



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

**ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΒΙΟΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ
ΤΟΥ 14-ΟΞΟ-3,7,18-ΔΟΛΑΜΠΕΛΛΑΤΡΙΕΝΙΟΥ
ΑΠΟ ΕΝΑ ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ *BACILLUS*
MEGATERIUM ΘΑΛΑΣΣΙΑΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΑΝΑΠΤΥΞΗ, ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ
ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ ΜΑΛΛΙΑΡΑΚΗΣ

**ΑΘΗΝΑ
ΙΟΥΛΙΟΣ 2015**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Ευσταθία Ιωάννου

Επίκ. Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Βασίλειος Ρούσσης

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Όλγα Τζάκου

Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευσταθία Ιωάννου

Επίκ. Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας απομονώθηκαν 11 διαφορετικά στελέχη ενδοφυτικών βακτηρίων από δείγμα του φαιοφύκους *Dilophus spiralis* που συλλέχθηκε στην Ελαφώνησο, ενώ παράλληλα από το οργανικό εκχύλισμα του φύκους απομονώθηκε σε επαρκή ποσότητα ο κύριος δευτερογενής μεταβολίτης του, το (1*R*,3*E*,7*E*,11*S*,12*S*)-14-οξο-3,7,18-δολαμπελλατριένιο.

Τα 11 ενδοφυτικά βακτηριακά στελέχη αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα βιομετατροπής του (1*R*,3*E*,7*E*,11*S*,12*S*)-14-οξο-3,7,18-δολαμπελλατριενίου. Το στέλεχος *Bacillus megaterium* BI0223, το οποίο εμφάνισε την ικανότητα να βιομετατρέπει τον συγκεκριμένο μεταβολίτη, υποβλήθηκε παρουσία του σε υγρή καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας.

Τα οργανικά υπολείμματα της βακτηριακής καλλιέργειας υποβλήθηκαν σε σειρά χρωματογραφικών διαχωρισμών, οπότε απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπικών μεθόδων NMR και MS οκτώ προϊόντα βιομετατροπής. Εξ αυτών, επτά μεταβολίτες αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα.

ABSTRACT

In the framework of the present thesis 11 endophytic bacterial strains were isolated from samples of the brown alga *Dilophus spiralis* which was collected in Elafonissos. In parallel, the major metabolite, (1*R*,3*E*,7*E*,11*S*,12*S*)-14-oxo-3,7,18-dolabellatriene, was isolated in sufficient amounts from the organic extract of the alga.

Subsequently, the 11 bacterial strains were evaluated for their ability to biotransform (1*R*,3*E*,7*E*,11*S*,12*S*)-14-oxo-3,7,18-dolabellatriene. Strain *Bacillus megaterium* BI0223, which was shown to successfully bioconvert the specific metabolite, was cultivated in larger scale liquid cultures supplemented with (1*R*,3*E*,7*E*,11*S*,12*S*)-14-oxo-3,7,18-dolabellatriene.

The organic residues of the bacterial cultures were subjected to a series of chromatographic separations that led to the isolation and structure elucidation of eight biotransformation products. The structures of the isolated natural products were established by means of spectroscopic analyses, including 1D and 2D NMR experiments, as well as MS data. Among the isolated metabolites, seven are new natural products.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω την Επίκ. Καθηγήτρια Ευσταθία Ιωάννου και τον Καθηγητή Βασίλειο Ρούσση για την ανάθεση του θέματος, τις συμβουλές και την συνεχή καθοδήγηση τους, τη μεταλαμπάδευση γνώσεων, επιστημονικών και μη, και την ηθική υποστήριξη σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, Καθηγητή Βασίλειο Ρούσση, Καθηγήτρια Όλγα Τζάκου και Επίκ. Καθηγήτρια Ευσταθία Ιωάννου, για το χρόνο που διέθεσαν να μελετήσουν και να κρίνουν την παρούσα εργασία.

Ευχαριστώ την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. Παναγιώτα Γεωργαντέα για την ιδιαίτερα ευχάριστη και δημιουργική συγκατοίκηση στο εργαστήριο και τις γνώσεις που αποκόμισα μέσα από τις συμβουλές της.

Ακόμη, ευχαριστώ τον ερευνητή Δρ. Αντώνη Μακρή και την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. Φωτεινή Τρίκκα του Ινστιτούτου Αγροβιοτεχνολογίας (ΕΚΕΤΑ) για τη ταυτοποίηση του βακτηριακού στελέχους.

Ευχαριστώ τους συνήθεις υπόπτους, μεταδιδακτορικούς, διδακτορικούς και μεταπτυχιακούς ερευνητές του εργαστηρίου, που έκαναν με την παρουσία τους ευχάριστη και ξεχωριστή αυτή την παραμονή: Σταμάτη, Φωτεινή, Κατερίνα, Νατάσα, Ειρήνη, Έλενα, Στέφανο, Εύη, Μαρία, Eniko, καθώς και όλους τους ομοετείς μου και ιδιαίτερος: Περικλή, Μίνα, Παναγιώτη.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου για τη γενικότερη στήριξή τους στην επιθυμία μου να ακολουθήσω μεταπτυχιακές σπουδές.

Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου, Ελευθέριο και Ελένη, και την αδελφή μου Μαλβίνα - Μαρία για τη γενικότερη στήριξή τους, υλική και ηθική, στην επιθυμία μου να ακολουθήσω μεταπτυχιακές σπουδές, καθώς και τον εκλιπόντα παππού μου, Κλεάνθη, για να την αγάπη και το ενδιαφέρον που μου ενέπνευσε προς τη φύση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	i
ABSTRACT	iii
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	v
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	vii
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	ix
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1.1. Φαρμακογνωσία και φυσικά προϊόντα – Ιστορία και εξελικτική θεώρηση	1
1.2. Θαλάσσια φαρμακογνωσία – Φυσικά προϊόντα θαλάσσιας προέλευσης	3
1.3. Φύκη	4
1.3.1. Γενικά	4
1.3.2. Φαιοφύκη	6
1.3.3. Οικογένεια Dictyotaceae – Είδος <i>Dilophus spiralis</i>	7
1.4. Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί	10
1.5. Βιομετατροπές χημικών ουσιών	11
1.5.1. Γενικά	11
1.5.2. Πλεονεκτήματα βιομετατροπών έναντι χημικής σύνθεσης	12
1.5.3. Βιομετατροπές από βακτήρια	13
1.5.4. Βιομετατροπές από μύκητες	19
1.5.5. Βιομετατροπές από μικροοργανισμούς θαλάσσιας προέλευσης	22
1.6. Σκοπός της μελέτης	23
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	25
2.1. Οργανολογία	25
2.2. Διαλύτες και χημικά αντιδραστήρια	25
2.3. Σύλλογή του φαιοφύκου <i>Dilophus spiralis</i>	26
2.4. Απομόνωση ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών από το φαιοφύκος <i>Dilophus spiralis</i>	27
2.5. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση του κύριου μεταβολίτη του φαιοφύκου <i>Dilophus spiralis</i>	28
2.6. Έλεγχος βιομετατροπής του 14-οξο-3,7,18-δολαμπελλατριενίου από τα	32

ενδοφυτικά βακτηριακά στελέχη	
2.7. Καλλιέργεια ενδοφυτικού βακτηριακού στελέχους BI0223 για τη βιομετατροπή του 14-οξο-3,7,18-δολαμπελλατριενίου	32
2.8. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση των προϊόντων βιομετατροπής του 14-οξο-3,7,18-δολαμπελλατριενίου από το ενδοφυτικό βακτηριακό στέλεχος BI0223	33
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	53
3.1. Μεταβολίτης 1	55
3.2. Μεταβολίτης 2	59
3.3. Μεταβολίτης 3	63
3.4. Μεταβολίτης 4	70
3.5. Μεταβολίτης 5	76
3.6. Μεταβολίτης 6	83
3.7. Μεταβολίτης 7	90
3.8. Μεταβολίτης 8	96
3.9. Μεταβολίτης 9	102
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	109
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	111

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

1D-NMR	πείραμα NMR μίας διάστασης
2D-NMR	πείραμα NMR δύο διαστάσεων
^1H NMR	1D-NMR πείραμα πυρήνων υδρογόνου (πρωτονίου)
^{13}C NMR	1D-NMR πείραμα πυρήνων άνθρακα, με ευρεία ετεροπυρηνική αποσύζευξη (proton-noise decoupled)
br	ευρεία (NMR)
CDCl_3	δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
CH_2Cl_2	διχλωρομεθάνιο
COSY	2D-NMR πείραμα ομοπυρηνικού συσχετισμού ^1H - ^1H για 2J και 3J (Correlated Spectroscopy)
δ	χημική μετατόπιση της απορρόφησης ενός πυρήνα σε σχέση με το τετραμεθυλοσιλάνιο (σε ppm) (NMR)
d	διπλή (NMR)
DEPT	1D-NMR πείραμα πυρήνων άνθρακα, κατά το οποίο οι κορυφές των πρωτοταγών και τριτοταγών ανθράκων δίνουν θετικό σήμα, οι κορυφές των δευτεροταγών δίνουν αρνητικό σήμα, ενώ οι τεταρτοταγείς δεν δίνουν καθόλου σήμα (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)
DMSO	διμεθυλοσουλφοξείδιο
EIMS	φασματομετρία μάζας με μέθοδο ιονισμού τον βομβαρδισμό με δέσμη ηλεκτρονίων (Electron Impact Mass Spectrometry)
EtOAc	οξικός αιθυλεστέρας
EtOH	αιθανόλη
cHex	κυκλοεξάνιο
HMBC	2D-NMR πείραμα ετεροπυρηνικού συσχετισμού ^1H - ^{13}C για 2J και 3J (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation)
HPLC	υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography)
HSQC	2D-NMR πείραμα ετεροπυρηνικού συσχετισμού ^1H - ^{13}C για 1J (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
GC	αέριος χρωματογραφία (Gas Chromatography)
GC-MS	αέριος χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)
J	σταθερά σύζευξης (σε Hz) (NMR)
m	πολλαπλή (NMR)
Me_2CO	ακετόνη
MeOH	μεθανόλη
MS	φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry)
m/z	λόγος μάζας προς φορτίο
NMR	φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance)
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	2D-NMR πείραμα ομοπυρηνικού συσχετισμού ^1H - ^1H στο χώρο (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy)

RI	δείκτης διάθλασης (Refractive Index)
q	τετραπλή (NMR)
s	απλή (NMR)
t	τριπλή (NMR)
TLC	χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography)

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1. Φαρμακογνωσία και φυσικά προϊόντα – Ιστορία και εξελικτική θεώρηση

Για χιλιάδες χρόνια, οι άνθρωποι επωφελούνται από την ικανότητα της φύσης να παράγει συστατικά με θεραπευτικές ιδιότητες. Σε κάποια μέρη του κόσμου, τα φάρμακα φυσικής προέλευσης αποτελούν ακόμη τους μοναδικούς τρόπους θεραπείας ασθενειών. Η επιστημονική έρευνα σε αυτά τα φυσικά «φάρμακα» οδήγησε στην ανακάλυψη χημικών ουσιών, των οποίων οι φαρμακολογικές ιδιότητες αποτέλεσαν τα θεμέλια της φαρμακευτικής βιομηχανίας. Σήμερα, οι δραστικές ουσίες πολλών φαρμάκων που διατίθενται στην αγορά είτε παραλαμβάνονται από φυσικές πηγές είτε παράγονται μέσω χημικής σύνθεσης χρησιμοποιώντας φυσικά προϊόντα ως πρότυπα ή αρχικές ενώσεις. Δραστικές ουσίες φαρμάκων ευρέως γνωστές, όπως η μορφίνη, η ταξόλη, η ασπιρίνη, η πενικιλίνη, η βινκριστίνη και η κυκλοσπορίνη είναι μερικά παραδείγματα που προέρχονται από χερσαία φυτά και μικροοργανισμούς.

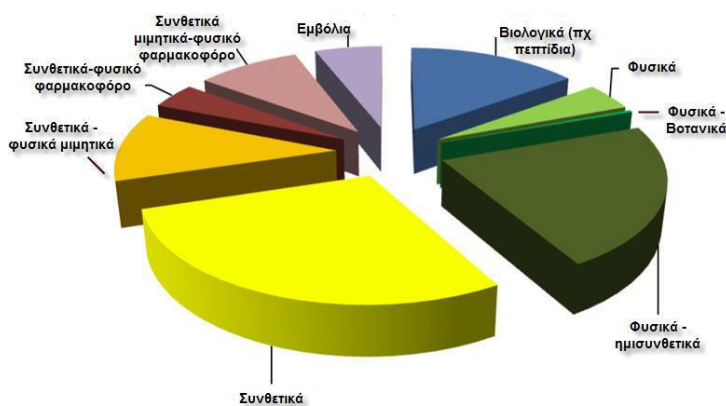
Τα φυτά χρησιμοποιήθηκαν από τον άνθρωπο σε ολόκληρο το ρου της ιστορίας του. Για παράδειγμα, ποικίλα φυτά με παραισθησιογόνες ιδιότητες χρησιμοποιήθηκαν από διαφορετικούς πολιτισμούς, όπως τις μάγισσες του Μεσαίωνα στην ευρωπαϊκή ιστορία και τους σαμάνους στη Κεντρική και Νότια Αμερική.

Το 1891 ο Γερμανός φυσιολόγος – χημικός Albrecht Kössel (Νομπέλ Ιατρικής 1910) πρότεινε την ιδέα της διάκρισης ανάμεσα σε πρωτογενή και δευτερογενή μεταβολισμό των οργανισμών. Οι πρωτογενείς μεταβολίτες εμπλέκονται σε βασικές διεργασίες του κυττάρου που είναι κοινές σε όλους τους οργανισμούς, ενώ οι δευτερογενείς μεταβολίτες προέρχονται από διακριτά βιοχημικά μονοπάτια και είναι παράγονται μόνο από κάποιους οργανισμούς. Προς το τέλος του 20^{ου} αιώνα, η ανάπτυξη της βιοχημείας και της μοριακής βιολογίας υπό το φως της εξελικτικής σκέψης, έφερε τους δευτερογενείς μεταβολίτες (ή φυσικά προϊόντα, όπως ξεκίνησαν να ονομάζονται) στο προσκήνιο, καθώς οι επιστήμονες αντιλήφθηκαν την ιδιαίτερη σημασία τους. Ειδικοί επιστήμονες, όπως κλινικοί βιοχημικοί, φαρμακολόγοι, τοξικολόγοι, μικροβιολόγοι και κυτταροβιολόγοι, εντυπωσιάστηκαν από τις ιδιότητες των φυσικών προϊόντων και έως τα μέσα του ίδιου αιώνα μερικά άρχισαν να τα χρησιμοποιούν ως πειραματικά εργαλεία που

επηρεάζαν ή διέκοπταν κυτταρικές λειτουργίες με συγκεκριμένους μηχανισμούς. Η ανακάλυψη των αντιβιοτικών έφερε επανάσταση και εδραίωσε πλέον το επιστημονικό και οικονομικό ενδιαφέρον για τα φυσικά προϊόντα. Τα ένζυμα υπεύθυνα για τη βιοσύνθεση των μεταβολιτών άρχισαν να μελετώνται, ο τρόπος παραγωγής τους άρχισε να γίνεται κατανοητός και εν συνεχεία η εξελικτική τους πορεία να αποκωδικοποιείται (Firn & Jones 2003, Firn & Jones 2009).

Το μεγάλο ερώτημα ήταν γιατί οι οργανισμοί δημιούργησαν αυτές τις ενώσεις και μάλιστα σε τόσο μεγάλη ποικιλία. Το πιο απλό εξελικτικό μοντέλο που εξηγεί την ύπαρξη και την ποικιλία τους είναι ότι οι χημικές αυτές ενώσεις θα πρέπει να προσδίδουν κάποιο εξελικτικό πλεονέκτημα στους παραγωγούς οργανισμούς. Ο παραγωγός οργανισμός αυξάνει τη προσαρμοστικότητα του και συνεπώς τις πιθανότητες επιβίωσης του μέσω της βιοσύνθεσης βιοδραστικών μεταβολιτών. Υπό την ευρεία έννοια, οι παραγωγοί οργανισμοί, συνήθως φυτά αλλά και οργανισμοί που δεν διαθέτουν ικανότητα ταχείας κίνησης πρέπει να αμύνονται ενάντια στους θηρευτές τους, καθώς και να ανταγωνίζονται άλλα φυτά ή οργανισμούς ως προς τους διαθέσιμους πόρους. Με το πέρασμα εκατομμυρίων ετών, η περιβαλλοντική πίεση και η συνεξέλιξη των οργανισμών και των πιθανών εχθρών τους δημιούργησαν αυτό το πλούσιο χημικό οπλοστάσιο (Firn & Jones 2003, Macías *et al.* 2007).

Έως σήμερα, ένας μεγάλος αριθμός βιοδραστικών φυσικών προϊόντων και παραγώγων αυτών έχουν εγκριθεί ως δραστικά συστατικά φαρμακευτικών σκευασμάτων και κυκλοφορούν στο εμπόριο (Εικ. 1) (Newman & Cragg 2012).



Εικόνα 1. Πηγές προέλευσης των εμπορικά διαθέσιμων φαρμάκων (Newman & Cragg 2012).

1.2. Θαλάσσια φαρμακογνωσία – Φυσικά προϊόντα θαλάσσιας προέλευσης

Οι ωκεανοί αποτελούν μία πλούσια πηγή βιολογικής και χημικής ποικιλότητας. Καλύπτουν περισσότερα από το 70% της επιφάνειας της Γης και περιέχουν πάνω από 300.000 γνωστά είδη ασπόνδυλων ζωικών οργανισμών και φυκών, τα οποία εικάζεται ότι αποτελούν μόλις ένα μικρό ποσοστό του συνολικού αριθμού των ειδών. Ο σχετικά μικρός αριθμός θαλάσσιων οργανισμών έχουν μελετηθεί έως τώρα έχει ήδη δώσει χιλιάδες νέες ουσίες με ασυνήθιστες χημικές δομές, ενώ μόνο ένα μικρό ποσοστό από αυτές έχει μελετηθεί ως προς την πιθανή φαρμακολογική τους δράση.

Έχει αποδειχθεί ότι πολλά βιοδραστικά φυσικά προϊόντα από βενθικά ασπόνδυλα μειώνουν τη θήρευση, αλλά οι μηχανισμοί δράσης είναι συνήθως άγνωστοι. Έχει προταθεί, παρόλο που έχει ελάχιστα διερευνηθεί, ότι η θρεπτική αξία του θηράματος σχετίζεται αναλογικά με τη παρουσία μεταβολιτών που είναι υπεύθυνοι για τη χημική του προστασία. Οι σχέσεις ανάμεσα στις χημικές δομές και την ικανότητα χημικής προστασίας δεν έχουν συσχετιστεί πλήρως.

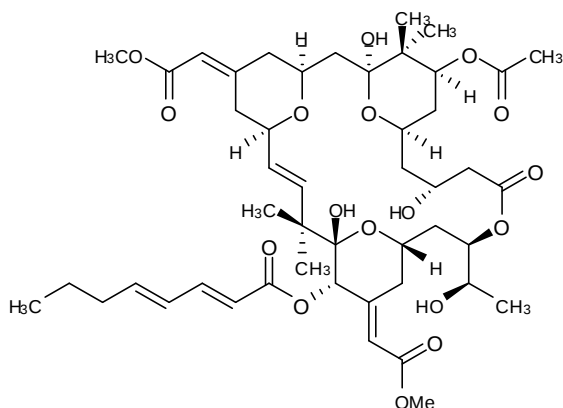
Η προσπάθεια για ανακάλυψη νέων βιοδραστικών ουσιών γίνεται ολοένα και εντονότερη σε όλο τον κόσμο και ενώσεις με πρωτότυπους χημικούς σκελετούς και ποικίλες δράσεις συνεχώς ανακαλύπτονται. Συχνά λόγω της φύσης του θαλάσσιου περιβάλλοντος, οι μεταβολίτες εμπεριέχουν αλογόνα (Br^- , Cl^- , I^-). Οι οργανισμοί που μελετώνται περιλαμβάνουν φύκη, μαλάκια, κυανοβακτήρια, δινομαστιγωτά, σπόγγους, κνιδόζωα, ασκίδια, εχινόδερμα, βακτήρια και μύκητες. Το φάσμα δράσεων που μελετάται περιλαμβάνει αντικαρκινική, αντιπαρασιτική, αντιφλεγμονώδη, αντιαλβινική, αντιρετροϊκή, αντιτροφική, κατά της βιοεπίστρωσης, κ.α.

Φυσικά προϊόντα θαλάσσιας προέλευσης, όπως αυτά που παρουσιάζονται στον Πίνακα 1, κυκλοφορούν ήδη στο εμπόριο ή βρίσκονται σε διάφορα στάδια κλινικών δοκιμών για την αντιμετώπιση ασθενειών. Για παράδειγμα, η βρυοστατίνη 1 προσδένεται στην πρωτεϊνική κινάση C με αποτέλεσμα να παρουσιάζει αντικαρκινικές και ανοσοδιεγερτικές ιδιότητες (Kortmansky & Schwartz 2003). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι δηλητήρια από θαλάσσια γαστερόποδα του γένους *Conus* φαίνεται να είναι πολύπλοκα μίγματα ενεργών ενώσεων, περιλαμβανόμενων νευροενεργών πεπτιδίων, τις κωνοτοξίνες. Οι τοξίνες αυτές είναι τόσο ισχυρές που όταν εκχέονται στο θήραμα (συνήθως ψάρι)

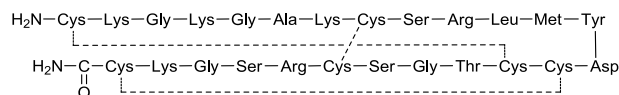
οδηγούν σε ακαριαία παράλυση. Μία εξ αυτών, το ζικονοτίδιο, αποτελεί το δραστικό συστατικό του ισχυρά αναλγητικού φαρμάκου Prialt, καθώς αλληλεπιδρά με τους νευρωνικούς υποδοχείς που μεταφέρουν ερεθίσματα (Akondi *et al.* 2014).

Πίνακας 1. Παραδείγματα θαλάσσιων φυσικών προϊόντων που κυκλοφορούν στο εμπόριο ή βρίσκονται σε προχωρημένα στάδια κλινικών δοκιμών.

Ασθένεια	Φυσικό Προϊόν	Οργανισμός	Προέλευση
Καρκίνος	Βρυοστατίνη 1	Βρυόζωο	Κόλπος Καλιφόρνια
Καρκίνος	Καχαλαλίδιο F	Μαλάκιο	Χαβάη
Καρκίνος	Δολαστατίνη 10	Μαλάκιο	Ινδικός Ωκεανός
Καρκίνος	Μυκαπεροξείδιο B	Σπόγγος	Ταϊλάνδη
Καρκίνος	Εκτεινασιδίνη-743	Ασκίδιο	Καραϊβική
HIV	Θευκή λαμελλαρίνη A	Ασκίδιο	Αυστραλία
Άσθμα	Κοντιγκναστερόλη	Σπόγγος	Παπούα, Ν. Γουινέα
Πόνος	Κωνοτοξίνες	Γαστερόποδο	Αυστραλία



Βρυοστατίνη 1



Ζικονοτίδιο

Παράλληλα, κάποια φυσικά προϊόντα θαλάσσιας προέλευσης χρησιμοποιούνται ως συστατικά σε καλλυντικά προϊόντα, όπως οι ψευδοπτεροσίνες από κοράλλια του γένους *Pseudopterogorgia* που εμφανίζουν ισχυρή αντιφλεγμονώδη δράση (Kijjoa & Sawangwong 2004).

1.3. Φύκη

1.3.1. Γενικά

Οι κύριοι ευκαρυωτικοί «φυτικοί» οργανισμοί των θαλασσών είναι τα φύκη. Τα

φύκη (algae) αποτελούν μία μεγάλη, ετερογενή και πολυφυλετική ομάδα σχετικά απλών στην οργάνωση «φυτών», τα οποία είναι αυτότροφα, υδρόβια ή ημιυδρόβια και στερούνται γνησίων ιστών (κυρίως αγωγού ιστού) και εξωτερικής διαμόρφωσης σε ρίζα, βλαστό και φύλλα. Αυτό το φυτικό σώμα ονομάζεται θαλλός (thallus) και τα φυτά που φέρουν θαλλό ονομάζονται θαλλόφυτα (thallophyta). Τα θαλλόφυτα, σύμφωνα με την κλασσική άποψη, περιλαμβάνουν δύο μεγάλες φυτικές ομάδες, τα φύκη και τους μύκητες. Μέχρι σήμερα έχουν προσδιορισθεί περίπου 25.000 είδη φυκών. Υπολογίζεται όμως ότι πρέπει να υπάρχουν δεκαπλάσια σε αριθμό που δεν έχουν περιγραφεί ακόμη, ιδίως αυτά που διαβιούν στους ωκεανούς (Γαλάτης *et al.* 1998). Σύμφωνα με το κλασσικό σύστημα ταξινόμησης του Cronquist, τα φύκη διακρίνονται σε επτά διαιρέσεις: Chlorophyta (Χλωροφύκη), Chrysophyta (Χρυσοφύκη), Phaeophyta (Φαιοφύκη), Euglenophyta (Ευγληνοφύκη), Cryptophyta (Κρυπτοφύκη), Pyrrhophyta (Πυρροφύκη), Rhodophyta (Ροδοφύκη) (Τζάκου & Κωνσταντινίδης 2003).

Η δυσκολία που παρουσιάζεται ακόμη και σε ειδικούς ερευνητές να δώσουν έναν σαφή ορισμό στα φύκη, οφείλεται στο ότι δεν υπάρχουν πολλά χαρακτηριστικά, που να είναι κοινά σε όλα τα φύκη και να απουσιάζουν από όλες τις άλλες ομάδες φυτικών οργανισμών.

Το στοιχείο που διακρίνει τα φύκη από τα ανώτερα φυτά είναι τα αναπαραγωγικά τους όργανα. Αυτά είναι μονοκύτταρα ή πολυκύτταρα αλλά αντίθετα με τα άλλα ανώτερα φυτά, στερούνται του προστατευτικού καλύμματος από άγονα κύτταρα που περιβάλλει τους αναπτυσσόμενους γαμέτες. Όλα τα αναπαραγωγικά κύτταρα των φυκών μετατρέπονται σε σπόρια ή γαμέτες. Αντίθετα, στα ανώτερα φυτά τα αναπαραγωγικά όργανα είναι πάντοτε πολύπλοκα και πολυκύτταρα και μόνο μερικά από τα εσωτερικά τους κύτταρα είναι γόνιμα. Αποτελούνται δηλαδή από δύο ιστούς, έναν αναπαραγωγικό και έναν άγονο, που όμως λειτουργούν μαζί ως ένα όργανο. Αυτό αντιπροσωπεύει ένα περισσότερο πολύπλοκο επίπεδο οργάνωσης του όλου «φυτικού» σώματος.

Μία άλλη διαφορά είναι η απουσία εμβρύου από τον κύκλο ζωής των φυκών. Υπάρχουν όμως και διαφορές στη δομή και στην οργάνωση του «φυτικού» σώματος μεταξύ ανωτέρων φυτών και φυκών. Σε αντίθεση με τα ανώτερα φυτά, στα φύκη περιλαμβάνονται πολλοί μονοκύτταροι τύποι, αλλά και στους πολυκύτταρους το φυτικό σώμα παρουσιάζει απλούστερη οργάνωση. Το υγρό περιβάλλον στο οποίο ζουν τα φύκη,

το μικρό τους μέγεθος, η γενική παρουσία φωτοσυνθετικών κυττάρων σε όλο το σώμα τους, καθώς και η δυνατότητα να απορροφούν νερό και θρεπτικά συστατικά κατευθείαν από το περιβάλλον τους, είναι οι βασικοί παράγοντες που ελαχιστοποιούν την ανάγκη για μεταφορά και στήριξη. Στα φύκη δεν αναπτύχθηκε γνήσιος αγωγός και στηρικτικός ιστός (Αριανούτσου-Φαραγγιτάκη 2009, Γαλάτης *et al.* 1998, Γιαννίταρος *et al.* 2004).

Τα φύκη απαντούν σχεδόν παντού. Εκτός από τις θάλασσες, τις λίμνες και τους ποταμούς, μπορεί να αναπτύσσονται σε κορμούς δένδρων, σε βράχους που βρέχονται από το κύμα, ή συμβιωτικά με άλλα φυτά ή και ζώα. Πολλές φορές ζουν σε αρκετά δυσμενείς συνθήκες, όπως πολύ χαμηλές ή πολύ υψηλές θερμοκρασίες (μέχρι 70°C). Ακόμη, έχουν βρεθεί σε νερά με υψηλή αλατότητα (π.χ. σε αλυκές) ή σε πολύ μεγάλα βάθη (μέχρι 100 m), όπου η ένταση του φωτός είναι πολύ χαμηλή. Εξελικτικά, τα φύκη πρωτοπαρουσιάστηκαν στη Γη πριν από 3,1 δις χρόνια (Προκάμβριο) (Γιαννίταρος *et al.* 2004, Τζάκου & Κωνσταντινίδης 2003).

1.3.2. Φαιοφύκη

Τα φαιοφύκη είναι αποκλειστικά θαλάσσιες βενθικές μορφές με μόνο τρία γένη σε γλυκά νερά. Χαρακτηριστικές τους χρωστικές είναι οι χλωροφύλλες α και c, καροτένια α και β, φυκοξανθίνη (στην οποία οφείλεται και το χρώμα τους), διατοξανθίνη, νεοξανθίνη, φλαβοξανθίνη, λουτεΐνη και βιολοξανθίνη. Περιλαμβάνουν πολύ γνωστές μορφές όπως τα Kelps (*Macrocystis*, *Laminaria*, *Nereocystis*, *Postelsia*) και απαντώνται στην υποπαράλια ζώνη των ψυχρών υδάτων των βραχωδών περιοχών του Ατλαντικού και Ειρηνικού ωκεανού. Μπορούν να φτάσουν σε μεγάλα μεγέθη, όπως φύκη του γένους *Macrocystis* που φτάνουν σε μήκος τα 60 m και σχηματίζουν ολόκληρα υποβρύχια δάση. Επίσης περιλαμβάνουν νηματοειδείς μορφές (*Ectocarpus*) και φύκη των βράχων (*Sargassum*, *Cystoseira*, *Fucus*) (Γιαννίταρος *et al.* 2004).



Δάση από Kelps



Εκπρόσωπος του γένους *Sargassum*

1.3.3. Οικογένεια Dictyotaceae – Είδος *Dilophus spiralis*

Η οικογένεια Dictyotaceae συμπεριλαμβάνει κοσμοπολιτικά είδη φαιοφυκών τα οποία θεωρούνται μία παραγωγική πηγή δευτερογενών μεταβολιτών. Αντιπρόσωποι αυτής της οικογένειας έχουν μελετηθεί διεξοδικά σε πολλές ερευνητικές εργασίες στο χώρο της χημείας για περισσότερα από 50 έτη, οδηγώντας στην απομόνωση σχεδόν 500 νέων φυσικών προϊόντων. Πολλοί από τους μεταβολίτες αυτούς έχουν αξιολογηθεί και αποδειχθεί ότι εμφανίζουν ποικίλα επίπεδα αντιβακτηριακής, αντιαμφοβικής, κυτταροτοξικής, αντιτροφικής, ιχθυοτοξικής, και/ή αντιβιοεπιστρωτικής δράσης. Ανάμεσα σε αυτά, είδη των γενών *Dictyota* και *Dilophus* παράγουν κυρίως σεσκιτερπένια και διτερπένια κανονικής βιοσύνθεσης παρουσιάζοντας μία ευρεία ποικιλία ανθρακικών σκελετών (Ioannou *et al.* 2008, Ioannou *et al.* 2011a).

Το είδος *Dilophus spiralis* (Montagne) G. Hamel εντοπίζεται κυρίως στις χώρες που περικλείουν τη λεκάνη της Μεσογείου, αλλά και στη Βόρειο-Ανατολική Ευρώπη σε μικρότερο βαθμό (Εικ. 2).

Είναι αυτότροφο, φωτοσυνθετικό φύκος που συναντάται από την άνοιξη έως το φθινόπωρο σε φωτόφιλες, παράκτιες περιοχές, πάνω σε βράχους ή στην άμμο, κοντά στην επιφάνεια του νερού.

Ο θαλλός είναι καφεκίτρινος, ύψους 10-15 cm και συγκρατείται στο υπόστρωμα μέσω μίας βάσης από στόλωνες. Διακλαδίζεται σε πολλά πεπλατυσμένα και συχνά στρεπτά ελάσματα, τα οποία διχοτομούνται.

Η συστηματική κατάταξη του είδους *D. spiralis* (Guiry 2015) φαίνεται στη συνέχεια.

Βασίλειο: Chromista

Άθροισμα: Ochrophyta

Κλάση: Phaeophyceae

Υποκλάση: Dictyotophycidae

Τάξη: Dictyotales

Οικογένεια: Dictyotaceae

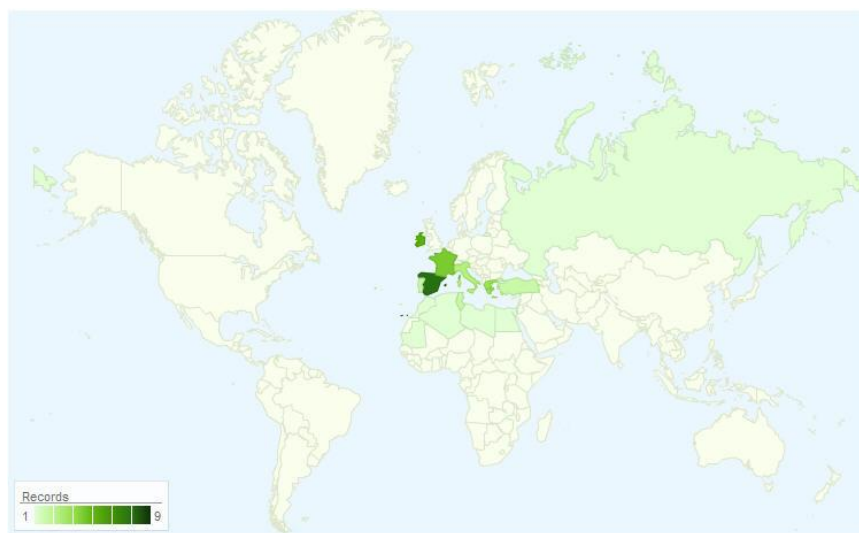
Φυλή: Dictyoteae

Γένος: *Dilophus*

Είδος: *D. spiralis*

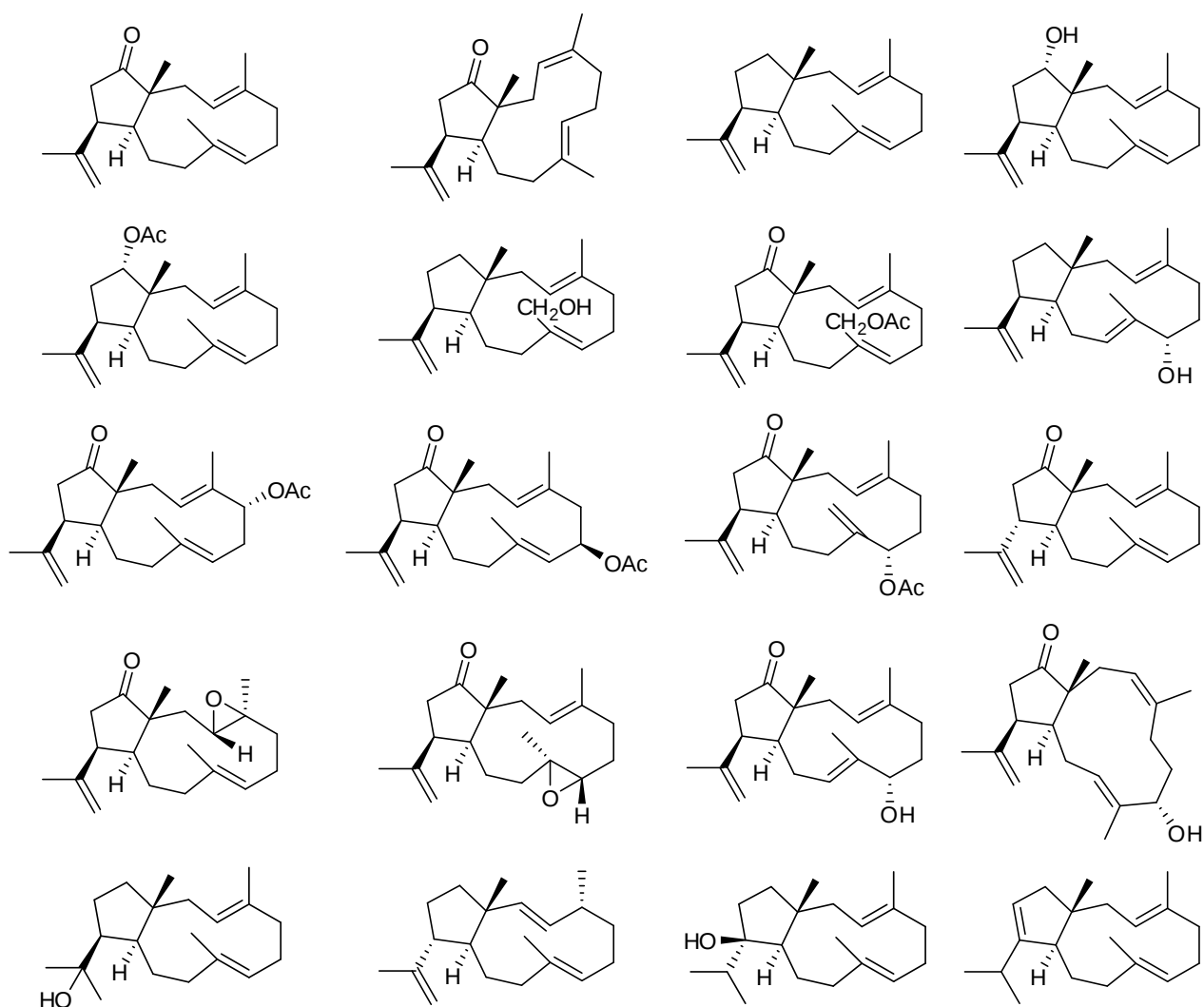


Το φαιοφύκος *Dilophus spiralis*



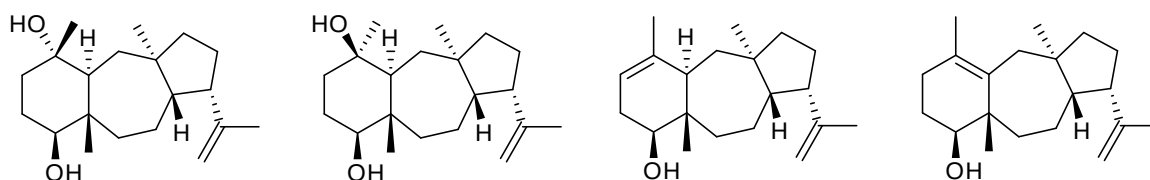
Εικόνα 2. Παγκόσμια εξάπλωση του φαιοφύκου *Dilophus spiralis*.

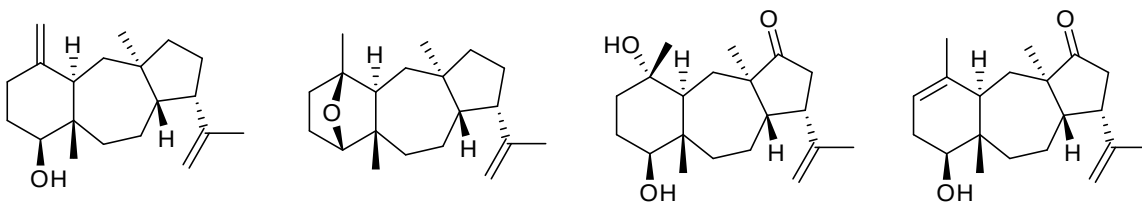
Από το φαιοφύκος *D. spiralis* έχουν απομονωθεί πολλά διτερπένια με σκελετό δολαμπελλανίου (Εικ. 3), τα οποία έχουν επιδείξει διαφορετικά επίπεδα αντιβακτηριακής δράσης έναντι στελεχών *Staphylococcus aureus* ανθεκτικών στη μεθικιλίνη (Ιοαννου *et al.* 2011a, Ιοαννου *et al.* 2012).



Εικόνα 3. Διτερπένια με σκελετό δολαμπελλανίου που έχουν απομονωθεί από το *Dilophus spiralis*.

Επίσης, από το *D. spiralis* έχουν απομονωθεί μεταξύ άλλων διτερπένια με σκελετό δολαστανίου (Εικ. 4), καθώς και διτερπένια με πρωτότυπους ανθρακικούς σκελετούς (Εικ. 5) (Ιοαννου *et al.* 2008, Ιοαννου *et al.* 2011b, Ιοαννου *et al.* 2013).





Εικόνα 4. Διτερπένια με σκελετό δολαστανίου που έχουν απομονωθεί από το *Dilophus spiralis*.



Εικόνα 5. Διτερπένια με πρωτότυπους ανθρακικούς σκελετούς που έχουν απομονωθεί από το *Dilophus spiralis*.

1.4. Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί

Ως ενδοφυτική περιοχή ορίζεται οποιαδήποτε περιοχή εντός της φυτικής ή ζωικής επιδερμίδας (Beattie 2006). Οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί διαβιούν μέσα σε φυτικούς ή ζωικούς οργανισμούς, χερσαίους και θαλάσσιους, αλλά και σε φύκη.

Στα φυκή συνήθως απαντώνται στις διακυτταρικές ή αποπλαστικές κενές περιοχές του ιστού του φύκου. Οι περιοχές αυτές φτάνουν πολλές φορές το 30% του συνολικού όγκου του εσωτερικού περιβάλλοντος των ριζοειδών και το 70% του θαλλού.

Η συνεισφορά των ενδοφύτων στον ξενιστή είναι η προώθηση της αύξησης, η καταστολή των παθογόνων, πιθανά η αποτοξίνωση του ιστού από βλαβερές ουσίες, η διαλυτοποίηση των φωσφορικών αλάτων και η παροχή αφομοιώσιμου αζώτου στον οργανισμό (Rosenblueth & Martinez-Romero 2006). Οι ενδοφυτικοί μύκητες υδρόβιων φυτικών οργανισμών για παράδειγμα, προκαλούν ασυμπτωματικές μολύνσεις σε ιστούς φυτών (Li *et al.* 2010), προστατεύουν το φυτό από τα έντομα και τους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς δίνοντας στον ξενιστή εξελικτικό πλεονέκτημα σε ακραίες συνθήκες. Μερικοί ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί μεταφέρονται μέσω των σπόρων, ενώ άλλοι έχουν την ικανότητα να αποικούν τον ξενιστή μέσω ιδιοτήτων που βρίσκονται ακόμα υπό μελέτη. Κάποιες ενδείξεις όμως υπάρχουν στο ότι μπορούν να εισέλθουν στον οργανισμό μέσω

των σημείων διαφοροποίησης και ακραίου μεριστώματος του θαλλού ή και από τραύματα (Beattie 2006).

Πολύ λίγα είναι γνωστά ακόμα για τη σχετική σημασία των εξελικτικών και οικολογικών παραγόντων που ελέγχουν την ενδοκυτταρική μικροβιακή χλωρίδα των φυκών. Φαίνεται ότι ο κάθε οργανισμός πρέπει να μελετάται τόσο από οικολογική όσο και από εξελικτική σκοπιά ώστε να γίνουν κατανοητές οι δυναμικές των ενδοσυμβιωτικών κοινοτήτων και η πολυπλοκότητά τους, αλλά και οι παράμετροι που τις επηρεάζουν (Hollants *et al.* 2013).

Στη περίπτωση των σπόγγων έχει βρεθεί ότι περιέχουν πολύ μεγάλο αριθμό συμβιωτών μικροοργανισμών λόγω του γεγονότος ότι στερούνται κάποιου ανοσοποιητικού μηχανισμού που θα τους προστατέψει από εισβολές. Οι μικροβιακοί συμβιώτες προσφέρουν ως αντάλλαγμα για τα θρεπτικά στοιχεία που προσλαμβάνουν και φιλτράρουν οι σπόγγοι, ένα χημικό οπλοστάσιο στη διάθεση του ξενιστή. Οι χημικές αυτές ουσίες πολλές φορές παρουσιάζουν εξαιρετική βιοδραστητικότητα σε φαρμακευτικές εφαρμογές.

Πολλοί από τους μικροοργανισμούς είναι υποχρεωτικά ενδοσυμβιώτες, ενώ άλλοι μπορούν να καλλιεργηθούν. Με μεθόδους μεταγονιδιωματικής και γενετικής μηχανικής τα βιοσυνθετικά τους γονίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για παραγωγή νέων προϊόντων (Fuerst 2014).

1.5. Βιομετατροπές χημικών ουσιών

1.5.1. Γενικά

Ο όρος βιομετατροπή τυπικά αναφέρεται σε μια αντίδραση που καταλύεται από κάποιο ένζυμο και έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία προϊόντων με διαφορετική δομή. Μπορεί επίσης να προσδιοριστεί ως η χρήση ζωντανών βιολογικών συστημάτων με σκοπό συγκεκριμένες δομικές αλλαγές σε χημικά μόρια, τα οποία δεν αποτελούν φυσικά υποστρώματα των συστημάτων αυτών (Borges *et al.* 2007). Τέτοιες μετατροπές έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό νέων χημικών ενώσεων οι οποίες δεν είναι πάντα εύκολο να συντεθούν μέσω καθαρά χημικών αντιδράσεων (Borges *et al.* 2009). Επίσης, η βιοαποικοδόμηση, ως διαδικασία αποτοξικοποίησης του περιβάλλοντος, συγκαταλέγεται στις βιομετατροπές που χρίζουν ιδιαίτερης προσοχής (Kolvenbach *et al.* 2014, Molina *et al.* 2012).

Ο άνθρωπος πάντα εκμεταλλευόταν την ικανότητα των μικροοργανισμών να παράγουν ευρεία ποικιλία επιθυμητών αρωμάτων και γεύσεων σε τρόφιμα και ποτά και σήμερα εστιάζονται προσπάθειες για περαιτέρω χρήση του πολυδύναμου ενζυματικού δυναμικού των μικροβίων. Τα ένζυμα που εμπλέκονται στο δευτερογενή μεταβολισμό και εμφανίζουν χαμηλή εξειδίκευση υποστρώματος είναι πιθανό να είναι ικανά για βιομετατροπές διαφορετικών τύπων χημικών ουσιών.

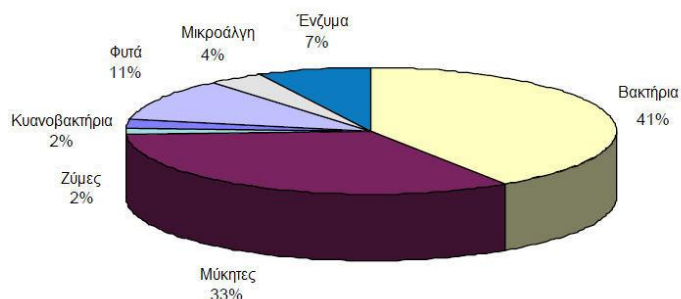
Οι μικροοργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αποικοδόμηση τοξικών αποβλήτων, αλλά και για την παραγωγή φαρμακευτικών ουσιών μέσω βιομετατροπών (Kolvenbach *et al.* 2014).

1.5.2. Πλεονεκτήματα βιομετατροπών έναντι χημικής σύνθεσης

Η μέθοδος της χημικής σύνθεσης συχνά έχει ως αποτέλεσμα παραγωγικές διαδικασίες κοστοβόρες και μη φιλικές προς το περιβάλλον. Υπό αυτή την έννοια οι βιοκαταλύτες μπορούν να προσφέρουν σημαντικό πλεονέκτημα. Τα κύρια πλεονεκτήματα της χρήσης των μικροβιακών βιοκαταλυτών έναντι της κλασσικής χημικής σύνθεσης περιλαμβάνουν το γεγονός ότι η διαδικασία αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί κάτω από ήπιες συνθήκες, έχει λιγότερα τοξικά απόβλητα και οι αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα σε οικολογικά αποδεκτές συνθήκες, με την ελάχιστη δυνατή επίπτωση στο περιβάλλον (Molina *et al.* 2013).

Επιπρόσθετα, η χημική εξειδίκευση, η στερεοεξειδίκευση και η επιλεκτικότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στις βιοτεχνολογικές μεθόδους επιτρέπουν συχνά την παραγωγή συγκεκριμένων εναντιομερών, εξαλείφοντας με αυτόν τον τρόπο την ανάγκη πολύπλοκων διαχωρισμών των επιθυμητών προϊόντων που σε διαφορετική περίπτωση θα αποτελούσαν αναγκαία βήματα της διαδικασίας (Borges *et al.* 2007). Ως επιλεκτικότητα ορίζεται η ικανότητα του ενζύμου να επιλέγει ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα ή λειτουργική ομάδα εν μέσω πολλών διαθέσιμων, ενώ η εξειδίκευση είναι η ικανότητα του ενζύμου να καταλύει την παραγωγή ενός μόνο στερεοϊσομερούς του προϊόντος μέσω συγκεκριμένων βημάτων αντίδρασης. Επιπλέον, τα προϊόντα που προκύπτουν από μια διαδικασία βιομετατροπής μπορούν κάλλιστα να χαρακτηριστούν ως «φυσικά προϊόντα» (Molina *et al.* 2013). Για το λόγο αυτό οι βιομετατροπές έχουν αναδειχθεί ως πλεονεκτικές μέθοδοι για την παραγωγή φυσικών προϊόντων με εμπορική και βιομηχανική σημασία σε σχέση και με τη χημική σύνθεση.

Στο ερευνητικό πεδίο των βιομετατροπών έχουν δημοσιευθεί αρκετές εργασίες στις οποίες υπεύθυνοι για τις βιομετατροπές είναι ευκαρυωτικοί και προκαρυωτικοί οργανισμοί, με τα βακτήρια και τους μύκητες να είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι (Εικ. 6) (de Carvalho & da Fonseca 2006).



Εικόνα 6. Κατηγορίες μικροοργανισμών που εμπλέκονται σε βιομετατροπές.

1.5.3. Βιομετατροπές από βακτήρια

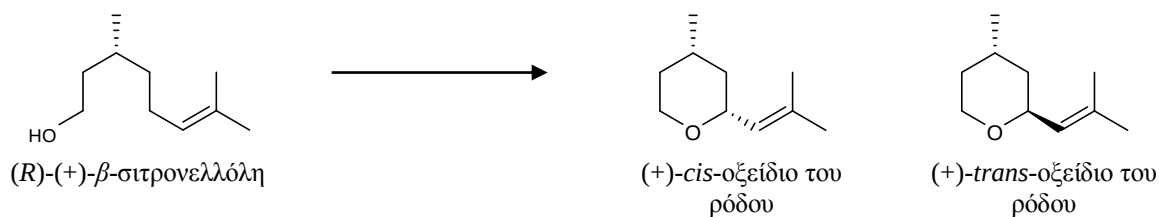
Το βακτηριακό γένος *Pseudomonas* είναι μία από τις πιο ετερογενείς και οικολογικώς σημαντικές ομάδες με πολλούς αντιπροσώπους του να χρησιμοποιούνται σε διάφορες βιομετατροπές τερπενίων. Πρόκειται για αερόβια Gram αρνητικά βακτήρια με ικανότητα κίνησης και σχήμα βακίλου, που χαρακτηρίζονται από έντονη προσαρμοστικότητα λόγω των πολύπλοκων ενδογενών ενζυμικών συστημάτων που διαθέτουν (Molina *et al.* 2013).

Οι πρώτες μελέτες βιομετατροπών τερπενίων ξεκίνησαν πριν μισό αιώνα όταν ο Seubert (1960) ανέφερε την ικανότητα ενός εδαφικού στελέχους *Pseudomonas citronellolis* να χρησιμοποιεί τη σιτρονελλόλη ως πηγή άνθρακα. Αργότερα και άλλα στελέχη από το ίδιο γένος βρέθηκε ότι μπορούν να αποικοδομούν την ένωση αυτή, όπως τα *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Pseudomonas fluorescens*.

Άκυκλες μονοτερπενικές αλκοόλες, όπως η σιτρονελλόλη, η γερανιόλη, η λιναλοόλη και η νερόλη θεωρούνται σημαντικά πρόδρομα για τη σύνθεση ενώσεων που χρησιμοποιούνται ως προσθετικά γεύσης και αρώματος. Επίσης, αποτελούν τα κύρια πρόδρομα μόρια της βιοσύνθεσης των τερπενίων. Εντούτοις, οι ενώσεις αυτές δε χρησιμοποιούνται απευθείας στη βιομηχανία ως προσθετικά επειδή είναι σχετικά ασταθείς

και έχουν σχετικά έντονη οσμή (Molina *et al.* 2013).

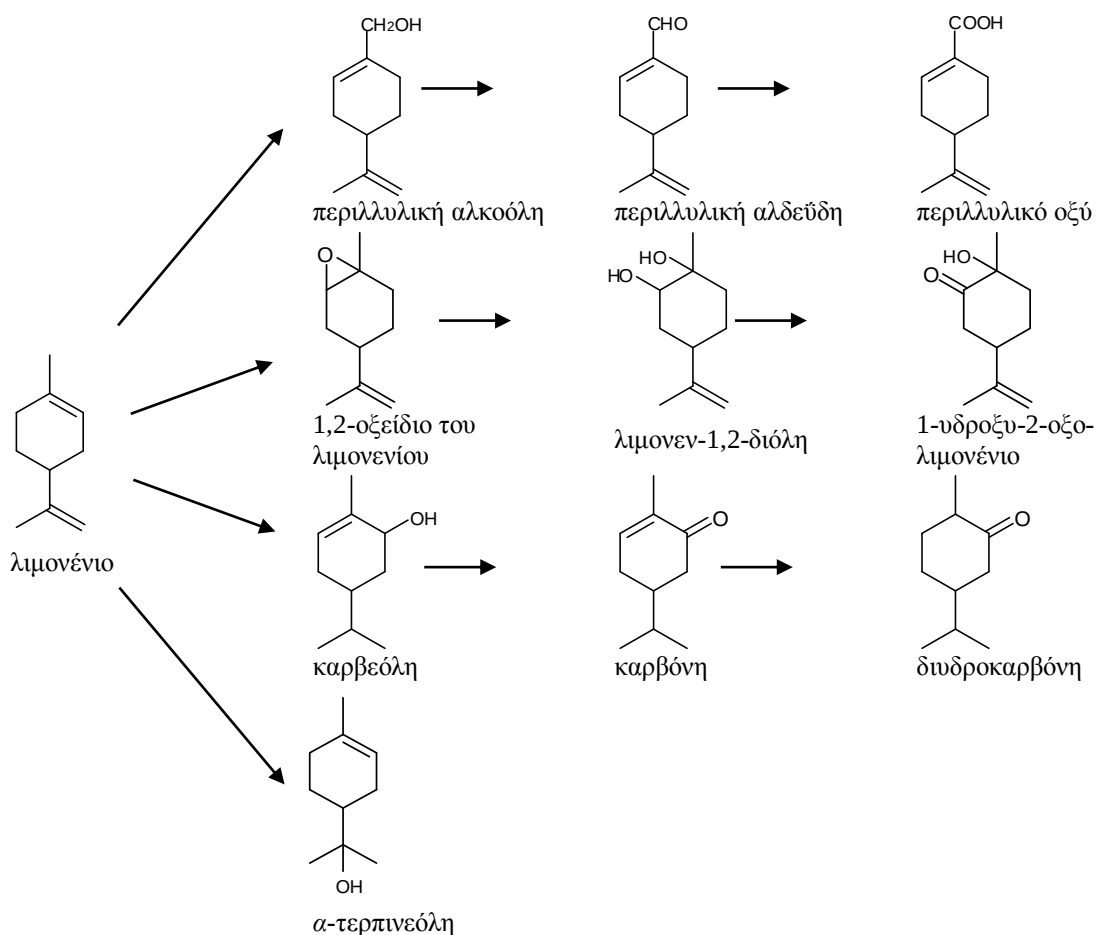
Χαρακτηριστικό παράδειγμα βιομετατροπής τερπενίου με εμπορική σημασία είναι η βιομετατροπή της σιτρονελλόλης σε οξείδιο του ρόδου. Η ένωση αυτή έχει απομονωθεί σε ίχνη από αιθέρια έλαια αντιπροσώπων της οικογένειας Rosaceae και είναι υπεύθυνη για τη χαρακτηριστική οσμή των ανθέων τους. Χρησιμοποιείται εμπορικά στην αρωματοποιία και βιομηχανικά παράγεται μέσω μιας σειράς αντιδράσεων με κύρια αντίδραση τη φωτοοξυγόνωση της σιτρονελλόλης (Alsters *et al.* 2009). Η διαδικασία της μικροβιακής βιομετατροπής μέσω ενός αντιπροσώπου του γένους *Pseudomonas* φαίνεται να είναι γρηγορότερη, αποδοτικότερη και οικονομικότερη (Εικ. 7). Τα παράγωγα της βιομετατροπής ήταν μίγμα *cis* και *trans* ισομερών σε υψηλή απόδοση. Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν επέδειξαν ανοχή στην τοξικότητα μεγάλων συγκεντρώσεων σιτρονελλόλης. Για το λόγο αυτό, η παραγωγή οξειδίου του ρόδου μέσω βιομετατροπής αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη τεχνική για την εμπορική παραγωγή αυτού του αρώματος (Pimentel *et al.* 2012).



Εικόνα 7. Βιομετατροπή της σιτρονελλόλης σε οξείδιο του ρόδου από ένα στέλεχος *Pseudomonas* sp.

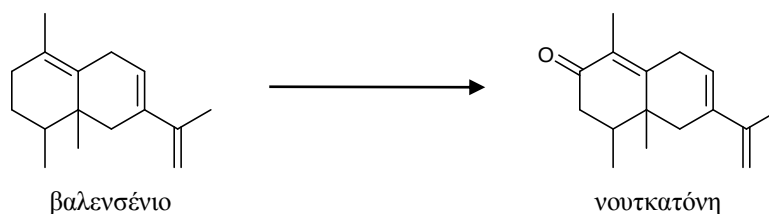
Σημαντικές έρευνες σε βιομετατροπές έχουν πραγματοποιηθεί και σε μονοκυκλικά τερπένια. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η μετατροπή του λιμονενίου σε μια σειρά ενώσεων από στελέχη του γένους *Pseudomonas* (Εικ. 8). Το λιμονένιο αποτελεί το πιο άφθονο μονοτερπένιο και αντιπροσωπεύει το 90% του αιθέριου ελαίου της φλούδας του πορτοκαλιού, η οποία αποτελεί ένα χαμηλού κόστους παραπροϊόν των καρπών του γένους *Citrus*. Για το λόγο αυτό, το λιμονένιο έχει μελετηθεί αρκετά ως προς τη βιομετατροπή του σε παράγωγα υψηλής αξίας με εμπορική σημασία. Μερικά από αυτά είναι η καρβεόλη, η καρβόνη, η διϋδροκαρβόνη και η α-τερπινεόλη. Η καρβόνη για παράδειγμα αποτελεί παράγωγο μείζονος σημασίας καθότι έχει ευρεία εφαρμογή ως προσθετικό γεύσης και αρώματος σε προϊόντα τροφίμων, φαρμακευτικά προϊόντα και προϊόντα υγιεινής με

επιπρόσθετες χρήσεις στη γεωργία, την ιατρική και την οργανική σύνθεση (Molina *et al.* 2013).



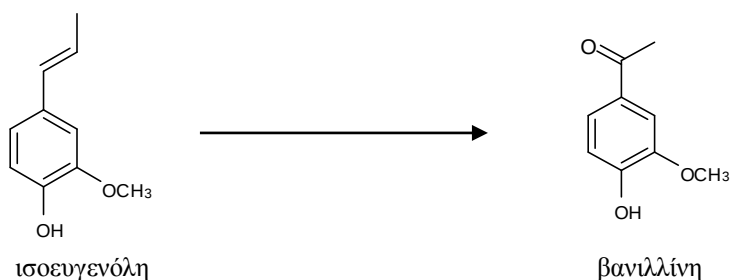
Εικόνα 8. Βιομετατροπή του λιμονενίου μέσω διαφορετικών βιοχημικών οδών από στελέχη του γένους *Pseudomonas*.

Παρόμοιες εφαρμογές έχουν βρεθεί και στην ομάδα των σεσκιτερπενίων, όπου το βαλενσένιο βιομετατρέπεται σε νουτκατόνη, η οποία αποτελεί μία πολύ ελκυστική ένωση με χαρακτηριστικό το ευχάριστο άρωμα γκρέιπφρουτ. Το βακτήριο που πραγματοποίησε τη βιομετατροπή ήταν ένα μεταλλαγμένο στέλεχος του είδους *Pseudomonas putida* (Εικ. 9) (Molina *et al.* 2013).



Εικόνα 9. Βιομετατροπή του βαλενσένιου σε νουτκατόνη από ένα στέλεχος *Pseudomonas putida*.

Στην ομάδα των τερπενίων αξίζει να αναφερθεί η βιομετατροπή της ευγενόλης και ισοευγενόλης σε βανιλίνη με αξιόλογη εμπορική σημασία (Εικ. 10). Οι δύο αυτές ενώσεις χρησιμοποιούνται κυρίως στην αρωματοποιία σε συνθέσεις κοντά στο άρωμα των ανθέων γαρύφαλλου. Ωστόσο οι ενώσεις αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως εκκινητές για τη σύνθεση βανιλίνης, ενός από τα κυριότερα αρώματα που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η ευγενόλη και η ισοευγενόλη μετατρέπονται σε βανιλίνη από βακτήρια του γένους *Pseudomonas* (Unno *et al.* 2007). Η βιομετατροπή ισοευγενόλης σε βανιλίνη έχει επιτευχθεί και από στελέχη του βακτηρίου *Bacillus subtilis* με αρκετά ικανοποιητική απόδοση (Shimoni *et al.* 2000), ενώ ενδιαφέρουσες σχετικές έρευνες έχουν γίνει και με μετατροπή του φερουλικού οξέος από αγροχημικά απόβλητα σε βανιλίνη μέσω οξυγαλακτικών βακτηρίων (Kaur *et al.* 2013).

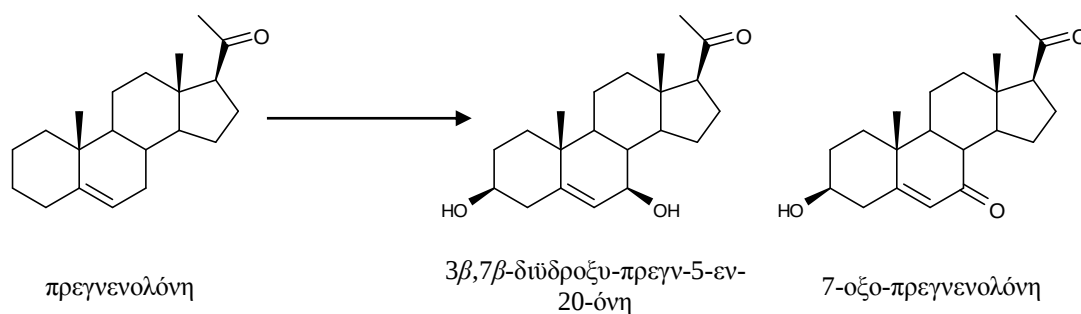


Εικόνα 10. Βιομετατροπή της ισοευγενόλης σε βανιλίνη από ένα στέλεχος *Pseudomonas* sp.

Η βενζαλδεΐδη είναι το δεύτερο πιο σημαντικό ποσοτικά συστατικό στη βιομηχανία τροφίμων μετά τη βανιλίνη και διαθέτει ένα ευχάριστο άρωμα αμυγδάλου, συνιστώντας βασικό συστατικό της γεύσης των κερασιών. Έχει περιγραφεί η βιοτεχνολογική παραγωγή της βενζαλδεΐδης μέσω της βιομετατροπής της φαινυλαλανίνης από στέλεχος *P. putida* (Molina *et al.* 2013).

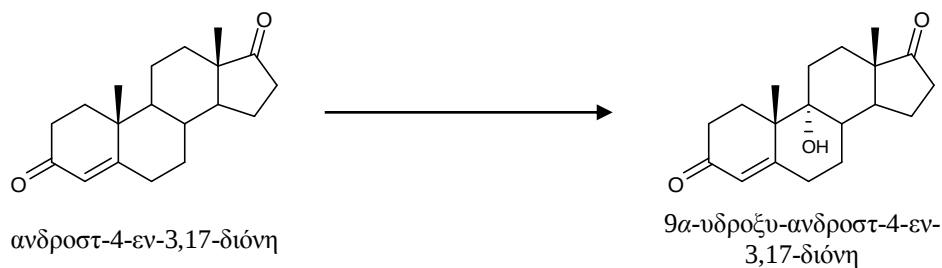
Έχει βρεθεί ότι είδη του γένους *Bacillus* βιομετατρέπουν την πρεγνενόλη, η

οποία είναι μια κύρια ορμόνη των ανθρώπινων νευρικών ιστών και ο θεραπευτικός της ρόλος στην επιδιόρθωση ελαττωματικών νευρώνων είναι τεκμηριωμένος. Επιπλέον, αποτελεί πρόδρομη ένωση για πολλές στεροειδείς ορμόνες. Ο μεταβολισμός της πρεγνενολόνης από στελέχη *Bacillus* sp. παρήγαγε μίγμα της 3 β ,7 β -διϋδροξυ-πρεγν-5-εν-20-όνης και της 7-οξο-πρεγνενολόνης (Εικ. 11) (Bhatti & Khera 2012).



Εικόνα 11. Βιομετατροπή της πρεγνενολόνης σε δύο παράγωγα από στελέχη *Bacillus* sp.

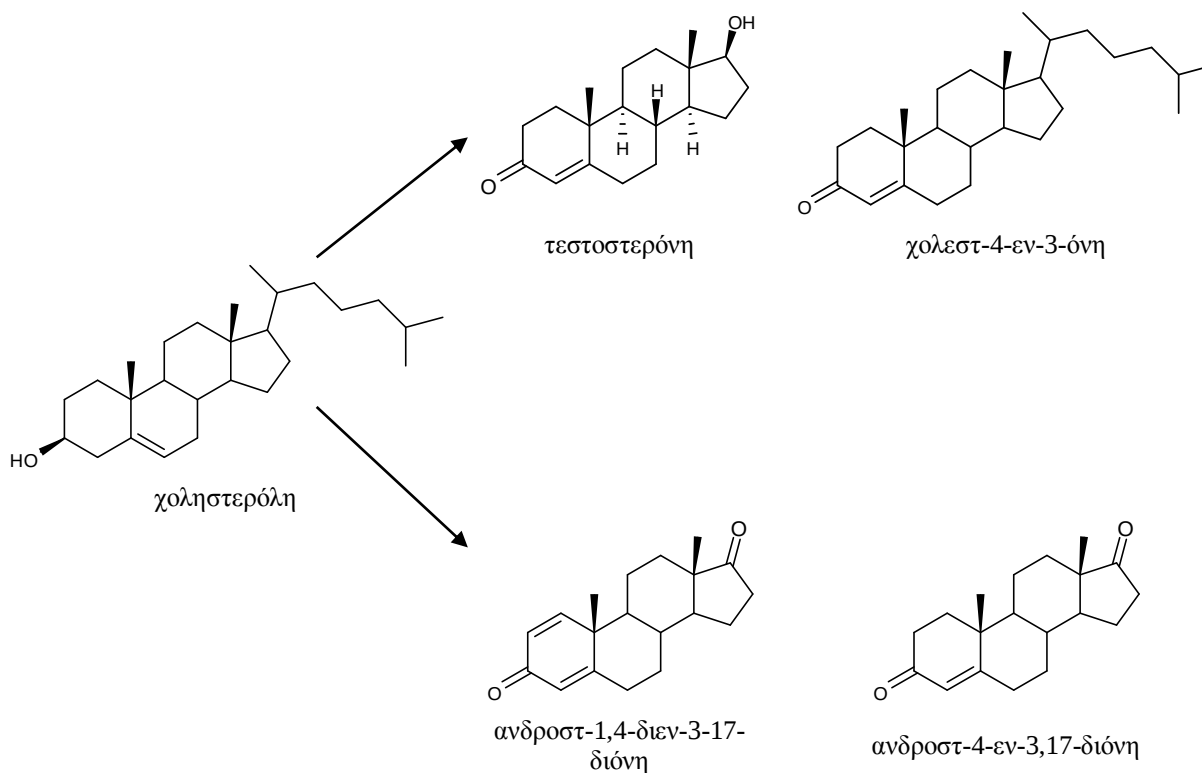
Είδη *Rhodococcus* sp. βιομετέτρεψαν μέσω απλής υδροξυλίωσης το στεροειδές ανδροστ-4-εν-3,17-διόνη στο 9 α -υδροξυ-ανδροστ-4-εν-3,17-διόνη (Εικ. 12) (Bhatti & Khera 2012).



Εικόνα 12. Βιομετατροπή της ανδροστ-4-εν-3,17-διόνης σε 9 α -υδροξυ-ανδροστ-4-εν-3,17-διόνη από ένα στέλεχος *Rhodococcus* sp.

Το μόριο της χοληστερόλης έχει αναφερθεί να βιομετατρέπεται από είδη του ακτινοβακτηριακού γένους *Mycobacterium* σε τέσσερις ενώσεις, την τεστοστερόνη, η οποία αποτελεί κύρια ορμόνη των αρσενικών ατόμων (ανδρογόνο), την χολεστ-4-εν-3-όνη, την ανδροστ-1,4-διεν-3,17-διόνη και την ανδροστ-4-εν-3,17-διόνη (Εικ. 13) (Bhatti & Khera 2012), ενώ έχει αναφερθεί η βιομετατροπή της χοληστερόλης σε τεστοστερόνη και

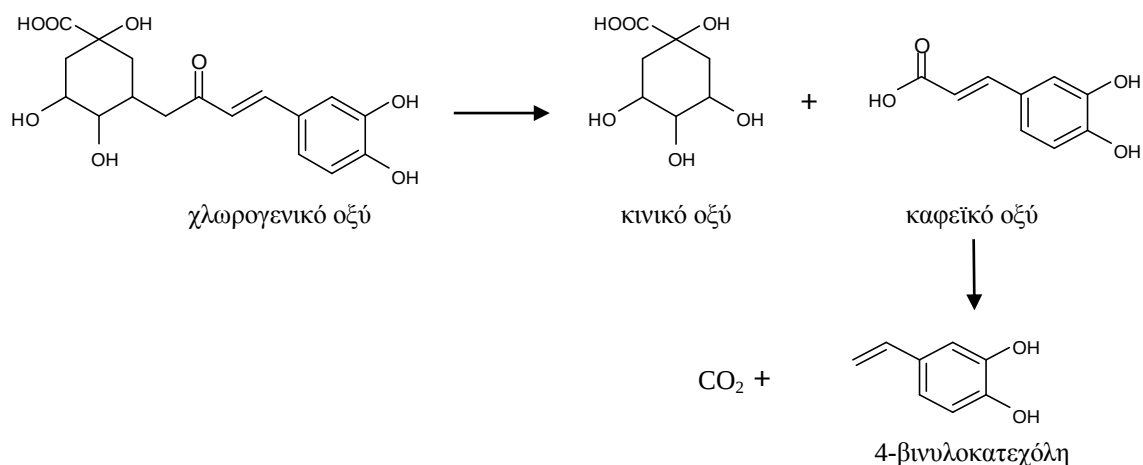
από το βακτήριο *Lactobacillus bulgaricus* (Kumar *et al.* 2001).



Εικόνα 13. Βιομετατροπή της χοληστερόλης σε τέσσερα παράγωγα από είδη *Mycobacterium* sp.

Βιομετατροπές στις οποίες εμπλέκονται βακτήρια έχουν επίσης μελετηθεί και σε περιπτώσεις πολυφαινολών. Το ενδιαφέρον για τις ενώσεις αυτές γεννάται από το γεγονός ότι σύμφωνα με αναφορές παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλία βιολογικών δράσεων, όπως η καταστροφή των ελευθέρων ριζών, η δέσμευση μεταλλικών ιόντων και η ρύθμιση της ενεργότητας ορισμένων ενζύμων. Στις ενώσεις αυτές ανήκουν και τα φαινολικά οξέα, τα οποία αν και συναντώνται στα λαχανικά, οι μεγαλύτερες ποσότητες εντοπίζονται στον καφέ. Οι ενώσεις αυτές συνήθως είναι τοξικές για τους μικροοργανισμούς, αλλά όχι για όλους. Κάποιοι μπορούν να τις χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα (Bel-Rhlid *et al.* 2013).

Το βακτήριο *Lactobacillus johnsonii* βρέθηκε ότι μετατρέπει το χλωρογενικό οξύ σε κινικό οξύ και καφεϊκό οξύ, ενώ το τελευταίο πάλι από το ίδιο βακτήριο, αλλά μέσω ενός διαφορετικού ενζυμικού συστήματος μετατρέπεται σε διοξειδίο του άνθρακα και 4-βινυλοκατεχόλη (Εικ. 14). Στην πρώτη αντίδραση το βακτήριο διασπά τον εστερικό δεσμό ανάμεσα στο καφεϊκό και το κινικό οξύ (Bel-Rhlid *et al.* 2013).

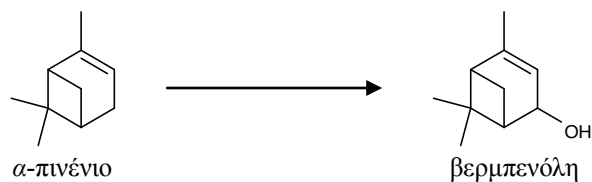


Εικόνα 14. Βιομετατροπή του χλωρογενικού οξέος σε κινικό και καφεϊκό οξύ από το βακτήριο *Lactobacillus johnsonii*.

Στη φαρμακευτική βιομηχανία στελέχη *Pseudomonas* sp. βρέθηκαν ικανά να μετατρέπουν την (S)-νικοτίνη σε τροποποιημένες πυριδίνες, οι οποίες χρησιμοποιούνται ως πρόδρομα μόρια για την παραγωγή φαρμάκων (Molina *et al.* 2013).

1.5.4. Βιομετατροπές από μύκητες

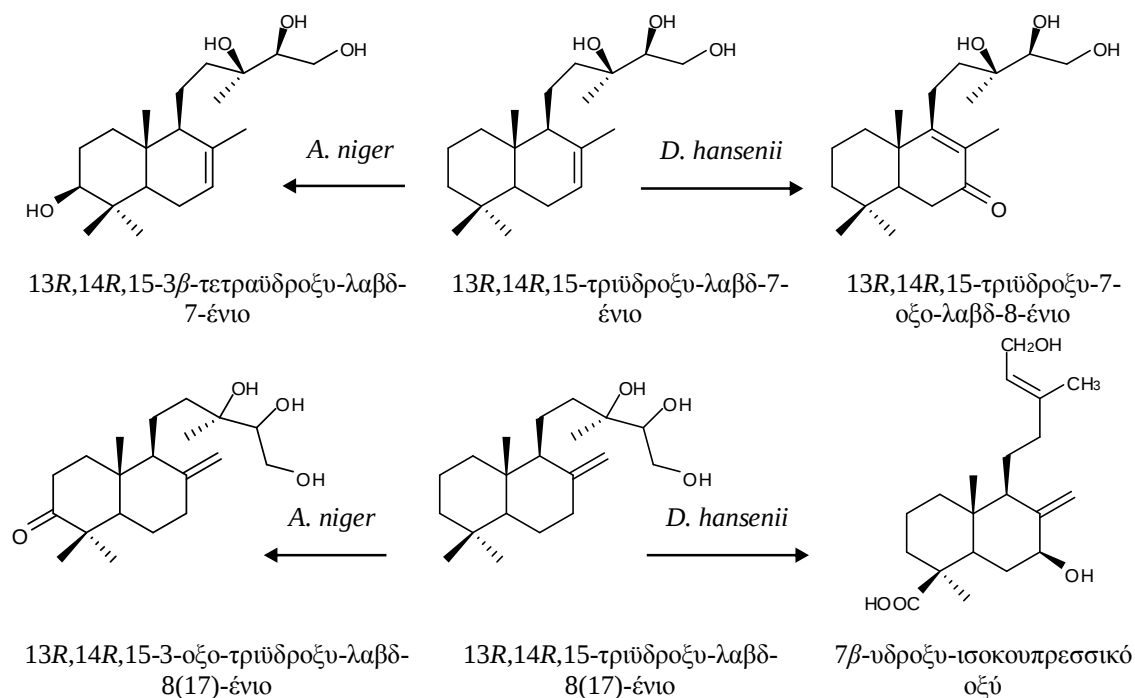
Ένα ενδοφυτικό μυκητιακό στέλεχος *Mucor* sp. που απομονώθηκε από το φυτό *Dipteryx alata* ήταν ικανό να βιομετατρέψει το μονοτερπένιο α -πινένιο σε βερμπενόλη μέσω μιας απλής υδροξυλίωσης (Εικ. 15). Την ίδια διαδικασία έχει δειχθεί ότι εκτελούν και στελέχη *Aspergillus* sp. και *Penicillium* sp. (Molina *et al.* 2012).



Εικόνα 15. Βιομετατροπή του α -πινενίου σε βερμπενόλη από ένα ενδοφυτικό μυκητιακό στέλεχος *Mucor* sp.

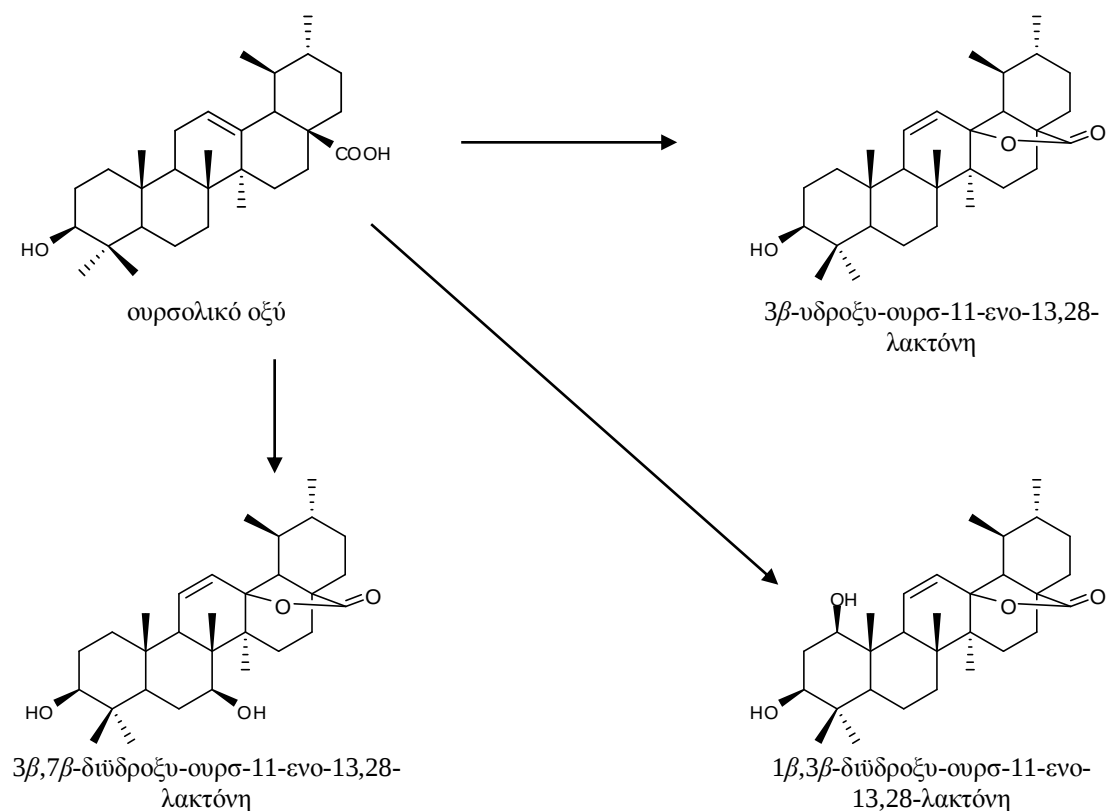
Μικροβιακές μετατροπές του 13R,14R,15-τριϋδροξυ-λαβδ-7-ενίου και του 13R,14R,15-τριϋδροξυ-λαβδ-8(17)-ενίου από τον μύκητα *Debaryomyces hansenii* έδωσαν τα 13R,14R,15-τριϋδροξυ-7-οξο-λαβδ-8-ένιο και 7β-υδροξυ-ισοκουπρεσσικό οξύ,

αντίστοιχα, ενώ όταν οι ίδιες ενώσεις προστέθηκαν στο μύκητα *Aspergillus niger* έδωσαν τα 13R,14R,15-3β-τετραϋδροξυ-λαβδ-7-ένιο και 13R,14R,15-3-οξο-τριϋδροξυ-λαβδ-8(17)-ένιο, αντίστοιχα (Εικ. 16) (Khera 2013).



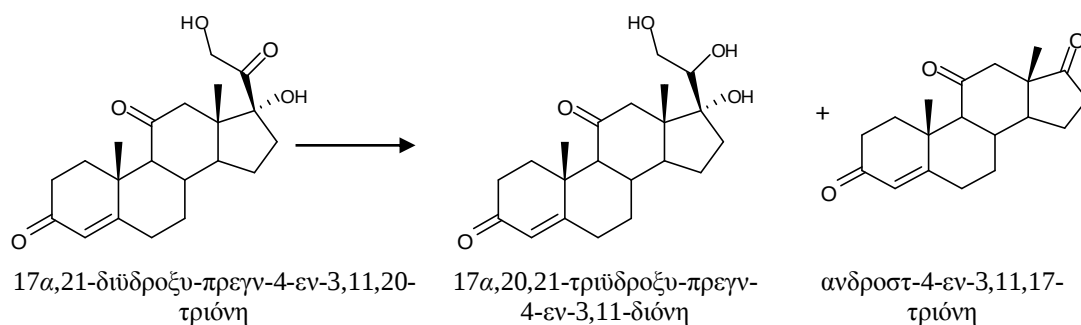
Εικόνα 16. Βιομετατροπές λαβδανικών διτερπενίων από νηματοειδείς μύκητες.

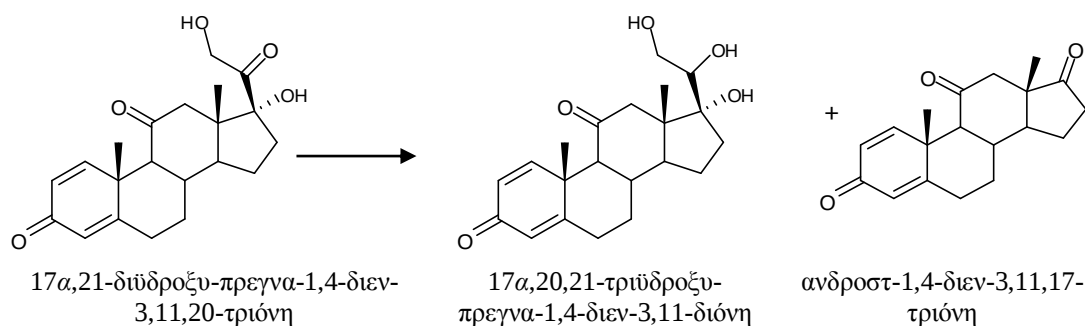
Στην κατηγορία των τριτερπενίων, ο ενδοφυτικός μύκητας *Umbelopsis isabellina*, ο οποίος απομονώθηκε από το φυτό *Huperzia serrata*, ήταν σε θέση να βιομετατρέπει το ουρσολικό οξύ σε τρία τριτερπένια, τα 3β-υδροξυ-ουρσ-11-ενο-13,28-λακτόνη, 3β,7β-διϋδροξυ-ουρσ-11-ενο-13,28-λακτόνη και 1β,3β-διϋδροξυ-ουρσ-11-ενο-13,28-λακτόνη (Εικ. 17) (Fu *et al.* 2011). Το ουρσολικό οξύ ανήκει σε μια ομάδα πεντακυκλικών τριτερπενικών οξέων με ευρεία διασπορά στο φυτικό βασίλειο και ενδείξεις για ανθελονοσιακή, αντικαρκινική και αντιρετροϊκή δράση (Bhatti & Khera 2012).



Εικόνα 17. Βιομετατροπή του ουρσολικού οξέος σε τρία λακτονικά παράγωγα από τον ενδοφυτικό μύκητα *Umbelopsis isabellina*.

Ο ασκομύκητας *Fusarium oxysporum* var. *cubense* βιομετέτρεψε την 17α,21-διϋδροξυ-πρεγν-4-εν-3,11,20-τριόνη σε 17α,20,21-τριϋδροξυ-πρεγν-4-εν-3,11-διόνη και ανδροστ-4-εν-3,11,17-τριόνη, ενώ επώαση της 17α,21-διϋδροξυ-πρεγνα-1,4-διεν-3,11,20-τριόνης με το ίδιο στέλεχος έδωσε 17α,20,21-τριϋδροξυ-πρεγνα-1,4-διεν-3,11-διόνη και ανδροστ-1,4-διεν-3,11,17-τριόνη (Εικ. 18) (Bhatti & Khera 2012).

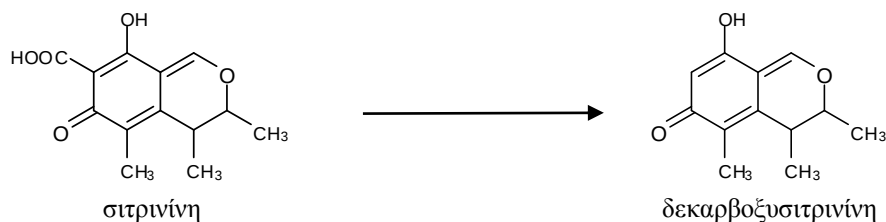




Εικόνα 18. Βιομετατροπές στεροειδών από τον ασκομύκητα *Fusarium oxysporum* var. *cubense*.

1.5.5. Βιομετατροπές από μικροοργανισμούς θαλάσσιας προέλευσης

Σχετικά λιγότερη έρευνα έχει διεξαχθεί στις βιομετατροπές στις οποίες λαμβάνουν μέρος μικροοργανισμοί από θαλάσσια οικοσυστήματα. Χαρακτηριστικό όμως παράδειγμα αποτελεί το βακτήριο *Moraxella* sp. Σε πρόσφατη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένα θαλάσσιο στέλεχος του γένους *Moraxella* για τη μετατροπή μιας τοξίνης, της σιτρινίνης, στην αποκαρβοξυλιωμένη της μορφή, σε ένα διφασικό σύστημα (Εικ. 19). Η σιτρινίνη είναι μια μυκοτοξίνη που αρχικά απομονώθηκε από το νηματοειδή μύκητα *Penicillium citrinum*, από όπου και πήρε και το όνομά της. Είναι ένωση ελάχιστα διαλυτή σε υδατικά διαλύματα, αλλά αρκετά διαλυτή σε οργανικούς διαλύτες και αποτελεί αντιβιοτικό ευρέως φάσματος. Ωστόσο, λόγω των νεφροτοξικών παρενεργειών σε πειραματόζωα έχει περιορισμένες φαρμακευτικές εφαρμογές. Η εργασία περιελάμβανε τη μετατροπή της σιτρινίνης στην αποκαρβοξυλιωμένη της μορφή που διατηρούσε τις ικανότητες του αντιβιοτικού, αλλά ταυτόχρονα δεν ήταν τοξική στα πειραματόζωα (Devi *et al.* 2006).



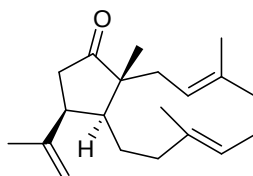
Εικόνα 19. Βιομετατροπή της σιτρινίνης σε δεκαρβοξυσιτρινίνη από το θαλάσσιο βακτήριο *Moraxella* sp.

1.6. Σκοπός της μελέτης

Από το φαιοφύκος *D. spiralis* έχουν απομονωθεί πολλά διτερπένια με σκελετό δολαμπελλανίου, τα οποία έχουν επιδείξει διαφορετικά επίπεδα αντιβακτηριακής δράσης έναντι στελεχών *S. aureus* ανθεκτικών στη μεθικιλίνη (Ιοαννου *et al.* 2011a, Ιοαννου *et al.* 2012). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των προηγούμενων μελετών, κάποια ανάλογα εμφάνιζαν ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα δραστηριότητας έναντι των συγκεκριμένων βακτηριακών στελεχών με τιμές MIC 2–16 µg/mL που κατά περιπτώσεις ήταν έως και οκτώ φορές καλύτερες σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές MIC για το πρότυπο αντιβιοτικό νορφλοξασίνη, ενώ άλλα ανάλογα ήταν αδρανή.

Δεδομένου ότι μικρές δομικές αλλαγές σε ένα μόριο δύνανται να το καταστήσουν δραστικότερο ή/και λιγότερο τοξικό, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να παραχθεί μέσω βιομετατροπών ένας αριθμός ανάλογων δομών που θα μπορούσαν να εμφανίζουν ακόμη υψηλότερα επίπεδα αντιβακτηριακής δράσης από αυτά που παρουσίασαν οι δευτερογενείς μεταβολίτες που είχαν εντοπιστεί στις αρχικές φυτοχημικές μελέτες του *D. spiralis*.

Για τον λόγο αυτό στόχος ήταν η απομόνωση του κύριου μεταβολίτη του φαιοφύκου *D. spiralis*, του (1*R*,3*E*,7*E*,11*S*,12*S*)-14-οξο-3,7,18-δολαμπελλατριενίου (Εικ. 20), καθώς και των ενδοφυτικών βακτηρίων του φύκου και η αξιολόγηση της ικανότητας των ενδοφυτικών βακτηρίων να βιομετατρέψουν το (1*R*,3*E*,7*E*,11*S*,12*S*)-14-οξο-3,7,18-δολαμπελλατριένιο. Στη συνέχεια, στόχος ήταν η απομόνωση και η ταυτοποίηση των προϊόντων βιομετατροπής και η αξιολόγηση της αντιβακτηριακής τους δράσης.



Εικόνα 20. (1*R*,3*E*,7*E*,11*S*,12*S*)-14-Οξο-3,7,18-δολαμπελλατριένιο, ο κύριος δευτερογενής μεταβολίτης του φαιοφύκου *Dilophus spiralis*.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Οργανολογία

Τα φάσματα NMR ελήφθησαν σε φασματογράφους Bruker AC 200 και Bruker DRX 400. Τα 2D-NMR πειράματα πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τις τυποποιημένες ακολουθίες παλμών Bruker. Για τη λήψη όλων των φασμάτων NMR χρησιμοποιήθηκε CDCl_3 . Οι ^1H και ^{13}C NMR χημικές μετατοπίσεις δίνονται στη κλίμακα δ (ppm) λαμβάνοντας ως αναφορά την κορυφή του CHCl_3 στα 7.24 και 77.0 ppm, αντίστοιχα, ενώ οι σταθερές σύζευξης J (Hz) δίνονται σε παρενθέσεις.

Τα φάσματα μάζας χαμηλής ευκρίνειας καταγράφηκαν σε φασματογράφο μάζας Hewlett-Packard 5973 με μέθοδο ιονισμού τον βομβαρδισμό με δέσμη ηλεκτρονίων (EIMS).

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί HPLC πραγματοποιήθηκαν σε χρωματογράφο Pharmacia LKB HPLC με μονή αντλία εισαγωγής του συστήματος διαλυτών και ανιχνευτή RI-102 Shodex.

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς HPLC ήταν στήλη κανονικής φάσης διαστάσεων 25 cm x 10 mm (Grace, Econoshpere Silica 10u).

Για τις αναλύσεις GC-MS χρησιμοποιήθηκε αέριος χρωματογράφος Hewlett-Packard 6890, εξοπλισμένος με τριχοειδή στήλη HP-5 MS (30 m x 0,25 mm, film thickness 0,25 μm), συνδεδεμένος σε σειρά με φασματογράφο μάζας Hewlett-Packard 5973. Η μέθοδος ιονισμού ήταν ο βομβαρδισμός με δέσμη ηλεκτρονίων στα 70 eV (EIMS). Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε το αδρανές αέριο He (2 mL/min).

Η συμπύκνωση των υπολειμμάτων και των κλασμάτων υπό κενό έγινε σε συσκευή ταχείας εξάτμισης διαλύτη με μηχανικά περιστρεφόμενη φιάλη απόσταξης και εφαρμογή ελαττωμένης πίεσης τύπου BÜCHI Rotavapor R-114 σε θερμοκρασία έως 38°C.

2.2. Διαλύτες και χημικά αντιδραστήρια

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί υγρής χρωματογραφίας με υποβοήθηση κενού πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως υλικό πλήρωσης της στήλης γέλη πυριτίου

κανονικής φάσης Kieselgel 60H της εταιρείας Merck.

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί υγρής χρωματογραφίας βαρύτητας πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ως υλικό πλήρωσης της στήλης γέλη πυριτίου κανονικής φάσης Kieselgel 60A flash (35-70 μ M) της εταιρείας Merck.

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί εκχύλισης στερεής φάσης πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας προκατασκευασμένες στήλες γέλης πυριτίου κανονικής φάσης (SiOH) τύπου SEP-PAK silica cartridge for rapid sample preparation της εταιρείας Waters Associates ή Chromafix της εταιρείας Macherey-Nagel.

Οι χρωματογραφικοί προσδιορισμοί TLC πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας πλάκες αλουμινίου με επίστρωση Kieselgel 60 G/UV₂₅₄ (20 x 20 cm, πάχους 0.2 mm) της εταιρείας Macherey-Nagel. Μετά την ανάπτυξη τους σε κατάλληλο σύστημα διαλυτών, οι πλάκες ελέγχονταν σε λάμπα υπεριώδους φωτός (UV) στα 254 nm και 365 nm και οι κηλίδες ανιχνεύονταν ύστερα από ψεκασμό με διάλυμα 5% H₂SO₄ σε MeOH και θέρμανση της πλάκας στους 100°C για περίπου 2 min.

Οι διαλύτες cHex, EtOAc, CH₂Cl₂ και MeOH ήταν καθαρότητας A.R. της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences, οι οποίοι πριν από τη χρήση τους αποστάχθηκαν. Οι διαλύτες EtOH και DMSO ήταν καθαρότητας A.R. της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences. Ο διαλύτης Me₂CO ήταν καθαρότητας HPLC της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences. Όλοι οι διαλύτες πριν από τη χρήση τους σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς HPLC διηθήθηκαν υπό κενό και απαερώθηκαν.

Για την λήψη των φασμάτων NMR χρησιμοποιήθηκε CDCl₃ χωρίς εσωτερικό πρότυπο των εταιρειών Deutero GmbH ή Aldrich-Sigma Chemical Company.

Το H₂O που χρησιμοποιήθηκε ήταν απεσταγμένο που στη συνέχεια διηθήθηκε μέσω συστήματος ρητινών.

2.3. Συλλογή του φαιοφύκου *Dilophus spiralis*

Δείγματα του φαιοφύκου *D. spiralis* συλλέχθηκαν στην Ελαφώνησο, νότια της Πελοποννήσου, σε βάθος 0,1-2 m. Διενεργήθηκαν δύο δειγματοληψίες: (i) τον Οκτώβριο του 2012, συλλογή στην οποία βασίστηκε η απομόνωση των ενδοφυτικών βακτηρίων του φαιοφύκου και (ii) τον Μάρτιο του 2013, συλλογή στην οποία βασίστηκε η απομόνωση του κύριου μεταβολίτη του φαιοφύκου. Τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο Εργαστήριο

Φαρμακογνωσίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών στη πρώτη περίπτωση με θαλασσινό νερό εντός αποστειρωμένου δοχείου μίας χρήσης, ενώ στη δεύτερη υπό ψύξη. Η πρώτη συλλογή επεξεργάστηκε άμεσα, ενώ η δεύτερη διατηρήθηκε στους -20°C μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία του οργανισμού.

2.4. Απομόνωση ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών από το φαιοφύκος *Dilophus spiralis*

Νωπό δείγμα του φαιοφύκου *D. spiralis*, το οποίο συλλέχθηκε τον Οκτώβριο του 2012, μεταφέρθηκε άμεσα στο εργαστήριο με θαλασσινό νερό εντός αποστειρωμένου δοχείου μίας χρήσης.

Η απομόνωση των ενδοφυτικών βακτηριακών στελεχών έγινε με τη μέθοδο της έμμεσης απομόνωσης. Επιλέχθηκαν εύρωστα τμήματα του θαλλού του φαιοφύκου, τα οποία αποστειρώθηκαν εξωτερικά ώστε να αποφευχθεί η απομόνωση επιφυτικών μικροοργανισμών. Για τον σκοπό αυτό οι ιστοί εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα 70% EtOH για 30 s και στη συνέχεια εκπλύθηκαν δύο φορές διαδοχικά με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό. Για να είναι δυνατή η διάκριση των πιθανών εναπομεινάντων επιφυτικών βακτηρίων από τα ενδοφυτικά, λήφθηκε το «αποτύπωμα» της εξωτερικής επιφάνειας του φύκου σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Marine Agar. Στη συνέχεια το φύκος τεμαχίστηκε ασηπτικά σε μικρά κομμάτια, τα οποία εμβαπτίστηκαν σε αποστειρωμένο θαλασσινό νερό, συνθλίφθηκαν με υάλινη ράβδο και αναδεύτηκαν για 10 min. Από το αρχικό αυτό διάλυμα (10^0) έγιναν δύο διαδοχικές αραιώσεις (10^{-1} και 10^{-2}), οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό τριών τρυβλίων με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Marine Agar για κάθε αραιώση. Στην επιφάνεια κάθε τρυβλίου ενοφθαλμίσθηκε διάλυμα όγκου 1 mL και ακολούθησε ομοιόμορφη διασπορά του δείγματος με τη χρήση αποστειρωμένου υάλινου διανομέα. Τα τρυβλία επώαστηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 27°C για 15 ημέρες.

Μετά από προσεκτική μακροσκοπική και μικροσκοπική παρατήρηση των τρυβλίων, επιλέχθηκαν οι αποικίες με διαφορετικό σχήμα, μέγεθος και χρώμα και με ασηπτική μεταφορά υποβλήθηκαν σε ανακαλλιέργειες σε διαφορετικά τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Marine Agar, με σκοπό τη δημιουργία αμιγών καλλιεργειών. Συνολικά απομονώθηκαν 11 διαφορετικά στελέχη ενδοφυτικών βακτηρίων (BI0199–BI0205 και BI0220–BI0223), τα οποία στη συνέχεια ελέγχθηκαν ως προς την ικανότητα

βιομετατροπής του κύριου μεταβολίτη του φαιοφύκους.

Η ταυτοποίηση του στελέχους BI0223 έγινε με προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου 16S rDNA και σύγκρισή της με τις αλληλουχίες της βάσης δεδομένων NCBI (GenBank) με το πρόγραμμα BLASTN (nucleotide sequencing Basic Local Alignment Search Tool).

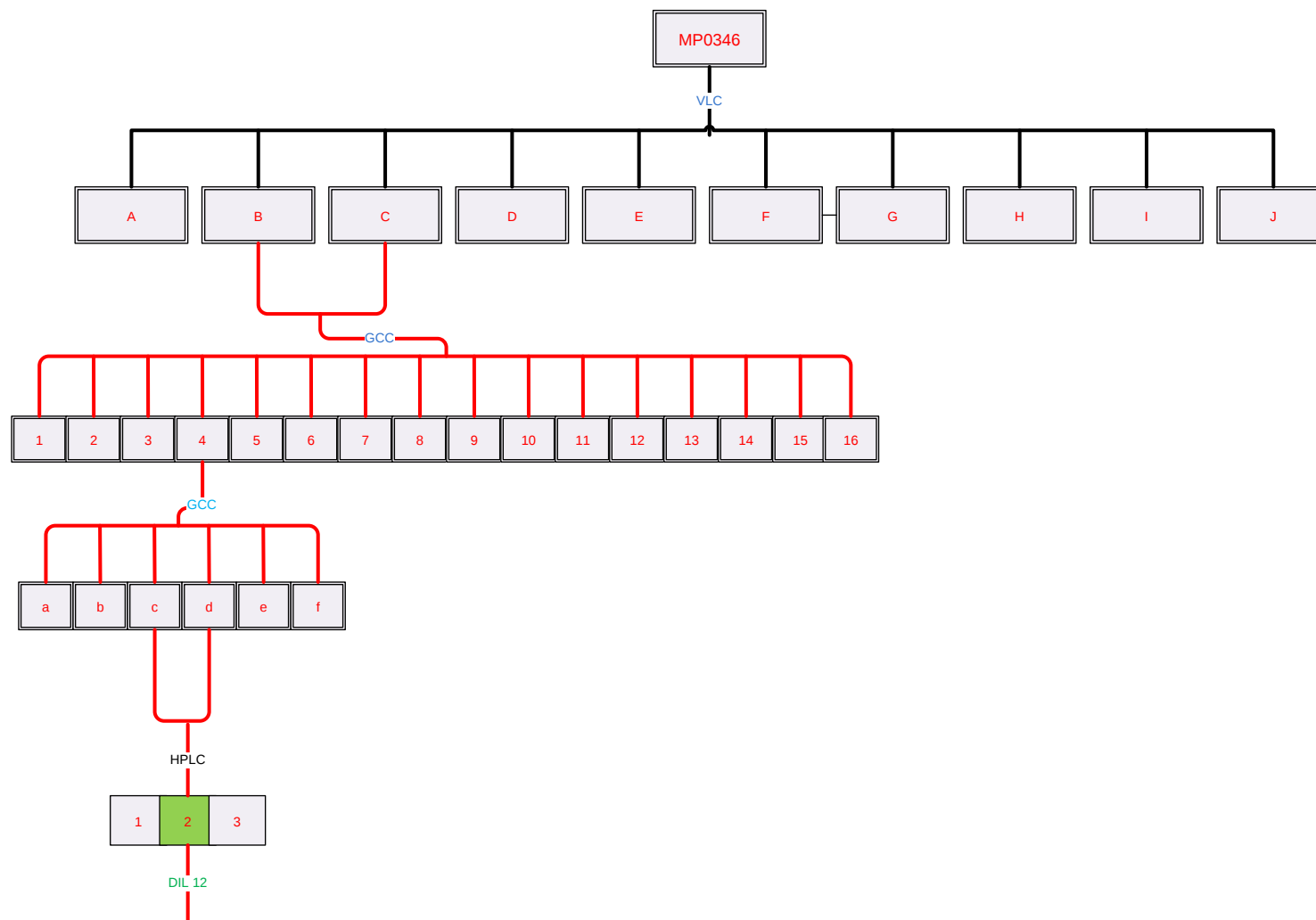
2.5. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση του κύριου μεταβολίτη του φαιοφύκους *Dilophus spiralis*

Νωπό δείγμα του φαιοφύκους *D. spiralis*, το οποίο συλλέχθηκε τον Μάρτιο του 2013, καθαρίστηκε από άλλους οργανισμούς και ξένα σώματα και στη συνέχεια υποβλήθηκε σε εξαντλητική εκχύλιση με μίγματα CH₂Cl₂/MeOH αναλογίας 1:2, 1:1 και 2:1. Μετά τη συνένωση των εκχυλισμάτων και τη συμπύκνωση τους υπό κενό προέκυψε υπόλειμμα πράσινου – καφέ χρώματος και ελαιώδους υφής.

Η πορεία απομόνωσης του κύριου μεταβολίτη από το οργανικό υπόλειμμα του φαιοφύκους φαίνεται διαγραμματικά στην Εικόνα 21, ενώ στη συνέχεια περιγράφονται λεπτομερώς όλα τα στάδια.

Το αρχικό υπόλειμμα (65.3 g) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία με υποβοήθηση κενού, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου κανονικής φάσης και ως κινητή φάση συστήματα διαλυτών βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας από 100% cHex έως 100% EtOAc και στη συνέχεια μίγματα EtOAc/MeOH έως 100% MeOH. Συνολικά παρελήφθησαν 26 κλάσματα, τα οποία αρχικά ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC. Τα κλάσματα που εμφάνισαν παρόμοια χρωματογραφικά χαρακτηριστικά συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 10 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν στη συνέχεια φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 2).

Τα υπολείμματα MP0346-B και MP0346-C συνενώθηκαν (1.98 g) και υποβλήθηκαν σε υγρή χρωματογραφία βαρύτητας σε στήλη γέλης πυριτίου κανονικής φάσης. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούταν από μίγματα cHex/EtOAc βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 98 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 3) και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 16 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 4).



Εικόνα 21. Η πορεία απομόνωσης του κύριου μεταβολίτη από το οργανικό υπόλειμμα του φαιοφύκου.

Πίνακας 2. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

Κλάσμα	Σύστημα διαλυτών	Κωδικός υπολείμματος
1	cHex (100%)	MP0346-A
2	cHex (100%)	
3	cHex/EtOAc (95:5)	
4	cHex/EtOAc (95:5)	
5	cHex/EtOAc (90:10)	
6	cHex/EtOAc (90:10)	MP0346-B
7	cHex/EtOAc (80:20)	
8	cHex/EtOAc (80:20)	
9	cHex/EtOAc (70:30)	MP0346-C
10	cHex/EtOAc (70:30)	
11	cHex/EtOAc (60:40)	MP0346-D
12	cHex/EtOAc (60:40)	MP0346-E
13	cHex/EtOAc (50:50)	
14	cHex/EtOAc (50:50)	MP0346-F
15	cHex/EtOAc (40:60)	
16	cHex/EtOAc (40:60)	MP0346-G
17	cHex/EtOAc (30:70)	
18	cHex/EtOAc (30:70)	
19	cHex/EtOAc (20:80)	
20	cHex/EtOAc (20:80)	
21	EtOAc (100%)	MP0346-H
22	EtOAc (100%)	
23	EtOAc/MeOH (90:10)	
24	EtOAc/MeOH (75:25)	MP0346-I
25	MeOH (100%)	MP0346-J
26	MeOH (100%)	

Πίνακας 3. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

Κλάσματα	Σύστημα διαλυτών
1-20	cHex/EtOAc (95:5)
21-35	cHex/EtOAc (94:6)
36-40	cHex/EtOAc (93:7)
41-45	cHex/EtOAc (92:8)
46-55	cHex/EtOAc (90:10)
56-60	cHex/EtOAc (88:12)
61-65	cHex/EtOAc (85:15)
66-70	cHex/EtOAc (80:20)
71-90	cHex/EtOAc (75:25)
91-95	cHex/EtOAc (50:50)
96-98	EtOAc (100%)

Πίνακας 4. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

Συνενωμένα κλάσματα	Κωδικός υπολείμματος	Μάζα (mg)
1-15	MP0346-B1	39.0
16-25	MP0346-B2	4.0
26-28	MP0346-B3	65.0
29-32	MP0346-B4	435.0
33-37	MP0346-B5	236.0
38-41	MP0346-B6	28.0
42-45	MP0346-B7	38.0
46-48	MP0346-B8	55.0
49-51	MP0346-B9	49.0
52-55	MP0346-B10	39.0
56-63	MP0346-B11	69.0
64-70	MP0346-B12	64.0
71-76	MP0346-B13	82.0
77-84	MP0346-B14	391.0
85-90	MP0346-B15	218.0
91-98	MP0346-B16	80.0

Το υπόλειμμα MP0346-B4 (435.0 mg) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία βαρύτητας σε στήλη γέλης πυριτίου κανονικής φάσης με ισοκρατικό σύστημα cHex/EtOAc (94:6) ως διαλύτη έκλουσης. Συνολικά παρελήφθησαν 91 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 6 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR (Πίν. 5).

Πίνακας 5. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

Συνενωμένα κλάσματα	Κωδικός υπολείμματος	Μάζα (mg)
1-20	MP0346-B4a	28.8
21-27	MP0346-B4b	85.3
28-30	MP0346-B4c	237.3
31-39	MP0346-B4d	77.6
40-78	MP0346-B4e	7.6
79-91	MP0346-B4f	3.6

Τα υπολείμματα MP0346-B4c και MP0346-B4d συνενώθηκαν (314.9 mg) και υποβλήθηκαν σε HPLC. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα MP0346-B4c2 ήταν καθαρή ουσία, το (1R,3E,7E,11S,12S)-14-οξο-3,7,18-δολαμπελλατριένιο που αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη του φαιοφύκους (Πίν. 6).

Πίνακας 6. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/EtOAc (97:3)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min
Ανιχνευτής	R.I.

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
MP0346-B4c1	5.2	9.8
MP0346-B4c2	192.5	14.9
MP0346-B4c3	11.8	17.9

2.6. Έλεγχος βιομετατροπής του 14-οξο-3,7,18-δολαμπελλατριενίου από τα ενδοφυτικά βακτηριακά στελέχη

Τα 11 ενδοφυτικά βακτηριακά στελέχη που απομονώθηκαν από το φαιοφύκος *D. spiralis* υποβλήθηκαν σε υγρές καλλιέργειες μικρής κλίμακας σε κωνικές φιάλες των 250 mL, οι οποίες περιείχαν 100 mL Marine Broth ως θρεπτικό υπόστρωμα. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 27°C υπό συνεχή ανάδευση σε περιστροφικό επωαστήρα (100 rpm). Μετά τη παρέλευση 72 h προστέθηκε σε κάθε βακτηριακή καλλιέργεια 1 mL διαλύματος του 14-οξο-3,7,18-δολαμπελλατριενίου, συγκέντρωσης 2 mg/mL DMSO. Η επώαση συνεχίστηκε στις ίδιες συνθήκες για επιπλέον 9 ημέρες. Μετά τη παρέλευση 2, 4, 7 και 9 ημερών λήφθηκε μικρός όγκος (5-10 mL) από κάθε βακτηριακή καλλιέργεια, ο οποίος εκχυλίστηκε με αντίστοιχο όγκο EtOAc. Ακολούθησε διαχωρισμός των δύο φάσεων (υδατική και οργανική) σε διαχωριστική χοάνη, έκπλυση της οργανικής φάσης εκ νέου με H₂O, αφυδάτωση με άνυδρο Na₂SO₄ και συμπύκνωση υπό κενό. Σε κάθε περίπτωση, τα οργανικά υπολείμματα που προέκυψαν ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία ¹H NMR και αναλύθηκαν με GC-MS.

2.7. Καλλιέργεια ενδοφυτικού βακτηριακού στελέχους BI0223 για τη βιομετατροπή του 14-οξο-3,7,18-δολαμπελλατριενίου

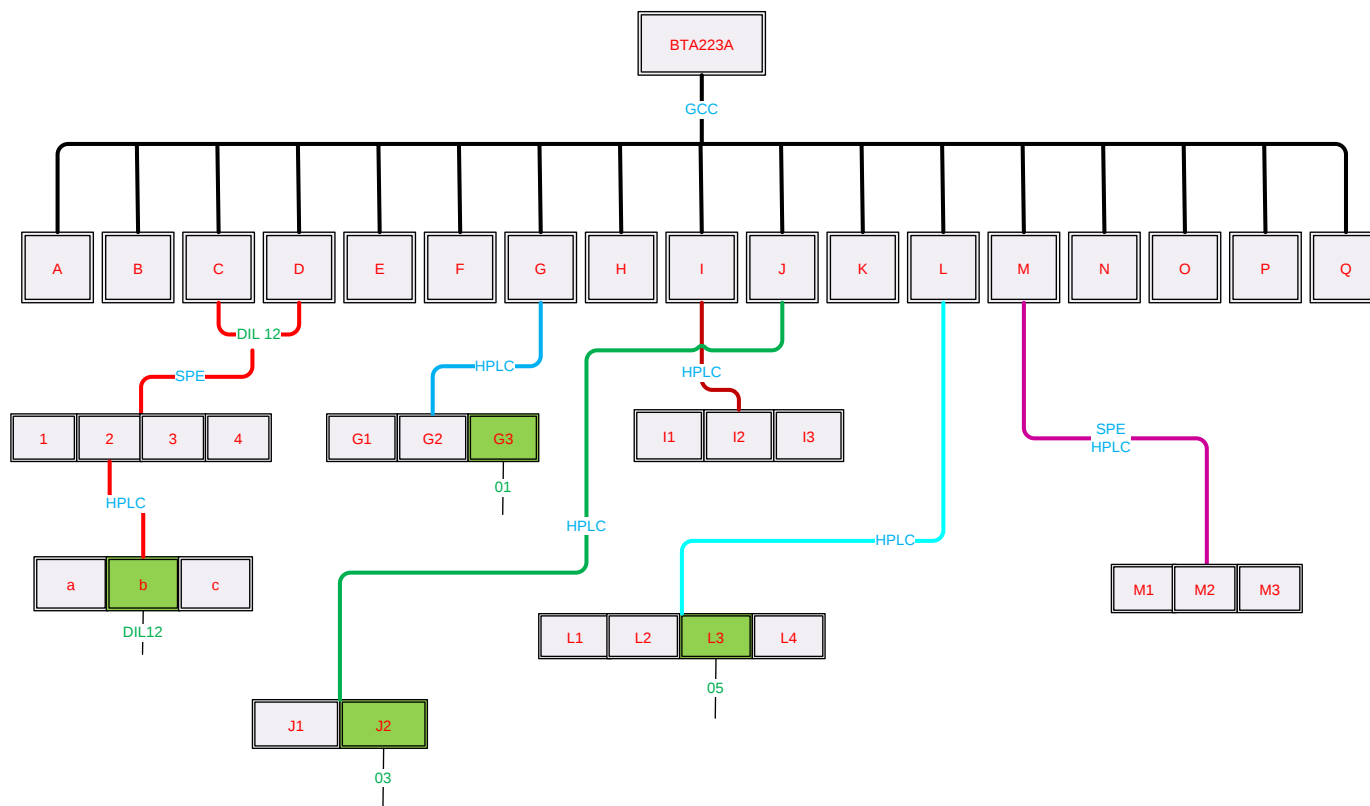
Το ενδοφυτικό βακτηριακό στέλεχος BI0223 υποβλήθηκε δύο φορές σε υγρή καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας σε κωνικές φιάλες των 2 L, οι οποίες περιείχαν 1 L Marine

Broth ως θρεπτικό υπόστρωμα η κάθε μία. Η επώαση πραγματοποιήθηκε στους 27°C υπό συνεχή ανάδευση σε περιστροφικό επωαστήρα (100 rpm). Μετά τη παρέλευση 48 h προστέθηκαν σε κάθε κωνική φιάλη 3 mL διαλύματος του 14-οξο-3,7,18-δολαμπελλατριενίου, συγκέντρωσης 20 mg/3 mL DMSO. Η επώαση συνεχίστηκε στις ίδιες συνθήκες. Μετά τη παρέλευση 6 ημερών η βακτηριακή καλλιέργεια εκχυλίστηκε με αντίστοιχο όγκο EtOAc. Ακολούθησε διαχωρισμός των δύο φάσεων (υδατική και οργανική) σε διαχωριστική χοάνη, έκπλυση της οργανικής φάσης εκ νέου με H₂O, αφυδάτωση με άνυδρο Na₂SO₄ και συμπύκνωση υπό κενό. Τα οργανικά υπολείμματα BTA223A (126 mg) και BTA223B (578 mg) που προέκυψαν από τη πρώτη καλλιέργεια συνολικού όγκου 2 L και από τη δεύτερη καλλιέργεια συνολικού όγκου 9 L, αντίστοιχα, ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία ¹H NMR και αναλύθηκαν με GC-MS.

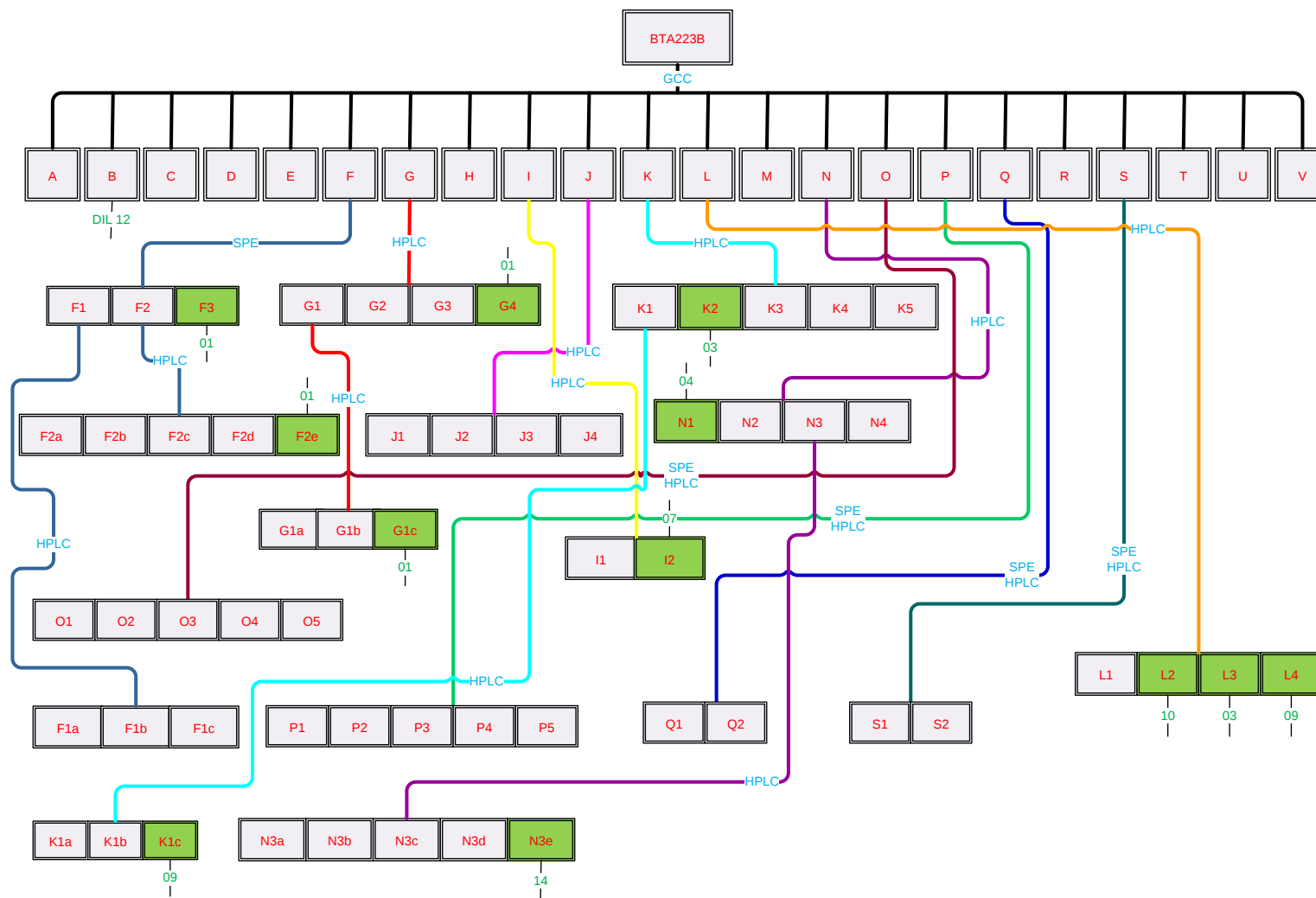
2.8. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση των προϊόντων βιομετατροπής του 14-οξο-3,7,18-δολαμπελλατριενίου από το ενδοφυτικό βακτηριακό στέλεχος BI0223

Η πορεία απομόνωσης των προϊόντων βιομετατροπής του 14-οξο-3,7,18-δολαμπελλατριενίου από τα οργανικά υπολείμματα BTA223A και BTA223B φαίνεται διαγραμματικά στις Εικόνες 22–24, ενώ στη συνέχεια περιγράφονται λεπτομερώς όλα τα στάδια.

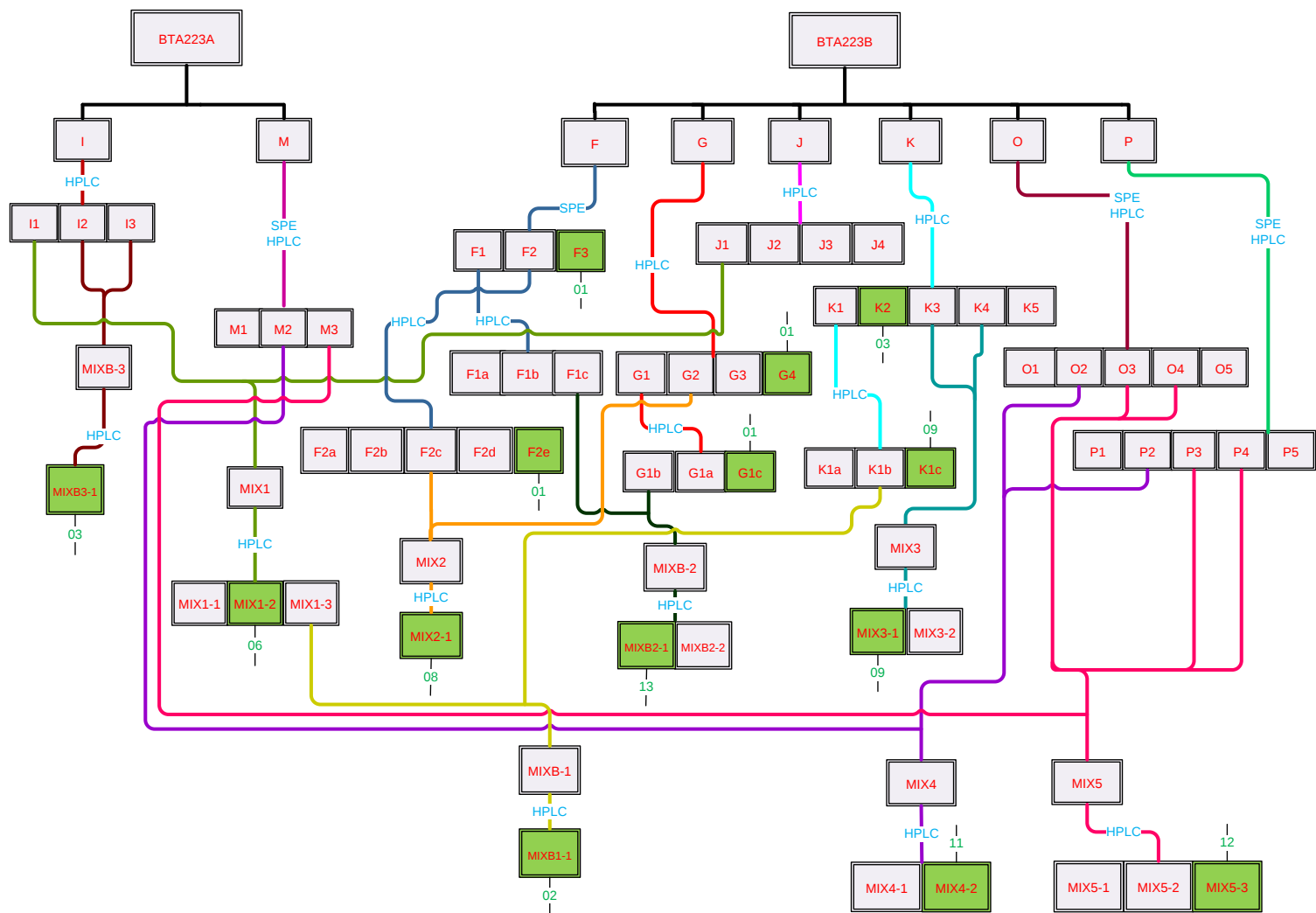
Το υπόλειμμα BTA223A (126 mg) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία βαρύτητας σε στήλη γέλης πυριτίου κανονικής φάσης. Το σύστημα των διαλυτών έκλυσης αποτελούταν από μίγματα cHex/EtOAc βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 63 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 7) και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 17 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 8).



Εικόνα 22. Η πορεία απομόνωσης των προϊόντων βιομετατροπής του 14-οξο-3,7,18-δολαμπελλατριενίου από τα οργανικά υπολείμματα BTA223A και BTA223B (μέρος Α).



Εικόνα 23. Η πορεία απομόνωσης των προϊόντων βιομετατροπής του 14-οξο-3,7,18-δολαμπελλατριενίου από τα οργανικά υπολείμματα BTA223A και BTA223B (μέρος B).



Εικόνα 24. Η πορεία απομόνωσης των προϊόντων βιομετατροπής του 14-οξο-3,7,18-δολαμπελλατριενίου από τα οργανικά υπολείμματα BTA223A και BTA223B (μέρος Γ).

Πίνακας 7. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

Κλάσματα	Σύστημα διαλυτών
1-4	cHex (100%)
5-8	cHex/EtOAc (98:2)
9-12	cHex/EtOAc (96:4)
13-18	cHex/EtOAc (94:6)
19-22	cHex/EtOAc (92:8)
23-26	cHex/EtOAc (90:10)
27-30	cHex/EtOAc (85:15)
31-34	cHex/EtOAc (80:20)
35-38	cHex/EtOAc (75:25)
39-42	cHex/EtOAc (70:30)
43-46	cHex/EtOAc (60:40)
47-50	cHex/EtOAc (50:50)
51-54	cHex/EtOAc (25:75)
55-63	EtOAc (100%)

Πίνακας 8. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

Συνενωμένα κλάσματα	Κωδικός υπολείμματος	Μάζα (mg)
1-9	BTA223A-A	17.8
10-11	BTA223A-B	0.8
12	BTA223A-C	5.6
13-14	BTA223A-D	1.7
15-17	BTA223A-E	1.1
18-23	BTA223A-F	2.2
24-28	BTA223A-G	20.7
29-34	BTA223A-H	2.3
35-38	BTA223A-I	8.5
39-41	BTA223A-J	7.1
42-43	BTA223A-K	1.8
44-47	BTA223A-L	5.8
48-50	BTA223A-M	5.6
51-54	BTA223A-N	3.1
55-58	BTA223A-O	2.2
59-62	BTA223A-P	0.8
63	BTA223A-Q	1.5

Το υπόλειμμα BTA223A-G (20.7 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BTA223A-G3 ήταν καθαρή ουσία (BTA223-01) (Πίν. 9).

Πίνακας 9. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας		
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm	
Διαλύτης έκλουσης	cHex/EtOAc (85:15)	
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min	
Ανιχνευτής	R.I.	

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223A-G1	0.6	17.9
BTA223A-G2	1.2	18.1
BTA223A-G3	7.0	36.2

Το υπόλειμμα BTA223A-I (8.5 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR (Πίν. 10).

Πίνακας 10. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας		
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm	
Διαλύτης έκλουσης	cHex/EtOAc (80:20)	
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min	
Ανιχνευτής	R.I.	

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223A-I1	2.5	25.9
BTA223A-I2	0.8	30.0
BTA223A-I3	1.4	30.2

Το υπόλειμμα BTA223A-J (7.1 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά παρελήφθησαν 2 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BTA223A-J2 ήταν καθαρή ουσία (BTA223-03) (Πίν. 11).

Πίνακας 11. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας		
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm	
Διαλύτης έκλουσης	cHex/EtOAc (75:25)	
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min	
Ανιχνευτής	R.I.	

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223A-J1	0.7	25.9
BTA223A-J2	3.0	30.0

Το υπόλειμμα BTA223A-L (5.8 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BTA223A-L3 ήταν καθαρή ουσία (BTA223-05) (Πίν. 12).

Πίνακας 12. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/EtOAc (55:45)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min
Ανιχνευτής	R.I.

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223A-L1	0.7	19.1
BTA223A-L2	1.8	22.1
BTA223A-L3	0.4	24.9
BTA223A-L4	1.0	27.3

Το υπόλειμμα BTA223A-M (5.6 mg) υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεάς φάσης χρησιμοποιώντας ως υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου κανονικής φάσης και ως κινητή φάση ισοκρατικό σύστημα cHex/EtOAc (55:45). Το υπόλειμμα που προέκυψε (3.9 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR (Πίν. 13).

Πίνακας 13. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/EtOAc (55:45)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min
Ανιχνευτής	R.I.

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223A-M1	0.4	19.8
BTA223A-M2	0.9	23.0
BTA223A-M3	1.2	26.9

Το υπόλειμμα BTA223B (578 mg) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία βαρύτητας σε στήλη γέλης πυριτίου κανονικής φάσης. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούνταν από μίγματα cHex/EtOAc βαθμιαία αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν 154 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 14) και στη συνέχεια συνενώθηκαν ώστε να προκύψουν 22 υπολείμματα, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR (Πίν. 15).

Πίνακας 14. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

Κλάσματα	Σύστημα διαλυτών
1-8	cHex (100%)
9-16	cHex/EtOAc (98:2)
17-24	cHex/EtOAc (96:4)
25-32	cHex/EtOAc (94:6)
33-40	cHex/EtOAc (92:8)
41-48	cHex/EtOAc (90:10)
49-56	cHex/EtOAc (85:15)
57-64	cHex/EtOAc (80:20)
65-72	cHex/EtOAc (75:25)
73-80	cHex/EtOAc (70:30)
81-92	cHex/EtOAc (60:40)
93-96	cHex/EtOAc (55:45)
97-104	cHex/EtOAc (50:50)
105-128	cHex/EtOAc (25:75)
129-136	cHex/EtOAc (20:80)
137-144	cHex/EtOAc (10:90)
145-153	EtOAc (100%)
154	EtOAc/MeOH (90:10)

Πίνακας 15. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

Συνενωμένα κλάσματα	Κωδικός υπολείμματος	Μάζα (mg)
1-37	BTA223B-A	8.3
38-47	BTA223B-B	30.1
48-50	BTA223B-C	1.6
51-55	BTA223B-D	1.3
56-63	BTA223B-E	3.3
64-69	BTA223B-F	29.0
70-76	BTA223B-G	12.0
77-80	BTA223B-H	1.7
81-86	BTA223B-I	4.6
87-91	BTA223B-J	18.5
92-96	BTA223B-K	29.9
97-101	BTA223B-L	10.5
102-105	BTA223B-M	4.0
106-112	BTA223B-N	18.6
113-115	BTA223B-O	20.7
116-119	BTA223B-P	27.2
120-123	BTA223B-Q	11.1
124-128	BTA223B-R	9.1
129-144	BTA223B-S	8.1
144-150	BTA223B-T	2.6
150-153	BTA223B-U	8.9
154	BTA223B-V	1.2

Το υπόλειμμα BTA223B-F (29.0 mg) υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεάς φάσης χρησιμοποιώντας ως υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου κανονικής φάσης και ως κινητή φάση συστήματα διαλυτών cHex/EtOAc αυξανόμενης πολικότητας. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC (Πίν. 16) και στη συνέχεια συνενώθηκαν σε 3 υπολείμματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το υπόλειμμα BTA223B-F3 ήταν καθαρή ουσία (BTA223-01) (Πίν. 17).

Πίνακας 16. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

Κλάσματα	Σύστημα διαλυτών
1	cHex/EtOAc (95:5)
2	cHex/EtOAc (90:10)
3	cHex/EtOAc (85:15)
4	cHex/EtOAc (80:20)

Πίνακας 17. Υπολείμματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

Συνενωμένα κλάσματα	Κωδικός υπολείμματος	Μάζα (mg)
1	BTA223B-F1	4.9
2	BTA223B-F2	14.3
3-4	BTA223B-F3	5.7

Το υπόλειμμα BTA223B-F1 (4.9 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR (Πίν. 18).

Πίνακας 18. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (87:13)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min
Ανιχνευτής	R.I.

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223B-F1a	0.2	12.9
BTA223B-F1b	0.6	13.5
BTA223B-F1c	1.7	14.4

Το υπόλειμμα BTA223B-F2 (14.3 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά παρελήφθησαν 5 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BTA223B-F2e είναι καθαρή ουσία (BTA223-01) (Πίν. 19).

Πίνακας 19. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/EtOAc (80:20)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min
Ανιχνευτής	R.I.

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223B-F2a	0.6	13.6
BTA223B-F2b	0.6	14.6
BTA223B-F2c	0.3	16.8
BTA223B-F2d	0.6	19.5
BTA223B-F2e	8.3	24.5

Το υπόλειμμα BTA223B-G (12.0 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BTA223B-G4 ήταν καθαρή ουσία (BTA223-01) (Πίν. 20).

Πίνακας 20. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/EtOAc (80:20)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min
Ανιχνευτής	R.I.

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223B-G1	3.7	14.2
BTA223B-G2	1.7	16.8
BTA223B-G3	1.1	17.8
BTA223B-G4	3.2	24.7

Το υπόλειμμα BTA223B-G1 (14.2 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BTA223B-G1c ήταν καθαρή ουσία (BTA223-01) (Πίν. 21).

Πίνακας 21. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (87:13)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min
Ανιχνευτής	R.I.

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223B-G1a	0.9	12.7
BTA223B-G1b	0.8	14.0
BTA223B-G1c	0.4	21.6

Το υπόλειμμα BTA223B-I (4.6 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά παρελήφθησαν 2 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BTA223B-I2 ήταν καθαρή ουσία (BTA223-07) (Πίν. 22).

Πίνακας 22. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (85:15)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min
Ανιχνευτής	R.I.

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223B-I1	0.1	16.5
BTA223B-I2	0.7	17.5

Το υπόλειμμα BTA223B-J (18.5 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR (Πίν. 23).

Πίνακας 23. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/EtOAc (80:20)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min
Ανιχνευτής	R.I.

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223B-J1	6.5	21.7
BTA223B-J2	5.3	24.5
BTA223B-J3	0.5	31.5
BTA223B-J4	0.5	34.5

Το υπόλειμμα BTA223B-K (29.9 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά παρελήφθησαν 5 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BTA223B-K2 ήταν καθαρή ουσία (BTA223-03) (Πίν. 24).

Πίνακας 24. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/EtOAc (75:25)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min
Ανιχνευτής	R.I.

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223B-K1	3.6	22.0
BTA223B-K2	11.9	24.9
BTA223B-K3	2.0	27.5
BTA223B-K4	3.5	32.9
BTA223B-K5	2.5	36.5

Το υπόλειμμα BTA223B-K1 (3.6 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BTA223B-K1c ήταν καθαρή ουσία (BTA223-09) (Πίν. 25).

Πίνακας 25. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (78:22)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min
Ανιχνευτής	R.I.

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223B-K1a	0.4	8.7
BTA223B-K1b	1.1	9.3
BTA223B-K1c	1.1	13.6

Το υπόλειμμα BTA223B-L (10.5 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H

NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα BTA223B-L2, BTA223B-L3 και BTA223B-L4 ήταν καθαρές ουσίες (BTA223-10, BTA223-03 και BTA223-09, αντίστοιχα) (Πίν. 26).

Πίνακας 26. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (78:22)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min
Ανιχνευτής	R.I.

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223B-L1	0.3	8.6
BTA223B-L2	2.9	11.6
BTA223B-L3	1.9	13.4
BTA223B-L4	4.9	17.8

Το υπόλειμμα BTA223B-N (18.6 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά παρελήφθησαν 4 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BTA223B-N1 ήταν καθαρή ουσία (BTA223-04) (Πίν. 27).

Πίνακας 27. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/EtOAc (55:45)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min
Ανιχνευτής	R.I.

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223B-N1	1.6	18.5
BTA223B-N2	1.0	20.5
BTA223B-N3	7.6	22.6
BTA223B-N4	0.8	33.1

Το υπόλειμμα BTA223B-N3 (7.6 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά παρελήφθησαν 5 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BTA223B-N3e ήταν καθαρή ουσία

(BTA223-14) (Πίν. 28).

Πίνακας 28. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (70:30)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min
Ανιχνευτής	R.I.

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223B-N3a	1.0	14.0
BTA223B-N3b	3.2	15.0
BTA223B-N3c	1.3	15.8
BTA223B-N3d	1.3	19.2
BTA223B-N3e	1.2	20.1

Το υπόλειμμα BTA223B-O (20.7 mg) υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεάς φάσης χρησιμοποιώντας ως υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου κανονικής φάσης και ως κινητή φάση ισοκρατικό σύστημα cHex/EtOAc (55:45). Το υπόλειμμα που προέκυψε (17.3 mg) υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά παρελήφθησαν 5 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 29).

Πίνακας 29. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/EtOAc (55:45)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min
Ανιχνευτής	R.I.

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223B-O1	2.3	21.6
BTA223B-O2	4.5	21.4
BTA223B-O3	1.3	26.7
BTA223B-O4	3.7	26.8
BTA223B-O5	1.4	34.2

Το υπόλειμμα BTA223B-P (27.2 mg) υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεάς φάσης χρησιμοποιώντας ως υλικό πλήρωσης γέλη πυριτίου κανονικής φάσης και ως κινητή φάση ισοκρατικό σύστημα cHex/EtOAc (55:45). Το υπόλειμμα που προέκυψε (13.7 mg)

υποβλήθηκε σε HPLC. Συνολικά παρελήφθησαν 5 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR (Πίν. 30).

Πίνακας 30. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/EtOAc (55:45)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min
Ανιχνευτής	R.I.

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223B-P1	0.8	19.5
BTA223B-P2	2.5	22.3
BTA223B-P3	2.1	25.3
BTA223B-P4	2.2	26.1
BTA223B-P5	1.3	35.0

Τα υπολείμματα BTA223A-I1 και BTA223B-J1 συνενώθηκαν στο BTA223MIX1 (9.0 mg) και υποβλήθηκαν σε HPLC. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BTA223MIX1-2 ήταν καθαρή ουσία (BTA223-06) (Πίν. 31).

Πίνακας 31. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (83:17)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min
Ανιχνευτής	R.I.

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223MIX1-1	0.6	11.5
BTA223MIX1-2	1.5	15.6
BTA223MIX1-3	4.8	17.4

Τα υπολείμματα BTA223B-F2c και BTA223B-G2 συνενώθηκαν στο BTA223MIX2 (2.0 mg) και υποβλήθηκαν σε HPLC. Συνολικά παραλήφθηκε 1 κλάσμα, το οποίο ζυγίστηκε και ελέγχθηκε φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι ήταν καθαρή ουσία (BTA223-08) (Πίν. 32).

Πίνακας 32. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (87:13)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min
Ανιχνευτής	R.I.

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223MIX2-1	0.6	15.8

Τα υπολείμματα BTA223B-K3 και BTA223B-K4 συνενώθηκαν στο BTA223MIX3 (5.5 mg) και υποβλήθηκαν σε HPLC. Συνολικά παρελήφθησαν 2 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BTA223MIX3-1 ήταν καθαρή ουσία (BTA223-09) (Πίν. 33).

Πίνακας 33. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (78:22)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min
Ανιχνευτής	R.I.

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223MIX3-1	4.7	11.5
BTA223MIX3-2	2.5	15.6

Τα υπολείμματα BTA223A-M2, BTA223B-O2 και BTA223B-P2 συνενώθηκαν στο BTA223MIX4 (7.9 mg) και υποβλήθηκαν σε HPLC. Συνολικά παρελήφθησαν 2 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BTA223MIX4-2 ήταν καθαρή ουσία (BTA223-11) (Πίν. 34).

Πίνακας 34. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (70:30)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min
Ανιχνευτής	R.I.

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223MIX4-1	1.6	8.5
BTA223MIX4-2	6.1	15.2

Τα υπολείμματα BTA223A-M3, BTA223B-O3, BTA223B-O4, BTA223B-P3 και BTA223B-P4 συνενώθηκαν στο BTA223MIX5 (10.5 mg) και υποβλήθηκαν σε HPLC. Συνολικά παρελήφθησαν 3 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BTA223MIX5-3 ήταν καθαρή ουσία (BTA223-12) (Πίν. 35).

Πίνακας 35. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (70:30)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min
Ανιχνευτής	R.I.

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223MIX5-1	1.8	17.8
BTA223MIX5-2	0.6	27.4
BTA223MIX5-3	3.4	37.2

Τα υπολείμματα BTA223B-K1b και BTA223MIX1-3 συνενώθηκαν στο BTA223MIXB1 (5.9 mg) και υποβλήθηκαν σε HPLC. Συνολικά παραλήφθηκε 1 κλάσμα, το οποίο ζυγίστηκε και ελέγχθηκε φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι ήταν καθαρή ουσία (BTA223-02) (Πίν. 36).

Πίνακας 36. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας	
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (85:15)
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min
Ανιχνευτής	R.I.

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223MIXB1-1	6.3	16.8

Τα υπολείμματα BTA223B-F1c και BTA223B-G1b συνενώθηκαν στο BTA223MIXB2 (2.5 mg) και υποβλήθηκαν σε HPLC. Συνολικά παρελήφθησαν 2 κλάσματα, τα οποία ζυγίστηκαν και ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα BTA223MIXB2-1 ήταν καθαρή ουσία (BTA223-13) (Πίν. 37).

Πίνακας 37. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας		
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm	
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (89:11)	
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min	
Ανιχνευτής	R.I.	

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223MIXB2-1	0.8	13.0
BTA223MIXB2-2	0.6	13.9

Τα υπολείμματα BTA223A-I2 και BTA223A-I3 συνενώθηκαν στο BTA223MIXB3 (2.2 mg) και υποβλήθηκαν σε HPLC. Συνολικά παραλήφθηκε 1 κλάσμα, το οποίο ζυγίστηκε και ελέγχθηκε φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι ήταν καθαρή ουσία (BTA223-03) (Πίν. 38).

Πίνακας 38. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

Συνθήκες χρωματογραφίας		
Στήλη	Econosphere silica 10u 250 mm x 10 mm	
Διαλύτης έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (87:13)	
Ροή διαλύτη	1.5 mL/min	
Ανιχνευτής	R.I.	

Κωδικός κλάσματος	Μάζα (mg)	Χρόνος έκλουσης (min)
BTA223MIXB3-1	1.0	22.4

Συνολικά από το φαιοφύκος *D. spiralis* και από τις καλλιέργειες του ενδοφυτικού βακτηριακού στελέχους BI0223 για τη βιομετατροπή του (1*R*,3*E*,7*E*,11*S*,12*S*)-14-οξο-3,7,18-δολαμπελλατριενίου απομονώθηκαν 15 μεταβολίτες, οι οποίοι παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 39.

Πίνακας 39. Απομονωμένοι μεταβολίτες και μάζες αυτών.

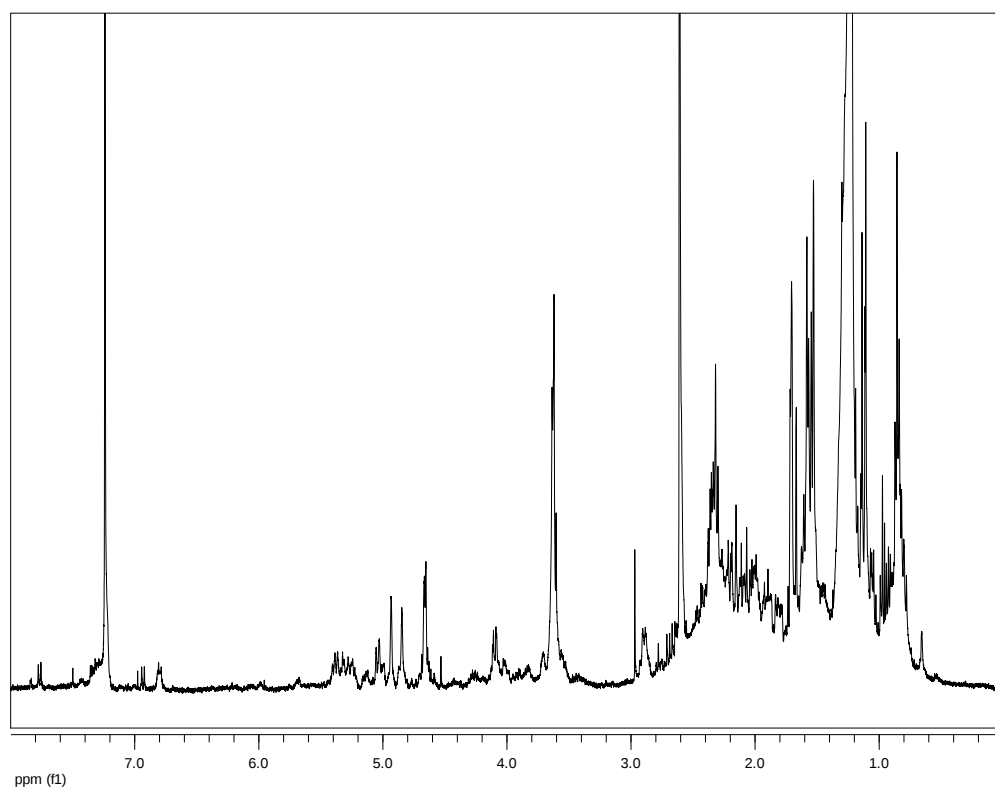
Μεταβολίτης	Κωδικός	Κλάσματα	Μάζα (mg)
1	(1 <i>R</i> ,3 <i>E</i> ,7 <i>E</i> ,11 <i>S</i> ,12 <i>S</i>)- 14-οξο-3,7,18- δολαμπελλατριένιο	MP0346-B4c2	192.5
2	BTA223-01	BTA223A-G3, BTA223B- F2e, BTA223B-F3, BTA223B-G1c, BTA223B- G4	24.6
3	BTA223-02	BTA223MIXB1-1	6.3
4	BTA223-03	BTA223A-J2, BTA223B-K2, BTA223B-L3, BTA223MIXB3-1	17.8
5	BTA223-12	BTA223MIX5-3	3.4
6	BTA223-06	BTA223MIX1-2	1.5
7	BTA223-09	BTA223B-K1c, BTA223B- L4, BTA223MIX3-1	11.3
8	BTA223-04	BTA223B-N1	2.7
9	BTA223-11	BTA223MIX4-2	6.1
	BTA223-05	BTA223A-L3	0.4
	BTA223-07	BTA223B-I2	0.7
	BTA223-08	BTA223MIX2-1	0.6
	BTA223-10	BTA223B-L2	3.5
	BTA223-13	BTA223MIXB2-1	0.8
	BTA223-14	BTA223B-N3e	1.1

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

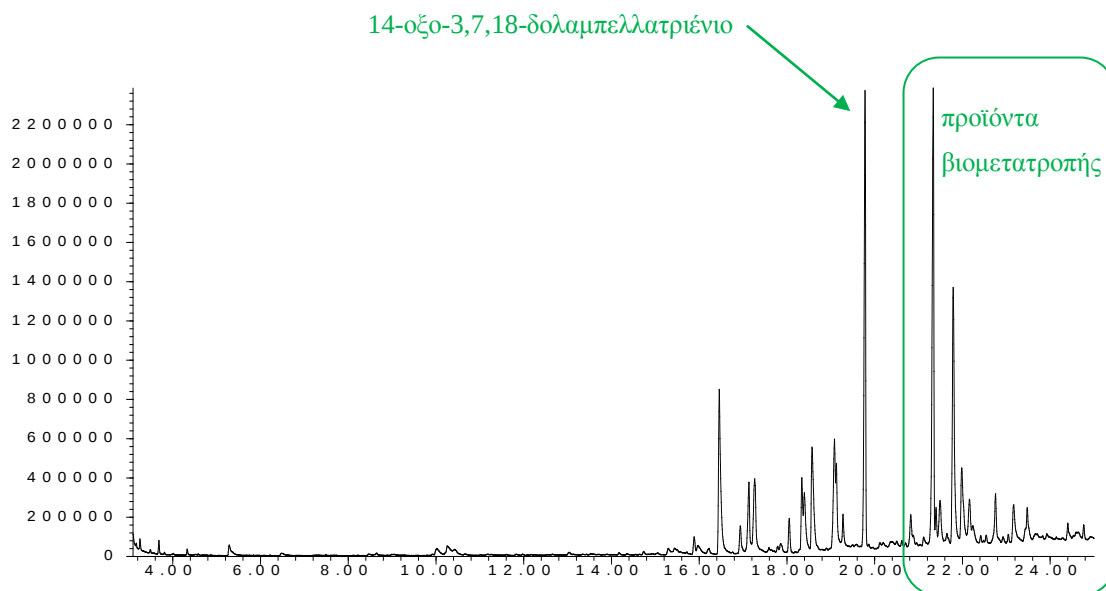
Από δείγμα του φαιοφύκους *D. spiralis*, το οποίο συλλέχθηκε στην Ελαφώνησο τον Οκτώβριο του 2012, απομονώθηκαν με τη μέθοδο της έμμεσης απομόνωσης 11 διαφορετικά στελέχη ενδοφυτικών βακτηρίων (BI0199–BI0205 και BI0220–BI0223).

Παράλληλα, δείγμα του *D. spiralis*, το οποίο συλλέχθηκε στην Ελαφώνησο τον Μάρτιο του 2013, εκχυλίστηκε με μίγματα $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ και το οργανικό εκχύλισμα που προέκυψε υποβλήθηκε σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς με αποτέλεσμα την απομόνωση του κύριου μεταβολίτη του φαιοφύκου (1).

Τα 11 ενδοφυτικά βακτηριακά στελέχη υποβλήθηκαν σε υγρές καλλιέργειες μικρής κλίμακας με στόχο την αξιολόγηση της ικανότητας βιομετατροπής του μεταβολίτη 1. Τα οργανικά υπολείμματα που προέκυψαν ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία ^1H NMR και αναλύθηκαν με GC-MS, οπότε και κατέστη εμφανές (Εικ. 25 και 26) ότι το στέλεχος BI0223 είχε την ικανότητα να βιομετατρέπει το 14-οξο-3,7,18-δολαμπελλατριένιο (1).



Εικόνα 25. Φάσμα ^1H NMR του οργανικού υπολείμματος που προέκυψε από την υγρή καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους BI0223 παρουσία του μεταβολίτη 1.



Εικόνα 26. Χρωματογράφημα GC-MS του οργανικού υπολείμματος που προέκυψε από την υγρή καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους BI0223 παρουσία του μεταβολίτη **1**.

Στη συνέχεια, το βακτηριακό στέλεχος BI0223, το οποίο ταυτοποιήθηκε μετά από σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου 16S rDNA με τις αλληλουχίες της βάσης δεδομένων NCBI ως *Bacillus megaterium* με ποσοστό ταύτισης 99%, υποβλήθηκε σε υγρή καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας παρουσία του 14-οξο-3,7,18-δολαμπελλατριενίου (**1**).

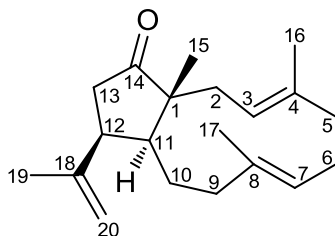
Ακολούθως τα οργανικά υπολείμματα που περιείχαν τα προϊόντα βιομετατροπής υποβλήθηκαν σε σειρά χρωματογραφικών διαχωρισμών με αποτέλεσμα την απομόνωση δεκατεσσάρων μεταβολιτών, εκ των οποίων μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί οι οκτώ (**2–9**).

Η ταυτοποίηση των απομονωμένων μεταβολιτών βασίστηκε στην ανάλυση των φασματοσκοπικών τους δεδομένων (NMR και MS) και στη σύγκρισή τους με τα δεδομένα ανάλογων δομών της βιβλιογραφίας.

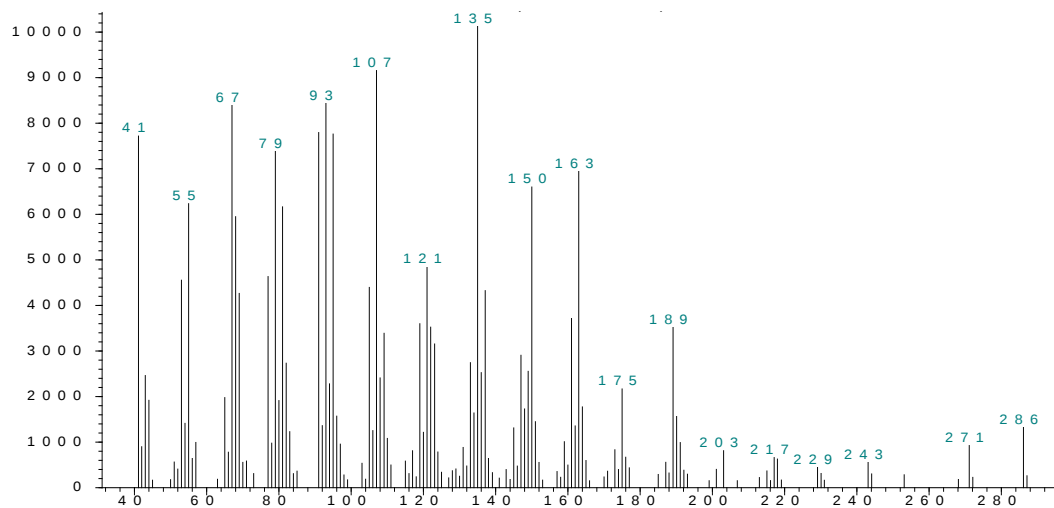
Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα των δευτερογενών μεταβολιτών **1–9** και περιγράφεται ο καθορισμός της χημικής τους δομής.

3.1. Μεταβολίτης 1

Ο μεταβολίτης **1** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως υποκίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 226.5 mg.



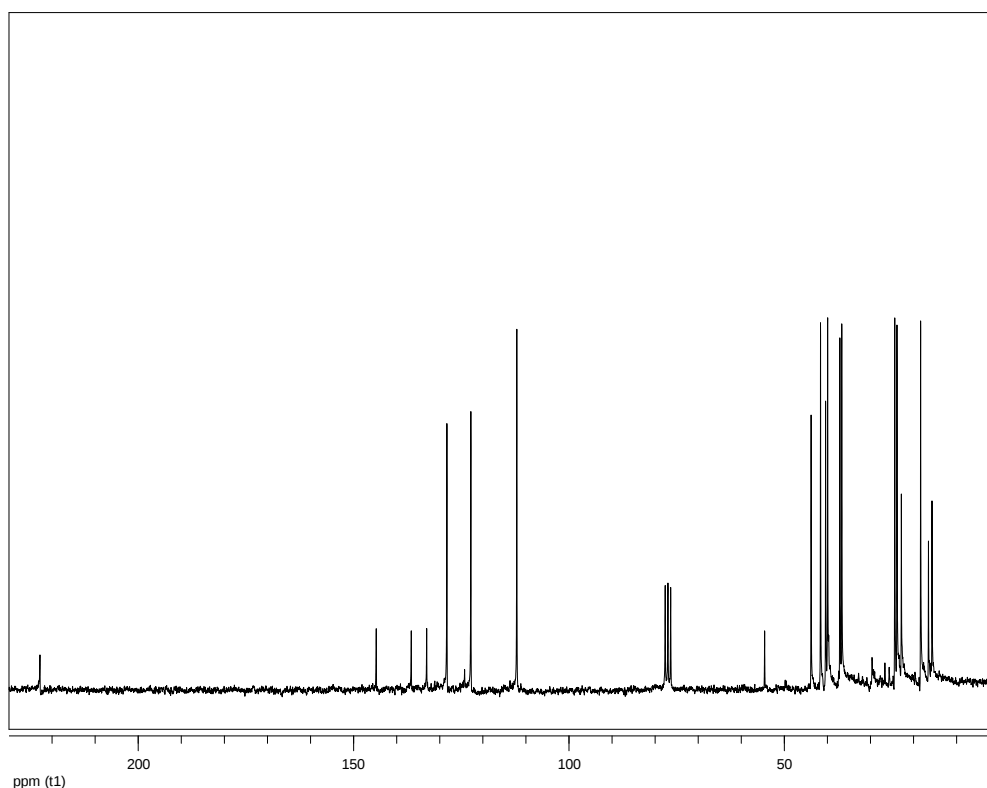
Το φάσμα μάζας (Εικ. 27) του μεταβολίτη **1** εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 286 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{20}H_{30}O$.



Εικόνα 27. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **1**.

Στο φάσμα ^{13}C NMR (Εικ. 28) του μεταβολίτη **1** εμφανίσθηκαν 20 κορυφές, μεταξύ των οποίων παρατηρήθηκαν:

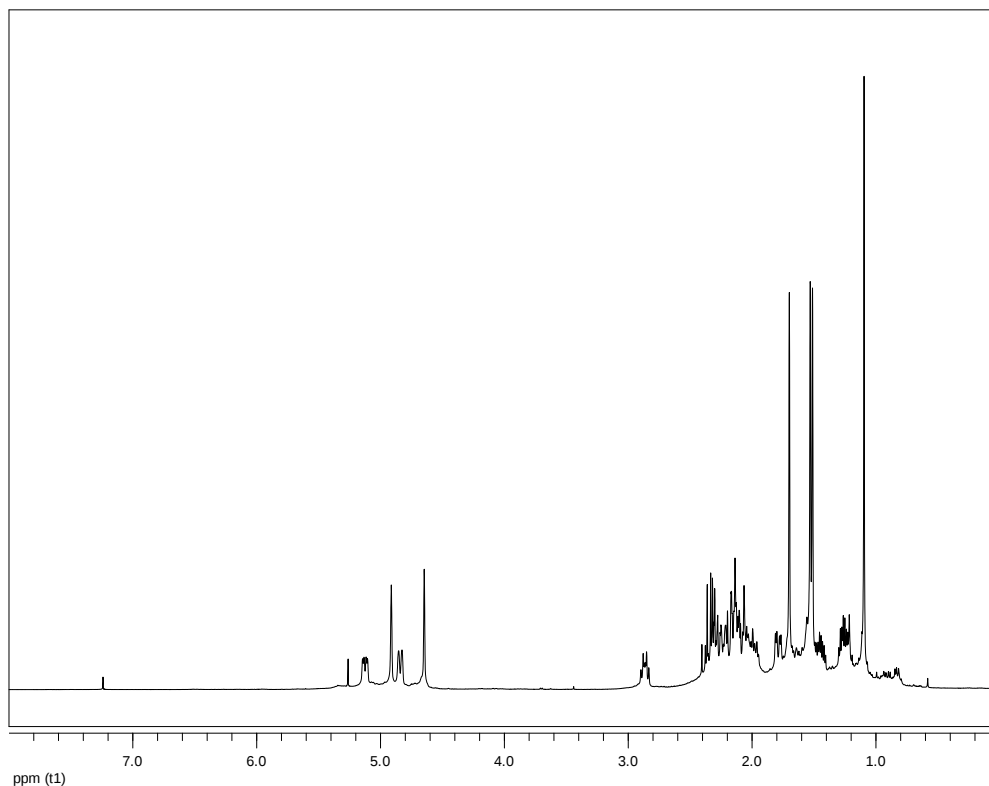
- Ένα καρβονυλικό άτομο άνθρακα σε δ 222.8, χαρακτηριστική χημική μετατόπιση για την παρουσία μιας κετονομάδας στο μόριο.
- Έξι ολεφινικά άτομα άνθρακα σε δ 112.1, 122.8, 128.3, 133.0, 136.6 και 144.7 που υπεδείκνυν την ύπαρξη τριών διπλών δεσμών άνθρακα-άνθρακα στο μόριο.



Εικόνα 28. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **1**.

Στο φάσμα ^1H NMR (Εικ. 29) του μεταβολίτη **1** παρατηρήθηκαν:

- Τέσσερις απλές κορυφές σε δ 1.09, 1.51, 1.53 και 1.70, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια ενός αλειφατικού και τριών βινυλικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα.
- Δύο ευρείες απλές κορυφές σε δ 4.65 και 4.91, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός εξωμεθυλενίου.
- Μία ευρεία διπλή κορυφή σε δ 4.84 και μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 5.12, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε δύο ολεφινικά μεθίνια.



Εικόνα 29. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **1**.

Λαμβάνοντας υπόψη τους τρεις διπλούς δεσμούς άνθρακα-άνθρακα και το καρβονύλιο ως τέσσερις από τους έξι βαθμούς ακορεστότητας, το μόριο θα έπρεπε να είναι δικυκλικό.

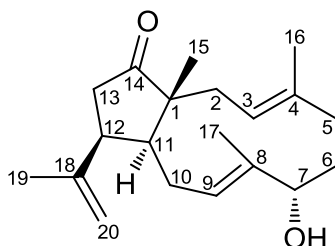
Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **1** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν (1*R*,3*E*,7*E*,11*S*,12*S*)-14-οξο-3,7,18-δολαμπελλατριένιο, το οποίο αποτελεί τον κύριο δευτερογενή μεταβολίτη του φαιοφύκους *D. spiralis* (Ιοαννου *et al.* 2011a). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **1** παρατίθενται στον Πίνακα 40.

Πίνακας 40. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **1** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

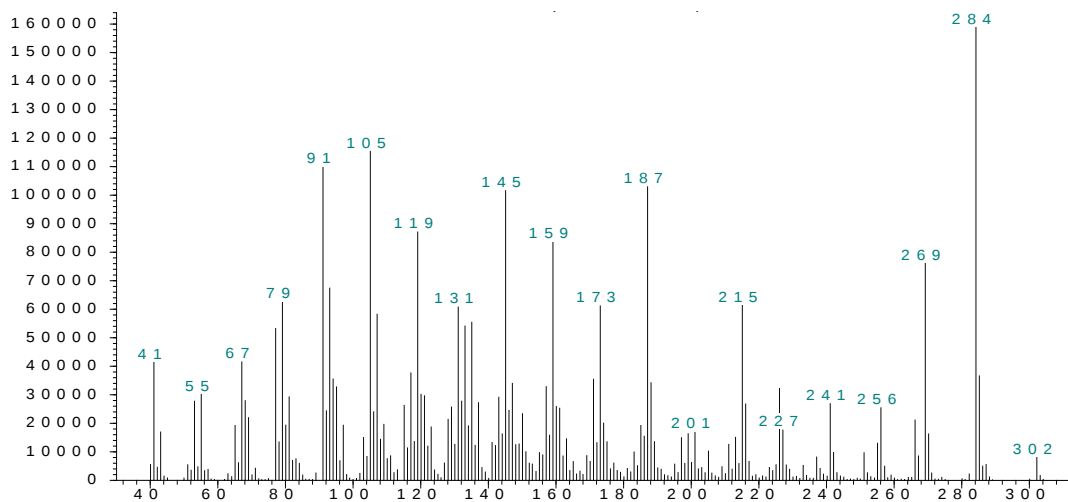
Θέση	δ_C	δ_H
1	54.6	
2	36.6	2.16 (m), 1.79 (dd, 13.1 , 4.4)
3	122.8	5.12 (dd, 11.1 , 4.4)
4	136.6	
5	39.9	2.25 (m), 2.04 (m)
6	24.3	2.30 (m), 2.06 (m)
7	128.3	4.84 (brd, 10.9)
8	133.0	
9	37.1	2.14 (m), 1.99 (m)
10	23.8	1.44 (m), 1.25 (m)
11	40.4	2.13 (m)
12	43.8	2.86 (dt, 11.0, 7.2)
13	41.6	2.35 (m)
14	222.8	
15	18.3	1.09 (s)
16	15.7	1.51 (s)
17	16.5	1.53 (s)
18	144.7	
19	22.8	1.70 (s)
20	112.1	4.91 (brs), 4.65 (brs)

3.2. Μεταβολίτης 2

Ο μεταβολίτης **2** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως λευκό κρυσταλλικό υπόλειμμα συνολικής μάζας 24.6 mg.



Το φάσμα μάζας (Εικ. 30) του μεταβολίτη **2** εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 302 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{20}H_{30}O_2$. Επιπλέον, παρατηρήθηκε θραύσμα $[M-H_2O]^+$ σε m/z 284 που υπεδείκνυε την ύπαρξη τουλάχιστον μίας υδροξυλομάδας στο μόριο.

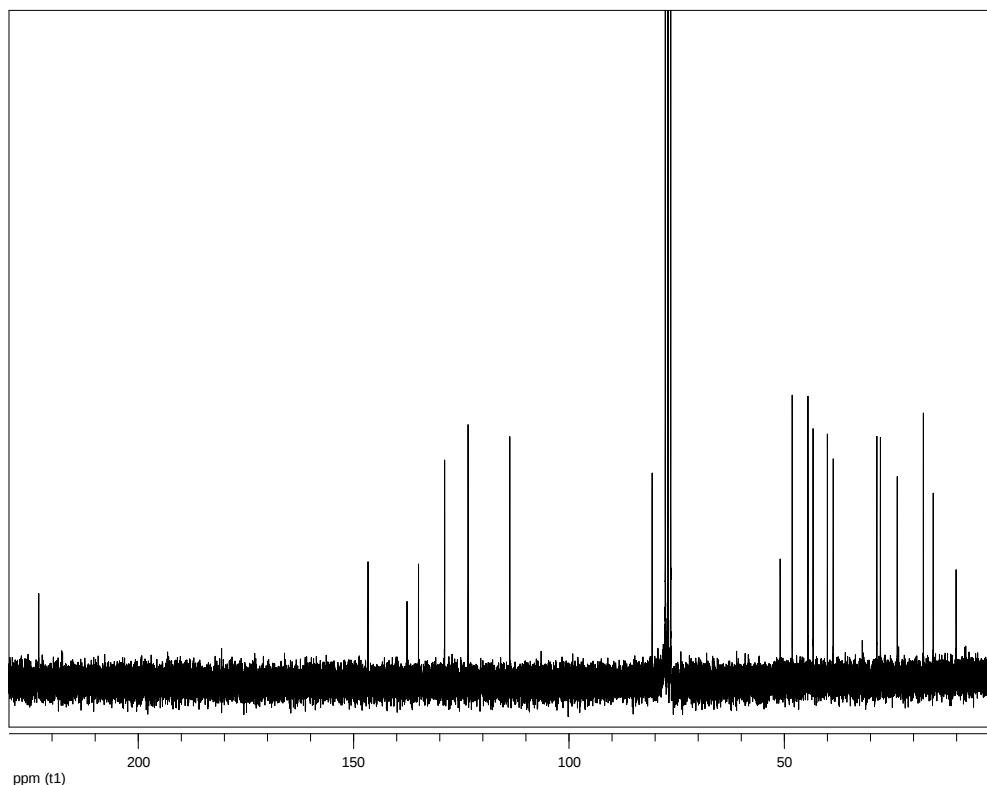


Εικόνα 30. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **2**.

Στο φάσμα ^{13}C NMR (Εικ. 31) του μεταβολίτη **2** εμφανίσθηκαν 20 κορυφές, μεταξύ των οποίων παρατηρήθηκαν:

- Ένα καρβονυλικό άτομο άνθρακα σε δ 223.1, χαρακτηριστική χημική μετατόπιση για την παρουσία μιας κετονομάδας στο μόριο.

- Έξι ολεφινικά άτομα άνθρακα σε δ 113.7, 123.4, 128.9, 134.9, 137.6 και 146.7 που υπεδείκνυν την ύπαρξη τριών διπλών δεσμών άνθρακα-άνθρακα στο μόριο.
- Ένα οξυγονωμένο άτομο άνθρακα σε δ 80.7, χαρακτηριστική χημική μετατόπιση για την παρουσία μιας υδροξυλομάδας στο μόριο.

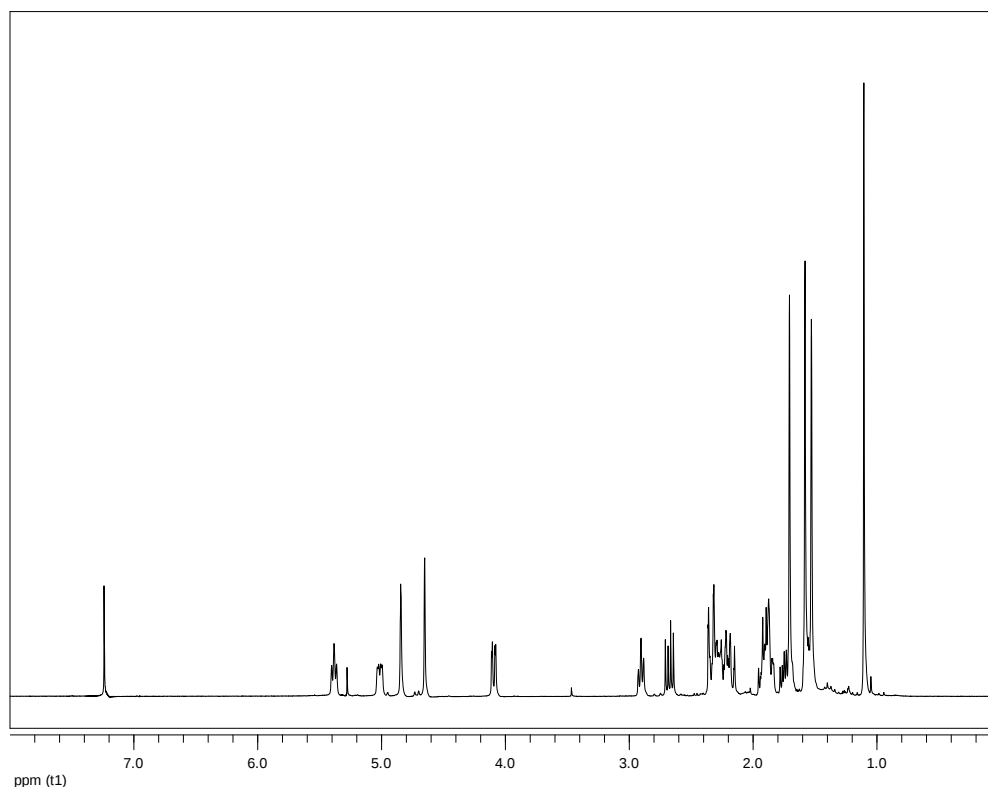


Εικόνα 31. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **2**.

Στο φάσμα ^1H NMR (Εικ. 32) του μεταβολίτη **2** παρατηρήθηκαν:

- Τέσσερις απλές κορυφές σε δ 1.11, 1.53, 1.58 και 1.71, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια ενός αλειφατικού και τριών βινυλικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομο άνθρακα.
- Δύο ευρείες απλές κορυφές σε δ 4.65 και 4.85, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός εξωμεθυλενίου.
- Μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 5.01 και μία τριπλή κορυφή σε δ 5.38, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε δύο ολεφινικά μεθίνια.

- Μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 4.09 που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε σε πρωτόνιο οξυγονωμένου άνθρακα.



Εικόνα 32. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **2**.

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **2** παρουσίαζαν πολλές ομοιότητες με τα αντίστοιχα του **1**. Σε συμφωνία με τον μοριακό τύπο, ήταν προφανής η παρουσία μίας υδροξυλομάδας στο μόριο.

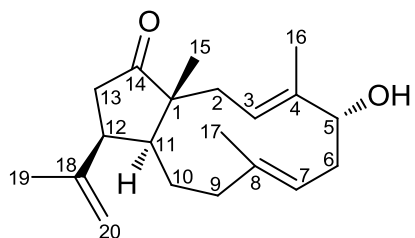
Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **2** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα γνωστό φυσικό προϊόν, το (1*R*,3*E*,7*S*,8*E*,11*S*,12*S*)-14-οξο-7-υδροξυ-3,8,18-δολαμπελλατριένιο (Ioannou *et al.* 2012). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **2** παρατίθενται στον Πίνακα 41.

Πίνακας 41. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **2** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

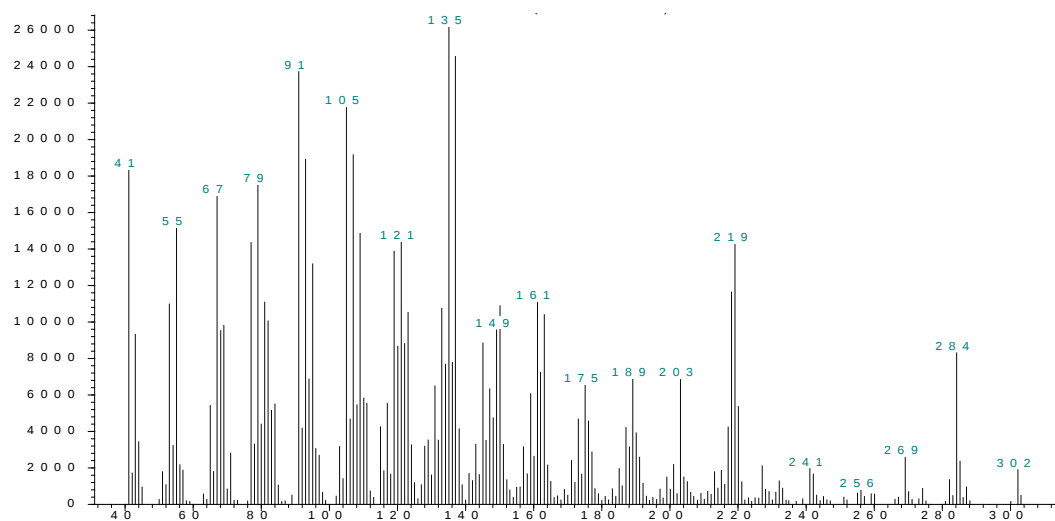
Θέση	δ_C	δ_H
1	51.0	
2	40.0	1.90 (m)
3	123.4	5.01 (dd, 10.5, 3.8)
4	134.9	
5	38.6	2.28 (m), 2.20 (m)
6	28.5	1.89 (m), 1.55 (m)
7	80.7	4.09 (dd, 10.8, 2.3)
8	137.6	
9	128.9	5.38 (t, 7.8)
10	27.7	2.32 (m), 1.74 (m)
11	48.2	2.22 (m)
12	44.5	2.90 (t, 8.8)
13	43.3	2.67 (dd, 17.1, 8.8), 2.34 (d, 17.1)
14	223.1	
15	17.7	1.11 (s)
16	15.4	1.53 (s)
17	10.1	1.58 (s)
18	146.7	
19	23.8	1.70 (s)
20	113.7	4.65 (brs), 4.85 (brs)

3.3. Μεταβολίτης 3

Ο μεταβολίτης **3** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 6.3 mg.



Το φάσμα μάζας (Εικ. 33) του μεταβολίτη **3** εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 302 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{20}H_{30}O_2$. Επιπλέον, παρατηρήθηκε θραύσμα $[M-H_2O]^+$ σε m/z 284 που υπεδείκνυε την ύπαρξη τουλάχιστον μίας υδροξυλομάδας στο μόριο.

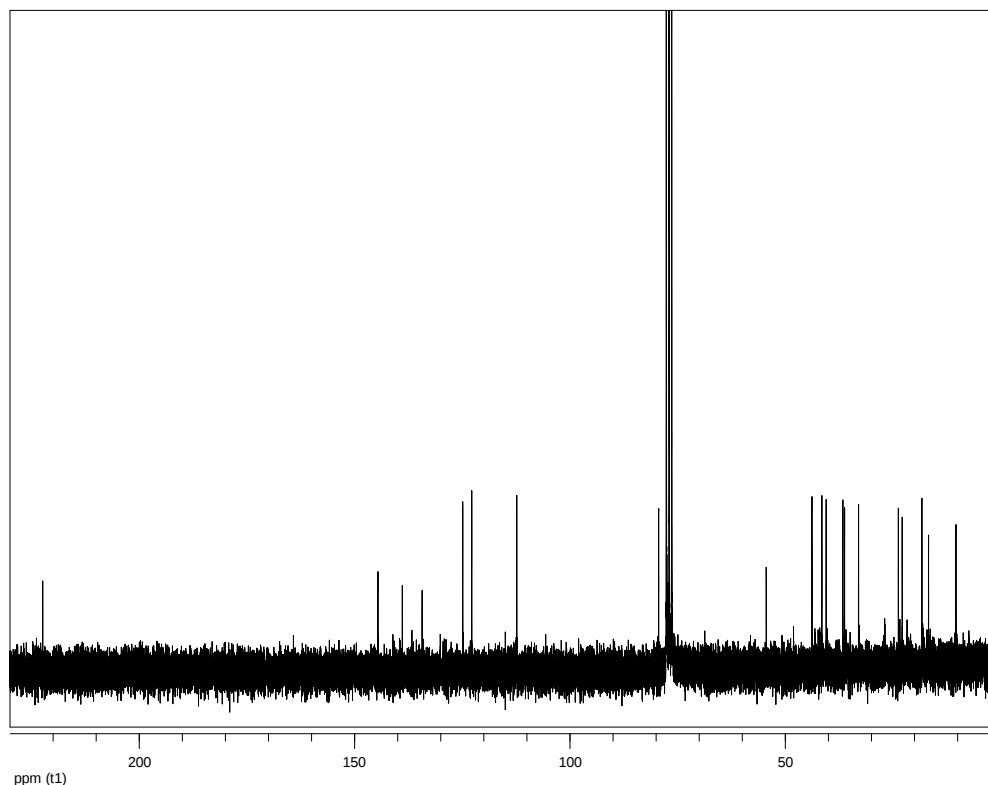


Εικόνα 33. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **3**.

Στο φάσμα ^{13}C NMR (Εικ. 34) του μεταβολίτη **3** εμφανίσθηκαν 20 κορυφές, μεταξύ των οποίων παρατηρήθηκαν:

- Ένα καρβονυλικό άτομο άνθρακα σε δ 222.4, χαρακτηριστική χημική μετατόπιση για την παρουσία μιας κετονομάδας στο μόριο.

- Έξι ολεφινικά άτομα άνθρακα σε δ 112.3, 122.8, 124.9, 134.3, 138.9 και 144.6 που υπεδείκνυν την ύπαρξη τριών διπλών δεσμών άνθρακα-άνθρακα στο μόριο.
- Ένα οξυγονωμένο άτομο άνθρακα σε δ 79.4, χαρακτηριστική χημική μετατόπιση για την παρουσία μιας υδροξυλομάδας στο μόριο.

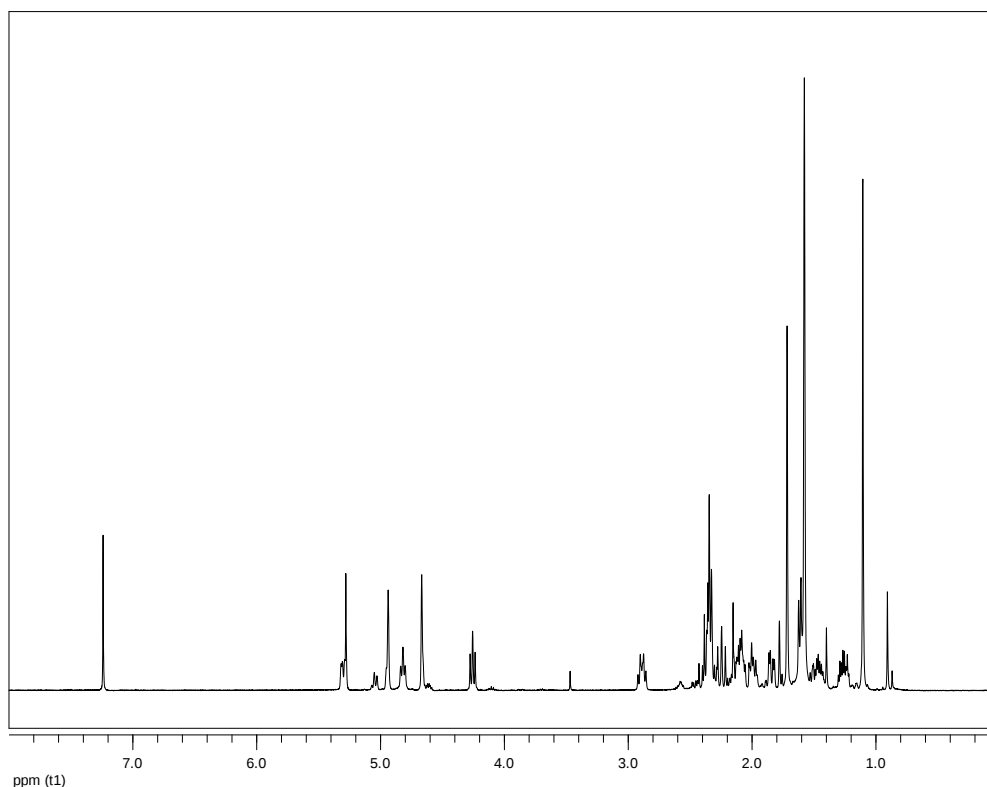


Εικόνα 34. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **3**.

Στο φάσμα ^1H NMR (Εικ. 35) του μεταβολίτη **3** παρατηρήθηκαν:

- Τρεις απλές κορυφές σε δ 1.11, 1.58 και 1.72, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία, έξι και τρία πρωτόνια, αντίστοιχα, και αφορούσαν σε πρωτόνια ενός αλειφατικού και τριών βινυλικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομο άνθρακα.
- Δύο ευρείες απλές κορυφές σε δ 4.67 και 4.94, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός εξωμεθυλενίου.
- Μία τριπλή κορυφή σε δ 4.82 και μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 5.30, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε δύο ολεφινικά μεθίνια.

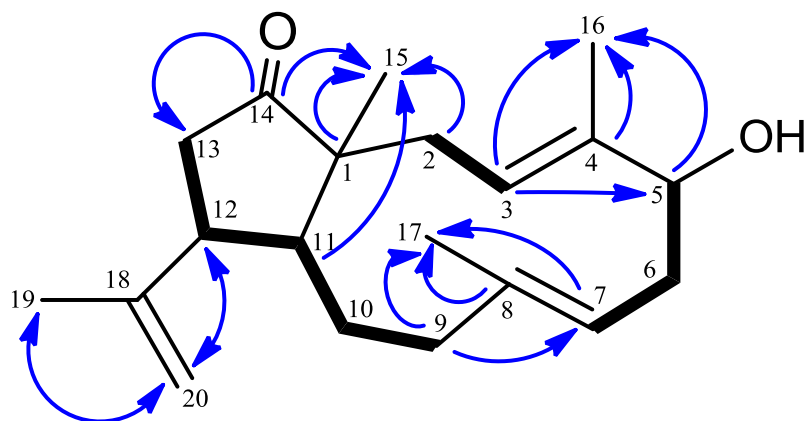
- Μία τριπλή κορυφή σε δ 4.26 που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε σε πρωτόνιο οξυγονωμένου άνθρακα.



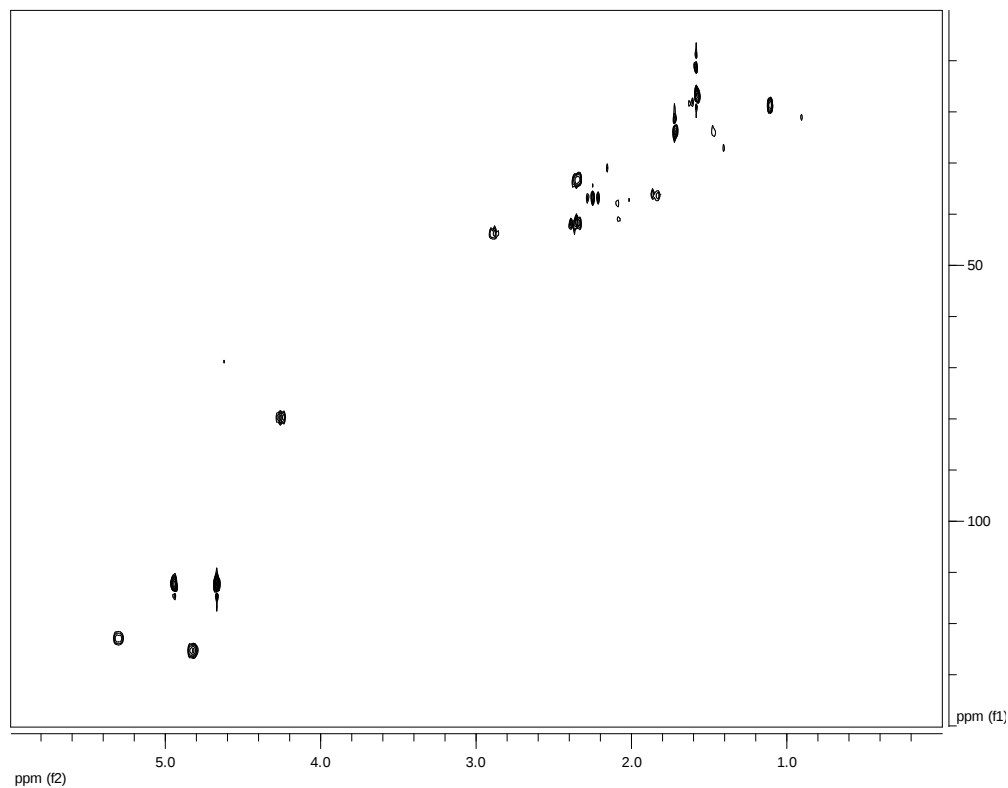
Εικόνα 35. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **3**.

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **3** παρουσίαζαν πολλές ομοιότητες με τα αντίστοιχα του **2** και σε συμφωνία με τον μοριακό τύπο ήταν εμφανές ότι επρόκειτο για ένα ισομερές του.

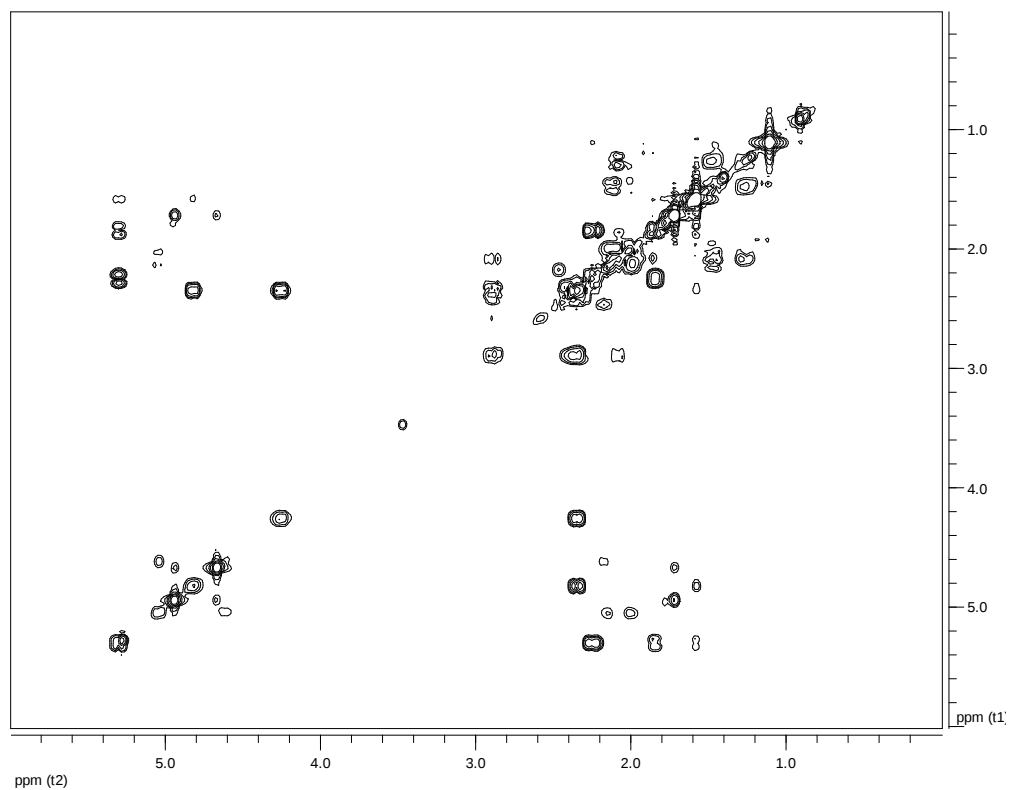
Η δισδιάστατη χημική δομή του μεταβολίτη **3** αποδόθηκε με τη βοήθεια των συσχετίσεων (Εικ. 36) που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT (Εικ. 37), COSY (Εικ. 38) και HMBC (Εικ. 39).



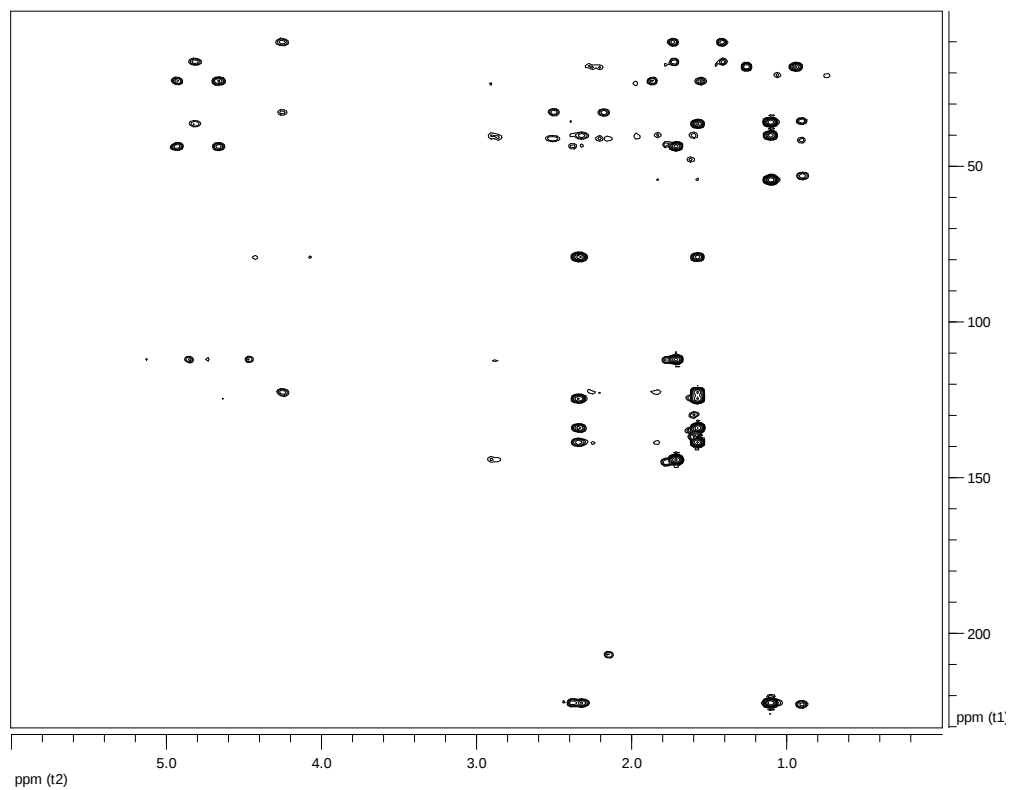
Εικόνα 36. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη 3.



Εικόνα 37. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη 3.



Εικόνα 38. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 3.



Εικόνα 39. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 3.

Συγκεκριμένα, οι ομοπυρηνικές συζεύξεις μακράς απόστασης των εξωμεθυλενικών πρωτονίων H₂-20 με τα H₃-19 και οι ισχυρές ετεροπυρηνικές συζεύξεις του άνθρακα C-19 με τα H₂-20, καθώς και του άνθρακα C-20 με τα μεθυλικά πρωτόνια H₃-19 ήταν ενδεικτικές για την ύπαρξη μιας ισοπροπενυλομάδας, ενώ η ετεροπυρηνική σύζευξη του άνθρακα C-20 με το μεθινικό πρωτόνιο H-12 υπέδειξε τη θέση της. Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις των πρωτονίων H-11/H-12 και H-12/H-13, σε συνδυασμό με τις ετεροπυρηνικές συζεύξεις του άνθρακα C-14 με τα μεθυλενικά πρωτόνια H-13 και των ανθράκων C-1, C-11 και C-14 με τα μεθυλικά πρωτόνια H₃-15 ολοκλήρωσαν τον πενταμελή δακτύλιο που φέρει το μεθύλιο H₃-15 στον C-1. Τα μεθυλενικά πρωτόνια H₂-2 εμφάνισαν ομοπυρηνική σύζευξη με το ολεφινικό μεθίνιο H-3, το οποίο με τη σειρά του εμφάνισε ομοπυρηνική σύζευξη μακράς απόστασης με τα μεθυλικά πρωτόνια H₃-16, ενώ οι άνθρακες C-3, C-4 και C-5 παρουσίασαν ετεροπυρηνικές συζεύξεις με τα πρωτόνια H₃-16. Ο άνθρακας C-3 παρουσίασε ετεροπυρηνική σύζευξη με το οξυγονωμένο μεθίνιο H-5. Οι ομοπυρηνικές συζεύξεις των μεθυλενικών πρωτονίων H-6 με το H-5 και το ολεφινικό πρωτόνιο H-7, η ομοπυρηνική σύζευξη μακράς απόστασης του H-7 με τα μεθυλικά πρωτόνια H₃-17 και οι ομοπυρηνικές συζεύξεις των H₂-9/H₂-10 και των H₂-10 με το μεθινικό πρωτόνιο H-11, σε συνδυασμό με τις ετεροπυρηνικές συζεύξεις των C-7, C-8 και C-9 με τα H₃-17, καθώς και του C-9 με το ολεφινικό μεθινικό πρωτόνιο H-7 ολοκλήρωσαν τον ενδεκαμελή δακτύλιο.

Η σχετική στερεοχημεία στο ασύμμετρο κέντρο C-5 αποδόθηκε ως *R** κατόπιν σύγκρισης της σταθεράς σύζευξης του H-5 με αυτήν του αντίστοιχου ακετυλιωμένου μεταβολίτη (Ioannou *et al.* 2012).

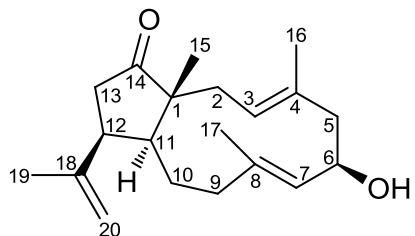
Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **3** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα νέο φυσικό προϊόν, το (1*R*,3*E*,5*R*,7*E*,11*S*,12*S*)-14-οξο-5-υδροξυ-3,7,18-δολαμπελλατριένιο. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **3** παρατίθενται στον Πίνακα 42.

Πίνακας 42. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **3** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

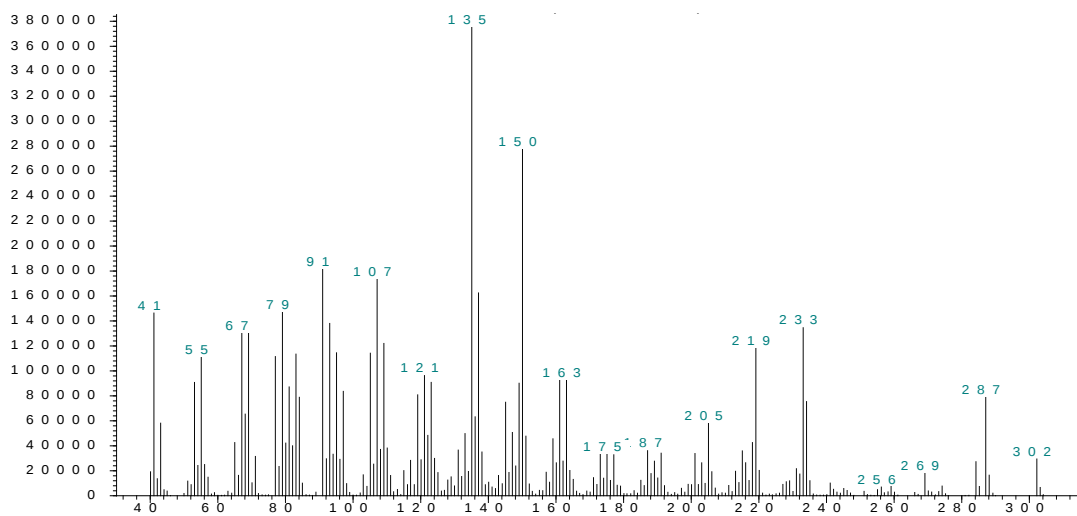
Θέση	δ_C	δ_H
1	54.4	
2	36.8	1.85 (m), 2.24 (m)
3	122.8	5.30 (dd, 11.0, 4.1)
4	138.9	
5	79.4	4.26 (t, 8.1)
6	33.0	2.34 (m)
7	124.9	4.82 (t, 7.2)
8	134.3	
9	36.6	2.10 (m), 1.99 (m)
10	23.8	1.48 (m), 1.27 (m)
11	40.9	2.07 (m)
12	43.8	2.88 (dt, 10.7, 7.5)
13	41.5	2.36 (m)
14	222.4	
15	18.3	1.11 (s)
16	10.4	1.58 (s)
17	16.7	1.58 (s)
18	144.6	
19	22.9	1.72 (s)
20	112.3	4.94 (brs), 4.67 (brs)

3.4. Μεταβολίτης 4

Ο μεταβολίτης **4** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 17.8 mg.



Το φάσμα μάζας (Εικ. 40) του μεταβολίτη **4** εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 302 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{20}H_{30}O_2$. Επιπλέον, παρατηρήθηκε θραύσμα $[M-H_2O]^+$ σε m/z 284 που υπεδείκνυε την ύπαρξη τουλάχιστον μίας υδροξυλομάδας στο μόριο.

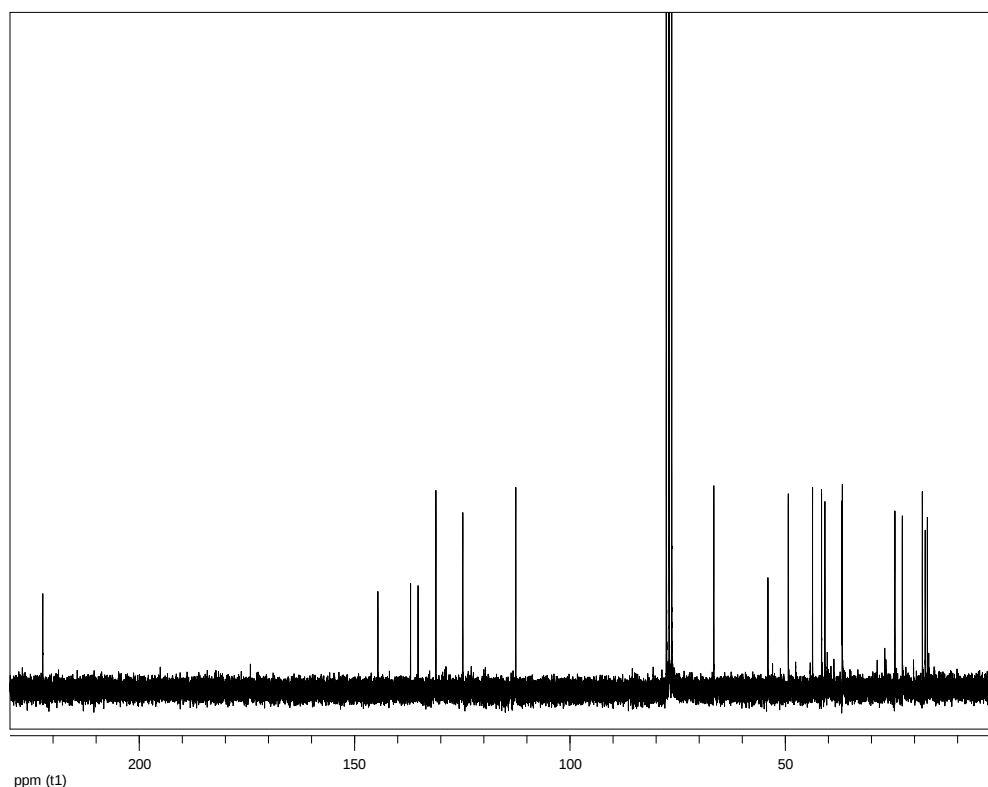


Εικόνα 40. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **4**.

Στο φάσμα ^{13}C NMR (Εικ. 41) του μεταβολίτη **4** εμφανίσθηκαν 20 κορυφές, μεταξύ των οποίων παρατηρήθηκαν:

- Ένα καρβονυλικό άτομο άνθρακα σε δ 222.4, χαρακτηριστική χημική μετατόπιση για την παρουσία μιας κετονομάδας στο μόριο.

- Έξι ολεφινικά άτομα άνθρακα σε δ 112.6, 124.9, 131.1, 135.3, 137.0 και 144.6 που υπεδείκνυν την ύπαρξη τριών διπλών δεσμών άνθρακα-άνθρακα στο μόριο.
- Ένα οξυγονωμένο άτομο άνθρακα σε δ 66.6, χαρακτηριστική χημική μετατόπιση για την παρουσία μιας υδροξυλομάδας στο μόριο.

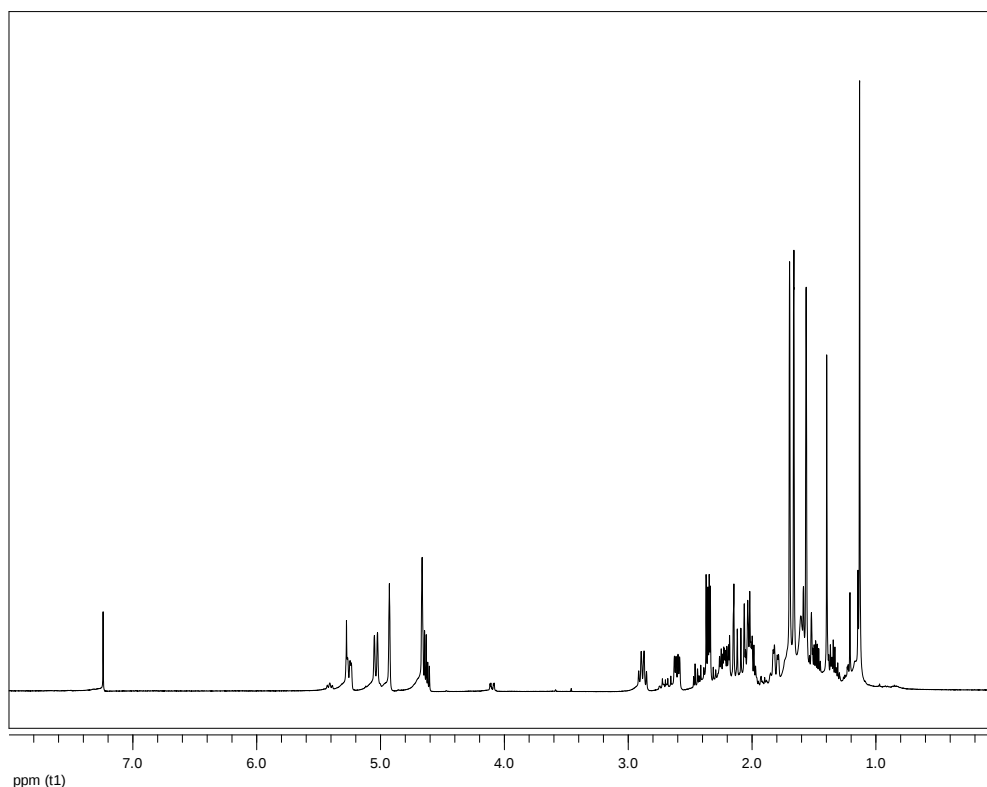


Εικόνα 41. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **4**.

Στο φάσμα ^1H NMR (Εικ. 42) του μεταβολίτη **4** παρατηρήθηκαν:

- Τέσσερις απλές κορυφές σε δ 1.13, 1.56, 1.66 και 1.70, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια ενός αλειφατικού και τριών βινυλικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομο άνθρακα.
- Δύο ευρείες απλές κορυφές σε δ 4.66 και 4.93, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός εξωμεθυλενίου.
- Μία διπλή κορυφή σε δ 5.04 και μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 5.26, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε δύο ολεφινικά μεθίνια.

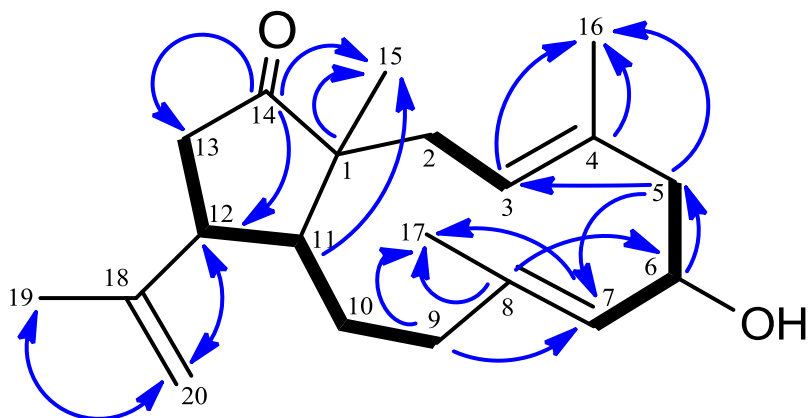
- Μία τριπλή διπλών κορυφή σε δ 4.63 που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε σε πρωτόνιο οξυγονωμένου άνθρακα.



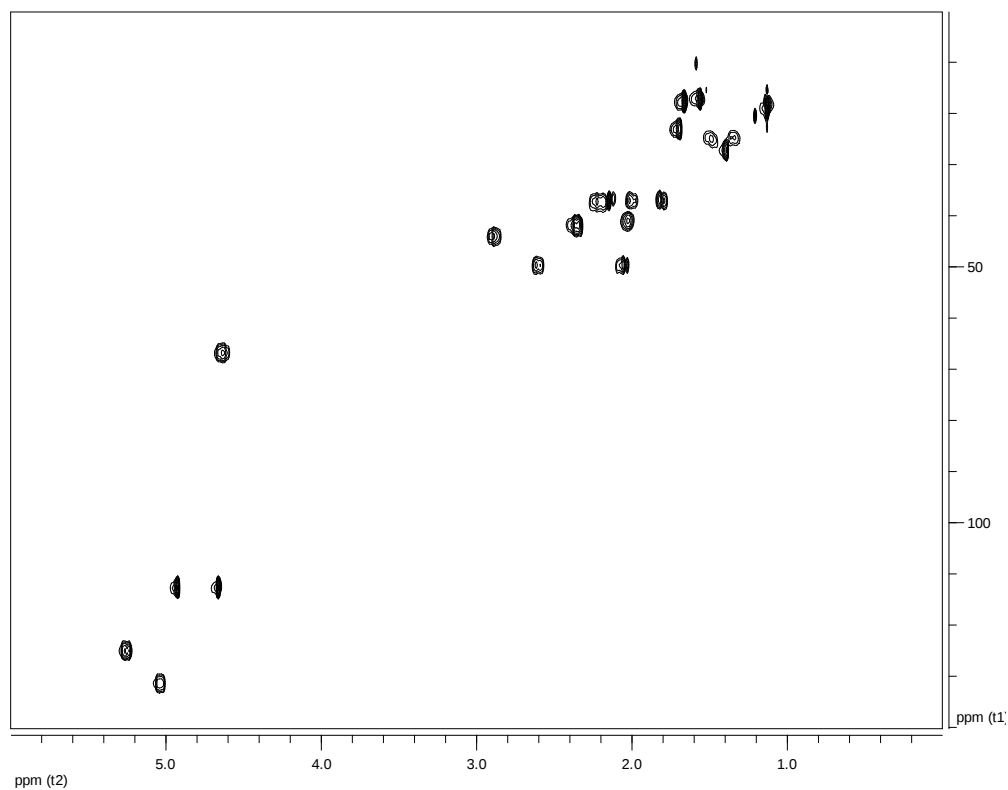
Εικόνα 42. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **4**.

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη **4** παρουσίαζαν πολλές ομοιότητες με τα αντίστοιχα των **2** και **3** και σε συμφωνία με τον μοριακό τύπο ήταν εμφανές ότι επρόκειτο για ένα ισομερές τους.

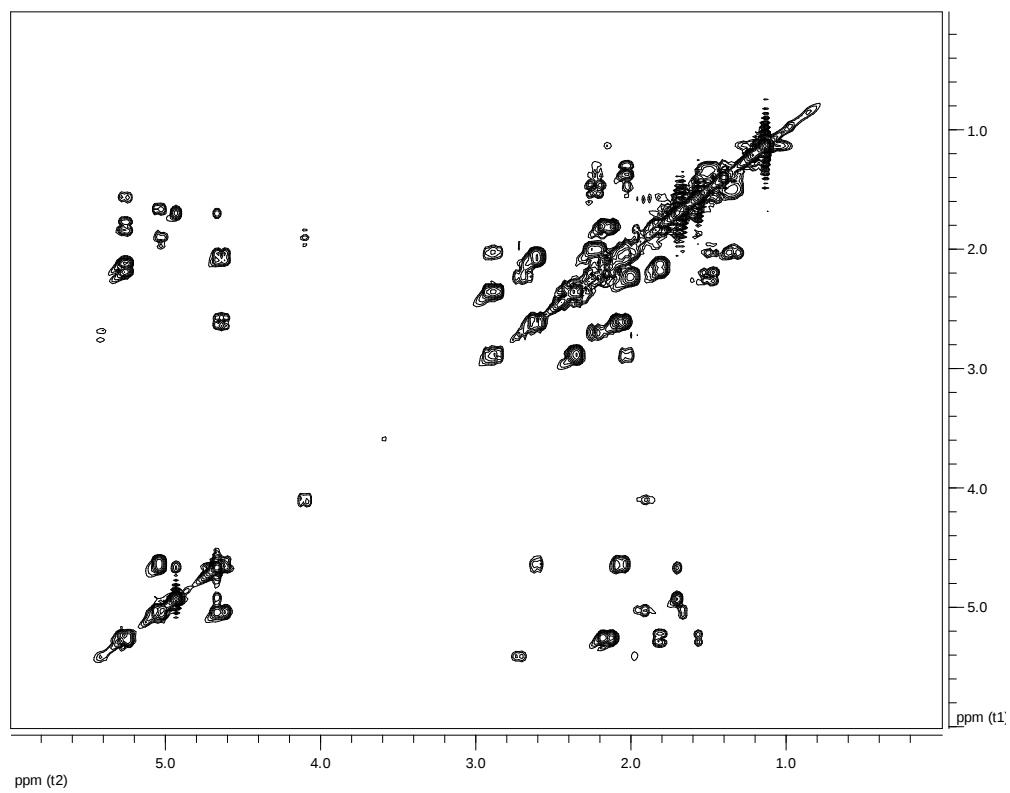
Η δισδιάστατη χημική δομή του μεταβολίτη **4** αποδόθηκε με τη βοήθεια των συσχετίσεων (Εικ. 43) που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT (Εικ. 44), COSY (Εικ. 45) και HMBC (Εικ. 46).



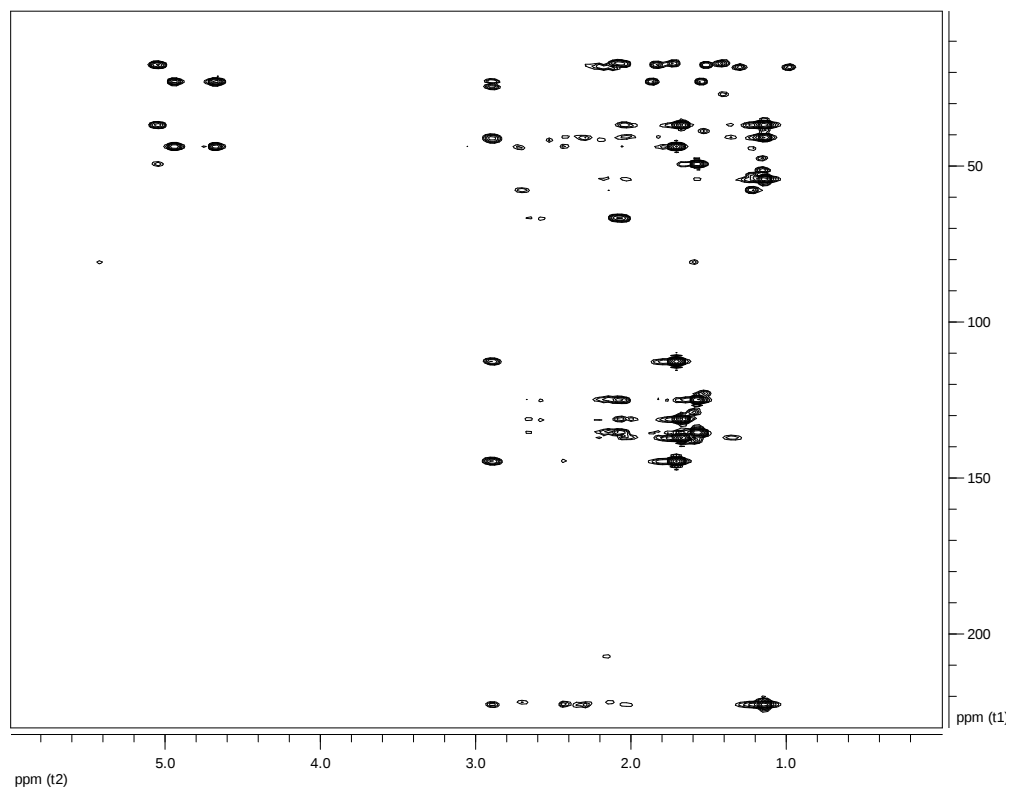
Εικόνα 43. Ομοπορηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπορηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη 4.



Εικόνα 44. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη 4.



Εικόνα 45. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 4.



Εικόνα 46. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 4.

Η σχετική στερεοχημεία στο ασύμμετρο κέντρο C-6 αποδόθηκε ως R^* κατόπιν σύγκρισης της σταθεράς σύζευξης του H-6 με αυτήν του αντίστοιχου ακετυλιωμένου μεταβολίτη (Ioannou *et al.* 2012).

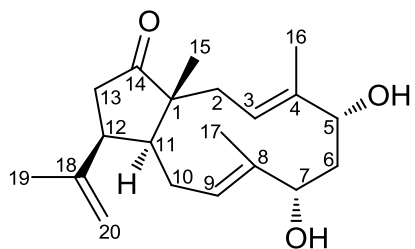
Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **4** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα νέο φυσικό προϊόν, το (1*R*,3*E*,6*R*,7*E*,11*S*,12*S*)-14-οξο-6-υδροξυ-3,7,18-δολαμπελλατριένιο. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **4** παρατίθενται στον Πίνακα 43.

Πίνακας 43. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **4** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

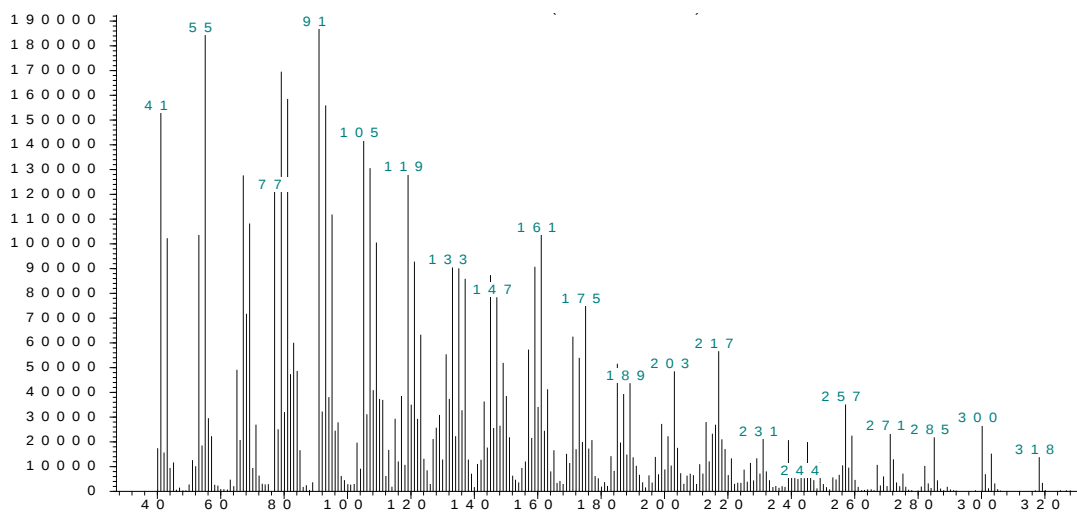
Θέση	δ_{C}	δ_{H}
1	54.0	
2	36.8	1.80 (m), 2.13 (m)
3	124.9	5.26 (dd, 11.8, 3.7)
4	135.3	
5	49.3	2.61 (dd, 11.5, 5.2), 2.05 (m)
6	66.6	4.63 (td, 10.1, 5.2)
7	131.1	5.04 (d, 10.1)
8	137.0	
9	36.8	2.23 (m), 2.01 (m)
10	24.6	1.49 (m), 1.35 (m)
11	40.8	2.04 (m)
12	43.7	2.90 (dt, 10.2, 7.9)
13	41.6	2.38 (dd, 17.4, 10.2), 2.32 (dd, 17.4, 7.9)
14	222.4	
15	18.2	1.13 (s)
16	17.0	1.56 (s)
17	17.5	1.66 (s)
18	144.6	
19	22.8	1.70 (s)
20	112.6	4.93 (brs), 4.66 (brs)

3.5. Μεταβολίτης 5

Ο μεταβολίτης **5** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 3.4 mg.



Το φάσμα μάζας (Εικ. 47) του μεταβολίτη **5** εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 318 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{20}H_{30}O_3$. Επιπλέον, παρατηρήθηκε θραύσμα $[M-H_2O]^+$ σε m/z 300 που υπεδείκνυε την ύπαρξη τουλάχιστον μίας υδροξυλομάδας στο μόριο.

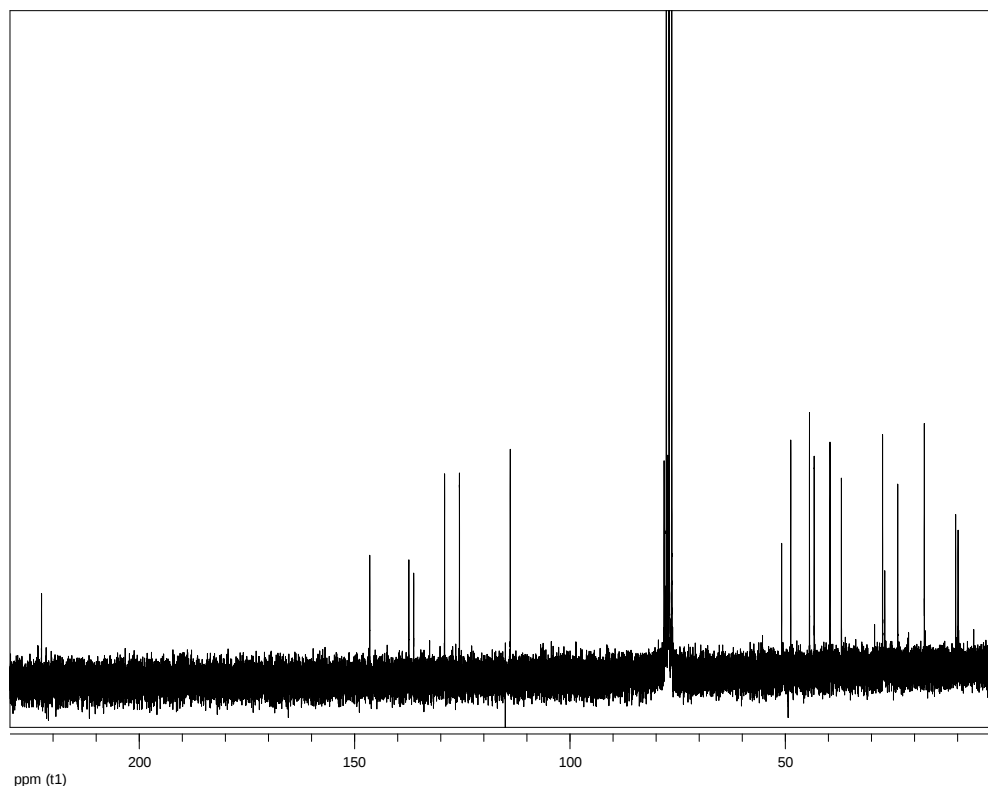


Εικόνα 47. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **5**.

Στο φάσμα ^{13}C NMR (Εικ. 48) του μεταβολίτη **5** εμφανίσθηκαν 20 κορυφές, μεταξύ των οποίων παρατηρήθηκαν:

- Ένα καρβονυλικό άτομο άνθρακα σε δ 222.7, χαρακτηριστική χημική μετατόπιση για την παρουσία μιας κετονομάδας στο μόριο.

- Έξι ολεφινικά άτομα άνθρακα σε δ 113.8, 125.6, 129.1, 136.3, 137.4 και 146.5 που υπεδείκνυν την ύπαρξη τριών διπλών δεσμών άνθρακα-άνθρακα στο μόριο.
- Δύο οξυγονωμένα άτομα άνθρακα που συντονίζονταν σε δ 77.3 και 78.1.

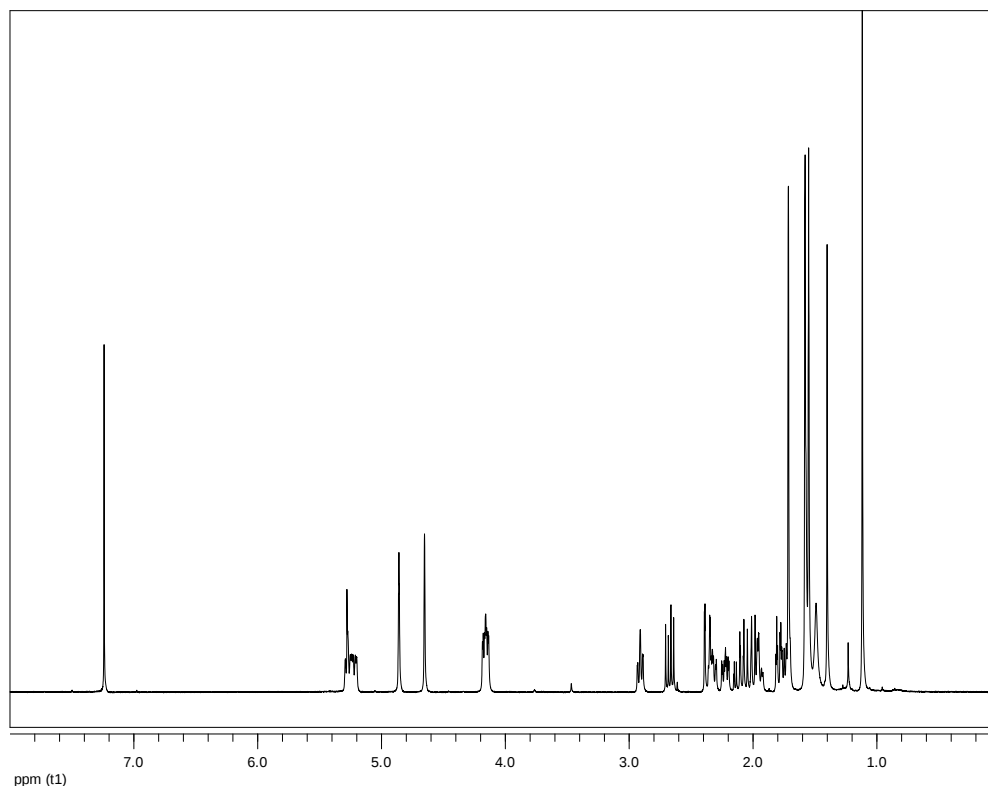


Εικόνα 48. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη 5.

Στο φάσμα ^1H NMR (Εικ. 49) του μεταβολίτη 5 παρατηρήθηκαν:

- Τέσσερις απλές κορυφές σε δ 1.12, 1.55, 1.58 και 1.71, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια ενός αλειφατικού και τριών βινυλικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα.
- Δύο ευρείες απλές κορυφές σε δ 4.65 και 4.86, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός εξωμεθυλενίου.
- Μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 5.22 και μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 5.27, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε δύο ολεφινικά μεθίνια.

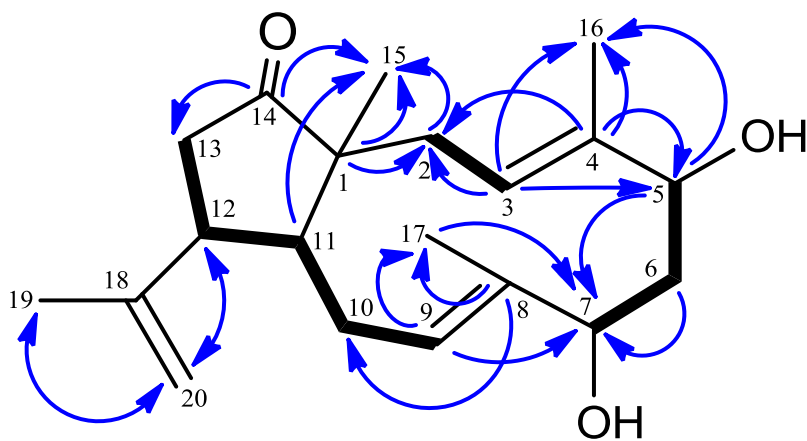
- Μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 4.15 και μια διπλή διπλών κορυφή σε δ 4.17 που ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε δύο πρωτόνια οξυγονωμένων ανθράκων.



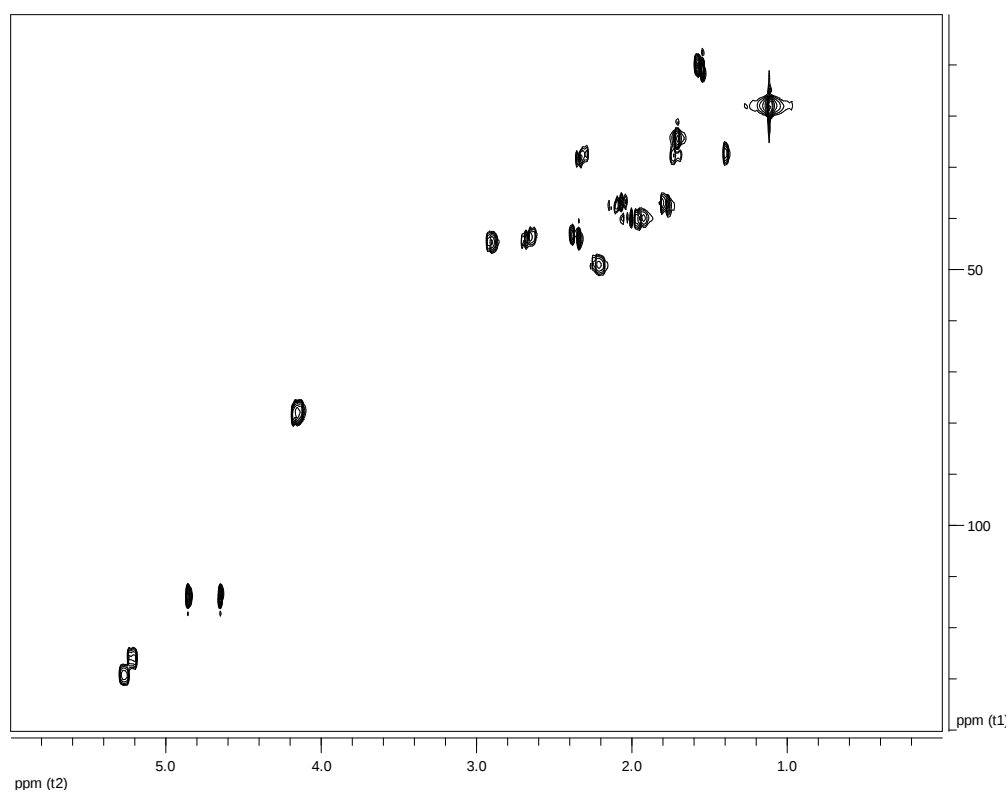
Εικόνα 49. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη 5.

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα του μεταβολίτη 5 παρουσίαζαν πολλές ομοιότητες με τα αντίστοιχα των 2–4. Σε συμφωνία με τον μοριακό τύπο, ήταν προφανής η παρουσία μίας επιπλέον υδροξυλομάδας στο μόριο.

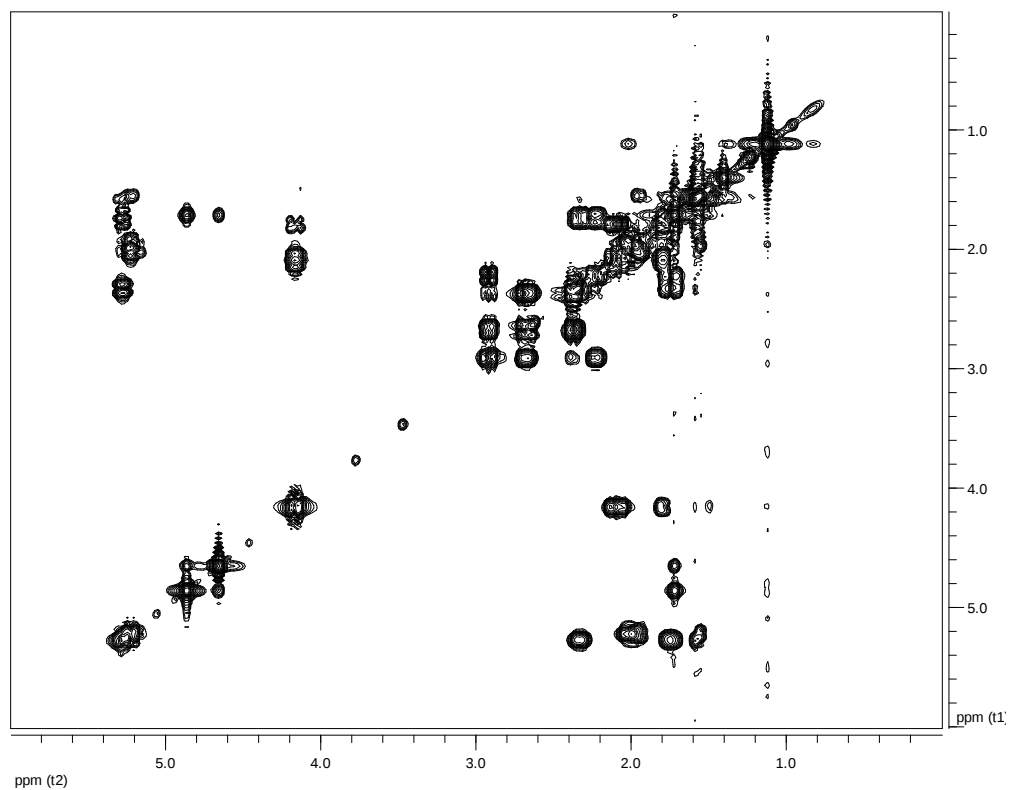
Η δισδιάστατη χημική δομή του μεταβολίτη 5 αποδόθηκε με τη βοήθεια των συσχετίσεων (Εικ. 50) που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT (Εικ. 51), COSY (Εικ. 52) και HMBC (Εικ. 53).



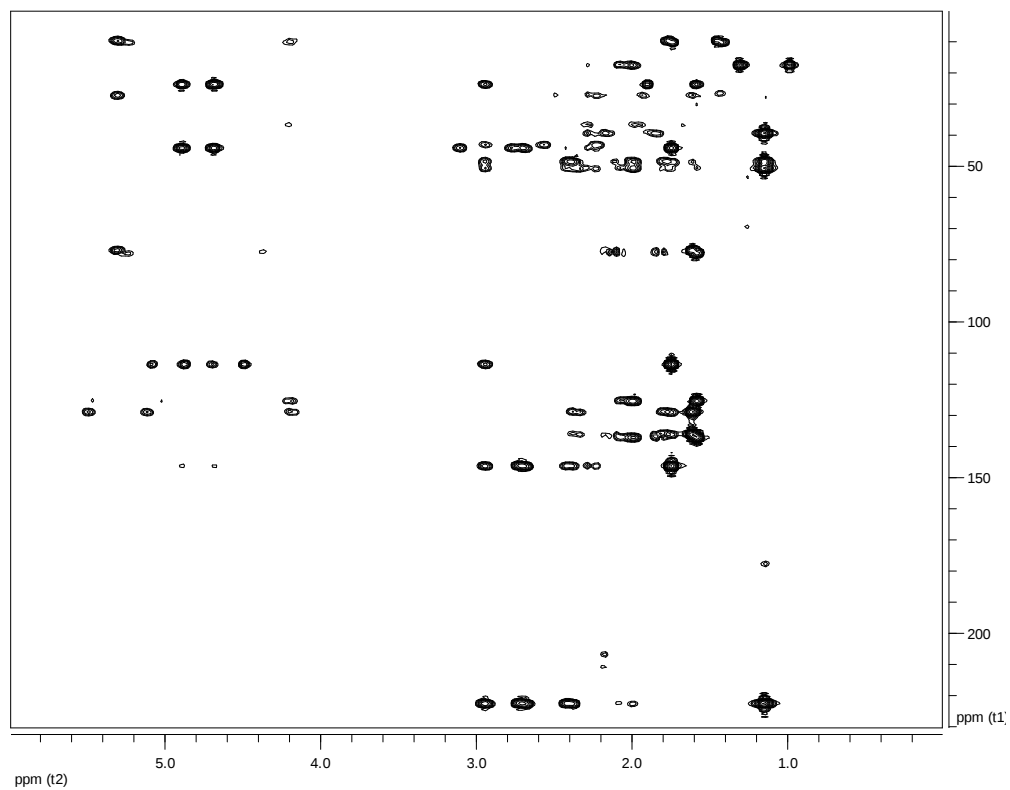
Εικόνα 50. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη 5.



Εικόνα 51. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη 5.

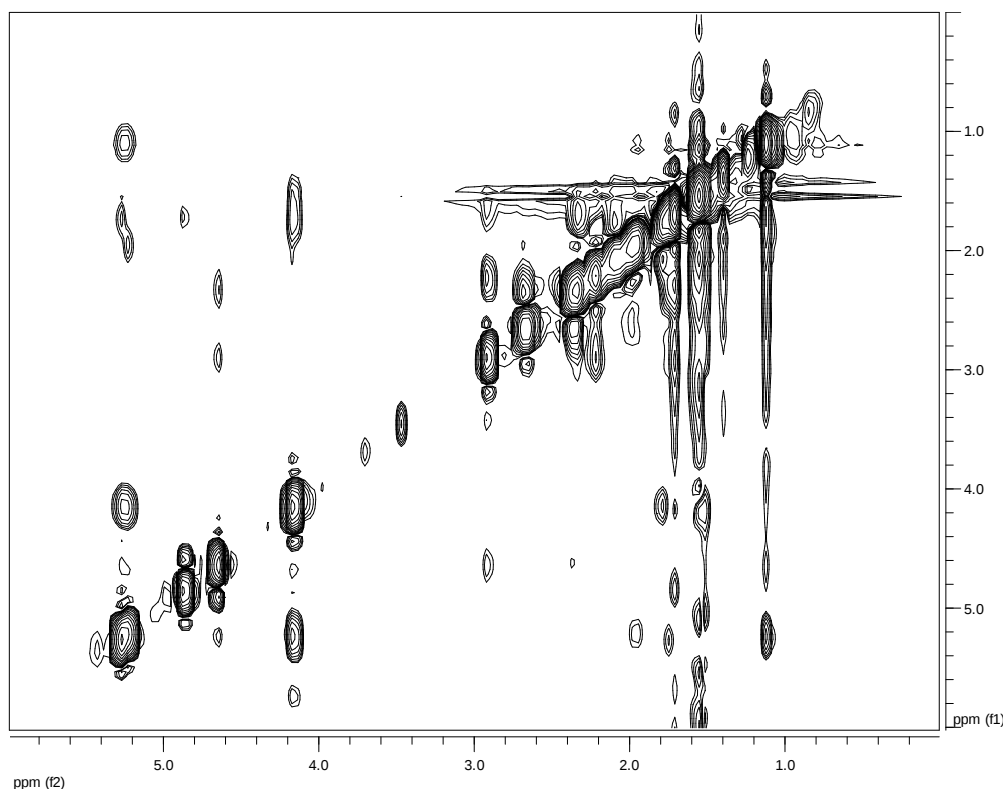


Εικόνα 52. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 5.



Εικόνα 53. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 5.

Η σχετική στεreoχημεία στα ασύμμετρα κέντρα C-5 και C-7 αποδόθηκε ως 5*R**,7*S** με βάση τις συσχετίσεις NOE των H-3/H-5, H-3/H₃-15, H-5/H-7 και H-7/H-9 που παρατηρήθηκαν στο φάσμα NOESY (Εικ. 54).



Εικόνα 54. Φάσμα NOESY του μεταβολίτη 5.

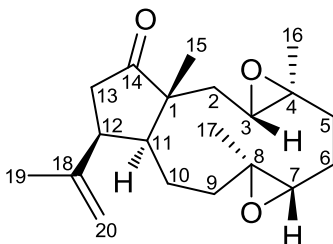
Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη 5 με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα νέο φυσικό προϊόν, το (1*R*,3*E*,5*R*,7*S*,8*E*,11*S*,12*S*)-14-οξο-5,7-διυδροξυ-3,8,18-δολαμπελλατριένιο. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 5 παρατίθενται στον Πίνακα 44.

Πίνακας 44. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **5** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

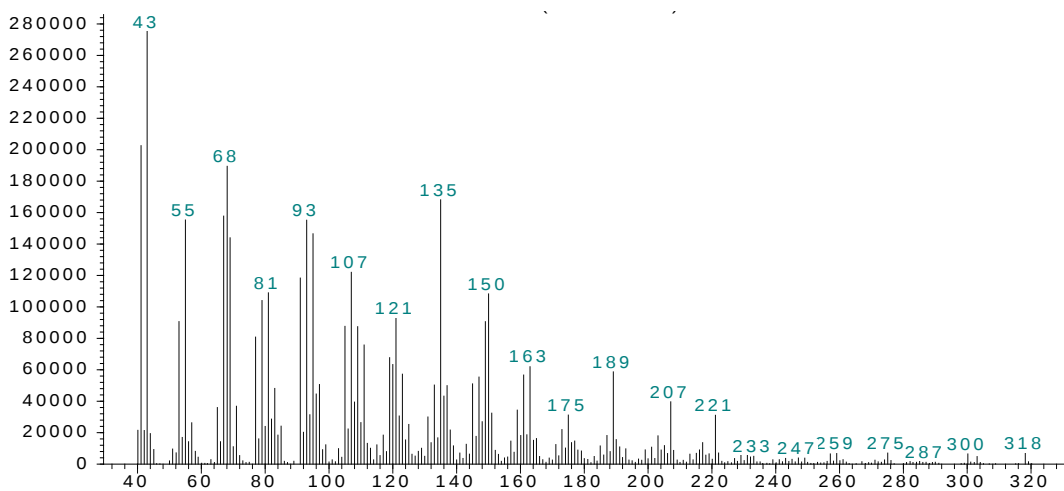
Θέση	δ_C	δ_H
1	50.9	
2	39.6	2.00 (m), 1.93 (m)
3	125.6	5.22 (dd, 11.3, 4.7)
4	137.4	
5	78.1	4.17 (dd, 10.8, 2.8)
6	37.0	2.07 (m), 1.78 (m)
7	77.3	4.15 (dd, 10.8, 2.6)
8	136.3	
9	129.1	5.27 (dd, 10.7, 5.7)
10	27.4	2.31 (m), 1.70 (m)
11	48.7	2.21 (m)
12	44.4	2.90 (td, 8.8, 1.6)
13	43.3	2.66 (dd, 17.2, 8.8), 2.33 (m)
14	222.7	
15	17.7	1.12 (s)
16	10.5	1.55 (s)
17	9.9	1.58 (s)
18	146.5	
19	23.9	1.71 (s)
20	113.8	4.85 (brs), 4.65 (brs)

3.6. Μεταβολίτης 6

Ο μεταβολίτης **6** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 1.5 mg.



Το φάσμα μάζας (Εικ. 55) του μεταβολίτη **6** εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 318 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{20}H_{30}O_3$.

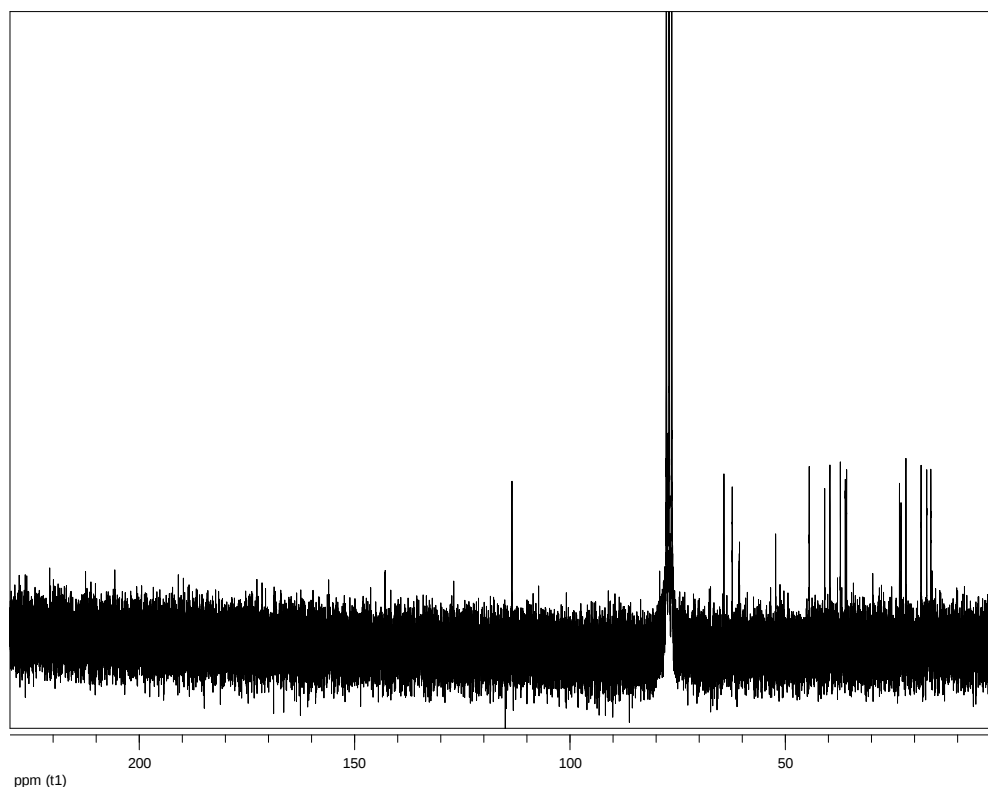


Εικόνα 55. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **6**.

Στο φάσμα ^{13}C NMR (Εικ. 56) του μεταβολίτη **6** εμφανίσθηκαν 20 κορυφές, μεταξύ των οποίων παρατηρήθηκαν:

- Ένα καρβονυλικό άτομο άνθρακα σε δ 220.5, χαρακτηριστική χημική μετατόπιση για την παρουσία μιας κετονομάδας στο μόριο.
- Δύο ολεφινικά άτομα άνθρακα σε δ 113.4 και 143.0 που υπεδείκνυν την ύπαρξη ενός διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα στο μόριο.

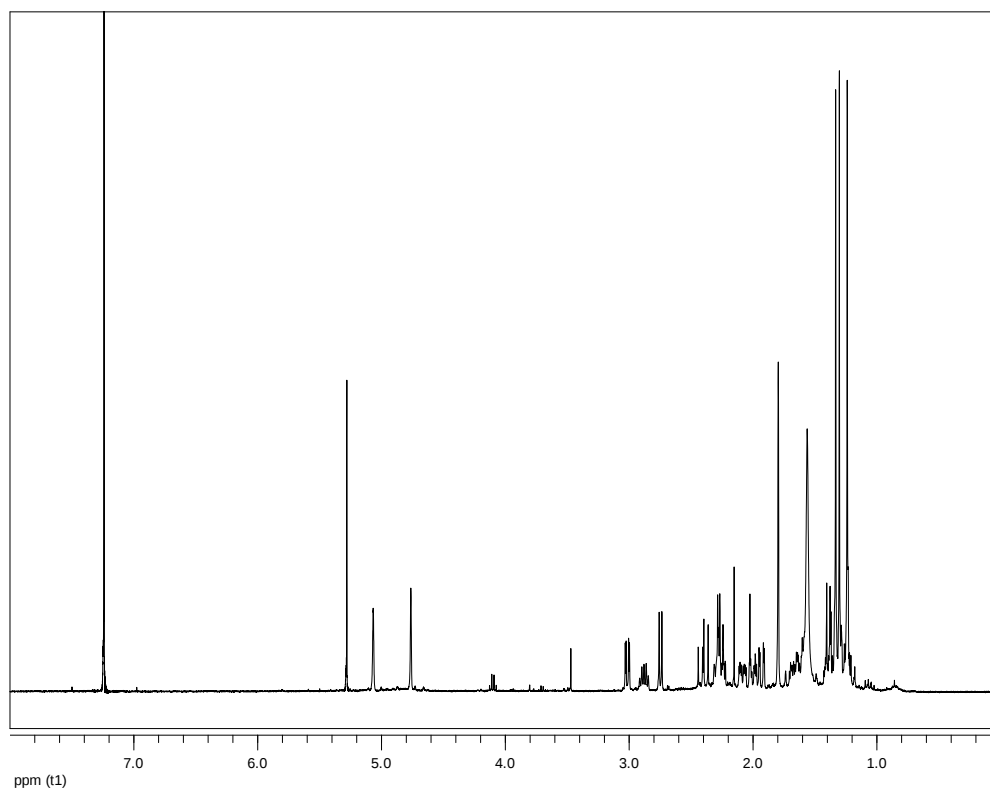
- Τέσσερα οξυγονωμένα άτομα άνθρακα που συντονίζονταν σε δ 60.6, 60.7, 62.3 και 64.2.



Εικόνα 56. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **6**.

Στο φάσμα ^1H NMR (Εικ. 57) του μεταβολίτη **6** παρατηρήθηκαν:

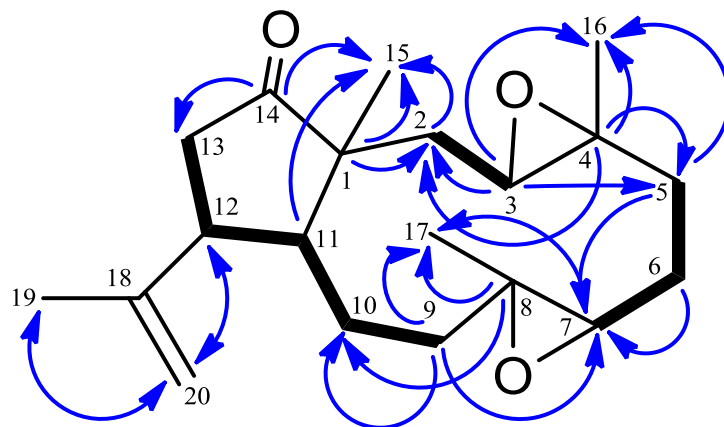
- Τέσσερις απλές κορυφές σε δ 1.24, 1.30, 1.33 και 1.79, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια τριών αλειφατικών και ενός βινυλικού μεθυλίου σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα.
- Δύο ευρείες απλές κορυφές σε δ 4.76 και 5.07, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός εξωμεθυλενίου.
- Μία ευρεία διπλή κορυφή σε δ 2.74 και μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 3.01, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε δύο πρωτόνια οξυγονωμένων ανθράκων.



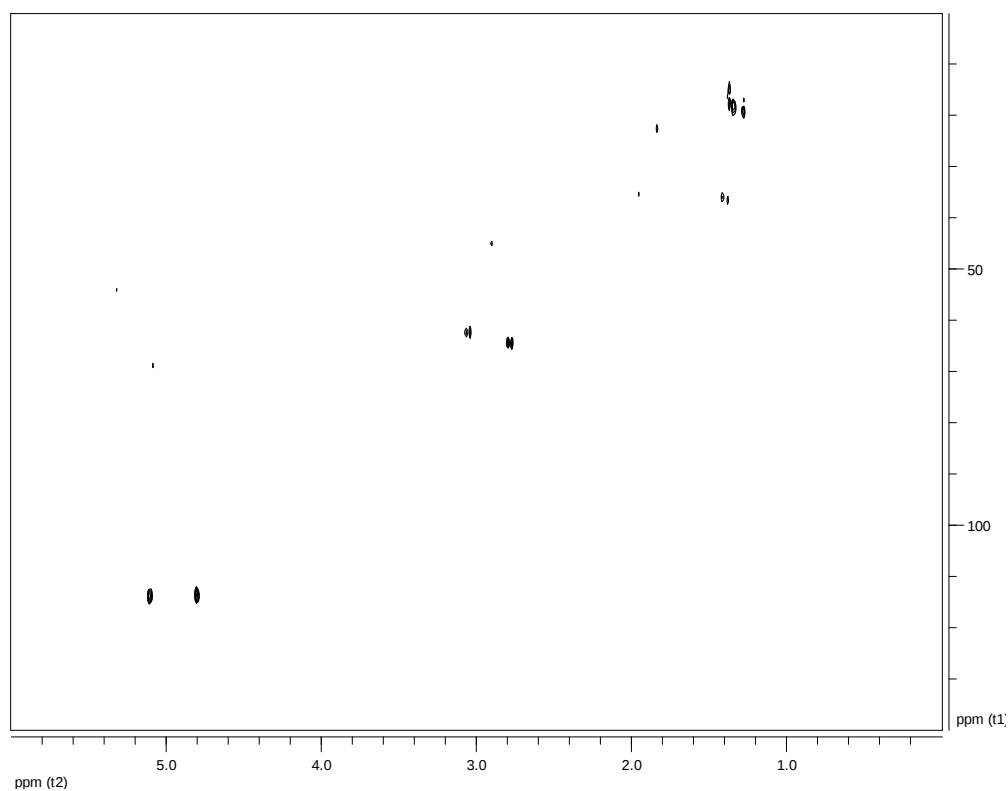
Εικόνα 57. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **6**.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **6** με τα αντίστοιχα των **1–5** οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα παρόμοιο μόριο, του οποίου οι διπλοί δεσμοί Δ^3 και Δ^7 έχουν μετατραπεί σε δύο εποξειδία.

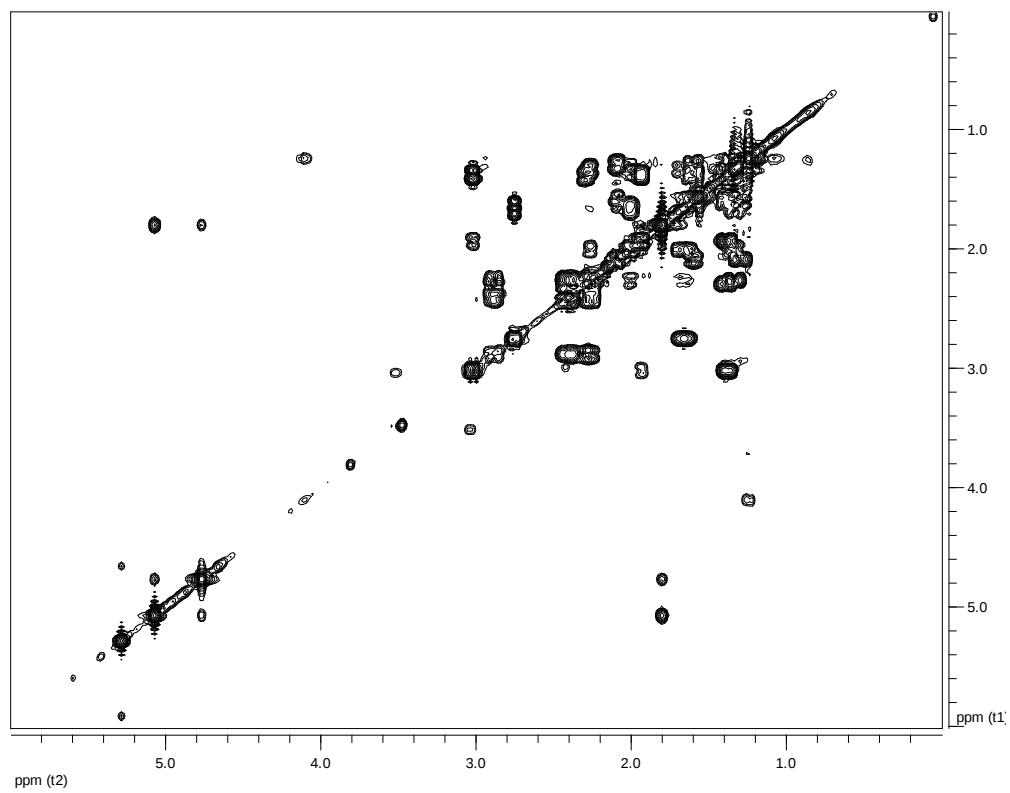
Η δισδιάστατη χημική δομή του μεταβολίτη **6** και συγκεκριμένα η θέση των εποξειδίων μεταξύ των C-3 και C-4 και των C-7 και C-8 πιστοποιήθηκε από τις ομοπυρηνικές και ετεροπυρηνικές συσχετίσεις (Εικ. 58) που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT (Εικ. 59), COSY (Εικ. 60) και HMBC (Εικ. 61).



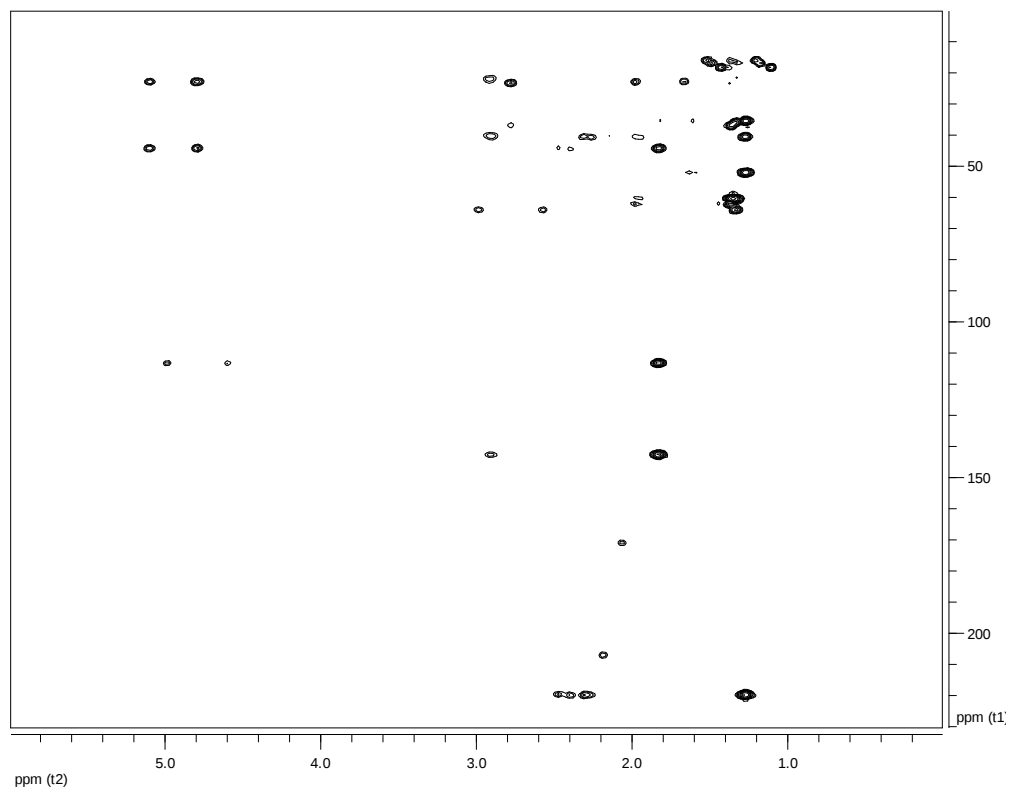
Εικόνα 58. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη **6**.



Εικόνα 59. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **6**.

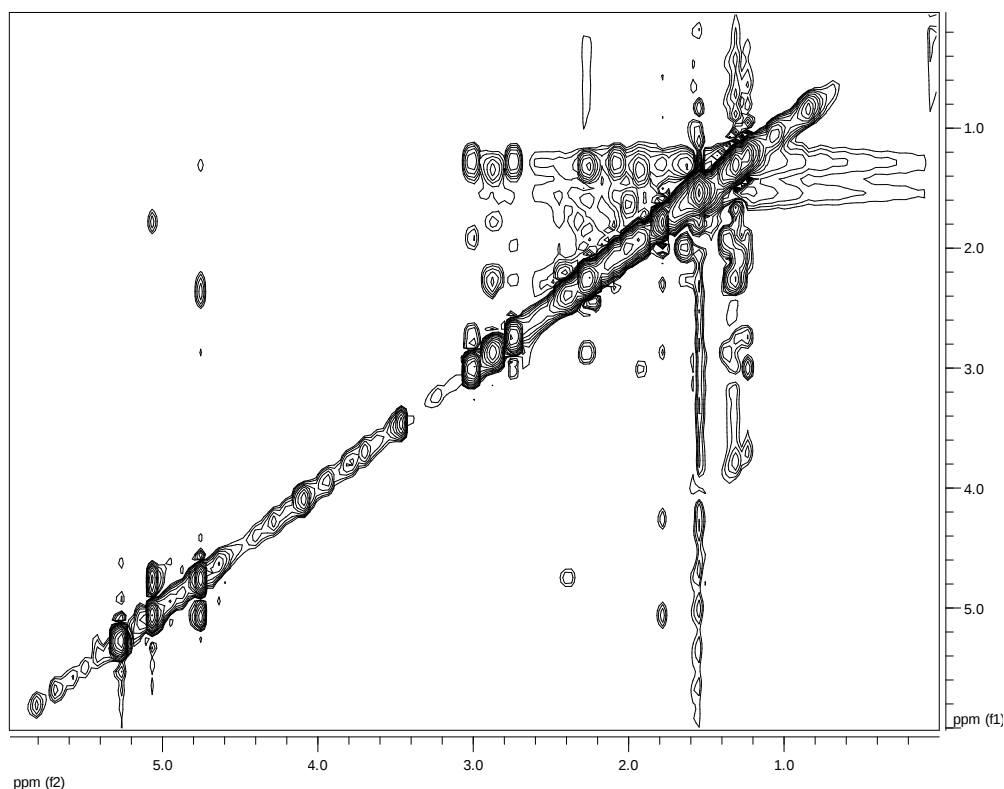


Εικόνα 60. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 6.



Εικόνα 61. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 6.

Η σχετική στεreoχημεία στα ασύμμετρα κέντρα C-3, C-4, C-7 και C-8 αποδόθηκε ως 3*S**,4*S**,7*S**,8*S** κατόπιν σύγκρισης των σταθερών σύζευξης των H-3 και H-7 με αυτές αντίστοιχων μεταβολιτών (Ιοαννου *et al.* 2011a) και επιβεβαιώθηκε με βάση τις συσχετίσεις NOE που παρατηρήθηκαν στο φάσμα NOESY (Εικ. 62).



Εικόνα 62. Φάσμα NOESY του μεταβολίτη **6**.

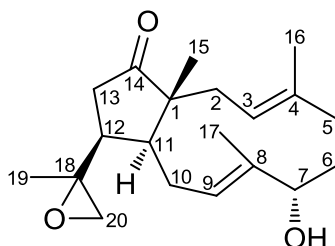
Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **6** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα νέο φυσικό προϊόν, το (1*R*,3*S*,4*S*,7*S*,8*S*,11*S*,12*S*)-3,4:7,8-διεποξυ-14-οξο-18-δολαμπελλένιο, το οποίο ταυτίζεται με ένα ημισυνθετικό προϊόν (Amico *et al.*, 1980). Ωστόσο, η δομή του ημισυνθετικού προϊόντος είχε αποδοθεί λάθος ως προς τη σχετική στεreoχημεία στο ασύμμετρο κέντρο C-12 και δεν είχε διευκρινιστεί η σχετική στεreoχημεία των ασύμμετρων κέντρων C-7 και C-8, ενώ παράλληλα είχαν αναφερθεί μόνο λίγες ¹H NMR χημικές μετατοπίσεις. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **6** παρατίθενται στον Πίνακα 45.

Πίνακας 45. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **6** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

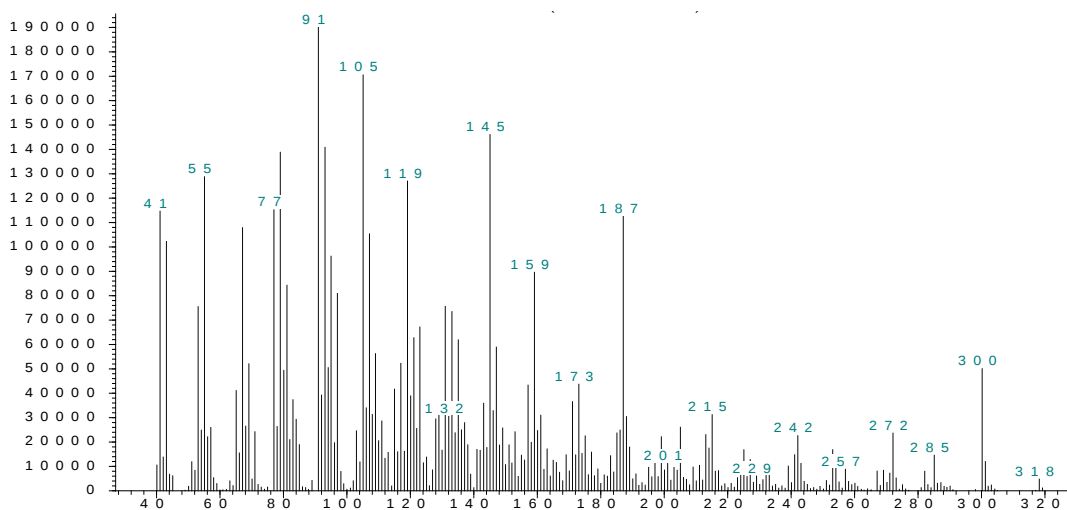
Θέση	δ_C	δ_H
1	52.2	
2	35.8	1.93 (d, 13.8), 1.38 (m)
3	62.3	3.01 (dd, 10.9, 2.8)
4	60.6	
5	37.2	2.08 (m), 1.32 (m)
6	23.5	1.70 (m), 1.62 (m)
7	64.2	2.74 (brd, 8.8)
8	60.7	
9	36.1	1.95 (m), 1.36 (m)
10	23.1	1.41 (m)
11	40.9	2.30 (m)
12	44.4	2.86 (m)
13	39.6	2.42 (d, 17.3), 2.26 (m)
14	220.5	
15	18.5	1.24 (s)
16	16.2	1.33 (s)
17	17.3	1.30 (s)
18	143.0	
19	22.0	1.79 (s)
20	113.4	5.07 (brs), 4.76 (brs)

3.7. Μεταβολίτης 7

Ο μεταβολίτης 7 απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 11.3 mg.



Το φάσμα μάζας (Εικ. 63) του μεταβολίτη 7 εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 318 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{20}H_{30}O_3$. Επιπλέον, παρατηρήθηκε θραύσμα $[M-H_2O]^+$ σε m/z 300 που υπεδείκνυε την ύπαρξη τουλάχιστον μίας υδροξυλομάδας στο μόριο.

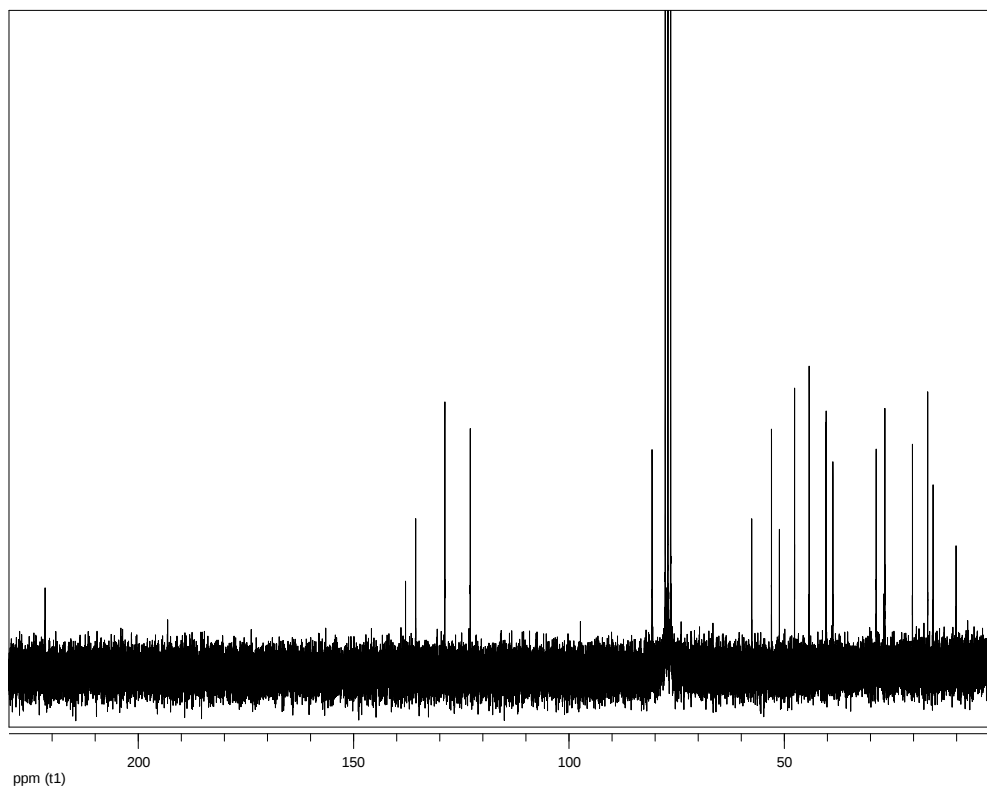


Εικόνα 63. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη 7.

Στο φάσμα ^{13}C NMR (Εικ. 64) του μεταβολίτη 7 εμφανίσθηκαν 20 κορυφές, μεταξύ των οποίων παρατηρήθηκαν:

- Ένα καρβονυλικό άτομο άνθρακα σε δ 221.6, χαρακτηριστική χημική μετατόπιση για την παρουσία μιας κετονομάδας στο μόριο.

- Τέσσερα ολεφινικά άτομα άνθρακα σε δ 122.9, 128.8, 135.6 και 137.9 που υπεδείκνυν την ύπαρξη δύο διπλών δεσμών άνθρακα-άνθρακα στο μόριο.
- Ένα οξυγονωμένο άτομο άνθρακα σε δ 80.7, χαρακτηριστική χημική μετατόπιση για την παρουσία μιας υδροξυλομάδας στο μόριο.
- Δύο οξυγονωμένα άτομα άνθρακα σε δ 53.0 και 57.6, χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις για την παρουσία μιας εποξυ-ομάδας στο μόριο.

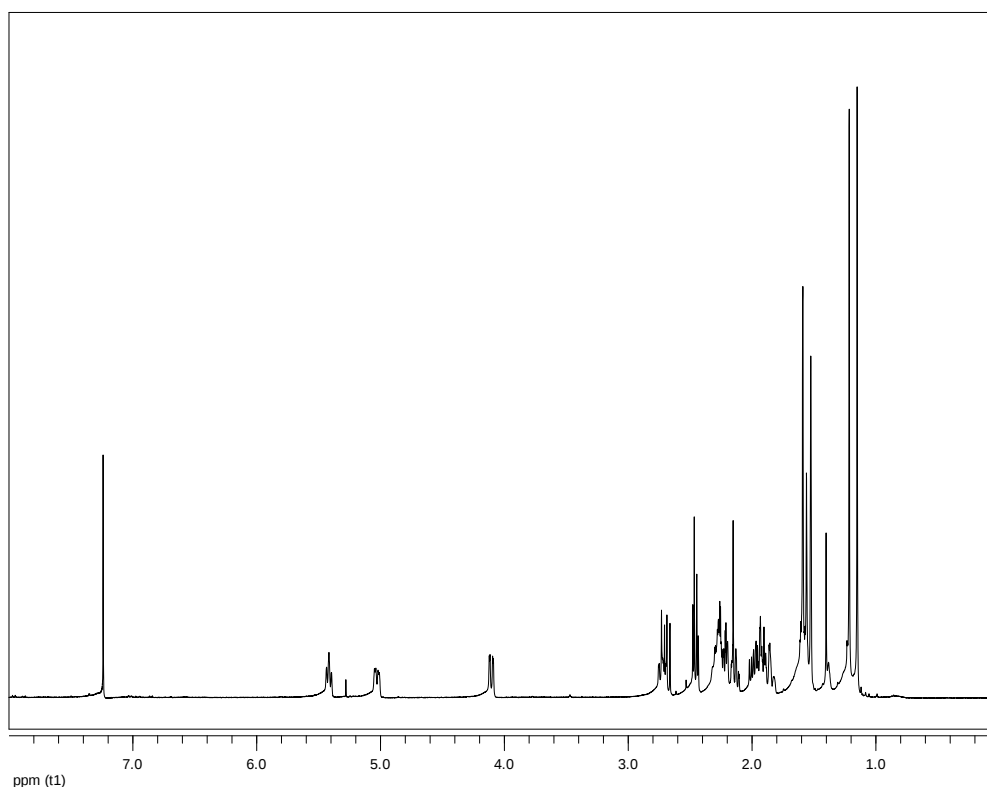


Εικόνα 64. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη 7.

Στο φάσμα ^1H NMR (Εικ. 65) του μεταβολίτη 7 παρατηρήθηκαν:

- Τέσσερις απλές κορυφές σε δ 1.15, 1.21, 1.53 και 1.59, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια δύο αλειφατικών και δύο βινυλικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα.
- Μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 5.03 και μία τριπλή κορυφή σε δ 5.42, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε δύο ολεφινικά μεθίνια.

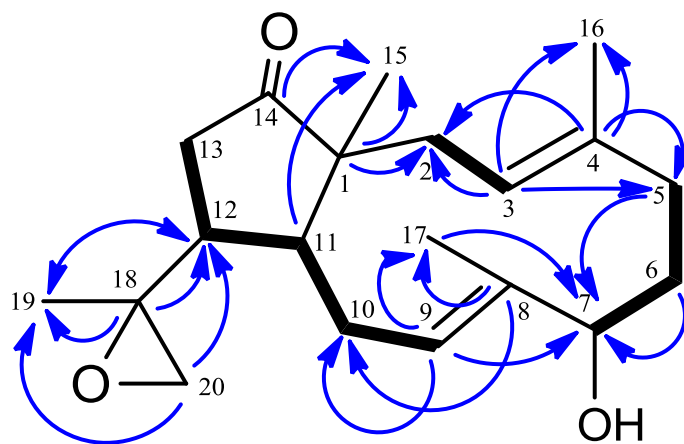
- Μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 4.10 που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε σε πρωτόνιο οξυγονωμένου άνθρακα.
- Δύο διπλές κορυφές σε δ 2.44 και 2.47 που ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε δύο πρωτόνια ενός οξυγονωμένου μεθυλενικού άνθρακα.



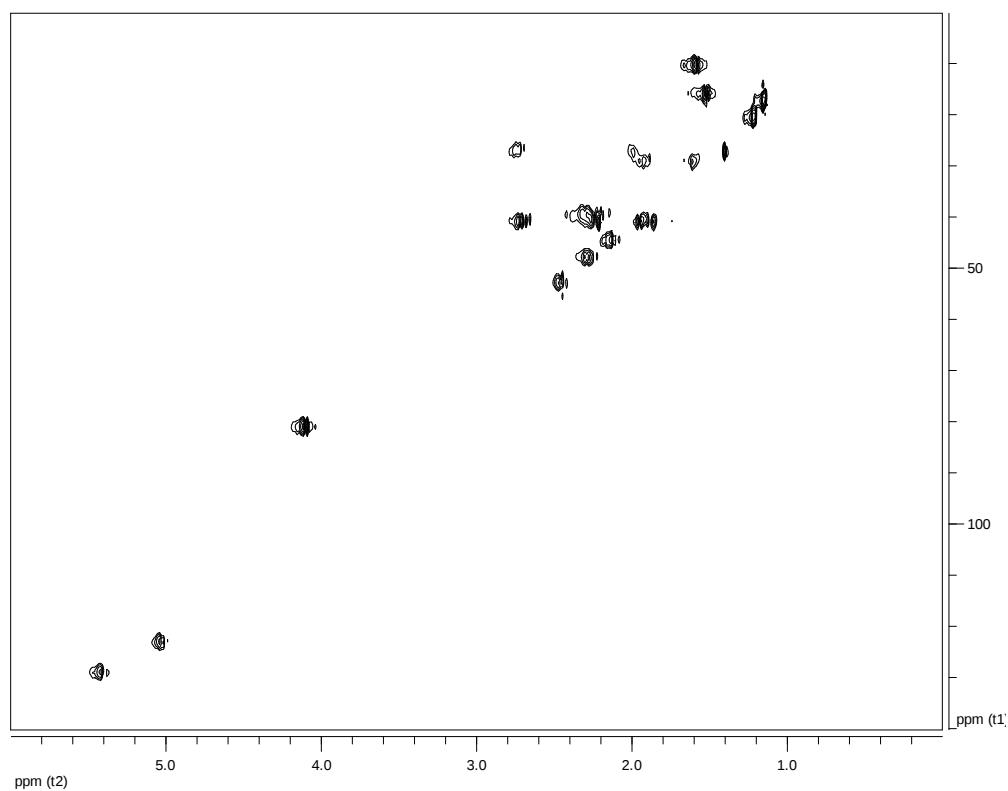
Εικόνα 65. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη 7.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη 7 με τα αντίστοιχα του 2 οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα παρόμοιο μόριο, όπου το εξωμεθυλένιο έχει μετατραπεί σε ένα εποξείδιο.

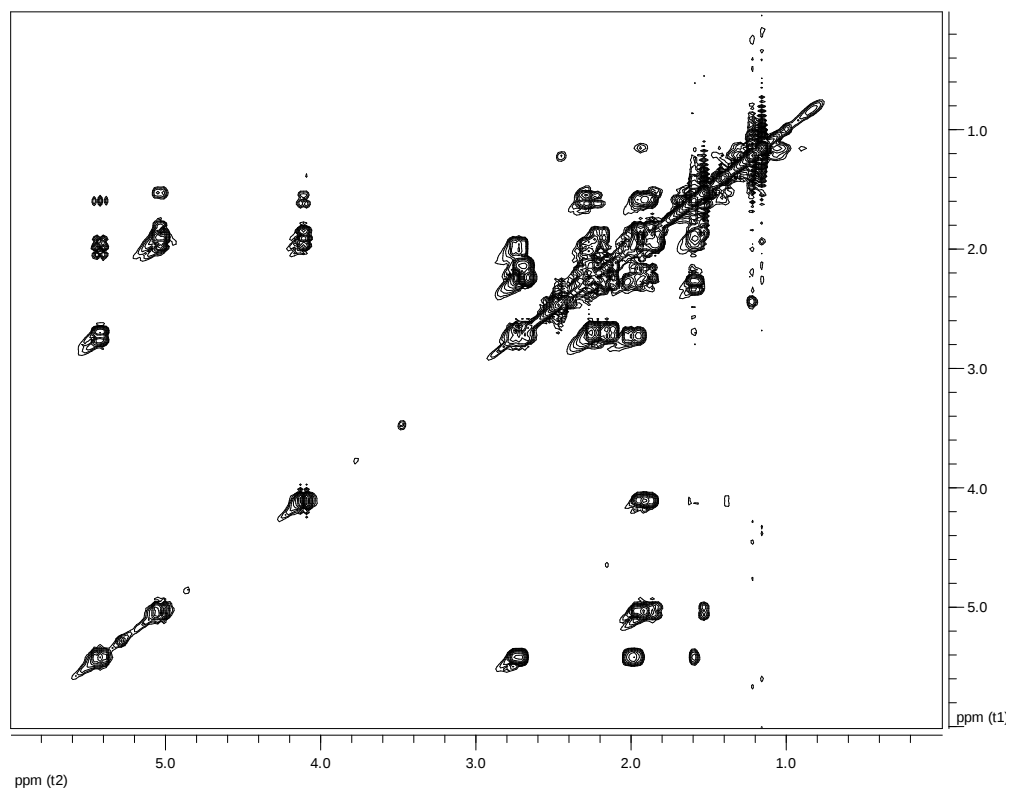
Η συγκεκριμένη δομική αλλαγή υποδείχθηκε από τις ετεροπυρηνικές συζεύξεις των ανθράκων C-18, C-19 και C-20 με το μεθινικό πρωτόνιο H-12, ενώ οι υπόλοιπες ομοπυρηνικές και ετεροπυρηνικές συσχετίσεις (Εικ. 66) που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT (Εικ. 67), COSY (Εικ. 68) και HMBC (Εικ. 69) επιβεβαίωσαν τη προτεινόμενη δομή.



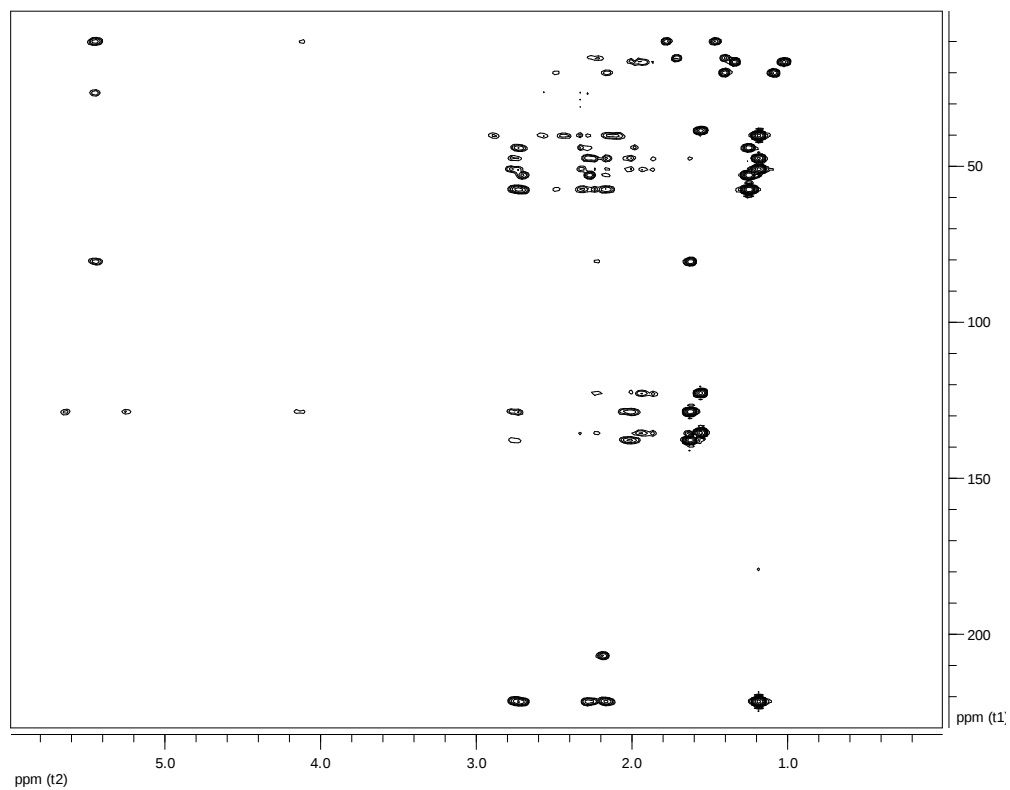
Εικόνα 66. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη 7.



Εικόνα 67. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη 7.



Εικόνα 68. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 7.



Εικόνα 69. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 7.

Η σχετική στερεοχημεία στο ασύμμετρο κέντρο C-7 αποδόθηκε ως S^* κατόπιν σύγκρισης της σταθεράς σύζευξης του H-7 με αυτήν του μεταβολίτη 2.

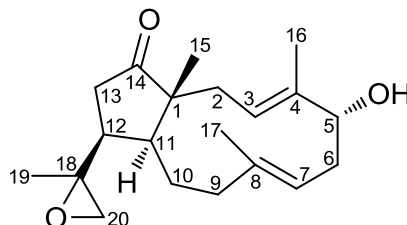
Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη 7 με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα νέο φυσικό προϊόν, το (1*R*,3*E*,7*S*,8*E*,11*S*,12*S*)-18,20-εποξυ-14-οξο-7-υδροξυ-3,8-δολαμπελλαδιένιο. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 7 παρατίθενται στον Πίνακα 46.

Πίνακας 46. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη 7 σε $CDCl_3$ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

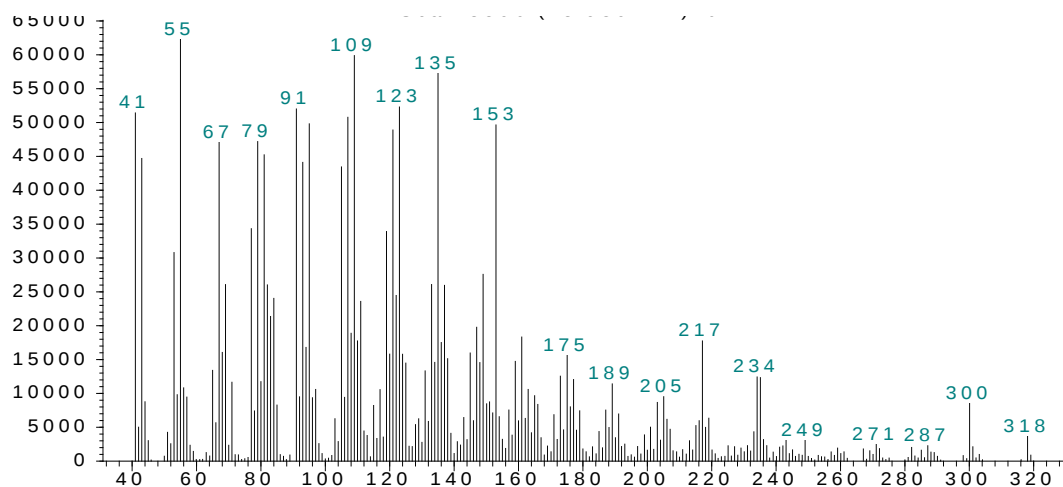
Θέση	δ_C	δ_H
1	51.1	
2	40.3	1.88 (m), 1.96 (m)
3	122.9	5.03 (dd, 10.9, 3.8)
4	135.6	
5	38.7	2.30 (m)
6	28.7	1.93 (m), 1.60 (m)
7	80.7	4.10 (dd, 10.8, 2.4)
8	137.9	
9	128.8	5.42 (t, 8.0)
10	26.6	2.74 (m), 2.03 (m)
11	47.6	2.28 (m)
12	44.2	2.14 (m)
13	40.4	2.71 (m), 2.22 (m)
14	221.6	
15	16.7	1.15 (s)
16	15.5	1.53 (s)
17	10.1	1.59 (s)
18	57.6	
19	20.2	1.21 (s)
20	53.0	2.47 (d, 4.8), 2.44 (d, 4.8)

3.8. Μεταβολίτης 8

Ο μεταβολίτης **8** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 2.7 mg.



Το φάσμα μάζας (Εικ. 70) του μεταβολίτη **8** εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 318 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{20}H_{30}O_3$. Επιπλέον, παρατηρήθηκε θραύσμα $[M-H_2O]^+$ σε m/z 300 που υπεδείκνυε την ύπαρξη τουλάχιστον μίας υδροξυλομάδας στο μόριο.

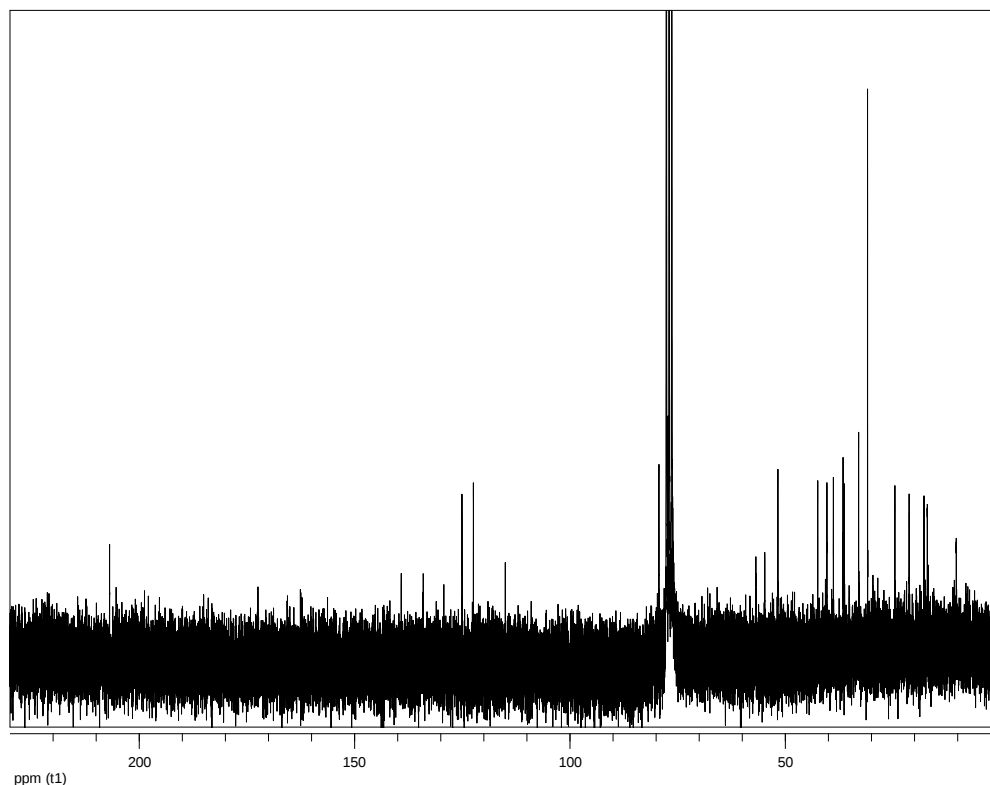


Εικόνα 70. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **8**.

Στο φάσμα ^{13}C NMR (Εικ. 71) του μεταβολίτη **8** εμφανίσθηκαν 20 κορυφές, μεταξύ των οποίων παρατηρήθηκαν:

- Ένα καρβονυλικό άτομο άνθρακα σε δ 221.7, χαρακτηριστική χημική μετατόπιση για την παρουσία μιας κετονομάδας στο μόριο.
- Τέσσερα ολεφινικά άτομα άνθρακα σε δ 122.4, 125.1, 134.1 και 139.2 που υπεδείκνυν την ύπαρξη δύο διπλών δεσμών άνθρακα-άνθρακα στο μόριο.

- Ένα οξυγονωμένο άτομο άνθρακα σε δ 79.3, χαρακτηριστική χημική μετατόπιση για την παρουσία μιας υδροξυλομάδας στο μόριο.
- Δύο οξυγονωμένα άτομα άνθρακα σε δ 51.7 και 56.8, χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις για την παρουσία μιας εποξυ-ομάδας στο μόριο.

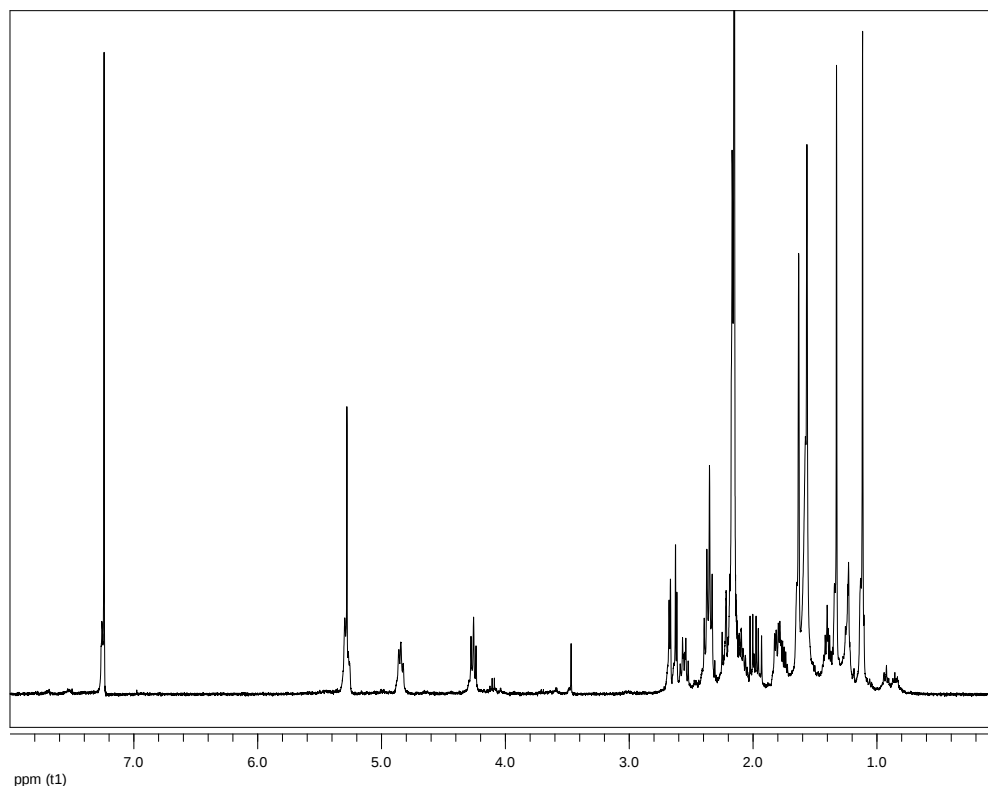


Εικόνα 71. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **8**.

Στο φάσμα ^1H NMR (Εικ. 72) του μεταβολίτη **8** παρατηρήθηκαν:

- Τέσσερις απλές κορυφές σε δ 1.12, 1.33, 1.56 και 1.63, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια δύο αλειφατικών και δύο βινυλικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα.
- Μία πολλαπλή κορυφή σε δ 4.84 και μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 5.28, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε δύο ολεφινικά μεθίνια.
- Μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 4.26 που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε σε πρωτόνιο οξυγονωμένου άνθρακα.

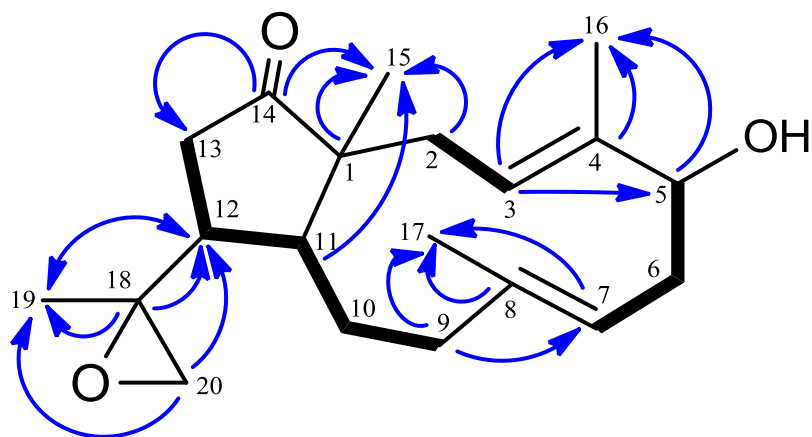
- Δύο διπλές κορυφές σε δ 2.62 και 2.67 που ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε δύο πρωτόνια ενός οξυγονωμένου μεθυλενικού άνθρακα.



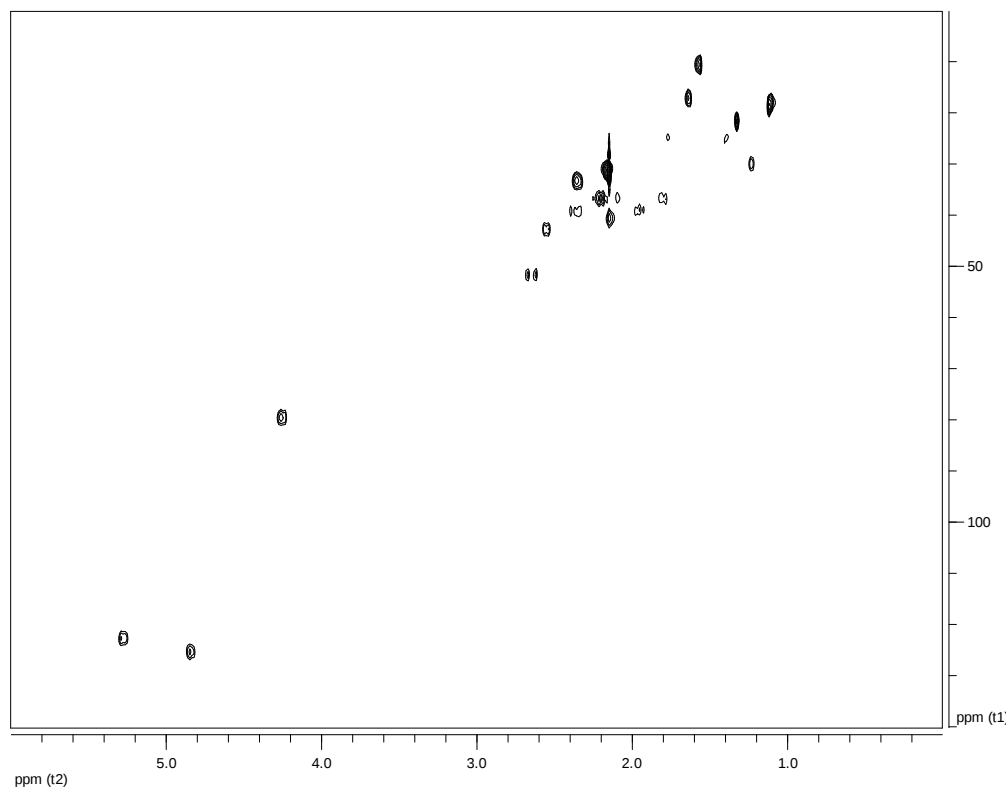
Εικόνα 72. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **8**.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **8** με τα αντίστοιχα του **3** οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα παρόμοιο μόριο, όπου το εξωμεθυλένιο έχει μετατραπεί σε ένα εποξείδιο.

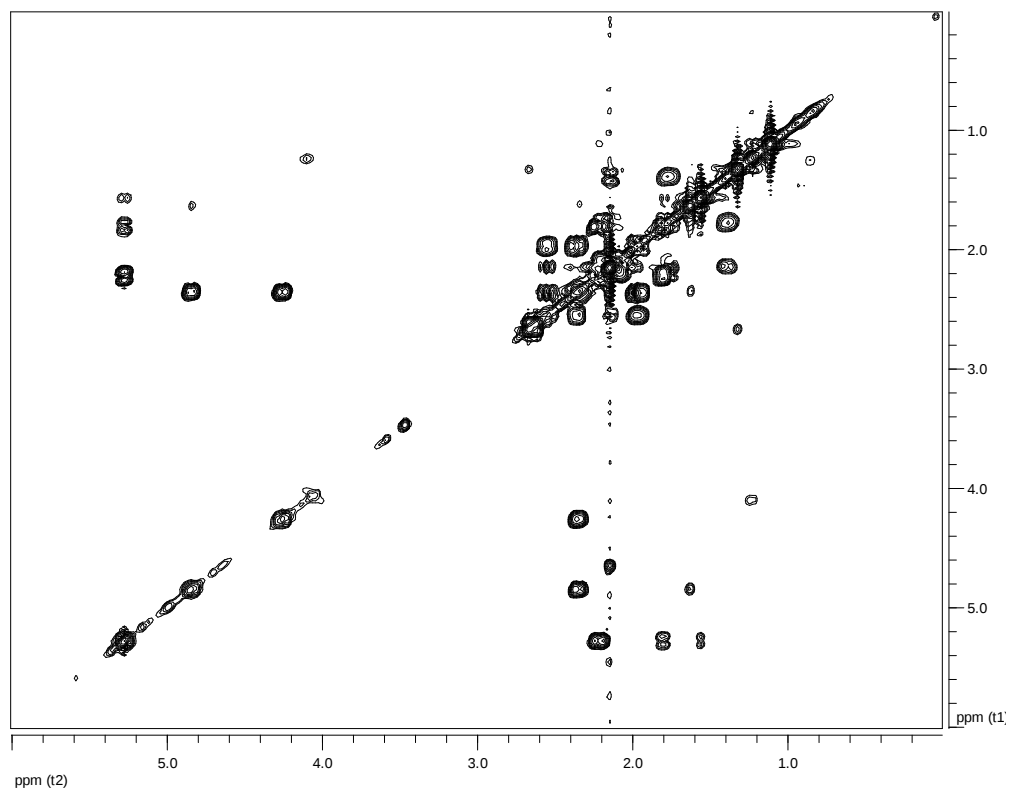
Η συγκεκριμένη δομική αλλαγή υποδείχθηκε από τις ετεροπυρηνικές συζεύξεις των ανθράκων C-18, C-19 και C-20 με το μεθινικό πρωτόνιο H-12, ενώ οι υπόλοιπες ομοπυρηνικές και ετεροπυρηνικές συσχετίσεις (Εικ. 73) που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT (Εικ. 74), COSY (Εικ. 75) και HMBC (Εικ. 76) επιβεβαίωσαν τη προτεινόμενη δομή.



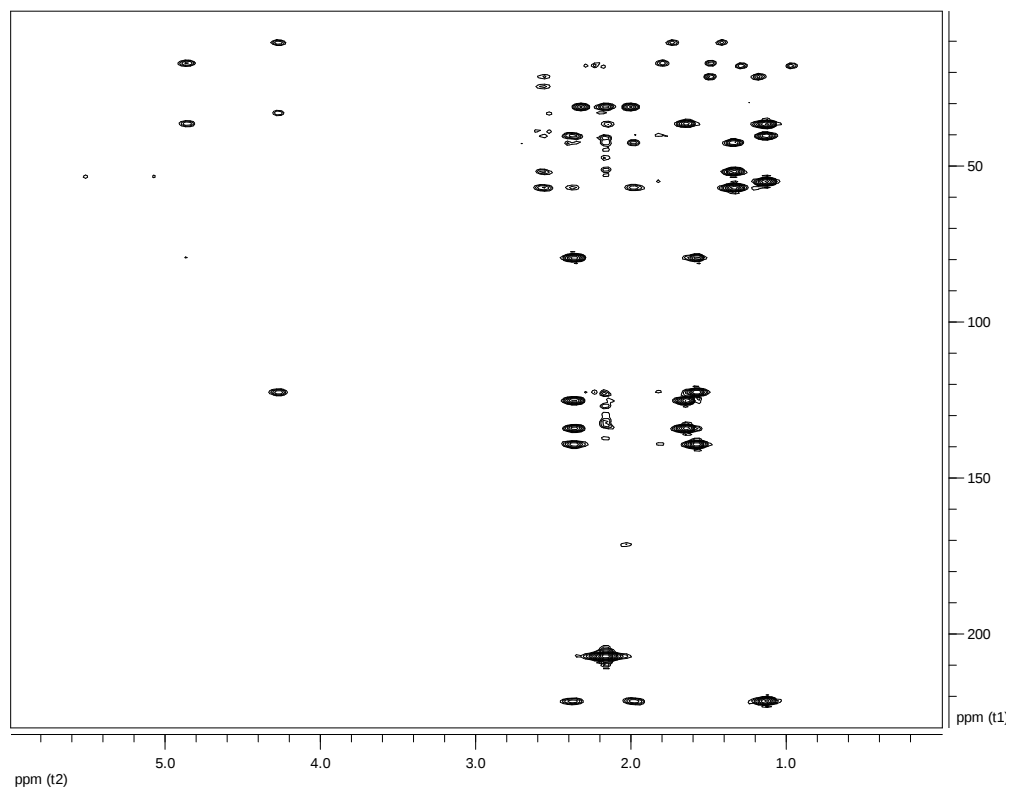
Εικόνα 73. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη **8**.



Εικόνα 74. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **8**.



Εικόνα 75. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 8.



Εικόνα 76. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 8.

Η σχετική στερεοχημεία στο ασύμμετρο κέντρο C-5 αποδόθηκε ως R^* κατόπιν σύγκρισης της σταθεράς σύζευξης του H-5 με αυτήν του μεταβολίτη **3**.

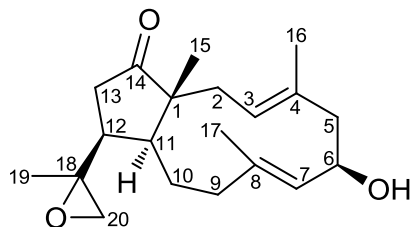
Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **8** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα νέο φυσικό προϊόν, το (1*R*,3*E*,5*R*,7*E*,11*S*,12*S*)-18,20-εποξυ-14-οξο-5-υδροξυ-3,7-δολαμπελλαδιένιο. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **8** παρατίθενται στον Πίνακα 47.

Πίνακας 47. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **8** σε $CDCl_3$ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

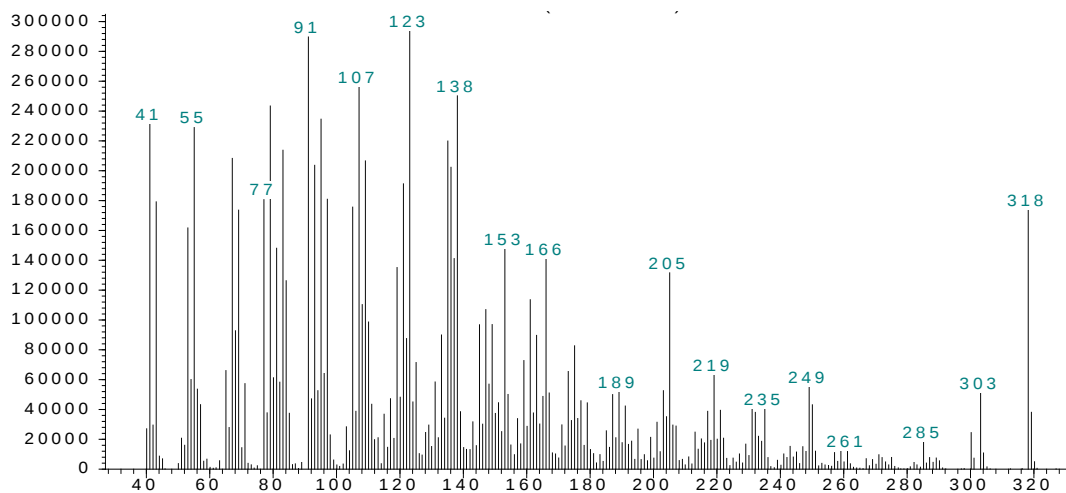
Θέση	δ_C	δ_H
1	54.8	
2	36.6	1.80 (m), 2.21 (m)
3	122.4	5.28 (dd, 11.6, 4.3)
4	139.2	
5	79.3	4.26 (dd, 8.8, 7.5)
6	33.0	2.35 (m)
7	125.1	4.84 (m)
8	134.1	
9	36.6	2.21 (m), 2.09 (m)
10	24.6	1.76 (m), 1.40 (m)
11	40.3	2.14 (m)
12	42.5	2.55 (m)
13	38.8	2.36 (t, 16.8, 8.4), 1.96 (dd, 16.8, 10.5)
14	221.7	
15	17.8	1.12 (s)
16	10.3	1.56 (s)
17	17.0	1.63 (s)
18	56.8	
19	21.3	1.33 (s)
20	51.7	2.67 (d, 4.2), 2.62 (d, 4.2)

3.9. Μεταβολίτης 9

Ο μεταβολίτης **9** απομονώθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα συνολικής μάζας 6.1 mg.



Το φάσμα μάζας (Εικ. 77) του μεταβολίτη **9** εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 318 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο $C_{20}H_{30}O_3$. Επιπλέον, παρατηρήθηκε θραύσμα $[M-H_2O]^+$ σε m/z 300 που υπεδείκνυε την ύπαρξη τουλάχιστον μίας υδροξυλομάδας στο μόριο.

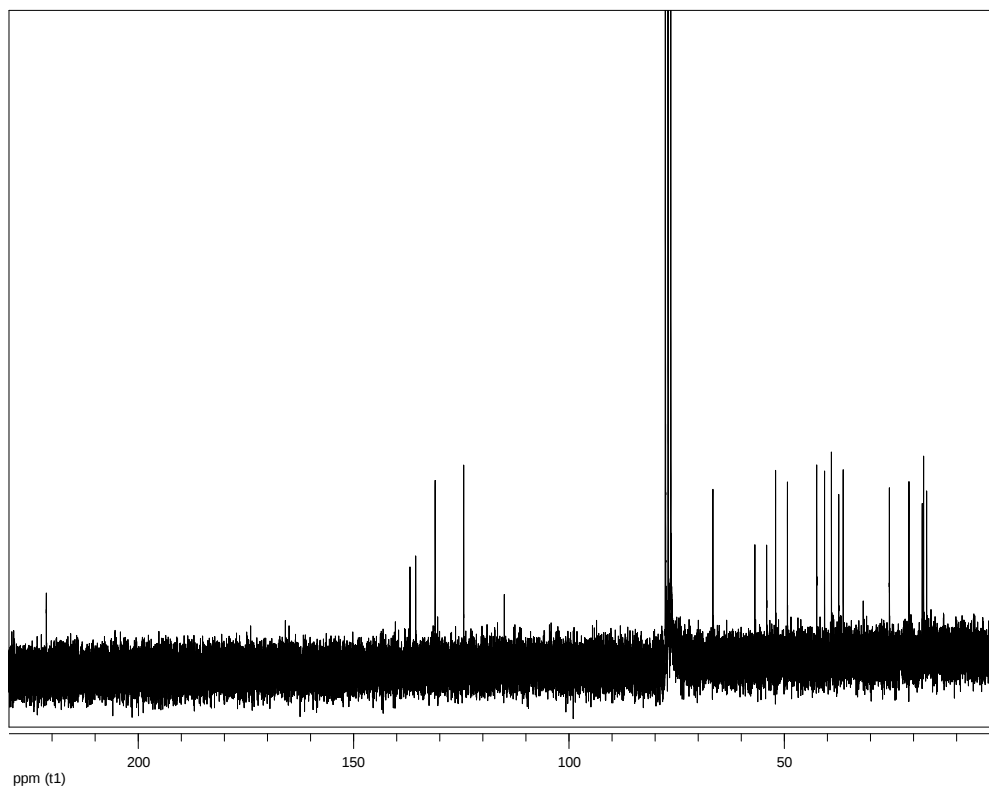


Εικόνα 77. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **9**.

Στο φάσμα ^{13}C NMR (Εικ. 78) του μεταβολίτη **9** εμφανίσθηκαν 20 κορυφές, μεταξύ των οποίων παρατηρήθηκαν:

- Ένα καρβονυλικό άτομο άνθρακα σε δ 221.3, χαρακτηριστική χημική μετατόπιση για την παρουσία μιας κετονομάδας στο μόριο.

- Τέσσερα ολεφινικά άτομα άνθρακα σε δ 124.4, 131.1, 135.6 και 136.9 που υπεδείκνυν την ύπαρξη δύο διπλών δεσμών άνθρακα-άνθρακα στο μόριο.
- Ένα οξυγονωμένο άτομο άνθρακα σε δ 66.6, χαρακτηριστική χημική μετατόπιση για την παρουσία μιας υδροξυλομάδας στο μόριο.
- Δύο οξυγονωμένα άτομα άνθρακα σε δ 52.0 και 56.8, χαρακτηριστικές χημικές μετατοπίσεις για την παρουσία μιας εποξυ-ομάδας στο μόριο.

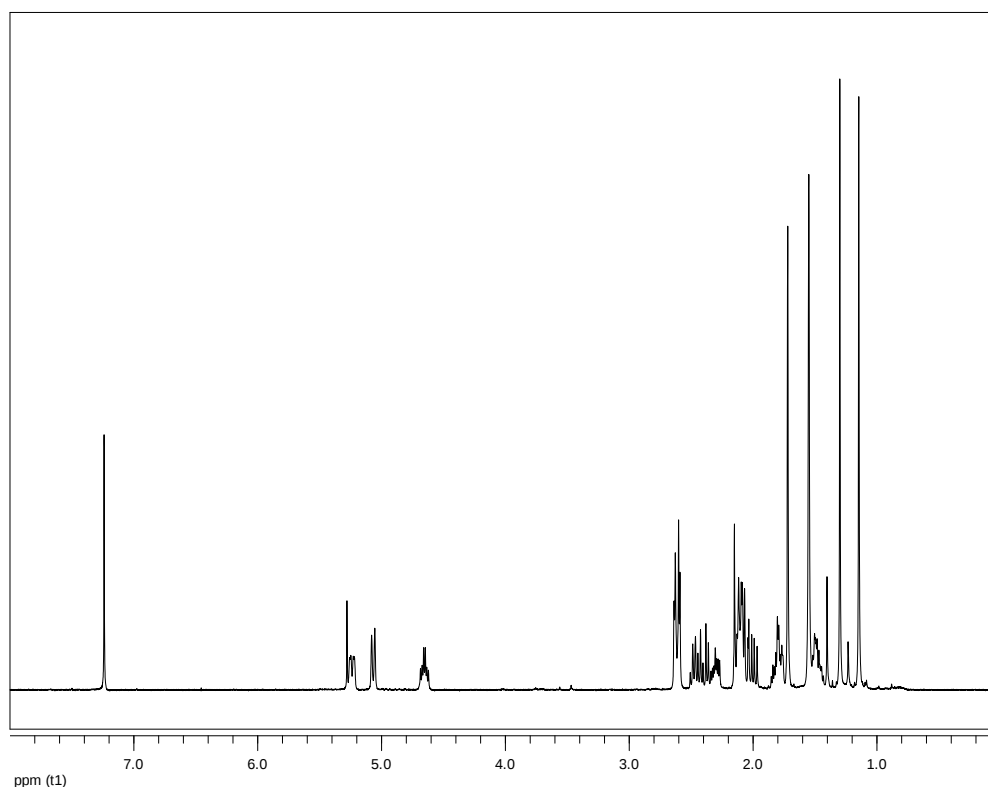


Εικόνα 78. Φάσμα ^{13}C NMR του μεταβολίτη **9**.

Στο φάσμα ^1H NMR (Εικ. 79) του μεταβολίτη **9** παρατηρήθηκαν:

- Τέσσερις απλές κορυφές σε δ 1.15, 1.30, 1.55 και 1.72, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια δύο αλειφατικών και δύο βινυλικών μεθυλίων σε τεταρτοταγή άτομα άνθρακα.
- Μία διπλή κορυφή σε δ 5.07 και μία διπλή διπλόν κορυφή σε δ 5.24, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε δύο ολεφινικά μεθίνια.

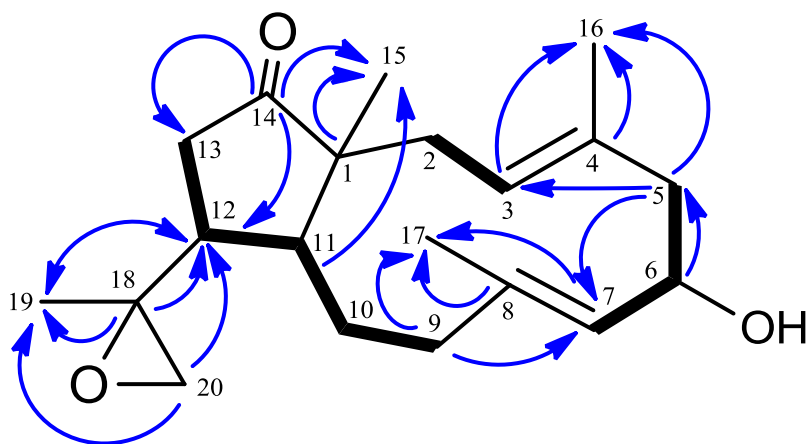
- Μία τριπλή διπλών κορυφή σε δ 4.65 που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε σε πρωτόνιο οξυγονωμένου άνθρακα.
- Δύο διπλές κορυφές σε δ 2.60 και 2.63 που ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε δύο πρωτόνια ενός οξυγονωμένου μεθυλενικού άνθρακα.



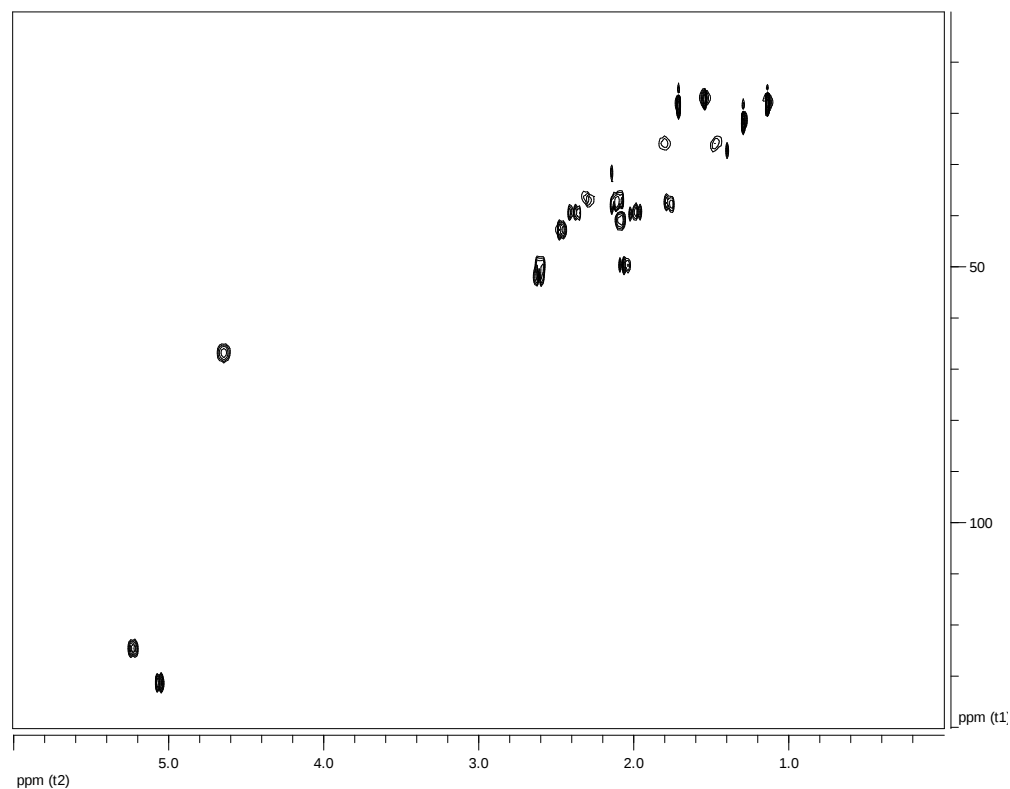
Εικόνα 79. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **9**.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **9** με τα αντίστοιχα του **4** οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα παρόμοιο μόριο, όπου το εξωμεθυλένιο έχει μετατραπεί σε ένα εποξειδίο.

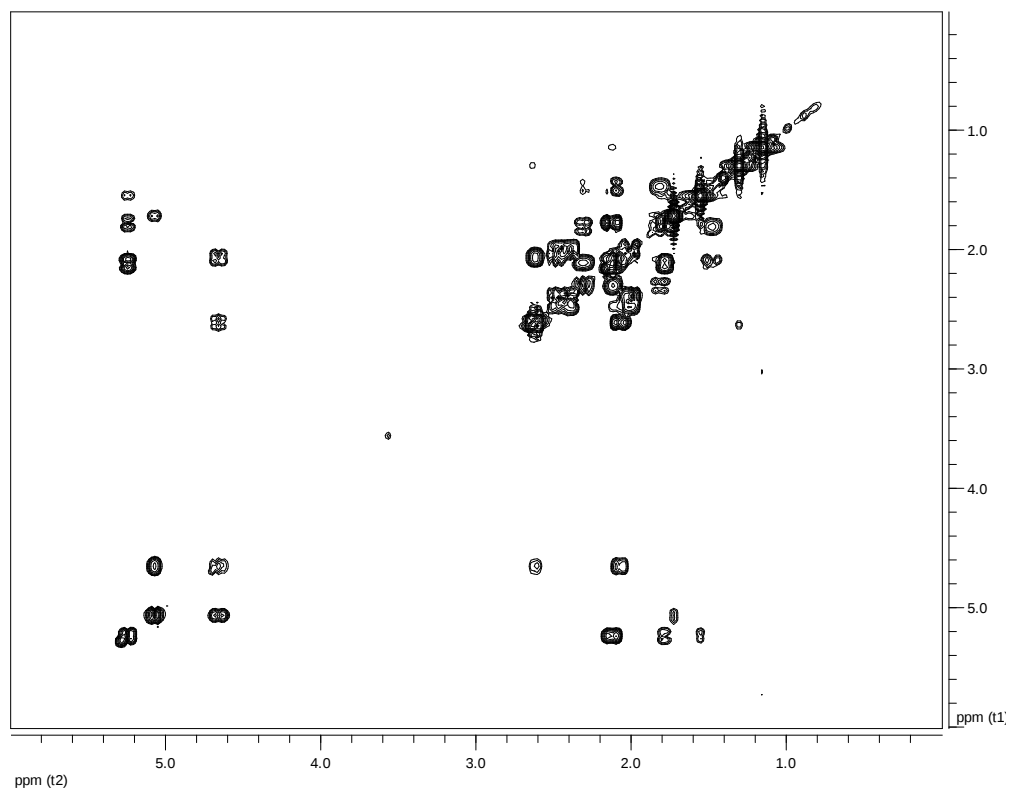
Η συγκεκριμένη δομική αλλαγή υποδείχθηκε από τις ετεροπυρηνικές συζεύξεις των ανθράκων C-18, C-19 και C-20 με το μεθινικό πρωτόνιο H-12, ενώ οι υπόλοιπες ομοπυρηνικές και ετεροπυρηνικές συσχετίσεις (Εικ. 80) που παρατηρήθηκαν στα φάσματα HSQC-DEPT (Εικ. 81), COSY (Εικ. 82) και HMBC (Εικ. 83) επιβεβαίωσαν τη προτεινόμενη δομή.



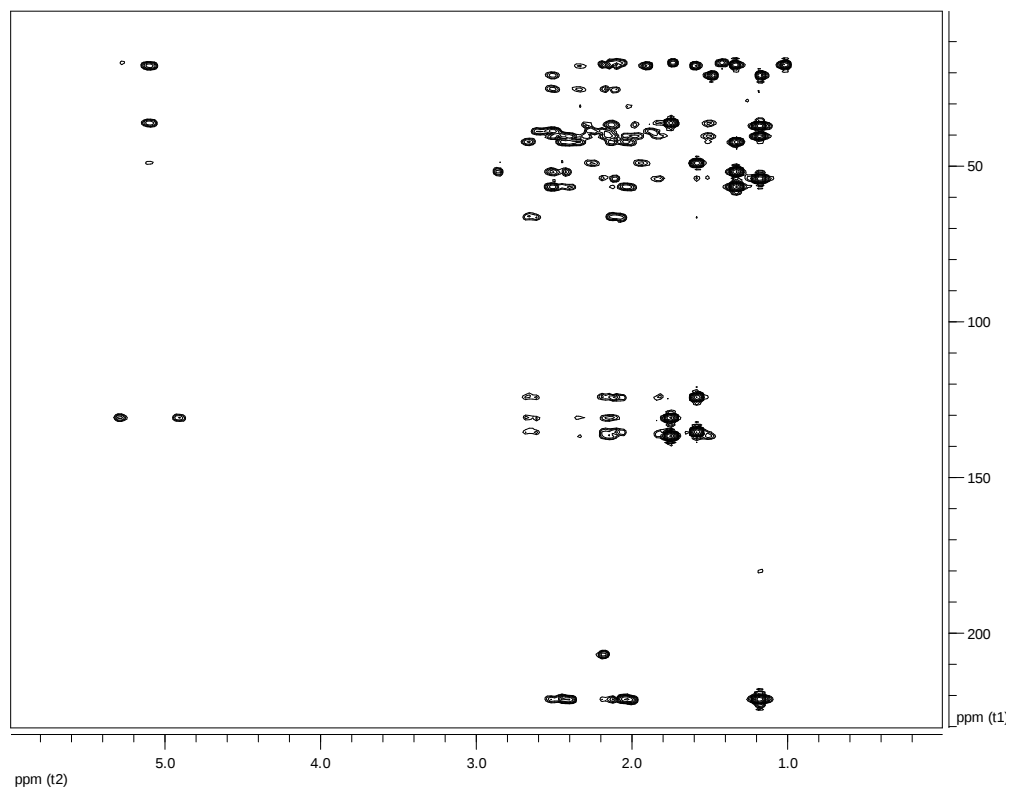
Εικόνα 80. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη **9**.



Εικόνα 81. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **9**.



Εικόνα 82. Φάσμα COSY του μεταβολίτη 9.



Εικόνα 83. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 9.

Η σχετική στερεοχημεία στο ασύμμετρο κέντρο C-6 αποδόθηκε ως R^* κατόπιν σύγκρισης της σταθεράς σύζευξης του H-6 με αυτήν του μεταβολίτη **4**.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **9** με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα νέο φυσικό προϊόν, το (1*R*,3*E*,6*R*,7*E*,11*S*,12*S*)-18,20-εποξυ-14-οξο-6-υδροξυ-3,7-δολαμπελλαδιένιο. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **9** παρατίθενται στον Πίνακα 48.

Πίνακας 48. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **9** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

Θέση	δ_{C}	δ_{H}
1	54.1	
2	37.4	2.12 (m), 1.77 (m)
3	124.4	5.24 (dd, 11.5, 3.6)
4	135.6	
5	49.3	2.60 (m), 2.06 (m)
6	66.6	4.65 (td, 10.2, 5.3)
7	131.1	5.07 (d, 10.2)
8	136.9	
9	36.3	2.29 (m), 2.10 (m)
10	25.6	1.80 (m), 1.47 (m)
11	40.7	2.08 (m)
12	42.5	2.46 (m)
13	39.1	2.38 (m), 1.99 (m)
14	221.3	
15	17.7	1.15 (s)
16	17.0	1.55 (s)
17	18.0	1.72 (s)
18	56.8	
19	21.1	1.30 (s)
20	52.0	2.63 (d, 4.3), 2.60 (d, 4.3)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

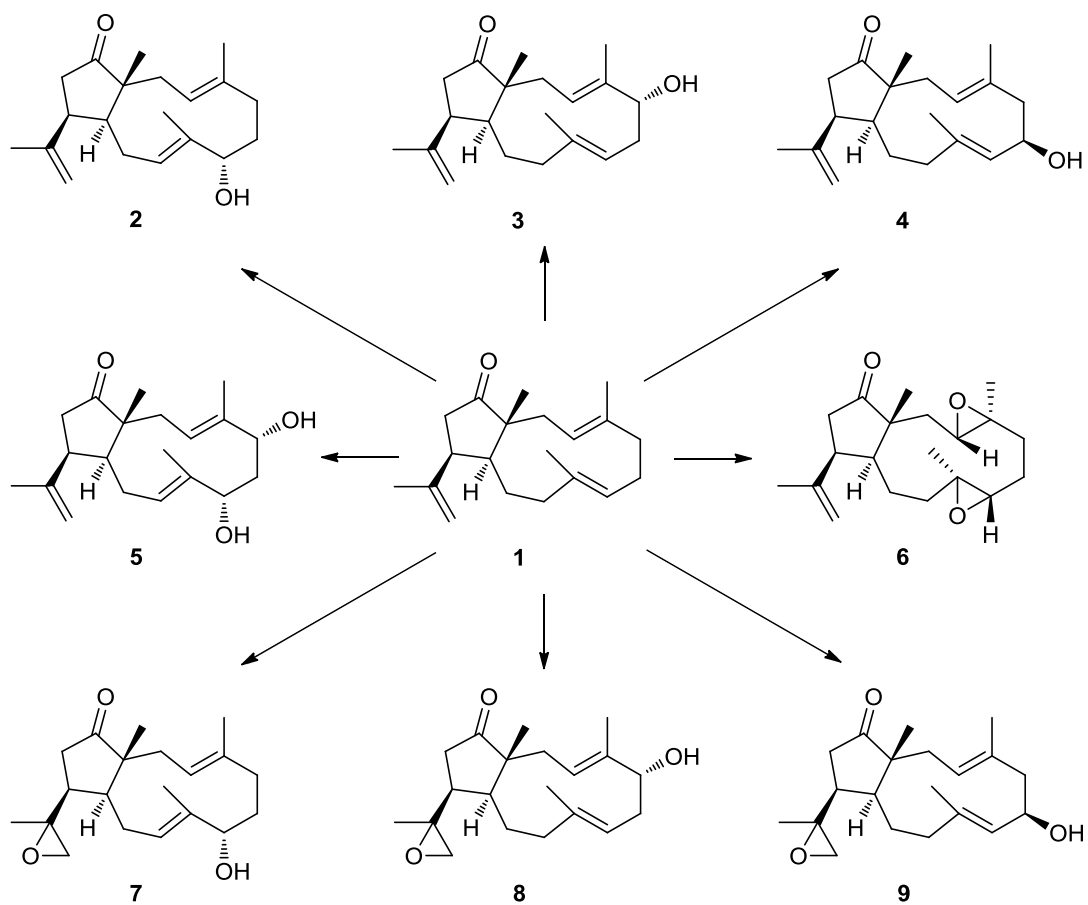
Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η απομόνωση του κύριου μεταβολίτη του φαιοφύκους *Dilophus spiralis*, καθώς και των ενδοφυτικών βακτηρίων του φύκους και η αξιολόγηση της ικανότητας των ενδοφυτικών βακτηρίων να βιομετατρέψουν το (1*R*,3*E*,7*E*,11*S*,12*S*)-14-οξο-3,7,18-δολαμπελλατριένιο, με απώτερο στόχο την απομόνωση και ταυτοποίηση των προϊόντων βιομετατροπής και την αξιολόγηση της αντιβακτηριακής τους δράσης, δεδομένου ότι στο παρελθόν ανάλογα μόρια έχουν επιδείξει διαφορετικά επίπεδα δραστηριότητας έναντι ανθεκτικών στη μεθικιλίνη στελεχών *Staphylococcus aureus*.

Στα πλαίσια αυτά απομονώθηκαν 11 διαφορετικά στελέχη ενδοφυτικών βακτηρίων από δείγμα του *D. spiralis* που συλλέχθηκε στην Ελαφώνησο, ενώ παράλληλα από το οργανικό εκχύλισμα του φύκους απομονώθηκε σε επαρκή ποσότητα το (1*R*,3*E*,7*E*,11*S*,12*S*)-14-οξο-3,7,18-δολαμπελλατριένιο (**1**).

Στη συνέχεια, τα 11 ενδοφυτικά βακτηριακά στελέχη αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα βιομετατροπής του μεταβολίτη **1**.

Το στέλεχος *Bacillus megaterium* BI0223, το οποίο εμφάνισε την ικανότητα να βιομετατρέπει τον μεταβολίτη **1**, υποβλήθηκε σε υγρή καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας παρουσία του 14-οξο-3,7,18-δολαμπελλατριενίου (**1**).

Από τα οργανικά υπολείμματα της βακτηριακής καλλιέργειας απομονώθηκαν με χρωματογραφικούς διαχωρισμούς δεκατέσσερα προϊόντα βιομετατροπής, εκ των οποίων μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί τα οκτώ (**2–9**) μέσω φασματοσκοπικών μεθόδων NMR και MS. Εξ αυτών, επτά μεταβολίτες (**3–9**) αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα.



Στο άμεσο μέλλον οι απομονωμένοι μεταβολίτες θα αξιολογηθούν ως προς την αντιβακτηριακή τους δράση έναντι στελεχών *S. aureus* ανθεκτικών στη μεθικιλίνη.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Akondi K. B., Muttenthaler M., Dutertre S., Kaas Q., Craik D. J., Lewis R. J., Alewood P. F. Discovery, synthesis, and structure-activity relationships of conotoxins. *Chem. Rev.*, **2014**, 114, 5815-5847.

Alsters P. L., Jary W., Nardello-Rataj V., Aubry J.-M. “Dark” singlet oxygenation of β -citronellol: a key step in the manufacture of rose oxide. *Org. Process Res. Dev.*, **2009**, 259–262.

Amico V., Oriente G., Piattelli M., Tringali C., Fattorusso E., Magno S., Mayol L. Diterpenes based on the dolabellane skeleton from *Dictyota dichotoma*. *Tetrahedron*, **1980**, 36, 1409-1414.

Beattie G. A. Plant-associated bacteria: survey, molecular phylogeny, genomics and recent advantages. In: Gnanamanickam S.S. (ed). Plant-associated bacteria. **2006**. Springer: Dordrecht, pp 1–56.

Bel-Rhliid R., Thapa D., Kraehenbuehl K., Hansen C. E., Fischer L. Biotransformation of caffeoyl quinic acids from green coffee extracts by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. *AMB Express*, **2013**, 3, 28.

Bhatti H. N., Khera R. A. Biological transformations of steroidal compounds: a review. *Steroids*, **2012**, 77, 1267-1290.

Borges K. B., Borges W. S., Pupo M. T., Bonato P. S. Endophytic fungi as models for the stereoselective biotransformation of thioridazine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2007**, 77, 669-674.

Borges K. B., Borges W. S., Durán-Patrón R., Pupo M. T., Bonato P. S. Collado I. G. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. *Tetrahedron Asymmetry*,

2009, 20, 385-397.

de Carvalho C. C., da Fonseca M. M. Biotransformation of terpenes. *Biotechnol. Adv.*, **2006**, 24, 134-142.

Devi P., Naik C. G., Rodrigues C. Biotransformation of citrinin to decarboxycitrinin using an organic solvent-tolerant marine bacterium, *Moraxella sp.* MB1. *Mar. Biotechnol.*, **2006**, 8, 129-138.

Firn R. D., Jones C. G. Natural products-a simple model to explain chemical diversity. *Nat. Prod. Rep.*, **2003**, 20, 382-391.

Firn R. D., Jones C. G. A Darwinian view of metabolism: molecular properties determine fitness. *J. Exp. Bot.*, **2009**, 60, 719-726.

Fu S. B., Yang J. S., Cui J. L., Feng X., Sun D. A. Biotransformation of ursolic acid by an endophytic fungus from medicinal plant *Huperzia serrata*. *Chem. Pharm. Bull.*, **2011**, 59, 1180-1182.

Fuerst J. A. Diversity and biotechnological potential of microorganisms associated with marine sponges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2014**, 98, 7331-7347.

Guiry M. D. In: Guiry M.D., Guiry G. M. AlgaeBase. **2015**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>.

Hollants J., Leliaert F., Verbruggen H., Willems A., De Clerck O. Permanent residents or temporary lodgers: characterizing intracellular bacterial communities in the siphonous green alga *Bryopsis*. *Proc. Biol. Sci.*, **2013**, 280, 20122659.

Ioannou E., Quesada A., Vagias C., Roussis V. Dolastanes from the brown alga *Dilophus spiralis*: absolute stereochemistry and evaluation of cytotoxicity. *Tetrahedron*, **2008**, 64,

3975-3979.

Ioannou E., Quesada A., Rahman M.M., Gibbons S., Vagias C., Roussis V. Dolabellanes with antibacterial activity from the brown alga *Dilophus spiralis*. *J. Nat. Prod.*, **2011a**, 74, 213-222.

Ioannou E., Vagias C., Roussis V. Dilospiranes A and B: diterpenes featuring novel carbocyclic units from the brown alga *Dilophus spiralis*. *Tetrahedron Lett.*, **2011b**, 52, 3054-3056.

Ioannou E., Quesada A., Rahman M.M., Gibbons S., Vagias C., Roussis V. Structures and antibacterial activities of minor dolabellanes from the brown alga *Dilophus spiralis*. *Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, 5177-5186.

Ioannou E., Vagias C., Roussis V. Isolation and structure elucidation of three new dolastanes from the brown alga *Dilophus spiralis*. *Mar. Drugs*, **2013**, 11, 1104-1112.

Kaur B., Chakraborty D., Kumar, B. Phenolic biotransformations during conversion of ferulic acid to vanillin by lactic acid bacteria. *BioMed Res. Int.* **2013**, 2013, 1-7.

Khera R. A. Biotransformations of diterpenoids and triterpenoids: a review. *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **2013**, 1-35.

Kijjoa A., Sawangwong P. Drugs and cosmetics from the sea. *Mar. Drugs*, **2004**, 2, 73-82.

Kolvenbach B. A., Helbling D. E., Kohler H. P., Corvini P. F. Emerging chemicals and the evolution of biodegradation capacities and pathways in bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **2014**, 27, 8-14.

Kortmansky J., Schwartz G.K. Bryostatin-1: a novel PKC inhibitor in clinical development. *Cancer Invest.*, **2003**, 21, 924-936.

Kumar R., Dahiya J. S., Singh D., Nigam P. Biotransformation of cholesterol using *Lactobacillus bulgaricus* in a glucose-controlled bioreactor. *Bioresour. Technol.*, **2001**, 78, 209-211.

Li H. Y., Zhao C. A., Liu C. J., Xu X. F. Endophytic fungi diversity of aquatic/riparian plants and their antifungal activity in vitro. *J. Microbiol.*, **2010**, 48, 1-6.

Macías F. A., Galindo J. L. G., Galindo J. C. G. Evolution and current status of ecological phytochemistry. *Phytochemistry*, **2007**, 68, 2917-2936.

Molina G., Pimentel M. R., Bertucci T. C. P., Pastore G. M. Application of fungal endophytes in biotechnological processes. *Chem. Eng. Trans.*, **2012**, 27.

Molina G., Pimentel M. R., Pastore G. M. *Pseudomonas*: a promising biocatalyst for the bioconversion of terpenes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2013**, 97, 1851-1864.

Newman D. J., Cragg G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.*, **2012**, 75, 311-335.

Pimentel M. R., Molina G., Bertucci T. C. P., Pastore G. M. Biotransformation of citronellol in rose oxide by *Pseudomonas* spp. *Chem. Eng. Trans.*, **2012**, 27, 295-300.

Rosenblueth M., Martinez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **2006**, 19, 827-837.

Shimoni E., Ravid U., Shoham Y. Isolation of a *Bacillus* sp. capable of transforming isoeugenol to vanillin. *J. Biotechnol.*, **2000**, 78, 1-9.

Unno T., Kim S. J., Kanaly R. A., Ahn J. H., Kang S. I., Hur H. G. Metabolic characterization of newly isolated *Pseudomonas nitroreducens* Jin1 growing on eugenol

and isoeugenol. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, 8556-8561.

Αριανούτσου – Φαραγγιτάκη Μ. Εργαστηριακές ασκήσεις Γενικής Οικολογίας. **2009**. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

Γαλάτης Β., Κατσαρός Χ., Αποστολάκος Π. Εισαγωγή στη Βοτανική. **1998**. Εκδόσεις Σταμούλης ΑΕ, Αθήνα.

Γιαννίτσaros Α., Καψανάκη-Γκότση Ε., Κουμπλή-Σοβαντζή Λ., Οικονόμου-Αμίλλη Α., Ρουσσομουστακάκη Μ. Μαθήματα Ταξινομικής Φυτών και Βιοσυστηματικής. **2004**. Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιολογίας, Τομέας Οικολογίας & Ταξινομικής.

Τζάκου Ο.Α., Κωνσταντινίδης Θ. Σημειώσεις Συστηματικής Βοτανικής. **2003**. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.