Avdikos, A., Karkabounas, S., Metsios, A., Kostoula, O., Havelas, K., Binolis, J., Verginadis, I., Hatziavazis, G., Simos, I., Evangelou, A., 2007. Anticancer effects on leiomyosarcoma-bearing Wistar rats after electromagnetic radiation of resonant radiofrequencies. *Hell J Nucl Med* 10, 95–101.
- Awada, H., Monplaisir, D., Daneault, C., 2012. Growth of polyelectrolyte on lignocellulosic fibres: Study by  $\zeta$ -potential, FTIR, and XPS. *BioResources* 7, 2090–2104. <https://doi.org/10.15376/biores.7.2.2090-2104>
- Ayoub, F.D.P., Caseli, L., 2017. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Controlling the molecular architecture of lactase immobilized in Langmuir-Blodgett films of phospholipids to modulate the enzyme activity. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 150, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.015>
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99, 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>
- Bali, E.B., Ergin, V., Rackova, L., Bayraktar, O., Küçükboyacı, N., Karasu, Ç., 2014. Olive leaf extracts protect cardiomyocytes against 4-hydroxynonenal-induced toxicity in vitro: Comparison with oleuropein, hydroxytyrosol, and quercetin. *Planta Med.* 80, 984–992. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1382881>
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S.K., 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.* 6, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bankova, E., Bakalova, N., Petrova, S., Kolev, D., 2006. Enzymatic synthesis of oligosaccharides and alkylglycosides in water-organic media via transglycosylation of lactose. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 20, 114–119. <https://doi.org/10.1080/13102818.2006.10817387>
- Barker, P.D., Bertini, I., Del Conte, R., Ferguson, S.J., Hajieva, P., Tomlinson, E., Turano, P., Viezzoli, M.S., 2001. A further clue to understanding the mobility of mitochondrial yeast cytochrome c. *Eur. J. Biochem.* 268, 4468–4476. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02369.x>
- Barth, A., 2007. Infrared spectroscopy of proteins. *Acta Biochim. Biophys.* 1767, 1073–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>
- Bayne, L., Ulijn, R. V., Halling, P.J., 2013. Effect of pore size on the performance of immobilised enzymes. *Chem. Soc. Rev.* 42, 9000–9010. <https://doi.org/10.1039/c3cs60270b>
- Bellamy, L.J., 1980. *The Infrared Spectra of Complex Molecules : Volume Two Advances in Infrared Group Frequencies.* Springer Netherlands.
- Berdy, J., 2005. Bioactive Microbial Metabolites. *J. Antibiot. (Tokyo).* 58, 1–26.
- Bernard, K., 2012. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 50, 3152–3158. <https://doi.org/10.1128/JCM.00796-12>
- Bernini, R., Crisante, F., Ginnasi, M.C., 2011. A convenient and safe O-methylation of flavonoids with dimethyl carbonate (DMC). *Molecules* 16, 1418–1425. <https://doi.org/10.3390/molecules16021418>
- Bertini, I., Gupta, Y.K., Luchinat, C., Parigi, G., Peana, M., Sgheri, L., Yuan, J., 2007. Paramagnetism-based NMR restraints provide maximum allowed probabilities for the different conformations of partially independent protein domains. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 12786–12794. <https://doi.org/10.1021/ja0726613>



- Betancor, L., Johnson, G.R., Luckarift, H.R., 2013. Stabilized Laccases as Heterogeneous Bioelectrocatalysts. *ChemCatChem* 5, 46–60. <https://doi.org/10.1002/cctc.201200611>
- Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N., Saija, A., 1999a. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J. Pharm. Pharmacol.* 51, 971–974. <https://doi.org/10.1211/0022357991773258>
- Bisignano, G., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Crisafi, G., Uccella, N., Saija, A., 1999b. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J. Pharm. Pharmacol.* 51, 971–974. <https://doi.org/10.1211/0022357991773258>
- Bommarius, A.S., Riebel-Bommarius, B.R., 2004. *Biocatalysis: Fundamentals and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., Berset, C., 1997. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH• free radical method. *LWT - Food Sci. Technol.* 30, 609–615. <https://doi.org/10.1006/food.1997.0240>
- Bornscheuer, U. T., Huisman, G.W., Kazlauskas, R.J., Lutz, S., Moore, J.C., Robins, K., 2012. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* 485, 185–194. <https://doi.org/10.1038/nature11117>
- Bornscheuer, U T, Huisman, G.W., Kazlauskas, R.J., Lutz, S., Moore, J.C., Robins, K., 2012. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* 485, 185–94.
- Bouallagui, Z., Han, J., Isoda, H., Sayadi, S., 2011. Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food Chem. Toxicol.* 49, 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.10.014>
- Bourlinos, A.B., Gournis, D., Petridis, D., Szabo, T., Szeri, A., Dekany, I., 2003. Graphite Oxide: Chemical Reduction to Graphite and Surface Modification with Primary Aliphatic Amines and Amino Acids. *Langmuir* 19, 6050–6055. <https://doi.org/10.1021/la026525h>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT , Food Sci. Technol.* 28, 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Briante, R., Cara, F. La, Tonziello, M.P., Febbraio, F., Nucci, R., 2001. Antioxidant Activity of the Main Bioactive Derivatives from Oleuropein Hydrolysis by Hyperthermophilic -Glycosidase  
Keywords : *J. Agric. Food Chem.* 3198–3203.
- Brockman et al., H.L., 1973. Catalysis by Adsorbed Enzymes : THE HYDROLYSIS OF TRIPROPIONIN BY PANCREATIC LIPASE ADSORBED TO by Adsorbed.
- Burton, S., Davids, L., 2012. Hydroxytyrosol compounds.
- Cai, X., Fang, Z., Dou, J., Yu, A., Zhai, G., 2013. Bioavailability of Quercetin: Problems and Promises. *Curr. Med. Chem.* 20, 2572–2582. <https://doi.org/10.2174/09298673113209990120>
- Cairns, J.R.K., Esen, A., 2010.  $\beta$ -Glucosidases. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 3389–3405. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0399-2>
- Calle, L.P., Cañada, F.J., Jiménez-Barbero, J., 2011. Application of NMR methods to the study of the interaction of natural products with biomolecular receptors. *Nat. Prod. Rep.* 28, 1118–1125. <https://doi.org/10.1039/c0np00071j>
- Capasso, R., Evidente, A., Schivol, L., Orru, G., Marcialis, M.A., CrIstinzlo, G., 1995. Antibacterial

- polyphenols from olive oil mill waste waters. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 393–398. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1995.tb03153.x>
- Caruana, M., Högen, T., Levin, J., Hillmer, A., Giese, A., Vassallo, N., 2011. Inhibition and disaggregation of  $\alpha$ -synuclein oligomers by natural polyphenolic compounds. *FEBS Lett.* 585, 1113–1120. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.03.046>
- Çelik, A., Dinçer, A., Aydemir, T., 2016. Characterization of  $\beta$ -glucosidase immobilized on chitosan-multiwalled carbon nanotubes (MWCNTS) and their application on tea extracts for aroma enhancement. *Int. J. Biol. Macromol.* 89, 406–414. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.008>
- Chakroun, H., Bouaziz, M., Yangui, T., Blibech, I., Dhouib, A., Sayadi, S., 2013. Enzymatic transformation of tyrosol by *Trametes trogii* laccases: Identification of the product and study of its biological activities. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 87, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.10.006>
- Chang, J., Lee, Y., Fang, S., Park, D., Choi, Y., 2013. Hydrolysis of isoflavone glycoside by immobilization of  $\beta$ -glucosidase on a chitosan-carbon in two-phase system. *Int. J. Biol. Macromol.* 61, 465–470.
- Chapman, J., Ismail, A.E., Dinu, C.Z., 2018. Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts* 8, 20–29. <https://doi.org/10.3390/catal8060238>
- Chatzikonstantinou, A. V., Chatziathanasiadou, M. V., Ravera, E., Fragai, M., Parigi, G., Gerothanassis, I.P., Luchinat, C., Stamatis, H., Tzakos, A.G., 2018a. Enriching the biological space of natural products and charting drug metabolites, through real time biotransformation monitoring: The NMR tube bioreactor. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1868, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.09.021>
- Chatzikonstantinou, A. V., Gkantzou, E., Gournis, D., Patila, M., Stamatis, H., 2018b. Stabilization of Laccase Through Immobilization on Functionalized GO-Derivatives, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc., pp. 47–81. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.05.014>
- Chatzikonstantinou, A. V., Gkantzou, E., Thomou, E., Chalmpes, N., Lyra, K.M., Kontogianni, V.G., Spyrou, K., Patila, M., Gournis, D., Stamatis, H., 2019. Enzymatic conversion of oleuropein to hydroxytyrosol using immobilized  $\beta$ -glucosidase on porous carbon cuboids. *Nanomaterials* 9, 1–19. <https://doi.org/10.3390/nano9081166>
- Chebil, L., Antoni, J., Humeau, C., Gerardin, C., Engasser, J.-M., Ghoul, M., 2007. Enzymatic Acylation of Flavonoids : Effect of the Nature of the Substrate , Origin of Lipase , and Regioselectivity. *Agric. Food Chem.* 55, 9496–9502. <https://doi.org/10.1021/jf071943j>
- Chebil, L., Humeau, C., Falcimaigne, A., Engasser, J.-M., Ghoul, M., 2006. Enzymatic acylation of flavonoids. *Process Biochem.* 41, 2237–2251. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.027>
- Chen, T., Yang, W., Guo, Y., Yuan, R., Xu, L., Yan, Y., 2014. Enhancing catalytic performance of  $\beta$ -glucosidase via immobilization on metal ions chelated magnetic nanoparticles. *Enzyme Microb. Technol.* 63, 50–57.
- Chiaradia, V., Soares, N.S., Valério, A., de Oliveira, D., Araújo, P.H.H., Sayer, C., 2016. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B on Magnetic Poly(Urea-Urethane) Nanoparticles. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 180, 558–575. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2116-6>
- Chiti, F., Dobson, C.M., 2006. Protein Misfolding, Functional Amyloid, and Human Disease. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 333–366. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.101304.123901>

- Choi, J.M., Han, S.S., Kim, H.S., 2015. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnol. Adv.* 33, 1443–1454. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.02.014>
- Chowdhury, A.H., Salam, N., Debnath, R., 2019. Design and Fabrication of Porous Nanostructures and Their Applications, *Nanomaterials Synthesis*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815751-0.00008-0>
- Claus, H., 2004. Laccases: Structure, reactions, distribution. *Micron* 35, 93–96. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2003.10.029>
- Claus, H., Faber, G., König, H., 2002. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 672–678. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1047-z>
- Cordeiro, R. de A., Teixeira, C.E.C., Brilhante, R.S.N., Castelo-Branco, D.S.C.M., Alencar, L.P., de Oliveira, J.S., Monteiro, A.J., Bandeira, T.J.P.G., Sidrim, J.J.C., Moreira, J.L.B., Rocha, M.F.G., 2015. Exogenous tyrosol inhibits planktonic cells and biofilms of *Candida* species and enhances their susceptibility to antifungals. *FEMS Yeast Res.* 15, 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov012>
- Cragg, G.M., Grothaus, P.G., Newman, D.J., 2009. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem. Rev.* 109, 3012–43. <https://doi.org/10.1021/cr900019j>
- D. Newman, Cragg, G., 2013. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Nat. Prod.* 75, 311–335. <https://doi.org/10.1021/np200906s.Natural>
- De La Puerta, R., Gutierrez, V.R., Hoult, J.R.S., 1999. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem. Pharmacol.* 57, 445–449. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(98\)00320-7](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00320-7)
- De Leonardis, A., Aretini, A., Alfano, G., MacCiola, V., Ranalli, G., 2008. Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea Europaea* L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *Eur. Food Res. Technol.* 226, 653–659. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0574-3>
- De Oliveira, E.B., Humeau, C., Maia, E.R., Chebil, L., Ronat, E., Monard, G., Ruiz-Lopez, M.F., Ghoul, M., Engasser, J.-M., 2010. An approach based on Density Functional Theory (DFT) calculations to assess the *Candida antarctica* lipase B selectivity in rutin, isoquercitrin and quercetin acetylation. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 66, 325–331. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.06.009>
- De Toma, A., Krishnamoorthy, J., Nam, Y., Jin Lee, H., Brender, J., Kochi, A., Lee, D., Onnis, V., Congiu, C., Manfredini, S., Vertuani, S., Balboni, G., Ramamoorthy, A., Lim, M.H., 2014. Synthetic Flavonoids, Aminoisoflavones: Interaction and Reactivity with Metal-Free and Metal-Associated Amyloid- $\beta$  Species. *Chem Sci.* 5, 4851–4862. <https://doi.org/10.1039/b000000x/>
- De Toma, A., Salamekh, S., Ramamoorthy, A., Lim, M.H., 2012. Misfolded Proteins in Alzheimer's Disease and Type II Diabetes. *Chem Soc Rev.* 41, 608–621. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2012.01428.x.Identification>
- del Campo et al., G., 2006. Quantitative analysis of malic and citric acids in fruit juices using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* 556, 462–468. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.09.039>
- Detsi, A., Bouloubasi, D., Prousis, K.C., Koufaki, M., Athanasellis, G., Melagraki, G., Afantitis, A.,

- Igglessi-markopoulou, O., Kontogiorgis, C., Hadjipavlou-litina, D.J., 2007. Design and Synthesis of Novel Quinolinone-3-aminoamides and Their  $\alpha$ -Lipoic Acid Adducts as Antioxidant and Anti-inflammatory Agents. *J. Med. Chem.* 50, 2450–2458. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jm061173n>
- Dhima, I.T., Peschos, D., Simos, Y. V., Gkiouli, M.I., Palatianou, M.E., Ragos, V.N., Kalfakakou, V., Evangelou, A.M., Karkabounas, S.C., 2018. Modulation of cisplatin cytotoxic activity against leiomyosarcoma cells by epigallocatechin-3-gallate. *Nat. Prod. Res.* 32, 1337–1342. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1343318>
- DiCosimo, R., McAuliffe, J., Poulouse, A.J., Bohlmann, G., 2013. Industrial use of immobilized enzymes. *Chem Soc Rev.* 42, 6437–6474. <https://doi.org/10.1039/c3cs35506c>
- Ding, S., Cargill, A.A., Medintz, I.L., Claussen, J.C., 2015. Increasing the activity of immobilized enzymes with nanoparticle conjugation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 34, 242–250. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.04.005>
- Dunker, A.K., Uversky, V.N., 2010. Drugs for ‘protein clouds’: targeting intrinsically disordered transcription factors. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10, 782–788. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2010.09.005>
- Durán, N., Esposito, E., 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment : a review. *Appl. Catal. B Environ.* 28, 83–99. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0926-3373\(00\)00168-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0926-3373(00)00168-5)
- Dwevedi, A., 2016. Basics of Enzyme Immobilization, in: *Enzyme Immobilization*. pp. 1–116. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41418-8>
- El, S.N., Karakaya, S., 2009. Olive tree (*Olea europaea*) leaves: Potential beneficial effects on human health. *Nutr. Rev.* 67, 632–638. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00248.x>
- Enguita, F.J., Martins, L.O., Henriques, A.O., Carrondo, M.A., 2003. Crystal structure of a bacterial endospore coat component: A laccase with enhanced thermostability properties. *J. Biol. Chem.* 278, 19416–19425. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301251200>
- Enotiadis, A., Angjeli, K., Baldino, N., Nicotera, I., Gournis, D., 2012. Graphene-based nafion nanocomposite membranes: Enhanced proton transport and water retention by novel organo-functionalized graphene oxide nanosheets. *Small* 8, 3338–3349. <https://doi.org/10.1002/sml.201200609>
- Estevez, L., Barpaga, D., Zheng, J., Sabale, S., Patel, R.L., Zhang, J.G., McGrail, B.P., Motkuri, R.K., 2018. Hierarchically Porous Carbon Materials for CO<sub>2</sub> Capture: The Role of Pore Structure. *Ind. Eng. Chem. Res.* 57, 1262–1268. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b03879>
- Estevez, L., Dua, R., Bhandari, N., Ramanujapuram, A., Wang, P., Giannelis, E.P., 2013. A facile approach for the synthesis of monolithic hierarchical porous carbons – high performance materials for amine based CO<sub>2</sub> capture and supercapacitor electrode. *Energy Environ. Sci.* 6, 1785–1790. <https://doi.org/10.1039/c3ee40549d>
- Estevez, L., Prabhakaran, V., Garcia, A.L., Shin, Y., Tao, J., Schwarz, A.M., Darsell, J., Bhattacharya, P., Shutthanandan, V., Zhang, J.G., 2017. Hierarchically Porous Graphitic Carbon with Simultaneously High Surface Area and Colossal Pore Volume Engineered via Ice Templating. *ACS Nano* 11, 11047–11055. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b05085>
- Figuerueroa-Espinoza, M.-C., Villeneuve, P., 2005. Phenolic Acids Enzymatic Lipophilization. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2779–2787. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf0484273>
- Filice, M., Guisan, J.M., Terreni, M., Palomo, J.M., 2012. Regioselective monodeprotection of

- peracetylated carbohydrates. *Nat. Protoc.* 7, 1783–96.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2012.098>
- Fortes, C.C.S., Daniel-da-Silva, A.L., Xavier, A.M.R.B., Tavares, A.P.M., 2017. Optimization of enzyme immobilization on functionalized magnetic nanoparticles for laccase biocatalytic reactions. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 117, 1–8.  
<https://doi.org/10.1016/j.cep.2017.03.009>
- Friedman, M., Henika, P.R., Levin, C.E., 2013. Bactericidal Activities of Health-Promoting , Food-Derived Powders Against the Foodborne Pathogens *Escherichia coli* , *Listeria monocytogenes* , *Salmonella enterica* , and *Staphylococcus aureus*. *J. Food Sci.* 78, 270–275.  
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.12021>
- Gácsér, A., Stehr, F., Kröger, C., Kredics, L., Schäfer, W., Nosanchuk, J.D., 2007. Lipase 8 affects the pathogenesis of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 75, 4710–4718.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.00372-07>
- Gall, M., Thomsen, M., Peters, C., Pavlidis, I. V., Jonczyk, P., Grunert, P.P., Beutel, S., Scheper, T., Gross, E., Backes, M., Geißler, T., Ley, J.P., Hilmer, J.M., Krammer, G., Palm, G.J., Hinrichs, W., Bornscheuer, U.T., 2014. Enzymatic conversion of flavonoids using bacterial chalcone isomerase and enoate reductase. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 53, 1439–1442.  
<https://doi.org/10.1002/anie.201306952>
- Gao, Y., Kyratzis, I., 2008a. Covalent Immobilization of Proteins on Carbon Nanotubes Using the Cross-Linker 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide—a Critical Assessment. *Bioconjug. Chem.* 19, 1945–1950. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/bc800051c>
- Gao, Y., Kyratzis, I., 2008b. Covalent Immobilization of Proteins on Carbon Nanotubes Using the Cross-Linker 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide—a Critical Assessment. *Bioconjug. Chem.* 19, 1945–1950. <https://doi.org/10.1021/bc800051c>
- Gengler, R.Y.N., Veligura, A., Enotiadis, A., Diamanti, E.K., Gournis, D., Józsa, C., Van Wees, B.J., Rudolf, P., 2010. Large-yield preparation of high-electronic-quality graphene by a langmuir-schaefer approach. *Small* 6, 35–39. <https://doi.org/10.1002/smll.200901120>
- Georgieva, S., Godjevargova, T., Portaccio, M., Lepore, M., Mita, D.G., 2008. Advantages in using non-isothermal bioreactors in bioremediation of water polluted by phenol by means of immobilized laccase from *Rhus vernicifera*. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 55, 177–184.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.03.011>
- Geromichalou, E., Sayyad, N., Kyriakou, E., Chatzikonstantinou, A. V., Giannopoulou, E., Vrbjar, N., Kalofonos, H.P., Stamatis, H., Tzakos, A.G., 2015. Regioselective chemical and rapid enzymatic synthesis of a novel redox-Antiproliferative molecular hybrid. *Eur. J. Med. Chem.* 96, 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.03.064>
- Gibellini, L., Pinti, M., Nasi, M., Montagna, J.P., De Biasi, S., Roat, E., Bertoncelli, L., Cooper, E.L., Cossarizza, A., 2011. Quercetin and cancer chemoprevention. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2011, 1–15. <https://doi.org/10.1093/ecam/neaq053>
- Gómez, J.M., Romero, M.D., Fernández, T.M., 2005. Immobilization of  $\beta$ -Glucosidase on carbon nanotubes. *Catal. Letters* 101, 275–278. <https://doi.org/10.1007/s10562-005-4904-4>
- Gong, Y., Wei, Z., Wang, J., Zhang, P., Li, H., Wang, Y., 2014. Design and Fabrication of Hierarchically Porous carbon with a Template-free Method. *Sci. Rep.* 4, 1–6.  
<https://doi.org/10.1038/srep06349>
- Goodman, D., 1958. The Interaction of Human Serum Albumin with Long-chain Fatty Acid Anions.

- J. Am. Chem. Soc. 80, 3892–3898.
- Gotor-Fernández et al., V., 2006a. *Candida antarctica* Lipase B: An Ideal Biocatalyst for the Preparation of Nitrogenated Organic Compounds. *Adv. Synth. Catal.* 348, 797–812. <https://doi.org/10.1002/adsc.200606057>
- Gotor-Fernández, V., Brieva, R., Gotor, V., 2006b. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 40, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.02.010>
- Goulas, V., Exarchou, V., Troganis, A.N., Psomiadou, E., Fotsis, T., Briasoulis, E., Gerothanassis, I.P., 2009. Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 600–608. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800204>
- Gourama, H., Letutour, B., Tantaoui-Elaraki, A., Benbya, M., Bullerman, L.B., 1989. Effects of Oleuropein, Tyrosol, and Caffeic Acid on the Growth of Mold Isolated from Olives. *J. Food Prot.* 52, 264–266. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-52.4.264>
- Granados-Principal, S., Quiles, J.L., Ramirez-Tortosa, C.L., Sanchez-Rovira, P., Ramirez-Tortosa, M.C., 2010. Hydroxytyrosol: From laboratory investigations to future clinical trials. *Nutr. Rev.* 68, 191–206. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2010.00278.x>
- Gratton, E., Jameson, D.M., Hall, R.D., 1984. Multifrequency Phase and Modulation. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 13, 105–124. <https://doi.org/10.1146/annurev.bb.13.060184.000541>
- Greenfield, N.J., 2009. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat. Protoc.* 1, 2876–2890. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.202>
- Grippa, E., Valla, R., Battinelli, L., Mazzanti, G., Saso, L., Silvestrini, B., 1999. Inhibition of *Candida rugosa* Lipase by Berberine and Structurally Related Alkaloids, Evaluated by High-Performance Liquid Chromatography. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* <https://doi.org/10.1271/bbb.63.1557>
- Grzesiek, S., Bax, A., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Hu, J.S., Kaufman, J., Palmer, I., Stahl, S.J., Wingfield, P.T., 1996. The solution structure of HIV-1 Nef reveals an unexpected fold and permits delineation of the binding surface for the SH3 domain of Hck tyrosine protein kinase. *Nat. Struct. Biol.* 3, 340–5.
- Gupta, M.N., Kaloti, M., Kapoor, M., Solanki, K., 2011. Nanomaterials as matrices for enzyme immobilization. *Artif. Cells, Blood Substitutes, Biotechnol.* 39, 98–109. <https://doi.org/10.3109/10731199.2010.516259>
- Gutierrez-Lugo, M.T., Deschamps, J.D., Holman, T.R., Suarez, E., Timmermann, B.N., 2004. Lipoyxygenase inhibition by anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerial parts of *Anadenanthera colubrina*. *Planta Med.* 70, 263–265. <https://doi.org/10.1055/s-2004-818920>
- Hamza, M., Khoufi, S., Sayadi, S., 2012. Fungal enzymes as a powerful tool to release antioxidants from olive mill wastewater. *Food Chem.* 131, 1430–1436. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.019>
- Hamza, M., Sayadi, S., 2015. Original article High production of *Aspergillus niger*  $\beta$ -glucosidase at pilot-scale and application for hydroxytyrosol release from olive by-product. *Food Sci. Technol.* 50, 1882–1890. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12839>
- Han, J., Talorete, T.P.N., Yamada, P., Isoda, H., 2009. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology* 59, 45–53. <https://doi.org/10.1007/s10616-009-9191-2>

- Hao, G.P., Mondin, G., Zheng, Z., Biemelt, T., Klosz, S., Schubel, R., Eychmüller, A., Kaskel, S., 2015. Unusual ultra-hydrophilic, porous carbon cuboids for atmospheric-water capture. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 54, 1941–1945. <https://doi.org/10.1002/anie.201409439>
- He, H., Hu, Y., Chen, S., Zhuang, L., Ma, B., Wu, Q., 2017. Preparation and Properties of A Hyperbranch-Structured Polyamine adsorbent for Carbon Dioxide Capture. *Sci. Rep.* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04329-w>
- He, S., Withers, S.G., 1997. Assignment of sweet almond b-glucosidase as a family 1 glycosidase and identification of its active site nucleophile. *J. Biol. Chem.* 272, 24864–24867. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.40.24864>
- Heijnen, C.G.M., Haenen, G.R.M.M., Acker, F.A.A. Van, Vijgh, W.J.F. Van Der, Bast, A., 2001. Flavonoids as peroxyxynitrite scavengers : the role of the hydroxyl groups. *Toxicol. Vitro.* 15, 3–6. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(00\)00053-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0887-2333(00)00053-9)
- Henrissat, B., Davies, G., 2016. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 637–644. <https://doi.org/10.1109/MCSoc.2016.13>
- Herrera, F.E., Chesi, A., Paleologou, K.E., Schmid, A., Munoz, A., Vendruscolo, M., Gustincich, S., Lashuel, H.A., Carloni, P., 2008. Inhibition of alpha-synuclein fibrillization by dopamine is mediated by interactions with five C-terminal residues and with E83 in the NAC region. *PLoS One* 3, e3394. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003394>
- Hong, T., Liu, W., Li, M., Chen, C., 2019. Recent advances in the fabrication and application of nanomaterial-based enzymatic microsystems in chemical and biological sciences. *Anal. Chim. Acta* 1067, 31–47. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.02.031>
- Horn, D.W., Tracy, K., Easley, C.J., Davis, V.A., 2012. Lysozyme dispersed single-walled carbon nanotubes: Interaction and activity. *J. Phys. Chem. C* 116, 10341–10348. <https://doi.org/10.1021/jp300242a>
- Houde, A., Kademi, A., Leblanc, D., 2004. Lipases and their industrial applications: An overview. *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part A Enzym. Eng. Biotechnol.* 118, 155–170. <https://doi.org/10.1385/ABAB:118:1-3:155>
- Hu, B., Pan, J., Yu, H.L., Liu, J.W., Xu, J.H., 2009. Immobilization of *Serratia marcescens* lipase onto amino-functionalized magnetic nanoparticles for repeated use in enzymatic synthesis of Diltiazem intermediate. *Process Biochem.* 44, 1019–1024. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.05.001>
- Hu, X., Zhao, X., Hwang, H. min, 2007. Comparative study of immobilized *Trametes versicolor* laccase on nanoparticles and kaolinite. *Chemosphere* 66, 1618–1626. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.004>
- Hyeon, J.E., Shin, S.K., Han, S.O., 2016. Design of nanoscale enzyme complexes based on various scaffolding materials for biomass conversion and immobilization. *Biotechnol. J.* 11, 1386–1396. <https://doi.org/10.1002/biot.201600039>
- Idris, A., Bukhari, A., 2012. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. *Biotechnol. Adv.* 30, 550–63. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.10.002>
- Illanes, A., 2008. Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications, *Comprehensive Biotechnology*, Second Edition. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00111-2>
- Imran, M., Asad, M.J., Hadri, S.H., 2012. Production and industrial applications of laccase enzyme. *J. Cell Mol. Biol.* 10, 1–11.

- Inamori, Y., Muro, C., Sajima, E., Katagiri, M., Okamoto, Y., Tanaka, H., Sakagami, Y., Tsujibo, H., 1997. Biological activity of purpurogallin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 890–892. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.890>
- Jaeger et al., K.E., 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 315–51. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.315>
- Jaeger, K.E., Reetz, M.T., 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 16, 396–403.
- Jandera, P., 2008. Methods for the HPLC analysis of phenolic compounds and flavonoids in beer, in: *Beer in Health and Disease Prevention*. pp. 1003–1014. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-373891-2.00098-5>
- Janga, S.C., Tzakos, A., 2009. Structure and organization of drug-target networks: insights from genomic approaches for drug discovery. *Mol. Biosyst.* 5, 1536–48. <https://doi.org/10.1039/B908147j>
- Jesionowski, T., Zdarta, J., Krajewska, B., 2014. Enzyme immobilization by adsorption : a review. *Adsorption* 20, 801–821. <https://doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y>
- Jin, L., Yang, K., Yao, K., Zhang, S., Tao, H., Lee, S., Liu, Z., Peng, R., 2012. Functionalized Graphene Oxide in Enzyme Engineering : A Selective Modulator for Enzyme Activity and Thermostability Functionalized Graphene Oxide in Enzyme Engineering : A Selective Modulator for Enzyme Activity and Thermostability. *ACS Nano* 6, 4864–4875. <https://doi.org/10.1021/nn300217z>
- Johannes et al., T., 2006. Biocatalysis 101–110. <https://doi.org/10.1081/E-ECHP-120017565>
- Junior, R., Caseli, L., 2017. Adsorption and enzyme activity of asparaginase at lipid Langmuir and Langmuir-Blodgett films. *Mater. Sci. Eng. C* 73, 579–584. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.041>
- Kalili, K.M., De Villiers, A., 2011. Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. *J. Sep. Sci.* 34, 854–876. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000811>
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T., 2012. PATHOGENIC ESCHERICHIA COLI. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 1–2. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Karageorgou, D., Thomou, E., Vourvou, N.T., Lyra, K.M., Chalmpes, N., Enotiadis, A., Spyrou, K., Katapodis, P., Gournis, D., Stamatis, H., 2019. Antibacterial and Algicidal Effects of Porous Carbon Cuboid Nanoparticles. *ACS Omega* 4, 4991–5001. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02018>
- Katsoura, M.H., Polydera, A.C., Katapodis, P., Kolisis, F.N., Stamatis, H., 2007. Effect of different reaction parameters on the lipase-catalyzed selective acylation of polyhydroxylated natural compounds in ionic liquids. *Process Biochem.* 42, 1326–1334. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.07.004>
- Kazlauskas, R.J., Bornscheuer, U.T., 1998. Biotransformations with Lipases, in: Rehm, H.J., Reed, G. (Eds.), *Biotechnology Set*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, pp. 37–191. <https://doi.org/10.1002/9783527620999.ch3h>
- Kellici, T.F., Chatziathanasiadou, M. V., Diamantis, D., Chatzikonstantinou, A. V., Andreadelis, I., Christodoulou, E., Valsami, G., Mavromoustakos, T., Tzakos, A.G., 2016. Mapping the interactions and bioactivity of quercetin—(2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin complex. *Int. J. Pharm.* 511, 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.07.008>



- Khan, I., Akhtar, M.W., 2010. The biotechnological perspective of Beta-Glucosidases. *Nat. Precedings* 1–8. <https://doi.org/10.1038/npre.2010.4945.1>
- Khedidja, B., Abderrahman, L., 2011. Selection of orlistat as a potential inhibitor for lipase from *Candida* species. *Bioinformation* 7, 125–129. <https://doi.org/10.6026/97320630007125>
- Khoufi, S., Hamza, M., Sayadi, S., 2011. Enzymatic hydrolysis of olive wastewater for hydroxytyrosol enrichment. *Bioresour. Technol.* 102, 9050–9058. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.048>
- Koehn, F.E., Carter, G.T., 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 206–20. <https://doi.org/10.1038/nrd1657>
- Kong, J., Yu, S., 2007. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures Protein FTIR Data Analysis and Band Assign-. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 39, 549–559. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00320.x>
- Kongpichitchoke, T., Hsu, J., Huang, T., 2015. Number of Hydroxyl Group on the B-ring of Flavonoids Affects Their Antioxidant Activity and Interaction with Phorbol Ester Binding Site of PKC  $\delta$  C1B Domain : In-vitro and In-silico Study Hydroxyl B- ring Flavonoids Antioxidant PKC $\delta$  C1B Domain. *Agric. Food Chem.* 63, 4580–4586. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00312>
- Konijnenberg, A., Ranica, S., Narkiewicz, J., Legname, G., Grandori, R., Sobott, F., Natalello, A., 2016. Opposite Structural Effects of Epigallocatechin-3-gallate and Dopamine Binding to  $\alpha$ -Synuclein. *Anal. Chem.* 88, 8468–8475. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00731>
- Kontogianni, Vassiliki G, Charisiadis, P., Margianni, E., Lamari, F.N., Gerothanassis, I.P., Tzakos, A.G., 2013. Olive leaf extracts are a natural source of advanced glycation end product inhibitors. *J. Med. Food* 16, 817–22. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0016>
- Kontogianni, V.G., Gerothanassis, I.P., 2012. Phenolic compounds and antioxidant activity of olive leaf extracts. *Nat. Prod. Res.* 26, 186–189. <https://doi.org/10.1080/14786419.2011.582842>
- Kontogianni, Vassiliki G., Tomic, G., Nikolic, I., Nerantzaki, A.A., Sayyad, N., Stosic-Grujicic, S., Stojanovic, I., Gerothanassis, I.P., Tzakos, A.G., 2013. Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chem.* 136, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.091>
- Kontogianni, V.G., Tsoumani, M.E., Kellici, T.F., Mavromoustakos, T., Gerothanassis, I.P., Tselepis, A.D., Tzakos, A.G., 2016. Deconvoluting the dual antiplatelet activity of a plant extract. *J. Agric. Food Chem.* 64, 4511–4521. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b00544>
- Korukluoglu, M., Sahan, Y., Yigit, A., Ozer, E.T., GÜCer, S., 2010. Antibacterial activity and chemical constitutions of *olea europaea* l. leaf extracts. *J. Food Process. Preserv.* 34, 383–396. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4549.2008.00318.x>
- Kouloumpis, A., Thomou, E., Chalmpes, N., Dimos, K., Spyrou, K., Bourlinos, A.B., Koutselas, I., Gournis, D., Rudolf, P., 2017. Graphene/Carbon Dot Hybrid Thin Films Prepared by a Modified Langmuir-Schaefer Method. *ACS Omega* 2, 2090–2099. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b00107>
- Krisch, J., Takó, M., Papp, T., Vágvölgyi, C., 2010. Characteristics and potential use of  $\beta$  - glucosidases from Zygomycetes, in: *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. pp. 891–896.
- Kudanga, T., Nemadziva, B., Le Roes-Hill, M., 2017. Laccase catalysis for the synthesis of bioactive

- compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 13–33. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7987-5>
- Kumar, S.V.S., Phale, P.S., Durani, S., Wangikar, P.P., 2003. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. *Biotechnol. Bioeng.* 83, 386–394. <https://doi.org/10.1002/bit.10681>
- Kunamneni, A., Plou, F., Ballesteros, A., Alcalde, M., 2008. Laccases and Their Applications: A Patent Review. *Recent Pat. Biotechnol.* 2, 10–24. <https://doi.org/10.2174/187220808783330965>
- Kyriakou, E., Kostagianni, A.D., Kellici, T.F., Giannopoulou, E., Siatis, K.E., Sayyad, N., Kalofonos, H.P., Mavromoustakos, T., Stamatis, H., Tzakos, A.G., 2018. Three Regioselectively Acylated Flavonoid Aglycone Derivatives in Equimolar Yield at One Blow. *Chem. Sel. Commun.* 3, 5207–5211. <https://doi.org/10.1002/slct.201703002>
- Kyriakou, E., Primikyri, A., Charisiadis, P., Katsoura, M., Gerotheranassis, I.P., Stamatis, H., Tzakos, A.G., 2012. Unexpected enzyme-catalyzed regioselective acylation of flavonoid aglycones and rapid product screening. *Org. Biomol. Chem.* 10, 1739–42. <https://doi.org/10.1039/c2ob06784f>
- Lahlou, M., 2013. The Success of Natural Products in Drug Discovery 2013, 17–31.
- Lakowicz, J.R. (Ed.), 2006. Protein Fluorescence, in: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. pp. 529–575. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4\\_16](https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4_16)
- Lau, S.C., Lim, H.N., Basri, M., Reza, H., Masoumi, F., Ahmad, A., 2014. Enhanced Biocatalytic Esterification with Lipase-Immobilized Chitosan / Graphene Oxide Beads. *PLoS One* 9, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104695>
- Laughton, M.J., Evans, P.J., Moroney, M.A., Houl, J.R., Halliwell, B., 1991. INHIBITION OF MAMMALIAN 5-LIPOXYGENASE AND CYCLO-OXYGENASE BY FLAVONOIDS AND PHENOLIC DIETARY ADDITIVES. *Biochem. Pharmacol.* 42, 1673–1681.
- Le Tutour, B., Guedon, D., 1992. Antioxidative activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry* 31, 1173–1178. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80255-D](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80255-D)
- Lee, R. Van Der, Buljan, M., Lang, B., Weatheritt, R.J., Daughdrill, G.W., Dunker, A.K., Fuxreiter, M., Gough, J., Gsponer, J., Jones, D.T., Kim, P.M., Kriwacki, R.W., Old, C.J., Pappu, R. V, Tompa, P., Uversky, V.N., Wright, P.E., Babu, M.M., 2014. Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins. *Chem. Rev.* 114, 6589–6631.
- Lee, Y., Kwon, O., Yoon, Y., Ryu, K., 2006. Immobilization of horseradish peroxidase on multi-wall carbon nanotubes and its electrochemical properties. *Biotechnol. Lett.* 28, 39–43. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-9685-8>
- Li, D., Li, X., Dang, W., Tran, P.L., Park, S.H., Oh, B.C., Hong, W.S., Lee, J.S., Park, K.H., 2013. Characterization and application of an acidophilic and thermostable  $\beta$ -glucosidase from *Thermophilum pendens*. *J. Biosci. Bioeng.* 115, 490–496. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.11.009>
- Li, Q., Fan, F., Wang, Y., Feng, W., Ji, P., 2013. Enzyme immobilization on carboxyl-functionalized graphene oxide for catalysis in organic solvent. *Ind. Eng. Chem. Res.* 52, 6343–6348. <https://doi.org/10.1021/ie400558u>
- Li, S., Zhao, Q., Wang, B., Yuan, S., Wang, X., Li, K., 2018. Quercetin reversed MDR in breast cancer cells through down-regulating P-gp expression and eliminating cancer stem cells mediated

- by YB-1 nuclear translocation. *Phyther. Res.* 32, 1530–1536.  
<https://doi.org/10.1002/ptr.6081>
- Li, Y., Gao, F., Wei, W., Qu, J., Ma, G., Zhou, W., 2010. Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic Pore size of macroporous polystyrene microspheres affects lipase immobilization. "Journal Mol. Catal. B, Enzym. 66, 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.05.007>
- Liaros, N., Tucek, J., Dimos, K., Bakandritsos, A., Andrikopoulos, K.S., Gournis, D., Zboril, R., Couris, S., 2016. The effect of the degree of oxidation on broadband nonlinear absorption and ferromagnetic ordering in graphene oxide. *Nanoscale* 8, 2908–2917.  
<https://doi.org/10.1039/c5nr07832f>
- Liu, D.M., Chen, J., Shi, Y.P., 2018. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 102, 332–342.  
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.011>
- Liu, M., Yong, Q., 2018. Efficient bioconversion of oleuropein from olive leaf extract to antioxidant hydroxytyrosol by enzymatic hydrolysis and high-temperature degradation. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 5, 680–689. <https://doi.org/10.1002/bab.1651>
- Liu, M., Yong, Q., Yu, S., 2018. Efficient bioconversion of oleuropein from olive leaf extract to antioxidant hydroxytyrosol by enzymatic hydrolysis and high temperature degradation. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 65, 680–689. <https://doi.org/10.1002/bab.1651>
- Liu, Y., Zeng, Z., Zeng, G., Tang, L., Pang, Y., Li, Z., Liu, C., Lei, X., Wu, M., Ren, P., Liu, Z., Chen, M., Xie, G., 2012. Immobilization of laccase on magnetic bimodal mesoporous carbon and the application in the removal of phenolic compounds. *Bioresour. Technol.* 115, 21–26.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.015>
- Luangon, B., Siyasukh, A., Winayanuwattikun, P., Tanthapanichakoon, W., 2012. Journal of Molecular Catalysis B : Enzymatic Flow-through immobilization of *Candida rugosa* lipase on hierarchical micro- / macroporous carbon monolith. "Journal Mol. Catal. B, Enzym. 75, 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.11.017>
- Mabona, U., Viljoen, A., Shikanga, E., Marston, A., Van Vuuren, S., 2013. Antimicrobial activity of southern African medicinal plants with dermatological relevance: From an ethnopharmacological screening approach, to combination studies and the isolation of a bioactive compound. *J. Ethnopharmacol.* 148, 45–55.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.056>
- Maccarrone, M., Veldink, G.A., Vliegthart, J.F.G., Agrò, A.F., 1995. Inhibition of soybean lipooxygenase-1 by chain-breaking antioxidants. *Lipids* 30, 51–54.  
<https://doi.org/10.1007/BF02537041>
- Marchetti, C., Clericuzio, M., Borghesi, B., Cornara, L., Ribulla, S., Gosetti, F., Marengo, E., Burlando, B., 2015. Oleuropein-Enriched Olive Leaf Extract Affects Calcium Dynamics and Impairs Viability of Malignant Mesothelioma Cells. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/908493>
- Marković, A.K., Torić, J., Barbarić, M., Brala, C.J., 2019. Hydroxytyrosol, tyrosol and derivatives and their potential effects on human health. *Molecules* 24, 1–39.  
<https://doi.org/10.3390/molecules24102001>
- Martinez-Gonzalez, A.I., Alvarez-parrilla, E., Díaz-sánchez, Á.G., 2017. In vitro Inhibition of Pancreatic Lipase by Polyphenols : A Kinetic , Fluorescence Spectroscopy and Molecular Docking Study 55, 519–530. <https://doi.org/10.17113/ftb.55.04.17.5138>

- Mate, D.M., Alcalde, M., 2017. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microb. Biotechnol.* 10, 1457–1467. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12422>
- Mateo, C., Palomo, J.M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R., 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 1451–1463. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>
- Mateos, R., Espartero, J.L., Trujillo, M., Ríos, J.J., León-Camacho, M., Alcudia, F., Cert, A., 2001. Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2185–2192. <https://doi.org/10.1021/jf0013205>
- Mayer, M., Meyer, B., 2001a. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 6108–6117. <https://doi.org/10.1021/ja0100120>
- Mayer, M., Meyer, B., 2001b. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 6108–6117. <https://doi.org/10.1021/ja0100120>
- Mellou et al., F., 2005. Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *J. Biotechnol.* 116, 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.12.002>
- Menea, B., Herrero, M., Rives, V., Lavrenko, M., Eggers, D.K., 2008. Favourable influence of hydrophobic surfaces on protein structure in porous organically-modified silica glasses. *Biomaterials* 29, 2710–2718. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.02.026>
- Misson, M., Zhang, H., Jin, B., 2015. Nanobiocatalyst advancements and bioprocessing applications. *J R Soc Interface* 12, 1–20. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0891>
- Mohamad, N.R., Marzuki, N.H.C., Buang, N.A., Huyop, F., Wahab, R.A., 2015. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 29, 205–220. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>
- Monteiro, D.R., Feresin, L.P., Arias, L.S., Barão, V.A.R., Barbosa, D.B., Delbem, A.C.B., 2015. Effect of tyrosol on adhesion of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to acrylic surfaces. *Med. Mycol.* 53, 656–665. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv052>
- Mu, Q., Liu, W., Xing, Y., Zhou, H., Li, Z., Zhang, Y., Ji, L., Wang, F., Si, Z., Zhang, B., Yan, B., 2008. Protein binding by functionalized multiwalled carbon nanotubes is governed by the surface chemistry of both parties and the nanotube diameter. *J. Phys. Chem. C* 112, 3300–3307. <https://doi.org/10.1021/jp710541j>
- Murphy, J.R., 1996. *Medical Microbiology*, 4th edition. The University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V., 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals* 6, 1451–1474. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>
- Neil.E.Jacobsen, 2007. *Explained, N M R Spectroscopy*.
- Nenadis, N., Tsimidou, M., 2002. Observations on the estimation of scavenging activity of phenolic compounds using rapid 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH.) Tests. *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* 79, 1191–1195. <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0626-z>

- Neves Petersen et al., M.T., 2001. How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution., *Journal of biotechnology*.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., 2016. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 79, 629–661. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>
- Nicolás, P., Lassalle, V., Ferreira, M.L., 2018. Immobilization of CALB on lysine-modified magnetic nanoparticles: influence of the immobilization protocol. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 41, 171–184. <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1855-2>
- Nikolaivits, E., Termentzi, A., Skaltsounis, A., 2017. Enzymatic tailoring of oleuropein from *Olea europaea* leaves and product identification by HRMS / MS spectrometry. *J. Biotechnol.* 253, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.05.020>
- Notarianni, M., Liu, J., Vernon, K., Motta, N., 2016. Synthesis and applications of carbon nanomaterials for energy generation and storage. *Beilstein J. Nanotechnol.* 7, 149–196. <https://doi.org/10.3762/bjnano.7.17>
- Oh, M., Lee, J.H., Wang, W., Lee, H.S., Lee, W.S., Burlak, C., Im, W., Hoang, Q.Q., Lim, H.-S., 2014. Potential pharmacological chaperones targeting cancer-associated MCL-1 and Parkinson disease-associated  $\alpha$ -synuclein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 11007–11012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320556111>
- Oldfield, C.J., Dunker, A.K., 2014. Intrinsically Disordered Proteins and Intrinsically Disordered Protein Regions. *Annu. Rev. Biochem.* <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-072711-164947>
- Omar, S.H., 2010. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Sci. Pharm.* 78, 133–154. <https://doi.org/10.3797/scipharm.0912-18>
- Ono, T., Goto, M., 2006. Peroxidative catalytic behavior of cytochrome c solubilized in reverse micelles. *Biochem. Eng. J.* 28, 156–160. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.10.005>
- Orfanakis, G., Patila, M., Catzikonstantinou, A. V, Lyra, K., Kouloumpis, A., Spyrou, K., Katapodis, P., 2018a. Hybrid Nanomaterials of Magnetic Iron Nanoparticles and Graphene Oxide as Matrices for the Immobilization of  $\beta$ -Glucosidase : Synthesis , Characterization , and Biocatalytic Properties. *Front. Mater.* 5, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmats.2018.00025>
- Orfanakis, G., Patila, M., Catzikonstantinou, A. V, Lyra, K., Kouloumpis, A., Spyrou, K., Katapodis, P., 2018b. Hybrid Nanomaterials of Magnetic Iron Nanoparticles and Graphene Oxide as Matrices for the Immobilization of  $\beta$ -Glucosidase : Synthesis , Characterization , and Biocatalytic Properties. *Front. Mater.* 5, 11pages. <https://doi.org/10.3389/fmats.2018.00025>
- Otake, Y., Hsieh, F., Walle, T., 2002. GLUCURONIDATION VERSUS OXIDATION OF THE FLAVONOID GALANGIN BY HUMAN LIVER MICROSOMES AND HEPATOCYTES. *DRUG Metab. Dispos.* 30, 576–581. <https://doi.org/https://doi.org/10.1124/dmd.30.5.576>
- Otto et al., R.T., 2000. Substrate specificity of lipase B from *Candida antarctica* in the synthesis of arylaliphatic glycolipids 201–211.
- Ozcan, T., Delikanli, B., 2014. Phenolics in Human Health. *Int. J. Chem. Eng. Appl.* 5, 393–396. <https://doi.org/10.7763/IJCEA.2014.V5.416>
- Padovan, A.C.B., Melo, A.S. de A., Colombo, A.L., 2013. Systematic review and new insights into the molecular characterization of the *Candida rugosa* species complex. *Fungal Genet. Biol.* 61, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.10.007>
- Pang, R., Li, M., Zhang, C., 2015. Degradation of phenolic compounds by laccase immobilized on

- carbon nanomaterials: Diffusional limitation investigation. *Talanta* 131, 38–45.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.045>
- Papadopoulou, A. a, Katsoura, M.H., Chatzikonstantinou, A., Kyriakou, E., Polydera, A.C., Tzakos, A.G., Stamatis, H., 2013. Enzymatic hybridization of  $\alpha$ -lipoic acid with bioactive compounds in ionic solvents. *Bioresour. Technol.* 136, 41–8.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.067>
- Parlett, C.M.A., Wilson, K., Lee, A.F., Lee, A.F., Wilson, K., 2013. Hierarchical porous materials: catalytic applications. *Chem Soc Rev* 42, 3876–3893. <https://doi.org/10.1039/c2cs35378d>
- Patel, R.N., 2017. Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals. *Bioorganic Med. Chem.*  
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.05.023>
- Patila, M., Diamanti, E.K., Bergouni, D., Polydera, A.C., Gournis, D., Stamatis, H., 2018. Preparation and biochemical characterisation of nanoconjugates of functionalized carbon nanotubes and cytochrome c. *Nanomedicine Res. J.* 3, 10–18. <https://doi.org/10.22034/nmrj.2018.01.002>
- Patila, M., Kouloumpis, A., Gournis, D., Rudolf, P., Stamatis, H., 2016a. Laccase-functionalized graphene oxide assemblies as efficient nanobiocatalysts for oxidation reactions. *Sensors (Switzerland)* 16, 1–14. <https://doi.org/10.3390/s16030287>
- Patila, M., Pavlidis, I. V., Diamanti, E.K., Katapodis, P., Gournis, D., Stamatis, H., 2013a. Enhancement of cytochrome c catalytic behaviour by affecting the heme environment using functionalized carbon-based nanomaterials. *Process Biochem.* 48, 1010–1017.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.021>
- Patila, M., Pavlidis, I. V., Diamanti, E.K., Katapodis, P., Gournis, D., Stamatis, H., 2013b. Enhancement of cytochrome c catalytic behaviour by affecting the heme environment using functionalized carbon-based nanomaterials. *Process Biochem.* 48, 1010–1017.  
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.04.021>
- Patila, M., Pavlidis, I. V., Kouloumpis, A., Dimos, K., Spyrou, K., Katapodis, P., Gournis, D., Stamatis, H., 2016b. Graphene oxide derivatives with variable alkyl chain length and terminal functional groups as supports for stabilization of cytochrome c. *Int. J. Biol. Macromol.* 84, 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.023>
- Patila, M., Pavlidis, I. V., Kouloumpis, A., Dimos, K., Spyrou, K., Katapodis, P., Gournis, D., Stamatis, H., 2016c. Graphene oxide derivatives with variable alkyl chain length and terminal functional groups as supports for stabilization of cytochrome c. *Int. J. Biol. Macromol.* 84, 227–235. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.12.023>
- Pavlidis, I. V., Tsoufis, T., Enotiadis, A., Gournis, D., Stamatis, H., 2010. Functionalized multi-wall carbon nanotubes for lipase immobilization. *Adv. Eng. Mater.* 12, 179–183.  
<https://doi.org/10.1002/adem.200980021>
- Pavlidis, I. V., Vorhaben, T., Gournis, D., Papadopoulos, G.K., Bornscheuer, U.T., Stamatis, H., 2012a. Regulation of catalytic behaviour of hydrolases through interactions with functionalized carbon-based nanomaterials. *J. Nanoparticle Res.* 14, 1–10.  
<https://doi.org/10.1007/s11051-012-0842-4>
- Pavlidis, I. V., Vorhaben, T., Tsoufis, T., Rudolf, P., Bornscheuer, U.T., Gournis, D., Stamatis, H., 2012b. Development of effective nanobiocatalytic systems through the immobilization of hydrolases on functionalized carbon-based nanomaterials. *Bioresour. Technol.* 115, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.007>
- Pavlidis, I. V., Vorhaben, T., Tsoufis, T., Rudolf, P., Bornscheuer, U.T., Gournis, D., Stamatis, H.,

- 2012c. Development of effective nanobiocatalytic systems through the immobilization of hydrolases on functionalized carbon-based nanomaterials. *Bioresour. Technol.* 115, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.007>
- Pavlidis, I. V., Patila, M., Bornscheuer, U.T., Gournis, D., Stamatis, H., 2014. Graphene-based nanobiocatalytic systems : recent advances and future prospects. *Trends Biotechnol.* 32. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.04.004>
- Pellecchia, M., Bertini, I., Cowburn, D., Dalvit, C., Giralt, E., Jahnke, W., James, T.L., Homans, S.W., Kessler, H., Luchinat, C., Meyer, B., Oschkinat, H., Peng, J., Schwalbe, H., Siegal, G., 2008. Perspectives on NMR in drug discovery: a technique comes of age. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 738–745. <https://doi.org/10.1038/nrd2606>
- Peng, Y.U.N., Liu, H., Zhang, X., Li, Y., Liu, S., 2009. CNT Templated Regioselective Enzymatic Polymerization of Phenol in Water and Modification of Surface of MWNT Thereby. *J. Polym. Sci.* 47, 1627–1635. <https://doi.org/10.1002/pola>
- Pereira, A.P., Ferreira, I.C., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P.B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., Pereira, J.A., 2007. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves. *Molecules* 12, 1153–1162. <https://doi.org/10.3390/12051153>
- Petersen.F., Amstutz.R., 2008. Natural Compounds as Drugs.
- Politi, M., Chávez, M.I., Cañada, F.J., Jiménez-Barbero, J., 2005. Screening by NMR: A new approach for the study of bioactive natural products? The example of *Pleurotus ostreatus* hot water extract. *European J. Org. Chem.* 1, 1392–1396. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200400566>
- Ponzoni, C., Beneventi, E., Cramarossa, M.R., Raimondi, S., Trevisi, G., Pagnoni, U.M., Riva, S., Forti, L., 2007. Laccase-catalyzed dimerization of hydroxystilbenes. *Adv. Synth. Catal.* 349, 1497–1506. <https://doi.org/10.1002/adsc.200700043>
- Popovych, N., Brender, J.R., Soong, R., Vivekanandan, S., Hartman, K., Basrur, V., MacDonald, P.M., Ramamoorthy, A., 2012. Site specific interaction of the polyphenol EGCG with the SEVI amyloid precursor peptide PAP(248-286). *J. Phys. Chem. B* 116, 3650–3658. <https://doi.org/10.1021/jp2121577>
- Prestrelski, S.J., Tedeschi, N., Arakawa, T., Carpenter, J.F., 1993. Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophys. J.* 65, 661–671. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(93\)81120-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(93)81120-2)
- Primikyri, A., Chatziathanasiadou, M. V., Karali, E., Kostaras, E., Mantzaris, M.D., Hatzimichael, E., Shin, J., Chi, S., Kolettas, E., Gerothanassis, I.P., Tzakos, A.G., 2014. Direct binding of Bcl-2 family proteins by quercetin triggers its pro-apoptotic activity Direct binding of Bcl-2 family proteins by quercetin triggers its pro-apoptotic activity. *ACS Chem. Biol.* 9, 2737–2741. <https://doi.org/10.1021/cb500259e>
- Rabbani, G., Ahmad, E., Khan, M.V., Ashraf, M.T., Bhat, R., Khan, R.H., 2015. RSC Advances *Candida antarctica* lipase B ( CaLB ): in relation to pH, chemical and thermal denaturation. *RSC Adv.* 5, 20115–20131. <https://doi.org/10.1039/C4RA17093H>
- Ran, N., Zhao, L., Chen, Z., Tao, J., 2008. Recent applications of biocatalysis in developing green chemistry for chemical synthesis at the industrial scale. *Green Chem.* 10, 361. <https://doi.org/10.1039/b716045c>
- Rao, A., Schoenenberger, M., Gnecco, E., Glatzel, T., Mayer, E., Brandlin, D., Scandella, L., 2007.

- Characterization of nanoparticles using Atomic Force Microscopy. *J. Phys.* 61, 971–976. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/61/1/192>
- Ravera, E., Corzilius, B., Michaelis, V.K., Luchinat, C., Griffin, R.G., Bertini, I., 2014. DNP-enhanced MAS NMR of bovine serum albumin sediments and solutions. *J. Phys. Chem. B* 118, 2957–2965. <https://doi.org/10.1021/jp500016f>
- Reis Giada, M. de L., 2016. Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. p. 13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Ren, Y., Rivera, J.G., He, L., Kulkarni, H., Lee, D.-K., Messersmith, P.B., 2011. Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating. *BMC Biotechnol.* 11, 63. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-63>
- Riva, S., 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol.* 24, 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.03.006>
- Robinson, J.G., Heistad, D.D., Fox, K.A.A., 2015. Atherosclerosis stabilization with PCSK-9 inhibition: An evolving concept for cardiovascular prevention. *Atherosclerosis* 243, 593–597. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.10.023>
- Rodríguez-Morató, J., Boronat, A., Kotronoulas, A., Pujadas, M., Pastor, A., Olesti, E., Pérez-Mañá, C., Khymenets, O., Fitó, M., Farré, M., de la Torre, R., 2016. Metabolic disposition and biological significance of simple phenols of dietary origin: hydroxytyrosol and tyrosol. *Drug Metab. Rev.* 48, 218–36. <https://doi.org/10.1080/03602532.2016.1179754>
- Rubio, S., Quintana, J., Eiroa, J.L., Triana, J., Estévez, F., 2007. Acetyl derivative of quercetin 3-methyl ether-induced cell death in human leukemia cells is amplified by the inhibition of ERK. *Carcinogenesis* 28, 2105–2113. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm131>
- Ruelle, B., Peeterbroeck, S., Gouttebaron, R., Godfroid, T., Monteverde, F., Dauchot, J.P., Alexandre, M., Hecq, M., Dubois, P., 2007. Functionalization of carbon nanotubes by atomic nitrogen formed in a microwave plasma Ar + N<sub>2</sub> and subsequent poly( $\epsilon$ -caprolactone) grafting. *J. Mater. Chem.* 17, 157–159. <https://doi.org/10.1039/b613581c>
- Ruiz, C., Falcocchio, S., Xoxi, E., Villo, L., Nicolosi, G., Pastor, F.I.J., Diaz, P., Saso, L., 2006. Inhibition of *Candida rugosa* lipase by saponins, flavonoids and alkaloids. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 40, 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.02.012>
- Runyoro, D.K.B., Matee, M.I.N., Ngassapa, O.D., Joseph, C.C., Mbwambo, Z.H., 2006. Screening of Tanzanian medicinal plants for anti-*Candida* activity. *BMC Complement. Altern. Med.* 6, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-11>
- Sakao, K., Fujii, M., Hou, D.-X., 2009. Acetyl derivate of quercetin increases the sensitivity of human leukemia cells toward apoptosis. *BioFactors* 35, 399–405. <https://doi.org/10.1002/biof.53>
- Sandoval, G., 2012. Lipases and Phospholipases.
- Sardi, J.C.O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A.M., Mendes Giannin, M.J.S., 2013. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J. Med. Microbiol.* 62, 10–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>
- Schrag, J., Miroslaw, C., 1997. Lipases and  $\alpha/\beta$  Hydrolase Fold 284, 85–107.
- Secundo, F., Barletta, G.L., Dumitriu, E., Carrea, G., Molecolare, R., Bianco, M., 2007. Can an Inactivating Agent Increase Enzyme Activity in Organic Solvent ? Effects of 18-Crown-6 on



- Lipase Activity , Enantioselectivity , and Conformation. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 97, 12–18. <https://doi.org/10.1002/bit.21223>
- Secundo, F., Carrea, G., Molocare, R., Bianco, M., 2005. Mono- and Disaccharides Enhance the Activity and Enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* Lipase in Organic Solvent but Do Not Significantly Affect its Conformation. *Biotechnol. Bioeng.* 92, 438–446. <https://doi.org/10.1002/bit.20604>
- Sehgal, D., Vijay, I.K., 1994. A method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation. *Anal. Biochem.* 218, 87–91. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1144>
- Senthivelan, T., Kanagaraj, J., Panda, R.C., Narayani, T., 2019. Screening and production of a potential extracellular fungal laccase from *Penicillium chrysogenum*: Media optimization by response surface methodology (RSM) and central composite rotatable design (CCRD). *Biotechnol. Reports* 23, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00344>
- Serefoglou, E., Litina, K., Gournis, D., Kalogeris, E., Tziaila, A.A., Pavlidis, I. V., Stamatis, H., Maccallini, E., Lubomska, M., Rudolf, P., 2008a. Smectite clays as solid supports for immobilization of  $\beta$ -glucosidase: Synthesis, characterization, and biochemical properties. *Chem. Mater.* 20, 4106–4115. <https://doi.org/10.1021/cm800486u>
- Serefoglou, E., Litina, K., Gournis, D., Kalogeris, E., Tziaila, A.A., Pavlidis, I. V., Stamatis, H., Maccallini, E., Lubomska, M., Rudolf, P., 2008b. Smectite Clays as Solid Supports for Immobilization of  $\beta$ -Glucosidase: Synthesis, Characterization, and Biochemical Properties. *Chem. Mater.* 20, 4106–4115. <https://doi.org/10.1021/cm800486u>
- Sereti, V., Stamatis, H., Pappas, C., Polissiou, M., Kolisis, F.N., 2001. Enzymatic Acylation of Hydroxypropyl Cellulose in Organic Media and Determination of Ester Formation by Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform ( DRIFT ) Spectroscopy. *Biotechnol. Bioeng.* 72, 495–500. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20010220\)72:4<495::AID-BIT1012>3.0.CO;2-T](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1097-0290(20010220)72:4<495::AID-BIT1012>3.0.CO;2-T)
- Serpen, A., Gökmen, V., 2007. Effects of  $\beta$ -carotene on soybean lipoxygenase activity: Kinetic studies. *Eur. Food Res. Technol.* 224, 743–748. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0368-z>
- Shaymaa, H.A.R., Dina, E.R., 2016. Effect of tyrosol on *Staphylococcus aureus* antimicrobial susceptibility, biofilm formation and virulence factors. *African J. Microbiol. Res.* 10, 687–693. <https://doi.org/10.5897/ajmr2016.8001>
- Shen, J., Shi, M., Yan, B., Ma, H., Li, N., Hu, Y., Ye, M., 2010. Covalent attaching protein to graphene oxide via diimide-activated amidation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 81, 434–438. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.07.035>
- Shingai, Y., Fujimoto, A., Nakamura, M., Masuda, T., 2011. Structure and function of the oxidation products of polyphenols and identification of potent lipoxygenase inhibitors from Fe-catalyzed oxidation of resveratrol. *J. Agric. Food Chem.* 59, 8180–8186. <https://doi.org/10.1021/jf202561p>
- Simons, W.W., Sadtler Research Laboratories, 1978. *The Sadtler handbook of infrared spectra.* Sadtler Research Laboratories, Philadelphia.
- Singh, G., Urhekar, A.D., 2013. Candidal Infection : Epidemiology, Pathogenesis and Recent Advances for Diagnosis. *Bull. Pharm. Med. Sci.* 1, 1–8.
- Singh, G., Verma, A.K., Kumar, V., 2016. Catalytic properties , functional attributes and industrial applications of  $\beta$ -glucosidases. *3 Biotech* 6, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0328-z>

- Sivanesam et al, K., 2015. Binding Interactions of Agents That Alter  $\alpha$ -Synuclein Aggregation. *RSC Adv.* 72, 181–204. <https://doi.org/10.1038/nature13314.A>
- Skoronski, E., Souza, D.H., Ely, C., Broilo, F., Fernandes, M., Fúrigo, A., Ghislandi, M.G., 2017. Immobilization of laccase from *Aspergillus oryzae* on graphene nanosheets. *Int. J. Biol. Macromol.* 99, 121–127. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.076>
- Soler-rivas, C., Espi, J.C., Wichers, H.J., 2000. Oleuropein and related compounds. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1013–1023. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1013::AID-JSFA571>3.0.CO;2-C](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1013::AID-JSFA571>3.0.CO;2-C)
- Solomon, E.I., Augustine, A.J., Yoon, J., 2008. O<sub>2</sub> Reduction to H<sub>2</sub>O by the multicopper oxidases. *Dalt. Trans.* 9226, 3921–3932. <https://doi.org/10.1039/b800799c>
- Solomon, E.I., Sundaram, U.M., Machonkin, T.E., 1996. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 96, 2563–2605. <https://doi.org/10.1021/cr950046o>
- Spyrou, K., Calvaresi, M., Diamanti, E.K., Tsoufis, T., Gournis, D., Rudolf, P., Zerbetto, F., 2015. Graphite oxide and aromatic amines: Size matters. *Adv. Funct. Mater.* 25, 263–269. <https://doi.org/10.1002/adfm.201402622>
- Spyrou, K., Potsi, G., Diamanti, E.K., Ke, X., Serestatidou, E., Verginadis, I.I., Velalopoulou, A.P., Evangelou, A.M., Deligiannakis, Y., Van Tendeloo, G., Gournis, D., Rudolf, P., 2014. Towards novel multifunctional pillared nanostructures: Effective intercalation of adamantylamine in graphene oxide and smectite clays. *Adv. Funct. Mater.* 24, 5841–5850. <https://doi.org/10.1002/adfm.201400975>
- Staudenmaier, L., 1898. Verfahren zur Darstellung der Graphitsäure. *Eur. J. Inorg. Chem.* 32, 1481–1487.
- Stergiou, D. V., Diamanti, E.K., Gournis, D., Prodromidis, M.I., 2010. Comparative study of different types of graphenes as electrocatalysts for ascorbic acid. *Electrochem. commun.* 12, 1307–1309. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2010.07.006>
- Sułkowska, A., 2002. Interaction of drugs with bovine and human serum albumin. *J. Mol. Struct.* 614, 227–232. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(02\)00256-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2860(02)00256-9)
- Sun, H., Zhang, H., Ang, E.L., Zhao, H., 2017. Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates. *Bioorganic Med. Chem.* 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.043>
- Sun, M.-H., Huang, S.-Z., Chen, L.-H., Li, Y., Yang, X.-Y., Yuan, Z.-Y., Su, B.-L.S., 2016. Applications of hierarchically structured porous materials from energy storage and conversion, catalysis, photocatalysis, adsorption, separation, and sensing to biomedicine. *Chem Soc Rev* 45, 3479–3563. <https://doi.org/10.1039/C6CS00135A>
- Suryanarayana, C., Koch, C.C., 2000. Nanocrystalline materials – Current research and future directions. *Hyperfine Interact.* 130, 5–44. <https://doi.org/10.1023/A:1011026900989>
- Suzuki, Y., Brender, J.R., Hartman, K., Ramamoorthy, A., Marsh, E.N.G., 2012. Alternative Pathways of Human Islet Amyloid Polypeptide Aggregation Distinguished by F-19 Nuclear Magnetic Resonance–Detected Kinetics of Monomer Consumption. *Biochemistry* 51, 8154–8162. <https://doi.org/10.1021/bi3012548>
- Tao, J., Xu, J.H., 2009. Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.01.018>
- Tawil, N., Sacher, E., Boulais, E., Mandeville, R., Meunier, M., 2013. X-ray photoelectron

- spectroscopic and transmission electron microscopic characterizations of bacteriophage-nanoparticle complexes for pathogen detection. *J. Phys. Chem. C* 117, 20656–20665. <https://doi.org/10.1021/jp406148h>
- Terreni, M., Salvetti, R., Linati, L., Fernandez-Lafuente, R., Fernández-Lorente, G., Bastida, A., Guisan, J.M., 2002. Regioselective enzymatic hydrolysis of acetylated pyranoses and pyranosides using immobilised lipases. An easy chemoenzymatic synthesis of ??- and ??-D-glucopyranose acetates bearing a free secondary C-4 hydroxyl group. *Carbohydr. Res.* 337, 1615–1621. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(02\)00113-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00113-1)
- Theodosiou, E., Stamatis, H., Kolisis, F., 2014. Bioavailability of silymarin flavonolignans : drug formulations and biotransformation. *Phytochem. Rev.* 13, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9285-5>
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., La Guardia, M., 2005. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr. Res. Rev.* 18, 98–112. <https://doi.org/10.1079/nrr200495>
- Tufvesson, P., Fu, W., Jensen, J.S., Woodley, J.M., 2010. Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis. *Food Bioprod. Process.* 88, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.01.003>
- Tural, S., Turhan, S., 2018. ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF THYME ( *Thymus vulgaris* L .), ROSEMARY ( *Rosmarinus officinalis* L .) AND LAUREL ( *Lauris* ( *Thymus vulgaris* L .), ROSEMARY ( *Rosmarinus officinalis* L .) AND LAUREL ( *Lauris nobilis* L .) ESSENTIAL OILS. *Gida J. Food* 42, 588–596. <https://doi.org/10.15237/gida.GD17030>
- Turck, D., Bresson, J., Burlingame, B., Dean, T., Fairweather-Tait, S., Heinonen, M., Hirsch-Ernst, K.I., Mangelsdorf, I., McArdle, H.J., Naska, A., Neuhäuser-Berthold, M., Nowicka, G., Pentieva, K., Sanz, Y., Siani, A., Sjödin, A., Stern, M., Tomé, D., Vinceti, M., Willatts, P., Engel, K., Marchelli, R., Pöting, A., Poulsen, M., Schlatter, J., Turla, E., van Loveren, H., 2017. Safety of hydroxytyrosol as a novel food pursuant to Regulation (EC) No 258/97. *EFSA J.* 15. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4728>
- Tziaila, A.A., Pavlidis, I. V., Felicissimo, M.P., Rudolf, P., Gournis, D., Stamatis, H., 2010. Lipase immobilization on smectite nanoclays: Characterization and application to the epoxidation of  $\alpha$ -pinene. *Bioresour. Technol.* 101, 1587–1594. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.023>
- Uppenberg et al., J., 1995. Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry* 34, 16838–51.
- Uppenberg et al., J., 1994. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* 2, 293–308.
- Vavříková, E., Gavezzotti, P., Purchartová, K., Fuksová, K., Biedermann, D., Kuzma, M., Riva, S., Křen, V., 2015. Regioselective alcoholysis of silychristin acetates catalyzed by lipases. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 11983–11995. <https://doi.org/10.3390/ijms160611983>
- Verma, M.L., Chaudhary, R., Tsuzuki, T., Barrow, C.J., Puri, M., 2013. Immobilization of b - glucosidase on a magnetic nanoparticle improves thermostability : Application in cellobiose hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 135, 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.047>
- Viegas, A., Nobrega, F.L., Cabrita, E.J., 2011a. Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding. *J. Chem. Educ.* 88, 990–994. <https://doi.org/10.1021/ed101169t>

- Viegas et al., A., 2011b. Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding. *J. Chem. Educ.* 88, 990–994. <https://doi.org/10.1021/ed101169t>
- Vila, M.A., Pazos, M., Iglesias, C., Veiga, N., Seoane, G., Carrera, I., 2016. Toluene Dioxygenase-Catalysed Oxidation of Benzyl Azide to Benzonitrile: Mechanistic Insights for an Unprecedented Enzymatic Transformation. *ChemBioChem* 17, 291–295. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500653>
- Vilaplana-Pérez, C., Auñón, D., García-Flores, L.A., Gil-Izquierdo, A., 2014. Hydroxytyrosol and potential uses in cardiovascular diseases, cancer, and AIDS. *Front. Nutr.* 1, 18. <https://doi.org/10.3389/fnut.2014.00018>
- Vinciguerra, V., D'Annibale, A., Gàcs-Baitz, E., Monache, G.D., 1997. Biotransformation of tyrosol by whole-cell and cell-free preparation of *Lentinus edodes*. *J. Mol. Catal. - B Enzym.* 3, 213–220. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(96\)00061-6](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(96)00061-6)
- Vinu, A., Hossian, K.Z., Srinivasu, P., Miyahara, M., Anandan, S., Gokulakrishnan, N., Mori, T., Ariga, K., Balasubramanian, V.V., 2007. Carboxy-mesoporous carbon and its excellent adsorption capability for proteins. *J. Mater. Chem.* 17, 1819–1825. <https://doi.org/10.1039/b613899c>
- Visioli, F., Bellomo, G., Galli, C., 1998. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247, 60–64. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8735>
- Viskupicova, J., Sturdik, E., Ondrejovic, M., 2009. Enzymatic transformation of flavonoids. *Acta Chim. Slovaca* 2, 88–106. <https://doi.org/https://ojs.fchpt.stuba.sk/ojs/index.php/ACS/article/view/71>
- Vogel, P., Machado, I.K., Garavaglia, J., Zani, V.T., de Souza, D., Dal Bosco, S.M., 2015. Beneficios polifenoles hoja de olivo (*Olea europaea* L) para la salud humana. *Nutr. Hosp.* 31, 1427–1433. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.3.8400>
- Wan, D., Tian, L., Li, X., Li, B., Zhang, Q., 2018. Regular article A versatile strategy for enzyme immobilization : Fabricating lipase / inorganic hybrid nanostructures on macroporous resins with enhanced catalytic properties. *Biochem. Eng. J.* 139, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.08.010>
- Wang, F., Guo, C., Yang, L. rong, Liu, C.Z., 2010. Magnetic mesoporous silica nanoparticles: Fabrication and their laccase immobilization performance. *Bioresour. Technol.* 101, 8931–8935. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.115>
- Wang, P., 2006. Nanoscale biocatalyst systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 574–579. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.10.009>
- Widsten, P., Heathcote, C., Kandelbauer, A., Guebitz, G., Nyanhongo, G.S., Nugroho, E., Kudanga, T., 2010. Enzymatic surface functionalisation of lignocellulosic materials with tannins for enhancing antibacterial properties. *Process Biochem.* 45, 1072–1081. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.03.022>
- Wu, J., Li, X., Yan, Y., Hu, Y., Zhang, Y., Tang, Y., 2013. Journal of Colloid and Interface Science Protein adsorption onto nanozeolite : Effect of micropore openings. *J. Colloid Interface Sci.* 406, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.05.073>
- Wu, Q., Needs, P.W., Lu, Y., Kroon, P.A., Ren, D., Yang, X., 2018. Different antitumor effects of quercetin, quercetin-3'-sulfate and quercetin-3-glucuronide in human breast cancer MCF-7 cells. *Food Funct.* 9, 1736–1746. <https://doi.org/10.1039/C7FO01964E>

- Xie, P., Huang, L., Cai-hong, Z., Zhang, Y., 2015. Phenolic compositions, and antioxidant performance of olive leaf and fruit (*Olea europaea* L.) extracts and their structure–activity relationships. *J. Funct. Foods* 16, 460–471.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.05.005>
- Xu, F., 2005. Applications of oxidoreductases: Recent progress. *Ind. Biotechnol.* 1, 38–50.  
<https://doi.org/10.1089/ind.2005.1.38>
- Xu, G.L., Sun, H., Luo, C., Estevez, L., Zhuang, M., Gao, H., Amine, R., Wang, H., Zhang, X., Sun, C.J., Liu, Y., Ren, Y., Heald, S.M., Wang, C., Chen, Z., Amine, K., 2019. Solid-State Lithium/Selenium–Sulfur Chemistry Enabled via a Robust Solid-Electrolyte Interphase. *Adv. Energy Mater.* 9, 1–14. <https://doi.org/10.1002/aenm.201802235>
- Xue, Y.M., Xu, C.Y., Hou, J.J., Li, X.Q., Cao, Z.G., 2015. Enhanced Soluble Expression of a Thermostable  $\beta$  glucosidase from *Thermotoga maritima* in *Escherichia coli* and its Application in Immobilization 1. *Appl. Biochem. Microbiol.* 51, 306–315.  
<https://doi.org/10.1134/S0003683815030175>
- Yoshida, H., 1883. Chemistry of Lacquer (Urushi). *J. Chem. Soc. Trans.* 43, 472–486.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1039/ct8834300472>
- Yuan, J., Wang, C., Ye, J., Tao, R., Zhang, Y., 2015. Enzymatic Hydrolysis of Oleuropein from *Olea europea* (Olive) Leaf Extract and Antioxidant Activities. *Molecules* 2903–2921.  
<https://doi.org/10.3390/molecules20022903>
- Zechel, D.L., Boraston, A.B., Gloster, T., Boraston, C.M., Macdonald, J.M., Tilbrook, D.M.G., Stick, R. V., Davies, G.J., 2003. Iminosugar Glycosidase Inhibitors: Structural and Thermodynamic Dissection of the Binding of Isofagomine and 1-Deoxynojirimycin to  $\beta$ -Glucosidases. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 14313–14323. <https://doi.org/10.1021/ja036833h>
- Zhang, Z.L., Chen, J., Xu, Q., Rao, C., Qiao, C., 2012. Efficient synthesis of hydroxytyrosol from 3,4-dihydroxybenzaldehyde. *Synth. Commun.* 42, 794–798.  
<https://doi.org/10.1080/00397911.2010.531369>
- Zhou, J., Zhang, J., David, A.E., Yang, V.C., 2013. Magnetic tumor targeting of  $\beta$ -glucosidase immobilized iron oxide nanoparticles. *Nanotechnology* 24, 1–12.  
<https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/37/375102>
- Zhou, Y., Wang, L., Wu, T., Tang, X., Pan, S., 2013. Optimal immobilization of  $\beta$ -glucosidase into chitosan beads using response surface methodology. *Electron. J. Biotechnol.* 16.  
<https://doi.org/10.2225/vol16-issue6-fulltext-5>
- Zhou, Z., Hartmann, M., 2013. Progress in enzyme immobilization in ordered mesoporous materials and related applications†. *Chem Soc Rev.* 42, 3894–3912.  
<https://doi.org/10.1039/c3cs60059a>
- Zwane, E., Parker, A., Kudanga, T., Davids, L.M., Burton, S.G., 2012. Novel, Biocatalytically Produced Hydroxytyrosol Dimer Protects against Ultraviolet-Induced Cell Death in Human Immortalized Keratinocytes. *J. Agric. Food Chem.* 60, 11509–11517.  
<https://doi.org/10.1021/jf300883h>
- Zygouri, P., Tsoufis, T., Kouloumpis, A., Patila, M., Potsi, G., Sevastos, A.A., Sideratou, Z., Katsaros, F., Charalambopoulou, G., Stamatias, H., Rudolf, P., Steriotis, T.A., Gournis, D., 2018. Synthesis, characterization and assessment of hydrophilic oxidized carbon nanodiscs in bio-related applications. *RSC Adv.* 8, 122–131. <https://doi.org/10.1039/c7ra11045f>
- ΑΘ.Βαλαβανίδης, 2008. Βασικές αρχές μοριακής φασματοσκοπίας και εφαρμογές στην οργανική χημεία.



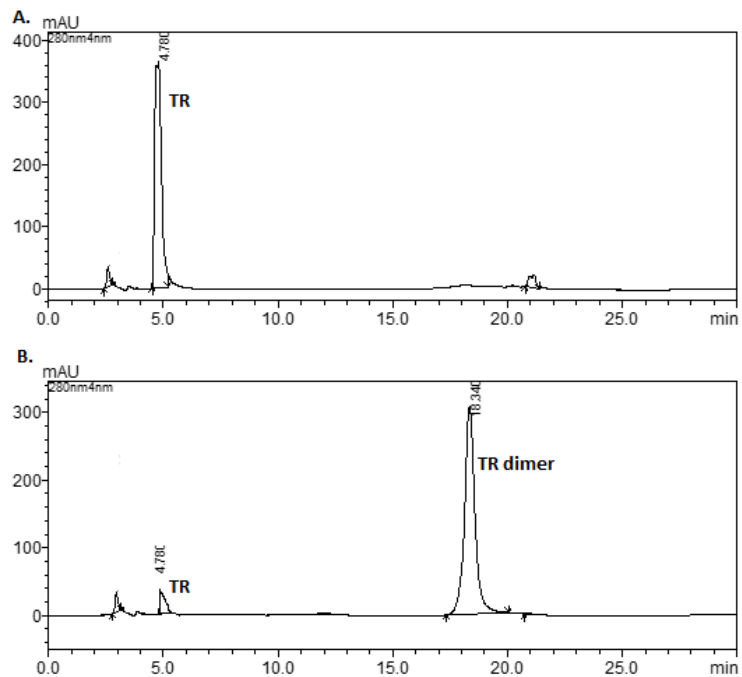
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

### 1.Σύνθεση του οξειδωμένου νανοϋλικού HPCox

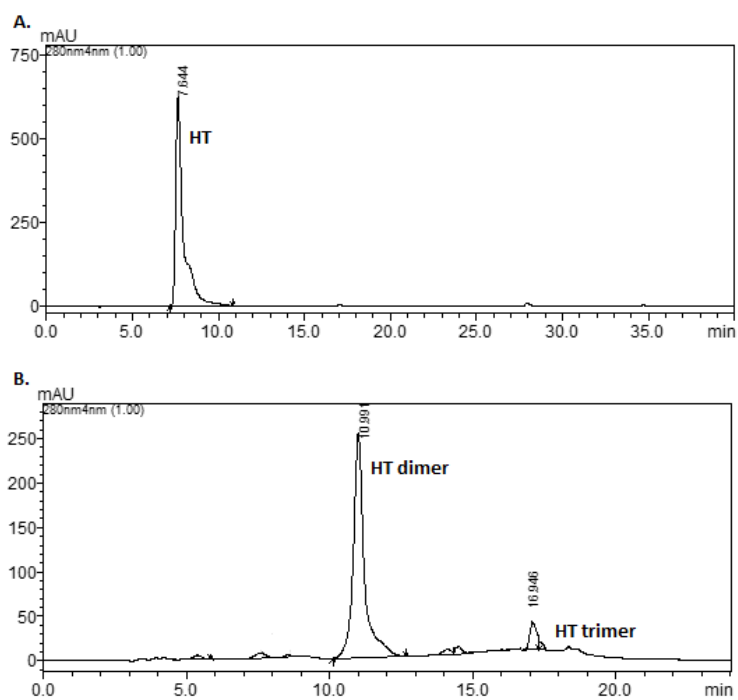
Η σύνθεση του νανοϋλικού HPC πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Estevez et al, (Estevez et al., 2017, 2013). Για την προετοιμασία των HPCox σε 20 mL διαλύματος 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> προστίθενται 6 g υπερθειικό αμμώνιο (1.74 M) και αφήνονται υπό ανάδευση. Στη συνέχεια σε αυτό το διάλυμα προστίθενται 100 mg HPC και το διάλυμα που προκύπτει αφήνεται υπό ανάδευση για 24 h. Ύστερα ακολουθούν 3 φυγοκεντρήσεις και εκπλύσεις με νερό. Τέλος, το ίζημα που προκύπτει απλώνεται σε ύαλο και αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Το υλικό της οξειδωμένης μορφής του ιεραρχημένου πορώδους άνθρακα ονομάστηκε HPCox. Ανάλυση υγρής χρωματογραφίας HPLC της βιοτροποποίησης της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης.

### 2.Ανάλυση υγρής χρωματογραφίας HPLC της βιοτροποποίησης της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης

Στις Εικόνες I1 και I2 απεικονίζονται τα φάσματα HPLC της ενζυμικής τροποποίησης της τυροσόλης και της υδροξυτυροσόλης από τον νανοβιοκαταλύτη HPCox-TnL. Το χρωματογράφημα της τυροσόλης φαίνεται στην Εικόνα I1 A όπου η ένωση εμφανίζεται στα 4.78 min. Μετά την ενζυμική τροποποίηση η τυροσόλη έχει μειωθεί σημαντικά και προκύπτει μια νέα κορυφή σε χρόνο 18.34 min (Εικόνα I1 B) που αντιστοιχεί στο διμερές της τυροσόλης σύμφωνα με την βιβλιογραφία και σύμφωνα με την ανάλυση NMR (Chakroun et al., 2013). Το χρωματογράφημα της υδροξυτυροσόλης φαίνεται στην Εικόνα I2 A όπου η ένωση εμφανίζεται στα 7.64 min. Μετά την ενζυμική τροποποίηση η υδροξυτυροσόλη έχει μειωθεί σημαντικά και προκύπτουν δύο νέες κορυφές σε χρόνο 10.99 min και 16.94 min (Εικόνα I2 B) που αντιστοιχούν στο διμερές και στο τριμερές της υδροξυτυροσόλης, αντίστοιχα, σύμφωνα με την βιβλιογραφία και σύμφωνα με την ανάλυση MS (Zwane et al., 2012).



**Εικόνα I1.** Χρωματογράφημα HPLC (A) της τυροσόλης (TR) και (B) της τροποποιημένης τυροσόλης από τον νανοβιοκαταλύτη HPCox-TvL, στα 280 nm.



**Εικόνα I2.** Χρωματογράφημα HPLC (A) της υδρόξυτυροσόλης (TR) και (B) της τροποποιημένης υδροξυτυροσόλης από τον νανοβιοκαταλύτη HPCox-TvL, στα 280 nm.



### **3.Ο πλήρης χαρακτηρισμός του διμερούς της τυροσόλης μέσω 1D <sup>1</sup>H NMR και 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC:**

Διμερές τυροσόλης: <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 7.27 (1H, H6, s), 7.05 (1H, H2, d, j=8.08), 6.76 (1H, H3, d, j=8.22), 4.86 (1H, H9, t, j=3), 4.66 (2H, H8, t), 4.09 (1H, H11α, tt, j=7), 3.98 (1H, H11β, tt, j=7), 4.16 (1H, H12α, q), 3.6 (1H, H12β, q), 3.9 (1H, H13, t, j=3), 2.84 (1H, H16α, d, j=3), 2.78 (1H, H16β, t, j=3), 2.74 (1H, H14α, d, j=2.87), 2.67 (1H, H14β, d, j=2.87), 2.72 (2H, H7, t, j=7.28); <sup>13</sup>C-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 207.07 C15, 158.15 C4, 133.2 C5, 130.69 C1, 124.81 C6, 110.11 C2, 109.94 C3, 87.85 C9, 83.45 C9, 67.37 C11, 63.23 C12, 53.05 C10, 40.5 C16, 39.5 C7, 39.35 C14;

## **4.Ανάλυση Φασματοσκοπίας Μάζας**

### **4.1.Οργανολογία**

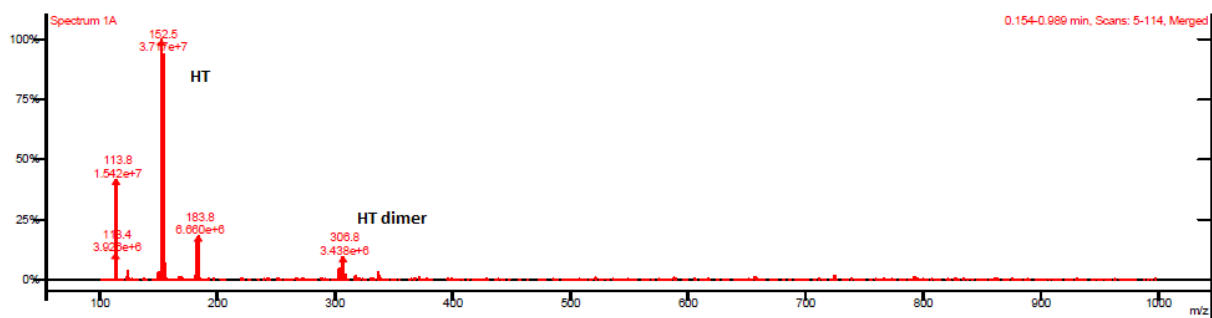
Για τον ιοντισμό και την ανίχνευση της υδροξυτυροσόλης στο διάλυμα της αντίδρασης, φασματομετρία μάζας τριπλού τετραπόλου χρησιμοποιήθηκε και πιο συγκεκριμένα το EVOQ Elite ER (Bruker Daltonics, Γερμανία).

### **4.2.Μεθοδολογία**

Η ανίχνευση της υδροξυτυροσόλης και του διμερούς της υδροξυτυροσόλης με το EVOQ Elite ER πραγματοποιήθηκε σε λειτουργία πλήρους σάρωσης (Full scan mode) χρησιμοποιώντας αρνητικό ιοντισμό ηλεκτροψεκασμού (ESI). Το διάλυμα αντίδρασης εισήχθη στο φασματόμετρο μάζας με άμεση έγχυση και ρυθμό ροής 15 μL min<sup>-1</sup>. Οι παράμετροι ESI για την ανίχνευση της υδροξυτυροσόλης καθώς και όλων των πιθανών ενώσεων στο διάλυμα της αντίδρασης ορίστηκαν ως ακολούθως: θερμοκρασία του κώνου 350 °C (cone temperature), ροή αερίου εκνέφωσης (N<sub>2</sub>) 20 μονάδες, ροή αερίου αποδιαλύτωσης (N<sub>2</sub>) 20 μονάδες και δυναμικό κώνου 4000V.

### **4.3.Αποτελέσματα**

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 13 στο μείγμα της αντίδρασης της τροποποίησης της υδροξυτυροσόλης ανιχνεύθηκε η υδροξυτυροσόλη που δεν αντέδρασε με m/z 152.5 και το διμερές της υδροξυτυροσόλης με m/z 306.8. Ομοίως έχει ταυτοποιηθεί και βιβλιογραφικά το διμερές της υδροξυτυροσόλης (Zwane et al., 2012).



**Εικόνα 13.** Φάσμα μαζών σε αρνητικό ιονισμό της υδροξυτυροσολης (HT) ( $m/z$  152.5) και του διμερούς της (HT dimer) ( $m/z$  306.8).

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

### 1. Σύνθεση των μαγνητικών νανοσωματιδίων HPCFe

Η σύνθεση των νανοσωματιδίων HPC πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με του Estevez et al, (Estevez et al., 2013)(Estevez et al., 2017). Για την προετοιμασία των HPCFe, 100 mg νιτρικού σιδήρου ( $\text{FeN}_3\text{O}_9 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) διαλυτοποιήθηκαν σε 10 mL μεθανόλης. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 100 mg HPC στο διάλυμα νιτρικού σιδήρου και το μείγμα επώαστηκε υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min. Προκειμένου να απομακρυνθεί η μεθανόλη, το μείγμα διατηρήθηκε σε θερμοκρασία 80°C για όλο το βράδυ. Η μαύρη σκόνη που προέκυψε εκτέθηκε σε ατμούς οξικού οξέος στους 80°C για 1h και στη συνέχεια ξηράνθηκε στους 80°C για 15 min προκειμένου να απομακρυνθεί το οξικό οξύ που προσροφήθηκε. Τέλος το δείγμα πυρολύθηκε στους 400°C για 20 min, με ρυθμό θέρμανσης 10 °C min<sup>-1</sup> υπό ατμόσφαιρά αργού, οδηγώντας στη σύνθεση των υβριδικών νανοσωματιδίων HPCFe.

### 2. Χαρακτηρισμός των μαγνητικών νανοσωματιδίων HPCFe

#### 2.1 Ποροσιμετρία αζώτου

##### 2.1.1. Μέθοδος

Οι αναλύσεις μεγέθους της επιφάνειας, του πορώδους και του μεγέθους των πόρων προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας ένα σύστημα αερίου QUANTACHROME AUTOSORB 6-B gas Sorption. Τα δείγματα απαερώθηκαν στους 110°C για τουλάχιστον 20 ώρες υπό κενό και στη συνέχεια εξετάστηκαν με ισοθερμία αζώτου προσρόφησης /εκρόφησης, σε σταθερή θερμοκρασία 77.4 K. Οι διάφορες ιδιότητες της υφής προσδιορίστηκαν από την ισοθερμία.

Η επιφάνεια του νανοϋλικού υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Brunauer-Emmett-Teller (BET) (7 σημείων). Ο όγκος των πόρων εκτιμήθηκε από την προσρόφηση ενός σημείου σε σχετική πίεση 0.995. Η κατανομή μεγέθους του μεσοπορώδους προσδιορίστηκε από την κορυφή προσρόφησης, σύμφωνα με τη μέθοδο Barrett-Joyner-Halanda (BJH)

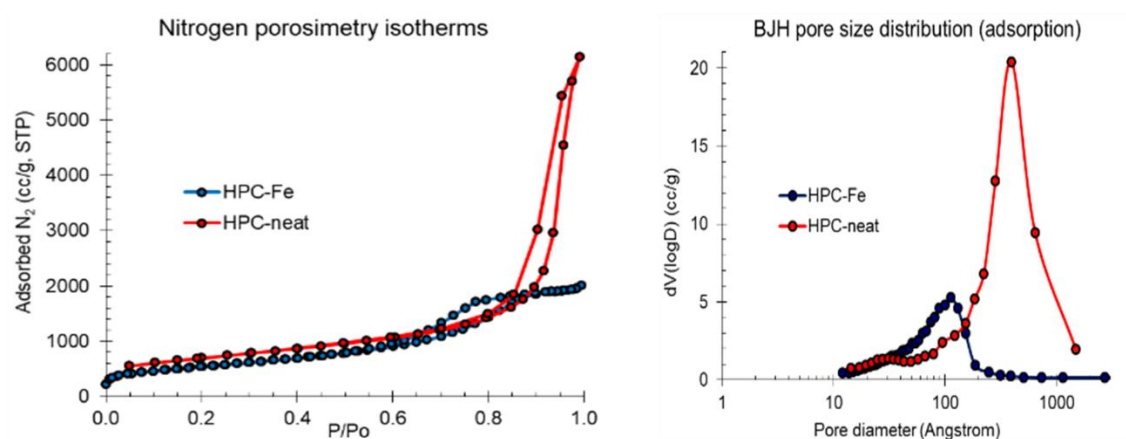
##### 2.1.2. Αποτελέσματα

Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα περιλαμβάνουν χαρακτηρισμό ποροσιμετρίας αζώτου του νανοϋλικού HPC πριν και μετά την φόρτωση των νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου NPs. Όπως μπορεί να φανεί από τον Πίνακα ΙΙ1, ο όγκος των πόρων του δείγματος HPC-Fe μειώνεται από 9.0 cm<sup>3</sup> / g σε 3.5 cm<sup>3</sup>/g. Στα 3.5 cm<sup>3</sup>/g, υπάρχει ακόμη μεγάλη ποσότητα κενών (~ 87% κατ' όγκο) που παραμένει στο HPC-Fe για φόρτωση των νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου NPs. Στην πραγματικότητα υπάρχουν αρκετά παραδείγματα στη βιβλιογραφία πορωδών υλικών άνθρακα που αναφέρουν παρόμοιες τιμές όγκου πόρων ως πολύ υψηλές. Επιπλέον, το SSA μειώνεται μόνο κατά ~ 500 m<sup>2</sup>/g στα 1938 m<sup>2</sup>/g, αφήνοντας μια καλή πλατφόρμα για καλή διασπορά / φόρτωση των νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου NP. Αυτές οι αλλαγές στις ιδιότητες της υφής μπορούν να παρατηρηθούν από τις ισοθερμικές αζώτου (Εικόνα ΙΙ1

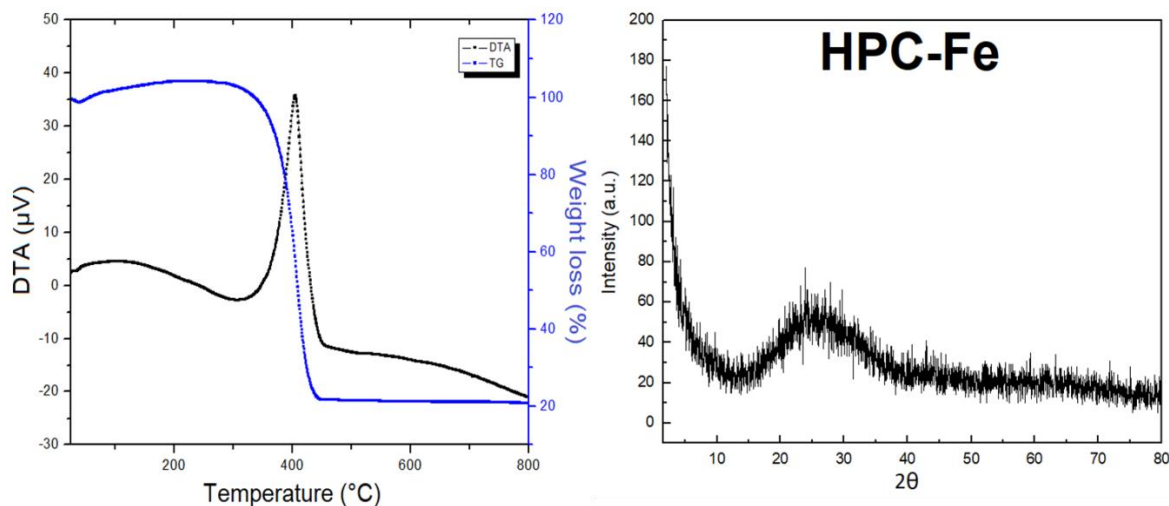
αριστερά). Η προκύπτουσα κατανομή μεγέθους πόρων (PSD) του νανοϋλικού HPC-Fe έναντι του μη φορτωμένου με νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου NP HPC υλικού (Εικόνα II1 δεξιά) δείχνει πως η προσθήκη NPs μετατοπίζει το PSD από ~ 40 nm σε ~ 11 nm.

**Πίνακας II1.** Χαρακτηριστικά της υφής του νανοϋλικού HPC πριν και μετά την φόρτωση των νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου.

Δείγμα	BET SSA [m <sup>2</sup> /g]	BJH απορρόφηση όγκος πόρων	Total pore volume at P/Po ~0.995	t-plot micropore SSA
HPC-neat	2432	9.0 cm <sup>3</sup> /g	9.3 cm <sup>3</sup> /g	415 m <sup>2</sup> /g
HPC-Fe	1938	3.5 cm <sup>3</sup> /g	3.1 cm <sup>3</sup> /g	161 m <sup>2</sup> /g



**Εικόνα II1.** (Αριστερά) N<sub>2</sub> ισόθερμες προσρόφησης και (Δεξιά) κατανομή μεγέθους πόρων (PSD) για τα υλικά HPC και HPC-Fe.



**Εικόνα 112.** Υλικό HPCFe στα αριστερά επαληθεύεται η ύπαρξη των μαγνητικών NPs οξειδίου του σιδήρου, από TGA. Στα δεξιά οι προσπάθειες για την αναγνώριση της φάσης μέσω XRD αποκάλυψαν μόνο ένα άμορφο φάσμα με νανοσωματίδια μαγνητικού σιδήρου <10 nm NPs.

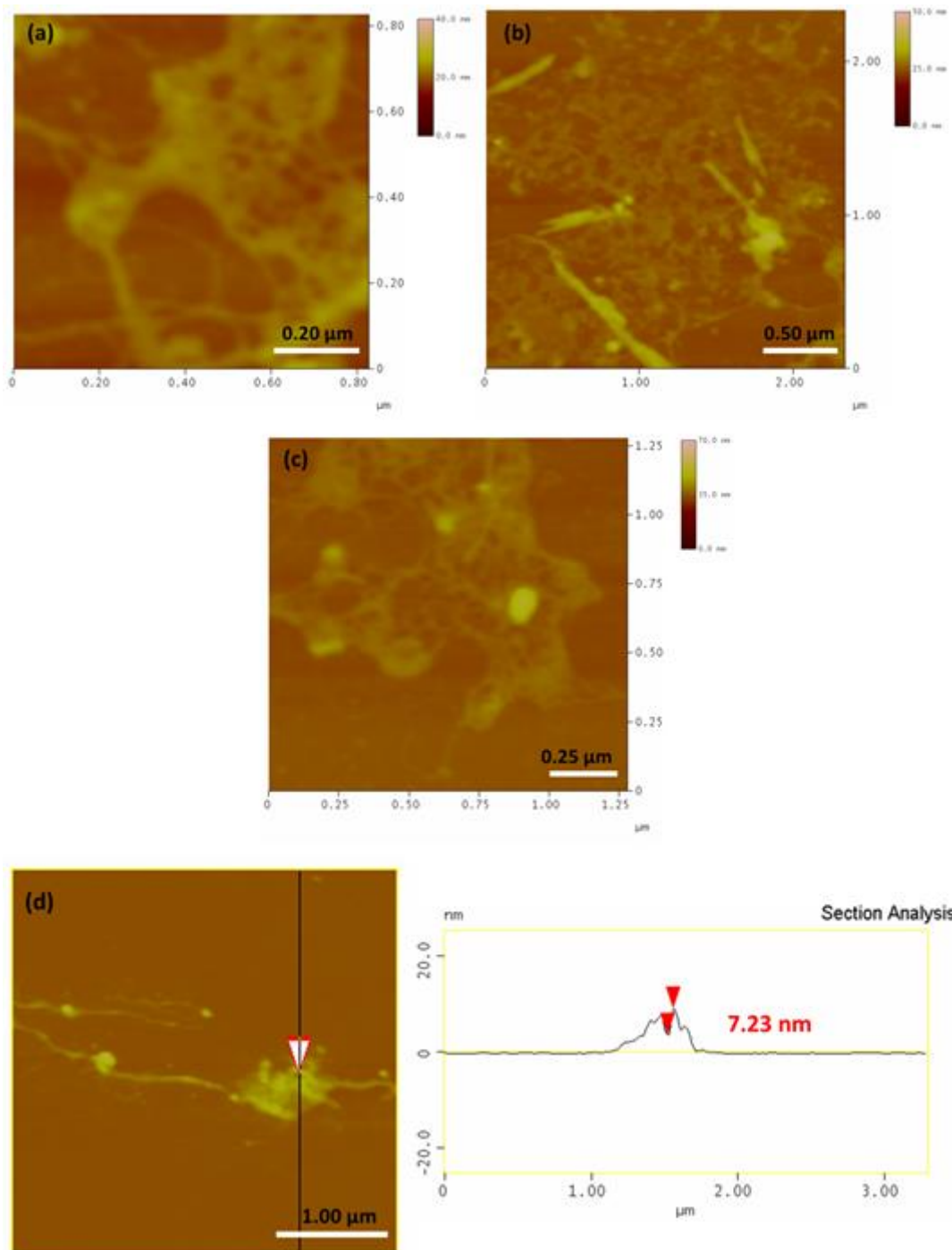
## 2.2. Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης (AFM)

### 2.2.1. Μέθοδος

Η λήψη των εικόνων έγινε σε μικροσκόπιο ατομικής δύναμης Bruker Multimode Nanoscope 3D του τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την λήψη των εικόνων ήταν αυτή της περιοδικής επαφής (Tapping Mode) με χρήση ακίδων) πυριτίου τύπου TAP300-G συχνότητας <10 nm και σταθερά δύναμης  $\sim 20\text{--}75 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ . Τα υμένια που μετρήθηκαν εναποτέθηκαν σε υποστρώματα πυριτίου (Si-wafers).

### 2.2.2. Αποτελέσματα

Αντιπροσωπευτικές εικόνες AFM των νανοϋλικών HPC και HPCFe παρουσιάζονται στην Εικόνα 113 που επιβεβαιώνει το σχηματισμό ενός δικτύου άνθρακα. Η μορφολογία σπόγγου είναι χαρακτηριστική του ιεραρχημένου πορώδους άνθρακα. Επιπλέον, η τοπογραφική εικόνα του υβριδικού συστήματος HPCFe, όπως αποκαλύπτεται από την ανάλυση της εγκάρσιας τομής, παρατηρείται στην Εικόνα 4d με μέσο μέγεθος του νανοσωματιδίου Fe των 7.23 nm που υποδηλώνει την επιτυχή ενσωμάτωση μαγνητικών νανοσωματιδίων.



**Εικόνα 113.** Εικόνα AFM ύψους του νανοϋλικού HPC (a και b) και του νανοϋλικού HPCFe (c) και τοπογραφικό προφίλ του HPCFe (d).

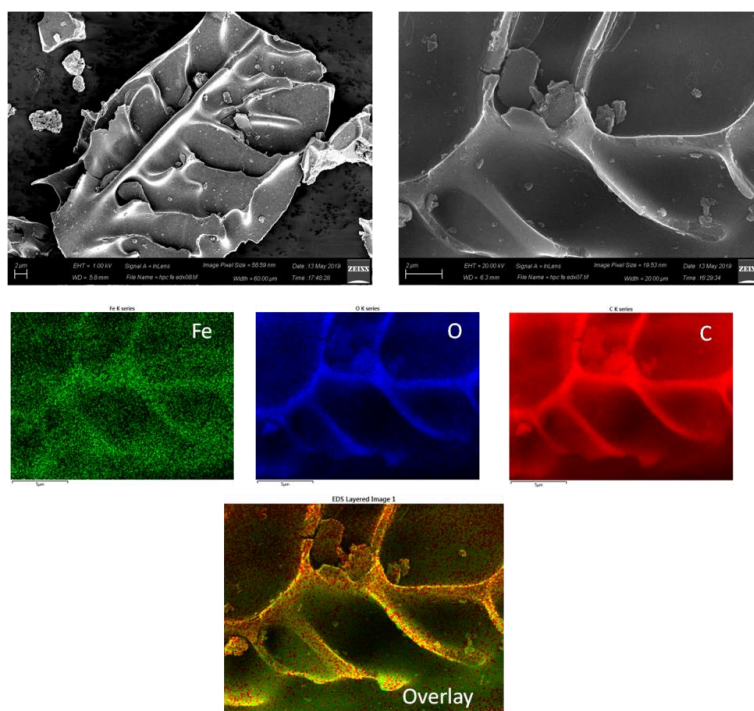
## 2.2. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης εκπομπής πεδίου

### 2.3.1. Μέθοδος

Η μορφολογία της επιφάνειας των δειγμάτων προσδιορίστηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης εκπομπής πεδίου (Field Emission Scanning Electron Microscopy, FE-SEM) χρησιμοποιώντας ηλεκτρονικό μικροσκόπιο SEM Zeiss Gemini 500 (Oberkochen, Germany). Πριν την ανάλυση SEM τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ταινία άνθρακα διπλή όψης και ψεκάστηκαν-επικαλύφθηκαν με άνθρακα. Η στοιχειακή σύσταση των δειγμάτων μελετήθηκε SEM/EDS (Φασματοσκοπία ενεργειακής διασποράς, Energy Dispersive Spectroscopy).

### 2.3.2. Αποτελέσματα

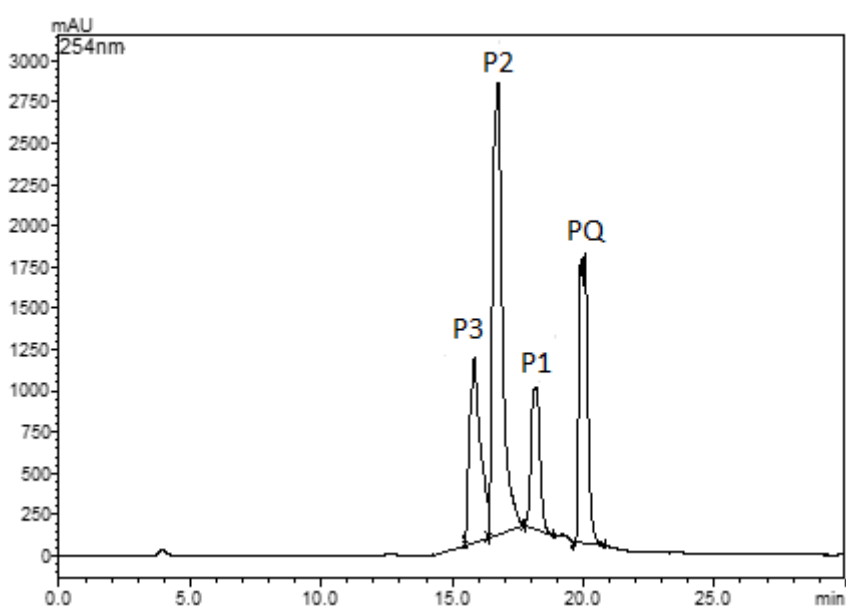
Περαιτέρω πληροφορίες μπορούν να ληφθούν με την άμεση απεικόνιση της κατανομής του οξειδίου του σιδήρου πάνω σε επιμέρους υβριδικά νανοσωματίδια χρησιμοποιώντας απεικόνιση SEM και στοιχειακή χαρτογράφηση. Οι εικόνες SEM ενός υβριδικού νανοϋλικού του HPCFe με διαφορετικές μεγεθύνσεις παρουσιάζονται στην Εικόνα II4 (γκρι εικόνες) αποκαλύπτοντας τη μορφολογία από το σχηματισμό πάγου που οδηγεί σε 1-10 μm μακροπόρους. Η κατανομή των στοιχείων άνθρακα, οξυγόνου και σιδήρου στη δομή του άνθρακα αξιολογείται μέσω χρωματισμένων χαρτών EDS, Εικόνα II4, που δείχνουν μια εξαιρετικά ομοιογενή διασπορά σωματιδίων οξειδίου του σιδήρου στα νανοσύνθετα άνθρακα.



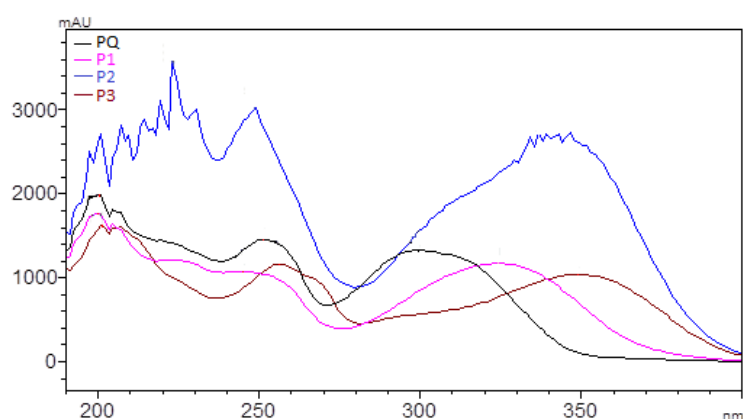
**Εικόνα II4.** Εικόνες SEM του υβριδικού νανοϋλικού HPCFe. EDS έγχρωμοι χάρτες κατανομής άνθρακα (κόκκινο), οξυγόνου (μπλε) και σιδήρου (πράσινο) και υπέρθεση αυτών.

### 3. Ανάλυση υγρής χρωματογραφίας (HPLC) της ενζυμικής αλκοόλυσης της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης

Στην Εικόνα II5 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα HPLC της αντίδρασης της ενζυμικής αλκοόλυσης της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης από τον βιοκαταλύτη HPCFe-CaLB στα 254 nm. Η υπερακετυλιωμένη κερσετίνη (PQ) που δεν αντέδρασε εκλύεται σε χρόνο έκλουσης 20.055 min, το τρι-ακετυλιωμένο ανάλογο της κερσετίνης P1 εκλύεται σε χρόνο 18.203 min, το δι-ακετυλιωμένο ανάλογο της κερσετίνης εκλύεται σε χρόνο 16.733 min, ενώ το μονοακετυλιωμένο ανάλογο της κερσετίνης P3 εκλύεται σε χρόνο 14.624 min.



**Εικόνα II5.** HPLC χρωματογράφημα της αντίδρασης αλκοόλυσης της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης από τον νανοβιοκαταλύτη HPCFe-CaLB.



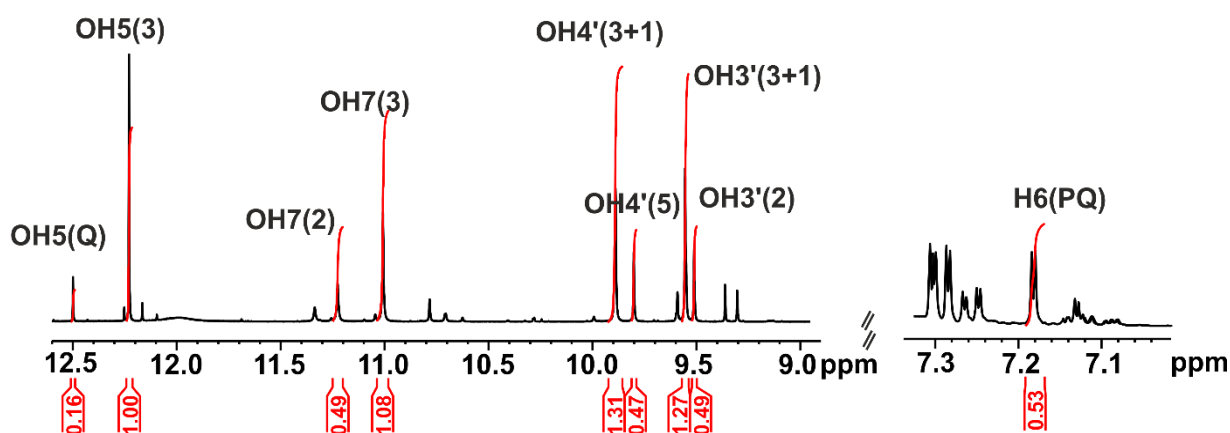
**Εικόνα II6.** Φάσμα απορρόφησης των κορυφών που παρατηρήθηκαν στο HPLC χρωματογράφημα (Εικόνα II5) της αντίδρασης αλκοόλυσης της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης από τον νανοβιοκαταλύτη HPCFe-CaLB. Υπερακετυλιωμένη κερσετίνη (PQ), τρι-ακετυλιωμένο ανάλογο της κερσετίνης P1, δι-ακετυλιωμένο ανάλογο της κερσετίνης και μονοακετυλιωμένο ανάλογο της κερσετίνης (P3)).



#### 4. Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Για τον προσδιορισμό της % απόδοσης της αντίδρασης της αλκοόλυσης της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης, ως προς κάθε προϊόν, χρησιμοποιήθηκαν τα ολοκληρώματα χαρακτηριστικών για κάθε ένωση κορυφών όπως φαίνεται στην Εικόνα II7 και η απόδοση ( $\alpha$ ) υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση:

$$\alpha = \frac{\text{Ολοκλήρωμα κορυφής προϊόντος (P)}}{\text{Ολοκλήρωμα κορυφής PQ} + \text{Άθροισμα ολοκληρωμάτων κορυφών προϊόντων}} \times 100$$



**Εικόνα II7.** Φάσματα  $^1\text{H-NMR}$  του μείγματος της ενζυμικής αλκοόλυσης της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης, με προσθήκη πικρικού οξέος. Στο φάσμα διακρίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές και τα ολοκληρώματα των ομάδων  $-\text{OH}$  των ενώσεων υπερακετυλιωμένη κερσετίνη (PQ), (3,5-διακετοξυ-7,3,4-τριυδροξυφλαβόνη (P1), 3,5,7-τριακετοξυ-3,4διυδροξυφλαβόνη (P2), 3-ακετοξυ-τετραϋδροξυφλαβόνη (P3) και κερσετίνη (Q).

#### 4.1. Ο πλήρης χαρακτηρισμός της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης και των μερικώς ακετυλιωμένων προϊόντων μέσω 1D $^1\text{H}$ NMR και 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC, 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC:

Υπερακετυλιωμένη κερσετίνη (PQ):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C) έχει ως ακολούθως:  $\delta$  = 2.318 (s, 3H, 3c), 2.336 (s, 3H, 5c), 2.340 (s, 3H, 7c), 2.335 (s, 3H, 3'c), 2.329 (s, 3H, 4'c), 7.18 (d,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.18$  Hz, 1 H, 6-H), 7.65 (d,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.20$  Hz, 1 H, 8-H), 7.84 (m, 1 H, 2'-H), 7.53 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.17$  Hz, 1 H, 5'-H), 7.85 (m, 1 H, 6'-H) ppm.  $^{13}\text{C}$ -NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  = 154.27 (C2), 134.19 (C3), 170 (C4), 150.2 (C5), 115.41 (C6), 155 (C7), 110.69 (C8), 157 (C9), 114.98 (C10), 124.64 (C1'), 124.4 (C2'), 145,3 (C3'), 143.28 (C4'), 125,2 (C5'), 127.41 (C6'), 21.3 (C3,5,7,3',4' c), 168 (C3b), 169 (C5,7,3',4' b) ppm.

3,5,7-τριακετοξυ-3',4'-διυδροξυφλαβόνη (P1):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  = 2.338 (s, 3 H, 7c-H), 2.323 (s, 3 H, 5c-H), 2.335 (s, 3 H, 3c-H), 7.125 (d,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.18$  Hz, 1 H, 6-H), 7.599 (d,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.18$  Hz, 1 H, 8-H), 6.89 (m, 1 H, 2'-H), 9.547 (s, 1 H, 3'-OH), 9.887 (s, 1 H, 4'-OH), 7.32 (m, 1 H, 5'-H), 7.25 (m, 1 H, 6'-H) ppm.  $^{13}\text{C}$ NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  = 155.6 (C2), 132.3 (C3), 150.2 (C5), 115 (C6), 154.7 (C7), 110.4 (C8), 156.8 (C9), 114.5 (C10), 120.5 (C1'), 116.79 (C2'), 146,22 (C3'), 150.12 (C4'), 115.73 (C5'), 121.06 (C6'), 21 (C3,5,7c), 173.7 (C3,5,7b) ppm.

3,5-διακετοξυ-7,3',4'-τριυδροξυφλαβόνη (P2):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  = 2.28 (s, 3 H, 5c-H), 2.30 (s, 3 H, 3c-H), 6.60 (d,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.30$  Hz, 1 H, 6-H), 6.88 (d,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.30$  Hz, 1 H, 8-H), 11.22 (s, 1 H, 7-OH), 6.87 (m, 1 H, 2'-H), 9.50 (s, 1 H, 3'-OH), 9.79 (s, 1 H, 4'-OH), 7.33 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.26$  Hz, 1 H, 5'-H), 7.24 (dd,  $^3J_{\text{H,H}} = 8.48$  Hz, 1 H, 6'-H) ppm.  $^{13}\text{C}$ -NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  = 155.6 (C2), 132.8 (C3), 169.6 (C4), 151.4 (C5), 109.8 (C6), 163.25 (C7), 101.5 (C8), 158.2 (C9), 109.7 (C10), 120.4 (C1'), 116.79 (C2'), 149,8 (C3'), 146.34 (C4'), 115.73 (C5'), 121.06 (C6'), 21 (C3,5c), 173.7 (C3,5b) ppm.

3-ακετοξυ-5,7,3',4'-τετραυδροξυφλαβόνη (P3):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  = 2.334 (s, 3 H, 3c), 12.21 (s, 1H, 5-OH), 6.24 (d,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.07$  Hz, 1 H, 6-H), 11.00 (s, 1 H, 7-OH), 6.48 (d,  $^4J_{\text{H,H}} = 2.07$  Hz, 1 H, 8-H), 7.33 (m, 1 H, 2'-H), 9.54 (s, 1 H, 3'-OH), 9.88 (s, 1 H, 4'-OH), 6.91 (m, 1 H, 5'-H), 7.28 (m, 1 H, 6'-H) ppm.  $^{13}\text{C}$ -NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ , 25 °C):  $\delta$  = 156.76 (C2), 130.6 (C3), 175.3 (C4), 161.6 (C5), 99.6 (C6), 165.3 (C7), 94.7 (C8), 157.4 (C9), 104.5 (C10), 120.5 (C1'), 116.76 (C2'), 146,22 (C3'), 150.12 (C4'), 115.69 (C5'), 121.15 (C6'), 21 (C3c), 168.9 (C3b) ppm.

**5. Βελτιστοποίηση της σύνθεσης του αναλόγου 3,5,7-τριακετοξυ-3',4'-διυδροξυφλαβόνης (P1) με την χρήση της μεθοδολογίας επιφάνειας απόκρισης.**

**Πίνακας II2.** Η επίδραση των παραμέτρων της αντίδρασης στην συγκέντρωση του αναλόγου P1.

Συγκέντρωση του P1 (g L <sup>-1</sup> )	Επίδραση	Διάστημα εμπιστοσύνης (±)
RT*RT	-2.767	0.368
E*RT	-1.247	0.226
E*E	-0.775	0.368
RT	0.634	0.202
E	0.616	0.202
MR	0.333	0.202
E*MR	0.247	0.226

**Πίνακας II3.** Η επίδραση των παραμέτρων της αντίδρασης στην % μετατροπή της υπερακετυλιωμένης κερσετίνης (PQ).

Μετατροπή της PQ %	Επίδραση	Διάστημα εμπιστοσύνης (±)
RT	41.879	4.424
E*E	-30.501	8.040
E	30.186	4.424
RT*RT	-10.897	8.040
E*RT	9.587	4.947
MR	4.506	4.424

## 5.1 Στατιστικά εργαλεία

### 1. Επίπεδο εμπιστοσύνης

Έστω  $X_1, \dots, X_n$  ένα τυχαίο δείγμα με μία άγνωστη παράμετρο  $\theta$ .

Έστω  $L = L(X_1, \dots, X_n)$  και  $U = U(X_1, \dots, X_n)$  το κάτω και άνω όριο ενός διαστήματος αντίστοιχα. Τα όρια αυτά είναι συναρτήσεις των τυχαίων μεταβλητών του δείγματος. Το **επίπεδο εμπιστοσύνης** φανερώνει την πιθανότητα το διάστημα  $(L, U)$  να περιέχει το  $\theta$ , δηλαδή:

$$\text{Επίπεδο εμπιστοσύνης} = P(L < \theta < U) = 1 - \alpha$$

και συμβολίζεται με  $100(1 - \alpha)\%$ .

### 2. Τιμή $p$

Η τιμή  $p$  ενός στατιστικού τεστ είναι η μικρότερη τιμή του επιπέδου σημαντικότητας  $\alpha$  για την οποία απορρίπτεται η αρχική υπόθεση βάσει των παρατηρούμενων δεδομένων. Η τιμή του  $\alpha$  δίνεται από την σχέση:

$$p(x) = P(T(X) \geq T(X_0) | H_0)$$

όπου,  $T(X) \geq C_\alpha$  είναι η κρίσιμη περιοχή του τεστ με  $T(X)$  το κατάλληλο στατιστικό για τον έλεγχο,  $T(X_0)$  η τιμή του στατιστικού που καθορίζει την κρίσιμη περιοχή και  $C_\alpha$  σταθερά τέτοια ώστε να έχουμε τεστ επιπέδου  $\alpha$ .

Αν  $\alpha > p$  η αρχική υπόθεση απορρίπτεται.

### 3. Πολλαπλή ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης (MLR)

Η πολλαπλή ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης εφαρμόζεται για την εύρεση της σχέσης ανάμεσα σε διάφορες ανεξάρτητες μεταβλητές με μία εξαρτημένη μεταβλητή. Το πρόγραμμα MODDE 7.0 (Umetrics AB, Umeå, Sweden) χρησιμοποιεί την ανάλυση ιδιοζουσών τιμών (Singular Value Decomposition, SVD) για την επίλυση του συστήματος εξισώσεων:

$$Y = X * B + E$$

Όπου  $Y$  ένας  $n * m$  πίνακας αποκρίσεων,  $X$  ένας  $n * p$  πίνακας, με  $p$  τον αριθμό των όρων του μοντέλου συμπεριλαμβανομένης και της σταθεράς,  $B$  ο πίνακας των συντελεστών παλινδρόμησης και  $E$  ο πίνακας των υπολοίπων.

### 4. Ανάλυση διακύμανσης, ANOVA

Η ανάλυση διακύμανσης (Analysis Of Variance, ANOVA) εξετάζει τη σχέση της εξαρτημένης μεταβλητής με τις ανεξάρτητες, κατανέμοντας στην ουσία τη συνολική διακύμανση  $SS$  σε ένα μέρος εξαιτίας του μοντέλου παλινδρόμησης και σε ένα μέρος εξαιτίας των υπολοίπων. Ισχύει δηλαδή,

$$SS = SS_{\text{regr}} + SS_{\text{resid}}$$

Η ανάλυση της διακύμανσης μπορεί να παρουσιασθεί ως εξής:

Πηγή Μεταβλητότητας	Βαθμοί Ελευθερίας	Άθροισμα Τετραγώνων	Μέσο τετράγωνο	F-test
Παλινδρόμηση	$DF = n - p - \sum_k (n_k - 1)$	$SSR = \sum_{i=1}^v (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$MSR = \frac{SSR}{DF}$	$F = \frac{MSR}{MSE}$
Υπόλοιπα	$DF_{resid} = (n - p)$	$SSE = \sum_{i=1}^v (y_i - \hat{y})^2$	$MSE = S^2 = \frac{SSE}{DF_{resid}}$	
Ολική	$DF_{tot} = (n + p)$	$SST = \sum_{i=1}^v (y_i - \bar{y})^2$		

όπου n: ο αριθμός των πειραμάτων

nk: ο αριθμός των επαναλήψεων στο k σετ

p: ο αριθμός των όρων του μοντέλου, συμπεριλαμβανομένης της σταθεράς

Εάν υπάρχουν επαναλαμβανόμενα δεδομένα τότε το άθροισμα τετραγώνων των υπολοίπων κατανέμεται περαιτέρω στο καθαρό σφάλμα  $SS_{pe}$  και την έλλειψη προσαρμογής  $SS_{lof}$ :

$$SS_{resid} = SS_{lof} + SS_{pe}$$

Και ισχύει:  $SS_{pe} = \sum_{ki} (e_{ki} - e_k)^2$

$$DF_{pe} = \sum_k (n_k - 1)$$

$$DF_{lof} = n - p - \sum_k (n_k - 1)$$

## 5. Στατιστικός έλεγχος F

Οι στατιστικές συναρτήσεις SSR και SSE είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους και τα μέσα τετράγωνα ακολουθούν την  $\chi^2$  κατανομή με βαθμούς ελευθερίας τους αντίστοιχους των αθροισμάτων των τετραγώνων. Επομένως η συνάρτηση F ακολουθεί την  $F_{1, n-2}$  κατανομή και μπορεί να χρησιμοποιηθεί, για να ελέγξουμε την σημαντικότητα της παλινδρόμησης. Ουσιαστικά ελέγχουμε την ισχύ της υπόθεσης, ότι τα δεδομένα μας μπορούν να περιγραφούν ικανοποιητικά από το μοντέλο.

Στην ANOVA δίδονται:

Το τεστ ποιότητας προσαρμογής της Παλινδρόμησης:  $F = \frac{MSR}{MSE}$

και το τεστ ποιότητας προσαρμογής της Έλλειψης προσαρμογής:  $F = \frac{SS_{lof}/DF_{lof}}{SS_{pe}/DF_{pe}}$

## 6. Μέτρα Ποιότητας Προσαρμογής (Goodness of Fit)

### Συντελεστής προσδιορισμού $R^2$

Με τον συντελεστή προσδιορισμού  $R^2$  μπορούμε να ελέγξουμε την αξία του γραμμικού μοντέλου, το οποίο προσαρμόζουμε στα δεδομένα. Ο συντελεστής προσδιορισμού εκφράζει το ποσοστό της μεταβλητότητας της απόκρισης  $Y$  που εξηγείται από το μοντέλο. Όσο πιο κοντά βρίσκεται η τιμή του  $R^2$  στην μονάδα, τόσο πιο ισχυρή γίνεται η γραμμική σχέση εξάρτησης των μεταβλητών.

$$\text{Ισχύει ότι: } R^2 = \frac{(SS - SS_{\text{resid}})}{SS}$$

### Παράμετρος $Q^2$

Η παράμετρος αυτή εκφράζει το ποσοστό μεταβλητότητας της απόκρισης  $y$  η οποία προβλέπεται από το μοντέλο.

$$\text{Ισχύει ότι: } Q^2 = \frac{(SS - PRESS)}{SS}$$

$$\text{Όπου, } PRESS = \sum_i \frac{(y - \bar{y})^2}{(1 - h_i)^2}$$

Και  $h_i$  το  $i$  διαγώνιο στοιχείο του πίνακα  $Hat(H)$ , ο οποίος συσχετίζει τις προβλεπόμενες  $y$  με τις παρατηρούμενες τιμές  $y$ .

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

### 1. Σύνθεση των πορώδων κυβοειδών ανθράκων οξειδωμένων και μη (PCC και PCCox)

Για την σύνθεση των PCC ακολουθήθηκε η ίδια πορεία όπως περιγράφεται από τους Karegeorgou et al., (Karageorgou et al., 2019). Πιο συγκεκριμένα προετοιμάστηκαν δύο διαλύματα. Το πρώτο αποτελούνταν από 1 g από pluronic διαλυμένο σε in 100 mL 0.1 M 4,4'-διπυριδίνης σε μείγμα νερού-αιθανόλης σε αναλογία 1:17 και το δεύτερο διάλυμα ήταν ένα υδατικό διάλυμα χλωριούχου χαλκού (II) (900 mL, 5.6 mM  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Το πρώτο διάλυμα προστέθηκε στο δεύτερο υπό έντονη ανάδευση. Τα σχηματιζόμενα προϊόντα ανακτήθηκαν με φυγοκέντρηση, πλύθηκαν τρεις φορές με νερό και ξηράθηκαν στον αέρα. Το προϊόν στη συνέχεια πυρολύθηκε υπό ροή αργού ( $500^\circ\text{C}$  για 2 h) και τα είδη χαλκού εκπλύθηκαν (αναδεύτηκαν σε υδατικό διάλυμα 4M  $\text{HNO}_3$  για 24 h). Η τελική μαύρη σκόνη συλλέχθηκε με ξήρανση στον αέρα αφού πρώτα έγινε πλύση με νερό μέχρις ότου η τιμή pH να φτάσει  $\sim 5.0$ .

Ομοίως, στη συνέχεια το νανοϋλικό PCC υποβλήθηκε σε επεξεργασία με ισχυρούς οξειδωτικούς παράγοντες χρησιμοποιώντας μια τροποποιημένη μέθοδο του Staudenmaier, προκειμένου να εισαχθούν πιο δραστικές ομάδες (PCCox) (Gengler et al., 2010; Karageorgou et al., 2019; Liaros et al., 2016; Staudenmaier, 1898; Stergiou et al., 2010). Επιπροσθέτως, 70 mg PCC προστέθηκαν σε μείγμα  $\text{H}_2\text{SO}_4$  και  $\text{HNO}_3$  (1.4 mL και 2.8 mL, αντίστοιχα) διατηρώντας ταυτόχρονα τη θερμοκρασία στους  $\sim 0^\circ\text{C}$  σε λουτρό νερού-πάγου. Υπό συνεχή ανάδευση και ψύξη, μικρές ποσότητες  $\text{KClO}_3$  (0.7 g συνολικά) προστέθηκαν αργά στο μείγμα. Η αντίδραση τερματίστηκε μετά από 18 h με έκχυση του μείγματος σε απεσταγμένο νερό και το τελικό προϊόν πλύθηκε μέχρι η τιμή του pH να φτάσει  $\sim 6,0$  και στη συνέχεια ξηράθηκε σε θερμοκρασία δωματίου.

### 2. Χαρακτηρισμός των νανοϋλικών PCC και PCCox

#### 2.1 Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης (AFM)

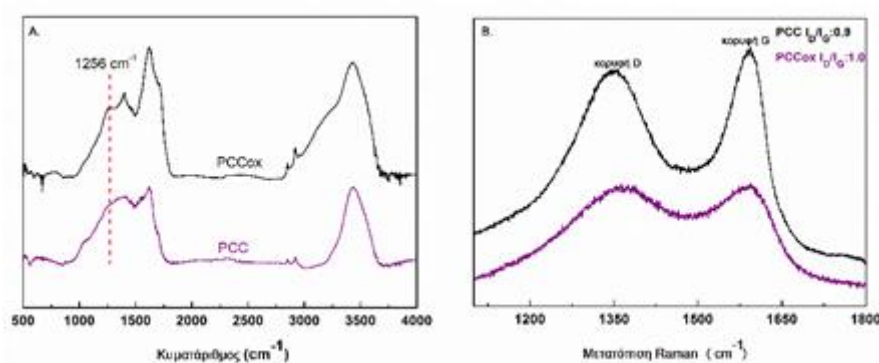
Η λήψη των εικόνων έγινε σε μικροσκόπιο ατομικής δύναμης (Atomic force microscopy, AFM) Bruker Multimode Nanoscope 3D του τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την λήψη των εικόνων ήταν αυτή της περιοδικής επαφής (Tapping Mode) με χρήση ακίδων πυριτίου τύπου TAP300-G συχνότητας  $<10\text{ nm}$  και σταθερά δύναμης  $\sim 20\text{--}75\text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ . Τα υμένια που μετρήθηκαν εναποτέθηκαν σε υποστρώματα πυριτίου (Si-wafers).

#### 2.2 Φασματοσκοπία Raman

Η λήψη των φασμάτων Raman πραγματοποιήθηκε σε ένα Micro-Raman σύστημα RM 1000 (RENISHAW, Old Town, UK). Η διέγερση του δείγματος έγινε από πηγή laser στα 532 nm (Nd-YAG) του τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Το φάσμα καταγράφηκε σε εύρος  $1100\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ . Κατά τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε ισχύς 0.5 έως 1 mW με σημείο εστίασης 1  $\mu\text{m}$  για να αποφευχθεί η φωτοαποσύνθεση των δειγμάτων. Η διασπορά Raman συλλέχθηκε μέσω οπτικού μικροσκοπίου εξοπλισμένου με φακούς 50x και 100x.

### 2.3 Αποτελέσματα-Συζήτηση

Για τον χαρακτηρισμό των νανοϋλικών χρησιμοποιήθηκαν διάφορες φασματοσκοπίες όπως Raman, FTIR και XPS. Τα φάσματα υπέρυθρου των PCC και PCCox απεικονίζονται στην Εικόνα III1. Στα φάσματα υπέρυθρης ακτινοβολίας (IR) του PCC, οι κορυφές μεταξύ  $2843$  και  $2931\text{ cm}^{-1}$  οφείλονται στις δονήσεις έκτασης των ομάδων  $\text{CH}_2$ , ενώ η ευρεία κορυφή στα  $3431\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στην παραμορφωμένη κορυφή του  $\text{H}_2\text{O}$ , η οποία είναι ενδεικτική της υδρόφιλης φύσης του υλικού με βάση τον άνθρακα. Η ασθενής ζώνη των δονήσεων έκτασης υδροξυλίου των ομάδων  $\text{C-OH}$ , που αναμένεται γύρω στα  $3550\text{ cm}^{-1}$  (Bourlinos et al., 2003), δεν είναι ορατή δεδομένου ότι υπερκαλύπτεται από την ευρεία κορυφή του νερού. Επιπλέον, η κορυφή στα  $1402\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στην αρωματική λειτουργική ομάδα  $\text{C=C}$ , ενώ η κύρια κορυφή στα  $1623\text{ cm}^{-1}$  οφείλεται σε δονήσεις έκτασης του δεσμού  $\text{C=O}$  των καρβοξυλομάδων (Sργου et al., 2014). Η τελευταία είναι πιο έντονη στην περίπτωση του φάσματος των PCCox λόγω του υψηλότερου βαθμού οξείδωσης. Με τον ίδιο τρόπο, η κορυφή στα  $1256\text{ cm}^{-1}$ , λόγω των δονήσεων των εποξειδικών ομάδων (COC) (Bellamy, 1980; Enotiadis et al., 2012; Simons and Sadtler Research Laboratories, 1978), είναι πιο διακριτή στο δείγμα PCCox, σε σύγκριση με το μη τροποποιημένο PCC, ως εξαιτίας της εκτεταμένης διεργασίας οξείδωσης.



**Εικόνα III1.** (A) FTIR φάσμα των PCC και PCCox, (B) Φάσμα Raman των PCC και PCCox.

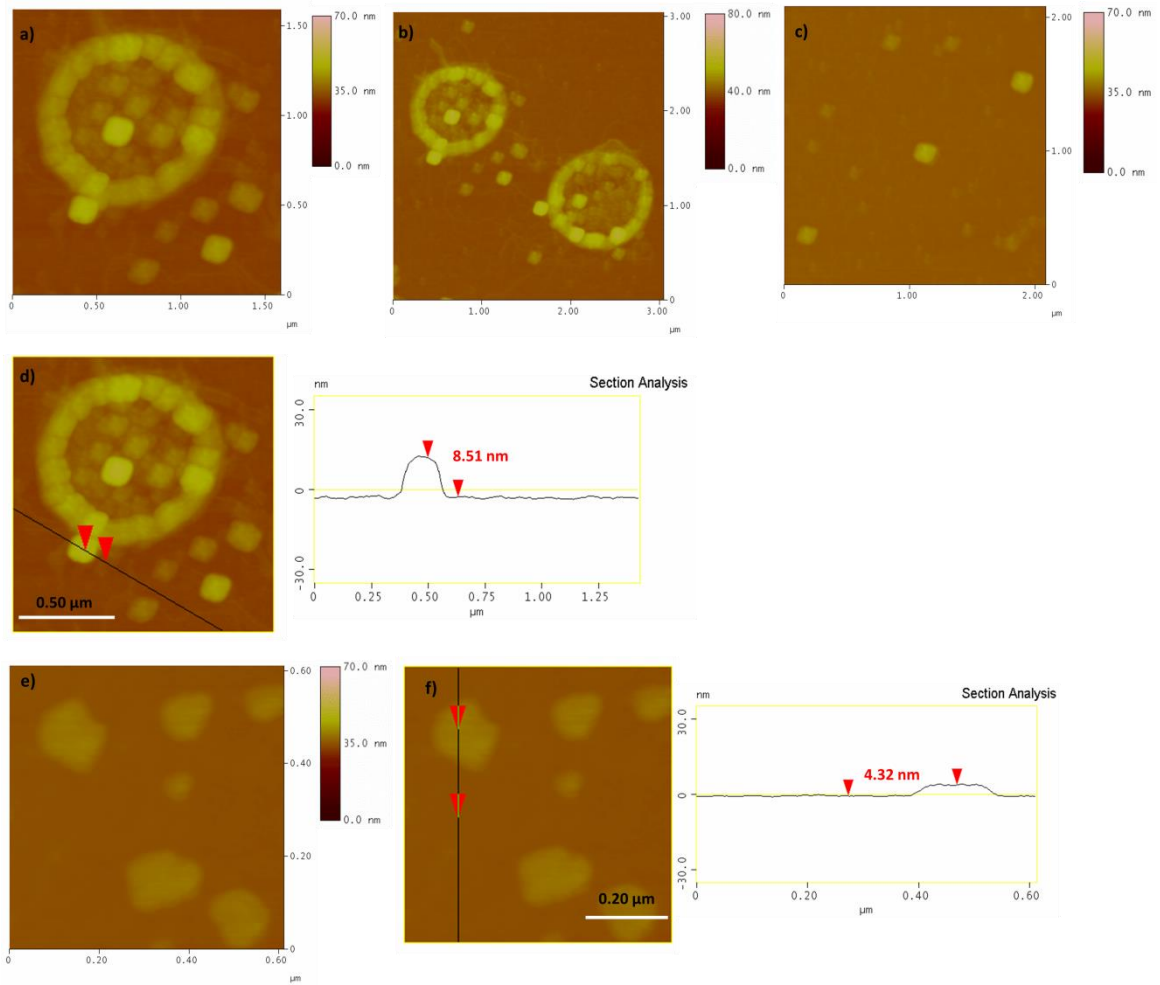
Τα φάσματα Raman PCC πριν και μετά την οξείδωση παρουσιάζονται στην Εικόνα III1 B. Οι δύο χαρακτηριστικές κορυφές γραφίτη, στα  $1350$ - $1370$  και  $1593\text{ cm}^{-1}$  που αντιστοιχούν σε D και G ζώνες γραφίτη, αντίστοιχα, παρατηρήθηκαν και στα φάσματα Raman και των δύο νανοϋλικών. Η ζώνη D συνδέεται με έναν  $\text{sp}^3$ -υβριδοποιημένο άνθρακα, ενώ η Z-ζώνη συνδέεται με ένα  $\text{sp}^2$ -υβριδισμένο άτομο άνθρακα. Ο λόγος εντάσεων ID/IG εκφράζει το βαθμό διαταραχής του πλέγματος άνθρακα. Μετά την οξείδωση, ο λόγος αυξήθηκε ελαφρά σε  $1.0$  (από  $0.9$  στο μη τροποποιημένο PCC), πράγμα που δείχνει μια μεταβολή στην υβριδοποίηση των ατόμων άνθρακα από  $\text{sp}^2$  σε  $\text{sp}^3$  λόγω της αύξησης του πληθυσμού των ομάδων που περιέχουν οξυγόνο, ως αποτέλεσμα της διαδικασίας οξείδωσης (Zygori et al., 2018).

Η επιτυχής οξείδωση των PCC επιβεβαιώθηκε και με φασματοσκοπία XPS. The results of pristine PCC and oxidized PCC (PCCox) have been reported in our previous work (Karageorgou et al., 2019). Σύμφωνα με αυτή τη μελέτη, τα μη τροποποιημένα PCC διαθέτουν λειτουργικές



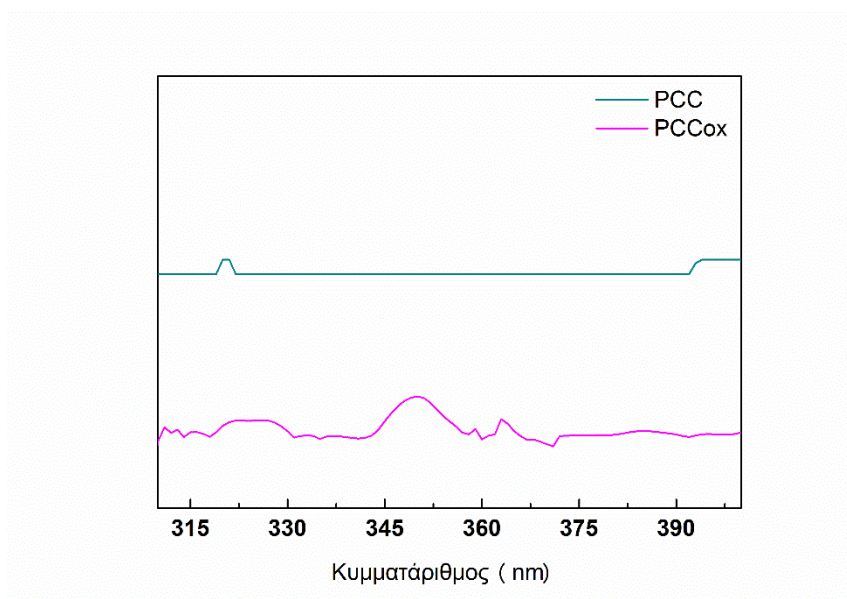
ομάδες οξυγόνου, εκτός από το κύριο πλαίσιο C-C, όπως C-O, C=O, και C(O)O. Μετά την οξείδωση, διαπιστώνεται μία σημαντική μείωση των δεσμών C-C (από 51.6 % για το PCC, σε 34 % για το PCCox) από την εισαγωγή πολλαπλών ομάδων οξυγόνου στο κύριο σώμα των PCC. Οι περισσότερες από τις λειτουργικές ομάδες οξυγόνου αυξήθηκαν σε αναλογία (όπως οι C-OH και οι C(O)O), ενώ παρατηρήθηκε και η εισαγωγή μιας επιπλέον κορυφής, που προέρχεται από τις εποξυ ομάδες λόγω της οξείδωσης του υλικού.

Αντιπροσωπευτικές εικόνες AFM των PCC και PCCox παρουσιάζονται στην Εικόνα III2, η οποία επιβεβαιώνει τον σχηματισμό κυβοειδούς δομής. Επιπλέον, η τοπογραφική εικόνα ενός απομονωμένου κυβοειδούς, όπως αποκαλύπτεται από την ανάλυση διατομής, παρατηρείται στην Εικόνα III2d με μέσο πάχος 8.51 nm. Συνεπώς, από τις εικόνες AFM του PCCox, παρατηρείται σαφώς ότι η διαδικασία οξείδωσης επηρέασε το κυβοειδές σχήμα των νανοδομών άνθρακα, καθώς και το πάχος του PCCox, το οποίο μειώνεται, όπως φαίνεται στην Εικόνα III2. Οι τιμές αυτές συμφωνούν και με προηγούμενες εργασίες (Karageorgou et al., 2019). Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι, ενώ συχνά παρατηρούνται απομονωμένοι κύβοι στην επιφάνεια του Si-wafer, υπάρχουν περιοχές όπου τα PCC τείνουν να οργανωθούν σε δακτυλοειδείς δομές, με την ενσωμάτωση των μονομερών κυβοειδών (Εικόνες III2α,β και d). Αυτή η συμπεριφορά μπορεί να οφείλεται σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών νανοσωματιδίων σε νερό, όπου σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου (μέσω των καρβοξυλικών και /ή υδροξυλικών ομάδων) μεταξύ γειτονικών κυβοειδών, πράγμα που έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας 2D δακτυλοειδούς υπερμοριακής δομής στο επιφάνεια του Si-wafer. Στην πραγματικότητα, όταν το pH αυξάνεται σε 11.0 (από 5.6 που ήταν αρχικά), λόγω της αποπρωτονίωσης των καρβοξυλικών (ή υδροξυλικών) ομάδων, η ενδομοριακή σύνδεση υδρογόνου δεν ήταν πλέον δυνατή και δεν παρατηρείται δακτυλοειδής υπερμοριακή δομή στην επιφάνεια. Η παρουσία ύδατος φαίνεται να είναι κρίσιμη για τον σχηματισμό αυτών των δομών που μοιάζουν με δακτυλίους, αφού, όταν πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε αιθανόλη (αντί για νερό), δεν παρατηρήθηκαν παρόμοιοι σχηματισμοί δακτυλίου. Από την άλλη πλευρά, τα οξειδωμένα PCC, λόγω του μεγαλύτερου αριθμού λειτουργικών ομάδων οξυγόνου στην επιφάνεια τους, είναι πιο υδρόφιλα από τα μη τροποποιημένα PCCs και προτιμούν να είναι διασπειρόμενα και απομονωμένα στο υδατικό μέσο. Έτσι, κατά την εναπόθεση, η πλειονότητα δεν τείνει να συσσωματώνεται σε δομές δακτυλίων (Εικόνα III3 e και f).



**Εικόνα III3.** Εικόνες AFM ύψους και τοπογραφικό προφίλ του PCC (a–d) και PCCox (e–f).

Τα φάσματα φθορισμού των νανοϋλικών PCC και PCCox (Εικόνα III3), όπου το μήκος διέγερσης ρυθμίστηκε στα 280 nm και η ένταση εκπομπής καταγράφηκε στην περιοχή 300 έως 400 nm, φαίνεται ότι δεν εμφανίζεται η χαρακτηριστική κορυφή ενζύμου στα 320 nm



**Εικόνα III3.** Φάσμα φθορισμού των νανοϋλικών PCC και PCCox.

Η περιεκτικότητα % των ατόμων C,O,N, και ο λόγος C / N της ομοιοπολικά ή μη ομοιοπολικά ακινητοποιημένης Tmbgl στα PCC και PCCox, προσδιορίστηκαν με XPS και παρουσιάζονται στους Πίνακες III1 και III2.

**Πίνακας III1.** Ατομικά ποσοστά των νανοβιοκαταλυτών PCC-Tmbgl-cov, PCC-Tmbgl-nc, PCCox-Tmbgl-cov, και PCCox-Tmbgl-nc.

Δείγμα	Ποσοστό %		
	C	O	N
PCC-Tmbgl-cov	75.1 ± 3.0	14.1 ± 1.1	10.8 ± 0.9
PCC-Tmbgl-nc	75.1 ± 3.0	13.5 ± 1.1	11.4 ± 0.9
PCCox-Tmbgl-cov	55.5 ± 2.2	40.7 ± 2.4	3.8 ± 0.3
PCCox-Tmbgl-nc	72 ± 2.9	23 ± 1.4	5 ± 0.4

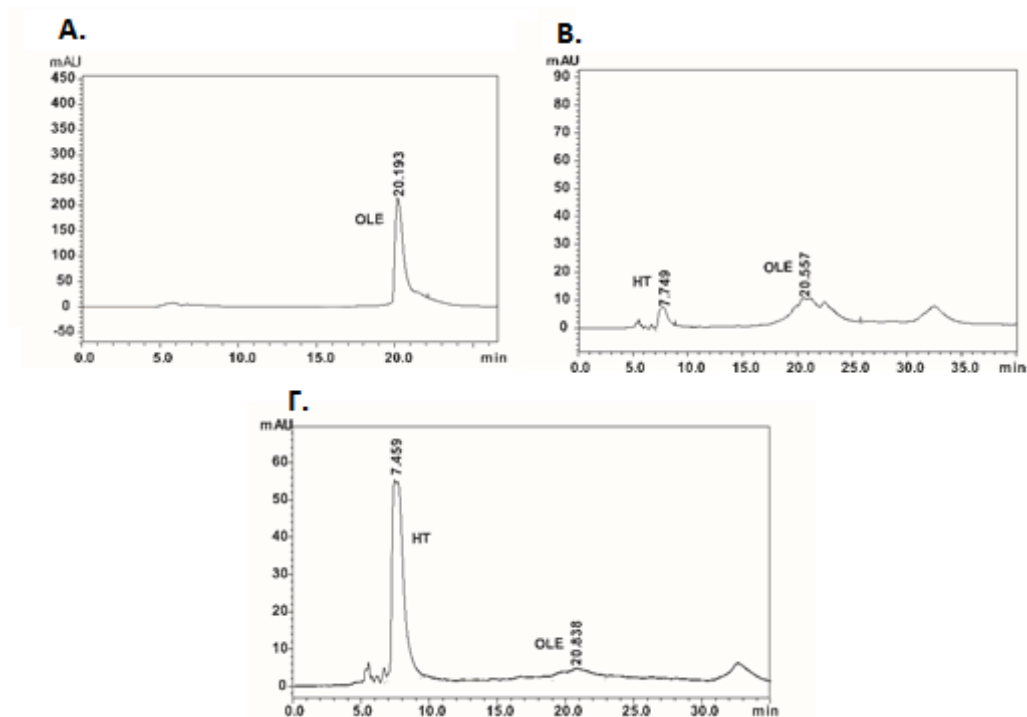
**Πίνακας III2.** Ο λόγος C/N των νανοβιοκαταλυτών PCC-Tmbgl-cov, PCC-Tmbgl-nc, PCCox-Tmbgl-cov, και PCCox-Tmbgl-nc.

<b>Δείγμα</b>	<b>Λόγος C/N</b>
PCC-Tmbgl-cov	6.9
PCC-Tmbgl-nc	6.6
PCCox-Tmbgl-cov	14.6
PCCox-Tmbgl-nc	14.4

### **3. Ανάλυση υγρής χρωματογραφίας HPLC**

#### **3.1. Ανάλυση χρωματογραφίας HPLC της μετατροπής της ελευρωπαϊνης σε υδροξυτυροσόλη**

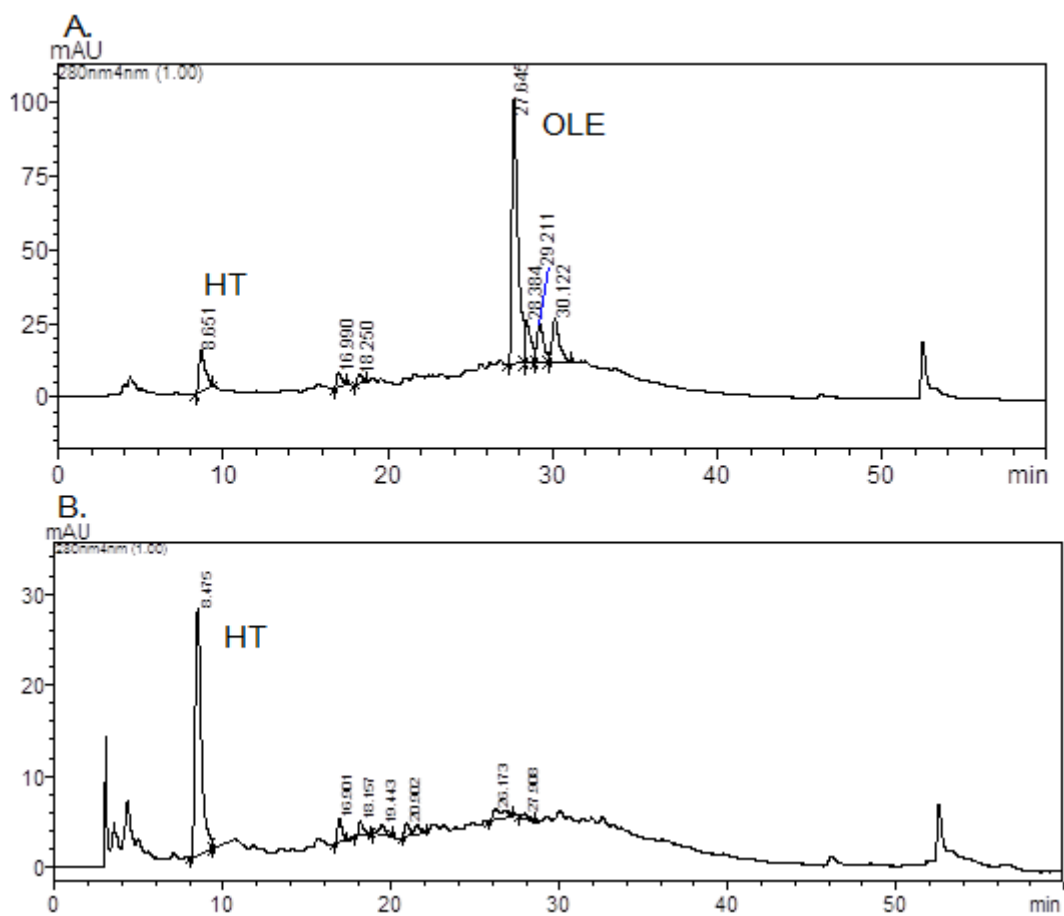
Στην Εικόνα III4 απεικονίζονται τα φάσματα HPLC των διαφορετικών βημάτων της χημιοενζυμικής τροποποίησης της ελευρωπαϊνης. Το χρωματογράφημα της ελευρωπαϊνης πριν την τροποποίηση φαίνεται στην Εικόνα III4 Α. Μετά την ενζυμική υδρόλυση της ελευρωπαϊνης από την ακινητοποιημένη β-γλυκοσιδάση για 24 h, η κορυφή της ελευρωπαϊνης (20.19 min) έχει μειωθεί σημαντικά, ενώ παρατηρείται ένας αριθμός διευρυμένων κορυφών σε εύρος 20–23 min (Εικόνα III4 Β). Αυτές οι κορυφές αποδίδονται σε ενδιάμεσα προϊόντα της αποικοδόμησης της ελευρωπαϊνης (Liu and Yong, 2018). Μία μικρή κορυφή υδροξυτυροσόλης επίσης παρατηρείται σε χρόνο 7.7 min. Μετά την επώαση του μείγματος της αντίδρασης στους 60 °C, pH 7 για 2 h, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα III4 Γ η κορυφή της υδροξυτυροσόλης αυξάνεται αισθητά, αποδεικνύοντας την επιτυχή μετατροπή της ελευρωπαϊνης σε υδροξυτυροσόλη.



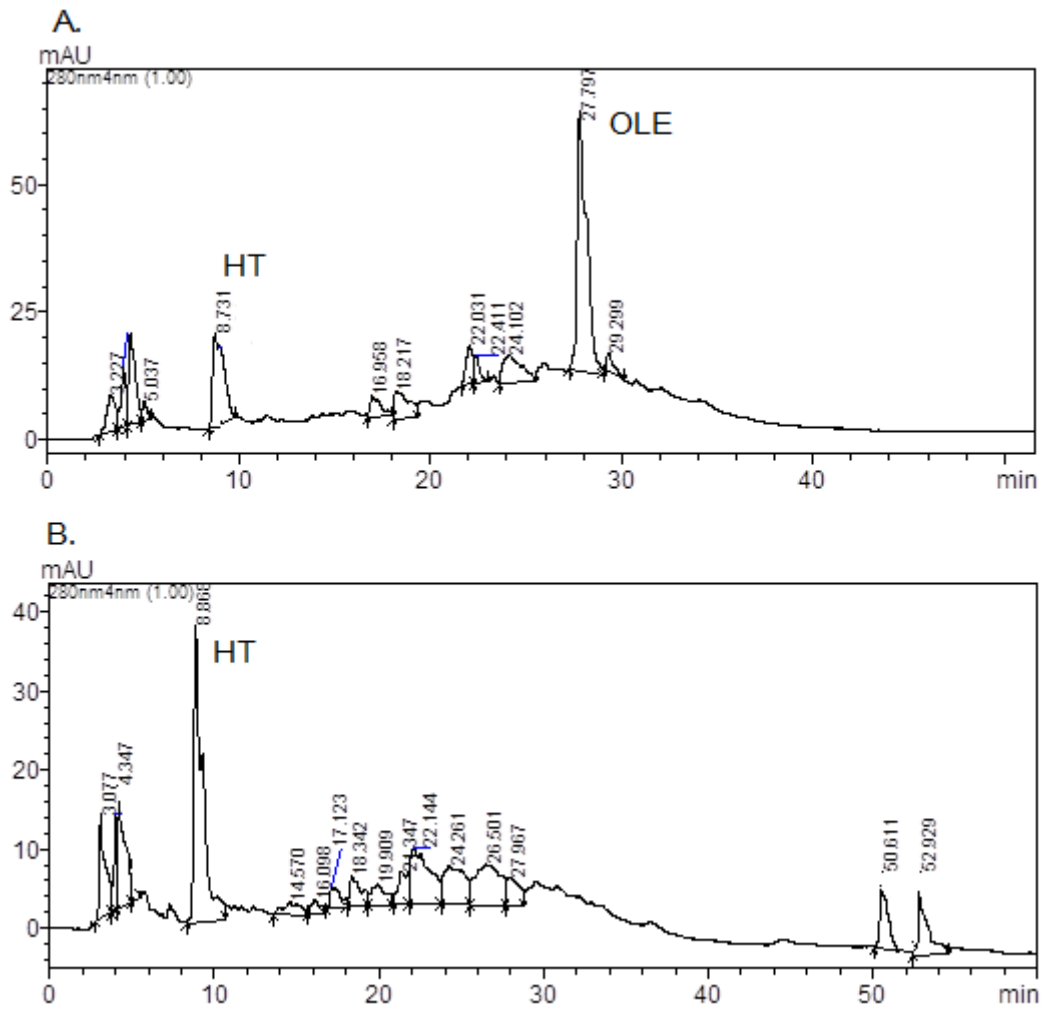
**Εικόνα III4.** Χρωματογράφημα HPLC των (Α) ελευρωπαΐνη (OLE), (Β) τροποποίηση ελευρωπαΐνης 1<sup>ο</sup> βήμα και (Γ) τροποποίηση ελευρωπαΐνης 2<sup>ο</sup> βήμα, στα 280 nm.

### 3.2. Ανάλυση χρωματογραφίας HPLC της μετατροπής της ελευρωπαΐνης σε υδροξυτυροσόλη στα εκχυλίσματα φύλλων ελιάς.

Στις Εικόνες III5 και III6 απεικονίζονται τα φάσματα HPLC των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς πριν και μετά την χημειοενζυμική τους τροποποίηση από τον νανοβιοκαταλύτη PCCox-Tmbgl-con. Και στις δύο περιπτώσεις τα εκχυλίσματα πριν την τροποποίηση έχουν ως κύρια ένωση την ελευρωπαΐνη που εμφανίζεται σε χρόνους 27.64 min και 27.79 min για το εκχύλισμα Aq Solg και Aq Ser αντίστοιχα. Μετά την χημειοενζυμική τροποποίηση έχει καταναλωθεί σχεδόν πλήρως η ελευρωπαΐνη και πλέον κύρια ένωση των εκχυλισμάτων είναι η υδροξυτυροσόλη που εμφανίζεται σε χρόνο 8.47 και 8.86 min για το εκχύλισμα Aq Solg και Aq Ser αντίστοιχα.



**Εικόνα III5.** Χρωματογράφημα HPLC εκχυλίσματος Αq Solg (A) πριν την χημειοενζυμική τροποποίηση και (B) μετά την χημειοενζυμική τροποποίηση με PCCox-Tmbgl-con.



**Εικόνα III6.** Χρωματογράφημα HPLC εκχυλίσματος Αq Ser (A) πριν την χημειοενζυμική τροποποίηση και (B) μετά την χημειοενζυμική τροποποίηση με PCCox-Tmbgl-cov.

## 4. Ανάλυση LC-MS

### 4.1. Οργανολογία

Όλα τα πειράματα LC-MS<sup>n</sup> πραγματοποιήθηκαν με το σύστημα Agilent 1100 Technologies LC/MSD Trap SL, (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) αποτελούμενο από αντλία Agilent G1312A, αυτόματο δειγματολήπτη Agilent G1313A, απαερωτή Agilent G1379A και ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού Agilent G1315B. Το φασματόμετρο μαζών ήταν τύπου Agilent G2445A (LC/MSD Trap SL ion trap mass spectrometer) εφοδιασμένο με σύστημα ηλεκτροψεκασμού ιόντος (ESI). Ο έλεγχος και η επεξεργασία των δεδομένων γίνεται μέσω H/Y και του προγράμματος Agilent Chemstation Software 2003.

### 4.2. Ανάλυση

10 µL φιλτραρισμένου δείγματος (με φίλτρα 0.45 µm) χορηγήθηκαν στο όργανο LC-MS instrument. Ο υδροχρωματογραφικός διαχωρισμός των φαινολικών συστατικών πραγματοποιήθηκε σε αναλυτική στήλη Altima C18, 25cm x 4.6 mm i.d., 5 µm της Alltech (Deerfield, USA). Χρησιμοποιήθηκε ροή 0.3 mL min<sup>-1</sup> για την ελεωρωπαϊνή, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη A (νερό με οξικό οξύ, 0.1 v/v) και ως διαλύτη B (ακετονιτρίλιο). Η διαβάθμιση διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση στην περίπτωση των πρότυπων ενώσεων ελεωρωπαϊνή και υδροξυτοροσόλη ήταν: 0–30 min, 80-50% A; 30–35 min 50% A; 35–40 min 50–80% A. Τα φάσματα UV/vis καταγράφηκαν σε εύρος of 200–550 nm και τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν στα 254 και 280 nm. Ενώ στην περίπτωση των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς ήταν: 0–20 min, 95-75% A; 20–40 min 75-50% A; 40–50 min 50-80% A; 50–60 min 80–95% A. Τα φάσματα UV/vis καταγράφηκαν σε εύρος of 200–550 nm και τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν στα 240, 254, 280 και 330 nm.

Τα ιόντα των προδρόμων σάρωσης της χημειοενζυμικής μετατροπής της ελεωρωπαϊνης σε υδροξυτοροσόλη καταγράφηκαν μεταξύ m/z 50 - m/z 1.000 σε αρνητική πολικότητα. Οι συνθήκες πηγής ιονισμού ήταν οι ακόλουθες: τάση τριοξειδούς, 3,5 kV, θερμοκρασία αερίου ξήρανσης, 350 ° C. Ροή και πίεση αζώτου, 11 L min<sup>-1</sup> και 50 psi, αντίστοιχα. Ο μέγιστος χρόνος συσσώρευσης της παγίδας ιόντων και ο αριθμός των επαναλήψεων MS για να ληφθούν τα φάσματα μέσου όρου MS καθορίστηκαν στα 30 και 3 ms, αντίστοιχα.

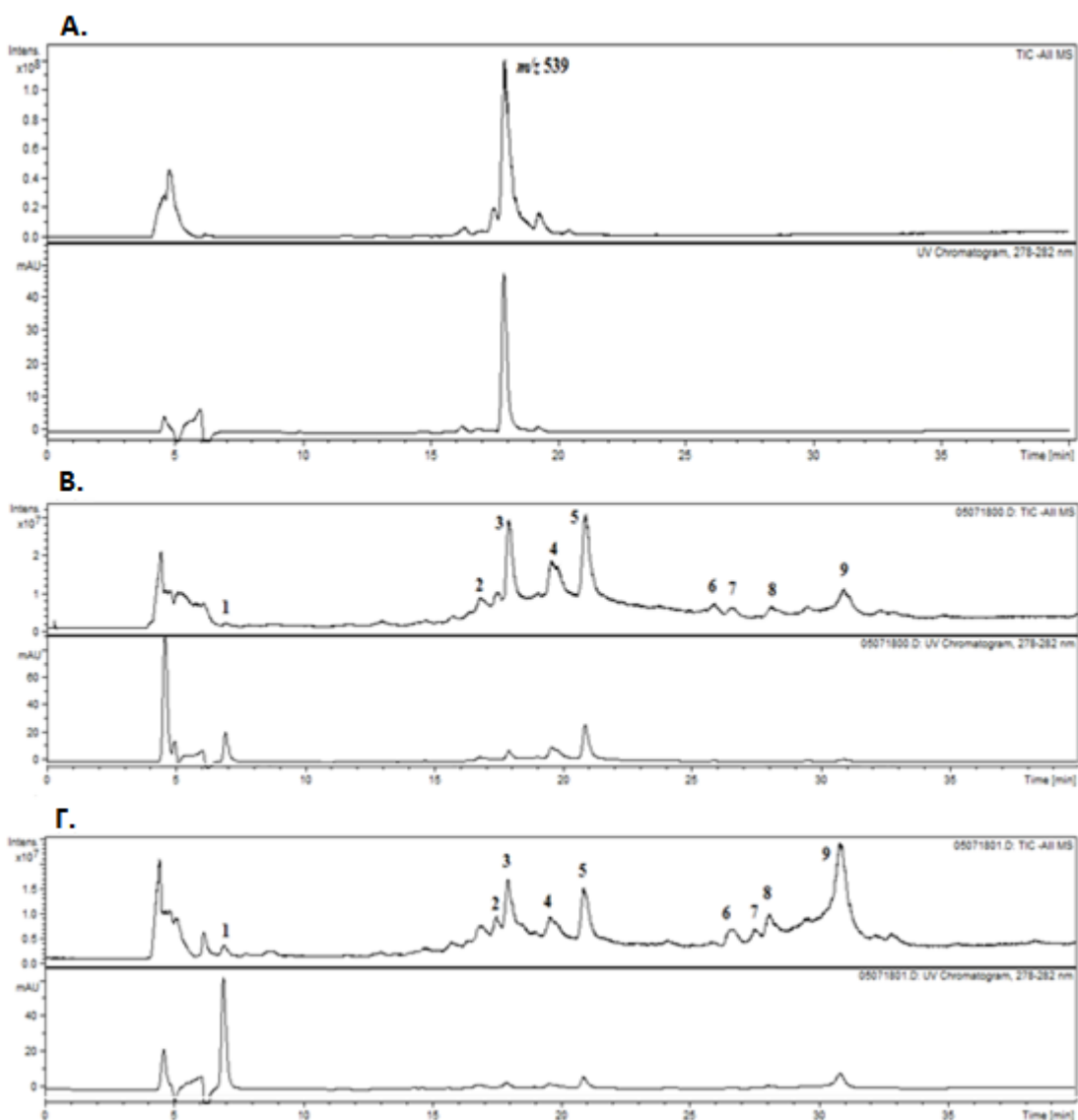
### 4.3. Αποτελέσματα

#### Ανάλυση LC-MS της τροποποίησης της μετατροπής της ελεωρωπαϊνης σε υδροξυτοροσόλη

Κατά την ανάλυση της χημειοενζυμικής μετατροπής της ελεωρωπαϊνης με LC-MS, το ολικό χρωματογράφημα ιόντος και το χρωματογράφημα UV στα 280 nm της μετατροπής της ελεωρωπαϊνης σε κάθε βήμα απεικονίζεται στην Εικόνα III7. Η ελεωρωπαϊνή ανιχνεύεται πριν από τη βιομετατροπή στα 17.4 min και αντιστοιχεί σε m/z 539 (Εικόνα III7 A). Μετά την ενζυμική υδρόλυση της ελεωρωπαϊνης από την ακινητοποιημένη β-γλυκοσιδάση για 24 h, η κορυφή της μειώνεται σημαντικά ενώ παρατηρούνται νέες κορυφές (κορυφή 2 και κορυφές 4-9) που αντιστοιχούν σε m/z 377 και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ανήκουν διαφορετικούς τύπους άγλυκων μορίων ελεωρωπαϊνης (Εικόνα III7 B) (Nikolaivits et al., 2017). Αυτά τα αποτελέσματα αποδεικνύουν την επιτυχή υδρόλυση του γλυκοσιδικού δεσμού της ελεωρωπαϊνης από την ακινητοποιημένη β-γλυκοσιδάση. Μια μικρή κορυφή υδροξυτοροσόλης ανιχνεύεται επίσης στα



6.9 λεπτά σε αυτό το βήμα, που αντιστοιχεί σε  $m/z$  123. Μετά την επώαση του μείγματος της αντίδρασης στους 60°C, pH 7 για 2 h (2<sup>ο</sup> Βήμα) υπάρχει αύξηση της κορυφής της υδροξυτυροσόλης και μια μείωση των κορυφών των άγλυκων της ελευρωπαΐνης που δείχνουν το σχηματισμό της υδροξυτυροσόλης κατά τη διάρκεια του 2<sup>ου</sup> βήματος της μετατροπής.



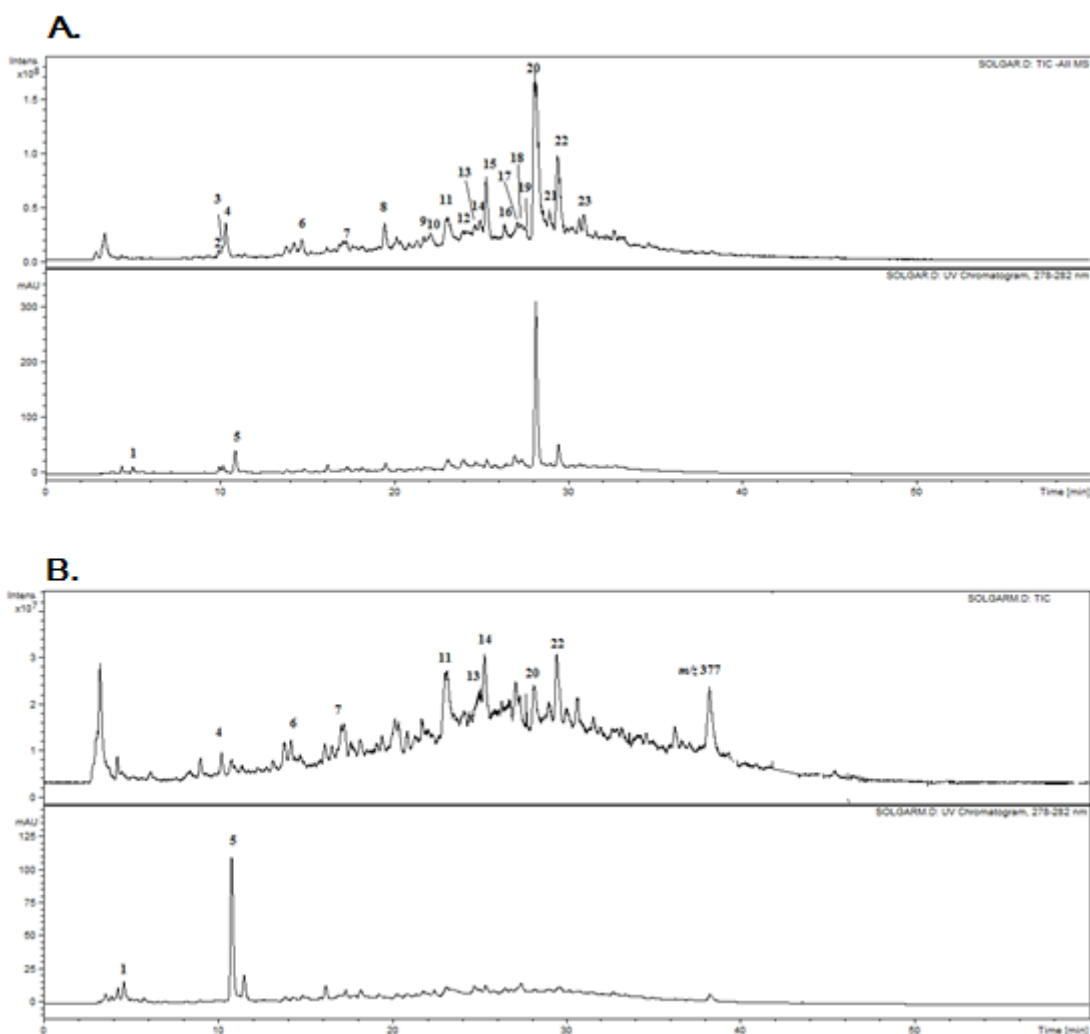
**Εικόνα III7.** (Α) Χρωματογράφημα ολικών ιόντων (πάνω) και χρωματογράφημα UV (κάτω) στα 280 nm της ελευρωπαΐνης ( $m/z$  539) πριν την τροποποίηση, (Β) Χρωματογράφημα ολικών ιόντων (πάνω) και χρωματογράφημα UV (κάτω) στα 280 nm της ενζυμικής υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης, 1<sup>ο</sup> βήμα, και (Γ) Χρωματογράφημα ολικών ιόντων (πάνω) και χρωματογράφημα UV (κάτω) στα 280 nm της τροποποίησης της ελευρωπαΐνης 2<sup>ο</sup> βήμα. Για την ταυτοποίηση των κορυφών βλ Πίνακες III3 και III4.

**Πίνακας III3.** Ταυτοποίηση των κορυφών της τροποποίησης της ελευρωπαϊνής (OLE).

<b>P.</b>	<b>Rt (min)</b>	<b>[M-H]- (m/z) (%)</b>	<b>Ενώσεις</b>
1	6.9	123(100), 153(45)	Υδροξυτυροσόλη
2	17.4	377(100), 713(56), 737(50), 307(35), 275(27), 349(22)	OLE-aglycon
3	17.9	539(100), 377(10)	OLE
4	19.5	377(100), 307(35), 275(28)	OLE-άγλυκο
5	20.9	377(100), 307(36), 275(29)	OLE-άγλυκο
6	26.6	377(100), 307(30), 275(25)	OLE-άγλυκο
7	27.5	377(100), 307(29), 275(23)	OLE-άγλυκο
8	28.0	377(100), 307(35), 275(25)	OLE-άγλυκο
9	30.8	377(100), 307(29), 275(21)	OLE-άγλυκο

### Ανάλυση LC-MS των τροποποιημένων και μη εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς

Κατά την ανάλυση της χημειοενζυμικής μετατροπής των εκχυλισμάτων φύλλων ελιάς με LC-MS, το ολικό χρωματογράφημα ιόντος και το χρωματογράφημα UV στα 280 nm της μετατροπής του εκχυλίσματος απεικονίζεται στις Εικόνες III8 και III9 και ο χαρακτηρισμός των κορυφών στους Πίνακες III4 και III5. Η κύρια ένωση των εκχυλισμάτων και στις δύο περιπτώσεις φαίνεται να είναι ελευρωπαΐνη που ανιχνεύεται στα 28.1 min και αντιστοιχεί σε  $m/z$  539. Μετά την χημειοενζυμική τροποποίηση των εκχυλισμάτων η ελευρωπαΐνη σχεδόν εξαφανίζεται και κύρια πλέον ένωση και στις δύο περιπτώσεις είναι η υδροξυτυροσόλη στα 10.7 min και αντιστοιχεί σε  $m/z$  123.

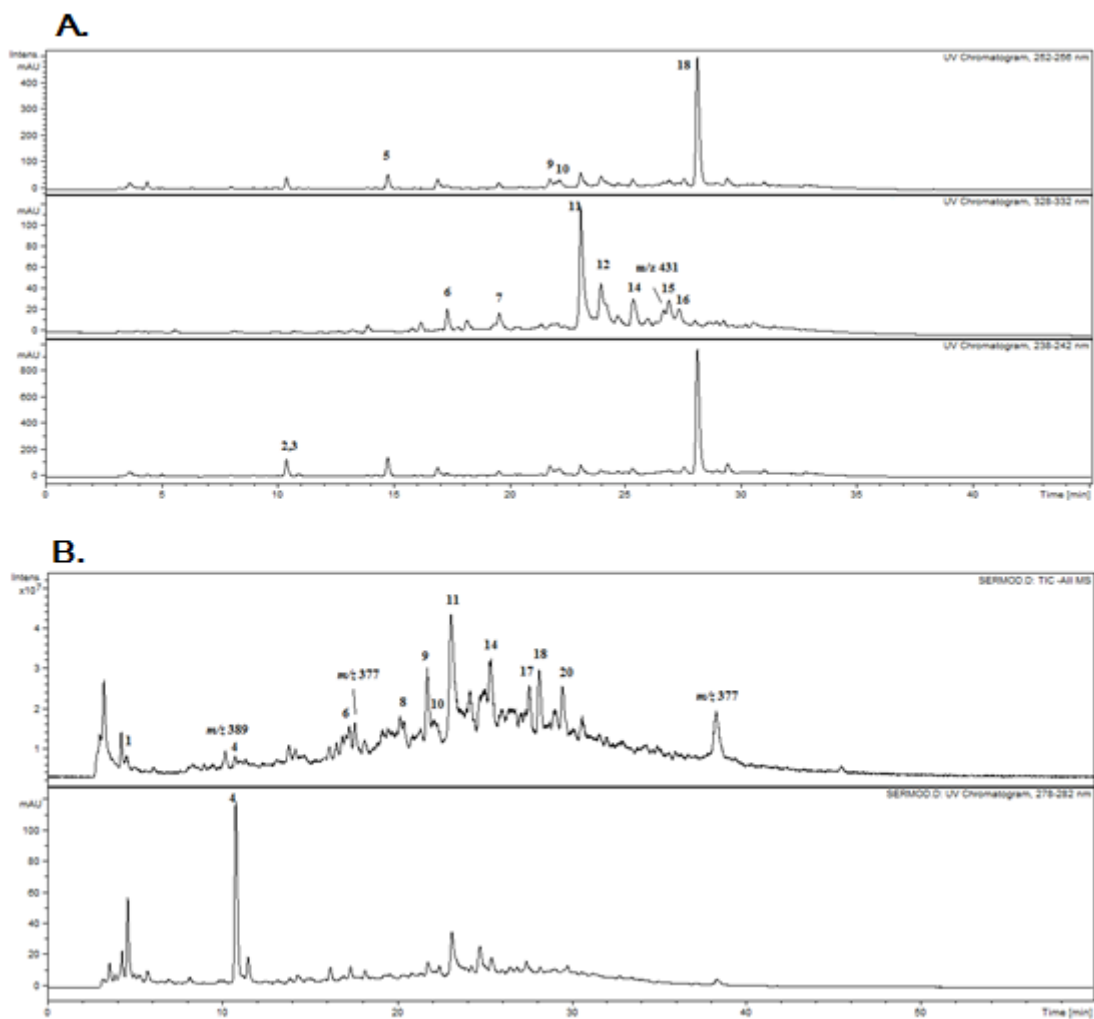


**Εικόνα III8.** (Α) Χρωματογράφημα ολικών ιόντων (πάνω) και χρωματογράφημα UV (κάτω) στα 280 nm του εκχυλίσματος Solgar πριν την τροποποίηση, (Β) Χρωματογράφημα ολικών ιόντων (πάνω) και χρωματογράφημα UV (κάτω) στα 280 nm του τροποποιημένου εκχυλίσματος ( $R_t= 38.2$  min,  $m/z$  377: άγλυκο ελευρωπαΐνης). Για την ταυτοποίηση των κορυφών βλ Πίνακα III4.

**Πίνακας III4.** Ταυτοποίηση των κορυφών του τροποποιημένου και μη εκχύλισματος φύλλων ελιάς Solgar.

Peak	R <sub>t</sub> (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	-MS <sup>2</sup> [M-H] <sup>-</sup> (m/z) (%)	-MS <sup>3</sup> [base peak] <sup>-</sup> (m/z) (%)	Ενώσεις
<b>1</b>	4.5	151(100), 123(39)	123(100)	-	4-Hydroxyphenylacetic acid
<b>2</b>	9.7	315(100), 631(59), 705(35), 653(25), 153(17)	153(100), 123(10)	123(100)	Hydroxytyrosol glucoside
<b>3</b>	10.0	705(100), 631(74), 315(48), 389(28)	153(100), 123(10)	123(100)	Hydroxytyrosol glucoside
<b>4</b>	10.3	389(100), 779(94), 801(77), 705(49), 315(7)	345(100), 227(40), 183(33)	183(100)	Oleoside
<b>5</b>	10.7	123(100), 153(60)	123(100), 151(20)	95(100)	Hydroxytyrosol
<b>6</b>	14.6	389(100), 779(19)	345(100), 209(47), 165(29), 121(19)	183(100), 165(99)	Secologanoside
<b>7</b>	17.2	519(100), 445(21)	193(100), 387(40), 235(27)	161(100), 225(47),	Unknown
<b>8</b>	19.5	609(100), 403(42), 829(39), 807(29)	371(100), 223(51), 179(32)	121(100), 165(98), 181(21)	Elenolic acid glucoside
<b>9</b>	21.7	525(100), 335(4)	195(100), 481(74), 389(44), 165(42)	345(100), 165(63), 319(35), 195(27)	Demethyloleuropein
<b>10</b>	22.1	555(100)	537(100), 403(41), 223(24)	223(100), 151(51)	10-Hydroxyoleuropein

<b>11</b>	23.1	623(100)	461(100), 315(3)	315(100), 135(87), 161(20), 297(11)	Verbascoside
<b>12</b>	23.9	447(100), 895(45)	285(100)	-	Luteolin-7-O-glucoside
<b>13</b>	24.7	623(100), 447(52)	461(100)	135(100), 315(87), 161(33), 297(10)	Isoverbascoside
<b>14</b>	24.9	701(100)	539(100), 377(23), 307(14), 275(15)	275(100), 307(67), 377(48)	Oleuropein diglucoside
<b>15</b>	25.3	701(100)	539(100), 377(8), 307(9), 275(8)	307(100), 275(84), 377(27)	Oleuropein diglucoside isomer
<b>16</b>	26.3	701(100)	539(100), 377(8), 307(9), 275(8)	307(100), 275(84), 377(27)	Oleuropein diglucoside isomer
<b>17</b>	26.9	447(100), 567(88), 895(41)	285(100)	-	Luteolin-4'-O-glucoside
<b>18</b>	27.3	461(100), 539(46), 567(40)	299(100), 446(61)	-	Chrysoeriol-7-O-glucoside (Fu 2010)
<b>19</b>	27.5	701(100)	275(100), 307(89), 377(60)	139(100), 95(51)	Oleuropein diglucoside
<b>20</b>	28.1	539(100)	275(100), 307(99), 375(86)	275(100), 139(11)	Oleuropein
<b>21</b>	29.0	539(100), 639(47), 565(33)	275(100), 307(87), 377(61)	275(100), 139(14)	Oleuropein isomer
<b>22</b>	29.5	539(100), 639(4)	307(100), 275(91), 377(30)	275(100), 139(14), 111(5)	Oleuroside
<b>23</b>	31.0	523(100), 639(43), 551(17)	361(100), 291(70), 259(44)	291(100), 259(56)	Ligstroside



**Εικόνα III9.** (Α) Χρωματογράφημα ολικών ιόντων (πάνω) και χρωματογράφημα UV (κάτω) στα 280 nm του εκχυλίσματος Σερρών πριν την τροποποίηση, (Β) Χρωματογράφημα ολικών ιόντων (πάνω) και χρωματογράφημα UV (κάτω) στα 280 nm του τροποποιημένου εκχυλίσματος ( $R_t = 38.2$  min,  $m/z$  377: άγλυκο ελευρωπαΐνης). Για την ταυτοποίηση των κορυφών βλ Πίνακα III5.

**Πίνακας III.5.** Ταυτοποίηση των κορυφών του τροποποιημένου και μη εκχύλισματος φύλλων ελιάς Solgar.

Peak	R <sub>t</sub> (min)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	-MS <sup>2</sup> [M-H] <sup>-</sup> (m/z) (%)	-MS <sup>3</sup> [base peak] <sup>-</sup> (m/z) (%)	Ενώσεις
<b>1</b>	4.5	151(100), 123(39)	123(100)	-	4-Hydroxyphenylacetic acid
<b>2</b>	9.7	315(100), 631(59), 705(35), 653(25), 153(17)	153(100), 123(10)	123(100)	Hydroxytyrosol glucoside
<b>3</b>	10.0	705(100), 631(74), 315(48), 389(28)	153(100), 123(10)	123(100)	Hydroxytyrosol glucoside
<b>4</b>	10.7	123(100), 153(60)	123(100),	95(100)	Hydroxytyrosol
<b>5</b>	14.6	389(100), 779(19)	345(100), 209(47), 165(29), 121(19)	183(100), 165(99)	Oleoside/ Secologanoside
<b>6</b>	17.2	519(100), 445(21)	193(100), 387(40), 235(27)	161(100), 225(47),	Unknown
<b>7</b>	19.5	807(100), 403(70), 829(39), 609(35)	371(100), 223(51), 179(32)	121(100), 165(98), 181(21)	Elenolic acid glucoside
<b>8</b>	20.4	401(100), 803(66)	239(100), 161(56), 221(51), 357(31)	221(100), 195(37), 179(32)	Unknown
<b>9</b>	21.7	525(100), 335(4)	195(100), 481(74), 389(44), 165(42)	345(100), 165(63), 319(35), 195(27)	Demethyloleuropein
<b>10</b>	22.1	555(100)	537(100), 403(41), 223(24)	223(100), 151(51)	10-Hydroxyoleuropein

<b>11</b>	23.1	623(100)	461(100), 315(3)	315(100), 135(92), 161(22), 297(11)	Verbascoside
<b>12</b>	23.9	447(100), 895(33), 477(28)	285(100)	-	Luteolin-7-O-glucoside
<b>13</b>	24.9	701(100)	539(100), 377(23), 307(14), 275(15)	275(100), 307(67), 377(48)	Oleuropein diglucoside
<b>14</b>	25.3	701(100)	539(100), 377(8), 307(9), 275(8)	307(100), 275(84), 377(27)	Oleuropein diglucoside isomer
<b>15</b>	26.9	447(100), 461(22)	285(100)	-	Luteolin-4'-O-glucoside
<b>16</b>	27.3	491(100), 461(29)	337(100), 175(8)	193(100), 175(85)	Chrysoeriol-7-O-glucoside ( <i>m/z</i> 461)
<b>17</b>	27.5	701(100)	275(100), 307(75), 377(62)	139(100), 95(47)	Oleuropein diglucoside isomer
<b>18</b>	28.1	539(100)	275(84), 307(100), 375(71)	275(100), 139(12)	Oleuropein
<b>19</b>	29.0	539(100)	275(100), 307(95), 377(82)	275(100), 139(14)	Oleuropein isomer
<b>20</b>	29.5	539(100)	307(100), 275(87), 377(30)	275(100), 139(13), 111(5)	Oleuroside
<b>21</b>	31.0	523(100)	361(100), 291(70), 259(43)	291(100), 259(60), 223(3)	Ligstroside



## 5. Ακίνητοποίηση β-γλυκοσιδάσης σε σφαιρίδια χιτοζάνης

Η β-γλυκοσιδάση Albgl ακίνητοποιήθηκε ομοιοπολικά σε σφαιρίδια χιτοζάνης. Η ακίνητοποίηση έγινε μέσω ενός μορίου συνδέτη, της γλουτεραλδεΐδης (Y. Zhou et al., 2013). Η γλουτεραλδεΐδη συνδέεται αρχικά με ομοιοπολικό δεσμό στις ελεύθερες αμινο-ομάδες της χιτοζάνης με το ένα της άκρο και στη συνέχεια συνδέεται με τις ελεύθερες αμινο-ομάδες του ενζύμου με το άλλο της άκρο.

Για τον σχηματισμό των σφαιριδίων χιτοζάνης αρχικά 1 g χιτοζάνης (ή 2 g στην περίπτωση του βιοαντιδραστήρα διαλείποντος έργου πλήρους ανάδευσης CSTR) διαλυτοποιήθηκαν σε 50 mL (ή 100 mL) διάλυμα οξικού οξέος 5 % v/v. Στη συνέχεια το διάλυμα αυτό προστέθηκε σταγόνα-σταγόνα με σύριγγα, σε 100 mL (ή 200 mL) διαλύματος καυστικού νατρίου συγκέντρωσης 2.0 M 80 % και αιθανόλης 20 %, όπου στιγμιαία σχηματίστηκαν τα σφαιρίδια χιτοζάνης. Τα σφαιρίδια αφέθηκαν στο διάλυμα για λίγα λεπτά για να σκληρύνουν. Στη συνέχεια διαχωρίστηκαν και ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό έως ότου το pH να γίνει ουδέτερο (pH 7).

Για την ακίνητοποίηση της Albgl, τα σφαιρίδια χιτοζάνης προστέθηκαν σε διάλυμα γλουτεραλδεΐδης 3.0 % και το μείγμα επώαστηκε στους 25 °C για 2 h. Ακολούθησαν εκπλήσεις με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού οξέος 100 mM, pH 5.0 για να απομακρυνθεί η περίσσια της γλουτεραλδεΐδης. Τα σφαιρίδια χιτοζάνης προστέθηκαν σε κατάλληλο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και κιτρικού οξέος 100 mM, pH 5.0, που περιείχε 30 mg (ή 80 mg) Albgl. Το μείγμα επώαστηκε στους 25 °C για 5 h. Μετά την επώαση ακολούθησαν εκπλήσεις με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και κιτρικού οξέος 100 mM, pH 5.0 για να απομακρυνθεί το ένζυμο που δεν ακίνητοποιήθηκε. Η απόδοση της ακίνητοποίησης υπολογίστηκε με την μέθοδο Bradford, όπου προσδιορίστηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο διάλυμα πριν και μετά την ακίνητοποίησης. Η απόδοση και στις δύο περιπτώσεις ήταν > 90 %.

## 6.0 πλήρης χαρακτηρισμός των πρότυπων ενώσεων με 1D <sup>1</sup>H NMR και 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC:

Υδροξυτυροσόλη: <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8.71 (s, OH), 8.65 (s, OH), 6.64 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 6.60 (s, 1H), 4.56 (t, OH), 3.51 (t, 2H), 2.57 (d, J = 7.42 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 145.3, 143.6, 133.5, 119.8, 118.8, 118.4, 63.2, 39.4;

Ελευρωπαΐνη: <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 8.77 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 6.67 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.64 (s, 1H), 6.5 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.00 (q, J = 7.14 Hz, 1H), 5.9 (s, 1H), 5.2 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 5.07 (d, J = 4.76 Hz, 1H), 5.01 (d, J = 5.26 Hz, 1H), 4.68 (d, J = 7.79 Hz, 1H), 4.52 (m, 1H), 4.11 (m, 2H), 3.89 (dd, J = 4.2 Hz, 1H), 3.70 (m, 1H), 3.48 (m, 1H), 3.22 (m, 2H), 3.12 (m, 2H), 2.7 (t, J = 7.00 Hz, 2H), 2.67 (m, 1H), 1.68 (d, J = 7.38 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 172.3, 169.19, 145.9, 144.8, 130.0, 129.31, 123.31, 120.2, 119.81, 116.6, 108.6, 107.4, 99.53, 93.61, 82.3, 77.6, 76.5, 73.7, 71.3, 70.9, 65.42, 61.58, 53.4, 34.4, 27.2, 13.81;

## 7. Εκτίμηση της κυτταρικής επιβίωσης/πολλαπλασιασμού των κυττάρων

**Τα αντιδραστήρια για τον έλεγχο της κυτταροτοξικής δράσης και του σχηματισμού αποικιών ήταν τα εξής:**

- Τα θρεπτικά μέσα Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), με χαμηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) και με υψηλή περιεκτικότητα σε γλυκόζη ( $4 \text{ g L}^{-1}$ ), αποστειρωμένα, της εταιρείας Merck KGaA.
- Ο εμβρυϊκός ορός βοδιού (Fetal Bovine Serum, FBS), αποστειρωμένος, της εταιρείας Gibco-Thermo Fisher Scientific, US.
- Η L-γλουταμίνη, 200 mM (100x), αποστειρωμένη και φιλτραρισμένη της εταιρείας Biowest-bw, USA.
- Το μείγμα πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης 100x, αποστειρωμένο και φιλτραρισμένο της εταιρείας Biowest-bw, USA.
- Το διάλυμα θρυψίνης/EDTA 1x σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS w/o ασβέστιο, w/o μαγνήσιο, w/o χρωστική κόκκινης φαινόλης (phenol red), αποστειρωμένο και φιλτραρισμένο, της εταιρείας Biowest-bw, USA.
- Το ρυθμιστικό αλατούχο διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffered Saline, PBS), της εταιρείας Merck KGaA.
- Το βρωμιούχο 3-(4,5-διμεθυλο-θειαζολιο)-2,5-διφαινυλο-τετραζόλιο [(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), (MTT)], της εταιρείας Merck KGaA.
- Το διμεθυλοσουλφοξείδιο, DMSO, της εταιρείας Fisher Chemical, Fisher Scientific, UK.
- Η χρωστική ηωσίνη και κρυσταλλικό ιώδες, Giemsa, της εταιρείας Merck KGaA

### Κυτταρικές σειρές

Τα πειράματα εκτίμησης της κυτταρικής επιβίωσης/πολλαπλασιασμού των κυττάρων αποικιών εκπονήθηκαν στο εργαστήριο Φυσιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Για την εκτίμηση της κυτταροτοξικής δράσης των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε μια φυσιολογική (ανθρώπινα εμβρυικά κύτταρα νεφρού, HEK293) και μια καρκινική σειρά (νεοπλασματικά κύτταρα λειομυοσαρκώματος επίμυος Wistar, LMS), τα οποία απομονώθηκαν από όγκους επίμυων που ιστολογικά χαρακτηρίστηκαν ως λειομυοσάρκωμα (Avdikos et al., 2007). Τα LMS κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM, χαμηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (low glucose,  $1 \text{ gr L}^{-1}$ ) ενώ τα κύτταρα HEK293 καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό υψηλής περιεκτικότητας σε γλυκόζη (high glucose,  $4 \text{ gr L}^{-1}$ ). Και στα δύο θρεπτικά υλικά προστέθηκε 10 % εμβρυϊκός βόειος ορός (Fetal Bovine Serum), 1 % πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη και 0.5 % L-γλουταμίνη. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο σε συνθήκες  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  και 5 %  $\text{CO}_2$ .

Η μέτρηση της επιβίωσης των κυττάρων μετά από την έκθεση τους στα τροποποιημένα και μη εκχυλίσματα έγινε με τη μέθοδο του MTT (Dhima et al., 2018). Η εφαρμογή αυτή

εκμεταλλεύεται την ιδιότητα του MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl- 2H-tetrazolium bromide) να ανάγεται από τα μεταβολικά ενεργά κύτταρα και συγκεκριμένα από το μιτοχονδριακό ένζυμο της σουκινικής αφυδρογονάσης (succinate dehydrogenase), προς δημιουργία αναγωγικών ισοδυνάμων όπως NAD και NADPH. Το προκύπτων ενδοκυτταρικό, αδιάλυτο στο νερό, μωβ ίζημα της φορμαζάνης μπορεί να διαλυθεί και να ποσοτικοποιηθεί με φασματοφωτομετρικά μέσα.

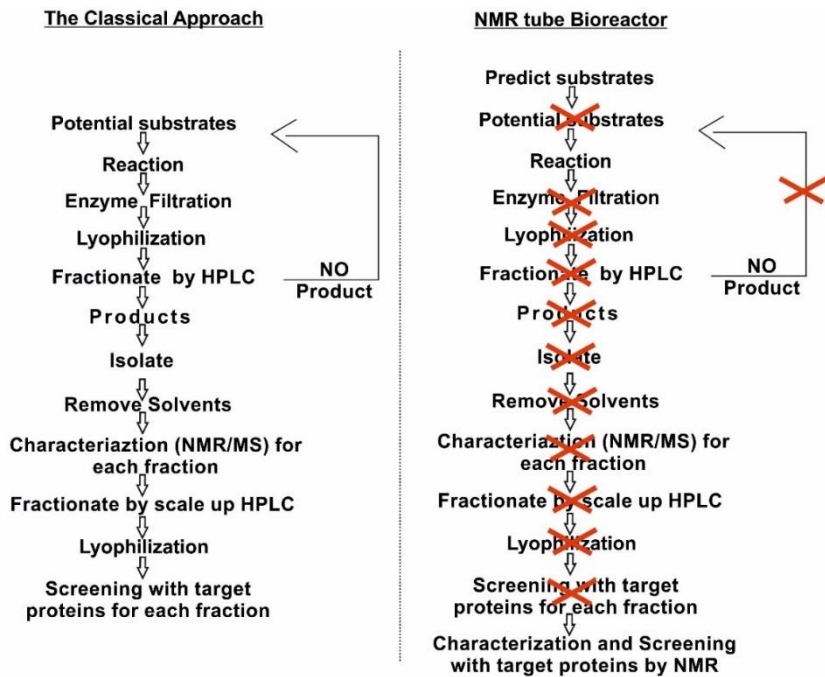
Αρχικά πραγματοποιείται σπορά 5.000 κυττάρων σε ένα πολυτριβλίο 96 φρεατίων. Μετά από επώαση 24 ωρών σε επωαστικό θάλαμο πραγματοποιείται η προσθήκη των εκχυλισμάτων στις επιθυμητές συγκεντρώσεις. Τα κύτταρα επωάζονται για άλλες 24 ή 48 ώρες. Ακολουθεί η προσθήκη 50  $\mu\text{L}$  MTT (3 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) και νέα επώαση για 3 ώρες. Με προσοχή αφαιρείται το υπερκείμενο διάλυμα και η διάλυση των κρυστάλλων που σχηματιστήκαν στο ταπήτιο του πολυτριβλίου γίνεται με την προσθήκη 200  $\mu\text{L}$  DMSO και ήπια ανάδευση με τη χρήση πολυπιπέτας. Η απορρόφηση σε κάθε φρεάτιο του πολυτριβλίου και για κάθε συγκέντρωση ουσίας πραγματοποιείται στα 540 nm (η απορρόφηση υποβάθρου-background absorbance μετρήθηκε στα 690 nm) με τη χρήση ενός φασματοφωτόμετρου (Multiskan Spectrum, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

### **Σχηματισμός Αποικιών (Clonogenic/Colony Formation Assay)**

Τα πειράματα μελέτης σχηματισμού αποικιών εκπονήθηκαν στο εργαστήριο Φυσιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, σύμφωνα με τους Dhima et al., (Dhima et al., 2018). Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε σπορά 25.000 κυττάρων/φρεάτιο (σε τελικό όγκο 1 mL θρεπτικού υλικού /φρεάτιο) σε ένα πολυτριβλίο 24 φρεατίων και τοποθετείται στον επωαστή για 24 h. Εν συνεχεία προστίθενται τα εκχυλίσματα (τροποποιημένα και μη) στις επιθυμητές συγκεντρώσεις και τα κύτταρα επωάζονται για ακόμη 48 h. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κύτταρα εκπλύονται με 1 mL/φρεάτιο ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Τα κύτταρα αποκολλούνται από το ταπήτιο μετά από επώαση με 0.25 mL θρυψίνης για 2-3 λεπτά στον επωαστή. Σε κάθε φρεάτιο προστίθεται 1 mL θρεπτικού υλικού και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση για να επιτευχθεί ομογενοποίηση του κυτταρικού εναιωρήματος. Με τη χρήση αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer μετρείται ο αριθμός των κυττάρων σε κάθε φρεάτιο. Στη συνέχεια μεταφέρονται 2.500 κύτταρα σε τρυβλία Petri (60 mm x 15 mm) από κάθε δείγμα και προστίθενται 5 mL θρεπτικού υλικού σε κάθε τρυβλίο και τοποθετούνται στον επωαστή. Καθ' όλη τη διάρκεια επώασης πραγματοποιείται καθημερινός οπτικός έλεγχος (μέσω του οπτικού ανεστραμμένου μικροσκοπίου) για τον έλεγχο της εξέλιξης των αποικιών. Την 3<sup>η</sup> ημέρα της επώασης πραγματοποιείται αλλαγή του θρεπτικού υλικού. Με το πέρας της μιας εβδομάδας το υπερκείμενο απορρίπτεται, τα κύτταρα εκπλύονται με 2 φορές με 3 mL ρυθμιστικού διαλύματος PBS. Σε κάθε τρυβλίο προστίθενται 5 mL μείγματος μεθανόλης-οξικού οξέος 3:1  $\text{v/v}$  και τα τρυβλία τοποθετούνται στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 10 λεπτά για να μονιμοποιηθούν τα κύτταρα. Ακολουθεί απόρριψη του μείγματος μεθανόλης-οξικού οξέος και τοποθέτηση των τρυβλίων σε απαγωγό για να στεγνώσουν. Μετά από περίπου 30 λεπτά προστίθεται σε κάθε τρυβλίο 5 mL διαλύματος χρωστικής Giemsa-δισαπτεσταγμένου νερού 1:10  $\text{v/v}$  και τα τρυβλία αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min, ώστε να γίνει χρώση των κυττάρων. Τέλος, η χρωστική απορρίπτεται και

τα τριβλία ξεπλένονται πολύ καλά με νερό βρύσης και αφήνονται σε απαγωγό για να στεγνώσουν. Μόλις στεγνώσουν γίνεται η μέτρηση των αποικιών σε κάθε τριβλίο. Τα αποτελέσματα αναφέρονται ως % αριθμού των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε σχέση με το control.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV



**Εικόνα IV1.** Η συμβατική προσέγγιση στη μελέτη βιοτροποποίησης των φυσικών προϊόντων και στη βιολογική αξιολόγηση των προϊόντων βιοτροποποίησης σε σύγκριση με την προσέγγιση του NMR tube βιοαντιδραστήρα.

**Ο πλήρης χαρακτηρισμός των υποστρωμάτων και των προϊόντων βιοτροποποίησης μέσω 1D <sup>1</sup>H NMR και 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC:**

Κερσετίνη: <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12.54 (s, 1H), 10.85 (s, 1H), 9.66 (s, 1H), 9.44 (s, 1H), 9.37 (s, 1H), 7.71 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 7.57 (dd, J= 2.23/6.28 Hz, 1H), 6.92 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.44 (d, J=2.08Hz, 1H), 6.22 (d, J=2.08Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 165.0, 161.9, 157.4, 148.7, 147.8, 146.2, 136.8, 123.1, 120.6, 116.2, 115.7, 103.9, 98.8, 94.0;

3'ακέτυλο κερσετίνη: <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12.47 (s, 1H), 10.89 (s, 1H), 10.48 (s, 1H), 9.66 (s, 1H), 7.99 (dd, J = 2.21/6.44 Hz, 1H), 7.91 (d, J=2.2 Hz, 1H), 7.12 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.50 (d, J=2.08Hz, 1H), 6.23 (d, J=2.08Hz, 1H), 2.33(s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 177.2, 169.9, 165.2, 161.9, 157.2, 152.1, 146.7, 139.2, 137.2, 127.2, 123.3, 123.2, 117.6, 98.9, 94.2, 21.4;

4'ακέτυλο κερσετίνη: <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12.41 (s, 1H), 10.94 (s, 1H), 10.09 (s, 1H), 9.78 (s, 1H), 7.83 (dd, J = 2.12/6.37 Hz, 1H), 7.64 (d, J=8.46 Hz, 1H), 7.22 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.47 (d, J=2.08Hz, 1H), 6.25 (d, J=2.08Hz, 1H), 2.32 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 177.4, 169.8, 165.4, 161.9, 157.4, 150.0, 146.4, 140.6, 138.2, 130.3, 124.0, 119.4, 116.7, 104.2, 98.9, 94.1, 21.3;

Ναρινγενίνη: <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12.14 (s, 1H), 10.78 (s, 1H), 9.58 (s, 1H), 7.31 (d, J=8.57 Hz, 2H), 6.8 (d, J=8.66 Hz, 2H), 5.88 (tt, J=2.2/2.04 Hz, 2H), 5.42 (dd, J=3.05/12.88, 1H), 3.17 (dd, J=13.03/18.3 Hz, 1H), 3.25 (dd, J=13.04/17.2 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 196.9, 167.3, 164.2, 163.2, 158.6, 129.2, 115.9, 102.6, 96.6, 95.9, 78.9, 42.48;

4'ακέτυλο ναρινγενίνη: <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12.84 (s, 1H), 12.12 (s, 1H), 7.56 (d, J=8.62Hz, 2H), 7.31 (d, J=8.58Hz, 2H), 5.93 (dd, J=11.05/2.14Hz, 2H), 5.9 (s, 1H), 5.6 (dd, J=12.78/3.08Hz, 1H), 2.83 (dd, J=17.17/3.12Hz, 1H), 2.28 (s, 3H); <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 196.9, 169.8, 167.3, 164.2, 163.4, 150.9, 136.6, 128.4, 122.3, 102.6, 96.6, 95.9, 78.2, 42.6, 21.43;

Πυρογαλλόλη: <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 6.73 (t, J=8.18 Hz, 1H), 6.53 (d, J=8.21 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 146.1, 133, 107, 118.3;

Περπουριγαλλίνη: <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 7.36 (d, J=11.3 Hz, 1H), 7.13 (d, J=9.42 Hz, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.78 (dd, J=9.73/11.73 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O): δ 146.6, 153.2, 136.2, 128.1, 128.4, 126.6, 124.3, 106.3;

Ρουτίνη (R): <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 12.63 (s, 1H), 10.87 (s, 1H), 9.69 (s, 1H), 9.2 (s, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.49 (dd, J=2.2/10.4 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.43 (d, J= 2.0 Hz, 1H), 6.23 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 5.35 (d, J=1.3 Hz, 1H), 4.4 (d, J=7.3 Hz, 1H), 3.74 (d, J=10.5 Hz, 1H), 3.42 (m, 1H), 3.32 (d, J=3.08 Hz, 1H), 3.3 (d, J=2.9 Hz, 1H), 3.32 (d, J=1.7 Hz, 3H), 3.26 (m, 1H), 3.2 (m, 1H), 3.1 (s, 1H), 3.09 (m, 1H), 1.03 (d, J=6.15 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 178.0, 164.9, 162.0, 157.6, 157.3, 149.3, 145.6, 134.2, 122.2, 116.8, 115.9, 104.8, 101.9, 101.5, 99.28, 94.17, 77.1, 77.0, 72.6, 71.3, 71.1, 70.8, 69.8, 67.8, 67.6, 18.42;

Δι-ακέτυλο ρουτίνη (R1): <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 12.62 (s, 1H), 10.88 (s, 1H), 9.7 (s, 1H), 9.25 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 6.88 (d, J=8.2 Hz, 1H), 6.43 (d, J=2.0 Hz, 1H), 6.23 (d, J=2.2, 1H), 5.58 (d, J=7.72, 1H), 4.87 (s, 1H), 4.65 (s, 1H), 4.49 (s, 1H), 3.71 (1H), 3.57 (s, 1H), 3.52 (s, 1H), 3.47 (s, 1H), 3.46 (s, 1H), 3.45 (s, 1H), 3.41 (s, 1H), 2.09 (s, 3H), 1.94 (s, 3H), 0.78 (s, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 170.77, 170.51, 164.99, 164.87, 162.1, 157.17, 157.15, 149.13, 145.69, 133.75, 122.31, 116.95, 116.14, 104.55, 101.27, 101.16, 99.51, 94.31, 78.15, 75.86, 74.31, 72.64, 71.04, 68.79, 68.21, 67.12, 66.58, 21.91, 21.64, 17.76;

Τρι-ακέτυλο ρουτίνη(R2):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 12.54 (s, 1H), 10.93 (s, 1H), 10.46 (s, 1H), 7.89 (dd,  $J$ = / 1H), 7.84 (s, 1H), 7.07 (d,  $J$ =8.7 Hz, 1H), 6.46 (d,  $J$ =2.0 Hz, 1H), 6.25 (d,  $J$ =2.1 Hz, 1H), 5.58 (s, 1H), 4.87 (s, 1H), 4.65 (s, 1H), 4.48 (s, 1H), 3.57 (s, 1H), 3.5 (s, 1H), 3.46 (s, 1H), 3.45 (s, 1H), 3.37 (s, 1H), 3.71 (s, 1H), 3.33 (s, 1H), 2.32 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 1.94 (s, 3H), 0.78 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$ -NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 170.52, 170.09, 169.49, 165.09, 164.91, 162.05, 157.29, 156.4, 152.61, 138.45, 122.78, 124.97, 117.39, 104.77, 101.27, 101.20, 99.54, 94.52, 78.19, 75.88, 74.33, 72.79, 71.06, 68.8, 68.42, 67.13, 66.59, 21.85, 21.65, 21.43, 17.68;

Ναριγκίνη(Ni):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  12.09 (s, 1H), 9.65 (s, 1H), 7.63 (d, 2H), 7.49 (dd,  $J$ =/ 1H), 6.83 (d, 2H), 6.15 (dd,  $J$ = 2.23 Hz 1H), 6.12 (dd,  $J$  = 2.12 Hz, 1H), 5.53 (m, 1H), 5.34 (s, 1H), 5.13 (m, 1H), 5.17 (m, 1H), 4.75 (s, 1H), 4.69 (s, 1H), 4.61 (s, 1H), 4.51 (s, 1H), 3.73 (m, 1H), 3.71 (m, 1H), 3.68 (m, 1H), 3.48 (m, 1H), 3.46 (m, 2H), 3.39 (m, 1H), 3.35 (m, 1H), 3.23 (m, 1H), 3.2 (m, 2H), 2.76 (m, 1H), 1.19 (d,  $J$ =6.68 Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  198.2, 165.6, 163.9, 163.7, 158.6, 129.3, 115.9, 104.2, 101.1, 116.8, 97.95, 97.0, 95.83, 79.39, 77.8, 77.7, 76.9, 72.53, 71.3, 71.2, 70.40, 68.9, 61.03, 42.7, 18.78;

Δι-ακέτυλο ναριγκίνη(Ni1):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 12.07 (1H, OH 5), 9.63 (1H, OH 4'), 7.35 (1H, H 2'), 7.35 (1H, H6'), 6.83 (1H, H 5'), 6.83 (1H, H 3'), 6.18 (1H, H 8), 6.12 (1H, H6), 5.56 (1H, H2), 5.23 (1H, H 1''), 5.22 (1H, H 1'''), 4.82 (1H, H 4'''), 4.31 (1H, H6'' $\alpha$ ), 4.08 (1H, H 6'' $\beta$ ), 4.01 (1H, H5'''), 3.76 (1H, H2''), 3.76 (1H, H2'''), 3.56 (1H, H 3'''), 3.54 (1H, H 3''), 3.52 (1H, H 5''), 3.42 (1H, H 3 $\alpha$ ), 3.22 (1H, H 4''), 2.79 (1H, H 3 $\beta$ ), 2.01 (3H, H 8''), 2.01 (1H, H 8'''), 1.1 (3H, H 6''') ppm.  $^{13}\text{C}$ -NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 198.17, 170.7, 170.7, 165.11, 163.11, 158.65, 129.1, 120.91, 115.82, 115.82, 104.4, 100.3 C1, 97.9 C1, 96.96, 95.81, 79.42, 77.51, 76.28, 74.68, 74.36, 70.52, 70.52, 68.57, 66.3, 63.85, 42.71, 21.54, 21.54, 18.31;

Τρι-ακέτυλο ναριγκίνη(Ni2):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 12.04 (1H, OH 5), 7.6 (1H, H 2'), 7.6 (1H, H6'), 7.24 (1H, H 5'), 7.24 (1H, H 3'), 6.23 (1H, H 8), 6.13 (1H, H6), 5.71 (1H, H2), 5.23 (1H, H 1''), 5.22 (1H, H 1'''), 4.82 (1H, H 4'''), 4.31 (1H, H6'' $\alpha$ ), 4.08 (1H, H 6'' $\beta$ ), 4.01 (1H, H5'''), 3.76 (1H, H2''), 3.76 (1H, H2'''), 3.56 (1H, H 3'''), 3.54 (1H, H 3''), 3.52 (1H, H 5''), 3.41 (1H, H 3 $\alpha$ ), 3.22 (1H, H 4''), 2.89 (1H, H 3 $\beta$ ), 2.32 (3H, H 8') 2.01 (3H, H 8''), 2.01 (1H, H 8'''), 1.1 (3H, H 6''');  $^{13}\text{C}$ -NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 197.84, 170.7, 170.7, 170.1, 165.38 163.9, 151.57, 151.53, 137.0, 128.65, 120.91, 122.6, 122.6, 104.2, 100.3, 97.9', 97.01, 95.97, 78.89, 77.51, 76.28, 76.68, 74.36, 70.52, 70.57, 68.57, 66.3, 63.85, 42.73, 21.61, 21.54, 21.54, 18.31;

7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (L):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 13.03 (s, 1H), 10.03 (s, 1H), 9.41 (s, 1H), 7.49 (dd,  $J$ =/ 1H), 7.46 (d,  $J$ =2.3 Hz, 1H), 6.94 (d,  $J$ = 1H), 6.82 (d,  $J$ =2.2 Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.48 (d,  $J$ =2.2 Hz, 1H), 5.12 (d,  $J$ =7.5 Hz, 1H), 3.75 (d,  $J$ =10.8 Hz, 1H), 3.51 (d,  $J$ =10.8 Hz, 1H), 3.48 (m, 1H), 3.3 (m, 1H), 3.2 (t,  $J$ =9 Hz, 1H);  $^{13}\text{C}$ -NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 182.89, 165.34, 163.78, 162.03, 157.8, 150.69, 146.66, 122.3, 119.84, 116.68, 114.23, 106.22, 103.83, 100.55, 100.29, 95.37, 77.82, 77.05, 73.79, 70.23, 74.17, 61.26;

Δι-ακέτυλο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (L1):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 13.05 (s, 1H), 10.05 (s, 1H'), 9.42 (s, 1H), 7.48 (dd,  $J$ =/Hz, 1H), 7.46 (s, 1H), 6.94 (dd,  $J$ =/, 1H), 6.82 (d,  $J$ =2.25 Hz, 1H), 6.8 (s, 1H), 6.5 (dd,  $J$ =/ Hz, 1H), 5.77 (s, 1H), 5.61 (s, 1H), 5.33 (t,  $J$ =/ Hz, 1H), 4.95 (m, 1H), 4.35 (m, 1H), 4.14 (m, 1H), 3.94 (t,  $J$ = Hz, 1H), 3.5 (m, 1H), 3.44 (m, 1H), 2.09 (d,  $J$ =7 Hz, 3H), 2.06 (dd,  $J$ =/ Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$ -NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 182.64, 170.47, 170.29, 165.2, 163.14, 161.9, 157.5, 150.57, 146.58, 122.04, 119.92, 116.64, 114.26, 106.32, 103.89, 100.19, 99.75, 95.57, 77.71, 74.17, 71.6, 68.35, 63.78, 21.61, 21.3;

Τρι-ακέτυλο 7-O-γλυκοζίτης της λουτεολίνης (L2):  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 12.96 (s, 1H), 10.74 (s, 1H), 7.91 (dd,  $J=$  / Hz, 1H), 7.86 (t,  $J=$  / Hz, 1H), 7.12 (dd,  $J=$  / Hz, 1H), 6.96 (d,  $J=1$  Hz, 1H), 6.76 (d,  $J=2.2$  Hz, 1H), 6.45 (dd,  $J=$  / Hz, 1H), 5.62 (s, 1H), 5.55 (s, 1H), 5.46 (t, 1H), 4.86 (t, 1H), 4.4 (m, 1H), 3.89 (m, 1H), 3.33 (m, 2H), 2.33 (d,  $J=1.2$  Hz, 3H), 2.08 (d,  $J=7$  Hz, 3H), 2.05 (dd, 1 H);  $^{13}\text{C}$ -NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ , 25 OC):  $\delta$  = 182.78, 170.87, 170.01, 169.3, 164.13, 162.6, 161.76, 157.6, 153.83, 139.47, 126.43, 122.49, 118.11, 106.31, 104.51, 100.00, 97.83', 95.65, 74.7, 74.5, 74.19, 70.54, 63.87, 21.5, 21.5, 21.2;



