

## ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΚΑΤΑΛΥΟΜΕΝΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΔΡΑΣΗΣ

**A. Χατζηκωνσταντίνου<sup>1</sup>, Κ. Νάκου<sup>1</sup>, Ι. Σίμος<sup>3</sup>, Μ. Πατήλα<sup>1</sup>, Β. Κοντογιάννη<sup>5</sup>, Α. Πολύδερα<sup>1</sup>, Δ. Γουρνής<sup>2</sup>, Ε. Βουτσάς<sup>4</sup>, Χ. Σταμάτης<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα

<sup>2</sup>Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Πολυτεχνική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα

<sup>3</sup>Εργαστήριο Φυσιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα

<sup>4</sup>Εργαστήριο Θερμοδυναμικής και Φαινομένων Μεταφοράς, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα, Ελλάδα

<sup>5</sup>Τομέας Οργανικής Χημικής και Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα.  
(\*[hstamati@uoi.gr](mailto:hstamati@uoi.gr))

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πολυφαινολικές ενώσεις αποτελούν μία ιδιαίτερη κατηγορία βιοδραστικών φυσικών προϊόντων ευρέως διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο. Λόγω των πολυάριθμων ωφέλιμων ιδιοτήτων τους όπως η αντιοξειδωτική, η αντικαρκινική, η αντιφλεγμονώδης, η αντιβακτηριακή, η αντικική κ.ά. πολλές από αυτές τις ενώσεις χρησιμοποιούνται σε φαρμακευτικά, καλλυντικά και διατροφικά σκευάσματα. Η τροποποίηση της δομής των πολυφαινολών *in vitro*, όπως για παράδειγμα μέσω αντιδράσεων αλκυλίωσης, ή σύζευξης τους με άλλα μόρια ή και διμερισμού ή ολιγομερισμού τους μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν ένα εργαλείο για τη βελτίωση των φυσικοχημικών και βιολογικών ιδιοτήτων τους, καθώς και για την τροποποίηση της βιοδιαθεσιμότητάς τους.

Στόχος της παρούσας μελέτης είναι η εφαρμογή ακινητοποιημένων ενζύμων σε υδατικά και μη υδατικά συστήματα για τη βιοκαταλυτική τροποποίηση πολυφαινολικών ενώσεων προς τη στοχευμένη ενίσχυση της αντιοξειδωτικής, αντιμικροβιακής και κυτταροτοξικής τους δράσης. Πορώδη μαγνητικά νανοϋλικά χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς ακινητοποίησης υδρολυτικών και οξειδοαναγωγικών ενζύμων. Τα νανοβιοκαταλυτικά αυτά συστήματα, στη συνέχεια, εφαρμόστηκαν στη στοχευμένη τροποποίηση πολυφαινολών που προέρχονται από φυτικά εκχυλίσματα. Τέλος, μελετήθηκαν παράγοντες που επιδρούν στην απόδοση της βιοκαταλυτικής διεργασίας, ενώ η βελτιστοποίηση της ενζυμικά καταλυόμενης σύνθεσης πολυφαινολικών παραγώγων με αυξημένη βιολογική δράση πραγματοποιήθηκε με τη μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης.

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι φαινολικές ενώσεις αποτελούν μια ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών που έχουν σημαντικές λειτουργίες στα φυτά. Παράλληλα, οι φαινόλες και οι πολυφαινόλες παρουσιάζουν μια σειρά βιολογικών ιδιοτήτων που ενισχύσουν την υγεία του ανθρώπου<sup>[1]</sup>. Η τυροσόλη [2-(4-hydroxyphenyl)ethanol] είναι μία απλή φαινολική ένωση φυσικής προέλευσης που συντίθενται και στο ανθρώπινο σώμα. Στη φύση, παίζει έναν αμυντικό ρόλο ενάντια σε παθογόνα. Η κύρια διατροφική πηγή τυροσόλης είναι το ελαιόλαδο και το κρασί, ενώ μπορεί να βρεθεί και σε άλλα αλκοολούχα ποτά, όπως η μπύρα και το βερμούτ. Η τυροσόλη διαθέτει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση λόγω της οξειδοαναγωγικής ιδιότητας των φαινολικών υδροξυλικών ομάδων και της διαμόρφωσής της, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι λειτουργεί ως αντιφλεγμονώδης, αντικαρκινική, αντι-ική και αντιμικροβιακή ένωση<sup>[1]-[3]</sup>. Η τυροσόλη και άλλες φαινολικές ενώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί σε αντιδράσεις οξειδωτικής σύζευξης, που καταλύονται από οξειδοαναγωγικά

ένζυμα όπως οι λακάσες, για το σχηματισμό πολυμερών<sup>[4]</sup>. Τα πολυμερή αυτά φαίνεται να εμφανίζουν αυξημένες βιολογικές δράσεις σε σχέση με τις πρόδρομες ενώσεις όπως αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή κ.α.<sup>[5]-[7]</sup>.

Προκειμένου να παρασκευαστούν ενζυμικά τέτοια βιοδραστικά πολυμερή της τυροσόλης μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοκαταλύτης η λακάση από το μύκητα *Trametes versicolor* (TvL) ακινητοποιημένη σε ιεραρχικά δομημένα πορώδη νανοϋλικά άνθρακα (HPC). Τα HPC έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια λόγω των καλά καθορισμένων πόρων τους με διαφορετικές διαστάσεις που κυμαίνονται από μακροπορώδη (> 50nm) και διασυνδεδεμένα μέσο- (2-50nm) και μικροπορώδη (<2nm). Λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων τους σε σύγκριση με άλλα υλικά όπως η μεγάλη επιφάνεια, η μεγάλη χωρητικότητα αποθήκευσης και οι ανώτερες ιδιότητες μεταφοράς μάζας, τα HPC έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορες εφαρμογές, από τη νανοεπιστήμη έως την κατάλυση, το διαχωρισμό, την ανίχνευση, τη βιο-και βιοϊατρική τεχνολογία, <sup>[8][9][10][11]</sup>. Υβριδικά HPC που περιέχουν μαγνητικά νανοσωματίδια σιδήρου (HPCFe) μπορούν να προσδώσουν στο νανοϋλικό μαγνητικές ιδιότητες. Πλεονέκτημα αυτών των μαγνητικών νανοϋλικών είναι ότι μπορούν εύκολα να διαχωριστούν από το μείγμα της αντίδρασης χρησιμοποιώντας ένα εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, διευκολύνοντας τον διαχωρισμό των προϊόντων καθώς και την επαναχρησιμοποίηση του ακινητοποιημένου βιοκαταλύτη.

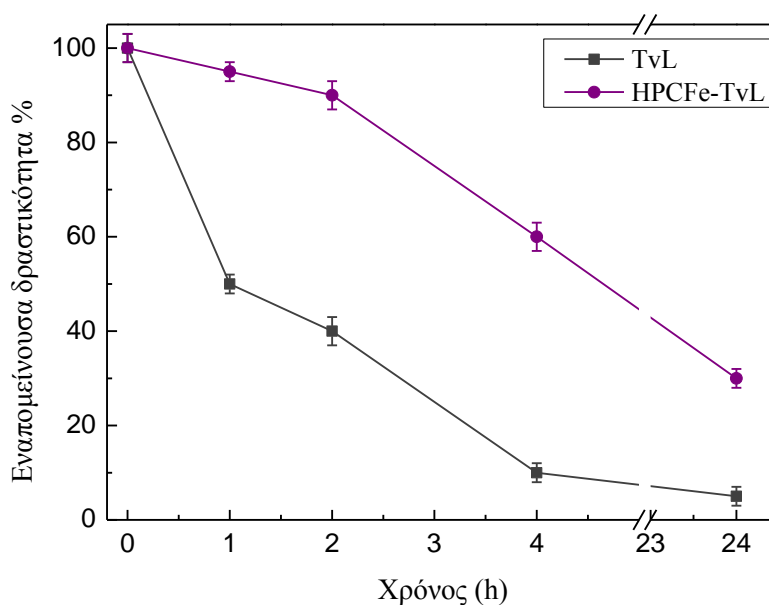
Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε ένας ισχυρός μαγνητικός νανο-βιοκαταλύτης μέσω της ομοιοπολικής ακινητοποίησης της λακάσης από *Trametes versicolor* (TvL) σε μαγνητικά ιεραρχικά δομημένα πορώδη νανοϋλικά άνθρακα (HPCFe). Στη συνέχεια μελετήθηκε η σταθερότητα του νανο-βιοκαταλύτη που παρασκευάστηκε καθώς και η ικανότητά του να καταλύει την τροποποίηση της τυροσόλης. Τέλος αξιολογήθηκε η βιολογική δράση της τυροσόλης και του προϊόντος της ενζυμικής τροποποίησής της.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

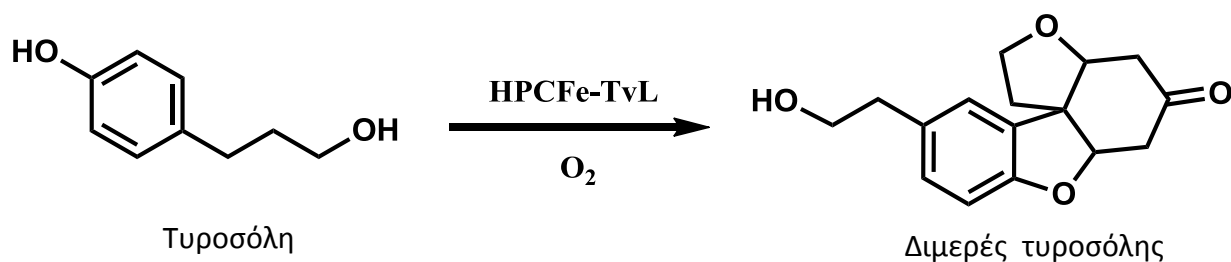
Η λακάση από *Trametes versicolor* ακινητοποιήθηκε επιτυχώς με ομοιοπολική σύνδεση σε μαγνητικά νανοσωματίδια HPCFe. Μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών ποσοτήτων ενζύμου στην απόδοση ακινητοποίησης και στη δραστηριότητα του ακινητοποιημένου σκευάσματος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 1, παρατηρείται ότι η αύξηση της ποσότητας του ενζύμου επιδρά ελάχιστα στην απόδοση ακινητοποίησης, ενώ φαίνεται να έχει έντονη επίδραση και στη δραστηριότητα του νανο-βιοκαταλύτη. Ως βέλτιστη ποσότητα επιλέχθηκαν τα 30 mg ενζύμου, καθώς σε αυτές τις συνθήκες εμφανίζεται η μέγιστη απόδοση ακινητοποίησης και η μέγιστη δραστηριότητα, 41% και 0,17 U mg<sup>-1</sup> νανο-βιοκαταλύτη αντίστοιχα. Στη συνέχεια μελετήθηκε η σταθερότητα της ακινητοποιημένης TvL σε σχέση με την ελεύθερη σε θερμοκρασία 37 °C. Όπως φαίνεται από το Σχήμα 1 το ακινητοποιημένο ένζυμο εμφανίζει αυξημένη σταθερότητα σε σχέση με το ελεύθερο καθώς μετά από 24 h επώασης στους 30 °C διατηρεί το 30% της δραστηριότητάς του, ενώ σε ελεύθερη μορφή η δραστηριότητά του μετά από 24 h είναι μόλις 5%.

**Πίνακας 1.** Μελέτη βελτιστοποίησης της ακινητοποίησης της λακάσης TvL με διαφορετικές ποσότητες ενζύμου. \*Unit = mmol ABTS<sup>+</sup>/min.

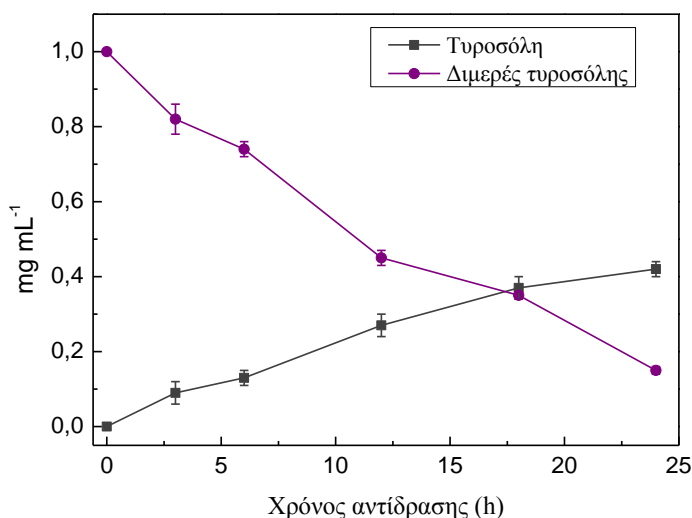
mg TvL	Απόδοση Ακινητοποίησης (%)	Δραστικότητα U* mg <sup>-1</sup>
10	34	0,06
20	38	0,08
30	41	0,17

**Σχήμα 1.** Εναπομείνουσα δραστικότητα ελεύθερης και ακινητοποιημένης TvL σε HPCFe, για διάφορους χρόνους επώασης στους 30 °C. Ως 100% ορίζεται η δραστικότητα του ενζύμου (ελεύθερου ή ακινητοποιημένου) πριν την επώαση σε χρόνο  $t = 0$ .

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι από την τροποποίηση της τυροσόλης με λακάση προκύπτει το διμερές της τυροσόλης ως κύριο προϊόν<sup>[4][6]</sup>. Ο μαγνητικός νανοβιοκαταλύτης HPCFe-TvL που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε στην τροποποίηση της τυροσόλης προς σχηματισμό ολιγομερών προϊόντων. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH 5 στους 30 °C για χρόνους επώασης 3 h, 6 h και 24 h. Μετά το τέλος της αντίδρασης το μείγμα αναλύθηκε με HPLC χρωματογραφία όπου απομονώθηκε μία κύρια κορυφή προϊόντος και χαρακτηρίστηκε με NMR και MS ως διμερές τυροσόλης (βλ. Σχήμα 2). Ο νανοβιοκαταλύτης HPCFe-TvL παρουσίασε υψηλή καταλυτική ικανότητα ως προς την τροποποίηση της τυροσόλης καθώς μετά από 24 h έδωσε 85% απόδοση προϊόντος που αντιστοιχεί σε 0,42 mg mL<sup>-1</sup>, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3.



**Σχήμα 2.** Αντίδραση τροποποίησης της τυροσόλης που καταλύεται από τον νανο-βιοκαταλύτη HPCFe-TvL, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 5 στους 30 °C.



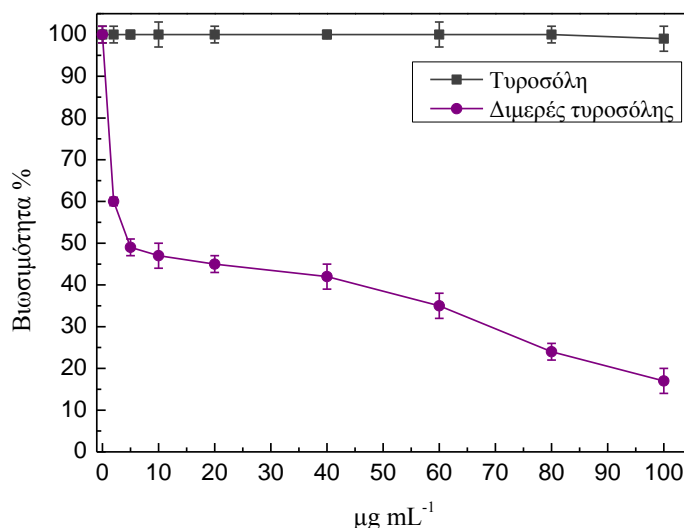
**Σχήμα 3.** Πρόοδος της αντίδρασης της τροποποίησης της τυροσόλης καταλυόμενη από το νανο-βιοκαταλύτη HPCFe-TvL.

Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης της τυροσόλης και του διμερούς της τυροσόλης πραγματοποιήθηκε με τη μελέτη δέσμευσης της σταθερής ελεύθερης ρίζας DPPH<sup>•</sup>. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών ενώσεων να δεσμεύουν τη ρίζα DPPH<sup>•</sup> και αποδίδεται στην ικανότητά τους να δίδουν το φαινολικό υδρογόνο στην ελεύθερη ρίζα. Η αντιοξειδωτική δράση εκφράστηκε με το συντελεστή SC<sub>50</sub>, που ορίζεται ως η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού (μg mL<sup>-1</sup>) στην οποία παρατηρείται το 50% της δέσμευσης της ρίζας DPPH<sup>•</sup>. Στον Πίνακα 3 φαίνεται ότι το διμερές της τυροσόλης εμφανίσει περίπου 5 φορές μεγαλύτερη ικανότητα να δεσμεύει τη ρίζα DPPH<sup>•</sup>.

**Πίνακας 3.** Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης της τυροσόλης και του διμερούς της τυροσόλης.

Δείγμα	SG <sub>50</sub> (μg mL <sup>-1</sup> )
Τυροσόλη	1,8 ±0,08
Διμερές τυροσόλης	0,384 ±0,05

Για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης της τυροσόλης και του διμερούς της τυροσόλης χρησιμοποιήθηκε το βακτήριο *E.coli* BL21DE3 το οποίο επώαστηκε απουσία και παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των υπό μελέτη ενώσεων (0-100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) σε ορό για 12 h, στους 37 °C. Στη συνέχεια κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης του βακτηρίου για κάθε περίπτωση. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4 σε αυτό το εύρος συγκεντρώσεων η τυροσόλη δεν παρουσιάζει καθόλου αντιμικροβιακή δράση ενώ το διμερές της τυροσόλης παρουσιάζει έντονη αντιμικροβιακή δράση καθώς παρατηρείται θνησιμότητα στο 80 % των κυττάρων σε συγκέντρωση 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .



**Σχήμα 4.** Ποσοστό βιωσιμότητας του βακτηρίου *E. Coli* μετά από αλληλεπίδραση με διαφορετικές συγκεντρώσεις τυροσόλης (μαύρο) και διμερούς τυροσόλης (μωβ) για 12 ώρες. Η 100% βιωσιμότητα αντιπροσωπεύει τη συνολική ποσότητα βιώσιμων κυττάρων ( $10^7$  cfu  $\text{mL}^{-1}$ ). Όλες οι μετρήσεις ήταν εις τριπλούν.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία τα μαγνητικά HPCFe νανοϋλικά φάνηκε να είναι αποτελεσματικοί φορείς για την ομοιοπολική ακινητοποίηση ενζύμων βιομηχανικού ενδιαφέροντος όπως η λακάση από *Trametes versicolor*. Ο νανοβιοκαταλύτης που αναπτύχθηκε HPCFe-TvL παρουσίασε αυξημένη δραστηριότητα και σταθερότητα και χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς στον ολιγομερισμό της τυροσόλης. Παράλληλα οι αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές μελέτες έδειξαν ότι το διμερές της τυροσόλης είχε καλύτερη βιολογική δράση από την πρόδρομη ένωση. Τέλος η εύκολη ανάκτηση και η σταθερότητα του νανοβιοκαταλύτη που αναπτύχθηκε τον καθιστούν κατάλληλο για την αποτελεσματική τροποποίηση φαινολικών ενώσεων προς ενίσχυση της βιολογικής τους δράσης.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Μέρος του έργου υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Δράσης ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ - ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ και συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνεΚ) (κωδικός έργου: Τ1ΕΔΚ-01716)». Η ΑΧ ενισχύθηκε με υποτροφία του ΙΚΥ, η οποία χρηματοδοτήθηκε από την Πράξη «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» από πόρους του ΕΠ «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση», 2014-2020 με τη συγχρηματοδότηση του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (Ε.Κ.Τ.) και του Ελληνικού Δημοσίου. Η

ΚΝ ενισχύθηκε με υποτροφία του Ιδρύματος Ευγενίδου, στο πλαίσιο του «ΚΑΔ Αλέξανδρου Σταυρόπουλου».

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- [1] T. Ozcan and B. Delikanli, *Int. J. Chem. Eng. Appl.*, 5 (5) (2014) 393–396.
- [2] H. Cory, S. Passarelli, J. Szeto, M. Tamez, and J. Mattei, *Front. Nutr.*, 5, (2018) 1–9.
- [3] F. Shahidi and P. Ambigaipalan, *J. Funct. Foods*, 18 (2015) 820–897.
- [4] H. Chakroun, M. Bouaziz, T. Yangui, I. Blibech, A. Dhouib, and S. Sayadi, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 87 (2013) 11–17.
- [5] L. Canfora, G. Iamarino, M. A. Rao, and L. Gianfreda, *J. Agric. Food Chem.*, 56 (4) (2008) 1398–1407.
- [6] H. Chakroun, M. Bouaziz, A. Dhouib, and S. Sayadi, *Environ. Technol.*, 33 (17) (2012) 1977–1985.
- [7] V. Vinciguerra, A. D’Annibale, E. Gàcs-Baitz, and G. D. Monache, *J. Mol. Catal. - B Enzym.*, 3(5) (1997) 213–220.
- [8] Vinu, Ajayan, Hossian Kazi Zakir, Srinivasu Pavuluri, Miyahara Masahiko, Anandan Srinivasan, Gokulakrishnan Narasimhan, Mori Toshiyuki, Ariga Katsuhiko, Balasubramanian Veerappan Vaithilingam, *Mater. Chem.*, 17 (18) (2007) 1819–1825.
- [9] L. Estevez, R. Dua, N. Bhandari, A. Ramanujapuram, P. Wang, and E. P. Giannelis, *Energy Environ. Sci.*, 6 (6) (2013) 1785–1790.
- [10] Z. Zhou and M. Hartmann, *Chem Soc Rev.*, 42 (2013) 3894–3912.
- [11] Sun Ming-Hui, Huang Shao-Zhuan, Chen Li-Hua, Li Yu, Yang Xiao-Yu, Yuan Zhong-Yong, Bao-Lian Su, *Chem Soc Rev*, 45 (12) (2016) 3479–3563.