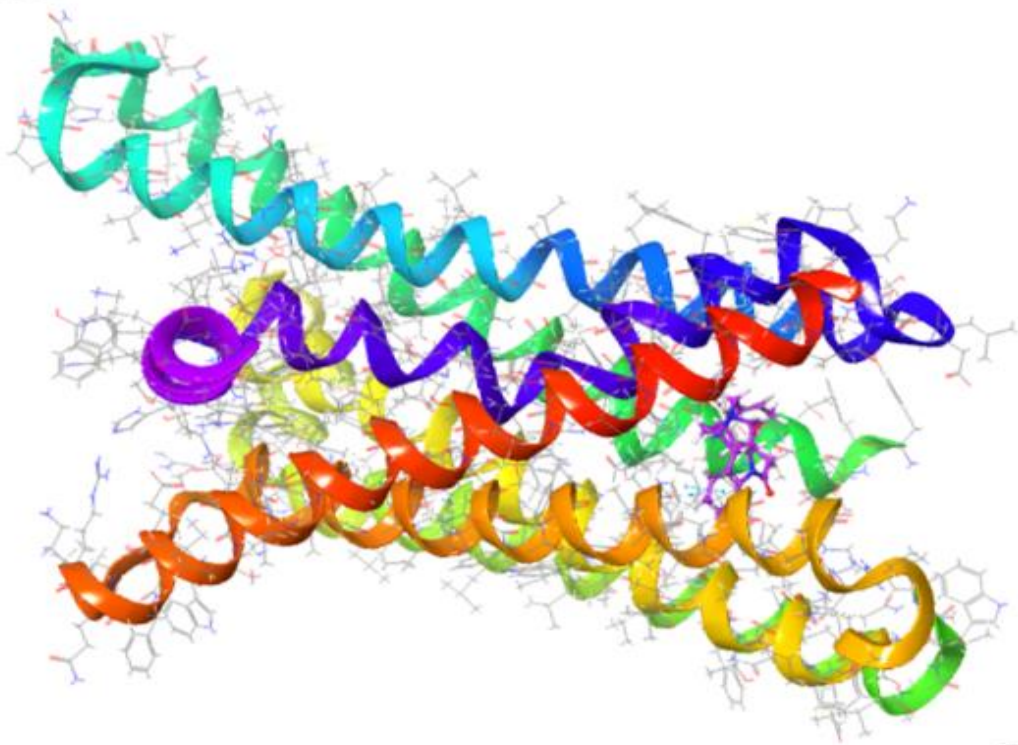




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«Εφαρμογή υπολογιστικών τεχνικών για την
πρόβλεψη νέων ενισχυτικών γεύσης από
εκχυλίσματα βασιλικού»**



Όνοματεπώνυμο: ΜΠΟΡΟΜΠΟΚΑ ANNA (Α.Μ: 20684066)

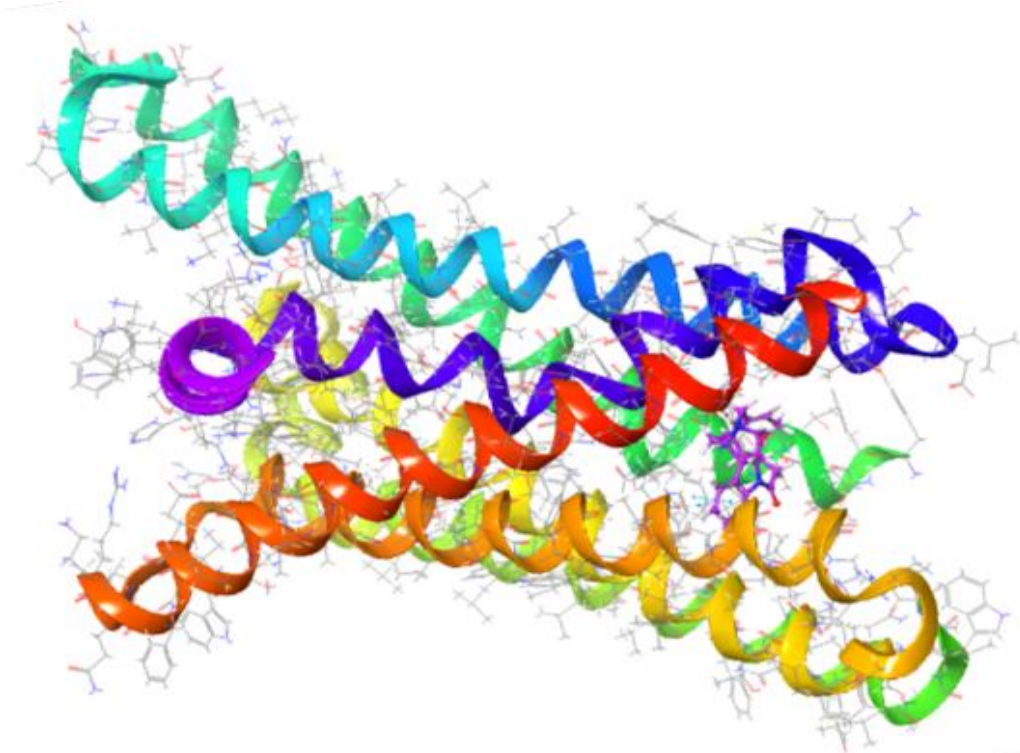
Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: ΚΡΙΤΣΗ ΕΥΤΥΧΙΑ

ΑΙΓΑΛΕΩ, 2024



UNIVERSITY OF WEST ATTICA SCHOOL
SCHOOL OF FOOD SCIENCE
DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
DIPLOMA THESIS

**«Application of computational techniques to
predict novel flavour enhancers from basil
extracts»**



Name of Student: BOROBOKA ANNA (A.M: 20684066)

Name of Supervisor : KRITSI EFTICHIA

AIGALEO, 2024



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**Εφαρμογή υπολογιστικών τεχνικών για την πρόβλεψη νέων ενισχυτικών
γεύσης από εκχυλίσματα βασιλικού»**

Μέλη Εξεταστικής Επιτροπής συμπεριλαμβανομένου και της Επιβλέπουσας

Η πτυχιακή εργασία εξετάστηκε επιτυχώς από την κάτωθι Εξεταστική Επιτροπή:

A/a	ΟΝΟΜΑ ΕΠΩΝΥΜΟ	ΒΑΘΜΙΔΑ/ΙΔΙΟΤΗΤΑ	ΨΗΦΙΑΚΗ ΥΠΟΓΡΑΦΗ
1	ΚΡΙΤΣΗ ΕΥΤΥΧΙΑ	ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ/ ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ	
2	ΣΙΝΑΝΟΓΛΟΥ ΒΑΣΙΛΕΙΑ	ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ /ΜΕΛΟΣ	
3	ΤΣΙΑΚΑ ΘΑΛΕΙΑ	ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ/ ΜΕΛΟΣ	


ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη Μπορομπόκα Άννα με αριθμό μητρώου 20684066, φοιτήτριες του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, δηλώνει 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
ΜΠΟΡΟΜΠΟΚΑ ANNA



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για τη διεκπεραίωση της παρούσας πτυχιακής εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου Ευτυχία Κρίτση, Επίκουρη Καθηγήτρια ΠΑΔΑ για την ανάθεση του θέματος, την αμέριστη υποστήριξη, την πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθεια που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής την κα. Σινάνογλου Βασιλεία, Καθηγήτρια ΠΑΔΑ και την κα. Τσιάκα Θάλεια, Επίκουρη Καθηγήτρια ΠΑΔΑ, για τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις τους και τη συμμετοχή τους ως μέλη της εξεταστικής επιτροπής της παρούσας εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με υποστήριξαν και με ενθάρρυναν κατά τη διάρκεια αυτής της διαδρομής, συμβάλλοντας με τον τρόπο τους στην επίτευξη αυτού του στόχου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανθρώπινη γεύση μπορεί να διακριθεί σε πέντε βασικές κατηγορίες: γλυκιά (sweet), πικρή (bitter), όξινη (sour), αλμυρή (salty), και umami. Αποτελεί ένα κρίσιμο χαρακτηριστικό στον ποιοτικό έλεγχο των τροφίμων και ποτών, καθορίζοντας την αποδοχή και την ικανοποίηση των καταναλωτών. Για τον λόγο αυτό, πολυάριθμες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην κατανόηση και τη βελτίωση των γευστικών ιδιοτήτων μέσω εφαρμογής της επιστημονικής έρευνας και της τεχνολογικής καινοτομίας. Στο πλαίσιο αυτό, αν και τα παραπροϊόντα απόσταξης του βασιλικού (*Ocimum basilicum L.*) ενδέχεται να παρουσιάζουν σημαντικές οικονομικές και περιβαλλοντικές προκλήσεις, προσφέρουν επίσης σημαντικές ευκαιρίες για τη βιομηχανία τροφίμων, συμβάλλοντας στην ανάπτυξη νέων γευστικών προφίλ και προϊόντων.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη και αξιολόγηση των γευστικών ιδιοτήτων του φαινολικού προφίλ του εκχυλίσματος βασιλικού, μέσω της εφαρμογής *in silico* τεχνικών. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα Μοριακής Πρόσδεσης (Molecular Docking) και χρησιμοποιήθηκαν υπολογιστικά εργαλεία πρόβλεψης της γεύσης (Virtual MultiTaste και BitterX). Από τα 50 φυτοχημικά συστατικά (κυρίως φαινολικά οξέα, σαλβιανολικά οξέα και φλαβονοειδή) που ταυτοποιήθηκαν με χρήση υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας (LC-MS), τα περισσότερα παρουσίασαν υψηλή πιθανότητα να διαθέτουν πικρή γεύση. Επομένως, η παρούσα εργασία εστίασε ιδιαίτερα στον ανθρώπινο πικρό υποδοχέα TAS2R46 (ή hTAS2R46). Τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης έδειξαν ότι μόνο 8 ενώσεις (Salvianolic acid F, Salvianolic acid A, Isoquercetin, Lithospermic acid A, Sagerinic acid, Salvianolic acid C, Caffeoylferuloyltartaric acid, Rosmarinic acid) παρουσίασαν ικανοποιητικό επίπεδο συγγένειας πρόσδεσης στον πικρό υποδοχέα TAS2R46 σε σύγκριση με τον γνωστό αγωνιστή στρυχνίνη. Αυτό το αποτέλεσμα και η επακόλουθη πικρία αποδόθηκαν στις αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα Glu265 και Thr180 μέσω άμεσων δεσμών υδρογόνου ή/και με το αμινοξύ Trp88 μέσω ανάπτυξης π-π δεσμού. Επιπλέον, τα αποτελέσματα πρόβλεψης του εργαλείου BitterX (> 50% πιθανότητα πρόσδεσης στον υποδοχέα hTAS2R46) επιβεβαίωσαν την αποτελεσματικότητα της *in silico* μεθόδου.

Ως εκ τούτου, τα τρέχοντα ευρήματα προσφέρουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τα γευστικά χαρακτηριστικά των παραπροϊόντων του βασιλικού, γεγονός που θα συμβάλει στην ανάπτυξη πιο φιλικών προς το περιβάλλον και καινοτόμων εφαρμογών για τα υπολείμματα αρωματικών βοτάνων.

Λέξεις - Κλειδιά: βασιλικός (*Ocimum Basilicum*), φαινολικές ενώσεις, μηχανισμοί γεύσης, πικρή γεύση, ανθρώπινος υποδοχέας πικρής γεύσης TAS2R46, μοριακή πρόσδεση, υπολογιστικά εργαλεία πρόβλεψης της γεύσης

ABSTRACT

Human taste can be divided into five basic categories: sweet, bitter, sour, salty, and umami. It is a critical attribute in the quality control of food and beverages, determining consumer acceptance and satisfaction. For this reason, numerous studies have focused on understanding and improving taste properties through scientific research and technological innovation. In this context, although the by-products of basil (*Ocimum basilicum* L.) distillation may present significant economic and environmental challenges, they also offer important opportunities for the food industry, contributing to the development of new taste profiles and products.

In this thesis, the study and evaluation of the flavor properties of the phenolic profile of basil extract were carried out by applying commercially available *in silico* techniques. In particular, Molecular Docking experiments were performed, and flavor prediction computer tools (Virtual MultiTaste and BitterX) were used. Out of 50 phytochemicals (mainly phenolic acids, salicylic acids, and flavonoids) identified using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), most of them showed that they were very likely to have a bitter taste. Therefore, the present work focuses particularly on the human bitter TAS2R46 (or *hTAS2R46*) receptor. Molecular docking studies showed that only 8 compounds (Salvianolic acid F, Salvianolic acid A, Isoquercetin, Lithospermic acid A, Sagerinic acid, Salvianolic acid C, Caffeoylferuloyltartaric acid, and Rosmarinic acid) showed a higher level of binding affinity to the TAS2R46 bitter receptor compared to its known agonist, strychnine. This result and the subsequent bitterness were attributed to interactions with Glu265 and Thr180 amino acids via direct hydrogen bonds and/or with Trp88 via π - π bonding. Furthermore, the prediction results of the BitterX tool (>50% probability of binding to the *hTAS2R46* receptor) confirmed the efficacy of the *in silico* method.

Therefore, the current findings provide valuable information on the taste characteristics of basil by-products, which will contribute to the development of more environmentally friendly and innovative applications for aromatic herb residues.

Keywords: basil (*Ocimum Basilicum*), phenolic compounds, taste mechanisms, bitter taste, human bitter taste receptor TAS2R46, molecular docking, computational taste prediction tools

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	13
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο : Φυτοχημικό προφίλ του είδους <i>Ocimum basilicum</i>	14
1.1 Εισαγωγή.....	14
1.2 Το είδος <i>Ocimum basilicum</i>	16
1.3 Χημική σύσταση του είδους <i>Ocimum basilicum</i>	17
1.4 Βιολογικές δράσεις του είδους <i>Ocimum basilicum</i>	17
1.4.1 Αντιμικροβιακή δράση.....	17
1.4.2 Αντιοξειδωτική δράση.....	18
1.4.3 Αντιφλεγμονώδης δράση.....	19
1.5 Γευστική Ποικιλία του Βασιλικού: Εξετάζοντας την Πικρή Γεύση	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο : Γεύση, Ενισχυτικά Γεύσης και Υποδοχείς Γεύσης	21
2.1 Αίσθηση της γεύσης.....	21
2.2 Το αισθητήριο όργανο της γεύσης	21
2.3 Υποδοχείς γεύσης.....	22
2.3.1 Υποδοχείς της πικρής γεύσης.....	22
2.3.2 Υποδοχείς της γλυκιάς γεύσης	23
2.3.3 Υποδοχείς umami γεύσης.....	24
2.3.4 Υποδοχείς της αλμυρής γεύσης.....	25
2.3.5 Υποδοχείς της όξινης γεύσης	26
2.4 Μοριακοί μηχανισμοί μεταγωγής σήματος της πικρής, γλυκιάς, και umami γεύσης	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: Εφαρμογή υπολογιστικών τεχνικών για την εύρεση ενισχυτικών γεύσης	29
3.1 Βάσεις δεδομένων και υπολογιστικά εργαλεία πρόβλεψης της γεύσης.....	29
3.2 Μοριακή πρόσδεση (Molecular Docking)	34
3.2.1 Εισαγωγή.....	34
3.2.2 Διάγραμμα ροής Μοριακής Πρόσδεσης.....	35
3.2.3 Προετοιμασία Προσδετών.....	36
3.2.4 Προετοιμασία Πρωτεΐνης.....	37
3.2.5 Επεξεργασία και αξιολόγηση αποτελεσμάτων.....	37
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	39

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4° : Δημιουργία βιβλιοθήκης ενώσεων	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5° : <i>In silico</i> τεχνικές.....	48
5.1 Χρήση του διαδικτυακού εργαλείου Virtuous MultiTaste για την πρόβλεψη γεύσης των ενώσεων που περιέχονται σε εκχυλίσματα βασιλικού.....	48
5.2 Προετοιμασία για την διεξαγωγή πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης	53
5.2.1 Προετοιμασία προσδετών	53
5.2.2 Επιλογή του κατάλληλου υποδοχέα - Προετοιμασία ανθρώπινου υποδοχέα	53
5.3 Επικύρωση της διαδικασίας της Μοριακής Πρόσδεσης	55
5.4 Αποτίμηση αποτελεσμάτων Μοριακής Πρόσδεσης.....	57
5.5 Αποτελέσματα πλατφόρμας BitterX	67
5.6 Σύνοψη	67
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6° : Γενικά συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι.....	70
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<i>Σχήμα 1.1:</i> Παραδείγματα επιλεγμένων ενώσεων που περιέχονται σε αρωματικά φυτά.....	14
<i>Σχήμα 1.2:</i> Χρήσεις και δράσεις των αρωματικών φυτών.....	15
<i>Σχήμα 1.3:</i> Απεικόνιση μονοτερπενίων του αιθέριου ελαίου του βασιλικού.....	19
<i>Σχήμα 2.1:</i> Μηχανισμός δράσης των υποδοχέων πικρής, γλυκιάς και umami γεύσης.....	28
<i>Σχήμα 3.1 :</i> Απεικόνιση αποτελεσμάτων ενός παραδείγματος ένωσης (Denatonium) με χρήση του εργαλείου VirtualTaste.....	32
<i>Σχήμα 3.2:</i> Η διαδικτυακή πλατφόρμα και τα αποτελέσματα του εργαλείου BitterX.....	33
<i>Σχήμα 3.3:</i> VirtuousMultiTaste: Υπολογιστικό εργαλείο πρόβλεψης της γεύσης.....	34
<i>Σχήμα 3.4:</i> Διάγραμμα ροής Μοριακής Πρόσδεσης.....	36
<i>Σχήμα 4.1:</i> Περιεχόμενες ενώσεις εκχυλίσματος <i>O. Bacilicum</i> (1)	45
<i>Σχήμα 4.2:</i> Περιεχόμενες ενώσεις εκχυλίσματος <i>O. Bacilicum</i> (2).....	46
<i>Σχήμα 4.3:</i> Περιεχόμενες ενώσεις εκχυλίσματος <i>O. Bacilicum</i> (3).....	47
<i>Σχήμα 5.1 :</i> Παράδειγμα απεικόνισης μετά την εφαρμογή αποτελεσμάτων του εργαλείου Virtual MultiTaste	48
<i>Σχήμα 5.2:</i> (Αριστερά) Τριδιάστατη απεικόνιση του ανθρώπινου υποδοχέα TAS2R46 (PDB: 7XP6) συμπλοκοποιημένου με το μόριο της στρυχνίνης, (Δεξιά) Τριδιάστατη απεικόνιση της στρυχνίνης	54
<i>Σχήμα 5.3:</i> Τριδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης του συμπλοκοποιημένου μορίου στρυχνίνης στη θέση πρόσδεσης του πικρού υποδοχέα hTAS2R46 (PDB ID: 7XP6).....	55
<i>Σχήμα 5.4:</i> Υπέρθηση των δύο διαμορφώσεων της στρυχνίνης έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου SP. Η δομή κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας της στρυχνίνης απεικονίζεται με μπλε χρώμα, ενώ η διαμόρφωση της στρυχνίνης που προέκυψε μετά την εφαρμογή του αλγορίθμου SP απεικονίζεται με πράσινο χρώμα.....	56
<i>Σχήμα 5.5:</i> Υπέρθηση των δύο διαμορφώσεων της στρυχνίνης έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου XP. Η δομή κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας της στρυχνίνης απεικονίζεται με μπλε χρώμα, ενώ η διαμόρφωση της στρυχνίνης που προέκυψε μετά την εφαρμογή του αλγορίθμου XP απεικονίζεται με πράσινο χρώμα.	56
<i>Σχήμα 5.6:</i> Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Salvianolic acid F με τον υποδοχέα hTAS2R46: τριδιάστατη (πάνω) και διδιάστατη (κάτω).....	59
<i>Σχήμα 5.7:</i> (Πάνω) Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Salvianolic acid A με τον υποδοχέα hTAS2R46: τριδιάστατη (πάνω) και διδιάστατη (κάτω).....	60

<i>Σχήμα 5.8:</i> Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Isoquercetin με τον υποδοχέα hTAS2R46: τριδιάστατη (πάνω) και διδιάστατη (κάτω).....	61
<i>Σχήμα 5.9:</i> Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Lithospermic acid A με τον υποδοχέα hTAS2R46: τριδιάστατη (πάνω) και διδιάστατη (κάτω).....	62
<i>Σχήμα 5.10:</i> Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Sagerinic acid με τον υποδοχέα hTAS2R46: τριδιάστατη (πάνω) και διδιάστατη (κάτω).	63
<i>Σχήμα 5.11:</i> Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Salvianolic acid C με τον υποδοχέα hTAS2R46: τριδιάστατη (πάνω) και διδιάστατη (κάτω).....	64
<i>Σχήμα 5.12:</i> Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Caffeoylferuloyltartaric acid (cichoric acid methyl ether) με τον υποδοχέα hTAS2R46: τριδιάστατη (πάνω) και διδιάστατη (κάτω).....	65
<i>Σχήμα 5.13:</i> Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Rosmarinic acid με τον υποδοχέα hTAS2R46: τριδιάστατη (πάνω) και διδιάστατη (κάτω).....	66

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

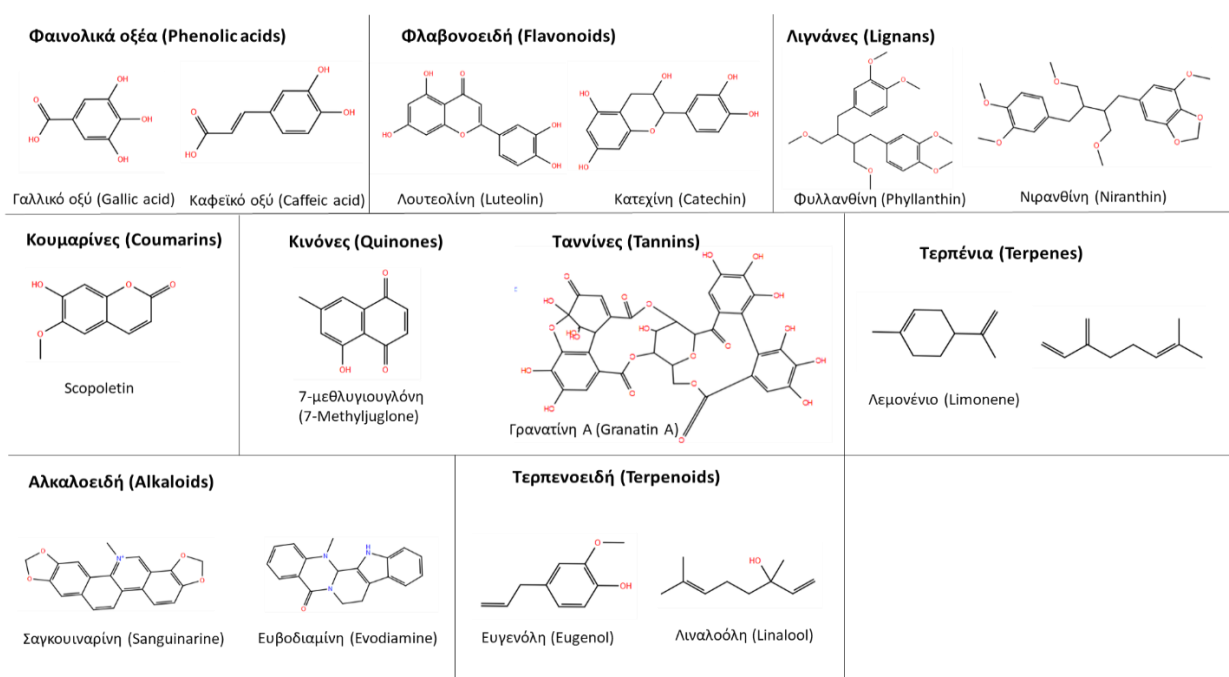
<i>Πίνακας 3.1:</i> Σύνοψη των κύριων βάσεων δεδομένων γεύσεις με συνδέσμους (links), τη χαρακτηριστική γεύση, το σχετικό αριθμό μορίων και τη δυνατότητα λήψης δεδομένων	29
<i>Πίνακας 3.2:</i> Σύνοψη των κύριων βάσεων δεδομένων γεύσεις με συνδέσμους (links), τη χαρακτηριστική γεύση, το σχετικό αριθμό μορίων και τη δυνατότητα λήψης δεδομένων.....	30
<i>Πίνακας 3.3:</i> Σύνδεσμοι εργαλείων πρόβλεψης της γεύσης.....	31
<i>Πίνακας 4.1:</i> Αρχεία Smiles των 50 εξεταζόμενων ενώσεων	40
<i>Πίνακας 5.1:</i> Αποτελέσματα εργαλείου Virtuous Multitaste. Ποσοστό πιθανότητας εμφάνισης πικρής, γλυκιάς, umami ή άλλης (όξινης ή αλμυρής) γεύσης των εξεταζόμενων ενώσεων.....	48
<i>Πίνακας 5.2:</i> Σχηματιζόμενοι δεσμοί μεταξύ του αγωνιστή στρυχνίνη (strychnine) και του πικρού υποδοχέα hTAS2R46.....	54
<i>Πίνακας 5.3:</i> Αποτελέσματα ενέργειας πρόσδεσης (Glide-score) της στρυχνίνης, έπειτα από την εφαρμογή αλγορίθμου SP και XP.....	56
<i>Πίνακας 5.4:</i> Τιμές ενέργειας πρόσδεσης (Glide – score) των ενώσεων που εμφάνισαν μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης σε σύγκριση με τη στρυχνίνη, μετά την εφαρμογή του αλγορίθμου Glide SP.....	57
<i>Πίνακας 5.5:</i> Αποτελέσματα πρόβλεψης της πιθανότητας (%) πρόσδεσης των 8 επιλεγμένων ενώσεων στον ανθρώπινο υποδοχέα hTAS2R46 έπειτα από την εφαρμογή του εργαλείου BitterX.	67
<i>Πίνακας 5.6:</i> Πρόβλεψη πικρής γεύσης και πιθανότητα (%) πρόσδεσης των 8 επιλεγμένων ενώσεων στον υποδοχέα hTAS2R46 , μέσω εφαρμογής των εργαλείων Virtuous Multitaste και BitterX, αντίστοιχα.....	67
<i>Πίνακας 5.7:</i> Ανίχνευση των ενώσεων protocatechuic, p-coumaric, p-hydroxybenzoic, gallic, ferulic και caffeic acids σε άλλους πικρούς υποδοχείς της οικογένειας hTAS2R με χρήση του εργαλείου BitterX.....	69

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο : Φυτοχημικό προφίλ του είδους *Ocimum basilicum*

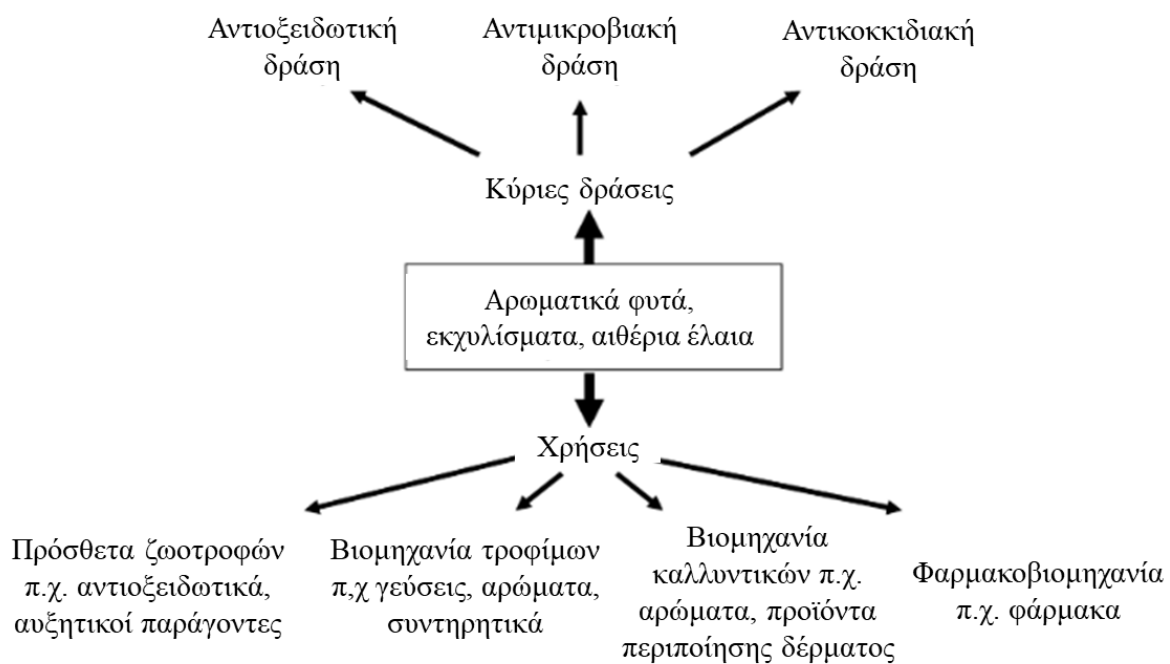
1.1 Εισαγωγή

Τα αρωματικά φυτά αποτελούν μία ομάδα του φυτικού βασιλείου που διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα φυτά λόγω της περιεκτικότητας τους σε αιθέρια έλαια. Τα έλαια αυτά είναι γνωστό ότι διαθέτουν και φαρμακευτικές ιδιότητες. Στον κόσμο των φυτών, έχουν προσδιοριστεί περίπου 350.000 διαφορετικά είδη, εκ των οποίων τα 18.000 έχουν χαρακτηριστεί αρωματικά. Από το 5000 π.Χ., η Μέση Ανατολή χρησιμοποιεί τα αρωματικά φυτά, γνωστά και ως βότανα και μπαχαρικά, για την ικανότητα τους να διατηρούν και να ενισχύουν το άρωμα και τη γεύση των τροφίμων (Christaki et al., 2012). Τα πιο γνωστά από αυτά, όπως η ρίγανη, το δεντρολίβανο, το φασκόμηλο, ο βασιλικός, ο γλυκάνισος κ.λπ., κατάγονται από την περιοχή της Μεσογείου και αποτελούνται από χημικές ουσίες όπως φαινολικά οξέα (phenolic acids), φλαβονοειδή (flavonoids), ταννίνες (tannins), λιγνάνες (lignans), κουμαρίνες (coumarins), κινόνες (quinones), τερπένια (terpenes), τερπενοειδή (terpenoids), αλκαλοειδή (alkaloids) και πολυπεπτίδια (polypeptides), ορισμένες από τις οποίες είναι υπεύθυνες για πλήθος δράσεων που σχετίζονται με την ανθρώπινη υγεία (αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντικαρκινική δράση κ.α.) (Solomou et al., 2016; Masyita et al., 2022; Kisiriko et al., 2021). Στο Σχήμα 1.1 απεικονίζονται παραδείγματα ενώσεων, που έχουν απομονωθεί από αρωματικά φυτά.



Σχήμα 1.1: Παραδείγματα επιλεγμένων ενώσεων που περιέχονται σε αρωματικά φυτά

Σήμερα, τα αρωματικά φυτά γνωρίζουν αυξανόμενη απήχηση στις βιομηχανίες τροφίμων. Οι ευεργετικές τους ιδιότητες για την ανθρώπινη υγεία, καθώς και η χρήση τους ως φυσικά ενισχυτικά γεύσης, συμβάλλουν σημαντικά σε αυτήν την τάση (Burt, 2004). Σύμφωνα με στατιστικά δεδομένα, το 50% των φυτών χρησιμοποιείται στον τομέα των τροφίμων, το 25% στη βιομηχανία καλλυντικών, το 20% προορίζεται για φαρμακευτική χρήση και το υπόλοιπο 5% διατίθεται σε άλλες εφαρμογές (Σχήμα 1.2) (Μυλωνάς, 2021). Ως απάντηση στην αυξανόμενη ζήτηση για ελάχιστα επεξεργασμένα και με υψηλότερη θρεπτική αξία τρόφιμα, έχει σημειωθεί μία αξιοσημείωτη άνοδος στην αναζήτηση φυσικών ουσιών που θα αντικαταστήσουν τα δυνητικά επιβλαβή τεχνητά πρόσθετα τροφίμων. Επιπρόσθετα, η βιομηχανία τροφίμων έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στην αξιοποίηση των αρωματικών φυτών ως φυσικά συντηρητικά για τη παράταση και βελτίωση της διάρκειας ζωής των προϊόντων. Η ολοένα αυξανόμενη στροφή προς τα αρωματικά φυτά αποδεικνύει τη σημαντική τους θέση στη σύγχρονη βιομηχανία τροφίμων, προσφέροντας ασφαλείς και φυσικές λύσεις για την ικανοποίηση των απαιτήσεων των καταναλωτών για υγιεινότερα και ποιοτικότερα προϊόντα (Dikme, 2023).



Σχήμα 1.2: Χρήσεις και δράσεις των αρωματικών φυτών.

1.2 Το είδος *Ocimum basilicum*

Το γένος *Ocimum* ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae*, τάξη *Lamiales* και περιλαμβάνει πολλά είδη που έχουν χρησιμοποιηθεί από την αρχαιότητα για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών, με ιδιαίτερη μνεία στο είδος *Ocimum basilicum* (Purushothaman, 2018). Στην επιστήμη της φαρμακευτικής είναι γνωστό με την ονομασία *Herba basilici*.



Ο βασιλικός είναι ευρέως γνωστός για την χρήση του τόσο για γαστρονομικούς

Εικόνα 1: Το είδος *Ocimum Basilicum*. Πηγή: <https://plants.ces.ncsu.edu/plants/ocimum-basilicum/>

όσο και αρωματικούς σκοπούς. Επιπλέον, οι άνθρωποι του Batak Karo στην Ινδονησιακή πολιτεία της Βόρειας Σουμάτρας το χρησιμοποιούν για τη θεραπεία του ρευματισμού, της υψηλής χοληστερόλης, της υπέρτασης, των πονοκεφάλων και εγκεφαλικών επεισοδίων. Είναι εγγενής σε τροπικές περιοχές από την Κεντρική Αφρική έως τη Νοτιοανατολική Ασία (Azizah, 2023).

Ο *Ocimum basilicum* είναι ένα ετήσιο βότανο με πυκνό φύλλωμα και ποικιλία αρωματικών συστατικών. Έχει την ικανότητα να ευδοκιμεί σε περιοχές με εύκρατο κλίμα, με θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 7 έως 27 °C, ετήσια βροχόπτωση από 0,6 έως 4,3 m και pH του εδάφους από 4,3 έως 8,2 (Azizah, 2023). Οι ποικιλίες του βασιλικού διαφέρουν σε χαρακτηριστικά όπως το χρώμα των φύλλων και των άνθων, το σχήμα των φύλλων και το άρωμα. Σύμφωνα με μελέτες, υπάρχουν έξι διακριτές μορφολογίες του φυτού (Shahrajabian et al., 2020):

- Πλατύφυλλος (*Ocimum basilicum* var. *Genovese*) που φέρει μεγάλο και πλατύ φύλλωμα.
- Τύποι νάνων “Minimum dwarf” ή “Dwarf bush”, πράσινη καλλιέργεια με χαμηλό και στενό φύλλο.
- Μικροί θάμνοι, όπως ο σγουρός “Greek basil” (*Ocimum basilicum* var. *Minimum*), με θαμνώδες φύλλωμα.
- Βασιλικός με φύλλα μαρουλιού “Lettuce-leaf basil” (*Ocimum basilicum* var. *Crispum*).
- Μωβ βασιλικός (*Ocimum basilicum* var. *Purpurascens*) που διαθέτει ερυθροϊώδη φύλλα.
- Συμπαγείς και σφαιροειδείς ποικιλίες “Compact bush basil”.

1.3 Χημική σύσταση του είδους *Ocimum basilicum*

Ερευνητικές μελέτες έχουν διεξαχθεί για τον προσδιορισμό της φυτοχημικής σύστασης του *Ocimum basilicum*. Τα βιοχημικά συστατικά των φαρμακευτικών φυτών μπορούν να επηρεαστούν από παράγοντες όπως το είδος, η ποικιλία, ο γονότυπος, η περίοδος και η περιοχή καλλιέργειας, καθώς και από τις συνθήκες ανάπτυξης. Η χημική σύσταση του βασιλικού περιλαμβάνει κατά μέσο όρο τα ακόλουθα: 92,1% νερό και βασικά θρεπτικά συστατικά, όπως πρωτεΐνες (3,15%), υδατάνθρακες (2,65%), εκ των οποίων το 0,3% αποτελεί τα διαλυτά σάκχαρα, το 1,6% αποτελεί τις φυτικές ίνες, το 0,75% είναι άλλοι υδατάνθρακες, ολικά λιπίδια (0,64%) και τέφρα (1,49%) (Tolay, 2021).

Ο βασιλικός περιέχει σημαντικές ποσότητες πολυφαινολών, όπως φαινολικά οξέα (π.χ. ροσμαρινικό (rosmarinic acid), βανιλικό (vanillic acid), κικορικό (cichoric acid), καφεϊκό (caffeic acid), καφταρικό οξύ (caftaric acid) και (π.χ. κερσετίνη (quercetin), απιγενίνη (apigenin) και οι γλυκοσίδες (glycosides) τους) (Yaldiz & Camlica, 2022). Η κύρια σύνθεση λιπαρών οξέων του *O. Basilicum* είναι το στεατικό οξύ (stearic acid), το ελαϊκό οξύ (oleic acid), το παλμιτικό οξύ (palmitic acid), το λινελαϊκό οξύ (linoleic acid), το μυριστικό οξύ (myristic acid), το α-λινολενικό οξύ (α-linolenic acid), το καρπικό οξύ (carpic acid), το λαυρικό οξύ (lauric acid) και το αραχιδονικό οξύ (arachidonic acid) (Shahrajabian et al., 2020). Το βότανο περιέχει σε ποσοστό 0,04%–1,5% αιθέριο έλαιο, με κυρίαρχα συστατικά το μονοτερπενοειδές λιναλοόλη (linalool), τη μεθυλοχαβικόλη (methyl chavicol), την ευγενόλη (eugenol) και τον κινναμικό μεθυλεστέρα (methyl cinnamate). (Yaldiz & Camlica, 2022).

1.4 Βιολογικές δράσεις του είδους *Ocimum basilicum*

1.4.1 Αντιμικροβιακή δράση

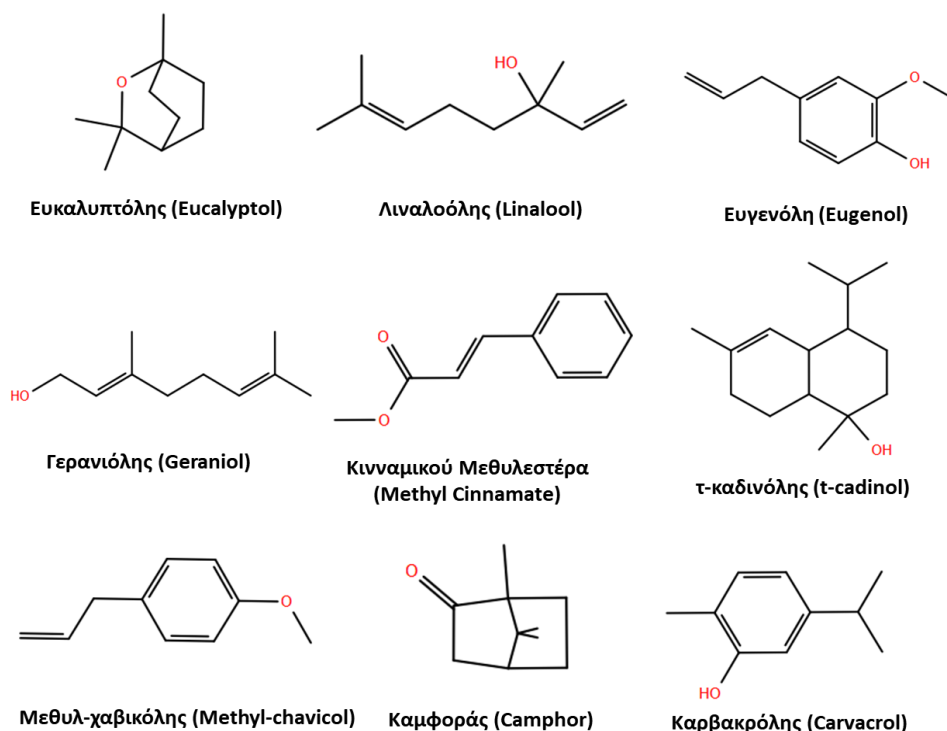
Η κατάχρηση και ο κακός χειρισμός αντιμικροβιακών έχουν οδηγήσει σε αύξηση των βακτηρίων που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά, τα οποία πλέον δεν μπορούν να αντιμετωπιστούν με τα σημερινά αντιμικροβιακά λόγω της κλιμάκωσης της μικροβιακής αντοχής. Το γεγονός αυτό έχει στρέψει το ενδιαφέρον των ερευνητών στα φαρμακευτικά φυτά (Eid et al, 2023). Το *Ocimum basilicum* περιλαμβάνει πλήθος φαινολικών ενώσεων, οι οποίες παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι σε ένα ευρύ φάσμα βακτηρίων. Χαρακτηριστικές ενώσεις είναι ευγενόλη (eugenol), η μεθυλική ευγενόλη (methyl eugenol), το βενζοϊκό οξύ (benzoic acid), το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ (4-hydroxybenzoic acid), το σαλικυλικό οξύ (salicylic acid) και η φαινόλη (phenol). Οι φαινολικές ενώσεις επιδρούν με διαφορετικό τρόπο στους μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της τροποποίησης της διαπερατότητας

των μικροβιακών κυτταρικών μεμβρανών με τη συσσώρευση υδρόφοβων ομάδων στη διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων, με αποτέλεσμα τη διαρροή ενδοκυτταρικών συστατικών και, τελικά, την πρόκληση κυτταρικού θανάτου. Το εκχύλισμα *Ocimum Basilicum* περιέχει επίσης τερπενοειδή, συμπεριλαμβανομένης της φυτόλης (phytol), λουπεόλης (lupeol), β – αμυρίνης (beta-amyrin), τα οποία προκαλούν καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών. Επιπλέον, η αντιβακτηριακή δράση του εξεταζόμενου εκχυλίσματος συνδέεται με την παρουσία τόσο κορεσμένων όσο και ακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία εμποδίζουν την ανάπτυξη αρνητικών (-) και θετικών (+) κατά Gram βακτηρίων (Zhakirbekov, 2024). Συγκεκριμένα, *in vitro* έρευνα των Sulistiyawati et al. (2023) ανέφερε ότι τα μεθανολικά εκχυλίσματα του βασιλικού έδειξαν αξιοσημείωτη αντιβακτηριακή δράση τόσο κατά Gram-θετικών βακτηρίων, όπως του *Bacillus cereus* και του *Staphylococcus aureus*, όσο και σε Gram-αρνητικά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων της *Escherichia coli* και της *Salmonella typhimurium*. Η μελέτη αποκάλυψε ότι τα εκχυλίσματα ήταν πιο αποτελεσματικά έναντι των Gram-θετικών στελεχών, αναδεικνύοντας την ικανότητα του *Ocimum basilicum* ως φυσικού αντιβακτηριακού παράγοντα στο πλαίσιο της ασφάλειας και της συντήρησης των τροφίμων (Sulistiyawati et al., 2023).

1.4.2 Αντιοξειδωτική δράση

Το έλαιο του *Ocimum Basilicum* παραλαμβάνεται από τα φύλλα και τα άνθη του φυτού και χρησιμοποιείται εκτενώς σε συστήματα επεξεργασίας τροφίμων ως αρωματικός παράγοντας και σε φαρμακευτικές βιομηχανίες για ιατρικούς σκοπούς. Η σύνθεση του αιθέριου ελαίου βασιλικού ποικίλει σημαντικά λόγω των εποχικών διακυμάνσεων, των διαφορετικών γεωγραφικών θέσεων και των φάσεων ανάπτυξης του φυτού. Το αιθέριο έλαιο του βασιλικού αποτελείται κυρίως από οξυγονωμένα και αρωματικά οξυγονωμένα μονοτερπένια, συμπεριλαμβανομένης της ευκαλυπτόλης (eucalyptol), της λιναλοόλης (linalool), της ευγενόλης (eugenol), της μεθυλ-χαβικόλης (methyl-chavicol), της γερανιόλης (geraniol), του κινναμικού μεθυλεστέρα (methyl cinnamate), της τ-καδινόλης (t-cadinol), της καμφοράς (camphor) και της καρβακρόλης (carvacrol) (Σχήμα 1.3). Μία πρόσφατη μελέτη επικεντρώθηκε στην περιεκτικότητα των αιθέριων ελαίων σε βιοδραστικά συστατικά και λιπαρά οξέα. Η μελέτη αυτή έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον των ερευνητών να διερευνήσουν τις δυνατότητές τους ως πρόσθετα τροφίμων και την ευελιξία τους σε βιομηχανικές χρήσεις. Για παράδειγμα, έχει εντοπιστεί ότι το αιθέριο έλαιο του βασιλικού προσφέρει αντιοξειδωτική δράση στο βόειο κρέας. (Nadeem, 2022). Επιπλέον, η περιεκτικότητα του *Ocimum Basilicum* σε δευτερογενείς μεταβολίτες, όπως οι τανίνες, οι φαινόλες, τα φλαβονοειδή, οι ανθοκυανίνες και τα στεροειδή,

συμβάλλει άμεσα στην αντιοξειδωτική τους δράση. Αυτοί οι μεταβολίτες είναι υπεύθυνοι για την εξουδετέρωση των αντιδράσεων ελεύθερων ριζών ή την απορρόφηση δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS), αποτρέποντας την πρόκληση βλάβης σε άλλα βιομόρια. Αυτά τα αντιοξειδωτικά συνεργούν με άλλα αντιοξειδωτικά που προέρχονται τόσο από φυσικές όσο και από συνθετικές πηγές. Η συνεργιστική τους δράση μπορεί να ενισχύσει το αντιοξειδωτικό δυναμικό και να μειώσει την ανάγκη για υψηλές δόσεις φαρμάκων, ελαχιστοποιώντας έτσι τις αρνητικές παρενέργειες που προκαλούνται από τις υψηλές δόσεις (Qamar, 2023).



Σχήμα 1.3: Απεικόνιση μονοτερπενίων του αιθέριου ελαίου του βασιλικού

1.4.3 Αντιφλεγμονώδης δράση

Η αντιφλεγμονώδης δράση του *Ocimum basilicum* αποδίδεται στα φυτοχημικά συστατικά του, συμπεριλαμβανομένων των φλαβονοειδών και των τανινών. Έχει αποδειχθεί ότι οι φαινολικές ουσίες καταστέλλουν τη σύνθεση προφλεγμονωδών μορίων κατά τη διάρκεια της φλεγμονής. Τα φλαβονοειδή αναστέλλουν τη δραστηριότητα πολλών μορίων που διεγείρουν τη φλεγμονή, συμπεριλαμβανομένης της κυκλοοξυγενάσης (Cyclooxygenase - COX), των κυτοκινών, του μεταγραφικού παράγοντα B (NF-κB - οικογένεια συμπλεγμάτων πρωτεΐνης μεταγραφικού παράγοντα που ελέγχει τη μεταγραφή του DNA) και των μεταλλοπρωτεϊνών μήτρας (Zhakirbekov, 2024).

1.5 Γευστική Ποικιλία του Βασιλικού: Εξετάζοντας την Πικρή Γεύση

Η γεύση του *Ocimum basilicum*, περιγράφεται συχνά ως πολύπλοκη και ποικιλόμορφη, περιλαμβάνοντας νότες γλυκιάς και αρωματικής φύσης. Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις ότι ορισμένες ποικιλίες μπορούν να αποδώσουν πικρές γεύσεις (Spence, 2024). Σύμφωνα με επιστημονικές μελέτες, ορισμένες φαινολικές ενώσεις και τανίνες που περιέχονται στον βασιλικό συμβάλουν στην πικρή γεύση του (Zhakirbekov, 2024). Επιπλέον, άλλες ενώσεις όπως οι κουμαρίνες και ορισμένοι γλυκοζίτες φλαβονοειδών, οι οποίες απελευθερώνουν πικρές γεύσεις κατά την υδρόλυση, ενδέχεται επίσης να συμβάλλουν στη συνολική γεύση του βασιλικού (Simon et al., 1990).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο : Γεύση, Ενισχυτικά Γεύσης και Υποδοχείς Γεύσης

2.1 Αίσθηση της γεύσης

Η γεύση είναι μία αισθητηριακή μέθοδος που περιλαμβάνει την αντίληψη χημικών ουσιών οι οποίες προέρχονται από τα τρόφιμα και διεγείρουν τα χημειοδεκτικά κύτταρα στους γευστικούς κάλυκες της στοματικής κοιλότητας (Breslin, 2013, Loper et al., 2015). Οι γευστικοί κάλυκες βρίσκονται στη γλώσσα, την υπερώα, τον φάρυγγα, την επιγλωττίδα και το λάρυγγα. Αν και πολλοί ισχυρίζονται ότι ο ανθρώπινος οργανισμός μπορεί να διακρίνει πολλές γευστικές ποιότητες, οι ερευνητές αποδέχονται τις τέσσερις βασικές κατηγορίες της γεύσης: αλμυρό, γλυκό, πικρό και ξινό. Εκτός από τις τέσσερις βασικές γεύσεις που είναι γνωστές από την αρχαιότητα, μία πέμπτη γεύση προστέθηκε στις αρχές του 20^{ου} αιώνα (1908) από τον Ιάπωνα Ikeda, ο οποίος την χαρακτήρισε ως “Umami” (Γρηγοράκης Κ., Τσακνής Ι., 2014). Η αλμυρή γεύση, προκαλείται κυρίως από την παρουσία ιόντων νατρίου (Na^+) ή/και αλάτων. Η umami γεύση αποδίδεται στην παρουσία πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων, ενώ η γλυκιά γεύση υποδηλώνει την παρουσία σακχάρων και γενικότερα διαλυτών υδατανθράκων σε επαρκή ποσότητα στην στοματική κοιλότητα. Η πικρή γεύση συχνά συνδέεται με την παρουσία τοξινών στο τρόφιμο, ενώ η όξινη γεύση είναι αναγκαία για την εκτίμηση της ωριμότητας των φρούτων, καθώς και για την ανίχνευση αλλοιωμένων τροφών (Prescott, 2014).

2.2 Το αισθητήριο όργανο της γεύσης

Η γλώσσα είναι το κύριο αισθητήριο όργανο της γεύσης, στην επιφάνεια της οποίας συναντώνται ενσωματωμένες μυκητοειδείς θηλές. Οι γευστικοί κάλυκες, που βρίσκονται στις θηλές, αποτελούνται από 30 έως 100 δίπολα νευροεπιθηλιακά κύτταρα γνωστά ως κύτταρα υποδοχέων γεύσης, μαζί με υποστηρικτικά κύτταρα. Τα γευστικά κύτταρα διακρίνονται σε τέσσερις τύπους: I, II, III και IV. Τα κύτταρα τύπου I, II και III εκφράζουν τους υποδοχείς γεύσης. Οι απολήξεις των γευστικών νευρικών ινών, που είναι υπεύθυνες για τη μετάδοση ηλεκτρικών ερεθισμάτων στον εγκέφαλο, βρίσκονται μεταξύ των γευστικών κυττάρων. Γευστικοί κάλυκες εντοπίζονται επίσης στη μαλακή υπερώα, στο λάρυγγα, στον φάρυγγα και στο ανώτερο τμήμα του οισοφάγου. Ο μέσος αριθμός γευστικών κάλυκων στη γλώσσα είναι 4.600. Τα γευστικά ερεθίσματα μεταφέρονται στο κεντρικό νευρικό σύστημα μέσω του προσωπικού, του γλωσσοφαρυγγικού και του πνευμονογαστρικού νεύρου (Παπανικολάου, 2016).

Τα κύτταρα τύπου I αποτελούν περίπου το ήμισυ του συνολικού αριθμού κυττάρων σε έναν γευστικό κάλυκα. Αυτά τα κύτταρα παράγουν ένζυμα και μεταφορείς για την απομάκρυνση νευροδιαβιβαστών από τα κύτταρα και διαθέτουν διαύλους ιόντων για την

ανακατανομή και εξισορρόπηση των κατιόντων K^+ . Περίπου το 1/3 των κυττάρων σε έναν γευστικό κάλυκα είναι τύπου II. Αυτά τα κύτταρα είναι μεγαλύτερα σε διάμετρο από τα κύτταρα τύπου I και λειτουργούν ως χημιοαισθητήρες για σάκχαρα, αμινοξέα και πικρές ουσίες, εκφράζοντας υποδοχείς γεύσης συζευγμένους με πρωτεΐνες G. Τα περισσότερα κύτταρα τύπου II εκφράζουν μία μόνο κατηγορία υποδοχέων γεύσης GPCR, είτε τον τύπο T1R είτε τον T2R. Τα γευστικά κύτταρα τύπου III είναι τα λιγότερο πολυάριθμα, αποτελώντας το 2-20% των κυττάρων σε μια γευστική θηλή, και η παρουσία τους ποικίλλει ανάλογα με την περιοχή του στοματικού επιθηλίου. Για παράδειγμα, οι γευστικές θηλές στο εμπρόσθιο μέρος της γλώσσας έχουν συνήθως ένα μόνο κύτταρο τύπου III, ενώ στο οπίσθιο μέρος της γλώσσας ενδέχεται να διαθέτουν έως 10. Αν και δεν διαθέτουν υποδοχείς γεύσης GPCR, έχουν την δυνατότητα να αντιλαμβάνονται την όξινη γεύση (Roper & Chaudhari, 2017).

2.3 Υποδοχείς γεύσης

Οι υποδοχείς γεύσης λειτουργούν ως χημειούποδοχείς που ανιχνεύουν και ανταποκρίνονται σε γευστικά ερεθίσματα, ή ως προσδέτες για τη μεταφορά σημάτων στον εγκέφαλο, με αποτέλεσμα την αντίληψη της γεύσης. Το νάτριο, καθώς και ορισμένες πικρές και γλυκές ουσίες, αποτελούν παραδείγματα γευστικών ερεθισμάτων που έχουν την ικανότητα να διαπερνούν την κυτταροπλασματική μεμβράνη των γευστικών κυττάρων. Αν και αρκετές πρωτεΐνες έχουν προταθεί ότι λειτουργούν ως γευστικοί υποδοχείς, αυτό δεν έχει αναγνωριστεί παγκοσμίως. Για να επιβεβαιωθεί ένας υποδοχέας γεύσης, πρέπει να ικανοποιηθούν αρκετές προϋποθέσεις: α) να διαπιστωθεί η μοριακή ταυτότητα του εν δυνάμει υποδοχέα, β) να επιβεβαιωθεί η έκφρασή του σε κύτταρα γευστικών υποδοχέων (TRCs), γ) να προσδιοριστούν οι κατάλληλοι προσδέτες και (δ) να αποδειχθεί ότι μεταβολές στον υποδοχέα γεύσης έχουν ως αποτέλεσμα και τροποποιήσεις στη γευστική λειτουργία. (Bachmanov et al., 2014)

2.3.1 Υποδοχείς της πικρής γεύσης

Η πικρή γεύση σηματοδοτεί την παρουσία τοξινών και τοξικών ουσιών στα τρόφιμα. Τα αλκαλοειδή (alkaloids), τα σουλφαμίδια (sulfonamides), η καφεΐνη (caffein) και η κινίνη (quinine) είναι ανάμεσα στις πιο πικρές ουσίες, οι οποίες είναι ανιχνεύσιμες σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (“Metabolomics of Taste,” n.d.). Μια κατηγορία 25 υποδοχέων πικρής γεύσης (TAS2Rs) μεσολαβεί στην αντίληψη της πικρής γεύσης στους ανθρώπους (Tan & Seetoh, 2022), καθένας από τις οποίους ανταποκρίνεται σε ένα ξεχωριστό σύνολο ενώσεων (Wooding et al., 2022). Οι TAS2Rs εκφράζονται σε γευστικά κύτταρα Τύπου II και ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων συζευγμένων με G-πρωτεΐνες (GPCRs). Αυτές οι πρωτεΐνες λειτουργούν ως

μοριακός διακόπτης μέσα στα κύτταρα και αποτελούνται από τρεις G- υπομονάδες (α -, β -, γ -) (Duc, Kim et al., 2015). Οι TAS2Rs εντοπίζονται όχι μόνο στη στοματική κοιλότητα αλλά και σε εξωστοματικούς ιστούς (Xu et al., 2022), οι οποίοι όταν διεγείρονται από συμβατές ενώσεις πυροδοτούν ένα μονοπάτι μεταγωγής, το οποίο περιγράφεται στην υποενότητα 2.4. (Descamps-Solà M. et al, 2023).

Το 2022, μία ερευνητική ομάδα με επικεφαλής τον καθηγητή Liu Zhi-Jie και τον Επίκουρο Καθηγητή Hua Tian του iHuman και του SLST στη ShanghaiTech πραγματοποίησε μια νέα ανακάλυψη στον τομέα των ανθρώπινων υποδοχέων πικρής γεύσης. Η ομάδα διεξήγαγε μια ολοκληρωμένη ανάλυση των δομών κρυογονικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας του ανθρώπινου υποδοχέα πικρής γεύσης TAS2R46. Εξέτασαν τον υποδοχέα σε δύο διαφορετικές μορφές: η μία δεσμευμένη στη στρυχνίνη και η άλλη στην αδέσμευτη (apo) κατάστασή της. Η στρυχνίνη είναι ένα τοξικό πικρό αλκαλοειδές που εξάγεται από τους σπόρους του *Strychnos nux-vomica*. Η έρευνα οδήγησε στην πρώτη τριδιάστατη απεικόνιση του ανθρώπινου υποδοχέα γεύσης (ShanghaiTech Team Makes Breakthroughs With Discoveries About Bitter Taste Receptors, n.d.).

2.3.2 Υποδοχείς της γλυκιάς γεύσης

Στις αρχές της δεκαετίας του 2000, ανακαλύφθηκε ότι η ανίχνευση της γλυκιάς γεύσης μεσολαβείται σε μεγάλο βαθμό από έναν μόνο υποδοχέα. Ο υποδοχέας γλυκιάς γεύσης είναι ετεροδιμερές σύμπλεγμα που συνδέεται με πρωτεΐνες G και αποτελείται από τις υπομονάδες T1R2 και T1R3, οι οποίες κωδικοποιούνται από τα γονίδια *TAS1R2* και *TAS1R3*, αντίστοιχα (Laffitte et al, 2014). Οι υπομονάδες T1R1, T1R2 και T1R3 ανήκουν στους GPCRs (G-protein coupled receptors), και συγκεκριμένα κατατάσσονται στην κατηγορία (class) C. Αυτή η κατηγορία περιλαμβάνει την οικογένεια των μεταβοτροπικών υποδοχέων γλουταμινικού (mGluRs), των υποδοχέων GABA (γ -νευροδιαβιβαστές αμινοβουτυρικού οξέος), υποδοχέων ασβεστίου Ca^{2+} (CaSR), υποδοχείς γεύσης (T1R) και φερομονών (V2R). Αυτοί οι υποδοχείς διαθέτουν δομικά μια εξωκυτταρική μονάδα που ονομάζεται Venus flytrap, VFTM, στην οποία δεσμεύονται οι αγωνιστές καθώς και μια διαμεμβρανική περιοχή με επτά έλικες (HD) η οποία είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης G. Οι περισσότεροι υποδοχείς, εξαιρουμένου του GABA, διαθέτουν και μία περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη μεταξύ των VFTM και TMD, γνωστή ως CRD (Cysteine-Rich Domain) (Cao, Huang et al., 2009). Ο υποδοχέας T1R2/T1R3 ανταποκρίνεται σε ένα ευρύ φάσμα χημικά διαφορετικών ενώσεων,

συμπεριλαμβανομένων φυσικών σακχάρων, μη θερμιδικών και τεχνητών γλυκαντικών, ορισμένων D-αμινοξέων και γλυκοπρωτεϊνών (π.χ. θαυματίνη (thaumatin), κουρκουλίνη (curculin)) (Lee A.A, Owyang C., 2017).

Παρότι οι υποδοχείς T1R είναι σχεδόν ταυτόσημοι σε πολλά είδη (οι άνθρωποι και τα ποντίκια παρουσιάζουν περίπου 70% ομοιότητα στην αλληλουχία των αμινοξέων), πολλές ερευνητικές μελέτες έχουν δείξει διαφορές στην αντίληψη της γλυκιάς γεύσης μεταξύ των δύο ειδών. Για παράδειγμα, τεχνητές γλυκαντικές ύλες, όπως, η νεοτάμη, η ασπαρτάμη, το κυκλαμικό οξύ και η νεοεπεριδίνη, καθώς και πρωτεΐνες γλυκιάς γεύσης, όπως η μπραζείνη, γίνονται αντιληπτές από τους ανθρώπους, αλλά όχι από τα τρωκτικά (Laffitte et al., 2014).

2.3.3 Υποδοχείς umami γεύσης

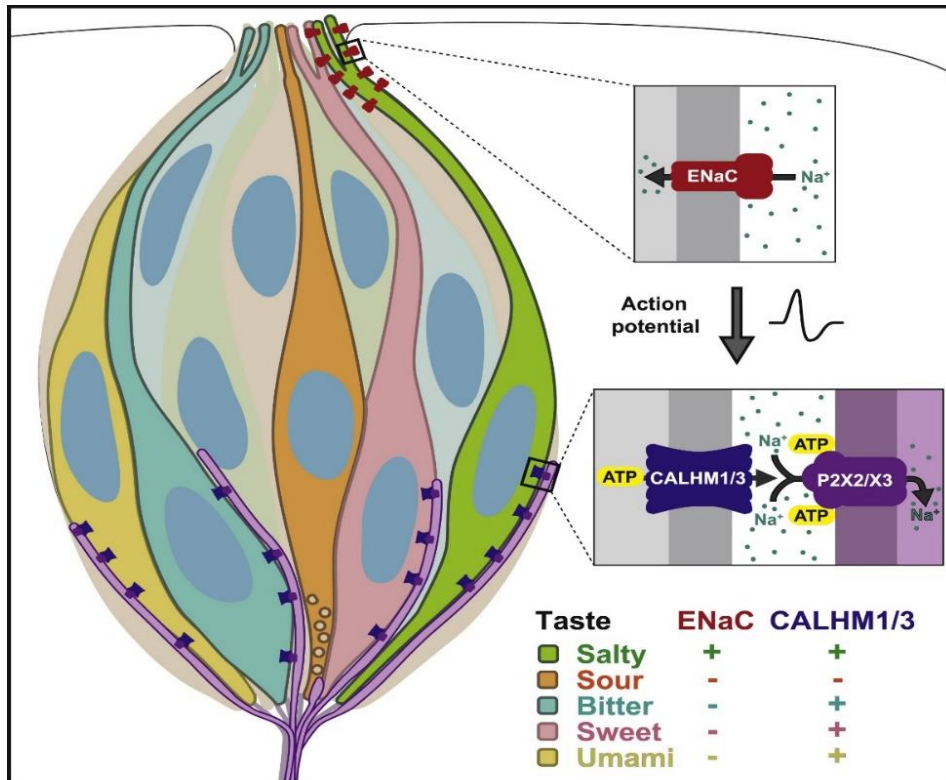
Το 1908, ο Ιάπωνας χημικός Kikunae Ikeda απομόνωσε το L- γλουταμινικό οξύ από αποξηραμένο konbu (αποξηραμένο φύκος), και το αναγνώρισε ως μία νέα γεύση γνωστή ως “umami”, από την ιαπωνική λέξη umai που σημαίνει νόστιμο. (Kinnamon S.C., 2009). Το γλουταμινικό μονοάτριο (MSG) είναι η κύρια χημική ουσία που είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της γεύσης umami στους ανθρώπους. Εμφανίζεται φυσικά σε ορισμένα τρόφιμα όπως το κρέας, τα λαχανικά, τα θαλασσινά και το τυρί. Οι ουσίες umami μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους και επίσης μπορούν να αλληλεπιδράσουν με άλλες γευστικές ουσίες με αποτέλεσμα μια συνεργιστική επίδραση ή μια επίδραση καταστολής στη συνολική αντίληψη της γεύσης. Τα ριβονουκλεοτίδια όπως η 5'-μονοφωσφορική ινοσίνη (IMP) και η 5'-μονοφωσφορική αδενοσίνη (AMP) φαίνεται να δρουν συνεργιστικά για την ενίσχυση της umami γεύσης του MSG (Wu et al, 2021). Μελέτη έδειξε ότι η ανάμειξη γλουταμινικού και 5'-μονοφωσφορικής ινοσίνης προσφέρει 7 φορές μεγαλύτερη ένταση umami σε σύγκριση με την ένταση μόνο του γλουταμινικού οξέος (Wang et al., 2020). Μέχρι σήμερα, έχουν εντοπιστεί διάφοροι υποδοχείς συζευγμένοι με πρωτεΐνες G (GPCRs) που είναι υπεύθυνοι για την αναγνώριση umami ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των T1R1/T1R3, τους μεταβοτροπικούς υποδοχείς γλουταμινικού mGluRs και CASR (calcium-sensing receptor). Μεταξύ αυτών, ο T1R1/T1R3 έχει αποδειχθεί ότι είναι ο κύριος υποδοχέας για την umami γεύση (Dong et al, 2023). Το ετεροδιμερές T1R1/T1R3 αποτελείται από μια κύρια εξωκυτταρική περιοχή, γνωστή ως Venus Flytrap Domain -VFD και μια επτά διαμεμβρανική περιοχή (Transmembrane Domains - TMD), οι οποίες συνδέονται με μια μικρή περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη (Cysteine-Rich Domain - CRD) (Zhang et al., 2022).

2.3.4 Υποδοχείς της αλμυρής γεύσης

Ο μοριακός μηχανισμός της αντίληψης της αλμυρής γεύσης, είναι αινιγματικός και έχει αποτελέσει αντικείμενο έντονης έρευνας. Ενώ η πικρή, η γλυκιά και η umami γεύση έχουν αποσαφηνιστεί μέσω της κλωνοποίησης των αντίστοιχων υποδοχέων με πρωτεΐνες G (GPCRs) και την ταυτοποίηση των οδών σηματοδότησης, η αλμυρή γεύση δεν έχει καταστεί πλήρως κατανοητή. Οι γευστικοί κάλυκες που νευρώνονται με την τυμπανική χορδή και τα γλωσσοφαρυγγικά νεύρα, χρησιμεύουν ως μέτρο της ενεργοποίησης των κυττάρων του υποδοχέα γεύσης. Πρώιμες μελέτες σε τρωκτικά αποκάλυψαν ότι η αμιλορίδη, ένα καλιοσυντηρητικό διουρητικό, ανέστειλε ένα μεγάλο ποσοστό της απόκρισης της τυμπανικής χορδής στο χλωριούχο νάτριο. Αυτό το εύρημα, τόνισε την παρουσία 2 μεταγωγικών οδών, την ευαίσθητη και τη μη ευαίσθητη σε αμιλορίδη, οι οποίες διαφέρουν ως προς την εκλεκτικότητα σε NaCl και την κυτταρική μεσολάβηση στους γευστικούς κάλυκες (η ευαίσθητη στην αμιλορίδη οδός περιορίζεται στο μπροστινό τμήμα της γλώσσας). Ο ευαίσθητος σε αμιλορίδη μηχανισμός υποδηλώνει μία σύνδεση μεταξύ του υποδοχέα αλμυρής γεύσης και του διαύλου ENaC (Epithelial sodium channel). Ο διάυλος ENaC είναι ένα ετερομερές που αποτελείται από τις ομόλογες υπομονάδες: α, β, γ. Ωστόσο, η κατανομή και η λειτουργική ποικιλομορφία των καναλιών ENaC εντός των γευστικών κυττάρων δεν είχαν αποσαφηνιστεί πλήρως μέχρι τις πρόσφατες μελέτες. (Liman et al, 2020)

Ταυτόχρονα τα κανάλια διαμορφωτή ομοιόστασης ασβεστίου (CALHM), συγκεκριμένα το CALHM1 και CALHM3, σχηματίζουν ένα κανάλι ιόντων μεγάλων πόρων με πύλη τάσης που ονομάζεται CALHM1/3 (Okui M. et al, 2021) και παίζει ουσιαστικό ρόλο στη μετάδοση σημάτων αλμυρής γεύσης. Αυτά τα κανάλια ανταποκρίνονται στην εκπόλωση της μεμβράνης απελευθερώνοντας ATP, στους υποδοχείς P2X2/X3 (Εικόνα 2). Η συνέκφραση των καναλιών ENaC και CALHM1/3 σε ένα υποσύνολο κυττάρων υποδοχέα γεύσης έχει αναγνωριστεί ως κρίσιμη για τη μεταγωγή της ευαίσθητης στην αμιλορίδη αλμυρής γεύσης, υποδηλώνοντας μια πολύπλοκη αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των καναλιών στην κωδικοποίηση και τη μετάδοση αισθήσεων αλμυρής γεύσης. Επιπλέον, η λειτουργική ποικιλομορφία που παρατηρείται στα κύτταρα ENaCa⁺ υπογραμμίζει την πολυπλοκότητα της αντίληψης της αλμυρής γεύσης, όπου συγκεκριμένα κυτταρικά υποσύνολα εκφράζουν ποικίλους συνδυασμούς καναλιών, συμβάλλοντας στη διαφοροποιημένη αντίληψη και μετάδοση αλμυρών ερεθισμάτων. Αυτά τα ευρήματα παρέχουν πολύτιμες γνώσεις για τους μοριακούς μηχανισμούς που διέπουν την αντίληψη της αλμυρής γεύσης, ανοίγοντας το δρόμο για

περαιτέρω εξερεύνηση και πιθανές θεραπευτικές παρεμβάσεις που στοχεύουν σε διαταραχές της αντίληψης γεύσης ή στην ανάπτυξη υγιεινών εναλλακτικών νατρίου (Liman et al, 2020).



Εικόνα 2: Κύτταρα υποδοχείς και μεταγωγή σήματος αλμυρής γεύσης ([https://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273\(20\)30358-5?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0896627320303585%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/neuron/fulltext/S0896-6273(20)30358-5?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0896627320303585%3Fshowall%3Dtrue))

2.3.5 Υποδοχείς της όξινης γεύσης

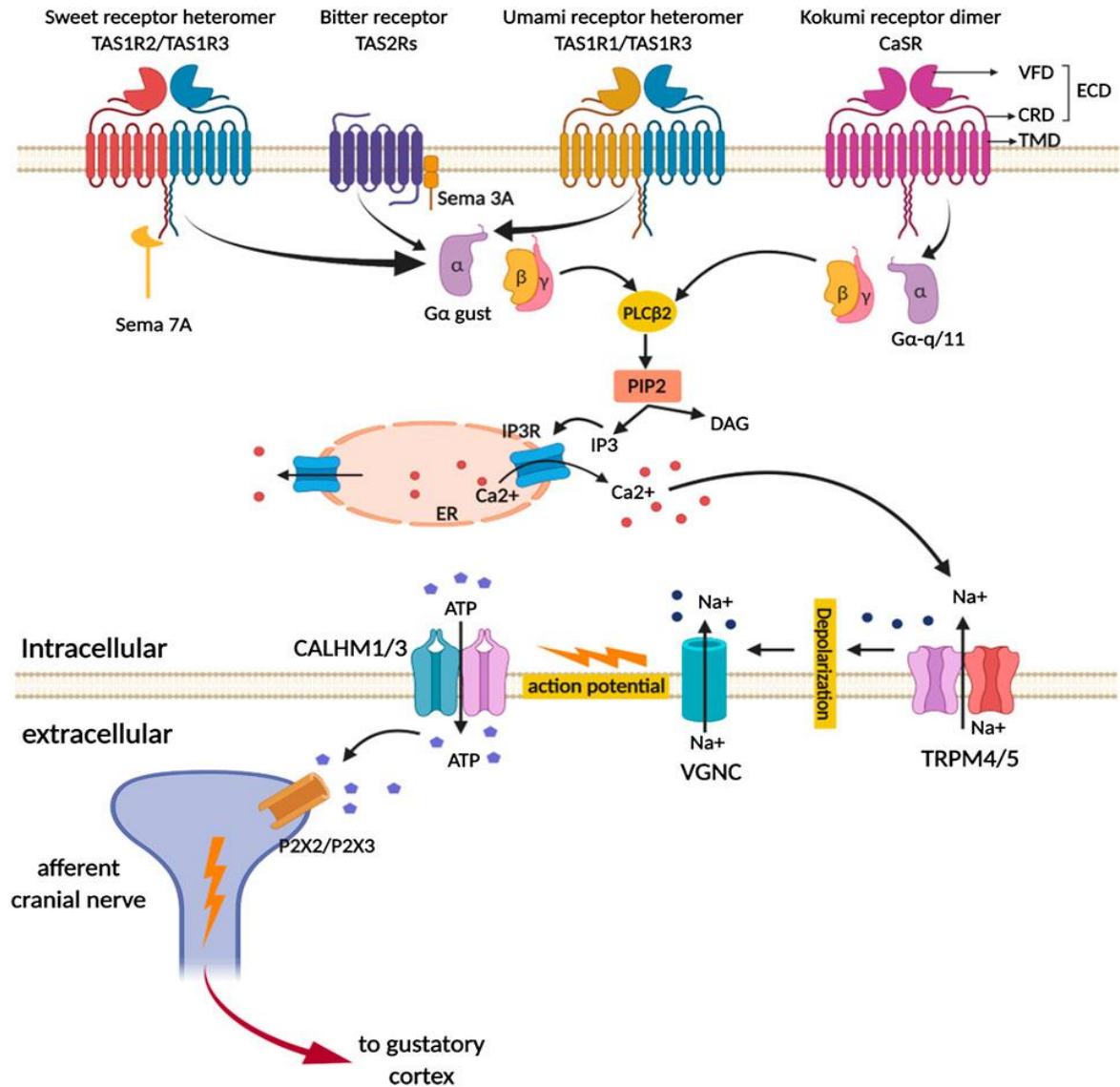
Η όξινη γεύση των τροφίμων και των ποτών οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στα οργανικά οξέα (ιόντα υδρογόνου), όπως το οξικό (acetic acid), κιτρικό (citric acid), μηλικό (malic acid) και φουμαρικό οξύ (fumaric acid) τα οποία συναντώνται στα φρούτα και τα λαχανικά, καθώς και το τρυγικό οξύ (tartaric acid) στο κρασί. Ακόμη και τα αραιά διαλύματα πολλών ανόργανων οξέων διαθέτουν όξινη γεύση (Kohlmeier M, 2015). Η πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για την ανίχνευση του όξινου στους γευστικούς κάλυκες ήταν δύσκολο να αναγνωρισθεί. Αυτό αποδίδεται εν μέρει στο γεγονός ότι, οι όξινες χημικές ουσίες ανιχνεύονται τόσο μέσω της αίσθησης της γεύσης (αντίληψη γεύσης) όσο και μέσω της παραγωγής πόνου (σωματοαισθητηριακή αντίληψη). Το 2019, η ομάδα της Emily Liman, καθηγήτρια βιολογικών επιστημών στο USC Dornsife College of Letters, Arts and Sciences, εντόπισε έναν υποψήφιο

αισθητήρα για χημικές ουσίες όξινης γεύσης, την πρωτεΐνη otopetrin 1 (OTOP1), η οποία ανήκει σε μία κατηγορία μορίων που ονομάζονται κανάλια ιόντων. Η OTOP1 λειτουργεί ως ένας διάυλος πρωτονίων, επιτρέποντας στα ιόντα H^+ να διασχίζουν τις κυτταρικές μεμβράνες. Ο μεταπτυχιακός φοιτητής του USC, *Yu-Hsiang Tu*, χρησιμοποίησε τεχνολογία επεξεργασίας γονιδίων για να δημιουργήσει ποντίκια με ένα απενεργοποιημένο γονίδιο *Otop1*, προκειμένου να ελέγξει εάν η πρωτεΐνη OTOP1 ήταν απαραίτητη για την απόκριση σε όξινες χημικές ουσίες ή οξέα. Όταν τα κύτταρα των υποδοχέων όξινης γεύσης εκτίθενται σε οξέα, ανταποκρίνονται παράγοντας ηλεκτρικό σήμα λόγω της κίνησης των ιόντων H^+ κατά μήκος της μεμβράνης του κυττάρου. Ο μεταπτυχιακός φοιτητής *Bochuan Teng* απέδειξε ότι τα κύτταρα υποδοχέα όξινης γεύσης από τα ποντίκια με μη λειτουργικό OTOP1 δεν είχαν ανιχνεύσιμα ρεύματα που αντιπροσωπεύουν την κίνηση του H^+ στα κύτταρα. Τα κύτταρα υποδοχέα όξινης γεύσης από τα μεταλλαγμένα ποντίκια επίσης δεν μείωσαν το ενδοκυτταρικό τους pH όταν εκτέθηκαν σε οξέα, κάτι που θα συνέβαινε εάν τα ιόντα H^+ μετακινούνταν στο κύτταρο. Τέλος, τα κύτταρα υποδοχέα όξινης γεύσης από τα μεταλλαγμένα ποντίκια δεν παρήγαγαν δυναμικά δράσης - ένα άλλο ηλεκτρικό σήμα - που απαιτούνται για την ενεργοποίηση του γευστικού νεύρου και το σήμα στον εγκέφαλο ως απόκριση σε ορισμένα όξινα διαλύματα (Liman et al, 2019).

2.4 Μοριακοί μηχανισμοί μεταγωγής σήματος της πικρής, γλυκιάς, και umami γεύσης

Τα σήματα πικρής, γλυκιάς και umami γεύσης υποστηρίζεται ότι ενεργοποιούν μία κοινή ενδοκυτταρική οδό σηματοδότησης στα κύτταρα Τύπου II (Dong et al., 2022), η οποία απεικονίζεται στο Σχήμα 2.2. Οι οικογένειες TAS1Rs και TAS2Rs ανήκουν στους υποδοχείς συζευγμένους με G- πρωτεΐνες (GPCRs). Η τριμερής G- πρωτεΐνη (α -, β -, γ -) ενεργοποιεί τη δεσμευμένη στη μεμβράνη ισομορφή $\beta 2$ της φωσφολιπάσης C (PLC - $\beta 2$), η οποία στη συνέχεια επάγει την παραγωγή 1,4,5- τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP3) και διακυλογλυκερόλης (DAG). Στη συνέχεια η IP3 συνδέεται με τον υποδοχέα (IP3R) που βρίσκεται στην μεμβράνη του λείου ενδοπλασματικού δικτύου, ενεργοποιώντας έτσι τα ενδοκυτταρικό κανάλι ιόντων ασβεστίου και οδηγώντας σε αύξηση της συγκέντρωσης Ca^{2+} (Descamps-Solà M. et al., 2023). Η DAG και τα ιόντα ασβεστίου προκαλούν διάνοιξη του παροδικού υποδοχέα δυναμικού καναλιού κατιόντων της υποοικογένειας M4 και M5 (TRPM4/5), που οδηγεί σε εισροή μονοσθενών κατιόντων Na^+ και εκπόλωση της μεμβράνης. Η εκπόλωση πυροδοτεί την απελευθέρωση του νευροδιαβιβαστή τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) στο εξωκυττάριο υγρό μέσω ενός ετεροδιμερούς καναλιού ομοιόστασης ασβεστίου CALHM1/CALHM3, ο οποίος μπορεί στη συνέχεια να ενεργοποιήσει τους πουρινεργικούς υποδοχείς P2X2 και 3 (P2X2/ P2X3) στα προσαγωγά κρανιακά νεύρα, οι

οποίοι μεταδίδουν σήματα στα κέντρα του εγκεφάλου που εμπλέκονται στην αντίληψη της γεύσης (Ahmad & Dalziel, 2020).



Σχήμα 2.1: Μηχανισμός δράσης των υποδοχέων πικρής, γλυκιάς και umami γεύσης (<https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2020.587664/full>)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: Εφαρμογή υπολογιστικών τεχνικών για την εύρεση ενισχυτικών γεύσης

3.1 Βάσεις δεδομένων και υπολογιστικά εργαλεία πρόβλεψης της γεύσης

Η αντίληψη της γεύσης καθορίζεται από τη δομική συγγένεια των χημικών ενώσεων με τους γευστικού υποδοχείς. Μικρές αλλαγές στη χημική σύνθεση του γευστικού συστατικού μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά την αντίληψη της γεύσης. Ο συνδυασμός των μοριακών περιγραφών και των πληροφοριών γεύσεις σε μεθόδους που βασίζονται σε προσδέτη (ligand) αντιπροσωπεύει ένα ισχυρό εργαλείο δεδομένων για την εφαρμογή μηχανικής μάθησης (Machine Learning - ML) με τη δυνατότητα πρόβλεψης της γεύσης με ακρίβεια. Αυτές οι προσεγγίσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση μεγάλων βάσεων δεδομένων μικρών ενώσεων, όπως η ZINC15, η DrugBank και η ChEMBL. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό πιθανών γευστικών ουσιών ή για την καθοδήγηση της ανάπτυξης νέων ενώσεων με ορισμένες λειτουργικές ιδιότητες και την επιθυμητή γεύση (Malavolta et al., 2022).

Προκειμένου να αναπτυχθούν αποτελεσματικά οι τεχνολογίες που βασίζονται στη μηχανική μάθηση (ML), είναι σημαντικό να οριστούν πρώτα αξιόπιστες και εύκολα κατανοητές βάσεις δεδομένων που περιλαμβάνουν πληροφορίες για την κάθε γεύση. Με την πάροδο των ετών, έχουν δημιουργηθεί πολυάριθμες βάσεις δεδομένων (databases), που περιλαμβάνουν ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που συνδέονται με τις γευστικές αντιλήψεις των τροφίμων. Στον Πίνακα 3.1, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι κύριες βάσεις δεδομένων και τα χαρακτηριστικά τους. Στον Πίνακα 3.2, απεικονίζονται άλλες βάσεις δεδομένων, οι οποίες δεν διαθέτουν ακριβείς πληροφορίες σχετικά με τη γεύση κάθε στοιχείου, αλλά σχετίζονται με τα συστατικά των τροφίμων και χρησιμοποιούνται συνήθως για την πρόβλεψη της γεύσης (Malavolta et al., 2022). Οι παρακάτω βάσεις δεδομένων αποτελούν το θεμέλιο για την ανάπτυξη υπολογιστικών εργαλείων πρόβλεψης της γεύσης.

Πίνακας 3.1: Σύνοψη των κύριων βάσεων δεδομένων γεύσεις με συνδέσμους (links), τη χαρακτηριστική γεύση, το σχετικό αριθμό μορίων και τη δυνατότητα λήψης δεδομένων

Βάση δεδομένων (DBs)	Σύνδεσμος (Links)	Γεύση	Αριθμός ενώσεων	Δυνατότητα λήψης δεδομένων
SuperSweet	http://bioinformatics.charite.de/sweet/	Sweet	8000	Yes
SweetenersDB	https://bit.ly/32fG9af	Sweet	316	No

BitterDB	https://bit.ly/3FinsB6	Bitter	1041	Yes
BT640	https://bit.ly/3pogTrj	Bitter	320	Yes
Rodgers Database	/	Bitter	682	/
Umami Database	https://bit.ly/3FhePal	Umami	800	No
UMP442	https://bit.ly/3yK6EAk	Umami	104	Yes
		Non-Umami	304	

Πίνακας 3.2: Σύνοψη των κύριων βάσεων δεδομένων γεύσεις με συνδέσμους (links), τη χαρακτηριστική γεύση, το σχετικό αριθμό μορίων και τη δυνατότητα λήψης δεδομένων

Βάση δεδομένων (DBs)	Σύνδεσμοι (Links)	Αριθμός ενώσεων
FoodDB	https://foodb.ca/	28.000
Super Natural II	https://bioinf-applied.charite.de/supernatural_new/	326.000
FlavorDB	https://cosylab.iiitd.edu.in/flavordb/	26.000
PhytoHub	http://phytohub.eu/	1863
ChEMBL	https://www.ebi.ac.uk/chembl/	17.000.000
DrugBank	https://go.drugbank.com/	500.000
ZINC15	https://zinc.docking.org/	230.000.000

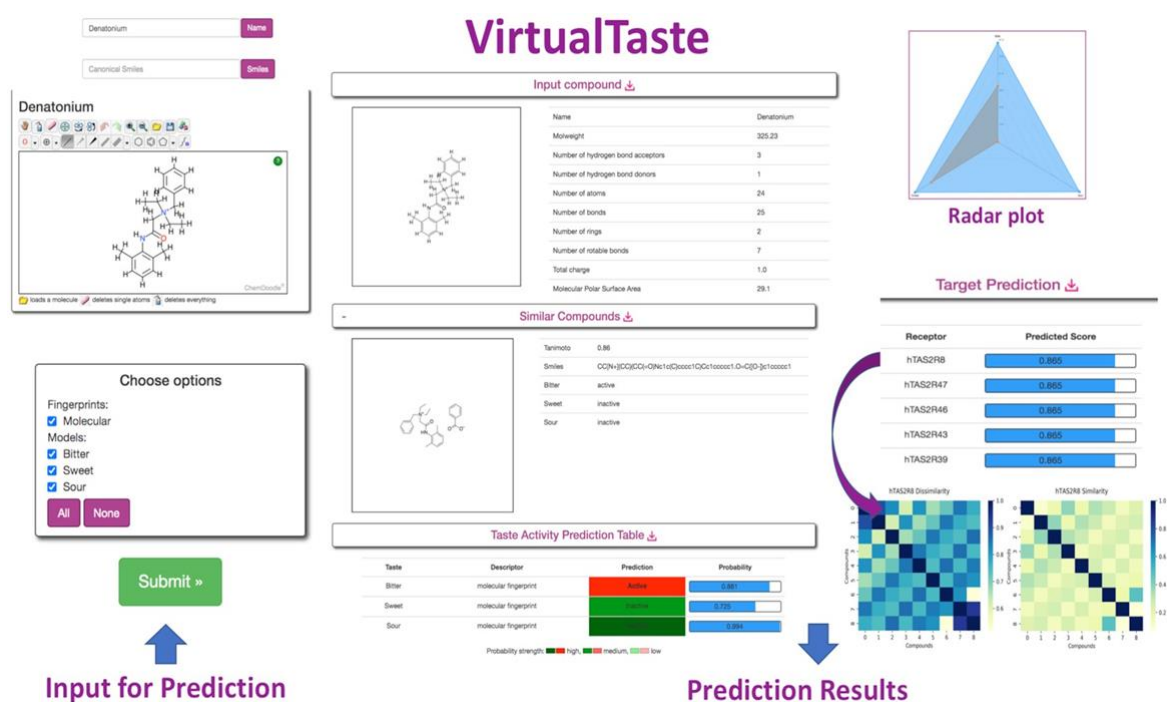
Τα τελευταία χρόνια, έχουν αναπτυχθεί αρκετά εργαλεία μηχανικής μάθησης (ML) που μπορούν να προβλέψουν τη γεύση συγκεκριμένων ενώσεων με βάση τη χημική τους δομή. Στη βιβλιογραφία, υπάρχει μια έντονη προτίμηση σε εργαλεία πρόβλεψης της γλυκιάς και της πικρής γεύσης, όπως είναι το BitterX, το BitterPredict, το iBitter-SCM, BERT4Bitter, το Predisweet, το BitterSweet και το VirtualTaste. Επιπλέον, για την πρόβλεψη της γεύσης umami έχουν δημιουργηθεί πέντε εργαλεία στην πρόσφατη βιβλιογραφία, συγκεκριμένα, iUmami-SCM, UMPred-FRL, VirtuousUmami, Umami-MRNN και Umami-BERT (Androutsos et al, 2023). Οι σύνδεσμοι των παραπάνω εργαλείων πρόβλεψης της γεύσης αναγράφονται στον Πίνακα 3.3.

Πίνακας 3.3: Σύνδεσμοι εργαλείων πρόβλεψης της γεύσης

Εργαλεία πρόβλεψης	Σύνδεσμοι (Links)
BitterX	https://mdl.shsmu.edu.cn/BitterX/
BitterPredict	https://github.com/Niv-Lab/BitterPredict1
iBitter-SCM	https://openebench.bsc.es/tool/ibitter-scm/
BERT4Bitter	http://pmlab.pythonanywhere.com/BERT4Bitter
Predisweet	http://chemosimserver.unice.fr/predisweet/
BitterSweet	https://bio.tools/BitterSweet
VirtualTaste	https://insilico-cyp.charite.de/VirtualTaste/
iUmami-SCM	http://camt.pythonanywhere.com/iUmami-SCM
UMPred-FRL	http://pmlabstack.pythonanywhere.com/UMPred-FRL
VirtuousUmami	https://virtuous.isi.gr/#/umami
Umami-MRNN	https://umami-mrnn.herokuapp.com/

Η πλατφόρμα πρόβλεψης VirtualTaste περιλαμβάνει τρία διαφορετικά μοντέλα γεύσης (γλυκό, πικρό και ξινό), προσφέρει δυνατότητα πρόβλεψης μοριακών στόχων για 25 υποδοχείς πικρής γεύσης και την προβλεπόμενη γεύση εγκεκριμένων φαρμάκων και φυσικών ενώσεων με στάθμη εμπιστοσύνης μεγαλύτερη από 75%. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε μορφή πίνακα και περιλαμβάνουν τη μοριακή δομή, τις φυσικοχημικές ιδιότητες και τα τρία πιο παρόμοια μόρια από την ομάδα εκπαίδευσης για τον καθορισμό του πεδίου εφαρμογής των μοντέλων πρόβλεψης VirtualTaste (Σχήμα 3.1). Τα δεδομένα συλλέχθηκαν από βιβλιογραφικές πηγές και διαφορετικές βάσεις δεδομένων που είναι διαθέσιμες, ενισχύοντας έτσι την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων (Fritz et al., 2021)

- Δεδομένα γλυκών ενώσεων (Sweet Data) : ελήφθησαν από τη βάση δεδομένων SuperSweet και από τη δημοσιευμένη εργασία BitterSweetForest
- Δεδομένα πικρής γεύσης (Bitter Data): λήφθηκαν από τη BitterDB και από τη δημοσιευμένη εργασία BitterSweetForest
- Δεδομένα πικρής γεύσης (Bitter Data): συλλέχθηκαν από δημόσιες βάσεις δεδομένων και επιμελήθηκαν χειροκίνητα από πηγές βιβλιογραφίας από τη βάση δεδομένων PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>)



Σχήμα 3.1 : Απεικόνιση αποτελεσμάτων ενός παραδείγματος ένωσης (Denatonium) με χρήση του εργαλείου VirtualTaste

Το BitterX είναι ένα εργαλείο ελεύθερης πρόσβασης, για την αναγνώριση ανθρώπινων υποδοχέων πικρής γεύσης, γνωστών ως TAS2Rs. Προβλέπει τους υποδοχείς TAS2R με βάση τις μοριακές δομές διάφορων χημικών ουσιών, ενσωματώνοντας δύο μεμονωμένες λειτουργίες: την επαλήθευση πικρού και την αναγνώριση TAS2R. Η επαλήθευση της πικρής ένωσης πραγματοποιείται από το SVM Model 1, το οποίο προβλέπει αν η ένωση είναι πικρή ή όχι. Αν η ένωση προβλεφθεί ως πικρή, το SVM Model 2 προσδιορίζει τους πιθανούς πικρούς υποδοχείς στο συγκεκριμένο είδος. Η υποβολή ερωτήματος μπορεί να πραγματοποιηθεί με τρεις τρόπους: 1) εισαγωγή των αρχείων SMILES στο πεδίο "SMILES", 2) αποστολή μοριακού αρχείου σε μορφή MDL mol στο πεδίο "Structure File" ή, 3) σκιαγράφηση της δομής στο "Structure" πεδίο (Σχήμα 3.2). Στη συνέχεια, οι χρήστες πρέπει να ορίσουν το "Job Name". Μετά την υποβολή, εμφανίζεται ένα μοναδικό Job ID. Η διαδικασία διαρκεί 5-10 δευτερόλεπτα και τα αποτελέσματα είναι διαθέσιμα στη σελίδα "Job Queue" (Σχήμα 3.2) (Huang et al., 2016).

The screenshot illustrates the BitterX web application interface, divided into three main sections: A, B, and C.

Section A: Job Information
 This section shows the input form for a new job. The "Job Name" field contains "case1". The "SMILES" field contains the string N=C(Nc1ccccc1)NC(=N)N. Below the input fields are buttons for "Run" and "Reset".

Section B: Job Browser
 This section displays a table of submitted jobs. The table has columns for Job Name, Job ID, Submit Type, Molecule Name, Submit Time, Finish Time, Is Bitter Compound, and Status. The job "case1" with Job ID "20130703180654_102" is shown as "Finished". A "View result" button is visible next to the status.

Job Name	Job ID	Submit Type	Molecule Name	Submit Time	Finish Time	Is Bitter Compound	Status
case1	20130703180654_102	SMILES	N=C(Nc1ccccc1)NC(=N)N	2013-7-3 18:06:54	2013-7-3 18:06:59	Yes	Finished

Section C: Job Result
 This section displays the results for the job. It includes a chemical structure of the molecule, details of the molecule, a histogram of receptor probability, and a list of receptors.

Structure of Molecule
N=C(Nc1ccccc1)NC(=N)N

Details of Molecule
 Molecule Name: 102-02-3.mol
 Molecule Weight: 177.21
 SMILES: N=C(Nc1ccccc1)NC(=N)N
 Number of Atoms: 24
 Number of Bonds: 24
 TPSA: 97.78

Histogram of Receptor Probability
 The histogram shows the probability of the molecule binding to various bitter receptors. The x-axis lists receptors: TA2R4_HUMAN, T2R10_HUMAN, T2R14_HUMAN, and T2R41_HUMAN. The y-axis shows Probability (%). The bar for TA2R4_HUMAN is the highest, at 82.374%.

Bitter Receptor	Probability (%)
TA2R4_HUMAN	82.374 %
T2R10_HUMAN	68.313 %
T2R14_HUMAN	58.959 %
T2R41_HUMAN	52.533 %

Receptor List
 This table lists the receptors identified for the molecule. It includes columns for BitterX ID, Receptor Name, BitterDB ID, UniProt ID, GenBank Accn, Full Name, Has Compound, and Probability.

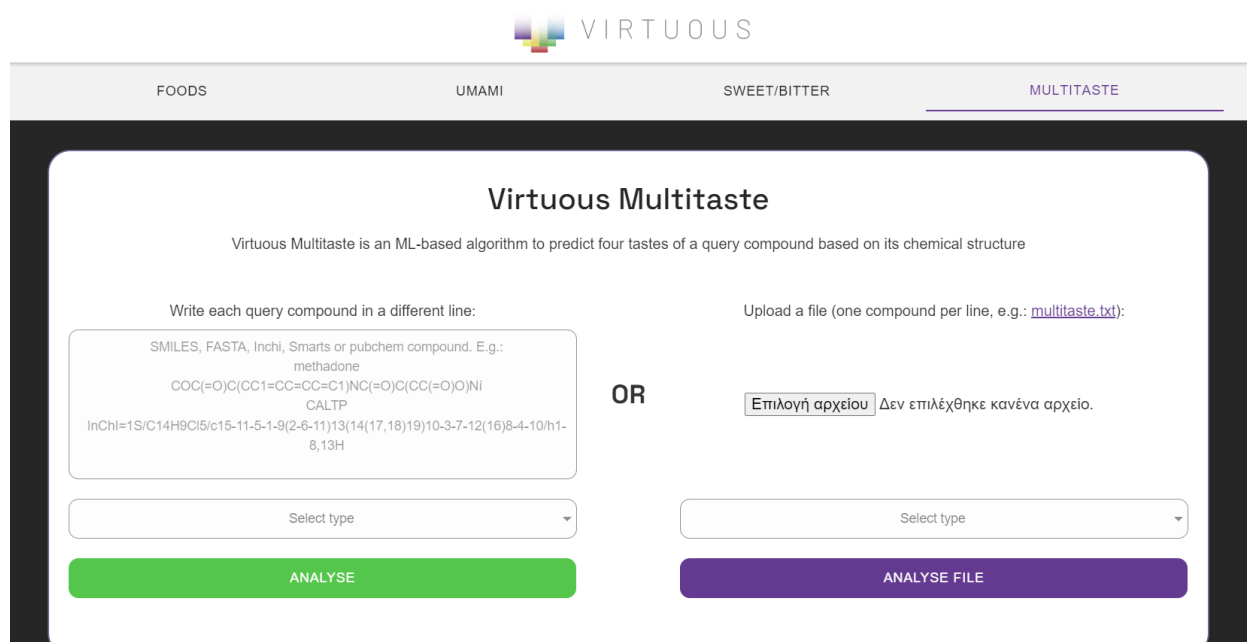
BitterX ID	Receptor Name	BitterDB ID	UniProt ID	GenBank Accn	Full Name	Has Compound	Probability
BXR00100003	TA2R4_HUMAN	T2R4	Q9NYW5	NP_059640	Taste receptor type 2 member 4	Yes	82.374 %
BXR00100008	T2R10_HUMAN	T2R10	Q9NYW0	NP_076410	Taste receptor type 2 member 10	Yes	68.313 %
BXR00100011	T2R14_HUMAN	T2R14	Q9NYV8	NP_076411	Taste receptor type 2 member 14	Yes	58.959 %
BXR00100017	T2R41_HUMAN	T2R41	P59536	NP_795364	Taste receptor type 2 member 41	Yes	52.533 %

Σχήμα 3.2: Η διαδικτυακή πλατφόρμα και τα αποτελέσματα του εργαλείου BitterX (<https://www.nature.com/articles/srep23450#Sec20>)

Αυτό το εργαλείο είναι χρήσιμο σε διάφορους κλάδους, όπως η επιστήμη των τροφίμων, η φαρμακολογία και τα καταναλωτικά προϊόντα, όπου η πικρή γεύση μπορεί να επηρεάσει την αποδοχή και την αποτελεσματικότητα των προϊόντων.

Το 2020, δημιουργήθηκε το εργαλείο VirtuousMultiTaste (<https://virtuous.isi.gr/#/virtuous-multitaste>), μια πρωτοποριακή διαδικτυακή πλατφόρμα μηχανικής μάθησης για την πρόβλεψη τεσσάρων διαφορετικών γεύσεων, συγκεκριμένα, τη πικρή, τη γλυκιά, της umami ή άλλης (όξινης ή αλμυρής) γεύσης. Επιτρέπει την ανάλυση

διαφόρων ουσιών και διευκολύνει την κατανόηση των χημικών και φυσικών στοιχείων που συμβάλλουν στη συνολική γευστική αντίληψη. Αναγνωρίζει διάφορους τύπους συμβολισμού μοριακής δομής των χημικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων των αρχείων SMILES, FASTA, InChI, SMARTS, ή των ονομάτων των ενώσεων στη βάση δεδομένων PubChem. Επιπλέον, η πλατφόρμα παρέχει το δικαίωμα στους χρήστες να εισάγουν ενώσεις απευθείας σε ένα πεδίο κειμένου ή να ανεβάσουν ένα αρχείο που αποτελείται από αρκετές ενώσεις, η καθεμία γραμμένη σε ξεχωριστή γραμμή (Σχήμα 3.3). Μόλις ολοκληρωθεί η ανάλυση, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε μορφή πίνακα, εμφανίζοντας τα SMILES των ενώσεων, την 2D μοριακή τους αναπαράσταση και το αποτέλεσμα πρόβλεψης γεύσης, τα οποία παρουσιάζονται σε μορφή κειμένου και σε μορφή διαγράμματος αράχνης. (Androutsos et al, 2023).



Σχήμα 3.3: VirtuousMultiTaste: Υπολογιστικό εργαλείο πρόβλεψης της γεύσης

3.2 Μοριακή πρόσδεση (Molecular Docking)

3.2.1 Εισαγωγή

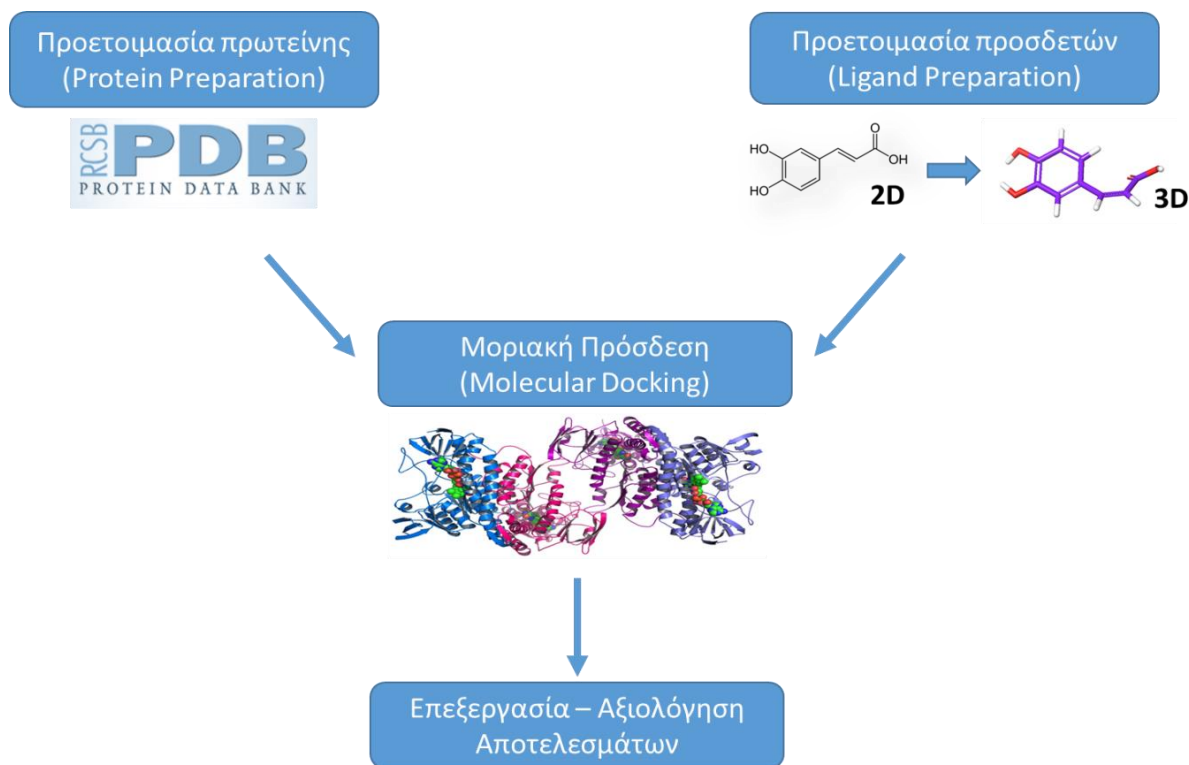
Η μοριακή πρόσδεση (molecular docking) αποτελεί ένα είδος υπολογιστικής μοντελοποίησης, μέσω της οποίας μπορεί να προβλεφθεί ο προτιμώμενος προσανατολισμός πρόσδεσης ενός μορίου προσδέτη (ligand) σε ένα άλλο μόριο (π.χ. υποδοχέα), με τα δύο αυτά να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους προκειμένου να σχηματίσουν ένα σταθερό σύμπλοκο. Ο στόχος της είναι να προβλέψει τον ενεργειακά ευνοϊκότερο τρόπο πρόσδεσης των δύο μορίων, παρέχοντας

πληροφορίες για τη σταθερότητα (όπως συγγένεια και σταθερά δέσμευσης) και την αλληλεπίδραση των συμπλεγμάτων (Agarwal & Mehrotra, 2016). Μια χαμηλή τιμή (αρνητική) ενέργειας υποδηλώνει ένα σταθερό σύστημα και έτσι μια πιθανή αλληλεπίδραση πρόσδεσης. Στους κλάδους της βιοχημείας και βιολογίας, η πρόσδεση ενός μορίου προσδέτη στον υποδοχέα επάγει σήμα, το οποίο στη συνέχεια μεταφράζεται σε βιολογικό αποτέλεσμα (Μαυρομούστακος et al, 2022). Πράγματι, οι *in silico* προσεγγίσεις επιτρέπουν πλέον την Εικονική σάρωση (Virtual screening - VS) εκατομμυρίων ενώσεων σε σύντομο χρονικό διάστημα, μειώνοντας έτσι το αρχικό κόστος της έρευνας και βελτιώνοντας τις πιθανότητες εύρεσης των επιθυμητών υποψηφίων ενώσεων για την επίτευξη συγκεκριμένων στόχων (Pinzi & Rastelli, 2019). Παραδείγματα ευρέως χρησιμοποιούμενων λογισμικών μοριακής πρόσδεσης περιλαμβάνουν το AutoDock (<https://autodock.scripps.edu/>), το GOLD (<https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/software/gold/>), το DOCK, και το Maestro (<https://www.schrodinger.com/platform/products/maestro/>), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Η διαδικασία της μοριακής πρόσδεσης διαφέρει σε κάθε αλγόριθμο ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του. Ωστόσο, όλοι οι αλγόριθμοι έχουν τρία θεμελιώδη χαρακτηριστικά (Vrontaki & Βροντάκη, 2016):

- ✓ Η ανάλυση του διαμορφωτικού χώρου του προσδέτη
- ✓ Η δημιουργία του συμπλέγματος μεταξύ του υποδοχέα και του προσδέτη
- ✓ Η αξιολόγηση της πρόσδεσης, με τον υπολογισμό της ενέργειας πρόσδεσης χρησιμοποιώντας μια συνάρτηση, η οποία διαφέρει από τον έναν αλγόριθμο στον άλλο.

3.2.2 Διάγραμμα ροής Μοριακής Πρόσδεσης

Το Σχήμα 3.2 απεικονίζει τα τέσσερα βασικά στάδια για την εφαρμογή υπολογισμών μοριακής πρόσδεσης μέσω ενός ολοκληρωμένου διαγράμματος ροής, το οποίο περιλαμβάνει την προετοιμασία των προσδετών (ligand preparation), την προετοιμασία πρωτεΐνης – στόχου (protein preparation), τη διαδικασία της πρόσδεσης και την επεξεργασία – αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.



Σχήμα 3.4: Διάγραμμα ροής Μοριακής Πρόσδεσης

3.2.3 Προετοιμασία Προσδετών

Η προετοιμασία των προσδετών είναι το αρχικό βήμα πριν την εκτέλεση της Μοριακής Πρόσδεσης. Σε αυτή τη διαδικασία, οι δομές των εν δυνάμει προσδετών υφίστανται έναν αριθμό μετασχηματισμών, διορθώσεων και βελτιστοποιήσεων, η οποία περιλαμβάνει επίσης την αφαίρεση τυχόν ανεπιθύμητων δομών. Αρχικά, οι ενώσεις (προσδέτες) οι οποίες στη συνέχεια θα μελετηθούν μετατρέπονται σε αρχεία SMILES ή SDF και εισάγονται στο υπολογιστικό εργαλείο (π.χ. Maestro, Autodock). Στη συνέχεια, γίνεται προσθήκη ατόμων υδρογόνου, εξάλειψη τυχόν ανεπιθύμητων μορίων (π.χ. αντισταθμιστικά ιόντα άλατος), ρύθμιση βέλτιστου pH (δημιουργία κατάλληλων ιοντικών καταστάσεων) και δημιουργία ταυτομερών δομών. Τελικά, η γεωμετρία τους ενισχύεται με τη χρήση τεχνικών μείωσης ενέργειας. Στο τελευταίο βήμα, βελτιστοποιείται η γεωμετρία έπειτα από ελαχιστοποίηση της ενέργειας με την χρήση κατάλληλων υπολογιστικών εργαλείων, όπως το LigPrep (MAESTRO) (Κρίτση, 2017).

3.2.4 Προετοιμασία Πρωτεΐνης

Η προετοιμασία της πρωτεΐνης είναι ένα σημαντικό στάδιο στη διαδικασία της μοριακής πρόσδεσης. Επί του παρόντος, χρησιμοποιούνται αρκετές μέθοδοι για τον προσδιορισμό πρωτεϊνικών δομών, συμπεριλαμβανομένης της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X (X-ray crystallography), της φασματοσκοπίας NMR και της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (electron microscopy). Οι δομές αυτές διατίθενται προς χρήση από την Πρωτεϊνική Βάση Δεδομένων (Protein Data Bank-PDB) (<https://www.rcsb.org/>) (PDB101, n.d.). Ωστόσο, λόγω συχνού εντοπισμού σφαλμάτων, απαιτείται η διόρθωση τους πριν τη χρήση τους σε *in silico* υπολογισμούς (Madhavi Sastry, 2013). Τα συνηθέστερα βήματα που ακολουθούνται περιλαμβάνουν:

- ✓ Πρόσθεση ατόμων υδρογόνου (για την βελτιστοποίηση των δεσμών υδρογόνου)
- ✓ Διόρθωση δεσμών και φορτίων
- ✓ Αφαίρεση ατομικών συγκρούσεων
- ✓ Αφαίρεση μορίων νερού (H₂O) που δεν συμμετέχουν σε γέφυρα μεταξύ προσδέτη ή σε συντονισμό με μέταλλα
- ✓ Επιλογή καταστάσεων πρωτονίωσης και ταυτομέρειας του αμινοξέος ιστιδίνη (His)

Συνήθως, μετά από όλες αυτές τις τροποποιήσεις και διορθώσεις, οι πρωτεϊνικές δομές βελτιστοποιούνται ενεργειακά. (Fassihi et al, 2023)

3.2.5 Επεξεργασία και αξιολόγηση αποτελεσμάτων

Μετά την προετοιμασία των προσδετών και της πρωτεΐνης, ακολουθεί η εφαρμογή αλγορίθμων για την ακριβή εκτίμηση της θέσης του προσδέτη στο ενεργό κέντρο του βιολογικού στόχου. Η αξιολόγηση του πειράματος της μοριακής πρόσδεσης στην παρούσα εργασία πραγματοποιείται από τον αλγόριθμο Glide, της εταιρείας Schrödinger, ο οποίος αναζητά ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προσδετών και της πρωτεΐνης – υποδοχέα. Το GlideScore υπολογίζεται μέσω της εξίσωσης (Μαυρομούστακος et al, 2022):

$$\text{GScore} = 0.065 \cdot \text{vdW} + 0.130 \cdot \text{Coul} + \text{Lipo} + \text{Hbond} + \text{Metal} + \text{BuryP} + \text{RotB} + \text{Site}, \text{ όπου}$$

vdW: Ενέργεια van der Waals

Coul: Ενέργεια Coulomb

Lipo: Όρος που εκτιμά την ευνοϊκή αλληλεπίδραση μεταξύ υδρόφοβων ομάδων

Hbond: Υπολογισμός Δεσμών Υδρογόνου

Metal: Αλληλεπιδράσεις με ανιοντικά άτομα

BuryP: "Ποινή" (Penalty) για τις πολικές ομάδες και τη συστροφή των αμιδίων

RotB: "Ποινή" για τον περιορισμό των περιστρεφόμενων δεσμών

Site: Υπολογισμός αλληλεπιδράσεων στο ενεργό κέντρο του υποδοχέα

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η διερεύνηση των γευστικών ιδιοτήτων του φαινολικού προφίλ εκχυλίσματος βασιλικού (*Ocimum basilicum L.*) με τη χρήση σειράς *in silico* τεχνικών, καθώς και η αξιολόγηση της πιθανής συμβολής τους στην ανάπτυξη νέων γευστικών προφίλ και προϊόντων στη βιομηχανία τροφίμων. Προς αυτή την κατεύθυνση, η εργασία επικεντρώθηκε στην πρόβλεψη της πικρής γεύσης των συστατικών αυτών μέσω της μελέτης του ανθρώπινου πικρού υποδοχέα TAS2R46, χρησιμοποιώντας τεχνικές Μοριακής Πρόσδεσης και υπολογιστικά εργαλεία πρόβλεψης γεύσης. Μέσω αυτής της έρευνας, αναμένεται να προκύψουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τα γευστικά χαρακτηριστικά των παραπροϊόντων του βασιλικού, ενισχύοντας την αξιοποίησή τους στη βιομηχανία τροφίμων.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο : Δημιουργία βιβλιοθήκης ενώσεων

Η δημιουργία της βιβλιοθήκης φυσικών ενώσεων προέκυψε με χρήση της τεχνικής Υγρή Χρωματογραφίας συζευγμένης με Φασματομετρία Μάζας (LC-MS). Συγκεκριμένα, η ανάλυση LC-MS του εκχυλίσματος *O. Basilicum* ταυτοποίησε την παρουσία 50 διαφορετικών ενώσεων, κυρίως φαινολικών οξέων (13 ενώσεις), φαινολικών γλυκοσιδίων (12 ενώσεις) και σαλβιανολικών οξέων (7 ενώσεις). Έπειτα, μέσω αναζήτησης κυρίως στη βάση δεδομένων PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) της NCBI, συλλέχθηκαν οι συμβολοσειρές SMILES των ενώσεων (Πίνακας 4.1). Στα παρακάτω 3 Σχήματα (Σχήμα 4.1, 4.2, και 4.3), απεικονίζονται οι σκελετικές δομές τους, καθώς παράλληλα αναγράφονται και οι συντακτικές χημικές δομές τους. Η διδιάστατη (2D) δομή τους αποκαλύπτει ότι η πλειοψηφία των φυτοχημικών ουσιών αυτών ανήκει στην κατηγορία των φαινολικών ενώσεων.

Πίνακας 4.1: Αρχεία Smiles των 50 εξεταζόμενων ενώσεων

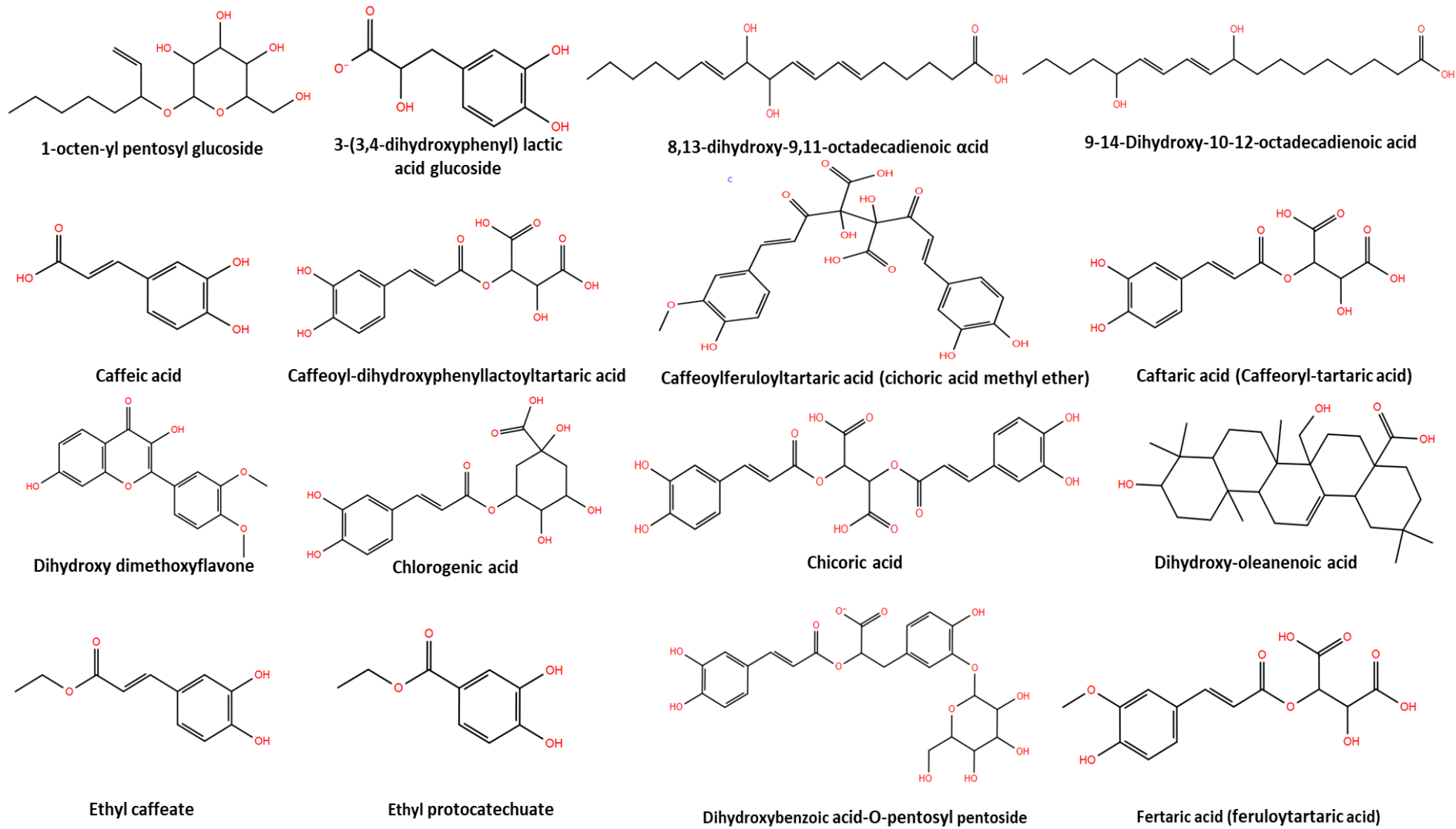
Όνομα ένωσης	SMILES
1-octen-yl-pentosyl glucoside	<chem>CCCCC(C=C)OC1C(C(C(C(O1)CO)O)O)O</chem>
3-(3,4-dihydroxyphenyl) lactic acid glucoside	<chem>C1=CC(=C(C=C1CC(C(=O)[O-])O)O)O</chem>
8,13-dihydroxy-9,11-octadecadienoic acid	<chem>CCCCC=CC(C(C=CC=CCCCC(=O)O)O)O</chem>
9-14-Dihydroxy-10-12-octadecadienoic acid	<chem>CCCCC(C=CC=CC(CCCCCC(=O)O)O)O</chem>
Caffeic acid	<chem>C1=CC(=C(C=C1C=CC(=O)O)O)O</chem>

Caffeoyl-dihydroxyphenyl lactoyltartaric acid	<chem>C1=CC(=C(C=C1C=CC(=O)OC(C(C(=O)O)O)C(=O)O)O)O</chem>
Caffeoylferuloyltartaric acid (cichoric acid methyl ether)	<chem>COC1=C(C=CC(=C1)C=CC(=O)C(C(=O)O)(C(C(=O)C=CC2=CC(=C(C=C2)O)O)(C(=O)O)O)O</chem>
Caftaric acid (Caffeoyl-tartaric acid)	<chem>C1=CC(=C(C=C1C=CC(=O)OC(=O)O)O)C(=C(CO)O)O</chem>
Dihydroxy dimethoxyflavoe	<chem>COC1=C(C=C(C=C1)C2=C(C(=O)C3=C(O2)C=C(C=C3)O)O)OC</chem>
Chlorogenic acid	<chem>C1C(C(C(C1(C(=O)O)O)OC(=O)C=CC2=CC(=C(C=C2)O)O)O)O</chem>
Chicoric acid	<chem>C1=CC(=C(C=C1C=CC(=O)OC(C(C(=O)O)OC(=O)C=CC2=CC(=C(C=C2)O)O)C(=O)O)O)O</chem>
Dihydroxy-oleanenoic acid	<chem>CC1(CCC2(CCC3(C(=CCC4C3(CCC5C4(CCC(C5(C)C)O)C)C)C2C1)CO)C(=O)O)C</chem>
Ethyl caffeate	<chem>CCOC(=O)C=CC1=CC(=C(C=C1)O)O</chem>
Ethyl protocatechuate	<chem>CCOC(=O)C1=CC(=C(C=C1)O)O</chem>
Dihydroxybenzoic acid-O-pentosyl pentoside	<chem>C1=CC(=C(C=C1CC(C(=O)[O-])OC(=O)C=CC2=CC(=C(C=C2)O)O)OC3C(C(C(C(O3)CO)O)O)O)O</chem>
Fertaric acid (feruloyltartaric acid)	<chem>Oc1ccc(cc1OC)/C=C/C(=O)OC(C(=O)O)C(O)C(=O)O</chem>
Ferulic acid	<chem>COC1=C(C=CC(=C1)C=CC(=O)O)O</chem>

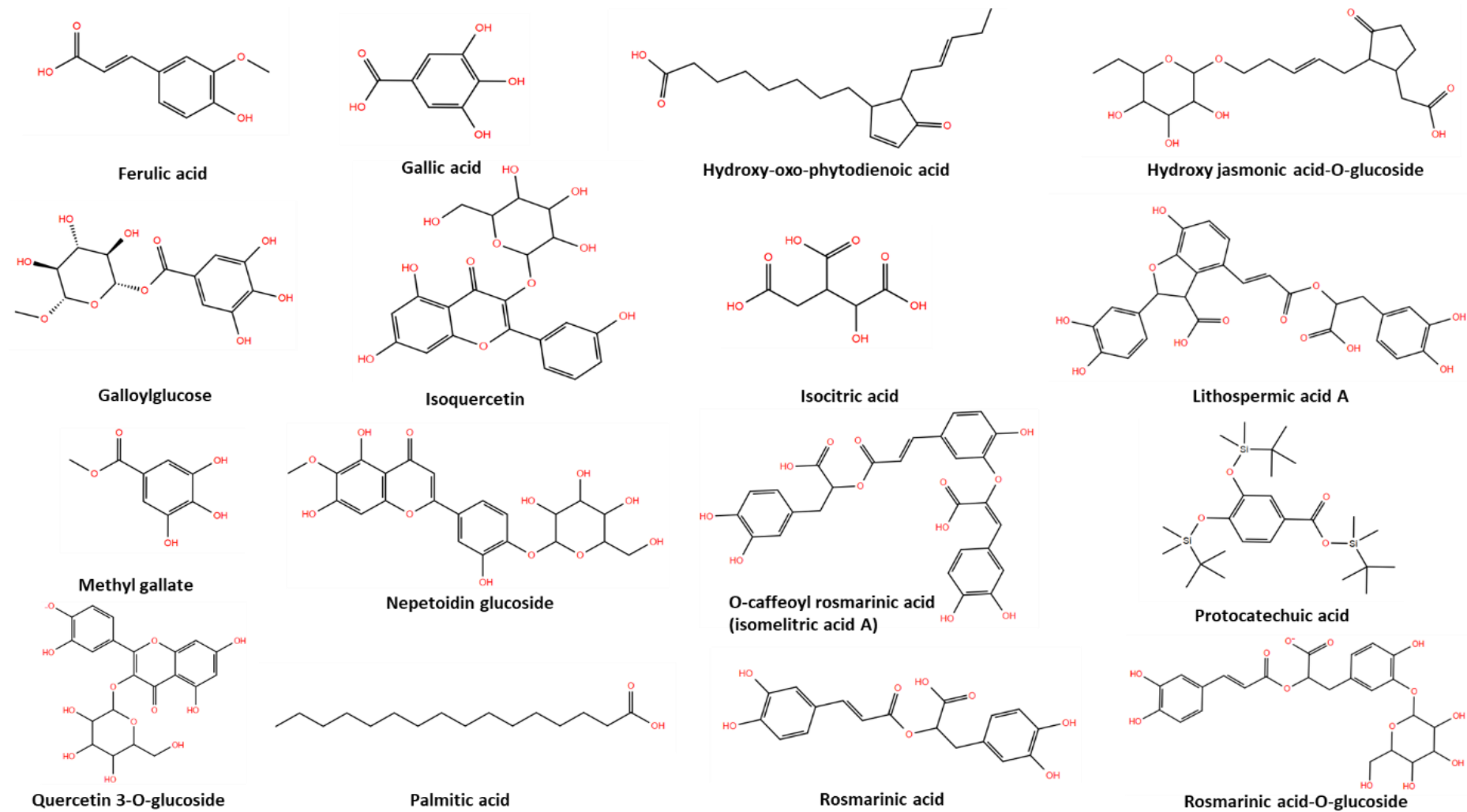
Gallic acid	<chem>C1=C(C=C(C(=C1O)O)O)C(=O)O</chem>
Hydroxy-oxo-phytodienoic acid	<chem>CCC=CCC1C(C=CC1=O)CCCCCCCC(=O)O</chem>
Hydroxy jasmonic acid-O-glucoside	<chem>CCC1C(C(C(C(O1)O)CCC=CCC2C(CCC2=O)CC(=O)O)O)O</chem>
Galloylglucose	<chem>CO[C@@H]1[C@H]([C@@H]([C@H]([C@@H](O1)OC(=O)c2cc(c(c2)O)O)O)O)O</chem>
Isoquercetin	<chem>C1=CC(=C(C=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)OC4C(C(C(C(O4)CO)O)O)O)O</chem>
Isocitric acid	<chem>O=C(O)C(CC(=O)O)C(O)C(=O)O</chem>
Lithospermic acid A	<chem>C1=CC(=C(C=C1CC(C(=O)O)OC(=O)C=CC2=C3C(C(OC3=C(C=C2)O)C4=CC(=C(C=C4)O)O)C(=O)O)O)O</chem>
Methyl gallate	<chem>COC(=O)C1=CC(=C(C(=C1)O)O)O</chem>
Nepetoidin glucoside	<chem>COC1=C(C2=C(C=C1O)OC(=CC2=O)C3=CC(=C(C=C3)OC4C(C(C(C(O4)CO)O)O)O)O)O</chem>
O-caffeoyl rosmarinic acid (isomelitic acid A)	<chem>C1=CC(=C(C=C1CC(C(=O)O)OC(=O)C=CC2=CC(=C(C=C2)O)OC(=CC3=CC(=C(C=C3)O)O)C(=O)O)O)O</chem>
Protocatechuic acid	<chem>CC(C)(C)[Si](C)(C)OC1=C(C=C(C=C1)C(=O)O[Si](C)(C)C(C)(C)O[Si](C)(C)C(C)(C)C</chem>
Quercetin 3-O-glucoside	<chem>C1=CC(=C(C=C1C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)OC4C(C(C(C(O4)CO)O)O)O)[O-]</chem>
Palmitic acid	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O</chem>
Rosmarinic acid	<chem>C1=CC(=C(C=C1CC(C(=O)O)OC(=O)C=CC2=CC(=C(C=C2)O)O)O)O</chem>

Rosmarinic acid-O-glucoside	<chem>C1=CC(=C(C=C1CC(C(=O)[O-])OC(=O)C=CC2=CC(=C(C=C2)O)O)OC3C(C(C(C(O3)CO)O)O)O)O</chem>
Quercetin-3-O-apiosyl (1-2) galactoside	<chem>C1C(C(C(O1)OC2C(C(C(OC2OC3=C(OC4=CC(=CC(=C4C3=O)O)O)C5=CC(=C(C=C5)O)O)CO)O)O)(CO)O</chem>
Quercetin-O-pentosyl-glucoside	<chem>C1C(C(C(OC1OC2=C(OC3=CC(=CC(=C3C2=O)O)OC4C(C(C(C(O4)CO)O)O)O)C5=CC(=C(C=C5)O)O)O)O)O</chem>
Salvianolic acid B	<chem>C1=CC(=C(C=C1CC(C(=O)O)OC(=O)C=CC2=C3C(C(OC3=C(C=C2)O)C4=CC(=C(C=C4)O)O)C(=O)OC(CC5=CC(=C(C=C5)O)O)C(=O)O)O)O</chem>
Rutin	<chem>CC1C(C(C(C(O1)OCC2C(C(C(C(O2)OC3=C(OC4=CC(=CC(=C4C3=O)O)O)C5=C(C(=C(C=C5)O)O)O)O)O)O)O)O</chem>
Salvialinic acid (danshensu)	<chem>C1=CC(=C(C=C1C[C@H](C(=O)O)O)O)O</chem>
Salvianolic acid C	<chem>C1=CC(=C(C=C1CC(C(=O)O)OC(=O)C=CC2=C3C=C(OC3=C(C=C2)O)C4=CC(=C(C=C4)O)O)O)O</chem>
Salvianolic acid F	<chem>C1=CC(=C(C=C1C=CC2=C(C=CC(=C2O)O)C=CC(=O)O)O)O</chem>
Salvianolic acid G	<chem>C1C(C(=O)C2=CC3=C(C(=C(C=C3)O)O)OC4=C(C=CC1=C24)O)C(=O)O</chem>
Salvianolic acid H/I	<chem>C1=CC(=C(C=C1CC(C(=O)O)OC(=O)C=CC2=CC(=C(C=C2)O)OC(=CC3=CC(=C(C=C3)O)O)C(=O)O)O)O</chem>
Salvianolic acid K	<chem>C1=CC(=C(C=C1CC(C(=O)O)OC(=O)C=CC2=CC(=C(C=C2)OC(C3=CC(=C(C=C3)O)O)O)C(=O)O)O)O</chem>
Salvigenin (5-Hydroxy-6,7,4'-trimethoxyflavone)	<chem>COC1=CC=C(C=C1)C2=CC(=O)C3=C(C(=C(C=C3O2)OC)OC)O</chem>
Trihydroxy-octadecendic acid	<chem>C(CCCCCCCC(O)(O)O)CCCCCCC=CC(=O)O</chem>

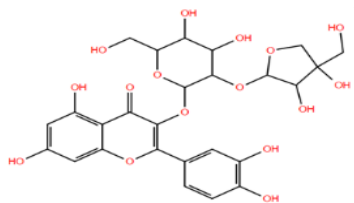
Vanillic acid	<chem>COc1cc(ccc1O)C(=O)O</chem>
Hydroxy-octadecatrienoic acid	<chem>CCC=CCC=CC=CC(CCCCCCCC(=O)O)O</chem>
Salvianolic acid A	<chem>C1=CC(=C(C=C1CC(C(=O)O)OC(=O)C=CC2=C(C(=C(C=C2)O)O)C=CC3=CC(=C(C=C3)O)O)O)O</chem>
Sagerinic acid	<chem>C1=CC(=C(C=C1CC(C(=O)O)OC(=O)C2C(C(C2C(=O)OC(CC3=CC(=C(C=C3)O)O)C(=O)O)C4=CC(=C(C=C4)O)O)C5=CC(=C(C=C5)O)O)O)O</chem>
p-Coumaric acid	<chem>C1=CC(=CC=C1C=CC(=O)O)O</chem>
p-Hydroxybenzoic acid	<chem>C1=CC(=CC=C1C(=O)O)O</chem>



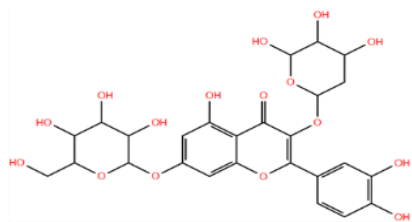
Σχήμα 4.1: Περιεχόμενες ενώσεις εκχυλίσματος *O. Bacilicum* (1)



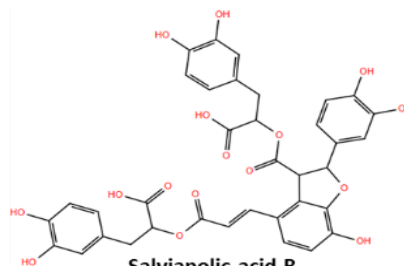
Σχήμα 4.2: Περιεχόμενες ενώσεις εκχυλίσματος *O. Bacilicum* (2)



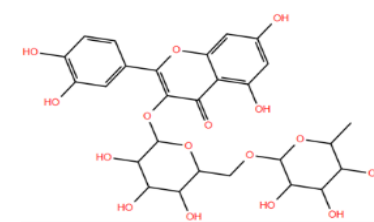
Quercetin-3-O-aposyl (1-2) galactoside



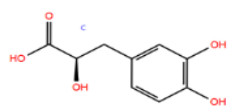
Quercetin-O-pentosyl-glucoside



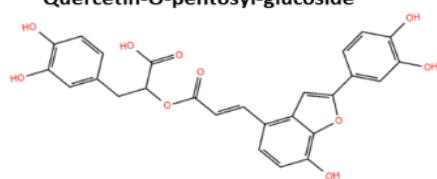
Salvianolic acid B



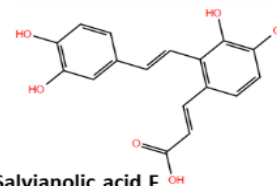
Rutin



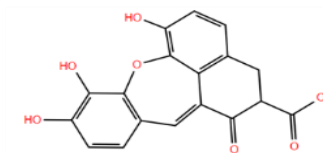
Salvianolic acid (danshensu)



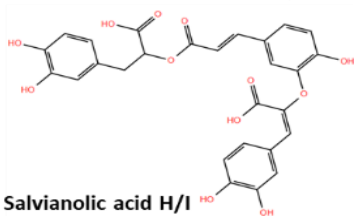
Salvianolic acid C



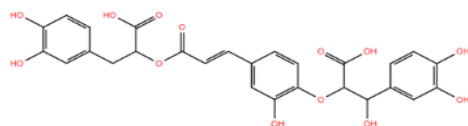
Salvianolic acid F



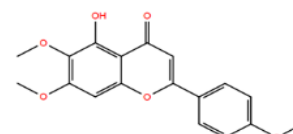
Salvianolic acid G



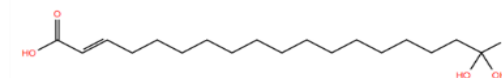
Salvianolic acid H/I



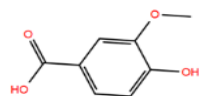
Salvianolic acid K



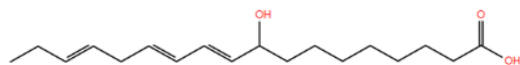
Salvigenin (5-Hydroxy-6,7,4'-trimethoxyflavone)



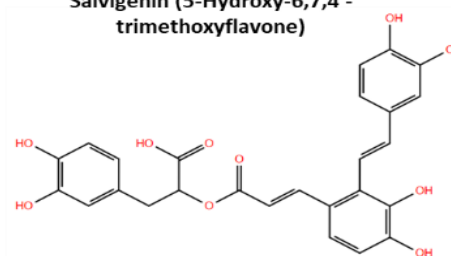
Trihydroxy-octadecendic acid



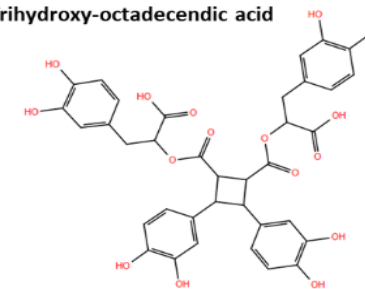
Vanillic acid



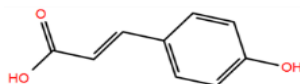
Hydroxy-octadecatrienoic acid



Salvianolic acid A



Sagerinic acid



p-Coumaric acid



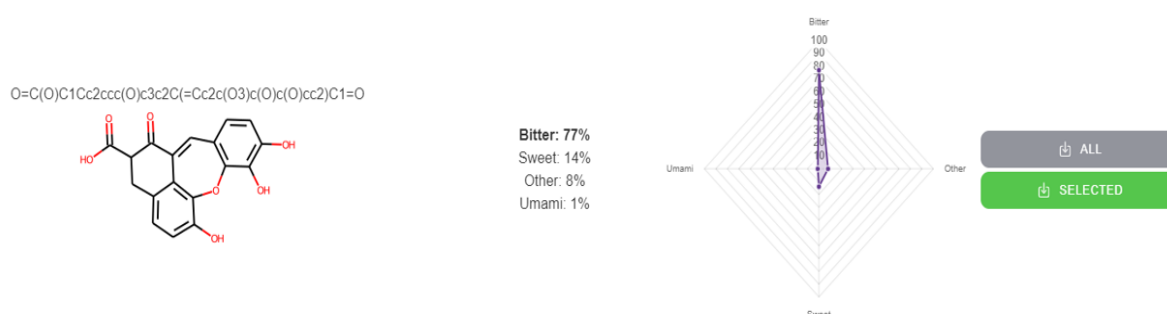
p-Hydroxybenzoic acid

Σχήμα 4.3: Περιεχόμενες ενώσεις εκχυλίσματος *O. Bacilicum* (3)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο : *In silico* τεχνικές

5.1 Χρήση του διαδικτυακού εργαλείου Virtuous MultiTaste για την πρόβλεψη γεύσης των ενώσεων που περιέχονται σε εκχυλίσματα βασιλικού

Στην παρούσα μελέτη, η πρόβλεψη της γεύσης των 50 ταυτοποιημένων ενώσεων του εκχυλίσματος *Ocimum Basilicum* πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του υπολογιστικού εργαλείου Virtuous MultiTaste (<https://virtuous.isi.gr/#/multitaste>). Για τον σκοπό αυτόν, τα SMILES συγκεντρώθηκαν σε ένα αρχείο κειμένου (txt. file), καταγράφοντας το κάθε ένα σε ξεχωριστή γραμμή. Μετά την ολοκλήρωση της ανάλυσης, τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν σε μορφή πίνακα, ο οποίος περιλαμβάνει τα SMILES των εξεταζόμενων ενώσεων, την 2D απεικόνιση των μοριακών δομών και τα αποτελέσματα πρόβλεψης της γεύσης, τα οποία παρουσιάζονται με δύο τρόπους: α) ως ποσοστό και β) σε μορφή γραφήματος αράχνης (spider chart) (Σχήμα 5.1). Τα αποτελέσματα του εργαλείου Virtuous MultiTaste παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1.



Σχήμα 5.1 : Παράδειγμα απεικόνισης μετά την εφαρμογή αποτελεσμάτων του εργαλείου Virtual MultiTaste

Πίνακας 5.1: Αποτελέσματα εργαλείου Virtuous Multitaste. Ποσοστό πιθανότητας εμφάνισης πικρής, γλυκιάς, umami ή άλλης (ξινή ή αλμυρής) γεύσης των εξεταζόμενων ενώσεων

Όνομα ένωσης	Πικρή γεύση (%)	Umami γεύση (%)	Γλυκιά γεύση (%)	Άλλη γεύση (%)
1-octen-yl-pentosyl glucoside	48	5	24	22
3-(3,4-dihydroxyphenyl) lactic acid glucoside	33	39	13	16

8,13-dihydroxy-9,11-octadecadienoic acid	39	22	21	18
9-14-Dihydroxy-10-12-octadecadienoic acid	42	16	21	21
Caffeic acid	42	16	33	9
Caffeoyl-dihydroxyphenyllactoyltartaric acid	20	38	21	21
Caffeoylferuloyltartaric acid (cichoric acid methyl ether)	55	4	25	16
Caftaric acid (Caffeoyl-tartaric acid)	20	38	21	21
Dihydroxy dimethoxyflavone	41	0	33	26
Chlorogenic acid	44	26	6	23
Chicoric acid	36	33	13	19
Dihydroxy-oleanenoic acid	81	1	8	9
Ethyl caffeate	78	3	17	2
Ethyl protocatechuate	80	8	6	5
Dihydroxybenzoic acid-O-pentosyl pentoside	41	19	6	34
Fertaric acid (feruloyltartaric acid)	38	22	12	27

Ferulic acid	54	11	19	17
Gallic acid	79	7	5	8
Hydroxy-oxo-phytodienoic acid	25	4	41	29
Hydroxy jasmonic acid-O-glucoside	47	9	19	25
Galloylglucose	23	35	8	34
Isoquercetin	86	0	8	5
Isocitric acid	2	83	1	14
Lithospermic acid A	53	15	7	25
Methyl gallate	56	17	11	16
Nepetoidin glucoside	55	0	26	19
O-caffeoyl rosmarinic acid (isomelitric acid A)	42	23	9	25
Protocatechuic acid	48	14	16	22
Quercetin 3-O-glucoside	47	4	21	27
Palmitic acid	58	3	19	20
Rosmarinic acid	40	26	11	23

Rosmarinic acid-O-glucoside	41	19	6	34
Quercetin-3-O-apiosyl (1–2) galactoside	19	4	15	62
Quercetin-O-pentosyl- glucoside	16	8	73	3
Salvianolic acid B	62	13	6	19
Rutin	11	2	7	80
Salvialinic acid (danshensu)	33	16	39	13
Salvianolic acid C	64	9	7	19
Salvianolic acid F	78	4	5	13
Salvianolic acid G	77	1	14	8
Salvianolic acid H/I	42	23	9	25
Salvianolic acid K	53	15	5	27
Salvigenin (5-Hydroxy- 6,7,4'-trimethoxyflavone)	62	1	14	23
Trihydroxy-octadecendic acid	21	39	26	14
Vanillic acid	58	16	16	11
Hydroxy-octadecatrienoic acid	57	4	15	24

Salvianolic acid A	55	13	3	29
Sagerinic acid	52	22	13	14
p-Coumaric acid	41	13	27	19
p-Hydroxybenzoic acid	45	12	22	21

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι από τις 50 εξεταζόμενες ενώσεις που ταυτοποιήθηκαν στο εξεταζόμενο εκχύλισμα βασιλικού, 36 εμφάνισαν ποσοστό μεγαλύτερο ή ίσο από 40%, υποδεικνύοντας ικανοποιητική πιθανότητα να παρουσιάσουν πικρή γεύση. Επιπλέον, 21 από αυτές τις ενώσεις παρουσίασαν πιθανότητα πικρής γεύσης μεγαλύτερη από 50%, ενώ για 7 ενώσεις η πιθανότητα κυμαινόταν από 70% έως 90%. Η προαναφερθείσα παρατήρηση μπορεί να θεωρηθεί ως ισχυρή ένδειξη ότι η κυρίαρχη γεύση του φαινολικού προφίλ εκχυλίσματος βασιλικού χαρακτηρίζεται κυρίως ως πικρή. Επιπλέον, τα ευρήματα πρόβλεψης της γεύσης έδειξαν ότι η quercetin-O-pentosyl-glucoside, το isocitric acid, η rutin, και η quercetin-3-O-aripiosyl (1–2) galactoside είχαν σημαντικές πιθανότητες ενεργοποίησης της γλυκιάς, umami και άλλης γεύσης, αντίστοιχα. Οι ενώσεις quercetin-O-pentosyl-glucoside, rutin και quercetin-3-O-aripiosyl (1–2) galactoside είναι τροποποιημένες μορφές της quercetin, στις οποίες έχουν συνδεθεί σάκχαρα. Η γλυκύτητα των συνδεδεμένων σακχάρων μπορεί να επηρεάσει το γευστικό τους προφίλ (Magar & Sohng, 2020).

Οι 36 ενώσεις που χαρακτηρίστηκαν ως πιθανά πικρές από το εργαλείο Virtuous Multitaste (<https://virtuous.isi.gr/#/multitaste>) στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε πειράματα μοριακής πρόσδεσης. Τα συγκεκριμένα πειράματα είχαν ως στόχο να εξετάσουν την ικανότητα των ενώσεων να ενεργοποιούν τον πικρό υποδοχέα hTAS2R46.

5.2 Προετοιμασία για την διεξαγωγή πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης

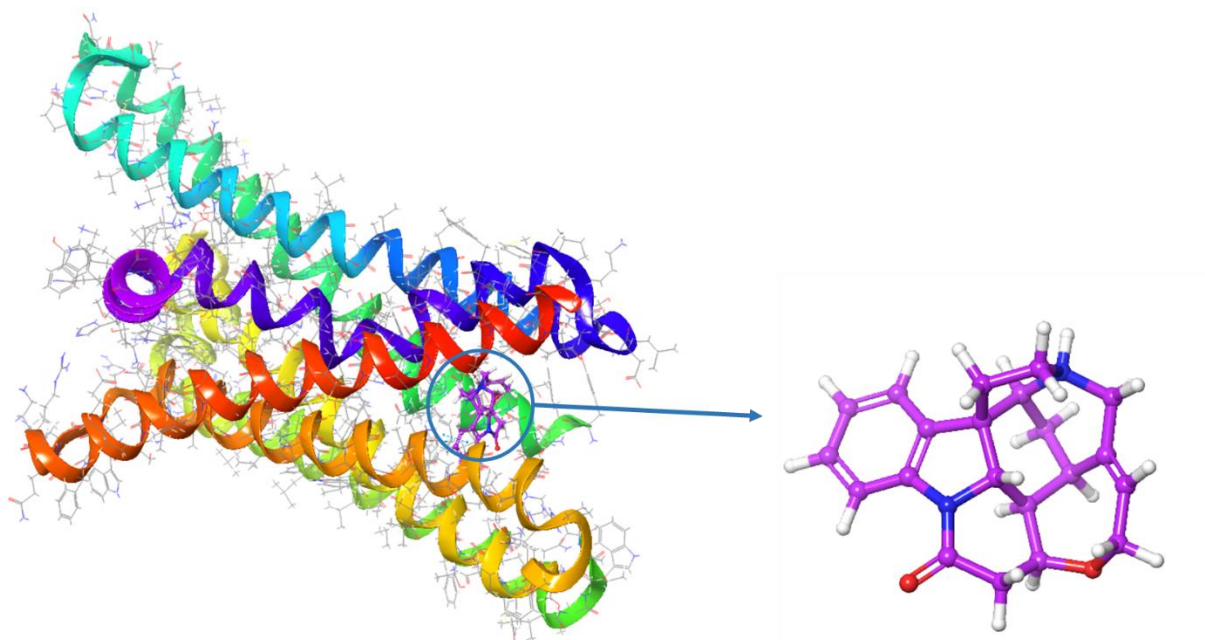
5.2.1 Προετοιμασία προσδετών

Το σύνολο των ενώσεων εισήχθη με μορφή SMILES στον χώρο εργασίας της πλατφόρμας Maestro molecular Interface (έκδοση 13:9). Μέσω του προγράμματος LigPrep, μετατράπηκαν σε τρισδιάστατες (3D) δομές χαμηλής ενέργειας (Schrödinger Release 2024-1: LigPrep, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2024) και ορίστηκε το επιθυμητό $\text{pH} = 7,0 \pm 0,5$ προκειμένου να δημιουργηθούν όλες οι πιθανές ιοντικές μορφές. Επιπλέον, για την ακριβή αναπαράσταση των μοριακών αλληλεπιδράσεων επιλέχθηκε το πεδίο δυνάμεων (force field) OPLS3.

5.2.2 Επιλογή κατάλληλου υποδοχέα - Προετοιμασία ανθρώπινου υποδοχέα

Έπειτα από εκτενή αναζήτηση σε βιβλιογραφικές πηγές και αρχεία PDB, επιλέχθηκε ο ανθρώπινος υποδοχέας πικρής γεύσης TAS2R46, συμπλοκοποιημένος με το μόριο της στρυχνίνης. Η επιλογή για αυτό το μοριακό σύστημα προήλθε από τον πρόσφατο πειραματικό προσδιορισμό της δομής συμπλόκου TAS2R46-στρυχνίνης, που πραγματοποιήθηκε το 2022, προκειμένου να αναζητηθούν παρόμοια δομικά μοτίβα. (Pallante et al., 2024). Για το σκοπό αυτό, από την πρωτεϊνική βάση δεδομένων (<https://www.rcsb.org>) ανακτήθηκε η δομή κρυογονικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (cryo-EM) του ανθρώπινου υποδοχέα TAS2R46 (Κωδικός PDB: 7XP6 και ανάλυση: 3,01Å) συμπλοκοποιημένη με το μόριο της στρυχνίνης.

Για την προετοιμασία του υποδοχέα χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Protein Preparation Wizard της πλατφόρμας Maestro. Πραγματοποιήθηκε ρύθμιση του pH ($\text{pH} = 7,0 \pm 0,5$), προσθήκη ατόμων υδρογόνου, απομάκρυνση όλων των μορίων H_2O που δεν συμμετείχαν σε γέφυρα μεταξύ προσδέτη ή με τα αμινοξέα του στόχου και η βελτιστοποίηση της πρωτεϊνικής δομής. Για την επίτευξη σταθερής διαμόρφωσης, πραγματοποιήθηκε ενεργειακή ελαχιστοποίηση χρησιμοποιώντας το πεδίο δυνάμεων (force field) OPLS3. Στο Σχήμα 5.2 απεικονίζεται ο εξεταζόμενος υποδοχέας *h*TAS2R46 συμπλοκοποιημένος με το μόριο της στρυχνίνης έπειτα από την προετοιμασία του.

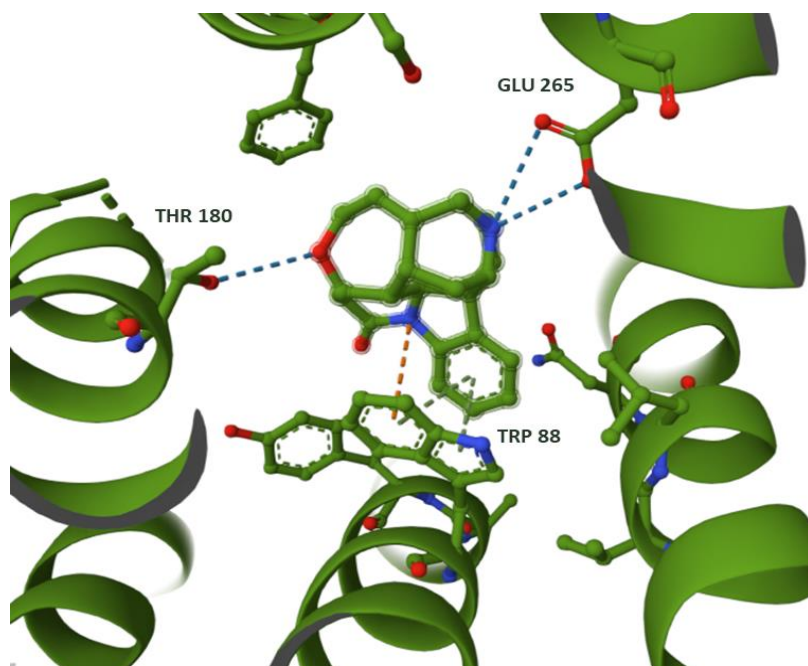


Σχήμα 5.2: (Αριστερά) Τριδιάστατη απεικόνιση του ανθρώπινου υποδοχέα TAS2R46 (PDB: 7XP6) συμπλοκοποιημένου με το μόριο της στρυχνίνης, (Δεξιά) Τριδιάστατη απεικόνιση της στρυχνίνης

Επομένως, προσδιορίστηκε ο τρόπος πρόσδεσης του συμπλοκοποιημένου προσδέτη στρυχνίνη (strychnine) με τον υποδοχέα *h*TAS2R46 (PDB ID: 7XP6). Συγκεκριμένα, τα αμινοξέα που εμπλέκονται στην πρόσδεση αναγνωρίστηκαν και επικυρώθηκαν μέσω της βιβλιογραφίας (Protein Data Bank-PDB) (Πίνακας 5.2). Στο Σχήμα 5.3 απεικονίζονται σε τριδιάστατη μορφή οι σχηματιζόμενοι δεσμοί, όπως προκύπτουν από τη δομή κρυογονικής ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (cryo-EM) της συμπλοκοποιημένης στρυχνίνης (strychnine) (PDB ID: 7XP6).

Πίνακας 5.2: Σχηματιζόμενοι δεσμοί μεταξύ του αγωνιστή στρυχνίνη (strychnine) και του πικρού υποδοχέα *h*TAS2R46

Κρίσιμα αμινοξέα	Σχηματιζόμενοι Δεσμοί
Γλουταμινικό οξύ (Glu) 265	2 Δεσμοί υδρογόνου (HB)
Θρεονίνη (Thr) 180	Δεσμός υδρογόνου (HB)
Θρυπτοφάνη (Trp) 88	2 π-π δεσμούς (pi-pi stacking)
	π- κατιόντος αλληλεπίδραση (pi-cation interaction)



Σχήμα 5.3: Τριδιάστατη απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης του συμπλοκοποιημένου μορίου στρυχνίνης στη θέση πρόσδεσης του πικρού υποδοχέα *hTAS2R46* (PDB ID: 7XP6).

5.3 Επικύρωση της διαδικασίας της Μοριακής Πρόσδεσης

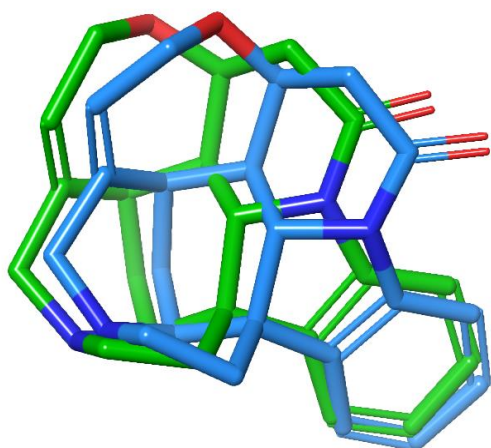
Για την επικύρωση της μοριακής πρόσδεσης και τον προσδιορισμό των κρίσιμων αλληλεπιδράσεων στη θέση πρόσδεσης του υποδοχέα, πραγματοποιήθηκαν πειράματα μοριακής πρόσδεσης στο μόριο της στρυχνίνης, τον ισχυρότερο αγωνιστή του TAS2R46 (Xu et al., 2022), χρησιμοποιώντας τους αλγορίθμους Πρότυπης Ακρίβειας (Standard Precision – SP) και Επιπρόσθετης Ακρίβειας (Extra Precision – XP) του προγράμματος Glide. Η θέση πρόσδεσης ορίστηκε σύμφωνα με τις συντεταγμένες του μορίου στρυχνίνης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία πλέγματος (grid box) διαστάσεων 10:10:10 Å.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε υπέρθεση της κρυογονικής δομής της στρυχνίνης με τη διαμόρφωση που προέκυψε έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου Πρότυπης Ακρίβειας (SP) και του αλγορίθμου Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP). Επιλέχθηκε να δημιουργηθούν 10 διαφορετικές πόζες (poses) πρόσδεσης στον εξεταζόμενο υποδοχέα. Η διαδικασία επαλήθευσης της μοριακής πρόσδεσης βασίστηκε στην αξιολόγηση της ομοιότητας μεταξύ των υπερτιθέμενων δομών της κρυο-EM και της προσδεδεμένης στρυχνίνης. Η ανάλυση αυτή κατέδειξε μια τιμή απόκλισης τετραγωνικής ρίζας μέσου τετραγώνου (RMSD) ίση με 0.1418 Å. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν μελετήθηκαν ως προς την αρχική διαμόρφωση που είχε ο αγωνιστής. Παρακάτω παρουσιάζονται οι τιμές της ενέργειας πρόσδεσης (Glide – score) της

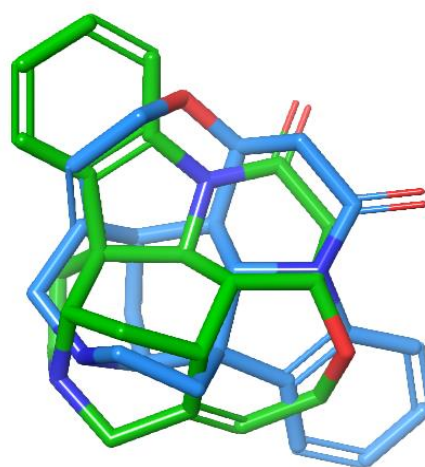
στρυχνίνης (Πίνακας 5.3) και οι καλύτερες πόζες που προέκυψαν από την μελέτη των αλγορίθμων SP και XP, αντίστοιχα (Σχήμα 5.4 και 5.5).

Πίνακας 5.3: Αποτελέσματα ενέργειας πρόσδεσης (Glide-score) της στρυχνίνης, έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου SP και XP.

Ένωση	Ενέργεια πρόσδεσης (Glide-score) (kcal·mol ⁻¹)	
	Αλγόριθμος Πρότυπης Ακρίβειας (SP)	Αλγόριθμος Επιπρόσθετης Ακρίβειας (XP)
Στρυχνίνη	- 5,44	- 5,01



Σχήμα 5.4: Υπέρθυση των δύο διαμορφώσεων της στρυχνίνης έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου SP. Η δομή κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας της στρυχνίνης απεικονίζεται με μπλε χρώμα, ενώ η διαμόρφωση της στρυχνίνης που προέκυψε μετά την εφαρμογή του αλγορίθμου SP απεικονίζεται με πράσινο χρώμα.



Σχήμα 5.5: Υπέρθυση των δύο διαμορφώσεων της στρυχνίνης έπειτα από την εφαρμογή του αλγορίθμου XP. Η δομή κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας της στρυχνίνης απεικονίζεται με μπλε χρώμα, ενώ η διαμόρφωση της στρυχνίνης που προέκυψε μετά την εφαρμογή του αλγορίθμου XP απεικονίζεται με πράσινο χρώμα.

Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων προέκυψε ότι ο αλγόριθμος SP παρουσίασε ικανοποιητικά αποτελέσματα και κρίθηκε κατάλληλος για την εφαρμογή πειραμάτων Μοριακής Πρόσδεσης.

5.4 Αποτίμηση αποτελεσμάτων Μοριακής Πρόσδεσης

Στο επόμενο βήμα της μελέτης, εφαρμόστηκε ο αλγόριθμος Glide-SP στις ενώσεις που επιλέχθηκαν (Πίνακας 5.1) και αξιολογήθηκαν τα αποτελέσματα της μοριακής πρόσδεσης. Η αξιολόγηση των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με βάση τα εξής κριτήρια: α) την ικανότητα πρόσδεσης των εξεταζόμενων ενώσεων, όπως αυτή καθορίζεται από τις τιμές Glide-Score και β) τον αριθμό και το είδος των αλληλεπιδράσεων με αμινοξέα που βρίσκονται εντός της θέσης πρόσδεσης.

Προκειμένου να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις των 36 εξεταζόμενων ενώσεων με τα αμινοξέα, συγκρίθηκαν οι τιμές Glide-score τους με την τιμή του συμπλοκοποιημένου προσδέτη. Στον Πίνακα 5.4 συλλέχθηκαν οι ενώσεις που εμφάνισαν μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης, όπως αντανακλάται στην τιμή Glide-score, σε σύγκριση με τον γνωστό αγωνιστή στρυχνίνη (gscore = $-5,44 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$).

Πίνακας 5.4: Τιμές ενέργειας πρόσδεσης (Glide – score) των ενώσεων που εμφάνισαν μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης σε σύγκριση με τη στρυχνίνη, μετά την εφαρμογή του αλγορίθμου Glide SP.

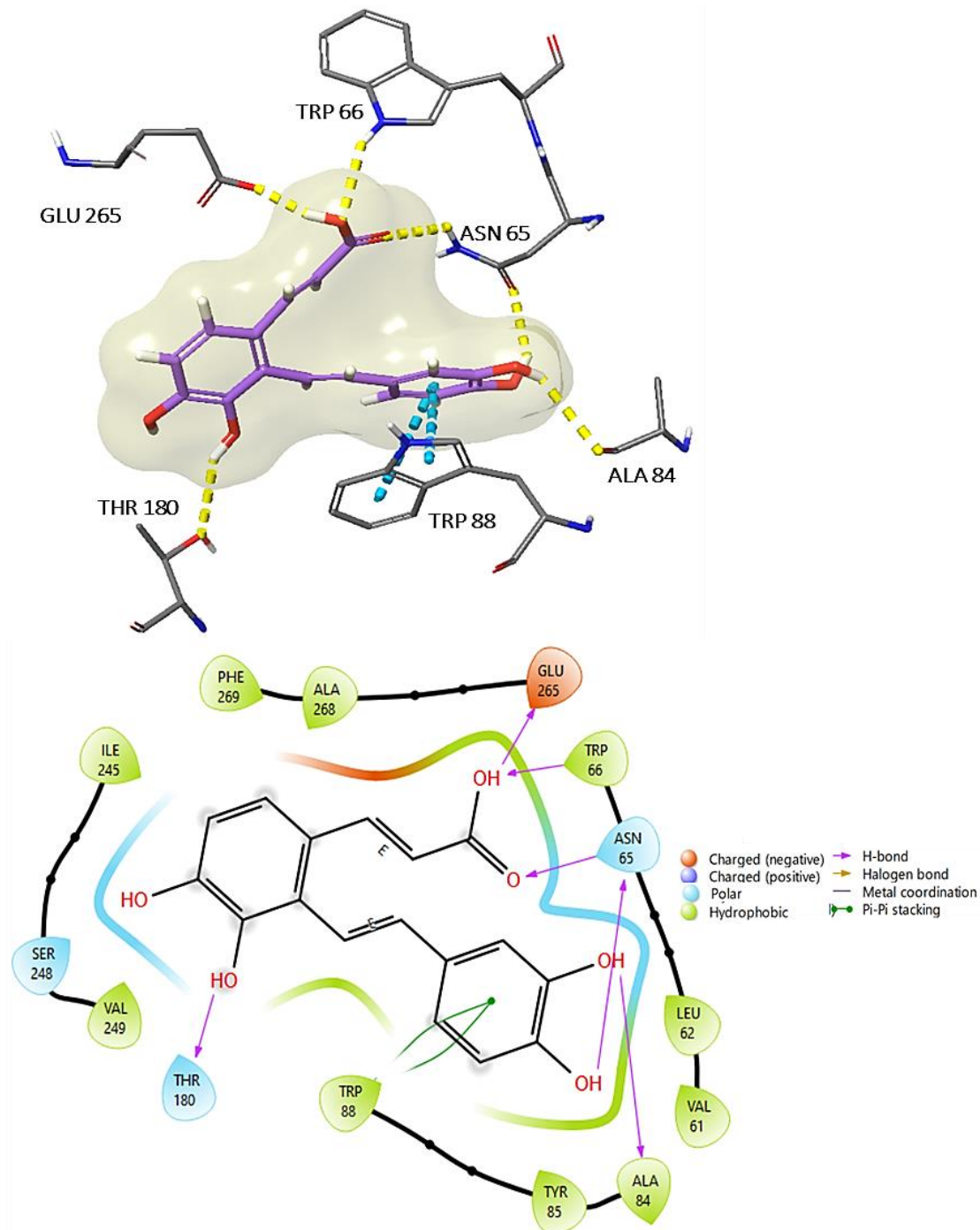
Ένωση	Glide Score ($\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)
Στρυχνίνη (Strychnine)	-5,44
Caffeic acid	-5,58
Salvianolic acid G	-5,63
p-Coumaric acid	-5,72
Gallic acid	-5,94
Salvianolic acid F	-6,31
Salvianolic acid A	-6,32
Salvianolic acid K	-6,38
Isoquercetin	-6,48
O-caffeoyl rosmarinic acid (isomelitric acid A)	-6,49
Salvianolic acid H/I	-6,49
Lithospermic acid A	-6,67

Sagerinic acid	-6,81
Salvianolic acid C	-7,16
Caffeoylferuloyltartaric acid (cichoric acid methyl ether)	-7,21
Salvianolic acid B	-7,26
Rosmarinic acid	-7,52

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το εργαλείο Virtuous Multitaste και τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης, επιλέχθηκαν οκτώ φυτοχημικές ενώσεις (Salvianolic acid F, Salvianolic acid A, Isoquercetin, Lithospermic acid A, Sagerinic acid, Salvianolic acid C, Caffeoylferuloyltartaric acid, Rosmarinic acid) ως οι πιο πιθανοί πικροί παράγοντες. Από την αξιολόγηση τρόπων πρόσδεσης των προαναφερθέντων ενώσεων, διαπιστώνεται ότι όλες οι ενώσεις σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με το αμινοξύ Glu265, καθώς και με το αμινοξύ Thr180 και/ή Trp88, όπως η στρυχνίνη. Αυτό το μοτίβο αλληλεπίδρασης ενισχύει τις δυνατότητές τους να προσδέσουν στον εξεταζόμενο υποδοχέα και να παραμένουν σταθερές. Ο τρόπος πρόσδεσης των οκτώ ενώσεων στον πικρό υποδοχέα hTAS2R46, απεικονίζεται στα Σχήματα 5.6-5.13 και περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

- Ένωση 1: Salvianolic acid F

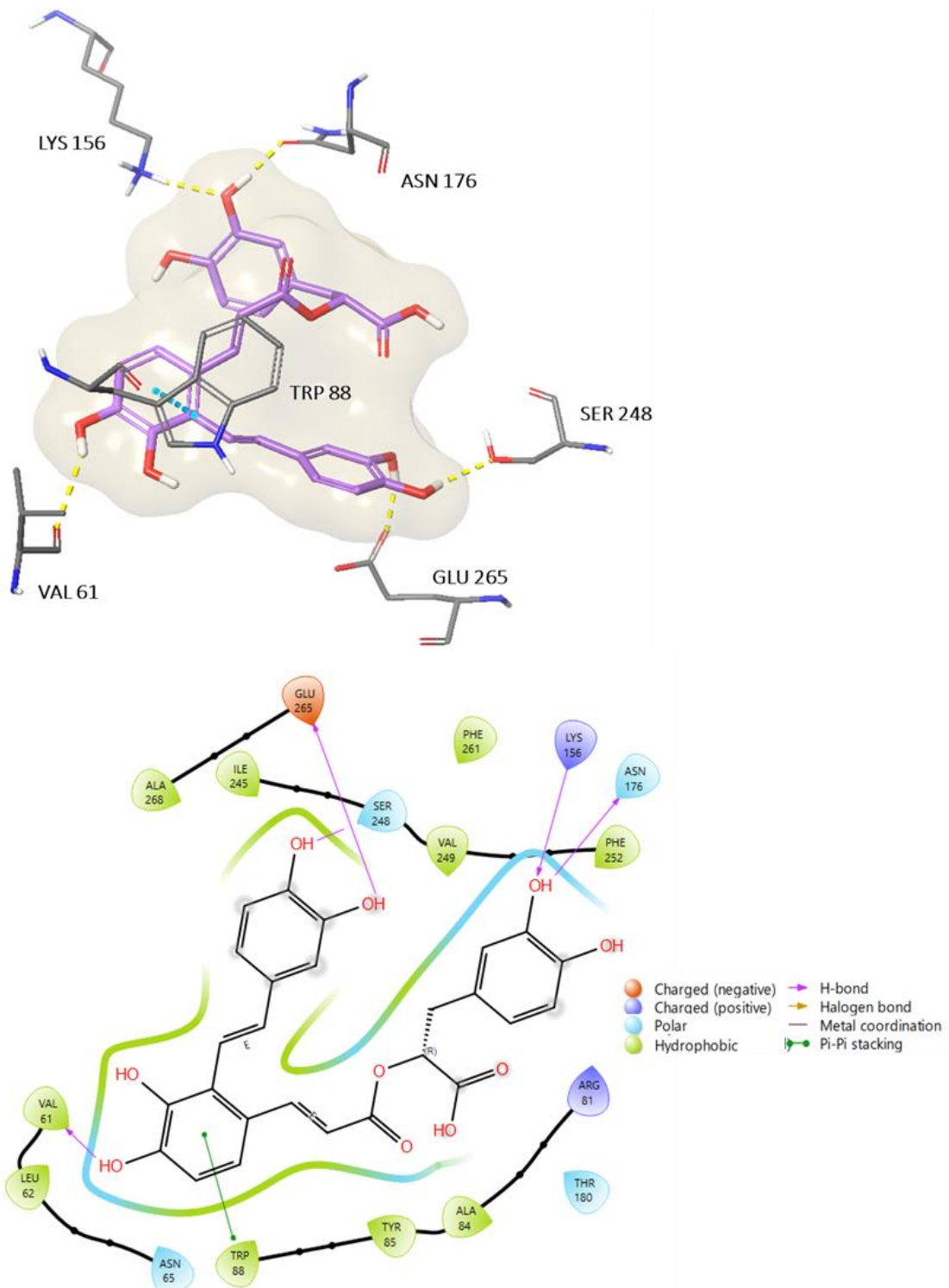
Στο Σχήμα 5.6 παρατηρείται ο σχηματισμός δεσμού υδρογόνου με τα αμινοξέα Glu265, Trp66, Asn65, Ala84 και Thr180. Επίσης, η ένωση σχηματίζει δύο π-π δεσμούς με το αμινοξύ Trp88. Επιπλέον, η ενέργεια πρόσδεσης ορίζεται $-6,31 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.



Σχήμα 5.6: Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Salvianolic acid F με τον υποδοχέα hTAS2R46: τριδιάστατη (πάνω) και διδιάστατη (κάτω).

- Ένωση 2: Salvianolic acid A

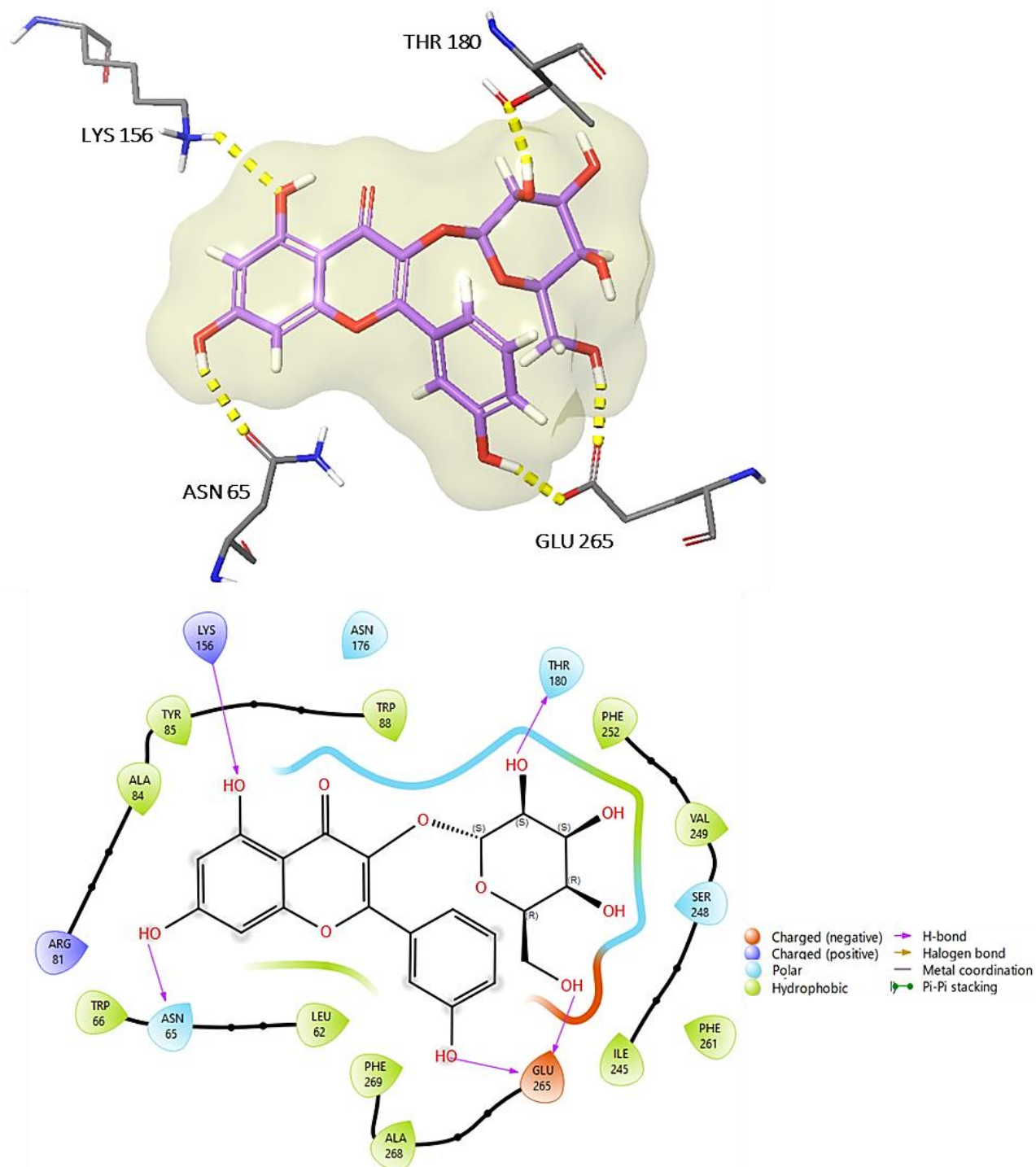
Στο Σχήμα 5.7 παρατηρείται ο σχηματισμός δεσμού υδρογόνου με τα αμινοξέα Glu265, Asn176, Lys156, Ser248 και Val61. Επίσης, η ένωση σχηματίζει π-π δεσμό με το αμινοξύ Trp88. Επιπλέον, η ενέργεια πρόσδεσης είναι $-6,32 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.



Σχήμα 5.7: Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Salvianolic acid A με τον υποδοχέα hTAS2R46: τριδιάστατη (πάνω) και διδιάστατη (κάτω).

- Ένωση 3: Isoquercetin

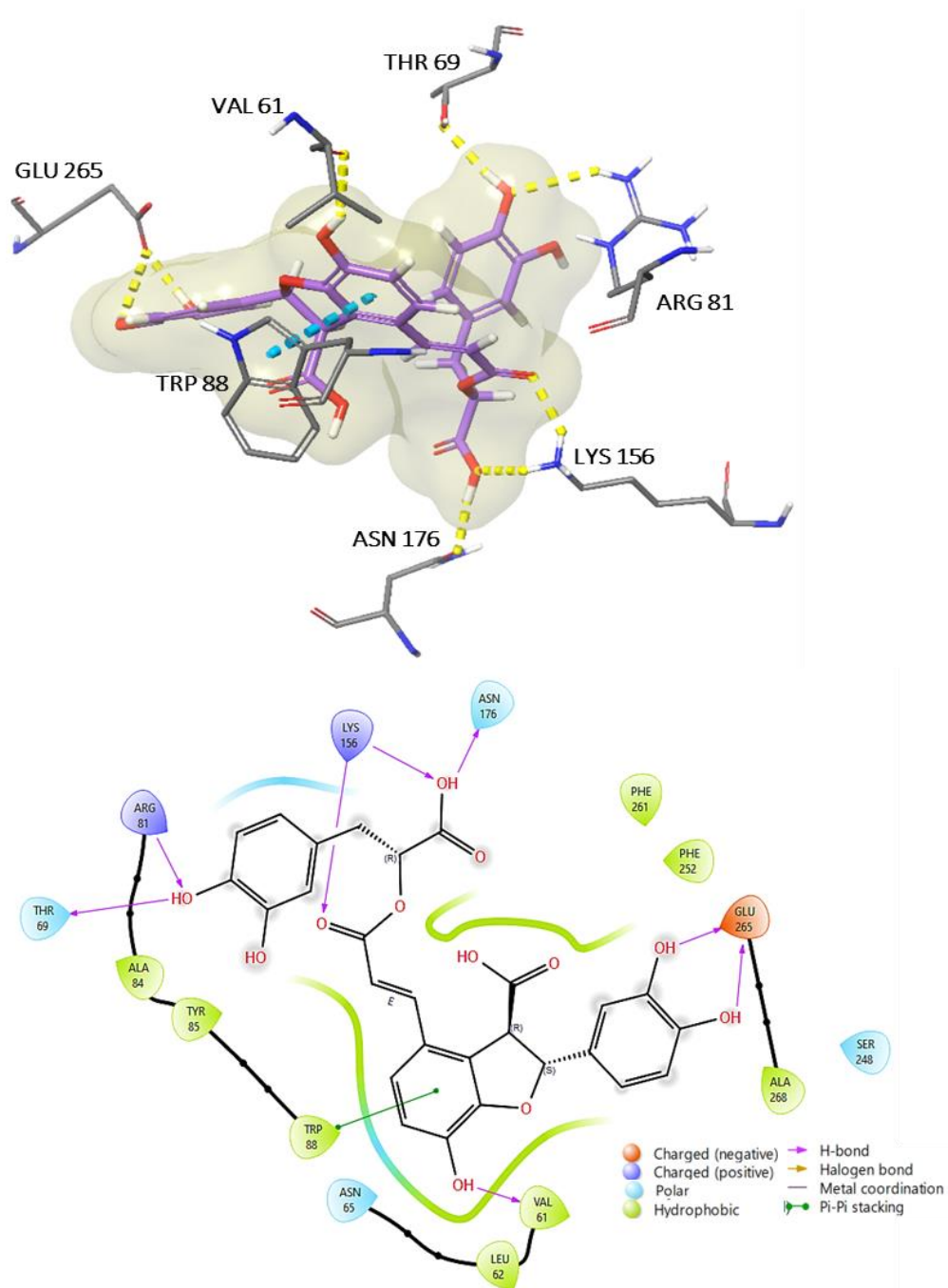
Η Isoquercetin ανήκει στην οικογένεια των φλαβονοειδών. Στο Σχήμα 5.8 παρατηρείται ο σχηματισμός δεσμού υδρογόνου με τα αμινοξέα Lys156, Asn65, Thr180 και διπλό δεσμό υδρογόνου με το αμινοξύ Glu265. Επιπλέον, η ενέργεια πρόσδεσης είναι $-6,48 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.



Σχήμα 5.8: Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Isoquercetin με τον υποδοχέα *hTAS2R46*: τριδιάστατη (πάνω) και διδιάστατη (κάτω).

- Ένωση 4: Lithospermic acid A

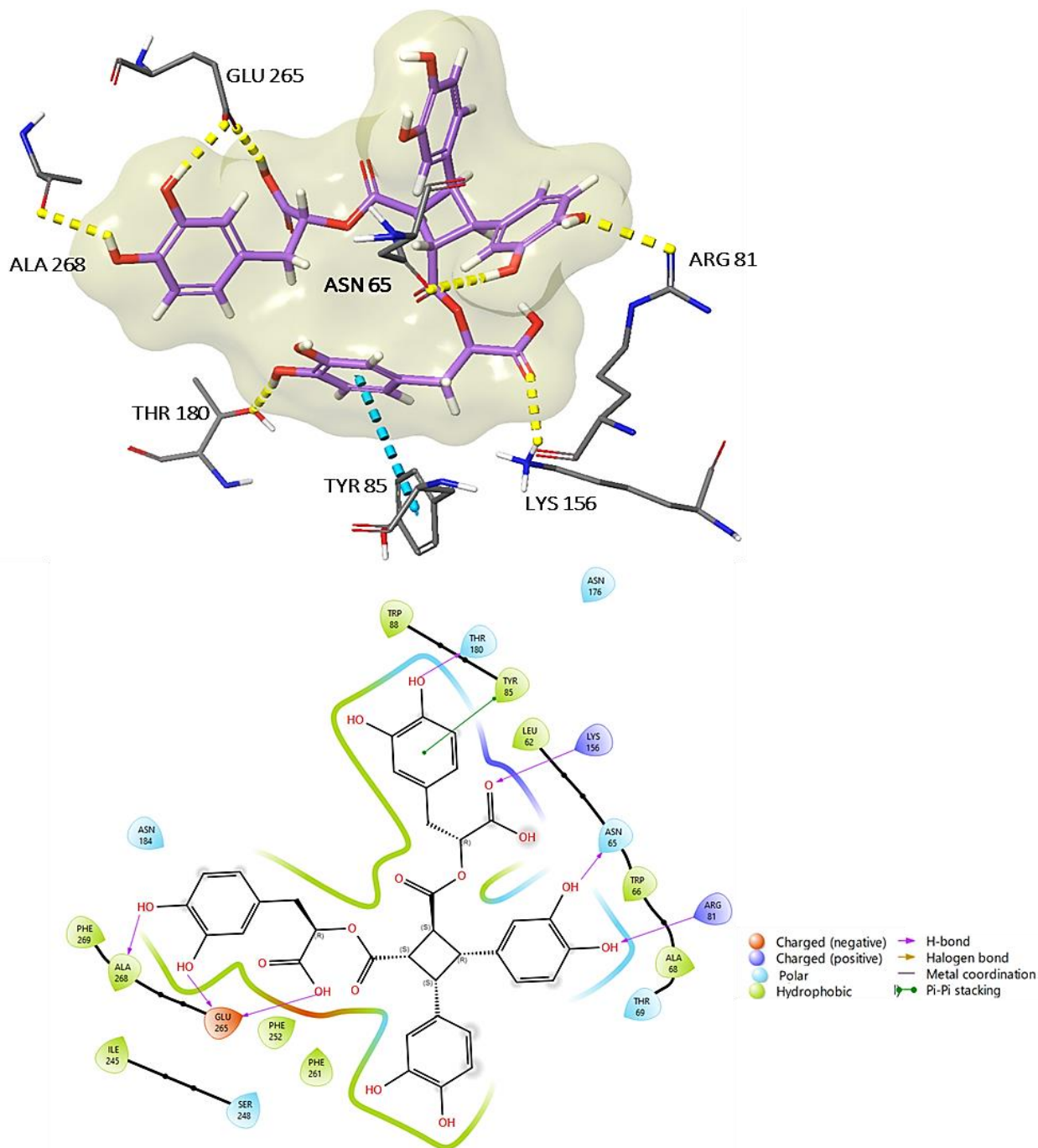
Το Lithospermic acid, μια πολυφαινολική ένωση που βρίσκεται συνήθως σε ορισμένα φυτά και συνδέεται στενά με τα σαλβιανολικά οξέα (Salvianolic acids), παρουσιάζει ένα πλούσιο μοτίβο αλληλεπιδράσεων που περιλαμβάνει τον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξέα Lys156, Glu 265, Thr69, Val61, Arg81, Asn 176 και π-π δεσμού με το αμινοξύ Trp88 (Σχήμα 5.9). Επιπλέον, η ενέργεια πρόσδεσης ορίζεται $-6,67 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.



Σχήμα 5.9: Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Lithospermic acid A με τον υποδοχέα hTAS2R46: τριδιάστατη (πάνω) και διδιάστατη (κάτω).

- Ένωση 5: Sagerinic acid

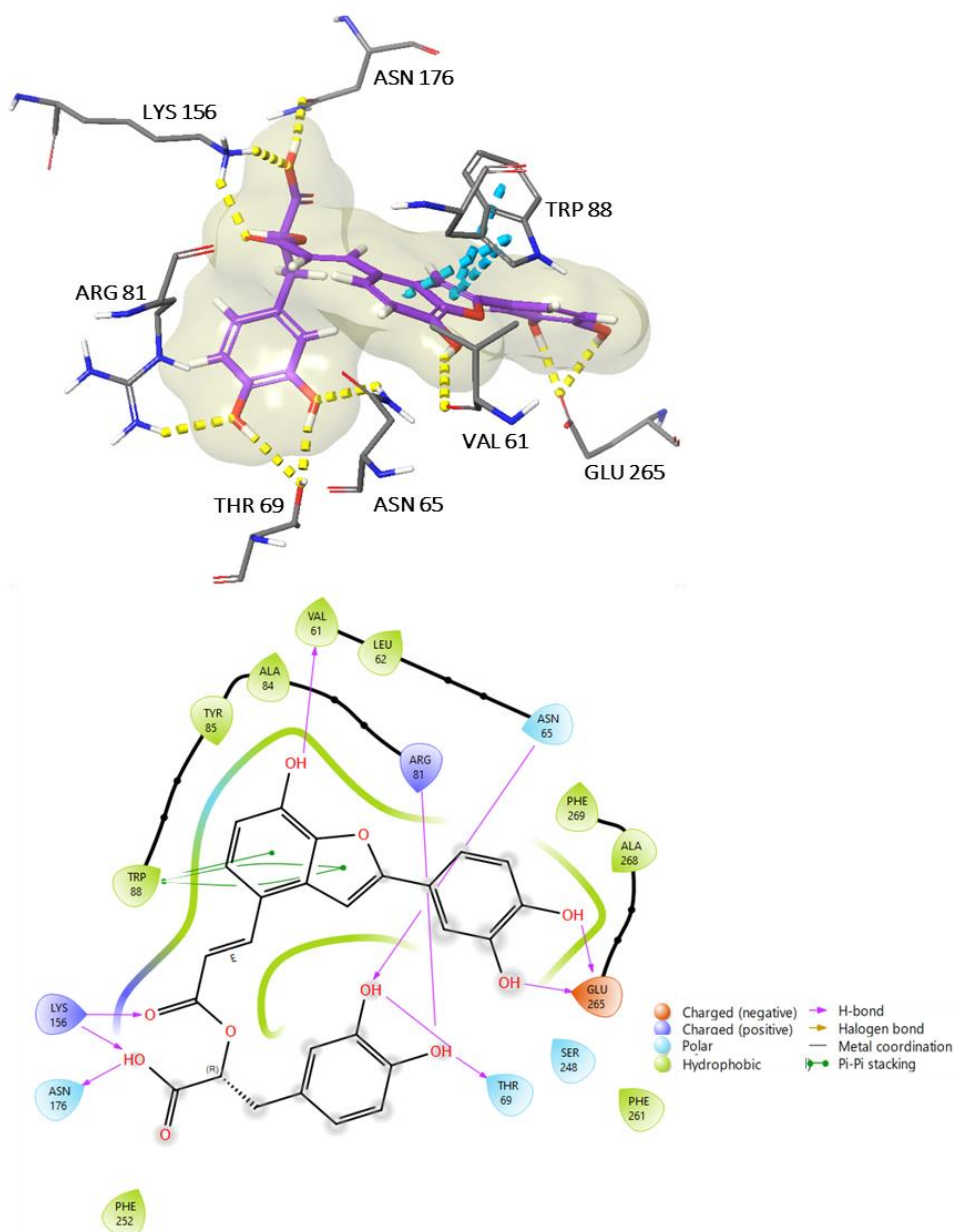
Η ένωση Sagerinic acid ανήκει στην κατηγορία των οργανικών ενώσεων που είναι γνωστές ως λιγνάνες. Στο Σχήμα 5.10 παρατηρείται ο σχηματισμός δεσμού υδρογόνου με τα αμινοξέα Lys156, Arg81, Asn65, Ala268 Thr180 και διπλού δεσμού υδρογόνου με το αμινοξύ Glu265. Το αμινοξύ Tyr88 αναπτύσσει π-π αλληλεπίδραση με των αρωματικό δακτύλιο της ένωσης. Επιπλέον, η ενέργεια πρόσδεσης είναι $-6,81 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.



Σχήμα 5.10: Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Sagerinic acid με τον υποδοχέα hTAS2R46: τριδιάστατη (πάνω) και διδιάστατη (κάτω).

- Ένωση 6: Salvianolic acid C

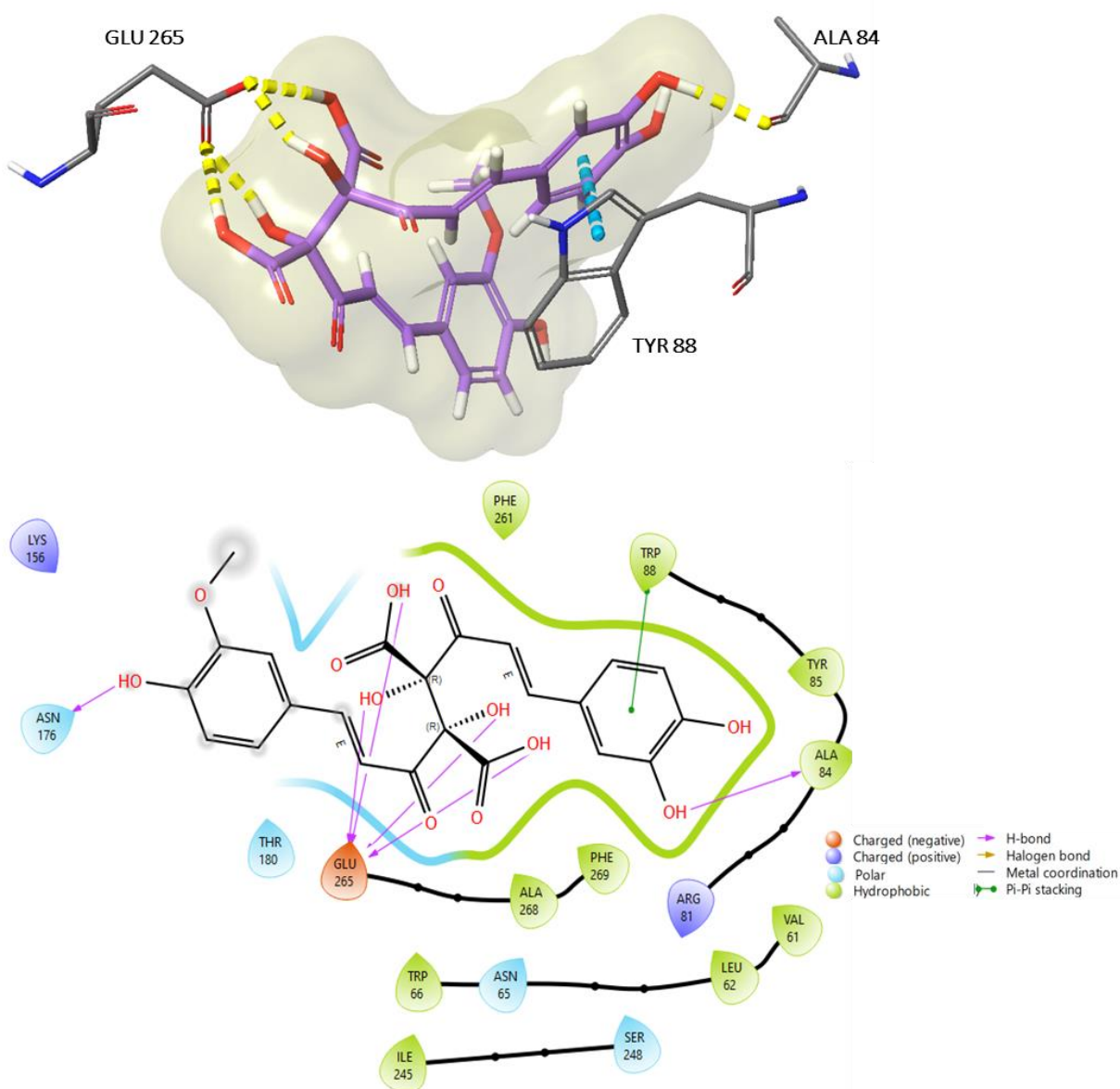
Η ένωση 6 (Σχήμα 5.11) σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με τα αμινοξέα Asn176, Arg81, Val61, Asn65. Το αμινοξύ Trp88 αναπτύσσει δύο π-π αλληλεπιδράσεις με των αρωματικό δακτύλιο και μία π-π αλληλεπίδραση με τον φουρανικό δακτύλιο της ένωσης. Η πρόσδεση της ένωσης 6 ενισχύεται επιπλέον μέσω σχηματισμού διπλού δεσμού υδρογόνου με τα αμινοξέα Thr69 και Glu265, αντίστοιχα. Επιπλέον, η ενέργεια πρόσδεσης είναι $-7,16 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.



Σχήμα 5.11: Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Salvianolic acid C με τον υποδοχέα hTAS2R46: τριδιάστατη (πάνω) και διδιάστατη (κάτω).

- Ένωση 7: Caffeoylferuloyltartaric acid (cichoric acid methyl ether)

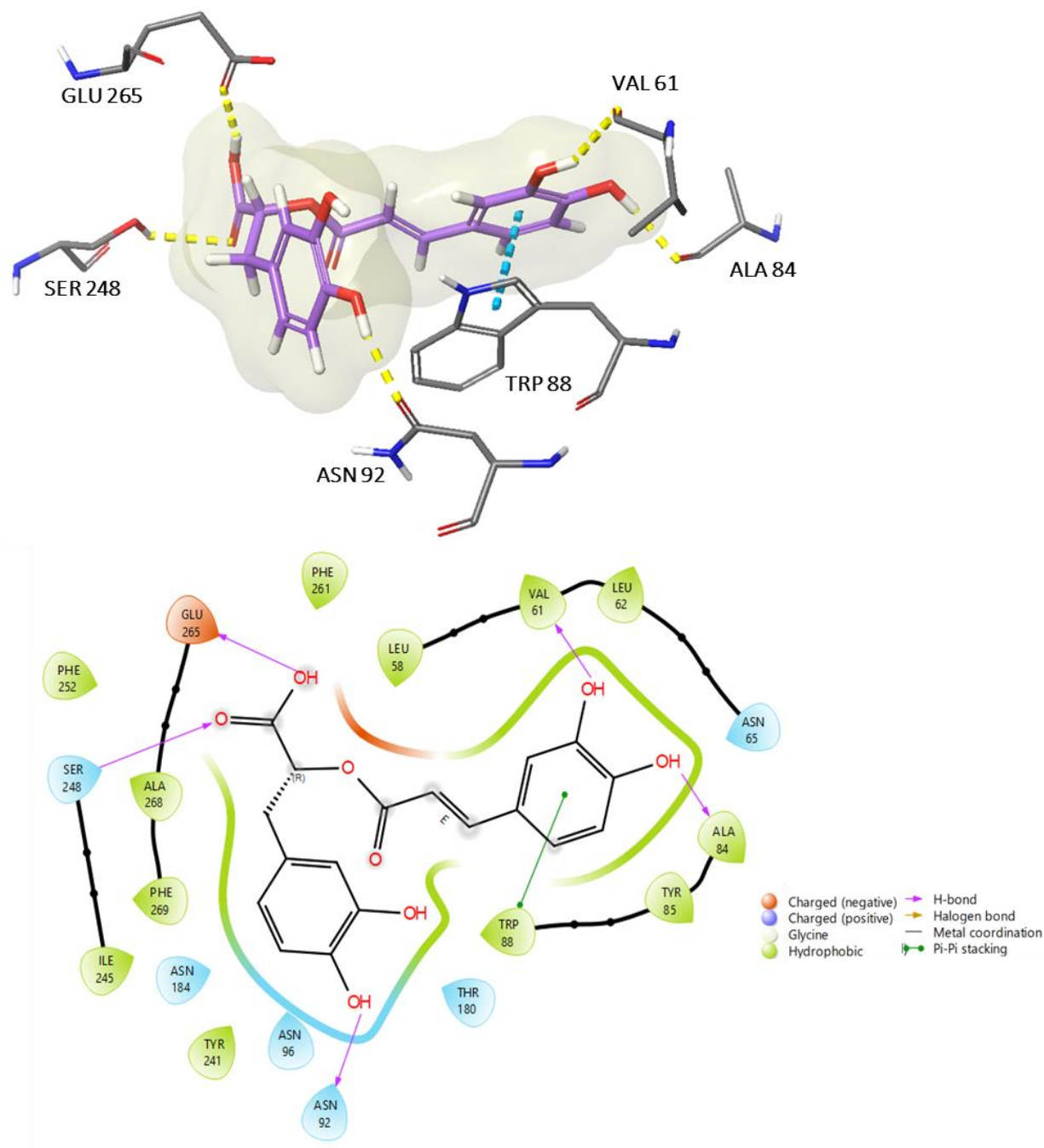
Αποτελεί ένα σύνθετο φαινολικό οξύ, το οποίο αποτελείται από δύο κύρια φαινολικά συστατικά: το **καφεϊκό οξύ** (caffeic acid) και το **φερουλικό οξύ** (ferulic acid), δεσμευμένα πάνω σε ένα μόριο **τρυγικού οξέος** (tartaric acid). Στο Σχήμα 5.12 παρατηρείται ο σχηματισμός δεσμού υδρογόνου με το αμινοξύ Ala84 και η ανάπτυξη π-π αλληλεπίδρασης μεταξύ του αρωματικού δακτυλίου της ένωσης και του αμινοξέος Tyr88. Η πρόσδεση του Caffeoylferuloyltartaric acid (cichoric acid methyl ether) ενισχύεται μέσω του σχηματισμού τετραπλού δεσμού υδρογόνου με το αμινοξύ Glu265. Επιπλέον, η ενέργεια πρόσδεσης είναι $-7.21 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.



Σχήμα 5.12: Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Caffeoylferuloyltartaric acid (cichoric acid methyl ether) με τον υποδοχέα hTAS2R46: τριδιάστατη (πάνω) και διδιάστατη (κάτω).

- Ένωση 8: Rosmarinic acid

Το Rosmarinic acid είναι ένα φυσικό φαινολικό συστατικό που απαντάται κυρίως στα αρωματικά φυτά της οικογένειας *Lamiaceae*. Στο Σχήμα 5.13 παρατηρείται ο σχηματισμός δεσμού υδρογόνου με τα αμινοξέα Glu265, Ser248, Asn92, Ala84 και Val61. Επίσης, αναπτύσσεται π-π αλληλεπίδραση μεταξύ του αρωματικού δακτυλίου της ένωσης Rosmarinic acid και του αμινοξέος Trp88. Η ενέργεια πρόσδεσης ισούται με $-7,52 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$.



Σχήμα 5.13: Απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων της ένωσης Rosmarinic acid με τον υποδοχέα hTAS2R46: τριδιάστατη (πάνω) και διδιάστατη (κάτω).

5.5 Αποτελέσματα πλατφόρμας BitterX

Στο τελικό στάδιο, χρησιμοποιήθηκε το διαδικτυακό εργαλείο BitterX (<http://mdl.shsmu.edu.cn/BitterX>) για τη συλλογή επιπρόσθετων πληροφοριών που σχετίζονται όχι μόνο με την πιθανότητα εμφάνισης πικρής γεύσης των οκτώ φυτοχημικών, αλλά και με την πρόβλεψη της πιθανότητας πρόσδεσής τους στον πικρό υποδοχέα hTAS2R46. Τα αποτελέσματα της πρόβλεψης του BitterX υπέδειξαν ότι όλες οι επιλεγμένες ενώσεις αναγνωρίζονται ως πικρές και εμφάνισαν ποσοστό πιθανότητας πρόσδεσης στον πικρό υποδοχέα hTAS2R46 μεγαλύτερο από 50%, επιβεβαιώνοντας την αποτελεσματικότητα της *in silico* μεθοδολογίας που εφαρμόστηκε (Πίνακας 5.5).

Πίνακας 5.5: Αποτελέσματα πρόβλεψης της πιθανότητας (%) πρόσδεσης των 8 επιλεγμένων ενώσεων στον υποδοχέα hTAS2R46 έπειτα από την εφαρμογή του εργαλείου BitterX.

Όνομα ένωσης	Ποσοστό πιθανότητας
Salvianolic acid F	65,81%
Salvianolic acid A	68,80%
Isoquercetin	60,99%
Lithospermic acid A	70,83%
Sagerinic acid	51,78%
Salvianolic acid C	74,46%
Caffeoylferuloyltartaric acid (cichoric acid methyl ether)	58,26%
Rosmarinic acid	51,71%

5.6 Σύνοψη

Το ποσοστό πρόβλεψης πικρής γεύσης από το εργαλείο Virtuous Multitaste, καθώς και η πιθανότητα πρόσδεσης των επιλεγμένων ενώσεων με τον υποδοχέα πικρής γεύσης hTAS2R46 από το εργαλείο BitterX, παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 5.6.

Πίνακας 5.6: Πρόβλεψη πικρής γεύσης και πιθανότητα (%) πρόσδεσης των 8 επιλεγμένων ενώσεων στον υποδοχέα hTAS2R46, μέσω εφαρμογής των εργαλείων Virtuous Multitaste και BitterX, αντίστοιχα.

Όνομα ένωσης	% Πικρή γεύση (Virtuous Multitaste)	TAS2R46 πιθανότητα (BitterX)
Rosmarinic acid	40%	51,71%
Sagerinic acid	52%	51,78%
Lithospermic acid A	53%	70,83%

Salvianolic acid A	55%	68,80%
Caffeoylferuloyltartaric acid (cichoric acid methyl ether)	55%	58,26%
Salvianolic acid C	64%	74,46%
Salvianolic acid F	78%	65,81%
Isoquercetin	86%	60,99%

Τα Salvianolic acids και το Rosmarinic acid, μια συλλογή βιολογικά δραστικών ουσιών που απαντώνται κυρίως στις ρίζες του *Salvia miltiorrhiza*, γνωστό και ως Danshen, παρουσιάζουν ποικίλες αλληλεπιδράσεις που βελτιώνουν τη σταθερότητα της πρόσδεσης τους στον πικρό υποδοχέα *hTAS2R46*. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, διαπιστώθηκε ότι το Danshen έχει πικρή γεύση, γεγονός που ίσως εξηγεί τα ενδιαφέροντα αποτελέσματα των Salvianolic acids (Zou et al., 2023; Tang & Zhao, 2024). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, υποδεικνύεται ότι ορισμένες μη πτητικές διατροφικές ενώσεις, όπως οι σαπωνίνες, οι φαινολικές ενώσεις, οι ταννίνες και τα αλκαλοειδή, χαρακτηρίζονται ως πικρές και ενεργοποιούν διάφορους γευστικούς υποδοχείς. Επιπλέον, αρκετά πικρά φυτοθεραπευτικά συστατικά που βρίσκονται σε κοινά φυτικά τρόφιμα περιλαμβάνουν την ταγκερετίνη (tangeretin), την κουερσετίνη (quercetin), τη ναρινγίνη (naringin), την κατεχίνη (catechin), την επικατεχίνη (epicatechin) κ.ά., επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματά των *in silico* τεχνικών (Drewnowski et al., 2000; Soares et al., 2013).

Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της μοριακής πρόσδεσης, παρατηρείται ότι οι ενώσεις Chlorogenic acid, p-coumaric acid, Gallic acid, Ferulic acid, Caffeic acid και Ethyl protocatechuate εμφάνισαν περιορισμένη ή μηδαμινή ικανότητα πρόσδεσης με τον πικρό ανθρώπινο υποδοχέα *TASR46*. Ωστόσο, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, αυτές οι ενώσεις παρουσιάζουν πικρή γεύση (Karolkowski et al., 2023). Η εγκυρότητα αυτής της διαπίστωσης ενισχύεται από τα δεδομένα του εργαλείου BitterX, καθώς, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 5.7, παρατηρείται ότι οι παραπάνω ενώσεις ανιχνεύθηκαν σε άλλους πικρούς υποδοχείς της οικογένειας *hTAS2R*, υποδηλώνοντας ότι η αίσθηση πικρής γεύσης μπορεί να προκύπτει μέσω διαφορετικών μοριακών μηχανισμών.

Πίνακας 5.7: Ανίχνευση των ενώσεων protocatechuic, p-coumaric, p-hydroxybenzoic, gallic, ferulic και caffeic acids σε άλλους πικρούς υποδοχείς της οικογένειας hTAS2R με χρήση του εργαλείου BitterX

Όνομα ένωσης	Ποσοστό πιθανότητας
Chlorogenic acid	60,61% (TAS2R14)
p-coumaric acid	68,57% (TAS2R4)
Ferulic acid	71,83% (TAS2R14)
Gallic acid	92,57% (TAS2R14)
Caffeic acid	70,73% (TAS2R14)
Ethyl protocatechuate	59,07% (TAS2R1)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο : Γενικά συμπεράσματα και μελλοντικοί στόχοι

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε το φαινολικό προφίλ των εκχυλισμάτων βασιλικού (*Ocimum basilicum L.*), εστιάζοντας στην αξιολόγηση των πικρών ιδιοτήτων τους χρησιμοποιώντας εργαλεία πρόβλεψης της γεύσης και τεχνικές μοριακής πρόσδεσης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή του εργαλείου Virtuous Multitaste και τα πειράματα μοριακής πρόσδεσης, επιλέχθηκαν οκτώ φυτοχημικές ενώσεις (Salvianolic acid F, Salvianolic acid A, Isoquercetin, Lithospermic acid A, Sagerinic acid, Salvianolic acid C, Caffeoylferuloyltartaric acid, Rosmarinic acid) ως οι πιο πιθανοί πικροί παράγοντες. Αυτές οι φαινολικές ενώσεις επέδειξαν ισχυρότερη συγγένεια πρόσδεσης στον πικρό υποδοχέα hTAS2R46 από τον γνωστό αγωνιστή στρυχνίνη, κυρίως μέσω αλληλεπιδράσεων που εμπλέκουν τα αμινοξέα Glu265, Thr180 (μέσω άμεσων δεσμών υδρογόνου), ή/και με το Trp88 (μέσω π-π δεσμού). Τα αποτελέσματα της πρόβλεψης από το εργαλείο BitterX έδειξαν ότι όλες οι επιλεγμένες ενώσεις χαρακτηρίζονται ως πικρές και παρουσίασαν πιθανότητα πρόσδεσης στον πικρό υποδοχέα hTAS2R46 μεγαλύτερη του 50%, επιβεβαιώνοντας την προσέγγιση της *in silico* μεθόδου.

Επομένως, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης παρέχουν μια ολοκληρωμένη εικόνα του γευστικού προφίλ των παραπροϊόντων που προέρχονται από τον βασιλικό, υπογραμμίζοντας σημαντικές δυνατότητες αυτών των ενώσεων καθώς και των εκχυλισμάτων βασιλικού, ως πικρών συστατικών στη βιομηχανία τροφίμων. Αυτή η έρευνα θέτει τα θεμέλια για τη βιώσιμη και καινοτόμο χρήση βιομάζας αρωματικών βοτάνων, εξετάζοντας τα πικρά χαρακτηριστικά και τις αλληλεπιδράσεις συγκεκριμένων φυτοσυστατικών με τον υποδοχέα hTAS2R46, η οποία θα μπορούσε να ενισχύσει και βελτιώσει την ανάπτυξη νέων γευστικών παραγόντων. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη δημιουργία ποικιλιών βασιλικού υψηλής ποιότητας που είναι άφθονες σε συγκεκριμένες ενώσεις-στόχους. Ως μελλοντικός στόχος, επιδιώκεται η διεξαγωγή πειραμάτων μοριακής πρόσδεσης και στον πικρό ανθρώπινο υποδοχέα TAS2R14, ο οποίος παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Η μελέτη αυτού του υποδοχέα θα μπορούσε να προσφέρει περαιτέρω πληροφορίες για τις πικρές ιδιότητες των φυτοσυστατικών του βασιλικού και να επεκτείνει τις εφαρμογές τους στη βιομηχανία γεύσεων. Τέλος, θα μπορούσαν να διερευνηθούν οι εφαρμογές στην ιατρική έρευνα, καθώς η συσχέτιση του πικρού υποδοχέα hTAS2R46 με τη θεραπεία του άσθματος, ανοίγει νέες προοπτικές και για τη φαρμακοβιομηχανία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Purushothaman B., PrasannaSrinivasan R., Suganthi P., Ranganathan B., Gimbin J., Shanmugam K., A Comprehensive Review on *Ocimum basilicum*, *Journal of Natural Remedies*, vol. 18, 2018, pp. 71 –
2. Azizah, N. S., Irawan, B., Kusmoro, J., Safriansyah, W., Farabi, K., Oktavia, D., Doni, F., & Miranti, M. (2023). Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) — A Review of Its Botany, Phytochemistry, Pharmacological Activities, and Biotechnological Development. *Plants*, 12(24), 4148. <https://doi.org/10.3390/plants12244148>
3. BRESLIN, P. A. 2013. An evolutionary perspective on food and human taste. *Curr Biol*, 23, R409- 18
4. Γρηγοράκης Κ., Τσάκνης Ι., *Οργανοληπτικός Έλεγχος Τροφίμων*, Εκδόσεις Παπασωτηρίου, Αθήνα 2014
5. Laffitte A., Neiers F., Briand L. (2014). Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 17(4): p379 – 385
6. Cao, J., Huang, S., Qian, J., Huang, J., Jin, L., Su, Z., & Liu, J. (2009). Evolution of the class C GPCR Venus flytrap modules involved positive selected functional divergence. *BMC Evolutionary Biology*, 9s67. <http://doi.org/10.1186/1471-2148-9-67>
7. Lee A.A, Owyang C. (2017), “Sugars, Sweet Taste Receptors, and Brain Responses”, *Nutrients* 9(7):653. <https://doi.org/10.3390/nu9070653>
8. HMT METABOLOMICS (2022) Metabolomics of taste [online]. Available from: <https://en.humanmetabolome.com/wp-content/uploads/2022/03/HMT-Taste-ebook.pdf>
9. Duc N.M., Kim H.R., and Chung K.Y. (2015) , Structural mechanism of G protein activation by G protein-coupled receptor. *European Journal of Pharmacology*. 763: p214–22.

10. Descamps-Solà M., Vilalta A., Jalsevac F., Blay T.M, Rodríguez-Gallego E., Pinent M., Beltrán-Debón R., Terra X., and Ardévol A., (2023), Bitter taste receptors along the gastrointestinal tract: comparison between humans and rodents, *Frontiers in Nutrition*, vol:10 doi: [10.3389/fnut.2023.1215889](https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1215889)
11. Kohlmeier M, *Nutrient Metabolism*, 2nd edition (2015), p.1-23, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387784-0.00001-8>
12. Agarwal S, And R. Mehrotra. Mini Review_ An Overview Of Molecular Docking. *Jsm Chemistry*, 2016;2:1024
13. Μαυρομούστακος, Θ., Χοντζοπούλου, Ε., Κυριακίδη, Σ., & Ζουμπουλάκης, Π. (2022). Αρχές Υπολογιστικής Χημείας [Μεταπτυχιακό εγχειρίδιο]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.
14. Bachmanov, A., Bosak, N., Lin, C., Matsumoto, I., Ohmoto, M., Reed, D., & Nelson, T. (2014, May 31). Genetics of Taste Receptors. *Current Pharmaceutical Design*, 20(16), 2669–2683. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990566>
15. Kinnamon S.C. (2009), “Umami Taste Transduction Mechanisms.” *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 90, no. 3, Elsevier BV, pp. 753S-755S. Crossref, <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.27462k>.
16. Wu B., Eldeghaidy S., Ayed C., Fisk I. D., Hewson L., & Liu Y. (2021). Mechanisms of umami taste perception: From molecular level to brain imaging. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(25), 7015–7024. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1909532>
17. Dong, X., Wan, C., Huang, A., Xu, H., & Lei, H. (2023). Novel Umami Peptides from *Hypsizygus marmoreus* and Interaction with Umami Receptor T1R1/T1R3. *Foods*, 12(4), 703. <https://doi.org/10.3390/foods12040703>

18. Okui M., Murakami T., Sun H., Ikeshita C., Kanamura N., & Taruno A. (2021, March 31). Posttranslational regulation of CALHM1/3 channel: N -linked glycosylation and S - palmitoylation. *The FASEB Journal*, 35(5). <https://doi.org/10.1096/fj.202002632r>
19. Liman E. R., (2020, June). Salty Taste: From Transduction to Transmitter Release, Hold the Calcium. *Neuron*, 106(5), 709–711. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.05.012>
20. PDB101: Learn: Guide to Understanding PDB Data: Methods for Determining Structure. (n.d.). RCSB: PDB-101. <https://pdb101.rcsb.org/learn/guide-to-understanding-pdb-data/methods-for-determining-structure>
21. Madhavi Sastry, G., Adzhigirey, M., Day, T., Annabhimoju, R., & Sherman, W. (2013, March). Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 27(3), 221–234. <https://doi.org/10.1007/s10822-013-9644-8>
22. Fassihi, A., Hatami, S., Najafabadi, H., Mahnam, K., & Najafipour, A. (2023). Preparing a database of corrected protein structures important in cell signaling pathways. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 18(1), 67-77. <https://doi.org/10.4103/1735-5362.363597>
23. Κρίτση Ευτυχία. (2017). “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. <https://doi.org/10.12681/eadd/40331>.
24. Muhammed, M. T., & Aki-Yalcin, E. (2018, October 8). Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives. *Chemical Biology & Drug Design*, 93(1), 12–20. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13388>

25. Vyas, V., Ukawala, R., Chintha, C., & Ghate, M. (2012). Homology modeling a fast tool for drug discovery: Current perspectives. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74(1), 1. <https://doi.org/10.4103/0250-474x.102537>
26. Zhakipbekov, K., Turgumbayeva, A., Akhelova, S., Bekmuratova, K., Blinova, O., Utegenova, G., Shertaeva, K., Sadykov, N., Tastambek, K., Saginbazarova, A., Urazgaliyev, K., Tulegenova, G., Zhalimova, Z., & Karasova, Z. (2024, January 12). Antimicrobial and Other Pharmacological Properties of *Ocimum basilicum*, Lamiaceae. *Molecules*, 29(2), 388. <https://doi.org/10.3390/molecules29020388>
27. Eid, A. M., Jaradat, N., Shraim, N., Hawash, M., Issa, L., Shakhsher, M., Nawahda, N., Hanbali, A., Barahmeh, N., Taha, B., & Mousa, A. (2023, July 4). Assessment of anticancer, antimicrobial, antidiabetic, anti-obesity and antioxidant activity of *Ocimum Basilicum* seeds essential oil from Palestine. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-023-04058-w>
28. Nadeem, H. R., Akhtar, S., Ismail, T., Qamar, M., Sestili, P., Saeed, W., Azeem, M., & Esatbeyoglu, T. (2022, September 23). Antioxidant Effect of *Ocimum basilicum* Essential Oil and Its Effect on Cooking Qualities of Supplemented Chicken Nuggets. *Antioxidants*, 11(10), 1882. <https://doi.org/10.3390/antiox11101882>
29. Qamar, F., Sana, A., Naveed, S., & Faizi, S. (2023, April). Phytochemical characterization, antioxidant activity and antihypertensive evaluation of *Ocimum basilicum* L. in l-NAME induced hypertensive rats and its correlation analysis. *Heliyon*, 9(4), e14644. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14644>
30. Androutsos L., Pallante L., Bompotas A., Stojceski F., Grasso G., Piga D., et al. (2023). VirtuousMultiTaste: Predicting Multiple Taste Sensations with a Multi- objective ML-driven Method. ChemRxiv. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2023-k3rcq>
31. Xu, W., Wu, L., Liu, S., Liu, X., Cao, X., Zhou, C., Zhang, J., Fu, Y., Guo, Y., Wu, Y., Tan, Q., Wang, L., Liu, J., Jiang, L., Fan, Z., Pei, Y., Yu, J., Cheng, J., Zhao, S., . . . Hua, T. (2022, September 16). Structural basis for strychnine activation of human bitter taste

receptor TAS2R46. *Science*, 377(6612), 1298–1304.

<https://doi.org/10.1126/science.abo1633>

32. Pallante, L., Cannariato, M., Androutsos, L., Zizzi, E. A., Bompotas, A., Hada, X., Grasso, G., Kalogeras, A., Mavroudi, S., Di Benedetto, G., Theofilatos, K., & Deriu, M. A. (2024, March 15). VirtuousPocketome: a computational tool for screening protein–ligand complexes to identify similar binding sites. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56893-7>
33. Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., & Florou-Paneri, P. (2012, September 20). Aromatic Plants as a Source of Bioactive Compounds. *Agriculture*, 2(3), 228–243. <https://doi.org/10.3390/agriculture2030228>
34. Μυλωνάς Π., (2021) . Εξελίξεις στην εκμετάλλευση αρωματικών φυτών, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πτυχιακή Εργασία.
35. Dikme T. G., (2023). Use of medicinal and aromatic plants in food, *Eu Clin Anal Med* 2023; 11(1):6-10
36. Solomou, A. D., Martinos, K., Skoufogianni, E., & Danalatos, N. G. (2016, March 28). Medicinal and Aromatic Plants Diversity in Greece and Their Future Prospects: A Review. *Agricultural Science*, 4(1), 9–20. <https://doi.org/10.12735/as.v4i1p09>
37. Zhang, N., Cui, Z., Li, M., Fan, Y., Liu, J., Wang, W., Zhang, Y., & Liu, Y. (2022, September 13). Typical Umami Ligand-Induced Binding Interaction and Conformational Change of T1R1-VFT. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(37), 11652–11666. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c05559>
38. Wang, W., Zhou, X., & Liu, Y. (2020, June). Characterization and evaluation of umami taste: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 127, 115876. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115876>

39. Dong, H., Liu, J., Zhu, J., Zhou, Z., Tizzano, M., Peng, X., Zhou, X., Xu, X., & Zheng, X. (2022, March 29). Oral Microbiota-Host Interaction Mediated by Taste Receptors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.802504>
40. Shahrajabian, M. H., Sun, W., & Cheng, Q. (2020). Chemical components and pharmacological benefits of Basil (*Ocimum basilicum*): A review. *International Journal of Food Properties*, 23(1), 1961–1970. <https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1828456>
41. Bajomo, E. M., Aing, M. S., Ford, L. S., & Niemeyer, E. D. (2022). Chemotyping of commercially available basil (*Ocimum basilicum* L.) varieties: Cultivar and morphotype influence phenolic acid composition and antioxidant properties. *NFS Journal*, 26, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2022.01.001>
42. Παπανικολάου Γ., (2016, Ιανουάριος 12). *Η αντίληψη της γεύσης του πικρού*. <http://hdl.handle.net/11419/653>
43. Tan, S. M., & Seetoh, W. G. (2022). Construction of a bioluminescence-based assay for bitter taste receptors (TAS2Rs). *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21678-3>
44. Wooding, S. P., & Ramirez, V. A. (2022). Global population genetics and diversity in the TAS2R bitter taste receptor family. *Frontiers in Genetics*, 13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.952299>
45. ShanghaiTech team makes breakthroughs with discoveries about bitter taste receptors. (n.d.). <https://www.shanghaitech.edu.cn/eng/2022/0915/c1688a840162/page.htm>
46. Ahmad, R., & Dalziel, J. E. (2020). G Protein-Coupled Receptors in Taste Physiology and Pharmacology. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.587664>
47. Tolay, I. (2021). The impact of different Zinc (Zn) levels on growth and nutrient uptake of Basil (*Ocimum basilicum* L.) grown under salinity stress. *PLOS ONE*, 16(2), e0246493. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246493>

48. Yaldiz, G., & Camlica, M. (2022). Essential oils content, composition and antioxidant activity of selected basil (*Ocimum basilicum* L.) genotypes. *South African Journal of Botany*, *151*, 675–694. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.10.045>
49. Malavolta, M., Pallante, L., Mavkov, B., Stojceski, F., Grasso, G., Korfiati, A., Mavroudi, S., Kalogeras, A., Alexakos, C., Martos, V., Amoroso, D., Di Benedetto, G., Piga, D., Theofilatos, K., & Deriu, M. A. (2022). A survey on computational taste predictors. *European Food Research & Technology*, *248*(9), 2215–2235. <https://doi.org/10.1007/s00217-022-04044-5>
50. Huang, W., Shen, Q., Su, X., Ji, M., Liu, X., Chen, Y., Lu, S., Zhuang, H., & Zhang, J. (2016). BitterX: a tool for understanding bitter taste in humans. *Scientific Reports*, *6*(1). <https://doi.org/10.1038/srep23450>
51. Pinzi, L., & Rastelli, G. (2019). Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(18), 4331. <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>
52. Vrontaki, E., & Βροντάκη, E. (2016). *Εικονικός βιολογικός έλεγχος βάσεων δεδομένων χημικών μορίων με τριδιάστατα μοντέλα ποσοτικών σχέσεων δομής-δράσης (3D-QSAR): εξερεύνηση καινοτόμων φαρμακευτικών μορίων για τη θεραπεία της ηπατίτιδας C και της μεσογειακής αναιμίας*. <https://www.didaktorika.gr/eadd/handle/10442/44060>
53. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, *94*(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
54. Kisiriko, M., Anastasiadi, M., Terry, L. A., Yasri, A., Beale, M. H., & Ward, J. L. (2021). Phenolics from Medicinal and Aromatic Plants: Characterisation and Potential as Biostimulants and Bioprotectants. *Molecules/Molecules Online/Molecules Annual*, *26*(21), 6343. <https://doi.org/10.3390/molecules26216343>

55. Masyita, A., Sari, R. M., Astuti, A. D., Yasir, B., Rumata, N. R., Emran, T. B., Nainu, F., & Simal-Gandara, J. (2022). Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food Chemistry*, *X*, *13*, 100217. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100217>
56. Sulistiyawati, I., Falah, M., Anggraeni, G., & Rovik, A. (2023). Antimicrobial Activity of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Against Gram-Negative Bacteria Involved in Pneumonia Infection. *Jurnal Sains Dan Teknologi*, *12*(2). <https://doi.org/10.23887/jstundiksha.v12i2.53577>
57. Roper, S. D., & Chaudhari, N. (2017). Taste buds: cells, signals and synapses. *Nature Reviews. Neuroscience*, *18*(8), 485–497. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.68>
58. Fritz, F., Preissner, R., & Banerjee, P. (2021). VirtualTaste: a web server for the prediction of organoleptic properties of chemical compounds. *Nucleic Acids Research*, *49*(W1), W679–W684. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab292>
59. Spence, C. (2024). Sweet basil: An increasingly popular culinary herb. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, *36*, 100927. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2024.100927>
60. Magar, R.T.; Sohng, J.K. A Review on Structure, Modifications and Structure-Activity Relation of Quercetin and Its Derivatives. *J Microbiol Biotechnol* 2020, *30*, 11–20, doi:10.4014/jmb.1907.07003.
61. Tang, J., & Zhao, X. (2024). Research Progress on Regulation of Immune Response by Tanshinones and Salvianolic Acids of Danshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). *Molecules*, *29*(6), 1201. <https://doi.org/10.3390/molecules29061201>
62. Zou, L. F., Liu, D. F., Yang, H., Zhou, C. H., Deng, S. B., Xu, N. S., He, X. M., Liu, Y. Q., Shao, M., Yu, L. Z., & Liu, J. S. (2023). Salvianolic acids from *Salvia miltiorrhiza* Bunge and their anti-inflammatory effects through the activation of $\alpha 7$ nAChR signaling. *Journal of Ethnopharmacology*, *317*, 116743. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.116743>

63. Drewnowski, A., & Gomez-Carneros, C. (2000). Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72(6), 1424–1435. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.6.1424>
64. Soares, S., Kohl, S., Thalmann, S., Mateus, N., Meyerhof, W., & De Freitas, V. (2013). Different Phenolic Compounds Activate Distinct Human Bitter Taste Receptors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(7), 1525–1533. <https://doi.org/10.1021/jf304198k>
65. Karolkowski, A., Belloir, C., Briand, L., & Salles, C. (2023). Non-Volatile Compounds Involved in Bitterness and Astringency of Pulses: A Review. *Molecules*, 28(8), 3298. <https://doi.org/10.3390/molecules28083298>