



Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

Παραδοτέο Π1.6.3 Ενζυμικοί βιοαισθητήρες για την ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών σε οπωροκηπευτικά

Πληροφορίες για το έγγραφο

Αριθμός παραδοτέου: **Π1.6.3**

Ενότητα εργασίας: **ΕΕ1**

Επικεφαλής δικαιούχος: **ΓΠΑ**

Συγγραφείς: **Ν. Λάμπρου, Ε. Αξαρλή, Π. Παντιώρα, Χ. Βαρώτσου**

Έκδοση: **1.0**

Είδος Παραδοτέου: **Έκθεση**

Ημερομηνία παράδοσης: **12 Δεκεμβρίου 2025**

Στοιχεία Πράξης

Τίτλος: Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος

Τίτλος (EN): InnoPP-Innovations in Plant Protection for sustainable and environmentally friendly pest control

Κωδικός πράξης: ΤΑΕΔΡ-0535675

Ακρωνύμιο έργου: InnoPP

Ημερομηνία έναρξης: 15 Μαΐου 2023

Διάρκεια: 28 Μήνες

Συντονιστής Φορέας: Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Συντονιστής/ Επιστημονικός Υπεύθυνος: Ιωάννης Βόντας

Πίνακας Περιεχομένων

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ	5
2	ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ	7
2.1	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	7
2.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	9
3	ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	18
4	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	20

Περίληψη του Έργου

Το έργο «Καινοτόμες λύσεις για τη βιώσιμη και περιβαλλοντικά φιλική φυτοπροστασία των οπωροκηπευτικών της Ελλάδας, στην Ευρώπη του μέλλοντος» στοχεύει στην ανάπτυξη σύγχρονων και καινοτόμων μεθόδων για την προστασία των καλλιεργειών όπως τα κηπευτικά, τα εσπεριδοειδή και το επιτραπέζιο σταφύλι. Περιλαμβάνει τη δημιουργία προηγμένων διαγνωστικών εργαλείων για την ανίχνευση εχθρών και παθογόνων με τεχνολογίες αιχμής, όπως ηλεκτρονικές παγίδες και βιοαισθητήρες, καθώς και πλατφόρμες αλληλούχισης για τον πλήρη προσδιορισμό των ιωμάτων. Επιπλέον, θα αναπτυχθούν μοντέλα πρόβλεψης επιδημιών και καινοτόμα βιοφυτοπροστατευτικά προϊόντα, τα οποία θα αξιολογηθούν για την ασφάλεια τους σε μη στόχους οργανισμούς. Τέλος, οι νέες τεχνολογίες θα ενσωματωθούν σε συστήματα ολοκληρωμένης διαχείρισης φυτοπροστασίας και θα δοκιμαστούν σε πραγματικές συνθήκες, ενώ θα αξιολογηθούν οι κοινωνικοοικονομικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις τους.

Σύνοψη της ΕΕ1

Στην Ενότητα Εργασίας 1 (ΕΕ1) αναπτύσσονται ολοκληρωμένα διαγνωστικά εργαλεία και μέθοδοι αιχμής για την ανίχνευση, ταυτοποίηση και παρακολούθηση εχθρών και παθογόνων στη γεωργική παραγωγή. Η δράση 1.1 επικεντρώνεται στη βελτίωση συστημάτων παρακολούθησης εντομολογικών εχθρών μέσω συγκριτικής αξιολόγησης καινοτόμων ηλεκτρονικών παγίδων και νέων ελκυστικών. Η δράση 1.2 αναπτύσσει σύγχρονα μοριακά διαγνωστικά, συμπεριλαμβανομένων LAMP μεθόδων για ταχεία ανίχνευση, λυοφιλοποιημένων "Ready-to-Go" κιτ για qPCR, υπερευαίσθητης πλατφόρμας ddPCR και προηγμένων τεχνικών αλληλούχισης για ιολογικές ασθένειες. Στην 1.3 διαμορφώνονται συστήματα πρόβλεψης επιδημιών με χρήση δορυφορικών δεδομένων για τη χαρτογράφηση και διάγνωση ιώσεων. Η ΕΕ1 ενσωματώνει επίσης τεχνητή νοημοσύνη: η δράση 1.4 αναπτύσσει νευρωνικά δίκτυα για αυτόματη αναγνώριση ζιζανίων, ενώ η 1.5 αξιοποιεί φασματικές τεχνολογίες και εικόνες drone για μοντέλα διάγνωσης ασθενειών. Παράλληλα, η δράση 1.6 εισάγει ηλεκτροχημικούς, ακουστικούς, κυτταρικούς και ενζυμικούς βιοαισθητήρες για την ανίχνευση ωχρατοξινών και υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων. Στη δράση 1.7 πραγματοποιείται μοριακή ανάλυση νέων δεικτών ανθεκτικότητας, ενώ η 1.8 αναπτύσσει διαγνωστικό για την αξιολόγηση της φυτικής άμυνας μετά από εφαρμογή βιοδιεγερτών. Τέλος, η δράση 1.9 εξετάζει τη διαγνωστική σημασία ταυτόχρονης παρουσίας ιών και ιοειδών μέσω φαινοτυπικής ανάλυσης.

Συνοπτική παρουσίαση του παραδοτέου Π1.6.3

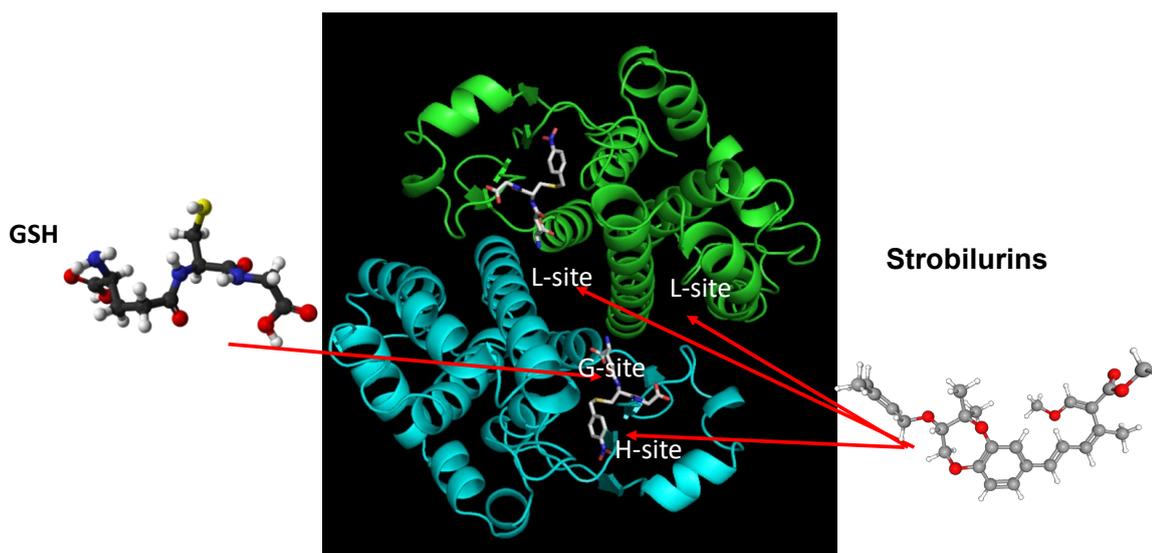
Το έργο αφορά την ανάπτυξη ενζυμικών βιοαισθητήρων για την επιτόπια και ταχεία και ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών της οικογένειας των στρομπιλουρινών. Η διαγνωστική αρχή βασίζεται στην παρεμπόδιση της δράσης του ενζύμου τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), ως ενζυμικής πλατφόρμας λόγω της ικανότητάς της να αλληλεπιδρά με τις δραστικές ουσίες στόχους. Η ερευνητική στρατηγική περιέλαβε τα στάδια ανίχνευση/εξόρυξη ενζύμων – διαλογή και επιλογή – λειτουργική γονιδιωματική – μηχανική ενζύμων, χαρακτηρισμό, ακινητοποίηση και ανάπτυξη του βιοαισθητήρα. Αρχικά πραγματοποιήθηκε screening ισοενζύμων GST. Μέσω ετερόλογης έκφρασης σε *E. coli* και χρωματογραφίας συγγένειας απομονώθηκαν ισοένζυμα. Η επιλογή της καταλληλότερης μορφής βασίστηκε σε μετρήσεις ενζυμικής δραστηριότητας. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στην τελική επιλογή του ενζύμου-στόχου.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν και δράσεις ενζυμικής μηχανικής για τη βελτίωση της σταθερότητας μέσω κατευθυνόμενης εξέλιξης (directed evolution). Δημιουργήθηκε βιβλιοθήκη μεταλλαγμένων ενζύμων, η οποία υποβλήθηκε σε συστηματικό screening για τον εντοπισμό μορφών με αυξημένη ευαισθησία αναστολής. Στη συνέχεια υλοποιήθηκαν πρωτόκολλα ακινητοποίησης του ενζύμου με τρεις προσεγγίσεις: (α) σχηματισμό τρισδιάστατου πλέγματος μέσω γλουταραλδεϋδης και BSA, όπου δοκιμάστηκαν διαφορετικές συνθήκες, (β) ακινητοποίηση σε φορέα χιτοζάνης με διαμοριακές συνδέσεις GA, και (γ) ενθυλάκωση σε σφαιρίδια αλγινικού νατρίου. Από την πρώτη μεθοδολογία αναδείχθηκε η βέλτιστη η συνθήκη, με τη μεγαλύτερη διατήρηση ενζυμικής δραστηριότητας. Τέλος, ο φωτομετρικός προσδιορισμός και η κινητική ανάλυση των ακινητοποιημένων μορφών επιβεβαίωσαν τη λειτουργικότητα του ενζύμου και την καταλληλότητά του ως βιοαισθητήρα. Τα αποτελέσματα της έρευνας θέτουν τα θεμέλια ενός αξιόπιστου ενζυμικού διαγνωστικού συστήματος για προσδιορισμό υπολλειματικότητας στρομφιλουριών.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ

Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης (Glutathione Transferases, GSTs) αποτελούν μία πολυμελή οικογένεια ενζύμων που απαντώνται ευρέως σε φυτικούς, ζωικούς και μικροβιακούς οργανισμούς και διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στους μηχανισμούς κυτταρικής αποτοξίνωσης. Η βασική τους λειτουργία αφορά την καταλυτική σύζευξη του μορίου γλουταθειόνης (GSH) με ηλεκτρονιόφιλα υποστρώματα, συμβάλλοντας έτσι στην εξουδετέρωση τοξικών ενώσεων (xenobiotics), προϊόντων οξειδωτικού στρες και φυτοπροστατευτικών ουσιών. Η ικανότητα των GSTs να αλληλεπιδρούν με ευρύ φάσμα χημικών ενώσεων και να μεταβάλλουν τη δραστηριότητά τους παρουσία αναστολέων καθιστά τα ένζυμα αυτά κατάλληλες βιομοριακές πλατφόρμες για την ανάπτυξη διαγνωστικών συστημάτων.

Η τριτοταγής δομή των GSTs αποτελείται από δύο υπομονάδες, οι οποίες μπορεί να σχηματίζουν είτε ομοδιμερή είτε ετεροδιμερή σύμπλοκα (Εικόνα 1.6.3-1). Κάθε υπομονάδα αποτελείται από 200–250 αμινοξέα, με μοριακό βάρος 25–30 kDa, και διαθέτει ένα ενεργό κέντρο. Κάθε υπομονάδα περιέχει μια ενεργή θέση που αποτελείται από μια περιοχή δέσμησης της γλουταθειόνης (G-site) στο N-τελικό της τμήμα και μια περιοχή δέσμησης του υδρόφοβου υποστρώματος (H-site) στο C-τελικό της τμήμα. Η H-site εμφανίζει χαμηλή ομολογία μεταξύ των ισοενζύμων της ίδιας οικογένειας αλλά και μεταξύ διαφορετικών οικογενειών, και μπορεί να συνδεθεί με μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων που διαφοροποιούνται σε μέγεθος, δομή και υδροφοβικότητα. Συνεπώς, η δομή του H-site καθορίζει την εξειδίκευση του ενζύμου ως προς τα υποστρώματα και την ικανότητά του ενζύμου να αναγνωρίζει διαφορετικές ξενοβιοτικές ενώσεις. Οι L-site δεσμεύουν μη-καταλυτικά ξενοβιοτικές ενώσεις και βρίσκονται γειτονικά με τις H-sites ή τις επικαλύπτουν.



Εικόνα 1.6.3-1. Δομή διμερούς GST που απεικονίζει τις κύριες λειτουργικές περιοχές του ενζύμου. Κάθε υπομονάδα (πράσινη και κυανή) φέρει τη θέση δέσμησης της γλουταθειόνης (G-site) στο N-τελικό τμήμα και τη θέση δέσμησης υδρόφοβου υποστρώματος (H-site) στο C-τελικό τμήμα. Το διάγραμμα επισημαίνει επιπλέον τις L-θέσεις (L-sites). Στα άκρα της εικόνας παρουσιάζονται τρισδιάστατες δομές υποστρωμάτων και εν δυνάμει αναστολέων, και τα βέλη υποδεικνύουν την κατεύθυνση πρόσδεσης των μορίων στις αντίστοιχες θέσεις του ενζύμου. Η οργάνωση των δομικών περιοχών καθορίζει την εξειδίκευση του ενζύμου και την ικανότητά του να αλληλεπιδρά με ξενοβιοτικές ενώσεις, όπως τα φυτοπροστατευτικά, επηρεάζοντας τη

συνολική καταλυτική δραστικότητα.

Τα τελευταία χρόνια οι ενζυμικοί βιοαισθητήρες που βασίζονται σε GSTs έχουν προσελκύσει σημαντικό επιστημονικό ενδιαφέρον, καθώς μπορούν να μετατρέψουν ένα βιοχημικό συμβάν (αναστολή ή μεταβολή της ενζυμικής δραστικότητας) σε μετρήσιμο σήμα, προσφέροντας ταχεία, ευαίσθητη και χαμηλού κόστους ανίχνευση τοξικών ουσιών. Η χρήση τους σε εφαρμογές παρακολούθησης υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών αποτελεί ιδιαίτερα ελκυστική προσέγγιση, δεδομένης της ανάγκης για επιτόπια, αξιόπιστη και μη χρονοβόρα ανάλυση σε αγροδιατροφικά προϊόντα. Πολλά ισοένζυμα GST έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη οπτικών, ηλεκτροχημικών ή ποτενσιομετρικών βιοαισθητήρων, ιδιαίτερα μέσω προσδιορισμού της αναστολής της ενζυμικής δραστικότητας (Karoli et al., 2008; Chronopoulou et al., 2012; Perperopoulou et al., 2021). Για παράδειγμα, ισοένζυμα GST έχουν ακινητοποιηθεί για τον προσδιορισμό ξενοβιοτικών ενώσεων όπως ζιζανιοκτόνων, π.χ. atrazine (Andreou & Clonis, 2002) καιalachlor (Perperopoulou et al., 2021), καθώς και εντομοκτόνων, όπως DDT (Morou et al., 2008) και malathion (Karoli et al., 2008). Επιπλέον, έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση αντικαρκινικών φαρμάκων (Materon et al., 2014). Στους ενζυμικούς βιοαισθητήρες, τα ακινητοποιημένα βιομόρια λειτουργούν ως στοιχεία αναγνώρισης που προσδένονται σταθερά σε κάποιον φορέα. Συνεπώς, η μέθοδος ακινητοποίησης επηρεάζει καθοριστικά τις ιδιότητες και την αναλυτική απόδοση του βιοαισθητήρα (Sassolas et al., 2012).

Στο πλαίσιο της παρούσας μελέτης, οι GSTs αξιοποιήθηκαν ως βιοαναγνώστες για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων της ομάδας των στρομπιλουρινών (pyraclostrobin, picoxystrobin, trifloxystrobin), ουσιών που χρησιμοποιούνται ευρέως στη φυτοπροστασία και των οποίων ο έλεγχος υπολειμμάτων είναι κρίσιμης σημασίας για την ασφάλεια τροφίμων.

Οι κύριοι επιστημονικοί στόχοι περιλαμβάνουν:

- 1) Αναγνώριση και επιλογή καταλληλότερου ισοενζύμου GST, ετερόλογης έκφρασης, καθαρισμού και κινητικής ανάλυσης.
- 2) Βελτιστοποίηση της σταθερότητας και λειτουργικότητας του ενζύμου μέσω κατευθυνόμενης εξέλιξης (directed evolution) και επιλογής μεταλλαγμένων μορφών με αυξημένη καταλυτική και δομική αντοχή.
- 3) Ανάπτυξη και αξιολόγηση πρωτοκόλλων ακινητοποίησης, τόσο μέσω χημικής διασύνδεσης με γλουταραλδεΐδη και BSA όσο και με χρήση φορέων αλγινικού ή χιτοζάνης, για τη δημιουργία σταθερών ενζυμικών συστημάτων κατάλληλων για ενσωμάτωση σε βιοαισθητήρα.
- 4) Κινητική και λειτουργική αξιολόγηση των ακινητοποιημένων ενζύμων ώστε να διασφαλιστεί η διατήρηση της δραστικότητας και η δυνατότητα ποσοτικής ανίχνευσης των φυτοπροστατευτικών.

Η ολοκλήρωση των παραπάνω στόχων επέτρεψε την παραγωγή μιας αξιόπιστης ενζυμικής πλατφόρμας, κατάλληλης για τη μελλοντική ενσωμάτωση σε φορητά διαγνωστικά συστήματα για την αγροδιατροφική αλυσίδα.

2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

2.1 Υλικά και Μέθοδοι

2.1.1. Υλικά

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *Escherichia coli* (BL21(DE3), DH5a) για την ετερόλογη έκφραση ισοενζύμων GSTs, καθώς και πλασμιδιακοί φορείς έκφρασης τύπου pET (pT7 προαγωγέα) που έφεραν τα αντίστοιχα γονίδια. Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκαν υποστρώματα υψηλής καθαρότητας της Sigma-Aldrich, συγκεκριμένα γλουταθειόνη (GSH) και 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB). Ως αναστολείς-στόχοι αξιοποιήθηκαν οι στρομπιλουρίνες pyraclostrobin, picoxystrobin και trifloxystrobin, οι οποίες παραχωρήθηκαν από το Εργαστήριο Φαρμακολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και χρησιμοποιήθηκαν ως καθαρές πρότυπες ενώσεις.

Για τις διεργασίες ακινητοποίησης εφαρμόστηκαν διάφορα χημικά συστήματα, όπως γλουταραλδεΐδη (GA, Sigma-Aldrich) ως διδραστικός παράγοντας, πρωτεΐνη ορού μόσχου (BSA, Sigma-Aldrich), αλγινικό νάτριο (Sigma-Aldrich) για την ενθυλάκωση του ενζύμου, καθώς και χλωριούχο ασβέστιο (CaCl_2 , Sigma-Aldrich) για τον σχηματισμό των σφαιριδίων αλγινικού. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε χιτοζάνη μέσου μοριακού βάρους (Sigma-Aldrich), διαλυμένη σε 2% (v/v) οξικό οξύ, για την παραγωγή φορέων ακινητοποίησης, οι οποίοι ενεργοποιήθηκαν με γλουταραλδεΐδη. Η σταθεροποίηση των βάσεων Schiff πραγματοποιήθηκε με διάλυμα NaBH_4 (Sigma-Aldrich). Για τις ανάγκες ρύθμισης pH χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (Sigma-Aldrich) συγκέντρωσης 20–100 mM, pH 7.0, ενώ η συγκέντρωση πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford. Για τον καθαρισμό των παραγόμενων GSTs χρησιμοποιήθηκε στήλη συγγένειας Glutathione Sepharose 4B (κατασκευάστηκε στο εργαστήριο). Για συμπύκνωση των ενζύμων χρησιμοποιήθηκαν συστήματα υπερδιήθησης Amicon Ultra (10 kDa MWCO, Merck Millipore). Οι φασματομετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο UV-Vis (Hitachi). Ο εργαστηριακός εξοπλισμός περιλάμβανε επωαστικό αναδευτήρα, φυγόκεντρο υψηλών ταχυτήτων, συσκευή SDS-PAGE, pHμετρο, αναλυτικό ζυγό, ψυκτικούς θαλάμους, καθώς και θερμικό κυκλοποιητή PCR για ανάγκες γενετικής τροποποίησης και κατευθυνόμενης εξέλιξης.

2.1.2. Μέθοδοι

Η έκφραση των ενζύμων πραγματοποιήθηκε σε καλλιέργειες *E. coli* BL21(DE3), οι οποίες αναπτύχθηκαν στους 37°C μέχρι η οπτική πυκνότητα να φτάσει περίπου στο 0.6. Στο στάδιο αυτό προστέθηκε IPTG τελικής συγκέντρωσης 1 mM για την επαγωγή της έκφρασης και η καλλιέργεια επώαστηκε για 4 ώρες στους 37°C. Μετά την επαγωγή, τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση και το κυτταρικό ίζημα χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό των ενζύμων. Το ίζημα αιωρήθηκε σε τριπλάσιο όγκο φωσφορικού ρυθμιστικού KH_2PO_4 20 mM, pH 7.0, και ακολούθησε θραύση με υπερήχους. Μετά από φυγοκέντρηση συλλέχθηκε το κυτταρικό εκχύλισμα, το οποίο υποβλήθηκε σε ολονύκτια διαπίδυση στο ίδιο ρυθμιστικό. Την επόμενη ημέρα το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε και το υπερκείμενο φορτώθηκε σε στήλη συγγένειας BES-GSH (1,4-butanediol diglycidyl ether-GSH-Sepharose CL6B), η οποία είχε ενεργοποιηθεί με φωσφορικό ρυθμιστικό KH_2PO_4 20 mM, pH 7.0. Μετά από σειρά πλύσεων, το ένζυμο εκλούστηκε με διαλύματα KH_2PO_4 20 mM που περιείχαν 10 mM GSH. Οι εκλούσεις

αναλύθηκαν ως προς τη δραστικότητα και οι πιο αποδοτικές ενώθηκαν και υποβλήθηκαν σε δεύτερη ολονύκτια διαπίδωση σε KH_2PO_4 0.1 M, pH 6.5, για την απομάκρυνση υπολειπόμενης γλουταθειόνης.

Για την αξιολόγηση της ανασταλτικής δράσης των στρομπιλουρινών στα υπό μελέτη ένζυμα πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της ενζυμικής δραστικότητας πριν και μετά την προσθήκη του αναστολέα. Ως 100% δραστικότητα θεωρήθηκε η δραστικότητα του συστήματος απουσία ενζύμου, δηλαδή σε μίγμα αντίδρασης που περιείχε όλα τα αντιδραστήρια εκτός του ενζύμου και λειτουργούσε ως μάρτυρας. Η μέθοδος βασίζεται στην αναστολή της ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης CDNB/GSH, η οποία μειώνεται παρουσία στρομπιλουρίνης. Το μίγμα επώασης τελικού όγκου 1 mL περιείχε 2,5 mM GSH, 1 mM CDNB, κατάλληλη ποσότητα ενζύμου και 10-100 μM στρομπιλουρίνη, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου 0,1 M, pH 6,5. Η αντίδραση παρακολουθήθηκε φωτομετρικά, καταγράφοντας την αύξηση της απορρόφησης στα 340 nm, από την οποία υπολογίστηκε η παραμένουσα δραστικότητα (%) για κάθε ένζυμο.

Στο πρωτόκολλο ακινητοποίησης με γλουταραλδεΐδη και BSA εξετάστηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί συγκεντρώσεων των αντιδραστηρίων, οι οποίοι καθόριζαν τον σχηματισμό του τρισδιάστατου πλέγματος ακινητοποίησης. Καθώς η γλουταραλδεΐδη λειτουργεί ως διδραστικό μόριο σχηματίζοντας βάσεις Schiff με τις αμινικές ομάδες του ενζύμου και της BSA, ο βαθμός ακινητοποίησης επηρεάστηκε από τις αναλογίες αυτών των παραμέτρων. Η αξιολόγηση της δραστικότητας των παραγόμενων ακινητοποιημένων μορφών κατέδειξε την καλύτερη συνθήκη ακινητοποίησης, η οποία επέδειξε την υψηλότερη διατήρηση ενζυμικής δραστικότητας σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες. Η μέτρηση της δραστικότητας πραγματοποιήθηκε φωτομετρικά στα 340 nm χρησιμοποιώντας το σύστημα CDNB/GSH.

Για την ακινητοποίηση σε χιτοζάνη παρασκευάστηκαν πηγματα χιτοζάνης 2-4% (w/v) σε οξικό οξύ, τα οποία ενεργοποιήθηκαν με διαλύματα γλουταραλδεΐδης 0.4-1% (v/v) και επώαστηκαν ολονύκτια με το ενζυμικό διάλυμα. Μετά την απομάκρυνση του μη δεσμευμένου ενζύμου και τη σταθεροποίηση των δεσμών με NaBH_4 , τα δείγματα πλύθηκαν και υποβλήθηκαν σε προσδιορισμό δραστικότητας και υπολογισμό απόδοσης πρόσδεσης.

Για την παρασκευή των σφαιριδίων αλγινικού νατρίου, 8 mL διαλύματος αλγινικού αναμείχθηκαν με 2 mL ενζύμου και το μείγμα διοχετεύθηκε σε διάλυμα CaCl_2 με ρυθμό 2 mL/min, σχηματίζοντας σφαιρίδια διαμέτρου περίπου 300 μm . Τα σφαιρίδια συλλέχθηκαν, πλύθηκαν και η απόδοση ενθυλάκωσης προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford.

Η φωτομετρική αξιολόγηση των ακινητοποιημένων ενζύμων έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7 στους 37°C, παρακολουθώντας την απορρόφηση στα 340 nm για 300 s. Στο πλαίσιο της κινητικής ανάλυσης προσδιορίστηκαν οι κινητικές σταθερές με μεταβολή των συγκεντρώσεων CDNB και GSH, επιτρέποντας τη διερεύνηση της επίδρασης της ακινητοποίησης στη λειτουργική συμπεριφορά του ενζύμου.

Για την ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου και έλεγχο της επαναληψιμότητας, αρχικά

εξετάστηκε η επίδραση διαφόρων συγκεντρώσεων pyraclostrobin στη δραστικότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου και κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης. Για την αξιολόγηση της επαναληψιμότητας και της ακρίβειας των μετρήσεων επιλέχθηκε συγκέντρωση του αναστολέα πλησίον της τιμής IC_{50} και πραγματοποιήθηκαν ανεξάρτητες μετρήσεις υπό τις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια εφαρμόστηκε το πείραμα «Προστιθέμενου και Αναμενόμενου» προκειμένου να αξιολογηθεί η αναλυτική ακρίβεια της μεθόδου. Επιλέχθηκαν συγκεκριμένες συγκεντρώσεις pyraclostrobin, μετρήθηκε η δραστικότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τις αναμενόμενες τιμές που υπολογίστηκαν βάσει της πρότυπης καμπύλης.

Για την αξιολόγηση της μεθόδου σε πραγματικές συνθήκες εξετάστηκε η δραστικότητα της ακινητοποιημένης GST παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων pyraclostrobin διαλυμένου σε μεταλλικό νερό. Για κάθε τύπο δείγματος κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη προκειμένου να εκτιμηθεί η ακρίβεια και η απόδοση της μεθόδου σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες.

Η σταθερότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου μελετήθηκε για χρονική περίοδο 200 ημερών. Σε καθορισμένα χρονικά σημεία προσδιοριζόταν η δραστικότητα της ακινητοποιημένης GST και συγκρινόταν με τη δραστικότητα του αντίστοιχου ελεύθερου ενζύμου, το οποίο διατηρούνταν υπό τις ίδιες συνθήκες. Και οι δύο μορφές αποθηκεύτηκαν στους 4°C και οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M, pH 6,5. Η σύγκριση επέτρεψε την αξιολόγηση της μακροχρόνιας λειτουργικής σταθερότητας της ακινητοποιημένης GST.

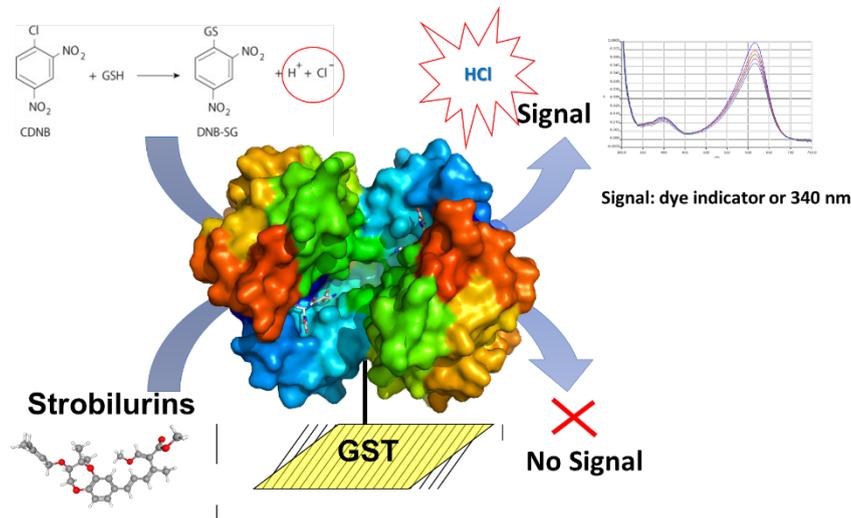
2.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση

2.2.1. Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος ανίχνευσης στηρίζεται στην ικανότητα των φυτοπροστατευτικών της ομάδας των στρομπιλουρινών να αναστέλλουν τη δράση της γλουταθειόνης τρανσφεράσης (GST). Η GST καταλύει τη σύζευξη της GSH με το πρότυπο υπόστρωμα CDNB, οδηγώντας στον σχηματισμό του προϊόντος DNB-SG και στην ταυτόχρονη απελευθέρωση H^+ και Cl^- . Η αντίδραση αυτή συνοδεύεται από χαρακτηριστική μεταβολή του φάσματος απορρόφησης στα 340 nm, η οποία αντικατοπτρίζει τον ρυθμό σχηματισμού του προϊόντος (Εικόνα 1.6.3-2). Όταν στο μίγμα αντίδρασης υπάρχουν στρομπιλουρίνες, αυτές αλληλεπιδρούν με το ένζυμο και προκαλούν αναστολή της καταλυτικής διαδικασίας. Ως αποτέλεσμα, μειώνεται η ταχύτητα σχηματισμού του προϊόντος DNB-SG και η μεταβολή της απορρόφησης περιορίζεται. Η ένταση της αναστολής είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της στρομπιλουρίνης, γεγονός που επιτρέπει την ποσοτικοποίηση της παρουσίας της.

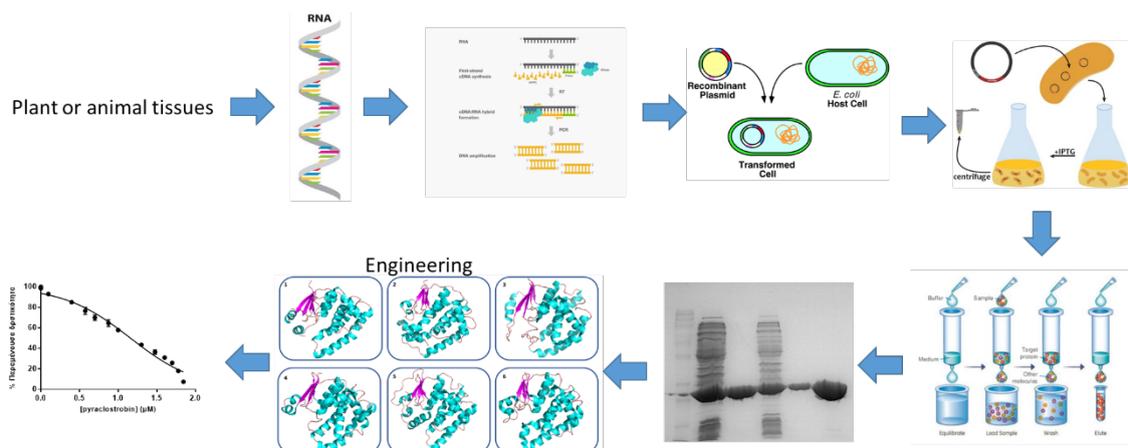
Η μέτρηση της αντίδρασης δεν περιορίζεται στη φασματοφωτομετρία. Η απελευθέρωση πρωτονίων (H^+) κατά τη διάρκεια της σύζευξης οδηγεί σε μικρή αλλά μετρήσιμη μεταβολή του pH, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί και χρωματομετρικά μέσω κατάλληλου δείκτη pH. Η χρήση δείκτη επιτρέπει την οπτική καταγραφή της ενζυμικής δραστικότητας και συνεπώς της αναστολής της· παρουσία φυτοπροστατευτικών το χρώμα μεταβάλλεται λιγότερο ή καθόλου, προσφέροντας έναν απλό, γρήγορο και οικονομικό τρόπο ανίχνευσης.

Συνολικά, η μέθοδος βασίζεται στη μετατροπή της ενζυμικής αναστολής σε μετρήσιμο οπτικό σήμα, καθιστώντας τη GST ένα αξιόπιστο στοιχείο βιοαναγνώρισης για την ανάπτυξη ενζυμικών βιοαισθητήρων ανίχνευσης υπολειμμάτων στρομπιλουρινών.



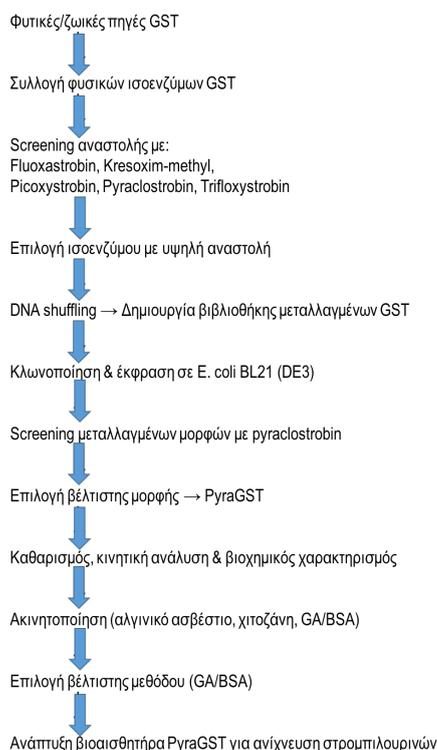
Εικόνα 1.6.3-2. Αρχή της μεθόδου ανίχνευσης βασισμένης στην αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας της GST από στρομπιλουρίνες. Το ένζυμο καταλύει τη σύζευξη της GSH με το πρότυπο υπόστρωμα CDNB, οδηγώντας στον σχηματισμό του προϊόντος DNB-SG με ταυτόχρονη απελευθέρωση ιόντων H^+ και Cl^- , γεγονός που συνοδεύεται από χαρακτηριστική μεταβολή του φάσματος απορρόφησης στα 340 nm. Η παρουσία στρομπιλουρινών αναστέλλει τη δράση του ενζύμου, μειώνοντας τον ρυθμό σχηματισμού του προϊόντος και συνεπώς το καταγραφόμενο φασματοφωτομετρικό σήμα, ενώ η αναστολή μπορεί να αποτυπωθεί και χρωματομετρικά λόγω της μεταβολής του pH. Η μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας αποτελεί τη βάση για την ανάπτυξη ενζυμικών βιοαισθητήρων ανίχνευσης φυτοπροστατευτικών.

2.2.2. Επιλογή και μηχανική για την βελτιστοποίηση του ενζύμου



Εικόνα 1.6.3-3. Σχηματική απεικόνιση της ολοκληρωμένης ερευνητικής διαδικασίας για την απομόνωση, έκφραση, βελτιστοποίηση και λειτουργική αξιολόγηση ενζύμου GST με εφαρμογή στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Η συνολική διαδικασία αποτυπώνει την αλληλουχία βημάτων από την αρχική επιλογή βιολογικού υλικού, τη μοριακή κλωνοποίηση και έκφραση, μέχρι την υπολογιστική και πειραματική βελτιστοποίηση του ενζύμου, επιτρέποντας την ανάπτυξη ενός αποδοτικού και σταθερού ενζύμου κατάλληλου για διαγνωστικές εφαρμογές.

Η ανάπτυξη ενός ενζύμου υψηλής εκλεκτικότητας και ανασταλτικότητας έναντι σε στρομπιλουρίνες απαιτεί μια πολυεπίπεδη προσέγγιση, όπως φαίνεται στο παρακάτω Σχήμα, που συνδυάζει μοριακή βιολογία, βιοχημεία, ενζυμική μηχανική και υπολογιστική ανάλυση. Η διαδικασία που εφαρμόστηκε στη μελέτη μπορεί να χωριστεί σε δύο κύρια στάδια: (1) επιλογή φυσικών ισοενζύμων με επιθυμητό ανασταλτικό προφίλ, και (2) ενζυμική βελτιστοποίηση μέσω κατευθυνόμενης εξέλιξης.

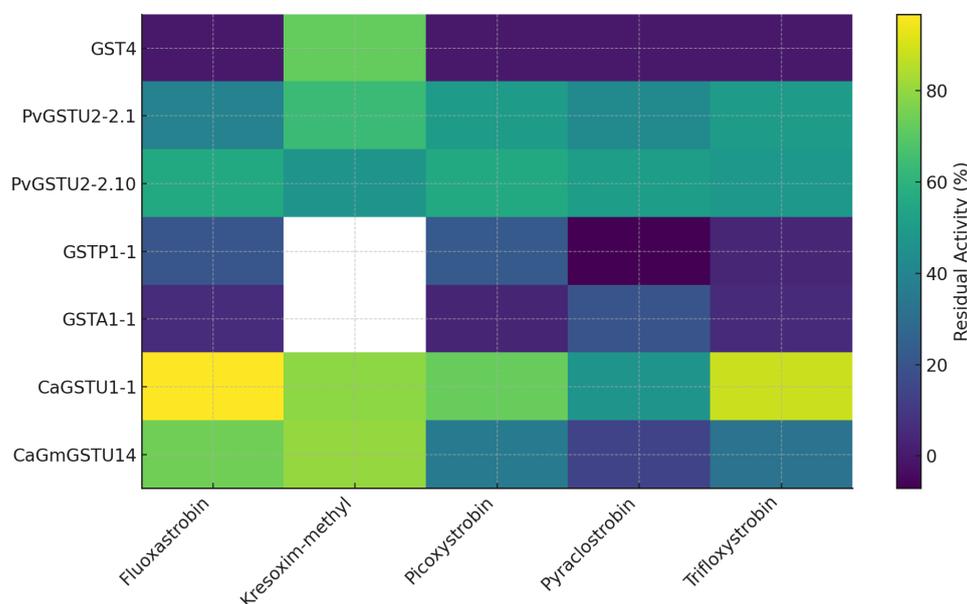


Στάδιο 1: Επιλογή υποψήφιων ισοενζύμων GST μέσω screening αναστολής. Στο πρώτο στάδιο συλλέχθηκε και αναλύθηκε ένα ευρύ φάσμα ισοενζύμων της υπεροξειδογενέιας των GSTs, προερχόμενων από φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς. Η επιλογή διαφορετικών βιολογικών πηγών εξασφαλίζει ποικιλία στη δομή των ενεργών κέντρων και στη συμβατότητα με διαφορετικού τύπου ξενοβιοτικά μόρια. Κάθε ισοένζυμο εκφράστηκε ετερόλογα σε *E. coli*, καθαρίστηκε και υποβλήθηκε σε *in vitro* δοκιμές αναστολής χρησιμοποιώντας πέντε στρομπιλουρίνες ευρείας χρήσης: Fluoxastrobin, Kresoxim-methyl, Picoxystrobin, Pyraclostrobin, Trifloxystrobin. Για κάθε ένζυμο αξιολογήθηκε η παραμένουσα δραστηριότητα μετά την έκθεση στο φυτοπροστατευτικό. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ορισμένα ισοένζυμα εμφανίζουν ευαισθησία προς στρομπιλουρίνες, γεγονός που υποδηλώνει δομική συμβατότητα του H-site με τα συγκεκριμένα μόρια. Το ισοένζυμο με την ισχυρότερη και ευρύτερη ανασταλτική απόκριση προκρίθηκε ως υποψήφιο για περαιτέρω βελτίωση μέσω ενζυμικής μηχανικής.

Η ανασταλτική επίδραση των στρομπιλουρινών αξιολογήθηκε μέσω μέτρησης της ενζυμικής δραστηριότητας πριν και μετά την προσθήκη του αναστολέα. Ως 100% δραστηριότητα ορίστηκε το σύστημα αναφοράς χωρίς αναστολέα. Η μέθοδος βασίστηκε στη μείωση της αντίδρασης CDNB/GSH παρουσία στρομπιλουρίνης. Η αντίδραση (1 mL) περιείχε GSH (2,5 mM), CDNB (1 mM), ένζυμο και στρομπιλουρίνη (100 μM) σε ρυθμιστικό φωσφορικού καλίου 0,1 M, pH 6,5, και παρακολουθήθηκε φωτομετρικά στα 340 nm για τον υπολογισμό της παραμένουσας δραστηριότητας (%).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι πέντε στρομπιλουρίνες που εξετάστηκαν

(Fluoxastrobin, Kresoxim-methyl, Picoxystrobin, Pyraclostrobin, Trifloxystrobin) προκαλούν σημαντική αναστολή στα περισσότερα ένζυμα (Εικόνα 1.6.3-4). Συνολικά, προέκυψε ότι οι στρομπιλουρίνες, αποτελούν ισχυρούς αναστολείς, παρουσιάζοντας υψηλά επίπεδα αναστολής στο σύστημα CDNB/GSH. Τα ένζυμα που μελετήθηκαν παρουσίασαν διαφορετικούς βαθμούς ευαισθησίας: οι ισομορφές PνGSTU2-2.1 και PνGSTU2-2.10 εμφάνισαν ενδιάμεση ανοχή, ενώ τα ένζυμα GSTP1-1 και GSTA1-1 κρίθηκαν ως ευαίσθητα, με χαμηλές τιμές παραμένουσας δραστηριότητας. Αντίθετα, τα φυτικής προέλευσης ένζυμα CaGSTU1-1 και CaGmGSTU14 εμφάνισαν αυξημένη ανθεκτικότητα, με παραμένουσα δραστηριότητα που σε κάποιες περιπτώσεις ξεπέρασε το 90%. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, το GST4 εμφάνισε αυξημένη αναστολή έναντι όλων των στρομπιλουρινών που εξετάστηκαν (spiromesifen, fluoxastrobin, picoxystrobin, pyraclostrobin και trifloxystrobin). Η παρατηρούμενη υψηλή αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας κατέστησε το ένζυμο ιδιαίτερα ενδιαφέρον για περαιτέρω μελέτη.



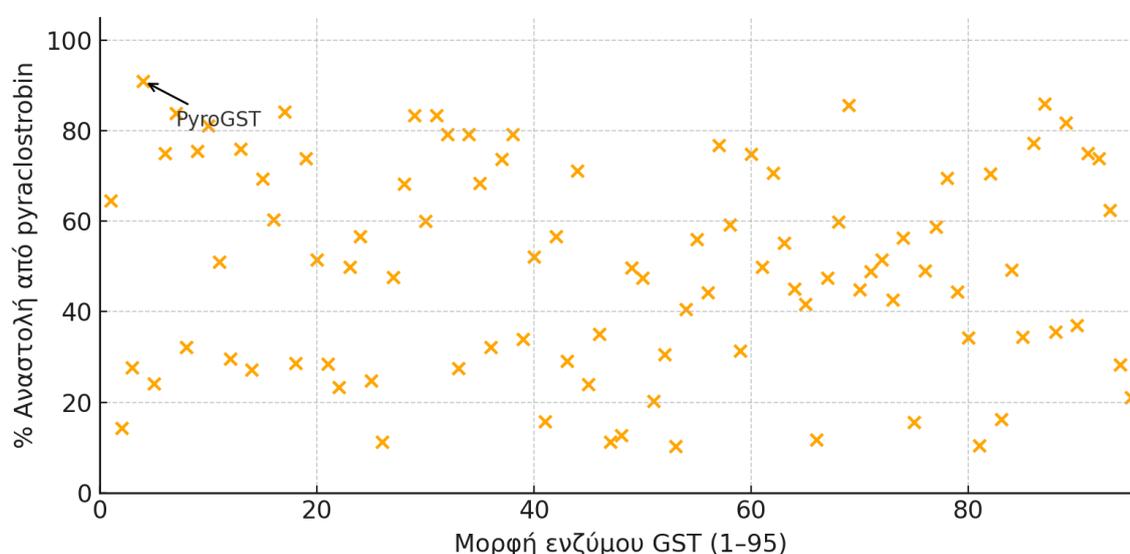
Εικόνα 1.6.3-4. Απεικόνιση heatmap της παραμένουσας ενζυμικής δραστηριότητας (%) επτά ενζύμων (GST4, PνGSTU2-2.1, PνGSTU2-2.10, GSTP1-1, GSTA1-1, CaGSTU1-1 και CaGmGSTU14) μετά από έκθεση σε πέντε στρομπιλουρίνες (Fluoxastrobin, Kresoxim-methyl, Picoxystrobin, Pyraclostrobin, Trifloxystrobin). Οι υψηλότερες τιμές δραστηριότητας υποδηλώνουν μειωμένη ανασταλτική δράση, ενώ οι χαμηλές τιμές αντανακλούν ισχυρή αναστολή του ενζύμου.

Να σημειωθεί ότι από τα αποτελέσματα της Εικόνας 1.6.3-4, προκύπτει ότι τα ισοένζυμα GSTA1-1 και GSTP1-1 εμφανίζουν διακριτά και σαφώς διαφοροποιημένα πρότυπα αναστολής έναντι των στρομπιλουρινών picoxystrobin, pyraclostrobin και trifloxystrobin. Για παράδειγμα: Στο picoxystrobin, το GSTP1-1 παρουσιάζει υψηλή αναστολή (22,11 %), ενώ το GSTA1-1 αναστέλλεται σε πολύ χαμηλότερο βαθμό (3,62 %). Στο pyraclostrobin, το GSTA1-1 αναστέλλεται σε πολύ υψηλό ποσοστό (19,71 %), ενώ το GSTP1-1 εμφανίζει πρακτικά μηδενική μεταβολή δραστηριότητας. Στο trifloxystrobin, και τα δύο ένζυμα παρουσιάζουν χαμηλή αλλά διαφοροποιημένη αναστολή. Η διαφορετική εκλεκτικότητα και ευαισθησία των δύο ισοενζύμων δημιουργεί τη δυνατότητα πολυπαραμετρικής ανάλυσης, επιτρέποντας την παράλληλη χρήση τους στο ίδιο διαγνωστικό σύστημα και την ταυτόχρονη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση μειγμάτων στρομπιλουρινών, αξιοποιώντας το μοναδικό αποτύπωμα αναστολής («inhibition fingerprint») που παράγει κάθε ένζυμο για κάθε μόριο. Συνεπώς, η συνδυαστική δράση των GSTA1-1 και GSTP1-1 μπορεί να αποτελέσει τη

βάση για την ανάπτυξη εξελιγμένων βιοαισθητήρων πολλαπλής ανάλυσης (multiplex biosensors), ικανών να διαχωρίζουν και να ανιχνεύουν ταυτόχρονα διαφορετικά φυτοπροστατευτικά της ίδιας χημικής οικογένειας.

Στάδιο 2: Ενζυμική μηχανική μέσω DNA shuffling και εξέταση μεταλλαγμένων παραλλαγών του ενζύμου. Το επιλεγμένο ισοένζυμο GST4 υποβλήθηκε σε διαδικασία κατευθυνόμενης εξέλιξης με στόχο την αύξηση της εκλεκτικότητάς του απέναντι στο pyrachlostrobin και πιθανόν άλλες στρομπιλουρίνες. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε ήταν το DNA shuffling, κατά το οποίο γονίδια του ενζύμου απομονώθηκαν, το μίγμα υποβλήθηκε σε fragmentation. Τα τμήματα ανασυνδυάστηκαν τυχαία *in vitro* ώστε να δημιουργηθούν νέες χιμαιρικές αλληλουχίες. Μετά από PCR ανασύνθεσης, προέκυψε μια βιβλιοθήκη μεταλλαγμένων παραλλαγών του ενζύμου.

Η βιβλιοθήκη κλωνοποιήθηκε σε εκφραστικό πλασμίδιο και μετασχηματίστηκε σε *E. coli* BL21(DE3). Μετά την επαγωγή έκφρασης με IPTG, πραγματοποιήθηκε screening αναστολής με pyrachlostrobin (Εικόνα 1.6.3-5). Για κάθε μεταλλαγμένο ένζυμο μετρήθηκε η παραμένουσα δραστηριότητα, και οι καλύτεροι κλώνοι επανεξετάστηκαν για επιβεβαίωση. Ανάμεσά τους, μία συγκεκριμένη παραλλαγή εμφάνισε την υψηλότερη ανασταλτική ευαισθησία, με σημαντικά υψηλότερη ευαισθησία σε σχέση με το αρχικό ένζυμο. Το βελτιστοποιημένο ένζυμο ονομάστηκε PyraGST, λόγω της εξαιρετικής του αναστολής από το pyrachlostrobin.



Εικόνα 1.6.3-5. Screening διαφορετικών μορφών του ενζύμου GST ως προς την αναστολή που υφίστανται από το pyrachlostrobin. Κάθε σημείο αντιστοιχεί σε μία μορφή του ενζύμου. Το PyraGST εμφανίζει το υψηλότερο ποσοστό αναστολής και επισημαίνεται στο γράφημα.

Στάδιο 3: Ακίνητοποίηση του βέλτιστου ενζύμου (PyraGST). Το PyraGST καθαρίστηκε με χρωματογραφία συγγένειας και αξιολογήθηκαν τρεις μέθοδοι ακίνητοποίησης ενθυλάκωση σε αλγινικό ασβέστιο, ακίνητοποίηση σε φορέα χιτοζάνης, διαμοριακή διασύνδεση με γλουταραλδεϋδη/BSA. Τα σποτελέσματα παρουσιάζονται στην Παράγραφο 2.2.3.

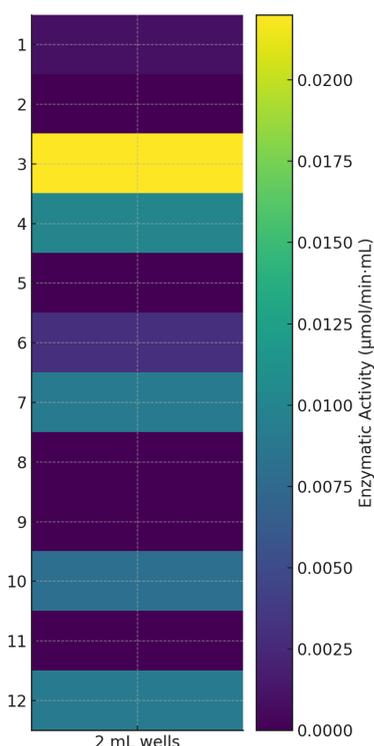
2.2.3. Ακίνητοποίηση του ενζύμου PyraGST με τη μέθοδο διασύνδεσης

Από όλες τις μεθόδους ακίνητοποίησης που αξιολογήθηκαν στο πλαίσιο της μελέτης

(ενθυλάκωση σε αλγινικό ασβέστιο, ακινητοποίηση σε φορέα χιτοζάνης και χημική διασύνδεση με γλουταραλδεΰδη/BSA), η τρίτη προσέγγιση, δηλαδή η ακινητοποίηση μέσω διαμοριακής διασύνδεσης με γλουταραλδεΰδη σε παρουσία BSA, αποδείχθηκε η πλέον αποτελεσματική. Η μέθοδος γλουταραλδεΰδη/BSA παρήγαγε: α) το υψηλότερο φασματοφωτομετρικό σήμα, δηλαδή τη μεγαλύτερη ανακτώμενη ενζυμική δραστηριότητα μετά την ακινητοποίηση, β) τη μεγαλύτερη δομική και λειτουργική σταθερότητα, με το ακινητοποιημένο ένζυμο να διατηρεί σημαντικό ποσοστό της αρχικής δραστηριότητας για παρατεταμένα χρονικά διαστήματα, γ) και σταθερό και ομογενές πήκτωμα, το οποίο επιτρέπει την αξιόπιστη επαναληψιμότητα των μετρήσεων και τη χρήση του συστήματος σε αναλυτικές εφαρμογές, όπως η ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Σε αντίθεση, οι μέθοδοι αλγινικού ασβεστίου και χιτοζάνης εμφάνισαν χαμηλότερη ανακτημένη δραστηριότητα και μειωμένη σταθερότητα, υποδηλώνοντας ότι οι μικροπεριβαλλοντικοί και στερεοχημικοί περιορισμοί των δύο αυτών υλικών δεν ήταν το ίδιο ευνοϊκοί για τη διατήρηση της καταλυτικής λειτουργίας του ενζύμου.

Η διαδικασία ακινητοποίησης του PyraGST αξιολογήθηκε υπό διαφορετικούς συνδυασμούς συγκεντρώσεων γλουταραλδεΰδης, BSA και ποσότητας ενζύμου. Στην Εικόνα 1.6.3-6 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των δοκιμών ακινητοποίησης ενζύμου κάτω από διαφορετικούς συνδυασμούς συγκεντρώσεων γλουταραλδεΰδης, αλβουμίνης ορού (BSA) και ποσότητας ενζύμου. Οι συνθήκες αυτές εξετάστηκαν συστηματικά με σκοπό την αξιολόγηση της δυνατότητας σχηματισμού σταθερού πηκτώματος και της διατήρησης ενζυμικής δραστηριότητας μετά την ακινητοποίηση, με χρήση του συστήματος GSH/CDNB ως αντιπροσωπευτικής αντίδρασης ελέγχου. Από τα αποτελέσματα διαπιστώνεται ότι πολλές από τις δοκιμασθείσες συνθήκες οδήγησαν σε μετρήσιμη ενζυμική δραστηριότητα, γεγονός που υποδηλώνει ότι το ένζυμο διατήρησε μέρος της λειτουργικότητάς του μετά την ακινητοποίηση. Ωστόσο, ένα σημαντικό ποσοστό συνθηκών είτε δεν εμφάνισε ενεργότητα, είτε δεν οδήγησε στον σχηματισμό επαρκούς πηκτώματος, πιθανώς λόγω ανεπαρκούς διασταύρωσης ή περίσσειας/ανεπάρκειας γλουταραλδεΰδης και BSA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συνθήκη με τη μέγιστη ανακτηθείσα δραστηριότητα, η οποία αντιστοιχεί σε: 0,5% v/v γλουταραλδεΰδη – 20 mg BSA – 100 μL ενζυμικού παρασκευάσματος. Η συγκεκριμένη συνθήκη φαίνεται να επιτυγχάνει τον βέλτιστο συνδυασμό μεταξύ ικανής διασταύρωσης του φορέα και διατήρησης της διαθεσιμότητας του ενεργού κέντρου του ενζύμου, με αποτέλεσμα την υψηλότερη καταλυτική απόδοση μετά την ακινητοποίηση. Το εύρημα αυτό αποτελεί κρίσιμο σημείο βελτιστοποίησης και δύναται να χρησιμοποιηθεί ως βάση για περαιτέρω παραμετροποίηση του συστήματος.

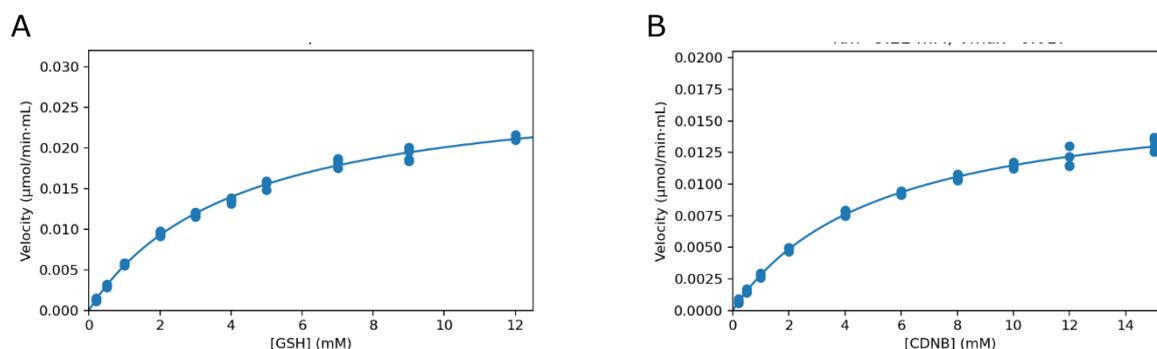
Συνολικά, η μέθοδος γλουταραλδεΰδη/BSA αποτελεί την καταλληλότερη στρατηγική ακινητοποίησης για το PyraGST, εξασφαλίζοντας τόσο υψηλή ευαισθησία όσο και μακροχρόνια σταθερότητα του βιοκαταλυτικού συστήματος.



Εικόνα 1.6.3-6. Heatmap ενζυμικής δραστηριότητας για 12 συνθήκες ακινητοποίησης. Με υψηλότερη ένταση (κόκκινο) σημειώνονται οι συνθήκες που εμφάνισαν τη μέγιστη δραστηριότητα, ενώ χαμηλές ή μηδενικές τιμές απεικονίζονται με πιο σκούρους τόνους.

2.2.4. Κινητική ανάλυση του ακινητοποιημένου PyraGST με το σύστημα GSH/CDNB

Η κινητική μελέτη του ακινητοποιημένου PyraGST έδειξε ότι το ένζυμο ακολουθεί κινητική Michaelis–Menten και για τα δύο υποστρώματα, GSH και CDNB (Εικόνα 1.6.3-7). Η K_m του ακινητοποιημένου ενζύμου ήταν σημαντικά αυξημένη σε σύγκριση με το ελεύθερο ένζυμο, ως συνέπεια πιθανών δομικών περιορισμών ή μειωμένης διαθεσιμότητας του ενεργού κέντρου. Ειδικότερα, για GSH, η K_m αυξήθηκε από 0,9 mM (ελεύθερο ένζυμο) σε 4,13 mM (ακινητοποιημένο). Για το CDNB, η K_m προσδιορίστηκε 5,22 mM. Τα αποτελέσματα αυτά είναι αναμενόμενα για ακινητοποιημένα συστήματα, όπου η διάχυση υποστρωμάτων και οι στερεοχημικοί περιορισμοί συχνά επηρεάζουν την καταλυτική προσβασιμότητα με συνέπεια την αύξηση της σταθεράς K_m .



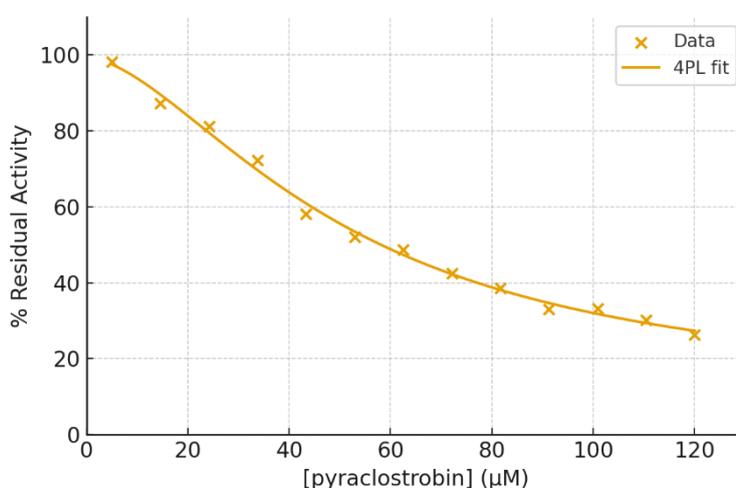
Εικόνα 1.6.3-7. Α. Κινητική καμπύλη του ακινητοποιημένου ενζύμου ως προς τη GSH. Η ταχύτητα της αντίδρασης παρουσιάζεται συναρτήσει της συγκέντρωσης της GSH. Η καμπύλη προσαρμόζεται στο μοντέλο Michaelis–Menten, επιβεβαιώνοντας ότι το ακινητοποιημένο ένζυμο

διατηρεί τον κλασικό μηχανισμό καταλυτικής δράσης. Η μετατόπιση της καμπύλης προς υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος υποδηλώνει μειωμένη συγγένεια του ενζύμου προς τη GSH μετά την ακινητοποίηση. Β. Κινητική καμπύλη του ακινητοποιημένου ενζύμου ως προς το CDNB. Η ταχύτητα της αντίδρασης απεικονίζεται ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του CDNB. Η καμπύλη της κινητικής προσαρμόζεται στο μοντέλο Michaelis–Menten, αναδεικνύοντας ότι ο μηχανισμός δράσης παραμένει αμετάβλητος ποιοτικά. Όπως και στην περίπτωση της GSH, παρατηρείται μετατόπιση της κινητικής καμπύλης, η οποία αντανακλά μειωμένη συγγένεια του ενζύμου για το CDNB εξαιτίας της ακινητοποίησης.

Συνολικά, η κινητική ανάλυση καταδεικνύει ότι αν και το ακινητοποιημένο ένζυμο εξακολουθεί να υπακούει στον κλασικό μηχανισμό Michaelis–Menten, παρουσιάζει μειωμένη συγγένεια για τα υποστρώματα συγκριτικά με το ελεύθερο ισοένζυμο, αναμενόμενη συμπεριφορά λόγω των φυσικών και χημικών περιορισμών που επιβάλλει η διαδικασία ακινητοποίησης.

2.2.5. Προσδιορισμός της ανασταλτικής ισχύος (IC_{50}) του pyraclostrobin για το ακινητοποιημένο PyraGST

Στο πλαίσιο της αξιολόγησης της ανασταλτικής δράσης του pyraclostrobin στο ακινητοποιημένο ισοένζυμο πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της τιμής IC_{50} . Στόχος της διαδικασίας ήταν να καθοριστεί η συγκέντρωση του αναστολέα στην οποία η παραμένουσα ενζυμική δραστηριότητα μειώνεται στο 50% της αρχικής τιμής της, όπως αυτή προσδιορίζεται απουσία αναστολέα. Για τον σκοπό αυτό εξετάστηκε η επίδραση του pyraclostrobin σε σειρά διαφορετικών συγκεντρώσεων, διατηρώντας σταθερή την ποσότητα του ακινητοποιημένου ισοενζύμου (Εικόνα 1.6.3-8). Η καταγραφή της υπολειπόμενης δραστηριότητας σε κάθε συγκέντρωση έδειξε σαφή δόσοεξαρτώμενη μείωση της καταλυτικής δραστηριότητας, η οποία προσαρμόστηκε σε μοντέλο λογαριθμικής αναστολής για τον υπολογισμό του IC_{50} . Η ανάλυση της καμπύλης αναστολής μέσω 4-παραμετρικού λογιστικού μοντέλου (4PL) έδειξε ότι το ακινητοποιημένο ισοένζυμο εμφανίζει τιμή IC_{50} περίπου 48.9 μM , αντανακλώντας τη συγκέντρωση pyraclostrobin που απαιτείται για να μειωθεί η ενζυμική δραστηριότητα στο 50% της αρχικής.

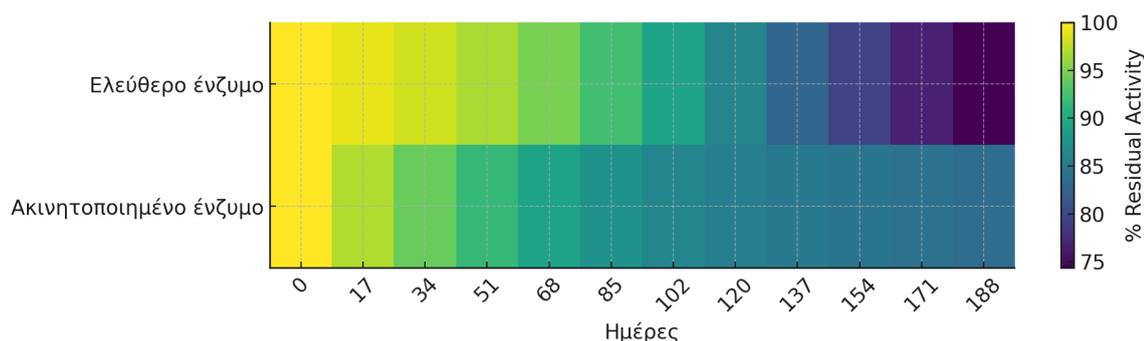


Εικόνα 1.6.3-8. Καμπύλη παραμένουσας δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ισοενζύμου έναντι του pyraclostrobin. Τα σημεία αντιστοιχούν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (5–120 μM). Η σταδιακή μείωση της δραστηριότητας με την αύξηση της συγκέντρωσης αναστολέα υποδεικνύει την ανασταλτική ισχύ του pyraclostrobin και επιτρέπει τον προσδιορισμό της τιμής IC_{50} .

2.2.6. Δομική σταθερότητα του PyraGST σε ελεύθερη και ακινητοποιημένη μορφή

Η σταθερότητα του PyraGST αξιολογήθηκε υπό συνθήκες αποθήκευσης 4 °C. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.6.3-9, η ακινητοποιημένη μορφή του ενζύμου διατήρησε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό δραστηριότητας σε σχέση με την ελεύθερη μορφή για περίπου ~200 ημέρες. Η σύγκριση των δύο καμπυλών παραμένουσας δραστηριότητας έδειξε ότι το ακινητοποιημένο ισοένζυμο παρουσιάζει αρχικά αυξημένη σταθερότητα, διατηρώντας υψηλότερα επίπεδα δραστηριότητας σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο κατά τα πρώτα στάδια της μελέτης. Η τάση αυτή δείχνει ότι η ακινητοποίηση προσφέρει ένα προστατευτικό μικροπεριβάλλον, το οποίο φαίνεται να περιορίζει τη δομική αποδόμηση ή την απώλεια καταλυτικής λειτουργίας κατά τους πρώτους μήνες. Ωστόσο, με την πάροδο του χρόνου, παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση της δραστηριότητας και για τις δύο μορφές του ενζύμου. Προς το τέλος της περιόδου παρακολούθησης, η δραστηριότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου μειώνεται λιγότερο, συγκριτικά με το ελεύθερο ισοένζυμο, γεγονός που υποδηλώνει ότι το πλεονέκτημα σταθερότητας που παρέχει η ακινητοποίηση είναι μακροχρόνια και δεν περιορίζεται στο αρχικό χρονικό διάστημα.

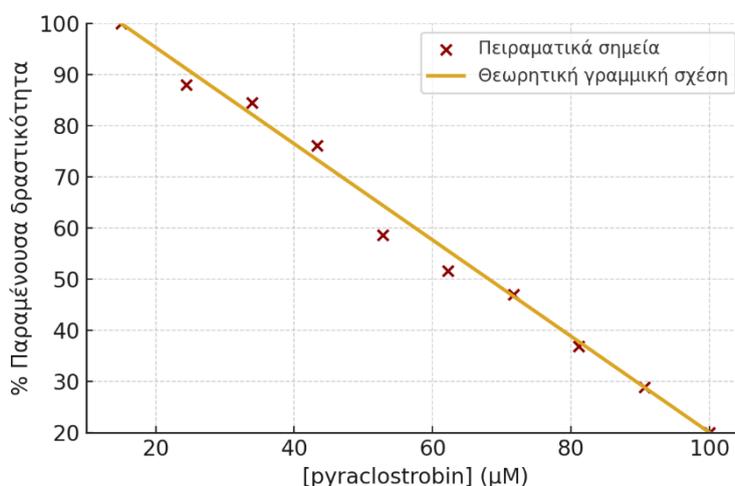
Η συνολική συμπεριφορά αποτυπώνει τον χαρακτηριστικό διφασικό ρόλο της ακινητοποίησης: αρχική προστασία της δομής και της δραστηριότητας, ακολουθούμενη από σταδιακή αποδυνάμωση, πιθανότατα λόγω καταστροφής της μήτρας ακινητοποίησης ή μακροχρόνιων φυσικοχημικών μεταβολών στο σύστημα.



Εικόνα 1.6.3-9. Heatmap παραμένουσας δραστηριότητας του ελεύθερου και ακινητοποιημένου ισοενζύμου PyraGST σε χρονικό διάστημα περίπου 200 ημερών. Οι διαφορετικές αποχρώσεις απεικονίζουν ποσοτικά τη μεταβολή της ενζυμικής δραστηριότητας με την πάροδο του χρόνου. Τα δεδομένα παρουσιάζονται σε δύο σειρές (ελεύθερο και ακινητοποιημένο ένζυμο), με την χρωματική κλίμακα να αντιστοιχεί στο ποσοστό παραμένουσας δραστηριότητας.

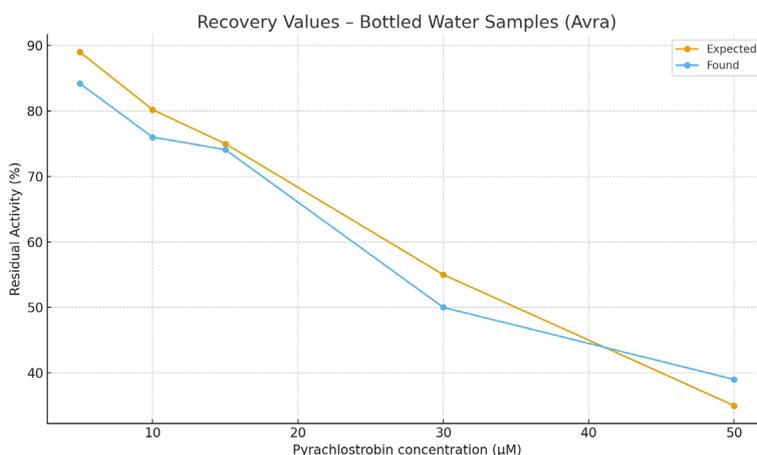
2.2.7. Ανάπτυξη αναλυτικής μεθόδου βασισμένης στην εκλεκτικότητα και αναστολή του PyraGST

Για την ανάπτυξη μίας εκλεκτικής αναλυτικής μεθόδου, αξιοποιήθηκε η εξειδίκευση του ακινητοποιημένου ισοενζύμου PyraGST έναντι του pyraclostrobin σε δείγματα εμφιαλωμένου νερού. Στην Εικόνα 1.6.3-10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των φασματοφωτομετρικών μετρήσεων για διαφορετικές συγκεντρώσεις pyraclostrobin σε εύρος 15–100 μM. Η μεταβολή της παραμένουσας ενζυμικής δραστηριότητας σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αναστολέα εμφανίζει γραμμική συμπεριφορά μέσα στο συγκεκριμένο εύρος, γεγονός που επιτρέπει τη χρήση της καμπύλης ως πρότυπης για ποσοτικό προσδιορισμό. Η πρότυπη αυτή καμπύλη μπορεί να αξιοποιηθεί για τον υπολογισμό άγνωστων συγκεντρώσεων pyraclostrobin και άλλων στρομπιλουρινών σε δείγματα, μέσω μέτρησης της παραμένουσας δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου.



Εικόνα 1.6.3-10. Γραφική απεικόνιση της σχέσης μεταξύ της συγκέντρωσης του pyraclostrobin (15–100 μM) και της παραμένουσας ενζυμικής δραστηριότητας του ακινητοποιημένου PyraGST σε δείγματα εμφιαλωμένου νερού. Τα πειραματικά σημεία παρουσιάζουν τη διασπορά των μετρήσεων, ενώ η γραμμική καμπύλη αντιστοιχεί στη θεωρητική εξίσωση παλινδρόμησης που περιγράφει το σύστημα.

Οι αναλύσεις σε δείγματα εμφιαλωμένου νερού με προσθήκη γνωστών συγκεντρώσεων pyrachlostrobin έδειξαν ότι ο βιοαισθητήρας παρουσιάζει ικανοποιητική συμπεριφορά ανάκτησης, με μικρές αποκλίσεις που καταγράφονται στο εύρος $\pm 10\%$, εκτός από την υψηλότερη συγκέντρωση (50 μM), όπου παρατηρείται υπερεκτιμημένη ανάκτηση (Εικόνα 1.6.3-11).



Εικόνα 1.6.3-11. Σύγκριση Αναμενόμενων και Ευρεθέντων τιμών παραμένουσας δραστηριότητας για δείγματα με προσθήκη γνωστών συγκεντρώσεων pyrachlostrobin. Το διάγραμμα δείχνει την απόκριση του βιοαισθητήρα και την απόκλιση των μετρήσεων από τις θεωρητικές τιμές.

Ο ενζυμικός βιοαισθητήρας χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό στρομπιλουρινών σε φυσικά δείγματα εκπλύσεων σταφυλιών, όπου αξιολογήθηκε η ανασταλτική τους επίδραση στην ενζυμική δραστηριότητα. Οι αναλύσεις αυτές με προσθήκη γνωστών συγκεντρώσεων pyraclostrobin (ή/και Kresoxim-methyl) έδειξαν ικανοποιητική ανάκτηση, με αποκλίσεις εντός $\pm 10\%$.

3 ΣΥΝΟΨΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο την ανάπτυξη και αξιολόγηση ενζυμικών βιοαισθητήρων βασισμένων σε GSTs για την ταχεία ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών, με έμφαση στο μυκητοκτόνο pyrachlostrobin, αντιπροσωπευτικό μέλος της οικογένειας των στρομπιλουρινών. Η ολοκληρωμένη προσέγγιση, που περιλάμβανε επιλογή ισοενζύμων, βελτίωση καταλυτικών ιδιοτήτων μέσω ενζυμικής μηχανικής, κινητική ανάλυση και ανάπτυξη διαφορετικών στρατηγικών ακινητοποίησης, επέτρεψε τη δημιουργία ενός λειτουργικού πρωτοτύπου βιοαισθητήρα.

Από τις εφαρμοζόμενες μεθόδους ακινητοποίησης, η προσέγγιση διαμοριακής διασύνδεσης με γλουταραλδεϋδη/BSA αναδείχθηκε ως η καταλληλότερη, προσφέροντας τα υψηλότερα επίπεδα ανακτώμενης ενζυμικής δραστηριότητας και σημαντικά βελτιωμένα σταθερότητα του ακινητοποιημένου PyraGST σε βάθος χρόνου. Η κινητική ανάλυση έδειξε ότι, παρότι η ακινητοποίηση επιφέρει αύξηση των τιμών K_m λόγω περιορισμών διάχυσης και τροποποιημένου μικροπεριβάλλοντος, το ένζυμο διατηρεί την καταλυτική του λειτουργία και είναι κατάλληλο για αναλυτικές εφαρμογές.

Η μελέτη της ανασταλτικής δράσης του pyrachlostrobin έδειξε δόσοεξαρτώμενη απόκριση, επιτρέποντας τον υπολογισμό IC_{50} και τη δημιουργία πρότυπων καμπυλών, οι οποίες καθιστούν το σύστημα αξιόπιστο για ποσοτική ανάλυση. Επιπλέον, η μέθοδος επέδειξε υψηλή επαναληψιμότητα και ποσοστά ανάκτησης σε πραγματικά δείγματα νερού, γεγονός που επιβεβαιώνει τη δυνατότητα εφαρμογής του βιοαισθητήρα σε περιβαλλοντικές αναλύσεις.

Συνολικά, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ακινητοποιημένο PyraGST αποτελεί μια αποτελεσματική, οικονομική και βιοσυμβατή πλατφόρμα για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων ανίχνευσης υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών. Η προσέγγιση συνδυάζει υψηλή εκλεκτικότητα, καλή σταθερότητα και δυνατότητα εφαρμογής σε πραγματικά δείγματα, γεγονός που ανοίγει τον δρόμο για περαιτέρω βελτιστοποίηση και ενσωμάτωση σε φορητές διαγνωστικές συσκευές πεδίου. Συνολικά, η παρούσα έρευνα θέτει τα θεμέλια για την ανάπτυξη νέας γενιάς βιοαισθητήρων βασισμένων σε GSTs, με υψηλή ευαισθησία, επιλεκτικότητα και δυνατότητα εφαρμογής στην πράξη, συμβάλλοντας ουσιαστικά στους τομείς της αγροδιατροφικής ασφάλειας, της περιβαλλοντικής παρακολούθησης και της πράσινης τεχνολογίας.

4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Βιβλιογραφικές Αναφορές

Andreou, V. G., & Clonis, Y. D. (2002). Novel fibre-optic biosensor based on immobilized glutathione S-transferase and sol-gel entrapped bromocresol green for the determination of atrazine. *Analytica Chimica Acta*, 460(2), 151–161. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00250-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00250-7)

Federici, L., Masulli, M., & Allocati, N. (2021). An overview of biosensors based on glutathione transferases and for the detection of glutathione. *Electroanalysis*, 33(8), 1908–1920. <https://doi.org/10.1002/elan.202100143>

Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 51–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>

Kapoli, E., Chronopoulou, E., & Labrou, N. E. (2008). Engineering sensitive glutathione transferase for the detection of xenobiotics. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(3), 498–503. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.05.001>

Materon, E. M., Medina, P. L., Flores, N. M., Elizalde, M. P., & Andrade, A. B. (2014). Glutathione S-transferase-based amperometric biosensor for anticancer drug detection. *Talanta*, 119, 447–453. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.11.037>

Morou, E., Dowd, A. J., Rajatileka, S., Steven, A., Hemingway, J., Ranson, H., & Vontas, J. (2010). A simple colorimetric assay for specific detection of glutathione-S transferase activity associated with DDT resistance in mosquitoes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(8), e808. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000808>

Perperopoulou, F., Fragoulaki, M., Papageorgiou, A. C., & Labrou, N. E. (2021). Directed evolution of a glutathione transferase for the development of a biosensor for alachlor determination. *Symmetry*, 13(3), 461. <https://doi.org/10.3390/sym13030461>

Sassolas, A., Blum, L. J., & Leca-Bouvier, B. D. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, 30(3), 489–511. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>