



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Πτυχιακή Εργασία

«Πρόβλεψη της Αντιμικροβιακής Δράσης Αιθέριου Ελαίου Λεβάντας»

Συγγραφέας: Αικατερίνη Φιλίππη Σπύρου

A.M.: 19684091



Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Ευτυχία Κρίτση

Αιγάλεω, Ιούλιος 2023



**UNIVERSITY OF WEST ATTICA
SCHOOL OF FOOD SCIENCE
DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY**

Diploma Thesis

«Antimicrobial Activity Prediction of Lavender Essential Oil»

Student name and surname: Aikaterini Filippi Spyrou

Registration Number: 19684091



Supervisor: Kritsi Eftichia

Aigaleo, July 2023



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Εφαρμογή Υπολογιστικών Τεχνικών για τη Μελέτη της Αντιμικροβιακής Δράσης Αιθέριου Ελαίου Λεβάντας

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	Ευτυχία Κρίση	Επίκουρη Καθηγήτρια/Επιβλέπουσα	
2	Βασιλεία Σινάνογλου	Καθηγήτρια/Μέλος	
3	Παναγιώτης Ζουμπουλάκης	Αναπληρωτής Καθηγητής/Μέλος	

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Αικατερίνη Φιλίππη Σπύρου του Ανδρέα, με αριθμό μητρώου 19684091 φοιτήτρια του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Τεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνω υπεύθυνα ότι: «Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα 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, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα



(Υπογραφή)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, Κρίση Ευτυχία, Επίκουρη Καθηγήτρια για την καθοδήγηση που μου προσέφερε, την ενέργεια και το χρόνο που διέθεσε χαρίζοντάς μου χρήσιμες συμβουλές και οδηγίες για την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας και την αγάπη που επέδειξε στηρίζοντάς με σε ολόκληρη τη δύσκολη πορεία προς την παραλαβή πτυχίου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής Βασιλεία Σινάνογλου, Καθηγήτρια ΠΑΔΑ και Παναγιώτη Ζουμπουλάκη, Αναπληρωτή Καθηγητή ΠΑΔΑ για τις παρατηρήσεις τους καθώς επίσης και τη συμμετοχή τους ως μέλη της εξεταστικής επιτροπής της παρούσας εργασίας.

Τέλος, οφείλω επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και τους ανθρώπους εκείνους που στάθηκαν δίπλα μου σε όλο το διάστημα των σπουδών μου, συμπεριλαμβανομένων των φίλων μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σήμερα, κρίσιμο πρόβλημα για τη βιομηχανία τροφίμων συνιστά η ανάπτυξη αλλά και ο πολλαπλασιασμός των παθογόνων μικροοργανισμών στα προϊόντα τροφίμων. Αποτέλεσμα αποτελεί η πιθανή μόλυνση του ανθρώπου από την κατανάλωσή τους με κίνδυνο την απαιτούμενη ασφάλεια και ποιότητα των προϊόντων. Τροφιμογενείς ασθένειες με σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία αναπτύσσονται εξαιτίας βακτηρίων όπως, *Staphylococcus spp.* και *Escherichia coli*. Επομένως, η αντιμετώπισή τους κρίνεται απαραίτητη. Η πρόληψη είναι δυνατή μέσω εφαρμογής κατάλληλων πρακτικών υγιεινής, ενώ ορισμένοι τρόποι αντιμετώπισης σχετίζονται με τη θερμική επεξεργασία και τη χρήση αντιβιοτικών. Λόγω της υποβάθμισης των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών και την αντοχή στα αντιβιοτικά που αναπτύσσουν οι μικροοργανισμοί, δημιουργούνται νέες τάσεις για την καταπολέμησή τους. Τα τελευταία χρόνια σημειώνονται αξιολογες προσπάθειες προς εύρεση νέων, κυρίως φυσικών, ενώσεων με αντιμικροβιακή δράση που προστίθενται στα προϊόντα τροφίμων.

Σκοπός της εν λόγω πτυχιακής εργασίας είναι η πρόβλεψη της αντιμικροβιακής δράσης των ενώσεων που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο λεβάντας κατά της δράσης των ενζύμων διϋδροφολικής αναγωγής και DNA γυράσης B των παθογόνων βακτηρίων, *S.aureus* και *E.coli*, μέσω εφαρμογής υπολογιστικών εργαλείων εικονικής σάρωσης.

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

- Σχηματισμός αλληλεπιδράσεων μεταξύ των εξεταζόμενων ενώσεων και αμινοξέων που περιλαμβάνονται στη θέση πρόσδεσης.
- Ικανότητα πρόσδεσης των εξεταζόμενων φυσικών ενώσεων (Glide-score).

Τέλος, από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της μοριακής πρόσδεσης (molecular docking) προέκυψαν τρεις ενώσεις, οι οποίες δύναται να αγοραστούν μελλοντικά και να πραγματοποιηθεί *in vitro* βιολογική τους αποτίμηση ως αναστολείς του ενζύμου DNA γυράση B του *S.aureus*.

Λέξεις - Κλειδιά: παθογόνα βακτήρια, τροφιμογενή νοσήματα, αιθέριο έλαιο λεβάντας, διϋδροφολική αναγωγής, DNA γυράση B, τεχνικές εικονικής σάρωσης, μοριακή πρόσδεση

ABSTRACT

Nowadays, the growth and multiplication of pathogenic microorganisms in food products is considered an important issue for the food industry in terms of safety and quality of the final product and human health. Bacteria, such as *Staphylococcus spp.* and *Escherichia coli* are responsible for foodborne illnesses causing serious health-related problems. In order to reduce and prevent the risk of foodborne illnesses, appropriate hygiene policies should be implemented, whereas food processing practices and the use of antibiotics enable their treatment. The degradation of foods organoleptic characteristics and the resistance to antibiotics have created new trends for microorganisms confrontation. During these past few years, notable efforts have been made, in order to discover novel, mainly natural compounds that act as antibacterial agents when added to food products.

The aim of the present thesis is the application of virtual screening techniques to predict the inhibitory activity of compounds present in lavender essential oil.

Particularly, dihydrofolate reductase and DNA gyrase B of *S.aureus* and *E.coli* were investigated.

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

- Interactions between the tested compounds and the amino-acids of the binding site
- Predicted binding affinity of the examined compounds (Glide-score).

Finally, the molecular docking results evaluation indicated three lavender essential oil compounds, which can be purchased and tested through *in vitro* enzymatic assays to validate their activity as inhibitors of the DNA Gyrase B enzyme of *S.aureus*.

Keywords: pathogenic bacteria, foodborne diseases, lavender essential oil, dihydrofolate reductase, DNA gyrase B, virtual screening techniques, molecular docking

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT	7
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	12
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	13
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή.....	16
1.1 Η βιομηχανία τροφίμων σήμερα.....	16
1.2 Αλυσίδα τροφίμων - Κατανόηση πιθανών επιμολύνσεων.....	16
1.3 Παραλαβή της πρώτης ύλης	17
1.4 Επεξεργασία της πρώτης ύλης	17
1.5 Συσκευασία έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων	19
1.6 Μεταφορά έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων	21
1.7 Τελική αγορά τροφίμων.....	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Μικροοργανισμοί και τρόφιμο	22
2.1 Εισαγωγή	22
2.2 Βακτήρια και τρόφιμα	22
2.3 Μύκητες και τρόφιμα	24
2.4 Παρουσία μικροοργανισμών στα τρόφιμα.....	24
2.5 Απαίτηση τροφίμου σε μικροοργανισμούς	24
2.6 Τροφικές δηλητηριάσεις.....	25
2.7 Γένος <i>Staphylococcus</i>	25
2.8 Χαρακτηριστικά <i>Staphylococcus aureus</i>	26
2.9 Εντεροτοξίνες <i>Staphylococcus aureus</i>	26

2.10 Προσβολή από <i>Staphylococcus aureus</i>	27
2.11 <i>Escherichia coli</i>	28
2.12 Χαρακτηριστικά <i>Escherichia coli</i>	28
2.13 Προσβολή από <i>Escherichia coli</i>	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Χαρακτηριστικά ένζυμα εντοπιζόμενα σε <i>Staphylococcus aureus</i> και <i>Escherichia coli</i>	31
3.1 Διϋδροφολική αναγωγή (DHFR).....	31
3.3 DNA γυράση B (DNA gyrase B).....	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Αιθέριο έλαιο λεβάντας.....	36
4.1 Χαρακτηριστικά και δράσεις.....	36
4.2 Πορεία παρασκευής αιθέριου ελαίου λεβάντας.....	37
4.3 Σύνθεση αιθέριου ελαίου λεβάντας	38
4.4 Σύνδεση αιθέριου ελαίου λεβάντας με <i>Staphylococcus aureus</i> και <i>Escherichia coli</i>	38
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Υπολογιστικά Εργαλεία Εικονικής Σάρωσης.....	39
5.1 Εισαγωγή	39
5.2 Μοριακή πρόσδεση (Molecular Docking).....	39
Σκοπός Εργασίας.....	42
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Δημιουργία & προετοιμασία βιβλιοθηκών ενώσεων	43
6.1 Δημιουργία βιβλιοθήκης ενώσεων	43
6.2 Προετοιμασία βιβλιοθήκης ενώσεων.....	55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Επιλογή & προετοιμασία ενζύμων	55
7.1 Επιλογή ενζύμων	55
7.2 Προετοιμασία ενζύμων.....	60
7.3 Εφαρμογή πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης	66
7.4 Αποτίμηση αποτελεσμάτων εφαρμογής πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης στη βιβλιοθήκη ενώσεων αιθέριου ελαίου λεβάντας	69

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Γενικά συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι	109
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	109

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Περιεχόμενες ενώσεις αιθέριου ελαίου λεβάντας	43
Πίνακας 2: Ένζυμα στόχοι εντός <i>S.aureus</i>	56
Πίνακας 3: Ένζυμα στόχοι του βακτηρίου <i>E.coli</i>	58
Πίνακας 4: Σχηματιζόμενοι δεσμοί μεταξύ του συμπλοκοποιημένου προσδέτη 7-(2-ethoxynaphthalen-1-yl)-6-methylquinazoline-2,4-diamine και του ενζύμου DHFR (PDB: 3SRW) του <i>S.aureus</i>	61
Πίνακας 5: Σχηματιζόμενοι δεσμοί μεταξύ του συμπλοκοποιημένου προσδέτη 4-bromo-5-methyl-N-[1-(3-nitropyridin-2-yl)piperidin-4-yl]-1H-pyrrole-2-carboxamide και του ενζύμου DNA GyrB (PDB: 3U2D) του <i>S.aureus</i>	62
Πίνακας 6: Σχηματιζόμενοι δεσμοί μεταξύ του συμπλοκοποιημένου προσδέτη Methotrexate και του ενζύμου DHFR (PDB: 1RG7) του <i>E.coli</i>	64
Πίνακας 7: Σχηματιζόμενοι δεσμοί μεταξύ του συμπλοκοποιημένου προσδέτη 4- $\{[4'$ -methyl-2'-(propanoylamino)-4,5'-bi-1,3-thiazol-2-yl]amino $\}$ benzoic acid και του ενζύμου DNA GyrB (PDB: 4DUH) του <i>E.coli</i>	66
Πίνακας 8: Συντεταγμένες (X, Y, Z) πλέγματος μοριακής πρόσδεσης	66
Πίνακας 9: Ενέργεια πρόσδεσης (Glide-score) των βεν δυνάμει προσδετών των εξεταζόμενων ενζύμων	69
Πίνακας 10: Ενέργεια πρόσδεσης των ενώσεων αιθέριου ελαίου λεβάντας κατά την εφαρμογή πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης στα ένζυμα-στόχους του <i>S.aureus</i>	70
Πίνακας 11: Ενέργεια πρόσδεσης των ενώσεων αιθέριου ελαίου λεβάντας κατά την εφαρμογή πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης στα ένζυμα-στόχους του <i>E.coli</i>	94

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Διάγραμμα αλυσίδας παραγωγής-διάθεσης τροφίμων.....	16
Εικόνα 2: Μέθοδοι επεξεργασίας τροφίμων	17
Εικόνα 3: Συσκευασία σε γυάλινους περιέκτες	19
Εικόνα 4: <i>S.aureus</i> μέσω μικροσκοπίου.....	25
Εικόνα 5: <i>E.coli</i> μέσω μικροσκοπίου.....	28
Εικόνα 6: Χημική δομή αναστολέων της DHFR.....	32

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Τριδιάστατη απεικόνιση ενζύμου DHFR	31
Σχήμα 2: Τριδιάστατη απεικόνιση ενζύμου DNA gyrase B.....	34
Σχήμα 3: (Αριστερά) Τριδιάστατη απεικόνιση του ενζύμου DHFR του <i>S. aureus</i> (PDB: 3SRW) συμπλοκοποιημένου με τον προσδέτη 7-(2-ethoxynaphthalen-1-yl)-6-methylquinazoline-2,4-diamine (Δεξιά) Τριδιάστατη απεικόνιση του εν λόγω συμπλοκοποιημένου προσδέτη.....	57
Σχήμα 4: (Αριστερά) Τριδιάστατη απεικόνιση του ενζύμου DNA GyrB του <i>S. aureus</i> (PDB: 3U2D) συμπλοκοποιημένου με τον προσδέτη 4-bromo-5-methyl-N-[1-(3-nitropyridin-2-yl)piperidin-4-yl]-1H-pyrrole-2-carboxamide (Δεξιά) Τριδιάστατη απεικόνιση του εν λόγω συμπλοκοποιημένου προσδέτη	57
Σχήμα 5: (Αριστερά) Τριδιάστατη απεικόνιση του ενζύμου DHFR του <i>E.coli</i> (PDB: 1RG7) συμπλοκοποιημένου με τον προσδέτη Methotrexate (Δεξιά) Τριδιάστατη απεικόνιση του εν λόγω συμπλοκοποιημένου προσδέτη.....	59
Σχήμα 6: (Αριστερά) Τριδιάστατη απεικόνιση του ενζύμου DNA GyrB του <i>E.coli</i> (PDB: 4DUH) συμπλοκοποιημένου με τον προσδέτη 4-{{4'-methyl-2'-(propanoylamino)-4,5'-bi-1,3-thiazol-2-yl}amino}benzoic acid (Δεξιά) Τριδιάστατη απεικόνιση του εν λόγω συμπλοκοποιημένου προσδέτη.....	59
Σχήμα 7: Δισδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης του συμπλοκοποιημένου προσδέτη 7-(2-ethoxynaphthalen-1-yl)-6-methylquinazoline-2,4-diamine στη θέση πρόσδεσης του ενζύμου DHFR (PDB: 3SRW) του <i>S.aureus</i>	61
Σχήμα 8: Δισδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης του συμπλοκοποιημένου προσδέτη 4-bromo-5-methyl-N-[1-(3-nitropyridin-2-yl)piperidin-4-yl]-1H-pyrrole-2-carboxamide στη θέση πρόσδεσης του ενζύμου DNA GyrB (PDB: 3U2D) του <i>S.aureus</i>	62
Σχήμα 9: Δισδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης του συμπλοκοποιημένου προσδέτη Methotrexate στη θέση πρόσδεσης του ενζύμου DHFR (PDB: 1RG7) του <i>E.coli</i>	64
Σχήμα 10: Δισδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης του συμπλοκοποιημένου προσδέτη 4-{{4'-methyl-2'-(propanoylamino)-4,5'-bi-1,3-thiazol-2-yl}amino}benzoic acid στη θέση πρόσδεσης του ενζύμου DNA GyrB (PDB: 4DUH) του <i>E.coli</i>	65
Σχήμα 11: Υπέρθυση των δύο διαμορφώσεων του 7-(2-ethoxynaphthalen-1-yl)-6-methylquinazoline-2,4-diamine έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου SP (αριστερά) και XP (δεξιά). Με μωβ χρώμα απεικονίζεται ο αναστολέας της κρυσταλλικής δομής και με πράσινο χρώμα ο αναστολέας, όπως προέκυψε μετά την εφαρμογή των αλγορίθμων.	67
Σχήμα 12: Υπέρθυση των δύο διαμορφώσεων του 4-bromo-5-methyl-N-[1-(3-nitropyridin-2-yl)piperidin-4-yl]-1H-pyrrole-2-carboxamide έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου SP (αριστερά) και XP (δεξιά). Με μωβ χρώμα απεικονίζεται ο αναστολέας της κρυσταλλικής δομής	

και με πράσινο χρώμα ο αναστολέας, όπως προέκυψε μετά την εφαρμογή των αλγορίθμων.	67
Σχήμα 13: Υπέρθυση των δύο διαμορφώσεων του Methotrexate έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου SP (αριστερά) και XP (δεξιά). Με μωβ χρώμα απεικονίζεται ο αναστολέας της κρυσταλλικής δομής και με πράσινο χρώμα ο αναστολέας, όπως προέκυψε μετά την εφαρμογή των αλγορίθμων.....	68
Σχήμα 14: Υπέρθυση των δύο διαμορφώσεων του 4- $\{[4'$ -methyl-2'-(propanoylamino)-4,5'-bi-1,3-thiazol-2-yl]amino $\}$ benzoic acid έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου SP (αριστερά) και XP (δεξιά). Με μωβ χρώμα απεικονίζεται ο αναστολέας της κρυσταλλικής δομής και με πράσινο χρώμα ο αναστολέας, όπως προέκυψε μετά την εφαρμογή των αλγορίθμων.	68
Σχήμα 15: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης geraniol με το ένζυμο της DNA GyrB του <i>S.aureus</i> μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP).....	81
Σχήμα 16: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης α -terpineol-R με το ένζυμο της DNA GyrB του <i>S.aureus</i> μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP)	82
Σχήμα 17: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης fenchyl acetate-3 με το ένζυμο της DNA GyrB του <i>S.aureus</i> μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP)	83
Σχήμα 18: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης geranyl acetate με το ένζυμο της DNA GyrB του <i>S.aureus</i> μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP)	84
Σχήμα 19: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης sabina ketone-1 με το ένζυμο της DNA GyrB του <i>S.aureus</i> μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP)	84
Σχήμα 20: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης lavandulyl acetate-S με το ένζυμο της DNA GyrB του <i>S.aureus</i> μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP)	85
Σχήμα 21: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης geraniol με το ένζυμο της DNA GyrB του <i>S.aureus</i> μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP) .	86
Σχήμα 22: Τριδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης geraniol με το ένζυμο της DNA GyrB του <i>S.aureus</i> μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP) .	86
Σχήμα 23: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης linalyl acetate-R με το ένζυμο της DNA GyrB του <i>S.aureus</i> μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP)	87
Σχήμα 24: Τριδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης linalyl acetate-R με το ένζυμο της DNA GyrB του <i>S.aureus</i> μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP)	88

Σχήμα 25: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης <i>fenchyl acetate-3</i> με το ένζυμο της DNA GyrB του <i>S.aureus</i> μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP)	89
Σχήμα 26: Τριδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης <i>fenchyl acetate-3</i> με το ένζυμο της DNA GyrB του <i>S.aureus</i> μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP)	90
Σχήμα 28: Τριδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης <i>geranyl acetate</i> με το ένζυμο της DNA GyrB του <i>S.aureus</i> μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP)	91
Σχήμα 27: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης <i>geranyl acetate</i> με το ένζυμο της DNA GyrB του <i>S.aureus</i> μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP)	91
Σχήμα 29: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης <i>b-caryophellene</i> με το ένζυμο της DHFR του <i>S.aureus</i> μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP)...	92
Σχήμα 30: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης <i>b-caryophellene</i> με το ένζυμο της DHFR του <i>S.aureus</i> μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP)	93
Σχήμα 31: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης <i>terpineol-4-R</i> με το ένζυμο της DNA GyrB του <i>E.coli</i> μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP)	105
Σχήμα 32: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης <i>terpineol-4-R</i> με το ένζυμο της DHFR του <i>E.coli</i> μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP)	105
Σχήμα 33: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης <i>terpineol-4-R</i> με το ένζυμο της DHFR του <i>E.coli</i> μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP)	107
Σχήμα 34: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης <i>b-caryophellene</i> με το ένζυμο της DHFR του <i>E.coli</i> μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP)	108

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

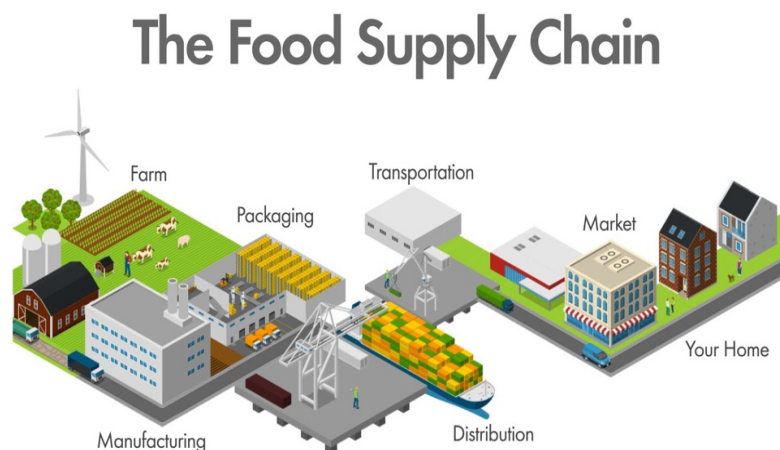
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Εισαγωγή

1.1 Η βιομηχανία τροφίμων σήμερα

Στις μέρες μας, ένας συνεχώς αναπτυσσόμενος και εξελισσόμενος κλάδος, ο οποίος επηρεάζεται από την επιστημονική εξέλιξη, ενώ επηρεάζει άμεσα την οικονομία και έμμεσα τον άνθρωπο, είναι η βιομηχανία τροφίμων και ποτών. Ως βιομηχανία τροφίμων ορίζεται ένα πολύπλοκο δίκτυο επεξεργασιών και προετοιμασίας, μέσω του οποίου πρώτες ύλες ζωικής και φυτικής προέλευσης μετατρέπονται σε τρόφιμα τα οποία διατίθενται στην αγορά πλέον προς κατανάλωση. Οι δύο βασικοί στόχοι της βιομηχανίας τροφίμων είναι η δημιουργία ποιοτικών και ασφαλών προϊόντων. Ποιοτικό χαρακτηρίζεται ένα προϊόν το οποίο περιλαμβάνει ένα σύνολο ιδιοτήτων και χαρακτηριστικών που συμβάλουν στην ικανότητά του να ικανοποιεί τις ανάγκες των καταναλωτών. Η ασφάλεια ενός τροφίμου αφορά τη διασφάλιση του από χημικούς, βιολογικούς ή φυσικούς παράγοντες, οι οποίοι μπορεί να θέσουν σε κίνδυνο την υγεία του καταναλωτή. Για τον έλεγχο και τη διασφάλιση των δύο αυτών παραμέτρων έχει συνταχθεί σχετικό νομοθετικό πλαίσιο, το οποίο απαιτείται να ακολουθείται. Ένα από τα χαρακτηριστικότερα νομοθετικά πλαίσια για τον τομέα τροφίμων και ποτών, αποτελεί το σύστημα HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*), σύστημα το οποίο αναγνωρίζει, αξιολογεί και ελέγχει τους κινδύνους οι οποίοι σχετίζονται με την ασφάλεια των τροφίμων (Earle, 1997).

1.2 Αλυσίδα τροφίμων - Κατανόηση πιθανών επιμολύνσεων

Η αλυσίδα τροφίμων περιλαμβάνει μια αλληλουχία σταδίων της παραγωγικής διαδικασίας από την πρωτογενή παραγωγή του τροφίμου έως και την τελική κατανάλωσή του (Εικόνα 1). Τα στάδια αυτά διαιρούνται στην παραλαβή της πρώτης ύλης, την ανάλογη επεξεργασία αυτής



Εικόνα 1: Διάγραμμα αλυσίδας παραγωγής-διάθεσης τροφίμων

Πηγή: <https://money.howstuffworks.com/food-supply-chain-pandemic.htm>

προς το ζητούμενο τρόφιμο, πιθανώς τη συσκευασία αυτού, τη μεταφορά και διανομή του σε σημεία πώλησης και την τελική αγορά από τον καταναλωτή (Beske et al., 2014).

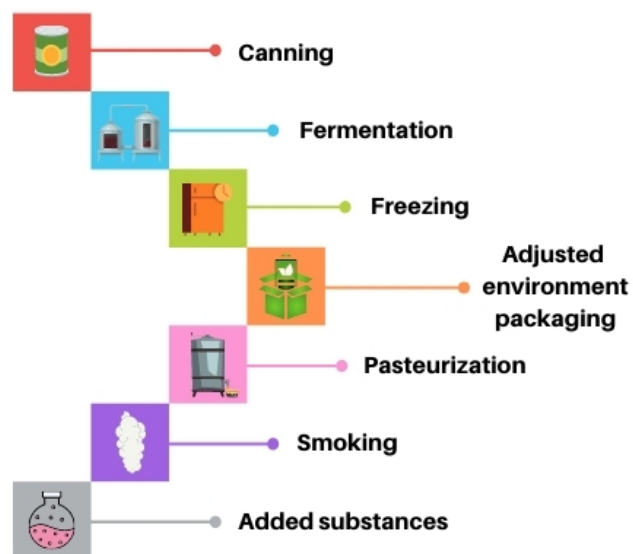
1.3 Παραλαβή της πρώτης ύλης

Η πρώτη ύλη οφείλει να ελέγχεται ανά παρτίδες, ώστε να αποδεικνύεται ότι πρόκειται για «υψηλή» ποιοτικά και οργανοληπτικά πρώτη ύλη, απαιτούμενη για ένα ασφαλές και ποιοτικό τελικό προϊόν. Στον τομέα των φρούτων και λαχανικών, για παράδειγμα, πραγματοποιείται έλεγχος, επιλογή και ταξινόμηση της πρώτης ύλης, δηλαδή των λαχανικών και των φρούτων, βάσει της ωριμότητας, του μικροβιολογικού προφίλ, της μορφολογίας και άλλων χαρακτηριστικών αναγκαίων για την παρασκευή προκαθορισμένων τελικών προϊόντων. Όσον αφορά τα προϊόντα ζωικής προέλευσης, πραγματοποιούνται επίσης θεσμοθετημένοι έλεγχοι σχετικοί με τον τρόπο εκτροφής ενός ζώου, τον τρόπο θανάτωσής του, τον τρόπο αποθήκευσης και μεταφοράς του σφάγιου και την μικροβιολογική του σύσταση. Για τα ιχθυηρά, τέλος, έχει συνταχθεί πρωτόκολλο για τον τρόπο αλίευσης, μεταφοράς και αποθήκευσης προκειμένου η πρώτη ύλη να παραμείνει μικροβιολογικά και οργανοληπτικά σταθερή (Earle, 1997).

1.4 Επεξεργασία της πρώτης ύλης

Εφόσον πραγματοποιηθεί σωστός χειρισμός και παράδοση της πρώτης ύλης σε κατάλληλες βιομηχανικές μονάδες, είναι δυνατή η επεξεργασία της εν λόγω καθαρής πρώτης ύλης προς παραγωγή του τελικού προϊόντος. Η επεξεργασία αυτή αφορά μια σειρά μεθόδων και τεχνικών οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη μετατροπή των τροφίμων σε διαφορετική μορφή, καθιστώντας τα κατάλληλα προς κατανάλωση (Εικόνα 2). Έτσι, αποφεύγονται μικροβιολογικές, ενζυμικές, χημικές και φυσικές μεταβολές, οι οποίες πιθανώς να καθιστούσαν το τρόφιμο ακατάλληλο προς κατανάλωση. Κάποια από τα βασικότερα πλεονεκτήματα της

FOOD PROCESSING METHODS



Εικόνα 2: Μέθοδοι επεξεργασίας τροφίμων

Πηγή: <https://www.foodresearchlab.com/blog/new-food-product-development/various-types-and-methods-involved-in-food-processing/>

επεξεργασίας τροφίμων περιλαμβάνουν την επιμήκυνση της διάρκειας ζωής, την ευκολία συντηρησιμότητας, τη μικροβιολογική σταθερότητα, την ενζυμική αδρανοποίηση, την αύξηση της εποχιακής διαθεσιμότητας, την εύκολη διακίνηση ευαλλοίωτων τροφίμων, την προσθήκη θρεπτικών συστατικών και τη συμβολή στην ποιότητα ζωής ειδικών ομάδων ευαίσθητου πληθυσμού, όπως οι αλλεργικοί. Σημειώνεται ότι επεξεργασμένα τρόφιμα ενδέχεται να διαθέτουν μειωμένη θρεπτική αξία, αλλά και συντηρητικά, τα οποία σε μεγαλύτερα ποσοστά των επιτρεπόμενων ορίων που αναγράφονται στον κώδικα τροφίμων και ποτών, καθίστανται βλαβερά για την ανθρώπινη υγεία. Μεθόδους επεξεργασίας αποτελούν οι μέθοδοι προετοιμασίας, η θέρμανση, η απομάκρυνση θερμότητας, η απομάκρυνση νερού και η χημική συντήρηση (Van Der Vorst et al., 2001).

Η πλύση, η ταξινόμηση, ο τεμαχισμός, η ανάμιξη, η άλεση κ.λπ. συγκαταλέγονται στις μεθόδους προετοιμασίας. Πρόκειται για επεξεργασία κατά την οποία δεν υπάρχει καμία συντηρητική δράση ή καταστροφή των μικροοργανισμών. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ιδιαίτερα στον τεμαχισμό και την ανάμιξη, αυξάνονται οι πιθανότητες ανάπτυξης μικροοργανισμών καθιστώντας τα τρόφιμα περισσότερο ευαλλοίωτα (Van Boekel et al., 2010).

Η επεξεργασία των τροφίμων με θέρμανση αφορά το ζεμάτισμα, τον βρασμό, την παστερίωση, την κονσερβοποίηση, τη συμπύκνωση, την εξώθηση, την έψηση/κλιβανισμό και το τηγάνισμα. Η χρήση ήπιας θερμότητας (όπως το ζεμάτισμα και η παστερίωση) οδηγεί στη θανάτωση μέρους των μικροοργανισμών, ενώ η έντονη θέρμανση (όπως η κονσερβοποίηση) θανατώνει το μεγαλύτερο μέρος των υπάρχοντων μικροοργανισμών. Παράλληλα, παρατηρείται αδρανοποίηση των φυσικώς υπάρχοντων ενζύμων (Van Boekel et al., 2010).

Η ψύξη και η κατάψυξη χρησιμοποιούνται για την επιβράδυνση της ταχύτητας ανάπτυξης των μικροοργανισμών και δράσης των ενζύμων, χωρίς όμως να παρατηρείται καταστροφή αυτών. Η κατάψυξη φαίνεται ότι παρουσιάζει μεγαλύτερη συντηρητική δράση από την ψύξη, καθώς κατά τη μετατροπή του νερού σε πάγο, το υπάρχον νερό δεσμεύεται με αποτέλεσμα να μην είναι διαθέσιμο για την κάλυψη των αναγκών των μικροοργανισμών (Rahman, 2007).

Οι διαδικασίες που αφορούν την απομάκρυνση του νερού έχουν παρόμοιο αποτέλεσμα με την κατάψυξη, διότι βασίζονται στην ανάγκη ύπαρξης νερού για την ανάπτυξη μικροοργανισμών και τη δράση ενζύμων. Συμπερασματικά, μείωση της ποσότητας νερού στο τρόφιμο μέσω της ξήρανσης, της απόσταξης και άλλων διεργασιών μπορεί να αναστείλει τις ανωτέρω λειτουργίες χωρίς όμως απαραίτητα να θανατώσει μικροοργανισμούς ή να αδρανοποιήσει ένζυμα, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη μικροοργανισμών σε περίπτωση επανενυδάτωσης (Doyle & Beuchat, 2007).

Η χημική επεξεργασία τροφίμων αποτελεί μία ακόμα χαρακτηριστική μέθοδο κατά την οποία υψηλές συγκεντρώσεις αιθανόλης ή οξέων μέσω ζύμωσης και οι υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, σακχάρων ή συντηρητικών μέσω προσθήκης αυτών, είναι ικανές να θανατώσουν τους

μικροοργανισμούς. Οι μικροοργανισμοί, όπως είναι γνωστό, παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα ανοχής σε χημικές ουσίες, καθιστώντας τις μούχλες και τις ζύμες ανθεκτικότερες. Αντιθέτως, τα βακτήρια δεν αναπτύσσονται στις παραπάνω περιπτώσεις (Doyle & Beuchat, 2007).

Καμία μέθοδος δεν χαρακτηρίζεται ιδανική, εφόσον είναι εμφανές ότι υπάρχουν και μειονεκτήματα πέρα από πλεονεκτήματα. Μειονεκτήματα αφορούν συνήθως το συμβιβασμό όσον αφορά την ποιότητα, τον απαιτούμενο χρόνο ζωής αλλά και το κόστος. Σύνηθες φαινόμενο, λοιπόν, αποτελεί ο συνδυασμός μεθόδων επεξεργασίας, προκειμένου να ελαχιστοποιηθούν τυχόν μειονεκτήματα των μεθόδων και να μεγιστοποιηθεί η αποτελεσματικότητα προς ένα μικροβιολογικά ασφαλές και οργανοληπτικά αποδεκτό προϊόν. Ανάλογα παραδείγματα αποτελούν η ξήρανση και η κάπνιση, η θέρμανση και η ψύξη καθώς επίσης και η θέρμανση και προσθήκη συντηρητικών. Βέβαια, δεν είναι λίγες οι φορές στις οποίες λαμβάνονται επιπρόσθετα μέτρα για την ενίσχυση ενός χαμηλού μικροβιακού φορτίου, όπως η απομάκρυνση του οξυγόνου ή ακόμα και η προσθήκη διοξειδίου του άνθρακα ή αδρανούς αερίου (Doyle & Beuchat, 2007).

1.5 Συσκευασία έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων

Η συσκευασία των «έτοιμων» προς κατανάλωση τροφίμων αποτελεί ένα εξίσου σημαντικό στάδιο κατά την παραγωγή προϊόντων, καθώς μέσω αυτής είναι ικανή η συγκράτηση του τροφίμου κατά τη μεταφορά για ελαχιστοποίηση απωλειών και μείωση της ρύπανσης του περιβάλλοντος (Εικόνα 3). Ακόμα και τρόφιμα τα οποία δεν συσκευάζονται, όπως φρέσκα φρούτα και λαχανικά, τοποθετούνται σε συγκεκριμένα κιβώτια ή δοχεία για τη μεταφορά και αποθήκευσή τους.



Εικόνα 3: Συσκευασία σε γυάλινους περιέκτες

Πηγή: <https://www.paclease.com.my/food-packaging-equipment-financing/>

Δεύτερον, ενισχύεται η προστασία του περιεχομένου τροφίμου από πιθανούς κινδύνους με σκοπό τη διατήρηση της ποιότητας.

Ένας σημαντικός κίνδυνος που αξίζει να αναφερθεί είναι οι μηχανικές φθορές οι οποίες μπορεί να προέλθουν από προσκρούσεις, κραδασμούς και συμπίεσεις κατά τη μεταφορά και

αποθήκευση. Απαραίτητα υλικά συσκευασίας για την αποφυγή των ανωτέρω αποτελούν ισχυρά και δύσκαμπτα υλικά, όπως μέταλλα, ξύλο και γυαλί (Doyle & Beuchat, 2007).

Η υγρασία καθώς και διάφορα αέρια του περιβάλλοντος, ακόμη, είναι ικανά να επηρεάσουν αρνητικά την ποιότητα του προϊόντος, να τροποποιήσουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του, καθώς επίσης και να το καταστήσουν περισσότερο ευαίσθητο σε μικροβιακές αλλοιώσεις, λόγω ανάπτυξης συνθηκών πολλαπλασιασμού εκάστοτε μικροοργανισμών όπως η αύξηση της υγρασίας και επομένως της ενεργότητας ύδατος, αλλά και της συγκέντρωσης του οξυγόνου. Υπάρχουν, όμως, και ορισμένες περιπτώσεις στις οποίες τρόφιμα, κυρίως φρέσκα φρούτα και λαχανικά, είναι απαραίτητο να έρχονται σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα με σκοπό τη διέλευση των υδρατμών από το τρόφιμο προς το περιβάλλον λόγω του υψηλού ρυθμού αναπνοής. Παράλληλα, υπάρχουν πολλά συσκευασμένα προϊόντα, τα οποία είναι απαραίτητο να βρίσκονται σε συνθήκες κενού ή τροποποιημένης ατμόσφαιρας, μειώνοντας συνήθως το οξυγόνο και χρησιμοποιώντας κάποιο άλλο αέριο σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, όπως διοξείδιο του άνθρακα και ευγενή αέρια. Με αυτόν τρόπο διατηρείται η ποιότητα του προϊόντος καθώς και η μικροβιολογική του σταθερότητα (Marsh & Bugusu, 2007).

Ορισμένες αλλοιώσεις στα τρόφιμα συμβαίνουν και λόγω του φωτός. Κρίσιμα συστατικά όπως οι βιταμίνες καταστρέφονται από το φως υψηλής ενεργειακής ορατότητας (μπλε φως) και την υπεριώδη ακτινοβολία. Τα λίπη, επίσης, οξειδώνονται με αποτέλεσμα το λεγόμενο τάγγισμα. Έτσι, τα τρόφιμα παρουσιάζουν τελικά μειωμένη οργανοληπτική και θρεπτική αξία. Στις προαναφερθείσες περιπτώσεις γίνεται χρήση είτε αδιαφανών συσκευασιών είτε έγχρωμων υλικών συσκευασίας (Potter & Hotchkiss, 1995).

Χαρακτηριστικές αλλοιώσεις των τροφίμων, προκύπτουν και λόγω υψηλών θερμοκρασιών ή υψηλών θερμοκρασιακών αλλαγών του περιβάλλοντος. Επιλέγονται, επομένως, συσκευασίες οι οποίες προσφέρουν θερμική μόνωση, ιδιότητα η οποία εξαρτάται από το πάχος της συσκευασίας αλλά και τη θερμική αγωγιμότητα και ανακλαστικότητα του υλικού (Doyle & Beuchat, 2007).

Το περιεχόμενο προϊόν προστατεύεται μέσω της συσκευασίας, ακόμα, και από σκόνες, ακαθαρσίες, ξένες ύλες, έντομα και τρωκτικά.

Μια από τις σημαντικότερες λειτουργίες της συσκευασίας αποτελεί η προστασία του τροφίμου από τυχόν μικροβιακές επιμολύνσεις. Είναι κρίσιμο τρόφιμα τα οποία έχουν αποστειρωθεί να μην έρθουν σε επαφή με ενεργές μορφές μικροοργανισμών, ώστε να αποφευχθεί η επιμόλυνση. Για μερικά προϊόντα η συνθήκη αυτή κρίνεται επιπλέον επιτακτική.

Τέλος, οφείλει να γίνει αναφορά στην αλληλεπίδραση συσκευασίας – τροφίμου. Τα υλικά συσκευασίας πρέπει να αποδεικνύεται ότι δεν προσβάλουν τα περιεχόμενα τρόφιμα, αλλά και να μην προσβάλλονται εκείνα αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, βάσει νομοθετικού σχεδίου

θα πρέπει να μην παρατηρούνται αλλαγές στην οσμή, γεύση και εμφάνιση του τροφίμου αλλά και να μη μεταφέρουν σ' αυτό επιβλαβείς για την υγεία ουσίες (Doyle & Beuchat, 2007).

Τρίτον, μέσω της συσκευασίας διευκολύνεται η προμήθεια και η χρήση του προϊόντος από τον καταναλωτή. Για παράδειγμα, τρόφιμα είναι πλέον διαθέσιμα καταναλωμένα εξ αρχής σε μερίδες, με την επιλογή εύκολου ανοίγματος και κλεισίματος αλλά και σε ποσότητες που καθίσταται εύκολη η αποθήκευση.

Τέταρτο πλεονέκτημα της συσκευασίας των τροφίμων, αποτελεί η «επικοινωνία» με τον καταναλωτή. Το ζήτημα εκτείνεται σε διάφορες πτυχές. Η πώληση του προϊόντος και κατ' επέκταση η βιομηχανία η οποία το έχει παράξει κρίνονται από τον τρόπο με τον οποίο αυτό παρουσιάζεται. Λόγοι μάρκετινγκ, λοιπόν, πρέπει να αναφερθούν. Επίσης, μέσω της συσκευασίας αναγράφονται απαραίτητα στοιχεία για το τρόφιμο, καθώς και διατροφικές πληροφορίες προς ενημέρωση του καταναλωτή. Στη σημερινή πραγματικότητα, οι καταναλωτές επιλέγουν ένα προϊόν βάσει του παραγωγού, της προέλευσης, του αντίκτυπου της βιομηχανίας στο περιβάλλον και της σύστασης σε απαραίτητα θρεπτικά συστατικά.

Στο χρονικό διάστημα παραμονής των τροφίμων σε ανάλογες επιχειρήσεις, κυρίως κατά τα στάδια της επεξεργασίας και συσκευασίας, πρέπει απαραίτητα να ισχύουν συγκεκριμένοι κανόνες ορθής υγιεινής πρακτικής, ώστε να αποφευχθούν ανεπιθύμητες μικροβιακές επιμολύνσεις. Έχει, μάλιστα, παρατηρηθεί ότι το μεγαλύτερο ποσοστό επιμολύνσεων συμβαίνει κατά τα στάδια παραγωγής λόγω λανθασμένων χειρισμών των εργαζομένων (Doyle & Beuchat, 2007).

1.6 Μεταφορά έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων

Ο τρόπος μεταφοράς και διανομής ενός τροφίμου χρήζει, επίσης, ιδιαίτερης προσοχής. Οχήματα μεταφοράς ελέγχονται από το νόμο για κανονισμούς που έχουν οριστεί, έχοντας ως στόχο τις απαραίτητες συνθήκες του εκάστοτε προϊόντος, προκειμένου να παραμείνει μικροβιολογικά ασφαλές και ποιοτικά σταθερό (Doyle & Beuchat, 2007).

1.7 Τελική αγορά τροφίμων

Κατά την τελική αγορά του προϊόντος από τον καταναλωτή, η αλυσίδα της βιομηχανίας τροφίμων διακόπτεται. Ο καταναλωτής φέρει πλέον ευθύνη για τη σωστή συντήρηση του προϊόντος, στάδιο που έχει αποδειχθεί αιτία για τις περισσότερες αλλοιώσεις τροφίμων σε σχέση με όλα τα προηγούμενα στάδια. Κάτι τέτοιο συμβαίνει λόγω έλλειψης γνώσης και ανθρώπινου λάθους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Μικροοργανισμοί και τρόφιμο

2.1 Εισαγωγή

Έχει ήδη αναφερθεί η προσοχή η οποία δίνεται στη μικροβιακή σταθερότητα και επιμόλυνση των τροφίμων. Ο πρώτος που αντιλήφθηκε τον ρόλο των μικροοργανισμών στην αλλοίωση τροφίμων ήταν ο Kircher το 1658, ενώ ο πρώτος ο οποίος εκτίμησε και κατανόησε πραγματικά την παρουσία και τον ρόλο των μικροοργανισμών στα τρόφιμα ήταν ο Pasteur. Το 1873 απέδειξε ότι η οξίνιση του γάλακτος οφείλεται σε μικροοργανισμούς, ενώ το 1860 χρησιμοποίησε τη θέρμανση, ως μέσο επεξεργασίας, για την καταστροφή ανεπιθύμητων μικροοργανισμών. Έτσι, λόγω του συγκεκριμένου επιστήμονα, η εν λόγω μορφή επεξεργασίας ονομάστηκε αργότερα παστερίωση. Αργότερα, το 1876, δύο ερευνητές ανακάλυψαν τα ενδοσπόρια των βακτηρίων. Οι μικροοργανισμοί οι οποίοι απαντώνται στα τρόφιμα είναι ετερότροφοι, μετατρέπουν την οργανική ύλη σε ενέργεια και ανόργανες ενώσεις, προκειμένου να διεκπεραιωθεί η λειτουργία της διαιώνισής τους. Η λεγόμενη μικροβιακή αλλοίωση αφορά την προσπάθεια της μικροχλωρίδας του τροφίμου να επιτύχει την ανοργανοποίηση της ύλης. Τα τρόφιμα αποτελούν άριστη πηγή οργανικών ενώσεων, απαραίτητων για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών. Μέσω εργαστηριακής έρευνας έχει αποδειχθεί ότι τα νωπά τρόφιμα περιέχουν έναν ποικίλο αριθμό μικροοργανισμών. Το ερώτημα το οποίο γεννάται είναι, κατά πόσο ένα τρόφιμο είναι ασφαλές για τον καταναλωτή, με κριτήριο το συνολικό μικροβιολογικό φορτίο του τροφίμου. Προκειμένου να απαντηθεί η συγκεκριμένη ερώτηση, οφείλει να γνωρίζει κανείς τους μικροοργανισμούς που εντοπίζονται φυσικά στο τρόφιμο αλλά και τους μη αναμενόμενους. Επιβάλλεται, λοιπόν, να γίνει αναφορά στα είδη των μικροοργανισμών που συναντώνται. Ορισμένοι από τους μικροοργανισμούς είναι επιθυμητοί σε ορισμένα τρόφιμα, άλλοι προκαλούν αλλοιώσεις των τροφίμων και άλλοι είναι παθογόνοι και συνεπώς αποφεύγονται (Doyle & Beuchat, 2007).

Αν και η ταξινόμηση των μικροοργανισμών δεν είναι στατική και επέρχονται συνεχώς αλλαγές λόγω της μελέτης του γενετικού υλικού τους, διακρίνονται στα τρία κύρια γένη των βακτηρίων, των μυκήτων και των ζυμών.

2.2 Βακτήρια και τρόφιμα

Τα βακτήρια, είναι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί χωρίς σχηματισμένο πυρήνα και κυτταρικά οργανίδια που ανήκουν στο βασίλειο των προκαρυωτικών κυττάρων. Διαχωρίζονται σε Gram αρνητικά και Gram θετικά. Πηγές των βακτηρίων που απαντώνται στα τρόφιμα αποτελούν το έδαφος και το νερό, τα φυτά και τα φυτικά προϊόντα, τα δοχεία, σκεύη και μηχανήματα επεξεργασίας, η εντερική οδός του ανθρώπου και των ζώων, το προσωπικό που έρχεται σε

επαφή με τα τρόφιμα, οι ζωοτροφές, το δέρμα των ζώων, ο αέρας και η σκόνη (Doyle & Beuchat, 2007).

Στο έδαφος και το νερό απαντώνται κοινοί μικροοργανισμοί, καθώς μικροοργανισμοί του εδάφους μεταφέρονται στην ατμόσφαιρα μέσω του αέρα και έπειτα στο υδάτινο οικοσύστημα με τη βροχή. Η αντίστροφη διαδικασία μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί, όπου μικροοργανισμοί μεταφέρονται στο έδαφος από το υδάτινο οικοσύστημα. Στο θαλασσινό νερό απαντώνται συνήθως αρνητικά κατά Gram βακτήρια, με τα θετικά κατά Gram βακτήρια να εμφανίζονται παροδικά (Novick, 1955).

Παρότι οι περισσότεροι μικροοργανισμοί του εδάφους και του νερού επιμολύνουν τα φυτά, μικρός μόνο αριθμός αυτών είναι ικανός να επιβιώσει. Μικροοργανισμοί οι οποίοι μπορούν να επιβιώσουν είναι κυρίως γαλακτικά βακτήρια, ζύμες και πολλά είδη μυκήτων. Χαρακτηριστικά βακτήρια που απαντώνται αποτελούν τα γένη *Corynebacterium*, *Curtobacterium*, *Pseudomonas* και *Xanthomonas* (Doyle & Beuchat, 2007).

Συχνό φαινόμενο αποτελεί η επιμόλυνση των τροφίμων με μικροοργανισμούς μέσω δοχείων, σκευών και γενικότερα των μηχανημάτων επεξεργασίας. Κατά κανόνα, φυτικά προϊόντα μολύνουν δοχεία συγκομιδής και μεταφοράς ενώ ζωικά μολύνουν τις επιφάνειες κοπής του κρέατος, τα μαχαίρια και τα μηχανήματα μετέπειτα επεξεργασίας, με αποτέλεσμα ο βαθμός μόλυνσης να είναι ανάλογος, τελικά, με τον αριθμό των μικροοργανισμών που φέρουν φυσικά οι πρώτες ύλες (Doyle & Beuchat, 2007).

Η ανθρώπινη φύση, επίσης, είναι αιτία επιμόλυνσης καθώς είναι πιθανή η χρήση μολυσμένου νερού κατά το πλύσιμο των πρώτων υλών, στο οποίο περιέχονται μικροοργανισμοί του εντερικού σωλήνα. Ειδικά, βακτήρια της οικογένειας *Enterobacteriaceae* επιβιώνουν για μεγάλο χρονικό διάστημα και θέτουν σε κίνδυνο την υγεία του καταναλωτή. Επιπλέον, η μικροχλωρίδα των ρούχων και των χεριών των χειριστών κατά την παραγωγική διαδικασία λόγω κακής υγιεινής, επιτρέπει την επιμόλυνση του τροφίμου με μικροοργανισμούς από τη ρινική κοιλότητα, το στόμα και το δέρμα (Doyle & Beuchat, 2007).

Πηγές μόλυνσης συνιστούν και οι ζωοτροφές οι οποίες μεταφέρουν είτε *Salmonella* είτε *Listeria monocytogenes* στα ζώα γαλακτοπαραγωγής και κρεατοπαραγωγής. Η μεταφορά συνεχίζει και στο δέρμα των ζώων, με σύνηθες πρόβλημα τη μικροχλωρίδα του μαστού απ' όπου είναι πιθανή η επιμόλυνση του χώρου γαλακτοπαραγωγής, των δοχείων συλλογής γάλακτος, των χεριών του προσωπικού και τελικά του νωπού γάλακτος (Doyle & Beuchat, 2007).

Τέλος, στις πηγές μόλυνσης ανήκουν και ο αέρας και η σκόνη, μέσω των οποίων μεταδίδονται ανθεκτικές μορφές μικροοργανισμών με κύριους εκπροσώπους τα θετικά κατά Gram βακτήρια, ορισμένους μύκητες και ζύμες. Οι μικροοργανισμοί που συναντώνται είναι, γενικά, σπορογόνοι (Doyle & Beuchat, 2007).

2.3 Μύκητες και τρόφιμα

Στην κατηγορία των ευκαρυωτικών κυττάρων ανήκουν οι μύκητες, οι οποίοι είναι ευρύτατα διαδεδομένοι στη φύση. Οι μύκητες οι οποίοι απαντούν στα τρόφιμα πολλαπλασιάζονται είτε με εγγενή σπόρια (ασκοσπόρια, ζυγοσπόρια) είτε με αγενή σπόρια (αρθροσπόρια, κονίδια, σποριοαγγειοσπόρια). Προσοχής, χρήζουν στη βιομηχανία τροφίμων οι ξηροφιλικό μύκητες, οι οποίοι μπορούν να αναπτυχθούν σε τιμές ενεργότητας ύδατος μικρότερες του 0,85, γεγονός που έχει ιδιαίτερη σημασία στα αφυδατωμένα τρόφιμα που η παρουσία τους αποτελεί αιτία αλλοίωσης. Στην ομάδα των ξηροφιλικών μυκήτων ανήκουν τα χαρακτηριστικά γένη *Aspergillus* και *Xeromyces* (Gray & Hesseltine, 1970).

2.4 Παρουσία μικροοργανισμών στα τρόφιμα

Ο αριθμός αλλά και τα είδη των μικροοργανισμών που εμφανίζονται σ' ένα τρόφιμο εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες, όπως το περιβάλλον των πρώτων υλών, το αρχικό μικροβιολογικό φορτίο των πρώτων υλών, οι συνθήκες υγιεινής κατά την επεξεργασία και η καταλληλότητα του υλικού συσκευασίας και των συνθηκών αποθήκευσης (Carlice, 1999).

Η σημασία της ύπαρξης των μικροοργανισμών εκτείνεται σε τρεις κατευθύνσεις. Όπως είναι γνωστό, οι μικροοργανισμοί υπάρχουν φυσικά στη χλωρίδα των τροφίμων και πολλές φορές είναι ακίνδυνοι. Σε άλλες περιπτώσεις εμφανίζονται ιδιαίτερος χρήσιμοι για την παραγωγή προϊόντων με συγκεκριμένα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά. Ιδιαίτερη σημασία για την τεχνολογία και μικροβιολογία τροφίμων διαδραματίζουν οι μικροοργανισμοί εκείνοι οι οποίοι προκαλούν ανεπιθύμητα αποτελέσματα στην ποιότητα του προϊόντος και κατ' επέκταση στην υγεία του καταναλωτή (Carlice, 1999).

Τα τρόφιμα αποτελούν περιπτώσεις στις οποίες οι μικροοργανισμοί εμφανίζονται φυσικά. Είναι τεχνικώς αδύνατο ένα τρόφιμο να απαλλαγεί πλήρως από το σύνολο όλων των μικροοργανισμών (Carlice, 1999).

2.5 Απαίτηση τροφίμου σε μικροοργανισμούς

Σε πολλές περιπτώσεις, μάλιστα, οι μικροοργανισμοί όχι μόνο δεν είναι επιζήμιοι, αλλά απαραίτητοι για την παραγωγή συγκεκριμένων προϊόντων. Χαρακτηριστική κατηγορία τέτοιων τροφών αποτελούν τα ζυμούμενα τρόφιμα, τα οποία παράγονται με τη βοήθεια γαλακτικών βακτηρίων. Η μπίρα, για παράδειγμα, παράγεται μέσω της συνεισφοράς στελεχών *Saccharomyces*, ενώ για τουρσιά συχνά γίνεται χρήση στελεχών *Lactobacillus* (Carlice, 1999).

2.6 Τροφικές δηλητηριάσεις

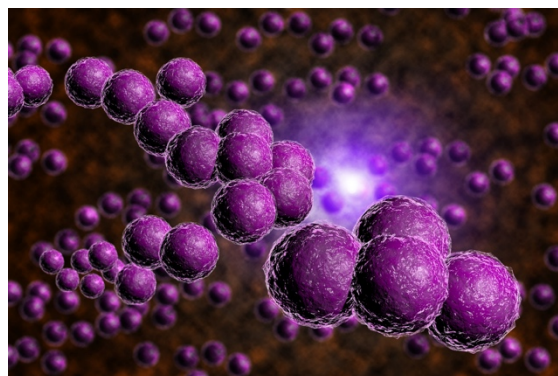
Οι μικροοργανισμοί των οποίων η παρουσία είναι ανησυχητική για τα τρόφιμα είναι παθογόνοι, με αποτέλεσμα να αποτελούν κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Γενικά, επίφοβα για τα τρόφιμα θεωρούνται κυρίως τα βακτήρια και οι μύκητες. Εξαιτίας αυτών, παρά την πρόοδο στους τομείς επεξεργασίας, συντήρησης, συσκευασίας και διακίνησης, έχει παρατηρηθεί αύξηση περιπτώσεων τροφικών δηλητηριάσεων (Lawrence et al., 2007). Κάτι τέτοιο πιθανώς να συμβαίνει και λόγω αύξησης κατανάλωσης προϊόντων ήπιας επεξεργασίας αλλά και λόγω εξέλιξης δυνατοτήτων διάγνωσης με αποτέλεσμα μια πιο αντιπροσωπευτική τελική εικόνα. Οι τροφικές δηλητηριάσεις διαχωρίζονται στις τροφολοιμώσεις και τις τροφοτοξινώσεις (Doyle & Beuchat, 2007).

Τροφολοιμώσεις εννοούνται οι τροφικές δηλητηριάσεις που προκαλούνται από την κατανάλωση τροφών που φέρουν μικροοργανισμούς, οι οποίοι προσβάλλουν τον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου. Χαρακτηριστικά παθογόνα βακτήρια τα οποία προκαλούν τροφολοιμώσεις είναι τα *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* και *Bacillus cereus* (Doyle & Beuchat, 2007).

Ως τροφοτοξίνωση θεωρείται η τροφική δηλητηρίαση η οποία προκαλείται από την κατανάλωση τροφών στις οποίες περιέχονται τοξικές ουσίες, οι οποίες εκούσια ή ακούσια προστέθηκαν στα τρόφιμα ή είναι προϊόντα μεταβολισμού των μικροοργανισμών. Παραδείγματα τροφοτοξινώσεων αποτελούν η σταφυλοκοκκική γαστρεντερίτιδα η οποία προκαλείται κυρίως από το *Staphylococcus aureus*, ο βουτυλισμός ο οποίος προκαλείται από ορισμένα στελέχη του *Clostridium botulinum* και οι μυκοτοξινώσεις οι οποίες προκαλούνται από διάφορους μύκητες (Bintsis & Department of International Trade, TEI of West Macedonia, Kastoria, Greece, 2017).

2.7 Γένος *Staphylococcus*

Πολλά είδη του γένους *Staphylococcus* (*S. aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. caprae*, *S. chromogens*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lentus*, *S. Saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. warneri*, *S. xylosus*) μελετώνται έντονα καθώς ευθύνονται για την παραγωγή εντεροτοξινών (Εικόνα 4). Η παραγωγή εντεροτοξινών ελέγχεται είτε από το χρωμόσωμα του κυττάρου είτε από τα πλασμίδια αυτού. Είναι δυνατόν έπειτα από προσβολή από βακτηριοφάγους, ένα μη τοξικό στέλεχος να καταστεί τοξικό. Εκτός ορισμένων εξαιρέσεων, τα περισσότερα στελέχη του *S.*



Εικόνα 4: *S. aureus* μέσω μικροσκοπίου

Πηγή: <https://mb-labs.com/testlibrary/staphylococcus-aureus/>

aureus που παράγουν εντεροτοξίνες, παράγουν κοαγκουλάση/πηκτάση (coagulase) και είναι προαιρετικά αερόβια με άριστες συνθήκες ανάπτυξης κατά την παραμονή σε αερόβιο περιβάλλον (Jfoster, 2002).

2.8 Χαρακτηριστικά *Staphylococcus aureus*

Η ανάπτυξη του *S. aureus* και η παραγωγή των τοξινών επηρεάζονται από τη θερμοκρασία, το pH, τη συγκέντρωση του NaCl, την ενεργότητα ύδατος, τη συγκέντρωση νιτρικών αλάτων και τη σύνθεση και φυσική μικροχλωρίδα των τροφίμων. Θερμοκρασία ανάπτυξης για τον *S. aureus* θεωρείται εκείνη μεταξύ 7 και 48 °C, ενώ για την παραγωγή εντεροτοξίνης από 10 έως 46 °C, με ιδανική από 40 έως 45 °C. Κατά κανόνα, όσο μειώνεται η ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξης του μικροοργανισμού, τόσο μειώνεται και ο ρυθμός παραγωγής της τοξίνης. Ως pH ανάπτυξης του *S. aureus* θεωρείται από 4,0 έως 9,8, με άριστο από 6,0 έως 7,0. Η ελάχιστη τιμή pH για την ανάπτυξη του *S. aureus* σε αερόβιες συνθήκες είναι χαμηλότερης εκείνης σε αναερόβιες συνθήκες. Τα περισσότερα στελέχη του *S. aureus* αναπτύσσονται σε συγκέντρωση NaCl 10%, με κάποιες εξαιρέσεις στις οποίες η ανάπτυξη επιτυγχάνεται σε συγκεντρώσεις NaCl 20%. Κατά γενικό κανόνα, με την αύξηση της συγκέντρωσης NaCl, αυξάνεται και η ελάχιστη τιμή pH ανάπτυξης. Η ενεργότητα ύδατος, επίσης, αποτελεί κρίσιμη παράμετρο για την ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού. Έτσι, και για τον *S. aureus*, η ελάχιστη τιμή a_w σε αερόβιο περιβάλλον αντιστοιχεί στην τιμή 0,86, ενώ σε αναερόβιο στην τιμή 0,90. Ιδανική a_w ανάπτυξης του συγκεκριμένου μικροοργανισμού παρατηρήθηκε ότι είναι η τιμή 0,83. Σημαντική ιδιότητα του *S. aureus* αποτελεί η ανθεκτικότητά του στα νιτρώδη άλατα. Συγκεκριμένα, κατά την αύξηση της συγκέντρωσης των νιτρικών αλάτων και μείωση του pH του προϊόντος αλλά και της περιεκτικότητας σε οξυγόνο, μειώνεται και ο ρυθμός ανάπτυξης του μικροοργανισμού και ο ρυθμός παραγωγής της τοξίνης. Η σύνθεση του τροφίμου κρίνεται σημαντική, καθώς σε προϊόντα με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη επιταχύνεται η παραγωγή τοξίνης. Η ποσότητα της εντεροτοξίνης που σχηματίζεται είναι, γενικά, μεγαλύτερη όταν στο προϊόν δεν υπάρχουν ανταγωνιστικοί μικροοργανισμοί ή έχουν αδρανοποιηθεί. Σε άριστες συνθήκες, η εντεροτοξίνη μπορεί να παραχθεί σε 4-6 ώρες. Η αναστολή της ανάπτυξης των σταφυλοκόκκων και άρα και παραγωγής των εντεροτοξινών αυτών έγκειται στη μείωση του pH, στην παραγωγή H₂O₂, στα αντιβιοτικά, στον ανταγωνισμό για τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά κλπ (Jfoster, 2002).

2.9 Εντεροτοξίνες *Staphylococcus aureus*

Διάφορες εντεροτοξίνες παράγονται από τον *S. aureus* (A,B,C₁,C₂,C₃,D,E,G,H,I,J,K,L) οι οποίες διαφέρουν ως προς την τοξικότητά τους (MacFarlane, 2017). Οι συγκεκριμένες εντεροτοξίνες αφορούν πρωτεΐνες με μοριακό βάρος 25.000-35.000. Προκειμένου να

παραχθεί ικανοποιητική ποσότητα εντεροτοξίνης που να προκαλεί τροφοδοξίνωση, το προϊόν πρέπει να περιέχει περισσότερους των 10^7 εντεροτοξικογενείς σταφυλοκόκκους ανά g ή ml (Jfoster, 2002).

Ο *S. aureus* συνεχίζει να απασχολεί την επιστημονική κοινότητα, παρά την τεχνολογική εξέλιξη, καθώς οι τοξίνες του έχει παρατηρηθεί να εμφανίζουν ανθεκτικότητα στη θερμική επεξεργασία. Η θερμοανθεκτικότητα αυτή εξαρτάται από τον τύπο και τη συγκέντρωση της εντεροτοξίνης, το υπόστρωμα (τρόφιμο) στο οποίο γίνεται η θέρμανση και τη θερμοκρασία θέρμανσης. Κατά κανόνα, οι εντεροτοξίνες δεν αδρανοποιούνται με την παστερίωση (72 °C για 15 sec) και την πολύ υψηλή θερμική επεξεργασία (UHT: 143,3 °C για 9 sec). Από το σύνολο των εντεροτοξινών που παράγει ο *S. aureus*, πιο θερμοανθεκτική παρουσιάζεται εκείνη του τύπου B (Ortega et al., 2010).

2.10 Προσβολή από *Staphylococcus aureus*

Προκειμένου να περιορισθεί η πιθανότητα τροφοδοξίνωσης από τον *S. aureus*, συνήθη μέτρα που λαμβάνονται αφορούν τη διατήρηση προϊόντων, τα οποία φέρουν χαμηλούς πληθυσμούς του μικροοργανισμού, σε θερμοκρασίες ψύξης (<5 °C) ή σε θερμοθαλάμους (>60 °C). Σε όλες τις περιπτώσεις οφείλει να δίνεται μεγάλη προσοχή στη θερμοκρασία περιβάλλοντος των προϊόντων. Πρέπει να αποφεύγονται θερμοκρασίες 7-48 °C για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 3-4 h. Παράλληλα, πρέπει να τηρούνται και να ελέγχονται όλοι οι προβλεπόμενοι κανόνες υγιεινής από το ανθρώπινο δυναμικό που έρχεται σε επαφή με τα τρόφιμα κατά την παραγωγική διαδικασία, αλλά και να πραγματοποιείται η απαραίτητη θερμική επεξεργασία οπουδήποτε αυτή ορίζεται (Taylor & Unakal, 2023).

Ο *S. aureus*, όπως και τα περισσότερα βακτήρια, εμφανίζεται στον αέρα, στο νερό, στα απόβλητα, αλλά και στο δέρμα και στη ρινική κοιλότητα του ανθρώπου και των ζώων. Συμπερασματικά, πολλά προϊόντα αναμένεται να αποτελούν αιτίες τροφοδοξίνωσης από σταφυλόκοκκους. Συνήθη παραδείγματα αφορούν το κρέας και τα κρεατοσκευάσματα, τα πουλερικά, τα ψάρια, το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τις μαγιονέζες, τις πάστες και τα προϊόντα ζαχαροπλαστικής (Taylor & Unakal, 2023).

Κατά την προσβολή ενός ανθρώπου από το συγκεκριμένο μικροοργανισμό και πιθανώς τις παραγόμενες τοξίνες αυτού, δεν οδηγεί πάντα σε όμοια συμπτώματα. Τα πιο κοινά, όμως, είναι η υποθερμία, η σιελόρροια, η ναυτία, ο έμετος, οι κράμπες και η διάρροια. Επιπλέον πιθανά συμπτώματα αποτελούν το ρίγος, η κεφαλαλγία, η εφίδρωση, η εξάντληση και η βραδυκαρδία. Ο χρόνος επώασης, δηλαδή η χρονική περίοδος η οποία μεσολαβεί από τη λήψη της τροφής μέχρι την εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων, είναι 2-4 ώρες. Η διάρκεια της ασθένειας χαρακτηρίζεται συνήθως στις 1-2 ημέρες, ενώ το ποσοστό θανάτων είναι πολύ χαμηλό (Guo et al., 2020; Taylor & Unakal, 2023).

2.11 *Escherichia coli*

Συχνά μελετώνται, επίσης, ορισμένα στελέχη του βακτηρίου *Escherichia coli* (*E.coli*) (Εικόνα 5). Τα στελέχη, γενικώς, διαφοροποιούνται ορολογικά σύμφωνα με τα αντιγόνα Ο (σωματικά αντιγόνα), Η (αντιγόνα μαστιγίων) και Κ (αντιγόνα κάψας). Τα Ο αντιγόνα καθορίζουν την ορολογική ομάδα των διαρροϊκών στελεχών και τα Η τον ορολογικό τύπο. Τα διαρροϊκά στελέχη, να σημειωθεί ότι κατατάσσονται στα εντεροπαθογόνα στελέχη *E.coli* (EPEC), εντεροτοξινογόνα στελέχη *E.coli* (ETEC), εντεροδισδυτικά στελέχη *E.coli* (EIEC), εντεροπροσκολλητικά στελέχη *E.coli* (DAEC), εντεροσυσσωρευτικά στελέχη *E.coli* (EAEC) και



Εικόνα 5: *E.coli* μέσω μικροσκοπίου

Πηγή: <https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/escherichia-coli-e-coli>

εντεροαιμορραγικά στελέχη *E.coli* (EHEC). Από τα παραπάνω, τα εντεροαιμορραγικά στελέχη χαρακτηρίστηκαν ως παθογόνα, λόγω παραγωγής βεροτοξινών (VT) ή Shiga τοξινών (Stx). Ο κοινότερος ορολογικός τύπος των εντεροαιμορραγικών στελεχών είναι το *E.coli* O157:H7, το οποίο πρώτο χρονολογικά επιβεβαιώθηκε για τη συμβολή του όσον αφορά συμπτώματα αιμορραγικής κολίτιδας (Lim et al., 2010).

2.12 Χαρακτηριστικά *Escherichia coli*

Χαρακτηριστικό της *E.coli* O157:H7 αποτελεί η ανθεκτικότητα σε όξινο περιβάλλον, καθώς κατά την έκθεση σε μειωμένο pH αναπτύσσονται μηχανισμοί αντοχής στο οξειδωτικό στρες. Έτσι, είναι δυνατή η επιβίωσή της σε όξινο περιβάλλον σε θερμοκρασίες ψύξης. Η ελάχιστη τιμή pH ανάπτυξης του βακτηρίου είναι 4-4,5 και αναλόγως το τρόφιμο και τις συνθήκες θερμοκρασίας παρουσιάζονται χρονικές διαφοροποιήσεις επιβίωσης. Στα ζυμούμενα αλλαντικά, για παράδειγμα, όπου το pH ορίζεται 4,5, η *E.coli* O157:H7 διατηρείται για 2 μήνες στους 4°C, ενώ αντίστοιχα σε μαγιονέζα με pH ίσο με 3,6-3,9, η *E.coli* O157:H7 επιβιώνει για 5-7 εβδομάδες στους 5 °C και για 1-3 εβδομάδες στους 20 °C. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός έχει την ικανότητα να αποκτά ανθεκτικότητα στη θέρμανση, την ακτινοβολία και στα χημικά συντηρητικά, κατά την ανάπτυξη μηχανισμών αντοχής στο όξινο περιβάλλον (Lim et al., 2010).

Η ανθεκτικότητα της *E.coli* O157:H7 στη θέρμανση αποτελεί μια σημαντική παράμετρο. Κατά την παστερίωση του γάλακτος (72 °C για 0,27min), για παράδειγμα, καταστρέφεται πληθυσμός 10⁴ *E.coli* O157:H7 ανά mL. Αντίστοιχα, κατά τη θερμική

επεξεργασία των αλλαντικών (68,3 °C για μερικά sec) καταστρέφεται πλήρως ο μικροοργανισμός (Lim et al., 2010).

Η ανθεκτικότητα στην ακτινοβόληση δημιουργεί επιπρόσθετα ζητήματα. Ακτινοβολία 1,5 kGy καταστρέφει την *E.coli* O157:H7 στον νωπό κιμά. Στις ΗΠΑ έχουν προσδιοριστεί συγκεκριμένοι κανονισμοί για την εφαρμογή ακτινοβόλησης σε ωμό και κατεψυγμένο κιμά.

2.13 Προσβολή από *Escherichia coli*

Ποικίλα είναι τα τρόφιμα που είναι ικανά να προκαλέσουν τροφική δηλητηρίαση από *E.coli* O157:H7. Σε αυτά περιλαμβάνονται κυρίως προϊόντα παρασκευασμένα από βοδινό κιμά τα οποία δεν έχουν υποστεί επαρκή θερμική επεξεργασία, μη παστεριωμένο γάλα και μηλοχυμό ή οίνο μηλίτη. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη σφαγή και επεξεργασία των βοοειδών τα βακτήρια *E.coli* που βρίσκονται φυσικά στο έντερο είναι πιθανό να μολύνουν το κρέας. Αυτή η πιθανότητα αυξάνεται λόγω πιθανής πρόσμιξης διαφορετικών ειδών βοδινού κρέατος. Επιπλέον, είναι δυνατή η επιμόλυνση του γάλακτος μέσω του αδένου του μαστού της αγελάδας ή του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται. Φρέσκα προϊόντα λαχανικών, επίσης, με κλασικά παραδείγματα το σπανάκι και το μαρούλι είναι ιδιαίτερα ευάλωτα στην επιμόλυνση από *E.coli*, λόγω απορροών υδάτων από φάρμες εκτροφής βοοειδών σε περιοχές γεωργικής καλλιέργειας. Μέσο επιμόλυνσης *E.coli* O157:H7 αποτελεί και το μολυσμένο νερό εξαιτίας ανθρώπινης ή ζωικής παρέμβασης, επομένως προσοχή πρέπει να δίνεται στο σωστό πλύσιμο πρώτων υλών με κατάλληλο και καθαρό νερό. Βέβαια, μέσω των συστημάτων ύδρευσης συνήθως θανατώνεται (Johnson & Russo, 2002).

Τα συμπτώματα τα οποία παρουσιάζει ένα άτομο που έχει προσβληθεί από *E.coli* O157:H7 διαφέρουν σε μικρό βαθμό ανά περίπτωση (Nguyen & Sperandio, 2012). Τα κυριότερα από αυτά είναι διάρροια, αιμορραγική κολίτιδα και το αιμολυτικό ουρεμικό σύνδρομο (Hemolytic Uremic Syndrome), το οποίο διακρίνεται ως αιμολυτική αναιμία, μειωμένος αριθμός αιμοπεταλίων, μείωση του όγκου των ούρων, οίδημα και νεφρική ανεπάρκεια (Spina et al., 2008).

Ευπαθείς ομάδες υψηλού κινδύνου προσβολής από *E.coli* O157:H7 αποτελούν τα μικρά παιδιά και οι ηλικιωμένοι, αλλά και άτομα τα οποία έχουν αδύναμο ανοσοποιητικό σύστημα, λόγω κυρίως αντιμετώπισης προβλημάτων υγείας (ανοσοκατεσταλμένοι ασθενείς) (Johnson & Russo, 2002).

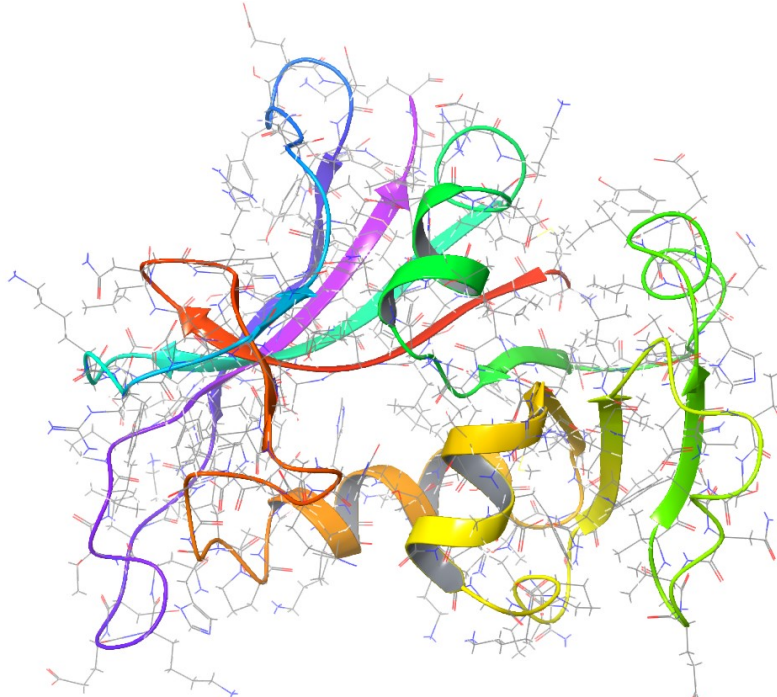
Τα μέτρα πρόληψης από πιθανή τροφική δηλητηρίαση από *E.coli* O157:H7 αφορούν την επαρκή θερμική επεξεργασία, την ψύξη των τροφίμων μετά τη θερμική επεξεργασία, τη χλωρίωση του νερού και την τήρηση των κανόνων υγιεινής και ορθής πρακτικής σε όλη τη διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας. Επιπρόσθετα, σημαντικά είναι, ο σωστός καθαρισμός εργαλείων και επιφανειών που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα που πιθανώς να περιέχουν τον μικροοργανισμό, καθώς και η ξεχωριστή αποθήκευση των τροφίμων. Τέλος, όπως

προαναφέρθηκε, μεγάλη βάση δίνεται στην υγιεινή και στους χειρισμούς των τροφίμων από τον καταναλωτή αφού κατά τη μετάδοση του μικροοργανισμού από άτομο σε άτομο η λοιμογόνος δράση ανέρχεται <100 κύτταρα, ενώ σε ευπαθείς ομάδες είναι αρκετά μόλις 10 κύτταρα (Lüthje & Brauner, 2014).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Χαρακτηριστικά ένζυμα εντοπιζόμενα σε *Staphylococcus aureus* και *Escherichia coli*

3.1 Διϋδροφολική αναγωγή (DHFR)

Το ένζυμο διϋδροφολική αναγωγή [Dihydrofolate Reductase (DHFR)] είναι ένα απαραίτητο ένζυμο το οποίο βρίσκεται εντός των κυττάρων πολλών οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, μυκήτων, φυτών και ζώων (Σχήμα 1) (Liu, 2013). Διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στο μεταβολισμό του φολικού οξέος, ενός παραγώγου της βιταμίνης B9, απαραίτητου για τη σύνθεση του DNA, του RNA και συγκεκριμένων αμινοξέων.

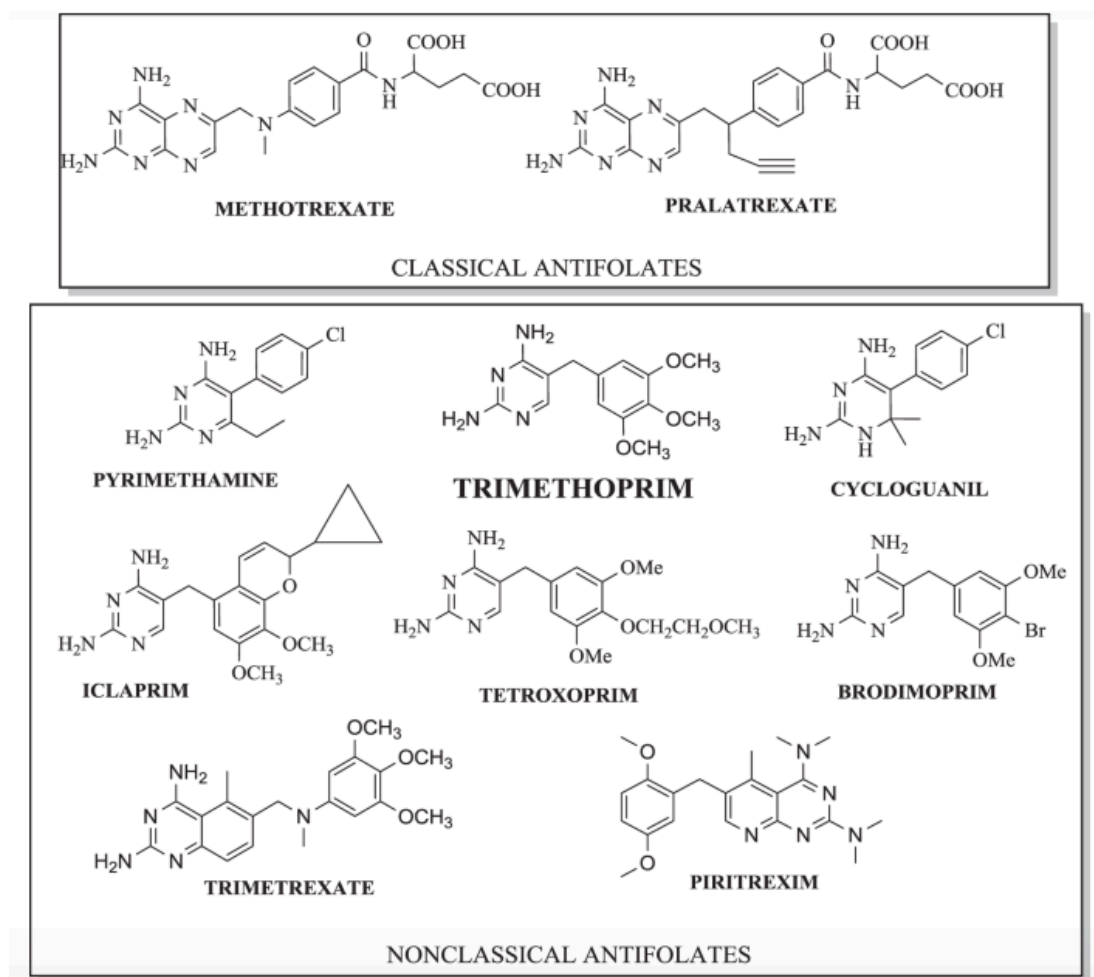


Σχήμα 1: Τριδιάστατη απεικόνιση ενζύμου DHFR

Στα βακτήρια, η DHFR καταλύει τη μετατροπή του διϋδροφολικού οξέος (dihydrofolate, DHF) σε τετραϋδροφολικό (tetrahydrofolate, THF) με τη συμβολή του συμπαραγόντα φωσφορικού νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου σε ανηγμένη μορφή (NADPH). Το THF λειτουργεί ως φορέας μονάδων άνθρακα απαραίτητων για διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις, όπως η σύνθεση των νουκλεοτιδίων και των αμινοξέων. Κατά τη διαδικασία αυτή, η DHFR μετατρέπει τη μορφή του διϋδροφολικού οξέος η οποία είναι ανενεργή στη μορφή του τετραϋδροφολικού οξέος που είναι ενεργή, με αποτέλεσμα να έχει την ικανότητα να συμμετέχει στις μεταβολικές διαδικασίες του κυττάρου (Srinivasan* et al., 2019).

Λόγω της σημαντικής συμβολής στο μεταβολισμό του φολικού οξέος, η DHFR αποτελεί στόχο για πληθώρα αντιμικροβιακών και αντικαρκινικών φαρμάκων. Η αναστολή της δράσης του ενζύμου DHFR προκαλεί τη διακοπή της παραγωγής των νουκλεοτιδίων αλλά και την καταστροφή της κυτταρικής ανάπτυξης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Παραδείγματα αναστολέων της DHFR περιλαμβάνουν τη σουλφοναμίδη η οποία χορηγείται για την αντιμετώπιση ανθρώπινων και ζωικών βακτηριακών λοιμώξεων, την τριμεθοπρίμη η

οποία χρησιμοποιείται κοινά σαν αντιβιοτικό και τη μεθοτρεξάτη η οποία χρησιμοποιείται στη χημειοθεραπεία για την αντιμετώπιση διαφόρων μορφών καρκίνου (Εικόνα 6) (Flensburg & Skold, 1987). Τα φάρμακα αυτά μπορούν να αναστείλουν τη λειτουργία της DHFR, αποτρέποντας τη μετατροπή του διϋδροφολικού σε τετραϋδροφολικό οξύ και καταστρέφοντας τη μεταβολική οδό του φολικού οξέος. Αυτή η παρεμπόδιση, προκαλεί βλάβη κατά την αντιγραφή της έλικας του DNA και της κυτταρικής διαίρεσης, οδηγώντας τελικά στην αναστολή ανάπτυξης του κυττάρου ή ακόμη και στη θανάτωσή του (Egorov et al., 2018; Wróbel et al.,



Εικόνα 6: Χημική δομή αναστολέων της DHFR

Πηγή: <https://www.nature.com/articles/s41429-019-0240-6#citeas> (Egorov et al., 2020).

Το φολικό οξύ διαδραματίζει σημαντικό ρόλο όχι μόνο στον ανθρώπινο οργανισμό αλλά και σε μικροοργανισμούς. Στα βακτήρια, συγκεκριμένα, αποτελεί κλειδί διαφόρων μεταβολικών διαδικασιών των κυτταρικών λειτουργιών. Μία από τις βασικότερες λειτουργίες του φολικού οξέος στα βακτήρια αποτελεί η σύνθεση των νουκλεοτιδίων, βασικών και απαραίτητων δομικών λίθων των DNA και RNA. Το φολικό οξύ παρέχει ουσιαστικά μονάδες

άνθρακα απαραίτητες για την παραγωγή πουρινών και πυριμιδίνων κατά την σύνθεση των νουκλεοτιδίων. Χωρίς επαρκές φολικό οξύ, τα βακτήρια θα αντιμετωπίσουν δυσκολίες κατά την αντιγραφή του DNA και συνεπώς τη διαιώνιση των γονιδίων, καθώς και για τη διεκπεραίωση σημαντικών για το κύτταρο διαδικασιών. Απαραίτητο είναι το φολικό οξύ και κατά τη σύνθεση των αμινοξέων και κατ'επέκταση των πρωτεϊνών. Συμμετέχει στη βιοσύνθεση συγκεκριμένων αμινοξέων όπως η σερίνη, η γλυκίνη κι η μεθειονίνη στα βακτήρια. Τα προαναφερθέντα αμινοξέα είναι απαραίτητα κατά την πρωτεϊνοσύνθεση και σε διάφορες μεταβολικές πορείες. Το φολικό οξύ συμμετέχει και σε αντιδράσεις μεθυλίωσης, όπου αποτελεί το δότη μεθυλομάδων στα βακτήρια. Οι μεθυλομάδες σχετίζονται με διάφορες κυτταρικές λειτουργίες, όπως η μεθυλίωση του DNA, η οποία είναι ικανή να επηρεάσει την έκφραση και ρύθμιση των γονιδίων του κυττάρου. Οι εξαρτώμενες από το φολικό οξύ αντιδράσεις μεθυλίωσης διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην προσαρμοστικότητα του βακτηρίου, τη λοιμογόνο δράση, καθώς και τη ρύθμιση των μεταβολικών οδών του. Το φολικό οξύ συμμετέχει και στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις εντός των βακτηρίων, ενεργώντας ως συμπαραγόντας για διάφορα ένζυμα τα οποία συμμετέχουν στις διαδικασίες μεταφοράς ηλεκτρονίων. Οι οξειδοαναγωγικές αυτές αντιδράσεις είναι σημαντικές για την παραγωγή ενέργειας και το μεταβολισμό των βακτηρίων. Τέλος, χαρακτηριστικός ρόλος του φολικού οξέος αφορά τη χρήση του ως αντιμικροβιακό στόχο. Η μεταβολική πορεία του φολικού οξέος, περιλαμβανομένου του ενζύμου DHFR, αποτελεί στόχο για πολλά ανιμικροβιακά φάρμακα, αφού όπως προαναφέρθηκε, η αναστολή της δράσης της DHFR διακόπτει τη σύνθεση του φολικού οξέος, με αποτέλεσμα τη βλάβη της σύνθεσης του DNA και της κυτταρικής διαίρεσης. Σε γενικές γραμμές, το φολικό οξύ είναι κρίσιμο για τη βακτηριακή ανάπτυξη, την αντιγραφή του DNA, τη σύνθεση των πρωτεϊνών και το μεταβολισμό. Η κατανόηση της δράσης του φολικού οξέος σύμφωνα με τις διαφορετικές ανάγκες και τις μεταβολικές πορείες σε διαφορετικά βακτηριακά είδη, είναι ικανή να οδηγήσει στην ανάπτυξη αντιμικροβιακών στρατηγικών και τον επικείμενο σχεδιασμό αποτελεσματικών αντιβιοτικών (Schweitzer et al., 1990; Silva, 2022).

Όπως και σε άλλα βακτήρια, η DHFR στον *S. aureus* καταλύει τη μετατροπή του διϋδροφολικού σε τετραϋδροφολικό οξύ, με τη συμβολή του NADPH. Στην περίπτωση του *S. aureus*, συγκεκριμένα αντιβιοτικά όπως η τριμεθοπρίμη και η σουλφαμεθοξαζόλη χρησιμοποιούνται κοινά για την αναστολή της δράσης της DHFR (Avendaño & Menéndez, 2008). Τα φάρμακα αυτά παρεμποδίζουν τη μετατροπή του διϋδροφολικού σε τετραϋδροφολικό οξύ, οδηγώντας στη διακοπή του μεταβολισμού του φολικού οξέος και κατ'επέκταση στην αναστολή της σύνθεσης του DNA και της κυτταρικής διαίρεσης. Επομένως, η ανάπτυξη και η μετάδοση του *S. aureus* μπορούν να περιοριστούν αποτελεσματικά στοχεύοντας στη DHFR (Varela, 2021).

Η DHFR εντοπίζεται και στο βακτήριο *E.coli*, διαδραματίζοντας εξίσου σημαντικό ρόλο για τις λειτουργίες του κυττάρου. Εκτός από τα παραπάνω, η *E.coli* DHFR σχετίζεται και με μηχανισμούς που αφορούν την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, αφού αποτελεί αντιμικροβιακό στόχο. Η DHFR αποτελεί στόχο για ορισμένα αντιβιοτικά, όπως η τριμεθοπρίμη. Τα εν λόγω αντιβιοτικά είναι ικανά να αναστείλουν τη λειτουργία δράσης του ενζύμου, οδηγώντας στην εξάντληση του THF και στην επιβράδυνση της σύνθεσης των νουκλεοτιδίων και των αμινοξέων. Στοχεύοντας, λοιπόν, στην DHFR, τα αντιβιοτικά προκαλούν βλάβη στο μεταβολισμό του φολικού οξέος και κατά συνέπεια στην ανάπτυξη και την επιβίωση των κυττάρων *E.coli*. Η δομή και οι λειτουργίες της DHFR στην *E.coli*, παρέχουν πληροφορίες για τις μεταβολικές της οδούς και συγχρόνως συμβάλλουν στη δημιουργία αποτελεσματικών αντιβιοτικών για την καταπολέμηση της λοίμωξης από το συγκεκριμένο βακτήριο (Kohen, 2015).

3.3 DNA γυράση B (DNA gyrase B)

Η DNA γυράση (DNA gyrase) είναι ένα ένζυμο που ανήκει στην οικογένεια της τοποϊσομεράσης II, το οποίο βρίσκεται στα βακτήρια κυρίως αλλά και σε κάποιους άλλους οργανισμούς. Αποτελείται από δύο υπομονάδες: τη DNA gyrase A (GyrA) και τη DNA gyrase B (GyrB) (Sissi, 2005). Η GyrB, λοιπόν, γνωστή και ως υπομονάδα B (Σχήμα 3), είναι η καταλυτική υπομονάδα για την ενζυμική δραστηριότητα της DNA γυράσης. Αποτελεί μεταλλοένζυμο καθώς είναι συμπλοκοποιημένη με Mg^{2+} , το οποίο συμβάλει καθοριστικά στην υδρόλυση (διάσπαση του μορίου από παρουσία ύδατος) της τριφωσφορικής αδενοσίνης



Σχήμα 2: Τριδιάστατη απεικόνιση ενζύμου DNA gyrase B

(ATP). Αυτό γίνεται δυνατό μέσω ενός τμήματος πρόσδεσης της ATP που περιλαμβάνει το ένζυμο. Αποτέλεσμα της εν λόγω αντίδρασης αποτελεί η απελευθέρωση συσσωρευμένης ενέργειας (Collin et al., 2011).

Οι βασικές λειτουργίες της DNA Gyrase οι οποίες απαιτούν ορισμένη ποσότητα ενέργειας είναι τέσσερις (Vijayakrishnan, 2018). Ευθύνεται, αρχικά, για την υπερελίκωση του DNA και επιτυγχάνεται μέσω της αποκοπής και της επανασύνδεσης των αλυσίδων DNA κατά τη διάρκεια του ξετυλίγματος και αναδίπλωσης του DNA. Μέσω της εισαγωγής αρνητικών συσπειρωμένων παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του DNA στο χώρο (topology) και στο μετριάσμα των τάσεων στρέψης, οι οποίες προκύπτουν κατά την αντιγραφή και μεταγραφή του DNA καθώς και σε άλλες εξαρτώμενες από το DNA διαδικασίες. Επιπλέον σημαντική λειτουργία της Gyrase είναι το ξετύλιγμα και η χαλάρωση του DNA, αφού κατέχει ATP-εξαρτώμενες ελικάσες. Είναι ικανή να ξετυλίξει το DNA πριν τη διχάλα αντιγραφής και τη διαδικασία μεταγραφής, σπάζοντας τις αλυσίδες του DNA και εκκινητοποιώντας το διαχωρισμό της διπλής έλικας. Η δράση αυτή είναι κρίσιμη για την αντιγραφή, μεταγραφή και τον ανασυνδυασμό του DNA. Ακόμα, η Gyrase μπορεί να χαλαρώσει τα θετικά υπερσυσπειρωμένα μόρια DNA αφαιρώντας την περίσσεια στροφών και επαναφέροντας το DNA στην αρχική του μορφή. Επιπρόσθετη λειτουργία της Gyrase αφορά τη ρύθμιση του DNA στο χώρο, αφού συνεισφέρει στη διατήρηση του σωστού βαθμού συσπείρωσης του DNA στα βακτήρια. Η σωστή διάταξη του DNA στο χώρο είναι απαραίτητη για διάφορες κυτταρικές διαδικασίες, όπως η έκφραση γονιδίων, το πακετάρισμα του DNA και η χρωμοσωμική οργάνωση. Τέλος, η Gyrase αποτελεί στόχο για διάφορα είδη αντιβιοτικών, όπως οι φθοροκινολόνες (π.χ. σιπροφλοξασίνη). Τέτοια αντιβιοτικά αναστέλλουν τη δράση της DNA gyrase B μέσω της πρόσδεσης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, προλαμβάνοντας το σπάσιμο και την επανένωση των αλυσίδων του DNA. Μέσω της παρέμβασης των αντιβιοτικών στη DNA gyrase B, διακόπτεται η αντιγραφή και η μεταγραφή του DNA, τελικά αναστέλλοντας τη βακτηριακή ανάπτυξη (Durcik et al., 2020).

Γενικά, η Gyrase έχει παρεμφερή δράση στον *S. aureus* και στην *E. Coli*, με εκείνη που αναλύθηκε προηγουμένως εντός των βακτηρίων. Τονίζεται ότι αποτελεί απαραίτητο ένζυμο καθώς συμβάλει στη συσπείρωση, το ξεδίπλωμα, τη χαλάρωση και τη ρύθμιση του DNA στο χώρο. Η ενζυμική της δράση είναι υψίστης σημασίας για τη διατήρηση της ορθής δομής και λειτουργίας του DNA, ενώ δρα και ως στόχος για ορισμένα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων (Marko Oblak et al., 2007).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Αιθέριο έλαιο λεβάντας

4.1 Χαρακτηριστικά και δράσεις

Το αιθέριο έλαιο λεβάντας (Εικόνα 7) αποτελεί ένα ευρέως γνωστό αιθέριο έλαιο προερχόμενο από το φυτό λεβάντα, επιστημονικά γνωστό και ως *Lavandula angustifolia*. Είναι διαδεδομένο λόγω του ευχάριστου αρώματός του και χρησιμοποιείται εδώ και αιώνες για τις ποικίλες θεραπευτικές και αρωματικές του ιδιότητες (Cavanagh & Wilkinson, 2005). Βασικό χαρακτηριστικό του αιθέριου ελαίου λεβάντας είναι το άρωμά του, το οποίο θεωρείται γλυκό, λουλουδένιο (floral) και βοτανώδες (herbaceous). Συχνά περιγράφεται ως χαλαρωτικό και καταπραϋντικό για το μυαλό και το σώμα, κάνοντάς το συνήθη επιλογή κατά την αρωματοθεραπεία αλλά και ως φυσικό άρωμα. Χρησιμοποιείται, ακόμα, και ως πρόσθετο σε προϊόντα περιποίησης του δέρματος, καθώς βοηθάει σε ερεθισμούς του δέρματος, επούλωση των πληγών, ακμή, τσιμπήματα εντόμων και πολλά άλλα. Σημαντικές είναι οι αντιμικροβιακές



Εικόνα 7: Αιθέριο έλαιο λεβάντας

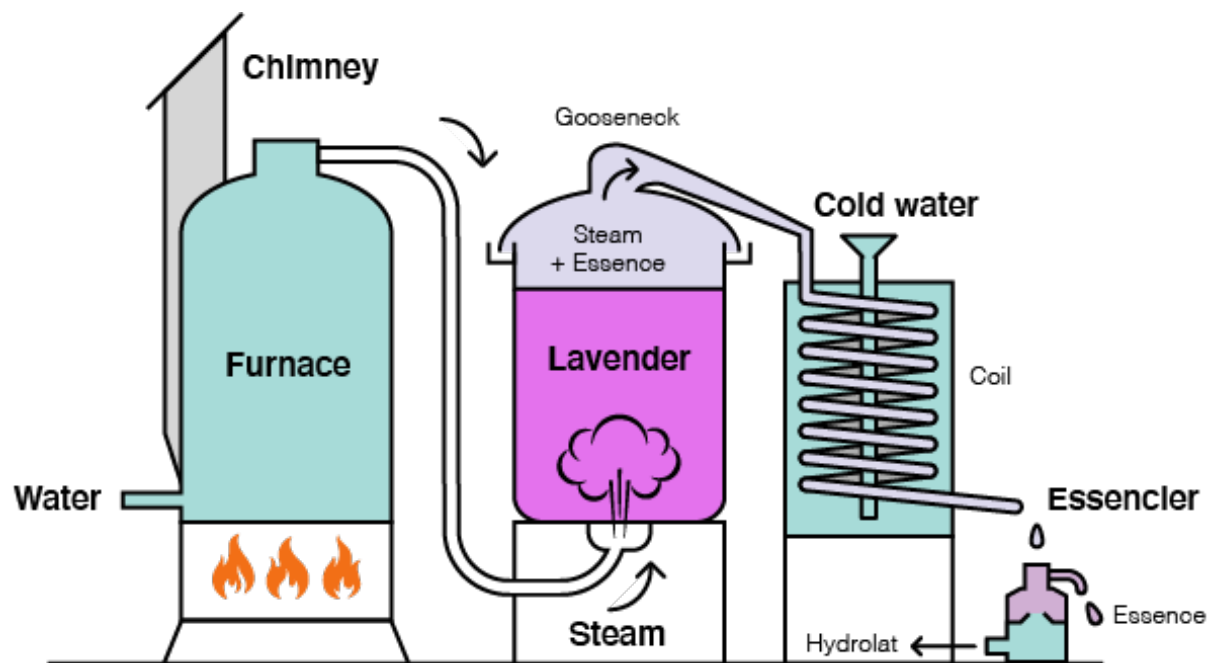
Πηγή:

<https://www.prevention.com/life/a25862105/lavender-essential-oil-benefits-uses/>

ιδιότητες του αιθέριου ελαίου λεβάντας καθώς έχει μελετηθεί για την πιθανή αναστολή ανάπτυξης συγκεκριμένων βακτηρίων και μυκήτων. Η ιδιότητά του αυτή το καθιστά δημοφιλή επιλογή για φυσικά απολυμαντικά και καθαριστικά προϊόντα. Τέλος, το αιθέριο έλαιο λεβάντας έχει μελετηθεί για την πιθανή επίδραση σε διάφορες παθήσεις. Αν και απαιτείται περισσότερη έρευνα, ορισμένες έρευνες υποδεικνύουν ότι το αιθέριο έλαιο λεβάντας πιθανά διαθέτει αναλγητικές, αντισπασμολυτικές και αντιφλεγμονώδεις δράσεις, εξ ου και χρησιμοποιείται σε πονοκεφάλους, μυϊκούς πόνους και πεπτικά προβλήματα. Σημαντικό είναι να σημειωθεί ότι ενώ το αιθέριο έλαιο λεβάντας θεωρείται γενικώς ασφαλές για τους περισσότερους ανθρώπους, υπάρχουν εξαιρέσεις στις οποίες παρατηρείται ευαισθησία ή αλλεργία, με αποτέλεσμα να συνιστάται δοκιμαστικό αλλεργικό τεστ και συμβουλευτική συνάντηση με επαγγελματία υγείας πριν τη χρήση (Cavanagh & Wilkinson, 2002, 2005).

4.2 Πορεία παρασκευής αιθέριου ελαίου λεβάντας

Το αιθέριο έλαιο λεβάντας κλασικά παρασκευάζεται μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται απόσταξη με υδρατμούς, η πιο κοινή μέθοδος για την εξαγωγή αιθέριων ελαίων από φυτικές ύλες (Εικόνα 8). Η γενική αρχή της πορείας παρασκευής του αιθέριου ελαίου λεβάντας εκκινείται με τη συγκομιδή του φυτού κατά την περίοδο άνθισης των λουλουδιών. Η χρονική περίοδος συγκομιδής επηρεάζει άμεσα την ποιότητα, το άρωμα και τη σύσταση του τελικού προϊόντος. Ακολουθεί η απόσταξη των ανθών, βλαστών και φύλλων της λεβάντας μέσω ειδικής συσκευής, συνήθως αποστακτήρα ή στήλη απόσταξης. Δημιουργούνται ξεχωριστά υδρατμοί και εισάγονται στο θάλαμο απόσταξης. Οι υδρατμοί διαπερνούν τα φυτικά υλικά, με αποτέλεσμα να προκαλείται ήπια θέρμανση με την οποία απελευθερώνονται ασταθείς αρωματικές ενώσεις. Στη συνέχεια, γίνεται συμπύκνωση του μίγματος ατμού και ασταθών αρωματικών ενώσεων, μέσω ανόδου του και εισαγωγής του σε συμπυκνωτή όπου και ψύχεται και μετατρέπεται πάλι σε υγρό το οποίο περιέχει το αιθέριο έλαιο και νερό. Απαραίτητος σε αυτό το στάδιο κρίνεται ο διαχωρισμός του ελαίου, διαδικασία εύκολη αφού αποτελεί υδρόφοβη ύλη με αποτέλεσμα να διαχωρίζεται από το νερό λόγω χαμηλότερης



Εικόνα 8: Παρασκευή αιθέριου ελαίου λεβάντας μέσω απόσταξης με υδρατμούς

Πηγή: <https://www.sollicebiotech.com/en/organic-fine-lavender-essential-oil/>

πυκνότητας και επικείμενης επίπλευσης. Ακολουθεί ένα φιλτράρισμα του αιθέριου ελαίου προς απομάκρυνση ακαθαρσιών ή φυτικών υπολειμμάτων ώστε να εξασφαλίζεται η καθαρότητα και διαύγεια του τελικού προϊόντος. Τέλος, γίνεται συσκευασία και αποθήκευση του προκύπτοντος αιθέριου ελαίου λεβάντας σε σκουρόχρωμους γυάλινους περιέκτες, σε ξηρό και δροσερό μέρος προς αποφυγή οξειδωσής του από τον ήλιο και διατήρησης της ποιότητάς του (Cassel et al., 2009).

4.3 Σύνθεση αιθέριου ελαίου λεβάντας

Το αιθέριο έλαιο λεβάντας είναι ένα σύνθετο μίγμα πολλών χημικών ενώσεων που συμβάλουν στο χαρακτηριστικό του άρωμα και στις πιθανές θεραπευτικές του ιδιότητες. Η σύνθεση του είναι δυνατόν να διαφέρει ελαφρώς λόγω του διαφορετικού είδους λεβάντας, τις συνθήκες ανάπτυξης και τη μέθοδο εκχύλισης που έχει χρησιμοποιηθεί. Οι ενώσεις που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο λεβάντας είναι πολυάριθμες και περιέχονται σε διάφορα ποσοστά όμως τις κύριες ενώσεις αποτελούν οι: linalool, linalyl acetate, terpinen-4-ol, lavandulol, lavandulyl acetate, beta-caryophyllene, ocimene και camphor. Η ένωση linalool συμβάλει στο λουλουδένιο άρωμα του αιθέριου ελαίου και έχει μελετηθεί και για τις χαλαρωτικές ιδιότητές του, ενώ η ένωση linalyl acetate παρέχει το γλυκό και φρουτώδες άρωμα και σχετίζεται με την καταπραϋντική του δράση. Η terpinen-4-ol είναι μια τερπενική αλκοόλη, η οποία περιλαμβάνει αντιμικροβιακές ιδιότητες οι οποίες συνεισφέρουν στη πιθανή θεραπευτική δράση του αιθέριου ελαίου. Η lavandulol είναι μία δευτεροταγής αλκοόλη με λουλουδένιο άρωμα και πιθανώς χαλαρωτικές ιδιότητες, ενώ η lavandulyl acetate αποτελεί εστέρα που ενισχύει το λουλουδένιο και γλυκό άρωμα του ελαίου λεβάντας. Το συγκεκριμένο άρωμα του ελαίου ενισχύεται και μέσω της ένωσης beta-caryophyllene η οποία παρουσιάζει πιθανώς αντιφλεγμονώδη δράση. Η ένωση ocimene, επίσης ως μονοτερπένιο συμβάλει στο άρωμα του αιθέριου ελαίου λεβάντας. Αν και το συγκεκριμένο αιθέριο έλαιο περιέχει σχετικά μειωμένα επίπεδα camphor σχετικά με άλλα αιθέρια έλαια, παρέχει αίσθηση δροσιάς και περιέχει ενδεχομένως αναλγητικές ιδιότητες (Dong et al., 2020).

4.4 Σύνδεση αιθέριου ελαίου λεβάντας με *Staphylococcus aureus* και *Escherichia coli*

Το αιθέριο έλαιο λεβάντας έχει μελετηθεί για την πιθανή αντιμικροβιακή του δράση και επομένως κατά των βακτηρίων *S. aureus* και *E.coli*, τα οποία απασχολούν εντόνως την επιστημονική κοινότητα (Vidhya Thomas et al., 2021). Παρ' ότι το συγκεκριμένο αιθέριο έλαιο θεωρείται ότι είναι ικανό να αναστείλει σε ένα βαθμό τη δράση τέτοιων βακτηρίων, είναι σημαντικό να τονισθεί ότι η επιστημονική έρευνα στο συγκεκριμένο ζήτημα υστερεί (Cavanagh & Wilkinson, 2005). Χαρακτηριστικές έρευνες αναφέρουν ότι το αιθέριο έλαιο λεβάντας έχει αντιμικροβιακή δράση κατά των βακτηρίων *S. aureus* και *E. coli* (Diass et al., 2023; Kwiatkowski et al., 2019).

Βέβαια, η αποτελεσματικότητα του αιθέριου ελαίου λεβάντας κατά του *S. aureus* διαφέρει βάσει παραγόντων όπως η συγκέντρωση του ελαίου, το στέλεχος του βακτηρίου και οι μέθοδοι ελέγχου (Siala, 2016). Κρίνεται απαραίτητο να γίνει περαιτέρω έρευνα σε σχέση με τις πιθανές ιδιότητες και δράσεις του αιθέριου ελαίου λεβάντας κατά των βακτηρίων, ειδικά των *S. aureus* και *E. coli*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Υπολογιστικά Εργαλεία Εικονικής Σάρωσης

5.1 Εισαγωγή

Μια σημαντική συνδυαστική τεχνική αποτελούν τα υπολογιστικά εργαλεία εικονικής σάρωσης, τα οποία δημιουργήθηκαν λόγω του υψηλού κόστους αποτυχημένων προσπαθειών κλινικών δοκιμών. Μέσω αυτών των τεχνικών γίνεται δυνατή η πρόβλεψη ορισμένων ενώσεων οι οποίες παρουσιάζουν αυξημένη ικανότητα πρόσδεσης και κατ'επέκταση αυξημένη πιθανότητα να αναστέλουν το βιολογικό στόχο που μελετάται. Δηλαδή, μέσω της εικονικής σάρωσης πραγματοποιείται αυτοματοποιημένη δοκιμή μεγάλου αριθμού υποψηφίων ενώσεων, φυσικών ή συνθετικών, ως προς τη δράση τους σε ορισμένους βιολογικούς στόχους (Murgueitio et al., 2012).

Αυτό γίνεται δυνατό μέσω της ταυτόχρονης εξέτασης πολλαπλών ενώσεων, που προκύπτουν από βιβλιοθήκες μορίων, στο βιολογικό στόχο που μελετάται. Έτσι, υπάρχει εξοικονόμηση του υψηλού κόστους των εργαστηριακών δοκιμών καθώς και χρόνου κατά την πειραματική διαδικασία (Κρίτση & Kritsi, 2017).

Έχουν ήδη γίνει έρευνες σε σχέση με πιθανούς αναστολείς του *S. aureus* μέσω των υπολογιστικών εργαλείων εικονικής σάρωσης (Muthukumar et al., 2022). Χαρακτηριστική είναι η έρευνα με τίτλο “In Silico Screening and In Vitro Activity Measurement Against *Staphylococcus aureus* of Essential Oil Compounds”. Δημοσιεύθηκε το 2013 και μέσω αυτής προσδιορίζονται ενώσεις που περιέχονται σε αιθέρια έλαια με πιθανή αντιβακτηριακή δράση κατά του *S. aureus*, οι οποίες στη συνέχεια δοκιμάστηκαν και επιβεβαιώθηκαν πειραματικά (Murgueitio et al., 2012).

Αντίστοιχα, μέσω των υπολογιστικών εργαλείων εικονικής σάρωσης, έχουν πραγματοποιηθεί έρευνες μελετώντας πιθανούς αναστολείς του βακτηρίου *E. coli* (Murgueitio et al., 2012).

5.2 Μοριακή πρόσδεση (Molecular Docking)

5.2.1 Εισαγωγή

Στόχος της μοριακής πρόσδεσης είναι ο προσδιορισμός της πιθανής πρόσδεσης μίας ένωσης σε μία πρωτεΐνη-στόχο, μέσω τεχνικής προσομοίωσης σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. Μέσω της διαδικασίας αυτής γίνεται δυνατή η εύρεση όχι μόνο του καταλληλότερου προσδέτη αλλά και του τρόπου πρόσδεσης (προσανατολισμός), ώστε να υπάρχει μέγιστη συμπληρωματικότητα (Amer et al., 2021). Αυτό γίνεται εφικτό μέσω της συγκεκριμένης τεχνικής, λόγω δημιουργίας διαφορετικών τρόπων πρόσδεσης (poses) των ενώσεων, υπολογισμού βαθμών ελευθερίας δεσμευμένου με το στόχο προσδέτη και της συνάρτησης βαθμολόγησης για τον υπολογισμό της ενέργειας πρόσδεσης. Υπάρχουν διάφορα προγράμματα μοριακής πρόσδεσης με αντίστοιχους αλγόριθμους π.χ. το AUTODOCK ή το MAESTRO το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Η μοριακή πρόσδεση μπορεί να διαιρεθεί σε τέσσερα βήματα τα

οποία αποτελούν η προετοιμασία των προσδετών, η προετοιμασία της πρωτεΐνης στόχου, η διαδικασία πρόσδεσης και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων (Κρίτση & Kritsi, 2017).

5.2.2 Προετοιμασία προσδετών

Αναγκαία είναι η προετοιμασία των ενώσεων των βιβλιοθηκών για επικείμενη χρήση κατά την εικονική σάρωση. Οι ενώσεις τις οποίες στη συνέχεια θα μελετηθούν, συνήθως αποθηκεύονται ως αρχεία .SMILE ή .SDF, αρχεία στα οποία οι ενώσεις εμφανίζονται σε δισδιάστατη απεικόνιση. Προκειμένου να επεξεργασθούν, είναι απαραίτητη η μετατροπή σε τριδιάστατη μορφή, διαδικασία που επιτυγχάνεται μέσω προγραμμάτων μοριακής μοντελοποίησης. Μια ένωση μπορεί να χρησιμοποιηθεί εφόσον πραγματοποιηθεί η προετοιμασία της, η οποία περιλαμβάνει: πρόσθηκη ατόμων υδρογόνου, αφαίρεση ανεπιθύμητων μορίων, ρύθμιση του βέλτιστου pH και προσδιορισμό των ταυτομερών ενώσεων. Τέλος, εφαρμόζονται αλγόριθμοι ελαχιστοποίησης ενέργειας με τη χρήση υπολογιστικών εργαλείων (Κρίτση & Kritsi, 2017).

5.2.3 Προετοιμασία πρωτεϊνών

Η εκάστοτε πρωτεΐνη-στόχος λαμβάνεται ως κρυσταλλική δομή από την Πρωτεϊνική Βάση Δεδομένων (Protein Data Bank-PDB) (<https://www.rcsb.org/>). Έπειτα, επεξεράζεται μέσω εφαρμογής κατάλληλων λογισμικών προκειμένου να διορθωθούν σφάλματα τα οποία εντοπίζονται. Οι συνήθεις τροποποιήσεις αφορούν τη διαγραφή μη απαραίτητων τμημάτων, την προσθήκη υδρογόνων και δεσμών, την αναγνώριση κάθε ομάδας ετεροατόμων, τη διαγραφή μορίων νερού που δε σχηματίζουν γέφυρα με τον προσδέτη, την επιλογή καταστάσεων πρωτονίωσης και ταυτομέρειας του αμινοξέος ιστοιδίνη (His) και την ελαχιστοποίηση ενέργειας προς τη σταθερότερη μορφή (Paul et al., 2004).

5.2.4 Εφαρμογή μοριακής πρόσδεσης και αξιολόγηση αποτελεσμάτων

Εφόσον έχει γίνει κατάλληλη προετοιμασία προσδετών και πρωτεΐνης, εφαρμόζονται αλγόριθμοι κατά το στάδιο της μοριακής πρόσδεσης. Κατά το στάδιο αυτό, προσδιορίζεται με ακρίβεια η θέση του προσδέτη στο ενεργό κέντρο της μελετώμενης πρωτεΐνης. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων αποτελεί το τελευταίο βήμα της διαδικασίας, όπου βάσει του τρόπου πρόσδεσης μέσω της συνάρτησης Glide Score (GScore) και των αλληλεπιδράσεων με την πρωτεΐνη-στόχο, ορίζονται οι προσδέτες με την υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης (Κρίτση & Kritsi, 2017).

Εμπειρική συνάρτηση $GScore = 0,065 \cdot vdW + 0,130 \cdot Coul + Lipo + Hbond + Metal + BuryP + RotB + Site$, όπου

vdW = Ενέργεια van der Waals,

Coul = Ενέργεια Coulomb,

Lipo = Όρος λιποφιλικός που υπολογίζει ευνοϊκές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις

Hbond = Υπολογισμός δεσμών 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

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι διττός και περιλαμβάνει την πρόβλεψη της αντιμικροβιακής δράσης αιθερίου ελαίου λεβάντας κατά των παθογόνων βακτηρίων *S.aureus* και *E.coli*. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε μηχανιστικά η πιθανή αναστολή δύο ενζύμων-στόχων από μια σειρά ενώσεων, συστατικών του εξεταζόμενου αιθερίου ελαίου, καθώς και προκρίθηκαν περιεχόμενες σε αυτό ενώσεις ως δυνητικοί αναστολείς των εξεταζόμενων ενζύμων. Προς αυτή την κατεύθυνση, εφαρμόστηκαν υπολογιστικά εργαλεία εικονικής σάρωσης. Η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων πρότεινε πιθανές ενώσεις-προσδέτες που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο λεβάντας καθώς επίσης και ένζυμα-στόχους των *S.aureus* και *E.coli*, τα οποία δυνητικά συντελούν στην αδρανοποίηση της παθογόνου δράσης των εξεταζόμενων βακτηρίων.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

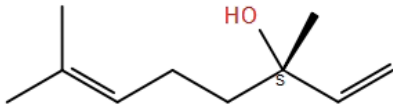
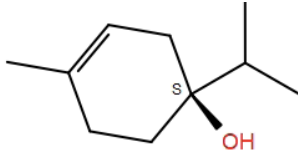
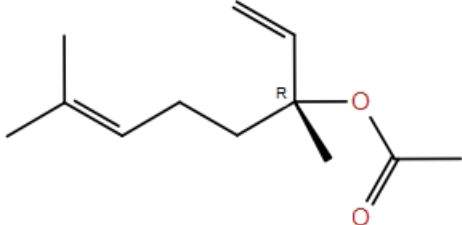
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Δημιουργία & προετοιμασία βιβλιοθηκών ενώσεων

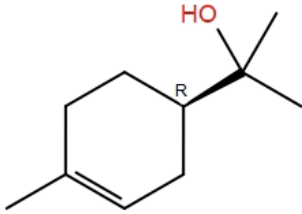
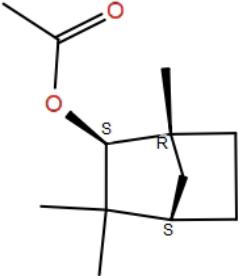
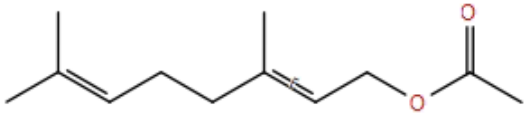
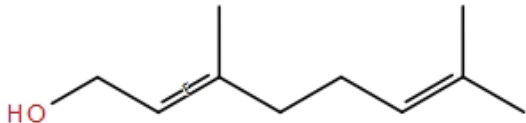
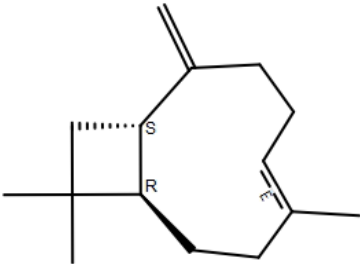
6.1 Δημιουργία βιβλιοθήκης ενώσεων

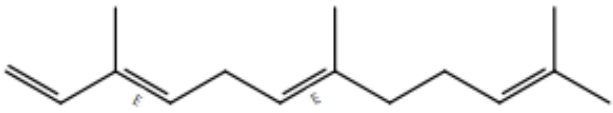
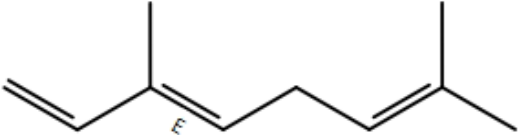
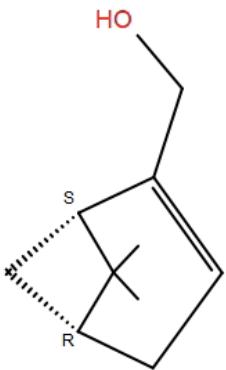
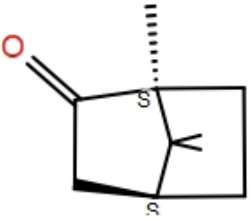
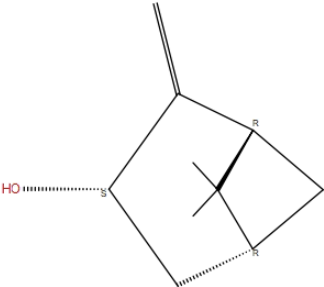
Η δημιουργία της επιθυμητής βιβλιοθήκης φυσικών ενώσεων προέκυψε με χρήση βιβλιογραφικών δεδομένων (Bialoń et al., 2019). Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε αναζήτηση της βιβλιογραφίας και ακολούθησε καταγραφή των χαρακτηρισμένων ενώσεων που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο λεβάντας, οι οποίες ανέρχονται συνολικά στις 59. Παρακάτω παρατίθεται πίνακας (Πίνακας 1) στον οποίο αναγράφονται οι εν λόγω ενώσεις ενώ παράλληλα αναγράφεται και η χημική τους δομή. Ύστερα από περαιτέρω παρατήρηση, φαίνεται ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των ενώσεων αυτών εντάσσεται στην κατηγορία των τερπενίων.

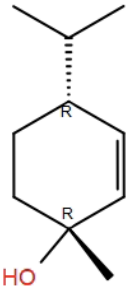
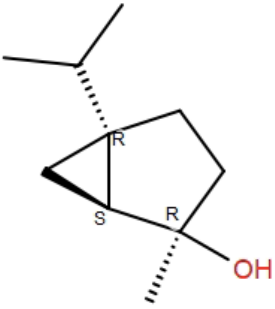
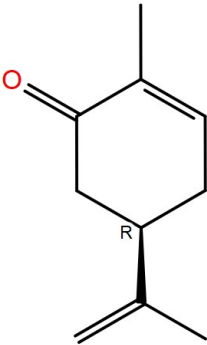
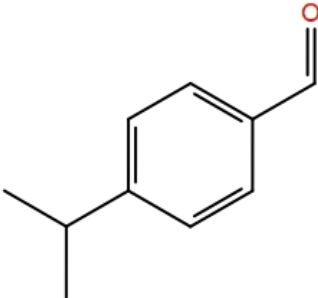
Πίνακας 1: Περιεχόμενες ενώσεις αιθέριου ελαίου λεβάντας

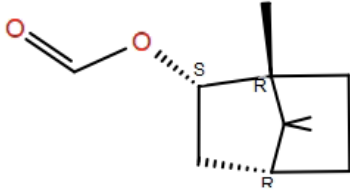
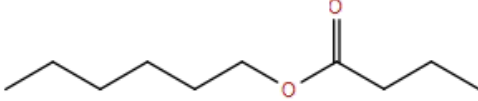
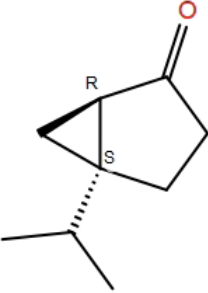
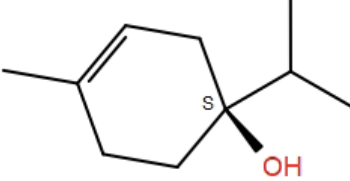
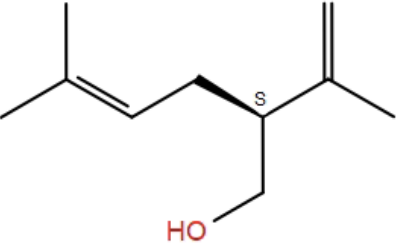
Πηγή: (Bialoń et al., 2019)

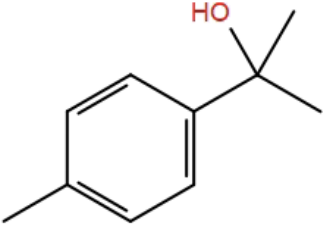
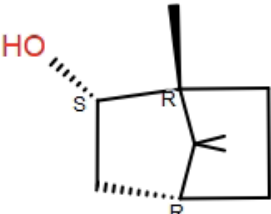
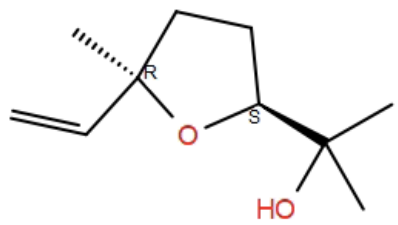
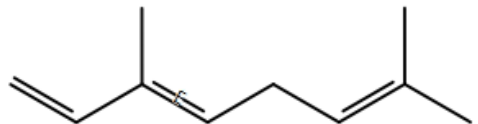
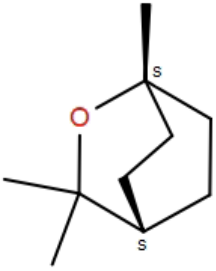
Χημική ένωση	Χημική δομή
Linalool (S,R)	
Terpineol-4 (S,R)	
Linalyl acetate (S,R)	

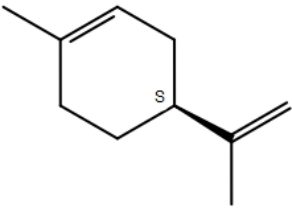
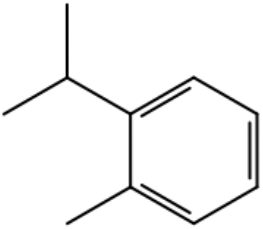
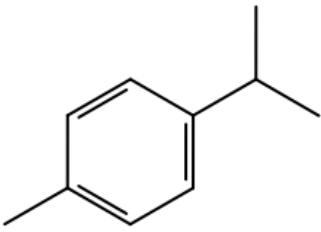
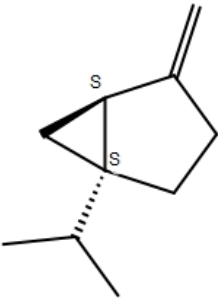
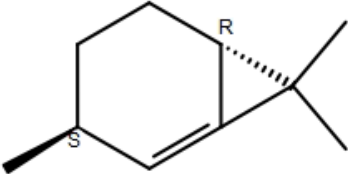
<p><i>a</i>-terpineol (S,R)</p>	 <p>The structure shows a six-membered ring with a double bond between the 2 and 3 o'clock positions. A methyl group is attached to the 9 o'clock position. At the 1 o'clock position, a quaternary carbon is bonded to a hydroxyl group (HO) and two methyl groups. The stereochemistry at the 1 o'clock position is labeled as R.</p>
<p>Fenchyl acetate (1,2,3,4)</p>	 <p>The structure shows a bicyclic system with a four-membered ring fused to a six-membered ring. The four-membered ring has two methyl groups and a quaternary carbon. The six-membered ring has a methyl group and an acetate group (-O-C(=O)-CH₃). The stereochemistry is labeled with S at the acetate-bearing carbon, R at the adjacent ring junction, and S at the other ring junction.</p>
<p>Geranyl acetate</p>	 <p>The structure shows a long chain with two double bonds and an acetate group at the end. The chain is 10 carbons long, with double bonds at the 2 and 6 positions. The acetate group is attached to the 10th carbon.</p>
<p>Geraniol</p>	 <p>The structure shows a long chain with two double bonds and a hydroxyl group at the end. The chain is 10 carbons long, with double bonds at the 2 and 6 positions. The hydroxyl group (HO) is attached to the 1st carbon.</p>
<p><i>b</i>-caryophellene</p>	 <p>The structure shows a complex bicyclic system with a seven-membered ring fused to a four-membered ring. The seven-membered ring has a double bond and a methyl group. The four-membered ring has a quaternary carbon and a methyl group. The stereochemistry is labeled with S at the ring junction, R at the other ring junction, and R at the double bond.</p>

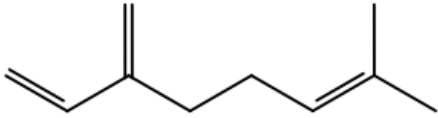
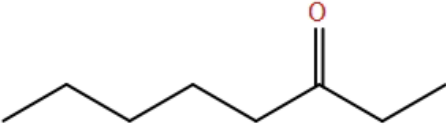
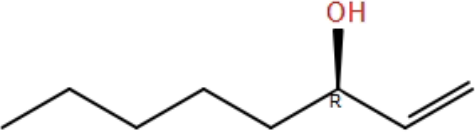
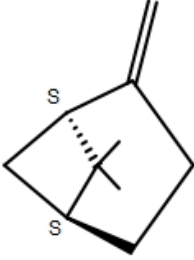
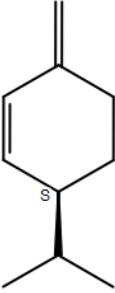
Farnesene	
<i>b</i> -ocimene (trans,cis)	
Myrtenol (1,2)	
Camphor (1,2)	
trans-pinocarveol	

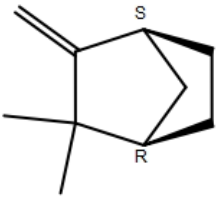
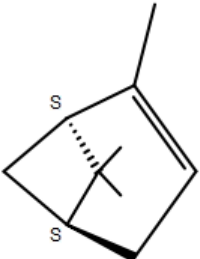
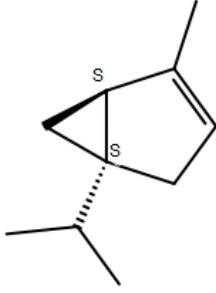
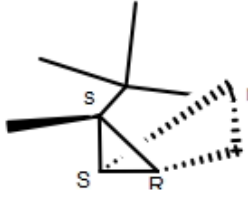
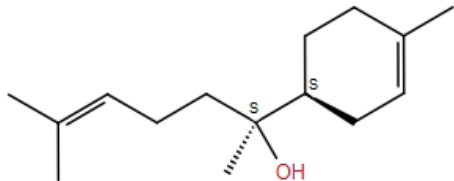
<p>cis-p-menth-2-en-1-ol</p>	
<p>trans-sabinene hydrate</p>	
<p>Carvone</p>	
<p>Cuminaldehyde</p>	

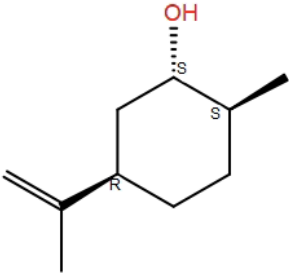
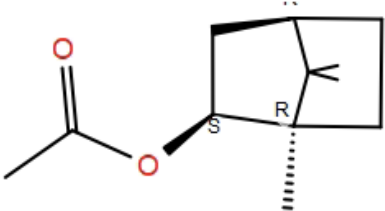
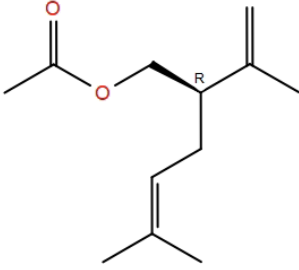
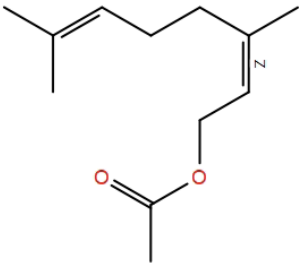
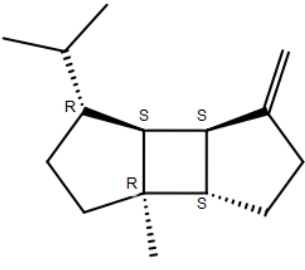
<p>Isobryl formate</p>	
<p>Hexyl butyrate</p>	
<p>Sabina ketone (1,2)</p>	
<p>Terpinen-4-ol (S,R)</p>	
<p>Lavandulol (S,R)</p>	

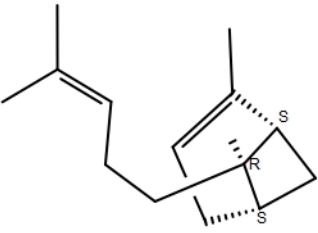
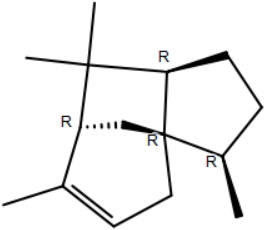
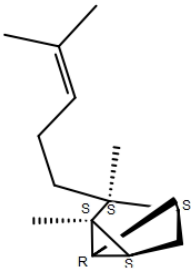
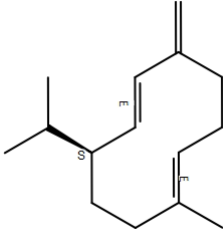
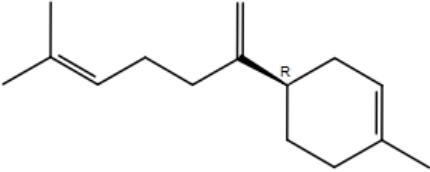
<p>p-cymen-8-ol</p>	
<p>Borneol</p>	
<p>Linalool oxide (trans,cis)</p>	
<p>(Z)-b-cimene</p>	
<p>Eucalyptol</p>	

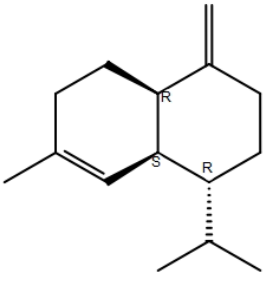
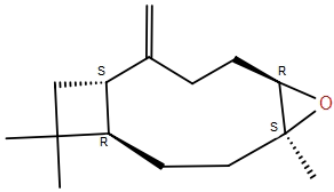
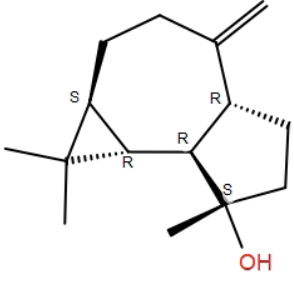
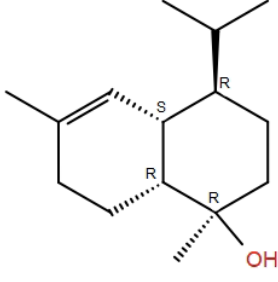
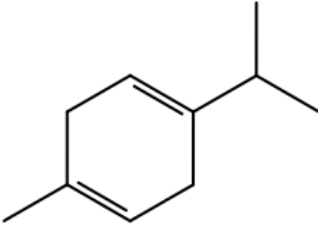
<p>Limonene (S,R)</p>	
<p>o-cymene</p>	
<p>p-cymene</p>	
<p>Sabinene (1,2)</p>	
<p>3-carene</p>	

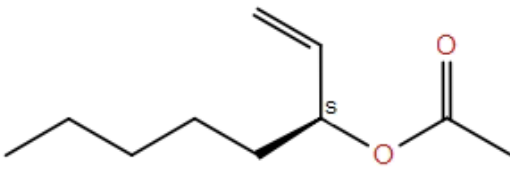
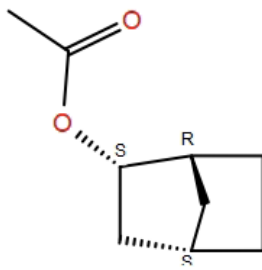
Myrcene	
3-octanone	
1-octen-3-ol (S,R)	
b-pinene (1,2)	
b-phellandrene (S,R)	

Camphene (1,2)	
α-pinene	
α-thujene (1,2)	
Tricyclene	
α-bisabolol	

<p>Dihydrocarveol</p>	
<p>Bornyl acetate</p>	
<p>Lavandulyl acetate (S,R)</p>	
<p>Neryl acetate</p>	
<p>b-bourbonene</p>	

<p>a-bergamotene (trans,cis)</p>	
<p>a-cederene</p>	
<p>a-santalene (1,2)</p>	
<p>Germacrene D (S,R)</p>	
<p>b-bisabolene (S,R)</p>	

<p>v-cadinene</p>	
<p>Caryophyllene oxide</p>	
<p>Spathulenol</p>	
<p>Cadinol</p>	
<p>γ-terpinene</p>	

1-octen-3-yl acetate (S,R)	
Norbornyl acetate	

6.2 Προετοιμασία βιβλιοθήκης ενώσεων

Μετά τη δημιουργία της βιβλιοθήκης ενώσεων αιθέριου ελαίου λεβάντας, πραγματοποιήθηκε η προετοιμασία της μέσω της πλατφόρμας Maestro (Schrödinger Release 2020-2: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020). Τα βήματα τα οποία ακολουθήθηκαν αφορούν την εισαγωγή των ενώσεων στη συγκεκριμένη πλατφόρμα και την εφαρμογή της διαδικασίας LigPrep (Schrödinger Release 2020-2: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020). Προκύπτει, έτσι, η τριδιάστατη μορφή των παραπάνω αναφερόμενων ενώσεων όπου ακολουθεί προσθήκη των υδρογόνων. Σε δεδομένο pH=7±0,5 των ενζύμων στόχων, το οποίο ορίστηκε μέσω της βάσης δεδομένων Brenda-Enzymes (<https://www.brenda-enzymes.org/>), λαμβάνονται οι πιθανές ιοντικές μορφές, με αποτέλεσμα να καταγράφονται τελικά 87 ενώσεις (λόγω στερεοχημείας). Παράλληλα επιλέχθηκε το πεδίο δυνάμεων (force field) OPLS3.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Επιλογή & προετοιμασία ενζύμων

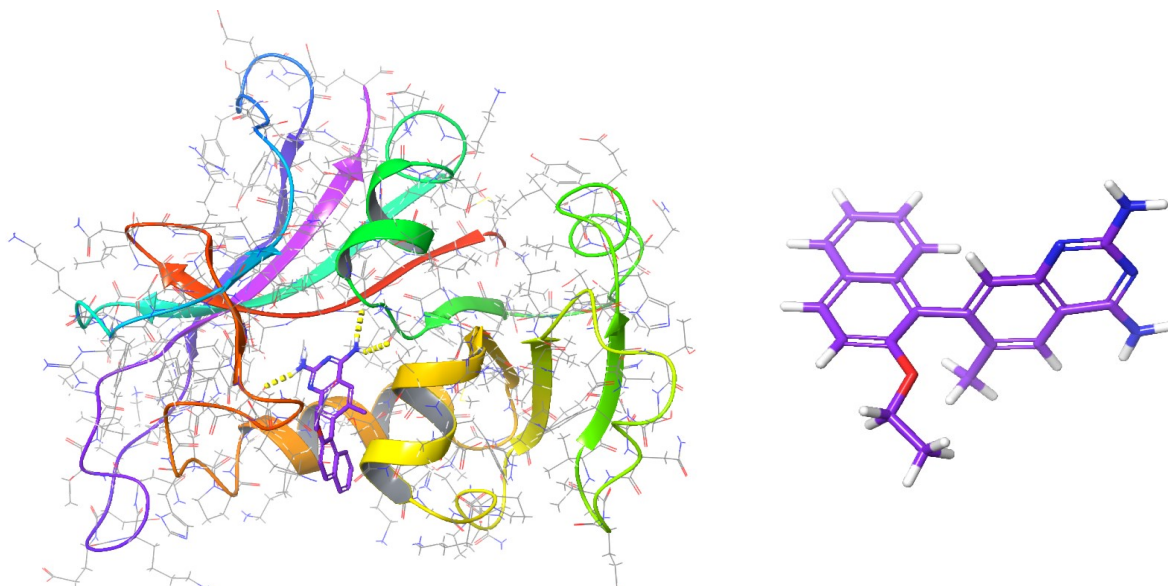
7.1 Επιλογή ενζύμων

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ικανότητα πρόσδεσης των ενώσεων που περιέχονται στο αιθέριο έλαιο λεβάντας (Πίνακας 1) σε ένζυμα-στόχους των *S.aureus* και *E.coli*. Μέσω μελέτης της βιβλιογραφίας προέκυψαν δύο ένζυμα-στόχους, αντίστοιχα, τα οποία παρουσιάζουν σημαντικό ρόλο μηχανιστικά για την αναστολή της δράσης των δύο μικροοργανισμών (Marko Oblak et al., 2007) (Kohen, 2015).

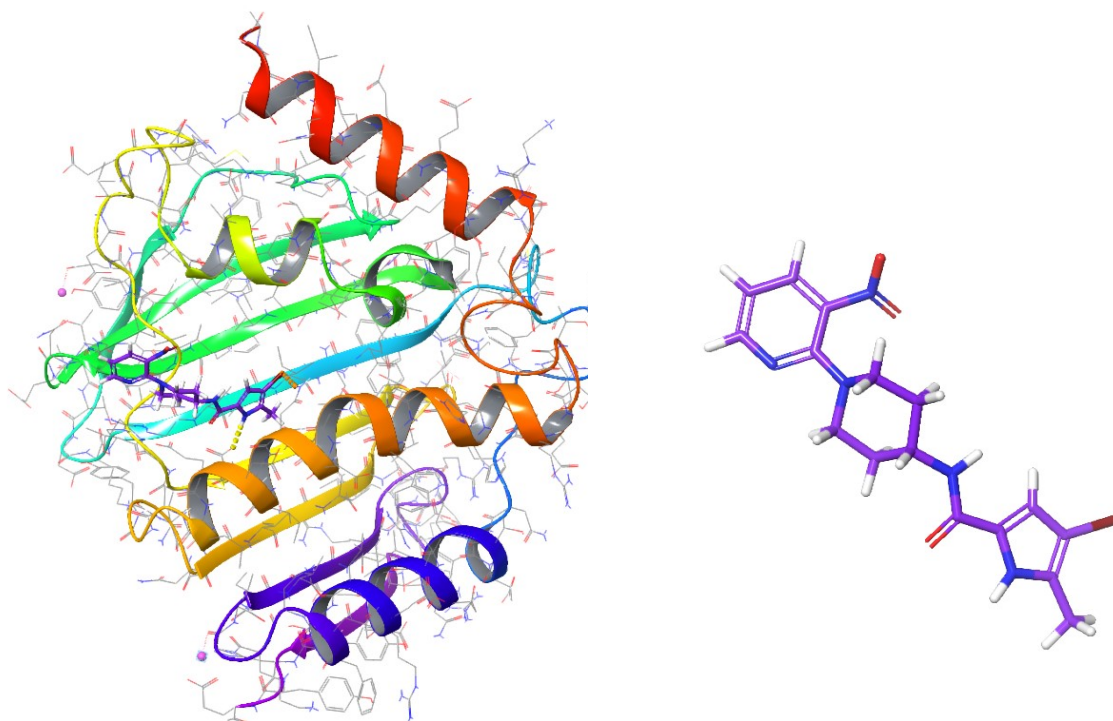
Παρακάτω παρατίθεται πίνακας στον οποίο αναγράφονται αναλυτικά τα ένζυμα-στόχοι του *S.aureus* που μελετήθηκαν, ο κωδικός αυτών σύμφωνα με τη βάση δεδομένων PDB και ο προσδέτης με τον οποίο είναι αυτά συμπλοκοποιημένα (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Ένζυμα στόχοι εντός *S.aureus*

Ένζυμο	Κωδικός PDB	Ligand (συμπλοκοποιημένος προσδέτης)
DHFR	3SRW (Li et al., 2011)	7-(2-ethoxynaphthalen-1-yl)-6-methylquinazoline-2,4-diamine
DNA GyrB	3U2D (Eakin et al., 2012)	4-bromo-5-methyl-N-[1-(3-nitropyridin-2-yl)piperidin-4-yl]-1H-pyrrole-2-carboxamide



Σχήμα 3: (Αριστερά) Τριδιάστατη απεικόνιση του ενζύμου DHFR του *S. aureus* (PDB: 3SRW) συμπλοκοποιημένου με τον προσδέτη 7-(2-ethoxyphenyl)-6-methylquinazoline-2,4-diamine (Δεξιά) Τριδιάστατη απεικόνιση του εν λόγω συμπλοκοποιημένου προσδέτη

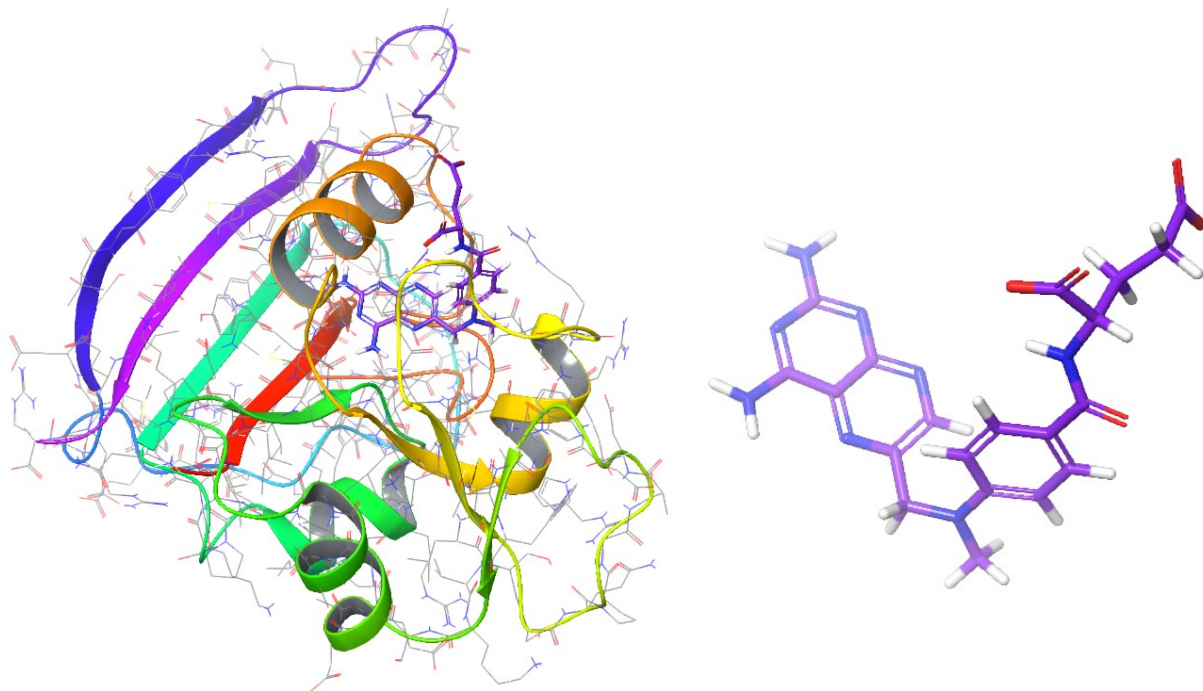


Σχήμα 4: (Αριστερά) Τριδιάστατη απεικόνιση του ενζύμου DNA GyrB του *S. aureus* (PDB: 3U2D) συμπλοκοποιημένου με τον προσδέτη 4-bromo-5-methyl-N-[1-(3-nitropyridin-2-yl)piperidin-4-yl]-1H-pyrrole-2-carboxamide (Δεξιά) Τριδιάστατη απεικόνιση του εν λόγω συμπλοκοποιημένου προσδέτη

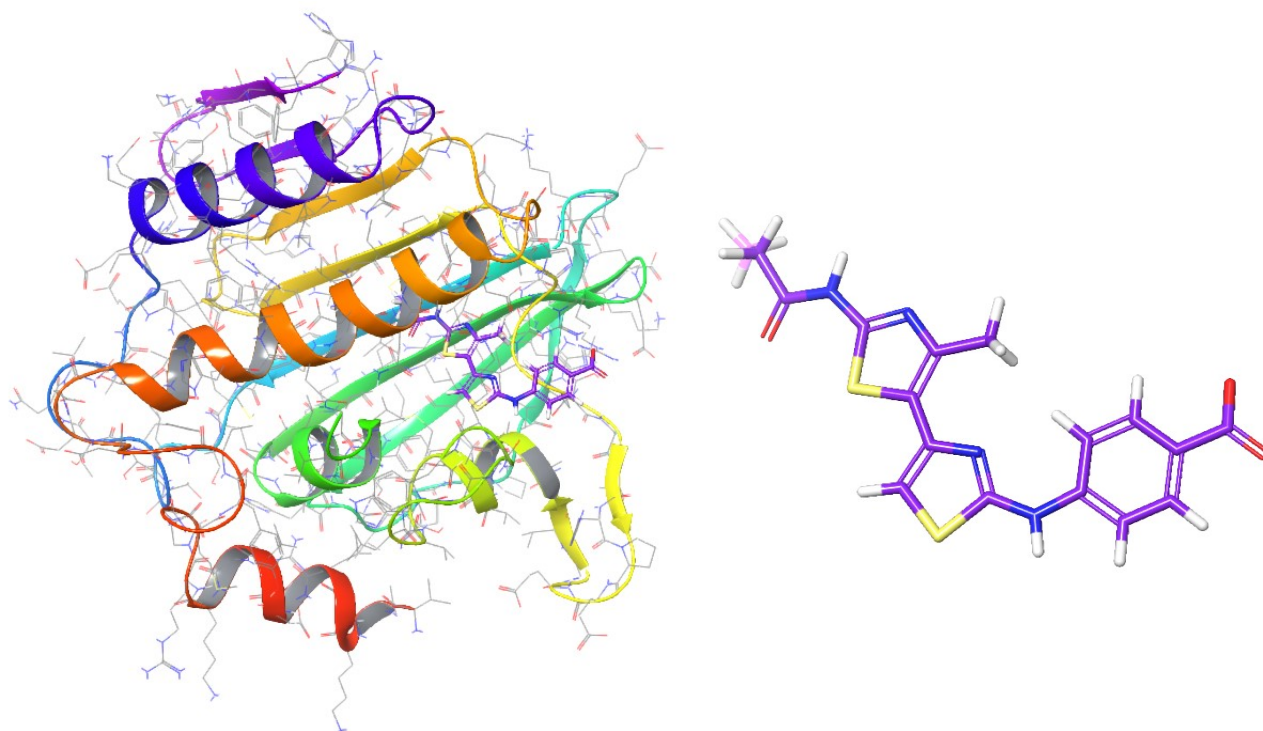
Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3) αναφέρονται τα ένζυμα-στόχοι του *E.coli*, ο κωδικός αυτών σύμφωνα με τη βάση δεδομένων PDB και ο προσδέτης με τον οποίο είναι συμπλοκοποιημένα.

Πίνακας 3: Ένζυμα στόχοι του βακτηρίου E.coli

Ένζυμο	Κωδικός PDB	Ligand (συμπλοκοποιημένος προσδέτης)
DHFR	1RG7 (Sawaya & Kraut, 1997)	Methotrexate
DNA GyrB	4DUH (Brvar et al., 2012)	4-{[4'-methyl-2'-(propanoylamino)-4,5'-bi-1,3-thiazol-2-yl]amino}benzoic acid



Σχήμα 5: (Αριστερά) Τριδιάστατη απεικόνιση του ενζύμου DHFR του *E.coli* (PDB: 1RG7) συμπλοκοποιημένου με τον προσδέτη Methotrexate (Δεξιά) Τριδιάστατη απεικόνιση του εν λόγω συμπλοκοποιημένου προσδέτη



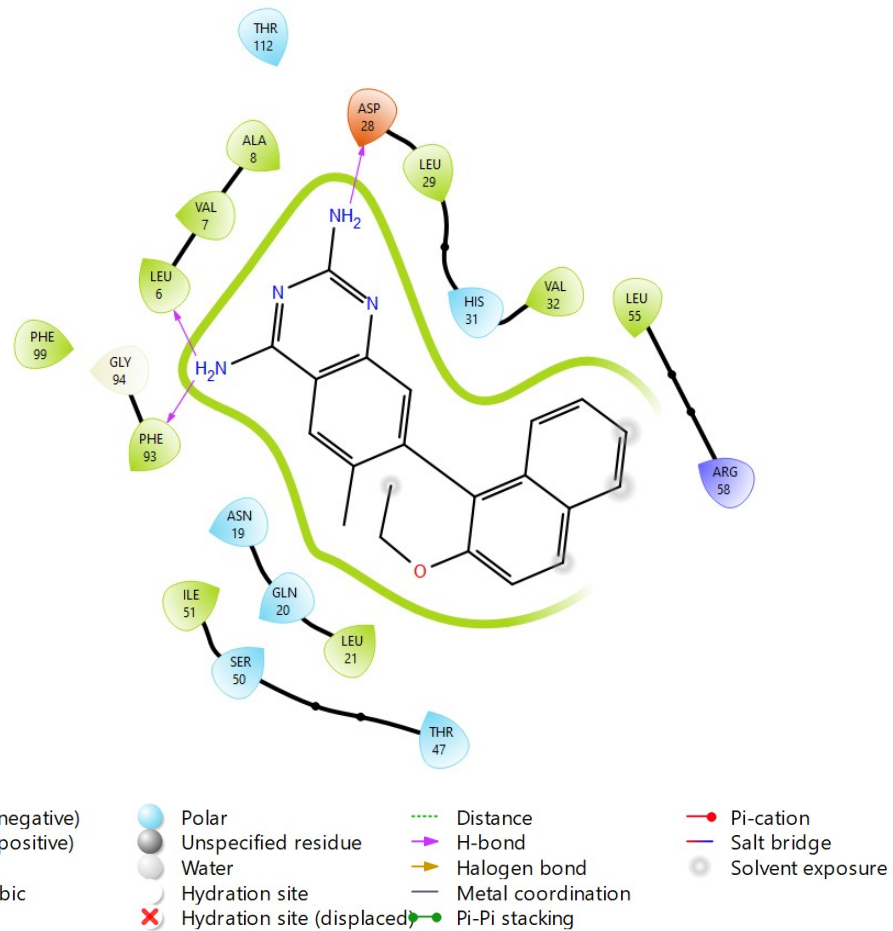
Σχήμα 6: (Αριστερά) Τριδιάστατη απεικόνιση του ενζύμου DNA Gyrase B του *E.coli* (PDB: 4DUH) συμπλοκοποιημένου με τον προσδέτη 4-[[4'-methyl-2'-(propanoylamino)-4,5'-bi-1,3-thiazol-2-yl]amino]benzoic acid (Δεξιά) Τριδιάστατη απεικόνιση του εν λόγω συμπλοκοποιημένου προσδέτη

7.2 Προετοιμασία ενζύμων

Μετά την επιλογή των ενζύμων-στόχων και τη λήψη των κρυσταλλικών τους δομών από την PDB, πραγματοποιήθηκε η προετοιμασία των πρωτεϊνών μέσω του προγράμματος Maestro (Schrödinger Release 2020-2: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020). Τα βήματα που ακολούθησαν σχετίζονται με την εισαγωγή των ενώσεων στην πλατφόρμα και την εφαρμογή της διαδικασίας Protein Preparation Wizard (Schrödinger Release 2020-2: Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020). Στη συνέχεια, ορίστηκε το βέλτιστο pH λειτουργίας των ενζύμων, $pH=7\pm 0,5$ χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων Brenda-Enzymes. Στόχο της προετοιμασίας αποτελεί η αφαίρεση των μορίων H_2O που δεν είναι ικανά να δημιουργήσουν γέφυρα με τον προσδέτη ή με τα αμινοξέα του ενζύμου-στόχου και η ενεργειακή ελαχιστοποίηση του ενζύμου, η οποία συνδέεται με τη σταθερότητά του. Κατά το στάδιο ελαχιστοποίησης ενέργειας, εφαρμόζεται OPLS3 πεδίο δυνάμεων (force field) (Κρίση & Kritsi, 2017).

Στα σχήματα που ακολουθούν (Σχήματα 7-10) παρατίθεται δισδιάστατη (2D) απεικόνιση ο τρόπος πρόσδεσης των συμπλοκοποιημένων προσδετών σε κάθε μελετώμενο ένζυμο-στόχο. Η εν λόγω απεικόνιση κρίνεται απαραίτητη καθώς συμβάλει στην κατανόηση του επιθυμητού τρόπου πρόσδεσης σύμφωνα με τα αμινοξέα του ενζύμου με τα οποία αλληλεπιδρά. Έτσι, είναι δυνατή, η μετέπειτα πρόβλεψη τις πιθανής αποτελεσματικής πρόσδεσης ενώσεων της δημιουργημένης βιβλιοθήκης.

Επομένως, προσδιορίστηκε ο τρόπος πρόσδεσης του συμπλοκοποιημένου προσδέτη 7-(2-ethoxyphenyl)-6-methylquinazoline-2,4-diamine με το ένζυμο DHFR (PDB: 3SRW) του *S.aureus* (Πίνακας 4). Επιπλέον, τα αμινοξέα που συμμετέχουν στην πρόσδεση προσδιορίστηκαν και επικυρώθηκαν μέσω της βιβλιογραφίας ("Molecular Docking Studies Of Some Novel Furan Derivatives As Potent Inhibitors Of Staphylococcus Aureus," 2019). Στο Σχήμα 7 απεικονίζονται οι δημιουργούμενοι δεσμοί, όπως προκύπτουν από την κρυσταλλική δομή του συμπλοκοποιημένου προσδέτη (PDB: 3SRW).



Σχήμα 7: Δισδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης του συμπλοκοποιημένου προσδέτη 7-(2-ethoxyphthalen-1-yl)-6-methylquinazoline-2,4-diamine στη θέση πρόσδεσης του ενζύμου DHFR (PDB: 3SRW) του *S.aureus*

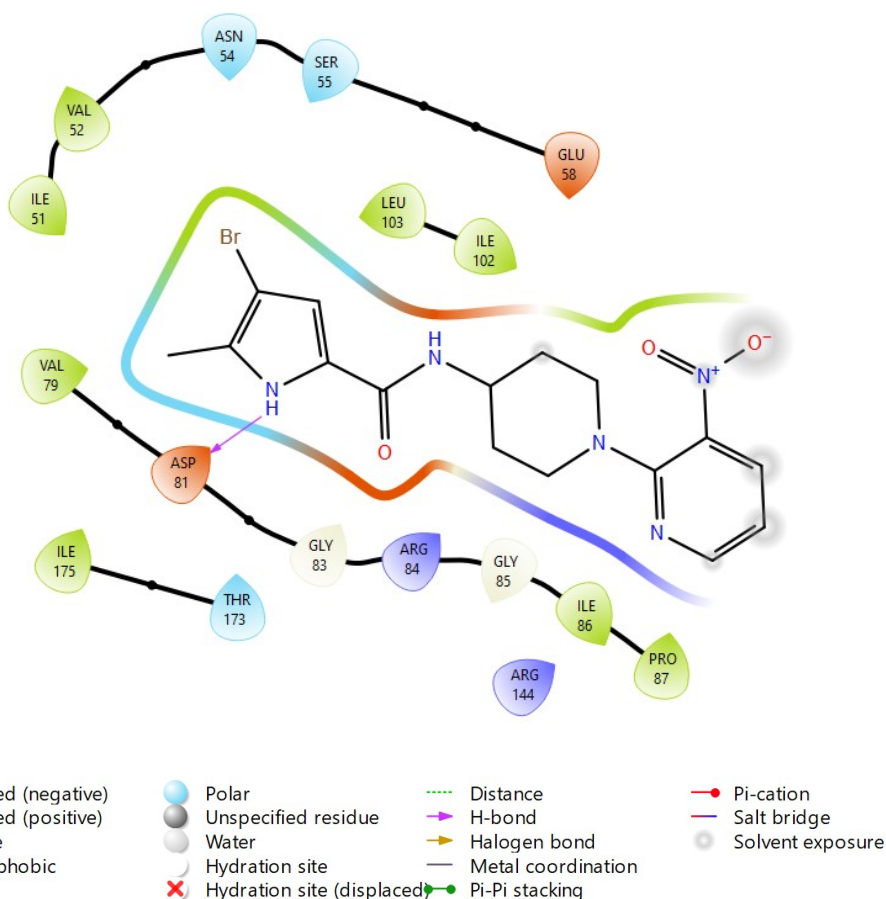
Πίνακας 4: Σχηματιζόμενοι δεσμοί μεταξύ του συμπλοκοποιημένου προσδέτη 7-(2-ethoxyphthalen-1-yl)-6-methylquinazoline-2,4-diamine και του ενζύμου DHFR (PDB: 3SRW) του *S.aureus*

Πηγή: ("Molecular Docking Studies Of Some Novel Furan Derivatives As Potent Inhibitors Of *Staphylococcus Aureus*," 2019)

Κρίσιμα αμινοξέα	Σχηματιζόμενοι Δεσμοί
Ασπαραγινικό οξύ (Asp) 28	Δεσμός υδρογόνου
Φαινυλαλανίνη (Phe) 93	Δεσμός υδρογόνου
Λευκίνη (Leu) 6	Δεσμός υδρογόνου

Επιπλέον, προσδιορίστηκε ο τρόπος πρόσδεσης του συμπλοκοποιημένου προσδέτη 4-bromo-5-methyl-N-[1-(3-nitropyridin-2-yl)piperidin-4-yl]-1H-pyrrole-2-carboxamide με το

ένζυμο DNA GyrB (PDB: 3U2D) του *S.aureus* (Πίνακας 5). Βιβλιογραφικές μελέτες χρησιμοποιήθηκαν εκ νέου για των προσδιορισμό των αμινοξέων που αλληλεπιδρούν και ακολούθησε καταγραφή τους (Das et al., 2018; Vijayakrishnan et al., 2018). Στο Σχήμα 8 παρουσιάζονται σε δισδιάστατη απεικόνιση οι αντίστοιχοι δεσμοί, όπως προκύπτουν από την κρυσταλλική δομή του συμπλοκοποιημένου προσδέτη (PDB: 3U2D).



Σχήμα 8: Δισδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης του συμπλοκοποιημένου προσδέτη 4-bromo-5-methyl-N-[1-(3-nitropyridin-2-yl)pyrrolidin-4-yl]-1H-pyrrole-2-carboxamide στη θέση πρόσδεσης του ενζύμου DNA GyrB (PDB: 3U2D) του *S.aureus*

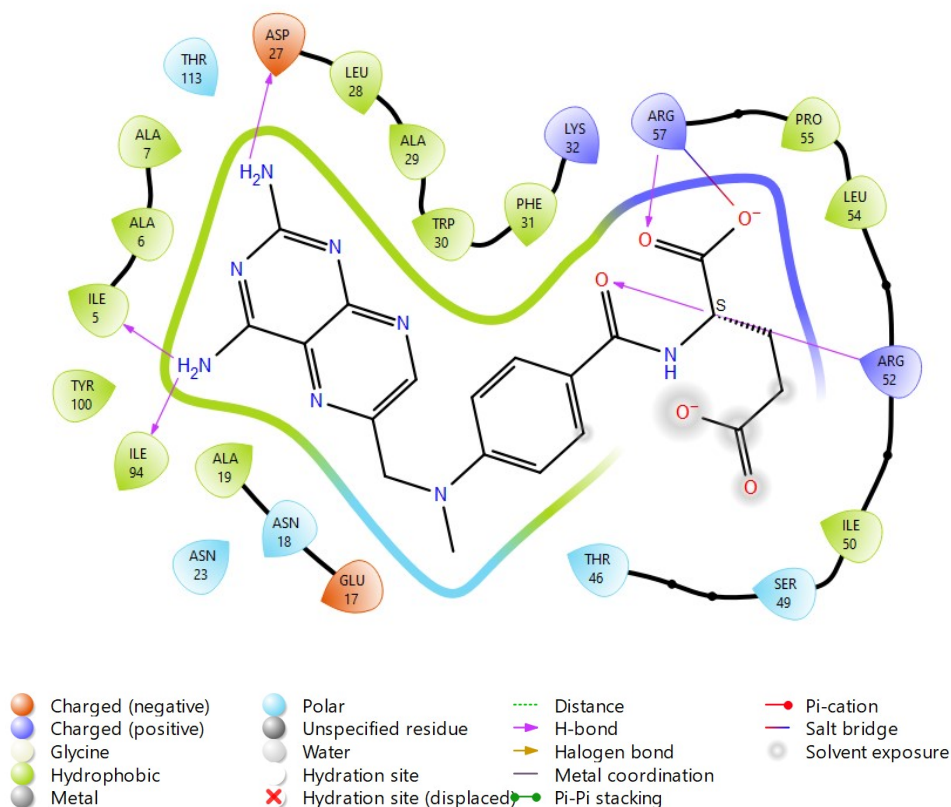
Πίνακας 5: Σχηματιζόμενοι δεσμοί μεταξύ του συμπλοκοποιημένου προσδέτη 4-bromo-5-methyl-N-[1-(3-nitropyridin-2-yl)pyrrolidin-4-yl]-1H-pyrrole-2-carboxamide και του ενζύμου DNA GyrB (PDB: 3U2D) του *S.aureus*

Πηγές: (Das et al., 2018; Vijayakrishnan et al., 2018)

Κρίσιμα αμινοξέα	Σχηματιζόμενοι Δεσμοί
Ασπαραγινικό οξύ (Asp) 81	Δεσμός υδρογόνου

Ισολευκίνη (Ile) 51	-
Σερίνη (Ser) 55	-
Βαλίνη (Val) 79	-
Θρεονίνη (Thr) 173	-
Ισολευκίνη (Ile) 86	-
Γλουταμινικό οξύ (Glu) 58	-
Αργινίνη (Arg) 84	-
Ασπαριγίνη (Asn) 54	-
Βαλίνη (Val) 52	-
Γλυκίνη (Gly) 83	-
Γλυκίνη (Gly) 85	-
Προλίνη (Pro) 87	-
Ισολευκίνη (Ile) 175	-
Λευκίνη (Leu) 103	-

Στη συνέχεια, με χρήση της βιβλιογραφίας (Spina et al., 2008) προσδιορίστηκαν οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ του προσδέτη Methotrexate και του ενζύμου DHFR (PDB: 1RG7) του βακτηρίου *E.coli* (Πίνακας 6). Στο Σχήμα 9 απεικονίζονται σε δισδιάστατη μορφή οι αντίστοιχοι δεσμοί, όπως προκύπτουν από την κρυσταλλική δομή του συμπλοκοποιημένου πρόσδετη (PDB: 1RG7).



Σχήμα 9: Δισδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης του συμπλοκοποιημένου προσδέτη Methotrexate στη θέση πρόσδεσης του ενζύμου DHFR (PDB: 1RG7) του *E.coli*

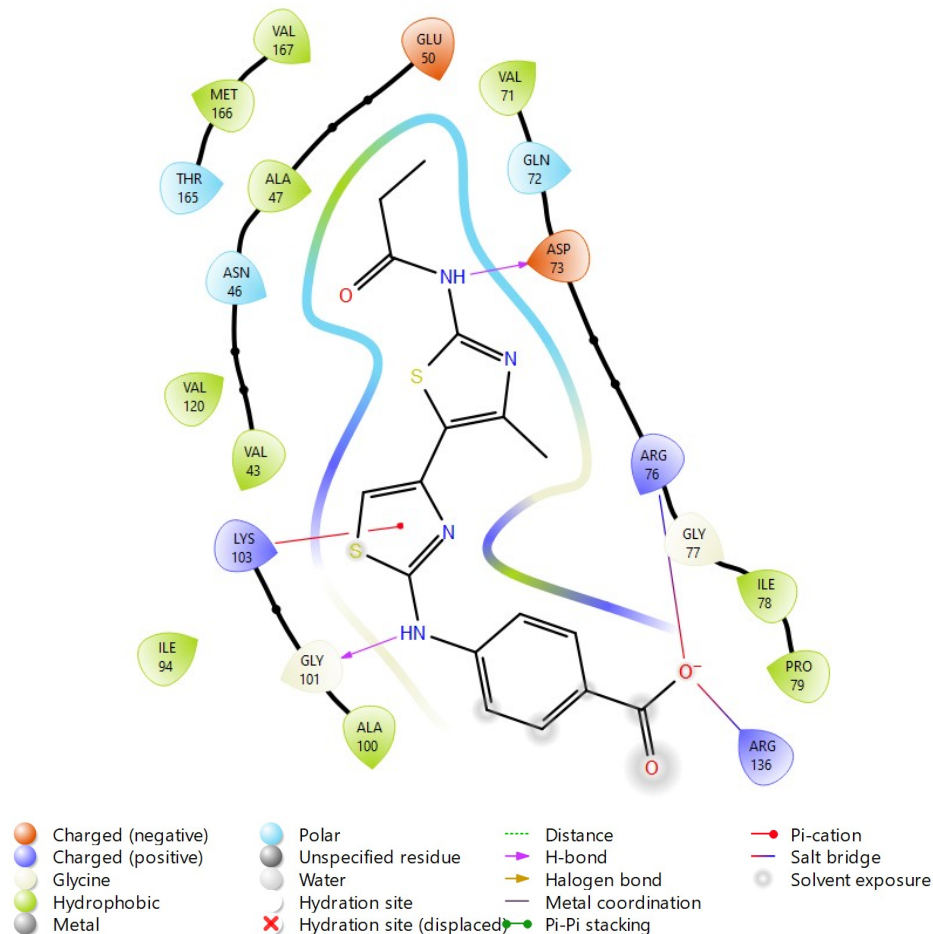
Πίνακας 6: Σχηματιζόμενοι δεσμοί μεταξύ του συμπλοκοποιημένου προσδέτη Methotrexate και του ενζύμου DHFR (PDB: 1RG7) του *E.coli*

Πηγή: (Spina et al., 2008)

Κρίσιμα αμινοξέα	Σχηματιζόμενοι Δεσμοί
Ασπαραγινικό οξύ (Asp) 27	Δεσμός υδρογόνου
Ισολευκίνη (Ile) 5	Δεσμός υδρογόνου
Ισολευκίνη (Ile) 94	Δεσμός υδρογόνου
Αργινίνη (Arg) 57	Δεσμός υδρογόνου
Αργινίνη (Arg) 52	Δεσμός υδρογόνου

Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται οι δεσμοί που σχηματίζονται μεταξύ του προσδέτη 4-[[4'-methyl-2'-(propanoylamino)-4,5'-bi-1,3-thiazol-2-yl]amino]benzoic acid, ο οποίος είναι

συμπλοκοποιημένος με το ένζυμο DNA GyrB (PDB: 4DUH) του *E.coli* (Πίνακας 7), έπειτα από βιβλιογραφική αναζήτηση (Ghannam et al., 2019) Στο Σχήμα 10 απεικονίζονται σε δισδιάστατη μορφή οι αντίστοιχοι δεσμοί, όπως προκύπτουν από την κρυσταλλική δομή του συμπλοκοποιημένου πρόσδετη (PDB: 4DUH).



Σχήμα 10: Δισδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης του συμπλοκοποιημένου πρόσδετη 4- $\{[4'$ -methyl-2'-(propanoylamino)-4,5'-bi-1,3-thiazol-2-yl]amino\}benzoic acid στη θέση πρόσδεσης του ενζύμου DNA GyrB (PDB: 4DUH) του *E.coli*.

Πίνακας 7: Σχηματιζόμενοι δεσμοί μεταξύ του συμπλοκοποιημένου προσδέτη 4-[[4'-methyl-2'-(propanoylamino)-4,5'-bi-1,3-thiazol-2-yl]amino}benzoic acid και του ενζύμου DNA GyrB (PDB: 4DUH) του *E.coli*

Πηγή: (Ghannam et al., 2019)

Κρίσιμα αμινοξέα	Σχηματιζόμενοι Δεσμοί
Ασπαραγινικό οξύ (Asp) 73	Δεσμός υδρογόνου
Αργινίνη (Arg) 76	Γέφυρα άλατος
Αργινίνη (Arg) 136	Γέφυρα άλατος
Γλυκίνη (Gly) 101	Δεσμός υδρογόνου
Λυσίνη (Lys) 103	Pi-cation
Γλυκίνη (Gly) 77	-

7.3 Εφαρμογή πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης

7.3.1 Επικύρωση μεθόδων Μοριακής Πρόσδεσης

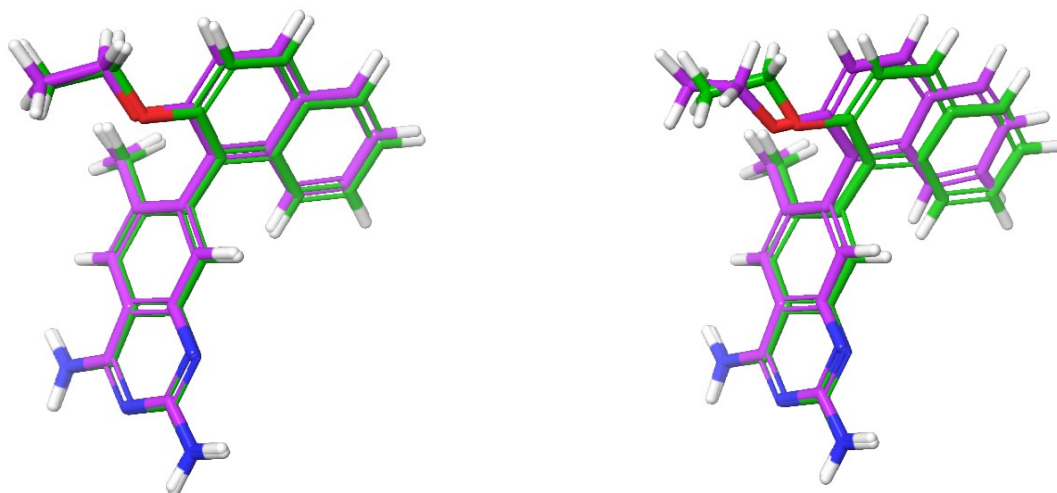
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μοριακής πρόσδεσης των συμπλοκοποιημένων προσδετών με χρήση των αλγορίθμων Πρότυπης Ακρίβειας (Standard Precision – SP) και Επιπρόσθετης Ακρίβειας (Extra Precision – XP) του προγράμματος Glide (Schrödinger Release 2020-2: Glide, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2020), προκειμένου να επικυρωθούν οι χρησιμοποιούμενες μέθοδοι. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκε πλέγμα (Grid Box) σύμφωνα με τις συντεταγμένες (X, Y, Z) του εξεταζόμενου συμπλοκοποιημένου προσδέτη, για κάθε ένζυμο-στόχο (Πίνακας 8).

Πίνακας 8: Συντεταγμένες (X,Y,Z) πλέγματος μοριακής πρόσδεσης

Ligand (Ένζυμο, Κωδικός PDB)	X	Y	Z
7-(2-ethoxynaphthalen-1-yl)-6-methylquinazoline-2,4-diamine (DHFR, 3SRW)	-5,04	-32,55	6,43
4-bromo-5-methyl-N-[1-(3-nitropyridin-2-yl)piperidin-4-yl]-1H-pyrrole-2-carboxamide (DNA GyrB, 3U2D)	0,54	2,9	24,5
Methotrexate (DHFR, 1RG7)	-1,54	21,7	22,99
4-[[4'-methyl-2'-(propanoylamino)-4,5'-bi-1,3-thiazol-2-yl]amino}benzoic acid (DNA GyrB, 4DUH)	30,81	5,61	5,32

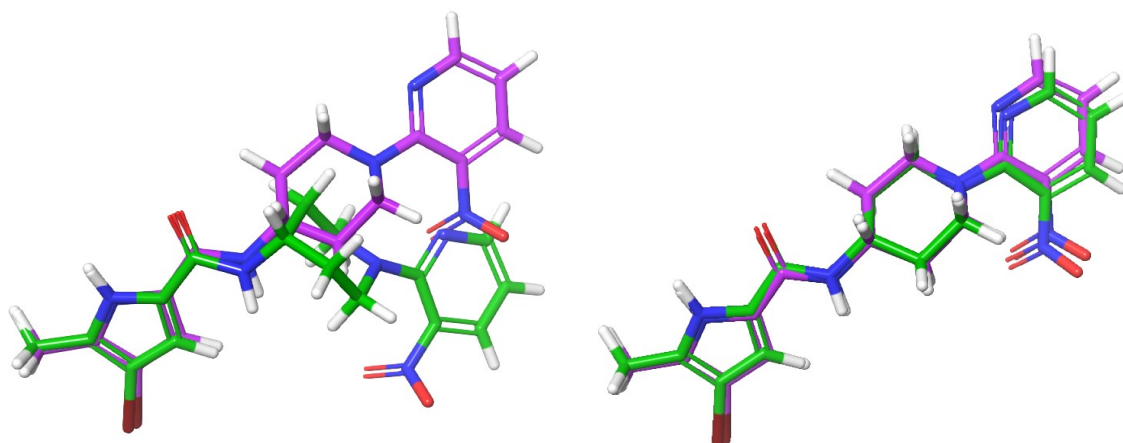
Πραγματοποιήθηκε υπέρθεση της κρυσταλλικής διαμόρφωσης του εκάστοτε συμπλοκοποιημένου προσδέτη με τη διαμόρφωση που προέκυψε έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP) και του αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP).

Αρχικά, υπέρθεσαν η κρυσταλλική διαμόρφωση του προσδέτη 7-(2-ethoxyphthalen-1-yl)-6-methylquinazoline-2,4-diamine (DHFR του *S.aureus*, PDB: 3SRW) με τη διαμόρφωση που προέκυψε έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP) και του αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP) (Σχήμα 11).



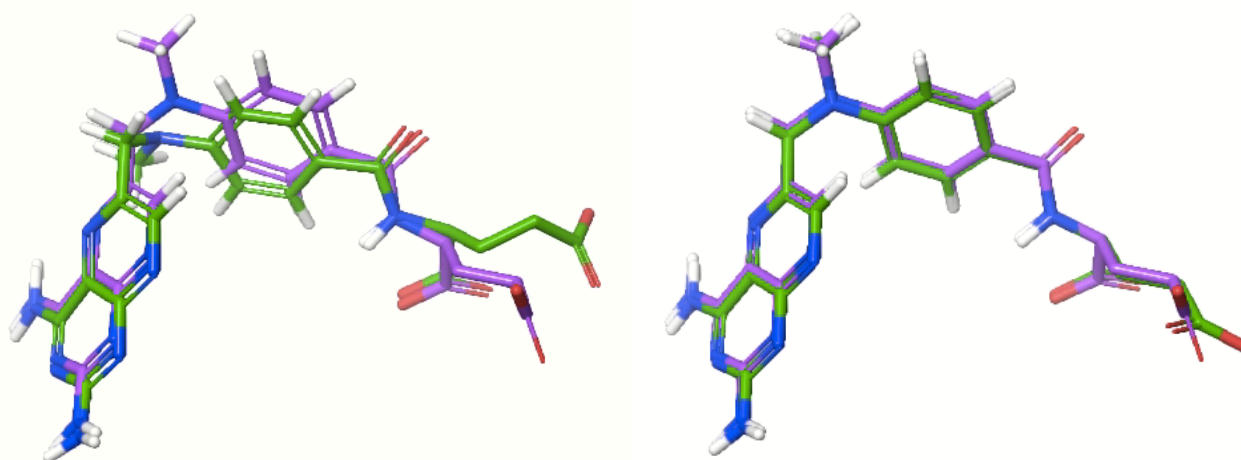
Σχήμα 11: Υπέρθεση των δύο διαμορφώσεων του 7-(2-ethoxyphthalen-1-yl)-6-methylquinazoline-2,4-diamine έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου SP (αριστερά) και XP (δεξιά). Με μωβ χρώμα απεικονίζεται ο αναστολέας της κρυσταλλικής δομής και με πράσινο χρώμα ο αναστολέας, όπως προέκυψε μετά την εφαρμογή των αλγορίθμων.

Στη συνέχεια, εκτελέστηκε υπέρθεση τις κρυσταλλικής διαμόρφωσης του προσδέτη 4-bromo-5-methyl-N-[1-(3-nitropyridin-2-yl)piperidin-4-yl]-1H-pyrrole-2-carboxamide (DNA GyrB του *S.aureus*, PDB: 3U2D) με τη διαμόρφωση που προέκυψε έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP) και του αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP) (Σχήμα 12).



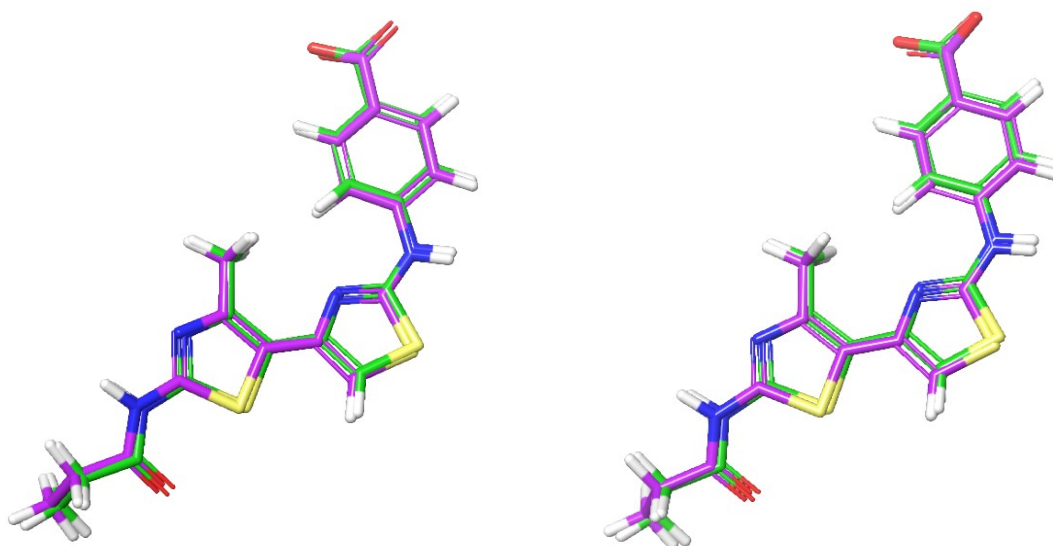
Σχήμα 12: Υπέρθεση των δύο διαμορφώσεων του 4-bromo-5-methyl-N-[1-(3-nitropyridin-2-yl)piperidin-4-yl]-1H-pyrrole-2-carboxamide έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου SP (αριστερά) και XP (δεξιά). Με μωβ χρώμα απεικονίζεται ο αναστολέας της κρυσταλλικής δομής και με πράσινο χρώμα ο αναστολέας, όπως προέκυψε μετά την εφαρμογή των αλγορίθμων.

Ακόμη, γίνεται υπέρθεση τις κρυσταλλικής διαμόρφωσης του προσδέτη Methotrexate (DHFR του *E.coli*, PDB: 1RG7) με τη διαμόρφωση που προέκυψε έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP) και του αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP) (Σχήμα 13).



Σχήμα 13: Υπέρθεση των δύο διαμορφώσεων του Methotrexate έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου SP (αριστερά) και XP (δεξιά). Με μωβ χρώμα απεικονίζεται ο αναστολέας της κρυσταλλικής δομής και με πράσινο χρώμα ο αναστολέας, όπως προέκυψε μετά την εφαρμογή των αλγορίθμων.

Τέλος, παρουσιάζεται η υπέρθεση τις κρυσταλλικής διαμόρφωσης του προσδέτη 4-[[4'-methyl-2'-(propanoylamino)-4,5'-bi-1,3-thiazol-2-yl]amino]benzoic acid (DNA GyrB του *E.coli*, PDB: 4DUH) με τη διαμόρφωση που προέκυψε έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP) και του αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP) (Σχήμα 14).



Σχήμα 14: Υπέρθεση των δύο διαμορφώσεων του 4-[[4'-methyl-2'-(propanoylamino)-4,5'-bi-1,3-thiazol-2-yl]amino]benzoic acid έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου SP (αριστερά) και XP (δεξιά). Με μωβ χρώμα απεικονίζεται ο αναστολέας της κρυσταλλικής δομής και με πράσινο χρώμα ο αναστολέας, όπως προέκυψε μετά την εφαρμογή των αλγορίθμων.

Προκύπτει, τελικά, ότι οι μέθοδοι είναι επικυρωμένες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω για τη διεξαγωγή πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης στη βιβλιοθήκη ενώσεων που περιλαμβάνονται στο αιθέριο έλαιο λεβάντας. Επιπλέον, οι τιμές της ενέργειας πρόσδεσης (Glide-score) των προσδετών του εκάστοτε ενζύμου παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 9).

Πίνακας 9: Ενέργεια πρόσδεσης (Glide-score) τωνβεν δυνάμει προσδετών των εξεταζόμενων ενζύμων

Κωδικός PDB	Ενέργεια πρόσδεσης (Glide-score) (kcal·mol ⁻¹)	
	Αλγόριθμος Πρότυπης Ακρίβειας (SP)	Αλγόριθμος Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP)
3SRW	-10,804	-12,241
3U2D	-5,250	-3,927
1RG7	-9,271	-8,710
4DUH	-7,939	-6,984

7.3.2 Εφαρμογή πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης

Την επικύρωση της χρησιμοποιούμενης μεθόδου ακολούθησε η εφαρμογή του αλγορίθμου Glide-SP και Glide-XP στην *in house* βιβλιοθήκη ενώσεων αιθέριου ελαίου λεβάντας (Πίνακας 1). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση των ενώσεων σε σχέση με τους επιλεγμένους προς αναστολή στόχους.

7.4 Αποτίμηση αποτελεσμάτων εφαρμογής πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης στη βιβλιοθήκη ενώσεων αιθέριου ελαίου λεβάντας

Οι ενώσεις αξιολογούνται για κάθε ένζυμο-στόχο σύμφωνα με τα ακόλουθα κριτήρια:

1. Την ικανότητα πρόσδεσης των εξεταζόμενων ενώσεων, σύμφωνα με τις τιμές Glide-score,
2. Από την αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων ενώσεων με αμινοξέα που βρίσκονται εντός της θέσης πρόσδεσης

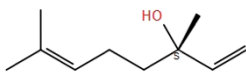
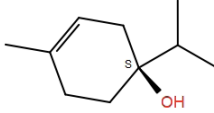
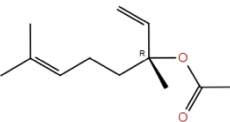
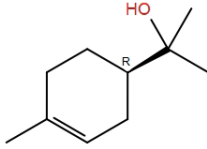
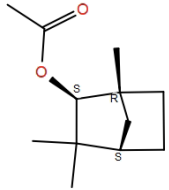
Προκειμένου να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις των εξεταζόμενων ενώσεων με τα αμινοξέα, χρησιμοποιήθηκε η βιβλιογραφία. Αντίστοιχα, συγκρίθηκαν οι τιμές Glide-score των ενώσεων της βιβλιοθήκης με εκείνες των συμπλοκοποιημένων προσδετών (Πίνακας 9).

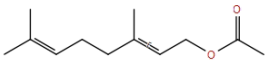
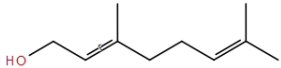
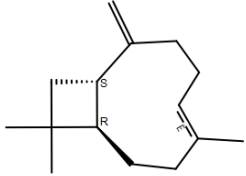
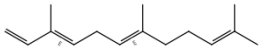
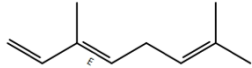
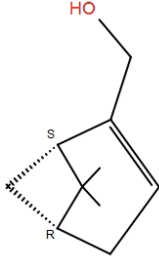
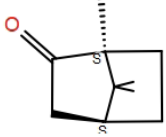
7.4.1 Αποτίμηση αποτελεσμάτων Μοριακής Πρόσδεσης για τον *S.aureus*

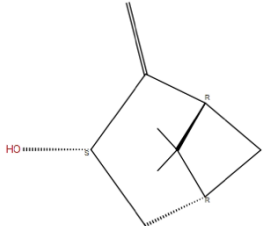
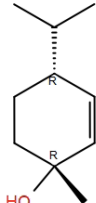
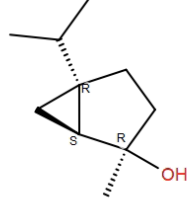
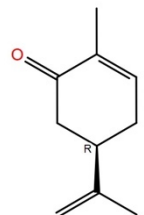
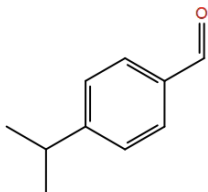
Αναφορικά με τον μικροοργανισμό *S.aureus* και τα ένζυμα τα οποία αποτελούν στόχο για την αναστολή αυτού, φαίνεται ότι η αντιμικροβιακή δράση του αιθερίου ελαίου λεβάντας πιθανώς

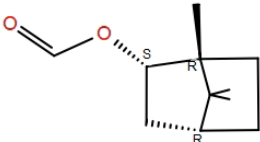
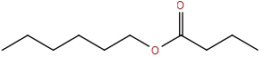
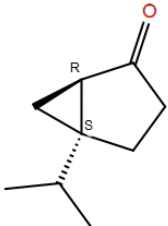
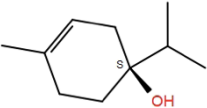
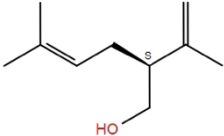
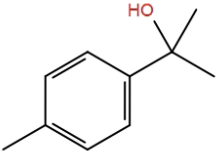
να οφείλεται στην αναστολή του ενζύμου DNA GyrB (PDB: 3U2D) συγκριτικά με το ένζυμο DHFR (PDB: 3SRW) (Πίνακας 10). Το συμπέρασμα αυτό εξάγεται διότι έξι συνολικά ενώσεις από το σύνολο του δειγματοχώρου, geraniol, α -terpineol-R, fenchyl acetate-3, geranyl acetate, sabina ketone-1 και lavandulyl acetate-S, αλληλεπιδρούν με τα αμινοξέα στη θέση πρόσδεσης και επιπλέον παρουσιάζουν ικανοποιητικές τιμές ενέργειας πρόσδεσης.

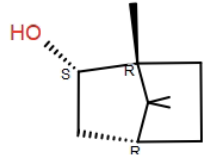
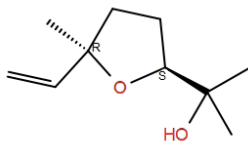
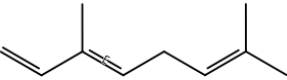
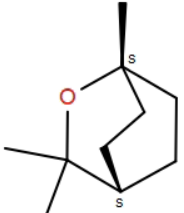
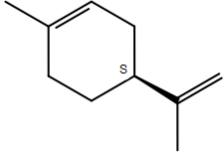
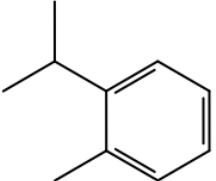
Πίνακας 10: Ενέργεια πρόσδεσης των ενώσεων αιθέριου ελαίου λεβάντας κατά την εφαρμογή πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης στα ένζυμα-στόχους του *S.aureus*

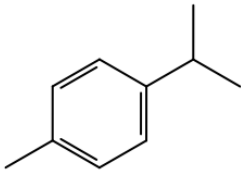
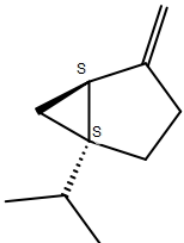
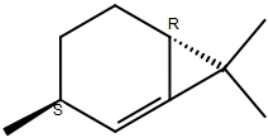
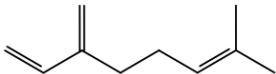
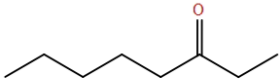
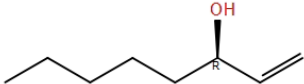
Ένωση	Χημική Δομή	Ενέργεια πρόσδεσης (Glide-score) (kcal·mol ⁻¹)			
		3SRW (DHFR)		3U2D (DNA GyrB)	
		SP	XP	SP	XP
Linalool (S,R)		-3,953	-3,962	-4,072	-3,991
Terpineol-4 (S,R)		-6,379	-5,608	-5,229	-3,283
Linalyl acetate (S,R)		-5,106	-5,201	-4,509	-3,140
α -terpineol (S,R)		-6,060	-5,584	-5,085	-4,052
Fenchyl acetate (1,2,3,4)		-6,120	-5,269	-5,135	-3,771

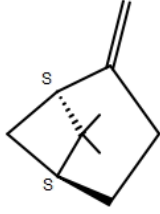
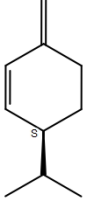
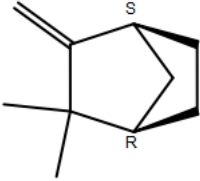
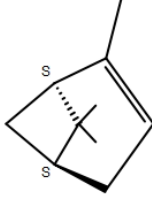
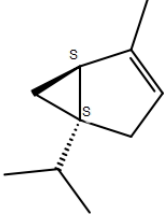
Geranyl acetate		-5,333	-4,943	-4,734	-4,695
Geraniol		-4,725	-5,189	-4,193	-3,662
b-caryophellene		-6,477	-5,339	-4,361	-2,473
Farnesene		-3,003	-2,153	-2,451	-2,762
b-cimene (trans,cis)		-4,391	-4,192	-2,541	-2,137
Myrtenol (1,2)		-6,364	-6,135	-4,756	-4,072
Camphor (1,2)		-5,882	-5,193	-4,616	-2,478

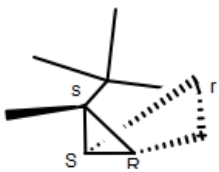
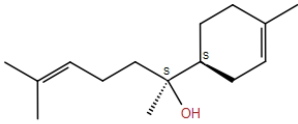
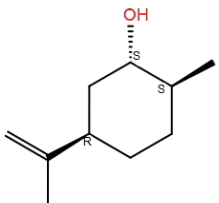
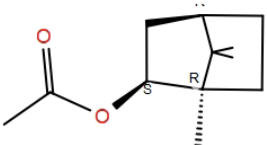
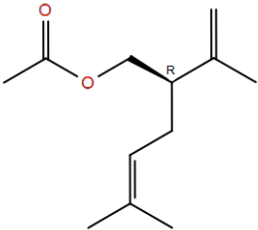
trans-pinocarveol		-6,519	-5,669	-4,674	-2,251
cis-p-menth-2-en-1-ol		-6,616	-5,782	-4,303	-2,745
trans-sabinene hydrate		-6,342	-5,254	-5,060	-2,375
Carvone		-5,716	-5,423	-5,333	-2,953
Cuminaldehyde		-7,271	-6,530	-5,769	-4,689

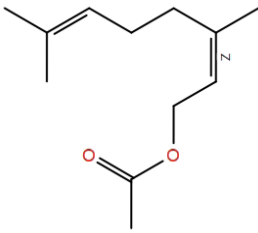
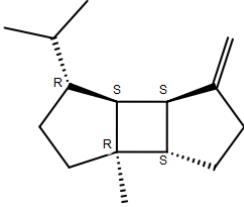
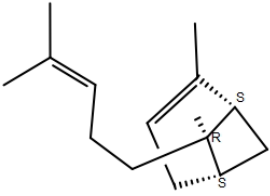
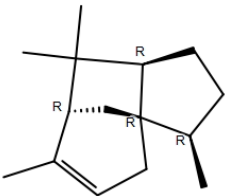
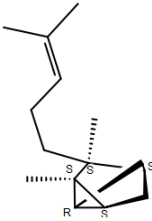
Isobornyl formate		-5,961	-5,315	-4,505	-2,762
Hexyl butyrate		-1,845	-1,732	-1,656	-1,892
Sabina ketone (1,2)		-6,125	-5,180	-5,979	-4,566
Terpinen-4-ol (S,R)		-6,379	-5,608	-5,378	-2,352
Lavandulol (S,R)		-4,307	-4,887	-2,894	-4,059
p-cymen-8-ol		-2,961	-5,608	-5,037	-4,234

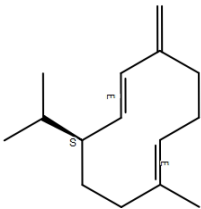
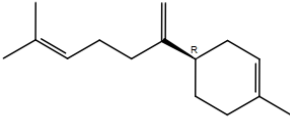
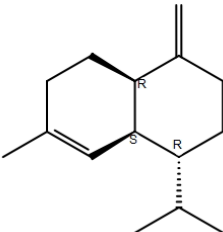
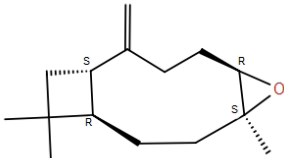
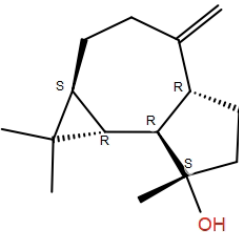
Borneol		-5,998	-5,052	-4,388	-2,451
Linalool oxide (trans,cis)		-6,078	-5,484	-2,382	-2,176
(Z)-b-ocimene		-4,365	-4,291	-2,376	-2,471
Eucalyptol		-6,065	-2,896	-4,538	-2,648
Limonene (S,R)		-5,659	-5,390	-4,495	-1,286
o-cymene		-6,924	-6,309	-5,270	-2,538

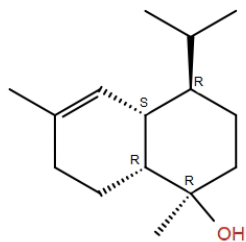
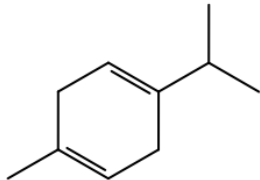
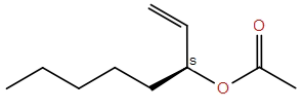
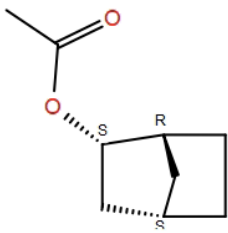
p-cymene		-6,896	-6,197	-5,347	-2,834
Sabinene (1,2)		-6,476	-6,149	-4,949	-2,561
3-carene		-6,335	-5,668	-5,110	-2,382
Myrcene		-3,484	-3,976	-1,476	-1,936
3-octanone		-3,484	-3,816	-1,264	-1,762
1-octen-3-ol (S,R)		-2,884	-3,865	-1,976	-2,457

b-pinene (1,2)		-6,268	-5,832	-4,885	-2,649
b-phellandrene (S,R)		-6,888	-6,471	-5,360	-2,373
Camphene (1,2)		-6,233	-5,510	-4,619	-2,672
alpha-pinene		-5,910	-2,945	-4,185	-2,376
alpha-thujene (1,2)		-6,439	-5,849	-5,189	-2,935

Tricyclene		-5,852	-4,911	-4,000	-2,647
α -bisabolol		-5,613	-6,663	-5,035	-4,244
Dihydrocarveol		-5,395	-5,511	-4,805	-2,735
Bornyl acetate		-6,323	-5,759	-4,601	-2,635
Lavandulyl acetate (S,R)		-5,378	-5,305	-4,596	-4,578

Neryl acetate		-5,106	-4,902	-1,756	-4,263
b-bourbonene		-7,024	-5,808	-4,938	-2,735
a-bergamotene (trans,cis)		-6,730	-6,813	-4,065	-2,942
a-cederene		-6,873	-5,470	-4,847	-2,749
a-santalene (1,2)		-6,789	-6,578	-4,425	-2,563

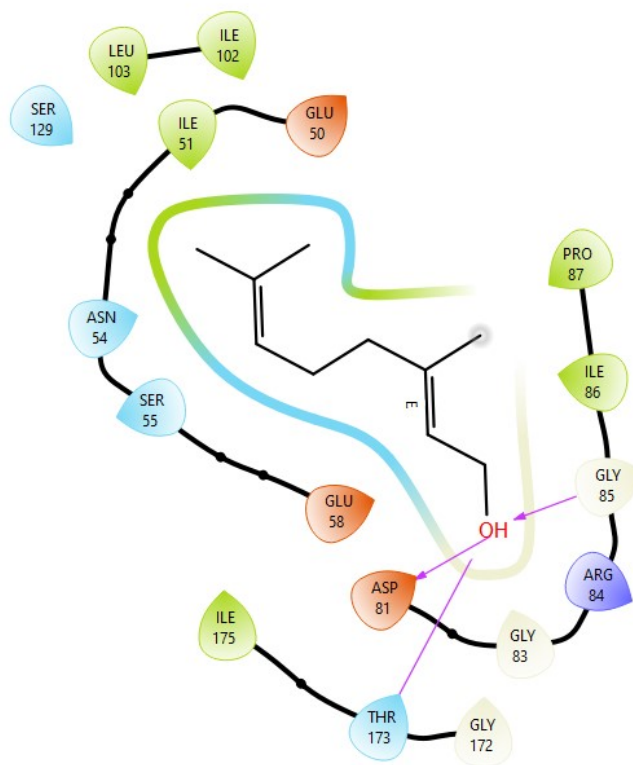
Germacrene D (S,R)		-6,985	-6,405	-5,098	-1,984
b-bisabolene (S,R)		-5,669	-6,128	-4,667	-2,368
v-cadinene		-7,119	-6,785	-5,253	-2,964
Caryophyllene oxide		-6,522	-5,766	-5,290	-2,842
Spathulenol		-6,916	-5,810	-4,519	-1,894

Cadinol		-6,224	-5,666	-5,230	-2,842
γ -terpinene		-6,605	-6,191	-5,547	-2,568
1-octen-3-yl acetate (S,R)		-4,220	-4,415	-4,315	-1,374
Norbornyl acetate		-6,341	-4,981	-5,352	-2,732

Ο τρόπος πρόσδεσης των έξι ενώσεων στο ένζυμο DNA GyrB, έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP), απεικονίζεται στα Σχήματα 15-20 και περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

- **Ένωση 1:** geraniol

Στο Σχήμα 17 παρατηρείται ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα Asp81, Gly85 και Thr173, κρίσιμα αμινοξέα για την πρόσδεση στο ένζυμο DNA GyrB, όπως φαίνεται στον Πίνακα 5. Η συγκεκριμένη ένωση έχει ικανοποιητική τιμή ενέργειας πρόσδεσης, η οποία ισούται με $-4,193 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.



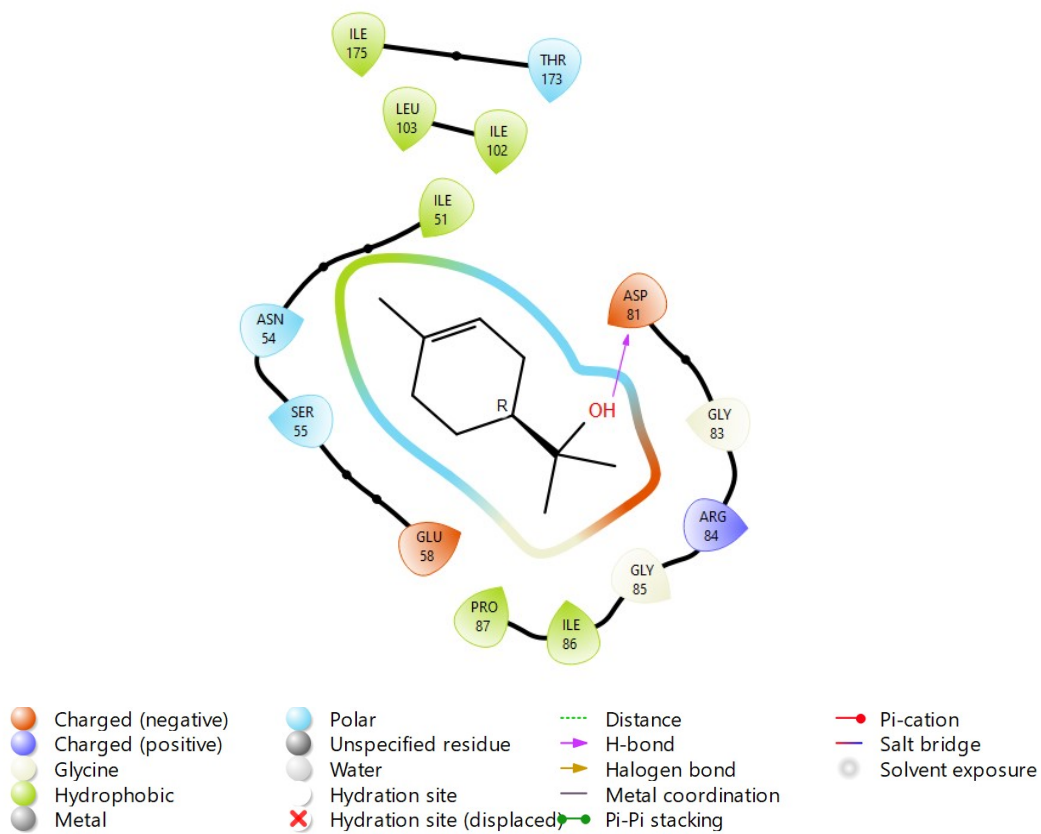
- | | | | |
|--------------------|----------------------------|--------------------|------------------|
| Charged (negative) | Polar | Distance | Pi-cation |
| Charged (positive) | Unspecified residue | H-bond | Salt bridge |
| Glycine | Water | Halogen bond | Solvent exposure |
| Hydrophobic | Hydration site (displaced) | Metal coordination | |
| Metal | | Pi-Pi stacking | |

Σχήμα 15: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης *geraniol* με το ένζυμο της DNA *GyrB* του *S.aureus* μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP)

- **Ένωση 2:** *a-terpineol-R*

Στο Σχήμα 18 παρατηρείται ο σχηματισμός δεσμού υδρογόνου με το αμινοξύ Asp81.

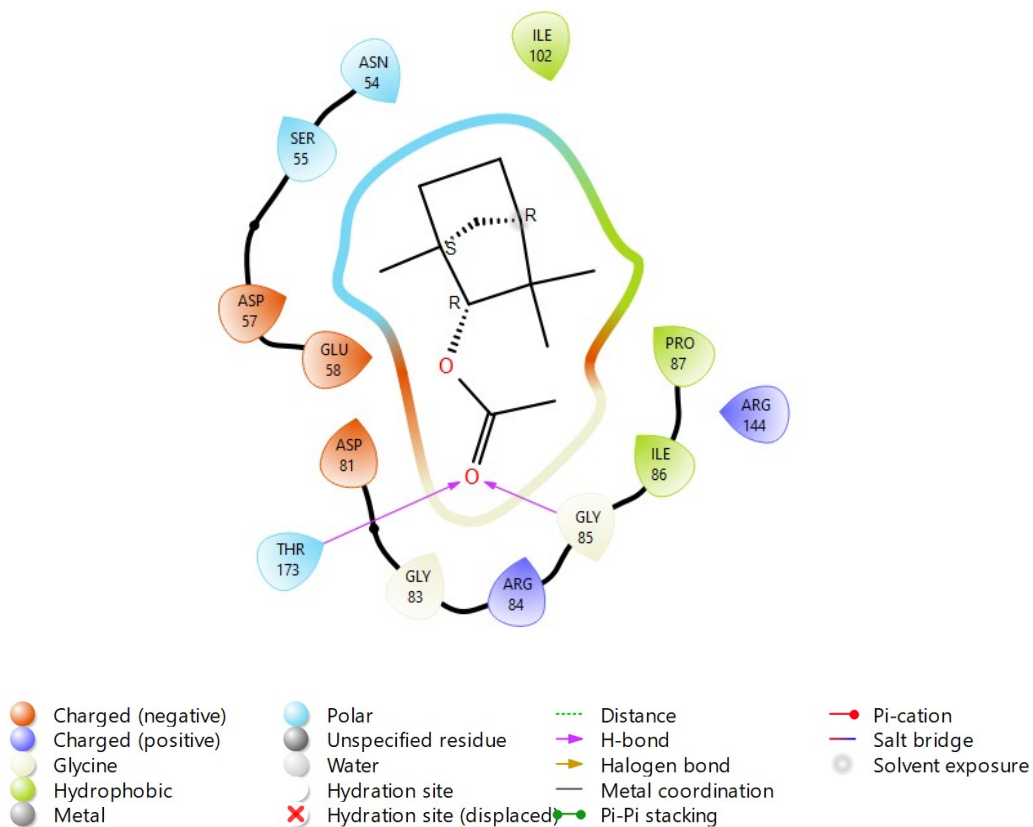
Επιπλέον, η ενέργεια πρόσδεσης ορίζεται $-5,085 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.



Σχήμα 16: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης *α-terpineol-R* με το ένζυμο της DNA Gyrase B του *S.aureus* μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP)

- **Ένωση 3:** fenchyl acetate-3

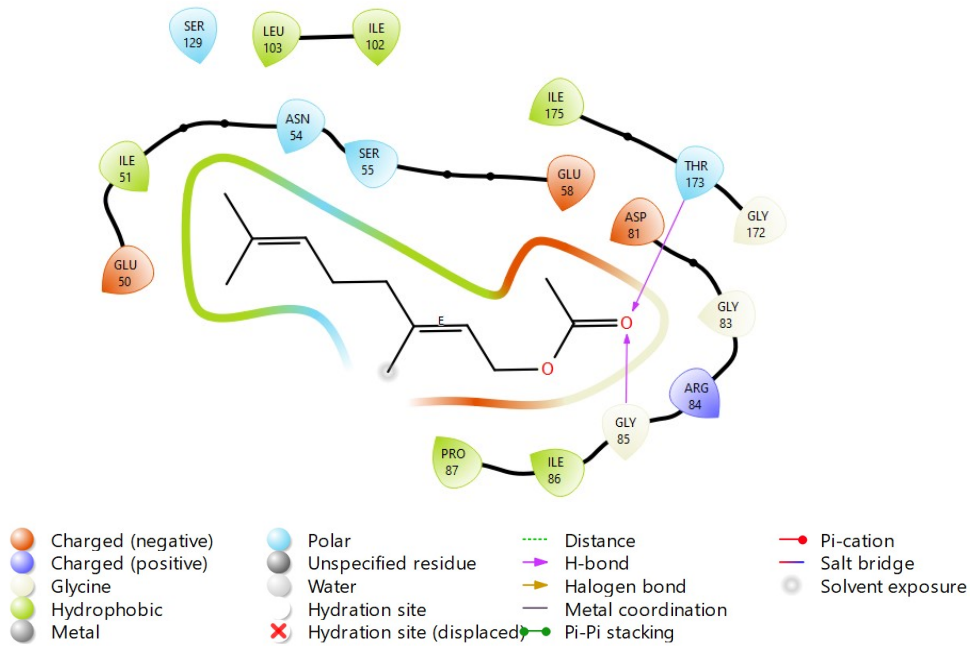
Στο Σχήμα 19 παρατηρείται ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα Gly85 και Thr173. Επιπλέον, η ενέργεια πρόσδεσης είναι $-5,135 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.



Σχήμα 17: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης *fenchyl acetate-3* με το ένζυμο της DNA Gyrase του *S.aureus* μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP)

- **Ένωση 4:** geranyl acetate

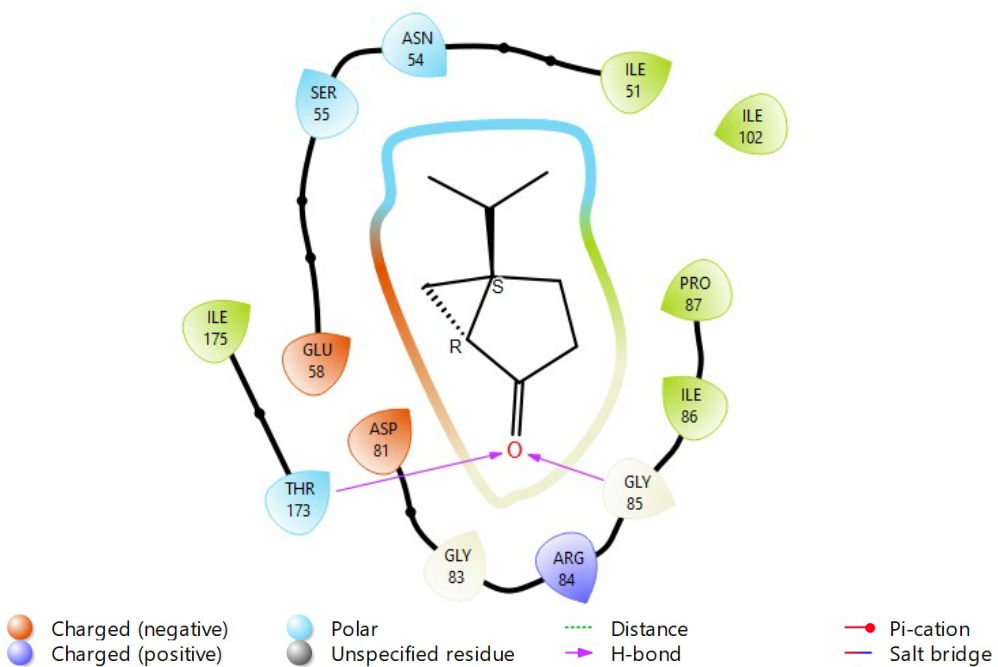
Στο Σχήμα 20 παρατηρείται ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα Gly85 και Thr173. Επιπλέον, η ενέργεια πρόσδεσης είναι $-4,734 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.



Σχήμα 18: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης geranyl acetate με το ένζυμο της DNA GyrB του *S.aureus* μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP)

- Ένωση 5: sabina ketone-1

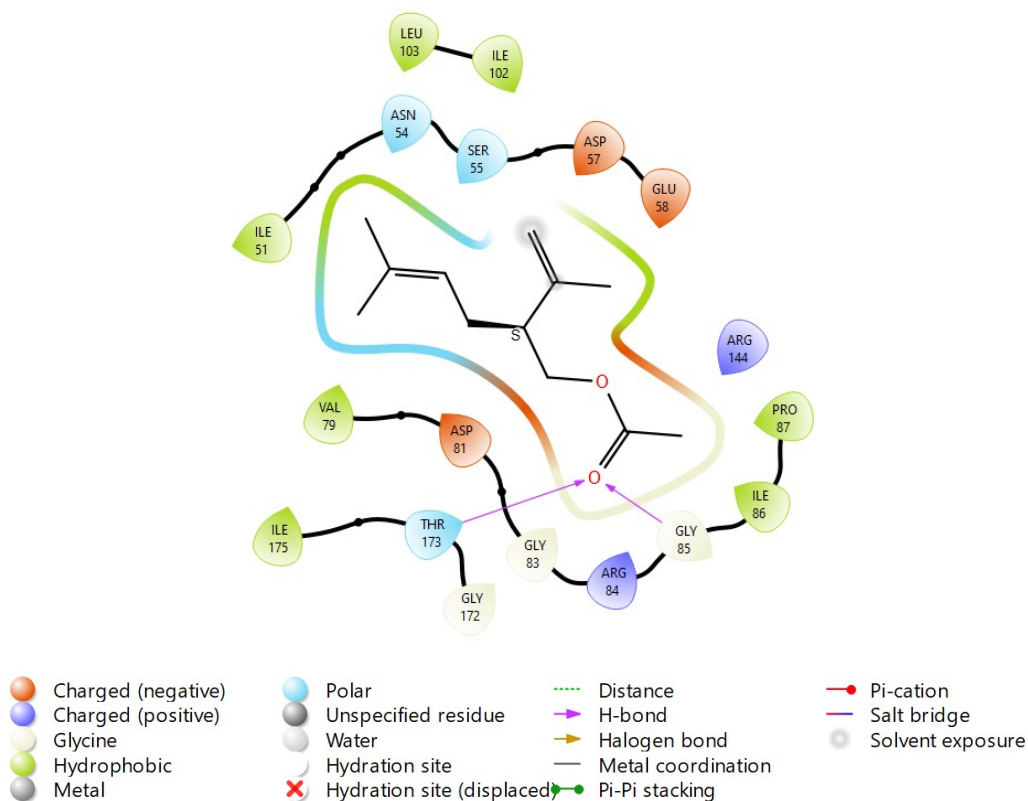
Στο Σχήμα 21 παρατηρείται ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα Gly85 και Thr173. Επιπλέον, η ενέργεια πρόσδεσης ορίζεται $-5,979 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$.



Σχήμα 19: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης sabina ketone-1 με το ένζυμο της DNA GyrB του *S.aureus* μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP)

- Ένωση 6: lavandulyl acetate-S

Στο Σχήμα 22 παρατηρείται ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα Gly85 και Thr173. Επιπλέον, η ενέργεια πρόσδεσης αναγράφεται $-4,596 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.

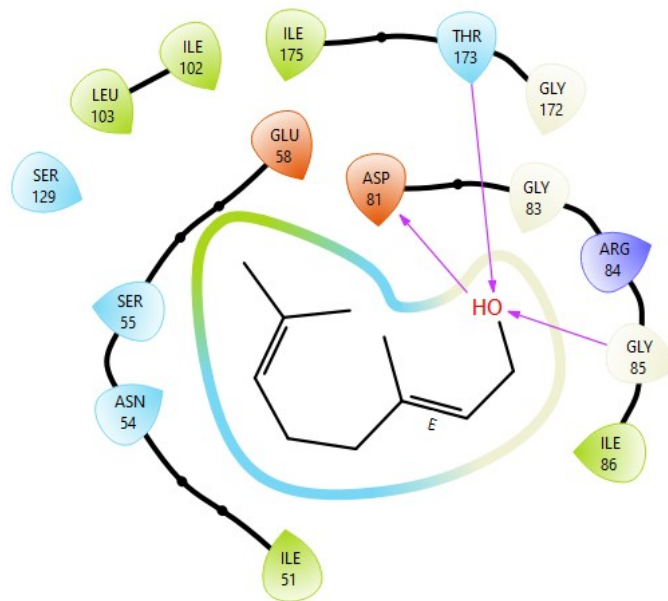


Σχήμα 20: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης lavandulyl acetate-S με το ένζυμο της DNA GyrB του *S.aureus* μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP)

Οι τέσσερις ενώσεις με τον σταθερότερο τρόπο πρόσδεσης στη DNA GyrB, έπειτα από την εφαρμογή του Αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP), απεικονίζονται στα Σχήματα 21-28 και περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω:

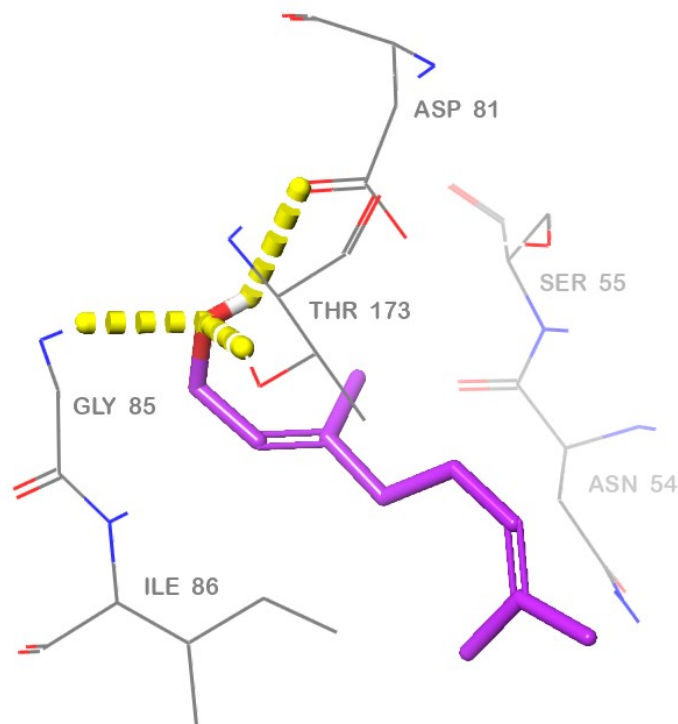
- Ένωση 1: Geraniol

Στα Σχήματα 23 και 24 παρατηρείται ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα Asp81, Gly85 και Thr173. Επιπλέον, η ενέργεια πρόσδεσης ορίζεται $-3,662 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.



- | | | | |
|--------------------|----------------------------|--------------------|------------------|
| Charged (negative) | Polar | Distance | Pi-cation |
| Charged (positive) | Unspecified residue | H-bond | Salt bridge |
| Glycine | Water | Halogen bond | Solvent exposure |
| Hydrophobic | Hydration site | Metal coordination | |
| Metal | Hydration site (displaced) | Pi-Pi stacking | |

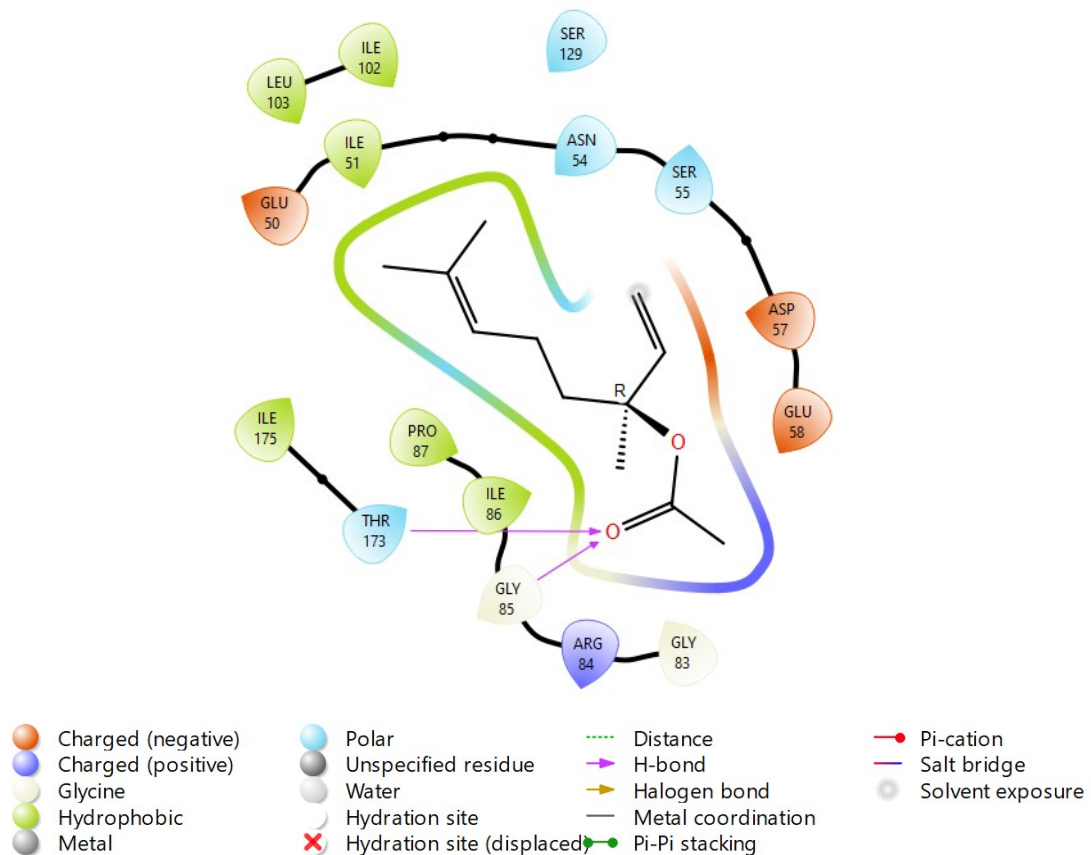
Σχήμα 21: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης geraniol με το ένζυμο της DNA GyrB του *S.aureus* μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP)



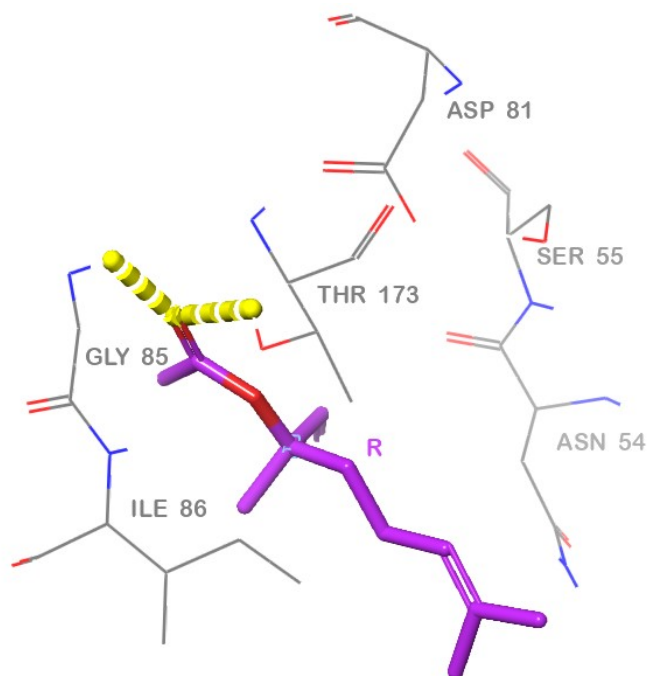
Σχήμα 22: Τριδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης geraniol με το ένζυμο της DNA GyrB του *S.aureus* μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP)

- Ένωση 2: linalyl acetate-R

Στα Σχήματα 25 και 26 παρατηρείται ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα Gly85 και Thr173. Επιπλέον, η ενέργεια πρόσδεσης προσδιορίζεται $-3,140 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.



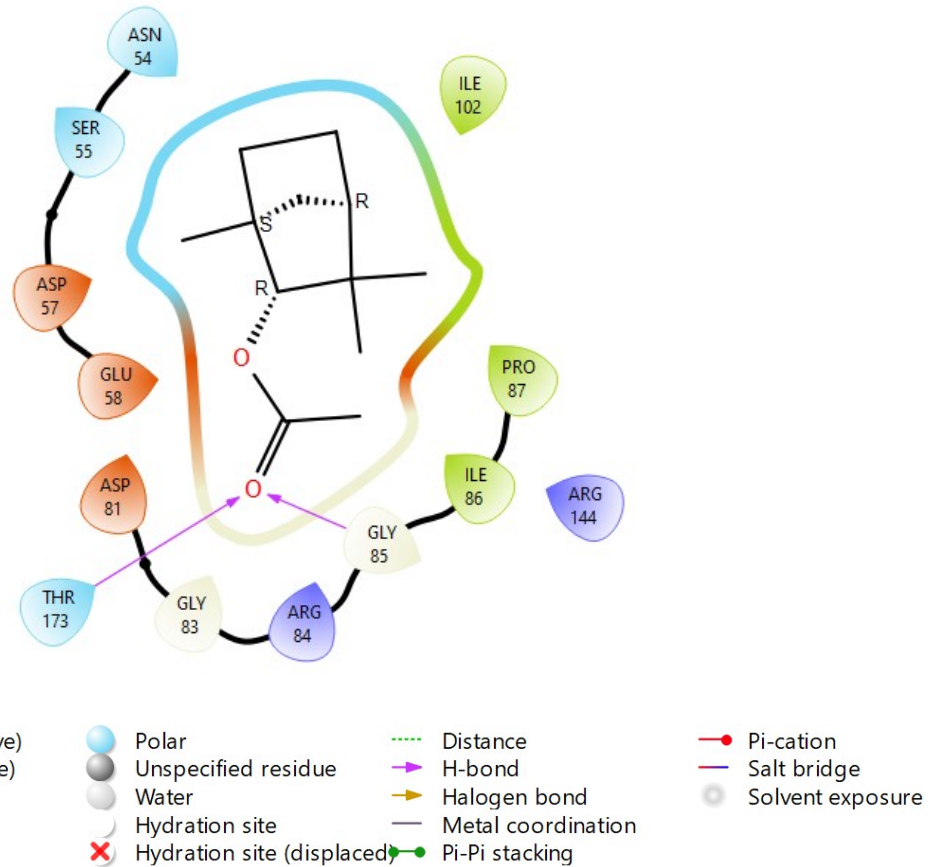
Σχήμα 23: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης linalyl acetate-R με το ένζυμο της DNA Gyrase του *S.aureus* μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP)



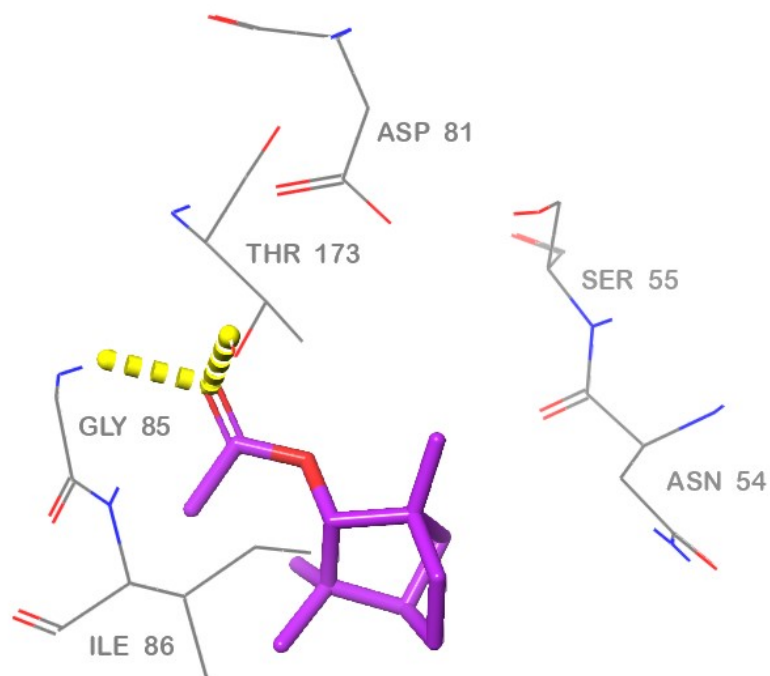
Σχήμα 24: Τριδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης *linalyl acetate-R* με το ένζυμο της DNA Gyrase B του *S.aureus* μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP)

- Ένωση 3: fenchyl acetate-3

Στα Σχήματα 27 και 28 παρατηρείται ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα Gly85 και Thr173. Επιπλέον, η ενέργεια πρόσδεσης ορίζεται $-3,771 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.



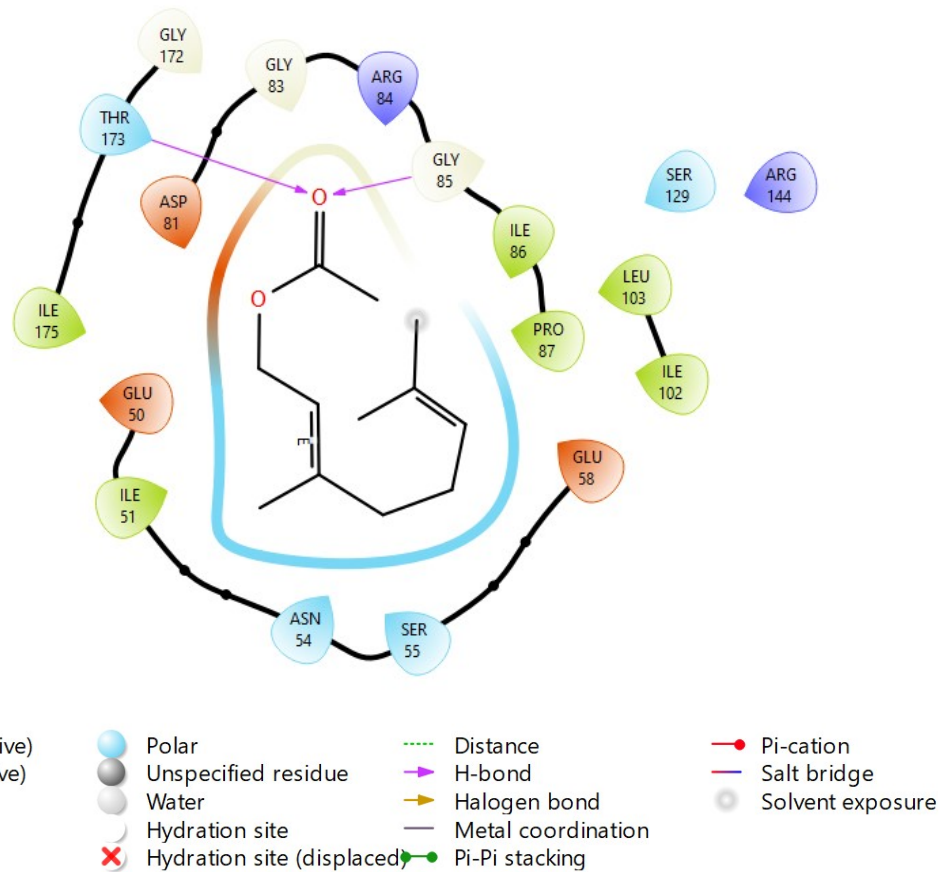
Σχήμα 25: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης *fenchyl acetate-3* με το ένζυμο της DNA Gyrase B του *S.aureus* μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP)



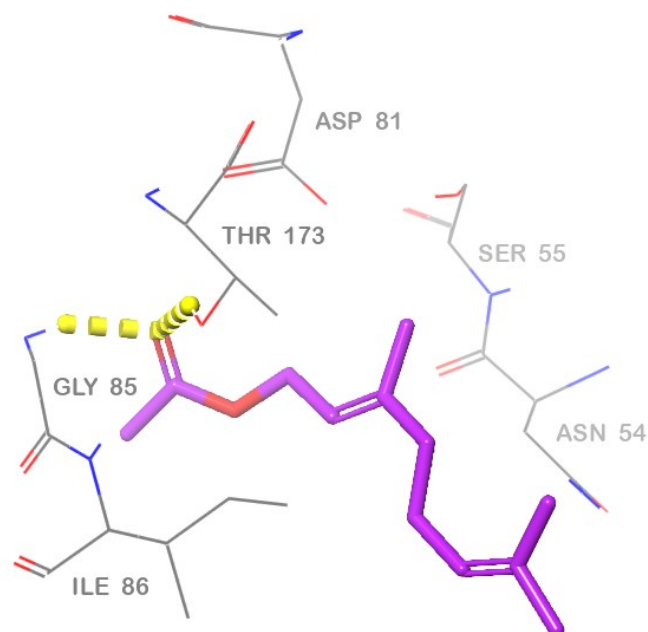
Σχήμα 26: Τριδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης *fenchyl acetate-3* με το ένζυμο της DNA *GyrB* του *S.aureus* μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP)

- Ένωση 4: geranyl acetate

Στα Σχήματα 29 και 30 παρατηρείται ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα Gly85 και Thr173. Επιπλέον, η ενέργεια πρόσδεσης είναι $-4,695 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$.

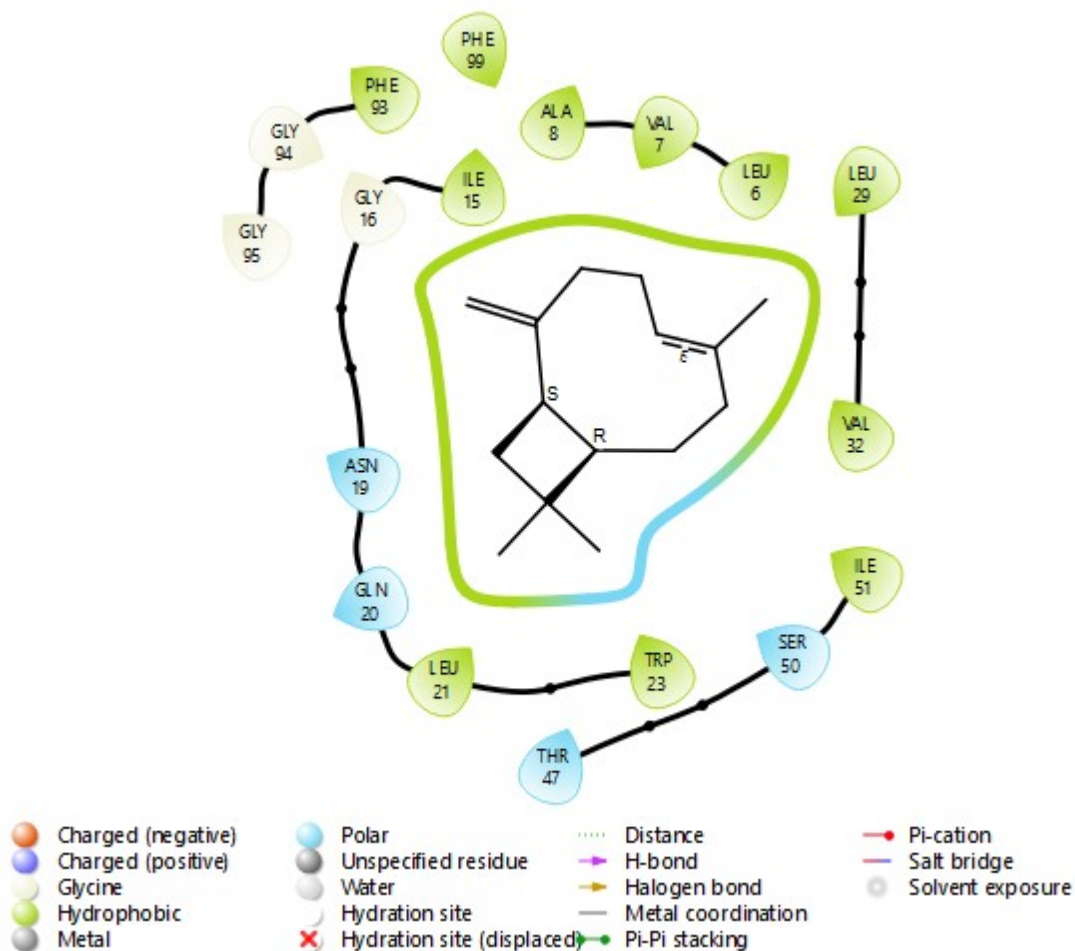


Σχήμα 28: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης geranyl acetate με το ένζυμο της DNA Gyrase B του *S.aureus* μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP)

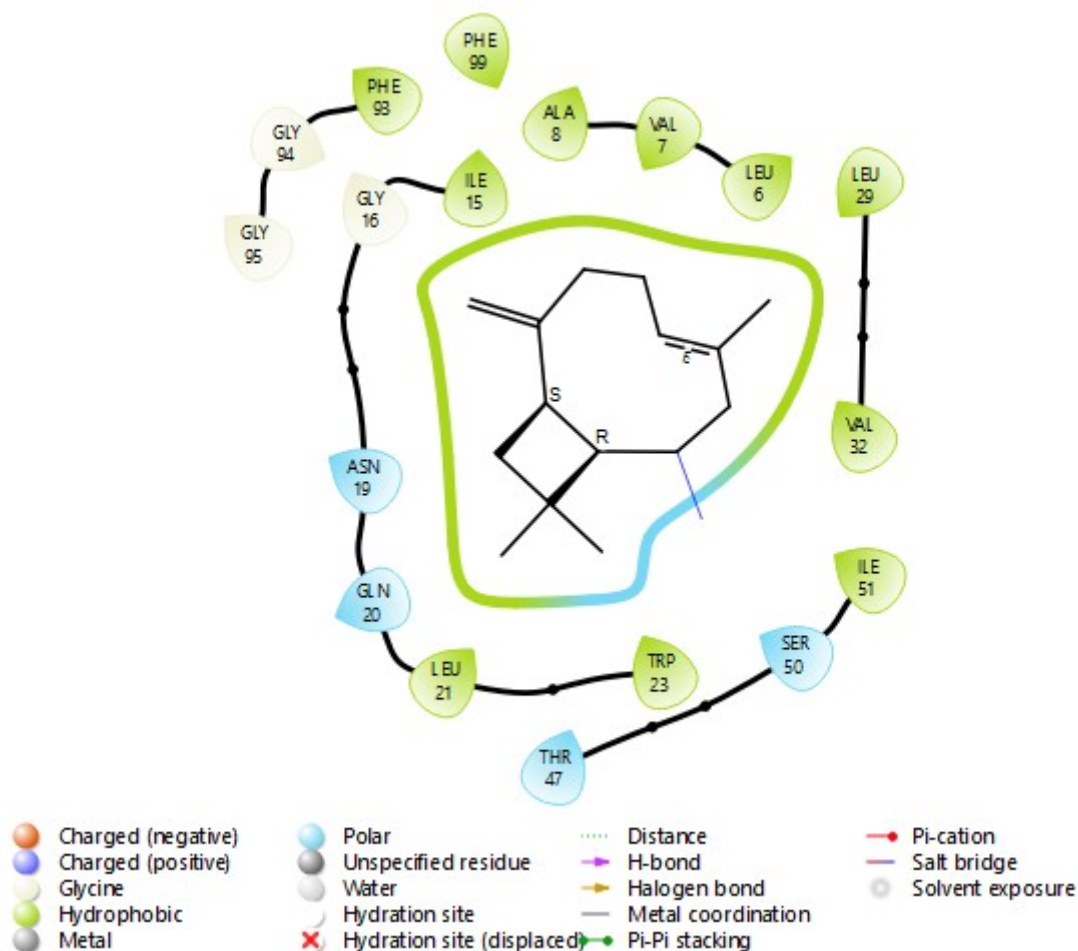


Σχήμα 27: Τριδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης geranyl acetate με το ένζυμο της DNA Gyrase B του *S.aureus* μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP)

Ενδεικτικά, στα Σχήματα 29 και 30 παρουσιάζεται ο τρόπος πρόσδεσης της ένωσης b-caryophellene, η οποία παρουσίασε την καλύτερη ενέργεια πρόσδεσης (Glide score) στο ένζυμο DHFR του *S.aureus*, όπως προέκυψε έπειτα από την εφαρμογή των Αλγορίθμων Πρότυπης και Επιπρόσθετης Ακρίβειας, αντίστοιχα. Όπως παρατηρείται, παρόλο που η ένωση εμφανίζει τιμές ενέργειας πρόσδεσης $-6,477$ και $-5,339$ kcal·mol⁻¹, αντίστοιχα, δεν παρατηρείται σχηματισμός αλληλεπιδράσεων που να αποδεικνύει τη σταθεροποίηση της ένωσης στη θέση πρόσδεσης του ένζυμο DHFR του *S.aureus*.



Σχήμα 29: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης b-caryophellene με το ένζυμο της DHFR του *S.aureus* μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP)



Σχήμα 30: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης *b-carophellene* με το ένζυμο της DHFR του *S.aureus* μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP)

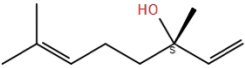
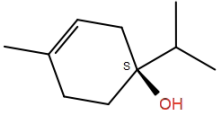
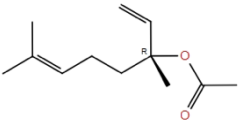
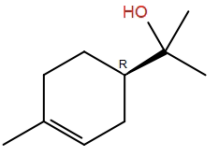
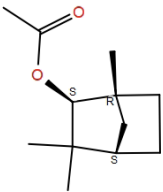
Τελικό συμπέρασμα, επομένως, είναι ότι πιθανά η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου λεβάντας έναντι του μικροοργανισμού *S.aureus* οφείλεται στην αναστολή του ενζύμου DNA GyrB (PDB: 3U2D) συγκριτικά με την DHFR (PDB: 3SRW). Ύστερα από περαιτέρω αξιολόγηση των ενώσεων που παρουσίασαν με τον καλύτερο τρόπο πρόσδεσης στη DNA GyrB, βάσει του Αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP) επιβεβαιώνεται η πιθανή ανασταλτική δράση τριών από τις έξι ενώσεις που αναλύθηκαν, βάσει του Αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP). Πιο συγκεκριμένα, η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου λεβάντας κατά του *S.aureus* είναι πιθανότερο να οφείλεται στις ενώσεις: geraniol, fenchyl acetate και geranyl acetate.

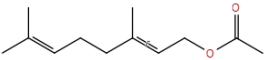
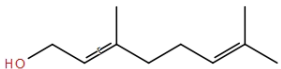
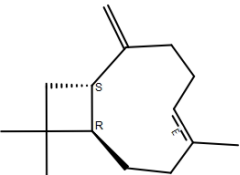
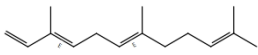
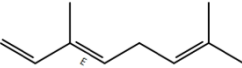

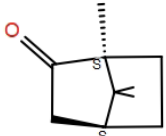
7.4.2 Αποτίμηση αποτελεσμάτων Μοριακής Πρόσδεσης για το βακτήριο *E.coli*

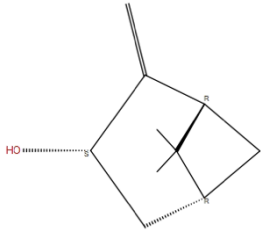
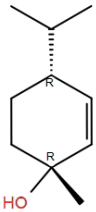
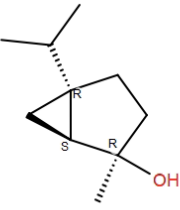
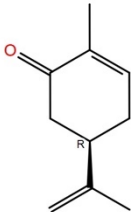
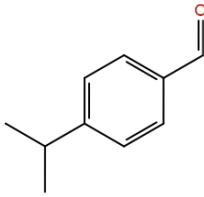
Αναφορικά με τα αποτελέσματα μοριακής πρόσδεσης των ενώσεων που απαρτίζουν την εξεταζόμενη βιβλιοθήκη στα μελετώμενα ένζυμα του μικροοργανισμού *E.coli*, φαίνεται ότι σύμφωνα με τα παραπάνω κριτήρια (Πίνακας 11), δεν εντοπίζονται σημαντικά αποτελέσματα πιθανής αναστολής των ενζύμων DNA GyrB (PDB: 4DUH) και DHFR (PDB: 1RG7). Πιθανά η δράση του *E.coli* να αναστέλλεται μέσω άλλου ενζύμου-στόχου ή ακόμα και να μην επιδρούν

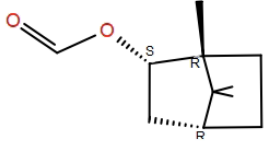
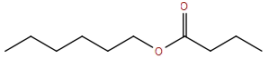
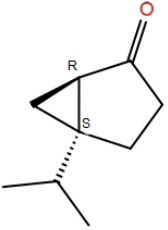
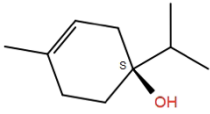
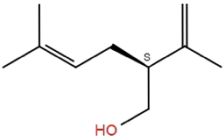
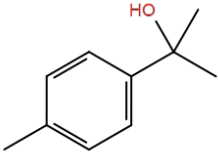
οι ενώσεις του αιθέριου ελαίου λεβάντας σε σημαντικό βαθμό ολικά στον μικροοργανισμό. Το συμπέρασμα αυτό λαμβάνεται από την έλλειψη ικανοποιητικών τιμών ενέργειας πρόσδεσης (Glide-score), σε συνδυασμό με την απώλεια αλληλεπιδράσεων.

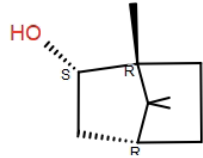
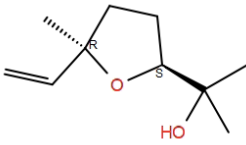
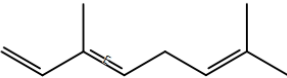
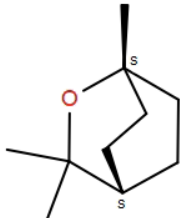
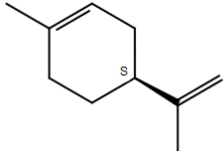
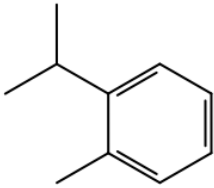
Πίνακας 11: Ενέργεια πρόσδεσης των ενώσεων αιθέριου ελαίου λεβάντας κατά την εφαρμογή πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης στα ένζυμα-στόχους του *E.coli*

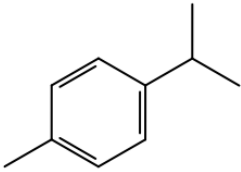
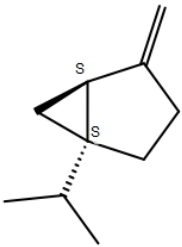
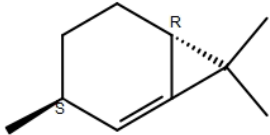
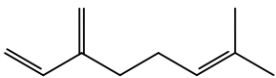
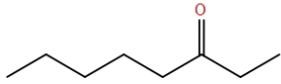
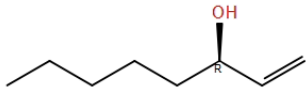
Ένωση	Χημική Δομή	Ενέργεια πρόσδεσης (Glide-score) (kcal·mol ⁻¹)			
		1RG7 (DHFR)		4DUH (DNA GyrB)	
		SP	XP	SP	XP
Linalool (S,R)		-4,143	-3,730	-3,756	-3,761
Terpineol-4 (S,R)		-6,643	-4,669	-5,836	-4,329
Linalyl acetate (S,R)		-4,506	-3,978	-3,890	-3,100
α-terpineol (S,R)		-6,243	-4,670	-5,744	-4,305
Fenchyl acetate (1,2,3,4)		-5,220	-4,797	-4,252	-2,765

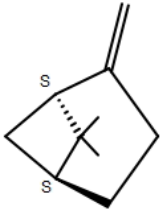
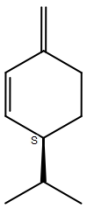
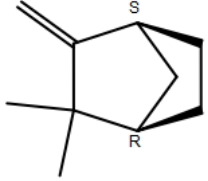
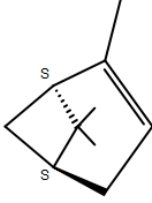
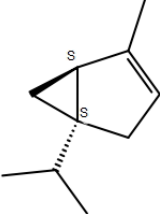
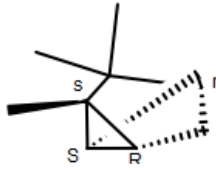
Geranyl acetate		-3,862	-4,818	-4,242	-3,746
Geraniol		-3,969	-3,692	-4,288	-4,009
b-caryophellene		-6,358	-5,000	-4,286	0,362
Farnesene		-2,032	-2,936	-1,659	-3,427
b-ocimene (trans,cis)		-3,390	-2,923	-3,508	-2,922
Myrtenol (1,2)		-5,862	-4,547	-4,478	-3,180
Camphor (1,2)		-5,507	-2,538	-3,330	-0,725

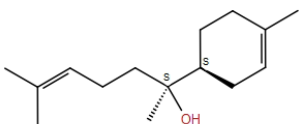
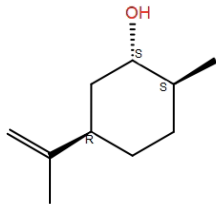
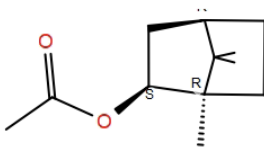
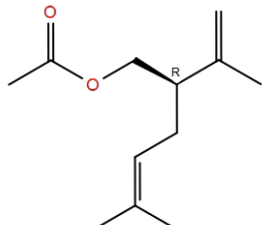
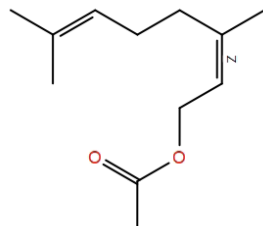
trans-pinocarveol		-6,075	-4,372	-4,501	-2,000
cis-p-menth-2-en-1-ol		-6,225	-4,426	-6,088	-4,501
trans-sabinene hydrate		-6,326	-4,750	-5,260	-3,766
Carvone		-5,971	-4,380	-5,025	-3,928
Cuminaldehyde		-6,462	-4,763	-5,728	-4,383

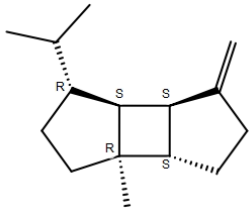
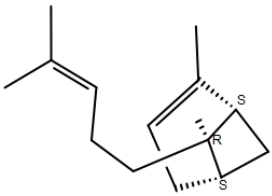
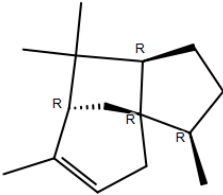
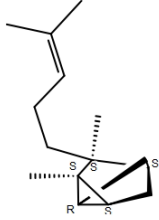
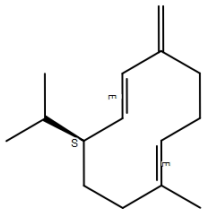
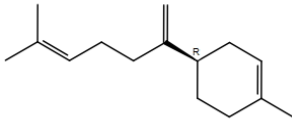
Isobornyl formate		-5,700	-4,375	-1,632	-1,074
Hexyl butyrate		-0,397	-1,360	0,107	-1,783
Sabina ketone (1,2)		-5,917	-4,090	-5,594	-3,312
Terpinen-4-ol (S,R)		-6,643	-4,801	-5,836	-4,329
Lavandulol (S,R)		-4,206	-4,077	-4,257	-3,789
p-cymen-8-ol		-6,156	-4,864	-5,773	-4,144

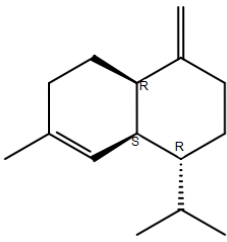
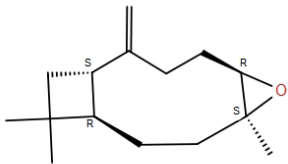
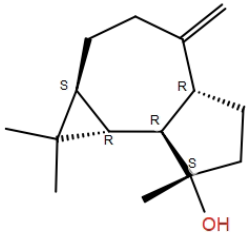
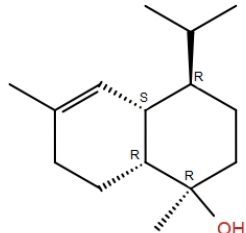
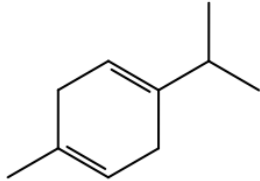
Borneol		-5,722	-4,094	-1,284	-1,427
Linalool oxide (trans,cis)		-5,514	-4,571	-4,682	-4,194
(Z)-b-ocimene		-3,398	-2,663	-3,624	-2,453
Eucalyptol		-5,055	-3,067	-3,916	0,515
Limonene (S,R)		-5,043	-3,660	-4,772	-3,447
o-cymene		-6,300	-4,117	-5,112	-3,501

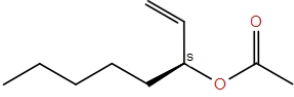
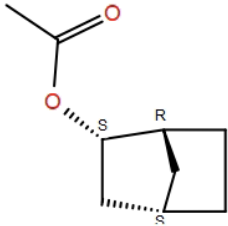
p-cymene		-5,853	-4,200	-5,701	-3,764
Sabinene (1,2)		-5,625	-4,086	-5,612	-3,598
3-carene		-5,534	-3,667	-5,032	-3,234
Myrcene		-2,807	-2,652	-2,693	-2,268
3-octanone		-3,113	-3,632	-1,031	-3,083
1-octen-3-ol (S,R)		-3,019	-3,046	-2,771	-2,718

b-pinene (1,2)		-5,617	-3,974	-3,993	-2,025
b-phellandrene (S,R)		-5,885	-3,705	-5,538	-3,597
Camphene (1,2)		-5,532	-3,859	-3,515	-1,703
a-pinene		-5,102	-3,726	-4,757	-1,397
a-thujene (1,2)		-5,843	-4,173	-5,499	-3,669
Tricyclene		-5,048	-3,144	-4,115	-1,900

a-bisabolol		-5,863	-5,282	-5,809	-5,405
Dihydrocarveol		-5,726	-4,431	-5,107	-3,945
Bornyl acetate		-5,375	-3,885	0,472	-1,422
Lavandulyl acetate (S,R)		-5,620	-5,298	-4,536	-4,572
Neryl acetate		-3,971	-4,684	-4,581	-4,090

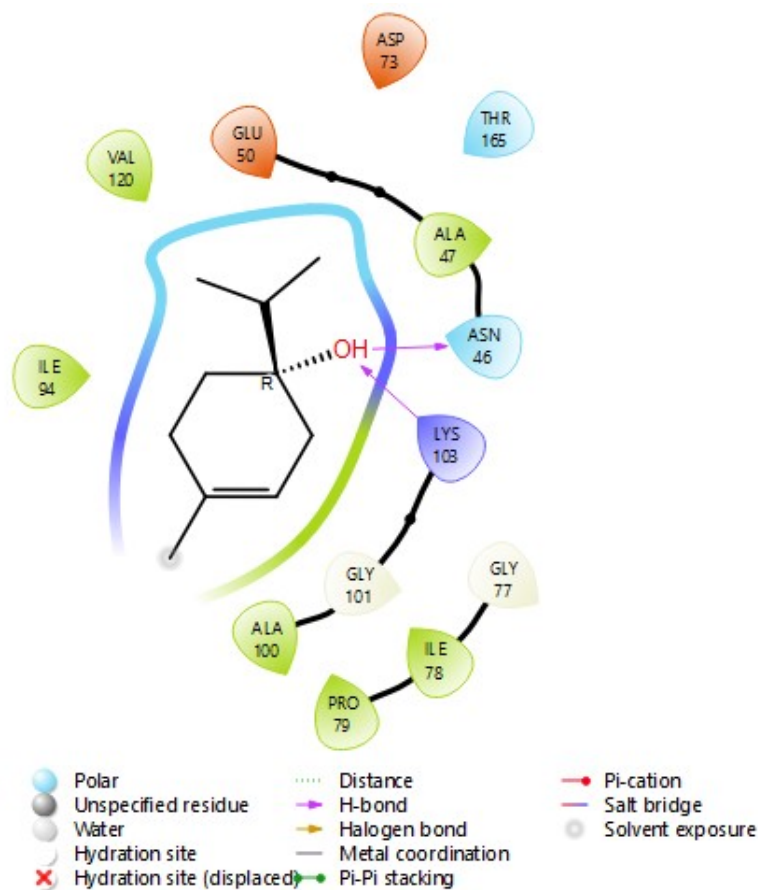
b-bourbonene		-6,816	-2,135	-5,615	-2,776
a-bergamotene (trans,cis)		-5,150	-4,279	-4,330	-3,478
a-cederene		-6,006	-4,379	-5,428	-3,165
a-santalene (1,2)		-5,006	-4,020	-3,867	-3,146
Germacrene D (S,R)		-6,238	-4,837	-5,648	-3,677
b-bisabolene (S,R)		-5,323	-4,695	-5,020	-4,133

v-cadinene		-6,328	-4,776	-5,928	-3,930
Caryophyllene oxide		-6,500	-3,319	-4,705	-3,685
Spathulenol		-6,555	-4,253	-5,998	-3,574
Cadinol		-6,669	-4,992	-6,202	-5,029
γ-terpinene		-6,081	-4,173	-5,590	-3,610

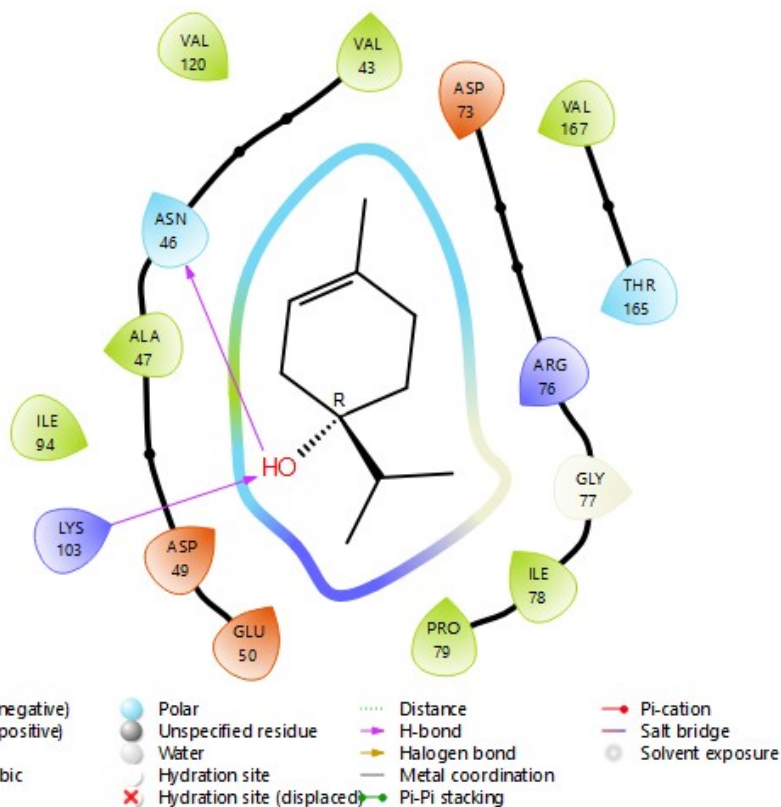
1-octen-3-yl acetate (S,R)		-4,144	-4,404	-3,719	-3,262
Norbornyl acetate		-6,081	-3,998	-4,172	-2,792

Όπως αναλύθηκε παραπάνω, δεν παρουσιάζονται ενώσεις του αιθέριου ελαίου λεβάντας με πιθανή αναστολή των ενζύμων DNA GyrB και DHFR του μικροοργανισμού *E. coli*. Συγκριτικά, παρόλα αυτά, η αναστολή του ενζύμου της DNA GyrB εμφανίζεται ως πιθανότερος μηχανισμός της αντιμικροβιακής δράσης. Οι ενώσεις με τον καλύτερο συνδυασμό αλληλεπιδράσεων και τιμών ενέργειας πρόσδεσης παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά στα Σχήματα 31-34.

Η ένωση με τον καλύτερο τρόπο πρόσδεσης στη DNA GyrB είναι η terpineol-4-R, σύμφωνα με τον Αλγόριθμο Πρότυπης Ακρίβειας (SP) και τον Αλγόριθμο Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP) (Σχήματα 31-32). Παρατηρείται ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα Asn46 και Lys103 και η ενέργεια πρόσδεσης καταγράφεται ίση με $-5,836$ και $-4,329$ kcal·mol⁻¹, αντίστοιχα.

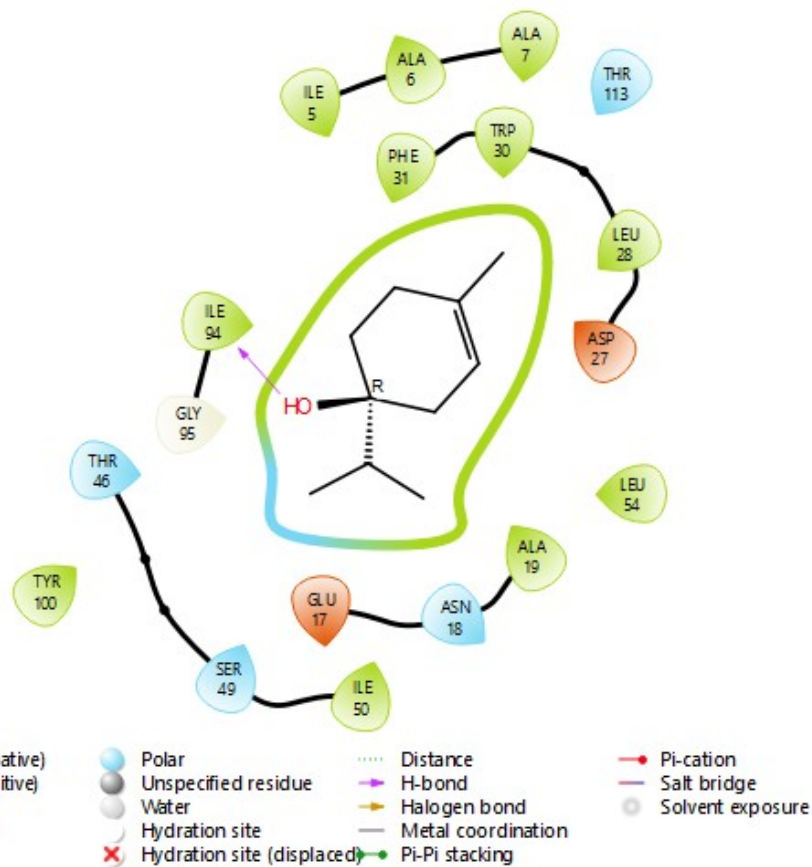


Σχήμα 31: Διαδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης terpineol-4-R με το ένζυμο της DNA GyrB του *E.coli* μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP)



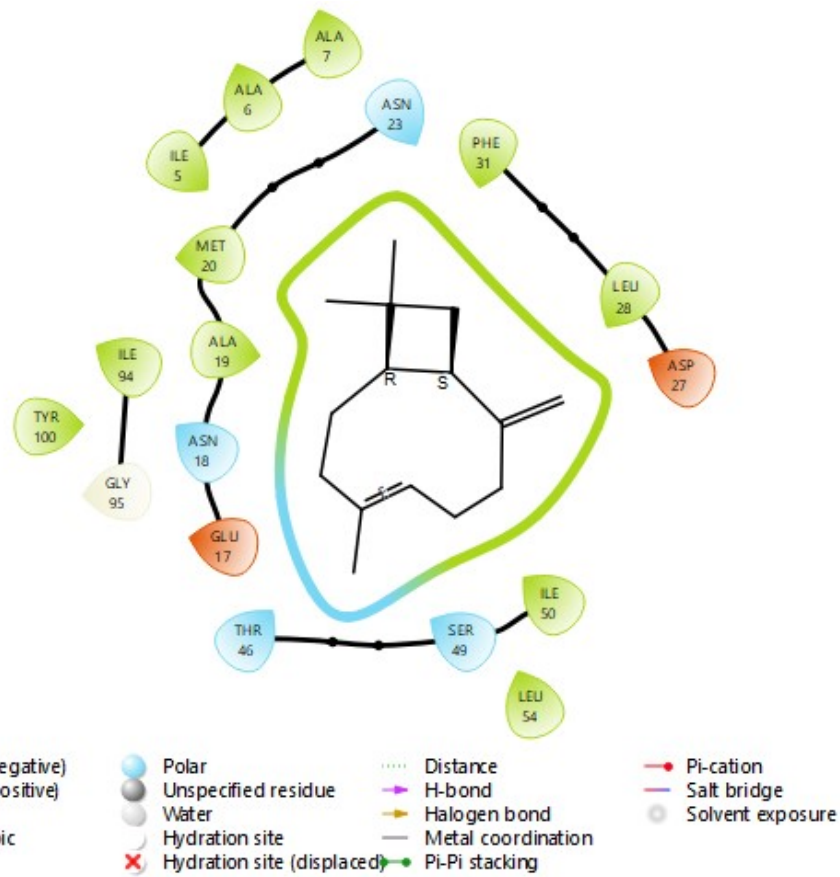
Σχήμα 32: Διαδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης terpineol-4-R με το ένζυμο της DHFR του *E.coli* μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP)

Η ένωση με τον σταθερότερο τρόπο πρόσδεσης στο ένζυμο DHFR είναι η terpineol-4-R σύμφωνα με τον Αλγόριθμο Πρότυπης Ακρίβειας (SP) και η b-caryophellene σύμφωνα με τον Αλγόριθμο Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP). Στο Σχήμα 33 απεικονίζεται ο τρόπος πρόσδεσης της ένωσης terpineol-4-R στο ένζυμο DHFR της E.coli, όπου παρατηρείται ο σχηματισμός δεσμού υδρογόνου με το αμινοξύ Ile94, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 6. Η Ενέργεια Πρόσδεσης παρουσιάζει τιμή ίση με $-6,643 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$.



Σχήμα 33: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης *terpineol-4-R* με το ένζυμο της DHFR του *E.coli* μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP)

Στο Σχήμα 34 απεικονίζεται ο τρόπος πρόσδεσης της ένωσης η *b-caryophellene* στο ένζυμο DHFR του *E.coli*, όπου δεν παρατηρείται σχηματισμός δεσμών. Η ενέργεια Πρόσδεσης καταγράφεται $-5,000 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$.



Σχήμα 34: Δισδιάστατη απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης *b-caryophellene* με το ένζυμο της DHFR του *E.coli* μέσω χρήσης του Αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Γενικά συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι

Σύμφωνα με τη μεθοδολογία που αναπτύχθηκε, δημιουργήθηκε μια βιβλιοθήκη ενώσεων-συστατικών αιθέριου ελαίου λεβάντας (συνολικά 87 ενώσεις) και μέσω υπολογιστικών εργαλείων εικονικής σάρωσης, δοκιμάστηκε ο τρόπος πρόσδεσης τους σε δύο ένζυμα-στόχους (DNA GyrB και DHFR) των μικροοργανισμών *S.aureus* και *E.coli*. Λαμβάνοντας υπόψη τα στοιχεία που προέκυψαν από τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας, εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι περιεχόμενες στο αιθέριο έλαιο λεβάντας ενώσεις πιθανώς αναστέλουν τη δράση ενζύμων-στόχων του *S.aureus*. Συγκεκριμένα, η αναστολή του ενζύμου DNA GyrB του *S.aureus* πιθανά σχετίζεται με την αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου λεβάντας και οφείλεται στις ενώσεις geraniol, fenchyl acetate και geranyl acetate.

Στην περίπτωση του βακτηρίου *E.coli*, η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι δεν προκρίνονται ενώσεις ως πιθανοί αναστολείς, δεδομένου ότι οι αλληλεπιδράσεις σε συνδυασμό με την ενέργεια πρόσδεσης δεν προσδίδουν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Παρόλα αυτά, το ένζυμο DNA GyrB φαίνεται να αποτελεί, όπως και στην περίπτωση του *S.aureus*, πιθανότερο στόχο συγκριτικά με το ένζυμο DHFR.

Συμπερασματικά, ενδιαφέρον παρουσιάζει η περαιτέρω μελέτη αναστολής του ενζύμου DNA GyrB του *S.aureus* μέσω *in vitro* δοκιμών με χρήση αιθέριου ελαίου λεβάντας, Μελλοντικός στόχος της παρούσας εργασίας είναι η αγορά των προτεινόμενων ενώσεων και η ενζυμική δοκιμή τους με απώτερο σκοπό την εφαρμογή τους σε συσκευασμένα προϊόντα τροφίμων για την αποφυγή ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών.

BIBΛIOΓPAΦIA

“Molecular Docking Studies Of Some Novel Furan Derivatives As Potent Inhibitors Of Staphylococcus Aureus.” *International Journal of Pharmaceutical Research* 11, no. 1 (March 1, 2019). <https://doi.org/10.31838/ijpr/2019.11.01.025>.

Amer, Hamada H., Essam Hassan Eldrehmy, Salama Mostafa Abdel-Hafez, Youssef Saeed Alghamdi, Magdy Yassin Hassan, and Saad H. Alotaibi. “Antibacterial and Molecular Docking Studies of Newly Synthesized Nucleosides and Schiff Bases Derived from Sulfadimidines.” *Scientific Reports* 11, no. 1 (September 9, 2021): 17953. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97297-1>.

Avendaño, Carmen, and J. Carlos Menéndez. “Antimetabolites.” In *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, 9–52. Elsevier, 2008. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52824-7.00002-0>.

Beske, Philip, Anna Land, and Stefan Seuring. “Sustainable Supply Chain Management Practices and Dynamic Capabilities in the Food Industry: A Critical Analysis of the Literature.” *International Journal of Production Economics* 152 (June 2014): 131–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijpe.2013.12.026>.

Bialoń, Marietta, Teresa Krzyśko-Łupicka, Ewa Nowakowska-Bogdan, and Piotr P. Wieczorek. “Chemical Composition of Two Different Lavender Essential Oils and Their Effect on Facial Skin Microbiota.” *Molecules* 24, no. 18 (September 8, 2019): 3270. <https://doi.org/10.3390/molecules24183270>.

Bintsis, Thomas and Department of International Trade, TEI of West Macedonia, Kastoria, Greece. “Foodborne Pathogens.” *AIMS Microbiology* 3, no. 3 (2017): 529–63. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.529>.

Brvar, Matjaž, Andrej Perdih, Miha Renko, Gregor Anderluh, Dušan Turk, and Tom Solmajer. “Structure-Based Discovery of Substituted 4,5'-Bithiazoles as Novel DNA Gyrase Inhibitors.” *Journal of Medicinal Chemistry* 55, no. 14 (July 26, 2012): 6413–26. <https://doi.org/10.1021/jm300395d>.

Caplice, E. “Food Fermentations: Role of Microorganisms in Food Production and Preservation.” *International Journal of Food Microbiology* 50, no. 1–2 (September 15, 1999): 131–49. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00082-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00082-3).

Cassel, E., R.M.F. Vargas, N. Martinez, D. Lorenzo, and E. Dellacassa. “Steam Distillation Modeling for Essential Oil Extraction Process.” *Industrial Crops and Products* 29, no. 1 (January 2009): 171–76. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.04.017>.

Cavanagh, H. M. A., and J. M. Wilkinson. “Biological Activities of Lavender Essential Oil.” *Phytotherapy Research* 16, no. 4 (June 2002): 301–8. <https://doi.org/10.1002/ptr.1103>.

Cavanagh, Heather M.A., and Jenny M. Wilkinson. “Lavender Essential Oil: A Review.” *Australian Infection Control* 10, no. 1 (March 2005): 35–37. <https://doi.org/10.1071/HI05035>.

Collin, Frédéric, Shantanu Karkare, and Anthony Maxwell. "Exploiting Bacterial DNA Gyrase as a Drug Target: Current State and Perspectives." *Applied Microbiology and Biotechnology* 92, no. 3 (November 2011): 479–97. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3557-z>.

Das, Shyamal, S. Bharanidharan, and A. Dhandapani. "Molecular Spectroscopy and Molecular Docking Studies on (E)-1-(4-Bromobenzylidene) Thiourea." Edited by Praveen Kumar Sharma. *Journal of New Developments in Chemistry* 1, no. 3 (February 15, 2018): 62–81. <https://doi.org/10.14302/issn.2377-2549.jndc-18-1933>.

Diass, Khaoula, Mohammed Merzouki, Kaoutar Elfazazi, Hanane Azzouzi, Allal Challioui, Khalil Azzaoui, Belkheir Hammouti, et al. "Essential Oil of *Lavandula Officinalis*: Chemical Composition and Antibacterial Activities." *Plants* 12, no. 7 (April 6, 2023): 1571. <https://doi.org/10.3390/plants12071571>.

Dong, Guangyao, Xiaohui Bai, Aoken Aimila, Haji Aisa, and Maitinuer Maiwulanjiang. "Study on Lavender Essential Oil Chemical Compositions by GC-MS and Improved PGC." *Molecules* 25, no. 14 (July 10, 2020): 3166. <https://doi.org/10.3390/molecules25143166>.

Doyle, Michael P., and Larry R. Beuchat, eds. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 3rd ed. Washington, D.C: ASM Press, 2007.

Durcik, Martina, Žiga Skok, Janez Ilaš, Nace Zidar, Anamarija Zega, Petra Éva Szili, Gábor Draskovits, et al. "Hybrid Inhibitors of DNA Gyrase A and B: Design, Synthesis and Evaluation." *Pharmaceutics* 13, no. 1 (December 22, 2020): 6. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010006>.

Eakin, Ann E., Oluyinka Green, Neil Hales, Grant K. Walkup, Shanta Bist, Alok Singh, George Mullen, et al. "Pyrrolamide DNA Gyrase Inhibitors: Fragment-Based Nuclear Magnetic Resonance Screening To Identify Antibacterial Agents." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56, no. 3 (March 2012): 1240–46. <https://doi.org/10.1128/AAC.05485-11>.

Earle, M.D. "Innovation in the Food Industry." *Trends in Food Science & Technology* 8, no. 5 (May 1997): 166–75. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01026-1](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01026-1).

Edwards-Jones, V., R. Buck, S.G. Shawcross, M.M. Dawson, and K. Dunn. "The Effect of Essential Oils on Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Using a Dressing Model." *Burns* 30, no. 8 (December 2004): 772–77. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2004.06.006>.

Egorov, A. M., M. M. Ulyashova, and M. Yu Rubtsova. "Bacterial Enzymes and Antibiotic Resistance." *Acta Naturae* 10, no. 4 (2018): 33–48.

Flensburg, John, and Ola Skold. "Massive Overproduction of Dihydrofolate Reductase in Bacteria as a Response to the Use of Trimethoprim." *European Journal of Biochemistry* 162, no. 3 (February 1987): 473–76. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb10664.x>.

Ghannam, Iman A.Y., Eman A. Abd El-Meguid, Islam H. Ali, Donia H. Sheir, and Ahmed M. El Kerdawy. "Novel 2-Arylbenzothiazole DNA Gyrase Inhibitors: Synthesis, Antimicrobial Evaluation, QSAR and Molecular Docking Studies." *Bioorganic Chemistry* 93 (December 2019): 103373. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103373>.

Gray, William D., and C. W. Hesseltine. "The Use of Fungi as Food and in Food Processing." *C R C Critical Reviews in Food Technology* 1, no. 2 (May 1970): 225–329. <https://doi.org/10.1080/10408397009527104>.

Guo, Yunlei, Guanghui Song, Meiling Sun, Juan Wang, and Yi Wang. "Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in Staphylococcus Aureus." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10 (March 17, 2020): 107. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107>.

Hooper, D. C. "Mechanisms of Action of Antimicrobials: Focus on Fluoroquinolones." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 32 Suppl 1 (March 15, 2001): S9–15. <https://doi.org/10.1086/319370>.

Jfoster, T. "Staphylococcus Aureus." In *Molecular Medical Microbiology*, 2:839–88. Elsevier, 2002. <https://doi.org/10.1016/B978-012677530-3/50258-0>.

Johnson, James R., and Thomas A. Russo. "Extraintestinal Pathogenic Escherichia Coli : 'The Other Bad E Coli .'" *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 139, no. 3 (March 2002): 155–62. <https://doi.org/10.1067/mlc.2002.121550>.

K, Ragi, Joby Thomas Kakkassery, Vinod P. Raphael, Reeya Johnson, and Vidhya Thomas K. "In Vitro Antibacterial and in Silico Docking Studies of Two Schiff Bases on Staphylococcus Aureus and Its Target Proteins." *Future Journal of Pharmaceutical Sciences* 7, no. 1 (December 2021): 78. <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00225-3>.

Kaizu, T., and H. S. Margolius. "Studies on Rat Renal Cortical Cell Kallikrein. I. Separation and Measurement." *Biochimica Et Biophysica Acta* 411, no. 2 (December 5, 1975): 305–15. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(75\)90310-4](https://doi.org/10.1016/0304-4165(75)90310-4).

Kohen, Amnon. "Dihydrofolate Reductase as a Model for Studies of Enzyme Dynamics and Catalysis." *F1000Research* 4 (December 17, 2015): 1464. <https://doi.org/10.12688/f1000research.6968.1>.

Kwiatkowski, Paweł, Łukasz Łopusiewicz, Mateusz Kostek, Emilia Drozłowska, Agata Pruss, Bartosz Wojciuk, Monika Sienkiewicz, Hanna Zielińska-Bliźniewska, and Barbara Dołęgowska. "The Antibacterial Activity of Lavender Essential Oil Alone and In Combination with Octenidine Dihydrochloride against MRSA Strains." *Molecules* 25, no. 1 (December 26, 2019): 95. <https://doi.org/10.3390/molecules25010095>.

Lawrence, David T., Stephen G. Dobmeier, Laura K. Bechtel, and Christopher P. Holstege. "Food Poisoning." *Emergency Medicine Clinics of North America* 25, no. 2 (May 2007): 357–73. <https://doi.org/10.1016/j.emc.2007.02.014>.

Li, Xiaoming, Mark Hilgers, Mark Cunningham, Zhiyong Chen, Michael Trzoss, Junhu Zhang, Lucy Kohlen, et al. "Structure-Based Design of New DHFR-Based Antibacterial Agents: 7-Aryl-2,4-Diaminoquinazolines." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21, no. 18 (September 2011): 5171–76. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.07.059>.

Lim, Ji Youn, Jangwon Yoon, and Carolyn J. Hovde. "A Brief Overview of Escherichia Coli O157:H7 and Its Plasmid O157." *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20, no. 1 (January 2010): 5–14.

Liu, C. Tony, Philip Hanoian, Jarrod B. French, Thomas H. Pringle, Sharon Hammes-Schiffer, and Stephen J. Benkovic. "Functional Significance of Evolving Protein Sequence in Dihydrofolate Reductase from Bacteria to Humans." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, no. 25 (June 18, 2013): 10159–64. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307130110>.

Lüthje, Petra, and Annelie Brauner. "Virulence Factors of Uropathogenic E. Coli and Their Interaction with the Host." In *Advances in Microbial Physiology*, 65:337–72. Elsevier, 2014. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2014.08.006>.

MacFarlane, Amanda J., and Patrick J. Stover. "Gastrointestinal Disorders: Overview." In *International Encyclopedia of Public Health*, 223–32. Elsevier, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00168-5>.

Marko Oblak, Miha Kotnik, and Tom Solmajer. "Discovery and Development of ATPase Inhibitors of DNA Gyrase as Antibacterial Agents." *Current Medicinal Chemistry* 14, no. 19 (August 1, 2007): 2033–47. <https://doi.org/10.2174/092986707781368414>.

Marsh, Kenneth, and Betty Bugusu. "Food Packaging? Roles, Materials, and Environmental Issues." *Journal of Food Science* 72, no. 3 (April 2007): R39–55. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00301.x>.

Murgueitio, Manuela S., Marcel Bermudez, Jérémie Mortier, and Gerhard Wolber. "In Silico Virtual Screening Approaches for Anti-Viral Drug Discovery." *Drug Discovery Today: Technologies* 9, no. 3 (September 2012): e219–25. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2012.07.009>.

Muthukumar, R., M. Karnan, N. Elangovan, M. Karunanidhi, and Renjith Thomas. "Synthesis, Spectral Analysis, Antibacterial Activity, Quantum Chemical Studies and Supporting Molecular Docking of Schiff Base (E)-4-((4-Bromobenzylidene) Amino)Benzenesulfonamide." *Journal of the Indian Chemical Society* 99, no. 5 (May 2022): 100405. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2022.100405>.

Nguyen, Y, and Vanessa Sperandio. "Enterohemorrhagic E. Coli (EHEC) Pathogenesis." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2 (2012). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00090>.

Novick, A. "Growth of Bacteria." *Annual Review of Microbiology* 9, no. 1 (October 1955): 97–110. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.09.100155.000525>.

Ortega, Elena, Hikmate Abriouel, Rosario Lucas, and Antonio Gálvez. "Multiple Roles of Staphylococcus Aureus Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic Activity, and Correlation to Antibiotic Resistance." *Toxins* 2, no. 8 (August 10, 2010): 2117–31. <https://doi.org/10.3390/toxins2082117>.

Paul, Nicodéme, Esther Kellenberger, Guillaume Bret, Pascal Müller, and Didier Rognan. "Recovering the True Targets of Specific Ligands by Virtual Screening of the Protein Data Bank: Virtual Screening of a Protein Library." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 54, no. 4 (March 1, 2004): 671–80. <https://doi.org/10.1002/prot.10625>.

Potter, Norman N., and Joseph H. Hotchkiss. "Food Deterioration and Its Control." In *Food Science*, by Norman N. Potter and Joseph H. Hotchkiss, 113–37. Food Science Text Series. Boston, MA: Springer US, 1995. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4985-7_7.

Rahman, Shafiur, ed. *Handbook of Food Preservation*. 2nd ed. Food Science and Technology. Boca Raton: CRC Press, 2007.

Sawaya, Michael R., and Joseph Kraut. "Loop and Subdomain Movements in the Mechanism of *Escherichia Coli* Dihydrofolate Reductase: Crystallographic Evidence ." *Biochemistry* 36, no. 3 (January 1, 1997): 586–603. <https://doi.org/10.1021/bi962337c>.

Schweitzer, Barry I., Adam P. Dicker, and Joseph R. Bertino. "Dihydrofolate Reductase as a Therapeutic Target." *The FASEB Journal* 4, no. 8 (May 1990): 2441–52. <https://doi.org/10.1096/fasebj.4.8.2185970>.

Siala, Wafi, Soňa Kucharíková, Annabel Braem, Jef Vleugels, Paul M Tulkens, Marie-Paule Mingeot-Leclercq, Patrick Van Dijck, and Françoise Van Bambeke. "The Antifungal Caspofungin Increases Fluoroquinolone Activity against Staphylococcus Aureus Biofilms by Inhibiting N-Acetylglucosamine Transferase." *Nature Communications* 7, no. 1 (November 3, 2016): 13286. <https://doi.org/10.1038/ncomms13286>.

Silva, Pedro J. "Computational Development of Inhibitors of Plasmid-Borne Bacterial Dihydrofolate Reductase." *Antibiotics* 11, no. 6 (June 7, 2022): 779. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060779>.

Sissi, C., E. Marangon, A. Chemello, C.G. Noble, A. Maxwell, and M. Palumbo. "The Effects of Metal Ions on the Structure and Stability of the DNA Gyrase B Protein." *Journal of Molecular Biology* 353, no. 5 (November 2005): 1152–60. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.09.043>.

Spina, Michele, Massimiliano Cuccioloni, Matteo Mozzicafreddo, Francesca Montecchia, Stefania Pucciarelli, Anna Maria Eleuteri, Evandro Fioretti, and Mauro Angeletti. "Mechanism of Inhibition of Wt-Dihydrofolate Reductase from *E. Coli* by Tea Epigallocatechin-Gallate:

EGCG Inhibits DHFR from *E. Coli*.” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 72, no. 1 (July 2008): 240–51. <https://doi.org/10.1002/prot.21914>.

Srinivasan*, Bharath, Sam Tonddast-Navaei, Ambrish Roy, Hongyi Zhou, and Jeffrey Skolnick. “Chemical Space of *Escherichia Coli* Dihydrofolate Reductase Inhibitors: New Approaches for Discovering Novel Drugs for Old Bugs.” *Medicinal Research Reviews* 39, no. 2 (March 2019): 684–705. <https://doi.org/10.1002/med.21538>.

Taylor, Tracey A., and Chandrashekhar G. Unakal. “Staphylococcus Aureus Infection.” In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>.

Van Boekel, Martinus, Vincenzo Fogliano, Nicoletta Pellegrini, Catherine Stanton, Gabriele Scholz, Sam Lalljie, Veronika Somoza, Dietrich Knorr, Pratima Rao Jasti, and Gerhard Eisenbrand. “A Review on the Beneficial Aspects of Food Processing.” *Molecular Nutrition & Food Research* 54, no. 9 (September 2010): 1215–47. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900608>.

Van Der Vorst, Jack G.A.J., Stephan J. Van Dijk, and Adrie J.M. Beulens. “Supply Chain Design in the Food Industry.” *The International Journal of Logistics Management* 12, no. 2 (July 1, 2001): 73–86. <https://doi.org/10.1108/09574090110806307>.

Varela, Manuel F., Jerusha Stephen, Manjusha Lekshmi, Manisha Ojha, Nicholas Wenzel, Leslie M. Sanford, Alberto J. Hernandez, Ammini Parvathi, and Sanath H. Kumar. “Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents.” *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 10, no. 5 (May 17, 2021): 593. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050593>.

Vijayakrishnan, P., S. Arul Antony, and D. Velmurugan. “Structural Data of DNA Binding and Molecular Docking Studies of Dihydropyrimidinone Transition Metal Complexes.” *Data in Brief* 19 (August 2018): 817–25. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.04.040>.

Wróbel, Agnieszka, Karolina Arciszewska, Dawid Maliszewski, and Danuta Drozdowska. “Trimethoprim and Other Nonclassical Antifolates an Excellent Template for Searching Modifications of Dihydrofolate Reductase Enzyme Inhibitors.” *The Journal of Antibiotics* 73, no. 1 (January 2020): 5–27. <https://doi.org/10.1038/s41429-019-0240-6>.

Κρίση, Ευτυχία, and Eftychia Kritsi. “Υπολογιστικά εργαλεία για την αναζήτηση νέων βιοδραστικών ενώσεων σε επιλεγμένους πρωτεϊνικούς στόχους.” Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο (ΕΜΠ), Σχολή Χημικών Μηχανικών, Τομέας Χημικών Επιστημών, Εργαστήριο Οργανικής Χημείας, 2017. <https://doi.org/10.12681/eadd/40331>.