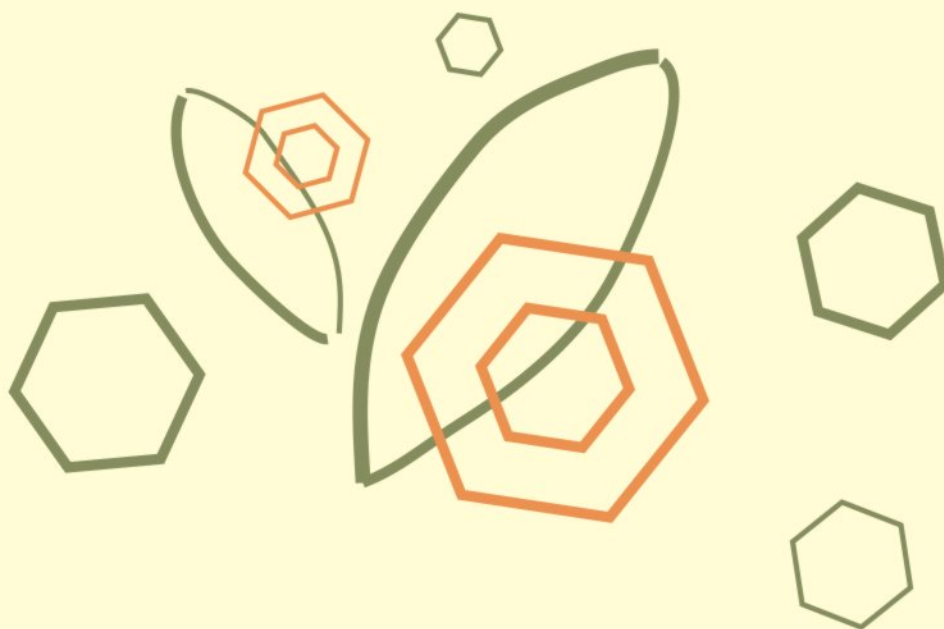


**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΔΟΜΗΣ
ΟΡΘΟ-ΔΙ-ΦΑΙΝΟΛΗΣ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΤΟΙΧΩΜΑΤΑ
ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ ΤΟΥΣ ΣΕ
ΔΙΕΣΤΕΡΙΚΑ ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΜΕ ΤΟ ΒΟΡΙΚΟ ΟΞΥ**



ΓΕΡΑΣΙΜΙΑ Δ. ΤΣΑΣΗ

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΥ ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ**

ΑΘΗΝΑ 2010

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΥΠΑΡΞΗΣ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΔΟΜΗΣ ΟΡΘΟ-ΔΙ-
ΦΑΙΝΟΛΗΣ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΑ ΤΟΙΧΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΜΜΕΤΟΧΗΣ
ΤΟΥΣ ΣΕ ΔΙΕΣΤΕΡΙΚΑ ΣΥΜΠΛΟΚΑ ΜΕ ΤΟ ΒΟΡΙΚΟ ΟΞΥ.

ΓΕΡΑΣΙΜΙΑ Δ. ΤΣΑΣΗ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΥ ΓΕΩΠΟΝΙΚΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ

ΑΘΗΝΑ 2010

Το θέμα της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης και η τριμελής εξεταστική επιτροπή εγκρίθηκαν με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης Ειδικής Σύνθεσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας (ΓΣΕΣ 13/29-04-2009).

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γεώργιος Καραμπουρνιώτης, Καθηγητής (Επιβλέπων)

Παναγιώτης Κατινάκης, Καθηγητής (Μέλος)

Γεώργιος Λιακόπουλος, Λέκτορας (Μέλος)

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	5
Πρόλογος	7
Εισαγωγή	9
1. Ανόργανη θρέψη φυτών	9
1.1. Βασικές αρχές	9
1.2. Τα θρεπτικά στοιχεία στο έδαφος	9
1.3. Πρόσληψη και διακίνηση των θρεπτικών στοιχείων εντός του φυτού.....	10
1.4. Φυσιολογική σημασία των θρεπτικών στοιχείων	10
1.5. Τροφοπενίες θρεπτικών στοιχείων	11
1.5.1. Επιπτώσεις της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων στο δευτερογενή μεταβολισμό	11
2. Το Βόριο.....	13
2.1. Χημεία του Βορίου	13
2.2. Βορονικά οξέα.....	14
2.3. Το Βόριο στα φυτά.....	16
2.3.1. Διαθεσιμότητα και Πρόσληψη	16
2.3.2. Διακίνηση του Βορίου μέσα στους φυτικούς ιστούς	17
2.3.3. Δομικός ρόλος Βορίου	18
3. Φαινολικά συστατικά	25
3.1. Χημεία	25
3.1.1. Απλά φαινολικά συστατικά	26
3.1.2. Φλαβονοειδή	27
3.2. Φαινολικά συστατικά στο κυτταρικό τοίχωμα	27
3.3. Φαινολικά συστατικά και Βόριο	28
3.4. Η διερεύνηση της ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ βορικού οξέος και φαινολικών συστατικών στο κυτταρικό τοίχωμα	29
4. Ελιά.....	30
4.1. Γενικά χαρακτηριστικά.....	30
4.2. Βόριο και ελιά	31
4.3. Φαινολικά συστατικά	31
Σκοπός της εργασίας.....	33
Υλικά και Μέθοδοι.....	35
1. Χημικά αντιδραστήρια και βιολογικό υλικό.....	35
1.1. Χημικά αντιδραστήρια και διαλύτες.....	35
1.2. Βιολογικό υλικό και απομόνωση κυτταρικών τοιχωμάτων	35
2. Επιμέρους πειράματα	35
2.1. Πείραμα 1: Σύγκριση σύστασης υδρολύματος μετά την επώαση με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ με το υδρόλυμα μετά από αλκαλική υδρόλυση των κυτταρικών τοιχωμάτων	35
2.1.1. Επώαση των κυτταρικών τοιχωμάτων παρουσία 3-νιτροφαινυλο-βορονικού οξέος και αλκαλική υδρόλυση.....	35
2.1.2. Χρωματογραφικές αναλύσεις.....	37
2.2. Πείραμα 2: Επίδραση της τιμής pH του μέσου επί της σύστασης του υδρολύματος μετά την επώαση των κυτταρικών τοιχωμάτων με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ.....	37
2.2.1. Επώαση των κυτταρικών τοιχωμάτων παρουσία 3-νιτροφαινυλο-βορονικού οξέος.....	37
2.2.2. Χρωματογραφικές αναλύσεις.....	37

Περιεχόμενα

2.3. Πείραμα 3: Παρασκευαστική απομόνωση και φασματοσκοπική μελέτη των συστατικών που απελευθερώνονται μετά την επώαση των κυτταρικών τοιχωμάτων με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ	39
2.3.1. Επώαση των κυτταρικών τοιχωμάτων παρουσία 3-νιτροφαινυλο-βορονικού οξέος.....	39
2.3.2. Διερεύνηση βέλτιστου pH για την εκχύλιση υγρού-υγρού με σκοπό την απομάκρυνση του 3-NBA από το υπερκείμενο της επώασης	39
2.3.3. Εκχύλιση σε διφασικό σύστημα για την απομάκρυνση περίσσειας του 3-NBA	40
2.3.4. Παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.....	40
2.3.5. Φασματοσκοπικές τεχνικές.....	41
Αποτελέσματα	43
1. Πείραμα 1: Σύγκριση σύστασης υδρολύματος μετά την επώαση με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ με το υδρόλυμα μετά από αλκαλική υδρόλυση των κυτταρικών τοιχωμάτων	43
1.1. Σκοπός του πειράματος.....	43
1.2. Αποτελέσματα χρωματογραφικών αναλύσεων	43
2. Πείραμα 2: Επίδραση της τιμής pH του μέσου επί της σύστασης του υδρολύματος μετά την επώαση των κυτταρικών τοιχωμάτων με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ.....	47
2.1. Σκοπός του πειράματος.....	47
2.2. Πιστοποίηση μεθόδου μέτρησης βορικού οξέος σε δείγματα διαφόρων τιμών pH με ταυτόχρονη παρουσία 3-νιτροφαινυλο-βορονικού οξέος.	47
2.3. Σύσταση του υδρολύματος σε μεταβολίτες και βορικό οξύ	49
3. Πείραμα 3: Παρασκευαστική απομόνωση και φασματοσκοπική μελέτη των συστατικών που απελευθερώνονται μετά την επώαση των κυτταρικών τοιχωμάτων με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ	51
3.1. Σκοπός του πειράματος.....	51
3.2. Διερεύνηση βέλτιστου pH για την εκχύλιση υγρού-υγρού με σκοπό την απομάκρυνση του 3-NBA από το υπερκείμενο της επώασης.....	51
3.3. Φασματοσκοπικές αναλύσεις.....	53
Συζήτηση	59
1. Πείραμα 1: Σύγκριση σύστασης υδρολύματος μετά την επώαση με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ με το υδρόλυμα μετά από αλκαλική υδρόλυση των κυτταρικών τοιχωμάτων	59
2. Πείραμα 2: Επίδραση της τιμής pH του μέσου επί της σύστασης του υδρολύματος μετά την επώαση των κυτταρικών τοιχωμάτων με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ.....	60
3. Πείραμα 3: Παρασκευαστική απομόνωση και φασματοσκοπική μελέτη των συστατικών που απελευθερώνονται μετά την επώαση των κυτταρικών τοιχωμάτων με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ	61
Τελικά συμπεράσματα.....	63
Βιβλιογραφία	65
Περίληψη	73

Πρόλογος

Η συνεργασία μου με το Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών ξεκίνησε για πρώτη φορά με σκοπό την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας.

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Γεωργίου Καραμπουρνιώτη που με επέλεξε για την εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας. Αισθάνομαι ιδιαίτερα τυχερή που στα πρώτα μου βήματα στο πεδίο της έρευνας βρέθηκα δίπλα σε ανθρώπους που πέρα από καταξιωμένοι επιστήμονες είναι και αξιόλογοι άνθρωποι.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Καθηγητή κ. Παναγιώτη Κατινάκη για την συμμετοχή του στην τριμελή εξεταστική επιτροπή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο Λέκτορα κ. Γεώργιο Λιακόπουλο για την ουσιαστική καθοδήγηση και βοήθεια που μου παρείχε σε όλα τα στάδια αυτής της εργασίας. Η συμβολή του ήταν καθοριστική όχι μόνο στη διεξαγωγή των επιμέρους πειραμάτων αλλά και στην επιστημονική γνώση και εμπειρία που μου μετέδωσε.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Διδάκτορα και μέλος ΕΕΔΙΠ του εργαστηρίου κ. Δημοσθένη Νικολόπουλο για τη βοήθεια που απλόχερα μου πείριχε σε διάφορα σημεία της πειραματικής πορείας και κυρίως για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα που δημιουργούσε μέσα στο εργαστήριο.

Ορισμένα από τα πειράματα της παρούσας εργασίας δεν θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν χωρίς την συμβολή της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κ. Ελένης Σκαλτσά του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής του Ε.Κ.Π.Α. την οποία ευχαριστώ ιδιαίτερα. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Διδάκτορα κ. Αικατερίνη Αργυροπούλου του Τμήματος Φαρμακευτικής για την συμβολή της στην λήψη των φασμάτων NMR και την καθοδήγησή της στην ανάπτυξη της μεθόδου παρασκευαστικής χρωματογραφίας. Ιδιαίτερα σημαντική ήταν η βοήθεια του Επίκουρου Καθηγητή κ. Πέτρου Ταραντίλη του Εργαστηρίου Γενικής Χημείας στην λήψη των φασμάτων DRIFT καθώς και του μέλους ΕΤΕΠ του Πανεπιστημίου κ. Κωνσταντίνος Αστράκα στην λήψη των φασμάτων MS για την οποία τους ευχαριστώ ιδιαίτερα. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω το μέλος ΕΕΔΙΠ του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων κ. Ουρανία Καλαντζή για την λιοφυλίωση απομονωμένων συστατικών.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω την προπτυχιακή φοιτήτρια Νατάσσα-Φαίη Κοσμίδου για την σημαντική της συμβολή στην διεξαγωγή των πειραμάτων καθώς και όλους τους συναδέλφους του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία που είχαμε.

Τέλος είναι σημαντικό να ευχαριστήσω του φίλους μου για την ηθική υποστήριξη που μου παρέχουν όλα αυτά τα χρόνια και την οικογένειά μου για την αγάπη και την συμπαράσταση που δείχνει σε κάθε μου επιλογή και προσπάθεια.

Εισαγωγή

1. Ανόργανη θρέψη φυτών

1.1. Βασικές αρχές

Τα φυτά αποτελούν φωτοσυνθετικά αυτότροφους οργανισμούς οι οποίοι συνθέτουν το σύνολο των δομικών και λειτουργικών τους μορίων από ανόργανα συστατικά. Η ανόργανη θρέψη των φυτών έχει ως αντικείμενο την μελέτη των φυσιολογικών μηχανισμών μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η πρόσληψη, διακίνηση, κατανομή καθώς και αξιοποίηση των ανόργανων συστατικών από το περιβάλλον (Δροσόπουλος, 1992).

Στο φυτικό σώμα μπορούν να ανιχνευθούν έως και 60 διαφορετικά στοιχεία μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται και αυτά που καλούνται απαραίτητα. Ο όρος αυτός αναφέρεται σε εκείνα τα στοιχεία που απαιτούνται για την ομάλη ανάπτυξη και ολοκλήρωση του βιολογικού κύκλου ενός φυτικού οργανισμού (Δροσόπουλος, 1992). Ως απαραίτητα στοιχεία έχουν χαρακτηριστεί τα C, H, O, N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Cu, Zn, Mo, Cl, B και Ni. Από τα παραπάνω, τα C, H, O, N, P, K, Ca, P, Mg και S καλούνται μακροστοιχεία επειδή απαιτούνται σε μεγάλες ποσότητες ενώ τα Mn, Cu, Zn, Mo, Cl, B και Ni καλούνται μικροστοιχεία ή ιχνοστοιχεία διότι απαιτούνται, συγκριτικά με τα μακροστοιχεία, σε πολύ χαμηλότερες ποσότητες.

1.2. Τα θρεπτικά στοιχεία στο έδαφος

Οι τροφικές απαιτήσεις των φυτικών οργανισμών ικανοποιούνται με πρόσληψη θρεπτικών συστατικών από την ατμόσφαιρα και το έδαφος. Τα στοιχεία C, H και O προσλαμβάνονται μέσω του H₂O και του CO₂ ενώ τα υπόλοιπα προσλαμβάνονται με τη βοήθεια του ριζικού συστήματος από το έδαφος. Τα εδαφικά χαρακτηριστικά αλλά και η αλληλεπίδραση φυτού και εδάφους διαμορφώνουν τη διαθεσιμότητα ενός δεδομένου θρεπτικού στοιχείου (Δροσοπουλος, 1992). Επίσης, η διαθεσιμότητα καθορίζεται και από τη συγκέντρωση του συγκεκριμένου στοιχείου στο εδαφικό διάλυμα αλλά και από την ικανότητα απορρόφησής του από τη ρίζα (Charin, 1980). Κατά κανόνα, τα θρεπτικά συστατικά του εδάφους προσλαμβάνονται με τη μορφή ιόντων.

Η παροχή των θρεπτικών συστατικών στον φυτικό οργανισμό επηρεάζεται τόσο από βιοτικούς όσο και από αβιοτικούς παράγοντες. Όσον αφορά στην πρώτη κατηγορία, είναι γνωστό πως η δραστηριότητα της μικροχλωρίδας του εδάφους και η εγκαθίδρυση συμβιωτικών σχέσεων επηρεάζουν το είδος και την ποσότητα των θρεπτικών στοιχείων που είναι διαθέσιμα στα φυτά (Taiz and Zeiger, 1998). Η παροχή θρεπτικών συστατικών επηρεάζεται επίσης από την κατανομή τους στις τρεις φάσεις του εδάφους τη στερεή, την υγρή και την αέρια. Άλλοι παράγοντες

Εισαγωγή

που επηρεάζουν την διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών στους φυτικούς οργανισμούς είναι η χημική σύσταση του μητρικού πετρώματος, ο ρυθμός αποσάθρωσης του, το pH, η λεπτή υφή του εδάφους αλλά και οι κλιματικές συνθήκες όπως η υγρασία, η θερμοκρασία και ο αερισμός του εδάφους.

1.3. Πρόσληψη και διακίνηση των θρεπτικών στοιχείων εντός του φυτού

Η πρόσληψη των θρεπτικών συστατικών πραγματοποιείται σε μία περιοχή γύρω από το ριζικό σύστημα που ονομάζεται όγκος ή ζώνη απορρόφησης. Η πρόσληψη των ιόντων γίνεται με άμεση επαφή της ρίζας με τα εδαφικά τεμαχίδια, με διάχυση των ιόντων μέσω του εδαφικού διαλύματος ή με μετακίνηση των ιόντων μέσω μαζικής ροής κατά την κίνηση του εδαφικού διαλύματος λόγω του ρεύματος της διαπνοής (Δροσόπουλος, 1992).

Την πρόσληψη των θρεπτικών στοιχείων ακολουθεί η διακίνησή τους εντός του φυτικού σώματος. Η πορεία των ιόντων πραγματοποιείται μέσω δύο οδών. Η πρώτη οδός υλοποιείται μέσω διάχυσης των ιόντων στον αποπλάστη (αποπλαστική κίνηση), διαμέσου των κυτταρικών τοιχωμάτων και των μεσοκυττάρων χώρων. Η κίνηση αυτή γίνεται χωρίς κατανάλωση ενέργειας αφού δεν παρεμβάλεται ο πρωτοπλάστης. Πρόκειται για μία παθητική κίνηση που βασίζεται σε μηχανισμούς διάχυσης και μαζικής ροής (Marschner, 1995). Εξαρτάται από τα ανατομικά χαρακτηριστικά των κυττάρων και από τη αλληλεπίδραση εδάφους φυτού και ατμόσφαιρας (Steudle, 2001). Μέσω της οδού αυτής διακινούνται τα ιόντα από το εξωτερικό διάλυμα μέχρι την ενδοδερμίδα της ρίζας. Η δεύτερη οδός πραγματοποιείται μέσω του συμπλάστη (συμπλαστική κίνηση). Στη συμπλαστική κίνηση η μεταφορά των ιόντων από κύτταρο σε κύτταρο γίνεται με τη βοήθεια των πλασμοδεσμών. Η συμπλαστική οδός απαιτεί την είσοδο των ιόντων διαμέσου της κυτταροπλασματικής μεμβράνης η οποία ωστόσο δεν είναι συνήθως ευχερής λόγω της διπλοστιβάδας των φωσφολιπιδίων. Λύση στο πρόβλημα αυτό δίνουν οι μεμβρανικές πρωτεΐνες που επιτρέπουν την παθητική μεταφορά είτε τη μεταφορά με κατανάλωση ενέργειας. Προφανώς, στην πορεία των ιόντων από το εδαφικό διάλυμα έως τα αγγεία του ξύλου συμμετέχουν και οι δύο παραπάνω οδοί.

1.4. Φυσιολογική σημασία των θρεπτικών στοιχείων

Σε γενικές γραμμές, τα μακροστοιχεία αποτελούν αναπόσπαστα δομικά συστατικά του κυττάρου, διατηρούν την κυτταρική οργάνωση και την ωσμωτική ισορροπία και λαμβάνουν μέρος στις ενεργειακές μετατροπές και στις ενζυμικές αντιδράσεις. Ο άνθρακας, το υδρογόνο και το οξυγόνο αποτελούν περίπου το 94% της ξηρής μάζας των φυτών και είναι τα κύρια δομικά στοιχεία των οργανικών συστατικών του κυττάρου. Τα παραπάνω μαζί με τον φώσφορο, το άζωτο και το θείο αποτελούν τα κύρια δομικά συστατικά των πρωτεϊνών. Τα

υπόλοιπα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία παίζουν τον ρόλο παραγόντων σταθεροποίησης της ειδικής δομής του πρωτοπλάσματος και των οργανιδίων του κυττάρου, καθώς και σταθεροποίησης των ενζύμων ή παραγόντων με καταλυτική σημασία (Δροσοπουλος, 1992).

Κάθε ένα από τα θρεπτικά στοιχεία συμμετέχει στο φυτικό μεταβολισμό με διαφορετικό τρόπο και σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Υπάρχει μια κρίσιμη συγκέντρωση για κάθε θρεπτικό στοιχείο που εξασφαλίζει την φυσιολογική ανάπτυξη του φυτικού οργανισμού. Συγκεντρώσεις χαμηλότερες αυτής της κρίσιμης συγκέντρωσης προκαλούν συνθήκες τροφопενίας για το συγκεκριμένο στοιχείο.

1.5. Τροφопενίες θρεπτικών στοιχείων

Τροφопενία καλείται η φυσιολογική κατάσταση που προκαλείται από την εκτεταμένη έλλειψη ενός ή περισσότερων θρεπτικών στοιχείων. Η ελλιπής παροχή θρεπτικών στοιχείων μπορεί να θεωρηθεί παράγοντας καταπόνησης καθώς προκαλεί διαταραχή σε μία ή περισσότερες λειτουργίες των φυτών. Οι λόγοι που μπορούν να οδηγήσουν σε ανεπάρκεια ενός στοιχείου είναι η μειωμένη περιεκτικότητα του εδάφους σε αυτό ή άλλες ιδιαιτερότητες στην χημική σύσταση του εδάφους (ανταγωνισμός μεταξύ θρεπτικών στοιχείων, αλατότητα, ακραίες τιμές του pH, παρουσία βαρέων μετάλλων, κ.λπ.), η παρουσία του στοιχείου σε μη αφομιώσιμη μορφή, ή οι ακραίες εδαφοκλιματικές συνθήκες (υπερβολική ή ελλιπής υγρασία, ανεπαρκής αερισμός).

Οι επιπτώσεις της τροφопενίας πρωταρχικά εντοπίζονται στην αδυναμία σύνθεσης των συστατικών στα οποία συμμετέχει το στοιχείο που βρίσκεται σε έλλειψη. Επίσης, παρατηρείται μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης, δυσλειτουργίες στον μεταβολισμό λόγω απενεργοποίησης των ενζυμικών συστημάτων ή απώλειας λειτουργικότητας των μεμβρανών που έχει σαν αποτέλεσμα τη διαταραχή διαμερισματοποίησης του κυττάρου και την απώλεια της ομοιόστασης (Taiz and Zeiger, 1998).

1.5.1. Επιπτώσεις της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων στο δευτερογενή μεταβολισμό

Ο δευτερογενής μεταβολισμός επηρεάζεται από ιδιαίτερα από αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης όπως οι τροφопενίες θρεπτικών στοιχείων. Για την περιγραφή των αλληλεπιδράσεων δευτερογενούς μεταβολισμού – θρέψης έχουν διατυπωθεί διάφορες θεωρίες.

Σύμφωνα με τη θεωρία ισορροπίας άνθρακα / θρεπτικών στοιχείων, το είδος και η ποσότητα των μεταβολιτών που συνθέτει ένα φυτό εξαρτάται από την διαθεσιμότητα των πόρων και συγκεκριμένα την ισορροπία μεταξύ παραγωγής

Εισαγωγή

οργανικού άνθρακα και διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών όπως του αζώτου. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες διακρίνονται σε αυτούς που περιέχουν άνθρακα (φαινολικά συστατικά και τερπένια) και σε αυτούς που περιέχουν άζωτο (αλκαλοειδή και κυανογόνα γλυκοσιδία). Όταν υπάρχει έλλειψη αζώτου, περιορίζεται η σύνθεση μορίων που περιέχουν άζωτο και ενισχύεται η σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών που περιέχουν άνθρακα. Σε συνθήκες τροφопενίας αζώτου, καθίσταται αδύνατη η σύνθεση δομικών μορίων όπως οι πρωτεΐνες ενώ το ποσοστό του άνθρακα που θα διοχετευτεί σε αναπτυξιακές διεργασίες είναι περιορισμένο. Η θεωρία αυτή παρουσιάζει ελλείψεις στο να συμπεριλάβει το γεγονός ότι οι λειτουργίες άμυνας κατά το αναπτυξιακό στάδιο δεν αποτελούν εναλλακτικό τρόπο απόθεσης θρεπτικών στοιχείων αλλά συνυπάρχουν με τις λειτουργίες της ανάπτυξης.

Η δεύτερη θεωρία ονομάζεται θεωρία ισορροπίας ανάπτυξης / διαφοροποίησης και υποστηρίζει πως η κατανομή των ενεργειακών πόρων έχει πρωταρχικό ρόλο τη ανάπτυξη και δευτερευόντως τους αμυντικούς μηχανισμούς όπου κυρίαρχο ρόλο διαδραματίζουν οι δευτερογενείς μεταβολίτες (Herms and Mattson, 1992). Σε συνθήκες τροφопενίας ευνοείται η ανάπτυξη αμυντικών μηχανισμών και έτσι τα θρεπτικά συστατικά κατευθύνονται στη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών σε υψηλές συγκεντρώσεις. Είναι προφανές ότι σε καταστάσεις τροφопενίας περιορίζεται η ανάπτυξη νέων ιστών ενώ ευνοείται η ενίσχυση των αμυντικών μηχανισμών.

Η τρίτη θεωρία ονομάζεται θεωρία της βέλτιστης άμυνας και υποστηρίζει ότι η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών έχει σχέση με τη συνύπαρξη των φυτικών οργανισμών με τους βιοτικούς εχθρούς τους. Η θεωρία αυτή έχει εξελικτική βάση γιατί στηρίζεται στα προσαρμοστικά πλεονεκτήματα που προσδίδουν στους οργανισμούς οι αμυντικοί μηχανισμοί (Hamilton et al., 2001). Είναι γεγονός ότι κατά κανόνα η έλλειψη θρεπτικών συστατικών οδηγεί στη σύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών. Συγκεκριμένα η τροφопενία αζώτου, φωσφόρου, καλίου, θείου και σιδήρου (Bryant et al., 1987) οδηγεί στη συσσώρευση φαινολικών συστατικών που μπορεί να οφείλεται είτε σε *de novo* βιοσύνθεσή τους είτε στη συμπύκνωση της υπάρχουσας δεξαμενής φαινολικών συστατικών.

Η συσσώρευση των φαινολικών συστατικών προκαλεί καταστολή των αυξητικών διαδικασιών, φαινόμενο που αποτελεί στρατηγική αντιμετώπισης της έλλειψης θρεπτικών στοιχείων. Επιπλέον, λόγω της παραπάνω καταστολής, υφίσταται περίσσεια οργανικού άνθρακα και η βιοσύνθεση φαινολικών συστατικών αποτελεί έναν τρόπο διοχέτευσής της. Τα φαινολικά συστατικά αποτελούν παράγοντες άμυνας έναντι βιοτικών παραγόντων καταπόνησης όπως είναι οι παθογόνοι μικροοργανισμοί και τα φυτοφάγα ζώα. Λόγω της συσσώρευσης

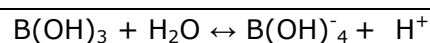
δευτερογενών μεταβολιτών, τα φυτά ενισχύουν τις αμυντικές τους γραμμές έναντι ενδεχόμενης απώλειας φυτικών οργάνων, η οποία πλέον καθίσταται καταστροφική υπό συνθήκες έλλειψης ενός ή περισσότερων θρεπτικών στοιχείων. Στις παραπάνω θεωρίες είναι σημαντικό να προστεθεί και μια καινούρια προσέγγιση πάνω στο ρόλο και την κατανομή των δευτερογενών μεταβολιτών στους φυτικούς οργανισμούς. Σύμφωνα με τους Close and McArthur (2002) ο πιο σημαντικός εξελικτικός παράγοντας πίεσης που καθορίζει την παραγωγή και κατανομή φαινολικών συστατικών δεν είναι οι βιοτικοί παράγοντες καταπόνησης αλλά η αυξημένη έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία η οποία μπορεί να προκαλέσει σημαντική βλάβη όπως επίσης και η έλλειψη κάποιων θρεπτικών συστατικών. Με βάση την άποψη αυτή ο ρόλος των φαινολικών συστατικών έγκειται κυρίως στην αντιοξειδωτική τους δράση με σκοπό την προστασία του φυτικού οργανισμού. Τα φυτοφάγα ενδέχεται να μην αποτελούν τόσο ισχυρό παράγοντα επιλογής για την παραγωγή φαινολικών, όπως μέχρι τώρα ήταν αποδεκτό. Έτσι αναμένεται να μην είναι όλα τα φαινολικά συστατικά αποτελεσματικά εναντίον τους καθώς και η κατανομή και η αφθονία τους να είναι άσχετη με την παρουσία των φυτοφάγων.

2. Το Βόριο

2.1. Χημεία του Βορίου

Με πιθανή εξαίρεση τον άνθρακα, το βόριο (B) παρουσιάζει την πιο ενδιαφέρουσα και ποικίλη χημεία από οποιοδήποτε άλλο στοιχείο (Greenwood και Earnshaw, 1984). Ο πιο σημαντικός αριθμός οξειδωσης του B είναι το +3 ενώ οι χαμηλότεροι αριθμοί οξειδωσης +1, 0 και -1 δεν απαντώνται συνήθως στις φυσικές ενώσεις του B (Power και Woods, 1997). Το μεγάλο ενδιαφέρον πάνω στη χημεία του B έγκειται στο γεγονός ότι φέρει μόνο τρία ηλεκτρόνια σθένους τα οποία όταν συμμετέχουν σε ισάριθμους δεσμούς αφήνουν ένα ελεύθερο p τροχιακό στη στιβάδα σθένους. Αυτό έχει συχνά σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό τριών ομοιοπολικών δεσμών. Αυτού του τύπου οι δεσμοί εντοπίζονται στα βοράνια (Power και Woods, 1997).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες και απουσία αλληλεπιδράσεων με άλλα βιομόρια, το B εντοπίζεται ως βορικό οξύ ($B(OH)_3$) ή ως βορικό ανιόν $B(OH)_4^-$ (Woods, 1996). Σε υδατικό διάλυμα συμπεριφέρεται σύμφωνα με την εξίσωση:



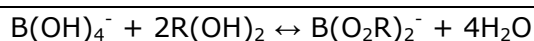
Το βορικό οξύ είναι ένα ασθενές οξύ με $pK_a = 9,24$ και στις συνθήκες pH του κυτταροπλάσματος (περίπου 7,4) ποσοστό μεγαλύτερο του 98% βρίσκεται στη μορφή αδιάστατου $B(OH)_3$ και λιγότερο από το 2% βρίσκεται στην ανιονική μορφή $B(OH)_4^-$ (Woods, 1996). Στις συνθήκες pH του αποπλάστη (pH 5,5) ποσοστό

Εισαγωγή

μεγαλύτερο του 99,95% βρίσκεται στη μορφή $B(OH)_3$ και λιγότερο από το 0,05% στη μορφή $B(OH)_4^-$ (Brown et al., 2002).

Το βορικό οξύ και το βορικό ανιόν εύκολα αντιδρά με διάφορα βιομόρια σχηματίζοντας σύμπλοκα και υπό φυσιολογικές συνθήκες οι σύμπλοκες μορφές του B υπερτερούν σε συγκεντρώσεις συγκριτικά με το ελεύθερο βορικό οξύ (Brown et al., 2002). Συγκεκριμένα, το βορικό οξύ σχηματίζει μόνο- και δι-εστέρες αντιδρώντας με μεγάλη ποικιλία δι- και πολυ-υδροξυ- ενώσεων (Woods, 1996). Οι προκύπτοντες βορικοί εστέρες βρίσκονται σε διαρκή δυναμική ισορροπία διάσπασης και σχηματισμού η οποία είναι pH-εξαρτώμενη (Friedman et al., 1974). Μια ποικιλία παραγόντων επηρεάζει την σταθερότητα αυτών των ενώσεων. Για παράδειγμα το αυξημένο pH σταθεροποιεί τις ενώσεις του B και τα σύμπλοκα με cis-διόλες ευνοούνται σε σχέση τις trans μορφές (Loomis και Durst, 1992, Goldbach, 1997). Παραδείγματα ενώσεων που σχηματίζουν ισχυρά σύμπλοκα με το βορικό οξύ είναι η ριβόζη, η απιόζη, η σορβιτόλη και άλλες πολυόλες (Loomis και Durst, 1992), όπως επίσης και φαινολικά συστατικά και αμινοξέα όπως η σερίνη (Tate και Meister, 1978).

Τα βορικό οξύ αντιδρά με δι-υδροξυ-παράγωγα σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:



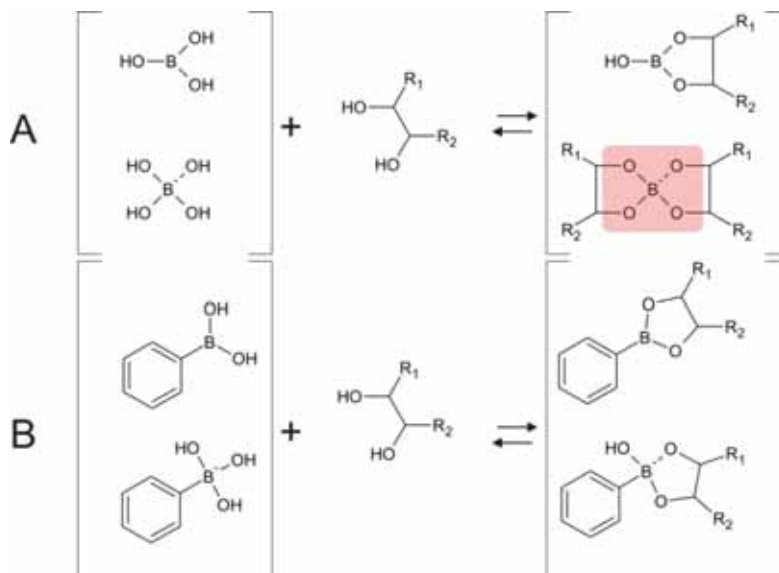
Είναι γνωστό ότι η προσθήκη κάποιας πολυόλης όπως της γλυκερόλης ή της μανιτόλης αυξάνει την οξύτητα του βορικού οξέος μειώνοντας το pH των διαλυμάτων του λόγω σχηματισμού των παραπάνω συμπλόκων (Power και Woods, 1997).

2.2. Βορονικά οξέα

Τα βορονικά οξέα είναι μία ομάδα με δομικά παρόμοια μόρια που έχουν τη δυνατότητα να σχηματίζουν αντιστρεπτούς εστερικούς δεσμούς με cis-διόλες με τρόπο παρόμοιο με αυτό του βορικού οξέος (Bergold και Scouten, 1983, Springsteen και Wang, 2002). Η σταθερότητα του συμπλόκου βορονικού οξέος-διόλης εξαρτάται από τις σταθερές ιονισμού, το είδος της διόλης και τις συγκεντρώσεις των δύο ενώσεων (Bergold και Scouten, 1983, Springsteen και Wang, 2002). Πιο συγκεκριμένα, σε καθορισμένη τιμή pH, χαμηλή τιμή pK_a (μεγαλύτερη οξύτητα) ευνοεί τον ιονισμό και δίνει πιο ισχυρά σύμπλοκα. Κατά κανόνα, υψηλότερες τιμές pH ευνοούν το σχηματισμό συμπλόκων μεταξύ βορονικών οξέων και διολών. Πιο συγκεκριμένα, όσο υψηλότερη, πάνω από την pK_a του βορονικού οξέος, είναι η τιμή του pH του διαλύματος, τόσο περισσότερο σταθερά είναι τα σύμπλοκα που προκύπτουν (Van Duin et al., 1984). Παρόλα αυτά, οι Yan et al. (2004) σε πειράματα που έκαναν πάνω στο σχεδιασμό

αισθητήρων βορονικών οξέων έδειξαν ότι ο κανόνας, σύμφωνα με τον οποίο, βορονικά οξέα με χαμηλές τιμές pK_a σε συνδυασμό με τιμές pH υψηλότερες της pK_a παρουσιάζουν μεγαλύτερη ικανότητα πρόσδεσης δεν ισχύει πάντα καθώς και άλλοι παράγοντες επηρεάζουν τη σταθερά σχηματισμού. Ωστόσο, στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, βορονικά οξέα με pK_a μικρότερη του βορικού προσδέουν ισχυρότερα τις cis-διόλες (Springsteen και Wang, 2002). Έτσι, όταν είναι και τα δύο παρόντα σε ίσες συγκεντρώσεις, τα παραπάνω βορονικά οξέα συναγωνίζονται το βορικό οξύ στο σχηματισμό δεσμών στις διαθέσιμες θέσεις των cis-διολών. Το γεγονός αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία στην χρήση των βορονικών οξέων στην μελέτη της χημείας και της φυσιολογίας του B στα βιολογικά συστήματα.

Ένα άλλο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των βορονικών οξέων, επίσης σημαντικό στον πειραματισμό, είναι ότι διαθέτουν ένα ζεύγος ομάδων υδροξυλίου και αντίθετα με το βορικό ανιόν (το οποίο διαθέτει δύο ζεύγη) δεν μπορούν να σχηματίσουν σύμπλοκα με δύο μόρια. Έτσι, ενώ το βορικό οξύ δρα στα (δισ)διεστερικά σύμπλοκα ως διασυνδετικό μόριο (cross-linker), τα βορονικά οξέα δεν σχηματίζουν διαδεσμούς (Liu και Scouten, 2000, βλ. επίσης εικόνα 1). Με τον τρόπο αυτό, η χρήση βορονικών οξέων δεν μπορεί να υποκαταστήσει την φυσιολογική δράση του βορικού οξέος ως διασυνδετικού μορίου και συνεπώς μπορεί να αποκαλύψει της επιπτώσεις της έλλειψης βορικού οξέος στα κύτταρα ή της αδυναμίας σχηματισμού των διαδεσμών με κυτταρικά συστατικά όπως τα πηκτινικά πολυμερή και τα συστατικά του κυτταροσκελετού (Bassil et al., 2004).



Εικόνα 1. Σχηματισμός διεστερικών συμπλόκων μεταξύ μιας διόλης και του βορικού οξέος (A) ή ενός βορονικού οξέος (B). Στην δεύτερη περίπτωση δεν σχηματίζεται δομή αντίστοιχη του βορικού διαδεσμού (βλ. A, κόκκινο πλαίσιο).

Εισαγωγή

Στα πειράματά τους οι Bassil et al. (2004) θέλοντας να ερευνήσουν το ρόλο του Β στα φυτά, χρησιμοποίησαν βορονικά οξέα με διαφορετικές pK_a και επέδειξαν τον ρόλο του Β στην οργάνωση της συνέχειας του κυτταροσκελετού με την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Συγκεκριμένα, σε καλλιέργειες BY-2 κυττάρων καπνού (*Nicotiana tabacum*), η προσθήκη 3-NBA (3-νιτροφαινόβορονικό οξύ, $pK_a = 7,2$) προκαλούσε αποδιοργάνωση στην ενδοκυτταρική δομή ενώ η προσθήκη MBA (μεθυλοβορονικό οξύ, $pK_a = 10,7$) δεν είχε ανάλογες επιπτώσεις. Αξίζει να σημειωθεί ότι το MBA έχει pK_a υψηλότερη αυτής του βορικού οξέος ($pK_a = 9,2$).

2.3. Το Βόριο στα φυτά

2.3.1. Διαθεσιμότητα και Πρόσληψη

Το Β αν και παρουσιάζει μειωμένη αφθονία στη φύση, είναι ένα ευρέως διαδεδομένο στοιχείο (Morgan, 1980) τόσο στη λιθόσφαιρα όσο και στην υδρόσφαιρα. Στο έδαφος οι συγκεντρώσεις ποικίλουν από 10-20 mg B kg⁻¹. Στο νερό της θάλασσας ποικίλουν από 1-10 mg B kg⁻¹ ενώ η συγκέντρωση στα νερά των ποταμών είναι περίπου 0,3% αυτής του θαλασσινού νερού. Τα εδάφη μπορούν να διαχωριστούν σε αυτά με υψηλή συγκέντρωση Β (10-100 mg B kg⁻¹) και σε αυτά με χαμηλή συγκέντρωση Β (<10 mg B kg⁻¹). Πάντως, τα περισσότερα εδάφη χαρακτηρίζονται από χαμηλή συγκέντρωση Β. Συνήθως μόνο το διαλυτό Β είναι διαθέσιμο στα φυτά το οποίο αντιστοιχεί στο 10% περίπου του συνολικού Β του εδάφους.

Το θέμα της πρόσληψης του Β από τα φυτά είναι αρκετά αντιφατικό και σημαντικά δεδομένα υποστηρίζουν τόσο την ενεργό όσο και την παθητική μεταφορά (Brown and Shelp, 1997, Hu and Brown, 1997). Η πρόσληψη του Β, υπό συνθήκες επάρκειας του στο έδαφος, είναι αποτέλεσμα παθητικής μεταφοράς ελεύθερου βορικού οξέος (Hu and Brown, 1997). Στην περίπτωση αυτή, ο ρυθμός πρόσληψης καθορίζεται από τη συγκέντρωση του Β στην περιοχή της ριζόσφαιρας, τις ενώσεις του Β στο εσωτερικό της ρίζας, τη διαπερατότητα των μεμβρανών, την εδαφική υγρασία και την ταχύτητα διαπνοής. Οι Brown και Shelp (1997) συμπέραναν ότι δεν υπάρχουν σημαντικά στοιχεία που να συνηγορούν υπέρ της πρόσληψης του Β μέσω μηχανισμού ενεργού μεταφοράς. Όσον αφορά στη διαπερατότητα των μεμβρανών, ο Raven (1980) υπολογίζοντας θεωρητικά τη διαπερατότητα του Β συμπέρανε ότι ήταν ικανή ώστε η μεταφορά του στο φυτό να γίνεται αποκλειστικά μέσω παθητικής διάχυσης. Νεώτερες έρευνες επιβεβαίωσαν την δυνατότητα μεταφοράς του Β διαμέσου τεχνητών λιπιδιακών μεμβρανών προερχόμενων τόσο από φυτικά όσο και από ζωικά κύτταρα (Dordas et al., 2000). Ακόμη, πειράματα που έγιναν σε μεταλλαγμένες σειρές του *Arabidopsis thaliana*

που διέφεραν στη λιπιδική σύσταση των μεμβρανών έδειξαν ότι η σύσταση της μεμβράνης επηρεάζει την διαπερατότητα του B και συνεπώς την πρόσληψη του από τα φυτά (Dordas και Brown, 2000).

Ωστόσο, αρκετές πειραματικές ενδείξεις συνηγορούν στην ύπαρξη τόσο μηχανισμών ενεργού μεταφοράς βορικού οξέος, οι οποίοι ενεργοποιούνται υπό συνθήκες ανεπαρκούς τροφοδοσίας των φυτών με B, όσο και καναλιών διευκολυνόμενης διέλευσης του βορικού οξέος. Νεώτερες έρευνες συμφωνούν με την δράση μεμβρανικών πρωτεϊνών ανάλογων των ακουαπορίνων στην πρόσληψη του βορικού οξέος καθώς η εφαρμογή αναστολέων των διαύλων των μεμβρανικών πρωτεϊνών (MIPs) στο *Arabidopsis* (όπως ο HgCl₂) προκάλεσε μείωση της πρόσληψης B κατά 35% (Dordas και Brown, 2000). Οι Dannel et al. (1997) παρατήρησαν πως η συγκέντρωση του B τόσο στον κυτταρικό χυμό της ρίζας όσο και στον ανιόντα χυμό ήταν περίπου 22 φορές μεγαλύτερη από αυτή του εξωτερικού διαλύματος όταν η συγκέντρωση B σε αυτό ήταν ανεπαρκής. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει την ύπαρξη ενός ενεργειακά εξαρτώμενου μεταφορέα για την πρόσληψη B ο οποίος λειτουργεί αντίθετα με την διαβάθμιση συγκέντρωσης B. Περαιτέρω, οι Pfeffer et al. (1999) έδειξαν ότι η πρόσληψη του B υπό συνθήκες ανεπαρκούς συγκέντρωσής του στο υπόστρωμα καλλιέργειας ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten. Στην ελιά, ο εγκλιματισμός φυτών σε ελλειμματικό μέσο προκαλεί την εμφάνιση μηχανισμού συσσώρευσης B (έως και δύο φορές συγκριτικά με το εξωτερικό μέσο) στον κυτταρικό χυμό της ρίζας ενώ η μεταφορά του στα αγγεία του ξύλου γίνεται μέσω διάχυσης (Stavrianakou et al., 2006). Πλέον, έχουν αναγνωριστεί μεταφορείς βορικού οξέος οι οποίοι εδράζουν στα κύτταρα του περικυκλίου της ρίζας του φυτού *Arabidopsis* (Takano et al., 2002).

2.3.2. Διακίνηση του Βορίου μέσα στους φυτικούς ιστούς

Είναι γεγονός ότι οι φυτικοί οργανισμοί διαφέρουν σημαντικά όσον αφορά στην ευκολία διακίνησης του Βορίου. Έτσι τα διάφορα είδη μπορούν να διακριθούν σε αυτά που παρουσιάζουν περιορισμένη κινητικότητα B και σε αυτά που το B εμφανίζει αυξημένη κινητικότητα (Brown και Shelp, 1997).

Ενδείξεις που σχετίζονται με την αδυναμία μετακίνησης του B εντός του φυτικού σώματος έχουμε σε φυτικά είδη στα οποία παρουσιάζεται μια μειούμενη κλίση συγκέντρωσης από τα γηραιότερα προς τα νεαρά ή αναπτυσσόμενα όργανα όταν η παροχή B είναι επαρκής. Ανάλογη εικόνα έχουμε και σε φυτικά είδη όπου το B κινείται εύκολα εντός του συστήματος μεταφοράς του ηθμού. Ωστόσο, στα είδη αυτά, και υπό συνθήκες ανεπαρκούς τροφοδοσίας με B, αυτή η κλίση συγκέντρωσης αναστρέφεται ή εξαφανίζεται, γεγονός που υποδηλώνει πως τα

Εισαγωγή

αποθέματα του στοιχείου αναδιανέμονται (Shelp et al., 1992). Την ικανότητα επανεκκίνησης του Β από τα ώριμα στα εκπτυσσόμενα φύλλα διαθέτει και η ελιά (Liakopoulos et al., 2005; Liakopoulos et al. 2009).

Ο μηχανισμός επαναδιανομής του Β συσχετίζεται με την ύπαρξη πολυολών μεταξύ των διακινούμενων φωτοσυνθετικών προϊόντων μέσω του ηθμού. Οι Brown and Hu (1996), πρότειναν ότι το Β είναι ευκίνητο στον ηθμό σε φυτικά είδη όπου μία, συνήθως, από τις πολυόλες σορβιτόλη, μαννιτόλη ή δουλσιτόλη συμπεριλαμβάνεται στα κύρια διακινούμενα φωτοσυνθετικά προϊόντα. Η αυξημένη κινητικότητα του Β στα είδη αυτά οφείλεται στον σχηματισμό συμπλόκων του Β με πολυόλες και την συνακόλουθη αποτροπή διαρροής του βορικού οξέος διαμέσου των μεμβρανών των ηθμοσωλήνων η οποία λαμβάνει χώρα στα φυτικά είδη όπου το βορικό οξύ βρίσκεται στον ηθμό ως ελεύθερο μόριο. Σύμφωνα με τους Liakopoulos et al. (2009), σε φυτά ελιάς, όχι μόνο λαμβάνει χώρα επαναδιανομή του στοιχείου μέσω του ηθμού αλλά αυξάνεται επιπλέον η συγκέντρωση της μαννιτόλης στον χυμό του ηθμού φύλλων στα οποία έχει επιβληθεί τροφοπενία Β σε σχέση με αυτά που αναπτύσσονταν σε επαρκή συγκέντρωση Β. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις μαννιτόλης ενδεχομένως κινητοποιούν στον ηθμό κατά αναλογία υψηλότερα ποσοστά βορικού οξέος βάσει των διαθέσιμων ποσοτήτων στα αντίστοιχα φύλλα προς τα εκπτυσσόμενα φύλλα. Με αυτόν τον τρόπο φαίνεται πως το φυτό μπορεί να υποστηρίξει την ανάπτυξη νέων οργάνων παρέχοντας υψηλά ποσοστά επανεκκινούμενου Β αναφορικά με την διαθέσιμη ποσότητα επειδή η εξωτερική τροφοδοσία είναι ελλειμματική.

2.3.3. Δομικός ρόλος Βορίου

2.3.3.1 Κυτταρικό τοίχωμα

Οι φυτικοί οργανισμοί έχοντας περιορισμένη δυνατότητα κίνησης ήταν απαραίτητο να εξελίξουν δομές και μηχανισμούς οι οποίοι θα τους επιτρέπουν να αντιμετωπίζουν τις δύσκολες περιβαλλοντικές συνθήκες και τις επιθέσεις παθογόνων μικροοργανισμών και φυτοφάγων ζώων. Το κυτταρικό τοίχωμα είναι μία πολύπλοκη δομή που μεταξύ άλλων εξυπηρετεί και αυτό το σκοπό καθώς περιβάλλει και προστατεύει τα φυτικά κύτταρα. Η βασική του δομή συνίσταται από μίγματα πολυσακχαριτών ενώ εναποτίθενται επίσης δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες καθώς και δομικές πολυμερισμένες αρωματικές και αλειφατικές ενώσεις αλλά και μεμονωμένοι μεταβολίτες όπως φαινολικά συστατικά ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο.

Στο κυτταρικό τοίχωμα λαμβάνουν χώρα πολύπλοκες φυσικοχημικές και ενζυμικές διεργασίες. Κατά τη διαδικασία της κυτταρικής αύξησης οι διαστάσεις και τα μηχανικά χαρακτηριστικά του κυτταρικού τοιχώματος αλλάζουν ανάλογα με

τους τύπους μακρομορίων που εναποτίθενται. Η στοιβάδα που εναποτίθεται πρώτη μετά την κυτταρική διαίρεση ονομάζεται μέση πλάκα και αποτελείται κυρίως από πηκτινικά συστατικά. Στη συνέχεια εναποτίθεται το πρωτογενές κυτταρικό τοίχωμα το οποίο αποτελείται από πηκτίνη, κυτταρίνη ημικυτταρίνη και πρωτεΐνες. Το κυτταρικό τοίχωμα πρέπει να ακολουθεί τη ανάπτυξη των κυττάρων και συγχρόνως να διατηρεί την ακεραιότητά του. Σε αυτό το σκοπό συμβάλει το μίγμα από πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τη συνεχή πρόσφηση και επέκταση της δομής. Σε πολλούς κυτταρικούς τύπους το τοίχωμα ενισχύεται με την εναπόθεση του δευτερογενούς τοιχώματος. Το δευτερογενές τοίχωμα είναι συνήθως πιο παχύ και χαρακτηρίζεται από σημαντικά λιγότερη πηκτίνη σε σχέση με το πρωτογενές τοίχωμα (Perez et al., 2003). Συχνά το δευτερογενές τοίχωμα ενισχύεται περαιτέρω με την εναπόθεση λιγνίνης, ενός πολυμερούς αρωματικών αλκοολών. Πιστεύεται ότι το πρωτογενές τοίχωμα συνεισφέρει στη δομική σταθερότητα αλλά και στη μεταγωγή σημάτων ενώ το δευτερογενές τοίχωμα είναι υπεύθυνο για την μηχανική ενδυνάμωση του κυττάρου.

Η αρχική αντίληψη ότι το κυτταρικό τοίχωμα είναι ένα νεκρό χωρίς δομή περίβλημα έχει πλέον αλλάξει. Θεωρείται μία δυναμική κατασκευή όπου πολύπλοκες δομές επιτελούν μια ποικιλία διεργασιών απαραίτητων για τη ζωή των φυτών. Στα πολυσακχαρικά συστατικά του τοιχώματος μπορούν να αποδοθούν πέντε κύριοι φυσιολογικοί ρόλοι.

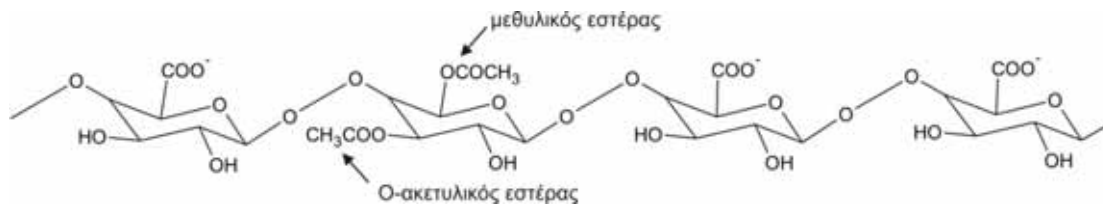
-
1. παροχή εναλλακτικού εκτατού δικτύου
 2. συνενώση των κύτταρων κοντά στη μέση πλάκα
 3. ρύθμιση της περατότητας του κυτταρικού τοιχώματος
 4. διαμόρφωση ενός ιοντικά ενεργού εξωσυμπλαστικού περιβάλλοντος
 5. μετάδοση σημάτων στο κύτταρο μέσω βιοενεργών μορίων
-

2.3.3.2. Τα πηκτινικά πολυμερή του κυτταρικού τοιχώματος

Η πηκτίνη συνίσταται από μία ομάδα πολυσακχαριτών, πολυμερών (γαλακτο)ουρονικών οξέων. Διακρίνονται τρεις κύριοι τύποι πηκτινικών πολυμερών: η ομογαλακτουρονάνη (HG), η ραμνογαλακτουρονάνη I (RG-I) και η ραμνογαλακτουρονάνη II (RG-II) ενώ απαντώνται επίσης η απιογαλακτορουανάνη (API) και η ξυλογαλακτουρονάνη (XGA) (O'Neill et al., 1990, Ridley et al., 2001). Οι πολυσακχαρίτες αυτοί φαίνεται να συνδέονται ομοιοπολικά μεταξύ τους γιατί διαχωρίζονται μόνο μετά από κατεργασία πρωτογενών κυτταρικών τοιχωμάτων με EPG (ενδοπολυγαλακτοτουνάση).

Η ομογαλακτουρονάνη (HG) είναι πολυμερές D-γαλακτουρονικών οξέων (GalpA) συνδεδεμένων με α-1,4 γλυκοζιδικούς δεσμούς. Τα κατάλοιπα GalpA

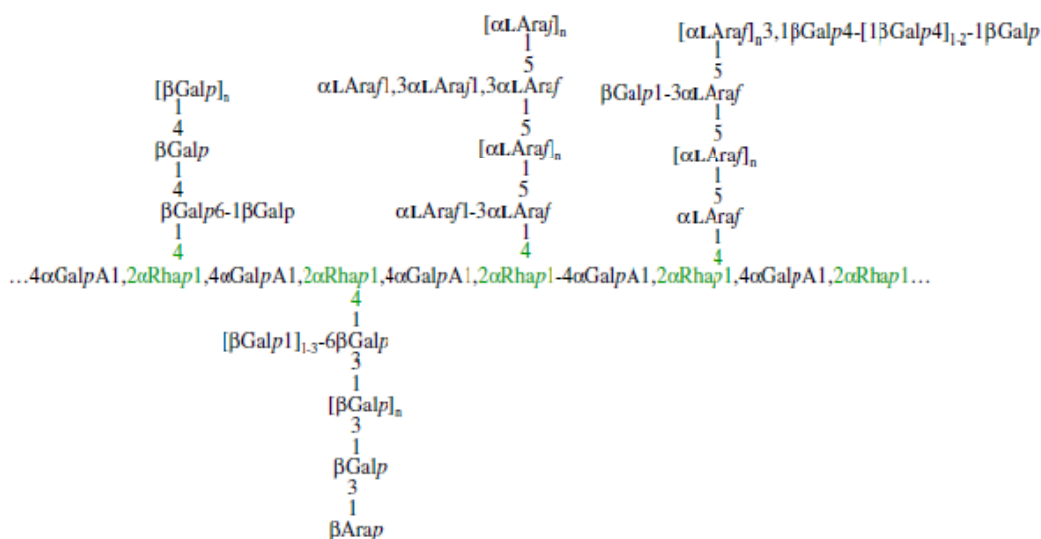
Εισαγωγή



Εικόνα 2. Μερική δομή της HG

μπορεί να είναι μεθυλο-εστεροποιημένα στον C-6 της καρβοξυλικής ομάδας ή ακετυλιωμένα στο O-2 ή στο O-3 όπως φαίνεται στην εικόνα 2. Το πρότυπο και το εύρος της εστεροποίησης είναι διαφορετικό σε κάθε περίπτωση και φαίνεται να ρυθμίζεται από το στάδιο ανάπτυξης και από το είδος του ιστού καθορίζοντας με τη σειρά του την ικανότητα έκτασης του τοιχώματος (Willats et al., 2001). Οι καρβοξυλικές ομάδες οι οποίες δεν είναι εστεροποιημένες φέρουν αρνητικά φορτία και αλληλεπιδρούν με ιόντα Ca^{2+} σχηματίζοντας ένα σταθερό πήγμα (Liners et al., 1989).

Ο σκελετός της RG-I αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες $[\rightarrow\alpha\text{-D-GalpA-1,2-}\alpha\text{-L-Rhap-1,4}\rightarrow]_n$ όπως προέκυψε από την ανάλυση πολυσακχαριτών

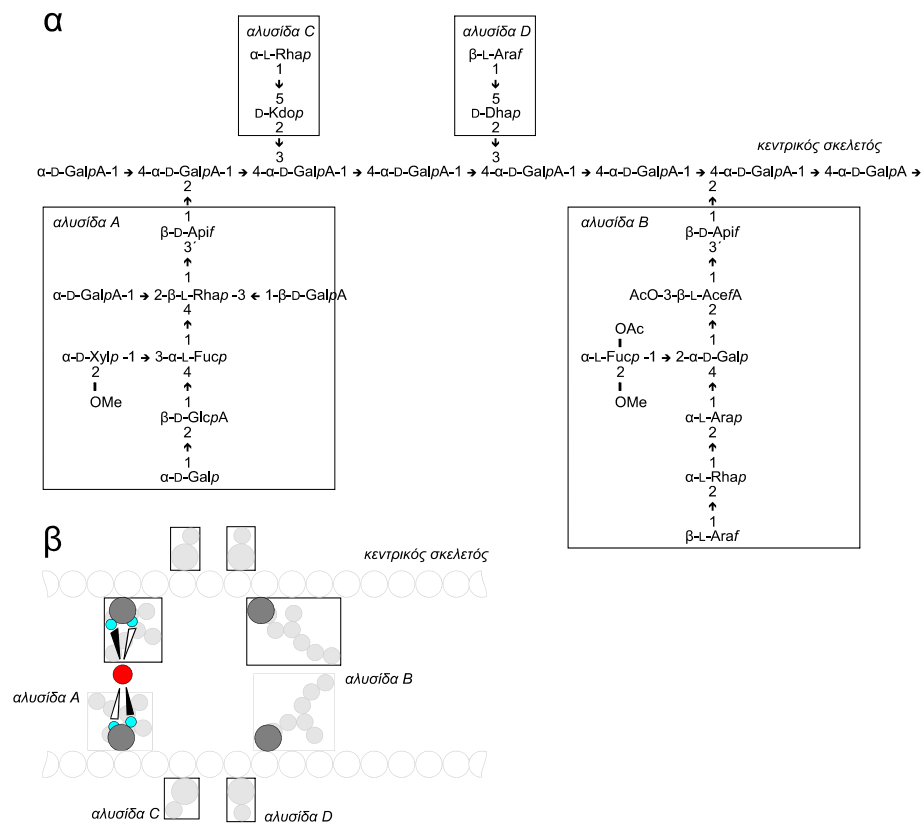


Εικόνα 3. Η δομή του βασικού σκελετού της RG-I και αντιπροσωπευτικών πλάγιων αλυσίδων (προσαρμοσμένο από Caffall and Mohnen, 2009).

της σόγιας (Nakamura et al., 2002). Σχηματικά η δομή της RG-I φαίνεται στην εικόνα 3.

Η ραμνογαλακτορουνάνη II (RG-II) είναι ένας πολυσακχαρίτης της ηηκτίνης με μοριακό βάρος περίπου 5 kDa που εντοπίζεται στα πρωτογενή κυτταρικά τοιχώματα των τραχεοφύτων (Matsunaga et al., 2004). Η RG-II είναι από τους πιο πολύπλοκους πολυσακχαρίτες που έχουν αναγνωρισθεί έως σήμερα, και επιδεικνύει αξιοσημείωτα συντηρημένη δομή εντός του φυτικού βασιλείου (Perez

et al., 2003). Αποτελείται από 12 διαφορετικά μονομερή στα οποία περιλαμβάνονται και σπάνια γλυκοσυλικά κατάλοιπα όπως D-απιόζη (Ari), L-ακερικό οξύ (AceA), 2-κέτο-3-δεοξυ-D-λυχο-επτουροσαρικό οξύ (Dha), 2-κετο-3-δεοξυ-D-μαννο-οκτουλοσονικό οξύ (Kdo), 2-O-μέθυλο-L-φουκόζη (2-OMeFuc) και 2-O-μέθυλο-D-ξυλόζη (2-OMeXyl), τα οποία είναι διασυνδεδεμένα με περίπου 20



Εικόνα 4. Μερική δομή της ραμνογαλακτουρονάνης-II. (α) Ο κεντρικός σκελετός της RG-II αποτελείται από μονάδες α-D-γαλακτοσυλο-πυρανοσυλ-ουρονικού οξέος (GalpA) στο οποίο ενώνονται τέσσερις πλάγιες αλυσίδες ολιγοσακχαριτών (A-D). Η A-αλυσίδα ενώνεται στον κεντρικό σκελετό με μια μονάδα β-D-απισουλ-φουρανοζίτη (Arif). Οι ομάδες Arif της A-αλυσίδας συμμετέχουν ανά δύο στο σχηματισμό του συμπλόκου RG-II-B-RG-II (β) λαμβάνοντας υπ' όψη ότι οι γλυκοφουρανόζες δημιουργούν τα σταθερότερα διεστερικά σύμπλοκα με το βορικό οξύ στη συγκεκριμένη δομή, η απιόζη αποτελεί το μόνο γλυκοφουρανοζίτη με ελεύθερες γειτονικές υδρόξυλομάδες με cis-διαμόρφωση. Άλλες συντημήσεις: AcefA, 3-C-καβροξυ-5-δεοξυ-L-ξυλοφουρανοζίτης; Araf, αραβινοφουρανοζίτης; Arap, αραβινο-πυρανοζίτης; Dhap, 3-δεοξυ-D-λυχο-επτουλο-πυρανοσυλ-αρικό οξύ; Fucp, φουκο-πυρανοζίτης; Galp, γαλακτο-πυρανοζίτης; GlcpA, γλυκο-πυρανοσυλ-ουρονικό οξύ; Kdo, 3-δεοξυ-D-μαννο-οκτουλο-πυρανοσυλονικό οξύ; 2-OMeFucp, 2-O-μεθυλο-φουκο-πυρανοζίτης; 2-OMeXylp, 2-O-μεθυλο-ξυλο-πυρανοζίτης; Rhap, ραμνο-πυρανοζίτης; OAc, O-ακετύλιο.

Εισαγωγή

διακριτούς δεσμούς (Ridley et al., 2001). Τέσσερις αλυσίδες ενώνονται στον ολιγογαλακτουρονικό σκελετό ο οποίος αποτελείται από τουλάχιστον έξι κατάλοιπα α-(1,4)-D-GalpA. Η μερική δομή της RG-II και ο τρόπος διμερισμού με το βορικό οξύ φαίνεται στην εικόνα 4.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 4, οι πλευρικές αλυσίδες a και b είναι δύο πολύπλοκοι ολιγοσακχαρίτες οι οποίοι συνδέονται με τον σκελετό του μορίου μέσω ενός καταλοίπου απιόζης (Ari). Οι ολιγοσακχαρίτες c και d περιέχουν αντίστοιχα τα κατάλοιπα Kdo και Dha και η αλυσίδα e αποτελείται από ένα κατάλοιπο Ara.

Οι πολυσακχαρίτες RG-I, RG-II και HG οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι ομοιοπολικά μεταξύ τους απελευθερώνονται από το κυτταρικό τοίχωμα με επίδραση EPG (O'Neill et al., 1996). Η σύνδεση των RG-I, RG-II και HG μέσω γλυκοσιδικών δεσμών είναι ένας από τους πιθανούς τρόπους σύνδεσης μέσα στο πηκτινικό κλάσμα. Επιπλέον, στο πηκτινικό δίκτυο ενυπάρχουν πολλαπλά είδη διαδεσμών στα οποία περιλαμβάνονται διαδεσμοί με ιόντα Ca^{2+} , εστερικοί διαδεσμοί μέσω βορικού οξέος και ομοιοπολικοί δεσμοί με φαινολικά και άλλα συστατικά (Caffall et al., 2009). Οι δεσμοί που αναπτύσσονται μεταξύ Ca^{2+} και των αλυσίδων HG ενισχύουν την συνεκτικότητα του δικτύου αυξάνοντας την ακαμψία του τοιχώματος ανάλογα με το βαθμό μεθυλοεστεροποίησης των αλυσίδων. Η παραπάνω διαδικασία εξαρτάται από τρεις παράγοντες: την ενδομοριακή διαμόρφωση της HG, την ενέργεια διαχωρισμού φορτίου μεταξύ δύο μορίων GalA στην αλυσίδα της HG και την ευκολία συναρμογής γειτονικών αλυσίδων της HG. Η μείωση στην ικανότητα έκτασης και η αύξηση της δυσκαμψίας του τοιχώματος έχει επίσης συσχετιστεί με τη μείωση των πλευρικών αλυσίδων αραβινάνης και γαλακτάνης της RG-I με παράλληλη αύξηση των συμπλόκων Ca^{2+} -HG. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του κυττάρου οι πλευρικές αλυσίδες αραβινάνης και γαλακτάνης αποδομούνται ενώ η HG συνεχίζει να εναποτίθεται σχηματίζοντας τα συμπλοκα που προαναφέρθηκαν.

2.3.3.3. Βόριο και κυτταρικό τοίχωμα

Είναι γεγονός ότι το B παίζει βασικό ρόλο στην ανάπτυξη, στην επιμήκυνση των κυττάρων και στη δομική σταθερότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων στα δικότυλα φυτικά είδη (Power και Woods, 1997). Ο Warrington (1923) υποστηρίζει ότι το B έχει σταθερό ρόλο στα φυτά και δεν βρίσκεται σε δυναμική κατάσταση καθώς η σωστή λειτουργία των φυτικών κυττάρων απαιτεί την συνεχή παρουσία B. Οι Skok και McIlrath (1958) υποστήριζαν πως υπάρχει μικρής έκτασης έως μηδενική μετακίνηση του B στα δικότυλα φυτικά είδη και η εξωτερική τροφοδοσία είναι απαραίτητη κατά τη διάρκεια της αυξητικής περιόδου.

Οι επιπτώσεις της τροφοπενίας B σε διάφορα είδη παρουσιάζουν υψηλού βαθμού ομοιογένεια και συνίστανται κυρίως στην αναστολή της δραστηριότητας

του κορυφαίου μεριστώματος του βλαστού και του ακραίου μεριστώματος της ρίζας αλλά και των αναπτυσσόμενων ιστών (Hu και Brown, 1995). Παράλληλα με αυτές τις μεταβολές σημειώνεται διαταραχή στην οργάνωση του πηκτικνού κλάσματος. Πιο συγκεκριμένα, υπό συνθήκες τροφοπενίας Β αλλάζει η δομή και η πυκνότητα του συστήματος Golgi το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην ενσωμάτωση των πηκτικών πολυμερών στο κυτταρικό τοίχωμα (Northcote, 1986). Συνεπώς φαίνεται πως η λειτουργία του Β στο κυτταρικό τοίχωμα σχετίζεται με την αλληλεπίδραση που αναπτύσσεται ανάμεσα στο Β και τα πηκτικνά πολυμερή του τελευταίου (Hu και Brown, 1994). Περαιτέρω ενδείξεις για τον εντοπισμό του Β στο κλάσμα της πηκτίνης δόθηκαν από τα πειράματα των Hu και Brown (1994) όπου αναλύθηκε το περιεχόμενο Β στα διάφορα κλάσματα του τοιχώματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μεγαλύτερη ποσότητα Β απελευθερώθηκε όταν επέδρασαν με το ένζυμο πεκτολυάση, το οποίο αποδιοργανώνει την πηκτίνη, ενώ αντίθετα κατά την ενζυμική υδρόλυση της κυτταρίνης δεν απελευθερώθηκε σημαντική ποσότητα Β. Είναι πλέον γνωστό ότι μεταβολές στη συγκέντρωση του Β επηρεάζουν τη λεπτή δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες του πρωτογενούς κυτταρικού τοιχώματος (Hu και Brown, 1994).

Με πειράματα στις ετεροκύστες αζωτοδεσμευτικών κυανοβακτηρίων οι Mateo et al. (1986) εντόπισαν πως κάτω από συνθήκες ανεπάρκειας Β το φράγμα διάχυσης του O_2 δεν ήταν λειτουργικό γεγονός που τους οδήγησε στο συμπέρασμα πως το Β σχηματίζει διαδεσμούς με τους πολυσακχαρίτες του τοιχώματος και εμποδίζει τη διάχυση του O_2 . Βρέθηκε ότι τα γλυκολιπίδια των ετεροκύστεων ήταν εξόζες με ομάδες υδροξυλίου σε *cis* διαμόρφωση η οποία ευνοεί το σχηματισμό διαδεσμών με το Β.

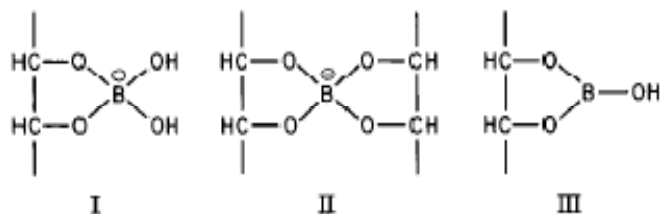
2.3.3.4. Βόριο και RG-II

Νεώτερες έρευνες διευκρίνησαν την φύση της αλληλεπίδρασης μεταξύ Β και πηκτίνης. Στο κυτταρικό τοίχωμα γειτονικές αλυσίδες της RG-II σχηματίζουν διμερή τα οποία σταθεροποιούνται μέσω βορικών διεστέρων ανάμεσα στα δύο κατάλοιπα απιόζης των α αλυσίδων (Kobayashi et al., 1996, Ishii και Matsunaga 1996, O'Neill et al., 1996, βλ. εικόνα 4). Οι Loomis και Durst (1991) υπέθεσαν ότι η σταθερότητα που παρουσιάζουν τα κυτταρικά τοιχώματα σχετίζεται με τους εστερικούς δεσμούς που σχηματίζει το Β με τα πηκτικνά πολυμερή. Οι *in muro* διαδεσμοί της RG-II ρυθμίζουν το πορώδες και τις μηχανικές ιδιότητες των πρωτογενών κυτταρικών τοιχωμάτων (Ishii et al., 2001) ενώ παρεμπόδιση του σχηματισμού τους έχει άμεση επίδραση στην ανάπτυξη των κυττάρων (O'Neill et al., 2001).

Η απόλυτη διευκρίνηση της δομής του διμερούς d-RG-II-B προέρχεται από τους O'Neill et al. (1996) οι οποίοι απομόνωσαν μονομερή (m-RG-II) και διμερή

Εισαγωγή

της RG-II που περιείχαν Β (d-RG-II-B). Χρησιμοποιώντας την τεχνική MALDI-TOF-MS, έδειξαν πως δύο μονομερή RG-II ενώνονται σταυρωτά με έναν εστέρα βορικού οξέος και σχηματίζουν ένα διμερές. Στη συνέχεια με την τεχνική ^{11}B -NMR διευκρίνησαν την διαμόρφωση των προϊόντων που προκύπτουν από την αντίδραση



Εικόνα 5. Οι τρεις δυνατοί τρόποι σχηματισμού των διμερών d-RG-II-B. Σε κάθε μία από τις παραπάνω περιπτώσεις το φάσμα ^{11}B -NMR δίνει σήμα σε συγκεκριμένο δ (χημική μετατόπιση). Τα σήματα που ελήφθησαν στην περίπτωση του διμερούς d-RG-II-B ήταν χαρακτηριστικά για μία διαμόρφωση 1 βορικό οξύ:2 διόλες, που αντιστοιχεί στη δομή II της εικόνας.

του βορικού οξέος και cis-διόλης. Οι πιθανές ενώσεις αυτής της αντίδρασης φαίνονται στην εικόνα 5.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τον σχηματισμό του διμερούς d-RG-II-B, πέρα από την αναλογία των συστατικών, είναι το pH και η παρουσία δισθενών ιόντων. Με βάση την ευαισθησία που παρουσιάζουν οι ενώσεις του Β στις όξινες συνθήκες οι Loomis και Durst (1992) υπολόγισαν ότι η πτώση του pH που προκαλείται από τις αυξίνες έχει σαν αποτέλεσμα τη διάσπαση και επανασύνδεση των διαδεσμών (cross-links) ώστε να καταστεί δυνατή η επιμήκυνση των κυττάρων (Power and Woods, 1997). Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν από τους O'Neill et al. (1996) όπου σε *in vitro* πειράματα διαπίστωσαν τον σχηματισμό διμερών της RG-II με το Β σε ένα εύρος pH μεταξύ 3,0 και 3,4. Πρέπει να σημειωθεί σ' αυτό το σημείο πως η διάσπαση των διμερών RG-II σε μονομερή προκύπτει χωρίς να γίνεται υδρόλυση των γλυκοσιδικών δεσμών (O'Neill et al., 1996). Επιπλέον, στα *in vitro* πειράματα των O'Neill et al. (1996), η προσθήκη Sr^{2+} , Ba^{2+} και Pb^{2+} αύξησε το σχηματισμό των διμερών μεταξύ RG-II και Β σε pH 3,7 και pH 3,5 ενώ η προσθήκη Ca^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} και Zn^{2+} ήταν λιγότερο αποτελεσματική. Ωστόσο, τα πειράματα των Kobayashi et al. (1999) έδειξαν την ύπαρξη δύο ιόντων Ca^{2+} στη δομή d-RG-II-B. Παρόλα αυτά, η προσθήκη Ca^{2+} από μόνη της δεν προκαλεί διμερισμό του μονομερούς RG-II απουσία βορικού οξέος.

3. Φαινολικά συστατικά

3.1. Χημεία

Τα τραχεόφυτα είναι σε θέση να συνθέτουν μια πληθώρα οργανικών μορίων με την κοινή ονομασία δευτερογενείς μεταβολίτες (Hardborne et al., 1984). Τα μόρια αυτά εμπλέκονται σε μία σειρά από δομικούς, αναπτυξιακούς, αμυντικούς και άλλους οικοφυσιολογικούς ρόλους καθ' όλη τη διάρκεια ζωής των. Μεταξύ αυτών, τα φαινολικά συστατικά διαδραματίζουν κύριους ρόλους στην δόμηση του φυτικού σώματος και την άμυνα έναντι βιοτικών και αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης καθώς και σε φαινόμενα αλληλεπίδρασης μεταξύ φυτών και άλλων οργανισμών του περιβάλλοντος (Dixon and Pavia, 1995; Beckman, 2000). Αξίζει να σημειωθεί πως η PAL, ένζυμο κλειδί στο μονοπάτι του σικιμικού οξέος, από το οποίο προέρχονται όλα τα φαινολικά συστατικά, ενεργοποιείται σε απόκριση ποικίλων συνθηκών καταπόνησης οδηγώντας στη συσσώρευση των αντίστοιχων μεταβολιτών (Dixon και Pavia, 1995). Τα φαινολικά συστατικά είναι ενώσεις που προέρχονται από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη και τυροσίνη τα οποία συντίθενται στο μεταβολικό μονοπάτι του σικιμικού οξέος. Περιέχουν τουλάχιστον έναν υποκατεστημένο φαινολικό δακτύλιο ενώ αρκετά συνηθισμένα στα φυτά είναι τα φαινυλοπροπανοειδή (τα οποία φέρουν επιπλέον πλευρική αλυσίδα C₃) και τα φλαβονοειδή με δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους μεταξύ τους μέσω ενός ετεροκυκλικού εξαμελούς δακτυλίου.

Η αρχική αντίδραση του μεταβολισμού των φαινυλοπροπανοειδών είναι η απαμίνωση της φαινυλαλανίνης με τη βοήθεια του ενζύμου αμμωνιο-λυάση της φαινυλαλανίνης γνωστό και ως PAL. Η αντίδραση αυτή περιλαμβάνει την απομάκρυνση ενός μορίου αμμωνίας και το σχηματισμό ενός διπλού δεσμού C-C οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό του *trans*-κιναιμικού οξέος. Η PAL είναι από τα πλέον σημαντικά ένζυμα του δευτερογενούς μεταβολισμού. Το επόμενο βήμα περιλαμβάνει την υδροξυλίωση του φαινολικού δακτυλίου, αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο μονοοξυγενάση. Στην αντίδραση αυτή χρησιμοποιείται το κυτόχρωμα P₄₅₀ σαν θέση δέσμευσης του O₂. Η παραπάνω αντίδραση οδηγεί στο σχηματισμό του *p*-κουμαρικού οξέος. Μετά το σχηματισμό του *p*-κουμαρικού οξέος μπορούν να ακολουθήσουν περαιτέρω υδροξυλιώσεις στη θέση 3 και 5 του φαινολικού δακτυλίου οι οποίες έχουν σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό του φερουλικού και του σιναπικού οξέος αντίστοιχα. Το φερουλικό οξύ μαζί με το σιναπικό και το *p*-κουμαρικό οξύ αποτελούν τα πρόδρομα μόρια για τη σύνθεση της λιγνίνης. Οι P₄₅₀ μονοοξυγενάσες είναι ευρέως διαδεδομένες τόσο στο ζωικό όσο και στο φυτικό βασίλειο. Η πλειοψηφία των πρωτεϊνών αυτών είναι πιθανό να εμπλέκεται στην προσθήκη υδροξυλομάδων για την σύνθεση φυτοορμονών και

Εισαγωγή

δευτερογενών μεταβολιτών. Όπως όλες οι P₄₅₀ μονοοξυγονάσες έτσι και η υδροξυλάση του κιναμικού οξέος είναι προσδεσμένη στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

Στην κλάση των φαινολικών συστατικών περιλαμβάνονται απλές φαινόλες, φαινολικά οξέα, κουμαρίνες, φλαβονοειδή και στυλβένια έως συμπυκνωμένες και υδρολυμένες ταννίνες, λιγνίνες και λιγνάνες (Stalikas, 2007). Τα διάφορα φαινολικά συστατικά εντοπίζονται ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού και τις συνθήκες που αναπτύσσεται. Ένα μικρό σχετικά ποσοστό βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή ενώ το κυρίως κλάσμα είναι ενωμένο με αιθερικούς, εστερικούς ή ακετυλικούς δεσμούς στην κυτταρίνη την λιγνίνη, σε πρωτεΐνες κ.λπ. (Lam et al., 2001).

3.1.1. Απλά φαινολικά συστατικά

Τα απλά φαινολικά συστατικά (που σε αντιδιαστολή με τις πολυφαινόλες θα μπορούσαν να αναφέρονται ως μονοφαινόλες) περιλαμβάνουν δύο διακριτές ομάδες: τα παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού και τα παράγωγα του υδροξυκινναμικού (πίνακας 1). Αν και ο βασικός σκελετός παραμένει ο ίδιος, η θέση και ο αριθμός των ομάδων υδροξυλίου στον αρωματικό δακτύλιο διαφέρει δημιουργώντας έτσι ποικιλία μορίων (Stalikas, 2007). Τα πιο κοινά παράγωγα του υδροξυκινναμικού οξέος είναι το *p*-κουμαρικό, το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ τα οποία συνήθως εντοπίζονται σαν απλοί εστέρες με το κινικό οξύ και τη γλυκόζη (Mattila and Kumpulainen, 2002). Τα παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού οξέος συνήθως συναντώνται σαν γλυκοσίδες, και οι πιο κοινές μορφές είναι το *p*-υδροξυβενζοϊκό, το βανιλικό και το πρωτοκατεχουϊκό οξύ (Mattila and Kumpulainen, 2002).

Πίνακας 1. Συνήθη απλά φαινολικά των φυτών, παράγωγα των δύο βασικών δομών.

υδροξυβενζοϊκά οξέα				
όνομα	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
βενζοϊκό οξύ	H	H	H	H
<i>p</i> -υδροξυβενζοϊκό οξύ	H	H	OH	H
βανιλικό οξύ	H	OCH ₃	OH	H
γαλλικό οξύ	H	OH	OH	OH
πρωτοκατεχουϊκό οξύ	H	OH	OH	H
συριγγικό οξύ	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
γεντισικό οξύ	OH	H	H	OH
βερατρικό οξύ	H	OCH ₃	OCH ₃	H
σαλικυλικό οξύ	OH	H	H	H

υδροξυκινναμικά οξέα				
όνομα	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
κινναμικό οξύ	H	H	H	H
<i>o</i> -κουμαρικό οξύ	OH	H	H	H
<i>m</i> -κουμαρικό οξύ	H	OH	H	H
<i>p</i> -κουμαρικό οξύ	H	H	OH	H
φερουλικό οξύ	H	OCH ₃	OH	H
συναπικό οξύ	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
καφεϊκό οξύ	H	OH	OH	H

3.1.2. Φλαβονοειδή

Η μεγαλύτερη ομάδα των φαιυλοπροπανοειδών είναι τα φλαβονοειδή, μόρια τα οποία προκύπτουν από την συμπύκνωση του 4-κουμαρόυλο-CoA με τρία μόρια του μηλότυλο-CoA, αντίδραση η οποία καταλύεται από την συνθετάση της χαλκόνης (CHS). Προϊόν αυτής της αντίδρασης είναι η 4,2',4',6'-τετραϋδροξυχαλκόνη η οποία μετατρέπεται στην φλαβανόνη ναρινγκενίνη με τη βοήθεια του ενζύμου ισομεράση της χαλκόνης (CHI). Με την αντίδραση αυτή η γέφυρα των 3 ατόμων άνθρακα κυκλοποιείται σε ετεροκυκλικό εξαμελή δακτύλιο μετά την προσθήκη μιας ομάδας υδροξυλίου στον άνθρακα του διπλού δεσμού της τριμελούς γέφυρας. Η ναρινγκενίνη είναι το πρόδρομο μόριο για μια τεράστια ποικιλία φλαβονοειδών.

Στην ομάδα των φλαβονοειδών περιλαμβάνονται μόρια τα οποία λειτουργούν προστατευτικά ενάντι σε φυτοφάγα ζώα, έναντι της υπεριώδους ακτινοβολίας, ως σήματα σε φαινόμενα ανάπτυξης και αναπαραγωγής των φυτών καθώς και σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ φυτών και άλλων οργανισμών συμπεριλαμβανομένων μικροβίων.

3.2. Φαινολικά συστατικά στο κυτταρικό τοίχωμα

Στη δομή των κυτταρικών τοιχωμάτων συμμετέχουν φαινολικά συστατικά τα οποία διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τη λιγνίνη και τα υδροξυκινναμικά οξέα (πίνακας 1). Τα περισσότερα δεδομένα για τα φαινολικά του κυτταρικού τοιχώματος αφορούν την εναπόθεση λιγνίνης στο δευτερογενές τοίχωμα. Οι αναπτυσσόμενοι ιστοί δεν περιέχουν αξιοσημείωτες ποσότητες λιγνίνης στο κυτταρικό τοίχωμα αλλά μονομερή έως διμερή μόρια φαινολικών συστατικών τα οποία σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να έχουν δομικό ρόλο (Lozonaya et al., 1999). Οι Kato et al. (1994) έδειξαν πως στους μη λιγνινοποιημένους ιστούς τα υδροξυκινναμικά οξέα καταλαμβάνουν σημαντικό ποσοστό των φαινολικών συστατικών του τοιχώματος και μπορεί να επιτελούν σημαντικές λειτουργίες. Τα υδροξυκινναμικά οξέα προσδένονται στα πολυμερή του τοιχώματος με εστερικούς ή αιθερικούς δεσμούς. Τα πλέον διαδεδομένα είναι το φερουλικό και το *p*-κουμαρικό οξύ τα οποία εντοπίζονται ομοιοπολικά συνδεδεμένα μέσω εστερικών δεσμών στους πολυσακχαρίτες και μέσω εστερικών ή αιθερικών δεσμών στα συστατικά της λιγνίνης (Scalbert et al., 1985). Έχει προταθεί πως ο σχηματισμός εστερικών και αιθερικών δεσμών στα μη ξυλοποιημένα πρωτογενή τοιχώματα παίζει σημαντικό ρόλο στις μηχανικές ιδιότητες του κυτταρικού τοιχώματος (Kamisaka et al. 1990; Ishii T., 1991; Parr et al. 1997).

Ειδικότερα, το φερουλικό οξύ (FA) εντοπίζεται συνδεδεμένο με εστερικούς δεσμούς στα υπολείματα των ημικυτταρινών των πρωτογενών τοιχωμάτων σε όλες

Εισαγωγή

τις οικογένειες των κομμελινοειδών (η ομάδα αυτή περιλαμβάνει περίπου το ήμισυ των μονοκότυλων ειδών συμπεριλαμβανομένων των αγρωστώδων). Ανάλογος τρόπος σύνδεσης του FA παρατηρείται μόνο σε λίγες οικογένειες δικότυλων ειδών (Hartkey και Harris, 1981; Hartley και Ford, 1989; Smith and Harris, 2001). Για τον εντοπισμό της ακριβούς θέσης των εστερικών δεσμών του FA πάνω στο κυτταρικό τοίχωμα χρησιμοποιήθηκε το μίγμα 'δρισελάση' (Smith και Harris, 2001) το οποίο έχει ενεργότητα ένδο- και έξω- γλυκανάσης αλλά όχι δράση εστεράσης. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων σε αγρωστώδη έδειξαν πως το FA είναι προσδεμένο στην γλυκουρονοαραβινοξυλάνη (GAX) τον πιο άφθονο μη κυτταρινικό πολυσακχαρίτη των πρωτογενών κυτταρικών τοιχωμάτων (Ishii, 1997). Στα πειράματά τους οι Smith και Harris (2001) σε κυτταρικά τοιχώματα του είδους *Ananas comosus* εντόπισαν στη μεγαλύτερη αφθονία το FA ενώ ακολουθούσε ένα άλλο σημαντικό υδροξυκιναμικό οξύ, το *p*-κουμαρικό. Το κυτταρικό τοίχωμα του είδους *Eleocharis dulcis*, το οποίο χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα υψηλή θερμική σταθερότητα και υψηλή διακυτταρική πρόσφυση, είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε FA το οποίο συμμετέχει σε γέφυρες διφερουλικού οξέος σε ποσοστό περίπου 40% (Parr et al. 1997).

3.3. Φαινολικά συστατικά και Βόριο

Έχει ήδη αναφερθεί ο τρόπος με τον οποίο επιδρά η ανόργανη θρέψη στον δευτερογενή μεταβολισμό. Κατά κανόνα, οι τροφοπενίες θρεπτικών συστατικών αυξάνουν τα φαινολικά συστατικά στους φυτικούς ιστούς (Brown et al., 1984). Όσον αφορά τη σχέση του Β με τα φαινολικά συστατικά φαίνεται πως η τροφοπενία ενισχύει την ενεργοποίηση του μεταβολικού μονοπατιού των φαινυλοπροπανοειδών κυρίως μέσω αύξησης της δραστηριότητας της PAL (Cakmak και Romheld, 1997).

Οι Dordas και Brown (2004) χρησιμοποιώντας καλλιέργειες κυτάρων (*Rosa damascena* Mill cv Gloide de Guilan) έδειξαν πως σε συνθήκες έλλειψης Β η βιωσιμότητα των κυτάρων μειώνεται σημαντικά ενώ παράλληλα παρατηρείται αύξηση των φαινολικών συστατικών. Παράλληλα με την αύξηση του θανάτου των κυτταρών, παρατηρείται διαρροή φαινολικών, σακχάρων και ιόντων διαμέσου της μεμβράνης. Υπό τροφοπενία Β, παρατηρείται αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου ΡΡΟ σε φυτά καπνού το οποίο οξειδώνει τα φαινολικά συστατικά σε κιννόνες και οδηγεί στη δημιουργία ελευθέρων ριζών οι οποίες προκαλούν κυτταρικές αλλοιώσεις (Camacho-Cristobal et al. 2002).

3.4. Η διερεύνηση της ύπαρξης συσχέτισης μεταξύ βορικού οξέος και φαινολικών συστατικών στο κυτταρικό τοίχωμα

Πειράματα σε φύλλα του είδους *Olea europaea* έδειξαν πως απουσία Β στο υπόστρωμα της καλλιέργειας προκαλεί, όπως αναμένεται, αύξηση των διαλυτών φαινολικών συστατικών τόσο στα ώριμα όσο και στα εκπυσόμενα φύλλα (Liakourou και Karabourniotis, 2005). Αντίθετα, σύμφωνα με περαιτέρω πειράματα, οι ποσότητες των φαινολικών συστατικών που παραλαμβάνονται μετά από αλκαλική υδρόλυση των κυτταρικών τοιχωμάτων των ιστών του φύλλου μειώνονται, υποδηλώνοντας μειωμένη ικανότητα πρόσδεσης ή αυξημένο ρυθμό απελευθέρωσής τους ως αποτέλεσμα της τροφопενίας Β (Κλουβάτου, 2006; Κοντουδάκης, 2007). Με βάση το παραπάνω εύρημα και δεδομένου ότι το βορικό οξύ μπορεί να σχηματίζει σύμπλοκα με ορισμένα φαινολικά συστατικά, διατυπώθηκε η υπόθεση ότι φαινολικά συστατικά κατάλληλης δομής προσδένονται σε υπολείμματα πολυμερών του κυτταρικού τοιχώματος (πιθανότατα στην απιόζη της RG-II) μέσω σταθερών διεστερικών συμπλόκων με τη συμμετοχή του βορικού οξέος. Η πιθανότητα αυτή ενισχύεται από: (α) την ύπαρξη κατάλληλων υπολειμμάτων στις αλυσίδες των πολυμερών του κυτταρικού τοιχώματος ώστε να προσφέρουν την μια από τις δύο πλευρές για τη δημιουργία του διαδεσμού. Με βάση την υπάρχουσα γνώση, είναι πιθανή η δημιουργία συμπλόκων του βορικού οξέος στα οποία η μια πλευρά συνδέεται με την RGII ενώ η άλλη με υποκαταστάτη διαφορετικό της RGII και στην προκειμένη περίπτωση κάποιο φαινολικό συστατικό. (β) η ύπαρξη φαινολικών συστατικών στο κυτταρικό τοίχωμα τα οποία επίσης φέρουν ομάδες υδροξυλίου σε γειτονικά άτομα άνθρακα (δομή όρθο-). Παρόλο που οι πλέον συνηθισμένες δομές που έχουν χαρακτηριστεί είναι το p-κουμαρικό και το φερουλικό οξύ, μόρια τα οποία δεν φέρουν ορθο-δι-υδροξυ σύστημα, υπάρχουν αναφορές και για την παρουσία καφεϊκού και δεϋδρο-διμερών καφεϊκού οξέος στο κυτταρικό τοίχωμα (Gibbons et al., 1999; Yang and Uchiyama, 2000). Τα παραπάνω μόρια διαθέτουν δομή ορθο-δι-φαινόλης και μπορούν θεωρητικά να σχηματίσουν σύμπλοκα με το βορικό οξύ *in muro*. (γ) η δυνατότητα του βορικού οξέος να δημιουργεί σύμπλοκα με τα παραπάνω φαινολικά. Η συμπλοκοποίηση του βορικού οξέος με φαινολικά συστατικά που φέρουν ορθο-δι-υδροξυ σύστημα είναι θεωρητικά δυνατή (Dembitsky et al., 2002). Προηγούμενα πειράματα έχουν δείξει τον σχηματισμό σταθερών συμπλόκων μεταξύ βορικού οξέος και φαινολικών συστατικών όπως το καφεϊκό και το χλωρογενικό οξύ καθώς και με τον φαινυλαιθανοειδή γλυκοζίτη ακτεοσίδη (Κλουβάτου, 2006). Συγκεκριμένα, ο σχηματισμός των συμπλόκων αυτών συνοδεύεται από βαθυχρωμική μετατόπιση του φάσματος απορρόφησης των παραπάνω φαινολικών.

Εισαγωγή

Περαιτέρω, η υπόθεση εργασίας ενισχύεται από μια σειρά πειραμάτων των οποίων τα βασικά ευρήματα παρουσιάζονται παρακάτω:

Η επιλεκτική λύση μέσω επώασης με 3-νιτρομεθυλο-βορονικό οξύ (3-NBA, βλ. ενότητα Μεθοδολογίας) των δεσμών των βορικών διεστέρων σε δίσκους φύλλων ελιάς (Τσαγκαράκη, 2007) ή απομονωμένα κυτταρικά τοιχώματα (Φραγγελάκης, 2009; Λιακόπουλος και Κεσόγλου, δημοσίευτα αποτελέσματα) προκαλεί μείωση των εστεροποιημένων φαινολικών του κυτταρικού τοιχώματος, υποδηλώνοντας πως μέρος των φαινολικών του τοιχώματος προσδένονται σε αυτό μέσω βορικών διεστέρων. Ανάλογη μείωση παρατηρήθηκε υπό συνθήκες τροφοπενίας βορίου (Τσαγκαράκη, 2007). Είναι αξιοσημείωτο πως συνδυασμός της επώασης με 3-NBA και τροφοπενίας βορίου επέδρασε προσθετικά στην μείωση των εστεροποιημένων φαινολικών του τοιχώματος γεγονός το οποίο υποδηλώνει ότι τα δύο αποτελέσματα προέρχονται πιθανότατα από τον ίδιο μηχανισμό, δηλ. τον μειωμένο ρυθμό δημιουργίας βορικών διεστέρων στο τοίχωμα (Τσαγκαράκη, 2007).

Περαιτέρω, επώαση απομονωμένων κυτταρικών τοιχωμάτων φύλλων ελιάς με το 3-NBA είχε ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση δύο μορίων των οποίων το φάσμα απορρόφησης στην υπεριώδη περιοχή υποδηλώνει την ύπαρξη υποκατεστημένου φαινολικού δακτυλίου (Φραγγελάκης, 2009; Λιακόπουλος και Κεσόγλου, δημοσίευτα αποτελέσματα). Η παραπάνω επώαση με 3-NBA είχε ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση επιπλέον και βορικού οξέος. Οι ποσότητες των δύο μορίων εμφάνισαν υψηλό βαθμό συσχέτισης με τις ποσότητες του βορικού οξέος αποτέλεσμα το οποίο υποδηλώνει ότι έχουν κοινή προέλευση και συνεπώς ότι ίσως σχετίζονται δομικά στο τοίχωμα (Λιακόπουλος και Κεσόγλου, δημοσίευτα αποτελέσματα).

4. Ελιά

4.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Η ελιά (*Olea europaea*) ανήκει στην οικογένεια Oleaceae η οποία περιλαμβάνει πάνω από 25 γένη (Ποντίκης, 2000) και περίπου 40 είδη και υποείδη που κατανέμονται Ευρώπη, Ασία, Αφρική και Ωκεανία (Médail et al., 2001). Η καλλιέργεια της ελιάς καλύπτει παγκοσμίως μια έκταση 100 εκατομμυρίων στρεμάτων το 98% της οποίας βρίσκεται στη λεκάνη της Μεσογείου (Ποντίκης, 2000). Επίσης με την καλλιέργεια της ελιάς αξιοποιούνται εκτάσεις που είναι ακατάλληλες για άλλες καλλιέργειες και ενισχύεται η προστασία των εδαφών από τη διάβρωση.

4.2. Βόριο και ελιά

Όσον αφορά τη σχέση της ελιάς με το Βόριο προκύπτει ότι το τελευταίο αποτελεί ένα σημαντικό ιχνοστοιχείο της ανόργανης θρέψης του συγκεκριμένου είδους. Συγκεκριμένα το παραπάνω συμπέρασμα προκύπτει από το γεγονός ότι η θρεπτική κατάσταση των ελαιόδέντρων από πλευράς Βορίου έχει άμεσες και έμμεσες επιδράσεις τόσο στη φυσιολογία όσο και στην ποσότητα και ποιότητα του προϊόντος (Γαβαλάς, 1978). Μακροσκοπικά οι συνθήκες τροφopenίας Β προκαλούν στα ελαιόδεντρα νέκρωση του ακραίου μεριστώματος του βλαστού και θαμνώδη εμφάνιση (Perica et al., 2001). Επίσης παρατηρείται πως υπάρχει σχηματισμός νέων φύλλων και βλαστών αλλά η ανάπτυξη των αναστέλεται πριν τα όργανα αυτά επιτύχουν το φυσιολογικό τους μέγεθος (Liakopoulos et al., 2005).

4.3. Φαινολικά συστατικά

Τα φύλλα της ελιάς περιέχουν μια μεγάλη ποικιλία φαινολικών παραγώγων στα οποία περιλαμβάνονται φαινολικά οξέα, φαινυλοπροπανοειδή, φλαβονοειδή (κυρίως γλυκοσυλιωμένα) και σεκοροειδή (Gariboldi et al., 1986). Ακόμη, ιδιαίτερα πλούσιες σε φλαβονοειδή είναι οι μη αδενώδεις τρίχες που καλύπτουν κυρίως την αποαξονική επιφάνεια των φύλλων (Karabourniotis et al., 1998). Η σύσταση των φαινολικών μεταβάλεται καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης (Karabourniotis et al., 1995, Karabourniotis et al., 1998). Η συσσώρευση φαινολικών συστατικών στο έλασμα του φύλλου και το τρίχωμα προσδίδει πολλά οικοφυσιολογικά πλεονεκτήματα στο φυτό της ελιάς (Karabourniotis et al., 1995, Karabourniotis και Bornman 1999, Liakoura et al., 1999) και επηρεάζεται με τη σειρά της από παράγοντες καταπονήσεων (Liakoura et al., 1997).

Σκοπός της εργασίας

Σύμφωνα με τα όσα εκτέθηκαν στην εισαγωγή, η ύπαρξη φαινολικών συστατικών στο κυτταρικό τοίχωμα τα οποία προσδένονται σε κατάλληλες θέσεις (πιθανότατα στα υπολείμματα της απιόζης του πολυμερούς RGII της πηκτίνης) μέσω βορικών διεστέρων προβλέπεται από ένα ολοκληρωμένο θεωρητικό πλαίσιο βασισμένο στην υπάρχουσα γνώση και παράλληλα υποστηρίζεται από μια σειρά πειραματικών ευρημάτων. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η περαιτέρω πειραματική τεκμηρίωση της υπόθεσης εργασίας. Πιο συγκεκριμένα, θα επιχειρηθεί παρασκευαστική απομόνωση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος τα οποία απελευθερώνονται μετά από υδρόλυση του με το βοράνιο 3-νιτρο-φαινυλοβορονικό οξύ και περαιτέρω φασματοσκοπικές μελέτες με σκοπό την διερεύνηση της δομής τους. Επιπλέον, θα μελετηθεί η απόσπαση των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος κάτω από διαφορετικές συνθήκες επώασης με σκοπό την διευκρίνιση της φύσης των δεσμών τους με τα πολυμερή του κυτταρικού τοιχώματος.

Υλικά και Μέθοδοι

1. Χημικά αντιδραστήρια και βιολογικό υλικό

1.1. Χημικά αντιδραστήρια και διαλύτες

Εκτός και αν αναφέρεται διαφορετικά, τα οργανικά χημικά αντιδραστήρια είναι αναλυτικής καθαρότητας και προέρχονται από την εταιρία Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), τα ανόργανα αντιδραστήρια είναι αναλυτικής καθαρότητας από την εταιρία Merck (Darmstadt, Germany) και οι διαλύτες είναι καθαρότητας υγροχρωματογραφίας ή αναλυτικής καθαρότητας από την εταιρία Scharlau Chemie S.A. (Barcelona, Spain).

1.2. Βιολογικό υλικό και απομόνωση κυτταρικών τοιχωμάτων

Ως βιολογικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν πλήρως εκπτυγμένα φύλλα τρέχουσας βλάστησης τους είδους *Olea europaea* της ποικιλίας 'Μανάκι' ή 'Αγριομάνακο' προερχόμενα είτε από φυτάρια ηλικίας ενός έτους (φυτώριο Ελιάς Γ. Κωστελένος, Πόρος Τροιζινίας) είτε από ενήλικα δένδρα του δενδροκομείου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Μετά την λήψη του νωπού βάρους τα φύλλα καθαρίστηκαν εξωτερικά με απιονισμένο νερό και τεμαχίστηκαν. Ακολούθησε λειοτρίβηση με υγρό άζωτο και εκχύλιση σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (67 mM, pH 7,4) στο οποίο είχε προστεθεί L-ασκορβικό οξύ σε συγκέντρωση 1% (w/w). Ακολούθησαν διαδοχικές φυγοκεντρήσεις (2600×g, 10 min) και εκχυλίσεις του ιζήματος σε απιονισμένο νερό, μεθανόλη, μεθανόλη:χλωροφόρμιο (1:1), ακετόνη και τέλος σε απιονισμένο νερό ώστε να απομακρυνθεί το ασκορβικό οξύ και ξανά σε ακετόνη για ξήρανση. Ενδεικτικά, για ιστό συνολικής νωπής βιομάζας 1 g χρησιμοποιήθηκαν 50 ml από κάθε έναν από τους παραπάνω διαλύτες. Τέλος τα κυτταρικά τοιχώματα ξηράθηκαν στους 75 °C για 10 min και καταγράφηκε η ξηρή μάζα.

2. Επιμέρους πειράματα

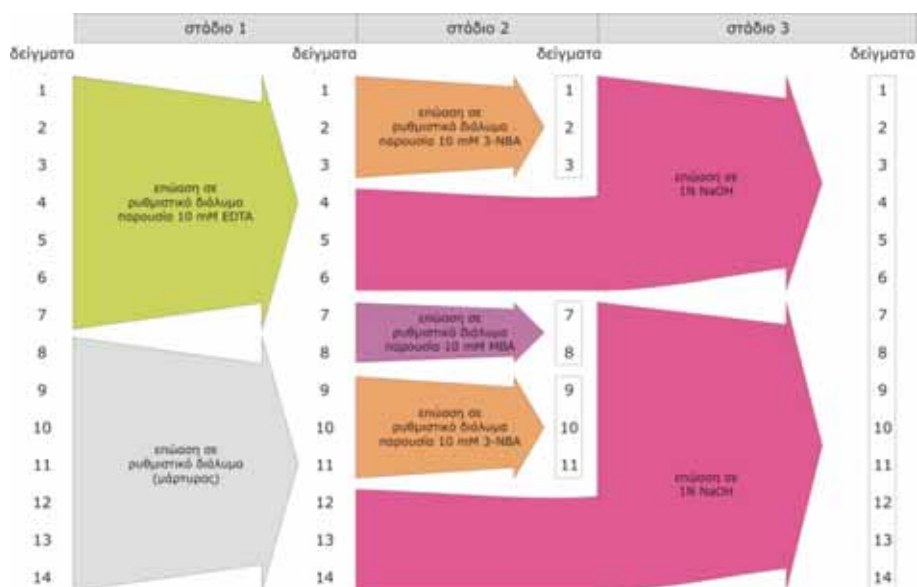
2.1. Πείραμα 1: Σύγκριση σύστασης υδρολύματος μετά την επώαση με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ με το υδρόλυμα μετά από αλκαλική υδρόλυση των κυτταρικών τοιχωμάτων

2.1.1. Επώαση των κυτταρικών τοιχωμάτων παρουσία 3-νιτροφαινυλο-βορονικού οξέος και αλκαλική υδρόλυση

Αρχικά τα δείγματα των απομονωμένων κυτταρικών τοιχωμάτων επώαστηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα απουσία ή παρουσία EDTA 10 mM. Η δεύτερη επώαση των απομονωμένων κυτταρικών τοιχωμάτων (α.κ.τ.) πραγματοποιήθηκε είτε σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (67 mM, pH 7,4) παρουσία 3-νιτροφαινυλο-

Υλικά και Μέθοδοι

βορονικού οξέος (3-NBA) σε συγκέντρωση 10 mM (έξι δείγματα) είτε σε διάλυμα NaOH 1N (έξι δείγματα), ενώ δύο δείγματα επώαστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (67 mM, pH 7,4) παρουσία μεθυλο-βορονικού οξέος (MBA) για τον έλεγχο του πειράματος (το MBA έχει pK_a μεγαλύτερη του βορονικού οξέος και ως εκ τούτου δεν έχει την ικανότητα να διασπά τους διεστερικούς δεσμούς του τελευταίου με διόλες). Σε κάθε περίπτωση, το δείγμα των κυτταρικών τοιχωμάτων εναιωρήθηκε στο μέσο επώασης με τη βοήθεια λουτρού υπερήχων (10 min). Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 40 °C υπό συνεχή ανάδευση για 16 h. Στο πείραμα 1, 100 mg ξηρού βάρους α.κ.τ. επώαστηκαν με 10 ml διαλύματος επώασης (3-NBA, NaOH ή MBA). Μετά την δεύτερη επώαση το ήμισι των δειγμάτων (τέσσερα από τα οκτώ δείγματα) που είχαν επωαστεί με βορονικά οξέα (3-NBA ή MBA) υποβλήθηκαν σε αλκαλική υδρόλυση με διάλυμα NaOH 1 N. Σχηματικά οι χειρισμοί του πειράματος 1 φαίνονται στην εικόνα 6. Στο τέλος της σειράς των επώασεων παραλήφθηκαν τα υπερκείμενα και, στην περίπτωση των αλκαλικών υδρολυμάτων, οξινίστηκαν με διάλυμα HCl 1N, υποβλήθηκαν σε υγρή εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα (3 × 20 ml), παραλήφθηκαν οι οργανικές φάσεις, εκπλύθηκαν με νερό (3 × 20 ml) για την απομάκρυνση του HCl που είχε διαλυθεί στην οργανική φάση, συμπυκνώθηκαν έως ξηρού σε περιστροφικό συμπυκνωτή κενού (40 °C) και επαναδιαλύθηκαν σε 6 ml MeOH:H₂O 1:1.



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση της αλληλουχίας πειραματικών χειρισμών (επώασεων) στις οποίες υποβλήθηκαν τα δείγματα των απομονωμένων κυτταρικών τοιχωμάτων. Τα πλαίσια στους αριθμούς δειγμάτων αντιστοιχούν στα στάδια μετά τα οποία έγιναν χρωματογραφικές αναλύσεις στα αντίστοιχα δείγματα.

2.1.2. Χρωματογραφικές αναλύσεις

Τα δείγματα διηθήθηκαν σε φίλτρο μεμβράνης οξικής κυτταρίνης (0,2 μm, Macherey-Nagel, Duren, Germany) και υποβλήθηκαν σε αναλυτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης για τα περιεχόμενα φαινολικά συστατικά και συναφή μόρια. Οι αναλύσεις έγιναν σε σύστημα Prominence (Shimadzu Co., Tokyo, Japan) εξοπλισμένο με απαερωτή DGU-20A₅, αντλία LC-20AD, ανιχνευτή UV-Vis συστοιχίας φωτοδιόδων SPD-M20A και θερμοστατούμενο διαμέρισμα στηλών CTO-20A. Όγκος 20 μl δείγματος εγχύθηκε σε στήλη Zorbax Stablebond-C₁₈, 5 μm, 250 × 4,6 mm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) και διαχωρίστηκε σε γραμμικό gradient των εξής διαλυτών: A: 0,1 % (w/w) AcOH: B: MeOH με το ακόλουθο πρόγραμμα: αρχή, A:B 80:20 / 0,0-12,0 min, μετάβαση σε A:B 50:50 / 12,0-17,0 min, μετάβαση σε A:B 0:100 / 17,0-20,0 min, ισοκρατικό / 20,0-20,1 min, μετάβαση σε A:B 80:20 και λειτουργία της στήλης για 10 min στην αρχική σύσταση διαλυτών πριν ακολουθήσει η επόμενη ανάλυση. Θερμοκρασία στήλης: 30 °C, ροή κινητής φάσης 1 ml min⁻¹. Η παρακολούθηση της ανάλυσης έγινε στα 330 nm ενώ τα χρωματογραφήματα κατεγράφησαν στην περιοχή από 190 έως 800 nm με πλάτος σχισμής 1,2 nm και αναλύθηκαν με λογισμικό LC Solutions ver. 1.23 SP1 (Shimadzu Co.). Τα εκλούόμενα συστατικά χαρακτηρίστηκαν βάσει του φάσματος απορρόφησης και της κινητικότητάς τους και ποσοτικοποιήθηκαν βάσει της επιφάνειας της κορυφής έκλουσης.

2.2. Πείραμα 2: Επίδραση της τιμής pH του μέσου επί της σύστασης του υδρολύματος μετά την επώαση των κυτταρικών τοιχωμάτων με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ**2.2.1. Επώαση των κυτταρικών τοιχωμάτων παρουσία 3-νιτροφαινυλο-βορονικού οξέος**

Η επώαση των α.κ.τ. πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικά διαλύματα κιτρικού/Na₂HPO₄ (150 mM, pH 3-8 ανά 1 μονάδα pH και 1% ασκορβικό οξύ (w/w)) απουσία ή παρουσία 3-νιτροφαινυλο-βορονικού οξέος (3-NBA) σε συγκέντρωση 10 mM (συνολικά 12 μεταχειρίσεις × 3 επαναλήψεις). Στο πείραμα 2, 75 mg ξηρού βάρους α.κ.τ. επώαστηκαν με 20 ml διαλύματος. Οι συνθήκες επώασης ήταν ίδιες με αυτές του πειράματος 1. Στο τέλος της σειράς των επώασεων παραλήφθηκαν τα υπερκείμενα και υποβλήθηκαν απευθείας σε χρωματογραφικές αναλύσεις.

2.2.2. Χρωματογραφικές αναλύσεις

Τα δείγματα διηθήθηκαν σε φίλτρο μεμβράνης οξικής κυτταρίνης (0,2 μm, Macherey-Nagel, Duren, Germany) και υποβλήθηκαν σε αναλυτική υγρή

Υλικά και Μέθοδοι

χρωματογραφία υψηλής απόδοσης για τα περιεχόμενα φαινολικά συστατικά και συναφή μόρια. Οι συνθήκες ανάλυσης ήταν όμοιες με αυτές του πειράματος 1. Επιπλέον, τα δείγματα του πειράματος 2 υποβλήθηκαν σε χρωματογραφικές αναλύσεις για το περιεχόμενο βορικό οξύ σύμφωνα με την μέθοδο του χρωμοτροπικού οξέος (Matoh et al., 1997; Stavrianakou et al., 2006). Σύμφωνα με την πρωτότυπη μέθοδο, σε υγρά δείγματα με ουδέτερο pH (1 ml) προστίθενται 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος NaOAc/AcOH 0,1 mM, pH 4,8 το οποίο περιέχει βρωμιούχο τετραβουτυλαμμώνιο (TBA) σε συγκέντρωση 1,61 g / 5 ml και 50 μl διαλύματος [150 mg χρωμοτροπικού οξέος (CA) / 186 mg Triplex III] / 5 ml. Το αντιδρών μίγμα παραμένει για τουλάχιστον 10 min και ακολούθως αναλύεται χρωματογραφικά σε στήλη ανάστροφης φάσης με διαλύτη ο οποίος περιέχει 550 ml MeOH, 33 ml HCl 1M, 3,5 g TBA και 6,06 g Tris, συμπληρούμενα με H₂O έως 1000 ml, ισοκρατικά με ροή 1 ml min⁻¹ και τα εκλουόμενα συστατικά ανιχνεύονται στα 350 nm. Υπό τις συνθήκες αυτές, το βορικό οξύ προσδιορίζεται ποσοτικά ως σύμπλοκο με το CA. Στις παρούσες αναλύσεις έγιναν οι παρακάτω τροποποιήσεις στη μέθοδο λόγω των διαφορετικών τιμών pH και της παρουσίας του 3-NBA στα δείγματα: Δείγμα όγκου 100 μl αναμίχθηκε με 900 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (67 mM, pH 7,4), 250 μl διαλύματος TBA και 250 μl διαλύματος CA. Στις παραπάνω αναλύσεις δεν κατέστη δυνατή η λήψη καμπύλης αναφοράς (μετά την ανάλυση προτύπων διαφόρων συγκεντρώσεων βορικού οξέος υπό την ταυτόχρονη παρουσία 10 mM 3-NBA στο εύρος τιμών pH 3-8) στην οποία το εμβαδόν της κορυφής έκλουσης που αντιστοιχεί στο σύμπλοκο βορικού οξέος-CA να είναι ίσο με μηδέν για το πρότυπο διάλυμα με συγκέντρωση 0 ppm. Ωστόσο, ενίσχυση της συγκέντρωσης βορίου (στοιχειακής) στα δείγματα κατά 0, 1, 5 και 10 ppm έδωσε γραμμική σχέση μεταξύ του εμβαδού της κορυφής του συμπλόκου βορικού οξέος-CA με την αύξηση της συγκέντρωσης και ότι η κλίση της παραπάνω σχέσης μπορεί να θεωρηθεί σταθερή στο εύρος τιμών pH 3-8 (βλ. Αποτελέσματα), εξασφαλίζοντας ότι το εμβαδόν της κορυφής έκλουσης του συμπλόκου βορικού οξέος-CA (χωρίς ενίσχυση της συγκέντρωσης του βορικού οξέος) των δειγμάτων που αναλύθηκαν μπορεί να εκφραστεί ως σχετική συγκέντρωση βορικού οξέος από το όριο συγκέντρωσης βορίου (στοιχειακού) 1 ppm και άνω.

2.3. Πείραμα 3: Παρασκευαστική απομόνωση και φασματοσκοπική μελέτη των συστατικών που απελευθερώνονται μετά την επώαση των κυτταρικών τοιχωμάτων με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ

2.3.1. Επώαση των κυτταρικών τοιχωμάτων παρουσία 3-νιτροφαινυλο-βορονικού οξέος

Κυτταρικά τοιχώματα ξηρού βάρους 21,32 g απομονώθηκαν όπως προηγουμένως από νεαρά πλήρως εκπτυγμένα φύλλα ελιάς ποικιλίας 'Μανάκι' και επώαστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (67 mM, pH 7,4) παρουσία 3-νιτροφαινυλο-βορονικού οξέος (3-NBA) σε συγκέντρωση 10 mM. Τα δείγματα των κυτταρικών τοιχωμάτων εναιωρήθηκε στο μέσο επώασης (1065 ml) με τη βοήθεια λουτρού υπερήχων (10 min). Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 40 °C υπό συνεχή ανάδευση για 16 h. Μετά το πέρας της επώασης τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν (2600×g, 10 min) και παραλήφθηκε το υπερκείμενο το οποίο υποβλήθηκε σε αναλυτική χρωματογραφική ανάλυση για τον έλεγχο της σύστασής του.

2.3.2. Διερεύνηση βέλτιστου pH για την εκχύλιση υγρού-υγρού με σκοπό την απομάκρυνση του 3-NBA από το υπερκείμενο της επώασης

Για την παρασκευαστική απομόνωση και την φασματοσκοπική μελέτη του μίγματος των συστατικών τα οποία απελευθερώθηκαν από τα κυτταρικά τοιχώματα ήταν απαραίτητη η απομάκρυνση του 3-NBA, διαδικασία που περιλαμβάνει την εκχύλιση υγρού-υγρού μεταξύ του υπερκειμένου και οργανικής φάσης οξικού αιθυλεστέρα σύμφωνα με προηγούμενα πειράματα (Λιακόπουλος και Κεσόγλου, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Συνοπτικά, η διαδικασία στηρίζεται στην προσθήκη μαννιτόλης σε περίσσεια ώστε το σύνολο σχεδόν του 3-NBA να συμπλοκοποιηθεί με την πολυόλη. Το σύμπλοκο που προκύπτει είναι ιδιαίτερα πολικό και παραμένει στην υδατική φάση ενώ τα υπό μελέτη μόρια μεταναστεύουν στην οργανική φάση. Ωστόσο, κρίθηκε απαραίτητη η εύρεση της βέλτιστης τιμής pH ώστε αφενός μεν η απομάκρυνση του 3-NBA και αφετέρου η ανάκτηση των υπό μελέτη συστατικών να είναι μέγιστες.

Η παραπάνω διερεύνηση πραγματοποιήθηκε σε αναλυτική κλίμακα και περιελάμβανε την εκχύλιση τμημάτων 25 ml του υπερκειμένου (ρυθμισμένων με προσθήκη 200 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (67mM) σε τιμές pH από 5 έως 8 με βήματα 0,5 (επτά τιμές pH) και εμπλουτισμένων με μαννιτόλη έως κορεσμού) με οξικό αιθυλεστέρα (3 × 25 ml). Μετά την παραλαβή της οργανικής φάσης, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε φασματοσκοπικές και χρωματογραφικές μετρήσεις για την εύρεση των ποσοστών ανάκτησης των υπό μελέτη μορίων και

Υλικά και Μέθοδοι

απομάκρυνσης του 3-NBA. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ως βέλτιστη τιμή pH θεωρήθηκε η τιμή 6,5.

2.3.3. Εκχύλιση σε διφασικό σύστημα για την απομάκρυνση περίσσειας του 3-NBA

Στο σύνολο του όγκου του υπερκειμένου εφαρμόστηκαν τμηματικά εκχυλίσεις σε διφασικό σύστημα ως εξής: 75 ml υπερκειμένου αναμίχθηκαν με 600 ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (67 mM, pH 6,5) και 54,6 g μαννιτόλης και εκχυλίστηκαν με οξικό αιθυλεστέρα (3 × 75 ml). Οι οργανικές φάσεις συννενώθηκαν και ακολούθησε συμπύκνωση του οξικού αιθυλεστέρα σε περιστροφικό συμπυκνωτή κενού (40 °C) από την οποία προέκυψε ξηρό υπόλειμα μάζας 213,4 mg. Το δείγμα επαναδιαλύθηκε σε 30 ml MeOH, διηθήθηκε σε φίλτρο μεμβράνης οξικής κυτταρίνης (0,2 μm, Macherey-Nagel, Duren, Germany) και υποβλήθηκε σε αναλυτική χρωματογραφική ανάλυση για τον έλεγχο της σύστασής του (για συνθήκες βλ. ενότητα 2.1.2, Υλικά και Μέθοδοι) και ακολούθως σε παρασκευαστική χρωματογραφία υψηλής απόδοσης για την απομόνωση των υπό μελέτη μορίων.

2.3.4. Παρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) εξοπλισμένο με αντλία PU-980 και ανιχνευτή υπεριώδους -ορατού UV-970. Το δείγμα εκχύθηκε τμηματικά ανά 450 μl σε ημιπαρασκευαστική στήλη ανάστροφης φάσης Kromasil 100-C₁₈, 10 μm, 250 × 10 mm (MZ Analysentechnik, Mainz, Germany) και διαχωρίστηκε ισοκρατικά σε μίγμα MeOH:1 % (w/w) AcOH 10:90 (v/v). Η απαέρωση της κινητής φάσης έγινε με διαβίβαση ηλίου. Ο ρυθμός ροής ήταν 1,5 ml min⁻¹ σε θερμοκρασία δωματίου και η ανίχνευση έγινε στα 330 nm. Τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη βοήθεια του λογισμικού Borwin Chromatographic Software, ver. 1. 21. 60 (JMBS Development, Fontaine, France). Η χρωματογραφική ανάλυση είχε διάρκεια 260 min. Τα κυρίως συλλεχθέντα κλάσματα ήταν δύο με ξηρά βάρη 25,9 και 19,5 mg και αντιστοιχούσαν στα υπό μελέτη συστατικά. Από τις φασματοσκοπικές μελέτες που ακολούθησαν, κυρίως φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (¹H-NMR), προέκυψε ότι τα απομονωμένα συστατικά δεν ήταν υψηλής καθαρότητας, ωστόσο, επανάληψη της απομόνωσής τους μέσω παρασκευαστικής υγρής χρωματογραφίας με τις ίδιες συνθήκες, εκτός της σύστασης της κινητής φάσης η οποία άλλαξε σε MeOH:1 % (w/w) AcOH 20:80 (v/v) και της ροής η οποία άλλαξε στο 1,8 ml min⁻¹, έδωσε νέα απομόνωση με ξηρά βάρη 3,0 και 10,4 mg. Τα απομονωμένα συστατικά υποβλήθηκαν σε λειοφυλίωση μετά το πέρας της οποίας είχαν ξηρά βάρη 1,4 και

6,9 mg. Τα απομονωμένα συστατικά υποβλήθηκαν σε σειρά φασματοσκοπικών αναλύσεων.

2.3.5. Φασματοσκοπικές τεχνικές

2.3.5.1. Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)

Τα φάσματα UV-Vis ελήφθησαν από 200-500 nm, πρώτα σε MeOH σε συγκέντρωση 0.15 mg ml⁻¹ και ακολούθως σε MeOH 50% σε συγκέντρωση 0.075 mg ml⁻¹ παρουσία 100-πλάσιας μοριακότητας H₃BO₃ (θεωρώντας ως μοριακό βάρος των απομονωμένων συστατικών την τιμή 139), σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UV-160A (Shimadzu Corporation, Japan).

2.3.5.2. Φασματοσκοπία υπερύθρου ανακλαστικότητας με σκέδαση με μετασχηματισμό Fourier (DRIFTS)

Τα φάσματα FT-IR ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Scientific) στην περιοχή 4000-400 cm⁻¹, το οποίο ήταν εξοπλισμένο με ανιχνευτή δευτεριωμένης θειϊκής τριγλυκίνης (DTGS), πηγή Nichrome και διαχωριστή δέσμης από KBr. Για την εισαγωγή του δείγματος χρησιμοποιήθηκε εξάρτημα λήψης μικροκάψουλας DRIFTS (Spectra Tech) και το φάσμα υποβάθρου ελήφθηκε με καθαρή ξηρή κόνη KBr. Τα φάσματα καταγράφηκαν και επεξεργάστηκαν με χρήση του λογισμικού FT-IR Omnic (ver.3.1) με διακριτικό όριο 4 cm⁻¹ και 100 σάρωσεις ανά δείγμα. Όλα τα φάσματα εξομαλύνθηκαν με τη χρήση του αλγορίθμου Savitsky - Golay με αυτόματες ρυθμίσεις.

2.3.5.3. Υγροχρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (LC-MS)

Η λήψη των φασμάτων μάζας έγινε σε σύστημα Shimadzu LC/MS-2010A εξοπλισμένο με δισαδική αντλία LC-10ADnr, απαερωτή DGU-14A, θερμοστατούμενο φούρνο στηλών CTO-10Avr, αυτόματο δειγματολήπτη SIL-10ADnr ρυθμισμένο σε όγκο έγχυσης δείγματος 20 μL, ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA) SPD-M10Avr και εκλεκτικό ανιχνευτή μαζών τετραπολικού φίλτρου (MSD) με πηγή ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI). Οι συνθήκες του ανιχνευτή MS στη λειτουργία αρνητικού ιόντος ήταν ως εξής: θερμοκρασία CDL 300 °C, block heater temperature 300 °C, ροή αερίου εκνέφωσης (N₂) 1 l min⁻¹, πίεση αερίου ξήρανσης (N₂) 0.1 MPa και ροή 10 l min⁻¹, -3.5 kV, τάση CDL 25 V, και τάση ανιχνευτή -1.7 kV. Χρωματογραφήματα LC/MS πλήρους σάρωσης καταγράφηκαν από 100 to 500 amu (λόγος μάζας προς φορτίο, *m/z*) με χρόνο σάρωσης 2000 amu/s. Όσον αφορά τη σάρωση έγιναν δοκιμές για 100-500 amu, 100-800 amu με χρόνο σάρωσης 4000 amu/s και 10-400 amu. Η καταγραφή των χρωματογραφημάτων και φασμάτων έγινε με χρήση του λογισμικού LC/MS solution Ver. 3.0 Workstation. Η ταύτιση των κορυφών μεταξύ αναλυτικού HPLC και LC/MS

Υλικά και Μέθοδοι

έγινε βάσει του χρόνου συγκράτησης και φασμάτων απορρόφησης στο υπεριώδες. Για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες της αναλυτικής υδροχρωματογραφίας όπως περιγράφονται παραπάνω (για συνθήκες βλ. ενότητα 2.1.2, Υλικά και Μέθοδοι) με την διαφορά ότι ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης μειώθηκε στο $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ και η συγκέντρωση του οξικού οξέος στην υδατική φάση του διαλύτη έκλουσης μειώθηκε στο 0,1%.

Αποτελέσματα

1. Πείραμα 1: Σύγκριση σύστασης υδρολύματος μετά την επώαση με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ με το υδρόλυμα μετά από αλκαλική υδρόλυση των κυτταρικών τοιχωμάτων

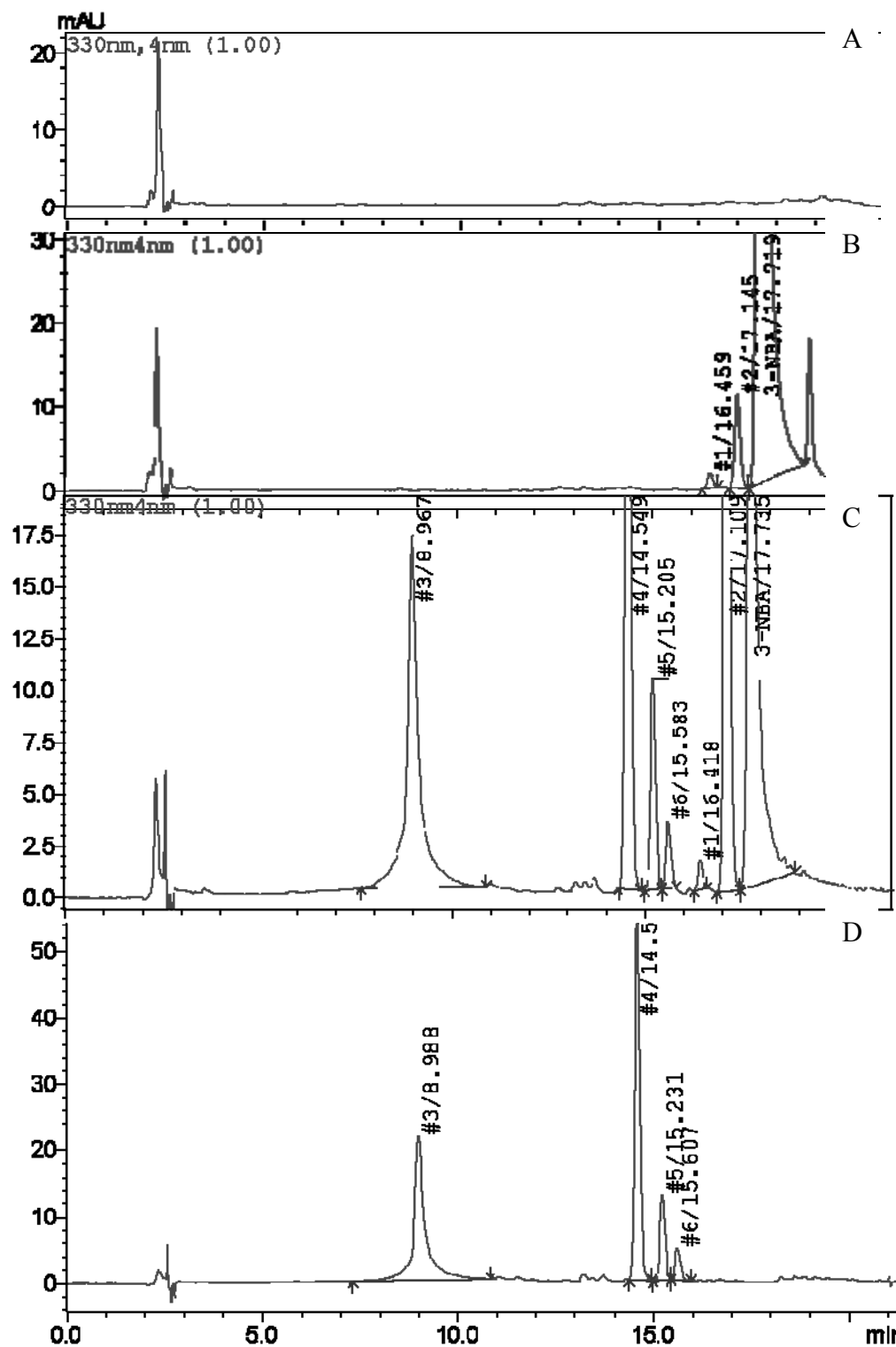
1.1. Σκοπός του πειράματος

Στο πείραμα 1, ποσότητα κυτταρικών τοιχωμάτων επώαστηκε με μεθυλοβορονικό οξύ, με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ και με NaOH με σκοπό τη συγκριτική μελέτη στη σύσταση των υδρολυμάτων. Τα βορονικά οξέα επιλέχθηκαν βάσει του γεγονότος ότι μπορούν να σχηματίζουν αντιστρεπτούς εστερικούς δεσμούς με τις cis-διόλες με τρόπο παρόμοιο με αυτόν του βορικού οξέος (Springsteen and Wang, 2002). Συγκεκριμένα, το 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ ($pK_a = 7,2$) είναι πιο ισχυρό οξύ σε σχέση με το βορικό ($pK_a = 9,2$) και έχει την ικανότητα να διασπά τους εστέρες του βορικού οξέος (Bassil et al., 2004). Αντίθετα, το μεθυλο-βορονικό οξύ ως πιο ασθενές οξύ ($pK_a = 10,7$) σε σχέση με το βορικό δεν μπορεί να διασπάσει τους παραπάνω δεσμούς και χρησιμεύει για τον έλεγχο της διαδικασίας. Όσον αφορά στον χειρισμό με διάλυμα NaOH, έχει αποδειχθεί ότι διασπά του εστερικούς δεσμούς που σχηματίζονται μεταξύ φαινολικών συστατικών και συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος (Lozonaya et al., 1999).

1.2. Αποτελέσματα χρωματογραφικών αναλύσεων

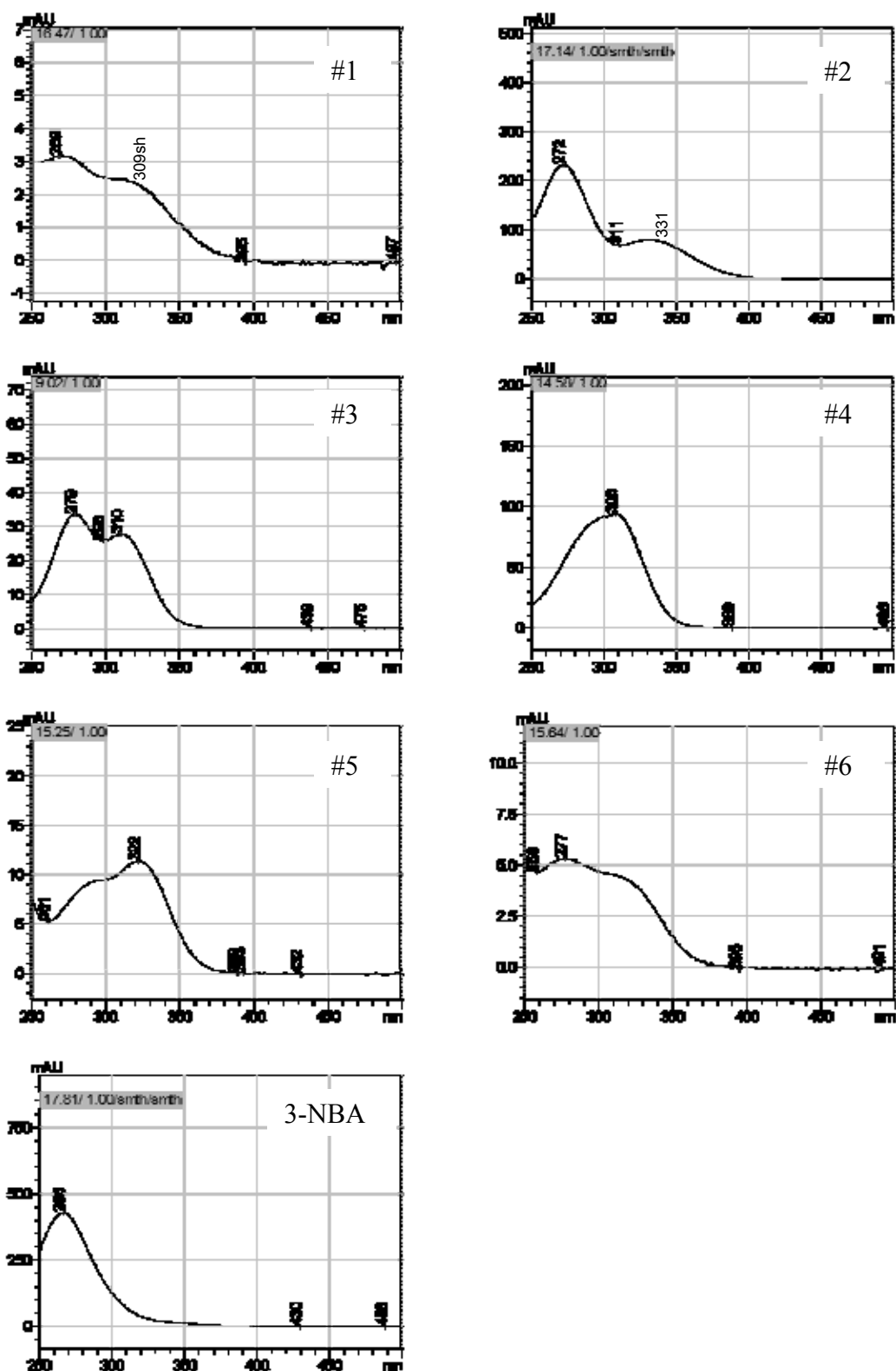
Στην εικόνα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της χρωματογραφικής ανάλυσης των υδρολυμάτων όπου τα υπό μελέτη συστατικά ανιχνεύονται στα 330 nm. Στην εικόνα 7A παρουσιάζεται το χρωματογράφημα μετά την επίδραση με μεθυλο-βορονικό οξύ. Είναι φανερό πως μετά την επίδραση με το συγκεκριμένο βορονικό οξύ δεν απελευθερώνεται κάποιο συστατικό από τα κυτταρικά τοιχώματα. Στην εικόνα 7B παρουσιάζονται τα συστατικά που ανιχνεύθηκαν μετά την χρωματογραφική ανάλυση του επώασματος με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ (χειρισμός 3-NBA). Με αυτόν τον χειρισμό εντοπίστηκαν δύο συστατικά (#1, #2 και επιπλέον αναλύεται και το ίδιο το 3-NBA). Τα συστατικά #1 και #2 παρουσιάζουν χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης φαινολικών συστατικών στην περιοχή 250-500 nm (Εικόνα 8). Στην εικόνα 7C εμφανίζονται τα συστατικά που εντοπίστηκαν στα επώασματα των κυτταρικών τοιχωμάτων τα οποία είχαν υποστεί αρχικά επίδραση με 3-NBA και ακολούθως υδρόλυση με 1N NaOH (χειρισμός 3-NBA+NaOH). Με τον παραπάνω χειρισμό ανιχνεύθηκαν τα συστατικά

Αποτελέσματα



Εικόνα 7. Αναλυτικά χρωματογραφήματα επωασμάτων των κυτταρικών τοιχωμάτων με Α. Μεθυλο-βορονικό οξύ, Β. 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ, C. 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ και ακολούθως με 1 N NaOH και, D. 1 N NaOH. Οι κορυφές έκλυσης #1-#6 αντιστοιχούν σε μόρια με χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης φαινολικών συστατικών (βλ. εικόνα 8). Οι κλίμακες απορρόφησης του ανιχνευτή μεταξύ των τεσσάρων χρωματογραφημάτων δεν είναι ποσοτικά ανάλογες. Ανίχνευση στα 330 nm. Για λεπτομέρειες σχετικά με το πείραμα και τις χρωματογραφικές συνθήκες βλ. Υλικά και Μέθοδοι.

Αποτελέσματα

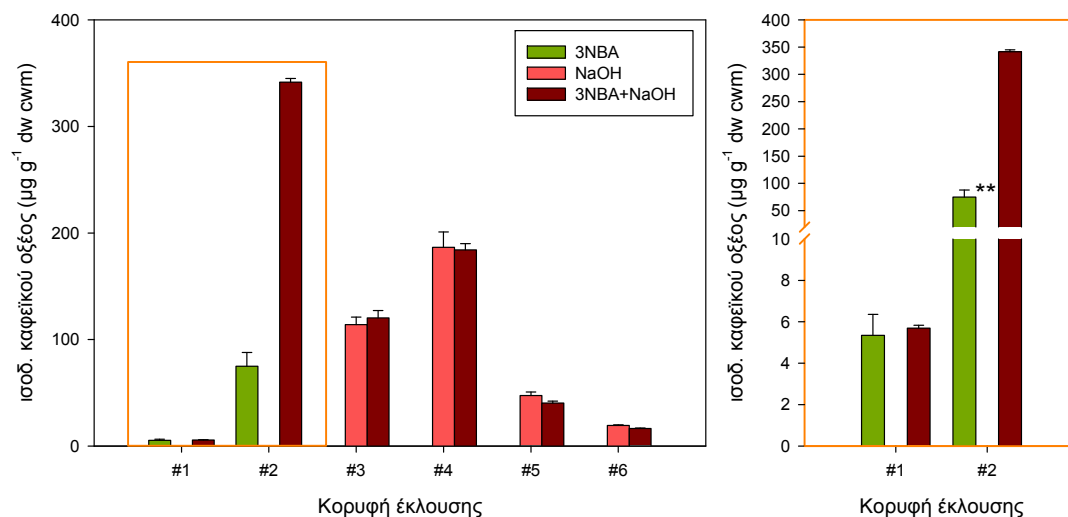


Εικόνα 8. Φάσματα απορρόφησης, στην περιοχή 250-500 nm, των κορυφών έκλουσης σύμφωνα με τις χρωματογραφικές αναλύσεις της εικόνας 6.

Αποτελέσματα

#1 και #2, όπως και πριν, αλλά επιπλέον τέσσερα συστατικά (#3, #4, #5 και #6) τα οποία επίσης εμφανίζουν χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης φαινολικών συστατικών στην περιοχή 250-500 nm (εικόνα 8). Τέλος στην εικόνα 7D παρουσιάζεται η χρωματογραφική ανάλυση των επωασμάτων που είχαν υποβληθεί σε αλκαλική υδρόλυση με διάλυμα 1N NaOH (χειρισμός NaOH). Με το χειρισμό αυτό ανιχνεύθηκαν μόνο τα συστατικά #3, #4, #5 και #6.

Σύμφωνα με την ποσοτική ανάλυση των δειγμάτων, τα μόρια ενδιαφέροντος (#1 και #2) μπορούν να απομονωθούν μετά την επίδραση με 3-NBA ή μετά από από συνδυασμένη επίδραση 3-NBA και NaOH ενώ αντίθετα δεν ανιχνεύονται στα αλκαλικά υδρολύματα (εικόνα 9). Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει πως η απελευθέρωση των συστατικών αυτών είναι αποτέλεσμα εξειδικευμένης δράσης του 3-NBA. Ωστόσο, η συγκέντρωση του συστατικού #2 είναι σημαντικά υψηλότερη όταν ακολουθείται ο χειρισμός 3-NBA+NaOH, συγκριτικά με αυτή του χειρισμού 3-NBA (εικόνα 9). Αντίθετα, όσον αφορά στο συστατικό #1, οι συγκεντρώσεις που καταγράφηκαν δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο χειρισμών. Τα συστατικά #3 έως #6 δεν απελευθερώνονται στον χειρισμό 3-NBA παρά μόνο μέσω αλκαλικής υδρόλυσης γεγονός που υποδηλώνει την πρόσδεσή τους μέσω κοινών εστερικών δεσμών με



Εικόνα 9. Ποσοτική σύσταση επωασμάτων των κυτταρικών τοιχωμάτων με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ (3NBA), με 1 N NaOH (NaOH) ή με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ και ακολούθως με 1 N NaOH (3NBA+NaOH). Τα συστατικά #1 έως #6 αντιστοιχούν στις κορυφές έκλουσης των χρωματογραφικών αναλύσεων (βλ. εικόνες 7 και 8) και έχουν εκφραστεί ποσοτικά ως ισοδύναμο καφεϊκού οξέος. Για λεπτομέρειες σχετικά με το πείραμα βλ. Υλικά και Μέθοδοι. Στο δεξί σκέλος της εικόνας εμφανίζονται οι συγκεντρώσεις των συστατικών #1 και #2 σε διαφορετική κλίμακα για καλύτερη εποπτεία. Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα του μέσου. Στοι δεξί γράφημα σημειώνονται μέσοι όροι οι οποίοι διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους (**: $P < 1\%$).

τα υδατανθρακικά υπολείματα συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος. Μεταξύ των χειρισμών 3-NBA+NaOH και NaOH δεν παρατηρούνται διαφορές (εικόνα 9).

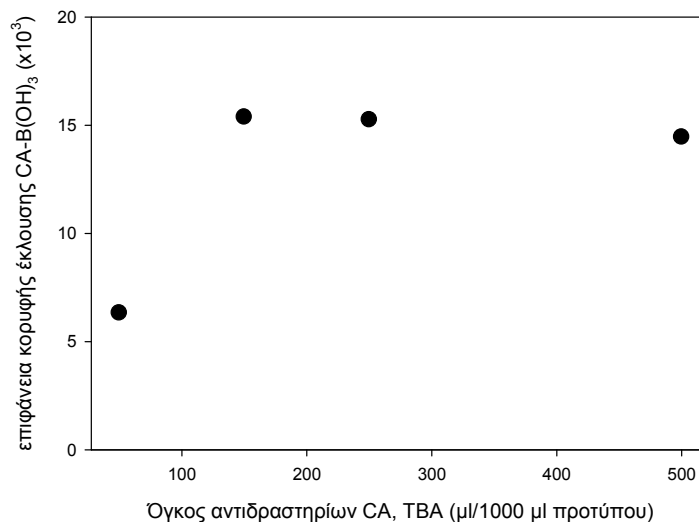
2. Πείραμα 2: Επίδραση της τιμής pH του μέσου επί της σύστασης του υδρολύματος μετά την επώαση των κυτταρικών τοιχωμάτων με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ

2.1. Σκοπός του πειράματος

Στο πείραμα 2 μελετήθηκε ο τρόπος με τον οποίο διαφορετικές τιμές pH του μέσου επώασης επιδρούν στη σύσταση του υδρολύματος και συγκεκριμένα στα υπό μελέτη συστατικά #1 και #2 παρουσία ή απουσία 3-NBA. Παράλληλα με τις παραπάνω μετρήσεις, έγινε και μέτρηση του βορικού οξέος που απελευθερωνόταν στο κάθε επώασμα με απώτερο στόχο τη συσχέτιση της συγκέντρωσης των υπό μελέτη συστατικών με αυτή του βορικού οξέος.

2.2. Πιστοποίηση μεθόδου μέτρησης βορικού οξέος σε δείγματα διαφόρων τιμών pH με ταυτόχρονη παρουσία 3-νιτροφαινυλο-βορονικού οξέος.

Η μέθοδος για τη μέτρηση του βορικού οξέος ενός δείγματος περιλαμβάνει την αντίδραση του βορικού οξέος με το χρωμοτροπικό οξύ (CA) και το σχηματισμό συμπλόκου το οποίο μπορεί να ανιχνευτεί μέσω HPLC (βλ. Matoh et al., 1997). Στην περίπτωση του πειράματος 2, έπρεπε αρχικά να καθοριστεί ο βέλτιστος όγκος των αντιδραστηρίων χρωμοτροπικού οξέος (CA) και βρωμιούχου τετραβουτυλαμμωνίου (TBA) έτσι ώστε η ποσότητα βορικού οξέος του δείγματος

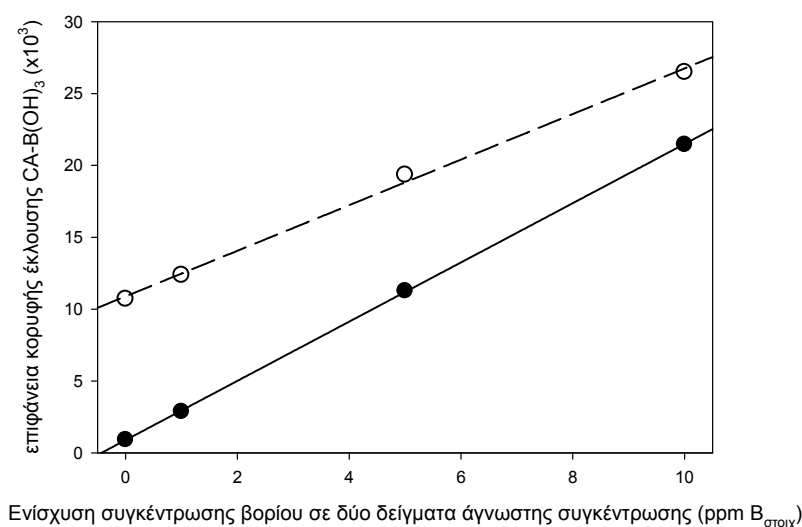


Εικόνα 10. Επίδραση του όγκου των αντιδραστηρίων χρωμοτροπικού οξέος (CA) και βρωμιούχου τετραβουτυλαμμωνίου (TBA) στην επιφάνεια της κορυφής έκλουσης που αντιστοιχεί στο σύμπλοκο χρωμοτροπικού οξέος-βορικού οξέος (CA-B(OH)₃) για αντίδραση με 1000 μl προτύπου διαλύματος βορίου συγκέντρωσης 1 ppm (5,72 mg H₃BO₃ l⁻¹).

Αποτελέσματα

να αντιδρά πλήρως και να σχηματίζει σύμπλοκο με το χρωμοτροπικό οξύ δεδομένης της ταυτόχρονης παρουσίας του 3-NBA το οποίο επίσης αναμένεται να σχηματίζει σύμπλοκο με το CA. Στην εικόνα 10 παρουσιάζεται η επίδραση διαφορετικών όγκων των αντιδραστηρίων CA και TBA στην επιφάνεια της κορυφής έκλυσης που αντιστοιχεί στο σύμπλοκο χρωμοτροπικού οξέος-βορικού οξέος (CA-B(OH)₃). Με βάση αυτά τα δεδομένα καθορίστηκε πως ο όγκος των αντιδραστηρίων ο οποίος εξασφαλίζει ποσοτική αντίδραση με το βορικό οξύ είναι 250μl.

Για τη συσχέτιση της συγκέντρωσης του βορίου με την επιφάνεια της κορυφής έκλυσης του συμπλόκου χρωμοτροπικού οξέος-βορικού οξέος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ενίσχυσης αναλυόμενου συστατικού κατά την οποία σε δείγματα με pH 3 και 8 προστέθηκε όγκος προτύπων διαλυμάτων βορίου συγκεντρώσεων 0, 10, 50 ή 100 ppm με τελική συγκέντρωση στα δείγματα 0, 1, 5 ή 10 ppm επιπλέον αυτής που είχαν αρχικά. Ακολούθως, τα δείγματα αυτά αντέδρασαν με CA και αναλύθηκαν χρωματογραφικά. Στην εικόνα 11 φαίνεται πως η ενίσχυση της συγκέντρωσης του βορίου στα δείγματα άγνωστης συγκέντρωσης ακολουθεί μια γραμμική αύξηση σε σχέση με την επιφάνει της κορυφής έκλυσης του



Εικόνα 11. Συσχέτιση μεταξύ ενίσχυσης της συγκέντρωσης βορίου και επιφάνειας της κορυφής έκλυσης που αντιστοιχεί στο σύμπλοκο χρωμοτροπικού οξέος-βορικού οξέος (CA-B(OH)₃) σε δύο δείγματα τιμών pH 3 (κλειστά σύμβολα, συνεχής γραμμή) και 8 (ανοικτά σύμβολα, διακεκομμένη γραμμή). Όγκος 100 μl δείγματος αναμίχθηκε με 100 μl προτύπου διαλύματος βορίου (συγκέντρωση βορίου 0; 10; 50 ή 100 ppm (ή συγκέντρωσης 0; 57,2; 286 ή 572 mg H₃BO₃ l⁻¹) δίνοντας τελική ενίσχυση της συγκέντρωσης στο αρχικό δείγμα κατά 0; 1; 5 ή 10 ppm βορίου και 800 μl ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 7,4, 250 μl αντιδραστηρίου χρωμοτροπικού οξέος και 250 μl αντιδραστηρίου βρωμιούχου τετραβουτυλαμμωνίου.

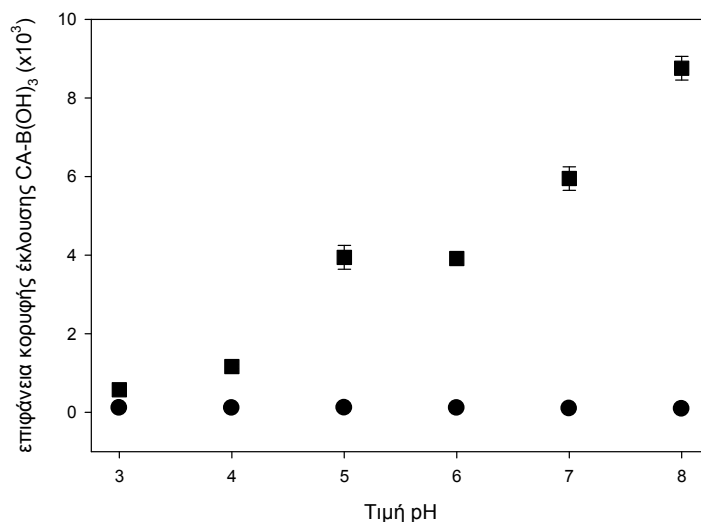
συμπλόκου χρωμοτροπικού οξέος-βορικού οξέος και στις δύο τιμές pH. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνει με έμμεσο τρόπο την αντιστοιχία της επιφάνειας της κορυφής έκλυσης του συμπλόκου χρωμοτροπικού οξέος-βορικού οξέος με τη συγκέντρωση βορίου του δείγματος και δίνει τη δυνατότητα χρήσης της μεθόδου για την απόκτηση σχετικών ποσοτικών δεδομένων.

2.3. Σύσταση του υδρολύματος σε μεταβολίτες και βορικό οξύ

Η συγκέντρωση βορίου των δειγμάτων συναρτήσει της τιμής pH φαίνεται στην εικόνα 12. Παρατηρούμε ότι η επώαση κυτταρικών τοιχωμάτων απουσία 3-NBA έχει ως αποτέλεσμα την απουσία βορίου σε όλο το εύρος τιμών pH του διαλύματος επώασης. Αντίθετα, η επώαση με 3-NBA είχε ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση βορικού οξέος σε συγκεντρώσεις οι οποίες αυξάνονται αυξανόμενης της τιμής pH του διαλύματος επώασης, υποδηλώνοντας πως το 3-NBA είναι περισσότερο αποτελεσματικό στην διάσπαση βορικών εστέρων των κυτταρικών τοιχωμάτων όταν ο χειρισμός πραγματοποιείται σε υψηλές τιμές pH (εικόνα 12).

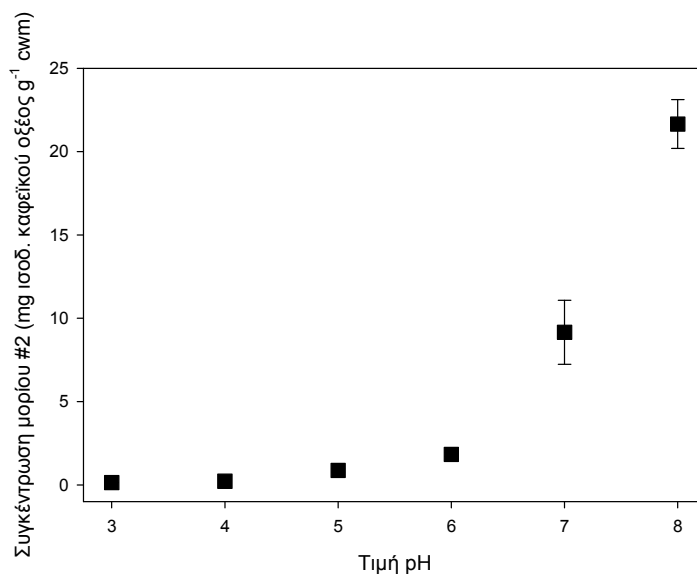
Η επίδραση των διαφόρων pH του μέσου επώασης εξετάστηκε επίσης και σε σχέση με το βαθμό απελευθέρωσης των υπό μελέτη συστατικών και συγκεκριμένα του μορίου #2. Στην εικόνα 13 φαίνεται πως αυξανόμενης της τιμής του pH του μέσου επώασης, παρουσία 3-νιτροφαινυλο-βορονικού οξέος, αυξάνεται και η συγκέντρωση του μορίου #2.

Τέλος, στην εικόνα 14 παρουσιάζεται η συσχέτιση της επιφάνειας της κορυφής

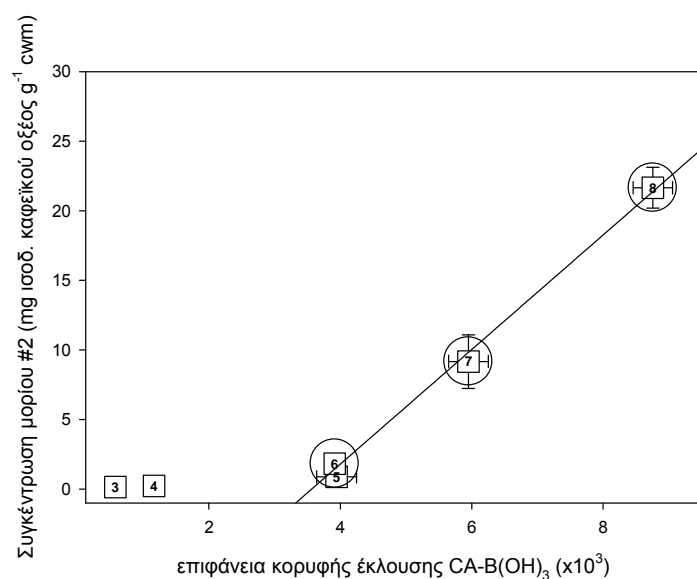


Εικόνα 12. Επίδραση της τιμής pH κατά την επώαση των κυτταρικών τοιχωμάτων απουσία (κύκλοι) ή παρουσία 10 mM 3-νιτροφαινυλο-βορονικού οξέος (τετράγωνα) στην επιφάνεια της κορυφής έκλυσης που αντιστοιχεί στο σύμπλοκο χρωμοτροπικού οξέος-βορικού οξέος (CA-B(OH)₃). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων ± τυπικό σφάλμα του μέσου.

Αποτελέσματα



Εικόνα 13. Επίδραση της τιμής pH κατά την επώαση των κυτταρικών τοιχωμάτων παρουσία 10 mM 3-νιτροφαινυλο-βορονικού οξέος στη συγκέντρωση του μορίου #2 (εκφρασμένη ως mg ισοδύναμα καφεϊκού οξέος ανά μονάδα ξηρού βάρους απομονωμένων κυτταρικών τοιχωμάτων). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα του μέσου.



Εικόνα 14. Συσχέτιση της επιφάνειας της κορυφής έκλουσης που αντιστοιχεί στο σύμπλοκο χρωμοτροπικού οξέος-βορονικού οξέος (CA-B(OH)₃) με τη συγκέντρωση του μορίου #2 (εκφρασμένη ως mg ισοδύναμα καφεϊκού οξέος ανά μονάδα ξηρού βάρους απομονωμένων κυτταρικών τοιχωμάτων). Οι αριθμοί εντός των συμβόλων αναφέρονται στην τιμή pH των διαλυμάτων επώασης. Η καμπύλη γραμμικής παλινδρόμησης εφαρμόστηκε στα δείγματα τα οποία επώαστηκαν σε τιμές pH 6, 7 και 8 ($r^2=0,997$; $P=0.0365$). Οι τιμές είναι μέσοι όροι 3 επαναλήψεων \pm τυπικό σφάλμα του μέσου.

έκλουσης που αντιστοιχεί στο σύμπλοκο χρωμοτροπικού οξέος-βορικού οξέος με τη συγκέντρωση του μορίου #2 τα οποία απελευθερώνονται από τα κυτταρικά τοιχώματα μετά από επώαση με 3-NBA σε δεδομένη τιμή pH και για τιμές από 3 έως 8. Παρατηρούμε πως για τιμές pH υψηλότερες του 6, παρατηρείται γραμμική συσχέτιση μεταξύ των δύο κατηγοριών μορίων υποδηλώνοντας στοιχειομετρική σχέση μεταξύ τους.

3. Πείραμα 3: Παρασκευαστική απομόνωση και φασματοσκοπική μελέτη των συστατικών που απελευθερώνονται μετά την επώαση των κυτταρικών τοιχωμάτων με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ

3.1. Σκοπός του πειράματος

Σκοπός του πειράματος ήταν η παρασκευαστική απομόνωση και ταυτοποίηση μέσω φασματοσκοπικών τεχνικών των συστατικών που απελευθερώνονται μετά από επώαση των κυτταρικών τοιχωμάτων με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ. Τα συστατικά του συγκεκριμένου επώασματος διαχωρίστηκαν χρωματογραφικά με χρήση παρασκευαστικής υγροχρωματογραφίας ενώ η αντιστοίχιση μεταξύ των απομονωμένων συστατικών και αυτών των δύο προηγούμενων πειραμάτων (συστατικών #1 και #2) έγινε βάσει του χρόνου έκλουσης και του φάσματος απορρόφησης. Στα απομονωμένα συστατικά ελήφθησαν φάσματα απορρόφησης στο υπεριώδες και υπέρυθρο.

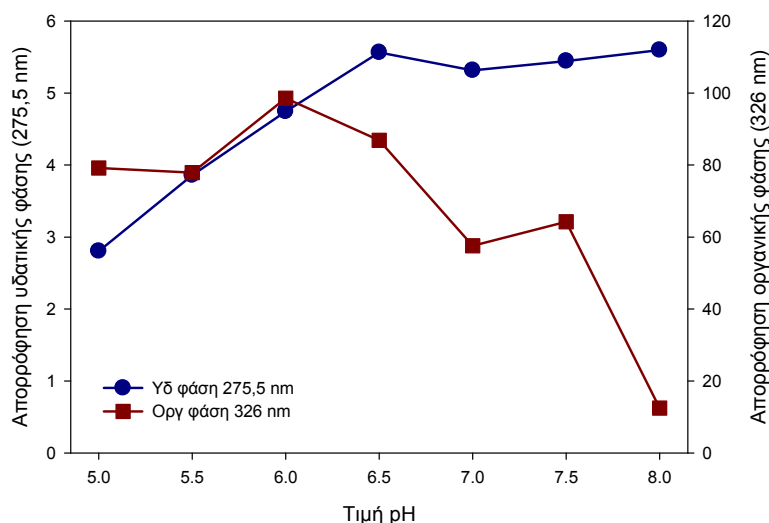
3.2. Διερεύνηση βέλτιστου pH για την εκχύλιση υγρού-υγρού με σκοπό την απομάκρυνση του 3-NBA από το υπερκείμενο της επώασης

Πριν τον χρωματογραφικό διαχωρισμό του υπερκείμενου της επώασης ήταν απαραίτητη η απομάκρυνση της περίσσειας του 3-NBA. Για το σκοπό αυτό, μικροί όγκοι από το υπερκείμενο της επώασης εκχυλίστηκαν με ρυθμιστικά διαλύματα διαφορετικών τιμών pH κορεσμένα σε μαννιτόλη ώστε να εντοπιστεί εκείνο στο οποίο επιτύγχανεται μέγιστη απομάκρυνση του 3-NBA και ταυτόχρονη βέλτιστη ανάκτηση των δύο υπό μελέτη συστατικών (βλ. Υλικά και Μεθόδους). Στην εικόνα 15 παρουσιάζεται η σχέση μεταξύ της τιμής pH του διαλύματος εκχύλισης και της απορρόφησης της οργανικής (στα 326 nm, βέλτιστη για την εκτίμηση της ανάκτησης των συστατικών #1 και #2) και της υδατικής φάσης (στα 275,5 nm, βέλτιστης για την εκτίμηση της απομάκρυνσης του 3-NBA). Στην περίπτωση της καμπύλης που αντιστοιχεί στην υδατική φάση η μεγαλύτερη απορρόφηση καταγράφεται στο pH 6.5. Κατά συνέπεια σε αυτό το pH επιτυγχάνεται η μέγιστη απομάκρυνση του 3-NBA. Όσον αφορά την καμπύλη της οργανικής φάσης, η οποία περιέχει τα υπό μελέτη μόρια, η μεγαλύτερη απορρόφηση καταγράφεται στο pH 6.0. Επίσης, σύμφωνα με την εικόνα 16, τα ποσοστά ανάκτησης των υπό

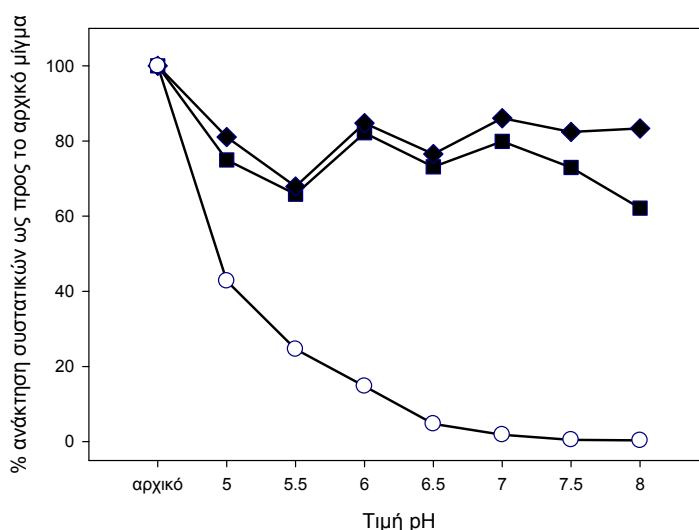
Αποτελέσματα

μελέτη συστατικών, όπως μετρήθηκαν μετά από χρωματογραφική ανάλυση, είναι μέγιστα μεταξύ τιμών pH 6,0 και 7,0 και ταυτόχρονα η απομάκρυνση του 3-NBA είναι αρκετά ικανοποιητική σε τιμή pH 6,5. Με βάση τα δεδομένα αυτά, η τιμή pH που επιλέχθηκε για να εκχυλιστεί παρασκευαστικά το αρχικό επώασμα ήταν το 6,5.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, σε υψηλότερες του 6,5 τιμές pH, ο βαθμός απομάκρυνσης του 3-NBA προσέγγιζε τιμές ανώτερες του 99% (εικόνα 16).



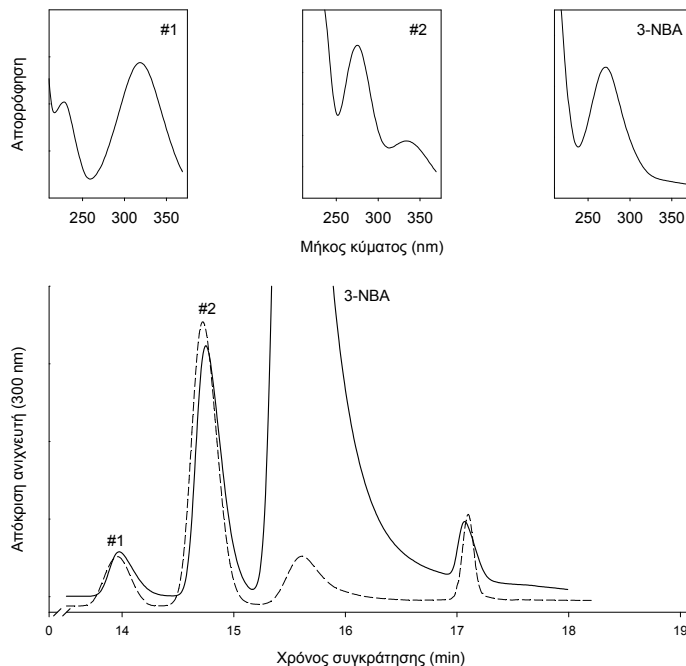
Εικόνα 15. Συσχέτιση μεταξύ τιμής pH του ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης (pH 5, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, και 8.0) με την απορρόφηση τόσο της οργανικής όσο και της υδατικής φάσης στα 326 nm και 275.5 nm αντίστοιχα.



Εικόνα 16. Συσχέτιση μεταξύ της τιμής pH του ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης και του ποσοστού ανάκτησης των υπό μελέτη συστατικών (#1: τετράγωνα και #2: ρόμβοι) και του 3-NBA (κύκλοι) στην οργανική φάση μετά την εκχύλιση υγρού-υγρού σε σχέση με το αρχικό δείγμα.

Ωστόσο, τέτοιες τιμές pH αποκλείστηκαν καθώς ήταν εμφανής, σύμφωνα με τα φωτομετρικά δεδομένα (εικόνα 15), αλλά και για την περίπτωση του συστατικού #1 σύμφωνα με τα χρωματογραφικά δεδομένα (εικόνα 16), η απώλεια επίσης σημαντικών ποσοτήτων των υπό μελέτη συστατικών από την οργανική φάση.

Μετά την κατεργασία του δείγματος ακολούθησε αναλυτική χρωματογραφία για έλεγχο της σύστασης του δείγματος η οποία έδειξε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης του 3-NBA (εικόνα 17).

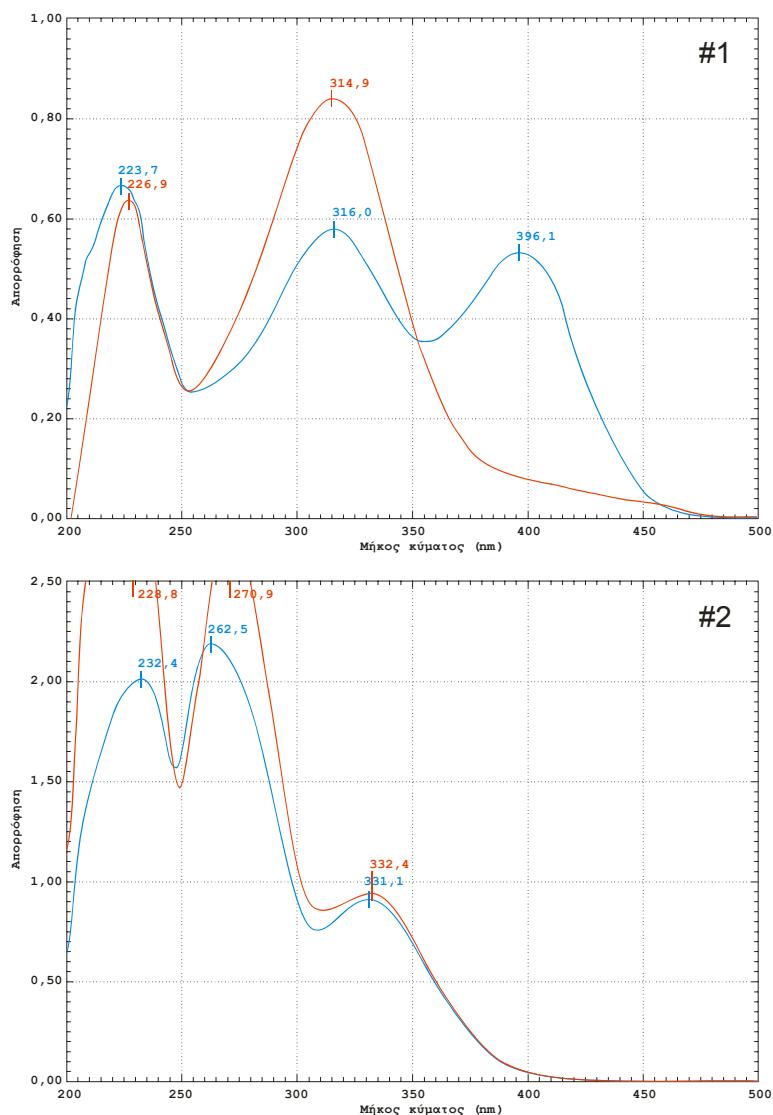


Εικόνα 17. Φάσματα απορρόφησης των υπό μελέτη συστατικών #1 και #2 και του 3-NBA. Στιγμιότυπο της χρωματογραφικής ανάλυσης του δείγματος στο οποίο εμφανίζονται σε διαφορετικό χρόνο έκλουσης οι κορυφές των συστατικών #1 #2 και του 3-NBA. Παρουσιάζεται η χρωματογραφική ανάλυση του δείγματος πριν (συνεχής γραμμή) και μετά (διακεκομένη γραμμή) την εκχύλιση υγρού-υγρού.

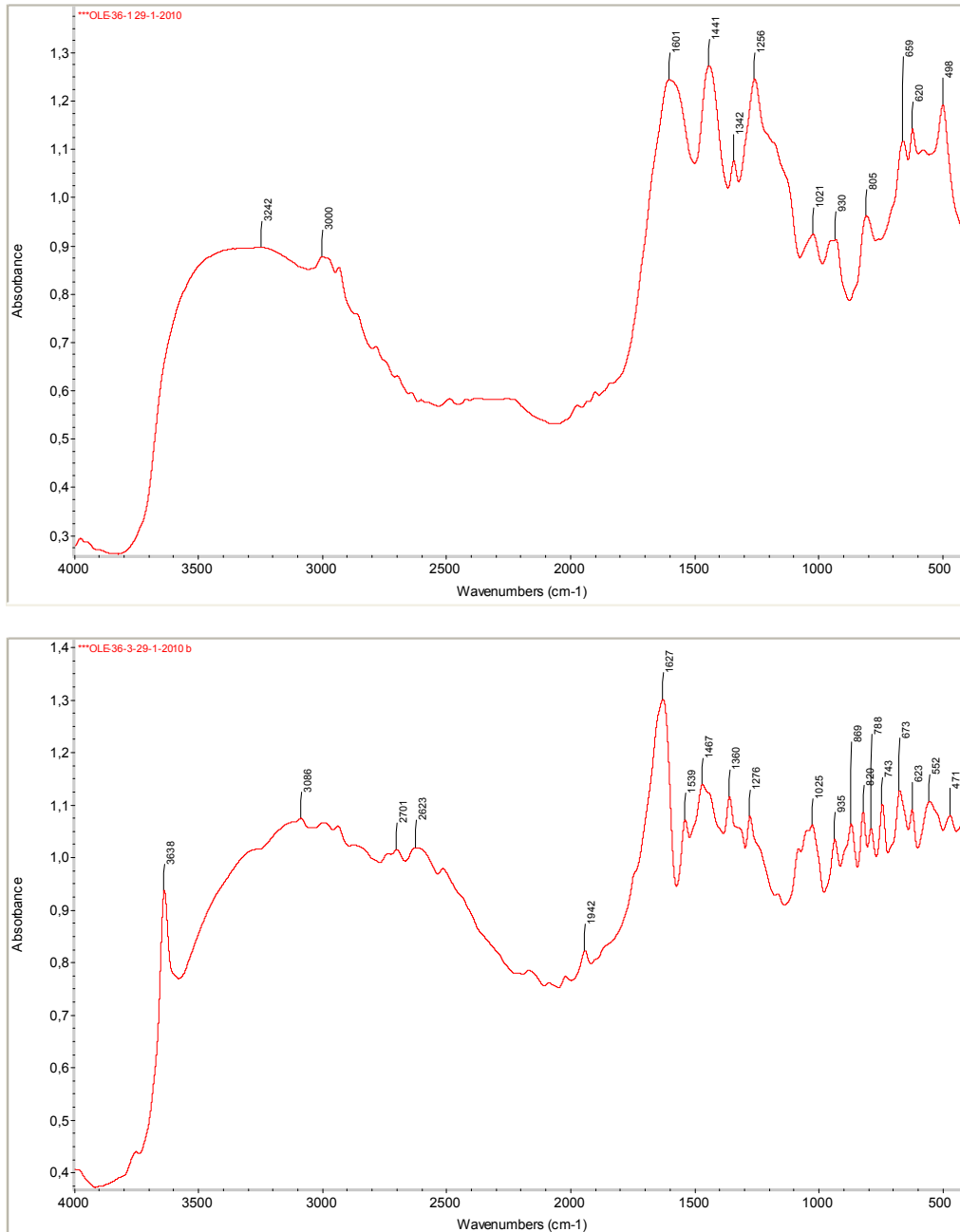
3.3. Φασματοσκοπικές αναλύσεις

Λήψη φασμάτων απορρόφησης στην υπεριώδη-ορατή περιοχή επιβεβαίωσαν την ταύτιση και σταθερότητα των υπό μελέτη συστατικών #1 και #2 ως αυτά που αρχικά απελευθερώθηκαν από τα κυτταρικά τοιχώματα των φύλλων της ελιάς μετά από επώαση με 3-NBA (εικόνα 18). Περαιτέρω, προσθήκη βορικού οξέος έδειξε αλλαγές στα φάσματα απορρόφησης οι οποίες τουλάχιστον για το συστατικό #2 υποδηλώνουν τον σχηματισμό βορικού διεστέρα, γεγονός το οποίο γίνεται φανερό από την βαθυχρωμική μετατόπιση των μεγίστων απορρόφησης (εικόνα 18).

Αποτελέσματα



Εικόνα 18. Φάσματα απορρόφησης στο υπεριώδες των δύο απομονωμένων συστατικών #1 και #2 σε μεθανόλη (συγκέντρωση κάθε συστατικού 1,08 mM, μπλε γραμμή) και φάσματα απορρόφησης στο υπεριώδες των δύο απομονωμένων συστατικών #1 και #2 σε μεθανόλη:υδατικό διάλυμα βορικού οξέος (1:1) (συγκέντρωση κάθε συστατικού 1,08 mM και συγκέντρωση βορικού οξέος 480 mM, κόκκινη γραμμή). Στα φάσματα των μιγμάτων (κόκκινη γραμμή) η γραμμομοριακή αναλογία βορικού οξέος:απομονωμένου συστατικού είναι 444:1 (υποθέτοντας μοριακό βάρος για το #1 ή για το #2 ίσο με 139 g mol^{-1}). Στο #1, η προσθήκη βορικού οξέος έχει ως συνέπεια την απόσβεση του μεγίστου στα 396,1 nm ενώ παρατηρείται μικρή βαθυχρωμική μετατόπιση του μεγίστου των 223,7 nm στα 226,9 nm (+3,2 nm) και μικρή υποχρωμική μετατόπιση του μεγίστου των 316,0 nm στα 314,9 nm (-1,1 nm). Επίσης παρατηρείται έντονο υπερχρωμικό φαινόμενο του μεγίστου των 316,0 nm. Στο #2, η προσθήκη βορικού οξέος έχει ως συνέπεια μικρή υποχρωμική μετατόπιση του μεγίστου των 232,4 nm στα 228,8 nm και έντονη βαθυχρωμική μετατόπιση του μεγίστου των 262,5 nm στα 270,9 nm (+8,4 nm). Επίσης παρατηρείται έντονο υπερχρωμικό φαινόμενο των μεγίστων των 232,4 και 262,5 nm.

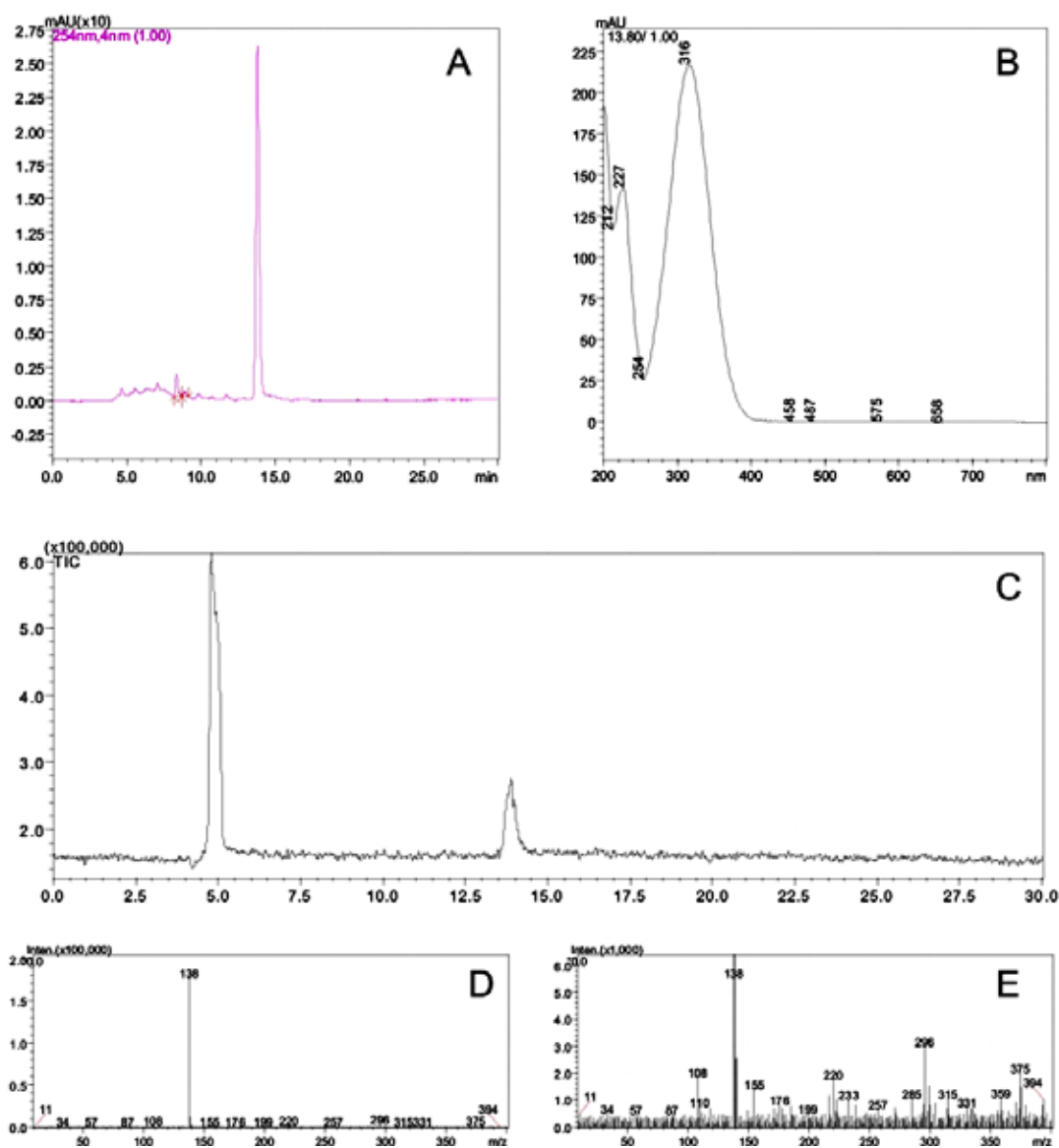


Εικόνα 19. Φάσματα υπερέυθρου ανακλαστικότητας με σκέδαση με μετασχηματισμό Fourier (DRIFT) των δύο απομονωμένων συστατικών #1 και #2.

Από την μελέτη των φασμάτων DRIFT (εικόνα 19) προέκυψαν ως κύρια ευρήματα για μεν το συστατικό #1 μέγιστα απορρόφησης στην περιοχή $3650-3100\text{ cm}^{-1}$ τα οποίες αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσης (O-H), στα 1601 και 1342 cm^{-1} τα οποία αντιστοιχούν σε δονήσεις αλειφατικής ομάδας $-\text{NO}_2$ ή σε δόνηση κάμψης (N-H), στα 1441 cm^{-1} το οποίο αντιστοιχεί σε δόνηση κάμψης (O-H), στα 1256 και 1021 cm^{-1} τα οποία αντιστοιχούν σε δονήσεις (C-O) αιθέρα ή καρβοξυλικού οξέος ή δόνηση αλειφατικής αμινομάδας και στα 805 cm^{-1} το οποίο αντιστοιχεί σε δόνηση αρωματικού συστήματος (C-H) και για το συστατικό #2 μέγιστα απορρόφησης

Αποτελέσματα

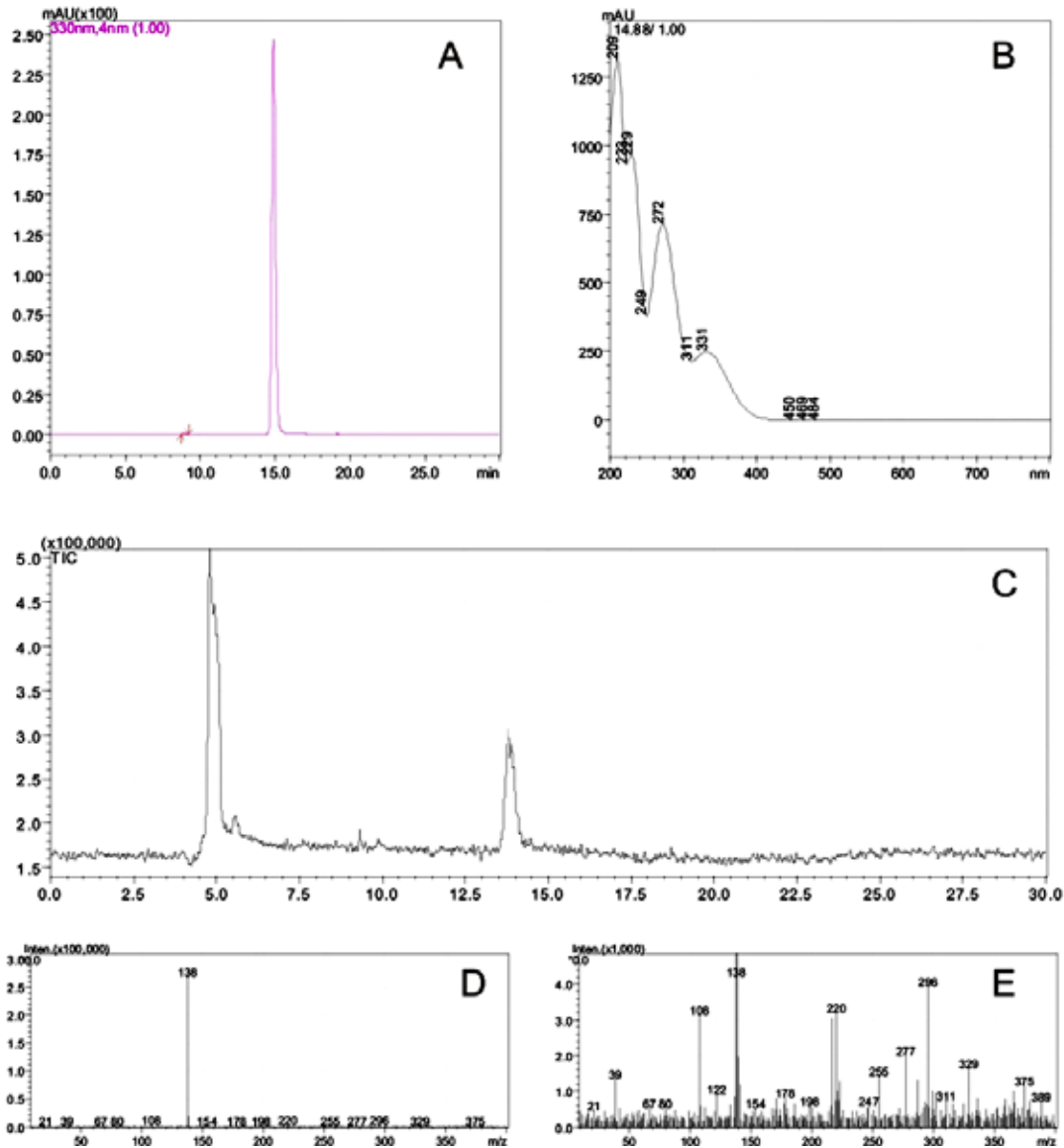
στην περιοχή $3650-3100\text{ cm}^{-1}$ τα οποίες αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσης (O-H), στα $1627, 1539$ και 1360 cm^{-1} τα οποία αντιστοιχούν σε δονήσεις αλειφατικής ομάδας $-\text{NO}_2$ ή σε δόνηση κάμψης (N-H), στα 1467 cm^{-1} το οποίο



Εικόνα 20. Χρωματογράφημα με ανίχνευση στο υπεριώδες (A), φάσμα απορρόφησης στο υπεριώδες (B), ανακατασκευασμένο χρωματογράφημα μάζας (C) και φάσματα μάζας (D και E) του απομονωμένου συστατικού #1.

αντιστοιχεί σε δόνηση κάμψης ($\text{C}-\text{H}_2$) ή σε αρωματικό σύστημα ($\text{C}=\text{C}$), στα 1276 cm^{-1} το οποίο αντιστοιχεί σε δόνηση τάσης ($\text{C}-\text{O}$) ή σε συνδυασμό με το μέγιστο στα 1025 cm^{-1} τα οποία αντιστοιχούν σε δονήσεις ($\text{C}-\text{O}$) αιθέρα ή καρβοξυλικού οξέος ή δόνηση αλειφατικής αμινομάδας και στα $869, 820$ και 788 cm^{-1} τα οποία αντιστοιχούν σε δονήσεις αρωματικού συστήματος ($\text{C}-\text{H}$). Από τα παραπάνω είναι συνεπώς πιθανή η ύπαρξη ομάδων υδροξυλίου στα υπό μελέτη συστατικά καθώς

και αρωματικού συστήματος ενώ ισχυρές ενδείξεις υπάρχουν για την ύπαρξη αμινομάδας είτε απευθείας ενωμένης στο αρωματικό σύστημα είτε σε αλλειφατική πλάγια αλυσίδα.



Εικόνα 21. Χρωματογράφημα με ανίχνευση στο υπεριώδες (A), φάσμα απορρόφησης στο υπεριώδες (B), ανακατασκευασμένο χρωματογράφημα μάζας (C) και φάσματα μάζας (D και E) του απομονωμένου συστατικού #2.

Τα φάσματα μάζας (εικόνες 20 και 21) έδωσαν σε υψηλή καθαρότητα τα μοριακά ιόντα με λόγο μάζας προς φορτίο 138 amu το οποίο συνεπάγεται μοριακό βάρος ίσο με 139 Da και για τα δύο υπό μελέτη συστατικά. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τα δεδομένα της υπέρυθρης φασματοσκοπίας υποδηλώνουν πιθανά την ύπαρξη ενός ατόμου αζώτου ανά μόριο των υπό μελέτη συστατικών.

Συζήτηση

1. Πείραμα 1: Σύγκριση σύστασης υδρολύματος μετά την επώαση με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ με το υδρόλυμα μετά από αλκαλική υδρόλυση των κυτταρικών τοιχωμάτων

Στο πείραμα 1, ποσότητα κυτταρικών τοιχωμάτων επώαστηκε με μεθυλοβορονικό οξύ, με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ και με NaOH με σκοπό τη συγκριτική μελέτη στη σύσταση των υδρολυμάτων. Τα βορονικά οξέα επιλέχθηκαν βάσει του γεγονότος ότι μπορούν να σχηματίζουν αντιστρεπτούς εστερικούς δεσμούς με τις *cis*-διόλες με τρόπο παρόμοιο με αυτόν του βορικού οξέος (Springsteen and Wang, 2002). Συγκεκριμένα, το 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ ($pK_a = 7,2$) είναι πιο ισχυρό οξύ σε σχέση με το βορικό ($pK_a = 9,2$) και έχει τη διασπά τους εστέρες του βορικού οξέος (Bassil et al., 2004). Αντίθετα, το μεθυλοβορονικό οξύ ως πιο ασθενές οξύ ($pK_a = 10,7$) σε σχέση με το βορικό δεν μπορεί να διασπάσει τους παραπάνω δεσμούς και χρησιμεύει για τον έλεγχο της διαδικασίας. Όσον αφορά στον χειρισμό με διάλυμα NaOH, έχει αποδειχθεί ότι διασπά του εστερικούς δεσμούς που σχηματίζονται μεταξύ φαινολικών συστατικών και συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος (Lozonaya et al., 1999).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η επώαση κυτταρικών τοιχωμάτων με MBA, όπως αναμενόταν, δεν απέδωσε κάποιο συστατικό στο διάλυμα επώασης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το συγκεκριμένο βορονικό οξύ δεν μπορεί να διασπάσει υφιστάμενα διεστερικά σύμπλοκα του βορικού οξέος. Το συγκεκριμένο βορονικό οξύ χρησιμοποίησαν ως μάρτυρα οι Bassil et al. (2004) όπου, αντίθετα με τη χρήση άλλων βορονικών οξέων, δεν παρατήρησαν κάποια μεταβολή στην κυτταρική ομοιότητα όταν επέδρασαν σε κύτταρα *Nicotiana tabacum*. Αντίθετα με τον χειρισμό με το MBA, ο χειρισμός των κυτταρικών τοιχωμάτων με 3-NBA, είχε σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση στο διάλυμα επώασης δύο συστατικών, των #1 και #2, των οποίων τα φάσματα απορρόφησης στην υπεριώδη περιοχή υποδηλώνουν την ύπαρξη υποκατεστημένου φαινολικού δακτυλίου, αντίστοιχα με προηγούμενα αποτελέσματα (Φραγγελάκης, 2009; Λιακόπουλος και Κεσόγλου, αδημοσίευτα αποτελέσματα). Δεδομένης της ικανότητας του 3-NBA να διασπά υφιστάμενα διεστερικά σύμπλοκα του βορικού οξέος, είναι πιθανή η προέλευση των συστατικών #1 και #2 από την διάσπαση τέτοιων συμπλόκων στο κυτταρικό τοίχωμα. Η πιθανότητα αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι τόσο ο χειρισμός με MBA όσο και η αλκαλική υδρόλυση του δείγματος σε διάλυμα 1N NaOH δεν απέδωσαν τα δύο αυτά συστατικά στο διάλυμα. Όσον αφορά στην αλκαλική υδρόλυση είναι γνωστό ότι οδηγεί στην διάσπαση εστερικών δεσμών μεταξύ φαινολικών συστατικών και υδατανθρακικών υπολειμάτων των κυτταρικών

Συζήτηση

τοιχωμάτων (Lozonaya et al. 1999). Πράγματι, ο χειρισμός αυτός είχε ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση τεσσάρων συστατικών (συστατικά #3 έως #6) με φάσμα απορρόφησης το οποίο υποδηλώνει δομή φαινολικού συστατικού στο διάλυμα αλλά όχι των συστατικών #1 και #2. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με την διεστερική φύση των δεσμών των #1 και #2 μέσω βορικού οξέος καθώς τέτοια σύμπλοκα είναι σταθερά σε υψηλές τιμές pH και δεν αναμένεται να διασπώνται μέσω αλκαλικής υδρόλυσης. Αντίστοιχα, ο χειρισμός με 3-NBA δεν οδήγησε στην διάσπαση των δεσμών των πολυμερών του κυτταρικού τοιχώματος με τα συστατικά #3 έως #6 καθώς αυτά δεν ανιχνεύτηκαν. Ωστόσο, ο συνδυασμένο χειρισμός με 3-NBA και NaOH οδήγησε στην απελευθέρωση στο διάλυμα τόσο των #1 και #2 όσο και των υπολοίπων συστατικών (#3 έως #6). Όσον αφορά στην ομάδα των συστατικών #3 έως #6, το αποτέλεσμα είναι αναμενόμενο καθώς τα συστατικά αυτά απελευθερώνονται μέσω αλκαλικής υδρόλυσης. Όσον αφορά στα συστατικά #1 και #2, η παρουσία τους στο αλκαλικό υδρόλυμα εφόσον έχει προηγηθεί χειρισμός με το 3-NBA χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Ενδεχομένως η επίδραση του 3-NBA να οδηγεί σε αλλαγή του τρόπου πρόσδεσης των συστατικών αυτών με το τοίχωμα (συγκεκριμένα του κλάσματος των συστατικών #1 και #2 τα οποία τελικά δεν διαλυτοποιούνται στο επώασμα του χειρισμού 3-NBA) με αποτέλεσμα η αλκαλική υδρόλυση που έπεται να τα απελευθερώνει στο διάλυμα.

2. Πείραμα 2: Επίδραση της τιμής pH του μέσου επί της σύστασης του υδρολύματος μετά την επώαση των κυτταρικών τοιχωμάτων με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ

Στο πείραμα 2 μελετήθηκε ο τρόπος με τον οποίο διαφορετικές τιμές pH του μέσου επώασης επιδρούν στη σύσταση του υδρολύματος και συγκεκριμένα στα υπό μελέτη συστατικά #1 και #2 παρουσία ή απουσία 3-NBA. Παράλληλα με τις παραπάνω μετρήσεις, έγινε και μέτρηση του βορικού οξέος που απελευθερωνόταν στο κάθε επώασμα με απώτερο στόχο τη συσχέτιση της συγκέντρωσης των υπό μελέτη συστατικών με αυτή του βορικού οξέος.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η επώαση των κυτταρικών τοιχωμάτων σε διαφορετικές τιμές pH (μεταξύ 3 και 8) απουσία 3-NBA δεν οδήγησε στην απελευθέρωση κάποιου από τα υπό μελέτη συστατικά. Αντίθετα, στη σειρά εκείνη των δειγμάτων που είχε ακολουθηθεί χειρισμός με 3-NBA, παρατηρήθηκε πως αυξανόμενης της τιμής του pH αυξάνεται και η συγκέντρωση των συστατικών #1 και #2 (αν και το συστατικό #1 δεν ήταν δυνατόν να ποσοτικοποιηθεί στις αντίστοιχες χρωματογραφικές αναλύσεις) καθώς και του βορικού οξέος που απελευθερώνονται. Πειράματα πάνω στη δράση των βορονικών οξέων έχουν δείξει

πως βορονικά οξέα με pK_a μικρότερη από αυτή του βορικού οξέος, προσδένονται ισχυρά στις *cis*-διόλες και εμποδίζουν το βορικό οξύ να προσδεθεί με αυτές (Winblade et al. 2000; Springsteen and Wang 2002). Επίσης όπως έχει δειχθεί από τους Bassil et al. (2004), επίδραση 3-NBA σε κύτταρα *Nicotiana tabacum* έχει στοχευμένη δράση πάνω στους διαδεσμούς που σχηματίζουν οι βορικοί εστέρες τους οποίους διασπά εκτοπίζοντας το βορικό οξύ. Τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούν να δικαιολογηθούν βάσει της αύξησης της σταθεράς σχηματισμού των συμπλόκων των βορονικών οξέων με διόλες σε υψηλές τιμές pH (Springsteen and Wang, 2002; Yan et al., 2004).

Ιδιαίτερα σημαντικό για την υπόθεση εργασίας σύμφωνα με την οποία τα συστατικά #1 και #2 προσδένονται στα κυτταρικά τοιχώματα μέσω βορικών διεστέρων, είναι η εύρεση γραμμικής σχέσης μεταξύ των ποσοτήτων του συστατικού #2 και του βορικού οξέος μετά την επώαση με 3-NBA σε διάφορες τιμές pH (μεταξύ 6 και 8). Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει πως μεταξύ των δύο παραπάνω μορίων δύναται να υφίσταται στοιχειομετρική αναλογία και επομένως δομική συσχέτισή τους στο κυτταρικό τοίχωμα.

3. Πείραμα 3: Παρασκευαστική απομόνωση και φασματοσκοπική μελέτη των συστατικών που απελευθερώνονται μετά την επώαση των κυτταρικών τοιχωμάτων με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ

Σκοπός του πειράματος ήταν η παρασκευαστική απομόνωση και ταυτοποίηση μέσω φασματοσκοπικών τεχνικών των συστατικών που απελευθερώνονται μετά από επώαση των κυτταρικών τοιχωμάτων με 3-νιτροφαινυλο-βορονικό οξύ. Τα συστατικά του συγκεκριμένου επώασματος διαχωρίστηκαν χρωματογραφικά με χρήση παρασκευαστικής υγροχρωματογραφίας ενώ η αντιστοίχιση μεταξύ των απομονωμένων συστατικών και αυτών των δύο προηγούμενων πειραμάτων (συστατικών #1 και #2) έγινε βάσει του χρόνου έκλουσης και του φάσματος απορρόφησης. Στα απομονωμένα συστατικά ελήφθησαν φάσματα απορρόφησης στο υπεριώδες και υπέρυθρο. Η καθαρότητά τους καθώς και το μοριακό βάρος εκτιμήθηκαν μέσω υγροχρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών.

Το πρώτο πρόβλημα που έπρεπε να επιλυθεί πριν προχωρήσουμε στην παρασκευαστική απομόνωση των υπό μελέτη συστατικών ήταν η εύρεση του βέλτιστου pH για την απομάκρυνση του 3-NBA. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα βορονικά οξέα σχηματίζουν σύμπλοκα μέσω διεστερικών δεσμών με τις *cis*-διόλες (Bergold και Scouten, 1983). Μεταξύ διαφορετικών διολών, ο σχηματισμός των συμπλόκων εξαρτάται από τις σταθερές σχηματισμού και τις σχετικές τους συγκεντρώσεις. Με βάση τα παραπάνω, ο μηχανισμός απομάκρυνσης του 3-NBA από το διάλυμα επώασης στηρίχθηκε στον σχηματισμό σχεδόν αποκλειστικά

Συζήτηση

συμπλόκων μεταξύ του 3-NBA και της μαννιτόλης η οποία επιλέχθηκε επειδή δεν είναι φαινολικό συστατικό, δεν απορροφά σε μήκη κύματος που θα παρέμβαιναν στις αναλυτικές μεθόδους, είναι εύκολα διαθέσιμη και διαλύεται εύκολα στο νερό δίνοντας διαλύματα με μεγάλες μοριακότητες. Με τον τρόπο αυτό, λόγω της υψηλής συγκέντρωσης μαννιτόλης (0,5 M), σχεδόν το σύνολο του 3-NBA τείνει να συμμετάσχει στο σύμπλοκο μαννιτόλη-3-NBA και λόγω υψηλής πολικότητας να παραμείνει στην υδατική φάση. Συνεπώς, στην εκχύλιση υγρού-υγρού με έναν οργανικό διαλύτη, όπως ο οξικός αιθυλεστέρας, τα υπό μελέτη συστατικά που βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή τείνουν σε μεγάλο ποσοστό να καταμεριθούν στην οργανική φάση απαλλαγμένα της παρουσίας του 3-NBA. Η ισχύς του μηχανισμού αυτού όπως και η εξάρτηση του βαθμού κατανομής του 3-NBA υπό μορφή συμπλόκου στην υδατική φάση συναρτήσε του pH της υδατικής φάσης επιβεβαιώθηκαν πειραματικά. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο βαθμός απομάκρυνσης του 3-NBA είναι εξαρτώμενος από την τιμή pH του διαλύματος και μάλιστα τείνει να μεγιστοποιείται σε τιμές pH ανώτερες του 6,0. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανότατα σχετίζεται με την αύξηση της σταθερότητας των συμπλόκων μεταξύ βορονικών οξέων και διολών όταν το pH του διαλύματος αυξάνεται πέραν της pK_a του βορονικού οξέος (Springsteen and Wang, 2002; Yan et al., 2004). Η κυρίαρχη άποψη στη βιβλιογραφία, που πρώτη φορά προτάθηκε από τα πειράματα του Logand (1959), είναι πως για το σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ ενός βορονικού οξέος και μιας διόλης το βέλτιστο pH πρέπει να έχει τιμή μεγαλύτερη από την pK_a του βορονικού οξέος. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, βέλτιστη απομάκρυνση του 3-NBA, η οποία υποδηλώνει ισχυρό και σχεδόν κατ' αποκλειστικότητα σχηματισμό συμπλόκου μαννιτόλης-3-NBA, σημειώνεται σε pH ανώτερο του 6,5 δεδομένου ότι η pK_a του 3-NBA είναι ίση με 7,2 (Bassil et al., 2004). Το αποτέλεσμα αυτό είναι αναμενόμενο δεδομένης και της συμμετοχής της μαννιτόλης στο διάλυμα σε υψηλή συγκέντρωση. Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέλειξαν οι Springsteen and Wang (2002) οι οποίοι μελέτησαν τη σταθερότητα των εστερικών δεσμών του φαινυλο-βορονικού οξέος (PBA) χρησιμοποιώντας σαν φθορίζοντα μάρτυρα την ουσία Alizarin Red S (ARS) σε διάφορες τιμές pH. Παρατήρησαν ότι η ικανότητα σχηματισμού συμπλόκου PBA -διόλης είναι μειωμένη σε χαμηλές τιμές pH ενώ προσεγγίζουν μέγιστη τιμή στο εύρος τιμών pH 4-7.

Σύμφωνα με τις φασματοσκοπικές αναλύσεις των απομονωμένων συστατικών #1 και #2 προκύπτει ότι τουλάχιστον το #2 πιθανά σχηματίζει διεστερικά σύμπλοκα με το βορικό οξύ δεδομένης της βαθυχρωμικής μετατόπισης του φάσματος απορρόφησης στην υπεριώδη περιοχή μετά την προσθήκη βορικού οξέος. Το γεγονός αυτό, τουλάχιστον για το συστατικό #2, δικαιολογεί και την

αρχική προέλευσή του ως συστατικό που απελευθερώνεται από τα κυτταρικά τοιχώματα μετά από επώαση με το βορονικό οξύ 3-NBA. Σύμφωνα με τα φάσματα υπερύθρου, φαίνεται πως τόσο στο συστατικό #1 όσο και στο #2 είναι παρόν κάποιο αρωματικό σύστημα καθώς και ομάδες υδροξυλίου. Τέτοιες δομές, πιθανά φαινολικού δακτυλίου, προσφέρουν τις αναγκαίες θέσεις για τον σχηματισμό διεστερικών συμπλόκων με το βορικό οξύ. Επίσης, βάσει των δονήσεων που αντιστοιχούν σε αμινικούς δεσμούς καθώς και των φασμάτων μάζας των δύο συστατικών, είναι πιθανή μια δομή παρόμοια με αυτή της ντοπαμίνης ή του διϋδροξυ-αμινο-μεθυλο-βενζολίου. Ωστόσο, τέτοιες δομές δεν έχουν προηγουμένα εντοπιστεί σε κυτταρικά τοιχώματα. Οι χημικές δομές των δύο συστατικών αναμένεται να επιβεβαιωθούν μέσω αναλύσεων φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού οι οποίες βρίσκονται σε εξέλιξη.

Τελικά συμπεράσματα

Σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν, τα υπό μελέτη συστατικά #1 και #2 είναι πιθανό να προσδένονται στο κυτταρικό τοίχωμα μέσω διεστερικών συμπλόκων με το βορικό οξύ. Τα συστατικά αυτά απελευθερώνονται μετά από επίδραση του βορονικού οξέος 3-NBA το οποίο εξειδικευμένα διασπά τέτοια σύμπλοκα. Η πιθανότητα αυτή ενισχύεται και από την μη απελευθέρωσή τους μετά από αλκαλική υδρόλυση με NaOH. Η επίδραση της τιμής του pH στον βαθμό απελευθέρωσης φαίνεται πως ερμηνεύεται μέσω της αύξησης της σταθεράς σχηματισμού μεταξύ των παραπάνω συστατικών και του βορονικού οξέος 3-NBA, γεγονός το οποίο περαιτέρω ενισχύει την υπόθεση εργασίας. Παράλληλα, τα φάσματα απορρόφησης τους στην υπεριώδη περιοχή υποδηλώνουν την ύπαρξη υποκατεστημένου φαινολικού δακτυλίου αλλά και τουλάχιστον για το συστατικό #2 την ικανότητα σχηματισμού διεστερικών συμπλόκων. Σημαντική είναι τέλος η διαφαινόμενη ύπαρξη στοιχειομετρικής σχέσης μεταξύ βορικού οξέος και συστατικού #2 που απελευθερώνονται στο διάλυμα επώασης.

Βιβλιογραφία

- Bassil, E., Hu, H.N. and Brown, P.H. 2004. Use of phenylboronic acids to investigate boron function in plants. Possible role of boron in transvacuolar cytoplasmic strands and cell-to-wall adhesion. *Plant Physiology*, 136:3383-3395.
- Beckman, C. H. 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 57: 101-110.
- Bergold, A. Scouten, W. H. 1983. Borate chromatography. In WH Scouten, ed, Solid Phase Biochemistry. John Wiley, New York, pp 149–187.
- Brown PH, Hu H. 1996. Phloem mobility of boron is species dependent: evidence for phloem mobility in sorbitol-rich species. *Annals of Botany* 77: 497-505.
- Brown PH, Shelp BJ. 1997. Boron mobility in plants. *Plant and Soil*. 193: 85-101.
- Brown, P. H. and Shelp, B. J. (1997) Boron mobility in plants. *Plant and Soil*. 193: 85-101.
- Brown, P. H., Graham R. D. and Nicholas, D. J. D. 1984. The effects of manganese and nitrate supply on levels of phenolics and lignin in young wheat plants. *Plant Soil*: 81, 437-440.
- Brown, P.H., Bellaloui, N., Wimmer, M.A., Bassil, E.S., Ruiz, J., Hu, H., Pfeffer, H., Dannel, F. and Römheld, V. 2002. Boron in plant biology. *Plant Biol.*, 4:205–223.
- Bryant, J. P., Chapin, F. S. III, Reichardt, P. B. & Clausen, T. P. 1987. Response of winter chemical defense in Alaska paper birch and green alder to manipulation of plant carbon/nutrient balance. *Oecologia*, 72: 510-514.
- Caffall K. H., Mohnen D. 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344: 1879-1900.
- Cakmak, I. and Römheld, V. 1997. Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. *Plant Soil*, 193:71–83.
- Camacho-Christóbal, J.J., Anzellotti, D. and González-Fontes, A. 2002. Changes in phenolic metabolism of tobacco plants during short-term boron deficiency. *Plant Physiol. Biochem.*, 40:997–1002.
- Chapin, F. S. 1980. The mineral nutrition of wild plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 11: 23-60.
- Close, C. C. and McArthur, C. 2002. Rethinking the role of many plant phenolics-protection from photodamage not herbivores? *Oikos*. 99: 166-172.

Βιβλιογραφία

- Dannel, F., Pfeffer, H. and Römheld, V. 1997. Effect of pH and boron concentration in the nutrient solution on translocation of boron in the xylem of sunflower. *In: Boron in Soils and Plants*. Eds. R.W. Bell and B. Rerkasem. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Dembitsky, V.M., Smoum, R., Al-Quntar, A.A., Abu Ali, H., Pergament, I. and Srebnik, M. 2002. Natural occurrence of boron-containing compounds in plants, algae and microorganisms. *Plant Science*, 163:931-942.
- Dixon, R.A. and Paiva, N.L. 1995. Stress-induced secondary metabolism. *Plant Cell*, 7:1085-1097.
- Dordas, C. and Brown, P.H. 2000. Permeability of boric acid across lipid bilayers and factors affecting it. *Journal of Membrane Biology*, 175:95-105.
- Dordas, C. Chrispels, M. J., and Brown, P. H. 2000. Permeability and channel-mediated transport of boric across membrane vesicles isolated from squash roots. *Plant Physiol.* 124: 1349-1361.
- Friedman, S., Pace, B., and Pizer, R., (1974) Complexation of phenylboronic acid with lactic acid. Stability constant and reaction kinetics. *J. Am. Chem. Soc.* 96: 5381-5384.
- Gariboldi, P., Jommi, G. and Verotta, L. 1986. Secoiridoids from *Olea europaea* L. *Phytochemistry*, 25:865-869.
- Gibbons, S., Mathew, K.T., Gray, A.I. 1999. A caffeic acid ester from *Halocnemum strobilaceum*. *Phytochemistry*, 51: 465-467.
- Goldbach, H. E. 1997. A critical review on current hypothesis concerning the role of boron in higher plants : suggestions for further research and methodological requirements. *J. Trace and Microprobe Tech.* 15: 51-91.
- Greenwood N N and Earnshaw A 1984 Chemistry of the Elements. *Pergamon Press*, New York.
- Hamilton, J.G., Zangerl, A.R., DeLucia, E.H. and Berenbaum, M.R. 2001. The carbon-nutrient balance hypothesis: its rise and fall. *Ecol. Lett.*, 4:86-95.
- Harborne, J.B., 1984. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Chapman and Hall, London, UK.
- Hartley R.D. and Harris P.J. 1981. Phenolic constituents of the cell walls of dicotyledons. *Biochem. Syst. Ecol.* 9: 189-203.
- Hartley, R. D. and Ford, C. W. 1989. Phenolic constituents of plant cell walls and biodegradability. *Plant Cell Wall Polymers, Biogenesis and Biodegradation*. 137-145.
- Herms, D.A. and Mattson, W.J. 1992. The dilemma of plants: to grow or defend. *Q. Rev. Biol.*, 67:283-335.

- Hu, H. and Brown, P. H. (1997) Absorption of boron by plant roots. *Plant and Soil* 193: 49-58.
- Hu, H. and Brown, P.H. 1994. Localization of boron in cell walls of squash and tobacco and its association with pectin; evidence for a structural role of boron in cell wall. *Plant Physiol.*, 105:681–689.
- Ishii, T. 1991. Isolation and characterization of a diferuloyl arabinoxylan hexasaccharide from bamboo shoot cell walls. *Carbohydr. Res.* 219: 15–22
- Ishii, T. and Matsunaga, T. 1996. Isolation and characterization of a boron-rhamnogalacturonan II complex from cell walls of sugar beet pulp. *Carbohydr Res.*, 284:1–9.
- Ishii, T., Matsunaga, T. and Hayashi, N. 2001. Formation of rhamnogalacturonan II–borate dimmer in pectin determines cell wall thickness of pumpkin tissue. *Plant Physiol.*, 126(4):1698–1705.
- Kamisaka, S., Takeda, S., Takahashi, K., Shibata, K. 1990. Diferulic and ferulic acid in the cell wall of *Avena* coleoptiles: their relationships to mechanical properties of the cell wall. *Physiol Plant.*,78: 1-7.
- Karabourniotis, G. and J. Bornman. 1999. Penetration of UV-A, UV-B and blue light through the leaf trichome layers of two xeromorphic plants, olive and oak, measured by optical fibre microprobes. *Physiol. Plant.* 105: 655-661.
- Karabourniotis, G. G Kofidis, C. Fasseas, V. Liakoura and I. Drossopoulos. 1998. Polyphenol deposition in leaf hairs of *Olea europaea* (Oleaceae) and *Quercus ilex* (Fagaceae). *Am. J. Bot.* 85:1007-1012.
- Karabourniotis, G., D. Kotsabassidis and Y. Manetas. 1995. Trichome density and its protective potential against ultraviolet-B radiation damage during leaf development. *Can. J. Bot.*73: 376-383.
- Karabourniotis, G., Kofidis, G., Fasseas, C., Liakoura, V., Drossopoulos, I., 1998. Polyphenol deposition in leaf hairs of *Olea europaea* (Oleaceae) and *Quercus ilex* (Fagaceae). *Am. J. Bot.* 85, 1007– 1012.
- Kato, Y., Yamanouchi, H., Hinata, K., Ohsumi, C., & Hayashi, T. 1994. Involvement of Phenolic Esters in Cell Aggregation of Suspension-Cultured Rice Cells. *Plant Physiol.*, 104, 147.
- Kobayashi, M., Matoh, T. and Azuma, J. 1996. Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate–diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiol.*, 110:1017–1020.
- Lam, T. B. T., Kadoya, K., Iiyama, K. 2001. Bonding of hydroxycinnamic acids to lignin: ferulic and *p*-coumaric acids are predominantly linked at the benzyl position of lignin, not the β -position, in grass cell walls. *Phytochemistry.* 57: 987-992.

Βιβλιογραφία

- Liakopoulos, G. and Karabourniotis, G. 2005. Boron deficiency and concentrations and composition of phenolic compounds in *Olea europaea* leaves: a combined growth chamber and field study. *Tree Physiology*, 25:307-315.
- Liakopoulos, G., Stavrianakou, S., Filippou, M., Fasseas, C., Tsadilas, C., Drossopoulos, I. and Karabourniotis, G. 2005. Boron remobilization at low boron supply in olive (*Olea europaea*) in relation to leaf and phloem mannitol concentrations. *Tree Physiol.*, 25:157-165.
- Liakopoulos, G., Stavrianakou, S., Nikolopoulos, D., Karvonis, E., Vekkos, K. A., Psaroudi, V., and Karabourniotis, G. 2009. Quantitative relationships between boron and mannitol concentrations in phloem exudates of *Olea europaea* leaves under contrasting boron supply conditions. *Plant and Soil*, 323: 177-186.
- Liakoura, V., M. Stefanou, Y. Manetas, C. Cholevas and G. Karabourniotis. 1997. Trichome density and its UV-B protective potential are affected by shading and leaf position on the canopy. *Environ. Exp. Bot.* 38:223-229.
- Liakoura, V., S. Stavrianakou, G. Liakopoulos, G. Karabourniotis and Y. Manetas. 1999. Effects of UV-B radiation on *Olea europaea*: comparisons between a greenhouse and a field experiment. *Tree Physiol.* 19:905-908.
- Liners, F., Letesson, J. J., Didembourg, C. and Van Cutsem, P. 1989. Monoclonal antibodies against pectin. Recognition of a conformation induced by calcium. *Plant Physiol.* 91: 1419-1424.
- Liu X-C, Scouten WH (2000) Borate affinity chromatography. In P Bailon, GK Ehrlich, W-J Fung, W Berthold, eds, *Methods in Molecular Biology*, Vol 147, *Affinity Chromatography: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 119-128.
- Loomis, W.D. and Durst, R.W. 1992. Chemistry and biology of boron. *Biofactors*, 3:229-239.
- Lozovaya, V.V., Gorshkova, T.A., Yablokova, E.V., Rumyantseva, N.I., Valieva, A., Ulanov, A. and Widholm, J.M. 1999. Cold alkali can extract phenolic acids that are ether linked to cell wall components in dicotyledonous plants (buckwheat, soybean and flax). *Phytochemistry*, 50:395-400.
- Marschner H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants*. second edition. 889pp. London: Academic Press.
- Mateo. P. Bonilla. I.. Femandez-Valiente. E. & Sanchez-Maeso. E. 1986. Essentiality of boron for dinitrogen fixation in *Anabaena* sp. PCC 7119. *Plant Physiol.* 81: 430-433.

- Matoh, T., Akaike, R. and Kobayashi, M. 1997. A sensitive and convenient assay for boron in plant using chromotropic acid and HPLC. *Plant Soil*, 192:115-118.
- Matsunaga, T., Ishii, T., Matsumoto, S, Higuchi, M., Darvill, A., Albersheim, P., O'Neill, M. 2004. Occurrence of the primary cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II in Pteridophytes, Lycophytes, and Bryophytes. Implications for the evolution of vascular plants. *Plant Physiol.* 134:339-351.
- Mattila, P., and Kumpulainen, J. 2002. Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *J.Agric. Food Chem.*, 50:3660-3667.
- Morgan V 1980 Boron Geochemistry. In Supplement to Mellor's Comprehensive Treatise on Inorganic and Theoretical Chemistry, vol. V, Part A: Boron-Oxygen Compounds. Longman, New York.
- Nakamura A, Furuta H, Maeda H, Takao T, Nagamatsu Y. 2002. Structural studies by stepwise enzymatic degradation of the main backbone of soybean soluble polysaccharides consisting of galacturonan and rhamnogalacturonan. *Biosci Biotechnol Biochem.* 66: 1301-1313.
- Northcote D.H. 1986. Control of pectin synthesis and deposition during plant cell wall growth. In ML Fishman, JJ Jen, eds, Chemistry and Function of Pectin, American Chemical Society Symposium series 310. American Chemical Society, Washington, DC, pp.134-140.
- O'Neill, M.A., Eberhard, S., Albersheim, P. and Darvill, A.G. 2001. Requirement of borate cross-linking of cell wall rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* growth. *Science*, 294:846-849.
- O'Neill, M.A., Warrenfeltz, D., Kates, K., Pellerin, P., Doco, T., Darvill, A.G. and Albersheim, P. 1996. Rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cell, forms a dimer that is covalently cross-linked by a borate ester. *J. Biol. Chem.*, 271:22923-22930.
- Parr, A. J., Ng, A., and Waldron K. W. 1997. Ester-Linked Phenolic Components of Carrot Cell Walls. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 2468-2471.
- Perez, S., M. A. E. Rodriguez-Carvajal, T. Doco. 2003. A complex structure cell wall polysaccharide: rhamnogalacturonan II. A structure in quest of function. *Biochimie*, 85: 109-121.
- Perica, S., Brown, P.H., Connell, J.H., Nyomora, A.M.S., Dordas, C., Hu, H. and Stangoulis. J.C. 2001. Foliar boron application improves flower fertility and fruit set of olive. *HortScience* 36:714-716.

Βιβλιογραφία

- Pfeffer, H., F. Dannel and V. Römheld. 1999. Isolation of soluble boron complexes and their determination together with free boric acid in higher plants. *J. Plant Physiol.* 154:283–288.
- Power, P.P. and Woods, W.G. 1997. The chemistry of boron and its speciation in plants. *Plant Soil*, 193:1–13.
- Raven, J.A. 1980. Short- and long-distance transport of boric acid in plants. *New Phytol.*, 84:231–249.
- Ridley, B. L., O'Neill, M. A., Mohnen, D. 2001. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*. 57:929–967.
- Scalbert, A., Monties, B., Lallemand, J. Y., Guittet, E., Rolando, C. 1985. Ether linkage between phenolic acids and lignin fractions from wheat straw. *Phytochemistry*. 24: 1359-1362.
- Shelp B J, Stattuck V I, McLellan D and Liu L 1992b Boron nutrition and composition of glucosinolates and soluble nitrogen compounds in two broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) cultivars. *Can J. Plant Sci.* 72, 889–899.
- Skok, J., and McIlrath, W. 1958. Distribution of boron in cells of dicotyledonous plants in relation to growth. *Plant Physiol.* 428-431.
- Smith, B. G., and Harris, J. P. 2001. Ferulic acid is esterified to glucuronoarabinoxylans in pineapple cell walls. *Phytochemistry*, 56: 513-519.
- Springsteen G, Wang B. 2002. A detailed examination of boronic acid-diol complexation. *Tetrahedron* 58: 5291–5300.
- Stalikas, C. D. 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J. Sep. Sci.* 30, 3268-3295
- Stavrianakou, S., Liakopoulos, G., Karvonis, E., Resta, E. and Karabourniotis G. 2006. Low-boron acclimation induces uptake of boric acid against a concentration gradient in root cells of *Olea europaea*. *Functional Plant Biology*, 33: 189-193.
- Steudle, E. 2001. The cohesion-tension mechanism and the acquisition of water by plant roots. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 847-875.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 1998. *Plant Physiology*. Sunderland: Sinauer Associates.
- Takano, J., Noguchi, K., Yasumori, M., Kobayashi, M., Gajdos, Z., Miwa, K., Hayashi, H., Yoneyama, T. and Fujiwara, T. 2002. *Arabidopsis* boron transporter for xylem loading. *Nature*, 420:337-340.
- Tate, S. S., and Meister, A. 1978. Serine-borate complex as a transportation-station inhibitor of gamma – glutamyl transpeptidase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 75: 4806-4809.

- Van Duin, M., Peters, J.A., Kieboom, A.P.G., and Van Bekkum, H. 1984. The pH dependence of the stability of esters of boric acid and borate in aqueous medium as studied by¹ B-NMR. *Tetrahedron*. 40: 2901–2911.
- Warrington K. 1923. The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants. *Ann. Bot.*, 37: 629-672.
- Willats, W. G. T., McCartney, L., Knox, J. P. 2001. *In-situ* analysis of pectic polysaccharides in seed mucilage and at the root surface of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 213: 37-44.
- Woods, W.G. 1996. A review of possible boron speciation relating to its essentiality. *J. Tr. Elem. Exp. Med.*, 9:153-163.
- Yan, J., Springsteen, G., Deeter, S., and Wang, B. 2004. The relationship between pKa, pH, and binding constants in the interactions between boronic acids and diols-it is not as simple as it appears. *Tetrahedron*, 60: 11205-11209.
- Yang, J. G. and Uchiyama, T. 2000. Hydroxycinnamic acids and their dimers involved in the cessation of cell elongation in *Mentha* suspension culture. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64(8): 1572–1579.
- Γαβαλάς, Ν.Α. 1978. Η ανόργανος θρέψις και η λίπανσις της ελιάς. Έκδοση Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου.
- Δροσόπουλος, Ι.Β. 1992. Η ανόργανη διατροφή των φυτών. Έκδοση Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Δροσόπουλος, Ι.Β. 1998. Φυσιολογία Φυτών ΙΙ. Έκδοση Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Κλουβάτου, Α. 2006. Διερεύνηση του φυσιολογικού ρόλου των φαινολικών συστατικών τα οποία συσσωρεύονται στην ελιά (*Olea europaea* L.) υπό συνθήκες ανεπάρκειας βορίου. Ερευνητική εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος εξειδίκευσης. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Κοντουδάκης, Μ. 2007. Παράγοντες του δευτερογενούς μεταβολισμού οι οποίοι σχετίζονται με τον εγκλιματισμό της ελιάς (*Olea europaea* L.) στην ανεπαρκή τροφοδοσία βορίου.
- Παναγόπουλος, Χ.Γ. 1997. Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων και Αμπέλου. Έκδοση Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Ποντίκης, Κ.Α. 2000. Ειδική Δενδροκομία, Ελαιοκομία. Έκδοση Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Περίληψη

Η παρουσία του βορίου, με τη μορφή του βορικού οξέος, στα κυτταρικά τοιχώματα είναι δεδομένη όπως επίσης και ο σχηματισμός διεστερικών συμπλόκων με τοιχωματικά κατάλοιπα του πηκτινικού κλάσματος. Ωστόσο, πέρα από την παραπάνω ιδιότητα το βορικό οξύ, θεωρητικά, μπορεί να σχηματίσει διεστερικούς δεσμούς με φαινολικά συστατικά, με κατάλληλη δομή, που εντοπίζονται στο κυτταρικό τοίχωμα. Στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε να τεκμηριωθεί πειραματικά η ορθότητα της παραπάνω υπόθεσης. Πιο συγκεκριμένα έγινε παρασκευαστική απομόνωση και φασματοσκοπική μελέτη των συστατικών που απελευθερώνονται μετά από υδρόλυση με το 3-νιτρο-φαινυλο-βορονικό οξύ. Επίσης έγινε μελέτη της απόσπασης των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος με διαφορετικές συνθήκες επώασης με σκοπό τη διερεύνηση της φύσης των δεσμών των συστατικών αυτών με τα πολυμερή του κυτταρικού τοιχώματος. Ειδικότερα μελετήθηκε η σύσταση των υδρολυμάτων του κυτταρικού τοιχώματος μετά από υδρόλυση με 3-νιτρο-φαινυλο-βορονικό οξύ και μετά από υδρόλυση με NaOH. Επίσης μελετήθηκε η επίδραση της τιμής του pH του μέσου επώασης στη σύσταση του υδρολύματος μετά από επώαση με 3-νιτρο-φαινυλο-βορονικό οξύ. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα υπό μελέτη συστατικά μπορούν να απελευθερωθούν μετά από το χειρισμό με 3-νιτρο-φαινυλο-βορονικό οξύ ενώ ο χειρισμός με NaOH δεν τα απελευθερώνει. Επίσης, αυξανόμενης της τιμής του pH του μέσου επώασης αυξάνεται και η συγκέντρωση ενός από τα υπό μελέτη συστατικά αλλά και του βορικού οξέος που απελευθερώνεται. Τέλος η παρασκευαστική απομόνωση και φασματική ταυτοποίηση των υπό μελέτη συστατικών έδειξε ότι παρουσιάζουν χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης φαινολικών συστατικών στην περιοχή του υπεριώδους. Επίσης τα φάσματα υπερύθρου έδειξαν την παρουσία αρωματικού δακτυλίου υποκατεστημένου με υδροξυλομάδες καθώς και την παρουσία αμινομάδας. Συμπερασματικά, τα υπό μελέτη συστατικά προσδένονται στο κυτταρικό τοίχωμα μέσω διεστερικών συμπλόκων με το βορικό οξύ. Δεδομένο που ενισχύεται από την εξειδικευμένη απομόνωσή τους με 3-νιτρο-φαινυλο-βορονικό οξύ και όχι με NaOH. Επίσης με αύξηση της τιμής του pH έχουμε αύξηση της σταθεράς σχηματισμού του 3-νιτρο-φαινυλο-βορονικού οξέος και των υπό μελέτη συστατικών. Σημαντική είναι τέλος η διαφανόμενη ύπαρξη στοιχειομετρικής σχέσης μεταξύ βορικού οξέος και ενός εκ των δύο συστατικών που απελευθερώνονται στο διάλυμα επώασης.

