

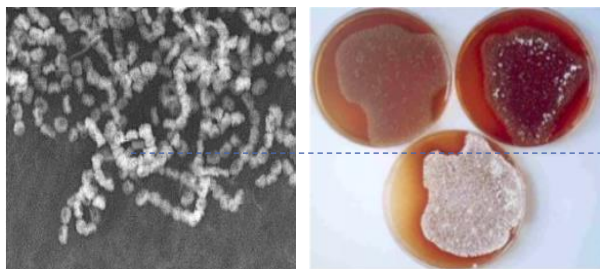


ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«Απομόνωση, Ανάπτυξη, Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών
Φυσικών Προϊόντων»

ΒΙΟΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ *STREPTOMYCES*
***SPINOVERRUCOSUS* ΚΑΙ ΤΟΥ *STREPTOMYCES CHARTREUSIS* ΓΙΑ**
ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ
ΜΕ ΑΝΤΙΓΗΡΑΝΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ



Νίκος Κατσίνας, Φαρμακοποιός

Αθήνα, Μάιος 2017

Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Φαρμακευτικής
Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα:

Απομόνωση, Ανάπτυξη, Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων

Τίτλος Εργασίας:

Βιοκατευθυνόμενη μελέτη του *Streptomyces spinoverrucosus* και του *Streptomyces chartreusis* για την απομόνωση και ταυτοποίηση βιοδραστικών μορίων με αντιγηραντική δράση

Φοιτητής:

Κατσίνας Νικόλαος
Φαρμακοποιός
Α.Μ.: 151404

Επιβλέπων Καθηγητής:

Επίκουρος Καθηγητής κ. Νικόλας Φωκιαλάκης

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Καθηγητής κ. Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης
Αναπληρωτής Καθηγητής κ. Νεκτάριος Αληγιάννης
Επίκουρος Καθηγητής κ. Νικόλας Φωκιαλάκης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του τμήματος Φαρμακευτικής Αθηνών. Οι καλλιέργειες των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκαν από το ίδρυμα ερευνών Fundació MEDINA της Ισπανίας, ενώ μέρος των βιοδοκιμών πραγματοποιήθηκε σε συνεργασία με τον Τομέα Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, του τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά:

- ❖ Τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, το Διευθυντή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Καθηγητή κ. Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νεκτάριο Αληγιάννη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλα Φωκιαλάκη, οι οποίοι δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα διπλωματική εργασία.
- ❖ Τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλα Φωκιαλάκη για την εξαιρετική συνεργασία μας, την εμπιστοσύνη και την καθοδήγηση που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια της παρούσας εργασίας, που συνετέλεσαν στην άριστη συνεργασία μας. Θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω δίμηνη πρακτική στην εταιρεία Soliance στη Γαλλία, καθώς και για το γενικότερο ενδιαφέρον και στήριξη στα επόμενα βήματα της ερευνητικής μου πορείας.
- ❖ Τον Αναπληρωτή Καθηγητή, Τρουγκάκο Ιωάννη και την ερευνητική του ομάδα, για τις βιολογικές δοκιμές σε κυτταρικές σειρές.
- ❖ Το Δρ. Νικόλαο Τσαφαντάκη για τη βοήθειά του, την υπομονή του, τη συνεχή καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας, τις πολύτιμες συμβουλές του και την άριστη συνεργασία που είχαμε.
- ❖ Τη Δρ. Ειρήνη Μπαϊρα για τη λήψη φασμάτων LC-HRMS και μάζας, για τη βοήθειά της στη διαδικασία του Dereplication και τη συμμετοχή της στη διόρθωση του συγκεκριμένου κειμένου.
- ❖ Τη Δρ. Αντιγόνη Χείλαρη, για τη βοήθειά της στη διαδικασία του Dereplication, στη διδασκαλία των λογισμικών και των βάσεων-δεδομένων.

- ❖ Το Δρ. Αποστόλη Αγγελή, για τη διδασκαλία του CPC και τη συμμετοχή του στην ταυτοποίηση των μορίων.
- ❖ Την Υποψήφια διδάκτωρ, Κατερίνα Γεωργουσάκη, για τα πρωτόκολλα εκχύλισης, τις βιολογικές δοκιμές και την καθοδήγηση και την υποστήριξή της καθ'όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.
- ❖ Την Υποψήφια διδάκτωρ, Πηνελόπη Βλάχου και την μεταπτυχιακό, Εύα Τσιοκάνου, για την άψογη συνεργασία και την στήριξη που μου παρείχαν σε καθημερινή βάση.
- ❖ Τους Αναπληρωτές Καθηγητές, Μαρίνα Κριτσανίδα και Raphaël Grougnet, οι οποίοι μου δίδαξαν την αγάπη για την έρευνα και ήταν η αφορμή για να ασχοληθώ και να αγαπήσω τη χημεία φυσικών προϊόντων.

Όλους τους προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές που απαρτίζουν το εργαστήριο, για τη βοήθειά τους και την άψογη συνεργασία μας.

Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου που πάντα με στηρίζει σε όλα μου τα βήματα και στους στενούς μου φίλους, για την υπομονή τους και την συμπαράστασή τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	10.
SUMMARY	14.
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	18.
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ, ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	20.
Πίνακες.....	20.
Εικόνες.....	22.
Γραφήματα.....	26.
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	28.
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	29.
A.1 Καλλυντικά	31.
A.1.1 Καλλυντικά με αντιγηραντική δράση	32.
A.1.2. Καλλυντικά με λευκαντική δράση	34.
A.1.3. Καλλυντικά με δράση στο πρωτεάσωμα	35.
A.2. Φυσικά προϊόντα από μικροοργανισμούς	38.
A.2.1. Δομή των βακτηρίων.....	38.
A.2.2. Φυσικά προϊόντα από βακτήρια.....	39.
A.2.3. Ταξινόμηση φυσικών προϊόντων από βακτήρια	40.
A.2.4. Καλλυντικά από βακτήρια	49.
A.3. Βακτήρια του γένους <i>Streptomyces</i>	54.
A.3.1. <i>Streptomyces spinoverrucosus</i>	61.
A.3.2. <i>Streptomyces chartreusis</i>	64.
A.4. Η μέθοδος της αντιστοίχισης (Annotation) γνωστών μεταβολιτών σε μίγματα (Dereplication).....	67.
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	68.
B.1. Παρασκευή δειγμάτων	70.
B.1.1. Πειραματικά δεδομένα από το ερευνητικό έργο Microsmetics.....	70.
B.1.2. Προετοιμασία βιομάζας και Παρασκευή του εκχυλίσματος του ακτινομύκητα <i>Streptomyces spinoverrucosus</i>	71.

B.1.3. Προετοιμασία βιομάζας και Παρασκευή του εκχυλίσματος του ακτινομύκητα <i>Streptomyces chartreusis</i>	72.
B.1.4. Εκχύλιση με υπέρηχους (UAE)	72.
B.1.5. Χρήση ρητίνης προσρόφησης	73.
B.1.6. Εκχύλιση Υγρού - Υγρού (Liquid - Liquid Extraction, L.L.E.).....	75.
B.2. Βιοδοκιμές.....	77.
B.2.1. Μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης.....	77.
B.2.2. Μελέτη λευκαντικής δράσης	79.
B.2.3. Μελέτη δράσης στο πρωτεάσωμα.....	81.
B.3. Φαρμακογνωστική μελέτη.....	82.
B.3.1. Αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Analytical TLC)	82.
B.3.2. Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Preparative-TLC)	83.
B.3.3. Χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρηση (CPC).....	84.
B.3.4. Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης ή Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)	88.
B.3.5. Ταυτοποίηση μεταβολιτών με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)	91.
B.3.6. Ταυτοποίηση μεταβολιτών με LC-HRMS/MS.....	92.
B.3.7. Αντιστοίχιση (Annotation) γνωστών μεταβολιτών σε μίγματα με LC-HRMS/MS.....	95.
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	98.
Γ.1. Βιοκατευθυνόμενη απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από τον ακτινομύκητα <i>Streptomyces spinoverrucosus</i> (CA-218259)	100.
Γ.1.1. Ποιοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων του CA-218259	100.
Γ.1.2. Χημικό προφίλ του εκχυλίσματος CA-218259_EtOH	102.
Γ.1.3. Φαρμακογνωστική μελέτη του εκχυλίσματος CA-218259_EtOH	104.
Γ.1.4. Αντιστοίχιση (Annotation) γνωστών μεταβολιτών σε μίγματα για το εκχύλισμα CA-218259_EtOH	111.
Γ.1.5. Ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών του CA-218259_EtOH	119.
Γ.1.5.1. Μεταβολίτης 1 (NKSS13)).....	119.
Γ.1.5.2. Μεταβολίτης 2 (NKSS4)	122.
Γ.1.5.3. Μεταβολίτης 3 (NKSS10)	127.

Γ.1.5.4. Μεταβολίτης 4 (NKSS11)	131.
Γ.1.5.5. Μεταβολίτης 5 (NKSS17)	135.
Γ.2. Βιοκατευθυνόμενη απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από τον ακτινομύκητα <i>Streptomyces chartreusis</i> (CA-126581)	139.
Γ.2.1. Ποιοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων του CA-126581	139.
Γ.2.2. Χημικό προφίλ του εκχυλίσματος CA-126581_Χad4-EtOH	141.
Γ.2.3. Φαρμακογνωστική μελέτη του εκχυλίσματος CA-126581_Χad4-EtOH	143.
Γ.2.4. Αντιστοίχιση (Annotation) γνωστών μεταβολιτών σε μίγματα για το εκχύλισμα CA-126581_Χad4-EtOH	148.
Γ.2.5. Ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών του CA-126581_Χad4-EtOH	152.
Γ.2.5.1. Μεταβολίτης 6 (NKSC9a)	152.
Γ.2.5.2. Μεταβολίτης 7 (NKSC12)	156.
Γ.2.5.3. Μεταβολίτης 8 (NKSC5)	161.
Γ.2.5.4. Μεταβολίτης 9 (NKSC13)	164.
Γ.2.5.5. Μεταβολίτης 10 (NKSC14)	168.
Γ.2.5.6. Μεταβολίτης 11 (NKSC4)	172.
Γ.2.5.7. Μεταβολίτης 12 (NKSC3)	177.
Γ.2.5.8. Μεταβολίτης 13 (NKSC23)	183.
Γ.2.5.9. Μεταβολίτης 14 (NKSC9b)	187.
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	192.
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	194.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το πρόγραμμα MICROSMETICS

Η παρούσα μελέτη διεξήχθη στα πλαίσια του ευρωπαϊκού προγράμματος “MICROSMETICS”, στόχος του οποίου ήταν η ανακάλυψη και η αξιοποίηση στον τομέα των καλλυντικών, καινοτόμων προϊόντων που προέρχονται από τη παγκόσμια βιοποικιλότητα, χρησιμοποιώντας σύγχρονες τεχνολογίες στους τομείς της βιοτεχνολογίας, της χημείας των φυσικών προϊόντων και της εφαρμοσμένης μικροβιολογίας.

Το συγκεκριμένο ερευνητικό πρόγραμμα περιλαμβάνει την ανακάλυψη νέων φυσικών προϊόντων προερχόμενων από την παγκόσμια μικροβιακή βιοποικιλότητα. Ήδη υπάρχουσες συλλογές καλλιεργίων μυκήτων και ακτινομυκήτων αξιοποιήθηκαν, ενσωματώνοντας σύγχρονες πλατφόρμες (*in silico* και *in vitro*) για την ορθολογική και στοχευμένη επιλογή των πιο ελπιδοφόρων στελεχών. Προηγμένες αναλυτικές προσεγγίσεις και τεχνικές εφαρμόστηκαν για την επιταχυνόμενη και αποτελεσματικότερη απομόνωση και ταυτοποίηση των βιοδραστικών μεταβολιτών. Ενσωματώθηκε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δοκιμών για την αξιολόγηση της αντιγηραντικής δράσης, και πιο συγκεκριμένα της αντιοξειδωτικής, προστατευτικής και λευκαντικής δράσης. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στην επιλογή και βελτιστοποίηση των τεχνολογιών καλλιέργειας των μικροοργανισμών σε πιλοτική κλίμακα, ώστε να είναι επιτυχής η παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα των νέων δραστικών πρώτων υλών, με σκοπό την εκμετάλλευση τους από τη βιομηχανία των καλλυντικών.

Για το σκοπό αυτό, δημιουργήθηκε ένα ακριβές λειτουργικό μοντέλο πρόβλεψης για όλες τις γνωστές καλλυντικές λειτουργίες. Επιπροσθέτως, κατασκευάστηκαν ομόλογα μοντέλα ειδικών υποδοχέων-στόχων (τυροσινάση, ελαστάση, υαλουρονιδάση και κολλαγενάση) για τις οποίες έχουν ήδη αναπτυχθεί *in vitro* δοκιμές. Πάνω από 40,000 μικροβιακοί μεταβολίτες δοκιμάστηκαν *in silico*. Συνδυάζοντας όλα τα αποτελέσματα με το λειτουργικό μοντέλο πρόβλεψης, επιλέχθηκαν 110 μικροοργανισμοί, που ενδεχομένως έχουν την δυνατότητα να παράγουν τους εν λόγω μεταβολίτες ή ανάλογα αυτών.

Ανάμεσα στους 110 μικροοργανισμούς, περιλαμβάνονται 54 μύκητες και 56 ακτινομύκητες που προέρχονται από τη παγκόσμια μικροβιακή βιοποικιλότητα (συμπεριλαμβανομένων στελεχών από Αλάσκα, Ισπανία, Νέα Καληδονία, Χαβάη, Νότια Αφρική κλπ.). Αυτά τα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικά καλλιεργητικά μέσα με σκοπό το κάθε στελεχος να παράγει δέκα διαφορετικά εκχυλίσματα και με αυτόν τον τρόπο να παραχθεί πληθώρα δευτερογενών μεταβολιτών. Συνολικά παρήχθησαν 1082 εκχυλίσματα (614 εκχυλίσματα ακτινομυκήτων και 425 εκχυλίσματα μυκήτων), τα οποία τοποθετήθηκαν σε 96-τρυπες πλάκες, ώστε να ακολουθηθεί το “high throughput screening”.

Πραγματοποιήθηκε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δοκιμών για την αξιολόγηση της αντιγηραντικής, αντιοξειδωτικής, προστατευτικής και λευκαντικής δράσης όλων των παραγόμενων παρασκευασμάτων. Για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των 1082 εκχυλισμάτων, πραγματοποιήθηκαν οι δοκιμές DPPH και ABTS. Η προστατευτική δράση στο δέρμα μελετήθηκε μετρώντας φασματοφωτομετρικά τις ανασταλτικές ιδιότητες των δειγμάτων έναντι των ενζύμων ελαστάση, κολλαγενάση και πρωτεάση. Η λευκαντική δράση αξιολογήθηκε βάσει της ικανότητας αναστολής του ενζύμου της τυροσινάσης, χρησιμοποιώντας την L-DOPA ως υπόστρωμα. Τέλος, για λόγους ασφάλειας, μελετήθηκε η κυτταροτοξικότητα των εκχυλισμάτων στις κυτταρικές σειρές A2058 (κύτταρα ανθρώπινου μελανώματος) και HepG2 (ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα καρκινώματος) με την μέθοδο MTT. Τα αποτελέσματα των παραπάνω βιοδοκιμών επέτρεψαν την τελική διαλογή των δραστικών και μη τοξικών εκχυλισμάτων.

Σε επόμενο στάδιο της μελέτης, επιλέχθηκαν τα 20 πιο δραστικά στελέχη (19 στελέχη καλλιεργούμενα με 14 διαφορετικά καλλιεργητικά μέσα) μέσω της αξιολόγησης του χημικού προφίλ των 104 εκχυλισμάτων χρησιμοποιώντας μία στρατηγική που συνδυάζει UHPLC και LC-HRMS, σε θετικό και αρνητικό ιονισμό, με στατιστικές μεθόδους πολλών μεταβλητών. Ανάμεσα σε αυτά βρίσκονταν 8 στελέχη μυκήτων και 12 στελέχη ακτινομυκήτων, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε μεγάλη κλιμακα (1L) με το βέλτιστο καλλιεργητικό μέσο. Από τα 12 στελέχη ακτινομυκήτων, τα 8 ανήκαν στο γένος *Streptomyces*. Το προφίλ των περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών μελετήθηκε με τη βοήθεια TLC, UPLC και LC-HRMS.

Πραγματοποιηθείσα εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, από τους 8 στρεπτομύκητες, οι 4 εμφάνισαν αντιοξειδωτική δράση, ενώ 2 από αυτούς εμφάνισαν δράση και στο 26S πρωτεάσωμα. Αυτά τα δύο στελέχη, τα οποία ήταν το *Streptomyces spinoverrucosus* (CA-218259) και το *Streptomyces chartreusis* (CA-126581), επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη και βιοκατευθυνόμενη απομόνωση των δευτερογενών τους μεταβολιτών, λόγω της αντιγηραντικής τους δράσης.

Τα εκχύλισματα Xad4-EtOH και EtOH του *Streptomyces spinoverrucosus* (CA-218259), καθώς και το υδραλκοολικό εκχύλισμα επεξεργασμένο με Xad4-EtOH του *Streptomyces chartreusis* (CA-126581) κατέδειξαν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση ($31.36\% \pm 0.26$ και $26,21\% \pm 0,22$ ποσοστό δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH στα 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ αντίστοιχα, για τον CA-218259 και $43.69\% \pm 1.42$ για τον CA-126581). Λόγω παρόμοιου ποσοστού αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH μεταξύ των εκχυλισμάτων Xad4-EtOH και EtOH του CA-218259, πιο πλούσιου χημικού προφίλ του εκχυλίσματος EtOH, καθώς και λόγω μεγαλύτερης ανάκτησης βιομάζας στην απευθείας εκχύλιση με EtOH, επιλέχθηκε το εκχύλισμα EtOH για την βιοκατευθυνόμενη απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών που περιέχει και στους οποίους οφείλεται η συγκεκριμένη δράση για τον *Streptomyces spinoverrucosus*, ενώ για τον *Streptomyces chartreusis* επιλέχθηκε το εκχύλισμα Xad4-EtOH. Παράλληλα, τα εκχύλισμα Xad4-EtOH του CA-126581 και EtOH του CA-

218259 κατέδειξαν και αξιόλογη λευκαντική δράση ($53.81\% \pm 0.48$ και 30.59 ± 7.20 αναστολή του ενζύμου της τυροσινάσης στα 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$, αντίστοιχα). Τέλος, κατά τον βιολογικό έλεγχο σε κυτταρικές σειρές των επιλεχθέντων εκχυλισμάτων των ακτινομυκήτων που αναφέρθηκαν, το αιθανολικό εκχύλισμα του *Streptomyces spinoverrucosus* εμφάνισε ενεργοποίηση της δραστηριότητας του 26S πρωτεασώματος, ενώ το εκχύλισμα Xad4-EtOH του *Streptomyces chartreusis* εμφάνισε αναστολή του.

Η ανάλυση και κλασμάτωση των εκχυλισμάτων αυτών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ταυτόχρονα κλασικές χρωματογραφικές μεθόδους (ημι-παρασκευαστική HPLC, παρασκευαστική TLC), καθώς και πιο καινοτόμες τεχνικές, όπως FCPC. Όλα τα παραγόμενα κλάσματα μελετήθηκαν ως προς την αντιοξειδωτική τους δράση, καθώς και για τη δράση τους στο πρωτεάσωμα και τα πιο δραστικά από αυτά επιλέχθηκαν για περαιτέρω κλασμάτωση είτε για ταυτοποίηση της δομής των μεταβολιτών που περιείχαν. Το σύνολο των φασματοσκοπικών δεδομένων (LC-HRMS και 1D & 2D NMR) καταγράφηκε για όλες τις απομονωμένες ενώσεις. Αποτέλεσμα όλων αυτών ήταν η βιοκατευθυνόμενη απομόνωση και ταυτοποίηση των κάτωθι:

- Πέντε μεταβολιτών του στελέχους CA-218259, οι οποίοι περιλαμβάνουν τις γνωστές ενώσεις (E)-ουροκανικό οξύ, Κυκλο-[Γλυκυλ-Προλίνη], Κυκλο-[Γλυκυλ-Αλανίνη], 4-μεθυλαμινοβενζοϊκό οξύ, καθώς και την L-τρυπτοφάνη, η οποία επιβεβαιώθηκε ότι αποτελεί συστατικό του θρεπτικού υλικού. Το (E)-ουροκανικό οξύ αποδείχθηκε ότι στη βιοδοκιμή σε κυτταρικές σειρές ενεργοποιεί τη δράση του 26S πρωτεασώματος.
- Εννέα μεταβολιτών του στελέχους CA-126581, οι οποίοι περιλαμβάνουν τις γνωστές ενώσεις νοκαρδαμίνη, δεφεροξαμίνη, φουταλοσίνη, δεοξυνοκαρδαμίνη, θυμιδίνη, 2'-δεοξουριδίνη, 2'-δεοξαδενοσίνη, 2'-δεοξουανοσίνη και 2'-δεοξυϊνσίνη. Για το συγκεκριμένο στέλεχος, πραγματοποιήθηκε πρώτα μια κλασμάτωση με FCPC μικρής κλίμακας (στήλη όγκου: 50mL) και 6 αντιπροσωπευτικά κλάσματα στάλθηκαν για βιοδοκιμές σε κυτταρικές σειρές, καταδεικνύοντας ένα δραστικό κλάσμα εξ'αυτών. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε μια κλασμάτωση σε μεγαλύτερη κλίμακα με FCPC (στήλη όγκου: 1000mL), από την οποία και απομονώθηκαν οι μεταβολίτες που αναφέρθηκαν. Με σύγκριση των φασμάτων HRMS σε θετικό και αρνητικό ηλεκτροψεκασμό ανάμεσα στο δραστικό κλάσμα της FCPC μικρής κλίμακας και των απομονωμένων μεταβολιτών, εικάζεται ότι ο μεταβολίτης στον οποίο οφείλεται η αναστολή του 26S πρωτεασώματος είναι η δεοξυνοκαρδαμίνη.

Αναμένεται ότι ακολουθώντας τα καλύτερα πρωτόκολλα εκχύλισης για το κάθε επιλεγμένο στέλεχος και παρόμοιες μεθόδους κλασμάτωσης, θα γίνει εφικτή η ανακάλυψη περισσότερων ικανών υποψηφίων που θα αξιοποιηθούν σε βιομηχανικό επίπεδο. Η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί μία δυνατή απόδειξη ότι η παγκόσμια μικροβιακή ποικιλότητα και οι μεταβολίτες που παράγει μπορούν να έχουν επιτυχημένες εφαρμογές στην παγκόσμια βιομηχανία καλλυντικών.

SUMMARY

The MICROSMETICS project

The present study was carried out towards an EU funded project, named “MICROSMETICS”. The aim of MICROSMETICS project was to discover and carry to the stage of development innovative products in the area of cosmeceuticals originating from global biodiversity using emerging and state of the art technologies in the field of biotechnology, natural products chemistry and applied microbiology.

More specifically, MICROSMETICS scientific concept involved the discovery of novel natural products originating from global microbial biodiversity. Already existing culture collections of fungi and actinomycetes were exploited incorporating modern high throughput platforms (*in silico* & *in vitro*) for the rational and targeted selection of the most promising strains. Advanced analytical approaches and techniques were applied for the efficient, accelerated and advantageous isolation and identification of natural constituents as well as the quality assessment of the lead products. A broad spectrum of bioassays was incorporated for the evaluation of anti-ageing, more specifically anti-oxidant, skin-protecting, and skin-whitening activity of all derived products. Attention was given to the selection and optimization of fermentation technologies used at pilot scale for the production of new active raw materials to be used in the cosmetic industry.

In order to achieve those goals, as a first step a Rational Drug Design approach has been developed. Starting from the CosIng Repository of the European Commission, an accurate functional prediction model was created for all known cosmetic functions. Additionally it was constructed the homology models of specific cosmetic target receptors (tyrosinase, elastase, hyaluronidase and collagenase) for which the appropriate *in vitro* tests have already been developed. More than 40.000 known microbial metabolites were processed through a consensus scoring prediction protocol using: a) functional prediction model b) virtual screening procedure for the above 4 selected receptors c) similarity search based on all known molecules from literature that bind to the specific receptors and d) toxicological profile filtering. Combining all the results with functional prediction model and toxicological profile filtering, 110 microorganisms were selected that can produce those metabolites or analogues.

Among them 54 fungi and 56 actinomycetes from the global biodiversity (including strains from Antarctica, Alaska, Spain, New Caledonia, Hawaii, South Africa, Comoros Island etc.) were cultivated under “nutritional arrays” (different culture conditions) in order each single strain to produce ten different extracts and thus exploit all the potential chemodiversity that microorganisms can produce. In total 1082 sample extracts (614 actinomycetous extracts & 425 fungal extracts) have been generated, then were filtered and prepared in 96 barcoded well format and were forwarded to high throughput screening.

Initially for the safety of those extracts cytotoxicity was evaluated on A2058 and HepG2 cell lines by the MTT method. The results of the above bioassays permitted the elimination of all toxic and non active extracts.

In order to select the 20 most active extracts (19 strains under 14 different fermentation media), a strategy combining UHPLC/Orbitrap-HRMS, in positive and negative modes, with multivariate statistical methods was applied. Thus, through analysis these 20 most promising extracts have been forwarded for large-scale cultivation (1L). In total, 8 fungal and 12 actinomycetous extracts were selected for further investigation. The chemical profile of those extracts was examined by using TLC, UPLC and LC-HRMS.

Work performed during the current master thesis

In the context of this work, among the 12 selected actinomycetes, the strains *Streptomyces spinoverrucosus* (CA-218259) and *Streptomyces chartreusis* (CA-126581) were selected for further study and for the bioguided isolation of their secondary metabolites. These 2 strains were chosen for their antioxidant / anti-ageing activity.

The hydralcoholic extract treated with Xad4-EtOH and the EtOH extracts of *Streptomyces spinoverrucosus* (strain CA-218259), as well as the Xad4-EtOH extract of *Streptomyces chartreusis* (strain CA-126584) have shown remarkable antioxidant activity (31.36% \pm 0.26 and 26,21% \pm 0,22 free radicals scavenging-DPPH assay respectively, for the strain CA-218259, and 43.69% \pm 1.42 for the strain CA-126581). Due to similar free radical DPPH scavenging rate between the Xad4-EtOH and EtOH extracts of the strain *Streptomyces spinoverrucosus*, enriched chemical profile of the EtOH extract and due to greater biomass recovery at the direct extraction with EtOH, the EtOH extract was selected for the isolation of its bioactive metabolites and the elucidation of their structures. The EtOH extract of CA-218259 showed also remarkable skin-whitening activity (30.59% \pm 7.20 inhibition of the tyrosinase enzyme). For the strain *Streptomyces chartreusis*, the Xad4-EtOH extract was selected, which also showed remarkable inhibition of the tyrosinase enzyme (53.81% \pm 0.48). In cell-based assays, the EtOH extract of the strain *Streptomyces spinoverrucosus* showed activation of the 26S proteasome activity, while the Xad4-EtOH extract of the strain *Streptomyces chartreusis* showed its inhibition.

The profiling and the fractionation of those extracts were performed using both classical chromatographic methods (semi-prep HPLC, preparative TLC), as well as more innovative techniques, like FCPC. All the fractions were evaluated for their antioxidant activity, as well as for their activity in the 26S proteasome, and the most active ones were chosen for further fractionation or for the direct elucidation of the structure of the metabolites they contained. The full set of spectroscopic data (LC-HRMS and 1D & 2D NMR) was recorded for all isolated compounds. During the process of the bio-guided isolation we managed to isolate and identify:

- Five metabolites of the strain CA-218259, which include the well-known compounds (E)-urocanic acid, Cyclo-[Glycyl-Prolyl], Cyclo-[Glycyl-Alanyl], 4-Methylaminobenzoic acid, as well as the L-Tryptophan (which was confirmed as a component of the fermentation media). In the cell-based assays, the (E)-urocanic acid was proved to activate the 26S proteasome activity.
- Nine metabolites of the strain CA-126581, which include the well-known compounds nocardamine, deferoxamine, futasoline, deoxynocardamine, thymidine, 2'-deoxyuridine, 2'-deoxyadenosine, 2'-deoxyguanosine and 2'-deoxyinosine. For this strain, a small scale fractionation was performed, using FCPC (Column volume: 50mL) and 6 representative fractions were forwarded for cell-based assays, proving one of them as active. Subsequently, a large scale fractionation was performed, using also FCPC (Column volume: 1000mL), isolating the nine compounds reported. By comparing the HR-MS spectras in positive and negative modes, of the active fraction (small scale FCPC) and of the isolated compounds (large scale FCPC), we assumed that deoxynocardamine is the bioactive compound.

It is anticipated that following the same extraction and fractionation protocol to other active strains we can identify more potent candidates for industrial development. This can serve as a proof of concept that microbial ingredients can have successful applications in cosmeceutical industry.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

¹³C-NMR	Carbon-13 nuclear magnetic resonance
¹H-NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
A.H.A.	Alpha hydroxyl acid
A.L.A.	Alpha lipoic acid
ATP	Adenine triphosphate
BuOH	Butanol
c-Hex	Cyclohexane
C-L	Caspase-like
COSY	Correlation Spectroscopy
CPC	Centrifugal Partition Chromatography
CPS	Counts per second
CT-L	Chymotrypsin-like
DAD	Diode Array Detector
DCM	Dichlororomethene
DMAPP	Dimethylalyl Pyrophosphate
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DOPA	dihydroxyphenylalanine
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EGT	L-ergothioneine
EMA	European Medicines Agency
ESI	Electrospray Ionization
EtOAc	Ethyl Acetate
EtOH	Ethanol
G, C	Guanine, Cytosine
GA	Gallic acid
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-CoA
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography ή High Performance Liquid Chromatography
HR-MS	High Resolution Mass Spectrometry
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IC₅₀	Inhibition Concentration
ICAM-I	Intercellular adhesion molecule-I
IPP	Isopentenyl pyrophosphate
K₂S₂O₈	Potassium persulfate
K_D	Συντελεστής κατανομής
KNN	k-Nearest neighbor algorithm
L.L.E.	Liquid-liquid extraction
LC	Liquid Chromatography
MAAs	Mycosporine-Like Amino Acids
MeOH	Methanol
MEP	2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate

MMPs	Matrix metalloproteinases
MS	Mass Spectrometry
NMR	Nuclear magnetic resonance
NRPs	Non-ribosomal peptides
PB	Potassium Buffer
PKS	Polyketide synthases
PN	Proteostasis network
rDNA	Recombinant DNA
ROS	Reactive Oxygen Species
Semi-Prep HPLC	Semi-preparative High-performance liquid chromatography
TLC	Thin-Layer Chromatography
TYR	Tyrosinase
U.S.F.D.A.	United States Food and Drug Administration
USAE	Ultrasound-assisted Extraction
UV-Vis	Ultraviolet–visible spectroscopy

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ, ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Πίνακες

α/α	Περιγραφή	Σελίδα
A.1	Αντιβακτηριακά που παράγονται από είδη του γένους <i>Streptomyces</i>	59
A.2	Αντιμυκητιακά που παράγονται από είδη του γένους <i>Streptomyces</i>	60
A.3	Δραστικές ουσίες που παράγονται από είδη του γένους <i>Streptomyces</i>	60
B.1	Λίστα καλλιεργητικών μέσων ακτινομυκήτων	70
B.2	Στοιχεία ακτινομυκήτων που επιλέχθηκαν για μελέτη	71
B.3	Συστατικά του μέσου καλλιέργειας FPY-6	71
B.4	Συστατικά του μέσου καλλιέργειας DNPM	72
B.5	Αποδόσεις εκχυλισμάτων των επιλεγθέντων στελεχών <i>Streptomyces</i>	76
B.6	Σύσταση του διφασικού συστήματος διαλυτών για τη CPC-CA-218259	85
B.7	Κλάσματα CPC-CA-218259	86
B.8	Πειραματικές συνθήκες CPC-CA-218259	87
B.9	Σύσταση του διφασικού συστήματος διαλυτών για τη CPC-CA-126581	87
B.10	Κλάσματα CPC-CA-126581	88
B.11	Πειραματικές συνθήκες CPC-CA-126581	88
B.12	Πειραματικές συνθήκες για την αναλυτική HPLC	89
B.13	Πρόγραμμα έκλυσης που χρησιμοποιήθηκε για την αναλυτική HPLC	90
B.14	Πειραματικές συνθήκες για την ημιπαρασκευαστική HPLC του κλάσματος 244-248 της CPC του εκχυλίσματος Xad4-EtOH του CA-126581	90
B.15	Πρόγραμμα έκλυσης που χρησιμοποιήθηκε για την ημιπαρασκευαστική HPLC του κλάσματος 244-248 της CPC του εκχυλίσματος Xad4-EtOH του CA-126581	91
B.16	Πειραματικές συνθήκες LC (LC-HRMS)	94
B.17	Πρόγραμμα έκλυσης που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων στο LC-HRMS/MS	94
B.18	Συνθήκες ιονισμού και θραυσμάτωσης MS/MS	94
Γ.1	Μελέτη Λευκαντικής και Αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CA-218259	101
Γ.2	Αντιοξειδωτική δράση του CA-218259_EtOH	102
Γ.3	Οι αποδόσεις της κλασμάτωσης με CPC του εκχυλίσματος EtOH του CA-218259, όπως προέκυψαν μετά τη συνένωση των παρόμοιων κλασμάτων	106
Γ.4	Αντιοξειδωτική δράση αντιπροσωπευτικών συνενωμένων κλασμάτων που προήλθαν από το CPC και την Εκχύλιση Υγρού – Υγρού	107
Γ.5	Αντιστοίχιση (annotation) γνωστών δευτερογενών μεταβολιτών του εκχυλίσματος CA-218259_EtOH, χρησιμοποιώντας ανάλυση UHPLC-	111

	HRMS με αρνητικό ηλεκτροψεκασμό. Για την αντιστοίχιση, χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων Reaxys, Dictionary of Natural Products και AntiMarin, εφαρμόζοντας απόκλιση μάζας 0.001 m/z ή 30 ppm. Στον Πίνακα αναφέρεται ο χρόνος κατακράτησης, το θεωρητικό και πειραματικό m/z , ο μοριακός τύπος, η απόκλιση μάζας, καθώς και οι κωδικοί των κλασμάτων που τα περιέχουν	
Γ.6	Αντιστοίχιση (annotation) γνωστών δευτερογενών μεταβολιτών του εκχυλίσματος CA-218259_EtOH, χρησιμοποιώντας ανάλυση UHPLC-HRMS με θετικό ηλεκτροψεκασμό. Για την αντιστοίχιση, χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων Reaxys, Dictionary of Natural Products και AntiMarin, εφαρμόζοντας απόκλιση μάζας 0.001 m/z ή 30 ppm. Στον Πίνακα αναφέρεται ο χρόνος κατακράτησης, το θεωρητικό και πειραματικό m/z , ο μοριακός τύπος, η απόκλιση μάζας, καθώς και οι κωδικοί των κλασμάτων που τα περιέχουν	113
Γ.7	Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του μεταβολίτη 1	119
Γ.8	Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του μεταβολίτη 2	122
Γ.9	Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του μεταβολίτη 3	127
Γ.10	Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του μεταβολίτη 4	131
Γ.11	Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του μεταβολίτη 5	135
Γ.12	Μελέτη Λευκαντικής και Αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CA-126581	140
Γ.13	Αντιοξειδωτική δράση του CA-126581_Xad4-EtOH	142
Γ.14	Οι αποδόσεις της κλασμάτωσης με CPC του εκχυλίσματος Xad4-EtOH του CA-126581, όπως προέκυψαν μετά τη συνένωση των παρόμοιων κλασμάτων	146
Γ.15	Αντιστοίχιση (annotation) γνωστών δευτερογενών μεταβολιτών του εκχυλίσματος CA-126581_Xad4-EtOH, χρησιμοποιώντας ανάλυση UHPLC-HRMS με αρνητικό ηλεκτροψεκασμό. Για την αντιστοίχιση, χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων Reaxys, Dictionary of Natural Products και AntiMarin, εφαρμόζοντας απόκλιση μάζας 0.001 m/z ή 30 ppm. Στον Πίνακα αναφέρεται ο χρόνος κατακράτησης, το θεωρητικό και πειραματικό m/z , ο μοριακός τύπος, η απόκλιση μάζας, καθώς και οι κωδικοί των κλασμάτων που τα περιέχουν.	148
Γ.16	Αντιστοίχιση (annotation) γνωστών δευτερογενών μεταβολιτών του εκχυλίσματος CA-126581_Xad4-EtOH, χρησιμοποιώντας ανάλυση UHPLC-HRMS με θετικό ηλεκτροψεκασμό. Για την αντιστοίχιση, χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων Reaxys, Dictionary of Natural Products και AntiMarin, εφαρμόζοντας απόκλιση μάζας 0.001 m/z ή 30 ppm. Στον Πίνακα αναφέρεται ο χρόνος	150

	κατακράτησης, το θεωρητικό και πειραματικό m/z , ο μοριακός τύπος, η απόκλιση μάζας, καθώς και οι κωδικοί των κλασμάτων που τα περιέχουν.	
Γ.17	Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του μεταβολίτη 6	152
Γ.18	Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του μεταβολίτη 7	156
Γ.19	Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του μεταβολίτη 8	161
Γ.20	Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του μεταβολίτη 9	164
Γ.21	Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του μεταβολίτη 10	168
Γ.22	Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του μεταβολίτη 11	172
Γ.23	Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του μεταβολίτη 12	177
Γ.24	Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του μεταβολίτη 13	183
Γ.25	Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του μεταβολίτη 14	187

Εικόνες

α/α	Περιγραφή	Σελίδα
A.1	Παραδείγματα σεσκιτερπενίων απομονωμένων από βακτήρια	41
A.2	Παραδείγματα διτερπενίων απομονωμένων από βακτήρια	42
A.3	Παραδείγματα τριτερπενίων απομονωμένων από βακτήρια	43
A.4	Παραδείγματα καρτενοειδών απομονωμένων από βακτήρια	44
A.5	Παραδείγματα αρωματικών πολυκετιδίων απομονωμένων από ακτινοβακτήρια	44
A.6	Παραδείγματα κινονών απομονωμένων από βακτήρια	46
A.7	Παραδείγματα αλκαλοειδών απομονωμένων από βακτήρια	47
A.8	Παραδείγματα μη ριβοσωμικών πεπτιδίων απομονωμένων από βακτήρια	48
A.9	Στέλεχος <i>Streptomyces</i> μετά από Gram χρώση	54
A.10	Κύκλος ζωής και επεκτατική ανάπτυξη των <i>Streptomyces</i>	56
A.11	Η ακανθώδης – ακροχονδρώδης μορφή της επιφάνειας των σπορίων του <i>Streptomyces spinoverrucosus</i>	62
A.12	Ενώσεις που έχουν απομονωθεί από το <i>Streptomyces spinoverrucosus</i>	63
A.13	Χημική δομή της Χατρεουσίνης (A) και Ελσαμυκίνης A (B)	65
B.1	Ποικιλομορφία των επιλεγμένων στελεχών ακτινομυκήτων	70
B.2	Χημική δομή ρητίνης XAD-4	74
B.3	Μορφή ρητίνης XAD-4 στο μικροσκόπιο	74
B.4	Μηχανισμός προσρόφησης στην ρητίνη XAD-4: φαινόμενο προσρόφησης ενός τυπικού μορίου (---o) σε ένα μεγεθυμένο τμήμα του κόκκου όπου το μόριο περιέχει ένα υδρόφοβο (---) και ένα υδρόφιλο τμήμα (o).	74
B.5	Δομή του μορίου DPPH• πριν και μετά την αντίδραση με αντιοξειδωτικό παράγοντα	77

B.6	Δομή γαλλικού οξέος	78
B.7	Μηχανισμός δράσης της τυροσινάσης	79
B.8	Δομή κοζικού οξέος	80
B.9	CAMAG TLC Visualizer για την αποτύπωση του χρωματογραφήματος ως έγχρωμης εικόνας στα 254 nm, 366 nm και το ορατό	82
B.10	Σύστημα CAMAG Linomat 5 με σύριγγα για την ομοιόμορφη εφαρμογή των δειγμάτων στις πλάκες με τη μορφή ψεκασμού	83
B.11	FCPC® Rousselet-Robatel Kromaton	85
B.12	Όργανο Φασματογράφου Bruker Ultrashield™ PLUS 600MHz	92
B.13	Όργανο LTQ Orbitrap	93
B.14	Διαδικασία που ακολουθείται ώστε να δημιουργηθεί η λίστα μαζών (Aligned peak list), που προκύπτει από την επεξεργασία των φασμάτων LC-HRMS με το λογισμικό MZmine 2.23, κατά την ταυτοποίηση γνωστών δευτερογενών μεταβολιτών σε μίγματα (Dereplication)	97
B.15	Μια νέα βιβλιοθήκη (Custom library) που έχει δημιουργηθεί από τις βάσεις-δεδομένων AntiMarin, Dictionary of Natural Products και Reaxys, εισάγεται στο λογισμικό MZmine και γίνεται αντιστοίχιση με τη λίστα μαζών (Aligned peak list) που δημιουργήθηκε από την επεξεργασία των φασμάτων LC-HRMS, κατά τη διαδικασία της ταυτοποίησης γνωστών δευτερογενών μεταβολιτών σε μίγματα (Dereplication)	97
Γ.1	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc, EtOH/H ₂ O και EtOH του CA-218259	100
Γ.2	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H ₂ O και Χαδ4 του CA-218259 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.	101
Γ.3	Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του EtOH εκχυλίσματος του CA-218259	102
Γ.4	TLC του CA-218259_EtOH στα 254, 366 nm και στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με αντιδραστήριο θειικής βανιλίνης. Ανάπτυξη στην οργανική φάση του διφασικού συστήματος CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O: 13/9/3	103
Γ.5	Χρωματογράφημα HPLC (254nm) του CA-218259_EtOH εκχυλίσματος	103
Γ.6	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Σύστημα διαλυτών: οργανική φάση του συστήματος CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O:13/9/3. Στη χρωματογραφία παρουσιάζονται τα συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από τη CPC, καθώς και το εκχύλισμα CA-218259_EtOH που υποβλήθηκε σε αυτή την κλασμάτωση	104
Γ.7	Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του συνενωμένου κλάσματος (35-37) της CPC του εκχυλίσματος EtOH του CA-218259	108

Γ.8	Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του συνενωμένου κλάσματος (59-64) της CPC του εκχυλίσματος EtOH του CA-218259	109
Γ.9	Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του συνενωμένου κλάσματος (71-80) της CPC του εκχυλίσματος EtOH του CA-218259	109
Γ.10	Δομή (E)-ουροκανικού οξέος (Μεταβολίτης 1)	119
Γ.11	Φάσμα ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 1	120
Γ.12	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 1	120
Γ.13	Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 1	121
Γ.14	Δομή L-τροπτοφάνης (Μεταβολίτης 2)	122
Γ.15	Φάσμα ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 2	123
Γ.16	Αρωματική περιοχή φάσματος ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 2	124
Γ.17	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 2	125
Γ.18	Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 2	125
Γ.19	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 2	126
Γ.20	Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 2	126
Γ.21	Δομή Κυκλο-[Γλυκυλ-Προλίνης] (Μεταβολίτης 3)	127
Γ.22	Φάσμα ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 3	128
Γ.23	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 3	129
Γ.24	Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 3	129
Γ.25	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 3	130
Γ.26	Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 3	130
Γ.27	Δομή Κυκλο-[Γλυκυλ-Αλανίνης] (Μεταβολίτης 4)	131
Γ.28	Φάσμα ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 4	132
Γ.29	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 4	133
Γ.30	Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 4	133
Γ.31	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 4	134
Γ.32	Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 4	134
Γ.33	Δομή 4-μεθυλαμινοβενζοϊκού οξέος (Μεταβολίτης 5)	135
Γ.34	Φάσμα ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 5	136
Γ.35	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 5	137
Γ.36	Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 5	137
Γ.37	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 5	138
Γ.38	Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 5	138
Γ.39	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc και EtOH/H ₂ O του CA-126581	139
Γ.40	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H ₂ O και Xad4 του CA-126581 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης	140
Γ.41	Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος Xad4-EtOH του CA-126581	141
Γ.42	TLC του CA-126581_Xad4-EtOH στα 254, 366 nm και στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με αντιδραστήριο θειϊκής βανιλίνης. Ανάπτυξη στην οργανική φάση του διφασικού συστήματος CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O: 13/9/3	142

Γ.43	Χρωματογράφημα HPLC (254nm) του εκχυλίσματος CA-126581_Χad4-EtOH	143
Γ.44	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Σύστημα διαλυτών: οργανική φάση του συστήματος CHCl ₃ /ΜΕΟΗ/Η ₂ Ο:13/9/3. Στη χρωματογραφία παρουσιάζονται τα συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από τη CPC μεγάλης κλίμακας, καθώς και το εκχύλισμα CA-126581_Χad4-EtOH που υποβλήθηκε σε αυτή την κλασμάτωση	145
Γ.45	Χρωματογράφημα ημι-παρασκευαστικής HPLC (232nm) του CA-126581_Χad4-EtOH εκχυλίσματος	147
Γ.46	Δομή Θυμιδίνης (Μεταβολίτης 6)	152
Γ.47	Φάσμα ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 6	153
Γ.48	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 6	154
Γ.49	Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 6	154
Γ.50	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 6	155
Γ.51	Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 6	155
Γ.52	Δομή 2'-Δεοξουριδίνης (Μεταβολίτης 7)	156
Γ.53	Φάσμα ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 7	157
Γ.54	Αρωματική περιοχή φάσματος ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 7	158
Γ.55	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 7	1591
Γ.56	Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 7	159
Γ.57	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 7	160
Γ.58	Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 7	160
Γ.59	Δομή 2'-Δεοξυαδενοσίνης (Μεταβολίτης 8)	161
Γ.60	Φάσμα ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 8	162
Γ.61	Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 8	163
Γ.62	Δομή 2'-Δεοξυουανοσίνης (Μεταβολίτης 9)	164
Γ.63	Φάσμα ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 9	165
Γ.64	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 9	166
Γ.65	Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 9	166
Γ.66	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 9	167
Γ.67	Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 9	167
Γ.68	Δομή 2'-Δεοξυϊνοσίνης (Μεταβολίτης 10)	168
Γ.69	Φάσμα ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 10	169
Γ.70	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 10	170
Γ.71	Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 10	170
Γ.72	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 10	171
Γ.73	Φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS για τον Μεταβολίτη 10	171
Γ.74	Δομή Φουταλοσίνης (Μεταβολίτης 11)	172
Γ.75	Φάσμα ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 11	173
Γ.76	Αρωματική περιοχή φάσματος ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 11	174
Γ.77	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 11	175
Γ.78	Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 11	175
Γ.79	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 11	176

Γ.80	Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 11	176
Γ.81	Δομή Δεφεροξαμίνης (Μεταβολίτης 12)	177
Γ.82	Φάσμα ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 12	178
Γ.83	Φάσμα ¹ H NMR. Τα 6-H και 17/28-H του Μεταβολίτη 12	179
Γ.84	Απόδοση των 2-H, 3-H, 4-H, 5-H και 6-H στο φάσμα ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 12	180
Γ.85	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 12	181
Γ.86	Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 12	181
Γ.87	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 12	182
Γ.88	Φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS για τον Μεταβολίτη 12	182
Γ.89	Δομή Νοκαρδαμίνης (Μεταβολίτης 13)	183
Γ.90	Φάσμα ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 13	184
Γ.91	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 13	185
Γ.92	Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 13	185
Γ.93	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 13	186
Γ.94	Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 13	186
Γ.95	Δομή Δεοξυνοκαρδαμίνης (Μεταβολίτης 14)	187
Γ.96	Φάσμα ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 14	188
Γ.97	Η τριπλή κορυφή των 2/24-H (J= 6.25 Hz) συμπίπτει με την απλή κορυφή των 13/14-H στα 2.47 ppm στο φάσμα ¹ H NMR για τον Μεταβολίτη 14	189
Γ.98	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 14	190
Γ.99	Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 14	190
Γ.100	Φάσμα HSBC για τον Μεταβολίτη 14	191
Γ.101	Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 14	191

Γραφήματα

α/α	Περιγραφή	Σελίδα
Γ.1	Μελέτη δράσης του εκχυλίσματος EtOH από το στέλεχος CA-218259, στη δραστηριότητα του πρωτεασώματος σε δύο κυτταρικές σειρές (CT-L/LLVY και C-L/LLE)	101
Γ.2	Μελέτη ενεργοποίησης της δραστηριότητας του 26S πρωτεασώματος από αντιπροσωπευτικά συνενωμένα κλάσματα του εκχυλίσματος CA-218259_EtOH που προήλθαν από το CPC και την Εκχύλιση Υγρού – Υγρού, στην κυτταρική σειρά CT-L/LLVY	107
Γ.3	Μελέτη ενεργοποίησης της δραστηριότητας του 26S πρωτεασώματος για τον Μεταβολίτη 1 (NKSS13) που απομονώθηκε από το εκχύλισμα CA-218259_EtOH, στην κυτταρική σειρά CT-L/LLVY	110
Γ.4	Μελέτη δράσης του εκχυλίσματος Xad4-EtOH από το στέλεχος CA-126581, στη δραστηριότητα του πρωτεασώματος σε δύο κυτταρικές σειρές (CT-L/LLVY και C-L/LLE)	140

Γ.5	Μελέτη αναστολής της δραστηριότητας του 26 S πρωτεασώματος από αντιπροσωπευτικά συνενωμένα κλάσματα του εκχυλίσματος CA-126581_Χad4-EtOH, που προήλθαν από την πρώτη δοκιμαστική CPC, στην κυτταρική σειρά CT-L/LLVY.	144
------------	---	-----

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η βιοκατευθυνόμενη μελέτη μικροοργανισμών του γένους *Streptomyces*, με στόχο την απομόνωση και ταυτοποίηση βιοδραστικών μορίων με αντιγηραντική δράση.

Πιο συγκεκριμένα,

1. Από τα 12 πιο δραστικά στελέχη ακτινομυκήτων, επιλέχθηκαν σαν πρωταρχικοί οι κάτωθι στόχοι:
 - Αντιοξειδωτική δράση
 - Δράση στο 26S πρωτεάσωμα
2. Η τελική επιλογή δύο εκχυλισμάτων, με αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση και εκ των οποίων, το ένα θα έχει επιδείξει σημαντική επαγωγή της δραστηριότητας του 26S πρωτεασώματος και το άλλο σημαντική αναστολή του.
3. Η λεπτομερής μελέτη των δύο πιο βιοδραστικών εκχυλισμάτων και η βιοκατευθυνόμενη απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών τους, με τελικό στόχο την ταυτοποίηση των βιοδραστικών μορίων.

Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A1. Καλλυντικά

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Οδηγία ΟΔ 76/768/ΕΟΚ, της 27^{ης} Ιουλίου 1976, ως όρος «καλλυντικό προϊόν» νοείται κάθε ουσία ή μείγμα που προορίζεται να έλθει σε επαφή με τα εξωτερικά μέρη του ανθρώπινου σώματος (επιδερμίδα, τριχωτά μέρη του σώματος και της κεφαλής, τα νύχια, τα χείλη και τα εξωτερικά γεννητικά όργανα) ή με τα δόντια και τους βλεννογόνους της στοματικής κοιλότητας, με αποκλειστικό ή κύριο σκοπό τον καθαρισμό τους, τον αρωματισμό τους, τη μεταβολή της εμφάνισής τους, την προστασία τους, τη διατήρησή τους σε καλή κατάσταση ή τη διόρθωση των σωματικών οσμών (άρθρο 2 του Κανονισμού). Αρκετά χρόνια αργότερα μάλιστα, το 2013, η οδηγία αυτή μετατράπηκε στον Κανονισμό 1223/2009, έχοντας πλέον ισχύ νόμου.

Μια διαφορετική ερμηνεία του όρου «καλλυντικό προϊόν» δόθηκε από τον Albert Kligman, το 1984, κατά τη διάρκεια του επιστημονικού συνεδρίου της Ένωσης Χημικών Καλλυντικών. Σύμφωνα με αυτόν, κάθε τοπικώς εφαρμοζόμενο προϊόν, ικανό να προκαλεί μετατροπές της κατάστασης του δέρματος, εντάσσεται σε αυτόν τον όρο. Κάθε τέτοιο όμως προϊόν, σύμφωνα με τον Kligman, δεν θεωρείται ούτε καλλυντικό ούτε φάρμακο, αλλά του αποδίδει έναν νέο όρο, «cosmeceutical» (Anunciato, T. P., et al., 2012 ; Kligman, A. M., 2005).

Ο όρος Cosmeceutical προκύπτει από τη σύντμηση των όρων cosmetics (καλλυντικά προϊόντα) και pharmaceutical (φάρμακα που προορίζονται για διάγνωση, θεραπεία ή πρόληψη μιας ασθένειας). Πρόκειται δηλαδή για καλλυντικά προϊόντα με δράση παρόμοια αυτής των φαρμάκων, λόγω των βιοδραστικών μορίων που μπορεί να περιέχουν (Fulekar, M. H., 2010). Είναι η γέφυρα μεταξύ των προϊόντων ατομικής φροντίδας και των φαρμάκων, έχοντας δημιουργηθεί και αναπτυχθεί ταυτόχρονα τόσο για τις κοσμητολογικές, όσο και για τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες (Dureja, H., et al., 2005). Στην Ευρώπη και τις Ηνωμένες Πολιτείες διαφημίζονται ως απλά cosmetics, ενώ στην Ιαπωνία προβάλλονται ως μια νέα κατηγορία προϊόντων που ενώ ομοιάζουν σε δράση με τα φάρμακα, πωλούνται απευθείας στον καταναλωτή (Draeos, Z. D., 2011).

Τα βιοδραστικά μόρια που μπορεί να περιέχουν αυτά τα προϊόντα «υβρίδιο» φαρμάκου και καλλυντικού, αποτελούν αντικείμενο έρευνας από εταιρείες φαρμάκων, καλλυντικών, φυσικών προϊόντων και βιοτεχνολογίας ταυτοχρόνως. Η επιστημονική πρόοδος μάλιστα στο πεδίο της βιολογίας και της φυσιολογίας του δέρματος, επιτάχυνε την ανάπτυξη νέων βιοδραστικών μορίων από πλευράς των εταιρειών καλλυντικών (Doolley, T.P., 1997). Πηγές βιοδραστικών μορίων μπορεί να αποτελούν τα ζώα, τα φυτά, τα ιχνοστοιχεία, ή συνθετικά ανάλογα, καθώς και τα βακτήρια, οι μύκητες και άλλοι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί (Erstein, H., 2009). Πολλά είναι τα βιοδραστικά μόρια προερχόμενα από φυσικές πηγές, που συμμετέχουν σε προϊόντα cosmeceuticals. Για παράδειγμα, τα φλαβονοειδή από τα αποξηραμένα άνθη της *Arnica montana* (οικ. Asteraceae) χρησιμοποιούνται τοπικά για διαστρέμματα και μώλωπες κ.α. (Abourashed A. E. & Ikhlas, K. A., 2010)

Τα *cosmeceuticals* μπορεί να προορίζονται για τη φροντίδα είτε των μαλλιών και των νυχιών είτε του δέρματος. Προϊόντα προσαρμοσμένα σε προβλήματα των μαλλιών και του τριχωτού της κεφαλής (π.χ. λιπαρότητα μαλλιών, ανδρογενετική αλωπεκία κ.α.), αλλά και προϊόντα αντιγήρανσης, λευκαντικά, αντιηλιακά, ενυδατικά κ.α. Ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι αντιηλιακά φίλτρα, βιταμίνες, εκχυλίσματα φυτών, αντιοξειδωτικές ουσίες, ρετινοϊδή, λευκαντικοί παράγοντες, ανόργανες ουσίες, τερπένια, φυτοοιστρογόνα, εκχυλίσματα μανιταριών κ.α. (Dureja, H., et al., 2005)

Τα *cosmeceuticals* έχουν γίνει πλέον το ταχύτερα αναπτυσσόμενο τμήμα στη βιομηχανία προσωπικής φροντίδας. Από αυτά, τα προϊόντα περιποίησης δέρματος καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο κομμάτι της αγοράς της Ευρώπης και της Αμερικής (80%). Επίσης, φαίνεται πως εναλλακτικοί μέθοδοι εφαρμογής κερδίζουν έδαφος όλο και περισσότερο, εξαιτίας του υψηλού ανταγωνισμού στην αγορά των καλλυντικών, όπως π.χ. laser και ενέσιμα, ενώ ο ανταγωνισμός μεταξύ των εταιρειών καλλυντικών αυξάνεται όλο και περισσότερο εξαιτίας της εισόδου εταιρειών φυσικών προϊόντων στην αγορά, καθώς και του *commoditization* καινοτόμων συστατικών και προϊόντων (Brandt, F. S., et al., 2011).

Παρ' όλ' αυτά, ο όρος *cosmeceutical* εξακολουθεί να είναι αμφιλεγόμενος, για πολλούς ευρωπαίους συγγραφείς (Anunciato, T. P., et al., 2012). Χρησιμοποιείται ευρέως στη διαφήμιση καλλυντικών, που όμως μπορεί να καταλήξει παραπλανητικός για τους περισσότερους καταναλωτές. Δεδομένου ότι οι καταναλωτές είναι πρόθυμοι να πληρώσουν περισσότερο για προϊόντα που αντιλαμβάνονται ως «υψηλής απόδοσης», μπορεί να μεταφράσουν ένα *cosmeceutical* ως όμοιο φαρμακευτικού προϊόντος, θεωρώντας ότι έχει υποβληθεί στους ίδιους ελέγχους αποτελεσματικότητας και ποιότητας ελέγχου που απαιτούνται για το φαρμακευτικό προϊόν (Erstein, H., 2009). Μάλιστα, σύμφωνα με τον U.S.F.D.A. (United States Food and Drug Administration), δεν αναγνωρίζεται καμία κατηγορία προϊόντων ως *cosmeceuticals*. Ένα προϊόν μπορεί να είναι φάρμακο, καλλυντικό ή συνδυασμός και των δύο, ο όρος όμως *cosmeceutical* δεν έχει καμία έννοια σύμφωνα με τον νόμο. Φαίνεται πως μελλοντικά θα ακολουθήσουν αυστηρότερες νομοθεσίες με στόχο να διασαφηνιστεί περισσότερο η διάκριση μεταξύ φαρμάκου και καλλυντικού. (U. S. Food and Drug Administration, 2012)

A1.1. Καλλυντικά με αντιγηραντική δράση

Η γήρανση προκαλεί μια σειρά αλλαγών στο πρόσωπο, ξεκινώντας από την παιδική ηλικία όπου το στρογγυλεμένο περίγραμμα μετατρέπεται σε γωνιώδες με ολοκληρωμένα χαρακτηριστικά, διαχωρίζοντας τον έφηβο από το παιδί. Αυτές οι αλλαγές οφείλονται σε μετατροπές του δέρματος, των οστών και των μαλακών ιστών. Ανάλογες μεταβολές συνεχίζονται καθ' όλες τις δεκαετίες του ατόμου, έως και την τρίτη ηλικία (Ramos-e-Silva, M., et al., 2013).

Υπάρχουν δύο είδη γήρανσης: η ενδογενής, αποκαλούμενη και ως πραγματική ή χρονολογική, και η εξωγενής. Η ενδογενής γήρανση οφείλεται σε ατομικούς γενετικούς παράγοντες, και πιο

συγκεκριμένα σε τελομερή του DNA. Όταν αυτά μένουν ανέπαφα, παρατείνεται ο κύκλος ζωής του κυττάρου. Όταν όμως υπερεκφράζονται, κάτι που συμβαίνει κατά τη γήρανση, τείνουν να συμπυκνωθούν. Αυτή η διαδικασία επιδιορθώνεται από το ένζυμο τελομεράση. Θα μπορούσαμε να κλειδώσουμε τη δράση της τελομεράσης για να πετύχουμε ενδογενή αντιγήρανση, αυτό όμως ίσως οδηγούσε σε καρκινογένεση. Παράγοντες που επηρεάζουν την ενδογενή γήρανση είναι η εθνικότητα, που συνδέεται με τη φωτογήρανση και τον αποχρωματισμό του δέρματος, οι ορμονολογικές μεταβολές, που επηρεάζουν τη σύνθεση κολλαγόνου, υαλουρονικού οξέος και την κατακράτηση νερού από το κύτταρο, και οι ανατομικές διαφοροποιήσεις, δεδομένου ότι στα σημεία του προσώπου με λεπτότερο δέρμα (π.χ. τα μάτια), η γήρανση είναι πιο έντονη. Δυστυχώς ακόμη δεν έχει βρεθεί καμία συστηματική ή τοπική θεραπεία για τον συγκεκριμένο τύπο γήρανσης (Ramos-e-Silva, M., et al., 2013).

Η εξωγενής γήρανση οφείλεται σε ελεγχόμενους παράγοντες και εμφανίζεται με διαφορετική ένταση ανά άτομο. Παράγοντες όπως: ηλιακή ακτινοβολία, ακραίες καιρικές συνθήκες, κάπνισμα, βαρύτητα, καθώς επίσης και ο τρόπος ζωής (διατροφή, ύπνος και κατάσταση της υγείας) συνδέονται με αυτόν τον τύπο γήρανσης (Ramos-e-Silva, M., et al., 2013). Η εξωγενής γήρανση που προκαλείται από την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία αποκαλείται και φωτογήρανση. Οι εξωγενείς παράγοντες γήρανσης δρουν συνεργιστικά με τους ενδογενείς και έτσι προκαλείται πρόωρη γήρανση του δέρματος (Wulf, H. C., et al., 2004).

Οι σύγχρονοι τρόποι αντιμετώπισης της γήρανσης συνοψίζονται σε 3 ομάδες (Rabe, J. H., 2006):

1. Πρόληψη της φωτογήρανσης με φυσικά ή χημικά αντιηλιακά φίλτρα. Βεβαίως αυτό πρέπει να συνδυάζεται και με μία συνειδητή συμπεριφορά όσον αφορά την έκθεση στον ήλιο.
2. Χρησιμοποίηση σκευασμάτων με δραστικές ουσίες που στόχο έχουν τη μείωση ή την αναβολή των συμπτωμάτων – σημείων γήρανσης.
3. Όταν εκδηλωθεί μια πιο σοβαρή μορφή γήρανσης, απαιτούνται πιο διεισδυτικές μέθοδοι, όπως laser, ενέσιμα, χημική απολέπιση με υψηλή συγκέντρωση οξέων κ.α.

Δραστικές ουσίες που εντάσσονται στον δεύτερο τρόπο αντιμετώπισης της γήρανσης και χρησιμοποιούνται ευρέως στα καλλυντικά προϊόντα σήμερα είναι τα ρετινοειδή, όπως ρετινόλη (Βιταμίνη Α), ρετινοϊκό οξύ και ρετιναλδεΐδη, τα οποία δρουν στην επιδερμίδα, μειώνοντας τη διάχυση των μελανοσωμάτων, ομαλοποιώντας τον κύκλο ζωής των κερατινοκυττάρων και μειώνοντας την κερατινοκυτταρική ατυπία. Χρησιμοποιούνται επίσης τα α-υδρόξυ οξέα (Α.Η.Α.), όπως το γλυκολικό, το κιτρικό, το λακτικό οξύ κ.α., των οποίων ο μηχανισμός δράσης ακόμα δεν έχει αποδειχθεί, ενώ γίνεται πολύ συχνά χρήση ενυδατικών ουσιών, πεπτιδίων, αντιηλιακών φίλτρων, καθώς και θεραπεία αναπλήρωσης ορμονών (Ramos-e-Silva, M., et al., 2013).

Το 1956, ο D. Harman ανέπτυξε τη θεωρία των ελεύθερων ριζών σύμφωνα με την οποία οι ενεργές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Reactive oxygen species-ROS) αθροίζονται με το χρόνο

προκαλώντας τη δυσλειτουργία των κυττάρων, των ιστών και του οργανισμού και τελικά οδηγώντας στο θάνατο, αφού έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν κυτταρικές βλάβες. Οι ενεργές ελεύθερες ρίζες οξυγόνου είναι αναπόφευκτα, φυσικά υποπροϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού και αποτελούν μόρια σε πολύ ασταθή μορφή διότι περιέχουν ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους στοιβάδα κι έτσι έχουν την τάση να προσλαμβάνουν ένα ηλεκτρόνιο από γειτονικά τους μόρια αφήνοντας έτσι αυτά σε ασταθή μορφή. Είκοσι χρόνια αργότερα, ο Harman έδειξε ότι η κύρια πηγή των ROS είναι το μιτοχόνδριο, το οποίο συμβάλλει στη συσσώρευση οξειδωτικού στρες με την εκροή της ρίζας του σουπεροξειδίου ($O_2\cdot^-$). Το οξειδωτικό στρες αποτελεί μια ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής και εκδήλωσης των ενεργών ελεύθερων ριζών οξυγόνου και της ικανότητας ενός βιολογικού συστήματος να αποτοξινώνει εύκολα τα ενεργά ενδιάμεσα ή να επιδιορθώνει τη βλάβη που αυτά προκαλούν (Harman, D.,1981; Medvedev, A.Z.,1990). Πάνω σε αυτή τη θεωρία, πολλά αντιοξειδωτικά, όπως το αλιποϊκό οξύ (A.L.A.), η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ), οι α-τοκοφερόλες (βιταμίνη E), η ουμπικινόνη (Q10) κ.α., ενσωματώνονται σε αντι-γηραντικά cosmetics, τα οποία μειώνουν τη βλάβη που προκαλείται από τις ελεύθερες ρίζες στα κύτταρα, δεσμεύοντάς τες (Ramos-e-Silva, M., et al., 2013).

Η θεωρία των ελεύθερων ριζών και το μονοπάτι της πρωτεασωμικής αποικοδόμησης των πρωτεϊνών μέσω ουβικιτίνης (βλ. Παράγραφο A.1.3) συμπεριλαμβάνονται στις στοχαστικές θεωρίες της γήρανσης (Harman, D.,1981; Medvedev, A.Z.,1990).

A.1.2. Καλλυντικά με λευκαντική δράση

Η μελανίνη είναι ένα πολυμερές που ανήκει σε μια οικογένεια χρωστικών που παράγονται από μια μεγάλη ποικιλία οργανισμών, ανάμεσά τους και στον άνθρωπο, και είναι υπεύθυνη για το σκούρο χρώμα του δέρματος μετά από έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία, καθώς και για την αμαύρωση στα φυτά. Υπάρχουν τρεις βασικοί τύποι μελανίνης: η ευμελανίνη (μαύρη - καφέ), η φαιομελανίνη (κίτρινη - κόκκινη) και η νευρομελανίνη (άχρωμη). Παράγεται στα μελανοκύτταρα, εξειδικευμένα κύτταρα που βρίσκονται στη βασική στιβάδα της επιδερμίδας. Βιοσυνθετικά, προέρχεται από το αμινοξύ τυροσίνη, μια μετατροπή που καταλύεται από το ένζυμο τυροσινάση (Cabanes, J., et al., 1994).

Η τυροσινάση (ή αλλιώς πολυφαινολοξειδάση) είναι μια διλειτουργική πρωτεΐνη – σύμπλοκο χαλκού. Στο ενεργό της κέντρο έχει τρεις διαφορετικές μορφές δισθενούς χαλκού που εμπλέκονται στις αντιδράσεις. Το ένζυμο καταλύει δύο διαφορετικές αντιδράσεις: τη δραστηριότητα της κρεσολάσης, ή αλλιώς την υδροξυλίωση των μονοφαινολών προς ο-διφαινόλες, και την δραστηριότητα της κατεχολάσης, ή αλλιώς την οξείδωση της ο-διφαινόλης προς ο-κινόνη (Cabanes, J., et al., 1994). Πιο συγκεκριμένα, μετατρέπει την τυροσίνη σε διυδροξυφαινολαλανίνη (DOPA), στη συνέχεια σε ντοπακινόνη, την οποία οξειδώνει προς

ντοπαχρώμη (dopachrome) και τελικά σε διϋδροξυϊνδολο-2-καρβοξυλικό οξύ. Έτσι, σχηματίζεται η ευμελανίνη (μαύρη-καφέ χρωστική ουσία). Αν η ντοπακινόνη μετατραπεί σε κυστεϊνυλική DOPA ή γλουταθειόνη DOPA, τότε μετατρέπεται σε φαιομελανίνη (κιτρινο-κόκκινη χρωστική ουσία) (Gao, X. H., et al., 2008).

Το κοζικό οξύ (5-υδροξυ-2-υδροξυμεθυλ-4Η-πυραν-4-όνη) είναι ένα αντιβιοτικό που παράγεται υπό αερόβιες συνθήκες από πολλά είδη *Aspergillus* και *Penicillium*, από ένα ευρύ φάσμα πηγών άνθρακα (Lee, et. a1., 1986; Kwak & Rhee, 1992). Παράγεται περισσότερο από τον μύκητα *Aspergillus oryzae*, ο οποίος έχει την κοινή ιαπωνική ονομασία koji. Είναι υποπροϊόν της διαδικασίας ζύμωσης του ρυζιού, και χρησιμοποιείται στην παραγωγή sake, ένα ιαπωνικό κρασί από ρύζι (Bjerrum, J., et al., 1958; Bentley, R., 2006). Έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως καλλυντικός παράγοντας με εξαιρετικό λευκαντικό αποτέλεσμα (Obara, et. a1., 1985; Ohgama, 1990), επειδή αναστέλλει το ένζυμο τυροσινάση (Saruno, et. a1., 1979 ; Chen, et. a1., 1991a, b).

A.1.3 Καλλυντικά με δράση στο πρωτεάσωμα

Το πρωτεάσωμα είναι ένα πολύ μεγάλο πρωτεϊνικό σύμπλεγμα, αποτελούμενο από πολλές υπομονάδες. Είναι ένας ενδοκυττάριος ρυθμιστής αποδόμησης πρωτεϊνών. Έχει τρεις βασικές υπομονάδες – σύμπλοκα. Η κύρια πρωτεολυτική δράση του γίνεται από το σύμπλοκο 20S, ενώ η κύρια ρυθμιστική του δράση από δύο σύμπλοκα, που ονομάζονται 19S. Μαζί συγκροτούν το 26S πρωτεάσωμα. Οι 19S ρυθμιστικές υπομονάδες του πρωτεασώματος φαίνεται να αναγνωρίζουν τις πρωτεΐνες που προορίζονται για αποδόμηση, κάτι που συμβαίνει με πολλαπλή επισήμανση αυτών με μια πρωτεΐνη που ονομάζεται ουμπικιτίνη. Πιο συγκεκριμένα, μια αλυσίδα μορίων ουμπικιτίνης συνδέεται στην επιφάνεια της προς αποδόμηση πρωτεΐνης, έχοντας δράση πεπτιδικού σήματος (Μαργαρίτης, Λ. Χ., et al., 2010).

Ο κύριος ρόλος επομένως του πρωτεασώματος είναι να αποικοδομεί αχρείαστες ή κατεστραμμένες πρωτεΐνες με πρωτεόλυση, μια χημική αντίδραση που διασπά πεπτιδικούς δεσμούς. Τα ένζυμα που βοηθούν τέτοιες αντιδράσεις ονομάζονται πρωτεάσες. Τα πρωτεασώματα είναι κομμάτι του κύριου μηχανισμού, με τον οποίο τα κύτταρα ρυθμίζουν την συγκέντρωση συγκεκριμένων πρωτεϊνών και αποικοδομούν ανώμαλα αναδιπλωμένες πρωτεΐνες (Lodish, H., et al., 2004).

Η οδός αποδόμησης από το πρωτεάσωμα είναι απαραίτητη για πολλές κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένου και του κυτταρικού κύκλου – και πιο συγκεκριμένα της απόπτωσης των κυττάρων (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος), την ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, και τις αποκρίσεις στο οξειδωτικό στρες. Η σημασία της πρωτεολυτικής διάσπασης στο εσωτερικό των κυττάρων και ο ρόλος της ουμπικιτίνης σε πρωτεολυτικά μονοπάτια αναγνωρίστηκε με την απονομή του Βραβείου Νόμπελ Χημείας το 2004 στον Aaron Ciechanover, Avram Hershko και Irwin Rose. (Nobel Prize Committee (2004). Nobel Prize Awardees in Chemistry, 2004. Retrieved 2006-12-11)

Η αναστολή της δραστηριότητας του πρωτεασώματος έχει διαφορετικά αποτελέσματα στην επαγωγή της απόπτωσης για τους διάφορους κυτταρικούς τύπους. Γενικά, η παρουσία του πρωτεασώματος δεν απαιτείται για τη διαδικασία της απόπτωσης, παρ' όλ' αυτά η αναστολή του φαίνεται να έχει προ-αποπτωτικά αποτελέσματα για τους περισσότερους κυτταρικούς τύπους που έχουν μελετηθεί. Η διαδικασία της απόπτωσης των κυττάρων επιτυγχάνεται μέσω διατάραξης της προγραμματισμένης αποικοδόμησης των ανώριμων ακόμα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο. Οι αναστολές του πρωτεασώματος έχουν αποτελεσματική αντικαρκινική δράση σε κυτταρικές καλλιέργειες, διαταράσσοντας αυτή την αποικοδόμηση (Adams, J., et al., 1999). Σε κάποιες κυτταρικές σειρές, από την άλλη, π.χ. θυμοκύτταρα, νευρώνες κ.α., εμποδίζεται η απόπτωσή τους, μετά από έκθεση σε αναστολές πρωτεασώματος. Ο μηχανισμός δράσης ακόμα δεν έχει αποδειχθεί, όμως θεωρείται ότι είναι εξειδικευμένος για κύτταρα σε κατάσταση ηρεμίας ή διαφοροποιημένα κύτταρα (Orlowski, R. Z. 1999).

Η ικανότητα των αναστολέων του πρωτεασώματος να επάγουν την απόπτωση σε ταχέως διαιρούμενα κύτταρα έχει εφαρμοστεί σε πληθώρα χημειοθεραπευτικών φαρμάκων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το Σαλινοσποραμίδιο Α, το οποίο αποτελεί ένα φυσικό προϊόν που απομονώθηκε για πρώτη φορά από τα θαλάσσια βακτήρια *Salinospora tropica* και *Salinospora arenicola*. Εισήχθη στη φάση Ι των κλινικών δοκιμών για τη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος, μόλις 3 χρόνια από την ανακάλυψή του (Feling, R.H., et al., 2003; Chauhan, D., et al., 2005).

Από την άλλη πλευρά, μόρια που ενεργοποιούν ή βελτιώνουν τη δραστηριότητα του πρωτεασώματος είναι λίγα και είναι ακόμα υπό μελέτη. Μόρια όπως το PA28, ενεργοποιητής του πρωτεασώματος που φαίνεται να βελτιώνει την επιβίωση στην ασθένεια του Huntington, αποδεικνύουν ότι οι ενεργοποιητές του συγκεκριμένου πρωτεϊνικού συμπλέγματος μπορούν να εξελιχθούν σαν χρήσιμοι θεραπευτικοί φορείς. Πληθώρα μικρών μορίων, όπως λιπαρά οξέα, αντιδραστήρια μετουσίωσης, πεπτίδια κ.α., φαίνεται να επάγουν τη δραστηριότητα του πρωτεασώματος (Huang, L., et al., 2009). Ταυτόχρονα όμως, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η έκφραση και η ενεργότητα του πρωτεασώματος μειώνεται κατά την κυτταρική και την *in vivo* γήρανση (Chondrogianni, N., et al., 2003; Grune, T., et al., 2005; Vernace, V. A., et al., 2007; Tsakiri, E. N., et al., 2013). Συγκεκριμένα, *in vitro* μελέτη σε ανθρώπινα γηρασμένα κύτταρα έδειξε μείωση της έκφρασης των καταλυτικών υπομονάδων του 20S πρωτεασώματος και των υπομονάδων του 19S ρυθμιστικού μορίου (Chondrogianni, N., et al., 2003). Ακόμη, έρευνα σε αιωνόβιους ανθρώπους έδειξε την απρόσμενη παραμονή της ενεργότητας του πρωτεασώματος σε επίπεδα όμοια με αυτά των νεαρών ατόμων (Chondrogianni, N., et al., 2000). Τέλος, έρευνες στο δίπτερο έντομο *Drosophila melanogaster* δείχνουν τη μείωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας και τη συσσώρευση των ουβικιτινωμένων πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια της γήρανσης. Έτσι, η μείωση της πρωτεασωμικής ενεργότητας φαίνεται πως συνδυάζεται με μείωση της έκφρασης του πρωτεασώματος κατά τη γήρανση (Vernace, V. A., et al., 2007), χωρίς να είναι

γνωστός ο μηχανισμός αυτής της μειορρυθμίσσης της έκφρασης του πρωτεασώματος (Tsakiri, E. N., et al., 2013).

Επιπρόσθετα, προηγούμενες μελέτες σε ανθρώπινα κύτταρα έχουν δείξει ότι πιθανώς τα ROS (ελεύθερες ρίζες οξυγόνου) αναστέλλουν το πρωτεάσωμα (Reinheckel, T., et al., 1998), και καθώς συσσωρεύονται με τη γήρανση, συμβάλλουν όλο και περισσότερο στη δυσλειτουργία του με άμεσο και έμμεσο τρόπο. Με άμεσο τρόπο τροποποιώντας τις υπομονάδες του ίδιου του πρωτεασώματος και έμμεσα τροποποιώντας πρωτεΐνες και λιπίδια, τα οποία δεν μπορούν να αποικοδομηθούν και συσσωρεύονται στα κύτταρα (Grune, T., et al., 1997). Αυτές οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια, που δεν μπορούν να αποικοδομηθούν, συναντώνται κυρίως σε μεταμιτωτικά κύτταρα όπως οι νευρώνες, οι οποίοι είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στη συσσώρευση αυτών των συναθροισμάτων (aggregates), τα οποία επηρεάζουν πολυάριθμα κυτταρικά σηματοδοτικά μονοπάτια, όπως και το πρωτεολυτικό μονοπάτι. Τα μεταμιτωτικά κύτταρα λόγω της ανικανότητάς τους να διαιρεθούν, δεν μπορούν να μεταβιβάσουν μέρος της ποσότητας στρες στα θυγατρικά κύτταρα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία τοξικού στρες (Takalo, M., et al., 2013)

A.2. Φυσικά προϊόντα από μικροοργανισμούς

Οι μικροοργανισμοί είναι μικροί ζωντανοί οργανισμοί που δεν είναι ορατοί με γυμνό μάτι. Ιστορικά, εντοπίστηκαν στις αρχές του 20^{ου} αιώνα ως πηγές πολύτιμων φυσικών προϊόντων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ανακάλυψη του αντιβιοτικού πενικιλίνη από τον μύκητα *Penicillium rubens*, το 1928 από τον Alexander Fleming (Houbraken, J., et al., 2011). Περιλαμβάνουν τους ιούς, και δύο ακόμα μεγάλες κατηγορίες, τους ευκαρυωτικούς και τους προκαρυωτικούς οργανισμούς, οι οποίοι έχουν παρόμοια χημική δομή, μιας και οι δύο περιέχουν νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια, πρωτεΐνες και υδατάνθρακες, ενώ χρησιμοποιούν τα ίδια είδη χημικών αντιδράσεων για τις λειτουργίες τους. Οι προκαρυωτικοί οργανισμοί διαφέρουν όμως με τους ευκαρυωτικούς σε ορισμένα δομικά χαρακτηριστικά, μιας και δε φέρουν οργανωμένο πυρήνα με μεμβράνη, το γενετικό υλικό δεν υπάρχει υπό μορφή χρωμοσωμάτων, δεν οργανώνεται σε ιστόνες και δεν εσωκλείεται μέσα σε μεμβράνη, στο κυτταρικό τους τοίχωμα υπάρχει σχεδόν πάντα ο πολυσακχαρίτης πεπτιδογλυκάνη, ενώ οργανίδια όπως μιτοχόνδρια, χλωροπλάστες, δικτυοσωμάτια, χυμοτόπια και ενδοπλασματικό δίκτυο, απουσιάζουν εντελώς (Tortora, G. J., et al., 2009; Γαλάτης, Β., et al., 1998).

Στην ομάδα των προκαρυωτικών μικροοργανισμών ανήκουν τα βακτήρια, καθώς επίσης και τα κυανοβακτήρια, τα αρχαιοβακτήρια και τα προχλωρόφυτα. Όλα αυτά μαζί συγκροτούν ένα ξεχωριστό βασίλειο, τα Monera. Οι μύκητες, από την άλλη, είναι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί. (Γαλάτης, Β., et al., 1998) Τέλος, οι Ακτινομύκητες ή Ακτινοβακτήρια είναι μια ταξινομική ομάδα Gram θετικών βακτηρίων. Χαρακτηριστικό ταξινομικό γένος αυτής της ομάδας είναι οι στρεπτομύκητες (*Streptomyces*) από τους οποίους παράγονται χρήσιμα αντιβιοτικά (στρεπτομυκίνη, τετρακυκλίνη κ.ά.). (Madigan, M., et al., 2005)

A.2.1. Δομή των βακτηρίων

Τα βακτήρια περιγράφηκαν για πρώτη φορά το 1689 από τον Ολλανδό Antonie van Leeuwenhoek, όμως η συστηματική τους μελέτη άρχισε τον 19^ο αιώνα. Είναι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί με απλή οργάνωση, που υπάρχουν σε μορφή κόκκων, κυλίνδρων (βάκιλλοι) ή έλικας (σπειρίλλια) (Γαλάτης, Β., et al., 1998).

Η κυτταρική δομή του βακτηρίου περιλαμβάνει το κυτταρικό τοίχωμα (ένα συμπαγές εξωτερικό περίβλημα), τον γλυκοκάλυκα (ένα κολλώδες στρώμα που περιβάλλει το κυτταρικό τοίχωμα), την κυτοπλασματική μεμβράνη (εσωτερικά του κυτταρικού τοιχώματος), το γενετικό υλικό του βακτηρίου (κυκλικό δίκλωνο μόριο DNA διάσπαρτο στο κυτόπλασμα, μιας και δεν υπάρχει οργανωμένος πυρήνας), και τέλος, το κυτόπλασμα που φέρει πάνω του ριβοσώματα και άλλα έγκλειστα αποταμιευτικής κυρίως σημασίας. Ακόμα, πολλά βακτήρια εξωτερικά του κυτταρικού τοιχώματος φέρουν μαστίγια, που περιστρέφονται και τους επιτρέπουν να κινούνται, καθώς και άλλα τριχοειδή εξαρτήματα, όπως ινίδια και κροσσοί. Έχουν μήκος από 0,5 έως 5 mm (Γαλάτης, Β., et al., 1998).

Οι ακτινομύκητες ή ακτινοβακτήρια, σχηματίζουν ένα δίκτυο διακλαδιζόμενων νηματίων που ονομάζεται μυκήλιο και ομοιάζει με αυτό των μυκήτων. Εξαιτίας αυτού, ονομάζονται παραπλανητικά και «μύκητες». Επίσης, στο DNA τους έχουν το υψηλότερο ποσοστό γουανίνης (G) και κυτοσίνης (C) από τα γνωστά βακτήρια (63% με 78%) (Madigan, M., et al., 2005).

Τα βακτήρια είναι παρόντα στο έδαφος, σε όξινες ιαματικές πηγές, σε ραδιενεργά απόβλητα, ύδατα και βαθιά στο φλοιό της γης, σε οργανικές ύλες και ζωντανούς ιστούς των περισσότερων οργανισμών (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016).

A.2.2. Φυσικά προϊόντα από βακτήρια

Χαρακτηριστικό γνώρισμα πολλών βακτηρίων είναι η ικανότητά τους να παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες που περιλαμβάνουν κοντά στις 50.000 γνωστές ενώσεις ποικίλων χημικών δομών. Συνήθως τείνουμε να συνδέουμε τους μικροοργανισμούς μόνο με σημαντικές παθήσεις. Η πλειονότητά τους όμως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ισορροπία των ζωντανών οργανισμών, ενώ έχουν ευρεία χρήση και στη βιομηχανία (Tortora, G. J., et al., 2009). Για παράδειγμα, ο *Lactobacillus* σε συνδυασμό με ζύμες και μικροοργανισμούς χρησιμοποιείται στην προετοιμασία ζυμωμένων τροφίμων, όπως τυρί, τουρσί, σάλτσα σόγιας, ξύδι και γιαούρτι (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016). Ένα άλλο παράδειγμα είναι το βακτήριο *Thiomargarita namibiensis*, ένα αρκετά σπάνιο βακτήριο λόγω του μεγάλου μεγέθους του και των ειδικών συνθήκων στις οποίες επιβιώνει, μιας και βρίσκεται σε λασπώδη εδάφη αφρικανικών ακτών. Το συγκεκριμένο βακτήριο καταναλώνει υδρόθειο, το οποίο είναι τοξικό για τα ζώα που ζουν σε λασπώδη περιβάλλοντα (Tortora, G. J., et al., 2009).

Ορισμένα βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιήσουν ρυπαντές σαν πηγές ενέργειας. Η χρήση των βακτηρίων με τέτοιο τρόπο ονομάζεται βιοαποκατάσταση και ξεκίνησε το 1988 από πολλές βιομηχανίες. Έτσι, τοξικές ουσίες μπορούν να απομακρυνθούν από νερά, από πετρελαιοκηλίδες, από περιοχές απόρριψης τοξικών ουσιών κ.τ.λ. Βακτήρια των γενών *Pseudomonas* και *Bacillus* χρησιμοποιούνται ευρέως για τον καθαρισμό ρύπων. Μάλιστα, ένζυμα του τελευταίου χρησιμοποιούνται και σε απορρυπαντικά ρούχων. Πολλά βακτήρια μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν και για τον καθαρισμό του νερού. Μια άλλη χρήση των μεταβολιτών που παράγονται από βακτήρια είναι η εντομοκτόνος δράση τους, στη θέση των φυτοφαρμάκων. Το βακτήριο *Bacillus thuringiensis* χρησιμοποιείται στην θέση συνθετικών φυτοφαρμάκων για τις κάμπιες του σταφυλιού και των φύλλων των οπωροφόρων δέντρων, καθώς και τα σκουλήκια του βαμβακιού, του καλαμποκιού, του άνθους του καπνού και των κραιβοειδών (Tortora, G. J., et al., 2009).

Μια ακόμη εφαρμογή των βακτηρίων είναι στη βιοτεχνολογία, και πιο συγκεκριμένα στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA (rDNA). Μπορούν έτσι να χρησιμοποιηθούν σαν «εργοστάσιο» παραγωγής χημικών ουσιών που φυσιολογικά δεν παράγονται από τους οργανισμούς. Με αυτόν τον τρόπο, μπορούν να παραχθούν πολλά εμβόλια, καθώς και

φαρμακευτικά προϊόντα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το εντεροβακτηρίδιο *E. coli*. Δύο διαφορετικές καλλιέργειες του συγκεκριμένου βακτηρίου χρησιμοποιήθηκαν για να παράξουν καθεμία από τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες της ινσουλίνης. Άλλα μόρια που παράγονται από το συγκεκριμένο μικροοργανισμό με αυτή την τεχνολογία είναι η ιντερφερόνη-α και γ, ο παράγοντας ενεργοποίησης αποικίας (CSF), ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη (hGH), οι ιντερλευκίνες, η προυποκινάση, η ρελαξίνη, η ταξόλη, ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF) κ.α. (Tortora, G. J., et al., 2009).

Τα βακτήρια εδάφους, όπως οι στρεπτομύκητες (*Streptomycetes*) και τα μυξοβακτήρια (*Mycobacteria*), είναι ιδιαίτερα πλούσιες πηγές σε μικρομοριακά φυσικά προϊόντα με αντιμυκητιασικές, αντιβακτηριακές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Τέλος, τα βακτήρια χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία για την παραγωγή καθαρών εναντιομερών ουσιών, όπου αυτά και τα συνθετικά ενδιάμεσά τους βρίσκουν εφαρμογές στον τομέα της φαρμακευτικής και σαν αγροχημικά (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016).

A.2.3. Ταξινόμηση φυσικών προϊόντων από βακτήρια

Είναι ενδιαφέρον ότι η πλειοψηφία των δευτερογενών μεταβολιτών των βακτηρίων και των μυκήτων προέρχονται από μερικές κοινές βιοσυνθετικές οδούς που χρησιμοποιούν πρόδρομες ενώσεις που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια του πρωτογενούς μεταβολισμού. Τα ενδιάμεσα που προκύπτουν από τη συμπύκνωση αυτών των μικρών βιοσυνθετικών μονάδων, μετά από πολλές ενζυμικές αντιδράσεις που καταλύονται, οδηγούν σε προϊόντα ποικίλων δομών. Έτσι, η πλειοψηφία αυτών των δευτερογενών μεταβολιτών ταξινομούνται εύκολα ανάλογα με τη βιοσυνθετική προέλευσή τους ως τερπενοειδή, πολυκετίδες, αλκαλοειδή, μη-ριβοσωματικά πεπτίδια κ.α. (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016).

1. Τερπενοειδή

Γνωστά και ως ισοπρενοειδή, τα τερπενοειδή ονοματίστηκαν για πρώτη φορά το 1880 από τον Kekule σαν μια μεγάλη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών με γενικό εμπειρικό τύπο $C_{10}H_{16}$, λόγω της παρουσίας της τερεβινθίνης, και περιλαμβάνουν τις στερόλες, τα καροτενοειδή, τις πολυπρενυλικές αλκοόλες, την ουμπικινόνη κ.α. Τα τερπενοειδή απαντώνται στη φύση σαν ορμόνες, χρωστικές, και σηματοδοτικά μόρια και επιτελούν ένα μεγάλο εύρος βιολογικών λειτουργιών, όπως αντιβιοτικά, παράγοντες παρεμπόδισης της διατροφής ή προσελκυστικά επικονιαστών.

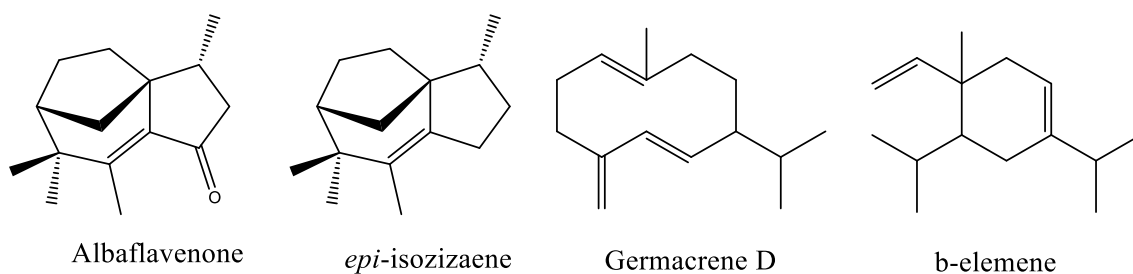
Βιοσυνθετικά, προέρχονται από την «ενεργοποιημένη» μορφή του ισοπρενίου, που ονομάζεται πυροφωσφορικό ισοπεντύλιο (IPP, isopentenyl pyrophosphate) και το αλλυλικό ισομερές του, πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP, dimethylallyl pyrophosphate). Το IPP συνήθως συντίθεται από το ακέτυλο-συνένζυμο Α (acetyl-CoA) με τη διαμεσολάβηση του μεβαλονικού

οξέος μέσω του μονοπατιού της 3-υδροξυ-3-μεθυλ-γλουταρυλο-συνενζύμου Α ρεντουκτάσης (HMG-CoA reductase) για τα αρχαιοβακτήρια και τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Παρ' όλ' αυτά, σε αρκετούς οργανισμούς συντίθεται μέσω του μονοπατιού της 2-C-μεθυλ-4-φωσφορικής-D-ερυθριτόλης (MEP, 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate), που ανακαλύφθηκε πρόσφατα. Πάνω από 40.000 τερπενοειδή έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί από φυσικές πηγές, συμπεριλαμβανομένων των μυκήτων και των βακτηρίων (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016).

2. Σεσκιτερπένια

Υπάρχουν πάνω από 10.000 γνωστά σεσκιτερπένια, μιας και αποτελούν την πιο ανομοιογενή ομάδα τερπενοειδών. Αποτελούνται από 15 άνθρακες (C₁₅) και προκύπτουν από τη σύζευξη τριών ισοπρενικών μονάδων. Παρότι βρίσκονται κυρίως σε φυτά, ένας πολύ μεγάλος αριθμός εξ'αυτών εντοπίζονται επίσης σε βακτήρια και μύκητες.

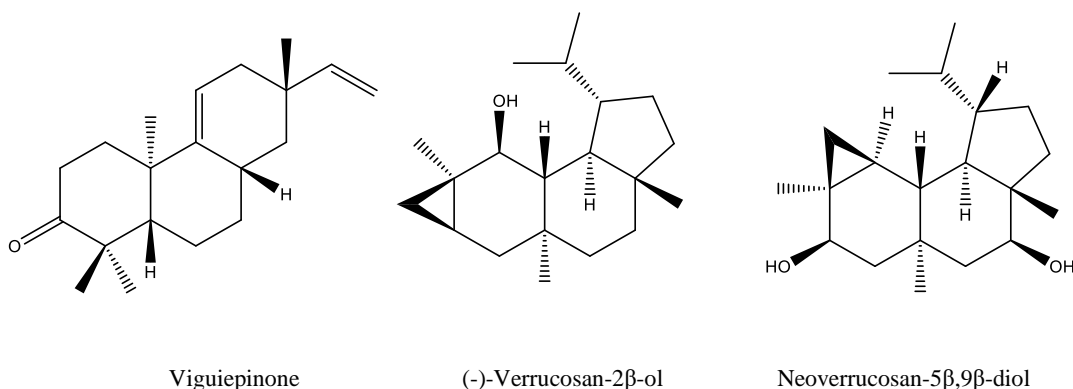
Παραδείγματα βακτηριακών σεσκιτερπενοειδών είναι τα σεσκιτερπένια αλπακλαβενόνη (albaclavenone), επι-ισοζιζαένιο (*epi*-isozizaene), (4S)-αλμπαφλαβενόλη ((4S)-albaflavenol) και (4R)-αλμπαφλαβενόλη ((4R)-albaflavenol), που απομονώθηκαν από το *Streptomyces coelicolor* A3. Σεσκιτερπένια τύπου γερμακρανίου, όπως 1(10)E,5E-γερμακραδιένιο-11-όλη (1(10)E,5E-germacradiene-11-ol), 1(10)E,5E-γερμακραδιένιο-3,11-διόλη (1(10)E,5Egermacradiene-3,11-diol) και 1(10)E,5E-γερμακραδιένιο-2,11-διόλη (1(10)E,5E-germacradiene-2,11-diol), απομονώθηκαν από το ενδοφυτικό *Streptomyces griseus*, ενώ γερμακρένιο D (Germacrene D), γερμακραδιενόλη (germacradienol), διϋδροαγαροφουράνη (dihydroagarofurane), β-ελεμένιο (β-elemene), δικυκλογερμακρένιο (bicyclogermacrene), καδινένιο (cadinene) και καλερένιο (calerene) έχουν απομονωθεί από το *Streptomyces citreus* CBS 109,6 (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016).



Εικόνα Α.1. Παραδείγματα σεσκιτερπενίων απομονωμένων από βακτήρια

3. Διτερπένια

Τα διτερπένια είναι τερπενοειδή που περιέχουν 20 άτομα άνθρακα (C₂₀). Πάνω από 5.000 φυσικά διτερπένια που ανήκουν σε είκοσι βασικούς δομικούς τύπους είναι γνωστά κυρίως από ανώτερα φυτά και μικροοργανισμούς.



Εικόνα Α.2. Παραδείγματα διτερπενίων απομονωμένων από βακτήρια

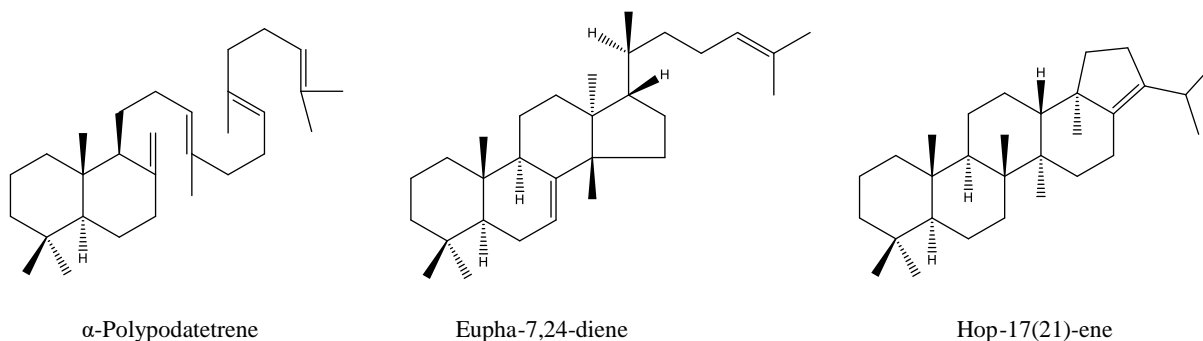
Παραδείγματα διτερπενίων που έχουν απομονωθεί από βακτήρια είναι η νεοβερουκοσάνη-5β,9β-διόλη (neoverrucosan-5β,9β-diol), η νεοβερουκοσάνη-5β,18-διόλη (neoverrucosan-5β,18-diol), η νεοβερουκοσάνη-5β,9β,18β-τριόλη (neoverrucosan-5β,9β,18β-triol) και η νεοβερουκοσάνη-5β,9β-διόλη-4-καρβοξυ-αλδεΐδη (neoverrucosan-5β,9β-diol-4-carboxaldehyde) από το *Saprosira grandis*. Ακόμη, ένα σπάνιο διτερπένιο με σύστημα 3,6,6,5-τετρακυκλικού δακτυλίου, η (-)-βερουκοσάνη-2β-όλη ((-)-verrucosan-2β-ol) έχει απομονωθεί από το φωτοτροπικό βακτήριο *Chloroflexus aurantiacus*. Τέλος, η βιγουϊεπινόνη (viguierinone) και οι οξαλοτερπίνες Α-Ε (oxaloterpins Α-Ε) απομονώθηκαν από το *Streptomyces sp.* KO-2988 (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016).

4. Τριτερπένια

Τα τριτερπένια και τα στεροειδή αποτελούν μια μεγάλη και ποικίλη κατηγορία φυσικών προϊόντων με τριάντα άτομα άνθρακα (C₃₀). Προέρχονται κυρίως από το 2,3-εποξείδιο του σκουαλενίου (squalene-2,3-epoxide), το οποίο σχηματίζεται από τη σύζευξη κεφαλής με κεφαλή (head to head) δύο σεσκιτερπενικών προδρόμων, που το καθένα έχει δεκαπέντε άτομα άνθρακα. Η στερεοχημεία του δακτυλίου στα κυκλικά τριτερπένια εξαρτάται από τη διαμόρφωση του all-trans-2,3-εποξειδίου του σκουαλενίου, μετά την αρχική κυκλοποίηση (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016 ; Hanson, J. R., 2008).

Μη φωτοσυνθετικά βακτήρια συνθέτουν ισοπrenoειδή και τριτερπένια, πριν ακόμα από τη βιοσύνθεση της χλωροφύλλης. Το σκουαλένιο έχει βρεθεί σε ευρέως αποκλίνουσες ομάδες βακτηρίων, δηλαδή η ικανότητα σύνθεσης του σκουαλενίου δεν αποτελεί μοναδική ιδιότητα κάποιας συγκεκριμένης βακτηριακής ομάδας. Στερόλες και σπανοειδή έχουν βρεθεί αποκλειστικά σε αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια βακτήρια, ενώ τα C-30 καροτενοειδή έχουν βρεθεί μόνο σε προαιρετικά αναερόβιους χημειοοργανοτροφικούς οργανισμούς. Κάνενα βακτήριο δεν έχει βρεθεί να περιέχει στερόλες, σπανοειδή και C-30 καροτενοειδή ταυτόχρονα.

Μόνο ο *Methylococcus capsulatus*, έχει βρεθεί ότι περιέχει ίση ποσότητα οπανοειδών και στερολών (Hanson, J. R., 2008).

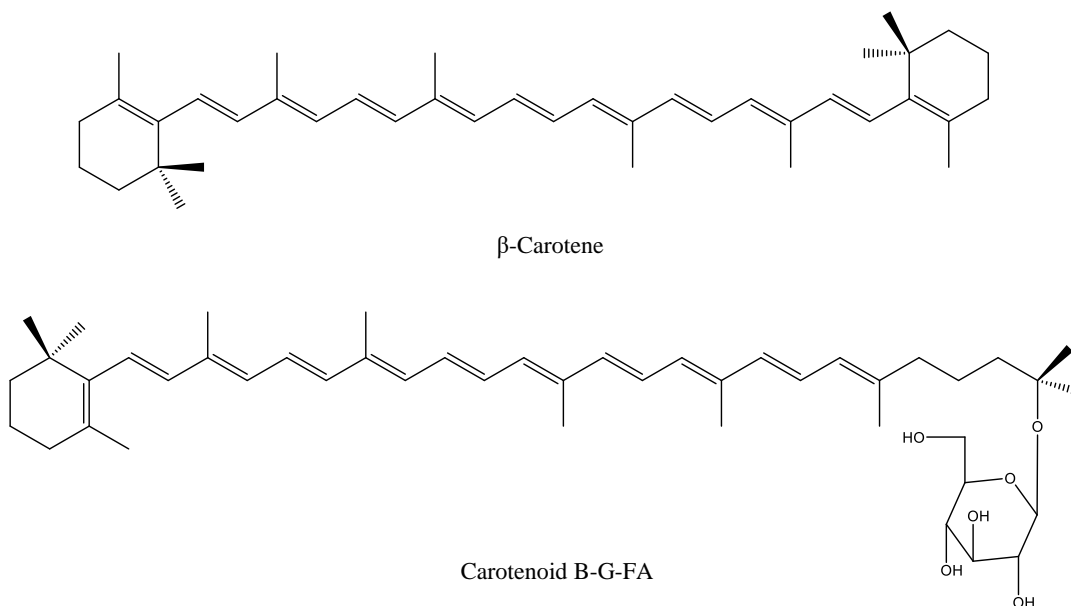


Εικόνα Α.3. Παραδείγματα τριτερπενίων απομονωμένων από βακτήρια

Μερικά παραδείγματα τριτερπενίων που έχουν απομονωθεί από βακτήρια περιλαμβάνουν το α -πολυποδατετραένιο (α -polygodatetraene), το γ -πολυποδατετραένιο (γ -polygodatetraene), το δαμμαρα-20(21),24-διένιο (dammara-20(21),24-diene), το 17-ισοδαμμαρα-12,24-διένιο (17-isodammara-12,24-diene), το 17-ισοδαμμαρα-20(21),24-διένιο (17-isodammara-20(21),24-diene), το ευφα-7,24-διένιο (eupha-7,24-diene), το χοπ-17(21)-ένιο (hop-17(21)-ene), το νεοχοπ-13(18)-ένιο (neohop-13(18)-ene), το νεοχοπ-12-ένιο (neohop-12-ene), το φερν-8-ένιο (fern-8-ene), το διπλοπτένιο (diploptene) και το χοπ-21-ένιο (hop-21-ene) από το *Zymomonas mobilis*, καθώς και τα χοπ-17(21)-ένιο (hop-17(21)-ene) και διπλοπτένιο (diploptene) από το *Bacillus acidocaldarius* (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016).

5. Καροτενοειδή

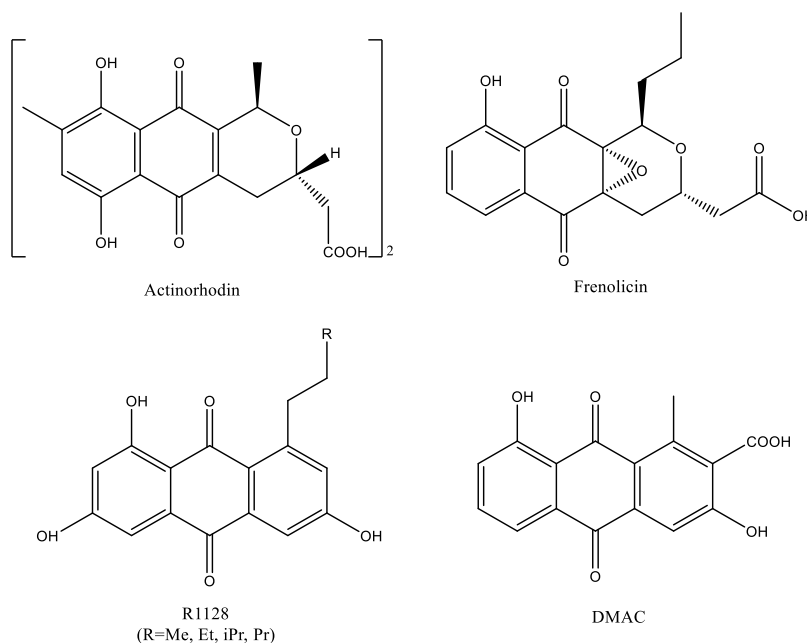
Τα πολυτερπένια (ή αλλιώς καροτενοειδή) είναι πολυϊσοπρενοειδή φυσικά προϊόντα, υπεύθυνα για τον χρωματισμό κάποιων βακτηρίων και μυκήτων. Η πλειοψηφία τους αποτελείται από μια αλυσίδα πολυενίου 40 ατόμων άνθρακα (C_{40}), η οποία μπορεί να καταλήγει σε κυκλικό δακτύλιο και να συμπληρώνεται από λειτουργικές ομάδες με οξυγόνο. Τα καροτενοειδή έχουν πολύ σημαντικό βιολογικό ρόλο, μιας και δρουν σαν βιολογικά αντιοξειδωτικά, προστατεύοντας τα κύτταρα και τους ιστούς από τις βλαβερές συνέπειες των ελεύθερων ριζών και του μονήρους οξυγόνου. Καροτενοειδή απαντώνται σε πολλά βακτήρια, όπως το γ -καροτένιο, το καροτενοειδές Β και ο β -D-γλυκοσίδης του στον C-1', το καροτενοειδές Β-G-FA, το καροτενοειδές Β-G και ο εστέρας λιπαρού οξέος στον C-6 της D-γλυκόζης του στο πράσινο νηματοειδές βακτήριο *Chloroflexus aurantiacus*, το καροτενοειδές Β, το καροτενοειδές Κ (κέτο- παράγωγο του καροτενοειδούς Β), οι β -D-γλυκοσίδες τους στον C-1', το καροτενοειδές Β-G και το καροτενοειδές Κ-G και οι εστέρες λιπαρού οξέος στον C-6 της D-γλυκόζης τους, το καροτενοειδές Β-G-FA και το καροτενοειδές Κ-G-FA στο *Rhodococcus rhodochrous* RNMS1 (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016).



Εικόνα A.4. Παραδείγματα καροτενοειδών απομονωμένων από βακτήρια

6. Πολυκετίδια

Τα πολυκετίδια αποτελούν μία μεγάλη και δομικά ποικιλόμορφη ομάδα φυσικών προϊόντων που περιλαμβάνει πολλές κετονικές (καρβονυλικές) ομάδες. Βιοσυντίθενται μέσω πολυμερισμού ακέτυλο- και προπιόνυλο- υπομονάδων, παρόμοια συνθετική οδός με αυτή των λιπαρών οξέων. Ομάδες ακέτυλο-συνενζύμου A (acetyl-CoA)/μαλόνυλο-συνενζύμου A (malonyl-CoA) ενώνονται από τα PKSs ένζυμα (συνθετάσες των πολυκετιδίων – polyketide synthases), τα οποία δρουν επαναλαμβανόμενα στο αυξανόμενο πολυκετίδιο, επεκτείνοντάς το κάθε φορά κατά δύο άνθρακες (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016).



Εικόνα A.5. Παραδείγματα αρωματικών πολυκετιδίων απομονωμένων από ακτινοβακτήρια

Οι πλούσιες βιολογικές ιδιότητες και η δομική πολυπλοκότητα των αρωματικών πολυκετιδίων έχουν προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον για την ανακάλυψη και βιοσύνθεση αυτών των ενώσεων (Hanson, J.R., 2008). Παράγονται κυρίως από ακτινομύκητες, όπως *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Saccharopolyspora*, *Nocardia*. Χαρακτηριστικές δομές αρωματικών πολυκετιδίων παρατίθενται στην Εικόνα Α.5 (Das, A., & Khosla, C., 2009).

Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει ενώσεις με φαρμακευτικό ενδιαφέρον, όπως η τετρακυκλίνη, η ερυθρομυκίνη, η ραπαμυκίνη και η αμφοτερκίνη Β, αντιβιοτικά παράγωγα πολυκετιδίων που έχουν απομονωθεί από βακτήρια, τον αντικαρκινικό παράγοντα δοξορουβικίνη, καθώς και ανοσοκατασταλτικά. Μερικά ακόμα παραδείγματα σημαντικών βακτηριακών πολυκετιδίων περιλαμβάνουν την κρουενταρένη Α και Β (cruentaren Α και Β) από το μυξοβακτήριο *Byssonorax cruenta*, τις αντιμυκητιασικές και κυτοτοξικές ενώσεις σοραφένη Α1α (sorarphen Α1α) και τις εποθιλόνες Α και Β (epothilones Α και Β) από το *Sorangium cellulosum*, τη στιγματελλίνη (stigmatellin) από το *Stigmatella aurantiaca*, το ακλανονικό οξύ (aklanonic acid) από το *Streptomyces* ZIMET 43,717, τη ραβιδομυκίνη (ravidomycin) από το *Streptomyces ravidus* και την γιλβοκαρσίνη Μ και V (gilvocarcin Μ και V) από το *Streptomyces gilvotanareus* (NRRL 11382) (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016).

7. Κινόνες

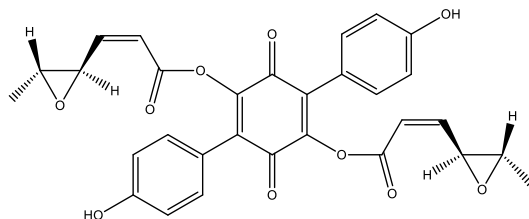
Οι Κινόνες είναι μία μεγάλη και ετερογενής ομάδα ενώσεων που εντοπίζονται σε μικροοργανισμούς, φύκη, λειχήνες, ανώτερους μύκητες, ανώτερα φυτά, ακόμη και σε ορισμένα έντομα. Έχουν χρώμα που κυμαίνεται από απαλό κίτρινο-πορτοκαλί, κόκκινο, μοβ, καφέ έως σχεδόν μαύρο. Μερικές κινόνες που περιέχουν ισοπροπενυλ- ομάδες ως υποκατάστατα, όπως η ουμπικινόνη, η μενακινόνη, η φυλλοκινόνη και οι πλαστοκινόνες. Είναι βιολογικά μόρια υψίστης σημασίας, που μπορούν να βρεθούν σε όλους τους ζωντανούς ιστούς, χωρίς να χρησιμεύουν ως χρωστικές. Η βασική δομή κινόνης αποτελείται από μία ακόρεστη κυκλική δικετόνη που παράγεται από ένα μονοκυκλικό ή πολυκυκλικό αρωματικό υδρογονάνθρακα. Η δομή της κινόνης μπορεί να προέρχεται τυπικά από οξειδωση των αντίστοιχων διυδροξυφαινολών. Τα απλούστερα παραδείγματα κινόνων είναι η ορθο- ή 1,2-βενζοκινόνη και η παρα- ή 1,4-βενζοκινόνη, τα οποία είναι παράγωγα του κυκλοεξαδιενίου, και μπορούν να θεωρηθούν ως προϊόντα οξειδωσης των διυδροξυφαινολών, κατεχόλη και κινόλη (υδροκινόνη), αντίστοιχα. Πάνω από 100 βενζοκινόνες έχουν απομονωθεί από φυσικές πηγές (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016).

Οι Ναφθοκινόνες (1,4-διοξοναφθαλένια), που προέρχονται από εξακετίδια, αντιπροσωπεύουν μια άλλη κατηγορία κινόνων. Αυτή η κατηγορία ενώσεων παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων, όπως φυτοτοξικές, εντομοκτόνες, αντιβακτηριακές, μυκητοκτόνες, κυτταροτοξικές, και αντικαρκινικές. Μερικές ναφθοκινόνες δρουν σαν μυκοτοξίνες και μπορούν να προκαλέσουν δηλητηρίαση στα ζώα και στον άνθρωπο. Έχουν ταυτοποιηθεί και C-γλυκοσίδες ναφθοκινονών, με χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτής της κατηγορίας να αποτελούν οι

μενοξυμυκίνες A και B (menoxymycins A και B), από βακτήρια του γένους *Streptomyces* που καλλιεργήθηκαν σε θαλάσσια ιζήματα, η γρανατικήνη (granaticin) από το *Streptomyces olivaceus*, και οι γρανατομυκίνες A, B, και D (granatomycins A, C και D) από το *S. violaceoruber* (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016).

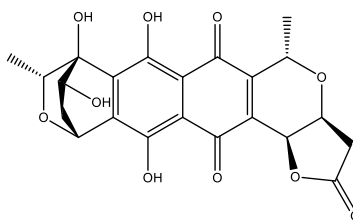
Οι Ανθρακινόνες (9,10-διοξοανθρακένια) είναι οκτακετίδια και μία από τις μεγαλύτερες κατηγορίες φυσικών προϊόντων μυκητιακής προέλευσης. Μερικές ανθρακινόνες σχηματίζουν διμερή πιθανώς με οξειδωτική σύζευξη των αντίστοιχων μονομερών τους. Έχουν αναφερθεί πολλοί Ο-γλυκοσίδες και C-γλυκοσίδες ανθρακινονών βακτηριακής προέλευσης με βιολογικές δράσεις. Η Κεσεορχοδομυκίνη (Caeseorhodomycin) απομονώθηκε από το βακτήριο εδάφους *Streptomyces caesius var. Egyptiaca*, και αποτελεί ένα παράδειγμα βακτηριακού Ο-γλυκοσίδη ανθρακινόνης. Μερικά παραδείγματα C-γλυκοσιδών ανθρακινονών αποτελούν η γαλαμυκίνη B (galtamycin B) και η σακουαγιαμυκίνη Z (saquayamycin Z) από το *Micromonospora* sp. Tue 6368, οι αμικενομυκίνες A και B (amicenomycins A και B) από το *Streptomyces* sp. MJ384-46F6, οι βενζανθρίνες A και B (benzanthrins A και B) από το *Amycolatopsis orientalis* subsp. *lurida*, καθώς και η φριδαμυκίνη D (fridamycin D) και οι χιμαλομυκίνες A και B (himalomycins A και B) από το θαλάσσιο βακτήριο *Streptomyces* sp. B6921. Οι σαπτομυκίνες B, C1, C2, D και E (Saptomycins B, C1, C2, D και E) ανήκουν στην κατηγορία των οξαβενζαθρακινονών και απομονώθηκαν από το βακτήριο *Streptomyces* sp. HP530. Στην Εικόνα A.6 απεικονίζονται οι δομές κάποιων κινονών βακτηριακής προέλευσης (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016).

Βενζοκινόνη



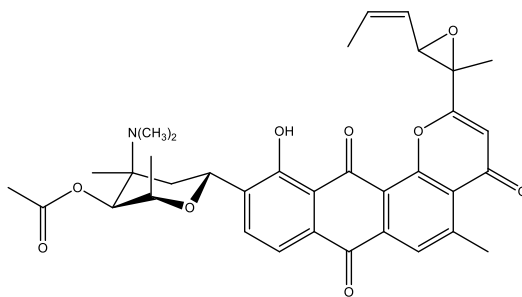
Flavomentin A

Ναφθοκινόνη



Granaticin

Ανθρακινόνη

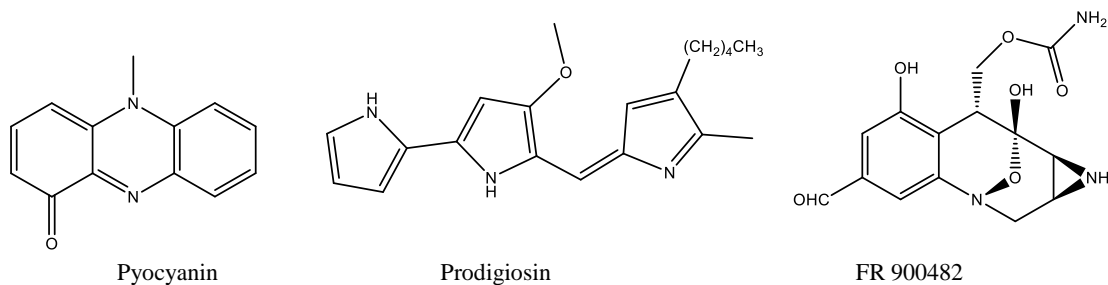


Saptomycin D

Εικόνα A.6. Παραδείγματα κινονών απομονωμένων από βακτήρια

8. Αλκαλοειδή

Τα Αλκαλοειδή είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που περιέχουν τουλάχιστον ένα άτομο αζώτου σε δακτύλιο. Το όνομα αλκαλοειδές προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «φυτικά αλκάλια» και χρησιμοποιείται για να περιγράψει την πλειοψηφία των φυσικών ενώσεων που περιέχουν άζωτο. Τα αλκαλοειδή παράγονται από μια μεγάλη ποικιλία οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων βακτηρίων, μυκήτων, φυτών, και ζώων. Εκτιμάται ότι είναι γνωστά περίπου 20.000 φυσικά αλκαλοειδή (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016). Τα πρώτα αλκαλοειδή από μικροοργανισμούς, που αναγνωρίστηκαν και μελετήθηκαν ήταν αυτά από το *Claviceps purpurea*. Μέχρι το 1960, όμως, καμία προσπάθεια δεν ήταν επιτυχής όσον αφορά την απόκτηση μεγαλύτερων ποσοτήτων αλκαλοειδών, παρά μόνο σε ίχνη. Το 1960, μία ομάδα ερευνητών περιέγραψε την παραγωγή αλκαλοειδών από το στέλεχος *Claviceps paspali*. Απομονώθηκαν η λυσεργόλη (lysergol), η λυσεργίνη (lysergine) και η λυσεργένη (lysergene) από σαπροφυτική καλλιέργεια ερυσιβόδου ούρα (Sualeh, M., et al., 2010). Τα αλκαλοειδή προέρχονται από αμινοξέα, όπως L-ορνιθίνη, L-λυσίνη, L-τυροσίνη, L-τρυπτοφάνη, L-ιστιδίνη, νικοτινικό οξύ και ανθρανιλικό οξύ. Έτσι, ορισμένα αλκαλοειδή περιέχουν δακτυλίου πυρρολιδίνης, πυρρολιζιδίνης, πιπεριδίνης, κινολιζιδίνης, ινδολιζιδίνης, πυριδίνης, κινολίνης, ισοκινολίνης, ινδολίου, και ιμιδαζολίου.



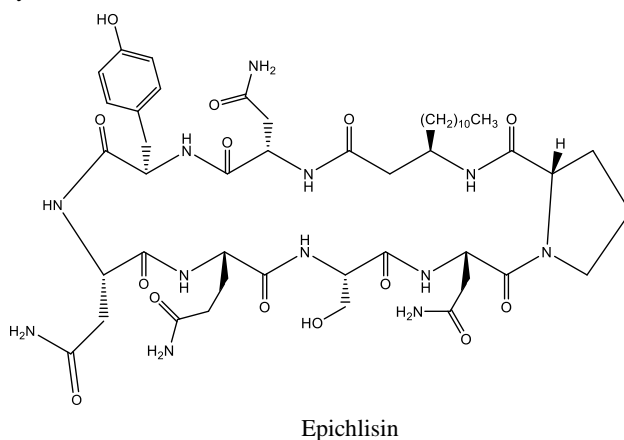
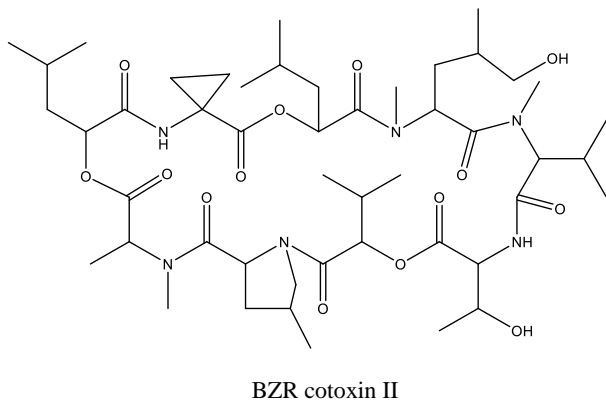
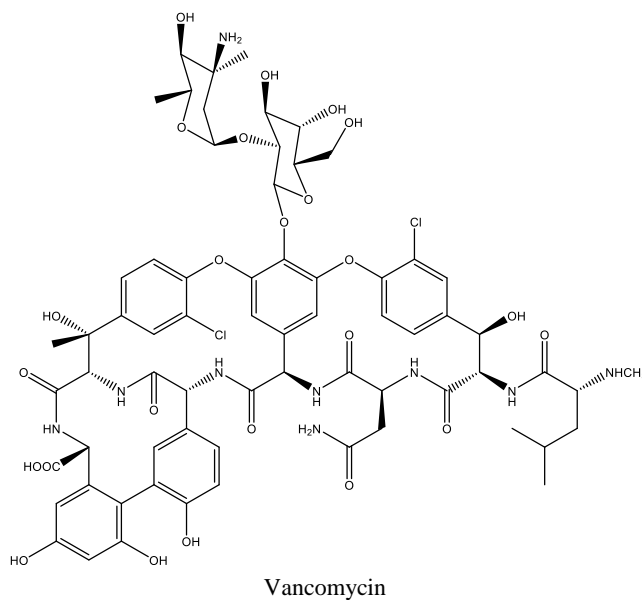
Εικόνα Α.7. Παραδείγματα αλκαλοειδών απομονωμένων από βακτήρια

Αλκαλοειδή διαφόρων τύπων έχουν απομονωθεί από βακτήρια και σε αυτά περιλαμβάνονται αλκαλοειδή φαιναζίνης, όπως η πυοκυανίνη (pyocyanin), η 1-υδροξυφαιναζίνη (1-hydroxyphenazine) και η αερουγκινοσίνη Α (aeruginosin A) από είδη *Pseudomonas*, το 1-φαιναζινοκαρβοξυλικό οξύ (1-phenazinecarboxylic acid), το 2-υδροξυφαινα-1-καρβοξυλικό οξύ (2-hydroxyphenazine-1-carboxylic acid), και η 2-υδροξυφαιναζίνη (2-hydroxyphenazine) από το *Pseudomonas aureofaciens* 30-84, η προδιγιοσίνη (prodigiosin) από το *Serratia marcescens*, η αντεκυλπροδιγιοσίνη (undecylprodigiosin) από το *Streptomyces coelicolor* A3(2), η μετακυκλοπροδιγινίνη (metacycloprodiginine) από το *Saccharopolyspora* sp., η κυκλοπροδιγιοσίνη (cycloprodigiosin) από το *Pseudoalteromonas denitrificans* και η κυκλονονυλπροδιγιοσίνη (cyclononylprodigiosin) από το *Actinomadura pelletieri*, οι μποξαζομυκίνες Α – Γ (boxazomycins A – C) από το *Pseudonocardia* sp., το FR900482 από το *Streptomyces sandaensis*, η ερβιμυκίνη Γ (herbimycin C) από το *Streptomyces hygroscopicus*, η

αγουαμικίνη (awamycin) και η ναφθομικίνη Η (naphthomycin Η) από *Streptomyces* sp. (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016)

9. Μη ριβοσωμικά πεπτίδια

Τα μη ριβοσωμικά πεπτίδια (NRP) είναι μία πολύ διαφορετική κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών, που συνήθως παράγονται από μικροοργανισμούς όπως τα βακτήρια και οι μύκητες, και χρησιμεύουν για τη χημική άμυνα και την επικοινωνία τους. Εμφανίζουν ένα ευρύ και σημαντικό φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων, όπως αντιβιοτικά (π.χ. βανκομικίνη), ανοσοκατασταλτικά (π.χ. κυκλοσπορίνη Α), αντι-ικά (π.χ. λυζοπεπτίνη Α), και αντικαρκινικά (π.χ. εχινομικίνη και τριοσίνη Α) (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016). Μία ιδιαιτερότητα των NRPs είναι η βιοποικιλότητα των μονομερών τους που εκτείνεται πέρα από τα υπολείμματα των 20 πρωτογενών αμινοξέων (Caboche, S., et al., 2010).



Εικόνα Α.8. Παραδείγματα μη ριβοσωμικών πεπτιδίων απομονωμένων από βακτήρια

Το πιο συνηθισμένο μη ριβοσωμικό πεπτιδίο είναι η γλουταθειόνη, η οποία είναι ένα συστατικό απαραίτητο για την αντιοξειδωτική άμυνα των περισσότερων αερόβιων οργανισμών. Τα μη ριβοσωμικά πεπτιδία προέρχονται τόσο από πρωτεϊνογόνα όσο και από μη πρωτεϊνογόνα αμινοξέα και συντίθενται από τεράστια πολυενζυματικά συγκροτήματα που ονομάζονται μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθετάσες (NRPSs). Τα φυσικά προϊόντα παράγωγα μη ριβοσωμικών πεπτιδίων έχουν συχνά κυκλικές και/ή γραμμικές διακλαδιζόμενες δομές και έχουν υποστεί τροποποιήσεις, όπως N-μεθυλίωση, N-φορμυλίωση, γλυκοζυλίωση, ακυλίωση, αλογόνωση ή υδροξυλίωση. Μερικά αξιοσημείωτα παραδείγματα μη-ριβοσωματικών πεπτιδίων βακτηριακής προέλευσης είναι οι μυχοχρομίδες S1-3 (myxochromides S1-3) από το *Stigmatella aurantiaca*, τα κυκλικά οκταπεπτιδία αργυρίνες A – H (argyrins A – H) από το *Archangium gephyra* και οι αναστολείς πολυμερισμού της τουμπουλίνης, τουμπουλυσίνες A – I (tubulysins A – I) από το *Archangium gephyra* και το *Angiococcus disciformis* (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016).

A.2.4. Καλλυντικά από βακτήρια

Πολλά είναι τα προϊόντα στην αγορά για αναζωογόνηση και λεύκανση του δέρματος και πολλά από αυτά τα προϊόντα ενσωματώνουν μανιτάρια, δευτερογενείς μεταβολίτες ή συστατικά μανιταριών ή δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από τους ποικίλους τρόπους ζύμωσης διαφόρων μυκήτων. Για παράδειγμα, το Kinara Lactic Acid Hydrating Serum, B Kamins Lactic 8 με γαλακτικό οξύ, το Bliss The Youth As We Know It με κεραμίδια, το Dermalogica Intensive Moisture Balance με υπεροξειδική δισμουτάση κ.α. είναι μερικά μόνο από τα αντιγηραντικά προϊόντα από μύκητες που κυκλοφορούν στην αγορά. Προϊόντα λεύκανσης μπορεί να περιέχουν κοζικό οξύ που αποτελεί παραπροϊόν ζύμωσης ζυθοποιίας ρυζιού (π.χ. Lightenex της PharmaClinic), εκχυλίσματα μανιταριών *Ganoderma* (π.χ. Nano Works Pureology) κ.α. Παρ' όλ' αυτά, φαίνεται να κυκλοφορούν πολύ λίγα προϊόντα στην αγορά με συστατικά βακτηρίων, ενώ ακόμα και η έρευνα στο συγκεκριμένο αντικείμενο βρίσκεται σε στάδιο ανάπτυξης.

Οι κατηγορίες ουσιών που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία *cosmeceuticals*, είναι ποικίλες, όπως καροτενοειδή, πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες ή πεπτιδία, φαινολικά παράγωγα, λιπαρά οξέα κ.α. Πολλές μάλιστα προέρχονται από θαλάσσιους μικροοργανισμούς. Η μαζική πλειοψηφία της επιφάνειας της γης (71%) καλύπτεται από ωκεανούς, με μεγάλη ποικιλομορφία. Πολλοί από τους οργανισμούς που κατοικούν σε αυτούς έχουν ήδη ανακαλυφθεί και χρησιμοποιούνται σαν πηγές στη σύγχρονη βιομηχανία, ανάμεσά τους και μικροοργανισμοί. Η πρόοδος στη βιομηχανική μικροβιολογία μάλιστα αύξησε το εύρος των μικροοργανισμών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν *cosmeceuticals*, από μικροάληγ έως και θαλάσσιους μικροοργανισμούς, στους οποίους εντάσσονται τα βακτήρια, τα κυανοβακτήρια και οι μύκητες. Περίπου 10⁶ βακτηριακά είδη βρίσκονται στους ωκεανούς, που έχουν προσαρμοστεί σε στρεσογόνα θαλάσσια περιβάλλοντα, όπως μεγάλα βάθη, με χαρακτηριστικά παραδείγματα το *Alteromonas macleodii subsp. Fijiensis*, το *Thermus thermophilus*, το *Vibrio diabolicus* κ.α. Η προσαρμοστική

ικανότητα πολλών εξ'αυτών των βακτηρίων σε τέτοια περιβάλλοντα οδηγεί στην παραγωγή βιοδραστικών εξωπολυσακχαριτών και ενζύμων που βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στην βιομηχανία καλλυντικών (Kim, S.K., 2012). Από το *Thermus thermophilus*, απομονώθηκαν ένζυμα (τα *extremozymes*), τα οποία έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (ROS) που προκαλούνται από την UV ακτινοβολία, προστατεύοντας έτσι από τη φωτογήρανση. Πρόκειται για ένζυμα σταθερά στη θερμοκρασία και την UV ακτινοβολία, τα οποία έχουν ενσωματωθεί σε προϊόντα *cosmeceuticals* με επιτυχία (Linter, et al., 2009), όπως π.χ. το Protective Moisturizer SPF15 ή το Reparative Moisturizer από την εταιρεία Cosmeceuticals. Επίσης, από το κυανοβακτήριο *Anacyathis nodulans*, απομονώθηκε ένα ένζυμο που συμμετέχει στη διαδικασία επιδιόρθωσης του DNA που έχει υποστεί βλάβες από την UV ακτινοβολία. Επομένως, *cosmeceuticals* που περιέχουν το συγκεκριμένο ένζυμο μπορούν να προλαμβάνουν τη φωτογήρανση, δρώντας αντι-αποπτωτικά (Eker et al., 1990).

Αρκετές ουσίες με φωτοπροστατευτική δράση έχουν απομονωθεί από βακτήρια, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη σχυτονεμίνη (*scytonemin*), μια χρωστική που απορροφά την UV-A ακτινοβολία. Μπορεί να παραχθεί με επαγωγή με UV-A ακτινοβολία από το κυανοβακτήριο *Chroococcidiopsis sp.*, σε συνδυασμό με θέρμανση και οξειδωτικούς παράγοντες. Σχυτονεμίνη έχει το προϊόν *Karipotone* από την Greentech. Από την άλλη, ορισμένα βακτήρια έχουν αναφερθεί ότι παράγουν μελανίνη από φαινολικά προϊόντα αποικοδόμησης, όπως ο οξικός 3,4-διυδροξυφαινυλ-εστέρας (3,4-dihydroxyphenylacetate), που συσσωρεύονται κατά τη διάρκεια του καταβολισμού της τυροσίνης. Σύνθεση της μελανίνης έχει επίσης αναφερθεί από ένα θαλάσσιο βακτήριο, το *Shewanella colwelliana* (Kim, S.K., 2012).

Τα αμινοξέα τύπου μυκοσπορίνης (Mycosporine-Like Amino Acids, MAAs), π.χ. *Shinorine*, *Porphyra-334* κ.α., έχουν προταθεί για πολλές δράσεις, με κυριότερη την απορρόφηση της ηλιακής ενέργειας. Φαίνεται να παράγονται από κυανοβακτήρια που κατοικούν σε περιοχές με αυξημένη συγκέντρωση αλάτων (Kim, S.K., 2012). Τελευταία, γίνεται χρήση τους και σε καλλυντικά προϊόντα με αντιγηραντική δράση. Μια ελβετική εταιρία, η Mibelle Biochemistry, ήδη παράγει ένα νέο αντιγηραντικό καλλυντικό προϊόν, το *HelioGuard 365*, χρησιμοποιώντας αμινοξέα τύπου μυκοσπορίνης, τα οποία εξάγει απευθείας από κυανοβακτήρια.

Οι πολυσακχαρίτες, όπως η χιτίνη και οι εξωπολυσακχαρίτες, αποτελούν βασικό δομικό συστατικό των κυτταρικών τοιχωμάτων των μικροβίων και χρησιμοποιούνται σε πολλά προϊόντα καλλυντικών, ως βελτιωτικά υφής. Πολλά είναι τα βακτηριακά είδη που περιέχουν εξωπολυσακχαρίτες, όπως τα *Alteromonas macleodii subsp. Fijiensis*, *Alteromonas macleodii*, *Alteromonas inferuns*, *Alteromonas* strain HYD 1644, *Pseudoalteromonas* CAM 025 και CAM 036 κ.α. Μάλιστα εξωπολυσακχαρίτες με μεγάλη ποσότητα ουρονικού οξέος, έχουν υψηλό ιξώδες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν παράγοντες ρύθμισης του ιξώδους σε καλλυντικά προϊόντα. Μια πρόσφατη μελέτη μάλιστα παρήγαγε εξωπολυσακχαρίτες μικρού μοριακού βάρους και καθορισμένου μεγέθους με μεγάλη επαναληψιμότητα, χρησιμοποιώντας

αποπολυμερισμό μέσω ελευθέρων ριζών με καταλύτη μέταλλο. Οι ερευνητές επέλεξαν σαν καταλύτη τον χαλκό, μιας και αυτός μπορεί να αποτελέσει σε χαμηλές συγκεντρώσεις έναν καλό αντιοξειδωτικό παράγοντα που προστατεύει το δέρμα από επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες οξειδωτική βλάβη και UV ακτινοβολία. Επομένως, αυτού του είδους οι εξωπολυσακχαρίτες απορροφώνται εύκολα από το δέρμα και μπορούν μελλοντικά να εφαρμοστούν σαν παράγοντες προστασίας του. Πρόσφατα, από το βακτήριο *Alteromonas macleodii subsp. Fijiensis* απομονώθηκε ένας σημαντικός εξωπολυσακχαρίτης που φαίνεται να μειώνει την έκφραση του διακυτταρικού μορίου προσκόλλησης (intercellular adhesion molecule – ICAM-I) κατά 76% στα κερατινοκύτταρα, κάτι που σημαίνει ενδεχομένως ότι η συγκεκριμένη ένωση μπορεί να αποτελέσει έναν καλό αντιφλεγμονώδη παράγοντα σε καλλυντικά, μειώνοντας την παραγόμενη από τη UV ακτινοβολία φλεγμονή του δέρματος (Kim, S.K., 2012).

Τα καρτενοειδή είναι μια σημαντική κατηγορία χρωστικών ενώσεων, που χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τις ξανθοφύλλες (που περιέχουν οξυγόνο) και τις καροτίνες. Τα καρτενοειδή χρησιμοποιούνται ευρέως στα καλλυντικά, ειδικά στις αντηλιακές κρέμες (π.χ. Methode Jeanne Piaubert -Anti -Ageing Facial Sun, Kiehl's Since 1851 Multi-Purpose Facial Formula). Πρόκειται για ενώσεις με 40 άτομα άνθρακα που προκύπτουν από τον ενζυματικό πολυμερισμό των ισοπρενικών μονάδων. Πολλά βακτήρια που έχουν απομονωθεί έχουν την ικανότητα να παράγουν το καρτενοειδές ασταξανθίνη. Η ασταξανθίνη χρησιμοποιείται στα καλλυντικά τόσο σαν χρωστική όσο και σαν αντιοξειδωτικός παράγοντας, ενώ φαίνεται να είναι απαραίτητη για την επιβίωση πολλών ψαριών, αλγών και μαλακίων. Τα βακτήρια που την παράγουν, φαίνεται να έχουν γονίδια τα οποία έχουν ήδη απομονωθεί και ελεγχθεί ως προς την ικανότητά τους να παράγουν ασταξανθίνη, εξετάζοντας έτσι την πιθανότητα να παραχθεί το συγκεκριμένο μόριο βιοτεχνολογικά (Kim, S.K., 2012).

Μικρά μόρια της κατηγορίας των κεραμιδίων (ceramides) και σφιγγολιπιδίων (sphingolipids) χρησιμοποιούνται επίσης στα καλλυντικά ως επιδερμικοί ενυδατικοί παράγοντες, αλλά είναι υψηλού κόστους λόγω της σπανιότητάς τους. Σφιγγολιπίδια, όπως το ceramide phosphorylglycerol phosphate, έχουν απομονωθεί στο παρελθόν από το αναερόβιο βακτήριο *Bacteroides melaninogenicus* (White, D.C., & Tucker, A.N., 1970).

Η ρεσβερατρόλη είναι δευτερογενής μεταβολίτης του εξωτερικού φλοιού των σταφυλιών, είναι συστατικό του κόκκινου κρασιού και πιστεύεται ότι είναι ευεργετική για την υγεία. Είναι μια φυτοαλεξίνη που συντίθεται από τα φυτά όταν αυτά αντιστέκονται στις επιθέσεις από μύκητες και βακτήρια (Sadruddin, S., & Aroga, R., 2009). Η ρεσβερατρόλη συμβάλλει στην απώλεια βάρους, την αύξηση ενέργειας, την μείωση τοξινών, την ανακούφιση της δυσκοιλιότητας και στην αντιγήρανση. Επίσης μπορεί να καταπολεμήσει το φούσκωμα και τις ρυτίδες, το διαβήτη και την αρθρίτιδα. Χρησιμοποιείται στα καλλυντικά, καθώς υπάρχει ο ισχυρισμός ότι προστατεύει το κολλαγόνο (Tian, T., et al., 2008; Wang, H., et al., 2007).

Το 1975 απομονώθηκε από το μυκήλιο του ακτινοβακτηρίου *Streptomyces hydroscopicus* το αντιβιοτικό ραπαμυκίνη (Rapamycin / AY-22,989), το οποίο βρέθηκε δραστικό έναντι των μυκήτων *Candida albicans*, *Microsporium gypseum* και *Trichophyton granulosum*. (Vezina, C., et al., 1975) Αρκετά αργότερα όμως, το 2010, η ραπαμυκίνη εξετάστηκε σαν παράγοντας αντιγήρανσης με πολύ καλά αποτελέσματα. Η ραπαμυκίνη φαίνεται να στοχεύει σε μονοπάτια μακροζωίας και να μιμείται ορισμένες πτυχές του μηχανισμού δράσης του διαιτητικού περιορισμού. Αποδείχτηκε ότι επιβραδύνει τη γήρανση σε ζύμες και ασπόνδυλα, ενώ βρέθηκε πρόσφατα ότι αυξάνει τη διάρκεια ζωής σε τρωκτικά. Επιπλέον, δείχνει εντυπωσιακά αποτελέσματα σε μοντέλα τρωκτικών για ασθένειες που σχετίζονται με την ηλικία, μιας και η ραπαμυκίνη έχει ήδη εγκριθεί για χρήση σε καρκινοπαθείς ασθενείς (Kaeberlein, M., 2010).

Πρόσφατα, απομονώθηκε η χρωστική Βακτηριοχλωροφύλλη α (Bacteriochlorophyll a) από το φωτοσυνθετικό βακτήριο *Rhodobacter sphaeroides*. Πέρα από αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική, εμφανίζει και αντιγηραντική δράση, μιας και ενεργοποιεί την παραγωγή προκολλαγόνου, συμβάλλει στην έκφραση ορισμένων γονιδίων που σχετίζονται με τη βελτίωση των ρυτίδων και εμφανίζει δερματο-προστατευτική δράση (Kim, N. Y., et al., 2015)

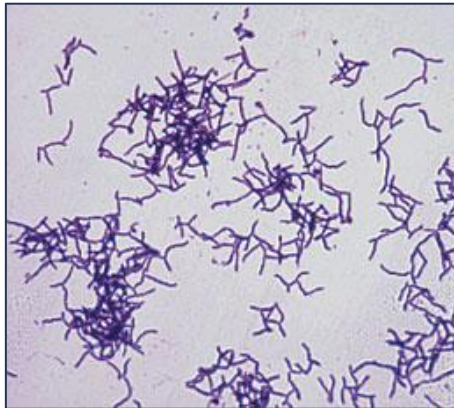
Η ανώμαλη μελάγχρωση του δέρματος μπορεί να οδηγήσει σε κηλίδες, σε καφέ έως γκρι αποχρωματισμό ή σε φακίδες, που πιθανώς να απαιτούν καλλυντική περιποίηση. Τα προβλήματα μελάγχρωσης του δέρματος συμβαίνουν λόγω παραγωγής περισσότερης ή μικρότερης ποσότητας μελανίνης από το φυσιολογικό. Τα μελανοκύτταρα παράγουν μελανίνη και ενεργοποιούνται από το ένζυμο τυροσινάση, η οποία δημιουργεί το χρώμα του δέρματος, των ματιών και μαλλιών. Οι περισσότερες θεραπείες λεύκανσης του δέρματος, προκαλούν μείωση της παραγωγής μελανίνης μέσω αναστολής της τυροσινάσης. Παρά το γεγονός ότι ουσίες με λευκαντική δράση φαίνεται να απομονώνονται κατά κύριο λόγο από μύκητες, ο Sano και ο Kaya περιέγραψαν την απομόνωση και την ταυτοποίηση ενός καινούριου μορίου, της οσιλαπεπτίνης G (oscillapeptin G), ένα κυκλικό δεσφιπεπτίδιο, αναστολέα του ενζύμου τυροσινάσης, από το τοξικό κυανοβακτήριο *Oscillatoria agardhii*. (Sano, T., & Kaya, K., 1996).

Τέλος, ενδιαφέρον παρουσιάζει η σχέση των βακτηρίων με τη διαδικασία της επούλωσης. Έχει προταθεί ότι η χρονιότητα μιας πληγής ξεκινά με επίμονα υψηλά επίπεδα βακτηρίων στους ιστούς, και ιδίως με την παραγωγή ενδοτοξίνης, με αποτέλεσμα την παρατεταμένη αύξηση των προφλεγμονωδών κυτοκινών. Αυτή η κατάσταση με τη σειρά της οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα μητρικών μεταλλοπρωτεασών (Matrix Metalloproteases - MMP's) μαζί με ένα μειωμένο επίπεδο των αναστολέων τους, και μια μειωμένη παραγωγή αυξητικών παραγόντων. Η φλεγμονή είναι ένα φυσιολογικό μέρος της διαδικασίας επούλωσης ενός τραύματος, ωστόσο, αν η φλεγμονώδης αντίδραση είναι πολύ υπερβολική, η διαδικασία επιδιόρθωσης παρατείνεται. Τα βακτήρια διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στην επούλωση των πληγών, επιτρέποντας συγκεκριμένα επίπεδα φλεγμονώδους αντίδρασης. Υπο-μολυσματικά επίπεδα βακτηρίων φαίνεται να επιταχύνουν την επούλωση πληγών και το σχηματισμό κοκκιώδους ιστού, με

αυξημένη διείσδυση ουδετερόφιλων, μονοκυττάρων και μακροφάγων, αυξημένα επίπεδα προσταγλανδίνης E2, και αύξηση σχηματισμού κολλαγόνου. Αυτή η απόδειξη ανοίγει το δρόμο για την έρευνα των βακτηρίων και τη συμμετοχή τους στη διαδικασία της επούλωσης, εξετάζοντας ενδεχομένως την εφαρμογή τους σε επουλωτικά προϊόντα cosmeceuticals. (Edwards, R. & Harding, K. G., 2004)

A.3. Βακτήρια του γένους *Streptomyces*

Το γένος *Streptomyces* είναι το μεγαλύτερο γένος της οικογένειας Streptomycetaceae, της τάξης βακτηρίων Actinomycetales (Waksman, S. A., & Hinrici, A. T., 1943). Η μετάφραση του ονοματός του σημαίνει «αλυσίδα μυκήτων», παρ' όλ' αυτά πρόκειται για Gram θετικά βακτήρια (Chater, K. 1984). Παρόλο που δεν είναι μύκητες, μπορεί να βρεθούν και στα ίδια ενδιαιτήματα όπου μπορεί να βρεθούν μύκητες και παρουσιάζουν επιφανειακές ομοιότητες (Ikeda, H., et al., 2003). Όλα τα μέλη της οικογένειας Streptomycetaceae, ανάμεσά τους και το γένος *Streptomyces*, έχουν περίπλοκο κύκλο ζωής, σχηματίζουν μηκύλια και εναέριες υφές, που μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μια αλυσίδα σπορίων, ενώ έχουν ειδικά χαρακτηριστικά στο 16S rRNA τους. Περιλαμβάνουν συγκεκριμένες μενακινόνες, ενσωματωμένο διαγνωστικό αμινοξύ στο κυτταρικό τους τοίχωμα, στερούνται διαγνωστικού σακχάρου (Schrempf, H., 2006), αλλά έχουν χαρακτηριστικά φωσφολιπίδια και γλυκολιπίδια (Kämpfer, P., 2006) και χαρακτηρίζονται από μεγάλες αναλογίες βάσεων γουανίνης (G) και κυτοσίνης (C) στο γονιδίωμά τους (Madigan M., et al., 2005). Αναγνωρίζονται τουλάχιστον 500 είδη *Streptomyces*. Η «σκονισμένη» εμφάνιση της ώριμης αποικίας, η συμπαγής φύση και το χρώμα καθιστούν την ταυτοποίηση των αποικιών του *Streptomyces* σε τρυβλία με άγαρ σχετικά εύκολη (Madigan M., et al., 2005).



Εικόνα A.9. Στέλεχος *Streptomyces* μετά από Gram χρώση

Τα τελευταία χρόνια τα *Streptomyces* έχουν αποδείξει ότι αποτελούν πλούσια πηγή μορίων μικρού μοριακού βάρους, πολλών κατηγοριών, με δράση αντιβακτηριδιακή, αντιμυκητιασική, αντιπαρασιτική, κυτταροστατική κ.α., καθώς και ενζύμων που είναι απαραίτητα για τη φυσική βιομετατροπή πολλών μακρομορίων του εδάφους (Schrempf, H., 2006).

Μορφολογία του γένους *Streptomyces*

Τα *Streptomyces* είναι Gram θετικά αερόβια βακτήρια. Αυτό σημαίνει ότι το κυτταρικό τους τοίχωμα αποτελείται από πεπτιδογλυκάνες με ενσωματωμένο LL-διαμινοπιμελικό οξύ (LL-diaminopimelic acid) (διαγνωστικό αμινοξύ), ενώ στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εμφανίζονται σε στρώματα με μικρή ηλεκτρονιακή πυκνότητα, ομοιογενή, περίπου 16-35 nm. Η ταξινομική σημασία των πολικών λιπιδίων είναι μεγάλη, μιας και υπάρχουν πέντε τύποι χαρακτηριστικών

φωσφολιπιδίων. Το γενετικό τους υλικό είναι ένα γραμμικό χρωμόσωμα, στο οποίο το ζεύγος των αζωτούχων βάσεων G + C κυμαίνεται από 69% έως 78% (Kämpfer, P., 2006), ενώ περιλαμβάνουν χαρακτηριστικές αλληλουχίες ανάμεσα στα γονίδια για το 23S και το 16S rRNA (Schrempf, H., 2006).

Περιέχουν μενακινόνες, με μία μερικώς κορεσμένη πλευρική αλυσίδα ισοπρενοειδών στη θέση 3 της ναφθοκινόνης. Η σύνθεση των μενακινονών βοηθάει στη διαφοροποίηση των *Streptomyces*, μιας και ο διαφορετικός αριθμός των ισοπρενικών μονάδων, ο διαφορετικός βαθμός υδρογόνωσής τους και η θέση των υδρογονωμένων ισοπρενικών μονάδων βοηθούν στην ταυτοποίηση και στην ταξινόμησή τους (Kämpfer, P., 2006).

Σε άγαρ σχηματίζουν διακριτικές και λειχηνοειδείς, δερματώδεις ή βουτυρώδεις αποικίες (Kämpfer, P., 2006). Δημιουργούν νημάτια, τα οποία έχουν διάμετρο 0,5-1,0 μm και απροσδιόριστο μήκος. Η ανάπτυξη γίνεται από το ένα μήκος του νήματος στο άλλο με διακλαδώσεις. Έτσι, η βλαστική φάση αποτελεί μια μάζα πυκνά πλεγμένη, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μυκηλίου ή αποικίας, η οποία όταν γερνάει δημιουργούνται εναέρια νημάτια, τα οποία γεννούν σπόρια πάνω από την επιφάνεια της αποικίας (Madigan M., et al., 2005).

Οι αποικίες έχουν στην αρχή ομαλή επιφάνεια, αλλά όταν στη συνέχεια αναπτύσσουν μυκήλια, εμφανίζονται να έχουν κροκιδώσεις ή κόκκους, ή βελούδινη υφή, ή μορφή σκόνης. Οι αποικίες του γένους *Streptomyces* είναι πολυκυτταρικές και διαφοροποιημένες, ενώ παρουσιάζουν χρονικό και χωρικό έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, της μορφογένεσης, του μεταβολισμού και της ροής των μεταβολιτών. Ο μεταβολισμός του είναι οξειδωτικός και χημειοοργανοτροφικός. (Kämpfer, P., 2006) Ο τρόπος παραγωγής των σπορίων, καθώς και το σχήμα και η διάταξη των εναέριων νηματίων των *Streptomyces* αποτελούν θεμελιώδη τους χαρακτηριστικά, που τα ξεχωρίζουν από τους υπόλοιπους ακτινομύκητες. Τα σπόρια τους μάλιστα (ή αλλιώς κονίδια) φέρουν μια χρωστική, που δίνει στην αποικία χαρακτηριστικό χρώμα (Madigan M., et al., 2005).

Δημιουργούν ένα σύμπλεγμα μυκηλίου-υποστρώματος, το οποίο βοηθά στη σάρωση οργανικών ενώσεων από τα υποστρώματα τους. Αν και τα μυκήλια και οι εναέριες υφές που προκύπτουν από αυτούς είναι ακίνητες, η κινητικότητα επιτυγχάνεται με διασπορά των σπορίων (Chater, K. 1984). Οι επιφάνειες των σπορίων μπορεί να είναι τριχωτές, ζαρωμένες, λείες, αγκαθωτές ή με εξογκώματα (Dietz, A. & Mathews, J., 1971). Μακριές αλυσίδες σπορίων (που συχνά περιέχουν περισσότερα από 50 σπόρια) περιέχονται στις εξειδικευμένες εναέριες υφές (Chater, K. 1984).

Κύκλος ζωής του γένους *Streptomyces*

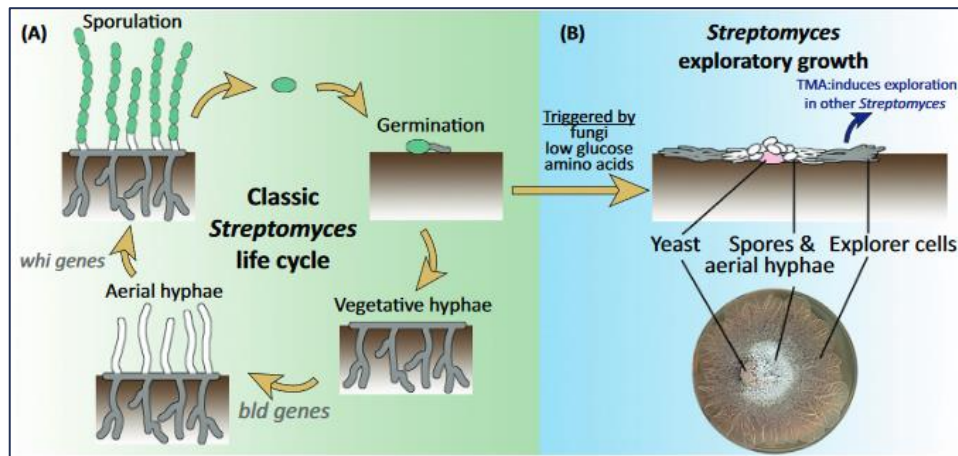
Τα βακτήρια του γένους *Streptomyces* είναι τα μόνα από τα βακτήρια εδάφους που σχηματίζουν νηματοειδή μυκήλια, εναέριες υφές και σπόρια κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους (Ikeda, H., et al., 2003). Παράγουν ποικιλία εξειδικευμένων μεταβολιτών με πολλαπλές χρήσεις, από απόκτηση θρεπτικών συστατικών έως και αναστολή της εξέλιξης ανταγωνιστικών οργανισμών. Αυτή η εξειδικευμένη παραγωγή μεταβολιτών είναι μοναδική για τα *Streptomyces*, και έχει

προταθεί ότι τα βακτήρια αυτά παράγουν μια ποικίλη γκάμα μεταβολιτών, ώστε να υποστηρίξουν τον ασυνήθιστο κύκλο ζωής τους (Jones, S.E. & Elliot, M.A., 2017).

Τα *Streptomyces* παράγουν σπόρια και ο κύκλος ζωής τους ξεκινά με τη βλάστηση αυτών. Οι αναδυόμενοι σωλήνες εκτείνονται με πολική ανάπτυξη στις άκρες των υφών. Διακλαδώσεις αναδύονται περιστασιακά, και αυτός ο επαναληπτικός κύκλος επέκτασης του άκρου των υφών και των διακλαδώσεων τελικά οδηγεί στον σχηματισμό ενός πυκνού δικτύου βλαστικών κυττάρων, γνωστό και ως βλαστικό μυκήλιο (Jones, S.E. & Elliot, M.A., 2017).

Τα βλαστικά κύτταρα των *Streptomyces* δεν ακολουθούν την κλασική κυτταρική διαίρεση, αντιθέτως δημιουργούν περιστασιακά εγκάρσια τοιχώματα εντός των βλαστικών υφών, ώστε να διασπείρουν μακρομόρια. Τα χρωμοσώματα αντιγράφονται εντός των υφών και διαχωρίζονται κατά μήκος των αυξανόμενων νημάτων και των αναδυόμενων διακλαδώσεων (Wolánski, M. et al., 2011 ; Kois-Ostrowska, A., 2016)

Η αναπαραγωγική φάση του κύκλου ζωής των *Streptomyces* περιλαμβάνει την αύξηση των νημάτων υφών που δεν έχουν διακλαδώσεις, από το βλαστικό μυκήλιο. Οι εναέριες υφές στη συνέχεια μετατρέπονται σε αλυσίδες αδρανών εξοσπορίων, μέσω ενός ταυτόχρονου κύκλου κυτταρικής διαίρεσης και διαχωρισμού των χρωμοσωμάτων (Εικόνα Α.10). Τα προκύπτοντα σπόρια είναι ανθεκτικά σε μια σειρά από τις περιβαλλοντικές μεταβολές, και μπορούν εύκολα να διασκορπιστούν στο περιβάλλον (Jones, S.E. & Elliot, M.A., 2017).



Εικόνα Α.10. Κύκλος ζωής και επεκτατική ανάπτυξη των *Streptomyces*

Οικολογία του γένους *Streptomyces*

Οι Στρεπτομύκητες είναι από τα πιο πολυάριθμα και πανταχού παρόντα βακτήρια εδάφους. Είναι ζωτικής σημασίας για το περιβάλλον, λόγω της ευρείας γκάμας μεταβολικών διεργασιών και βιομετατροπών τους (Bentley, S. D., et al., 2002). Είναι γνωστοί για την ξεχωριστή "γήινη" μυρωδιά τους, που προκύπτει από την παραγωγή μιας σειράς πτητικών μεταβολιτών, που ονομάζονται γεωσμίνες. Οι γεωσμίνες είναι τερπενοειδή, με 15 άτομα άνθρακα, με

χαρακτηριστικό παράδειγμα την trans-1,10-διμεθυλο-trans-9-δεκαλόλη. Τα αλκαλικά και τα ουδέτερα εδάφη είναι πιο πρόσφορα για την ανάπτυξη των *Streptomyces* σε σχέση με τα όξινα. Τα *Streptomyces* προτιμούν τα καλά στραγγιζόμενα εδάφη, μιας και χρειάζονται λιγότερο υδατικό δυναμικό για να αναπτυχθούν σε σχέση με πολλά άλλα βακτήρια. Είναι αυστηρά αερόβιοι οργανισμοί και η ανάπτυξή τους σε υγρή καλλιέργεια ενισχύεται συχνά με πυκνό αερισμό (Madigan M., et al., 2005). Η ανάπτυξή τους εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως την ύπαρξη θρεπτικών συστατικών, τη θερμοκρασία, το pH, τα επίπεδα υγρασίας και αλατότητας, την υφή του εδάφους και το κλίμα (Locci, R., 1989), παρ' όλ' αυτά δεν απαιτούν πηγές οργανικού αζωτού, βιταμίνες ή άλλους παράγοντες ανάπτυξης. Γενικά, είναι μεσόφιλα βακτήρια, αν και μερικά είναι θερμοανθεκτικά (αντέχουν σε θερμοκρασία έως και 45°C) και κάποια άλλα θερμοφιλά (αναπτύσσονται σε θερμοκρασία περίπου 28–55°C ή και περισσότερο) (Kämpfer, P., 2006).

Εντούτοις, τα συνολικά οικοφυσιολογικά γνωρίσματα των *Streptomyces* υποστηρίζουν ένα πιο «κοσμοπολιτικό» βιογεωγραφικό προφίλ, μιας και δεν είναι το έδαφος το μόνο περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι διανέμονται ευρέως και σε υδάτινα και σε χερσαία περιβάλλοντα (Antony-Babu, S., et al., 2008). Αυτή η διασπορά των *Streptomyces* θα μπορούσε να αποδοθεί στην αναπαραγωγή τους μέσω σπορίων, τα οποία εξαπλώνονται εύκολα. Έτσι θα μπορούσε να εξηγηθεί η παρουσία τους σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Αρκετά μέλη του γένους *Streptomyces* έχουν απομονωθεί από διάφορα βλαστικά και αναπαραγωγικά φυτικά μέρη, όπως ρίζες, κόνδυλους, μίσχους, φύλλα και σπόρους (Anuncião, J. & Olivares, F. L., 2016). Πρόσφατες έρευνες τεκμηριώνουν τους ακτινομύκητες που προέρχονται από θαλάσσιους οικότοπους, ως πηγές νέων αντιβιοτικών και αντικαρκινικών παραγόντων (Baskaran, R., et al., 2011), μιας και πολλά είδη *Streptomyces* απομονώθηκαν από θαλάσσιες πηγές (Remya, M., & Vijayakumar, R., 2008).

Έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν σπόρια κάτω από αντίξοες αβιοτικές συνθήκες, ενώ προσαρμόζονται σε περιόδους ξηρασίας, παγετού, υδροστατικής πίεσης και αναερόβιες συνθήκες (Kämpfer, P., 2006), μια ανταγωνιστική ικανότητα που σχετίζεται ενδεχομένως με την παραγωγή αντιβιοτικών, που είναι εκτεταμένη στα συγκεκριμένα βακτήρια. Έχουν ένα ευρύ φάσμα pH ως ευνοϊκό για την ανάπτυξή τους, το οποίο μάλιστα κυμαίνεται μεταξύ των διαφορετικών ειδών *Streptomyces* (π.χ. pH 4.3 για το οξεόφιλο *S. yeochonensis*, pH 7.0 για το ουδετερόφιλο *S. Roseus*, και pH 10 για το βασεόφιλο *S. alkalithermotolerans*) (Anuncião, J. & Olivares, F. L., 2016).

Ως χημειοοργανοτροφικοί οργανισμοί, εμφανίζουν μια μεγάλη ευελιξία στο μεταβολισμό ενός ευρέος φάσματος πηγών άνθρακα συμπεριλαμβανομένων μονο- και δι-σακχαριτών, πολυολών, οργανικών οξέων, πολυσακχαριτών, αλλά και πιο σύνθετων και ανθεκτικών πηγών άνθρακα (Anuncião, J. & Olivares, F. L., 2016). Συμμετέχουν στην αποικοδόμηση των αδιάλυτων υπολειμμάτων άλλων οργανισμών, όπως λιγνοκυτταρίνης και χιτίνης (από τα πιο άφθονα

βιοπολυμερή του κόσμου), καθιστώντας τους στρεπτομύκητες από τους βασικούς οργανισμούς στην ανακύκλωση άνθρακα (Bentley, S. D., et al., 2002). Συμμετέχουν στην αποδόμη πολλών ακόμα οργανικών συστατικών που χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο, όπως βαμβάκι και φυτικές ίνες, μαλλί, υδρογονάνθρακες αέριων καυσίμων και γαλακτωμάτων, και καουτσούκ (Kämpfer, P., 2006).

Ταυτοποίηση των *Streptomyces*

Η αλληλούχιση των γονιδίων του 16S rRNA και η σύγκρισή τους με δημοσιευμένες αλληλουχίες είναι ενδεχομένως η πιο αξιόπιστη μέθοδος για αντιστοίχιση των οργανισμών στα διάφορα γένη. Παρ' όλ' αυτά, εξαιτίας των πολλών δημοσιευμένων ειδών του γένους *Streptomyces*, δεν είναι εύκολο να προταθεί μια ενιαία μέθοδος για ταυτοποίησή τους. Πριν την οργάνωση ενός «σχεδίου» ταυτοποίησης των ειδών του *Streptomyces*, περισσότερες γονιδιωματικές πληροφορίες πρέπει να αξιολογηθούν. Τα τελευταία χρόνια, μόνο μερικά είδη έχουν προταθεί για ανάλυση με βάση την αλληλουχία του 16S RNA και τον φαινοτυπικό χαρακτηρισμό. Η ICSP υποεπιτροπή για την ταξινόμηση των Streptomycetaceae προτείνει ως πρώτο βήμα τη μελέτη κάποιας συνωνυμίας γονιδίων, με στόχο να μειωθεί ο αριθμός των ειδών του συγκεκριμένου είδους. Έως τώρα τα γονιδιώματα μόνο δύο ειδών είναι διαθέσιμα (Kämpfer, P., 2006). Το 2002 αναφέρθηκε η πρώτη πλήρης αλληλούχιση του γονιδιώματος του *S. coelicolor*, που περιγράφεται ένα μοντέλο που αφορά την εξέλιξη ενός μεγάλου γραμμικού χρωμοσώματος (Bentley, S. D., et al., 2002). Η σύγκριση των γονιδιωμάτων των *S. averiltilis* και *S. coelicolor* υποστηρίζει αυτό το μοντέλο (Bentley, S. D., et al., 2003). Επιπλέον, ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι οι στρεπτομύκητες είναι μέλη της ίδιας ταξινόμησης σειράς (Actinomycetales) με τους αιτιολογικούς παράγοντες της φυματίωσης και της λέπρας (*Mycobacterium tuberculosis* και *Mycobacterium leprae*), τα γονιδιώματα των οποίων έχουν ήδη αλληλουχηθεί. Επομένως, μια σύγκρισή τους θα μπορούσε να μας δώσει ενδιαφέρουσες πληροφορίες (Bentley, S. D., et al., 2002).

Δευτερογενείς μεταβολίτες και αντιβιοτικά του γένους *Streptomyces*

Η σημασία των *Streptomyces* για την ιατρική προέρχεται από το γεγονός ότι παράγουν πάνω από τα δύο τρίτα των φυσικής προέλευσης αντιβιοτικών σε χρήση, καθώς και πολλές ακόμα φαρμακευτικές ουσίες, όπως αντικαρκινικά και ανοσοκατασταλτικά, μέσω πολύπλοκων βιοσυνθετικών οδών (Bentley, S. D., et al., 2002). Οι πρώτες ενδείξεις για παραγωγή αντιβιοτικών από τα *Streptomyces* παρατηρήθηκαν στην επιφάνεια των τρυβλίων με άγαρ που χρησιμοποιήθηκαν για την αρχική απομόνωσή τους, μιας και γειτονικές αποικίες βακτηρίων εμφάνισαν ζώνες αναστολής (Madigan M., et al., 2005).

Τουλάχιστον 500 αντιβιοτικές ουσίες έχουν αποδειχθεί ότι παράγονται από *Streptomyces*, ενώ πάνω από 60 έχουν βρει πρακτική εφαρμογή στην ιατρική, την κτηνιατρική, τη γεωργία και τη βιομηχανία. Ορισμένοι στρεπτομύκητες παράγουν περισσότερα του ενός αντιβιοτικά, ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι αν ένας στρεπτομύκητας είναι ανθεκτικός στα

αντιβιοτικά που παράγει ο ίδιος, παραμένει συνήθως ευαίσθητος στα αντιβιοτικά που παράγονται από άλλους στρεπτομύκητες. Το αίτιο που προκαλεί την παραγωγή αντιβιοτικών, από πλευράς οικολογίας, δεν είναι σαφές. Εντούτοις, μια υπόθεση που έχει διατυπωθεί είναι ότι η παραγωγή αντιβιοτικών, η οποία συνδέεται με τη σπορίωση (διαδικασία που με τη σειρά της προκαλείται από την έλλειψη θρεπτικών στοιχείων), ίσως είναι ένας μηχανισμός αναστολής ανάπτυξης άλλων οργανισμών που ανταγωνίζονται τα διαφοροποιούμενα κύτταρα των *Streptomyces* για τα λιγοστά διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά (Madigan M., et al., 2005).

Τα αντιβιοτικά είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παρουσιάζουν μία μεγάλη ποικιλία χημικών τύπων. Περιλαμβάνουν αμινογλυκοσίδες, ανασμισίνες, ανθρακυκλίνες, β-λακτάμες, μακρολίδια, νουκλεοσίδια, πεπτίδια, πολυένια, πολυαιθέρες, τετρακυκλίνες και άλλα αντιβιοτικά που δεν συμπεριλαμβάνονται σε αυτές τις καλά προσδιορισμένες ομάδες (Crandall, L. W., & Hamill, R. L., 1986; Pape, H., & Rehm, H. J., 1986). Στον Πίνακα Α.1 που ακολουθεί παρουσιάζονται μερικά από τα πιο γνωστά αντιβακτηριακά που απομονώθηκαν από στρεπτομύκητες.

Πίνακας Α.1. Αντιβακτηριακά που παράγονται από είδη του γένους *Streptomyces* (Madigan M., et al., 2005 ; Crandall, L. W. & Hamill, R. L., 1986 ; Pape, H., & Rehm, H. J., 1986 ; www.galinos.gr).

Κοινή ονομασία	Χημική ομάδα	Παραγωγός οργανισμός
Ολεαντομυκίνη	Μακρολίδια	<i>S. antibioticus</i>
Βορομυκίνη	Μακρολίδια	<i>S. antibioticus</i>
Ερυθρομυκίνη	Μακρολίδια	<i>S. erythreus</i>
Κλινδαμυκίνη	Μακρολίδια	<i>S. lincolnensis</i>
Λανκασιδίνη	Μακρολίδια	<i>S. violaceoniger</i>
Τερραμυκίνη	Τετρακυκλίνες	<i>S. rimosus</i>
Χρυσομυκίνη	Τετρακυκλίνες	<i>S. aureofaciens</i>
Τετρακυκλίνη	Τετρακυκλίνες	<i>S. aureofaciens</i>
Οξυτετρακυκλίνη	Τετρακυκλίνες	<i>S. rimosus</i>
Χλωροτετρακυκλίνη	Τετρακυκλίνη	<i>S. aureofaciens</i>
Κλαβουλανικό οξύ	β-λακτάμες	<i>S. clavuligerus</i>
Σεφαμυκίνη Α, Β	β-λακτάμες	<i>S. chartreusis</i>
Θειεναμυκίνη	Καρβαπενέμες	<i>S. cattleya</i>
Υγρομυκίνη Β	Αμινογλυκοσίδες	<i>S. hygrosopicus</i>
Καναμυκίνη Α, Β	Αμινογλυκοσίδες	<i>S. hanamyceticus</i>
Σπεκτινομυκίνη	Αμινογλυκοσίδες	<i>Streptomyces spp.</i>
Στρεπτομυκίνη	Αμινογλυκοσίδες	<i>S. griseus</i>
Νεομυκίνη	Αμινογλυκοσίδες	<i>S. fradiae</i>
Δαπτομυκίνη	Λιποπεπτίδιο	<i>S. roseosporus</i>
Προστιναμυκίνη	Λιποπεπτίδιο	<i>S. pristinaespiralis</i>
Βανκομυκίνη	Τρικυκλικό γλυκοπεπτίδιο	<i>S. antibioticus</i>
Πυρομυκίνη	Αμινονουκλεοσίδης	<i>S. alboniger</i>
Τυνικαμυκίνη	Νουκλεοσίδες	<i>S. torulosus</i>
Λινκομυκίνη	Απροσδιόριστη	<i>S. lincolnensis</i>
Χλωραμφαινικόλη	Απροσδιόριστη	<i>S. venezuelae</i>
Φωσφομυκίνη	Απροσδιόριστη	<i>S. fradiae</i>

Τα πολυένια είναι μια κατηγορία ενώσεων με αντιμυκητιακή δράση, που και αυτές απομονώνονται κατά κύριο λόγο από βακτήρια του γένους *Streptomyces*. Συνδέονται με την εργοστερόλη της μεμβράνης του κυττάρου του μύκητα και έτσι τον εξασθενούν, προκαλώντας διαρροή ιόντων K⁺ και Na⁺, η οποία μπορεί να οδηγήσει στον μυκητιακό κυτταρικό θάνατο. Πρόκειται για μια υποομάδα των μακρολιδίων και μπορεί να είναι τριένια, τετραένια, πενταένια, εξαένια ή επταένια (Hamilton-Miller, 1973). Στον πίνακα Α.2 παρακάτω παρουσιάζονται κάποια παραδείγματα αντιμυκητιακών μορίων που προέρχονται από *Streptomyces*.

Πίνακας Α.2. Αντιμυκητιακά που παράγονται από είδη του γένους *Streptomyces* (Hamilton-Miller, 1973)

Κοινή ονομασία	Χημική ομάδα	Παραγωγός οργανισμός
Ρεμισαφυλίνη	Πολυένια (Τριένια)	<i>S. antibioticus</i>
Νυστατίνη	Πολυένια (Τετραένια)	<i>S. noursei</i>
Δισταμυκίνη Β	Πολυένια (Πενταένια)	<i>S. distallicus</i>
Μυκελίνη	Πολυένια (Εξαένια)	<i>S. roseoflavus</i>
Αμφοτερκίνη Β	Πολυένια (Επταένια)	<i>S. nodosus</i>

Πολλά ακόμα μόρια έχουν απομονωθεί από *Streptomyces*, αρκετά εξ' αυτών ίδιων χημικών κατηγοριών με τα ήδη αναφερθέντα αντιβακτηριακά ή αντιμυκητιακά, τα οποία και έδειξαν ποικιλία δράσεων, όπως αντιοϊκή, αντιογκική, αντιπαρασιτική, αντιυπερλιπιδαιμική, ανοσοκατασταλτική, νευροπροστατευτική, κατά του Alzheimer κ.α. Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα περιγράφονται στον πίνακα Α.3 που ακολουθεί.

Πίνακας Α.3. Δραστικές ουσίες που παράγονται από είδη του γένους *Streptomyces* (Solecka, J., et al., 2012)

Δράση	Κοινή ονομασία	Χημική ομάδα	Παραγωγός οργανισμός
Αντιογκικά	Ακτινομυκίνη D	Χρωμοπεπτίδια	<i>S. antibioticus</i>
	Μαγιαμυκίνη	Πολυκετίδιο	<i>S. sp. strain HB202</i>
	Δαυνορουμπικίνη	Ανθρακυκλίνες	<i>S. peuceticus</i>
	Δοξορουβικίνη	Ανθρακυκλίνες	<i>S. peuceticus</i>
	Μπλεομυκίνη	Ανθρακυκλίνες	<i>S. verticillus</i>
	Μυτομυκίνες	Κινόνες	<i>S. caespitosus</i>
	Ρεζιτοφλαβίνη	Άλλες κινόνες	<i>S. chibaensis</i>
	Στρεπτοζοτοκίνη	Απροσδιόριστη	<i>S. achromogenes</i>
Αντιπαρασιτικά	Μιλβεμυκίνες	Μακρολίδια	<i>S. hygrosopicus ssp. Aureolacrimosus</i>
	Αβερμεκτίνες	Μακρολίδια	<i>S. avermitilis</i>
	Ναντσανγκμυκίνη	Πολυαιθέρας	<i>S. nanchangensis</i>
	Βαλινομυκίνη	Κυκλοδεψιπεπτίδιο	<i>S. fulvissimus</i>
	Σταυροσπορίνη	Αλκαλοειδές	<i>S. sp. strain 11</i>
Αντιοϊκά	Τουνικαμυκίνη	Νουκλεοσίδια	<i>S. lyososuperficus</i>
	Στρεπτοβιρουντίνη	Νουκλεοσίδια	<i>S. griseoflavus subsp. Thuringiensis</i>
	JBIR-68	Απροσδιόριστη	<i>S. sp. R118</i>

Αντιυπερλιπιδαιμικά	Λιποσατίνες	β-λακτόνες	<i>S. toxytricini</i>
Ανοσοκατασταλτικά	Ραπαμυκίνη	Μακρολίδια	<i>S. hydroscopicus</i>
	Τακρολίμους	Μακρολίδια	<i>S. tsukubaensis</i>
Κατά του Alzheimer	Φυσοστιγμίνη	Αλκαλοειδές	<i>S. griseofuscus</i>
	Τουμεσκεναμίδα Α	Κυκλικό δεψιπεπτίδιο	<i>S. tumescens</i>
Νευροπροστατευτικά	Φλαβιογερανίνη	Ναφθοκινόνη	<i>S. sp. RAC226</i>

Ενδιαφέρον ακόμη παρουσιάζουν οι Μπαφιλομυκίνες, δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από *Streptomyces*, οι οποίες εμφανίζουν αντιμικροβιακή, αντιμυκητιακή, αντιογκική και αντιπαρασιτική δράση. Οι Μπαφιλομυκίνες A1, A2, B1, B2, C1 και C2 ανήκουν στην κατηγορία των μακρολιδίων και απομονώθηκαν από το *Streptomyces griseus*, εμφανίζοντας πολύ καλή αντιβακτηριακή δράση έναντι Gram θετικών βακτηρίων. Οι καινούριες Μπαφιλομυκίνες, 9-διυδροξυμπαφιλομυκίνη D και 29-υδροξυμπαφιλομυκίνη D απομονώθηκαν από το *Streptomyces sp.* YIM56209 και εμφάνισαν αξιόλογη αντιογκική δράση (Solecka, J., et al., 2012).

Τέλος, η μελέτη για τυχόν λευκαντική δράση από *Streptomyces* από τους Te-Sheng Chang and Min Tseng (2006), έδειξε ανάμεσα στα 10.000 είδη που εξετάστηκαν ένα πιθανό στέλεχος με αξιόλογη αναστολή του ενζύμου της τυροσινάσης, θέτοντας τις βάσεις για ανακάλυψη νέων παρεμποδιστών τυροσινάσης από μικροοργανισμούς (Chang, T. S., & Tseng, M., 2006).

A.3.1. *Streptomyces spinoverrucosus*

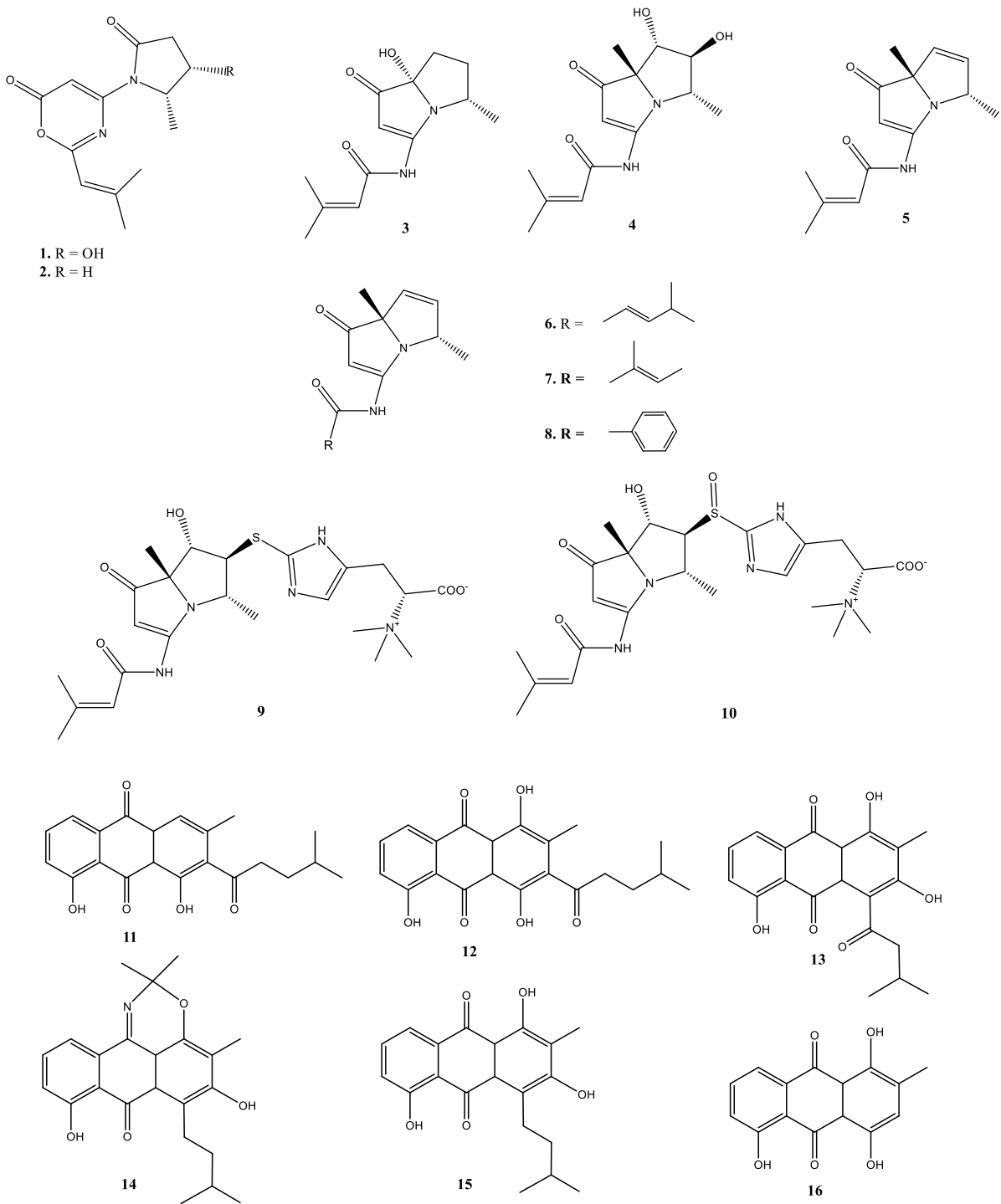
Ο *Streptomyces spinoverrucosus* αποτελεί ένα είδος του γένους *Streptomyces*, που διαφέρει από τα υπόλοιπα του ίδιου γένους όσον αφορά το χρώμα της εναέριας μάζας, των αποικιών και των υδατοδιαλυτών χρωστικών του. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον αέρα του Κουβέιτ (Kuwait). Το όνομά του προκύπτει από τις λατινικές λέξεις *spinosus* (ακανθώδης) και *verrucosus* (ακροχονδρώδης), αναφερόμενο στη μορφή της επιφάνειας των σπορίων του (Εικόνα A.11). Το χρώμα της εναέριας μάζας του, του δίνει τη δυνατότητα να τοποθετείται σε κόκκινες, κίτρινες, πράσινες και γκρι σειρές, είναι θετικό στη μελανίνη και σχηματίζει σπειροειδείς αλυσίδες σπορίων, με 10 έως 20 σπόρια ανά αλυσίδα, με την επιφάνειά τους να είναι ακανθωτή. Το χρώμα των αποικιών του είναι καφέ-κόκκινο, το χρώμα των υδατοδιαλυτών χρωστικών του είναι κόκκινο, καφέ ή ανάμιξή τους και αναπτύσσεται σε καλλιεργητικό μέσο με D-γλυκόζη, D-ξυλόζη, L-αραβινόζη, i-ινοσιτόλη, D-μαννιτόλη, φρουκτόζη, ραμνόζη, σουκρόζη και ραφινόζη. Το κυτταρικό του τοίχωμα περιλαμβάνει το διαγνωστικό αμινοξύ LL-διαμινοπιμελικό οξύ (Diab, A. & Al-Gounaim, M. Y., 1982)



Εικόνα Α.11. Η ακανθώδης – ακροχονδρώδης μορφή της επιφάνειας των σπορίων του *Streptomyces spinovertucosus*

Έως τώρα, από τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό έχουν απομονωθεί :

1. Παράγωγα 1,3 – οξαζιν – 6 – όνης (1,3-oxazin-6-one derivatives): Σπινοξαζίνη Α (**1**) και Σπινοξαζίνη Β (**2**) (Spinnoxazines Α και Β)
2. Οι Μποχεμαμίνες D (**3**), E (**4**), F (**5**), G (**6**), H (**7**) και I (**8**) (Bohemamines D-I)
3. Αλκαλοειδή πυρρολιζιδίνης τύπου μποχεμαμίνης: Σπιθιονεΐνη Α (**9**) και Σπιθιονεΐνη Β (**10**) (Spithioneines Α και Β)
4. Ανθρακινόνες: Γαλβακινόνη Α (**11**), Γαλβακινόνη Β (**12**) και Γαλβακινόνη C (**13**) (Galvaquinones Α, Β και C), 5,8-διυδροξυ-2,24-τριμεθυλ-6-(3-μεθυλβουτυλ)ανθρα[9,1-*de*][1,3]οξαζιν-7(2H)-όνη (**14**) (5,8 – dihydroxy – 2,2,4 – trimethyl – 6 - (3-methylbutyl) anthra[9,1-*de*][1,3]oxazin-7(2H)-one), λουπινασιδίνη Α (**15**) (lupinacidin Α) και Ισλανδισίνη (**16**) (islandicin) (Fu, P., et al., 2015 ; Fu, P. & MacMillan, J. B., 2015 ; Hu, Y., et al., 2012)



Εικόνα A.12. Ενώσεις που έχουν απομονωθεί από το *Streptomyces spinoverrucosus*

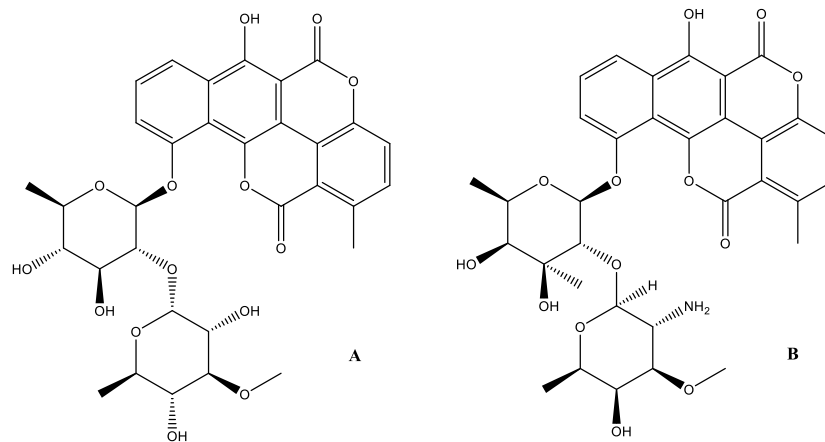
A.3.2. *Streptomyces chartreusis*

Ο *Streptomyces chartreusis* αποτελεί και αυτό είδος του γένους *Streptomyces*, απομονώθηκε από το έδαφος της Αφρικής (Leach, B. E., et al., 1953) και περιγράφηκε ταξινομικά για πρώτη φορά το 1956. Η ταξινόμησή του φαίνεται να είναι διαφορετική από τα άλλα είδη, μιας και η καλλιέργειά του χαρακτηρίζεται από την παραγωγή χαρακτηριστικών μπλε-γκρι έως μπλε-πράσινων σπορίων σε διάφορα καλλιεργητικά μέσα. Το όνομά του προκύπτει από τη γαλλική λέξη *chartreuse*, που σημαίνει κιτρινοπράσινος, και αναφέρεται στις χαρακτηριστικές χρωστικές του συγκεκριμένου μικροοργανισμού (Calhoun, K. N. & Johnson, L.E., 1956 ; Goodfellow, M., et al., 2012).

Οι αλυσίδες των σπορίων του είναι σπειροειδείς με 10 έως 50 σπόρια ανά αλυσίδα, ενώ τα συμπλέγματα των αλυσίδων ομοιάζουν με έλικες σπονδύλων. Η επιφάνεια των σπορίων είναι ακανθώδης. Το χρώμα της εναέριας μάζας της αποικίας είναι μπλε σε άγαρ ζύμης-βύνης, άγαρ αλεύρου βρώμης, άγαρ αλάτων-αμύλου και άγαρ γλυκερόλης-ασπαραγίνης. Έχει επίσης αναφερθεί και γκρι χρώμα σε άγαρ αλεύρου βρώμης. Το χρώμα σε καλλιεργητικό μέσο είναι μελανών αποχρώσεων σε άγαρ πεπτόνης-ζύμης-σιδήρου και ζωμού τρυπτόνης-ζύμης, αλλά όχι σε άγαρ τυροσίνης. Ως καλλιεργητικά μέσα, χρησιμοποιούνται τα D-γλυκόζη, L-αραβινόζη, σουκρόζη, D-ξυλόζη, ισο-ινοσιτόλη, D-μαννιτόλη, D-φρουκτόζη, ραμνόζη και ραφινόζη (Goodfellow, M., et al., 2012).

Χαρακτηριστικός δευτερογενής μεταβολίτης του συγκεκριμένου είδους είναι το αντιβιοτικό χαρτρεουσίνη (*chartreusin*) (Εικόνα A.13), το οποίο απομονώθηκε από το διήθημα της καλλιέργειας και από το μυκήλιό του. Η κοινή ονομασία χαρτρεουσίνη δόθηκε εξαιτίας του χαρακτηριστικού πρασινο-κίτρινου χρώματος του κρυσταλλικού προϊόντος, που ομοιάζει με το χρώμα των σπορίων του μικροοργανισμού (Leach, B. E., et al., 1953). Είναι δραστικό ενάντια σε βακτηριοφάγους, μυκοβακτηρίδια, gram-θετικά και αρκετά από τα gram-αρνητικά βακτήρια. Είναι σχετικά αδρανές έναντι των μυκήτων (Calhoun, K. N. & Johnson, L.E., 1956). Δομικό ανάλογο της χαρτρεουσίνης, η ελσαμικίνη A (*elsamicin A*) (Εικόνα A.13), απομονώθηκε και αυτή από το *S. chartreusis* και χρησιμοποιείται στη χημειοθεραπεία (Barceló F. & Portugal J., 2004).

Ακόμα, έχουν απομονωθεί τα αντιβιοτικά τουνικαμικίνες, με χαρακτηριστική τη N-δεακυλοτουνικαμικίνη (*N-deacyltunicamycin*). Οι τουνικαμικίνες είναι μοναδικές δομικά ενώσεις που αναστέλλουν ένζυμα απαραίτητα για τον σχηματισμό βασικών ενδιάμεσων στην πορεία βιοσύνθεσης των ευκαρυωτικών N-γλυκοπρωτεϊνών και των βακτηριακών πεπτιδογλυκανών. Το 2011 ταυτοποιήθηκαν δώδεκα γονίδια βιοσύνθεσης τουνικαμικινών από τον *S. chartreusis* (Doroghazi, J.R., et al., 2011).



Εικόνα A.13. Χημική δομή της Χατρεουσίνης (A) και Ελσαμυκίνης A (B)

Ένζυμα αποικοδόμησης ξυλάνης παράγονται από μια ευρεία ποικιλία ειδών μυκήτων και έχουν αναφερθεί για χρήση σε βιο-λεύκανση πολτών. Οι ξυλάνες ευθύνονται για το 20 έως 35% του συνολικού ξηρού βάρους των σκληρών ξύλων και ετήσιων φυτών και αντιπροσωπεύουν μια τεράστια πηγή ζυμώσιμων σακχάρων και καυσίμων. Η απομόνωση εξωκυτταρικής ξυλανάσης (xylanase) από το *Streptomyces chartreusis*, θέτει τις βάσεις για μελέτη του συγκεκριμένου μικροοργανισμού σε cosmeceuticals λευκαντικής δράσης (Li, X., et al., 2011).

A.4. Η μέθοδος της αντιστοίχισης (Annotation) γνωστών μεταβολιτών σε μίγματα (Dereplication)

Ο προσδιορισμός γνωστών μορίων σε πρώιμο στάδιο αποτελεί βασικό βήμα στην ανακάλυψη νέων φυσικών προϊόντων, καθώς ελαχιστοποιεί χρόνο και κόστος. Ο όρος Dereplication αναφέρεται στην ταυτοποίηση γνωστών μεταβολιτών σε ολικά εκχυλίσματα ή κλάσματα με σκοπό την ανακάλυψη νέων μορίων με φαρμακολογικό ενδιαφέρον. Για το σκοπό αυτό μέθοδοι υψηλής ανάλυσης, όπως η φασματομετρία μάζας μετασχηματισμού Fourier συζευγμένη με υγρή χρωματογραφία (LC-HRFTMS) και η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), βρίσκουν εφαρμογή με σκοπό την ανάλυση του χημικού προφίλ μικροβιακών εκχυλισμάτων. Η δημιουργία του μεταβολομικού προφίλ δίνει τη δυνατότητα της διαλογής εκχυλισμάτων μακροοργανισμών, καθώς και της απομόνωσης και καλλιέργειας μικροοργανισμών που ενδεχομένως παράγουν βιοδραστικά φυσικά προϊόντα (Tawfike, A.F., et al., 2013).

Λογισμικά, όπως το MZmine (<http://mzmine.github.io/>) και το SIEVE (Thermo Scientific), χρησιμοποιούνται για την πρωτογενή ανάλυση και επεξεργασία (data processing) των δειγμάτων. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες που ανιχνεύονται από την παραπάνω επεξεργασία προσδιορίζονται με τη βοήθεια βιβλιοθηκών και βάσεων δεδομένων ανάλυσης HRMS και NMR, όπως είναι η AntiMarin (μια βάση δεδομένων που αποτελεί συγχώνευση της βάσης δεδομένων Antibase), για δευτερογενείς μεταβολίτες μικροοργανισμών και ανώτερων μυκήτων, η MarinLit, για τα θαλάσσια φυσικά προϊόντα, το Dictionary of Natural Products και το Reaxys, τόσο για φυτικούς οργανισμούς όσο και για μικροοργανισμούς. Στη συνέχεια, η πλήρης ταυτοποίηση των μορίων πραγματοποιείται με τη χρήση αναλυτικών προτύπων αναφοράς στο HRMS και πειραμάτων NMR (¹HNMR, HSQC, COSY, HMBC) (Tawfike, A.F., et al., 2013).

Η αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z) των ανιχνευόμενων μεταβολιτών που εξάγεται από τα πειράματα LC-MS είναι η κύρια πληροφορία που χρησιμοποιείται στη διαδικασία του Dereplication. Για περισσότερο από μια δεκαετία, αναλυτές μάζας ήταν σε θέση να προσδιορίσουν μάζες με ακρίβεια, με μια απόκλιση κάτω των 10 ppm. Αυτό το επίπεδο ακρίβειας μάζας επιτρέπει τον προσδιορισμό στοιχειακών ορίων για ενώσεις κάτω των 600 Da, όταν συνδυάζεται με ισοτοπικές αναλογίες μάζας. Σήμερα, με τη χρήση φασματομέτρου μάζας κυκλοτρονίου ιόντων συντονισμού με μετασχηματισμό Fourier (FTICRMS) μπορούμε πλέον να έχουμε αποκλίσεις μάζας μικρότερες του 1 ppm, ενώ ένα τυπικό όργανο παρέχει απόκλιση μάζας από 1 έως 10 ppm. Εξαιτίας όμως των πολλών πιθανών ισομερών, αυτή η διαδικασία από μόνη της δεν αρκεί για την πλήρη ταυτοποίηση των ενώσεων. Χρειαζόμαστε επιπλέον χαρακτηριστικά διάκρισης, όπως το ισοτοπικό μοντέλο (Isotopic modeling), το χρόνο κατακράτησης στο χρωματογράφημα (Chromatographic retention time), τη μετατόπιση του χρόνου λόγω κινητικότητας του ιόντος (Ion mobility drift time) και τη θραυσματοποίηση του μορίου (Fragmentation - MS/MS). Επιπρόσθετες πληροφορίες από το φάσμα υπεριώδους/ορατού (UV/Vis) της ουσίας ή και τη βιολογική δραστηρότητά της, χρησιμοποιούνται

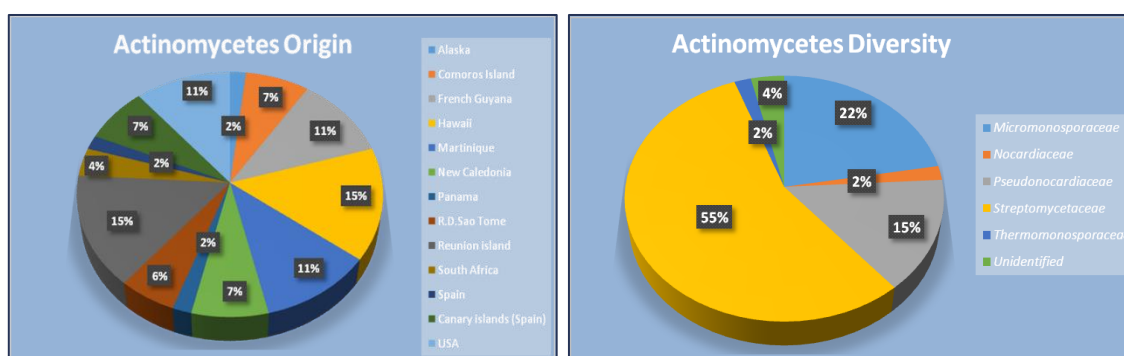
όταν τα παραπάνω χαρακτηριστικά δεν επαρκούν για την πλήρη ταυτοποίησή της. Επίσης, δεν πρέπει να ξεχνάμε ότι η ανάλυση μάζας βασίζεται στην ικανότητα του μορίου να δημιουργεί ιόντα. Ουδέτερες ενώσεις ή ενώσεις που δεν ιονίζονται πολύ, δεν εντοπίζονται από τον ανιχνευτή μάζας και γι' αυτό το λόγο, ο αριθμός των ενώσεων που εντοπίζονται σε ένα δείγμα, μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την πηγή και τις συνθήκες ιονισμού που χρησιμοποιήθηκαν (Covington, B.C., et al., 2017).

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B1. Παρασκευή δειγμάτων

B.1.1. Πειραματικά δεδομένα από το ερευνητικό έργο Microsmetics

Στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος Microsmetics, έγινε επιλογή 56 στελεχών ακτινομυκήτων από την παγκόσμια βιοποικιλότητα.



Εικόνα Β.1. Ποικιλομορφία των επιλεγμένων στελεχών ακτινομυκήτων

Τα επιλεγμένα στελέχη καλλιεργήθηκαν σε μια ποικιλία καλλιεργητικών μέσων. Στόχος ήταν κάθε στέλεχος να παράγει δέκα διαφορετικά εκχυλίσματα, ώστε να παράξουν όλο το δυνατό φάσμα δευτερογενών μεταβολιτών τους.

Πίνακας Β.1. Λίστα καλλιεργητικών μέσων ακτινομυκήτων

Καλλιεργητικό Μέσο Ακτινομυκήτων		
Κατάλληλο για όλους τους ακτινομύκητες	Κατάλληλο για είδη των γενών <i>Streptomyces</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Actinomadura</i>	Κατάλληλο για είδη του γένους <i>Micromonosporaceae</i>
DES-15	FPY-6	FPY-2
DEF-15S	FRA-2	S9702Xv2
FPY-12	FRM	RAM2P-V2
APM9	GESH-3	RAM-5P
DNPM	GPA	SAM-6
FR23	KHC	

Ο καθένας από τους 56 ακτινομύκητες εμβολιάστηκε στα θρεπτικά υλικά που αναφέρθηκαν παραπάνω. Ζυμώθηκαν στους 28° C, σε 70% υγρασία και στις 220 grm και καλλιεργήθηκαν για 7 ή 14 μέρες. Συνολικά παρήχθησαν 614 εκχυλίσματα ακτινομυκήτων.

Κατά τη διαδικασία του “high-throughput screening”, τα εκχυλίσματα των ακτινομυκήτων, καθώς και τα καλλιεργητικά τους μέσα διανεμήθηκαν σε 96-τρυπες πλάκες. Η κάθε πλάκα περιείχε 80 εκχυλίσματα. Οι ακτινομύκητες που τελικά επιλέχθηκαν ως βιοδραστικοί σε τουλάχιστον έναν

από τους εξετασθέντες στόχους, παρουσιάζονται στον Πίνακα Β.2 που ακολουθεί, μαζί με το καλλιεργητικό τους μέσο.

Πίνακας Β.2. Στοιχεία ακτινομυκήτων που επιλέχθηκαν για μελέτη

Στέλεχος	Κωδικός	Καλλιεργητικό μέσο
<i>Streptomyces chartreusis</i>	CA-126581	DNPM
<i>Streptomyces chartreusis</i>	CA-126581	FRM
<i>Streptomyces pactum</i>	CA-128791	FPY-12
<i>Streptomyces glaucusporus</i>	CA-214639	APM9
<i>Streptomyces purpurascens</i>	CA-129247	FPY-6
<i>Streptomyces spinoverrucosus</i>	CA-218259	FPY-6
<i>Streptomyces tendae</i>	CA-131129	DNPM
<i>Streptomyces griseus</i>	CA-118972	KHC
<i>Streptomyces hygrosopicus subsp. angustimyceticus</i>	CA-129531	DNPM
<i>Amycolatopsis kentuckyensis</i>	CA-126574	DNPM
<i>Micromonospora humi</i>	CA-129255	DEF-15S
<i>Pseudonocardia alni</i>	CA-126374	GESH-3

Από τους 12 ακτινομύκητες που αναφέρθηκαν, οι 8 ήταν στρεπτομύκητες και από αυτούς επιλέχθηκαν ο *Streptomyces spinoverrucosus* (CA-218259) και ο *Streptomyces chartreusis* (CA-126581) για περαιτέρω μελέτη και βιοκατευθυνόμενη απομόνωση των δευτερογενών τους μεταβολιτών. Τα 2 αυτά στελέχη επιλέχθηκαν για την αντιοξειδωτική / αντιγηραντική τους δράση.

Β.1.2. Προετοιμασία βιομάζας και Παρασκευή του εκχυλίσματος του ακτινομύκητα *Streptomyces spinoverrucosus*

Το στέλεχος CA-218259 του ακτινομύκητα *Streptomyces spinoverrucosus* απομονώθηκε από το αμμώδες έδαφος της παραλίας Playa de la Cometa (οPasit), στα Κανάρια νησιά της Ισπανίας (Canary Islands).

Για την παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας και επαρκή για τις περαιτέρω αναλύσεις και διαχωρισμούς βιομάζα, το συγκεκριμένο στέλεχος καλλιεργήθηκε με το βέλτιστο μέσο καλλιέργειας (FPY-6) σε κλίμακα ζύμωσης του 1 L.

Πίνακας Β.3. Συστατικά του μέσου καλλιέργειας FPY-6

Πηγή Άνθρακα (C)	Πηγή Αζώτου (N)	Ιχνοστοιχεία
Φρουκτόζη	Εκχύλισμα μαγιάς / Αμικάση / ΝΖ αμίνης / Βακτοπεπτόνη	Fe, Zn, Mn, Cu, Co

Η καλλιέργεια του μικροοργανισμού πραγματοποιήθηκε στους 28°C, με 70% υγρασία, η ανάδευση ήταν ρυθμισμένη στα 220 rpm και ολοκληρώθηκε μετά από 14 μέρες. Κατόπιν, 1L ακετόνης αναμίχθηκε με τη βιομάζα και το μίγμα ομογενοποιήθηκε με κατάλληλο αναδευτήρα

(blender). Η καλλιέργεια ανακινήθηκε για 1 h για να βελτιστοποιηθεί η εκχύλιση με την ακετόνη. Ακολούθησε εξάτμιση της ακετόνης (έως το ½ του αρχικού όγκου), ψύξη και λυοφιλοποίηση του δείγματος για τη παραλαβή της ξηρής προς ανάλυση βιομάζας.

B.1.3. Προετοιμασία βιομάζας και Παρασκευή του εκχυλίσματος του ακτινομύκητα *Streptomyces chartreusis*

Το στέλεχος CA-126581 του ακτινομύκητα *Streptomyces chartreusis* απομονώθηκε από ένα δείγμα λάβας του ηφαιστείου της νήσου Ρεουνιόν (Reunion Island), το 1976.

Για την παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας και επαρκή για τις περαιτέρω αναλύσεις και διαχωρισμούς βιομάζα, το συγκεκριμένο στέλεχος καλλιεργήθηκε με το βέλτιστο μέσο καλλιέργειας (DNPM) σε κλίμακα ζύμωσης του 1 L.

Πίνακας B.4. Συστατικά του μέσου καλλιέργειας DNPM

Πηγή Άνθρακα (C)	Πηγή Αζώτου (N)
Δεξτρίνη	Εκχύλισμα μαγιάς / NZ σόγιας

Η καλλιέργεια του μικροοργανισμού πραγματοποιήθηκε στους 28°C, με 70% υγρασία, η ανάδευση ήταν ρυθμισμένη στα 220 rpm και ολοκληρώθηκε μετά από 14 μέρες. Κατόπιν, 1L ακετόνης αναμίχθηκε με τη βιομάζα και το μίγμα ομογενοποιήθηκε με κατάλληλο αναδευτήρα (blender). Η καλλιέργεια ανακινήθηκε για 1 h για να βελτιστοποιηθεί η εκχύλιση με την ακετόνη. Ακολούθησε εξάτμιση της ακετόνης (έως το ½ του αρχικού όγκου), ψύξη και λυοφιλοποίηση του δείγματος για τη παραλαβή της ξηρής προς ανάλυση βιομάζας.

Σημειώνεται ότι η καλλιέργεια όλων των επιλεγμένων μικροοργανισμών και η προετοιμασία των εκχυλισμάτων τους στις 96-τρυπες πλάκες που προορίστηκαν για high-throughput screening, καθώς και η καλλιέργεια στο 1 L που περιγράφηκε και που προορίστηκε για την βιοκατευθυνόμενη απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών που παράγαν, πραγματοποιήθηκαν από το ίδρυμα ερευνών Fundació MEDINA στη Γρανάδα της Ισπανίας.

B.1.4. Εκχύλιση με υπέρηχους (UAE)

Αρχή μεθόδου

Στην εκχύλιση με υπέρηχους (Ultrasound-assisted extraction, UAE), το δείγμα τοποθετείται με κατάλληλο διαλύτη σε λουτρό υπερήχων. Η διάδοση των υπερήχων χαρακτηρίζεται από ελάχιστη συχνότητα 16kHz και προκαλεί κίνηση του υγρού λόγω συμπίεσης και αραιώσης. Με την αύξηση της πίεσης επιτυγχάνονται φαινόμενα διείδυσης και μεταφοράς, ενώ με την αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνονται φαινόμενα διάχυσης και διαλυτοποίησης (Carrera, C., et al., 2012).

Τα κύρια πλεονεκτήματά της είναι η αποτελεσματικότητα, η απλότητα στη χρήση, η εξοικονόμηση ενέργειας, το χαμηλό κόστος του εξοπλισμού και η χρήση μέτριων θερμοκρασιών, γεγονός που τη καθιστά ιδανική για θερμικά ασταθείς ενώσεις. Επίσης, μειώνεται ο χρόνος εκχύλισης, χρησιμοποιούνται μικρότεροι όγκοι διαλυτών και εκχυλίζονται ταυτόχρονα πολλά δείγματα. Για την επιτυχή εφαρμογή αυτού του είδους εκχύλισης, είναι απαραίτητος ο έλεγχος διαφόρων παραμέτρων, όπως η εφαρμοζόμενη συχνότητα υπερήχων, η θερμοκρασία και το σύστημα διαλυτών. Το υψηλότερο ποσοστό εκχύλισης επιτυγχάνεται συνήθως στα πρώτα λεπτά (Esclapez, M. D., et al., 2011; Carrera, C., et al., 2012)

Πειραματική πορεία

Τοποθετήθηκε 1 g δείγματος βιομάζας με 40 mL διαλύτη σε λουτρό υπερήχων για 45 λεπτά υπό ανάδευση. Στη συνέχεια έγινε διήθηση υπό κενό, με διηθητικό χαρτί, σε χωνί Büchner. Επαναλήφθηκε η διαδικασία ώστε τελικά να έχουν γίνει δύο κύκλοι εκχύλισης για κάθε διαλύτη. Το εκχύλισμα συμπυκνώθηκε με Rotavapor Buchi R-210 και φυλάχθηκε σε σκουρόχρωμο περιέκτη στους 4°C. Η πειραματική αυτή διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για όλα τα εκχυλίσματα.

Από προηγούμενες δοκιμές που είχαν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο, έγινε τελική επιλογή του πρωτοκόλλου εκχύλισης που συμβάλλει στην αύξηση της δράσης για την οποία επιλέχθηκε το κάθε στέλεχος:

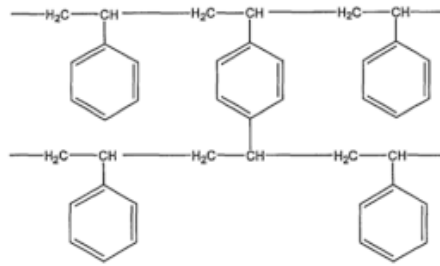
- **Πρωτόκολλο Εκχύλισης 1:** Διαδοχική εκχύλιση με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας: Εκχύλιση με EtOH και ακολούθως εκχύλιση με μίγμα EtOH/H₂O: 50/50.
- **Πρωτόκολλο Εκχύλισης 2:** Διαδοχική εκχύλιση με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας: τρεις κύκλοι εκχύλισης με c-Hex, ακολούθως τρεις κύκλοι εκχύλισης με EtOAc και τέλος τρεις κύκλοι εκχύλισης με μίγμα EtOH/H₂O: 50/50. Στη συνέχεια, υγρή-υγρή εκχύλιση τρεις φορές με EtOAc/H₂O: 1/1 του EtOH/H₂O εκχυλίσματος (Παράγραφος B.1.6) και χρήση ρητίνης προσρόφησης XAD-4 στην υδατική φάση για απομάκρυνση των πιο πολικών ουσιών (Παράγραφος B.1.5).

Το πρωτόκολλο Εκχύλισης 1 εφαρμόστηκε για τη λήψη των εκχυλισμάτων από τον μικροοργανισμό *Streptomyces spinoverrucosus*, ενώ το Πρωτόκολλο Εκχύλισης 2 για τον μικροοργανισμό *Streptomyces chartreusis*.

B.1.5. Χρήση ρητίνης προσρόφησης

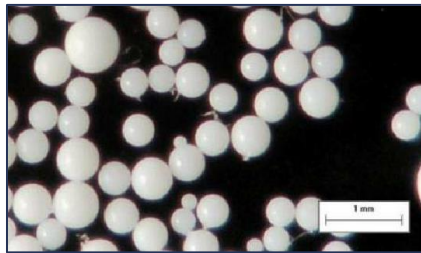
Αρχή μεθόδου

Η μη πολική ρητίνη XAD-4 είναι πολυμερής οργανική ένωση, που προκύπτει από συμπολυμερισμό του στυρολίου και του διβινυλο-βενζολίου. Είναι μία ιονική ρητίνη, υψιμοριακή, αδιάλυτη στο νερό και τους συνήθεις οργανικούς διαλύτες.



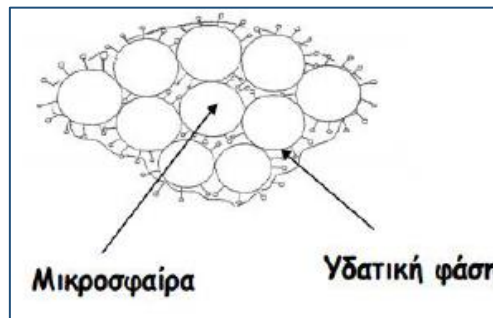
Εικόνα Β.2. Χημική δομή ρητίνης XAD-4

Πρόκειται για μια υδρόφοβη δομή σαν πλέγμα, η οποία περιλαμβάνει μία συνεχή πολυμερή φάση αρωματικής ή ακρυλικής φύσης.



Εικόνα Β.3. Μορφή ρητίνης XAD-4 στο μικροσκόπιο

Κατά τη διέλευση υδατικού διαλύματος γίνεται κατακράτηση των φαινολικών συστατικών και η παραλαβή τους επιτυγχάνεται με έκλουση, με σύστημα διαλυτών.



Εικόνα Β.4. Μηχανισμός προσρόφησης στην ρητίνη XAD-4: φαινόμενο προσρόφησης ενός τυπικού μορίου (---O) σε ένα μεγεθυμένο τμήμα του κόκκου όπου το μόριο περιέχει ένα υδρόφοβο (---) και ένα υδρόφιλο τμήμα (O).

Χρησιμοποιείται για απομάκρυνση υδατοδιαλυτών οργανικών ουσιών από υδατικά συστήματα, για διαχωρισμό ιοντικών και μη υδατοδιαλυτών μιγμάτων από τα συστατικά τους, για καθαρισμό υδατοδιαλυτών οργανικών υλικών μέσω της προσρόφησης τους, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό τους από ανόργανα άλατα, καθώς και στη φαρμακευτική βιομηχανία για απομάκρυνση υδρόφοβων επιφανειοδραστικών ουσιών, φυτοφαρμάκων, χλωριωμένων οργανικών ενώσεων κ.α.

Πειραματική πορεία

500 ml συμπυκνωμένου εκχυλίσματος EtOH/H₂O:50/50, αναμιγνύονται με 250 ml ρητίνης προσρόφησης XAD-4 σε νερό. Το διάλυμα μένει υπό μαγνητική ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου για 12-16 ώρες. Κατόπιν η ρητίνη εκπλένεται με όγκο νερού 250 ml και το υδατικό διάλυμα συλλέγεται, συμπυκνώνεται και ξηραίνεται μέχρι στερεού υπολείμματος. Για την παραλαβή των δραστικών συστατικών, εκπλένουμε τη ρητίνη με 500 ml αιθανόλης (EtOH) 96% υπό μαγνητική ανάδευση για 4-5 ώρες, δύο φορές. Με τον τρόπο αυτό παραλαμβάνεται στο τέλος αιθανολικό διάλυμα, το οποίο συμπυκνώνεται και ξηραίνεται μέχρι στερεού υπολείμματος.

B.1.6. Εκχύλιση Υγρού - Υγρού (Liquid - Liquid Extraction, L.L.E.)

Αρχή μεθόδου

Η βασική αρχή της εκχύλισης υγρού – υγρού είναι η επαφή ενός αρχικού υγρού διαλύματος (τροφοδοσία) με ένα άλλο υγρό διαλύτη. Οι δύο διαλύτες πρέπει να είναι μη αναμίξιμοι ή μερικώς αναμίξιμοι μεταξύ τους. Κατά την προσθήκη του διαλύτη δημιουργούνται δύο υγρές φάσεις, οι οποίες διαχωρίζονται λόγω της διαφορετικής τους πυκνότητας, και λαμβάνει χώρα μεταφορά μάζας της διαλυμένης ουσίας από τη φάση του αρχικού διαλύματος προς τη φάση του διαλύτη. Ο διαλύτης επιλέγεται έτσι ώστε ένα ή περισσότερα από τα συστατικά του αρχικού διαλύματος (διαλυμένη ουσία) να είναι επιλεκτικά διαλυτά στον διαλύτη.

Πειραματική πορεία

Πραγματοποιήθηκε L.L.E. χρησιμοποιώντας το σύστημα διαλυτών: EtOAc/H₂O: 1/1.

Το εκχύλισμα EtOH/H₂O - 50:50 του δείγματος, το οποίο προήλθε από διαδοχική εκχύλιση με c-Hex και EtOAc (Πρωτόκολλο εκχύλισης 2) για τον μικροοργανισμό CA-126581, και από διαδοχική εκχύλιση του αιθανολικού εκχυλίσματος (Πρωτόκολλο εκχύλισης 1) για τον μικροοργανισμό CA-218259, διαλύθηκε σε 500ml H₂O. Η χρήση υπερήχων διευκολύνει και επιταχύνει τη διάλυση. Ακολουθεί μεταφορά του υδατικού μίγματος σε διαχωριστική χοάνη των 2500ml και ανάμιξη του με 500ml EtOAc. Πραγματοποιείται καλή ανακίνηση του μίγματος, έτσι ώστε να έλθουν σε στενή επαφή και να αποκατασταθεί ισορροπία των διαλυμένων ουσιών στις δύο φάσεις, οπότε και διαχωρίζονται. Η οργανική στιβάδα (EtOAc) συλλέγεται και προστίθεται νέα ποσότητα EtOAc στη διαχωριστική χοάνη που περιέχει το υδατικό μίγμα. Επαναλήφθηκε η διαδικασία ώστε τελικά να έχουν γίνει τρεις κύκλοι εκχύλισης.

Το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα (EtOH/ H₂O-EtOAc) συμπυκνώθηκε σε Rotavapor Buchi R-210 και φυλάχθηκε σε σκουρόχρωμο περιέκτη στους 4°C.

Πίνακας Β.5. Αποδόσεις εκχυλισμάτων των επιλεγθέντων στελεχών *Streptomyces*

Στέλεχος	Κωδικός	Καλλιεργητικό μέσο	% Απόδοση εκχύλισης					
			Πρωτόκολλο 1		Πρωτόκολλο 2			
			EtOH	EtOH/H ₂ O-EtOAc	c-Hex	EtOAc	EtOH/H ₂ O-EtOAc	Xad4-EtOH
<i>Streptomyces spinoverrucosus</i>	CA-218259	FPY-6	13.74	1.84	-	-	-	-
<i>Streptomyces chartreusis</i>	CA-126581	DNPM	-	-	0.25	1.97	0.46	13.42

B.2. Βιοδοκιμές

Για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε η μέθοδος αναστολής της ελεύθερης ρίζας 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζιλίου (DPPH), ενώ για την αξιολόγηση της λευκαντικής δράσης μελετήθηκε η αναστολή της τυροσινάσης από μανιτάρι, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την 3,4-διϋδροξυφαινυλαλανίνη (L-DOPA).

Για επιβεβαίωση τυχόν αντιγηραντικής δράσης, ο Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, του Τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, πραγματοποίησε βιοδοκιμές σε κυτταρικές σειρές για έλεγχο αναστολής ή ενεργοποίησης της δραστηριότητας του 26S πρωτεασώματος.

Οι βιοδοκιμές είχαν ήδη πραγματοποιηθεί σε πρώτο στάδιο κατά το “high throughput screening” για την αρχική διαλογή των πιο δραστικών ακτινομυκήτων και κατά την βιοκατευθυνόμενη βελτιστοποίηση εκχύλισης. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, οι βιοδοκιμές επαναλήφθηκαν για την αξιολόγηση των πιο δραστικών εκχυλισμάτων που παρήχθησαν σε μεγαλύτερη κλίμακα και των βιοδραστικών δευτερογενών μεταβολιτών που απομονώθηκαν από αυτά.

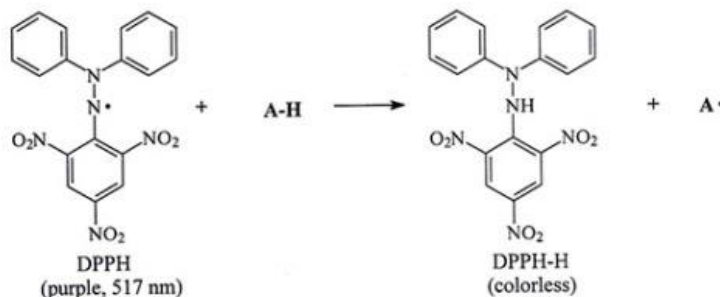
Τα πρωτόκολλα των βιοδοκιμών που διεξήχθησαν περιγράφονται αναλυτικά στις ακόλουθες παραγράφους.

B.2.1. Μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης

Μέθοδος 2,2-Διφαινυλ-1-πικρυλυδραζιλίου (DPPH)

Μηχανισμός δράσης

Η μέθοδος αυτή είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη για μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης φυσικών προϊόντων, καθώς είναι απλή και παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία. Το DPPH (2,2 – διφαινυλ-1-πικρυλυδραζίλιο) αποτελεί μία από τις λίγες σταθερές και εμπορικά διαθέσιμες οργανικές ρίζες αζώτου με έντονα ιώδες χρώμα. Τα συστατικά του προς ανάλυση δείγματος με αντιοξειδωτική δράση δεσμεύουν αυτή τη ρίζα, οδηγώντας σε αποχρωματισμό του διαλύματος από έντονο ιώδες σε υποκίτρινο.



Εικόνα Β.5. Δομή του μορίου DPPH• πριν και μετά την αντίδραση με αντιοξειδωτικό παράγοντα

Η ελάττωση της απορρόφησης παρακολουθείται στα 517 nm, όπου παρατηρείται το μέγιστο του φάσματος του μορίου της ρίζας (Brand-Williams, et al., 1995). Η μεταβολή της έντασης της απορρόφησης αντικατοπτρίζει τη μείωση της ποσότητας της ελεύθερης ρίζας.

Πειραματική πορεία

Αρχικά έγινε παρασκευή του αντιδραστηρίου και των δειγμάτων.

Για την παρασκευή του αντιδραστηρίου (διάλυμα DPPH•) χρησιμοποιήθηκε διφαινυλοπικρυλυδραζύλιο (Sigma-Aldrich). 1,24 mg αντιδραστηρίου DPPH διαλύθηκαν σε 10 mL EtOH (καθαρότητας HPLC). Το διάλυμα αναδεύτηκε και τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο υπερήχων μέχρι πλήρους διάλυσης. Η παρασκευή του διαλύματος γίνεται σε καθημερινή βάση και η απορρόφηση του είναι $1,780 \pm 0,025$. Φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο περιέκτη σε θερμοκρασία δωματίου.

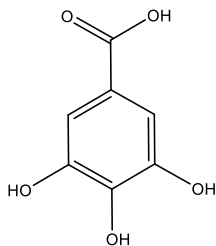
Για την παρασκευή των δειγμάτων, διαλύονται στον αντίστοιχο διαλύτη σε $c=4\text{mg/mL}$ για αρχικά εκχυλίσματα και σε $c=2\text{mg/mL}$ για κλάσματα.

Στα πηγάδια 96-τρυπης πλάκας τοποθετήθηκαν 10μL δείγματος σε 190 μL αιθανολικού διαλύματος DPPH. Ο τελικός όγκος μέσα στο πηγάδι ήταν 200 μL, με $c=200\text{ μg/mL}$ για τα αρχικά εκχυλίσματα και $c=100\text{ μg/mL}$ για τα κλάσματα. Χρησιμοποιήθηκε «control» για τον διαλύτη του κάθε δείγματος (DMSO), με 10μL διαλύτη και 190μL αιθανολικού διαλύματος DPPH, καθώς και αναστολέας πρότυπος (γαλλικό οξύ-GA) με συγκέντρωση $c=100\text{ μg/mL}$ (10 μL GA σε 190 μL διάλυμα DPPH•). Για τον μηδενισμό του οργάνου για το control, τον πρότυπο αναστολέα, καθώς και όλα τα υπόλοιπα δείγματα, δημιουργήθηκαν τα αντίστοιχα τυφλά («blank»), στα οποία χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη αντί του αντιδραστηρίου. Το γαλλικό οξύ είναι θετικός μάρτυρας ($IC_{50}=5\text{ μg/mL}$). Οι επαναλήψεις έγιναν εις τριπλούν.

Η πλάκα επώαστηκε στο σκοτάδι για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετρήθηκε απορρόφηση στα 517nm και προσδιορίστηκε το ποσοστό δέσμησης της ελεύθερης ρίζας, βάσει του παρακάτω τύπου:

$$\frac{\{(A-B)-(C-D)\}}{(A-B)} \times 100, \quad \text{(Εξίσωση B.1)}$$

όπου A: Control (χωρίς δείγμα), B: “blank” του “control” (χωρίς δείγμα, χωρίς DPPH), C: δείγμα, D: “blank” δείγματος (χωρίς DPPH).



Εικόνα B.6. Δομή γαλλικού οξέος

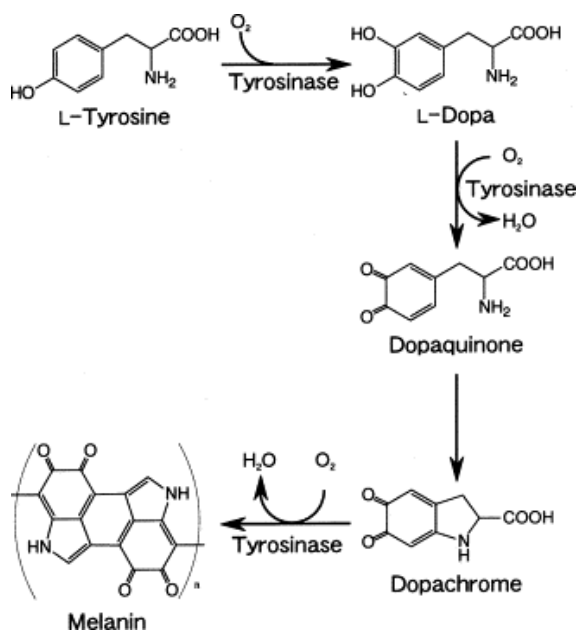
Η αντιοξειδωτική ικανότητα των δειγμάτων εκφράστηκε με τη μορφή του δείκτη IC₅₀ (Inhibition Concentration), ο οποίος εκφράζει τη συγκέντρωση εκείνη του δείγματος που απαιτείται για να μειωθεί η απορρόφηση στα 517 nm, του τυφλού διαλύματος DPPH κατά 50%. Η συγκέντρωση αυτή βρέθηκε από τη γραφική παράσταση των ποσοστών δέσμευσης του DPPH με τη συγκέντρωση των δειγμάτων (1, 5, 10, 25, 50, 75 και 100 μg/ml).

B.2.2. Μελέτη λευκαντικής δράσης

Μηχανισμός Δράσης

Η υπερμελάγχρωση είναι γενικά μια αβλαβής, επιφανειακή κατάσταση που προκαλείται από μία ανομοιόμορφη παραγωγή και διανομή της μελανίνης. Η συσσώρευση εκτεταμένης επιδερμικής μελάγχρωσης οδηγεί σε ποικίλες δερματολογικές διαταραχές, όπως το μελάνωμα που συνδέεται με την ηλικία, τις φακίδες και τις κηλίδες ηλικίας. Οι βασικές φαρμακευτικές και καλλυντικές αγωγές που χρησιμοποιούνται για πρόληψη και την αντιμετώπιση της υπερμελάγχρωσης είναι οι αναστολείς του ενζύμου τυροσινάση, μέσω της αναστολής της ενζυματικής οξείδωσης (Parvez, S., et al., 2007).

Η τυροσινάση είναι ένα ένζυμο ευρέως διαδεδομένο σε βακτήρια, μύκητες, ανώτερα φυτά και ζώα. Πρόκειται για μια μονοοξυγενάση που περιέχει χαλκό στο ενεργό της κέντρο και εμπλέκεται στη βιοσύνθεση της μελανίνης. Καταλύει την υδροξυλίωση της τυροσίνης, μιας μονοφαινόλης, σε 3,4 διϋδροξυφαινυλαλανίνη ή σε DOPA, μια ο-διφαινόλη. Η οξείδωση της DOPA σε ντοπακινόνη (ο-κινόνη) μπορεί στη συνέχεια να μετασηματιστεί στις χρωστικές μελανίνης μέσω μιας σειράς ενζυματικών και μη ενζυματικών αντιδράσεων (Sánchez-Ferrer, Á., et al., 1995).



Εικόνα B.7. Μηχανισμός δράσης της τυροσινάσης

Πειραματική πορεία (Masuda, T., et al., 2007)

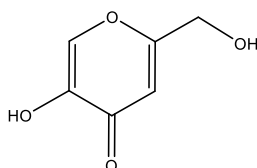
Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η ικανότητα των δειγμάτων να παρεμποδίσουν την οξείδωση της L-DOPA σε ντοπακινόνη και ακολούθως σε ντοπαχρώμη από τυροσινάση μανιταριού.

Παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- Ρυθμιστικό Διάλυμα (Potassium Buffer, PB) : 49.4 g NaH₂PO₄ + 82.6 g Na₂HPO₄ + 1 L H₂O καθαρότητας HPLC. Μαγνητική ανάδευση για μισή ώρα και επιβεβαίωση pH=6.7±0.02. Διατήρηση στους 4°C.
- L-DOPA : 5 mg σε 10 mL ρυθμιστικό διάλυμα (PB). Το διάλυμα αναδεύτηκε με τη βοήθεια vortex για 5 λεπτά και τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο υπερήχων για 15 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 2.900 rpm, για 10 λεπτά και μεταφορά του υπερκείμενου σε falcon. Το υπόστρωμα διατηρήθηκε σε σκοτεινό περιβάλλον και σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα Τυροσινάσης: 92 U/mL τυροσινάση μανιταριού (L-Tyrosinase, 25.000 units, Sigma-Aldrich, διατήρηση στους -20°C) διαλυμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα (PB).
- Παρασκευή δειγμάτων διαλυμένα στον αντίστοιχο διαλύτη σε c=4 mg/mL για τα ολικά εκχυλίσματα και c=2mg/mL για τα κλάσματα.

Στα πηγάδια 96-τρυπης πλάκας τοποθετήθηκαν αρχικά 80 μL ρυθμιστικού διαλύματος και 40 μL δείγματος. Προστέθηκαν 40μL διαλύματος τυροσινάσης και η πλάκα επώαστηκε σε σκοτεινό περιβάλλον, σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά. Κατόπιν προστέθηκαν 40 μL L-DOPA και ακολούθησε επώαση της πλάκας σε σκοτεινό περιβάλλον για 5 λεπτά. Ως τυφλό χρησιμοποιήθηκαν 40 μL του διαλύτη των δειγμάτων. Για κάθε δείγμα και για το τυφλό δημιουργήθηκε και ένα πηγάδι για το μηδενισμό του οργάνου, όπου προστέθηκαν 120 μL ρυθμιστικού διαλύματος, 40μL δείγματος και 40 μL L-DOPA. Οι επαναλήψεις έγιναν εις τριπλούν. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 475 nm και το ποσοστό παρεμπόδισης υπολογίστηκε βάσει της Εξίσωσης B.1, όπως και στη μέθοδο DPPH.

Σαν πρότυπος αναστολέας χρησιμοποιήθηκε το κοζικό οξύ (IC₅₀=2 μg/ml) και το μεθανολικό εκχύλισμα ριζών γλυκόριζας (IC₅₀=5 μg/ml). Οι απορροφήσεις μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-Vis μοντέλο Infinite® M200 Pro της εταιρείας TECAN και χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Magellan™.



Εικόνα B.8. Δομή κοζικού οξέος

B.2.3. Μελέτη δράσης στο πρωτεάσωμα

Ανθρώπινοι ινοβλάστες τοποθετήθηκαν σε τρυβλία των 60-mm. Μετά από 24 ώρες εμβολιασμού και επώασης για κάθε μικρο-κλάσμα συγκέντρωσης 1 μg / ml, τα κύτταρα λύθηκαν με ένα ρυθμιστικό διάλυμα κατάλληλο για την απομόνωση του 26S πρωτεασώματος (0,2% Nonidet P-40, 5 mM ATP, 10% γλυκερίνη, 20 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM διθειοθρεϊτόλη και 20 mM Tris, pH 7,6). Το προϊόν της λύσης διαυγάστηκε με φυγοκέντρηση στα 19,000g (4 ° C) και 20 μg από τις πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκαν αμέσως για να προσδιοριστεί η κύρια πρωτεολυτική δραστηριότητα στο πρωτεάσωμα [τύπου χυμοτρυψίνης (CT-L/LLVY) και τύπου κασπάσης (C-L/LLE) για τα ολικά εκχυλίσματα και τύπου χυμοθρυψίνης (CT-L/LLVY) για τα κλάσματα]. Η δραστηριότητα προσδιορίστηκε με καταγραφή της υδρόλυσης του φθορογόνου πεπτιδίου Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA), στους 37° C για 30 λεπτά. Ο φθορισμός μετρήθηκε με ένα φθορισμόμετρο της εταιρείας VersaFluor™ (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA) στα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής 350 και 440 nm, αντίστοιχα. Κάθε δείγμα παρασκευάστηκε εις διπλούν.

Τα πειράματα διεξήχθησαν τουλάχιστον εις διπλούν. Για την στατιστική επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν τα λογισμικά MS Excel και Statistical Package for Social Sciences (IBM SPSS, version 19.0 για Windows). Η στατιστική σημαντικότητα αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας μονόδρομη ανάλυση διακύμανσης (one-way analysis of variance – ANOVA). Τα σημεία των δεδομένων αντιστοιχούν στο μέσο όρο των ανεξάρτητων πειραμάτων και οι ράβδοι σφάλματος υποδηλώνουν την τυπική απόκλιση (Standard Deviation – SD).

Σημειώνεται ότι οι βιοδοκιμές στο πρωτεάσωμα των εκχυλισμάτων και των κλασμάτων των επιλεγμένων μικροοργανισμών, πραγματοποιήθηκαν από το Τμήμα Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

B.3.1. Αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Analytical TLC)

Αρχή μεθόδου

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (Thin Layer Chromatography –TLC) είναι μια από τις πιο συνηθισμένες τεχνικές για τον γρήγορο έλεγχο μιγμάτων και καθαρών ουσιών. Χρησιμοποιούνται ειδικές πλάκες αλουμινίου επιστρωμένες με γέλη πυριτίου. Το προς εξέταση δείγμα τοποθετείται λίγο πάνω από τη βάση της πλάκας με μορφή κηλίδας και στη συνέχεια η πλάκα τοποθετείται μέσα σε ένα θάλαμο ανάπτυξης, με τέτοιο τρόπο ώστε μόνο η βάση της να βρίσκεται σε επαφή με το σύστημα ανάπτυξης, που είναι συνήθως μίγμα οργανικών διαλυτών. Η γέλη πυριτίου αποτελεί τη στατική φάση της χρωματογραφίας ενώ το διάλυμα ανάπτυξης την κινητή φάση και οι ουσίες μετακινούνται προς τα επάνω μέσω τριχοειδών φαινομένων. Η απόσταση που διανύει κάθε ουσία καθορίζεται από τη σχετική της συγγένεια για τη στατική φάση ως προς την κινητή φάση (Watson, D.G., 2005)

Πειραματική πορεία

Για τον ποιοτικό έλεγχο των εκχυλισμάτων, των κλασμάτων και των καθαρών ουσιών με αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (αναλυτική TLC) χρησιμοποιήθηκαν πλάκες αλουμινίου 20 x 20 cm κανονικής φάσης με επίστρωση γέλης οξειδίου του πυριτίου και με πάχος στιβάδας 0.1mm (Silica gel 60 F254-Merck). Η παρατήρηση των χρωματογραφήματων έγινε σε λάμπα υπεριώδους-ορατού (UV-Vis, CAMAG TLC Visualizer, Εικόνα B.9) σε μήκη κύματος 254 nm και 366 nm. Τέλος ψεκάζονταν με μεθανολικό διάλυμαθειικής βανιλίνης (αντιδραστήριο εμφάνισης), θερμαίνονταν και παρατηρούνταν στο ορατό. Για το μεθανολικό διάλυμαθειικής βανιλίνης παρασκευάστηκαν δύο διαλύματα: το διάλυμα (A) που περιείχε βανιλίνη (Merck, Art. No. S26047 841) 5% (w/v) σε μεθανόλη και το διάλυμα (B) που περιείχε πυκνό H₂SO₄ 5% (v/v) σε μεθανόλη. Ίσοι όγκοι αναμιγνύονταν αμέσως πριν τον ψεκασμό και τα χρωματογραφήματα θερμαίνονταν για 5 min στους 105°C.



Εικόνα B.9. CAMAG TLC Visualizer για την αποτύπωση του χρωματογραφήματος ως έγχρωμης εικόνας στα 254 nm, 366 nm και το ορατό.

B.3.2. Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Preparative TLC)

Αρχή μεθόδου

Η παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) χρησιμοποιείται ευρέως, μιας και είναι από τις πιο απλές χρωματογραφικές μεθόδους. Κατάλληλος κλειστός θάλαμος που περιέχει το επιλεγμένο σύστημα διαλυτών και μια υάλινη πλάκα κανονικής φάσης επιστρωμένη με γέλη πυριτίου είναι τα μόνα που απαιτούνται για τη πραγματοποίηση της αναλυτικής χρωματογραφίας. Με τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας, επιτυγχάνονται αποτελεσματικοί διαχωρισμοί και ακριβείς ποσοτικοποιήσεις των συστατικών του προς ανάλυση δείγματος. Χρησιμοποιείται για απομόνωση ουσιών από μίγματα με χαμηλό ολικό βάρος (συνήθως 5 έως 100 mg) και μικρό αριθμό περιεχόμενων ουσιών (Sherma, J., & Fried, B., 2003).

Πειραματική πορεία

Για την παρασκευαστική TLC χρησιμοποιήθηκαν υάλινες πλάκες κανονικής φάσης επιστρωμένες με γέλη οξειδίου του πυριτίου Silica F254 με πάχος 0.25mm (Silica gel 60 F254-Merck, 20x20). Με την παρασκευαστική TLC, το δείγμα δεν τοποθετείται με μορφή κηλίδων, αλλά ως μια ενιαία οριζόντια λεπτή γραμμή μέσω της αυτόματης συσκευής παρασκευαστικής TLC σε απόσταση 2 cm από τη βάση της TLC (Linomat 5, CAMAG, Εικόνα Β.10). Εναλλακτικά, το δείγμα μπορεί να τοποθετηθεί και με τη χρήση μια πιπέτας παστέρ με πιο λεπτό άκρο, κάτι που επιτυγχάνεται με καύση του. Ακολούθως, η TLC αναπτύσσεται σε 100 mL κατάλληλου συστήματος διαλυτών (κινητή φάση) μέσα σε έναν καλά σφραγισμένο θάλαμο και έως το μέτωπο του διαλύτη να φτάσει σε απόσταση περίπου 2 cm από το τέλος της πλάκας. Το σύστημα διαλυτών ανάπτυξης επιλέγεται με ανάπτυξη πρώτα σε αναλυτική TLC. Η πλάκα παρατηρείται στα 254 nm και 366 nm και ένα μικρό τμήμα της πλάκας ψεκάζεται με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης για να εντοπιστούν οι ουσίες που δεν είναι εμφανείς στο UV. Οι ζώνες της στατικής φάσης που φαίνεται να έχουν τις επιθυμητές ουσίες αποξύνονται από την επιφάνεια της πλάκας, συλλέγονται χωριστά και εκχυλίζονται με κατάλληλο διαλύτη. Ως διαλύτη εκχύλισης επιλέχθηκε το σύστημα: MeOH:CHCl₃:H₂O – 14 : 6 : 1. Ακολουθεί εξάτμιση και ζύγιση των παραληφθέντων προς ταυτοποίηση ουσιών.



Εικόνα Β.10. Σύστημα CAMAG Linomat 5 με σύριγγα για την ομοιόμορφη εφαρμογή των δειγμάτων στις πλάκες με τη μορφή ψεκασμού

B.3.3. Χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρηση (CPC)

Αρχή μεθόδου

Η χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρηση (CPC - Centrifugal Partition Chromatography) αποτελεί μια χρωματογραφία συστημάτων υγρού-υγρού, η οποία βασίζεται στην κατανομή των διαλυμένων ουσιών μεταξύ τουλάχιστον δυο μη αναμίξιμων υγρών φάσεων σύμφωνα με το συντελεστή κατανομής K_D (Hamzaoui, M., et al., 2013). Μια συσκευή CPC είναι σχεδιασμένη για να εκτελεί χρωματογραφία με τη χρήση ενός διφασικού συστήματος υγρού-υγρού χωρίς στερεό υπόστρωμα για τη διατήρηση της στατικής φάσης (Marchal, L., et al., 2003). Η τεχνική αυτή επιτρέπει ν' αποφευχθεί η μη αναστρέψιμη προσρόφηση των δειγμάτων στο στερεό υπόστρωμα και να διατηρηθεί η χημική ακεραιότητα των μιγμάτων που υποβάλλονται σε κλασμάτωση (Hamzaoui, M., et al., 2013).

Το μηχάνημα CPC αποτελείται από μια σειρά από κανάλια που συνδέονται σε σειρά με αγωγούς και ευθυγραμμίζονται σε δίσκους κυκλικά γύρω από ένα στροφέα. Η κίνηση του στροφέα υποβάλλει την παρούσα διάταξη σ' ένα σταθερό πεδίο φυγοκέντρησης.

Δύο μη αναμίξιμα υγρά, που έχουν παρασκευαστεί με ανάμειξη δύο ή περισσότερων διαλυτών, χρησιμοποιούνται ως κινητές και στατικές φάσεις. Η κινητή φάση διηθείται διαμέσου της στατικής, χάρη σε μια αντλία και στο φυγοκεντρικό πεδίο. Λόγω της υγρής τους φύσης και οι δυο φάσεις μπορούν να επιλεγούν ως κινητή ή στατική αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα, η στατική φάση διατηρείται στο εσωτερικό της στήλης υπό μία φυγόκεντρο δύναμη που παράγεται από τη περιστροφή του στροφέα γύρω από έναν ενιαίο άξονα. Η δεύτερη φάση του διφασικού συστήματος χρησιμοποιείται ως κινητή φάση και τροφοδοτείται υπό πίεση μέσα στη στήλη και αντλείται διαμέσου της στατικής φάσης. Στην ανιούσα λειτουργία (ascending mode), η ελαφρύτερη φάση διηθείται μέσα από τη βαρύτερη, με μια κατεύθυνση αντίθετη από το πεδίο φυγοκέντρησης (από την περιφέρεια προς κέντρο του στροφέα σε κάθε κανάλι), ενώ στην κατιούσα λειτουργία (descending mode) η βαρύτερη φάση διηθείται μέσω της ελαφρύτερης, στην κατεύθυνση του φυγοκεντρικού πεδίου (Marchal, L., et al., 2003).

Η FCPC χαρακτηρίζεται από πολύ καλή συγκράτηση της στατικής φάσης, η οποία επιτρέπει υψηλές ταχύτητες ροής και σύντομους χρόνους ανάλυσης με μια καλή απόδοση, όταν χρησιμοποιούνται επαρκείς ταχύτητες περιστροφής και ροής (Marchal, L., et al., 2003). Επίσης, είναι κατάλληλη για θερμοευαίσθητες ουσίες, μιας και δεν χρησιμοποιείται υψηλή θερμοκρασία, έχει μεγάλη επαναληψιμότητα, είναι εύκολη η ανάκτηση του προς διαχωρισμό δείγματος, ενώ μπορεί να εφαρμοστεί και σε μεγάλη κλίμακα (Hamzaoui, M., et al., 2013).

Τέλος, η πιο σημαντική ίσως παράμετρος στη CPC είναι η επιλογή κατάλληλου συστήματος διαλυτών, το οποίο πρέπει να πληροί τις ακόλουθες προϋποθέσεις (Marston, A., & Hostettmann, K., 2006):

1. Ο χρόνος καθίζησης του συστήματος διαλυτών πρέπει να είναι μικρότερος από 30 δευτερόλεπτα. Έτσι, επιτυγχάνεται ικανοποιητική συγκράτηση της στατικής φάσης.
2. Ο συντελεστής κατανομής των ενώσεων (K_D) θα πρέπει να είναι μεταξύ 0.5 και 2.0. Μόνο έτσι επιτυγχάνεται αποτελεσματικός διαχωρισμός
3. Το υπό εξέταση διφασικό σύστημα πρέπει να παράγει παρόμοιους όγκους σε κάθε φάση. Έτσι, μπορεί να αποφευχθεί η αλόγιστη κατανάλωση διαλυτών.
4. Πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πολικότητα του δείγματος, η διαλυτότητά του και η ικανότητα του να σχηματίζει σύμπλοκα.

Η μέθοδος CPC εφαρμόστηκε σε μηχανήμα FCPC® Rousselet-Robatel Kromaton με στήλη χωρητικότητας 1L (Εικόνα Β.11). Η ταχύτητα περιστροφής κυμαίνεται από 200 έως 2000rpm, παράγοντας έτσι φυγόκεντρο δύναμη ίση με 120 x g στα 1000 rpm και 480 x g στα 2000 rpm. Η κινητή φάση εισέρχεται σε ανιούσα ή κατιούσα φάση μέσα από την ειδική αντλία (LabAlliance, Scientific Scientific System, Inc). Τα κλάσματα συλλέγονται μέσω του συλλέκτη Buchi B-684.



Εικόνα Β.11. FCPC® Rousselet-Robatel Kromaton

Πειραματική πορεία

1. Αιθανολικό εκχύλισμα του *Streptomyces spinoverrucosus* (CA-218259)

➤ Προετοιμασία συστημάτων διαλυτών

Για την ανάλυση του εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκαν διφασικά συστήματα που αποτελούνταν από n-Hexane/EtOAc/BuOH/EtOH/H₂O στις εξής αναλογίες (Πίνακας Β.6):

Πίνακας Β.6. Σύσταση του διφασικού συστήματος διαλυτών για τη CPC-CA-218259

Συστήματα	Αναλογίες Διαλυτών					Όγκος (mL)
	n-Hexane	EtOAc	BuOH	EtOH	H ₂ O	
1°	3	2	0	3	2	1200
2°	1	4	0	2	3	1200
3°	1	3	1	2	3	1200

Για την παρασκευή του συστήματος διαλυτών και το διαχωρισμό της στατικής από την κινητή φάση, όλοι οι διαλύτες τοποθετήθηκαν σε διαχωριστική χοάνη και αναδεύτηκαν 4-5 φορές, ενώ μετά από κάθε ανάδευση ακολουθούσε εκτόνωση του συστήματος. Στη συνέχεια το σύστημα αφέθηκε να ηρεμήσει για λίγα λεπτά, ώστε να πραγματοποιηθεί διαχωρισμός. Η κάτω φάση που παραλήφθηκε ήταν η στατική φάση (πολική) και η πάνω η κινητή (άπολη). Σε όλα τα συστήματα διαλυτών η διαδικασία που ακολουθήθηκε για το διαχωρισμό των φάσεων ήταν η ίδια.

➤ Προετοιμασία δείγματος

Διαλύθηκαν 1051,7 mg του εκχυλίσματος σε 25 mL στατικής φάσης του 1^{ου} συστήματος, τοποθετώντας το δείγμα σε υδατόλουτρο υπερήχων ώστε να διευκολυνθεί η διάλυση

➤ Προετοιμασία μηχανήματος FCPC1000® Kromaton

Το μηχάνημα τέθηκε σε λειτουργία ανιούσας φάσης (ascending mode) και 1.2 L από τη στατική φάση του 1^{ου} συστήματος χρησιμοποιήθηκαν για την πλήρωση της στήλης χωρητικότητας 1000 mL, με περιστροφή στήλης 200 rpm και ροή 15 mL/min. Ακολούθως, έγινε εισαγωγή της κινητής φάσης του 1^{ου} συστήματος στη στήλη στις 800 rpm ώστε να γίνει εξισορρόπηση των φάσεων. Αφέθηκαν να τρέξουν τόσα mL κινητής φάσης, όσα χρειάστηκαν για να πληρωθεί η στήλη ($S_f=0,76$). Το δείγμα εισήχθη ενέσιμα σε βρόγχο των 30 mL. Ακολούθησε η συλλογή των κλασμάτων (20mL) σε σωληνάκια με ροή 15 mL/min. Μετά την συλλογή 56 κλασμάτων των 20 mL, ξεκίνησε η διοχέτευση της κινητής φάσης του 2^{ου} συστήματος. Η ροή των διαλυτών και η περιστροφή παρέμειναν σταθερά και συλλέχθηκαν 54 κλάσματα των 20 mL. Για τη διοχέτευση του 3^{ου} συστήματος πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία και συλλέχθηκαν 58 κλάσματα των 20 mL. Μετά την εφαρμογή των τριών συστημάτων ακολούθησε εξώθηση των ουσιών που είχαν παραμείνει στη στατική φάση εισάγοντας στη στήλη τη πολική φάση – στατική φάση του 1^{ου} συστήματος (extrusion), απ' όπου και συλλέχθηκαν 72 επιπλέον κλάσματα. Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν (Πίνακας Β.7) ελέγχθηκαν ως προς το περιεχόμενό τους με τη χρήση χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) με σύστημα ανάπτυξης διαλυτών την οργανική φάση του διφασικού συστήματος $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, σε αναλογία 13:9:3 και ακολούθησαν οι απαραίτητες συνενώσεις.

Πίνακας Β.7. Κλάσματα CPC-CA-218259

Συστήματα	Αριθμός κλασμάτων
Κινητή φάση 1 ^{ου}	56 (1-56)
Κινητή φάση 2 ^{ου}	54 (57-110)
Κινητή φάση 3 ^{ου}	58 (111-168)
Στατική φάση 1 ^{ου}	72 (169-240)

Πίνακας Β.8. Πειραματικές συνθήκες CPC-CA-218259

Όγκος ένεσης	25 mL
Ρυθμός ροής	15 mL/min
Ρυθμός Περιστροφής	800 rpm

2. Εκχύλισμα Xad4-EtOH του *Streptomyces chartreusis* (CA-126581)

➤ Προετοιμασία συστημάτων διαλυτών

Για την ανάλυση του εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκαν διφασικά συστήματα που αποτελούνταν από c-Hexane/EtOAc/BuOH/EtOH/H₂O στις εξής αναλογίες (Πίνακας Β.9):

Πίνακας Β.9. Σύσταση του διφασικού συστήματος διαλυτών για τη CPC-CA-126581

Συστήματα	Αναλογίες Διαλυτών					Όγκος (mL)
	c-Hexane	EtOAc	BuOH	EtOH	H ₂ O	
1 ^ο	5	10	0	5	10	750
2 ^ο	1	14	0	5	10	750
3 ^ο	1	12	2	5	10	1100
4 ^ο	1	9	5	5	10	1500
5 ^ο	1	7	7	5	10	1000

Για την παρασκευή των συστημάτων διαλυτών ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Η κάτω φάση που παραλήφθηκε ήταν η στατική φάση (πολική) και η πάνω η κινητή (άπολη).

➤ Προετοιμασία δείγματος

Διαλύθηκαν 4,0492 g του εκχυλίσματος σε 12,5 mL στατικής φάσης και 12,5 mL κινητής φάσης του 1^{ου} συστήματος, τοποθετώντας το δείγμα σε υδατόλουτρο υπερήχων ώστε να διευκολυνθεί η διάλυση.

➤ Προετοιμασία μηχανήματος FCPC1000[®] Kromaton

Το μηχάνημα τέθηκε σε λειτουργία ανιούσας φάσης (ascending mode) και 1.2 L από τη στατική φάση του 1^{ου} συστήματος χρησιμοποιήθηκαν για την πλήρωση της στήλης χωρητικότητας 1000 mL, με περιστροφή στήλης 200 rpm και ροή 10 mL/min. Ακολούθως, έγινε εισαγωγή της κινητής φάσης του 1^{ου} συστήματος στη στήλη στις 800 rpm ώστε να γίνει εξισορρόπηση των φάσεων. Αφέθηκαν να τρέξουν τόσα mL κινητής φάσης, όσα χρειάστηκαν για να πληρωθεί η στήλη ($S_f=0,70$). Το δείγμα εισήχθη ενέσιμα σε βρόγχο των 30 mL. Ακολούθησε η συλλογή των κλασμάτων (20mL) σε σωληνάκια με ροή 10 mL/min. Μετά την συλλογή 36 κλασμάτων των 20 mL, ξεκίνησε η διοχέτευση της κινητής φάσης του 2^{ου} συστήματος. Η ροή των διαλυτών και η

περιστροφή παρέμειναν σταθερά και συλλέχθηκαν 40 κλάσματα των 20 mL. Για τη διοχέτευση του 3^{ου} συστήματος πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία, ενώ συλλέχθηκαν 48 κλάσματα των 20 mL. Ακολούθησε η διοχέτευση του της άπολης φάσης του 4^{ου} συστήματος, με το οποίο συλλέχθηκαν 73 κλάσματα των 20 mL, και τέλος η εισαγωγή της κινητής φάσης του 5^{ου} συστήματος, με το οποίο συλλέχθηκαν 52 κλάσματα των 20 mL. Λόγω αυξημένης απώλειας στατικής φάσης από τη στήλη, στο κλάσμα 162 αναγκαστήκαμε να μειώσουμε την ταχύτητα περιστροφής στα 500 rpm. Έτσι, καταφέραμε να συγκρατήσουμε στατική φάση εντός της στήλης. Μετά την εφαρμογή των πέντε συστημάτων ακολούθησε εξώθηση των ουσιών που είχαν παραμείνει στη στατική φάση εισάγοντας στη στήλη τη πολική φάση – στατική φάση του 1^{ου} συστήματος (extrusion), απ' όπου και συλλέχτηκαν 69 επιπλέον κλάσματα. Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν (Πίνακας Β.10) ελέγχθηκαν ως προς το περιεχόμενό τους με τη χρήση χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) με σύστημα ανάπτυξης διαλυτών την οργανική φάση του διφασικού συστήματος CHCl₃/MeOH/H₂O, σε αναλογία 13:9:3 και ακολούθησαν οι απαραίτητες συνενώσεις.

Πίνακας Β.10. Κλάσματα CPC-CA-126581

Συστήματα	Αριθμός κλασμάτων
Κινητή φάση 1 ^{ου}	36 (1-36)
Κινητή φάση 2 ^{ου}	40 (37-76)
Κινητή φάση 3 ^{ου}	48 (77-124)
Κινητή φάση 4 ^{ου}	73 (125-197)
Κινητή φάση 5 ^{ου}	52 (198-249)
Στατική φάση 1 ^{ου}	69 (250-318)

Πίνακας Β.11. Πειραματικές συνθήκες CPC-CA-126581

Όγκος ένεσης	25 mL
Ρυθμός ροής	10 mL/min
Ρυθμός Περιστροφής	800 rpm

Β.3.4. Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης ή Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Αρχή μεθόδου

Στην υγρή χρωματογραφία ο διαχωρισμός των μορίων του αναλυόμενου δείγματος βασίζεται στη διαφορετική κατανομή τους μεταξύ δύο μη αναμίξιμων φάσεων, δηλαδή μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης. Ο διαχωρισμός διέπεται από διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αναλυτή και των σταθερών και κινητών φάσεων, όπως αλληλεπιδράσεις διασποράς, διπόλου-διπόλου και δεσμούς υδρογόνου (Snyder, L. R., et al., 2011). Η χρωματογραφία HPLC

(High Pressure Liquid Chromatography ή High Performance Liquid Chromatography) αποτελεί σημαντικά εξελιγμένη μορφή της χρωματογραφίας στήλης, όπου η κινητή φάση ρέει με τη βοήθεια αντλίας διαμέσου της στατικής (Kazakevich, Y.V. & LoBrutto, R., 2007). Η στατική φάση αποτελείται είτε από στερεό πορώδες υλικό με ενεργή επιφάνεια και μικροσωματιδιακή μορφή, ή από ένα λεπτό υμένιο υγρού καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα πολύ μικρής διαμέτρου, που βρίσκεται μέσα στη στήλη. Η κινητή φάση είναι ένας διαλύτης ή μίγμα διαλυτών. Κάθε συστατικό μετακινείται μέσα στη στήλη με διαφορετική ταχύτητα και αυτό αποτελεί τη βάση κάθε χρωματογραφικού διαχωρισμού. Η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης μέσα από τη στατική πραγματοποιείται μέσω χρήσης αντλιών υψηλής πίεσης με αποτέλεσμα να επιτυγχάνονται δύσκολοι διαχωρισμοί μέσα σε λίγα λεπτά. Ανάλογα με τη πολικότητα της στατικής φάσης, η υγρή χρωματογραφία διακρίνεται σε χρωματογραφία κανονικής φάσης (normal phase) και σε αντίστροφης φάσης (reverse phase) (Snyder, L. R., et al., 2012). Η χρήση αντλίας υψηλής πίεσης επιταχύνει την ανάλυση και επιτρέπει τη χρήση χρωματογραφικών στηλών με μικρό μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης. Η χρήση μικρού μεγέθους σωματιδίων υλικού πλήρωσης αυξάνει το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης, που είναι διαθέσιμο να αλληλεπιδράσει με τα μόρια που μεταφέρονται μέσω της κινητής φάσης. Κατά συνέπεια, βελτιώνεται ο διαχωρισμός των αναλυόμενων μορίων και μειώνεται σημαντικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για έναν διαχωρισμό (Kazakevich, Y.V. & LoBrutto, R., 2007).

Για την αναλυτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) χρησιμοποιήθηκε σύστημα Thermo Finnigan που αποτελείται από:

- αντλία SpectraSystem P4000, με την ικανότητα ανάμειξης τεσσάρων διαφορετικών διαλυτών, σε οποιαδήποτε αναλογία
- απαερωτή (degasser) SpectraSystem 1000
- αυτόματο δειγματολήπτη SpectraSystem AS3000
- ανιχνευτή UV SpectraSystem UV2000

Για την λήψη και την επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό ChromQuest™ 4.1.

Πίνακας Β.12. Πειραματικές συνθήκες για την αναλυτική HPLC

Στατική φάση	Στήλη: Discovery, HS-C18, 25 cm x 4.6 mm, i.d.: 5 μm, Superlco
Κινητή φάση	A: ACN, B: H ₂ O (0,1% F.A.)
Θερμοκρασία	T _R
Ρυθμός ροής	1.00 mL/min
Όγκος ένεσης	10 μL
Συγκέντρωση δείγματος	1.5 mg/mL, MeOH:H ₂ O – 50:50

Πίνακας Β.13. Πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την αναλυτική HPLC

Χρόνος t (min)	Σύσταση Διαλυτών	
	A (%)	B (%)
0	2	98
60	100	0
70	100	0
73	2	98
87	2	98

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και καταγράφηκαν απορροφήσεις 254, 285 και 366 nm.

Για την κλασμάτωση των εκχυλισμάτων εφαρμόστηκε ημιπαρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (Semi-preparative High Performance Liquid Chromatography – Semi-Prep HPLC). Το σύστημα αποτελούνταν από τα εξής:

- δύο αντλίες Prep Pump – Lab Alliance, με την ικανότητα ανάμειξης δύο διαφορετικών διαλυτών, σε οποιαδήποτε αναλογία
- ανιχνευτή UV Ecom Flash 06S DAD 800

Για την λήψη και την επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Clarity 3.0.07.662.

Κλάσμα 244-248 της CPC από το εκχύλισμα Xad4-EtOH του *Streptomyces chartreusis* (CA-126581)

Πίνακας Β.14. Πειραματικές συνθήκες για την ημιπαρασκευαστική HPLC του κλάσματος 244-248 της CPC του εκχυλίσματος Xad4-EtOH του CA-126581

Στατική φάση	Στήλη: Fortis C18, 250x10 mm , i.d.: 5 μm
Κινητή φάση	A: ACN, B: H ₂ O (0,1% T.F.A.)
Θερμοκρασία	25° C
Ρυθμός ροής	2.00 mL/min
Όγκος ένεσης	12 ενέσεις των 100 μL και 15 ενέσεις των 175 μL
Συγκέντρωση δείγματος	10 mg/mL, MeOH:H ₂ O – 50:50
Απορρόφηση	232 nm

Πίνακας Β.15. Πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την ημιπαρασκευαστική HPLC του κλάσματος 244-248 της CPC του εκχυλίσματος Χαd4-EtOH του CA-126581

Χρόνος t (min)	Σύσταση Διαλυτών	
	A (%)	B (%)
0	2	98
10	10	90
20	10	90
46	36	64
49	100	0
50	100	0
53	2	98
68	2	98

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθαρότητας HPLC και πριν τη χρησιμοποίησή τους πραγματοποιήθηκε απαέρωση (degass) σε συσκευή υπερήχων για 30 λεπτά.

B.3.5. Ταυτοποίηση μεταβολιτών με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Αρχή μεθόδου

Η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) βασίζεται στην ιδιότητα που έχουν οι πυρήνες των ατόμων που εισέρχονται σε μαγνητικό πεδίο να απορροφούν και να επανεκπέμπουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Είναι μια μορφή φασματομετρίας απορρόφησης, όπου το δείγμα που βρίσκεται σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στην περιοχή των ραδιοκυμάτων και οι προσανατολισμένοι πυρήνες των ατόμων από την κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας μεταβαίνουν στην κατάσταση υψηλότερης ενέργειας με αντιστροφή του spin. Όταν πραγματοποιηθεί αυτή η αναστροφή, οι πυρήνες έχουν συντονισθεί με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία, απ' όπου προκύπτει και ο όρος «συντονισμός». Η περιοχή συχνοτήτων, που απαιτούνται για τη διέγερση και την πολλαπλότητα των κορυφών που προκύπτουν, είναι πολύ χαρακτηριστική της δομής του μορίου.

Πρόκειται για μια ισχυρή τεχνική, η οποία παρέχει πολύ περισσότερες πληροφορίες για τη μοριακή δομή από κάθε άλλη τεχνική. Βρίσκει ευρύτατη εφαρμογή στην φαρμακευτική ανάλυση, καθώς δίνει τη δυνατότητα για το χαρακτηρισμό της ακριβούς δομής των πρώτων υλών και των τελικών προϊόντων, αλλά και του προσδιορισμού προσμίξεων, συμπεριλαμβανομένων και εναντιομερών προσμίξεων, χωρίς διαχωρισμό, μέχρι και επιπέδου 10%. Επίσης, παρέχει τη δυνατότητα χρήσης για δακτυλικό αποτύπωμα μιγμάτων και για ποσοτική ανάλυση φαρμάκων σε σκευάσματα χωρίς προηγούμενο διαχωρισμό (Watson, D. G., 2005).

Πειραματική πορεία

Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε φασματογράφο Bruker Ultrashield™ PLUS 600MHz (Εικόνα Β.12). Λήφθηκαν φάσματα μίας (1D) και δύο (2D) διαστάσεων. Τα κλάσματα διαλύθηκαν σε 0,5-0,6 mL MeOD ή DMSO-d₆ και μεταγγίστηκαν σε στενούς υάλινους σωλήνες NMR (διάμετρος 5mm). Τα δείγματα αναλύθηκαν σε διάλυμα σε δευτεριωμένο διαλύτη, για να εξασφαλιστεί ότι δεν υπήρχε παρεμπόδιση του σήματος των πρωτονίων των δειγμάτων από τα πρωτόνια του διαλύτη, που βρισκόταν σε σχετικά μεγάλη ποσότητα. Το κάθε δείγμα περιστράφηκε υπό σταθερό μαγνητικό πεδίο σε περίπου 30 περιστροφές/s, με τη βοήθεια αεροστροβίλου, εξασφαλίζοντας έτσι την ομοιογένεια του μαγνητικού πεδίου σε όλο το δείγμα στην οριζόντια κατεύθυνση.

Οι χημικές μετατοπίσεις (δ) είναι εκφρασμένες σε ppm, ενώ οι σταθερές σύζευξης (J) σε Hz. Η πολλαπλότητα των κορυφών εκφράζεται ως *s* (απλή), *brs* (ευρεία απλή), *d* (διπλή), *t* (τριπλή), *q* (τετραπλή), *dd* (διπλή-διπλή) και *m* (πολλαπλή). Έγινε λήψη φασμάτων ¹H-NMR, COSY, HSQC, HMBC, πραγματοποιώντας σάρωση ακτινοβολιών ραδιοσυχνότητας 6000 Hz, σε μια περιοχή 10 ppm. Το πηνίο του δέκτη μέτρησε την απορρόφηση της ακτινοβολίας, καθώς σαρώθηκε η συχνότητα στην εξεταζόμενη περιοχή, αλλά και την επιφάνεια κάθε σήματος, που είναι ανάλογη προς τον αριθμό των πρωτονίων που απορροφούν την ακτινοβολία.

Οι πληροφορίες που συλλέχθηκαν από τα φάσματα οδήγησαν στη διεξαγωγή συμπεράσματος για τη μοριακή δομή των ουσιών.



Εικόνα Β.12. Όργανο Φασματογράφου Bruker Ultrashield™ PLUS 600MHz

Β.3.6. Ταυτοποίηση μεταβολιτών με LC-HRMS/MS

Αρχή μεθόδου

Η φασματομετρία μάζας είναι μια αναλυτική τεχνική αναγνώρισης άγνωστων ενώσεων, ποσοτικοποίησης γνωστών και διευκρίνησης της δομής τους. Το φασματόμετρο μαζών λειτουργεί με το σχηματισμό φορτισμένων μορίων ή μοριακών θραυσμάτων, είτε σε περιοχή υψηλού κενού, είτε αμέσως πριν την είσοδο του δείγματος στην περιοχή υψηλού κενού. Τα ιόντα σχηματίζονται στην αέρια φάση, έτσι ώστε να μπορούν να διαχειρισθούν με την εφαρμογή είτε

ηλεκτρικού, είτε μαγνητικού πεδίου, για να είναι δυνατός ο προσδιορισμός των μοριακών τους βαρών (Watson, D.G., 2005).

Στην παρούσα εργασία, για την ταυτοποίηση των δομών που περιείχαν τα εκχυλίσματα, αλλά και τα παραληφθέντα κλάσματα και καθαρές ενώσεις, πραγματοποιήθηκε Υγρή Χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας. Η παραγωγή ιόντων έγινε με ηλεκτροψεκασμό. Η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού επιτρέπει στα ιόντα να μεταφερθούν στην αέρια φάση από το διάλυμα στο οποίο βρίσκονται, κάτι που αποτελεί προϋπόθεση για την ανάλυσή τους με μεθοδολογία φασματομετρίας μαζών. Τα μόρια της ένωσης μετατρέπονται σε ιόντα με θετικό ή αρνητικό φορτίο. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια ηλεκτρικών πεδίων τα παραχθέντα ιόντα ευθυγραμμίζονται σε λεπτή δέσμη. Η δέσμη διέρχεται μέσω ηλεκτρικού και μαγνητικού πεδίου οπότε το κάθε ιόν, ανάλογα με το λόγο μάζα προς φορτίο (m/z), αποκλίνει από την αρχική κατεύθυνση. Τέλος, τα ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z μπορούν να ανιχνευθούν με κατάλληλο ανιχνευτή. Το διάγραμμα της έντασης του σήματος κάθε ιόντος ενός αναλυτή έναντι του λόγου m/z ορίζεται ως το φάσμα μάζας του αναλυτή (Kaklamanos, G., et al., 2009).

Η φασματομετρία μαζών αποτελεί μια ιδιαίτερα ειδική τεχνική για τον προσδιορισμό ή την επιβεβαίωση της ταυτότητας των φαρμάκων και των πρώτων υλών. Σε συνδυασμό με την υγρή χρωματογραφία (LC-MS) παρέχει μεθόδους για τον χαρακτηρισμό των προσμίξεων σε φάρμακα, καθώς και για τον προσδιορισμό φαρμάκων και μεταβολιτών τους σε βιολογικά υγρά και ιστούς. Επίσης, με χρήση βιβλιοθηκών φασμάτων αποθηκευμένων στον υπολογιστή είναι δυνατή η απευθείας σύγκριση των δεδομένων με πρότυπα φάσματα και η ταυτοποίηση των υπό ανάλυση ουσιών (Watson, D.G., 2005).



Εικόνα B.13. Όργανο LTQ Orbitrap

Πειραματική πορεία

Η τεχνική πραγματοποιήθηκε σε μηχάνημα LTQ-Orbitrap platform της εταιρείας Thermo Fisher Scientific (Εικόνα B.13), το οποίο συνδυάζει αναλυτή μάζας γραμμικής παγίδας (linear trap) με

αναλυτή μάζας τροχιακής παγίδας (orbitrap). Δίνει μετρήσεις μοριακού βάρους με ακρίβεια 4 δεκαδικών ψηφίων, παρέχοντας τη δυνατότητα απόδοσης των μοριακών τύπων και των βαθμών ακορεστότητας με μεγάλη ακρίβεια. Για μεγαλύτερη ακρίβεια λήφθηκαν και φάσματα MS/MS. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν σε διάλυμα MeOH/H₂O:50/50 αναλυτικής καθαρότητας σε τελική συγκέντρωση 200 µg/mL.

Οι πειραματικές συνθήκες της Υγρής Χρωματογραφίας και Φασματομετρίας Μάζας παρατίθενται στους πίνακες που ακολουθούν:

Πίνακας B.16. Πειραματικές συνθήκες LC (LC-HRMS)

Στατική φάση	Στήλη: Fortis C18 (100 mm x 2.1 mm, 1.7 µ)
Κινητή φάση	A: H ₂ O (0,1% F.A.), B: ACN
Θερμοκρασία	40° C
Ρυθμός ροής	350 µL/min
Όγκος ένεσης	2 µL

Πίνακας B.17. Πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων στο LC-HRMS/MS

Χρόνος t (min)	Σύσταση Διαλυτών	
	A (%)	B (%)
0	95	5
3	95	5
23	0	100
25	0	100
27	95	5
31	95	5

Πίνακας B.18: Συνθήκες ιονισμού και θραυσμάτωσης MS/MS

Εύρος μάζας	100 – 1500 (FS & MS/MS)
Διακριτική Ικανότητα Μάζας	30 000
Ρυθμισμένη Ενέργεια Πρόσκρουσης	35% (Act.Q 0.250)
Ανιχνευτής Ιονισμού	Positive & Negative mode
Συνθήκες ESI	Capillary temp.: 300°C; capillary voltage: -3.5V; tube lens: -98 V Sheath gas nitrogen: 40 arb. units; auxiliary gas nitrogen: 10 arb. Units

B.3.7. Αντιστοίχιση (Annotation) γνωστών μεταβολιτών σε μίγματα με LC-HRMS/MS

Τα δεδομένα που προέκυψαν από την ανάλυση LC-HRMS αναλύθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Mzmine 2.23 για τη διόρθωση της γραμμής βάσης (baseline correction), την ανίχνευση των κορυφών (peak detection), την ευθυγράμμιση του χρωματογραφήματος (alignment), την αποσυνέλιξη των κορυφών (deconvolution) και την κανονικοποίηση των δεδομένων (normalization). Αναλυτικότερα, τα δεδομένα που προέκυψαν από αρνητικό ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό (ESI negative mode) :

- Διορθώθηκαν όσον αφορά τη γραμμή βάσης (baseline) εφαρμόζοντας τη μέθοδο διόρθωσης της ασύμμετρης γραμμής βάσης χρησιμοποιώντας την τιμή 500 για την κανονικοποίηση και 0.01 για την ασυμμετρία.
 - Για τον εντοπισμό μεμονωμένων ιόντων εφαρμόστηκε η μέθοδος ανίχνευσης μάζας (mass detection module) με σκοπό την δημιουργία μιας λίστας μαζών για κάθε σάρωση, χρησιμοποιώντας τον κεντροειδή αλγόριθμο (centroid algorithm) με ένα επίπεδο θορύβου της τάξης των 1×10^6 μέτρων ανά δευτερόλεπτο (counts per second – cps).
 - Για την απομάκρυνση των υπολειπόμενων σημάτων (residual signals) χρησιμοποιήθηκε φίλτρο κορυφών FTMS shoulder peaks εφαρμόζοντας το μοντέλο γκαουσιανής συνάρτησης κορυφών με ανάλυση μαζών (mass resolution) στα 30.000.
 - Ακολουθήθηκε επίσης συγκεκριμένος τρόπος δόμησης των χρωματογραφήματων, ώστε τα χρωματογραφήματα να κατασκευαστούν με ελάχιστο χρονικό διάστημα τα 0.08 λεπτά, ελάχιστο ύψος κορυφών το 1×10^6 cps και ακρίβεια μάζας (m/z tolerance) τα 0.001 ή 10 ppm.
 - Οι κορυφές των παραγόμενων χρωματογραφήματων αποσυνελίχθηκαν χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο κοπής της γραμμής βάσης (cut-off baseline algorithm), εφαρμόζοντας ως ελάχιστο ύψος κορυφών το 1×10^6 (cps), ως ελάχιστη διάρκεια της κάθε κορυφής (peak duration) τα 0 έως 0.5 λεπτά και ως επίπεδο της γραμμής βάσης τα 1×10^6 (cps).
 - Για την αφαίρεση ισοτόπων χρησιμοποιήθηκε ο αλγόριθμος ομαδοποίησης των ισοτοπικών μαζών των κορυφών (isotopic peak grouper algorithm) εφαρμόζοντας ακρίβεια μάζας τα 0.001 ή 10 ppm, ακρίβεια χρόνου κατακράτησης (retention time tolerance) τα 0.08 λεπτά και μέγιστο φορτίο 3.
- Τα ιόντα προσθήκης (adducts) ή συμπλέγματα κορυφών (peak complexes) αναγνωρίζονται χρησιμοποιώντας μεθόδους ταυτοποίησης των ιόντων προσθήκης και των συμπλεγμάτων.
- Με τη χρήση της μεθόδου ευθυγράμμισης Join (Join alignment method), μια νέα ευθυγραμμισμένη λίστα κορυφών δημιουργείται, εφαρμόζοντας ακρίβεια μάζας 0.001 m/z ή 10 ppm, ζύγιση για το χρόνο κατακράτησης και m/z 95 και ακρίβεια χρόνου κατακράτησης 0.08 λεπτά.

- Ο αλγόριθμος ανίχνευσης κορυφών (peak finder algorithm) χρησιμοποιήθηκε για να γεμίσει τα κενά σύμφωνα με τις παραμέτρους της ακρίβειας έντασης στο 80%, της ακρίβειας μάζας στα 0.001 m/z ή 10 ppm και της ακρίβειας του χρόνου κατακράτησης στα 0.08 λεπτά.

Τέλος ο αλγόριθμος CAMERA εφαρμόστηκε για να γίνει αναζήτηση ψευδο-φασμάτων, ενώ η μέθοδος κανονικοποίησης (Normalization module) εφαρμόστηκε έτσι ώστε να εξομαλύνει το ύψος κάθε κορυφής από μια σταθμισμένη συμμετοχή των τριών προτύπων. Στο τέλος της διαδικασίας, δημιουργήθηκε μια τελική λίστα μαζών και εξήχθη ως αρχείο .csv.

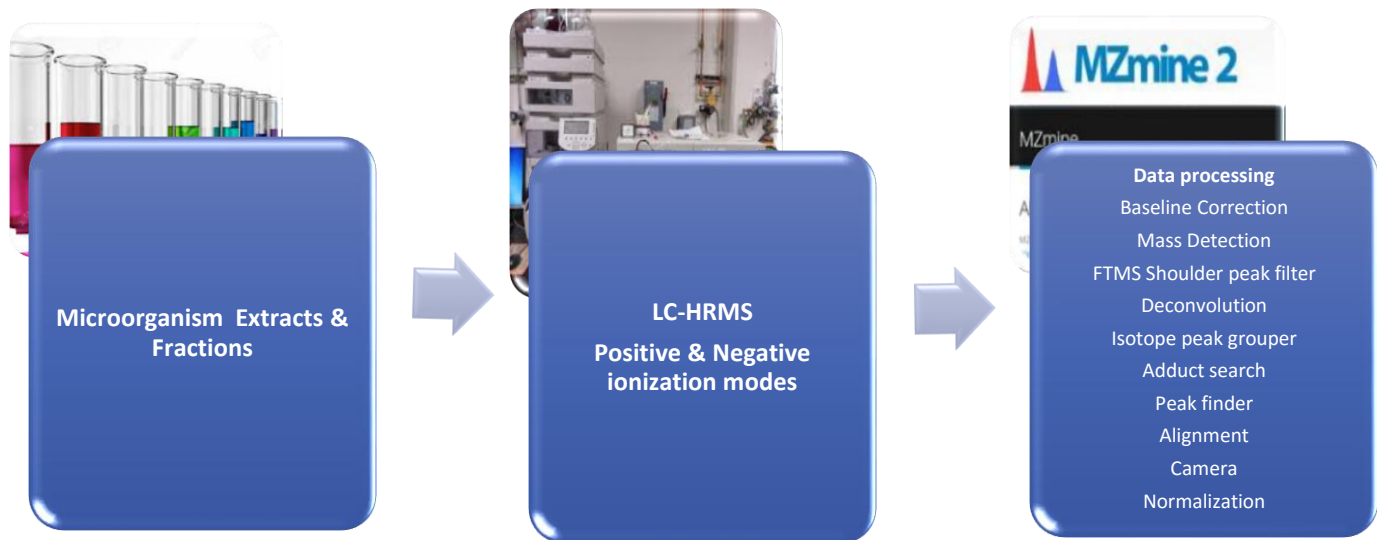
Η ίδια διαδικασία, όπως περιγράφεται παραπάνω, εφαρμόστηκε και για την επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν από τον θετικό ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό (ESI positive mode), εφαρμόζοντας επίπεδο θορύβου στα 1×10^7 (cps), ακρίβεια χρόνου κατακράτησης στα 0,08 λεπτά και ακρίβειας μάζας στα 0.001 m/z ή 10 ppm.

Οι λίστες μαζών που προέκυψαν από την επεξεργασία των φασμάτων με το λογισμικό Mzmine 2.23 εισήχθησαν στην ηλεκτρονική πλατφόρμα Metaboanalyst για την εκτίμηση των τιμών που λείπουν (gap filling) με την εφαρμογή του αλγορίθμου k-πλησιέστερου γείτονα (KNN, k-nearest neighbor). Τα εξαγόμενα αρχεία .csv υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με στατιστική ανάλυση.

Στο τέλος της διαδικασίας, η λίστα που δημιουργείται (Aligned peak list) έχει τη μορφή: Ακριβής μάζα (Accurate mass)_Χρόνος κατακράτησης (Retention time-Rt)_Εμβαδό κάτω από την καμπύλη (Area under the curve-AUC), η οποία περιέχει όλες τις μάζες που ανιχνεύονται με βάση τα κριτήρια που αναφέρθηκαν.

Για την ταυτοποίηση των μεταβολιτών δημιουργήθηκε μια νέα βιβλιοθήκη (Custom library) η οποία περιείχε όλα τα μόρια που έχουν απομονωθεί από το συγκεκριμένο γένος του μικροοργανισμού (*Streptomyces*), χρησιμοποιώντας τις βιβλιοθήκες-βάσεις δεδομένων AntiMarin, Dictionary of Natural Products και Reaxys. Η βιβλιοθήκη (Custom library) εισήχθη στο λογισμικό MZmine και έγινε αντιστοίχιση με τη λίστα (Aligned peak list) που δημιουργήθηκε με την παραπάνω διαδικασία εφαρμόζοντας απόκλιση μάζας 0.001 m/z ή 30 ppm.

Εικόνα B.14. Διαδικασία που ακολουθείται ώστε να δημιουργηθεί η λίστα μαζών (Aligned peak list), που προκύπτει από την επεξεργασία των φασμάτων LC-HRMS με το λογισμικό MZmine 2.23, κατά την ταυτοποίηση γνωστών δευτερογενών μεταβολιτών σε μίγματα (Dereplication)



Εικόνα B.15. Μια νέα βιβλιοθήκη (Custom library) που έχει δημιουργηθεί από τις βάσεις-δεδομένων AntiMarin, Dictionary of Natural Products και Reaxys, εισάγεται στο λογισμικό MZmine και γίνεται αντιστοίχιση με τη λίστα μαζών (Aligned peak list) που δημιουργήθηκε από την επεξεργασία των φασμάτων LC-HRMS, κατά τη διαδικασία της ταυτοποίησης γνωστών δευτερογενών μεταβολιτών σε μίγματα (Dereplication)



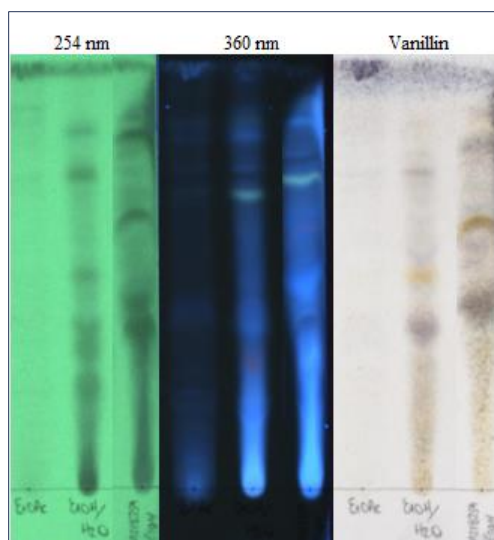
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Γ.1. Βιοκατευθυνόμενη απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από τον ακτινομύκητα *Streptomyces spinoverrucosus* (CA-218259)

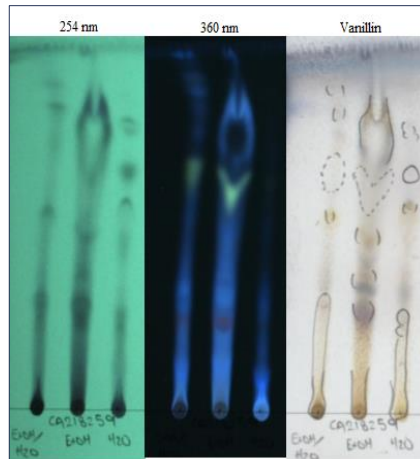
Ο ακτινομύκητας CA-218259 επιλέχθηκε για μελέτη λόγω της αντιοξειδωτικής / αντιγηραντικής του δράσης. Τα αποτελέσματα των βιολογικών δοκιμών κατέδειξαν την ισχυρή αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων EtOH και Xad4-EtOH, καθώς και την ενεργοποίηση της δραστηριότητας του 26S πρωτεασώματος σε κυτταρικές σειρές από το εκχύλισμα EtOH του ακτινομύκητα *Streptomyces spinoverrucosus* (CA-218259). Λόγω παρόμοιου ποσοστού αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH (Παράγραφος Β.2.1) μεταξύ των εκχυλισμάτων Xad4-EtOH και EtOH, πιο πλούσιου χημικού προφίλ του εκχυλίσματος EtOH, καθώς και λόγω μεγαλύτερης ανάκτησης βιομάζας στην απευθείας εκχύλιση με EtOH, επιλέχθηκε το εκχύλισμα EtOH για την βιοκατευθυνόμενη απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών που περιέχει και στους οποίους οφείλεται η συγκεκριμένη δράση.

Γ.1.1. Ποιοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων του CA-218259

Παρακάτω παρουσιάζεται το χημικό προφίλ των εκχυλισμάτων που προέκυψαν με χρήση των δύο πρωτοκόλλων εκχύλισης (βλ. Παράγραφο Β.1.4) σε αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας – TLC (βλ. Παράγραφο Β.3.1) για τον μικροοργανισμό CA-218259 (Εικόνες Γ.1 και Γ.2). Οι εκχυλίσεις έγιναν σε μικρή κλίμακα, με εκχύλιση 1 g βιομάζας, με σκοπό την ποιοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων. Παρουσιάζονται ακόμη τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών με τη μέθοδο DPPH (βλ. Παράγραφο Β.2.1), τη μέθοδο αναστολής του ενζύμου Τυροσινάση (βλ. Παράγραφο Β.2.2) (Πίνακας Γ.1), καθώς και οι βιοδοκιμές σε δύο κυτταρικές σειρές (βλ. Παράγραφο Β.2.3) (Γράφημα Γ.1).



Εικόνα Γ.1. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc, EtOH/H₂O και EtOH του CA-218259.



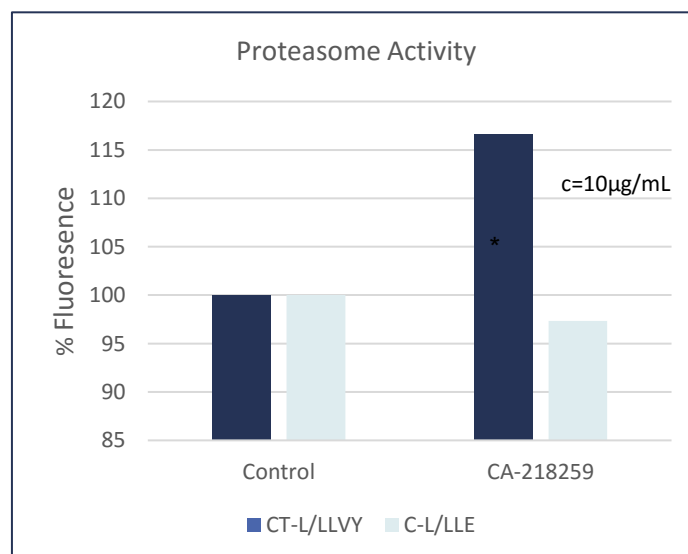
Εικόνα Γ.2. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H₂O και Χαd4 του CA-218259 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.

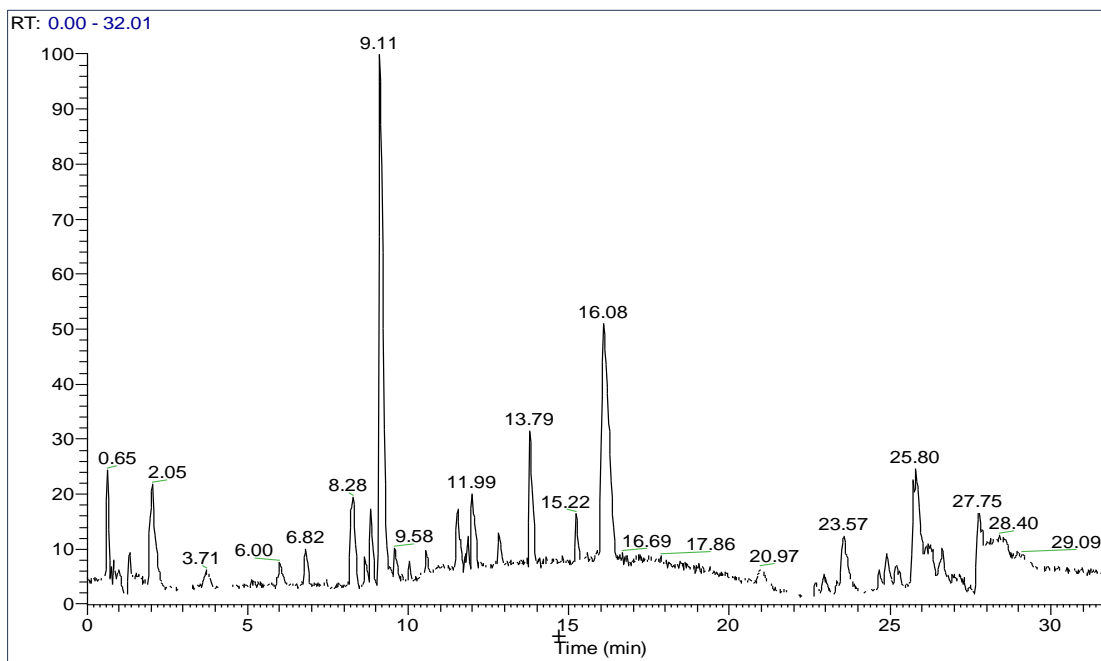
Το EtOH εκχύλισμα προέκυψε από απευθείας εκχύλιση της βιομάζας (Πρωτόκολλο Εκχύλισης 1), ενώ τα υπόλοιπα από διαδοχική εκχύλιση (Πρωτόκολλο Εκχύλισης 2) (Παράγραφος Β.1.4).

Πίνακας Γ.1. Μελέτη Λευκαντικής και Αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CA-218259

Πρωτόκολλο Εκχύλισης	Εκχυλίσματα	Αντιοξειδωτική Δράση		Λευκαντική Δράση	
		DPPH (200 µg/ml)		(300 µg/ml)	
		% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV
1	EtOH	26.21	0.22	30.59	7.20
	EtOH/H ₂ O	14.79	0.37	28.71	1.85
2	EtOAc	3.43	1.91	50.52	13.16
	Χad4-EtOH	31.36	0.26	40.82	3.30

Γράφημα Γ.1. Μελέτη δράσης του εκχυλίσματος EtOH από το στέλεχος CA-218259, στη δραστηριότητα του πρωτεασώματος σε δύο κυτταρικές σειρές (CT-L/LLVY και C-L/LLE)





Εικόνα Γ.3. Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του EtOH εκχυλίσματος του CA-218259

Γ.1.2 Χημικό προφίλ του εκχυλίσματος CA-218259_EtOH

Όπως αναλύθηκε στην παράγραφο Γ.1.1, το εκχύλισμα το οποίο επιλέχθηκε για την αντιοξειδωτική του ικανότητα ήταν το εκχύλισμα της αιθανόλης (EtOH), το οποίο προήλθε κατόπιν απευθείας εκχύλισης βάσει του 1^{ου} πρωτοκόλλου εκχύλισης, που έχει περιγραφεί στην Παράγραφο Β.1.4.

Για τη παραγωγή μεγάλης ποσότητας εκχυλίσματος EtOH, ζυγίστηκαν 5,30 g ξηρής βιομάζας και πραγματοποιήθηκαν 2 κύκλοι εκχύλισης με EtOH (απόδοση εκχύλισης: 13,74%) και κατόπιν 2 κύκλοι εκχύλισης με EtOH/H₂O – 50:50 (απόδοση εκχύλισης: 82,16%). Συνολικά παραλήφθηκαν 727,9 mg CF-218259_EtOH εκχυλίσματος.

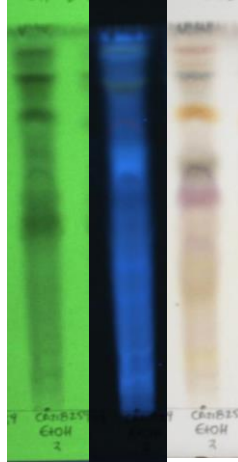
Πραγματοποιήθηκε επαναληπτικός έλεγχος της αντιοξειδωτικής δράσης του CA-218259_EtOH εκχυλίσματος βάσει της μεθόδου DPPH (βλ. Παράγραφο Β.2.1) σε συγκεντρώσεις 200 µg/ml:

Πίνακας Γ.2. Αντιοξειδωτική δράση του CA-218259_EtOH

DPPH (200 µg/ml)	
Αναστολή (%)	STDEV
21.60	0.42

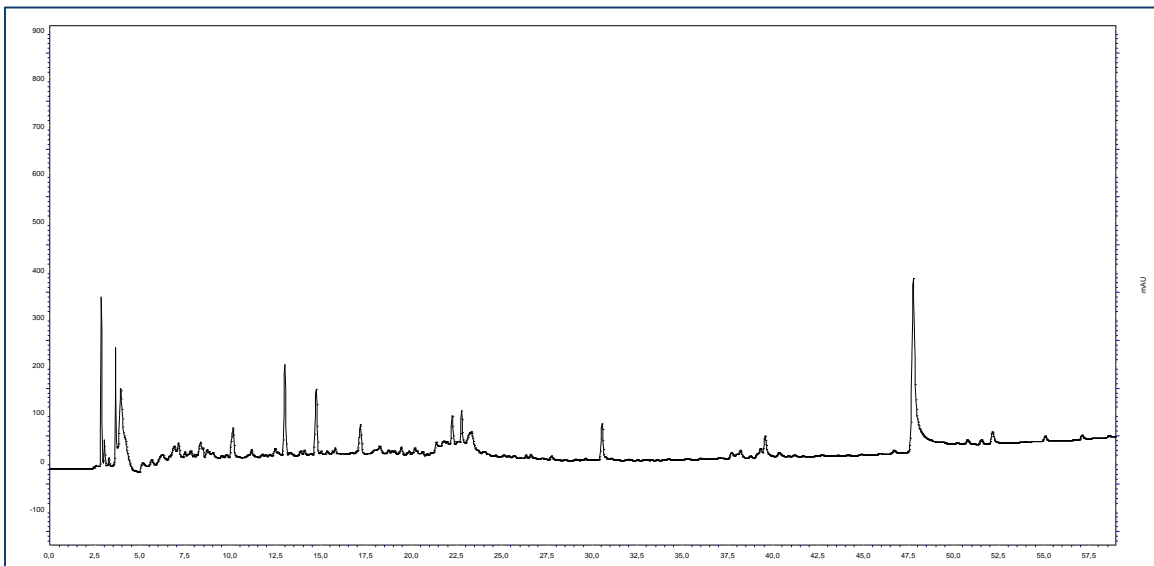
Για την αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) του CA-218259_EtOH αναπτύχθηκε καλύτερα στην οργανική φάση του διφασικού συστήματος CHCl₃/MeOH/H₂O: 13/9/3 και

υπέδειξε ένα πλούσιο χημικό προφίλ του εκχυλίσματος, με ουσίες μεγάλου εύρους πολικότητας, τα οποία απορροφούν στο υπεριώδες-ορατό (UV-Vis), γεγονός που αποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο εκχύλισμα μπορεί να μελετηθεί περαιτέρω με τη χρήση χρωματογραφικών τεχνικών που χρησιμοποιούν ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού.



Εικόνα Γ.4. TLC του CA-218259_EtOH στα 254, 366 nm και στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με αντιδραστήριο θειϊκής βανιλίνης. Ανάπτυξη στην οργανική φάση του διφασικού συστήματος $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$: 13/9/3

Το πλούσιο προφίλ του συγκεκριμένου εκχυλίσματος σε δευτερογενείς μεταβολίτες επιβεβαιώνεται και από το χρωματογράφημα HPLC της εικόνας Γ.5 που ακολουθεί.



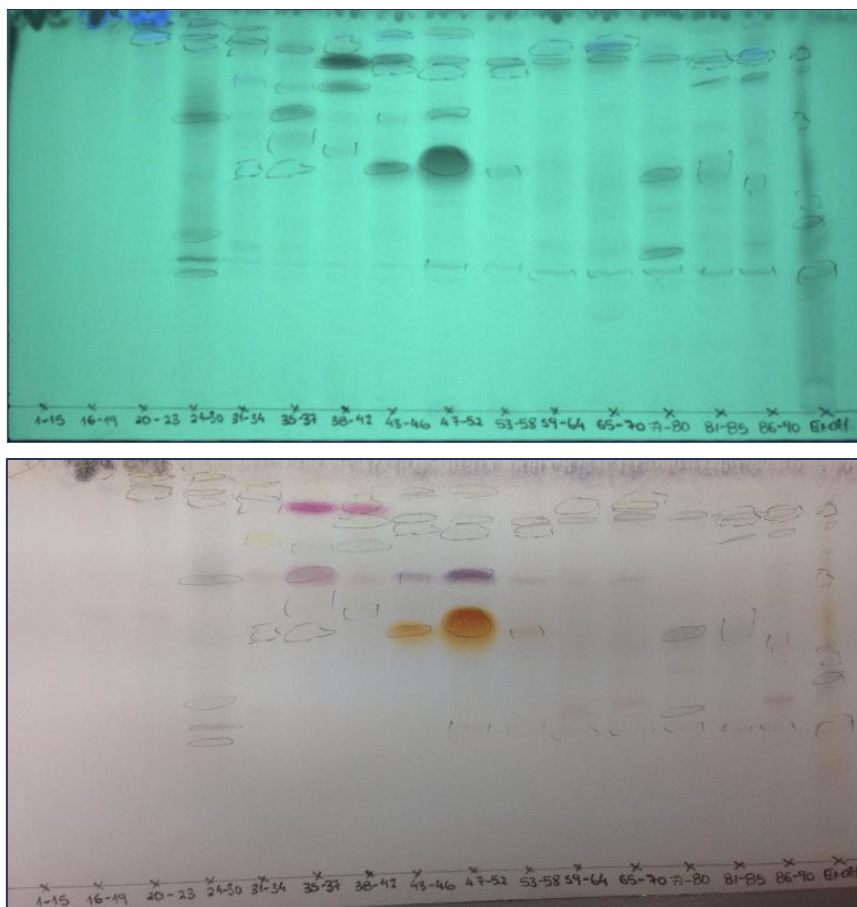
Εικόνα Γ.5. Χρωματογράφημα HPLC (254nm) του CA-218259_EtOH εκχυλίσματος

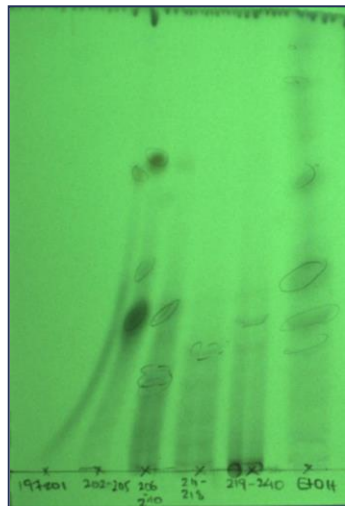
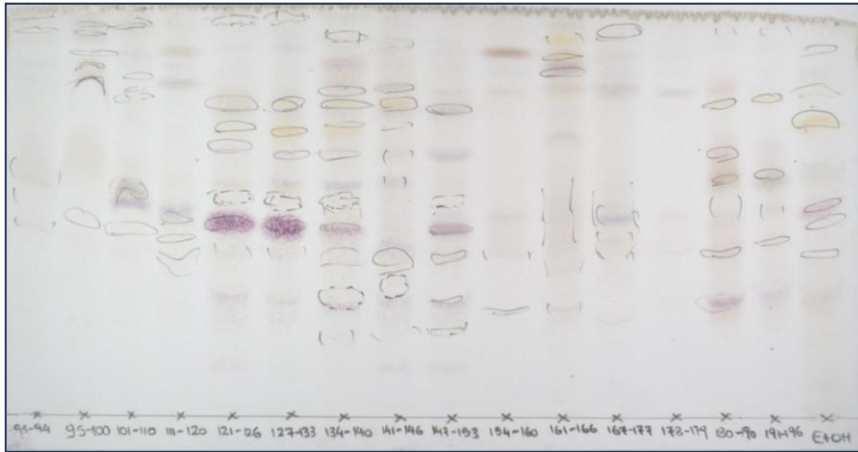
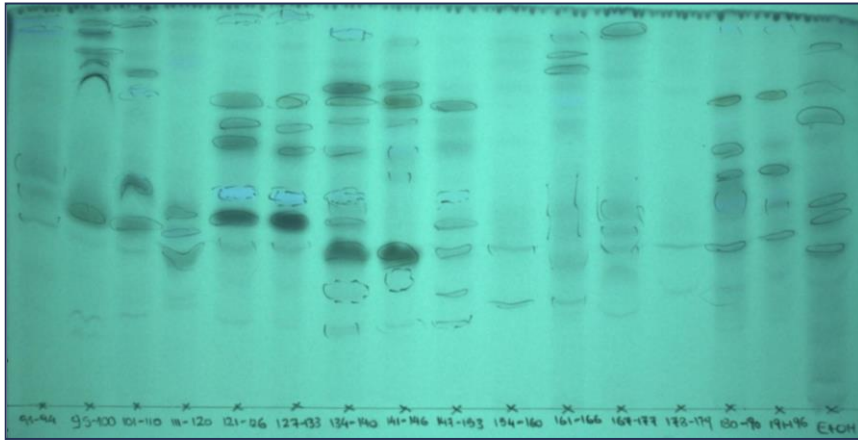
Γ.1.3 Φαρμακογνωστική μελέτη του εκχυλίσματος CA-218259_EtOH

Το περιεχόμενο του CA-218259_EtOH παρουσιάζει μεγάλο εύρος πολικότητας στην TLC. Συνεπώς, για την κλασμάτωσή του επιλέχθηκε η φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής (Centrifugal Partition Chromatography - CPC) με την μέθοδο της βαθμιδωτής έκλουσης-εξώθησης, η οποία δίνει την δυνατότητα για κλασμάτωση των συστατικών ενός μίγματος εξαρτώμενη από τον συντελεστή κατανομής των μορίων στο διφασικό σύστημα διαλυτών που θα επιλεγεί. Η κλασμάτωση του δραστικού εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην Παράγραφο Β.3.3 (1).

Τα 727,9 mg της δεύτερης εκχύλισης συνενώθηκαν με τα 323,8 mg του εκχυλίσματος EtOH που χρησιμοποιήθηκαν για την ποιοτική ανάλυση (Παράγραφος Γ.1.1), προς απόκτηση τελικά 1,05 g εκχυλίσματος EtOH. Από την κλασμάτωση αυτών, παραλήφθηκαν συνολικά 240 κλάσματα. Το σύνολο των κλασμάτων ελέγχθηκε ποιοτικά με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) και ομαδοποιήθηκαν σε 35 συνενώσεις κλασμάτων (Πίνακας Γ.4). Τα νέα κλάσματα που προέκυψαν υποβλήθηκαν ξανά σε TLC χρωματογραφία (Εικόνα Γ.6).

Εικόνα Γ.6. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Σύστημα διαλυτών: οργανική φάση του συστήματος $\text{CHCl}_3/\text{ΜΕΟΗ}/\text{H}_2\text{O}:13/9/3$. Στη χρωματογραφία παρουσιάζονται τα συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από τη CPC, καθώς και το εκχύλισμα CA-218259_EtOH που υποβλήθηκε σε αυτή την κλασμάτωση





Πίνακας Γ.3. Οι αποδόσεις της κλασμάτωσης με CPC του εκχυλίσματος EtOH του CA-218259, όπως προέκυψαν μετά τη συνένωση των παρόμοιων κλασμάτων

Συνενώσεις	Κωδικοί	Μεταβολίτης	Καθαρό Βάρος (mg)
1-15	-	-	5.2
16-19	-	-	9.0
20-23	NKSS 16	-	5.6
24-30	-	-	4.2
31-34	-	-	2.4
35-37	NKSS 1	-	1.7
38-42	NKSS 17	5	2.9
43-46	-	-	2.6
47-52	NKSS 2	-	4.0
53-58	-	-	3.0
59-64	NKSS 38	-	4.1
65-70	-	-	3.7
71-80	NKSS 39	-	10.3
81-85	-	-	6.1
86-90	-	-	8.0
91-94	-	-	5.4
95-100	-	-	27.2
101-110	-	-	13.9
111-120	-	-	8.1
121-126	NKSS 4,5,6,7,8,9,10,11,12	2, 3	11.0
127-133	NKSS 4,5,6,7,8,9,10,11,12	2, 3	14.4
134-140	-	-	19.0
141-146	NKSS 13,14,15	1	27.3
147-153	-	-	10.1
154-160	NKSS 18	-	4.5
161-166	-	-	8.6
167-177	-	-	10.7
178-179	-	-	1.6
180-190	NKSS 21,22	-	27.5
191-196	NKSS 23,24,25	-	25.6
197-201	-	-	19.0
202-205	NKSS 19,20	4	92.2
206-210	NKSS 3	-	237.9
211-218	-	-	101.3
219-240	-	-	7.6

Μετά το τέλος της αρχικής κλασμάτωσης του εκχυλίσματος CA-218259_EtOH, πραγματοποιήθηκε Εκχύλιση Υγρού – Υγρού στο κλάσμα 206-210, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην Παράγραφο Β.1.6, προς απόκτηση 1,2 mg (απόδοση: 0,5%) κλάσματος 206-210_EtOAc (NKSS3) και 216,3 mg κλάσματος 206-210_H₂O.

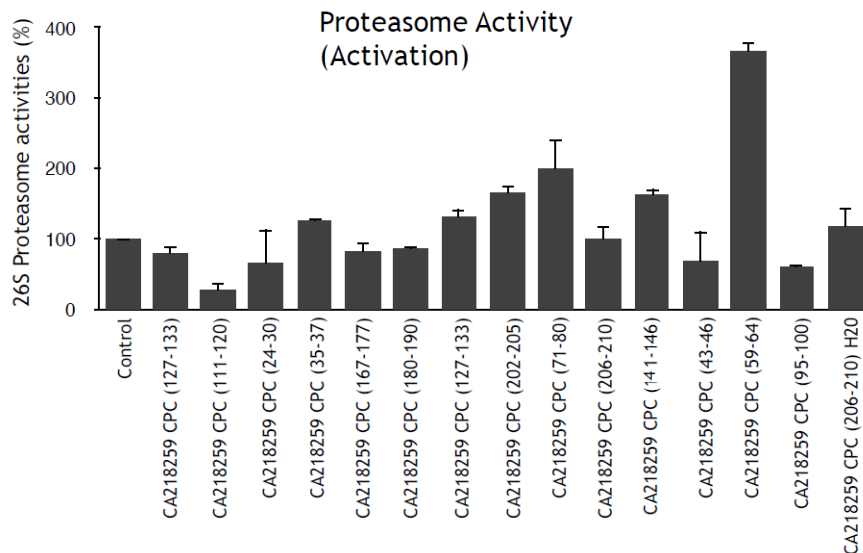
Ακολούθησε ο έλεγχος της αντιοξειδωτικής δράσης των αντιπροσωπευτικών κλασμάτων, καθώς και ο έλεγχος σε κυτταρικές σειρές για τυχόν ενεργοποίηση της δραστηριότητας του

πρωτεασώματος, με στόχο να δοθεί προτεραιότητα στη βιοκατευθυνόμενη απομόνωση και ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών του εκχυλίσματος. Τα επιλεγθέντα προς εξέταση κλάσματα και η δράση τους, που ελέγχθηκε βάσει του πρωτοκόλλου που περιγράφεται στις Παραγράφους Β.2.1 και Β.2.3, παρουσιάζονται στον Πίνακα Γ.5 για την αντιοξειδωτική δράση και στο Γράφημα Γ.2 για τη δράση τους στο πρωτεάσωμα.

Πίνακας Γ.4. Αντιοξειδωτική δράση αντιπροσωπευτικών συνενωμένων κλασμάτων που προήλθαν από το CPC και την Εκχύλιση Υγρού – Υγρού

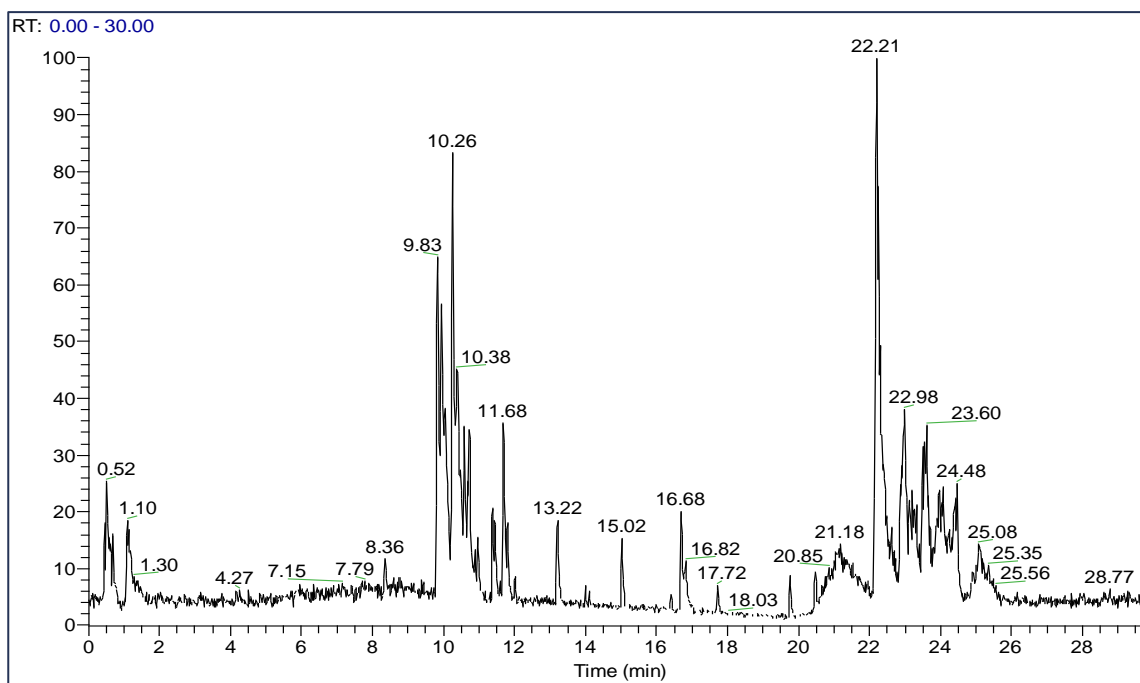
Συνενωμένα Κλάσματα	C (μg/ml)	% Αναστολή	STDEV
16-19	100	2,91	0,77
24-30		16,89	1,11
35-37		8,84	1,02
47-52		7,98	1,89
59-64		7,29	1,06
71-80		5,31	0,98
95-100		-2,12	0,69
111-120		9,03	0,31
127-133		8,73	0,49
141-146		32,93	0,5
147-153		14,66	0,68
167-171		5,65	0,79
180-190		4,91	0,24
202-205		3,69	0,74
206-210, H ₂ O		7,21	1,00
206-210, EtOAc		16,04	0,39

Γράφημα Γ.2. Μελέτη ενεργοποίησης της δραστηριότητας του 26S πρωτεασώματος από αντιπροσωπευτικά συνενωμένα κλάσματα του εκχυλίσματος CA-218259_EtOH που προήλθαν από το CPC και την Εκχύλιση Υγρού – Υγρού, στην κυτταρική σειρά CT-L/LLVY.

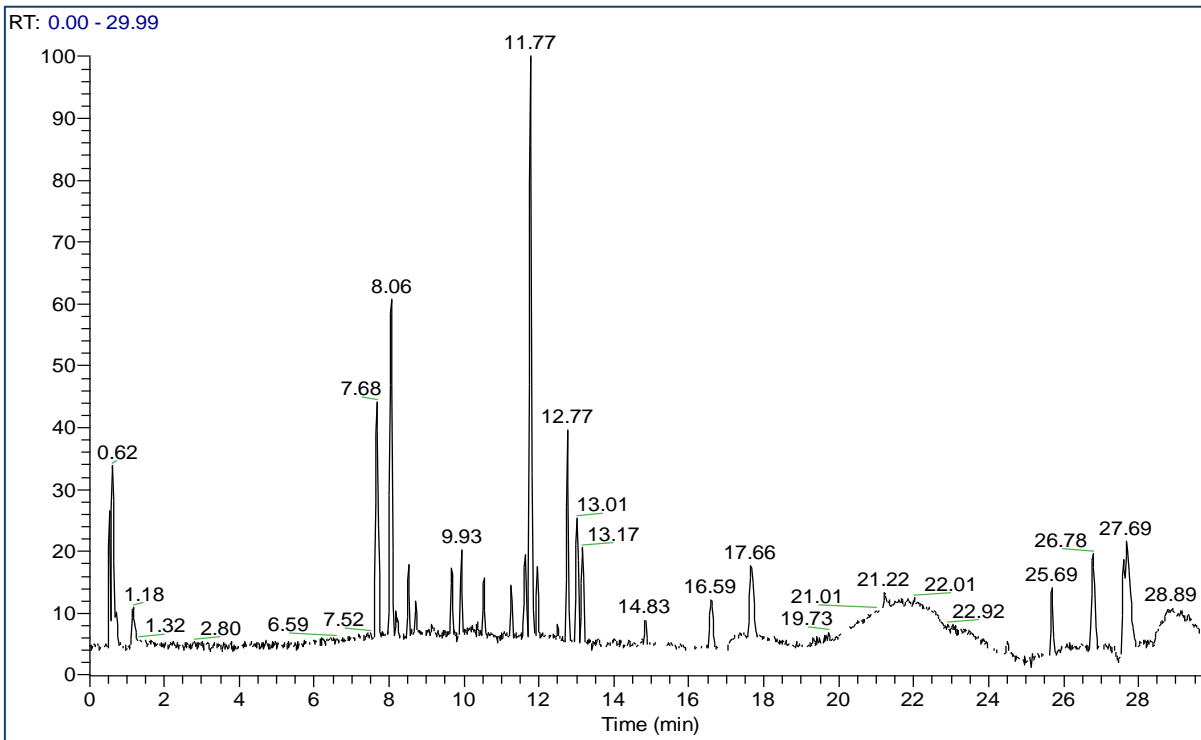


Τα αποτελέσματα των βιολογικών δοκιμών έδειξαν ότι η αντιοξειδωτική δράση του ολικού εκχυλίσματος, που υπενθυμίζεται ότι βρέθηκε $21,60 \pm 0.42$, οφείλεται στους δευτερογενείς μεταβολίτες που περιέχονται στο συνενωμένο κλάσμα (141-146). Η δράση ενεργοποίησης της δραστηριότητας του 26S πρωτεασώματος οφείλεται στους δευτερογενείς μεταβολίτες που περιέχονται στα συνενωμένα κλάσματα (35-37), (59-64), (71-80), (127-133), (141-146) και (202-205).

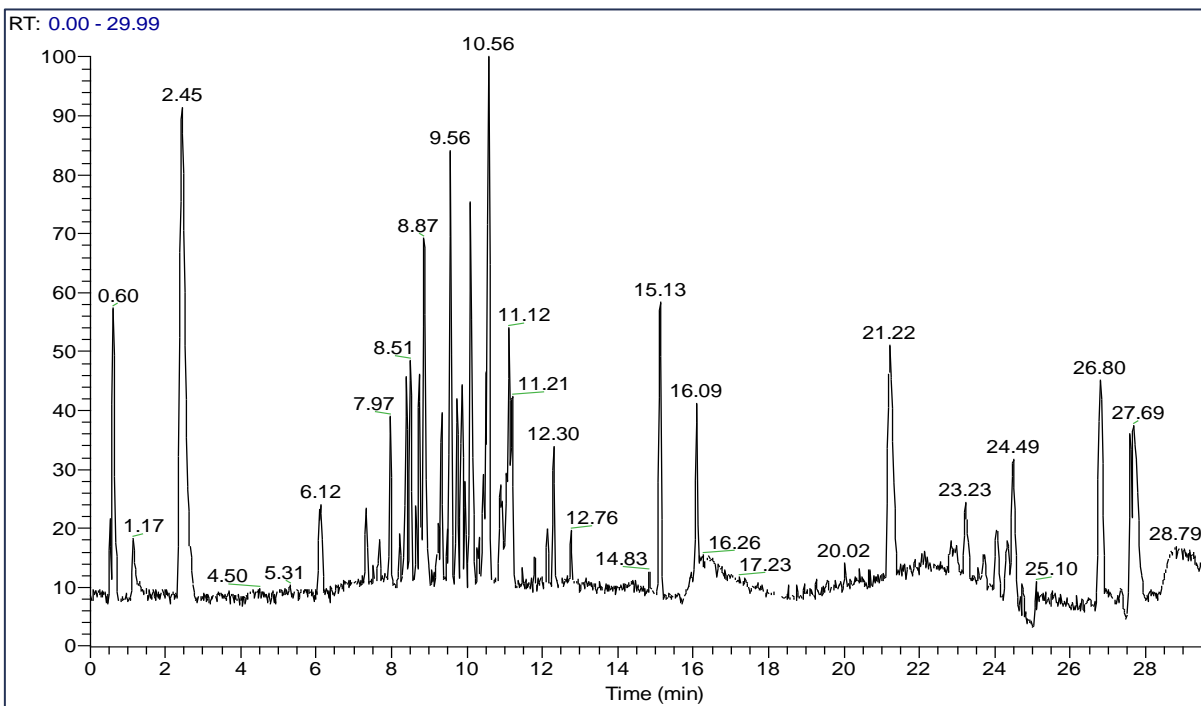
Δυστυχώς, όπως φαίνεται και στον πίνακα Γ.4, δεν υπήρχε επαρκής ποσότητα για περαιτέρω χρωματογραφικό διαχωρισμό αρκετών από τα δραστικά κλάσματα, όπως των (35-37), (59-64) και (71-80), τα οποία είχαν πλούσιο χημικό προφίλ, κάτι που αποδεικνύεται και από τα χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS που ακολουθούν (Εικόνες Γ.7, Γ.8 και Γ.9).



Εικόνα Γ.7. Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του συνενωμένου κλάσματος (35-37) της CPC του εκχυλίσματος EtOH του CA-218259



Εικόνα Γ.8. Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του συνενωμένου κλάσματος (59-64) της CPC του εκχυλίσματος EtOH του CA-218259

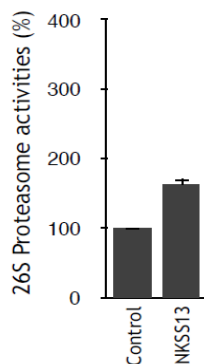


Εικόνα Γ.9. Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του συνενωμένου κλάσματος (71-80) της CPC του εκχυλίσματος EtOH του CA-218259

- Στο συνενωμένο κλάσμα (141-146) πραγματοποιήθηκε μια παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Preparative TLC), όπως περιγράφεται στην Παράγραφο Β.3.2. Αναπτύχθηκε με σύστημα διαλυτών την οργανική φάση του συστήματος $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}:13/9/3$ και οδήγησε στην απομόνωση του Μεταβολίτη 1 (NKSS13), που σε μικρότερη αναλογία περιέχει ως πρόσμιξη το *cis*-ισομερές του. Παράλληλα, παραλάβαμε τις ζώνες NKSS14 και NKSS15, που αποτελούν μίγματα μεταβολιτών.
- Λόγω όμοιου χημικού προφίλ στην αναλυτική TLC, τα συνενωμένα κλάσματα (121-126) και (127-133) συνενώθηκαν περαιτέρω και αναπτύχθηκαν σε μια παρασκευαστική TLC, με σύστημα διαλυτών την οργανική φάση του διφασικού συστήματος $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}:13/9/3$, όπως περιγράφεται στην Παράγραφο Β.3.2. Απομονώθηκαν οι Μεταβολίτες 2 (NKSS4), 3 (NKSS10) και 4 (NKSS11). Παραλάβαμε ακόμα τις ζώνες NKSS5, NKSS6, NKSS7, NKSS8, NKSS9 και NKSS12, ως μίγματα μεταβολιτών.
- Παράλληλα, απευθείας από το συνενωμένο κλάσμα (38-42) του CPC ταυτοποιήθηκε ο Μεταβολίτης 5 (NKSS17).
- Δυστυχώς, στο συνενωμένο κλάσμα (202-205), δεν καταφέραμε να απομονώσουμε κάποιον μεταβολίτη ικανό προς ταυτοποίηση. Πραγματοποιήθηκε παρασκευαστική TLC με το ίδιο σύστημα διαλυτών για ανάπτυξη, και απομονώθηκαν τα μίγματα δευτερογενών μεταβολιτών NKSS19 και NKSS20.
- Τέλος, τα μίγματα μεταβολιτών NKSS21 και NKSS22 παραλήφθηκαν από την ανάπτυξη παρασκευαστικής TLC των συνενωμένων κλασμάτων (180-190), ενώ τα μίγματα NKSS23, NKSS24 και NKSS25 παραλήφθηκαν μέσω παρασκευαστικής TLC των συνενωμένων κλασμάτων (191-196). Και οι δύο TLC αναπτύχθηκαν με σύστημα διαλυτών την οργανική φάση του διφασικού συστήματος $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}:13/9/3$, όπως περιγράφεται στην Παράγραφο Β.3.2.

Από τους μεταβολίτες που απομονώθηκαν, ο Μεταβολίτης 1 (NKSS13) αποδείχθηκε ότι έχει ικανότητα ενεργοποίησης της δραστηριότητας του 26S πρωτεασώματος, όπως αποδεικνύεται και από το Γράφημα Γ.3 που ακολουθεί. Οι υπόλοιποι δευτερογενής μεταβολίτες που απομονώθηκαν βρίσκονται σε στάδια βιοδοκιμών σε κυτταρικές σειρές, καθώς και ελέγχου αντιοξειδωτικής δράσης, με στόχο να βρεθούν οι δραστικοί μεταβολίτες στους οποίους οφείλεται η δράση.

Γράφημα Γ.3. Μελέτη ενεργοποίησης της δραστηριότητας του 26S πρωτεασώματος για τον Μεταβολίτη 1 (NKSS13) που απομονώθηκε από το εκχύλισμα CA-218259_EtOH, στην κυτταρική σειρά CT-L/LLVY.



Ακολούθησε η ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών με τη λήψη φασμάτων LC-HRMS/MS και NMR, όπως περιγράφεται στην Παράγραφο Γ.1.5.

Τα μίγματα μεταβολιτών προορίστηκαν για αντιστοίχιση (Annotation) με γνωστούς μεταβολίτες μέσω της διαδικασίας του Dereplication, όπως περιγράφεται στην Παράγραφο Γ.1.4.

Γ.1.4. Αντιστοίχιση (Annotation) γνωστών μεταβολιτών σε μίγματα (Dereplication) για το εκχύλισμα CA-218259_EtOH

Για την αντιστοίχιση (annotation) των γνωστών δευτερογενών μεταβολιτών που προέκυψαν από τη φαρμακογνωστική του μελέτη του εκχυλίσματος CA-218259_EtOH (Περιγράφηκε στην Παράγραφο Γ.1.3), χρησιμοποιήθηκαν βάσεις δεδομένων-βιβλιοθήκες, όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο Β.2.4, ενώ εφαρμόστηκε απόκλιση μάζας 0.001 m/z ή 30 ppm. Στους Πίνακες Γ.6 και Γ.7 αναφέρεται ο χρόνος κατακράτησης, το θεωρητικό και πειραματικό m/z , ο μοριακός τύπος, η απόκλιση μάζας, καθώς και οι κωδικοί των κλασμάτων που τα περιέχουν, σε αρνητικό και θετικό ηλεκτροψεκασμό, αντίστοιχα.

Πίνακας Γ.5. Αντιστοίχιση (annotation) γνωστών δευτερογενών μεταβολιτών του εκχυλίσματος CA-218259_EtOH, χρησιμοποιώντας ανάλυση UHPLC-HRMS με αρνητικό ηλεκτροψεκασμό. Για την αντιστοίχιση, χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων Reaxys, Dictionary of Natural Products και AntiMarin, εφαρμόζοντας απόκλιση μάζας 0.001 m/z ή 30 ppm. Στον Πίνακα αναφέρεται ο χρόνος κατακράτησης, το θεωρητικό και πειραματικό m/z , ο μοριακός τύπος, η απόκλιση μάζας, καθώς και οι κωδικοί των κλασμάτων που τα περιέχουν.

Feature	Retention Time	m/z πειραματικό	m/z θεωρητικό	ESI mode	Molecular Formula	Δ (ppm)	Annotation	Fraction
1	0.62	179.0565	179.0560	-	C ₆ H ₁₂ O ₆	0.005	Jinggangmycin II	NKSS5
2	0.62	179.0565	179.0560	-	C ₆ H ₁₂ O ₆	0.005	Jinggangmycin III	NKSS5
3	1.35	211.0724	211.0720	-	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₄	0.005	Surugapyrrole A	NKSS13
4	1.66	287.0883	287.0920	-	C ₁₆ H ₁₆ O ₅	13.933	Nanaomycin-betaA; OM 173betaA; OM 173beta1; AM-3867 III	NKSS14
5	1.73	225.0881	225.0880	-	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₄	0.005	Nikkomycin D	NKSS15
6	1.93	213.0881	213.0880	-	C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₄	0.005	Cairomycin A; Cyclo(aspartylleucyl)	NKSS13
7	2.01	437.2137	437.2080	-	C ₂₅ H ₃₀ N ₂ O ₅	12.067	Streptopenazine F	NKSS15
8	2.01	437.2137	437.2080	-	C ₂₅ H ₃₀ N ₂ O ₅	12.067	Streptopenazine G	NKSS15
9	3.09	143.0353	143.0350	-	C ₆ H ₈ O ₄	0.005	4,5-Dihydroxy-5-hydroxymethyl-2-cyclopenten-1-one; Pentenomycin I; XB 94; C 2554B	NKSS15
10	3.09	143.0353	143.0350	-	C ₆ H ₈ O ₄	0.005	4-Epipentonomycin I; C-2554B; XB-94	NKSS15
11	5.95	249.1245	249.1240	-	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₃	0.005	Nongidin A; Jenamidine A1/A2	NKSS5
12	6.15	259.1299	259.1300	-	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₅	0.005	N-Valyldihydroxyhomopropoline	NKSS15
13	6.54	151.0405	151.0400	-	C ₈ H ₈ O ₃	6.621	2,4-Dihydroxy-6-methylbenzaldehyde; Orsellin-aldehyde	NKSS2

14	6.54	151.0405	151.0400	-	C ₈ H ₈ O ₃	6.621	p-Hydroxyphenylacetic acid	NKSS2
15	6.54	151.0405	151.0400	-	C ₈ H ₈ O ₃	6.621	2,4'-Dihydroxyacetophenone	NKSS2
16	6.68	698.2570	698.2820	-	C ₃₆ H ₄₅ NO ₁₃	35.803	Aclacinomycin S; MA-144-S1	NKSS6, 14, 19, 22, 23
17	6.89	277.1558	277.1560	-	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₃	0.005	Terragine C	NKSS5
18	7.33	413.1099	413.1100	-	C ₁₉ H ₁₈ N ₄ O ₇	0.005	Futalosine	NKSS13
19	7.61	174.0563	174.0560	-	C ₁₀ H ₉ NO ₂	0.005	3-(Hydroxyacetyl)-indole	NKSS2
20	7.61	174.0563	174.0560	-	C ₁₀ H ₉ NO ₂	0.005	3-Indolyl carboxylic acid methyl ester	NKSS2
21	7.62	264.0879	264.0840	-	C ₈ H ₁₅ N ₃ O ₇	15.146	Streptozotocin; Streptozocin; Zanosar; NSC-37917; NSC-85998; U-9889	NKSS3
22	8.52	167.0716	167.0710	-	C ₉ H ₁₂ O ₃	5.985	6-Ethyl-4-hydroxy-3,5-dimethylpyran-2-one	NKSS17
23	8.52	167.0716	167.0710	-	C ₉ H ₁₂ O ₃	5.985	Butyrolactone Tue 1718 G2	NKSS17
24	8.52	167.0716	167.0710	-	C ₉ H ₁₂ O ₃	5.985	2-(3'-Hydroxy-4'-methoxyphenyl)ethanol	NKSS17
25	8.52	167.0716	167.0710	-	C ₉ H ₁₂ O ₃	5.985	Surugapyrone A	NKSS17
26	10.25	214.1450	214.1450	-	C ₁₁ H ₂₁ NO ₃	0.005	Homomonactin acid amide	NKSS1
27	12.20	451.2701	451.2710	-	C ₂₆ H ₃₆ N ₄ O ₃	2.216	Antiostatin B3	NKSS2
28	12.20	451.2701	451.2710	-	C ₂₆ H ₃₆ N ₄ O ₃	2.216	Antiostatin B4	NKSS2
29	13.11	453.2860	453.2860	-	C ₂₅ H ₄₂ O ₇	0.005	GEX-Q1	NKSS2
30	13.11	453.2860	453.2860	-	C ₂₅ H ₄₂ O ₇	0.005	GEX-Q2	NKSS2
31	13.11	453.2860	453.2860	-	C ₂₅ H ₄₂ O ₇	0.005	GEX-Q4	NKSS2
32	13.88	490.3538	490.3540	-	C ₂₉ H ₄₉ NO ₅	0.005	Lipstatin	NKSS2, 17
33	13.88	490.3538	490.3610	-	C ₂₃ H ₄₉ N ₅ O ₆	14.275	Actinomycin J; Actinoflavin; Actinomycin 4A-2; Actinomycin J1; Actinomycin M; Actinomycin X	NKSS2, 17
34	14.15	490.3535	490.3610	-	C ₂₃ H ₄₉ N ₅ O ₆	14.275	70591 components 2C..4B, 5A, 5B, 7; Actinomycin-Z complex; Actinomycin complex 41156	NKSS2, 17
35	14.18	517.2838	517.2710	-	C ₃₁ H ₃₈ N ₂ O ₅	25.131	64-4HmABA	NKSS5
36	14.18	517.2838	517.2710	-	C ₃₁ H ₃₈ N ₂ O ₅	25.131	64-3,4-AHBA2	NKSS5
37	14.18	517.2838	517.2740	-	C ₂₀ H ₃₈ N ₈ O ₈	19.332	Guadinomine A	NKSS5
38	14.18	517.2838	517.2920	-	C ₂₈ H ₄₂ N ₂ O ₇	15.465	Autolytimycin	NKSS5
39	15.35	669.1600	669.1610	-	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₃	1.494	Julichrome Q3,5; Julimycin-B-I complex	NKSS16
40	15.35	669.1600	669.1650	-	C ₃₃ H ₃₄ O ₁₃ S	7.472	BE-52440B	NKSS16
41	15.35	669.1600	669.1680	-	C ₂₂ H ₃₄ N ₆ O ₁₆ S	11.955	C-8030 E	NKSS16
42	20.68	625.3868	625.3750	-	C ₃₇ H ₅₄ O ₈	19.188	LL-F28249 lambda; S 541F; L 759154	NKSS5, 8, 12, 21
43	20.68	625.3868	625.3750	-	C ₃₇ H ₅₄ O ₈	19.188	S 541 G; LL-F28249a	NKSS5, 8, 12, 21
44	20.68	625.3868	625.3750	-	C ₃₇ H ₅₄ O ₈	19.188	LL-F28249theta	NKSS5, 8, 12, 21
45	20.68	625.3868	625.3750	-	C ₃₇ H ₅₄ O ₈	19.188	LL-F28249jota	NKSS5, 8, 12, 21

46	20.68	635.4156	635.410	-	C ₂₇ H ₅₆ N ₈ O ₉	9.443	Cairomycin C	NKSS5, 8, 12, 21
47	20.68	635.4156	635.4160	-	C ₃₆ H ₆₀ O ₉	0.005	Bafilomycin A2	NKSS5, 8, 12, 21
48	20.68	635.4156	635.4160	-	C ₃₆ H ₆₀ O ₉	0.005	L-681110-B1	NKSS5, 8, 12, 21
49	21.12	355.1579	355.1550	-	C ₂₁ H ₂₄ O ₅	8.447	Phosphatoquinone-A	NKSS3, 5, 21
50	21.74	369.1734	369.1710	-	C ₂₂ H ₂₆ O ₅	5.418	4-Hydroxy-7-methoxy-2,3,6-trimethyl-3-(4-methyl-pent-3-enyl)-2,3-dihydro-naphtho[2,3-b]furan-5,8-dione	NKSS16
51	21.74	369.1734	369.1710	-	C ₂₂ H ₂₆ O ₅	5.418	Furaquinocin C; KO-3988-C	NKSS16
52	21.74	369.1734	369.1710	-	C ₂₂ H ₂₆ O ₅	5.418	Flaviogeranin	NKSS16
53	21.88	305.2154	305.2120	-	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	9.829	Salaceyin B	NKSS6, 8,13, 22, 24
54	22.76	894.2746	894.2940	-	C ₄₃ H ₄₉ N ₃ O ₁₈	21.246	Sugordomycin-D-4; Coumermycin D	EtOH ₂ extract NKSS
55	22.95	309.1740	309.1710	-	C ₁₇ H ₂₆ O ₅	9.703	Oxycineromycin B	1,4,5,6,7,8,10,11,12,14,15,16,19,20,21,22,23,24,25

Πίνακας Γ.6. Αντιστοίχιση (annotation) γνωστών δευτερογενών μεταβολιτών του εκχυλίσματος CA-218259_EtOH, χρησιμοποιώντας ανάλυση UHPLC-HRMS με θετικό ηλεκτροψεκασμό. Για την αντιστοίχιση, χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων Reaxys, Dictionary of Natural Products και AntiMarin, εφαρμόζοντας απόκλιση μάζας 0.001 *m/z* ή 30 ppm. Στον Πίνακα αναφέρεται ο χρόνος κατακράτησης, το θεωρητικό και πειραματικό *m/z*, ο μοριακός τύπος, η απόκλιση μάζας, καθώς και οι κωδικοί των κλασμάτων που τα περιέχουν.

Feature	Retention Time	<i>m/z</i> πειραματικό	<i>m/z</i> θεωρητικό	ESI mode	Molecular Formula	Δ (ppm)	Annotation	Fraction
1	0.39	214.0905	214.0860	+	C ₁₃ H ₁₁ NO ₂	23.355	2-Hydroxybenzanilide	NKSS13, 25
2	0.40	195.0890	195.0860	+	C ₇ H ₁₄ O ₆	15.378	7-Deoxy-D-altro-2-heptulose; SF-666-B	NKSS25
3	0.40	195.0890	195.0860	+	C ₇ H ₁₄ O ₆	15.378	7-Deoxy-D-glycero-D-gluco-heptose; SF-666-A	NKSS25
4	0.40	195.0890	195.0860	+	C ₇ H ₁₄ O ₆	15.378	7-Deoxy-L-glycero-D-gluco-heptose; MBU-18	NKSS25
5	0.45	171.9928	171.9930	+	C ₄ H ₇ Cl ₂ NO ₂	0.005	2-Amino-4,4-dichlorobutanoic acid; Armentomycin; U-10923	NKSS25
6	0.50	136.0740	136.0760	+	C ₈ H ₉ NO	14.698	2-Phenylacetamide	NKSS25
7	0.50	136.0740	136.0760	+	C ₈ H ₉ NO	14.698	2-Amino-acetophenone; 1-(2-Amino-phenyl)-ethanone	NKSS25
8	0.61	214.0910	214.0860	+	C ₁₃ H ₁₁ NO ₂	23.355	2-Hydroxybenzanilide	NKSS25
9	0.67	137.0455	137.0460	+	C ₅ H ₄ N ₄ O	0.005	Hypoxanthine	NKSS5
10	0.96	268.1041	268.1000	+	C ₁₃ H ₁₇ NO ₃ S	14.920	U 68204	NKSS8

11	0.96	268.1041	268.1000	+	C ₁₃ H ₁₇ NO ₃ S	14.920	5-(2-Methyl-1E-1,3-butadienyl)-5-acetamido-3-ethyl-2,5-dihydro-4-hydroxy-2-oxo-thiophene; Thiotretionic acid Tue 3010	NKSS8
12	0.96	268.1041	268.1040	+	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	0.005	Formycin-A; Formycin; NSC-102811; 4-215	NKSS8
13	0.96	268.1041	268.1040	+	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	0.005	Adenosine; 9-beta-(D-Ribofuranosyl)adenine; beta-Adenosine	NKSS8
14	0.96	268.1041	268.1040	+	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	0.005	Adenine 9-beta-D-arabinofuranoside; Ara-A; VIRA-A; Spongoadenosine; Adenine arabinoside; Vidarabine	NKSS8
15	1.01	164.0749	164.0710	+	C ₉ H ₉ NO ₂	24.379	2-N-Hydroxy-3,4-dihydroisoquinoline-1-one	NKSS23
16	1.17	212.1043	212.1030	+	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₃	4.715	Pentopyranine-A	NKSS23
17	1.17	212.1043	212.1030	+	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₃	4.715	Pentopyranine-B	NKSS23
18	1.29	324.1195	324.1190	+	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ O ₆	0.005	FR-66979	NKSS13, 15
19	1.45	245.0970	245.0920	+	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₃	20.400	7-(4'-Nitrophenyl)-hepta-2,4,6-trienoic acid amide	NKSS19, 22, 23
20	1.45	245.0970	245.1020	+	C ₁₁ H ₁₆ O ₆	20.400	Rancinamycin Ia; Rancinamycin-I; Ranimycin; U-22583	NKSS19, 22, 23
21	1.45	245.0970	245.1020	+	C ₁₁ H ₁₆ O ₆	20.400	Rancinamycin Ib	NKSS19, 22, 23
22	1.58	166.0875	166.0860	+	C ₉ H ₁₁ NO ₂	12.042	Anthranilic acid ethyl ester	EtOH extract
23	1.58	166.0875	166.0860	+	C ₉ H ₁₁ NO ₂	12.042	p-(Acetylamino)benzyl alcohol	EtOH extract
24	1.61	224.1280	224.1280	+	C ₁₂ H ₁₇ NO ₃	0.005	(S)-3-p-Methoxyphenyl-3-acetamidopropan-1-ol	NKSS5
25	1.61	224.1280	224.1280	+	C ₁₂ H ₁₇ NO ₃	0.005	3097-D1; Deacetylanisomycin	NKSS5
26	1.65	199.1077	199.1080	+	C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₃	0.005	Nocardanin	NKSS11
27	1.72	227.1030	227.1030	+	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₄	0.005	Nikkomycin D	NKSS15
28	1.99	220.1183	220.1120	+	C ₁₆ H ₁₃ N	27.258	N-Phenyl-beta-naphthylamine	NKSS15
29	2.09	220.1181	220.1120	+	C ₁₆ H ₁₃ N	27.258	N-Phenyl-1-naphthylamine; N-Phenyl-alpha-naphthylamine	NKSS15
30	2.20	152.0710	152.0710	+	C ₈ H ₉ NO ₂	0.005	SIPI-96-1041; o-Hydroxyacetanilide; 2-Acetamidophenol; 2-Hydroxyacetanilide; 2-Hydroxyphenylacetamide	NKSS18
31	2.20	152.0710	152.0710	+	C ₈ H ₉ NO ₂	0.005	Methyl 2-aminobenzoate;	NKSS18

							Anthranilic acid methyl ester	
32	2.20	152.0710	152.0710	+	C ₈ H ₉ NO ₂	0.005	N-Methylantranilic acid	NKSS18
33	2.20	152.0710	152.0710	+	C ₈ H ₉ NO ₂	0.005	Streptokordin	NKSS18
34	2.95	205.0970	205.0930	+	C ₆ H ₁₂ N ₄ O ₄	19.503	(3R,6R)-3,6-Bis[(aminooxy)methyl]-2,5-piperazinedione; D-Cycloserine dimer; Cycloserine diketopiperazine DCS	NKSS4,5
35	2.95	205.0970	205.0930	+	C ₆ H ₁₂ N ₄ O ₄	19.503	(3R,6R)-3,6-Bis[(aminooxy)methyl]-2,5-piperazinedione; Cycloserine diketopiperazine; DCS	NKSS4,5
36	2.95	205.0970	205.0930	+	C ₆ H ₁₂ N ₄ O ₄	19.503	(3S,6S)-3,6-Bis[(aminooxy)methyl]-2,5-piperazinedione; Cycloserine diketopiperazine; DCS	NKSS4,5
37	5.35	261.1245	261.1230	+	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃	7.659	cis-Cyclo(tyrosylprolyl); (S,S)-ML 1532II; A 19C; Cyclo(L-Tyr-L-Pro); 3097-A; Maculosin 1; cyclo(3S-Tyr,8aS-Pro); ML 1532II; A 19C	NKSS18
38	5.35	261.1245	261.1230	+	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃	7.659	cyclo-(N-Me-Tyr,dehydroAbu)	NKSS18
39	5.35	261.1245	261.1230	+	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃	7.659	trans-Cyclo(3S-Tyr,8aR-Pro); cyclo(D-Pro-L-Tyr)	NKSS18
40	5.45	229.1558	229.1550	+	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₃	4.364	a-Methyldeithiobiotin; Libramycin-A; a-MDB	NKSS20
41	5.52	197.1294	197.1280	+	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂	5.073	cis-(3S,7aS)-Cyclo(prolylvalyl), L,L-form; Prolylvaline anhydride; 3-Isopropyl-2,5-dioxo-1,4-diazabicyclo-4,3,0-nonane; K73	NKSS21
42	5.52	197.1294	197.1280	+	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂	5.073	(3R,7aS)-Cyclo(prolylvalyl); cyclo(D-Pro, L-Val); trans-cyclo(Pro,Val)	NKSS21
43	5.52	197.1294	197.1280	+	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂	5.073	Amiclenomycin; L-2-Amino-4-(4-amino-2,5-cyclohexadienyl)-butanoic acid; Acm	NKSS21
44	5.52	197.1294	197.1280	+	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₂	5.073	Maculosin-5	NKSS21
45	5.69	300.2019	300.1960	+	C ₁₉ H ₂₅ NO ₂	19.987	Glaciapyrrole C	NKSS3
46	5.69	305.1572	305.1500	+	C ₁₆ H ₂₀ N ₂ O ₄	22.939	Tomaymycin	NKSS3

47	6.11	263.1404	263.1350	+	C ₉ H ₁₈ N ₄ O ₅	22.801	N2-(2-Carboxyethyl)-3-hydroxyarginine	NKSS20
48	6.44	214.0897	214.0820	+	C ₈ H ₁₁ N ₃ O ₄	32.697	Duazomycin-A; N-Acetyl DON; BA-8509A; NSC-51097; Diazamycin-A; Diazomycin-A	NKSS14
49	6.44	214.0897	214.0860	+	C ₁₃ H ₁₁ NO ₂	14.013	2-Hydroxybenzanilide	NKSS14
50	6.50	332.1342	332.1240	+	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₅	30.108	Mitiromycin A; Mitiromycin	NKSS14
51	6.50	332.1342	332.1280	+	C ₂₁ H ₁₇ NO ₃	18.065	0231-B	NKSS14
52	6.84	279.1704	279.1700	+	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₃	0.005	Terragine C	NKSS5
53	6.87	393.2095	393.2050	+	C ₁₇ H ₃₂ N ₂ O ₆ S	12.716	Lincomycin B; U-21699; 4"-Ethyllincomycin	NKSS2
54	6.87	393.2095	393.2050	+	C ₁₇ H ₃₂ N ₂ O ₆ S	12.716	Lincomycin-D; U-11973-E; N-Demethylincomycin	NKSS2
55	6.87	393.2095	393.2060	+	C ₂₅ H ₂₈ O ₄	10.173	Spirohexenolide B	NKSS2
56	6.87	416.2852	416.2800	+	C ₂₅ H ₃₇ NO ₄	12.011	Piericidin-A; Piericidin-A1; Shaoguanmycin-B; SN-198-E; IT-143-D	NKSS3
57	7.23	415.2540	415.2440	+	C ₂₀ H ₃₄ N ₂ O ₇	24.082	TMC-86B	NKSS3
58	7.23	415.2540	415.2510	+	C ₂₂ H ₃₈ O ₅ S	7.225	Panosialin-wD	NKSS3
59	7.23	415.2540	415.2510	+	C ₂₂ H ₃₈ O ₅ S	7.225	Panosialin-wC	NKSS3
60	7.23	432.2805	432.2740	+	C ₂₅ H ₃₇ NO ₅	13.880	Aphicidin; Piericidin-C1; Piericidin-D	NKSS3
61	7.23	432.2805	432.2820	+	C ₁₉ H ₃₇ N ₅ O ₆	4.627	Istamycin C1; 2"-N-Formylistamycin C	NKSS3
62	7.23	437.2358	437.2260	+	C ₁₈ H ₂₈ N ₈ O ₅	22.871	10381a1; Arginomycin	NKSS3
63	7.23	460.3115	460.3060	+	C ₂₇ H ₄₁ NO ₅	10.862	Piericidin-C3; Piericidin-C	NKSS3
64	7.23	460.3115	460.3060	+	C ₂₇ H ₄₁ NO ₅	10.862	Piericidin-D2; Piericidin-M	NKSS3
65	7.23	460.3115	460.3060	+	C ₂₇ H ₄₁ NO ₅	10.862	Piericidin-B5 N-oxide	NKSS3
66	7.44	152.0708	152.0710	+	C ₈ H ₉ NO ₂	0.005	Methyl 2-aminobenzoate; Anthranilic acid methyl ester	NKSS17
67	7.44	152.0708	152.0710	+	C ₈ H ₉ NO ₂	0.005	N-Methylantranilic acid	NKSS17
68	7.44	152.0708	152.0710	+	C ₈ H ₉ NO ₂	0.005	Streptokordin	NKSS17
69	7.52	459.2798	459.2870	+	C ₂₄ H ₄₃ O ₆ P	15.241	Cyclipostin Q3	NKSS3
70	7.52	459.2798	459.2870	+	C ₂₄ H ₄₃ O ₆ P	15.241	Cyclipostin Q	NKSS3
71	7.52	459.2798	459.2870	+	C ₂₄ H ₄₃ O ₆ P	15.241	Cyclipostin S	NKSS3
72	7.64	266.1026	266.0980	+	C ₈ H ₁₅ N ₃ O ₇	18.790	Streptozotocin; Streptozocin; Zanosar; NSC-37917; NSC-85998; U-9889	NKSS3
73	7.68	152.0708	152.0710	+	C ₈ H ₉ NO ₂	0.005	SIPI-96-1041; o-Hydroxyacetanilide; 2-Acetamidophenol; 2-Hydroxyacetanilide; 2-Hydroxyphenylacetamide	NKSS17
74	7.96	265.1911	265.1950	+	C ₂₀ H ₂₄	15.084	Hexaene-H-85	NKSS6, 11
75	7.96	265.1911	265.1950	+	C ₂₀ H ₂₄	15.084	Tetrahexin	NKSS6, 11

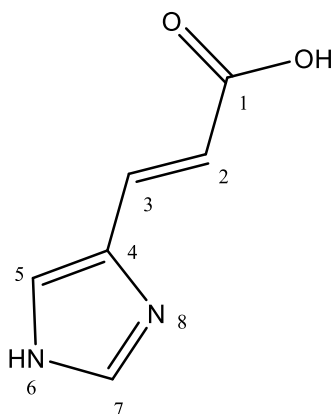
76	8.21	608.3847	608.3790	+	C ₃₃ H ₅₃ NO ₉	9.862	3-O-Acetyl M-4365 G2	NKSS3
77	8.78	243.0877	243.0860	+	C ₁₁ H ₁₄ O ₆	8.228	(3,4,5-Trihydroxy-6-oxo-1-cyclohexen-1-yl)methyl 2-butenolate; 2-Crotonyloxymethyl-(4R,5R,6R)-4,5,6trihydroxycyclohex-2-enone; Glyo-II	NKSS7
78	8.78	243.0877	243.0860	+	C ₁₁ H ₁₄ O ₆	8.228	Butalactin; (2R*,3S*)-2-(4',5'-Epoxyhex-2'E-en)oyl-2-hydroxy-3-hydroxymethylbutanolid	NKSS7
79	8.78	243.0877	243.0860	+	C ₁₁ H ₁₄ O ₆	8.228	Zhijiangjunsu; 633	NKSS7
80	8.78	243.0877	243.0860	+	C ₁₁ H ₁₄ O ₆	8.228	Lactone II; Dihydro-4-[4,5-epoxy-1-oxohex-2-enyloxymethyl]-3-hydroxy-2(3H)-furanone	NKSS7
81	8.78	243.0877	243.0880	+	C ₁₂ H ₁₀ N ₄ O ₂	0.005	Lumichrome; 7,8-Dimethyl-isoalloxazine	NKSS7
82	11.44	640.3898	640.4060	+	C ₃₄ H ₅₇ NO ₁₀	24.985	M-2847	NKSS3
83	11.63	728.4425	728.4580	+	C ₃₈ H ₆₅ NO ₁₂	20.592	20-Deoxy-20-dihydro-23-demycinosyltylosin; DODMT; DH-DO-DMT	NKSS3
84	11.71	772.4689	772.4480	+	C ₃₉ H ₆₅ NO ₁₄	27.186	Leucomycin-A5; Turimycin-H4	NKSS3
85	11.71	772.4689	772.4480	+	C ₃₉ H ₆₅ NO ₁₄	27.186	Staphcocomycin; Desmycarosyl-angolamycin	NKSS3
86	11.71	772.4689	772.4480	+	C ₃₉ H ₆₅ NO ₁₄	27.186	Tylosin-B; Demethylcarosyltyrosin A; Desmycosin; Demycarosyltylosin	NKSS3
87	13.42	373.2738	373.2700	+	C ₁₉ H ₃₆ N ₂ O ₅	10.716	Neoenactin M1; Lipoxamycin; U-26146	NKSS2
88	14.17	492.3677	492.3680	+	C ₂₉ H ₄₉ NO ₅	0.005	Lipstatin	NKSS2
89	14.17	492.3677	492.3760	+	C ₂₃ H ₄₉ N ₅ O ₆	16.248	Actinomycin J; Actinoflavin; Actinomycin 4A-2; Actinomycin J1; Actinomycin M; Actinomycin X	NKSS2
90	14.17	492.3677	492.3760	+	C ₂₃ H ₄₉ N ₅ O ₆	16.248	70591 components 2C..4B, 5A, 5B, 7; Actinomycin-Z complex; Actinomycin complex 41156	NKSS2
91	15.90	335.1036	335.1130	+	C ₁₇ H ₁₈ O ₇	26.857	Nanaomycin aB; OM 173aB; OM 173a3	NKSS16
92	16.25	301.1192	301.1180	+	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₄	3.320	Pyridindolol K2	NKSS16
93	18.67	429.3181	429.3210	+	C ₂₄ H ₄₄ O ₆	6.988	5-(1,2-Dihydroxyethyl)-3-	NKSS5

							octadecyl-tetronic acid; 4-(1,2-Dihydroxy-ethyl)-3-hydroxy-2-octadecyloxy-2,5-dihydrofuran-2-one	
94	21.28	406.2553	406.2660	+	C ₁₇ H ₃₅ N ₅ O ₆	27.077	Fortimicin A; Astromicin; KW 1070; ABBOTT-44747; XK-70-1	NKSS21, 24, 25
95	21.89	871.5721	871.5780	+	C ₄₇ H ₈₂ O ₁₄	6.884	X-206; C-41	NKSS8
96	22.11	793.5681	793.5460	+	C ₄₅ H ₇₆ O ₁₁	27.723	Mer-5504A3	NKSS21
97	22.14	749.5424	749.5200	+	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₀	30.685	20-Deoxy-17-epinarasin	NKSS21, 23
98	22.14	749.5424	749.5200	+	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₀	30.685	20-Deoxynarasin	NKSS21, 23
99	22.43	871.5725	871.5780	+	C ₄₇ H ₈₂ O ₁₄	5.737	CP 47433; 47433	NKSS7, 8, 9, 10, 13, 14, 15
100	22.43	871.5725	871.5780	+	C ₄₇ H ₈₂ O ₁₄	5.737	X-206; C-41	NKSS7, 8, 9, 10, 13, 14, 15
101	22.59	413.2658	413.2650	+	C ₂₁ H ₃₆ N ₂ O ₆	2.420	NK-04000P; Epopromycin A	NKSS5
102	22.59	887.5676	887.5420	+	C ₃₇ H ₇₀ N ₁₄ O ₁₁	29.294	A-53930A; Lavendothricin-C	NKSS4
103	22.59	887.5676	887.5420	+	C ₃₇ H ₇₀ N ₁₄ O ₁₁	29.294	Streptothricin-C; OP-2D; Racemomycin-D; Nourseothricin C	NKSS4
104	22.60	393.2979	393.3000	+	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	5.085	Elasnin; KM-2753	NKSS2, 3, 12 17
105	22.60	393.2979	393.3000	+	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	5.085	Sigmosceptrellin B; Priamicin B	NKSS2, 3, 12 17
106	22.60	393.2979	393.3000	+	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	5.085	Sigmosceptrellin C	NKSS2, 3, 12 17
107	23.07	685.4364	685.4520	+	C ₃₇ H ₆₄ O ₁₁	23.343	Monensin-D; A 3823D	NKSS5, 15, 19, 20, 21
108	23.98	689.5211	689.5280	+	C ₃₃ H ₆₈ N ₈ O ₇	10.152	L-156373-E	NKSS3, 21, 22, 23, 24
109	24.05	758.2257	758.2150	+	C ₂₅ H ₃₉ N ₇ O ₁₈ S	14.508	Adenomycin; C-19-97; C-8030-C	NKSS20, 21, 23
110	24.12	541.1213	541.1060	+	C ₂₅ H ₂₇ Cl ₃ N ₂ O ₅	27.720	7-Demethyl A-80915 B	NKSS1, 9, EtOH extract
111	24.13	689.5200	689.5280	+	C ₃₃ H ₆₈ N ₈ O ₇	11.602	L-156373-E	NKSS21
112	28.99	214.0896	214.0820	+	C ₈ H ₁₁ N ₃ O ₄	32.697	Duazomycin-A; N-Acetyl DON; BA-8509A; NSC-51097; Diazamycin-A; Diazomycin-A	NKSS15
113	28.99	214.0896	214.0860	+	C ₁₃ H ₁₁ NO ₂	14.013	2-Hydroxybenzanilide	NKSS15

Γ.1.5 Ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών του CA-218259_EtOH

Γ.1.5.1. Μεταβολίτης 1 (NKSS13)

Βάσει της ανάλυσης των 1D και 2D φασμάτων NMR, και του φασμάτος μάζας ESI(+) HR-MS, ο Μεταβολίτης 1 ταυτοποιήθηκε ως το (E)-ουροκανικό οξύ (E-uurocanic acid). Απομονώθηκε με TLC preparative από τα συνενωμένα κλάσματα (141-146) του CPC, όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο Γ.1.3. Στις βιολογικές δοκιμές σε κυτταρικές σειρές, κατέδειξε δράση επαγωγής της δραστηριότητας του 26S πρωτεασώματος, όπως φαίνεται και στο Γράφημα Γ.5.



Εικόνα Γ.10. Δομή (E)-Ουροκανικού οξέος (Μεταβολίτης 1)

Πίνακας Γ.7. Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του μεταβολίτη 1

Θέση	^1H NMR (600MHz, MeOD, δ ppm, J σε Hz)	^{13}C NMR* (600MHz, MeOD, δ ppm)
1	-	169.80
2	6.38 (d, J= 16.06 Hz, 1H)	116.34
3	7.35 (d, J= 16.06 Hz, 1H)	134.44
4	-	136.30
5	7.24 (s, 1H)	139.56
6	-	-
7	7.69 (s, 1H)	123.20
8	-	-

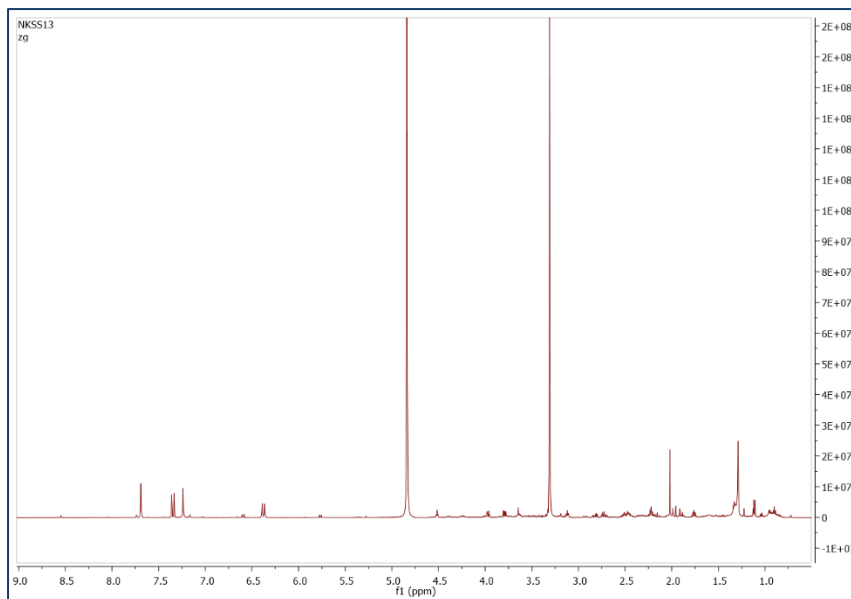
*Ο προσδιορισμός των ^{13}C έγινε από τη βιβλιογραφία (Valeev, F. A., et al., 2007)

Στο φάσμα πρωτονίου του Μεταβολίτη 1 παρατηρείται η ύπαρξη σημάτων μόνο στην αρωματική περιοχή. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται:

- Μία διπλή κορυφή στα 6.38 ppm με σταθερά σύζευξης J= 16.06 Hz, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 2-H
- Μια απλή κορυφή στα 7.24 ppm, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 5-H

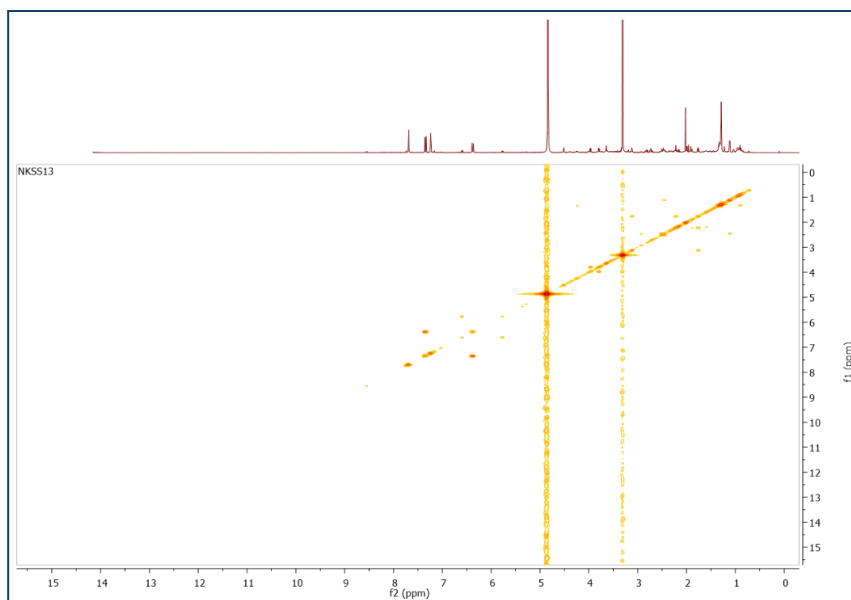
- Μία διπλή κορυφή στα 7.35 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 16.06$ Hz, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στα πρωτόνιο 3-H
- Μια απλή κορυφή στα 7.69 ppm, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 7-H

Η σταθερά σύζευξης των διπλών κορυφών των πρωτονίων 2-H και 3-H επιβεβαιώνει ότι πρόκειται για *trans*-διπλό δεσμό.



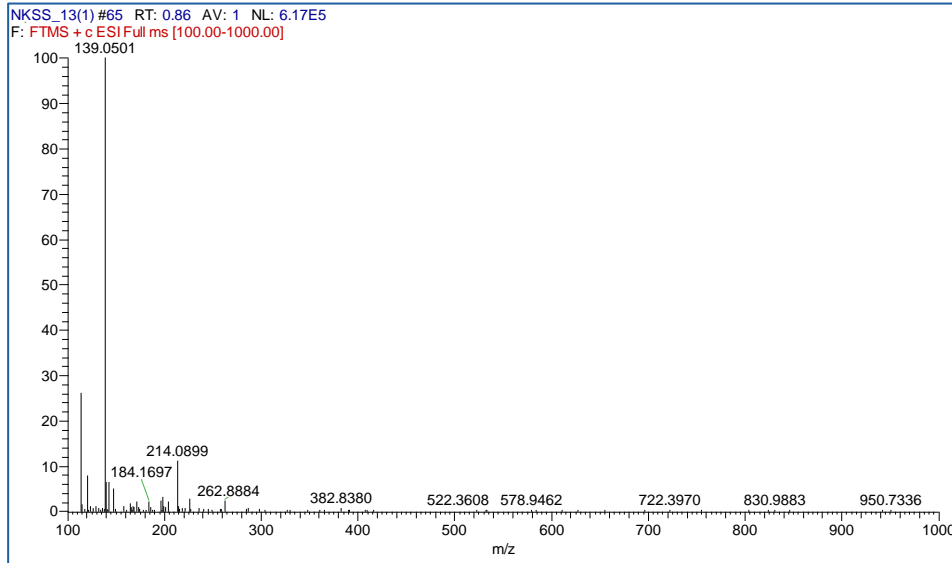
Εικόνα Γ.11. Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 1

Από το φάσμα COSY, επιβεβαιώνεται η συσχέτιση των πρωτονίων 2-H και 3-H, ενώ οι άνθρακες αποδόθηκαν από τη βιβλιογραφία (Valeev, F. A., et al., 2007)



Εικόνα Γ.12. Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 1

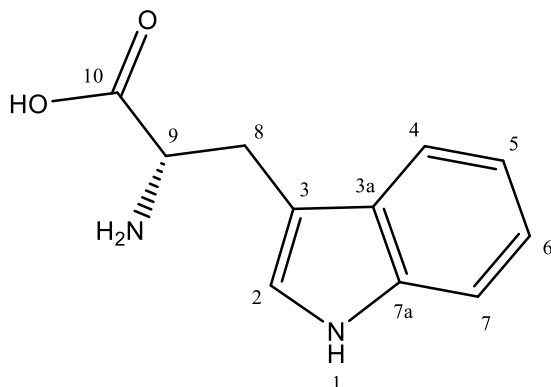
Η δομή του Μεταβολίτη 1 επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS, στο οποίο εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα $m/z=139.0501$. Έτσι, ο μοριακός τύπος του Μεταβολίτη 1 προσδιορίστηκε ως $C_6H_6N_2O_2$ με Accurate Mass= 138.0424.



Εικόνα Γ.13. Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 1

Γ.1.5.2. Μεταβολίτης 2 (NKSS4)

Σύμφωνα με την ανάλυση των 1D και 2D φασμάτων NMR, και του φασμάτος μάζας ESI(+) HR-MS, ο Μεταβολίτης 2 ταυτοποιήθηκε ως η L-τρυπτοφάνη (L-tryptophan). Κατόπιν ανάλυσης του φάσματος μάζας ESI(+) HR-MS του θεραπευτικού υλικού (FPY-6) του CA-218259, επιβεβαιώθηκε ότι ο NKSS4 αποτελεί συστατικό του θεραπευτικού υλικού και όχι μεταβολίτη του μικροοργανισμού.

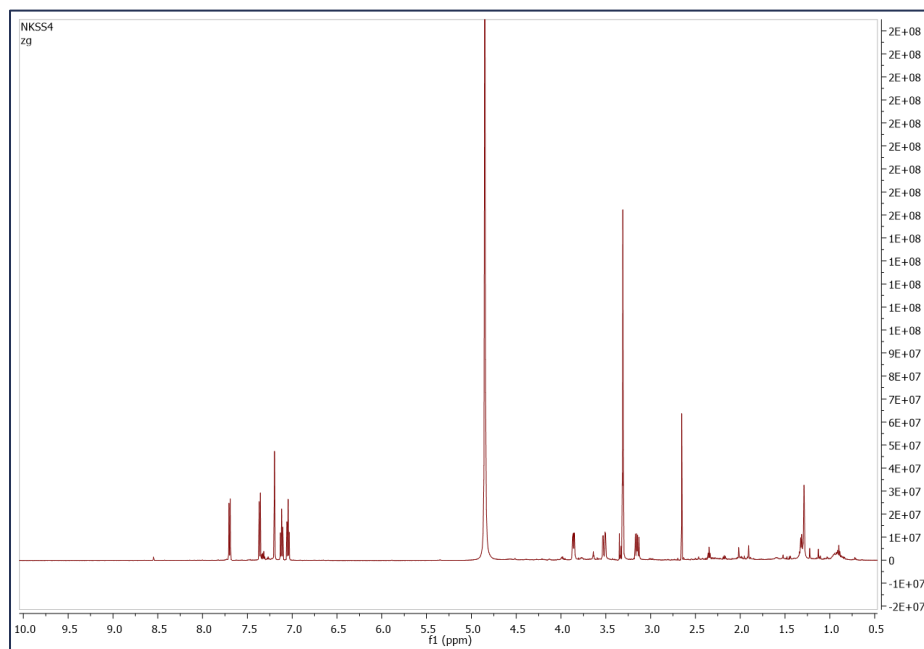


Εικόνα Γ.14. Δομή L-τρυπτοφάνης (Μεταβολίτης 2)

Πίνακας Γ.8. Χημικές μετατοπίσεις ¹H NMR του μεταβολίτη 2

Θέση	¹ H NMR (600MHz, MeOD, δ ppm, J σε Hz)	¹³ C NMR* (600MHz, MeOD, δ ppm)
1	-	-
2	7.20 (s, 1H)	124.93
3	-	109.08
3a	-	128.13
4	7.70 (d, J= 8.14 Hz, 1H)	119.14
5	7.05 (t, J= 7.54 Hz, 1H)	119.85
6	7.12 (t, J= 7.54 Hz, 1H)	122.49
7	7.36 (d, J= 8.14 Hz, 1H)	112.19
7a	-	138.07
8-Ha	3.52 (dd, J= 15.35, 4.03 Hz, 1H)	28.19
8-Hb	3.15 (dd, J= 15.35, 9.45 Hz, 1H)	
9	3.86 (dd, J= 9.45, 4.03 Hz, 1H)	56.47
10	-	174.03

*Ο προσδιορισμός των ¹³C έγινε με τη χρήση των φασμάτων HSQC-DEPT και HMBC

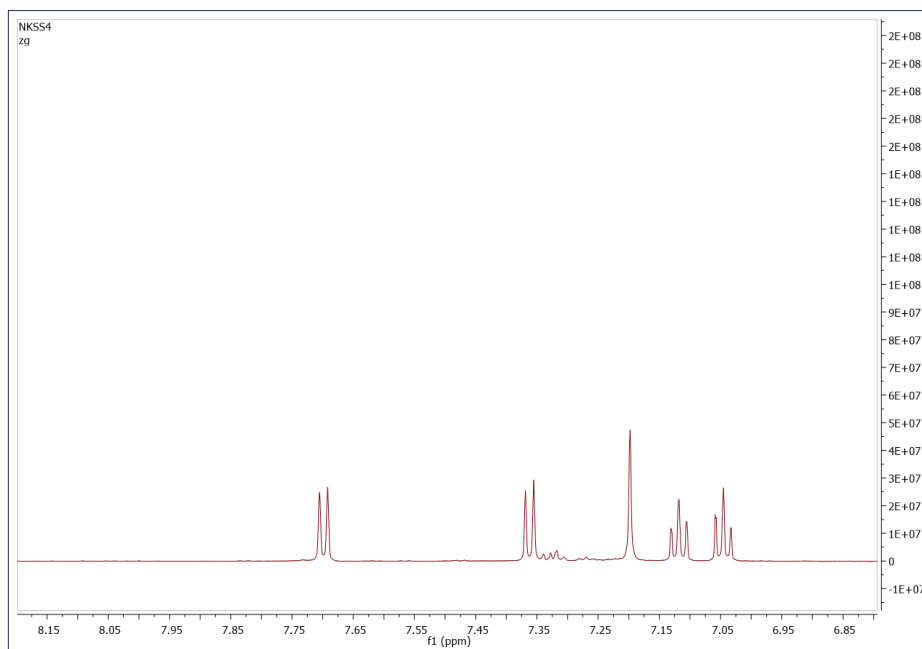


Εικόνα Γ.15. Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 2

Κατόπιν μελέτης της αρωματικής περιοχής του φάσματος ^1H NMR, παρατηρείται:

- Μία τριπλή κορυφή στα 7.05 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 7.54$ Hz, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 5-H
- Μία τριπλή κορυφή στα 7.12 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 7.54$ Hz, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 6-H
- Μια απλή κορυφή στα 7.20 ppm, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 2-H
- Μία διπλή κορυφή στα 7.36 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 8.14$ Hz, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στα πρωτόνια 7-H
- Μια διπλή κορυφή στα 7.70 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 8.14$ Hz, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 4-H

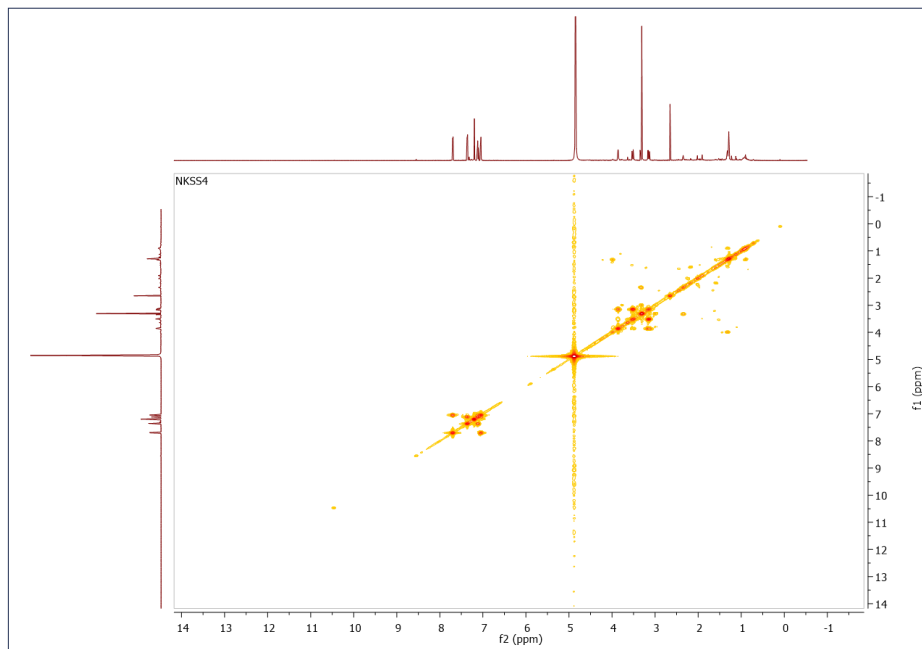
Μέσω του φάσματος ετεροπυρηνικής συσχέτισης HSQC-DEPT, αποδόθηκαν οι μετατοπίσεις των παραπάνω ανθράκων, όπως φαίνονται στον Πίνακα Γ.8.



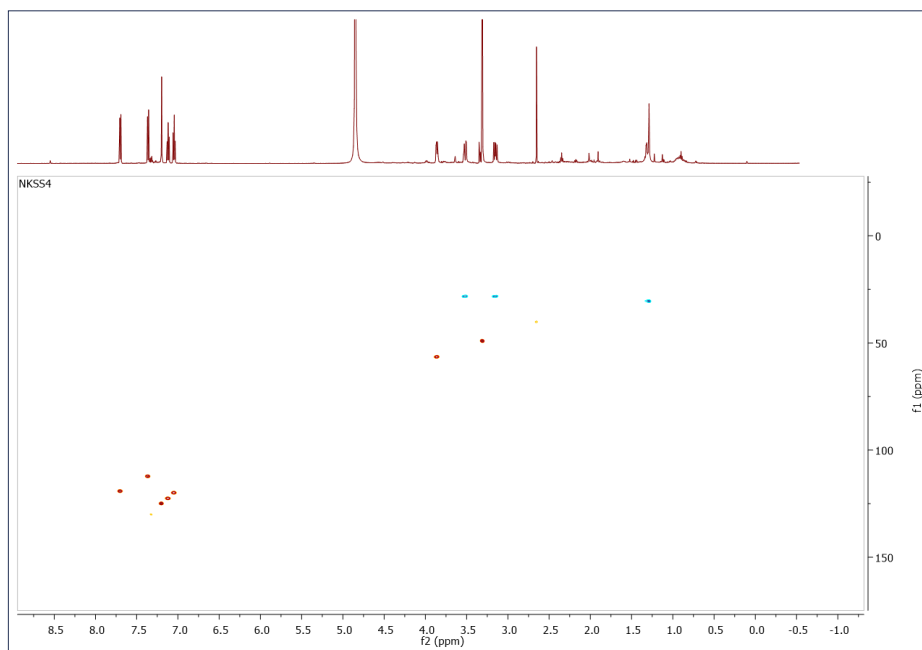
Εικόνα Γ.16. Αρωματική περιοχή φάσματος ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 2

Από το φάσμα COSY, εμφανίζεται συσχέτιση του πρωτονίου 5-H με τα πρωτόνια 4-H και 6-H, και του πρωτονίου 7-H με το 6-H. Από το φάσμα ετεροπυρηνικής συσχέτισης HMBC, τα πρωτόνια 2-H, 4-H, 5-H και 6-H εμφανίζουν συσχέτιση με τον άνθρακα C7a, τα πρωτόνια 2-H, 4-H, 5-H και 7-H με τον άνθρακα C3a, και τα πρωτόνια 2-H και 4-H με τον C3, οι οποίοι και αποδόθηκαν στα 138.07 ppm, 128.13 ppm και 109.08 ppm αντίστοιχα.

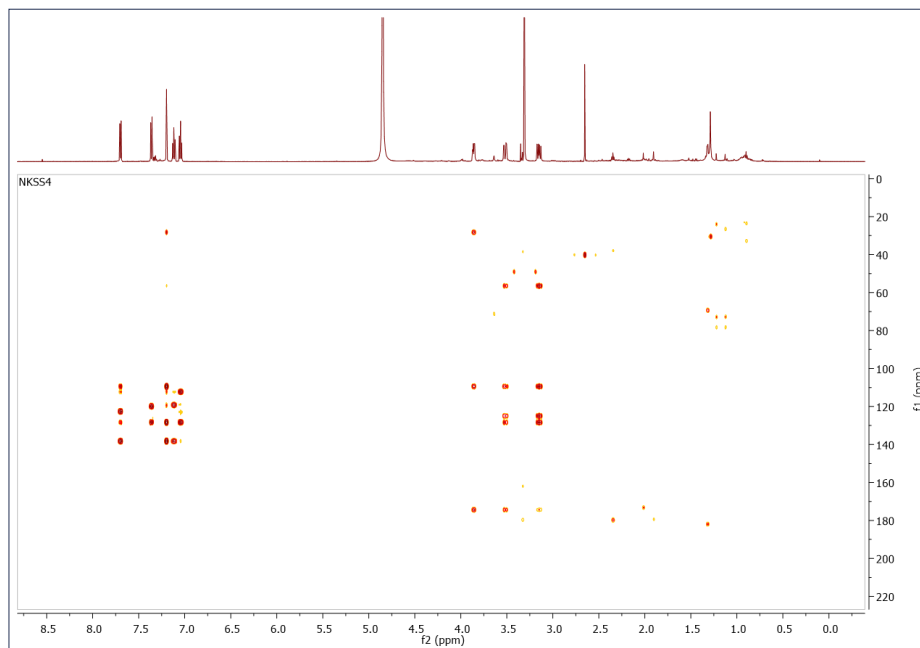
Η διπλή διπλή κορυφή στα 3.86 ppm (9-H) με σταθερά σύζευξης $J = 9.45/4.03$ Hz, που ολοκληρώνει για 1H δηλώνει την παρουσία πρωτονίου πάνω σε άνθρακα που συνδέεται με άζωτο και καρβονύλιο. Από το φάσμα HMBC, το 9-H εμφανίζει συσχέτιση με τον καρβοξυλικό άνθρακα C10, καθώς και με τον C3, ενώ το πρωτόνιο 2-H εμφανίζει ετεροπυρηνική συσχέτιση με τον άνθρακα C8, επιβεβαιώνοντας τη συγκεκριμένη διάταξη. Από το φάσμα COSY, εμφανίζει συσχέτιση με τα πρωτόνια 8-Ha/Hb, ενώ από το φάσμα HSQC-DEPT αποδόθηκαν οι άνθρακες C8 και C9, όπως περιγράφονται στον Πίνακα Γ.8.



Εικόνα Γ.17. Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 2

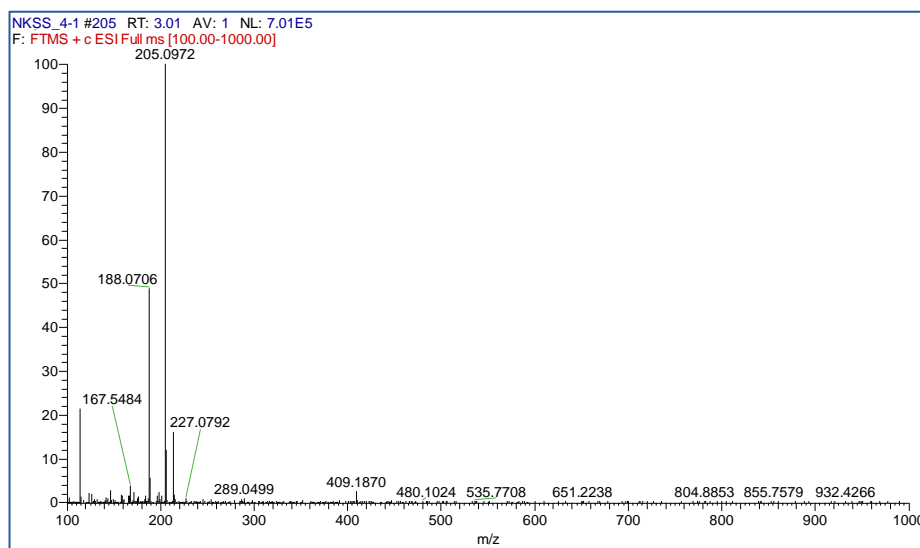


Εικόνα Γ.18. Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 2



Εικόνα Γ.19. Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 2

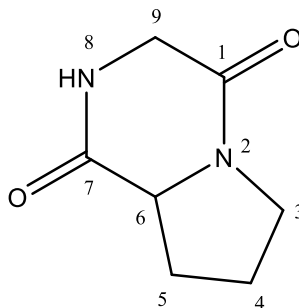
Στο φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα $m/z=205.0972$. Έτσι, ο μοριακός τύπος του Μεταβολίτη 2 προσδιορίστηκε ως $C_{11}H_{12}N_2O_2$ με Accurate Mass= 204.0893.



Εικόνα Γ.20. Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 2

Γ.1.5.3. Μεταβολίτης 3 (NKSS10)

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Huang, R. , et al., 2014) και βάσει της ανάλυσης των 1D και 2D φασμάτων NMR, και του φασμάτος μάζας ESI(+) HR-MS, ο μεταβολίτης NKSS10 ταυτοποιήθηκε ως η κυκλο-[γλυκυλ-προλίνη] (cyclo-[glycylprolyl]). Απομονώθηκε με TLC preparative από τα συνενωμένα κλάσματα (121-126) και (127-133) του CPC, όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο Γ.1.3. Έχει απομονωθεί ξανά από θαλάσσιους σπόγγους του γένους *Axinella* (Huang, R. , et al., 2014), καθώς και από αχινόδεσμα, όπως ο αστερίας *Luidia clathrata* (Pettit, G.R., et al., 1970).

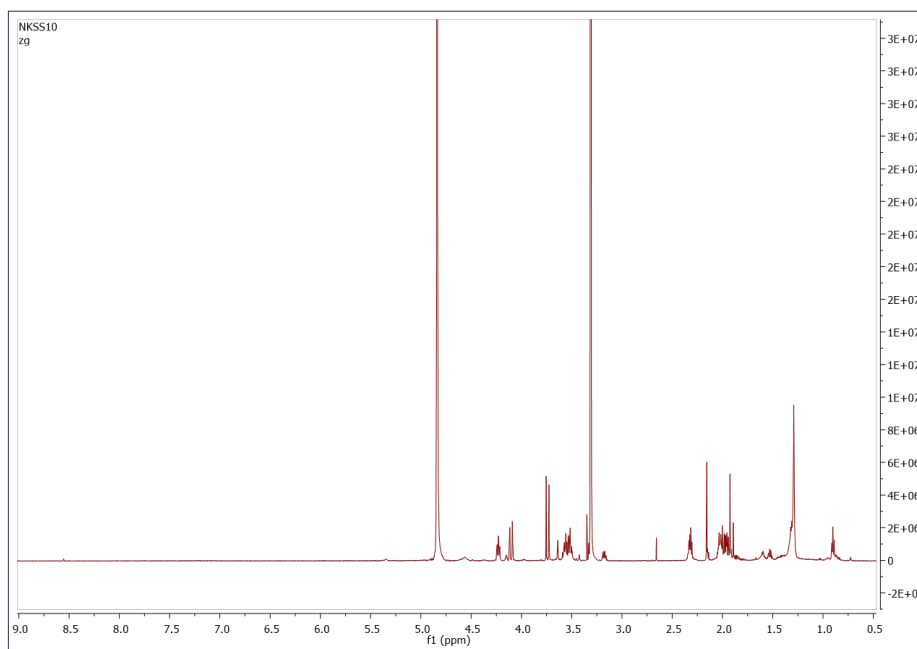


Εικόνα Γ.21. Δομή Κυκλο-[Γλυκυλ-Προλίνης] (Μεταβολίτης 3)

Πίνακας Γ.9. Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του μεταβολίτη 3

Θέση	^1H NMR (600MHz, MeOD, δ ppm, J σε Hz)	^{13}C NMR* (600MHz, MeOD, δ ppm)
1	-	166.32
2	-	-
3	3.54 (m, 2H)	46.02
4-Ha	2.02 (m, 1H)	23.08
4-Hb	1.95 (m, 1H)	
5-Ha	2.32 (m, 1H)	29.07
5-Hb	1.98 (m, 1H)	
6	4.23 (d, J= 8.01 Hz, 1H)	59.65
7	-	171.91
8	-	-
9-Ha	4.10 (d, J= 16.89 Hz, 1H)	46.74
9-Hb	3.74 (d, J= 16.89 Hz, 1H)	

*Ο προσδιορισμός των ^{13}C έγινε με τη χρήση των φασμάτων HSQC-DEPT και HMBC

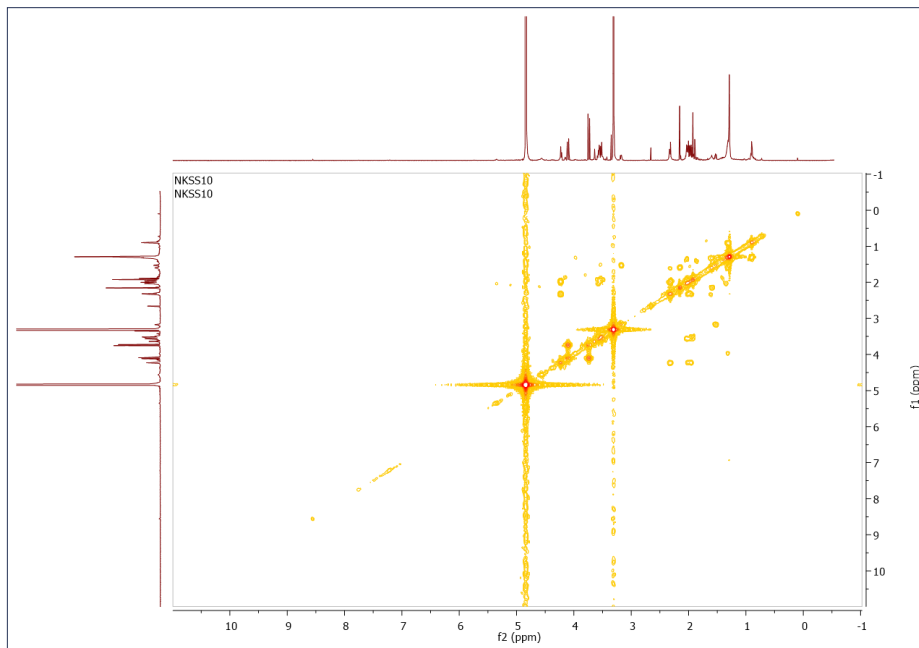


Εικόνα Γ.22. Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 3

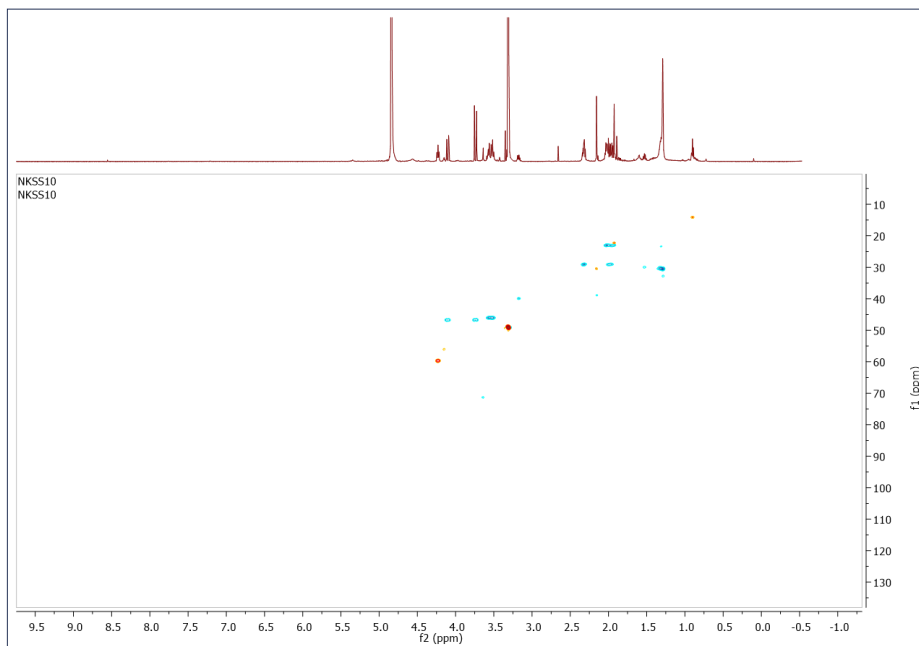
Κατόπιν μελέτης του φάσματος ^1H NMR (Εικόνα Γ.24), παρατηρείται απουσία σημάτων στην αρωματική περιοχή, κάτι που δηλώνει απουσία πρωτονίων σε αρωματικό δακτύλιο ή διπλούς δεσμούς.

Η πολλαπλή κορυφή του φάσματος ^1H NMR στα 3.54 ppm που ολοκληρώνει για 2H, υποδηλώνουν την ύπαρξη πρωτονίων που ανήκουν σε άνθρακες που συνδέονται με άζωτο. Οι διπλές κορυφές στα 3.74 ppm (με σταθερά σύζευξης $J= 16.89$ Hz), στα 4.10 ppm (με σταθερά σύζευξης $J= 16.89$ Hz) και στα 4.23 ppm (με σταθερά σύζευξης $J= 8.01$ Hz) ανήκουν σε πρωτόνια που συνδέονται ταυτόχρονα με άζωτο και καρβόνυλιο. Από το φάσμα ετεροπυρηνικής συσχέτισης HSQC-DEPT, αποδόθηκαν οι άνθρακες C2, C6 και C9. Επίσης, επιβεβαιώθηκε ότι οι πολλαπλές κορυφές στα 1.95 ppm και 2.02 ppm ανήκουν στον C4, ενώ οι πολλαπλές κορυφές στα 1.98 ppm και 2.32 ppm ανήκουν στον C5, οι οποίοι και αποδόθηκαν.

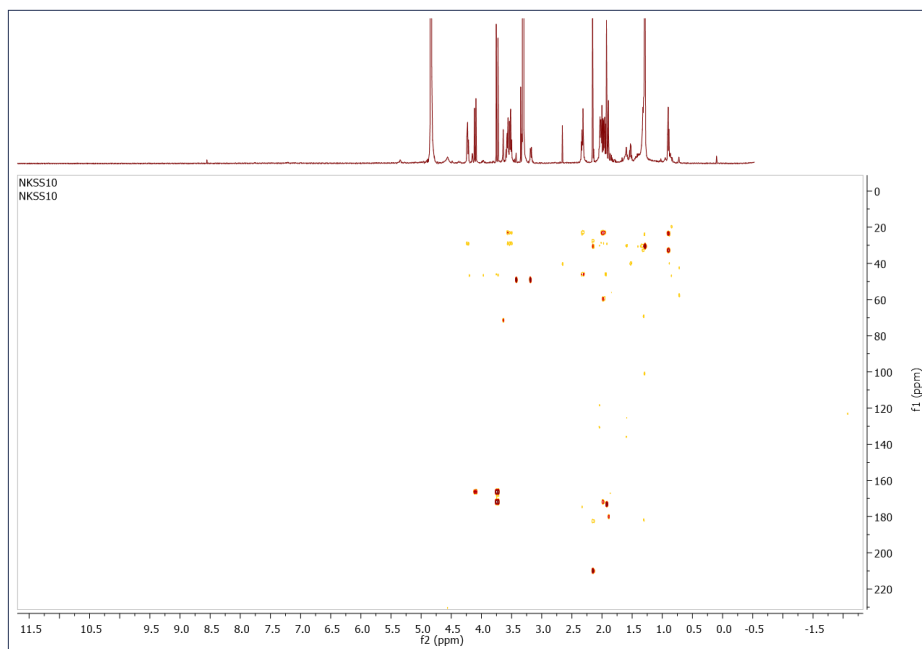
Από το φάσμα COSY, εμφανίζεται συσχέτιση των πρωτονίων 4-Ha/Hb με τα 5-Ha/Hb και 3-H, καθώς και του 6-H με τα 5-Ha/Hb. Από το φάσμα ετεροπυρηνικής συσχέτισης HMBC, τα πρωτόνια 5-Hb και 6-H εμφανίζουν συσχέτιση με τον άνθρακα C7, και τα πρωτόνια 9-Ha/Hb με τον άνθρακα C1, οι οποίοι και αποδόθηκαν.



Εικόνα Γ.23. Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 3

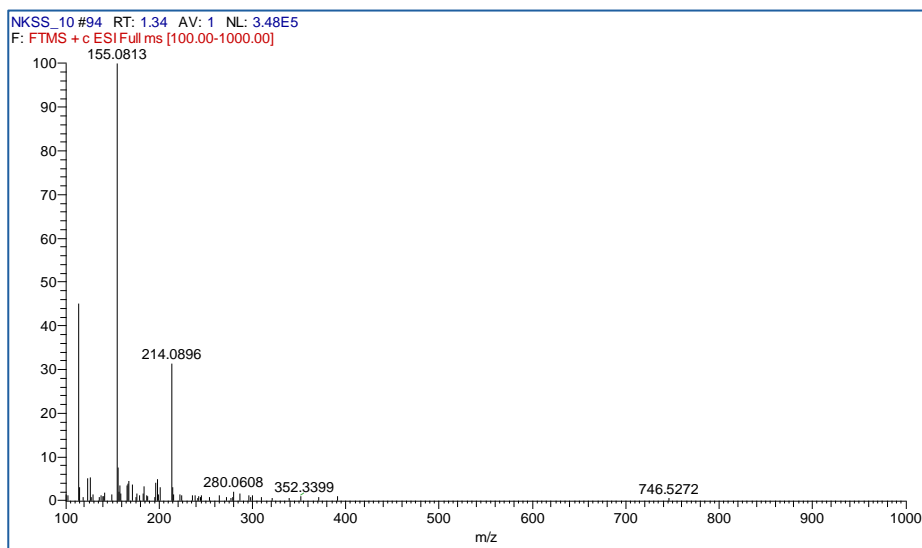


Εικόνα Γ.24. Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 3



Εικόνα Γ.25. Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 3

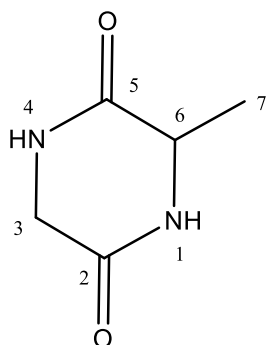
Η δομή του Μεταβολίτη 3 επιβεβαιώθηκε με σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με των προτεινόμενων από τη βιβλιογραφία (Huang, R. , et al., 2014). Στο φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα $m/z=155.0813$. Έτσι, ο μοριακός τύπος του Μεταβολίτη 3 προσδιορίστηκε ως $C_7H_{10}N_2O_2$ με Accurate Mass= 154.0737.



Εικόνα Γ.26. Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 3

Γ.1.5.4. Μεταβολίτης 4 (NKSS11)

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Coursindel, T., et al., 2010) και βάσει της ανάλυσης των 1D και 2D φασμάτων NMR, και του φασμάτος μάζας ESI(+) HR-MS, ο μεταβολίτης NKSS11 που απομονώθηκε με TLC preparative από τα συνενωμένα κλάσματα (121-126) και (127-133) του CPC, όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο Γ.1.3, ταυτοποιήθηκε ως η κυκλο-[γλυκυλ-αλανίνη] (cyclo-[glycyl-Alanyl]). Δυστυχώς απομονώθηκε παρουσία προσμίξεων μη ικανών προς ταυτοποίηση. Έχει απομονωθεί στο παρελθόν από σπόρους καβουρδισμένου κακάο (Keil, B., et al., 1975), από μύκητες του γένους *Penicillium* (Yuan, Y., et al., 2014), καθώς και από βακτήρια του γένους *Bacillus* (Zhang, H.-l., et al., 2003).

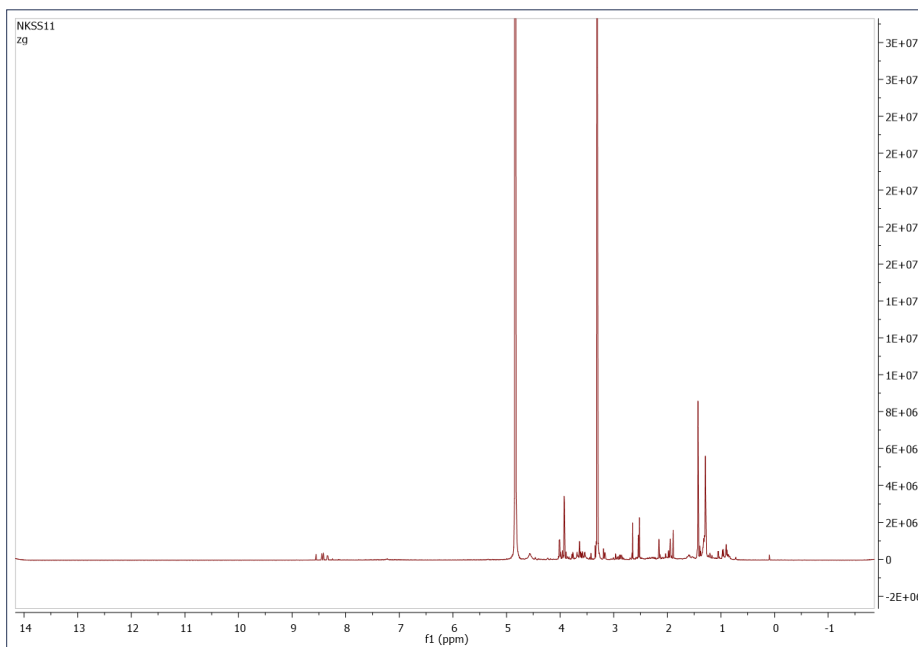


Εικόνα Γ.27. Δομή Κυκλο-[Γλυκυλ-Αλανίνης] (Μεταβολίτης 4)

Πίνακας Γ.10. Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του μεταβολίτη 4

Θέση	^1H NMR (600MHz, MeOD, δ ppm, J σε Hz)	^{13}C NMR* (600MHz, MeOD, δ ppm)
1	-	-
2	-	168.33
3	3.92 (m, 2H)	45.18
4	-	-
5	-	171.30
6	4.01 (m, 1H)	51.46
7	1.43 (d, J= 7.12 Hz, 3H)	19.13

*Ο προσδιορισμός των ^{13}C έγινε με τη χρήση των φασμάτων HSQC-DEPT και HMBC

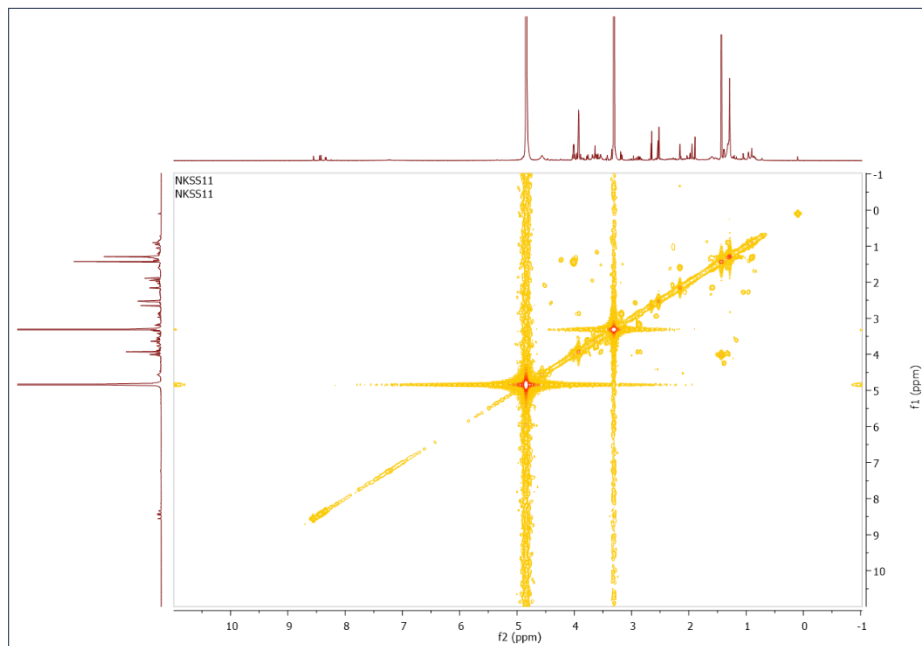


Εικόνα Γ.28. Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 4

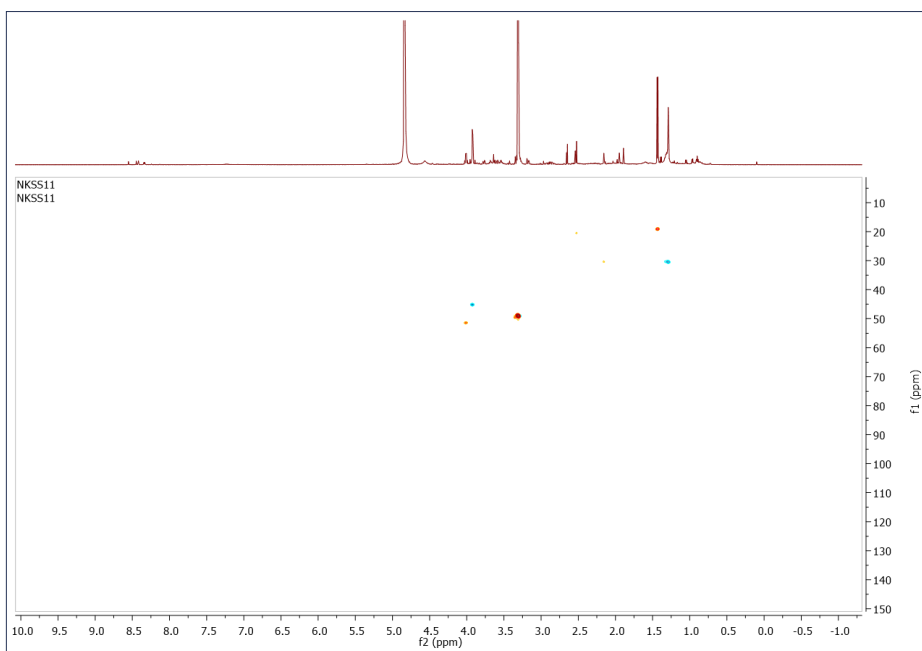
Κατόπιν μελέτης του φάσματος ^1H NMR (Εικόνα Γ.30.), παρατηρείται απουσία σημάτων στην αρωματική περιοχή που να ανήκουν στο συγκεκριμένο μεταβολίτη, κάτι που δηλώνει απουσία πρωτονίων σε αρωματικό δακτύλιο ή διπλούς δεσμούς. Τα σήματα στην περιοχή 8.30-8.50 ppm ανήκουν σε προσμίξεις, μη δυνατόν να ταυτοποιηθούν.

Η πολλαπλή κορυφή του φάσματος ^1H NMR στα 3.92 ppm που ολοκληρώνει για 2H, υποδηλώνει την ύπαρξη πρωτονίων που ανήκουν σε άνθρακες που συνδέονται με άζωτο και καρβονύλιο. Από το φάσμα COSY, δεν εμφανίζεται κάποια συσχέτιση με γειτονικά πρωτόνια. Από το φάσμα ετεροπυρηνικής συσχέτισης HSQC-DEPT, αποδόθηκε ο άνθρακας C3, ενώ από το φάσμα ετεροπυρηνικής συσχέτισης HMBC, εμφανίστηκε συσχέτιση του πρωτονίου 3-H με τους άνθρακες C2 και C5.

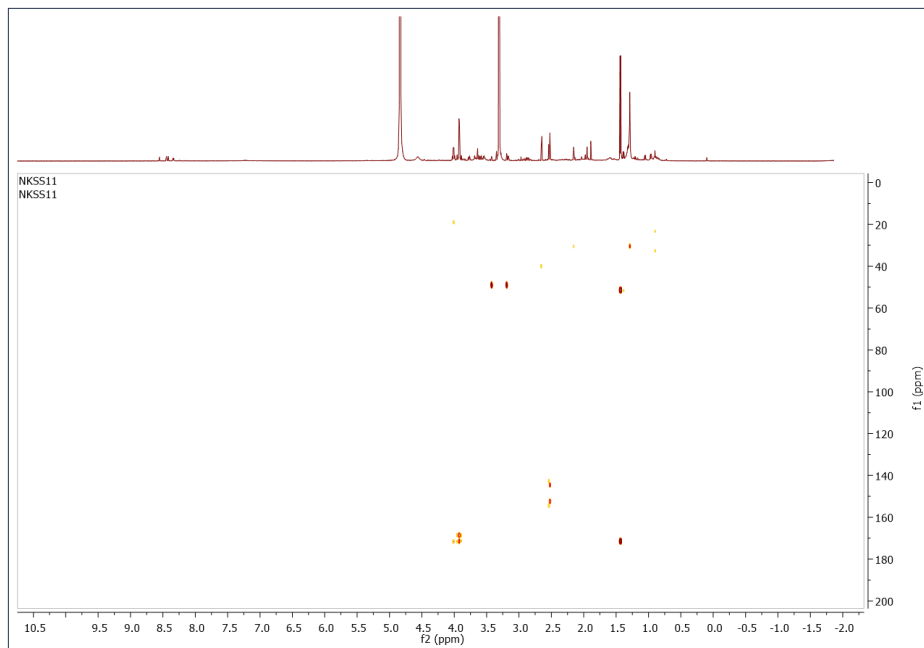
Η πολλαπλή κορυφή στα 4.01 ppm δηλώνει την παρουσία ενός ακόμα πρωτονίου που συνδέεται με άζωτο και καρβονύλιο. Η διπλή κορυφή στα 1.43 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 7.12$ Hz, ολοκληρώνει για 3H και δηλώνει την παρουσία μεθυλίου δίπλα σε μεθίνιο. Από το φάσμα COSY, επιβεβαιώνεται η συσχέτιση των πρωτονίων 7-H με το 6-H. Από το φάσμα HSQC-DEPT, αποδόθηκε ο μεθινικός άνθρακας C6, καθώς και ο μεθυλικός C7. Τέλος, από το φάσμα HMBC, εμφανίστηκε συσχέτιση των πρωτονίων 6-H και 7-H με τον άνθρακα C-5.



Εικόνα Γ.29. Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 4

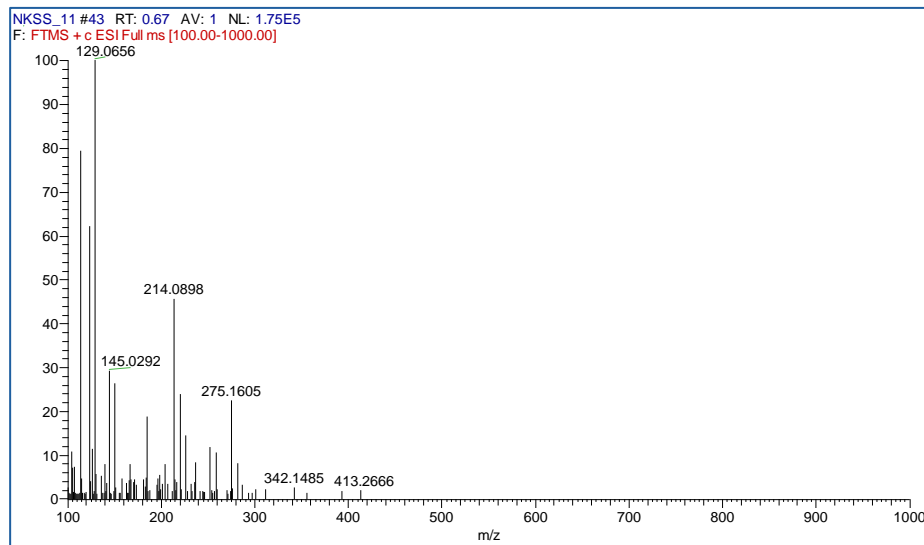


Εικόνα Γ.30. Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 4



Εικόνα Γ.31. Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 4

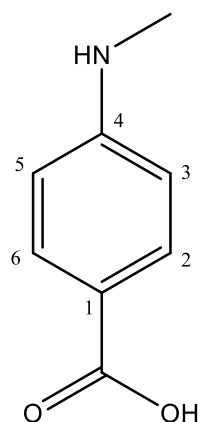
Η ανάλυση των φασμάτων NMR 1D και 2D και η ταύτιση των χημικών μετατοπίσεων με των προτεινόμενων από τη βιβλιογραφία (Coursindel, T., et al., 2010), μας έδωσαν τη δυνατότητα να επιβεβαιώσουμε τη δομή του Μεταβολίτη 4. Ο μοριακός τύπος ($C_5H_8O_2N_2$ με Accurate Mass= 128.0580) επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS, όπου εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα $m/z= 129.0656$.



Εικόνα Γ.32 . Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 4

Γ.1.5.5. Μεταβολίτης 5 (NKSS17)

Ο μεταβολίτης που ταυτοποιήθηκε στο συνενωμένο κλάσμα (38-42) του CPC (βλ. Παράγραφο Γ.1.3) ταυτοποιήθηκε ως το 4-μεθυλαμινοβενζοϊκό οξύ (4-methylaminobenzoic acid), βάσει της βιβλιογραφίας (Skurinski, W., et al., 1986), καθώς και της ανάλυσης των 1D και 2D φασμάτων NMR, και του φασμάτος μάζας ESI(+) HR-MS.

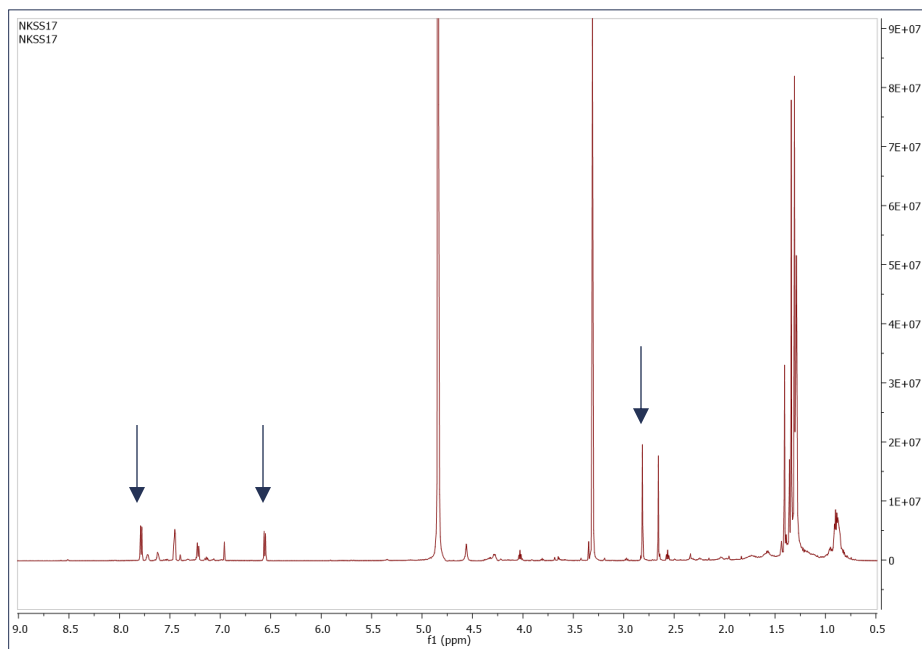


Εικόνα Γ.33. Δομή 4-μεθυλαμινοβενζοϊκού οξέος (Μεταβολίτης 5)

Πίνακας Γ.11. Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του μεταβολίτη 5

Θέση	^1H NMR (600MHz, MeOD, δ ppm, J σε Hz)	^{13}C NMR* (600MHz, MeOD, δ ppm)
1	-	118.66
2, 6	7.78 (d, J= 8.63 Hz, 2H)	132.56
3, 5	6.56 (d, J= 8.63 Hz, 2H)	111.63
4	-	155.01
1-carboxyl	-	171.38
N-methyl	2.81 (s, 3H)	29.62

*Ο προσδιορισμός των ^{13}C έγινε με τη χρήση των φασμάτων HSQC-DEPT και HMBC



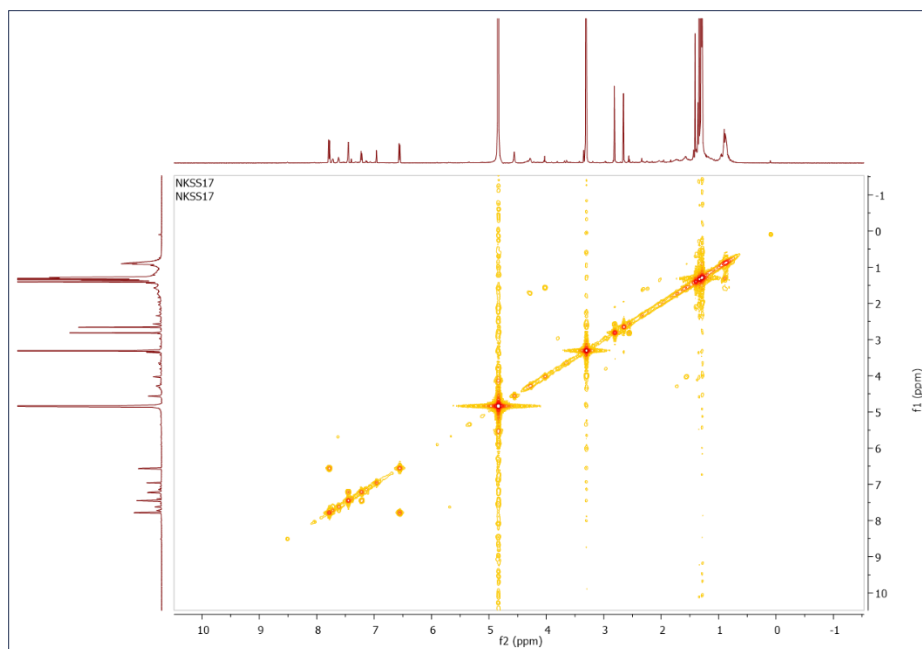
Εικόνα Γ.34. Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 5

Κατόπιν μελέτης της αρωματικής περιοχής του φάσματος ^1H NMR, οι κορυφές που ανήκουν στο συγκεκριμένο μόριο και όχι σε προσμίξεις, είναι:

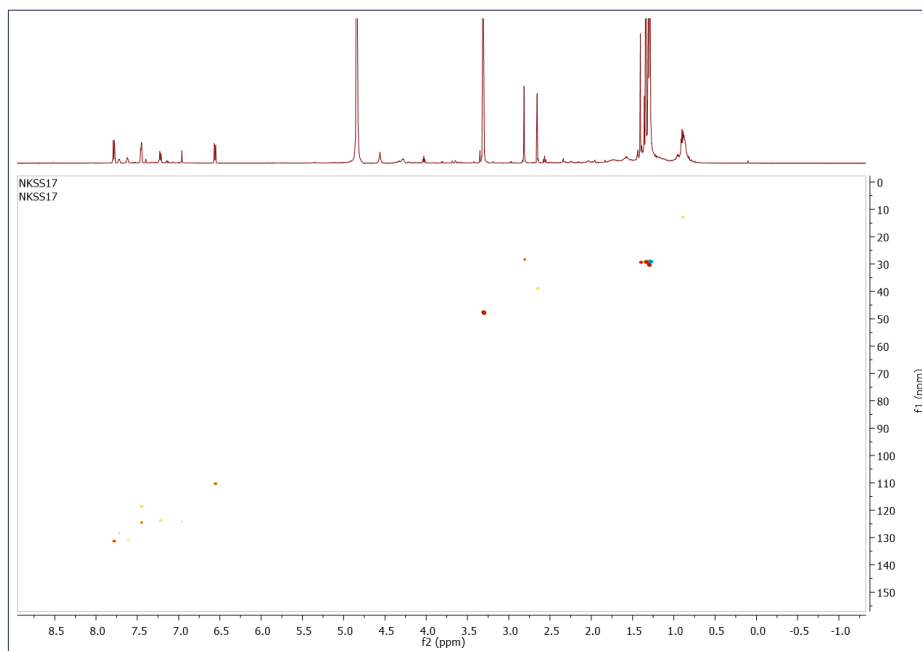
- Μία διπλή κορυφή στα 7.78 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 8.63$ Hz, που ολοκληρώνει για 2H και αντιστοιχεί στα πρωτόνια 2-H και 6-H
- Μία διπλή κορυφή στα 6.56 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 8.63$ Hz, που ολοκληρώνει για 2H και αντιστοιχεί στα πρωτόνια 3-H και 5-H

Από το φάσμα ετεροπυρηνικής συσχέτισης HSQC-DEPT, αποδόθηκαν οι άνθρακες στα 132.56 ppm (C2/C6) και 111.63 ppm (C3/C5) αντίστοιχα. Από το φάσμα COSY, εμφανίζεται συσχέτιση του πρωτονίου 2-H με το 3-H και του πρωτονίου 5-H με το 6-H. Από το φάσμα ετεροπυρηνικής συσχέτισης HMBC, το πρωτόνιο στα 7.78 ppm εμφανίζει συσχέτιση με τον άνθρακα στα 132.56 ppm (C2/C6), καθώς και με τους άνθρακες στα 155.01 ppm (C4) και στα 171.38 ppm (καρβοξυλικός άνθρακας). Το πρωτόνιο στα 6.56 ppm εμφανίζει ετεροπυρηνική συσχέτιση με τον άνθρακα στα 111.36 ppm (C3/C5), καθώς και με τον άνθρακα στα 118.36 ppm (C1).

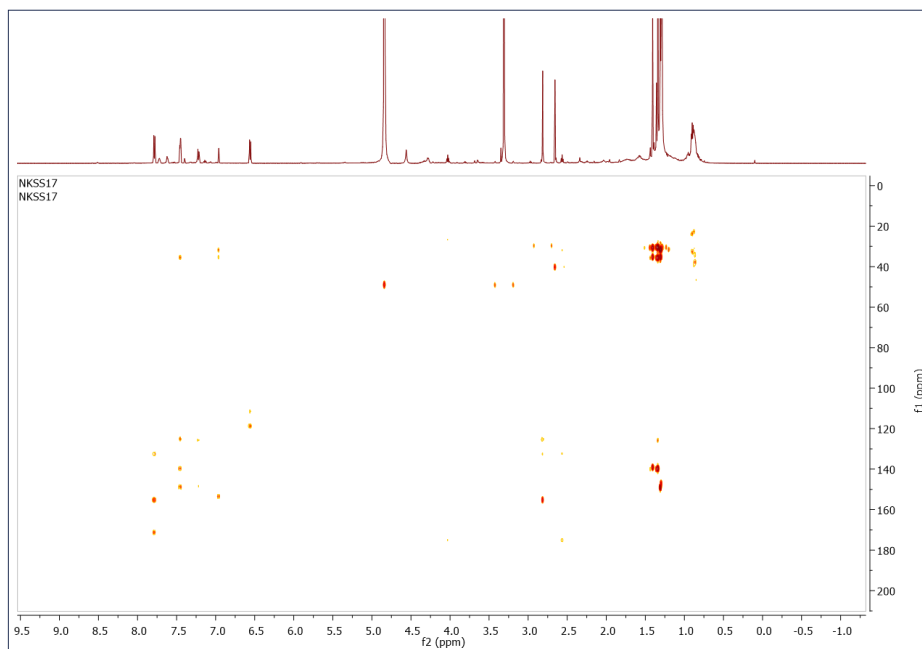
Η απλή κορυφή στα 2.81 ppm που ολοκληρώνει για 3H δηλώνει την παρουσία μεθυλίου συνδεδεμένου σε άζωτο. Από το φάσμα HSQC-DEPT, αποδόθηκε ο άνθρακας του N-μεθυλίου, ενώ από το φάσμα HMBC εμφανίστηκε ετεροπυρηνική συσχέτιση με τον άνθρακα C1, επιβεβαιώνοντας τη σύνδεσή του στη συγκεκριμένη θέση.



Εικόνα Γ.35. Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 5

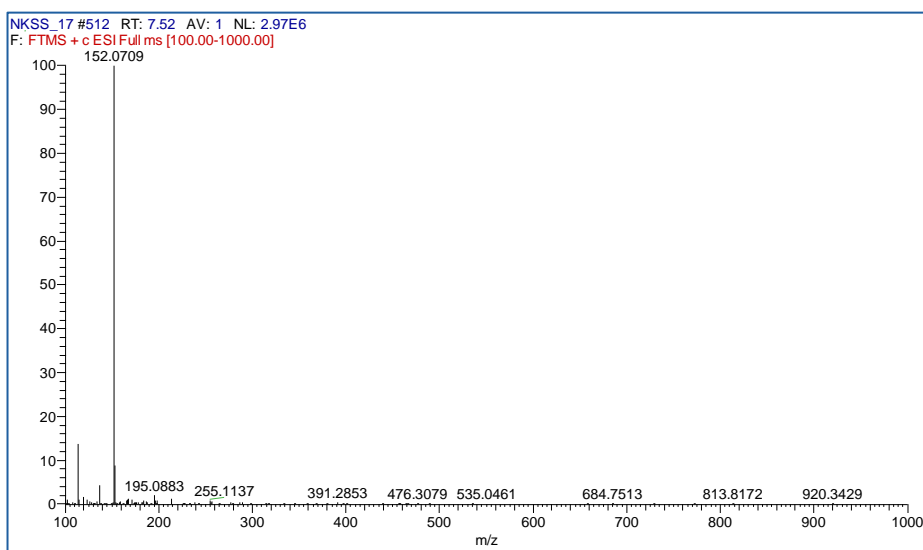


Εικόνα Γ.36. Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 5



Εικόνα Γ.37. Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 5

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Skuripski, W., et al., 1986), το μοριακό βάρος του 4-μεθυλαμινοβενζοϊκού οξέος είναι το Accurate Mass=151.0628 και ο μοριακός τύπος του ο $C_8H_9NO_2$, κάτι που επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS στο οποίο εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα $m/z=152.0709$.



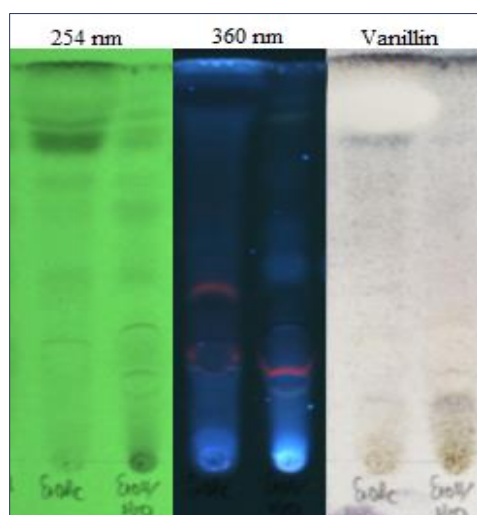
Εικόνα Γ.38. Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 5

Γ.2. Βιοκατευθυνόμενη απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από τον ακτινομύκητα *Streptomyces chartreusis* (CA-126581)

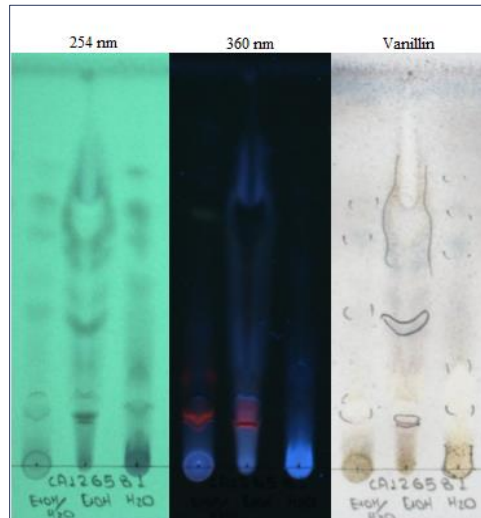
Ο ακτινομύκητας CA-126581 επιλέχθηκε για μελέτη λόγω της αντιοξειδωτικής/αντιγηραντικής του δράσης, όπως και ο CA-218259. Τα αποτελέσματα των βιολογικών δοκιμών κατέδειξαν την ισχυρή αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος Χαd4-EtOH. Ταυτόχρονα όμως, κατέδειξαν και μια αναστολή της δραστηριότητας του 26S πρωτεασώματος σε κυτταρικές σειρές. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε το συγκεκριμένο εκχύλισμα για την βιοκατευθυνόμενη απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών στους οποίους οφείλεται η συγκεκριμένη δράση.

Γ.2.1. Ποιοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων του CA-126581

Παρακάτω παρουσιάζεται το χημικό προφίλ των εκχυλισμάτων που προέκυψαν με χρήση του Πρωτόκολλου εκχύλισης 2 (βλ. Παράγραφο Β.1.4) σε αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας – TLC (βλ. Παράγραφο Β.3.1) για τον μικροοργανισμό CA-126581 (Εικόνες Γ.41 και Γ.42). Οι εκχυλίσεις έγιναν σε μικρή κλίμακα, με εκχύλιση 1 g βιομάζας, με σκοπό την ποιοτική ανάλυση των εκχυλισμάτων. Παρουσιάζονται ακόμη τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών με τη μέθοδο DPPH (βλ. Παράγραφο Β.2.1), τη μέθοδο αναστολής του ενζύμου Τυροσινάση (βλ. Παράγραφο Β.2.2) (Πίνακας Γ.12), καθώς και οι βιοδοκιμές σε δύο κυτταρικές σειρές (βλ. Παράγραφο Β.2.3) (Γράφημα Γ.4).



Εικόνα Γ.39. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc και EtOH/H₂O του CA-126581.

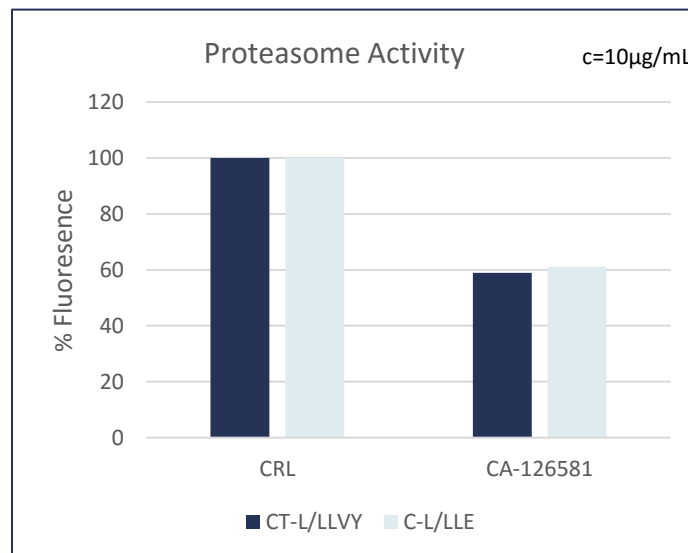


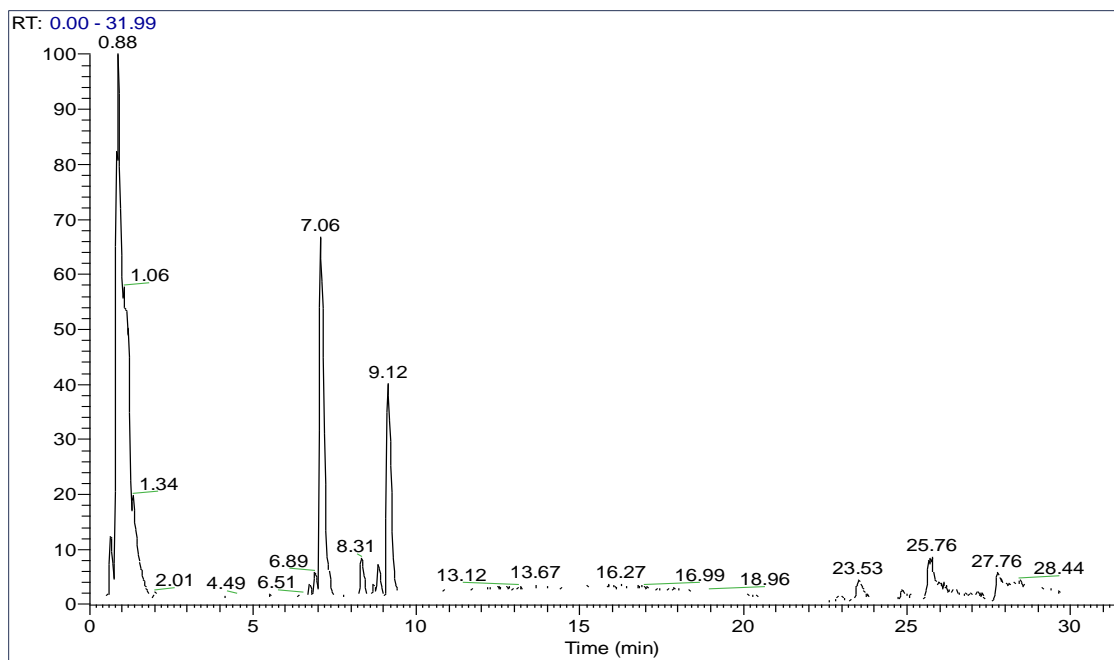
Εικόνα Γ.40. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H₂O και Χαδ4 του CA-126581 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης

Πίνακας Γ.12. Μελέτη Λευκαντικής και Αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CA-126581

Πρωτόκολλο Εκχύλισης	Διαλύτης Εκχύλισης	Αντιοξειδωτική Δράση		Λευκαντική Δράση	
		DPPH (200 µg/ml)		(300 µg/ml)	
		% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV
1	EtOH/H ₂ O	12.00	0.68	34.16	4.21
2	Xad4-EtOH	43.69	1.42	53.81	1.27
	EtOAc	15.24	1.40	60.23	1.48

Γράφημα Γ.4. Μελέτη δράσης του εκχυλίσματος Χαδ4-EtOH από το στέλεχος CA-126581, στη δραστηριότητα του πρωτεασώματος σε δύο κυτταρικές σειρές (CT-L/LLVY και C-L/LLE)





Εικόνα Γ.41. Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος Xad4-EtOH του CA-126581

Γ.2.2 Χημικό προφίλ του εκχυλίσματος CA-126581_Xad4-EtOH

Όπως αναλύθηκε στην παράγραφο Γ.2.1, το εκχύλισμα το οποίο απέδωσε τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα για την οποία και επιλέχθηκε το συγκεκριμένο στέλεχος ήταν το εκχύλισμα εκχύλισμα Xad4-EtOH, το οποίο προήλθε κατόπιν διαδοχικής εκχύλισης βάσει του 2^{ου} πρωτοκόλλου εκχύλισης, που έχει περιγραφεί στην Παράγραφο Β.1.4.

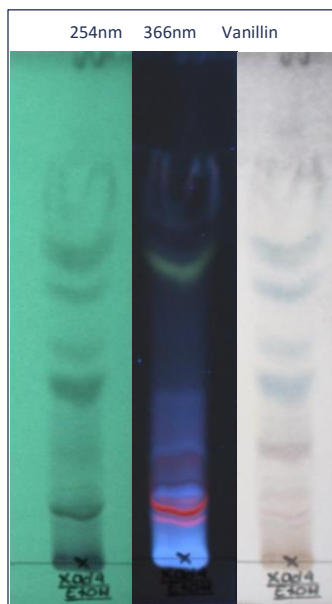
Για τη παραγωγή μεγάλης ποσότητας εκχυλίσματος Xad4-EtOH, ζυγίστηκαν 30,18 g ξηρής βιομάζας. Σύμφωνα με το 2^ο πρωτόκολλο εκχύλισης που περιγράφεται στη παράγραφο Β.1.4, πραγματοποιήθηκαν 3 κύκλοι εκχύλισης με c-Hex (απόδοση εκχύλισης: 0,25%), κατόπιν 3 κύκλοι εκχύλισης με EtOAc (απόδοση εκχύλισης: 1,97%) και τέλος 3 κύκλοι εκχύλισης με EtOH/H₂O (απόδοση εκχύλισης: 58,71%). Ακολούθησε Εκχύλιση Υγρού – Υγρού 3 φορές με EtOAc στο εκχύλισμα EtOH/H₂O, όπως περιγράφεται στη παράγραφο Β.1.6 (απόδοση εκχύλισης: 0,46%), και στην υδατική φάση έγινε χρήση ρητίνης προσρόφησης Xad-4, όπως περιγράφεται στην Παράγραφο Β.1.5 (απόδοση εκχύλισης: 13,42%). Συνολικά παραλήφθηκαν 4,05 g εκχυλίσματος CA-126581_Xad4-EtOH.

Πραγματοποιήθηκε επαναληπτικός έλεγχος της αντιοξειδωτικής δράσης του CA-126581_Xad4-EtOH εκχυλίσματος βάσει της μεθόδου DPPH (βλ. Παράγραφο Β.2.1) σε συγκεντρώσεις 200 µg/ml:

Πίνακας Γ.13. Αντιοξειδωτική δράση του CA-126581_Xad4-EtOH

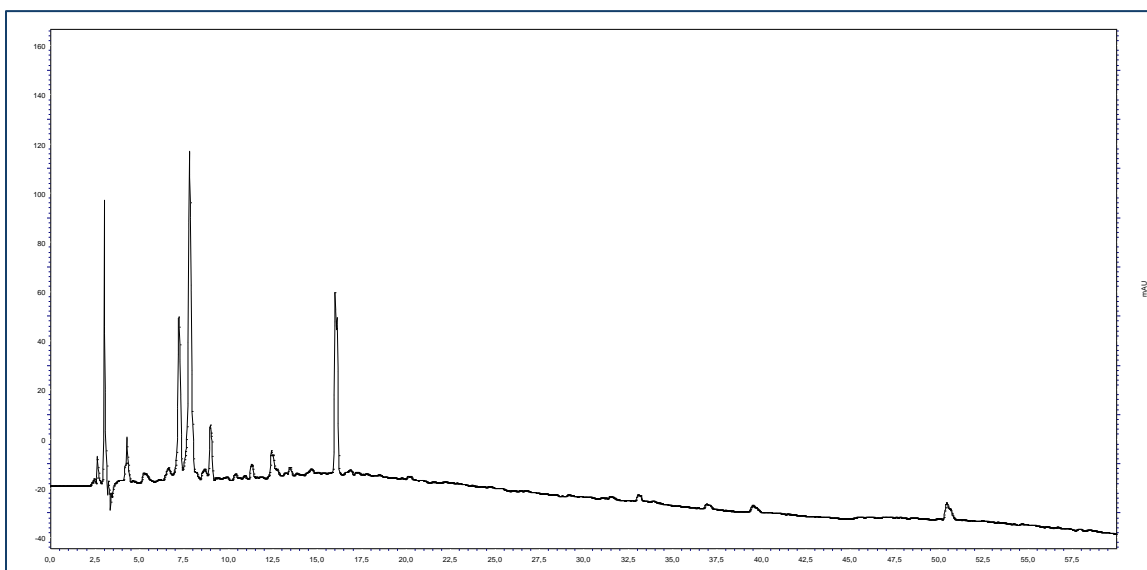
DPPH (200 µg/ml)	
Αναστολή (%)	STDEV
40.88	1.42

Για την αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) του CA-126581_Xad4-EtOH αναπτύχθηκε καλύτερα στην οργανική φάση του διφασικού συστήματος CHCl₃/MeOH/H₂O : 13/9/3 και υπέδειξε ένα πλούσιο χημικό προφίλ του εκχυλίσματος, με ουσίες μεγάλου εύρους πολικότητας, τα οποία απορροφούν στο υπεριώδες-ορατό (UV-Vis), γεγονός που αποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο εκχύλισμα μπορεί να μελετηθεί περαιτέρω με τη χρήση χρωματογραφικών τεχνικών που χρησιμοποιούν ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού.



Εικόνα Γ.42. TLC του CA-126581_Xad4-EtOH στα 254, 366 nm και στο ορατό κατόπιν ψεκασμού με αντιδραστήριο θειικής βανιλίνης. Ανάπτυξη στην οργανική φάση του διφασικού συστήματος CHCl₃/MeOH/H₂O: 13/9/3

Το πλούσιο προφίλ του συγκεκριμένου εκχυλίσματος σε δευτερογενείς μεταβολίτες επιβεβαιώνεται και από το χρωματογράφημα HPLC της Εικόνας Γ.45 που ακολουθεί.



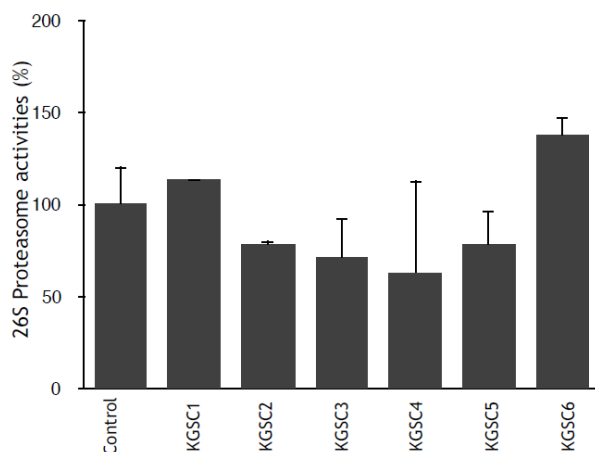
Εικόνα Γ.43. Χρωματογράφημα HPLC (254nm) του εκχυλίσματος CA-126581_Xad4-EtOH

Γ.2.3 Φαρμακογνωστική μελέτη του εκχυλίσματος CA-126581_Xad4-EtOH

Το περιεχόμενο του εκχυλίσματος CA-126581_Xad4-EtOH παρουσιάζει μεγάλο εύρος πολικότητας στην TLC. Συνεπώς, για την κλασμάτωσή του επιλέχθηκε η φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής (Centrifugal Partition Chromatography - CPC) με την μέθοδο της βαθμιδωτής έκλουσης-εξώθησης, η οποία δίνει την δυνατότητα για κλασμάτωση των συστατικών ενός μίγματος εξαρτώμενη από τον συντελεστή κατανομής των μορίων στο διφασικό σύστημα διαλυτών που θα επιλεγεί. Η κλασμάτωση του δραστικού εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην Παράγραφο Β.3.3 (2).

Στα πλαίσια του προγράμματος Microsmetics, για τη μελέτη του χημικού προφίλ και τη διευκόλυνση των βιοδοκιμών του συγκεκριμένου εκχυλίσματος, πριν την πραγματοποίηση του CPC σε μεγάλη κλίμακα (στήλη όγκου: 1000 mL) που περιγράφεται, πραγματοποιήθηκε πρώτα μια κλασμάτωση σε μικρότερη κλίμακα (CPC με στήλη όγκου: 50 mL). Στο πρώτο δοκιμαστικό CPC, εκχυλίστηκε 1 g βιομάζας, προς απόκτηση 72,9 mg εκχυλίσματος Xad4-EtOH. Χρησιμοποιήθηκε σύστημα βαθμιδωτής έκλουσης-εξώθησης, συλλέχθηκαν 71 κλάσματα, τα οποία συνενώθηκαν σε 14. Από αυτά, 6 αντιπροσωπευτικά κλάσματα, επιλέχθηκαν για έλεγχο σε κυτταρικές σειρές για τυχόν αναστολή της δραστηριότητας του 26S πρωτεασώματος, με στόχο να δοθεί προτεραιότητα στη βιοκατευθυνόμενη απομόνωση και ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών του εκχυλίσματος. Οι κωδικοί των 6 κλασμάτων ήταν: KGSC1, KGSC2, KGSC3, KGSC4, KGSC5 και KGSC6. Τα επιλεχθέντα προς εξέταση κλάσματα και η δράση τους, που ελέγχθηκε βάσει του πρωτοκόλλου που περιγράφεται στην Παράγραφο Β.2.3, παρουσιάζεται στο Γράφημα Γ.5.

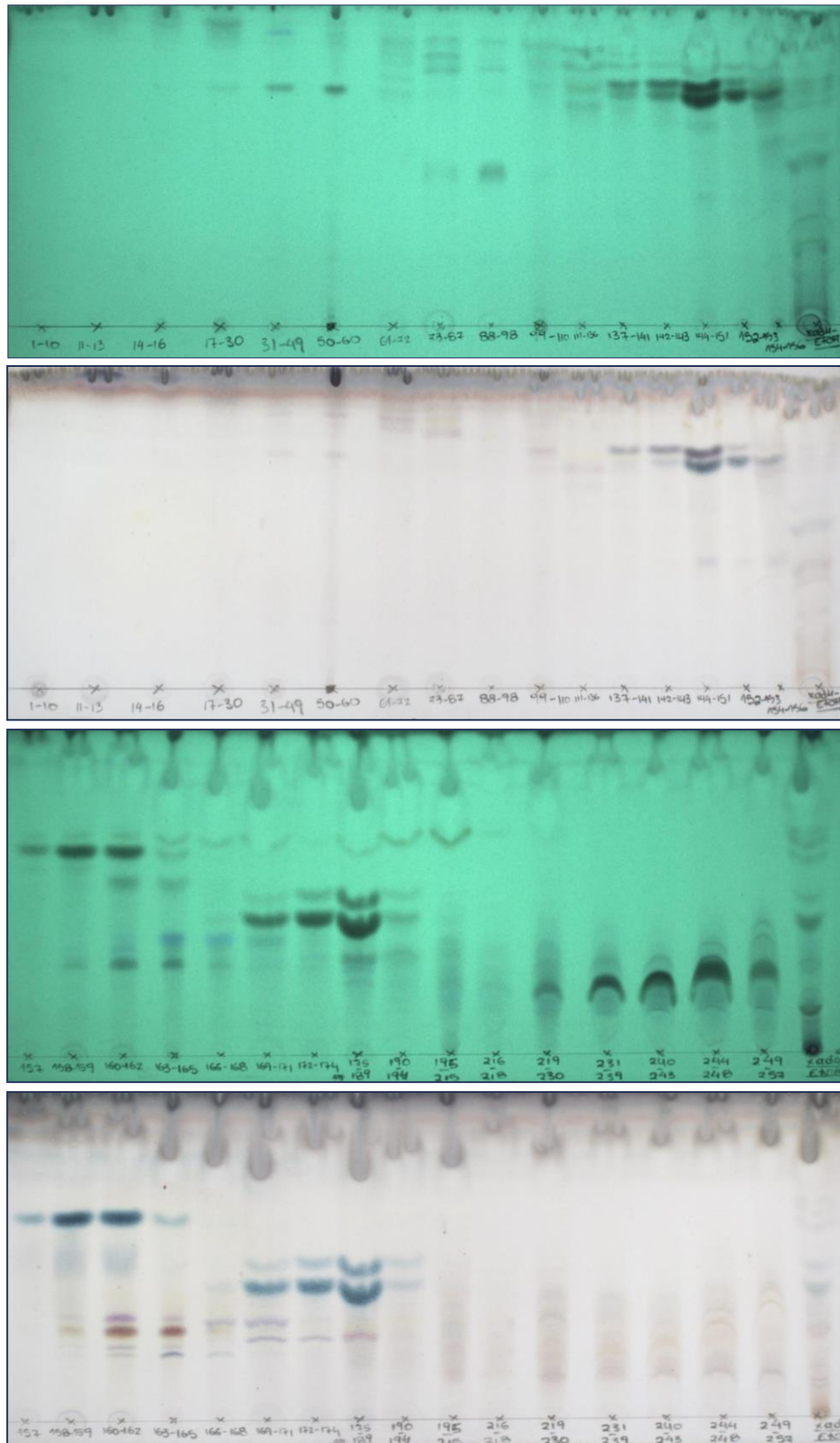
Γράφημα Γ.5. Μελέτη αναστολής της δραστηριότητας του 26 S πρωτεασώματος από αντιπροσωπευτικά συνενωμένα κλάσματα του εκχυλίσματος CA-126581_Xad4-EtOH, που προήλθαν από την πρώτη δοκιμαστική CPC, στην κυτταρική σειρά CT-L/LLVY.

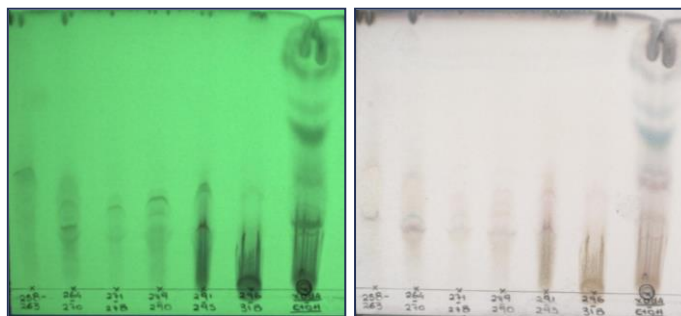


Τα αποτελέσματα των βιολογικών δοκιμών έδειξαν ότι η δράση αναστολής της δραστηριότητας του 26S πρωτεασώματος οφείλεται στους δευτερογενείς μεταβολίτες που περιέχονται στο συνενωμένο κλάσμα KGSC2. Έγινε λήψη φάσματος LC-HRMS/MS του κλάσματος KGSC2, καθώς και του μη δραστικού κλάσματος KGSC1, ούτως ώστε να γίνει αντιστοίχιση των πιθανών δραστικών δευτερογενών μεταβολιτών με τους μεταβολίτες των συνενωμένων κλασμάτων του CPC μεγαλύτερης κλίμακας που περιγράφεται παρακάτω.

Στο CPC μεγαλύτερης κλίμακας, πραγματοποιήθηκε κλασμάτωση των 4,05 g εκχυλίσματος CA-126581_Xad4-EtOH, με CPC όγκου στήλης 1000 mL, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην Παράγραφο Β.3.3 (2). Παραλήφθηκαν συνολικά 318 κλάσματα, το σύνολο των οποίων ελέγχθηκε ποιοτικά με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) και ομαδοποιήθηκαν σε 38 συνενώσεις κλασμάτων (Πίνακας Γ.14). Τα νέα κλάσματα που προέκυψαν υποβλήθηκαν ξανά σε TLC χρωματογραφία (Εικόνα Γ.46).

Εικόνα Γ.44. Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Σύστημα διαλυτών: οργανική φάση του συστήματος $\text{CHCl}_3/\text{ΜΕΟΗ}/\text{Η}_2\text{O}:13/9/3$. Στη χρωματογραφία παρουσιάζονται τα συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από τη CPC μεγάλης κλίμακας, καθώς και το εκχύλισμα CA-126581_Xad4-EtOH που υποβλήθηκε σε αυτή την κλασμάτωση

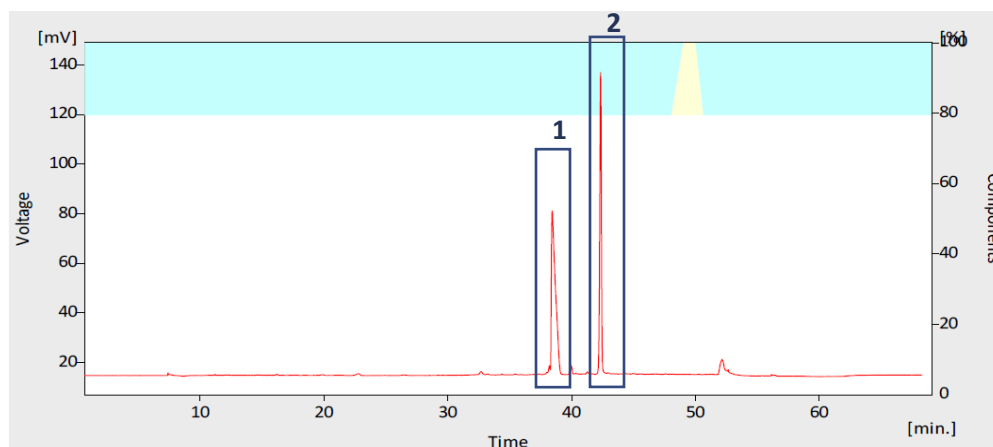




Πίνακας Γ.14. Οι αποδόσεις της κλασμάτωσης με CPC του εκχυλίσματος Χαd4-EtOH του CA-126581, όπως προέκυψαν μετά τη συνένωση των παρόμοιων κλασμάτων

Συνενώσεις	Κωδικοί	Μεταβολίτης	Καθαρό Βάρος (mg)
1-10	-	-	22.9
11-13	-	-	23.6
14-16	-	-	4.0
17-30	-	-	3.1
31-49	-	-	4.5
50-60	-	-	8.3
61-72	-	-	4.2
73-87	-	-	7.1
88-98	-	-	6.1
99-110	-	-	15.2
111-136	NKSC 23	13	161.9
137-141	-	-	22.8
142-143	NKSC 9a, 5, 9b	6, 8, 14	9.6
144-151	NKSC 9a, 5, 9b	6, 8, 14	33.1
152-153	-	-	13.5
154-156	-	-	21.2
157	-	-	8.0
158-159	NKSS4, NKSC12	2, 7	19.1
160-162	-	-	37.4
163-165	-	-	67.5
166-168	-	-	80.3
169-171	-	-	83.3
172-174	NKSC 13, 14	9, 10	62.2
175-189	-	-	207.0
190-194	-	-	51.4
195-215	-	-	160.0
216-218	-	-	16.0
219-230	-	-	61.5
231-239	-	-	52.4
240-243	-	-	47.0
244-248	NKSC 4, 3	11, 12	81.1
249-257	-	-	151.5
258-263	-	-	77.8
264-270	-	-	78.0
271-278	-	-	110.7
279-290	-	-	297.0
291-295	-	-	663.8

- Στο συνενωμένο κλάσμα (142-143) πραγματοποιήθηκε μια παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Preparative TLC), όπως περιγράφεται στην Παράγραφο Β.3.2. Αναπτύχθηκε με σύστημα διαλυτών $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}:90/10$ και οδήγησε στην απομόνωση του Μεταβολίτη 6 (NKSC9a), του Μεταβολίτη 14 (NKSC9b) και του Μεταβολίτη 8 (NKSC5).
- Λόγω όμοιου χημικού προφίλ στην αναλυτική TLC των συνενωμένων κλασμάτων (142-143) και (144-151), επαναλήφθηκε μια παρασκευαστική TLC στο συνενωμένο κλάσμα (144-151), για απόκτηση μεγαλύτερης ποσότητας των Μεταβολιτών 6 (NKSC9a), 14 (NKSC9b) και 8 (NKSC5). Αναπτύχθηκε και αυτή με σύστημα διαλυτών $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}:90/10$, με ανάπτυξη δύο φορές, όπως περιγράφεται στην Παράγραφο Β.3.2.
- Ομοίως, παρασκευαστική TLC, όπως περιγράφεται στην Παράγραφο Β.3.2, πραγματοποιήθηκε και στο συνενωμένο κλάσμα (158-159), με σύστημα διαλυτών την οργανική φάση του διφασικού συστήματος $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}:13/9/3$, η οποία οδήγησε στην απομόνωση του Μεταβολίτη 7 (NKSC12), ενώ απομονώθηκε ξανά ο Μεταβολίτης 2 (NKSS4).
- Στο συνενωμένο κλάσμα (172-174) πραγματοποιήθηκε μια παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Preparative TLC), όπως περιγράφεται στην Παράγραφο Β.3.2. Αναπτύχθηκε με σύστημα διαλυτών την οργανική φάση του διφασικού συστήματος $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}:13/9/3$ και οδήγησε στην απομόνωση του Μεταβολίτη 9 (NKSC13) και του Μεταβολίτη 10 (NKSC14).
- Στο συνενωμένο κλάσμα (244-248), πραγματοποιήθηκε μια ημιπαρασκευαστική Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), όπως περιγράφεται στην παράγραφο Β.3.4. Με τη χρήση των πειραματικών συνθηκών και το πρόγραμμα έκλουσης που περιγράφονται στον Πίνακα Β.14 και Β.15 αντίστοιχα, ελήφθη το χρωματογράφημα της Εικόνας Γ.47 και παραλήφθηκαν τα κλάσματα 1 και 2, που αντιστοιχούν στους Μεταβολίτες 12 (NKSC3) και 11 (NKSC4), αντίστοιχα.



Εικόνα Γ.45. Χρωματογράφημα ημι-παρασκευαστικής HPLC (232nm) του CA-126581_Xad4-EtOH εκχυλίσματος

- Από το συνενωμένο κλάσμα (131-136), με απόξυση της λευκής σκόνης των τοιχωμάτων του δοχείου, απομονώθηκε απευθείας ο Μεταβολίτης 13 (NKSC23).

Από την ανάλυση των μαζών που περιέχονται στο φάσμα LC-HRMS του δραστικού κλάσματος KGSC2, καθώς και στα φάσματα LC-HRMS/MS του μη δραστικού κλάσματος KGSC1, του πρώτου δοκιμαστικού CPC (στήλη όγκου: 50 mL), σε αντιστοιχία με τα φάσματα LC-HRMS των μεταβολιτών που απομονώθηκαν από το CPC μεγαλύτερης κλίμακας, βρέθηκε ότι ο δευτερογενής μεταβολίτης που τα διαφοροποιεί αντιστοιχεί στον Μεταβολίτη 14 (NKSC9b). Επομένως, η δράση αναστολής της δραστηριότητας του 26S πρωτεασώματος οφείλεται ενδεχομένως στον συγκεκριμένο μεταβολίτη, κάτι που μένει να αποδειχθεί μελλοντικά με βιοδοκιμές σε κυτταρικές σειρές.

Ακολούθησε η ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών με τη λήψη φασμάτων LC-HRMS/MS και NMR, όπως περιγράφεται στην Παράγραφο Γ.2.5.

Πρώτα όμως, εφαρμόστηκε και εδώ η μέθοδος της αντιστοίχισης (Annotation) γνωστών μορίων (Dereplication), που περιγράφεται στην Παράγραφο Γ.2.4, αυτή τη φορά στους απομονωμένους μεταβολίτες, για την επιτάχυνση της διαδικασίας.

Γ.2.4. Αντιστοίχιση (Annotation) γνωστών μεταβολιτών σε μίγματα (Dereplication) για το εκχύλισμα CA-126581_Xad4-EtOH

Για την αντιστοίχιση (annotation) των γνωστών δευτερογενών μεταβολιτών που προέκυψαν από τη φαρμακογνωστική του μελέτη του εκχυλίσματος CA-126581_Xad4-EtOH (Περιγράφηκε στην Παράγραφο Γ.2.3), χρησιμοποιήθηκαν βάσεις δεδομένων-βιβλιοθήκες, όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο Β.2.4, ενώ εφαρμόστηκε απόκλιση μάζας 0.001 m/z ή 30 ppm. Στους Πίνακες Γ.15 και Γ.16 αναφέρεται ο χρόνος κατακράτησης, το θεωρητικό και πειραματικό m/z , ο μοριακός τύπος, η απόκλιση μάζας, καθώς και οι κωδικοί των κλασμάτων που τα περιέχουν, σε αρνητικό και θετικό ηλεκτροψεκασμό, αντίστοιχα.

Πίνακας Γ.15. Αντιστοίχιση (annotation) γνωστών δευτερογενών μεταβολιτών του εκχυλίσματος CA-126581_Xad4-EtOH, χρησιμοποιώντας ανάλυση UHPLC-HRMS με αρνητικό ηλεκτροψεκασμό. Για την αντιστοίχιση, χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων Reaxys, Dictionary of Natural Products και AntiMarin, εφαρμόζοντας απόκλιση μάζας 0.001 m/z ή 30 ppm. Στον Πίνακα αναφέρεται ο χρόνος κατακράτησης, το θεωρητικό και πειραματικό m/z , ο μοριακός τύπος, η απόκλιση μάζας, καθώς και οι κωδικοί των κλασμάτων που τα περιέχουν.

Feature	Retention Time	m/z πειραματικό	m/z θεωρητικό	ESI mode	Molecular Formula	Δ (ppm)	Annotation	Fraction
1	0.92	225.0610	225.0670	-	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₂	26.659	1-Hydroxy-6-methoxy-phenazine; 6-Methoxy-1-phenazinol	NKSC21
2	0.92	225.0610	225.0670	-	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₂	26.659	beta-Carboline-3-carboxylic acid methyl ester	NKSC21
3	1.46	251.0781	251.0790	-	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₄	3.584	Nebularine; NSC-65423; 9-beta-D-Ribofuranosylpurine	NKSC14
4	1.46	251.0781	251.0790	-	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₄	3.584	Ozemycin-A	NKSC14

5	1.47	266.0894	266.0860	-	C ₁₃ H ₁₇ NO ₃ S	12.778	U 68204	NKSC13
6	1.47	266.0894	266.0860	-	C ₁₃ H ₁₇ NO ₃ S	12.778	5-(2-Methyl-1E-1,3-butadienyl)-5-acetamido-3-ethyl-2,5-dihydro-4-hydroxy-2-oxo-thiophene; Thiotetronic acid Tue 3010	NKSC13
7	1.47	266.0894	266.0890	-	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	1.503	Adenine 9-beta-D-arabinofuranoside; Ara-A; VIRA-A; Spongoadenosine; Adenine arabinoside; Vidarabine	NKSC13
8	1.47	266.0894	266.0890	-	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	1.503	Formycin-A; Formycin; NSC-102811; 4-215	NKSC13
9	1.47	266.0894	266.0890	-	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	1.503	Adenosine; 9-beta-(D-Ribofuranosyl)adenine; beta-Adenosine	NKSC13
10	1.69	287.0884	287.0920	-	C ₁₆ H ₁₆ O ₅	12.539	Nanaomycin-betaA; OM 173betaA; OM 173beta1; AM-3867 III	NKSC9
11	1.84	295.0932	295.0940	-	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₆	2.710	N-Formylantimycic acid Me ester	NKSC5
12	1.84	295.0932	295.0940	-	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₆	2.710	Streptomycamide A	NKSC5
13	1.84	295.0932	295.0980	-	C ₁₈ H ₁₆ O ₄	16.266	Serpentemycine B	NKSC5
14	1.84	295.0932	295.0980	-	C ₁₈ H ₁₆ O ₄	16.266	Serpentemycine C	NKSC5
15	1.84	295.0932	295.0980	-	C ₁₈ H ₁₆ O ₄	16.266	Dicarboxylic acid 4	NKSC5
16	1.84	295.0932	295.0980	-	C ₁₈ H ₁₆ O ₄	16.266	1-Hydroxy-6-methoxy-8-propylantraquinone; 8-Hydroxy-3-methoxy-1-propylantraquinone	NKSC5
17	3.47	143.0352	143.0350	-	C ₆ H ₈ O ₄	1.398	4,5-Dihydroxy-5-hydroxymethyl-2-cyclopenten-1-one; Pentenomycin I; XB 94; C 2554B	NKSC10
18	3.47	143.0352	143.0350	-	C ₆ H ₈ O ₄	1.398	4-Epipentenomycin I; C-2554B; XB-94	NKSC10
19	3.61	559.3444	559.3280	-	C ₃₂ H ₄₈ O ₈	29.320	Milbemycin beta5	NKSC3,4
20	3.61	559.3444	559.3460	-	C ₂₅ H ₄₈ N ₆ O ₈	2.860	Deferoxamine; Desferrioxamine B; Proferrioxamine-B; NSC 527604; Desferan; Ba 29837; NSC 268993	NKSC3,4
21	3.62	699.3129	699.3130	-	C ₃₆ H ₄₈ N ₂ O ₁₂	0.143	g-Rhodomycin II; g-Rhodomycin-Roa2	NKSC9
22	3.62	699.3129	699.3130	-	C ₃₆ H ₄₈ N ₂ O ₁₂	0.143	Rhodomycin-A; beta-Rhodomycin-II; beta-Rhodomycin-Roa2; S-583-A-III	NKSC9
23	3.62	699.3129	699.3130	-	C ₃₆ H ₄₈ N ₂ O ₁₂	0.143	Alldimycin-B; a2-Rhodomycin-Roa2	NKSC9
24	3.97	401.1087	401.0990	-	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₈	24.183	4-O-(1'-alpha-L-Rhamnopyranosyl)-4,6-dihydroxyphenazine-1-carboxylic Acid	NKSC21
25	3.97	401.1087	401.1030	-	C ₂₄ H ₁₈ O ₆	14.211	Saptomycin-F	NKSC21
26	3.97	401.1087	401.1140	-	C ₂₃ H ₁₈ N ₂ O ₅	13.213	Saphenamycin; A 32256	NKSC21
27	4.00	459.2446	459.2460	-	C ₂₀ H ₃₆ N ₄ O ₈	3.048	Desferri-ferrioxamine H	NKSC3
28	4.00	459.2446	459.2520	-	C ₂₃ H ₄₁ O ₇ P	16.113	Cyclipostin B	NKSC3
29	4.00	459.2446	459.2520	-	C ₂₃ H ₄₁ O ₇ P	16.113	Cyclipostin C	NKSC3
30	4.00	459.2446	459.2520	-	C ₂₃ H ₄₁ O ₇ P	16.113	Cyclipostin D	NKSC3
31	4.00	459.2446	459.2520	-	C ₂₃ H ₄₁ O ₇ P	16.113	Cyclipostin E	NKSC3
32	4.00	459.2446	459.2520	-	C ₂₃ H ₄₁ O ₇ P	16.113	Cyclipostin A2	NKSC3
33	4.00	459.2446	459.2520	-	C ₂₃ H ₄₁ O ₇ P	16.113	Cyclipostin A	NKSC3

34	4.00	401.1083	401.0990	-	C ₁₉ H ₁₈ N ₂ O ₈	23.186	4-O-(1'-alpha-L-Rhamnopyranosyl)-4,6-dihydroxyphenazine-1-carboxylic Acid	NKSC5
35	4.00	401.1083	401.1030	-	C ₂₄ H ₁₈ O ₆	13.213	Saptomycin-F	NKSC5
36	4.00	401.1083	401.1140	-	C ₂₃ H ₁₈ N ₂ O ₅	14.211	Saphenamycin; A 32256	NKSC5
37	4.08	413.1095	413.1100	-	C ₁₉ H ₁₈ N ₄ O ₇	1.210	Futalosine	NKSC4
38	4.08	413.1095	413.0990	-	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₈	25.417	1-(1'-alpha-Rhamnopyranosyloxycarbonyl)-phenazine-6-carboxylic acid	NKSC4
39	4.09	613.3548	613.3380	-	C ₃₅ H ₅₀ O ₉	27.390	KSB-1939 L3beta	NKSC12
40	4.09	613.3548	613.3380	-	C ₃₅ H ₅₀ O ₉	27.390	KSB-1939 L3a	NKSC12
41	4.09	613.3548	613.3380	-	C ₃₅ H ₅₀ O ₉	27.390	UK-78618; N-787-182-1	NKSC12
42	4.09	613.3548	613.3380	-	C ₃₅ H ₅₀ O ₉	27.390	Milbemycin a23	NKSC12
43	4.09	613.3548	613.3510	-	C ₃₅ H ₄₆ N ₆ O ₄	6.195	5,5'-Methylenebiprimaquine	NKSC12
44	4.13	585.3239	585.3250	-	C ₂₆ H ₄₆ N ₆ O ₉	1.879	Proferrioxamine-D2; Desferrioxamine D2	NKSC23
45	4.16	583.3454	583.3280	-	C ₃₄ H ₄₈ O ₈	29.827	LL-F28249beta; S 541C; Nemadectin beta	NKSC5, 9
46	4.16	583.3454	583.3280	-	C ₃₄ H ₄₈ O ₈	29.827	VM 44866	NKSC5, 9
47	4.16	583.3454	583.3460	-	C ₂₇ H ₄₈ N ₆ O ₈	1.029	Terragine E; Desoxynocardamine; Peptide 1	NKSC5, 9
48	4.21	473.2755	473.2620	-	C ₂₁ H ₃₈ N ₄ O ₈	28.525	Amastatin; Amastatin A2	NKSC13
49	4.24	599.3391	599.3230	-	C ₃₄ H ₄₈ O ₉	26.863	GR-135402; Putredinin	NKSC23
50	4.24	599.3391	599.3350	-	C ₃₄ H ₄₄ N ₆ O ₄	6.841	5,5'-Biprimaquine	NKSC23
51	4.24	599.3391	599.3410	-	C ₂₇ H ₄₈ N ₆ O ₉	3.170	Nocardamine; Norcardamin; Deferrioxamine E; Desferri-ferrioxamin-E; Proferrioxamine-E	NKSC23
52	4.41	309.0971	309.0910	-	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	19.735	PS-8	NKSC4
53	4.41	309.0971	309.0990	-	C ₁₆ H ₁₄ N ₄ O ₃	6.147	Lymphostin; LK6-A	NKSC4
54	4.47	439.2913	439.2850	-	C ₂₈ H ₄₀ O ₄	14.341	Boligrevilol	NKSC12
55	4.47	439.2913	439.3040	-	C ₂₁ H ₄₀ N ₆ O ₄	28.910	Leupeptin Pr-LL	NKSC12

Πίνακας Γ.16. Αντιστοίχιση (annotation) γνωστών δευτερογενών μεταβολιτών του εκχυλίσματος CA-126581_Xad4-EtOH, χρησιμοποιώντας ανάλυση UHPLC-HRMS με θετικό ηλεκτροψεκασμό. Για την αντιστοίχιση, χρησιμοποιήθηκαν οι βάσεις δεδομένων Reaxys, Dictionary of Natural Products και AntiMarin, εφαρμόζοντας απόκλιση μάζας 0.001 *m/z* ή 30 ppm. Στον Πίνακα αναφέρεται ο χρόνος κατακράτησης, το θεωρητικό και πειραματικό *m/z*, ο μοριακός τύπος, η απόκλιση μάζας, καθώς και οι κωδικοί των κλασμάτων που τα περιέχουν.

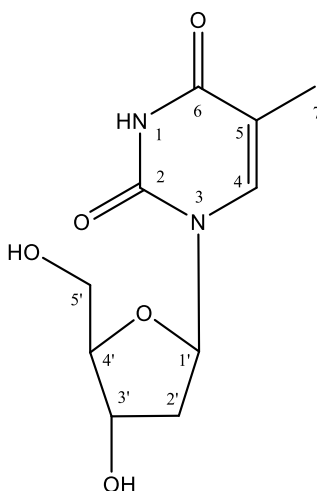
Feature	Retention Time	<i>m/z</i> πειραματικό	<i>m/z</i> θεωρητικό	ESI mode	Molecular Formula	Δ (ppm)	Annotation	Fraction
1	1.01	252.1089	252.1090	+	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₃	0.397	2'-Deoxyadenosin	NKSC5
2	1.06	137.0452	137.0460	+	C ₅ H ₄ N ₄ O	5.837	Hypoxanthine	NKSC14
3	1.45	229.0815	229.0820	+	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₅	2.183	Deoxyuridine	NKSC12
4	3.10	205.0967	205.0930	+	C ₆ H ₁₂ N ₄ O ₄	18.053	(3R,6R)-3,6-Bis[(aminooxy)methyl]-2,5-piperazine-dione; D-Cycloserine dimer; Cycloserine diketopiperazine DCS	NKSC11
5	3.10	205.0967	205.0930	+	C ₆ H ₁₂ N ₄ O ₄	18.053	(3RS,6RS)-3,6-Bis[(aminooxy)methyl]-2,5-piperazinedione; Cycloserine diketopiperazine; DCS	NKSC11
6	3.10	205.0967	205.0930	+	C ₆ H ₁₂ N ₄ O ₄	18.053	(3S,6S)-3,6-Bis[(aminooxy)methyl]-2,5-piperazinedione; Cycloserine diketopiperazine; DCS	NKSC11

7	3.63	265.1543	265.1550	+	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₃	2.639	Phenamide	NKSC11
8	3.63	265.1543	265.1550	+	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₃	2.639	Bohemamine B	NKSC11
9	3.63	265.1543	265.1550	+	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₃	2.639	Bohemamine C	NKSC11
10	3.63	561.3596	561.3610	+	C ₂₅ H ₄₈ N ₆ O ₈	2.494	Deferoxamine; Desferrioxamine B; Proferrioxamine-B; NSC 527604; Desferan; Ba 29837; NSC 268993	NKSC4
11	3.64	561.3586	561.3420	+	C ₃₂ H ₄₈ O ₈	29.571	Milbemycin beta5	NKSC3
12	3.64	561.3586	561.3420	+	C ₃₂ H ₄₈ O ₈	29.571	HA-1-92	NKSC3
13	3.64	561.3586	561.3420	+	C ₃₂ H ₄₈ O ₈	29.571	Milbemycin beta9	NKSC3
14	3.64	561.3586	561.3610	+	C ₂₅ H ₄₈ N ₆ O ₈	4.275	Deferoxamine; Desferrioxamine B; Proferrioxamine-B; NSC 527604; Desferan; Ba 29837; NSC 268993	NKSC3
15	3.95	656.2815	656.2700	+	C ₃₄ H ₄₁ NO ₁₂	17.523	TAN-1120 II	NKSC4
16	3.98	195.0647	656.0650	+	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	1.538	Ferulic acid	NKSC21
17	4.09	415.1238	415.1140	+	C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₈	23.607	1-(1'-alpha-Rhamnopyranosyloxycarbonyl)-phenazine-6-carboxylic acid	NKSC4
18	4.09	415.1238	415.1250	+	C ₁₉ H ₁₈ N ₄ O ₇	2.891	Futalosine	NKSC4
19	4.16	585.3592	585.3420	+	C ₃₄ H ₄₈ O ₈	29.384	LL-F28249beta; S 541C; Nemaectin beta	NKSC5,9
20	4.16	585.3592	585.3420	+	C ₃₄ H ₄₈ O ₈	29.384	VM 44866	NKSC5,9
21	4.16	585.3592	585.3610	+	C ₂₇ H ₄₈ N ₆ O ₈	3.075	Terragine E; Desoxynocardamine; Peptide 1	NKSC5,9
22	4.23	601.3538	601.3370	+	C ₃₄ H ₄₈ O ₉	27.937	Milbemycin a22	NKSC23
23	4.23	601.3538	601.3500	+	C ₃₄ H ₄₄ N ₆ O ₄	6.319	5,5'-Biprimaquine	NKSC23
24	4.23	601.3538	601.3560	+	C ₂₇ H ₄₈ N ₆ O ₉	3.658	Nocardamine; Norcardamin; Deferrioxamine E; Desferri-ferrioxamine-E; Proferrioxamine-E	NKSC23
25	4.51	441.3061	441.3000	+	C ₂₈ H ₄₀ O ₄	13.820	Boligrevilol	NKSC12
26	4.51	441.3061	441.3180	+	C ₂₁ H ₄₀ N ₆ O ₄	26.960	Leupeptin Pr-LL	NKSC12
27	6.05	387.1798	387.1800	+	C ₂₂ H ₂₆ O ₆	0.517	2-11-B; Gibbestatin-B	NKSC5
28	6.05	387.1798	387.1800	+	C ₂₂ H ₂₆ O ₆	0.517	Furaquinocin D; KO-3988-D	NKSC5
29	6.05	387.1798	387.1800	+	C ₂₂ H ₂₆ O ₆	0.517	Furaquinocin F; KO-3988-F	NKSC5
30	6.05	387.1798	387.1800	+	C ₂₂ H ₂₆ O ₆	0.517	PI-220	NKSC5
31	6.20	779.521	779.5300	+	C ₄₄ H ₇₄ O ₁₁	11.546	Narasin D; A-28086-D	NKSC10
32	6.20	779.521	779.5300	+	C ₄₄ H ₇₄ O ₁₁	11.546	Mer-5504A4	NKSC10

Γ.2.5. Ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών του CA-126581_Xad4-EtOH

Γ.2.5.1. Μεταβολίτης 6 (NKSC9a)

Ο μεταβολίτης NKSC9a, που απομονώθηκε από τα συνενωμένα κλάσματα (142-143) και (144-151) του CPC με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Preparative TLC), όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο Γ.2.3, ταυτοποιήθηκε ως η θυμιδίνη (Thymidine), και βρίσκεται σε μίγμα με τον Μεταβολίτη 10 (NKSC9b). Η ταυτοποίηση του μεταβολίτη έγινε με μελέτη των φασμάτων NMR 1D και 2D του μεταβολίτη και με σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με τις τιμές που προτείνονται από την βιβλιογραφία (Ying, Y-M., et al., 2013).

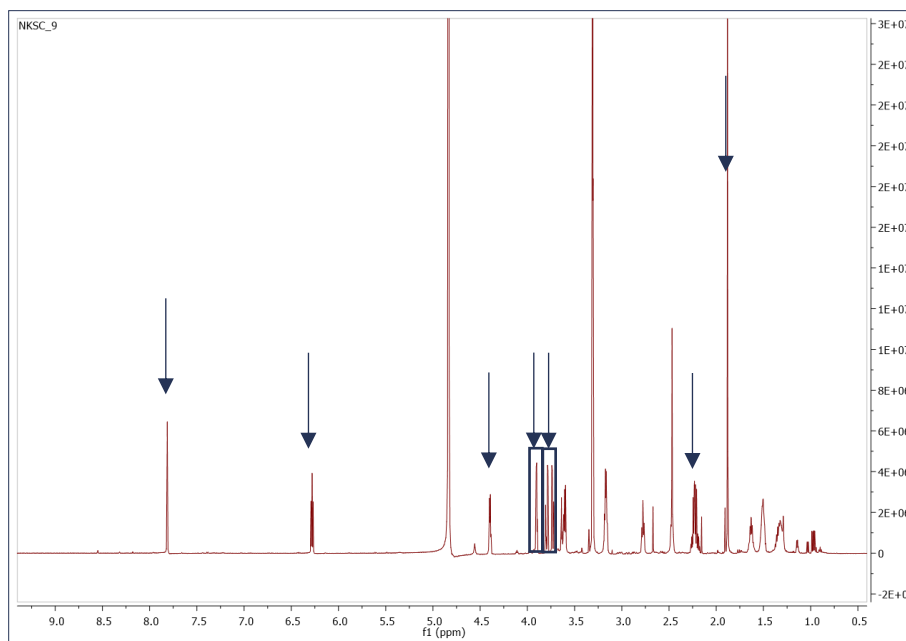


Εικόνα Γ.46. Δομή Θυμιδίνης (Μεταβολίτης 6)

Πίνακας Γ.17. Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του μεταβολίτη 6

Θέση	^1H NMR (600MHz, MeOD, δ ppm, J σε Hz)	^{13}C NMR* (600MHz, MeOD, δ ppm)
1	-	-
2	-	152.27
3	-	102.33
4	7.81 (d, J= 1.18 Hz, 1H)	137.94
5	-	111.34
6	-	166.36
7	1.88 (d, J= 1.18 Hz, 3H)	12.19
1'	6.28 (t, J= 6.82 Hz, 1H)	86.31
2'	2.23 (m, 2H)	41.00
3'	4.40 (m, 1H)	71.98
4'	3.90 (m, 1H)	88.61
5'-Ha	3.73 (dd, J= 12.09, 3.68 Hz, 1H)	62.63
5'-Hb	3.79 (dd, J= 12.09, 3.20 Hz, 1H)	

*Ο προσδιορισμός των ^{13}C έγινε με τη χρήση των φασμάτων HSQC-DEPT και HMBC



Εικόνα Γ.47. Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 6

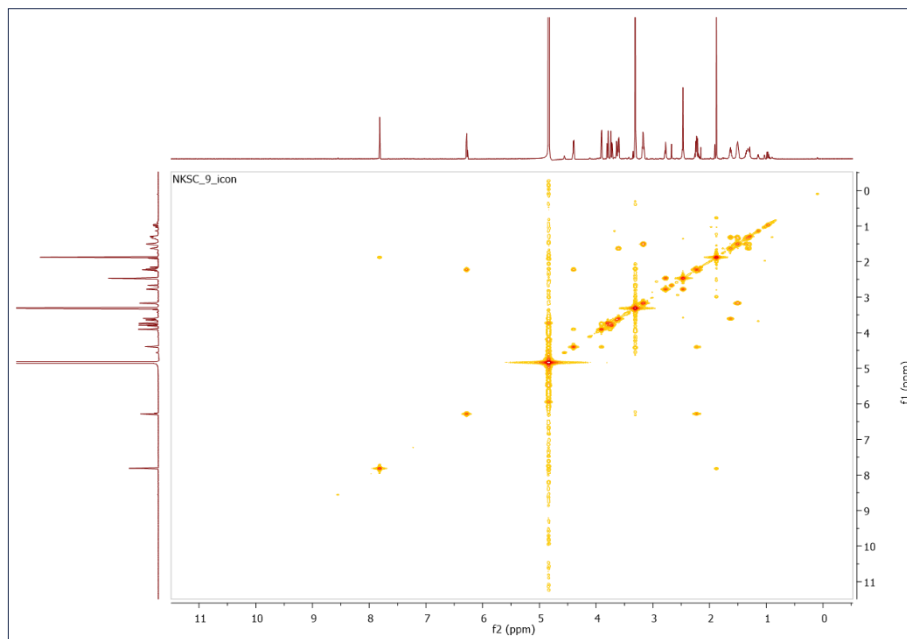
Κατόπιν μελέτης της αρωματικής περιοχής του φάσματος ^1H NMR, παρατηρείται ένα σήμα στα 7.81 ppm (διπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης $J = 1.18$ Hz), που ολοκληρώνει για 1H, το οποίο υποδηλώνει την ύπαρξη ενός πρωτονίου σε αρωματικό δακτύλιο (4-H). Μέσω του φάσματος ετεροπυρηνικής συσχέτισης HSQC-DEPT αποδόθηκε η μετατόπιση του άνθρακα C4 του αρωματικού δακτυλίου στα 137.94 ppm. Από το φάσμα HMBC, το 4-H εμφανίζει ετεροπυρηνική συσχέτιση με τους καρβονυλικούς άνθρακες αμιδίου στα 152.27 και 166.36 ppm (που αποδίδονται στους C2 και C6 αντίστοιχα) βάσει της βιβλιογραφίας (Ying, Y-M., et al., 2013), τον τεταρτοταγή αρωματικό άνθρακα C5 στα 111.34 ppm, τον άνθρακα C7 στα 12.19 ppm και τον άνθρακα C1' στα 86.31 ppm.

Η διπλή κορυφή στα 1.88 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 1.18$ Hz, που ολοκληρώνει για 3H, υποδηλώνει την ύπαρξη ενός μεθυλίου το οποίο συνδέεται με τεταρτοταγή άνθρακα διπλού δεσμού (C5). Η μετατόπιση του C7 δόθηκε μέσω του φάσματος ετεροπυρηνικής συσχέτισης HSQC-DEPT στα 12.19 ppm. Μέσω του φάσματος HMBC, επιβεβαιώνεται η συσχέτιση του 7-H με τους άνθρακες C4, C5 και C6.

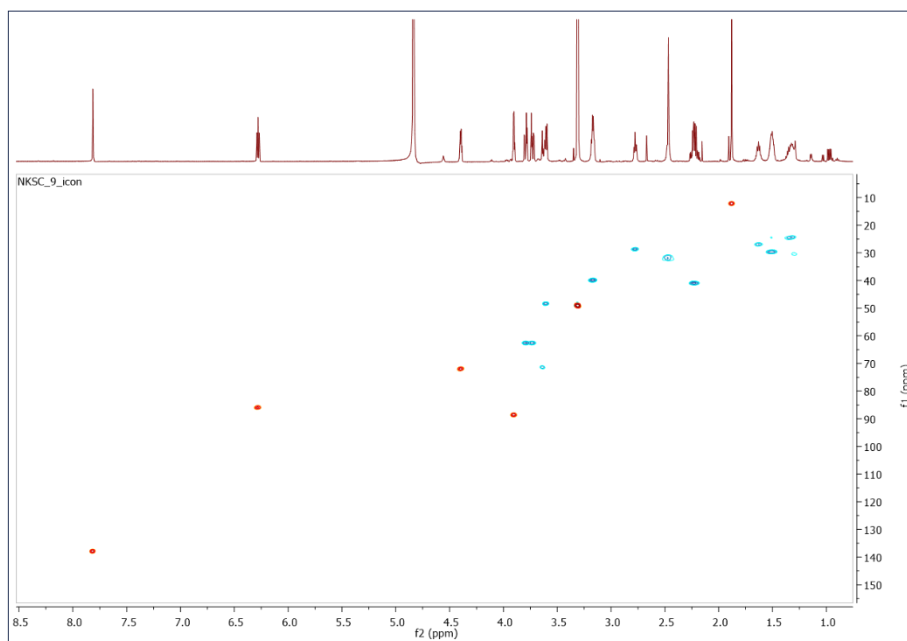
Η τριπλή κορυφή στα 6.28 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 6.82$ Hz, που ολοκληρώνει για 1H, αποδίδεται και βάσει της βιβλιογραφίας (Ying, Y-M., et al., 2013) στο 1'-H ανωμερικού άνθρακα σακχάρου. Από το φάσμα HSQC-DEPT, ο C-1' αποδόθηκε στα 86.31 ppm. Η πολλαπλότητα της κορυφής (t, $J = 6.82$ Hz) δηλώνει παρουσία 2H στη 2'-θέση του σακχάρου, δηλαδή την απουσία 2'-OH. Η μετατόπιση του σήματος του ανωμερικού H σε αρκετά χαμηλά πεδία (6.28 ppm), επιβεβαιώνει και βιβλιογραφικά (Ying, Y-M., et al., 2013) τη σύνδεση του σακχάρου σε άζωτο.

Από το φάσμα HMBC, η σύνδεση στο 3-N επιβεβαιώνεται, μιας και το 4-H εμφανίζει συσχέτιση με τον C-1' και το 1'-H με τους άνθρακες C2 και C4.

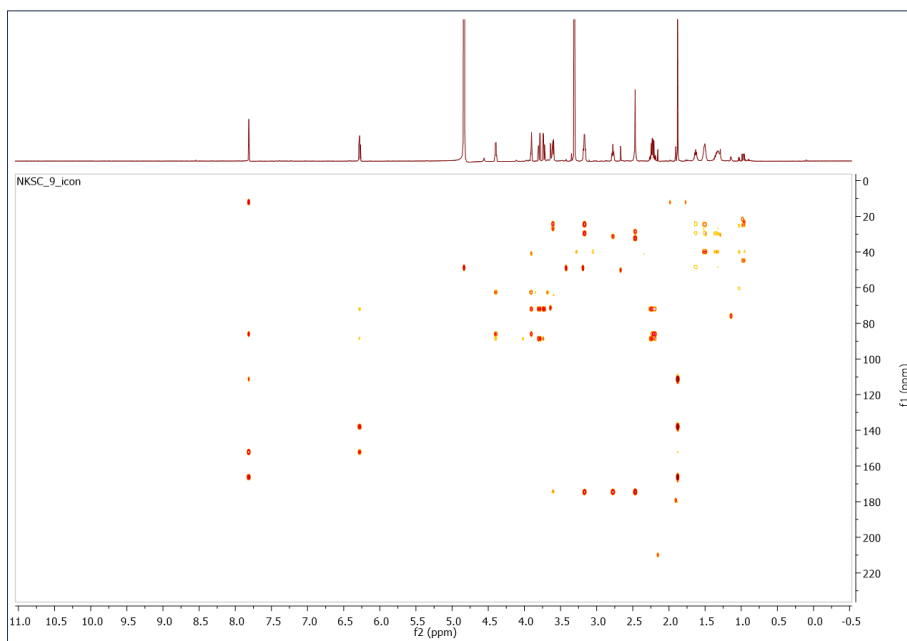
Η πολλαπλή κορυφή στα 2.23 ppm ολοκληρώνει για 2H και αντιστοιχεί στα 2'-H. Από το φάσμα COSY, εμφανίζει συσχέτιση με το 1'-H και το 3'-H. Αντίστοιχα, το 3'-H εμφανίζει συσχέτιση με τα 2'-H και τα 4'-H, και τα 5'-Ha/5'-Hb με το 4'-H. Από το φάσμα HSQC-DEPT, αποδόθηκαν οι άνθρακες C-2' στα 41.00 ppm, C-3' στα 71.98 ppm, C-4' στα 88.61 ppm και C-5' στα 62.63 ppm.



Εικόνα Γ.48. Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 6

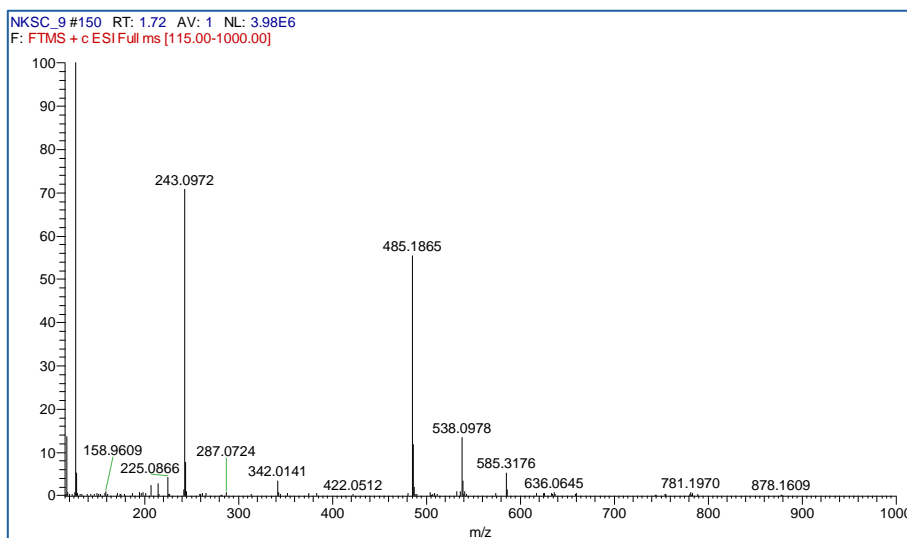


Εικόνα Γ.49. Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 6



Εικόνα Γ.50. Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 6

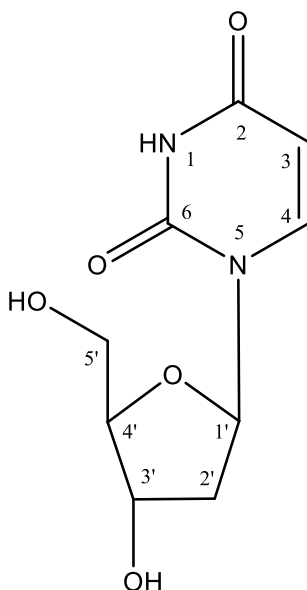
Στο φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS, εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα $m/z=243.0972$, γεγονός που επιβεβαίωσε τον μοριακό τύπο του Μεταβολίτη 6 ως τον $C_{10}H_{14}N_2O_5$, με Accurate Mass= 242.0897.



Εικόνα Γ.51. Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 6

Γ.2.5.2. Μεταβολίτης 7 (NKSC12)

Ο μεταβολίτης που απομονώθηκε με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (preparative TLC) από το κλάσμα (158-159) του CPC (βλ. Παράγραφο Γ.2.3) ταυτοποιήθηκε ως η 2'-δεοξουριδίνη (2'-deoxyuridine) (Youssef, D.T.A., et al., 2015).

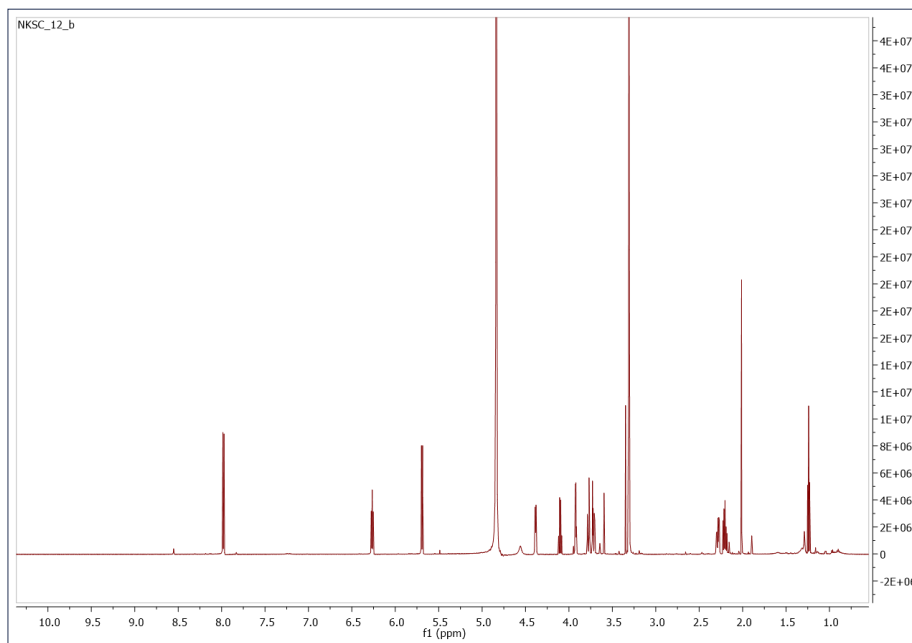


Εικόνα Γ.52. Δομή 2'-Δεοξουριδίνης (Μεταβολίτης 7)

Πίνακας Γ.18. Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του μεταβολίτη 7

Θέση	^1H NMR (600MHz, MeOD, δ ppm, J σε Hz)	^{13}C NMR* (600MHz, MeOD, δ ppm)
1	-	-
2	-	166.07
3	5.69 (d, J= 8.09 Hz, 1H)	102.33
4	7.98 (d, J= 8.09 Hz, 1H)	142.20
5	-	-
6	-	152.08
1'	6.27 (t, J= 6.74 Hz, 1H)	86.31
2'-Ha	2.20 (m, 1H)	41.08
2'-Hb	2.29 (m, 1H)	
3'	4.38 (m, 1H)	71.95
4'	3.92 (m, 1H)	88.74
5'-Ha	3.72 (dd, J= 12.09, 3.72 Hz, 1H)	62.66
5'-Hb	3.78 (dd, J= 12.09, 3.27 Hz, 1H)	

*Ο προσδιορισμός των ^{13}C έγινε με τη χρήση των φασμάτων HSQC-DEPT και HMBC

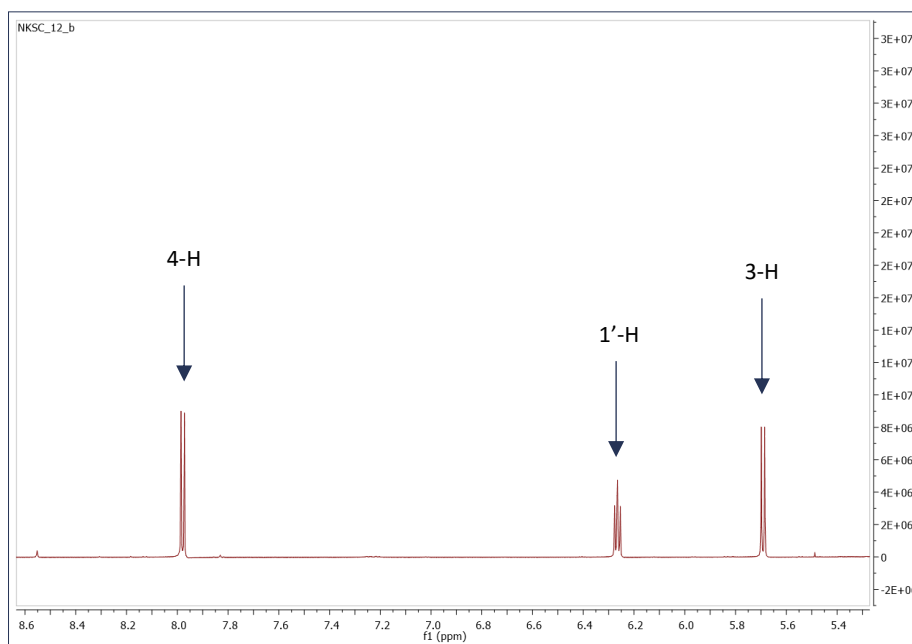


Εικόνα Γ.53. Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 7

Κατόπιν μελέτης της αρωματικής περιοχής του φάσματος ^1H NMR, παρατηρείται:

- Μία διπλή κορυφή στα 7.98 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 8.09$ Hz, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 4-H
- Μία διπλή κορυφή στα 5.69 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 8.09$ Hz, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 3-H
- Μία τριπλή κορυφή στα 6.27 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 6.74$ Hz, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 1'-H

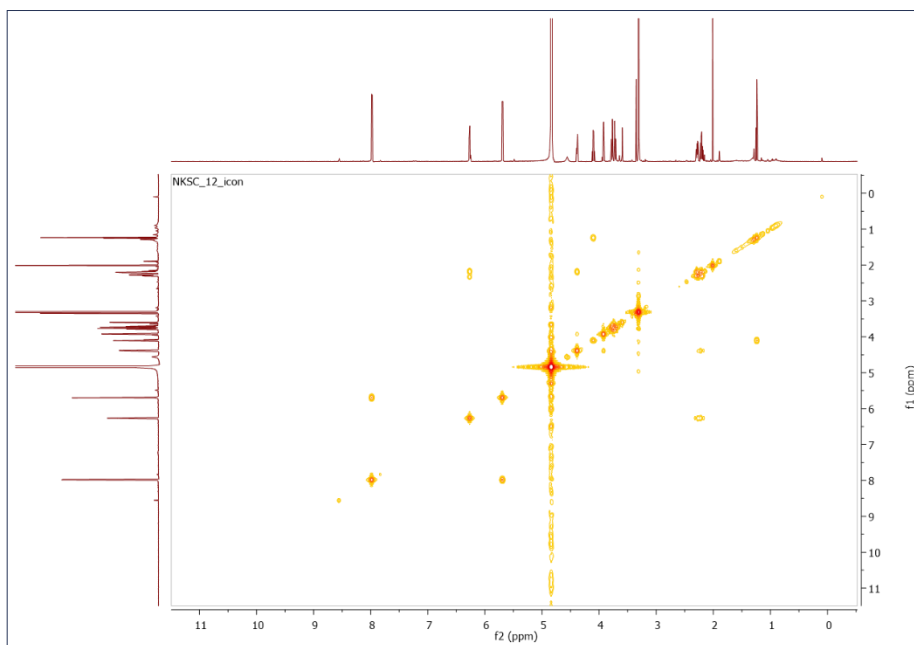
Από το φάσμα COSY, εμφανίζεται συσχέτιση μεταξύ των πρωτονίων 3-H και 4-H. Μέσω του φάσματος ετεροπυρηνικής συσχέτισης HSQC-DEPT, αποδόθηκαν οι μετατοπίσεις των παραπάνω ανθράκων, όπως φαίνονται στον Πίνακα Γ.18. Από το φάσμα ετεροπυρηνικής συσχέτισης HMBC, το 4-H εμφανίζει συσχέτιση με τους άνθρακες C1, C2, C3 και C1', ενώ το 3-H εμφανίζει συσχέτιση με τους άνθρακες C2 και C4.



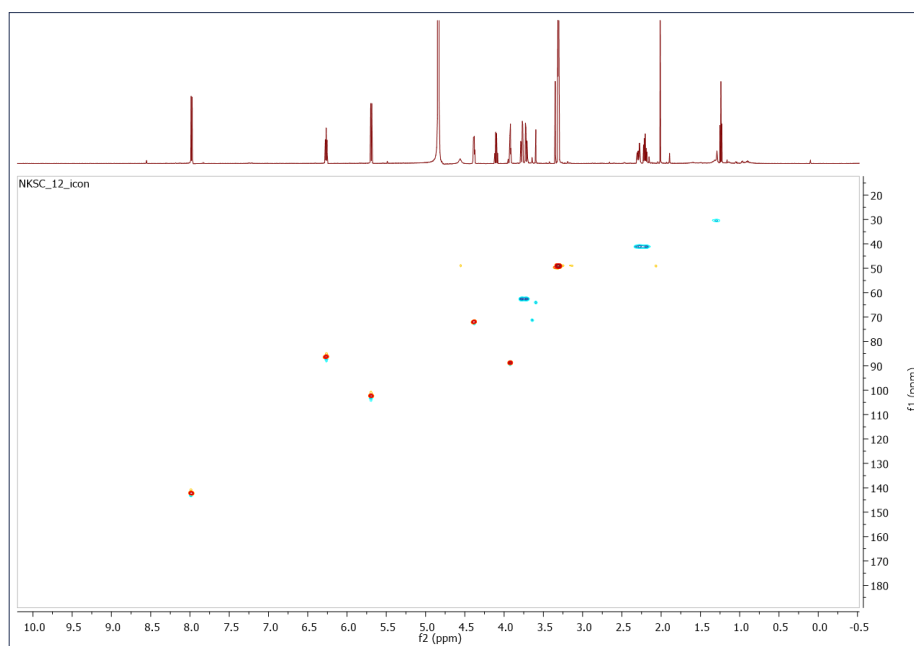
Εικόνα Γ.54. Αρωματική περιοχή φάσματος ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 7

Η τριπλή κορυφή στα 6.27 ppm αποδίδεται στο ανωμερικό πρωτόνιο σακχάρου 1'-H. Από το φάσμα HSQC-DEPT, ο C-1' αποδώθηκε στα 86.31 ppm. Η πολλαπλότητα της κορυφής (t , $J = 6.74$ Hz) δηλώνει την απουσία 2'-OH, ενώ η μετατόπιση του σήματος του ανωμερικού H σε αρκετά χαμηλά πεδία (6.27 ppm), αποδεικνύει τη σύνδεση του σακχάρου σε άζωτο. Η μορφή και η σύνδεση του σακχάρου αποδίδεται και βάσει της βιβλιογραφίας (Youssef, D.T.A., et al., 2015). Από το φάσμα HMBC, η σύνδεση στο 5-N επιβεβαιώνεται, μιας και το 4-H εμφανίζει συσχέτιση με τον C-1' και το 1'-H με τους άνθρακες C4 και C6.

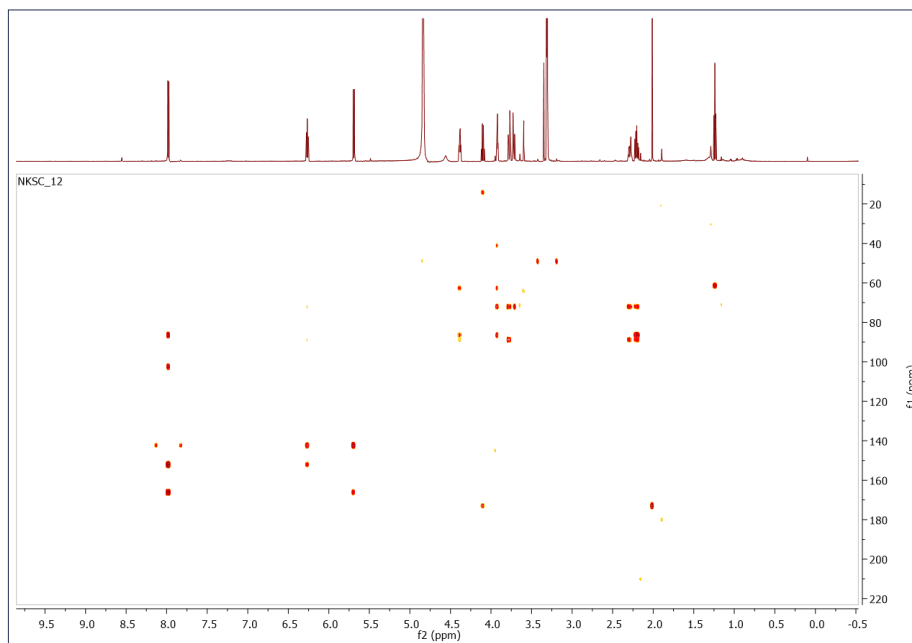
Το φάσμα COSY επιβεβαιώνει τη δομή του σακχάρου βάσει της βιβλιογραφίας (Youssef, D.T.A., et al., 2015), μιας και το 1'H εμφανίζει συσχέτιση με τα 2'-H, το 3'-H με τα 2'-H και 4'-H, και τα 5'-Ha/5'-Hb με το 4'-H. Από το φάσμα HSQC-DEPT, αποδώθηκαν οι μετατοπίσεις των ανθράκων όπως φαίνονται στον Πίνακα Γ.18.



Εικόνα Γ.55. Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 7

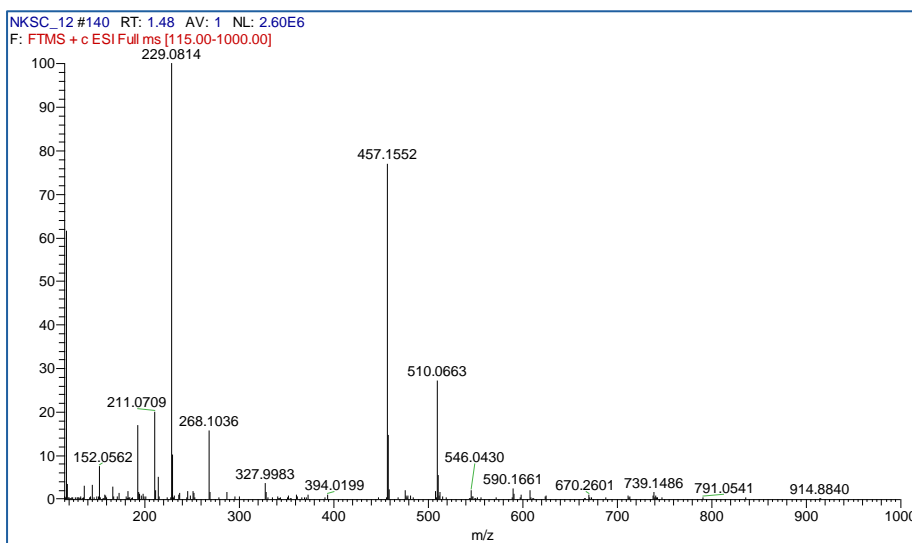


Εικόνα Γ.56. Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 7



Εικόνα Γ.57. Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 7

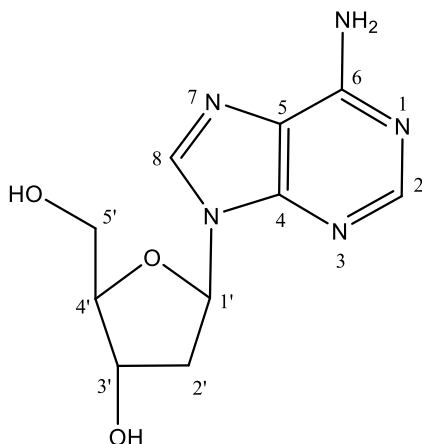
Το μοριακό βάρος της 2'-δεοξουριδίνης (Accurate Mass=228.0741) όπως επίσης και ο μοριακός τύπος της ($C_9H_{12}N_2O_5$), επιβεβαιώθηκαν και από το φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS στο οποίο εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα $m/z=229.0814$.



Εικόνα Γ.58. Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 7

Γ.2.5.3. Μεταβολίτης 8 (NKSC5)

Ο Μεταβολίτης 8 απομονώθηκε από τα συνενωμένα κλάσματα (142-143) και (144-151) του CPC, κατόπιν διαχωρισμού μέσω TLC Preparative (βλ. Παραγραφο Γ.2.3), δυστυχώς παρουσία προσμίξεων μη ικανών προς ταυτοποίηση. Η μελέτη του φάσματος ^1H NMR του μορίου και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με τις τιμές που προτείνονται από την βιβλιογραφία (Huang, R., et al., 2011) είχαν σαν αποτέλεσμα την ταυτοποίηση του μεταβολίτη ως τη 2'-δεοξαδενοσίνη (2'-deoxyadenosine). Το μόριο έχει απομονωθεί ξανά από θαλάσσιους σπόγγους του γένους *Callyspongia* (Huang, R., et al., 2011).

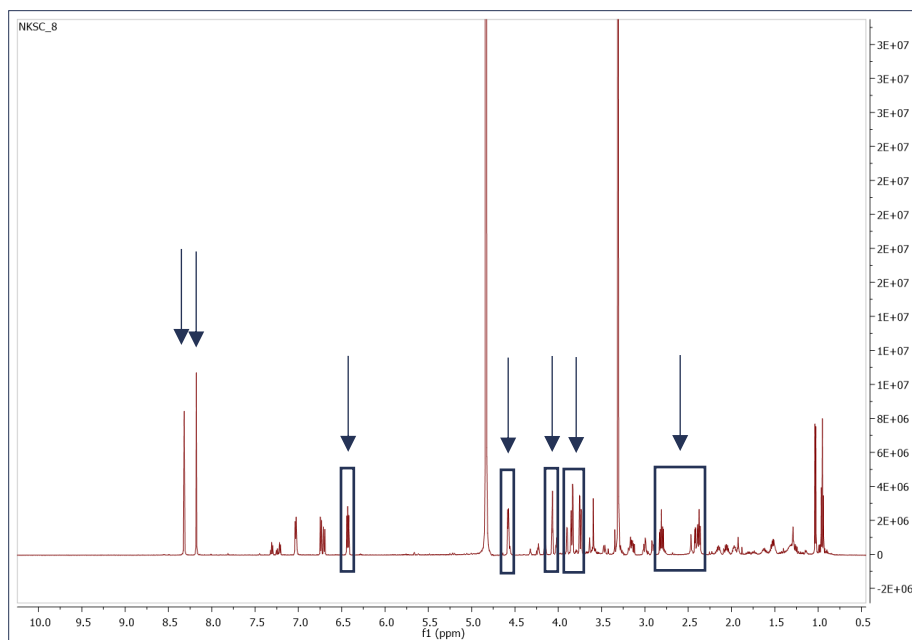


Εικόνα Γ.59. Δομή 2'-Δεοξαδενοσίνης (Μεταβολίτης 8)

Πίνακας Γ.19. Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του μεταβολίτη 8

Θέση	^1H NMR (600MHz, MeOD, δ ppm, J σε Hz)	^{13}C NMR* (600MHz, MeOD, δ ppm)
2	8.32 (s, 1H)	153.50
4	-	150.10
5	-	120.10
6	-	157.60
8	8.18 (s, 1H)	141.60
1'	6.43 (dd, J= 7.92/6.16 Hz, 1H)	90.10
2'-Ha	2.41 (m, 1H)	41.60
2'-Hb	2.81 (m, 1H)	
3'	4.58 (m, 1H)	73.10
4'	4.07 (m, 1H)	87.20
5'-Ha	3.84 (dd, J= 12.11, 3.16 Hz, 1H)	63.70
5'-Hb	3.74 (dd, J= 12.11, 3.16 Hz, 1H)	

*Ο προσδιορισμός των ^{13}C έγινε από τις προτεινόμενες τιμές από τη βιβλιογραφία (Huang, R., et al., 2011)



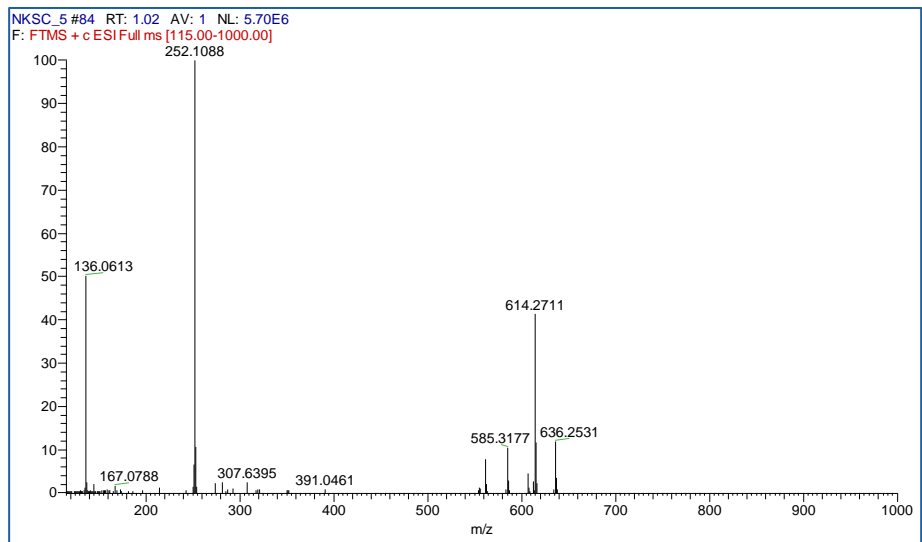
Εικόνα Γ.60. Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 8

Κατόπιν μελέτης της αρωματικής περιοχής του φάσματος ^1H NMR, παρατηρείται:

- Μία απλή κορυφή στα 8.32 ppm, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 2-H
- Μία απλή κορυφή στα 8.18 ppm, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στα πρωτόνια 8-H
- Μία διπλή διπλής κορυφή στα 6.43 ppm με σταθερές σύζευξης $J = 7.92/6.16$ Hz, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στα πρωτόνια 1'-H

Η παρουσία του ανωμερικού πρωτονίου στα 6.43 ppm που εμφανίζεται ως διπλή διπλής κορυφή, αλλά και των κορυφών στα 2.41-4.58 ppm, υποδηλώνουν την παρουσία της 2'-δεοξυριβόζης.

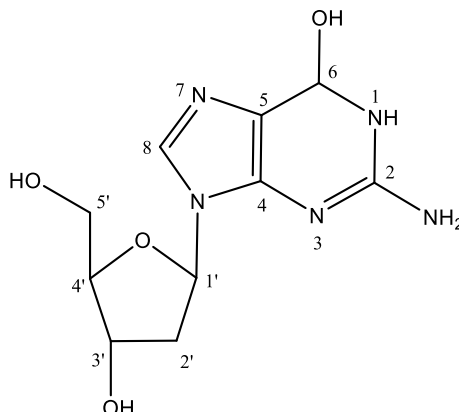
Η ανάλυση του φάσματος ^1H NMR και η απόλυτη ταύτιση των χημικών μετατοπίσεων με των προτεινόμενων από τη βιβλιογραφία (Huang, R., et al., 2011), μας έδωσαν τη δυνατότητα να προσδιορίσουμε την δομή του Μεταβολίτη 8. Ο μοριακός τύπος ($\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{N}_5$ με Accurate Mass= 251.1013) επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS, όπου εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα $m/z = 252.1088$.



Εικόνα Γ.61. Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 8

Γ.2.5.4. Μεταβολίτης 9 (NKSC13)

Όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο Γ.2.3, ο Μεταβολίτης 9 απομονώθηκε από το συνενωμένο κλάσμα (172-174) του CPC, με Preparative TLC. Ταυτοποιήθηκε ως η 2'-δεοξυγουανοσίνη (2'-deoxyguanosine), όπως αποδεικνύεται και από τη σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με τις τιμές της βιβλιογραφίας (Robins, M.J., et al., 1997).



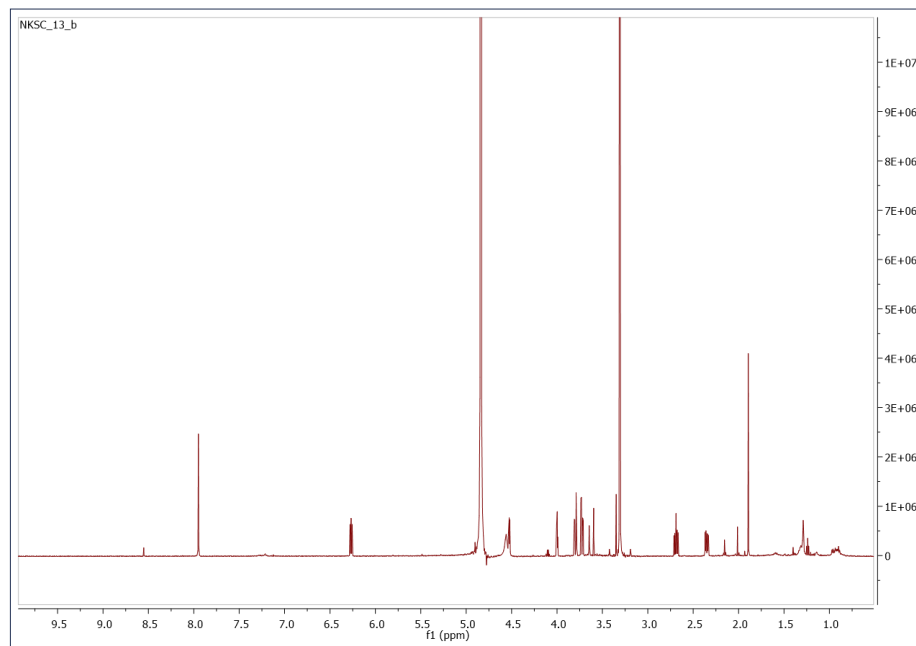
Εικόνα Γ.62. Δομή 2'-Δεοξυγουανοσίνης (Μεταβολίτης 9)

Πίνακας Γ.20. Χημικές μετατοπίσεις ¹H NMR του μεταβολίτη 9

Θέση	¹ H NMR (600MHz, MeOD, δ ppm, J σε Hz)	¹ H NMR (600MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm, J σε Hz)	¹³ C NMR* (600MHz, MeOD, δ ppm)
2	-	-	150.4**
4	-	-	152.15
5	-	-	118.00
6	-	-	159.10
8	7.95 (s, 1H)	7.88 (s, 1H)	137.26
1'	6.27 (dd, J= 7.83/6.13 Hz, 1H)	6.11 (dd, J= 6.30/6.28 Hz, 1H)	85.42
2'-Ha	2.35 (m, 1H)	2.38 (m, 1H)	40.95
2'-Hb	2.69 (m, 1H)	2.61 (m, 1H)	
3'	4.53 (m, 1H)	4.33 (m, 1H)	72.30
4'	4.00 (m, 1H)	3.80 (m, 1H)	89.09
5'-Ha	3.80 (dd, J= 12.11, 3.73 Hz, 1H)	3.55 (m, 2H)	63.17
5'-Hb	3.72 (dd, J= 12.11, 3.73 Hz, 1H)		
5'-OH	-	4.95 (m, 1H)	-
3'-OH	-	5.26 (m, 1H)	-
NH	-	11.12 (brs, 1H)	-
NH ₂	-	6.67 (s, 2H)	-

*Ο προσδιορισμός των ¹³C έγινε με τη χρήση των φασμάτων HSQC-DEPT και HMBC

**Ο προσδιορισμός έγινε από τις προτεινόμενες τιμές από τη βιβλιογραφία (Robins, M.J., et al., 1997)



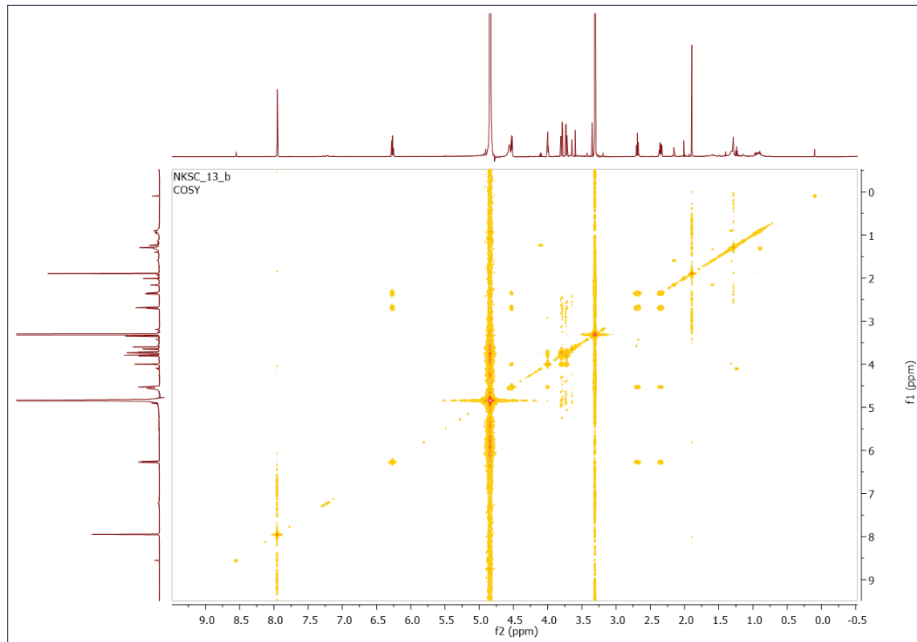
Εικόνα Γ.63. Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 9

Κατόπιν μελέτης της αρωματικής περιοχής του φάσματος ^1H NMR, παρατηρείται:

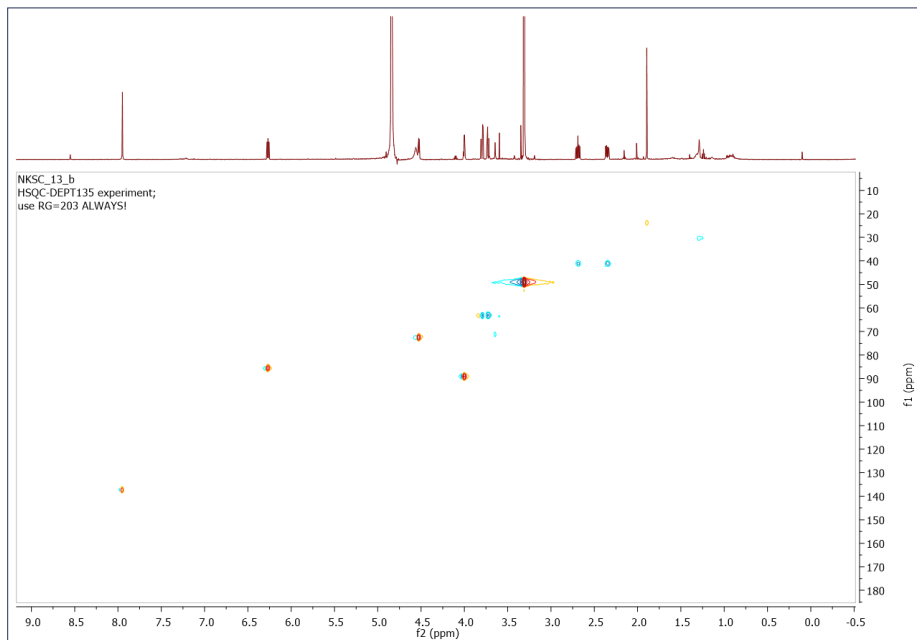
- Μια απλή κορυφή στα 7.95 ppm, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 8-H
- Μία διπλή διπλής κορυφή στα 6.27 ppm με σταθερές σύζευξης $J = 7.83/6.13$ Hz, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στα πρωτόνια 1'-H

Μέσω του φάσματος ετεροπυρηνικής συσχέτισης HSQC-DEPT, αποδόθηκαν οι μετατοπίσεις των παραπάνω ανθράκων, όπως φαίνονται στον Πίνακα Γ.20. Μέσω του φάσματος ετεροπυρηνικής συσχέτισης HMBC, το πρωτόνιο 8-H εμφανίζει συσχέτιση με τους άνθρακες C5, C4 και C6, οι οποίοι και αποδόθηκαν (Πίνακας Γ.20). Δυστυχώς, ο C2 δεν ήταν δυνατόν να προσδιοριστεί ούτε μέσω του φάσματος HMBC, ούτε μέσω του φάσματος HSQC-DEPT, μιας και δεν μπορεί να εμφανίσει καμία ετεροπυρηνική συσχέτιση. Βιβλιογραφικά, αποδίδεται στα 150.4 ppm.

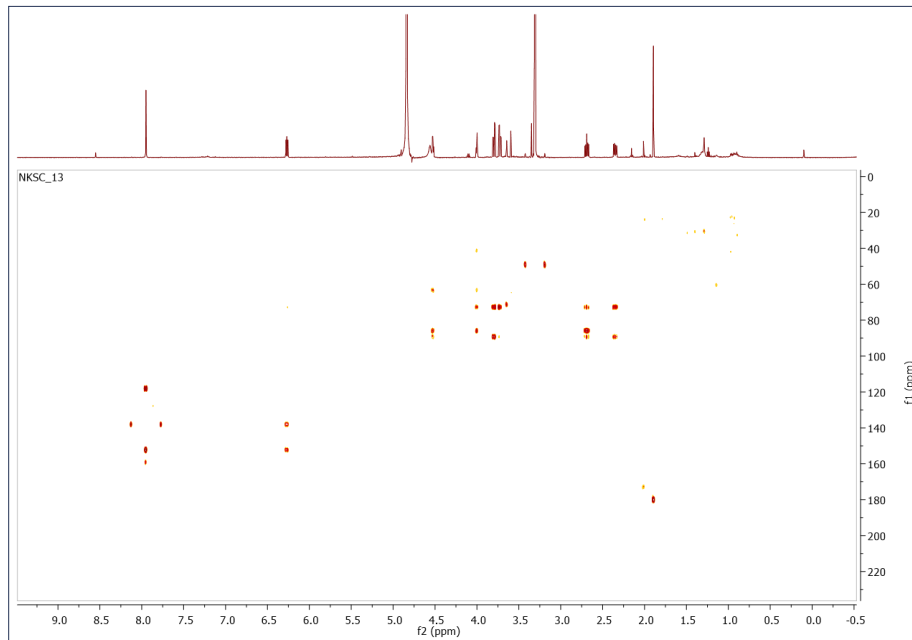
Η κορυφή στα 6.27 ppm αποδίδεται στο ανωμερικό πρωτόνιο σακχάρου 1'-H. Η πολλαπλότητα της κορυφής (dd, $J = 6.13$ Hz) δηλώνει την απουσία 2'-OH, ενώ η μετατόπιση του σήματος του ανωμερικού H σε αρκετά χαμηλά πεδία (6.27 ppm), αποδεικνύει τη σύνδεση του σακχάρου σε άζωτο. Η μορφή και η σύνδεση του σακχάρου αποδίδεται και βάσει της βιβλιογραφίας (Robins, M.J., et al., 1997), καθώς και από το φάσμα HMBC, στο οποίο το 1'-H εμφανίζει συσχέτιση με τους άνθρακες C4 και C8. Το φάσμα COSY επιβεβαιώνει τη δομή του σακχάρου βάσει της βιβλιογραφίας (Robins, M.J., et al., 1997), μιας και το 2'H εμφανίζει συσχέτιση με τα 1'-H και 3'-H, και το 4'-H με τα 3'-H και 5'-Ha/5'-Hb. Από το φάσμα HSQC-DEPT, αποδόθηκαν οι μετατοπίσεις των ανθράκων όπως φαίνονται στον Πίνακα Γ.20.



Εικόνα Γ.64. Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 9

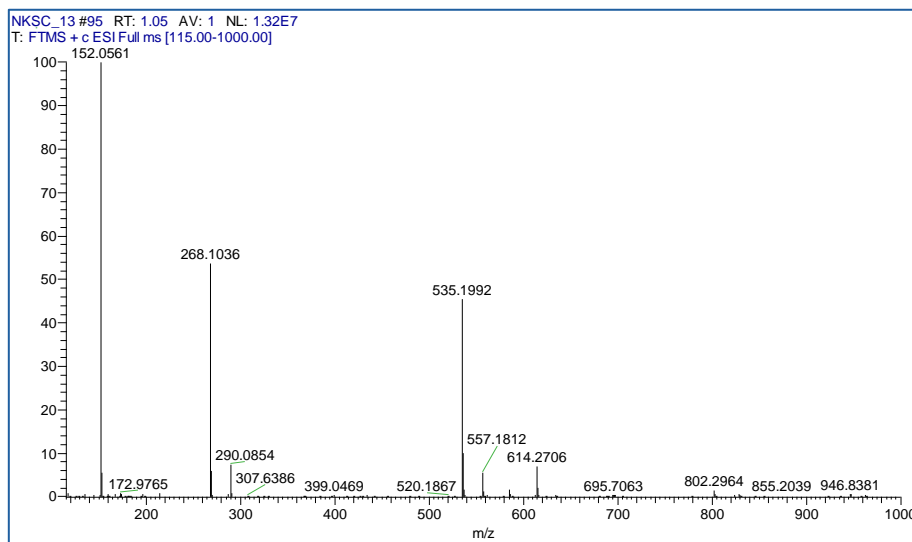


Εικόνα Γ.65. Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 9



Εικόνα Γ.66. Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 9

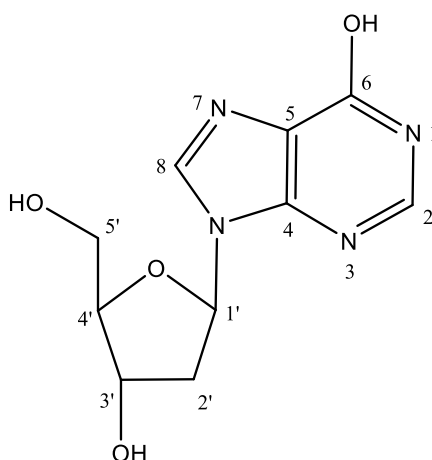
Η ανάλυση των 1D και 2D φασμάτων και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με των προτεινόμενων από τη βιβλιογραφία (Robins, M.J., et al., 1997) μας έδωσαν τη δυνατότητα να προσδιορίσουμε το μοριακό τύπο του Μεταβολίτη 9 ως $C_{10}H_{13}N_5O_4$ με Accurate Mass= 267.0962. Ο μοριακός τύπος επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS, στο οποίο εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα $m/z=268.1036$.



Εικόνα Γ.67. Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 9

Γ.2.5.5. Μεταβολίτης 10 (NKSC14)

Ο Μεταβολίτης 10 απομονώθηκε από το συνενωμένο κλάσμα (172-174) του CPC, κατόπιν διαχωρισμού μέσω TLC Preparative (βλ. Παράγραφο Γ.2.3). Η μελέτη των φασμάτων NMR 1D και 2D του μορίου και του φάσματος ESI(-) HR-MS, σε συνδυασμό με τη σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με τις τιμές που προτείνονται από την βιβλιογραφία (Huang, R., et al., 2011) είχαν σαν αποτέλεσμα την ταυτοποίηση του μεταβολίτη ως τη 2'-δεοξυϊνσίνη (2'-deoxyinosine). Το μόριο έχει απομονωθεί ξανά από θαλάσσιους σπόγγους του γένους *Callyspongia* (Huang, R., et al., 2011).

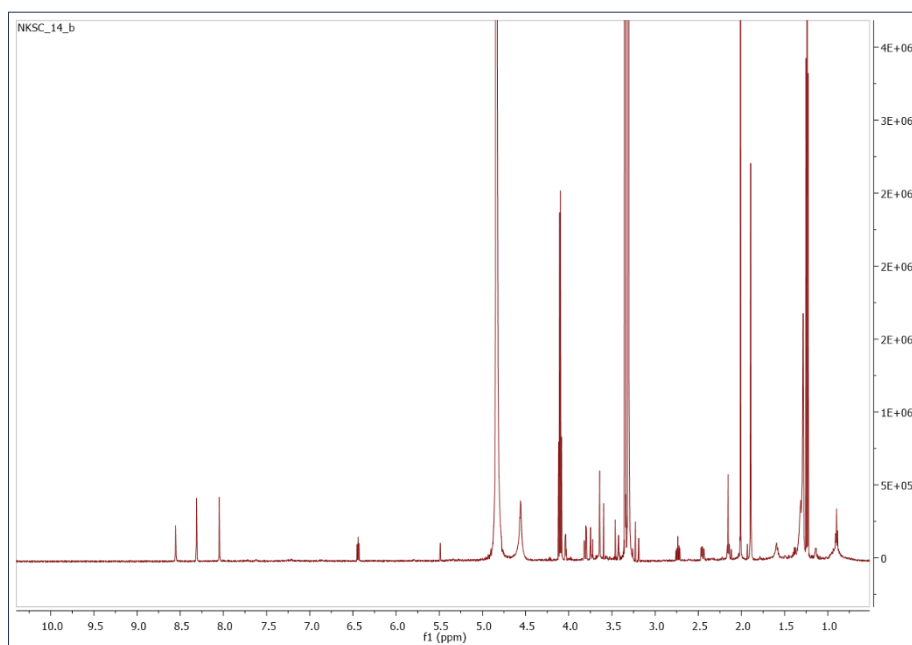


Εικόνα Γ.68. Δομή 2'-Δεοξυϊνσίνης (Μεταβολίτης 10)

Πίνακας Γ.21. Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του μεταβολίτη 10

Θέση	^1H NMR (600MHz, MeOD, δ ppm, J σε Hz)	^{13}C NMR* (600MHz, MeOD, δ ppm)
2	8.31 (s, 1H)	140.13
4	-	149.39
5	-	125.96
6	-	159.55
8	8.05 (s, 1H)	146.64
1'	6.44 (t, J= 6.73 Hz, 1H)	86.21
2'-Ha	2.45 (m, 1H)	41.62
2'-Hb	2.74 (m, 1H)	
3'	4.56 (m, 1H)	72.42
4'	4.04 (m, 1H)	89.19
5'-Ha	3.81 (dd, J= 12.19, 3.70 Hz, 1H)	62.95
5'-Hb	3.73 (dd, J= 12.19, 3.70 Hz, 1H)	

*Ο προσδιορισμός των ^{13}C έγινε με τη χρήση των φασμάτων HSQC-DEPT και HMBC



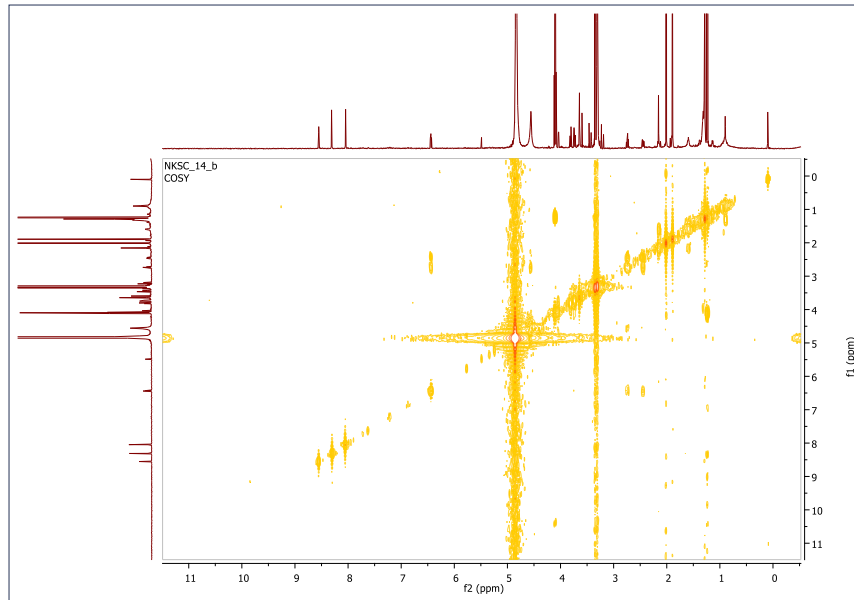
Εικόνα Γ.69. Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 10

Κατόπιν μελέτης της αρωματικής περιοχής του φάσματος ^1H NMR, παρατηρείται:

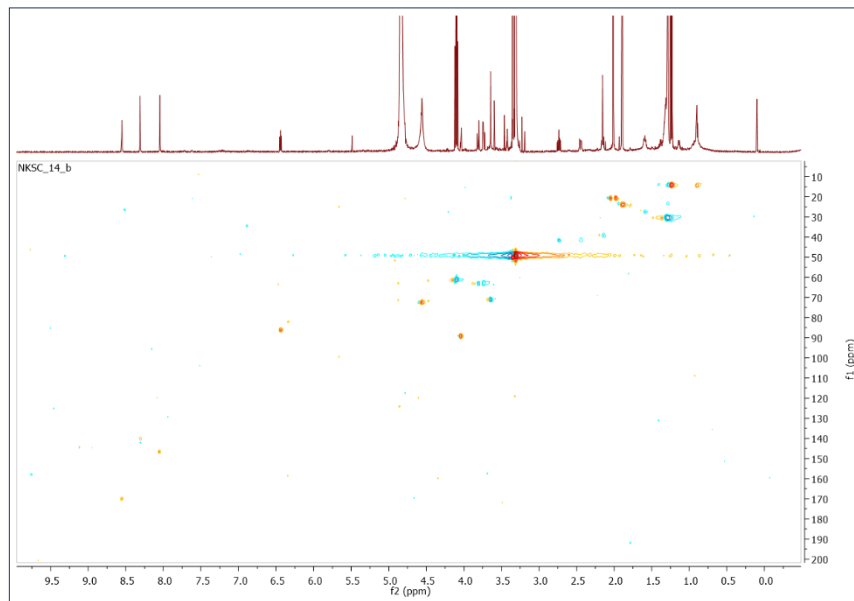
- Μια απλή κορυφή στα 8.05 ppm, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 2-H
- Μια απλή κορυφή στα 8.31 ppm, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 8-H
- Μία τριπλή κορυφή στα 6.44 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 6.73$ Hz, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στα πρωτόνια 1'-H

Μέσω του φάσματος ετεροπυρηνικής συσχέτισης HSQC-DEPT, αποδόθηκαν οι μετατοπίσεις των παραπάνω ανθράκων, όπως φαίνονται στον Πίνακα Γ.21. Μέσω του φάσματος ετεροπυρηνικής συσχέτισης HMBC, το πρωτόνιο 2-H εμφανίζει συσχέτιση με τους άνθρακες C4 και C6, ενώ το πρωτόνιο 8-H εμφανίζει συσχέτιση με τους άνθρακες C5 και C4, οι οποίοι και αποδόθηκαν (Πίνακας Γ.21).

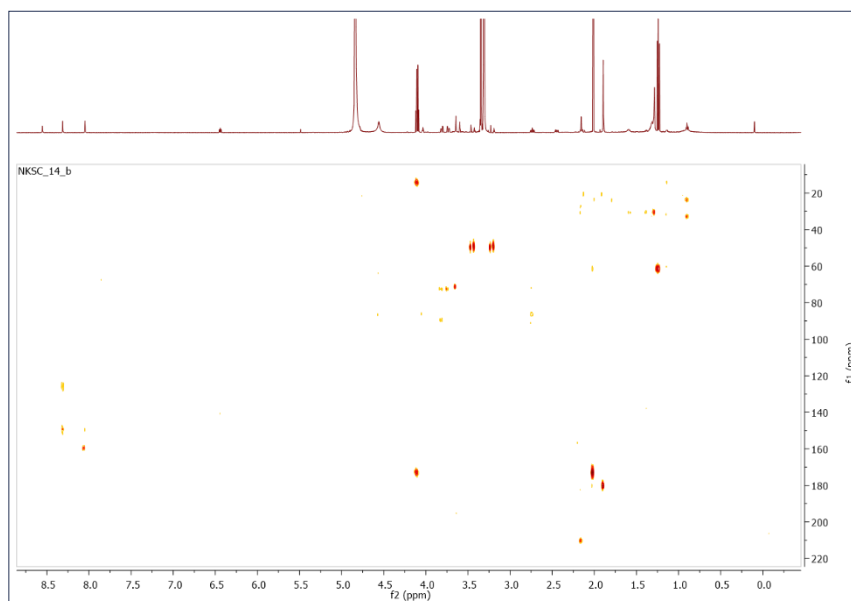
Η τριπλή κορυφή στα 6.44 ppm αποδίδεται στο ανωμερικό πρωτόνιο σακχάρου 1'-H. Η πολλαπλότητα της κορυφής (t, $J = 6.73$ Hz) δηλώνει την απουσία 2'-OH, ενώ η μετατόπιση του σήματος του ανωμερικού H σε αρκετά χαμηλά πεδία (6.44 ppm), αποδεικνύει τη σύνδεση του σακχάρου σε άζωτο. Η μορφή και η σύνδεση του σακχάρου αποδίδεται και βάσει της βιβλιογραφίας (Huang, R., et al., 2011). Από το φάσμα HMBC, η σύνδεση στο 9-N επιβεβαιώνεται, μιας 1'-H εμφανίζει συσχέτιση με τους άνθρακες C4 και C8. Το φάσμα COSY επιβεβαιώνει τη δομή του σακχάρου βάσει της βιβλιογραφίας (Huang, R., et al., 2011), μιας και το 2'-H εμφανίζει συσχέτιση με τα 1'-H και 3'-H, και το 4'-H με τα 3'-H και 5'-Ha/5'-Hb. Από το φάσμα HSQC-DEPT, αποδόθηκαν οι μετατοπίσεις των ανθράκων όπως φαίνονται στον Πίνακα Γ.21.



Εικόνα Γ.70. Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 10

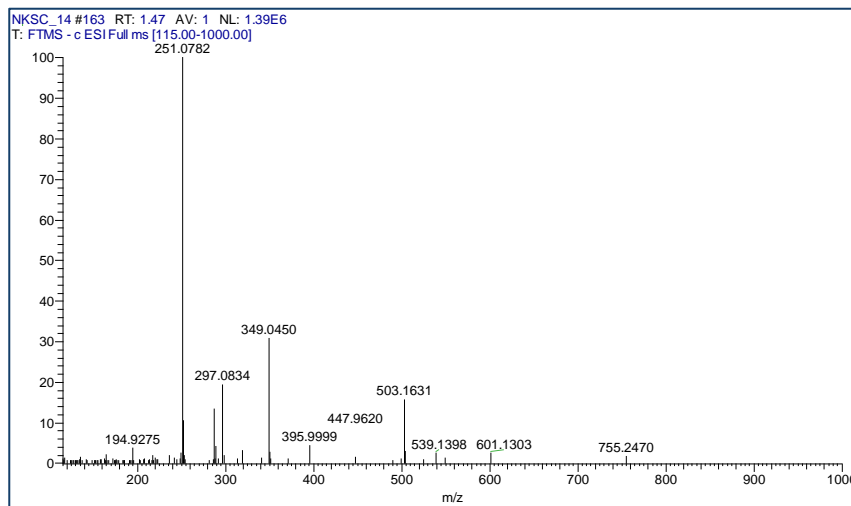


Εικόνα Γ.71. Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 10



Εικόνα Γ.72. Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 10

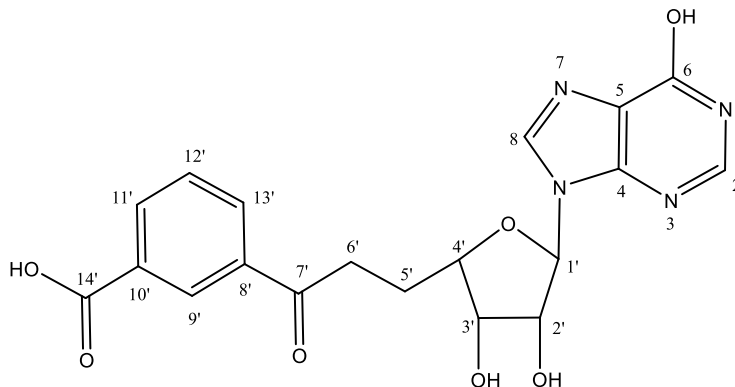
Ο μοριακός τύπος του Μεταβολίτη 10 προσδιορίστηκε ως $C_{10}H_{12}N_4O_4$ με Accurate= 252.0853. Στο φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα $m/z=251.0782$, επιβεβαιώνοντας τον μοριακό τύπο.



Εικόνα Γ.73. Φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS για τον Μεταβολίτη 10

Γ.2.5.6. Μεταβολίτης 11 (NKSC4)

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Hosokawa, N., et al., 1999), ο μεταβολίτης που απομονώθηκε από την HPLC του συνενωμένου κλάσματος (244-248) του CPC όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο Γ.2.3, είναι η φουταλοσίνη (futasoline), η οποία έχει απομονωθεί ξανά από το *Streptomyces* sp. MK359-NF1. Η μελέτη των φασμάτων NMR 1D και 2D, καθώς και του φασμάτος μάζας ESI(+) HR-MS του μεταβολίτη σε συνδυασμό με τη βιβλιογραφία (Hosokawa, N., et al., 1999), είχαν σαν αποτέλεσμα την ταυτοποίηση του μεταβολίτη.

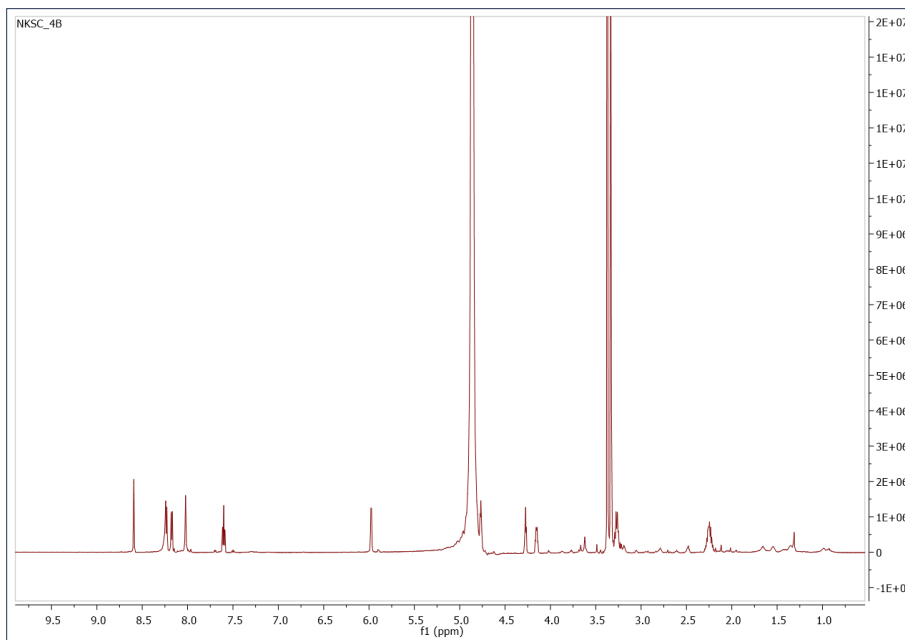


Εικόνα Γ.74. Δομή Φουταλοσίνης (Μεταβολίτης 11)

Πίνακας Γ.22. Χημικές μετατοπίσεις ¹H NMR του μεταβολίτη 11

Θέση	¹ H NMR (600MHz, MeOD, δ ppm, J σε Hz)	¹ H NMR (600MHz, D ₂ O, δ ppm, J σε Hz)	¹³ C NMR* (600MHz, MeOD, δ ppm)
2	8.00 (s, 1H)	7.97 (s, 1H)	146.48
4	-	-	149.84
5	-	-	-
6	-	-	158.79
8	8.23 (s, 1H)	8.16 (s, 1H)	141.20
1'	5.95 (d, J= 4.28 Hz, 1H)	5.92 (d, J= 4.81 Hz, 1H)	90.53
2'	4.75 (t, J= 4.79 Hz, 1H)	4.96 (t, J= 5.01 Hz, 1H)	75.04
3'	4.25 (t, J= 5.01 Hz, 1H)	4.47 (t, J= 4.96 Hz, 1H)	74.68
4'	4.13 (m, 1H)	4.29 (m, 1H)	84.90
5'-Ha	2.22 (m, 2H)	2.27 (m, 1H)	28.80
5'-Hb		2.39 (m, 1H)	
6'-Ha	3.26 (m, 1H)	3.24 (m, 1H)	35.45
6'-Hb	3.20 (m, 1H)	3.15 (m, 1H)	
7'	-	-	200.69
8'	-	-	138.40
9'	8.57 (s, 1H)	8.26 (s, 1H)	129.96
10'	-	-	132.35
11'	8.21 (d, J= 7.80 Hz, 1H)	8.07 (d, J= 7.78 Hz, 1H)	134.81
12'	7.58 (t, J= 7.75 Hz, 1H)	7.45 (t, J= 7.78 Hz, 1H)	129.78
13'	8.15 (d, J= 7.80 Hz, 1H)	7.81 (d, J= 7.78 Hz, 1H)	132.68
14'	-	-	168.70

*Ο προσδιορισμός των ¹³C έγινε με τη χρήση των φασμάτων HSQC-DEPT και HMBC

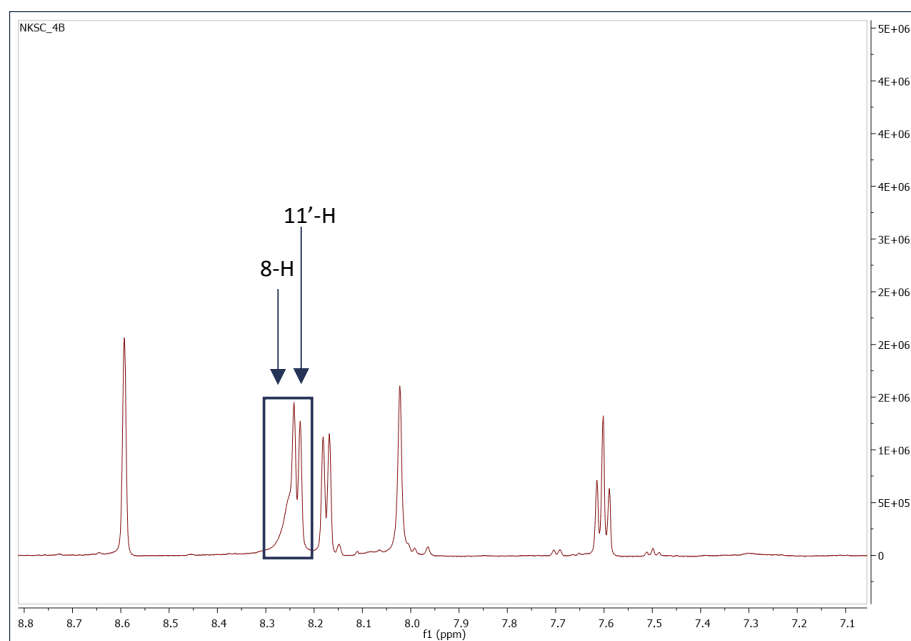


Εικόνα Γ.75. Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 11

Κατόπιν μελέτης της αρωματικής περιοχής του φάσματος ^1H NMR, παρατηρείται:

- Μία τριπλή κορυφή στα 7.58 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 7.75$ Hz, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 12'-H
- Μια απλή κορυφή στα 8.00 ppm, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 2-H
- Μία διπλή κορυφή στα 8.15 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 7.80$ Hz, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στα πρωτόνια 13'-H
- Μία διπλή κορυφή στα 8.21 ppm με σταθερά σύζευξης $J = 7.80$ Hz, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στα πρωτόνια 11'-H
- Μια απλή κορυφή στα 8.23 ppm, που ολοκληρώνει για 1H, και συμπίπτει με την κορυφή του 11'-H, όπως φαίνεται και στην Εικόνα Γ.78. Αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 8-H
- Μια απλή κορυφή στα 8.57 ppm, που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο 9'-H

Μέσω του φάσματος ετεροπυρηνικής συσχέτισης HSQC-DEPT, αποδόθηκαν οι μετατοπίσεις των παραπάνω ανθράκων, όπως φαίνονται στον Πίνακα Γ.22.

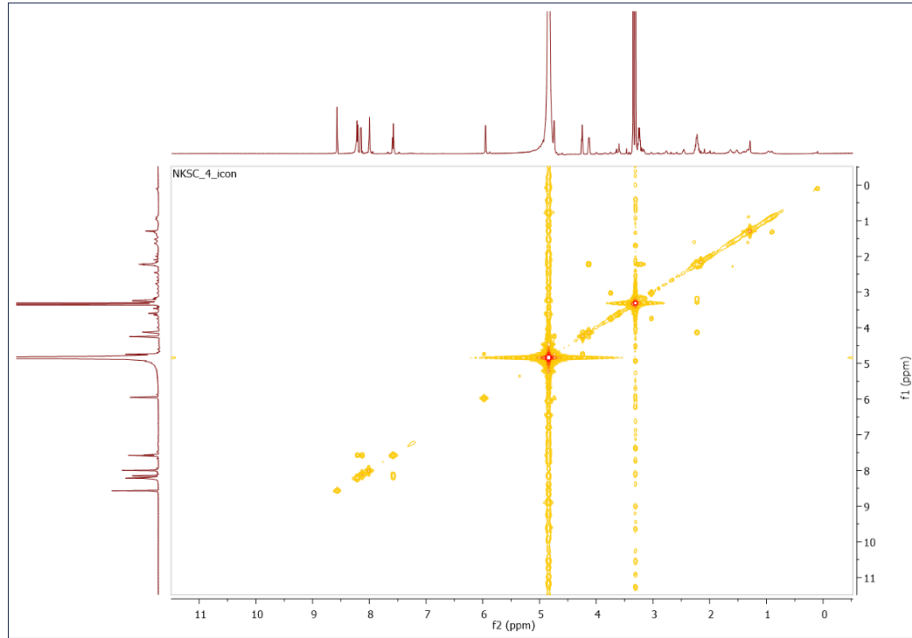


Εικόνα Γ.76. Αρωματική περιοχή φάσματος ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 11

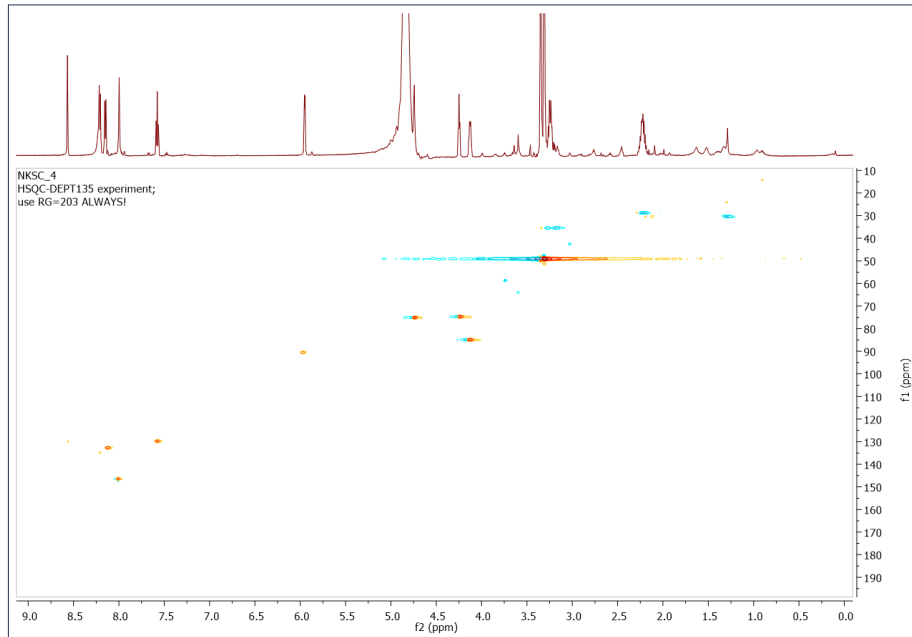
Από το φάσμα COSY, εμφανίζεται συσχέτιση μεταξύ του πρωτονίου 12'-H με τα 11'-H και 13'-H. Από το φάσμα ετεροπυρηνικής συσχέτισης HMBC, το 12'-H εμφανίζει συσχέτιση με τους άνθρακες C8' και C10', ενώ το 9'-H εμφανίζει συσχέτιση με τους άνθρακες C14' και C7'.

Από το φάσμα COSY, εμφανίζεται συσχέτιση μεταξύ του πρωτονίου 5'-H με τα 4'-H και 6'-H, του 3'-H με τα 2'-H και 4'-H και του ανωμερικού πρωτονίου 1'-H με το 2'-H. Από το φάσμα HSQC-DEPT, αποδόθηκαν οι παραπάνω άνθρακες (Πίνακας Γ.22).

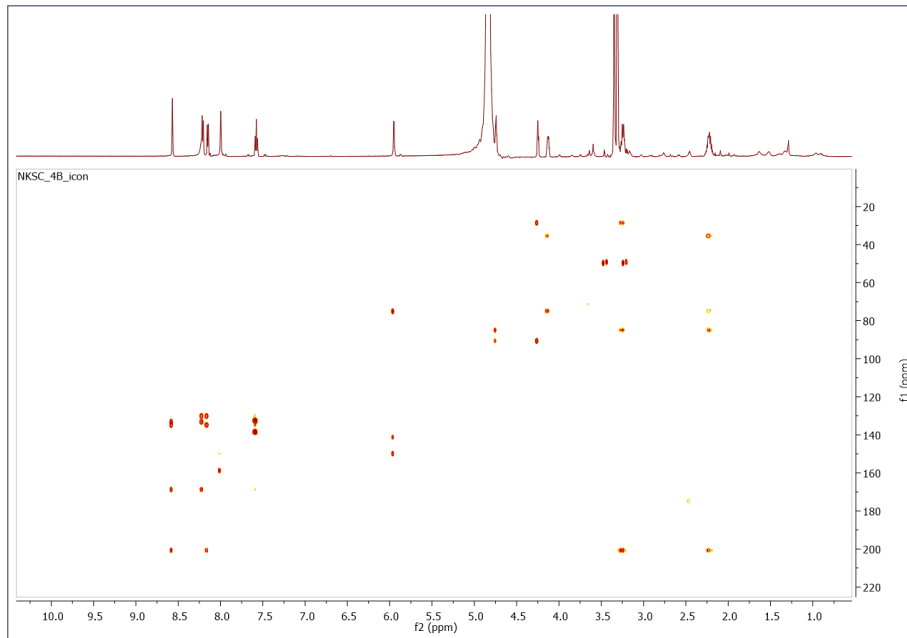
Μέσω του φάσματος HMBC, το πρωτόνιο 2-H εμφανίζει συσχέτιση με τους άνθρακες C4 και C6, ενώ το πρωτόνιο 1'-H εμφανίζει συσχέτιση με τους άνθρακες C4 και C8. Δυστυχώς, λόγω αλληλεπικάλυψης των κορυφών των πρωτονίων 8-H και 11'-H, όπως φαίνεται στην Εικόνα Γ.78, δεν ήταν δυνατή η απόδοση του άνθρακα C5 στο φάσμα HMBC.



Εικόνα Γ.77. Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 11

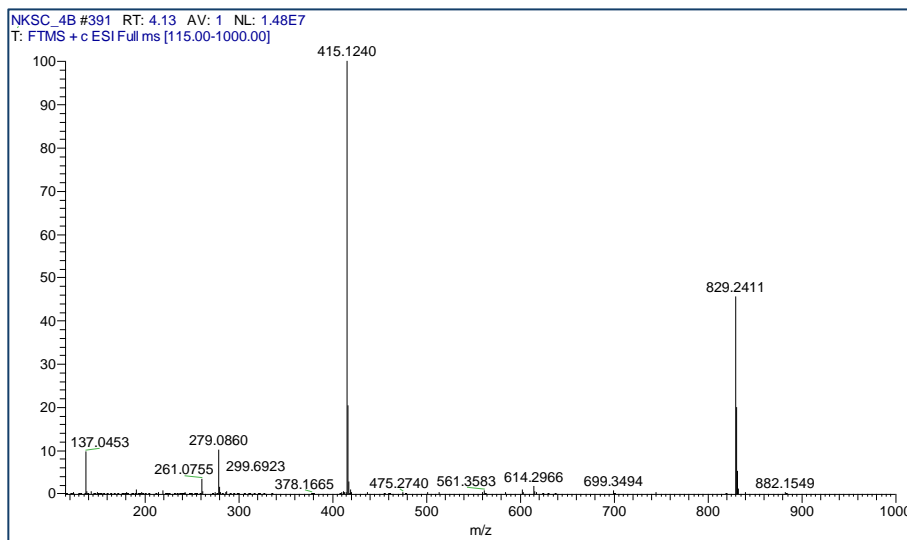


Εικόνα Γ.78. Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 11



Εικόνα Γ.79. Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 11

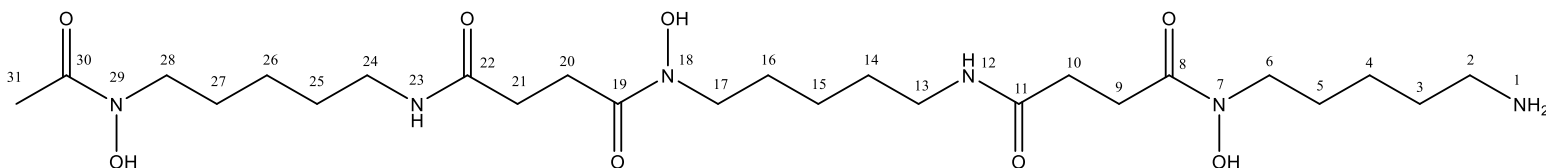
Στο φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS, εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα $m/z=415.1240$, γεγονός που, σε συνδυασμό με τη βιβλιογραφία (Hosokawa, N., et al., 1999), επιβεβαίωσε τον μοριακό τύπο του Μεταβολίτη 11 ως τον $C_{19}H_{18}N_4O_7$, με Accurate Mass= 414.1170.



Εικόνα Γ.80. Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 11

Γ.2.5.7. Μεταβολίτης 12 (NKSC3)

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Sekirouva, O. N., et al., 2016) και βάσει της ανάλυσης των 1D και 2D φασμάτων NMR, και του φασμάτος μάζας ESI(+) HR-MS, ο μεταβολίτης NKSC3 που απομονώθηκε από την HPLC του συνενωμένου κλάσματος (244-248) του CPC, όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο Γ.2.3, ταυτοποιήθηκε ως η δεφεροξαμίνη (deferoxamine).

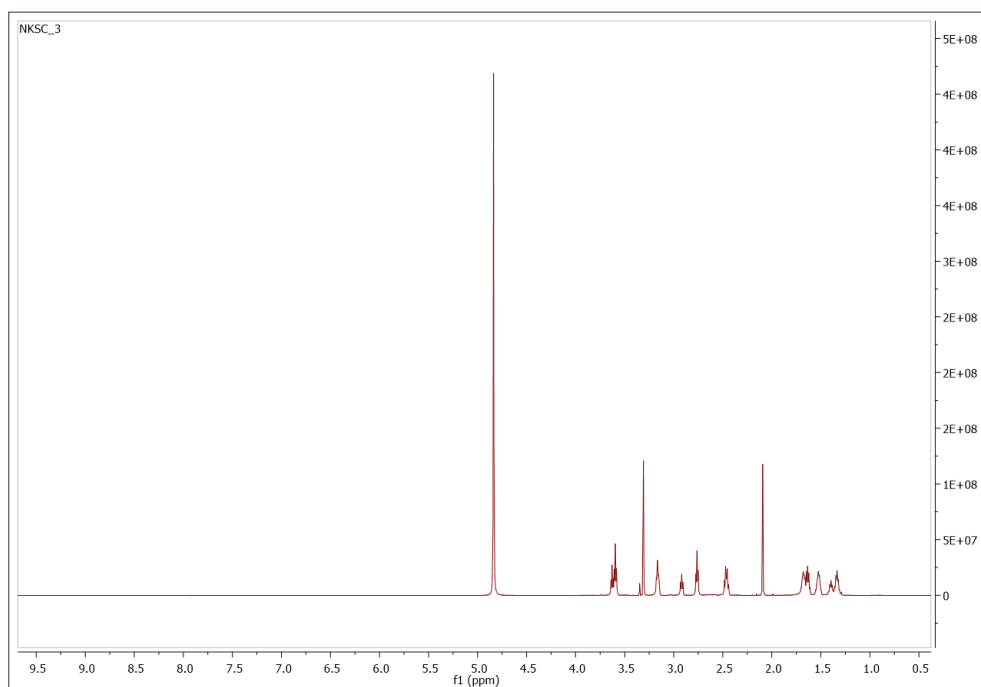


Εικόνα Γ.81. Δομή Δεφεροξαμίνης (Μεταβολίτης 12)

Πίνακας Γ.23. Χημικές μετατοπίσεις ^1H NMR του μεταβολίτη 12

Θέση	^1H NMR (600MHz, MeOD, δ ppm, J σε Hz)	^{13}C NMR* (600MHz, MeOD, δ ppm)
1	-	-
2	2.92 (t, J= 7.54 Hz, 2H)	40.30
3, 5	1.68 (m, 4H)	27.93
4	1.40 (m, 2H)	23.91
6	3.61 (t, J= 6.74 Hz, 2H)	48.38
7, 12, 18, 23, 29	-	-
8, 11, 19, 22	-	174.72
9, 20	2.76 (t, J=7.03 Hz, 4H)	28.51
10, 21	2.46 (t, J= 7.21 Hz, 4H)	31.06
13, 24	3.16 (m, 4H)	40.03
14, 25	1.52 (m, 4H)	29.72
15, 26	1.32 (m, 4H)	24.60
16,27	1.64 (m, 4H)	27.07
17,28	3.59 (t, J= 7.57 Hz, 4H)	48.38
30	-	173.53
31	2.12 (s, 3H)	19.89

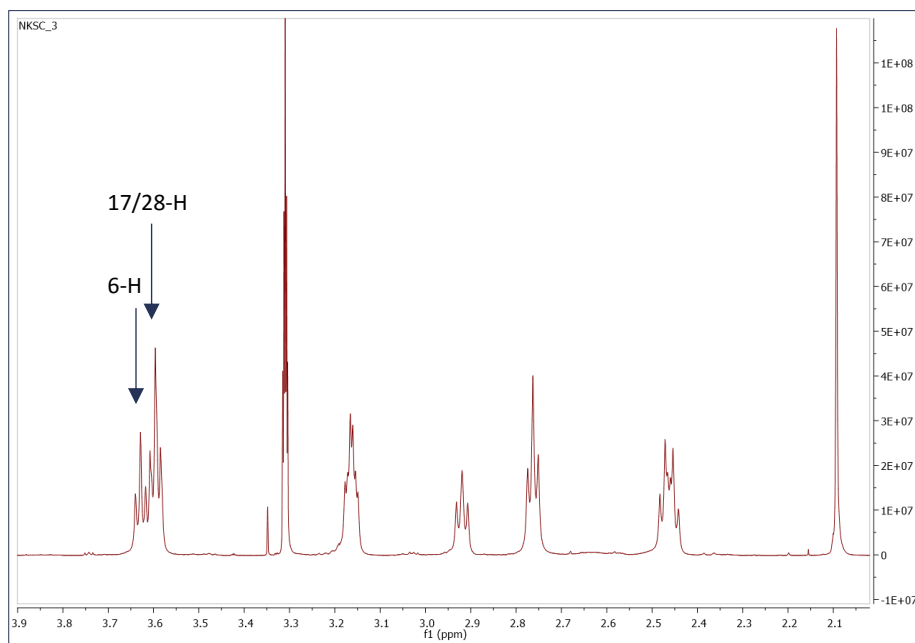
*Ο προσδιορισμός των ^{13}C έγινε με τη χρήση των φασμάτων HSQC-DEPT και HMBC



Εικόνα Γ.82. Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 12

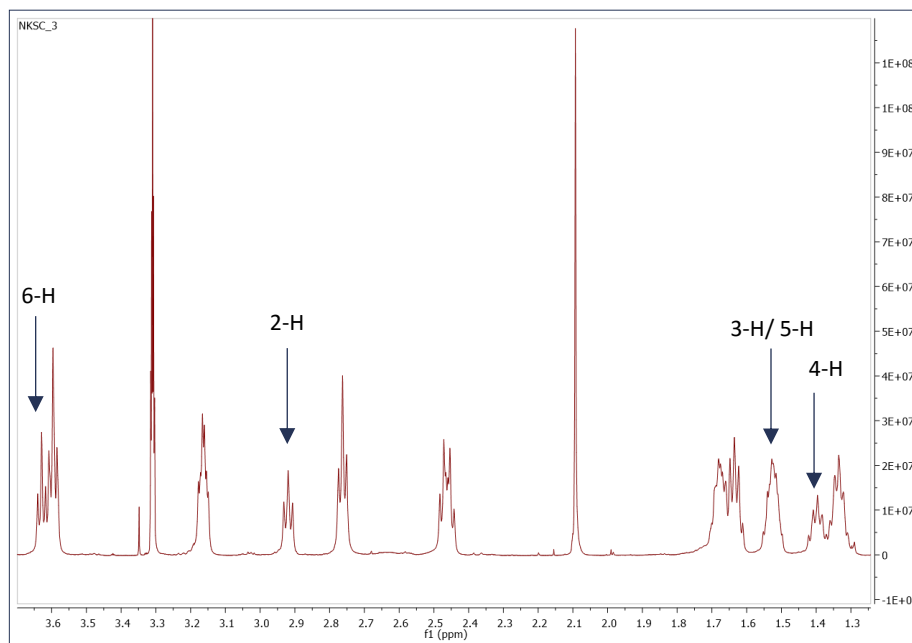
Κατόπιν μελέτης του φάσματος ^1H NMR (Εικόνα Γ.84), παρατηρείται απουσία σημάτων στην αρωματική περιοχή, κάτι που δηλώνει απουσία πρωτονίων σε αρωματικό δακτύλιο ή διπλούς δεσμούς.

Οι δύο τριπλές κορυφές του φάσματος ^1H NMR στα 3.61 ppm, που ολοκληρώνει για 1H, και στα 3.59 ppm, που ολοκληρώνει για 2H, με σταθερές σύζευξης $J= 6.74$ Hz και $J= 7.57$ Hz αντίστοιχα (Εικόνα Γ.85.), υποδηλώνουν την ύπαρξη πρωτονίων που ανήκουν σε άνθρακες που συνδέονται με άζωτο συνδεδεμένο με υδροξύλιο (N-OH). Από το φάσμα ετεροπυρηνικής συσχέτισης HSQC-DEPT, επιβεβαιώθηκε ότι τα συγκεκριμένα πρωτόνια ανήκουν σε δύο διαφορετικούς μεθυλενικούς άνθρακες που συμπίπτουν στα 48.38 ppm. Το γεγονός ότι και τα δύο αυτά σήματα αποδίδονται σε μεθυλενικούς άνθρακες, μας αποδεικνύει ότι η κορυφή στα 3.61 ppm ολοκληρώνει για 2H, ενώ η κορυφή στα 3.59 ppm ολοκληρώνει για 4H.



Εικόνα Γ.83. Φάσμα ^1H NMR. Τα 6-H και 17/28-H του Μεταβολίτη 12

Από το φάσμα ^1H -NMR παρατηρείται ότι, όπως και η τριπλή κορυφή στα 3.61 ppm, έτσι και η τριπλή κορυφή στα 2.92 ppm (με σταθερά σύζευξης $J = 7.54$ Hz) και η πολλαπλή κορυφή στα 1.40 ppm, ολοκληρώνουν επίσης για 1H. Η πολλαπλή κορυφή στα 1.68 ppm ολοκληρώνει για 2H. Από το φάσμα COSY, εμφανίζεται συσχέτιση των πρωτονίων στα 1.68 ppm με τα πρωτόνια στα 3.61 ppm, στα 1.40 ppm και στα 2.92 ppm. Από το φάσμα HSQC-DEPT, αποδεικνύεται ότι όλοι οι άνθρακες που αντιστοιχούν στα σήματα που αναφέρθηκαν είναι μεθυλενικοί, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι η κορυφή στα 1.68 ppm αντιστοιχεί σε 4H (δύο μεθυλενικοί άνθρακες που επαναλαμβάνονται), ενώ τα υπόλοιπα σήματα αντιστοιχούν σε 2H έκαστο. Έτσι, όπως φαίνεται και στον Πίνακα Γ.23, από το φάσμα COSY, εμφανίζεται συσχέτιση των 6-H (3.61 ppm) με τα 5-H (1.68 ppm), των 5-H με τα 4-H (1.40 ppm) και τα 6-H, των 4-H με τα 5-H και τα 3-H (1.68 ppm), και τέλος των 3-H με τα 2-H (2.92 ppm) και 4-H. Μέσω του φάσματος HSQC-DEPT, αποδόθηκαν οι άνθρακες C5 στα 27.93 ppm, C4 στα 23.91 ppm, C3 στα 27.93 ppm και C2 στα 40.30 ppm.

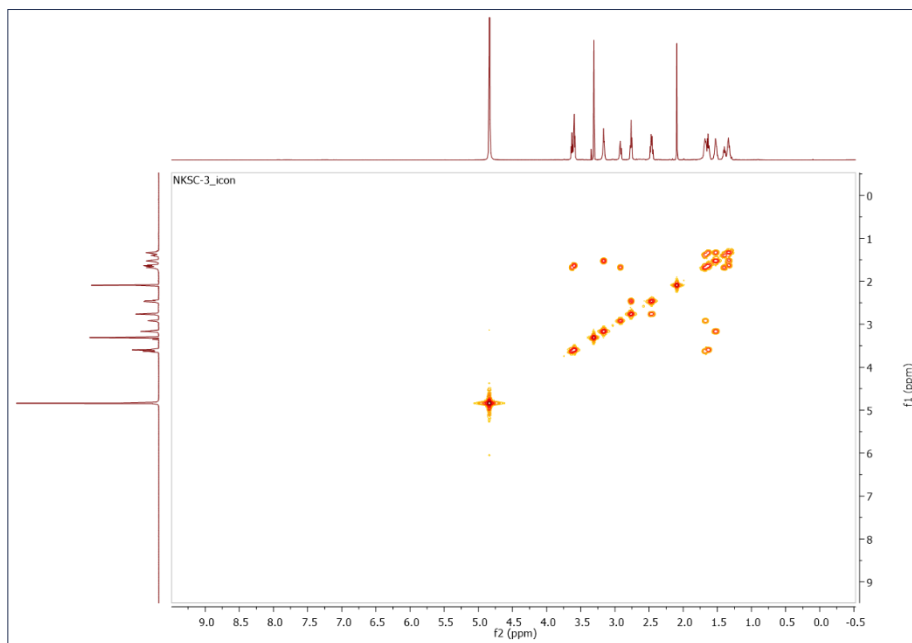


Εικόνα Γ.84. Απόδοση των 2-H, 3-H, 4-H, 5-H και 6-H στο φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 12

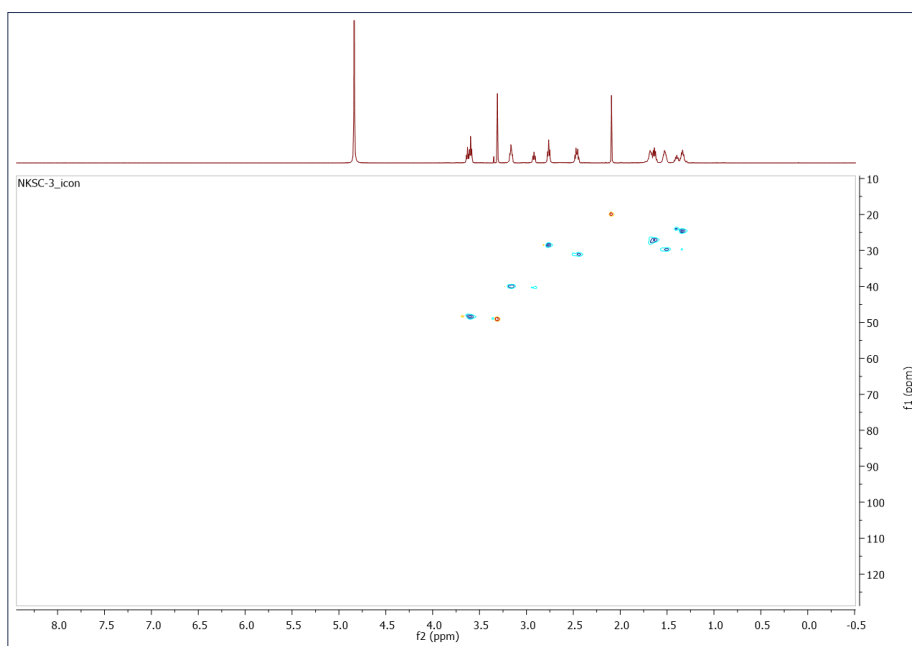
Οι δύο τριπλές κορυφές στα 2.76 ppm και 2.46 ppm με σταθερές σύζευξης $J=7.03$ Hz και $J=7.21$ Hz αντίστοιχα, που ολοκληρώνουν για 2H και επομένως αντιστοιχούν σε 4H η καθεμία, εμφανίζουν συσχέτιση στο φάσμα COSY και η μετατόπιση των ανθράκων τους δόθηκε μέσω του φάσματος ετεροπυρηνικής συσχέτισης HSQC-DEPT στα 28.51 ppm και 31.06 ppm αντίστοιχα. Από τις ετεροπυρηνικές συσχετίσεις HMBC του 9-H με τους άνθρακες 31.06 και 174.72, και του 10-H με τους άνθρακες 28.51 και 174.72, αποδώθηκε η διάταξή τους. Η ολοκλήρωση του συγκεκριμένου τμήματος του μορίου υποδηλώνει την επανάληψή του δύο φορές.

Από το φάσμα COSY, η τριπλή κορυφή στα 3.59 ppm που αντιστοιχεί στο 17-H εμφανίζει συσχέτιση με το 16-H (πολλαπλή κορυφή στα 1.64 ppm), το 16-H με το 17-H και το 15-H (πολλαπλή κορυφή στα 1.32 ppm), το 15-H με το 16-H και το 14-H (πολλαπλή κορυφή στα 1.52 ppm), το 14-H με το 15-H και το 13-H (πολλαπλή κορυφή στα 3.16 ppm) και το 13-H με το 14-H. Μέσω του φάσματος HSQC-DEPT, αποδώθηκαν οι μεθυλενικοί άνθρακες C16 στα 27.07 ppm, C15 στα 24.60 ppm, C14 στα 29.72 ppm και C13 στα 40.03 ppm. Για ακόμη μία φορά, η ολοκλήρωση υποδηλώνει την επανάληψη του συγκεκριμένου τμήματος του μορίου δύο φορές.

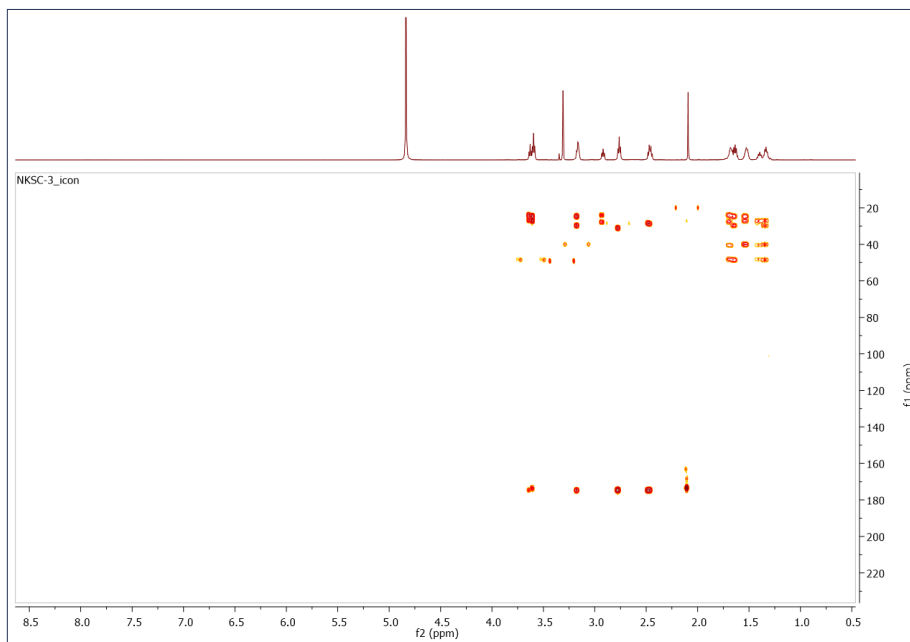
Τέλος, από το φάσμα ^1H -NMR και HSQC-DEPT παρατηρείται ότι η μονή κορυφή στα 2.12 ppm που ολοκληρώνει για 1.5H (και άρα αντιστοιχεί σε 3H) παρουσιάζει σύζευξη με τον άνθρακα C31 στα 19.89 ppm, ενώ από το φάσμα HMBC εμφανίζει ετεροπυρηνική συσχέτιση με τον άνθρακα στα 173.53 ppm.



Εικόνα Γ.85. Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 12

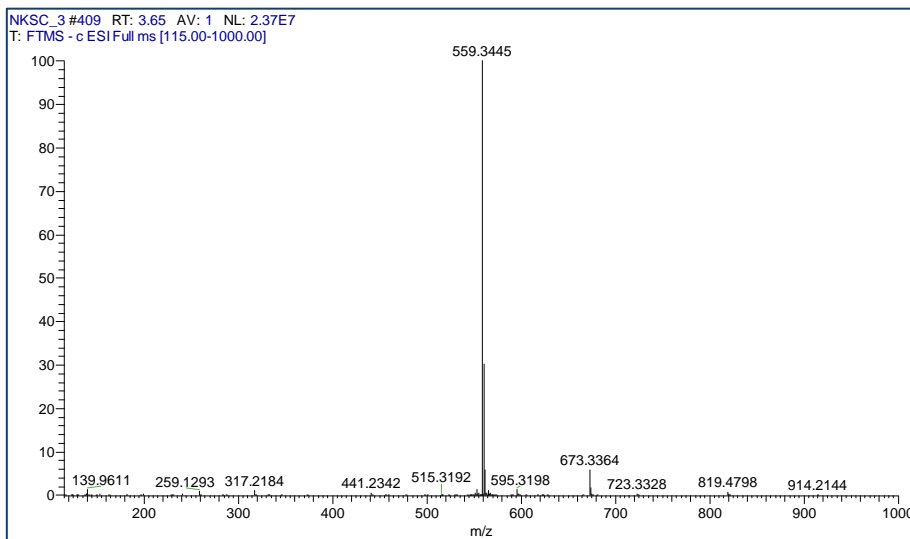


Εικόνα Γ.86. Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 12



Εικόνα Γ.87. Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 12

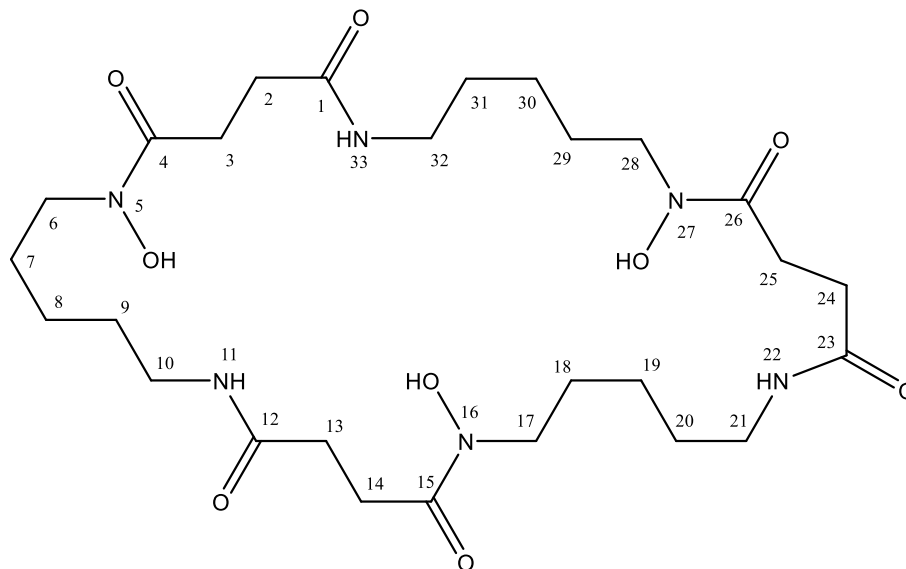
Η ανάλυση των 1D και 2D φασμάτων και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με των προτεινόμενων από τη βιβλιογραφία (Sekirouga, O. N., et al., 2016) μας έδωσαν τη δυνατότητα να προσδιορίσουμε το μοριακό τύπο του Μεταβολίτη 12 ως $C_{25}H_{48}N_6O_8$ με Accurate Mass= 560.3528. Ο μοριακός τύπος επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS, στο οποίο εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα $m/z=559.3445$.



Εικόνα Γ.88. Φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS για τον Μεταβολίτη 12

Γ.2.5.8. Μεταβολίτης 13 (NKSC23)

Ο μεταβολίτης που απομονώθηκε απευθείας από το συνενωμένο κλάσμα (131-136) του CPC όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο Γ.2.3, αναγνωρίστηκε ως η νοκαρδαμίνη (nocardamine), η οποία έχει απομονωθεί ξανά από το *Streptomyces hygroscopicus gedanus* (DeBoer, C., & Dietz, A., 1976). Η μελέτη των φασμάτων NMR 1D και 2D του μεταβολίτη και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με τις τιμές που προτείνονται από την βιβλιογραφία (Wang, G.-Y.-S., et al., 2000) είχαν σαν αποτέλεσμα την ταυτοποίηση του μεταβολίτη (Εικόνα Γ.91).

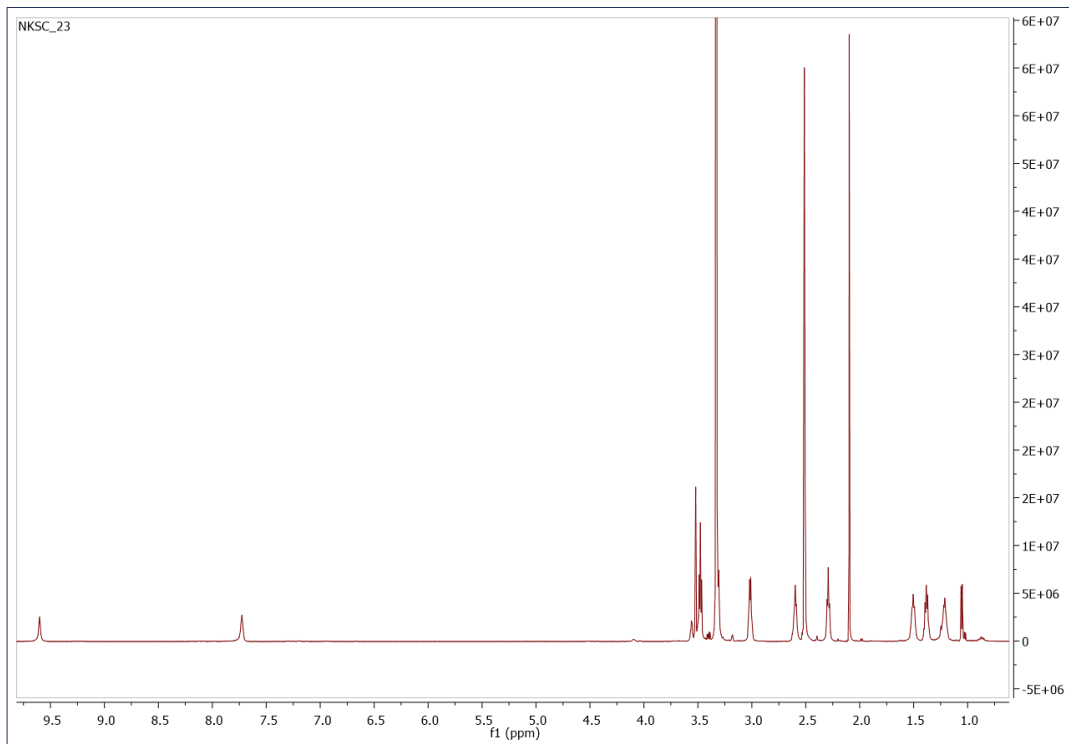


Εικόνα Γ.89. Δομή Νοκαρδαμίνης (Μεταβολίτης 13)

Πίνακας Γ.24. Χημικές μετατοπίσεις ¹H NMR του μεταβολίτη 13

Θέση	¹ H NMR (600MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm, J σε Hz)	¹³ C NMR* (600MHz, DMSO-d ₆ , δ ppm)
1, 12, 23	-	171.25
4, 15, 26	-	171.79
2, 13, 24	2.28 (t, J= 6.89 Hz, 6H)	29.67
3, 14, 25	2.59 (t, J= 6.89 Hz, 6H)	27.19
6, 17, 28	3.46 (t, J= 6.83 Hz, 6H)	46.52
7, 18, 29	1.49 (m, 6H)	25.56
8, 19, 30	1.20 (m, 6H)	22.82
9, 20, 31	1.37 (m, 6H)	28.22
10, 21, 32	3.00 (m, 6H)	38.03
NH	7.71 (s, 3H)	-
OH	9.59 (s, 3H)	-

*Ο προσδιορισμός των ¹³C έγινε με τη χρήση των φασμάτων HSQC-DEPT και HMBC



Εικόνα Γ.90. Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 13

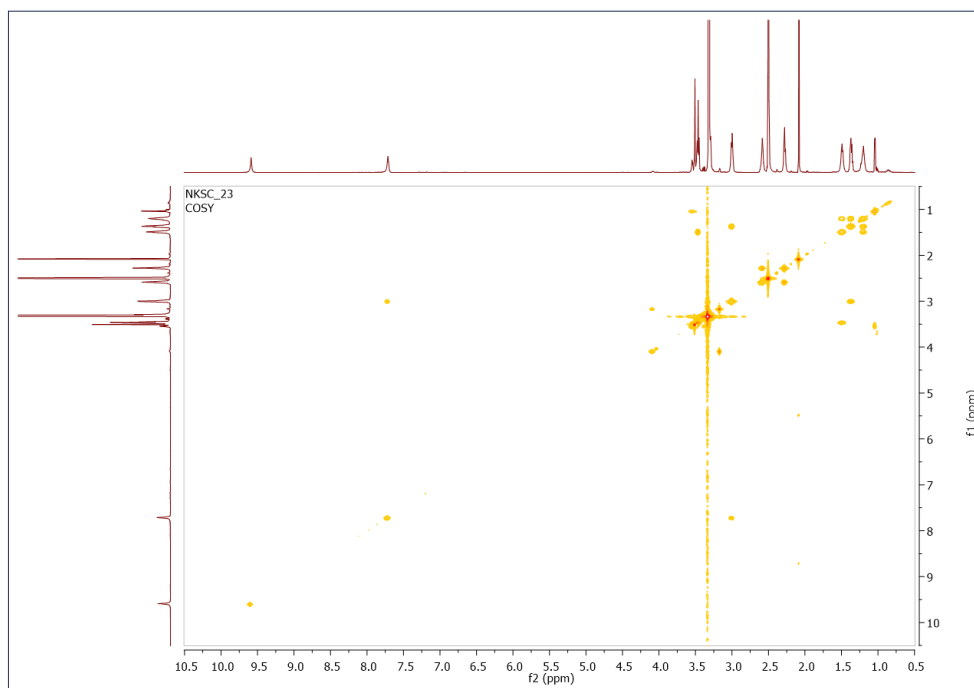
Κατόπιν μελέτης της αρωματικής περιοχής του φάσματος ^1H NMR, παρατηρείται:

- Μία μονή κορυφή στα 9.59 ppm που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο OH
- Μία μονή κορυφή στα 7.71 ppm που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στα πρωτόνια NH

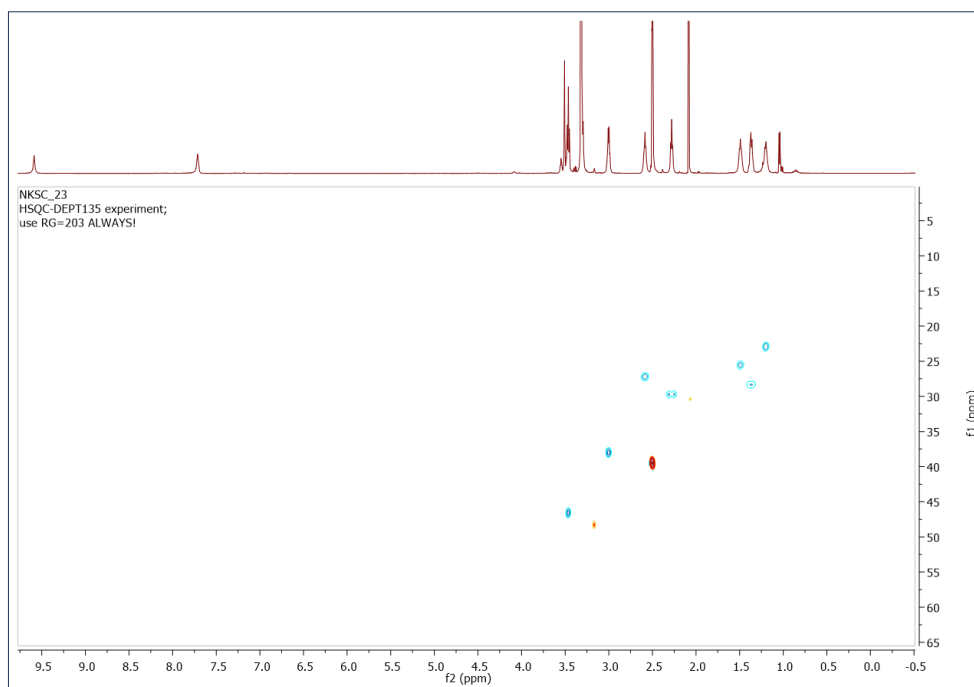
Μέσω του φάσματος ετεροπυρηνικής συσχέτισης HSQC-DEPT, επιβεβαιώθηκε ότι τα συγκεκριμένα πρωτόνια δεν αποδίδονται σε άνθρακα.

Οι δύο τριπλές κορυφές στα 2.59 ppm και 2.28 ppm με σταθερά σύζευξης $J=6.89$ Hz, που ολοκληρώνουν για 2H η καθεμία, εμφανίζουν συσχέτιση στο φάσμα COSY και η μετατόπιση των ανθράκων τους δόθηκε μέσω του φάσματος ετεροπυρηνικής συσχέτισης HSQC-DEPT στα 27.19 ppm και 29.67 ppm αντίστοιχα. Από τις ετεροπυρηνικές συσχετίσεις HMBC του 2-H με τους άνθρακες 27.19 και 171.79, και του 3-H με τους άνθρακες 29.67 και 171.25 αποδόθηκε η διάταξή τους.

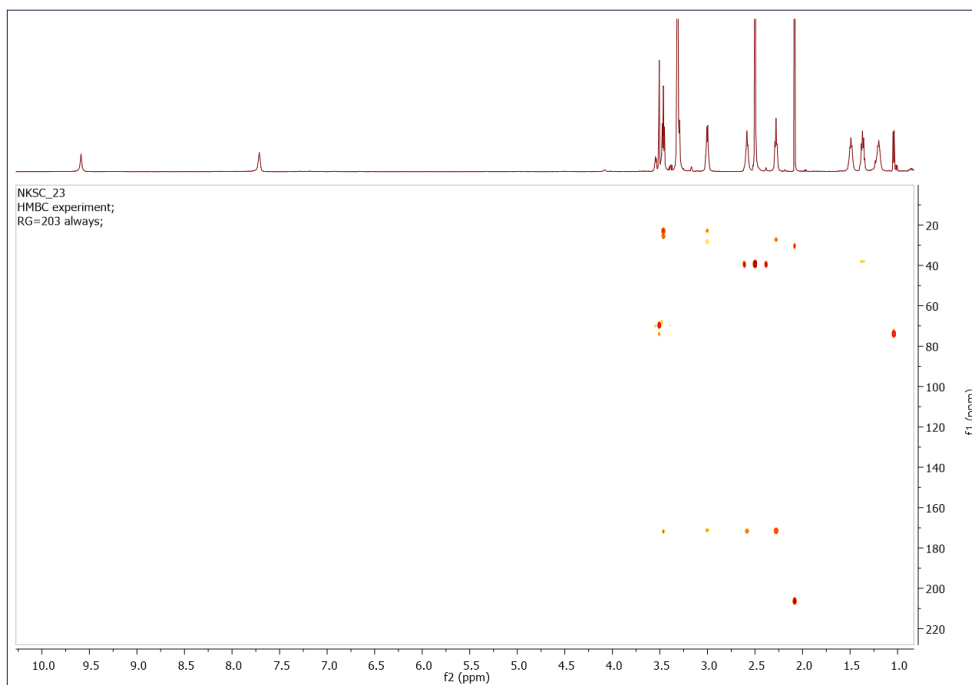
Από το φάσμα ^1H -NMR και HSQC-DEPT παρατηρείται ότι η τριπλή κορυφή με σταθερά σύζευξης $J=6.83$ Hz στα 3.46 ppm που ολοκληρώνει για 2H, παρουσιάζει σύζευξη με τον άνθρακα C6 στα 46.52 ppm, ο οποίος συνδέεται με N-OH. Από το φάσμα COSY, εμφανίζεται συσχέτιση του 6-H με το 7-H (πολλαπλή κορυφή στα 1.49 ppm), του 7-H με το 6-H και το 8-H (πολλαπλή κορυφή στα 1.20 ppm), του 8-H με το 7-H και το 9-H (πολλαπλή κορυφή στα 1.37 ppm), του 9-H με το 8-H και το 10-H (πολλαπλή κορυφή στα 3.00 ppm) και του 10-H με το 9-H και το N-H. Μέσω του φάσματος HSQC-DEPT, αποδόθηκαν οι άνθρακες C7 στα 25.56 ppm, C8 στα 22.82 ppm, C9 στα 28.22 ppm και C10 στα 38.03 ppm.



Εικόνα Γ.91. Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 13

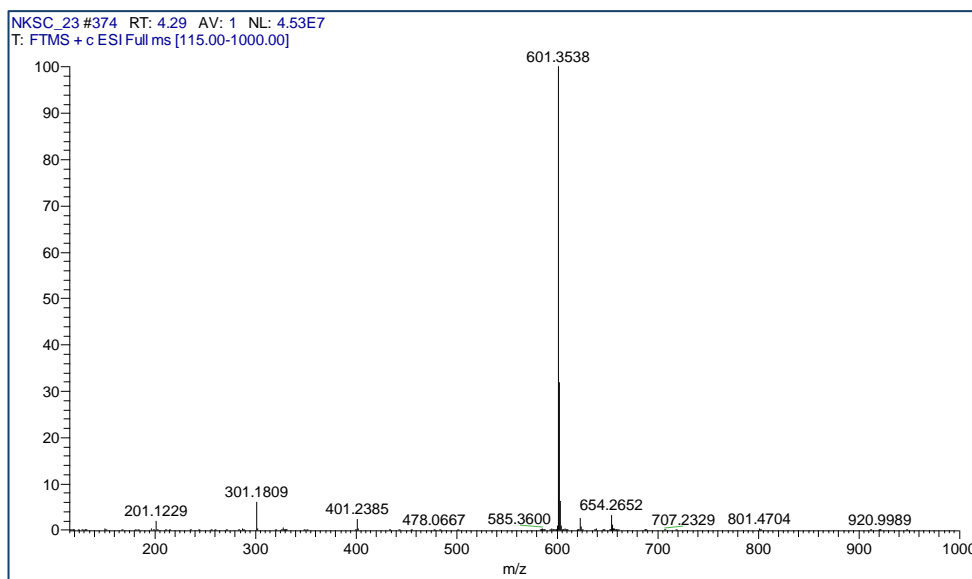


Εικόνα Γ.92. Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 13



Εικόνα Γ.93. Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 13

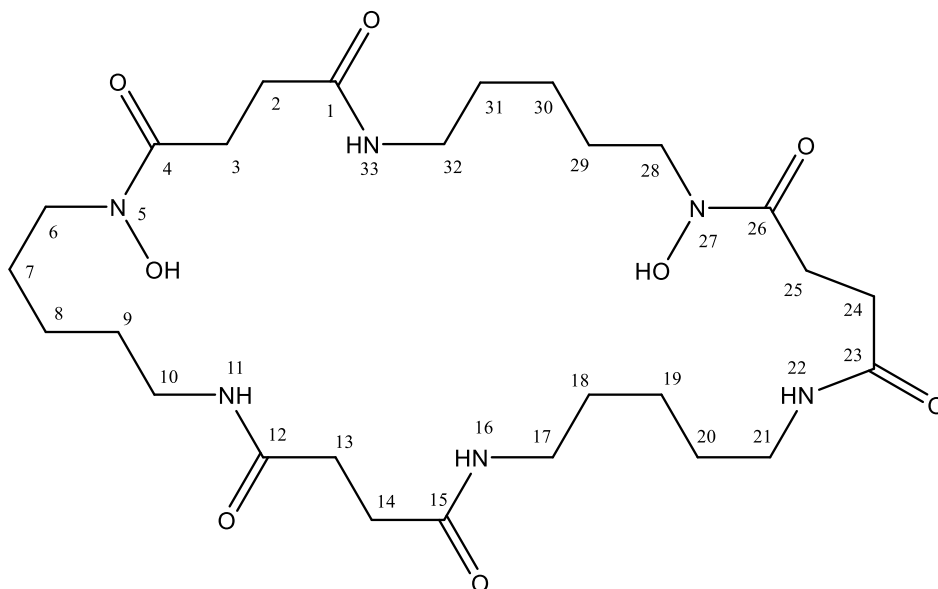
Η ανάλυση των 1D και 2D φασμάτων και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με των προτεινόμενων από τη βιβλιογραφία (Wang, G.-Y.-S., et al., 2000) μας έδωσαν τη δυνατότητα να προσδιορίσουμε το μοριακό τύπο του Μεταβολίτη 13 ως $C_{27}H_{48}N_6O_9$ με Accurate Mass= 600.3477, κάτι που υποδηλώνει την επανάληψη του συγκεκριμένου τμήματος του μορίου τρεις φορές. Ο μοριακός τύπος επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS στο οποίο εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα $m/z=601.3538$.



Εικόνα Γ.94. Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 13

Γ.2.5.9. Μεταβολίτης 14 (NKSC9b)

Χημικό ανάλογο της νοκαρδαμίνης (NKSC23), η δεοξυνοκαρδαμίνη χαρακτηρίζεται από την απουσία υδροξυλίου στη θέση 16 (Εικόνα Γ.97). Έχει απομονωθεί και αυτή στο παρελθόν από ακτινομύκητες του γένους *Streptomyces* που ζουν σε αταυτοποίητους θαλάσσιους σπόγγους (Lee, H.-S., et al., 2005). Απομονώθηκε σε μίγμα με τον Μεταβολίτη 6 (Θυμιδίνη - NKSC9a) από τα συνενωμένα κλάσματα (142-143) και (144-151) του CPC με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Preparative TLC), όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο Γ.2.3. Με ανάλυση των 1D και 2D φασμάτων NMR, σε συνδυασμό με τη βιβλιογραφία (Lee, H.-S., et al., 2005), οδηγηθήκαμε στην ταυτοποίηση της δομής του μεταβολίτη.

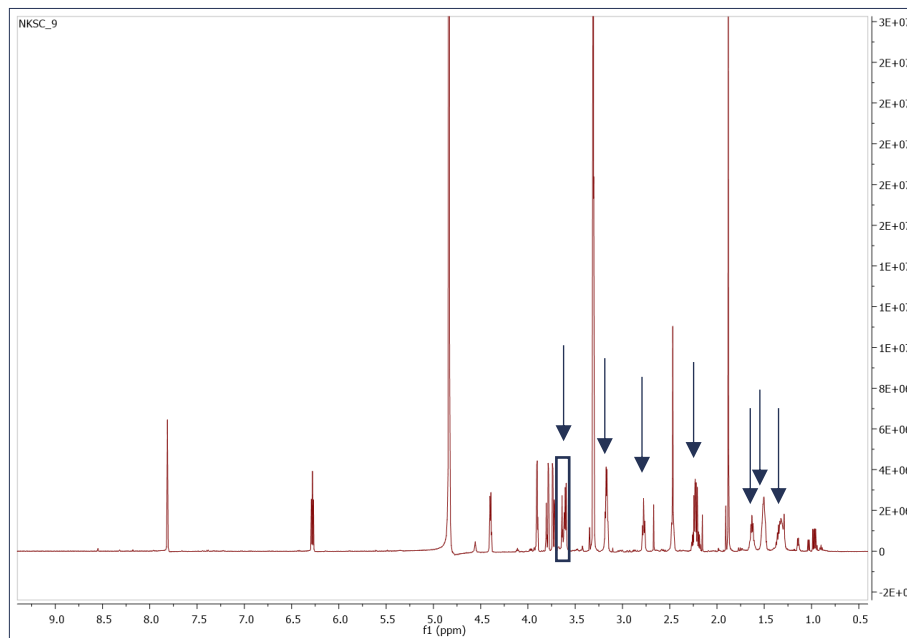


Εικόνα Γ.95. Δομή Δεοξυνοκαρδαμίνης (Μεταβολίτης 14)

Πίνακας Γ.25. Χημικές μετατοπίσεις ¹H NMR του μεταβολίτη 14

Θέση	¹ H NMR (600MHz, MeOD, δ ppm, J σε Hz)	¹³ C NMR* (600MHz, MeOD, δ ppm)
1, 12, 15, 23	-	174.49
2, 24	2.47 (t, J= 6.25 Hz, 4H)	31.64
13, 14	2.47 (s, 4H)	31.64
3, 25	2.78 (t, J= 7.06 Hz, 4H)	28.68
4, 26	-	174.22
6, 28	3.61 (t, J= 6.37 Hz, 4H)	48.39
7, 29	1.63 (m, 4H)	26.92
8, 19, 30	1.32 (m, 6H)	24.43
9, 18, 20, 31	1.51 (m, 8H)	29.60
10, 17, 21, 32	3.17 (m, 8H)	39.95

*Ο προσδιορισμός των ¹³C έγινε με τη χρήση των φασμάτων HSQC-DEPT και HMBC



Εικόνα Γ.96. Φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 14

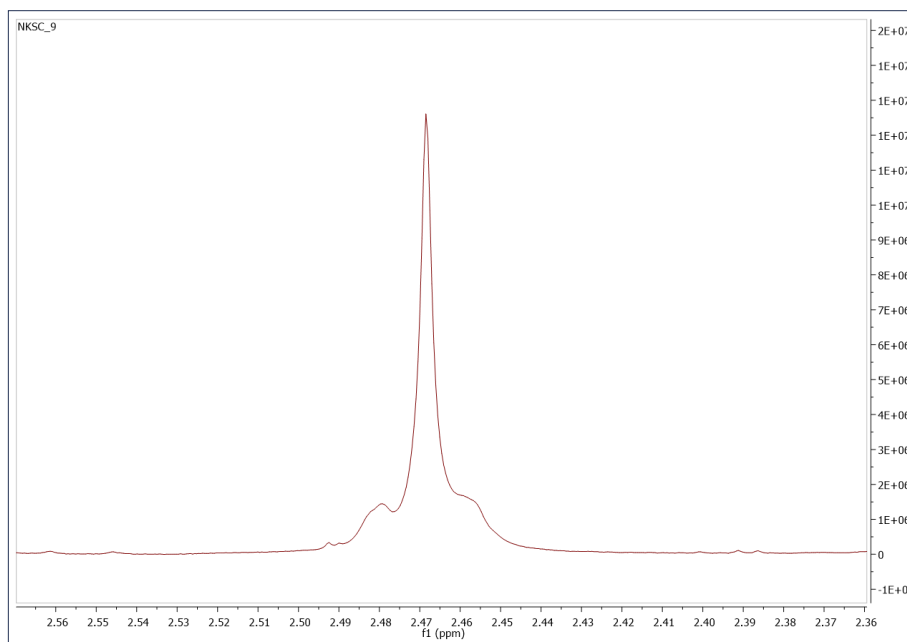
Κατόπιν μελέτης του φάσματος ^1H NMR (Εικόνα Γ.98), παρατηρείται απουσία σημάτων στην αρωματική περιοχή που να αντιστοιχούν στο συγκεκριμένο μεταβολίτη, μιας και τα σήματα στα 7.81 ppm και 6.28 ppm, αποδίδονται στον Μεταβολίτη 6, με τον οποίο βρίσκεται σε μίγμα. Αυτό δηλώνει απουσία πρωτονίων σε αρωματικό δακτύλιο ή διπλούς δεσμούς.

Δεδομένης της δομικής αναλογίας του Μεταβολίτη 14 και του Μεταβολίτη 13, παρατηρείται μεγάλη ομοιότητα στα φάσματα ^1H NMR τους (Εικόνες Γ.92 και Γ.98). Η τριπλή κορυφή του φάσματος ^1H NMR του Μεταβολίτη 14 στα 3.61 ppm, με σταθερά σύζευξης $J = 6.37$ Hz, ολοκληρώνει για 1H και αποδίδεται στους άνθρακες C6 και C28, οι οποίοι βρίσκονται δίπλα σε άζωτο συνδεδεμένο με υδροξύλιο (N-OH), όπως και στον Μεταβολίτη 13. Από το φάσμα ετεροπυρηνικής συσχέτισης HSQC-DEPT, επιβεβαιώθηκε ότι οι συγκεκριμένοι άνθρακες είναι μεθυλενικοί και συμπίπτουν στα 48.39 ppm. Επομένως, το συγκεκριμένο σήμα αντιστοιχεί σε 4H. Από τα φάσματα ομοπυρηνικής συσχέτισης COSY και ετεροπυρηνικής συσχέτισης HMBC, επιβεβαιώνεται η συσχέτιση των πρωτονίων στα 3.61 ppm με τα πρωτόνια στα 1.63 ppm, ενώ επιβεβαιώνεται και η διάταξη των 7/29-H, 8/30-H, 9/31-H και 10/32-H.

Η πολλαπλή κορυφή στα 3.17 ppm ολοκληρώνει για 2H, και επομένως αντιστοιχεί σε 8H, κάτι που επιβεβαιώνει την απουσία υδροξυλίου στο ένα από τα τρία τμήματα του μορίου, τα οποία επαλαμβάνονται στον Μεταβολίτη 13. Οι πολλαπλές κορυφές στα 1.63 ppm, στα 1.51 ppm και στα 1.32 ppm ολοκληρώνουν για 1H, 2H και 1,5H, και επομένως για 4H, 8H και 6H αντίστοιχα. Έτσι επιβεβαιώνεται και η διάταξη των 17-H, 18-H, 19-H, 20-H και 21-H.

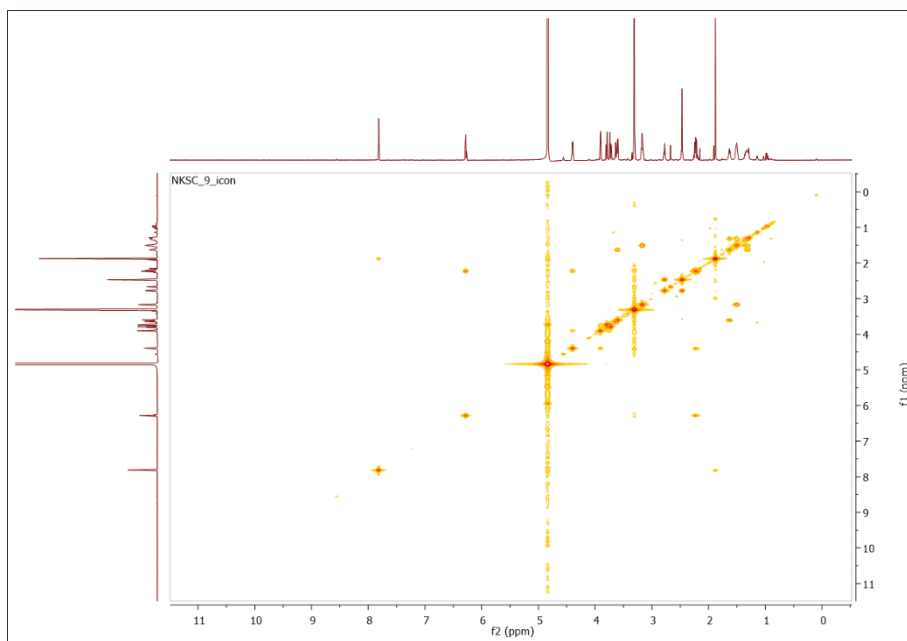
Η απουσία υδροξυλίου στη θέση 16 επιβεβαιώθηκε και από την ολοκλήρωση των δύο τριπλών κορυφών στα 2.78 και 2.47 ppm, με σταθερές σύζευξης $J = 7.06$ Hz και $J = 6.25$ Hz αντίστοιχα, η

οποία αντιστοιχεί σε 1H και 2H, και επομένως σε 4H και 8H αντίστοιχα. Από το φάσμα COSY, επιβεβαιώθηκε συσχέτιση των δύο αυτών σημάτων, ενώ στα 2.47 ppm συμπίπτει η τριπλή κορυφή των 2/24-H από τη συσχέτισή τους με τα 3/25-H, με την απλή κορυφή των 13-H και 14-H από τη μεταξύ τους συσχέτιση (Εικόνα Γ.99). Όλες οι ολοκληρώσεις που αναφέρθηκαν, καθώς και οι χημικές μετατοπίσεις, επιβεβαιώνονται και από τη βιβλιογραφία (Lee, H.-S., et al., 2005).

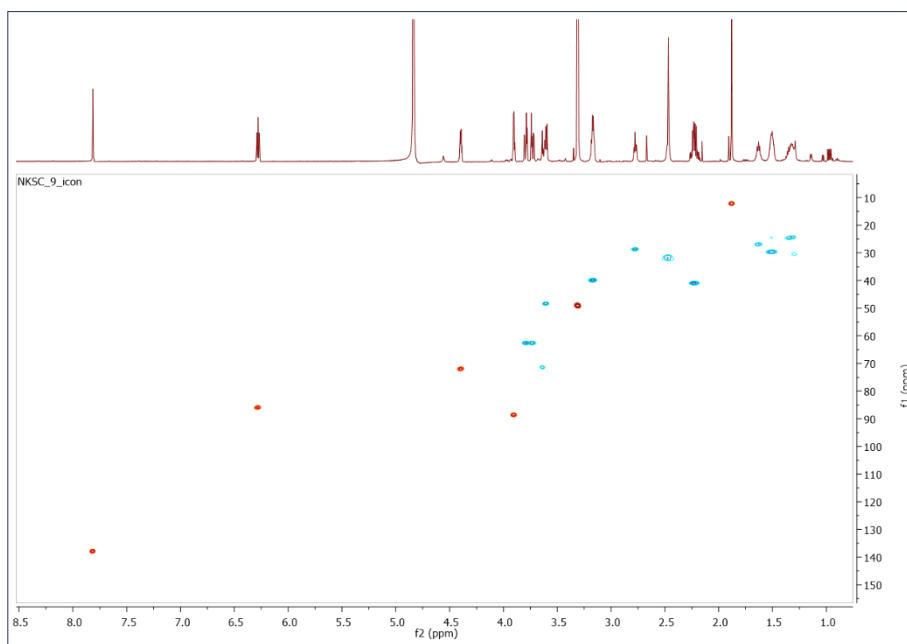


Εικόνα Γ.97. Η τριπλή κορυφή των 2/24-H ($J = 6.25$ Hz) συμπίπτει με την απλή κορυφή των 13/14-H στα 2.47 ppm στο φάσμα ^1H NMR για τον Μεταβολίτη 14

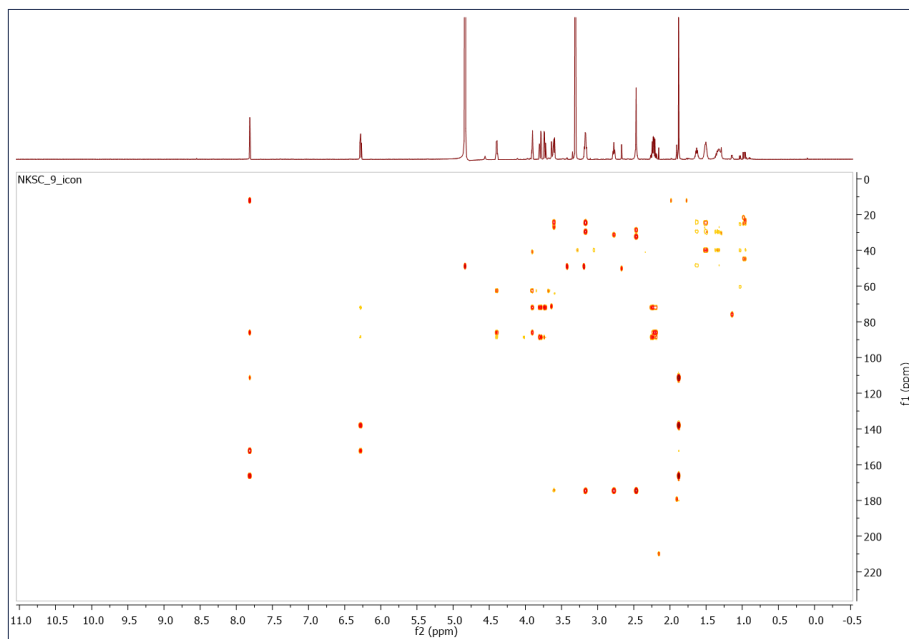
Μέσω του φάσματος ετεροπυρηνικής συσχέτισης HSQC-DEPT, αποδόθηκαν όλες οι μετατοπίσεις των ανθράκων, όπως φαίνονται στον Πίνακα Γ.25.



Εικόνα Γ.98. Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 14

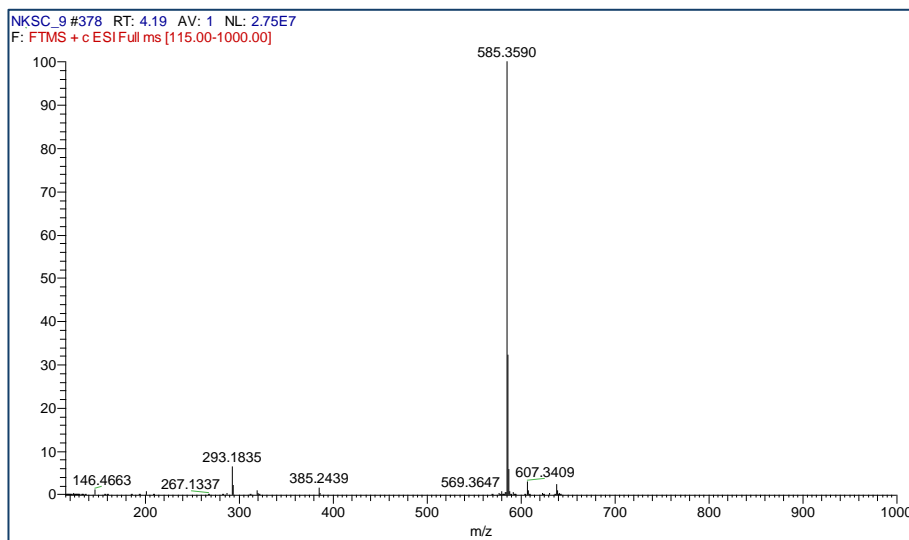


Εικόνα Γ.99. Φάσμα HSQC-DEPT για τον Μεταβολίτη 14



Εικόνα Γ.100. Φάσμα HSBC για τον Μεταβολίτη 14

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το μοριακό βάρος της δεοξυνοκαρδαμίνης είναι το Accurate Mass=584.3528 και ο μοριακός τύπος της ο $C_{27}H_{48}N_6O_8$, κάτι που επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS στο οποίο εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα $m/z=585.3590$.



Εικόνα Γ.101. Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 14

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από προηγούμενες μελέτες στα πλαίσια του προγράμματος Microsmetics, επιλέχθηκαν τα 20 πιο δραστικά στελέχη μικροοργανισμών από την παγκόσμια βιοποικιλότητα (19 στελέχη καλλιεργούμενα με 14 διαφορετικά καλλιεργητικά μέσα) που είναι δυνατόν να παράξουν μεταβολίτες που μπορούν να αξιοποιηθούν στον τομέα των καλλυντικών προϊόντων. Ανάμεσα σε αυτά βρίσκονταν 8 στελέχη μυκήτων και 12 στελέχη ακτινομύκητων (8 εκ των οποίων είναι στρεπτομύκητες). Τα δραστικά στελέχη καλλιεργήθηκαν σε μεγάλη κλιμακα (1L) με το βέλτιστο καλλιεργητικό μέσο.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, από τους 8 στρεπτομύκητες, οι 4 εμφάνισαν αντιοξειδωτική δράση, ενώ δύο από αυτούς εμφάνισαν δράση και στο 26S πρωτεάσωμα. Αυτά τα δύο στελέχη, τα οποία ήταν το *Streptomyces spinoverrucosus* (CA-218259) και το *Streptomyces chartreusis* (CA-126581), επιλέχθηκαν για περαιτέρω μελέτη και βιοκατευθυνόμενη απομόνωση των δευτερογενών τους μεταβολιτών.

Τα εκχύλισμα Χad4-EtOH και EtOH του *Streptomyces spinoverrucosus* (CA-218259), καθώς και το εκχύλισμα Χad4-EtOH του *Streptomyces chartreusis* (CA-126581) κατέδειξαν αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση ($31.36\% \pm 0.26$ και $26,21\% \pm 0,22$ ποσοστό δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH στα 200 μg/ml αντίστοιχα, για τον CA-218259 και $43.69\% \pm 1.42$ για τον CA-126581). Λόγω παρόμοιου ποσοστού αναστολής της ελεύθερης ρίζας DPPH μεταξύ των εκχυλισμάτων Χad4-EtOH και EtOH του CA-218259, πιο πλούσιου χημικού προφίλ του εκχυλίσματος EtOH, καθώς και λόγω μεγαλύτερης ανάκτησης βιομάζας στην απευθείας εκχύλιση με EtOH, επιλέχθηκε το εκχύλισμα EtOH για την βιοκατευθυνόμενη απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών που περιέχει και στους οποίους οφείλεται η συγκεκριμένη δράση για τον *Streptomyces spinoverrucosus*. Για τον *Streptomyces chartreusis*, επιλέχθηκε το εκχύλισμα Χad4-EtOH. Κατά τον βιολογικό έλεγχο σε κυτταρικές σειρές των επιλεχθέντων εκχυλισμάτων, το αιθανολικό εκχύλισμα του *Streptomyces spinoverrucosus* εμφάνισε ενεργοποίηση της δραστηριότητας του 26S πρωτεασώματος, ενώ το εκχύλισμα Χad4-EtOH του *Streptomyces chartreusis* εμφάνισε αναστολή του.

Η ανάλυση και κλασμάτωση των εκχυλισμάτων αυτών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ταυτόχρονα κλασικές χρωματογραφικές μεθόδους (ημι-παρασκευαστική HPLC, παρασκευαστική TLC), καθώς και πιο καινοτόμες τεχνικές, όπως FCPC, με αποτέλεσμα την βιοκατευθυνόμενη απομόνωση και ταυτοποίηση των κατόθι:

- πέντε μεταβολιτών του στελέχους CA-218259, οι οποίοι περιλαμβάνουν τις γνωστές ενώσεις (E)-ουροκανικό οξύ, Κυκλο-[Γλυκυλ-Προλίνη], Κυκλο-[Γλυκυλ-Αλανίνη], 4-μεθυλαμινοβενζοϊκό οξύ, καθώς και L-τρυπτοφάνη, η οποία επιβεβαιώθηκε ότι αποτελεί συστατικό του θρεπτικού υλικού. Το (E)-ουροκανικό οξύ αποδείχθηκε ότι στη βιοδοκιμή σε κυτταρικές σειρές ενεργοποιεί τη δράση του 26S πρωτεασώματος. Μελλοντικά,

αναμένεται να ολοκληρωθούν οι βιοδοκιμές και για τους υπόλοιπους μεταβολίτες τόσο σε κυτταρικές σειρές όσο και για αντιοξειδωτική δράση.

- εννέα μεταβολιτών του στελέχους CA-126581, οι οποίοι περιλαμβάνουν τις γνωστές ενώσεις νοκαρδαμίνη, δεφεροξαμίνη, φουταλοσίνη, δεοξυνοκαρδαμίνη, θυμιδίνη, 2'-δεοξουριδίνη, 2'-δεοξυαδενοσίνη, 2'-δεοξυγουανοσίνη και 2'-δεοξυϊνσίνη. Για το συγκεκριμένο στέλεχος, πραγματοποιήθηκε πρώτα μια κλασμάτωση με FCPC μικρής κλίμακας (στήλη όγκου: 50mL) και 6 αντιπροσωπευτικά κλάσματα στάλθηκαν για βιοδοκιμές σε κυτταρικές σειρές, καταδεικνύοντας ένα δραστικό κλάσμα εξ'αυτών. Κατόπιν πραγματοποιήθηκε μια κλασμάτωση σε μεγαλύτερη κλίμακα με FCPC (στήλη όγκου: 1000mL), από την οποία και απομονώθηκαν οι μεταβολίτες που αναφέρθηκαν. Με σύγκριση των φασμάτων HRMS σε θετικό και αρνητικό ηλεκτροψεκασμό ανάμεσα στο δραστικό κλάσμα της FCPC μικρής κλίμακας και των απομονωμένων μεταβολιτών, εικάζεται ότι ο μεταβολίτης στον οποίο οφείλεται η αναστολή του 26S πρωτεασώματος είναι η δεοξυνοκαρδαμίνη. Μελλοντικά, αναμένεται να αποδειχθεί η συγκεκριμένη δράση και πειραματικά, καθώς και να πραγματοποιηθούν οι βιοδοκιμές και για τους υπόλοιπους μεταβολίτες, τόσο για τη δράση στο 26S πρωτεάσωμα όσο και για την αντιοξειδωτική δράση.

Παράλληλα, λαμβάνοντας υπόψη ότι τα επιλεχθέντα εκχυλίσματα εμφάνισαν και αξιόλογη λευκαντική δράση ($53.81\% \pm 0.48$ και $30.59\% \pm 7.20$ αναστολή του ενζύμου της τυροσινάσης στα 300 $\mu\text{g/ml}$ για τον *Streptomyces chartreusis* και τον *Streptomyces spinoverrucosus* αντίστοιχα), αναμένεται να μελετηθεί περαιτέρω μελλοντικά η συγκεκριμένη δράση για τους μεταβολίτες που απομονώθηκαν με βιολογικές δοκιμές.

Στο μέλλον, ακολουθώντας παρόμοια στρατηγική, αξιοποιώντας τα βέλτιστα πρωτόκολλα εκχύλισης για το κάθε επιλεγμένο στέλεχος και παρόμοιες μεθόδους κλασμάτωσης, αναμένεται να γίνει εφικτή η ανακάλυψη περισσότερων βιοδραστικών μορίων που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν σε βιομηχανικό επίπεδο. Η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί μία δυνατή απόδειξη ότι η παγκόσμια μικροβιακή ποικιλότητα και οι μεταβολίτες που παράγει μπορούν να έχουν επιτυχημένες εφαρμογές στην παγκόσμια βιομηχανία καλλυντικών.

BIBΛIOΓPAΦIA

Abourashed, A. E., & Ikhlas, K. A. (2010). Leung's Encyclopedia of common natural ingredients used in foods, drugs and cosmetics. John Wileys and sons Inc, 92-94.

Adams, J., Palombella, V.J., Sausville, E.A., Johnson, J., Destree, A., Lazarus, D.D., Maas, J., Pien, C.S., Prakash, S., Elliott, P.J. (1999). Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Research*, 59(11), 2615–22.

Antony-Babu, S., Stach, J.E., Goodfellow, M. (2008). Genetic and phenotypic evidence for *Streptomyces griseus* ecovars isolated from a beach and dune sand system. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 94(1), 63–74.

Anunciaçã, J., & Olivares, F. L. (2016). Plant growth promotion by streptomycetes: ecophysiology, mechanisms and applications. *Chemical and Biological technologies in Agriculture*, 3, 24.

Anunciato, T.P., & da Rocha Filho, P.A. (2012). Carotenoids and polyphenols in nutricosmetics, nutraceuticals, and cosmeceuticals. *J Cosmet Dermatol.*, 11, 51-4.

Barceló, F., & Portugal, J. (2004). Elsamicin A binding to DNA. A comparative thermodynamic characterization. *FEBS Lett.*, 576(1-2), 68–72.

Baskaran, R., Vijayakumar, R., & Mohan, P. M. (2011). Enrichment method for the isolation of bioactive actinomycetes from mangrove sediments of Andaman Islands, India. *Malaysian J Microbiol*, 7(1), 26-32.

Bentley, R. (2006). From miso, sake and shoyu to cosmetics: a century of science for kojic acid. *Nat. Prod. Rep.*, 23, 1046–1062.

Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.-H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.-A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J. & Hopwood, D. A. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, Macmillan Magazines Ltd, 417, 141-147.

Bentley, S. D., Thomson, N.R., Mohammed, S., Crossman, L.C., and Parkhill, J. (2003). The devil is in the detail. *Trends Microbiol.* 11, 256–258.

Bjerrum, J., et al. (1958). *Stability Constants*. Chemical Society, London.

Brandt, F. S., Cazzaniga, A., Hann, M. (2011). Cosmeceuticals: current trends and market analysis. In *Seminars in cutaneous medicine and surgery*. Frontline Medical Communications, 30(3), 141-143.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.

- Cabanes, J., Soledad, C., Garcia-Carmona, F. (1994) Kojic Acid, a Cosmetic Skin Whitening Agent, is a Slow-binding Inhibitor of Catecholase Activity of Tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.*, 46, 982-985.
- Caboche, S., Leclère, V., Pupin, M., Kucherov, G., & Jacques, P. (2010). Diversity of monomers in nonribosomal peptides: towards the prediction of origin and biological activity. *Journal of bacteriology*, 192(19), 5143-5150.
- Calhoun, K. N., & Johnson, L.E. (1956). Taxonomic and Microbiologic Studies of *Streptomyces chartreusis*, n.sp. *Antibiotics & Chemotherapy*, 6 (4), 294-8.
- Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2012). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta*, 732, 100-104.
- Chang, T. S., & Tseng, M. (2006). Preliminary screening of soil actinomycetes for anti-tyrosinase activity. *Journal of Marine Science and Technology*, 14(3), 190-193.
- Chater, K. (1984). Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. In Losick, Richard, *Microbial development*, 89–115
- Chauhan, D., Catley, L., Li, G., et al. (2005). A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib. *Cancer Cell*, 8(5), 407–19.
- Chen, J. S., Wei, Ch., Rolle, R. S., Otwell, W. S., Balaban, M. O., Marshall, M. R. (1991). Inhibitory effect of kojic acid on some plant and crustacean polyphenol oxidases. *J. Agric. Food. Chem.*, 39, 1936-1401.
- Chondrogianni, N., Petropoulos, I., Franceschi, C., Friguet, B., Gonos, E.S. (2000). Fibroblast cultures from healthy centenarians have an active proteasome. In *Experimental Gerontology*, 35, 721–728.
- Chondrogianni, N., Stratford, F.L.L., Trougakos, I.P., Friguet, B., Rivett, A.J., Gonos, E.S. (2003). Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts. Induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 28026–28037.
- Coursindel, T., Restouin, A., Dewynter, G., Martinez, J., Collette, Y., Parrot, I. (2010). Stereoselective ring contraction of 2,5-diketopiperazines: An innovative approach to the synthesis of promising bioactive 5-membered scaffolds, *Bioorganic Chemistry* 38, 210–217.
- Covington, B.C., McLean, J.A., Bachmann, B.O. (2017). Comparative mass spectrometry-based metabolomics strategies for the investigation of microbial secondary metabolites, *Nat. Prod. Rep.*, 2017, 34, 6-24.
- Crandall, L. W., & Hamill, R. L. (1986). Antibiotics produced by *Streptomyces*: major structural classes. *The bacteria*, 9, 355-401.
- Das, A., & Khosla, C. (2009). Biosynthesis of aromatic polyketides in bacteria. *Accounts of chemical research*, 42(5), 631-639.
- DeBoer, C., & Dietz, A. (1976). The description and antibiotic production of *Streptomyces hydroscopicus* var. *geldanus*, *J. Antibiot.*, 29, 1182-1188.

- Diab, A. & Al-Gounaim, M. Y. (1982). *Streptomyces spinoverrucosus*, a New Species from the Air of Kuwait, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32 (3), 327-331
- Dietz, A., & Mathews, J. (1971). Classification of *Streptomyces* spore surfaces into five groups. *Applied Microbiology*, 21 (3): 527–533.
- Dooley, T.P. (1997). Is there room for a moderate level of regulatory oversight? In: Hori W, editor. Drug discovery approaches for developing cosmeceuticals: advanced skin care and cosmetic products. Southborough, IBC Library Series.
- Doroghazi, J.R., Ju, K.S., Brown, D.W., Labeda, D.P., Deng, Z., Metcalf, W.W., Chen, W., Price, N.P.J. (2011). Genome Sequences of Three Tunicamycin-Producing *Streptomyces* Strains, *S. chartreusis* NRRL 12338, *S. chartreusis* NRRL 3882, and *S. lysosuperificus* ATCC 31396. *J. Bacteriol.*, 193(24), 7021-7022.
- Draeos, Z.D. (2011). The art and science of new advances in cosmeceuticals. *Clin Plastic Surg.*, 38, 397-407.
- Dureja, H., Kaushik, D., Gupta, M., Kumar, V., Lather, V. (2005). Cosmeceuticals: An emerging concept. *Indian J. Pharmacol.*, 37, 155-9
- Edwards, R., & Harding, K. G. (2004). Bacteria and wound healing. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 17, 91–96.
- Eker, A. P. M., Kooiman, P., Hassels, J. K. C. (1990). DNA photoreactivating enzyme from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 8009–8015.
- Epstein, H. (2009). Cosmeceutical vehicles. *Clin. Dermatol.*, 27(5), 453–60.
- Esclapez, M. D., García-Pérez, J. V., Mulet, A., & Cárcel, J. A. (2011). Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Engineering Reviews*, 3(2), 108-120.
- Feling, R.H., Buchanan, G.O., Mincer, T.J., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., Fenical, W. (2003). Salinosporamide A: a highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *salinospora*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 42(3), 355–7.
- Fu, P., & MacMillan, J. B. (2015). Spithioneines A and B, Two New Bohemamine Derivatives Possessing Ergothioneine Moiety from a Marine-Derived. *Organic Letters*, 17(12), 3046–3049.
- Fu, P., La, S. and MacMillan, J. B. (2015). 1,3-Oxazin-6-one Derivatives and Bohemamine-Type Pyrrolizidine Alkaloids from a Marine-Derived *Streptomyces spinoverrucosus*. *Journal of Natural Products*, 79(3), 455–462.
- Fulekar, M. H. (2010). *Environmental biotechnology*. CRC Press.
- Gao, X. H., Zhang, L., Wei, H., & Chen, H. D. (2008). Efficacy and safety of innovative cosmeceuticals. *Clinics in dermatology*, 26(4), 367-374.
- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M. E., Suzuki, K., Ludwig, W., Whitman, W. B. (2012). *Systematic Bacteriology, Volume Five: The Actinobacteria, Part A. Second Edition*. Springer, ISBN 978-0-387-95043-3, 1602 – 1737.
- Grune, T., Merker, K., Jung, T., Sitte, N., Davies, K.J.A. (2005). Protein oxidation and degradation during postmitotic senescence. *Free Radical Biology and Medicin*, 39(9), 1208–1215.

- Grune, T., Reinheckel, T., Davies, K.J. (1997). Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11(7), 526–534.
- Hamilton-Miller. (1973). *Chemistry and Biology of the Polyene Macrolide Antibiotics*. Bacteriological Reviews. American Society for Microbiology, 37(2), 166–196.
- Hamzaoui, M., Renault, J. H., Reynaud, R., & Hubert, J. (2013). Centrifugal partition extraction in the pH-zone-refining displacement mode: an efficient strategy for the screening and isolation of biologically active phenolic compounds. *Journal of Chromatography B*, 937, 7-12.
- Hanson, J. R. (2008). *Chemistry of fungi*. Royal Society of Chemistry.
- Harman, D. (1981). The aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 78(11), 7124-8.
- Hosokawa, N., Naganawa, H., Kasahara, T., Hattori, S., Hamada, M., Takeuchi, T., Yamamoto, M., Tsuchiya, Hori, M. (1999). Futosine and its derivatives, new nucleoside analogs, *Chem. Pharm. Bull.*, 47(7), 1032-1034.
- Houbraken, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2011). Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA fungus*, 2(1), 87-95.
- Hu, Y., Martinez, E. D., MacMillan, J. B. (2012). Anthraquinones from a Marine-Derived, *Journal of Natural Products*, 75(10), 1759–1764.
- Huang, R., Yan, T., Peng, Y., Zhou, X., Yang, X., Liu, Y. (2014). Diketopiperazines from the marine sponge *Axinella* sp., *Chemistry of Natural Compounds*, 50(1), 191-193.
- Huang, R., Zhou, X., Peng, Y., Yang, X., Xu, T., Liu, Y. (2011). Nucleosides from the marine sponge *Callyspongia* sp., *Chemistry of Natural Compounds*, 46(6), 1010-1011.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., & Ōmura, S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature biotechnology*, 21(5), 526-531.
- Jones, S.E., & Elliot, M.A. (2017). *Streptomyces Exploration: Competition, Volatile Communication and New Bacterial Behaviours*, Trends in Microbiology. In Press. Doi: 10.1016/j.tim.2017.02.001.
- Kaeberlein, M. (2010), Resveratrol and rapamycin: are they anti-aging drugs?. *BioEssays*, 32(2), 96–99.
- Kaklamanos, G., Theodoridis, G., & Dabalís, T. (2009). Determination of anabolic steroids in bovine urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877(23), 2330-2336.
- Kämpfer, P. (2006). The Family Streptomycetaceae, Part I: Taxonomy. *The Prokaryotes*, 3, 538-604.
- Kazakevich, Y. V., & LoBrutto, R. (2007) *HPLC for pharmaceutical scientists*. New Jersey: John Wiley & Sons Inc., ISBN: 978-0-471-68162-5.
- Keil, B., Polonsky, J., Nouaille, F., Lederer, E. (1975). Identification of the bitter principle of cocoa, *Helvetica Chimica Acta*, 58(4), 1078-1086.

- Kim, N.Y., Yim, T.B., & Lee, H.Y. (2015). Skin Anti-Aging Activities of Bacteriochlorophyll a from Photosynthetic Bacteria, *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 25(10), 1589–1598.
- Kim, S.K. (2012). *Marine Cosmeceuticals Trends and Prospects*, CRC Press - Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL.
- Kligman, A.M. (2005). What are cosmeceuticals? In: Draelos ZD, editor. *Procedures in Cosmetic Dermatology: Cosmeceuticals*. Philadelphia, PA: Elsevier, 1-2.
- Kois-Ostrowska, A. (2016) Unique function of the bacterial chromosome segregation machinery in apically growing *Streptomyces* – targeting the chromosome to new hyphal tubes and its anchorage at the tips. *PLOS Genet.*, 12, e1006488.
- Kwak, M. Y., & Rhee, J. S. (1992). Cultivation characteristics of immobilized *Aspergillus oryzae* for kojic acid production. *Biotec- nol. Bioeng.*, 39, 903-906.
- Leach, B.E., Calhoun, K. M., Johnson, L.E., Teeters, C.M., Jackson, W.G. (1953). Chartreusin, a New Antibiotic Produced by *Streptomyces chartreusis*, a New Species, *Journal of the American Chemical Society*, 75(16), 4011–4012.
- Lee, H.-S., Shin, H.J., Jang, K.H., Kim, T.S., Oh, K.B., Shin, J. (2015). Cyclic Peptides of the Nocardamine Class from a Marine-Derived Bacterium of the Genus *Streptomyces*, *J. Nat. Prod.*, 68, 623-625.
- Lee, L. S., Parrish, F. W., Jacks, T. J. (1986). Substrate depletion during formation of aflatoxin and kojic acid on corn inoculated with *Aspergillus flavus*. *Mycopathologia*, 93, 105-107.
- Leslie Gunatilaka, A. A., & Kithsiri Wijeratne, E. M. (2015-2016) Natural Products from Bacteria and Fungi, *Phytochemistry and Pharmacognosy, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*.
- Li, X., Sun, B., Zhao, J., Lv, Y., Song, H., Li, E., Zhu, Y. (2011). Production and improved bleaching abilities of a thermostable xylanase from a newly isolated *Streptomyces chartreusis* strain, *African Journal of Biotechnology*, 10(64), 14132-14142.
- Linter, K., Chamberlin, C. M., Peschard, O., et al. (2009). Cosmeceuticals and active ingredients. *Clinics in Dermatology*, 27, 461–468.
- Locci, R. (1989). The Actinomycetes I. Suprageneric classification of actinomycetes. *Bergey's manual of systematic bacteriology Vol 4 (Williams S.T., Sharpe M.E. & Holt J.G. Eds.)*. 4, 2451-2469.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, S.L., Darnell, J. (2004). *Molecular cell biology (5th ed.)*. New York: W.H. Freeman and CO, 3, 66–72.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (2005). *Brock: Βιολογία των μικροοργανισμών, απόδοση στα ελληνικά από Γεωργακόπουλο, Διαλλινά, Ζαχαριουδάκη, Καραγκούνη-Κύρτσου, Κοκκορογιάννη, Φριλίγγο, Χατζηλουκά, Χριστιά. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο*, 481.
- Marchal, L., Legrand, J., & Foucault, A. (2003). Centrifugal partition chromatography: a survey of its history, and our recent advances in the field. *The Chemical Record*, 3(3), 133-143.
- Marston, A., & Hostettmann, K. (2006). Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. *Journal of Chromatography A*, 1112(1), 181-194.

- Masuda, T., Fujita, N., Odaka, Y., Takeda, Y., Yonemori, S., Nakamoto, K., & Kuninaga, H. (2007). Tyrosinase inhibitory activity of ethanol extracts from medicinal and edible plants cultivated in okinawa and identification of a water-soluble inhibitor from the leaves of *Nandina domestica*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71(9), 2316-2320.
- Medvedev, A.Z. (1990). An attempt at a rational classification of theories of ageing, *Biol Rev Camb Philos Soc.*, 65(3), 375-98.
- Obara, Y., Ito, T., Hizu, Y. (1985). Cosmetic skin whitening by food containing kojic acid and its esters, In: *Jpn. Kokai Tokyo Koho J.P.*, 60, 137-253
- Ohyama, Y. (1990) Melanogenesis-inhibitory effect of kojic acid and its action mechanism. *Fragrance J.*, 6, 53-58.
- Orlowski, R.Z. (1999). The role of the ubiquitin-proteasome pathway in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 6(4), 303–13.
- Pape, H., & Rehm, H. J. (1986). *Microbial products II (Vol. 4)*. VCH Verlagsgesellschaft mbH
- Parvez, S., Kang, M., Chung, H. S., & Bae, H. (2007). Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phytotherapy Research*, 21(9), 805-816.
- Pettit, G.R., Day, J.F., Hartwell, J.L., Wood, H.B. (1970). Antineoplastic Components of Marine Animals, *Nature*, 227, 962-963.
- Rabe, J.H., Mamelak, A.J., McElgunn, P.J., Morison, W.L., Sauder, D.M. (2006). Photoaging mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol.*, 55, 1-19.
- Ramos-e-Silva, M., Ribeiro Celestino, L., Ramos-e-Silva, S., Fucci-da-Costa, A.P. (2013). Anti-aging cosmetics: Facts and controversies. *Clinics in Dermatology*, 31, 750–758.
- Reinheckel, T., Sitte, N., Ullrich, O., Kuckelkorn, U., Davies, K.J., Grune, T. (1998). Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *The Biochemical Journal*, 335(3), 637–642.
- Remya, M., & Vijayakumar, R. (2008). Isolation and characterization of marine antagonistic actinomycetes from west coast of India. *Medicine and biology*, 15(1), 13-19.
- Robins, M. J., Zou, R., Hansske, F. Wnuk, S. F. (1997). Synthesis of sugar-modified 2,6-diaminopurine and guanine nucleosides from guanosine via transformations of 2-aminoadenosine and enzymatic deamination with adenosine deaminase, *Can. J. Chem*, 75, 762-767.
- Sadrudin, S., & Arora, R. (2009). Resveratrol: biologic and therapeutic implications. *Journal of the cardiometabolic syndrome*, 4(2), 102-106.
- Sánchez-Ferrer, Á., Rodríguez-López, J. N., García-Cánovas, F., & García-Carmona, F. (1995). Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1247(1), 1-11.
- Sano, T., and Kaya, K., Oscillapeptin G, a tyrosinase inhibitor from toxic *Oscillatoria agardhii*. *Journal of Natural Products*, 59(1), 90–92, 1996

- Saruno, R., Kato, F., Ikeno, T. (1979) Kojic acid, a tyrosinase inhibitor from *Aspergillus albus*. *Agric. Biol. Chem.*, 43, 1337- 1339.
- Schrempf, H. (2006). The Family Streptomycetaceae, Part II: Molecular Biology. *The Prokaryotes*, 3, 605-622.
- Sekurova, O. N., Pérez-Victoria, I., Martín, J., Degnes, K. F., Sletta, H., Reyes, F., Zotchev, S. B. (2016). New Deferoxamine Glycoconjugates Produced upon Overexpression of Pathway-Specific Regulatory Gene in the Marine Sponge-Derived *Streptomyces albus* PVA94-07, *Molecules*, 21(9), 1131, supporting information.
- Sherma, J., & Fried, B. (Eds.). (2003). *Handbook of thin-layer chromatography* (Vol. 89). CRC press.
- Skupinski, W., Pichnej, L., Pakuia, R., Jahn-Andrychowska, W., Trojanowska, Z., Butkiewicz, K. (1986). Preparation of 4-Methylaminobenzoic acid from Anaesthesin (4-aminobenzoic acid ethyl ester) via Phase-Transfer Methylation of its Amino group, *Arch.. Pharm. (Weinheim)* 319, 862-864.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2011). *Introduction to modern liquid chromatography*. John Wiley & Sons.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Glajch, J. L. (2012). *Practical HPLC method development*. John Wiley & Sons.
- Solecka, J., Zajko, J., Postek, M., Rajnisz, A. (2012). Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Cent. Eur. J. Biol.*, 7(3), 373-390
- Sualeh, M., Baig, M. T., & Zoha, S. (2010). Zafar Alam Mahmood, Syed Waseemuddin Ahmed, Iqbal Azhar. *Pak. J. Pharm. Sci*, 23(3), 349-357.
- Takalo, M., Salminen, A., Soininen, H., Hiltune, M., Haapasalo, A. (2013). Protein aggregation and degradation mechanisms in neurodegenerative diseases. *American Journal of Neurodegenerative Disease*, 2(1), 1–14.
- Tawfike , A.F., Viegelmann, C., Edrada-Ebel, R. (2013). Metabolomics and dereplication strategies in natural products, *Methods Mol Biol.*, 1055, 227-244.
- Tian, T., Sun, Q., Shen, J., Zhang, T., Gao, P., Sun, Q. (2008). Microbial transformation of polydatin and emodin-8-β-d-glucoside of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc into resveratrol and emodin respectively by *Rhizopus microsporus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(6), 861-866.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C.L. (2009) Εισαγωγή στη Μικροβιολογία, Γενική επιμέλεια: Αθανάσιος Τσακρής, Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης, Αθήνα, 36, 48,52-53, 124, 324, 340.
- Tsakiri, E.N., Iliaki, K.K., Höhn, A., Grimm, S., Papassideri, I.S., Grune, T., Trougakos, I.P. (2013). Diet-derived advanced glycation end products or lipofuscin disrupts proteostasis and reduces lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Free Radic Biol Med*, 65, 1155-63.
- Tsakiri, E.N., Sykiotis, G.P., Papassideri, I.S., Gorgoulis, V.G., Bohmann, D., Trougakos, I.P. (2013). Differential regulation of proteasome functionality in reproductive vs. somatic tissues of *Drosophila* during aging or oxidative stress. *FASEB J*, 27(6), 2407-20.

- Tsakiri, E.N., Sykiotis, G.P., Papassideri, I.S., Terpos, E., Dimopoulos, M.A., Gorgoulis, V.G., Trougakos, I.P. (2013). Proteasome dysfunction in *Drosophila* signals to an Nrf2-dependent regulatory circuit aiming to restore proteostasis and prevent premature aging. *Aging Cell*, 12(5), 802–813.
- U.S. Food and Drug Administration. U.S. Department of Health and Human Services. (2012). Is It a Cosmetic, a Drug, or Both? (Or Is It Soap?)".
- Valeev, F.A., Salikhov, Sh.M., Krasnoslobodtseva, O. Yu., Sharipov, B.T., Spirikhin, L.V., Tolstikov, G.A. (2007). Synthesis of *N*-methyl urocanates of hydroxyderivatives of isocembrol, *Chemistry of Natural Compounds*, 43(2), 143-148
- Vernace, V.A., Arnaud, L., Schmidt-Glenewinkel, T., Figueiredo-Pereira, M.E. (2007) Ageing perturbs 26S proteasome assembly in *Drosophila melanogaster*. *FASEB J*, 21(11), 2672-82.
- Vezina, C., Kudelski, A., Sehga, S. N. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The journal of antibiotics*, 28(10), 721-726.
- Wang, G.-Y.-S., Graziani, E., Waters, B., Pan, W., Xiang, L., McDermott, J., Meurer, G., Saxena, G., Andersen, R. J., Davies, J. (2000). Novel Natural Products from Soil DNA Libraries in a Streptomycete Host, *Organic Letters*, 2(16), 2401-2404.
- Wang, H., Liu, L., Guo, Y. X., Dong, Y. S., Zhang, D. J., & Xiu, Z. L. (2007). Biotransformation of piceid in *Polygonum cuspidatum* to resveratrol by *Aspergillus oryzae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 75(4), 763-768.
- Watson, D.G. (2005). Φαρμακευτική Ανάλυση 2^η Έκδοση. Παρισιάνου Α.Ε. ISBN 978-960-394-772-6.
- White, D.C., & Tucker, A.N. (1970). Ceramide phosphorylglycerol phosphate a new sphingolipid found in bacteria. *Lipids*, 5, 56.
- Wolanski, M., Wali, R., Tilley, E., Jakimowicz, D., Zakrzewska-Czerwińska, J., Herron, P. (2011). Replisome trafficking in growing vegetative hyphae of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.*, 193, 1273–1275.
- Wulf, H. C., Sandby-Møller, J., Kobayasi, T., & Gniadecki, R. (2004). Skin aging and natural photoprotection. *Micron*, 35(3), 185-191.
- Ying, Y.-M., Shan, W.-G., Liu, W.-H., Zhan, Z.-J. (2013). Alkaloids and nucleoside derivatives from a fungal endophyte of *Huperzia serrata*, *Chemistry of Natural Compounds*, 49(1), 184-186.
- Youssef, D.T.A., Badr, J.M., Shaala, L.A., Mohamed, G.A., Bamanie, F.H. (2015). Ehrenasterol and biemnic acid; new bioactive compounds from the Red Sea sponge *Biemna ehrenbergi*, *Phytochemistry Letters*, 12, 296-301.
- Yuan, Y., Tian, J.-M., Xiao, J., Shao, Q., Gao, J.-M. (2014). Bioactive metabolites isolated from *Penicillium* sp. YY-20, the endophytic fungus from *Ginkgo biloba*, *Natural Product Research*, 28(4), 278 – 281.
- Zhang, H.-l., et al., (2003). *Zhongguo Yaowu Huaxue Zazhi*, 13, 294-296.

Γαλάτης, Β., Αποστολάκος, Π., Κατσαρός, Χ. (1998). Εισαγωγή στη Βοτανική, Εκδόσεις Αθ. Σταμούλης, Αθήνα, 139-140.

Μαργαρίτης, Λ. Χ., Γαλανόπουλος, Β. Κ., Κεραμάρης, Κ. Ε., Μαρίνος, Ε. Σ., Παπασιδέρη, Ι. Σ., Στραβοπόδης, Δ. Ι., Τρουγκάκος, Ι. Π. (2008), Βιολογία Κυττάρου, Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, 437-438, 518.

Ηλεκτρονική βιβλιογραφία

1. www.galinos.gr
2. www.fda.gov/cosmetics