



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

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ ΜΥΚΗΤΕΣ ΘΑΛΑΣΣΙΑΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

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

ΕΛΕΝΗ ΚΑΤΣΙΝΗ

**ΑΘΗΝΑ
ΙΟΥΛΙΟΣ 2014**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

Ευσταθία Ιωάννου

Λέκτορας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Βασίλειος Ρούσσης

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Αλέξιος-Λέανδρος Σκαλτσούνης

Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευσταθία Ιωάννου

Λέκτορας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η χημική σύσταση των οργανικών εκχυλισμάτων της καλλιέργειας επιλεγμένων μυκητιακών στελεχών θαλάσσιας προέλευσης. Τα μυκητιακά στελέχη F10013 και F10107 απομονώθηκαν από δείγμα του ροδοφύκου *Laurencia* sp. που συλλέχθηκε στη περιοχή Σκάλα στα Βιγκλάφια Λακωνίας τον Μάρτιο του 2013 και από δείγμα του σπόγγου *Ircinia variabilis* που συλλέχθηκε στον Αγ. Φωκά της Τήνου τον Ιούνιο του 2013, αντίστοιχα.

Έπειτα από υγρή καλλιέργεια των επιλεγμένων μυκητιακών στελεχών, διήθηση της καλλιέργειας και εκχύλιση του διηθήματος με EtOAc, τα υπολείμματα που παραλήφθηκαν υποβλήθηκαν σε σειρά χρωματογραφικών διαχωρισμών, οπότε απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν μέσω φασματοσκοπικών μεθόδων NMR και MS δέκα μεταβολίτες.

Συγκεκριμένα απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν οκτώ 2,5-δικετοπιπεραζίνες, μία απλή φαινολική ένωση και ένα αλκαλοειδές.

ABSTRACT

The subject of the present thesis is the chemical investigation of the organic extracts obtained from two marine-derived fungal strains. Strains FI0013 and FI0107 were isolated from specimens of the red alga *Laurencia* sp. collected in Skala at Viglafia (Laconia) in March 2013 and specimens of the sponge *Ircinia variabilis* collected in Ag. Fokas at Tinos island in June 2013, respectively.

The crude extracts obtained from the extraction of the liquid cultures of the selected fungal strains with EtOAc were submitted to a series of chromatographic separations that led to the isolation and structure elucidation of ten metabolites. The structures and relative configurations of the isolated natural products were established by means of spectroscopic analyses, including 1D and 2D NMR experiments, as well as MS data.

The isolated secondary metabolites include eight 2,5-diketopiperazines, one simple phenolic derivative and one alkaloid.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τη Λέκτορα Ευσταθία Ιωάννου και τον Καθηγητή Βασίλειο Ρούσση για την ανάθεση του θέματος, την υποστήριξη και την καθοδήγησή τους καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής Καθηγητή Βασίλειο Ρούσση, Καθηγητή Αλέξιο-Λέανδρο Σκαλτσούνη και Λέκτορα Ευσταθία Ιωάννου για την ανάγνωση και αξιολόγηση της εργασίας μου.

Ευχαριστώ επίσης την Καθηγήτρια Όλγα Τζάκου για τη βοήθειά της κατά την πορεία της εργασίας μου.

Θα ήθελα, τέλος, να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, τους μεταπτυχιακούς φοιτητές, υποψήφιους διδάκτορες, μεταδιδακτορικούς ερευνητές και τεχνικούς για την συνεργασία τους και τη βοήθεια τους καθ' όλη τη διάρκεια παραμονής μου στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	i
ABSTRACT	iii
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	v
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	vii
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	ix
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1.1. Εισαγωγή	1
1.1.1. Θαλάσσια φαρμακογνωσία	1
1.1.2. Φυσικά προϊόντα από θαλάσσιους οργανισμούς	2
1.1.3. Οι μικροοργανισμοί θαλάσσιας προέλευσης ως πηγή φυσικών προϊόντων	5
1.2. Μύκητες	8
1.2.1. Γενικά	8
1.2.2. Μορφολογία - Αναπαραγωγή	8
1.2.3. Θρέψη και Φυσιολογία	9
1.2.4. Ταξινόμηση	9
1.2.5. Οικολογικός ρόλος – Χρήσεις	10
1.3. Θαλάσσιοι Μύκητες	11
1.3.1. Ιστορικά	11
1.3.2. Οικολογικός ρόλος – Επίδραση στο θαλάσσιο περιβάλλον	12
1.3.3. Κατανομή	13
1.3.4. Βιοδραστικοί δευτερογενείς μεταβολίτες από μύκητες θαλάσσιας προέλευσης	16
1.4. Σκοπός της μελέτης	28
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	29
2.1. Οργανολογία	29
2.2. Διαλύτες και χημικά αντιδραστήρια	30

2.3. Απομόνωση και καλλιέργεια των επιλεγμένων μυκητιακών στελεχών	31
2.4. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το μυκητιακό στέλεχος F10013.....	33
2.5. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το μυκητιακό στέλεχος F10107.....	43
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	47
3.1. Μεταβολίτης 1	48
3.2. Μεταβολίτης 2	52
3.3. Μεταβολίτης 3	56
3.4. Μεταβολίτης 4	60
3.5. Μεταβολίτης 5	64
3.6. Μεταβολίτης 6	68
3.7. Μεταβολίτης 7	72
3.8. Μεταβολίτης 8	76
3.9. Μεταβολίτης 9	80
3.10. Μεταβολίτης 10.....	82
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	89
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	93

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

1D-NMR	πείραμα NMR μίας διάστασης
2D-NMR	πείραμα NMR δύο διαστάσεων
¹H NMR	1D-NMR πείραμα πυρήνων υδρογόνου (πρωτονίου)
¹³C NMR	1D-NMR πείραμα πυρήνων άνθρακα, με ευρεία ετεροπυρηνική αποσύζευξη (proton-noise decoupled)
br	ευρεία (NMR)
CDCl₃	δευτεριωμένο χλωροφόρμιο
CH₂Cl₂	διχλωρομεθάνιο
CHCl₃	χλωροφόρμιο
COSY	2D-NMR πείραμα ομοπυρηνικού συσχετισμού ¹ H- ¹ H για ² J και ³ J (Correlated Spectroscopy)
δ	χημική μετατόπιση της απορρόφησης ενός πυρήνα σε σχέση με το τετραμεθυλοσιλάνιο (σε ppm) (NMR)
d	διπλή (NMR)
EIMS	φασματομετρία μάζας με μέθοδο ιονισμού τον βομβαρδισμό με δέσμη ηλεκτρονίων (Electron Impact Mass Spectrometry)
EtOAc	οξικός αιθυλεστέρας
cHex	κυκλοεξάνιο
HMBC	2D-NMR πείραμα ετεροπυρηνικού συσχετισμού ¹ H- ¹³ C για ² J και ³ J (Heteronuclear Multiple-Bond Correlation)
HPLC	υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography)
HSQC	2D-NMR πείραμα ετεροπυρηνικού συσχετισμού ¹ H- ¹³ C για ¹ J (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
J	σταθερά σύζευξης (σε Hz) (NMR)
m	πολλαπλή (NMR)
Me₂CO	ακετόνη
MeCN	ακετονιτρίλιο
MeOH	μεθανόλη
MS	φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry)
m/z	λόγος μάζας προς φορτίο
NMR	φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance)
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. Εισαγωγή

1.1.1. Θαλάσσια φαρμακογνωσία

Σχεδόν τα τρία τέταρτα της επιφάνειας της γης καταλαμβάνονται από νερό, θάλασσες και ωκεανούς. Οι οργανισμοί που διαβιούν στο θαλάσσιο οικοσύστημα είναι ποικίλοι και περιλαμβάνουν ψάρια, οστρακοειδή, φύκη, βακτήρια και μύκητες, που μόλις τα τελευταία χρόνια έχουν αρχίσει να μελετώνται ως πηγές φυσικών προϊόντων. Είναι γεγονός πως πολλά από τα φυσικά προϊόντα θαλάσσιας προέλευσης έχουν αποδειχθεί βιολογικά δραστικά και δυνητικά χρήσιμα φαρμακολογικά. Δεδομένου ότι οι θαλάσσιοι οργανισμοί ζουν σε σημαντικά διαφορετικό περιβάλλον από εκείνο των χερσαίων οργανισμών, είναι εύλογο να υποθέσει κανείς ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες τους θα διαφέρουν σημαντικά.

Κατά τα τελευταία χρόνια, η έρευνα σχετικά με τη χημεία των θαλάσσιων οργανισμών έχει βιώσει μία τεράστια άνοδο. Αυτό οφείλεται στην ανάγκη για περισσότερες και νέες βιοδραστικές ενώσεις με πιθανές φαρμακευτικές εφαρμογές. Για το σκοπό αυτό, πολλά είδη έχουν εξεταστεί ως προς τη δραστικότητα τους και μία σειρά από βιοδραστικά μόρια, συχνά με εξειδικευμένη δράση και μοναδικά δομικά χαρακτηριστικά, έχουν απομονωθεί. Η ταχεία ανάπτυξη στη χημεία των θαλάσσιων οργανισμών τις τελευταίες πέντε δεκαετίες έχει οδηγήσει στην ανακάλυψη ενός εκπληκτικά μεγάλου αριθμού νέων δομών. Πάνω από 15 ενώσεις θαλάσσιας προέλευσης βρίσκονται επί του παρόντος σε διάφορα στάδια κλινικών δοκιμών.

Η Θαλάσσια Φαρμακογνωσία δεν εστιάζει το ενδιαφέρον της μόνο στην απομόνωση και μελέτη νέων βιοδραστικών μεταβολιτών και τοξινών από θαλάσσιους οργανισμούς, αλλά και στη διερεύνηση των οικολογικών σχέσεων των θαλάσσιων οργανισμών. Ακόμη, προσπαθεί να δώσει λύση και στο πρόβλημα της βιοεπίστρωσης των επιφανειών που εκτίθενται στο θαλάσσιο περιβάλλον ψάχνοντας για φυσικά προϊόντα που θα είναι αποτελεσματικά, αλλά δεν θα το επιβαρύνουν (Saleem *et al.* 2007).

1.1.2. Φυσικά προϊόντα από θαλάσσιους οργανισμούς

Με τον όρο φυσικά προϊόντα εννοούμε τις ουσίες που προέρχονται από τη φύση και πιο συγκεκριμένα τους δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από ζωντανούς οργανισμούς. Η πλειοψηφία των φυσικών προϊόντων που έχουν βρει μέχρι σήμερα φαρμακευτική εφαρμογή προέρχεται από οργανισμούς του χερσαίου περιβάλλοντος. Η ανάπτυξη όμως, νέων τεχνικών εξερεύνησης του θαλάσσιου περιβάλλοντος, έδωσε τη δυνατότητα σε ερευνητές να ασχοληθούν με φυσικά προϊόντα θαλάσσιας προέλευσης.

Λόγω του σταθερού, αλλά αρκετά ανταγωνιστικού περιβάλλοντος στο οποίο ζουν, οι θαλάσσιοι οργανισμοί εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερη ποικιλομορφία και διαθέτουν περισσότερο ανεπτυγμένες και πολύπλοκες μεταβολικές οδούς σε σύγκριση με τους χερσαίους. Συνθέτουν βιοδραστικά μόρια με σπάνιους χημικούς σκελετούς και δραστικές ομάδες με εντονότερες βιολογικές δράσεις και συχνά υψηλότερης εξειδίκευσης. Οι εφαρμογές τους είναι ποικίλες (φάρμακα, καλλυντικά, διατροφή, βιοτεχνολογία, κ.α.) με κύρια έμφαση στον τομέα της υγείας εξαιτίας του μεγάλου φάσματος δράσεων που εμφανίζουν (αντικαρκινική, αντιική, αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη, κ.α.).

Οι θαλάσσιοι οργανισμοί που έχουν μελετηθεί και αποδώσει δευτερογενείς μεταβολίτες είναι κατά κύριο λόγο φύκη (μακροφύκη, μικροφύκη), μικροοργανισμοί (βακτήρια, μύκητες), σπόγγοι, ασκίδια και κοιλεντερωτά. Άλλες πηγές δευτερογενών μεταβολιτών λιγότερο μελετημένες είναι μαλάκια, βρυόζωα και ψάρια. Πολλά φυσικά προϊόντα που έχουν απομονωθεί από θαλάσσιους οργανισμούς αποτελούν το δραστικό συστατικό φαρμακευτικών σκευασμάτων, ενώ πολλά άλλα βρίσκονται σε διάφορα στάδια κλινικών δοκιμών.

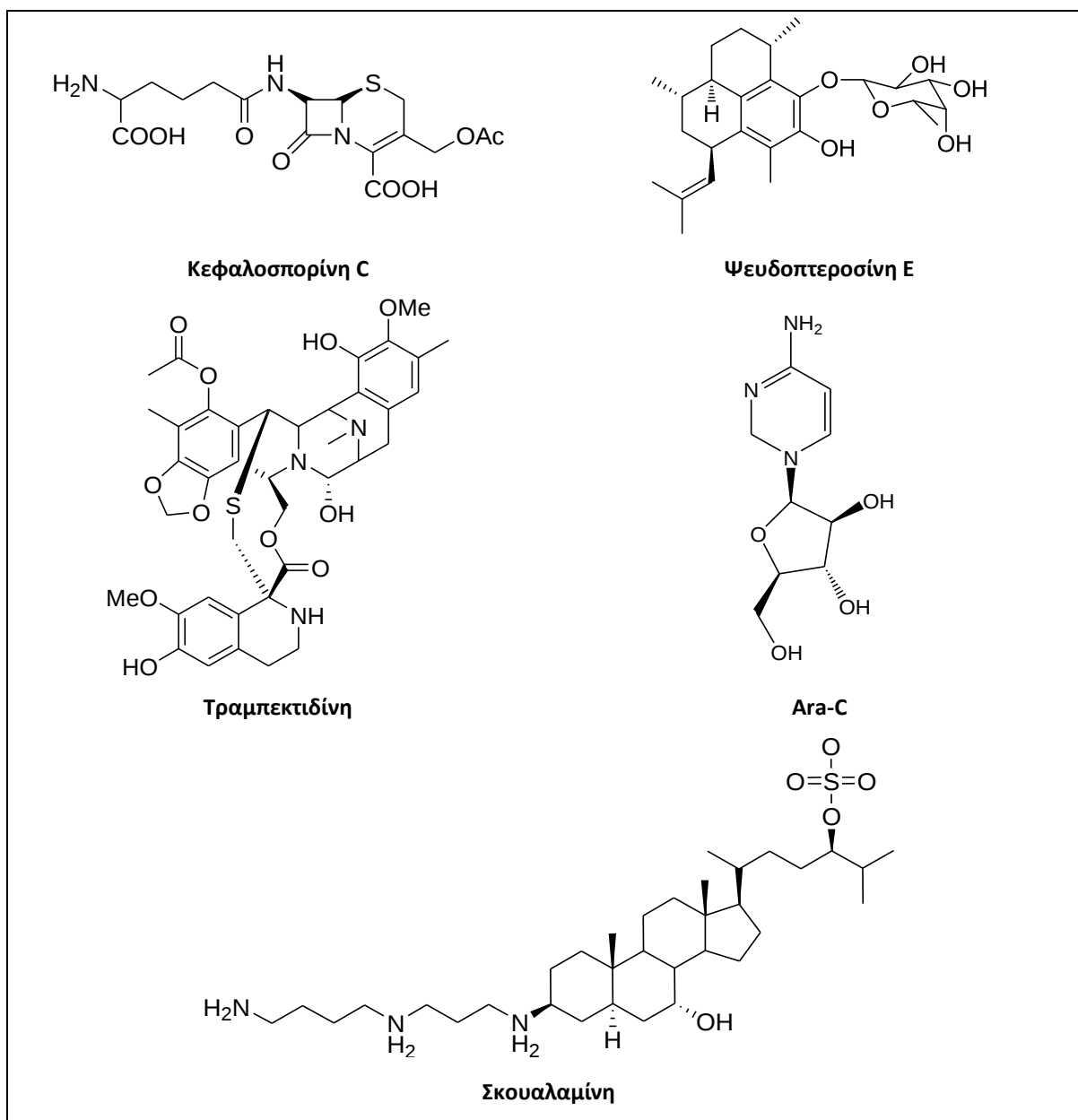
Στον Πίνακα 1 και στην Εικόνα 1 παρουσιάζονται κάποια παραδείγματα φυσικών προϊόντων θαλάσσιας προέλευσης που κυκλοφορούν ήδη ως εμπορικά σκευάσματα.

Πίνακας 1. Φυσικά προϊόντα θαλάσσιας προέλευσης που κυκλοφορούν ως εμπορικά σκευάσματα.

Όνομα	Προέλευση	Δράση
Κεφαλοσπορίνη C	<i>Cephalosporium acremonium</i> (μύκητας)	Αντιμικροβιακή
Ara-A (Vidarabine®)	<i>Tethya crypta</i> (σπόγγος)	Αντιιική
Ara-C (Cytarabine®)	<i>Tethya crypta</i> (σπόγγος)	Αντικαρκινική
Τραμπεκτιδίνη (Yondelis®)	<i>Ecteinascidia turbinata</i> (ασκίδιο)	Κατά του σαρκώματος των μαλακών ιστών
Ζικονοτίδιο (Prialt®)	<i>Conus magus</i> (γαστερόποδο)	Αναλγητική
Ψευδοπτεροσίνη E	<i>Pseudopterogorgia elisabethae</i> (κοράλλι)	Αντιφλεγμονώδη
Σκουαλαμίνη	<i>Scualus acanthias</i> (καρχαρίας)	Αντιαγγειογενετική
Καϊνικό οξύ (Digesan®)	<i>Diginea simplex</i> (ροδοφύκος)	Ανθελμινθική

Τα θαλάσσια προϊόντα βρίσκουν και άλλες σημαντικές εφαρμογές. Ο σκελετός των σκληρών κοραλλιών αποτελείται κυρίως από υδροξυαπατίτη, ο οποίος επιτρέπει την ελεύθερη ανάπτυξη των αιμοφόρων αγγείων και των οστών και χρησιμοποιείται στα ορθοπεδικά εμφυτεύματα και στην οδοντιατρική. Η ορμόνη καλσιτονίνη από τον σολομό ελέγχει τα επίπεδα Ca^{+2} στο αίμα και χρησιμοποιείται στη θεραπεία της οστεοπόρωσης. Η «γη διατόμων» είναι ένα πορώδες υλικό με πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία (προσρόφηση της νιτρογλυκερίνης στην παρασκευή του δυναμίτη, υλικό χρωματογραφίας, μέσο διήθησης στην οινοποιϊα και ζυθοποιϊα).

Στο αίμα του αρθροπόδου *Limulus polyphemus* υπάρχει ένα συστατικό πρωτεϊνικής φύσης το οποίο προκαλεί πήξη του αίματος όταν έρχεται σε επαφή με ενδοτοξίνες Gram-αρνητικών βακτηρίων. Το LAL test (Limulus Amoebocyte Lysate test) χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της παρουσίας ενδοτοξινών σε προϊόντα ιατρικής και φαρμακευτικής χρήσης. Η πράσινη πρωτεΐνη φθορισμού (Green Fluorescent Protein) από τη μέδουσα *Aequora victoria* βρίσκει χρήση στη μοριακή βιολογία και στη μικροσκοπία φθορισμού για την παρατήρηση των ζώντων κυττάρων.



Εικόνα 1. Χημικές δομές φυσικών προϊόντων θαλάσσιας προέλευσης.

1.1.3. Οι μικροοργανισμοί θαλάσσιας προέλευσης ως πηγή φυσικών προϊόντων

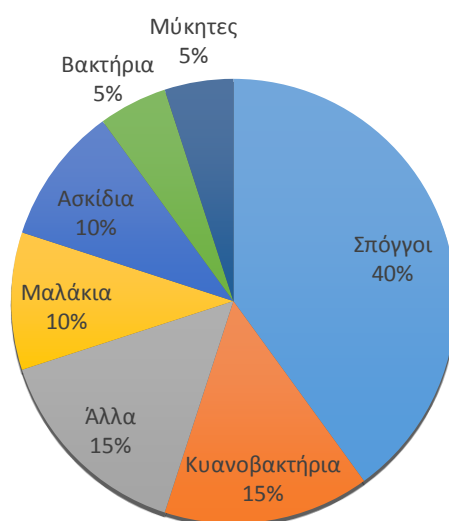
Οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί, και ιδιαίτερα οι μύκητες και τα βακτήρια, έχουν δώσει νέα ώθηση στην έρευνα των φυσικών προϊόντων θαλάσσιας προέλευσης κατά τα τελευταία 15 χρόνια. Η ποικιλομορφία των δευτερογενών μεταβολιτών που αναφέρθηκαν κατά τη διάρκεια της πρόσφατης δεκαετίας είναι συναρπαστική. Αυτό τονίζει τη σημασία των θαλάσσιων μικροοργανισμών ως πηγή φυσικών προϊόντων. Οι μικροοργανισμοί παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο σε όλους τους σημαντικούς βιολογικούς κύκλους που παίρνουν μέρος στους ωκεανούς, ενώ εμπλέκονται άμεσα σε οικολογικά φαινόμενα. Το θαλάσσιο περιβάλλον είναι μοναδικό εξαιτίας των εξειδικευμένων οργανικών αλλά και ανόργανων ουσιών που περιέχει, καθώς και λόγω των θερμοκρασιών και των συνθηκών πίεσης. Αυτά, αλλά και άλλα χαρακτηριστικά του θαλάσσιου περιβάλλοντος, όπως τα μεγάλα βάθη, φύκη, σπόγγοι, ψάρια, κλπ, παρέχουν ένα ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Abdel-Lateff *et al.* 2003).

Οι δυσκολίες που αντιμετώπισαν στη συλλογή των θαλάσσιων μακροοργανισμών, καθώς και η ανεπαρκής ποσότητα των απομονωμένων βιοδραστικών ουσιών τους, έδωσαν κίνητρο σε πολλές ερευνητικές ομάδες να διερευνήσουν τους μικροοργανισμούς που συνδέονται με αυτούς, ή εκείνους που βρίσκονται άμεσα στο νερό ή στα θαλάσσια ιζήματα. Υπάρχουν μερικά προφανή πλεονεκτήματα στη διερεύνηση των μικροβίων σε σύγκριση με τους μακροοργανισμούς. Κάποια από αυτά είναι, η εκ νέου απομόνωση των ενώσεων μετά από μεγάλης κλίμακας καλλιέργεια του μικροοργανισμού, καθώς και το γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί είναι πιο εύκολοι στον χειρισμό τους γενετικά. Με βάση τα παραπάνω, οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί έχουν γίνει κεντρικό θέμα για πολλές ομάδες που διερευνούν φυσικά προϊόντα με στόχο την εξεύρεση νέων φαρμακευτικών ουσιών ή ενώσεων χρήσιμων για τη γεωργία (Proksch *et al.* 2002, Osterhage 2001). Στον Πίνακα 2 παρατίθενται κάποια παραδείγματα φυσικών προϊόντων που έχουν απομονωθεί από βακτήρια και μύκητες θαλάσσιας προέλευσης.

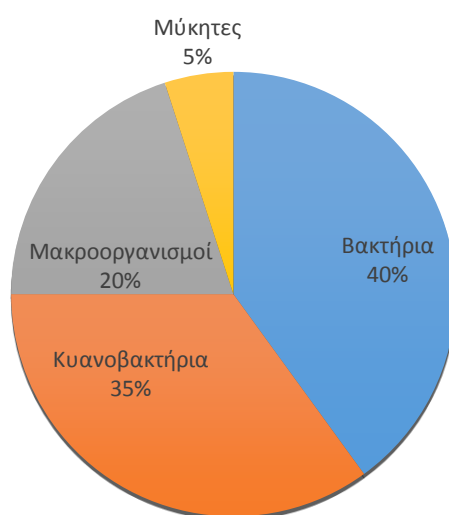
Πίνακας 2. Παραδείγματα φυσικών προϊόντων που έχουν απομονωθεί από βακτήρια και μύκητες θαλάσσιας προέλευσης.

Όνομα	Παραγωγός Μικροοργανισμός	Χημική Κατηγορία
Σαλινοσποραμίδιο A	<i>Salinispora tropica</i> (βακτήριο)	Πολυκυκλικό μακρολίδιο
Σπορολίδια A & B	<i>Salinispora tropica</i> (βακτήριο)	Μακροκυκλικές λακτόνες
Σαλινικετάλες A & B	<i>Salinispora arenicola</i> (βακτήριο)	Μακρολίδια
Αρεναμίδιο A	<i>Salinispora arenicola</i> (βακτήριο)	Πεπτίδιο
Αρενικολίδια A & B	<i>Salinispora arenicola</i> (βακτήριο)	Μακρολίδια
Μαρινισπορολίδιο A	<i>Marinispora</i> sp. (βακτήριο)	Μακρολίδιο
Μαρινομυκίνη A	<i>Marinispora</i> sp. (βακτήριο)	Μακρολίδιο
Μαρινοπυρρόλες A - F	<i>Streptomyces</i> sp. (βακτήριο)	Αλκαλοειδή
Αμμοσαμίδια A & B	<i>Streptomyces</i> sp. (βακτήριο)	Αλκαλοειδή
Κεφαλοσπορίνη C	<i>Cephalosporium acremonium</i> (μύκητας)	β-Λακτάμη
Αλοβίρες A – E	<i>Scytalidium</i> sp. (μύκητας)	Πεπτίδια
Ροστρατίνη C	<i>Exserohilum rostratum</i> (μύκητας)	Αλκαλοειδές
Ασκοσαλιπυρρολιδινόνη A	<i>Ascochyta salicorniae</i> (μύκητας)	Αλκαλοειδές
Μικροσπρίνη A	<i>Microsporum</i> cf. <i>gypseum</i> (μύκητας)	Πεπτίδιο
Βασιλισταμίδιο A	<i>Bacillus laterosporus</i> (βακτήριο)	Παράγωγο λιπαρού οξέος

Η σημασία των μικροοργανισμών θαλάσσιας προέλευσης ως πηγή βιοδραστικών φυσικών προϊόντων καθίσταται ακόμη πιο σπουδαία αν αναλογιστεί κανείς ότι με βάση ερευνητικά αποτελέσματα των τελευταίων ετών οι μικροοργανισμοί παρουσιάζονται ως οι πραγματικοί παραγωγοί οργανισμοί ενός μεγάλου αριθμού μεταβολιτών που αρχικά είχαν απομονωθεί από θαλάσσιους μακροοργανισμούς (Simmons & Gerwick 2008). Ενδεικτικά παρουσιάζονται οι οργανισμοί από τους οποίους έχουν απομονωθεί 20 αντικαρκινικά φάρμακα που βρίσκονται σε διάφορα στάδια κλινικών δοκιμών (Εικ. 2), καθώς και οι πραγματικές ή οι αναμενόμενες πηγές προέλευσης τους (Εικ. 3).



Εικόνα 2. Πηγές απομόνωσης 20 αντικαρκινικών φαρμάκων θαλάσσιας προέλευσης σε κλινικές δοκιμές.



Εικόνα 3. Πραγματικές ή αναμενόμενες πηγές προέλευσης 20 αντικαρκινικών φαρμάκων θαλάσσιας προέλευσης σε κλινικές δοκιμές.

1.2. Μύκητες

1.2.1. Γενικά

Είναι ευκαρυωτικοί, μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι οργανισμοί, οι οποίοι αποτελούν ένα από τα πέντε βασίλεια των έμβιων όντων. Η γενικά αποδεκτή εκτίμηση του αριθμού των ειδών των μυκήτων στη Γη είναι 1,5 εκατομμύριο. Αν και είναι αβέβαιο πόσα ακριβώς είναι τα γνωστά είδη μυκήτων, μπορούμε να υποθέσουμε ότι βρίσκονται στην κλίμακα από 72.000 έως 100.000. Αυτό συνεπάγεται ότι οι γνωστοί μύκητες σήμερα δεν υπερβαίνουν το 5% του συνόλου των υπαρχόντων ειδών. Προφανώς, η πλειοψηφία των μυκήτων που κατοικούν στον πλανήτη μας δεν έχει ακόμη περιγραφεί. Αυτό συνεπάγεται ότι οι μύκητες αντιπροσωπεύουν δυνητικά μία τεράστια πηγή φυσικών προϊόντων με διαφορετικές χημικές δομές και δράσεις. Πολλά είδη έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή αντιβιοτικών, βιταμινών, αλλά και αντικαρκινικών φαρμάκων. Το πρώτο αντιβιοτικό που ανακάλυψε ο Fleming, η πενικιλίνη προέρχεται από ένα είδος *Penicillium*. Επίσης, είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη η χρήση τους στην παρασκευή και συντήρηση τροφίμων. Υπάρχουν τέλος μύκητες που παράγουν τοξίνες, οι οποίες προκαλούν μεγάλες ζημιές σε ζώα ή ακόμα και στον άνθρωπο (Gunatilaka *et al.* 2006, Abdel-Lateff *et al.* 2003).

1.2.2. Μορφολογία - Αναπαραγωγή

Τα κύτταρα των μυκήτων περιβάλλονται από κυτταρικό τοίχωμα, κύριο συστατικό του οποίου είναι η χιτίνη (ένα πολυμερές που συνθέτει και τον εξωσκελετό των εντόμων). Άλλο κοινό χαρακτηριστικό τους είναι η έλλειψη πλαστιδίων, ενώ περιέχουν γλυκογόνο ως αποταμιευτική ουσία. Ως προς τη μορφή του σώματος διακρίνονται δύο τύποι μυκήτων. Στον πρώτο τύπο ανήκουν εκείνοι όπου το σώμα του κάθε ατόμου αποτελείται από ένα και μόνο κύτταρο, σφαιρικού, ωοειδούς, ελλειψοειδούς κλπ. σχήματος. Οι μονοκύτταροι αυτοί μύκητες είναι γνωστοί ως ζύμες (Ζυμομύκητες). Στο δεύτερο τύπο ανήκουν μύκητες, των οποίων το σώμα αποτελείται από λεπτότατα διακλαδιζόμενα νημάτια μικροσκοπικής διαμέτρου (συνήθως 2-10 μm), τα οποία ονομάζονται υφές. Το σύνολο των υφών που απαρτίζει το σώμα του μύκητα ονομάζεται μυκήλιο και οι μύκητες

αυτής της κατηγορίας ονομάζονται μυκηλιακοί.

Οι μύκητες, στη συντριπτική τους πλειονότητα, έχουν την ιδιότητα να αναπαράγονται και να πολλαπλασιάζονται με ειδικές αναπαραγωγικές μονάδες, τα σπόρια, τα οποία κατά κανόνα σχηματίζονται σε εξειδικευμένα αναπαραγωγικά όργανα. Ανάλογα με τη διαδικασία σχηματισμού και το βιολογικό ρόλο τους, διακρίνονται δύο τύποι σπορίων: τα σπόρια εγγενούς αναπαραγωγής και τα σπόρια αγενούς αναπαραγωγής. Η αγενής αναπαραγωγή γίνεται με διαίρεση του κυττάρου (σχάση) ή αποβλάστηση, ενώ στην εγγενή γίνεται σεξουαλική σύζευξη πυρήνων-γαμετών αντίθετου φύλου με αποτέλεσμα το σχηματισμό ζυγωτών πυρήνων.

1.2.3. Θρέψη και Φυσιολογία

Οι μύκητες είναι ετερότροφοι οργανισμοί και επομένως χρειάζονται έτοιμες οργανικές ενώσεις για να τραφούν. Ανάλογα με τον τρόπο θρέψης τους διακρίνονται σε σαπροφυτικούς (χρησιμοποιούν ως τροφή νεκρές οργανικές ουσίες), παρασιτικούς (ζουν πάνω σε άλλους ζωντανούς οργανισμούς από τους οποίους τρέφονται) και συμβιωτικούς, οι οποίοι αποτελούν και την πιο ιδιαίτερη περίπτωση μυκήτων. Οι μύκητες έχουν την ικανότητα να συμβιώνουν με διάφορους άλλους οργανισμούς, όπως φύκη (λειχήνες), ρίζες φυτών (μυκόρριζες), ακόμα και έντομα.

Το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται διαφέρει αρκετά από αυτό άλλων μικροοργανισμών. Ο χρόνος ανάπτυξης τους μπορεί να διαρκέσει από 48 ώρες έως και 7 ημέρες, με θερμοκρασία ανάπτυξης 30-37°C, ενώ χρειάζονται όξινο περιβάλλον με pH 5-6,5. Οι συνθήκες αυτές μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με το είδος του μύκητα. Παρ'όλα αυτά, οι μύκητες είναι αποκλειστικά αερόβιοι ζώντες οργανισμοί και για την ανάπτυξη τους απαραίτητη είναι η παρουσία σχετικής υγρασίας, της οποίας το όριο δεν είναι απόλυτα καθορισμένο.

1.2.4. Ταξινόμηση

Παρότι τα παραδοσιακά συστήματα κατατάσσουν τους μύκητες στο βασίλειο των φυτών, σήμερα είναι κοινώς αποδεκτό πως ανήκουν σε ξεχωριστό βασίλειο οργανισμών. Παράλληλα, και η ταξινόμηση των μυκήτων σε κατώτερες ταξινομικές μονάδες

παρουσιάζει προβλήματα. Παρ' όλα αυτά, ένα κοινώς αποδεκτό σύστημα ταξινόμησης, διαιρεί τους μύκητες στις κλάσεις *Mycomycetes* (Μυχομύκητες), *Phycomycetes* (Φυκομύκητες), *Ascomycetes* (Ασκομύκητες), *Basidiomycetes* (Βασιδιομύκητες) και *Deuteromycetes* (Δευτερομύκητες). Στην τελευταία κλάση περιλαμβάνονται οι ατελείς μύκητες (*Fungi imperfecti*).

1.2.5. Οικολογικός ρόλος – Χρήσεις

Οι μύκητες συνιστούν τη δεύτερη μεγαλύτερη ομάδα μετά από τα έντομα και είναι ευρέως διαδεδομένοι στη φύση. Εμφανίζονται στην παγωμένη Ανταρκτική, σε τροπικές, αλλά και σε εύκρατες περιοχές. Κατοικούν σε εδάφη, στην επιφάνεια των βράχων σε βουνά και στο θαλασσινό νερό. Οι μύκητες παρασιτούν σε φυτά, πρωτόζωα, ψάρια, έντομα και θηλαστικά (Feofilova 2001).

Οι μύκητες βρίσκονται παντού, στο έδαφος, στα φυτά, στο νερό θαλασσών και λιμνών, ακόμα και στον ατμοσφαιρικό αέρα. Πολλοί, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, παρασιτούν σε φυτά, σε ζώα, στον άνθρωπο με αποτέλεσμα να προκαλούν σημαντικά προβλήματα, όπως μηκυτιάσεις, καταστροφές τροφίμων και βιομηχανικών προϊόντων (χρώματα, υφάσματα, δέρματα, κ.α.), ακόμα και ζημιές σε ολόκληρες φυτικές καλλιέργειες. Ιδιαίτερα στον άνθρωπο είναι ικανοί να προκαλέσουν από απλές δηλητηριάσεις και αλλεργίες έως σοβαρές ασθένειες, όπως των πνευμόνων, του δέρματος, κ.α. Για παράδειγμα, στο γένος *Amanita* ανήκουν τα περισσότερα είδημανιταριών και σε αυτά οφείλεται το μεγαλύτερο ποσοστό θανάτων απόμανιτάρια.

Ταμανιτάρια χρησιμοποιήθηκαν από τα αρχαία χρόνια για τροφή, για λατρευτικούς και για φαρμακευτικούς σκοπούς. Σήμερα κάποια από αυτά καλλιεργούνται σε βιομηχανική κλίμακα για τροφή. Κάποια άλλα αποτελούν αντικείμενο έρευνας για την παραγωγή ενζύμων, φαρμάκων και άλλων χρήσιμων για τον άνθρωπο ουσιών. Μερικά αξιοποιούνται για τη βιολογική επεξεργασία αποβλήτων χάρη στο πλούσιο ενζυμικό δυναμικό τους και την ικανότητά τους να αποδομούν πολύπλοκες οργανικές ενώσεις.

Πέρα, λοιπόν, από τα προβλήματα που μπορεί να δημιουργούν, πολλοί μύκητες έχουν αποδειχτεί ιδιαίτερα χρήσιμοι για τον άνθρωπο. Για παράδειγμα, οι ζυμομύκητες

χρησιμοποιούνται στην παρασκευή του ψωμιού, του κρασιού και της μπύρας. Επίσης, μεταξύ των μυκήτων υπάρχουν κάποια είδη που περιέχουν παραισθησιογόνες ουσίες (ψιλοκυβίνη και ψιλοκίνη) και γι' αυτό το λόγο οι ουσίες αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί και στην ψυχιατρική. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί η συνεισφορά τους στη φαρμακευτική λόγω της παραγωγής πολλών αντιβιοτικών ουσιών, όπως η πενικιλίνη από τα είδη *Penicillium notatum* και *Penicillium chrysogenum* και η κεφαλοσπορίνη από είδη του γένους *Cephalosporium*.

1.3. Θαλάσσιοι Μύκητες

1.3.1. Ιστορικά

Η ανάγκη για περισσότερες και νέες βιοδραστικές ενώσεις με πιθανές φαρμακευτικές εφαρμογές, οδήγησε τους ερευνητές στο θαλάσσιο περιβάλλον, προς εύρεση μυκήτων με δυνητικά νέα βιοσυνθετική ποικιλομορφία. Λίγο μετά την ανακάλυψη της πενικιλίνης, ο Giuseppe Brotzu, το 1945, άρχισε να ερευνά δείγματα θαλασσινού νερού κοντά σε μία εστία λυμάτων στη Σαρδηνία για μικροοργανισμούς με αντιβιοτική δράση. Ο Brotzu υπέθεσε ότι ο καθαρισμός του νερού μπορεί να οφείλεται εν μέρει σε βακτηριακό ανταγωνισμό. Απομόνωσε έναν θαλάσσιο μύκητα που εμφάνισε αντιβακτηριακή δράση και παρατήρησε ότι ήταν παρόμοιος με τον *Cephalosporium acremonium* (τώρα ονομάζεται *Acremonium chrysogenum*). Στα χρόνια που μεσολάβησαν, οι έρευνες περιορίστηκαν στους ακτινομύκητες, αλλά το ενδιαφέρον εστιάστηκε στους μύκητες ξανά όταν η κυκλοσπορίνη Α απομονώθηκε από τον *Tolyrocladium inflatum* το 1976 και εγκρίθηκε για κλινική χρήση ως ανοσοκατασταλτικό το 1983.

Μολονότι η κεφαλοσπορίνη C απομονώθηκε από ένα θαλάσσιο μύκητα, μελέτες όσον αφορά τη χημεία θαλάσσιων μυκήτων ήταν σπάνιες μέχρι τη δεκαετία του 1990. Λίγες μελέτες διεξήχθησαν μεταξύ των ετών 1970 και 1990, ενώ ακολούθησε μία σχεδόν εκθετική ανάπτυξη μέσα στη δεκαετία του 1990. Το siccayne ήταν πιθανότατα το πρώτο αντιβιοτικό που απομονώθηκε από έναν υποχρεωτικά θαλάσσιο βασιδιομύκητα, τον *Halocyphina villosa*.

Συνολικά, οι έρευνες έχουν οδηγήσει στην ανακάλυψη περισσότερων από 1000 νέων φυσικών προϊόντων από θαλάσσιους μύκητες, συμπεριλαμβανομένων πολλών με νέους ανθρακικούς σκελετούς (Rateb & Ebel 2011). Ωστόσο, έχουν δημιουργηθεί πολλά ερωτήματα σε σχέση με τους μεταβολίτες που παράγουν, όπως επίσης και σε ορισμένες περιπτώσεις, σε σχέση με τις ομοιότητές τους με μεταβολίτες χερσαίων μυκήτων. Παρ' όλα αυτά, οι θαλάσσιοι μύκητες έχουν αποδειχθεί πλούσια πηγή νέων φυσικών προϊόντων που έχουν δείξει μεγάλες δυνατότητες στη φαρμακευτική λόγω των βιολογικών τους δράσεων (Bugni 2003).

1.3.2. Οικολογικός ρόλος – Επίδραση στο θαλάσσιο περιβάλλον

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι μύκητες είναι ετερότροφοι ευκαρυωτικοί οργανισμοί που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αποσύνθεση των νεκρών φυτικών ιστών (κυτταρίνη και λιγνίνη) και σε μικρότερο βαθμό των ζωικών ιστών, όπως η κερατίνη και η χιτίνη. Με την αποσύνθεση απελευθερώνονται θρεπτικά συστατικά στο οικοσύστημα. Οι μύκητες έχουν εξελιχθεί βιολογικά και βιοχημικά με τρόπο διαφορετικό, ο οποίος τους επέτρεψε να χρησιμοποιήσουν διάφορα στερεά υποστρώματα. Παρά το γεγονός ότι πολλοί οικολογικοί ρόλοι των μυκήτων στο χερσαίο οικοσύστημα έχουν περιγραφεί και μελετηθεί λεπτομερώς, η μελέτη της οικολογίας των μυκήτων στο θαλάσσιο περιβάλλον ήταν αρκετά πιο δύσκολη.

Πολλές μελέτες που αφορούν την οικολογία των θαλάσσιων μυκήτων έχουν γίνει λόγω της παθογένειας ορισμένων ειδών μυκήτων. Για παράδειγμα, στην Καραϊβική μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας θαλάσσιων κοραλλιών έχουν αποδοθεί σε μόλυνση από παθογόνα στελέχη του γένους *Aspergillus*. Αν και τα στελέχη αυτά θεωρούνται χερσαίοι οργανισμοί, είναι ανεκτικοί σε υψηλές συγκεντρώσεις αλατιού και χαμηλή ενεργότητα νερού. Επίσης, και άλλα είδη μυκήτων, τα οποία πιστεύεται ότι είναι χερσαίοι οργανισμοί, μπορεί να έχουν συνέπειες στο θαλάσσιο οικοσύστημα. Για παράδειγμα, το είδος *Fusarium solani* είναι γνωστό για την ικανότητά του να μολύνει διάφορα θαλάσσια οστρακόδερμα (Nakagiri 2002, Leano 2002).

Αν και πολλές ασθένειες και λοιμώξεις στο θαλάσσιο περιβάλλον έχουν αποδοθεί σε μύκητες, άλλες περιπτώσεις δείχνουν ότι υπάρχουν αλληλοεξαρτώμενες σχέσεις

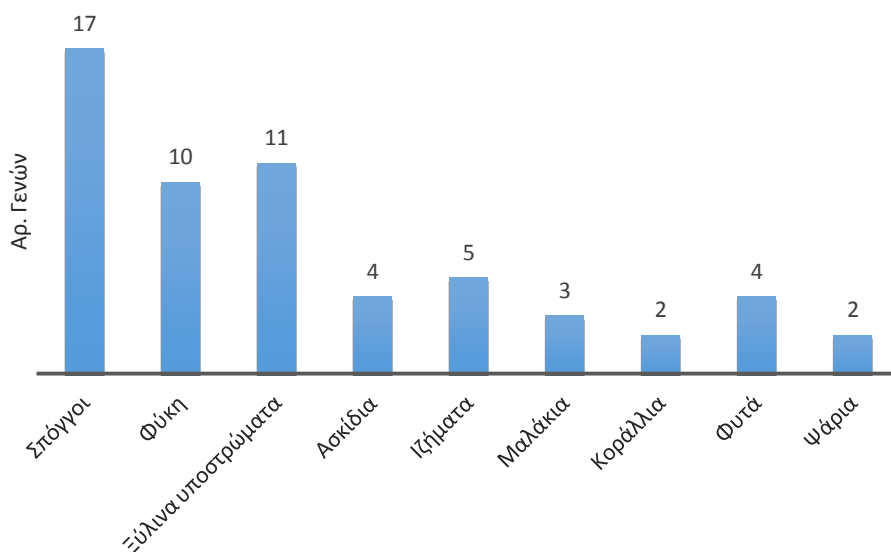
μεταξύ ενός ξενιστή και ένα μύκητα. Για παράδειγμα, ο ασκομύκητας *Turgidosculum ulvae* μεγαλώνει μόνο στο θαλλό του χλωροφύκου *Blidingia minima*. Ο *T. ulvae* έχει την ιδιότητα να μετατρέπει τις επιμολυσμένες περιοχές σε σκούρες και σκληρές, όμως τα ασπόνδυλα που φυσιολογικά θρέφονται από φύκη δεν θα φάνε τα μολυσμένα τμήματα του φύκου. Ως εκ τούτου, η σχέση μπορεί να είναι αμοιβαία επωφελής και για τις δύο οργανισμούς. Στην περίπτωση του φύκου *Ascophyllum nodosum* και του συμβιωτικού μύκητα *Mycosphaerella ascophylli*, τόσο ο ξενιστής όσο και ο μύκητας, φαίνεται να εξαρτώνται ο ένας από τον άλλο για την επιβίωση τους, καθώς κανείς από τους δύο δεν φαίνεται να υπάρχουν χωριστά στη φύση. Μία άλλη ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι τα είδη που ανήκουν στο γένος *Koralionastes* βρίσκονται πάντα συμβιωτικά σε εξωσκελετούς σπόγγων (Bentis *et al.* 2000, Bugni 2003).

Μελλοντικές έρευνες επικεντρωμένες στις σχέσεις μεταξύ των μυκήτων και των ξενιστών τους στο θαλάσσιο περιβάλλον θα αποδειχθούν ιδιαίτερα χρήσιμες στην κατανόηση του θαλάσσιου οικοσυστήματος και θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε βελτιωμένες μεθόδους συλλογής και ενδεχομένως στην απομόνωση χημικά ανεξερεύνητων ειδών.

1.3.3. Κατανομή

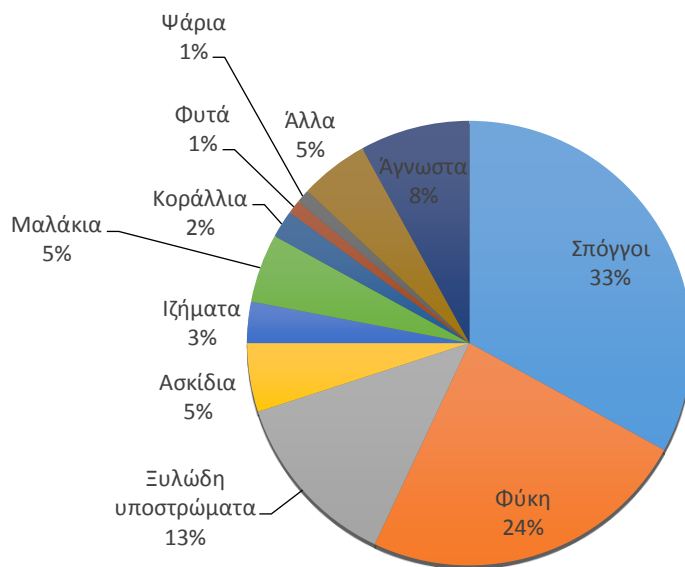
Οι μύκητες που προέρχονται από θαλάσσιους οικοτόπους, διακρίνονται σε υποχρεωτικά και προαιρετικά θαλάσσια είδη. Η πρώτη κατηγορία μυκήτων περιορίζεται στο θαλάσσιο περιβάλλον, ενώ η δεύτερη συναντάται επίσης σε γλυκά νερά ή χερσαίες περιοχές, ή και τα δύο. Η απομόνωση ενός στελέχους μύκητα από ένα θαλάσσιο δείγμα δεν αποδεικνύει ότι αυτός ο μύκητας ζει στο θαλάσσιο περιβάλλον. Είναι πάντα δυνατό να απομονώσουμε έναν χερσαίο μύκητα, ο οποίος αποτελεί μία πρόσμειξη στο θαλάσσιο περιβάλλον. Ενδεχομένως, ένα τέτοιο προϊόν απομόνωσης να ήταν αδρανές υπό τη μορφή σπορίων έως ότου οι περιβάλλοντες συνθήκες στο εργαστήριο κατέστησαν ευνοϊκή την ανάπτυξή του. Οι περισσότεροι μύκητες που απομονώθηκαν από θαλάσσια δείγματα δεν έχει αποδειχθεί ότι είναι υποχρεωτικά ή προαιρετικά θαλάσσιοι. Έτσι, μάλλον η πιο γενική έκφραση “μύκητες προερχόμενοι από το θαλάσσιο περιβάλλον” (marine-derived fungi) να είναι και η πιο ακριβής.

Η κατανομή των μυκήτων, όπως περιγράφεται σε αυτή την ενότητα, βασίζεται αποκλειστικά σε αναφορές που περιγράφουν τη χημική διερεύνηση θαλάσσιων μυκήτων και κατηγοριοποιούνται με βάση την πηγή του μύκητα. Η κατανομή των μυκήτων έχει γραφικά συνοψισθεί με βάση τον αριθμό των διακριτών γενών που περιγράφονται από βιβλιογραφίες φυσικών προϊόντων (Εικ. 4). Από το γράφημα, είναι προφανές ότι οι σπόγγοι έχουν αποφέρει τη μεγαλύτερη ταξινομική ποικιλομορφία (17%), ενώ ακολουθούν με μεγάλο ποσοστό τα φύκη (10%). Ξυλώδη υποστρώματα αντιπροσωπεύουν το 11% της κατανομής, ενώ δείγματα ιζημάτων αντιπροσωπεύουν το 5%. Τέλος, τα χερσαία φυτά αντιπροσωπεύουν το 4%, ενώ ακολουθούν με μικρότερο ποσοστό άλλες κατηγορίες.

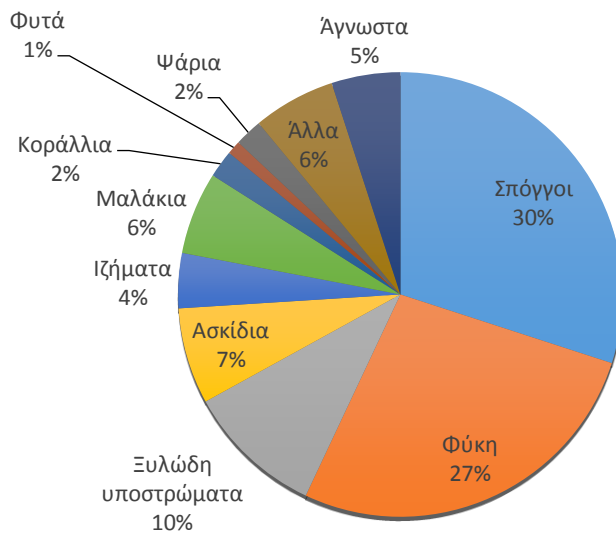


Εικόνα 4. Αριθμός γενών μυκήτων ανά θαλάσσια προέλευση (Bugni 2003).

Οι μύκητες που απομονώνονται από σπόγγους, φύκη ή ξυλώδη υποστρώματα παράγουν την πλειοψηφία της χημείας που περιγράφεται (70%, Εικ. 5). Ιδιαίτερα, οι μύκητες που προέρχονται από σπόγγους αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό (33%) του συνόλου των ενώσεων στη βιβλιογραφία και έχουν γενικά τον υψηλότερο αριθμό νέων μεταβολιτών (Εικ. 6). Οι μύκητες που προέρχονται από φύκη ακολουθούν αμέσως μετά, αντιπροσωπεύοντας το 24% του συνολικού ποσοστού των ενώσεων, ενώ αντιπροσωπεύουν ένα ελαφρώς υψηλότερο ποσοστό (27%) νέων μεταβολιτών.



Εικόνα 5. Κατανομή του συνολικού αριθμού καταγεγραμμένων ενώσεων (Bugni 2003).



Εικόνα 6. Κατανομή νέων απομονωμένων μεταβολιτών (Bugni 2003).

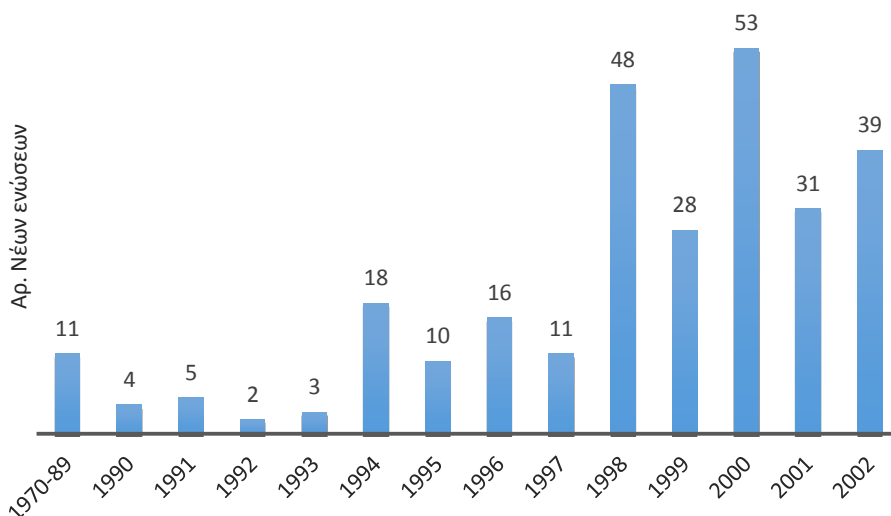
Επιπλέον, η αναλογία των νέων μεταβολιτών σε σύγκριση με γνωστούς μεταβολίτες είναι πολύ μεγαλύτερη για μύκητες προερχόμενους από φύκη (3.1 : 1) σε αντίθεση με εκείνους που απομονώνονται από σπόγγους (1.4 :1). Δυστυχώς, οι γνωστές

ενώσεις δεν αναφέρονται πάντα, με αποτέλεσμα οι γνώσεις μας να μην είναι απολύτως ακριβείς σε σχέση με τα πραγματικά αποτελέσματα (Bugni 2003).

1.3.4. Βιοδραστικοί δευτερογενείς μεταβολίτες από μύκητες θαλάσσιας προέλευσης

Συνολικά, οι θαλάσσιοι μύκητες αποτελούν πηγή σημαντικής χημικής ποικιλομορφίας και το γεγονός αυτό υποστηρίζεται από τις περίπου 1000 νέες ενώσεις που έχουν απομονωθεί και περιγραφεί τα τελευταία χρόνια. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 7, η έρευνα για τους θαλάσσιους μύκητες άνθισε στη δεκαετία του 1990, και κυρίως από το 1998 και μετά. Παρά το γεγονός ότι ο ετήσιος αριθμός των καταγεγραμμένων νέων ενώσεων ήταν υψηλότερος το 1998 και το 2000, η γενική τάση δείχνει ότι ο αριθμός των νέων μεταβολιτών βρίσκεται ακόμα σε αυξητική πορεία.

Οι βιολογικές δράσεις τους είναι κυρίως η αντιβιοτική και η αντικαρκινική. Άλλες δράσεις που έχουν παρατηρηθεί είναι η αντιική, η αντιοξειδωτική, η αντιβακτηριακή και η αντιπαρασιτική.



Εικόνα 7. Αριθμός νέων καταγεγραμμένων ενώσεων ετησίως (Bugni 2003).

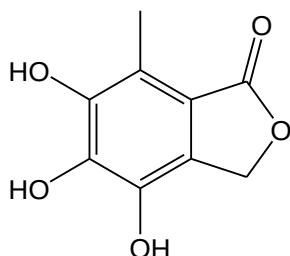
Οι θαλάσσιοι μύκητες έχουν πρόσφατα χρησιμοποιηθεί ως μία νέα πηγή νέων βιοδραστικών δευτερογενών μεταβολιτών. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν εκείνοι, οι οποίοι συνδέονται με μακροοργανισμούς, όπως φύκη και σπόγγοι. Τα περισσότερα

είδη μακροοργανισμών (φύκη, σπόγγοι, κοράλλια, ψάρια, κ.α.) έχουν εκτενώς ερευνηθεί για την περιεκτικότητά τους σε φυσικά προϊόντα. Αυτοί οι μακροοργανισμοί έχουν επίσης χρησιμεύσει ως ξενιστές για μικροοργανισμούς και έχουν πρόσφατα θεωρηθεί ως μία σημαντική πηγή φυσικών προϊόντων (König *et al.* 1996, Abdel-Lateff *et al.* 2003).

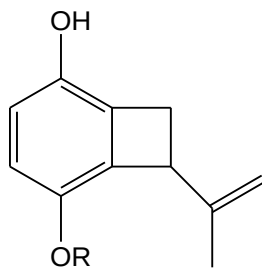
Χημικά το μεγαλύτερο ποσοστό δευτερογενών μεταβολιτών που απομονώνονται από θαλάσσιους μύκητες ανήκουν στις ακόλουθες ομάδες:

- **Πολυκετίδια**

Ο μύκητας *Epicoccum* sp. που απομονώθηκε από το φαιοφύκος *Fucus vesiculosus* απέδωσε ως μεταβολίτη την ισοβενζοφουρανόνη ericoccone (Saleem *et al.* 2007).



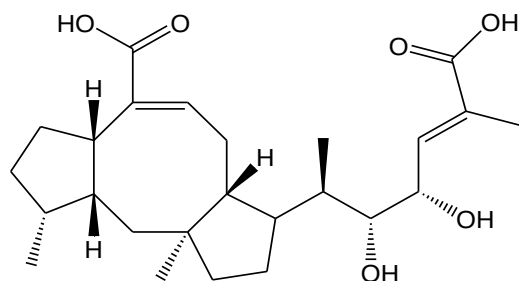
Επίσης, ένα άλλο παράδειγμα θαλάσσιου μύκητα είναι ο *Acremonium* sp., ο οποίος απέδωσε δύο νέα παράγωγα υδροκινόνης (7-ισοπροπενυλδίκυκλο[4.2.0]οκτα-1,3,5-τριεν-2,5-διόλη [1] και 7-ισοπροπενυλδίκυκλο[4.2.0]οκτα-1,3,5-τριεν-2,5-διόλη-5-β-D-γλυκοκυρανοσίδης [2]).



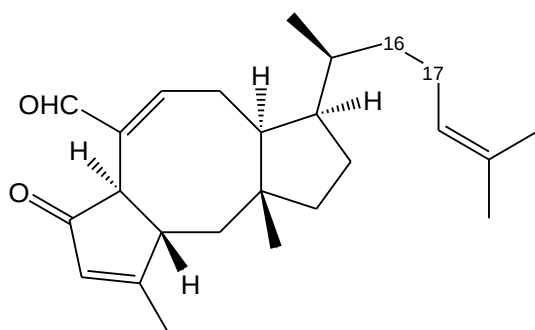
[1]: R=H, [2]: R=Glc

- **Τερπένια**

Από τον θαλάσσιο μύκητα *Halorosellinia oceanica* απομονώθηκε ένα σεστερτερπένιο (halorosellinic acid), το οποίο σύμφωνα με μελέτες έδειξε σημαντική αντιβακτηριακή δράση (Chinworrungsee *et al.* 2001).



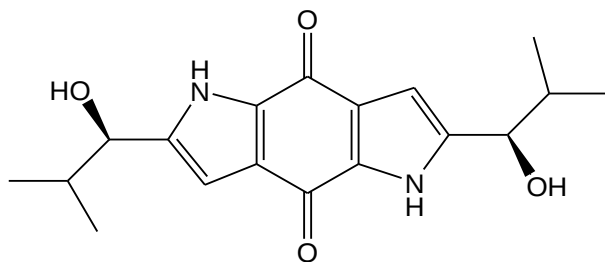
Επίσης, τα σεστερτερπένια 6-*epi*-orhiobolin G και 6-*epi*-orhiobolin N, που απομονώθηκαν από τον μύκητα *Emericella varicolor*, παρουσίασαν σημαντική κυτταροτοξική δράση (Wei *et al.* 2005).



6-*epi*-orhiobolin N: Δ^{16}

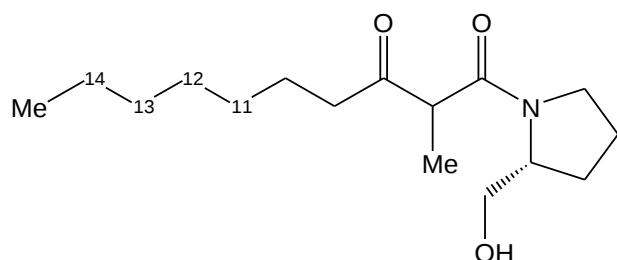
- **Αλκαλοειδή**

Ένα παράγωγο διπυρρολοβενζοκινόνης (terreusinone) απομονώθηκε από τον θαλάσσιο μύκητα *Aspergillus terreus* (Lee *et al.* 2003).



Επίσης, τρία αλκαλοειδή πυρρολιδίνης (scalusamides A–C) απομονώθηκαν από τον μύκητα *Penicillium citrinum*, ο οποίος βρέθηκε στο γαστρεντερικό σύστημα ενός ψαριού. Ύστερα από έρευνα βρέθηκε πως ο μεταβολίτης scalusamide A εμφανίζει ισχυρή αντιμυκητιασική δράση έναντι του *Cryptococcus neoformans* και αντιβακτηριακή δράση

έναντι του *Micrococcus luteus* (Saleem *et al.* 2007).



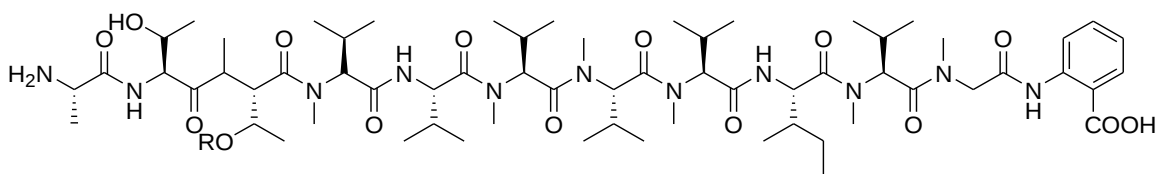
Scalusamide A: Δ^{13}

Scalusamide B: Δ^{11}

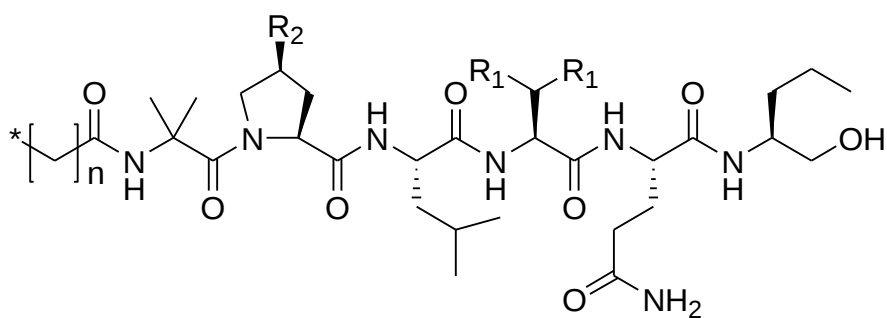
Scalusamide C: -

• Πεπτίδια

Δύο δωδεκαπεπτίδια ευθείας αλυσίδας (dictyonamides A και B) απομονώθηκαν από θαλάσσιο μύκητα που βρέθηκε στο ροδοφύκος *Ceratodictyon spongiosum*. Συγκεκριμένα ο μεταβολίτης dictyonamide A βρέθηκε ότι αναστέλλει την κινάση 4 (Komatsu *et al.* 2000).



Επίσης, τα πεπτίδια halonirs A-E που απομονώθηκαν από μύκητα του γένους *Scytalidium* αποδείχθηκε πως είναι ισχυροί in vitro αναστολείς του ιού του έρπητα 1 και 2 (Rowley *et al.* 2003).



A: $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{OH}$, $n = 12$

B: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$, $n = 12$

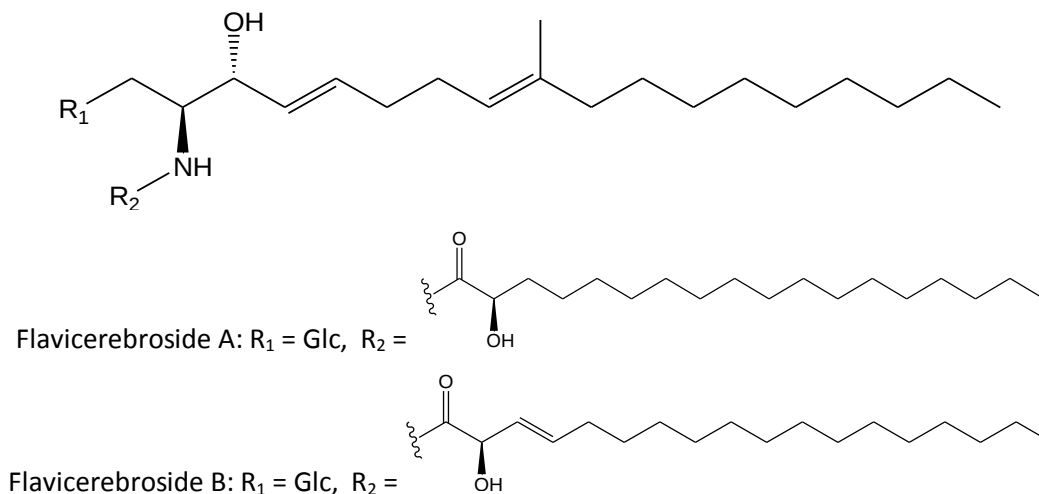
C: $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{H}$, $n = 12$

D: $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{OH}$, $n = 10$

E: $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{H}$, $n = 10$

- **Παράγωγα λιπαρών οξέων**

Οι μεταβολίτες flavicerebroside A και B που απομονώθηκαν από τον θαλάσσιο μύκητα *Aspergillus flavipes*, εμφάνισαν κυτταροτοξική δράση έναντι της KB κυτταρικής σειράς (Saleem *et al.* 2007).



Στη συνέχεια, το ενδιαφέρον εστιάζεται στους δευτερογενείς μεταβολίτες μυκήτων που προέρχονται από φύκη και σπόγγους, καθώς αυτές οι δύο κατηγορίες μονοπωλούν το ενδιαφέρον των ερευνητών τα τελευταία χρόνια λόγω των σημαντικών αποτελεσμάτων που έχουν αποφέρει.

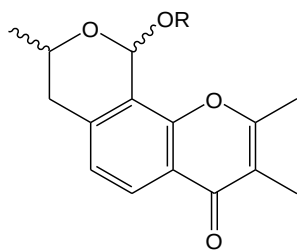
Δευτερογενείς μεταβολίτες μυκήτων προερχόμενων από σπόγγους

Οι μύκητες που ζουν συμβιωτικά με σπόγγους παράγουν δραστικούς μεταβολίτες, οι οποίοι θεωρούνται ως μηχανισμοί άμυνας για την προστασία του οργανισμού από τους περιβαλλοντικούς κινδύνους. Η συσχέτιση σπόγγου και μικροοργανισμού κατά πάσα πιθανότητα χρονολογείται 500 εκατομμύρια χρόνια πριν. Η σχέση μεταξύ των θαλάσσιων ασπόνδυλων (σπόγγοι) και των θαλάσσιων μικροοργανισμών (μύκητες ή βακτήρια) μπορεί να είναι πολύπλευρη. Ο σπόγγος μπορεί να χρησιμεύσει ως μέσο τροφής για τον μύκητα ή απλά ο μύκητας να ζει στο εσωτερικό του. Παρ' όλα αυτά, η ακριβής σχέση μεταξύ σπόγγων-ξενιστών και μυκήτων είναι ακόμη άγνωστη, όπως επίσης και το αν ο μύκητας είναι υποχρεωτικά ή προαιρετικά θαλάσσιος (Proksch *et al.* 2002, Abdel-Lateff *et al.* 2003).

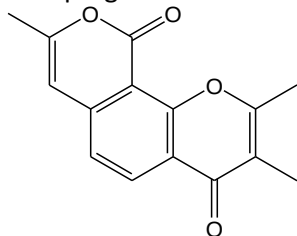
Στον Πίνακα 3 αναφέρονται ενδεικτικά δευτερογενείς μεταβολίτες που απομονώθηκαν από μύκητες προερχόμενους από σπόγγους την περίοδο 1998 – 2002 και στη συνέχεια παρατίθενται οι χημικές δομές τους (Εικ. 8).

Πίνακας 3. Παραδείγματα μεταβολιτών από μύκητες προερχόμενους από σπόγγους (1998-2002).

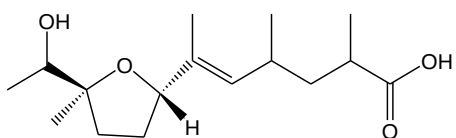
Σπόγγος	Μύκητας	Απομονωμένος Μεταβολίτης
<i>Jaspis cf. coriacea</i>	<i>Paecilomyces cf. javanica</i>	Deoxynortrichoharzin
<i>Haliclona sp.</i>	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Vertinoid polyketides, epoxysorbicillinol
<i>Halodule wrightii</i>	<i>Fusarium sp.</i>	Sansalvamide
<i>Hyrtilios proteus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Asperic acid, hexylitaconic acid, malformin C, pyrophen, asperazine
<i>Mytilus coruscus</i>	<i>Penicillium sp.</i>	Sculezonones A and B
<i>Callyspongia aerizusa</i>	<i>Drechslera hawaiiensis</i>	Spiciferones A and B, Spiciferol A
<i>Mytilus coruscus</i>	<i>Penicillium sp.</i>	Coruscol A
<i>Callyspongia aerizusa</i>	<i>Drechslera hawaiiensis</i>	Speciferol A / Butoxyl- spiciferin
	<i>Cladosporium herbarum</i>	Herbarin A and B / Pandangolide 3 and 4 / Acetyl sumiki's acid
<i>Hyrtilios proteus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Asperic acid
<i>Aplysina aerophoba</i>	<i>Microsphaeropsis sp.</i>	10-Hydroxy-18-methoxyl betaenone / 10-Hydroxy-18- N-2-naphthyl-N phenylamino betaenone / three 1,3,6,8- tetrahydroxylanthroquinone congeners
	<i>Hortaea werneckii</i>	Hortein
	<i>Microsphaeropsis sp.</i>	Microsphaerones A and B
<i>Porifera sp.</i>	<i>Emericella variegata</i>	Varitriol / Varioxirane / Dihydroterrein / Varixanthone
<i>Xestospongia exigua</i>	<i>Penicillium cf. montanense</i>	Xestodecalactones A-C
	<i>Aspergillus versicolor</i>	Aspergiones A-F
<i>Niphates olemda</i>	<i>Curvularia lunata</i>	Lunatin



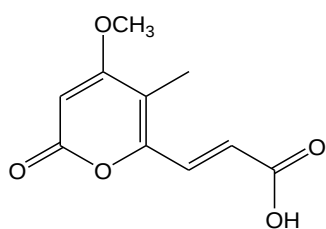
Aspergione A: R = CH₃
Aspergione B: R = H



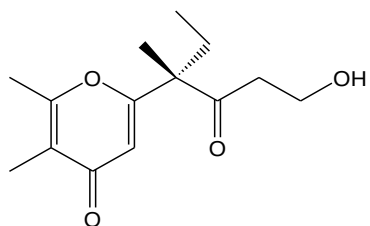
Aspergione D



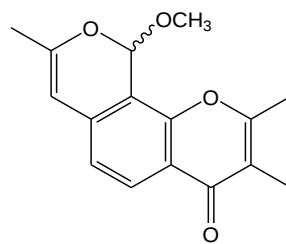
Asperic acid



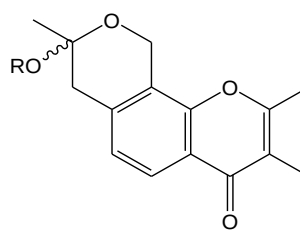
Herbarin B



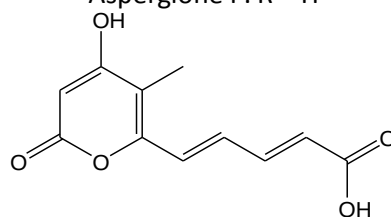
Butoxy-spiciferin



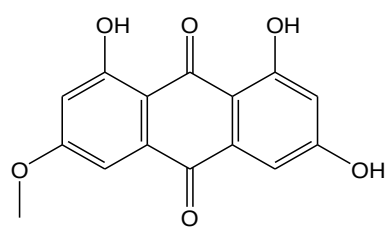
Aspergione C



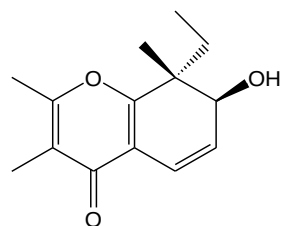
Aspergione E: R = CH₃
Aspergione F: R = H



Herbarin A



Lunatin



Spiciferol A

Εικόνα 8. Χημικές δομές μεταβολιτών από μύκητες προερχόμενους από σπόγγους.

Δευτερογενείς μεταβολίτες μυκήτων προερχόμενων από φύκη

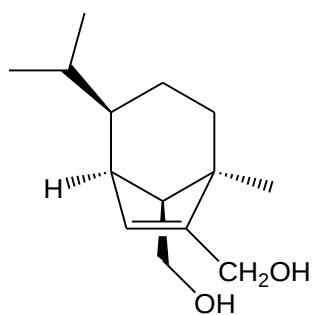
Σχεδόν το ένα τρίτο όλων των γνωστών μυκήτων που έχουν καταγραφεί συνδέονται με φύκη. Οι μύκητες συνήθως περιορίζονται σε συγκεκριμένα φύκη και πιο κυρίως στα χλωροφύκη, στα φαιοφύκη ή στα ροδοφύκη. Αν και οι πρώτες περιγραφές των μυκήτων που προέρχονταν από φύκη εμφανίστηκαν στα τέλη του δέκατου ένατου αιώνα, οι περισσότεροι μυκητολόγοι αγνόησαν αυτό το θέμα και επικεντρώθηκαν σε μύκητες που ζούσαν σε ξύλινα υποστρώματα. Η προτίμηση για αυτούς τους μύκητες έναντι εκείνων που ζούσαν σε φύκη μπορεί να εξηγηθεί από την ευκολότερη πρόσβαση σε αυτούς. Επιπρόσθετα, οι θαλάσσιοι αυτοί μύκητες εμφανίζονται με ένα σχετικά σποραδικό τρόπο, ο οποίος μπορεί να εξηγηθεί από τις αντιβιοτικές ουσίες που παράγονται από τα υγιή φύκη π.χ., τανίνες. Τέλος, τεράστιες δυσκολίες συναντώνται κατά την καλλιέργεια φυκών-ξενιστών σε πειράματα λοιμώξεων. Παρ' όλα αυτά, αυτές οι έρευνες είναι απαραίτητες προκειμένου να ερμηνευτεί η ακριβής σχέση μεταξύ ξενιστή και μύκητα, καθώς και να εξακριβωθεί για το αν πρόκειται για συμβιωτικό οργανισμό, παρασιτικό ή σαπροφυτικό (Osterhage *et al.* 2000).

Ο λόγος που η έρευνα των μυκήτων εστιάζεται στους δευτερογενείς μεταβολίτες τους είναι ξεκάθαρος, αν λάβουμε υπόψη πως ένας μύκητας παίζει έναν αλληλοεξαρτώμενο ρόλο με το φύκος, εκκρίνοντας μεταβολίτες που είναι τοξικοί για τους παθογόνους παράγοντες του ξενιστή του (Schulz *et al.* 1995). Οι μύκητες που απομονώνονται από φύκη συχνά ανήκουν σε εκπροσώπους γνωστούς στο χερσαίο περιβάλλον όπως *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. και στο γένος *Acremonium*. Αν και τα περισσότερα από αυτά τα στελέχη μυκήτων δεν είναι υποχρεωτικά θαλάσσια, σχεδόν όλες οι ενώσεις που απομονώνονται από αυτούς τα τελευταία χρόνια παρουσιάζουν νέα χημεία (Osterhage *et al.* 2000).

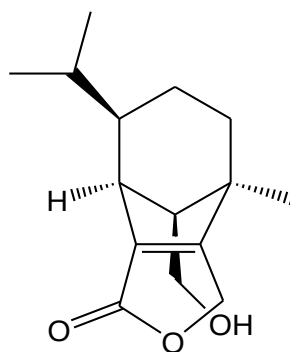
Μία ενδεικτική λίστα μεταβολιτών απομονωμένων από μύκητες που προήλθαν από φύκη βάσει της βιβλιογραφίας από το 1993 έως το 2003 παρέχεται στον Πίνακα 4. Οι χημικές δομές ορισμένων από αυτούς παρατίθενται στη συνέχεια (Εικ. 9-11).

Πίνακας 4. Παραδείγματα μεταβολιτών από μύκητες προερχόμενους από φύκη (1993-2003).

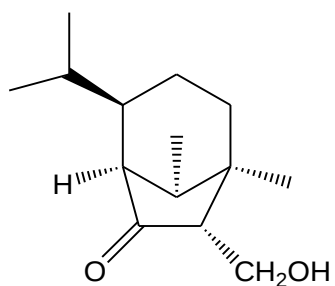
Φύκος	Μύκητας	Απομονωμένος Μεταβολίτης
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	<i>Penicillium</i> sp.	Communesins A & B
<i>Sargassum tortile</i>	<i>Leptosphaeria</i> sp.	Leptosins A-F Leptosins G, G1,G2 & H Leptosins I & J
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	<i>Penicillium</i> sp.	Penochalasin A-C Penostatins A-E Penostatins F-I
<i>Halymenia dilatata</i>	<i>Fusarium</i> sp.	Halymecins A-C
	<i>Acremonium</i> sp.	Halymecins D & E
<i>Ceramium condi</i>	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	two sterols
<i>Penicillus capitatus</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>	4 sesquiterpenoid nitrobenzoyl esters
<i>Sargassum ringgoldianum</i>	<i>Penicillium waksmani</i>	Pyrenocines D, E, pyrenocines A, B, three dioxopiperazine derivatives
<i>Sargassum</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.	Mactanamide
<i>Ceratodictyon spongiosum</i>	KO63	Dictyonamides A & B
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	<i>Penicillium</i> sp.	Penochalasin D-H
<i>Rosenvingea</i> sp.	<i>Pestalotia</i> sp.	Pestalone
<i>Sargassum tortile</i>	<i>Leptosphaeria</i> sp.	Leptosins M, M1, N & N1
<i>Fucus spiralis</i>	<i>Phoma tropica</i>	5-Hydroxyramulosin
<i>Liagora viscida</i>	<i>Drechslera dematioidea</i>	Isosativenetriol, Drechslerines A & B, 9- Hydroxyhelminthosporol, Drechslerines C-G, Sativene epoxide
<i>Carpopeltis cornea</i>	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Parasitenone
<i>Codium fragile</i>	<i>Fusarium</i> sp.	Tetrapeptide JM47
<i>Gracilaria verrucosa</i>	Unidentified	Nb-Acetyltryptamine



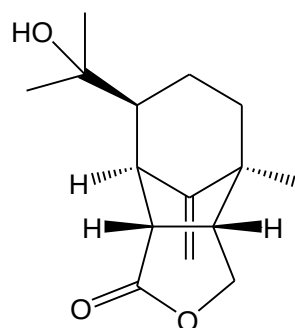
Drechslerine A



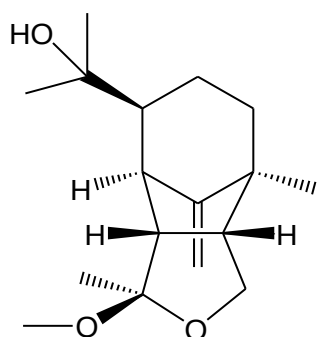
Drechslerine B



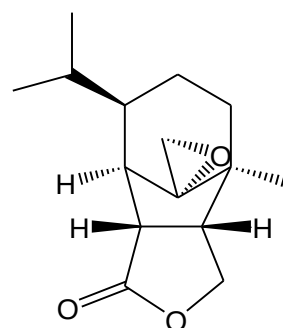
Drechslerine C



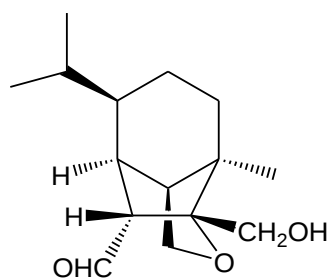
Drechslerine D



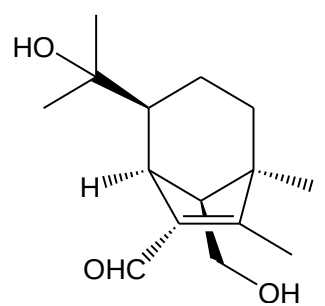
Drechslerine E



Drechslerine F

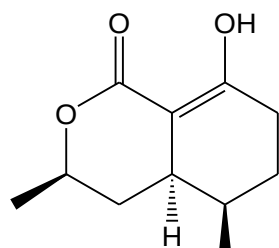


Drechslerine G

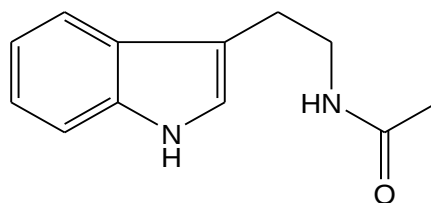


9-Hydroxyhelminthosporol

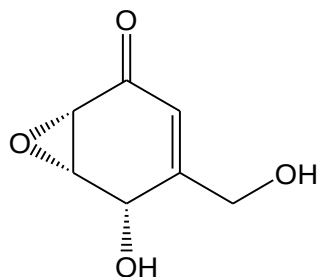
Εικόνα 9. Χημικές δομές μεταβολιτών από μύκητες προερχόμενους από φύκη.



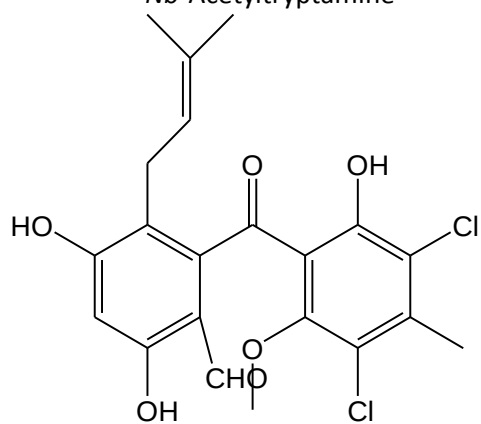
5-Hydroxyramulosin



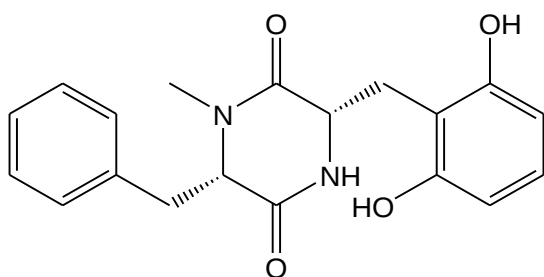
Nb-Acetyltryptamine



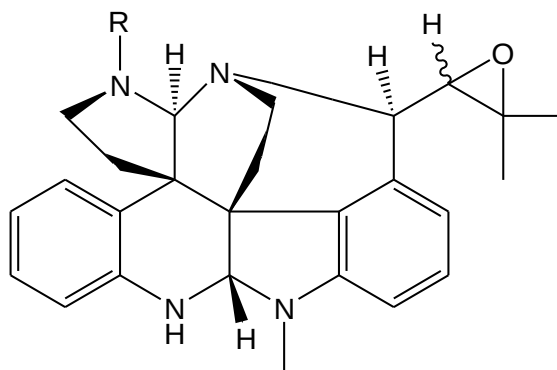
Parasitenone



Pestalone

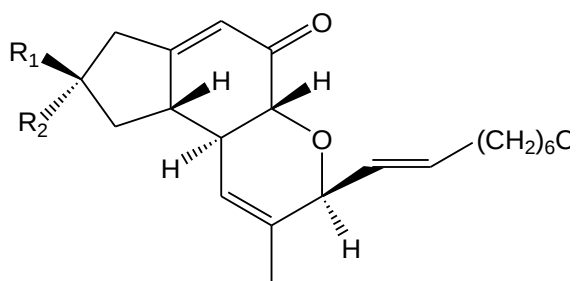


Mactanamide



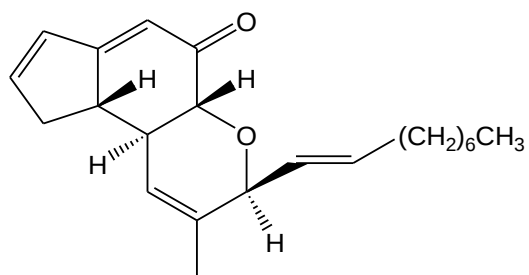
Communesin A: R = COCH₃
Communesin B: R = COCH=CHCH=CHCH₃ (trans-trans)

Εικόνα 10. Χημικές δομές μεταβολιτών από μύκητες προερχόμενους από φύκη.

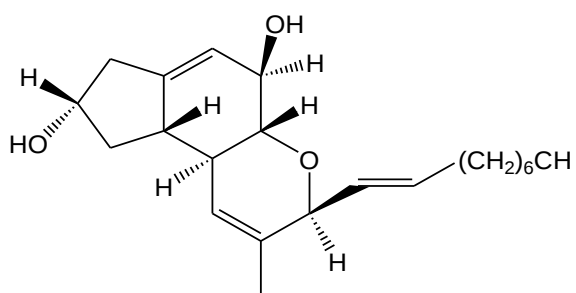


Penostatin A: R1 = OH, R2 = H

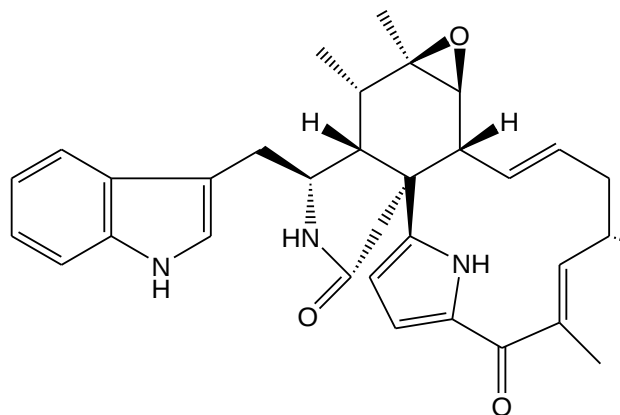
Penostatin B: R1 = H, R2 = OH



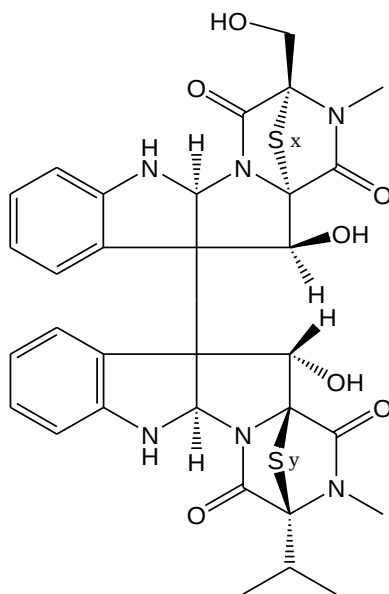
Penostatin C



Penostatin D



Penochalasin A



Leptosin A: x = 4, y = 2

Leptosin B: x = 3, y = 2

Leptosin C: x = 2, y = 2

Εικόνα 11. Χημικές δομές μεταβολιτών από μύκητες προερχόμενους από φύκη.

1.4. Σκοπός της μελέτης

Απώτερος στόχος της έρευνας που σχετίζεται με τη χημεία φυσικών προϊόντων είναι η απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών, οι οποίοι θα παρουσιάζουν βιολογική δράση ή κάποια άλλη αξιόλογη εφαρμογή.

Σε αυτή την κατεύθυνση, επιλέχθηκαν προς μελέτη δύο μυκητιακά στελέχη θαλάσσιας προέλευσης. Το βασικό κριτήριο για την επιλογή των συγκεκριμένων στελεχών ήταν το πολύ ενδιαφέρον χημικό προφίλ που παρουσίασαν τα οργανικά εκχυλίσματα που προέκυψαν από την καλλιέργεια τους σε μικρή κλίμακα σε προκαταρκτικό έλεγχο με φασματοσκοπία ^1H NMR, καθώς και με χρωματογραφία HPLC.

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 , εκτός και αν αναφέρεται διαφορετικά. 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 ή σε φασματογράφο μάζας Thermo Electron Corporation DSQ με μέθοδο ιονισμού τον βομβαρδισμό με δέσμη ηλεκτρονίων (EIMS).

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί HPLC πραγματοποιήθηκαν σε χρωματογράφο Waters 600 με διπλή αντλία εισαγωγής του συστήματος διαλυτών και ανιχνευτή RI Waters 410 ή σε χρωματογράφο Pharmacia LKB HPLC με μονή αντλία εισαγωγής του συστήματος διαλυτών και ανιχνευτή RI-102 Shodex.

Οι στήλες που χρησιμοποιήθηκαν στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς HPLC ήταν οι ακόλουθες: (i) στήλη κανονικής φάσης διαστάσεων 25 cm x 10 mm (Grace, Econoshpere Silica, 10 μ) και (ii) στήλη αντίστροφης φάσης διαστάσεων 25 cm x 8 mm (Kromasil 100 C18, 5 μ m).

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-200 σε θερμοκρασία έως 38°C.

Η αποστείρωση των θρεπτικών μέσων και των απαραίτητων μεταλλικών ή υάλινων σκευών έγινε σε συσκευή αποστείρωσης τύπου Raypa Steam Sterilizer AES-75 ή Raypa Steam Sterilizer AES-150 για 20 min στους 121°C.

Η επώαση των τρυβλίων με τις στερεές καλλιέργειες των μυκητιακών στελεχών έγινε σε επωαστικό κλίβανο τύπου Nüve incubator EN 120.

Η ανάδευση των υγρών καλλιεργειών των μυκητιακών στελεχών έγινε σε

περιστροφικό αναδευτήρα δαπέδου τύπου Zhicheng ZHWY-3222 στα 125 rpm.

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 μM) της εταιρείας Merck.

Οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί εκχύλισης στερεής φάσης πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας προκατασκευασμένες στήλες γέλης πυριτίου κανονικής (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/ UV_{254} (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% H_2SO_4 σε MeOH και θέρμανση της πλάκας στους 100°C για περίπου 2 min.

Οι διαλύτες cHex, EtOAc, CH_2Cl_2 και MeOH ήταν καθαρότητας A.R. της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences, οι οποίοι πριν από τη χρήση τους αποστάχθηκαν. Ο διαλύτης Me_2CO ήταν καθαρότητας A.R. της εταιρείας LAB-SCAN Analytical Sciences. Ο διαλύτης MeCN 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 CDCl_3 χωρίς εσωτερικό πρότυπο της εταιρείας Aldrich-Sigma Chemical Company.

Το H_2O που χρησιμοποιήθηκε ήταν απεσταγμένο που στη συνέχεια διηθήθηκε μέσω συστήματος ρητινών.

2.3. Απομόνωση και καλλιέργεια των επιλεγμένων μυκητιακών στελεχών

Τα μυκητιακά στελέχη FI0013 και FI0107, τα οποία μελετήθηκαν στη παρούσα εργασία, αποτελούν ενδοφυτικά στελέχη θαλάσσιων μακροοργανισμών. Συγκεκριμένα, το στέλεχος FI0013 απομονώθηκε από δείγμα του ροδοφύκου *Laurencia* sp. που συλλέχθηκε στη περιοχή Σκάλα στα Βιγκλάφια Λακωνίας τον Μάρτιο του 2013, ενώ το στέλεχος FI0107 απομονώθηκε από δείγμα του σπόγγου *Ircinia variabilis* που συλλέχθηκε στον Αγ. Φωκά της Τήνου τον Ιούνιο του 2013.

Και στις δύο περιπτώσεις, νωπά δείγματα των μακροοργανισμών μεταφέρθηκαν άμεσα στο Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας του ΕΚΠΑ με θαλασσινό νερό εντός αποστειρωμένου δοχείου μίας χρήσης. Η απομόνωση των μυκητιακών στελεχών έγινε με τη μέθοδο της έμμεσης απομόνωσης. Συνοπτικά, μετά την αποστείρωση της εξωτερικής επιφάνειας του μακροοργανισμού με διάλυμα 70% EtOH για 15–30 s και έκπλυση με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό, ο ιστός του μακροοργανισμού τεμαχίστηκε ασηπτικά σε μικρά κομμάτια, τα οποία τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια τρυβλίων με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα PDA (20 g D-γλυκόζη, 4 g εκχύλισμα πατάτας και 15 g άγαρ σε 1 L αποστειρωμένο νερό). Τα τρυβλία επωάστηκαν σε επωαστικό κλίβανο στους 27°C για 30 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 PDA με σκοπό τη δημιουργία αμιγών καλλιεργειών. Για τη μακροχρόνια συντήρηση των μυκητιακών στελεχών δημιουργήθηκαν stock γλυκερόλης 50% σε erpedorfs, τα οποία διατηρούνται στους -80 °C.

Για την απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών που παράγουν τα δύο μυκητιακά στελέχη, αυτά υποβλήθηκαν σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας σε υγρό θρεπτικό μέσο YPG (10 g D-γλυκόζη, 5 g εκχύλισμα ζύμης και 5 g πεπτόνη σε 1 L αποστειρωμένο θαλασσινό νερό).

Για το στέλεχος FI0013 (Εικ. 12) πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια συνολικού όγκου 10 L (σε 10 κωνικές φιάλες όγκου 2 L με 1 L θρεπτικό μέσο στη κάθε μία) στους 30 °C για 9 ημέρες υπό συνεχή ανάδευση σε περιστροφικό αναδευτήρα. Μετά το πέρας της

περιόδου επώασης, η υγρή καλλιέργεια διηθήθηκε για την απομάκρυνση των μυκηλίων. Το διήθημα εκχυλίστηκε με EtOAc και ακολούθησε διαχωρισμός των δύο φάσεων σε διαχωριστική χοάνη, οπότε και συλλέχθηκε η οργανική στοιβάδα. Η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές. Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα συνενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν υπό κενό, οπότε και παρελήφθη το αρχικό υπόλειμμα κίτρινου χρώματος και ελαιώδους υφής, μάζας 4.25 g.



Εικόνα 12. Καλλιέργεια του μυκητιακού στελέχους FI0013 σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα PDA.

Για το στέλεχος FI0107 (Εικ. 13) πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια συνολικού όγκου 3 L (σε 10 κωνικές φιάλες όγκου 1 L με 300 mL θρεπτικό μέσο στη κάθε μία) στους 27 °C για 10 ημέρες υπό συνεχή ανάδευση σε περιστροφικό αναδευτήρα. Μετά το πέρας της περιόδου επώασης, η υγρή καλλιέργεια διηθήθηκε για την απομάκρυνση των μυκηλίων. Το διήθημα εκχυλίστηκε με EtOAc και ακολούθησε διαχωρισμός των δύο φάσεων σε διαχωριστική χοάνη, οπότε και συλλέχθηκε η οργανική στοιβάδα. Η διαδικασία επαναλήφθηκε άλλες δύο φορές. Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα συνενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν υπό κενό, οπότε και παρελήφθη το αρχικό υπόλειμμα κίτρινου χρώματος και ελαιώδους υφής, μάζας 1.27 g.

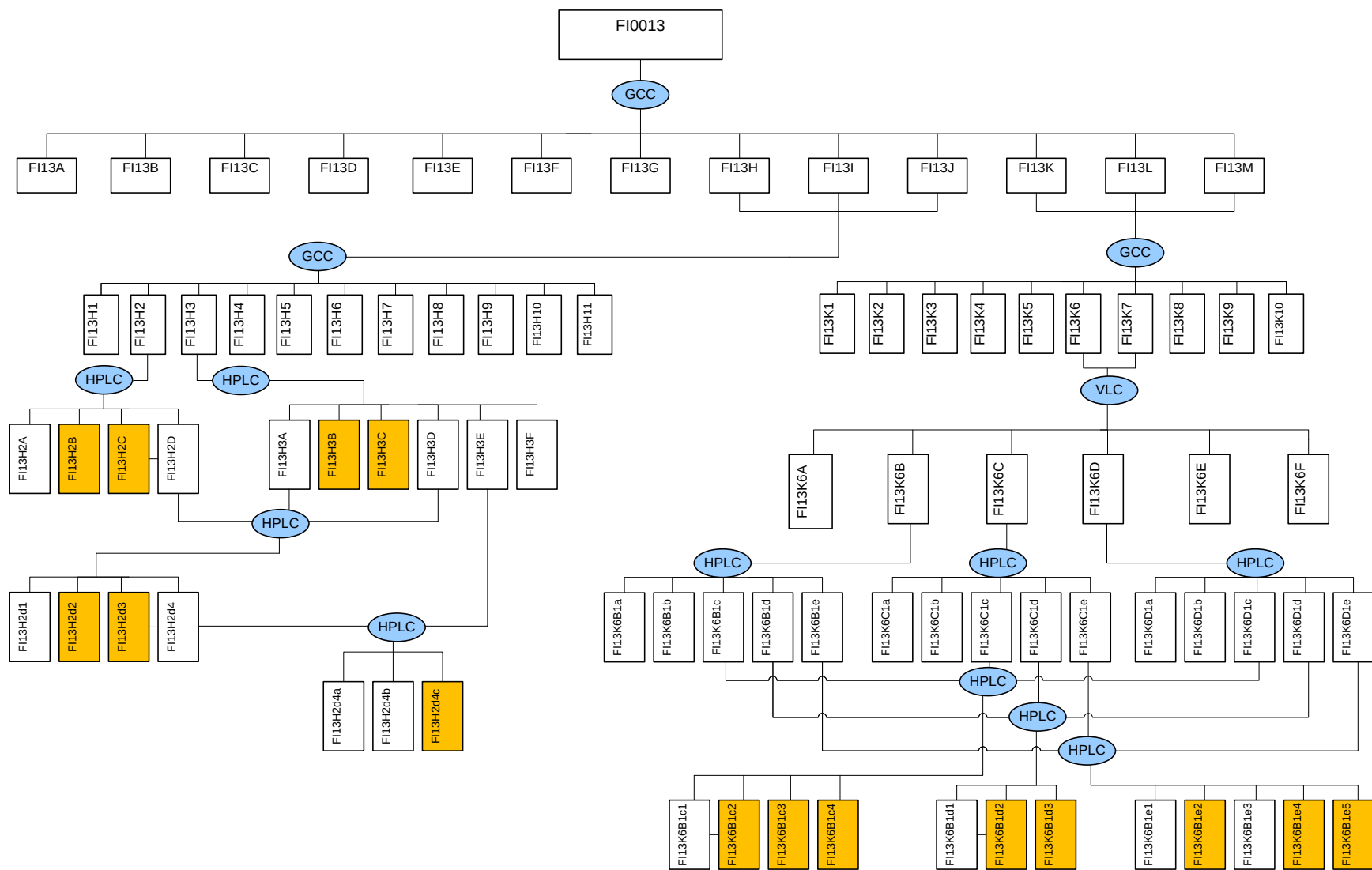


Εικόνα 13. Καλλιέργεια του μυκητιακού στελέχους FI0107 σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα PDA.

Τα δύο υπολείμματα ελέγχθηκαν με φασματοσκοπία ^1H NMR και χρωματογραφία TLC και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς των χημικών συστατικών τους με χρήση υγρής χρωματογραφίας υπό κενό (VLC), υγρής χρωματογραφίας βαρύτητας (GCC), εκχύλισης στερεής φάσης (SPE) και υγρής χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC).

2.4. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το μυκητιακό στέλεχος FI0013

Η πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών από το αρχικό υπόλειμμα της καλλιέργειας του μυκητιακού στελέχους FI0013 φαίνεται διαγραμματικά στην Εικόνα 14, ενώ στη συνέχεια περιγράφονται αναλυτικά τα στάδια του χρωματογραφικού διαχωρισμού.



Εικόνα 14. Η πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών από το αρχικό υπόλειμμα της καλλιέργειας του μυκητιακού στελέχους FI0013.

Το αρχικό υπόλειμμα (4.25 g) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία βαρύτητας σε στήλη γέλης πυριτίου κανονικής φάσης. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούταν από μίγματα cHex/EtOAc και EtOAc/MeOH σε συστήματα αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν συνολικά 96 κλάσματα (Πίν. 5), τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC. Τα κλάσματα που εμφάνισαν παρόμοια χρωματογραφικά χαρακτηριστικά συνενώθηκαν, οπότε τελικά προέκυψαν 13 κλάσματα (Πίν. 6), τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR.

Πίνακας 5. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	ΟΓΚΟΣ (mL)
1-7	cHex/EtOAc (80:20)	250
8-17	cHex/EtOAc (70:30)	250
18-26	cHex/EtOAc (60:40)	250
27-37	cHex/EtOAc (50:50)	250
38-51	cHex/EtOAc (40:60)	250
52-63	cHex/EtOAc (30:70)	250
64-75	cHex/EtOAc (20:80)	250
76-80	cHex/EtOAc (10:90)	100
81-85	EtOAc (100%)	100
86-88	EtOAc/MeOH (90:10)	250
89-90	EtOAc/MeOH (75:25)	250
91-96	MeOH (100%)	700

Πίνακας 6. Κλάσματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΣΥΝΕΝΩΜΕΝΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΜΑΖΑ (mg)
FI13A	1-11	28.0
FI13B	12-20	19.5
FI13C	21-23	4.7
FI13D	24-27	60.1
FI13E	28-44	191.3
FI13F	45-51	15.2
FI13G	52-62	11.8
FI13H	63-80	544.6
FI13I	81-85	75.9
FI13J	86-90	96.6
FI13K	91-92	272.0
FI13L	93-94	886.0
FI13M	95-96	569.0

Τα υπολείμματα FI13H, FI13I και FI13J συνενώθηκαν (717.1 mg) και υποβλήθηκαν σε υγρή χρωματογραφία βαρύτητας σε στήλη γέλης πυριτίου κανονικής φάσης. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούταν από μίγματα cHex/EtOAc και EtOAc/MeOH σε συστήματα αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν συνολικά 102 κλάσματα (Πίν. 7), τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC. Τα κλάσματα που εμφάνισαν παρόμοια χρωματογραφικά χαρακτηριστικά συνενώθηκαν, οπότε τελικά προέκυψαν 11 κλάσματα (Πίν. 8), τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR.

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

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	ΟΓΚΟΣ (mL)
1-66	cHex/EtOAc (60:40)	1400
67-74	cHex/EtOAc (50:50)	200
75-82	cHex/EtOAc (40:60)	200
83-89	cHex/EtOAc (30:70)	100
90-91	cHex/EtOAc (20:80)	100
92-93	cHex/EtOAc (10:90)	100
94-95	EtOAc (100%)	100
96-97	EtOAc/MeOH (90:10)	100
98-99	EtOAc/MeOH (75:25)	100
100-102	MeOH (100%)	200

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

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΣΥΝΕΝΩΜΕΝΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΜΑΖΑ (mg)
FI13H1	1-22	11.1
FI13H2	23-32	308.1
FI13H3	33-46	88.2
FI13H4	47-59	12.1
FI13H5	60-72	5.8
FI13H6	73-83	3.7
FI13H7	84-89	2.1
FI13H8	90-93	3.2
FI13H9	94-97	5.7
FI13H10	98-99	2.6
FI13H11	100-102	41.0

Το υπόλειμμα FI13H2 (308.1 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με ισοκρατικό σύστημα cHex/EtOAc (60:40) ως διαλύτη έκλουσης. Παρελήφθησαν 4 κλάσματα συνολικά, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα

κλάσματα FI13H2b και FI13H2c ήταν καθαρές ουσίες (FI0013-9 και FI0013-10, αντίστοιχα) (Πίν. 9).

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

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
Στήλη	Econosphere Silica 10u, 250 mm × 10 mm
Διαλύτης Έκλουσης	cHex/EtOAc (60:40)
Ροή Έκλουσης	1.75 mL/min
Ανιχνευτής	RI

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
FI13H2a	3.1	7.24
FI13H2b	2.5	19.62
FI13H2c	91.4	24.15
FI13H2d	34.7	27.48

Το υπόλειμμα FI13H3 (88.2 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με ισοκρατικό σύστημα cHex/EtOAc (60:40) ως διαλύτη έκλουσης. Παρελήφθησαν 6 κλάσματα συνολικά, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα FI13H3b και FI13H3c ήταν καθαρές ουσίες (FI0013-9 και FI0013-10, αντίστοιχα) (Πίν. 10).

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

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
Στήλη	Econosphere Silica 10u, 250 mm × 10 mm
Διαλύτης Έκλουσης	cHex/EtOAc (60:40)
Ροή Έκλουσης	1.75 mL/min
Ανιχνευτής	RI

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
FI13H3a	5.8	7.34
FI13H3b	0.6	20.95
FI13H3c	10.4	25.85
FI13H3d	4.9	28.30
FI13H3e	1.6	29.20
FI13H3f	1.8	34.71

Τα υπολείμματα FI13H2d και FI13H3d, τα οποία παρουσίασαν παρόμοια φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά, συνενώθηκαν (39.6 mg) και υποβλήθηκαν σε HPLC με ισοκρατικό σύστημα cHex/EtOAc (60:40) ως διαλύτη έκλουσης. Παρελήφθησαν 4 κλάσματα συνολικά, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα FI13H2d2 και FI13H2d3 ήταν καθαρές ουσίες (FI0013-10 και FI0013-11, αντίστοιχα) (Πίν. 11).

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

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
Στήλη	Econosphere Silica 10u, 250 mm × 10 mm
Διαλύτης Έκλουσης	cHex/EtOAc (60:40)
Ροή Έκλουσης	1.75 mL/min
Ανιχνευτής	RI

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
FI13H2d1	0.5	7.66
FI13H2d2	2.4	25.25
FI13H2d3	13.0	26.28
FI13H2d4	3.9	29.60

Τα υπολείμματα FI13H2d4 και FI13H3e, τα οποία παρουσίασαν παρόμοια φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά, συνενώθηκαν (5.5 mg) και υποβλήθηκαν σε HPLC με ισοκρατικό σύστημα cHex/Me₂CO (70:30) ως διαλύτη έκλουσης. Παρελήφθησαν 3 κλάσματα συνολικά, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα FI13H2d4c ήταν καθαρή ουσία (FI0013-12) (Πίν. 12).

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

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
Στήλη	Econosphere Silica 10u, 250 mm × 10 mm
Διαλύτης Έκλουσης	cHex/Me ₂ CO (70:30)
Ροή Έκλουσης	1.75 mL/min
Ανιχνευτής	RI

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
FI13H2d4a	1.2	7.53
FI13H2d4b	1.6	14.66
FI13H2d4c	2.0	15.91

Τα υπολείμματα FI13K, FI13L και FI13M συνενώθηκαν (1.73 g) και υποβλήθηκαν σε υγρή χρωματογραφία βαρύτητας σε στήλη γέλης πυριτίου κανονικής φάσης. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούταν από μίγματα EtOAc/MeOH σε συστήματα αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν συνολικά 104 κλάσματα (Πίν. 13), τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC. Τα κλάσματα που εμφάνισαν παρόμοια χρωματογραφικά χαρακτηριστικά συνενώθηκαν, οπότε τελικά προέκυψαν 10 κλάσματα (Πίν. 14), τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR.

Πίνακας 13. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	ΟΓΚΟΣ (mL)
1-40	EtOAc/MeOH (99:1)	800
41-50	EtOAc/MeOH (98:2)	200
51-60	EtOAc/MeOH (95:5)	200
61-70	EtOAc/MeOH (90:10)	200
71-80	EtOAc/MeOH (80:20)	200
81-90	EtOAc/MeOH (70:30)	200
91-99	EtOAc/MeOH (50:50)	200
100-104	MeOH (100%)	400

Πίνακας 14. Κλάσματα που προέκυψαν μετά από συνένωση και οι μάζες αυτών.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΣΥΝΕΝΩΜΕΝΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΜΑΖΑ (mg)
FI13K1	1-9	8.4
FI13K2	10-12	7.0
FI13K3	13-18	31.0
FI13K4	19-24	39.9
FI13K5	25-30	28.9
FI13K6	31-66	235.0
FI13K7	67-78	81.4
FI13K8	79-87	203.5
FI13K9	88-99	383.8
FI13K10	100-104	462.0

Τα υπολείμματα FI13K6 και FI13K7, τα οποία παρουσίασαν παρόμοια φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά, συνενώθηκαν (316.4 mg) και υποβλήθηκαν σε υγρή χρωματογραφία με υποβοήθηση κενού, έχοντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου αντίστροφης φάσης (C₁₈) και ως κινητή φάση διαλύτες μειούμενης πολικότητας από 100% H₂O μέχρι 100% MeOH. Παρελήφθησαν συνολικά 6 κλάσματα (Πίν. 15), τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC και φασματοσκοπικά με ¹H NMR.

Πίνακας 15. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης και οι μάζες αυτών.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	ΟΓΚΟΣ (mL)	ΜΑΖΑ (mg)
FI13K6A	H ₂ O (100%)	100	193.4
FI13K6B	H ₂ O/MeOH (80:20)	100	17.2
FI13K6C	H ₂ O/MeOH (60:40)	100	9.1
FI13K6D	H ₂ O/MeOH (40:60)	100	10.7
FI13K6E	H ₂ O/MeOH (20:80)	100	17.5
FI13K6F	MeOH (100%)	100	22.9

Το υπόλειμμα FI13K6B (17.2 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με ισοκρατικό σύστημα H₂O/MeOH (30:70) ως διαλύτη έκλουσης. Παρελήφθησαν 5 κλάσματα συνολικά, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 16).

Πίνακας 16. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
Στήλη	Kromasil 100 C18 5u, 250 mm × 8 mm
Διαλύτης Έκλουσης	H ₂ O/MeOH (30:70)
Ροή Έκλουσης	1.50 mL/min
Ανιχνευτής	RI

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
FI13K6D1a	1.6	6.42
FI13K6D1b	0.3	8.35
FI13K6D1c	1.3	10.03
FI13K6D1d	0.6	11.92
FI13K6D1e	2.0	14.64

Το υπόλειμμα FI13K6C (9.1 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με ισοκρατικό σύστημα H₂O/MeOH (30:70) ως διαλύτη έκλουσης. Παρελήφθησαν 5 κλάσματα συνολικά, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 17).

Πίνακας 17. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
Στήλη	Kromasil 100 C18 5u, 250 mm × 8 mm
Διαλύτης Έκλουσης	H ₂ O/MeOH (30:70)
Ροή Έκλουσης	1.50 mL/min
Ανιχνευτής	RI

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
FI13K6C1a	1.0	6.45
FI13K6C1b	0.9	8.48
FI13K6C1c	1.6	10.04
FI13K6C1d	1.0	12.12
FI13K6C1e	1.2	14.80

Το υπόλειμμα FI13K6D (10.7 mg) υποβλήθηκε σε HPLC με ισοκρατικό σύστημα H₂O/MeOH (30:70) ως διαλύτη έκλουσης. Παρελήφθησαν 5 κλάσματα συνολικά, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR (Πίν. 18).

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

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
Στήλη	Kromasil 100 C18 5u, 250 mm × 8 mm
Διαλύτης Έκλουσης	H ₂ O/MeOH (30:70)
Ροή Έκλουσης	1.50 mL/min
Ανιχνευτής	RI

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
FI13K6B1a	1.1	6.35
FI13K6B1b	1.9	8.20
FI13K6B1c	4.7	9.25
FI13K6B1d	2.0	10.68
FI13K6B1e	2.3	12.10

Τα υπολείμματα FI13K6B1c, FI13K6C1c και FI13K6D1c, τα οποία παρουσίασαν παρόμοια φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά, συνενώθηκαν (7.6 mg) και υποβλήθηκαν σε HPLC με ισοκρατικό σύστημα H₂O/MeCN (70:30) ως διαλύτη έκλουσης. Παρελήφθησαν 4 κλάσματα συνολικά, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα FI13K6B1c2, FI13K6B1c3 και FI13K6B1c4 ήταν καθαρές ουσίες (FI0013-1, FI0013-2 και FI0013-3, αντίστοιχα) (Πίν. 19).

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

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
Στήλη	Kromasil 100 C18 5u, 250 mm × 8 mm
Διαλύτης Έκλουσης	H ₂ O/MeCN (70:30)
Ροή Έκλουσης	1.50 mL/min
Ανιχνευτής	RI

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
FI13K6B1c1	0.2	9.19
FI13K6B1c2	1.4	12.67
FI13K6B1c3	4.5	14.23
FI13K6B1c4	1.5	15.82

Τα υπολείμματα FI13K6B1d, FI13K6C1d και FI13K6D1d, τα οποία παρουσίασαν παρόμοια φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά, συνενώθηκαν (3.6 mg) και υποβλήθηκαν σε HPLC με ισοκρατικό σύστημα H₂O/MeCN (70:30) ως διαλύτη έκλουσης. Παρελήφθησαν 3 κλάσματα συνολικά, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα FI13K6B1d2 και FI13K6B1d3 ήταν καθαρές ουσίες (FI0013-4 και FI0013-5, αντίστοιχα) (Πίν. 20).

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

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
Στήλη	Kromasil 100 C18 5u, 250 mm × 8 mm
Διαλύτης Έκλουσης	H ₂ O/MeCN (70:30)
Ροή Έκλουσης	1.50 mL/min
Ανιχνευτής	RI

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
FI13K6B1d1	0.3	9.23
FI13K6B1d2	0.8	15.33
FI13K6B1d3	1.1	19.15

Τα υπολείμματα FI13K6B1e, FI13K6C1e και FI13K6D1e, τα οποία παρουσίασαν παρόμοια φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά, συνενώθηκαν (5.5 mg) και υποβλήθηκαν σε HPLC με ισοκρατικό σύστημα H₂O/MeCN (70:30) ως διαλύτη έκλουσης. Παρελήφθησαν 5 κλάσματα συνολικά, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ¹H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι τα κλάσματα FI13K6B1e2, FI13K6B1e4 και FI13K6B1e5 ήταν καθαρές ουσίες (FI0013-6, FI0013-7 και FI0013-8, αντίστοιχα) (Πίν. 21).

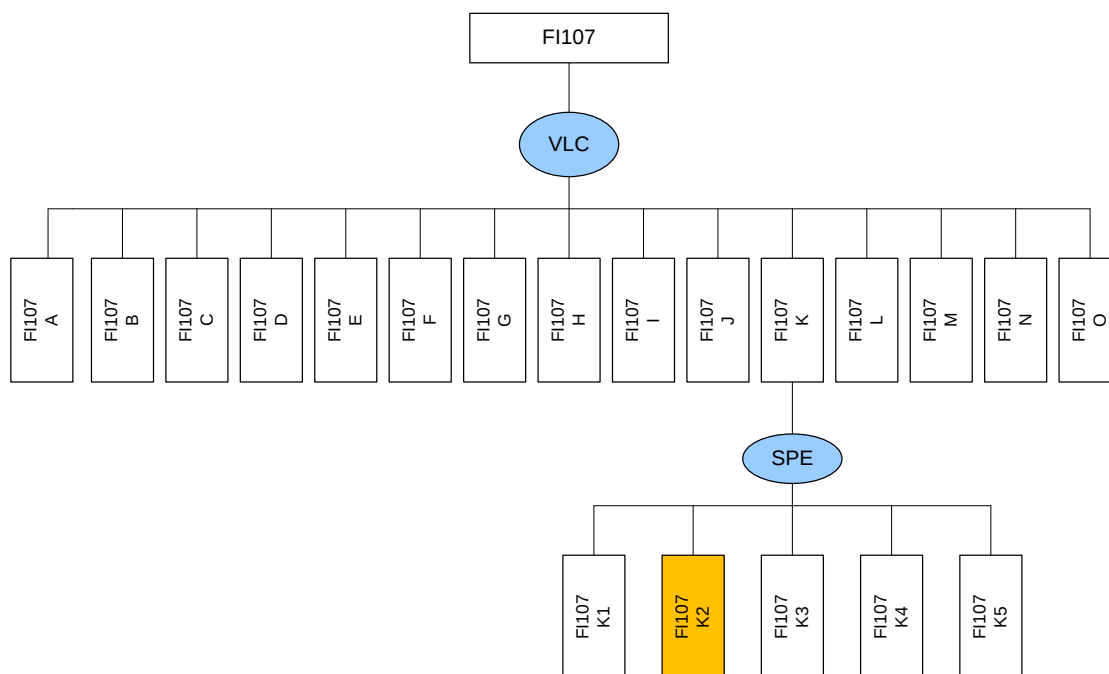
Πίνακας 21. Συνθήκες χρωματογραφίας, κλάσματα που παρελήφθησαν, χρόνοι έκλουσης και μάζες αυτών.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
Στήλη	Kromasil 100 C18 5u, 250 mm × 8 mm
Διαλύτης Έκλουσης	H ₂ O/MeCN (70:30)
Ροή Έκλουσης	1.50 mL/min
Ανιχνευτής	RI

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΜΑΖΑ (mg)	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)
FI13K6B1e1	0.4	9.03
FI13K6B1e2	1.0	22.79
FI13K6B1e3	1.0	25.13
FI13K6B1e4	0.9	27.58
FI13K6B1e5	0.5	33.50

2.5. Χρωματογραφικός διαχωρισμός και απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από το μυκητιακό στέλεχος FI0107

Η πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών από το αρχικό υπόλειμμα της καλλιέργειας του μυκητιακού στελέχους FI0107 φαίνεται διαγραμματικά στην Εικόνα 15, ενώ στη συνέχεια περιγράφονται αναλυτικά τα στάδια του χρωματογραφικού διαχωρισμού.



Εικόνα 15. Η πορεία απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών από το αρχικό υπόλειμμα της καλλιέργειας του μυκητιακού στελέχους FI0107.

Το αρχικό υπόλειμμα (1.27 g) υποβλήθηκε σε υγρή χρωματογραφία με υποβοήθηση κενού, έχοντας ως στατική φάση γέλη πυριτίου και ως κινητή φάση μίγματα cHex/EtOAc και EtOAc/MeOH σε συστήματα αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν συνολικά 15 κλάσματα (Πίν. 22), τα οποία ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC και φασματοσκοπικά με ^1H NMR.

Το υπόλειμμα FI107K (21.4 mg) υποβλήθηκε σε εκχύλιση στερεάς φάσης χρησιμοποιώντας στήλη γέλης πυριτίου κανονικής φάσης. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης αποτελούταν από μίγματα cHex/EtOAc σε συστήματα αυξανόμενης πολικότητας. Παρελήφθησαν συνολικά 5 κλάσματα, τα οποία ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με ^1H NMR, οπότε και διαπιστώθηκε ότι το κλάσμα FI107K2 ήταν καθαρή ουσία (FI0107-1) (Πίν. 23).

Πίνακας 22. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης και οι μάζες αυτών.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	ΟΓΚΟΣ (mL)	ΜΑΖΑ (mg)
FI107A	c-Hex (100%)	200	7.1
FI107B	c-Hex/EtOAc (90:10)	150	0.3
FI107C	c-Hex/EtOAc (80:20)	150	19.8
FI107D	c-Hex/EtOAc (70:30)	150	28.7
FI107E	c-Hex/EtOAc (60:40)	150	30.9
FI107F	c-Hex/EtOAc (50:50)	150	28.7
FI107G	c-Hex/EtOAc (40:60)	150	40.4
FI107H	c-Hex/EtOAc (30:70)	150	170.2
FI107I	c-Hex/EtOAc (20:80)	150	188.8
FI107J	c-Hex/EtOAc (10:90)	150	80.5
FI107K	EtOAc (100%)	150	21.4
FI107L	EtOAc/MeOH (95:5)	150	38.2
FI107M	EtOAc/MeOH (90:10)	150	90.9
FI107N	EtOAc/MeOH (75:25)	100	86.2
FI107O	MeOH (100%)	300	233.9

Πίνακας 23. Κλάσματα που παρελήφθησαν με τα αντίστοιχα συστήματα διαλυτών έκλουσης και οι μάζες αυτών.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ	ΣΥΣΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΤΩΝ	ΟΓΚΟΣ (mL)	ΜΑΖΑ (mg)
FI107K1	c-Hex/EtOAc (50:50)	5	0.5
FI107K2	c-Hex/EtOAc (40:60)	5	8.2
FI107K3	c-Hex/EtOAc (30:70)	5	8.8
FI107K4	c-Hex/EtOAc (20:80)	5	0.9
FI107K5	EtOAc (100%)	5	0.7

Συνολικά από τα υπολείμματα της καλλιέργειας των μυκητιακών στελεχών FI0013 και FI0107 απομονώθηκαν 13 μεταβολίτες, οι οποίοι παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 24.

Πίνακας 24. Απομονωμένοι μεταβολίτες από τα υπολείμματα της καλλιέργειας των μυκητιακών στελεχών FI0013 και FI0107.

ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΜΑΖΑ (mg)
1	FI0013-2	FI13K6B1c3	4.5
2	FI0013-1	FI13K6B1c2	1.4
3	FI0013-3	FI13K6B1c4	1.5
4	FI0013-4	FI13K6B1d2	0.8
5	FI0013-6	FI13K6B1e2	1.0
6	FI0013-7	FI13K6B1e4	0.9
7	FI0013-5	FI13K6B1d3	1.1
8	FI0013-8	FI13K6B1e5	0.5
9	FI0013-9	FI13H2b, FI13H3b	3.1
10	FI107-1	FI107K2	8.2
	FI0013-10	FI13H2c, FI13H3c, FI13H2d2	104.2
	FI0013-11	FI13H2d3	13.0
	FI0013-12	FI13H2d4c	2.0

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

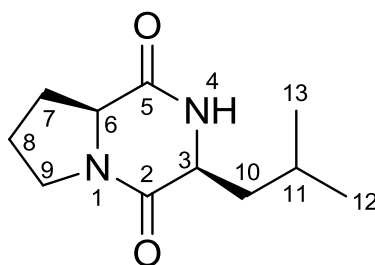
Τα μυκητιακά στελέχη FI0013 και FI0107 απομονώθηκαν από δείγμα του ροδοφύκου *Laurencia* sp. που συλλέχθηκε στη περιοχή Σκάλα στα Βιγκλάφια Λακωνίας και από δείγμα του σπόγγου *Ircinia variabilis* που συλλέχθηκε στον Αγ. Φωκά της Τήνου, αντίστοιχα. Τα υπολείμματα της καλλιέργειας των επιλεγμένων μυκητιακών στελεχών υποβλήθηκαν σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς με αποτέλεσμα την απομόνωση δεκατριών δευτερογενών μεταβολιτών, εκ των οποίων μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί οι δέκα (**1–10**).

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

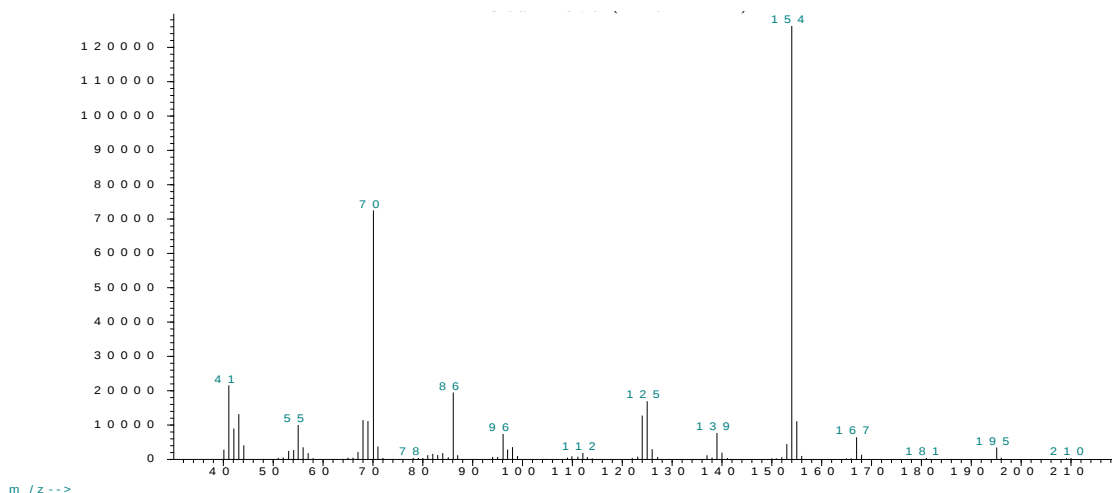
Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα φασματοσκοπικά δεδομένα των δευτερογενών μεταβολιτών **1–10** και περιγράφεται ο καθορισμός της χημικής τους δομής.

3.1. Μεταβολίτης 1

Ο μεταβολίτης **1** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 4.5 mg. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS παρέπεμπαν σε μόριο της οικογένειας των 2,5-δικετοπιπεραζινών.



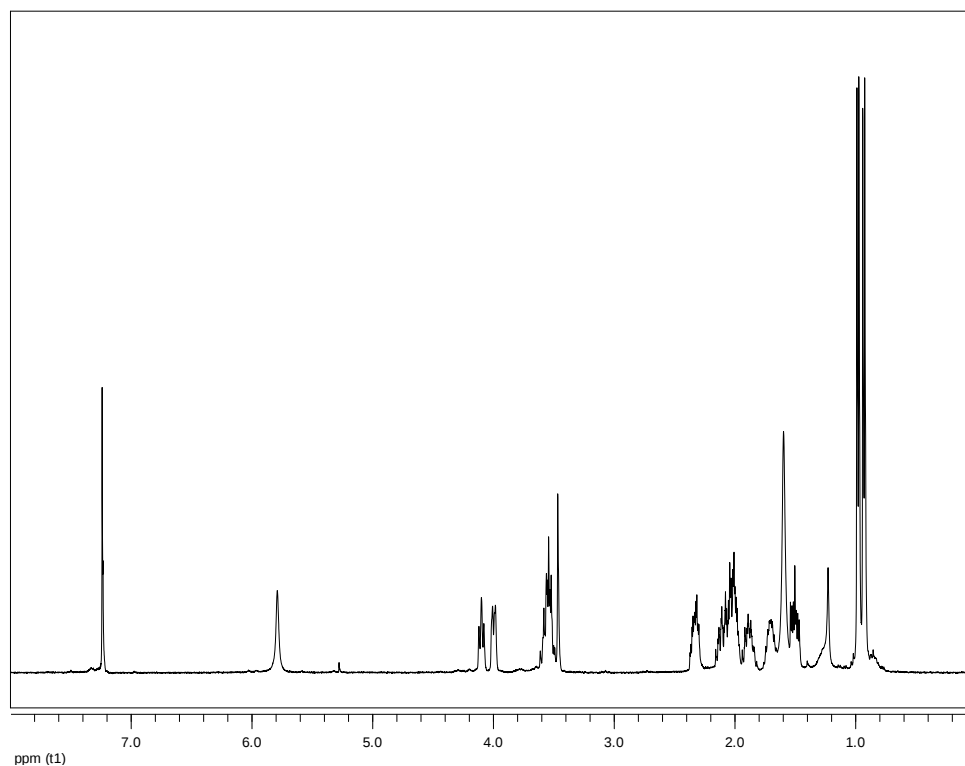
Στο φάσμα μάζας (Εικ. 16) ο μεταβολίτης **1** εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 210.



Εικόνα 16. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **1**.

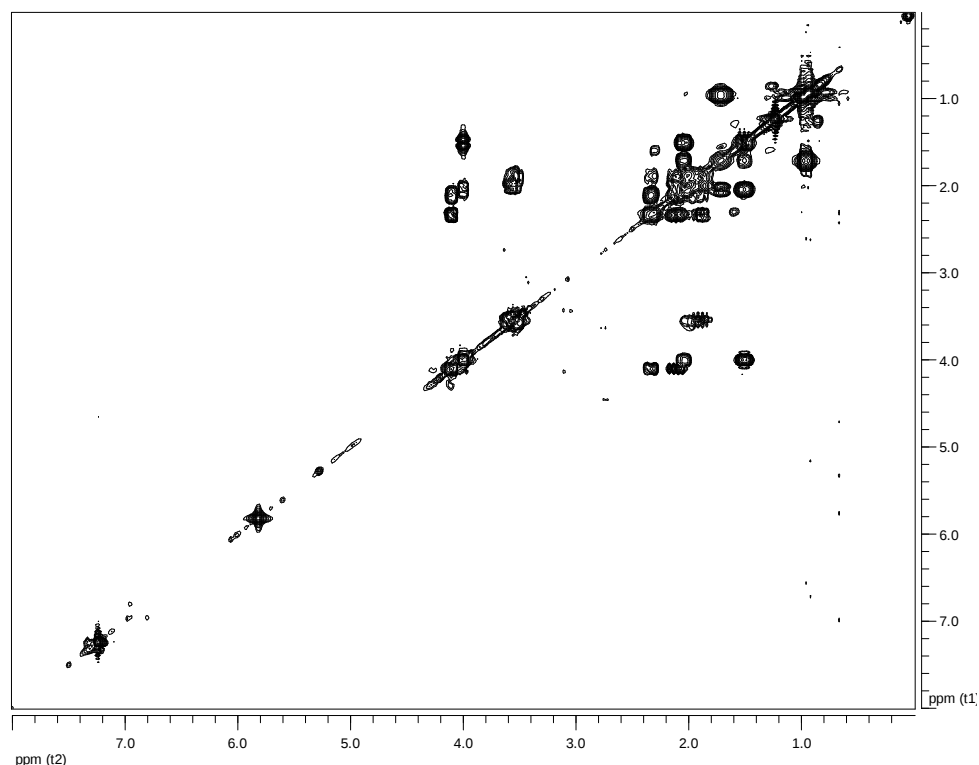
Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **1** (Εικ. 17) παρατηρήθηκαν: (i) δύο διπλές κορυφές σε δ 0.93 και 0.98, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια των δύο μεθυλίων σε τριτοταγείς άνθρακες, (ii) μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 4.00 και μία τριπλή κορυφή σε δ 4.10, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα μεθίνια H_α δύο αμινοξέων και (iii) μία

ευρεία απλή κορυφή σε δ 5.79 που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε στο ευκίνητο πρωτόνιο μίας αμινομάδας.



Εικόνα 17. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **1**.

Οι ομοπυρηνικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 18) καθόρισαν δύο απομονωμένα spin συστήματα: (i) H-6 / H₂-7 / H₂-8 / H₂-9 που παρέπεμπε σε μία προλίνη και (ii) H-4 / H-3 / H₂-10 / H-11 / (H₃-13) H₃-12 που παρέπεμπε σε μία λευκίνη.



Εικόνα 18. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **1**.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του μεταβολίτη **1** οδήγησε στον μοριακό τύπο $C_{11}H_{18}N_2O_2$ που αντιστοιχούσε σε βαθμό ακορεστότητας τέσσερα. Αυτό με τη σειρά του οδήγησε στο συμπέρασμα πως το μόριο ήταν δικυκλικό και έφερε δύο διπλούς δεσμούς άνθρακα-οξυγόνου.

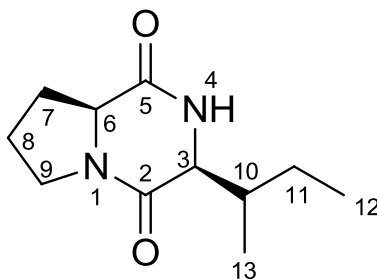
Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **1** (Πίν. 25) με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(προλίνη-λευκίνη) [*cis*-cyclo(Pro-Leu)], το οποίο έχει παρουσιάσει ισχυρή αντιβακτηριακή δράση έναντι του *Escherichia coli* (Fdhila *et al.* 2003).

Πίνακας 25. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **1** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

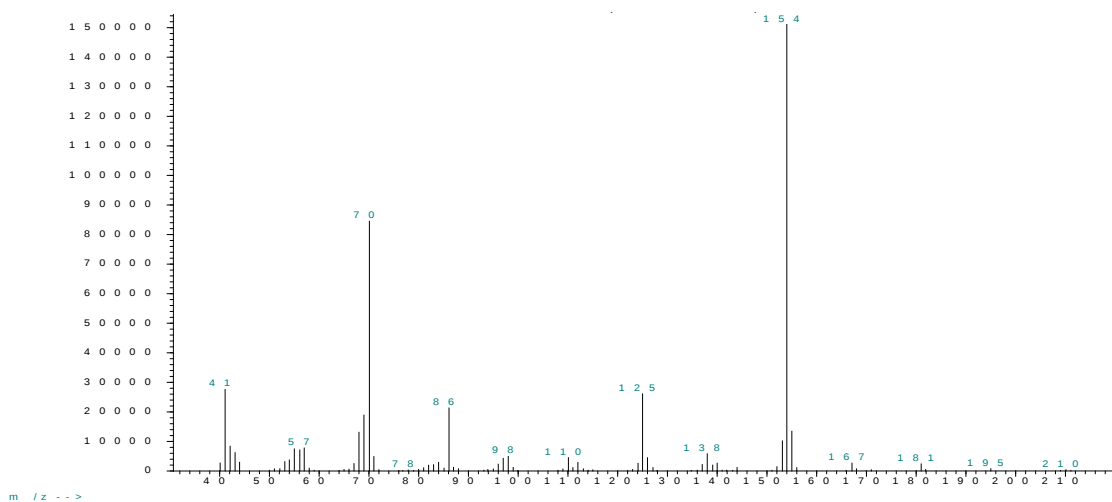
Θέση	δ _H
3	4.00 (dd, 9.6, 2.8)
4	5.79 (brs)
6	4.10 (t, 8.2)
7	2.34 (m), 2.11 (m)
8	2.00 (m), 1.89 (m)
9	3.58 (m), 3.52 (m)
10	2.04 (m), 1.51 (m)
11	1.71 (m)
12	0.93 (d, 6.5)
13	0.98 (d, 6.5)

3.2. Μεταβολίτης 2

Ο μεταβολίτης **2** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 1.4 mg. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS παρέπεμπαν σε μόριο της οικογένειας των 2,5-δικετοπιπεραζινών.



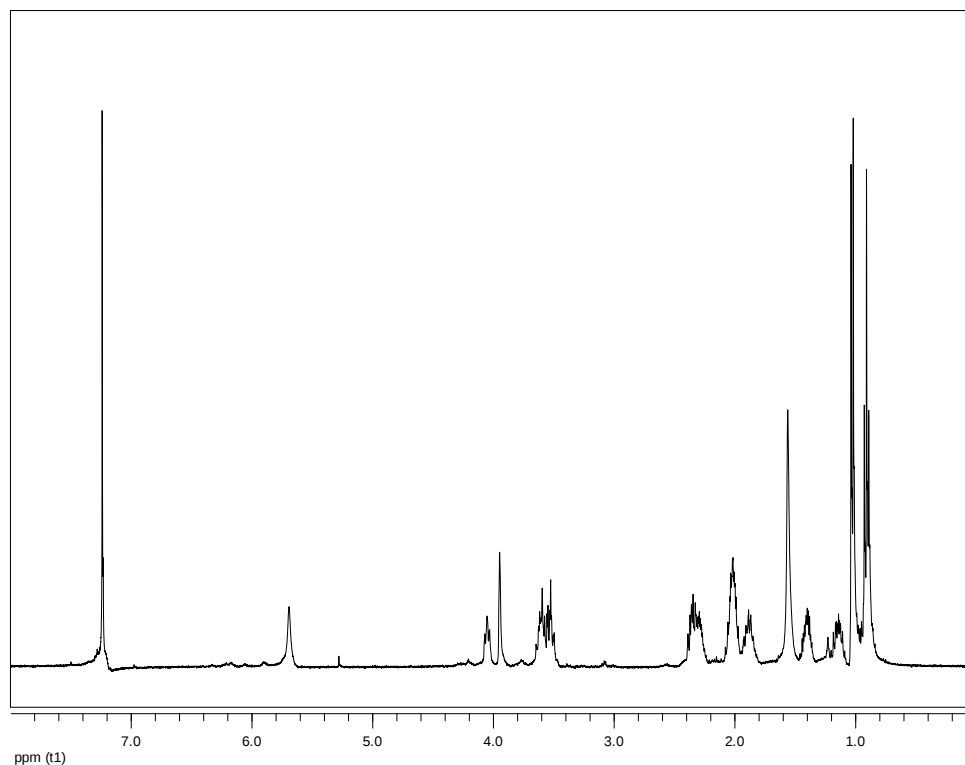
Στο φάσμα μάζας (Εικ. 19) ο μεταβολίτης **2** εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 210.



Εικόνα 19. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **2**.

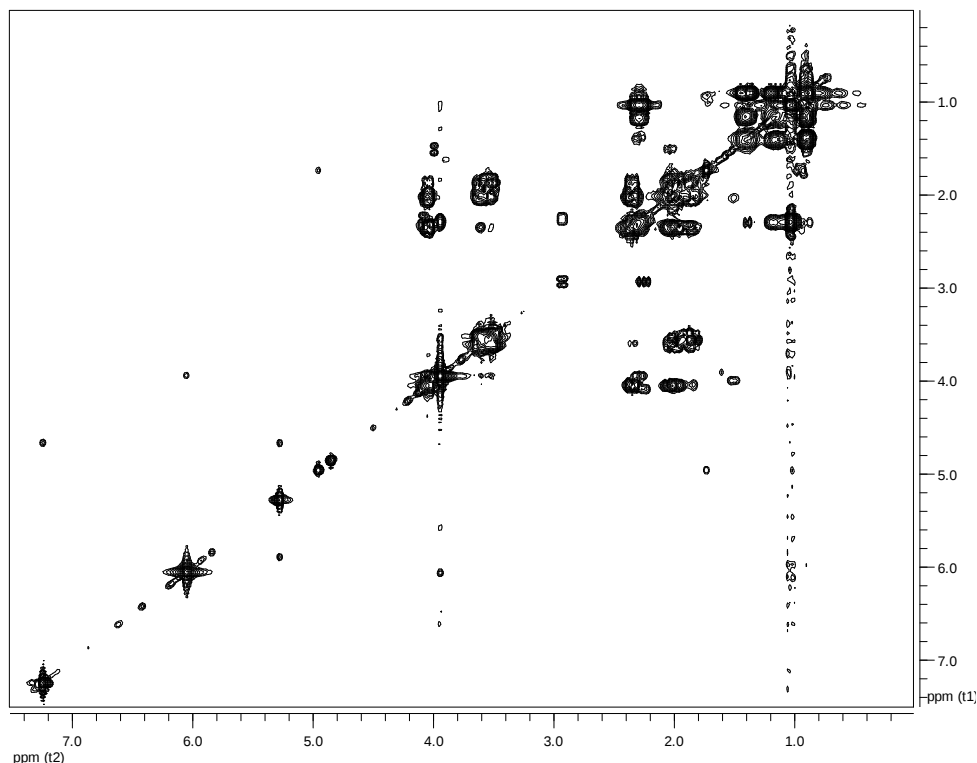
Το φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **2** (Εικ. 20), εμφάνισε πολλές ομοιότητες με αυτό του μεταβολίτη **1**. Συγκεκριμένα, όπως και στην περίπτωση του μεταβολίτη **1**, παρατηρήθηκαν: (i) μία διπλή κορυφή σε δ 1.03, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αποδόθηκε στα πρωτόνια ενός μεθυλίου σε τριτοταγή άνθρακα, (ii) μία ευρεία απλή

κορυφή σε δ 3.95 και μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 4.05, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα μεθίνια H_α δύο αμινοξέων και (iii) μία ευρεία απλή κορυφή σε δ 5.69 που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε στο ευκίνητο πρωτόνιο μίας αμινομάδας. Σε σύγκριση με το μεταβολίτη **1** εμφανής ήταν η αντικατάσταση του δεύτερου μεθυλίου σε τριτοταγή άνθρακα από ένα μεθύλιο σε δευτεροταγή άνθρακα, η κορυφή του οποίου εμφανιζόταν ως τριπλή σε δ 0.91.



Εικόνα 20. Φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **2**.

Οι ομοπυρηνικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 21) καθόρισαν δύο απομονωμένα spin συστήματα: (i) $H-6 / H_2-7 / H_2-8 / H_2-9$ που παρέπεμπε σε μία προλίνη και (ii) $H-4 / H-3 / H-10 / (H_3-13) H_2-11 / H_3-12$ που παρέπεμπε σε μία ισολευκίνη.



Εικόνα 21. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **2**.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του μεταβολίτη **2** οδήγησε στον μοριακό τύπο $C_{11}H_{18}N_2O_2$. Σε συμφωνία με τον μοριακό τύπο ήταν εμφανές ότι η δομή του μεταβολίτη **2** ήταν ανάλογη με αυτήν του **1** μετά από αντικατάσταση της λευκίνης από ισολευκίνη.

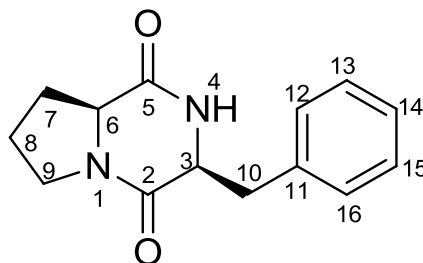
Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **2** (Πίν. 26) με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(προλίνη-ισολευκίνη) [*cis*-cyclo(Pro-Ile)] (Fdhila *et al.* 2003).

Πίνακας 26. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **2** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

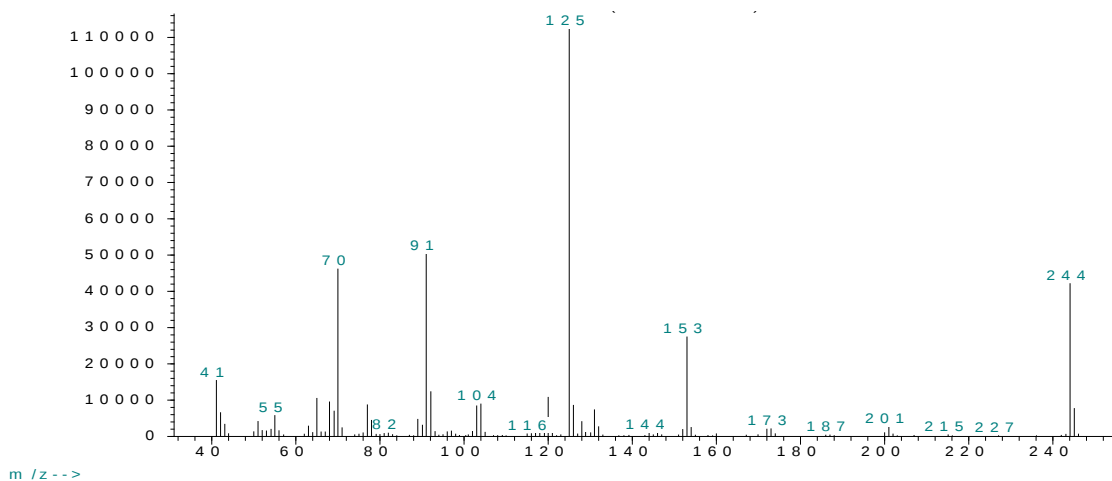
Θέση	δ _H
3	3.95 (brs)
4	5.69 (brs)
6	4.05 (dd, 8.2, 6.9)
7	2.36 (m), 2.01 (m)
8	2.00 (m), 1.85 (m)
9	3.59 (m), 3.51 (m)
10	2.29 (m)
11	1.40 (m), 1.17 (m)
12	0.91 (t, 7.4)
13	1.03 (d, 7.2)

3.3. Μεταβολίτης 3

Ο μεταβολίτης **3** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 1.5 mg. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS παρέπεμπαν σε μόριο της οικογένειας των 2,5-δικετοπιπεραζινών.



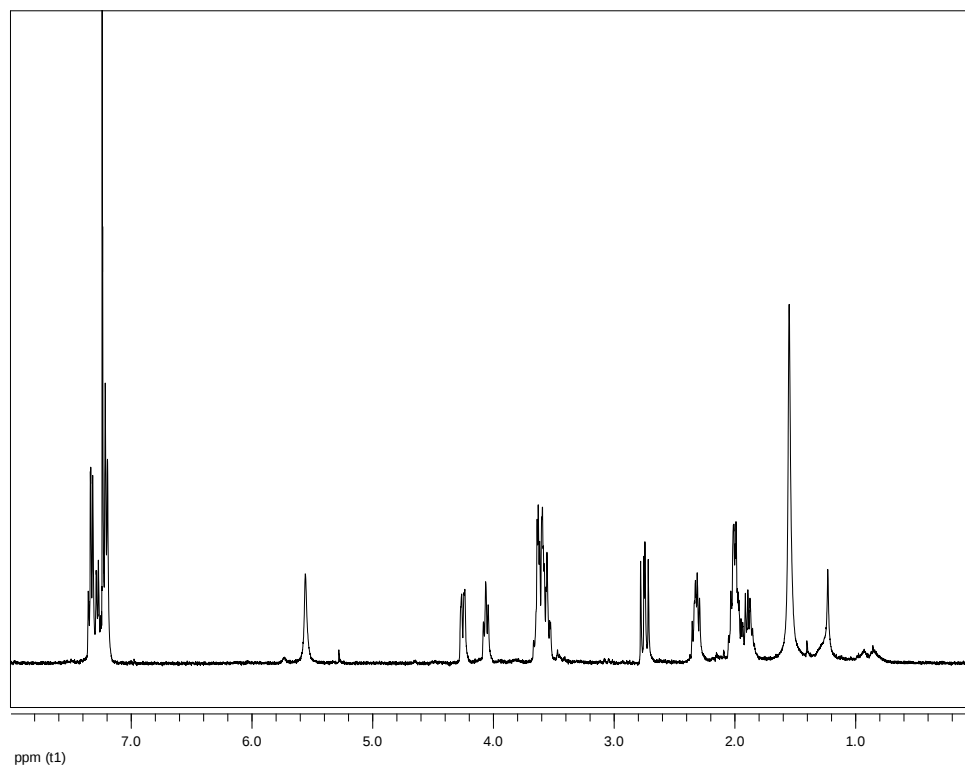
Στο φάσμα μάζας (Εικ. 22) ο μεταβολίτης **3** εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 244.



Εικόνα 22. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **3**.

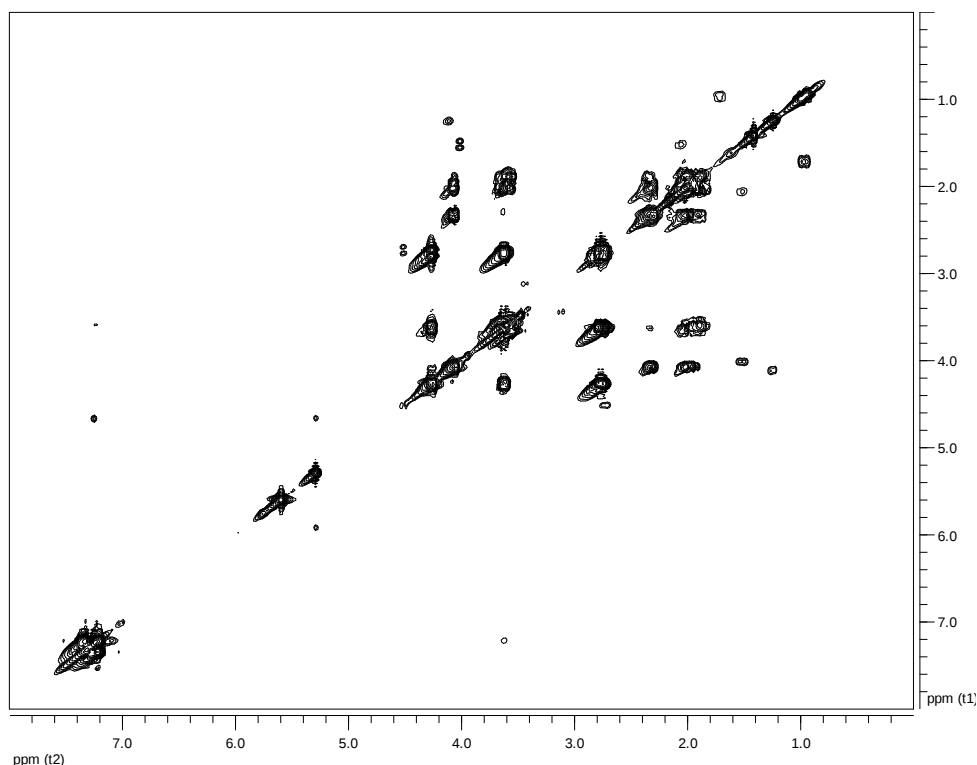
Το φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **3** (Εικ. 23) εμφάνισε πολλές ομοιότητες με αυτά των μεταβολιτών **1** και **2**. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν: (i) δύο διπλές διπλών κορυφές σε δ 4.06 και 4.25, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα μεθίνια H_α δύο αμινοξέων και (ii) μία ευρεία απλή κορυφή σε δ 5.56 που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε στο ευκίνητο πρωτόνιο μίας

αμινομάδας. Σε αντίθεση με τους δύο προηγούμενους μεταβολίτες, εμφανής ήταν η απουσία μεθυλίων και η ταυτόχρονη παρουσία αφενός πέντε αρωματικών πρωτονίων σε δ 7.20–7.33 και αφετέρου ενός βενζυλικού μεθυλενίου σε δ 2.75 και 3.63.



Εικόνα 23. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **3**.

Οι ομοπυρηνικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 24) καθόρισαν τρία απομονωμένα spin συστήματα: (i) H-6 / H₂-7 / H₂-8 / H₂-9 που παρέπεμπε σε μία προλίνη, (ii) H-4 / H-3 / H₂-10 και (iii) έναν μονοϋποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο (H-12 έως H-16), ο συνδυασμός των οποίων παρέπεμπε σε μία φαινυλαλανίνη.



Εικόνα 24. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **3**.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του μεταβολίτη **3** οδήγησε στον μοριακό τύπο $C_{14}H_{16}N_2O_2$ που αντιστοιχούσε σε βαθμό ακορεστότητας οχτώ. Αυτό με τη σειρά του οδήγησε στο συμπέρασμα πως στον μεταβολίτη **3** προστέθηκε ένας αρωματικός δακτύλιος, δηλαδή μία φαινυλαλανίνη πήρε την θέση της λευκίνης και της ισολευκίνης των μεταβολιτών **1** και **2**, αντίστοιχα.

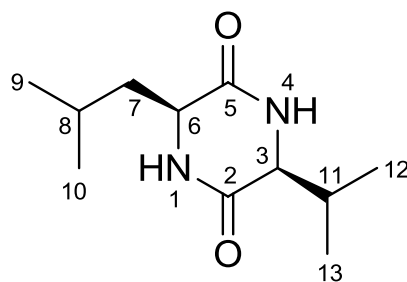
Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **3** (Πίν. 27) με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(προλίνη-φαινυλαλανίνη) [*cis*-cyclo(Pro-Phe)], το οποίο παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση (Fdhila *et al.* 2003).

Πίνακας 27. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **3** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

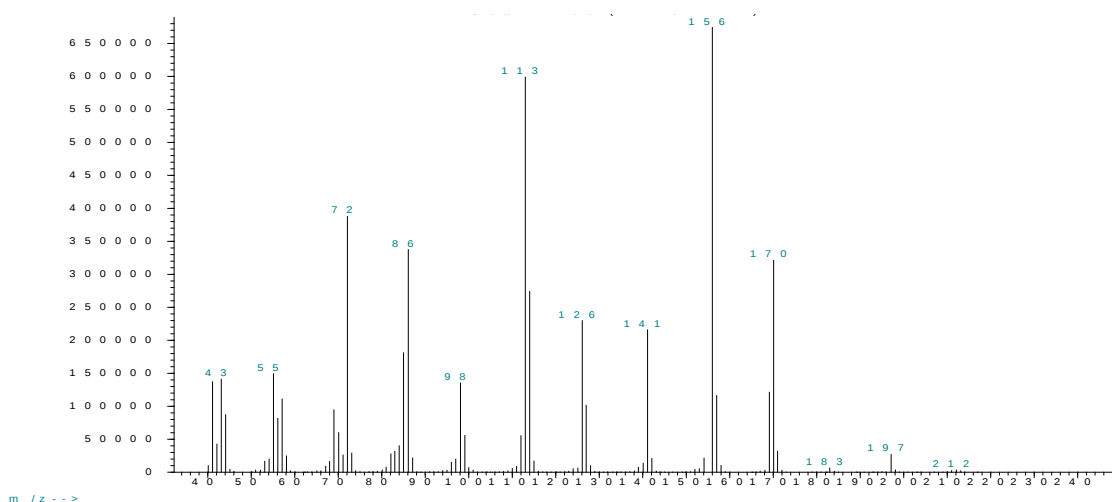
Θέση	δ _H
3	4.25 (dd, 10.5, 3.1)
4	5.56 (brs)
6	4.06 (dd, 8.6, 7.0)
7	2.33 (m), 2.00 (m)
8	2.04 (m), 1.88 (m)
9	3.59 (m), 3.51 (m)
10	3.63 (m), 2.75 (dd, 14.4, 10.8)
12, 16	7.20 (brd, 7.3)
13, 15	7.33 (brt, 7.3)
14	7.28 (brd, 7.3)

3.4. Μεταβολίτης 4

Ο μεταβολίτης **4** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 0.8 mg. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS παρέπεμπαν σε μόριο της οικογένειας των 2,5-δικετοπιπεραζινών.



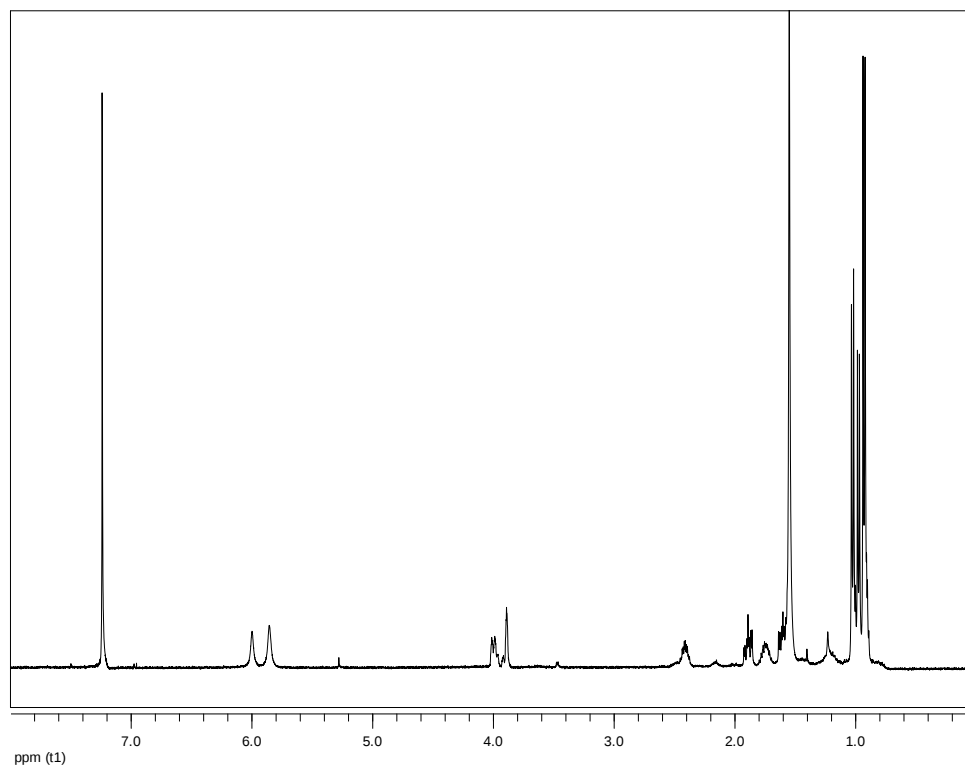
Στο φάσμα μάζας (Εικ. 25) ο μεταβολίτης **4** εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 212.



Εικόνα 25. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **4**.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **4** (Εικ. 26) παρατηρήθηκαν: (i) τρεις διπλές κορυφές σε δ 0.93, 0.98 και 1.03, οι οποίες ολοκλήρωναν για έξι, τρία και τρία πρωτόνια η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια των τεσσάρων μεθυλίων σε τριτοταγείς άνθρακες, (ii) μία ευρεία απλή κορυφή σε δ 3.88 και μία πολλαπλή κορυφή σε δ 4.00, οι

οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα μεθίνα H_α δύο αμινοξέων και (iii) δύο ευρείες απλές κορυφές σε δ 5.86 και 6.00 που ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα ευκίνητα πρωτόνια δύο αμινομάδων.



Εικόνα 26. Φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **4**.

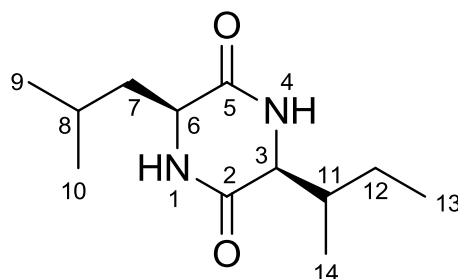
Οι ομοπυρηνικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 27) καθόρισαν δύο απομονωμένα spin συστήματα: (i) $H-6 / H_2-7 / H-8 / (H_3-10) H_3-9$ που παρέπεμπε σε μία λευκίνη και (ii) $H-4 / H-3 / H-11 / (H_3-13) H_3-12$ που παρέπεμπε σε μία βαλίνη.

Πίνακας 28. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **4** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

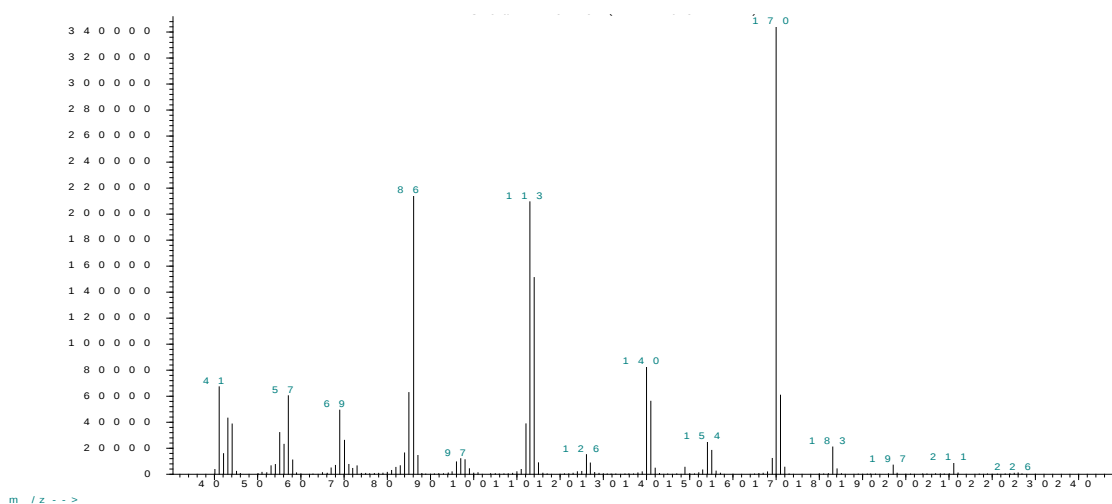
Θέση	δ _H
1	6.00 (brs)
3	3.88 (brs)
4	5.86 (brs)
6	4.00 (m)
7	1.89 (ddd, 13.6, 9.9, 3.8), 1.61 (m)
8	1.75 (m)
9	0.93 (d, 6.7)
10	0.98 (d, 6.5)
11	2.42 (m)
12	0.93 (d, 6.7)
13	1.03 (d, 7.0)

3.5. Μεταβολίτης 5

Ο μεταβολίτης **5** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 1.0 mg. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS παρέπεμπαν σε μόριο της οικογένειας των 2,5-δικετοπιπεραζινών.



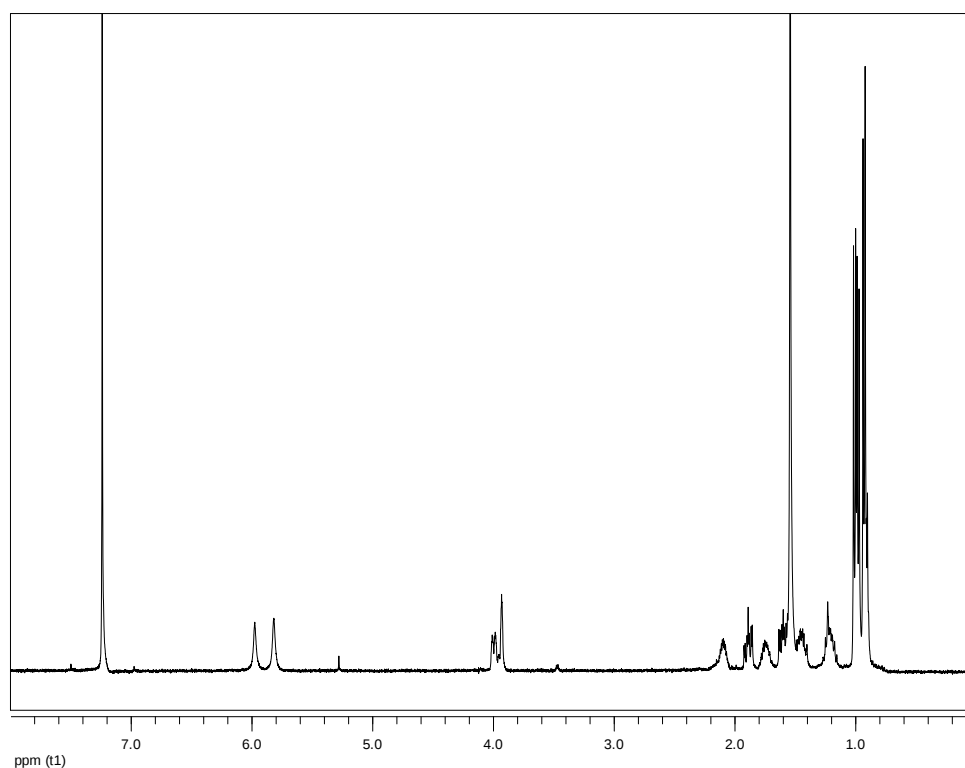
Στο φάσμα μάζας (Εικ. 28) ο μεταβολίτης **5** εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 226.



Εικόνα 28. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **5**.

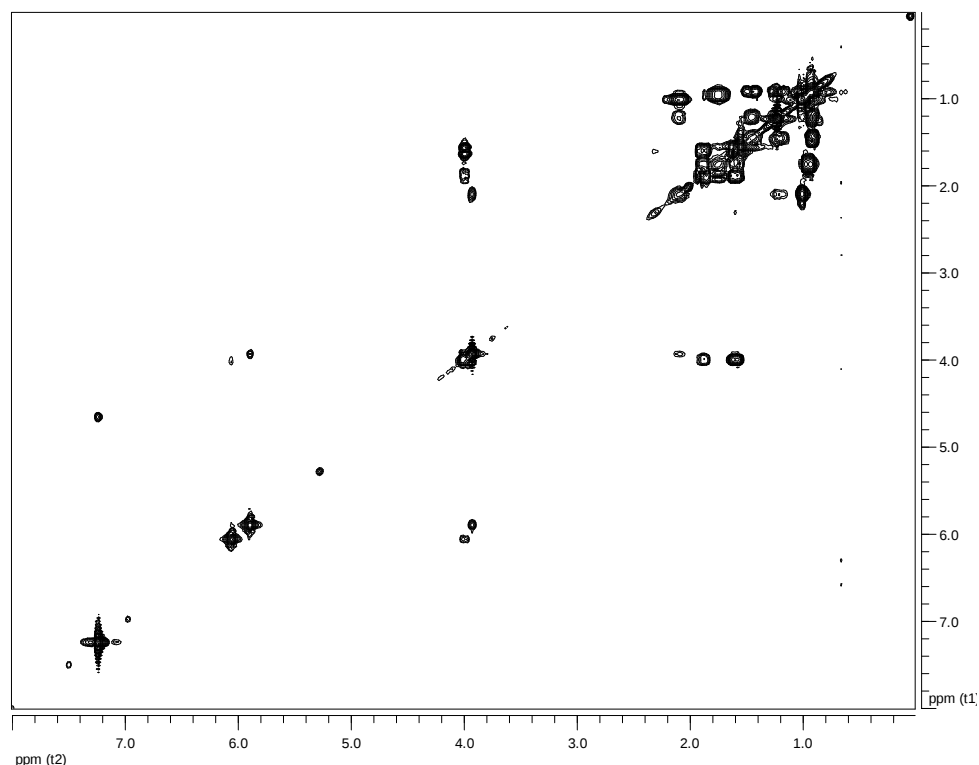
Το φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **5** (Εικ. 29) εμφάνισε πολλές ομοιότητες με αυτό του μεταβολίτη **4**. Συγκεκριμένα, όπως και στην περίπτωση του μεταβολίτη **4**, παρατηρήθηκαν: (i) μία ευρεία απλή κορυφή σε δ 3.93 και μία πολλαπλή κορυφή σε δ 4.00, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα μεθίνια

H_α δύο αμινοξέων και (ii) δύο ευρείες απλές κορυφές σε δ 5.82 και 5.98 που ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα ευκίνητα πρωτόνια δύο αμινομάδων. Σε αντίθεση με τον μεταβολίτη **4**, εμφανής ήταν η παρουσία μόνο τριών μεθυλίων που εμφανίζονταν ως διπλές κορυφές σε δ 0.93, 0.98 και 1.01, καθώς και μίας τριπλής κορυφής σε δ 0.92, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αποδόθηκε στα πρωτόνια ενός μεθυλίου σε δευτεροταγή άνθρακα.



Εικόνα 29. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **5**.

Οι ομοπυρηνικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 30) καθόρισαν δύο απομονωμένα spin συστήματα: (i) H-6 / H₂-7 / H-8 / (H₃-10) H₃-9 που παρέπεμπε σε μία λευκίνη και (ii) H-4 / H-3 / H-11 / (H₃-14) H₂-12 / H₃-13 που παρέπεμπε σε μία ισολευκίνη.



Εικόνα 30. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **5**.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του μεταβολίτη **5** οδήγησε στον μοριακό τύπο $C_{12}H_{22}N_2O_2$ που αντιστοιχούσε σε βαθμό ακορεστότητας τρία, ο οποίος με τη σειρά του μας οδήγησε στο συμπέρασμα πως το μόριο ήταν μονοκυκλικό και έφερε δύο διπλούς δεσμούς άνθρακα-οξυγόνου, όπως και ο μεταβολίτης **4**.

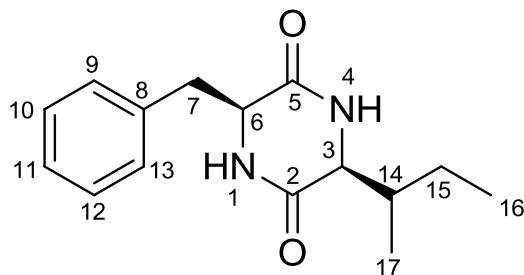
Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **5** (Πίν. 29) με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(λευκίνη-ισολευκίνη) [*cis*-cyclo(Leu-Ile)] (Furukawa *et al.* 2012, Lu *et al.* 2009).

Πίνακας 29. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **5** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

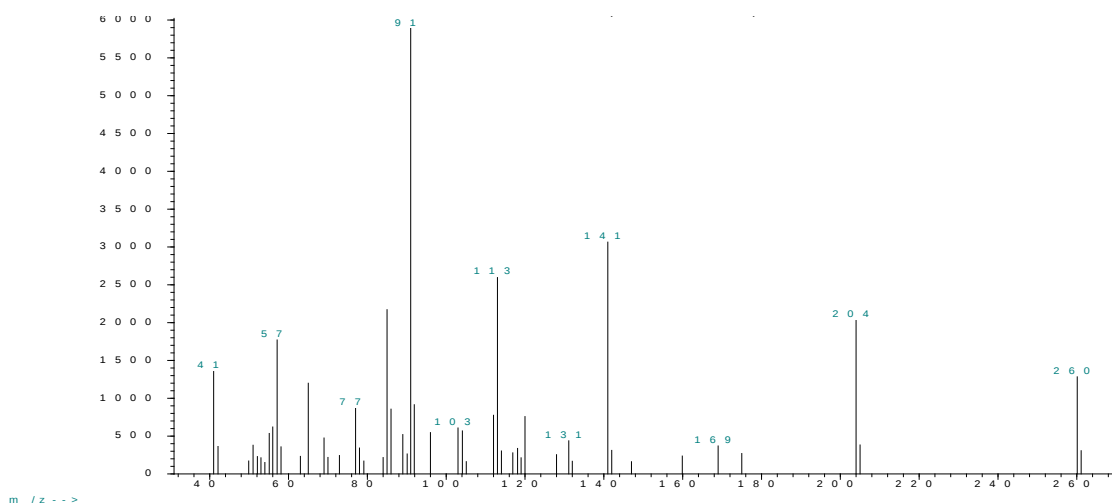
Θέση	δ _H
1	5.98 (brs)
3	3.93 (brs)
4	5.82 (brs)
6	4.00 (m)
7	1.89 (ddd, 13.6, 10.0, 3.8), 1.59 (m)
8	1.75 (m)
9	0.93 (d, 7.1)
10	0.98 (d, 6.5)
11	2.10 (m)
12	1.46 (m), 1.22 (m)
13	0.92 (t, 7.4)
14	1.01 (d, 7.1)

3.6. Μεταβολίτης 6

Ο μεταβολίτης **6** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 0.9 mg. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS παρέπεμπαν σε μόριο της οικογένειας των 2,5-δικετοπιπεραζινών.



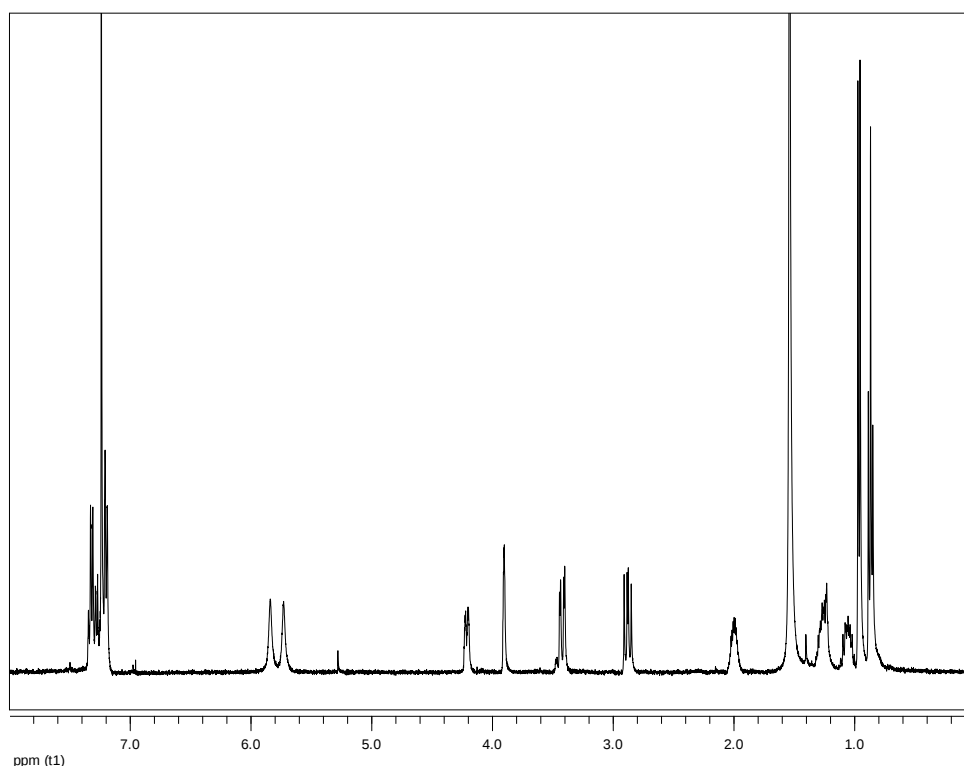
Στο φάσμα μάζας (Εικ. 31) ο μεταβολίτης **6** εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 260.



Εικόνα 31. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **6**.

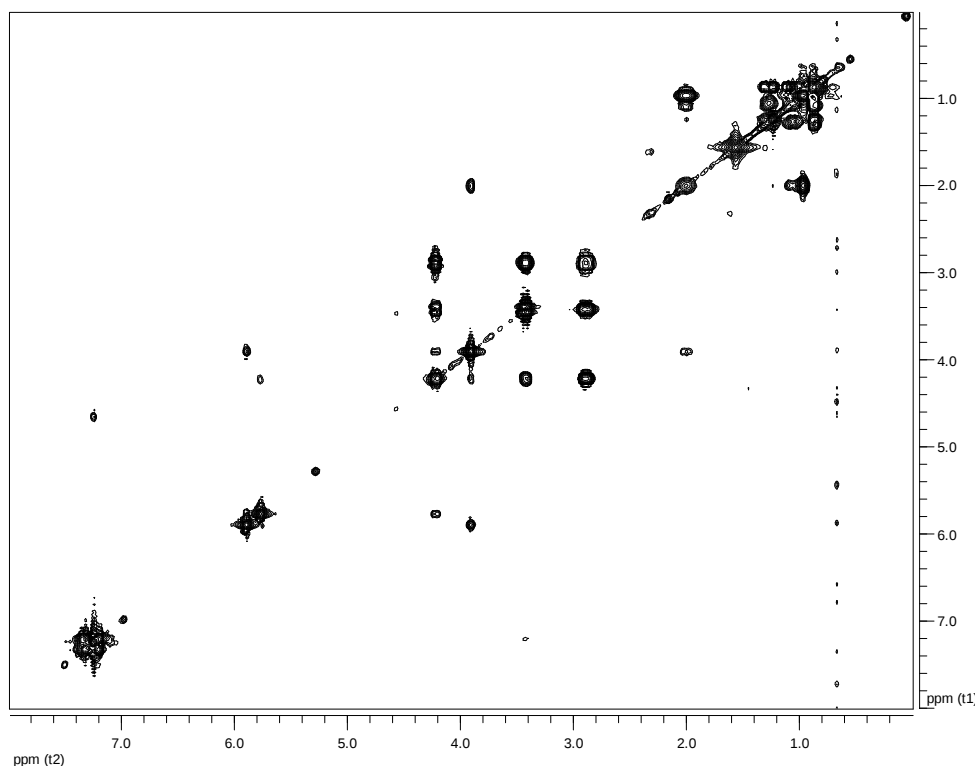
Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **6** (Εικ. 32) παρατηρήθηκαν: (i) μία διπλή κορυφή σε δ 0.96, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αποδόθηκε στα πρωτόνια ενός μεθυλίου σε τριτοταγή άνθρακα, (ii) μία τριπλή κορυφή σε δ 0.87, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αποδόθηκε στα πρωτόνια ενός μεθυλίου σε δευτεροταγή άνθρακα, (iii) δύο διπλές διπλών σε δ 2.88 και 3.42, οι οποίες ολοκλήρωναν

για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός βενζυλικού μεθυλενίου, (iv) μία ευρεία απλή κορυφή σε δ 3.90 και μία πολλαπλή κορυφή σε δ 4.21, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα μεθίνα H_α δύο αμινοξέων, (v) δύο ευρείες απλές κορυφές σε δ 5.73 και 5.84 που ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα ευκίνητα πρωτόνια δύο αμινομάδων και (vi) κορυφές σε δ 7.20-7.33, οι οποίες ολοκλήρωναν για πέντε πρωτόνια συνολικά και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός μονοϋποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.



Εικόνα 32. Φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **6**.

Οι ομοπυρηνικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 33) καθόρισαν τρία απομονωμένα spin συστήματα: (i) H-4 / H-3 / H-14 / (H₃-17) H₂-15 / H₃-16 που παρέπεμπε σε μία ισολευκίνη, (ii) H-6 / H₂-7 και (iii) έναν μονοϋποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο (H-9 έως H-13), ο συνδυασμός των οποίων παρέπεμπε σε μία φαινυλαλανίνη.



Εικόνα 33. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **6**.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του μεταβολίτη **6** οδήγησε στον μοριακό τύπο $C_{15}H_{20}N_2O_2$ που αντιστοιχούσε σε βαθμό ακορεστότητας εφτά.

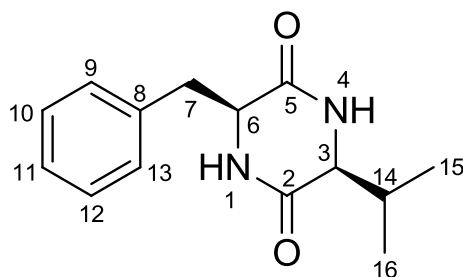
Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **6** (Πίν. 30) με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(φαινυλαλανίνη-ισολευκίνη) [*cis*-cyclo(Phe-Ile)] (Stark & Hofmann, 2005).

Πίνακας 30. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **6** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

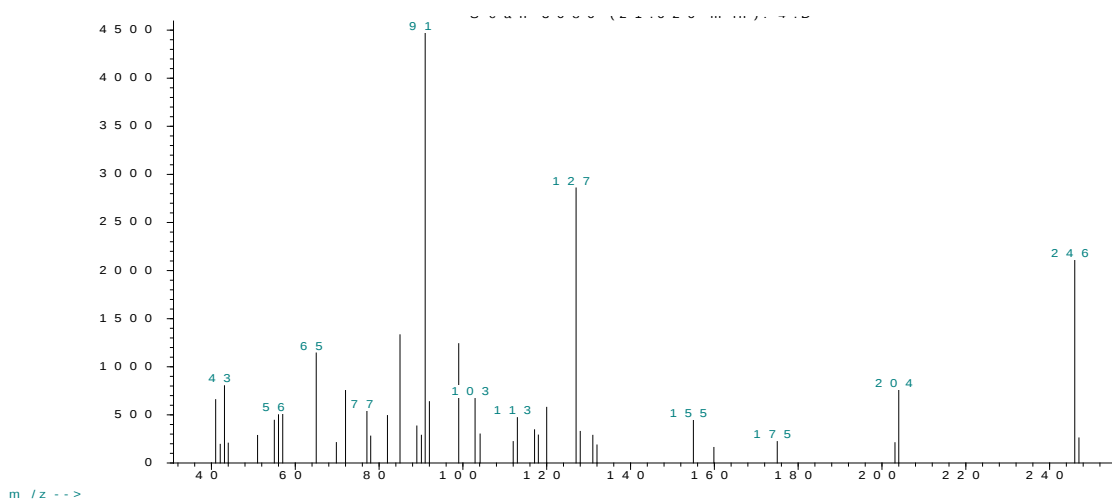
Θέση	δ _H
1	5.73 (brs)
3	3.90 (brs)
4	5.84 (brs)
6	4.21 (m)
7	3.42 (dd, 13.8, 3.4), 2.88 (dd, 13.8, 9.8)
9, 13	7.20 (brd, 7.3)
10, 12	7.33 (brt, 7.3)
11	7.28 (brd, 7.3)
14	2.00 (m)
15	1.27 (m), 1.07 (m)
16	0.87 (t, 7.4)
17	0.96 (d, 7.1)

3.7. Μεταβολίτης 7

Ο μεταβολίτης **7** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 1.1 mg. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS παρέπεμπαν σε μόριο της οικογένειας των 2,5-δικετοπιπεραζινών.



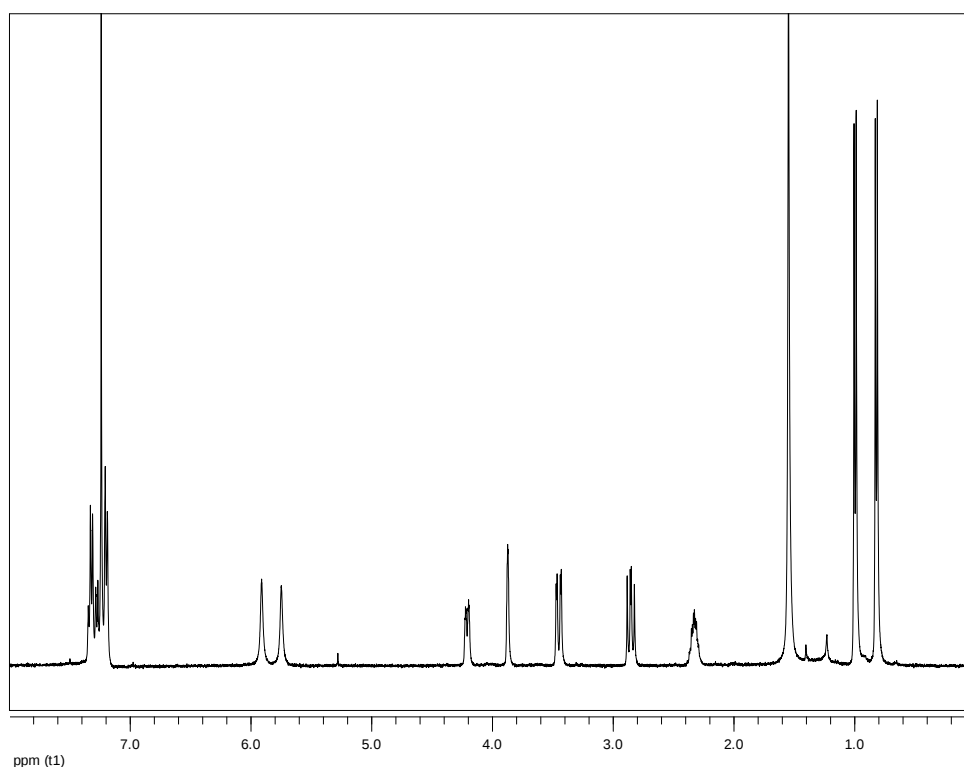
Στο φάσμα μάζας (Εικ. 34) ο μεταβολίτης **7** εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 246.



Εικόνα 34. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **7**.

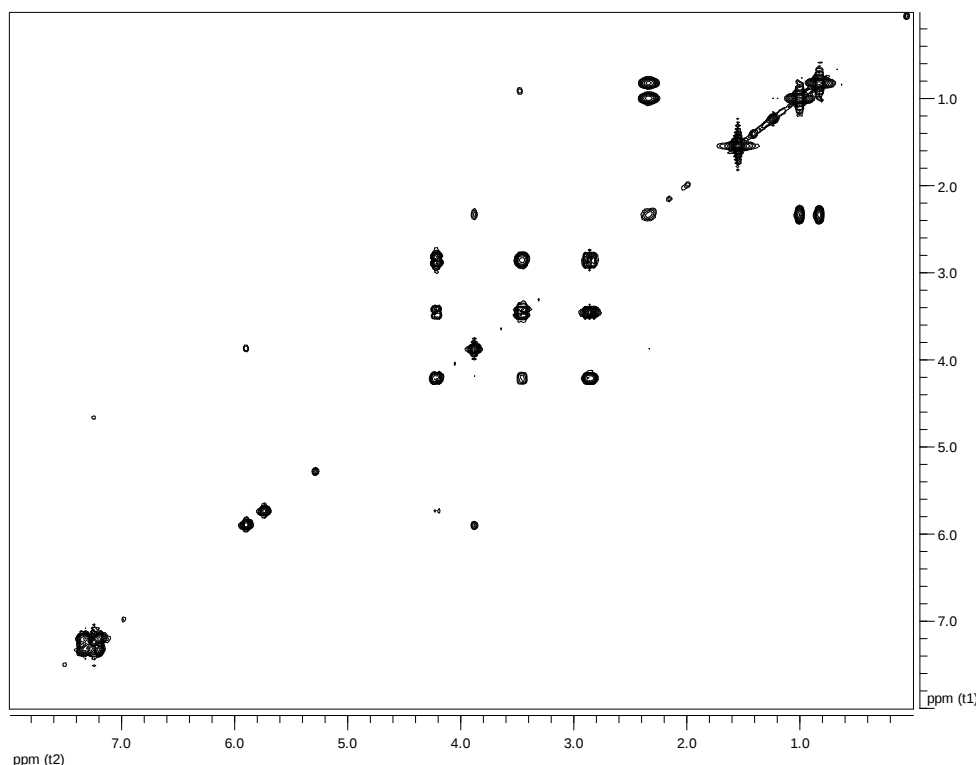
Το φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **7** (Εικ. 35) εμφάνισε πολλές ομοιότητες με αυτό του μεταβολίτη **6**. Συγκεκριμένα, όπως και στην περίπτωση του μεταβολίτη **6**, παρατηρήθηκαν: (i) δύο διπλές διπλών σε δ 2.85 και 3.45, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός βενζυλικού μεθυλενίου, (ii) μία ευρεία απλή κορυφή σε δ 3.87 και μία πολλαπλή κορυφή σε δ 4.21, οι οποίες

ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα μεθίνα H_α δύο αμινοξέων, (iii) δύο ευρείες απλές κορυφές σε δ 5.75 και 5.91 που ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αποδόθηκαν στα ευκίνητα πρωτόνια δύο αμινομάδων και (iv) κορυφές σε δ 7.20-7.33, οι οποίες ολοκλήρωναν για πέντε πρωτόνια συνολικά και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός μονοϋποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου. Σε σύγκριση με τον μεταβολίτη **6**, εμφανής ήταν η παρουσία δύο διπλών κορυφών σε δ 0.82 και 1.00, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια δύο μεθυλίων σε τριτοταγείς άνθρακες.



Εικόνα 35. Φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη **7**.

Οι ομοπυρηνικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 36) καθόρισαν τρία απομονωμένα spin συστήματα: (i) H-4 / H-3 / H-14 / (H₃-16) H₃-15 που παρέπεμπε σε μία βαλίνη, (ii) H-6 / H₂-7 και (iii) έναν μονοϋποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο (H-9 έως H-13), ο συνδυασμός των οποίων παρέπεμπε σε μία φαινυλαλανίνη.



Εικόνα 36. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **7**.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του μεταβολίτη **7** οδήγησε στον μοριακό τύπο $C_{14}H_{18}N_2O_2$ που αντιστοιχούσε σε βαθμό ακορεστότητας εφτά, όπως και στον μεταβολίτη **6**, με τη διαφορά ότι σε αυτό το μόριο έχει αντικατασταθεί η ισολευκίνη από βαλίνη.

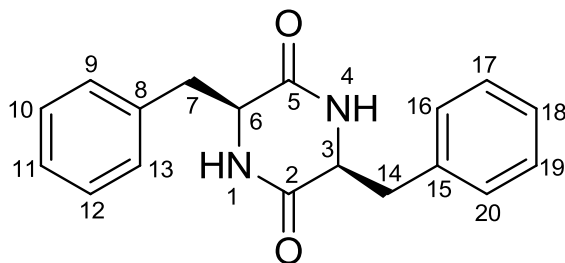
Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **7** (Πίν. 31) με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(φαινυλαλανίνη-βαλίνη) [*cis*-cyclo(Phe-Val)] (Stark & Hofmann, 2005).

Πίνακας 31. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **7** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

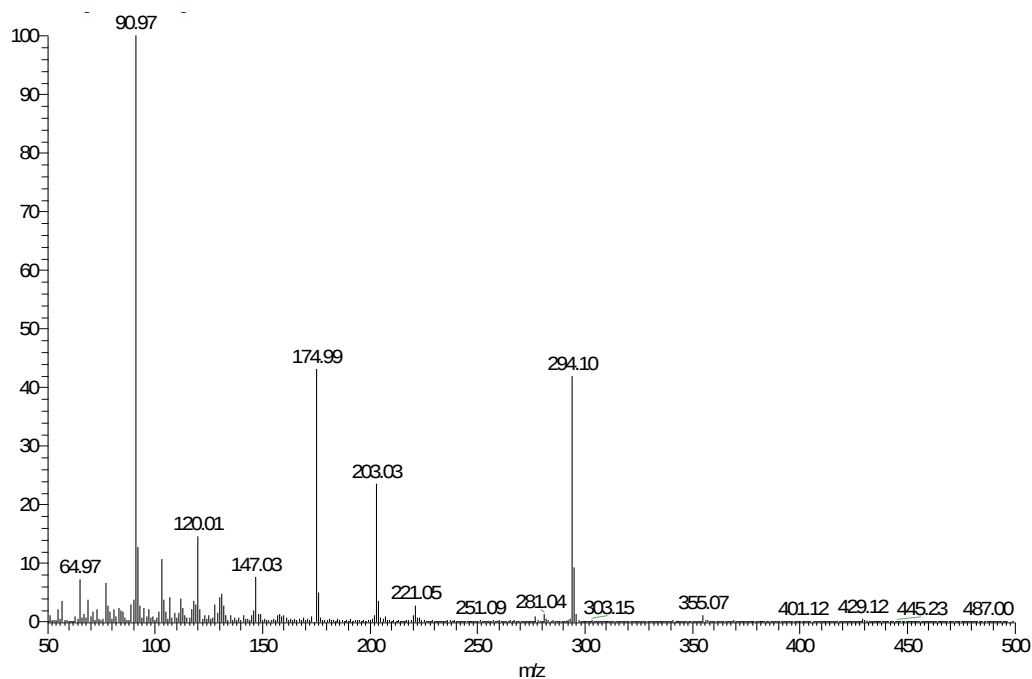
Θέση	δ _H
1	5.75 (brs)
3	3.87 (brs)
4	5.91 (brs)
6	4.21 (m)
7	3.45 (dd, 13.7, 3.3), 2.85 (dd, 13.7, 10.1)
9, 13	7.20 (brd, 7.3)
10, 12	7.33 (brt, 7.3)
11	7.28 (brd, 7.3)
14	2.33 (m)
15	0.82 (d, 6.8)
16	1.00 (d, 7.1)

3.8. Μεταβολίτης 8

Ο μεταβολίτης **8** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 0.5 mg. Τα φασματοσκοπικά δεδομένα NMR και MS παρέπεμπαν σε μόριο της οικογένειας των 2,5-δικετοπιπεραζινών.



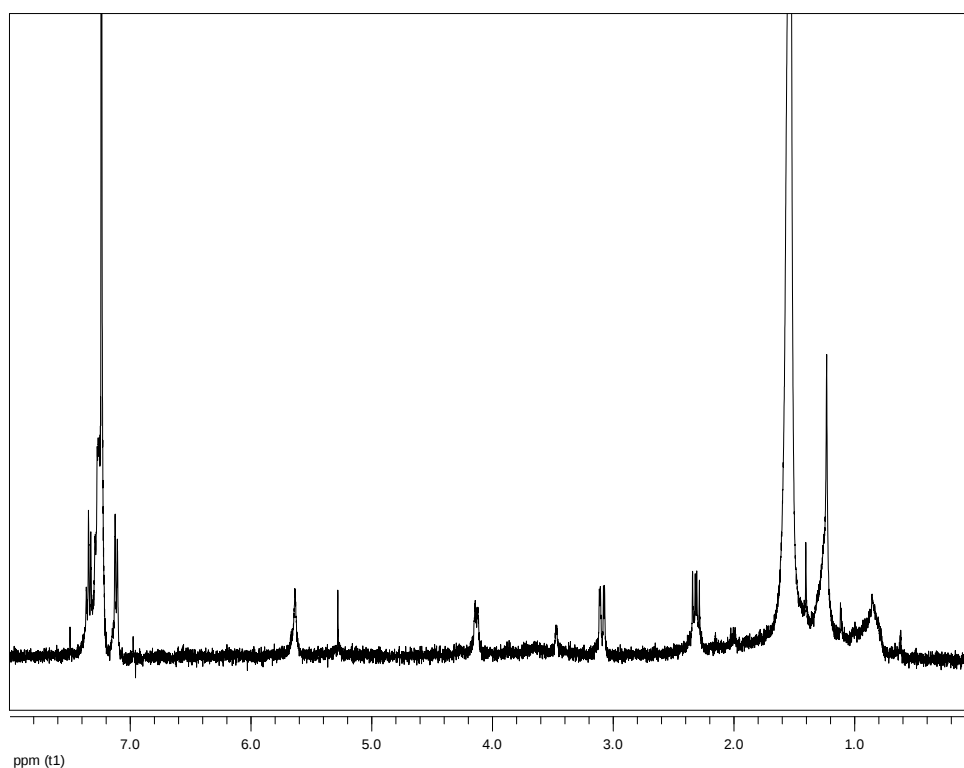
Στο φάσμα μάζας (Εικ. 37) ο μεταβολίτης **8** εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 294.



Εικόνα 37. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **8**.

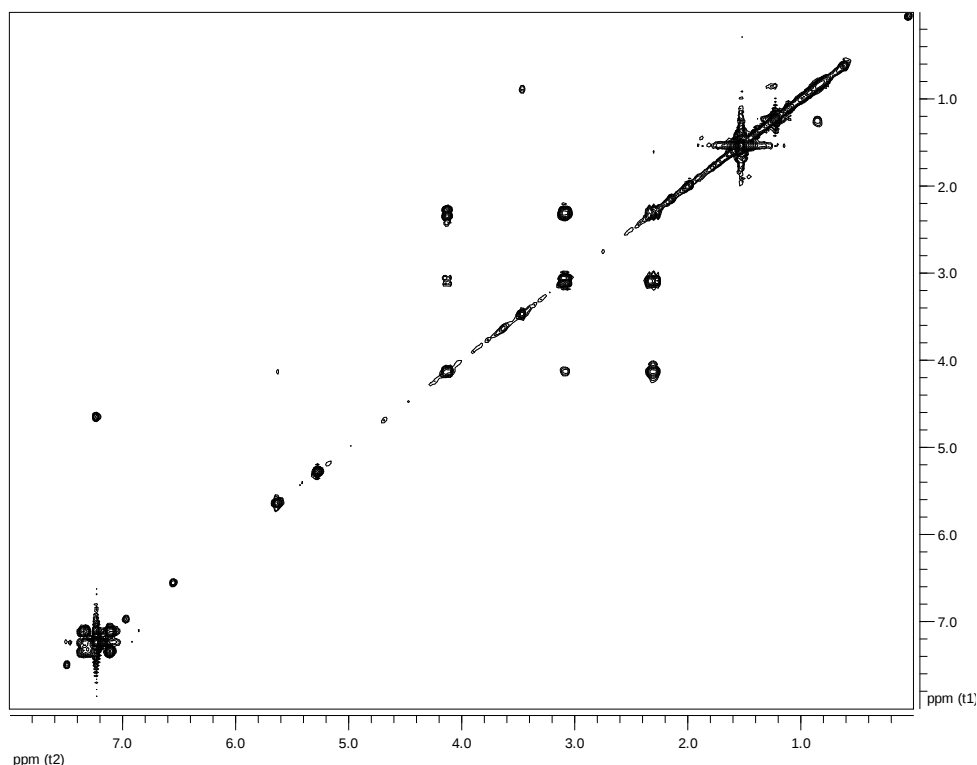
Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **8** (Εικ. 38) παρατηρήθηκαν: (i) δύο διπλές διπλών σε δ 2.31 και 3.09, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και

αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός βενζυλικού μεθυλενίου, (ii) μία πολλαπλή κορυφή σε δ 4.13, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε στο μεθίνιο H_α ενός αμινοξέος, (iii) μία ευρεία απλή κορυφή σε δ 5.63 που ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αποδόθηκε στο ευκίνητο πρωτόνιο μίας αμινομάδας και (iv) κορυφές σε δ 7.20-7.33, οι οποίες ολοκλήρωναν για πέντε πρωτόνια συνολικά και αποδόθηκαν στα πρωτόνια ενός μονοϋποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου.



Εικόνα 38. Φάσμα 1H NMR του μεταβολίτη 8.

Οι ομοπυρηνικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY (Εικ. 39) καθόρισαν δύο απομονωμένα spin συστήματα: (i) $H-4$ / $H-3$ / H_2-14 και (ii) έναν μονοϋποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο ($H-9$ έως $H-13$), ο συνδυασμός των οποίων παρέπεμπε σε μία φαινυλαλανίνη.



Εικόνα 39. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **8**.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του μεταβολίτη **8** οδήγησε στον μοριακό τύπο $C_{18}H_{18}N_2O_4$ που αντιστοιχούσε σε βαθμό ακορεστότητας έντεκα. Αυτό με τη σειρά του οδήγησε στο συμπέρασμα πως το μόριο ήταν τρικυκλικό και έφερε δύο διπλούς δεσμούς άνθρακα-οξυγόνου και προφανώς ήταν συμμετρικό.

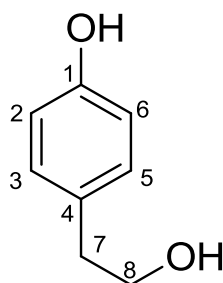
Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **8** (Πίν. 32) με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν *cis*-κυκλο(φαινυλαλανίνη-φαινυλαλανίνη) [*cis*-cyclo(Phe-Phe)] (Joshi & Verma, 2008).

Πίνακας 32. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **8** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

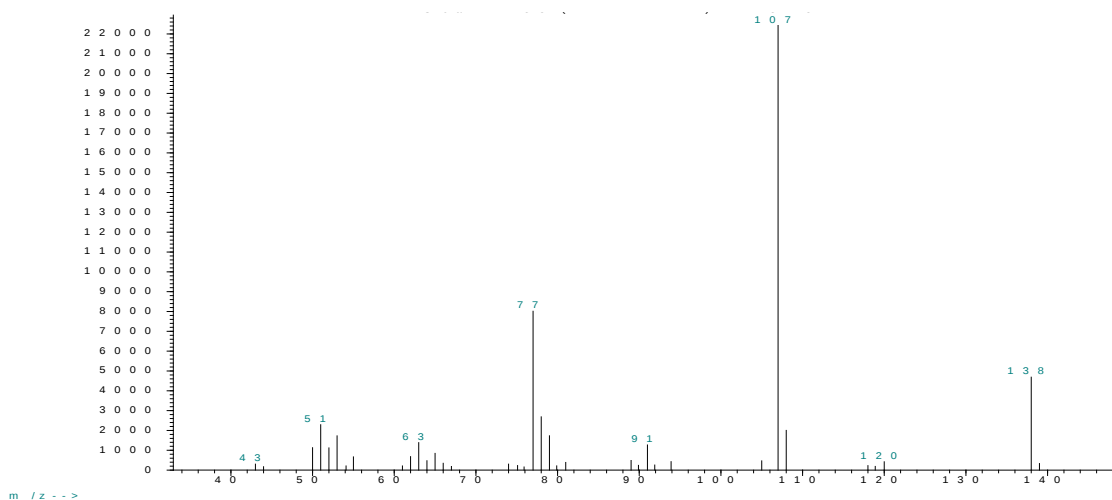
Θέση	δ _H
1, 4	5.63 (brs)
3, 6	4.13 (m)
7, 14	3.09 (dd, 13.8, 3.3), 2.31 (dd, 13.8, 8.8)
9, 13, 16, 20	7.11 (brd, 7.3)
10, 12, 17, 19	7.35 (brt, 7.3)
11, 18	7.27 (brd, 7.3)

3.9. Μεταβολίτης 9

Ο μεταβολίτης **9** απομονώθηκε ως άχρωμο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 3.1 mg.

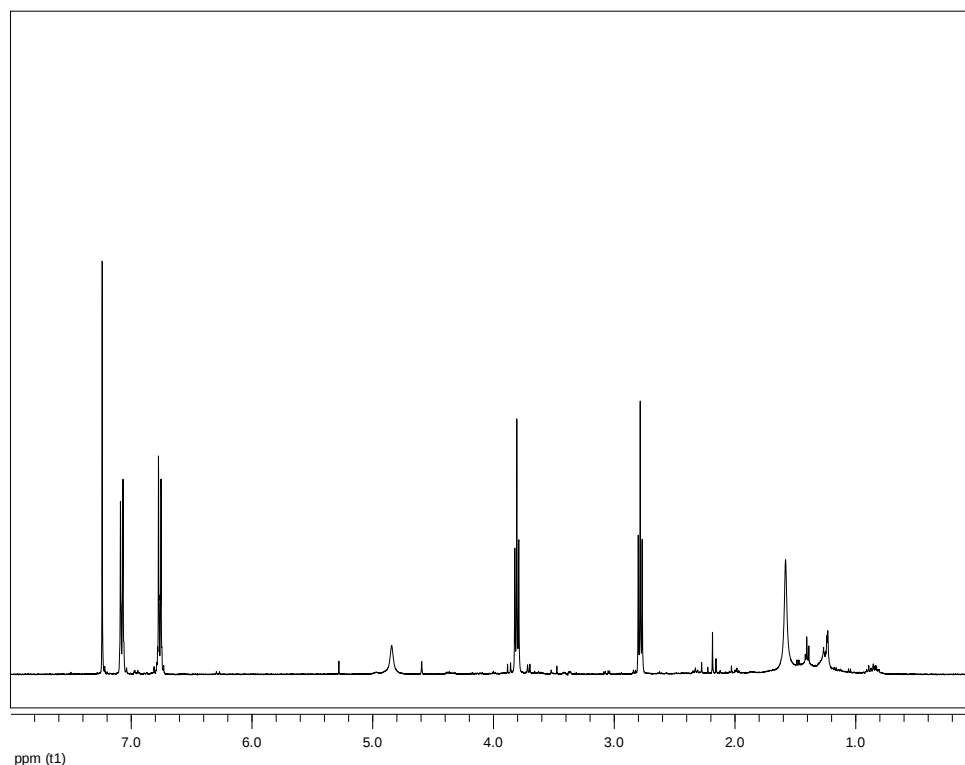


Στο φάσμα μάζας (Εικ. 40) ο μεταβολίτης **9** εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 138.



Εικόνα 40. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **9**.

Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **9** (Εικ. 41) παρατηρήθηκαν: (i) δύο διπλές κορυφές σε δ 7.07 και 6.76, οι οποίες ολοκλήρωναν για δύο πρωτόνια η καθεμία και αποδόθηκαν στα πρωτόνια του αρωματικού δακτυλίου, (ii) μία τριπλή κορυφή σε δ 3.80, η οποία ολοκλήρωνε για δύο πρωτόνια και αποδόθηκε στα πρωτόνια του μεθυλενίου που γειτνιάζει με οξυγόνο, (iii) μία τριπλή κορυφή σε δ 2.78, η οποία ολοκλήρωνε για δύο πρωτόνια και αποδόθηκε στο μεθυλένιο που γειτνιάζει με τον αρωματικό δακτύλιο.



Εικόνα 41. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **9**.

Ο συνδυασμός των φασματοσκοπικών δεδομένων (NMR και MS) του μεταβολίτη **9** οδήγησε στον μοριακό τύπο $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{O}_2$ που αντιστοιχούσε σε βαθμό ακορεστότητας τέσσερα. Αυτό με τη σειρά του οδήγησε στο συμπέρασμα πως το μόριο αποτελείται από έναν διυποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο.

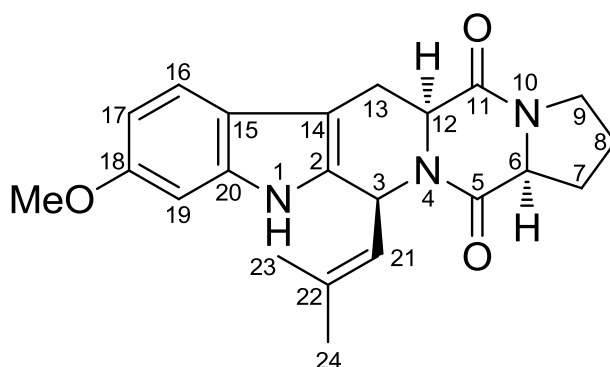
Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **9** (Πίν. 33) με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα πως πρόκειται για το γνωστό φυσικό προϊόν 4-(2-υδροξυαιθύλ)-φαινόλη (Liu *et al.* 2010).

Πίνακας 33. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **9** σε CDCl_3 (δ σε ppm, πολλαπλότητα, J σε Hz).

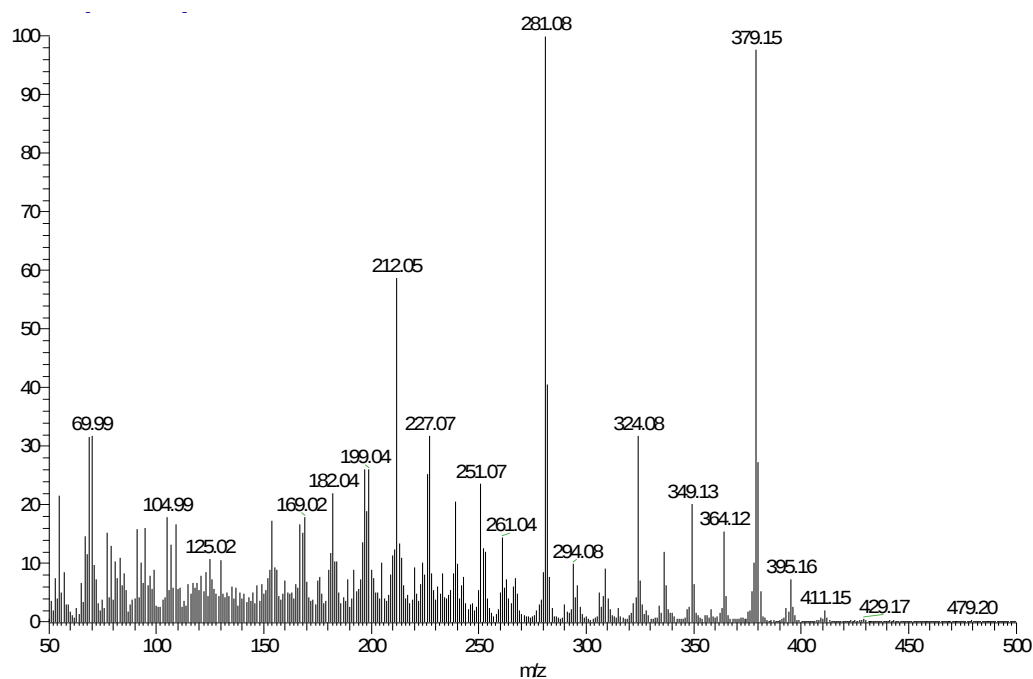
Θέση	δ_{H}
2, 6	6.76 (d, 8.4)
3, 5	7.07 (d, 8.4)
7	2.78 (t, 6.5)
8	3.80 (t, 6.5)

3.10. Μεταβολίτης 10

Ο μεταβολίτης **10** απομονώθηκε ως κίτρινο ελαιώδες υπόλειμμα, συνολικής μάζας 8.2 mg.

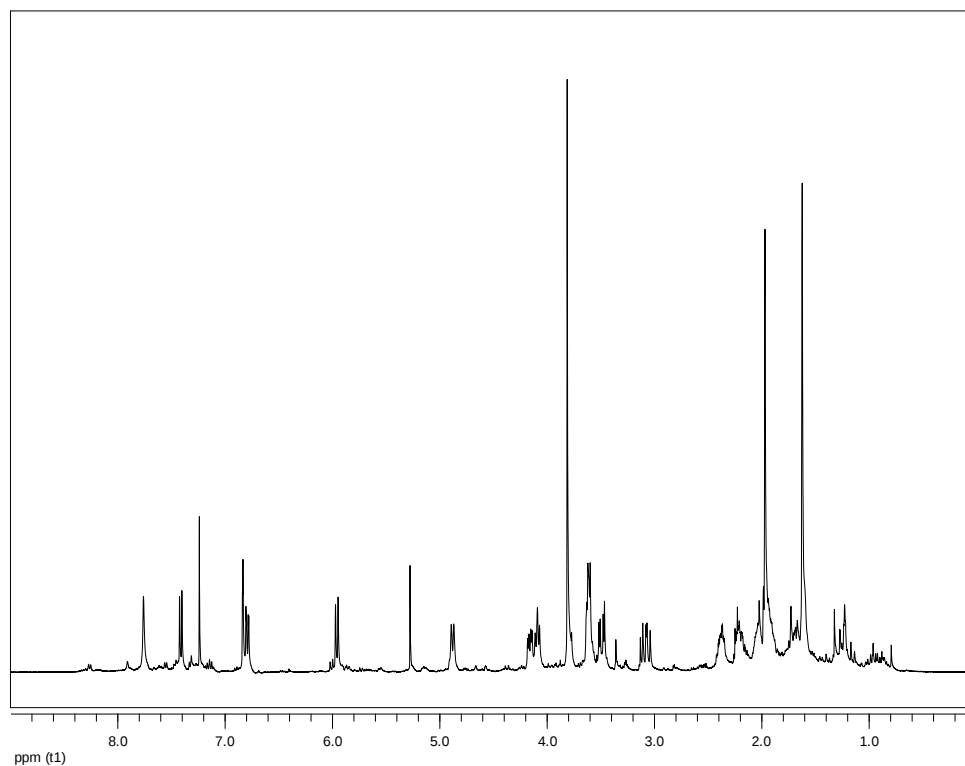


Στο φάσμα μάζας (Εικ. 42) ο μεταβολίτης **10** εμφάνισε μοριακό ιόν $[M]^+$ σε m/z 379, γεγονός που υπέδειξε ότι το μόριο περιείχε περιττό αριθμό ατόμων αζώτου.



Εικόνα 42. Φάσμα μάζας (EIMS) του μεταβολίτη **10**.

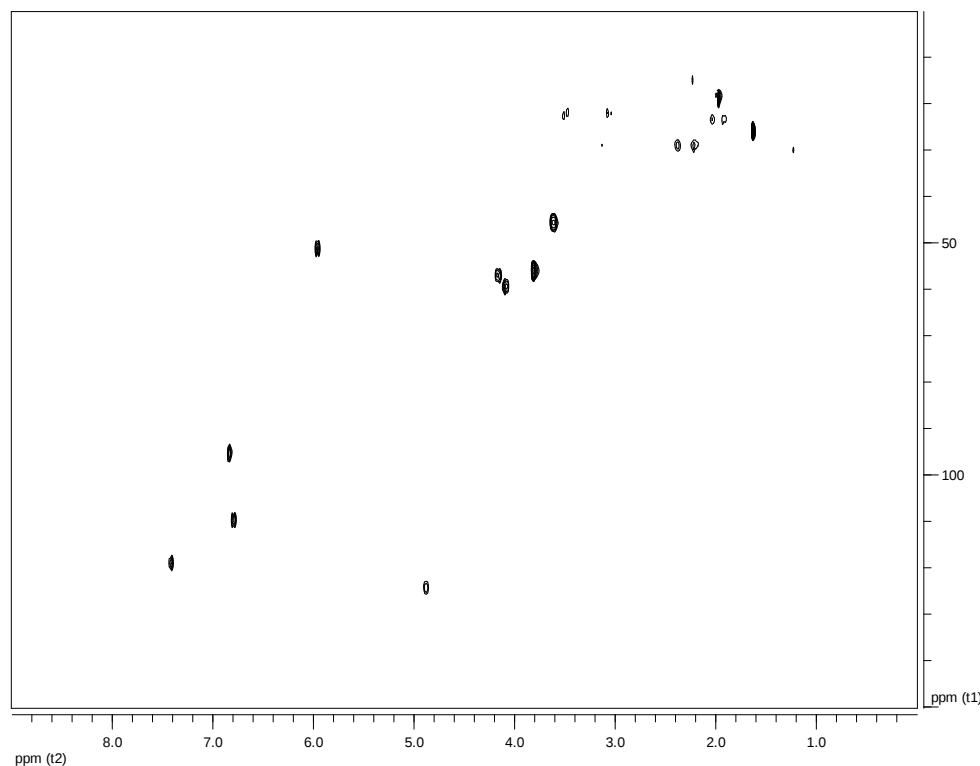
Στο φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **10** (Εικ. 43) παρατηρήθηκαν: (i) δύο απλές κορυφές σε δ 1.62 και 1.97, οι οποίες ολοκλήρωναν για τρία πρωτόνια η κάθε μία και αντιστοιχούσαν σε πρωτόνια δύο βινυλικών μεθυλίων σε τεταρτοταγείς άνθρακες, (ii) μία απλή κορυφή σε δ 3.80, η οποία ολοκλήρωνε για τρία πρωτόνια και αντιστοιχούσε στα πρωτόνια μίας μεθοξυ-ομάδας, (iii) μία διπλή κορυφή σε δ 4.87, η οποία ολοκλήρωνε για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχούσε σε ένα ολεφινικό μεθίνιο, iv) μία διπλή διπλών κορυφή σε δ 6.79, μία διπλή κορυφή σε δ 6.84 και μία διπλή κορυφή σε δ 7.41, οι οποίες ολοκλήρωναν για ένα πρωτόνιο η κάθε μία και αντιστοιχούσαν στα πρωτόνια ενός 1,2,4-τριϋποκατεστημένου αρωματικού δακτυλίου και v) μία ευρεία απλή κορυφή σε δ 7.76, η οποία αποδόθηκε σε ένα ευκίνητο πρωτόνιο.



Εικόνα 43. Φάσμα ^1H NMR του μεταβολίτη **10**.

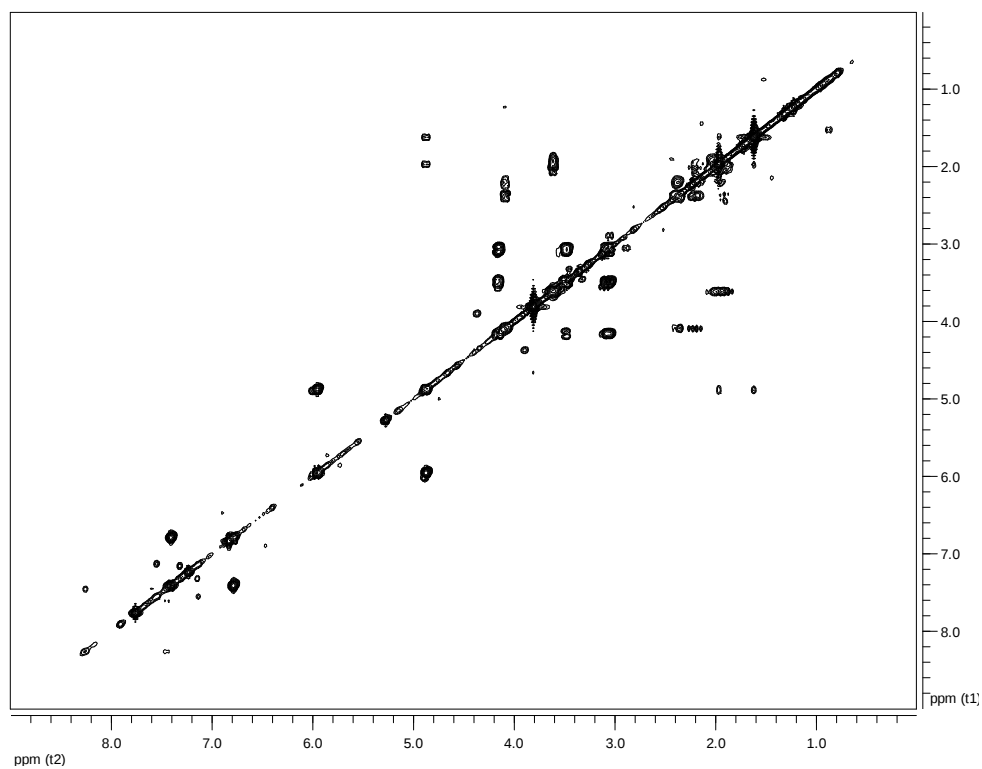
Από την ανάλυση του φάσματος HSQC-DEPT (Εικ. 44) καθορίστηκαν οι χημικές μετατοπίσεις των πρωτονιωμένων ανθράκων. Η δισδιάστατη χημική δομή του μεταβολίτη **10** αποδόθηκε με τη βοήθεια των συσχετίσεων που παρατηρήθηκαν στα

φάσματα COSY (Εικ. 45) και HMBC (Εικ. 46).

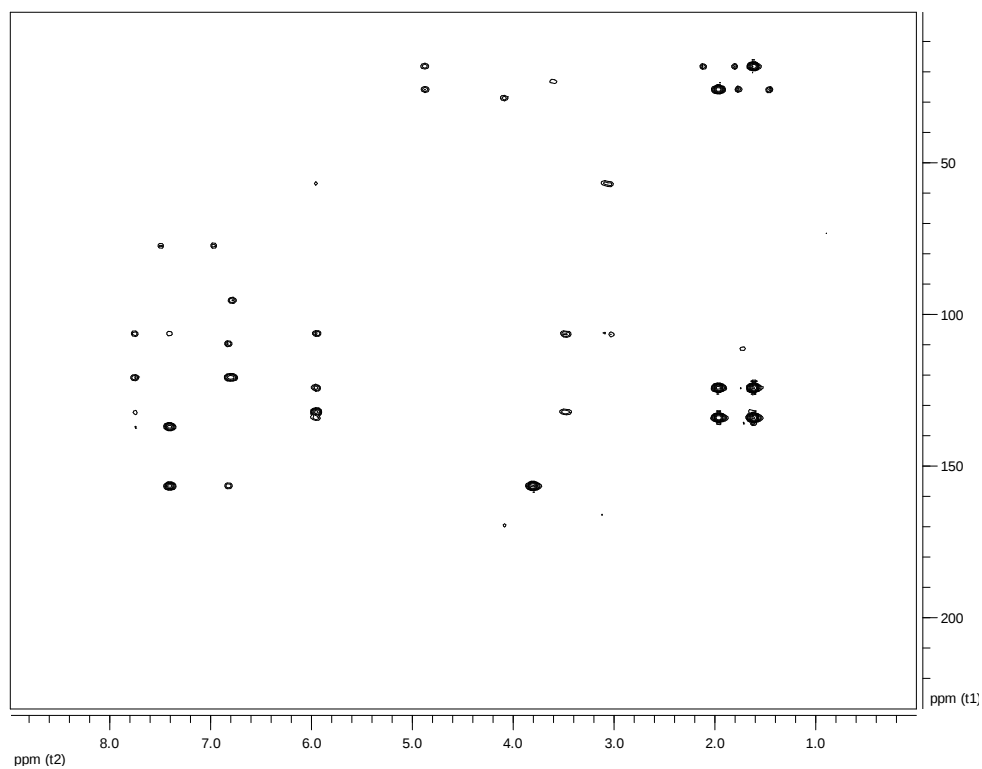


Εικόνα 44. Φάσμα HSQC-DEPT του μεταβολίτη **10**.

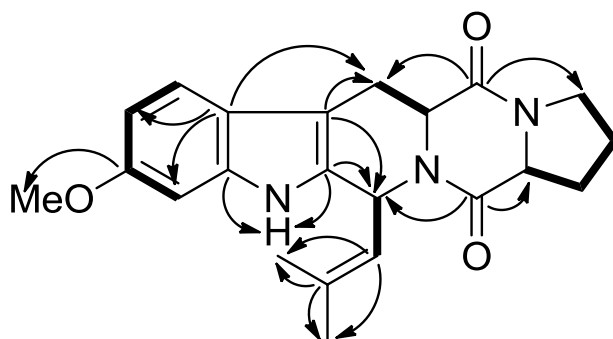
Συγκεκριμένα, οι ομοπυρηνικές συσχετίσεις που παρατηρήθηκαν στο φάσμα COSY καθόρισαν τέσσερα απομονωμένα spin συστήματα: (i) ένα $-\text{CH}_2-\text{CH}-$, (ii) ένα $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-$, (iii) ένα $-\text{CH}-\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ και (iv) έναν 1,2,4-τριϋποκατεστημένο αρωματικό δακτύλιο. Οι ετεροπυρηνικές συσχετίσεις ενός καρβονυλικού άνθρακα σε δ 165.8 (C-11) με τα H₂-9 και H-12, καθώς και ενός καρβονυλικού άνθρακα σε δ 169.5 (C-5) με τα H-3 και H-6 που παρατηρήθηκαν στο φάσμα HMBC συνέδεσαν τα τρία spin συστήματα (i, ii και iii). Στη συνέχεια, οι HMBC συσχετίσεις των H₂-13 με τους C-14 και C-15, του H-3 με τους C-2 και C-14, καθώς και του ευκίνητου πρωτονίου (NH-1) με τους C-2 και C-20 ολοκλήρωσαν την αλληλουχία των ατόμων στον σκελετό του μεταβολίτη **10** (Εικ. 47).



Εικόνα 45. Φάσμα COSY του μεταβολίτη **10**.



Εικόνα 46. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη **10**.



Εικόνα 47. Ομοπυρηνικές συζεύξεις COSY και οι πιο σημαντικές ετεροπυρηνικές συζεύξεις HMBC για τον μεταβολίτη **10**.

Σύγκριση των φασματοσκοπικών δεδομένων του μεταβολίτη **10** (Πίν. 34) με αυτά της βιβλιογραφίας για αντίστοιχα μόρια οδήγησε στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για τον γνωστό μεταβολίτη φουμιτρεμοργίνη C (fumitremorgin C) που στο παρελθόν έχει απομονωθεί από τον μύκητα *Aspergillus fumigatus* (Cui *et al.* 1996).

Πίνακας 34. Φασματοσκοπικά δεδομένα NMR του μεταβολίτη **10** σε CDCl₃ (δ σε ppm, πολλαπλότητα, *J* σε Hz).

Θέση	δ_c	δ_H
1		7.76 (brs)
2	132.2	
3	51.0	5.95 (d, 9.0)
5	169.5	
6	59.2	4.08 (t, 8.0)
7	28.6	2.38 (m), 2.21 (m)
8	23.1	2.03 (m), 1.91 (m)
9	45.4	3.62 (m)
11	165.8	
12	56.8	4.17 (dd, 11.5, 4.9)
13	21.9	3.49 (m), 3.07 (m)
14	106.3	
15	120.8	
16	118.9	7.41 (d, 8.6)
17	109.5	6.79 (dd, 8.6, 2.0)
18	156.5	
19	95.3	6.84 (d, 2.0)
20	137.1	
21	124.2	4.87 (d, 9.0)
22	134.0	
23	25.7	1.62 (s)
24	18.1	1.97 (s)
OMe	55.8	3.80 (s)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

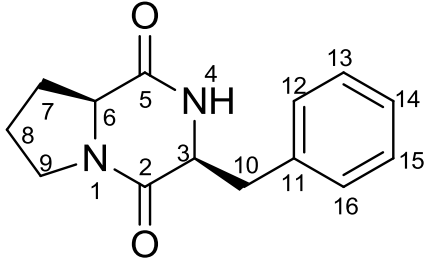
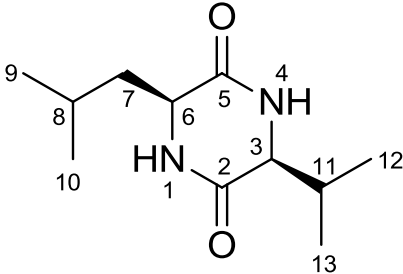
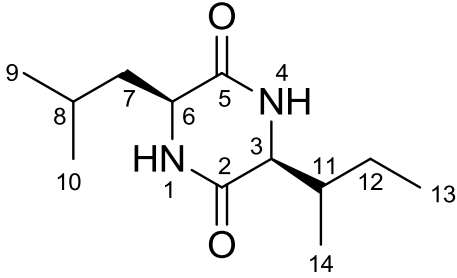
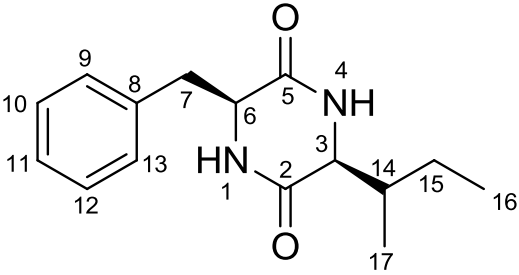
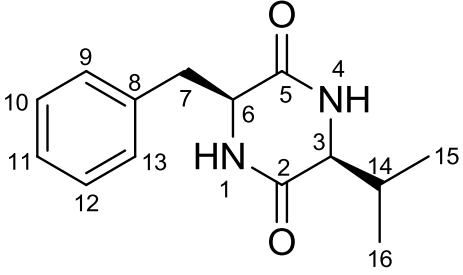
Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετήθηκε η χημική σύσταση των υπολειμμάτων της καλλιέργειας επιλεγμένων μυκητιακών στελεχών θαλάσσιας προέλευσης. Τα μυκητιακά στελέχη F10013 και F10107 απομονώθηκαν από δείγμα του ροδοφύκου *Laurencia* sp. που συλλέχθηκε στη περιοχή Σκάλα στα Βιγκλάφια Λακωνίας και από δείγμα του σπόγγου *Ircinia variabilis* που συλλέχθηκε στον Αγ. Φωκά της Τήνου, αντίστοιχα.

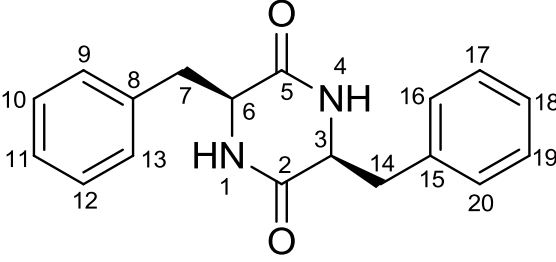
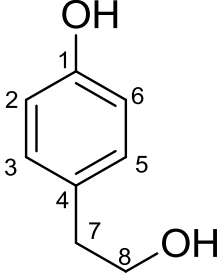
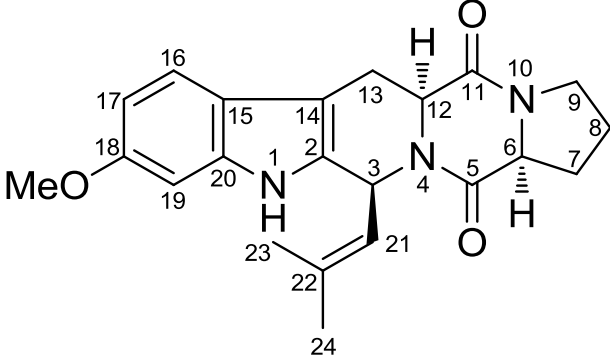
Τα υπολείμματα της καλλιέργειας των επιλεγμένων μυκητιακών στελεχών υποβλήθηκαν σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς με αποτέλεσμα την απομόνωση δεκατριών δευτερογενών μεταβολιτών, εκ των οποίων μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί οι δέκα (**1–10**) μέσω φασματοσκοπικών μεθόδων NMR και MS.

Συνολικά απομονώθηκαν οκτώ 2,5-δικετοπιπεραζίνες (**1–8**), μία απλή φαινολική ένωση (**9**) και ένα αλκαλοειδές (**10**).

Στη συνέχεια παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι απομονωθέντες μεταβολίτες.

Μεταβολίτης	Δομή
1 <i>cis</i>-κυκλο(προλίνη- λευκίνη)	
2 <i>cis</i>-κυκλο(προλίνη- ισολευκίνη)	

3 <i>cis</i>-κυκλο(προλίνη- φαινυλαλανίνη)	
4 <i>cis</i>-κυκλο(λευκίνη- βαλίνη)	
5 <i>cis</i>-κυκλο(λευκίνη- ισολευκίνη)	
6 <i>cis</i>- κυκλο(φαινυλαλανίνη- ισολευκίνη)	
7 <i>cis</i>- κυκλο(φαινυλαλανίνη- βαλίνη)	

8 <i>cis</i>- κυκλο(φαινυλαλανίνη- φαινυλαλανίνη)	
9 4-(2'-υδροξυαιθύλ)- φαινόλη	
10 φουμιτρεμοργίνη C	

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdel-Lateff A., Fisch K.M., König G.M., Wright A.D. A new antioxidant isobenzofuranone derivative from the algicolous marine fungus *Epicoccum* sp. *Planta Med.* **2003**, 69, 831-834.
- Abdel-Lateff A., Klemke C., König G.M., Wright A.D. Two new xanthone derivatives from the algicolous marine fungus *Wardomyces anomalus*. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 706-708.
- Bentis C. J., Kaufinan L., Golubic S. Endolithic fungi in reef-building corals (Order: Scleractinia) are common, cosmopolitan, and potentially pathogenic. *Biol. Bull.* **2000**, 198, 254-260.
- Blunt J.W., Copp B.R., Munro M.H.G., Northcote P.T., Prinsep M.R. Marine Natural Products. *Nat. Prod. Rep.*, **2008**, 25, 35-94.
- Bugni T.S. **2003**. Investigation of marine-derived fungi for bioactive natural products. PhD thesis. University of Utah, Utah, USA.
- Chinworrungsee M., Kittakoop P., Isaka M., Rungrod A., Tanticharoen M., Thebtaranonth Y. Antimalarial halorosellinic acid from the marine fungus *Halorosellinia oceanica*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2001**, 11, 1965-1969.
- Cui C. B., Kakeya H., Osada H. Novel mammalian cell cycle inhibitors, tryprostatins A, B and other diketopiperazines produced by *Aspergillus fumigatus*. II. Physico-chemical properties and structures. *J. Antibiot.*, **1996**, 49, 534-540.
- Fdhila F., Vázquez V., Sánchez J. L., Riguera R. dd-Diketopiperazines: Antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. *J. Nat. Prod.*, **2003**, 66, 1299–1301.
- Feofilova E. P. The kingdom Fungi: Heterogeneity of physiological and biochemical properties and relationships with plants, animals, and prokaryotes. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2001**, 37, 124-137.
- Furukawa T., Akutagawa T., Funatani H., Uchida T., Hotta Y., Niwa M., Takaya Y. Cyclic dipeptides exhibit potency for scavenging radicals. *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, 20,

2002-2009.

- Gunatilaka A.A.L., Wijeratne E.M.K. **2006**. Natural products from bacteria and fungi. In *Encyclopedia of life support systems*.
- He R., Wang B., Wakimoto T., Wang M., Zhu L., Abe I. Cyclodipeptides from metagenomic library of a Japanese marine sponge. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2013**, 24, 1926-1932.
- Joshi K.B., Verma S. Participation of aromatic side chains in diketopiperazine ensembles. *Tetrahedron Lett.*, **2008**, 49, 4231-4234.
- Komatsu K., Shigemori H., Mikami Y., Kobayashi J. Sculezonones A and B, two metabolites possessing a phenalenone skeleton from a marine-derived fungus *Penicillium* species. *J. Nat. Prod.*, **2000**, 63, 408-409.
- König G. M., Wright A. D. Marine natural products research: current directions and future potential. *Planta Med.* **1996**, 62, 193-211.
- Leano E. M. **2002**. Ecology of straminipiles from mangrove habitats. In *Fungi in Marine Environments*, Fungal Diversity Press: Hong Kong, pp. 111-134.
- Lee S.M., Li X.F., Jiang H., Cheng J.G., Seong S., Choi H.D., Son B.W. Terreusinone, a novel UV-A protecting dipyrroloquinone from the marine algicolous fungus *Aspergillus terreus*. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 7707-7710.
- Liu F.F., Li G.H., Yang Z.S., Zheng X., Yang Y., Zhang K.Q. Two new sesquiterpenes from the fungus *Stereum* sp. *Helv. Chim. Acta*, **2010**, 93, 1737 – 1741.
- Lu X., Shen Y., Zhu Y., Xu Q., Liu X., Ni K., Cao X., Zhang W., Jiao B. Diketopiperazine constituents of marine *Bacillus subtilis*. *Chem. Nat. Comp.*, **2009**, 45, 290-292.
- Nakagiri A. **2002**. *Halophytophthora* species from tropical and subtropical mangroves: A review of their characteristics. In *Fungi in Marine Environments*, Fungal Diversity Press: Hong Kong, pp. 1-14.
- Osterhage C., Schwibbe M., König G.M., Wright A.D. Differences between marine and terrestrial *Phoma* species as determined by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochem. Anal.*, **2000**, 11, 1-7.
- Osterhage C., Kaminsky R., König G.M., Wright A.D. Ascosalipyrrolone A, an antimicrobial alkaloid, from the obligate marine fungus *Ascochyta salicorniae*. *J. Org. Chem.*,

- 2000**, 65, 6412-6417.
- Osterhage C. **2001**. Isolation, structure determination and biological activity assessment of secondary metabolites from marine-derived fungi. PhD thesis. Technischen Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig, Germany.
- Proksch P., Edrada R. A., Ebel R. Drugs from the seas - current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol, Biotechnol.* **2002**, 59, 125-134.
- Rateb M.E., Ebel R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. *Nat. Prod. Rep.*, **2011**, 28, 290-344.
- Rowley D.C., Kelly S., Kauffman C.A., Jensen P.R., Fenical W. Halovirs A-E, new antiviral agents from a marine-derived fungus of the genus *Scytalidium*. *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, 11, 4263-4274.
- Saleem M., Ali M.S., Hussain S., Jabbar A., Ashrafd M., Lee Y.S. Marine natural products of fungal origin. *Nat. Prod. Rep.*, **2007**, 24, 1142–1152.
- Schulz B., Sucker J., Aust H.-J., Krohn K., Ludewig K., Jones P.G., Döring D. Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species. *Mycol. Res.*, **1995**, 99, 1007-1015.
- Shanga Z., Li X.M., Li C.S., Wang B.G. Diverse secondary metabolites produced by marine-derived fungus *Nigrospora* sp. MA75 on various culture media. *Chem. Biodivers.*, **2012**, 9, 1338-1348.
- Simmons T.L., Gerwick W.H. **2008**. Anticancer drugs of marine origin. In *Oceans and human health: Risks and remedies from the seas*. New York: Academic, pp. 432-452.
- Stark T., Hofmann T. Structures, sensory activity, and dose/response functions of 2,5-diketopiperazines in roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*). *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 7222–7231.
- Wei H., Itoh T., Kinoshita M., Kotoku N., Aoki S., Kobayashi M. Shimalactone A, a novel polyketide, from marine-derived fungus *Emericella variecolor* GF10. *Tetrahedron*, **2005**, 61, 8054-8058.