



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ

ΤΙΤΛΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ:

«Μελέτη υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης με το ένζυμο β-γλυκοζιδάση και της ακινητοποίησης σε φορέα στήριξης Eupergit C.»



Της **ΠΟΛΙΤΗ ΜΑΡΙΑΣ**, Χημικός Μηχ., ΕΜΠ

Τριμελής Επιτροπή

Καλογεράκης Νικόλαος (Επιβλέπων καθηγητής)

Ξεκουκουλωτάκης Νικόλαος

Παρανυχιανάκης Νικόλαος

Νοέμβρης, ΧΑΝΙΑ 2011

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή εκπονήθηκε στο Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος , στο Πολυτεχνείο Κρήτης στα Χανιά, στο εργαστήριο Βιοχημικής Μηχανικής και Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος εξειδίκευσης «Περιβαλλοντικής και Υγειονομικής Μηχανική». Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που με βοήθησαν για να ολοκληρωθεί αυτή η εργασία.

α Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επίκουρο Καθηγητή Κο Ξεκουκουλωτάκη Νίκο για την συνεχή καθοδήγηση και τις συμβουλές καθόλη τη διάρκεια της διατριβής .

α Τον επιβλέποντα της διατριβής μου, τον καθηγητή τον Κο Καλογεράκη Νικόλαο για την ανάθεση της εργασίας και για την υποστήριξη του για την ολοκλήρωση της.

α Την Λέκτορα Κα Βενιέρη Δανάη για κάθε συμβουλή της και τέλος δεν μπορώ να μην αναφέρω την αμέριστη βοήθεια του διδάκτορα Φροντιστή Ζάχου και της υποψήφιου διδάκτορα Μπαμπατσούλη Γιώτας στο εργαστήριο.

α Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την ενθάρρυνση και συμπαράσταση που μου έδειξαν με οποιοδήποτε τρόπο κατά τη διάρκεια της ενασχόλησης μου με αυτήν την εργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT	6
1.1 Εισαγωγή	7
1.2 Φύση του προβλήματος της διαχείρισης των αποβλήτων	7
1.3 Παραπροϊόντα της ελιάς.....	8
1.4 Μέθοδος βιώσιμης επεξεργασίας αποβλήτων: Ανάκτηση βιοενεργών συστατικών.....	9
1.5 Φαινόλες.....	10
1.5.1 Περιγραφή	10
1.5.2 Προέλευση των φαινολών	10
1.4.3 Τα φύλλα της ελιάς και οι πολυφαινόλες τους.....	11
1.5.3 Ανάκτηση φαινολών από τα φύλλα της ελιάς με εκχύλιση.....	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	14
2.1 Ευεγερτικές ιδιότητες των φύλλων ελιάς λόγω των φαινολικών ενώσεων.....	14
2.2 Προέλευση της ελευρωπαΐνης και οι ιδιότητες της.....	14
2.3 Η ενζυμική έναντι της χημικής υδρόλυσης	16
2.5 Προϊόντα της υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης και ιδιότητες τους.....	18
2.6 Φυτικοχημικές αλληλεπιδράσεις και μέθοδοι προστασίας των φαινολικών ενώσεων.....	19
3.1 Εισαγωγή στα ένζυμα.....	20
3.2 Τρόπος δράσης των ενζύμων.....	20
3.3 Εκτίμηση του ρυθμού αντίδρασης, των κινητικών παραμέτρων των ενζύμων.....	21
3.4 Η ομάδα των β-γλυκοζιδάσεων.....	23
3.4.2 Μηχανισμοί της κατάλυσης από την β-γλυκοζιδάση.....	25
3.5 Παράγοντες που επηρεάζουν τα ένζυμα.....	26
3.5.1 pH και θερμοκρασία.....	26
3.5.2 Αναστολείς	26
3.6 Χαρακτηριστικά του ενζύμου β-γλυκοζιδάση από αμύγδαλο.....	27
3.6.1 Εφαρμογές και παραδείγματα υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης από β-γλυκοζιδάση.....	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	28
4.1 Συστήματα ακινητοποιημένων ενζύμων.....	28
4.2 Επίδραση της ακινητοποίησης.....	30
4.3 Περιορισμοί λόγω διάχυσης στα ακινητοποιημένα ενζυμικά συστήματα.....	31
4.4 Εφαρμογές στην ακινητοποίηση πρωτεϊνών.....	31
4.5 Μηχανισμός ακινητοποίησης του ενζύμου στον εποξύ φορέα όπως ο Eupergit C.....	33
4.6 Ιδιότητες των εποξιομάδων που υπάρχουν στους φορείς ομοιοπολικής σύνδεσης.....	34
4.7 Δομή του φορέα στήριξης του Eupergit C	35

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	36
5.1 Υλικά	36
5.1.1 Ενζυμο β-γλυκοζιδάση από αμύγδαλο	36
5.1.2 Εκχύλισμα ελευρωπαϊνης από τα φύλλα της ελιάς.	36
5.1.3 Χημικά αντιδραστήρια	36
5.2 Πειραματικό σύστημα	37
5.3 Αναλυτικές μέθοδοι.....	38
5.3.1 Πρωτόκολλο προσδιορισμός της συνολικής πρωτεΐνης με την μέθοδο του QuantiPro BCA-kit.	38
5.3.2 Μέτρηση της 4-νιτροφαινόλης.	39
5.3.3 Μέθοδος προσδιορισμού της ελευρωπαϊνης	40
5.4 Απενεργοποίηση του ενζύμου.	42
5.5 Διαχωρισμός του ακινητοποιημένου ενζύμου από το διάλυμα.	43
5.6 Λυοφιλίωση του ακινητοποιημένου ενζύμου.	43
5.7 Επώαση των δειγμάτων	43
5.8 Διεργασία της εκχύλισης και καθαρισμού της ελευρωπαϊνης.	44
5.9 Χρωματογραφία της κατανομής στήλης υπό πίεση.	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	46
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	46
6.1 Μέτρηση της ειδικής ενεργότητας της β-γλυκοζιδάσης	46
6.2 Επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό υδρόλυσης του υποστρώματος 4-νιτροφαινόλο-β-D- γλυκοκυρανοζίτη.	47
6.3 Επίδρασης της θερμοκρασίας στη φυσική υδρόλυση της ελευρωπαϊνης.....	51
6.4 Επίδραση της συγκέντρωσης του βιοκαταλύτη στο ρυθμό υδρόλυσης με σταθερή συγκέντρωση ελευρωπαϊνη	52
6.5 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων της υδρόλυσης της ελευρωπαϊνης.....	57
6.6 Ακινητοποίηση του ενζύμο β-γλυκοζιδάση σε φορέα στήριξης Eupergit C	59
6.7 Ακινητοποίηση με πρόσθετα για την βελτίωση της ακινητοποίησης του ενζύμου στον Eupergit C.	61
6.8 Ενεργότητα του ακινητοποιημένου έναντι του ελεύθερου ενζύμου στην υδρόλυση της ελευρωπαϊνης.....	62
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	65
Βιβλιογραφική ανασκόπηση	67

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ελευρωπαϊνή αποτελεί φαινόλη που υπάρχει σε αφθονία στα φύλλα της ελιάς με αντιοξειδωτικές ικανότητες. Έχει αποδειχτεί ότι τα παράγωγα υδρόλυσης της όπως το άγλυκον της ελευρωπαϊνης και η υδροξυτυροσόλη είναι ακόμη πιο δραστικές χημικές ενώσεις που δρουν εξουδετερώνοντας στα κύτταρα ρίζες και άλλα ενεργά είδη, παρέχοντας έτσι μια προστασία έναντι της οξειδωτικής αλλοίωσης πολύτιμων βιομορίων όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA. Η συγκεκριμένη εργασία επικεντρώνεται στη μελέτη της υδρόλυσης της ελευρωπαϊνης από το ένζυμο β-γλυκοζιδάση για παραγωγή άγλυκον και γλυκόζης και στοχεύει σε μία αειφόρα βιοτεχνολογική στρατηγική διαχείρισης των απόβλητων της ελιάς. Η ακινητοποίηση του ενζύμου σε επιφάνεια φορέα στήριξης βελτιώνει τη διεργασία από οικονομικής και ποιοτικής πλευράς λόγω της ανάκτησης του ενζύμου και της καθαρότητας του προϊόντος αντίστοιχα, βελτιώνοντας επίσης κάποια χαρακτηριστικά του ενζύμου.

Κατά το πειραματικό μέρος διερευνήθηκε το θερμοκρασιακό εύρος όπου δρα το ένζυμο και ο ρυθμός υδρόλυσης του υπόστρωματος ο 4-νιτρο-φαίνυλο-β-D-γλυκοπυρανοζίτης και υπολογίστηκε από την αύξηση του προϊόντος 4-νιτροφαινόλης με φωτομέτρηση στα 405nm. Βρέθηκε ότι στους 50°C ότι έχει τη μεγαλύτερη ειδική ενεργότητα (0.150 IU/mg) ενώ στους 80 °C απενεργοποιείται, και η ενέργεια θερμικής ενεργοποίησης από την εξίσωση Arrhenius υπολογίζεται $E_a=11.82$ kcal/mol. Στη συνέχεια έγιναν πειράματα προσδιορισμού κινητικών παραμέτρων με υπόστρωμα την ελευρωπαϊνή. Εδώ να σημειωθεί ότι ο ρυθμός της υδρόλυσης υπολογίστηκε από τη μείωση της ελευρωπαϊνης και ποσοτικοποιήθηκε με την μέθοδο HPLC. Οι παράμετροι προσδιορίστηκαν σε $K_m=7.38$ mM και $u_{max}=0.095$ IU/mg. Στην συνέχεια έγινε βελτιστοποίηση της αρχικής συγκέντρωσης του ενζύμου για 2 συγκεντρώσεις ελευρωπαϊνης 0.185 και 0.976 mM και η βέλτιστη ήταν $[E_o]=0.196$ mg/L. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ακινητοποίηση του ενζύμου σε φορέα στήριξης σε ουδέτερες συνθήκες για 64 ώρες με αποτέλεσμα να ακινητοποιείται 90% της πρωτεΐνης. Στη συνέχεια έγινε βελτιστοποίηση της ακινητοποίησης με προσθήκη γλυκόζης 1% και αλβουμίνης βοδινού ορού 1% w/v. Πειράματα υδρόλυσης του p-PNG από το ακινητοποιημένο ένζυμο με ή χωρίς πρόσθετα και η ενεργότητα αυξήθηκε 1.12 φορές σε σχέση με το ένζυμο χωρίς πρόσθετα. Τέλος, αφού έγινε απομόνωση ελευρωπαϊνης από φύλλα της ελιάς με εκχύλιση στερεού-υγρού με διαλύτη τη μεθανόλη και χρωματογραφία στήλης με απόδοση 1450 mg OE/kg φύλλων ελιάς, στις βέλτιστες συνθήκες πραγματοποιήθηκε υδρόλυση του ανακτηθέντος εκχυλίσματος OE στη βέλτιστη θερμοκρασία με το σύστημα ακινητοποιημένου ενζύμου με ειδική ενεργότητα να είναι $1.037 \cdot 10^{-3}$ και η μετατροπή της OE να φτάνει το 60 % της αρχικής συγκέντρωσης μετά από 90 min.

ABSTRACT

The leaves of *Olea europea* are characterized by high oleuropein content that consider as antioxidative phenolic compound. The aglycon and hydroxytyrosol, obtainable by oleuropein hydrolysis is well known as more active pharmacological molecule that acts scavenging free radicals as superoxide anion, protecting against the oxidative stress of valuable molecules like proteins, lipids and DNA. In the current study is developed the kinetic study of oleuropein hydrolysis by β -glycosidase giving aglucon and glucose products and represents a sustainable production strategy to valorize olive mill wastes. Moreover, enzyme immobilization on an inert carrier offers the prospect of cost saving by enzyme recycling and improves the process yield and enzyme characteristics.

In the experimental part was investigated that the temperature range that the enzyme catalyzes and the rate of hydrolysis of 4-nitro-phenyl- β -D-glucopyranoside and β -glucosidase activity was determined by monitoring release of 4-nitrophenol. It was shown that the activity in 50°C was the optimum temperature with activity 0.150IU/mg protein mean while in 80 °C the enzyme inactivated. The activation energy was measured $E_a=11.82\text{kcal/mol}$. Afterwards, assays with oleuropein hydrolysis were conducted to determine kinetic parameters, so $K_m=7.38\text{mM}$ and $V_m=0,095\text{ IU/mg}$. The oleuropein hydrolysis was monitored by oleuropein reduction by HPLC method. Then, optimization of enzyme concentration was assayed in two OE concentration, 0.185-0.976mM and resulted as optimal $[E_o]=0.196\text{ mg/L}$. Thereafter, immobilization of enzyme on Eupergit C was incubated in neutral conditions for 64 hours with amount of immobilized protein reached the 90%. Based on results below, β -glucosidase was immobilized again in the presence of 1% glucose, followed by BSA 1%. Preincubation with the glucose and BSA increase the related activity of immobilized enzyme 1.12-fold. Last but not least, oleuropein isolation by solvent extraction method, that is abundant in nature and considered as waste material. Then, purification of organic leaf extract by liquid chromatography method target to high purity oleuropein with yield 1450 mg oleuropein/kg dry olive leaves. Hydrolysis experiments of oleuropein extract by immobilized enzyme was tested based in optimum conditions as below described. Special activity was determined as $1.037 \cdot 10^{-3}$ units/mg and the oleuropein conversion reduced in 60 % of initial concentration after 90min reaction.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 Εισαγωγή

Ιστορική αναδρομή

Η ελιά αποτελεί ένα ιερό και πολύτιμο δέντρο από τα αρχαία χρόνια. Το δέντρο της ελιάς είναι στενά συνδεδεμένο με την ιστορία της Μεσογείου, αφού το ήπιο κλίμα ευνόησε τη διάδοση της καλλιέργειας του. Ο καρπός αλλά και τα υπόλοιπα μέρη θεωρούνται από την αρχαιότητα ζωτικής σημασίας. Τα φύλλα της ελιάς έχουν μελετηθεί για τις θεραπευτικές του ιδιότητες. Από το 19^ο αιώνα υπάρχουν αναφορές για την συμβολή των εκχυλισμάτων φύλλων της ελιάς στην υγεία. Από τα μέσα του 20^{ου} αιώνα έχει αποδειχθεί ότι αυτές οι ευεργετικές ικανότητες των φύλλων της ελιάς οφείλονται στην παρουσία των φαινολών της ελιάς.[1]

Βοτανικά χαρακτηριστικά

Η ελιά είναι αειθαλής, καρποφόρο δέντρο και ανήκει στην οικογένεια Oleaceae και στο γένος Olea. Τα χαρακτηριστικά της οικογένειας αυτής είναι ο μικρός και ελλιπών κάλυκας, η άστροφη στεφάνη, οι δύο στήμονες, τα συμφυή καρμοπέταλα. Τα άνθη συναντιούνται σε φοβοεοδείς ταξιανθίες. Τα φύλλα είναι στενά, λογχοειδή, μακρουλά ή πλατιά, βγαίνουν στο βλαστό δυο-δυο αντικριστά και ζουν 2-3 χρόνια. Το γένος παρουσιάζει 20 είδη από τα οποία, το είδος Olea europaea παρουσιάζει οικονομικό ενδιαφέρον [2].

Στη συγκεκριμένη εργασία τα φύλλα της ελιάς που χρησιμοποιήθηκαν, ανήκουν σε αυτό το είδος και συλλέχτηκαν από το προαύλιο χώρο του Πολυτεχνείου Κρήτης. Το δέντρο της ελιάς ευδοκίμει σε ξηροθερμικές περιοχές και αποτελεί ένα από τα λίγα δέντρα που αναπτύσσεται σε πετρώδη και άγονα εδάφη.

1.2 Φύση του προβλήματος της διαχείρισης των αποβλήτων

Σήμερα η παγκόσμια καλλιέργεια ελαιόδεντρων περιλαμβάνει $750 \cdot 10^6$ δέντρα και καλύπτουν $7 \cdot 10^6$ εκτάρια γης. Η ετήσια παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς και ελαιολάδου εκτιμάται σε 1 και $2.5 \cdot 10^6$ τόνους αντίστοιχα [3].

Εξίσου και η καλλιέργεια και η επεξεργασία της ελιάς παράγουν τεράστιες ποσότητες αποβλήτων. Η κατεργασία των ελιών αποδίδει κατά 20% ελαιολάδο και 80% απόβλητα ελαιουργείου[4]. Ενδεικτικά η συνολική ποσότητα αποβλήτων που περιλαμβάνουν τα στερεά και υγρά απόβλητα που μπορεί να παραχθούν κυμαίνονται από 0.2-1.6 m³/kg ελαιόκαρπου, αναλόγως

τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο εξαγωγής [5]. Οι Cabrera et al. έχουν υπολογίσει τη ετήσια παραγωγή αποβλήτων σε μεσογειακές χώρες σε $10\text{-}12 \cdot 10^6 \text{ m}^3$ [25]. Στην Ελλάδα οι Iconomou et al. εκτιμούν ότι είναι $1.5 \cdot 10^6 \text{ m}^3$.

1.3 Παραπροϊόντα της ελιάς

Υπολείμματα από τη συγκομιδή και το κλάδεμα.

Τα φύλλα της ελιάς αποτελούν ένα μέρος των στερεών αποβλήτων των ελαιουργείων. Περιέχουν σημαντικές ποσότητες φαινόλων οι οποίες με τη ρίψη τους στο περιβάλλον δημιουργούν δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον αφού είναι τοξικά για τους υδρόβιους οργανισμούς. Από την άλλη μεριά μερικές από τις περιεχόμενες φαινόλες αποτελούν βιοενεργά συστατικά για τον άνθρωπο ώστε να αξιοποιηθούν από βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών. Τα φύλλα της ελιάς αποτελούν φθινό υπόστρωμα σε σχέση με τα αρωματικά φυτά τα οποία καλλιεργούνται για αυτούς τους σκοπούς.

Πιο συγκεκριμένα τα ελαιόδεντρα συνήθως κλαδεύονται σε κλάδεμα κάθε 2 χρόνια ενώ κάθε χρόνο γίνεται ένα τυπικό καθάρισμα. Έχει υπολογιστεί ότι μόνο από το κλάδεμα παράγονται 25kg παραπροϊόντων (φύλλα και κλαδιά) ανά ελαιόδεντρο ετησίως. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα φύλλα της ελιάς αποτελούν το 5% του βάρους των εκχυλιζόμενων ελιών[4].

Μετά το διαχωρισμό των μεγάλων κλαδιών, τα φύλλα και τα μικρά κλαδιά (< από 3cm διάμετρο) μπορούν να δοθούν σαν λίπασμα ή σαν ζωοτροφή. Οι Civantos et al. [5] εντόπισαν διαφορές στο ότι τα φύλλα που συλλέγονται στα ελαιουργεία έχουν ασήμαντο ποσοστό σε ξύλο ενώ στα κλαδιά το ποσοστό του ξύλου είναι υπολογίσιμο. Στα κλαδιά με διάμετρο μικρότερη από 4 εκατοστά το ποσοστό των φύλλων είναι 50%.

Η χημική σύσταση των φύλλων ελιάς, που έχουν ανακτηθεί είτε από το κλάδεμα είτε από το καθάρισμα των ελιών σε διάφορους μύλους και έχουν προεπεξεργαστεί με ξήρανση στους 60°C φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1: Χημικής σύσταση των φύλλων της ελιάς από κλάδεμα και από τους μύλους

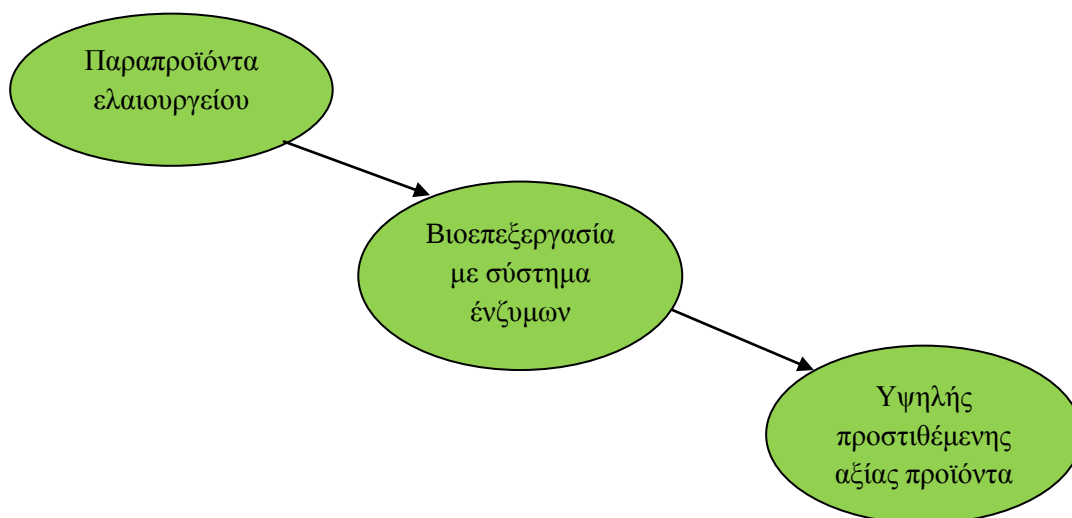
Συστατικά	Περιεκτικότητα(g/100g ξ.β)
Οργανική ύλη	76.4 - 92.7
Πρωτεΐνες	6.31 - 10.9
Λίπη	2.28 - 9.57
Ολικό άζωτο ^a	35.2 - 49.2
Ολικές πολυφαινόλες	0.14 - 4.3
Εδώδιμες ίνες	34.9 - 41.3
Λιγνίνες	14.1 - 21.1
Ταννίνες	0.669 - 1.11

^a (g/100g TN για το άζωτο που περιέχεται στα κυτταρικά τοιχώματα των φύλλων.)[6]

Πιο συγκεκριμένα όσον αφορά τις φαινόλες, σύμφωνα με μελέτη του Sansoucy et al. [7a] το ποσοστό των φαινολών στα ξηρά φύλλα μπορεί να μειωθεί κατά 36% σε σχέση με τα νωπά, δηλαδή υπάρχει μία απώλεια λόγω θερμικής επεξεργασίας. Ακόμα και τα ξηρά και τα φρέσκα κλαδιά το ποσοστό των φαινολών κυμαίνεται από 7-9 g/100 g ξ.β η φ.β. Ακόμη σε φύλλα με 8.8-22.6% ξύλο οι περιεκτικότητες σε φαινόλη κυμαίνεται από 7.7-8.7 g/100 g ξ.β. Η χημική σύνθεση των φύλλων της ελιάς εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως την ποικιλία της ελιάς, τις κλιματολογικές συνθήκες, την ηλικία του δέντρου, την αναλογία ξύλου-φύλλων, χρόνο συγκομιδής, παρουσία ή μη εντομοκτόνων, λιπασμάτων. κ.τ.λ.

1.4 Μέθοδος βιώσιμης επεξεργασίας αποβλήτων: Ανάκτηση βιοενεργών συστατικών

Οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις εναπόθεσης ακατέργαστων αποβλήτων είναι μεγάλες λόγω του μεγάλου ρυπαντικού φορτίου. έτσι προτείνεται μετατροπή των συστημάτων ελαιολάδου με στόχο την μείωση των παραγόμενων αποβλήτων, συνδυασμένοι μέθοδοι αποτοξίνωση για τη μείωση του ρυπαντικού φορτίου στους αποδέκτες και αξιοποίηση του ρεύματος των αποβλήτων. Η αξιοποίηση των αποβλήτων ελαιουργείου εκτός από τις συνηθισμένες πρακτικές όπως η κομποστοποίηση, τροφή ζώων, λίπασμα δεν προάγουν τη βιωσιμότητα των ελαιοτριβείων. Τα απόβλητα όπως φαίνεται και στον πίνακα 1 περιέχουν πρωτεΐνες, σάκχαρα, λιπίδια, φαινόλες αποτελώντας μια φτηνή πρώτη ύλη για την παραγωγή χημικών ενώσεων φυσικής προέλευσης. Μια συνδυασμένη προεπεξεργασία του αποβλήτου που την ακολουθεί ανάκτηση υψηλής αξίας φυσικών προϊόντων όπως αντιοξειδωτικών, χρωστικών, αμύλου, ενζύμων θα μπορούσε να έχει μεγαλύτερο ενδιαφέρον από οικονομικής και οικολογικής προσέγγισης. Ακόμη κάποια παραπροϊόντα μπορούν να μετατραπούν σε ακόμη πιο χρήσιμα όπως για «bio-based» χημικά για χρήση (π.χ αντιοξειδωτικά, αρώματα), μακρομόρια π.χ βιοπολυμερή, λιπαντικά, βιοκαύσιμα (βιοαιθανόλη, βιοαέριο). Συγκεκριμένα μπορούν να αξιοποιηθούν από ελαιουργικά απόβλητα οι διαιτητικές ίνες και οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν υψηλής αξίας ενώσεις λόγω των ευεγερτικών και χρήσιμων ιδιοτήτων τους. Στην παρούσα εργασία ο στόχος είναι η μετατροπή της άφθονης πρώτης ύλης που τα φύλλα της ελιάς σε προϊόν υψηλής προστιθέμενης αξίας με φυσική επεξεργασία με τη χρήση ενζυμικού συστήματος [7b].



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της βιώσιμη πορεία επεξεργασίας αποβλήτων ελαιουργείου.

1.5 Φαινόλες

1.5.1 Περιγραφή

Στην οργανική χημεία οι φαινόλες αναφέρεται σε μια κατηγορία χημικών ενώσεων που περιέχουν έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους υποκατεστημένους με μία ή περισσότερες υδροξυλομάδες (-OH). Η πιο απλή ένωση είναι η φαινόλη (C_6H_5OH). Οι ενώσεις που περιέχουν τουλάχιστον δυο -OH ονομάζονται πολυφαινόλες. Οι περισσότερες φαινόλες έχουν τον ίδιο μεταβολικό προπομπό, την φαινυλαλανίνη, η οποία από-μινώνεται σε κινναμικό οξύ[8]. Αυτό το συστατικό εισέρχεται στην φαινυλο-προπανοειδή οδό και μπορεί να σχηματίσει τις εξής κατηγορίες φυτικών φαινολών:

- I. Παράγωγα του υδροξυ-βενζοϊκού και -κινναμικού οξέος
- II. Υδροξυ-κουμαρίνες
- III. Φλαβονοειδή
- IV. Ταννίνες
- V. Λιγνάνες

1.5.2 Προέλευση των φαινολών

Οι φαινόλες βρίσκονται σε αφθονία στη φύση και συγκεκριμένα στους φυτικούς ιστούς που τις βιοσυνθέτουν. Τα φρούτα και τα λαχανικά αποτελούν τις κύριες πηγές προέλευσης, ενώ έπονται τα φύλλα, δημητριακά, βότανα, καρυκεία κτλ. Οι φαινόλες από τις πρωτογενείς πηγές μεταφέρονται στα δευτερογενή προϊόντα και στα αντίστοιχα παραπροϊόντα. Ενδεικτικά

παραδείγματα αποβλήτων διάφορων προελεύσεων με υψηλή περιεκτικότητα σε φαινόλες αποτελούν τα υπολλείμματα πούλπας σταφυλιού που περιέχουν 13.8 g πολυφαινόλες/kg [9], στη πούλπα του λεμονιού 13.3 g πολυφαινόλες/kg.[10] Ενώ στα απόβλητα ελαιουργείου 13-40 g ολικές φαινόλες/kg [11].

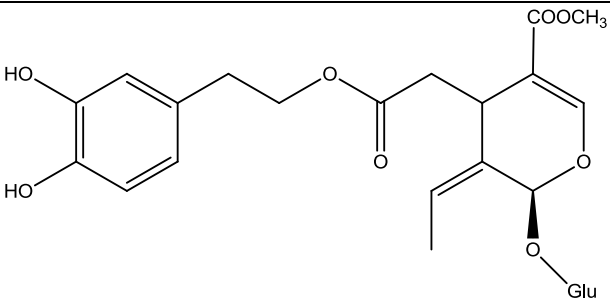
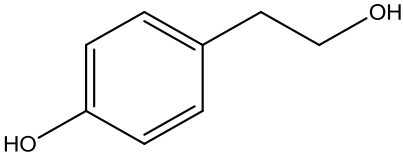
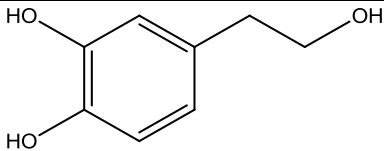
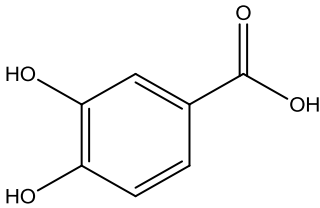
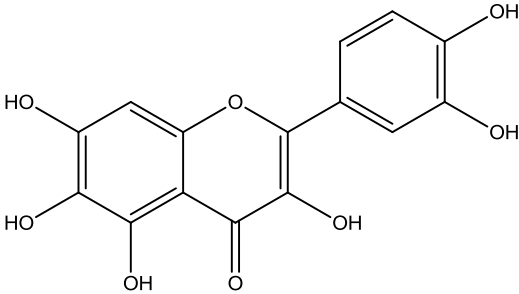
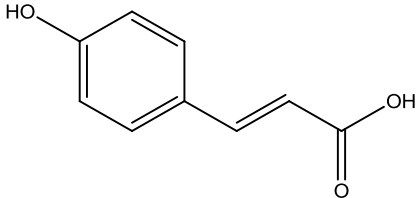
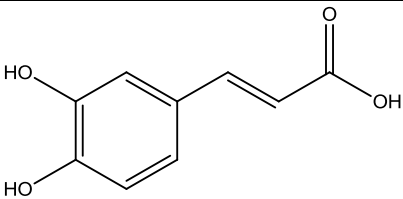
Οι φαινόλες των αποβλήτων ελαιουργείου μπορεί να υπάρχουν από τη φύση στο ελαιόκαρπο ή να δημιουργήθηκαν κατά τη διαδικασία εξαγωγής του ελαιόλαδου. Πιο συγκεκριμένα ο ελαιόκαρπος και τα απόβλητα περιέχουν φαινολικά οξέα και αλκοόλες, σερεκενοειδή και φλαβονοειδή. Έχουν ταυτοποιηθεί πάνω 50 ενώσεις στα απόβλητα του ελαιουργείου και 40 στο ελαιόλαδο.

1.4.3 Τα φύλλα της ελιάς και οι πολυφαινόλες τους.

Τα φύλλα της ελιάς έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς στη παραδοσιακή ιατρική σε αρκετές περιοχές της Μεσογείου και στα νησιά της [12]. Το κυριότερο συστατικά των φύλλων είναι τα σερεκενοειδή όπως η ελευρωπαΐνη, διμεθυλολευρωπαΐνη, ligostroside, και oleoside. Ακόμη τα φύλλα της ελιάς περιέχουν φλαβονοειδή όπως απιγενίνη, κερσετίνη, λουτεολίνη, kaempferol και από την ομάδα των φαινολικών οξέων καφεϊκό, κουμαρικό, φερουλικό, πρωτοκατεχικό, π-υδροξυβενζοϊκό, π-υδροξυφαινυλοοξικό οξύ και από την ομάδα των αλκοολών κυριαρχούν η τυροσόλη, υδροξυτυροσόλη και η βανιλιεθανοδιόλη [19].

Οι χημικοί τύποι αντιπροσωπευτικών φαινολικών αλκοολών, σερεκενοειδών ,και φλαβονοειδών που υπάρχουν στα φύλλα της ελιάς.

Πίνακας 2: Αντιπροσωπευτικοί χημικοί τύποι φαινολών που υπάρχουν στα εκχυλίσματα φύλλων της ελιάς.

Φαινόλες	Χημική δομή
Ελευρωπαΐνη	
Τυροσόλη	
Υδροξυτυσόλη	
Πρωτοκατεχικό οξύ	
Κερσετίνη	
p-κουμαρικό	
Καφεϊκό οξύ	

1.5.3 Ανάκτηση φαινολών από τα φύλλα της ελιάς με εκχύλιση.

Η ανάκτηση αντιοξειδωτικών ουσιών από φυσικές πηγές πραγματοποιείται συνήθως με εκχύλιση με έναν ή περισσότερους οργανικούς διαλύτες ενώ η απόδοση και η αντιοξειδωτική δράση τους εξαρτάται από την πολικότητα τους [13]. Ο όρος «εκχύλιση» αναφέρεται στην διεργασία κατά την οποία ένα συστατικό στερεό ή υγρό, παραλαμβάνεται από ένα άλλο στερεό ή υγρό χρησιμοποιώντας τον κατάλληλο διαλύτη. Η μέθοδος της εκχύλισης αποτελεί ευρέως διαδεδομένη εφαρμογές διαχωρισμών της βιομηχανίας τροφίμων με κύρια την εκχύλιση στερεού - υγρού (SPE-Solid phase extraction) και δευτερευόντως την εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE-Liquid liquid extraction). Η δρώσα δύναμη της εκχύλισης είναι η διαφορά συγκέντρωσης μεταξύ του στερεού και του διαλύτη. Η ταχύτητα εκχύλισης μπορεί να μεταβληθεί αυξάνοντας το συντελεστή διάχυσης ή μειώνοντας τον μέγεθος των κομματιών. Η αύξηση της θερμοκρασίας και η μείωση του ιξώδους αυξάνουν σημαντικά το συντελεστή διάχυσης [14]. Ως επακόλουθο, η αύξηση της θερμοκρασίας ευνοεί την ταχύτερη εκχύλιση των συστατικών, αλλά θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι κατά τη θέρμανση μπορεί να ενεργοποιηθούν κάποια ένζυμα, η αποδόμηση κάποιων θερμοευαίσθητων συστατικών [15].

Η παραλαβή των πολυφαινολών από τα φύλλα της ελιάς γίνεται κυρίως με εκχύλιση υγρού-στερεού με διαλύτες όπως μίγματα μεθανόλης/νερού [16], αιθανόλη[17], ακετόνη [33], ακόμη και σκέτο νερό [21a].

Ακόμη μία άλλη μέθοδος εκχύλισης βιοφαινολών, είναι η μέθοδος της εκχύλισης με τη βοήθεια υπέρηχων, θεωρητικά είναι πιο «πράσινος» αφού χρησιμοποιήθηκαν μη τοξικοί διαλύτες όπως αναλογία αιθανόλη/νερού και πιο γρήγορος 25min σε σχέση με τη συμβατική μέθοδο εκχύλισης που απαιτεί 24ώρες[19].

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη σύνθεση φαινολών των εκχυλισμάτων, εκτός τους διαλύτες εκχύλισης, το χρόνο από τη θερμοκρασία εκχύλισης άλλοι παράγοντες όπως ο τόπος και ο χρόνος περισυλλογής επηρεάζουν τις ιδιότητες του δείγματος. Ακόμη οι συνθήκες συντήρησης των ανακτώμενων φύλλων μπορούν με τη σειρά τους να επηρεάσουν τη σύνθεση των φαινολών περιλαμβανόμενης και της OE όπως έδειξαν οι Paiva Martins et al.[72].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1 Ευεγερτικές ιδιότητες των φύλλων ελιάς λόγω των φαινολικών ενώσεων.

Οι επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι στις μεσογειακές χώρες υπάρχουν λιγότερα επεισόδια καρδιαγγειακών παθήσεων σε σχέση με την υπόλοιπη Ευρώπη. Αυτά τα πορίσματα των μελετών οφείλονται κατά κύριο λόγο στη μεσογειακή διατροφή, με χαρακτηριστικό την μεγάλη κατανάλωση ελαιολάδου και ελιών[20]. Για το λόγο αυτό τελευταία δίνεται μεγαλύτερη προσοχή στις φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στην ελιά.

Η χρήση του εκχυλίσματος φύλλων ελιάς σαν θρεπτικό πρόσθετο μειώνει την πιθανότητα μικροβιακής προσβολής, ειδικότερα στο εντερικό και αναπνευστικό σύστημα εξαιτίας της συνεργατικής και προσθετικής δράσης των πολυφαινολών που περιέχονται.

Στην μελέτη [21a] μελετήθηκε η ανασταλτική δράση μικροοργανισμών που εκτός από την υποβάθμιση της ποιότητας των τροφίμων μπορούν να επηρεάσουν και να προσβάλλουν το ανθρώπινο εντερικό και αναπνευστικό σύστημα. Σύμφωνα με το ρυθμό ανάπτυξης των μικροβίων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος φύλλων ελιάς το οποίο καταπολεμά καλύτερα, όπως φαίνεται με τη σειρά ευαισθησίας *B. cereus* - *C. albicans* > *E. coli* > *S. aureus* > *C. neoformans* - *K. pneumoniae* - *P. aeruginosa* > *B. subtilis*. *B. cereus* (Gram θετικοί) και *C. albicans* (μύκητας). Ακόμη πιο συγκεκριμένα η ελαιωρωπαΐνη, υδροξυτυροσόλη και άλλες φαινολικές ενώσεις δείχνουν ότι αναστέλλουν ή καθυστερούν το ρυθμό ανάπτυξης διάφορων παθογόνων μ.ο όπως *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Salmonella typhi*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio alginolyticus*. σύμφωνα με τους Bisignano et al.[21b].

2.2 Προέλευση της ελευρωπαΐνης και οι ιδιότητες της.

Η ελευρωπαΐνη είναι το βασικό συστατικό των εκχυλισμάτων των φύλλων της ελιάς, αποτελεί μια φαινολική ένωση που ανήκει στα σερεκενοειδή. Η ελαιωρωπαΐνη είναι γλυκοζιτικός εστέρας της υδροξυτυροσόλης και του ελενοικού οξέος ή αλλιώς γλυκοζιλωμένο άγλυκον. Η πορεία της βιοσύνθεσης της ελαιωρωπαΐνης στην ελιά προκύπτει από ένα μεταβολικό μονοπάτι του μεβαλονικού οξέος, που καταλήγει στο σχηματισμό oleosides που από εκεί προέρχονται τα σερεκενοειδή.[22b]

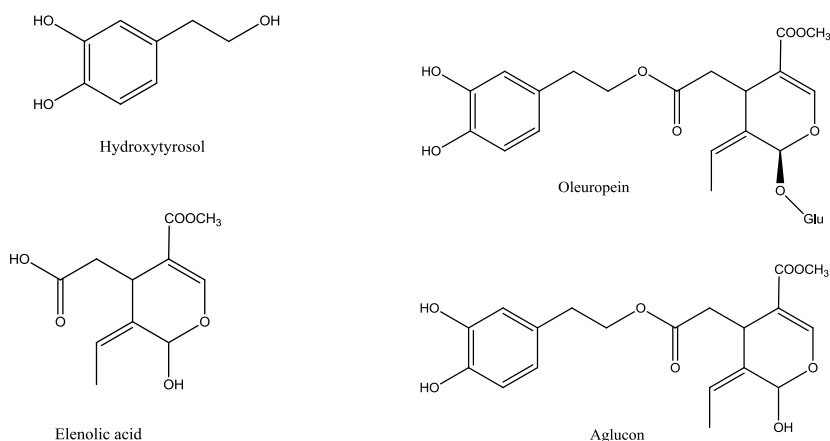
Εκτός από τα φύλλα της ελιάς υπάρχει και στους ανεπεξέργαστους άγουρους καρπούς της ελιάς, ενώ στο ελαιόλαδο βρίσκεται σε πολύ μικρές ποσότητες. Ενδεικτικά στα φύλλα της ελιάς (του είδους *Olea Europea*) συναντάται σε ποσοστό 1-14% w/w, στο λάδι 0.005-0.12%w/w, στα υγρά απόβλητα 0.87% w/w[23]. Είναι υπεύθυνη για την πικρή γεύση και το γεμάτο άρωμα του ελαιόλαδου, ενώ παρουσιάζει υψηλή ικανότητα αμαύρωσης και οξείδωσης [25].

Πίνακας 3: Αναφορές για την εκχυλιζόμενη ποσότητα ελευρωπαΐνης και τη μέθοδο εκχύλισης και ανάλυσης.

Περιεκτικότητα OE (mg/kg ξ.β φύλλων ελιάς)	Διαλύτης εκχύλισης Αναλογία δείγματος/διαλύτη	Μέθοδοι ανάλυσης	Αναφορά
1680 (±103.67)	MeOH (25 °C) - 100g/500 ml	HPLC,GC-MS	[73]
36000	Ακετόνη(25 °C) (5kg/25lt)	MPLC, HPLC	[33]
26471± 1760.2	Νερό(στους 100°C) - (5g/150ml)	HPLC, NMR	[21a]
22610±632	EtOH/νερό (59:41) - (1g/8ml)	HPLC,MS	[19]
14400	Ατμός,MeOH (500g)/EtoAc	TLC,MS	[24]
2440	Νερό (100°C)-(50g/250ml)	HPLC	[31]

Η υδρόλυση της μπορεί να γίνει είτε ενζυμικά με την ενδογενής β-γλυκοζιδάση ή εστεράσεων ή πολυφαινολονοξειδασών που υπάρχουν στο δέντρο της ελιάς [15]. Είτε χημικά κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας της ελιάς π.χ στη διαδικασία ξεπικρίσματος των καρπών, όπου επικρατούν βασικές συνθήκες ,η ελευρωπαΐνη έχει την τάση να υδρολύεται σε προϊόντα όπως υδροξυτυροσόλη ελεονικό οξύ και γλυκόζη [24].Συγκεκριμένα η επεξεργασία με καυστικό νάτριο υδρολύει του εστερικούς δεσμούς μετατρέποντας την ελευρωπαΐνη σε υδροξυτυροσόλη ή ελεονικό οξύ.

Ακόμη, κατά την επεξεργασία των ελιών π.χ κατά το ξέπλυμα γίνεται διάχυση των πολικών ουσιών όπως οι προαναφερθείσες από την σάρκα των ελιών κατά την πλύση στα απόβλητα νερά. Έτσι η ελευρωπαΐνη και υδροξυτυροσόλη υπάρχουν τελικά σε μικρές ποσότητες στο λάδι, οι οποίες του προσδίδουν μια οξειδωτική σταθερότητα και σε μεγαλύτερες στα υγρά απόβλητα του ελαιουργείου.[3]



Εικόνα 2: Προϊόντα της υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης είτε ενζυμικής είτε χημικής διεργασίας.

2.3 Η ενζυμική έναντι της χημικής υδρόλυσης .

Είναι βασικό ότι η βιοτεχνολογία της ενζυμικής υδρόλυσης διευκολύνει τη διαχείριση της εκάστοτε διεργασίας αφού ο διαχωρισμός του προϊόντος γίνεται απλοϊκός και ελαχιστοποιείται το οικολογικό αποτύπωμα ελαχιστοποιώντας τα τοξικά απόβλητα. Αυτή η προσέγγιση του «καθαρού ρεύματος» του προϊόντος δίνει μια ώθηση στην χρήση των βιοκαταλυτών στην φαρμακευτική βιομηχανία. Ο Poulsen et al. έχει δείξει ότι η χημική παραγωγή της αμοξυσιλίνης παράγει παραπροϊόντα σε σχέση με την ενζυμική διεργασία που είναι λιγότερο τοξικά και αλλεργικά. Ενώ η παραγωγή αντιβιοτικών β-λακτάμης (amoxil) στην χημική σύνθεση τους απαιτούν διαλύτη διχλωρομεθάνιο, με την ενζυμική διεργασία δεν χρειαζόταν ο διαλύτης [71].

Οι Walter et al.[24] έδειξαν ότι από την χημική υδρόλυση της ελευρωπαΐνης (OE) (με συνθήκες 1N H₂SO₄, 100°C) παράγονται με μερική μετατροπή, άγλυκο της ελαιωρωπαΐνης και γλυκόζη ενώ σε 2^ο στάδιο γίνεται πλήρης μετατροπή της ελευρωπαΐνης στα παραπροϊόντα της υδροξυτυροσόλης, της γλυκόζης και του ελενοϊκού οξέος. Αντίθετα, η ενζυματική υδρόλυση (σε πιο ήπιες συνθήκες) από τη β-γλυκοζιδάση έχει ως προϊόντα αποκλειστικά γλυκόζη και άγλυκο της ελαιωρωπαΐνης[22]. Έτσι η χημικής υδρόλυση υστερεί λόγω της παραγωγής παραπροϊόντων, μειώνοντας έτσι την επιλεκτικότητα και της παραγωγικότητα της διεργασίας.

2.4 Φαρμακευτικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες της ελευρωπαΐνης.

Όσον αφορά τις αντιμικροβιακές ιδιότητες στην ελιά, οι υψηλές συγκεντρώσεις της ελευρωπαΐνης και των μεταβολιτών ενώσεων της έχει αποδειχτεί ότι παρέχουν στο είδος *Olea europea* ένα είδος αντίστασης στην επίθεση μικροβίων και εντόμων (37b). Συγκεκριμένα έχει παρατηρηθεί

ανασταλτική επίδραση της ελευρωπαΐνης σε βακτήρια γαλακτικού οξέος και σε άλλους μικροοργανισμούς που περιλαμβάνονται στη ωρίμανση των ελιών (37c).

Όσον αφορά τον ανθρώπινο οργανισμό, είναι αποδεκτό ότι το οξειδωτικό στρες και οι οξειδωτικές αλλοιώσεις των βιομορίων όπως λιπιδίων, πρωτεϊνών και DNA συμβάλλουν στην παθολογία του καρκίνου, της αρτηριοσκλήρωσης και άλλων χρόνιων δυσλειτουργιών καθώς και στην εξέλιξη νευροεκφυλιστικών ασθενειών ή στις διεργασίες που σχετίζονται με το γήρας.

Η ελευρωπαΐνη έχει μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα, σε σχέση με το λιποδιαλυτό ανάλογο της τοκοφερόλης [26]. Η ελευρωπαΐνη είναι αποσβέστης διάφορων ριζών και ενεργών μορφών οξυγόνου και αζώτου. Συμβάλλει στην καταπολέμηση της αρτηριοσκλήρυνσης αναστέλλοντας της οξείδωση του LDL δεσμεύοντας διάφορα είδη ριζών που αντιδρούν με το οξυγόνο στα αγγειακά τοιχώματα [30]. Ακόμη έχει βρεθεί ότι μειώνει τα συνολικά επίπεδα χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων και εμποδίζει το οξειδωτικό μυοκαρδιακό στρες δίνοντας ελπίδες για μελλοντική χρήση στην θεραπεία της καρδιάς (coronary heart disease) [31,32].

Ακόμη πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι η ελευρωπαΐνη μπορεί να ρυθμίζει το μεταβολισμό, ενώ αντι-ισχαιμικές, αντικαρκινικές και αντιογκολογικές επιδράσεις έχουν προσφάτως αναδειχθεί σε αναίσθητα ποντίκια.[33] Ενώ μειώνει τη παραγωγή φλεγμονών [34]. Ακόμη έχει βρεθεί ότι αναστέλλει *in vitro* τα μυκοπλάσματα (παθογόνα βακτήρια στους ανθρώπους) [35].



Εικόνα 3: Σκεύασμα σε κάψουλες που κυκλοφορεί στο εμπόριο με περιεκτικότητα 6% ελευρωπαΐνη.

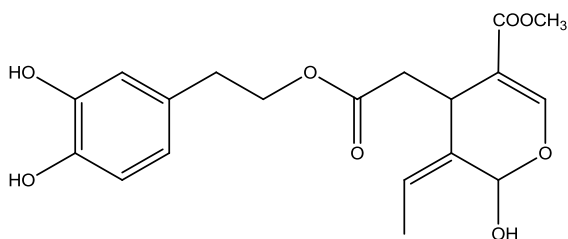
Η συνιστώμενη κατά μέσο όρο κατανάλωση φαινολών (που κατά κύριο λόγω προέρχονται από την υδρόλυση της ΟΕ) από ανεπεξέργαστες ελιές και το ελαιόλαδο υπολογίζεται σε 100 mg ισοδύναμα ΟΕ τη μέρα. Απορροφάται γρήγορα από τον οργανισμό όταν δοθεί από το στόμα και τη μέγιστη συγκέντρωση πλάσματος μετά από 2 ώρες.[33]

2.5 Προϊόντα της υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης και ιδιότητες τους.

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα προϊόντα υδρόλυσης της ελαιωρωπαΐνης έχουν μεγαλύτερη ανασταλτική δράση κατά των παθογόνων μικροοργανισμών από ότι η ελευρωπαΐνη. [24]

Συγκεκριμένα το άγλυκον της ελαιωρωπαΐνης, υπάρχει στα φύλλα ή στο καρπό της ελιάς προσδίδει αντιμικροβιακές ιδιότητες σε κοινές παθήσεις στα ελαιόδεντρα [37] και συγκεκριμένα ενάντια στο βακτήριο *pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* που προκαλεί τους όγκους των ελιών.[38]

Ακόμη είναι γνωστό σαν ισχυρό αντιοξειδωτικό εμποδίζοντας την οξείδωση LDL.[30] Ακόμη όσον αφορά τις οργανοληπτικές ιδιότητες, το άγλυκον, είναι τόσο πικρό όσο η ελευρωπαΐνη.



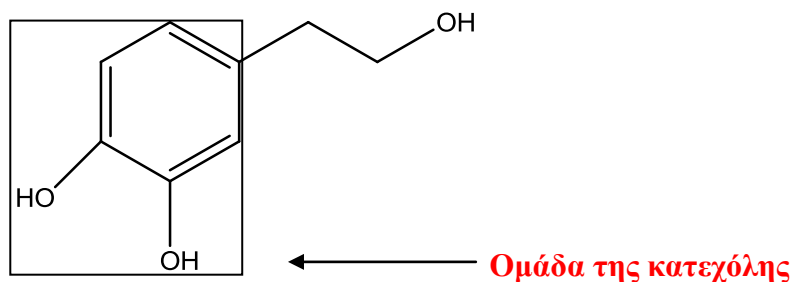
Εικόνα 4: Η χημική δομή του μορίου του άγλυκον της ελευρωπαΐνης.

Η υδροξυτυροσόλη, αλλιώς (2-(3,4-διυδροξυφαινυλοϊθανόλη ή 3,4 DHPEA) είναι ο-διφαινόλη και αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς μεταβολίτες της υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης που προκύπτει με τη β-γλυκοζιδάση και έπειτα την αποσταθεροποίηση του άγλυκον μέσω της λύσης του εστερικού δεσμού κάτω ισχυρές είτε όξινες [24] είτε βασικές συνθήκες[24b] και υψηλές θερμοκρασίες.

Η παραγωγή της προκύπτει είτε από την χημική σύνθεση της που βασίζονται στην αναγωγή του 3,4-διυδροξυφαινυλοξικού οξέος παρουσία LiBH_4 [41] ή του αντίστοιχου μεθυλεστέρα [42]. είτε από φυσικές πηγές για την αξιοποίηση του σαν συμπλήρωμα διατροφής, σταθεροποιητικό τροφίμων ή στα καλλυντικά. Η ανάκτηση του από φυσικές πηγές μπορεί να γίνει με βιομετατροπή είτε ενζυμικά με την τυροσινάση μανιταριών και ασκορβικό οξύ[74b] είτε με ακινητοποιημένα κύτταρα *Pseudomonas aeruginosa* που μετατρέπουν την τυροσόλη σε υδροξυτυροσόλη. [74a]

Η αντιοξειδωτική του ικανότητα οφείλεται στην ομάδα της κατεχόλης, και η δράση της υδροξυτυροσόλης στην υδατική φάση συγκρίνεται με το ασκορβικό οξύ ενώ στη ελαιώδη φάση είναι 4 φορές υψηλότερη, αυτή η συμπεριφορά είναι γνωστή σαν πολικό παράδοξο[39]. Ως αμφίφιλη ένωση με $\log P=0.02$ καθίσταται βιοδιαθέσιμο αφού μπορεί να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες. Όπως και η ελευρωπαΐνη έχει αποδειχτεί ότι προστατεύει τα κύτταρα από

το οξειδωτικό στρες, έχει αντιμικροβιακές, αντικαρκινικές, αντιογκολογικές και κυρίως μειώνει την παθογένεση καρδιαγγειακών επεισοδίων. [40]



Εικόνα 5 : Η χημική δομή της υδροξυτυροσόλης και η ομάδα της κατεχόλης.

Όσον αφορά το προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας και των υπόλοιπων φαινολών που φαίνονται στην εικόνα 2, οι Briante et al. [39] δοκίμασαν δύο μεθόδους αντιοξειδωτικής ικανότητας που βασίζονται α) στην ικανότητα δέσμευσης ελεύθερων ριζών όπως του DMPD[•] (N-N-dimethyl-p-phenylenediamine) και ABAP[•] (2,2'-azobis(2-amidinopropane)) β) στην ικανότητα δέσμευσης ριζών υπεροξειδίου από λιπαρά οξέα π.χ λινολειακού οξέος. Παρατηρήσανε ότι στη μέθοδο **DMPD[•]** η YT δείχνει αντιοξειδωτική δράση συγκρίσιμη με υδρόφιλες χημικές ενώσεις όπως το υδατοδιαλυτού ανάλογου TROLOX. Αυτό οφείλεται στην μεγαλύτερη ικανότητα των φαινολικών ενώσεων με υποκατάστατες υδροξυλίου να είναι δότες. Η ενώ χαμηλότερη επίδραση έχει ο κλειστός δακτύλιος του ελενολικού οξέος. Σύμφωνα με τη δεύτερη μέθοδο, η YT έχει μεγαλύτερη ικανότητα απόσβεσης ριζών υπεροξειδίου λιπαρών οξέων σε σχέση με την OE, το άγλυκο και του ασκορβικού αναλόγου (4.01 της YT έναντι 1.15,1.86,1.00 αντίστοιχα) λόγω ικανότητας που οφείλεται στην αλληλεπίδραση του φαινολικού δακτυλίου, το οποίο δεν είναι συνδεδεμένο με την το ελενολικό μόριο, με τη ρίζα υπεροξειδίου και ειδικά με τη ρίζα άνθρακα που προέρχεται από τα λιπαρά οξέα.

2.6 Φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις και μέθοδοι προστασίας των φαινολικών ενώσεων.

Η ελευρωπαΐνη και η υδροξυτυροσόλη είναι ισχυρά αντιοξειδωτικά και έτσι αυτοοξειδώνονται με γρήγορο ρυθμό παρουσία αέρα, πάνω σε silica gel, αλκαλικό μέσο, καταλήγοντας σε ένα μαύρο πολυμερές. Αυτή η συμπεριφορά δεν επιτρέπει μεγάλης διάρκειας αποθήκευση ή μεγάλης παραγωγής χρωματογραφικό καθαρισμό.[43]

Οι Gambacorta et al. [44] αναφέρουν τρόπο προστασίας της 'ευ-οξειδωτη ομάδα' κατεχόλης μέσω ακετυλίωσης ώστε να ξεπεραστεί αυτό το εμπόδιο κατά τη διάρκεια της μεγάλης διάρκειας

αποθήκευση ή μεγάλης παραγωγής χρωματογραφικό καθαρισμό. Έτσι προτείνουν χημική μετατροπή της ελευρωπαΐνης σε σταθερή μορφή του ακετονιδίου της υδροξυτυροσόλης με την προσθήκη 2,2-dimethoxypropane(DMP) και camphorsulfonic οξύ (CSA) και την απομάκρυνση της μεθανόλης με απόδοση (76%) και στην συνέχεια ακολουθεί διαδικασία αποακετυλίωσης σε όξινες μη υδατικές συνθήκες.

Ακόμα άλλη μέθοδος προστασίας του εκχυλίσματος φαινολών έναντι φαινομένων οξείδωσης και με παράλληλη αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας αποτελεί η τεχνική ενθυλάκωσης σε σχηματισμό αμύλου β-κυκλοδεξτρίνης.[73]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1 Εισαγωγή στα ένζυμα

Τα ένζυμα είναι συνήθως πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους(>15kDa) που δρουν ως καταλύτες. Τα ένζυμα είναι εξειδικευμένοι, πολύπλευρης χρήσης και πολλοί αποτελεσματικοί βιοκαταλύτες αποδίδοντας πολύ μεγαλύτερους ρυθμούς αντίδρασης σε σχέση με τις χημικές καταλυόμενες αντιδράσεις σε συνθήκες περιβάλλοντος. Η ονομασία των ενζύμων γίνεται με την πρόσθεση της κατάληξης -άση είτε στο τέλος του υποστρώματος είτε στο τέλος της αντίδρασης που καταλύουν, όπως αλκοολική διυδρογένηση. Μερικά ένζυμα έχουν απλή δομή, όπως μια διπλωμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα. Πολλά ένζυμα έχουν περισσότερες από μία υπομονάδες. Κάποια πρωτεϊνικά ένζυμα χρειάζονται μια μη πρωτεϊνική ομάδα για να είναι ενεργά όπως ένας συμπάραγοντας όπως ένα μεταλλικό ιόν Mg,Fe,Zn,Mn είτε ένα συνένζυμο όπως μόρια NAD,FAD,CoA , είτε κάποιες βιταμίνες.

3.2 Τρόπος δράσης των ενζύμων

Τα ένζυμα μειώνουν την ενέργεια ενεργοποίησης που καταλύουν με τη δέσμευση του υποστρώματος και το σχηματισμό συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος. Τα ένζυμα δεν επηρεάζουν τη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας ή τη σταθερά ισορροπίας. Τα ένζυμα παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα και κατατάσσονται ανάλογα με τη αντίδραση που καταλύουν. Οι σημαντικότερες ομάδες είναι οξειδοαναγωγάσες (οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις), τρανφεράσες (μεταφορά ενεργών ομάδων), υδρολάσες (οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις), λυάσες (προσθήκη σε διπλούς δεσμούς), ισομεράσες (αντιδράσεις ισομερισμού), λιγάσες (σχηματισμός δεσμών με διάσπαση ATP).Το ένζυμο β-γλυκοζιδάση που

χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ανήκει στην ομάδα υδρολασών και δρουν σε γλυκοζιτικούς δεσμούς.

Από μοριακή πλευρά η αλληλεπίδραση του ενζύμου και του υποστρώματος δεν έχει κατανοηθεί. Η αλληλεπίδραση αυτή διαφέρει από το ένα σύμπλοκο ενζύμου- υποστρώματος στο άλλο. Η αλληλεπίδραση μεταξύ ενζύμου του ενζύμου και του υποστρώματος οφείλεται σε συνήθως σε ασθενείς δυνάμεις όπως Van der Waals και δεσμούς υδρογόνου. Το υπόστρωμα προσδένεται σε μια ειδική περιοχή του ενζύμου που είναι γνωστή ως ενεργό κέντρο (active site). Το απλούστερο μοντέλο που μπορεί να περιγράψει αυτήν την αλληλεπίδραση είναι το μοντέλο κλειδιού – κλειδαριάς.

3.3 Εκτίμηση του ρυθμού αντίδρασης, των κινητικών παραμέτρων των ενζύμων.

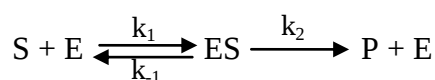
Η μελέτη της κινητικής μιας ενζυματικής αντίδρασης, εντός ενός αντιδραστήρα διαλείποντος έργου (batch) που διατηρείται σε σταθερή θερμοκρασία και σταθερό pH, βασίζεται σε γνωστά στοιχεία όπως η αρχική συγκέντρωση υποστρώματος $[S_0]$ και ενζύμου $[E_0]$. Στη συνέχεια γίνονται μετρήσεις της συγκέντρωσης του υποστρώματος ή του προϊόντος συναρτήσει του χρόνου. Από τις μετρήσεις της συγκέντρωσης του υποστρώματος ή του προϊόντος κατά τα χρονικά διαστήματα, t_i , $i=0,1,\dots$, μπορούμε να υπολογίσουμε τον αρχικό ρυθμό της αντίδρασης:

$$u_0 = \frac{d[P]}{dt} = \frac{-d[S]}{dt}$$

για το συγκεκριμένο ποσό ενζύμου (E_0) που έχει χρησιμοποιηθεί.

Πρέπει να σημειωθεί ότι υπολογίζονται μόνον οι αρχικοί ρυθμοί της αντίδρασης (δηλ. πολύ κοντά στο $t=0$) όπου η συγκέντρωση του υποστρώματος και του ενζύμου είναι γνωστή με μεγαλύτερη ακρίβεια.

Η κινητική μίας απλής ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης συχνά αναφέρεται ως κινητική Michaelis-Menten ή κινητική κορεσμού. Η κινητική κορεσμού μπορεί να προκύψει από μία απλή αντίδραση που συμπεριλαμβάνει ένα αντιστρεπτό βήμα για το σχηματισμό συμπλόκου ενζύμου- υποστρώματος και ένα βήμα διάστασης για το σύμπλοκο ES.



Οι Michaelis και Menten θεώρησαν ότι η πρώτη αντίδραση βρίσκεται πάντα σε ισορροπία (rapid equilibrium assumption). Επομένως οι συγκεντρώσεις πρέπει ανά πάσα στιγμή να ικανοποιούν την σχέση:

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (2)$$

όπου k_1 είναι η σταθερά ισορροπίας της πρώτης αντίδρασης.

Εάν E_0 είναι η συνολική συγκέντρωση του ενεργού ενζύμου στον αντιδραστήρα και υποθέσουμε ότι το ένζυμο δε διασπάται ή απενεργοποιείται, από το ισοζύγιο μάζας του ενζύμου έχουμε

$$[E] = [E_0] - [ES] \quad (3)$$

Η ρυθμός παραγωγής του προϊόντος είναι :

$$u_o = \frac{d[P]}{dt} = \frac{-d[S]}{dt} = k_2 [ES] \quad (4)$$

Χρησιμοποιώντας τις εξισώσεις (1), (2), (3),(4) από την προηγούμενη εξίσωση προκύπτει η συγκέντρωση του ελεύθερου ενζύμου στο αντιδραστήρα συναρτήσει του $[S]$ και του $[E_0]$:

$$u_o = \frac{u_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

Όπου $u_{max} = k_2 [E_0]$ και $K_m = \frac{k_{-1}}{k_1}$

Η δεύτερη αντίδραση θεωρείται ότι καθορίζει τον ρυθμό της συνολικής αντίδρασης.

Το επόμενο πρόβλημα που προκύπτει άμεσα είναι ο υπολογισμός των αγνώστων παραμέτρων: του μέγιστου ρυθμού αντίδρασης, u_{max} , και της σταθεράς κορεσμού, K_m . Η τιμή του u_o εξαρτάται από τις τιμές $[E_0]$ και $[S_0]$ κατά τη φόρτωση του αντιδραστήρα. Έτσι μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλά ζευγάρια τιμών $[S]$ και u_o . Έτσι, όταν έχουμε κινητική Michaelis-Menten και έχει προταθεί η εξίσωση Lineweaver-Burk :

$$\frac{1}{u_o} = \frac{K_m}{u_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{u_{max}}$$

Το γράφημα του $1/u_0$ συναρτήσει του $1/[S]$ είναι γραμμικό με κλίση $K_m/u_{\max}$ και αποτέμνουσα το $1/u_{\max}$. Από ένα γράφημα μπορεί να γίνει καλή εκτίμηση της τιμής του $u_{\max}$ αλλά όχι απαραίτητα του K_m . Οι τιμές για χαμηλές συγκεντρώσεις επηρεάζουν την κλίση και την αποτέμνουσα περισσότερο για αυτές τις συγκεντρώσεις.

Η παράμετρος K_m είναι μια εγγενής παράμετρος ενώ το $u_{\max}$ δεν είναι. Το K_m είναι μια συνάρτηση των παραγόντων του ρυθμού και είναι αναμενόμενο να μεταβάλλεται με το pH και τη θερμοκρασία. Δηλώνει τη συγγένεια με το υπόστρωμα, όσο πιο μικρή είναι τόσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια με το υπόστρωμα. Εντούτοις, το u_m είναι μια συνάρτηση της παραμέτρου k_2 του ρυθμού και της αρχικής συγκέντρωσης του ενζύμου λόγω της σχέσης $u_{\max}=k_2[E_0]$.

Εδώ πρέπει σημειώσουμε ότι η συγκέντρωση του ενζύμου σπάνια μετράται σε βάρος (mg/L) ή moles (mmol/L). Επειδή γενικά μας ενδιαφέρει το «βιολογικά ενεργό» ένζυμο, ο συνήθης τρόπος μέτρησης της ποσότητας οποιουδήποτε ενζύμου είναι σε ενζυμικές μονάδες (Units).

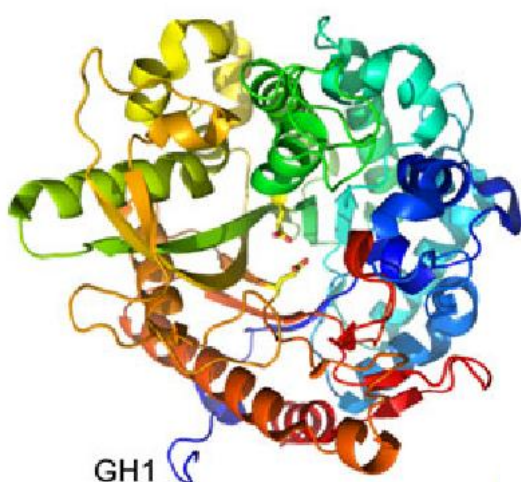
Ενα unit είναι η ποσότητα του ενζύμου που δίνει μια προκαθορισμένη ποσότητα καταλυτικής δράσης υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Για παράδειγμα ένα unit θα ήταν ο σχηματισμός ενός μmole προϊόντος ανά λεπτό σε συγκεκριμένο pH και θερμοκρασία με συγκέντρωση υποστρώματος πολύ μεγαλύτερη από την τιμή του K_m . Η ειδική δραστηριότητα (specific activity) είναι ο αριθμός των units δραστηριότητας προς την ποσότητα της ολικής πρωτεΐνης (IU/mg), αποτελεί ένα δείκτη της καθαρότητας και ενεργότητας του ενζύμου[44].

3.4 Η ομάδα των β -γλυκοζιδάσεων

Η ομάδα των β -γλυκοζιδάσεων (β -D-γλυκοπυρανοζίτη γλυκουδρολάση E.C.3.2.1.21) είναι ένζυμα που υδρολύουν γλυκοζιδικούς δεσμούς απομακρύνοντας τα τερματικά μη αναγωγικά γλυκοζιδικά παράγωγα από γλυκοζίτες ή ολιγοσακχαρίτες. Κατηγοροποιούνται σε ομάδες (GH): τις GH1, GH3, GH5 και GH30, βασίζονται στην αλληλουχία των αμινοξέων τους. Αυτά τα ένζυμα βρίσκονται παντού, σε όλα τα είδη των ζωντανών οργανισμών, αρχαιοβακτήρια, ευβακτήρια, ευκαρυωτικά όπου παίζουν πλήθος ρόλων. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται μετατροπή βιομάζας, λύση γλυκολιπιδίων και εξωγενών λιπιδίων στα ζώα, παραγωγή λιγνίνης από κυτταρικά τοιχώματα, καταβολισμό των κυτταρικών τοιχωμάτων των ολιγοσακχαριτών, άμυνα (παράγουν HCN όταν οι ρίζες φασολίων, σπόροι λιναριού, μανιόκας υποστούν κάποια κόψιμο (45), ενεργοποίηση των παραγών ορμονών και απελευθέρωση αρωμάτων στα φυτά, ενίσχυση αρωμάτων που αυξάνουν την ποιότητα ποτών και τροφίμων, στην συνέχεια και αλληλεπίδραση φυτών-μικροβίων και φυτών-εντόμων.

3.4.1 Εφαρμογές της β-γλυκοζιδάσης.

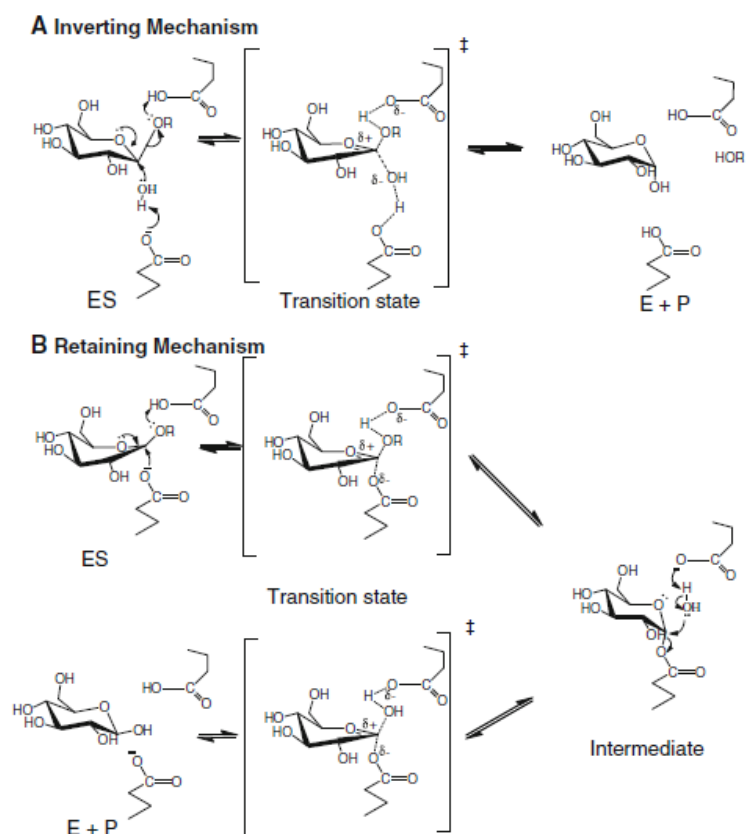
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω οι β-γλυκοζιδάσες χρησιμοποιούνται για την μετατροπή βιομάζας, όπως των β-γλυκανών (πολυσακχαρίτης που αποτελείται από μονομερή γλυκόζης), την μεγαλύτερη πηγή βιομάζας παγκοσμίως. Η μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη για την παραγωγή αλκοόλης λόγω της αναστολής των από κυτταρινάσων από τη γλυκόζη, οι κατάλληλες β-γλυκοζιδάσες προτιμούνται λόγω της ανοχής τους σε μεγάλες ποσότητες γλυκόζης. Έτσι, γίνεται η ταυτοποίηση και η παραγωγή αυτών των ενζύμων από βακτήρια, μύκητες και φυτά(46). Ακόμη υπάρχουν πολλές πρόδρομες ουσίες β-γλυκοζιτών στα φυτά που με την υδρολύση τους ενισχύουν την ποιότητα των τροφίμων και ποτών(47). Γενικά, η β-γλυκοζιδάση υπάρχει φυσικά σε ιστούς φυτών, υδρολύουν αυτές τις αρωματικές πρόδρομες ενώσεις για να παράγουν την επιθυμητή αναλογία άγλυκον που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση αρωμάτων ή ποιότητας στα τρόφιμα και τα ποτά πριν κατά τη διάρκεια και μετά την επεξεργασία τους. Για παράδειγμα η πικρή γεύση στα αμύγδαλου οφείλεται στην παρουσία κυανογενών γλυκοζιτών(45). Εκτός από την ενίσχυση αρώματος ένζυμα απομονωμένα από φυτικό ιστό ή άλλες πηγές μπορούν να εμπλουτίσουν θρεπτικά με την απελευθέρωση βιταμινών(π.χ γίνεται απελευθέρωση της B6(πυριδοξίνη) στο ρύζι από τον αντίστοιχο γλυκοζίτη της πυριδοξίνη), αντιοξειδωτικών[48]. Η υδρόλυση των γλυκοζιτών σε άγλυκον αυξάνει τη θρεπτική βιοδιαθεσιμότητα, για αυτό στις ζωικές τροφές μπορεί να προστεθεί ακατέργαστη β-γλυκοζιδάση.



Εικόνα 6: Απεικόνιση της τριτοταγής δομής της β-γλυκοζιδάσης(GH1) όπου ανήκει και η β-γλυκοζιδάση από αμύγδαλο.[49] τονίζοντας τα 2 κύρια στοιχεία α-έλικα και τον β-πτυχωτών φύλλων ενώ τα κομμάτια της πεπτιδικής αλυσίδας που δεν ανήκουν σε κάποιο από τα δομικά στοιχεία της δευτεροταγής δομής εμφανίζονται σαν απλές γραμμές. (δομή β-πτυχωτών φύλλων/α-έλικα)₈. Οι διαφορετικές πεπτιδικές αλυσίδες χρωματίζονται βαθμιδωτά από το μπλε χρώμα (το αμινοτελικό άκρο) έως ενώ κόκκινο χρώμα (το καρβοτελικό άκρο) κάθε αλυσίδας. Με εστίαση στο ενώσεις συναρμογής που αποτελείται από το υπόστρωμα στο ενεργό κέντρο. Μέσω του λογισμικού τρισδιάστατης απεικόνισης βιομορίων PYMOL.[50]

3.4.2 Μηχανισμοί της κατάλυσης από την β-γλυκοζιδάση

Οι γλυκοζίτικες υδρολάσες δρουν σαν βιοκαταλύτες χρησιμοποιώντας δύο μηχανισμούς, πρώτον με τη αναστροφή (inversion) και δεύτερον με τη διατήρηση της στερεοχημείας του ανωμερή άνθρακα.[51] Και τα δύο είδη μηχανισμών χρησιμοποιούν ένα ζεύγος οξικών και νουκλεοφιλικών υπολειμμάτων (residue), συνήθως καρβοξυλικά οξέα, στην κάθε πλευρά των σακχάρων, σχεδόν 5 Åstrom μακριά από τον μηχανισμό κατακράτησης και 10 Åstrom για τον μηχανισμό μετατροπής, στον οποίο ένα μόριο νερού πρέπει να ταιριάζει ανάμεσα στον καταλύτη και το υπόστρωμα. Η ομάδα β-γλυκοζιδάσεων GH1 χρησιμοποιεί τον 2^ο μηχανισμό και πραγματοποιούν την κατάλυση σε δύο βήματα, τη γλυκοζιλίωση και την απογλυκοζιλίωση. Στη γλυκοζιλίωση το άγλυκον αποκόπτεται με το δόσιμο ενός πρωτονίου από τη καταλυτική βάση/οξύ και νουκλεοφιλική επίθεση του καταλυτικού νουκλεοφιλικού στο πάνω μέρος του άνθρακα για να παράγει ένα α-ομοιοπολικά δεμένο ενζυμικό ενδιάμεσο. Ενώ στο βήμα της απογλυκοζιλίωσης, διαδικασία αντιστρέφεται, με το μόριο του νερού να εισχωρεί με βοήθεια από την καταλυτική βάση/οξύ για να αντικαταστήσει το καταλυτικό νουκλεόφιλο με τη γλυκόζη [50].



Εικόνα 7: Μηχανισμοί κατάλυσης α) μέσω αναστροφής όπου γίνεται απλή αντικατάσταση του άγλυκον από το νερό που οδηγεί σε ανωμερή άνθρακα με αναστραμμένη χειρομορφία β) μέσω κατακράτησης όπου πρώτα γίνεται η γλυκοζιλίωση με το οξύ δίνει ένα πρωτόνιο στο μόριο γλυκόζης ενώ τα νουκλεόφιλα επιτίθενται από την άλλη μεριά και σχηματίζουν ένα α-linked ενδιάμεσο και στη συνέχεια στο βήμα της απογλυκοζιλίωσης η καταλυόμενη βάση.

3.5 Παράγοντες που επηρεάζουν τα ένζυμα

3.5.1 pH και θερμοκρασία

Οι β-γλυκοζιδάσες λειτουργούν σε εύρος βέλτιστο pH συναρτήσει της σταθερότητας αναλόγως την πηγή προέλευσης τους και την αλληλουχία των αμινοξέων. Το βέλτιστο pH δραστηριότητας κυμαίνεται από 4 έως 7.5 ενώ τείνουν να είναι σταθερά σε εύρος pH από 4 με 9. Είναι σύνηθες να συντηρούνται με ασφάλεια στους 0-4°C και σε pH 7-8 σε ρυθμιστικά διαλύματα αφού έχει απομακρυνθεί τυχόν επιμόλυνση με πρωτεάσες (προσθήκη γλυκερόλης ή αζίδιο).

Η θερμική σταθερότητα ποικίλει αρκετά σε αυτήν την κατηγορία ενζύμων. Τα μεσόφιλα β-γλυκοζιδάσες δείχνουν τη μέγιστη ενεργότητα στους 30-65 °C και απενεργοποιούνται γύρω στους 55-70°C. Η υψηλή ενεργότητα σε θερμοκρασίες παραπάνω από το φυσιολογικό έχουν σαν αποτέλεσμα την τάχιστα θερμική απενεργοποίηση για αυτό οι δοκιμές πρέπει να γίνονται μεταξύ 30-40°C. Σαν παράδειγμα υψηλής θερμοκρασιακής δραστηριότητας αποτελεί η β-γλυκοζιδάση από θερμόφιλα βακτήριας (π.χ T.Maritima BglA που δουλεύουν βέλτιστα στους 100 °C). Η παραπάνω σταθερότητα μπορεί να οφείλεται σε προλίνη πεπτίδια, ηλεκτροστατικών γεφυρών, εσωτερικά μόρια νερού και ένωση περισσότερων υπομονάδων στην τεταρτοταγή δομή [53].

3.5.2 Αναστολείς

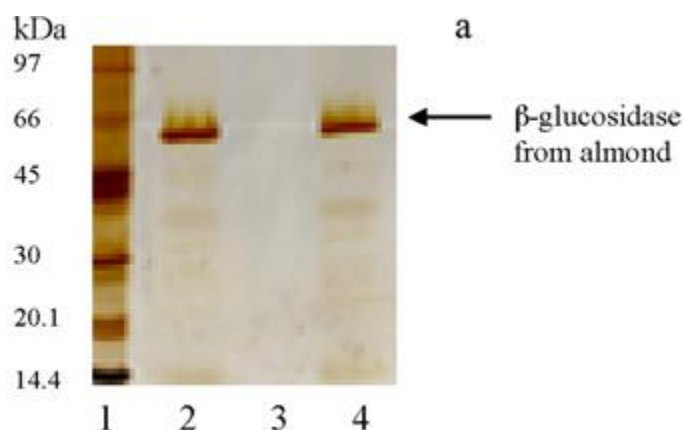
Ορισμένες ενώσεις προσδένονται στα ένζυμα και μειώνουν την δραστηριότητα τους. Οι ενώσεις αυτές ονομάζονται αναστολείς. Η αναστολή αυτή μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε αναντίστρεπτη. Οι ενώσεις που προκαλούν αντιστρεπτή αναστολή διαχωρίζονται πιο εύκολα από το ένζυμο. Οι τρεις κατηγορίες αντιστρεπτής ενζυμικής αναστολής είναι η συναγωνιστική, μη συναγωνιστική και η ασυναγώνιστη. Σε ορισμένες περιπτώσεις το υπόστρωμα δρα και αυτό σαν αναστολέας. Οι συναγωνιστικοί αναστολείς είναι χημικά ανάλογα του υποστρώματος και συναγωνίζονται με το υπόστρωμα για το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Το αποτέλεσμα της συναγωνιστικής αναστολής είναι μια αυξημένη τιμή της $K_{m,apparent}$ και συνεπώς ο μειωμένος ρυθμός αντίδρασης. Οι μη συναγωνιστικοί αναστολείς δεν είναι χημικά ανάλογα και προσδένονται σε κέντρα διαφορετικά από το ενεργό κέντρο και μειώνουν την ενζυμική συγγένεια με το ενεργό κέντρο. Το αποτέλεσμα της μη συναγωνιστικής αναστολής είναι η μείωση του u_m . Ενώ οι ασυναγώνιστοι αναστολείς προσδένονται στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Το αποτέλεσμα της μη συναγωνιστικής αναστολής είναι η μείωση του u_m και του K_m [44].

Οι β-γλυκοζιδάσες αναστέλλονται λόγω κατάσταση μετάπτωσης ανάλογων σακχάρων όπως γλυκοζίτες, ελεύθερους αγλυκόνες και τα υποστρώματα που υδρολύονται σχετικά αργά. Η

ελεύθερη γλυκόζη είναι σχετικά αδύναμος αναστολέας ($K_i=100-200\text{mM}$). Ενώ τα μεταλλικά ιόντα δεν αναστέλλουν το ένζυμο β-γλυκοζιδάση, μερικά ιόντα το κάνουν όπως Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} (134). Απο αναφορές το ασκορβικό αποτελεί συμπαράγοντα, βοηθώντας τη ενεργότητα του ενζύμου.[53]

3.6 Χαρακτηριστικά του ενζύμου β-γλυκοζιδάση από αμύγδαλο.

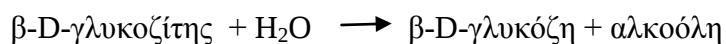
Η β-γλυκοζιδάση από αμύγδαλο που ανήκει στην οικογένεια *Prunus Dulcis*, είναι γλυκοπρωτεΐνη και αποτελείται από δύο ισοδύναμες υπομονάδες των 65 kDa, το συνολικό μοριακό βάρος είναι 135 kDa.



Εικόνα 8: β-γλυκοζιδάση από αμύγδαλο στη γραμμή 1 και 2 μέσω της τεχνικής ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE.[56]

Έχει δοθεί αριθμός καταχώρησης από τη Enzyme Commission (EC) [3.2.1.21], CAS Number: 9001-22-3. Άλλες ονομασίες που έχουν δοθεί είναι β-D-γλυκοζιτική γλυκουδρολάση. Ο συντελεστής απορρόφησης στα 280 nm είναι $E_{1\%} = 7.06$. Το σημείο ηλεκτρωνητικότητας είναι pI: 7.31

Το ένζυμο καταλύει την εξής αντίδραση



Εκτός από τον β-D-γλυκοζίτη, υδρολύει και β-D-γαλακτοζίτη and β-D-fucosides.

Τιμές K_m που έχουν αναφερθεί είναι 6.0 mM για το υπόστρωμα ο-νιτροφαινυλο-D-D-γλυκοζίτη και 1.8 mM για το p-νιτροφαινυλο-β-D-fucoside. Το ένζυμο δε χρειάζεται ενεργοποιητή..[54]

3.6.1 Εφαρμογές και παραδείγματα υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης από β-γλυκοζιδάση.

Έχει χρησιμοποιηθεί β-γλυκοζιδάση που παράγεται στο υπερθερμόφιλο αρχαιοβακτήριο *Sulfolobus solfataricus* εκφρασμένο στο *E.coli*, ακινητοποιημένη σε φορέα στήριξης κυτοσίνης (με σταυροσύνδεση σε διάλυμα γλουταραλδεύδης), έγινε η ενζυμική υδρόλυση σε άγλυκον και γλυκόζη στους 60 °C και 70°C σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου pH 7 και

παρατήρησαν ότι στους 70°C, εκτός από άγλυκο της ΟΕ και γλυκόζη παράγεται υδροξυτυροσόλη λόγω διάσπασης του άγλυκον ΟΕ[55]. Ενώ ο Limiroli et al. πραγματοποίησε υδρόλυση με β-γλυκοζιδάση από αμύγδαλο στους 25 °C και pH 5.2, όπου το άγλυκο της ελευρωπαϊνης που παράχθηκε δεν μετατρέπεται περαιτέρω σε υδροξυτυροσόλη[38a]. Ο Capasso et al. με τη σειρά του χρησιμοποιεί το ίδιο με παραπάνω ένζυμο στους 37 °C και σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου pH 4.2. Δείχνει ότι με την προσθήκη γλυκόζης σε συγκεντρώσεις 0-200 mM, η τιμή της u_m δεν εξαρτάται από τις διάφορες συγκεντρώσεις γλυκόζης, ενώ το φαινόμενο K_m αυξάνεται με την αυξανόμενη συγκέντρωση γλυκόζης. Αυτό δείχνει ότι γίνεται ανταγωνιστική αναστολή. Η σταθερά αναστολής, K_i υπολογίστηκε 390 mM. Από τα προηγούμενα διαφαίνεται ότι η παρεμπόδιση της γλυκόζης είναι αμελητέα για την υδρόλυση της ελευρωπαϊνης[38b]. Ακόμη, στην αναφερθείσα μελέτη των Mazzei et al. η β-γλυκοζιδάση από αμύγδαλο έχει δοκιμαστεί στην υδρόλυση της ελευρωπαϊνης στους 25 °C σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου pH 6.5 ακινητοποιημένη με υπερδιήθηση μέσω σταυρωτής ροής σε σύστημα βιοαντιδραστήρα μεμβρανών από πολυσουλφόνη με μοριακό κατώφλι 30kDa δίνοντας στη έξοδο άγλυκον και γλυκόζη. Σε αυτήν μελέτη αποδεικνύεται ότι η ακινητοποίηση δεν μειώνει K_m δηλαδή τη συγγένεια με το υπόστρωμα αλλά αντιθέτως την ενισχύει, ενώ αυξάνεται και η σταθερότητα του ενζύμου[56].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1 Συστήματα ακινητοποιημένων ενζύμων

Ο περιορισμός σε ένα συγκεκριμένο χώρο είναι γνωστός ως ενζυμική ακινητοποίηση. Η ακινητοποίηση των ενζύμων προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως η επαναχρησιμοποίηση και του ενζύμου και η εξάλειψη των διαδικασιών ανάκτησης και καθαρισμού. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις, παρέχει ένα καλύτερο περιβάλλον για τη δράση του ενζύμου. Ακόμη επειδή τα ένζυμα είναι ακριβά η επαναχρησιμοποίησή τους είναι κρίσιμη σε πολλές διεργασίες. Επίσης καθώς μερικά από τα ενδοκυτταρικά ένζυμα είναι προσκολλημένα σε μεμβράνες, η ακινητοποίησή τους αποτελεί ένα σύστημα πρότυπο για τη μίμηση και την κατανόηση της δράσης μερικών προσκολλημένων σε μια μεμβράνη ενδοκυτταρικών ενζύμων. Επιπλέον, με την ακινητοποίηση των ενζύμων συνήθως βελτιώνεται η καθαρότητα των προϊόντων και ελαχιστοποιούνται τα προβλήματα χειρισμού εκροής.

Οι κυριότερες μέθοδοι ακινητοποίησης είναι η παγίδευση και η επιφανειακή ακινητοποίηση :

- **Παγίδευση**

Η παγίδευση είναι ο φυσικός εγκλεισμός των ενζύμων σε μικρό χώρο. Η παγίδευση σε μήτρα και η παγίδευση σε μεμβράνη, συμπεριλαμβανομένης και της μικροενθυλάκωσης, είναι οι δύο βασικές μέθοδοι παγίδευσης.

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την ακινητοποίηση είναι πολυμερή υλικά όπως αλγινικό ασβέστιο, το άγαρ, η κ-καραγενάνη, το ακρυλαμίδιο και το κολλαγόνο. Ωστόσο, για τον ίδιο σκοπό μπορούν να χρησιμοποιηθούν και μερικά στέρεα υλικά, όπως ο ενεργός άνθρακας, πορώδη κεραμικά και γη διατόμων. Η μήτρα μπορεί να είναι μία μεμβράνη, ένα σωματίδιο ή μία ίνα.

Η παγίδευση σε μεμβράνη είναι δυνατή, όπως για παράδειγμα έχουν χρησιμοποιηθεί μονάδες κοίλων ινών για να παγιδεύσουν ένα ενζυμικό διάλυμα μεταξύ λεπτών, ημιπερατών μεμβρανών. Συνήθως χρησιμοποιούνται μεμβράνες από νάιλον, κυτταρίνη, πολυσουλφόνη και πολυακρυλικό.

Μία ειδική μορφή παγίδευσης σε μεμβράνη είναι η μικροενθυλάκωση (microencapsulation).σε αυτήν την τεχνική σχηματίζονται μικροσκοπικές, κοίλες σφαίρες. Οι σφαίρες που είναι περιέχουν το ενζυμικό διάλυμα είναι εγκλεισμένες σε μία πορώδη μεμβράνη(π.χ πολυμερές). Η παγίδευση όμως έχει κάποια σημαντικά μειονεκτήματα όπως, διαρροή ενζύμου μέσα στο διάλυμα, σημαντικό περιορισμό διάχυσης, ελαττωμένη ενζυμική δραστηριότητα και σταθερότητα και έλλειψη ελέγχου των συνθηκών του μικροπεριβάλλοντος.

- **Επιφανειακή κινήτοποίηση**

Οι κυριότεροι τύποι ακινητοποίησης ενζύμων σε επιφάνειες υλικών στήριξης είναι η προσρόφηση και η ομοιοπολική πρόσδεση.

Η προσρόφηση είναι η πρόσδεση ενζύμων σε επιφάνειες σωματιδίων στήριξης λόγω ανάπτυξης ασθενών δυνάμεων, όπως δυνάμεις διασποράς ή Van der Waals. Το ενεργό κέντρο του προσροφημένου ενζύμου συνήθως δεν επηρεάζεται, με αποτέλεσμα να διατηρείται σχεδόν πλήρως η δραστηριότητα κατά την προσρόφηση. Σύνηθες πρόβλημα αποτελεί η εκρόφηση των ενζύμων, ιδιαίτερα κατά την παρουσία ισχυρών υδροδυναμικών δυνάμεων, καθώς οι δυνάμεις συνοχής είναι ασθενείς. Η προσρόφηση των ενζύμων μπορεί να σταθεροποιηθεί με την σταυροσυνδεσή τους με γλουταραλδεΐδη, αν και η χρησιμοποίηση της μπορεί να προκαλέσει μετουσίωση σε κάποια ένζυμα. Τα υλικά στήριξης που χρησιμοποιούνται για την προσρόφηση

των ενζύμων μπορεί να είναι είτε ανόργανα, όπως αλουμίνα, διοξείδιο του πυριτίου, πορώδεις γυαλί, κεραμικά, γη διατόμων, πηλός και μπετονίτης είτε οργανικά υλικά όπως κυτταρίνη, άμυλο, ενεργός άνθρακας και ρητίνες ιοντοανταλλαγής (Amberlite, Sephadex, Eupergit, Dowex). Οι επιφάνειες των υλικών στήριξης συχνά χρειάζονται κάποια προκατεργασία για να είναι αποτελεσματική η ακινητοποίηση.

Η ομοιοπολική σύνδεση (covalent binding) είναι η συγκράτηση των ενζύμων στις επιφάνειες στήριξης με το σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών. Τα μόρια του ενζύμου συνδέονται με το υλικό στήριξης μέσω ορισμένων λειτουργικών ομάδων όπως αμινο-, καρβοξυλό-, υδροξυλό- και σουλφιδρυλο-ομάδων. Επειδή οι ομάδες αυτές δεν πρέπει να βρίσκονται στο ενεργό κέντρο, μία συνήθης μέθοδος που εφαρμόζεται είναι με το κορεσμό του ενζυμικού διαλύματος, με έναν συναγωνιστικό αναστολέα προτού λάβει χώρα το ομοιοπολικό δέσιμο. Οι λειτουργικές ομάδες που βρίσκονται στο υλικό στήριξης συνήθως ενεργοποιούνται με διάφορα χημικά αντιδραστήρια όπως βρωμιούχο κυάνιο, καρβοδιαμίδιο, και η γλουταραλδεύδη. Οι ομάδες πρόσδεσης στο πρωτεϊνικό μόριο είναι συνήθως οι πλάγιες (R) ή οι αμινο- και καρβοξυλο-ομάδες της πολυπεπτιδικής αλυσίδας.

Η καταλληλότητα του υλικού στήριξης και της μεθόδου ακινητοποίησης εξαρτάται από το ένζυμο που χρησιμοποιείται και από τη εφαρμογή. Η επιλογή γίνεται με 2 κριτήρια.

(1) την ικανότητα πρόσδεσης του υλικού, που είναι συνάρτηση της πυκνότητας του φορτίου, των λειτουργικών ομάδων, του πορώδους και της υδροφοβικότητας της επιφάνειας στήριξης

(2) τη σταθερότητα και τη διατήρηση της ενζυμικής ενεργότητας, που είναι συνάρτηση των λειτουργικών ομάδων του υλικού στήριξης και των μικροπεριβαλλοντικών συνθηκών[44].

4.2 Επίδραση της ακινητοποίησης

Αν η ακινητοποίηση προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση του ενζύμου ή αν η δραστικές ομάδες του ενεργού κέντρου παίρνουν μέρος στην πρόσδεση, μπορεί να επέλθει μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου κατά την ακινητοποίηση. Συνήθως η ακινητοποίηση έχει σαν αποτέλεσμα την ελάττωση της ενζυμικής δραστηριότητας και σταθερότητας. Ωστόσο σε κάποιες περιπτώσεις, η ακινητοποίηση μπορεί να κάνει το αντίθετο, δημιουργώντας ευνοϊκότερες συνθήκες. Επειδή τα ένζυμα έχουν συχνά περισσότερα από ένα λειτουργικά κέντρα που μπορούν να προσδεθούν στην επιφάνεια του υλικού στήριξης, με αποτέλεσμα αυτό το παρασκεύασμα να

είναι ετερογενείς. Ακόμη και όταν η πρόσδεση δεν αλλάζει την ενζυμική δομή, μερικά ένζυμα μπορεί να προσδεθούν με τέτοιο τρόπο ώστε το ενεργό τους κέντρο να είναι μακριά από το διάλυμα του υποστρώματος που έχει σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη πρόσβαση του υποστρώματος στο ένζυμο.

Αναφορικά άλλοι τρόποι ακινητοποίησης είναι η κρυσταλλοποίηση του ενζύμου με ή χωρίς σταυροσύνδεση.

4.3 Περιορισμοί λόγω διάχυσης στα ακινητοποιημένα ενζυμικά συστήματα.

Στα ακινητοποιημένα συστήματα παρατηρούνται διάφορα επίπεδα αντίστασης λόγω διάχυσης. Οι αντιστάσεις ποικίλουν ανάλογα με τη φύση του υλικού στήριξης (πορώδες ή μη πορώδες), με τις υδροδυναμικές συνθήκες που περιβάλλουν το υλικό στήριξης. Η μη σοβαρή ή μη επίπτωση της αντίστασης της διάχυσης στο ρυθμό της αντίδρασης εξαρτάται από σχετικό λόγο του ρυθμού της αντίδρασης προς το ρυθμό της διάχυσης, που χαρακτηρίζεται από το αριθμό Damkohler(Da).

$$Da = \text{μέγιστος ρυθμός αντίδρασης} / \text{μέγιστο ρυθμό διάχυσης} = V_m / k_L [S_b]$$

$Da \gg 1$, ο ρυθμός της διάχυσης είναι περιοριστικός

$Da \ll 1$, ο ρυθμός της αντίδρασης είναι περιοριστικός

$Da = 1$, οι αντιστάσεις διάχυσης και αντίδρασης είναι περιοριστικές.

Όπου k_L ο συντελεστής μεταφοράς μάζας (cm/s), $[S_b]$ η συγκέντρωση του υποστρώματος στο υψηλού όγκου παραγωγής υγρό ζύμωσης. Στα ένζυμα που είναι παγιδευμένα σε μια σταθερή μήτρα η διάχυση και η ενζυμική αντίδραση γίνονται συνήθως ταυτόχρονα, ενώ σε αυτά που είναι προσροφημένα η διάχυση και η αντίδραση είναι δυο διαδοχικά φαινόμενα.

4.4 Εφαρμογές στην ακινητοποίηση πρωτεϊνών.

Τα ένζυμα είναι βιοκαταλύτες με μεγάλη βιομηχανική εφαρμογή: υψηλή ενεργότητα υπό τους ήπιες συνθήκες, υψηλή εναντιομερή, Regio-επιλεκτικότητα και μεγάλη εξειδίκευση.[60] Παρολαυτά, τα ένζυμα είναι βιολογική προελεύσεως και έχουν εξελιχθεί για να ικανοποιήσουν ένα σύνολο απαιτήσεων, μερικές φορές αντίθετος στις βιομηχανικές ανάγκες (είναι διαλυτά, ασταθή και σχεδιασμένα να λειτουργούν κάτω από φυσιολογικές συνθήκες). Επομένως η ακινητοποίηση απαιτείται συχνά για τις περισσότερες βιομηχανικές εφαρμογές των ενζύμων[61].

Η έρευνα στην ακινητοποίηση πρωτεϊνών έχει ξεκινήσει από τη δεκαετία του '60 σε εργαστηριακή κλίμακα για να ακινητοποιούν μικρές ποσότητες των πρωτεϊνών χωρίς υπάρξει σημαντική βελτίωση στα χαρακτηριστικά του ενζύμου. Η πρώτη βιομηχανική εφαρμογή αναφέρθηκε το 1967 από τον Tosa et al. στο Tanabe Seiyaku στην Ιαπωνία που χρησιμοποιήθηκαν στήλες με ακινητοποιημένου *Aspergillus oryzae* αμινοακυλάση για την διάσπαση του συνθετικού, ρακεμικού DL-αμινοξέων διαλύματος στα αντίστοιχα ενεργά εναντιομερή. Γύρω στο 1970, άλλα δύο συστήματα ακινητοποίησης που ξεκίνησαν σε πιλοτική κλίμακα, στην Αγγλία με ακυλάση της πενικιλίνης για την παραγωγή 6-amino-penicillanin acid (6-APA) και στις Η.Π.Α ακινητοποιημένη ισομεράση της γλυκόζης για τη μετατροπή της γλυκόζης σε φρουκτόζη[65].

Πίνακας 5: Άλλες εφαρμογές ακινητοποιημένων συστημάτων β-γλυκοζιδασών και στόχοι διεργασίας.

β-γλυκοζιδάση	Σκοπός διεργασίας	Είδος ακινητοποίησης	Αναφορά
Από <i>Pyrococcus furiosus</i>	Παραγωγή πρεβιοτικού λακτουλόζης	Ακινητοποιημένο σε Eupergit C και Amberlite	Mayer et al.[57]
Από <i>Aspergillus niger</i>	Υδρόλυση βιομάζας λιγνοκυτταρινούχων	Ελεύτερο και ακινητοποιημένο σε Eupergit C	Tu et al. [58]
Από αμύδαλο	Μελέτη απενεργοποίησης και ενεργότητας	Ακινητοποιημένο σε μήτρα κυτοσίνης	Chang et al.[59]
Από αμύδαλο	Υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης	Ακινητοποιημένο σε πολυσουλφιδικές μεμβράνες	Mazzei et al.[56]
Από αμύδαλο	Υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης	Ακινητοποιημένο σε μεμβράνη υπερδιήθησης	Capasso et al.[38]

Από την άλλη μεριά, υπάρχουν σοβαρά μειονεκτήματα στην εφαρμογή τους σε βιομηχανική κλίμακα. Μεταξύ αυτών τα μειονεκτήματα είναι χρήση των τοξικών αντιδραστηρίων, πολύπλοκη ενεργοποίηση των φορέων στήριξης και χαμηλή σταθερότητα των ενεργών ομάδων[61]. Στη βιομηχανία, στόχος είναι να καλύπτεται πλήρως η επιφάνεια στήριξης με την πρωτεΐνη με στόχο την υψηλή ογκομετρική ενεργότητα, βελτιώνοντας τις ιδιότητές του (π.χ. σταθερότητα) και αποφυγή της χρήσης τοξικών αντιδραστηρίων.

Πρέπει να σημειωθεί ότι ο κύριος στόχος της ενζυμικής ακινητοποίησης είναι η επαναχρησιμοποίηση του ενζύμου. Ο παραπάνω στόχος έχει νόημα μόνο αν η ακινητοποίηση

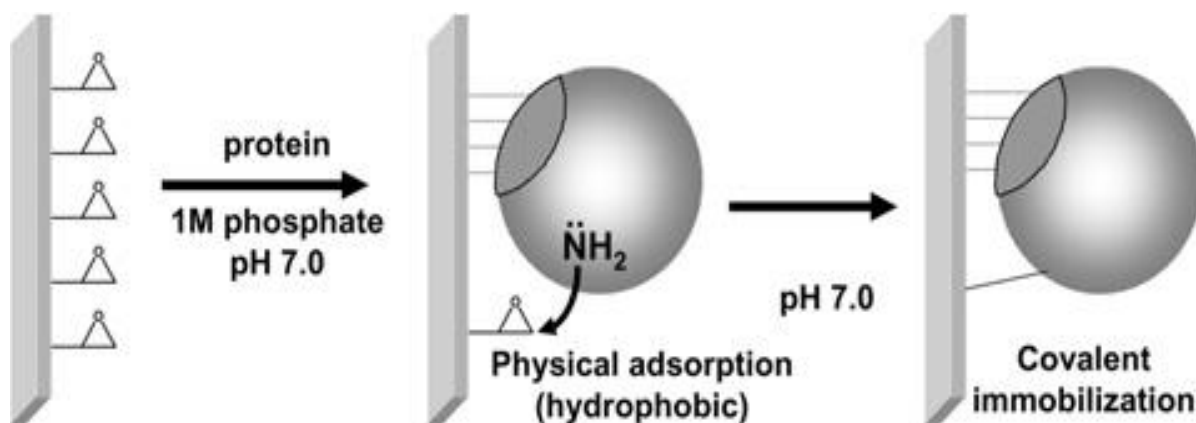
καθιστά το ένζυμο σταθερό και είναι δραστικό για πολλούς κύκλους αντίδρασης. Η ακινητοποίηση ενός ενζύμου σε έναν πορώδες υλικό στήριξης μπορεί να βελτιώσει σταθερότητά του χωρίς να επηρεάζει την ακαμψία της ενζυμικής δομής. Κατά συνέπεια το ακινητοποιημένο ένζυμο θα είναι πιο σταθερό από το διαλυτό ένζυμο εάν αυτό εκτεθεί σε διεπιφάνειες αέριου-υγρού (συστήματα υπό ανάδευση, φυσαλίδες οξυγόνου ή άλλων αερίων κ.λπ.)[62]. Επιπλέον, η ακινητοποίηση αποτρέπει επίσης τη πρωτεόλυση (που δεν είναι δυνατό εάν το ένζυμο και πρωτεΐνη - επιμόλυνση διασπαρθούν μαζί σε μία στήριξη), συσσωμάτωση ή άλλα ενδομοριακά φαινόμενα. Η χρήση των μη πορώδων στηρίξεων μειώνει αυτά τα πλεονεκτήματα όταν το σύστημα του ενζύμου είναι εκτιθέμενο στις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις όπως το διαλυτό ένζυμο [63].

Η πραγματική ακαμψία θα πρέπει να είναι αναμενόμενη μόνο εάν μία έντονη πολυσημειακή ομοιοπολική σύνδεση συμβεί μεταξύ του ενζύμου και της υποστήριξης. Αυτό πρέπει να καθορίσει όλες τις θέσεις όλων των λειτουργικών ομάδων και μειώσει την ενζυμική κινητικότητα. Αυτή η πολυσημειακή ομοιοπολική σύνδεση είναι μία αρκετά σύνθετη διαδικασία στην οποία δύο μη-συμπληρωματικές δομές (η επιφάνεια μιας πρωτεΐνης και η επιφάνεια στήριξης πρέπει να αντιδράσουν). Επιπλέον η ακινητοποίηση μπορεί να βελτιώσει άλλα χαρακτηριστικά του ενζύμου όπως η ενεργότητα [63] μείωση της επίδρασης του αναστολέα, ρύθμιση της εξειδίκευσης και επιλεκτικότητας [64] ή βελτιώνοντας τη συμπεριφορά του σε συνθετικές διεργασίες[63].

4.5 Μηχανισμός ακινητοποίησης του ενζύμου στον εποξύ φορέα όπως ο Eupergit C.

Οι φορείς στήριξης εποξυομάδων είναι μία πολύ καλή επιλογή μήτρας όπου επιτυγχάνεται μία εύκολη ακινητοποίηση των πρωτεϊνών σε εργαστηριακή και βιομηχανική κλίμακα. Αντιδρούν με την πρωτεΐνη σε ήπιες αλκαλικές συνθήκες (π.χ pH=7), προωθώντας μικρές χημικές τροποποιήσεις της ενζυμικής δομής (δευτεροταγής αμίνη, θειοαιθέρας και αιθέρας). Αυτές οι στηρίξεις παρέχονται σε ενεργή μορφή. Είναι σταθεροί κατά την διάρκεια της αποθήκευσης και διασπείρονται εύκολα σε ουδέτερο υδάτινο μέσο. Οι φορείς στήριξης με εποξυομάδες που υπάρχουν είναι οι Eupergit C, Eupergit 250, Sepabeads, Phema-GMA.

Η ακινητοποίηση γίνεται σε δύο βήματα: πρώτα γρήγορη και όχι έντονη φυσική προσρόφηση της πρωτεΐνης πάνω στον φορέα και δεύτερον μία ομοιοπολική αντίδραση λαμβάνει χώρα μεταξύ της προσροφημένης πρωτεΐνης και των γειτονικών εποξυομάδων[65]. Όπως φαίνεται και στο ακόλουθο σχήμα:



Εικόνα 9: Ακίνητοποίηση της πρωτεΐνης πάνω σε φορέα στήριξης με ενεργοποιημένες τις εποξυ-ομάδες.

Χάρη σε αυτόν τον μηχανισμό, οι εποξυ-φορείς στήριξης που χρησιμοποιούνται είναι ελαφρώς υδροφοβικοί, ώστε να προσροφούνται οι πρωτεΐνες όταν επωάζονται σε υψηλή ιοντική ισχύ (λόγω υδροφοβικής αλληλεπίδρασης), έτσι υδροφιλικό φορείς στήριξης όπως η αгарόζη δεν προτείνονται. Οι προτεινόμενοι φορείς στήριξης μπορούν να επιτύχουν κάλυψη της επιφάνειας τους 100mg πρωτεΐνης /ml πακτωμένου φορέα, το loading capacity είναι πολύ μεγάλο και ανταγωνιστικό προς άλλους φορείς[66].

4.6 Ιδιότητες των εποξιομάδων που υπάρχουν στους φορείς ομοιοπολικής σύνδεσης.

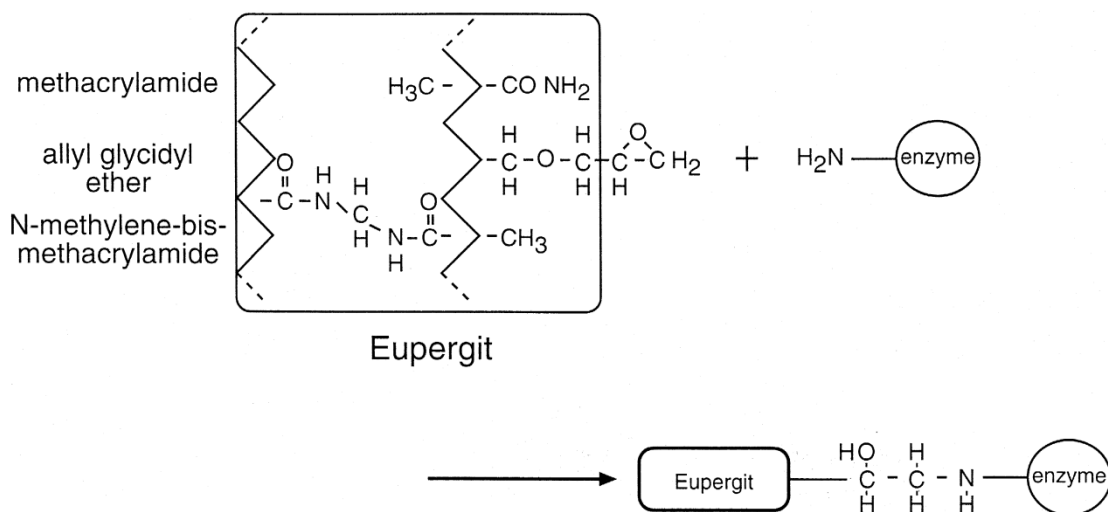
Οι εποξιομάδες παρουσιάζουν εξαιρετικές ιδιότητες που περιγράφονται ως εξής :

- Σχηματίζουν πολύ πυκνό μονοστρωματικό στρώμα από ενεργές και σταθερές εποξιομάδες στο φορέα που αυτό σημαίνει ότι εάν υπάρχουν πολλές ενεργές ομάδες και από το ένζυμο, είναι πιθανό να υπάρχει μία άμεση πολυσημειακή ομοιοπολική σύνδεση.
- Οι εποξυ-ομάδες δρουν με πολλές από τις ομάδες που είναι άφθονες στην επιφάνεια του ενζύμου (π.χ. αμίνες,θειόλες, φαινολικές και ιμιδαζόλη).
- Η αντίδραση με τις νουκλεόφιλες ομάδες δεν επηρεάζονται από τη στερεοχημική παρεμπόδιση (steric hindrances). Λόγω της μεγάλης σταθερότητας των εποξιομάδων η διαδικασία ακίνητοποίησης μπορεί να κρατήσει για μεγάλες χρονικές περιόδους και για μεγάλες τιμές pH (π.χ 10).
- Η αντίδραση μεταξύ του ενζύμου-φορέα στήριξης δύναται να σταματήσει με το ‘μπλοκάρισμα’ των εποξιομάδων με διάφορα αντιδραστήρια (μερκαπτοαιθανόλη, γλυκίνη, γλυκόζη κτλ.). Αυτό επιτρέπει τον έλεγχο των τελικών ιδιοτήτων της επιφάνειας στήριξης[64].

4.7 Δομή του φορέα στήριξης του Eupergit C

Ο Eupergit C αποτελείται από μακροπορώδη σφαιρίδια με διάμετρο από 100-250μm, παρασκευασμένα από τον συμπολυμερισμό των N,N'-μεθυλένο-δι-μεθακρυλαμίδιο, glycidyl methacrylate, allyl glycidyl ether και μεθακρυλαμίδιο.

Η μέθοδος βασίζεται πάνω σε μία καινοτόμο μέθοδο bead-πολυμερισμού που αναπτύχθηκε από τον Roehm το 1970.[66] Λόγω της δομής του ο Eupergit C είναι σταθερός, και χημικά και μηχανικά, σε εύρος pH από 0 έως 14, δεν διογκώνεται ή συρρικνώνεται κάτω από κάτω από αλλαγές pH σε αυτή τη κλίμακα. Ο Eupergit C ενώνεται με τα ένζυμα μέσω των εποξειδικών του ομάδων που αντιδρούν με τις αμινομάδες σε ουδέτερο ή βασικό pH ή με τις σουλφυδροομάδες των πρωτεϊνικών μορίων ή τις καρβοξυλομάδες σε όξινο ή ουδέτερο pH. Εξαιτίας της μεγάλης πυκνότητας σε εποξιομάδες στην επιφάνεια των σφαιριδίων (600μmol/g ξηρού Eupergit C) τα ένζυμα ακινητοποιούνται σε διάφορα σημεία της δομής τους. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται "πολυσημειακή επαφή" και θεωρείται ο βασικός παράγοντας για την λειτουργική σταθερότητα των ενζύμων στο φορέα στήριξης Eupergit C[67]. Η χωρητικότητα πρόσδεσης ενζύμου είναι 100 mg πρωτεΐνης/g Eupergit C.



Εικόνα 10: Δομή του Eupergit C και η ομοιοπολική σύνδεση του με το ένζυμο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Πειραματική διαδικασία

Υλικά και αναλυτικές μέθοδοι

5.1 Υλικά

5.1.1 Ενζυμο β-γλυκοζιδάση από αμύγδαλο

β-γλυκοζιδάση από αμύγδαλο E.C.1.1.21, χρωματογραφικά διαχωρισμένο ένζυμο σε μορφή σκόνης. Ειδική ενεργότητα 0.240 U/mg με υπόστρωμα 4-νιτροφαινυλο-β-D-γλυκοκυρανοζίτη και καταλύει την αντίδραση υδρόλυσης:



5.1.2 Εκχύλισμα ελευρωπαΐνης από τα φύλλα της ελιάς.

Το μεθανολικό εκχύλισμα ελευρωπαΐνη από φύλλα της ελιάς (*Olea europaea*) που συλλέχτηκαν στο εξωτερικό χώρο του Πολυτεχνείου Κρήτης κατά την περίοδο του Μαΐου 2010.

5.1.3 Χημικά αντιδραστήρια

β-γλυκοζιδάση από αμύγδαλο, φορέας ακινητοποίησης Eupergit C (50-300μm) με ομάδες αιθυλενοξιδίων $\geq 0,25\%$, 4-νιτροφαινυλο-β-D-γλυκοκυρανοζίτης (98% TLC), αλβουμίνη βοδινού ορού (protease free), D(+) μονοένυδρη γλυκόζη, οξικό οξύ, οξικό τριένυδρο νάτριο, δισόξινο φωσφορικό κάλιο, μονόξινο φωσφορικό κάλιο Τα παραπάνω αντιδραστήρια είναι από τον οίκο της Sigma-Aldrich και είναι αναλυτικού βαθμού καθαρότητας ή υψηλότερης. Το ο-φωσφορικό οξύ (HPLC 85-90%) και 4-νιτροφαινόλη ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας του οίκου Fluka και η ελευρωπαΐνη (HPLC>80%) προμηθεύτηκε από τον οίκο Extrasynthese.

Οι διαλύτες διχλωρομεθάνιο, ακετόνη, μεθανόλη ήταν υψηλού βαθμού καθαρότητας και ακετονιτρίλιο βαθμού καθαρότητας HPLC από τον οίκο Sigma-Aldrich Ltd.

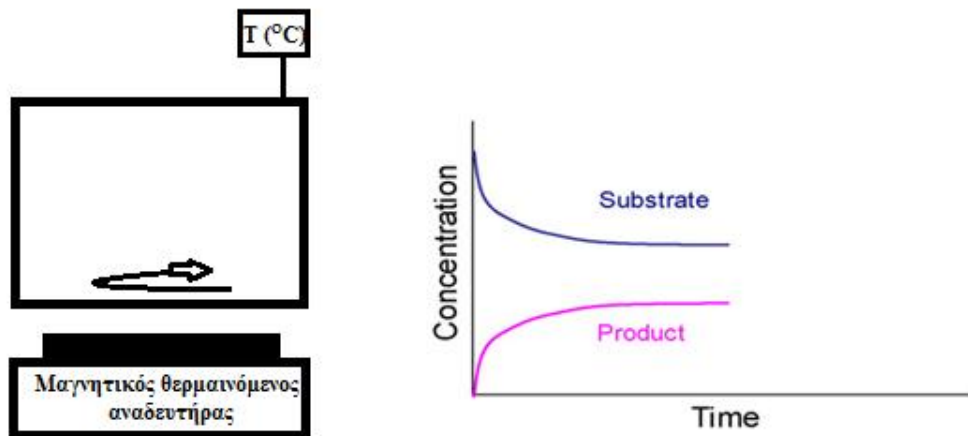
5.2 Πειραματικό σύστημα

Κλειστό Σύστημα υπό ανάδευση. Για την αντίδραση της υδρόλυσης χρησιμοποιήθηκε ποτήρι ζέσεως (όγκου 50,150,250 ml) καλυμμένο με αλουμινόχαρτο πάνω σε θερμαινόμενη πλάκα υπό συνεχή ανάδευση 150 rpm για πλήρη και ομογενή ανάμιξη. Ομοίως και για την αντίδραση της ακινητοποίησης που πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες περιβάλλοντος (20-25°C).

Συγκεκριμένα η αντίδραση της υδρόλυσης του 4-νιτροφαίνυλο-β-D-γλυκοπυρανοζίτη γινόταν στο ποτήρι ζέσεως σε συνολικό όγκο αντιδρώντος μίγματος ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου 150ml. Τα δείγματα λαμβανόταν σε συναρτήσει με το χρόνο και μετρηθεί η αύξηση του προϊόντος 4-νιτροφαινόλης. Η θερμοκρασία ελεγχόταν με τη βοήθεια θερμόμετρου.

Η αντίδραση της υδρόλυσης της ελευρωπαΐνη γινόταν στο ποτήρι ζέσεως σε συνολικό όγκο αντιδρώντος μίγματος ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου 50ml. Τα δείγματα λαμβανόταν σε συναρτήσει με το χρόνο για να μετρηθεί η μείωση του υποστρώματος της ελευρωπαΐνης.

Η ακινητοποίηση πραγματοποιήθηκε σε όγκο 10ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου 1M, pH 7.



Εικόνα 11: Σύστημα ανάδευσης όπου πραγματοποιήθηκαν η αντίδραση υδρόλυσης και η ακινητοποίηση ενζύμου και η συγκέντρωση του υποστρώματος και του προϊόντος συναρτήσει με το χρόνο.

Μέσο αντίδρασης υδρόλυσης: Για την προετοιμασία των ενζυμικών ρυθμιστικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε πυκνό οξικό οξύ και οξικό άλας του νατρίου που αναμίχθηκαν

υπό τις κατάλληλες αναλογίες για συγκέντρωση 0.1M με pH 5 σε υπερκάθαρο νερό. Τυχόν απόκλιση από το επιθυμητό pH ρυθμιζόταν με ο-φωσφορικό οξύ ή καυστικό νάτριο.

Μέσο αντίδρασης ακινητοποίησης: Για την προετοιμασία του διαλύματος ακινητοποίησης χρησιμοποιήθηκε δισόξινο φωσφορικό κάλιο KH_2PO_4 , μονόξινο φωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4) υπό τις κατάλληλες αναλογίες για την απαιτούμενη συγκέντρωση 1M με pH 7 σε υπερκάθαρο νερό. Τυχόν απόκλιση από το επιθυμητό pH ρυθμιζόταν με ο-φωσφορικό οξύ ή καυστικό νάτριο.

5.3 Αναλυτικές μέθοδοι

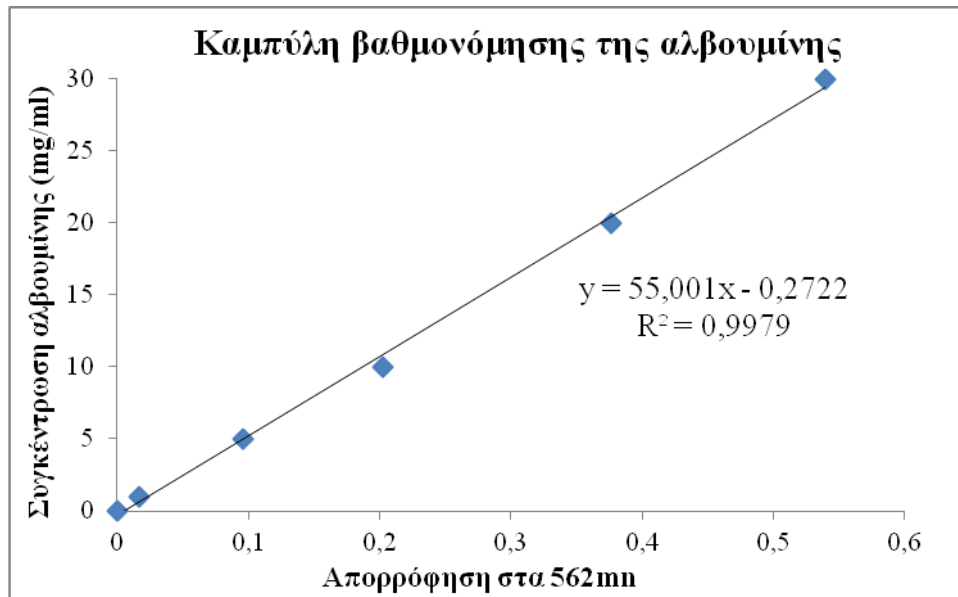
5.3.1 Πρωτόκολλο προσδιορισμός της συνολικής πρωτεΐνης με την μέθοδο του QuantiPro BCA-kit.

Για τον προσδιορισμό πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε QuantiPro BCA Assay Kit (με εύρος 1-30μg/ml) της Sigma Aldrich. Κατά την διάρκεια της ακινητοποίησης συναρτήσε του χρόνου λαμβανόταν δείγματα. Η ποσότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου υπολογίστηκε ως διαφορά της συνολικής πρωτεΐνης που προστέθηκε αρχικά μείον την ποσότητα που απέμεινε στο διάλυμα.

Η τεχνική του bicinchoninic acid(BCA) στηρίζεται στον σχηματισμό του συμπλόκου Cu^{+2} και πρωτεΐνης σε βασικές συνθήκες και ακολουθεί η αναγωγή του Cu^{+2} σε Cu^{+1} . Η ποσότητα της αναγωγής είναι ανάλογη της πρωτεΐνης. Έχει αποδειχτεί οι δεσμοί κυστεΐνης, κυστίνης, τρυπτοφάνης, τυροσίνης και πεπτιδίων ανάγει τον Cu^{+2} σε Cu^{+1} . Το bicinchoninic acid σχηματίζει ένα μωβ-μπλε σύμπλεγμα με τον Cu^{+1} σε αλκαλικά περιβάλλοντα, έτσι παρέχουν το απαιτούμενο για να ελεγχθεί η αναγωγή του αλκαλικού Cu^{+2} από τις πρωτεΐνες.

Το QuantiPro BCA-kit δίνει γραμμική απόκριση για συγκεντρώσεις 0.5-30 μg/ml πρωτεΐνης. Το μίγμα αντίδρασης αποτελείται από το διάλυμα (QA) που αποτελείται από sodium carbonate, sodium tartate and sodium bicarbonate σε NaOH 0.2M, pH=11.25, το διάλυμα (QB) αποτελείται από 4%(w/v) BCA pH=8.5, το διάλυμα (QC) 4% (w/v) copper(II) sulfate, pentahydrate. Η ανάμιξη γινόταν ως εξής σε αναλογία QA/QB/QC (25:25:1), έτσι ονομάζουμε το αντιδραστήριο Quantipro. Στη συνέχεια γινόταν προσθήκη δείγματος ενζύμου: Quantipro (1:1), ανάδευση και έπειτα επώαση για 2 ώρες στους 37°C σε θάλαμο επώασης. Στην συνέχεια τα δείγματα αφήνονται να έλθουν στην θερμοκρασία περιβάλλοντος και φωτομετρούνται στα 562nm σύμφωνα με το πρωτόκολλο. Η απορρόφηση ανάγεται σε συγκέντρωση πρωτεΐνης μέσω της πρότυπης καμπύλη βαθμονόμησης της πρωτεΐνης που έγινε

με Bovine Serum Albumine(BSA)-αλβουμίνη βοδινού ορού σε συγκεντρώσεις από 1 μέχρι 30 $\mu\text{g/ml}$ και φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα.

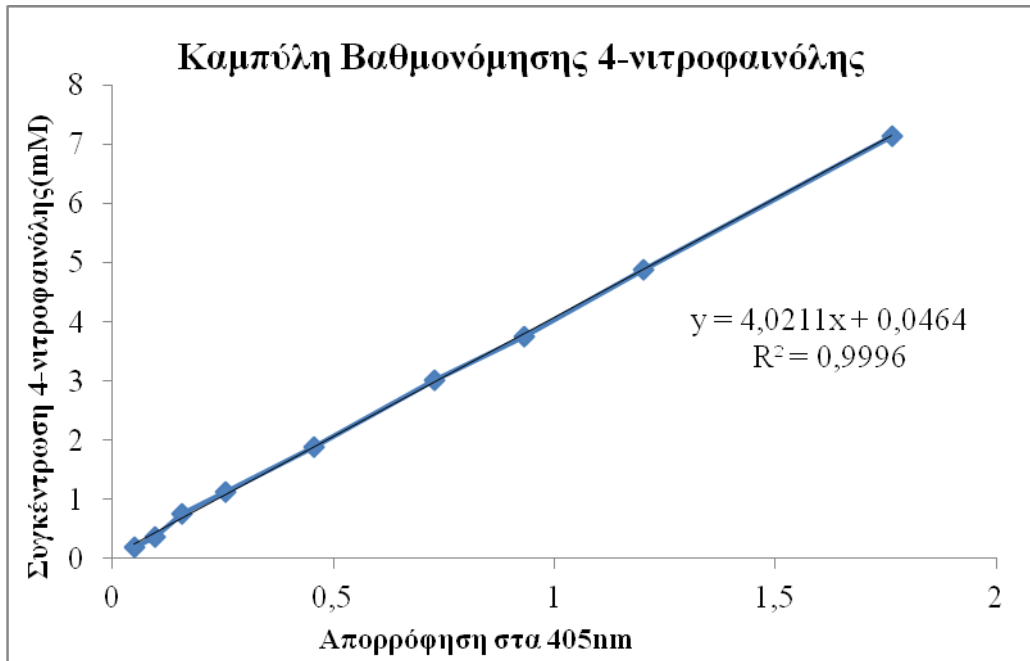


Διάγραμμα 1: Καμπύλη βαθμονόμησης της συγκέντρωσης αλβουμίνης βοδινού ορού συναρτήσει της απορρόφησης στα 562nm.

5.3.2 Μέτρηση της 4-νιτροφαινόλης.

Ο ρυθμός της αντίδρασης της υδρόλυσης του υποστρώματος 4-νιτροφαινυλο-β-D-γλυκοκυρανοζίτη σε 4-νιτροφαινόλη και γλυκόζη προσδιορίστηκε με βάση την απορρόφηση της νιτροφαινόλης στα 405 nm (OD_{405}) χρησιμοποιώντας κυψελίδα χαλαζία οπτικής διαδρομής 1 cm. Οι φωτομετρικοί προσδιορισμοί έγιναν με την βοήθεια φασματοφωτόμετρου μονής δέσμης ορατού-υπεριώδους, UV mini 1240 του οίκου Shimadzu (μοντέλο U-2000, μήκος οπτικής διαδρομής 1cm) που φέρει υποδοχή κυψελίδας και φασματοφωτόμετρο απλής δέσμης.

Η αντίδραση της υδρόλυσης παρακολουθείται φωτομετρικά μέσω της μέτρησης της απελευθέρωσης της 4-νιτροφαινόλης στα 405 nm και μέσω της καμπύλης αναφοράς που έχει δημιουργηθεί με πρότυπα διαλύματα 4-νιτροφαινόλης σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου 0.1M pH 5 με εύρος συγκεντρώσεων από 0.25 έως 7.2 mM. Στο διάγραμμα 2 δίνεται η καμπύλη βαθμονόμησης της 4-νιτροφαινόλης.



Διάγραμμα 2: Καμπύλη βαθμονόμησης της 4-νιτροφαινόλης σε 0.1M ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου pH 5 συναρτήσει της απορρόφησης στα 405 nm.

5.3.3 Μέθοδος προσδιορισμού της ελευρωπαΐνης

Ο ρυθμός αντίδρασης της υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης στις ουσίες άγλυκο της ελευρωπαΐνης και γλυκόζη προσδιορίστηκε με βάση την μέτρηση της εναπομένουσας ελευρωπαΐνης μέσω του χρωματογραφικού διαχωρισμού με την διάταξη HPLC υπό τις κατάλληλες συνθήκες .

Πραγματοποιήθηκε απευθείας χρωματογραφικός διαχωρισμός της ελευρωπαΐνης των δειγμάτων με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού και φθορισμού (High Performance Liquid Chromatography-UV-Vis Diode Array/Fluorescence, HPLC-DAD/Fluorescence) συνδεδεμένο με H/Y με το υποστηρικτικό λογισμικό της Waters ,Millenium Software .

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε χρωματογράφο τύπου Alliance 2690 του οίκου Waters ο οποίος φέρει ανιχνευτές UV-Vis Diode Array (2996 PDA Detector). Ο διαχωρισμός των συστατικών του μίγματος πραγματοποιήθηκε σε χρωματογραφική στήλη του τύπου Luna C₁₈ με διαστάσεις 250×4,6 mm και μέγεθος σωματιδίων 5 μm, στην οποία έχει συνδεθεί προστήλη (Security guard) διαστάσεων 4,0×3,0 mm επίσης του οίκου Phenomenex. Η στήλη θερμοστατήθηκε στους 30 °C και ο όγκος εισαγωγής του μίγματος ήταν 100 μL. Η κινητή φάση αποτελούνταν από μίγμα με αυξανόμενη ένταση χρωματογραφικής έκλουσης

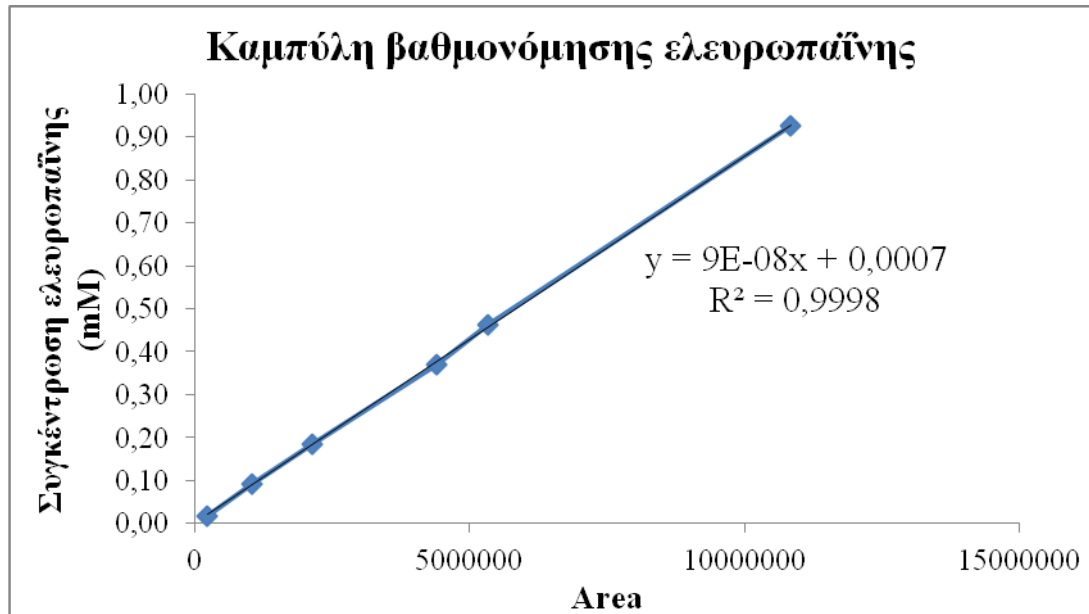
αποτελούμενο από (διαλύτης Α), υπερκάθαρο νερό οξινισμένο με $\text{o-H}_3\text{PO}_4$ σε pH 4.6 και το (διαλύτης Β) ακετονιτριλίου με ροή 1 mL/min:

Να σημειωθεί ότι η φάση του υπερκάθαρου νερού οξινίζεται ελαφρώς για να μην υπάρχουν ιονισμένες μορφές των ουσιών.

Πίνακας 5: Συνθήκες ροής της έκλουσης με βαθμιαία μεταβολής της σύστασης του μίγματος διαλυτών της κινητής φάσης για το διαχωρισμό της ελευρωπαϊνής σε στήλη C18 με τη χρήση του DAD ανίχνευσης με ροή 1ml/min και 30min η διάρκεια της έκλουσης .

TIME (min)	ΔΙΑΛΥΤΗΣ Α (%)	ΔΙΑΛΥΤΗΣ Β (%)
0	90	10
10	70	30
25	60	40
27	90	10

Η ένωση ελευρωπαϊνή ανιχνεύτηκε με τον ανιχνευτή UV-Vis Diode Array, στον οποίο το μήκος κύματος ήταν 280 nm. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 30 min. Ο χρόνος κατακράτησης t_R είναι τα 14.4 λεπτά. Για την κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης, πρότυπα διαλύματα των ουσιών συγκέντρωσης 1 g/L σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου pH 5 0.1M αραιώθηκαν σε συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από 0,02 έως 0,95 mM (10 έως 500 mg/L). Στο διάγραμμα 3 δίνεται η καμπύλη βαθμονόμησης της ελευρωπαϊνής.



Διάγραμμα 3: Καμπύλη βαθμονόμησης της ελευρωπαΐνης σε 0.1M ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου 0.1M pH 5 με ανίχνευση στα 280 nm.

Σε μεταγενέστερα πειράματα, προσδιορίστηκε η καθαρότητα των πρότυπων διαλυμάτων ελευρωπαΐνης σε 97.7%, αρκετά ικανοποιητική για εξωτερικό πρότυπο.

5.4 Απενεργοποίηση του ενζύμου.

Από τη βιβλιογραφία[56] και πειραματική δοκιμή διαπιστώθηκε ότι ο κατάλληλος τρόπος για να απενεργοποιηθεί το ένζυμο, μεταξύ χημικής και φυσικής μεθόδου, είναι η θερμική απενεργοποίηση του. Έτσι, αποφεύγονται οι χημικές παρεμβολές στις αναλύσεις στην HPLC ή στις φασματοφωτομετρικές μεθόδους.

Για την απενεργοποίηση χρησιμοποιήθηκε μία θερμαινόμενη βάση και ένα υδατόλουτρο που όταν έφτανε στην επιθυμητή θερμοκρασία στους 100 °C, τότε βυθιζόταν για 1-2 λεπτά το κάθε δείγμα και στη συνέχεια αφήνεται να έρθει στη θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Παρατηρήθηκε ότι με την θερμική απενεργοποίηση στους 80-100°C για 1-2 λεπτά η ουσία της ελευρωπαΐνης και 4-νιτροφαινόλης μένουν σταθερές και δεν υδρολύονται.

5.5 Διαχωρισμός του ακινητοποιημένου ενζύμου από το διάλυμα.

Μετά τη διαδικασία της ακινητοποίησης του ενζύμου πραγματοποιήθηκαν φυγοκεντρήσεις του ακινητοποιημένου συμπλόκου πρωτεΐνης-Eupergit C για τον διαχωρισμό από το διάλυμα ακινητοποίησης και τον καθαρισμό του με πλύσεις επί τρεις φορές με απιονισμένο νερό. Αρχικά φυγοκεντρήθηκε στα 3500 rpm(2383 x g) για 15 min στους 25°C, σε πλαστικά δοχεία φυγοκέντρησης όγκου 50 ml. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν Labofuge 400 του οίκου Heraeus Instruments.

5.6 Λυοφιλίωση του ακινητοποιημένου ενζύμου.

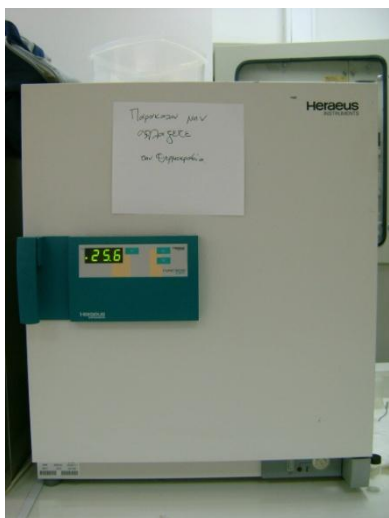
Η απομάκρυνση υγρασίας του ακινητοποιημένου ενζύμου έγινε με τη μέθοδο της ψυχοξήρανσης (freeze-drying). Κατά τη μέθοδο αυτή, καταψύχεται στους -55 °C το προς τη ξήρανση υλικό και έπειτα ακολουθεί εξάχνωση υπό κενό σε 20mbar. Στη συνέχεια το λυοφιλικό ένζυμο διατηρήθηκε στους -18 °C. Ο λυοφιλωτής που χρησιμοποιήθηκε για την ψυχοξήρανση των δειγμάτων ήταν Coolsafe Pro της Scanvac.



Εικόνα 12: Λυοφιλωτής της Coolsafe Pro της Scanvac που έφτανε στους -55 °C υπό κενό σε 20mbar.

5.7 Επώαση των δειγμάτων

Επώαση των δειγμάτων για τον προσδιορισμό πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε στον επωαστήρα της Heraeus instruments στους 37°C όπως υποδεικνυόταν από το πρωτόκολλο που περιγράφεται 5.3.1.



Εικόνα 13:Συσκευή επώασης των δειγμάτων για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης.

Τα υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα παρασκευαζόταν σε υπερκάθαρο νερό από το σύστημα Compact ultrapure water system με σύστημα Easypure RF της Barnstead σε αγωγιμότητα 18,2 MΩ/cm .

Για την παρασκευή των απαιτούμενων ρυθμιστικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε ψηφιακό πεχάμετρο, pH GLP21, Crison instruments.

Σε όλες τις παραπάνω διαδικασίες χρησιμοποιήθηκαν πιπέτες ρυθμιζόμενες τύπου Gilson.

5.8 Διεργασία της εκχύλισης και καθαρισμού της ελευρωπαΐνης.

Πραγματοποιήθηκε συλλογή φύλλων ελιάς από τον προαύλιο χώρο του Πολυτεχνείου Κρήτης, ξεπλυνθήκαν με άφθονο νερό βρύσης για να φύγει η σκόνη και τυχόν υπολείμματα φυτοφαρμάκων. Στη συνέχεια ξήρανση στους 55 °C σε φούρνο με ξηρό αέρα έως ότου σταθεροποιηθεί το βάρος τους και έπειτα η κονιορτοποίηση τους σε μίξερ.

Ποσότητα 24g φύλλων με 700 ml μεθανόλης εισήχθησαν σε γυάλινες φιάλες χωρητικότητας 2 λίτρων και ξεκίνησε το σύστημα της εκχύλισης υγρού–στερεού να αναδεύεται ισχυρά για 3 μέρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για τη παρεμπόδιση χημικών ή ενζυμικών μεταβολών ώστε να εισχωρήσει ο διαλύτης στα κυτταρικά τοιχώματα των φύλλων. Μετά το πέρας της εκχύλισης ακολούθησε διήθηση με χάρτινο φίλτρο ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις υγρού και στερεού. Ακολουθεί συμπύκνωση του διηθήματος μέσω εξάτμισης του διαλύτη υπό κενό στην ειδική εγκατάσταση εξάτμισης και το ξηρό οργανικό υπόλειμμα συντηρείται στην ψύξη στους 4°C.

5.9 Χρωματογραφία της κατανομής στήλης υπό πίεση.

Στόχος της χρωματογραφίας είναι ο διαχωρισμός των συστατικών διάφορων μιγμάτων μεγάλης κλίμακας.

Στην παρούσα εργασία ο στόχος είναι να διαχωριστεί το οργανικό εκχύλισμα των φύλλων της ελιάς από το βήμα 5.8 ώστε απομονωθεί η ουσία της ελευρωπαΐνης, όσον το δυνατόν σε μεγαλύτερη καθαρότητα.

Αρχικά γινόταν η πάκτωση της χρωματογραφικής στήλης (μήκους 25cm, διαμέτρου 3cm) με αιώρημα silica gel (20-40 μm) σε μεθανόλη μέχρι 2 εκατοστά από την αρχή της στήλης. Στην συνέχεια εισαγωγή του οργανικού εκχυλίσματος (ποσότητα που αντιστοιχεί σε 6.75g φύλλων ελιάς) διαλυμένο στην κινητή φάση στο στρώμα του silica gel χωρίς να διαταραχθεί η επιφάνεια του στρώματος. Με τη βοήθεια μιας φούσκας εισάγεται το μίγμα των διαλυτών εκλούσεως διχλωρομεθάνιο:μεθανόλη (80:20) Στο τέλος εφαρμόζεται σύστημα πίεσης με στόχο να επιτευχθεί η απαιτούμενη ροή έκλουσης. Μετά από έκλουση 600ml συστήματος διαλύτων έγινε έκλουση της ελευρωπαΐνης από την στήλη σε κλάσματα των 25ml. Στην συνέχεια τα κλάσματα συμπυκνώθηκαν και επαναδιαλύθηκαν σε μεθανόλη. Η ύπαρξη της ΟΕ στα κλάσματα διαπιστώθηκε με την μεθόδου της HPLC.

Τα κλάσματα που περιείχαν ΟΕ αντιστοιχούν σε 260 mg οργανικού υπολείμματος Η περιεκτικότητα σε ΟΕ ήταν 3.81% w/w. Η τελική απόδοση καθαρής ελευρωπαΐνης αντιστοιχεί σε 1.46 g ΟΕ/kg ξ.β φύλλων ελιάς .



Εικόνα 14: Διάταξη υγρής χρωματογραφίας στήλης, σύστημα εκχύλισης υπό ανάδευση (αριστερά) και σύστημα εξάτμισης υπό κενό (δεξιά).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

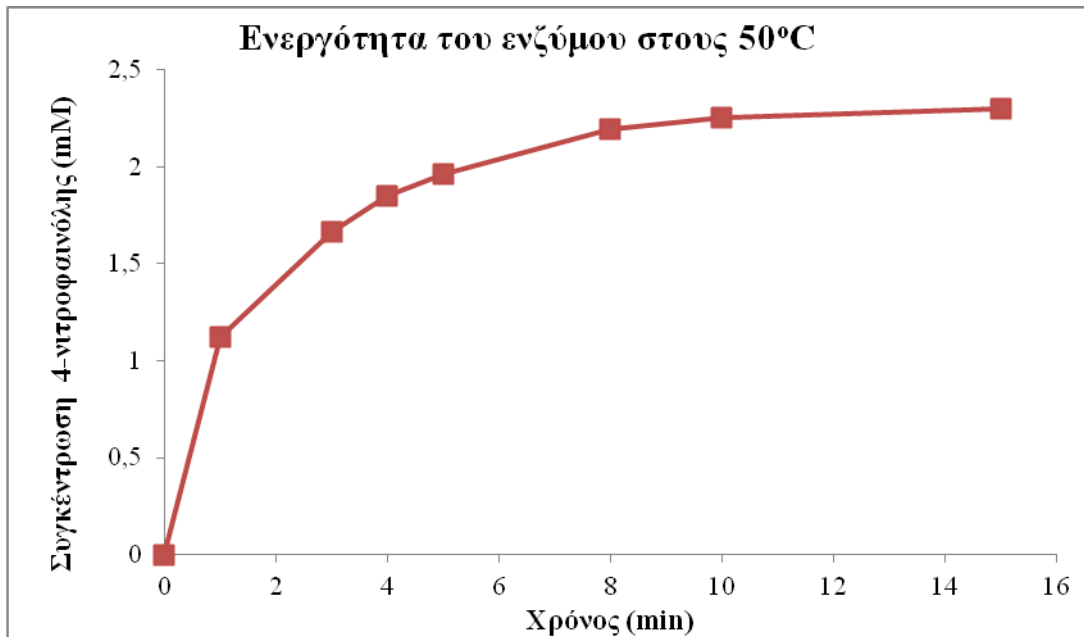
6.1 Μέτρηση της ειδικής ενεργότητας της β-γλυκοζιδάσης.

Η ενεργότητα του ενζύμου β-γλυκοζιδάσης μετρήθηκε με τη υδρόλυση του συνθετικού υποστρώματος p-νιτροφαινυλο-β-D-γλυκοπυρανοζίτη (p-NPG) σε 4-νιτροφαινόλη και γλυκόζη.

Πρέπει να σημειωθεί ότι χρησιμοποιήθηκε p-NPG ως υπόστρωμα σαν οικονομικότερη προσέγγιση έναντι της ελευρωπαΐνη και πιο εύκολη όσον αφορά το προσδιορισμό της αύξησης του προϊόντος της 4-νιτροφαινόλης για το προσδιορισμό βελτιστοποίησης κάποιων παραγόντων όπως η θερμοκρασία που επηρεάζουν τη δράση του ενζύμου.

Τα ενζυμικά διαλύματα αποτελούσαν από 90 ml 0.1M ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου 0.1M pH 5, 50 ml συγκέντρωσης 5 ή 10 mM 4-PNG σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου και 10 ml ενζυμικού διαλύματος με τελική συγκέντρωση διαλύματος 0.032 mg ενζύμου/ml. Τα διαλύματα αντίδρασης επώαστηκαν σε θερμοκρασία 50°C σε θερμαινόμενη πλάκα υπό ήπια ανάδευση. Ανά επιλεγόμενα χρονικά διαστήματα λαμβανόταν δείγμα και γινόταν απενεργοποίηση του ενζύμου με θέρμανση για περίπου 1-2 λεπτά. Η αντίδραση της υδρόλυσης παρακολουθείται φωτομετρικά μέσω της μέτρησης της απελευθέρωσης της 4-νιτροφαινόλης στα 405 nm και μέσω της καμπύλης αναφοράς όπως φαίνεται στο διάγραμμα 2 που έχει δημιουργηθεί με πρότυπα διαλύματα 4-νιτροφαινόλης σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου pH 5 με εύρος συγκεντρώσεων από 0.25-7.2 mM.

Συγκεκριμένα, η μέτρηση της δραστηριότητας της β-γλυκοζιδάσης, βασίζεται στον προσδιορισμό της ταχύτητας σχηματισμού της νιτροφαινόλης. Η ενεργότητα εκφράζεται σε IU(International Units), όπου 1 IU απελευθερώνει 1mmole 4-νιτροφαινόλης το λεπτό σε θερμοκρασία 50°C ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου 0.1M pH 5 με αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 10mM p-PNG. Ας σημειωθεί ότι η αρχική συγκέντρωση υποστρώματος πρέπει να είναι μεγαλύτερη από την K_m που από την βιβλιογραφία είναι 6 mM. [54] Για να υπολογιστεί η ενεργότητα θα χρησιμοποιηθεί ο αρχικός ρυθμός αύξησης του προϊόντος δηλαδή $V_o = d[P]/dt$, όπου $d[P]$ η διαφορά συγκέντρωσης του προϊόντος(μονάδες mM) και όπου $dt=1min$. Στην συνέχεια η ειδική ενεργότητα υπολογίστηκε από τη κλίση V_o προς την μάζα του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε.



Διάγραμμα 4: Ρυθμός υδρόλυσης μέσω της αύξησης του προϊόντος στους 50°C σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου 0.1M pH 5 με αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 10mM p-PNG.

Ειδική Ενεργότητα (units/mg)	0.240
------------------------------	-------

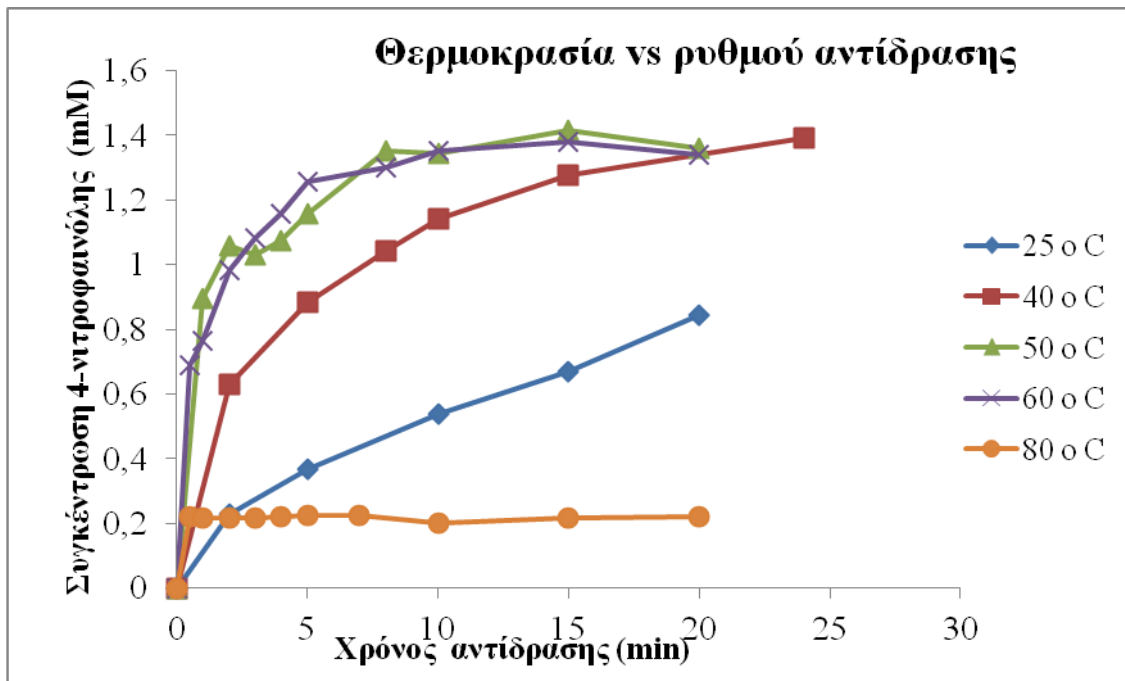
Η ειδική ενεργότητα σημαίνει ότι το 1 IU απελευθερώνει 0.240 mmole 4-νιτροφαινόλης το λεπτό σε θερμοκρασία 50°C σε 0.1M ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου pH 5 με αρχική συγκέντρωση υποστρώματος 10mM p-PNG.

6.2 Επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό υδρόλυσης του υποστρώματος 4-νιτροφαινυλο-β-D-γλυκοπυρανοζίτη.

Σε αυτό το πείραμα μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στην ενεργότητα του ενζύμου β-γλυκοζιδάσης από αμύγδαλο με σταθερό υπόστρωμα και σταθερή συγκέντρωση ενζύμου (0.024 mg/ml). Επιλέχθηκαν 5 διαφορετικές θερμοκρασίες στους 25,40,50,60,80°C. Τα ενζυμικά διαλύματα αποτελούνταν από 90 ml 0.1M ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου pH 5, 50 ml 5 mM p-PNG σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου και 10 ml ενζυμικού διαλύματος ώστε η τελική συγκέντρωση στο διάλυμα να είναι 0.023-0.025 mg/ml. Το ρυθμιστικό διάλυμα και το ενζυμικό διάλυμα προτού αναμιχθούν εγκλιματίζονταν κάθε φορά μέχρι να φτάσουν στην κατάλληλη θερμοκρασία. Τα διαλύματα αντίδρασης και εγκλιματισμού πραγματοποιήθηκαν σε θερμαινόμενη πλάκα υπό ήπια ανάδευση. Ανά επιλεγόμενα χρονικά διαστήματα, δηλαδή στο 0, 1, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 30, 45, 60 λεπτά λαμβανόταν δείγμα 3

ml και γινόταν απενεργοποίηση του ενζύμου με θέρμανση για περίπου 1-2 λεπτά στο υδατόλουτρο στους 90°C. Κατόπιν αφηνόταν να έλθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και φωτομετρήθηκε στα 405nm. Η ποσοτικοποίηση της του προϊόντος υδρόλυσης, τη 4-νιτροφαινόλης προσδιορίστηκε μέσω της καμπύλη βαθμονόμησης της 4-νιτροφαινόλης στο διάγραμμα 2.

Στο ακόλουθο διάγραμμα και πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αυτών των μετρήσεων.



Διάγραμμα 5: Η πορεία της αντίδρασης υδρόλυσης του 4-νιτροφαινόλη-β-D-γλυκοκυρανοζίτη [$S_0=5\text{Mm}$] σε 4-νιτροφαινόλη συναρτήσει της θερμοκρασίας σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου 0.1 M pH 5.

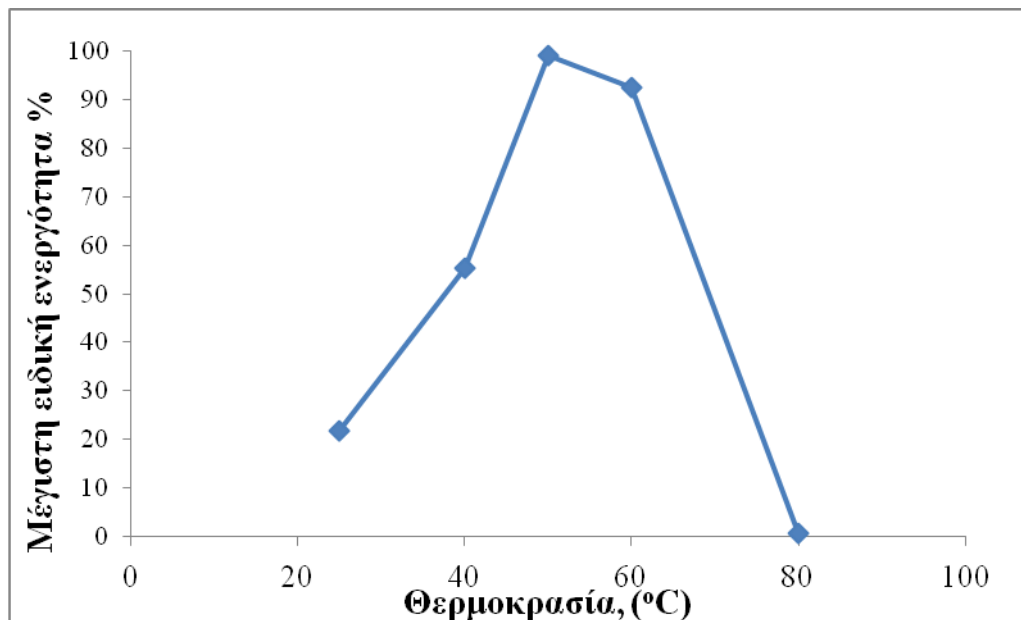
Παρατηρείται στο διάγραμμα 5 ότι το ένζυμο στους 25°C υδρολύει σχετικά αργά ενώ από τους 40 °C και μέχρι τους 60 °C και πάνω ο ρυθμός αυξάνεται αισθητά με τους 50 °C να είναι ο μέγιστος ρυθμός υδρόλυσης. Τέλος παρατηρείται ότι το ένζυμο στους 80 °C απενεργοποιείται. Ενώ παρατηρείται ότι στα 5 πρώτα λεπτά η αντίδραση φαίνεται να έχει τελειώσει σε όλες τις θερμοκρασίες .

Πίνακας 1: Η ειδική ενεργότητα συναρτήσει της θερμοκρασίας.

T(°C)	Ειδική ενεργότητα(IU/mg protein)
25	0.033
40	0.084
50	0.150
60	0.140
80	0.010

Στον παραπάνω πίνακα γίνεται συσχέτιση κατά πόσο η θερμοκρασία επηρεάζει την ενεργότητα του ενζύμου. Παρατηρείται ότι ο ρυθμός από τους 40°C στους 50°C διπλασιάζεται σχεδόν ενώ η μέγιστη ειδική ενεργότητα παρουσιάζεται στους 50 °C χωρίς να διαφέρει πολύ σε σχέση με τους 60 °C. Στους 25°C είναι αισθητά μικρότερη.

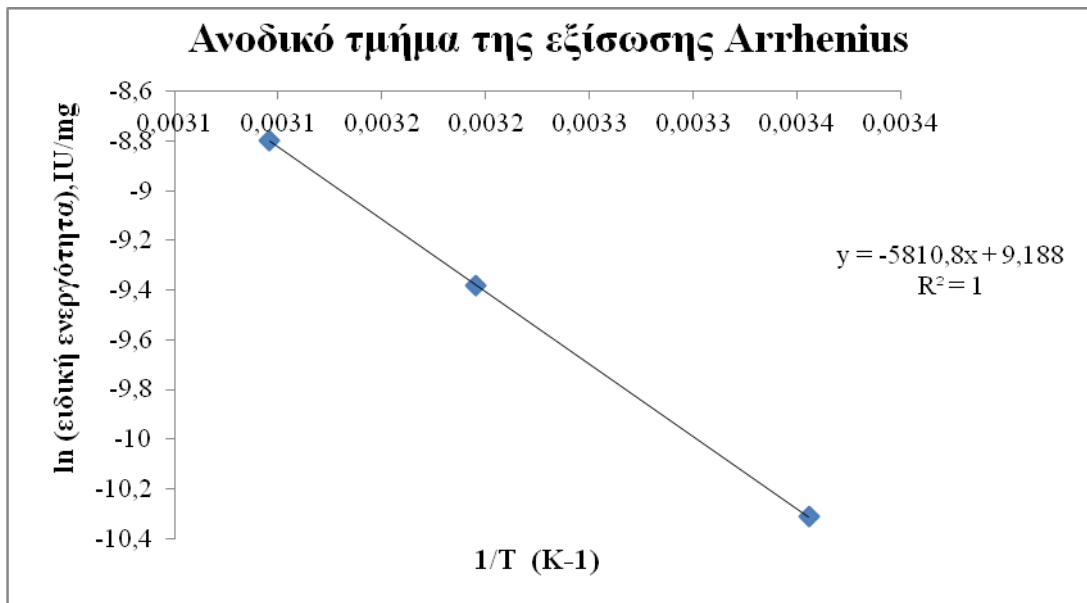
Στο διάγραμμα 6, φαίνεται η σχετική ειδική ενεργότητα επί τοις εκατό, με το 100% να είναι η μέγιστη ενεργότητα στους 50 °C.



Διάγραμμα 6: Η επίδραση της θερμοκρασίας στη ειδική ενεργότητα της β-γλυκοζιδάσης από αμύγδαλο. Το καθοδικό τμήμα οφείλεται στη θερμική μετουσίωση του ενζύμου.

Ο ρυθμός των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων αυξάνεται με τη θερμοκρασία μέχρι ένα ορισμένο σημείο. Πάνω από μια συγκεκριμένη θερμοκρασία, η ενζυμική δραστηριότητα μειώνεται συναρτήσει της θερμοκρασίας, λόγω μετουσίωσης του ενζύμου. Στο πάνω διάγραμμα απεικονίζεται η μεταβολή του ρυθμού μιας ενζυμικής αντίδρασης με τη θερμοκρασία και η παρουσία μιας βέλτιστης θερμοκρασίας. Το ανοδικό τμήμα του διαγράμματος είναι γνωστό ως θερμική ενεργοποίηση (temperature activation).

Στην περιοχή αυτή, ο ρυθμός της αντίδρασης μεταβάλλεται σύμφωνα με την εξίσωση Arrhenius. $U_{\max} = k_2 \cdot [E_0]$ και $k_2 = Ae^{-E_a/RT}$, όπου E_a η ενέργεια ενεργοποίησης (kcal/mol) και $[E_0]$ η συγκέντρωση του ενεργού ενζύμου. Το γράφημα του $\ln U_{\max}$ συναρτήσει του $1/T$ είναι γραμμικό με κλίση $-E_a/R$ όπου σταθερά των αερίων $R = 1.987 \text{ cal} \cdot (\text{Kmol})^{-1}$.



Διάγραμμα 7: Καμπύλη του ανοδικού τμήματος της Arrhenius της υδρόλυσης του 4-νιτροφαινυλο-β-D-γλυκοκυρανοζίτη από το ένζυμο β-γλυκοζιδάση. Συνθήκες του πειράματος: 0.1M ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου pH 5, με αρχική συγκέντρωση υποστρώματος p-PNG 5mM.

Η ενέργεια ενεργοποίησης που προκύπτει από την κλίση αντιστοιχεί σε $E_a = 11.55 \text{ kcal/mol}$.

Στο διάγραμμα 8 παρατηρείται ότι η ελευρωπαΐνη υδρολύεται με αργούς ρυθμούς στις συνθήκες του πειράματος σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου 0.1M pH 5 υπό ανάδευση στους 55°C, και μόνο μετά από 3 ώρες παρατηρείται μείωση κατά 6% της αρχικής συγκέντρωσης. Ενώ μετά τις 4 ώρες παρατηρείται μια μείωση κατά 10%. Έτσι, η ελευρωπαΐνη είναι σταθερή ένωση γιατί η υδρόλυση της σχεδόν αμελητέα στις συνθήκες του πειράματος στις 2 ώρες που είναι η χρονική διάρκεια που εκτελείται το εκάστοτε πείραμα υδρόλυσης.

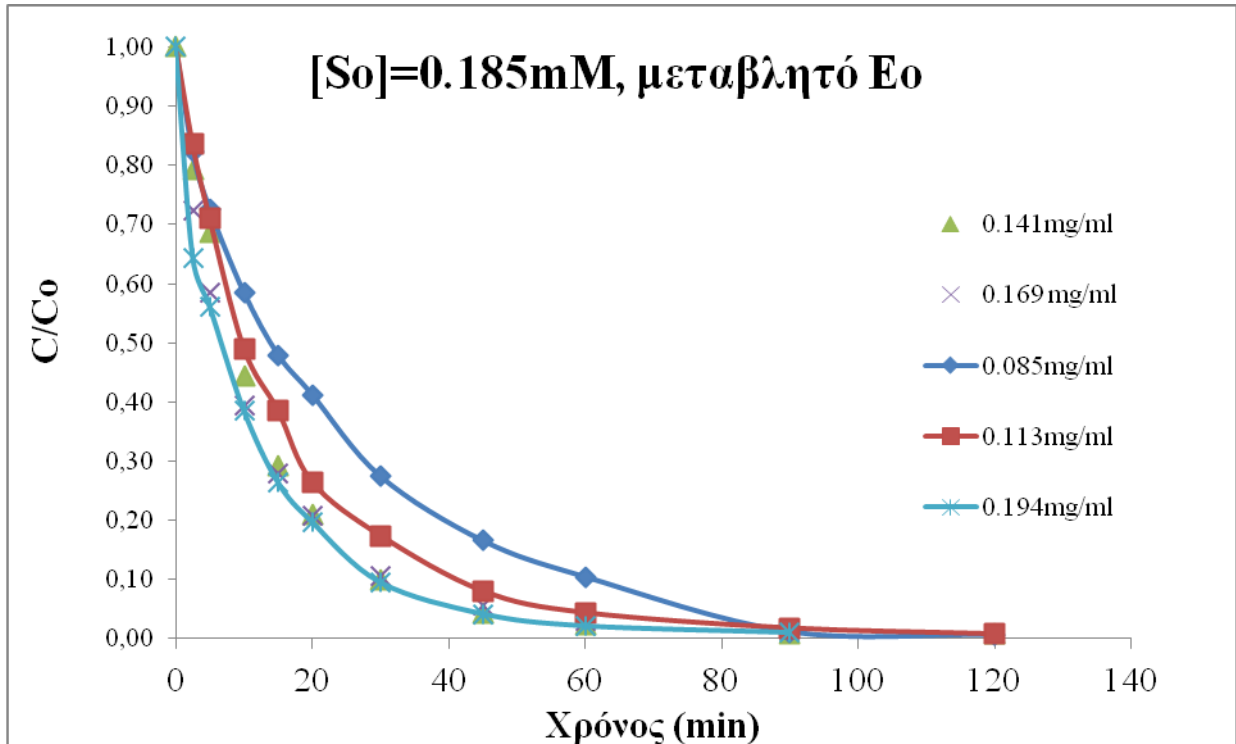
6.4 Επίδραση της συγκέντρωσης του βιοκαταλύτη στο ρυθμό υδρόλυσης με σταθερή συγκέντρωση ελευρωπαΐνη .

Σε αυτό το πείραμα έγινε ο προσδιορισμός της βέλτιστης συγκέντρωσης ενζύμου σε 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος 0.182 και 0.924 mM.

Σε αυτό το πείραμα μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του βιοκαταλύτη στην ενεργότητα του ενζύμου β-γλυκοζιδάσης από αμύγδαλο με σταθερό υπόστρωμα και σταθερή θερμοκρασία 50 °C. Ο ρυθμός της υδρόλυσης βρέθηκε μέσω της μείωσης του υποστρώματος μετρήθηκε μέσω της High Performance Liquid Chromatography μεθόδου. Επιλέχθηκαν 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου(mg/ml) (0.084-**0.113**-0.141-**0.169**-0.194). Τα ενζυμικά διαλύματα αποτελούταν 25 ml διαλύματος ελευρωπαΐνη 1g/L σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου και από 25 ml αραιωμένου ενζυμικού που παρασκευαζόταν από ένα αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης ενζύμου 0.7 mg/ml που αραιωνόταν με 0.1M ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου pH 5 μέχρι τελικής εκάστοτε συγκέντρωσης ώστε ο συνολικός όγκος διαλύματος αντίδρασης να είναι 50 ml. Το ρυθμιστικό και το ενζυμικό διάλυμα προτού αναμιχθούν εγκλιματίζονταν κάθε φορά μέχρι να φτάσουν στην θερμοκρασία των 50°C. Τα διαλύματα αντίδρασης και εγκλιματισμού πραγματοποιήθηκαν σε θερμαινόμενη πλάκα υπό ήπια ανάδευση. Ανά επιλεγόμενα χρονικά διαστήματα, δηλαδή στο 0, 2.5 ,5 ,10 ,15 , 20 , 30 ,45 , 60 , 90 ,120 λεπτά λαμβανόταν δείγμα και γινόταν απενεργοποίηση του ενζύμου με θέρμανση για περίπου 1-2 λεπτά στο υδατόλουτρο που έφτανε σε θερμοκρασία βρασμού. Κατόπιν τα δείγματα αφηνόταν να έρθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μετρήθηκαν μέσω της High Performance Liquid Chromatography μεθόδου και της καμπύλης αναφοράς που έχει δημιουργηθεί με πρότυπα διαλύματα ελευρωπαΐνη με εύρος συγκεντρώσεων από 0.02-0.93 mM. Για να υπολογιστεί η ενεργότητα θα χρησιμοποιηθεί ο αρχικός ρυθμός μείωσης του

υποστρώματος δηλαδή $u_0 = -d[S]/dt$ όπου $d[S](mM)$ διαφορά συγκέντρωσης του υποστρώματος όπου $dt=2.5min$ Δηλαδή η ειδική ενεργότητα υπολογίστηκε από τη κλίση u_0 προς το βάρος του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε. Και για την διευκόλυνση των υπολογισμών χρησιμοποιήθηκε η απόλυτη τιμή του αρχικού ρυθμού.

Στα ακόλουθα διαγράμματα και πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αυτών των μετρήσεων



Διάγραμμα 9: Η μεταβολή του ρυθμού υδρόλυσης με σταθερή την συγκέντρωση του υποστρώματος $S_0=0.185mM$ σε διαφορετικές τιμές $[E_0]$ σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου $0.1M$ pH 5 στους $50^\circ C$.

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται η μείωση του υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου σε $[S_0]=0.185mM$ και φαίνεται ότι πιο γρήγορη μείωση του ρυθμού υδρόλυση παρατηρείται στην αρχική συγκέντρωση ενζύμου 0.141 και 0.197 mg/ml και το ποσοστό υδρόλυσης της ΟΕ φτάνει στο 5% της $[S_0]$ σε 1ώρα για όλες τις $[E_0]$. Ενώ από αρχικές συγκεντρώσεις 0.085 - 0.113 mg/ml ο ρυθμός είναι πιο αργός και στην 1 ώρα φτάνει στο 88% και 95% αντίστοιχα της αρχικής συγκέντρωσης.

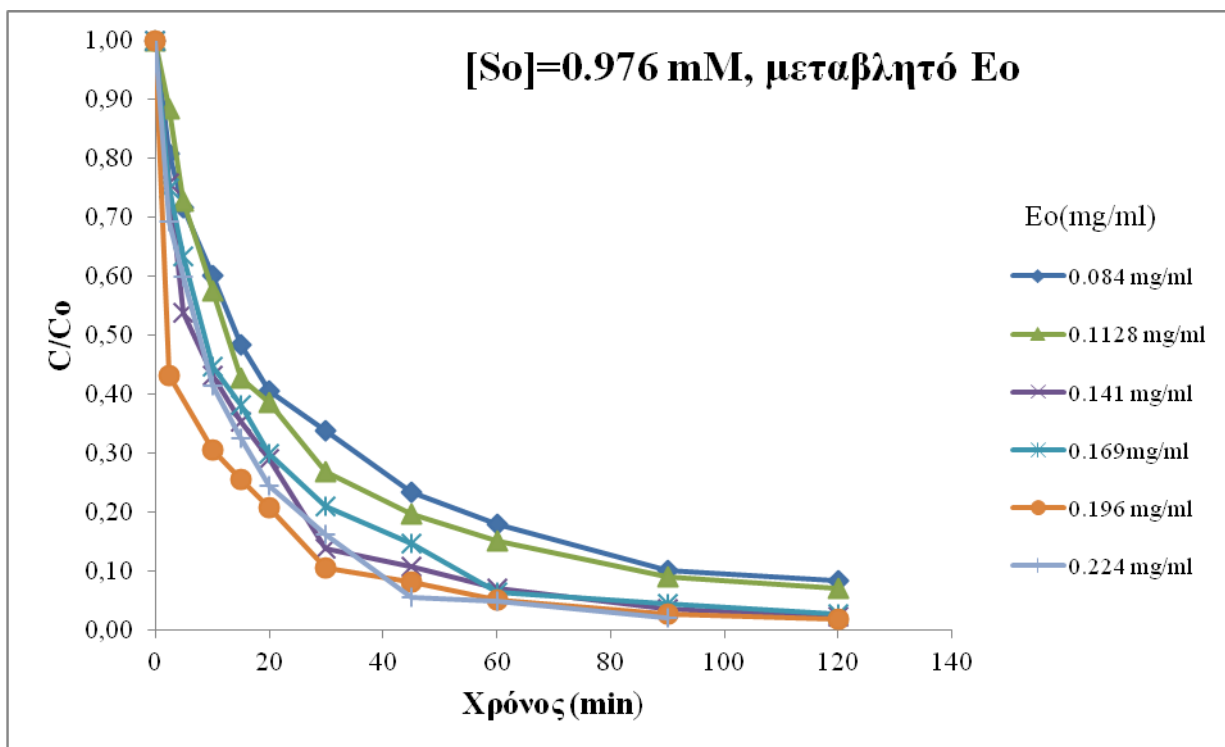
Πίνακας 2: Η ειδική ενεργότητα της υδρόλυσης με σταθερή την συγκέντρωση του υποστρώματος $S_0=0.185\text{mM}$ σε διαφορετικές τιμές $[E_0]$ σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού 0.1M , $\text{pH } 5$ στους 50°C .

Ειδική ενεργότητα (IU/mg)	$E_0(\text{mg/ml})$	% μετατροπή στα 60 min
0,00114	0,085	88,2
0,00202	0,113	95,7
0,00278	0,141	97,6
0,00197	0,169	97,0
0,00238	0,194	97,9

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται η ειδική ενεργότητα που προέκυψε από το απόλυτη τιμή του αρχικού ρυθμού υδρόλυσης προς τη ποσότητα του ενζύμου που προστέθηκε, τη συγκέντρωση του ενζύμου και το ποσοστό μετατροπής της ΟΕ στη 1 ώρα. Η ενεργότητα αυξάνεται όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του ενζύμου μέχρι την συγκέντρωση 0.141 mg/ml . Στις $0.169\text{-}0.194\text{ mg/ml}$ παρατηρούμε μια μείωση της ενεργότητας.

Ομοίως σε αυτό το πείραμα μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του βιοκαταλύτη στην ενεργότητα του ενζύμου β-γλυκοζιδάσης από αμύγδαλο με σταθερό υπόστρωμα $[S_0]=0.976\text{ mM}$ στους 50°C σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού 0.1M , $\text{pH } 5$. Επιλέχθηκαν 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου(mg/ml) ($0.084\text{-}0.1128\text{-}0.141\text{-}0.169\text{-}0.196\text{-}0.224$). Και για την διευκόλυνση των υπολογισμών χρησιμοποιήθηκε η απόλυτη τιμή του αρχικού ρυθμού.

Στα ακόλουθα διαγράμματα και πίνακες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αυτών των μετρήσεων :



Διάγραμμα 10: Η μεταβολή του ρυθμού υδρόλυσης με σταθερή την συγκέντρωση του υποστρώματος $S_0=0.976$ mM σε διαφορετικές τιμές αρχικής συγκέντρωσης του ενζύμου E_0 σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού 0.1M στους 50°C .

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται η μείωση του υποστρώματος συναρτήσει του χρόνου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ενζύμου σε $[S_0]=0.976\text{mM}$ και φαίνεται ότι πιο γρήγορη μείωση του ρυθμού υδρόλυση παρατηρείται στην αρχική συγκέντρωση ενζύμου 0.141 έως 0.224 mg/ml, με την συγκέντρωση ενζύμου 0.196 mg/ml να είναι ο ρυθμός υδρόλυσης είναι πιο γρήγορος ενώ στις συγκεντρώσεις ενζύμου 0.084-0.1128 mg/ml είναι πιο χαμηλοί οι ρυθμοί.

Πίνακας 3: Η ειδική ενεργότητα της υδρόλυσης με σταθερή την συγκέντρωση του υποστρώματος $S_0=0.976\text{mM}$ σε διαφορετικές τιμές $[E_0]$ σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού 0.1M , $\text{pH } 5$ στους 50°C .

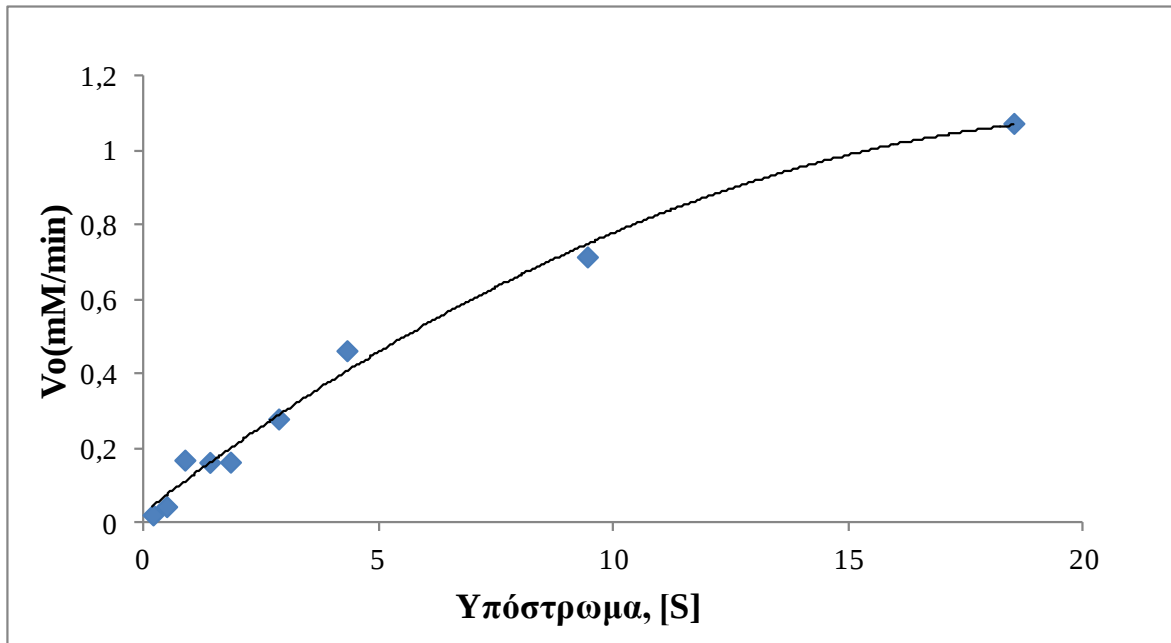
Ειδική (IU/mg protein)	ενεργότητα $E_0(\text{mg/ml})$	% μετατροπή της ΟΕ στα 60 min
0.0163	0.056	71.19
0.0182	0.084	82.09
0.0071	0.1128	84.82
0.0134	0.141	92.80
0.0017	0.1692	93.48
0.0199	0.1974	94.74
0.0109	0.2224	95.12

Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται η ειδική ενεργότητα που προέκυψε από την απόλυτη τιμή του αρχικού ρυθμού υδρόλυσης προς τη ποσότητα του ενζύμου που προστέθηκε, τη συγκέντρωση του ενζύμου και το ποσοστό μετατροπής της ΟΕ στη 1 ώρα. Η ενεργότητα αυξάνεται όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του ενζύμου μέχρι την συγκέντρωση 0.196 mg/ml . Η βέλτιστη συγκέντρωση ενζύμου με την μεγαλύτερη ενεργότητα είναι στη $[E_0] = 0.196 \text{ mg/ml}$. Η ποσοστιαία μετατροπή της ΟΕ στην 1 ώρα φτάνει το 95% στη βέλτιστη συγκέντρωση ενζύμου και στις 0.094, 0.121 και 0.169 φτάνουν εξίσου το 95%. Οι πιο χαμηλές μετατροπές που κυμαίνονται 70-85% είναι για συγκεντρώσεις ενζύμου 0.084 έως 0.1128 mg/ml .

6.5 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων της υδρόλυσης της ελευρωπαϊνης.

Σε αυτό το πείραμα μελετήθηκε ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων K_m και V_m της β-γλυκοζιδάσης από αμύγδαλο. Η αντίδραση της υδρόλυσης της ελευρωπαϊνης πραγματοποιήθηκε με αρχικές συγκεντρώσεις της από 0.1 μέχρι 10 g/L (σε παραπάνω συγκεντρώσεις υπάρχουν προβλήματα διαλυτότητας της ελευρωπαϊνης) σε 0.1M ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου με σταθερή συγκέντρωση ενζύμου β-γλυκοζιδάση ($E_0=0,196$ mg/ml) σε θερμοκρασία 50 °C. Επιλέχθηκαν 8 διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (mM) (0.185-0.444-0.925-1.33-1.85-2.66-4.62-9.25-18.51). Τα ενζυμικά διαλύματα αποτελούνταν 25 έως 38 ml διαλύματος ελευρωπαϊνης κατάλληλης αρχικής συγκέντρωσης ώστε με την εκάστοτε αραίωση να φτάνει στις επιθυμητές συγκεντρώσεις σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικού νατρίου και 12 ml ενζυμικό διάλυμα από αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης ενζύμου 0,7 mg/ml ώστε ο συνολικός όγκος διαλύματος αντίδρασης να είναι 50 ml. Το ρυθμιστικό και το ενζυμικό διάλυμα προτού αναμιχθούν εγκλιματίζονταν κάθε φορά μέχρι να φτάσουν στην θερμοκρασία των 50°C. Τα διαλύματα αντίδρασης και εγκλιματισμού πραγματοποιήθηκαν σε θερμαινόμενη πλάκα υπό ήπια ανάδευση. Ανά επιλεγόμενα χρονικά διαστήματα, δηλαδή στο 0, 2.5 , 5 , 10 , 15 , 20 , 30 , 45 , 60 , 90 , 120 λεπτά λαμβανόταν δείγμα και γινόταν απενεργοποίηση του ενζύμου με θέρμανση για περίπου 1-2 λεπτά στο υδατόλουτρο που έφτανε σε θερμοκρασία βρασμού. Κατόπιν τα δείγματα αφήνονταν να έρθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ο ρυθμός της υδρόλυσης παρακολουθήθηκε από της μείωση του υποστρώματος που μετρήθηκε μέσω της High Performance Liquid Chromatography μεθόδου και μέσω της High Performance Liquid Chromatography μεθόδου και της καμπύλης αναφοράς που έχει δημιουργηθεί με πρότυπα διαλύματα ελευρωπαϊνης με εύρος συγκεντρώσεων από 0.02-0.93 mM. Για να υπολογιστεί η ενεργότητα θα χρησιμοποιηθεί ο αρχικός ρυθμός μείωσης του υποστρώματος δηλαδή $u_0=-d[S]/dt$ όπου $d[S](mM)$ διαφορά συγκέντρωσης του υποστρώματος όπου $dt=2.5min$ Δηλαδή η ειδική ενεργότητα υπολογίστηκε από τη κλίση u_0 προς το βάρος του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε. Και για την διευκόλυνση των υπολογισμών χρησιμοποιήθηκε η απόλυτη τιμή του αρχικού ρυθμού

Στο παρακάτω διάγραμμα , φαίνεται η επίδραση του υποστρώματος στο ρυθμό μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης.



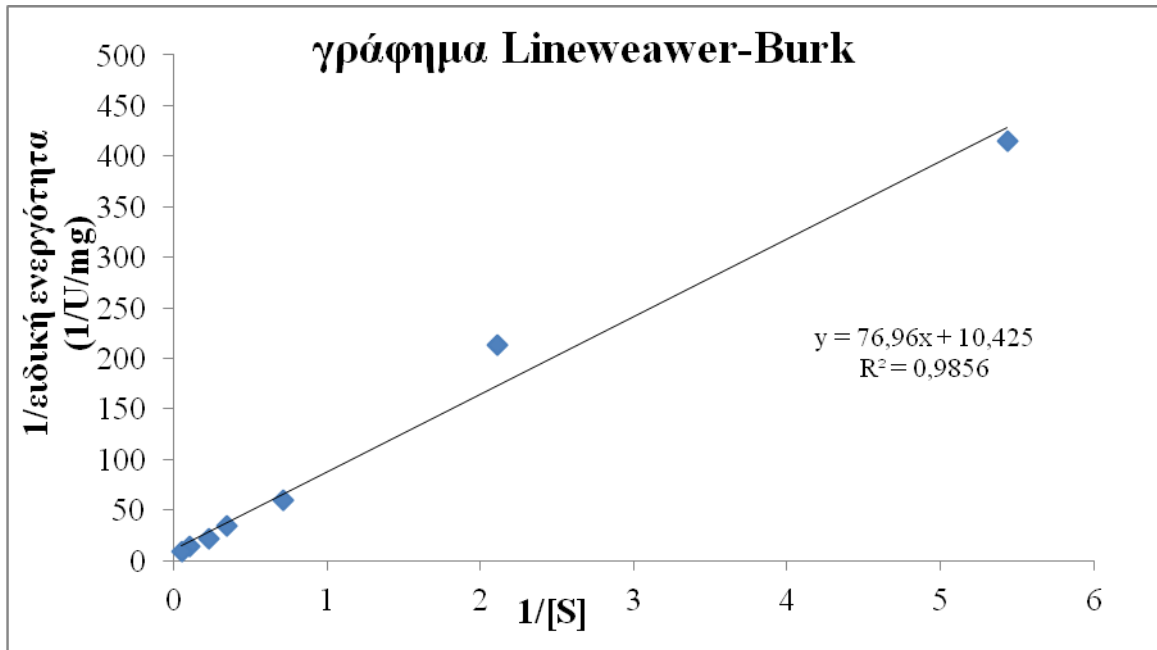
Διάγραμμα 11: Επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος της ελευρωπαϊνης στο ρυθμό της υδρόλυσης της από τη β-γλυκοζιδάση με σταθερή $[E_o] = 0.196 \text{ mg/ml}$.

Στο διάγραμμα 11 σκιαγραφείται η επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος της ελευρωπαϊνη στο ρυθμό της υδρόλυσης της από τη β-γλυκοζιδάση με σταθερή $[E_o] = 0.196 \text{ mg/ml}$ σύμφωνα με την κινητική Michaelis-Menten. Η καμπύλη δεν έχει πιάσει το απαιτούμενο πλατώ.

Με τα παρόντα δεδομένα, δηλαδή τα ζευγάρια τιμών $[S]$ και u_o χρησιμοποιούνται για να γίνει το παραπάνω διάγραμμα 3 αλλά ο ακριβής υπολογισμός της σταθεράς K_m και $u_{\max}$ είναι πολύ δύσκολος. Για αυτό έχει προταθεί η εξίσωση Lineweaver-Burk :

$$1/u_o = K_m/u_{\max} * 1/[S] + 1/u_{\max}$$

Το γράφημα του $1/u_o$ συναρτήσει του $1/[S]$ είναι γραμμικό με κλίση K_m/u_m και αποτέμνουσα το $1/u_m$. Από ένα γράφημα μπορεί να γίνει καλή εκτίμηση της τιμής του V_m αλλά όχι απαραίτητα του K_m . Οι τιμές για χαμηλές συγκεντρώσεις επηρεάζουν την κλίση και την αποτέμνουσα περισσότερο για αυτές τις συγκεντρώσεις.



Διάγραμμα 12: Γράφημα διπλής αντιστροφής Lineweaver-Burk.

Από την κλίση K_m/u_{max} και αποτέμνουσα το $1/u_{max}$ προκύπτουν οι τιμές για τα $K_m=7.38mM$ και $u_m=0.095 IU*(mg)^{-1}$

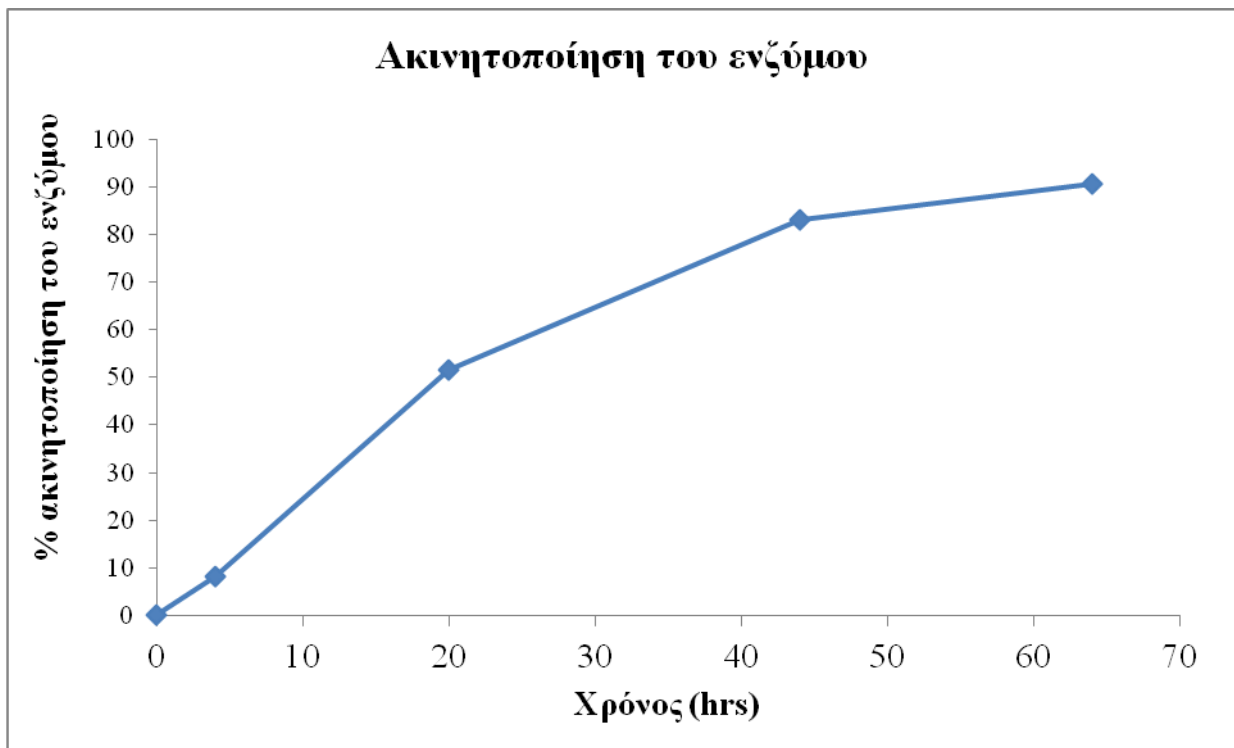
6.6 Ακίνητοποίηση του ένζυμο β-γλυκοζιδάση σε φορέα στήριξης Eupergit C .

Στη συνέχεια έγινε η προσπάθεια της επαναχρησιμοποίησης του ενζύμου της β-γλυκοζιδάσης μέσω της επιφανειακής ομοιοπολική ακίνητοποίηση του ενζύμου πάνω σε φορέα στήριξης Eupergit C. Ο Eupergit C αποτελεί μία επιφάνεια στήριξης μέσω λειτουργικών ομάδων που περιέχει τις εποξυ-ομάδες. Η ακίνητοποίηση προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα όπως την επαναχρησιμοποίηση του ενζύμου σε πολλαπλούς κύκλους διαλείποντος έργου (batch reactor) και την εξάλειψη διαδικασιών ανάκτησης και καθαρισμού. Από τη βιβλιογραφία η ακίνητοποίηση φαίνεται ότι βελτιώνει την αντοχή στην θερμοκρασία και την απενεργοποίηση του ενζύμου μέσω της πολυσημειακής προσκόλλησης της πρωτεΐνης (multipoint attachment). Έτσι σε ποτήρι ζέσεως προστίθεται 30μl ενζύμου από διάλυμα συγκέντρωσης $E_o=183 mg$ ενζύμου/ml που ισοδυναμεί 5.5 mg συνολικής ποσότητας ισοδύναμη με 0.825 IU β-γλυκοζιδάση) σε 10 ml 1M, pH 7.0 ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού νατρίου και στη συνέχεια προστίθεται 0.5g Eupergit C που είναι σε μορφή σκόνης.

Η επώαση κράτησε για 64 ώρες στους 25°C και αναδεύονταν ήπια. Ανά χρονικά διαστήματα(0,4,20,44,64 ώρες) λαμβάνονταν δείγματα για την ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης που απέμεινε στο διάλυμα. Η πρωτεΐνη μετρήθηκε με το BCA kit και ποσοτικοποιήθηκε μέσω της καμπύλης βαθμονόμησης με αλβουμίνη βοδινού ορού με εύρος 1-30 mg/ml.

Η ακινητοποιημένη πρωτεΐνη υπολογίστηκε από την διαφορά της ολικής πρωτεΐνης που προστέθηκε και της πρωτεΐνης που απέμεινε στο διάλυμα. Μετά το πέρας της ακινητοποίησης πραγματοποιήθηκε ξέπλυμα με απιονισμένο νερό και στην συνέχεια ακολούθησε η μέθοδος της ψυχοξήρανσης υπό κενό και έπιτα η διατήρηση του συμπλέγματος πρωτεΐνης-φορέα στήριξης στους -18°C .

Στο παρακάτω διάγραμμα σκιαγραφείται η πορεία της ακινητοποίησης του ενζύμου συναρτήσει του χρόνου.



Διάγραμμα 13: Η πορεία της ποσοστιαίας ακινητοποίησης της β-γλυκοζιδάσης πάνω στο φορέα ακινητοποίησης Eupergit C σε ουδέτερες συνθήκες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι στις πρώτες 20 ώρες η ακινητοποίηση έφτασε το 55% ενώ στις 64 ώρες ο βαθμός της ακινητοποίησης έφτασε 90% .

6.7 Ακίνητοποίηση με πρόσθετα για την βελτίωση της ακίνητοποίησης του ενζύμου στον Eupergit C.

Στη συνέχεια από τη βιβλιογραφία [58] επιλέχθηκε η ικανότητα της γλυκόζης σαν συναγωνιστικός αναστολέας της β-γλυκοζιδάσης για την βελτίωση της απόδοσης της ακίνητοποίησης με τη προστασία του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Ενώ η προσθήκη ορού αλβουμίνης επίσης βελτιώνει την απόδοση της ακίνητοποίησης μπλοκάρωντας τις ελεύθερες εναπομείνουσες εποξυμάδες του φορέα υποστήριξης.

Σε αιώρημα 1M ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου pH 7 όγκου 100 ml που έχει προστεθεί ενζυμο(0.3 ml αρχικής συγκέντρωσης 183.52 mg/ml ενζυμικού διαλύματος(5.5 mg αντιστοιχούν σε 0.825 IU) προστίθεται γλυκόζη 1% w/v και μετά από 2 ώρες επώασης προστίθεται ο Eupergit C (5g). Μετά από 21 ώρες ξεπλένεται το αιώρημα από τη γλυκόζη και προστίθεται ο ορός αλβουμίνης βοδινού ορού 1% w/v και συνεχίζεται η επώαση για 24 ώρες ακόμη. Ο συνολικός χρόνος επώασης είναι 45 ώρες. Προκύπτει ότι το ποσοστό ακίνητοποίησης είναι 83% σύμφωνα με το διάγραμμα 12 ακίνητοποίησης.

Το σύστημα της ακίνητοποίησης Eupergit C-ενζύμου με προσθήκη 1% w/v γλυκόζης και BSA επαναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M οξικού νατρίου pH 5 για να γίνουν οι δοκιμές υδρόλυσης με υπόστρωμα 4 νιτροφαινύλο-β-D-γλυκοκυρανοζίτης $[S_0]=5\text{mM}$ στους 50°C όπου προστέθηκε συνολική ποσότητα Eupergit 200 mg. Ο συνολικός χρόνος επώασης είναι 45 ώρες. Προκύπτει ότι το ποσοστό ακίνητοποίησης είναι 83% σύμφωνα με το διάγραμμα ακίνητοποίησης.

Ενώ δοκιμές υδρόλυσης με υπόστρωμα 4 νιτροφαινύλο-β-D-γλυκοκυρανοζίτης πραγματοποιούνται με ακίνητοποιημένο σύστημα Eupergit C-ενζύμου χωρίς πρόσθετα συνολικής μάζας 100mg. Προκύπτει ότι το ποσοστό ακίνητοποίησης είναι 90% σύμφωνα με το διάγραμμα ακίνητοποίησης αφού είχε αφεθεί για 64 ώρες.

Ο αρχικός ρυθμός υδρόλυσης με πρόσθετα προκύπτει σαν πηλίκο dc/dt όπου $dt=10\text{min}$ $dc_{\text{με πρόσθετα}}=0.967\text{mM}$ άρα $u_0=0.097\text{IUnits}$ που αντιστοιχούν σε 1.82mg ακίνητοποιημένου ενζύμου άρα ειδική ενεργότητα ισούται με 0.053 IUnits/mg.

Ο αρχικός ρυθμός χωρίς πρόσθετα προκύπτει σαν πηλίκο dc/dt όπου $dt=10\text{min}$ $dc=0.472\text{mM}$, άρα $u_0=0.0471\text{Units}$ που αντιστοιχούν σε 0.99 mg ακίνητοποιημένου ενζύμου άρα ειδική ενεργότητα ισούται με 0.0475 IUnits/mg.

Πίνακας 4: Η επίδραση του ακινητοποίησης με πρόσθετα ή χωρίς στην ενεργότητα του ενζύμου β-γλυκοζιδάση. Οι δοκιμές υδρόλυσης έγιναν με υπόστρωμα 4 νιτροφαινόλο-β-D-γλυκοκυρανοζίτης στους 50°C .

Συνθήκες ακινητοποίησης	Σχετική ενεργότητα ^a	Απόδοση της ακινητοποίησης(%) ^b
Χωρίς πρόσθετα	1	31.3
1% w/v γλυκόζη και BSA	1.12	35.3

^a Η σχετική ειδική ενεργότητα υπολογίστηκε ως εξής: ειδική ενεργότητα με 1% w/v γλυκόζη και BSA / ειδική ενεργότητα χωρίς πρόσθετα.

^b Η απόδοση της ακινητοποίησης υπολογίστηκε ως εξής: Ενεργότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου / ενεργότητα ενζύμου που προστέθηκε σε ελεύθερη μορφή %

Υπενθυμίζεται ότι η ενεργότητα του ελεύθερου ενζύμου αντιστοιχεί σε 0.150 IU/mg.

Στον παραπάνω πίνακα υπολογίζονται η σχετική ενεργότητα του συμπλόκου πρωτεΐνης-φορέα χωρίς πρόσθετα σαν σημείο αναφοράς και συγκρίνεται με την ενεργότητα του συμπλόκου πρωτεΐνης-φορέα εμπλουτισμένο με γλυκόζη και BSA. Η προσθήκη τους αυξάνει την ενεργότητα κατά 1.12 φορές. Η απόδοση της ακινητοποίησης με πρόσθετα αυξάνεται 1.12 φορές σε σχέση με το αναφοράς.

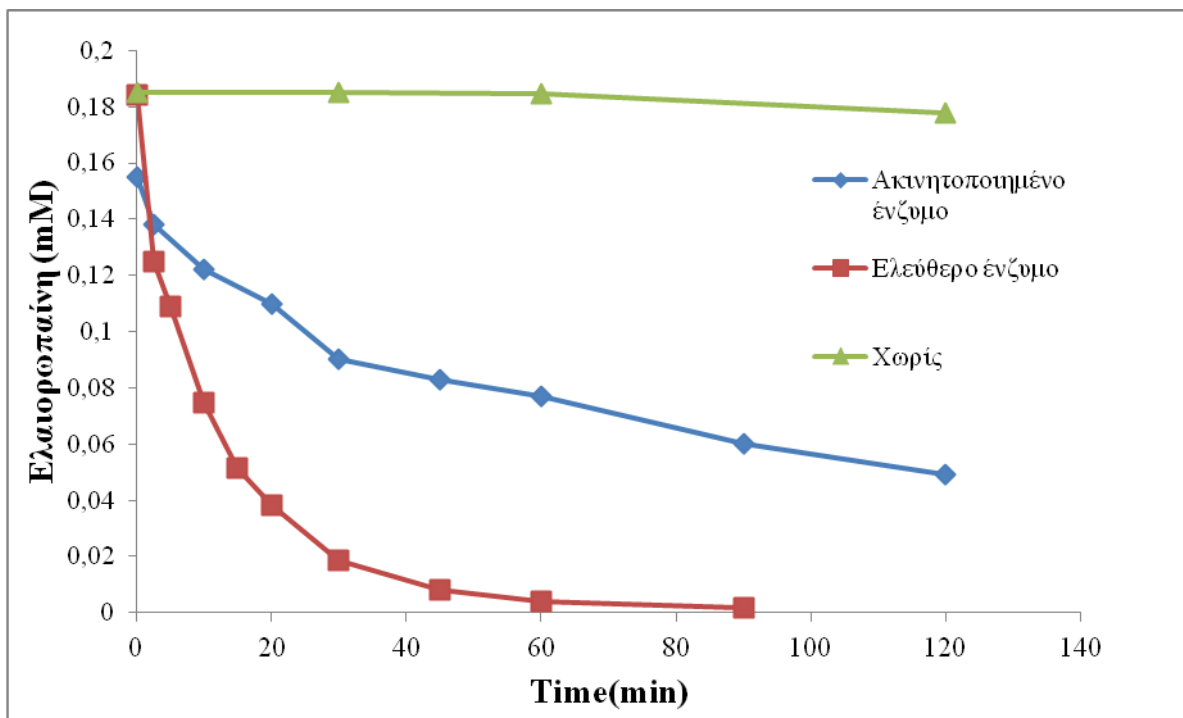
6.8 Ενεργότητα του ακινητοποιημένου έναντι του ελεύθερου ενζύμου στην υδρόλυση της ελευρωπαΐνης.

Το σύστημα της ακινητοποίησης Eupergit C-ενζύμου με προσθήκη 1% w/v γλυκόζη και BSA επαναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M οξικού νατρίου pH 5 για να γίνουν οι δοκιμές υδρόλυσης της ελευρωπαΐνης από το εκχύλισμα που έχει απομονωθεί από το φύλλα της ελιάς όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.8 με συγκέντρωση $[S_0]=0.184\text{mM}$ στους 50°C όπου προστέθηκε συνολική ποσότητα Eupergit 730 mg που θεωρητικά περιεχόταν ακινητοποιημένη πρωτεΐνη 6.63 mg^{***}. Ο όγκος του διαλύματος υδρόλυσης ήταν 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου 0.1 M, pH 5 στους 50°C υπό ανάδευση. Το ρυθμιστικό και το ενζυμικό διάλυμα προτού αναμιχθούν εγκλιματίζονταν κάθε φορά μέχρι να φτάσουν στην θερμοκρασία των 50°C. Τα διαλύματα αντίδρασης και εγκλιματισμού

πραγματοποιήθηκαν σε θερμαινόμενη πλάκα υπό ήπια ανάδευση. Ανά επιλεγόμενα χρονικά διαστήματα, δηλαδή στα 0 , 2.5 , 5, 10 ,15 , 20 ,30 , 45 , 60 , 90 ,120 λεπτά λαμβανόταν δείγμα και γινόταν απενεργοποίηση του ενζύμου με θέρμανση για περίπου 1-2 λεπτά στο υδατόλουτρο που έφτανε σε θερμοκρασία βρασμού. Κατόπιν τα δείγματα αφηνόταν να έρθουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μετρήθηκαν μέσω της High Performance Liquid Chromatography μεθόδου και της καμπύλης αναφοράς που έχει δημιουργηθεί με πρότυπα διαλύματα ελευρωπαϊνή με εύρος συγκεντρώσεων από 0.02-0.93 mM. Για να υπολογιστεί η ενεργότητα θα χρησιμοποιηθεί ο αρχικός ρυθμός μείωσης του υποστρώματος δηλαδή $u_0 = -d[S]/dt$ όπου $d[S]$ (mM) διαφορά συγκέντρωσης του υποστρώματος όπου $dt=2.5\text{min}$ Δηλαδή η ειδική ενεργότητα υπολογίστηκε από τη κλίση u_0 προς το βάρος του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε.

*0.73g συμπλεμα πρωτεΐνης - Eupergit C 83% (ποσοστό ακινητοποίησης) *5.5(συνολική προστιθέμενη πρωτεΐνη) / 0.5g (συνολικός προστιθέμενος Eupergit C).

Στο παρακατω διάγραμμα παρουσιάζονται η πορεία της υδρόλυσης της ελευρωπαϊνης:



Διάγραμμα 14 : Πορεία της υδρόλυσης της ελευρωπαϊνης με ελεύθερη, ακινητοποιημένη β-γλυκοζιδάση και απουσία ενζύμου σε ρυθμιστικού διαλύματος οξικού νατρίου 0.1 M, pH 5 στους 50 °C.

Από το διάγραμμα 14 παρατηρείται ο ρυθμός μείωσης του υποστρώματος της ελευρωπαϊνης λόγω της υδρόλυσης από ελεύθερη ακινητοποιημένη και απουσία β-γλυκοζιδάσης. Ο ρυθμός που μειώνεται η ελευρωπαϊνή είναι αρκετά πιο γρήγορος σε σχέση με το

ακίνητοποιημένο για την ίδια αρχική συγκέντρωση ελευρωπαϊνης. Ενώ η υδρόλυση είναι σχεδόν αμελητέα για τις 2 ώρες που διαρκεί το πείραμα.

Πίνακας 5: Η επίδραση της ακίνητοποίησης σε διάφορες παραμέτρους του ενζύμου β- γλυκοζιδάση.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	Ελεύθερο ένζυμο	Ακίνητοποιημένο ένζυμο
$u_0(\text{mM}/\text{min})$	$23 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-3}$
Ποσότητα ενζύμου	9.8	6.63
Ειδική ενεργότητα (IU/mg πρωτεΐνης)	$2.41 \cdot 10^{-3}$	$1.037 \cdot 10^{-3}$
Μετατροπή % μετά από 90min	95%	60%

Στον παραπάνω πίνακα αναφέρονται ο αρχικός ρυθμός, η ειδική ενεργότητα και η μετατροπή του υποστρώματος μετά από 90 λεπτά αντίδρασης. Παρατηρείται ότι ο αρχικός ρυθμός του ελεύθερου ενζύμου είναι 3.83 φορές μεγαλύτερος. Η ειδική ενεργότητα 2.3 φορές μεγαλύτερος από το ακίνητοποιημένο. Ενώ η ποσοστιαία μετατροπή της αρχικής ΟΕ στα 90 λεπτά είναι 95% ενώ για το ακίνητοποιημένο είναι 60%.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ειδική ενεργότητα του ενζύμου υπολογίστηκε 0.240IU/mg στους 50°C με υπόστρωμα p-PNG και συγκέντρωση $[S_o]=10\text{mM}$. Για να προσδιοριστεί η βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας του ενζύμου επιλέχτηκε το 4-PNG έναντι της ελευρωπαϊνή σαν πιο οικονομική προσέγγιση. Η βέλτιστη θερμοκρασία προσδιορίστηκε ότι είναι στους 50 °C με την ειδική ενεργότητα 0.150 IU/mg με αρχική συγκέντρωση $[S_o]=5\text{mM}$. Έγινε η παραδοχή ότι πρέπει να αποφεύγονται οι υψηλές θερμοκρασίες λόγω εξάτμισης και επειδή είναι κρίσιμο σημείο στην καμπύλη της θερμοκρασίας αφού στους 80°C το ένζυμο απενεργοποιείται και ρυθμού θα επιλεγεί η 50°C.

Η ενέργεια απενεργοποίησης από το διάγραμμα του Arrhenius προκύπτει 11.82kcal/mol για εύρος θερμοκρασίας ανόδου 25-50°C ενώ στη μελέτη Capasso et al.[38] είναι 19.12 kcal/mol για θερμοκρασιακό εύρος 21-37 °C.

Μετά τη επιλογή της βέλτιστης θερμοκρασία μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του βιοκαταλύτη για 2 συγκεντρώσεις OE και προκύπτει ότι για την χαμηλή συγκέντρωση $[S_o]=0.185\text{ mM}$ ότι πάνω από την τιμή $[E_o]=0.141\text{ mg/ml}$ δεν αυξάνεται η ειδική ενεργότητα. Ενώ στην μεγάλη συγκέντρωση $[S_o]=0.976\text{ mM}$ η βέλτιστη $[E_o]=0.197\text{ mg/ml}$ δίνει τον μεγαλύτερη τιμή ειδική ενεργότητας 0.197 IU/mg με 97% μετατροπή στα 60λεπτά.

Ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων K_m, V_m ακολούθησε και η αξιολόγηση τους δείχνει ότι η $K_m=7.38\text{ mM}$ στη παρούσα μελέτη έναντι $K_m=4.8\text{ mM}$ σε $T=25\text{ }^\circ\text{C}$ [56] και $K_m=4.66\text{ Mm}$ $T=37\text{ }^\circ\text{C}$ [38] που δείχνει ότι στους 50 °C μειώνεται η συγγένεια με το υπόστρωμα της ελευρωπαϊνή. Η υπόθεση αυτή χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση γιατί η καμπύλη κινητικής δεν έχει την κατάλληλη μορφή. Όσον αφορά την $V_m =0.095\text{IU/mg}$ $[E_o]=0.196\text{ mg/ml}$ έναντι $V_m =0.019\text{IU/mg}$ στους 25 °C με $[E_o]=0.035\text{ mg/ml}$ [56] και $V_m =0,0036\text{IU/mg}$ στους 37 °C με $[E_o]=1\text{ mg/ml}$ [38] που δείχνει ότι η ποσότητα ενζύμου επηρεάζει το V_m .

Η ακινητοποίηση φτάνει το 90% στις 64 ώρες. Η παρατεταμένη επώαση ευνοεί την πολυσημειακή ακινητοποίηση δηλαδή το ένζυμο να προσκολλάται από πολλά σημεία και να σταθεροποιείται περισσότερο. Επειδή οι ομάδες αυτές δεν πρέπει να βρίσκονται στο ενεργό κέντρο, μία μέθοδος που εφαρμόζεται είναι με το κορεσμό του ενζυμικού διαλύματος, με έναν συναγωνιστικό αναστολέα τη γλυκόζη προτού λάβει χώρα το ομοιοπολικό δέσιμο. Στη

συνέχεια οι εναπομείνουσες ενεργές ομάδες του φορέα, θα πρέπει να απενεργοποιηθούν έτσι η προσθήκη αλβουμίνης βοδινού ορού καταλαμβάνει αυτές τις ομάδες στο φορέα στήριξης ώστε να μην αλληλεπιδράσουν περαιτέρω με το ενεργό κέντρο του ένζυμο. Η προσθήκη του συναγωνιστικού αναστολέα και της αλβουμίνης βελτιώνει ελάχιστα την απόδοση της ακινητοποίησης κατά 35.3% έναντι του 31.3% στην ακινητοποίηση χωρίς πρόσθετα. Σε άλλη μελέτη παρατηρήθηκε [58] 2.5 φορές αύξηση της απόδοσης και αύξηση της σταθερότητας για πάνω από 60 ώρες στους 45°C για την β-γλυκοζιδάση από *Aspergillus niger*.

Στις δοκιμές υδρόλυσης της ελευρωπαΐνη παρατηρήθηκε ότι η ειδική ενεργότητα του ακινητοποιημένης β-γλυκοζιδάσης μειώνεται κατά 2.32 φορές σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο, αυτή η μείωση οφείλεται κατά πάσα πιθανότητα στην δυσκολία μεταφοράς μάζας λόγω διάχυσης του υποστρώματος μεταξύ των πόρων προκειμένου να αντιδράσει με το ακινητοποιημένο στην επιφάνεια του πόρου ενεργό κέντρο του ένζυμου στο του ένζυμου. Ενώ ο βαθμός μετατροπής του υποστρώματος μειώνεται κατά 35% με το ακινητοποιημένο ένζυμο σε σχέση με το ελεύθερο. Όπως είναι αναμενόμενο και ο αρχικός ρυθμός είναι μικρότερος .

Η απομόνωση της ΟΕ από τα φύλλα της ελιάς αποδίδει κατά 1450 mg OE /kg φύλλων ελιάς. Αποδεικνύεται ότι επειδή η ελαιορωπαΐνη ανακτάται από μηδενικής αξίας πρώτη ύλη και η περαιτέρω αξιοποίηση της μέσω της ενζυμικής υδρόλυσης της σε υψηλής βιοενεργής αξίας μεταβολιτών της. καθιστά τη διεργασία επεξεργασίας αποβλήτων εξαιρετικά βιώσιμη.

Προτάσεις

Σε επόμενη προσπάθεια θα μπορούσαν να διερευνηθούν τα εξής:

1. Η επαναχρησιμοποίηση του ακινητοποιημένου ενζύμου σε πολλαπλούς διαδοχικούς κύκλους υδρόλυση
2. Η σταθερότητα του ένζυμου σε σχέση με το χρόνο και τη θερμοκρασία.
3. Η εφαρμογή του ακινητοποιημένου συμπλόκου σε σύστημα βιοαντιδραστήρα.

Βιβλιογραφική ανασκόπηση

1. Japón-Luján R., Luque-Rodríguez J. M., Luque de Castro M. D. (2006). Multivariate optimisation of the microwave-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Anal Bioanal Chem*, 385 pp753–759
2. Υπουργείο γεωργίας, φυσικών πόρων και περιβάλλοντος Λευκωσίας (ΥΓΦΠΠ) (2002). Η ελιά.
3. Brenes, M., Garcia, A., Garcia, P., Rios, J. J., & Garrido, A. (1999). Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), 3535–3540.
4. Niaounakis, M., Halvadakis, C. P. (2004). Introduction in Olive-Mill waste management. Literature Review and Patent Survey , Athens: Typothito.
5. Civantos L. (1981) Aprovechamiento de ramones y lena en el olivar. *Agricultura* 55 1801-1181
6. Molina A,Yanez R., Moumen A, Garcia M. (2003) Chemical composition and nitrogen availability for goats and sheeps of some olive byproducts. *Small ruminant Res.*49 pg 329-336
7. a) Sansoucy R., Alibes X., Berge O, Martilotti and Zoiopoulos (1985) Olive by-products for animal feed FAO Animal production and health paper 43 ISBN 92-5-101488-4.
b) Federici F.Fava,N.Kalogerakis,D.Mantzavinos (2009) Valorisation of agro-industrial by-products, effluents and waste:concept,opportunities and the case of olive mill wastewaters J Chem Technol Biotechnol; 84: 895–900
8. Amarowicz, R., Carle, R., Dongowski, G., Durazzo, A., Galensa, R., Kammerer, D., Maiani, G., & Piskula, M. K. (2009). Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, S151-S183.
9. Louli, V., Ragoussis, N., & Magoulas, K. (2004). Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. *Bioresource Technology*, 92(2), 201-208
10. Fernández-López, J., Fernández-Ginés, J. M., Aleson-Carbonell, L., Sendra, E., Sayas-Barberá, E., & Pérez-Alvarez, J. A. (2004). Application of functional citrus by-products to meat products. *Trends in Food Science and Technology*, 15(3-4), 176-185
11. Paredes C., Bernal, M. P., Roig, A., Cegarra J. (2001). Effects of olive mill wastewater addition in composting of agroindustrial and urban wastes. *Biodegradation*, 12(4), 225-234.
12. Bellisle E. (2003) Why should study human food intake behavior? *Nutr.Metab. Cardiovascular. Dis*,Vol 13, pg189-183.
13. Oreopoulou, V., & Tzia, C. (2006). Utilization of plant by-products for the recovery of proteins, dietary fibers, antioxidants, and colorants. In V. Oreopoulou and W. Russ. *Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry* (pp. 209-232). Springer Science and Business Media: New York
14. Gao L., Mazza, G. (1996). Extraction of anthocyanin pigments from purple sunflower hulls. *Journal of Food Science*, 61(3), 600-603.
15. Γαλανάκης Χ.(2010) Μελέτη καθαρισμού και ανάκτησης οργανικών συστατικών ελαιουργείου. Διδακτορική διατριβή. Πολυτεχνείο Κρήτης.
16. Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Rizner Hras A., Simoncic M. & Knez Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89, 191–198

17. Mylonaki S. & Kiassos E. & Makris D. P. & Kefalas P. (2008). Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Anal Bioanal Chem*, 392, 977–985
18. Paiva-Martins F. & Pinto M. (2008). Isolation and Characterization of a New Hydroxytyrosol Derivative from Olive (*Olea europaea*) Leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5582–5588
19. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenol from olive leaves. R. Japon-Lujan et al. (2006) *Journal of Chromatography A* (73-82)
20. Henry B., (1983) Diet and atherosclerosis: Epidemiologic evidence and public health implications. *Prev. Medicine*, Vol.12, pg 2-10.
21. a) Pereira A., Ferreira I. (2007) Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves Biological molecules pp 1153-1162. b) Bisignano G.; Tomaino A, Lo Cascio, R, Crisafi G., Uccella, N., Saija A. On the in vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J. Pharm. Pharmacol.* 1999, 51, 971–974..
22. a) Panizzi L, Scarpati M., Oriente E. (1960) Costituzione della oleuropeina, glucoside, glucoside amaro e azione ipotensiva dell'olivo. *Gazzetta Chimica Italiano* 90, pp 1449-1485. b) Damtoft S, Franzyk H, Jensen SR. (1993) Biosynthesis of secoiridoid glucosides in Oleaceae. *Phytochemistry*; 34: 1291–1299
23. Ruiz-Gutierrez, V., Muriana, F. J. G., Maestro, R., & Graciani, E. (1995). Oleuropein on lipid and fatty-acid composition of rat-heart. *Nutrition Research*, 15(1), 37-51.
24. a) Walter, W. M. Jr., Fleming, H. P., and Etchells, J. L. From green olives (1973) Preparation of Antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein *Appl. Microbiol.* 26, 773-776. b) Brenes, M.; Rejano, L.; Garcia, P.; Sanchez, A. H.; Garrido, A. Biochemical changes in phenolic compounds during Spanish-style green olive processing (1995) *J. Agric. Food Chem*, 43, 2702–2706.
25. Cabrera, F., López, R., Martínez-Bordiú, A., Dupuy de Lome, E., & Murillo, J. (1996). Land treatment of olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 38(3-4), 215-225.
26. Speroni E, Guerra MC, Minghetti A, Crespi-Perellino N, Pasini P, Piazza F. (1998) Oleuropein evaluated in vitro and in vivo as an antioxidant. *Phytother Res.* 12 pp 98–100.
27. Chimi H, Cillard J, Cillard P, Rahmani M. (1991) Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *J Am Oil Chem Soc.*; 68:307–12.
28. Witztum JL. (1987) Intensive drug therapy of hypercholesterolemia. *Am Heart J.*; 113:603–9.
29. Vissers MN, Zock PL, Roodenburg AJC, Leenen R, Katan MB. Olive oil phenols are absorbed in humans. *J Nutr.* (2002) 132:409–17.
30. Visioli F, Bellomo G, Galli C. Free radical scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun.* (1998) 247:60–4.
31. Agalias, A., Magiatis, P., Skaltsounis, A. L., Mikros, E., Tarbopoulos, A., Gikas, E., Spanos, I., & Manios, T. (2007). A new process for the management of olive oil mill waste water and recovery of natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(7), 2671-2676.
32. Manna C., Migliardi, V., Golino, P., Scognamiglio, A., Galletti, P., Chiariello, M., Zappia V., (2004) Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. *J. Nutr. Biochem.* 15, 461–466.

33. Andreadou, I.; Iliodromitis, E. K.; Mikros, E.; Constantinou, M.; Agalias, A.; Magiatis, P.; Skaltsounis, A. L.; Kamber, E.; Tsantili-Kakoulidou, A.; Kremastinos, D. T. (2006) The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits. *J. Nutr.*, 136, 2213–2219.
34. Miles, E. A.; Zoubouli, P.; Calder, P. C. (2005) Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition* 21, 389–394
35. Furneri, P. M.; Marino, A.; Saija, A.; Uccella, N.; Bisignano, G. In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. (2002) *Int. J. Antimicrob. Agents*, 20, 293–296
36. Cruess, W. V. and Alsberg, C. L. (1934), *J. Amer. Chem. Soc.* 56, 2115–2117
37. α) Amiot M. Fleuriot A, Macheix J. (1989) Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry* 28, pg 67–69 b) Kubo, I., Matsumoto, A., and Takase, I. (1985), *J. Chem. Ecol.* 2, 251–263. c). Vaughn, R. H. (1954), in *Industrial fermentations*, Underkofler, L. A. and Hickey, R. J., Chemical Inc., New York, 2, pp. 417–47
38. a) Limiroli R. Consonni R. Ottolina G. Marsilio V. Bianchi G. Zetta (1995) ¹H and ¹³C NMR characterization of new oleuropein aglycones. *J Chem Soc Perkin Trans 1.* 1519–1523. b) Capasso R., Evidente A, Visca C, Gianfreda L, M. Maremonti, Greco G. (1996) Production of Glucose and Bioactive Aglycone by Chemical and Enzymatic Hydrolysis of Purified Oleuropein from *Olea Europea*, *Applied Biochemistry and Biotechnology* Vol.62
39. Briante, R.; La Cara, F.; Tonziello, M. P.; Febbraio, F.; Nucci, R. Antioxidant activity of the main bioactive derivatives from oleuropein hydrolysis by hyperthermophilic *b*-glycosidase. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 3198–3203
40. Capasso, R.; Evidente, A.; Avolio, S.; Solla, F. (1999). A highly convenient synthesis of hydroxytyrosol and its recovery from agricultural waste waters. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1745–1748.
41. Bai, C.; Yan, X.; Takenaka, M.; Sekyya, S.; Nagata, T. Determination of synthetic hydroxytyrosol in rat plasma by GC/MS. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 3998–4001
42. Tuck, K. L.; Tan, H.; Hayball, P. J. (2000). Synthesis of tritium-labeled hydroxytyrosol, a phenolic compound found in olive oil. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 4087–4090.
43. A. Gambacorta, D. Tofani, R. Bernini, and Migliorini 2007 High-Yielding Preparation of a Stable Precursor of Hydroxytyrosol by Total Synthesis and from the Natural Glycoside Oleuropein. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 3386–3391
44. Michael L. Shuler, Fikret Kargi (2005) Βιοχημική διεργασιών, Βασικές έννοιες, Πανεπιστημιακές εκδόσεις ΕΜΠ, Αθήνα, σελ. 75–124
45. Sanchez-Perez R, Jørgensen K, Olsen CE, Dicenta F, Møller BL (2008) Bitterness in almonds. *Plant Physiol* 146:1040–1052
46. Gilbert HJ, Stalbrand H, Brumer H (2008) How the walls come tumbling down: recent structural biochemistry of plant polysaccharide degradation. *Curr Opin Plant Biol* 11:338–348
47. Gunata Z., (2003) Flavor enhancement in fruit juices and derived beverages by exogenous glycosidases and consequences of the use of enzyme preparations. In: Whitaker JR, Voragen AGJ, Wong DWS (eds) *Handbook of food enzymology*. Marcel Dekker Inc., New York, pp 303–330
48. Yasumoto K, Tsuji H, Iwami K, Mitsuda H (1977) Isolation from rice bran of a bound form of vitamin B6 and its identification as 5-O-b-D-glucopyranosyl-pyridoxine. *Agric Biol Chem* 41:1061–1067

49. He.S, Withers SG. (1997) Assignment of sweet almond beta-glucosidase as a family 1 glycosidase and identification of its active site nucleophile. *J Biol Chem* Oct 3; 272(40) 24864-7. pmid:9312086. PubMed HubMed
50. James R. Ketudat, Asim Esen (2010) 'β-glucosidase review' *Cell.Mole.Life Sciences* 67 pg 3389-3405
51. Park JK, Wang L-X, Patel HV, Roseman S. (2002) Molecular cloning and characterization of a unique b-glucosidase from *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem* 277:29555–29560
52. Chi YI, Martinez-Cruz LA, Jancarik J, Swanson RV, Robertson DE, Kim SH (1999) Crystal structure of the beta-glycosidase from the hyperthermophile *Thermosphaera aggregans*: insights into its activity and thermostability. *FEBS Lett* 445:375–383
53. Burmeister WP, Cottaz S, Rollin P, Vasella A, Henrissat B (2000) High resolution X-ray crystallography shows that ascorbate is a cofactor for myrosinase and substitutes for the function of the catalytic base. *J Biol Chem* 275:39385–39393
54. *Enzyme Handbook*, vol. II, Barman, T. E., Springer-Verlag (1969), (New York, NY: EC 3.2.1.21, pp. 578-579.
55. Briante.R, La Cara F., Febraio F., (2000). Hydrolysis of oleuropein from hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus Solfataricus* immobilized on chitosan matrix *Journal of Biotechnology* 77,pg 275-286).
56. Mazzei a R. , Giorno L., Piacentini E., Mazzuca S., Drioli E. (2005) Kinetic study of a biocatalytic membrane reactor containing immobilized β-glucosidase for the hydrolysis of oleuropein *Journal of Membrane Science* 339 pg 215–223
57. J.Mayer, B.Kranz, L.Fischer. *Journal of Biotechnology* 145(2010) Continuous production of lactulose by immobilized thermostable β-glucosidase from *Pyrococcus furiosus* pg 387-393.
58. Tu.M, Zhang X., Kurabi a., Gilkes N., Mabee W. Saddler J. *Biotechnology letters* (2006) Immobilization of β-glucosidase on Eupergit C for lignocellulose hydrolysis. 28:pg 151-156
59. Chang M., Kao H., Juang R. (2008) Thermal inactivation of b-glucosidase immobilized on chitosan-clay composite. *Journal of Biological Macromolecules* 43, pg 48-53
60. Wong, C.-H. and Whitesides, G.M. (1994) *Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Pergamon Press, Oxford.
61. Bickerstaff, G.F. (1997) *Immobilization of Enzymes and Cells: Methods in Biotechnology*, Vol. 1, Humana Press, Totowa
62. Betancor, L., Lopez-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Fuentes, M., Fernandez-Lafuente, R. and Guisasa'n, J.M. (2004) *J. Biotechnol.* 110, 201–207
63. Betancor, L., Fuentes, M., Dellamora-Ortiz, G., Lopez-Gallego, F., Hidalgo, A., Alonso-Morales, N., Mateo, C., Guisasa'n, J.M. and Fernandez-Lafuente, R. (2005) *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 32, 97–101].
64. Palomo, J.M., Segura, R.L., Mateo, C., Fernandez-Lafuente, R. and Guisasa'n, J.M. (2004) *Biomacromolecules* 5, 249–254),
65. Fernandez-Lorente, G., Palomo, J.M., Cocca, J., Mateo, C., Moro, P., Terreni, M., Fernandez-Lafuente, R. and Guisasa'n, J.M. (2003) *Tetrahedron* 59, 5705–5711
66. Bauer-Arnaz, K., Napolitano, E.W., Roberts, D.N., Montali, J.A., Hughes, M.B.R. and Schmidt, Jr, D.E. (1998) *J. Chromatogr. A* 803, 73–82
67. C. Mateo, V. Grazu, B.C.C. Pessela, T. Montes, J.M. Palomo, R. Torres, F. Lopez-Gallego, R. Fernandez-Lafuente and J.M. Guisasa'n 7th International Conference on Protein Stabilization 2007 Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization–stabilization.

68. T. Tosa, T. Mori, N. Fuse, I. Chibata, *Biotechnol. Bioeng.* 9 1967. 603–615
69. M. Pennewiss, H. Knoell, H. Masanek, Roehm, German Patent DE2009218C3, 1970
70. J. Turkova, K. Blaha, M. Malanikova, D. Vancurova, F.Svec, J. Kalal, (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 524 , pp162–169.
71. Poul Borge Poulsen, WIPO Patent Application WO/1994/017800 ,International Patent Application.
72. Paiva-Martins F.and Gordon M. (2001). Isolation and Characterization of the Antioxidant Component 3,4-Dihydroxyphenylethyl 4-formyl-3-formylmethyl-4-hexenoate from Olive (*Olea europaea*) Leaves. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4214-4219.
73. Mourtzinos I.Salta F, Yannakopoulou K, Chiou A.,Karathanos V.(2007) Encapsulation of Olive Leaf Extract in Cyclodextrin.*Journal Agric.Food.Chem* 55,pp 8088-8094.
74. a)Espin J.,Soler R.,Cantos E.,Barberan F,Wichers H.(2001) Synthesis of the antioxidant using tyrosinase as a biocatalyst. *Journal Agric.Food.Chem* 49,pp 3198-3203.b) Bouallaghi Z. ,Sayadi S.(2006) Production of high hydroxytyrosol yields via tyrosol conversion by *Pseudomonas aeruginosa* immobilized resting cells.*Journal Agric.Food.Chem* 54,pp 9906-9911.