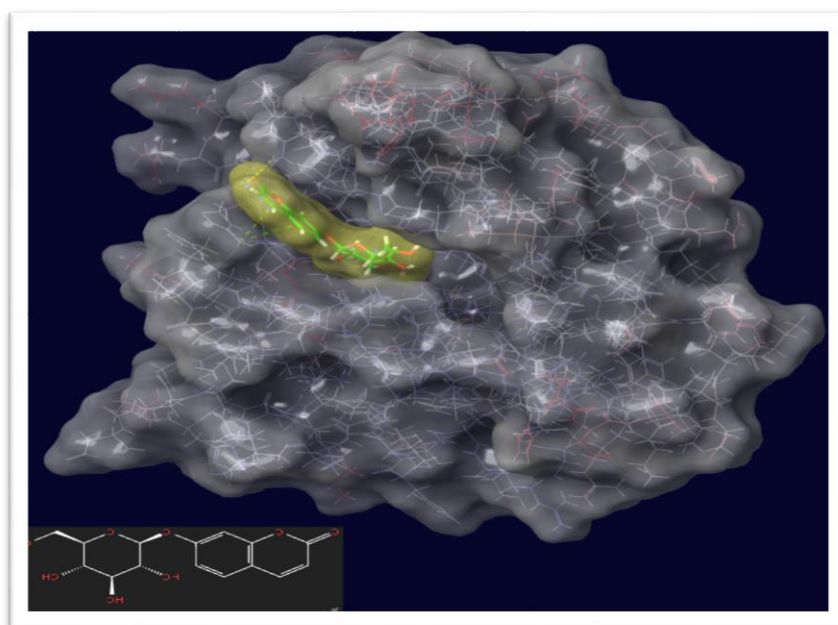




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Εύρεση φυσικών ενώσεων με αντιμικροβιακές ιδιότητες
έναντι τροφιμογενών νοσημάτων με υπολογιστικά εργαλεία»**



Όνοματεπώνυμο: ΝΙΚΟΛΑΟΥ ΙΦΙΓΕΝΕΙΑ (ΑΜ: 71617075)

ΜΑΡΚΟΥ ΜΑΡΙΑ (ΑΜ: 71617060)

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Ευτυχία Κρίτση

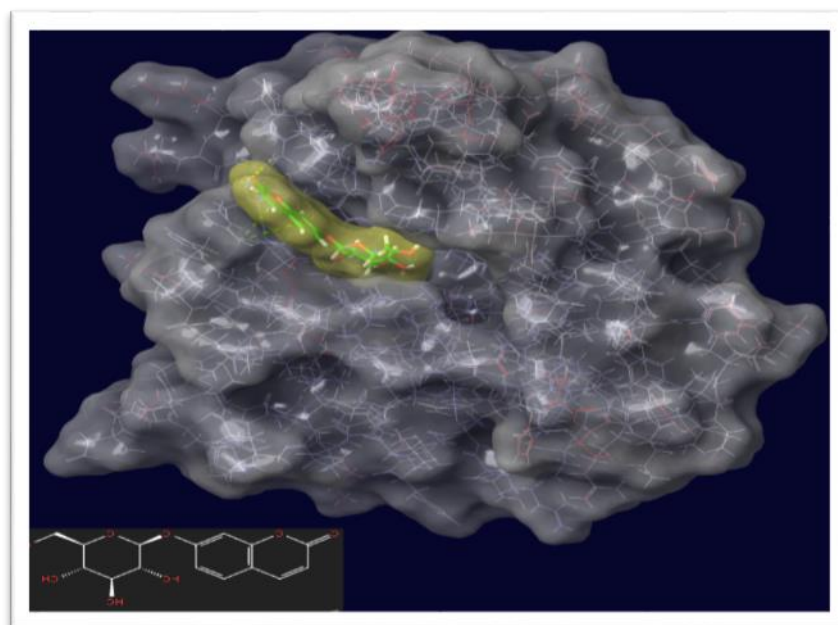
ΑΙΓΑΛΕΩ, ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟΣ 2023



UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF FOOD SCIENCES
DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECNOLOGY

DIPLOMA THESIS

**«Discovery of natural compounds with antimicrobial properties
against food diseases by applying computational tools»**



Name of Student: NIKOLAOU IFIGENEIA (RN: 71617075)

MARKOU MARIA (RN: 71617060)

Supervisor: Eftichia Kritsi



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**«Εύρεση φυσικών ενώσεων με αντιμικροβιακές ιδιότητες
έναντι τροφιμογενών νοσημάτων με υπολογιστικά εργαλεία»**

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και του Εισηγητή

Η πτυχιακή εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

A/α	ΟΝΟΜΑ - ΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1	ΕΥΤΥΧΙΑ ΚΡΙΤΣΗ	ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΗ ΥΠΟΤΡΟΦΟΣ	
2	ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΖΟΥΜΠΟΥΛΑΚΗΣ	ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ	
3	ΣΠΥΡΙΔΩΝ ΚΟΝΤΕΛΕΣ	ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Οι κάτωθι υπογεγραμμένες Νικολάου Ιφιγένεια του Γεωργίου, με αριθμό μητρώου 71617075 και Μάρκου Μαρία του Νικολάου με αριθμό μητρώου 71617060, φοιτήτριες του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνουμε υπεύθυνα ότι:

«Είμαστε συγγραφείς αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχαμε για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες κάναμε χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνουμε ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από εμάς αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μας, όσο και του Ιδρύματος.

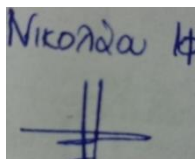
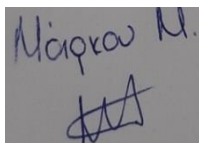
Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μας ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μας».

Η Δηλούσα

Η Δηλούσα

Νικολάου Ιφιγένεια

Μάρκου Μαρία

Handwritten signature of Nikoleta Ifigeneia in blue ink, with the name written above the signature.Handwritten signature of Maria Markou in blue ink, with the name written above the signature.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας πτυχιακής εργασίας, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μας Ευτυχία Κρίτση, Ακαδημαϊκή υπότροφο του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, για την ανάθεση του θέματος της πτυχιακής εργασίας αλλά και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μας πρόσφερε σε όλη τη διάρκεια της εργασίας.

Επίσης, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής Παναγιώτη Ζουμπουλάκη, Αναπληρωτή Καθηγητή ΠΑΔΑ και Σπυρίδων Κοντελέ, Επίκουρο Καθηγητή ΠΑΔΑ για τις παρατηρήσεις τους και τη συμμετοχή τους ως μέλη της εξεταστικής επιτροπής της παρούσας εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα συσκευασμένα τρόφιμα η ανάπτυξη καθώς και η επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών δύναται να προκαλέσει σοβαρές τροφικές ασθένειες διακυβεύοντας την ασφάλεια καθώς και την ποιότητα των τροφίμων. Βακτήρια όπως, *Salmonella spp.* και *Escherichia coli* είναι υπεύθυνα για την πρόκληση σοβαρών τροφιμογενών ασθενειών και η αντιμετώπισή τους κρίνεται απαραίτητη. Ορισμένοι από τους συνηθέστερους τρόπους αντιμετώπισης τους είναι η παστερίωση και η χρήση αντιβιοτικών. Λόγω των προβλημάτων που παρουσιάζουν οι παραπάνω μέθοδοι (υποβάθμιση οργανοληπτικών χαρακτηριστικών, αντοχή στα αντιβιοτικά) έχουν αναπτυχθεί νέες τάσεις για την καταπολέμηση τους. Προς αυτή την κατεύθυνση, τα τελευταία χρόνια καταβάλλονται αξιόλογες προσπάθειες για την εύρεση νέων ενώσεων που δρουν ως αντιμικροβιακά συστατικά τροφίμων, με τις φυσικές ενώσεις να κατέχουν εξέχουσα θέση.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η εύρεση φυσικών ενώσεων με αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι του ενζύμου Τοποϊσομεράση IV του παθογόνου βακτηρίου *Escherichia coli*, με εφαρμογή Υπολογιστικών Τεχνικών Εικονικής Σάρωσης (Virtual Screening Techniques). Συγκεκριμένα, οι φυσικές ενώσεις της βιβλιοθήκης «Specs» (<https://www.specs.net/>) υποβλήθηκαν σε πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης (Molecular Docking) για τη μελέτη της ικανότητας πρόσδεσης τους στο ένζυμο Τοποϊσομεράση IV του παθογόνου βακτηρίου *Escherichia coli*.

Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και η τελική επιλογή των ενώσεων βασίστηκε στα ακόλουθα κριτήρια:

- ✓ Σχηματισμός αλληλεπιδράσεων μεταξύ των εξεταζόμενων ενώσεων και των κρίσιμων για την πρόσδεση αμινοξέων.
- ✓ Ικανότητα πρόσδεσης των εξεταζόμενων φυσικών ενώσεων (Glide-score).

Τέλος, από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της Μοριακής Πρόσδεσης προέκυψαν έξι ενώσεις, οι οποίες δύναται να αγοραστούν μελλοντικά και να πραγματοποιηθεί *in vitro* βιολογική τους αποτίμηση ως αναστολείς του εξεταζόμενου ενζύμου.

Λέξεις - Κλειδιά: παθογόνα βακτήρια, τροφιμογενή νοσήματα, Τοποϊσομεράση IV, φυσικές ενώσεις, τεχνικές Εικονικής Σάρωσης, Μοριακή Πρόσδεση

ABSTRACT

In packaged foods, the growth and survival of pathogenic microorganisms can cause serious foodborne diseases, compromising the safety and quality of the food. Bacteria such as, *Salmonella spp.* and *Escherichia coli* are responsible for serious foodborne illnesses and their treatment is considered essential. Certain common ways for their treatment are pasteurization and the use of antibiotics. Due to the problems presented by the above methods (degradation of organoleptic characteristics, resistance to antibiotics) new trends have been developed to overcome them. Towards this direction, in recent years considerable efforts have been made to discover novel compounds that act as antimicrobial food ingredients, with natural compounds occupying a prominent position.

The aim of the present thesis is the discovery of natural compounds with antimicrobial properties against the Topoisomerase IV enzyme of the pathogenic bacterium *Escherichia coli*, by applying Virtual Screening Techniques. Specifically, the natural compounds contained to the "Specs" library (<https://www.specs.net/>) were subjected to Molecular Docking study, aiming to evaluate their bind affinity to the Topoisomerase IV enzyme of the pathogenic bacterium *Escherichia coli*.

The results assessment and the final selection of compounds were based on the following criteria:

- ✓ Interactions between the tested compounds and the amino acids crucial for the binding.
- ✓ Predicted binding affinity of the examined natural compounds (Glide-score).

Finally, the Molecular Docking results evaluation indicated six compounds as the most promising, which can be purchased in the future and carried out *in vitro* assays to validate their activity as inhibitors of the examined enzyme.

Keywords: pathogenic bacteria, foodborne diseases, Topoisomerase IV, natural compounds, Virtual Screening techniques, Molecular Docking

Περιεχόμενα

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	12
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	15
1.1 Οι μικροοργανισμοί ως βασικό πρόβλημα στη βιομηχανία τροφίμων.....	15
1.2. Αντιμετώπιση μικροοργανισμών	15
1.3. Νέες τάσεις και εφαρμογές για την αντιμετώπιση των παθογόνων μικροοργανισμών.....	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΗ ΠΑΘΟΓΟΝΑ ΚΑΙ ΑΛΛΟΙΟΓΟΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	18
2.1. Χαρακτηριστικά και κατηγορίες βακτηρίων	18
2.2. Βακτήρια και τρόφιμα	20
2.2.1. <i>Salmonella spp.</i>	21
2.2.2. <i>Yersinia spp.</i>	22
2.2.3. <i>Campylobacter spp.</i>	22
2.2.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	23
2.2.5. <i>Escherichia coli</i>	23
2.3. Τροφιμογενή νοσήματα.....	24
2.3.1. Σαλμονέλλωση	25
2.3.2. Γερσινίωση	26
2.3.3. Καμπυλοβακτηρίωση	26
2.3.4. Λιστερίωση.....	27
2.3.5. Παθογένειες της εντεροαιμοραγικής <i>E.coli</i> (EHEC)	27
2.4. Αντιμετώπιση.....	28
2.5. Πρωτεϊνικοί στόχοι εμπλεκόμενοι σε αντιβακτηριακούς μηχανισμούς.....	32
Τοποϊσομεράση IV	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΙΚΑ ΕΡΓΑΛΕΙΑ ΕΙΚΟΝΙΚΗΣ ΣΑΡΩΣΗΣ	36
3.1. Εισαγωγή	36

3.2. Βιβλιοθήκες Φυσικών ενώσεων	38
3.3. Πρόβλεψη Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων	38
3.4. Μοριακή Πρόσδεση (Molecular Docking)	39
3.4.1. Εισαγωγή.....	39
3.4.2. Διάγραμμα ροής Μοριακής πρόσδεσης	39
3.4.3. Προετοιμασία Πρωτεΐνης	40
3.4.4. Προετοιμασία Προσδετών	40
3.4.5. Εφαρμογή μοριακής πρόσδεσης και Αποτελέσματα.....	41
3.4.6. Χρησιμοποιούμενα Λογισμικά.....	41
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	42
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ..	43
4.1. Επιλογή βιβλιοθηκών	43
4.2. Προετοιμασία βιβλιοθήκης φυσικών ενώσεων	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΔΙΕΞΑΓΩΓΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ.....	44
5.1. Προετοιμασία ενζύμου στόχου για τη διεξαγωγή πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης.....	44
5.2. Εφαρμογή πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης.....	46
5.2.1 Επικύρωση μεθόδων Μοριακής Πρόσδεσης.....	46
5.2.2 Αποτελέσματα εφαρμογής πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης στη βιβλιοθήκη Specs.....	47
5.2.3 Αποτελέσματα από την εφαρμογή του αλγορίθμου Glide-XP	56
5.3 Γενικά συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι.....	61
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	62
Ξένη βιβλιογραφία	62
Ελληνική Βιβλιογραφία	71
Ιστοσελίδες.....	71
Πηγές εικόνων	72

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1 Παραδείγματα Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων.....	18
Πίνακας 2 Παραδείγματα Αερόβιων, Αναερόβιων και Προαιρετικά Αναερόβιων βακτηρίων	19
Πίνακας 3 Παραδείγματα Θερμόφιλων, Μεσόφιλων και Ψυχρόφιλων βακτηρίων.....	20
Πίνακας 4 Θερμοκρασίες ανάπτυξης βακτηρίων	20
Πίνακας 5 Συσκευασμένα τρόφιμα και παθογόνα βακτήρια.....	21
Πίνακας 6 Παθογόνοι τύποι E.coli (Allocati et al., ‘Escherichia coli in Europe: an overview’.)	24
Πίνακας 7 Παθογόνα βακτήρια και οι ασθένειες που προκαλούν	24
Πίνακας 8 Φυσικές ενώσεις και οι μικροοργανισμοί που αναστέλλουν.....	30
Πίνακας 9 Σχηματιζόμενοι δεσμοί μεταξύ του αναστολέα νοβοβιοκίνη και του ενζύμου E. coli Τοποϊσομεράση IV.....	45
Πίνακας 10 Οι χημικές δομές των ενώσεων που επιλέχθηκαν μετά τη χρήση του αλγόριθμου Glide-SP. Δίνονται οι κωδικοί Specs / ZINC, το Glide-score, η ονομασία τους και η 2D δομή τους	48
Πίνακας 11 Οι χημικές δομές των ενώσεων που επιλέχθηκαν έπειτα από τη χρήση του αλγόριθμου Glide-XP. Δίνονται οι κωδικοί Specs / ZINC, το Glide-score, η ονομασία τους και η 2D δομή τους.....	56

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 2.1 Ανάπτυξη μικροοργανισμών <i>Proteus</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella</i> σε τρυβλίο Petri	21
Εικόνα 2.2 Το παθογόνο βακτήριο <i>Salmonella</i> και τα τρόφιμα στα οποία εμφανίζεται	26
Εικόνα 2.3 Μέθοδοι αντιμετώπισης βακτηρίων: Χρήση αποστειρωτήρων για την εφαρμογή θερμικής επεξεργασίας, Εφαρμογή χαμηλών θερμοκρασιών με Ψύξη-Κατάψυξη, Μείωση ενεργότητας ύδατος με αφυδάτωση (Φρούτα), Μείωση pH (με την προσθήκη λεμονιού) Προσθήκη χημικών συντηρητικών, Προσθήκη αντιβιοτικών	29
Εικόνα 2.4 Δομή χιτοζάνης	31
Εικόνα 2.5 Τριδιάστατη απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής της Τοποϊσομεράσης IV συμπλοκοποιημένη με τον αναστολέα νοβοβιοκίνη	32
Εικόνα 2.6 Τριδιάστατη απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής της υπομονάδας <i>ParC</i> της Τοποϊσομεράσης IV	33
Εικόνα 2.7 Τριδιάστατη απεικόνιση της κρυσταλλική δομής της υπομονάδας <i>ParE</i> της Τοποϊσομεράσης IV συμπλοκοποιημένη με <i>ADPNP</i>	33
Εικόνα 2.8 Χημική δομή του ναλιδιξικού οξέος.	34
Εικόνα 2.9 Χημική δομή της νοβοβιοκίνης.....	34
Εικόνα 2.10 Χημική δομή της χλωροβιοκίνης.....	35
Εικόνα 3.1 Αριστερά: Τριδιάστατη απεικόνιση της κρυσταλλική δομής της <i>GyrB-ATPase</i> συμπλοκοποιημένη με τη ραδισικόλη (πράσινο χρώμα), Δεξιά: Η χημική δομή της ραδισικόλης.....	37
Εικόνα 3.2 (Αριστερά) Η χημική δομή της αμυγδαλίνης, (Δεξιά) Τριδιάστατη απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής της <i>tyrosyl-tRNA</i> συνθετάσης συμπλοκοποιημένη με αμυγδαλίνη.....	37

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα 3.1 Διάγραμμα ροής Μοριακής Πρόσδεσης.	40
Σχήμα 5.1 Τριδιάστατη απεικόνιση του ενζύμου της Τοποϊσομεράσης IV συμπλοκοποιημένο με την νοβοβιοκίνη. Με κίτρινο χρώμα αναπαρίστανται οι δεσμοί υδρογόνου και με πράσινο χρώμα οι Pi-cation δεσμοί.....	44
Σχήμα 5.2 Δισδιάστατη απεικόνιση των κρίσιμων για την πρόσδεση αλληλεπιδράσεων του ενζύμου E. Coli Τοποϊσομεράση IV με τον αναστολέα νοβοβιοκίνη.....	45
Σχήμα 5.3 Υπέρθυση των δύο διαμορφώσεων της νοβοβιοκίνης έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου SP. Με γαλάζιο χρώμα απεικονίζεται ο αναστολέας της κρυσταλλικής δομής και με πράσινο χρώμα ο αναστολέας, όπως προέκυψε μετά την εφαρμογή του αλγορίθμου SP.	46
Σχήμα 5.4 Υπέρθυση των δύο διαμορφώσεων της νοβοβιοκίνης έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου SP. Με γαλάζιο χρώμα απεικονίζεται ο αναστολέας της κρυσταλλικής δομής και με κίτρινο χρώμα ο αναστολέας, όπως προέκυψε μετά την εφαρμογή του αλγορίθμου XP.	47
Σχήμα 5.5 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης 1S-1-[[4,5-dimethoxy-2-[trimethoxy(methyl)BLAHyl]oxy-phenyl]methyl]-6-methoxy-2-methyl-3,4-dihydro (Ένωση 1) με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και με μωβ χρώμα οι γέφυρες άλατος.	50
Σχήμα 5.6 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης 3-formyl-4-oxo-4H-chromen-7-yl acetate (Ένωση 2) με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου.	50
Σχήμα 5.7 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Aloe-emodin (Ένωση 3) με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου.	51
Σχήμα 5.8 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Naringenin derivative (Ένωση 4) με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου.	52
Σχήμα 5.9 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Skimmin (Ένωση 5) με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και με πράσινο χρώμα οι Pi-cation δεσμοί.	52
Σχήμα 5.10 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Nebularin (Ένωση 6) με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου.....	53

Σχήμα 5.11 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης <i>Silybin</i> (Ένωση 7) με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου.....	53
Σχήμα 5.12 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης <i>Lappaconitene</i> (Ένωση 8) με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και με μωβ χρώμα οι γέφυρες άλατος.....	54
Σχήμα 5.13 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης <i>Laudanosine</i> (Ένωση 9) με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου, με μωβ χρώμα οι γέφυρες άλατος και με πράσινο χρώμα οι <i>Pi-cation</i> δεσμοί.....	54
Σχήμα 5.14 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης <i>Rutin</i> (Ένωση 10) με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και με πράσινο χρώμα οι <i>Pi-cation</i> δεσμοί.	55
Σχήμα 5.15 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης <i>Lawinal</i> (Ένωση 11) με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και με πράσινο χρώμα οι <i>Pi-cation</i> δεσμοί.	56
Σχήμα 5.16 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης <i>Skimmin</i> με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και με πράσινο χρώμα οι <i>Pi-cation</i> δεσμοί.	57
Σχήμα 5.17 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης <i>Naringenin derivative</i> με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου.....	58
Σχήμα 5.18 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης <i>Nebularin</i> με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου.	58
Σχήμα 5.19 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης <i>Laudanosine</i> με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και με πράσινο χρώμα οι <i>Pi-cation</i> δεσμοί.....	59

Σχήμα 5.20 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης *3-formyl-4-oxo-4H-chromen-7-yl acetate* με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου. ... 60

Σχήμα 5.21 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης *Silybin* με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και με πράσινο ο π -cation δεσμός. 60

Θεωρητικό Μέρος

Κεφάλαιο 1: Εισαγωγή

1.1 Οι μικροοργανισμοί ως βασικό πρόβλημα στη βιομηχανία τροφίμων

Τα τρόφιμα αποτελούν βασική πηγή για την ανθρώπινη ζωή και υγεία. Είναι απαραίτητα για τη σωστή λειτουργία του οργανισμού καθώς καλύπτουν τις απαιτήσεις του σε ενέργεια και συντελούν στην ανάπτυξη και διατήρησή του. Παρόλα αυτά, στα τρόφιμα μπορούν να αναπτυχθούν ανεπιθύμητοι μικροοργανισμοί οι οποίοι θέτουν τον άνθρωπο σε κίνδυνο προξενώντας του ασθένειες. Οι ασθένειες αυτές καλούνται τροφιμογενείς και οφείλονται σε τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια, τα οποία στις περιπτώσεις ανάπτυξής τους στις τροφές ακόμα και σε ελάχιστη μολυσματική δόση (Yousef, A. E., & Abdelhamid, A. G., 2019), (Abdelhamid, A.G., & El-Dougdoud, N.K., 2020) μπορούν να βλάψουν σοβαρά την ανθρώπινη υγεία. Εκτός από τα τροφιμογενή παθογόνα, προβληματισμό προκαλούν και τα αλλοιογόνα βακτήρια στη βιομηχανία τροφίμων. Η ανάπτυξη των οποίων έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση φυσικών βλαβών και χημικών μεταβολών (τοξικές ουσίες που είναι προϊόντα μεταβολισμού των μικροοργανισμών) και ως συνέπεια μπορούν να προξενήσουν λοιμώξεις και δηλητηριάσεις ενώ δεν είναι λίγες και οι περιπτώσεις θανάτου (Scallan et al., 2011; Villalobos- Delgado et al., 2019; Rodríguez-Sánchez et al., 2021). Τρόφιμα με μικροβιακή μόλυνση είναι υπεύθυνα για 600 εκατομμύρια ασθένειες και 420 χιλιάδες θανάτους ετησίως (Özogul, Y., Özogul, F., & Kulawik, P., 2021).

1.2. Αντιμετώπιση μικροοργανισμών

Από τα ανωτέρω γίνεται αντιληπτό ότι οι μικροοργανισμοί αποτελούν σοβαρό πρόβλημα για τη βιομηχανία τροφίμων καθώς διατρέχει σημαντικό κίνδυνο η υγεία των καταναλωτών αλλά και αυξάνεται το κόστος παραγωγής, εφόσον διατίθενται προϊόντα τα οποία δεν είναι κατάλληλα για κατανάλωση (Rodríguez-Sánchez et al., 2021).

Για το λόγο αυτό, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για την αντιμετώπιση τους, ορισμένες από τις οποίες μπορούν να εφαρμοστούν συνδυαστικά στα τρόφιμα, γνωστές με τον όρο «προσέγγιση εμποδίων» (παστερίωση και στη συνέχεια ψύξη), ενώ άλλες είναι ανεξάρτητες, όπως είναι η αποστείρωση η οποία έπειτα από την εφαρμογή της δεν απαιτεί ψύξη για τη διατήρηση του προϊόντος. Έχουν ως αποτέλεσμα, την αναστολή ή την πλήρη καταστροφή των ανεπιθύμητων παθογόνων μικροοργανισμών και συνεπώς τη διατήρηση των τροφίμων (Abdelhamid, A.G., & El-Dougdoud, N.K., 2020).

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η θερμική επεξεργασία. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας το τρόφιμο θερμαίνεται έως μια συγκεκριμένη θερμοκρασία 50 °C-150 °C, με σκοπό τη θανάτωση των παθογόνων μικροοργανισμών. Όμως, η συγκεκριμένη

μέθοδος παρουσιάζει ένα σημαντικό μειονέκτημα το οποίο είναι η μεταβολή των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των τροφίμων (Kong et al., 2007). Η απαίτηση για τρόφιμα χωρίς υποβάθμιση των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών οδήγησε στην ανάπτυξη μη θερμικών μεθόδων επεξεργασίας, όπως είναι η υψηλή υδροστατική πίεση, η ακτινοβολία και η χρήση ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου (Abdelhamid, A.G. ,& El- Dougdoug, N.K., 2020).

Επιπρόσθετες διαδικασίες που συνεισφέρουν στην αναστολή μικροοργανισμών είναι η μείωση του pH, γεγονός που επιτυγχάνεται με την προσθήκη οργανικών οξέων, η προσθήκη επιθυμητής μικροχλωρίδας με στόχο την αναστολή των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών, η μείωση της ενεργότητας ύδατος με τη χρήση ζάχαρης ή αλατιού ή μέσω διαδικασιών συμπίκνωσης και αφυδάτωσης. Επίσης, σημαντικό ρόλο κατέχουν και η συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, γνωστή και ως MAP, η οποία ρυθμίζει τα αέρια που περιλαμβάνονται στη συσκευασία (άζωτο, οξυγόνο, CO₂), η κατάψυξη και τέλος τα χημικά συντηρητικά (Batiha et al., 2021; Rawat et al., 2015).

1.3. Νέες τάσεις και εφαρμογές για την αντιμετώπιση των παθογόνων μικροοργανισμών

Τα τελευταία χρόνια έχουν δημιουργηθεί νέες τάσεις με στόχο την καταπολέμηση των παθογόνων μικροοργανισμών. Η ανάγκη αυτή δημιουργήθηκε δεδομένου ότι οι συμβατικές μέθοδοι ενώ είναι αποτελεσματικές, πολλές φορές έχουν ως συνέπεια την υποβάθμιση των προϊόντων (χρήση χημικών συντηρητικών) (Davidson et al., 2012).

Για το λόγο αυτό σημαντική θέση κατέχει η χρήση βιοσυντηρητικών ή αλλιώς φυσικών ενώσεων ως αντιμικροβιακά συστατικά στα τρόφιμα. Προέρχονται από φυτά, ζώα ή μικροοργανισμούς και παρατείνουν τη διάρκεια ζωής των προϊόντων (Pisoschi et al., 2018). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η ελεγχόμενη προσθήκη μικροοργανισμών ή των μεταβολιτών τους, τα οποία έχουν την ικανότητα να δρουν ως βιοελεγκτικοί παράγοντες. Τη δυνατότητα αυτή την παρέχουν τα ακόλουθα είδη: *Bacillus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Kluyveromyces* (Ceugniez et al., 2017; Hossain et al., 2017; Ouweland et al., 2002). Η προσθήκη γαλακτικών βακτηρίων αποτελεί επίσης, μια “καλή” τεχνική αναστολής των παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών των τροφίμων, μέσω της παραγωγής βακτηριοσίνων (αντιμικροβιακών πρωτεϊνών) (Azizi et al., 2017; Jabbari et al., 2017; Rouse et al., 2008; Todorov et al., 2017; Yoon et al., 2016) που μπορούν επιπλέον να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο των βακτηρίων. Χαρακτηριστικές περιπτώσεις φυσικών ενώσεων με αντιμικροβιακές ιδιότητες είναι τα αιθέρια έλαια, τα οργανικά οξέα, τα μπαχαρικά, οι λυσοζύμες, η λακτοφερίνη, διάφορες φαινολικές ενώσεις κτλ. (Raybaudi–Massilia et al.,

2009; Davidson et al., 2013). Οι φυσικές ενώσεις προστίθενται απευθείας στο τρόφιμο, είτε επικαλυμμένες στην επιφάνεια του, είτε ενσωματωμένες στο υλικό συσκευασίας.

Εκτενέστερη ανάλυση όσον αφορά τις φυσικές ενώσεις και την εφαρμογή τους θα πραγματοποιηθεί σε επόμενο κεφάλαιο (Batiha et al., 2021).

Κεφάλαιο 2: Τροφιμογενή παθογόνα και αλλοιογόνα βακτήρια

2.1. Χαρακτηριστικά και κατηγορίες βακτηρίων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι μικροοργανισμοί αποτελούν σοβαρό ζήτημα για τη βιομηχανία τροφίμων. Σε αυτό το κεφάλαιο, θα πραγματοποιηθεί λεπτομερής αναφορά για τους όρους μικροοργανισμός και κυρίως βακτήριο.

Με τον όρο μικροοργανισμοί, νοούνται οι ζωντανοί οργανισμοί που είναι προκαρυωτικά κύτταρα, δηλαδή μονοκύτταροι οργανισμοί που δεν διαθέτουν κυτταρικό πυρήνα, όπως είναι τα βακτήρια, οι μονοκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί που περιλαμβάνουν πυρήνα, όπως είναι οι ζυμομύκητες και τέλος οι πολυκύτταροι οργανισμοί με πυρήνες και άλλα οργανίδια, όπως είναι οι μύκητες. Από τα παραπάνω, μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα βακτήρια και θα αναλυθούν εκτενώς στο παρόν κεφάλαιο (Rawat et al., 2015).

Τα βακτήρια μπορεί να βρίσκονται είτε με τη μορφή κόκκων είτε με τη μορφή ράβδων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα μικροοργανισμού με σχήμα κόκκου είναι ο *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ενώ με σχήμα ράβδου η *Salmonella spp.* Διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες στα αρνητικά κατά Gram και στα θετικά κατά Gram βακτήρια με βάση τη χρώση κατά Gram. Στην περίπτωση των αρνητικών κατά Gram, τα βακτήρια χρωματίζονται κόκκινα ενώ τα θετικά κατά Gram με την ίδια μέθοδο χρωματίζονται ιώδη. Η διάκριση αυτή οφείλεται στα φυσιολογικά χαρακτηριστικά του κυτταρικού τοιχώματος (Rawat et al., 2015).

Στον Πίνακα 1 παρατίθενται ορισμένα παραδείγματα βακτηρίων θετικών και αρνητικών κατά Gram.

Πίνακας 1 Παραδείγματα Gram θετικών και αρνητικών βακτηρίων

Βακτήρια	Θετικά κατά Gram	Αρνητικά κατά gram
<i>Lactobacillus</i>	✓	
<i>Leuconostoc</i>	✓	
<i>Salmonella</i>		✓
<i>Bacillus</i>	✓	
<i>Escherichia</i>		✓
<i>Listeria</i>	✓	
<i>Pseudomonas</i>		✓
<i>Yersinia</i>		✓
<i>Shigella</i>		✓
<i>Campylobacter</i>		✓
<i>Clostridium</i>	✓	
<i>Staphylococcus</i>	✓	

Επιπλέον, τα βακτήρια μπορούν να ταξινομηθούν με βάση το οξυγόνο που απαιτείται για την ανάπτυξη τους. Συνεπώς, τα βακτήρια που δεν χρειάζονται οξυγόνο για να αναπτυχθούν ονομάζονται αναερόβια, ενώ εκείνα που αναπτύσσονται αποκλειστικά με την παρουσία οξυγόνου καλούνται αερόβια. Εκτός από τις δύο ανωτέρω κατηγορίες υπάρχει και μία τρίτη, τα προαιρετικά αναερόβια βακτήρια τα οποία διαφέρουν από τα υπόλοιπα καθώς είναι ικανά να αναπτυχθούν με ή χωρίς την παρουσία οξυγόνου (Rawat et al., 2015).

Στον Πίνακα 2 απεικονίζονται ορισμένα είδη βακτηρίων σύμφωνα με την απαίτηση τους σε οξυγόνο.

Πίνακας 2 Παραδείγματα Αερόβιων, Αναερόβιων και Προαιρετικά Αναερόβιων βακτηρίων

Βακτήρια	Αναερόβια	Αερόβια	Προαιρετικά Αναερόβια
<i>Salmonella</i>			✓
<i>Listeria</i>			✓
<i>Clostridium</i>	✓		
<i>Yersinia</i>			✓
<i>Escherichia</i>			✓
<i>Pseudomonas</i>		✓	
<i>Staphylococcus</i>			✓
<i>Shigella</i>			✓
<i>Bacillus</i>	✓		

Ακόμα, τα βακτήρια μπορούν να διακριθούν σε κατηγορίες με βάση το εύρος θερμοκρασίας που αναπτύσσονται. Σύμφωνα με αυτό τον τρόπο διακρίνονται σε θεرمόφιλα, μεσόφιλα και ψυχρόφιλα καθώς και σε ψυχρότροφα βακτήρια. Τα θεرمόφιλα βακτήρια, αναπτύσσονται σε υψηλές θερμοκρασίες μεταξύ 45-70°C, τα μεσόφιλα σε μεσαίες θερμοκρασίες 10-45°C ενώ αντίστοιχα τα ψυχρόφιλα και τα ψυχρότροφα έχουν εύρος θερμοκρασιών -5 έως 20°C και -5 έως 35°C, αντίστοιχα (Πίνακας 3). Παρόλο που, οι μικροοργανισμοί έχουν τη δυνατότητα να επιβιώνουν σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, για κάθε έναν από αυτούς υπάρχει μια συγκεκριμένη θερμοκρασία κατά την οποία πολλαπλασιάζονται με το μεγαλύτερο δυνατό ρυθμό. Η θερμοκρασία αυτή ονομάζεται βέλτιστη θερμοκρασία και εξαρτάται από την κατηγορία στην οποία ανήκει το βακτήριο (Ingraham, J.L., & Stokes, J.L., 1959) (Πίνακας 4).

Πίνακας 3 Παραδείγματα Θερμόφιλων, Μεσόφιλων και Ψυχρόφιλων βακτηρίων

Βακτήρια	Θερμόφιλα	Μεσόφιλα	Ψυχρόφιλα
<i>Leuconostoc</i>		✓	
<i>Lactobacillus</i>		✓	
<i>Staphylococcus</i>		✓	
<i>Clostridium</i>		✓	
<i>Bacillus</i>		✓	
<i>Campylobacter</i>	✓		

Πίνακας 4 Θερμοκρασίες ανάπτυξης βακτηρίων

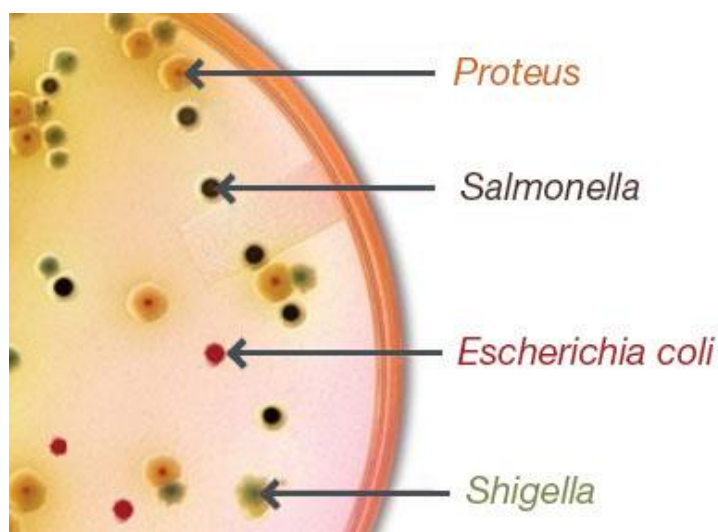
Βακτήρια	Θερμοκρασίες ανάπτυξης	Βέλτιστη θερμοκρασία
<i>Salmonella</i>	8-45°C	37°C
<i>Listeria</i>	0-45°C	25-30°C
<i>Yersinia</i>	0-45°C	25-32°C
<i>Escherichia coli (E.coli)</i>	10-46°C	35°C

2.2. Βακτήρια και τρόφιμα

Η παρουσία βακτηρίων στα τρόφιμα είναι αρκετά συχνή εφόσον αποτελούν ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη τους. Τα τρόφιμα μπορεί να περιλαμβάνουν μικροοργανισμούς αλλοίωσης ή ακόμα και παθογόνους μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί αλλοίωσης αποτελούνται κυρίως από αερόβια ψυχρότροφα Gram αρνητικά βακτήρια, ετεροζυμωτικούς γαλακτοβάκιλλους (οξυγαλακτικά βακτήρια που κατά τη διάρκεια της ζύμωσης παράγουν εκτός από γαλακτικό οξύ, αιθανόλη, οξικό οξύ και CO₂) και από σπορογόνα βακτήρια. Χαρακτηριστική περίπτωση αλλοίωσης τροφίμου από βακτήρια αποτελούν τα τυριά, στα οποία δημιουργούνται ανεπιθύμητα αέρια (CO₂, H₂, NH₃) λόγω της δράσης κολοβακτηριδίων, ετεροζυμωτικών γαλακτοβάκιλλων και σπορογόνων βακτηρίων. Για την επιβίωση των συγκεκριμένων μικροοργανισμών σε ένα τρόφιμο απαιτείται η ύπαρξη θρεπτικών ουσιών και ιδιαίτερα άνθρακα για τη διεξαγωγή των μεταβολικών τους λειτουργιών. Με την πάροδο του χρόνου πραγματοποιούνται χημικές αλλαγές στο τρόφιμο και μεταβάλλονται οι οργανοληπτικές του ιδιότητες καθώς εμφανίζεται δυσάρεστη οσμή και γεύση (Rawat et al., 2015).

Τα παθογόνα βακτήρια αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται με τον ίδιο τρόπο στα τρόφιμα και αποτελούν την αιτία διαφόρων ασθενειών. Μεγάλο μέρος του πληθυσμού σε παγκόσμια κλίμακα ταλαιπωρείται από δυσεντερία, διάρροια και τροφικές δηλητηριάσεις έπειτα από κατάποση μολυσμένου τροφίμου με παθογόνα βακτήρια. *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Listeria monocytogenes (L. monocytogenes)*, *Campylobacter* και η *Escherichia coli (E.coli)* αποτελούν ορισμένα από τα παθογόνα που είναι υπεύθυνα για τέτοιου είδους

μολύνσεις (Marušić et al., 2011). Στην Εικόνα 2.1 απεικονίζεται η ανάπτυξη ορισμένων μικροοργανισμών σε τρυβλίο Petri.



Εικόνα 2.1 Ανάπτυξη μικροοργανισμών *Proteus*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Shigella* σε τρυβλίο Petri (<https://theory.labster.com/ss-agar/>)

Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται ορισμένοι παθογόνοι μικροοργανισμοί και τα τρόφιμα τα οποία προσβάλλουν.

Πίνακας 5 Συσκευασμένα τρόφιμα και παθογόνα βακτήρια

Συσκευασμένα Τρόφιμα	Παθογόνα Βακτήρια
Χοιρινό, βόειο κρέας	<i>Salmonella spp.</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Campylobacter jejuni</i>
Αυγά	<i>Salmonella spp.</i>
Λαχανικά (λάχανο, καλαμπόκι)	<i>Salmonella spp.</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>
Γαλακτοκομικά προϊόντα (γάλα, μαλακό τυρί, βούτυρο)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>
Ψάρια και θαλασσινά (καβούρι, γαρίδες, μαριναρισμένα ψάρια)	<i>Listeria monocytogenes</i>
Φρούτα (πεπόνι)	<i>Listeria monocytogenes</i>
Πουλερικά (κοτόπουλο, γαλοπούλα)	<i>Salmonella spp.</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Campylobacter jejuni</i>

2.2.1. *Salmonella spp.*

Τα βακτήρια του είδους *Salmonella*, είναι μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, είναι Gram αρνητικά βακτήρια, δεν παράγουν σπόρια, είναι σχετικά αναερόβια και μορφολογικά έχουν σχήμα ραβδίου (Fàbrega & Vila., 2013; Crum-Cianflone et al., 2008; McSorley, S.J., 2014). Είναι προαιρετικά παθογόνα και έχουν τη δυνατότητα να επιζήσουν σε διαφορετικές συνθήκες. Είναι ικανά να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες από 8 °C έως 45 °C, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37 °C. Επιπλέον, διαθέτουν την ικανότητα να επιβιώνουν σε μεγάλο εύρος τιμών pH (pH = 4,0-9,5), με βέλτιστο pH 6,5-7,0 και σε ενεργότητα ύδατος 0,94 (Rönnqvist et al., 2018). Παρόλα αυτά, τα βακτήρια του είδους *Salmonella* επιβιώνουν και σε

ακραίες συνθήκες. Τέλος, η κίνηση τους πραγματοποιείται μέσω του μαστιγίου που διαθέτουν.

Η *Salmonella* διακρίνεται σε δυο είδη, το είδος *S. bongori* και το είδος *S. enterica* και περιέχει περισσότερους από 2.500 ορότυπους, εκ των οποίων οι περισσότεροι ανήκουν στο είδος *S. enterica*. Από τα είδη που αναφέρθηκαν, το *S. enterica* παρουσιάζει μεγαλύτερο ενδιαφέρον καθώς είναι η αιτία για το 99% των περιπτώσεων ασθένειας σε ανθρώπους και ζώα (Chlebicz & Ślizewska, 2018).

2.2.2. *Yersinia spp.*

Περιλαμβάνει 17 είδη και αποτελεί μέλος της οικογένειας των Εντεροβακτηριδίων. Από τα 17 είδη μόνο η *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*) είναι υπεύθυνη για την ασθένεια γερσινίωση. Τα βακτήρια αυτά, μπορεί να έχουν σχήμα είτε ραβδιού είτε κόκκου και το μέγεθος τους κυμαίνεται 0,5-0,8 μm σε πλάτος και 1-1,3 μm σε μήκος, επιπλέον ταξινομούνται στο γένος *Yersinia*. Επίσης, μπορούν να κινηθούν σε θερμοκρασίες 22 -30°C μέσω του μαστιγίου που διαθέτουν, ενώ είναι ακίνητα στους 37°C καθώς διακόπτεται η διαδικασία της μεταγραφής της φλαγελλίνης (κύρια πρωτεΐνη για το σχηματισμό μαστιγίου) (Fàbrega & Vila., 2012). Η *Y. Enterocolitica* είναι ψυχρόφιλη και αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες 0-45°C με ιδανική θερμοκρασία 25 – 32 °C (Janowska et al., 2012; Dekker & Frank, 2015). Επιπλέον, ανήκει στα Gram αρνητικά βακτήρια, δεν παράγει σπόρια και δεν απαιτείται οξυγόνο για την επιβίωση του (Janowska et al., 2012). Ακόμα, παράγει τοξίνη σε χαμηλές θερμοκρασίες και ευνοείται η ανάπτυξη της σε τιμές pH μικρότερες από 9,0 και σε ενεργότητα ύδατος μεγαλύτερη από 0,96. Με την προσθήκη οργανικών οξέων, όπως για παράδειγμα κιτρικό οξύ, παρεμποδίζεται η δράση του βακτηρίου *Y. enterocolitica* (Bari et al., 2011).

Στην *Y. enterocolitica* ανήκουν 6 βιότυποι και είναι οι ακόλουθοι: 1A, 1B, 2,3,4,5 , εκ των οποίων πλέον παθογόνοι βιότυποι/ορότυποι είναι οι 1B/O:8, 2/O:5,2/O:9, 3/O:3 και ο 4/O:3. Τέλος, έπειτα από επιδημιολογικές μελέτες ανακαλύφθηκε ότι στις περισσότερες περιπτώσεις η γερσινίωση προήλθε έπειτα από μόλυνση του ανθρώπου με τον ορότυπο 4/O:3 (Rahman et al., 2011; Schaake et al., 2014; Chlebicz & Ślizewska., 2018).

2.2.3. *Campylobacter spp.*

Το είδος *Campylobacter* έχει πλάτος 0,2-0,9 μm και μήκος 0,2-5,0 μm, σχήμα ραβδιού, ανήκει στα Gram αρνητικά βακτήρια και διαθέτει μαστίγιο (Kaakoush et al., 2015; Silva et al., 2011). Στη βιβλιογραφία είναι γνωστά 32 είδη και 13 υποείδη του *Campylobacter*. Τα πιο σημαντικά είναι το *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) και το *Campylobacter coli* (*C. coli*) (Modi et al., 2015; Krutkiewicz, A., 2008). Έχουν τη δυνατότητα να επιβιώνουν σε συγκέντρωση CO₂ 10% και

σε O₂ 5%, συνεπώς θεωρούνται μικροαερόφιλα και με ιδανικές θερμοκρασίες 30°C έως 46°C (Bronnec et al., 2016; Wiczczyk & Osek, 2013; Chlebicz & Śliżewska., 2018).

2.2.4. *Listeria monocytogenes*

Η *Listeria* χωρίζεται σε δύο ομάδες, στη *Listeria sensu stricto* που διαθέτει τα είδη: *L. seelgeri*, *L. marthii*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. innocua* και τη δεύτερη ομάδα που ονομάζεται *Listeria sensu lato* και περιλαμβάνει 11 είδη. Μόνο η *L. monocytogenes* συγκαταλέγεται στα παθογόνα βακτήρια και είναι απειλητική για τον ανθρώπινο οργανισμό (Donovan, S., 2015; Orsi & Wiedmann.; 2016, den Bakker et al., 2014).

Η *L. monocytogenes* ανήκει στα θετικά κατά Gram, είναι αρνητική στην αντίδραση της υπεροξειδάσης ενώ είναι θετική στην καταλάση, θεωρείται αναερόβιος μικροοργανισμός και έχει σχήμα κινητού ραβδίου. Επιπλέον, δεν έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει σπόρια (Donovan, S., 2015). Αυτά τα βακτήρια είναι ικανά να επιβιώσουν σε ακραίες συνθήκες, όπως είναι η υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι, οι χαμηλές θερμοκρασίες (επιβιώνει στους 0°C), σε pH 4,4 -9,4 και τέλος σε ενεργότητα ύδατος 0,9 (Schäfer et al., 2017; McNeill, Sisson, & Jarrett., 2017; Osimani & Clementi., 2016; Chlebicz & Śliżewska., 2018).

2.2.5. *Escherichia coli*

Η *Escherichia coli* (*E.coli*) πρόκειται για ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο, με ραβδοειδές σχήμα που αναπτύσσεται σε αερόβιες ή προαιρετικά αερόβιες συνθήκες. Αποτελεί χαρακτηριστικό εκπρόσωπο των κολοβακτηριοειδών εντεροβακτηρίων και ενδημεί αποκλειστικά στον εντερικό σωλήνα των θερμόαιμων ζώων και του ανθρώπου. Για το λόγο αυτό, το είδος *Escherichia coli* αποτελεί δείκτη εντερικής μόλυνσης και συνθηκών υγιεινής των τροφίμων καθ' όλη τη διάρκεια επεξεργασίας και συντήρησής τους (Τυμπής Δ., Πετράκης Ελ., Κοντελής Σπ., 2016, σελ. 39-40).

Τα περισσότερα στελέχη της *E.coli* είναι αβλαβή, ωστόσο μερικά στελέχη είναι παθογόνα και προκαλούν διάρροια, αιματώδη ή μη (διαρροϊκή *E. coli*) και είναι αυτά τα οποία απασχολούν κυρίως την επιστήμη. Η διαρροϊκή *E.coli* με βάση τους τύπους των λοιμογόνων παραγόντων, τα κλινικά τους συμπτώματα και τους διαφορετικούς ορότυπους O:H, οι οποίοι προκύπτουν από τα τρία βασικά αντιγόνα επιφάνειας που εντοπίζονται στα στελέχη της *E.coli* (το O: σωματικό, το H: μαστιγιακό και το K: καψιδιακό), ταξινομείται σε συγκεκριμένες κατηγορίες (Πίνακας 6), οι οποίες είναι οι εξής: η εντεροπαθογόνος *E. coli* (EPEC), η εντεροτοξική *E. coli* (ETEC), η εντεροδιεισδυτική *E. coli* (EIEC), η εντεροδιαχεόμενη *E. coli* (DAEC), η εντεροσυσσωρευόμενη *E. coli* (EAEC) και η εντεροαιμορραγική *E. coli* (EHEC) (Allocati et al., 2013). Παρακάτω αναλύεται κυρίως ο τύπος της EHEC, που προκαλεί τις

σοβαρότερες ασθένειες αποτελώντας αντικείμενο μελέτης για την επιστήμη (Sahl et al., 2013).

Πίνακας 6 Παθογόνοι τύποι *E.coli* (Allocati et al., ‘*Escherichia coli* in Europe: an overview’.)

Pathotype (acronym)	Diseases	Symptoms	Virulence factors
Enteric <i>E.coli</i>			
Enteropathogenic <i>E. coli</i> (EPEC)	Diarrhoea in children	Watery diarrhoea and vomiting	Bfp, Intimin, LEE
Enterohaemorrhagic <i>E. coli</i> (EHEC)	Haemorrhagic colitis, HUS	Bloody diarrhoea	Shiga toxins, Intimin, Bfp
Enterotoxigenic <i>E. coli</i> (ETEC)	Traveler’s diarrhoea	Watery diarrhoea and vomiting	Heat-labile and sheat-stable toxins, CFAs
Enteraggregative <i>E. coli</i> (EAEC)	Diarrhoea in children	Diarrhoea with mucus and vomiting	AAFs, cytotoxins
Diffusely Adherent <i>E. coli</i> (DAEC)	Acute diarrhoea in children	Watery diarrhoea, recurring UTI	Daa, AIDA
Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)	Shigellosis-like	Watery diarrhoea; dysentery	Shiga toxin, hemolysin, Cellular invasion, Ipa

2.3. Τροφιμογενή νοσήματα

Η παρουσία παθογόνων βακτηρίων (*Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*) στα τρόφιμα έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση τροφικών δηλητηριάσεων στον ανθρώπινο οργανισμό. Η τροφική δηλητηρίαση γίνεται αντιληπτή με την εμφάνιση συμπτωμάτων όπως είναι η ναυτία, η διάρροια και ο εμετός. Ωστόσο, σε μερικούς οργανισμούς τα συμπτώματα μπορεί να είναι πιο σοβαρά και να περιλαμβάνουν παράλυση, διαταραχή νευρικού συστήματος και ηπατική ανεπάρκεια οδηγώντας πολύ συχνά σε θάνατο (Chlebicz & Śliżewska., 2018).

Στον Πίνακα 7 συνοψίζονται τα κυριότερα είδη παθογόνων βακτηρίων καθώς και οι τροφιμογενείς ασθένειες που προκαλούν.

Πίνακας 7 Παθογόνα βακτήρια και οι ασθένειες που προκαλούν

Είδη	Ασθένειες
<i>Salmonella spp.</i>	Σαλμονέλλωση
<i>Campylobacter jejuni</i>	Καμπυλοβακτηρίωση
<i>Listeria monocytogenes</i>	Λιστερίωση
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Γερσινίωση

2.3.1. Σαλμονέλλωση

Η σαλμονέλλωση είναι μια ασθένεια που προκαλείται από το βακτήριο *Salmonella* spp. Οι ορότυποι *Salmonella enteritidis* (*S. enteritidis*) και *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) οδηγούν σε λοίμωξη του γαστρεντερικού σωλήνα του ανθρώπου, επιπλέον επηρεάζουν τα ζώα δημιουργώντας τους ποικίλα συμπτώματα, όπως είναι ο τύφος στα ποντίκια, η διάρροια και η ανορεξία στα μοσχάρια (Costa et al., 2012; Wiedemann et al., 2015). Σαλμονέλλωση στον ανθρώπινο οργανισμό προκαλούν επίσης και οι ορότυποι *S. typhi* και *S. paratyphi A,B,C*, ενώ δεν επηρεάζουν την υγεία των ζώων.

Η σαλμονέλλωση μπορεί να οδηγήσει μέχρι και σε θάνατο, κυρίως σε παιδιά ηλικίας μικρότερης των 4 χρονών που έχουν καταναλώσει τρόφιμα μολυσμένα με τους ορότυπους *S. enteritidis* και *S. typhimurium* (Evangeloroulou et al., 2015; De Jong et al., 2012).

Η ασθένεια σαλμονέλλωση μπορεί να εμφανιστεί με 3 μορφές. Η πρώτη είναι η μη επεμβατική και μη τυφοειδής (υπεύθυνοι είναι όλοι οι ορότυποι της *Salmonella* εκτός από *S. typhi* και *S. paratyphi A,B,C*), προκαλεί κυρίως διάρροια, εμετό και ναυτία. Η δεύτερη είναι η επεμβατική και μη τυφοειδής (*S. typhimurium*, *S. enteritidis*), η οποία προκαλεί κυρίως πυρετό και δεν παρατηρείται διάρροια. Τέλος, η τρίτη μορφή είναι ο τυφοειδής πυρετός (*S. typhi*) και ο παρατυφοειδής πυρετός (*S. paratyphi A,B,C*) που μπορεί να οδηγήσει σε χρόνια ασθένεια και να προκαλέσει μέχρι και καρκίνο της χοληδόχου κύστης (Kurtz, Goggins, & McLachlan, 2017; Snider et al., 2014).

Η σαλμονέλλωση προκαλεί ποικίλα συμπτώματα, τα οποία σχετίζονται με τον ορότυπο που την προκάλεσε. Τα πιο κοινά είναι στομαχόπονος, πυρετός, απώλεια όρεξης, πονοκέφαλος και διάρροια ή δυσκοιλιότητα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα συμπτώματα μπορεί να είναι εντονότερα και να συμπεριλαμβάνουν αναπνευστικά προβλήματα, νευρολογικές αλλαγές, διάτρηση εντέρου καθώς και βλάβη σπλήνας (Fàbrega & Vila., 2013; Antillón et al., 2017). Εμφανίζονται μετά από 6 έως 72 ώρες και συνήθως δεν διαρκούν περισσότερο από 7 ημέρες (Fàbrega & Vila., 2013; Jiang et al., 2015; Jarvis et al., 2016).

Σύμφωνα με μελέτες η μολυσματική δόση που απαιτείται για να προκληθεί η ασθένεια στον ανθρώπινο οργανισμό είναι 10^6 - 10^8 μικροοργανισμοί του γένους *Salmonella*, βέβαια σε ορισμένες περιπτώσεις 10 μικροοργανισμοί αρκούν για να προκληθεί νόσηση (Antunes et al., 2016; Jarvis et al., 2016).

Τέλος, τα τρόφιμα που αποτελούν πηγή του βακτηρίου *Salmonella* είναι τα αβγά (Hurtado, Osejo, & Oporto., 2017), το χοιρινό, τα γαλακτοκομικά προϊόντα (Hurtado, Osejo,

& Oporto., 2017; Park et al., 2014; Pesciaroli et al., 2017; Sivaramalingam et al., 2013) και τα λαχανικά (Kore et al., 2017; Chlebicz & Śliżewska., 2018).

Στην Εικόνα 2.2 απεικονίζεται το βακτήριο *Salmonella* και ορισμένα τρόφιμα ευπαθή σε σαλμονέλλωση.



Εικόνα 2.2 Το παθογόνο βακτήριο *Salmonella* και τα τρόφιμα στα οποία εμφανίζεται (<https://www.ift.org/news-and-publications/food-technologymagazine/issues/2020/december/columns/food-safety-and-quality-salmonella-salmonellosis-and-produce>.), (https://medlabgr.blogspot.com/2011/11/blog-post_3.html), (<https://www.in.gr/2005/12/22/greece/salmonela-se-xoirino-kreas-apo-dania-kai-akataillios-kafes-apo-bietnam/>), (<https://www.reader.gr/yeia/155865/ayxanoy-poly-ton-kindyno-gia-salmonela-oi-syskevasmenes-salates-kommenon-lahanikon>), (<https://www.onmed.gr/yeia-eidhseis/story/374424/odigies-efet-pos-tha-xexorizete-an-ta-galaktokomika-poy-agorazete-ftiaxontai-apo-elliniko-gala>)

2.3.2. Γερσινίωση

Το βακτήριο *Yersinia enterocolitica* είναι υπεύθυνο για την ασθένεια που ονομάζεται γερσινίωση, η οποία προκαλείται έπειτα από κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου με το συγκεκριμένο βακτήριο. Η μολυσματική δόση έτσι ώστε να εκδηλωθεί η ασθένεια, είναι 10^8 - 10^9 μικροοργανισμοί *Yersinia enterocolitica*. Τα συμπτώματα εμφανίζονται συνήθως εντός διαστήματος 3-7 ημερών ή ακόμα και σε 1-11 ημέρες (Janowska et al., 2012; Rosner, Stark, & Werber., 2010). Συνήθως είναι ήπια και σε αυτά συγκαταλέγεται πυρετός και διάρροια. Σε σοβαρότερες περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσει σε μυοκαρδίτιδα, βακτηριαίμια, ηπατίτιδα (Dekker & Frank., 2015; Bottone et al., 2015). Ομάδες υψηλού κινδύνου είναι οι ηλικιωμένοι, τα παιδιά κάτω των 5 ετών και ανοσοκατασταλμένοι ασθενείς. Συνήθως, για την αντιμετώπιση της ασθένειας δεν απαιτείται νοσηλεία, ενώ για τα άτομα που ανήκουν στην ομάδα υψηλού κινδύνου προτείνεται αντιβιοτική θεραπεία.

Τέλος, γερσινίωση μπορεί να προκληθεί έπειτα από την κατανάλωση χοιρινού κρέατος, γαλακτοκομικών προϊόντων, θαλασσινών και ύδατος (Bursóna et al., 2017; Chlebicz & Śliżewska., 2018).

2.3.3. Καμπυλοβακτηρίωση

Η καμπυλοβακτηρίωση προκαλείται από το βακτήριο *Campylobacter jejuni* και απαιτούνται μόλις 800 μικροοργανισμοί για να προκληθεί η ασθένεια. Τα συμπτώματα εμφανίζονται σε

1 έως 7 ημέρες και περιλαμβάνουν διάρροια, κοιλιακό άλγος, αφυδάτωση, πυρετό και εμετό, έχοντας διάρκεια από 5 έως 7 ημέρες (Kaakoush et al., 2015; Schielke, Rosner, & Stark., 2014). Η ασθένεια εκδηλώνεται έπειτα από την κατανάλωση μολυσμένου βόειου κρέατος, πουλερικών και χοιρινού.

Τα είδη του βακτηρίου *Campylobacter* έχουν απομονωθεί επιπλέον από γαλακτοκομικά προϊόντα και λαχανικά (Erps et al., 2013; Newell et al., 2017). Στο χοιρινό κρέας αναπτύσσεται κυρίως το είδος *Campylobacter coli*, το οποίο προκαλεί επίσης την καμπυλοβακτηρίωση αλλά σε μικρότερη συχνότητα καθώς δεν παρουσιάζει αντοχή σε συνθήκες ξήρανσης και κατάψυξης. Στα υπόλοιπα τρόφιμα που αναφέρθηκαν επικρατεί το *Campylobacter jejuni* (Chlebicz & Śliżewska., 2018).

2.3.4. Λιστερίωση

Η λιστερίωση προκαλείται από το βακτήριο *Listeria monocytogenes* και προσβάλλει κυρίως άτομα σε ανοσοκαταστολή, ηλικιωμένους, εγκύους και βρέφη. Τα συμπτώματα της λιστερίωσης μπορούν να εμφανιστούν σε διάστημα από 1 έως 70 ημέρες περιλαμβάνοντας διάρροια, εμετό, πονοκέφαλο, υπνηλία, κοιλιακό άλγος και απώλεια όρεξης, ενώ η μολυσματική δόση που απαιτείται για να εκδηλωθεί η ασθένεια δεν έχει διευκρινιστεί. Σε περίπτωση νόσησης με λιστερίωση κατά τη διάρκεια εγκυμοσύνης μπορεί να προκληθεί αποβολή του εμβρύου και στα νεογνά μηνιγγίτιδα, πνευμονία και σήψη (Zhu, Gooneratne, & Hussain., 2017).

Η κύρια αιτία της λιστερίωσης είναι η κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων με το βακτήριο *Listeria monocytogenes*. Χαρακτηριστικά παραδείγματα τροφίμων που αποτελούν πηγή του βακτηρίου είναι τα λαχανικά και τα ψάρια (Gambarin et al., 2012). Τέλος, η λιστερίωση οδηγεί σε μεγάλο ποσοστό σε θνητότητα (Rothrock et al., 2017; Tahoun et al., 2017). Συγκεκριμένα, στην Ελλάδα για το διάστημα 2004-2020 η θνητότητα ήταν 23,6%, με παρόμοια ποσοστά να καταγράφονται και σε άλλες Ευρωπαϊκές χώρες (<https://eody.gov.gr/>) (Chlebicz & Śliżewska, 2018).

2.3.5. Παθογένειες της εντεροαιμοραγικής *E.coli* (EHEC)

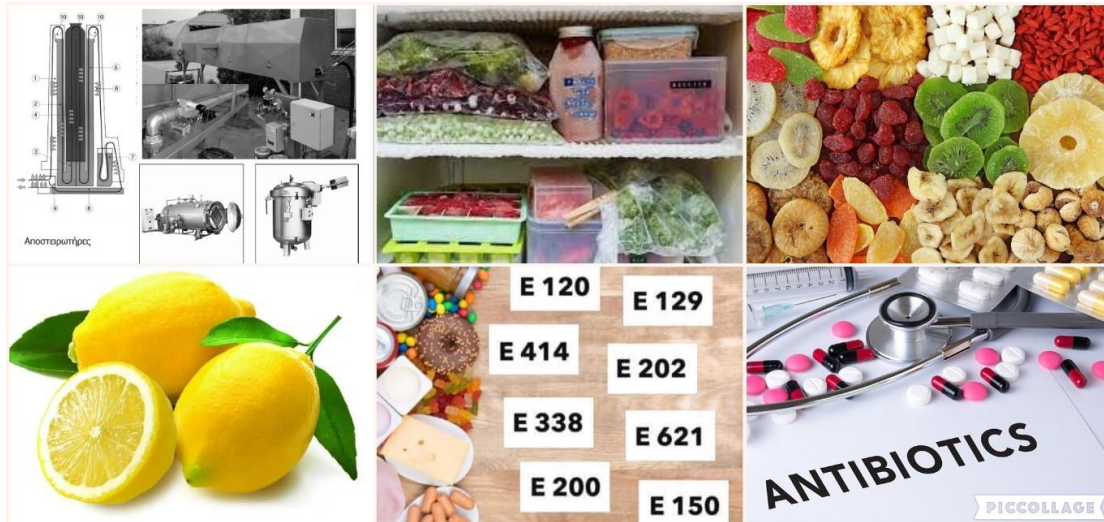
Τα εντεροαιμοραγικά κολοβακτηρίδια ευθύνονται για τα περισσότερα περιστατικά γαστρεντερίτιδας που εκδηλώνονται στις ανεπτυγμένες χώρες. Τα πιο σημαντικά παθογόνα στελέχη της EHEC είναι εκείνα του ορότυπου O157:H7, ο οποίος αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά το 1982. Η προσβολή γίνεται κυρίως μέσω της κατανάλωσης ωμού μοσχαρίσιου κιμά, άλλων παρασκευασμάτων κρέατος (π.χ. λουκάνικων), μη παστεριωμένου γάλακτος αλλά και λαχανικών, χυμών και σε μικρότερο ποσοστό με την κατανάλωση πόσιμου νερού.

Τα πιο συχνά συμπτώματα των EHEC στελεχών στον ανθρώπινο οργανισμό, είναι το κοιλιακό άλγος και η διάρροια που συνοδεύεται με αιμορραγία (αιμορραγική κολίτιδα). Έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις ασθένειας ακόμα και με την παρουσία λιγότερων των 100 κυττάρων (Kaper J. et al., 2004). Ακόμα μία σοβαρή επιπλοκή των στελεχών αυτών είναι η εμφάνιση του αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου (haemolytic uremic syndrome – HUS), το οποίο σχετίζεται με οξεία νεφρική ανεπάρκεια, θρομβοκυτταροπενία και μικροαγγειοπαθητική αιμολυτική αναιμία, κυρίως σε παιδιά. Ο βασικός παράγοντας λοιμογόνου δράσης για την EHEC είναι οι Stxs (Shiga-toxins), οι οποίες είναι επίσης γνωστές ως βεροκυτοτοξίνες (verocytotoxin-VT) και έχουν πάρει το όνομά τους από την Stx που παράγει η *Shigella dysenteriae*, λόγω της ομοιότητάς τους, και προσβάλλουν τα κύτταρα των νεφρών.

2.4. Αντιμετώπιση

Για την καταπολέμηση των ασθενειών που προκαλούνται από τη δράση παθογόνων βακτηρίων έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές. Σημαντικό ρόλο λαμβάνει η θερμική επεξεργασία των τροφίμων, καθώς με την αύξηση της θερμοκρασίας επιτυγχάνεται η καταστροφή των παθογόνων βακτηρίων. Επιπλέον διαδικασίες που περιορίζουν τη δράση τους είναι οι ακόλουθες: ψύξη, κατάψυξη, μείωση pH τροφίμου, μείωση ενεργότητας ύδατος μέσω συμπύκνωσης ή αφυδάτωσης και χρήση χημικών συντηρητικών (Εικόνα 2.3). Πολλές όμως από τις παραπάνω διεργασίες έχουν ως συνέπεια την υποβάθμιση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών των τροφίμων, όπως είναι η αλλοίωση της υφής, της γεύσης, του χρώματος και η καταστροφή ορισμένων θρεπτικών συστατικών (βιταμίνες), με αποτέλεσμα την παραγωγή προϊόντων κατώτερης ποιότητας τα οποία είναι μη αποδεκτά από τους καταναλωτές (Mahmud & Khan., 2018; Pisoschi et al., 2018; Batiha et al., 2021; Rawat, S., 2015).

Τα αντιβιοτικά αποτελούν εξίσου μια καλή μέθοδο αντιμετώπισης των ασθενειών που οφείλονται σε παθογόνα βακτήρια, ωστόσο η αλόγιστη κατανάλωση τους είχε ως συνέπεια την ανάπτυξη πολυανθεκτικών παθογόνων βακτηρίων στα αντιβιοτικά (Λιακόπουλος., 2009).



Εικόνα 2.3 Μέθοδοι αντιμετώπισης βακτηρίων: Χρήση αποστειρωτήρων για την εφαρμογή θερμικής επεξεργασίας (<https://opencourses.ionio.gr/modules/document/file.php/DF0111/lecture%20%CE%9A%CE%9F%CE%9D%CE%A3%CE%95%CE%A1%CE%92%CE%9F%CE%A0%CE%9F%CE%99%CE%97%CE%A3%CE%97.pdf>), Εφαρμογή χαμηλών θερμοκρασιών με Ψύξη-Κατάψυξη (<http://garcinia-cambogia.gr/trofima-ston-katapsykth/>), Μείωση ενεργότητας ύδατος με αφυδάτωση (Φρούτα) (<https://www.proionta-tis-fisis.com/7-apoxiramea-frouta-pou-mas-giatrevoun/>), Μείωση pH (μέσω προσθήκης λεμονιού) (<https://pharmagel.gr/i-evergetiki-drasi-tou-lemonioy-stin-ygeia/>), Προσθήκη χημικών συντηρητικών (<https://meygeia.gr/prostheta-trofimon-yparchoun/>), Προσθήκη αντιβιοτικών (https://atlantea.News/antiviotika_filoi_i_exthroi_mas/)

Συνεπώς, λόγω των μειονεκτημάτων που αναφέρθηκαν, έχει δημιουργηθεί η ανάγκη εύρεσης νέων τεχνολογιών με στόχο την αντιμετώπιση των τροφιμογενών νοσημάτων, όπως είναι η χρήση φυσικών ενώσεων με αντιμικροβιακές ιδιότητες (Abdelhamid & El-Dougdoug., 2020).

Οι φυσικές ενώσεις δύναται να είναι φυτικής ή ζωικής προέλευσης ή ακόμα μπορεί να προέρχονται από μικροοργανισμούς, προσφέροντας τη δυνατότητα μείωσης των παθογόνων μικροοργανισμών και τη διατήρηση της ποιότητας των τροφίμων (Abdelhamid & El-Dougdoug., 2020).

Στις φυσικές ενώσεις φυτικής προέλευσης περιλαμβάνονται κυρίως τα αιθέρια έλαια, τα μπαχαρικά και ορισμένα βότανα. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ολόκληρα, αλεσμένα ή σε ενθυλακωμένη μορφή (Embuscado et al., 2015; Srinivasan et al., 2014). Λόγω της παρουσίας φαινολικών οξέων, τανινών, φλαβονοειδών και τερπενοειδών διαθέτουν αντιμικροβιακή και ταυτόχρονα αντιοξειδωτική ικανότητα (Lucera et al., 2012; Tajkarimi, Ibrahim, & Cliver., 2010; Pisoschi et al., 2018). Έπειτα από μελέτη, σε παθογόνα βακτήρια που αναπτύσσονται σε άψητο χοιρινό (αποθηκευμένο στους 20 °C για 9 ημέρες), η προσθήκη εκχυλίσματος γαρύφαλλου είχε ως αποτέλεσμα την ελάττωση των παθογόνων μικροοργανισμών (Shan et al., 2009), συνεπώς αποτελεί εναλλακτικό τρόπο για τη συντήρηση κρέατος και την αποφυγή χρήσης χημικών συντηρητικών. Τα αιθέρια έλαια παρέχουν επίσης φυσικές ενώσεις με ανασταλτική δράση κατά των τροφιμογενών

παθογόνων βακτηρίων (Mendonca et al., 2018; Shan et al., 2009). Ορισμένα παραδείγματα είναι τα αιθέρια έλαια(essential oils) γλυκόριζας και δεντρολίβανου που αναστέλλουν την ανάπτυξη των *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus sake*, *Pseudomonas fluorescens* και *Escherichia coli*, όπως και οι φυσικές ενώσεις θυμόλη, μενθόλη, καρβακρόλη και γερανιόλη που αναστέλλουν τη δράση των *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Shigella flexneri* και *Shigella sonnei* (Batiha et al., 2021).

Στον Πίνακα 8 παρατίθενται επιπλέον περιπτώσεις αιθέριων ελαίων με ανασταλτική δράση ενάντια βακτηρίων.

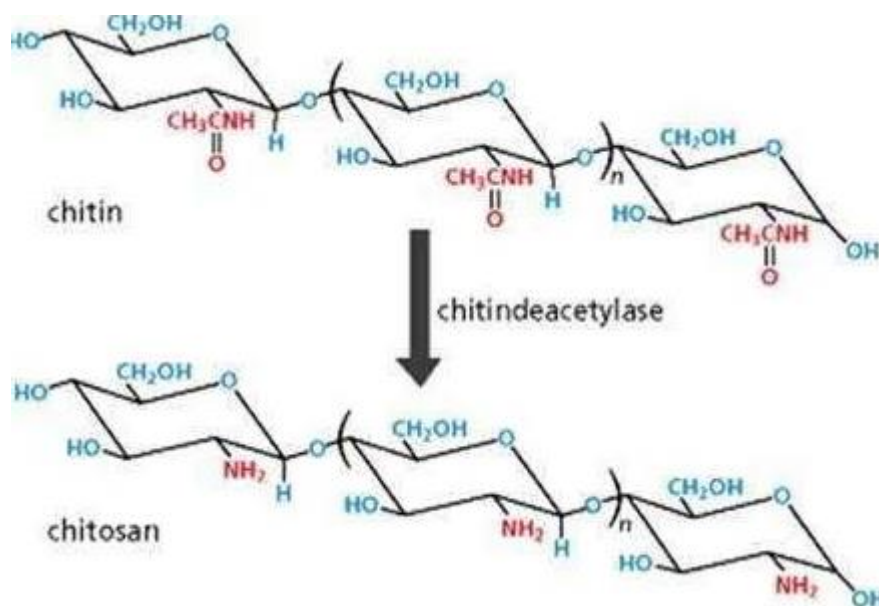
Πίνακας 8 Φυσικές ενώσεις και οι μικροοργανισμοί που αναστέλλουν

Φυσικές ενώσεις	Μικροοργανισμοί	Αναφορές
Αιθέρια έλαια σκόρδου	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. typhimurium</i>	Gyawali & Ibrahim, 2014
Αιθέρια έλαια κανέλας (σε χυμό μήλου)	<i>L. monocytogenes</i>	Cava et al., 2007
Αιθέριο έλαιο δεντρολίβανου (σε κιμά)	<i>C.jejuni</i>	Piskernik et al., 2011
Αιθέρια έλαια δάφνης (σε τυρί)	<i>L. monocytogenes</i>	Khorshidian et al., 2018; Smith-Palmer et al., 2001

Εκτός όμως από τις ενώσεις φυτικής προέλευσης, υπάρχουν και αυτές της ζωικής. Είναι κυρίως πρωτεΐνες και ένζυμα, όπως η λακτοπεροξειδάση, λακτοφερίνη και η λυσοζύμη. Η αντιμικροβιακή τους ικανότητα βασίζεται στην καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων (Tiwari et al., 2009) με συνέπεια τον θάνατο τους (Pisoschi et al., 2018; Batiha et al., 2021).

Η χιτίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που βρίσκεται φυσικά στο κέλυφος του καβουριού, της γαρίδας και της καραβίδας. Έπειτα από τη διεργασία της αποακετυλίωσης της λαμβάνεται η χιτοζάνη η οποία διαθέτει αντιμικροβιακή δράση έναντι ορισμένων βακτηρίων. Σύμφωνα με μελέτες παρέχει τη δυνατότητα αναστολής των βακτηρίων γαλακτικού οξέος, *Pseudomonas* spp., *Brochothrixther mospacta*, *Enterobacteriaceae* και γενικά μπορεί να περιορίσει τη συνολική μικροβιακή χλωρίδα του τροφίμου (Soultos et al., 2008). Η χιτοζάνη έχει χρησιμοποιηθεί ως βρώσιμο φιλμ σε φρούτα με σκοπό την αύξηση της διάρκειας ζωής τους (Jiang & Li., 2001) και σε Ελληνικά χοιρινά λουκάνικα σε συγκέντρωση 1% για την προστασία από μικροβιακή αλλοίωση (Soultos et al., 2008; Lucera et al., 2012).

Στην Εικόνα 2.4 απεικονίζεται η δομή της χιτοζάνης.



Εικόνα 2.4 Δομή χιτοζάνης (<http://gr.pioneerbiotech.com/info/want-to-know-more-about-chitosan-51824623.html>)

Άλλο ένα φυσικό συστατικό για την αναστολή των παθογόνων βακτηρίων είναι η λυσοζύμη, η οποία είναι ένα ένζυμο που λαμβάνεται από το γάλα και τα αυγά. Η αντιμικροβιακή της ικανότητα οφείλεται στη δυνατότητα υδρόλυσης β-1,4 δεσμών ανάμεσα σε N-ακετυλομουραμικού οξέος και N-ακετυλογλυκοζαμίνης, τα οποία αποτελούν συστατικά του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος (Cunningham et al., 1991). Έρευνες έχουν δείξει ότι είναι αρκετά αποδοτική σε βακτήρια όπως: *Listeria monocytogenes*, *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus spp.* και *Clostridium tyrobutyricum* (Davidson et al., 2013). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η παρεμπόδιση της δράσης του *Clostridium tyrobutyricum* σε ημίσκληρα τυριά, έπειτα από προσθήκη λυσοζύμης (Pellegrino & Tirelli., 2000; Lucera et al., 2012; Batiha et al., 2021).

Στην ίδια κατηγορία ανήκουν η λακτοφερίνη και η λακτοπεροξειδάση, οι οποίες είναι πρωτεΐνες που λαμβάνονται από το αγελαδινό γάλα. Η λακτοπεροξειδάση είναι αρκετά αποδοτική για τα βακτήρια *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* και τα *Coliforms*, το ίδιο και η λακτοφερίνη για τα *E. coli*, *Klebsiella* και *L. Monocytogenes* (Gyawali & Ibrahim., 2014; Batiha et al., 2021).

Επιπλέον, ορισμένοι ωφέλιμοι μικροοργανισμοί, όπως είναι τα γαλακτικά βακτήρια (LAB) έχουν τη δυνατότητα να παράγουν ορισμένες ενώσεις με αντιμικροβιακή δράση (Ghanbari et al., 2013). Σε αυτή την κατηγορία ανήκει η νισίνη, η οποία παράγεται από κάποια στελέχη *Lactococcus lactis*. Η δράση της νισίνης βασίζεται στην αναστολή των ανεπιθύμητων βακτηρίων μέσω της διατάραξης της κυτταρικής τους μεμβράνης με αποτέλεσμα την αποβολή ενδοκυτταρικών συστατικών και την αναστολή των βασικών

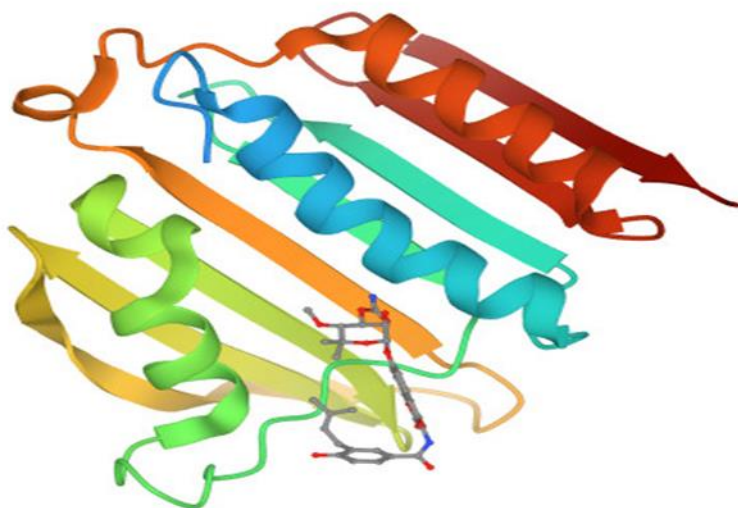
διεργασιών του κυττάρου (Bauer & Dicks., 2005). Η αντιμικροβιακή της ικανότητα είναι αποδοτική για τα θετικά κατά Gram βακτήρια και κυρίως για τα βακτήρια: *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*(Brewer, Adams, & Park., 2002; López-Pedemonte et al., 2003). Έχει εφαρμοστεί σε κονσερβοποιημένα τρόφιμα, γαλακτοκομικά προϊόντα, κρέας και προϊόντα ψαριών (Ross et al., 2002; Batiha et al., 2021; Lucera et al., 2012).

Τέλος, τα οργανικά οξέα όπως το οξικό, το προπιονικό και το γαλακτικό οξύ διαθέτουν επίσης αντιμικροβιακή δράση. Παρέχουν βακτηριοκτόνο και βακτηριοστατική δράση καθώς μειώνουν το pH, συσσωρεύουν ανιόντα μέσα στο κύτταρο του μικροοργανισμού, εμποδίζουν τη μεταφορά θρεπτικών ουσιών και διαταράσσουν την κυτταρική μεμβράνη με συνέπεια το βακτηριακό κύτταρο να μην εκτελεί σωστά τις βασικές του λειτουργίες και να καταστρέφεται (Ricke et al., 2003; Lucera et al., 2012).

2.5. Πρωτεϊνικοί στόχοι εμπλεκόμενοι σε αντιβακτηριακούς μηχανισμούς

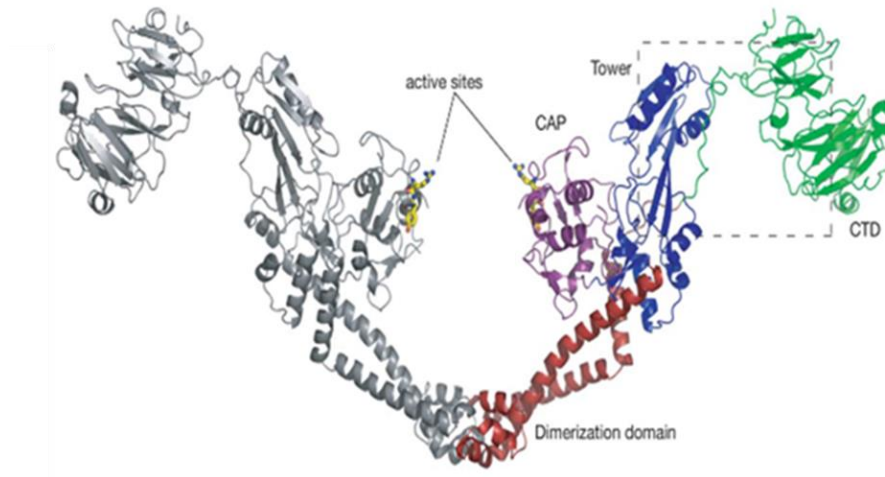
Τοποϊσομεράση IV

Η Τοποϊσομεράση IV ανήκει στις Τοποϊσομεράσες τύπου II, είναι ομόλογο της DNAγυράσης (DNA gyrase) και αποτελεί έναν σημαντικό πρωτεϊνικό στόχο για την εύρεση αντιβακτηριακών φαρμάκων (Εικόνα 2.5). Χρησιμοποιεί την ελεύθερη ενέργεια που προέρχεται από την υδρόλυση του ATP (Τριφωσφορική αδενοσίνη) για την κατάλυση τοπολογικών μεταβολών στο γονιδίωμα του βακτηρίου (Bellon et al., 2004).

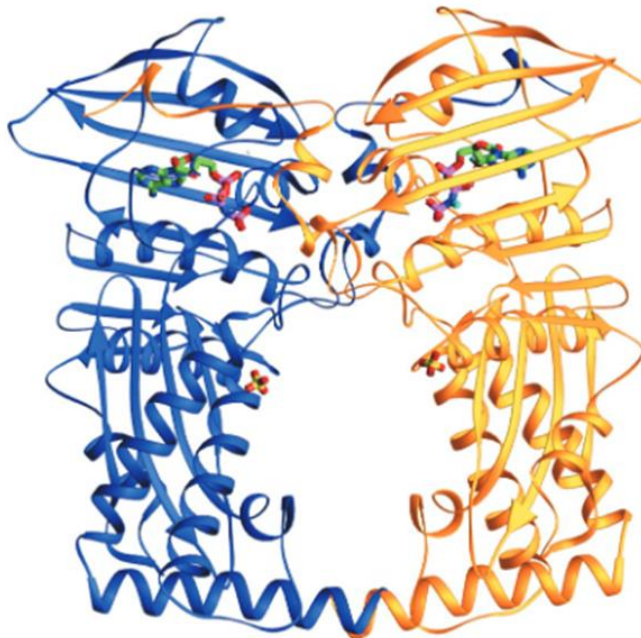


Εικόνα 2.5 Τριδιάστατη απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής της Τοποϊσομεράσης IV συμπλοκοποιημένη με τον αναστολέα νοβοβιοκίνη (<https://www.rcsb.org/structure/1s14>)

Διαθέτει τις υπομονάδες, ParC και ParE, οι οποίες παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.6 και στην Εικόνα 2.7, αντίστοιχα (Hoshino et al., 1994; Peng & Marians., 1993). Η υπομονάδα ParC είναι υπεύθυνη για τη διέλευση του DNA και δομείται από 752 αμινοξέα (83,7 kDa) στο βακτήριο *E.coli* (Berlyn, Low, & Rudd., 1996; Peng & Marians., 1993), ενώ η υπομονάδα ParE περιλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης του ATP και αποτελείται από 630 αμινοξέα (70,2 kDa) (Berlyn, Low, & Rudd., 1996; Peng & Marians., 1993).



Εικόνα 2.6 Τριδιάστατη απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής της υπομονάδας ParC της Τοποϊσομεράσης IV (Corbett et al., 2005)

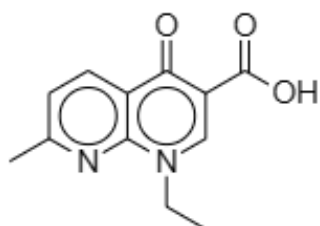


Εικόνα 2.7 Τριδιάστατη απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής της υπομονάδας ParE της Τοποϊσομεράσης IV συμπλοκοποιημένη με ADPNP (Bellon et al., 2004)

Η βασική λειτουργία της Τοποϊσομεράσης IV στο βακτηριακό κύτταρο είναι ο διαχωρισμός των θυγατρικών συνδεδεμένων χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA και αποτελεί κρίσιμο σημείο για την επιβίωση του μικροοργανισμού (Levine et al., 1998). Το ένζυμο αυτό έχει απομονωθεί από τους μικροοργανισμούς *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus*. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η Τοποϊσομεράση IV είναι ομόλογο ένζυμο της DNAγυράσης, συνεπώς προσφέρεται η δυνατότητα για διπλή στόχευση των πρωτεϊνών από αντιβακτηριακές ενώσεις και μειώνεται η πιθανότητα να παρουσιαστεί ανθεκτικότητα σε αυτές (Gjorgjieva et al., 2016).

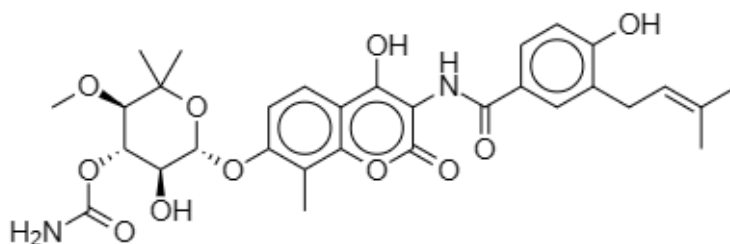
Αντιβακτηριακές ιδιότητες έναντι της Τοποϊσομεράσης IV διαθέτουν οι φυσικές ενώσεις που ανήκουν στην κατηγορία των κουμαρινών, οι οποίες πρώτη φορά απομονώθηκαν από τον μύκητα *Streptomyces* (Hoeksema et al., 1955; Hinman et al., 1956) και οι κινολόνες οι οποίες αποτελούν συνθετικά φάρμακα. Το σημείο στόχευσης των κινολόνων (ναλιδιξικό οξύ, οξολινικό οξύ) είναι η υπομονάδα ParC, σε αντίθεση με το σημείο στόχευσης των κουμαρινών που είναι η υπομονάδα ParE (Gjorgjieva et al., 2016).

Στην Εικόνα 2.8 παρουσιάζεται η δομή του ναλιδιξικού οξέος.

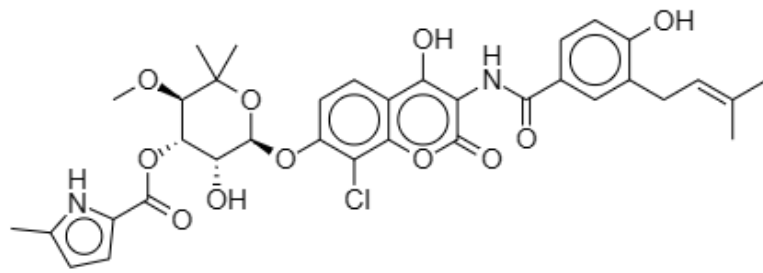


Εικόνα 2.8 Χημική δομή του ναλιδιξικού οξέος

Χαρακτηριστικά παραδείγματα κουμαρινών είναι η νοβοβοκίνη (Εικόνα 2.9) και η χλωροβοκίνη (Εικόνα 2.10). Η δράση τους οφείλεται στη δυνατότητα να καταλαμβάνουν τη θέση πρόσδεσης ATP (Sugino et al., 1977; Gellert et al., 1977). Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι το ένζυμο Τοποϊσομεράση IV συνιστά έναν ιδανικό στόχο για την αναστολή τροφιογενών βακτηρίων με τη βοήθεια φυσικών ενώσεων (Bellon et al., 2004; Drlica et al., 1997).



Εικόνα 2.9 Χημική δομή της νοβοβοκίνης



Εικόνα 2.10 Χημική δομή της χλωροβιοκίνης

Κεφάλαιο 3: Υπολογιστικά εργαλεία Εικονικής Σάρωσης

3.1. Εισαγωγή

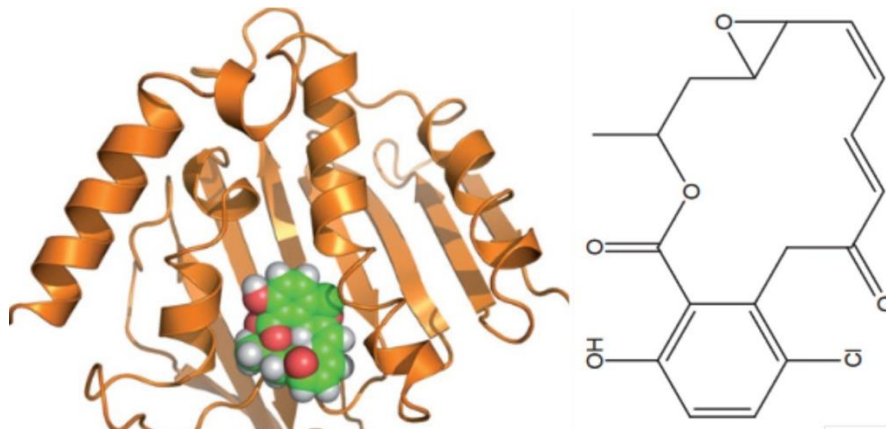
Τα υπολογιστικά εργαλεία εικονικής σάρωσης αποτελούν μια σημαντική συνδυαστική τεχνική που αποσκοπεί στην ανακάλυψη νέων και αποτελεσματικότερων ενώσεων έναντι ποικίλων βιολογικών στόχων (Von Itzstein et al., 1993, Varney et al., 1992). Τα εργαλεία αυτά συνιστούν σημαντικό κομμάτι της εξέλιξης της τεχνολογίας καθώς στηρίζονται στη χρήση ηλεκτρονικών υπολογιστών.

Μέσω των υπολογιστικών εργαλείων εικονικής σάρωσης παρέχεται η δυνατότητα πρόβλεψης ενώσεων (φυσικών ή συνθετικών), οι οποίες εν δυνάμει προσδένονται στο βιολογικό στόχο που έχει επιλεχθεί να μελετηθεί. Συγκεκριμένα, εξετάζεται η ικανότητα πρόσδεσης φυσικών ή χημικών ενώσεων στην πρωτεΐνη στόχο ενδιαφέροντος. Στη συνέχεια, εφόσον προβλεφθεί η ένωση που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ικανότητα πρόσδεσης στον εξεταζόμενο στόχο μπορεί να αγοραστεί και να μελετηθεί πειραματικά (Shen et al., 2003; Shoichet et al., 2004).

Το βασικότερο πλεονέκτημα των υπολογιστικών τεχνικών είναι η ταυτόχρονη μελέτη βιβλιοθηκών μορίων που περιέχουν πληθώρα ενώσεων, στο βιολογικό στόχο που εξετάζεται, με αποτέλεσμα τη μείωση του κόστους (Eringis et al., 2002). Χαρακτηριστικά παραδείγματα ανακάλυψης νέων φαρμάκων, με χρήση υπολογιστικών εργαλείων εικονικής σάρωσης είναι:

- 1) Η ανακάλυψη του αναστολέα της νευραμινιδάσης (ένζυμο του ιού της γρίπης), ζαναμιβίρη (zanamivir) το οποίο εγκρίθηκε το 1999 και είναι γνωστό με την εμπορική ονομασία Relenza (Von Itzstein et al., 2007; Κρίτση, 2017; Shoichet et al., 2004) και
- 2) Οι φυσικές ενώσεις ραδισικόλη (radicicol) και αμυγδαλίνη (amygdalin), οι οποίες διαθέτουν ανασταλτική δράση σε διάφορα στελέχη του βακτηρίου *Staphylococcus aureus*.

Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η δράση της ραδισικόλης στο βιολογικό στόχο GyrB ATPase (Εικόνα 3.1) ενώ για την αμυγδαλίνη χρησιμοποιήθηκε ο βιολογικός στόχος tyrosyl-tRNA συνθετάση (Εικόνα 3.2), όπου παρατηρήθηκε υψηλή συγγένεια πρόσδεσης και στις δυο περιπτώσεις (Zang et al., 2016).



Εικόνα 3.1 Αριστερά: Τριδιάστατη απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής της GyrB-ATPase συμπλοκοποιημένη με τη ραδισκόλη (πράσινο χρώμα), Δεξιά: Η χημική δομή της ραδισκόλης (Zang et al., 2016)



Εικόνα 3.2 (Αριστερά) Η χημική δομή της αμυγδαλίνης, (Δεξιά) Τριδιάστατη απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής της tyrosyl-tRNA συνθετάσης συμπλοκοποιημένη με αμυγδαλίνη (Zang et al., 2016)

Συμπερασματικά, τα υπολογιστικά εργαλεία κατέχουν σημαντικό ρόλο στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων για την καταπολέμηση χρόνιων ή μη ασθενειών, καθώς παρέχουν τη δυνατότητα πρόβλεψης της συγγένειας πρόσδεσης μεταξύ του βιολογικού στόχου που εξετάζεται και των ενώσεων των βιβλιοθηκών που έχουν επιλεγεί να μελετηθούν. Με αποτέλεσμα, τον εντοπισμό της ένωσης που δεσμεύεται ισχυρότερα στον στόχο, η οποία δύναται να αγοραστεί και να εφαρμοστούν *in vitro* δοκιμές, για να επιβεβαιωθεί η δράση της ως αναστολέα της πρωτεΐνης-στόχου. Η μέθοδος αυτή, διευκολύνει τους ερευνητές εφόσον μειώνεται ο απαιτούμενος χρόνος και το κόστος της έρευνας (Shoichet et al., 2004).

Τέλος, τα υπολογιστικά εργαλεία εικονικής σάρωσης είναι μια χρήσιμη μέθοδος εύρεσης φυσικών ενώσεων με αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι ενός πρωτεϊνικού στόχου. Σύμφωνα με το παράδειγμα που αναφέρθηκε οι φυσικές ενώσεις ραδισκόλη και

αμυγδαλίνη διαθέτουν αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Staphylococcus aureus* καθώς έχουν υψηλή συγγένεια πρόσδεσης με τα αντίστοιχα ένζυμα GyrB-ATPase και tyrosyl-tRNA συνθετάση (Zang et al., 2016).

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία αναζητούνται φυσικές ενώσεις με αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι του ενζύμου Τοποϊσομεράση IV της *Escherichia coli*.

3.2. Βιβλιοθήκες Φυσικών ενώσεων

Για τη διευκόλυνση των ερευνητών έτσι ώστε η χρήση της εικονικής σάρωσης να είναι αμεσότερη υπάρχουν διαθέσιμες αρκετές βιβλιοθήκες ενώσεων με ελεύθερη πρόσβαση μέσω διαδικτύου.

Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει στραφεί προς τις φυσικές ενώσεις καθώς διαθέτουν αρκετά πλεονεκτήματα. Αρχικά, βρίσκονται σε μεγάλο αριθμό στη φύση, συγκεκριμένα από το φυτικό βασίλειο έχουν απομονωθεί τουλάχιστον 500,000 ενώσεις (Demain et al., 2005) μέχρι σήμερα, αρκετές εκ των οποίων είναι γνωστές για τις αντιμικροβιακές και φαρμακευτικές τους ιδιότητες. Τέλος, η ανάγκη των καταναλωτών για φυσικά και ασφαλή προϊόντα και η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά έχει ενισχύσει αυτή την τάση (Lucera et al., 2012). Για αυτούς τους λόγους εκτός από τις βιβλιοθήκες συνθετικών χημικών ενώσεων έχουν δημιουργηθεί και βιβλιοθήκες που περιλαμβάνουν φυσικές ενώσεις, όπως είναι η βιβλιοθήκη Specs (<https://www.specs.net/>).

Στη συνέχεια, περιγράφεται η αναγκαία προετοιμασία για τη χρήση των βιβλιοθηκών στην εικονική σάρωση. Βασικό σημείο αποτελεί η μορφή των αρχείων. Συνήθως οι ενώσεις είναι αποθηκευμένες με τη μορφή αρχείων .SDF ή .SMILE. Τα αρχεία .SMILE, που χρησιμοποιούνται ευρέως, είναι αρχεία τα οποία απεικονίζουν την ένωση σε δισδιάστατη μορφή. Επομένως, απαραίτητο βήμα είναι η μετατροπή τους σε τριδιάστατη μορφή μέσω εφαρμογής προγραμμάτων μοριακής μοντελοποίησης, ώστε να είναι δυνατή η επεξεργασία τους. Επίσης, ορισμένες επιπλέον διαδικασίες που εφαρμόζονται είναι η πρωτονίωση των οξέων και η αποπρωτονίωση των βάσεων στο βέλτιστο pH του στόχου που εξετάζεται. Στη συνέχεια, η βιβλιοθήκη που έχει επιλεγεί είναι έτοιμη για χρήση (Irwin & Shoichet et al., 2005).

3.3. Πρόβλεψη Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων

Ιδιαίτερη σημασία δίνεται στην πρόβλεψη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ενώσεων που περιλαμβάνονται στις βιβλιοθήκες. Σύμφωνα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες οι ενώσεις μπορούν να διακριθούν σε ενώσεις-οδηγούς και σε φάρμακα. Η διάκριση αυτή πραγματοποιείται σύμφωνα με το εύρος τιμών που έχει οριστεί έπειτα από μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων ορισμένων φαρμάκων από τον Lipinski. Συγκεκριμένα, οι ιδιότητες

που εξετάζονται είναι το μοριακό βάρος, η λιποφιλικότητα, ο αριθμός των δοτών δεσμού υδρογόνου και των δεκτών δεσμού υδρογόνου. Σύμφωνα με τον Lipinski όταν οι παραπάνω φυσικοχημικές ιδιότητες κυμαίνονται σε συγκεκριμένες τιμές, τότε η απορρόφηση της ένωσης από τον οργανισμό είναι ισχυρότερη. Σε αυτή τη διαδικασία δόθηκε η ονομασία «κανόνας των 5» καθώς τα όρια των τιμών είναι όλα πλησίον του 5 ή σε πολλαπλάσιο αυτού.

Παρακάτω αναγράφονται τα εύρη τιμών των παραπάνω φυσικοχημικών ιδιοτήτων στα οποία μια ένωση παρουσιάζει αυξημένη πιθανότητα να είναι φάρμακο (Oprea., 2002):

1. Δότες δεσμού υδρογόνου < 5
2. Μοριακό βάρος < 500
3. Λιποφιλικότητα < 5
4. Δέκτες δεσμού υδρογόνου < 10

Παραδείγματα λογισμικών για την πρόβλεψη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων είναι το Qikprop της πλατφόρμας Maestro και το SwissADME (Κρίτση, 2017; Oprea, 2002; Lipinski et al., 1997).

3.4. Μοριακή Πρόσδεση (Molecular Docking)

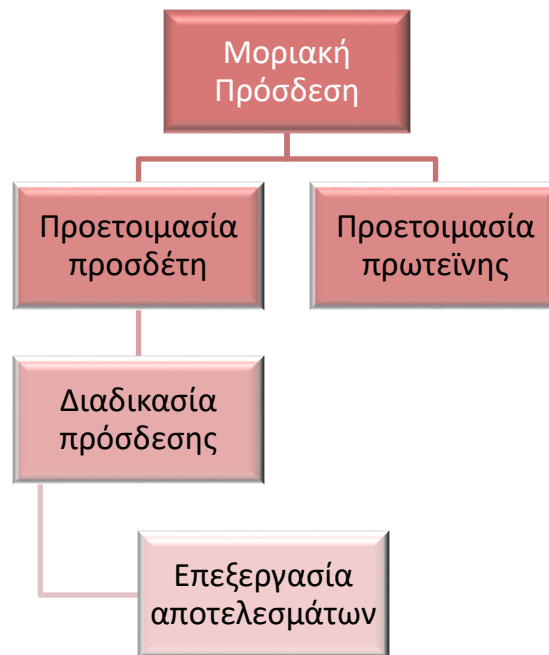
3.4.1. Εισαγωγή

Η μοριακή πρόσδεση αποτελεί μια τεχνική προσομοίωσης σε υπολογιστή, η οποία έχει ως στόχο να προσδιορίσει αν υπάρχει συγγένεια πρόσδεσης ανάμεσα σε έναν εν δυνάμει προσδέτη και σε μια πρωτεΐνη-στόχο, καθώς επίσης και τον τρόπο με τον οποίο προσδένονται. Ουσιαστικά, η μοριακή πρόσδεση επιτρέπει την εύρεση του καλύτερου προσανατολισμού ανάμεσα στον υποδοχέα και τον προσδέτη, έτσι ώστε να προκύψει η μέγιστη συμπληρωματικότητα (Morris & Lim-Wilby., 2008). Το παραπάνω επιτυγχάνεται με τη δημιουργία διαφορετικών τρόπων πρόσδεσης (poses) των εξεταζόμενων μορίων, τον υπολογισμό των βαθμών ελευθερίας του προσδέτη όταν βρίσκεται δεσμευμένος με το στόχο και τέλος τη συνάρτηση βαθμολόγησης που υπολογίζει την ενέργεια πρόσδεσης (Κρίτση., 2017). Ένα αξιόπιστο πρόγραμμα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εφαρμογή της μοριακής πρόσδεσης είναι το GLIDE (Chen et al., 2006; Fan et al., 2019).

3.4.2. Διάγραμμα ροής Μοριακής πρόσδεσης

Στην πραγματικότητα η μοριακή πρόσδεση δεν αποτελείται μόνο από ένα στάδιο αλλά απαρτίζεται από τα εξής βήματα: Προετοιμασία προσδετών, προετοιμασία πρωτεΐνης, διαδικασία πρόσδεσης και τέλος επεξεργασία αποτελεσμάτων (Sastry et al., 2013).

Παρακάτω απεικονίζεται το διάγραμμα ροής που αντιστοιχεί στη διαδικασία της μοριακής πρόσδεσης (Σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1 Διάγραμμα ροής Μοριακής Πρόσδεσης.

3.4.3. Προετοιμασία Πρωτεΐνης

Εφόσον επιλεχθεί η πρωτεΐνη-στόχος, μπορεί να ληφθεί η κρυσταλλική της δομή από την πρωτεϊνική βάση δεδομένων (Protein Data Bank - PDB). Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη επεξεργάζεται κατάλληλα καθώς εντοπίζονται συνήθως ορισμένα σφάλματα.

Τα συνηθέστερα βήματα που ακολουθούνται περιλαμβάνουν:

1. Τη συμπλήρωση των υδρογόνων και των δεσμών.
2. Την αναγνώριση κάθε ομάδας ετεροατόμων και την επεξεργασία των φορτίων τους.
3. Την αφαίρεση μορίων νερού (H_2O) που δεν συμμετέχουν σε γέφυρα μεταξύ προσδέτη ή αμινοξέων στόχου.

Όσον αφορά το αμινοξύ ιστοιδίνη (His) απαιτείται η επιλογή της κατάστασης ταυτομέρειας. Τέλος, σημαντικό βήμα είναι η ελαχιστοποίηση της ενέργειας του στόχου, ώστε να ληφθεί μια σταθερή ενεργειακά δομή (Sastry et al., 2013; Κρίτση, 2017).

3.4.4. Προετοιμασία Προσδετών

Όπως η πρωτεΐνη-στόχος έτσι και οι προσδέτες, χρειάζονται προετοιμασία πριν την εφαρμογή της μοριακής πρόσδεσης. Το πρώτο βήμα είναι όμοιο με αυτό της προετοιμασίας της πρωτεΐνης και περιλαμβάνει τη συμπλήρωση των υδρογόνων. Στο δεύτερο στάδιο, αφαιρούνται όσα μόρια θεωρούνται ακατάλληλα και στη συνέχεια, απαιτείται ρύθμιση του pH και εύρεση ταυτομερών δομών. Στο τελευταίο βήμα, λαμβάνεται η καταλληλότερη γεωμετρία του προσδέτη έπειτα από ελαχιστοποίηση της ενέργειας (Sastry et al., 2013).

3.4.5. Εφαρμογή μοριακής πρόσδεσης και Αποτελέσματα

Αφού πραγματοποιηθεί η επεξεργασία πρωτεΐνης και προσδετών, λαμβάνει χώρα η διαδικασία της πρόσδεσης σύμφωνα με το διάγραμμα ροής που έχει παρουσιαστεί (Σχήμα 3.1). Με σκοπό τον προσδιορισμό του τρόπου με τον οποίο προσδένονται οι ενώσεις στη πρωτεΐνη-στόχο και τον υπολογισμό της συγγένειας πρόσδεσης μεταξύ πρωτεΐνης και προσδετών. Τέλος, πραγματοποιείται η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων και επικρατούν οι προσδέτες που παρουσιάζουν την υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης με το μελετούμενο στόχο (Κρίτση, 2017).

3.4.6. Χρησιμοποιούμενα Λογισμικά

Τα υπολογιστικά προγράμματα μοριακής πρόσδεσης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι τα FlexX, Glide, Gold και ICM (Chen et al., 2006; Pagadala et al., 2017). Βασικός στόχος όλων αυτών των προγραμμάτων είναι η εύρεση του καλύτερου τρόπου πρόσδεσης μεταξύ βιολογικού στόχου και προσδέτη.

Τα αποτελέσματα της μοριακής πρόσδεσης αξιολογούνται μέσω εμπειρικών συναρτήσεων, όπως είναι τα Glide-score και E-model. Η συνάρτηση Glide-score υπολογίζει την ικανότητα πρόσδεσης των ενώσεων στον βιολογικό στόχο, ενώ η συνάρτηση Emodel υπολογίζει τις τιμές του καλύτερου τρόπου πρόσδεσης για κάθε ένωση στον πρωτεϊνικό στόχο (Pagadala et al., 2017; Chen et al., 2006).

Εμπειρική συνάρτηση Glide-score: $0.065 * vdW + 0.130 * Coul + Lipo + Hbond + Metal + BuryP + RotB + Site$

Ισχύει : vdW = Ενέργεια van der Waals

$Coul$ = Ενέργεια Coulomb,

$Lipo$ = Όρος λιποφιλικός που υπολογίζει ευνοϊκές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις

$Hbond$ = Δεσμοί υδρογόνου

$Metal$ = Αλληλεπιδράσεις με ανιοντικά άτομα

$BuryP$ = "Ποινή" (Penalty) για πολικές ομάδες και συστροφή των αμιδίων

$RotB$ = "Ποινή" για περιορισμό περιστρεφόμενων δεσμών

$Site$ = Υπολογισμός πολικών αλληλεπιδράσεων στο ενεργό κέντρο.

Σκοπός Εργασίας

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η εύρεση νέων φυσικών ενώσεων που διαθέτουν αντιβακτηριακές ιδιότητες ικανές να ελαττώσουν τη δράση παθογόνων βακτηρίων και παράλληλα να ελαχιστοποιήσουν την εμφάνιση τροφιμογενών νοσημάτων. Η εργασία αυτή έχει ως βάση τα υπολογιστικά εργαλεία εικονικής σάρωσης και μέσω των αποτελεσμάτων τους θα προταθούν φυσικές ενώσεις με εν δυνάμει ανασταλτική ικανότητα έναντι του ενζύμου Τοποϊσομεράση IV (*Escherichia coli*) για αγορά και *in vitro* ενζυμική δοκιμή μελλοντικά. Απώτερος στόχος της παρούσας εργασίας είναι η χρήση των προτεινόμενων φυσικών ενώσεων σε συσκευασμένα τρόφιμα.

Πειραματικό μέρος

Κεφάλαιο 4: Επιλογή και Προετοιμασία βιβλιοθηκών φυσικών ενώσεων

4.1. Επιλογή βιβλιοθηκών

Για τη λήψη της επιθυμητής βιβλιοθήκης φυσικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων Zinc και ειδικότερα η νέα έκδοση Zinc 15 (<https://zinc15.docking.org>) με ελεύθερη πρόσβαση μέσω διαδικτύου. Έπειτα από την εισαγωγή στην ιστοσελίδα, από το αρχικό μενού επιλέγονται οι κατάλογοι (catalogs) και πραγματοποιείται η αναζήτηση φυσικών ενώσεων που βρίσκονται σε απόθεμα (instock). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, επιλέχθηκε η βιβλιοθήκη φυσικών ενώσεων της εταιρείας Specs, η οποία περιλαμβάνει 2,139 φυσικές ενώσεις και πραγματοποιήθηκε λήψη των αρχείων σε μορφή .SMILES.

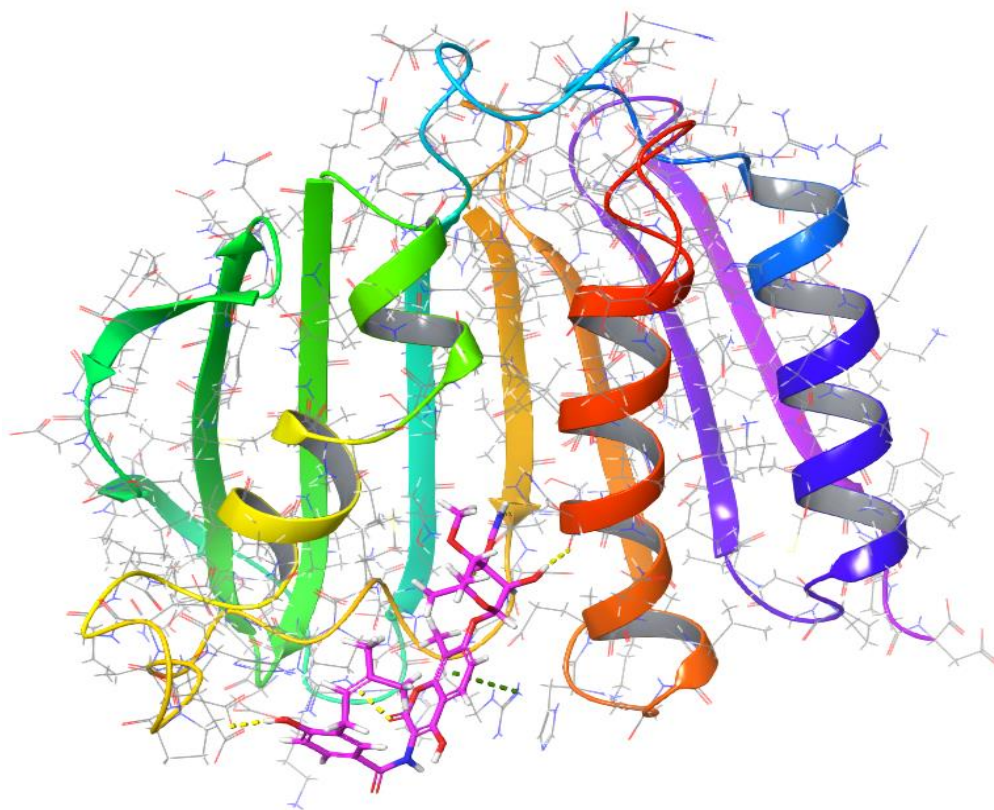
4.2. Προετοιμασία βιβλιοθήκης φυσικών ενώσεων

Μετά την επιλογή της βιβλιοθήκης φυσικών ενώσεων για την παρούσα εργασία, ακολούθησε η προετοιμασία της χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα Maestro. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε εισαγωγή της βιβλιοθήκης στην πλατφόρμα και στη συνέχεια προετοιμάστηκε κατάλληλα μέσω εφαρμογής του προγράμματος LigPrep. Μέσω της διαδικασίας, οι ενώσεις μετατράπηκαν σε τριδιάστατη μορφή και ακολούθησε προσθήκη των υδρογόνων. Επίσης, προκειμένου να ληφθούν όλες οι πιθανές ιοντικές μορφές ορίστηκε το επιθυμητό pH = 7,5 +/- 0,5 και επιλέχθηκε το πεδίο δυνάμεων (force field) OPLS3.

Κεφάλαιο 5: Διεξαγωγή πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης

5.1. Προετοιμασία ενζύμου στόχου για τη διεξαγωγή πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης

Το ένζυμο στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η Τοποϊσομεράση IV του παθογόνου βακτηρίου *Escherichia coli*. Μέσω της πρωτεϊνικής βάσης δεδομένων Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>) πραγματοποιήθηκε η επιλογή της κατάλληλης κρυσταλλικής δομής του ενζύμου. Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η κρυσταλλική δομή της *E. Coli* Τοποϊσομεράσης IV (υπομονάδα ParE) συμπλοκοποιημένη με την κουμαρίνη νοβοβοκίνη (Κωδικός PDB: 1S14, ανάλυση 2,1Å) (Σχήμα 5.1), η οποία είναι γνωστό ότι δρα ως αναστολέας του ενζύμου Τοποϊσομεράση IV (Bellon et al., 2004).

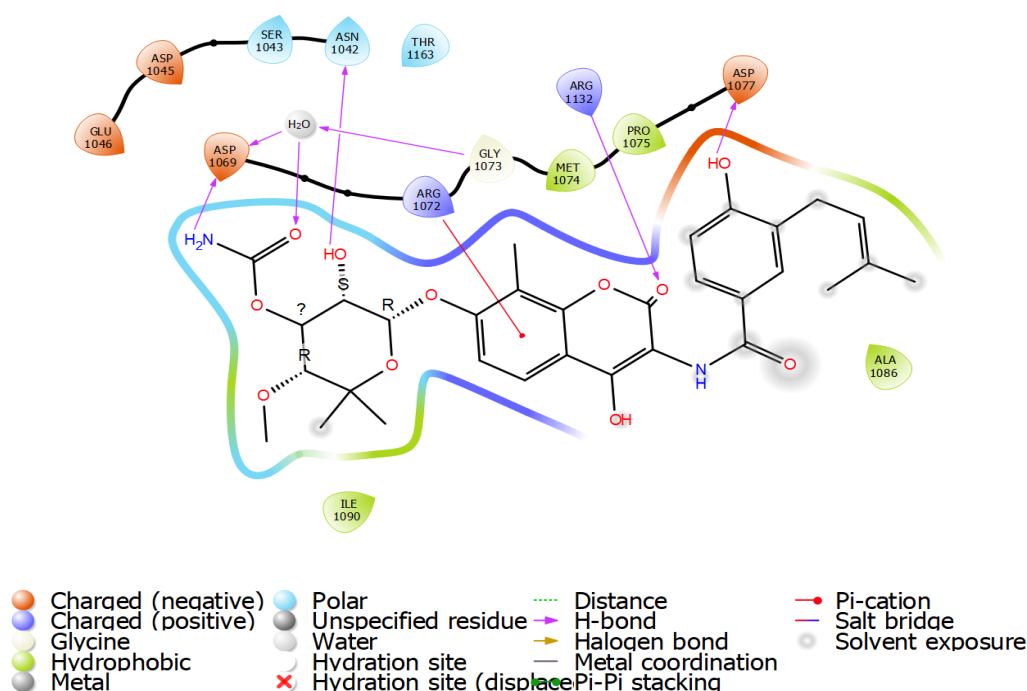


Σχήμα 5.1 Τριδιάστατη απεικόνιση του ενζύμου της Τοποϊσομεράσης IV συμπλοκοποιημένο με την νοβοβοκίνη. Με κίτρινο χρώμα αναπαρίστανται οι δεσμοί υδρογόνου και με πράσινο χρώμα οι Pi-cation δεσμοί.

Για την προετοιμασία του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε και πάλι η πλατφόρμα Maestro και ειδικότερα το πρόγραμμα Protein Preparation Wizard. Η διαδικασία περιελάμβανε τη ρύθμιση του pH = 7,5 +/- 0,5 (βέλτιστο pH του ενζύμου). Για την εύρεση του βέλτιστου pH χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων BRENDA (<https://www.brenda-enzymes.org/>).

Στόχος της προετοιμασίας, είναι η αφαίρεση μορίων H₂O τα οποία δεν διέθεταν ικανότητα να σχηματίζουν γέφυρα με τον προσδέτη ή με τα αμινοξέα του στόχου και η ενεργειακή ελαχιστοποίηση του ενζύμου. Για την ελαχιστοποίηση της ενέργειας του ενζύμου εφαρμόστηκε το OPLS3 πεδίο δυνάμεων (force field) εξασφαλίζοντας μια σταθερή διαμόρφωση χαμηλής ενέργειας για το ένζυμο.

Τέλος, προσδιορίστηκαν τα κρίσιμα για την πρόσδεση αμινοξέα μέσω της καταγραφής των αλληλεπιδράσεων της νοβοβιοκίνης με το ένζυμο *E. coli* Τοποϊσομεράση IV (Πίνακας 9). Στο Σχήμα 5.2 παρουσιάζονται σε διδιάστατη απεικόνιση οι αντίστοιχοι δεσμοί.



Σχήμα 5.2 Διδιάστατη απεικόνιση των κρίσιμων για την πρόσδεση αλληλεπιδράσεων του ενζύμου *E. coli* Τοποϊσομεράση IV με τον αναστολέα νοβοβιοκίνη.

Πίνακας 9 Σχηματιζόμενοι δεσμοί μεταξύ του αναστολέα νοβοβιοκίνη και του ενζύμου *E. coli* Τοποϊσομεράση IV

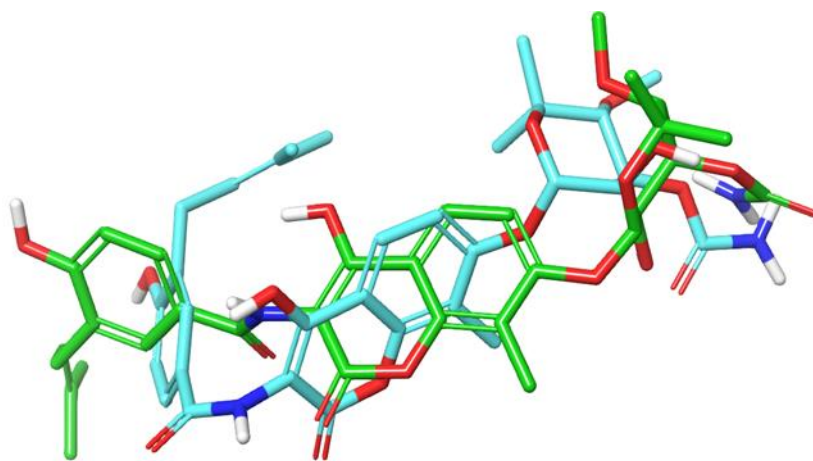
Κρίσιμα Αμινοξέα	Σχηματιζόμενοι Δεσμοί
Ασπαραγινικό οξύ (Asp) 1077	Δεσμός υδρογόνου
Αργινίνη (Arg) 1132	Δεσμός υδρογόνου
Ασπαραγίνη (Asn) 1042	Δεσμός υδρογόνου
Γλυκίνη (Gly) 1073	Δεσμός υδρογόνου
Ασπαραγινικό οξύ (Asp) 1069	Γέφυρα μέσω νερού
Αργινίνη (Arg) 1072	Pi - cation

5.2. Εφαρμογή πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης

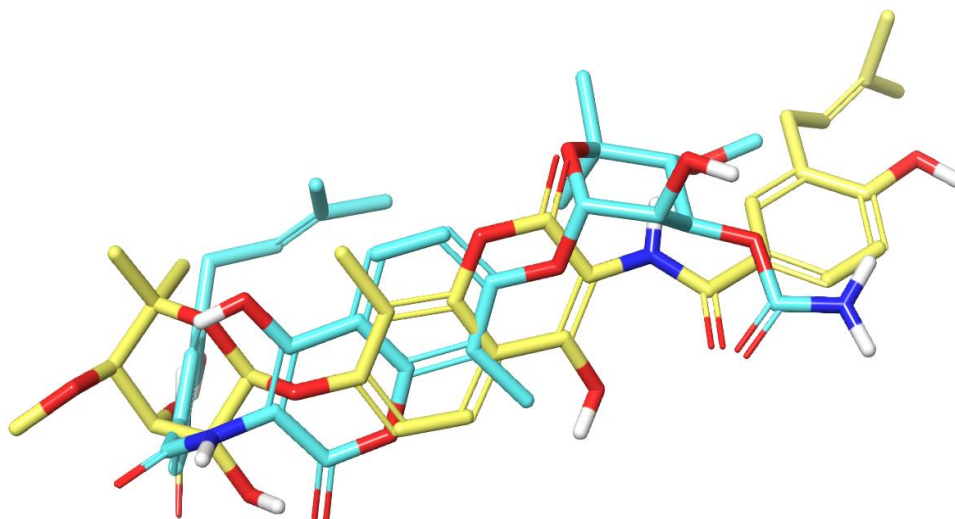
5.2.1 Επικύρωση μεθόδων Μοριακής Πρόσδεσης

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης στον συμπλοκοποιημένο αναστολέα νοβοβιοκίνη με χρήση των αλγορίθμων Πρότυπης Ακρίβειας (Standard Precision - SP) και Επιπρόσθετης Ακρίβειας (Extra Precision - XP) του προγράμματος Glide, στοχεύοντας στην επικύρωση των χρησιμοποιούμενων μεθόδων. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκε πλέγμα (Grid Box) σύμφωνα με τις συντεταγμένες του αναστολέα νοβοβιοκίνη (X, Y, Z = 16).

Από την υπέρθεση της κρυσταλλικής διαμόρφωσης της νοβοβιοκίνης και της διαμόρφωσης που προέκυψε έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP) (Σχήμα 5.3) και του αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP) (Σχήμα 5.4) προέκυψε ότι οι μέθοδοι είναι επικυρωμένες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω για τη διεξαγωγή πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης στις φυσικές ενώσεις που περιλαμβάνονται στη βιβλιοθήκη Specs (<https://www.specs.net/>). Επίσης, οι τιμές της ενέργειας πρόσδεσης (Glide-score) της νοβοβιοκίνης μετά την εφαρμογή του αλγορίθμου SP και XP είναι $-5,90 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ και $-7,68 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, αντίστοιχα.



Σχήμα 5.3 Υπέρθεση των δύο διαμορφώσεων της νοβοβιοκίνης έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου SP. Με γαλάζιο χρώμα απεικονίζεται ο αναστολέας της κρυσταλλικής δομής και με πράσινο χρώμα ο αναστολέας, όπως προέκυψε μετά την εφαρμογή του αλγορίθμου SP.



Σχήμα 5.4 Υπέρθυση των δύο διαμορφώσεων της νοβοβιοκίνης έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου SP. Με γαλάζιο χρώμα απεικονίζεται ο αναστολέας της κρυσταλλικής δομής και με κίτρινο χρώμα ο αναστολέας, όπως προέκυψε μετά την εφαρμογή του αλγορίθμου XP.

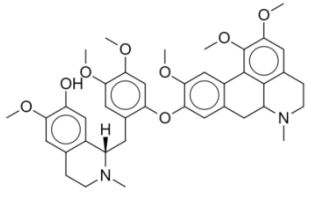
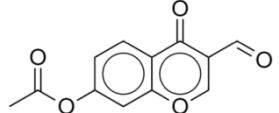
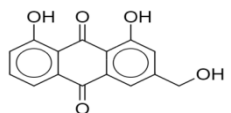
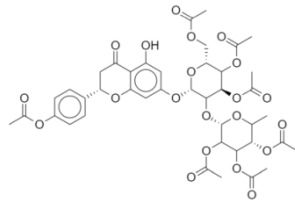
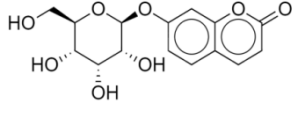
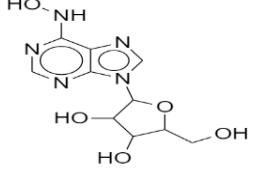
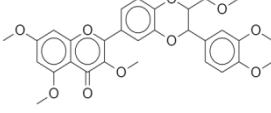
5.2.2 Αποτελέσματα εφαρμογής πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης στη βιβλιοθήκη Specs

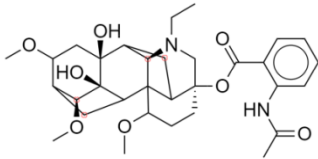
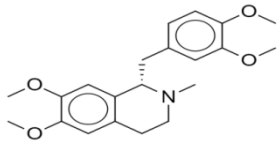
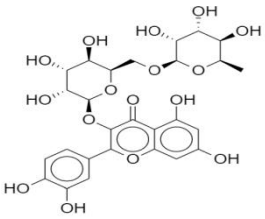
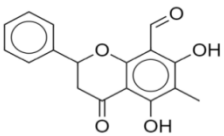
Το επόμενο βήμα της μελέτης περιελάμβανε την εφαρμογή του αλγορίθμου Glide-SP στις φυσικές ενώσεις της βιβλιοθήκης Specs (<https://www.specs.net/>) και την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της μοριακής πρόσδεσης. Από τα αποτελέσματα προέκυψαν 1,248 φυσικές ενώσεις, οι οποίες αξιολογήθηκαν σύμφωνα με τα ακόλουθα κριτήρια:

1. Την ικανότητα πρόσδεσης των εξεταζόμενων φυσικών ενώσεων, σύμφωνα με τις τιμές Glide-score καθώς επίσης και
2. Από την αλληλεπίδραση ή όχι των εξεταζόμενων ενώσεων με τα κρίσιμα για την πρόσδεση αμινοξέα (Πίνακας 9).

Σύμφωνα με τα παραπάνω κριτήρια διαπιστώθηκε ότι από τις 1,248 φυσικές ενώσεις μόνο οι 11 (Πίνακας 10) πληρούσαν τα παραπάνω κριτήρια. Στη συνέχεια, ο τρόπος πρόσδεσης των ενώσεων αυτών μελετήθηκε εκ νέου μέσω εφαρμογής του αλγορίθμου Glide-XP.

Πίνακας 10 Οι χημικές δομές των ενώσεων που επιλέχθηκαν μετά τη χρήση του αλγόριθμου *Glide-SP*. Δίνονται οι κωδικοί *Specs / ZINC*, το *Glide-score*, η ονομασία τους και η 2D δομή τους

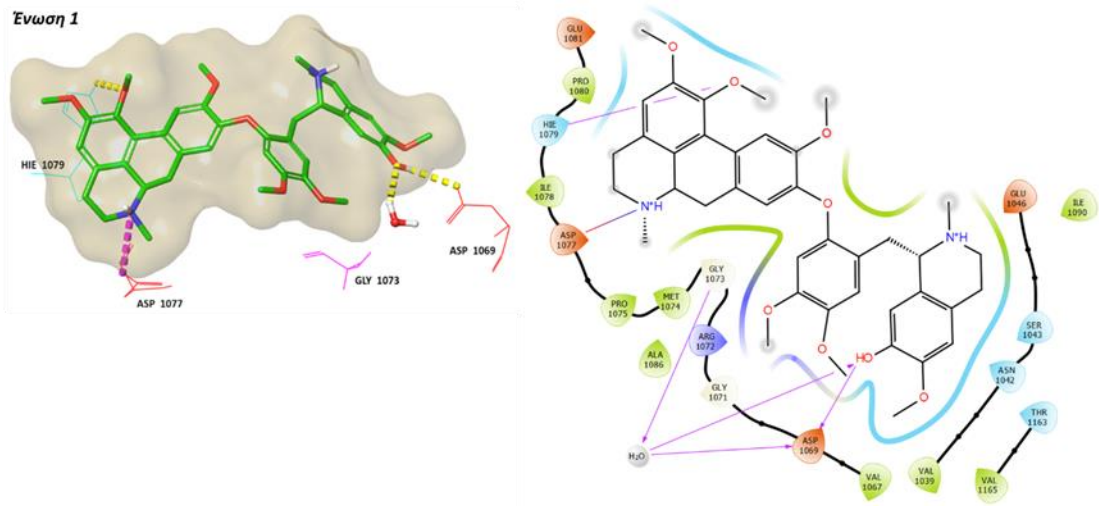
A/A	Κωδικός Specs / ZINC	Glide-score (kcal · mol ⁻¹)	Ονομασία	Δομή
1	AK-906/20892006 ZINC000096316256 specsnp	-7,24	(1S)-1-[[[4,5-dimethoxy-2-[trimethoxy(methyl)BLAHyl]oxyphenyl]methyl]-6-methoxy-2-methyl-3,4-dihydro	
2	AJ-291/34003002 ZINC000000334890 specsnp	-7,06	3-formyl-4-oxo-4H-chromen-7-yl acetate	
3	AL-466/21162055 ZINC000004098644 specsnp	-7,03	Aloe-Emodin	
4	AA-504/21004033 ZINC000248053151 specsnp	-7,02	Naringenin derivative	
5	AH-214/21165011 ZINC000001559620 specsnp	-6,82	Skimmin	
6	AG-670/20238004 ZINC000004104779 specsnp	-6,60	Nebularin	
7	AC-776/21184002 ZINC000002048853 specsnp	-6,38	Silybin	

8	AJ-738/20210002 ZINC000101659473 specsnp	-6,17	Lappaconitene	
9	AE-508/25006691 ZINC000000621833 specsnp	-6,14	Laudanosine	
10	AJ-652/21105007 ZINC000077256922 specsnp	-6,08	Rutin	
11	AK-693/21124018 ZINC000003581770 specsnp	-5,87	Lawinal	

Οι αλληλεπιδράσεις των ενώσεων απεικονίζονται στα Σχήμα 5.5-5.15 και περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω:

- **Ένωση 1:** (1S)-1-[[[4,5-dimethoxy-2-[trimethoxy(methyl)BLAHyl] oxy-phenyl]methyl]-6-methoxy-2-methyl-3,4-dihydro

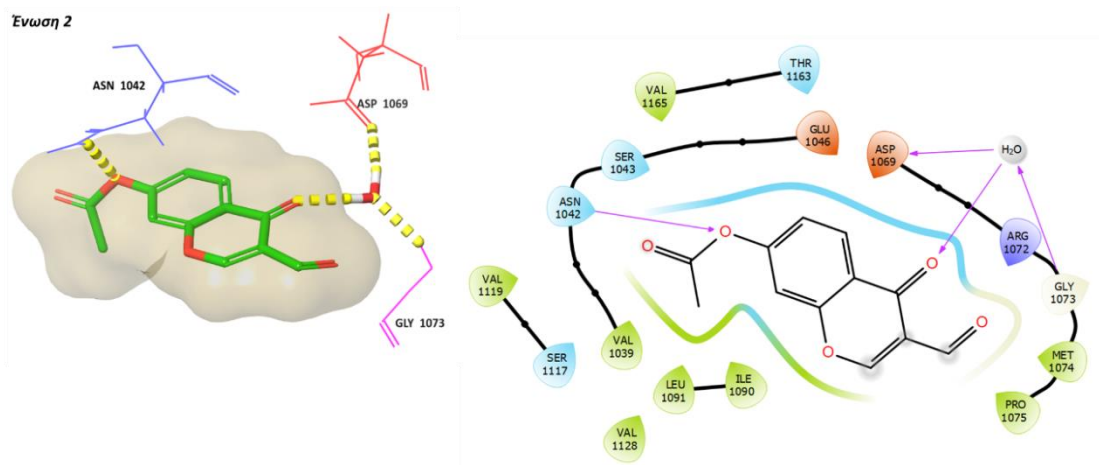
Στο Σχήμα 5.5 παρατηρείται ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου με το αμινοξύ Asp1069 και ένα μόριο H₂O, δημιουργώντας μία γέφυρα με το αμινοξύ Gly1073. Επίσης, δημιουργείται γέφυρα άλατος μεταξύ της ελεύθερης καρβοξυλομάδας του αμινοξέος της Asp1077 και ενός ελεύθερου NH⁺ ενός δακτυλίου της ένωσης. Τέλος, σχηματίζεται δεσμός υδρογόνου με το αμινοξύ His1079, το οποίο ωστόσο δεν συγκαταλέγεται στις κρίσιμες αλληλεπιδράσεις.



Σχήμα 5.5 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) διδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης 1S-1-[[4,5-dimethoxy-2-[trimethoxy(methyl)BLAHyl]oxy-phenyl]methyl]-6-methoxy-2-methyl-3,4-dihydro (Ένωση 1) με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και με μωβ χρώμα οι γέφυρες άλατος.

- **Ένωση 2:** 3-formyl-4-oxo-4H-chromen-7-yl acetate

Η ένωση 2 (Σχήμα 5.6) αναπτύσσει δεσμό υδρογόνου με τα κρίσιμο αμινοξύ Asn1042, ενώ μέσω ενός δεσμού υδρογόνου με ένα μόριο H₂O σχηματίζεται γέφυρα με τα αμινοξέα Asp1069 και Gly1073.

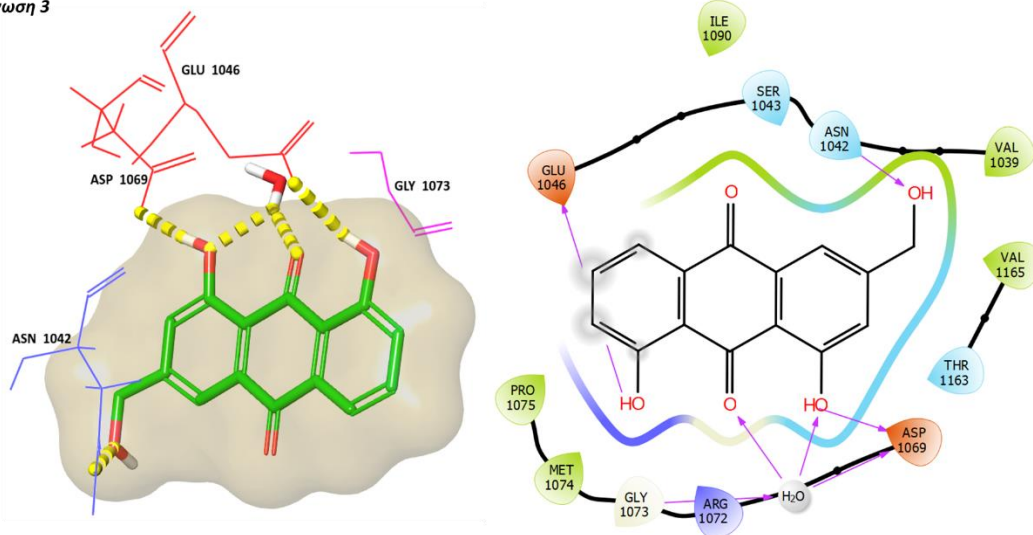


Σχήμα 5.6 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) διδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης 3-formyl-4-oxo-4H-chromen-7-yl acetate (Ένωση 2) με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου.

- Ένωση 3: Aloe-emodin

Η ένωση 3 (Σχήμα 5.7) σχηματίζει μέσω δεσμών υδρογόνου κρίσιμες αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα Asn1042, Asp1069 και μέσω ενός μορίου H₂O δημιουργείται γέφυρα με το αμινοξύ Gly1073. Τέλος, αναπτύσσεται δεσμός υδρογόνου με το αμινοξύ Glu1046, το οποίο δεν περιλαμβάνεται στα κρίσιμα αμινοξέα.

Ένωση 3

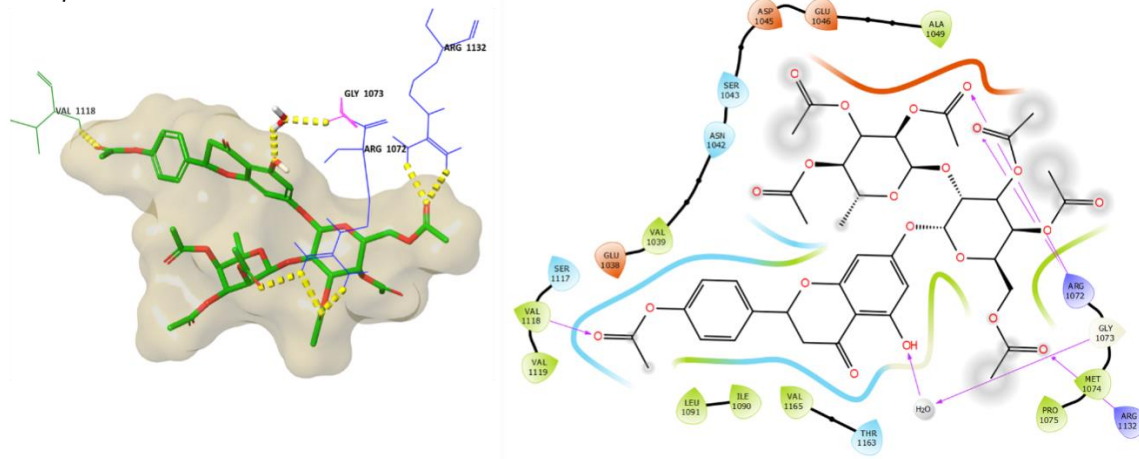


Σχήμα 5.7 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) διδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Aloe-emodin (Ένωση 3) με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου.

- **Ένωση 4:** Naringenin derivative

Η ένωση 4 (Σχήμα 5.8) αναπτύσσει δύο δεσμούς υδρογόνου με το αμινοξύ Arg1072 και άλλον έναν με την Arg1132. Επίσης, μέσω ενός μορίου H₂O σχηματίζεται δεσμός με την Gly1073. Ο δεσμός υδρογόνου με την Val στη θέση 1118, δεν περιλαμβάνεται στις κρίσιμες αλληλεπιδράσεις.

Ένωση 4

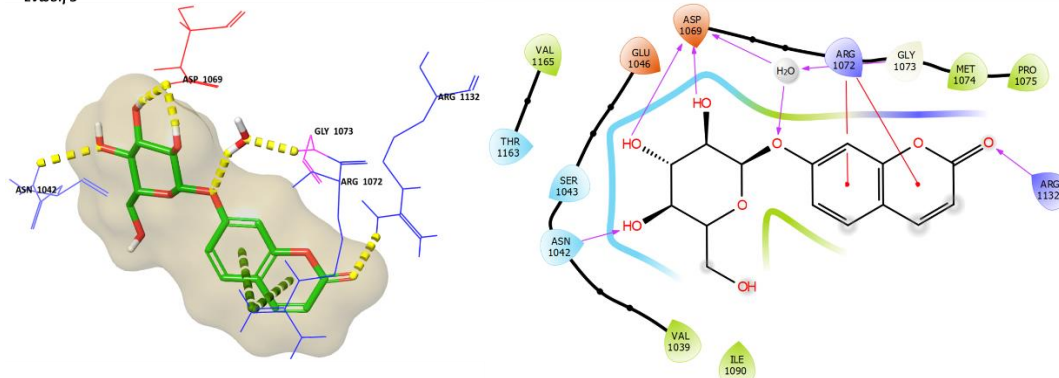


Σχήμα 5.8 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) διδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Naringenin derivative (Ένωση 4) με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου.

- **Ένωση 5:** Skimmin

Στην ένωση 5 (Σχήμα 5.9) όλες οι αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται είναι με τα αμινοξέα τα οποία έχουν χαρακτηριστεί “κρίσιμα”. Σχηματίζονται 2 Pi-cationδεσμοί με την Argστη θέση 1072 καθώς και δεσμός υδρογόνου με την Arg1132. Επίσης, δημιουργείται δεσμός υδρογόνου με την Asn1042 και με το Asp1069. Επιπλέον, δημιουργείται γέφυρα μέσω ενός μορίου H₂O με την Gly1073.

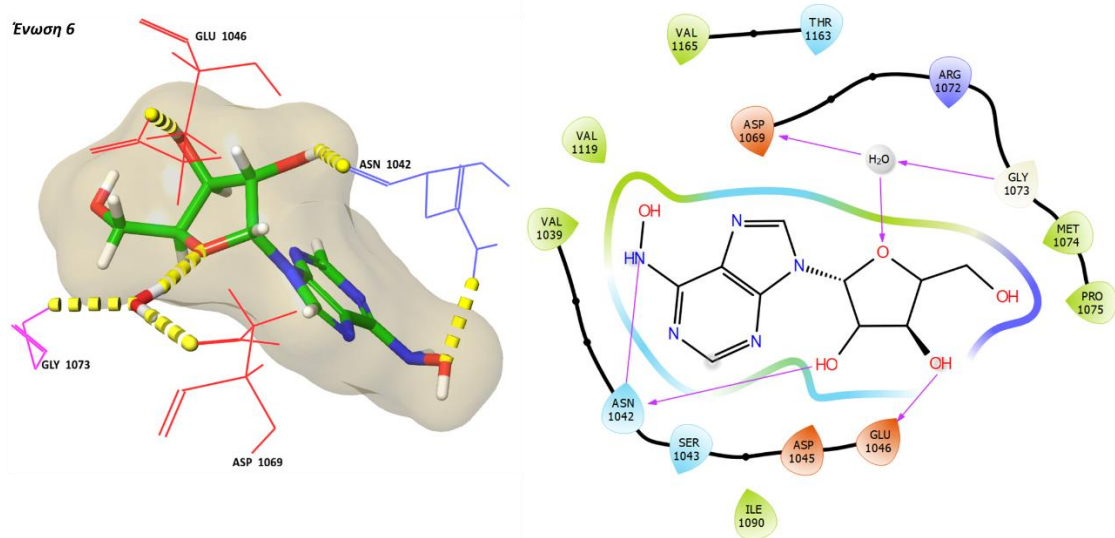
Ένωση 5



Σχήμα 5.9 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) διδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Skimmin (Ένωση 5) με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και με πράσινο χρώμα οι Pi-cation δεσμοί.

- Ένωση 6: Nebularin

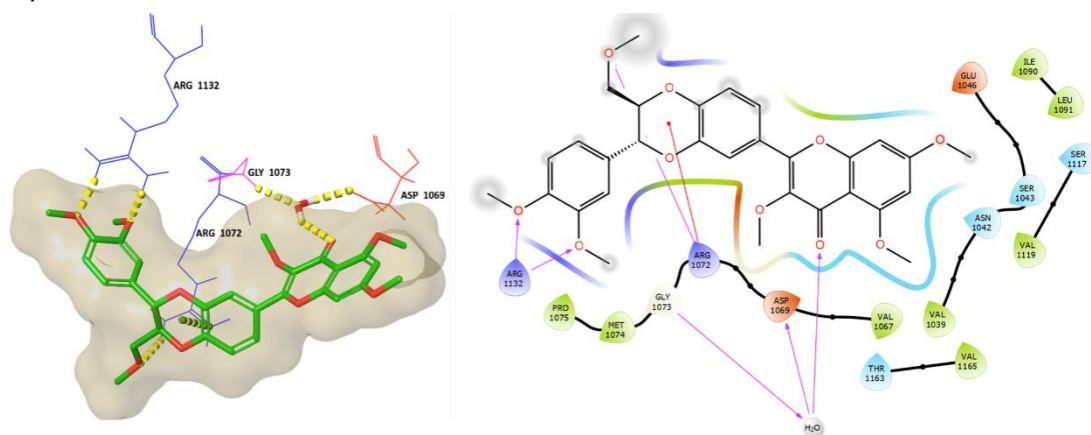
Η ένωση 6 (Σχήμα 5.10) αναπτύσσει 2 δεσμούς υδρογόνου με την Asn1042 και μέσω ενός δεσμού με ένα μόριο H₂O σχηματίζει γέφυρα με το Asp1069 και την Gly1073. Δεσμός υδρογόνου σχηματίζεται και με το Glu1046.



Σχήμα 5.10 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) διδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Nebularin (Ένωση 6) με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου.

- Ένωση 7: Silybin

Με το αμινοξύ Arg στη θέση 1072, η ένωση 7 (Σχήμα 5.11) αναπτύσσει έναν δεσμό Pi-cation καθώς και έναν δεσμό υδρογόνου. Αντίστοιχα, σχηματίζονται 2 δεσμοί υδρογόνου με την Arg1132 και μέσω ενός μορίου H₂O δημιουργείται γέφυρα με τα αμινοξέα Asp1069 και Gly1073.

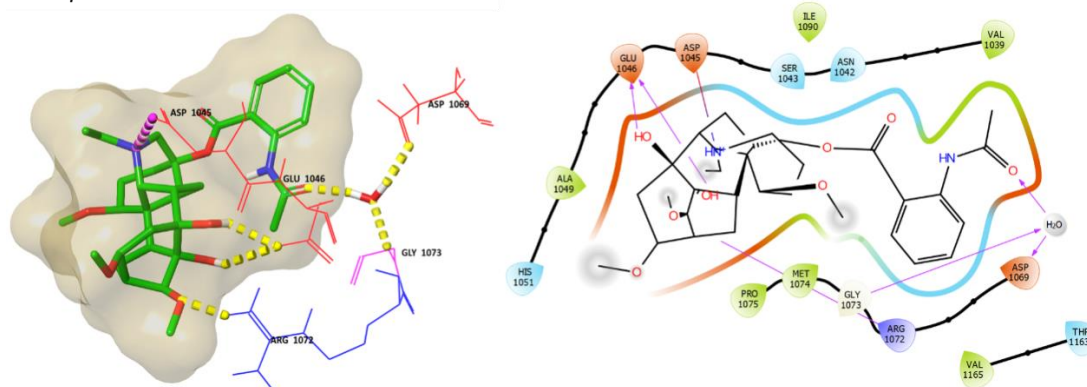


Σχήμα 5.11 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) διδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Silybin (Ένωση 7) με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου.

- **Ένωση 8:** Lappaconitene

Οι κρίσιμες αλληλεπιδράσεις που σχηματίζει η ένωση 8 (Σχήμα 5.12) είναι ένας δεσμός υδρογόνου με την Arg1072 και μέσω του ίδιου μορίου H₂O σχηματίζει γέφυρα με το Asp1069 και την Gly1073. Επίσης, αναπτύσσει 2 δεσμούς υδρογόνου με το Glu1046 και γέφυρα άλατος με το Asp1045.

Ένωση 8

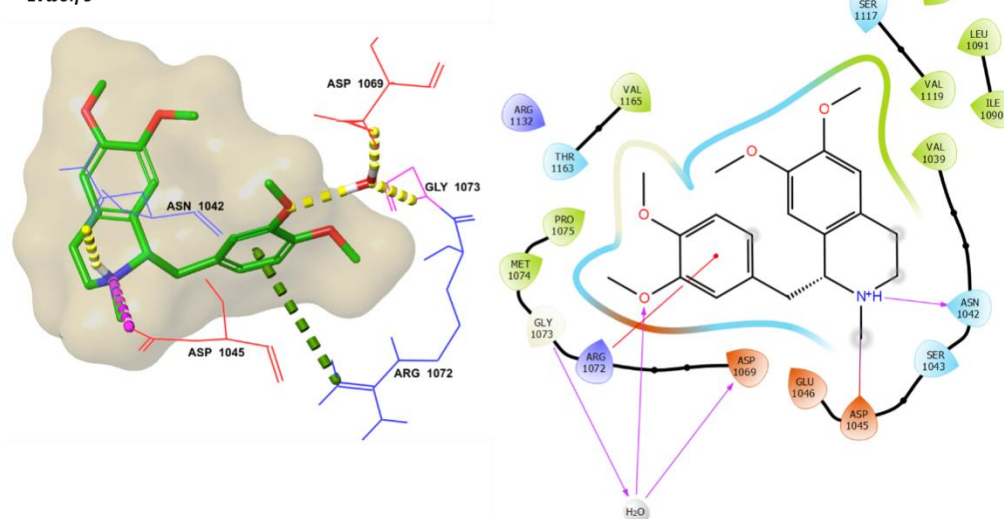


Σχήμα 5.12 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) διδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Lappaconitene (Ένωση 8) με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και με μωβ χρώμα οι γέφυρες άλατος.

- **Ένωση 9:** Laudanosine

Για την ένωση 9 (Σχήμα 5.13) παρατηρείται η ανάπτυξη ενός δεσμού υδρογόνου με την Asn1042 και μέσω του ίδιου μορίου H₂O δημιουργείται μία γέφυρα με τα αμινοξέα Asp1069 και Gly1073. Επίσης, δημιουργείται ένας Pi-cation δεσμός με την Arg1072. Τέλος, σχηματίζεται δεσμός υδρογόνου με το Asp1045 που δεν περιλαμβάνεται στα αμινοξέα που δημιουργούν κρίσιμες αλληλεπιδράσεις.

Ένωση 9

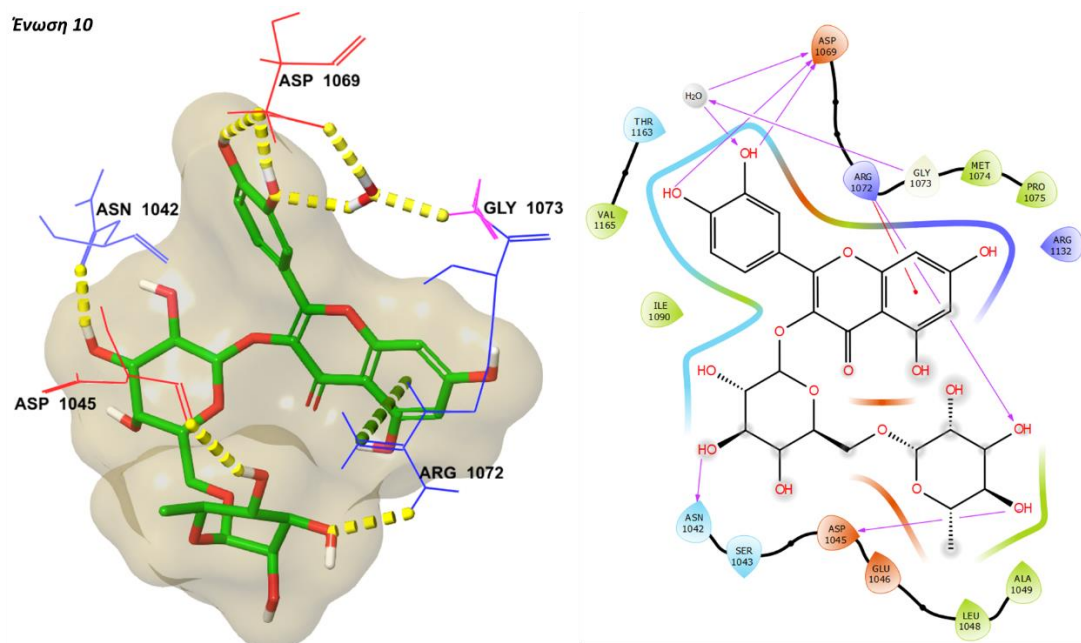


Σχήμα 5.13 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) διδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Laudanosine (Ένωση 9) με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα

απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου, με μωβ χρώμα οι γέφυρες άλατος και με πράσινο χρώμα οι Pi-cation δεσμοί.

- **Ένωση 10: Rutin**

Στην ένωση 10 (Σχήμα 5.14), όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 5.5, αναπτύσσονται αρχικά δύο δεσμοί υδρογόνου με το Asp1069 ενώ μέσω ενός μορίου H₂O δημιουργείται γέφυρα με το αμινοξύ Gly1073. Επίσης, δεσμό υδρογόνου σχηματίζει η ένωση με την Asn1042 και την Arg1072, με το τελευταίο αμινοξύ να αναπτύσσει επιπλέον Pi-cation δεσμό. Δεσμός υδρογόνου αναπτύσσεται και με το Asp στη θέση 1045.

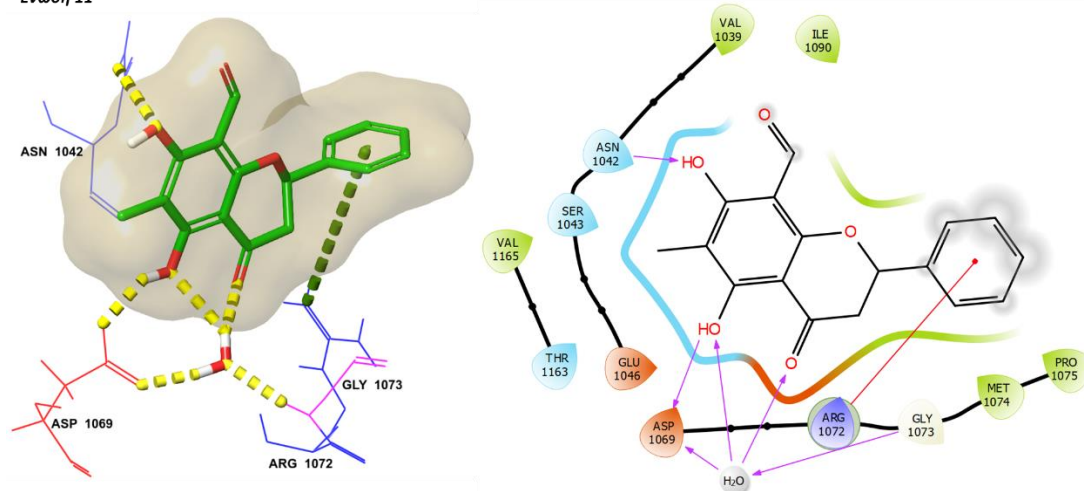


Σχήμα 5.14 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) διδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Rutin (Ένωση 10) με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και με πράσινο χρώμα οι Pi-cation δεσμοί.

- **Ένωση 11: Lawinal**

Η ένωση 11 (Σχήμα 5.15) σχηματίζει κρίσιμες αλληλεπιδράσεις δημιουργώντας δεσμούς υδρογόνου με τα αμινοξέα Asn1042 και Asp1069. Επίσης, το μόριο H₂O που συνδέεται με το Asp1069 δημιουργεί “γέφυρα” με την Gly1073. Τέλος, αναπτύσσεται Pi-cation δεσμός με την Arg στη θέση 1132.

Ένωση 11



Σχήμα 5. 15 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) διδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Lawinal (Ένωση11) με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και με πράσινο χρώμα οι Pi-cation δεσμοί.

5.2.3 Αποτελέσματα από την εφαρμογή του αλγορίθμου Glide-XP

Οι φυσικές ενώσεις που επιλέχθηκαν από την εφαρμογή του αλγορίθμου Glide-SP χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια ως “δειγματοχώρος” για το τελικό στάδιο της πειραματικής διαδικασίας που περιλαμβάνει την εφαρμογή του αλγόριθμου Glide-XP.

Τα κριτήρια αξιολόγησης παρέμειναν τα ίδια και σε αυτό το στάδιο. Βασικός σκοπός της χρήσης αυτού του αλγορίθμου είναι η πρόβλεψη των τελικών φυσικών ενώσεων που θα επιλεγθούν και μελλοντικά θα αγοραστούν για την *in vitro* βιολογική τους αποτίμηση ως αναστολείς του εξεταζόμενου ενζύμου.

Στον Πίνακα 11 καταγράφονται οι 6 φυσικές ενώσεις που παρουσιάζουν τα πλέον αξιόλογα αποτελέσματα έπειτα από την εφαρμογή του αλγόριθμου Glide-XP.

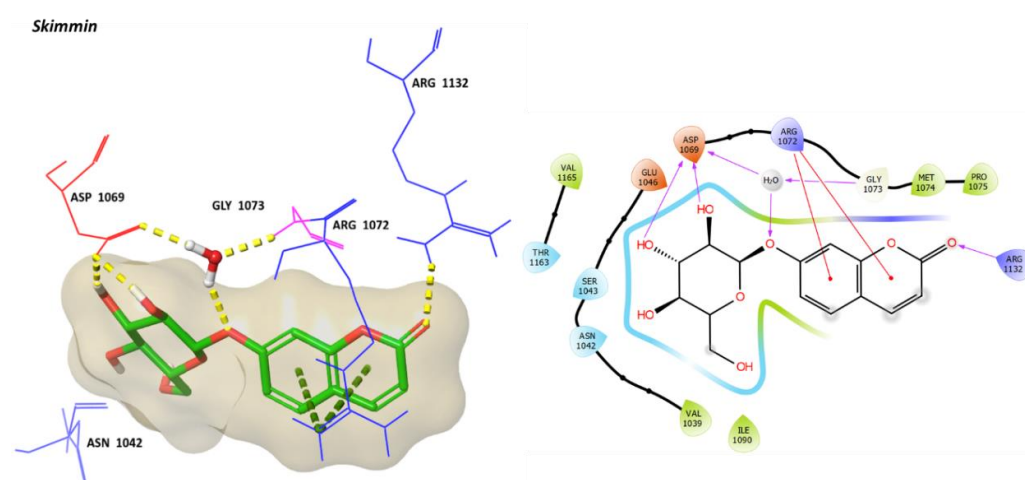
Πίνακας 11 Οι χημικές δομές των ενώσεων που επιλέχθηκαν έπειτα από τη χρήση του αλγόριθμου Glide-XP. Δίνονται οι κωδικοί Specs / ZINC, το Glide-score, η ονομασία τους και η 2D δομή τους

A/A	Κωδικός Specs / ZINC	Glide-score (kcal · mol ⁻¹)	Ονομασία
1	AH-214/21165011 ZINC000001559620	-7,74	Skimmin
2	AA-504/21004033 ZINC000248053151	-7,31	Naringenin Derivative
3	AG-670/20238004 ZINC000004104779	-7,00	Nebularine
4	AE-508/25006691 ZINC000000621833	-6,47	Laudonosine
5	AJ-291/34003002 ZINC000000334890	-5,69	3-formyl-4-oxo-4H-chromen-7-yl acetate
6	AC-776/21184002 ZINC000002048853	-5,03	Silybin

Στα Σχήματα 5.16-5.21 παρουσιάζεται ο τρόπος πρόσδεσης των τελικών φυσικών ενώσεων που επιλέχθηκαν, έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου Glide-XP.

- Ένωση 1: Skimmin

Μετά την εφαρμογή του Glide-XP, στην ένωση αυτή, όπως παρουσιάζεται και στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα 5.16), αναπτύσσονται 2 Pi-cation δεσμοί με την Arg στη θέση 1072 καθώς και δεσμός υδρογόνου με την Arg1132. Επίσης, δημιουργούνται 2 δεσμοί υδρογόνου με το Asp1069. Επιπλέον, δημιουργείται γέφυρα μέσω ενός μορίου H₂O με την Gly1073. Παρατηρείται σε σχέση με τα αποτελέσματα από τον Glide-SP για την ένωση αυτή να απουσιάζει ο δεσμός υδρογόνου με την Asn1042.

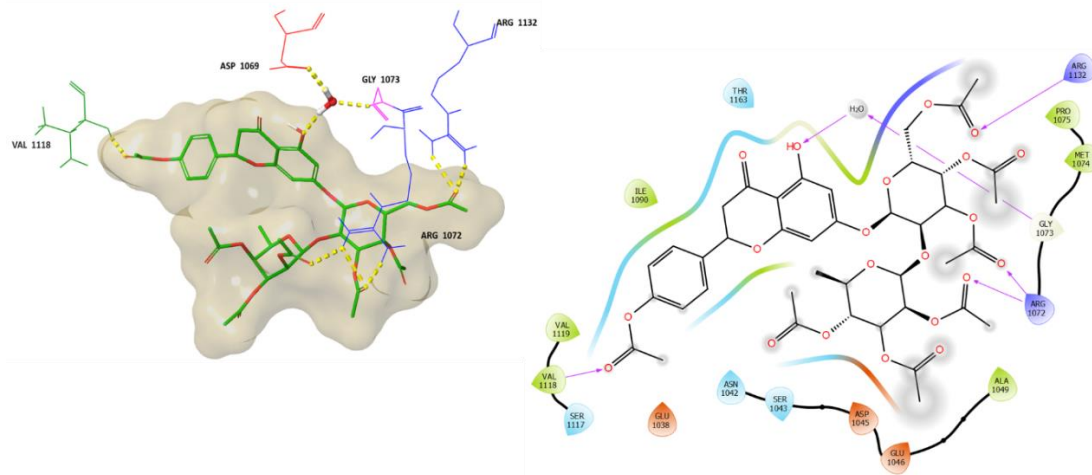


Σχήμα 5.16 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) διδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Skimmin με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και με πράσινο χρώμα οι Pi-cation δεσμοί.

- Ένωση 2: Naringenin Derivative

Η ένωση αυτή (Σχήμα 5.17) αναπτύσσει δύο δεσμούς υδρογόνου με το αμινοξύ Arg1072 και άλλον έναν με την Arg1132. Επίσης, μέσω ενός μορίου H₂O σχηματίζεται δεσμός με την Gly1073. Ο δεσμός υδρογόνου με την Val στη θέση 1118, δεν περιλαμβάνεται στις κρίσιμες αλληλεπιδράσεις. Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή και των δύο αλγορίθμων σε αυτή την ένωση ως προς τις αλληλεπιδράσεις με τα “κρίσιμα” αμινοξέα είναι τα ίδια.

Naringenin Derivative

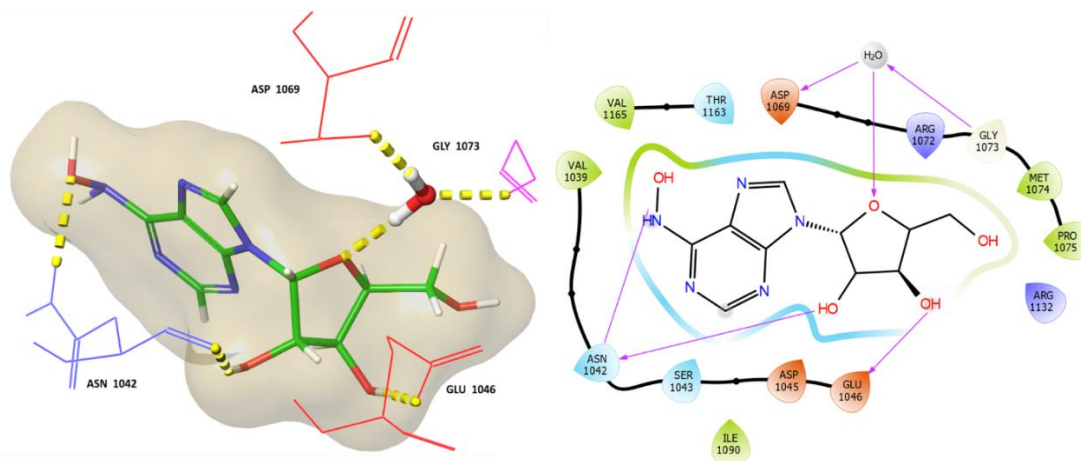


Σχήμα 5.17 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) διδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Naringenin derivative με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου.

- **Ένωση 3: Nebularine**

Η ένωση Nebularine (Σχήμα 5.18) αναπτύσσει 2 δεσμούς υδρογόνου με την Asn1042 και μέσω ενός δεσμού με ένα μόριο H₂O σχηματίζει γέφυρα με το Asp1069 και την Gly1073. Δεσμός υδρογόνου σχηματίζεται και με το Glu1046, το οποίο όπως έχει αναφερθεί, δεν αποτελεί “κρίσιμη” αλληλεπίδραση. Αντίστοιχα και για αυτή την ένωση δεν παρατηρούνται διαφορετικά αποτελέσματα μεταξύ των 2 αλγορίθμων.

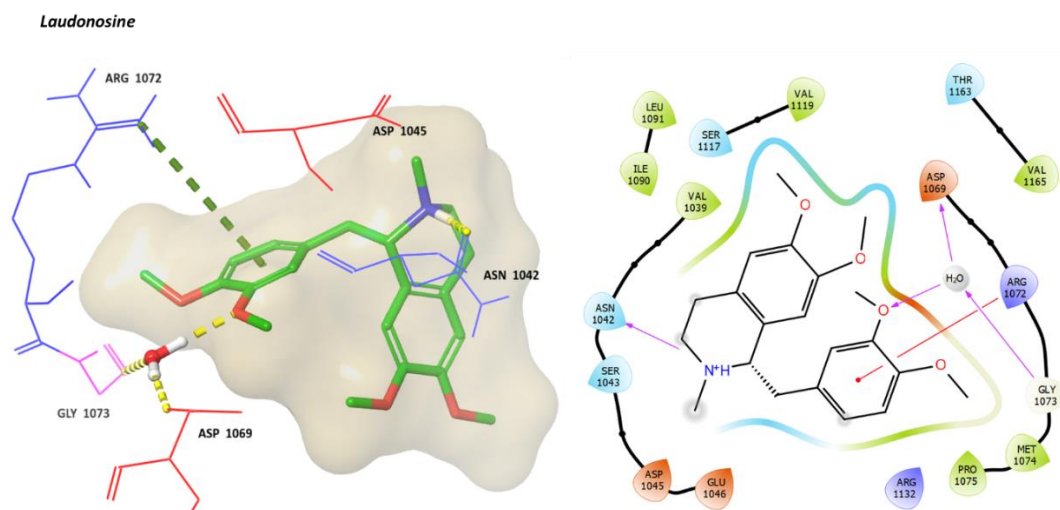
Nebularine



Σχήμα 5.18 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) διδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Nebularine με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου.

- Ένωση 4: Laudanosine

Από την εφαρμογή του αλγόριθμου Glide-XP, στην ένωση αυτή (Σχήμα 5.19), παρατηρείται η ανάπτυξη ενός δεσμού υδρογόνου με την Asn1042 και μέσω του ίδιου μορίου H₂O δημιουργείται μία γέφυρα με τα αμινοξέα Asp1069 και Gly1073. Επίσης, δημιουργείται ένας Pi-cation δεσμός με την Arg1072. Δεν σχηματίζεται δεσμός υδρογόνου με το Asp1045 που δεν περιλαμβάνεται στα αμινοξέα που δημιουργούν κρίσιμες αλληλεπιδράσεις, η οποία δεν περιλαμβάνεται στα αμινοξέα που δημιουργούν κρίσιμες αλληλεπιδράσεις, η οποία περιλαμβάνει και τη μοναδική διαφορά με τα αποτελέσματα του Glide-SP.

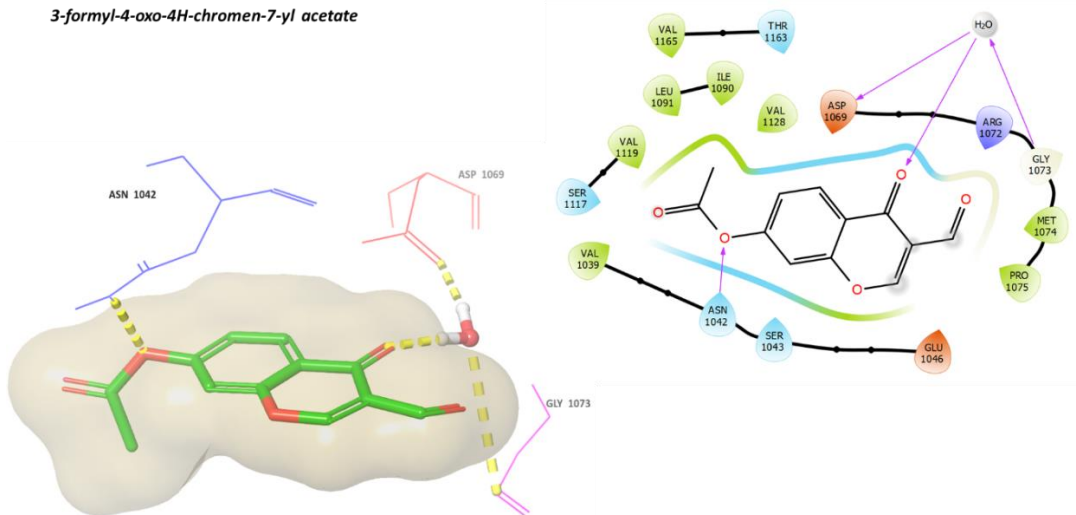


Σχήμα 5.19 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Laudanosine με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και με πράσινο χρώμα οι Pi-cation δεσμοί.

- Ένωση 5: 3-formyl-4-oxo-4H-chromen-7-yl acetate

Η ένωση αυτή (Σχήμα 5.20) αναπτύσσει δεσμό υδρογόνου με τα κρίσιμα αμινοξέα Asn1042, ενώ μέσω ενός δεσμού υδρογόνου με ένα μόριο H₂O σχηματίζεται γέφυρα με τα αμινοξέα Asp1069 και Gly1073. Παρατηρούνται τα ίδια αποτελέσματα μετά την εφαρμογή και των δύο αλγορίθμων.

3-formyl-4-oxo-4H-chromen-7-yl acetate

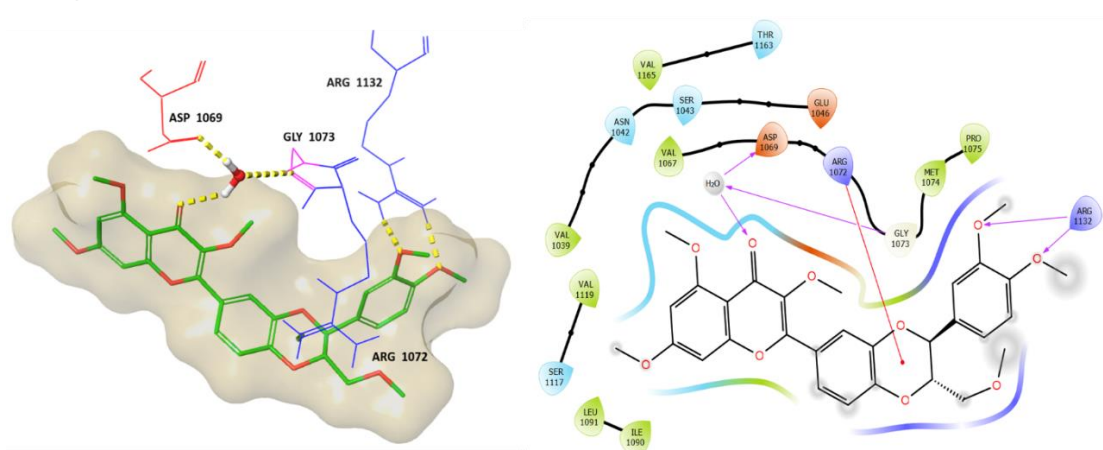


Σχήμα 5.20 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) διδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης 3-formyl-4-oxo-4H-chromen-7-yl acetate με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου.

- Ένωση 6: Silybin

Όπως φαίνεται (Σχήμα 5.21), η ένωση Silybin με το αμινοξύ Arg στη θέση 1072, αναπτύσσει έναν δεσμό Pi-cation. Αντίστοιχα, σχηματίζονται 2 δεσμοί υδρογόνου με την Arg1132 και μέσω ενός μορίου H₂O δημιουργείται γέφυρα με τα αμινοξέα Asp1069 και Gly1073. Η μόνη διαφορά που παρατηρείται στα αποτελέσματα, είναι η απουσία του δεσμού υδρογόνου που σχηματιζόταν με το αμινοξύ Arg στην θέση 1072 στην εφαρμογή του Glide-SP.

Silybin



Σχήμα 5.21 (Αριστερά) Τριδιάστατη και (Δεξιά) διδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Silybin με το ένζυμο της Τοποϊσομεράσης IV. (Αριστερά) Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και με πράσινο ο Pi-cation δεσμός.

5.3 Γενικά συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι

Λαμβάνοντας υπόψη τα στοιχεία που προέκυψαν από τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας, εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι φυσικές ενώσεις: **Skimmin (κουμαρίνη)**, **Naringenin Derivative (φλαβονοειδές)**, **Nebularine (ριβονουκλεοζίτης πουρίνης)**, **Laudonosine (Ισοκινολίνη)**, **3-formyl-4-oxo-4H-chromen-7-yl-acetate** και **Silybin (φλαβονοειδές)** παρουσιάζουν αυξημένη πιθανότητα να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου Τοποϊσομεράση IV του παθογόνου βακτηρίου *Escherichia coli* καθώς από την αποτίμηση των αποτελεσμάτων της μοριακής πρόσδεσης προέκυψε ότι αλληλεπιδρούν με την πλειοψηφία των κρίσιμων αμινοξέων, όπως αυτοί προσδιορίστηκαν από την εφαρμογή μοριακής πρόσδεσης της Τοποϊσομεράσης IV και του φαρμάκου νοβοβιοκίνη. Επιπλέον, παρουσιάζουν παρόμοια ικανότητα πρόσδεσης με το φάρμακο (παρόμοιες τιμές Glide-score).

Επίσης, παρατηρείται ότι η φυσική ένωση **Skimmin** που επιλέχθηκε ως πιθανός αναστολέας του ενζύμου και το φάρμακο νοβοβιοκίνη ανήκουν στην κατηγορία των κουμαρίνων. Όπως αναφέρθηκε και στο αντίστοιχο κεφάλαιο η νοβοβιοκίνη αποτελεί αναστολέα του προς μελέτη ενζύμου-στόχου, της Τοποϊσομεράσης IV, επομένως η εύρεση μιας ένωσης η οποία ανήκει στην ίδια κατηγορία αποτελεί θετικό δείκτη για τα αποτελέσματα μας.

Ακόμα, ανάμεσα στις προτεινόμενες ενώσεις βρίσκονται το **Naringenin Derivative** και το **Silybin**, τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών. Οι παραπάνω ενώσεις είναι γνωστό ότι διαθέτουν αντιμικροβιακή και ταυτόχρονα αντιοξειδωτική ικανότητα. Επίσης, πρόσφατες μελέτες για το Silybin, φυσική ένωση που απομονώνεται από το εκχύλισμα των καρπών του φυτού *Silybum marianum* (γαϊδουράγκαθο), αναφέρουν πως παρουσιάζει ρυθμιστική δράση ως προς την αντοχή διάφορων μικροοργανισμών σε αντιβιοτικά (Hurtona M. et al., 2022).

Τέλος, σαν γενικό συμπέρασμα, θετικής ένδειξης των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας, είναι το γεγονός ότι η πλειοψηφία των τελικών φυσικών ενώσεων που επιλέχθηκαν με βάση τα κριτήρια που τέθηκαν, ανήκουν σε κατηγορίες φυσικών ενώσεων ήδη αναγνωρισμένων για τις αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές τους δράσεις (π.χ. φλαβονοειδή, κουμαρίνες). Αυτό τις καθιστά από καλύτερη βάση πιθανόν αποτελεσματικές και για τον μελλοντικό στόχο της παρούσας πτυχιακής εργασίας, ο οποίος είναι η αγορά των προτεινόμενων φυσικών ενώσεων και η *in vitro* ενζυμική δοκιμή τους με απώτερο σκοπό την εφαρμογή τους σε συσκευασμένα τρόφιμα.

Βιβλιογραφία

Ξένη βιβλιογραφία

Άρθρα

Abdelhamid, AhmedG, andNohaKEI-DougDoug. 'Controlling Foodborne Pathogens with Natural Antimicrobials by Biological Control and Antivirulence Strategies'. *Heliyon* 6, no. 9 (2020): e05020.

Allocati, Nerino, Michele Masulli, Mikhail F Alexeyev, and Carmine Di Ilio. 'Escherichia Coli in Europe: An Overview'. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10, no. 12 (2013): 6235–54.

Antillón, Marina, Joshua L Warren, Forrest W Crawford, Daniel M Weinberger, Esra Kürüm, Gi Deok Pak, Florian Marks, and Virginia E Pitzer. 'The Burden of Typhoid Fever in Low-and Middle-Income Countries: A Meta-Regression Approach'. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11, no. 2 (2017): e0005376.

Antunes, Patrícia, Joana Mourão, J Campos, and Luísa Peixe. 'Salmonellosis: The Role of Poultry Meat'. *Clinical Microbiology and Infection* 22, no. 2 (2016): 110–21.

Azizi, Fahimeh, Mohammad B Habibi Najafi, and Mohammad R Edalatian Dovom. 'The Biodiversity of Lactobacillus Spp. from Iranian Raw Milk Motal Cheese and Antibacterial Evaluation Based on Bacteriocin-Encoding Genes'. *Amb Express* 7, no. 1 (2017): 1–10.

Bakker, Henk C den, Steven Warchocki, Emily M Wright, Adam F Allred, Christina Ahlstrom, Clyde S Manuel, Matthew J Stasiewicz, Angela Burrell, Sherry Roof, and Laura K Strawn. 'Listeria Floridensis Sp. Nov., Listeria Aquatica Sp. Nov., Listeria Cornellensis Sp. Nov., Listeria Riparia Sp. Nov. and Listeria Grandensis Sp. Nov., from Agricultural and Natural Environments'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64, no. Pt_6 (2014): 1882–89.

Bari, Md, M Anwar Hossain, Kenji Isshiki, and Dike Ukuku. 'Behavior of Yersinia Enterocolitica in Foods'. *Journal of Pathogens* 2011 (2011).

Batiha, Gaber El-Saber, Diaa E Hussein, Abdelazeem M Algammal, Toyosi T George, Philippe Jeandet, Ali Esmail Al-Snafi, Achyut Tiwari, Jorge Pamplona Pagnossa, Clara Mariana Lima, and Nanasahab D Thorat. 'Application of Natural Antimicrobials in Food Preservation: Recent Views'. *Food Control* 126 (2021): 108066.

Bauer, R, and LMT Dicks. 'Mode of Action of Lipid II-Targeting Lantibiotics'. *International Journal of Food Microbiology* 101, no. 2 (2005): 201–16.

Bellon, Steven, Jonathan D Parsons, Yunyi Wei, Koto Hayakawa, Lora L Swenson, Paul S Charifson, Judith A Lippke, Robert Aldape, and Christian H Gross. 'Crystal Structures of Escherichia Coli Topoisomerase IV ParE Subunit (24 and 43 Kilodaltons): A Single Residue Dictates Differences in Novobiocin Potency against Topoisomerase IV and DNA Gyrase'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, no. 5 (2004): 1856–64.

Berlyn, MARY KB, K Brooks Low, and KENNETH E Rudd. 'Linkage Map of Escherichia Coli K-9'. *Escherichia Coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* 2 (1996): 1715–1902.

Bottone, Edward J. 'Yersinia Enterocolitica: Revisitation of an Enduring Human Pathogen'. *Clinical Microbiology Newsletter* 37, no. 1 (2015): 1–8.

Brewer, R, MR Adams, and SF Park. 'Enhanced Inactivation of Listeria Monocytogenes by Nisin in the Presence of Ethanol'. *Letters in Applied Microbiology* 34, no. 1 (2002): 18–21.

Bronnec, Vicky, Hana Turoňová, Agnès Bouju, Stéphane Cruveiller, Ramila Rodrigues, Katerina Demnerova, Odile Tresse, Nabila Haddad, and Monique Zagorec. 'Adhesion, Biofilm Formation, and Genomic Features of Campylobacter Jejuni Bf, an Atypical Strain Able to Grow under Aerobic Conditions'. *Frontiers in Microbiology* 7 (2016): 1002.

Bursová, Šárka, Lenka Necidová, Danka Haruštiaková, and Bohumíra Janštová. 'Growth Potential of Yersinia Enterocolitica in Pasteurised Cow's and Goat's Milk Stored at 8° C and 24° C'. *Food Control* 73 (2017): 1415–19.

Cava, R, E Nowak, A Taboada, and F Marin-Iniesta. 'Antimicrobial Activity of Clove and Cinnamon Essential Oils against Listeria Monocytogenes in Pasteurized Milk'. *Journal of Food Protection* 70, no. 12 (2007): 2757–63.

Ceugniz, Alexandre, Françoise Coucheney, Philippe Jacques, Georges Daube, Véronique Delcenserie, and Djamel Drider. 'Anti-Salmonella Activity and Probiotic Trends of Kluyveromyces Marxianus S-2-05 and Kluyveromyces Lactis S-3-05 Isolated from a French Cheese, Tomme d'Orchies'. *Research in Microbiology* 168, no. 6 (2017): 575–82.

Chen, Hongming, Paul D Lyne, Fabrizio Giordanetto, Timothy Lovell, and Jin Li. 'On Evaluating Molecular-Docking Methods for Pose Prediction and Enrichment Factors'. *Journal of Chemical Information and Modeling* 46, no. 1 (2006): 401–15.

Chlebicz, Agnieszka, and Katarzyna Ślizewska. 'Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review'. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15, no. 5 (2018): 863.

Corbett, Kevin D, Allyn J Schoeffler, Nathan D Thomsen, and James M Berger. 'The Structural Basis for Substrate Specificity in DNA Topoisomerase IV'. *Journal of Molecular Biology* 351, no. 3 (2005): 545–61.

Costa, Luciana F, Tatiane A Paixão, Renée M Tsolis, Andreas J Bäumlér, and Renato L Santos. 'Salmonellosis in Cattle: Advantages of Being an Experimental Model'. *Research in Veterinary Science* 93, no. 1 (2012): 1–6.

Crum-Cianflone, Nancy F. 'Salmonellosis and the Gastrointestinal Tract: More than Just Peanut Butter'. *Current Gastroenterology Reports* 10, no. 4 (2008): 424–31.

Cunningham, FE, VA Proctor, and SJ Goetsch. 'Egg-White Lysozyme as a Food Preservative: An Overview'. *World's Poultry Science Journal* 47, no. 2 (1991): 141–63.

Davidson, P Michael, Faith J Critzer, and T Matthew Taylor. 'Naturally Occurring Antimicrobials for Minimally Processed Foods'. *Annual Review of Food Science and Technology* 4 (2013): 163–90.

Davidson, P Michael, T Matthew Taylor, and Shannon E Schmidt. 'Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds'. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2012, 765–801.

De Jong, Hanna K, Chris M Parry, Tom van der Poll, and W Joost Wiersinga. 'Host–Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis', 2012.

Dekker, John P, and Karen M Frank. 'Salmonella, Shigella, and Yersinia'. *Clinics in Laboratory Medicine* 35, no. 2 (2015): 225–46.

Βιβλίο

Demain, Arnold L, and Lixin Zhang. 'Natural Products and Drug Discovery'. In *Natural Products*, 3–29. Springer, 2005.

Donovan, Summer. 'Listeriosis: A Rare but Deadly Disease'. *Clinical Microbiology Newsletter* 37, no. 17 (2015): 135–40.

Drlica, Karl, and Xilin Zhao. 'DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones'. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61, no. 3 (1997): 377–92.

Embuscado, Milda E. 'Spices and Herbs: Natural Sources of Antioxidants—a Mini Review'. *Journal of Functional Foods* 18 (2015): 811–19.

Epps, Sharon VR, Roger B Harvey, Michael E Hume, Timothy D Phillips, Robin C Anderson, and David J Nisbet. 'Foodborne Campylobacter: Infections, Metabolism, Pathogenesis and Reservoirs'. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10, no. 12 (2013): 6292–6304.

Eringis, Dawn, and Bruce Goldman. 'Locus Discovery: From Structure to Hit in Weeks'. *Drug Discovery Today* 7, no. 5 (2002): S16–18.

Evangelopoulou, G, S Kritas, G Christodoulopoulos, and AR Burriel. 'The Commercial Impact of Pig Salmonella Spp. Infections in Border-Free Markets during an Economic Recession'. *Veterinary World* 8, no. 3 (2015): 257.

Fàbrega, Anna, and Jordi Vila. 'Salmonella Enterica Serovar Typhimurium Skills to Succeed in the Host: Virulence and Regulation'. *Clinical Microbiology Reviews* 26, no. 2 (2013): 308–41.

'Yersinia Enterocolitica: Pathogenesis, Virulence and Antimicrobial Resistance'. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 30, no. 1 (2012): 24–32.

Fan, Jiyu, Ailing Fu, and Le Zhang. 'Progress in Molecular Docking'. *Quantitative Biology* 7, no. 2 (2019): 83–89.

Gambarin, Patrizia, Cristian Magnabosco, Marina Nadia Losio, Enrico Pavoni, Antonietta Gattuso, Giuseppe Arcangeli, and Michela Favretti. 'Listeria Monocytogenes in Ready-to-Eat Seafood and Potential Hazards for the Consumers'. *International Journal of Microbiology* 2012 (2012).

Gellert, Martin, Kiyoshi Mizuuchi, Mary H O'Dea, Tateo Itoh, and Jun-Ichi Tomizawa. 'Nalidixic Acid Resistance: A Second Genetic Character Involved in DNA Gyrase Activity'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, no. 11 (1977): 4772–76.

Ghanbari, Mahdi, Mansooreh Jami, Konrad J Domig, and Wolfgang Kneifel. 'Seafood Biopreservation by Lactic Acid Bacteria—a Review'. *LWT-Food Science and Technology* 54, no. 2 (2013): 315–24.

Gjorgjieva, Marina, Tihomir Tomasic, Michaela Barancokova, Sotirios Katsamakas, Janez Ilas, Paivi Tammela, Lucija Peterlin Mašič, and Danijel Kikelj. 'Discovery of Benzothiazole Scaffold-Based DNA Gyrase B Inhibitors'. *Journal of Medicinal Chemistry* 59, no. 19 (2016): 8941–54.
Gyawali, Rabin, and Salam A Ibrahim. 'Natural Products as Antimicrobial Agents'. *Food Control* 46 (2014): 412–29.

Hinman, Jack W, Herman Hoeksema, E Louis Caron, and WG Jackson. 'THE PARTIAL STRUCTURE OF NOVOBIOCIN (STREPTONIVICIN). 1 II.' *Journal of the American Chemical Society* 78, no. 5 (1956): 1072–74.

Hoeksema, Herman, James L Johnson, and Jack W Hinman. 'Structural Studies on Streptonivcin, 1 a New Antibiotic'. *Journal of the American Chemical Society* 77, no. 24 (1955): 6710–11.

Hoshino, Kazuki, Akihiro Kitamura, Ian Morrissey, Kenichi Sato, J-I Kato, and Hideo Ikeda. 'Comparison of Inhibition of Escherichia Coli Topoisomerase IV by Quinolones with DNA Gyrase Inhibition'. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38, no. 11 (1994): 2623–27.

Hossain, Md Iqbal, Mohammad Sadekuzzaman, and Sang-Do Ha. 'Probiotics as Potential Alternative Biocontrol Agents in the Agriculture and Food Industries: A Review'. *Food Research International* 100 (2017): 63–73.

Hurtado, Ana, Medelin Ocejo, and Beatriz Oporto. 'Salmonella Spp. and Listeria Monocytogenes Shedding in Domestic Ruminants and Characterization of Potentially Pathogenic Strains'. *Veterinary Microbiology* 210 (2017): 71–76.

Hurtová, Martina, Kristýna Káňová, Simona Dobiasová, Kateřina Holasová, Denisa Čáková, Lan Hoang, David Biedermann, Marek Kuzma, Josef Cvačka, and Vladimír Křen. 'Selectively Halogenated Flavonolignans—Preparation and Antibacterial Activity'. *International Journal of Molecular Sciences* 23, no. 23 (2022): 15121.

Ingraham, JL, and JL Stokes. 'Psychrophilic Bacteria'. *Bacteriological Reviews* 23, no. 3 (1959): 97–108.

Irwin, John J, and Brian K Shoichet. 'ZINC— a Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening'. *Journal of Chemical Information and Modeling* 45, no. 1 (2005): 177–82.

Jabbari, Vahid, Mahmoud Sowti Khiabani, Reza Rezaei Mokarram, Azad Mohammad Hassanzadeh, Elham Ahmadi, Sasan Gharenaghadeh, Nayyer Karimi, and Hossein Samadi Kafil. 'Lactobacillus Plantarum as a Probiotic Potential from Kouzeh Cheese (Traditional Iranian Cheese) and Its Antimicrobial Activity'. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 9, no. 2 (2017): 189–93.

Janowska, Małgorzata, B Jędrzejewska, and Joanna Janowska. 'Jersinioza-Nowe Wyzwanie Współczesnej Medycyny'. *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu* 18, no. 3 (2012).

Jarvis, Nathan A, Corliss A O'Bryan, Turki M Dawoud, Si Hong Park, Young Min Kwon, Philip G Crandall, and Steven C Ricke. 'An Overview of Salmonella Thermal Destruction during Food Processing and Preparation'. *Food Control* 68 (2016): 280–90.

Jiang, Chengsheng, Kristi S Shaw, Crystal R Upperman, David Blythe, Clifford Mitchell, Raghu Murtugudde, Amy R Sapkota, and Amir Sapkota. 'Climate Change, Extreme Events and Increased Risk of Salmonellosis in Maryland, USA: Evidence for Coastal Vulnerability'. *Environment International* 83 (2015): 58–62.

Jiang, Yueming, and Yuebiao Li. 'Effects of Chitosan Coating on Postharvest Life and Quality of Longan Fruit'. *Food Chemistry* 73, no. 2 (2001): 139–43.

Kaakoush, Nadeem O, Natalia Castaño-Rodríguez, Hazel M Mitchell, and Si Ming Man. 'Global Epidemiology of Campylobacter Infection'. *Clinical Microbiology Reviews* 28, no. 3 (2015): 687–720.

Kaper, James B, James P Nataro, and Harry LT Mobley. 'Pathogenic Escherichia Coli'. *Nature Reviews Microbiology* 2, no. 2 (2004): 123–40.

Khorshidian, Nasim, Mojtaba Yousefi, Elham Khanniri, and Amir Mohammad Mortazavian. 'Potential Application of Essential Oils as Antimicrobial Preservatives in Cheese'. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 45 (2018): 62–72.

Kong, Fanbin, Juming Tang, Barbara Rasco, and Chuck Crapo. 'Kinetics of Salmon Quality Changes during Thermal Processing'. *Journal of Food Engineering* 83, no. 4 (2007): 510–20.

Kore, Kokeb, Biruhtesfa Asrade, Kassa Demissie, and Kassaye Aragaw. 'Characterization of Salmonella Isolated from Apparently Healthy Slaughtered Cattle and Retail Beef in Hawassa, Southern Ethiopia'. *Preventive Veterinary Medicine* 147 (2017): 11–16.

Krutkiewicz, Alicja. 'Kampylobakteriozy u Ludzi i Zwierząt'. *Życie Weterynaryjne* 83, no. 4 (2008): 285–88.

Kurtz, Jonathan R, J Alan Goggins, and James B McLachlan. 'Salmonella Infection: Interplay between the Bacteria and Host Immune System'. *Immunology Letters* 190 (2017): 42–50.

Levine, Cindy, Hiroshi Hiasa, and Kenneth J Mariani. 'DNA Gyrase and Topoisomerase IV: Biochemical Activities, Physiological Roles during Chromosome Replication, and Drug Sensitivities'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression* 1400, no. 1–3 (1998): 29–43.

Lipinski, Christopher A, Franco Lombardo, Beryl W Dominy, and Paul J Feeney. 'Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings'. *Advanced Drug Delivery Reviews* 23, no. 1–3 (1997): 3–25.

López-Pedemonte, Tomás J, Artur X Roig-Sagués, Antonio J Trujillo, Marta Capellas, and Buenaventura Guamis. 'Inactivation of Spores of Bacillus Cereus in Cheese by High Hydrostatic

Pressure with the Addition of Nisin or Lysozyme'. *Journal of Dairy Science* 86, no. 10 (2003): 3075–81.

Lucera, Annalisa, Cristina Costa, Amalia Conte, and Matteo A Del Nobile. 'Food Applications of Natural Antimicrobial Compounds'. *Frontiers in Microbiology* 3 (2012): 287.

Madhavi Sastry, G, Matvey Adzhigirey, Tyler Day, Ramakrishna Annabhimoju, and Woody Sherman. 'Protein and Ligand Preparation: Parameters, Protocols, and Influence on Virtual Screening Enrichments'. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 27, no. 3 (2013): 221–34.

Mahmud, Jumana, and Ruhul A Khan. 'Characterization of Natural Antimicrobials in Food System'. *Advances in Microbiology* 8, no. 11 (2018): 894.

Marušić, Ana. 'Food Safety and Security: What Were Favourite Topics for Research in the Last Decade?' *Journal of Global Health* 1, no. 1 (2011): 72.

McNeill, Charleen, Wendy Sisson, and Anna Jarrett. 'Listeriosis: A Resurfacing Menace'. *The Journal for Nurse Practitioners* 13, no. 10 (2017): 647–54.

McSorley, Stephen J. 'Immunity to Intestinal Pathogens: Lessons Learned from S Almonella'. *Immunological Reviews* 260, no. 1 (2014): 168–82.

Βιβλίο

Mendonca, Aubrey, Armitra Jackson-Davis, Rkia Moutiq, and Emalie Thomas-Popo. 'Use of Natural Antimicrobials of Plant Origin to Improve the Microbiological Safety of Foods'. In *Food and Feed Safety Systems and Analysis*, 249–72. Elsevier, 2018.

Modi, Shivani, MN Brahmhatt, YA Chatur, and JB Nayak. 'Prevalence of Campylobacter Species in Milk and Milk Products, Their Virulence Gene Profile and Anti-Bio Gram'. *Veterinary World* 8, no. 1 (2015): 1.

Βιβλίο

Morris, Garrett M, and Marguerita Lim-Wilby. 'Molecular Docking'. In *Molecular Modeling of Proteins*, 365–82. Springer, 2008.

Βιβλίο

Newell, Diane G, Lapo Mughini-Gras, Ruwani S Kalupahana, and Jaap A Wagenaar. 'Campylobacter Epidemiology—Sources and Routes of Transmission for Human Infection'. In *Campylobacter*, 85–110. Elsevier, 2017.

Oprea, Tudor Ionel. 'Virtual Screening in Lead Discovery: A Viewpoint'. *Molecules* 7, no. 1 (2002): 51–62.

Orsi, Renato H, and Martin Wiedmann. 'Characteristics and Distribution of Listeria Spp., Including Listeria Species Newly Described since 2009'. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100, no. 12 (2016): 5273–87.

Osimani, Andrea, and Francesca Clementi. 'The Occurrence of Listeria Monocytogenes in Mass Catering: An Overview in the European Union'. *International Journal of Hospitality Management* 57 (2016): 9–17.

Ouwehand, Arthur C, Seppo Salminen, and Erika Isolauri. 'Probiotics: An Overview of Beneficial Effects'. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*, 2002, 279–89.

Özogul, Yesim, Fatih Özogul, and Piotr Kulawik. 'The Antimicrobial Effect of Grapefruit Peel Essential Oil and Its Nanoemulsion on Fish Spoilage Bacteria and Food-Borne Pathogens'. *LWT* 136 (2021): 110362.

Pagadala, Nataraj S, Khajamohiddin Syed, and Jack Tuszynski. 'Software for Molecular Docking: A Review'. *Biophysical Reviews* 9, no. 2 (2017): 91–102.

Park, Si Hong, Muhsin Aydin, Anita Khatiwara, Maureen C Dolan, David F Gilmore, Jennifer L Bouldin, Soohyoun Ahn, and Steven C Ricke. 'Current and Emerging Technologies for Rapid Detection and Characterization of Salmonella in Poultry and Poultry Products'. *Food Microbiology* 38 (2014): 250–62.

Pellegrino, Luisa, and Antonio Tirelli. 'A Sensitive HPLC Method to Detect Hen's Egg White Lysozyme in Milk and Dairy Products'. *International Dairy Journal* 10, no. 7 (2000): 435–42.

Peng, Hong, and Kenneth J Mariani. 'Escherichia Coli Topoisomerase IV. Purification, Characterization, Subunit Structure, and Subunit Interactions.' *Journal of Biological Chemistry* 268, no. 32 (1993): 24481–90.

Pesciaroli, M, L Cucco, S De Luca, FR Massacci, C Maresca, L Medici, M Panicià, E Scoccia, M Staffolani, and G Pezzotti. 'Association between Pigs with High Caecal Salmonella Loads and Carcass Contamination'. *International Journal of Food Microbiology* 242 (2017): 82–86.

Piskernik, Saša, Anja Klančnik, Charlotte Tandrup Riedel, Lone Brøndsted, and Sonja Smole Možina. 'Reduction of Campylobacter Jejuni by Natural Antimicrobials in Chicken Meat-Related Conditions'. *Food Control* 22, no. 5 (2011): 718–24.

Pisoschi, Aurelia Magdalena, Aneta Pop, Cecilia Georgescu, Violeta Turcuș, Neli Kinga Olah, and Endre Mathe. 'An Overview of Natural Antimicrobials Role in Food'. *European Journal of Medicinal Chemistry* 143 (2018): 922–35.

Rahman, Atiqur, Tania S Bonny, Siriporn Stonsaovapak, and Chiraporn Ananchaipattana. 'Yersinia Enterocolitica: Epidemiological Studies and Outbreaks'. *Journal of Pathogens* 2011 (2011).

Rawat, Seema. 'Food Spoilage: Microorganisms and Their Prevention'. *Asian Journal of Plant Science and Research* 5, no. 4 (2015): 47–56.

Raybaudi-Massilia, Rosa M, Jonathan Mosqueda-Melgar, Robert Soliva-Fortuny, and Olga Martín-Belloso. 'Control of Pathogenic and Spoilage Microorganisms in Fresh-cut Fruits and Fruit Juices by Traditional and Alternative Natural Antimicrobials'. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8, no. 3 (2009): 157–80.

Ricke, SC. 'Perspectives on the Use of Organic Acids and Short Chain Fatty Acids as Antimicrobials'. *Poultry Science* 82, no. 4 (2003): 632–39.

Rodríguez-Sánchez, S, P Fernández-Pacheco, S Seseña, C Pintado, and M LI Palop. 'Selection of Probiotic Lactobacillus Strains with Antimicrobial Activity to Be Used as Biocontrol Agents in Food Industry'. *LWT* 143 (2021): 111142.

Rönnqvist, M, V Välttilä, J Ranta, and P Tuominen. 'Salmonella Risk to Consumers via Pork Is Related to the Salmonella Prevalence in Pig Feed'. *Food Microbiology* 71 (2018): 93–97.

Rosner, Bettina M, Klaus Stark, and Dirk Werber. 'Epidemiology of Reported Yersinia Enterocolitica Infections in Germany, 2001-2008'. *BMC Public Health* 10, no. 1 (2010): 1–8.

Ross, R Paul, Sheila Morgan, and Collin Hill. 'Preservation and Fermentation: Past, Present and Future'. *International Journal of Food Microbiology* 79, no. 1–2 (2002): 3–16.

Rothrock Jr, Michael J, Morgan L Davis, Aude Locatelli, Aaron Bodie, Tori G McIntosh, Janet R Donaldson, and Steven C Ricke. 'Listeria Occurrence in Poultry Flocks: Detection and Potential Implications'. *Frontiers in Veterinary Science* 4 (2017): 125.

Rouse, Susan, and Douwe van Sinderen. 'Bioprotective Potential of Lactic Acid Bacteria in Malting and Brewing'. *Journal of Food Protection* 71, no. 8 (2008): 1724–33.

Βιβλίο

Sahl, Jason W, Carolyn R Morris, and David A Rasko. 'Comparative Genomics of Pathogenic Escherichia Coli'. In *Escherichia Coli*, 21–43. Elsevier, 2013.

Scallan, Elaine, Robert M Hoekstra, Frederick J Angulo, Robert V Tauxe, Marc-Alain Widdowson, Sharon L Roy, Jeffery L Jones, and Patricia M Griffin. 'Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens'. *Emerging Infectious Diseases* 17, no. 1 (2011): 7.

Schaake, Julia, Anna Drees, Petra Grüning, Frank Uliczka, Fabio Pisano, Tanja Thiermann, Alexandra von Altrock, Frauke Seehusen, Peter Valentin-Weigand, and Petra Dersch. 'Essential Role of Invasin for Colonization and Persistence of Yersinia Enterocolitica in Its Natural Reservoir Host, the Pig'. *Infection and Immunity* 82, no. 3 (2014): 960–69.

Schäfer, Daniela F, Juliana Steffens, Juliana Barbosa, Jamile Zeni, Natalia Paroul, Eunice Valduga, Alexander Junges, Geciane T Backes, and Rogério L Cansian. 'Monitoring of Contamination Sources of Listeria Monocytogenes in a Poultry Slaughterhouse'. *LWT* 86 (2017): 393–98.

Schielke, Anika, Bettina M Rosner, and Klaus Stark. 'Epidemiology of Campylobacteriosis in Germany—Insights from 10 Years of Surveillance'. *BMC Infectious Diseases* 14, no. 1 (2014): 1–8.

Shan, Bin, Yi-Zhong Cai, John D Brooks, and Harold Corke. 'Antibacterial and Antioxidant Effects of Five Spice and Herb Extracts as Natural Preservatives of Raw Pork'. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89, no. 11 (2009): 1879–85.

Shen, Jianhua, Xiaoying Xu, Feng Cheng, Hong Liu, Xiaomin Luo, Jingkan Shen, Kaixian Chen, Weimin Zhao, Xu Shen, and Hualiang Jiang. 'Virtual Screening on Natural Products for Discovering Active Compounds and Target Information'. *Current Medicinal Chemistry* 10, no. 21 (2003): 2327–42.

Shoichet, Brian K. 'Virtual Screening of Chemical Libraries'. *Nature* 432, no. 7019 (2004): 862–65.

Silva, Joana, Daniela Leite, Mariana Fernandes, Cristina Mena, Paul Anthony Gibbs, and Paula Teixeira. 'Campylobacter Spp. as a Foodborne Pathogen: A Review'. *Frontiers in Microbiology* 2 (2011): 200.

Sivaramalingam, Theva, Scott A McEwen, David L Pearl, Davor Ojkic, and Michele T Guerin. 'A Temporal Study of Salmonella Serovars from Environmental Samples from Poultry Breeder Flocks in Ontario between 1998 and 2008'. *Canadian Journal of Veterinary Research* 77, no. 1 (2013): 1–11.

Smith-Palmer, A, J Stewart, and Lorna Fyfe. 'The Potential Application of Plant Essential Oils as Natural Food Preservatives in Soft Cheese'. *Food Microbiology* 18, no. 4 (2001): 463–70.
Snider, Timothy A, Tamara Gull, Todd A Jackson, Francisco J Martinez-Becerra, Daniel R Picking, William D Picking, and Wendy L Picking. 'Experimental Salmonellosis Challenge Model in Older Calves'. *Veterinary Microbiology* 170, no. 1–2 (2014): 65–72.

Soultos, N, Zisis Tzikas, Amin Abraham, Dimitrios Georgantelis, and Ioannis Ambrosiadis. 'Chitosan Effects on Quality Properties of Greek Style Fresh Pork Sausages'. *Meat Science* 80, no. 4 (2008): 1150–56.

Srinivasan, K. 'Antioxidant Potential of Spices and Their Active Constituents'. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54, no. 3 (2014): 352–72.

Sugino, Akio, Craig L Peebles, Kenneth N Kreuzer, and Nicholas R Cozzarelli. 'Mechanism of Action of Nalidixic Acid: Purification of Escherichia Coli NalA Gene Product and Its Relationship to DNA Gyrase and a Novel Nicking-Closing Enzyme'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, no. 11 (1977): 4767–71.

Tahoun, Asmaa BMB, Rasha MM Abou Elez, Eman N Abdelfatah, Ibrahim Elsohaby, Attia A El-Gedawy, and Ahmed M Elmoslemany. 'Listeria Monocytogenes in Raw Milk, Milking Equipment and Dairy Workers: Molecular Characterization and Antimicrobial Resistance Patterns'. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 10 (2017): 264–70.

Tajkarimi, MM, Salam A Ibrahim, and DO Cliver. 'Antimicrobial Herb and Spice Compounds in Food'. *Food Control* 21, no. 9 (2010): 1199–1218.

Tiwari, Brijesh K, Vasilis P Valdramidis, Colm P O'Donnell, Kasiviswanathan Muthukumarappan, Paula Bourke, and PJ Cullen. 'Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, no. 14 (2009): 5987–6000.
Todorov, Svetoslav Dimitrov, Saso Stojanovski, Ilija Iliev, Penka Moncheva, Luis Augusto Nero, and Iskra Vitanova Ivanova. 'Technology and Safety Assessment for Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Bulgarian Fermented Meat Product "Lukanka"'. *Brazilian Journal of Microbiology* 48 (2017): 576–86.

Varney, Michael D, Gifford P Marzoni, Cindy L Palmer, Judith G Deal, Stephanie Webber, Katherine M Welsh, Russell J Bacquet, Charlotte A Bartlett, and Catharine A Morse. 'Crystal-Structure-Based Design and Synthesis of Benz [Cd] Indole-Containing Inhibitors of Thymidylate Synthase'. *Journal of Medicinal Chemistry* 35, no. 4 (1992): 663–76.

Βιβλίο

Villalobos-Delgado, Luz H, GV Nevárez-Moorillon, Irma Caro, Emiliano J Quinto, and Javier Mateo. 'Natural Antimicrobial Agents to Improve Foods Shelf Life'. In *Food Quality and Shelf Life*, 125–57. Elsevier, 2019.

Von Itzstein, Mark. 'The War against Influenza: Discovery and Development of Sialidase Inhibitors'. *Nature Reviews Drug Discovery* 6, no. 12 (2007): 967–74.

Von Itzstein, Mark, Wen-Yang Wu, Gaik B Kok, Michael S Pegg, Jeffrey C Dyason, Betty Jin, Tho Van Phan, Mark L Smythe, Hume F White, and Stuart W Oliver. 'Rational Design of Potent Sialidase-Based Inhibitors of Influenza Virus Replication'. *Nature* 363, no. 6428 (1993): 418–23.

Wieczorek, Kinga, and Jacek Osek. 'Antimicrobial Resistance Mechanisms among Campylobacter'. *BioMed Research International* 2013 (2013).

Wiedemann, Agnès, Isabelle Virlogeux-Payant, Anne-Marie Chaussé, Adam Schikora, and Philippe Velge. 'Interactions of Salmonella with Animals and Plants'. *Frontiers in Microbiology* 5 (2015): 791.

Yoon, Yohan, Soomin Lee, and Kyoung-Hee Choi. 'Microbial Benefits and Risks of Raw Milk Cheese'. *Food Control* 63 (2016): 201–15.

Yousef, Ahmed E, and Ahmed G Abdelhamid. 'Behavior of Microorganisms in Food: Growth, Survival, and Death'. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2019, 3–21.

Zang, Ping, Aijie Gong, Peirong Zhang, and Jinling Yu. 'Targeting Druggable Enzymome by Exploiting Natural Medicines: An in Silico–in Vitro Integrated Approach to Combating Multidrug Resistance in Bacterial Infection'. *Pharmaceutical Biology* 54, no. 4 (2016): 604–18.
Zhu, Qi, Ravi Gooneratne, and Malik Altaf Hussain. 'Listeria Monocytogenes in Fresh Produce: Outbreaks, Prevalence and Contamination Levels'. *Foods* 6, no. 3 (2017): 21.

Ελληνική Βιβλιογραφία

Άρθρα

Κρίση, Ευτυχία. 'Υπολογιστικά Εργαλεία Για Την Αναζήτηση Νέων Βιοδραστικών Ενώσεων Σε Επιλεγμένους Πρωτεϊνικούς Στόχους', 2017.

Λιακόπουλος, Απόστολος Χ. 'Διερεύνηση Μηχανισμών Αντοχής Των Gram Θετικών Κόκκων Στις Οξαζολιδινόνες', 2009.

Βιβλίο

Τυμπής Δ., Πετράκης Ελ., Κοντελής Σπ. *Μικροβιολογία Τροφίμων, Μεθοδολογία Και Τεχνικές Αναλύσεων*, 2016.

Ιστοσελίδες

Brendadatabase(<https://www.brenda-enzymes.org/>)

ProteinDataBank(<https://www.rcsb.org>)

Specs library (<https://www.specs.net/>)

Zincdatabase (<https://zinc15.docking.org>)

Εθνικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας- Λιστερίωση (<https://eody.gov.gr/>)

Πηγές εικόνων

Εικόνα 2.11 Ανάπτυξη μικροοργανισμών *Proteus*, *Salmonella*, *Escherichiacoli*, *Shigella* σε τρυβλίο Petri (<https://theory.labster.com/ss-agar/>)

Εικόνα 2.5 Το παθογόνο βακτήριο *Salmonella* και τα τρόφιμα στα οποία εμφανίζεται (<https://www.ift.org/news-and-publications/food-technology-magazine/issues/2020/december/columns/food-safety-and-quality-salmonella-salmonellosis-and-produce>.)
(https://medlabgr.blogspot.com/2011/11/blog-post_3.html)
(<https://www.in.gr/2005/12/22/greece/salmonella-se-xoirino-kreas-apo-dania-kai-akatallilos-kafes-apo-bietnam/>)

(<https://www.reader.gr/ygeia/155865/ayxanoyv-poly-ton-kindyno-gia-salmonela-oi-syskeyasmenes-salates-kommenon-lahanikon>)

(<https://www.onmed.gr/ygeia-eidhseis/story/374424/odigies-efet-pos-tha-xexorizete-an-ta-galaktokomika-poy-agorazete-ftiaxontai-apo-elliniko-gala>)

Εικόνα 2.6 Μέθοδοι αντιμετώπισης βακτηρίων: Χρήση αποστειρωτήρων για την εφαρμογή θερμικής επεξεργασίας(<https://opencourses.ionio.gr/modules/document/file.php/DFO111/lecture%20%CE%9A%CE%9F%CE%9D%CE%A3%CE%95%CE%A1%CE%92%CE%9F%CE%A0%CE%9F%CE%99%CE%97%CE%A3%CE%97.pdf>), Εφαρμογή χαμηλών θερμοκρασιών με Ψύξη-Κατάψυξη (<http://garcinia-cambogia.gr/trofima-ston-katapsykti/>), Μείωση ενεργότητας υδατός με αφυδάτωση (Φρούτα) (<https://www.proionta-tis-fisis.com/7-apoxiramena-frouta-pou-mas-giatrevoun/>), Μείωση pH (με την προσθήκη λεμονιού) (<https://pharmagel.gr/i-evergetiki-drasi-tou-lemonioy-stin-ygeia/>), Προσθήκη χημικών συντηρητικών (<https://meygeia.gr/prostheta-trofimon-yparchoun/>), Προσθήκη αντιβιοτικών (https://atlantea.News/antiviotika_filoi_i_exthroi_mas/)

Εικόνα 2.7 Δομή χιτοζάνης (<http://gr.pioneerbioteck.com/info/want-to-know-more-about-chitosan-51824623.html>).

Εικόνα 2.8 Απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής της Τοποϊσομεράσης IV συμπλοκοποιημένη με τον αναστολέα νοβοβιοκίνη. (<https://www.rcsb.org/structure/1s14>)

Εικόνα 2.9 Κρυσταλλική δομή της υπομονάδας ParC της Τοποϊσομεράσης IV(Corbett et al., 'The structural basis for substrate specificity in DNA topoisomerase IV'.)

Εικόνα 2.10 Κρυσταλλική δομή υπομονάδας ParE της τοποϊσομεράσης IV συμπλοκοποιημένη με ADPNP (Bellon et al., 'Crystal structures of Escherichia coli topoisomerase IV ParE subunit (24 and 43 kilodaltons): a single residue dictates differences in novobiocin potency against topoisomerase IV and DNA gyrase'.)

Εικόνα 3.1: 1) Κρυσταλλική δομή GyrB-ATPase συμπλοκοποιημένη με τη ραδισικόλη, 2) Δομή ραδισικόλης (Zang et al., 'Targeting druggable enzymome by exploiting natural medicines: An in silico-in vitro integrated approach to combating multidrug resistance in bacterial infection'.)

Εικόνα 3.2: 1) Δομή αμυγδαλίνης, 2) Κρυσταλλική δομή tyrosyl-tRNA συνθετάσης συμπλοκοποιημένη με αμυγδαλίνη (Zang et al., 'Targeting druggable enzymome by exploiting natural medicines: An in silico-in vitro integrated approach to combating multidrug resistance in bacterial infection'.)