



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΟΓΝΩΣΙΑΣ & ΧΗΜΕΙΑΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης  
«Απομόνωση, Ανάπτυξη, Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών  
Προϊόντων»



**ΒΙΟΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΤΗΣ  
ΠΑΓΚΟΣΜΙΑΣ ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ  
ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΜΕ  
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΚΑΙ ΛΕΥΚΑΝΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ**



**ΓΕΩΡΓΟΥΣΑΚΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ**

ΧΗΜΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2016



INNOVATIVE  
COSMETICS  
FROM  
MICROORGANISMS



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

**Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα:**

Απομόνωση, Ανάπτυξη, Παραγωγή και Έλεγχος Βιοδραστικών Φυσικών Προϊόντων

**Τίτλος Εργασίας:**

«Βιοκατευθυνόμενη μελέτη μικροοργανισμών της παγκόσμιας βιοποικιλότητας για την απομόνωση και ταυτοποίηση βιοδραστικών μορίων με αντιοξειδωτική και λευκαντική δράση»

**Φοιτήτρια:**

Γεωργουσάκη Αικατερίνη  
Χημικός Μηχανικός  
Α.Μ.: 140412

**Επιβλέπων Καθηγητής:**

Επίκουρος Καθηγητής κ. Νικόλας Φωκιαλάκης

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

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



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, του τμήματος Φαρμακευτικής Αθηνών, ενώ οι καλλιέργειες των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκαν στο Ίδρυμα ερευνών Fundación MEDINA της Ισπανίας.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά:

- ❖ Τα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, το Διευθυντή του Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Καθηγητή κ. Αλέξιο-Λεάνδρο Σκαλτσούνη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νεκτάριο Αληγιάννη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλα Φωκιαλάκη, οι οποίοι δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα διπλωματική εργασία.
- ❖ Τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Νικόλα Φωκιαλάκη για την εξαιρετική συνεργασία μας, τη συνεχή επίβλεψη, ηθική στήριξη, εμπιστοσύνη και την ακούραστη καθοδήγηση που μου παρείχε σε όλη τη διάρκεια των δυο αυτών ετών, που συντέλεσαν στην άριστη συνεργασία μας. Θα ήθελα επίσης να τον ευχαριστήσω για την ευκαιρία που μου έδωσε να πραγματοποιήσω ένα μέρος της συγκεκριμένης εργασίας στο Ίδρυμα ερευνών Fundación MEDINA της Ισπανίας.
- ❖ Το Δρ. Νικόλαο Τσαφαντάκη για τη βοήθειά του, την υπομονή του και τη συνεχή καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας και για τις πολύτιμες συμβουλές του.
- ❖ Τη Δρ. Ειρήνη Μπαϊρα, τους Δρ. Νικόλαο Λεμονάκη και Dr.Vincent Briudes για τη λήψη φασμάτων LC-HRMS και μάζας.
- ❖ Όλους τους προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς και διδακτορικούς φοιτητές που απαρτίζουν το εργαστήριο, για τη βοήθειά τους και την άψογη συνεργασία μας.
- ❖ Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου που πάντα με στηρίζει σε όλα μου τα βήματα και στους στενούς μου φίλους, για την υπομονή τους και την συμπαράσταση τους.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....	9
SUMMARY.....	13
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	17
ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ, ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ .....	19
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	28
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	29
A.1 “Cosmeceuticals” .....	31
A.1.1 “Cosmeceuticals” με αντι-γηραντική δράση.....	32
A.1.2 “Cosmeceuticals” με λευκαντική δράση .....	33
A.2 Φυσικά Προϊόντα από μικροοργανισμούς .....	35
A.2.1 Φυσικά προϊόντα από βακτήρια και μύκητες.....	35
A.2.2 Ταξινόμηση φυσικών προϊόντων από μικροοργανισμούς .....	37
A.2.3 “Cosmeceuticals” από μύκητες .....	50
A.3 Μύκητες του γένους <i>Cercospora</i> .....	61
A.4 Βακτήρια του γένους <i>Streptomyces</i> .....	69
A.5.1 <i>Streptomyces hygroscopicus subsp. angustmyceticus</i> .....	74
B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	77
B.1 Προετοιμασία δειγμάτων .....	79
B.1.1 Διαλογή και καλλιέργεια των μικροοργανισμών προς μελέτη.....	79
B.1.2 Προετοιμασία βιομάζας και παρασκευή εκχυλίσματος του μύκητα <i>Cercospora sp.</i> .....	82
B.1.3 Προετοιμασία βιομάζας και παρασκευή εκχυλίσματος του ακτινομύκητα <i>Streptomyces hygroscopicus subsp. angustmyceticus</i> .....	83
B.1.4 Εκχύλιση με υπέρηχους (USAE) .....	84
B.1.5 Χρήση ρητίνης προσρόφησης .....	85
B.1.6 Εκχύλιση υγρού-υγρού (Liquid-liquid extraction, L.L.E.).....	87
B.2 Βιοδοκιμές .....	89
B.2.1 Μελέτη Αντιοξειδωτικής Δράσης.....	89
B.2.2 Μελέτη Λευκαντικής Δράσης.....	92
B.3 Αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Αναλυτική TLC).....	95
B.4 Παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας .....	96
B.5 Χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρηση (CPC).....	97
B.6 Υπερκρίσιμη ρευστή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (SFC-MS) .....	100
B.7 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).....	102
B.8 Υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης (UPLC) .....	105

B.9 Ταυτοποίηση ουσιών με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)	107
B.10 Ταυτοποίηση δομών με LC-HRMS/MS	108
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	111
Γ.1 “High-throughput screening”	113
Γ.2 Βιοκατευθυνόμενη επιλογή πρωτόκολλου εκχύλισης	125
Γ.2.1 Στελέχη επιλεγμένα για αντιοξειδωτική δράση	125
Γ.2.2 Στελέχη επιλεγμένα για λευκαντική δράση	139
Γ.3 Βιοκατευθυνόμενη απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από τον μύκητα <i>Cercospora sp.</i>	155
Γ.3.1 Ποιοτική ανάλυση του CF-223709_EtOAc	155
Γ.3.2 Κλασμάτωση του CF-223709_EtOAc με hplc-semiprep	156
Γ.3.3 Κλασμάτωση του CF-223709_EtOAc με SFC-MS	158
Γ.3.3 Ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών του CF-223709_EtOAc	162
Γ.4 Βιοκατευθυνόμενη απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών από τον ακτινομύκητα <i>Streptomyces hygrosopicus angustmyceticus</i>	177
Γ.4.1 Ποιοτική ανάλυση του CA-129531_EtOAc_LL	177
Γ.4.2 Κλασμάτωση του CA-129531_EtOAc_LL ΜΕ CPC	179
Γ.4.3 Ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών του CA-129531_EtOAc_LL	183
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	193
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	195



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

### **Το πρόγραμμα MICROSMETICS:**

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

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

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

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

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

### **Πραγματοποιηθείσα εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης:**

Μεταξύ των 1082 εκχυλισμάτων, 104 επέδειξαν σημαντική δράση σε τουλάχιστον ένα στόχο. Ανάμεσα στα 104 εκχυλίσματα, τα 75 ανήκαν σε ακτινομύκητες και τα 29 σε μύκητες. Αξίζει να σημειωθεί ότι μόλις το 11% και 6% όλων των εκχυλισμάτων ακτινομυκήτων και μυκήτων αντίστοιχα, χαρακτηρίστηκαν ως μη τοξικά και δραστικά. Περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων επέδειξε και πιθανή συμβολή της επιλογής του καλλιεργητικού μέσου στη μεταβολή της δράσης.

Το επόμενο στάδιο της μελέτης, ήταν η επιλογή των 20 πιο δραστικών στελεχών που πραγματοποιήθηκε μέσω της αξιολόγησης του χημικού προφίλ των 104 εκχυλισμάτων χρησιμοποιώντας μία στρατηγική που συνδυάζει UHPLC και LC-HRMS, σε θετικό και αρνητικό ιονισμό, με στατιστικές μεθόδους πολλών μεταβλητών. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε επανάληψη όλων των βιολογικών δοκιμών για αυτά τα 104 δραστικά εκχυλίσματα, με στόχο να αποκλειστούν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Τα χρωματογραφήματα αναλύθηκαν και παρατηρήθηκε μία θετική συσχέτιση μεταξύ των προφίλ των εκχυλισμάτων και των βιολογικών δράσεων. Έτσι επιλέχθηκαν τα 20 πιο δραστικά εκχυλίσματα (19 στελέχη καλλιεργούμενα με 14 διαφορετικά καλλιεργητικά μέσα), ανάμεσα στα οποία βρίσκονταν 8 από στελέχη μυκήτων και 12 από στελέχη ακτινομυκήτων, για την καλλιέργειά τους σε μεγάλη κλίμακα και για την επαλήθευση της δράσης τους.

Τα στελέχη καλλιεργήθηκαν στο 1 L με το βέλτιστο καλλιεργητικό μέσο και παρήχθησαν 66 εκχυλίσματα, εφαρμόζοντας διάφορα πρωτόκολλα εκχύλισης, με στόχο την βιοκατευθυνόμενη βελτιστοποίηση της μεθόδου εκχύλισης. Ανάμεσα σε αυτά τα περισσότερα επαλήθευσαν την δράση τους κατά την ανακαλλιέργειά τους στο 1 L, ενώ άλλα απέτυχαν. Το προφίλ των περιεχόμενων δευτερογενών μεταβολιτών μελετήθηκε με τη βοήθεια TLC, UPLC και LC-HRMS.

Το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του *Cercospora sp.* (στέλεχος CF-223709) κατέδειξε την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση ( $70.76\% \pm 1.28$  ποσοστό δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH, στα 200  $\mu\text{g/ml}$ ), ενώ το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα που προήλθε από υγρή υγρή εκχύλιση (EtOAc\_LL) του *Streptomyces hygroscopicus subsp. angustmyceticus* (στέλεχος CA-129531) κατέδειξε την πιο σημαντική λευκαντική δράση ( $74.35\% \pm 0.48$  αναστολή του ενζύμου της τυροσινάσης, στα 300  $\mu\text{g/ml}$ ). Συνεπώς τα προαναφερθέντα εκχυλίσματα στελεχών επιλέχθηκαν για την περαιτέρω τους μελέτη και απομόνωση και ταυτοποίηση των βιοδραστικών μεταβολιτών τους.

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

- τριών δραστικών μεταβολιτών, στους οποίους οφείλεται η αντιοξειδωτική δράση του στελέχους CF-223709, οι οποίοι περιλαμβάνουν τις γνωστές ενώσεις φουλβικό οξύ ( $\text{IC}_{50}=21.58$   $\mu\text{g/ml}$ , δοκιμή DPPH) και βιναξανθόνη (35.08  $\mu\text{g/ml}$ , δοκιμή DPPH), καθώς και ένα νέο φυσικό προϊόν, παράγωγο του φουλβικού οξέος, με μοριακό τύπο  $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_6$  ( $\text{IC}_{50}=18.99$   $\mu\text{g/ml}$ , δοκιμή DPPH).
- δύο δραστικών μεταβολιτών, που συνεισφέρουν στην λευκαντική δράση του στελέχους CA-129531 και ταυτοποιήθηκαν ως τριχοστατίνη A και τριχοστατικό οξύ.

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



## SUMMARY

---

### **The MICROSOMETICS project:**

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

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

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

Among them 54 fungi and 56 actinomycetes from the global biodiversity (including strains from Antarctica, Alaska, Spain, New Caledonia, Hawaii, South Africa, Comoros Island etc.) were cultivated under “nutritional arrays” (different culture conditions) in order each single strain to produce ten different extracts and thus

exploit all the potential chemodiversity that microorganisms can produce. In total 1082 sample extracts (614 actinomycetous extracts & 425 fungal extracts) have been generated, then were filtered and prepared in 96 barcoded well format and were forwarded to high throughput screening.

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

### **Work performed during the current master thesis:**

A broad spectrum of bioassays have being incorporated for the evaluation of anti-ageing, more specifically anti-oxidant, skin-protecting, and skin-whitening activity of all derived products. For the evaluation of the 1082 extracts concerning the antioxidant activity the DPPH and ABTS assays were used. Skin-protecting was evaluated by measuring spectrophotometrically the inhibitory properties of samples against enzymes which are related to the elasticity and moisture of the skin (elastase, collagenase, and protease). The skin whitening activities were determined by the tyrosinase assay, using L-DOPA as substrate.

Among the 1082 extracts the top 104 extracts demonstrated significant activity in at least one target and were forwarded to metabolomics analysis. Among the 104 extracts, 75 belonged to actinomycetes and 29 to fungi. Only the 11% and 6% of all the actinomycetes' and fungi's extracts respectively were non toxic and active. Data analysis revealed the likely effect in the activity that the culture medias may have.

In order to select the 20 most active extracts, a strategy combining UHPLC/Orbitrap-HRMS, in positive and negative modes, with multivariate statistical methods was applied. In parallel, biological assays were repeated to exclude the false positive samples and select the most active ones. All derived chromatograms have been analyzed and a positive correlation between the profiles of the extracts with the bioassays' results was observed. Thus, through analysis the 20 most promising extracts (19 strains under 14 conditions have been forwarded for large-scale cultivation and for confirmation of the activity. In total 8 fungal and 12 actinomycetous extracts were selected for further investigation.

All strains were cultivated with the optimum media for producing the active metabolites in a 1 L scale fermentation and 66 extracts were generated, using various extraction protocols in order to optimize the extraction method. Among them some confirmed the activity while in others the large scale cultivation failed to produce the same activity and metabolites and thus their cultivation is currently re-evaluated. The chemical profile of those extracts was examined by using TLC, UPLC and LC-HRMS.

The EtOAc extract of *Cercospora sp.* (strain CF-223709) with the most significant antioxidant activity ( $70.76\% \pm 1.28$  free radicals scavenging, DPPH assay) and the

EtOAc\_LL extract of *Streptomyces hygroscopicus angustmyceticus* (strain CA-129531) with the most significant skin-whitening activity (74.35%  $\pm$  0.48 inhibition of the tyrosinase enzyme), were chosen in order to isolate their bioactive metabolites and elucidate their structures.

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

- three bioactive metabolites that cause the antioxidant activity of the strain CF-223709, which include the well-known active compounds fulvic acid ( $IC_{50}$ =21.58  $\mu$ g/ml, DPPH assay) and vinaxanthone ( $IC_{50}$ =35.08  $\mu$ g/ml, DPPH assay), as well as one new natural product with the chemical formula  $C_{13}H_{12}O_6$  ( $IC_{50}$ =18.99  $\mu$ g/ml, DPPH assay).
- two bioactive metabolites that contribute to the skin-whitening activity of the strain CA-129531: trichostatin A and trichostatic acid.

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





## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

<b><sup>13</sup>C-NMR</b>	Carbon-13 nuclear magnetic resonance
<b><sup>1</sup>H-NMR</b>	Proton Nuclear Magnetic Resonance
<b>ABTS</b>	2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
<b>ABA</b>	Abscisic acid
<b>CBT</b>	Cercospora beticola toxin
<b>COSY</b>	Correlation Spectroscopy
<b>CPC</b>	Centrifugal Partition Chromatography
<b>DCM</b>	Dichloromethene
<b>DMAPP</b>	Dimethylalyl Pyrophosphate
<b>DMSO</b>	Dimethyl Sulfoxide
<b>DOPA</b>	dihydroxyphenylalanine
<b>DPPH</b>	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
<b>EGT</b>	L-ergothioneine
<b>EMA</b>	European Medicines Agency
<b>ESI</b>	Electrospray Ionization
<b>FDA</b>	US Food and Drug Administration
<b>G, C</b>	Guanine, Cytosine
<b>HMBC</b>	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
<b>HPLC</b>	High Pressure Liquid Chromatography ή High Performance Liquid Chromatography
<b>DAD</b>	Diode Array Detector
<b>HR-MS</b>	High Resolution Mass Spectrometry
<b>HSQC</b>	Heteronuclear Single Quantum Coherence
<b>IC<sub>50</sub></b>	Inhibition Concentration
<b>IPP</b>	Isopentenyl pyrophosphate
<b>K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub></b>	Potassium persulfate
<b>K<sub>D</sub></b>	Συντελεστής κατανομής
<b>LC</b>	Liquid Chromatography
<b>LLE</b>	Liquid-liquid extraction
<b>MMPs</b>	Matrix metalloproteinases
<b>MS</b>	Mass Spectrometry
<b>NMR</b>	Nuclear magnetic resonance
<b>NRPs</b>	Non-ribosomal peptides
<b>PB</b>	Potassium Buffer
<b>Semi-Prep HPLC</b>	Semi-preparative High-performance liquid chromatography
<b>SFC</b>	Supercritical Fluid Extraction
<b>TLC</b>	Thin-Layer Chromatography
<b>Trolox</b>	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

<b>TYR</b>	Tyrosinase
<b>UPLC</b>	Ultra Performance Liquid Chromatography
<b>USAE</b>	Ultrasound-assisted Extraction
<b>UV-Vis</b>	Ultraviolet–visible spectroscopy

## ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ, ΕΙΚΟΝΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

### Πίνακες

<b>α/α</b>	<b>Περιγραφή</b>	<b>Σελίδα</b>
<b>A.1</b>	Παραδείγματα εμπορικών σκευασμάτων που περιέχουν μύκητες ή εκχυλίσματα μυκήτων	56
<b>A.2</b>	Αποτελέσματα εξέτασης ειδών του γένους <i>Cercospora</i> για κερκοσπορίνη και άλλους δευτερογενείς μεταβολίτες	63
<b>A.3</b>	Αντιβιοτικά και άλλες συγγενείς ουσίες που παράγονται από είδη του γένους <i>Streptomyces</i>	73
<b>B.1</b>	Λίστα καλλιεργητικών μέσων μυκήτων	80
<b>B.2</b>	Λίστα καλλιεργητικών μέσων ακτινομυκήτων	80
<b>B.3</b>	Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα του καταλόγου των εκχυλισμάτων, όπου C?=καλλιεργητικό μέσο (negative control), CA=στέλεχος ακτινομύκητα, CF=στέλεχος μύκητα	81
<b>B.4</b>	Συστατικά του μέσου καλλιέργειας SCY-2	82
<b>B.5</b>	Συστατικά του μέσου καλλιέργειας DNPM	83
<b>B.6</b>	Στοιχεία μικροοργανισμών που καλλιεργήθηκαν στο 1 L	84
<b>B.7</b>	Αποδόσεις εκχυλισμάτων των επιλεγθέντων στελεχών	88
<b>B.8</b>	Σύσταση του διαφασικού συστήματος διαλυτών για τη CPC	99
<b>B.9</b>	Πειραματικές συνθήκες CPC	99
<b>B.10</b>	Κλάσματα CPC	100
<b>B.11</b>	Πειραματικές συνθήκες SFC-MS	102
<b>B.12</b>	Πειραματικές συνθήκες για την αναλυτική HPLC	103
<b>B.13</b>	Πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την αναλυτική HPLC	104
<b>B.14</b>	Πειραματικές συνθήκες για την ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία του CA-129531	104
<b>B.15</b>	Πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία του CA-129531	105
<b>B.16</b>	Πειραματικές συνθήκες για την ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία του CF-223709	105
<b>B.17</b>	Πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία του CF-223709	105
<b>B.18</b>	Πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων	106
<b>B.19</b>	Πειραματικές συνθήκες LC	109
<b>B.20</b>	Πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων	110
<b>B.21</b>	Συνθήκες ιονισμού και θραυσμάτωσης MS/MS	110
<b>Γ.1</b>	Κατώτατο όριο ανά βιολογικό στόχο, για τη θεώρηση ενός εκχυλίσματος ως δραστικού κατά το προκαταρκτικό screening.	114
<b>Γ.2</b>	Επιλεγθέντα στελέχη ακτινομυκήτων κατά το προκαταρκτικό high-throughput screening	116

<b>Γ.3</b>	Επιλεγθέντα στελέχη μυκήτων κατά το προκαταρκτικό high-throughput screening	119
<b>Γ.4</b>	Τα 20 τελικά επιλεγθέντα δραστικά στελέχη	123
<b>Γ.5</b>	Βιολογική δράση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CA-214639	127
<b>Γ.6</b>	Βιολογική δράση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CA-129247	130
<b>Γ.7</b>	Βιολογική δράση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CA-126581	132
<b>Γ.8</b>	Βιολογική δράση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CA-131129	134
<b>Γ.9</b>	Βιολογική δράση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CA-218259	136
<b>Γ.10</b>	Βιολογική δράση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CF-223709	137
<b>Γ.11</b>	Βιολογική δράση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CA-129255	141
<b>Γ.12</b>	Βιολογική δράση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CA-126574	143
<b>Γ.13</b>	Βιολογική δράση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CF-223716	145
<b>Γ.14</b>	Βιολογική δράση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CF-116223	147
<b>Γ.15</b>	Βιολογική δράση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CF-092983	149
<b>Γ.16</b>	Βιολογική δράση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CA-129531	151
<b>Γ.17</b>	Αποτελέσματα λευκαντικής δράσης των ληφθέντων κλασμάτων από την ημι-παρασκευαστική HPLC	152
<b>Γ.18</b>	Αντιοξειδωτική δράση του CF-223709_EtOAc	155
<b>Γ.19</b>	Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης των ληφθέντων κλασμάτων από την ημι-παρασκευαστική HPLC	157
<b>Γ.20</b>	Προκαταρκτική εξέταση της αντιοξειδωτικής δράσης των κλασμάτων 1,2,3 και 4	158
<b>Γ.21</b>	Αποδόσεις και αντιοξειδωτική δράση των κλασμάτων που λήφθηκαν από το SFC-MS	159
<b>Γ.22</b>	Χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H}$ NMR του μεταβολίτη 1.	162
<b>Γ.23</b>	Χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H}$ NMR του μεταβολίτη 2	167
<b>Γ.24</b>	Χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H}$ NMR του μεταβολίτη 3	171
<b>Γ.25</b>	Λευκαντική δράση του CA-129531_EtOAc_LL	177
<b>Γ.26</b>	Οι αποδόσεις της κλασμάτωσης με CPC, όπως προέκυψαν από τη συνένωση των παρόμοιων κλασμάτων	179
<b>Γ.27</b>	Λευκαντική δράση αντιπροσωπευτικών συνενωμένων κλασμάτων που προήλθαν από το CPC	181
<b>Γ.28</b>	Χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H}$ NMR του μεταβολίτη 4	183
<b>Γ.29</b>	Χημικές μετατοπίσεις $^1\text{H}$ NMR του μεταβολίτη 5	188

## Εικόνες

<b>α/α</b>	<b>Περιγραφή</b>	<b>Σελίδα</b>
<b>A.1</b>	Άκυκλα μονοτερπένια	38
<b>A.2</b>	Μονοκυκλικά μονοτερπένια	39
<b>A.3</b>	Δικυκλικά μονοτερπένια	39
<b>A.4</b>	Παραδείγματα σεσκιτερπενίων απομονωμένων από μύκητες ή βακτήρια	40
<b>A.5</b>	Παραδείγματα διτερπενίων απομονωμένων από μύκητες ή βακτήρια	41
<b>A.6</b>	Χημική δομή εργοστερόλης	41
<b>A.7</b>	Χημική δομή ελβολικού οξέος	42
<b>A.8</b>	Χημική δομή κεφαλοσπορίνης	42
<b>A.9</b>	Χημική δομή φουσιδικού οξέος	42
<b>A.10</b>	Χημική δομή φασκικουλικού οξέος A	43
<b>A.11</b>	Χημική δομή γανοδερικού οξέος	43
<b>A.12</b>	Χημική δομή πορικοϊκού οξέος	44
<b>A.13</b>	Παραδείγματα αρωματικών πολυκετιδίων που έχουν απομονωθεί από ακτινοβακτήρια	45
<b>A.14</b>	Χημική δομή λακτόνης τριακετικού οξέος (A) και ρακιδικίνης (B)	46
<b>A.15</b>	Χημική δομή 6-μεθυλσαλικυλικού οξέος	46
<b>A.16</b>	Χημική δομή πενικιλλικού οξέος	46
<b>A.17</b>	Χημική δομή κυκλοσπορίνης	47
<b>A.18</b>	Χημικές δομές αλκαλοειδών από μύκητες	48
<b>A.19</b>	Χημική δομή κυτοχάλασίνης A και B	49
<b>A.20.(1-12)</b>	Εμπορικά σκευάσματα καλλυντικών που περιέχουν μανιτάρια ή εκχυλίσματα αυτών. 1. Aquamella Cream ( <i>Tremella fuciformis</i> ) 2. Origins Plantidote Mega-Mushroom Treatment 3. Vitamega shampoo ( <i>Agaricus subrufescens</i> ) 4. Alqvimia Eternal Youth ( <i>Schizophyllum commune</i> ) 5. Sukran Grape Seed Lift Eye Mask ( <i>Tremella polysaccharide</i> ) 6. Aveeno Positively Ageless Cream ( <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Lentinula edodes</i> ) 7. BeautyDiy Aqua Circulation Hydrating Gel ( <i>Tremella polysaccharide</i> ) 8. La Prairie Advanced Marine Biology Night Solution ( <i>Tremella fuciformis</i> ) 9. Sulwhasoo Hydroaid (εκχύλισμα του <i>Schizophyllum commune</i> ) 10. Yves Saint Laurent Temps Majeur Elixir De Nui ( <i>Ganoderma lucidum</i> ) 11. Murad's Sleep Reform Serum ( <i>Schizophyllum</i> ) 12. Kose Sekkisei Cream ( <i>Cordyceps sinensis</i> )	58
<b>A.21.(13-18)</b>	Διάφορα nutricosmetics που περιέχουν προϊόντα μανιταριού. 13. Grifron Maltake ( <i>Grifola frondosa</i> ), 14. Mushroom Wisdom Super Turkey Tail ( <i>Coriohus versicolor</i> ), 15. Perricone MD	59

	Maltake Mushroom Extract SX-Fraction, 16. Mushroom Wisdom Super Lion's Mane ( <i>Hericium erinaceus</i> ), 17. Mushroom Wisdom Super Tremella ( <i>Tremella fuciformis</i> και <i>Grifola frondosa</i> ), 18. Mushroom Wisdom Super Royal Agaricus ( <i>Agaricus blazei</i> )	
A.22	Κονίδια του γένους <i>Cercospora</i> (Jason Brock, University of Georgia)	62
A.23	Χημική δομή κερκοσπορίνης και αναλόγων της	64
A.24	Χημική δομή μπετικολίνης-1 (CBT)	65
A.25	Χημική δομή φουλβικού οξέος	65
A.26	Χημική δομή λιγουστρόνης A(6), B(7), C(8)	66
A.27	Χημική δομή μελλεΐνης (9) και 4-υδρόξυμελλεΐνης (10)	66
A.28	Χημική δομή ταΐβαπυρόνης (11), δοχιστρομίνης (12, 13) και του νέου μορίου (14) που απομονώθηκε από τον <i>C. melonis</i>	66
A.29	Χημική δομή των μορίων (19), (20) και (22) που απομονώθηκαν από τον <i>C. scirpicola</i>	67
A.30	Χημική δομή τραβερσιανάλης	67
A.31	Στελεχος <i>Streptomyces</i> όπως φαίνεται στο φωτονικό μικροσκόπιο με χρώση κατά Gram	69
A.32	Αποικίες του ακτινομύκητα <i>Streptomyces hygrosopicus</i> πάνω σε πλάκα άγαρ μέσω μικροσκοπίου	74
A.33	Χημική δομή ανγκουστμυκίνης A (A) και C (B)	75
B.1	Απεικόνιση της συλλογής μικροοργανισμών του ιδρύματος ερευνών Fundacióń MEDINA της Ισπανίας	79
B.2	Ποικιλομορφία των επιλεγμένων στελεχών (54 μύκητες και 56 ακτινομύκητες)	79
B.3	Διανομή εκχυλισμάτων σε 96-τρυπες πλάκες	81
B.4	Το στέλεχος CF-223709 μετά την ολοκλήρωση της καλλιέργειας του	82
B.5	Το στέλεχος CA-129531 μετά την ολοκλήρωση της καλλιέργειας του	83
B.6	Χημική δομή ρητίνης XAD-4	86
B.7	Μηχανισμός προσρόφησης στην ρητίνη XAD-4: φαινόμενο προσρόφησης ενός τυπικού μορίου (---o) σε ένα μεγενθυμένο τμήμα του κόκκου όπου το μόριο περιέχει ένα υδρόφοβο (---) και ένα υδρόφιλο τμήμα (o).	86
B.8	Μηχανισμός δράσης DPPH•	90
B.9	Δομή γαλλικού οξέος	91
B.10	Μηχανισμός δράσης ABTS• <sup>+</sup>	91
B.11	Δομή Trolox.	92
B.12	Μηχανισμός δράσης της τυροσινάσης	93
B.13	Δομή κοζικού οξέος	94
B.14	Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-Vis μοντέλο Infinite® M200 Pro της εταιρείας TECAN	94

<b>B.15</b>	CAMAG TLC Visualizer για την αποτύπωση του χρωματογραφήματος ως έγχρωμης εικόνας στα 254 nm, 366 nm και το ορατό.	95
<b>B.16</b>	Σύστημα CAMAG Linomat 5 με σύριγγα για την ομοιόμορφη εφαρμογή των δειγμάτων στις πλάκες με τη μορφή ψεκασμού	96
<b>B.17</b>	FCPC <sup>®</sup> Rousselet-Robatel Kromaton	98
<b>B.18</b>	Διάταξη SFC-MS	101
<b>B.19</b>	LTQ Orbitrap όργανο	109
<b>Γ.1</b>	Γράφημα ποσοστού κυτταροτοξικότητας εκχυλισμάτων ακτινομυκήτων	113
<b>Γ.2</b>	Γράφημα ποσοστού κυτταροτοξικότητας εκχυλισμάτων μυκήτων	114
<b>Γ.3</b>	Διάγραμμα ποσοστού δραστικών εκχυλισμάτων ακτινομυκήτων ανά βιολογικό στόχο	115
<b>Γ.4</b>	Διάγραμμα ποσοστού δραστικών εκχυλισμάτων μυκήτων ανά βιολογικό στόχο	115
<b>Γ.5</b>	Διάγραμμα δραστικών εκχυλισμάτων ακτινομυκήτων ταξινομημένα βάσει των καλλιεργητικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν	121
<b>Γ.6</b>	Διάγραμμα δραστικών εκχυλισμάτων μυκήτων ταξινομημένα βάσει των καλλιεργητικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν	121
<b>Γ.7</b>	Ποσοστά δραστικών στελεχών ακτινομυκήτων ταξινομημένα ως προς την οικογένεια προέλευσης	122
<b>Γ.8</b>	Ποσοστά δραστικών στελεχών μυκήτων ταξινομημένα ως προς την οικογένεια προέλευσης	122
<b>Γ.9</b>	Γράφημα που καταδεικνύει το ποσοστό των εκχυλισμάτων που είχαν αντιοξειδωτική δράση	126
<b>Γ.10</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc και EtOH/H <sub>2</sub> O του CA-214639.	126
<b>Γ.11</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H <sub>2</sub> O και Xad-4 του CA-214639 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης	126
<b>Γ.12</b>	Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος Xad-4 του CA-214639	128
<b>Γ.13</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc και EtOH/H <sub>2</sub> O του CA-129247.	129
<b>Γ.14</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H <sub>2</sub> O και Xad-4 του CA-129247 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.	129
<b>Γ.15</b>	Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος Xad-4 του CA-129247	130
<b>Γ.16</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc και EtOH/H <sub>2</sub> O του CA-126581.	131

<b>Γ.17</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H <sub>2</sub> O και Xad-4 του CA-126581 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.	131
<b>Γ.18</b>	Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος Xad-4 του CA-126581	132
<b>Γ.19</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc και EtOH/H <sub>2</sub> O του CA-131129.	133
<b>Γ.20</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H <sub>2</sub> O και Xad-4 του CA-131129 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.	133
<b>Γ.21</b>	Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος του CA-131129	134
<b>Γ.22</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc, EtOH/H <sub>2</sub> O και EtOH του CA-218259	135
<b>Γ.23</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H <sub>2</sub> O και Xad-4 του CA-218259 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.	135
<b>Γ.24</b>	Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος Xad-4 του CA-218259	136
<b>Γ.25</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc και EtOH/H <sub>2</sub> O του CF-223709.	137
<b>Γ.26</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H <sub>2</sub> O και Xad-4 του CF-223709 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.	137
<b>Γ.27</b>	Χρωματογράφημα ESI(+) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα του CF-223709	138
<b>Γ.28</b>	Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα του CF-223709	138
<b>Γ.29</b>	Γράφημα που καταδεικνύει το ποσοστό των εκχυλισμάτων που είχαν λευκαντική δράση	139
<b>Γ.30</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc, EtOH/H <sub>2</sub> O και EtOH του CA-129255	140
<b>Γ.31</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H <sub>2</sub> O και Xad-4 του CA-129255 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.	140
<b>Γ.32</b>	Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος Xad-4 του CA-129255	141
<b>Γ.33</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc, EtOH/H <sub>2</sub> O και EtOH του CA-126574	142
<b>Γ.34</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H <sub>2</sub> O και Xad-4 του CA-126574 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.	142



<b>Γ.35</b>	Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος Xad-4 του CA-126574	143
<b>Γ.36</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc, EtOH/H <sub>2</sub> O και EtOH του CF-223716.	144
<b>Γ.37</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H <sub>2</sub> O και Xad-4 του CF-223716 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.	144
<b>Γ.38</b>	Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος του CF-223716	145
<b>Γ.39</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc, EtOH/H <sub>2</sub> O και EtOH του CF-116223.	146
<b>Γ.40</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H <sub>2</sub> O και Xad-4 του CF-116223 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.	146
<b>Γ.41</b>	Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος Xad-4 του CF-116223	147
<b>Γ.42</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc, EtOH/H <sub>2</sub> O και EtOH του CF-092983.	148
<b>Γ.43</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H <sub>2</sub> O και Xad-4 του CF-092983 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.	148
<b>Γ.44</b>	Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος Xad-4 του CF-092983	149
<b>Γ.45</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc, EtOH και MeOH του CA-129531.	150
<b>Γ.46</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H <sub>2</sub> O και Xad-4 του CA-129531 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.	150
<b>Γ.47</b>	Χρωματογράφημα HPLC των εκχυλισμάτων του CA-129531(254 nm) βάσει των πειραματικών συνθηκών και του προγράμματος έκλουσης που περιγράφονται στους Πίνακες B.11 και B.12 αντίστοιχα.	151
<b>Γ.48</b>	Χρωματογράφημα ημι-παρασκευαστικής HPLC (264nm) του CA-129531_MeOH εκχυλίσματος	152
<b>Γ.49</b>	Συγκριτικό διάγραμμα λευκαντικής δράσης εκχυλισμάτων του στελέχους CA-129531	153
<b>Γ.50</b>	Χρωματογράφημα ESI(+) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα που προήλθε από υγρή-υγρή εκχύλιση του CA-129531	153
<b>Γ.51</b>	Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα που προήλθε από υγρή-υγρή εκχύλιση του CA-129531	154
<b>Γ.52</b>	TLC του CF-223709_EtOAc εκχυλίσματος στα 254 και 360 nm.	156

	Ανάπτυξη σε σύστημα CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O: 13/9/3	
<b>Γ.53</b>	Χρωματογράφημα UPLC (284nm) του CF-223709_EtOAc	156
<b>Γ.54</b>	Χρωματογράφημα ημι-παρασκευαστικής HPLC (254nm) του CF-223709_EtOAc εκχυλίσματος	157
<b>Γ.55</b>	Διαχωρισμός του εκχυλίσματος CF-223709_EtOAc με SFC και αρίθμηση των ληφθέντων κλασμάτων	158
<b>Γ.56</b>	Χρωματογράφημα CF-223709_EtOAc (284 nm)	159
<b>Γ.57</b>	Χρωματογράφημα KGFa21 (284 nm)	160
<b>Γ.58</b>	Χρωματογράφημα Μεταβολίτη 1 (KGFa20), (284 nm)	160
<b>Γ.59</b>	Χρωματογράφημα Μεταβολίτη2, (KGFa22) (284 nm)	161
<b>Γ.60</b>	Χρωματογράφημα Μεταβολίτη 3, (KGFa19) (284 nm)	161
<b>Γ.61</b>	Δομή μεταβολίτη 1	162
<b>Γ.62</b>	Φάσμα <sup>1</sup> H NMR για τον Μεταβολίτη 1.	163
<b>Γ.63</b>	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 1.	164
<b>Γ.64</b>	Φάσμα HSQC για τον Μεταβολίτη 1.	165
<b>Γ.65</b>	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 1.	165
<b>Γ.66</b>	Φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS για τον Μεταβολίτη 1	166
<b>Γ.67</b>	Δομή φουλβικού οξέος (Μεταβολίτης 2)	167
<b>Γ.68</b>	Φάσμα <sup>1</sup> H NMR για τον Μεταβολίτη 2.	168
<b>Γ.69</b>	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 2.	169
<b>Γ.70</b>	Φάσμα HSQC για τον Μεταβολίτη 2.	169
<b>Γ.71</b>	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 2.	170
<b>Γ.72</b>	Φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS για τον Μεταβολίτη 2.	170
<b>Γ.73</b>	Δομή βιναξανθόνης (Μεταβολίτης 3)	171
<b>Γ.74</b>	Φάσμα <sup>1</sup> H NMR για τον Μεταβολίτη 3.	172
<b>Γ.75</b>	Αρωματική περιοχή φάσματος <sup>1</sup> H NMR για τον Μεταβολίτη 3.	173
<b>Γ.76</b>	Αλειφατική περιοχή φάσματος <sup>1</sup> H NMR για τον Μεταβολίτη 3.	174
<b>Γ.77</b>	Φάσμα HSQC για τον Μεταβολίτη 3.	175
<b>Γ.78</b>	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 3.	175
<b>Γ.79</b>	Φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS για τον Μεταβολίτη 3	176
<b>Γ.80</b>	TLC του CA-129531_EtOAc_LL στα 254, 360 nm και στο ορατό κατόπιν ψεκάσματος με αντιδραστήριοθειικής βανιλίνης. Ανάπτυξη σε σύστημα CHCl <sub>3</sub> /MeOH: 9/1	178
<b>Γ.81</b>	Χρωματογράφημα UPLC (254nm) του CA-129531_EtOAc_LL	178
<b>Γ.82</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Σύστημα διαλυτών CHCl <sub>3</sub> /MeOH:90/10. Στη χρωματογραφία παρουσιάζονται τα συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από τη CPC, καθώς και το εκχύλισμα CA-129531_EtOAc_LL που υποβλήθηκε σε αυτή τη κλασμάτωση	180
<b>Γ.83</b>	Χρωματογράφημα Μεταβολίτη 4 ( KGBa5) (254 nm)	181
<b>Γ.84</b>	Χρωματογράφημα Μεταβολίτη 5 (KGBa7) (254 nm)	182
<b>Γ.85</b>	Δομή τριχοσταίνης Α (Μεταβολίτης 4)	183
<b>Γ.86</b>	Φάσμα <sup>1</sup> H NMR για τον Μεταβολίτη 4.	185
<b>Γ.87</b>	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 4.	185

<b>Γ.88</b>	Φάσμα HSQC για τον Μεταβολίτη 4.	186
<b>Γ.89</b>	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 4.	186
<b>Γ.90</b>	Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 4.	187
<b>Γ.91</b>	Δομή τριχοστατικού οξέος (Μεταβολίτης 5)	188
<b>Γ.92</b>	Φάσμα <sup>1</sup> H NMR για τον Μεταβολίτη 5.	189
<b>Γ.93</b>	Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 5.	190
<b>Γ.94</b>	Φάσμα HSQC για τον Μεταβολίτη 5.	190
<b>Γ.95</b>	Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 5.	191
<b>Γ.96</b>	Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 5	191

## ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

---

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η βιοκατευθυνόμενη μελέτη μικροοργανισμών της παγκόσμιας βιοποικιλότητας, με στόχο την απομόνωση και ταυτοποίηση βιοδραστικών μορίων με αντιοξειδωτική και λευκαντική δράση.

Πιο συγκεκριμένα,

1. Η βιολογική αποτίμηση της δράσης 1082 μικροβιακών εκχυλισμάτων, που προήλθαν από τη καλλιέργεια 110 μικροοργανισμών. Επιλέχθηκαν σαν πρωταρχικοί οι κάτωθι στόχοι:
  - Αντιοξειδωτική δράση
  - Λευκαντική δράση
2. Η επιλογή 20 εκχυλισμάτων, που αξίζει να διερευνηθούν περαιτέρω, με την παράλληλη μελέτη της βιολογικής δράσης και του χημικού προφίλ τους.
3. Η βιοκατευθυνόμενη επιλογή του πρωτοκόλλου εκχύλισης που θα χρησιμοποιηθεί για κάθε επιλεγμένο στέλεχος.
4. Η τελική επιλογή δύο εκχυλισμάτων, εκ των οποίων το ένα θα έχει επιδείξει την σημαντικότερη αντιοξειδωτική δράση και το άλλο τη σημαντικότερη λευκαντική δράση.
5. Η λεπτομερής μελέτη των δύο πιο βιοδραστικών εκχυλισμάτων και η βιοκατευθυνόμενη απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών τους, με τελικό στόχο την ταυτοποίηση των βιοδραστικών μορίων.

## **Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

---



## A.1 “COSMECEUTICALS”

---

Ο όρος “cosmeceuticals” εισήχθη για πρώτη φορά από τον Albert Kligman (Kligman, A. M., 2000) κατά τη διάρκεια ενός συνεδρίου περίπου 20 χρόνια πριν. Πρόκειται για μία κατηγορία καλλυντικών προϊόντων που περιέχουν βιολογικά ενεργά συστατικά με οφέλη παρόμοια με εκείνα που προσφέρουν τα φάρμακα και πληρούν τόσο τις ανάγκες της ομορφιάς όσο και της υγείας. Ο όρος “cosmeceuticals” χρησιμοποιείται για να ορίσει ένα προϊόν το οποίο αποτελεί ένα υβρίδιο φαρμάκου και καλλυντικού (Fulekar, M.H., 2010). Χρησιμοποιείται από υπηρεσίες και εταιρίες επαγγελματικής περιποίησης δέρματος, για να περιγράψουν ένα προϊόν το οποίο έχει μετρήσιμη βιολογική δράση στο δέρμα, όπως ένα φάρμακο, αλλά ορίζεται ως καλλυντικό καθώς υπάρχει ο ισχυρισμός ότι επηρεάζει την εμφάνιση (Adam S et al., 2010). Πολλές δραστικές ουσίες που περιέχονται σε αυτά είτε συντίθενται χημικώς, είτε προέρχονται φυσικά από φυτικούς ή ζωικούς οργανισμούς (Dureja, H., et al., 2005).

Τα “cosmeceuticals” προορίζονται ως αντηλιακά, λευκαντικά, αντιρυτιδικά, αποσμητικά, αντιγηραντικά ή για τη φροντίδα των νυχιών και των μαλλιών. Εφαρμόζονται τοπικά και περιέχουν συστατικά τα οποία επηρεάζουν τη βιολογική λειτουργία του δέρματος. Παραδείγματα των συστατικών αυτών είναι βιταμίνες, αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά, διάφορες αντιοξειδωτικές ουσίες, παράγοντες ανάπτυξης, πεπτίδια, αντιφλεγμονώδεις ουσίες, πολυσακχαρίτες και χρωστικοί ή λευκαντικοί παράγοντες (Dover, J., 2008; Dureja, H., et al., 2005; Choi, D.S. & Berson, C.M., 2006).

Σήμερα, πολλά καλλυντικά προϊόντα με βιολογικά ενεργά συστατικά έχουν αναπτυχθεί και διατίθενται στο εμπόριο, αν και υπάρχουν αποκλίσεις σχετικά με τους κανονισμούς και τις εγκρίσεις που απαιτούνται. Τα καλλυντικά ορίζονται από τον FDA (Food and Drug Administration) ως «αντικείμενα τα οποία προορίζονται να εφαρμοστούν στο ανθρώπινο σώμα και σε οποιοδήποτε μέρος αυτού για τον καθαρισμό, τον καλλωπισμό, την προώθηση της ελκυστικότητας ή για την τροποποίηση της εμφάνισής του». Οι ισχυρισμοί σχετικά με τα φάρμακα υπόκεινται σε αυστηρό έλεγχο από την αρμόδια αμερικανική αρχή για την επίβλεψη τροφίμων και φαρμάκων (FDA), σε αντίθεση με τα καλλυντικά όπου ο FDA δεν έχει την νόμιμη εξουσία να τα εγκρίνει πριν αυτά κυκλοφορήσουν στην αγορά. Παρ’ όλα αυτά τα καλλυντικά πρέπει να είναι ασφαλή για τους καταναλωτές και να φέρουν τη κατάλληλη ετικέτα. Οι εταιρίες και τα άτομα που εμπορεύονται καλλυντικά έχουν νομική ευθύνη για την ασφάλεια και την προσθήκη ετικέτας με όλες τις απαραίτητες πληροφορίες των προϊόντων τους ([www.fda.gov/cosmetics](http://www.fda.gov/cosmetics)). Τα επιθυμητά χαρακτηριστικά των κυκλοφορούντων “cosmeceuticals” είναι η αποτελεσματικότητα, η ασφάλεια, η σταθερότητα του σκευάσματος, η καινοτομία, η συμβατότητα με το δέρμα και η όσο το δυνατόν λιγότερο δαπανηρή παραγωγή τους (Dureja, H., et al., 2005).

Παρ’ όλο που τα “cosmeceuticals” δεν έχουν αναγνωριστεί επίσημα από τον FDA ή από τον EMA (European Medicines Agency), ο όρος αυτός έχει υιοθετηθεί ευρέως

από βιομηχανίες καλλυντικών και η αγορά αυτή αναπτύσσεται με ταχείς ρυθμούς παρά την δυσχερή παγκόσμια οικονομία των τελευταίων ετών. Βιολογικά ενεργά συστατικά αναπτύσσονται συνεχώς από μικρές και μεγάλες εταιρίες που ασχολούνται με φαρμακευτικά, βιοτεχνολογικά και καλλυντικά προϊόντα, ενώ εξελίξεις στον τομέα της γνώσης της βιολογίας του δέρματος και της φαρμακολογίας έχουν διευκολύνει την ταχύτερη ανάπτυξη αυτού του κλάδου (Dureja, H., et al., 2005).

Η παγκόσμια αγορά “cosmeceuticals” επικεντρώνεται στις επτά πιο ανεπτυγμένες αγορές, συμπεριλαμβανομένων των Ηνωμένων Πολιτειών, της Ιαπωνίας και των πέντε κορυφαίων χωρών της Ευρώπης: Ηνωμένο Βασίλειο, Γαλλία, Γερμανία, Ιταλία και Ισπανία. Πρόσφατες έρευνες πάνω στα “cosmeceuticals” τόνισε τις ισχυρές προοπτικές ανάπτυξης τα επόμενα χρόνια. Σύμφωνα με αυτές, επίκειται ραγδαίος ετήσιος ρυθμός ανάπτυξης της τάξης του 7,7%, με πρόσφατη έρευνα να ισχυρίζεται ότι η παγκόσμια αγορά των “cosmeceuticals” θα φτάσει τα \$ 42,4 δις. μέχρι το 2018 (Lohani, A., et al., 2014).

Στον κλάδο των “cosmeceuticals”, τα καλλυντικά φροντίδας του δέρματος αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο μερίδιο της αγοράς (43%). Η περιποίηση του δέρματος κυριαρχείται από προϊόντα αντιγήρανσης, αλλά επεκτείνεται και σε μία σειρά προϊόντων για άλλες παθήσεις όπως φωτογήρανση, δυσχρωμίες και ρυτίδες (Brandt, F.S., et al., 2011).

---

#### A.1.1 “COSMECEUTICALS” ΜΕ ANTI-ΓΗΡΑΝΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

---

Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι γήρανσης:

1. Η φυσική διαδικασία της γήρανσης, η οποία συμβαίνει ενδογενώς και δημιουργεί λεπτές ρυτίδες, το λεπτό και διάφανο δέρμα, κοίλα μάγουλα και υποδοχείς ματιών, «κρέμασμα» δέρματος, απώλεια σφρηγιότητας στα χέρια και στο λαιμό, όχι πλήρως ενυδατωμένο δέρμα και το γκριζάρισμα ή απώλεια των μαλλιών.
2. Η εξωγενής γήρανση που προκαλείται από εξωγενείς παράγοντες, όπως οι επαναλαμβανόμενες εκφράσεις προσώπου, η βαρύτητα, το κάπνισμα και κυρίως η έκθεση στο ηλιακό φως. Οι εξωγενείς παράγοντες γήρανσης δρούν παράλληλα με την ενδογενή γήρανση και προκαλείται έτσι πρόωρη γήρανση του δέρματος. Η φωτογήρανση είναι ο όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει την εξωγενή γήρανση που προκαλείται από την έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία. Χαρακτηρίζεται από κηλίδες, ευριαγγείες στο πρόσωπο, τραχύ και χαλαρό δέρμα, ρυτίδες που εξαφανίζονται όταν το δέρμα τεντώνεται, ακτινική υπερκεράτωση και καρκίνο του δέρματος (Wulf, H.C., et al., 2004).

Το φωτογερασμένο δέρμα υποδεικνύεται από ποικίλες εκδηλώσεις που παράγονται από τις αλλαγές των διαφόρων κυτταρικών ή μη κυτταρικών συστατικών του δέρματος και προκαλούνται από διαφορετικούς μηχανισμούς. Είναι δύσκολο να



εφευρεθεί μια σειρά φαρμακευτικών καλλυντικών προϊόντων που να πληρεί όλες τις ανάγκες για την αποτελεσματική θεραπεία της φωτογήρανσης. Τα φαρμακευτικά καλλυντικά που ήδη κυκλοφορούν στο εμπόριο έχουν ως στόχο την επιμέρους θεραπεία αυτής της πάθησης, π.χ. αντιρυτιδικά, ενυδατικά κ.α.

Οι ρυτίδες είναι ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά της γήρανσης του δέρματος συμπεριλαμβανομένων και της φωτογήρανσης και της γήρανσης λόγω ηλικίας (Glogau, R.G., 1994). Η ακριβής παθογένεια που προκαλεί τις ρυτίδες δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί. Οι διάφορες αλλαγές στο δέρμα είναι περισσότερο εμφανείς στα γερασμένα δέρματα, τα οποία έχουν κατακερματισμένες ελαστικές ίνες, μειωμένο κολλαγόνο και δυσανάλογα ποσοστά κολλαγόνα τύπου I και III. Στο κάτω μέρος των ρυτίδων το κολλαγόνο τύπου IV είναι σε μικρότερη συγκέντρωση σε σχέση με τα φυσιολογικά επίπεδα. Η συγκέντρωση σε γλυκοζαμινογλυκάνες, και συγκεκριμένα υαλουρονικό οξύ, είναι επίσης μειωμένη. Η βλάβη του κολλαγόνου αποδίδεται σε διάφορους τύπους ενζύμων αποικοδόμησης κολλαγόνου, τα οποία είναι γνωστά ως μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs). Η ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή κολλαγόνου, ζελατινάσης και στρομελυσίνης, Η μείωση της ελαστίνης μπορεί επίσης να προκληθεί από το ένζυμο MMP-2 (Lintner, K., et al., 2002).

Πολλά άλλα συστατικά από διάφορες πηγές έχουν εξεταστεί ως υποψήφια για φαρμακευτική καλλυντική δράση, συμπεριλαμβανομένων της καλσιτριόλης, του καφεϊκού οξέος, πολυφαινόλων και ισοφλαβονών (Kullavanijaya, P., & Lim, H., 2005).

---

#### A.1.2 “COSMECEUTICALS” ΜΕ ΛΕΥΚΑΝΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

---

Ο αριθμός και η ποσότητα των μελανοκυττάρων, καθώς και το είδος και η κατανομή της μελανίνης στο δέρμα, είναι οι κύριοι παράγοντες που καθορίζουν το χρώμα του δέρματος. Η σύνθεση της μελανίνης ολοκληρώνεται μέσα από μια σειρά οξειδωτικών αντιδράσεων, όπου η τυροσινάση είναι το ένζυμο κλειδί.

Η τυροσινάση μετατρέπει τη τυροσίνη σε διυδροξυφαινυλαλανίνη (DOPA) και στη συνέχεια σε ντοπακινόνη, η οποία οξειδώνεται σε ντοπαχρώμη (dopachrome) και τελικά σε διυδρόξυινδόλη ή διυδρόξυινδόλο-2-καρβοξυλικό οξύ για να σχηματιστεί η ευμελανίνη (μαύρη-καφέ χρωστική ουσία). Η ντοπακινόνη μπορεί επίσης να μετατραπεί σε κυστεϊνυλική DOPA ή γλουταθειόνη DOPA και ακολούθως σε φαιομελανίνη (κιτρινο-κόκκινη χρωστική ουσία). Αίτια της υπερμελάγχρωσης είναι η μεταφλεγμονώδης υπερμελάγχρωση, η εγκυμοσύνη, η χρήση ορισμένων φαρμάκων, οι φωτοευαίσθητοποιητικοί παράγοντες, το υπεριώδες φως και διάφορες ασθένειες, όπως η νόσος του Addison, ασθένειες του ήπατος ή όγκοι της υπόφυσης. Υπάρχουν πολλές μελαγχρωστικές διαταραχές που θέτουν αισθητικά προβλήματα στους ανθρώπους. Οι πανάδες, οι φακίδες και οι κηλίδες γήρανσης είναι από τα πιο κοινά.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα φυσικών ουσιών που έχουν την δυνατότητα να αναστέλουν τη παραγωγή της μελανίνης είναι τα εξής (Gao, X. H., et al., 2008):

- Το κοζικό οξύ (2-μέθυλο-5-υδροξυ-4-πυραν-4-όνη-), είναι μία φυσική ουσία που παράγεται από μύκητες ή βακτήρια, όπως *Aspergillus penicillium* ή *Acetobacter spp.*, και είναι παρούσα σε παραδοσιακά Ιαπωνικά τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση. Υπάρχουν *in vivo* και *in vitro* μελέτες, που δείχνουν ότι το κοζικό οξύ είναι αποτελεσματικό στην αναστολή της παραγωγής της μελανίνης. Επίσης είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό στη μείωση της χρωστικής σε ασθενείς με μέλασμα.
- Το αζελαϊκό οξύ είναι ένα φυσικό κορεσμένο δικαρβοξυλικό οξύ που αρχικά απομονώθηκε από τον *Pityrosporum ovale*. Είναι ένας αποτελεσματικός παράγοντας στη θεραπεία μεγάλου αριθμού δερματικών διαταραχών (π.χ. ακμή) και εφαρμόζεται με κρέμα ή γέλη σε συγκεντρώσεις 15-20%. Μπορεί επίσης να αναστείλει την παραγωγή της μελανίνης.

## A.2 ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

---

Οι μικροοργανισμοί εντοπίστηκαν από τις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα ως πηγές πολύτιμων φυσικών προϊόντων, όπως αποδεικνύεται από την ανακάλυψη της πενικιλίνης από τον μύκητα *Penicillium rubens*, που έγινε από τον Alexander Fleming το 1928 (Houbraeken, J., et al., 2011). Ιστορικά οι μικροοργανισμοί (κυρίως τα βακτήρια και οι μύκητες) έχουν διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην ανακάλυψη νέων χημικών δομών, όπως τα αντιβιοτικά, με τελικό στόχο την ανακάλυψη και ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Οι επίγειοι μικροβιακοί πληθυσμοί είναι ποικιλόμορφοι, το οποίο άμεσα αντικατοπτρίζεται στον μεγάλο αριθμό χημικών ενώσεων και μεταβολιτών που περιέχουν (Radjasa, O.K., et al., 2011; Newman, D. J., & Cragg, G. M., 2007).

### A.2.1 ΦΥΣΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΜΥΚΗΤΕΣ

---

Τα βακτήρια και οι μύκητες ανήκουν σε μία ομάδα μικροσκοπικών οργανισμών που ονομάζονται μικροοργανισμοί. Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα πολλών βακτηρίων και μυκήτων είναι η ικανότητά τους να παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες που περιλαμβάνουν κοντά στις 50.000 γνωστές ενώσεις που έχουν ένα εξαιρετικά ποικίλο φάσμα χημικών δομών. Τα βακτήρια είναι μία μεγάλη ομάδα μονοκύτταρων προκαρυωτικών οργανισμών που εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία σε μέγεθος και σχήμα, το οποίο κυμαίνεται από σφαίρες έως ράβδους και σπείρες (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016).

Είναι πανταχού παρόντες σε κάθε βιότοπο της Γης, αναπτύσσονται στο έδαφος, σε όξινες ιαματικές πηγές, σε ραδιενεργά απόβλητα, ύδατα και βαθιά στο φλοιό της Γης, όπως επίσης και σε οργανικές ύλες και ζωντανούς ιστούς των περισσότερων οργανισμών συμπεριλαμβανομένων φυτών και ζώων. Τα βακτηριακά κύτταρα έχουν περίπου το ένα δέκατο του μεγέθους των ευκαρυωτικών κυττάρων και έχουν μήκος από 0,5 έως 5 mm.

Το περιεχόμενο των βακτηριακών κυττάρων περιβάλλεται από μία μεμβράνη λιπιδίων (κυτταρική μεμβράνη) η οποία δρα εντός του κυττάρου σαν φραγμός κατακράτησης θρεπτικών συστατικών, πρωτεϊνών και άλλων απαραίτητων συστατικών του κυτταροπλάσματος. Μερικά βακτήρια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην βιομηχανία. Για παράδειγμα, ο *Lactobacillus* σε συνδυασμό με ζύμες και μικροοργανισμούς έχουν χρησιμοποιηθεί για χιλιάδες χρόνια στην προετοιμασία ζυμωμένων τροφίμων όπως τυρί, τουρσί, σάλτσα σόγιας, ξύδι και γιαούρτι.

Τα βακτήρια τα οποία έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν μία ποικιλία οργανικών ενώσεων, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί στην επεξεργασία και στη βιοαποκατάσταση αποβλήτων. Μερικά βακτήρια είναι ικανά να διασπούν υδρογονάνθρακες στο πετρέλαιο και αυτά χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό πετρελαιοκηλίδων. Στην περίπτωση βιολογικού ελέγχου παρασίτων, τα βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη θέση των φυτοφαρμάκων. Τα βακτήρια που ανήκουν στο υποείδος του *Bacillus thuringiensis* χρησιμοποιούνται ως εντομοκτόνα των

*Lepidoptera* με τα εμπορικά ονόματα Dipel και Thuricide. Λόγω της εξειδίκευσής τους αυτά τα παρασιτοκτόνα θεωρούνται φιλικά προς το περιβάλλον με ελάχιστη έως και μηδαμινή επίδραση στον άνθρωπο, στην άγρια φύση και στα ευεργετικά έντομα (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016).

Τα πανταχού παρόντα βακτήρια εδάφους, όπως οι στρεπτομύκητες (*Streptomyces*) και τα μυξοβακτήρια (*Mycobacteria*), είναι ιδιαίτερα πλούσιες πηγές σε μικρομοριακά φυσικά προϊόντα. Πολυάριθμα φυσικά προϊόντα με αντιμυκητιασικές, αντιβακτηριακές και αντικαρκινικές ιδιότητες έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από τους οργανισμούς αυτούς. Στη χημική βιομηχανία, τα βακτήρια είναι η πιο σημαντική φυσική πηγή για την παραγωγή καθαρών εναντιομερών ουσιών, όπου αυτά και τα συνθετικά ενδιάμεσα τους βρίσκουν εφαρμογές στον τομέα της φαρμακευτικής και σαν αγροχημικά (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016).

Σε αντίθεση με τα βακτήρια, οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί γνωστοί ότι κατοικούν σχεδόν σε όλα τα σημεία της Γης και έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν διάφορα στερεά υποστρώματα ως συνέπεια της ποικιλομορφίας της βιολογικής και βιοχημικής τους εξέλιξης. Μέχρι στιγμής, έχουν περιγραφεί περισσότερα από 70,000 είδη μυκήτων. Ωστόσο, ορισμένες εκτιμήσεις δείχνουν ότι μπορεί να υπάρχουν 1.5 εκατομμύριο είδη μυκήτων. Το βασίλειο των μυκήτων περιέχει μερικούς από τους πιο σημαντικούς οργανισμούς, τόσο σε επίπεδο οικολογικό όσο και σε οικονομικό, ενώ περιέχει πολλές γνωστές κατηγορίες μυκήτων, όπως μανιτάρια, ερυσιβοειδή, τρούφες και ζυμομύκητες. Συνεχίζουν τον θρεπτικό κύκλο των οικοσυστημάτων διασπώντας την νεκρή οργανική ύλη. Επιπλέον, τα περισσότερα αγγειακά φυτά δεν μπορούν να αναπτυχθούν χωρίς τους συμβιωτικούς μύκητες (καλούνται μυκόριζα και κατοικούν στο ριζικό σύστημα των φυτών), καθώς τους παρέχουν μερικά απαραίτητα θρεπτικά συστατικά, κυρίως φωσφορικά άλατα. Οι μύκητες επίσης είναι γνωστοί για μία σειρά ασθενειών που προκαλούν σε φυτά, ζώα και ανθρώπους.

Πολλοί μύκητες είναι πηγές δευτερογενών μεταβολιτών. Λίγο μετά τον Α' Παγκόσμιο Πόλεμο, ο βρετανός επιστήμονας Harold Rainstrick ξεκίνησε τη συστηματική μελέτη των μεταβολιτών των μυκήτων για πρώτη φορά. Ο ίδιος και η ομάδα του συνέβαλλαν σημαντικά στην αναγνώριση των μυκήτων ως μία σημαντική πηγή φυσικών προϊόντων. Πρόσφατα, έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες μελέτες για τους δευτερογενείς μεταβολίτες των μυκήτων, καθώς υπάρχει μεγάλη ανάγκη για την εύρεση φυσικών προϊόντων που μπορεί να εκμεταλλευτεί ο τομέας των φαρμάκων και της γεωργίας.

Αντιβιοτικοί, αντιμυκητιασικοί, ανοσοκατασταλτικοί παράγοντες και παράγοντες μείωσης της χοληστερίνης που έχουν απομονωθεί από μεταβολίτες μυκήτων έχουν χρησιμοποιηθεί κλινικά τις τελευταίες πέντε δεκαετίες, συνεισφέροντας σημαντικά στην ευημερία της ανθρωπότητας και στη θεαματική αύξηση του προσδόκιμου ορίου ζωής που παρατηρήθηκε κατά το δεύτερο μισό του εικοστού αιώνα. Μύκητες

εδάφους, παρασιτικοί και σαπροφυτικοί μύκητες έχουν διερευνηθεί για τους δευτερογενείς τους μεταβολίτες σχετικά ικανοποιητικά. Ωστόσο, το ενδιαφέρον για τους δευτερογενείς μεταβολίτες των συμβιωτικών μυκήτων που ζουν σε συνδυασμό με χερασία φυτά, λιχήνες, θαλάσσιους οργανισμούς και έντομα έχει ενταθεί πρόσφατα λόγω της πεποίθησης ότι τα φυσικά προϊόντα που παράγουν αυτοί οι μύκητες ως αποτέλεσμα των οικολογικών επιδράσεων και των επιδράσεων με τους ξενιστές τους, αναμένεται να εμφανίζουν αξιόλογες βιολογικές δράσεις (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016).

---

#### A.2.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

---

Είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον το γεγονός ότι η πλειοψηφία των βακτηριακών και μυκητιακών δευτερογενών μεταβολιτών προέρχονται από μερικές κοινές βιοσυνθετικές οδούς που χρησιμοποιούν προδρόμους (μικρές βιοσυνθετικές μονάδες ή δομικές μονάδες) που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια του πρωτογενούς μεταβολισμού. Τα ενδιάμεσα που προκύπτουν από τη συμπύκνωση αυτών των μικρών βιοσυνθετικών μονάδων, κατόπιν διαδοχικών ενζυμικών αντιδράσεων οδηγούν σε προϊόντα με ποικίλες δομές. Έτσι, η πλειοψηφία αυτών των δευτερογενών μεταβολιτών είναι εύκολο να ταξινομηθούν βάσει της βιοσυνθετικής τους προέλευσης σε τερπενοειδή, πολυκετίδια, μη ριβοσωμικά πεπτίδια, αλκαλοειδή και κυτοχάλασίνες (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016).

##### Τερπενοειδή

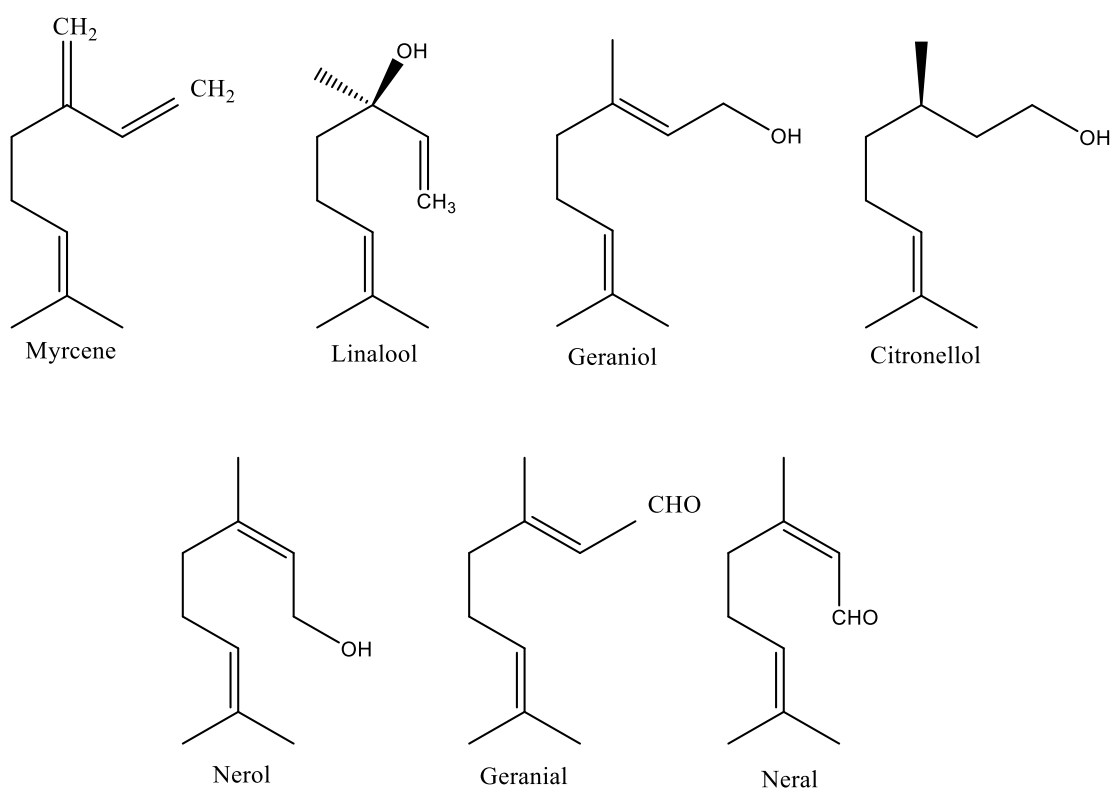
Τα τερπενοειδή, γνωστά και ως ισοπρενοειδή, αποτελούν μία μεγάλη και με μεγάλη ποικιλότητα κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών που περιέχει καρτενοειδή, στερόλες, πολυπρενυλαλκοόλες, ουμπικινόνες κ.α. Ο Kekule, το 1880, ήταν ο πρώτος επιστήμονας που ονόμασε τις ενώσεις με γενικό εμπειρικό τύπο  $C_{10}H_{16}$  «τερπένια», λόγω της παρουσίας του στη τερεβινθίνη. Τα τερπενοειδή απαντώνται στη φύση σαν χρωστικές, φερομόνες και μόρια επικοινωνίας και τελούν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών λειτουργιών όπως αντιβιοτική δράση, παράγοντες παρεμποδίσεως της διατροφής ή προσελκυστικά επικονιαστών. Όλα τα ισοπρενοειδή προέρχονται βιοσυνθετικά από τις ενεργοποιημένες μορφές του ισοπρενίου (isopentenyl pyrophosphate, IPP) και το αλλυλικό του ισομερές (dimethylallyl pyrophosphate, DMAPP). Πάνω από 40.000 τερπενοειδή έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί από φυσικά προϊόντα, συμπεριλαμβανομένων των μυκήτων και των βακτηρίων και εκατοντάδες νέες δομές καταγράφονται κάθε χρόνο (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016).

##### Μονοτερπένια

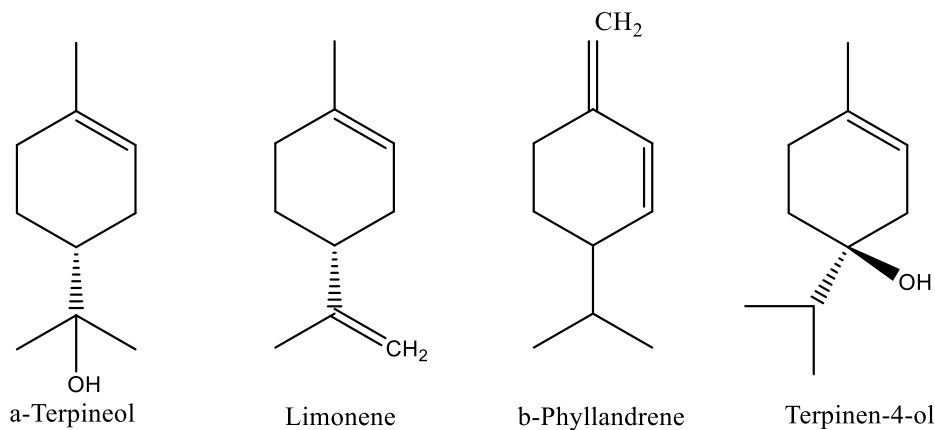
Τα μονοτερπένια συντίθενται από δύο ισοπρενικές ομάδες και γι αυτό περιέχουν 10 άτομα άνθρακα ( $C_{10}$ ). Πάνω από 1,500 μονοτερπένια είναι γνωστά και αυτά είναι είτε άκυκλα, είτε κυκλικά ή δικυκλικά. Απαντώνται στη φύση σαν υδρογονάνθρακες, αλκοόλες, αλδεΐδες, καρβοξυλικά οξέα και εστέρες. Το αιθέριο έλαιο που

απομονώθηκε από τον μύκητα *Ceratocystis virescens* περιέχει άκυκλα μονοτερπένια, λιναλοόλη, κιτρονελόλη, γερανιόλη, νεράλη, γερανιάλη, οξικό κιτρονελλύλιο και οξικό γερανύλιο μαζί με ένα κυκλικό μονοτερπένιο, την α-τερπινεόλη. Έχει αναφερθεί επίσης η παρουσία άκυκλων μονοτερπινικών αλκοολών, κιτρονελόλης, νερόλης και γερανιόλης στο *Trametes odorata*.

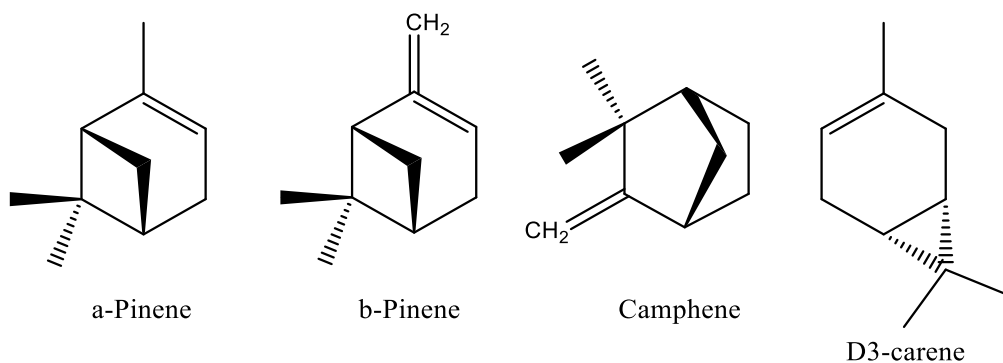
Διάφορα είδη μυκήτων που ανήκουν στην οικογένεια *Phenillius* παράγουν την άκυκλη μονοτερπενική αλκοόλη, τη λιναλοόλη. Έχει επίσης αναφερθεί η παρουσία των άκυκλων μονοτερπενίων, μυρκένιο και κιτρονελόλης, των μονοκυκλικών μονοτερπενικών λιμονενίου, β-φελλανδρενίου phellandrene τερπινεν-4-όλης μαζί με τη παρουσία των δικυκλικών μονοτερπενίων α-πινενίου, β-πινενίου, καμφένιου και 3-καρενίου στο πτητικό κλάσμα των αεροσπορίων του μύκητα *Cronartium fusiforme*. Μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα μονοτερπενίων που προέρχονται από μύκητες παρατίθενται στις Εικόνες A.1 , A.2 και A.3 (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016).



**Εικόνα A.1:** Άκυκλα μονοτερπένια



**Εικόνα Α.2:** Μονοκυκλικά μονοτερπένια



**Εικόνα Α.3:** Δικυκλικά μονοτερπένια

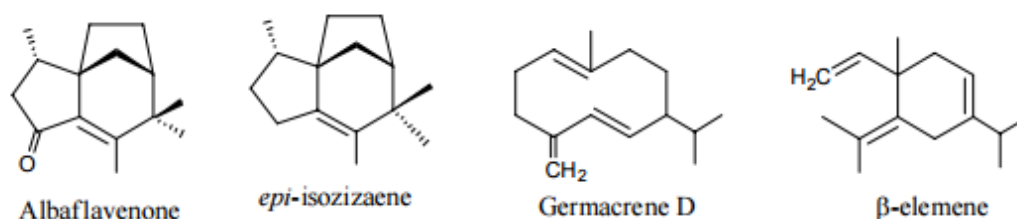
### Σεσκιτερπένια

Τα σεσκιτερπένια είναι τερπενοειδή που περιέχουν 15 άτομα άνθρακα ( $C_{15}$ ) και συντίθενται από τρεις ισοπρενικές ομάδες. Είναι η πιο ποικιλόμορφη ομάδα των τερπενίων στη φύση και περίπου 10,000 είναι ήδη γνωστά. Κυρίως απομονώνονται από φυτά, άλλα ένα μεγάλο ποσοστό αυτών απομονώνεται από βακτήρια και μύκητες.

Τα σεσκιτερπένια αλμοακλαβενόνη (albaclavenone), επι-ισοζιζαένιο (epi-isozizaene), αλμπαφλαβενόλη (albaflavenol) και (4R)-αλμπαφλαβενόλη ((4R)-albaflavenol) στον *Streptomyces coelicolor* A3, τα σεσκιτερπένια τύπου γερμακρενίου 1(10)E, 5E-γερμακραδιένιο-11-όλη, 1(10)E, 5E-γερμακραδιένιο-3,11-διόλη και 1(10)E, 5E-γερμακραδιένιο-2,11-διόλη του ενδοφυτικού *S. griseus* και τα γερμακρένια D, γερμακραδιενόλη, διϋδροαγαροφουράνη (dihydroagarofurane), β-ελεμένιο (β-elemene), δικυκλογερμακρένιο, καδινένιο (cadinene) και καλερένιο (calerene) του *S. citreus* CBS 109,6 αποτελούν μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα βακτηριακών σεσκιτερπενοειδών.

Τα σεσκιτερπένια που έχουν αναφερθεί ότι προέρχονται από μύκητες εμφανίζονται σαν άκυκλα ή μονο-, δι-, τρι- και τετρα-κυκλικά συστήματα. Η παρουσία του άκυκλου σεσκιτερπενοειδούς β-φαρνεσένιο (β-farnesene) στο *Cronartium fusiforme* έχει επίσης αναφερθεί. Παράδειγμα μονοκυκλικού σεσκιτερπενικού μεταβολίτη που προέρχεται από μύκητα είναι το υμενοϊκό οξύ (hymenoiic acid) που έχει απομονωθεί

από τον *Hymenochaetaceae* sp. (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016).



**Εικόνα Α.4:** Παραδείγματα σεσκιτερπενίων απομονωμένων από μύκητες ή βακτήρια

### Διτερπένια

Τα διτερπένια είναι τερπενοειδή που περιέχουν 20 άτομα άνθρακα (C<sub>20</sub>). Πάνω από 5,000 φυσικά διτερπένια που ανήκουν σε είκοσι βασικούς δομικούς τύπους είναι γνωστά κυρίως από ανώτερα φυτά και μικροοργανισμούς. Δραστικές ουσίες που έχουν σκελετό διτερπενίου περιλαμβάνουν τις φυτοορμόνες και τις γιβερίλινες: τρισπορικό οξύ (trisporic acid), φυτοαλεξίνες, κασβένιο (casbene) και ποδοκαρπικό οξύ (podocarpic acids) και φυσικά κανναβιδοειδή, τα οποία είναι κύρια συστατικά του μύκητα *Gibberella fujikuroi*.

Η νεοβερουκοσάνη-5β,9β-διόλη (neoverrucosan-5β,9β-diol), νεοβερουκοσάνη-5β,18-διόλη (neoverrucosan-5β,18-diol), νεοβερουκοσάνη-5β,9β,18β-τριόλη (neoverrucosan-5β,9β,18β-triol) και νεοβερουκοσάνη-5β,9β-διόλη-4-καρβοξυαλδεΐδη (neoverrucosan-5β,9β-diol-4-carboxaldehyde) από το βακτήριο *Saprospira grandis*, ένα σπάνιο διτερπένιο με σύστημα 3,6,6,5-τετρακυκλικού δακτυλίου και η (-)-βερουκοσάνη-2β-όλη ((-)-verrucosan-2β-ol) από το φωτοτροπικό βακτήριο *Chloroflexus aurantiacus* και η βιγουϊεπινόνη (viguierpinone) και οι οξαλοτερπίνες Α-Ε (oxaloterpins A-E) από τον *Streptomyces* sp. KO-2988, είναι μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα βακτηριακών διτερπενοειδών.

Ανάμεσα στα διτερπένια τα οποία έχουν απομονωθεί από μύκητες, η μπακατίνη ΙΙΙ (baccatin III), η οποία είναι το διτερπένιο που περιέχεται στο γνωστό αντικαρκινικό φάρμακο Paclitaxel (Taxol®), θεωρείται το πιο σημαντικό. Έχει απομονωθεί από τον ενδοφυτικό μύκητα *Taxomyces andreanae*, που κατοικεί στο *Taxus brevifolia*.

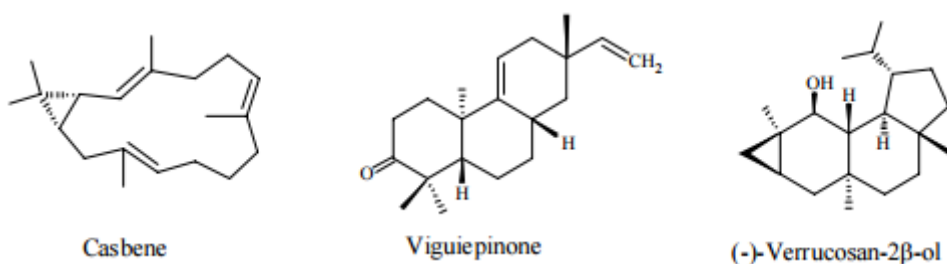
Έχουν επίσης αναφερθεί οι απομονώσεις των κάτωθι (Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M., 2015-2016):

- μονοκυκλικό διτερπένιο μορελιόλη (moreloriol) από τον μύκητα *Morchella conica*
- Περικονισίνη Α και Β (periconicin A & B) από τον ενδοφυτικό μύκητα *Periconia* sp.
- (+)-πιμάρια-8,15-διένιο ((+)-pimara-8,15-diene), ισοπιμάρια-8,15-διένιο (isopimara-8,15-diene), 8β-πιμάρια-9(11),15-διένιο (8β-pimara-9(11),15-



diene), πιμάρα-7,15-διένιο (pimar-7,15-diene) και πιμάρα-8(14),15-διένιο (pimar-8(14),15-diene) από τον *Phoma betae*

- Φουσικοκίνη A και J (Fusicoccin A & J) από τον φυτοπαθογόνο μύκητα *Phomopsis (Fusicoccum) amygdali*
- Επτεμερόνη A και G (Heptemerone A & G) από τον *Coprinus heptemerus*

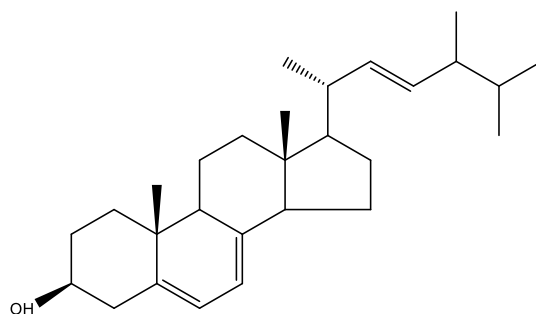


Εικόνα Α.5: Παραδείγματα διτερπενίων απομονωμένων από μύκητες ή βακτήρια

### Τριτερπένια

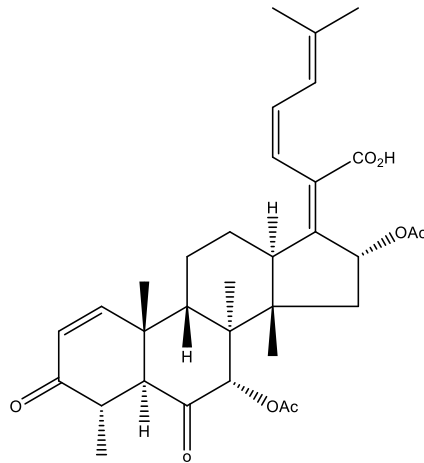
Τα τριτερπένια και οι πρόδρομοι τους ισοπρενοειδείς υδρογονάνθρακες είναι από τις παλαιότερες γνωστές και πανταχού παρούσες χημικές ουσίες στη γη και έχουν βρεθεί σε απολιθώματα από μια ποικιλία γεωλογικών σχηματισμών και ιζημάτων. Το σκουαλένιο είναι η δομική μονάδα των τριτερπενίων και στεροειδών. Σχηματίζεται από την ένωση δύο C<sub>15</sub> διφωσφορικών μονάδων φαρνεσιλίου, που συνδέονται κεφαλή με κεφαλή.

Πολλά τριτερπένια που προέρχονται από μύκητες, σε αντίθεση με αυτά που προέρχονται από βακτήρια, ανήκουν στην τετρακυκλική τάξη και σχηματίζονται από την κυκλοποίηση του εποξειδίου του σκουαλενίου. Τα πεντακυκλικά τριτερπένια είναι πολύ σπάνια στους μύκητες. Η αλκυλίωση της πλευρικής αλυσίδας στον C<sub>24</sub> με την εισαγωγή μίας επιπλέον ομάδας μεθυλίου είναι μία σύνηθης διαδικασία στους μύκητες και οδηγεί στον σχηματισμό της εργοστερόλης (Hanson, J. R., 2008).



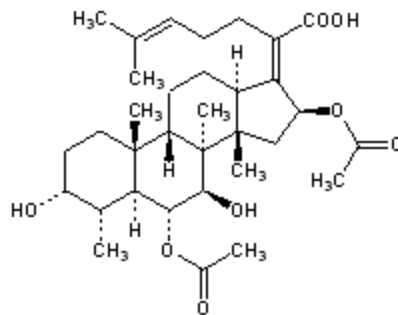
Εικόνα Α.6: Χημική δομή εργοστερόλης

Το ελβολικό οξύ ήταν το πρώτο στεροειδές φουσιδικό αντιβιοτικό που απομονώθηκε από τον *Aspergillus fumigatus* var<sup>n</sup> *helvola* το 1943 από τους Chain και Florey (Hanson, J. R., 2008).



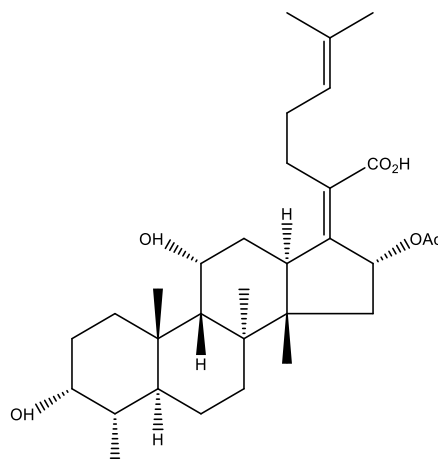
**Εικόνα A.7:** Χημική δομή ελβολικού οξέος

Η κεφαλοσπορίνη P1 απομονώθηκε από στελεχος του *Cephalosporium acremonium* από το οποίο προέρχονται τα αντιβιοτικά κεφαλοσπορίνης β-λακτάμης (Hanson, J. R., 2008).



**Εικόνα A.8:** Χημική δομή κεφαλοσπορίνης

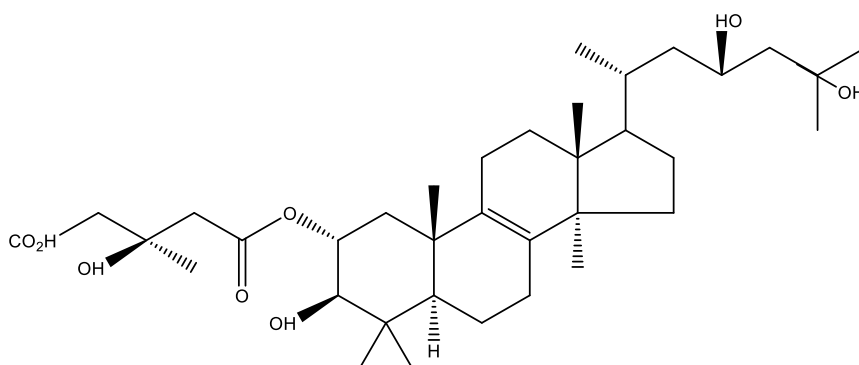
Το φουσιδικό οξύ απομονώθηκε σαν αντιβιοτικό από τον *Fusidium coccineum* το 1962 (Hanson, J. R., 2008).



**Εικόνα A.9:** Χημική δομή φουσιδικού οξέος

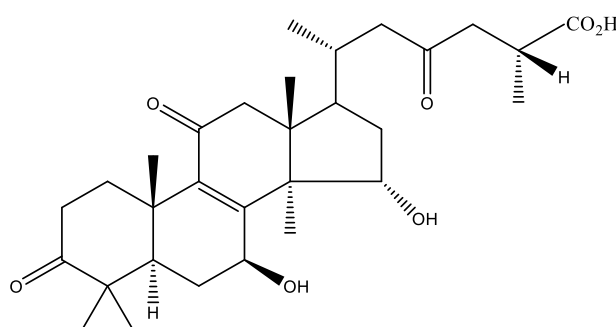
Οι φασκικουλόλες (fasciculols), όπως το φασκικουλικό οξύ A (fasciculic acid A), τα οποία απομονώθηκαν από τον *Hypholoma (Neamatoloma) fasciculare* είναι

παρεμποδιστές ανάπτυξης φυτών. Μερικά είναι εστεροποιημένα με μία μονάδα υδροξυ-μέθυλ-γλουταρυλγλυκύλιο (hydroxymethyl-glutarylglucyl) (Hanson, J. R., 2008).



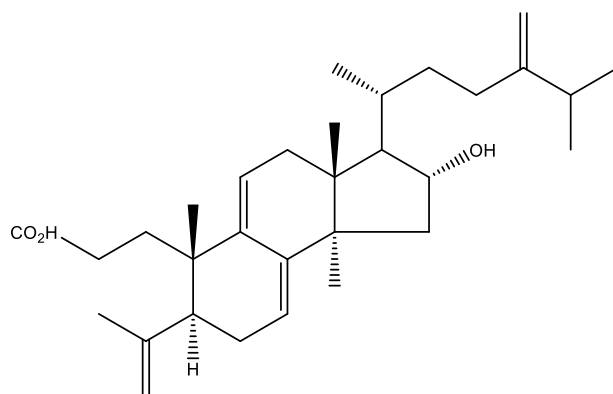
Εικόνα A.10: Χημική δομή φασκικουλικού οξέος A

Τα καρποφόρα μέρη του *Ganoderma lucidum* χρησιμοποιούνται ευρέως στην ανατολική ιατρική για διάφορες ιατρικές περιστάσεις, κυρίως για ό,τι αφορά το ανοσοποιητικό σύστημα και φλεγμονές. Στην κινέζικη παραδοσιακή ιατρική αυτός ο μύκητας είναι γνωστός και ως Ling Zhi και στην Ιαπωνία ως Reishi. Πάνω από 50 διαφορετικά τετρακυκλικά τριτερπένια έχουν απομονωθεί. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γανοδερικό οξύ (Hanson, J. R., 2008).



Εικόνα A.11: Χημική δομή γανοδερικού οξέος

Ο *Poria cocos*, που επίσης χρησιμοποιείται στην κινέζικη παραδοσιακή ιατρική, περιέχει ένα ευρύ φάσμα υδροξυλιωμένων λανοστανών (lanostanes), συμπεριλαμβανομένου του πορικοϊκού οξέος A (poricoic acid A), το οποίο έχει κυτταροτοξική δράση έναντι ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών (Hanson, J. R., 2008).



Εικόνα Α.12: Χημική δομή πορικοϊκού οξέος Α

Η ικανότητα σύνθεσης ισοπρενοειδών και αργότερα τριτερπενίων ήταν παρούσα σε μη φωτοσυνθετικά βακτήρια πριν από την εξέλιξη της βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης. Το σκουαλένιο και ένας αριθμός μειωμένων σκουαλενίων έχουν βρεθεί σε ευρέως αποκλίνουσες βακτηριακές ομάδες, συμπεριλαμβανομένων των χημειοοργανοτροφικών, χημειολιθοτροφικών και φωτοοργανοτροφικών οργανισμών, με τα επίπεδα γουανίνης και κυτοσίνης να ποικίλουν από 32 έως 74 mol%. Έτσι, η ικανότητα σύνθεσης του σκουαλενίου δεν αποτελεί μοναδική ιδιότητα σε κάποια συγκεκριμένη βακτηριακή ομάδα. Στερόλες και οπανοειδή έχουν βρεθεί αποκλειστικά σε αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια βακτήρια, με περιεχόμενο ποσοστό γουανίνης και κυτοσίνης μεγαλύτερο από 50 mol%. Αντιθέτως, τα C-30 καροτενοειδή έχουν βρεθεί μόνο σε προαιρετικά αναερόβιους χημειοοργανοτροφικούς οργανισμούς με ποσοστά γουανίνης και κυτοσίνης της τάξης του 30-40 mol%, όπως για παράδειγμα οι *Streptococcus faecium* και *Staphylococcus aureus*. Κάνενα βακτήριο δεν έχει βρεθεί να περιέχει στερόλες, οπανοειδή και C-30 καροτενοειδή ταυτόχρονα. Μόνο ο *Methylococcus capsulatus*, έχει βρεθεί ότι περιέχει τόσο οπανοειδή όσο και στερόλες (Hanson, J. R., 2008).

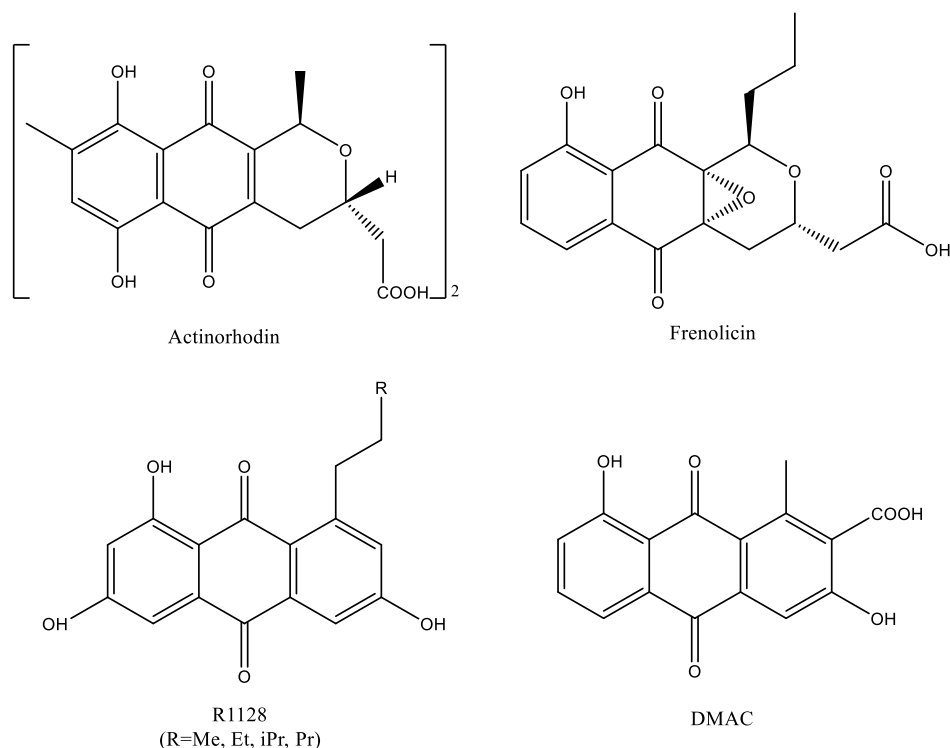
Τα οπανοειδή υπάρχουν σε διάφορα είδη βακτηρίων συμπεριλαμβανομένων των *Rhodospseudomonas*, *Methylomonas*, *Hyphomicrobium*, και *Nitrosomonas* (Taylor, R. F., 1984).

### Πολυκετίδια

Τα αρωματικά πολυκετίδια αποτελούν μία σημαντική και δομικά ποικιλόμορφη ομάδα φυσικών προϊόντων που συντίθεται από μικροοργανισμούς και φυτά. Αυτή η ομάδα περιλαμβάνει ενώσεις με φαρμακευτικό ενδιαφέρον, όπως η τετρακυκλίνη, η νταουνορουμπικίνη και η μιθραμυκίνη. Από την άλλη, μερικές ανθρώπινες ή ζωικές ασθένειες έχουν συνδεθεί με μυκητιασικές μυκοτοξίνες, πολλές από τις οποίες είναι αρωματικά πολυκετίδια. Οι πλούσιες βιολογικές ιδιότητες, τόσο θετικές όσο και αρνητικές, και η δομική πολυπλοκότητα των αρωματικών πολυκετιδίων έχει προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον για την ανακάλυψη και βιοσύνθεση αυτών των ενώσεων.

Βιοσυντίθενται από πολύ-1,3-δικαρβονυλικές ενώσεις (Hanson, J.R., 2008). Παρά τη δομική ομοιότητα μεταξύ των βακτηριακών και μυκητιασικών αρωματικών πολυκετιδίων, πολυάριθμα πειράματα που έγιναν με τη χρήση επισημασμένων με ισότοπα πρόδρομων ενώσεων, αποκάλυψαν θεμελιώδεις διαφορές στη στρατηγική κυκλοποίησης (Zhou, H., et al., 2010).

Τα πολυκετίδια είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από τους ακτινομύκητες και πιο συγκεκριμένα από τα γένη *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Saccharopolyspora* και *Nocardia*. Υπολογίστηκε ότι το 1986 είχαν ταυτοποιηθεί περίπου 6000 αντιβιοτικά, εκ των οποίων τα 70 ήταν σε κλινική χρήση. Επιπλέον 1100 μεταβολίτες αναφέρθηκαν μεταξύ του 1988 και 1992. Ανάμεσα σε αυτά περίπου το 40% ήταν πολυκετίδια (Barr, P. J., et al., 2000). Τα μόρια αυτά συντίθενται από συνθάσες πολυκετιδίου (PKSs) και εμφανίζουν αντικαρκινική (π.χ. δοξορουβικίνη), αντιβακτηριακή (π.χ. οξυτετρακυκλίνη), αντιμυκητιασική (π.χ. πραντιμικίνη), αντιυική (π.χ. A-74528), αντιπαρασιτική (π.χ. φρενολισίνη (frenolicin)) και άλλες σχετικές ιδιότητες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αρωματικών πολυκετιδίων που έχουν απομονωθεί από ακτινοβακτήρια παρατίθενται στην Εικόνα Α.13 (Das, A., & Khosla, C., 2009).



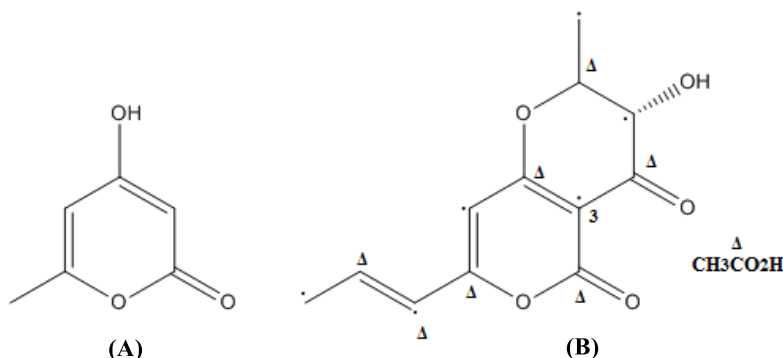
**Εικόνα Α.13:** Παραδείγματα αρωματικών πολυκετιδίων που έχουν απομονωθεί από ακτινοβακτήρια

Οι μεταβολίτες που απομονώνονται από το μονοπάτι σύνθεσης πολυκετιδίων κυρίως παράγονται από Ασκομύκητες και από είδη του γένους *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* και *Alternaria* και συναντώνται λιγότερα συχνά σε είδη Βασιδιομυκήτων (Hanson, J. R., 2008).

Ανάμεσα στους μεταβολίτες που παράγονται από είδη της οικογένειας *Aspergillus* και *Penicillium* βρισκονται αρωματικές ενώσεις, κινόνες, πυρόνες και λακτόνες.

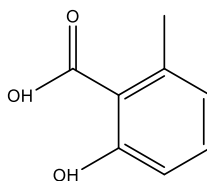
Ομαδοποιούνται βάσει των οξικών μονάδων που κατανέμονται πάνω στον σκελετό σε τρι-, τέτρα-, πεντα-κετίδια κ.ο.κ. Μερικά πολυκετίδια που παράγουν οι μύκητες αποτελούν χρωστικές ή μυκοτοξίνες (Hanson, J. R., 2008).

Τα τρικετίδια είναι εξαιρετικά σπάνια. Η λακτόνη τριακετικού οξέος (triacetic acid lactone) έχει απομονωθεί από τον *Penicillium ratulum*. Η ραδικινίνη (radicinin) είναι μία φυτοτοξίνη που έχει απομονωθεί από τον *Alternaria radicina* (*Stemphyllium radicinum*) και προκαλεί μαύρη σήψη των καρότων (Hanson, J. R., 2008).



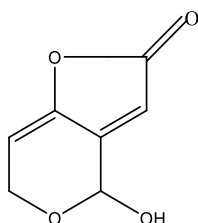
**Εικόνα A.14:** Χημική δομή λακτόνης τριακετικού οξέος (A) και ραδικινίνης (B)

Το τετρακετίδιο 6-μεθυλσαλικυλικό οξύ έχει απομονωθεί από διάφορα είδη *Penicillium* (Hanson, J. R., 2008).



**Εικόνα A.15:** Χημική δομή 6-μεθυλσαλικυλικού οξέος

Δύο ενδιαφέροντες μεταβολίτες του *Penicillium ratulum*, η πατουλίνη και το πενικιλλικό οξύ ανήκουν στην κατηγορία των μυκοτοξίνων. Το πενικιλλικό οξύ έχει απομονωθεί και από άλλα είδη του γένους *Penicillium*, όπως για παράδειγμα από τα *P. ruberulum* και *P. cyclospium* (Hanson, J. R., 2008).

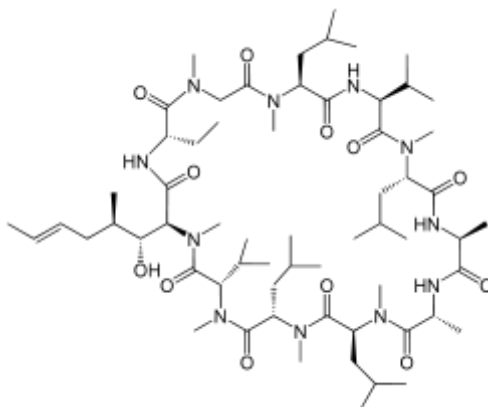


**Εικόνα A.16:** Χημική δομή πενικιλλικού οξέος

## Μη ριβοσωμικά πεπτίδια

Τα μη ριβοσωμικά πεπτίδια (nonribosomal peptides-NRPs) είναι μόρια που παράγονται από μικροοργανισμούς που έχουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικών ιδιοτήτων και φαρμακευτικές εφαρμογές (π.χ. αντιβιοτική, αντιμικροβιακή, ανοσορρυθμιστική δράση, αντιογκογόνο δράση). Μία ιδιαιτερότητα των NRPs είναι η βιοποικιλότητα των μονομερών τους που εκτείνεται πέρα από τα υπολείμματα των 20 πρωτογενών αμινοξέων. Συντίθενται από τεράστια πολυενζυματικά συγκροτήματα που ονομάζονται μη ριβοσωμικές πεπτιδικές συνθετάσες (NRPSs).

Η κυκλοσπορίνη (Εικόνα Α.17), που είναι ένα ανοσοκατασταλτικό φάρμακο που χρησιμοποιείται ευρέως σε μεταμόσχευση οργάνων, η δαπτομυκίνη, που χρησιμοποιείται στη θεραπεία ορισμένων λοιμώξεων που προκαλούνται από gram-θετικά βακτήρια και η μπλεομυκίνη, που χρησιμοποιείται στη θεραπεία διαφόρων μορφών καρκίνου, είναι μερικά κοινά παραδείγματα των NRPs υψηλής θεραπευτικής σημασίας (Caboche, S., et al., 2010).

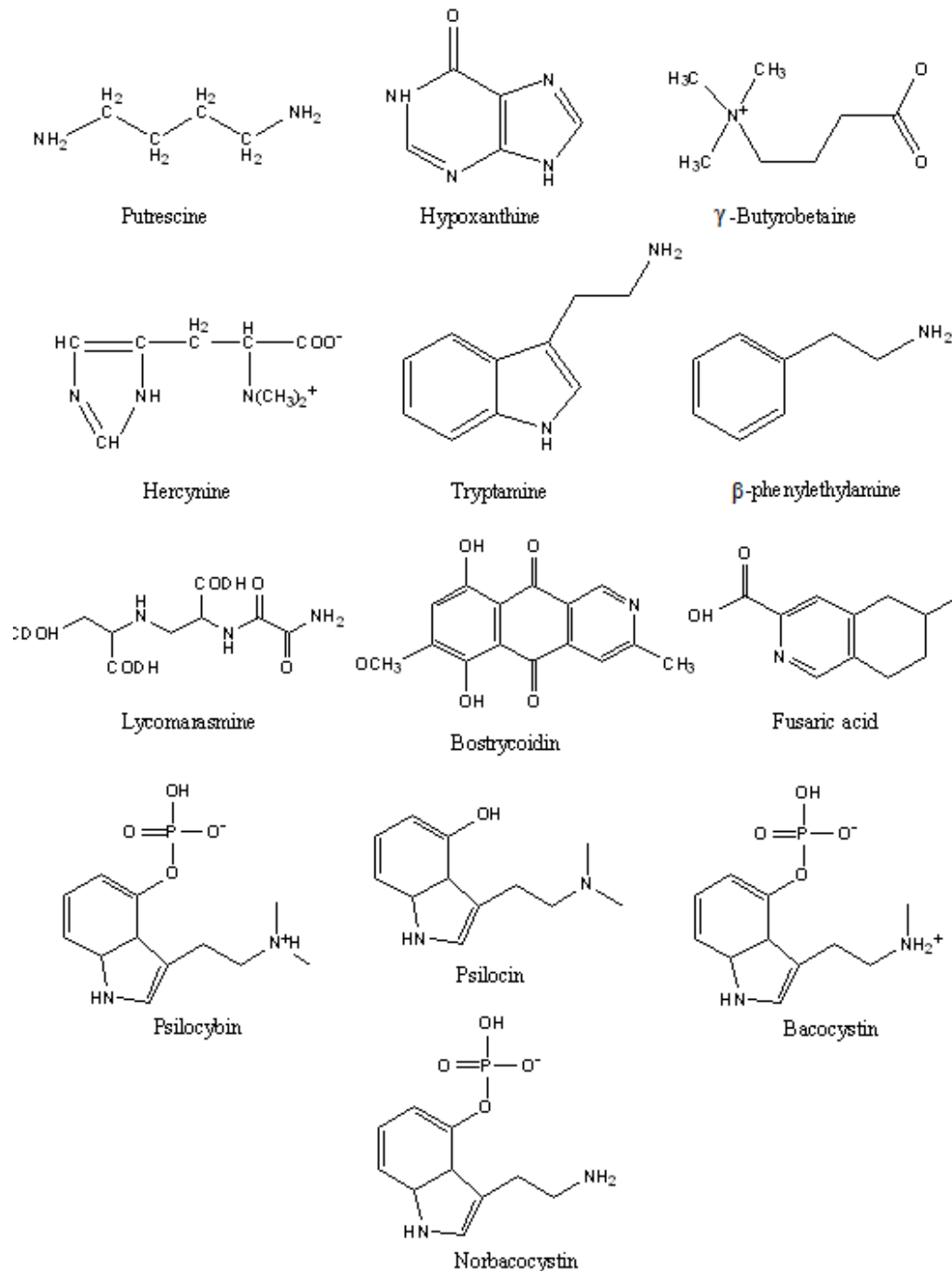


Εικόνα Α.17: Χημική δομή κυκλοσπορίνης

## Αλκαλοειδή

Τα αλκαλοειδή αποτελούν μία ομάδα βασικών οργανικών ενώσεων που περιέχονται σε φυτά και μικροοργανισμούς και περιέχουν τουλάχιστον ένα άτομο αζώτου σε δακτύλιο. Τα πρώτα αλκαλοειδή που προέρχονται από μικροοργανισμούς που αναγνωρίστηκαν και μελετήθηκαν ήταν αυτά από τον *Claviceps purpurea*. Μέχρι το 1960, εντούτοις, καμία προσπάθεια δεν ήταν επιτυχής όσον αφορά την απόκτηση μεγαλύτερων ποσοτήτων από ίχνη αλκαλοειδών. Το 1960, μία ομάδα ερευνητών περιέγραψε την παραγωγή αλκαλοειδών από το στέλεχος *Claviceps paspali*. Την ίδια χρονιά, απομονώθηκαν η λυσεργόλη (lysergol), λυσεργίνη (lysergine) και λυσεργένη (lysergene) από σαπροφυτική καλλιέργεια ερυσιβώδους όλυρας. Άλλα παραδείγματα απομόνωσης αλκαλοειδών από μύκτες είναι τα κάτοθι, των οποίων οι χημικές οδμές παρατίθενται στην Εικόνα Α.18 (Sualeh, M., et al., 2010):

- Πουτρεσκίνη (putrescine), υποξανθίνη (hydroxanthine), γ-βουτυρομπεταΐνη (γ-Butyrobetaine), β-φενυλαιθυλαμίνη (β-Phenylethylamine) και ερκυνίνη (hircynine) από μύκητες του γένους *Boletus*
- Βοστρυκοϊδίνη (bostrycoidin), λυκομαρασμίνη (lycomarasmine) και φουσαρικό οξύ (fusaric acid) από τους μύκητες *Fusarium bostrycoides*, *Fusarium lycopersici* και *Fusarium Ixysporium* αντίστοιχα
- Ψιλοκυμπίνη (psilocybin), ψιλοκίνη (psilocin), μπαεοκυστίνη (baeocystin) και νορμπαεοκυστίνη (norbaeocystin) από μύκητες του γένους *Psilocybe*



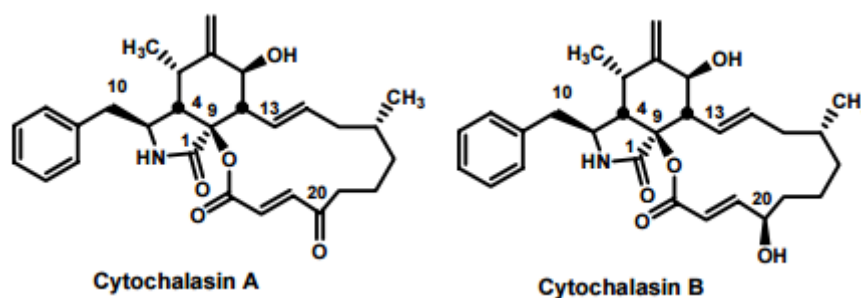
Εικόνα Α.18: Χημικές δομές αλκαλοειδών από μύκητες



Η παραγωγή αλκαλοειδών από βακτήρια δεν είναι συνήθης στη φύση. Τα βακτήρια *Pseudomonas spp.* παράγουν την ταμπτοξίνη (tabtoxin) και την πυοκυανίνη (pyocyanine) που αποτελούν αλκαλοειδή με αξιόλογη βιολογική δράση. Το θαλάσσιο βακτήριο *Pantoea agglomerans* P20-14 παράγει αλκαλοειδή ινδολίου. Το ενδοφυτικό βακτήριο *Pseudomonas brassicacearum* ssp. *neoaurantiaca* που απομονώθηκε από τη *Salvia miltiorrhiza* παράγει 11 αλκαλοειδή, και ενδοφυτικά βακτήρια που απομονώθηκαν από το *Miquelia dentate* παράγουν τα αντικαρκινικά αλκαλοειδή της καμτοθεκίνης (camptothecine). Τέλος, το θαλάσσιο βακτήριο *Bacillus pumilus*, το οποίο απομονώθηκε από το μύρο κοράλι *Anthipathes sp.*, παράγει βιοενεργά αλκαλοειδή με δράση κατά της τρυπανοσωμίας (Aniszewski, T., 2015).

### Ανάλογα κυτοχάλασίνης

Τα ανάλογα κυτοχάλασίνης είναι μία οικογένεια μεταβολιτών που προέρχονται από μύκητες και έχουν πολύπλοκη και ποικίλη μοριακή δομή και ποικίλες βιολογικές ιδιότητες. Το κοινό μοτίβο δομής τους μοιράζεται μεταξύ διαφόρων μελών του μορίου και είναι ένας άκαμπτος δικοκυκλικός πυρήνας ισοϊνδολόνης που συγχωνεύεται σε ένα μακροκυκλικό μόριο. Οι διαφορετικές μακροκυκλικές δομές πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στο προσδιορισμό της βιολογικής τους δραστηριότητας.



Εικόνα Α.19: Χημική δομή κυτοχάλασίνης Α και Β

#### “Cosmeceuticals” αντι-γήρανσης δέρματος

Η αναζωογόνηση του δέρματος συνδέεται άμεσα με την αντί-γήρανση, καθώς παρέχει ένα υγιές και γερό δέρμα χωρίς ρυτίδες. Υπάρχουν στην αγορά και πολλά από αυτά πολλά προϊόντα ενσωματώνουν μανιτάρια, δευτερογενείς μεταβολίτες ή συστατικά μανιταριών ή δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται απομονώνονται από τους ποικίλους τρόπους ζύμωσης διαφόρων μυκήτων.

Το γαλακτικό οξύ είναι ένα άλφα-υδρόξυ-οξύ το οποίο χρησιμοποιείται σε καλλυντικά σκευάσματα δέρματος, για την ενυδάτωση, την εξομάλυνση της ξηρότητας και για την απολέπιση του δέρματος (π.χ. Kinara Lactic Acid Hydrating Serum, B Kamins Lactic 8). Μπορεί ενίοτε να χρησιμοποιηθεί σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ( $\geq 12\%$ ) για χημική απολέπιση (π.χ. Skin Ceuticals Gel Peel GL Glycolic/Lactic Acid Peel), κατά την οποία αφαιρεί την εξωτερική στοιβάδα του δέρματος. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι το γαλακτικό οξύ μπορεί να παραχθεί από διάφορα στελέχη του μύκητα *Rhizopus* (Zhang, Z. Y., et al., 2007).

Μικρά μόρια της κατηγορίας των κεραμιδίων (ceramides) χρησιμοποιούνται επίσης στα καλλυντικά ως επιδερμικοί ενυδατικοί παράγοντες, αλλά είναι υψηλού κόστους λόγω της σπανιότητάς τους (π.χ. Elizabeth Arden Ceramide Purifying Toner, Bliss The Youth As We Know It και Zirh Rejuvenate Anti-Aging Face Cream). Τα κεραμίδια έχουν απομονωθεί από διάφορους μύκητες, όπως από τον *Phellinus pini* (Lourenco, A., et al., 1996) και τον *Tuber indicum* (Gao, J. M., et al., 2004) και αποτελούν πιθανές πηγές για χρήση σε καλλυντικά.

Η χιτίνη-γλυκάνη είναι ένα συμπολυμερές που βρίσκεται στο κυτταρικό τοίχωμα αρκετών μυκήτων, συμπεριλαμβανομένου του *Aspergillus niger* (Gautier, S., et al., 2008). Η χιτίνη-γλυκάνη έχει καλές ενυδατικές ιδιότητες και μπορεί να βοηθήσει στην καταπολέμηση μερικών από τα σημάδια της γήρανσης του δέρματος και έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί σε σκευάσματα που προορίζονται για την ενυδάτωση και αντι-γήρανση του δέρματος. Η χιτίνη γλυκάνη του KitoZyme είναι ένα συστατικό το οποίο απομονώνεται από το μυκήλιο του *Aspergillus niger*, το οποίο αναπτύσσεται στα παραπροϊόντα της παραγωγής φαρμάκων και τροφίμων (Gautier, S. et al., 2008). Το συστατικό αυτό χρησιμοποιείται σήμερα στο προϊόν KiOsmetine-CG. Διάφορα είδη μανιταριών έχουν επίσης μελετηθεί ως πηγή αυτού του συστατικού (Synytsya, A., et al., 2009; Vysotskaya, M.R., et al., 2009) και συνεπώς μπορεί να έχουν πιθανή χρήση σε καλλυντικά σκευάσματα.

Η υπεροξειδική δισμουτάση (superoxide dismutase) χρησιμοποιείται σε καλλυντικά προϊόντα για να μειώσει την καταστροφή του δέρματος από τις ελεύθερες ρίζες π.χ. για να μειώσει την ίνωση του δέρματος που εμφανίζεται μετά από χημειοθεραπεία σε περιπτώσεις καρκίνου του μαστού και παράγεται από μανιτάρια (Campana, F., et al., 2004; Sang-Shin, P., & Hwang, S. M., 1999). Η υπεροξειδική δισμουτάση είναι γνωστή για τη δράση της για την αναστροφή της ίνωσης, ίσως μέσω της αναστροφής

των μυοϊνοβλαστών σε ινοβλάστες (Vozenin-Brotons, M.C., et al., 2001). Ήδη χρησιμοποιείται σε πολυάριθμα καλλυντικά προϊόντα που προορίζονται για τη φροντίδα του δέρματος και των μαλλιών (π.χ. Pevonia Botanica—Oxygenating Combination, Dermalogica Intensive Moisture Balance).

Οι πολυσακχαρίτες, ιδιαιτέρως η β-(1-3)-D-γλουκάνη, οι οποίοι έχουν αντικαρκινικές ιδιότητες, έχουν βρεθεί σε πολυάριθμους μύκητες, όπως για παράδειγμα σε είδη του *Pleurotus* (Synytsya, A., et al., 2009) και χρησιμοποιούνται σε καλλυντικά σκευάσματα. Στην Ιαπωνία, οι β-γλυκάνες όπως οι λεντινάνη και κρεστίνη (πολυσακχαρίτης-K), που απομονώνονται από ορισμένα φαρμακευτικά μανιτάρια, χρησιμοποιούνται στη χημειοθεραπεία για τη θεραπεία διαφόρων τύπων καρκίνου. Μία υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη-πολυσακχαρίτης, το σύμπλοκο β-(1,6)-D-γλουκάνη, που απομονώθηκε από τα καρποσώματα του *Agaricus subrufescens*, μελετήθηκε για τη δράση του στη διαμόρφωση του ανοσοποιητικού συστήματος (Angeli, J. P. F., et al., 2009).

Η *Lentinula edodes* περιέχει μία δραστική ουσία που ονομάζεται λεντινάνη, η οποία φέρεται να διεγείρει το ανοσοποιητικό σύστημα, ενισχύοντας την ικανότητά της να καταπολεμά τις λοιμώξεις και τις ασθένειες. Χρησιμοποιείται στο καλλυντικό σκευάσμα Aveeno Positively Ageless Night Cream (Εικόνα Α.6).

Η σχιζοφυλλάνη, που απομονώνεται από τον μύκητα *Schizophyllum commune* είναι επίσης μία β-(1,3)-D-γλουκάνη με φαρμακευτικές ιδιότητες και περιέχεται στο σκευάσμα Murad's Sleep Reform Serum (Εικόνα Α.11).

Ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό, η L-εργοθειονίνη (L-ergothioneine, EGT), ανακαλύφθηκε σε υψηλές συγκεντρώσεις στα μανιτάρια. Είναι ένα αμινοξύ παράγωγο θειοουρίας - ιστιδίνης. Τα μανιτάρια *Agaricus bisporus*, περιέχουν τα περισσότερα ποσοστά EGT (Dubost, N.J., et al., 2006; Dubost, N.J., et al., 2007). Η εργοθειονίνη είναι ένα φυσικό αντιοξειδωτικό του δέρματος, όπως αποδεικνύεται από τη παρουσία του μεταφορέα EGT στους ινοβλάστες. Αποτελεί ισχυρότερο αντιοξειδωτικό από το συνένζυμο Q(10) λόγω της σχετικά μεγαλύτερης αποτελεσματικότητας της στην απευθείας αναστολή των ελεύθερων ριζών και στην προστασία των κυττάρων από την υπερϊώδη ακτινοβολία (Dong, K. K., et al., 2007). Προϊόντα δέρματος που περιέχουν εργοθειονίνη είναι τα: Cellex-C Advanced-C Neck Firming Cream, Kinerase Pro Therapy Ultra Rich Night και Osmotics 'Renovage' Cellular Longevity Serum.

Στα καλλυντικά σκευάσματα φροντίδας του δέρματος χρησιμοποιούνται επίσης τα ωμέγα-3 (π.χ. εικοσαπεντανοϊκό οξύ), ωμέγα-6 (π.χ. λινολεϊκό οξύ) και ωμέγα-9 λιπαρά οξέα (π.χ. ολεϊκό οξύ). Τα λιπαρά οξέα είναι φυσικά συστατικά του δέρματος και είναι συστατικά του συμπλέγματος που συνθέτει το εξωτερικό στρώμα που προστατεύει τον οργανισμό από την οξειδωτική βλάβη (Passi, S., et al., 2002; Pons, A., et al., 2002). Τα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα χρησιμοποιούνται στη σύνθεση των προσταγλανδινών PGE3 που ρυθμίζουν την φλεγμονώδη απόκριση και πιστεύεται ότι

βοηθούν στη μείωση αρκετών φλεγμονωδών συγγενών διαταραχών από τις οποίες το σώμα πάσχει, όπως δερματικά εξανθήματα και ερυθρότητα. Το σώμα χρησιμοποιεί τα ω-6 λιπαρά οξέα για να βοηθήσει τη θεραπεία ξηρότητας ή για να καταπολεμή παθήσεις του δέρματος όπως το έκζεμα. Τα ωμέγα-9 λιπαρά οξέα απαντώνται σε κυτταρικές μεμβράνες, ιδιαίτερα στον ιστό του δέρματος, όπου η ελαστικότητα είναι σημαντική. Το ολεϊκό οξύ (συν. ελαϊκό οξύ) συγκεκριμένα, είναι άφθονο σε κύτταρα του δέρματος και αποτελεί ένα πολύ καλό μέσο για τη μεταφορά θρεπτικών ουσιών δια μέσου του φραγμού του δέρματος. Έλαια πλούσια σε ελαϊκό οξύ είναι γενικά πολύ απορροφητικά και ως αποτέλεσμα χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία φροντίδας του δέρματος (Cheng, M.H., et al., 1999). Τα λιπαρά οξέα επίσης έχουν δείξει ότι αναστέλλουν την διάσπαση του κολλαγόνου και βελτιώνουν τη λειτουργία των κυττάρων (Kim, H.H., et al., 2006; Zulfakar, M.H., et al., 2007). Τα λιπαρά οξέα χρησιμοποιούνται στα καλλυτικά σκευάσματα σαν μαλακτικά, αντι-οξειδωτικά και σαν ρυθμιστές κυττάρων (π.χ. Sundari Omega 3 & Amalaki Night Cream και La Mer The Body Cream). Το γ-λινολενικό οξύ θεωρείται ότι προωθεί την υγιή ανάπτυξη του δέρματος και αποτελεί ένα αντιφλεγμονώδη παράγοντα. Τα σκευάσματα Bobbi Brown Brightening Intensive Cream και True Cosmetics Youth Revealing Complex περιέχουν λινολεϊκό οξύ, το Perricone MD Advanced Eye Area Therapy περιέχει εικοσαπεντανοϊκό οξύ και το Peter Thomas Roth Un-Wrinkle Peel Pads περιέχει λινολενικό και το This Works— Super Moisture λινολεϊκό και λινολενικό οξύ. Τα λιπαρά οξέα που χρησιμοποιούνται σε καλλυντικά μπορούν να παραχθούν από μύκητες (Ward, O. P., & Singh, A., 2005):

- Εικοσαπεντανοϊκό οξύ (eicosapentaenoic acid): νηματοειδείς μύκητες όπως είδη των *Pythium* και *Mortierella* που χρησιμοποιούν λακτόζη ως κύρια πηγή άνθρακα (O'Brien, D. J., et al., 1993)
- Λινολεϊκό οξύ (linoleic acid): έχει απομονωθεί από τα *Astraeus spp.* (Kakumyan, P., & Matsui, K., 2009), *Cordyceps* (Yang, F.Q., et al., 2009) και τον *Pleurotus sajor-cajú* (Nieto, I. J., & Chegwin Carolina A., 2008)
- γ-λινολενικό οξύ (γ-linolenic acid): απομόνωση από είδη των μυκήτων *Mortierella* και *Rhizopus* (Krištofiková, L., et al., 1991)

Τα καροτενοειδή είναι οργανικές χρωστικές ουσίες που έχουν βρεθεί σε ορισμένους μύκητες (Jin J.M. et al., 2010) και χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τις ξανθοφύλλες (που περιέχουν οξυγόνο) και τις καροτίνες. Τα καροτενοειδή χρησιμοποιούνται ευρέως στα καλλυντικά, ειδικά στις αντηλιακές κρέμες (π.χ. Methode Jeanne Piaubert -Anti -Ageing Facial Sun, Kiehl's Since 1851 Multi-Purpose Facial Formula). Το λυκοπένιο, ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό που περιέχεται στις ντομάτες, έχει βρεθεί ότι μπορεί να απομονωθεί από τον *Blakeslea trispora* (Mantzouridou, F., et al., 2008) και από άγρια μανιτάρια (Barros, L., et al., 2007a; Barros, L., et al., 2007b). Μέχρι σήμερα, μόνο το λυκοπένιο που απομονώνεται από ντομάτα είναι αυτό που περιέχεται σε καλλυντικά σκευάσματα.

Η ρεσβερατρόλη εμφανίζεται φυσικά στον εξωτερικό φλοιό των σταφυλιών και είναι συστατικό του κόκκινου κρασιού και πιστεύεται ότι είναι ευεργετική για την υγεία.

Είναι μια φυτοαλεξίνη που συντίθεται από τα φυτά όταν αυτά αντιστέκονται στις επιθέσεις από μύκητες και βακτήρια (Sadrudin, S., & Arora, R., 2009). Η ρεσβερατρόλη είναι ένας βασικός παράγοντας που συνδράμει στην απώλεια βάρους, την αύξηση ενέργειας, την μείωση τοξινών, την ανακούφιση της δυσκοιλιότητας και στην αντι-γήρανση. Επίσης μπορεί να καταπολεμήσει το φούσκωμα και τις ρυτίδες, το διαβήτη και την αρθρίτιδα. Χρησιμοποιείται στα καλλυντικά, καθώς υπάρχει ο ισχυρισμός ότι προστατεύει το κολλαγόνο. (Tian, T., et al., 2008; Wang, H., et al., 2007).

Η τρεαλόζη, που είναι επίσης γνωστή ως μυκόζη ή τρεμαλόζη, είναι ένας φυσικός άλφα-συνδεδεμένος δισακχαρίτης που σχηματίζεται από ένα α,α-1,1-γλυκοσидικό δεσμό ανάμεσα σε δύο μονάδες α-γλυκόζης. Η τρεαλόζη είναι ένα αντιοξειδωτικό που μπορεί να συντεθεί και από μύκητες. Είναι διαδεδομένη σε μανιτάρια όπως τα *Lentinula edodes*, *Grifola fondosa*, *Pholiota nameko* και *Auricularia auricula-judae* (Ng, T. B., 2004; Kalač, P., 2009).

Άλλες καλλυντικές ενώσεις που βρίσκονται σε μύκητες ανήκουν στην οικογένεια των φλαβονοειδών και τανινών και πολλές από αυτές χρησιμοποιούνται ήδη ή έχουν την δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά σε καλλυντικά δέρματος.

#### **“Cosmeceuticals” λεύκανσης δέρματος**

Η ανώμαλη μελάγχρωση του δέρματος μπορεί να οδηγήσει σε κηλίδες, σε καφέ έως γκρί αποχρωματισμό ή σε φακίδες, που πιθανώς να απαιτούν καλλυντική περιποίηση. Τα προβλήματα μελάγχρωσης του δέρματος συμβαίνουν λόγω παραγωγής περισσότερης ή μικρότερης ποσότητας μελανίνης από το φυσιολογικό. Τα μελανοκύτταρα παράγουν μελανίνη και ενεργοποιούνται από την τυροσινάση, η οποία δημιουργεί το χρώμα του δέρματος, τα ματιών και μαλλιών. Οι περισσότερες θεραπείες λεύκανσης του δέρματος, προκαλούν μείωση της παραγωγής μελανίνης με αναστολή της τυροσινάσης.

Το ελλαγικό οξύ είναι ένα πολυφαινολικό αντιοξειδωτικό και συνιστάται η χρήση του για την λεύκανση του δέρματος, καθώς επίσης έχει αντικαρκινικές ιδιότητες. Το γαλλικό οξύ είναι γνωστό ότι έχει αντι-οξειδωτική, αντι-φλεγμονώδη και αντι-μικροβιακή δράση και ανασταλτική δράση κατά της παραγωγής ελεύθερων ριζών (Fang, S.H., et al., 2008). Τόσο το ελλαγικό, όσο και το γαλλικό οξύ μπορούν να παραχθούν από φυτικές ταννίνες χρησιμοποιώντας ως βιοκατλύτη τον *Aspergillus niger* (Ventura, J., et al., 2008). Το γαλακτικό και γλυκολικό οξύ χρησιμοποιούνται επίσης ως λευκαντικά δέρματος και πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι είδη του *Rhizopus* θα μπορούσαν να προσφέρουν μια εναλλακτική πηγή για τη παραγωγή του γαλακτικού οξέος (Zhang, Z.Y. et al., 2007). Στα λευκαντικά του δέρματος περιλαμβάνεται επίσης το αζελαϊκό οξύ, το οποίο γενικά χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της ακμής. Προέρχεται από ένα ζυμομύκητα που παράγεται φυσικά στο δέρμα και το συναντάμε συχνά σε διαφορετικά προϊόντα που το συνδυάζουν μεταξύ άλλων με άλφα-υδρόξυ-οξέα. Παράδειγμα καλλυντικών σκευασμάτων λεύκανσης δέρματος είναι το Shu Uemura White Recovery EX+ Brightening, που περιέχει

ελλαγικό οξύ και το Cellex-C Advanced Skin Hydration Complex, που περιέχει γαλακτικό οξύ.

Το κοζικό οξύ χρησιμοποιείται επί χρόνια ως λευκαντικό δέρματος και αποτελεί ένα παραπροϊόν ζύμωσης ζυθοποιίας ρυζιού (Yabuta, T., 1924). Παρουσιάζει επίσης αντιβακτηριακές και αντιμυκητιασικές ιδιότητες. Επειδή το κοζικό οξύ είναι ασταθές και χρωματίζεται καφέ με τη παρουσία φωτός, συχνά προτιμάται το διπαλμιτικό κοζικό οξύ, το οποίο έχει αντι-οξειδωτικές ιδιότητες. Η εταιρία PharmaClinic παράγει μία λευκαντική κρέμα που ονομάζεται Lightenex, η οποία περιέχει διπαλμιτικό κοζικό οξύ που απομονώνεται από ιαπωνικά μανιτάρια και υπάρχει ο ισχυρισμός ότι λειτουργεί πιο αποτελεσματικά σε πιο σκουρόχρωμα δέρματα. Το διπαλμιτικό κοζικό οξύ περιέχεται επίσης στα σκευάσματα Dermâge Brightening Cream και Suisse+Lab Whitening Cream.

Σήμερα, πολλές από τις καλλυντικές μάσκες προσώπου που κυκλοφορούν στην αγορά, περιέχουν εκχυλίσματα *Ganoderma*. Έχουν μελετηθεί τα ανασταλτικά αποτελέσματα έναντι της δραστηριότητας της τυροσινάσης από ουσίες που απομονώνονται από διάφορα εκχυλίσματα μανιταριών ανάμεσα στα οποία το *Ganoderma lucidum* εμφάνισαν σημαντική αναστολή της δράσης της τυροσινάσης (IC<sub>50</sub> value 0.32 mg/ml) σε σχέση με αυτή που εμφανίζουν άλλοι βασιδιομύκητες. Τα ευρήματα ότι τα εκχυλίσματα μανιταριών αναστέλλουν τη δράση της τυροσινάσης βοηθά στη κατανόηση της θεραπευτικής δράσης που παρουσιάζουν διάφορα κινέζικα παραδοσιακά φυτικά προϊόντα φροντίδας του δέρματος (Chien, C.C. et al., 2008).

Διάφορα εκχυλίσματα μανιταριών πιστεύεται ότι έχουν ιδιότητες λεύκανσης του δέρματος. Η ιδέα αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι οι μύκητες μπορεί να αποχρωματίζουν το ξύλο και να υποβαθμίζουν τη μελανίνη. Αποτελέσματα μελετών έδειξαν ότι από του δευτερογενείς μεταβολίτες που απομονώθηκαν από διάφορους μύκητες, οι μεταβολίτες που απομονώθηκαν από τον *Sporotrichum pruinosum* ήταν οι πιο υποσχόμενοι για τον αποχρωματισμό της σύνθετης μελανίνης. Μία αερόβια διαδικασία χρησιμοποιήθηκε για τη παραγωγή ενζύμου αποχρωματισμού του δέρματος από το συγκεκριμένο στέλεχος και το ένζυμο αυτό μελετήθηκε για των αποχρωματισμό που προκαλεί στα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα του δέρματος και σε ολόκληρη την επιδερμίδα φωτότυπου δέρματος III και V. Έτσι αποδεικνύεται η αποτελεσματική ενζυματική αποικοδόμηση της μελανίνης του δέρματος αντί της αναστολής της σύνθεσής της που προκαλούν άλλοι παράγοντες. Αυτό ανοίγει νέους ορίζοντες για τη δυνατότητα χρησιμοποίησης ενζύμων στα καλλυντικά λεύκανσης του δέρματος (Mohorčić, M., et al., 2007).

#### **“Cosmeceuticals” από μανιτάρια**

Πολλές γνωστές μάρκες καλλυντικών προϊόντων πρόσθεσαν στα σκευάσματα τους εκχυλίσματα μανιταριών (π.χ. Origins Plantidote Mega-Mushroom Treatment (Εικόνα Α.20.2), Actifirm Actizyme Renovation Mushroom, Alqvinia Eternal Youth Cream (Εικόνα Α.20.4), Menard Embellir line). Παρακατω παρουσιάζονται

αναλυτικότερα μερικά από χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων καλλυντικών σκευασμάτων που παρατίθενται στον Πίνακα Α.1:

- Η πρώτη γραμμή καλλυντικών προϊόντων στον κόσμο, αναπτύχθηκε από το Επιστημονικό Κέντρο Koltsovo, στη Ρωσία. Τα μανιτάρια περιείχαν ένα μεγάλο φάσμα βιολογικά ενεργών ουσιών που είναι απαραίτητες για το δέρμα, όπως πρωτεΐνες, υδρογονάνθρακες, λιπίδια, ανόργανα άλατα, οργανικά οξέα, βιταμίνες, βιοτίνη και φολικό οξύ. Η εταιρεία ανέπτυξε μία σειρά από καλλυντικές κρέμες ( «Mushroom Collection») με εκχύλισμα του Αμανίτη του Μυγοκτόνου (*Amanita muscaria*).
- Οι εταιρίες Estee Lauder και Avena χρησιμοποιούν το *Hypsizygos ulmarium*.
- Η σειρά προϊόντων Positively Ageless της Johnson & Johnson/ Aveeno/Active Naturals (Εικόνα Α.20.6) χρησιμοποιούν ένα εκχύλισμα μανιταριού που περιέχει ένα συνδυασμό *Lentinula edodes* και *Ganoderma lucidum*, και η εταιρία ισχυρίζεται ότι η κρέμα «έχει αποδειχθεί ότι βοηθά στην επιτάχυνση της φυσικής διαδικασίας ανανέωσης της επιδερμίδας για την ανασύσταση των επιφανειακών κυττάρων. Μειώνει την εμφάνιση των λεπτών γραμμών και ρυτίδων.».
- Η σειρά προϊόντων Nano Works Pureology για μαλλιά και δέρμα, περιέχουν ένα μίγμα των *Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes* και *Mucor miehei*, το οποίο έχει αντιγηραντικές ιδιότητες, θρεπτικές για τα μαλλιά και περιέχει αντιοξειδωτικά συστατικά.
- Η νέα σειρά προϊόντων “Mega-Mushroom” περιέχει ένα μίγμα τριών διαφορετικών εκχυλισμάτων μανιταριών: *Hypsizygos ulmarium*, *Cordyceps* και το *Ganoderma Lucidum* (Lemann, P., 2007). Το *Hypsizygos ulmarium* είναι γνωστό για τα πολλαπλά οφέλη του. Η κατανάλωσή του μπορεί να μειώσει τα επίπεδα χοληστερόλης, έχει αντικαρκινικές ιδιότητες, υψηλή διατροφική αξία και περιέχει υψηλά επίπεδα βιταμινών, πρωτεϊνών, β-γλυκανών και μη-κορεσμένων λιπαρών οξέων. Στην κινεζική ιατρική χρησιμοποιείται για την ενίσχυση της επιδερμίδας, καθώς ενισχύει την αντίσταση του οργανισμού κατά των σημαδιών της γήρανσης. Οι ίδιοι ισχυρισμοί έχουν υποβληθεί για άλλα μανιτάρια που υπάρχουν στη συγκεκριμένη φόρμουλα.
- Η εταιρεία “Med Myco Ltd” (Ισραήλ) εκμεταλλεύεται το φαρμακευτικό και εμπορικό δυναμικό των βιοδραστικών συστατικών που περιέχουν τα βρώσιμα μανιτάρια. Το εκχύλισμα «Med Myco» περιέχει ένα οξύ παράγωγο του ετεροπολυσακχαρίτη γλυκομαννάνη που απομονώνεται από καλλιέργειες του μανιταριού *Tremella*, είναι ανεξάρτητο του pH και σχηματίζει ένα φιλμ όταν συνδέεται με τα μαλλιά ή το δέρμα. Έχει αντι-φλεγμονώδεις και αντι-αλλεργικές ιδιότητες, επιταχύνει την επούλωση τραυμάτων και βοηθά στη πρόληψη του εκφυλισμού των κυττάρων λόγω γήρανσης (Lemann, P., 2007).
- Η εταιρία καλλυντικών Vitamega Cosmetics χρησιμοποιεί κατά κύριο λόγο τον *Agaricus subrufescens*. Η σειρά σαμπουάν (Εικόνα Α.20.3) ισχυρίζεται ότι προσδίδει μακροπρόθεσμη ενυδάτωση στα μαλλιά, δίνοντας τους

μεγαλύτερη λάμψη και απαλότητα. Η ενυδατική κρέμα που παράγουν ανανεώνει και αναζωογονεί το δέρμα.

- Το εκχύλισμα του μανιταριού *Tremella fuciformis sporocarps* μπορεί να περιέχει έως και 500 φορές το βάρος του σε νερό. Είναι πολύ διάσημο στην Κίνα και την Ιαπωνία ως υποκατάστατο του υαλουρονικού οξέος. Χρησιμοποιείται από την P&G στη σειρά προϊόντων του δέρματος SK-II και σε πολλές άλλες μάρκες, όπως οι Kanebo και Fancl.
- Η εταιρία Bel-mélo έχει μία σειρά καλλυντικών, καθώς και συμπληρώματα διατροφής, που περιέχει β-γλυκάνες από διάφορα είδη μανιταριών. Χρησιμοποιεί πηγές όπως τα *Agaricus subrufescens (as A. blazei)*, *Agrocybe aegerita*, *Armillaria mellea*, *Antrodia camphorata*, *Cordyceps sinensis*, *Trametes versicolor*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Hericium erinaceus*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus nebrodensis*, *Schizophyllum commune*, *Phellinus linteus*, *Sparassis crispa* και άλλα ιατρικά ενεργά είδη μανιταριών.
- Η Mushroom Wisdom Inc. παράγει ποικίλα προϊόντα μανιταριών (Εικόνα A.14,16,17,18). Τα περισσότερα είναι συμπληρώματα διατροφής, εκτός από τη κρέμα περιποίησης του δέρματος Aquamella Cream (Εικόνα A.20.1) που περιέχει εκχυλίσματα του *Tremella fuciformis*.
- Η Earthherbs® L.L.C. παράγει φαρμακευτικά καλλυντικά και συμπληρώματα διατροφής από το μανιτάρι *Siberian chaga*. Το προϊόν Earthherbs Anti-Oxidant Treatment περιέχει chaga κρέμα μανιταριών και υποστηρίζει ότι αναζωογονεί το δέρμα.
- Η καλλυντική κρέμα Murad's Cleansing Shave είναι ένα ισχυρό καθαριστικό, το οποίο χρησιμοποιεί ένζυμα μανιταριών που βοηθούν στην απαλή απολέπιση της επιδερμίδας. Το serum Murad's Age Diffusing είναι ένας αντι-γηραντικός ορός και περιέχει το *Lentinula edodes* (Εικόνα A.20.11).

**Πίνακας Α.1:** Παραδείγματα εμπορικών σκευασμάτων που περιέχουν μύκητες ή εκχυλίσματα μυκήτων

Όνομα Προϊόντος	Λειτουργία Προϊόντος	Μύκητας/Εκχύλισμα μύκητα	Ιστότοπος
Sukran Grape Seed Lift Eye Mask	Βελτιώνει τη ποιότητα δέρματος γύρω από τα μάτια	<i>Tremella polysaccharide</i>	www.sukran.com
BeautyDiy Aqua Circulation Hydrating Gel	Ενυδάτωση	<i>Tremella polysaccharide</i>	Pinkybeauty.com.au
Sulwhasoo Hydroaid	Ενυδατική κρέμα για καθαρό και διαυγές δέρμα	Εκχύλισμα <i>Schizophyllum commune</i>	www.sulwhasoo.com
Alqvimia Eternal Youth Cream Facial Maxima	Αντι-γηραντική δράση	<i>Schizophyllum commune</i>	www.alqvimia.com



---

Regeneracion

Tan Ryuk Sang Firming Cream	Σύσφιξη και αναζωογόνηση δέρματος	<i>Ganoderma lucidum, Pleurotus ostreatus</i>	www.coracosmetics.com
Aveno Positively Ageless	Σύσφιξη δέρματος	<i>Lentinula edodes</i>	www.aveeno.com
Yves Saint Laurent Temps Majeur Elixir De Nuit	Αντι-γηραντική δράση	<i>Ganoderma lucidum</i>	www.yslbeautyus.com
Kose Sekkisei Cream	Ενυδάτωση και μείωση παραγωγής μελανίνης	<i>Cordyceps sinensis</i>	www.sekkisei.com
La Prairie Advanced Marine Biology Night Solution	Ενυδάτωση	<i>Tremella fuciformis</i>	www.shoplaprairie.com
Vitamega Facial Moisturizing Mask	Αναζωογόνηση δέρματος	<i>Agaricus subrufescens (as A. brasiliensis)</i>	www.vitamegacosmetic.com
Menard Embellir Refresh Massage	Αντι-γηραντική δράση	<i>Ganoderma lucidum</i>	www.menard-cosmetic.com
Nano Works Shineluxe	Αντι-γηραντική δράση	<i>Ganoderma lucidum, Lentinula edodes, Mucor miehei</i>	www.pureology.com

---



**Εικόνα Α.20-(1-12):** Εμπορικά σκευάσματα καλλυντικών που περιέχουν μανιτάρια ή εκχυλίσματα αυτών. 1. Aquamella Cream (*Tremella fuciformis*) 2. Origins Plantidote Mega-Mushroom Treatment 3. Vitamega shampoo (*Agaricus subrufescens*) 4. Alqvimia Eternal Youth (*Schizophyllum commune*) 5. Sukran Grape Seed Lift Eye Mask (*Tremella polysaccharide*) 6. Aveeno Positively Ageless Cream (*Ganoderma lucidum*, *Lentinula edodes*) 7. BeautyDiy Aqua Circulation Hydrating Gel (*Tremella polysaccharide*) 8. La Prairie Advanced Marine Biology Night Solution (*Tremella fuciformis*) 9. Sulwasoo Hydroaid (εκχύλισμα του *Schizophyllum commune*) 10. Yves Saint Laurent Temps Majeur Elixir De Nui (*Ganoderma lucidum*) 11. Murad's Sleep Reform Serum (*Schizophyllum*) 12. Kose Sekkisei Cream (*Cordyceps sinensis*)



**Εικόνα Α.21-(13-18):** Διάφορα nutriscosmetics που περιέχουν προϊόντα μανιταριού. 13. Grifron Maltake (*Grifola frondosa*), 14. Mushroom Wisdom Super Turkey Tail (*Coriohus versicolor*), 15. Perricone MD Maltake Mushroom Extract SX-Fraction, 16. Mushroom Wisdom Super Lion's Mane (*Hericium erinaceus*), 17. Mushroom Wisdom Super Tremella (*Tremella fuciformis* και *Grifola frondosa*), 18. Mushroom Wisdom Super Royal Agaricus (*Agaricus blazei*)

Τα αντιοξειδωτικά που περιέχονται στα μανιτάρια είναι κυρίως φαινολικές ενώσεις, που έχουν ποσοτικοποιηθεί σε πολλά διαφορετικά είδη κυρίως από τη Φινλανδία, την Ινδία, την Κορέα την Πορτογαλία και την Τουρκία. Ανάλυση των φαινολικών ενώσεων που περιέχονται σε δεκαεπτά πορτογαλικά άγρια είδη μανιταριών διεξήχθη με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης συζευγμένης με ανίχνευση με συστοιχία φωτοδιόδων (HPLC-DAD). Πρωτοκατεχικό, π-υδροξυβενζοϊκό, π-κουμαρικό και κινναμωμικό οξύ βρέθηκαν και προσδιορίστηκαν ποσοτικά. Η *Fistulina hepatica* παρουσίασε την υψηλότερη συγκέντρωση σε φαινολικά οξέα (111.72 mg / Kg, dw) λόγω της σημαντικής συμβολής των πρωτοκατεχικού (67,62 mg / Kg) και π-υδροξυβενζοϊκού (41.92 mg / kg) οξέων. Τα εδώδιμα μανιτάρια που αναλύθηκαν στη παρούσα έρευνα των Vaz, J. A., και των συνεργατών, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν άμεσα στη διατροφή του ανθρώπου για την καταπολέμηση του οξειδωτικού στρες. Τα μη βρώσιμα είδη θα μπορούσαν να αποτελέσουν πηγή φαινολικών ενώσεων που θα χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα στη βιομηχανία τροφίμων ή ως συστατικά φαρμακευτικών και καλλυντικών σκευασμάτων, λόγω των καλών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους (Vaz, J. A., et al., 2011).



### A.3 ΜΥΚΗΤΕΣ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Cercospora*

Από τότε που εντοπίστηκε και καταγράφηκε το γένος *Cercospora* από τον Fresenius το 1863, έχουν καταγραφεί πολυάριθμα είδη και έχουν περιγραφεί από μυκητολόγους και κυτταροπαθολόγους. Η μονογραφία του Chupp (1954) είναι μία πολύτιμη πηγή αναφοράς και οι μελέτες του Deighton (1971, 1973a, 1973b) έχουν προσθέσει σημαντικά στην αποσαφήνιση της ενδιαφέρουσας αυτής ομάδας των μυκήτων. Πιο πρόσφατα, οι Braun (1991, 1992, 1993, 1995) και Deighton (1976) έχουν περιγράψει μία σειρά από συναφή είδη *Cercospora* και υπολογίζεται ότι μέχρι σήμερα έχουν δημοσιευθεί πάνω από 2,000 είδη που ανήκουν στο γένος αυτό, η οποία είναι μία ετερογενής ομάδα και ένα από τα μεγαλύτερα γένη των υφομυκήτων (Narayan, S., et al., 2001).

Το γένος *Cercospora* αντιπροσωπεύεται από ένα μεγάλο αριθμό ειδών που προκαλούν ασθένειες της κηλίδωσης των φύλλων σε ένα ευρύ φάσμα φυτών ξενιστών. Αυτά είναι υπεύθυνα για μεγάλη ζημιά στα φυτά υψηλής οικονομικής αξίας όπως τα δημητριακά, τα όσπρια, τα χόρτα, τα λαχανικά, τα δένδρα δάσους και τα διακοσμητικά φυτά. Οι νοσούσες κηλίδες στα φύλλα ποικίλουν σε σχήμα, μέγεθος και γενικά έχουν ένα ωχρό καφέ έως καφέ χρώμα. Υπό υγρές συνθήκες, άφθονα κονίδια σχηματίζονται στις νεκρωτικές κηλίδες. Οι κονιδιοφόροι αναπτύσσονται μέσα από τα στομάτια των πασχουσών περιοχών (Narayan, S., et al., 2001).

#### Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Το μυκήλιο του συγκεκριμένου μικροοργανισμού αποτελείται από πολύ λεπτές έως χονδροειδείς, αρκετά τακτικά έως άτακτα οργανωμένες και χωρισμένες σε διαφράγματα υφές, που ως επί το πλείστον διακλαδώνονται στον ιστό του ξενιστή. Το μυκήλιο συχνά παράγεται εξωτερικά και είτε ανακύπτουν από το εσωτερικό μυκήλιο και αναδύεται μέσα από τα στόματα, όπως στη περίπτωση των *C. condensata* και *C. petersii*, είτε αναδύεται απευθείας μέσα από τα κονιδιοφόρα, όπως στο *C. portoricensis*. Το χρώμα του μυκηλίου κυμαίνεται στις αποχρώσεις του καφέ, λόγω των χρωστικών ουσιών που παράγει. Όταν αυτό δεν είναι ακόμα πλήρως ανεπτυγμένο είναι είτε άχρωμο είτε ελαφρώς χρωματισμένο.

Τα κονιδιοφόρα αναδύονται από τον ιστό του ξενιστή είτε μέσω των στομάτων είτε με ρήξη της επιδερμίδας. Και οι δύο αυτοί τύποι εμφάνισης των κονιδιοφόρων μπορεί να βρεθούν στο ίδιο είδος. Όταν ένα είδος παράγει ένα εξωτερικό μυκήλιο τα κονιδιοφόρα μπορούν επίσης να παραχθούν μέσω έγχυσης πάνω σε αυτό. Σημαντική ποικιλομορφία παρουσιάζεται σε επίπεδο μεγέθους, σήμανσης και χρώματος των κονιδιοφόρων.

Τα κονίδια του γένους *Cercospora* χαρακτηρίζονται από διακριτά μορφολογικά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα είδη, όπως το *C. acalyphae*, έχουν κονίδια εκ των οποίων το σημείο σύνδεσης είναι τόσο ευρύ όσο η μέγιστη διάμετρος του κονιδίου. Από τη βάση ή κοντά σε αυτή, το κονίδιο λεπταίνει σταδιακά προς την κορυφή. Γι αυτό το λόγο προτείνεται ο όρος «βελονοειδές». Σε άλλα είδη, το σημείο σύνδεσης

είναι στενότερο από τη μέγιστη διάμετρο, όπως στη περίπτωση των *C. smilacina* και *C. ferruginea*. Σε άλλα είδη τα κονίδια είναι κυλινδρικά, όπως στο *C. althaeina*. Κατά την ανάπτυξή του, το κονίδιο εμφανίζεται αρχικά ως μικρό, οβάλ, ελλειπτικό, ροπαλοειδές ή κυλινδρικό. Καθώς μεγαλώνει, επιμηκώνεται και διαμορφώνεται όπως περιγράφηκε παραπάνω. Ποικίλουν σε μέγεθος και χρώμα (Solheim, W. G., 1930).



Εικόνα Α.22: Κονίδια του γένους *Cercospora* (Jason Brock, University of Georgia)

### Δευτερογενείς Μεταβολίτες

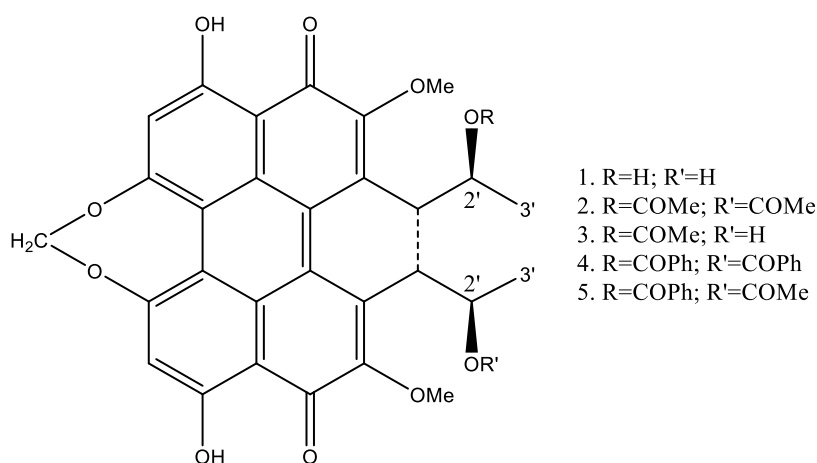
Ανάμεσα στους φυτοπαθογόνους μικροοργανισμούς, το γένος *Cercospora* είναι ευρέως γνωστό, καθώς συμπεριλαμβάνει πολλά είδη τα οποία είναι υπεύθυνα για πολλές ασθένειες κηλίδωσης φύλλων διαφόρων φυτών μεγάλης οικονομικής σημασίας, όπως και έχει προαναφερθεί. Ο πιθανός φυτοτοξικός ρόλος που διαδραματίζεται από τους παραγόμενους δευτερογενείς μεταβολίτες των *Cercospora*, έχει τονιστεί από τον Schloesser (Schloesser, E., 1972). Ωστόσο η πρώτη αναφορά για την παραγωγή φυτοτοξίνης από τον *C. kikuchii* έγινε από τους Kuyama και Tamura (Kuyama S and Tamura T., 1957), από τον οποίο απομονώθηκε κερκοσπορίνη. Η δομή και η ασυνήθιστη στερεοχημεία της κερκοσπορίνης διασαφηνίστηκες λίγα χρόνια αργότερα. Έχουν δημοσιευτεί επίσης άρθρα σχετικά με την απομόνωση της κερκοσπορίνης από άλλα είδη *Cercospora*, όπως *C. beticola*, *C. huyii*, *C. personata* και *C. ricinella*.

Εξ αιτίας του ενδιαφέροντος της κερκοσπορίνης ως φυτοξίνη, της πιθανής συνέργειας της με άλλους μεταβολίτες και της ελπίδας να βρεθούν νέες βιολογικά ενεργές ουσίες, η Assante G. και οι συνεργάτες της μελέτησαν 61 είδη *Cercospora* από τα οποία τα 23 παράγουν κερκοσπορίνη και αρκετά παρήγαγαν άλλους δευτερογενείς μεταβολίτες (Πίνακας Α.2) (Assante, G., et al., 1977; Sakaki, T. et al., 1981).

**Πίνακας Α.2:** Αποτελέσματα εξέτασης ειδών του γένους *Cercospora* για κερκοσπορίνη και άλλους δευτερογενείς μεταβολίτες

Είδος	Κερκοσπορίνη	Άλλοι δευτερογενείς μεταβολίτες
<i>C. aleuritidis</i>	-	-
<i>C. althaelna</i>	-	-
<i>C. ampelopsidis</i>	-	-
<i>C. angolensis</i>	-	-
<i>C. apii</i>	-	-
<i>C. ariminiensis</i>	√	-
<i>C. armoraciae</i>	-	-
<i>C. astragali</i>	-	-
<i>C. bellynchii</i>	-	-
<i>C. bertoreae</i>	√	Τοξίνη <i>C. beticola</i> ( <i>C. beticola</i> toxin, CBT)
<i>C. beticola</i>	√	CBT, fulvic acid
<i>C. bizzozeriana</i>	√	-
<i>C. bolleana</i>	-	-
<i>C. calotropidis</i>	-	-
<i>C. canescens</i>	√	-
<i>C. cantuariensis</i>	-	-
<i>C. cari</i>	-	Κυνοδοντίνη (cynodontin)
<i>C. carotae</i>	√	-
<i>C. chenopodii</i>	√	-
<i>C. cistinearum</i>	√	-
<i>C. cladosporioides</i>	√	-
<i>C. diazu</i>	√	-
<i>C. dulcamarae</i>	√	-
<i>C. erysimi</i>	√	-
<i>C. exosporioides</i>	-	-
<i>C. ferruginea</i>	-	Δοχιστρομίνη (dohistromin) (12)
<i>C. festucae</i>	-	Δοχιστρομίνη (12)
<i>C. fusca</i>	-	-
<i>C. italic</i>	-	-
<i>C. kaki</i>	-	-
<i>C. kikuchii</i>	√	-
<i>C. kikuchii</i>	√	-
<i>C. ligustrina</i>	-	Λιγουστρόνη A(6), B(7), C(8) (ligustrone A(6), B(7), C(8))
<i>C. magnoliae</i>	-	-
<i>C. malvacearum</i>	√	-
<i>C. malvicola</i>	√	-
<i>C. mediaginis</i>	√	-
<i>C. melonis</i>	-	(14)
<i>C. mercurialis</i>	-	-
<i>C. microsora</i>	-	Δοχιστρομίνη (12)
<i>C. musae</i>	-	-
<i>C. nicotianae</i>	√	-
<i>C. olivascens</i>	-	-
<i>C. oryzae</i>	√	-
<i>C. personata</i>	√	-

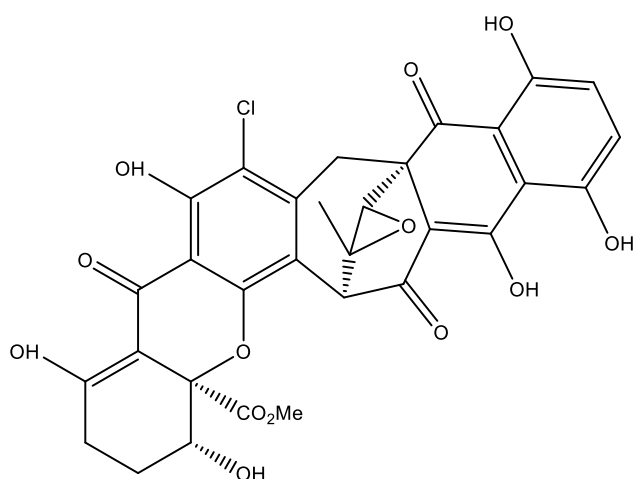
<i>C. plantaginis</i>	√	-
<i>C. plumbaginea</i>	-	-
<i>C. psoruleae-bituminosae</i>	-	-
<i>C. rautensis</i>	-	-
<i>C. rhapsicola</i>	-	-
<i>C. rosicola</i>	-	Δοχιστρομίνη (12)
<i>C. rubi</i>	-	Δοχιστρομίνη (12)
<i>C. salina</i>	-	-
<i>C. scirpicola</i>	-	(19), (20), (22)
<i>C. setariae</i>	√	(2), (3), (4), (5)
<i>C. smilacis</i>	-	Δοχιστρομίνη (12, 13), αβερουφίνη (averufin) και αβερυθρίνη (averythrin)
<i>C. taiwanensis</i>	-	Μελλεΐνη (mullein) (9), 4-υδροξυ-μελλεΐνη (4-hydroxymellein) (10), ταϊβαπυρόνη (taiwapyrone) (11)
<i>C. unamunoi</i>	√	-
<i>C. vaginae</i>	-	-
<i>C. violae</i>	√	-
<i>C. zebrina</i>	-	-
<i>C. zonata</i>	-	-



**Εικόνα A.23:** Χημική δομή κερκοσπορίνης και αναλόγων της

Ένα στέλεχος του γένους *Cercospora* (CE14) συλλέχθηκε από τις ρίζες δενδρυλλίων σόγιας. Οι ρίζες περιείχαν κερκοσπορίνη που απομονώθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν. *In vitro* καλλιέργειες του στελέχους CE14 παράγαγαν Β σεμπετίνη (sebetin B), η οποία είναι γνωστή και ως CBT (*C. beticola* toxin) που έχει βρεθεί και στα παραπάνω στελέχη (Robeson, D. J., & Jalal, M. A., 1993).

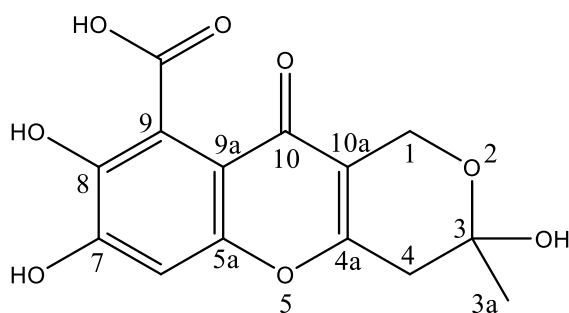




**Εικόνα A.24:** Χημική δομή μπετικολίνης-1 (CBT)

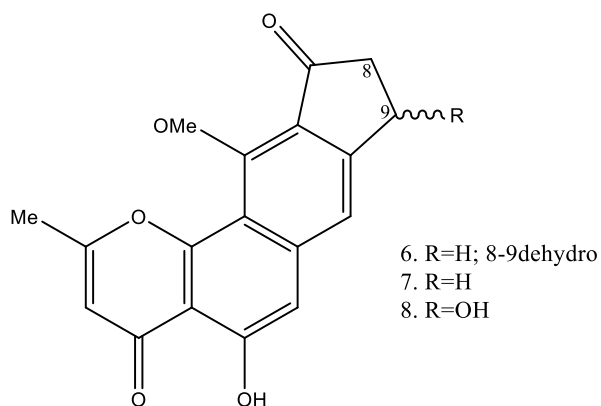
Από τον φυτοπαθογόνο *C. beticola* απομονώθηκε από τους Sakaki, T. και τους συνεργάτες του το 1981 (Sakaki, T., et al., 1981) το φουλβικό οξύ (fulvic acid), που είχε απομονωθεί για πρώτη φορά από τον μύκητα *Penicillium griseofulvum*. Είναι αρκετά ενδιαφέρον το γεγονός ότι η ένωση αυτή συνδέεται με τη πορεία βιοσύνθεσης που ακολουθεί η κερκοσπορίνη.

Το φουλβικό οξύ αποτελεί μία εξαιρετικά πολύπλοκη και βιοδραστική οργανική ουσία, με χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα. Ανήκει σε μία κατηγορία ενώσεων που περιλαμβάνουν χουμικές ενώσεις, χουμικά οξέα και χουμίνες. Αυτές οι ενώσεις χρησιμοποιούνται ως φαρμακευτικοί, αντιμικροβιακοί, αντιφλεγμονώδεις και αντιογκογόνοι παράγοντες, ως διεγερτικά του συκωτιού, διορθωτικά για το γαστρικό έλκος και για τη θεραπεία εγκαυμάτων του δέρματος. Πιο συγκεκριμένα, το φουλβικό οξύ, λόγω των λειτουργικών του ομάδων, έχει διάφορες ευεργετικές ιδιότητες. Σε εξέλιξη βρίσκονται μελέτες για την δράση του στο ανθρώπινο σώμα, ενώ ήδη έχει περιγραφεί η πιθανή εφαρμογή του ως αντιμικροβιακός, αντιφλεγμονώδης και αντιοξειδωτικός παράγοντας. Χρησιμοποιείται μέσω εξωτερικής χρήσης για τη θεραπεία αιματώματος, φλεβίτιδας, αρθροπάθειας, πολυαρθρίτιδας, οστεοαρθρίτιδας, οστεοχόνδρωσης κ.α. Παράλληλα, λαμβάνεται από το στόμα για τη θεραπεία γαστρίτιδας, διάρροιας, στομαχικού έλκους, δυσεντερίας, κολίτιδας και του σακχαρώδους διαβήτη (Rodríguez, N. C., et al., 2011).

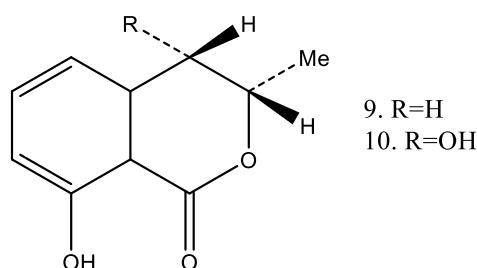


**Εικόνα A.25:** Χημική δομή φουλβικού οξέος

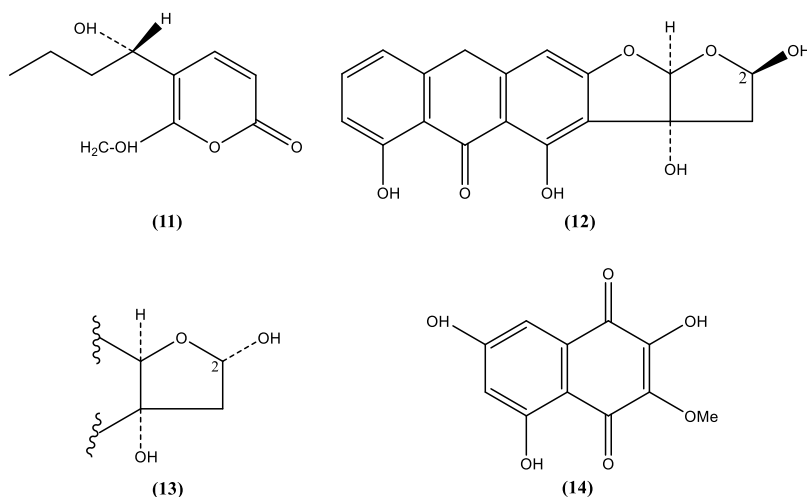
Οι λιγουστρόνη Α, Β και C (Ligustrone A, B & C) είναι νέοι μεταβολίτες που έχουν απομονωθεί από τον *C. ligustrina Boerema*. Η λιγουστρόνη Β αποτελεί τον βασικό μεταβολίτη. Η λιγουστρόνη Α και C είναι τα παράγωγα 8,9-διϋδρο και 8-υδροξυ της λιγουστρόνης Β αντίστοιχα (Arnone A., et al., 1975).



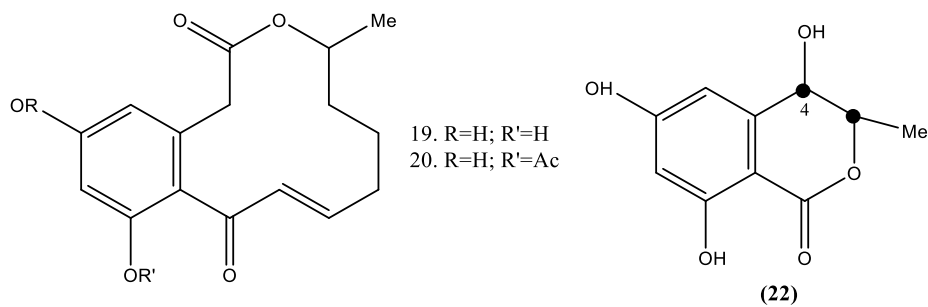
**Εικόνα A.26:** Χημική δομή λιγουστρόνης Α(6), Β(7), C(8)



**Εικόνα A.27:** Χημική δομή μελλείνης (9) και 4-υδροξυμελλείνης (10)

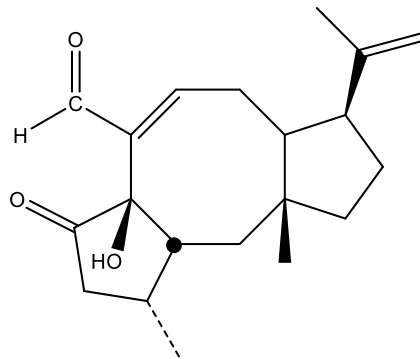


**Εικόνα A.28:** Χημική δομή ταΐβατυρόνης (11), δοχιστρομίνης (12, 13) και του νέου μορίου (14) που απομονώθηκε από τον *C. melonis*



**Εικόνα Α.29:** Χημική δομή των μορίων (19), (20) και (22) που απομονώθηκαν από τον *C. scirpicola*

Άλλοι μεταβολίτες που έχουν απομονωθεί από διάφορα είδη του γένους *Cercospora* είναι το αψισικό οξύ (Abscisic acid ή ABA) και η τραβερσιανάλη (traversianal). Το ABA αποτελεί μία σημαντική φυτική ορμόνη που εμπλέκεται στον έλεγχο της ομαλής ανάπτυξης των ανώτερων φυτών. Ο μύκητας *Cercospora rosicola* συνθέτει μεγάλες ποσότητες αυτής της ένωσης (Assante, G., et al., 1977). Η τραβερσιανάλη από την άλλη, είναι ένα νέο τρικυκλικό διτερπένιο αλδεΐδης, το οποίο απομονώθηκε από τον *C. tracersiana* (Stoessl, A., et al., 1989).

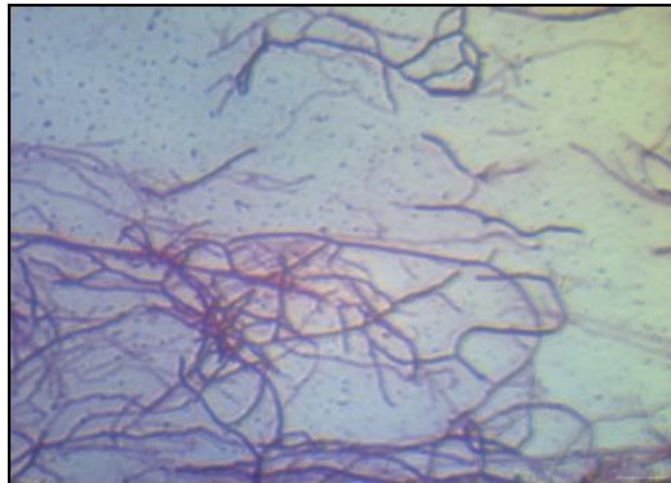


**Εικόνα Α.30:** Χημική δομή τραβερσιανάλης



#### A.4 ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΤΟΥ ΓΕΝΟΥΣ *Streptomyces*

Οι στρεπτομύκητες ανήκουν στο γένος *Streptomyces*, της οικογένειας *Streptomycetaceae*, της τάξης βακτηρίων *Actinomycetales* (Waksman, S. A., & Hinrich, A. T., 1943). Είναι το πιο μελετημένο από τα υπόλοιπα γένη της τάξης των ακτινομυκήτων, που σχηματίζουν μηκύλιο. Σε γενικές γραμμές η οικογένεια *Streptomycetaceae* μπορεί να διακριθεί από φυσιολογικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά, από τη χημική σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων, τον τύπο της πεπτιδογλυκάνης, των φωσφολιπιδίων, των αλυσίδων των λιπαρών οξέων, το ποσοστό του περιεχομένου G-C, την ανάλυση του 16S rRNA και τον υβριδισμό του DNA-DNA. Οι στρεπτομύκητες μπορούν να αναπτυχθούν σε διάφορα περιβάλλοντα και παράγουν στρώμα εναέριων υφών που μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μία αλυσίδα σπορίων (Korn-Wendisch, F. & Kutzner, H.J., 1992). Πάνω από 500 είδη του γένους *Streptomyces* έχουν περιγραφεί και αποτελούν τη μεγαλύτερη φυσική πηγή παραγωγής αντιβιοτικών και άλλων δευτερογενών ουσιών (Ventura, M., et al., 2007).



**Εικόνα Α.31:** Στελεχος *Streptomyces* όπως φαίνεται στο φωτονικό μικροσκόπιο με χρώση κατά Gram

#### Μορφολογικά χαρακτηριστικά του γένους *Streptomyces*

Οι στρεπτομύκητες παρουσιάζουν, σε μεγαλύτερο μάλιστα βαθμό από σχεδόν όλα τα άλλα βακτήρια, ένα αριθμό μακροσκοπικών χαρακτηριστικών που βοηθούν στο διαχωρισμό και στην ταυτοποίηση διαφόρων ειδών. Αυτά είναι: α) το χρώμα της επιφάνειας των σπορίων και του μυκηλίου υποστρώματος, β) η παραγωγή χρωστικών ουσιών που διαχέονται στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας, γ) η συνοχή και η μορφή του αέριου μυκηλίου και δ) η μορφολογία των αποικιών (Williams, S. T., et al., 1983).

Τα είδη του γένους *Streptomyces* είναι χημειοοργανοτροφικά, νηματοειδή gram-θετικά βακτήρια. Παρόλο που δεν είναι μύκητες, μπορεί να βρεθούν και στα ίδια ενδιαιτήματα όπου μπορεί να βρεθούν μύκητες και παρουσιάζουν επιφανειακές

ομοιότητες (Ikeda, H., et al., 2003). Έχουν γονιδιώματα με υψηλή περιεκτικότητα σε γουανίνη και κυτοσίνη (69-78%) (Kavitha, A., et al., 2010).

Τα μέλη του γένους σχηματίζουν εκτεταμένη, διακλαδιζόμενο βλασθητικό και αέριο μυκήλιο. Το βλασθητικό μυκήλιο έχει διάμετρο που κυμαίνεται από 0.5 έως 2.0 μm και παρουσιάζει ασυνεχή διαμερισματοποίηση ενώ σε σπάνιες περιπτώσεις παρατηρείται παραγωγή σπορίων (Ventura, M., et al., 2007). Τα σπόρια σχηματίζονται από τον κατακερματισμό των νημάτων και σχηματίζουν ευθείες, κυματοειδείς ή ελικοειδείς αλυσίδες με περισσότερα από 50, μη κινητά σπόρια ανά αλυσίδα (Becker, B., et al, 1965; Shirling, E.B., and Gottlieb, D., 1968). Οι αποικίες αναπτύσσονται αργά και συχνά χαρακτηρίζονται από μία μυρωδιά που μοιάζει με αυτή του χώματος, λόγω της παραγωγής γεωσμίνης που είναι ένας πτητικός μεταβολίτης (Jüttner, F., & Watson, S. B., 2007). Αρχικά οι αποικίες έχουν μία σχετικά λεία επιφάνεια, αλλά αργότερα αναπτύσσουν εναέριο μυκήλιο που μπορεί να εμφανιστεί με διάφορες μορφές, είτε κοκκοειδής, ή κονιορτώδης ή σαν βελούδο. Το χρώμα του βλασθητικού και του αέριου μυκηλίου οφείλεται σε μια μεγάλη ποικιλία χρωστικών που παράγουν οι στρεπτομυκήτες (Flärdh, K., & Buttner, M. J., 2009).

Ο χημικός τύπος του τοιχώματος είναι I με κύριο χαρακτηριστικό την παρουσία, Π-διαμινοπιμελικού οξέος (L-DAP) στις πεπτιδογλυκάνες και γλυκίνης, αλλά και την απουσία χαρακτηριστικών σακχάρων (Lechevalier, M. P., & Lechevalier, H., 1970; Lechevalier, H. A., & Lechevalier, M. P., 1970).

### Ο κύκλος ζωής του γένους *Streptomyces*

Η μικροσκοπική μορφολογία έχει παίξει σοβαρό ρόλο στο διαχωρισμό του γένους *Streptomyces* από άλλους σποροφόρους ακτινομύκητες καθώς και στην ταυτοποίηση των διαφόρων ειδών του. Ο κύκλος ζωής των στρεπτομυκήτων περιλαμβάνει τρεις χαρακτηριστικές δομές: α) το βλασθητικό μυκήλιο που ονομάζεται μυκήλιο υποστρώματος και σχηματίζεται τόσο σε στερεά όσο και σε υγρά θρεπτικά υποστρώματα, β) το αέριο μυκήλιο που φέρει αλυσίδες σπορίων που μερικές φορές ονομάζονται και σποροφόροι και γ) τα ίδια τα σπόρια (Kutzner, H.J., 1981).

Ο κύκλος ζωής των στρεπτομυκήτων ξεκινά όταν ένα σπόριο εγκαθίσταται σε ένα πλούσιο θρεπτικό μέσο. Αυτό διεγείρει το σπόριο να εξέλθει από το στάδιο του ληθάργου και να εισέλθει στο στάδιο της εκβλάστησης, σχηματίζοντας τους βλασθητικούς σωλήνες. Η επιμήκυνση των βλασθητικών σωλήνων πραγματοποιείται με επάκρια αύξηση και τα κύτταρα δεν υφίστανται διχοτόμηση. Μέσω της επέκτασης και των διακλαδώσεων οι βλασθητικοί σωλήνες δημιουργούν ένα δίκτυο νημάτων που αναπτύσσονται επιφανειακά και στο εσωτερικό ενός τρυβλίου με άγαρ. Το δίκτυο αυτό που δημιουργείται ονομάζεται μυκήλιο υποστρώματος (Flärdh, K., & Buttner, M. J., 2009). Καθώς η αποικία συνεχίζει να αυξάνεται, το μυκήλιο στο κέντρο της αποικίας αρχίζει να διαφοροποιείται με αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός νέου τύπου κυττάρου, τις αέριες υφές. Αφού ολοκληρωθεί η ανάπτυξη των εναέριων υφών, αυτές στη συνέχεια υφίστανται ταυτόχρονες κυτταρικές διαιρέσεις όπου

σχηματίζονται τμήματα, το καθένα από τα οποία θα αναπτυχθεί στο τέλος σε ανθεκτικό σπόριο. (Kieser, T., et al., 2000).

### Οικοφυσιολογία γένους *Streptomyces*

Οι στρεπτομύκητες συναντώνται σε μία ποικιλία οικοσυστημάτων με σημαντικότερο αυτό του εδάφους. Βρίσκονται κυρίως στα επιφανειακά στρώματα. Τα αλκαλικά και ουδέτερα εδάφη είναι κατάλληλα για την ανάπτυξη των στρεπτομυκήτων. Η χαρακτηριστική χωμάτινη οσμή του εδάφους, οφείλεται στην παραγωγή σειράς μεταβολιτών των στρεπτομυκήτων που ονομάζονται γεωσμίνες. Οι ουσίες αυτές είναι τερπενοειδή C15 (ακόρεστες ενώσεις δακτυλίου άνθρακα, οξυγόνου και υδρογόνου). Μια κοινή γεωσμίνη είναι η trans-1.10-διμεθυλο-trans-9-δεκαλόλη (Madigan, M.T., et al., 1997). Η κατανομή των στρεπτομυκήτων στο έδαφος και στο νερό εξαρτάται από την ύπαρξη θρεπτικών συστατικών, τη θερμοκρασία, το pH, τα επίπεδα υγρασίας, αλατότητας, την υφή του εδάφους και το κλίμα (Locci, R., 1989).

Παρόλο που το έδαφος είναι ο σημαντικότερος βιότοπος των στρεπτομυκήτων, άλλα ενδιαιτήματα είναι:

- Διάφορα οργανικά υλικά: μεσόφιλα και θεرمόφιλα είδη του γένους *Streptomyces* μπορούν να αποικοδομήσουν πολλά φυσικά υποστρώματα, πλαστικά, καουτσούκ και χαρτί (Subba Rao, N. S., 1999).
- Γλυκά ύδατα και θαλάσσια ενδιαιτήματα: Η απομόνωση διαφόρων ειδών στρεπτομυκήτων από θαλάσσια περιβάλλοντα αποτέλεσε μια πλούσια περιοχή έρευνας κατά την τελευταία δεκαετία (Remya, M., & Vijayakumar, R., 2008). Ανάμεσα στους θαλάσσιους οικότοπους που μελετήθηκαν, τα θαλάσσια ασπόνδυλα, και ιδιαίτερα οι σπόγγοι σφουγγάρια, είχαν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον για την ανακάλυψη νέων ειδών (Selvakumar, D., et al., 2010). Πρόσφατες έρευνες τεκμηριώνουν τους ακτινομύκητες που προέρχονται από θαλάσσιους οικότοπους, ως πηγές νέων αντιβιοτικών και αντικαρκινικών παραγόντων (Baskaran, R., et al., 2011).
- Φυτικοί οργανισμοί: οι στρεπτομύκητες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως φυτοπαθογόνοι, όπως οι *Streptomyces scabies*, *S. ipomoea*, *S. turgidiscabies*, *S. aureofaciens*, *S. acidiscabies* και *S. tumescans* που προκαλούν ποικίλες ασθένειες στα φυτά. (Fatore, M., et al., 2000). Από την άλλη, μερικά είδη *Streptomyces* δρουν ως βιολογικός έλεγχος για τη μείωση των παρασίτων και των βλαβών που προκαλούν αυτά (Rugthaworn, P., 2007).
- Ζώα και άνθρωπος: Μερικά είδη στρεπτομυκήτων είναι παθογόνα και προκαλούν μολύνσεις στον άνθρωπο, όπως το μυκήτωμα που μπορεί να προκληθεί από τον *Streptomyces somaliensis* και *Streptomyces sudanensis* (Quintana, E., et al., 2008).

Όσον αφορά στη φυσιολογία τους, παρουσιάζουν αρκετά μεγάλη διατροφική ευελιξία. Είναι αερόβια, χημειοοργανοτροφικά βακτήρια και χρειάζονται οργανικές πηγές άνθρακα, ανόργανες πηγές αζώτου και ανόργανα άλατα, ενώ δεν χρειάζονται

βιταμίνες και παράγοντες ανάπτυξης (Lee, M., & Demain, A., 1997). Οι απαιτήσεις τους για απόλυτα απαραίτητους παράγοντες ανάπτυξης είναι σπάνιες, ενώ μπορούν να χρησιμοποιούν ευρύτατη ποικιλία σακχάρων, αλκοολών, οργανικών οξέων, αμινοξέων και ορισμένων αρωματικών ενώσεων. Ένα και μόνο στέλεχος μπορεί να διασπάσει πάνω από πενήντα διαφορετικές πηγές άνθρακα. Η ιδανική θερμοκρασία αύξησης των στρεπτομυκήτων κυμαίνεται από 25 έως 35°C αν και υπάρχουν και μερικά ψυχρόφιλα ή θερμόφιλα είδη. Γενικά αυξάνονται σε pH 6.5 έως 8.0 (Κατσίφας, Ε.Α., 1999).

### Δευτερογενείς μεταβολίτες και αντιβιοτικά

Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό των στρεπτομυκήτων είναι η δυνατότητα παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών με αντιβακτηριακές, αντιμυκητιασικές, αντιαρκτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Επίσης παράγουν αντιπαρασιτικές, εντομοκτόνες και ζιζανιοκτόνες αλλά και ουσίες που χρησιμοποιούνται σαν θρεπτικά συμπληρώματα για την επαγωγή της αύξησης και την προστασία από διάφορες μολύνσεις διαφόρων ειδών πτηνών, χοίρων και άλλων ζώων (Pape, H., & Rehm, H. J., 1986).

Οι *Streptomyces griseus* και *Streptomyces coelicolor* χρησιμοποιούνται αντίστοιχα για τη βιομηχανική παραγωγή της στρεπτομυκίνης και για τη παραγωγή νέων αντιβιοτικών, όπως διυδρογραντικίνη. Η δοξορουβικίνη ως αντικαρκινικός παράγοντας (Mukhtar, H., Ijaz, S., & Ikram-ul-Haq., 2012) και η ραπαμυκίνη ως ανοσοτροποποιητικός παράγοντας είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται επίσης από στρεπτομυκήτες (Ying, Y., & Marta, M., 2001).

Η ανακάλυψη του πρώτου αντιβιοτικού (ακτινομυκίνη) που παράγεται από το στρεπτομυκήτα *Streptomyces antibioticus* ήταν η αφορμή για εκτεταμένα προγράμματα απομόνωσης και ταυτοποίησης στρεπτομυκήτων. Αποτέλεσμα της έρευνας αυτής είναι να υπάρχουν σήμερα περίπου 4,000 αντιβιοτικά προερχόμενα από στρεπτομυκήτες. Τα αντιβιοτικά είναι δευτερογενείς μεταβολίτες που παρουσιάζουν μία μεγάλη ποικιλία χημικών τύπων. Περιλαμβάνουν αμινογλυκοσίδες, ανσαμυσίνες, ανθρακυκλίνες, β-λακτάμες, μακρολίδια, νουκλεοσίδες, πεπτίδια, πολυένια, πολυαιθέρες, τετρακυκλίνες και άλλα αντιβιοτικά που δεν συμπεριλαμβάνονται σε αυτές τις καλά προσδιορισμένες ομάδες (Crandall, L. W., & Hamill, R. L., 1986; Pape, H., & Rehm, H. J., 1986). Στον Πίνακα Α.3 παρουσιάζεται μια επιλογή από διάφορα αντιβιοτικά που παράγονται από στρεπτομυκήτες. Αν και τις τελευταίες δύο δεκαετίες η έρευνα για καινούργια αντιβιοτικά έχει εστιασθεί σε άλλα είδη σπάνιων και μοναδικών ακτινομυκήτων (Nisbet, L. J., 1982) οι στρεπτομυκήτες εξακολουθούν να θεωρούνται πλούσια πηγή για την απομόνωση βιοενεργών ουσιών (Okami, Y., & Hotta, K., 1988).



**Πίνακας Α.3:** Αντιβιοτικά και άλλες συγγενείς ουσίες που παράγονται από είδη του γένους *Streptomyces* (Ōmura, S., & Tanaka, H., 1984; Crandall, L. W., & Hamill, R. L., 1986; Pape, H., & Rehm, H. J., 1986)

Δράση	Αντιβιοτικό	Δομική κατάταξη	Παραγωγός
Αντιβακτηριακά	Στρεπτομυκίνη	Αμινογλυκοσίδες	<i>S. griseus</i>
	Καναμυκίνη Α, Β	Αμινογλυκοσίδες	<i>S. hanamyceticus</i>
	Υγρομυκίνη Β	Αμινογλυκοσίδες	<i>S. hygrosopicus</i>
	Σεφαμυκίνη Α, Β	β-Λακτάμες	<i>S. chartreusis</i>
	Θειναμυκίνη	β-Λακτάμες	<i>S. cattleya</i>
	Κλαβουλανικό οξύ	β-Λακτάμες	<i>S. clavuligerus</i>
	Ολεαντομυκίνη	Μακρολίδια	<i>S. antibioticus</i>
	Λανκασιδίνη	Μακρολίδια	<i>S. violaceoniger</i>
	Προστιναμυκίνη	Πεπτολιπίδια	<i>S. pristinaespiralis</i>
	Οξυτετρακυκλίνη	Τετρακυκλίνες	<i>S. rimosus</i>
	Λινκομυκίνη	Απροσδιόριστη	<i>S. lincolnensis</i>
	Χλωροφαινικόλη	Απροσδιόριστη	<i>S. venezuelae</i>
Αντιμυκητιακά	2-Υδροξυμεθυλκαλβάμη	β-Λακτάμες	<i>S. clavuligerus</i>
	Νυστατίνη	Πολυένια (Τετραένια)	<i>S. noursei</i>
	Αμπροτερικίνη Β	Πολυένια (Επταένια)	<i>S. nodosus</i>
	Καντισίνη/Λεβορίν	Πολυένια (Επταένια)	<i>S. griseus</i>
Αντιοικά	Άρα-Α	Νουκλεοσίδια	<i>S. antibioticus</i>
	Τουνικαμυκίνη	Νουκλεοσίδια	<i>S. chartreusis</i>
Αντιογκικά	Νταουνουροβικίνη	Ανθρακυκλίνες	<i>S. peuceticus</i>
	Ντοξορουβικίνη	Ανθρακυκλίνες	<i>S. peuceticus</i> var. <i>caesius</i>
	Διτρισαρουβικίνες	Ανθρακυκλίνες	<i>S. cyaneus</i>
	Μιτομυκίνη C	Άλλες κινόνες	<i>S. caespitosus</i>
	Ακτινομυκίνη	Χρωμοπεπτίδια	<i>S. antibioticus</i>
	Σαρκομυκίνη	Απροσδιόριστη	<i>S. erythrochromogenes</i>
Αντιπαρασιτικά	Υγρομυκίνη Β	Αμινογλυκοσίδες	<i>S. hygrosopicus</i>
	Αβερμεκτίνες	Μακρολίδια	<i>S. avermitilis</i>
	Μιλβεμυκίνες	Μακρολίδια	<i>S. hygrosopicus</i> ssp. <i>aureolacrimosus</i>
	Μονενκίνη	Πολυαιθέρες	<i>S. cinnamomensis</i>
	Σαλινομυκίνες	Πολυαιθέρες	<i>S. albus</i>
Εντομοκτόνα	Αβερμεκτίνες	Μακρολίδια	<i>S. avermitilis</i>
	Μιλβεμυκίνες	Μακρολίδια	<i>S. hygrosopicus</i> ssp. <i>Aureolacrimosus</i>
Ζιζανιοκτόνα	Βιαλαφός	Απροσδιόριστη	<i>S. hygrosopicus</i>
	Φωσφινοθρικίνη	Απροσδιόριστη	<i>S. viridochromogenes</i>

Προκαταρκτική μελέτη από τους Te-Sheng Chang and Min Tseng (2006) για τυχόν λευκαντική δράση από είδη ακτινομυκήτων εδάφους του γένους *Streptomyces*, έδειξε ανάμεσα στα 10,000 είδη που εξετάστηκαν ένα μόνο πιθανό στέλεχος με αξιολογή αναστολή του ενζύμου της τυροσινάσης (46 U/ml). Αυτή η έρευνα είναι ή

πρώτη που αφορά τυχόν λευκαντική δράση των ακτινομύκητων και θέτει τις βάσεις για την ανακάλυψη νέων παρεμποδιστών τυροσινάσης από μικροοργανισμούς.

---

#### A.5.1 *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *angustmyceticus*

---

Ο *Streptomyces hygroscopicus* subsp. *angustmyceticus* αποτελεί υποείδος του *S. hygroscopicus*, το οποίο είναι ένα Gram-θετικό, αερόβιο, νηματοειδές βακτήριο και ανήκει στην ομάδα των ακτινομυκήτων. Είναι βακτήριο που έχει την ικανότητα να σχηματίζει βιοφίλμ. Οι βιομεμβράνες είναι κυρίως συσσωρεύσεις των βακτηρίων σε υδατικά περιβάλλοντα. Σχηματίζονται όταν τα βακτήρια εκκρίνουν βλενώδη υλικά που παρέχουν στους μικροοργανισμούς ένα μέσο σύνδεσης σε υγρές επιφάνειες. Οι μικροοργανισμοί που σχηματίζουν βιοφίλμ πραγματοποιούν μία ποικιλία από επιβλαβείς ή ωφέλιμες αντιδράσεις κάτω από ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες.

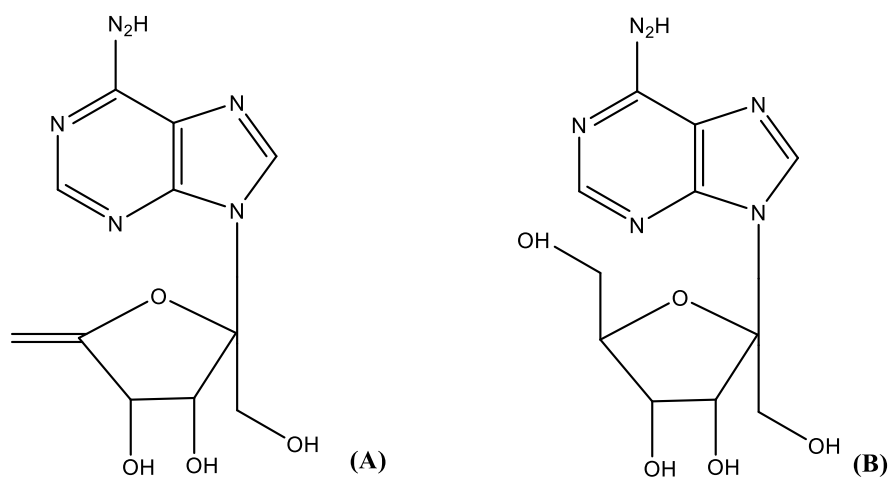


**Εικόνα A.32:** Αποικίες του ακτινομύκητα *Streptomyces hygroscopicus* πάνω σε πλάκα άγαρ μέσω μικροσκοπίου

Το στέλεχος *S. hygroscopicus* είναι υπεύθυνο για την παραγωγή μιας ομάδας αντιβιοτικών μη αρωματικών εστέρων που έχουν καρβονύλιο και περισσότερα από μία ομάδες μεθυλίου και αιθυλίου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αντιβιοτικού που απομονώνεται από το συγκεκριμένο οργανισμό είναι η μιλβεμυσίνη, που χρησιμοποιείται ως εντομοκτόνο και για τον έλεγχο ορισμένων παρασιτικών λοιμώξεων στα ζώα. Έχει μελετηθεί ότι οι συνθήκες καλλιέργειας επηρεάζουν την παραγωγή αντιβιοτικών, ενώ οι βέλτιστες συνθήκες έχουν βρεθεί να είναι η καλλιέργεια του σε συνθετικό μέσο, σε pH 7 και θερμοκρασία 30°C (Bhattacharyya, B. K., et al., 1998).

Το όνομα του υποείδους *S. hygroscopicus* subsp. *angustmyceticus* έχει δοθεί λόγω της ιδιότητας του να παράγει το αντιβιοτικό ανγκουστμυκίνη (angustmycin). Η ανγκουστμυκίνη A και C έχουν απομονωθεί από τον Yüntsen και τους συνεργάτες του, το 1956, οι οποίοι ανέφεραν ότι ήταν ένα νουκλεοτίδιο και το χαρακτήρισαν ως μη βιοδραστικό. Η ανγκουστμυκίνη A αρχικά αναγνωρίστηκε ως 6-αμίνω-9-(L-1,2-φουκοκυρανοσεενυλ)-πουρίνη και αναφέρθηκε να έχει αντιμικροβιακή δράση αποκλειστικά έναντι μυκοβακτηριδίων. Η δράση αυτή μειώνεται όταν ο μικροοργανισμός καλλιεργείται σε οργανικό καλλιεργητικό μέσο, γεγονός που οφείλεται στο γεγονός ότι παράγονται συγκεκριμένοι ανταγωνιστές αυτής της ένωσης στο οργανικό μέσο. Παράλληλα με την αντιμικροβιακή δράση, εξετάστηκε η δράση

έναντι πειραματικών μολύνσεων και όγκων σε πειραματόζωα. Τόσο ανγκουστμυκίνη Α όσο και η C παρουσίασαν σημαντική δράση έναντι μολύνσεων σταφυλόκοκκου και στρεπτόκοκκου σε ποντίκια. Η ανγκουστμυκίνη C ήταν αρκετά πιο δραστική από την Α. Τέλος, και οι δύο ενώσεις έδειξαν σημαντική δράση έναντι στη κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος 256 Walker στα ποντίκια και λιγότερη δράση έναντι του αδενοκαρκινώματος 755 (Guarino, A.J., 1967).



**Εικόνα Α.33:** Χημική δομή ανγκουστμυκίνης Α (Decoyinin, Decoyinine, Angostomycin) (A) και ανγκουστμυκίνης C (6-Amino-9-beta-D-psicofuranosylpurine, Psicofuranine) (B)

Τα λεία σπόρια του συγκεκριμένου υποείδους (0.8616 mm) δημιουργούνται και συστοιχίζονται σε σπείρες δύο έως τριών στροφών. Αποδομεί το tween 40 και το ουρικό οξύ. Δεν χρησιμοποιεί τη μεθανόλη ή την προπανόλη σαν μοναδική πηγή άνθρακα. Σαν πηγές αζώτου για ανάπτυξη και ενέργεια χρησιμοποιούνται οι α-αλανίνη, L-αλανίνη, L-αργινίνη, L-γλυκίνη, L-ιστιδίνη, L-ισολευκίνη, L-ορνιθίνη, L-σερίνη, L-θρεονίνη και L-βαλίνη (1% w/v). Το στέλεχος είναι ευαίσθητο στην υδροχλωρική δοξυκυκλίνη, στη θειική γενταμυκίνη, στη θειική καναμυκίνη, στη θειική νεομυκίνη, στη θειική στρεπτομυκίνη και στη θειική τομπραμυκίνη (σε συγκέντρωση 8mg/ml), και στην ερυθρομυκίνη, στην υδροχλωρική λινκομυκίνη, στη φωσφορική ολεαντομυκίνη και στη ριφαμυκίνη (σε συγκέντρωση 32 mg/ml). Το ποσοστό του περιεχόμενου αθροίσματος γουανίνης και κυτοσίνης του DNA είναι 70.2 mol% (Kumar, Y., & Goodfellow, M., 2010).



## **Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

---



## B.1 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

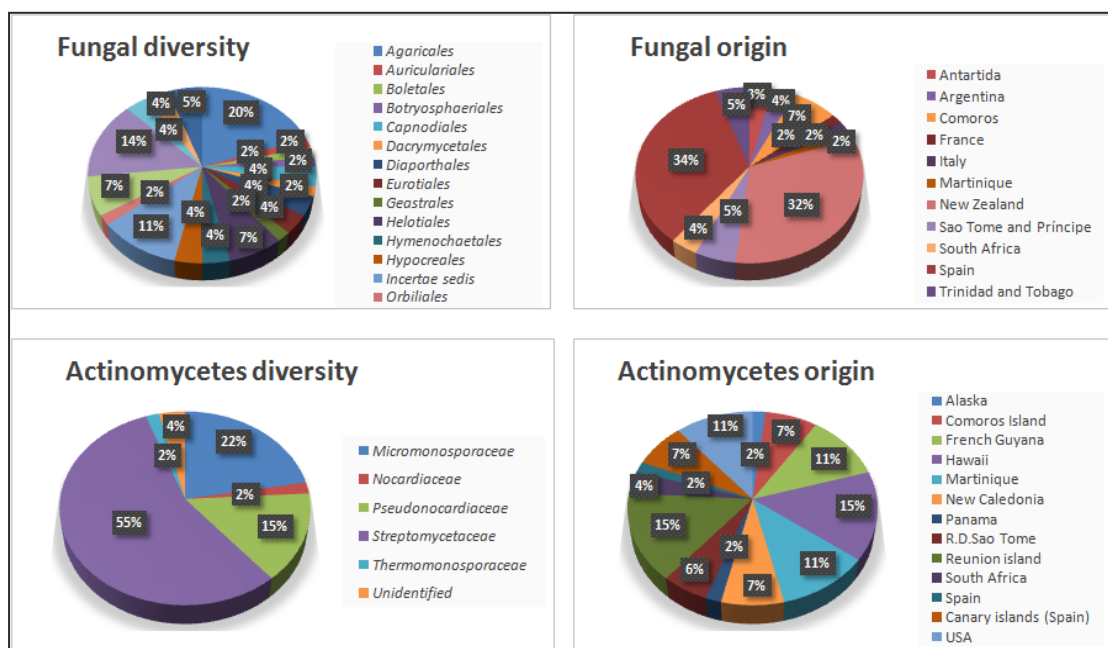
### B.1.1 ΔΙΑΛΟΓΗ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΠΡΟΣ ΜΕΛΕΤΗ

Για την επιλογή των μικροοργανισμών που επρόκειτο να μελετηθούν πραγματοποιήθηκε *in silico* διαλογή μέσω του λεξικού φυσικών προϊόντων «ANTIBASE» έναντι επιλεγμένων βιολογικών στόχων με καλλυντικό ενδιαφέρον. Χρησιμοποιήθηκε η συλλογή μικροοργανισμών (μύκητες και ακτινομύκητες) του ιδρύματος ερευνών Fundaci3n MEDINA της Ισπανίας (Εικόνα Β.1).



**Εικόνα Β.1:** Απεικόνιση της συλλογής μικροοργανισμών του ιδρύματος ερευνών Fundaci3n MEDINA της Ισπανίας

Τελικά επιλέχθηκαν 110 στελέχη, εκ των οποίων τα 54 ανήκαν σε μύκητες και τα 56 σε ακτινομύκητες, τα οποία προέρχονται από την παγκόσμια βιοποικιλότητα, όπως Ανταρκτική, Αλάσκα, Ισπανία, Χαβάη, Ν. Αφρική (Εικόνα Β.2).



**Εικόνα Β.2:** Ποικιλομορφία των επιλεγμένων στελεχών (54 μύκητες και 56 ακτινομύκητες)

Τα 110 επιλεγμένα στελέχη καλλιεργήθηκαν με μία ποικιλία θρεπτικών συστατικών, έτσι ώστε κάθε στέλεχος να παράγει τελικά δέκα διαφορετικά εκχυλίσματα, με αποτέλεσμα οι μικροοργανισμοί να μπορέσουν να παράγουν όλο το δυνατό φάσμα δευτερογενών μεταβολιτών (Πίνακες Β.1 και Β.2).

**Πίνακας Β.1:** Λίστα καλλιεργητικών μέσων μυκήτων

Καλλιεργητικό Μέσο Μυκήτων
AD5
MMK2
SUPERMALT
YES
SCY2
MSPM
LSFM
XPMK
Dex-Soy
SMK

**Πίνακας Β.2:** Λίστα καλλιεργητικών μέσων ακτινομυκήτων

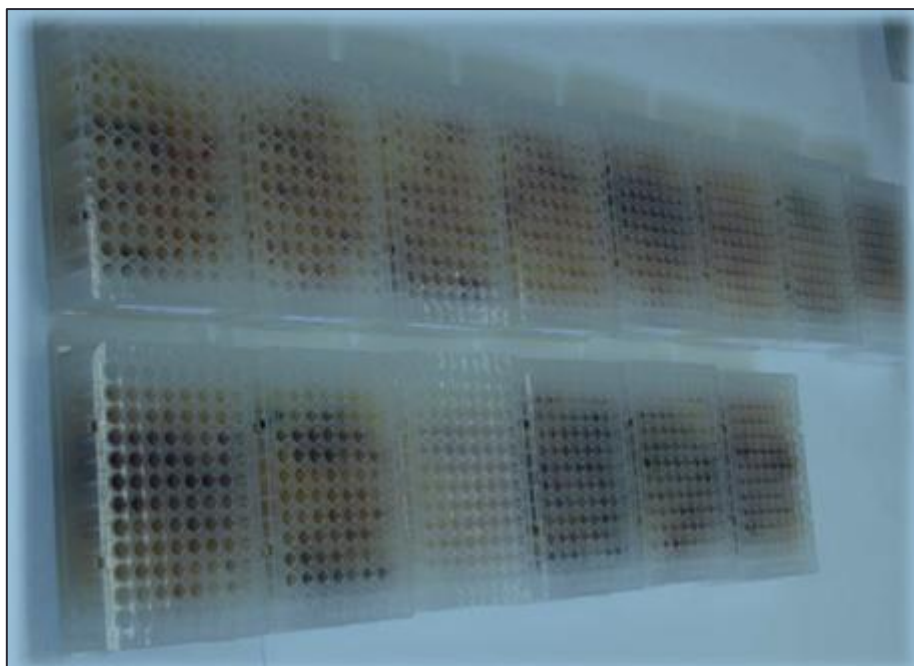
Καλλιεργητικό Μέσο Ακτινομυκήτων		
Κατάλληλο για όλους τους ακτινομύκητες	Κατάλληλο για είδη των γενών <i>Streptomyces</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Actinomadura</i>	Κατάλληλο για είδη του γένους <i>Micromonosporaceae</i>
DES-15	FPY-6	FPY-2
DEF-15S	FRA-2	S9702Xv2
FPY-12	FRM	RAM2P-V2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

Οι μικροοργανισμοί ενεγοποιήθηκαν από τις μητρικές καλλιέργειες όπου διατηρούνται σε stock στους -80°C στο ίδρυμα ερευνών Fundaci3n MEDINA και πραγματοποιήθηκε ο εμβολιασμός του κάθε στελέχους στο αντίστοιχο θρεπτικό μέσο (SMYA για τους μύκητες και ATCC2 για τα βακτήρια). Μετά από περίπου μία εβδομάδα, ο κάθε μικροοργανισμός εμβολιάστηκε στα θρεπτικά μέσα που αναφέρθηκαν παραπάνω. Για την καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν φιαλίδια EPA (όγκος καλλιέργειας=12 ml). Οι μύκητες ζυμώθηκαν στους 22°C, σε 70% υγρασία και στις 220 rpm. Σε αντίστοιχες συνθήκες ζυμώθηκαν και οι ακτινομύκητες, με τη



διαφορά ότι η θερμοκρασία ήταν στους 28°C. Οι μύκητες καλλιεργήθηκαν για 14 ή 21 μέρες και οι ακτινομύκητες για 7 ή 14 μέρες.

Συνολικά παρήχθησαν 1082 εκχυλίσματα (425 εκχυλίσματα μυκήτων και 614 εκχυλίσματα ακτινομυκήτων). Για τον εύκολο χειρισμό των δειγμάτων κατά το “high-throughput screening”, όλα τα εκχυλίσματα (3 ml, 20% DMSO) διανεμήθηκαν σε 96-τρυπες πλάκες (54μl εκχυλίσματος/ κελί). Η κάθε πλάκα περιείχε 80 εκχυλίσματα (6 πλάκες για τα εκχυλίσματα μυκήτων και 8 πλάκες για τα εκχυλίσματα ακτινομυκήτων).



**Εικόνα Β.3:** Διανομή εκχυλισμάτων σε 96-τρυπες πλάκες

Τα εκχυλίσματα των μυκήτων έφεραν τον κωδικό «CSF1-6» και τα εκχυλίσματα των ακτινομυκήτων έφεραν τον κωδικό «CSA1-8». Ανάμεσα στα εκχυλίσματα υπήρχαν και τα μέσα καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών. Λόγω του μεγάλου όγκου των δειγμάτων και για τον ευκολότερο χειρισμό των πειραμάτων κωδικοποιήθηκαν τα εκχυλίσματα των μικροοργανισμών κατά την διανομή τους στις πλάκες όπως φαίνεται στον Πίνακα Β.3.

**Πίνακας Β.3:** Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα του καταλόγου των εκχυλισμάτων, όπου C?=καλλιερρητικό μέσο (negative control), CA=στέλεχος ακτινομύκητα, CF=στέλεχος μύκητα

PL_NAME	PL_ROW	PL_COLUMN	NAME	PL_ORDER	FERM_MEDIA
PL-CSA-000001	A	2	C?-289675-M0001-EC01-a03	9	APM9
PL-CSA-000001	B	2	C?-289675-M0003-EC01-a03	10	DEF-15
PL-CSA-000001	C	2	C?-289675-M0005-EC01-a03	11	DEF-15S
PL-CSA-000001	D	2	C?-289675-M0007-EC01-a03	12	DNPM
PL-CSA-000001	E	2	C?-289675-M0009-EC01-a03	13	FPY-12
PL-CSA-000001	F	2	C?-289675-M0011-EC01-a03	14	FPY-6
PL-CSA-000001	E	3	CA-078901-a01-M0011-EC01-a03	21	APM9
PL-CSA-000001	F	3	CA-078901-a01-M0012-EC01-a03	22	DEF-15
PL-CSA-000001	G	3	CA-078901-a01-M0013-EC01-a03	23	DEF-15S
PL-CSA-000001	H	3	CA-078901-a01-M0014-EC01-a03	24	DNPM
PL-CSA-000001	A	4	CA-078901-a01-M0015-EC01-a03	25	FPY-12
PL-CSA-000001	B	4	CA-078901-a01-M0016-EC01-a03	26	FPY-6

PL-CSA-000001	C	4	CA-078901-a01-M0017-EC01-a03	27	FR23
PL-CSF-000001	A	2	CF-081003-a02-M0001-EC01-a01	9	AD5
PL-CSF-000001	B	2	CF-081003-a02-M0002-EC01-a01	10	Dex-Soy
PL-CSF-000001	C	2	CF-081003-a02-M0003-EC01-a01	11	LSFM
PL-CSF-000001	D	2	CF-081003-a02-M0004-EC01-a01	12	MMK2
PL-CSF-000001	C	4	CF-084449-a02-M0009-EC01-a01	27	XPMK
PL-CSF-000001	D	4	CF-084449-a02-M0010-EC01-a01	28	YES
PL-CSF-000001	E	4	CF-086911-a02-M0001-EC01-a01	29	AD5
PL-CSF-000001	F	4	CF-086911-a02-M0002-EC01-a01	30	Dex-Soy
PL-CSF-000001	G	4	CF-086911-a02-M0003-EC01-a01	31	LSFM
PL-CSF-000001	H	4	CF-086911-a02-M0004-EC01-a01	32	MMK2

### B.1.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΜΥΚΗΤΑ *Cercospora sp.*

Το στέλεχος CF-223709 του μύκητα *Cercospora sp.* απομονώθηκε από ένα δείγμα εδάφους από το τροπικό δάσος στο Sao Tome και Principe.

Για την παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας και επαρκή για τις περαιτέρω αναλύσεις και διαχωρισμούς βιομάζα, το συγκεκριμένο στέλεχος καλλιεργήθηκε με το βέλτιστο μέσο καλλιέργειας (SCY-2) σε κλίμακα ζύμωσης του 1 L.

**Πίνακας B.4:** Συστατικά του μέσου καλλιέργειας SCY-2

Πηγή άνθρακα (C)	Πηγή αζώτου (N)	Ιχνοστοιχεία
Σουκρόζη/ Καλαμποκάλευρο/ Μαλτόζη	Εκχύλισμα μαγιάς	Θείο (S)

Η καλλιέργεια του μικροοργανισμού πραγματοποιήθηκε στους 20°C, με 70% υγρασία, η ανάδευση ήταν ρυθμισμένη στα 220 rpm και ολοκληρώθηκε μετά από 14 μέρες.



**Εικόνα B.4:** Το στέλεχος CF-223709 μετά την ολοκλήρωση της καλλιέργειας του

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

### B.1.3 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΒΙΟΜΑΖΑΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΑΚΤΙΝΟΜΥΚΗΤΑ *Streptomyces hygrosopicus subsp. angustmyceticus*

Το στέλεχος CA-129531 του ακτινομύκητα *Streptomyces hygrosopicus subsp. angustmyceticus* απομονώθηκε από ένα δείγμα εδάφους από το τροπικό δάσος στο νησί της Martinique.

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

**Πίνακας B.5:** Συστατικά του μέσου καλλιέργειας DNPM

Πηγή άνθρακα (C)	Πηγή αζώτου (N)
Δεξτρίνη	Εκχύλισμα μαγιάς/ N-Z σόγιας

Η καλλιέργεια του μικροοργανισμού πραγματοποιήθηκε στους 28°C, με 70% υγρασία, η ανάδευση ήταν ρυθμισμένη στα 220 rpm και ολοκληρώθηκε μετά από 14 μέρες.



**Εικόνα B.5:** Το στέλεχος CA-129531 μετά την ολοκλήρωση της καλλιέργειας του

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

Με αντίστοιχο τρόπο καλλιεργήθηκαν σε κλίμακα ζύμωσης του 1 L και οι υπόλοιποι 10 επιλεγθέντες για τη βιολογική τους δράση μικροοργανισμοί, στο κατάλληλο καλλιεργητικό μέσο. Αναλυτικότερα οι μικροοργανισμοί που επιλέχθηκαν, μαζί με το

καλλιεργητικό μέσο που χρησιμοποιήθηκε για τον καθένα παρουσιάζονται στον Πίνακα Β.6.

**Πίνακας Β.6:** Στοιχεία μικροοργανισμών που καλλιεργήθηκαν στο 1 L

Στέλεχος	Κωδικός	Καλλιεργητικό μέσο
<i>Streptomyces purpurascens</i>	CA-129247	FPY-6
<i>S. spinoverrucosus</i>	CA-218259	FPY-6
<i>S. chartreusis</i>	CA-126581	DNPM
<i>S. tendae</i>	CA-131129	DNPM
<i>S. glaucusporus</i>	CA-214639	APM9
<i>Micromonospora humi</i>	CA-129255	DEF-15S
<i>Amycolatopsis kentuckyensis</i>	CA-126574	DNPM
<i>Rhizopycnis vagum</i>	CF-223716	AD5
<i>Ascochytulina sp.</i>	CF-116223	SMK
<i>Bjerkandera adusta</i>	CF-092983	Dex-Soy

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

#### B.1.4 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ (USAE)

##### Αρχή μεθόδου

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπέρηχους (Ultrasound-assisted extraction, USAE), είναι μία ενδιαφέρουσα τεχνική παραλαβής υψηλής αξίας ενώσεων. Τα κύρια πλεονεκτήματά της είναι η αποτελεσματικότητα, η απλότητα στη χρήση, η εξοικονόμηση ενέργειας, το χαμηλό κόστος του εξοπλισμού και η χρήση μέτριων θερμοκρασιών, γεγονός που τη καθιστά ιδανική για θερμικά ασταθείς ενώσεις. Με την χρήση των υπερήχων μειώνεται ο χρόνος εκχύλισης, χρησιμοποιούνται μικρότεροι όγκοι διαλυτών και υπάρχει η δυνατότητα να εκχυλίζονται ταυτόχρονα πολλά δείγματα. Για την επιτυχή εφαρμογή αυτού του είδους εκχύλισης, είναι απαραίτητος ο έλεγχος διαφόρων παραμέτρων, όπως η εφαρμοζόμενη συχνότητα υπερήχων, η θερμοκρασία και το σύστημα διαλυτών. Το υψηλότερο ποσοστό εκχύλισης επιτυγχάνεται συνήθως στα πρώτα λεπτά (Esclapez, M. D., et al., 2011; Carrera, C., et al., 2012).

Στην εκχύλιση με υπέρηχους, το δείγμα τοποθετείται με κατάλληλο διαλύτη σε λουτρό υπερήχων. Η διάδοση των υπερήχων χαρακτηρίζεται από ελάχιστη συχνότητα 20 kHz και προκαλεί κίνηση του υγρού λόγω συμπίεσης και αραιώσης. Με την αύξηση της πίεσης επιτυγχάνονται φαινόμενα διείσδυσης και μεταφοράς, ενώ με την

αύξηση της θερμοκρασίας επιταχύνονται φαινόμενα διάχυσης και διαλυτοποίησης. Αυτά έχουν ως αποτέλεσμα την διευκόλυνση της εξόδου των συστατικών από το στερεό δείγμα και την είσοδο αυτών στο σύστημα διαλυτών της εκχύλισης, που επιλέγεται ανάλογα με τη φύση των προς εκχύλιση ουσιών (Carrera, C., et al., 2012).

### Πειραματική πορεία

Τοποθετήθηκε 1 g δείγματος με 50 mL διαλύτη σε λουτρό υπερήχων για 30 min. Στη συνέχεια έγινε φυγοκέντρηση του μίγματος (3000 rpm, 10 min). Μετά το πέρας της εκχύλισης ακολούθησε διήθηση υπό κενό, με διηθητικό χαρτί, σε χωνί Büchner. Επαναλήφθηκε η διαδικασία ώστε τελικά να έχουν γίνει δύο κύκλοι εκχύλισης. Το εκχύλισμα συμπυκνώθηκε σε Rotavapor Buchi R-210 και φυλάχθηκε σε σκουρόχρωμο περιέκτη στους 4 °C.

Πραγματοποιήθηκαν διάφορες δοκιμές για τους διαλύτες παραλαβής των εκχυλισμάτων με στόχο την τελική επιλογή του πρωτοκόλλου εκχύλισης που συμβάλλει στην αύξηση της δράσης για την οποία επιλέχθηκε το εκάστοτε στέλεχος:

- **Πρωτόκολλο Εκχύλισης 1:** Διαδοχική εκχύλιση με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας: δύο κύκλοι εκχύλισης με n-Hex, ακολούθως δύο κύκλοι εκχύλισης με EtOAc και τέλος δύο κύκλοι εκχύλισης με μίγμα EtOH/H<sub>2</sub>O: 50/50
- **Πρωτόκολλο Εκχύλισης 2:** Διαδοχική εκχύλιση με διαλύτες αυξανόμενης πολικότητας: δύο κύκλοι εκχύλισης με n-Hex, ακολούθως δύο κύκλοι εκχύλισης με EtOAc και τέλος δύο κύκλοι εκχύλισης με MeOH ή EtOH
- **Πρωτόκολλο Εκχύλισης 3:** Εκχύλιση με EtOH
- **Πρωτόκολλο Εκχύλισης 4:** Εκχύλιση με μίγμα EtOH/H<sub>2</sub>O: 50/50 και χρήση ρητίνης προσρόφησης XAD-4 για απομάκρυνση των πιο πολικών ουσιών (Παράγραφος B.1.5).
- **Πρωτόκολλο Εκχύλισης 5:** Υγρή-υγρή εκχύλιση με EtOAc/H<sub>2</sub>O: 1/1 του MeOH εκχυλίσματος που προήλθε από το Πρωτόκολλο Εκχύλισης 2 (Παράγραφος B.1.6).

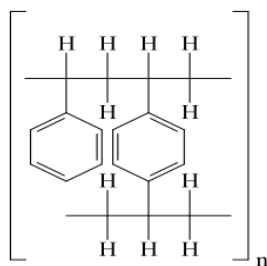
---

## B.1.5 ΧΡΗΣΗ ΡΗΤΙΝΗΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ

---

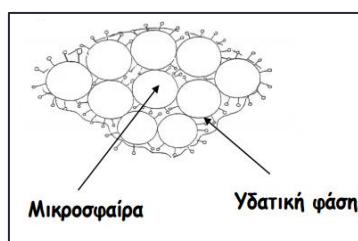
### Αρχή μεθόδου

Η μη πολική ρητίνη XAD-4 είναι μία ιονική ρητίνη, υψιμοριακή, πολυμερής οργανική ένωση (συμπολυμερισμού στυρολίου και διβινυλο-βενζολίου), αδιάλυτη στο νερό και τους συνήθεις οργανικούς διαλύτες.



**Εικόνα Β.6:** Χημική δομή ρητίνης XAD-4

Είναι μία υδρόφοβη επιφάνεια με πλεγματοειδή δομή η οποία περιλαμβάνει μία συνεχή πολυμερή φάση αρωματικής ή ακρυλικής φύσης. Κατά τη διέλευση υδατικού διαλύματος γίνεται κατακράτηση των φαινολικών συστατικών και η παραλαβή τους επιτυγχάνεται με έκλυση, με σύστημα διαλυτών.



**Εικόνα Β.7:** Μηχανισμός προσρόφησης στην ρητίνη XAD-4: φαινόμενο προσρόφησης ενός τυπικού μορίου (---ο) σε ένα μεγενθυμένο τμήμα του κόκκου όπου το μόριο περιέχει ένα υδρόφοβο (---) και ένα υδρόφιλο τμήμα (ο).

Οι σημαντικότερες εφαρμογές είναι:

- Απομάκρυνση υδατοδιαλυτών οργανικών ουσιών από υδατικά συστήματα
- Διαχωρισμός ιοντικών και μη υδατοδιαλυτών μιγμάτων από τα συστατικά τους
- Καθαρισμός υδατοδιαλυτών οργανικών υλικών μέσω της προσροφήσεως τους, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό τους από ανόργανα άλατα.

#### Πειραματική πορεία

26 ml συμπυκνωμένου εκχυλίσματος EtOH/H<sub>2</sub>O: 50/50, αναμιγνύονται με 13 ml ρητίνης προσρόφησης XAD-4 σε νερό. Το διάλυμα μένει υπό μαγνητική ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου για 12-16 ώρες. Κατόπιν η ρητίνη εκπλένεται με όγκο νερού 10 ml και το υδατικό διάλυμα συλλέγεται, συμπυκνώνεται και ξηραίνεται μέχρι στερεού υπολείμματος. Για την παραλαβή των δραστικών συστατικών, εκπλένουμε τη ρητίνη με 26 ml αιθανόλης (EtOH) 96%. Με τον τρόπο αυτό παραλαμβάνεται στο τέλος αιθανολικό διάλυμα, το οποίο συμπυκνώνεται και ξηραίνεται μέχρι στερεού υπολείμματος.

### Αρχή μεθόδου

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

### Πειραματική πορεία

Πραγματοποιήθηκε L.L.E. χρησιμοποιώντας το σύστημα διαλυτών: EtOAc/H<sub>2</sub>O: 1/1 (Πρωτόκολλο 5). Το μεθανολικό εκχύλισμα του δείγματος, το οποίο προήλθε από διαδοχική εκχύλιση βάσει του 2<sup>ου</sup> πρωτόκολλου εκχύλισης, διαλύθηκε σε 500 ml H<sub>2</sub>O. Η χρήση υπερήχων διευκολύνει και επιταχύνει τη διάλυση. Ακολουθεί μεταφορά του υδατικού μίγματος σε διαχωριστική χοάνη των 2 L και ανάμιξη του με 500 ml EtOAc. Πραγματοποιείται καλή ανακίνηση του μίγματος, έτσι ώστε να έλθουν σε στενή επαφή και να αποκατασταθεί ισορροπία των διαλυμένων ουσιών στις δύο φάσεις, οπότε και διαχωρίζονται. Η οργανική στιβάδα (EtOAc) συλλέγεται και προστίθεται στη διαχωριστική χοάνη που περιέχει το υδατικό μίγμα νέα ποσότητα EtOAc. Επαναλήφθηκε η διαδικασία ώστε τελικά να έχουν γίνει τρεις κύκλοι εκχύλισης. Η απόδοση της εκχύλισης σε ποσότητα βιομάζας 30.25 g ήταν 1.44% όταν πραγματοποιήθηκε εκχύλιση σε μεγάλη κλίμακα.

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

**Πίνακας Β.7:** Αποδόσεις εκχυλισμάτων των επιλεγθέντων στελεχών

Στέλεχος	Κωδικός	Καλλιεργητικό Μέσο	Αποδόση Εκχύλισης								
			Πρωτόκολλο 1			Πρωτόκολλο 2		Πρωτόκολλο 3	Πρωτόκολλο 4	Πρωτόκολλο 5	
			n-Hex	EtOAc	EtOH/H <sub>2</sub> O (50/50)	EtOH	MeOH	EtOH	Xad-4	EtOAc_LL	
Ακτινομύκητες	<i>Streptomyces purpurascens</i>	CA-129247	FPY-6	11.32%	14.84%	79.10%	-	-	-	44.14%	-
	<i>S. spinoverrucosus</i>	CA-218259	FPY-6	9.86%	5.48%	80.20%	-	-	27.94%	16.60%	-
	<i>S. chartreusis</i>	CA-126581	DNPM	1.84%	11.48%	68.82%	-	-	-	11.44%	-
	<i>S. tendae</i>	CA-131129	DNPM	9.93%	6.85%	69.28%	-	-	-	9.89%	-
	<i>S. hygrosopicus angustmyceticus</i>	CA-129531	DNPM	1.06%	7.63%	73.70%	77.00%	67.27%	-	12.83%	1.54%
	<i>S. glaucusporus</i>	CA-214639	APM9	10.28%	17.86%	70%	-	-	-	8.85%	-
	<i>Amycolatopsis kentuckyensis</i>	CA-126574	DNPM	10.51%	9.47%	59.53%	-	-	22.02%	7.30%	-
	<i>Micromonospora humi</i>	CA-129255	DEF-15S	9.78%	10.21%	53.47%	-	-	20.71%	7.37%	-
Μύκητες	<i>Cercospora sp.</i>	CF-223709	SCY-2	2.11%	6.06%	65.92%	-	-	-	10.26%	-
	<i>Rhizopycnis vagum</i>	CF-223716	AD5	15.14%	7.14%	81.70%	-	-	14.43%	7.45%	-
	<i>Bjerkandera adusta</i>	CF-092983	Dex-Soy	15.62%	15.70%	64.57%	-	-	17.39%	9.31%	-
	<i>Ascochytulina sp</i>	CF-116223	SMK	16.22%	18.95%	44.72%	-	-	17.03%	7.32%	-



## B.2 ΒΙΟΔΟΚΙΜΕΣ

---

Για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν οι μέθοδοι DPPH και ABTS, ενώ για την αξιολόγηση της λευκαντικής δράσης πραγματοποιήθηκε η βιοδοκιμή αναστολής της τυροσινάσης, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την L-DOPA.

Το επιστημονικό ίδρυμα Fundación MEDINA της Ισπανίας εκπόνησε τη μελέτη της κυτταροτοξικότητας των δειγμάτων, η οποία μελετήθηκε στις κυτταρικές σειρές A2058 (κύτταρα ανθρώπινου μελανώματος) και HepG2 (ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα καρκινώματος) με τη μέθοδο MTT.

Η εταιρία Proteos Biotech της Ισπανίας εκπόνησε τη μελέτη της δερματοπροστατευτικής δράσης. Για το σκοπό αυτό όλα τα δείγματα αξιολογήθηκαν για την ικανότητα τους να αναστέλλουν ένζυμα που εμπλέκονται στη γήρανση του δέρματος: κολλαγενάση, ελαστάση και πρωτεάση.

Οι βιοδοκιμές εφαρμόστηκαν στις τρεις φάσεις της παρούσας εργασίας:

1. Κατά το “high throughput screening”
2. Κατά την βιοκατευθυνόμενη βελτιστοποίηση εκχύλισης
3. Κατά την βιοκατευθυνόμενη απομόνωση δευτερογενών μεταβολιτών των πιο δραστικών εκχυλισμάτων

Όλες οι βιοδοκιμές επαναλήφθηκαν δύο φορές, πραγματοποιώντας δύο διαφορετικά πειράματα. Έγινε τρίτη επανάληψη των βιολογικών πειραμάτων για τα δείγματα εκείνα τα οποία επιλέχθηκαν ως δραστικά και για εκείνα που η απόκλιση μεταξύ των τιμών παρεμπόδισης ήταν μεγάλη ( $STDEV \geq 4$ ).

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

---

### B.2.1 ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

---

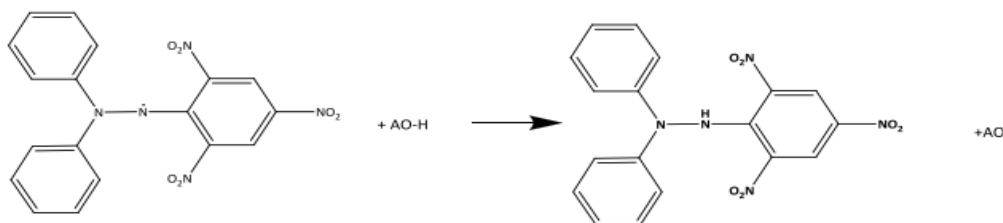
#### ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ ΔΙΦΑΙΝΥΛΟΠΙΚΡΥΛΥΔΡΑΖΥΛΙΟΥ-DPPH•

---

##### Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αυτή είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης των φυσικών προϊόντων. Ένας από τους λόγους είναι ότι η συγκεκριμένη μέθοδος είναι απλή και έχει μεγάλη ευαισθησία. Το DPPH• (2,2 – διφαινυλο-1-πικρυλυδραζίλιο) είναι μια σταθερή ρίζα, το οργανικό διάλυμα της οποίας παρουσιάζει έντονο ιώδες (μωβ) χρώμα. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών συστατικών των εκχυλισμάτων να δεσμεύουν αυτή τη ρίζα

οδηγώντας στον αποχρωματισμό του διαλύματος από έντονο ιώδες σε υποκίτρινο. Η ελάττωση της απορρόφησης παρακολουθείται στα 517 nm, όπου παρατηρείται το μέγιστο του φάσματος του μορίου της ρίζας (Brand-Williams, W., et al., 1995). Η μεταβολή της έντασης της απορρόφησης αντικατοπτρίζει τη μείωση της ποσότητας της ελεύθερης ρίζας.



**Εικόνα Β.8:** Μηχανισμός δράσης DPPH•

### Πειραματική πορεία

Για τη παρασκευή του διαλύματος DPPH• χρησιμοποιήθηκε ρίζα διφαινυλοπικρυλδραζύλιου (Sigma-Aldrich). Το διάλυμα DPPH• (314.47 μM) παρασκευάζεται καθημερινά διαλύοντας την κατάλληλη ποσότητα σε αιθανόλη (καθαρότητας HPLC). Το διάλυμα αναδεύεται και τοποθετείται σε υδατόλουτρο υπερήχων μέχρι πλήρους διάλυσης. Η απορρόφηση του διαλύματος είναι  $1.780 \pm 0.025$ . Φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο περιέκτη σε θερμοκρασία δωματίου.

Στα πηγάδια 96-τρυπης πλάκας τοποθετήθηκαν 10 μL δείγματος σε 190 μL διαλύματος DPPH. Για το τυφλό (ή αλλιώς “control”) αντί 10μL δείγματος χρησιμοποιήθηκε ο διαλύτης των δειγμάτων (στη συγκεκριμένη περίπτωση DMSO), ενώ για το μηδενισμό του οργάνου (“blank”) για το τυφλό και τα υπόλοιπα δείγματα χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη αντί του αντιδραστηρίου. Μετά από περίοδο επώασης 30 λεπτών σε σκοτεινό περιβάλλον και θερμοκρασία δωματίου, μετρήθηκε η απορρόφηση στα 517 nm και προσδιορίστηκε το ποσοστό παρεμπόδισης (I%) βάσει του παρακάτω τύπου:

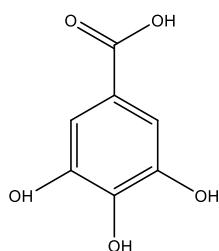
$$I\% = \left[ \frac{A_0 - A}{A_0} \right] * 100 \quad (\text{Εξίσωση Β.1})$$

όπου **I%**: η ποσοστιαία παρεμπόδιση της ελεύθερης ρίζας

**A<sub>0</sub>**: η απορρόφηση του τυφλού

**A**: η απορρόφηση του δείγματος

Κατά τη πρώτη φάση της μελέτης, “high-throughput screening”, τα εκχυλίσματα των στελεχών που είχαν τοποθετηθεί στις 96-τρυπες πλάκες μελετήθηκαν σε αραιώση 1:100 (σε DMSO), εις διπλούν. Στα επόμενα δύο στάδια τα δείγματα μελετήθηκαν σε συγκέντρωση 200 μg/ml, εις τριπλούν. Σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκε σαν πρότυπος αναστολέας το γαλλικό οξύ (IC<sub>50</sub>=5 μg/ml) (Koleva, I. I., et al., 2002).



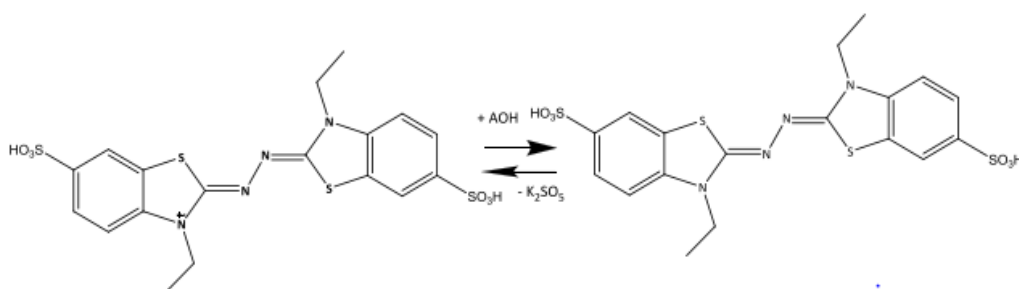
**Εικόνα B.9:** Δομή γαλλικού οξέος

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

#### ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΟΥ 2,2'-ΑΖΙΝΟΔΙ-(3-ΑΙΘΥΛΒΕΝΖΟΔΙΑΖΟΛΙΝΟ-6-ΣΟΥΛΦΟΝΙΚΟ ΟΞΕΟΣ)-ABTS

##### Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος ABTS αναπτύχθηκε αρχικά από τους Miler και Rice-Evans το 1993 και αργότερα εξελίχθηκε από τους Re, R., et al., (1999). Το οξειδωτικό ριζικό κατιόν  $ABTS^{\bullet+}$  παράγεται από την οξείδωση του 2,2'-αζινοδι(3-αιθυλβενζοδιαζολινο-6-σουλφονικό οξύ) ( $ABTS^{2-}$ ) με υπερθειικά ιόντα. Η ρίζα του κατιόντος  $ABTS^{\bullet+}$ , που έχει βαθύ κυανό χρώμα, αποχρωματίζεται παρουσία των αντιοξειδωτικών ουσιών σύμφωνα με τον μηχανισμό δράσης της Εικόνας B.10. Η μείωση του χρώματος του διαλύματος του  $ABTS^{\bullet+}$  από αντιοξειδωτικούς παράγοντες-δότες υδρογόνου, υπολογίζεται από τη μείωση της απορρόφησης στα 734 nm (Re, R., et al., 1999).



**Εικόνα B.10:** Μηχανισμός δράσης  $ABTS^{\bullet+}$

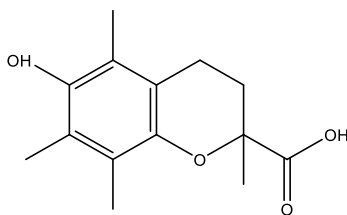
##### Πειραματική πορεία

Διάλυμα αμμωνιακού άλατος ABTS 7 mM παρασκευάζεται διαλύοντας 76.77 mg σε 19.98 mL νερό καθαρότητας HPLC. Το κατιόν  $ABTS^{\bullet+}$  παρασκευάζεται από την αντίδραση 7 mM αμμωνιακού άλατος ABTS με 140 mM υπερθειικό κάλιο  $K_2S_2O_8$  (37,84 mg  $K_2S_2O_8$  σε 1 mL νερό καθαρότητας HPLC). Η οξείδωση του ABTS αρχίζει αμέσως και η απορρόφηση παραμένει σταθερή μετά από 12-16 ώρες, όπου γίνεται η

επώασή του σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό περιβάλλον. Μετά το τέλος της επώασης του διαλύματος της ρίζας, αυτό αραιώνεται με αιθανόλη έτσι ώστε η απορρόφηση να είναι  $0.700 \pm 0.02$  στα 734 nm.

Στα πηγάδια της 96-τρυπης πλάκας τοποθετήθηκαν 50  $\mu\text{L}$  δείγματος σε 100  $\mu\text{L}$  αιθανολικού διαλύματος ABTS. Για το τυφλό αντί 50  $\mu\text{L}$  δείγματος χρησιμοποιήθηκε ο διαλύτης των δειγμάτων (στη συγκεκριμένη περίπτωση DMSO), ενώ για το μηδενισμό του οργάνου για το τυφλό και τα υπόλοιπα δείγματα χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη αντί του αντιδραστηρίου. Η πλάκα επώαστηκε στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου, για 10 λεπτά και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 734 nm. Το ποσοστό παρεμπόδισης της ρίζας (I%) υπολογίστηκε σύμφωνα με την Εξίσωση 1.

Κατά το στάδιο του “high-throughput screening” τα εκχυλίσματα των στελεχών που είχαν τοποθετηθεί στις 96-τρυπες πλάκες μελετήθηκαν σε αραιώση 1:102 (σε DMSO), εις διπλούν. Στα επόμενα δύο στάδια της μελέτης, τα δείγματα μελετήθηκαν σε συγκέντρωση 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , εις τριπλούν. Σαν πρότυπος αναστολέας, σε κάθε στάδιο, χρησιμοποιήθηκε το 6-υδροξυ-2,5,7,8-τετραμεθυλχρωμαν-2-καρβοξυλικό οξύ ή αλλιώς Trolox ( $\text{IC}_{50}=30 \mu\text{g}/\text{ml}$ ).



**Εικόνα B.11:** Δομή Trolox.

---

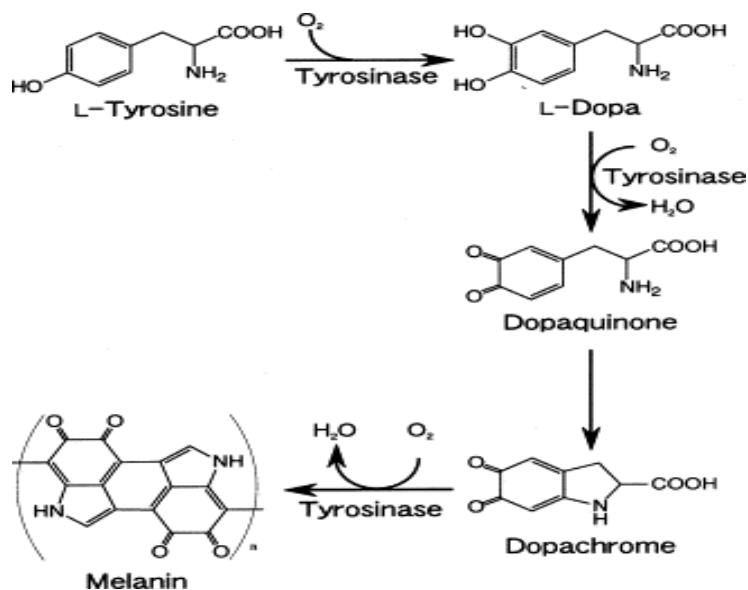
## B.2.2 ΜΕΛΕΤΗ ΛΕΥΚΑΝΤΙΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ

---

### Αρχή μεθόδου

Δεδομένου ότι η συσσώρευση εκτεταμένης επιδερμικής μελάγχρωσης οδηγεί σε ποικίλες δερματολογικές διαταραχές, όπως το μελάνωμα που συνδέεται με την ηλικία, τις φακίδες και τις κηλίδες ηλικίας, οι αναστολείς της τυροσινάσης χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο σε φαρμακευτικές και καλλυντικές αγωγές για την πρόληψη της υπερμελάγχρωσης, μέσω της αναστολής της ενζυματικής οξείδωσης (Briganti, S., et al. 2003, Parvez, S., et al. 2007).

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



Εικόνα Β.12: Μηχανισμός δράσης της τυροσινάσης

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

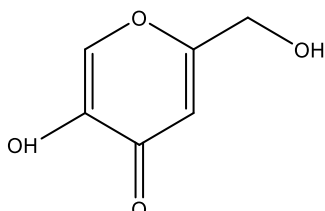
Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η ικανότητα των δειγμάτων να παρεμποδίσουν την οξείδωση της L-DOPA σε ντοπακουνίνη και ακολούθως σε ντοπαχρώμη από τυροσινάση μανιταριού.

Παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- Ρυθμιστικό Διάλυμα (Potassium Buffer, PB) : 49.4 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 82.6 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 1 L H<sub>2</sub>O καθαρότητας HPLC. Μαγνητική ανάδευση για μισή ώρα και επιβεβαίωση pH=6.7±0.02. Διατήρηση στους 4°C.
- L-DOPA : 5 mg σε 10 mL PB. Το διάλυμα αναδεύτηκε με τη βοήθεια vortex για 5 λεπτά και τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο υπερήχων για 15 λεπτά. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 2,900 rpm, για 10 λεπτά και μεταφορά του υπερκείμενου σε falcon. Το υπόστρωμα διατηρήθηκε σε σκοτεινό περιβάλλον και σε θερμοκρασία δωματίου.
- 92 U/mL τυροσινάση (από μανιτάρι, 25,000 units, Sigma- Aldrich, διατήρηση στους -20°C) διαλυμένη σε PB.

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

Κατά το στάδιο του “high-throughput screening” τα εκχυλίσματα των στελεχών που είχαν τοποθετηθεί στις 96-τρυπες πλάκες μελετήθηκαν σε αραιώση 1:100 (σε ρυθμιστικό διάλυμα), εις διπλούν. Στα επόμενα στάδια τα δείγματα μελετήθηκαν σε συγκέντρωση 300  $\mu\text{g/ml}$  (η αραιώση των δειγμάτων έγινε με το ρυθμιστικό διάλυμα) εις τριπλούν, ενώ σε κάθε περίπτωση σαν πρότυπος αναστολέας χρησιμοποιήθηκε το κοζικό οξύ ( $\text{IC}_{50}=2 \mu\text{g/ml}$ ) και το μεθανολικό εκχύλισμα ριζών γλυκόριζας ( $\text{IC}_{50}=5 \mu\text{g/ml}$ ).



**Εικόνα B.13:** Δομή κοζικού οξέος

Οι απορροφήσεις μετρήθηκαν σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-Vis μοντέλο Infinite® M200 Pro της εταιρείας TECAN και χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Magellan™.



**Εικόνα B.14:** Φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού UV-Vis μοντέλο Infinite® M200 Pro της εταιρείας TECAN

### B.3 ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ TLC)

---

#### Αρχη μεθόδου

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) είναι μία χρωματογραφική τεχνική που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος, χρησιμοποιώντας ως στατική φάση μία λεπτή στιβάδα που υποστηρίζεται από ένα αδρανές υπόστρωμα (αλουμίνιο, γυαλί ή πλαστικό) και ως κινητή φάση ένα σύστημα οργανικών διαλυτών.

#### Πειραματική πορεία

Για τον ποιοτικό έλεγχο του περιεχομένου των παρασκευασθέντων ολικών εκχυλισμάτων και των κλασμάτων που προέκυψαν από τη χρωματογραφική ανάλυσή τους, καθώς και για την απομόνωση και ταυτοποίηση των μεταβολιτών χρησιμοποιήθηκαν πλάκες αλουμινίου γέλης οξειδίου πυριτίου (silica gel 60 F-254 Merck) με δείκτη φθορισμού σε φύλλα αλουμινίου 20 x 20 cm, πάχους στιβάδας 0.1 mm (αναλυτική TLC κανονικής φάσεως)

Χρησιμοποιήθηκαν ποικίλα συστήματα ανάπτυξης:

- οργανική φάση του διφασικού συστήματος  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ : 13/9/3.
- $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ : 9/1
- $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ : 8/2
- $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ : 98/2

Η παρατήρηση των χρωματογραφημάτων έγινε σε λάμπα υπεριώδους-ορατού (UV-Vis, CAMAG TLC Visualizer, Εικόνα B.10) σε μήκη κύματος 254 nm και 366 nm. Τέλος ψεκάζονταν με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης (αντιδραστήριο εμφάνισης), θερμαίνονταν και παρατηρούνταν στο ορατό. Για το μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης παρασκευάστηκαν δύο διαλύματα: το διάλυμα (A) που περιείχε βανιλίνη (Merck, Art. No. S26047 841) 5% (w/v) σε μεθανόλη και το διάλυμα (B) που περιείχε πυκνό  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5% (v/v) σε μεθανόλη. Ίσοι όγκοι αναμιγνύονταν αμέσως πριν τον ψεκασμό και τα χρωματογραφήματα θερμαίνονταν για 5 min στους 105°C.



**Εικόνα B.15:** CAMAG TLC Visualizer για την αποτύπωση του χρωματογραφήματος ως έγχρωμης εικόνας στα 254 nm, 366 nm και το ορατό.

### Αρχή μεθόδου

Η παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στριβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) είναι η πιο απλή χρωματογραφική μέθοδος και γι αυτό το λόγο χρησιμοποιείται ευρέως. Κατάλληλος κλειστός θάλαμος που περιέχει το επιλεγμένο σύστημα διαλυτών είναι τα μόνα που απαιτούνται για τη πραγματοποίηση της αναλυτικής χρωματογραφίας. Με τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας, επιτυγχάνονται αποτελεσματικοί διαχωρισμοί και ακριβείς ποσοτικοποιήσεις των συστατικών του προς ανάλυση δείγματος. Χρησιμοποιείται για την τελική απομόνωση ουσιών από μίγματα με χαμηλό ολικό βάρος (συνήθως 5-100 mg) και μικρό αριθμό περιεχόμενων ουσιών (Sherma, J., & Fried, B., 2003).

### Πειραματική πορεία

Για την παρασκευαστική TLC χρησιμοποιήθηκαν υάλινες πλάκες κανονικής φάσης επιστρωμένες με γέλη οξειδίου του πυριτίου Silica F<sub>254</sub> με πάχος 0.25mm (Silica gel 60 F<sub>254</sub>-Merck, 20x20). Με την παρασκευαστική TLC, το δείγμα δεν τοποθετείται με μορφή κηλίδων, αλλά ως μια ενιαία οριζόντια λεπτή γραμμή μέσω της αυτόματης συσκευής παρασκευαστικής TLC (Linomat 5, CAMAG, Εικόνα B.11).



**Εικόνα B.16:** Σύστημα CAMAG Linomat 5 με σύριγγα για την ομοιόμορφη εφαρμογή των δειγμάτων στις πλάκες με τη μορφή ψεκασμού

Ακολούθως αναπτύχθηκε σε 100 ml κατάλληλου συστήματος διαλυτών μέσα σε έναν καλά σφραγισμένο θάλαμο και έως το μέτωπο του διαλύτη να φτάσει σε απόσταση περίπου 2 cm από το τέλος της πλάκας. Το σύστημα διαλυτών είχε προηγουμένως ελεγχθεί με αναλυτική TLC. Η πλάκα παρατηρήθηκε στα 254 nm και 366 nm και ένα μικρό τμήμα της πλάκας ψεκάστηκε με μεθανολικό διάλυμα θειϊκής βανιλίνης για να εντοπιστούν οι ουσίες που δεν ήταν εμφανείς στο UV. Οι ζώνες της στατικής φάσης που φαίνεται να έχουν τις επιθυμητές ουσίες αποξύνονται από την επιφάνεια της πλάκας, συλλέγονται χωριστά και εκχυλίζονται με κατάλληλο διαλύτη. Ακολούθησε εξάτμιση και ζύγιση των παραληφθέντων προς ταυτοποίηση ουσιών.



### Αρχή μεθόδου

Η χρωματογραφία κατανομής με φυγοκέντρωση (Centrifugal Partition Chromatography ή CPC) αποτελεί μία από τις παραλλαγές της χρωματογραφίας συστημάτων υγρού-υγρού και βασίζεται στην κατανομή των διαλυμένων ουσιών του μίγματος στις δύο φάσεις ενός διφασικού συστήματος διαλυτών, με βάση τον συντελεστή κατανομής  $K_D$  (Hamzaoui, M., et al., 2013).

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

Μία από τις υγρές φάσεις του διφασικού συστήματος χρησιμοποιείται ως στατική υγρή φάση. Τροφοδοτείται στη στήλη (ή στροφέα), ενώ αυτή περιστρέφεται σε μέτρια ταχύτητα περιστροφής. Η στατική φάση διατηρείται στο εσωτερικό της στήλης υπό μία φυγόκεντρο δυναμική που παράγεται από τη περιστροφή του στροφέα γύρω από έναν ενιαίο άξονα. Η δεύτερη φάση του διφασικού συστήματος χρησιμοποιείται ως κινητή φάση και τροφοδοτείται υπό πίεση μέσα στη στήλη και αντλείται διαμέσου της στατικής φάσης. Τα εκλούόμενα κλάσματα της κινητής και στατικής φάσης συλλέγονται επί μία περίοδο αρκετών λεπτών έως και μερικών ωρών και περιλαμβάνουν τις επιμέρους απομονωμένες ουσίες.

Κρίσιμη παράμετρος για την επίτευξη ενός επιτυχούς διαχωρισμού μέσω της CPC είναι η επιλογή κατάλληλου συστήματος διαλυτών. Ένα κατάλληλο σύστημα διαλυτών πρέπει να πληροί τις ακόλουθες προϋποθέσεις (Marston, A., & Hostettmann, K., 2006):

- Ικανοποιητική συγκράτηση της στατικής φάσης. Ο χρόνος καθίζησης του συστήματος διαλυτών πρέπει να είναι μικρότερος από 30 δευτερόλεπτα.
- Για αποτελεσματικό διαχωρισμό. Ο συντελεστής κατανομής των ενώσεων ( $K_D$ ) θα πρέπει να είναι μεταξύ 0.5 και 2.0.
- Προκειμένου να αποφευχθεί η αλόγιστη κατανάλωση διαλυτών, συνίσταται ότι το υπό εξέταση διφασικό σύστημα παράγει παρόμοιους όγκους σε κάθε φάση.
- Πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η πολικότητα του δείγματος, η διαλυτότητά του και η ικανότητα του να σχηματίζει σύμπλοκα.

Σε περίπτωση που το επιλεγμένο σύστημα δεν είναι κατάλληλο και ο διαχωρισμός δεν επιτυγχάνεται, το δείγμα μπορεί να ανακτηθεί πλήρως.

Στη CPC έχουμε τη δυνατότητα να αντιστρέφει τη κατεύθυνση της ροής και να εναλλάσσει τις στατικές και κινητές φάσεις. Στην ανιούσα λειτουργία (ascending mode) η ελαφρύτερη φάση διηθείται μέσα από τη βαρύτερη, με μια κατεύθυνση

αντίθετη από το πεδίο φυγοκέντρωσης ( από την περιφέρεια προς κέντρο του στροφέα σε κάθε κανάλι ), ενώ στην κατιούσα λειτουργία (descending mode) η βαρύτερη φάση διέρχεται μέσω της ελαφρύτερης, στην κατεύθυνση του φυγοκεντρικού πεδίου (Marchal, L., et al., 2003).

Η CPC υπερτερεί έναντι άλλων παραδοσιακών τεχνικών διαχωρισμού έχοντας μία σειρά από πλεονεκτήματα: (i) δεν χρησιμοποιείται στερεή στατική φάση και γίνεται κατανάλωση μικρής ποσότητας διαλυτών, με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζεται ως μία πιο «πράσινη» και οικονομική τεχνική, (ii) υψηλές ταχύτητες ροής και σύντομος χρόνος διαχωρισμού, (iii) δυνατότητα διαχωρισμού σε μεγάλη κλίμακα, (iv) κατάλληλη για θερμοευαίσθητες ουσίες και διατήρηση χημικής ακεραιότητας των μιγμάτων που υποβάλλονται σε κλασμάτωση, (v) αποφυγή της αμετάκλητης προσρόφηση του προς διαχωρισμό μίγματος στο στερεό υπόστρωμα, (vi) επαναληψιμότητα και (vii) συνολική ανάκτηση του προς διαχωρισμό δείγματος (Marston, A., & Hostettmann, K., 2006; Hamzaoui, M., et al., 2013).

### Πειραματική πορεία

Η μέθοδος CPC εφαρμόστηκε σε μηχανήμα FCPC<sup>®</sup> Rousselet-Robatel Kromaton με στήλη χωρητικότητας 50 mL. Η ταχύτητα περιστροφής κυμαίνεται από 200 έως 2000 rpm, παράγοντας έτσι φυγόκεντρο δύναμη ίση με 120 x g στα 1000 rpm και 480 x g στα 2000 rpm. Η κινητή φάση εισέρχεται σε ανιούσα ή κατιούσα φάση μέσα από την ειδική αντλία (LabAlliance, Scientific Scientific System, Inc). Τα κλάσματα συλλέγονται μέσω του συλλέκτη Buchi B-684.



Εικόνα B.17: FCPC<sup>®</sup> Rousselet-Robatel Kromaton

#### ➤ Προετοιμασία συστήματος διαλυτών

Προκειμένου να επιτευχθεί η βέλτιστη κατανομή και να βρεθεί το κατάλληλο σύστημα διαλυτών, λήφθηκε υπόψιν ότι το δραστικό εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα του *S. hygrosopicus subsp. angustmyceticus* έφερε κυρίως άπολα μόρια. Επιπλέον, προκειμένου να διαμορφωθούν δύο μη αναμίξιμες φάσεις και να προσαρμοστεί η πολικότητα της οργανικής και της υδατικής φάσης, είναι απαραίτητος ένας πολικός και ένας μη πολικός διαλύτης.

Για την ανάλυση του εκχυλίσματος χρησιμοποιήθηκαν διφασικά συστήματα που αποτελούνταν από n-Hex/EtOAc/EtOH/H<sub>2</sub>O στις εξής αναλογίες:

**Πίνακας Β.8:** Σύσταση του διφασικού συστήματος διαλυτών για τη CPC

Σύστημα	Στατική φάση		Κινητή φάση	
	n-Hex	EtOAc	EtOH	H <sub>2</sub> O
1 <sup>ο</sup>	2.5	2.5	1	4
2 <sup>ο</sup>	2.5	2.5	2	3
3 <sup>ο</sup>	2.5	2.5	3	2

Οι δυο φάσεις του κάθε συστήματος τοποθετούνται σε διαχωριστική χοάνη και ανακινούνται. Το σύστημα αφήνεται να διαχωριστεί για όσο χρόνο χρειάζεται.

➤ **Προετοιμασία δείγματος**

Διαλύονται με τη βοήθεια υπερήχων 150.7 mg δείγματος σε 2.5 ml της στατικής φάσης και 0.5 ml της κινητής φάσης του 1<sup>ου</sup> συστήματος.

➤ **Προετοιμασία μηχανήματος FCPC® Kromaton**

Οι πειραματικές συνθήκες ήταν όμοιες και για τις δύο κλασματώσεις με CPC. Πιο συγκεκριμένα:

**Πίνακας Β.9:** Πειραματικές συνθήκες CPC

Όγκος ένεσης	3 ml
Ρυθμός ροής	3 ml/min
Ρυθμός περιστροφής	700 rpm

Αρχικά διοχετεύτηκε 1.2 L στατικής φάσης του 1<sup>ου</sup> Συστήματος (n-Hex/EtOAc) με περιστροφή στήλης 200 rpm και ροή 5 ml/min. Για τη διοχέτευση της κινητής φάσης του 1<sup>ου</sup> Συστήματος, η περιστροφή αυξήθηκε στις 700 rpm και η ροή ρυθμίστηκε στα 3 ml/min και αφέθηκαν να τρέξουν τόσα ml κινητής φάσης, όσα χρειάστηκαν για να πληρωθεί η στήλη (Sf=0,45). Μετά τη εξισορρόπηση των συστημάτων, πραγματοποιήθηκε η εισαγωγή του δείγματος ενέσιμα σε βρόγχο των 3mL. Μετά την συλλογή 10 κλασμάτων των 5 ml, ξεκίνησε η διοχέτευση της κινητής φάσης του 2<sup>ου</sup> Συστήματος. Η ροή των διαλυτών και η περιστροφή παρέμειναν σταθερά και συλλέχθηκαν 10 κλάσματα των 5 ml. Για τη διοχέτευση του 3<sup>ου</sup> Συστήματος πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία, ενώ συλλέχθηκαν 14 κλάσματα των 5 ml. Μετά την εφαρμογή των τριών συστημάτων ακολούθησε εξώθηση των ουσιών που είχαν παραμείνει στη στατική φάση εισάγοντας στη στήλη τη πολική φάση του 3<sup>ου</sup> συστήματος (extrusion), απ' όπου και συλλέχθηκαν 15 επιπλέον κλάσματα (Πίνακας Β.10). Συλλέχθηκαν συνολικά 50 κλάσματα και η διαδικασία ολοκληρώθηκε με τη διοχέτευση διαλύματος MeOH:H<sub>2</sub>O σε αναλογία 50:50, διατηρώντας την ίδια περιστροφή στήλης και ροής διαλυτών.

**Πίνακας Β.10:** Κλάσματα CPC

Σύστημα	Αριθμός κλασμάτων
Κινητή φάση 1 <sup>ο</sup>	(1-10)
Κινητή φάση 2 <sup>ο</sup>	(11-20)
Κινητή φάση 3 <sup>ο</sup>	(21-34)
Στατική φάση 3 <sup>ο</sup>	(35-50)

## B.6 ΥΠΕΡΚΡΙΣΙΜΗ ΡΕΥΣΤΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (SFC-MS)

### Αρχή μεθόδου

Η υπερκρίσιμη ρευστή χρωματογραφία (Supercritical Fluid Extraction ή SFC) είναι μία φιλική προς το περιβάλλον χρωματογραφική τεχνική κανονικής φάσης, η οποία χρησιμοποιεί το αέριο CO<sub>2</sub> σε υπερκρίσιμη κατάσταση ( $\theta=31^{\circ}\text{C}$  &  $p>72\text{ atm}$ ) ως κινητή φάση και μία πολική στατική φάση, όπως SiO<sub>2</sub> ή Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται είναι σχεδόν ίδιος με αυτόν της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Πολύπλοκα μίγματα μπορούν να διαχωριστούν και η ποσότητα και η ταυτότητα του κάθε συστατικού του μίγματος μπορούν να προσδιοριστούν.

Η πιο σημαντική διαφορά από την HPLC έγκειται στην χρήση του πυκνού συμπιεσμένου αερίου CO<sub>2</sub>, το οποίο σε υψηλές πιέσεις δρα ως διαλύτης. Συγκεκριμένα τα βασικά πλεονεκτήματα της SFC έναντι της HPLC όταν χρησιμοποιούνται παρασκευαστικά είναι τα εξής (Guiochon, G., & Tarafder, A., 2011):

1. Πολλές ενώσεις έχουν μεγαλύτερη διαλυτότητα σε μίγματα υπερκρίσιμων ρευστών από ό,τι σε οργανικούς διαλύτες.
2. Κατάλληλο για άπολες ενώσεις
3. Το μέγιστο επιτρεπόμενο ποσό φορτίου της στήλης της παρασκευαστικής SFC είναι μεγαλύτερο από αυτό της HPLC με αποτέλεσμα να αυξάνεται η παραγωγικότητα και η απόδοση της.
4. Υψηλότερη απόδοση ανάκτησης και ευκολότερη ανάκτηση προϊόντων.
5. Είναι κατάλληλη για το διαχωρισμό θερμοευαίσθητων ουσιών, καθώς η χρωματογραφία πραγματοποιείται στους  $\approx 31^{\circ}\text{C}$ .
6. Το υπερκρίσιμο CO<sub>2</sub> είναι φθηνότερο και ασφαλέστερο από οργανικούς διαλύτες. Είναι ένας «πράσινος» διαλύτης, μη τοξικός, πτητικός και μη εύφλεκτος.

Το διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) είναι ένας εξαιρετικά άπολος διαλύτης. Κατά συνέπεια, για περισσότερο πολικές ουσίες χρησιμοποιούνται διάφοροι συνδιαλύτες όπως αιθανόλη, ισοπροπανόλη και ακετονιτρίλιο.

## Πειραματική πορεία

Η εκχύλιση των ουσιών πραγματοποιήθηκε σε χρωματογράφο της εταιρίας Waters. Το μηχάνημα αποτελείται από την αντλία δείγματος (Waters 2767 Sample Manager Injector and Collector), τη μονάδα παροχής των διαλυτών (Thar SFC Fluid Delivery Module), τη στήλη μέσα σε θερμοστατούμενο φούρνο (Waters Column Oven), τον περιστολέα πίεσης (Waters Back Pressure Regulator), την αντλία του συνδιαλύτη (Waters 515 HPLC Pump), την αντλία ελέγχου των διαλυτών (Waters Pump Control Module II), τον προθερμαντήρα (Thar SFC Heat Exchanger) και τον ανιχνευτή (Waters 2998 Photodiode Array Detector). Το σύστημα είναι συνδεδεμένο με το φασματομετρο μάζας Waters SQD (ανιχνευτής απλού τετράπολου, πηγή ESI). Η προμήθεια της φιάλης CO<sub>2</sub> έγινε από την εταιρία REVIVAL και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε στο λογισμικό MassLynx v.4.1.



Εικόνα B.18: Διάταξη SFC-MS

Για το καλύτερο διαχωρισμό και την απομόνωση καθαρών ουσιών συνοπτικά εφαρμόστηκαν τα εξής:

### ➤ Προετοιμασία συστήματος διαλυτών

Το CO<sub>2</sub> όπως προαναφέρθηκε, είναι ένας άπολος διαλύτης ο οποίος παρασύρει τα άπολα συστατικά. Ο συνδιαλύτης χρησιμοποιείται για να αυξήσει την πολικότητα της κινητής φάσης και το εύρος των συστατικών που θα εκλουστούν. Ως συνδιαλύτης αρχικά χρησιμοποιήθηκε η μεθανόλη, αλλά λόγω χημικής αστάθειας κατά την συλλογή ορισμένων κλασμάτων, αντικαταστάθηκε με ισοπροπανόλη, αφού διαπιστώθηκε ότι είχαν παρόμοια αποτελέσματα στους επιθυμητούς διαχωρισμούς. Δοκιμάστηκε ισοκρατική έκλυση με αλληπάλληλες εγχύσεις αλλάζοντας το ποσοστό συνδιαλύτη. Το ακριβές σύστημα που επιλέχθηκε βασίστηκε στα αποτελέσματα των δοκιμών και φαίνεται παρακάτω:

Στατική φάση	Στήλη Silica Ethylpyridine (150mm), 37°C
Κινητή φάση	Διαλύτης έκλυσης: CO <sub>2</sub> Συνδιαλύτης: Ισοπροπανόλη (C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O)

➤ **Προετοιμασία δειγμάτων**

Παρασκευάζεται διάλυμα του προς χρωματογραφική ανάλυση δείγματος σε συγκέντρωση 2 mg/ml και διάλυμα 10 mg/ml για τη συλλογή κλασμάτων.

➤ **Προετοιμασία μηχανήματος SFC**

Διαμορφώνεται η μέθοδος χρωματογραφίας μέσω του λογισμικού MassLynx, v.4.1 της Waters ως εξής:

**Πίνακας B.11:** Πειραματικές συνθήκες SFC-MS

Μέθοδος ροής διαλυτών	Isocratic (Isopropanol: 55 ml/min)
Ρυθμός ροής κατά τη χρωματογραφία και κατά τη συλλογή κλασμάτων	5 ml/min
Όγκος εισαγωγής δείγματος κατά την αναλυτική χρωματογραφία	(C <sub>δείγματος</sub> =2 mg/ml)
Όγκος εισαγωγής δείγματος κατά τη συλλογή κλασμάτων	200 µl (C <sub>δείγματος</sub> =10 mg/ml)
P <sub>CO2</sub>	50-60 bar
Μήκος κύματος απορρόφησης	Diode array (210-450 nm)
Διάρκεια κύκλου χρωματογραφίας	13 min
Αριθμός κύκλων	30

➤ **Συλλογή και συμπύκνωση κλασμάτων**

Συλλέγονται τα κλάσματα σε σκουρόχρωμους περιέκτες και στη συνέχεια συμπυκνώνονται σε Rotavapor Buchi R-210 και φυλάσσονται στους 4°C.

## B.7 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

### Αρχή μεθόδου

Η χρωματογραφία HPLC (High Pressure Liquid Chromatography ή High Performance Liquid Chromatography) αποτελεί τεχνολογική εξέλιξη της κλασικής χρωματογραφίας στήλης. Αναπτύχθηκε στα μέσα της δεκαετίας του 1970 και η ταχύτερη εδραίωσή της στο χώρο της ενόργανης ανάλυσης βασίστηκε στην ανακάλυψη νέων υλικών πλήρωσης της στήλης, καθώς και στην ευκολία που παρείχαν οι συνδεδεμένοι σε σειρά ανιχνευτές. Στη δεκαετία του 1980 εμφανίστηκαν νέες τεχνικές στην Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης οι οποίες βελτίωσαν το διαχωρισμό, την ανίχνευση, τον ποιοτικό και τον ποσοτικό διαχωρισμό των ενώσεων, ενώ παράλληλα η ανάπτυξη των υπολογιστών διευκόλυνε ουσιαστικά την αυτοματοποίηση της συγκεκριμένης τεχνικής. Το γεγονός αυτό καθιέρωσε την HPLC ως μια ιδιαίτερα δημοφιλή τεχνική, καθώς θεωρείται μία σημαντικότερη μέθοδος διαχωρισμού με μεγάλη ευαισθησία, επαναληψιμότητα, εύκολη προσαρμογή σε ακριβείς ποσοτικούς διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών και με ευρύτατες εφαρμογές στην ανάλυση αμινοξέων, πρωτεϊνών, νουκλεϊκών

οξέων, υδρογονανθράκων, υδατανθράκων, φαρμακευτικών ουσιών, τερπενοειδών, φυτοφαρμάκων, αντιβιοτικών, στεροειδών, οργανομεταλλικών ενώσεων και ποικιλία ανόργανων ουσιών.

Στην υγρή χρωματογραφία ο διαχωρισμός των μορίων του αναλυόμενου δείγματος βασίζεται στη διαφορετική κατανομή τους μεταξύ δύο μη αναμίξιμων φάσεων, δηλαδή μεταξύ της στατικής και κινητής φάσης. Ο διαχωρισμός διέπεται από διάφορες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αναλυτή και των σταθερών και κινητών φάσεων, όπως αλληλεπιδράσεις διασποράς, διπόλου-διπόλου και δεσμούς υδρογόνου (Snyder, L. R., et al., 2010). Η στατική φάση αποτελείται είτε από στερεό πορώδες υλικό με ενεργή επιφάνεια και μικροσωματιδιακή μορφή, ή από ένα λεπτό υμένιο υγρού καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα πολύ μικρής διαμέτρου, που βρίσκεται μέσα στη στήλη. Η κινητή φάση είναι ένας διαλύτης ή μίγμα διαλυτών. Κάθε συστατικό μετακινείται μέσα στη στήλη με διαφορετική ταχύτητα και αυτό αποτελεί τη βάση κάθε χρωματογραφικού διαχωρισμού. Η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης μέσα από τη στατική πραγματοποιείται μέσω χρήσης αντλιών υψηλής πίεσης με αποτέλεσμα να επιτυγχάνονται δύσκολοι διαχωρισμοί μέσα σε λίγα λεπτά. Ανάλογα με τη πολικότητα της στατικής φάσης η υγρή χρωματογραφία διακρίνεται σε χρωματογραφία κανονικής φάσης (normal phase) και σε αντίστροφης φάσης (reverse phase) (Snyder, L. R., et al., 1997).

### Πειραματική πορεία

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

- αντλία SpectraSystem P4000, με την ικανότητα ανάμειξης τεσσάρων διαφορετικών διαλυτών, σε οποιαδήποτε αναλογία
- απασερωτή (degasser) SpectraSystem 1000
- αυτόματο δειγματολήπτη SpectraSystem AS3000
- ανιχνευτή UV SpectraSystem UV6000LP

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

**Πίνακας B.12:** Πειραματικές συνθήκες για την αναλυτική HPLC

Στατική φάση	Στήλη: Discovery, HS-C <sub>18</sub> , 25 cm x 4.6 mm, i.d.: 5 μm, Superlco
Κινητή φάση	A: ACN (0,1% F.A.), B: ACN/H <sub>2</sub> O
Θερμοκρασία	T <sub>R</sub>
Ρυθμός ροής	0.8 mL/min
Όγκος ένεσης	10 mL
Συγκέντρωση δείγματος	2 mg/ml, MeOH

**Πίνακας B.13:** Πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την αναλυτική HPLC

Χρόνος t (min)	Σύσταση Διαλυτών	
	A (%)	B (%)
0	0	100
3	0	100
10	10	90
30	20	80
35	25	75
50	50	50
70	100	0
73	0	100
87	0	100

Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και καταγράφηκαν απορροφήσεις 265, 284 και 360 nm.

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

- αντλία SpectraSystem P4000, με την ικανότητα ανάμειξης τεσσάρων διαφορετικών διαλυτών, σε οποιαδήποτε αναλογία
- απαερωτή (degasser) SpectraSystem 1000
- ανιχνευτής UV SpectraSystem UV6000LP

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

### **1. Μεθανολικό εκχύλισμα (MeOH) του *S. hygrosopicus subsp. angustmyceticus* (CA-129531)**

**Πίνακας B.14:** Πειραματικές συνθήκες για την ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία του CA-129531

Στατική φάση	Στήλη: Fortis C <sub>18</sub> , 250x10 mm , i.d.: 5 μm
Κινητή φάση	A: H <sub>2</sub> O, B: MeOH
Θερμοκρασία	25°C
Ρυθμός ροής	2 mL/min
Όγκος ένεσης	3 ενέσεις των 200 μL & 5 ενέσεις των 300 μL
Συγκέντρωση δείγματος	10 mg/ml, MeOH
Απορρόφηση	265 nm



**Πίνακας B.15:** Πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία του CA-129531

Χρόνος t (min)	Σύσταση Διαλυτών	
	A (%)	B (%)
0	95	5
40	50	50
50	0	100
52	0	100
55	95	5
65	95	5

## 2. Εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) του *Cercospora sp.* (CF-223709)

**Πίνακας B.16:** Πειραματικές συνθήκες για την ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία του CF-223709

Στατική φάση	Στήλη: Fortis C <sub>18</sub> , 250x10 mm , i.d.: 5 μm
Κινητή φάση	A: H <sub>2</sub> O (0,1% A.A.), B: MeOH
Θερμοκρασία	25°C
Ρυθμός ροής	1.5 mL/min
Όγκος ένεσης	9 ενέσεις των 200 μL
Συγκέντρωση δείγματος	5 mg/ml, MeOH
Απορρόφηση	254 nm

**Πίνακας B.17:** Πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την ημιπαρασκευαστική χρωματογραφία του CF-223709

Χρόνος t (min)	Σύσταση Διαλυτών	
	A (%)	B (%)
0	90	10
60	0	100
63	90	10
73	90	10

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθαρότητας HPLC και πριν τη χρησιμοποίησή τους πραγματοποιήθηκε διήθηση σε ειδική συσκευή υπό κενό και ηθμό 0.45μm.

## B.8 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΠΕΡΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (UPLC)

### Αρχή μεθόδου

Η υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης (Ultra Performance Liquid Chromatography - UPLC) αποτελεί την εξέλιξη της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) που χρησιμοποιείται πάνω από 30 χρόνια παγκοσμίως στα εργαστήρια.

Η UPLC θεωρείται καινοτομία της υγρής χρωματογραφίας. Η νέα αυτή τεχνική φέρνει μεγάλες βελτιώσεις στην ευαισθησία, τη διαχωριστικότητα, την καθώς και

στην ταχύτητα της ανάλυσης. Πιο συγκεκριμένα η οργανολογία της είναι ικανή να αντέχει σε μεγαλύτερη πίεση και η πλήρωση της στήλης γίνεται με μικρότερης διαμέτρου σωματίδια. Η UPLC βασίζεται στη χρήση στατικών φάσεων αποτελούμενες από μικρότερα σωματίδια μεγέθους μικρότερου των 2 μm (στην HPLC χρησιμοποιούνται σωματίδια μεγέθους 3-10 μm). Μικρότερα σωματίδια παρέχουν όχι μόνο αυξημένη αποτελεσματικότητα, αλλά και την ικανότητα χρήσης αυξημένης ροής κινητής φάσης, χωρίς απώλεια αποτελεσματικότητας παρέχοντας ταχύτητα και διαχωριστικότητα.

Η οργανολογία της είναι ανάλογη με την HPLC. Πιο συγκεκριμένα:

- Δεξαμενή διαλυτών.
- Δύο αντλίες για την προώθηση του διαλύτη με πίεση έως και 18000 psi συνεδεμένες παράλληλα σε ένα μίκτη (mixing chamber) για την ανάμιξη των διαλυτών υπό υψηλή πίεση .
- Αυτόματο δειγματολήπτη (sample manager).
- Μια στήλη με πληρωτικό υλικό μεγέθους σωματιδίων μικρότερου των 2μm.
- Ανιχνευτή PDA και ανιχνευτή φθορισμού.
- Έναν υπολογιστή και κατάλληλο λογισμικό (Empower pro & Acquity UPLC Console).

### Πειραματική πορεία

Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν Fortis HPLC, C<sub>18</sub>, 1.7 μm (Μέγεθος: 150x2.1 mm). Οι διαλύτες έκλουσης ήταν νερό καθαρότητας HPLC με 0.1% οξικό οξύ (Διαλύτης A) και ακετονιτρίλιο καθαρότητας HPLC (Διαλύτης B). Εφαρμόστηκε η τεχνική της βαθμιδωτής έκλουσης (gradient elution), όπου η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται βαθμιαία, με στόχο των καλύτερο διαχωρισμό των συστατικών των δειγμάτων. Το πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων φαίνεται στον Πίνακα Β.14. Η ροή της κινητής φάσης ήταν ρυθμισμένη στη σταθερή τιμή 0.4 ml/min.

Παρασκευάστηκαν δείγματα σε συγκέντρωση 300 μg/ml για τα εκχυλίσματα και 100 μg/ml για τα κλάσματα και τις απομονωμένες ουσίες και ο όγκος εισαγωγής ήταν 10 μL.

**Πίνακας Β.18:** Πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων

Χρόνος t (min)	Σύσταση Διαλυτών	
	A (%)	B (%)
0	95	5
0.5	95	5
1	95	5
2	80	20

3.5	45	55
4.5	45	55
8	5	95
9	0	100
9.5	95	5
10.5	95	5

Τα χρωματογραφήματα καταγράφηκαν στα 220, 254, 284 και 360 nm.

## B.9 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΟΥΣΙΩΝ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΗΝΙΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (NMR)

### Αρχή μεθόδου

Η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού είναι μια μορφή φασματομετρίας απορρόφησης, όπου το δείγμα που βρίσκεται σε ισχυρό μαγνητικό πεδίο απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στην περιοχή των ραδιοκυμάτων (4 έως 900 MHz) και οι προσανατολισμένοι πυρήνες των ατόμων από την κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας μεταβαίνουν στην κατάσταση υψηλότερης ενέργειας με αντιστροφή του spin. Όταν πραγματοποιηθεί αυτή η αναστροφή, οι πυρήνες έχουν συντονισθεί με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία, απ' όπου προκύπτει και ο όρος «συντονισμός».

Η συχνότητα απορρόφησης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας που παρατηρείται από την αλληλοεπίδρασή της με τους πυρήνες του αναλύτη, είναι χαρακτηριστική για κάθε πυρήνα, με αποτέλεσμα η μέθοδος NMR να αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο για την ταυτοποίηση της δομής οργανικών ενώσεων, για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους και για το χημικό «περιβάλλον» των πυρήνων των ατόμων στα μόρια των χημικών ενώσεων. Εφαρμόζεται ευρέως στην φαρμακευτική ανάλυση, συγκεκριμένα στη ποσοτική ανάλυση φαρμάκων σε σκευάσματα χωρίς προηγούμενο διαχωρισμό και παρέχει τη δυνατότητα χρήσης για δακτυλικό αποτύπωμα μιγμάτων (Watson, D.G., 2005).

### Πειραματική πορεία

Για τη λήψη των φασμάτων Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού χρησιμοποιήθηκε ο φασματογράφος Bruker Ultrashield™ PLUS 600 MHz, στον οποίο ελήφθησαν φάσματα μίας (1D) και δύο (2D) διαστάσεων. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε γυάλινους σωλήνες NMR (διάμετρος 5mm). Οι δευτεριωμένοι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για τη διάλυση των ενώσεων ήταν μεθανόλη (MeOD) και διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO-d6) (≈600 μL). Ο δευτεριωμένος διαλύτης χρησιμοποιείται για να εξασφαλισει ότι δεν υπήρχε παρεμπόδιση του σήματος των

πρωτονίων των δειγμάτων από τα πρωτόνια του διαλύτη, που βρισκόταν σε σχετικά μεγάλη ποσότητα.

Οι χημικές μετατοπίσεις ( $\delta$ ) είναι εκφρασμένες σε ppm, ενώ οι σταθερές σύζευξης ( $J$ ) σε Hz. Η πολλαπλότητα των κορυφών εκφράζεται ως  $s$  (απλή),  $brs$  (ευρεία απλή),  $d$  (διπλή),  $t$  (τριπλή),  $q$  (τετραπλή),  $dd$  (διπλή-διπλή) και  $m$  (πολλαπλή).

Ελήφθησαν τα φάσματα  $^1\text{H}$ NMR, COSY, HSQC, HMBC, πραγματοποιώντας σάρωση ακτινοβολιών ραδιοσυχνότητας 6000 Hz, σε μια περιοχή 10 ppm.

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

---

## B.10 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΟΜΩΝ ΜΕ LC-HRMS/MS

---

### Αρχή μεθόδου

Η φασματομετρία μαζών (mass spectrometry, MS) είναι μία αναλυτική τεχνική χαρακτηρισμού μοριακής δομής, που βασίζονται στον ιοντισμό μορίων ή την παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων και την καταγραφή της σχετικής έντασης του ιοντικού ρεύματος που αντιστοιχεί σε κάθε κορυφή. Το φασματόμετρο μαζών λειτουργεί με το σχηματισμό φορτισμένων μορίων ή μοριακών θραυσμάτων, είτε σε περιοχή υψηλού κενού, είτε αμέσως πριν την είσοδο του δείγματος στην περιοχή υψηλού κενού. Η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού επιτρέπει στα ιόντα να μεταφερθούν στην αέρια φάση από το διάλυμα στο οποίο βρίσκονται και αποτελεί προϋπόθεση για την ανάλυσή τους με μεθοδολογία φασματομετρίας μαζών. Τα μόρια της ένωσης μετατρέπονται σε ιόντα με θετικό ή αρνητικό φορτίο. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια ηλεκτρικών πεδίων τα παραχθέντα ιόντα ευθυγραμμίζονται σε λεπτή δέσμη. Η δέσμη διέρχεται μέσω ηλεκτρικού και μαγνητικού πεδίου οπότε το κάθε ιόν, ανάλογα με το λόγο μάζα προς φορτίο ( $m/z$ ), αποκλίνει από την αρχική κατεύθυνση. Τέλος, τα ιόντα με διαφορετικό λόγο  $m/z$  μπορούν να ανιχνευθούν με κατάλληλο ανιχνευτή. Το διάγραμμα της έντασης του σήματος κάθε ιόντος ενός αναλυτή έναντι του λόγου  $m/z$  ορίζεται ως το φάσμα μάζας του αναλυτή (Kaklamanos, G., et al., 2009).

Με χρήση βιβλιοθηκών φασμάτων αποθηκευμένων στον υπολογιστή είναι δυνατή η απευθείας σύγκριση των δεδομένων με πρότυπα φάσματα και η ταυτοποίηση των υπό ανάλυση ουσιών

Σε σύγκριση με τις τεχνικές οπτικής φασματομετρίας η φασματομετρία μαζών εμφανίζει σημαντικά πλεονεκτήματα. Ανάμεσα σε αυτά συγκαταλέγονται τα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης που επιτυγχάνει σε σχέση με τις οπτικές μεθόδους, καθώς και το γεγονός ότι προκύπτουν απλά φάσματα που συχνά ερμηνεύονται εύκολα. Επιπλέον, δίδεται η δυνατότητα μέτρησης ατομικών ισοτοπικών λόγων.

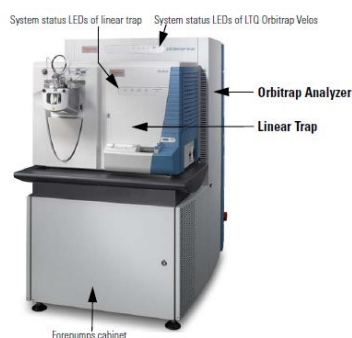
Η φασματομετρία μαζών παρουσιάζει μεγάλο εύρος εφαρμογών (ίσως το μεγαλύτερο σε σχέση με άλλες αναλυτικές τεχνικές) διότι παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη στοιχειακή σύσταση του δείγματος, τις δομές των μορίων (ανόργανων, οργανικών,

βιολογικών), την ποιοτική και ποσοτική σύσταση μειγμάτων και την αναλογία ισοτόπων ατόμων σε δείγματα. Εφαρμόζεται κυρίως στην ανάλυση για τον ποσοτικό προσδιορισμό και τον προσδιορισμό της δομής μορίων μεγάλου μοριακού βάρους. Αυξανόμενο είναι επίσης το ενδιαφέρον της χρήσης μεθοδολογίας φασματομετρίας μαζών για τη μελέτη πρωτεϊνικών αλληλουχιών καθώς και του μεταβολισμού των φαρμάκων. Σε συνδυασμό με την υγροχρωματογραφία (LC-MS) παρέχει μεθόδους για τον χαρακτηρισμό των προσμίξεων σε φάρμακα, καθώς και για τον προσδιορισμό φαρμάκων και μεταβολιτών τους σε βιολογικά υγρά και ιστούς (Watson, D.G., 2005).

Στην παρούσα εργασία, για την ταυτοποίηση των δομών που περιείχαν τα εκχυλίσματα, αλλά και τα παραληφθέντα κλάσματα από τα SFC και CPC και τα καθαρά απομονωμένα μόρια, πραγματοποιήθηκε Υγρή Χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας. Η παραγωγή ιόντων έγινε με ηλεκτοσπασμό.

### Πειραματική πορεία

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε υβριδικό φασματομέτρο LTQ Orbitrap της εταιρείας Thermo Fisher Scientific, το οποίο συνδυάζει αναλυτή μάζας γραμμικής παγίδας (linear trap) με αναλυτή μάζας τροχιακής παγίδας (orbitrap). Η τεχνική πραγματοποιήθηκε σε μηχάνημα LTQ-Orbitrap platform, που δίνει μετρήσεις μοριακού βάρους με ακρίβεια 4 δεκαδικών ψηφίων, παρέχοντας τη δυνατότητα απόδοσης των μοριακών τύπων και των βαθμών ακορεστότητας με μεγάλη ακρίβεια. Για μεγαλύτερη ακρίβεια λήφθηκαν και φάσματα MS/MS.



**Εικόνα Β.19:** LTQ Orbitrap όργανο

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

**Πίνακας Β.19:** Πειραματικές συνθήκες LC

<b>Στατική φάση</b>	Στήλη: Fortis C <sub>18</sub> (100 mm x 2.1 mm, 1.7 μ)
<b>Θερμοκρασία</b>	40°C

<b>Κινητή φάση</b>	A. H <sub>2</sub> O (0.1% FA) B. ACN
<b>Ρυθμός ροής</b>	350 $\mu$ L/min
<b>Όγκος ένεσης</b>	2 $\mu$ L

**Πίνακας B.20:** Πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων

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

**Πίνακας B.21:** Συνθήκες ιονισμού και θραυσμάτωσης MS/MS

<b>Εύρος Μάζας</b>	100-1500 (FS & MS/MS)
<b>Διακριτική Ικανότητα Μάζας</b>	30000
<b>Ρυθμισμένη Ενέργεια Πρόσκρουσης</b>	35% (Act.Q 0.250)
<b>Ανιχνευτής Ιονισμού</b>	Positive & Negative mode
<b>Συνθήκες ESI</b>	Capillary temp.: 300°C; capillary voltage: -3.5 V; tube lens: -98 V Sheath gas nitrogen: 40 arb. units; auxiliary gas nitrogen: 10 arb. units

Τα δείγματα προετοιμάστηκαν με MeOH και σε διάλυμα MeOH/H<sub>2</sub>O:50/50 αναλυτικής καθαρότητας σε τελική συγκέντρωση 300 mg/ml για αρχικά κλάσματα και ολικά εκχυλίσματα και σε συγκέντρωση 100  $\mu$ g/ml για καθαρά μόρια.

## **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

---

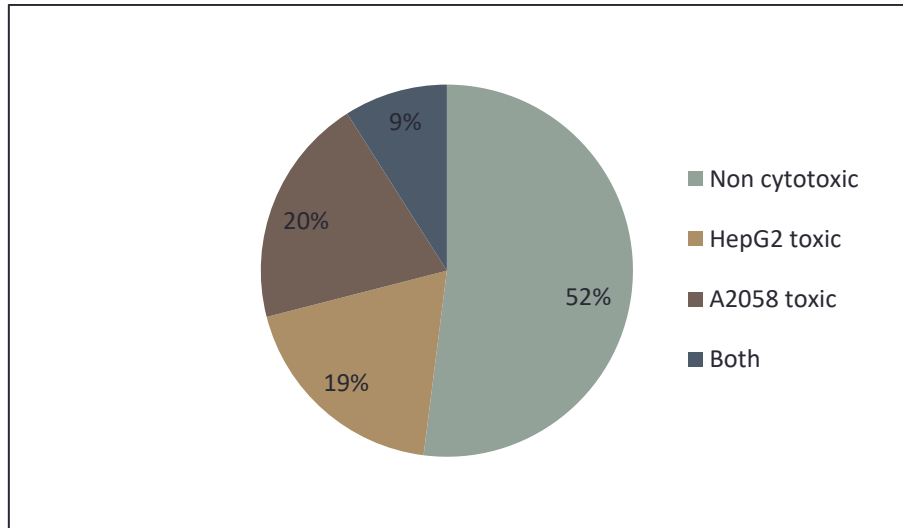




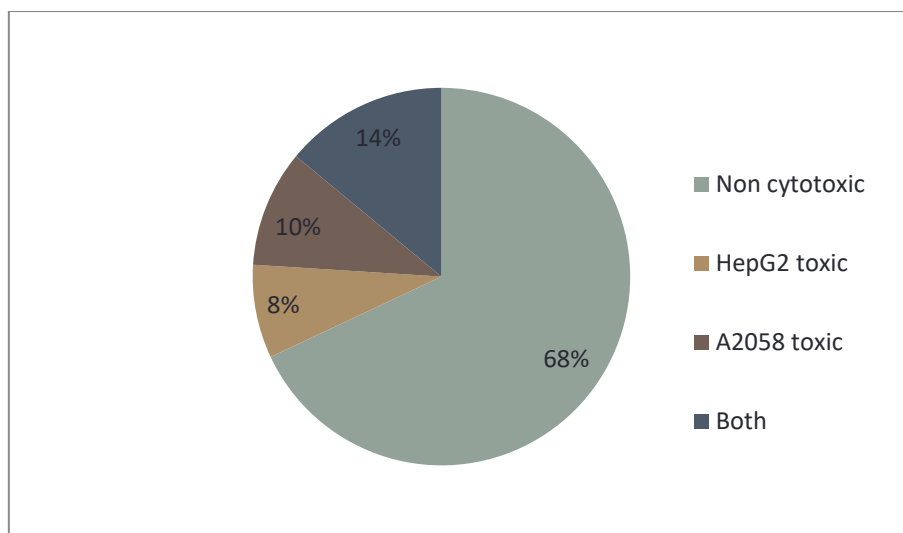
## Γ.1 “HIGH-THROUGHPUT SCREENING”

Στα πλαίσια του προγράμματος ήδη υπάρχουσες συλλογές καλλιεργειών μυκήτων και ακτινομυκήτων, προερχόμενα από την παγκόσμια μικροβιακή βιοποικιλότητα μελετήθηκαν *in silico* για την ορθολογική και στοχευμένη επιλογή των πιο ελπιδοφόρων για αντιγηραντική δράση στελεχών. Επιλέχθηκαν έτσι 110 μικροοργανισμοί, οι οποίοι καλλιεργήθηκαν σε 10 διαφορετικά θρεπτικά μέσα. Τα ~1100 εκχυλίσματα που δημιουργήθηκαν αξιολογήθηκαν για την βιολογική τους δραστηριότητα. Διεξήχθη ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δοκιμών που περιλαμβάνουν την αντι-γηραντική και πιο συγκεκριμένα αντιοξειδωτική δράση, τη προστασία και τη λευκαντική δράση του δέρματος.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση της κυτταροτοξικότητας των εκχυλισμάτων στο ερευνητικό κέντρο Fundacion MEDINA, για τον αποκλεισμό αυτών των εκχυλισμάτων που θα παρουσιάζουν τοξικότητα και στις δύο κυτταρικές σειρές όπου πραγματοποιήθηκε η μελέτη τοξικότητας (A2058 και HepG2). Τα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζουν το ποσοστό των εκχυλισμάτων των ακτινομυκήτων και μυκήτων που ήταν τοξικά.



**Εικόνα Γ.1:** Γράφημα ποσοστού κυτταροτοξικότητας εκχυλισμάτων ακτινομυκήτων



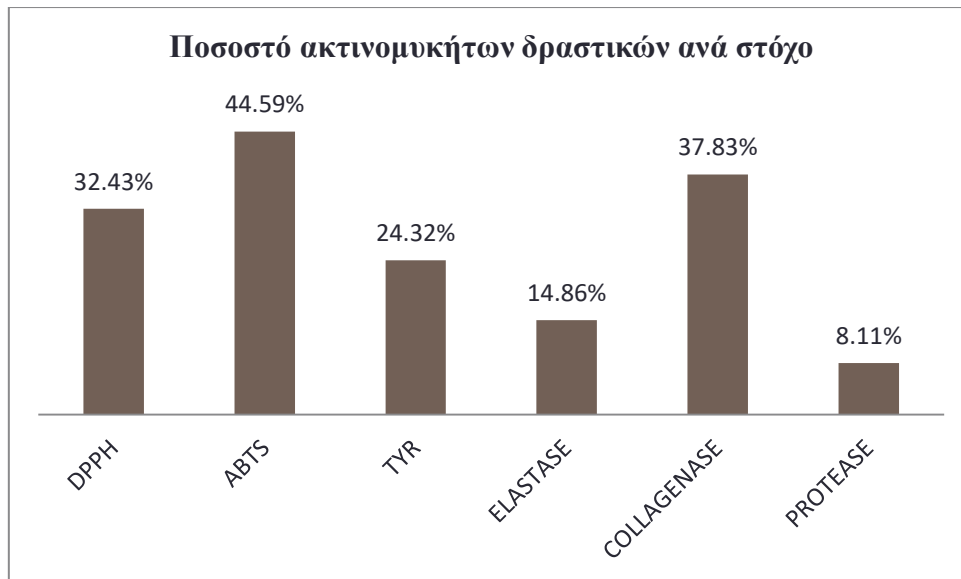
**Εικόνα Γ.2:** Γράφημα ποσοστού κυτταροτοξικότητας εκχυλισμάτων μυκήτων

Παράλληλα, για την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής δράσης των ~1100 εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι DPPH και ABTS (βλ. Παράγραφο Β.2.1), ενώ η λεύκανση του δέρματος μελετήθηκε βάσει της ικανότητάς τους να αναστέλουν το ένζυμο τυροσινάση (βλ. Παράγραφο Β.2.2). Η δερματοπροστατευτική δράση αξιολογήθηκε από την εταιρία PROTEOS, μετρώντας φασματοφωτομετρικά τις ανασταλτικές ιδιότητες των δειγμάτων έναντι ενζύμων που σχετίζονται με την ελαστικότητα και υγρασία του δέρματος (ελαστάση, κολλαγενάση και πρωτεάση). Τα κατώτατα όρια του ποσοστού αναστολής ή των U/ml που τέθηκαν για να θεωρηθεί δραστικό το εκχύλισμα του εκάστοτε μικροοργανισμού κατά το προκαταρκτικό screening, παρουσιάζονται στον Πίνακα Γ.1.

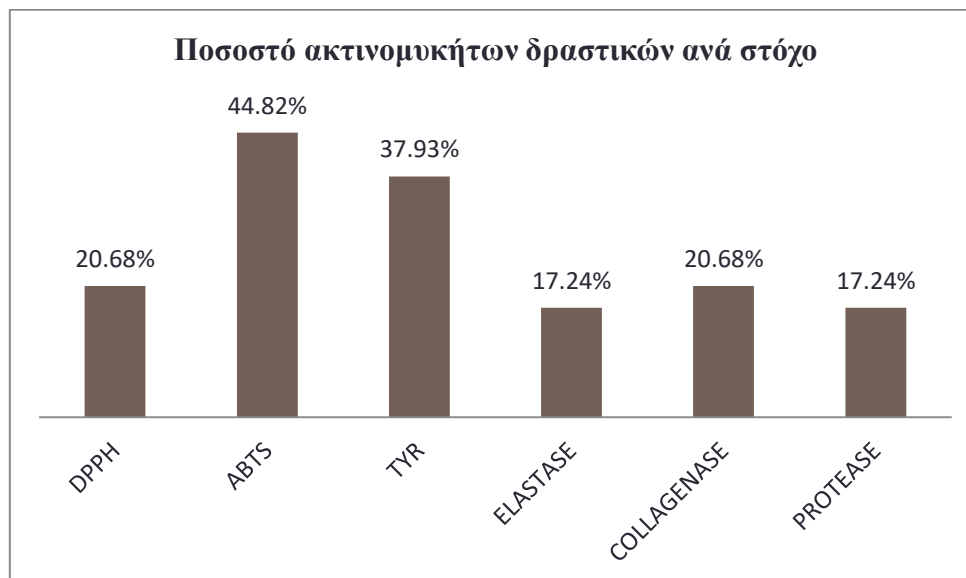
**Πίνακας Γ.1:** Κατώτατο όριο ανά βιολογικό στόχο, για τη θεώρηση ενός εκχυλίσματος ως δραστικού κατά το προκαταρκτικό screening.

	Κυτταροτοξικότητα	Αντιοξειδωτική δράση		Προστασία δέρματος			Λευκαντική δράση
		DPPH	ABTS	Ελαστάση	Κολλαγενάση	Πρωτεάση	Τυροσινάση
<b>Αραίωση</b>	1:200	1:100	1:102	1:50	1:51	1:51	1:100
<b>%Αναστολή</b>	-	≥ 27%	≥ 95%	-	-	-	≥ 20%
<b>U/ml</b>	≤ -50.00	-	-	≤ 0.35	≤ 9.274	≤ 153.61	-

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των βιολογικών δοκιμών κατέδειξε συνολικά 104 βιοδραστικά σε τουλάχιστον ένα στόχο εκχυλίσματα, εκ των οποίων τα 75 ανήκουν σε ακτινομυκήτες και τα υπόλοιπα 29 σε μύκητες. Μόλις το 11% των ακτινομυκήτων και το 6% των μυκήτων ήταν τελικά μη τοξικά και δραστικά. Στα παρακάτω διαγράμματα παρουσιάζεται το ποσοστό των εκχυλισμάτων ακτινομυκήτων και μυκήτων που ήταν δραστικό σε κάθε βιολογική δοκιμή που πραγματοποιήθηκε.



**Εικόνα Γ.3:** Διάγραμμα ποσοστού δραστικών εκχυλισμάτων ακτινομυκήτων ανά βιολογικό στόχο



**Εικόνα Γ.4:** Διάγραμμα ποσοστού δραστικών εκχυλισμάτων μυκήτων ανά βιολογικό στόχο

Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακες Γ.2 και Γ.3) παρουσιάζονται αναλυτικά τα στελέχη τα οποία επιλέχθηκαν και η βιολογική δράση για την οποία επιλέχθηκαν. Παρατηρείται ότι ορισμένα στελέχη εμφάνισαν δράση καλλιεργούμενα σε περισσότερα από ένα θρεπτικά μέσα, όπως ο *Streptomyces hygrosopicus subsp. angustimyceticus*.

Πίνακας Γ.2: Επιλεγθέντα στελέχη ακτινομυκήτων κατά το high-throughput screening

Στέλεχος ακτινομύκητα	Κωδικός στελέχους	Καλλιεργητικό μέσο	Αντιοξειδωτική δράση		Λευκαντική δράση	Προστασία του δέρματος	
			DPPH ASSAY	ABTS ASSAY		Ελαστάση	Κολλαγενάση
<i>Streptomyces sp.</i>	CA-078914	FPY-6	√	√			
<i>Saccharopolyspora sp.</i>	CA-091863	DNPM	√	√			
		GESH-3	√				
<i>Streptomyces sp.</i>	CA-098443	FPY-6	√	√			
<i>Streptomyces hygroscopicus subsp. globosus</i>	CA-122376	GESH-3	√		√		√
<i>Amycolatopsis kentuckyensis</i>	CA-126574	DNPM		√	√		
<i>Streptomyces chartreusis</i>	CA-126581	DNPM	√	√			
<i>Amycolatopsis pretoriensis</i>	CA-128769	APM9		√		√	
<i>Streptomyces pactum</i>	CA-128791	DNPM	√	√			
		FPY-12				√	
<i>Streptomyces purpurascens</i>	CA-129247	FPY-6	√	√			
<i>Streptomyces hygroscopicus angustimyceticus</i>	CA-129531	APM9		√	√		
		DEF-15S		√	√		
		DNPM		√	√		
		FPY-12			√		
		FPY-6	√	√	√		
		FR23			√		
		FRA2			√		
		GPA			√		
KHC		√	√				

<i>Streptomyces tendae</i>	CA-131129	DNPM	√	√			
<i>Streptomyces glaucusporus</i>	CA-214639	APM9	√	√		√	
<i>Streptomyces cellulosa</i>	CA-218136	FPY-6	√	√			
		FRM				√	
<i>Streptomyces spinoverrucosus</i>	CA-218259	FPY-6	√	√			
		GESH-3			√		
<i>Streptomyces rubrogriseus</i>	CA-218749	DNPM	√	√			
<i>Streptomyces chartreusis</i>	CA-244599	FRM				√	
<i>Streptomyces sp.</i>	CA-270460	DNPM			√		
		FRA2				√	
<i>Micromonospora tulbaghia</i>	CA-128820	DNPM		√		√	
<i>Micromonospora saelicesensis</i>	CA-128823	APM9		√		√	
<i>Micromonospora humi</i>	CA-129255	APM9	√	√			
		DEF-15S				√	
		SAM-6	√	√			
<i>Micromonospora sp. (USA)</i>	CA-270464	SAM-6	√	√			
<i>Verrucosipora sp.</i>	CA-270526	DEF-15S			√		
		SAM-6	√	√			
<i>Verrucosipora sp.</i>	CA-275039	SAM-6	√	√			
<i>Streptomyces tendae</i>	CA-131129	APM9			√		
<i>Streptomyces sp.</i>	CA-270460	FRM			√		
<i>Streptomyces griseus</i>	CA-118972	FRM				√	√
<i>Actinomadura sp.</i>	CA-099271	DEF-15					√
		DEF-15S					√
		DNPM		√			√
		FPY-6		√			√
		FRA2					

		FRM					√
		KHC					√
<i>Streptomyces griseus</i>	CA-118972	DNPM	√	√			√
		FRA2					√
		KHC		√			√
<i>Streptomyces hygroscopicus subsp. globosus</i>	CA-122376	DEF-15S					√
		DNPM					√
		FPY-6	√	√			√
		FR23					√
		KHC					√
<i>Streptomyces platensis</i>	CA-126250	DEF-15	√				√
		DEF-15S					√
		DNPM		√			√
		GESH-3					√
<i>Pseudonocardia alni</i>	CA-126374	DEF-15					√
		FRM					√
		GESH-3					√
		GPA					√
		KHC					√
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	CA-126383	FPY-6					√
		KHC					√
<i>Streptomyces arenae</i>	CA-126547	DEF-15				√	
<i>Streptomyces cellulosa</i>	CA-218136	FRM				√	
<i>Streptomyces chartreusis</i>	CA-244599	FRM				√	
<i>Streptomyces hygroscopicus angustimyceticus</i>	CA-129531	APM9			√		
<i>Streptomyces tendae</i>	CA-227287	DNPM	√	√			
<i>Streptomyces chartreusis</i>	CA-126581	APM9	√				

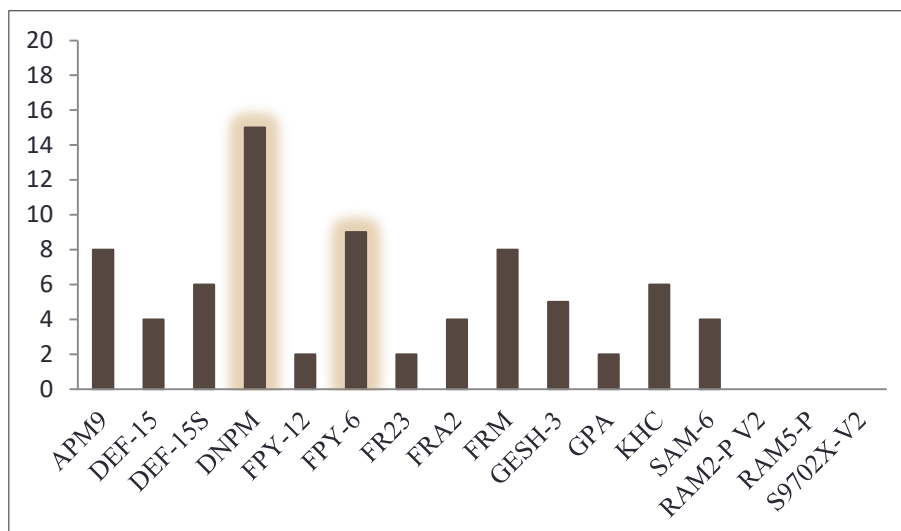
Πίνακας Γ.3: Επιλεγθέντα στελέχη μυκήτων κατά το high-throughput screening

Στέλεχος	Κωδικός στελέχους	Καλλιεργητικό μέσο	Αντιοξειδωτική δράση		Λευκαντική δράση	Προστασία του δέρματος	
			DPPH ASSAY	ABTS ASSAY		Ελαστάση	Κολλαγενάση
<i>Daedalea quercina</i>	CF-081003	AD5			√		
<i>Poronia punctata</i>	CF-086911	MSPM	√	√			
		SCY2		√			
<i>Bjerkandera adusta</i>	CF-092983	Dex-Soy			√		
		LSFM		√	√		
		SCY2		√	√		
		SUPERMALT			√		
		YES			√		
<i>Ascochytulina sp</i>	CF-116223	SCY2			√		
		SMK			√		
<i>Cercospora sp.</i>	CF-223709	AD5	√	√			
		LSFM	√	√			
		SCY2	√	√			
<i>Rhizopycnis vagum</i>	CF-223716	AD5			√		
<i>Paecilomyces lilocinus</i>	CF-224359	MMK2		√	√		
<i>Virgaria nigra</i>	CF-231658	MMK2		√	√		
		SCY2				√	
		YES				√	
<i>Rhizostilbella hibisci</i>	CF-233293	SMK		√	√		
<i>Phellinus nothofagi</i>	CF-270817	Dex-Soy				√	

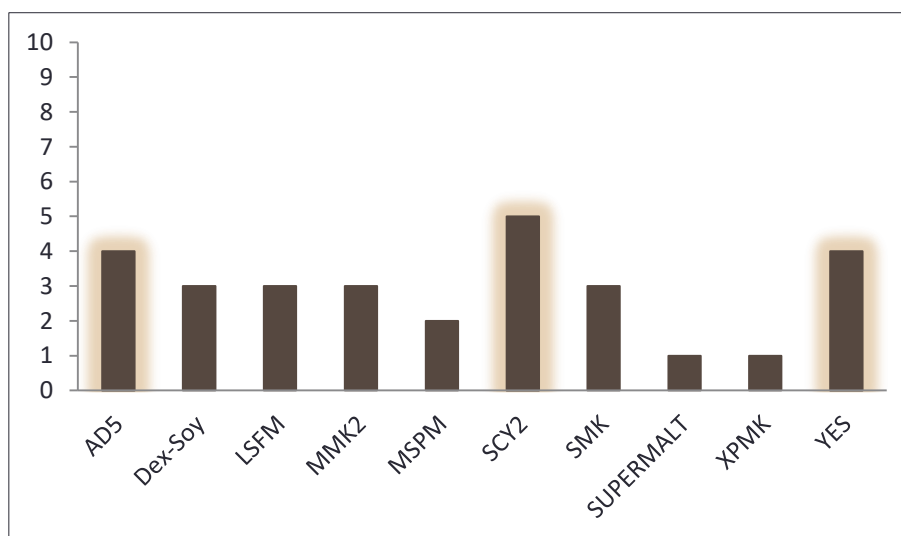
<i>Repetobasidium sp.nov.</i>	CF-270673	YES	√	√			
<i>Calyprella totara</i>	CF-270789	YES		√			
<i>Flammulina velutipes</i>	CF-105386	MSPM					√
<i>Sphaerobolus stellatus</i>	CF-169864	MMK2					√
		SMK					√
<i>Heterochaete delicata</i>	CF-270602	AD5					√
<i>Repetobasidium sp.nov.</i>	CF-270673	XPMK					√
<i>Orbilina delicatula</i>	CF-270879	Dex-Soy	√	√			
<i>Rhizochaete sp. nov.</i>	CF-270863	LSFM					√



Η ανάλυση των δεδομένων επέτρεψε την μελέτη της πιθανής επίδρασης που έχουν τα καλλιεργητικά μέσα στην ανάπτυξη ή αύξηση της βιολογικής δράσης του στελέχους. Συγκεκριμένα μέσα καλλιέργειας, όπως το DNPM για τη καλλιέργεια των ακτινομυκήτων και το SCY2 για τη καλλιέργεια των μυκήτων, έδειξαν ότι ίσως συνεισφέρουν στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών που είναι υπεύθυνοι για τη βιοδραστικότητα των επιλεγμένων εκχυλισμάτων.



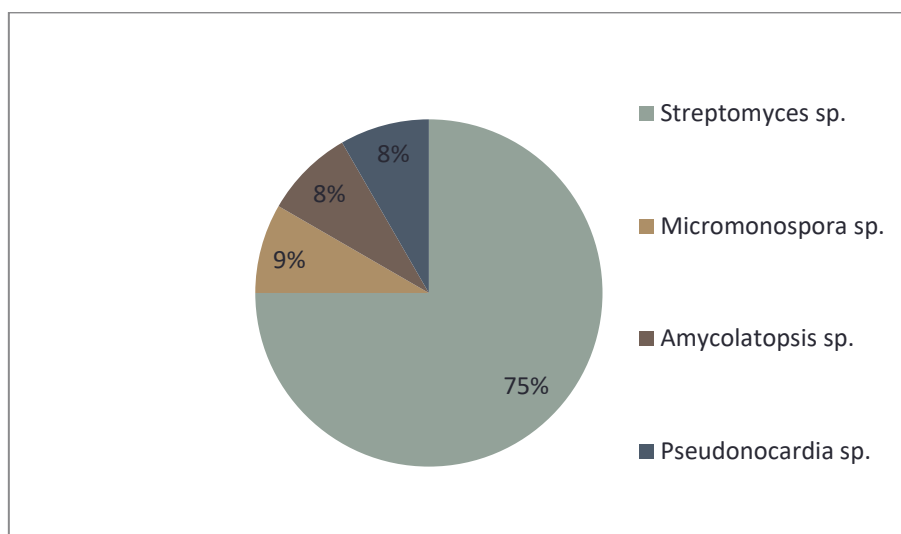
**Εικόνα Γ.5:** Διάγραμμα δραστικών εκχυλισμάτων ακτινομυκήτων ταξινομημένα βάσει των καλλιεργητικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν



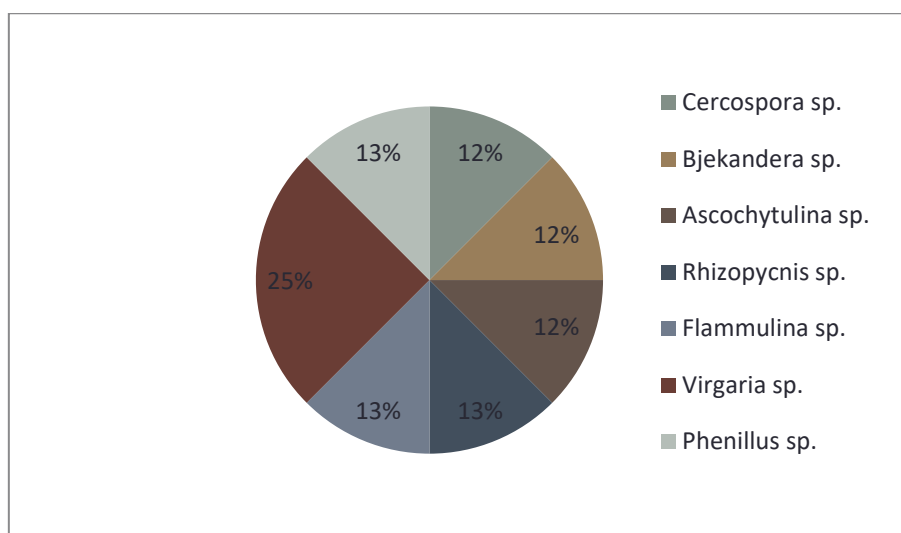
**Εικόνα Γ.6:** Διάγραμμα δραστικών εκχυλισμάτων μυκήτων ταξινομημένα βάσει των καλλιεργητικών μέσων που χρησιμοποιήθηκαν

Το επόμενο στάδιο ήταν η επανάληψη των βιολογικών δοκιμών στα 104 επιλεχθέντα στελέχη, για την τελική επιλογή των 20 πιο δραστικών στελεχών που προορίστηκαν προς βιοκατευθυνόμενη απομόνωση και ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών (13 στελέχη ακτινομυκήτων και 6 μυκήτων εκ των οποίων το ένα επιλέχθηκε για δύο μέσα καλλιέργειας). Το μεγαλύτερο ποσοστό των επιλεχθέντων στελεχών ακτινομυκήτων ανήκαν στην οικογένεια *Streptomyces* (Εικόνα Γ.7), ενώ στην περίπτωση των μυκήτων στην οικογένεια *Virgaria* επιλέχθηκε το ίδιο στέλεχος

καλλιεργούμενο σε δύο θρεπτικά μέσα με αξιόλογη δερματο-προστατευτική δράση (Εικόνα Γ.8).



**Εικόνα Γ.7:** Ποσοστά δραστικών στελεχών ακτινομυκήτων ταξινομημένα ως προς την οικογένεια προέλευσης



**Εικόνα Γ.8:** Ποσοστά δραστικών στελεχών μυκήτων ταξινομημένα ως προς την οικογένεια προέλευσης

Η τελική επιλογή των 20 πιο δραστικών στελεχών, η προέλευση, το καλλιεργητικό μέσο, καθώς και η δράση για την οποία επιλέχθηκαν παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα Γ.4.

Πίνακας Γ.4: Τα 20 τελικά επιλεγθέντα δραστικά στελέχη

Βιοδραστικότητα	Στέλεχος	Προέλευση	Καλλιεργητικό Μέσο	Κωδικός	Αντιοξειδωτική Δράση		Δράση προστατευτική του δέρματος		Λευκαντική Δράση
					DPPH (% Αναστολή)	ABTS (% Αναστολή)	Ελασάση (U/ml)	Κολλαγενάση (U/ml)	% Αναστολή της τυροσινάσης
Προστατευτική του δέρματος	<i>Streptomyces pactum</i>	Hawaii	FPY-12	CA-128791	-	-	-2.34	-	-
	<i>Phenillus nothofagi</i>	New Zealand	Dex-Soy	CF-270817	-	-	-1.69	-	-
	<i>Streptomyces chartreusis</i> ,	Reunion Island	FRM	CA-244599	-	-	-0.68	-	-
	<i>Virgaria nigra</i>	Sao Tome and Príncipe	YES	CF-231658	-	-	-0.36	-	-
			SCY2	CF-231658	-	-	-0.14	-	-
	<i>Streptomyces griseus</i>	Maritinique (France)	KHC	CA-118972	-	-	-	-2647.00	-
	<i>Pseudonocardia alni</i>	Alaska	GESH-3	CA-126374	-	-	-	-2749.86	-
<i>Flammulina velutipes</i>	Spain	MSPM	CF-105386	-	-	-	-2384.15	-	
Αντιοξειδωτική & προστατευτική του δέρματος	<i>Streptomyces glaucusporus</i>	Canary Islands (Spain)	APM9	CA-214639	49	95.12	-0.32	-	-
Λευκαντική & προστατευτική του δέρματος	<i>Micromonospora humi</i>	Reunion Island	DEF-15S	CA-129255	-	-	-0.25	-	26.73
Λευκαντική του δέρματος	<i>Amycolatopsis kentuckyensis</i>	Reunion Island	DNPM	CA-126574	-	-	-	-	34.01
	<i>Streptomyces hygroscopicus angustimyceticus</i>	Maritinique (France)	DNPM	CA-129531	-	-	-	-	53.03
	<i>Rhizopycnis vagum</i>	Sao Tome and Príncipe	AD5	CF-223716	-	-	-	-	29.08
	<i>Ascochyutulina sp</i>	France	SMK	CF-116223	-	-	-	-	39.14

	<i>Bjerkandera adusta</i>	Spain	Dex-Soy	CF-092983	-	-	-	-	39.37
<b>Αντιοξειδωτική</b>	<i>Cercospora</i> sp.	Sao Tome και Principe	SCY-2	CF-223709	50.55	96.21	-	-	-
	<i>Streptomyces purpurascens</i>	Reunion Island	FPY-6	CA-129247	47.37	99.95	-	-	-
	<i>Streptomyces spinoverrucosus</i>	Canary Islands (Spain)	FPY-6	CA-218259	46.27	99.54	-	-	-
	<i>Streptomyces chartreusis</i>	Reunion Island	DNPM	CA-126581	40.88	99.78	-	-	-
	<i>Streptomyces tendae</i>	Hawaii	DNPM	CA-131129	41.42	99.75	-	-	-

## Γ.2 ΒΙΟΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΕΠΙΛΟΓΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

---

Από τα είκοσι επιλεγμένα για την αξιολόγηση δράση τους στελέχη, επιλέχθηκε να μελετηθούν τα 12 τα οποία κατέδειξαν αντιοξειδωτική και λευκαντική δράση και τα οποία καλλιεργήθηκαν με το βέλτιστο καλλιεργητικό μέσο σε κλίμακα ζύμωσης του 1 L (Πίνακας Β.6).

Έχοντας ως στόχο την εύρεση του καταλληλότερου πρωτοκόλλου εκχύλισης που να συμβάλλει στην αύξηση της δράσης για την οποία επιλέχθηκε ο εκάστοτε μικροοργανισμός, εφαρμόστηκαν σε όλα τα επιλεγθέντα στελέχη διαφορετικές μέθοδοι εκχύλισης. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρονται κάτωθι οι εκχυλίσεις που εφαρμόστηκαν στις ξηρές βιομάζες του 1 L του κάθε δραστικού στελέχους:

- Διαδοχική εκχύλιση: n-Hex, στη συνέχεια EtOAc και τέλος EtOH/H<sub>2</sub>O: 50/50
- Απευθείας εκχύλιση με EtOH στις βιομάζες των στελεχών που είχαν επιλεγθεί για λευκαντική δράση
- Χρήση ρητίνης προσρόφησης XAD-4 σε εκχύλισμα που προήλθε από την απευθείας του εκχύλιση με EtOH/H<sub>2</sub>O: 50/50

Συνολικά παρήχθησαν 66 εκχυλίσματα (Πίνακας Β.7) τα οποία αξιολογήθηκαν για την αντιοξειδωτική και λευκαντική τους δράση, με στόχο την επιλογή των πιο δραστικών εκχυλισμάτων ανά μικροοργανισμό. Ανάμεσα τους, μερικοί επιβεβαίωσαν την βιολογική δράση για την οποία επιλέχθηκαν, ενώ άλλοι απέτυχαν σε κάθε πρωτόκολλο εκχύλισης που δοκιμάστηκε.

---

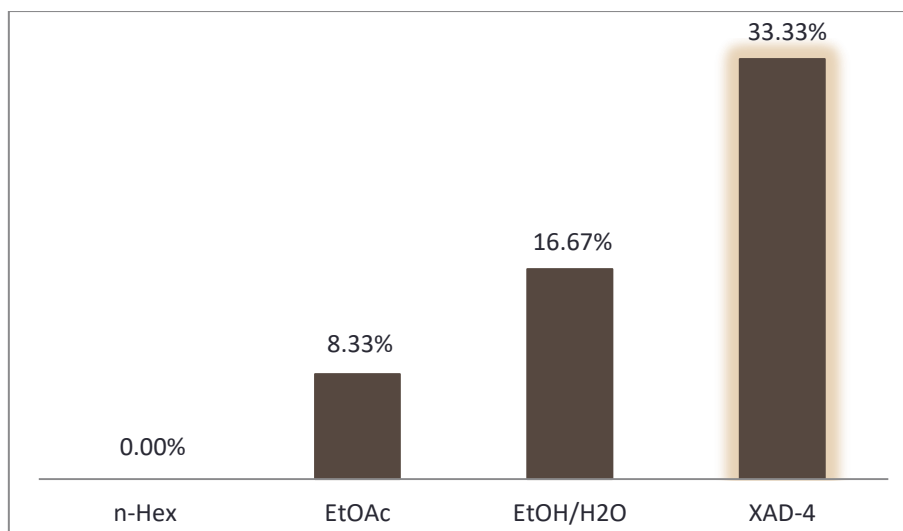
### Γ.2.1 ΣΤΕΛΕΧΗ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ ΓΙΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

---

Στις παρακάτω παραγράφους δίνονται αναλυτικά τα χημικά προφίλ των εκχυλισμάτων που παρήχθησαν καθώς και η βιολογική τους δράση.

Από τα έξι επιλεγθέντα για αντιοξειδωτική δράση στελέχη, μόνο τα μισά επιβεβαίωσαν την δράση τους κατά την ανακαλλιέργεια τους στο 1 L, ενώ δύο παρουσίασαν αξιολογη λευκαντική δράση.

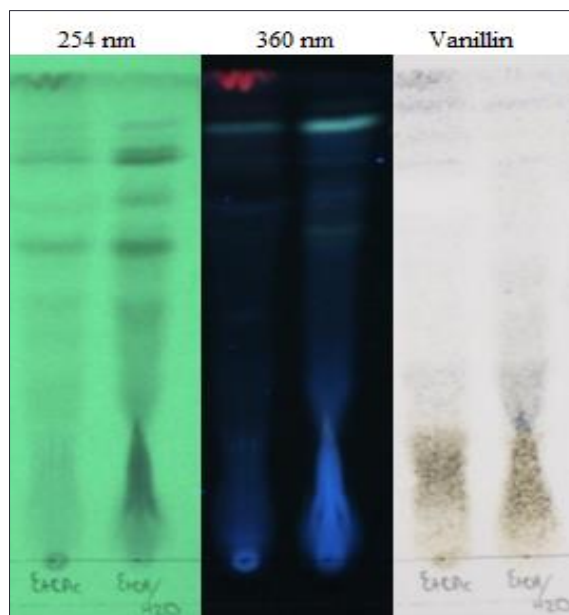
Το γράφημα της Εικόνας Γ.9 δείχνει ότι τα εκχυλίσματα που προήλθαν κατόπιν χρήσης ρητίνης προσρόφησης να παρουσιάζουν στη πλειοψηφία τους της μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση.



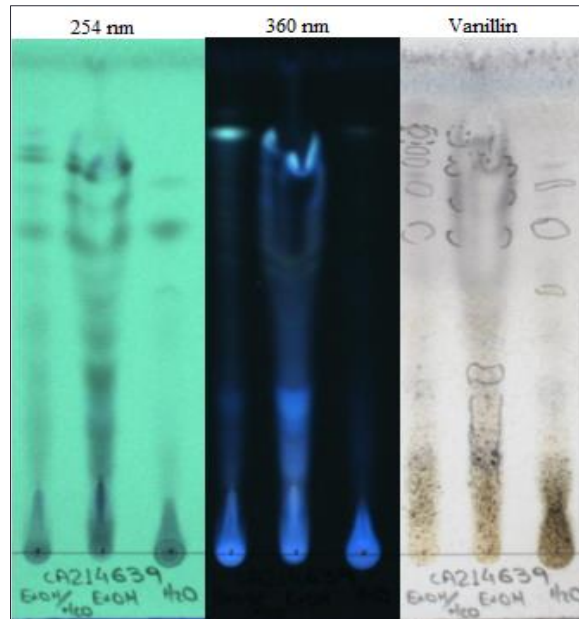
**Εικόνα Γ.9:** Γράφημα που καταδεικνύει το ποσοστό των εκχυλισμάτων που είχαν αντιοξειδωτική δράση

Σημειώνεται ότι τα εκχυλίσματα του n-Hex δεν παρουσίασαν καμία δράση όπως και ήταν αναμενόμενο, ενώ δεν επιτεύχθηκε σε όλες τις περιπτώσεις αύξηση της δραστηρότητας με τη χρήση ρητίνης προσρόφησης.

#### Γ.2.1.1 *Streptomyces glaucusporus* (CA-214639)



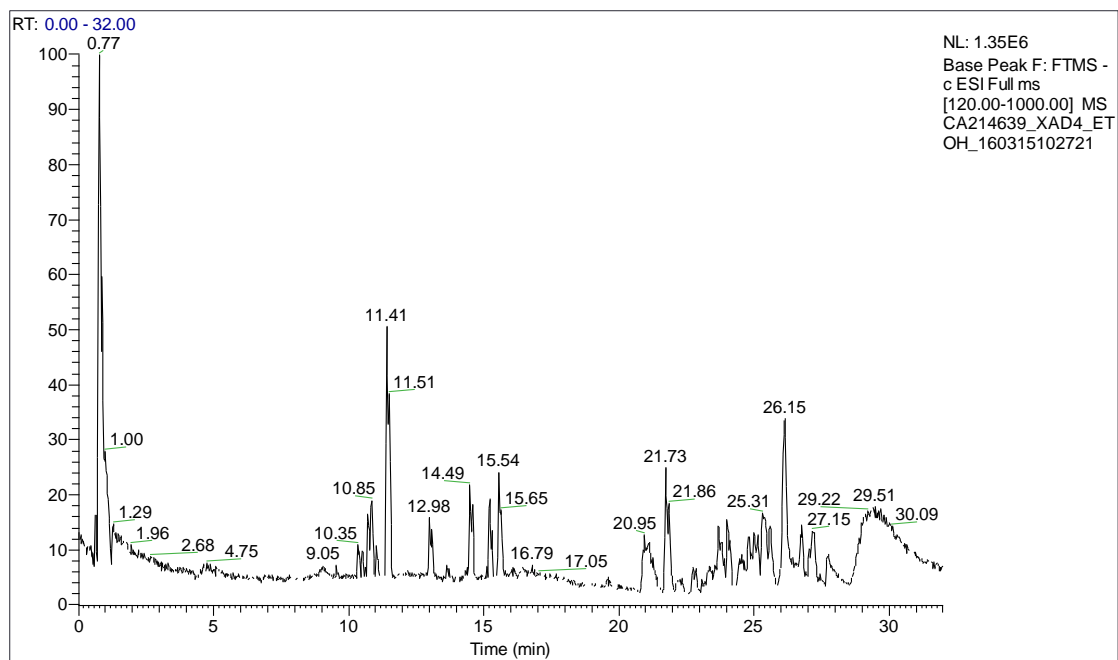
**Εικόνα Γ.10:** Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc και EtOH/H<sub>2</sub>O του CA-214639.



Εικόνα Γ.11: Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H<sub>2</sub>O και Xad-4 του CA-214639 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.

Πίνακας Γ.5: Βιολογική δράση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CA-214639

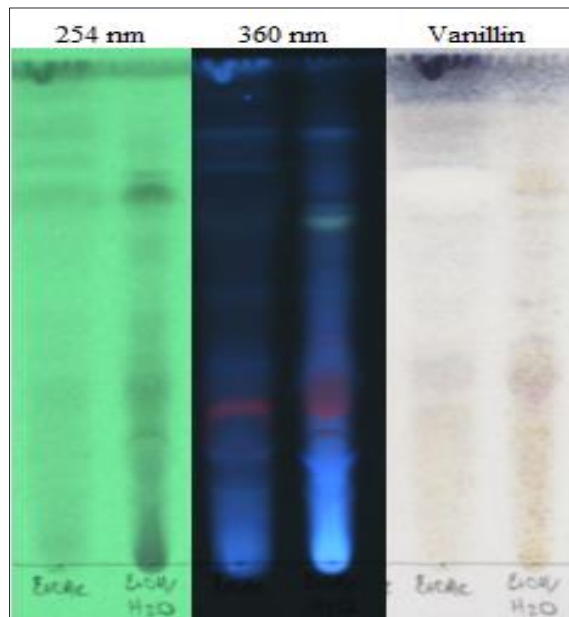
Πρωτόκολλο Εκχύλισης	Διαλύτης Εκχύλισης	Αντιοξειδωτική Δράση				Λευκαντική Δράση	
		DPPH (200 µg/ml)		ABTS (100 µg/ml)		(300 µg/ml)	
		% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV
1	EtOAc	5.17	0.46	71.92	0.08	<b><u>54.53</u></b>	<b><u>2.49</u></b>
	<b><u>EtOH/H<sub>2</sub>O</u></b>	5.19	0.68	<b><u>95.75</u></b>	<b><u>0.20</u></b>	36.68	4.93
4	EtOH/H <sub>2</sub> O	0.62	1.09	28.07	1.02	23.70	3.06
	Xad4	4.80	0.26	45.47	0.29	33.70	0.53



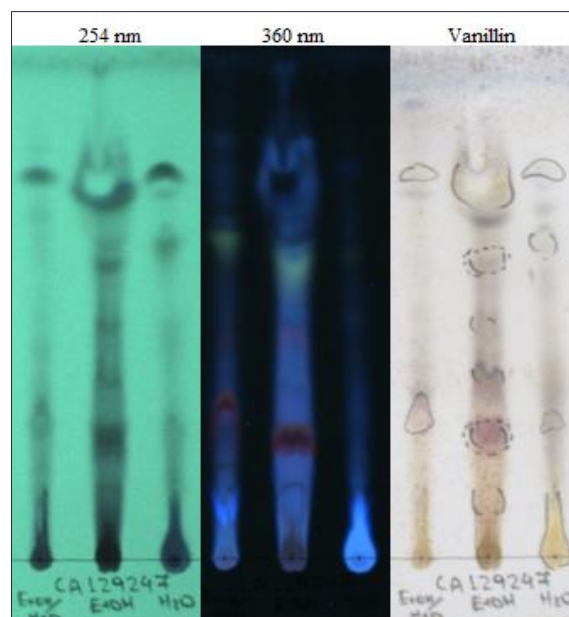
**Εικόνα Γ.12:** Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος Χαδ-4 του CA-214639



Γ.2.1.2 *Streptomyces purpurascens* (CA-129247)



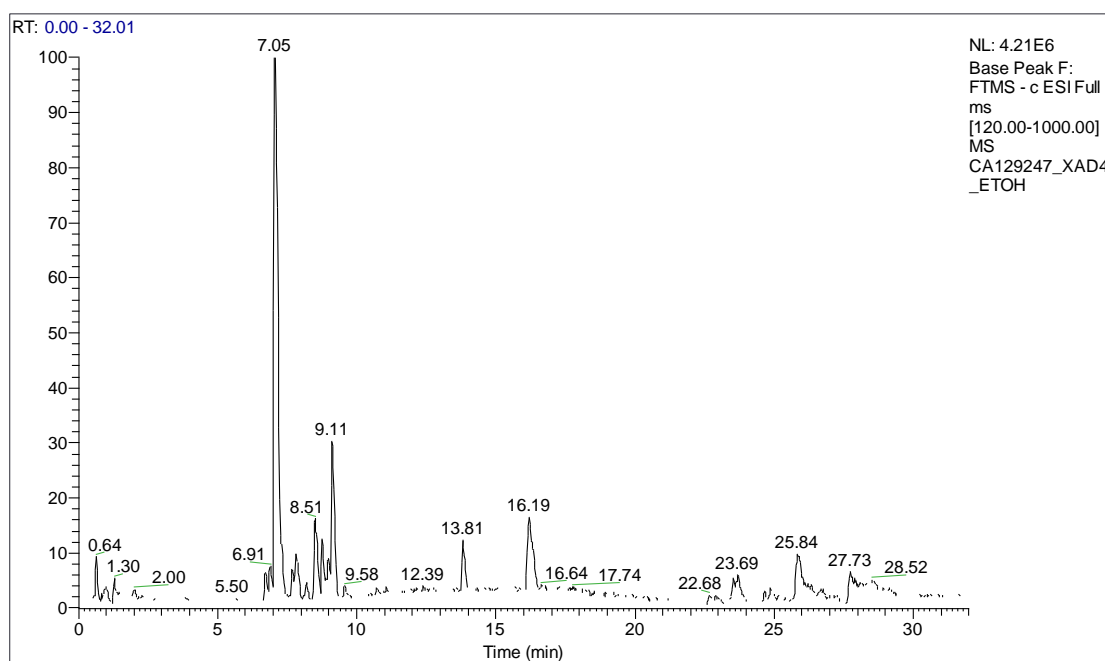
**Εικόνα Γ.13:** Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc και EtOH/H<sub>2</sub>O του CA-129247.



**Εικόνα Γ.14:** Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H<sub>2</sub>O και Xad-4 του CA-129247 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.

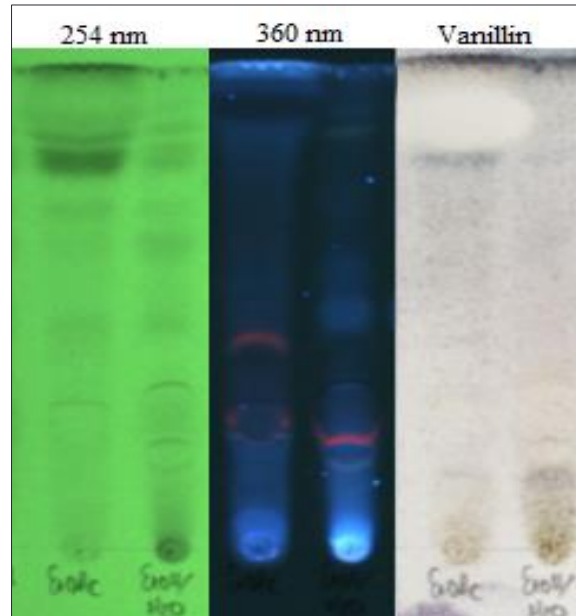
Πίνακας Γ.6: Βιολογική δράση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CA-129247

Πρωτόκολλο Εκχύλισης	Διαλύτης Εκχύλισης	Αντιοξειδωτική Δράση				Λευκαντική Δράση	
		DPPH (200 µg/ml)		ABTS (100 µg/ml)		(300 µg/ml)	
		% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV
1	<u>EtOAc</u>	17.02	3.57	71.92	0.08	<u>55.65</u>	<u>7.42</u>
	EtOH/H <sub>2</sub> O	35.67	3.25	<u>95.75</u>	<u>0.20</u>	45.34	2.70
4	EtOH/H <sub>2</sub> O	38.10	1.18	93.25	0.18	29.41	0.94
	<u>Xad4</u>	<u>66.70</u>	<u>0.12</u>	<u>96.03</u>	<u>0.66</u>	<u>54.88</u>	<u>1.14</u>

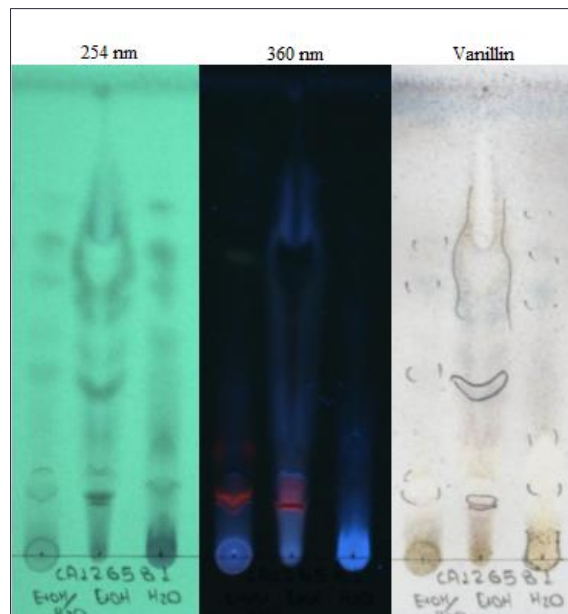


Εικόνα Γ.15: Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος Xad-4 του CA-129247

Γ.2.1.3 *Streptomyces chartreusis* (CA-126581)



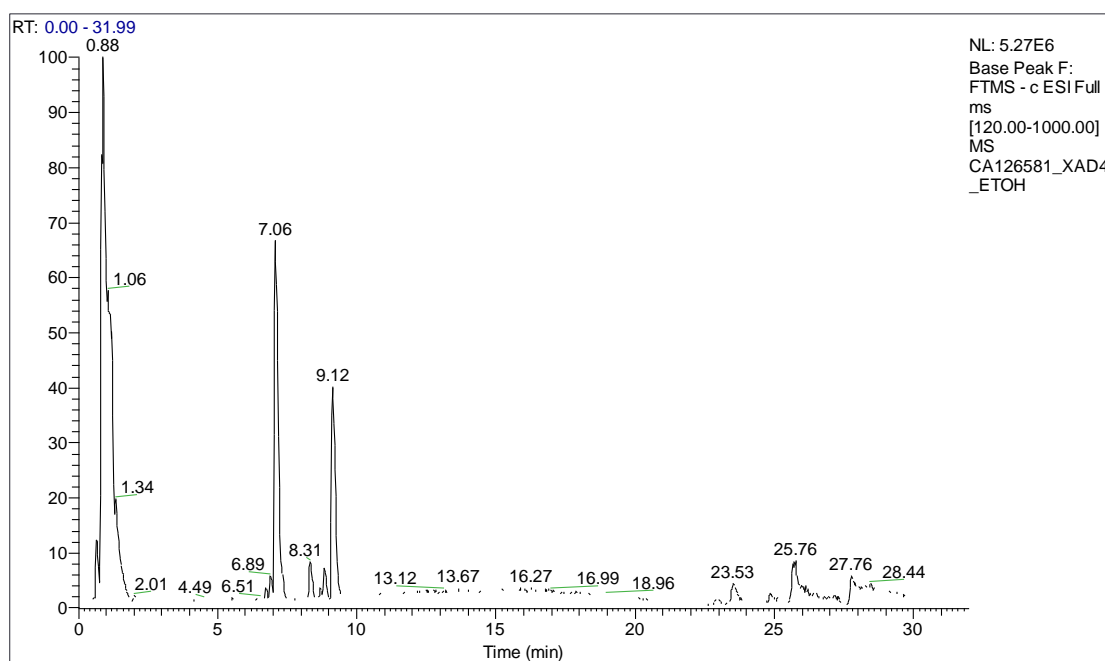
**Εικόνα Γ.16:** Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc και EtOH/H<sub>2</sub>O του CA-126581.



**Εικόνα Γ.17:** Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H<sub>2</sub>O και Xad-4 του CA-126581 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.

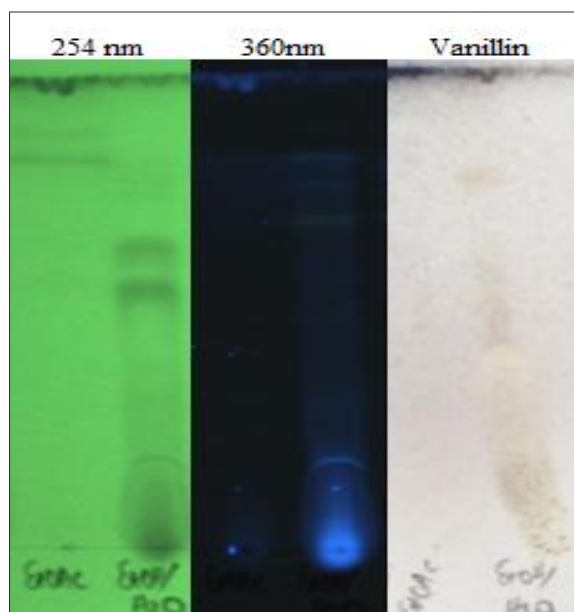
Πίνακας Γ.7: Βιολογική δράση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CA-126581

Πρωτόκολλο Εκχύλισης	Διαλύτης Εκχύλισης	Αντιοξειδωτική Δράση				Λευκαντική Δράση	
		DPPH (200 µg/ml)		ABTS (100 µg/ml)		(300 µg/ml)	
		% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV
1	<u>EtOAc</u>	15.24	1.40	87.24	0.53	<u>60.23</u>	<u>1.48</u>
	<u>EtOH/H2O</u>	7.57	5.87	75.24	0.82	<u>55.88</u>	<u>13.31</u>
4	EtOH/H2O	12.00	0.68	39.52	0.99	34.16	4.21
	<u>Xad4</u>	<u>43.69</u>	<u>1.42</u>	<u>89.78</u>	<u>0.41</u>	<u>53.81</u>	<u>1.27</u>

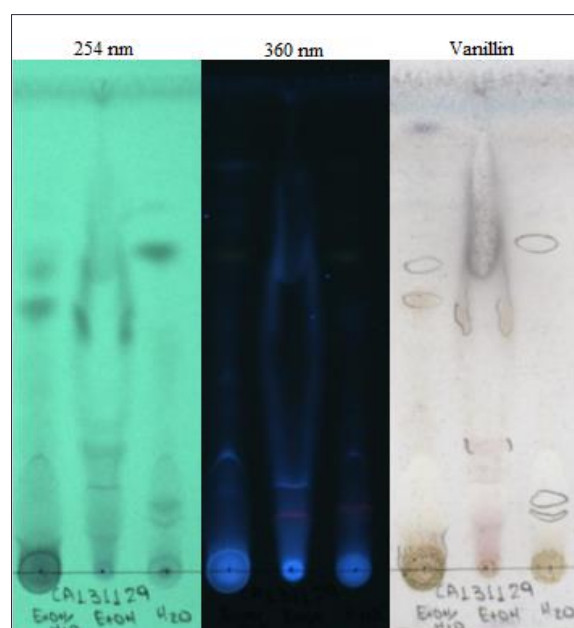


Εικόνα Γ.18: Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος Xad-4 του CA-126581

Γ.2.1.4 *Streptomyces tendae* (CA-131129)



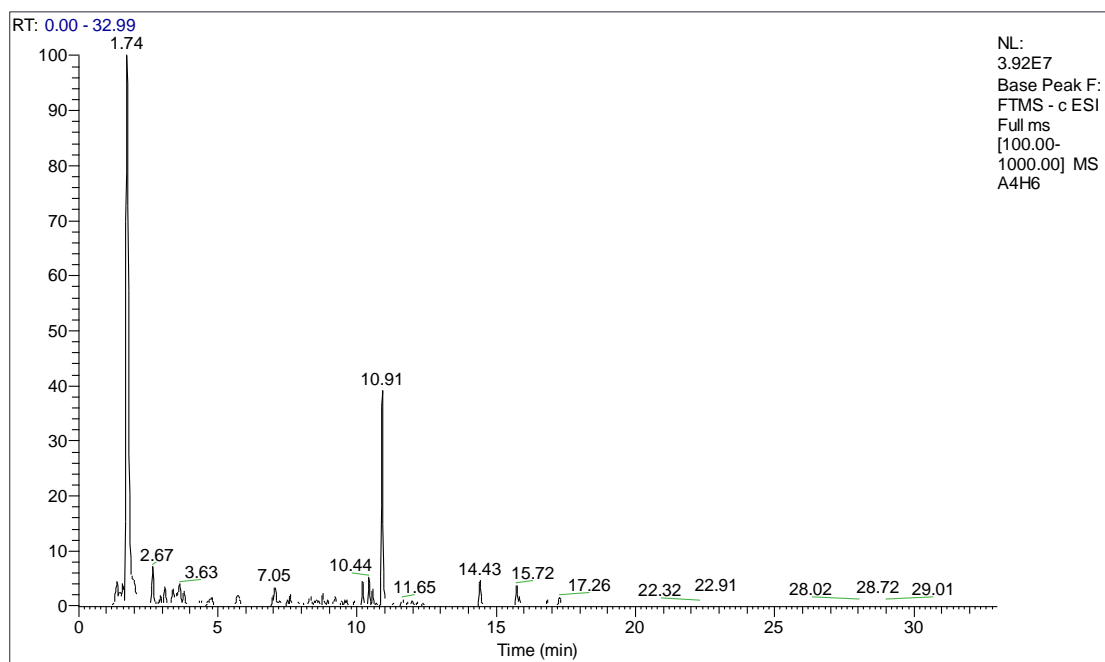
**Εικόνα Γ.19:** Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc και EtOH/H<sub>2</sub>O του CA-131129.



**Εικόνα Γ.20:** Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H<sub>2</sub>O και Xad-4 του CA-131129 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.

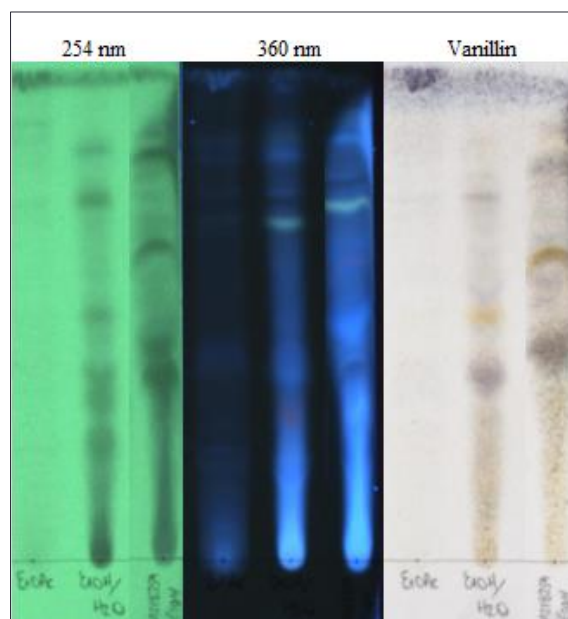
**Πίνακας Γ.8:** Βιολογική δράση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CA-131129

Πρωτόκολλο Εκχύλισης	Διαλύτης Εκχύλισης	Αντιοξειδωτική Δράση				Λευκαντική Δράση	
		DPPH (200 µg/ml)		ABTS (100 µg/ml)		(300 µg/ml)	
		% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV
1	<u>EtOAc</u>	0.82	0.62	27.89	2.31	<u>79.08</u>	<u>6.18</u>
	EtOH/H <sub>2</sub> O	-0.14	0.53	64.23	1.21	38.76	3.14
4	EtOH/H <sub>2</sub> O	-1.72	0.58	30.38	0.67	27.43	2.51
	Xad4	-1.23	0.60	35.64	0.34	32.70	1.24

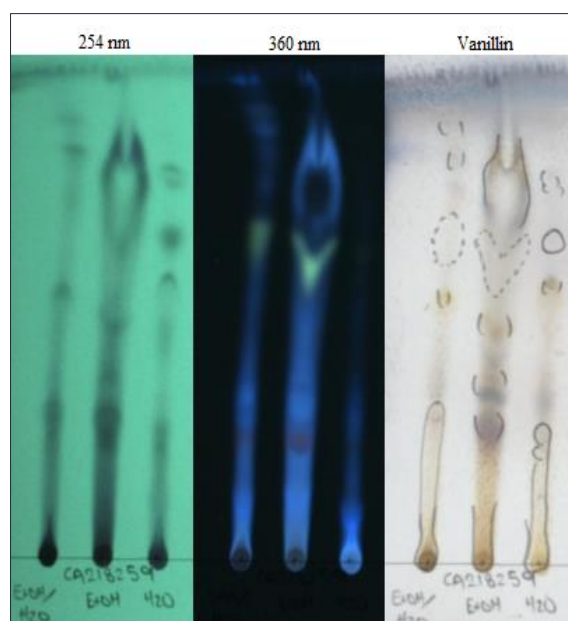


**Εικόνα Γ.21:** Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος του CA-131129

Γ.2.1.5 *Streptomyces spinoverrucosus* (CA-218259)



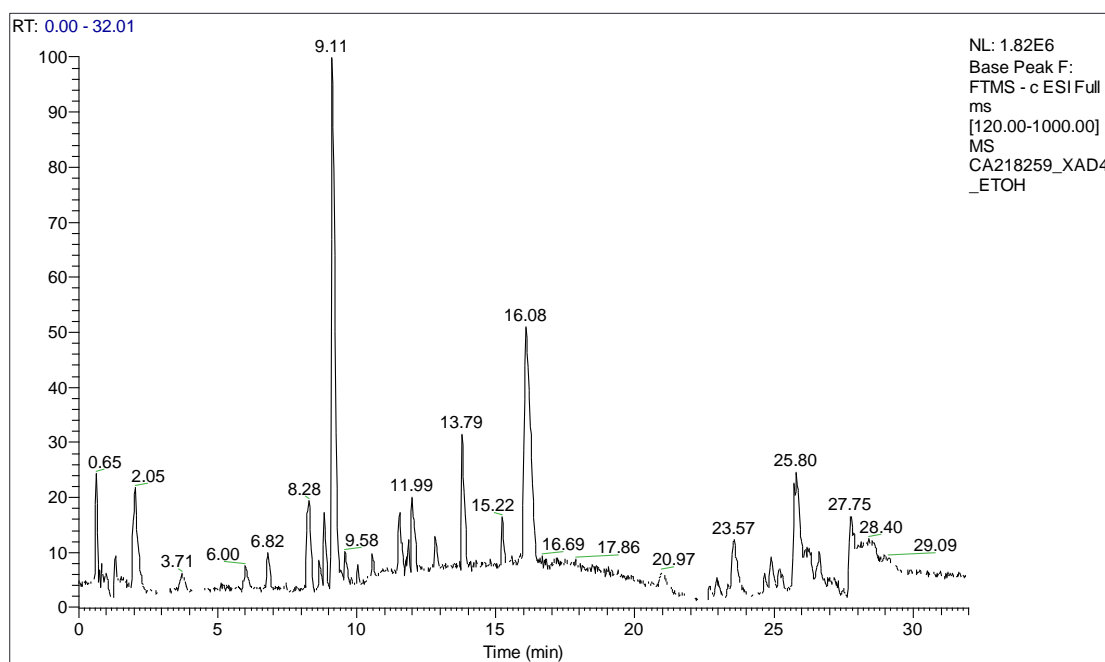
**Εικόνα Γ.22:** Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc, EtOH/H<sub>2</sub>O και EtOH του CA-218259.



**Εικόνα Γ.23:** Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H<sub>2</sub>O και Xad-4 του CA-218259 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.

Πίνακας Γ.9: Βιολογική δράση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CA-218259

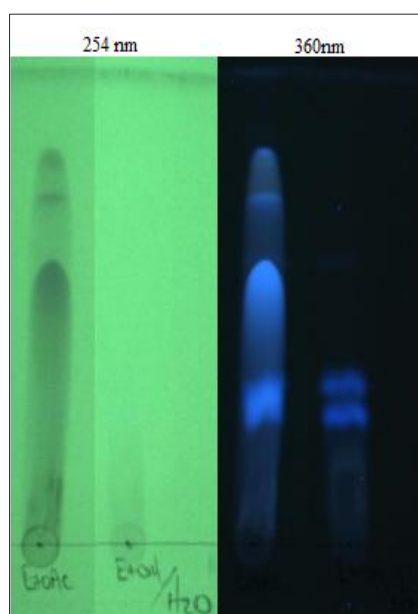
Πρωτόκολλο Εκχύλισης	Διαλύτης Εκχύλισης	Αντιοξειδωτική Δράση				Λευκαντική Δράση	
		DPPH (200 µg/ml)		ABTS (100 µg/ml)		(300 µg/ml)	
		% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV
1	<u>EtOAc</u>	3.43	1.91	44.51	2.86	<u>50.52</u>	<u>13.16</u>
	<u>EtOH/H2O</u>	14.12	0.36	<u>96.57</u>	<u>1.30</u>	36.17	5.74
3	EtOH	26.21	0.22	74.37	1.10	30.59	7.20
4	EtOH/H2O	14.79	0.37	79.21	0.81	28.71	1.85
	Xad4	31.36	0.26	86.37	0.03	40.82	3.30



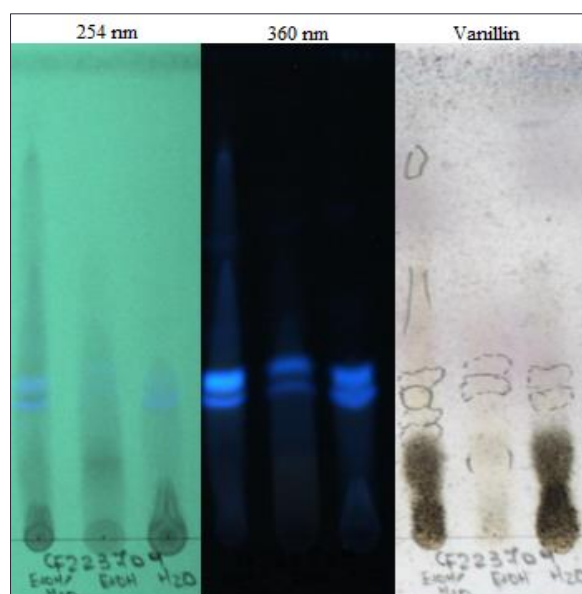
Εικόνα Γ.24: Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος Xad-4 του CA-218259



Γ.2.1.6 *Cercospora* sp. (CF-223709)



Εικόνα Γ.25: Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc και EtOH/H<sub>2</sub>O του CF-223709.

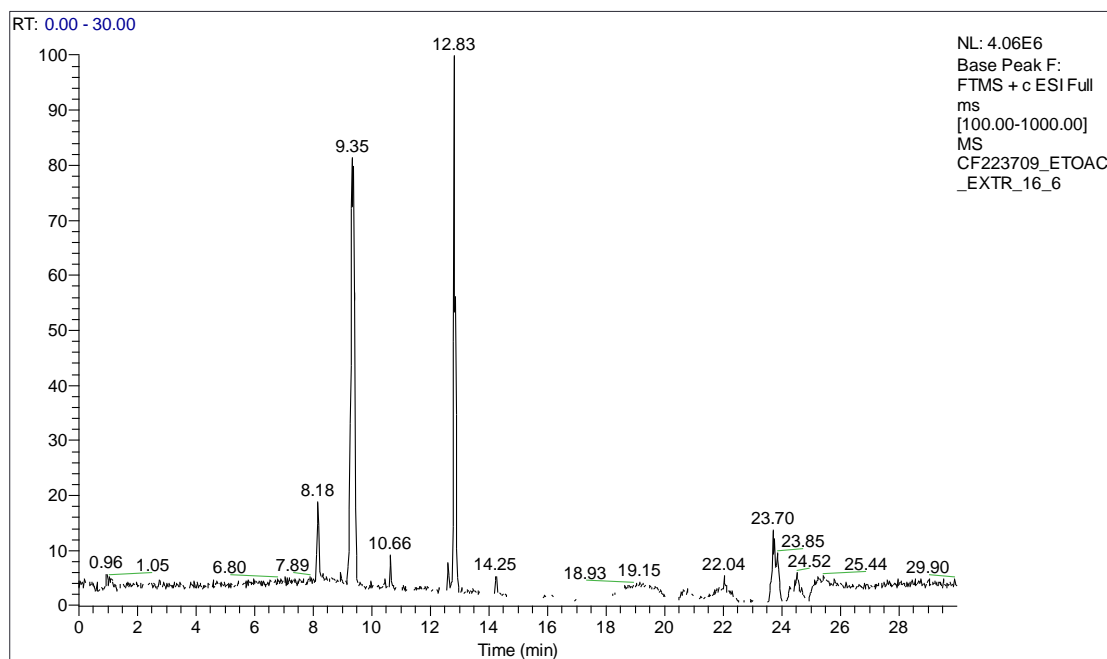


Εικόνα Γ.26: Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H<sub>2</sub>O και Xad-4 του CF-223709 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.

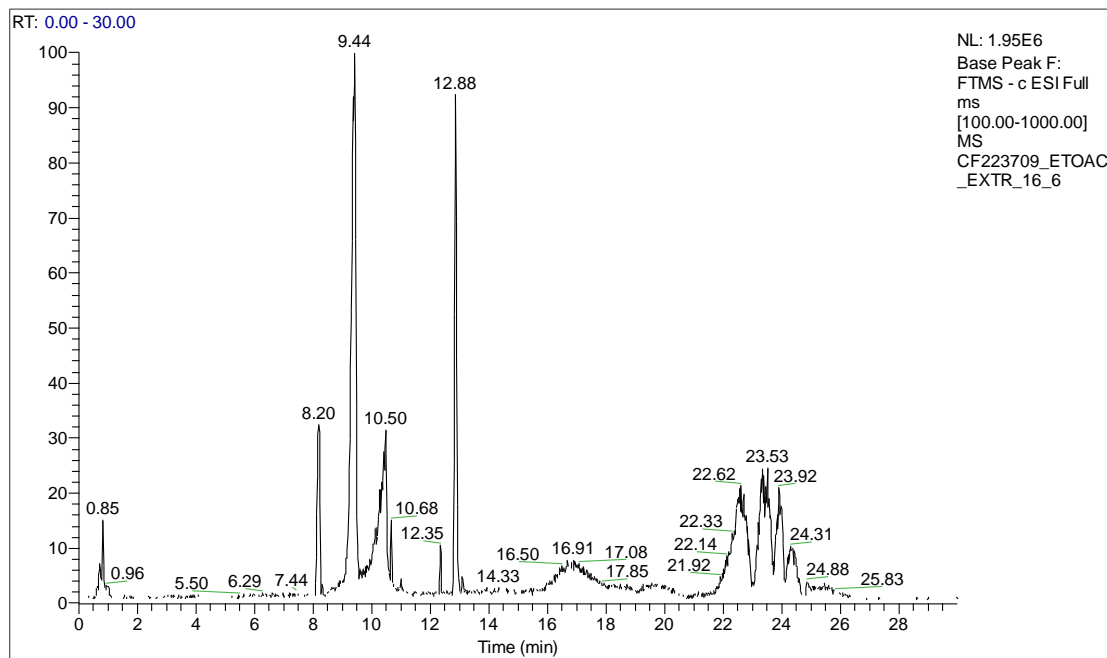
Πίνακας Γ.10: Βιολογική δράση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CF-223709

Πρωτόκολλο Εκχύλισης	Διαλύτης Εκχύλισης	Αντιοξειδωτική Δράση				Λευκαντική Δράση	
		DPPH (200 µg/ml)		ABTS (100 µg/ml)		(300 µg/ml)	
		% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV
1	<b>EtOAc</b>	<b>70.76</b>	<b>1.28</b>	<b>99.66</b>	<b>0.10</b>	17.36	2.25
	EtOH/H <sub>2</sub> O	26.86	0.34	38.06	1.43	23.20	1.53
4	EtOH/H <sub>2</sub> O	23.32	2.79	45.49	7.65	27.82	1.82
	<b>Xad4</b>	<b>62.83</b>	<b>1.26</b>	<b>99.55</b>	<b>0.03</b>	35.19	0.66

Όντας το στέλεχος με την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, επιλέχθηκε για περαιτέρω μελέτη. Η βιοκατευθυνόμενη απομόνωση και ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών του, περιγράφονται στην ενότητα Γ.2.



**Εικόνα Γ.27:** Χρωματογράφημα ESI(+) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα του CF-223709



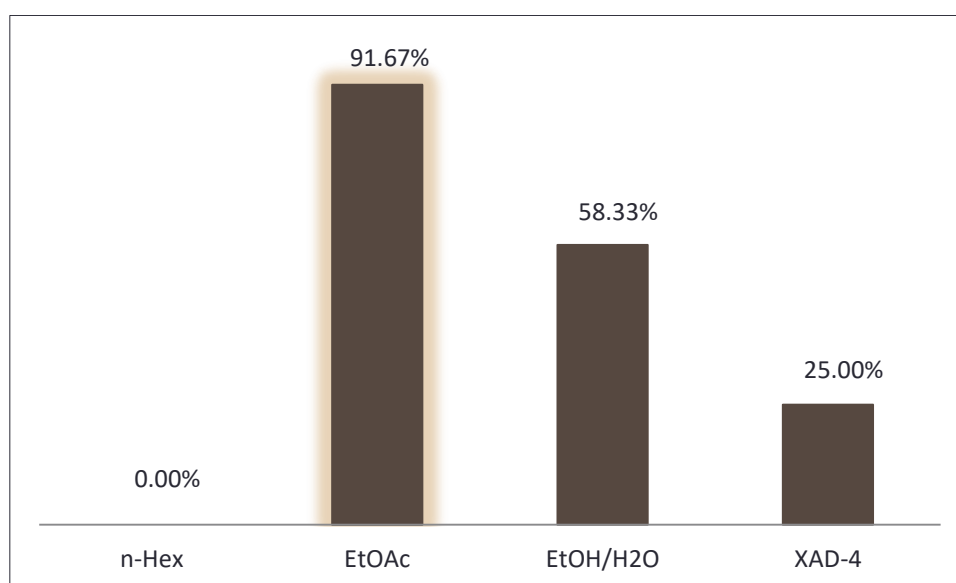
**Εικόνα Γ.28:** Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος του οξικού αιθυλεστέρα του CF-223709

## Γ.2.2 ΣΤΕΛΕΧΗ ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΑ ΓΙΑ ΛΕΥΚΑΝΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ

Στις παρακάτω παραγράφους δίνονται αναλυτικά τα χημικά προφίλ των εκχυλισμάτων που παρήχθησαν καθώς και η βιολογική τους δράση.

Από τα 6 επιλεχθέντα για λευκαντική δράση στελέχη, όλα επιβεβαίωσαν την δράση τους κατά την ανακαλλιέργεια τους στο 1 L, ενώ κανένα από αυτά δεν παρουσίασε αντιοξειδωτική δράση.

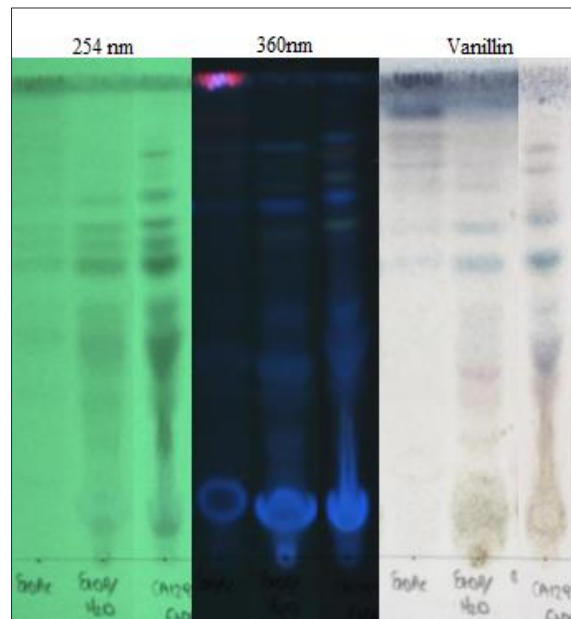
Το γράφημα της Εικόνας Γ.29 δείχνει την κατανομή της δραστηριότητας των διαφορετικών εκχυλισμάτων που παρήχθησαν, με τα εκχυλίσματα του οξικού αιθυλεστέρα να παρουσιάζουν στη πλειοψηφία τους της υψηλότερη λευκαντική δράση.



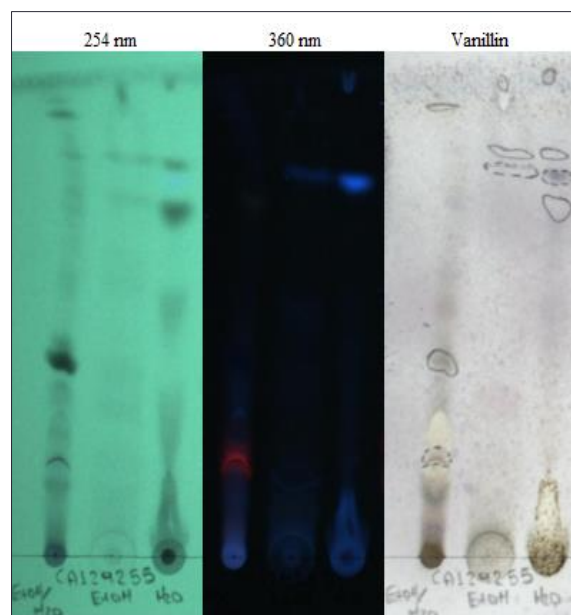
**Εικόνα Γ.29:** Γράφημα που καταδεικνύει το ποσοστό των εκχυλισμάτων που είχαν λευκαντική δράση

Σημειώνεται ότι τα εκχυλίσματα του n-Hex δεν παρουσίασαν καμία δράση όπως και ήταν αναμενόμενο, ενώ δεν επιτεύχθηκε σε όλες τις περιπτώσεις αύξηση της δραστηριότητας με τη χρήση ρητίνης προσρόφησης.

Γ.2.2.1 *Micromonospora humi* (CA-129255)



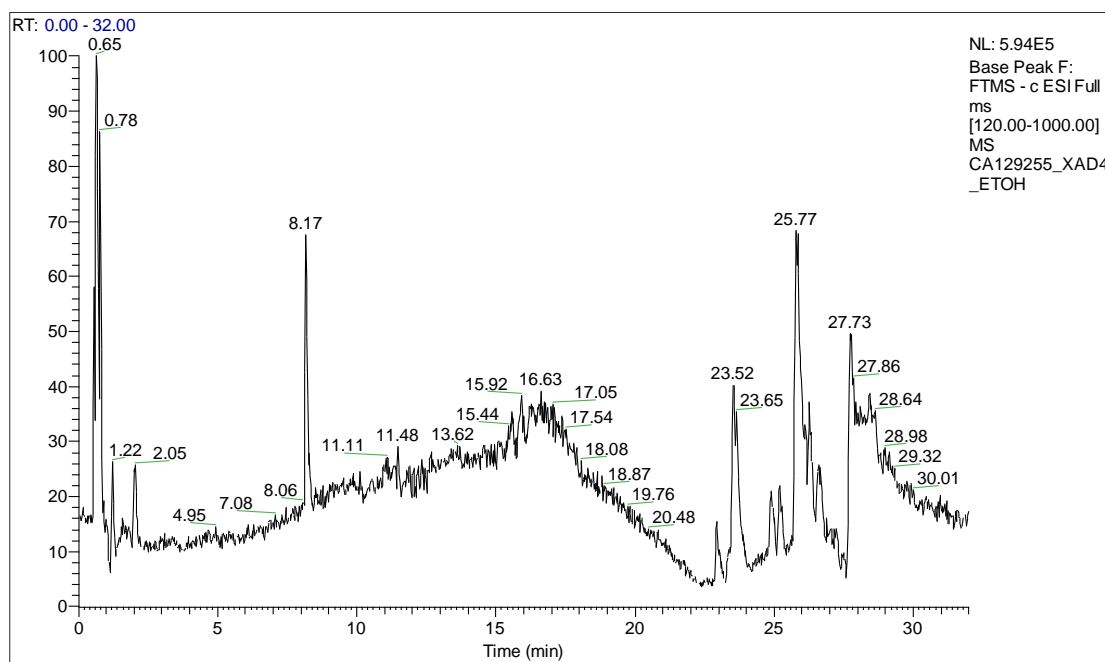
**Εικόνα Γ.30:** Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc, EtOH/H<sub>2</sub>O και EtOH του CA-129255.



**Εικόνα Γ.31:** Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H<sub>2</sub>O και Xad-4 του CA-129255 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.

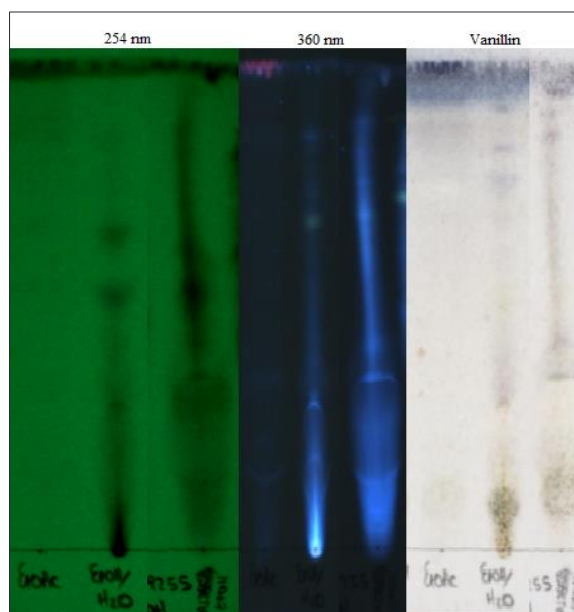
Πίνακας Γ.11: Βιολογική δράση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CA-129255

Πρωτόκολλο Εκχύλισης	Διαλύτης Εκχύλισης	Αντιοξειδωτική Δράση				Λευκαντική Δράση	
		DPPH (200 µg/ml)		ABTS (100 µg/ml)		(300 µg/ml)	
		% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV
1	<u>EtOAc</u>	5.42	0.85	18.29	2.26	<u>66.00</u>	<u>12.73</u>
	EtOH/H <sub>2</sub> O	6.27	0.70	20.79	1.46	44.80	14.16
3	EtOH	7.93	0.26	15.94	1.82	34.64	6.16
4	EtOH/H <sub>2</sub> O	0.39	1.07	26.75	1.41	-	-
	Xad4	9.66	8.57	34.43	0.66	39.42	0.44

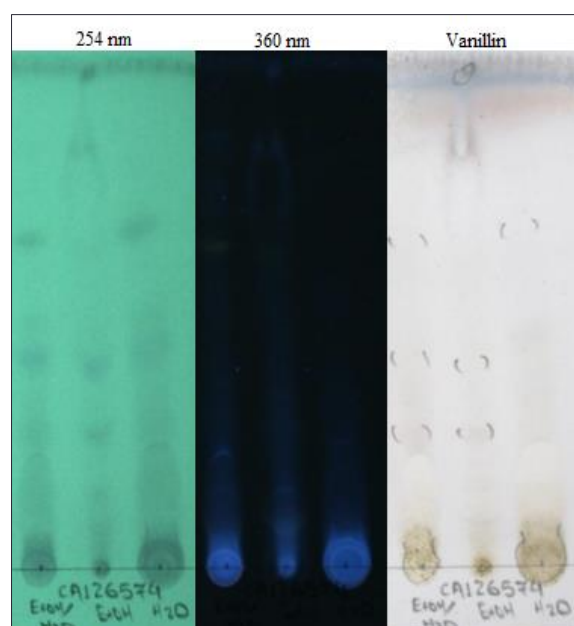


Εικόνα Γ.32: Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος Xad-4 του CA-129255

Γ.2.2.2 *Amycolatopsis kentuckyensis* (CA-126574)



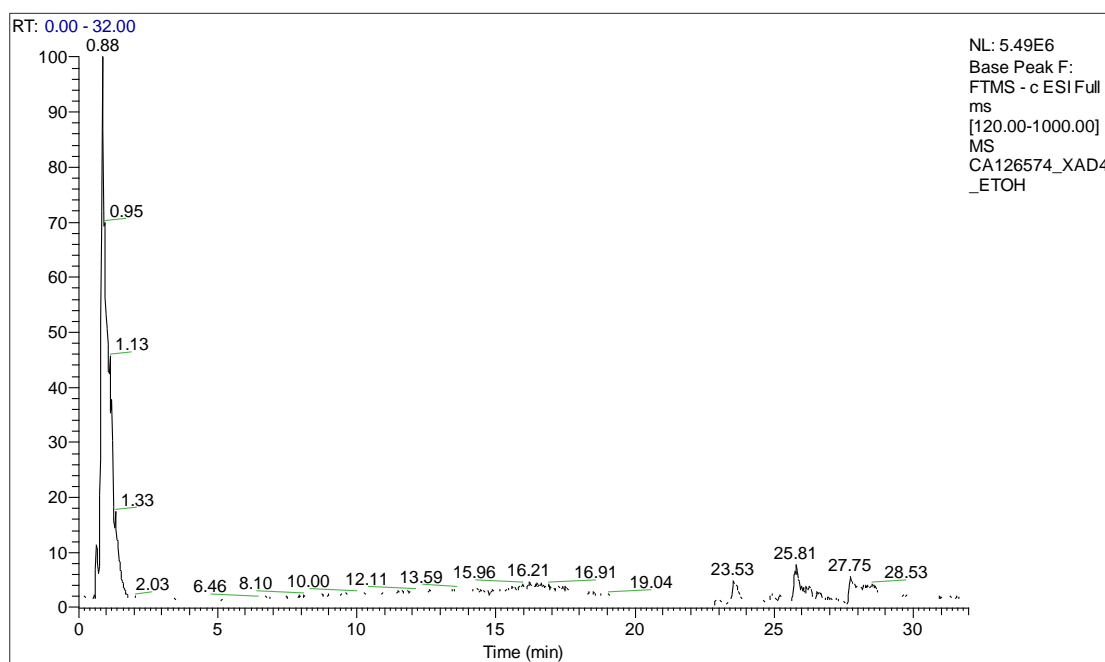
**Εικόνα Γ.33:** Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc, EtOH/H<sub>2</sub>O και EtOH του CA-126574.



**Εικόνα Γ.34:** Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H<sub>2</sub>O και Xad-4 του CA-126574 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.

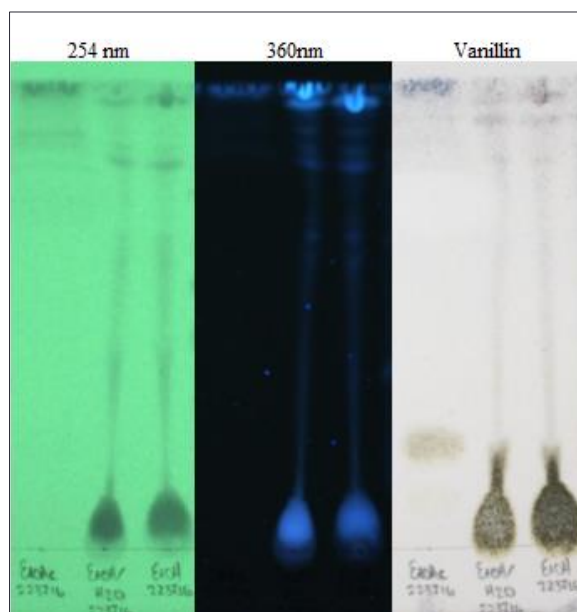
**Πίνακας Γ.12:** Βιολογική δράση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CA-126574

Πρωτόκολλο Εκχύλισης	Διαλύτης Εκχύλισης	Αντιοξειδωτική Δράση				Λευκαντική Δράση	
		DPPH (200 μg/ml)		ABTS (100 μg/ml)		(300 μg/ml)	
		% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV
1	<u>EtOAc</u>	5.95	0.46	31.57	1.39	<u>73.20</u>	<u>5.99</u>
	EtOH/H <sub>2</sub> O	4.84	0.22	58.71	2.11	48.36	5.99
3	EtOH	4.51	0.47	32.43	0.88	28.44	4.26
4	EtOH/H <sub>2</sub> O	-1.59	1.06	38.72	0.72	18.08	2.44
	Xad4	-2.29	0.51	30.87	0.64	26.88	0.94

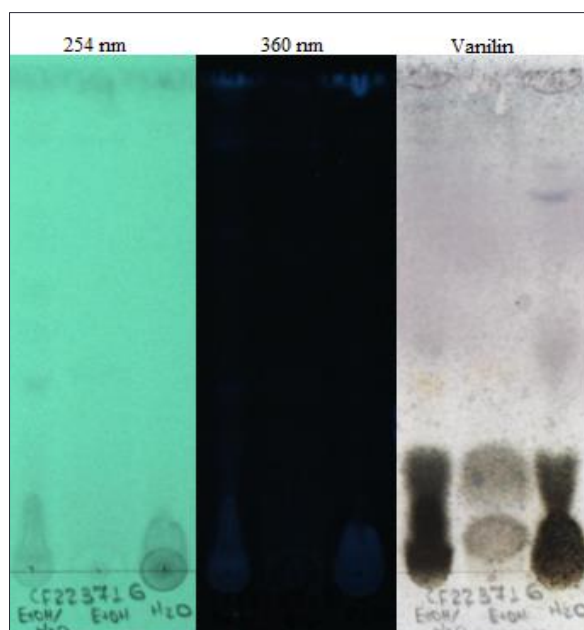


**Εικόνα Γ.35:** Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος Xad-4 του CA-126574

Γ.2.2.3 *Rhizopycnis vagum* (CF-223716)



**Εικόνα Γ.36:** Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc, EtOH/H<sub>2</sub>O και EtOH του CF-223716.

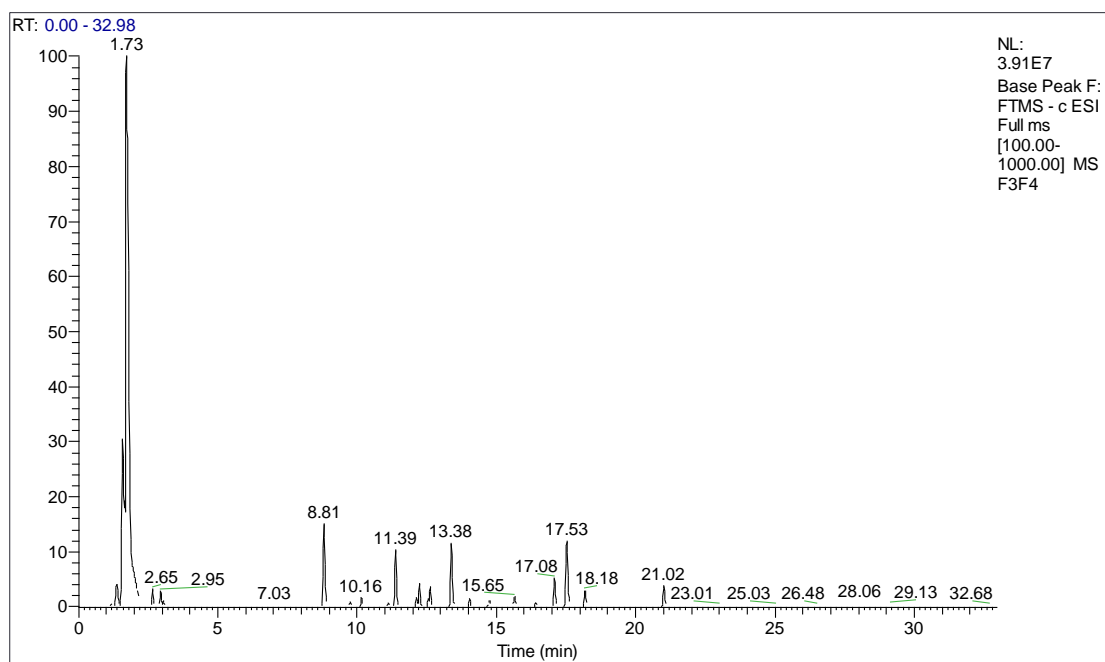


**Εικόνα Γ.37:** Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H<sub>2</sub>O και Xad-4 του CF-223716 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.



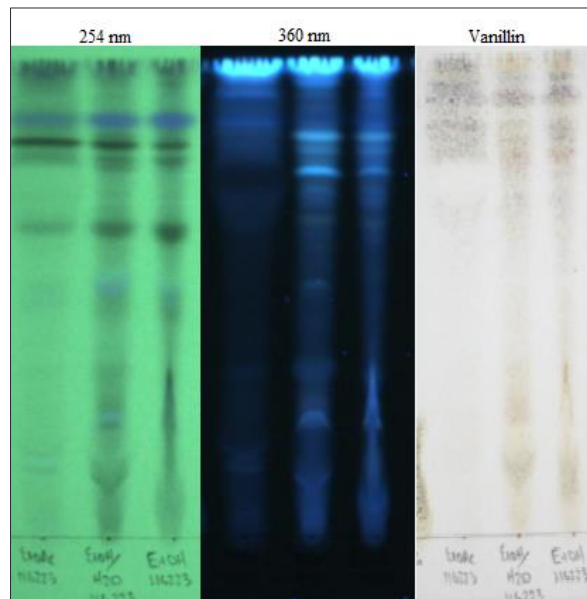
**Πίνακας Γ.13:** Βιολογική δράση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CF-223716

Πρωτόκολλο Εκχύλισης	Διαλύτης Εκχύλισης	Αντιοξειδωτική Δράση				Λευκαντική Δράση	
		DPPH (200 µg/ml)		ABTS (100 µg/ml)		(300 µg/ml)	
		% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV
1	<u>EtOAc</u>	5.82	0.55	4.84	1.03	<u>69.55</u>	<u>1.09</u>
	EtOH/H <sub>2</sub> O	4.99	0.26	3.17	1.01	49.57	8.59
3	EtOH	3.26	0.59	2.34	1.66	35.79	4.62
4	EtOH/H <sub>2</sub> O	2.20	4.45	3.62	0.77	35.92	4.52
	Xad4	-0.37	0.31	5.55	1.28	30.34	3.63

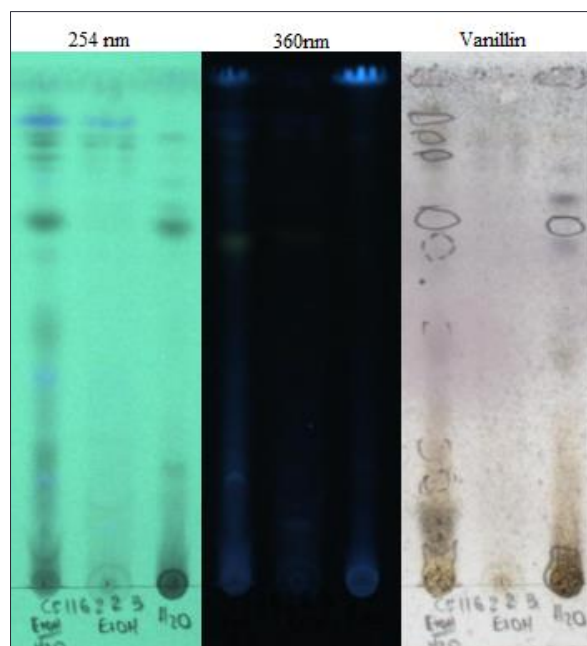


**Εικόνα Γ.38:** Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος του CF-223716

Γ.2.2.4 *Ascochyutulina* sp. (CF-116223)



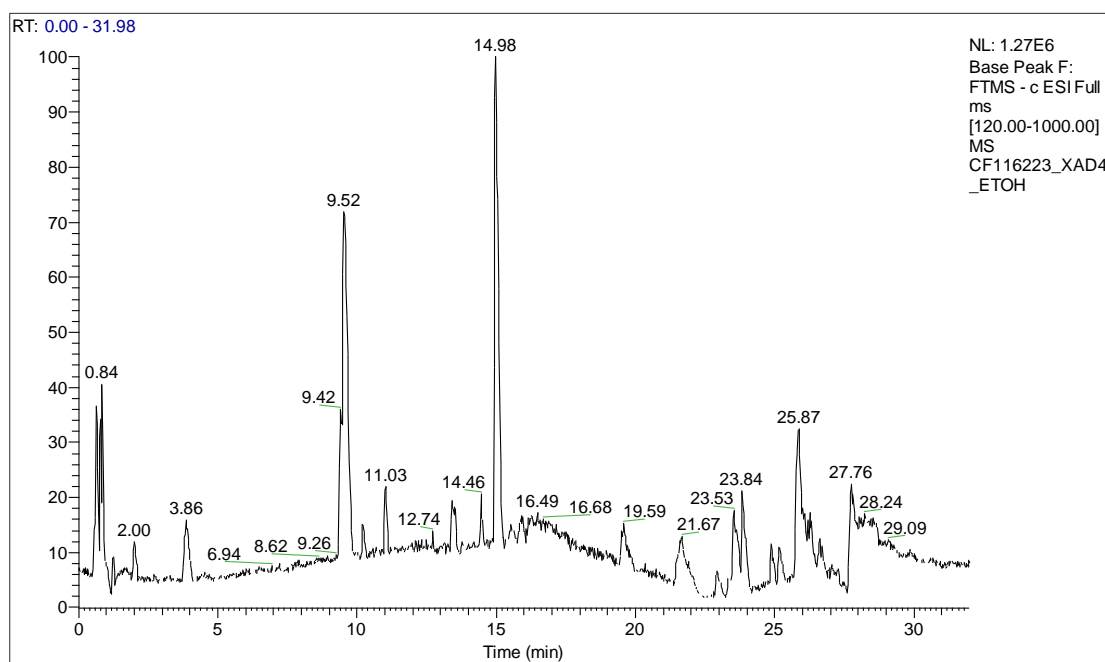
Εικόνα Γ.39: Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc, EtOH/H<sub>2</sub>O και EtOH του CF-116223.



Εικόνα Γ.40: Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H<sub>2</sub>O και Xad-4 του CF-116223 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.

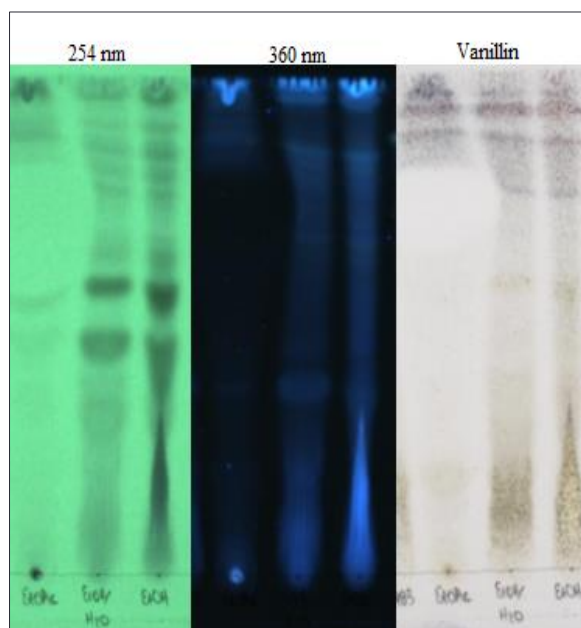
**Πίνακας Γ.14:** Βιολογική δράση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CF-116223

Πρωτόκολλο Εκχύλισης	Διαλύτης Εκχύλισης	Αντιοξειδωτική Δράση				Λευκαντική Δράση	
		DPPH (200 µg/ml)		ABTS (100 µg/ml)		(300 µg/ml)	
		% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV
1	<u>EtOAc</u>	6.36	0.18	26.53	0.51	<u>50.69</u>	<u>8.72</u>
	EtOH/H <sub>2</sub> O	10.49	0.16	65.60	0.79	32.16	1.48
3	EtOH	8.16	0.46	14.59	0.62	32.01	2.43
4	EtOH/H <sub>2</sub> O	4.29	0.75	39.17	0.59	-	-
	Xad4	6.72	0.31	39.83	1.13	33.28	1.40

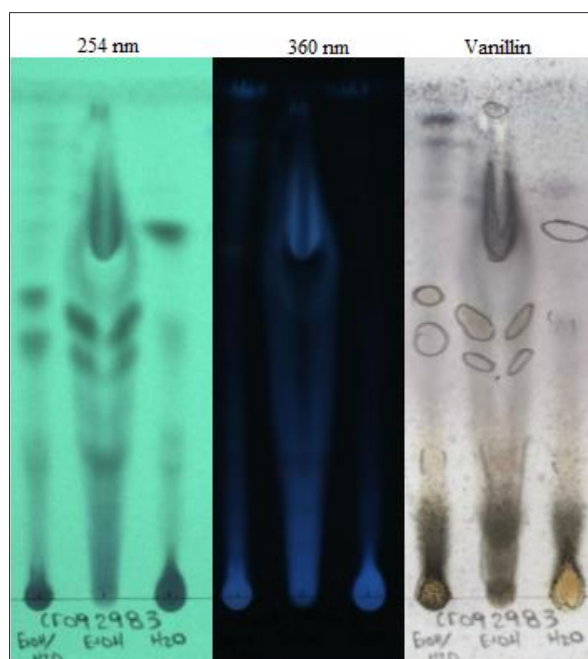


**Εικόνα Γ.41:** Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος Xad-4 του CF-116223

Γ.2.2.5 *Bjerkandera adusta* (CF-092983)



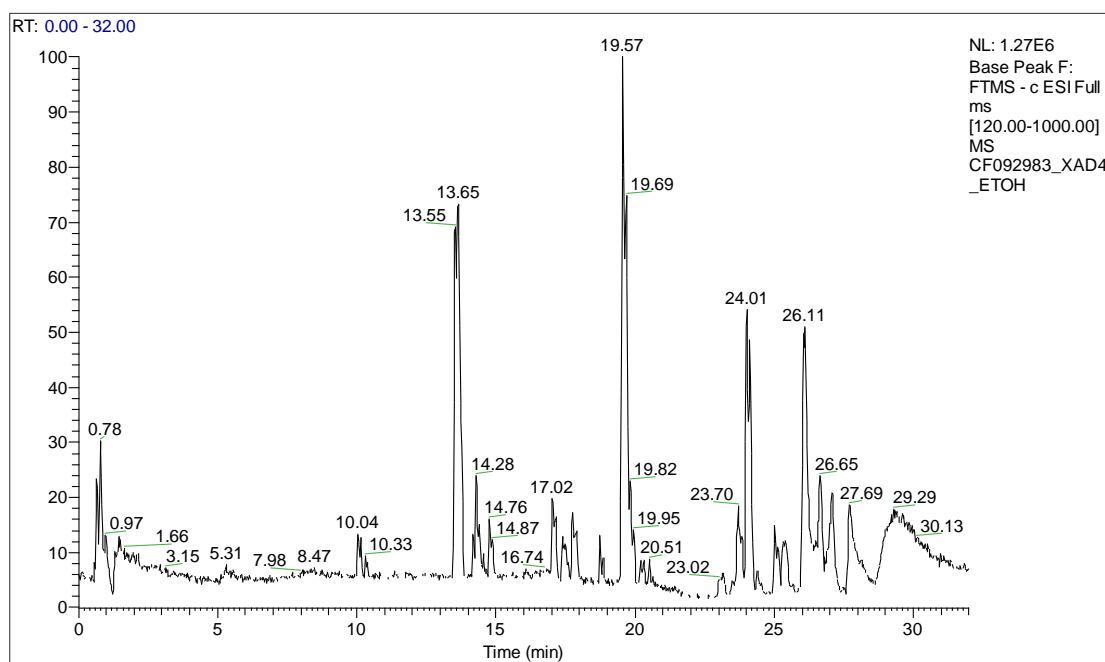
**Εικόνα Γ.42:** Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc, EtOH/H<sub>2</sub>O και EtOH του CF-092983.



**Εικόνα Γ.43:** Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H<sub>2</sub>O και Xad-4 του CF-092983 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.

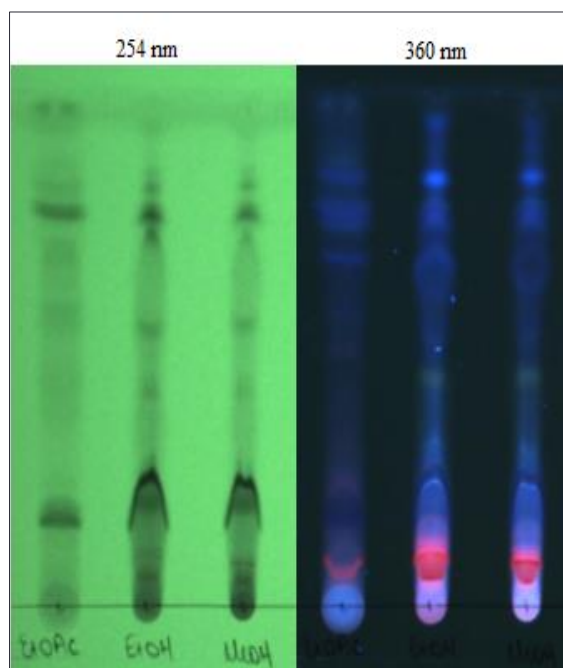
Πίνακας Γ.15: Βιολογική δράση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CF-092983

Πρωτόκολλο Εκχύλισης	Διαλύτης Εκχύλισης	Αντιοξειδωτική Δράση				Λευκαντική Δράση	
		DPPH (200 µg/ml)		ABTS (100 µg/ml)		(300 µg/ml)	
		% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV
1	<u>EtOAc</u>	4.20	0.19	29.63	4.06	<u>56.38</u>	<u>8.97</u>
	EtOH/H <sub>2</sub> O	5.41	0.13	56.99	3.91	49.30	3.37
3	EtOH	4.68	0.56	19.67	0.79	42.33	5.91
4	EtOH/H <sub>2</sub> O	-1.22	0.52	38.45	0.53	36.14	1.34
	Xad4	-1.23	0.64	28.23	0.29	47.32	1.34

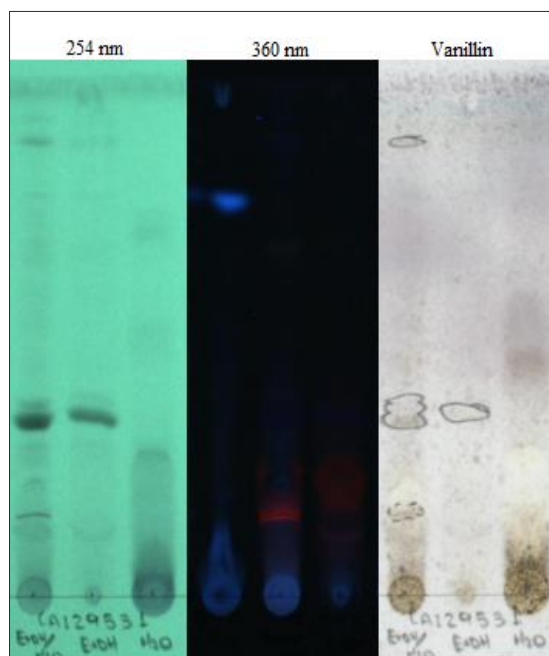


Εικόνα Γ.44: Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος Xad-4 του CF-092983

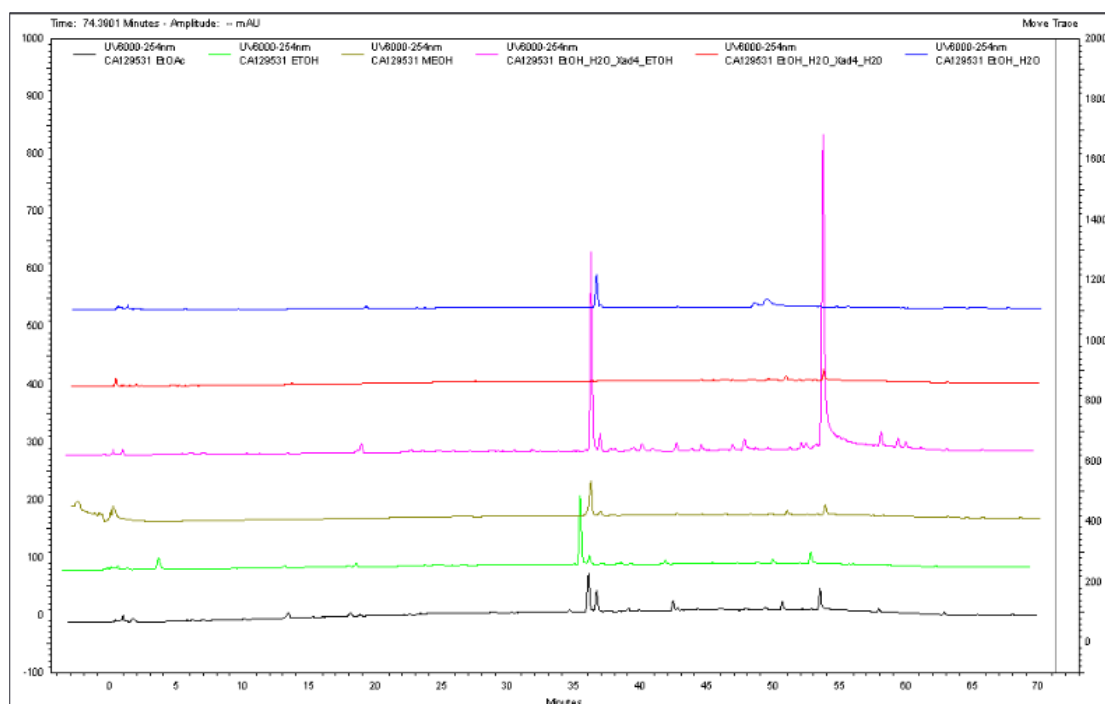
Γ.2.2.6 *Streptomyces hygroscopicus angustimyceticus* (CA-129531)



Εικόνα Γ.45: Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOAc, EtOH και MeOH του CA-129531.



Εικόνα Γ.46: Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) των εκχυλισμάτων EtOH/H<sub>2</sub>O και Xad-4 του CA-129531 για επιβεβαίωση της αποτελεσματικότητας της χρήσης ρητίνης προσρόφησης.



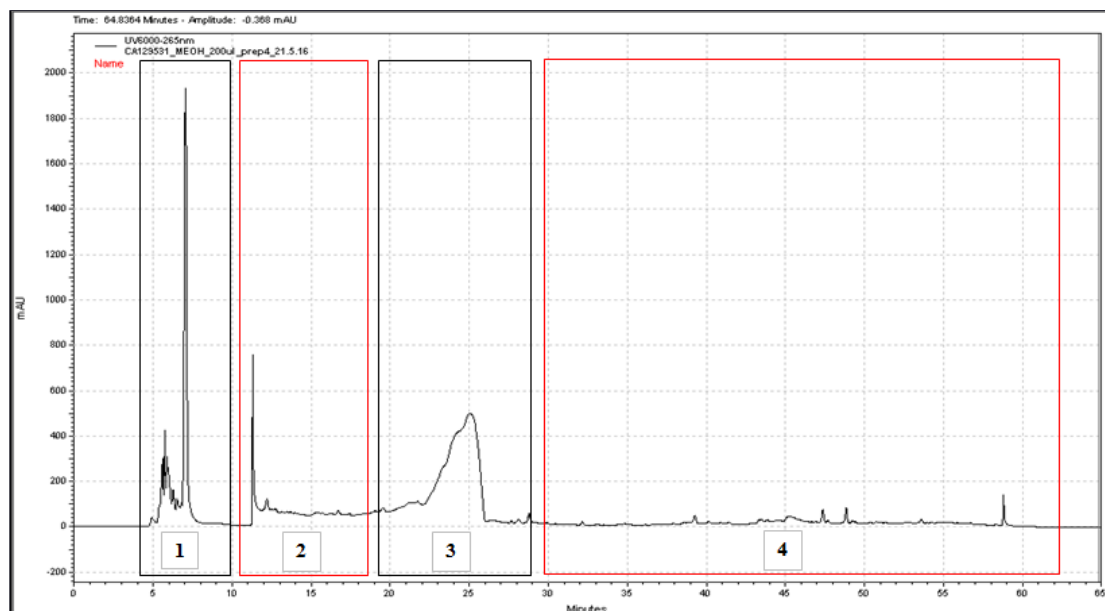
**Εικόνα Γ.47:** Χρωματογράφημα HPLC των εκχυλισμάτων του CA-129531(254 nm) βάσει των πειραματικών συνθηκών και του προγράμματος έκλουσης που περιγράφονται στους Πίνακες B.11 και B.12 αντίστοιχα.

Παρατηρήθηκε από την χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) καθώς και από την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) το παρόμοιο χημικό προφίλ των εκχυλισμάτων MeOH, EtOH και Xad-4. Αυτό το γεγονός, σε συνδυασμό με την παρόμοια λευκαντική δράση που παρουσίασαν τα άνωθεν εκχυλίσματα καθώς και την υψηλή απόδοση εκχύλισης που είχαν (Πίνακας B.7), οδήγησαν σε προκαταρκτικές προσπάθειες απομόνωσης των δευτερογενών μεταβολιτών που προκαλούν αυτή τη δράση. Με τη χρήση παρασκευαστικής TLC απομονώθηκε ο κύριος μεταβολίτης ο οποίος δεν παρουσίασε αξιόλογη λευκαντική δράση ( $12.92 \pm 0.65$ ). Αυτό οδήγησε στη διαπίστωση ότι η ουσία ή οι ουσίες στις οποίες οφείλεται η λευκαντική δράση των εκχυλισμάτων οφείλεται είτε σε μεταβολίτες που βρίσκονται σε ίχνος στα συγκεκριμένα εκχυλίσματα (άπολες ενώσεις) είτε σε συνέργεια αυτών.

**Πίνακας Γ.16:** Βιολογική δράση εκχυλισμάτων που προήλθαν από το στέλεχος CA-129531

Πρωτόκολλο Εκχύλισης	Διαλύτης Εκχύλισης	Αντιοξειδωτική Δράση				Λευκαντική Δράση	
		DPPH (200 $\mu\text{g/ml}$ )		ABTS (100 $\mu\text{g/ml}$ )		(300 $\mu\text{g/ml}$ )	
		% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV	% Αναστολή	STDEV
1	<u>EtOAc</u>	3.72	6.62	16.85	0.28	<u>60.93</u>	<u>5.69</u>
	EtOH/H <sub>2</sub> O	5.50	2.84	21.53	1.45	40.42	6.09
2	MeOH	2.09	4.00	-	-	43.54	4.00
	EtOH	-	-	-	-	45.44	5.39
4	EtOH/H <sub>2</sub> O	-	-	31.47	1.51	58.90	1.25
	<u>Xad4</u>	-	-	35.72	0.42	<u>52.59</u>	<u>2.31</u>

Για τη διερεύνηση της πολικότητας στην οποία ανήκουν οι δραστικοί δευτερογενείς μεταβολίτες πραγματοποιήθηκε ημι-παρασκευαστική HPLC στο μεθανολικό εκχύλισμα του CA-129531 βάσει της μεθόδου και του προγράμματος έκλουσης που περιγράφονται στους Πίνακες Β.14 και Β.15 αντίστοιχα (Εικόνα Γ.36).



**Εικόνα Γ.48:** Χρωματογράφημα ημι-παρασκευαστικής HPLC (264nm) του CA-129531\_MeOH εκχυλίσματος

Τα κλάσματα τα οποία παραλήφθηκαν εξετάστηκαν ως προς τη λευκαντική τους δράση σε δύο συγκεντρώσεις όπως φαίνεται στον Πίνακα Γ.17. Στο ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε η μελέτη της λευκαντικής δράσης του μεθανολικού εκχυλίσματος του CA-129531 από το οποίο προήλθαν τα κλάσματα και βρέθηκε  $38.6\% \pm 2.8$

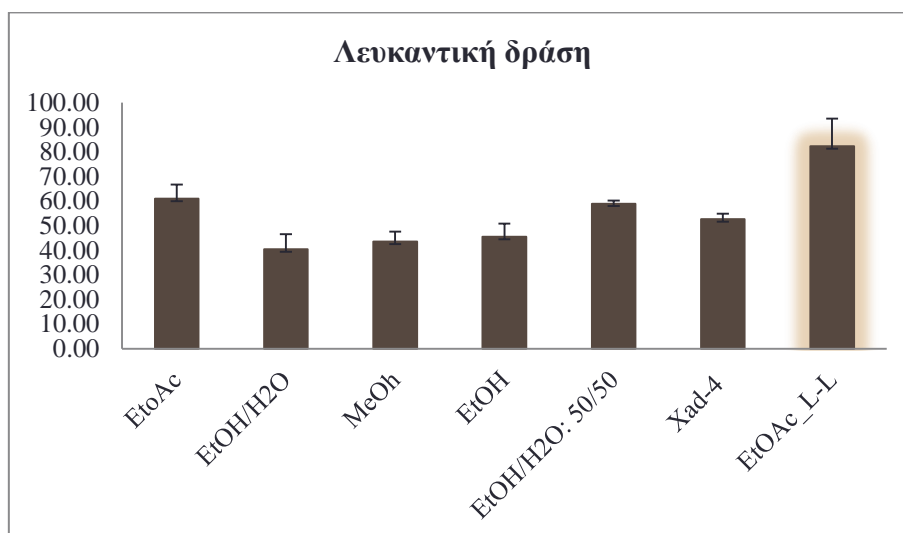
**Πίνακας Γ.17:** Αποτελέσματα λευκαντικής δράσης των ληφθέντων κλασμάτων από την ημι-παρασκευαστική HPLC

Κλάσμα	Λευκαντική Δράση		
	Συγκέντρωση (μg/ml)	Αναστολή (%)	STDEV
1	300	21.23	3.07
	100	2.99	2.94
2	300	46.57	3.59
	100	20.70	3.78
3	300	54.11	0.82
	100	20.18	1.76
4	300	60.56	2.54
	100	35.16	0.28

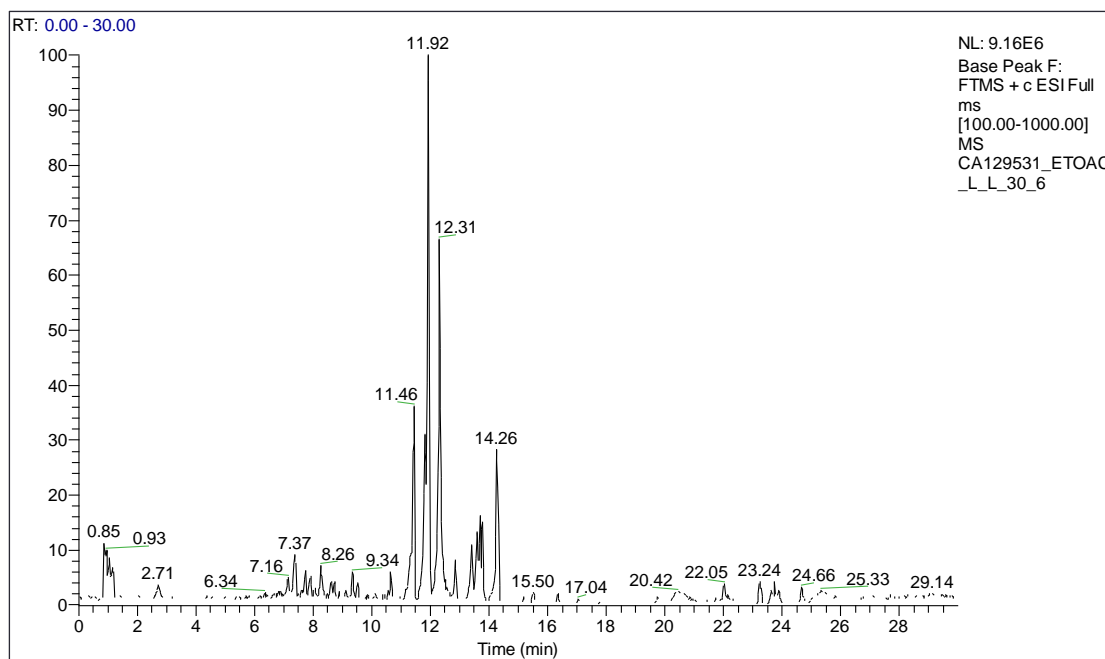
Από τα αποτελέσματα της λευκαντικής δράσης των κλασμάτων επιβεβαιώνεται η αρχική υπόθεση ότι αυτή επικεντρώνεται στα άπολα συστατικά του εκχυλίσματος, τα οποία και βρίσκονται σε εξαιρετικά μικρή συγκέντρωση. Γι αυτό το λόγο



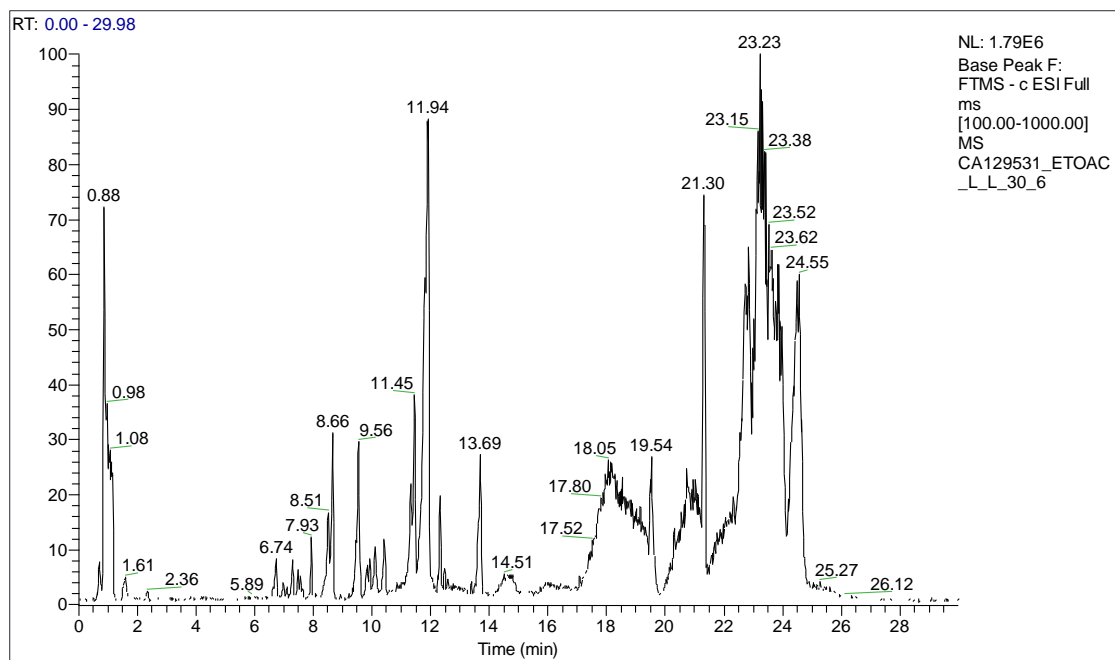
δοκιμάστηκε η υγρή-υγρή εκχύλιση του ήδη υπάρχοντος μεθανολικού εκχυλίσματος (Παράγραφος Β.1.4) με οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc) και επανεξέταση της λευκαντικής δράσης του νέου εκχυλίσματος που κωδικοποιήθηκε ως CA-129531\_EtOAc\_LL. Πράγματι, εμφάνισε δράση αρκετά μεγαλύτερη σε σχέση με τα υπόλοιπα εκχυλίσματα ( $82.26\% \pm 11.19$ ), όπως φαίνεται και από το διάγραμμα της Εικόνας Γ.49, και η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την βιοκατευθυνόμενη απομόνωση και απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών του, περιγράφεται στην ενότητα Γ.4.



**Εικόνα Γ.49:** Συγκριτικό διάγραμμα λευκαντικής δράσης εκχυλισμάτων του στελέχους CA-129531



**Εικόνα Γ.50:** Χρωματογράφημα ESI(+)-HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα που προήλθε από υγρή-υγρή εκχύλιση του CA-129531



**Εικόνα Γ.51:** Χρωματογράφημα ESI(-) HR-MS βασικών κορυφών του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα που προήλθε από υγρή-υγρή εκχύλιση του CA-129531

### Γ.3 ΒΙΟΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΜΥΚΗΤΑ *Cercospora sp.*

Τα αποτελέσματα των βιολογικών δοκιμών κατέδειξαν την ισχυρή αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα του μύκητα *Cercospora sp.* (CF-223709\_EtOAc). Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε το συγκεκριμένο εκχύλισμα για την βιοκατευθυνόμενη απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών που περιέχει και στους οποίους οφείλεται η συγκεκριμένη δράση.

#### Γ.3.1 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ CF-223709\_EtOAc

Όπως αναλύθηκε στην ενότητα Γ.2, το εκχύλισμα το οποίο απέδωσε τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα για την οποία και επιλέχθηκε το συγκεκριμένο στέλεχος ήταν το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) το οποίο προήλθε κατόπιν διαδοχικής εκχύλισης βάσει του 1<sup>ου</sup> πρωτοκόλλου εκχύλισης που έχει περιγραφεί στην Παράγραφο Β.1.4.

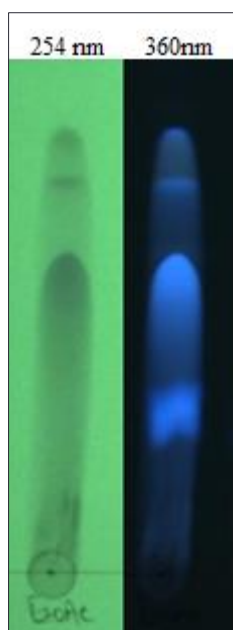
Για τη παραγωγή μεγάλης ποσότητας εκχυλίσματος EtOAc και λαμβάνοντας υπόψη την χαμηλή απόδοση εκχύλισης ζυγίστηκαν 20 g ξηρής βιομάζας και πραγματοποιήθηκαν 2 κύκλοι εκχύλισης με n-Hex (απόδοση εκχύλισης: 2,36%) και κατόπιν 2 κύκλοι εκχύλισης με EtOAc (απόδοση εκχύλισης: 4,87%). Συνολικά παραλήφθηκαν 974,1 mg CF-223709\_EtOAc εκχυλίσματος.

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αντιοξειδωτικής δράσης του CF-223709\_EtOAc εκχυλίσματος βάσει της μεθόδου DPPH και ABTS (βλ. Παράγραφο Β.2.1) σε συγκεντρώσεις 200 μg/ml και 100 μg/ml αντίστοιχα:

**Πίνακας Γ.18:** Αντιοξειδωτική δράση του CF-223709\_EtOAc

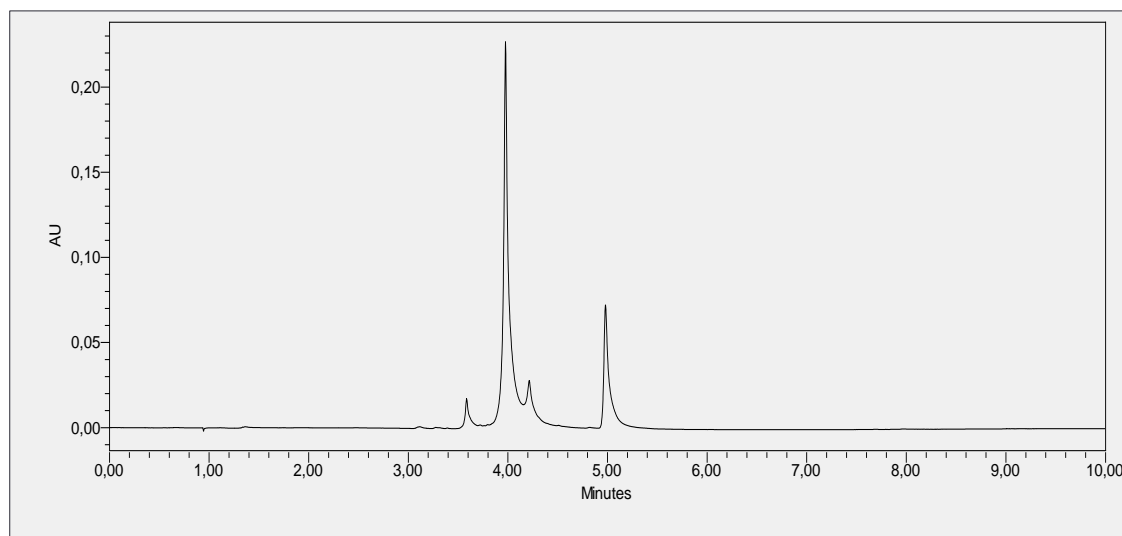
DPPH (200 ug/ml)		ABTS (100 ug/ml)	
Αναστολή (%)	STDEV	Αναστολή (%)	STDEV
70.76	1.28	99.66	0.10

Για την αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) του CF-223709\_EtOAc αναπτύχθηκε καλύτερα στο διφασικό σύστημα CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O: 13/9/3 και υπέδειξε τη παρουσία 4 κυρίως μορίων τα οποία απορροφούν στο υπεριώδες-ορατό (UV-Vis). Αυτό αποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο σχετικά άπολο εκχύλισμα μπορεί να μελετηθεί περαιτέρω με τη χρήση χρωματογραφικών τεχνικών που χρησιμοποιούν ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού.



**Εικόνα Γ.52:** TLC του CF-223709\_EtOAc εκχυλίσματος στα 254 και 360 nm. Ανάπτυξη σε σύστημα CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O: 13/9/3

Πραγματοποιήθηκε ποιοτική ανάλυση του συγκεκριμένου εκχυλίσματος με υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης (UPLC) και ελήφθη το χρωματογράφημα της Εικόνας Γ.53, από το οποίο αποδεικνύεται η ύπαρξη 4 κυρίων κορυφών, που επιβεβαιώνει την εικόνα που έδωσε η TLC.

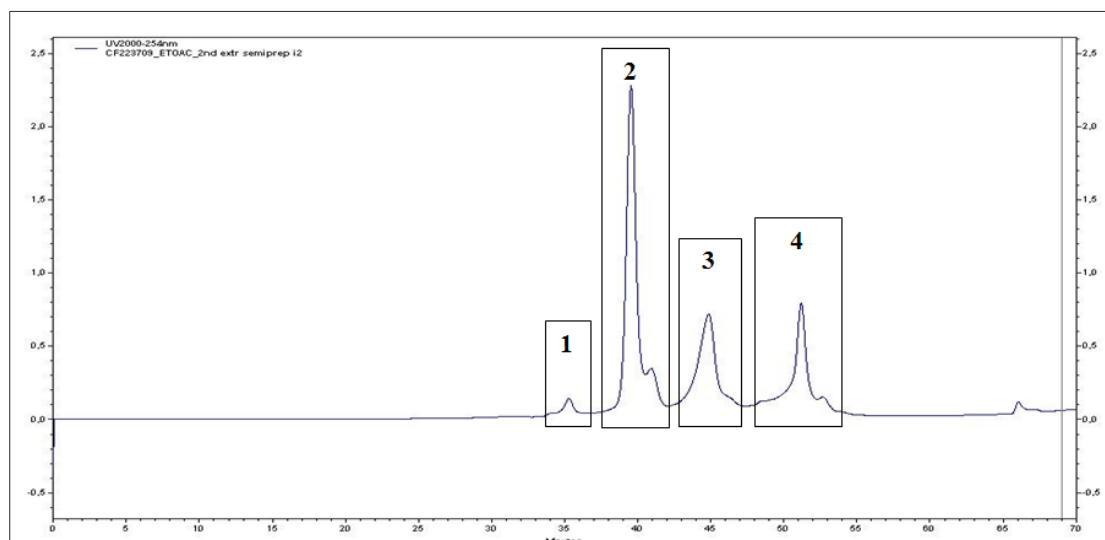


**Εικόνα Γ.53:** Χρωματογράφημα UPLC (284nm) του CF-223709\_EtOAc

### Γ.3.2 ΚΛΑΣΜΑΤΩΣΗ ΤΟΥ CF-223709\_ETOAC ΜΕ HPLC-semiprep

Το αποτέλεσμα που έδωσε η UPLC σε συνδυασμό με την άπολη φύση του συγκεκριμένου εκχυλίσματος κατέστησε δυνατή την αποτελεσματική κλασμάτωση του με τη χρήση ημι-παρασκευαστικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) αντίστροφης φάσης, που χρησιμοποιείται συνήθως.

Με τη χρήση των πειραματικών συνθηκών και το πρόγραμμα έκλυσης που περιγράφονται στον Πίνακα Β.16 και Β.17 αντίστοιχα, ελήφθη το χρωματογράφημα της Εικόνας Γ.54 και παραλήφθηκαν τα κλάσματα 1,2,3 και 4.



**Εικόνα Γ.54:** Χρωματογράφημα ημι-παρασκευαστικής HPLC (254nm) του CF-223709\_EtOAc εκχυλίσματος

Με στόχο τον εντοπισμό της αντιοξειδωτικής δράσης του αρχικού εκχυλίσματος (CF-223709\_EtOAc) πραγματοποιήθηκαν βιολογικές δοκιμές της αντιοξειδωτικής ικανότητας των κλασμάτων 1,2,3 και 4 και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα Γ.19.

**Πίνακας Γ.19:** Αποτελέσματα αντιοξειδωτικής δράσης των ληφθέντων κλασμάτων από την ημι-παρασκευαστική HPLC

Κλάσμα	Κωδικός	DPPH			ABTS		
		Συγκέντρωση (µg/ml)	Αναστολή (%)	STDEV	Συγκέντρωση (µg/ml)	Αναστολή (%)	STDEV
HPLC-1	KGFa1	200	-	-	100	-	-
		5	-	-			
HPLC-2	KGFa2	200	95.31	0.10	100	99.74	0.12
		5	22.83	1.25			
HPLC-3	KGFa3	200	93.94	0.35	100	100.10	0.12
		5	33.29	0.30			
HPLC-4	KGFa4	200	93.59	0.18	100	100.12	0.10
		5	24.65	1.13			

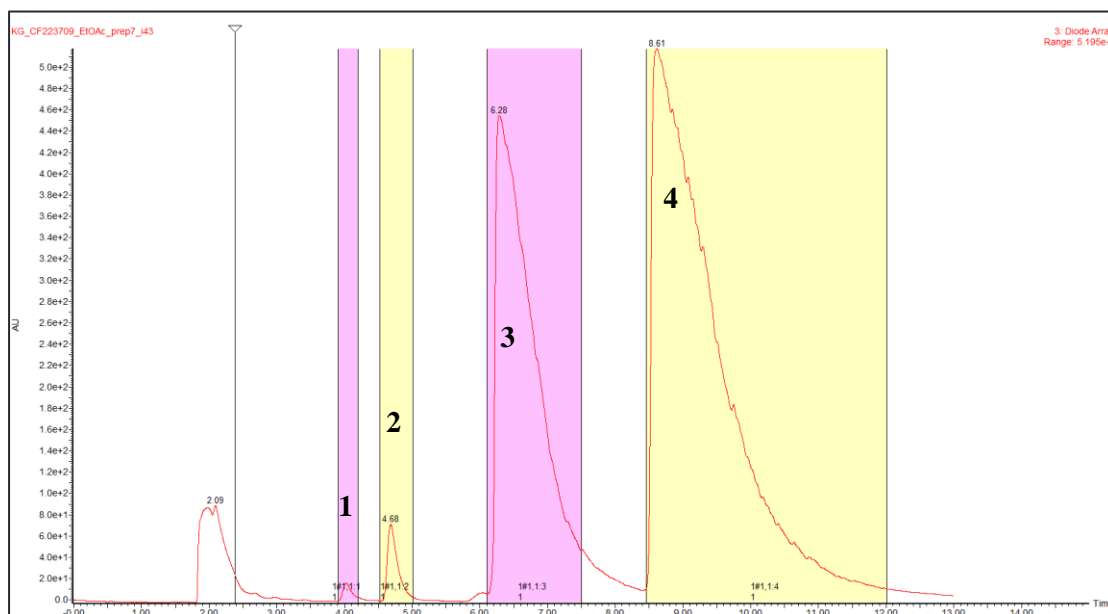
Παρατηρείται ότι η αντιοξειδωτική δράση του CF-223709\_EtOAc εκχυλίσματος αποδίδεται στις κορυφές 2,3, και 4 του χρωματογραφήματος της Εικόνας Γ.54. Το πρώτο κλάσμα που παραλήφθηκε (1<sup>η</sup> κορυφή) δεν επέδειξε αντιοξειδωτική δράση.

Στα πλαίσια απομόνωσης μεγαλύτερης ποσότητας των βιοδραστικών κλασμάτων και λόγω προβλημάτων που αντιμετωπίστηκαν σε ημι-παρασκευαστικό και παρασκευαστικό επίπεδο κατά τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής

απόδοσης (HPLC), επιλέχθηκε να συνεχιστεί η απομόνωση με τη χρήση υπερκρίσιμης ρευστής χρωματογραφίας (SFC).

### Γ.3.3 ΚΛΑΣΜΑΤΩΣΗ ΤΟΥ CF-223709\_ΕΤΟΑC ΜΕ SFC-MS

Το δραστικό εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα του *Cercospora sp.* διαχωρίστηκε με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε και περιγράφηκε στη παράγραφο Β.6. Το χρωματογράφημα που παραλήφθηκε παρουσιάζεται στην Εικόνα Γ.41.



**Εικόνα Γ.55:** Διαχωρισμός του εκχυλίσματος CF-223709\_EtOAc με SFC και αρίθμηση των ληφθέντων κλάσμάτων

Η αντιοξειδωτική τους ικανότητα ελέγχθηκε προκαταρκτικά σε συγκέντρωση 100  $\mu\text{g/ml}$  με τη μέθοδο DPPH για την εξακρίβωση ότι η δράση του αρχικού εκχυλίσματος επικεντρώνεται σε κάποιο από τα κλάσματα. Όπως φαίνεται στον Πίνακα Γ.20, η δράση επικεντρώνεται στα κλάσματα 2,3 και 4.

**Πίνακας Γ.20:** Προκαταρκτική εξέταση της αντιοξειδωτικής δράσης των κλάσμάτων 1,2,3 και 4

Κλάσματα SFC	DPPH (100 $\mu\text{g/ml}$ )	
	Αναστολή (%)	STDEV
SFC-1	31.87	1.63
SFC-2	90.81	0.18
SFC-3	64.94	2.26
SFC-4	69.81	0.83

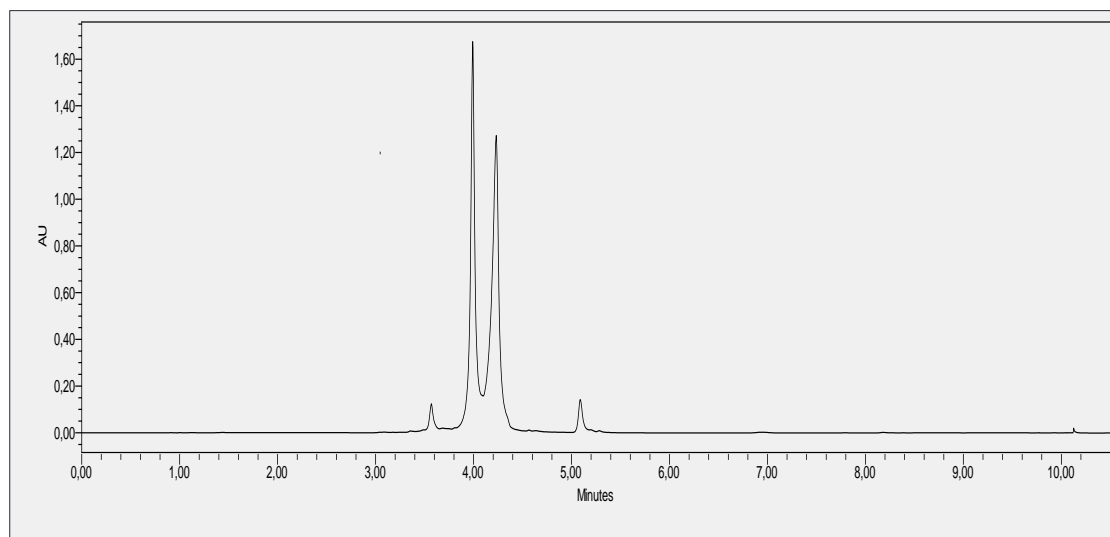
Τα αποτελέσματα των βιολογικών δοκιμών ενθάρρυναν στο να συνεχιστεί η συλλογή κλάσμάτων σε μεγαλύτερη κλίμακα ώστε να ανακτηθεί μεγαλύτερη ποσότητα με σκοπό την επιβεβαίωση της δράσης τους και κατόπιν για τη ταυτοποίηση τους.

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 30 κύκλοι συλλογής με τη βοήθεια της υπερκρίσιμης ρευστής χρωματογραφίας (SFC). Οι τέσσερις κορυφές συλλέχθηκαν με αυτόματη συλλογή κλασμάτων και το ακριβές τους μοριακό βάρος καταγράφηκε στο φασματογράφο μάζας (MS) που είναι συζευγμένος με το SFC. Κατόπιν έγινε επανάληψη των βιολογικών δοκιμών, όπου και επιβεβαιώθηκε η δραστηριότητα των κλασμάτων 2,3, και 4 και υπολογίστηκε η μέση ανασταλτική συγκέντρωση της κάθε μίας. (Πίνακας Γ.21).

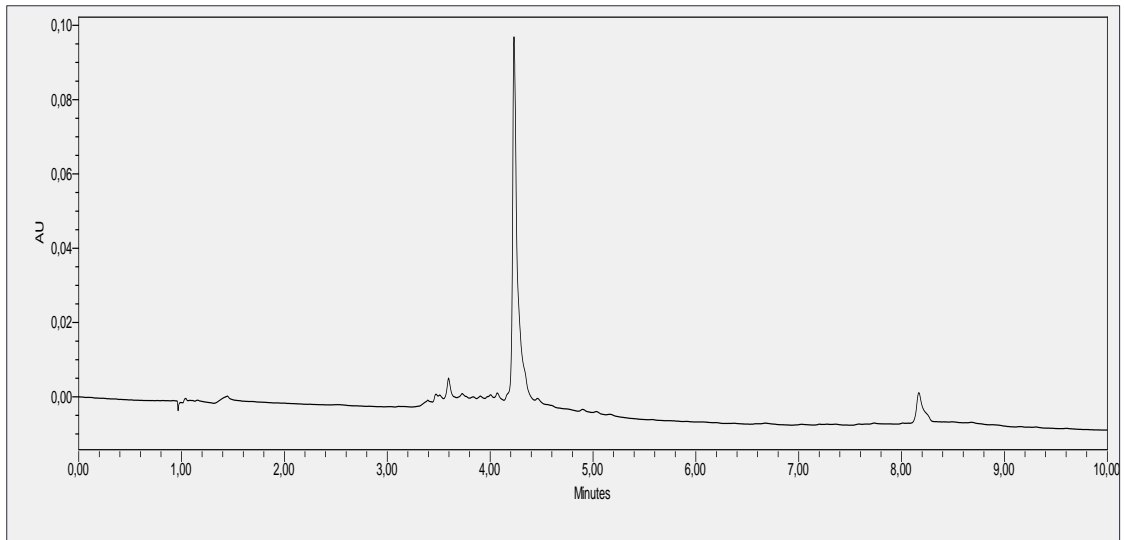
**Πίνακας Γ.21:** Αποδόσεις και αντιοξειδωτική δράση των κλασμάτων που λήφθηκαν από το SFC-MS

Κλάσμα	Κωδικός	Μεταβολίτες	Απόδοση (%)	DPPH, IC <sub>50</sub> (μg/ml)	ABTS (6.66 μg/ml)	
					Αναστολή (%)	STDEV
SFC-1	KGFa21	-	0.57	-	17.37	3.30
SFC-2	KGFa20	1	1.45	18.99	96.02	1.40
SFC-3	KGFa22	2	38.44	21.58	51.81	2.44
SFC-4	KGFa19	3	35.08	28.02	100.11	0.03

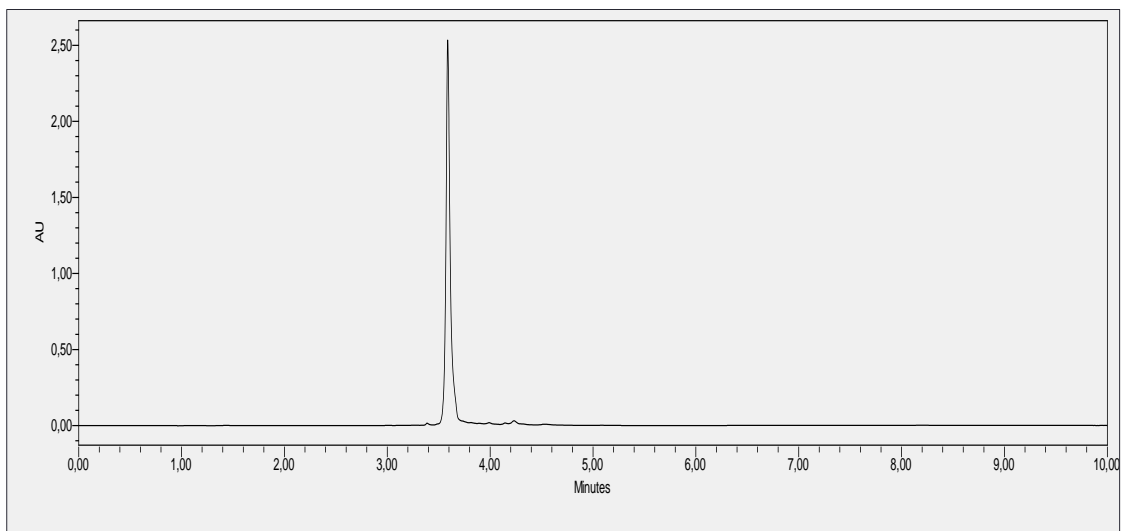
Για την επιβεβαίωση της καθαρότητας των παραληφθέντων κλασμάτων πραγματοποιήθηκε ανάλυση του αρχικού εκχυλίσματος (Εικόνα Γ.56) και των κλασμάτων (Εικόνες Γ.57, Γ.58, Γ.59, Γ.60) με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης (UPLC). Τα χρωματογραφήματα που παρατίθενται καταγράφηκαν στα 284 nm.



**Εικόνα Γ.56:** Χρωματογράφημα CF-223709\_EtOAc (284 nm)

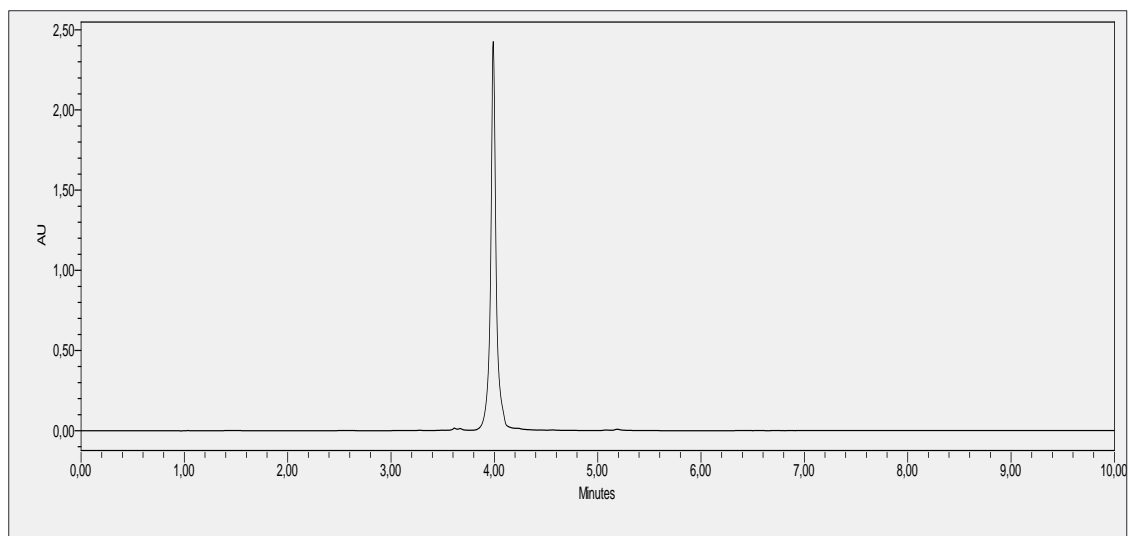


**Εικόνα Γ.57:** Χρωματογράφημα KGFa21 (284 nm)

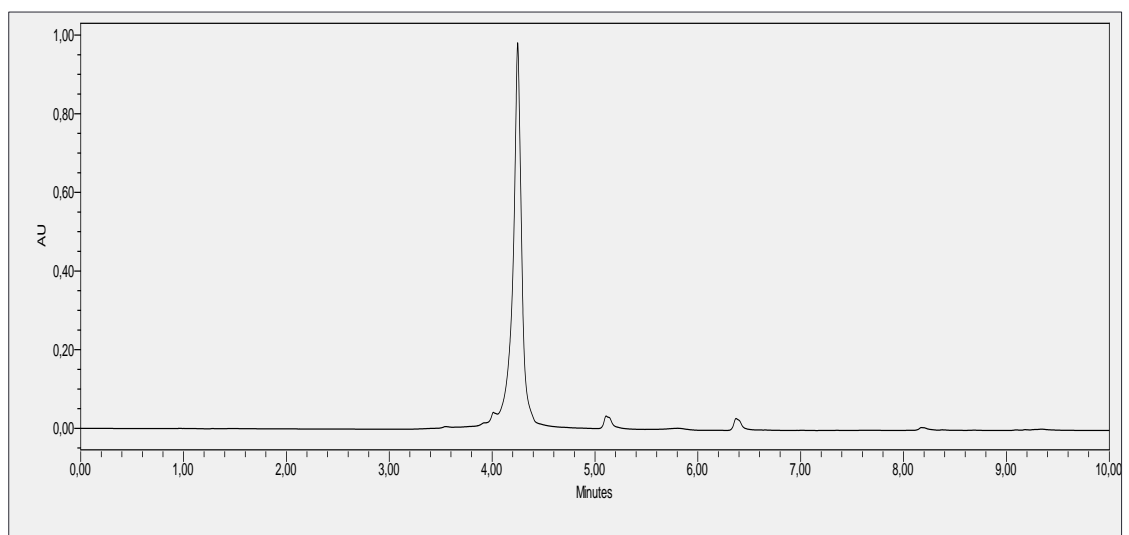


**Εικόνα Γ.58:** Χρωματογράφημα Μεταβολίτη 1 (KGFa20), (284 nm)





**Εικόνα Γ.59:** Χρωματογράφημα Μεταβολίτη2, (KGFa22) (284 nm)

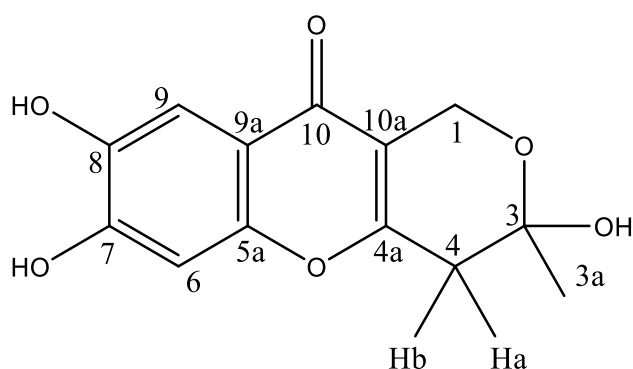


**Εικόνα Γ.60:** Χρωματογράφημα Μεταβολίτη 3, (KGFa19) (284 nm)

Γ.3.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥ CF-223709\_ΕΤΟΑC

Γ.4.3.1 Μεταβολίτης 1 (KGFa20)

Ο μεταβολίτης 1, απομονώθηκε με χρήση υπερκρίσιμης ρευστής χρωματογραφίας (SFC) από το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του στελέχους CF-223709. Ταυτοποιήθηκε ως η 3,7,8-τριυδροξυ-3-μεθυλο-3,4-διυδρο-1H,10H-πυραν[4,3-b]χρωμεν-10-όνη και αποτελεί ένα νέο φυσικό προϊόν.

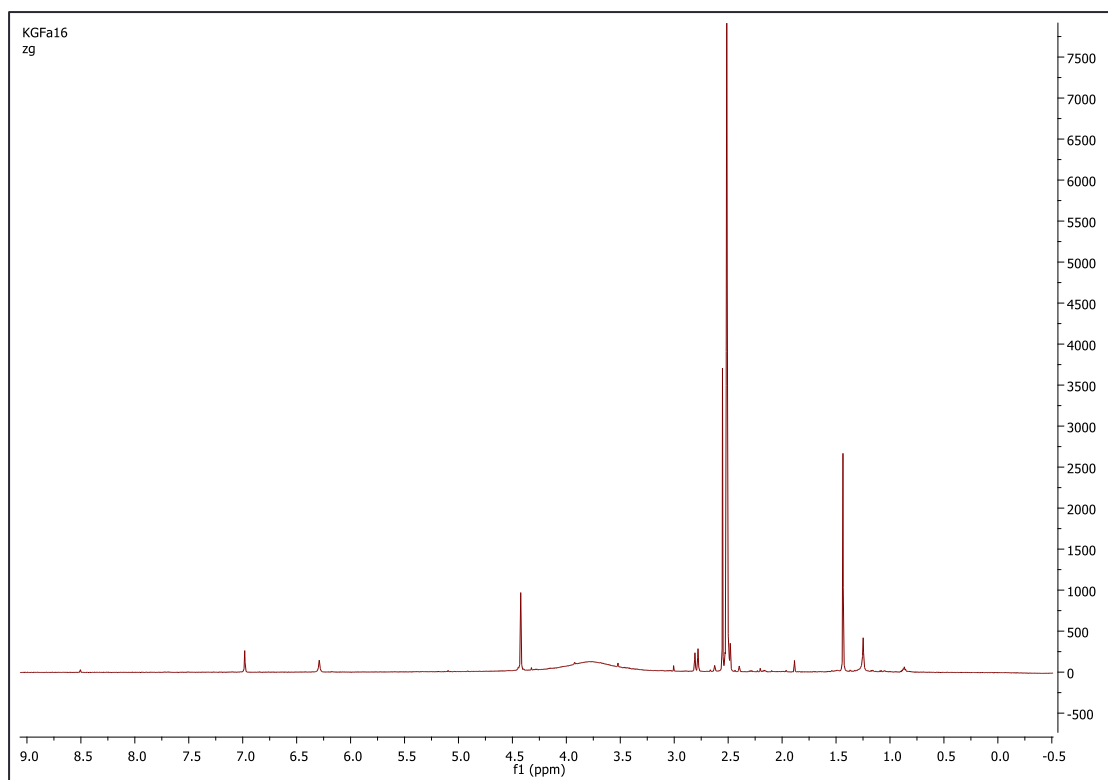


Εικόνα Γ.61: Δομή 3,7,8-τριυδροξυ-3-μέθυλ-3,4-διυδρο-1H,10H-πυραν[4,3-b]χρωμεν-10-όνη

Πίνακας Γ.22: Χημικές μετατοπίσεις  $^1\text{H}$  NMR του μεταβολίτη 1.

Θέση	$^1\text{H}$ NMR (600MHz, DMSO d-6, $\delta$ ppm, J σε Hz)	$^{13}\text{C}$ NMR* (600MHz, DMSO d-6, $\delta$ ppm)
1	4.41 (2H, s)	56.03
2	-	-
3	-	94.24
3a	1.42 (3H, s)	28.81
4-Ha 4-Hb	2.47 (1H, d, J=17.17 Hz) 2.78 (1H, d, J=17.17 Hz)	37.79
4a	-	156.3
5	-	-
5a	-	161.5
6	6.31 (1H, s)	99.79
7	-	153.72
8	-	147.03
9	6.98 (1H, s)	102.72
9a	-	-
10	-	173.32
10a	-	112.66

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



**Εικόνα Γ.62:** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR για τον Μεταβολίτη 1.

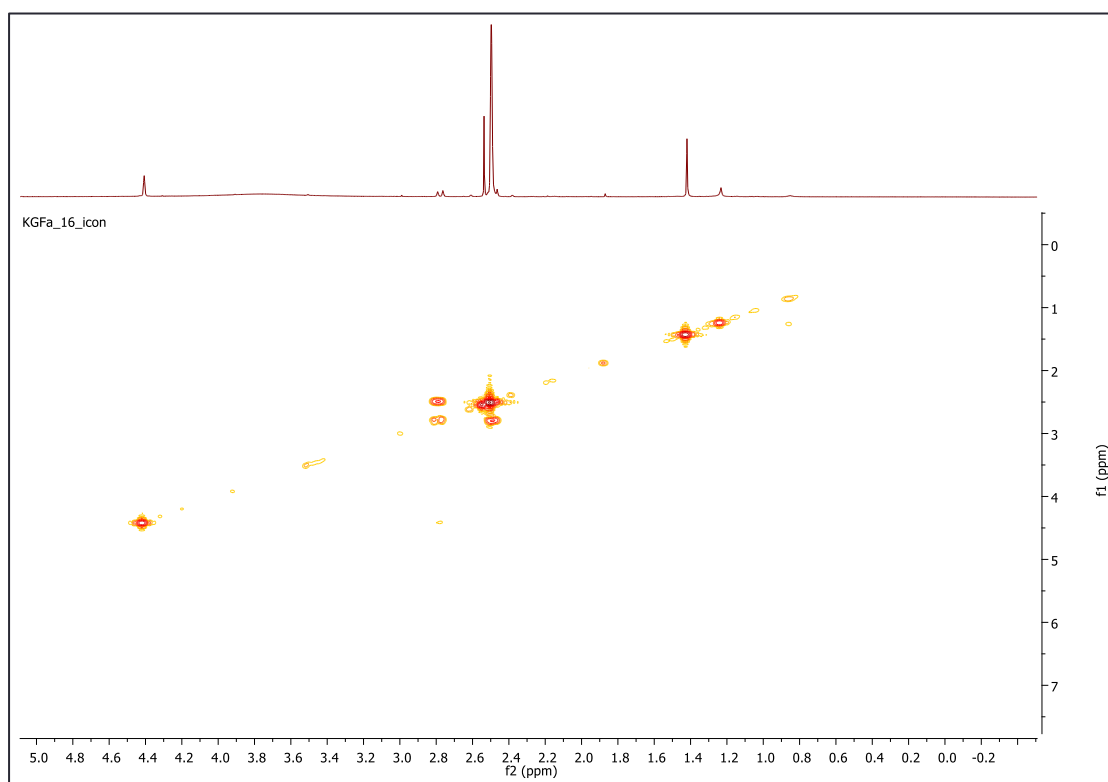
Από τη μελέτη του φάσματος  $^1\text{H}$ -NMR, η μονή κορυφή στα 1.42 ppm, που ολοκληρώνει για 3H, υποδηλώνει την ύπαρξη ενός μεθυλίου το οποίο συνδέεται με τεταρτοταγή άνθρακα. Μέσω του φάσματος ετεροπυρηνικής συσχέτισης HSQC-DEPT αποδόθηκε η κορυφή στα 28.81 ppm στον άνθρακα του μεθυλίου στη θέση 3a του μορίου.

Από το φάσμα HMBC διακρίνεται η σύζευξη των μεθυλικών πρωτονίων με τους άνθρακες στα 37.79, 56.03, 94.24 και 156.3:

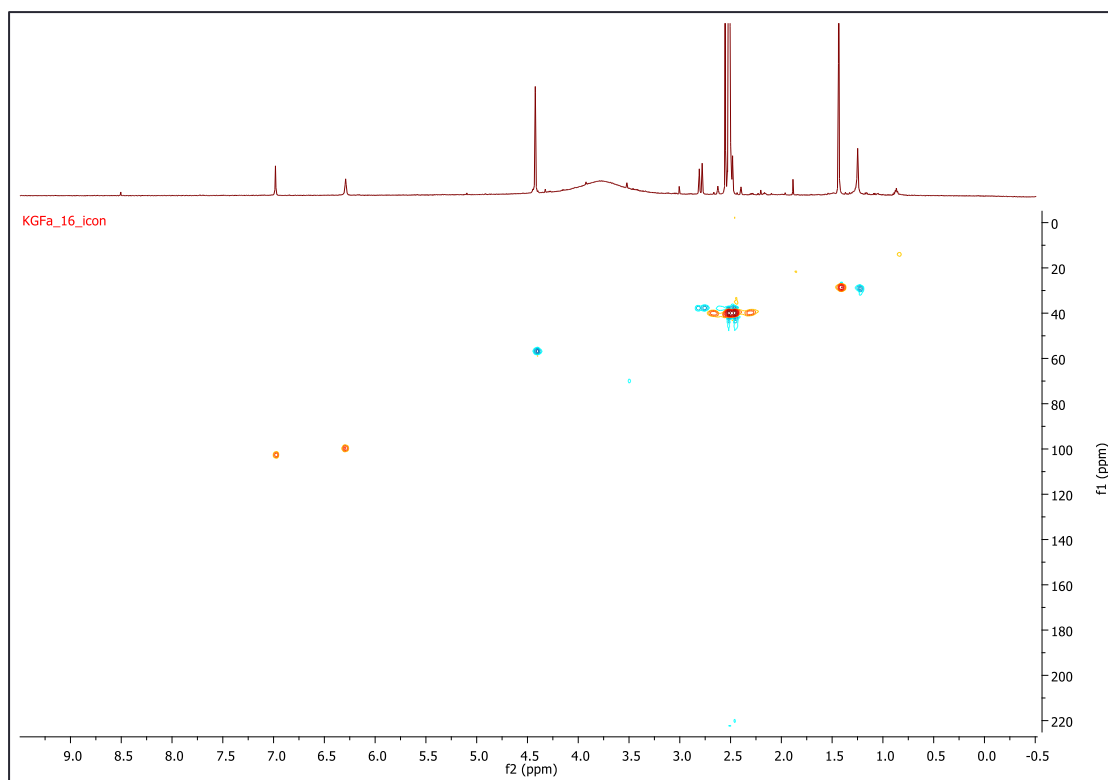
- Από το φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR και HSQC-DEPT παρατηρείται ότι η μονή κορυφή στα 4.41 ppm που ολοκληρώνει για 2H παρουσιάζει σύζευξη με τον οξυγόνωμενο άνθρακα στα 56.03 ppm, που αποδίδεται στη θέση 1 του μορίου. Επίσης, οι ετεροπυρηνικές συσχέτισεις HMBC των συγκεκριμένων πρωτονίων (H-1) με τον άνθρακα C10a καθώς επίσης και οι κοινές συζεύξεις αυτών και των μεθυλικών πρωτονίων H-3a με τους τεταρτοταγείς άνθρακες C3 και C4a επιβεβαιώνουν τη θέση τους στο μόριο.
- Από το φάσμα HSQC-DEPT παρατηρούνται 2 σήματα στα 2.78 και 2.47 ppm που αντιστοιχούν στον άνθρακα C4 με μετατόπιση 37.79. Στο φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR τα δύο σήματα παρουσιάζουν πολλαπλότητα διπλής κορυφής με κοινή σταθερά σύζευξης  $J=17.17$  Hz, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη δίδυμης σύζευξης. Τα συγκεκριμένα πρωτόνια παρουσιάζουν επίσης σύζευξη και στο φάσμα COSY, γεγονός που επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα του πειράματος HSQC-DEPT.

- Η σχετική θέση της μεθυλενικής ομάδας, προκύπτει από το πείραμα HMBC, όπου διακρίνονται οι συσχετίσεις μεταξύ των πρωτονίων στα 2.78 και 2.47 ppm και των ανθράκων στα 156.3 (C4a), 94.24 (C3), 28.81 (C3a), και 112.66 (C10a) ppm, καθώς και του ανθρακα στα 37.79 (C4) ppm με τα μεθυλικά πρωτόνια στα 1.42 ppm.

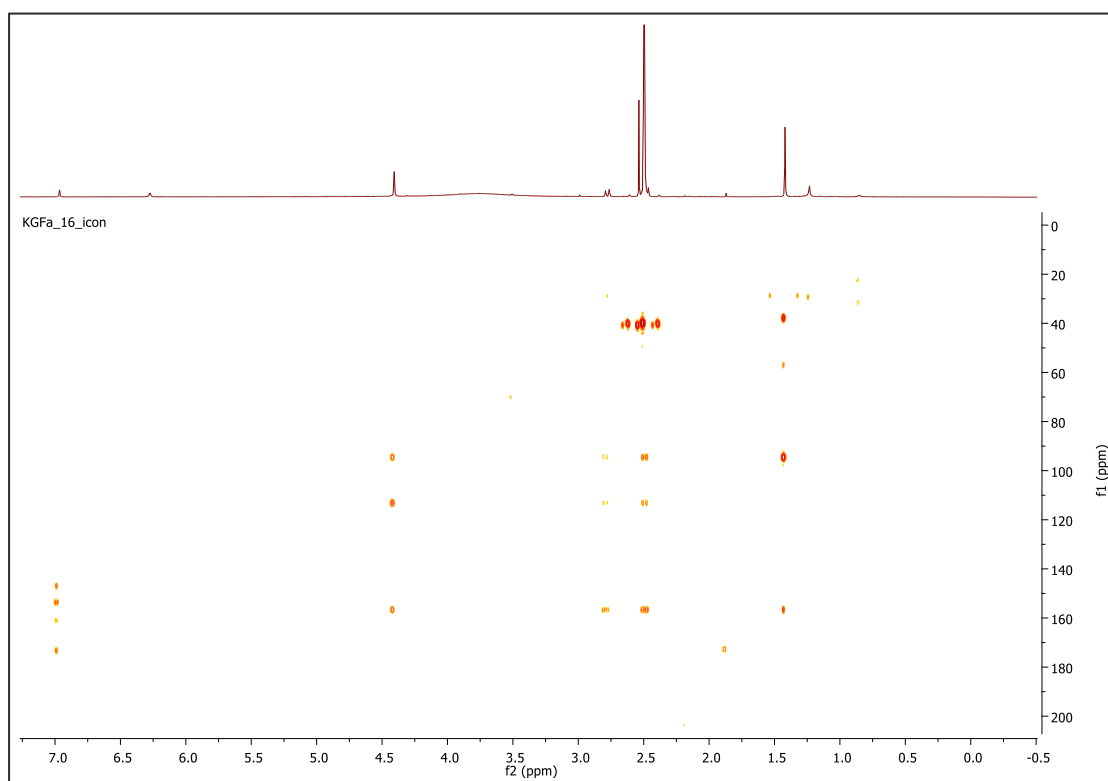
Στην αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H-NMR}$  παρατηρούνται δυο μονές κορυφές στα 6.31 και 6.98 ppm αντίστοιχα, γεγονός που υποδηλώνει πάρα υποκατάσταση των πρωτονίων H-6 και H-9. Επίσης, μέσω του φάσματος ετεροπυρηνικού συσχετισμού  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  για  $1J$  (HSQC-DEPT) αποδόθηκαν οι χημικές μετατοπίσεις των ανθράκων που παρουσιάζουν απευθείας σύνδεση με τα αρωματικά πρωτόνια (102.72 ppm (C9) και 99.79 ppm (C6), αντίστοιχα). Τέλος, οι κοινές ετεροπυρηνικές συσχετίσεις HMBC των αρωματικών πρωτονίων με τους οξυγονωμένους άνθρακες στα 153,72 ppm (C7) και 147,03 ppm (C8) καθώς επίσης και οι συζεύξεις του ενός εκ των δυο με τον καρβονυλικό άνθρακα C-10 στα 173.32 ppm, αφενός επιβεβαίωσαν την μεταξύ τους διάταξη και αφετέρου την σχετική θέση του καθενός στο μόριο.



**Εικόνα Γ.63:** Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 1.

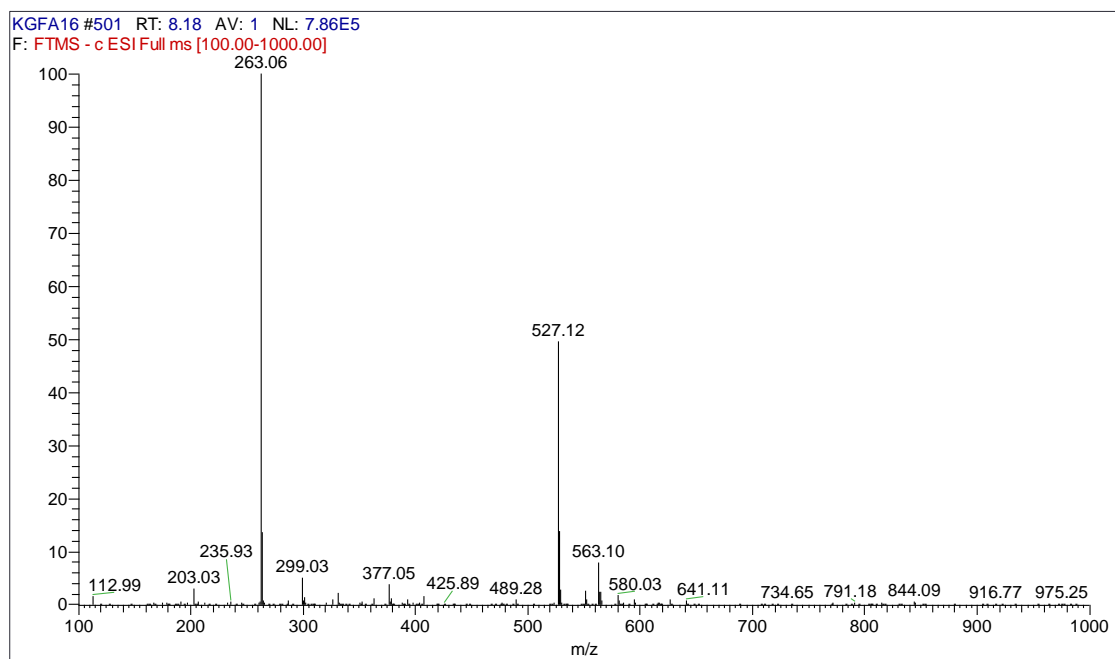


**Εικόνα Γ.64:** Φάσμα HSQC για τον Μεταβολίτη 1.



**Εικόνα Γ.65:** Φάσμα HSBC για τον Μεταβολίτη 1.

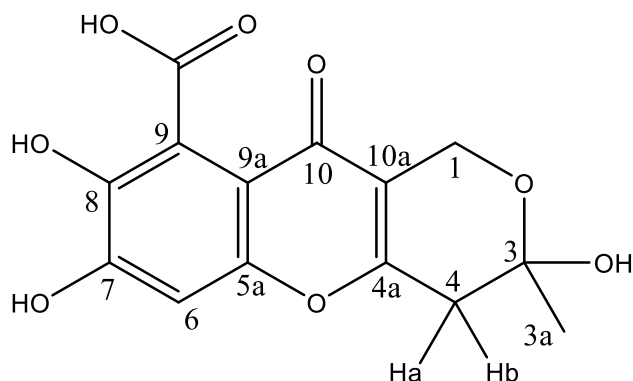
Βάση του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR, στον μεταβολίτη 1 αποδόθηκε ο μοριακός τύπος  $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_6$  (MB= 264), ο οποίος επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα μάζας ESI (-) HR-MS στο οποίο παρατηρήθηκε το ψευδομοριακό ιόν στα  $m/z=263.06$



**Εικόνα Γ.66:** Φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS για τον Μεταβολίτη 1

#### Γ.4.3.1 Μεταβολίτης 2 (KGFa22)

Ο μεταβολίτης που απομονώθηκε από το τρίτο κλάσμα συλλογής, που έγινε με τη βοήθεια του SFC όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο Γ.3.3, αναγνωρίστηκε ως το φουλβικό οξύ (fulvic acid), το οποίο έχει απομονωθεί ξανά από το *Cercospora beticola* (Sakaki, T. et al., 1981). Η μελέτη των φασμάτων NMR 1D και 2D του μεταβολίτη και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με τις τιμές που προτείνονται από την βιβλιογραφία (Fujita, K. I., et al., 1999) είχαν σαν αποτέλεσμα την ταυτοποίηση του μεταβολίτη (Εικόνα Γ.67).

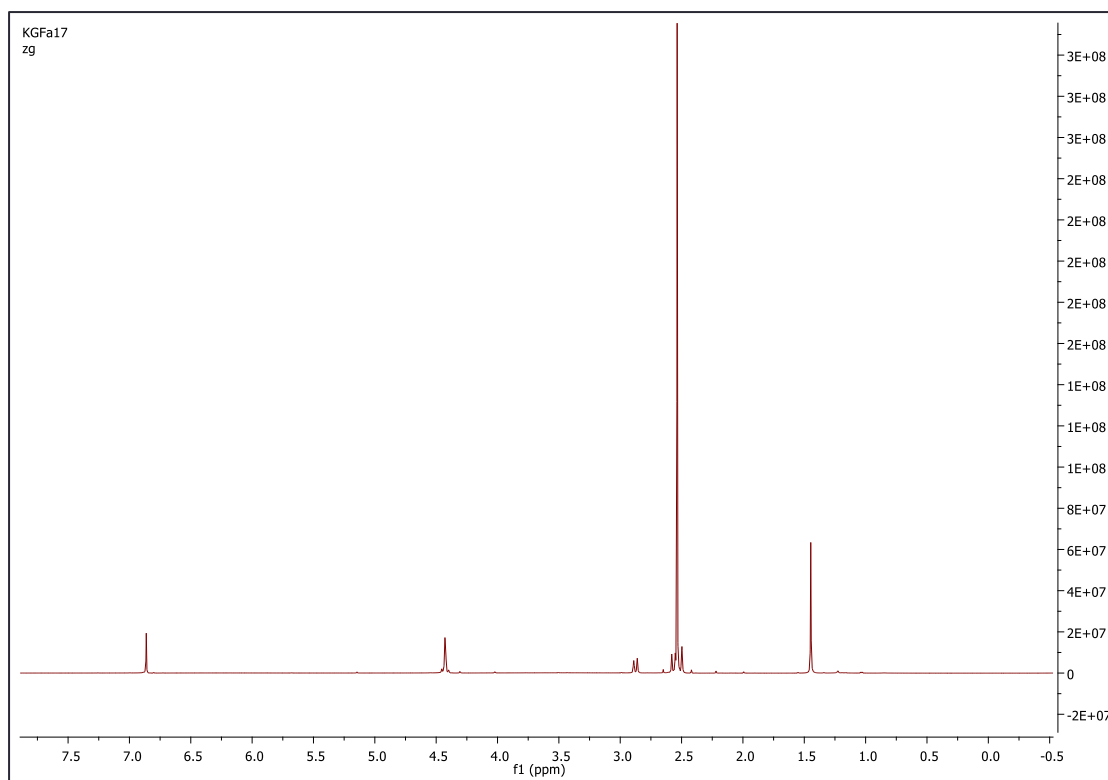


Εικόνα Γ.67: Δομή φουλβικού οξέος (Μεταβολίτης 2)

Πίνακας Γ.23: Χημικές μετατοπίσεις  $^1\text{H}$  NMR του μεταβολίτη 2

Θέση	$^1\text{H}$ NMR (600MHz, DMSO d-6, $\delta$ ppm, J σε Hz)	$^{13}\text{C}$ NMR* (600MHz, DMSO d-6, $\delta$ ppm)
1	4.39 (2H, s)	56.46
2	-	-
3	-	94.56
3a	1.41 (3H, s)	27.44
4-Ha	2.53 (1H, d, J=17.13)	36.56
4-Hb	2.84 (1H, d, J=17.13)	
4a	-	-
5	-	-
5a	-	158.88
6	6.83 (1H, s)	101.5
7	-	151.44
8	-	142.77
9	-	118.47
9a	-	112.01
10	-	173.14
10a	-	-

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



**Εικόνα Γ.68:** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR για τον Μεταβολίτη 2.

Κατόπιν μελέτης της αρωματικής περιοχής του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR, παρατηρείται ένα σήμα στα 6.83 ppm, το οποίο υποδηλώνει την ύπαρξη ενός αρωματικού δακτυλίου. Μέσω του φάσματος ετεροπυρηνικής συσχέτισης HSQC-DEPT αποδόθηκε η μετατόπιση του άνθρακα C6 του αρωματικού δακτυλίου στα 101.5 ppm.

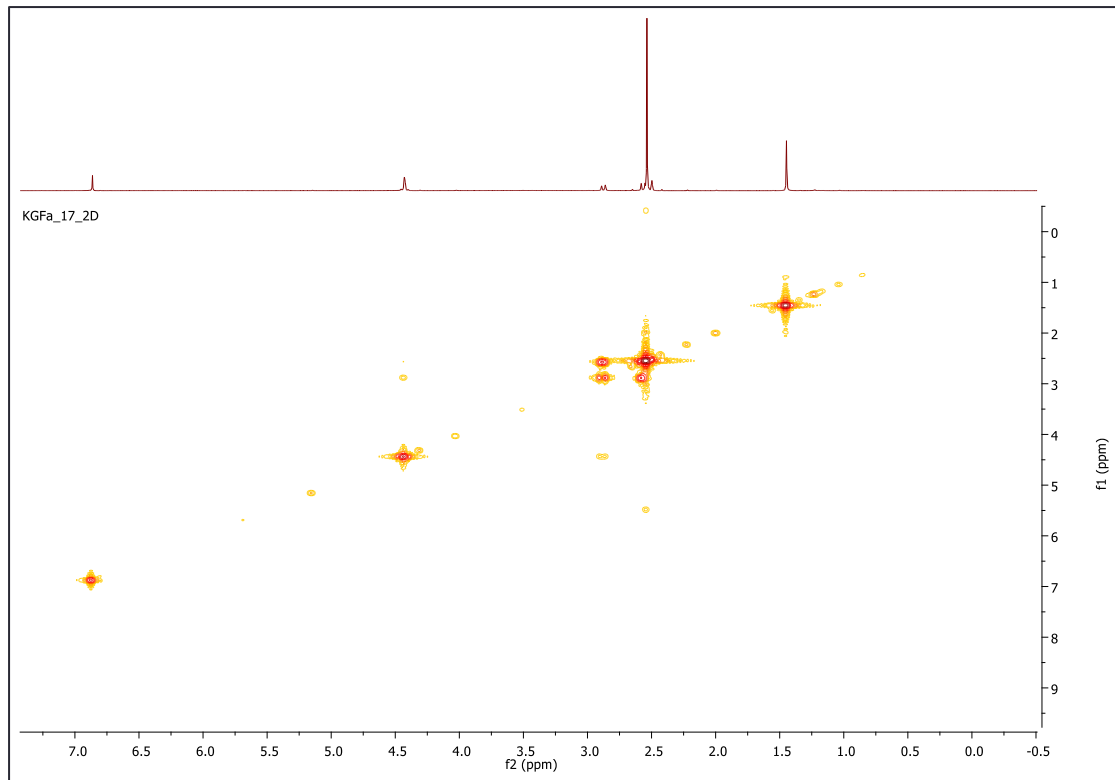
Η μονή κορυφή στα 1.41 ppm, που ολοκληρώνει για 3 H, υποδηλώνει την ύπαρξη ενός μεθυλίου το οποίο συνδέεται με τον τεταρτοταγή άνθρακα C3a, του οποίου η μετατόπιση δόθηκε μέσω του φάσματος ετεροπυρηνικής συσχέτισης HSQC-DEPT στα 27.44 ppm.

Από το φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR και HSQC-DEPT παρατηρείται ότι η μονή κορυφή στα 4.39 ppm που ολοκληρώνει για 2 H παρουσιάζει σύζευξη με τον οξυγονομένο άνθρακα C1 στα 56.46 ppm

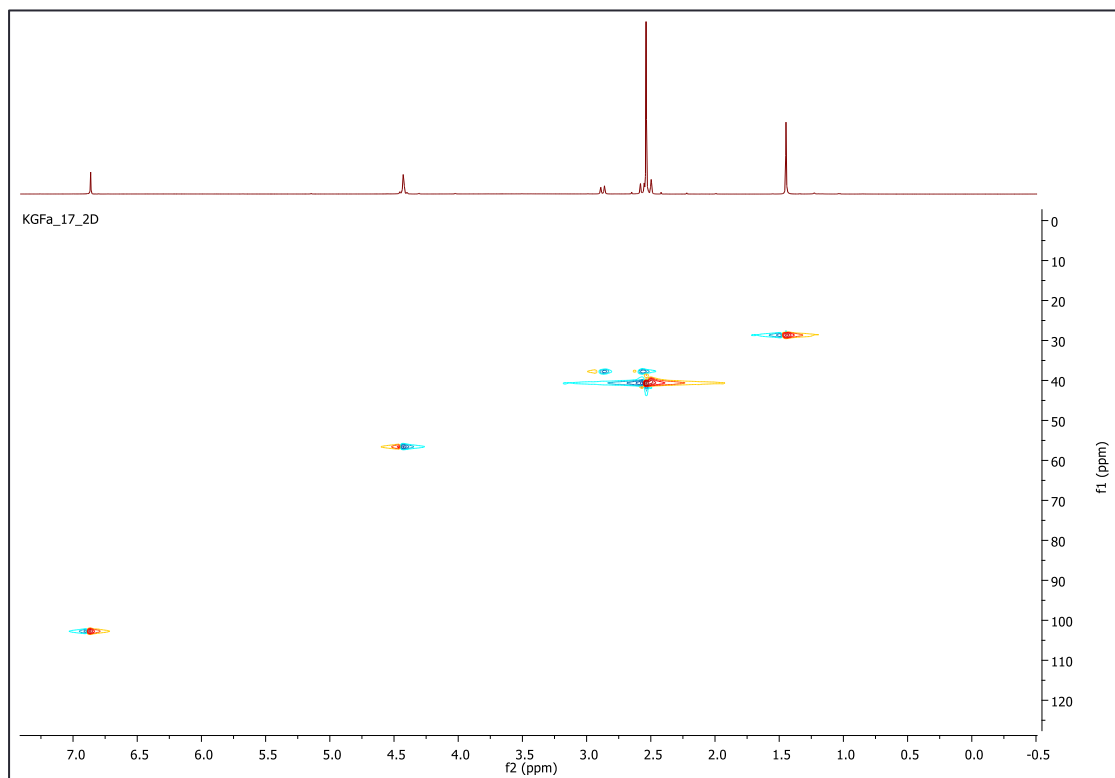
Από το φάσμα  $^1\text{H}$ -NMR παρατηρούνται 2 διπλές κορυφές στα 2.53 ppm και 2.84 ppm, που ολοκληρώνουν για 2H η κάθε μία, και παρουσιάζουν κοινή σταθερά σύζευξης  $J=17.34$  Hz, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη δίδυμης σύζευξης. Από το φάσμα COSY επιβεβαιώνεται η συσχέτισή τους, ενώ από το φάσμα HSQC-DEPT προσδιορίστηκε η διάταξη τους στο μόριο πάνω στον άνθρακα C4 με μετατόπιση 36.56 ppm. Από τις κοινές ετεροπυρηνικές συσχετίσεις HMBC των 4-Ha και 4-Hb με τους άνθρακες άνθρακες στα 94.56, 114 και 158.57 ppm επιβεβαιώθηκε η διάταξή τους.

Από το πείραμα HMBC, οι άνθρακες στις μετατοπίσεις 142.77 και 151.44 αντιστοιχίζονται στους C8 και C7 βάσει της βιβλιογραφίας (Fujita, K. I., et al., 1999).

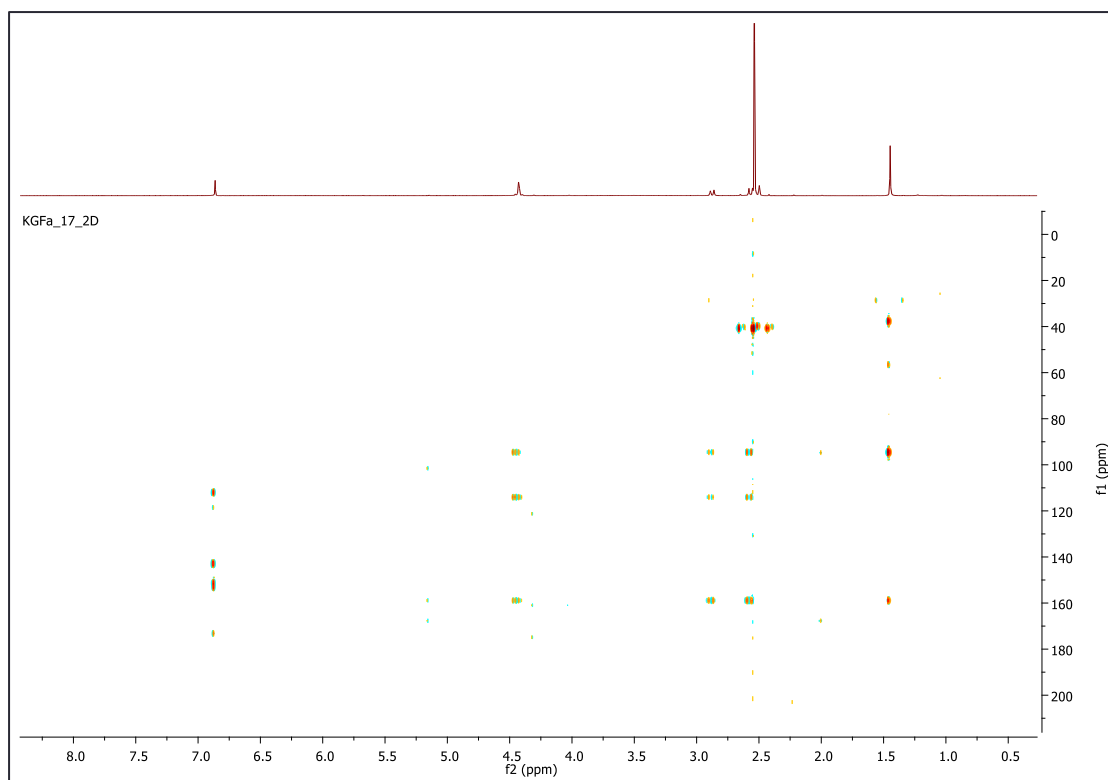




**Εικόνα Γ.69:** Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 2.

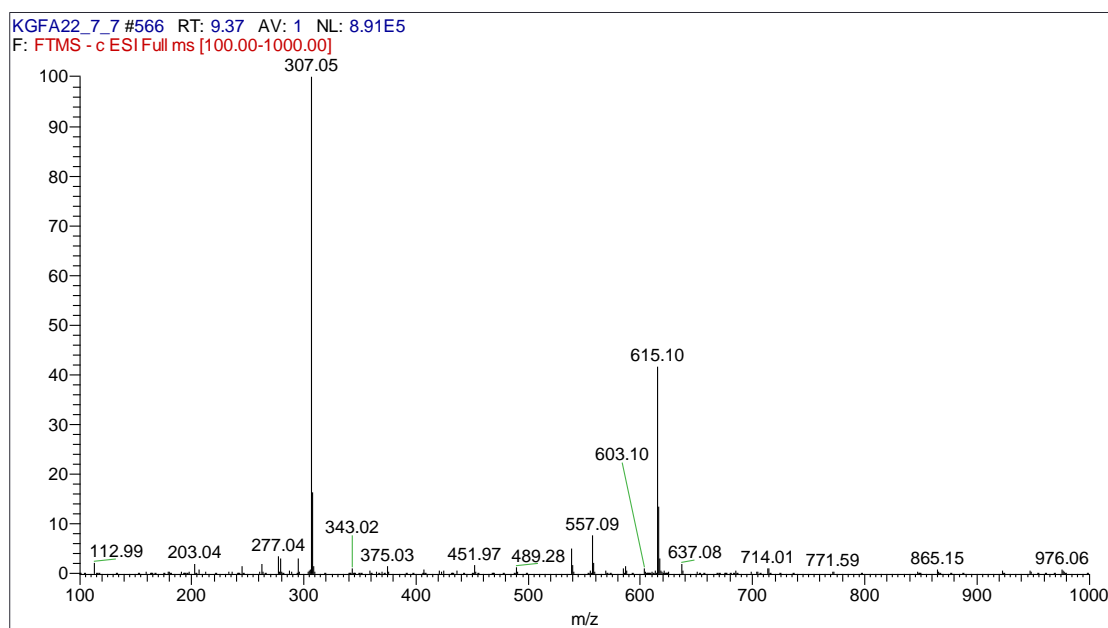


**Εικόνα Γ.70:** Φάσμα HSQC για τον Μεταβολίτη 2.



**Εικόνα Γ.71:** Φάσμα HSBC για τον Μεταβολίτη 2.

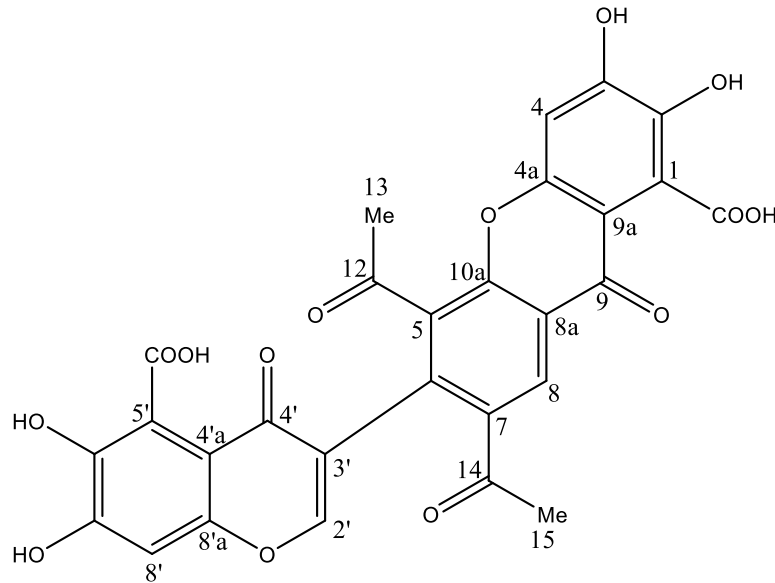
Η ανάλυση των 1D και 2D φασμάτων και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με των προτεινόμενων από τη βιβλιογραφία (Fujita, K. I., et al., 1999) μας έδωσαν τη δυνατότητα να προσδιορίσουμε το μοριακό τύπο του μεταβολίτη 2 ως  $C_{14}H_{12}O_8$  με  $MB= 308,24$ . Ο μοριακός τύπος επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS στο οποίο εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα  $m/z=307.05$ .



**Εικόνα Γ.72:** Φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS για τον Μεταβολίτη 2.

### Γ.4.3.1 Μεταβολίτης 3 (KGFa19)

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Zheng, C. J., et al., 2009) και βάσει της ανάλυσης των 1D και 2D φασμάτων, και του φασμάτος μάζας ESI(-) HR-MS, ο μεταβολίτης KGFa19 ταυτοποιήθηκε ως η βιναξανθόνη (vinaxanthone).

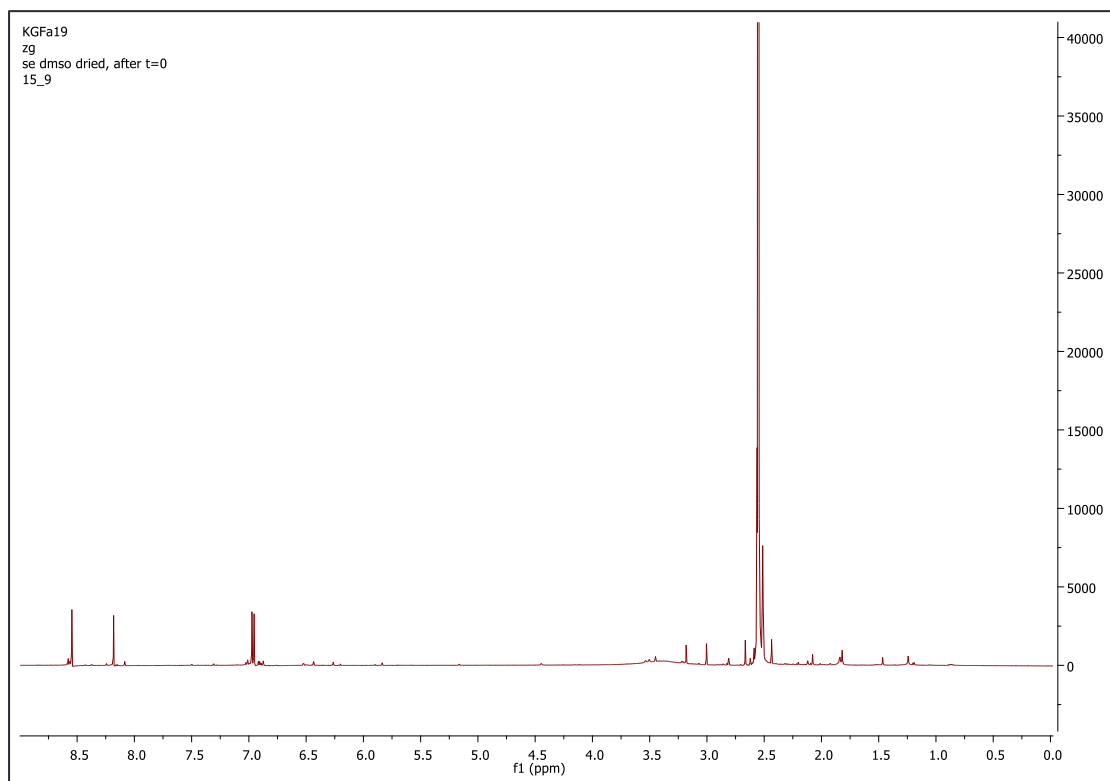


Εικόνα Γ.73: Δομή βιναξανθόνης (Μεταβολίτης 3)

Πίνακας Γ.24: Χημικές μετατοπίσεις <sup>1</sup>H NMR του μεταβολίτη 3

Θέση	<sup>1</sup> H NMR (600MHz, DMSO d-6, δ ppm, J σε Hz)	<sup>13</sup> C NMR* (600MHz, DMSO d-6, δ ppm)
1	-	
2	-	
3		
4	6.93 (1H, s)	102.32
4a	-	
5	-	
6	-	132.92
8	8.52 (1H, s)	126.81
8a	-	
9	-	
9a	-	
10a	-	
12	-	
13	2.53 (3H, s)	32.24
14	-	
15	2.52 (3H, s)	29.43
2'	8.16 (1H, s)	153.06
3'	-	
4'	-	
4'a	-	
5'	-	

8'	6.94 (1H, s)	102.66
8'a	-	
*Ο προσδιορισμός των $^{13}\text{C}$ έγινε με τη χρήση των φασμάτων HSQC-DEPT και HMBC		

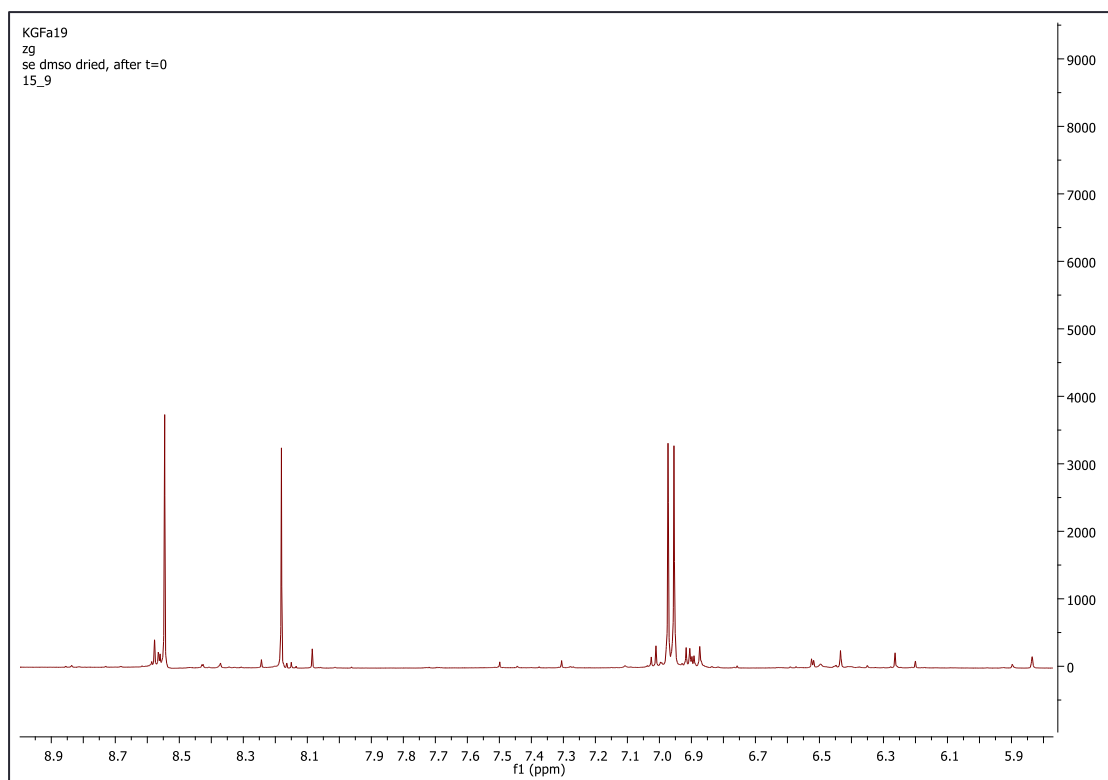


**Εικόνα Γ.74:** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR για τον Μεταβολίτη 3.

Από τη μελέτη της αρωματικής περιοχής του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR (Εικόνα Γ.45) παρατηρήθηκαν τα εξής σήματα:

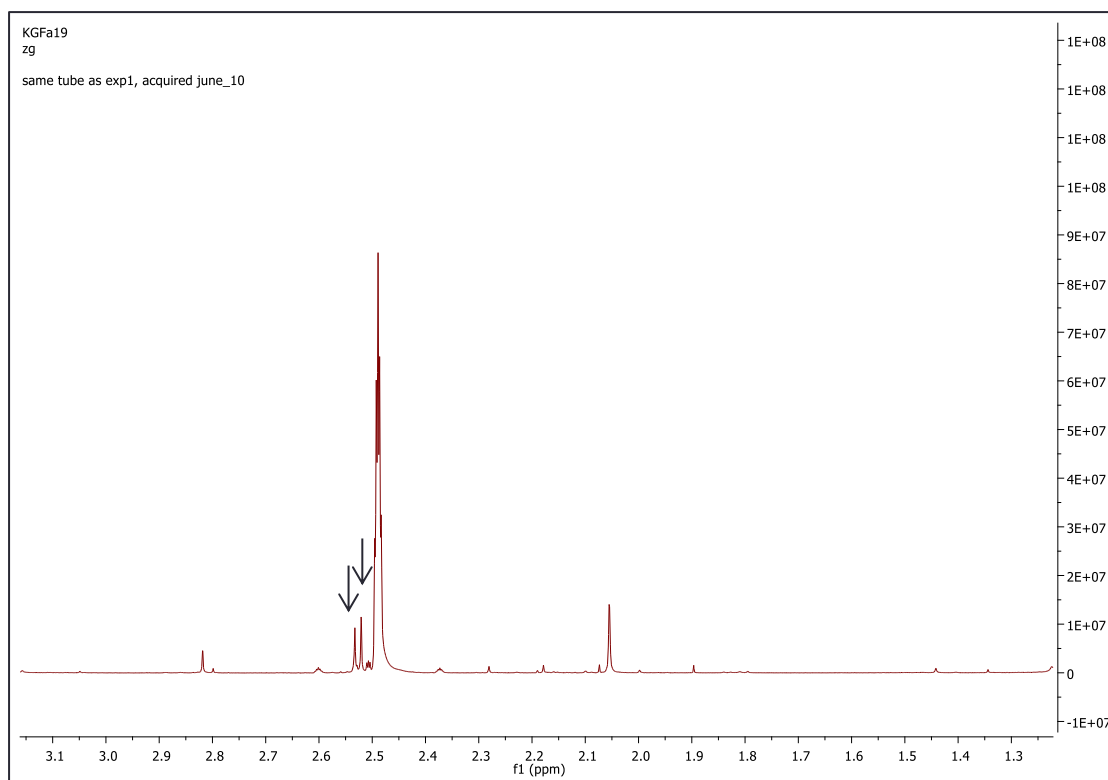
- μία μονή κορυφή στα 6.93 ppm που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-4,
- μία μονή κορυφή στα 6.94 ppm που ολοκληρώνει για 1H και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-8',
- μία μονή κορυφή στα 8.52 ppm (1H) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-8, και
- μία μονή στα 8.16 ppm (1H) που αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H-2'.

Μέσω του φάσματος ετεροπυρηνικής συσχέτισης HSQC-DEPT αποδόθηκαν οι μετατοπίσεις των παραπάνω ανθράκων, όπως φαίνονται στον πίνακα Γ.24.



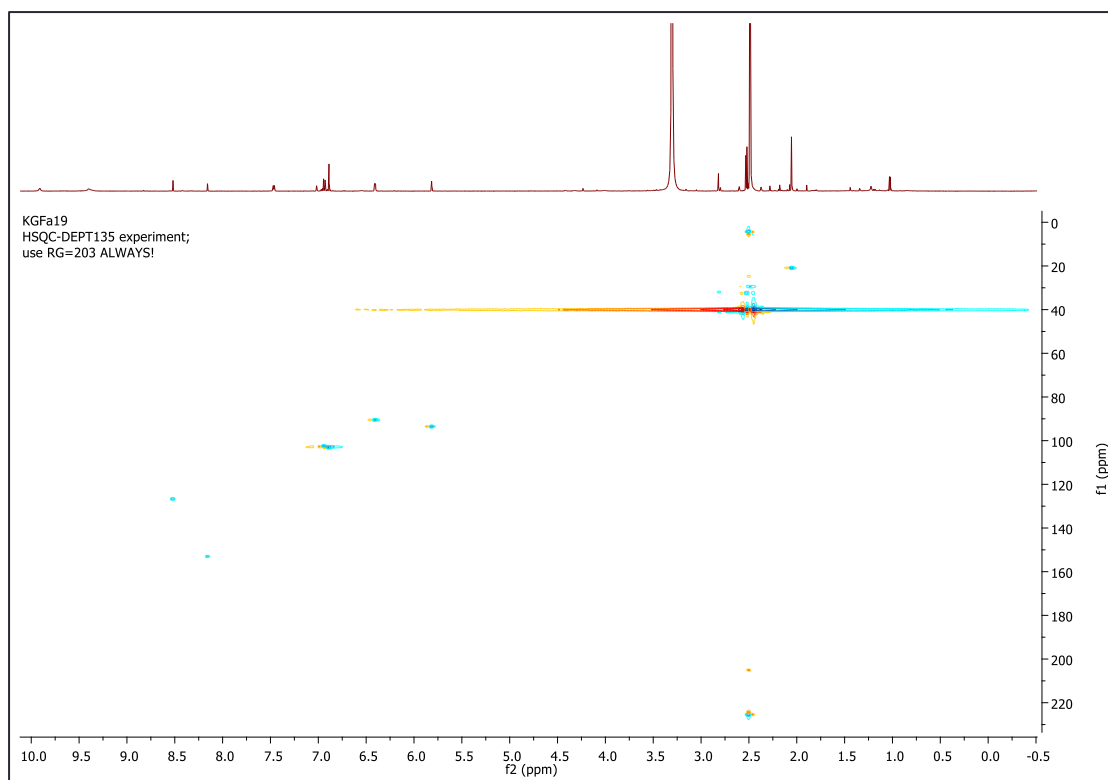
**Εικόνα Γ.75:** Αρωματική περιοχή φάσματος  $^1\text{H}$  NMR για τον Μεταβολίτη 3.

Οι μονές κορυφές στα 2.52 και 2.53 ppm του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR (Εικόνα Γ.26), που ολοκληρώνουν για 3H η κάθε μία, υποδηλώνουν την ύπαρξη δύο μεθυλιών που συνδέονται σε τεταρτοταγείς άνθρακες. Αυτά τα σήματα αντιστοιχίζονται στα χαρακτηριστικά μεθύλια του μορίου της βιναξανθόνης στις θέσεις 15 και 13.

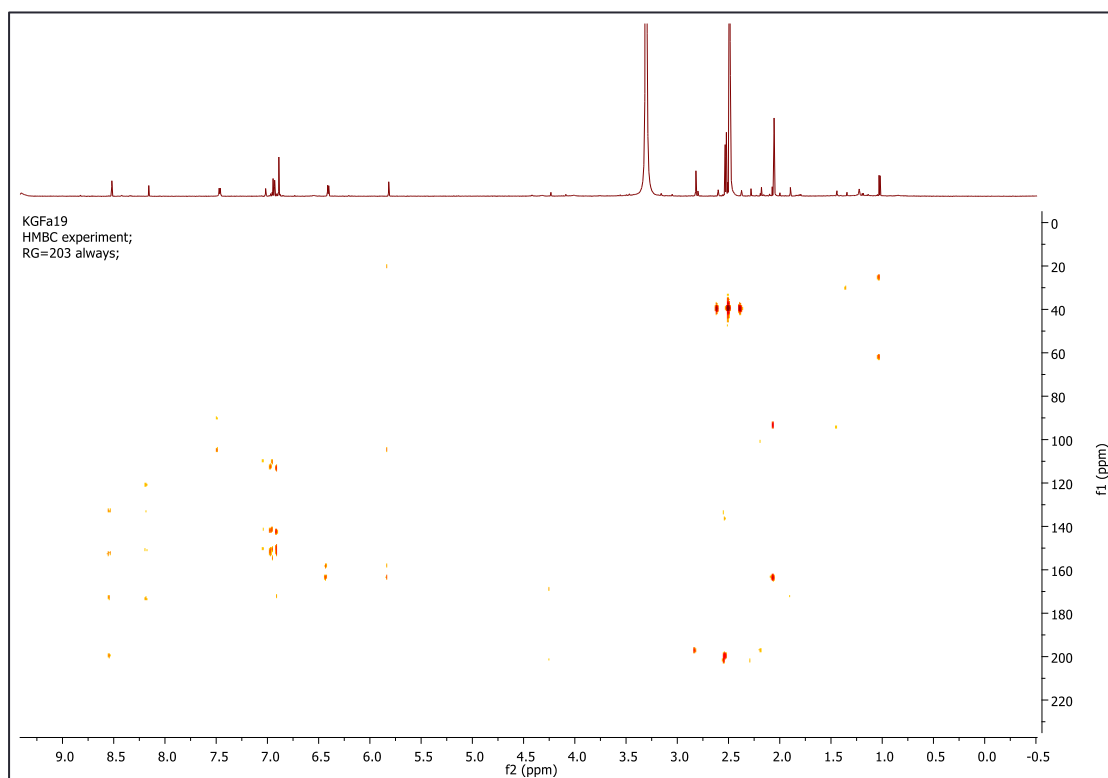


**Εικόνα Γ.76:** Αλειφατική περιοχή φάσματος  $^1\text{H}$  NMR για τον Μεταβολίτη 3.

Από το φάσμα HMBC παρατηρείται η σύζευξη του H-8 και H-15 με τον C14 του οποίου η μετατόπιση βρίσκεται στα 199.93 ppm. Επίσης βρίσκεται η μετατόπιση του C7 στα 136.64 ppm.

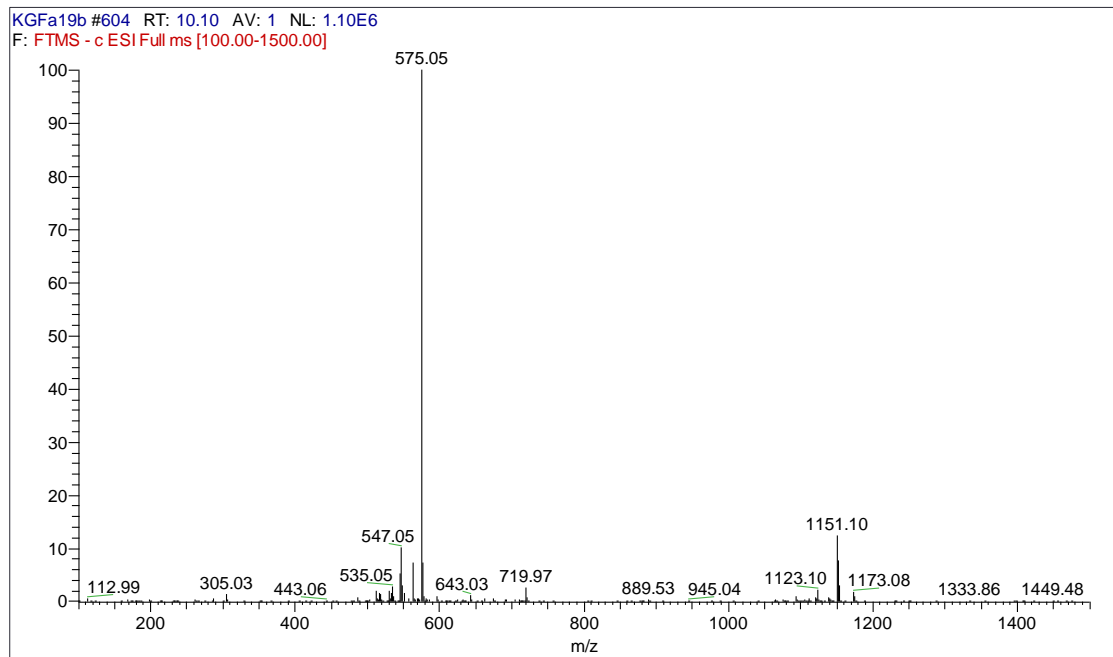


**Εικόνα Γ.77:** Φάσμα HSQC για τον Μεταβολίτη 3.



**Εικόνα Γ.78:** Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 3.

Στο φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS, εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα  $m/z=575.045$ , γεγονός που επιβεβαίωσε τον μοριακό τύπο του μεταβολίτη 3 ως τον  $C_{28}H_{16}O_{14}$ , με  $MB= 576,418$  (Zheng, C. J., et al., 2009).



**Εικόνα Γ.79:** Φάσμα μάζας ESI(-) HR-MS για τον Μεταβολίτη 3



#### Γ.4 ΒΙΟΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΗ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΑΠΟ ΤΟΝ ΑΚΤΙΝΟΜΥΚΗΤΑ *Streptomyces* *hygroscopicus angustmyceticus*

Τα αποτελέσματα των βιολογικών δοκιμών κατέδειξαν ισχυρή λευκαντική δράση του εκχυλίσματος οξικού αιθυλεστέρα του ακτινομύκητα *Streptomyces hygroscopicus angustmyceticus* που προήλθε από υγρή-υγρή εκχύλιση (CA-129531\_EtOAc\_LL). Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε το συγκεκριμένο εκχύλισμα για την βιοκατευθυνόμενη απομόνωση των δευτερογενών μεταβολιτών στους οποίους οφείλεται η συγκεκριμένη δράση.

##### Γ.4.1 ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ CA-129531\_EtOAc\_LL

Όπως αναλύθηκε στην Ενότητα Γ.2, το εκχύλισμα το οποίο απέδωσε τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα για την οποία και επιλέχθηκε το συγκεκριμένο στέλεχος ήταν το εκχύλισμα του οξικού αιθυλεστέρα (EtOAc) το οποίο προήλθε κατόπιν υγρής-υγρής εκχύλισης βάσει του πρωτοκόλλου εκχύλισης που έχει περιγραφεί στην Παράγραφο Β.1.6.

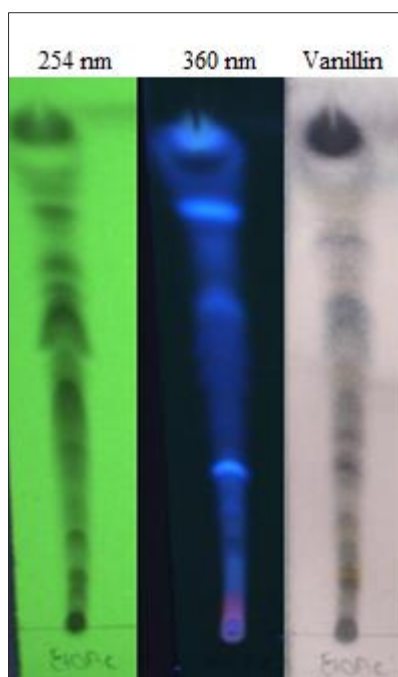
Για τη παραγωγή μεγάλης ποσότητας εκχυλίσματος EtOAc και λαμβάνοντας υπόψη την χαμηλή απόδοση εκχύλισης ζυγίστηκαν 30.25 g ξηρής βιομάζας. Σύμφωνα με το 1<sup>ο</sup> πρωτόκολλο εκχύλισης που περιγράφεται στη παράγραφο Β.1.4, πραγματοποιήθηκαν 2 κύκλοι εκχύλισης με n-Hex, κατόπιν 2 κύκλοι εκχύλισης με EtOAc και τέλος 2 κύκλοι εκχύλισης με MeOH, για τη παραλαβή 20.36 g μεθανολικού εκχυλίσματος. Ακολούθησε υγρή-υγρή εκχύλιση, όπως περιγράφεται στη παράγραφο Β.1.6, για τη παραλαβή 293.67 mg του εκχυλίσματος CA-129531\_EtOAc\_LL.

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της λευκαντικής δράσης του CA-129531\_EtOAc\_LL εκχυλίσματος βάσει της μεθόδου που περιγράφεται στη Παράγραφο Β.2.2 σε συγκέντρωση 300 µg/ml:

**Πίνακας Γ.25:** Λευκαντική δράση του CA-129531\_EtOAc\_LL

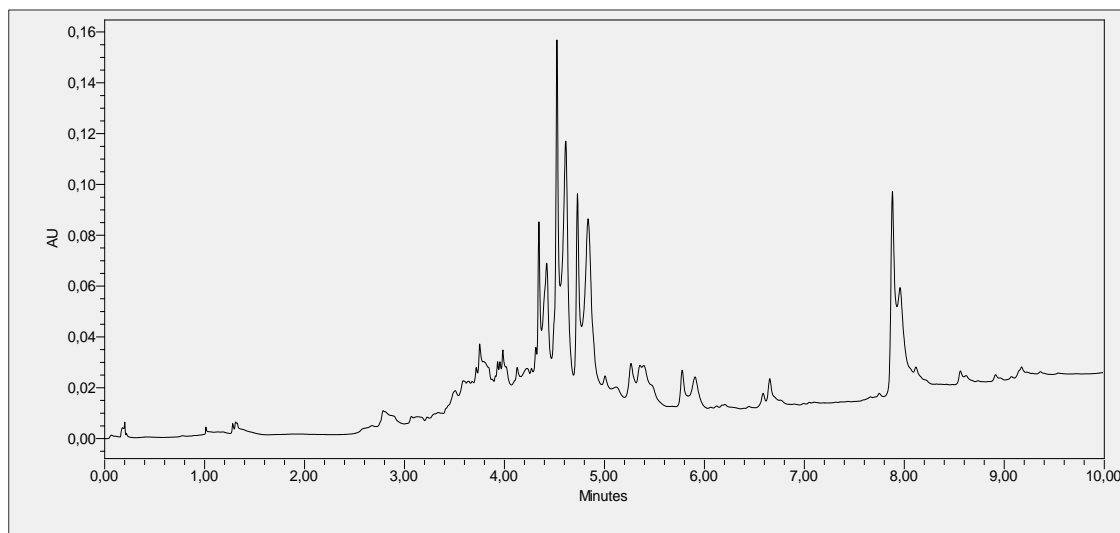
Λευκαντική δράση (300 µg/ml)	
Αναστολή (%)	STDEV
74.35	0.48

Για την αναλυτική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) του CA-129531\_EtOAc\_LL αναπτύχθηκε καλύτερα στο διαφασικό σύστημα CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O: 13/9/3 και χαρακτηρίζεται πλούσιο σε μόρια τα οποία απορροφούν στο υπεριώδες-ορατό (UV-Vis), γεγονός που αποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο σχετικά άπολο εκχύλισμα μπορεί να μελετηθεί περαιτέρω με τη χρήση χρωματογραφικών τεχνικών που χρησιμοποιούν ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού.



**Εικόνα Γ.80:** TLC του CA-129531\_EtOAc\_LL στα 254, 360 nm και στο ορατό κατόπιν ψεκασματος με αντιδραστήριο θειϊκής βανιλίνης. Ανάπτυξη σε σύστημα CHCl<sub>3</sub>/MeOH: 9/1

Το πλούσιο προφίλ του συγκεκριμένου εκχυλίσματος σε δευτερογενείς μεταβολίτες επιβεβαιώνεται και από το χρωματογράφημα UPLC της Εικόνας Γ.80.



**Εικόνα Γ.81:** Χρωματογράφημα UPLC (254nm) του CA-129531\_EtOAc\_LL

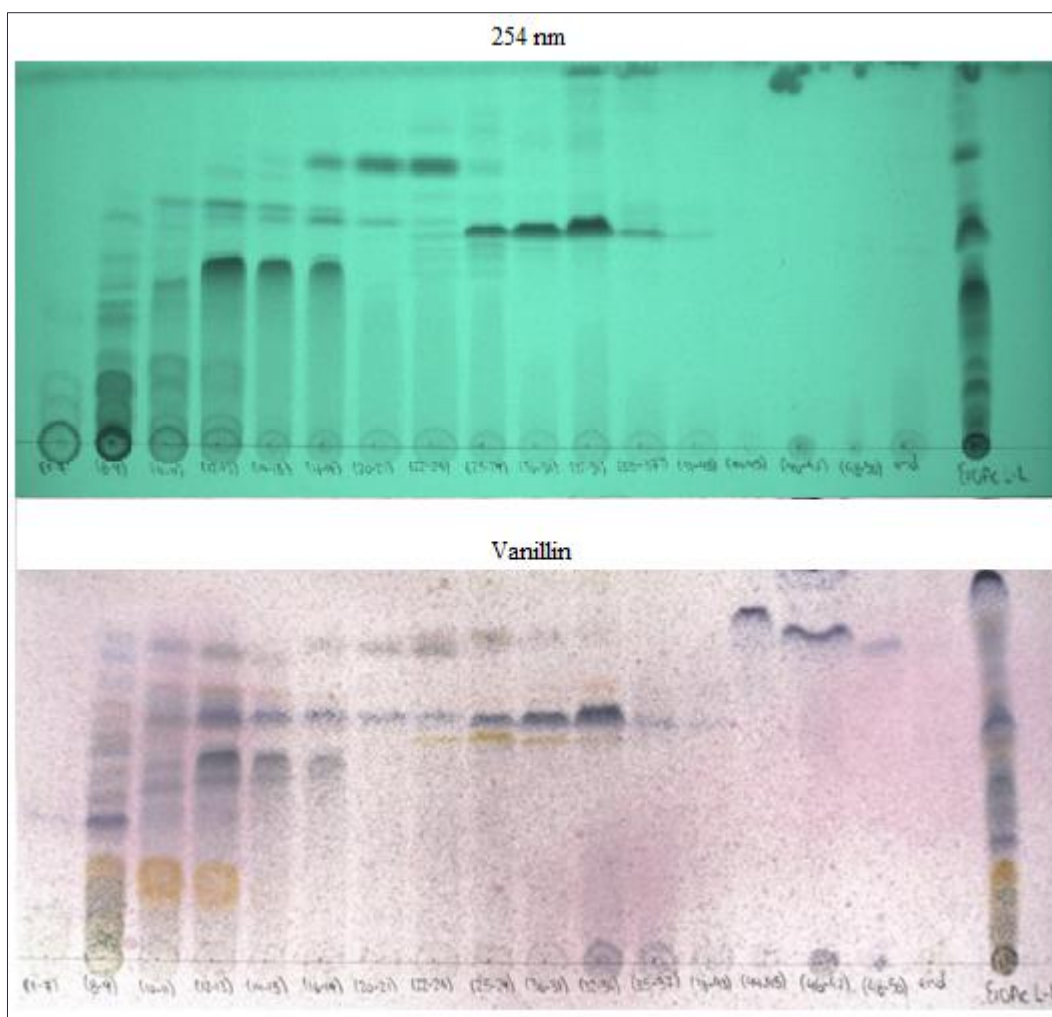
#### Γ.4.2 ΚΛΑΣΜΑΤΩΣΗ ΤΟΥ CA-129531\_EtOAc\_LL ΜΕ CPC

Ενώ το σημαντικότερο κομμάτι του περιεχομένου του CA-129531\_EtOAc\_LL είναι άπολο, παρουσιάζει μεγάλο εύρος πολικότητας στην TLC. Συνεπώς, για την κλασμάτωσή του επιλέχθηκε η φυγόκεντρος χρωματογραφία κατανομής (Centrifugal Partition Chromatography - CPC) με την μέθοδο της βαθμιδωτής έκλουσης-εξώθησης, η οποία δίνει την δυνατότητα για κλασμάτωση των συστατικών ενός μίγματος εξαρτώμενη από τον συντελεστή κατανομής των μορίων στο διφασικό σύστημα διαλυτών που θα επιλεγεί. Η κλασμάτωση του δραστικού εκχυλίσματος πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στη Παράγραφο Β.5.

Από τη κλασμάτωση 150.7 mg του CA-129531\_EtOAc\_LL παραλήφθηκαν συνολικά 50 κλάσματα. Το σύνολο των κλασμάτων ελέγχθηκε ποιοτικά με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) και ομαδοποιήθηκαν σε 16 συνενώσεις κλασμάτων (Πίνακας Β.11). Τα νέα κλάσματα που προέκυψαν υποβλήθηκαν ξανά σε TLC χρωματογραφία (Εικόνα Γ.81).

**Πίνακας Γ.26:** Οι αποδόσεις της κλασμάτωσης με CPC, όπως προέκυψαν από τη συνένωση των παρόμοιων κλασμάτων

Συνενώσεις	Κωδικοί	Μεταβολίτης	Καθαρό βάρος (mg)
(1-7)	-	-	1.83
(8-9)	KGBa8	-	39.5
(10-11)	-	-	6.37
(12-13)	KGBa9	-	4.77
(14-15)	KGBa5	4	3.71
(16-19)	KGBa15	-	3.57
(20-21)	-	-	1.45
(22-24)	KGBa11	-	2.75
(25-29)	KGBa6	-	2.77
(30-31)	-	-	1.36
(32-34)	KGBa7	5	3.92
(35-37)	-	-	0.91
(38-43)	-	-	0.94
(44-45)	-	-	6.02
(46-47)	-	-	-
(48-50)	-	-	0.52



**Εικόνα Γ.82:** Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Σύστημα διαλυτών CHCl<sub>3</sub>/ΜΕΟΗ:90/10. Στη χρωματογραφία παρουσιάζονται τα συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από τη CPC, καθώς και το εκχυλίσμα CA-129531\_EtOAc\_LL που υποβλήθηκε σε αυτή τη κλασμάτωση.

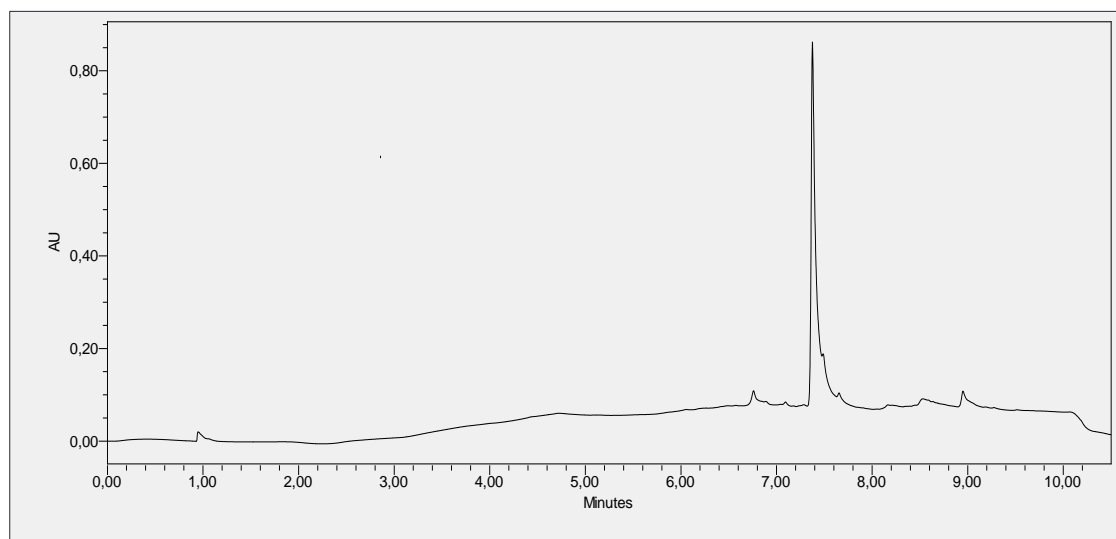
Μετά το τέλος της αρχικής κλασμάτωσης του εκχυλίσματος CA-129531\_EtOAc\_LL ακολούθησε ο έλεγχος της λευκαντικής δράσης των αντιπροσωπευτικών κλασμάτων με στόχο να δοθεί προτεραιότητα στη βιοκατευθυνόμενη απομόνωση και ταυτοποίηση των δευτερογενών μεταβολιτών του εκχυλίσματος. Τα επιλεγθέντα προς εξέταση κλάσματα, καθώς και η λευκαντική τους δράση, που ελέγχθηκε σε δύο συγκεντρώσεις (100 και 50 µg/ml) βάσει του πρωτοκόλλου που περιγράφεται στη Παράγραφο Β.2.2, παρουσιάζονται στον Πίνακα Γ.27.

**Πίνακας Γ.27:** Λευκαντική δράση αντιπροσωπευτικών συνενωμένων κλασμάτων που προήλθαν από το CPC

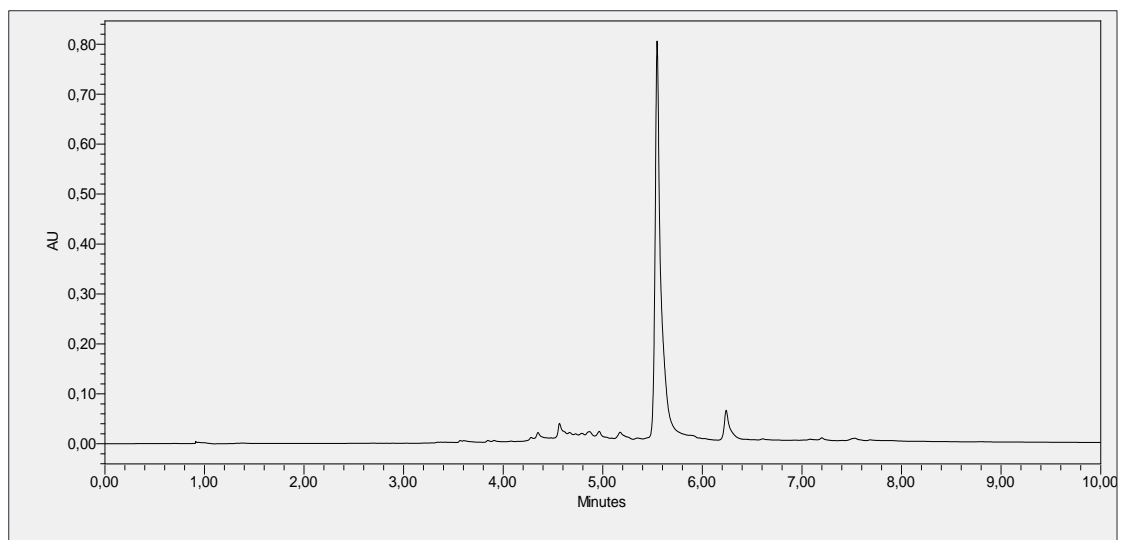
Συνενώσεις	C (μg/ml)	% Αναστολή	STDEV
(8-9)	100	30.92	3.51
	50	19.85	0.83
<b>(12-13)</b>	<b>100</b>	<b>92.37</b>	<b>1.16</b>
	<b>50</b>	<b>86.33</b>	<b>0.17</b>
<b>(16-19)</b>	<b>100</b>	<b>94.12</b>	<b>0.38</b>
	<b>50</b>	<b>89.45</b>	<b>1.46</b>
<b>(25-29)</b>	<b>100</b>	<b>80.27</b>	<b>1.07</b>
	<b>50</b>	<b>70.33</b>	<b>0.11</b>
<b>(32-34)</b>	<b>100</b>	<b>56.42</b>	<b>1.15</b>
	<b>50</b>	<b>55.61</b>	<b>0.19</b>
(44-45)	100	2.69	3.80
	50	-5.74	0.28
(48-50)	100	-5.85	2.65
	50	-7.11	2.42

Τα αποτελέσματα των βιολογικών δοκιμών έδειξαν ότι η λευκαντική δράση του ολικού εκχυλίσματος, που υπενθυμίζεται ότι βρέθηκε  $74.35 \pm 0.48$ , οφείλεται στους δευτερογενείς μεταβολίτες που περιέχονται στα συνενωμένα κλάσματα (12-13), (16-19), (25-29) και (32-34).

Τα συνενωμένα κλάσματα (14-15) και (32-34), που έχουν κωδικοποιηθεί ως KGBa5 (Μεταβολίτης 4) και KGBa7 (Μεταβολίτης 5) αντίστοιχα, προορίστηκαν σε ταυτοποίηση.



**Εικόνα Γ.83:** Χρωματογράφημα Μεταβολίτη 4 ( KGBa5) (254 nm)

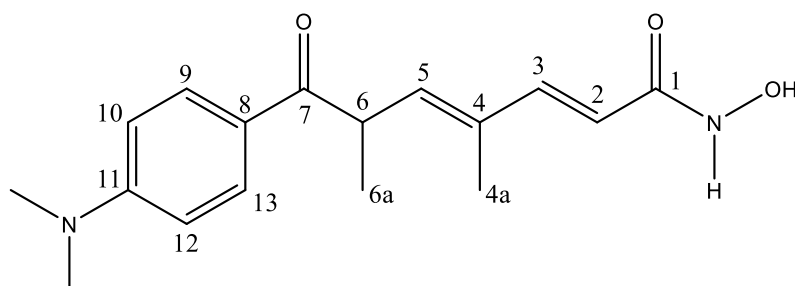


**Εικόνα Γ.84:** Χρωματογράφημα Μεταβολίτη 5 (KGBa7) (254 nm)

Γ.4.3 ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΤΟΥ CA-129531\_EtOAc\_LL

Γ.4.3.1 Μεταβολίτης 4 (KGBa5)

Ο μεταβολίτης που απομονώθηκε από το κλάσμα (14-15) του CPC ταυτοποιήθηκε ως η τριχοστατίνη A (trichostatin A), το οποίο έχει απομονωθεί το 1976 από στελέχη του ακτινομύκητα *Streptomyces hygroscopicus* (Tsuji, N., et al., 1976).



Εικόνα Γ.85: Δομή τριχοστατίνης A (Μεταβολίτης 4)

Πίνακας Γ.28: Χημικές μετατοπίσεις  $^1\text{H}$  NMR του μεταβολίτη 4

Θέση	$^1\text{H}$ NMR (600MHz, MeOD, $\delta$ ppm, J σε Hz)	$^{13}\text{C}$ NMR* (600MHz, MeOD, $\delta$ ppm)
1	-	-
2	5.87 (d, 1H, J=15.07 Hz)	115.48
3	7.16 (d, 1H, J=15.07 Hz)	144.17
4	-	132.83
5	5.90 (d, 1H, J=9.95 Hz)	139.65
6	4.53 (dq, 1H, J= 6.48, 9.95 Hz)	40.16
7	-	199.97
8	-	123.75
9, 13	7.87 (d, 2H, J=9.36 Hz)	130.46
10, 12	6.73 (d, 2H, J=9.36 Hz)	110.37
11	-	153.98
4a	1.92 (s, 3H)	11.22
6a	1.27 (d, 3H, J=6.48 Hz)	16.78
11-N,N-dimethyl	3.06 (s, 6H)	38.48

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

Στην αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR, παρατηρούνται δύο διπλές κορυφές στα 7.87 και 6.73 ppm, που ολοκληρώνουν για 2 πρωτόνια η κάθε μία, με σύζευξη J-9.36 Hz. Αυτά τα πρωτόνια ανήκουν στους γειτονικούς και ισοδύναμους άνθρακες C-9/C-13 και C-10/C-12 και η συσχέτισής τους επιβεβαιώνονται από το φάσμα COSY (Εικόνα Γ.87).

Στα 3.06 ppm εντοπίζεται σήμα μονής κορυφής που αντιστοιχεί στα 6 ισοδύναμα μεθυλικά πρωτόνια της 11-N,N-διμεθυλομάδας. Στην συνέχεια, από το φάσμα HSQC προσδιορίστηκαν και οι αντιστοιχοι ισοδύναμοι άνθρακες τους στα 38.48 ppm. Από το φάσμα HMBC φαίνεται η σύζευξη του άνθρακα στα 153.98 ppm με το πρωτόνιο στα 7.87 ppm που αντιστοιχεί στα ισοδύναμα H-9/H-13. Άρα στα 153.98 ppm αντιστοιχεί ο C-11. Επίσης συμπεραίνεται ότι τα 6.73 αντιστοιχούν τα H-10/H-12. Από το 2D φάσμα HSQC βρίσκονται οι μετατοπίσεις των ισοδύναμων ανθράκων C10/C12 στα 110.37 ppm. Επίσης, βάσει του πειραματος HMBC προσδιορίστηκε η χημική μετατόπιση του C8 στα 123.75 ppm, καθώς εντοπίστηκε η σύζευξη του με τα πρωτόνια στα 6.73 ppm.

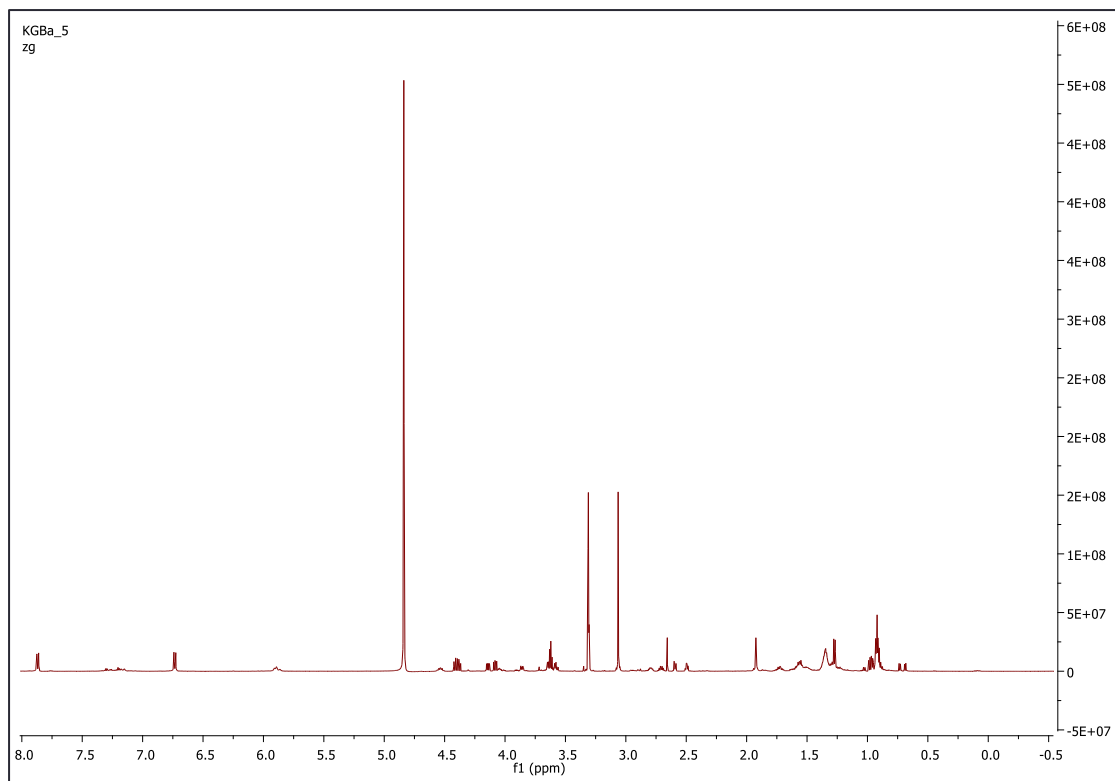
Από τη μελέτη του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR, στην αλειφατική περιοχή εμφανίζεται στα 1.27 ppm μία διπλή κορυφή, που ολοκληρώνει για 3H και υποδηλώνει την παρουσία ενός μεθυλίου (C6a). Στα 199.97 ppm αντιστοιχίζεται ο καρβονυλικός άνθρακας C7 ο οποίος από το φάσμα HMBC παρατηρείται να έχει σύζευξη με τα πρωτόνια στα 6.73 ppm (H-10/H-12) και 1.27 ppm (H-6a). Από το φάσμα HSQC η μετατόπιση του άνθρακα C6a βρίσκεται στα 16.78 ppm. Από το φάσμα HMBC φαίνεται η σύζευξη του H-6a με τον ολεφινικό άνθρακα C5 (139.65 ppm) και τον άνθρακα C6 (40.16 ppm).

Η μονή κορυφή στα 1.92 ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθυλίου στη θέση 4a του μορίου, του οποίου ο άνθρακας βρίσκεται από το HSQC να έχει μετατόπιση στα 11.22 ppm. Από το φάσμα HMBC παρατηρείται η σύζευξη των μεθυλικών πρωτονίων H4a με τον τεταρτοταγή άνθρακα C4 στα 132.83 ppm, καθώς επίσης και με τους άνθρακες των πρωτονίων H3 και H5 στα 144.17 και 139.65, αντιστοιχα.

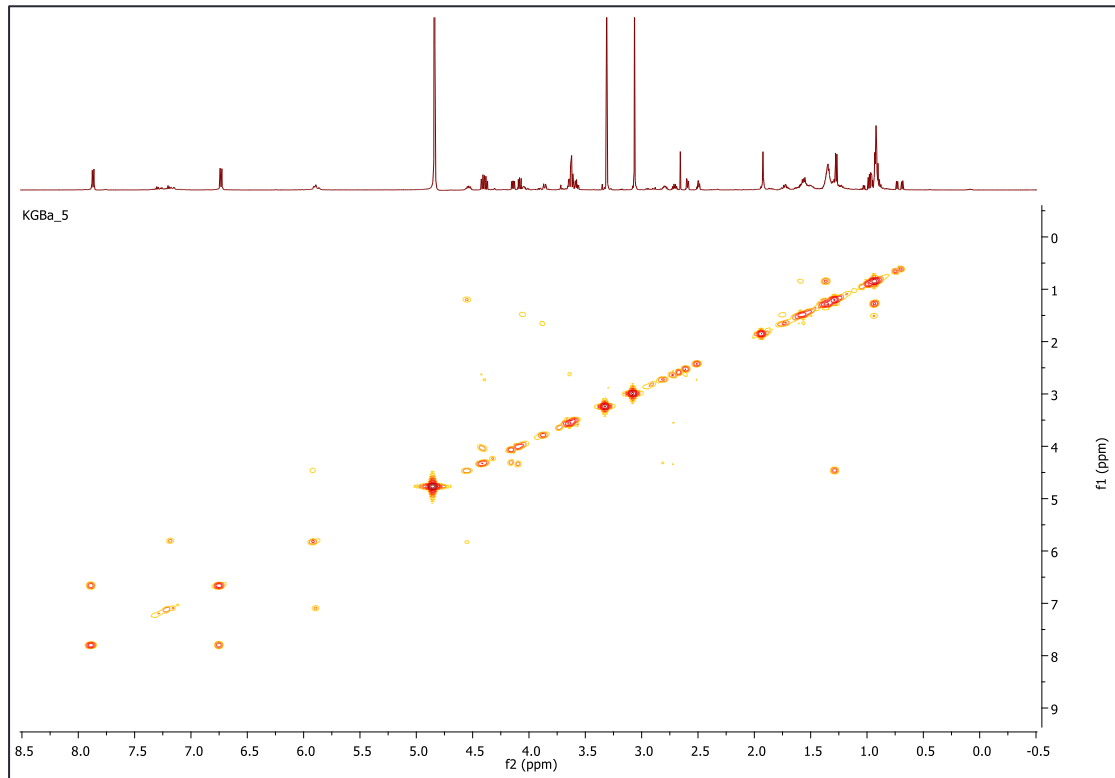
Στην αρωματική περιοχή του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR διακρίνεται σήμα στα 7.16 ppm. Από τη μεγάλη σταθερά σύζευξης (15.07 Hz) προσδιορίζεται η παρουσία διπλού δεσμού σε trans διαμόρφωση μεταξύ μεταξύ των πρωτονίων H-2 και H-3, όπως αυτό αποδεικνύεται από το φάσμα COSY, λόγω της συζεύξης που παρουσιάζουν.

Από τη βιβλιογραφία θα αναμέναμε μία διπλή κορυφή περίπου στα 5.87 ppm που να ολοκληρώνει για 1H και να έχει σύζευξη  $\approx 15$  Hz (Chatterjee A. et al., 2010). Από το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR παρατηρείται ότι στην περιοχή κοντά στα 5.90 ppm εμφανίζονται δύο σήματα με παρόμοια χημική μετατόπιση, εκ των οποίων το ένα στα 5.90 έχει ήδη αντιστοιχηθεί στο H-5. Άρα η κορυφή στα 5.87 ppm αντιστοιχεί στον άνθρακα στα 115.48 ppm, ο οποίος αντιστοιχεί στον C2.

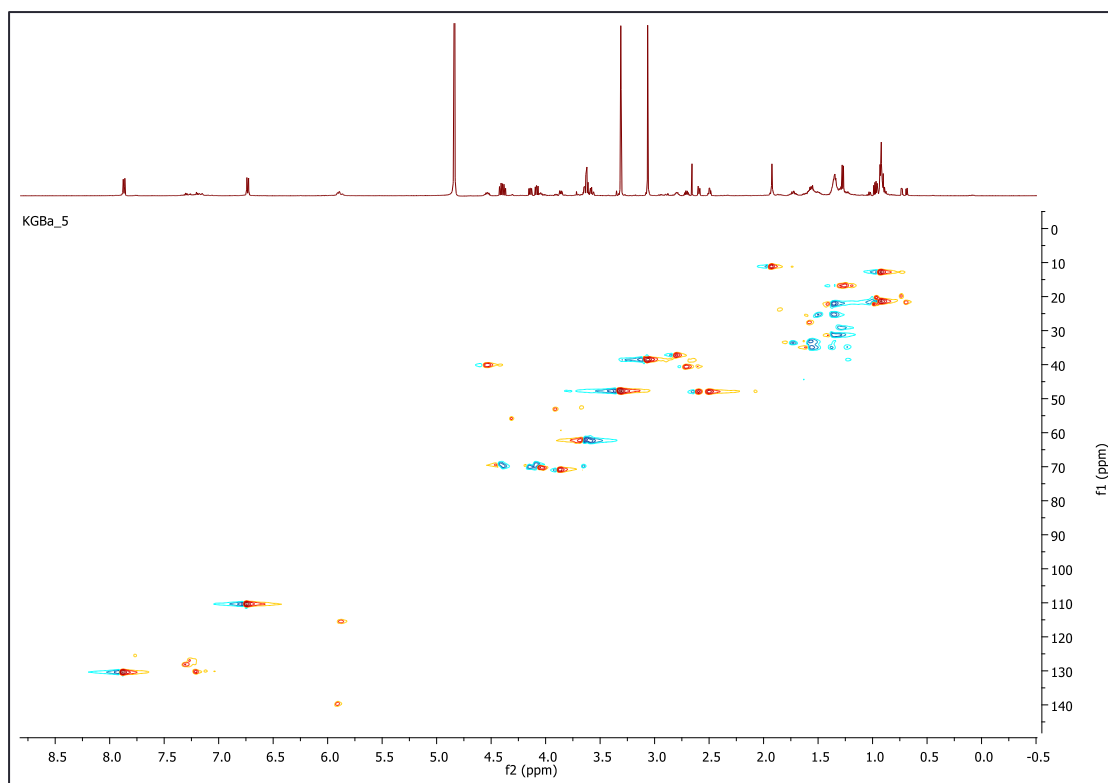




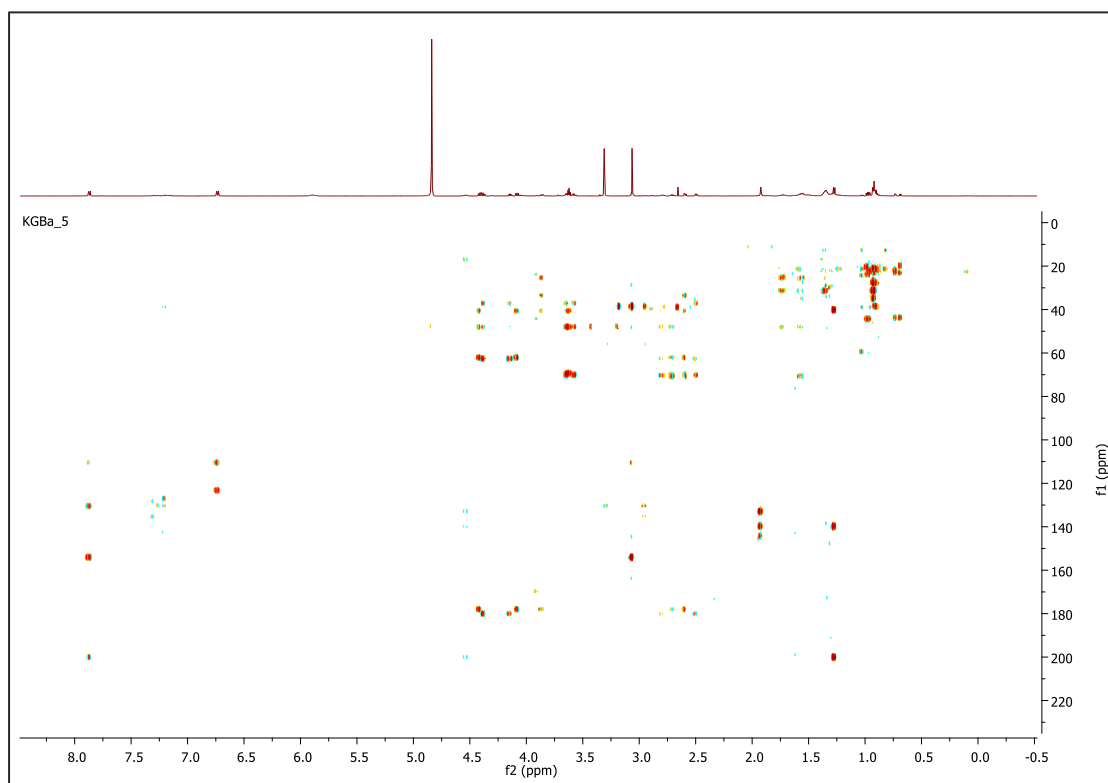
**Εικόνα Γ.86:** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR για τον Μεταβολίτη 4.



**Εικόνα Γ.87:** Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 4.

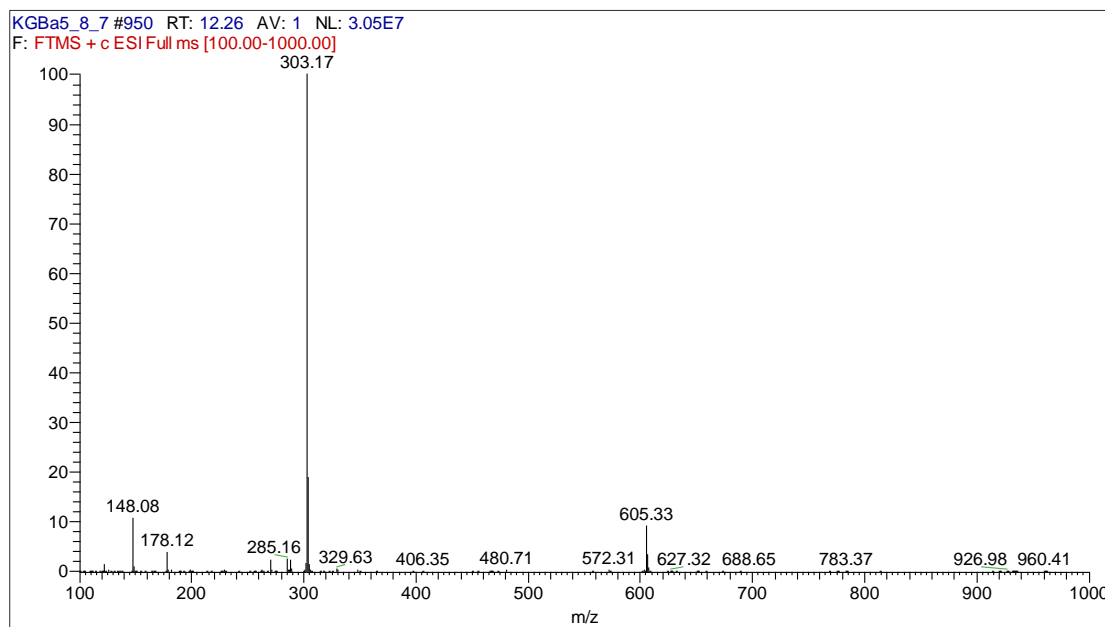


**Εικόνα Γ.88:** Φάσμα HSQC για τον Μεταβολίτη 4.



**Εικόνα Γ.89:** Φάσμα HMBC για τον Μεταβολίτη 4.

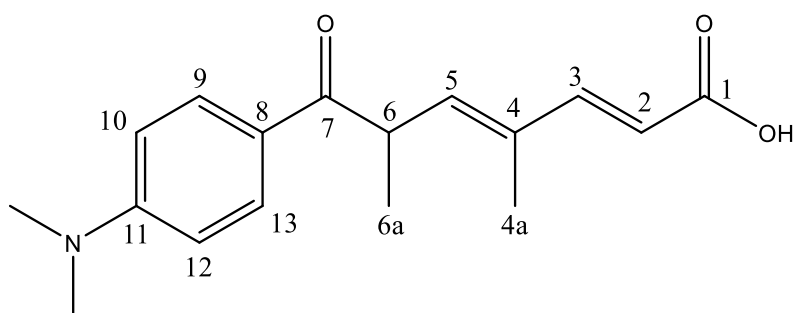
Η ανάλυση των 1D και 2D φασμάτων και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με των προτεινόμενων από τη βιβλιογραφία μας έδωσαν τη δυνατότητα να προσδιορίσουμε το μοριακό τύπο του μεταβολίτη KGBa5 ως  $C_{17}H_{22}N_2O_3$  με  $MB=302$  (Takahiro Hosoya et al., 2012). Ο μοριακός τύπος επιβεβαιώθηκε και από το φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS στο οποίο εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα  $m/z=303.17$ .



Εικόνα Γ.90: Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 4.

#### Γ.4.3.1 Μεταβολίτης 5 (KGBa7)

Ο μεταβολίτης που απομονώθηκε από το κλάσμα (32-34) του CPC ταυτοποιήθηκε ως το τριχοστατικό οξύ (trichostatic acid), το οποίο έχει συντεθεί χημικώς (Chatterjee, A., et al., 2010), καθώς και έχει απομονωθεί από είδος του *Streptomyces* sp. που απομονώθηκε από θαλάσσιο σπόγγο (Hosoya, T., et al., 2012).

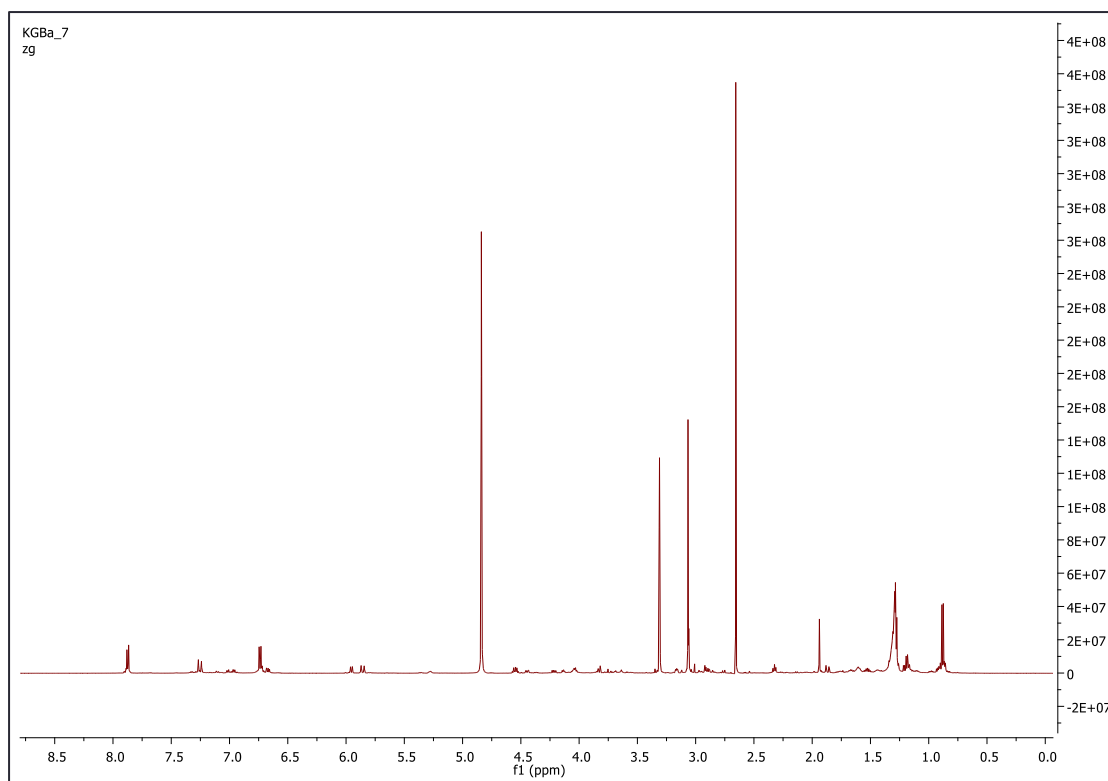


Εικόνα Γ.91: Δομή τριχοστατικού οξέος (Μεταβολίτης 5)

Πίνακας Γ.29: Χημικές μετατοπίσεις  $^1\text{H}$  NMR του μεταβολίτη 5

Θέση	$^1\text{H}$ NMR (600MHz, MeOD, $\delta$ ppm, J σε Hz)	$^{13}\text{C}$ NMR* (600MHz, MeOD, $\delta$ ppm)
1	-	169.55
2	5.86 (d, J=15.86 Hz, 1H)	117.05
3	7.25 (d, J= 15.86 Hz, 1H)	148.80
4	-	132.92
5	5.95 (d, J= 9.37 Hz, 1H)	141.13
6	4.55 (dq, J= 6.56, 9.37 Hz, 1H)	40.13
7	-	199.81
8	-	123.15
9, 13	7.87 (d, J=9.01 Hz, 2H)	130.51
10, 12	6.74 (d, J=9.01 Hz, 2H)	110.34
11	-	153.73
4a	1.94 (d, J=1.10 Hz, 3H)	11.13
6a	1.27 (d, J=6.56 Hz, 3H)	16.92
11-N,N-dimethyl	3.07 (s, 6H)	38.90

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



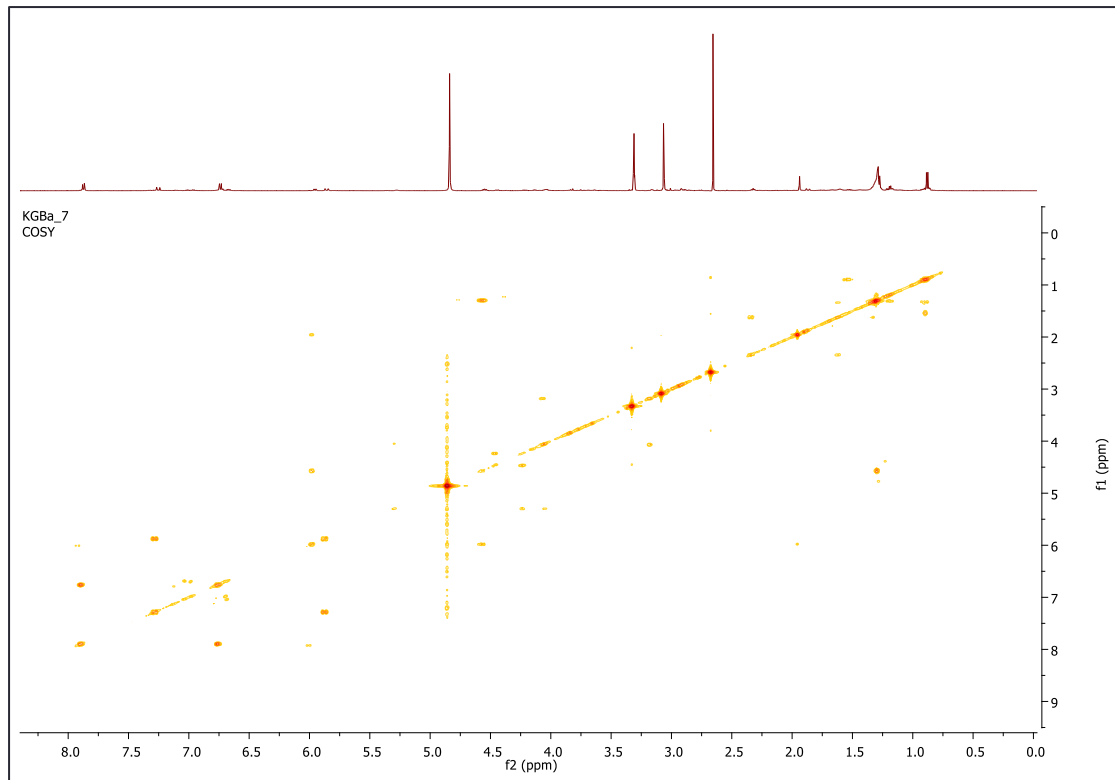
**Εικόνα Γ.92:** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR για τον Μεταβολίτη 5.

Από το φάσμα HMBC αντιστοιχίζεται ο καρβονυλικός C7 στα 199.81 ppm, ενώ καθώς παρουσιάζει σύζευξη με τα πρωτόνια στα 7.87 και 1.28 ppm τα οποία αντιστοιχίζονται στα ισοδύναμα H-9/H-13 και H-6a. Άρα η κορυφή στα 1.94 ppm από το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR αντιστοιχίζεται στο μεθύλιο στη θέση 4 του μορίου.

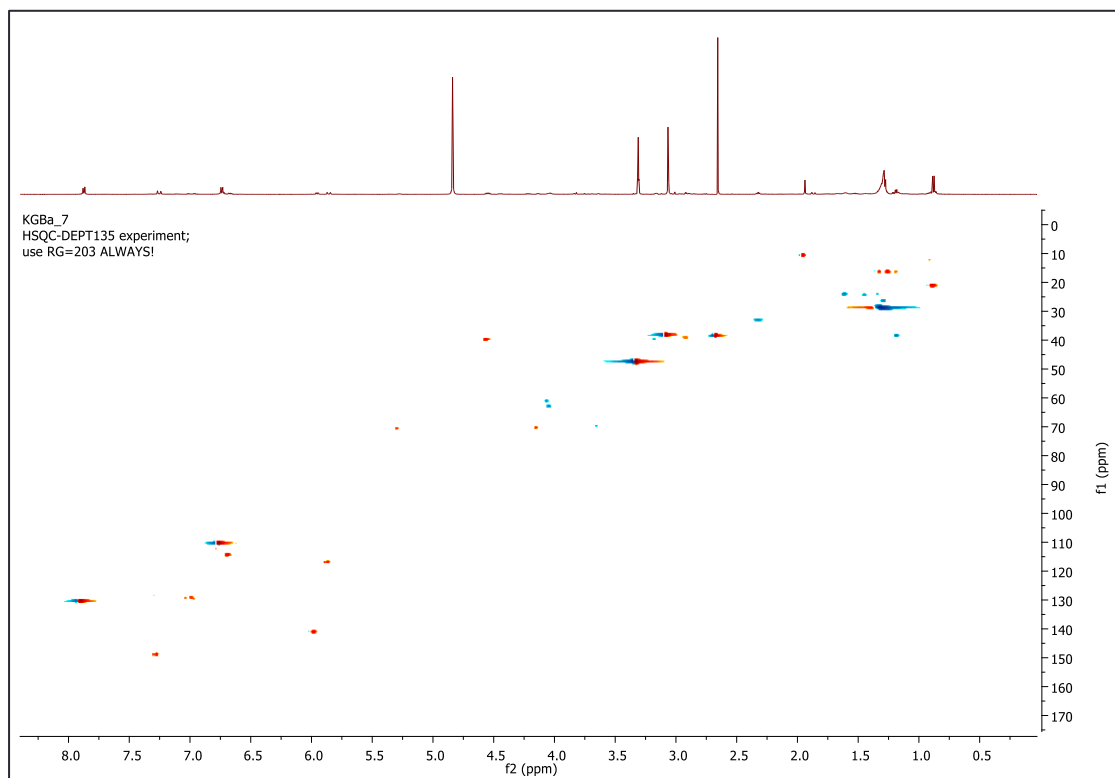
Από τη σύζευξη  $J \approx 15$  Hz των κορυφών στα 7.25 και 5.86 ppm από το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR, εντοπίζεται η trans σύζευξη του διπλού δεσμού μεταξύ των H-2 και H-3. Η σύζευξη των πρωτονίων αυτών επιβεβαιώνεται από το φάσμα COSY, ενώ από το φάσμα HSQC βρίσκονται οι μετατοπίσεις των C2 και C3 στα 117.05 και 148.80 ppm αντίστοιχα.

Από τα σήματα και τις συσχετίσεις του φάσματος HMBC αντιστοιχίζεται ο τεταρτοταγής C4 στα 132.92 ppm, ενώ ο άνθρακας στα 169.55 ppm, που παρουσιάζει συσχέτιση με το πρωτόνιο H-3, αντιστοιχίζεται στον C1 της καρβοξυλικής ομάδας.

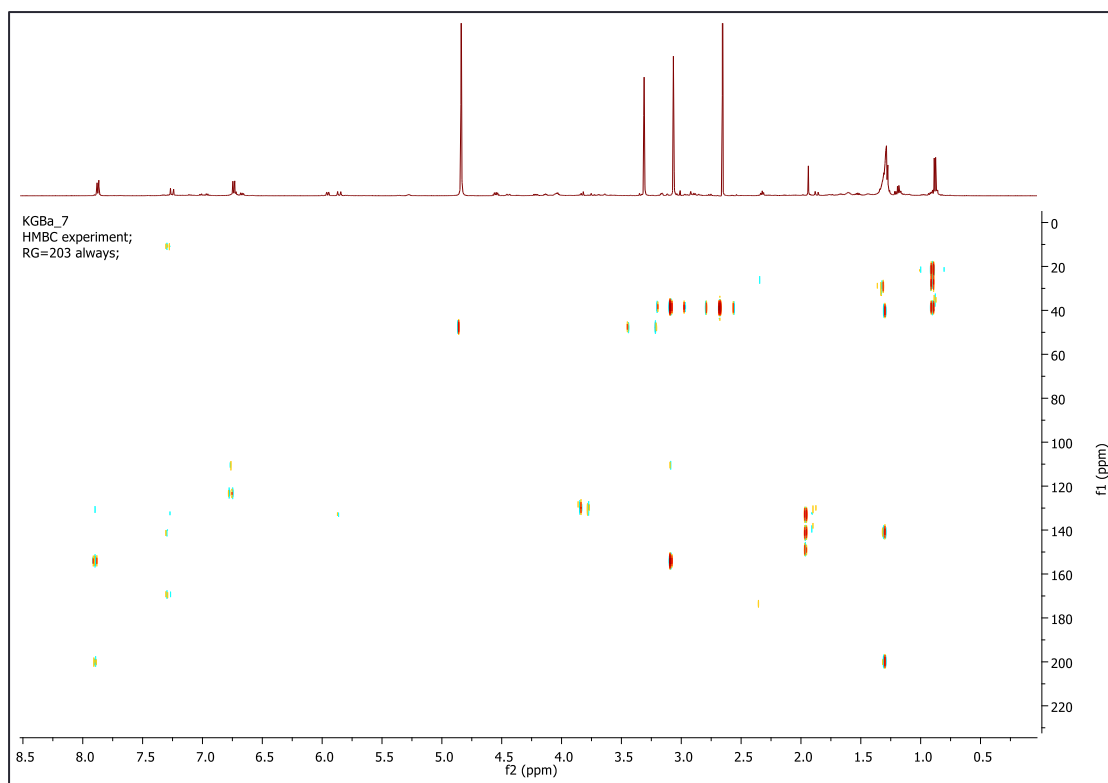
Οι υπόλοιπες συζεύξεις αντιστοιχίζονται κατ' αντίστοιχο τρόπο με τη πορεία που ακολουθήθηκε για τον μεταβολίτη 4.



**Εικόνα Γ.93:** Φάσμα COSY για τον Μεταβολίτη 5.

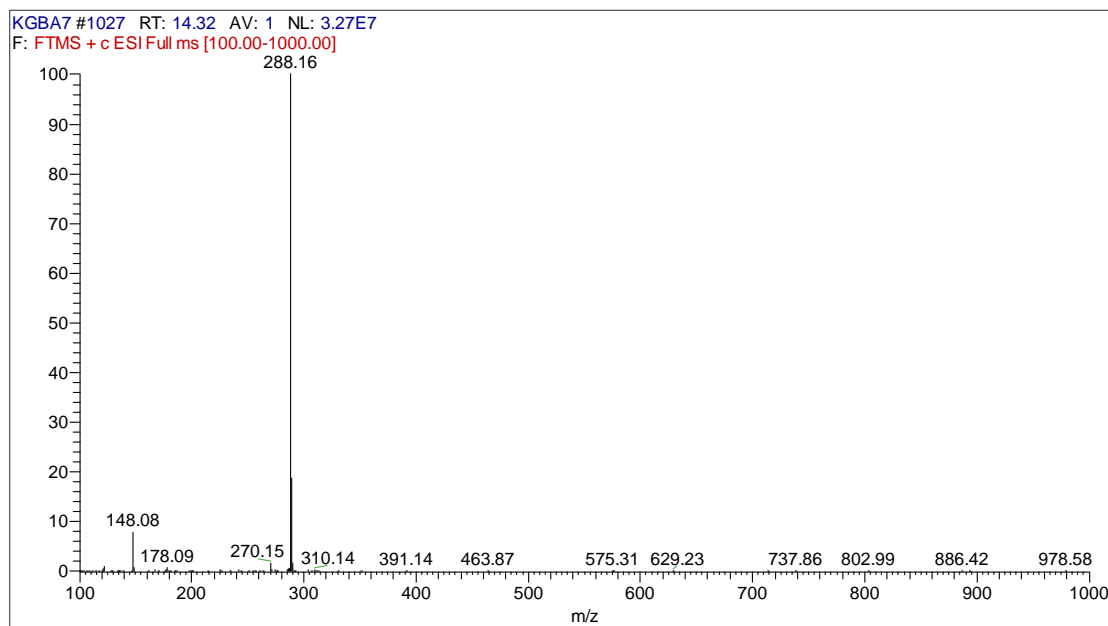


**Εικόνα Γ.94:** Φάσμα HSQC για τον Μεταβολίτη 5.



**Εικόνα Γ.95:** Φάσμα HSBC για τον Μεταβολίτη 5.

Η ανάλυση των 1D και 2D φασμάτων και η σύγκριση των χημικών μετατοπίσεων με των προτεινόμενων από τη βιβλιογραφία (Chatterjee, A., et al., 2010; Hosoya, T., et al., 2012) μας έδωσαν τη δυνατότητα να προσδιορίσουμε το μεταβολίτη 5 ως το τριχοστατικό οξύ. Το μοριακό βάρος του (MB=287) όπως επίσης και ο μοριακός τύπος του μεταβολίτη ( $C_{17}H_{21}NO_3$ ), επιβεβαιώθηκαν και από το φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS στο οποίο εμφανίστηκε το ψευδομοριακό ιόν στα  $m/z=288.15$ .



**Εικόνα Γ.96:** Φάσμα μάζας ESI(+) HR-MS για τον Μεταβολίτη 5.





## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

---

Ανάμεσα στα 1082 εκχυλίσματα μικροοργανισμών προερχόμενων από την παγκόσμια μικροβιακή βιοποικιλότητα (614 εκχυλίσματα ακτινομυκήτων και 425 εκχυλίσματα μυκήτων), 104 εκχυλίσματα επέδειξαν σημαντική δράση σε τουλάχιστον ένα στόχο. Τα εκχυλίσματα των ακτινομυκήτων επέδειξαν σε μεγαλύτερη συχνότητα δράση από ό,τι αυτά των μυκήτων (44.23% παραπάνω τα δραστικά στελέχη των ακτινομυκήτων). Μόλις το 11% και 6% όλων των εκχυλισμάτων ακτινομυκήτων και μυκήτων αντίστοιχα, χαρακτηρίστηκαν ως μη κυτταροτοξικά και δραστικά.

Κατά το προκαταρκτικό screening δεν παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στη δράση που εμφανίζουν οι ακτινομύκητες και οι μύκητες. Σε αντίθεση, κατόπιν επεξεργασίας των δεδομένων και παρακολούθηση της δράσης σε συσχέτιση με τα μέσα καλλιέργειας, το DNPM για τους ακτινομύκητες και το SCY-2 για τους μύκητες αποτελούσαν τα καλλιεργητικά μέσα που κυριαρχούσαν ανάμεσα στα 104 hits. Αυτό οδηγεί ίσως στο συμπέρασμα ότι αποτελούν κατάλληλα μέσα ζύμωσης για την ανάπτυξη των επιθυμητών βιοδραστικών δευτερογενών μεταβολιτών.

Το επόμενο στάδιο της μελέτης, ήταν η επιλογή των 20 πιο δραστικών εκχυλισμάτων που πραγματοποιήθηκε μέσω της αξιολόγησης του χημικού προφίλ των 104 εκχυλισμάτων και μέσω της επανάληψης όλων των βιολογικών δοκιμών. Τελικώς επιλέχθηκαν 19 στελέχη, εκ των οποίων το ένα παρουσίασε σημαντική δράση καλλιεργούμενο σε δύο διαφορετικά καλλιεργητικά μέσα. Αυτό το γεγονός αποδεικνύει και την ιδιαιτερότητα των μικροοργανισμών να παράγουν διαφορετικούς μεταβολίτες όταν καλλιεργούνται σε διαφορετικές συνθήκες. Τα 20 εκχυλίσματα επιλέχθηκαν κατά κύριο λόγο για αξιολογη αντιοξειδωτική (6 εκχυλίσματα) και λευκαντική δράση (6 εκχυλίσματα). Πέντε από αυτά παρουσίασαν σημαντική αναστολή του ενζύμου της ελαστάσης, ενώ τρία παρουσίασαν αναστολή του ενζύμου της κολλαγενάσης. Τα αποτελέσματα των δοκιμών για την αναστολή της πρωτεάσης δεν έδωσαν σημαντικά αποτελέσματα.

Τα στελέχη καλλιεργήθηκαν στο 1 L με το βέλτιστο καλλιεργητικό μέσο με στόχο την επιβεβαίωση της δράσης τους και την παραγωγή ποικίλων εκχυλισμάτων, με στόχο την βιοκατευθυνόμενη βελτιστοποίηση της μεθόδου εκχύλισης. Δηλαδή την ανεύρεση της μεθόδου εκχύλισης που απέδιδε τη μεγαλύτερη δράση ανά στέλεχος. Κατά το στάδιο αυτό, παρήχθησαν 66 εκχυλίσματα. Σημαντικό μέρος των στελεχών που επιλέχθηκαν για αντιοξειδωτική δράση, δεν επιβεβαίωσαν την αρχική υπόθεση. Σε αντίθεση, η λευκαντική δράση παρέμεινε αξιοσημείωτη στα στελέχη που επιλέχθηκαν για αυτή, ενώ παράλληλα εμφανίστηκε σε πολλά από τα στελέχη που παρουσίασαν κατά το προκαταρκτικό screening μόνο αντιοξειδωτική δράση. Τα αιθανολικά εκχυλίσματα που προήλθαν από χρήση ρητίνης προσρόφησης έδειξαν σε

μεγαλύτερο ποσοστό αξιόλογη αντιοξειδωτική δράση, ενώ τα εκχυλίσματα του οξικού αιθυλεστέρα έδειξαν αξιόλογη λευκαντική δράση.

Το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα του *Cercospora sp.* (στέλεχος CF-223709) κατέδειξε την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση ( $70.76\% \pm 1.28$  ποσοστό δέσμευσης της ελεύθερης ρίζας DPPH), ενώ το εκχύλισμα οξικού αιθυλεστέρα που προήλθε από υγρή υγρή εκχύλιση (EtOAc\_LL) του *Streptomyces hygrosopicus angustmyceticus* (στέλεχος CA-129531) κατέδειξε την πιο σημαντική λευκαντική δράση ( $74.35\% \pm 0.48$  αναστολή του ενζύμου της τυροσινάσης).

Η ανάλυση και βιοκατευθυνόμενη κλασμάτωση των εκχυλισμάτων αυτών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας ταυτόχρονα κλασικές χρωματογραφικές μεθόδους (ημι-παρασκευαστική HPLC), καθώς και πιο καινοτόμες τεχνικές, όπως UPLC, SFC-MS και FCPC, με αποτέλεσμα την ταυτοποίηση των κατόπι δραστικών μορίων:

- τριών μεταβολιτών, στους οποίους οφείλεται η αντιοξειδωτική δράση του στελέχους CF-223709. Σε αυτούς περιλαμβάνονται οι γνωστές ενώσεις φουλβικό οξύ ( $IC_{50}=21.58$   $\mu\text{g/ml}$ , δοκιμή DPPH) και βιναξανθόνη ( $35.08$   $\mu\text{g/ml}$ , δοκιμή DPPH), καθώς και ένα νέο φυσικό προϊόν με χημικό τύπο  $C_{13}H_{12}O_6$  ( $IC_{50}=18.99$   $\mu\text{g/ml}$ , δοκιμή DPPH).
- δύο γνωστών μεταβολιτών, που συνεισφέρουν στην λευκαντική δράση του στελέχους CA-129531, της τριχοστατίνης A και του τριχοστατικού οξέος.

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

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

Angeli, J. P. F., Ribeiro, L. R., Camelini, C. M., de Mendonça, M. M., & Mantovani, M. S. (2009). Evaluation of the antigenotoxicity of polysaccharides and  $\beta$ -glucans from *Agaricus blazei*, a model study with the single cell gel electrophoresis/Hep G2 assay. *Journal of food composition and analysis*, 22(7), 699-703.

Aniszewski, T. (2015). *Alkaloids: Chemistry, Biology, Ecology, and Applications*. Elsevier.

Arnone A., Camarda L., Merlini L., Nasini G. (1975). The structure of ligustrone A, B and C, new metabolites from *Cercospora ligustrina* Boerema, *Gazzetta chimica Italiana*, 105,1093-1103.

Assante, G., Merlini, L., & Nasini, G. (1977). (+)-Abscisic acid, a metabolite of the fungus *Cercospora rosicola*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 33(12), 1556-1557.

Barr, P. J., Santi, D. V., Ashley, G. W., & Ziermann, R. (2000). U.S. Patent No. 6,033,883. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Barros, L., Baptista, P., Estevinho, L. M., & Ferreira, I. C. (2007b). Effect of fruiting body maturity stage on chemical composition and antimicrobial activity of *Lactarius* sp. mushrooms. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(21), 8766-8771.

Barros, L., Ferreira, M. J., Queiros, B., Ferreira, I. C., & Baptista, P. (2007a). Total phenols, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food chemistry*, 103(2), 413-419.

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

Becker, B., Lechevalier, M. P., & Lechevalier, H. A. (1965). Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various form-genera of aerobic actinomycetes. *Applied microbiology*, 13(2), 236-243.

Bhattacharyya, B. K., Pal, S. C., & Sen, S. K. (1998). Antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus* D1. 5: Cultural effect. *Revista de microbiologia*, 29(3).

Brandt, F. S., Cazzaniga, A., & Hann, M. (2011, September). Cosmeceuticals: current trends and market analysis. In *Seminars in cutaneous medicine and surgery* (Vol. 30, No. 3, pp. 141-143). Frontline Medical Communications.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Briganti, S., Camera, E., & Picardo, M. (2003). Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Research*, 16(2), 101-110.
- Caboche, S., Leclère, V., Pupin, M., Kucherov, G., & Jacques, P. (2010). Diversity of monomers in nonribosomal peptides: towards the prediction of origin and biological activity. *Journal of bacteriology*, 192(19), 5143-5150.
- Cambon-Bonavita, M. A., Raguenes, G., Jean, J., Vincent, P., & Guezenec, J. (2002). A novel polymer produced by a bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid. *Journal of applied microbiology*, 93(2), 310-315.
- Campana, F., Zervoudis, S., Perdereau, B., Gez, E., Fourquet, A., Badiu, C., ... & Koulaloglou, S. (2004). Topical superoxide dismutase reduces post-irradiation breast cancer fibrosis. *Journal of cellular and molecular medicine*, 8(1), 109-116.
- Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2012). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta*, 732, 100-104.
- Chang, T. S., & Tseng, M. (2006). Preliminary screening of soil actinomycetes for anti-tyrosinase activity. *Journal of Marine Science and Technology*, 14(3), 190-193.
- Chatterjee, A., Richer, J., Hulett, T., Iska, V. B. R., Wiest, O., & Helquist, P. (2010). An Efficient Synthesis of ( $\pm$ )-Trichostatic Acid and Analogues: A New Route to ( $\pm$ )-Trichostatin A. *Organic letters*, 12(4), 832-834.
- Cheng, M. H., Walker, T. H., Hulbert, G. J., & Raman, D. R. (1999). Fungal production of eicosapentaenoic and arachidonic acids from industrial waste streams and crude soybean oil. *Bioresource technology*, 67(2), 101-110.
- Chien, C. C., Tsai, M. L., Chen, C. C., Chang, S. J., & Tseng, C. H. (2008). Effects on tyrosinase activity by the extracts of *Ganoderma lucidum* and related mushrooms. *Mycopathologia*, 166(2), 117-120.
- Choi, D.S. & Berson, C.M. (2006). Cosmeceuticals. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*. PubMed, 163-168.
- Crandall, L. W., & Hamill, R. L. (1986). Antibiotics produced by *Streptomyces*: major structural classes. *The bacteria*, 9, 355-401.
- Das, A., & Khosla, C. (2009). Biosynthesis of aromatic polyketides in bacteria. *Accounts of chemical research*, 42(5), 631-639.

- Dong, K. K., Damaghi, N., Kibitel, J., Canning, M. T., Smiles, K. A., & Yarosh, D. B. (2007). A comparison of the relative antioxidant potency of L-ergothioneine and idebenone. *Journal of cosmetic dermatology*, 6(3), 183-188.
- Dover, J. (2008). Skin therapy letter. *Cosmeceuticals: A Practical Approach*, 1-7.
- Dubost, N. J., Beelman, R. B., & Royse, D. J. (2007). Influence of selected cultural factors and postharvest storage on ergothioneine content of common button mushroom *Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach (Agaricomycetidae). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 9(2).
- Dubost, N. J., Beelman, R. B., Peterson, D., & Royse, D. J. (2006). Identification and quantification of ergothioneine in cultivated mushrooms by liquid chromatography-mass spectroscopy. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 8(3).
- Dureja, H., Kaushik, D., Gupta, M., Kumar, V., & Lather, V. (2005). Cosmeceuticals: An emerging concept. *Indian Journal of Pharmacology*, 37(3), 155.
- Ellwood, D. C., Evans, C. G. T., Dunn, G. M., McInnes, N., Yeo, R. G., & Smith, K. J. (1996). U.S. Patent No. 5,563,051. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Esclapez, M. D., García-Pérez, J. V., Mulet, A., & Cárcel, J. A. (2011). Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Engineering Reviews*, 3(2), 108-120.
- Fang, S. H., Rao, Y. K., & Tzeng, Y. M. (2008). Anti-oxidant and inflammatory mediator's growth inhibitory effects of compounds isolated from *Phyllanthus urinaria*. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(2), 333-340.
- Fatope, M. O., Al-Kindi, M. Z. S., & Abdunour, O. A. (2000). Research trends: Natural products as pest, microbial disease and tumor control agents. *Science and Technology*, 55-71.
- Flärdh, K., & Buttner, M. J. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 7(1), 36-49.
- Foucault, Alain P. (1994). *Centrifugal Partition Chromatography*. Chromatographic Science Series, Vol. 68. CRC Press.
- Fujita, K. I., Nagamine, Y., Ping, X., & Taniguchi, M. (1999). Mode of Action of Anhydrofulvic Acid against *Candida utilis* ATCC 42402 under Acidi Condition. *The Journal of antibiotics*, 52(7), 628-634.
- Fulekar, M. H. (2010). *Environmental biotechnology*. CRC Press.
- Gao, J. M., Zhang, A. L., Chen, H., & Liu, J. K. (2004). Molecular species of ceramides from the ascomycete truffle *Tuber indicum*. *Chemistry and physics of lipids*, 131(2), 205-213.

- Gao, X. H., Zhang, L., Wei, H., & Chen, H. D. (2008). Efficacy and safety of innovative cosmeceuticals. *Clinics in dermatology*, 26(4), 367-374.
- Gautier, S., Xhaufnaire-Uhoda, E., Gonry, P., & Piérard, G. E. (2008). Chitin–glucan, a natural cell scaffold for skin moisturization and rejuvenation. *International journal of cosmetic science*, 30(6), 459-469.
- Glogau, R. G. (1994). Chemical peeling and aging skin. *J Geriatr Dermatol*, 2(1), 30-35.
- Gordon, E. M., & Sykes, R. B. (2014). Cephamycin antibiotics. *Chemistry and biology of  $\beta$ -lactam antibiotics*, 1, 199-370.
- Guarino, A.J. (1967). Angustmycin A. In *Mechanism of Action*. Springer Berlin Heidelberg, 464-467.
- Guiochon, G., & Tarafder, A. (2011). Fundamental challenges and opportunities for preparative supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(8), 1037-1114.
- Hamzaoui, M., Renault, J. H., Reynaud, R., & Hubert, J. (2013). Centrifugal partition extraction in the pH-zone-refining displacement mode: an efficient strategy for the screening and isolation of biologically active phenolic compounds. *Journal of Chromatography B*, 937, 7-12.
- Hanson, J. R. (2008). *Chemistry of fungi*. Royal Society of Chemistry.
- Hosoya, T., Hirokawa, T., Takagi, M., & Shin-ya, K. (2012). Trichostatin analogues JBIR-109, JBIR-110, and JBIR-111 from the marine sponge-derived *Streptomyces* sp. RM72. *Journal of natural products*, 75(2), 285-289.
- Houbraken, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2011). Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA fungus*, 2(1), 87-95.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., ... & Ōmura, S. (2003). Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nature biotechnology*, 21(5), 526-531.
- Jin, J. M., Lee, J., & Lee, Y. W. (2010). Characterization of carotenoid biosynthetic genes in the ascomycete *Gibberella zeae*. *FEMS microbiology letters*, 302(2), 197-202.
- Jüttner, F., & Watson, S. B. (2007). Biochemical and ecological control of geosmin and 2-methylisoborneol in source waters. *Applied and environmental microbiology*, 73(14), 4395-4406.

- Kaklamanos, G., Theodoridis, G., & Dabalís, T. (2009). Determination of anabolic steroids in bovine urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 877(23), 2330-2336.
- Kakumyan, P., & Matsui, K. (2009). Characterization of volatile compounds in *Astraeus* spp. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 73(12), 2742-2745.
- Kalač, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food chemistry*, 113(1), 9-16.
- Kavitha, A., Vijayalakshmi, M., Sudhakar, P., & Narasimha, G. (2010). Screening of actinomycetes strains for the production of antifungal metabolites. *African Journal of Microbiology Research*, 4(1), 027-032.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., & Hopwood, D. A. (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. International Microbiology Vol.3. The John Innes Foundation: Norwich, UK
- Kim, H. H., Cho, S., Lee, S., Kim, K. H., Cho, K. H., Eun, H. C., & Chung, J. H. (2006). Photoprotective and anti-skin-aging effects of eicosapentaenoic acid in human skin in vivo. *Journal of lipid research*, 47(5), 921-930.
- Kligman, A. M. (2000). Cosmeceuticals: do we need a new category?. *Cosmetic Science And Technology Series*, 1-8.
- Koleva, I. I., van Beek, T. A., Linssen, J. P., Groot, A. D., & Evstatieva, L. N. (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical analysis*, 13(1), 8-17.
- Korn-Wendisch, F. & Kutzner, H.J. (1992). The Family Streptymycetaceae, In: *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications*, Springer Verlag (Balows A., Trueper H.G., Dworkin M., Harder W. and Schleider K.H., Eds), second edition, 921-995.
- Krebs, K. G., Heusser, D., Wimmer, H., & Stahl, E. (1969). *Thin-layer chromatography*. by E. Stahl, Springer-Verlag, Berlin, Heiderberg and New York, 881.
- Křištofiková, L., Rosenberg, M., Vlnova, A., Šajbidor, J., & Čertík, M. (1991). Selection of *Rhizopus* strains for (+)-lactic acid and  $\gamma$ -linolenic acid production. *Folia microbiologica*, 36(5), 451-455.
- Kullavanijaya, P., & Lim H. (2005). Photoprotection. *J Am Acad Dermatol*, 937-958.
- Kumar, A. S., Mody, K., & Jha, B. (2007). Evaluation of biosurfactant/bioemulsifier production by a marine bacterium. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 79(6), 617-621.

Kumar, Y., & Goodfellow, M. (2010). Reclassification of *Streptomyces hygrosopicus* strains as *Streptomyces aldersoniae* sp. nov., *Streptomyces angustmyceticus* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces ascomycinicus* sp. nov., *Streptomyces decoyicus* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces milbemycinicus* sp. nov. and *Streptomyces wellingtoniae* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(4), 769-775.

Kutzner, H.J. (1981) *The Family Streptomycetaceae. The prokaryotes*, Springer Verlag, Berlin (Starr M.P., Stolp H., Truper G.H., Ballows A. & Schegel H.G. Eds.), 2028-2090.

Kuyama, S. (1962). Cercosporin. A pigment of *Cercosporina kikuchii* Matsumoto et Tomoyasu. III. The nature of the aromatic ring of cercosporin. *The Journal of Organic Chemistry*, 27(3), 939-944.

Kuyama, S., & Tamura, T. (1957). Cercosporin. A pigment of *Cercosporina kikuchii* Matsumoto et Tomoyasu. I. Cultivation of fungus, isolation and purification of pigment. *Journal of the American Chemical Society*, 79(21), 5725-5726.

Lechevalier, H. A., & Lechevalier, M. P. (1970). A critical evaluation of the genera of aerobic actinomycetes. In *The Actinomycetales. The Jena International Symposium on Taxonomy*, September 1968. (pp. 393-405).

Lechevalier, M. P., & Lechevalier, H. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 20(4), 435-443.

Lee, M., & Demain, A. (1997). Effects of nitrogen source on production of antibiotics. *Journal of Microbiology*, 412-422.

Lemann, P. (2007). Mushrooms in cosmetics. *SpecialChem Cosmetics and Personal Care, Innovations and Solutions*.

Leslie Gunatilaka, A. A. & Kithsiri Wijeratne, E. M.. (2015-2016) Natural Products from Bacteria and Fungi, *Phytochemistry and Pharmacognosy, Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*

Lintner, K., Lamy, F., Mas-Chamberlin, C., Mondon, P., Scocci, S., Buche, P., & Girard, P. (2002). Heat-stable enzymes from deep sea bacteria: a key tool for skin protection against UV-A induced free radicals. *IFSCC Mag*, 5(3), 195-200.

Locci, R. (1989). *The Actinomycetes I. Suprageneric classification of actinomycetes. Bergey's manual of systematic bacteriology Vol 4 (Williams S.T., Sharpe M.E. & Holt J.G. Eds.), Volume 4, 2451-2469.*

Lohani, A., Verma, A., Joshi, H., Yadav, N., & Karki, N. (2014). Nanotechnology-based cosmeceuticals. *ISRN dermatology, Volume 2014*.



- Lourenço, A., Lobo, A. M., Rodríguez, B., & Jimeno, M. L. (1996). Ceramides from the fungus *Phellinus pini*. *Phytochemistry*, 43(3), 617-620.
- Mantzouridou, F., & Tsimidou, M. Z. (2008). Lycopene formation in *Blakeslea trispora*. Chemical aspects of a bioprocess. *Trends in food science & technology*, 19(7), 363-371.
- Marchal, L., Legrand, J., & Foucault, A. (2003). Centrifugal partition chromatography: a survey of its history, and our recent advances in the field. *The Chemical Record*, 3(3), 133-143.
- Marston, A., & Hostettmann, K. (2006). Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis. *Journal of Chromatography A*, 1112(1), 181-194.
- Masuda, T., Fujita, N., Odaka, Y., Takeda, Y., Yonemori, S., Nakamoto, K., & Kuninaga, H. (2007). Tyrosinase inhibitory activity of ethanol extracts from medicinal and edible plants cultivated in okinawa and identification of a water-soluble inhibitor from the leaves of *Nandina domestica*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71(9), 2316-2320.
- Matsunaga, T., Burgess, J. G., Yamada, N., Komatsu, K., Yoshida, S., & Wachi, Y. (1993). An ultraviolet (UV-A) absorbing biopterin glucoside from the marine planktonic cyanobacterium *Oscillatoria* sp. *Applied microbiology and biotechnology*, 39(2), 250-253.
- Mohorčič, M., Friedrich, J., Renimel, I., André, P., Mandin, D., & Chaumont, J. P. (2007). Production of melanin bleaching enzyme of fungal origin and its application in cosmetics. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12(3), 200-206.
- Mukhtar, H., Ijaz, S., & Ikram-ul-Haq. (2012). Production of antitumor antibiotic by *Streptomyces capoamus*. *Pakistan Journal Of Botany*, 44(1), 445-452.
- Mukta, S., & Adam, F. (2010). Cosmeceuticals in day-to-day clinical practice. *Journal of drugs in dermatology: JDD*, 9(5 Suppl ODAC Conf Pt 1), s62-6.
- Narayan, S., Kharwar, R. N., & Singh, R. K. (2001). Some novel taxa of hyphomycete genus *Cercospora* causing foliar spots in India. *Indian Phytopathology*, 54(3), 351-357.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2007). Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of natural products*, 70(3), 461-477.
- Ng, T. B. (2004). Peptides and proteins from fungi. *Peptides*, 25(6), 1055-1073.

- Nieto, I. J., & Chegwin Carolina A. (2008). Triterpenoids and fatty acids identified in the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 53(2), 1515-1517.
- Nisbet, L. J. (1982). Current strategies in the search for bioactive microbial metabolites. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 32(1), 251-270.
- O'brien, D. J., Stinson, E. E., Wessinger, E. W., & Somkuti, G. A. (1993). U.S. Patent No. 5,246,842. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Okami, Y., & Hotta, K. (1988). Search and discovery of new antibiotics.
- Ōmura, S., & Tanaka, H. (1984). Production, structure and antifungal activity of polyene macrolides. In *Macrolide Antibiotics: Chemistry, Biology, and Practice* (pp. 351-404). Academic Press, New York.
- Pape, H., & Rehm, H. J. (Eds.). (1986). *Microbial products II* (Vol. 4). VCH Verlagsgesellschaft mbH.
- Parvez, S., Kang, M., Chung, H. S., & Bae, H. (2007). Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phytotherapy Research*, 21(9), 805-816.
- Passi, S., De Pità, O., Puddu, P., & Littarru, G. P. (2002). Lipophilic antioxidants in human sebum and aging. *Free radical research*, 36(4), 471-477.
- Pons, A., Timmerman, P., Leroy, Y., & Zanetta, J. P. (2002). Gas-chromatography/mass-spectrometry analysis of human skin constituents as heptafluorobutyrate derivatives with special reference to long-chain bases. *Journal of lipid research*, 43(5), 794-804.
- Quintana, E. T., Wierzbicka, K., Mackiewicz, P., Osman, A., Fahal, A. H., Hamid, M. E., ... & Goodfellow, M. (2008). *Streptomyces sudanensis* sp. nov., a new pathogen isolated from patients with actinomycetoma. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 93(3), 305-313.
- Radjasa, O. K., Vaske, Y. M., Navarro, G., Vervoort, H. C., Tenney, K., Linington, R. G., & Crews, P. (2011). Highlights of marine invertebrate-derived biosynthetic products: Their biomedical potential and possible production by microbial associants. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 19(22), 6658-6674.
- Raguénès, G. H. C., Peres, A., Ruimy, R., Pignet, P., Christen, R., Loaec, M., ... & Guezennec, J. G. (1997). *Alteromonas infernus* sp. nov., a new polysaccharide-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Journal of applied microbiology*, 82(4), 422-430.

Raguénès, G., Christen, R., Guezennec, J., Pignet, P., & Barbier, G. (1997). *Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(4), 989-995.

Raguènes, G., Pignet, P., Gauthier, G., Peres, A., Christen, R., Rougeaux, H., ... & Guezennec, J. (1996). Description of a new polymer-secreting bacterium from a deep-sea hydrothermal vent, *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, and preliminary characterization of the polymer. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(1), 67-73.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9), 1231-1237.

Remya, M., & Vijayakumar, R. (2008). Isolation and characterization of marine antagonistic actinomycetes from west coast of India. *Medicine and biology*, 15(1), 13-19.

Robeson, D. J., & Jalal, M. A. (1993). A *Cercospora* isolate from soybean roots produces cebetin B and cercosporin. *Phytochemistry*, 33(6), 1546-1548.

Rodríguez, N. C., Urrutia, E. C., Gertrudis, B. H., & Pedraza, J. (2011). Antioxidant activity of fulvic acid: A living matter-derived bioactive compound. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 9(3&4), 123-127.

Rugthaworn, P., Dilokkunanant, U., Sangchote, S., Piadang, N., & Kitpreechavanich, V. (2007). A search and improvement of actinomycete strains for biological control of plant pathogens. *Kasetsart J.(Nat. Sci.)*, 41, 248-254.

Sadrudin, S., & Arora, R. (2009). Resveratrol: biologic and therapeutic implications. *Journal of the cardiometabolic syndrome*, 4(2), 102-106.

Sakaki, T., Ichihara, A., & Sakamura, S. (1981). Isolation of fulvic acid from *Cercospora beticola*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(5), 1275-1276.

Sánchez-Ferrer, Á., Rodríguez-López, J. N., García-Cánovas, F., & García-Carmona, F. (1995). Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1247(1), 1-11.

Sang-Shin, P., & Hwang, S. M. (1999). Purification and characterization of iron-containing superoxide dismutase from *Lentinus edodes*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 9(6), 854-860.

Schloesser, E., (1971) *Phytopath. Medit.* 10, 154; and preceding papers

- Selvakumar, D., Arun, K., Suguna, S., Kumar, D., & Dhevendaran, K. (2010). Bioactive potential of *Streptomyces* against fish and shellfish pathogens. *Iran. J. Microbiol.*, 2(3), 157-164.
- Sherma, J., & Fried, B. (Eds.). (2003). *Handbook of thin-layer chromatography* (Vol. 89). CRC press.
- Shirling E.B. and Gottlieb D. (1968) Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. II. Species description from the first study. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 18, 69-189
- Singh, L. S., Baruah, I., & Bora, T. C. (2006). Actinomycetes of Loktak habitat: isolation and screening for antimicrobial activities. *Biotechnology*, 5(2), 217-221.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2011). *Introduction to modern liquid chromatography*. John Wiley & Sons.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Glajch, J. L. (2012). *Practical HPLC method development*. John Wiley & Sons.
- Solheim, W. G. (1930). Morphological studies of the genus *Cercospora* (Vol. 12, No. 1). University of Illinois.
- Stoessl, A., Rock, G. L., & Stothers, J. B. (1989). The isolation, structure, and stereochemistry of traversiadene. The precursor hydrocarbon of traversianal biosynthesis. *Canadian Journal of Chemistry*, 67(8), 1302-1304.
- Sualeh, M., Baig, M. T., & Zoha, S. (2010). Zafar Alam Mahmood, Syed Waseemuddin Ahmed, Iqbal Azhar. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 23(3), 349-357.
- Subba Rao, N. S. (1999). *Soil microbiology: of soil microorganisms and plant growth* (No. 631.46 S82 1999).
- Synytsya, A., Míčková, K., Synytsya, A., Jablonský, I., Spěváček, J., Erban, V., ... & Čopíková, J. (2009). Glucans from fruit bodies of cultivated mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii*: Structure and potential prebiotic activity. *Carbohydrate polymers*, 76(4), 548-556.
- Takamatsu, S., Hodges, T. W., Rajbhandari, I., Gerwick, W. H., Hamann, M. T., & Nagle, D. G. (2003). Marine natural products as novel antioxidant prototypes. *Journal of Natural Products*, 66(5), 605-608.
- Taylor, R. F. (1984). Bacterial triterpenoids. *Microbiological reviews*, 48(3), 181.
- Tian, T., Sun, Q., Shen, J., Zhang, T., Gao, P., & Sun, Q. (2008). Microbial transformation of polydatin and emodin-8- $\beta$ -D-glucoside of *Polygonum cuspidatum*

Sieb. et Zucc into resveratrol and emodin respectively by *Rhizopus microsporus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(6), 861-866.

Tsuji, N., Kobayashi, M., Nagashima, K., Wakisaka, Y., & Koizumi, K. (1976). A new antifungal antibiotic, trichostatin. *The Journal of antibiotics*, 29(1), 1-6.

Vaz, J. A., Barros, L., Martins, A., Morais, J. S., Vasconcelos, M. H., & Ferreira, I. C. (2011). Phenolic profile of seventeen Portuguese wild mushrooms. *LWT-Food Science and Technology*, 44(1), 343-346.

Ventura, J., Belmares, R., Aguilera-Carbo, A., Gutiérrez-Sanchez, G., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2008). Fungal biodegradation of tannins from creosote bush (*Larrea tridentata*) and tar bush (*Flourensia cernua*) for gallic and ellagic acid production. *Food Technology and Biotechnology*, 46(2), 213.

Vincent, P., Pignet, P., Talmont, F., Bozzi, L., Fournet, B., Guezennec, J., ... & Prieur, D. (1994). Production and characterization of an exopolysaccharide excreted by a deep-sea hydrothermal vent bacterium isolated from the polychaete annelid *Alvinella pompejana*. *Applied and environmental microbiology*, 60(11), 4134-4141.

Vozenin-Brotons, M. C., Sivan, V., Gault, N., Renard, C., Geffrotin, C., Delanian, S., ... & Martin, M. (2001). Antifibrotic action of Cu/Zn SOD is mediated by TGF- $\beta$ 1 repression and phenotypic reversion of myofibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(1), 30-42.

Vysotskaya, M. R., Maslova, G. V., Petrova, V. A., & Nud'ga, L. A. (2009). Electrochemical recovery of chitin-glucan complex from *Pleurotus ostreatus* basidial fungus and properties of the product. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 82(8), 1390-1395.

Wang, H., Liu, L., Guo, Y. X., Dong, Y. S., Zhang, D. J., & Xiu, Z. L. (2007). Biotransformation of piceid in *Polygonum cuspidatum* to resveratrol by *Aspergillus oryzae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 75(4), 763-768.

Ward, O. P., & Singh, A. (2005). Omega-3/6 fatty acids: alternative sources of production. *Process Biochemistry*, 40(12), 3627-3652.

Watson, D.G., 2005, *Φαρμακευτική Ανάλυση 2η Έκδοση, Παρισιάνου Α.Ε.* ISBN 978-960-394-772-6.

Williams, S. T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E. M. H., Sneath, P. H. A., & Sackin, M. J. (1983). Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *Microbiology*, 129(6), 1743-1813.

Wulf, H. C., Sandby-Møller, J., Kobayasi, T., & Gniadecki, R. (2004). Skin aging and natural photoprotection. *Micron*, 35(3), 185-191.

Yabuta, T. (1924). The constitution of Koji Acid, a  $\gamma$ -Pyrone Derivative Formed by *Aspergillus Oryzae* from Carbohydrates. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 1(1), 1-3.

Yang, F. Q., Feng, K., Zhao, J., & Li, S. P. (2009). Analysis of sterols and fatty acids in natural and cultured *Cordyceps* by one-step derivatization followed with gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical analysis*, 49(5), 1172-1178.

Ying , Y., & Marta, M. (2001). Effects of L-lysine on production of rapamycin. *Journal of Drugs*, 102- 105.

Zhang, Z. Y., Jin, B., & Kelly, J. M. (2007). Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. *Biochemical Engineering Journal*, 35(3), 251-263.

Zheng, C. J., Sohn, M. J., & Kim, W. G. (2009). Vinaxanthone, a new FabI inhibitor from *Penicillium* sp. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 63(5), 949-953.

Zhou, H., Li, Y., & Tang, Y. (2010). Cyclization of aromatic polyketides from bacteria and fungi. *Natural product reports*, 27(6), 839-868.

Zulfakar, M. H., Edwards, M., & Heard, C. M. (2007). Is there a role for topically delivered eicosapentaenoic acid in the treatment of psoriasis?. *European Journal of Dermatology*, 17(4), 284-291.

Κατσίφας Ε.Α. (1999) Επίδραση διαφόρων παραγόντων στην επιβίωση και αύξηση στρεπτομυκικών σε δείγματα εδάφους. Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

### **Ηλεκτρονική βιβλιογραφία**

1. [www.fda.gov/cosmetics](http://www.fda.gov/cosmetics)
2. [www.vitamegacosmetic.com](http://www.vitamegacosmetic.com)