

ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ



ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ & ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗΣ

ΔΙΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«Βιοτεχνολογία»

Διερεύνηση της ικανότητας στελεχών μυκήτων της ελληνικής  
βιοποικιλότητας να βιομετατρέπουν κανναβινοειδή

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ελένη Γεωργούλα

ΓΕΩΠΟΝΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2023

ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑΣ & ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗΣ

ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«Βιοτεχνολογία»

Διερεύνηση της ικανότητας στελεχών μυκήτων της ελληνικής  
βιοποικιλότητας να βιομετατρέπουν κανναβινοειδή

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ελένη Γεωργούλα

A.M. 7113142100006

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή**

- **Επιβλέπουσα:** Ζαχαρούλα Γκόνου – Ζάγκου, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τομέας Οικολογίας & Ταξινομικής, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- **Μέλος:** Δημήτριος Χατζηνικολάου, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας Βοτανικής, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- **Μέλος:** Παναγούλα Κόλλια, Καθηγήτρια, Τομέας Γενετικής & Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

*Στον ανιψιό μου*

---

## Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στον Τομέα Οικολογίας και Ταξινομικής του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών σε συνεργασία με τον Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων του Τμήματος Φαρμακευτικής, στο πλαίσιο του Διδρυματικού ΠΜΣ «Βιοτεχνολογία». Με την ολοκλήρωσή της θα ήθελα να ευχαριστήσω εγκάρδια την Επίκουρη Καθηγήτρια Ζαχαρούλα Γκόνου-Ζάγκου, επιβλέπουσα της διατριβής, που μου έδωσε την ευκαιρία να διευρύνω τις εργαστηριακές γνώσεις μου, καθώς και για την πολύτιμη καθοδήγηση και στήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια της διατριβής μου. Θερμές ευχαριστίες και στον Επίκουρο Καθηγητή Νικόλαο Φωκιαλάκη, για την πολύτιμη συνεισφορά του στην εκπόνηση της παρούσας διατριβής. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταδιδάκτορα Νικόλαο Τσαφαντάκη, για τις πολύτιμες συμβουλές, την καθοδήγηση, την στήριξη και την υπομονή του, καθώς και τους υποψήφιους διδάκτορες Κωνσταντίνο Γαϊτάνη και Χριστίνα Κούφαλη, για την πολύτιμη συμβολή τους στην ολοκλήρωση του πειράματος. Θερμά ευχαριστώ στον μεταπτυχιακό φοιτητή Ρωμανό-Κωνσταντίνο Αντωνόπουλο για τη βοήθειά του και την καθοδήγησή του. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Δημήτριο Χατζηνικολάου και την Καθηγήτρια Παναγούλα Κόλλια, για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή της διατριβής μου και για τις χρήσιμες υποδείξεις τους. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την βοήθεια και τη στήριξη που μου παρείχε.

Ελένη Γεωργούλα

# Περιεχόμενα

Περιεχόμενα.....	1
Περίληψη.....	3
Abstract .....	4
Κατάλογος Πινάκων .....	5
Κατάλογος Εικόνων .....	7
Συνοτομογραφίες .....	10
Κεφάλαιο 1 .....	13
1. Εισαγωγή .....	14
1.1 Οι μύκητες.....	14
1.1.1 Ασκομύκητες .....	15
1.1.2 Ενδοφυτικοί μύκητες .....	16
1.1.2.1 Ενδοφυτικοί μύκητες σε φυτά κάνναβης .....	18
1.1.3 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές των μυκήτων .....	20
1.1.4 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές ενδοφυτικών μυκήτων.....	21
1.2 Κάνναβη ( <i>Cannabis sativa</i> L.) .....	22
1.2.1 Γενικά στοιχεία.....	22
1.2.2 Κανναβινοειδή.....	24
1.2.2.1 Φυτοκανναβινοειδή .....	24
1.2.2.2 Βιοσύνθεση φυτοκανναβινοειδών .....	27
1.2.2.3 Κανναβιδιόλη (CBD) .....	29
1.2.3 Βιομετατροπή κανναβινοειδών .....	30
Σκοπός της μελέτης .....	33
Κεφάλαιο 2 .....	34
2. Πειραματικό μέρος.....	35
2.1 Οργανολογία .....	35
2.2 Αποστείρωση επιφανειών και εργαλείων .....	39
2.3 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού.....	40
2.4 Καλλιέργεια απομονωμένων ενδοφυτικών μυκήτων.....	40
2.5 Υγρές καλλιέργειες .....	42
2.5.1 Εκχυλίσεις υγρών καλλιεργειών .....	45
2.5.1.1 Εκχυλίσεις καλλιεργειών μικρής κλίμακας υποβοηθούμενες με υπερήχους (Ultrasounds Assisted Extraction, UAE).....	45
2.5.1.2 Εκχυλίσεις καλλιεργειών μεγάλης κλίμακας υγρής-υγρής οργανικής φάσης (Liquid Liquid Extraction, LLE).....	46

2.6 Αναλυτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (αναλυτική HPLC).....	47
2.7 Υγρή Χρωματογραφία Βαρύτητας (Column Chromatography, CC) .....	49
2.8 Ημιπαρασκευαστική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης .....	56
2.8.1 Ημιπαρασκευαστική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης για τη συνένωση EG1-22 .....	56
2.8.2 Ημιπαρασκευαστική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης για τη συνένωση EG1-23/EG1-24 .....	56
Κεφάλαιο 3 .....	58
3. Αποτελέσματα .....	59
3.1 Χημικό προφίλ ενδοφυτικών μυκήτων .....	59
3.1.1 Μεταβολίτης 1.....	59
3.1.2 Μεταβολίτης 2.....	62
3.1.3 Μεταβολίτης 3.....	65
3.1.4 Μεταβολίτης 4.....	67
3.1.5 Μεταβολίτης 5.....	72
3.1.6 Μεταβολίτης 6.....	78
3.1.7 Μεταβολίτης 7.....	84
3.1.8 Μεταβολίτης 8.....	91
3.1.9 Μεταβολίτης 9.....	98
Κεφάλαιο 4 .....	105
4. Συμπεράσματα .....	106
Βιβλιογραφία.....	109

## Περίληψη

Οι ενδοφυτικοί μύκητες, που συναντώνται στην κάνναβη (*Cannabis sativa*) φαίνεται να είναι υπεύθυνοι για τον βιομετασχηματισμό των κανναβινοειδών και τον εμπλουτισμό του φυτού με νέες ενώσεις. Ωστόσο υπάρχουν ελάχιστα δεδομένα και το ερευνητικό αυτό πεδίο χρειάζεται περαιτέρω μελέτη, ώστε να διερευνηθεί ο ρόλος των ενδοφυτικών μυκήτων στο φυτό, καθώς και των νέων προϊόντων που προκύπτουν, όπως και η δυνατότητα να αξιοποιηθούν αυτά προς όφελος του ανθρώπου.

Για το σκοπό αυτό, στελέχη ενδοφυτικών μυκήτων, που είχαν απομονωθεί από φυτά κάνναβης της δίοικης ποικιλίας Carmagnola, καλλιεργήθηκαν σε στερεό θρεπτικό μέσο PDA για μία εβδομάδα και έπειτα κομμάτια μυκηλίου επωάστηκαν σε υγρό θρεπτικό υλικό. Οι καλλιέργειες εμβολιάστηκαν με CBD και επωάστηκαν για επτά μέρες. Όσες παρουσίασαν ενδιαφέρον χημικό προφίλ υποβλήθηκαν σε μεγαλύτερης κλίμακας καλλιέργειες. Οι υγρές καλλιέργειες διηθήθηκαν και το υγρό διήθημα εκχυλίστηκε με οξικό αιθυλεστέρα, διαδικασία που επαναλήφθηκε δύο φορές. Τα εκχυλίσματα αραιώθηκαν και αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Ακολούθησε η υγρή χρωματογραφία βαρύτητας σε στήλη γέλης πυριτίου από όπου προέκυψαν κλάσματα που συνενώθηκαν κατόπιν παρατήρησης των χρωματογραφημάτων λεπτής στιβάδας. Για τον καθαρισμό των οργανικών ενώσεων που παρουσίασαν ενδιαφέρον πραγματοποιήθηκε ημιπαρασκευαστική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Τα κλάσματα ελέγχθηκαν φασματοσκοπικά με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού.

Ο ενδοφυτικός μύκητας που παρουσίασε το πιο ενδιαφέρον χημικό προφίλ ήταν ο *Dichotomopilus erectus*. Από τα προϊόντα που παρήγαγε ο μύκητας αυτός απομονώθηκαν εννέα μεταβολίτες. Οι μεταβολίτες αυτοί παραλήφθηκαν από τη στήλη βαρύτητας και κατόπιν χρωματογραφικών διαχωρισμών. Η ταυτοποίησή τους πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπικά δεδομένα και τα ψευδομοριακά ιόντα τους αναγνωρίστηκαν με φασματομετρία μάζας. Τρεις από τους απομονωμένους μεταβολίτες αποτελούν νέα φυσικά προϊόντα, καθώς δεν έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία μόρια με τη συγκεκριμένη χημική δομή. Συγκεκριμένα, ταυτοποιήθηκαν ως 4''-υδροξυ-δεϋδροκανναβιελσοΐνη, 4''-υδροξυ-κανναβιδιολαλδεΰδη και 4'',7-διυδροξυ-κανναβιελσοΐνη. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι ενδοφυτικοί μύκητες της κάνναβης έχουν σπουδαία δυνατότητα να μετατρέπουν ενώσεις και να τις αποδίδουν σε μεγάλες ποσότητες, ώστε να μπορούν να αξιοποιηθούν σε πλήθος φαρμακευτικών εφαρμογών.

# Abstract

## "Investigation of the ability of greek fungal species to biotransform cannabinoids"

Endophytic fungi, found in *Cannabis sativa*, seem to be responsible for the biotransformation of cannabinoids and the enrichment of the plant with new compounds. However, such research data are very few and more studies are needed in order to investigate the role of the endophytic fungi, as well as of the newly produced compounds, and the possibility for the exploitation of the latter for the benefit of humans.

For this purpose, strains of endophytic fungi, isolated from cannabis plants of the dioecious variety Carmagnola, were grown on PDA solid medium for one week and then sections of mycelium were incubated in liquid nutrient medium. The cultures were inoculated with CBD and incubated for seven days. Those that presented interesting chemical profiles were subjected to larger scale cultures. The liquid cultures were filtered and then, they were extracted with ethyl acetate. This procedure was repeated twice. The extracts were diluted and analyzed by high performance liquid chromatography. This procedure was followed by liquid gravity chromatography on a silica gel column yielding fractions that merged upon observation of TLCs. For cleaning organic compounds of interest Semi-Preparative liquid chromatography was performed. Fractions were checked spectroscopically with NMR.

The endophytic fungus that presented the most interesting chemical profile was *Dichotomopilus erectus*. Nine metabolites were isolated from the products produced by this fungus. These metabolites were collected from the gravity of column chromatography and after chromatographic separations. Their identification was performed by spectroscopic data and their pseudomolecular ions were identified by mass spectrometry. Three of the isolated metabolites were new natural products, as molecules with this specific chemical structure are not reported in the literature. Specifically, they were identified as 4''-hydroxy-dehydrocannabielsoin, 4''-hydroxy-cannabidiolaldehyde and 4'',7-dihydroxycannabielsoin. This fact leads to the conclusion that the endophytic fungi of cannabis have a great potential to convert compounds and yield in large quantities, so that they can be exploited in a number of pharmaceutical applications.



## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1: Ενδοφυτικοί μύκητες και αντίστοιχα άρθρα αναφοράς .....	19
Πίνακας 2: Συστημική ταξινόμηση της κάνναβης .....	22
Πίνακας 3: Είδη απομονωμένων ενδοφυτικών μυκήτων .....	40
Πίνακας 4: Υλικά και ποσότητες υγρού θρεπτικού μέσου .....	42
Πίνακας 5: Μάζες δειγμάτων και μαρτύρων καλλιέργειών μικρής κλίμακας.....	45
Πίνακας 6: Μάζες δειγμάτων και μαρτύρων καλλιέργειών μεγάλης κλίμακας.....	46
Πίνακας 7: Πειραματικές συνθήκες HPLC.....	48
Πίνακας 8: Σύστημα διαλυτών και χρόνοι έκλουσης.....	48
Πίνακας 9: Σύστημα διαλυτών στήλης γέλης πυριτίου .....	50
Πίνακας 10: Συνενώσεις κλασμάτων .....	51
Πίνακας 11: Σύστημα διαλυτών MPLC.....	53
Πίνακας 12: Μάζες συνενωμένων κλασμάτων .....	54
Πίνακας 13: Συνθήκες διεξαγωγής Semi-Prep HPLC.....	56
Πίνακας 14: Πρόγραμμα έκλουσης συνενώσεως EG1-22.....	56
Πίνακας 15: Μάζα καθαρής ουσίας που προέκυψε από την Semi-Prep HPLC .....	56
Πίνακας 16: Συνθήκες διεξαγωγής ημιπαρασκευαστικής HPLC για τις συνενώσεις EG1-23/EG1-24.....	57
Πίνακας 17: Πρόγραμμα έκλουσης για τη συνένωση EG1-23/EG1-24.....	57
Πίνακας 18: Μάζες τριών κλασμάτων που προέκυψαν από τη Semi-Prep HPLC .....	57
Πίνακας 19: Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H}$ και $^{13}\text{C}$ NMR του μεταβολίτη 1 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο .....	61
Πίνακας 20: Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H}$ και $^{13}\text{C}$ NMR του μεταβολίτη 2 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο .....	64
Πίνακας 21: Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H}$ και $^{13}\text{C}$ NMR του μεταβολίτη 3 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο .....	66
Πίνακας 22: Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H}$ και $^{13}\text{C}$ NMR του μεταβολίτη 4 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.....	72
Πίνακας 23: Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H}$ και $^{13}\text{C}$ NMR του μεταβολίτη 5 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.....	78
Πίνακας 24: Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H}$ και $^{13}\text{C}$ NMR του μεταβολίτη 6 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.....	84
Πίνακας 25: Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H}$ και $^{13}\text{C}$ NMR του μεταβολίτη 7 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.....	91

Πίνακας 26: Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H}$ NMR του μεταβολίτη 7 σε δευτεριωμένη πυριδίνη .....	91
Πίνακας 27: Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H}$ και $^{13}\text{C}$ NMR του μεταβολίτη 8 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.....	98
Πίνακας 28: Φασματοσκοπικά δεδομένα $^1\text{H}$ και $^{13}\text{C}$ NMR του μεταβολίτη 9 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.....	104

## Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1: Ο κύκλος ζωής των Ασκομυκήτων.....	16
Εικόνα 2: Ενδοφυτικοί μύκητες της <i>C.sativa</i> .....	18
Εικόνα 3: Καλλιέργεια κάνναβης στην Ελλάδα.....	23
Εικόνα 4: Εφαρμογές της κάνναβης.....	24
Εικόνα 5: Δομή κανναβινοειδών της κάνναβης και άλλων φυτικών ειδών .....	25
Εικόνα 6: Χημική δομή σημαντικότερων φυτοκανναβινοειδών .....	26
Εικόνα 7: Βιοσύνθεση κανναβινοειδών.....	28
Εικόνα 8: Συμπύκνωση εκχυλισμάτων σε BUCHI Rotavapor .....	36
Εικόνα 9: CAMAG TLC Visualizer 2 για παρατήρηση TLC.....	37
Εικόνα 10: HPLC για διαχωρισμό μεταβολιτών .....	38
Εικόνα 11: MPLC για απομόνωση μεταβολιτών του DPA18.....	39
Εικόνα 12: Σύστημα HPLC και UPLC για πραγματοποίηση LC-MS.....	39
Εικόνα 13: Καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα .....	42
Εικόνα 14: Κωνικές φιάλες με υγρό θρεπτικό μέσο .....	43
Εικόνα 15: Incubator shaker.....	43
Εικόνα 16: Αφαίρεση μυκηλίου με κυλινδρικό διακορευτή.....	44
Εικόνα 17: Καλλιέργειες σε υγρό θρεπτικό μέσο .....	45
Εικόνα 18: Διήθηση εκχυλισμάτων και διαχωρισμός φάσεων.....	47
Εικόνα 19: Χρωματογράφημα HPLC για το δείγμα PA03.....	49
Εικόνα 20: Χρωματογράφημα HPLC για το δείγμα PA18.....	49
Εικόνα 21: Στήλη γέλης πυριτίου .....	50
Εικόνα 22: TLC συνενωμένων κλασμάτων για το δείγμα PA03 .....	53
Εικόνα 23: TLC συνενωμένων κλασμάτων για το δείγμα PA18 .....	55
Εικόνα 24: Φάσμα μάζας του μεταβολίτη 1 .....	59
Εικόνα 25: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR του μεταβολίτη 1 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο .....	60
Εικόνα 26: Φάσμα μάζας HSQC του μεταβολίτη 1 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο .....	61
Εικόνα 27: Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 1 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο .....	61
Εικόνα 28: Η χημική δομή του μεταβολίτη 1 .....	62
Εικόνα 29: Φάσμα μάζας του μεταβολίτη 2 .....	63
Εικόνα 30: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR του μεταβολίτη 2 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο .....	64
Εικόνα 31: Η χημική δομή του μεταβολίτη 2 .....	65
Εικόνα 32: Φάσμα μάζας του μεταβολίτη 3 .....	65
Εικόνα 33: Φάσμα <sup>1</sup> H NMR του μεταβολίτη 3 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο .....	66

Εικόνα 34: Η χημική δομή του μεταβολίτη 3 .....	67
Εικόνα 35: Φάσματα μάζας του μεταβολίτη 4.....	68
Εικόνα 36: Φάσματα μάζας $^1\text{H}$ NMR του μεταβολίτη 4 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο .....	69
Εικόνα 37: Φάσμα COSY του μεταβολίτη 4 σε δευτεριωμένη μεθανόλη .....	70
Εικόνα 38: Φάσμα HSQC του μεταβολίτη 4 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.....	71
Εικόνα 39: Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 4 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.....	71
Εικόνα 40: Η χημική δομή του μεταβολίτη 4.....	72
Εικόνα 41: Φάσματα μάζας του μεταβολίτη 5.....	73
Εικόνα 42: Φάσμα $^1\text{H}$ NMR του μεταβολίτη 5 σε δευτεριωμένη μεθανόλη .....	74
Εικόνα 43: Φάσμα COSY του μεταβολίτη 5 σε δευτεριωμένη μεθανόλη .....	75
Εικόνα 44: Φάσμα HSQC του μεταβολίτη 5 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.....	76
Εικόνα 45: Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 5 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.....	77
Εικόνα 46: Η χημική δομή του μεταβολίτη 5.....	78
Εικόνα 47: Φάσματα μάζας του μεταβολίτη 6.....	79
Εικόνα 48: Φάσμα $^1\text{H}$ NMR του μεταβολίτη 6 σε δευτεριωμένη μεθανόλη .....	80
Εικόνα 49: Φάσμα COSY του μεταβολίτη 6 σε δευτεριωμένη μεθανόλη .....	81
Εικόνα 50: Φάσμα HSQC του μεταβολίτη 6 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.....	82
Εικόνα 51: Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 6 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.....	83
Εικόνα 52: Η χημική δομή του μεταβολίτη 6.....	84
Εικόνα 53: Φάσματα μάζας του μεταβολίτη 7.....	85
Εικόνα 54: Φάσμα $^1\text{H}$ NMR του μεταβολίτη 7 σε δευτεριωμένη μεθανόλη .....	87
Εικόνα 55: Φάσμα $^1\text{H}$ NMR του μεταβολίτη 7 σε δευτεριωμένη πυριδίνη.....	87
Εικόνα 56: Φάσμα COSY του μεταβολίτη 7 σε δευτεριωμένη μεθανόλη .....	88
Εικόνα 57: Φάσμα HSQC του μεταβολίτη 7 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.....	89
Εικόνα 58: Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 7 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.....	90
Εικόνα 59: Η χημική δομή του μεταβολίτη 7 .....	91
Εικόνα 60: Φάσματα μάζας του μεταβολίτη 8.....	92
Εικόνα 61: Φάσμα $^1\text{H}$ NMR του μεταβολίτη 8 σε δευτεριωμένη μεθανόλη .....	94
Εικόνα 62: Φάσμα COSY του μεταβολίτη 8 σε δευτεριωμένη μεθανόλη .....	95
Εικόνα 63: Φάσμα HSQC του μεταβολίτη 8 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.....	96
Εικόνα 64: Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 8 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.....	97
Εικόνα 65: Η χημική δομή του μεταβολίτη 8.....	98
Εικόνα 66: Φάσματα μάζας του μεταβολίτη 9.....	99
Εικόνα 67: Φάσματα $^1\text{H}$ NMR του μεταβολίτη 9 σε δευτεριωμένη μεθανόλη .....	100

Εικόνα 68: Φάσμα COSY του μεταβολίτη 9 σε δευτεριωμένη μεθανόλη .....	101
Εικόνα 69: Φάσμα HSQC του μεταβολίτη 9 σε δευτεριωμένη μεθανόλη .....	102
Εικόνα 70: Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 9 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.....	103
Εικόνα 71: Η χημική δομή του μεταβολίτη 9 .....	104

## Συντομογραφίες

<b>ACN</b>	<b>Acetonitrile</b>
<b>brd</b>	Ευρεία διπλή και ευρεία απλή κορυφή
<b>CB<sub>1</sub></b>	<b>Cannab</b> inoid receptor type <b>1</b>
<b>CB<sub>2</sub></b>	<b>Cannab</b> inoid receptor type <b>2</b>
<b>CBC</b>	<b>Cannab</b> ichromene
<b>CBD</b>	<b>Cannab</b> idiol
<b>CBDAS</b>	<b>Cannab</b> idiol <b>Acid Synthase</b>
<b>CBE</b>	<b>Cannab</b> ielsoin
<b>CBG</b>	<b>Cannab</b> igerol
<b>CBGA</b>	<b>Cannab</b> igerolic acid
<b>CBL</b>	<b>Cannab</b> icyclol
<b>CBN</b>	<b>Cannab</b> inol
<b>CBND</b>	<b>Cannab</b> inodiol
<b>CBT</b>	<b>Cannab</b> icitran
<b>CC</b>	<b>Column Chromatography</b>
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	<b>Chloroform</b>
<b>cHex</b>	<b>Cyclohexane</b>
<b><sup>13</sup>C NMR</b>	1D NMR πείραμα πυρήνων άνθρακα, με ευρεία ετεροπυρηνική αποσύζευξη (proton-noise decoupled)
<b>COSY</b>	2D NMR πείραμα ομοπυρηνικού συσχετισμού <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H για <sup>2</sup> J και <sup>3</sup> J (Correlated Spectroscopy)
<b>Cs AAE1</b>	Ένζυμο ενεργοποίησης ακυλίου
<b>d</b>	Διπλή κορυφή
<b>dd</b>	Διπλή διπλής κορυφή
<b>dm</b>	Διπλή πολλαπλών κορυφή
<b>EtOAc</b>	Οξικός αιθυλεστέρας
<b>EtOH</b>	Αιθυλική αλκοόλη
<b>1D NMR</b>	Πείραμα NMR μίας διάστασης
<b>2D NMR</b>	Πείραμα NMR δύο διαστάσεων

<b>GPP</b>	<b>Geranyl Pyrophosphate</b>
<b>HMBC</b>	2D NMR πείραμα ετεροπυρηνικού συσχετισμού $^1\text{H}$ $^{13}\text{C}$ για $^2\text{J}$ και $^3\text{J}$ ( <b>H</b> eteronuclear <b>M</b> ultiple <b>B</b> ond <b>C</b> orrelation)
$^1\text{H}$ NMR	1D NMR πείραμα πυρήνων υδρογόνου (πρωτονίου)
<b>HPLC</b>	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης ( <b>H</b> igh <b>P</b> erformance <b>L</b> iquid <b>C</b> hromatography)
<b>HRMS</b>	Φασματομετρία Μάζας Υψηλής Ανάλυσης ( <b>H</b> igh <b>R</b> esolution <b>M</b> ass <b>S</b> pectrometry)
<b>HSQC</b>	2D NMR πείραμα ετεροπυρηνικού συσχετισμού $^1\text{H}$ $^{13}\text{C}$ για $^1\text{J}$ ( <b>H</b> eteronuclear <b>S</b> ingle <b>Q</b> uantum <b>C</b> oherence)
<b>J</b>	Σταθερά σύζευξης
<b>LC-MS</b>	Υγρή Χρωματογραφία Φασματομετρία Μάζας ( <b>L</b> iquid <b>C</b> hromatography- <b>M</b> ass <b>S</b> pectrometry)
<b>m</b>	Πολλαπλή κορυφή NMR
<b>m/z</b>	Λόγος μάζας προς φορτίο
<b>MeOH</b>	Μεθανόλη
<b>MPLC</b>	Υγρή Χρωματογραφία Μέτριας Πιέσεως ( <b>M</b> edium <b>P</b> ressure <b>L</b> iquid <b>C</b> hromatography)
<b>MS</b>	Φασματομετρία μάζας ( <b>M</b> ass <b>S</b> pectrometry)
<b>MS<sup>2</sup></b>	Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS)
<b>NMR</b>	Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού ( <b>N</b> uclear <b>M</b> agnetic <b>R</b> esonance)
<b>OA</b>	Ελαιοβετολικό οξύ
<b>OAC</b>	Κυκλάση ελαιολικού οξέος
<b>OLA</b>	Ελαιολικό οξύ
<b>PDA</b>	<b>P</b> otato <b>D</b> extrose <b>A</b> gar
<b>SemiPrep HPLC</b>	Ημιπαρασκευαστική ( <b>S</b> emi <b>P</b> reparative) HPLC
<b>q</b>	Τετραπλή κορυφή NMR
<b>s</b>	Απλή κορυφή NMR
<b>sx</b>	Εξαπλή κορυφή
<b>t</b>	Τριπλή κορυφή NMR
<b>td</b>	Τριπλή διπλών κορυφή

<b>tm</b>	Τριπλή πολλαπλών κορυφή
<b>TFA</b>	<b>Trifluoroacetic Acid</b>
<b>THC</b>	<b>Tetrahydrocannabinol</b>
<b>TKS</b>	<b>Tetraketide Synthase</b>
<b>TLC</b>	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας ( <b>Thin Layer Chromatography</b> )
<b>δ</b>	Χημική μετατόπιση της απορρόφησης ενός πυρήνα σε σχέση με το τετραμεθυλοσιλάνιο
<b>Δ<sup>8</sup>-THC</b>	Δ <sup>8</sup> -trans-τετραϋδροκανναβινόλη
<b>Δ<sup>9</sup>-THC</b>	Δ <sup>9</sup> - τετραϋδροκανναβινόλη



# Κεφάλαιο 1

## Εισαγωγή

## 1. Εισαγωγή

### 1.1 Οι μύκητες

Οι μύκητες ανήκουν σε ένα ξεχωριστό Βασίλειο από τα συνολικά πέντε Βασίλεια που υπάρχουν, λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους (Richards et al., 2017). Πρόκειται για ευκαρυωτικούς οργανισμούς, μονοκύτταρους ή πολυκύτταρους (κυρίως πολυκύτταροι) (Fashola et al., 2023). Αναπαράγονται αγενώς ή εγγενώς (Fashola et al., 2023). Έχουν διαφορετικό μέγεθος και σχήμα και ποικίλουν όσον αφορά τη συνθετότητά τους (Morton, 2021). Γενικά, το σώμα των μυκήτων ονομάζεται θαλλός (Mishra, 2005) και τα περισσότερα είδη αναπτύσσονται ως υφές (Fashola et al., 2023) με ή χωρίς διαφράγματα. Το κυτταρικό τους τοίχωμα αποτελείται από χιτίνη, β-γλυκάνες και γλυκοπρωτεΐνες (Garcia- Rubio et al., 2020) και προσφέρει στους μύκητες σχήμα και προστασία από την οσμωτική λύση και από την είσοδο επιβλαβών μακρομορίων (Cole, 1996). Είναι οργανισμοί που δε φωτοσυνθέτουν και συνεπώς αποτελούν ετερότροφους οργανισμούς (Deacon, 2006), δηλαδή εξαρτώνται από τα προϊόντα του μεταβολισμού άλλων οργανισμών. Συναντώνται ως σαπροτροφικοί, που καταναλώνουν νεκρή οργανική ύλη ή ως βιοτροφικοί, δηλαδή παράσιτα ή παθογόνα (Cole, 1996). Ορισμένοι μύκητες είναι και σαπροτροφικοί και βιοτροφικοί (Cole, 1996). Επιπλέον, δεν έχουν εσωτερικό πεπτικό σύστημα, για αυτό η πέψη τους αναφέρεται ως εξωκυτταρική. Παρουσιάζουν υψηλό δυναμικό διασποράς και η μεταβολική τους δραστηριότητα βασίζεται κυρίως σε πρωτογενείς και δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι μύκητες από τους οποίους λείπει ο πολυκυτταρικός χαρακτήρας, δηλαδή όσοι αποτελούν μονοκύτταρους μικροοργανισμούς, ονομάζονται ζύμες (Cole, 1996). Οι ζύμες είναι λίγες σε αριθμό, όμως αρκετά σημαντικές λόγω της συμβολής τους στις ζυμώσεις. Τέλος, υπάρχουν και οι διμορφικοί μύκητες, οι οποίοι ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν, φέρονται είτε ως ζύμες είτε βαίνουν σε φάση υφών (Alexopoulos et al., 1996).

Σύμφωνα με στατιστικά δεδομένα, μέχρι το 2020, είχαν περιγραφεί 148.000 είδη μυκήτων στον πλανήτη (Cheek et al., 2020), ενώ εκτιμάται ότι ο συνολικός τους αριθμός ανέρχεται στα 3,8 εκατομμύρια (Hawksworth & Lücking, 2017). Συγκεκριμένα, μερικοί από αυτούς είναι ωφέλιμοι για τον άνθρωπο, ενώ άλλοι χαρακτηρίζονται ως παθογόνοι. Ωστόσο από τα ήδη καταγεγραμμένα είδη φαίνεται πως μόλις τα 200 είναι παθογόνα (Deacon, 2006). Γενικά, διακρίνονται σε εννέα ομάδες βάσει των αναπαραγωγικών τους δομών, μεταξύ των οποίων οι Microsporidia, Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Zoopagomycota, Mucoromycota, Glomeromycota, Ascomycota και Basidiomycota (Naranjo-Ortiz & Gabaldón, 2019). Έχουν πολλές εφαρμογές στον κλάδο της γεωργίας, της υγείας, των

τροφίμων. Είναι απαραίτητοι σε όλα τα οικοσυστήματα, καθώς η συμβολή τους στους βιογεωχημικούς κύκλους είναι πολύτιμη (Gadd, 2007).

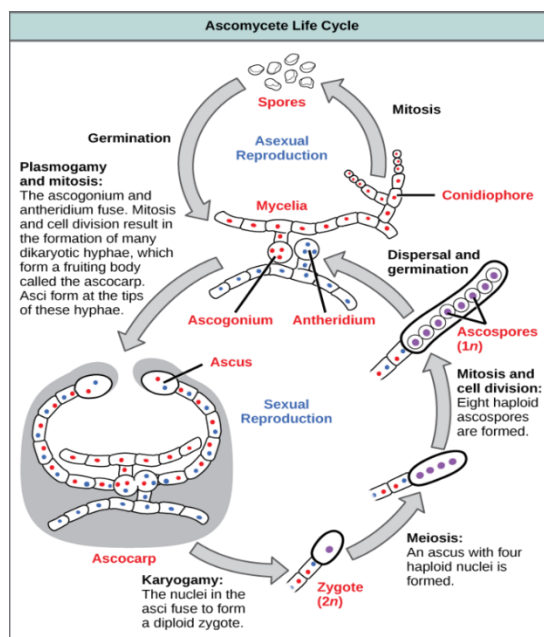
Σύμφωνα με έρευνες, οι μύκητες μπορούν να αναπτύσσονται σε μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων, καθώς παρουσιάζουν έντονη μεταβολική ευελιξία, γεγονός που βοηθάει στην εύκολη καλλιέργειά τους σε εργαστηριακό επίπεδο (Tudzynski, 2014). Συγκεκριμένα, διασπούν το υπόστρωμα μέσω εκκρινόμενων ενζύμων, με αποτέλεσμα να προκύπτουν θρεπτικές ουσίες τις οποίες καταναλώνουν μέσω των υφών τους. Έτσι, πολλοί μύκητες έχουν αναπτύξει συμβιωτικές σχέσεις με διάφορους οργανισμούς (Varma & Kharkwal, 2009).

### **1.1.1 Ασκομύκητες**

Οι Ασκομύκητες είναι ένα φύλο του Βασιλείου των Μυκήτων, που περιλαμβάνει περίπου 110.000 είδη, με τον αριθμό αυτό να αυξάνεται ετησίως (Wijayawardene et al., 2021). Στο φύλο αυτό ανήκουν οι περισσότεροι από τους μύκητες (Alisha Quandt & Haelewaters, 2021), αρκετοί από τους οποίους έχουν υψηλή οικονομική σημασία (Anon, 2022). Περιλαμβάνει κυρίως σαπροφυτικούς, παθογόνους και ενδοφυτικούς μύκητες (Wijayawardene et al., 2021).

Υπάρχουν 3 υπόφυλα του φύλου Ascomycota, μεταξύ των οποίων το υπόφυλο Pezizomycotina, Saccharomycotina και Taphrinomycotina (Wijayawardene et al., 2020). Οι περισσότεροι Ασκομύκητες, όπως οι τρούφες, οι πυρηνομύκητες, οι ασκολειχήνες, ανήκουν στο υπόφυλο Pezizomycotina, όπου χαρακτηριστικό γνώρισμά τους είναι η δημιουργία ασκοκαρπίων, όπως αναφέρεται εκτενέστερα παρακάτω (McCoy, 2016).

Η αναπαραγωγή τους γίνεται εγγενώς και αγενώς (Anon, 2021). Στην περίπτωση της αγενούς αναπαραγωγής, σημαντικό ρόλο παίζουν οι κονιδιοφόροι πάνω στους οποίους σχηματίζονται απλοειδή κονίδια (Anon, 2021). Στην περίπτωση της εγγενούς αναπαραγωγής δημιουργείται ένας ασκός εντός του οποίου σχηματίζονται τα ασκοσπόρια (Wilson et al., 2019). Ο βιολογικός κύκλος ενός μύκητα, που αναπαράγεται αγενώς ή εγγενώς απεικονίζεται στην Εικόνα 1. Γενικά, οι ασκοί περιέχουν διαφορετικό αριθμό ασκοσπορίων (Cousin, 2014) ανάλογα με το είδος του Ασκομύκητα και μπορούν να σχηματίζονται σε διαφοροποιημένη αναπαραγωγική δομή, το ασκοκάρπιο (Anon, 2021), το οποίο συναντάται κυρίως στο υπόφυλο Pezizomycotina (Wynns, 2015). Συγκεκριμένα, τα ασκοκάρπια διακρίνονται σε περιθήκια, κλειστοθήκια, αποθήκια και ψευδοθήκια (Gould, 2009). Μετά την απελευθέρωση των ασκοσπορίων, ακολουθεί η βλάστησή τους και η δημιουργία υφών και μυκηλίου, άρα εξασφαλίζεται η ανάπτυξη σε γειτονικό περιβάλλον και η διαίωνιση του είδους (Anon, 2021).



**Εικόνα 1.** Ο κύκλος ζωής των ασκομυκήτων (Ανον, 2022)

Οι Ασκομύκητες μπορούν να μειώσουν την παραγωγή καλλιεργειών, παράγοντας τοξικούς για τα φυτά δευτερογενείς μεταβολίτες (Ανον, 2022), ενώ άλλοι έχουν ωφέλιμες λειτουργίες, όπως για παράδειγμα είδη του γένους *Aspergillus*, που χρησιμοποιούνται στην ποτοποιία. Οι χρήσεις τους είναι ποικίλες, εστιάζονται, όμως, κυρίως στις ζυμώσεις μπύρας, ψωμιού, κρασιού στις βιομηχανίες τροφίμων, αλλά χρησιμοποιούνται και στην αυτούσια κατανάλωση τους όπως οι τρούφες (Ανον, 2021). Οι Ασκομύκητες μπορούν να δράσουν και ως παράσιτα. Συγκεκριμένα, στον άνθρωπο μπορεί να προκαλέσουν πνευμονοπάθεια ιδιαίτερα επικίνδυνη για ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς (Ανον, 2022).

### 1.1.2 Ενδοφυτικοί μύκητες

Οι ενδοφυτικοί μύκητες είναι μικροοργανισμοί που διαβιούν εντός φυτικών ιστών (Gurta, 2018) και η πλειοψηφία τους ανήκει στο φύλο των Ασκομυκήτων (Babu & Sarma, 2019). Οι μικροοργανισμοί αυτοί είτε υπάρχουν σε όλο το βιολογικό κύκλο του φυτού (υποχρεωτικά ενδοφυτικοί, "obligate endophytes") είτε παραμένουν μόνο σε ένα μέρος αυτού (προαιρετικά ενδοφυτικοί, "opportunistic endophytes") (Hardoim et al., 2015). Επίσης, υπάρχει και μια δεύτερη διάκριση των ενδοφυτικών μικροοργανισμών με την ευρεία έννοια. Πρώτον, υπάρχουν ενδοφυτικοί μύκητες, που δημιουργούν σχέσεις ομοσιτισμού και τρέφονται από το φυτό χωρίς να ασκούν σε αυτό κάποια επίδραση. Δεύτερον, δημιουργούνται σχέσεις αμοιβαιότητας, όπου οι μύκητες επωφελούνται από το φυτό, αλλά

και το φυτό επωφελείται από αυτούς (Brader et al., 2017). Τέλος, εκτιμάται ότι υπάρχει και μια τρίτη κατηγορία μυκήτων, οι λεγόμενοι παρασιτικοί-παθογόνοι οι οποίοι προκαλούν βλάβες στο φυτό (Hardoim et al., 2015). Γενικά, σύμφωνα με έρευνες έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχουν πολλών ειδών ενδοφυτικοί μύκητες που παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλή ποικιλομορφία (Θωλμούδη, 2018).

Συνήθως, ανευρίσκονται σε αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά, όπως είναι η φαρμακευτική κάνναβη. Η πλειοψηφία των ενδοφυτικών μυκήτων εντοπίζονται στο ριζικό σύστημα των φυτών, όπως και οι μυκκόριζες, ενώ μικρότερο, αλλά σημαντικό ποσοστό βρίσκεται στα εναέρια τμήματα, όπως βλαστοί και φύλλα (Hardoim et al., 2015). Στην πραγματικότητα, αναπτύσσεται μια συμβιωτική σχέση μεταξύ του φυτού και του μικροοργανισμού, όπου το φυτό εκμεταλλεύεται προς όφελός του βιοδραστικές ουσίες που παράγει ο μικροοργανισμός, αλλά και ο μύκητας ωφελείται από το φυτό καταναλώνοντας διάφορα θρεπτικά συστατικά του (Nisa et al., 2015; Tadych & White, 2009). Με τη στενότερη έννοια, ως ενδοφυτικοί μύκητες αναφέρονται εκείνοι που συμβιώνουν με τους υπέργειους φυτικούς ιστούς.

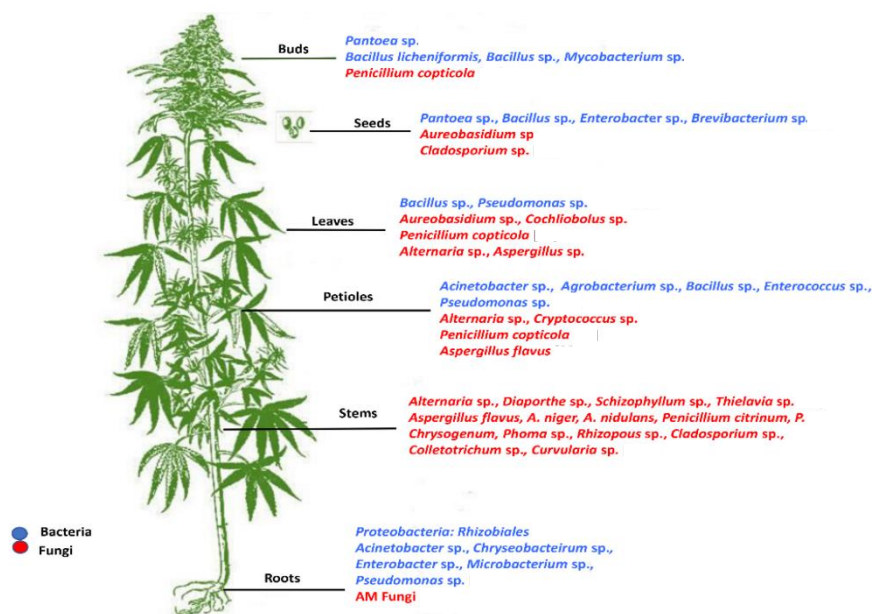
Οι μεταβολίτες που παράγουν οι ενδοφυτικοί μύκητες έχουν ποικίλες εφαρμογές, με κυριότερη τη συμβολή τους στην ιατρική και στις φαρμακευτικές βιομηχανίες, ως αντικαρκινικά, αντιβακτηριακά, αντιμυκητιασικά και άλλα φάρμακα (Hardoim et al., 2015). Μερικές ομάδες δευτερογενών μεταβολιτών είναι τα флаβονοειδή, τερπενοειδή, αλκαλοειδή, φαινόλες και στεροειδή (Abdel-Azeem et al., 2019). Κυριότερο παράδειγμα αποτελεί η παραγωγή ταξόλης από ενδοφυτικούς μύκητες που ολοκληρώνουν τον βιολογικό τους κύκλο εντός φυτικών ειδών της οικογένειας Taxaceae (Jia et al., 2016). Επίσης, συμβάλλουν στην δημιουργία πρόδρομων ενώσεων που αποσκοπεί στη λειτουργία της οδού σηματοδότησης του φυτού, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα ελέγχου της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών του φυτού. Συγκεκριμένα, ορισμένοι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται στην κάνναβη, όπως είναι το CBD, συμβάλλει στον περιορισμό του βιοτικού και αβιοτικού στρες που δέχεται το φυτό (Taghinasab & Jabaji, 2020). Ένα άλλο χαρακτηριστικό παράδειγμα αφορά το είδος *Aquilaria malaccensis* στο οποίο η παρουσία ενδοφυτικών μυκήτων οδήγησε στην αύξηση της παραγωγής της αγκαροσπιρόλης, που χρησιμοποιείται ευρέως στις φαρμακευτικές εταιρείες, αλλά και σε όφελος της κοσμετολογίας (Taghinasab & Jabaji, 2020).

Τα τελευταία χρόνια, εφαρμόζεται η πρακτική της συγκαλλιέργειας, κατά την οποία καλλιεργούνται ταυτοχρόνως περισσότεροι του ενός μικροοργανισμοί, με απώτερο σκοπό

την αναζήτηση φυσικών προϊόντων που δεν έχουν διερευνηθεί στο παρελθόν, εξαιτίας της απουσίας τους στις μονοειδικές καλλιέργειες (Θωλμούδη, 2018). Η απουσία τους μπορεί να οφείλεται στη σίγηση ορισμένων γονιδίων (Θωλμούδη, 2018).

### 1.1.2.1 Ενδοφυτικοί μύκητες σε φυτά κάνναβης

Η *Cannabis sativa* είναι σημαντικό φυτό για τη βιομηχανία φαρμάκων, λόγω των χημικών ουσιών που παράγει, κυριότερες από τις οποίες είναι τα κανναβινοειδή (Taghinasab & Jabaji, 2020). Οι χημικές ενώσεις αυτές συμβάλλουν στην αντοχή του φυτού σε βιοτικές και αβιοτικές συνθήκες, καθώς και στην άμυνα του φυτού (Taghinasab & Jabaji, 2020). Έρευνες αναφέρουν ότι η παραγωγή των ουσιών αυτών σχετίζεται με την ύπαρξη ενδοφυτικών μυκήτων (Εικ.2). Οι μύκητες αυτοί βιομετασχηματίζουν τα κανναβινοειδή, ερευνητικό πεδίο το οποίο δεν έχει μελετηθεί ακόμα σε βάθος (Αντωνόπουλος, 2021).



**Εικόνα 2.** Οι πιο συχνοί ενδοφυτικοί μύκητες, που συναντώνται σε καλλιέργειες *Cannabis sativa* (Taghinasab & Jabaji, 2020)

Στα πλαίσια ερευνητικής μελέτης των Punja και Scott (2023), εντοπίστηκαν τα στελέχη *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Acremonium alternatum*, *Lecanacillium aphanocladii*, *Metarhizium anisopliae*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus puniceus*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium olsonii*, *Chaetomium brasiliensis*, *Chaetomium globosum* και *Penicillium polonicum* εντός του στελέχους *C. sativa*. Αντίστοιχα, έχουν γίνει αναφορές για την παρουσία των *Arthrinium* sp., *Aspergillus* spp., *Aureobasidium* sp., *Cladosporium* sp. και

*Beauveria* sp., σε καλλιέργειες *C. sativa*, δέκα στελεχών της οικογένειας Chaetomiaceae, καθώς και για τους ενδοφυτικούς μύκητες *Microascus trigonosporus* και *Chaetomium globosum* (Αντωνόπουλος 2021, Κωνσταντίνου 2022).

Υπάρχουν κι άλλες πρόσφατες μελέτες που παρουσιάζουν τους ενδοφυτικούς μύκητες που διαβιούν εντός των φυτών κάνναβης, όπως αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα (Πίν.1).

**Πίνακας 1.** Ενδοφυτικοί μύκητες που έχουν απομονωθεί από διάφορα τμήματα του φυτού *C.sativa* και τα αντίστοιχα άρθρα αναφοράς τους.

Ενδοφυτικοί μύκητες στην <i>Cannabis sativa</i>	Άρθρο αναφοράς των ενδοφυτικών μυκήτων
<i>Acremonium alternatum</i>	Punja & Scott, 2023
<i>Alternaria alternata</i>	Punja & Scott, 2023
<i>Alternaria brassicae</i>	Qadri et al., 2013
<i>Alternaria tenuissima</i>	Punja & Scott, 2023
<i>Arthrimum</i> sp.	Αντωνόπουλος 2021, Κωνσταντίνου 2022
<i>Aspergillus flavus</i>	Gautam et al., 2013
<i>Aspergillus nidulans</i>	Gautam et al., 2013
<i>Aspergillus niger</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Aspergillus</i> spp.	Αντωνόπουλος 2021, Κωνσταντίνου 2022
<i>Aspergillus versicolor</i>	Kusari et al., 2013
<i>Aureobasidium</i> sp.	Αντωνόπουλος 2021, Κωνσταντίνου 2022
<i>Beauveria bassiana</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Beauveria</i> sp.	Αντωνόπουλος 2021, Κωνσταντίνου 2022
<i>Botrytis cinerea</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Chaetomium elatum</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Chaetomium brasiliensis</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Chaetomium globosum</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Chaetomium coronatus</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Chaetomium cladosporioides</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Chaetomium floccosum</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Cladosporium floccosum</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Cladosporium</i> sp.	Gautam et al., 2013
<i>Cochliobolus</i> sp.	Scott et al., 2018
<i>Colletotrichum gloeosporoides</i>	Lubna et al., 2018
<i>Colletotrichum</i> sp.	Gautam et al., 2013
<i>Colletotrichum trichellum</i>	Lubna et al., 2018
<i>Conidiobolus coronatus</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Cryptococcus</i> sp.	Scott et al., 2018
<i>Curvularia lunata</i>	Gautam et al., 2013
<i>Diaporthe eres</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Diversispora</i> sp.	Taghinasab & Jabaji, 2020
<i>Drechslera</i> sp.	Scott et al., 2018
<i>Eupenicillium rubidurum</i>	Taghinasab & Jabaji, 2020
<i>Eutypella</i> sp.	Scott et al., 2018

<i>Epicoccum nigrum</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Funnelformis geosporum</i>	Taghinasab & Jabaji, 2020
<i>Funnelformis mosseae</i>	Taghinasab & Jabaji, 2020
<i>Fusarium avenaceum</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Fusarium oxysporum</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Fusarium proliferatum</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Fusarium sporotrichiodes</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Glomus caledonium</i>	Taghinasab & Jabaji, 2020
<i>Glomus occultum</i>	Taghinasab & Jabaji, 2020
<i>Humicola brevis</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Microascus trigonosporus</i>	Αντωνόπουλος 2021
<i>Mortierella hyalina</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Mucor circineoloides</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Mucor racemosus</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Nigrospora oryzae</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	Kusari et al., 2013
<i>Penicillium araracuarensense</i>	Lubna et al., 2018
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Gautam et al., 2013
<i>Penicillium citrinum</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Penicillium copticola</i>	Kusari et al., 2013
<i>Penicillium expansum</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Penicillium meleagrinum</i>	Kusari et al., 2013
<i>Penicillium olsonii</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Penicillium polonicum</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Lubna et al., 2018
<i>Penicillium spathulatum</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Penicillium sumatrense</i>	Kusari et al., 2013
<i>Phoma</i> sp.	Gautam et al., 2013
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Punja and Scott, 2023
<i>Schizophyllum commune</i>	Qadri et al., 2013
<i>Stragonosporopsis</i> sp.	Gautam et al., 2013
<i>Trichoderma harzianum</i>	Punja and Scott, 2023

### 1.1.3 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές των μυκήτων

Οι μύκητες, όπως και τα βακτήρια και τα αρχαία, δρουν ως αποικοδομητές της οργανικής ύλης, με την κυριότερη λειτουργία τους να είναι η διάσπαση της νεκρής οργανικής ύλης (Volk, 2013). Η διάσπαση αφορά και υποστρώματα που περιέχουν λιγνίνη και κυτταρίνη (Volk, 2013). Γενικά, οι μύκητες μπορούν να ανταπεξέλθουν σε διάφορες συνθήκες, κάτι που τους καθιστά περισσότερο ανθεκτικούς από άλλους μικροοργανισμούς (Uradhyay et al., 2016). Η ικανότητά τους αυτή οφείλεται στην παραγωγή ενζύμων, όπως για παράδειγμα η παραγωγή λακκάσης, που συμβάλει στην απομάκρυνση των τοξικών ουσιών των ρύπων (Singh et al., 2011). Επιπλέον παραδείγματα ενζύμων αποτελούν η υπεροξειδάση του μαγγανίου και η υπεροξειδάση της λιγνίνης. Εκτός από τα παραδείγματα αυτά και άλλα ένζυμα που



αποτελούν προϊόν παραγωγής των μυκήτων έχουν αξιοποιηθεί για την αποτοξικοποίηση ουσιών προς παραγωγή χρήσιμων και θρεπτικών συστατικών (Uradhyay et al., 2016).

Οι μύκητες αξιοποιούνται στη γεωργία στη παραγωγή βιολιπασμάτων και για τη βελτίωση του εδάφους με βιολογικό τρόπο. Επιπλέον, μέσω της παραγωγής μεταβολιτών και του παρασιτισμού τους συμβάλλουν στον βιοέλεγχο. Από τις σπουδαιότερες βιοτεχνολογικές εφαρμογές τους είναι η χρησιμότητά τους στην ανακάλυψη των αντιβιοτικών (Fleming, 1929) που βελτίωσαν την ποιότητα ζωής του ανθρώπου. Συμπληρωματικά, οι μύκητες είναι σημαντικοί στη διατροφή του ανθρώπου και των ζώων, καθώς τα κύτταρα ζύμης αξιοποιούνται ως εναλλακτικές ζωοτροφές. Πολύτιμη είναι η συμβολή τους και στην δημιουργία συμπληρωμάτων διατροφής που βελτιώνουν την ανθρώπινη υγεία. Όσον αφορά την ενέργεια, οι μύκητες αποτελούν πηγές βιοκαυσίμων, όπως της βιοαιθανόλης και του βιοντίζελ. Τέλος, συμβάλλουν στην μείωση της ατμοσφαιρικής ρύπανσης, αφού μπορούν να δράσουν ως βιομετασχηματιστές και βιοαποικοδομητές, συμβάλλοντας στην βιοεξυγίανση και απορρύπανση του περιβάλλοντος. Έχουν, ακόμη, γίνει αναφορές για τη χρησιμότητά τους στη βιονανοτεχνολογία μέσω των μυκητογενών νανοσωματιδίων.

Οι μύκητες αποτελούν πηγή βιοδραστικών δευτερογενών μεταβολιτών. Η εύρεση νέων μεταβολιτών φαίνεται ότι παρουσιάζει αυξητική πορεία (Bugni, 2003). Το γεγονός αυτό οφείλεται στη συνεισφορά των μεταβολιτών στη παραγωγή νέων φαρμακευτικών προϊόντων προς όφελος του ανθρώπου, αλλά και στη διαδικασία της βιομετατροπής (Αντωνόπουλος, 2021).

#### **1.1.4 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές ενδοφυτικών μυκήτων**

Οι ενδοφυτικοί μύκητες θεωρούνται σημαντικοί λόγω της δράσης τους στους κλάδους της γεωργίας και της βιοτεχνολογίας (Kusari et al., 2012). Συγκεκριμένα, εντός των καλλιεργούμενων φυτικών ειδών δρουν προστατευτικά έναντι παθογόνων μικροοργανισμών και δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών (ξηρασία, αλατότητα), αμύνονται στη βιοτική και αβιοτική καταπόνηση, αλλά συμβάλλουν, επίσης, και στους αναπτυξιακούς μηχανισμούς των φυτών (Taghinasab & Jabaji, 2020). Αποτελούν, επομένως, έναν μηχανισμό βιοελέγχου. Οι παραπάνω παράγοντες είναι η απόδειξη της πολύτιμης συμβολής τους στη βιοτεχνολογία φυτών (Kusari et al., 2017). Οι μεταβολίτες που παράγουν αξιοποιούνται στην παρασκευή αντικαρκινικών και άλλων φαρμάκων και εντομοκτόνων σκευασμάτων (Taghinasab & Jabaji, 2020). Μπορούν να αξιοποιηθούν για την παρασκευή σκευασμάτων που χρησιμοποιούνται προληπτικά για την αποφυγή επερχόμενων ασθενειών ή για την εξάλειψή τους σε αρχικά στάδια (Kusari et al., 2014). Επίσης, οι ενδοφυτικοί μύκητες ενισχύουν την ικανότητα των

φυτών να παράγουν σε υψηλά ποσοστά ωφέλιμους για τον άνθρωπο μεταβολίτες (Taghinasab & Jabaji, 2020).

Παρά τις έρευνες γύρω από το πεδίο των ενδοφυτικών μυκήτων της κάνναβης, πέρα από την απομόνωση και ταυτοποίηση τους, δεν φαίνεται να έχουν αξιοποιηθεί επαρκώς. Καθίσταται, έτσι, αναγκαία η περαιτέρω εξέταση στοιχείων προς αναζήτηση νέων δεδομένων που θα οδηγήσουν στην αξιοποίηση των μεταβολιτών που παράγουν ως θεραπευτικό μέσο πολλών ασθενειών του ανθρώπου. Πολλές από τις ενώσεις που παράγονται μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη παραγωγή φαρμάκων, αν γίνει σωστή εκμετάλλευση των ενδοφυτικών μυκήτων και των προϊόντων του μεταβολισμού τους (Taghinasab & Jabaji, 2020).

## 1.2 Κάνναβη (*Cannabis sativa* L.)

### 1.2.1 Γενικά στοιχεία

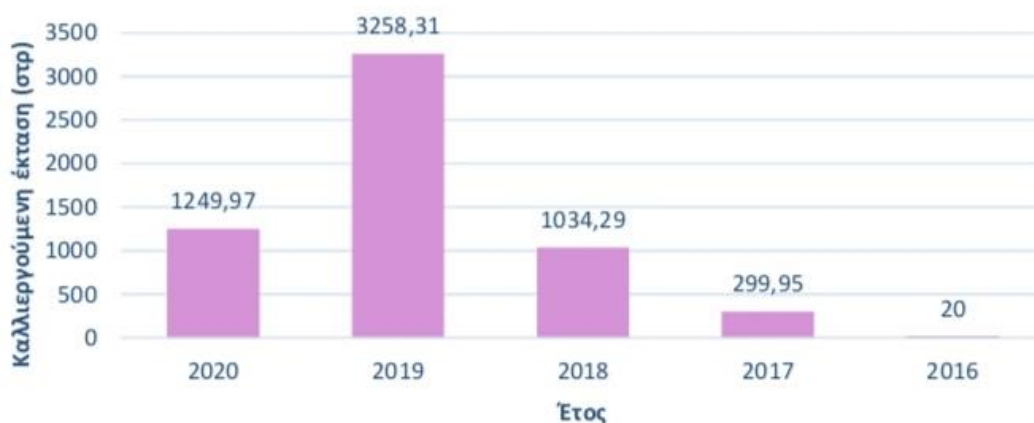
Η *C. sativa* L. ανήκει στην Οικογένεια Cannabaceae και στο Γένος *Cannabis* (Cascini & Boschi, 2017) (Πίν.2). Είναι ποώδες φυτό (Cascini & Boschi, 2017), που καλλιεργείται χιλιάδες χρόνια, λόγω των θεραπευτικών ιδιοτήτων του (Hussain et al., 2021). Επιπροσθέτως, πρόκειται για ετήσιο φυτό (Chandra et.al., 2017) με διάρκεια βιολογικού κύκλου περίπου πέντε μήνες. Η σπορά του πραγματοποιείται το καλοκαίρι και αφορά κυρίως μονόικες ποικιλίες, που περιλαμβάνουν και αρσενικά και θηλυκά άνθη (Berenji et al., 2013), στα οποία παράγονται κανναβινοειδή και τερπένια.

**Πίνακας 2.** Η συστηματική ταξινόμηση της κάνναβης (Euro+Med Plant Base, 2011).

<b>Βασίλειο</b>	Plantae-Plants
<b>Άθροισμα</b>	Tracheophyta
<b>Υποάθροισμα</b>	Spermatophytina
<b>Κλάση</b>	Magnoliopsida
<b>Υπέρταξη</b>	Rosanae
<b>Τάξη</b>	Rosales
<b>Οικογένεια</b>	Cannabaceae
<b>Γένος</b>	<i>Cannabis</i> L.
<b>Είδος</b>	<i>Cannabis sativa</i> L.

Τις τελευταίες δεκαετίες, οι καλλιεργούμενες ποικιλίες κάνναβης προκύπτουν από διασταυρώσεις των υποειδών *C. sativa* L και *C. indica* Lam, για αυτό τον λόγο δεν είναι σαφή τα χαρακτηριστικά του φυτού, ενώ όσον αφορά τη νομοθεσία, η καλλιέργεια της

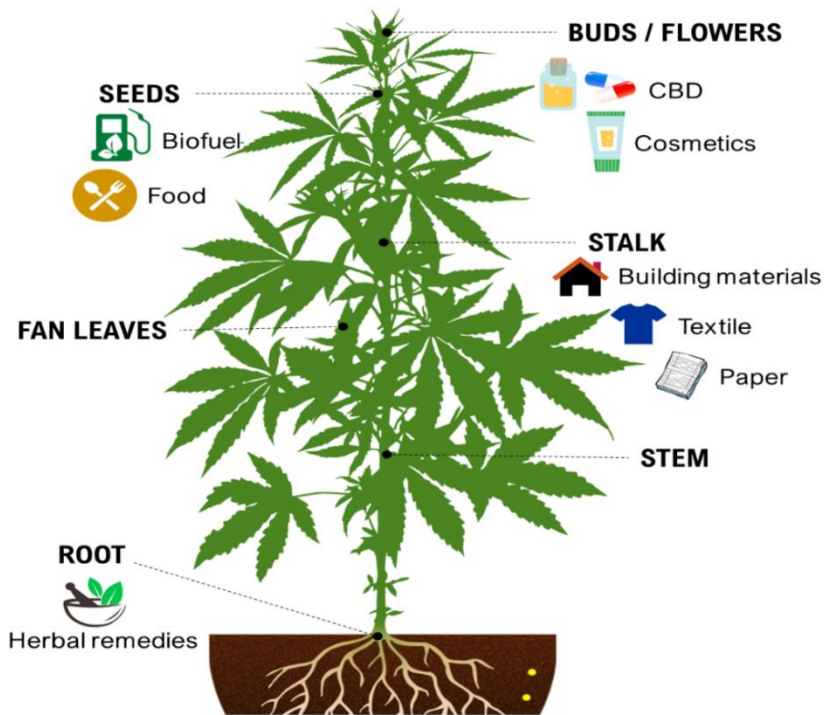
βιομηχανικής κάνναβης (*C. sativa*) επιτράπηκε στην Ελλάδα το 2016 με την ΚΥΑ 1750/39224/31-3-2016 που δημοσιεύτηκε στο ΦΕΚ αρ. 929B/6-4-2016 (Εικ.3) (Minagric, 2021). Στην Ευρώπη, η καλλιέργεια της ξεκίνησε από τον προηγούμενο αιώνα, με κυριότερη χώρα παραγωγής της, την Γαλλία (Minagric, 2021).



**Εικόνα 3.** Η καλλιέργεια της κάνναβης στην Ελλάδα την τελευταία δεκαετία (Minagric, 2021)

Στην κάνναβη υπάρχουν ποικίλες ενώσεις και μεταβολίτες με διάφορες φυσικοχημικές ιδιότητες (Aliferis & Bernard-Perron, 2020). Οι νέοι μεταβολίτες που παράγονται αναμένεται να έχουν εφαρμογές σε διάφορους κλάδους, όπως στην κοσμετολογία, την βιομηχανία φαρμάκων και τροφίμων, όμως ακόμη δεν έχουν αξιοποιηθεί επαρκώς (Aliferis & Bernard-Perron, 2020).

Τα οφέλη της *C. sativa* βασίζονται στα κανναβινοειδή που παράγονται (Hajirahimkhan et al., 2023), με σημαντικότερη την Δ<sup>9</sup>-τετραϋδροκανναβινόλη (Δ<sup>9</sup>-THC), που επηρεάζει τους μηχανισμούς αντίληψης του ανθρώπου (Pereira & Wiegand, 2014) (Εικ.3). Ωστόσο, ορισμένες από τις ενώσεις αυτές παράγονται σε πολύ μικρές ποσότητες εντός του φυτού.



**Εικόνα 4.** Οι διάφορες εφαρμογές της κάνναβης, βιοτεχνολογικές και μη. Παρατηρείται η παραγωγή CBD κυρίως στα θηλυκά άνθη του φυτού (Hesami et al., 2021).

### 1.2.2 Κανναβινοειδή

Τα κανναβινοειδή είναι ομάδα ενώσεων που συναντώνται στην κάνναβη (Kaba & Ray, 2023) όμως συντίθενται και από άλλους οργανισμούς, όπως από τους μύκητες (Gülck & Møller, 2020). Αυτή η ομάδα είναι γνωστή και με τον όρο τερπενοειδείς ενώσεις της κάνναβης (Χανδρινού, 2019).

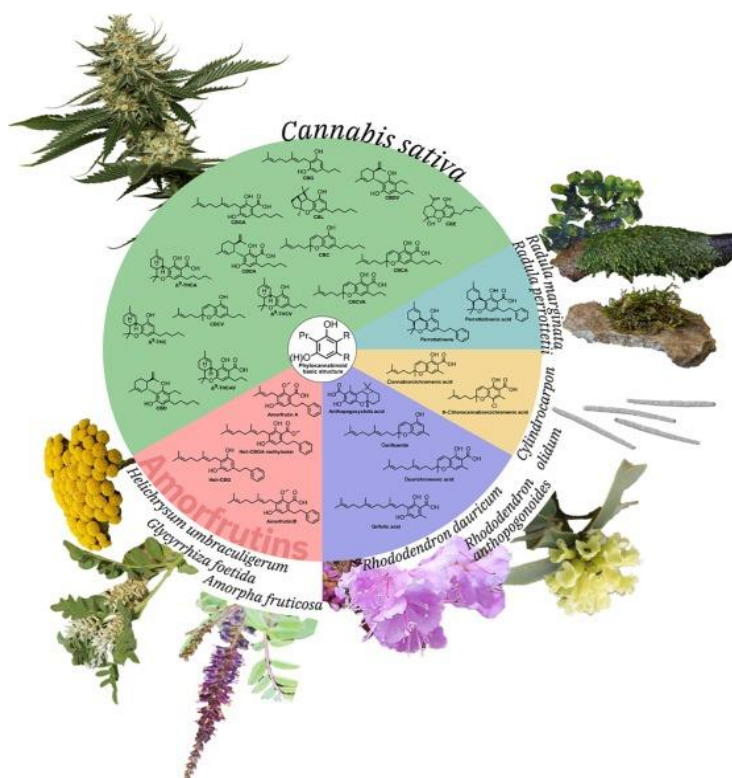
Γενικά, τα κανναβινοειδή διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες:

1. Φυτοκανναβινοειδή (συναντώνται σε φυτά κάνναβης)
2. Ενδοκανναβινοειδή (παράγονται ενδογενώς στο ανθρώπινο σώμα)
3. Συνθετικά κανναβινοειδή (παράγονται με τεχνητό τρόπο σε εργαστηριακές συνθήκες) (Ομάδα SCIRE, 2020)

#### 1.2.2.1 Φυτοκανναβινοειδή

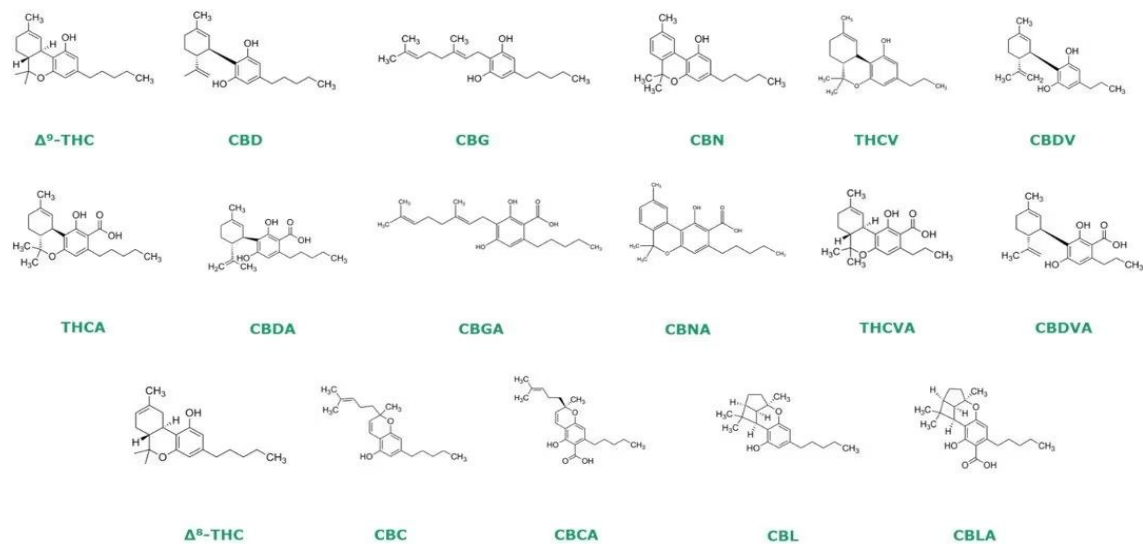
Η *C. sativa* φέρει πλήθος φυτοκανναβινοειδών ενώσεων και τερπενίων. Ωστόσο, πέρα από την παρουσία τους στην κάνναβη, έχουν βρεθεί σε αξιόλογες ποσότητες και σε άλλα φυτικά είδη (Εικ.5) (Gülck & Møller, 2020). Από τα σημαντικότερα που έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί είναι τα  $\Delta^8$ -τετραϋδροκανναβινόλη ( $\Delta^8$ -THC),  $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλη ( $\Delta^9$ -THC), κανναβιχρωμίνη (CBC), κανναβιδιόλη (CBD), κανναβιελσοΐνη (CBE), κανναβιγερόλη (CBG), κανναβικυκλόλη (CBL), κανναβινόλη (CBN), κανναβινοδιόλη (CBND) και κανναβιτριόλη

(CBT) (Ξένου, 2022). Γενικά, έχουν ταυτοποιηθεί 125 φυτοκανναβινοειδή από το φυτό *C. sativa* από τις συνολικά 567 χημικές ουσίες που έχουν βρεθεί εντός του φυτού (Khalsa et al., 2022). Τα φυτοκανναβινοειδή αυτά φέρεται πως παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη νέων φαρμάκων, με την THC και την CBD να έχουν εξέχουσα θέση στην έρευνα, λόγω των πολλά υποσχόμενων θεραπευτικών οφελειών τους (Khalsa et al., 2022).



**Εικόνα 5.** Δομή των κανναβινοειδών που βρίσκονται στην κάνναβη και σε άλλα φυτικά είδη (Gülck & Møller, 2020).

Όσον αφορά τη χημική δομή τους (Εικ.6), αποτελούνται στην πλειοψηφία τους από 21 άτομα άνθρακα (Χανδρινού, 2019). Φέρουν έναν δακτύλιο διβενζοπυρανίου και μια υδρόφοβη αλκυλική αλυσίδα (Χανδρινού, 2019). Η αλκυλική αλυσίδα παρουσιάζεται διαφοροποιημένη μεταξύ των φυτοκανναβινοειδών στον C3 του αρωματικού δακτυλίου (Χανδρινού, 2019). Η διαφοροποίηση αυτή αφορά κυρίως το μήκος της αλυσίδας (Χανδρινού, 2019).



**Εικόνα 6.** Η χημική δομή των σημαντικότερων φυτοκανναβινοειδών. (Εικόνα από Sigma Aldrich)

Κατά τη δεκαετία του 1980, ανακαλύφθηκαν οι πρώτοι υποδοχείς που σχετίζονται με την πρόσδεση φυτοκανναβινοειδών, με τον πρώτο να αναφέρεται ως CB<sub>1</sub>. Ο υποδοχέας αυτός απαντάται στον εγκέφαλο και συγκεκριμένα στην παρεγκεφαλίδα, στα βασικά γάγγλια και σε σημεία του ανθρώπινου οφθαλμού (Straiker et al., 1999), ενώ αναφέρεται και ως υποδοχέας του κεντρικού νευρικού συστήματος (Murillo-Rodriguez, 2008). Στον υποδοχέα προσδένονται ενδογενείς ενώσεις, γεγονός που επιβεβαιώνει την απουσία των φυτοκανναβινοειδών από τον εγκέφαλο (Χανδρινού, 2019). Ωστόσο, στον εγκέφαλο των θηλαστικών έχουν βρεθεί υποδοχείς που σχετίζονται με ενώσεις που προέρχονται από το φυτό της κάνναβης (Gülck & Møller, 2020). Αντιθέτως, ο δεύτερος υποδοχέας που ανακαλύφθηκε, ονομάζεται CB<sub>2</sub> και εντοπίζεται στο ανοσοποιητικό σύστημα και σε ανοσοκύτταρα (Saroz et al., 2019; Gülck & Møller, 2020). Γενικότερα, το ενδοκανναβινοειδές σύστημα αποτελείται από υποδοχείς κανναβινοειδών, οι οποίοι συμβολίζονται με CB<sub>x</sub> (Gülck & Møller, 2020).

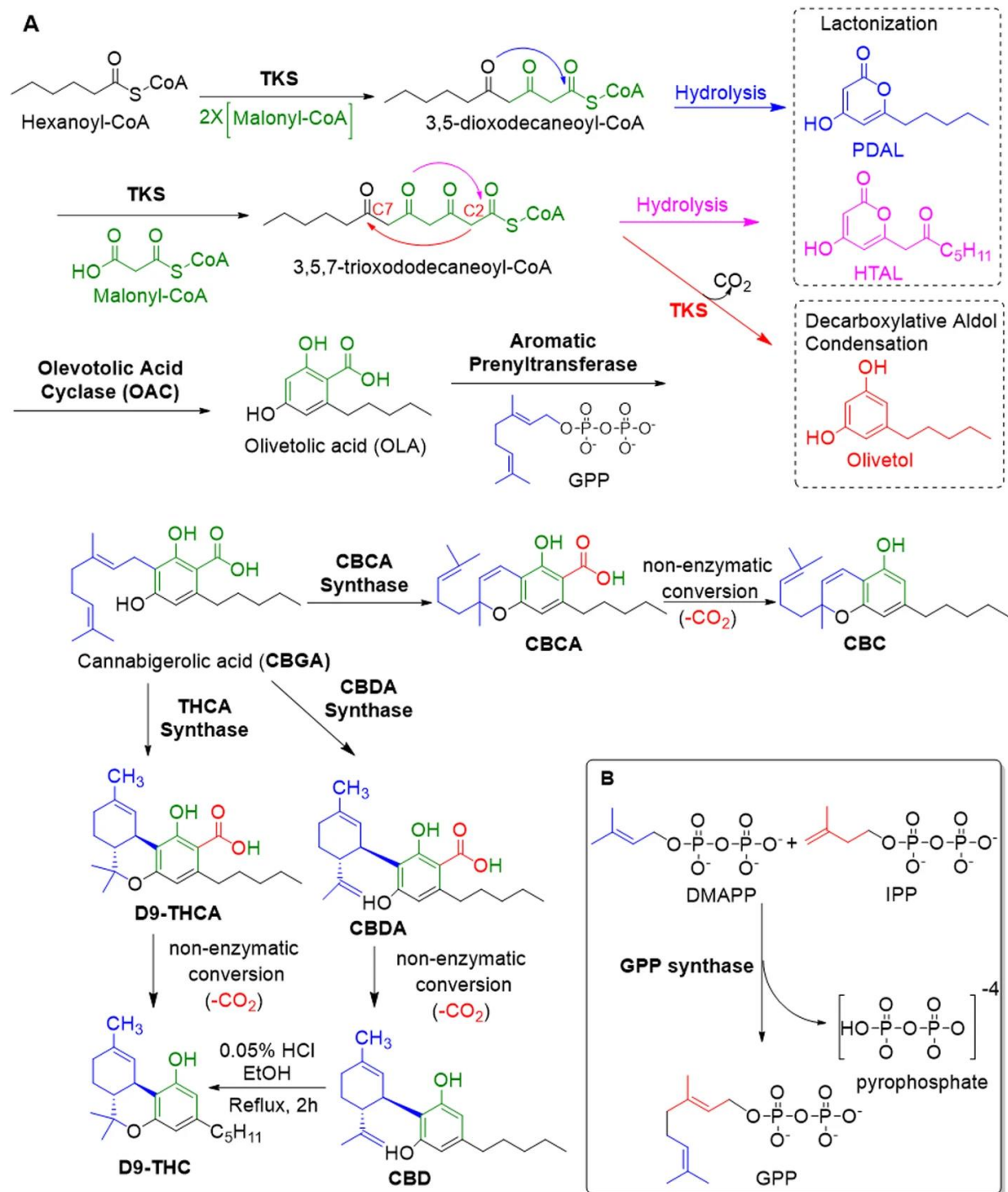
Από τα ανωτέρω φυτοκανναβινοειδή, στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκε η ένωση CBD κατά την υγρή καλλιέργεια των μυκήτων, προκειμένου να γνωστοποιηθεί η ικανότητα των μυκήτων να βιομετατρέπουν την ένωση αυτή.

### 1.2.2.2 Βιοσύνθεση φυτοκανναβινοειδών

Η βιοσύνθεση των φυτοκανναβινοειδών πραγματοποιείται κυρίως στα θηλυκά άνθη του φυτού της κάνναβης και σε πολύ μικρότερο ποσοστό στα αρσενικά άνθη (Tahir et al., 2021). Η παραγωγή τους λαμβάνει χώρα στα λεγόμενα αδενικά τριχώματα (glandular trichomes), που βρίσκονται πέρα από τα άνθη και σε άλλα εναέρια τμήματα του φυτού όπως στα βράκτια φύλλα, τον βλαστό και τον μίσχο του φυτού (Tahir et al., 2021). Δεν συναντώνται φυτοκανναβινοειδή στο ριζικό σύστημα του φυτού (Govindarajan et al., 2023). Επιπροσθέτως, λόγω των υψηλών επιπέδων υπερϊώδους ακτινοβολίας στην οποία εκτίθενται τα φυτά που καλλιεργούνται στην ύπαιθρο, αυξάνονται τα επίπεδα παραγωγής της τετραϋδροκανναβινόλης THC (Govindarajan et al., 2023). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει ότι η παραγωγή φυτοκανναβινοειδών επηρεάζεται από τις μεταβολές του περιβάλλοντος, που αφορούν την υγρασία, τη θερμοκρασία και άλλες περιβαλλοντικές συνθήκες (Govindarajan et al., 2023).

Σε μοριακό επίπεδο, η βιοσύνθεση (Εικ.7) ξεκινάει με την κατάλυση της συμπύκνωσης του hexanoyl-CoA από την tetraketide synthase (TKS) με τρία μόρια malonyl-CoA (Tahir et al., 2021). Το hexanoyl-CoA προκύπτει μέσω του ενζύμου ενεργοποίησης ακυλίου (Cs AAE1) (Govindarajan et al., 2023). Μετά από την προαναφερθείσα κατάλυση, προκύπτει το 3,5,7-trioxododecanooyl-CoA. Απουσία του συνενζύμου A, το 3,5,7-trioxododecanooyl-CoA υπόκειται σε κατάσταση κυκλοποίησης και αρωματοποίησης υπό την επίδραση της κυκλάσης του ελαιολικού οξέος (OAC) και, έτσι, παράγεται το ελαιολικό οξύ (OLA) (Tahir et al., 2021). Ουσιαστικά, πραγματοποιείται κατάλυση της συμπύκνωσης των ανθράκων C2 έως C7 αλδόλης, μέσω της κυκλάσης του ελαιολικού οξέος (OAC) (Govindarajan et al., 2023). Στη συνέχεια ακολουθεί η παραγωγή κανναβιγερολικού οξέος (CBGA), που πραγματοποιείται μέσω της εισαγωγής μιας ομάδας πρενυλίου (Tahir et al., 2021). Το κανναβιγερολικό οξύ είναι η πρόδρομη ένωση για τον σχηματισμό των φυτοκανναβινοειδών (Αντωνόπουλος, 2021).





**Εικόνα 7.** Βιοσύνθεση φυτοκανναβινοειδών. Για τη δημιουργία των φυτοκανναβινοειδών Δ<sup>9</sup>-THC, CBD και CBC, παρεμβάλλονται τα παραπροϊόντα pentyl diacetic lactone (PDAL), hexanoyl triacetic acid lactone (HTAL) και olivetol. Παρατηρείται ότι η συνθάση πυροφωσφορικού γερανυλεστέρα οδηγεί στην κατάλυση πυροφωσφορικού γερανυλίου (GPP). Το GPP συντίθεται με την παράλληλη δράση των πυροφωσφορικό διμεθυλαλλύλιο (DMAPP) και πυροφωσφορικό ισοπεντενυλεστέρα (IPP) (Tahir et al., 2021).



### 1.2.2.3 Κανναβιδιόλη (CBD)

Η κανναβιδιόλη (CBD) είναι φυτοκανναβινοειδές μεγάλης σημασίας για την ιατρική κοινότητα. Στον ανθρώπινο οργανισμό δρα αλληλεπιδρώντας με τους CB<sub>2</sub> υποδοχείς και άλλους μοριακούς στόχους (Khalsa et al., 2022). Συνήθως, περιέχεται σε υψηλό ποσοστό (περίπου 40%) στο φυτικό εκχύλισμα του φυτού και δρα κυρίως ως νευροπροστατευτικό (Campos et al., 2012). Δεν αποτελεί ψυχοδραστικό συστατικό (Khalsa et al., 2022), ενώ παρεμποδίζει τις επιπτώσεις της τετραϋδροκανναβινόλης THC στο νευρικό σύστημα του ανθρώπου. Επιπροσθέτως, έχει αγχολυτική και αντιψυχωσική δράση, ενώ παράλληλα συμβάλλει και στην θεραπεία ασθενειών ή καταστάσεων όπως η επιληψία και η σχιζοφρένεια (Ξένου, 2021). Θεωρείται σπασμολυτική ουσία για τα ζώα, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, καθώς έρευνες έχουν αποδείξει ότι μειώνει τα επεισόδια σπασμών και βελτιώνει την κινητική κατάσταση ασθενών με σύνδρομο Parkinson (Devinsky et al., 2014). Στις δράσεις της περιλαμβάνονται και οι αντιμικροβιακές της ιδιότητες, καθώς έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματική στην αντιμετώπιση των θετικών κατά Gram μικροοργανισμών. Συμπερασματικά, πρόκειται για μια ένωση χρήσιμη για την ιατρική επιστήμη, για αυτό και νομιμοποιήθηκε η χρήση της στην Ελλάδα σε διάφορα φαρμακευτικά και καταναλωτικά προϊόντα (Εφημερίδα των συντακτών, 2021). Ωστόσο, όπως τα περισσότερα φυτοκανναβινοειδή, έτσι και η κανναβιδιόλη έχει μειωμένη εφαρμογή, αφού προς το παρόν έχει αναφερθεί η παρουσία της μόνο σε σκευάσματα κατά της επιληψίας και της σκλήρυνσης κατά πλάκας (Khalsa et al., 2022).

Η απομόνωση της CBD από τα φυτά κάνναβης καθίσταται δύσκολη διαδικασία λόγω της παρουσίας κι άλλων φυτοκανναβινοειδών ενώσεων που περιπλέκουν την καθαρότητα της, αλλά και εξαιτίας της μικρής περιεκτικότητας στην οποία βρίσκεται, σε κάποιες περιπτώσεις, εντός των διαφόρων τμημάτων μερικών ποικιλιών του φυτού. Για τον παραπάνω λόγο παρουσιάζεται ως ιδανική λύση η παραγωγή της κανναβιδιόλης από μικροοργανισμούς όπως οι μύκητες (Qiu et al., 2022), μετά από γενετική τροποποίηση.

Όσον αφορά τη βιοσύνθεσή της, χρησιμοποιούνται δύο πρόδρομες ουσίες, το μηλονουλοσυνένζυμο A και το εξανούλο-συνένζυμο A. Από τις πρόδρομες ουσίες προκύπτει το ελαιοβετολικό οξύ (OA), για το σχηματισμό του οποίου λαμβάνει δράση και ο πυροφωσφορικός γερανυλεστέρας (GPP). Οι πρόδρομες ουσίες υπόκεινται σε απομεθυλίωση και ακυλίωση, ώστε τελικά να προκύψει το κανναβιγερολικό οξύ (CBGA). Το CBGA, υπό την επίδραση της συνθάσης του κανναβιδιολικού οξέος (CBDAS), τροποποιείται σε κανναβιδιολικό οξύ και με αποκαρβοξυλίωση, μετατρέπεται στην κανναβιδιόλη (Qiu et al., 2022).

### 1.2.3 Βιομετατροπή κανναβινοειδών

Βιομετατροπή είναι η δομική μεταβολή μιας ένωσης, που πραγματοποιείται μέσω της χρήσης κάποιου ζωντανού οργανισμού ή βιολογικού συστήματος (Sarao, 2006). Επίσης, ως βιολογικό σύστημα μπορεί να θεωρηθεί και η βιομάζα κάποιου μικροοργανισμού (Sarao, 2006). Σκοπός την βιομετατροπής είναι η δημιουργία μεταβολιτών υψηλής απόδοσης, που δύσκολα συντίθεται με εργαστηριακά μέσα (McClanahan, 1985). Έχουν διεξαχθεί πειράματα για τη βιομετατροπή της  $\Delta^8$ -τετραϋδροκανναβινόλης, της κανναβιδιόλης, της  $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλης και της κανναβινόλης (McClanahan & Robertson, 1984). Τα προϊόντα βιομετατροπής υπόκεινται σε διάφορες χρωματογραφικές μεθόδους προκειμένου να αναλυθούν περαιτέρω (Sarao, 2006).

Έρευνες που έχουν γίνει εν καιρώ έχουν αποδείξει την ικανότητα ορισμένων μικροβιακών συστημάτων να αλλάζουν τη δομή κάποιων ενώσεων, προς παραγωγή νέων φυσικών προϊόντων που ενδεχομένως έχουν υψηλότερης κλίμακας θεραπευτικές ιδιότητες και που αξιοποιούνται ευκολότερα στη φαρμακοβιομηχανία προς όφελος του ανθρώπου. Περιπτώσεις βιομετατροπής κανναβινοειδών από μύκητες αναφέρονται παρακάτω:

- Μετατροπή των  $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλη,  $\Delta^8$ -τετραϋδροκανναβινόλη, κανναβιδιόλη και κανναβινόλη από μύκητες *Syncephalastrum racemosum* (Robertson et al., 1975).
- Από τη βιομετατροπή των CBD, CBN,  $\Delta^8$ -THC και  $\Delta^9$ -THC από τον μύκητα *S. racemosum* προέκυψαν 4'-υδροξυ-μεταβολίτες (Robertson & Lyle, 1975).
- Συνεισφορά των μυκήτων *Pellicularia filamentosa* και *Streptomyces lavendulae* στην υδροξυλίωση του  $\Delta^8$ -THC, που οδήγησε στη παραγωγή 7β,3'- και 7β,4'-διυδροξυ- $\Delta^8$ -THC (Vidic et al., 1976).
- Παραγωγή 4'-υδροξυ-8-οξο- $\Delta^9$ -THC μέσω του μύκητα *Cunninghamella blakesleeana* (Binder, 1976).
- Αναλύσεις για τη βιομετατροπή της  $\Delta^9$ -τετραϋδροκανναβινόλης σε 358 καλλιέργειες εκ των οποίων οι 175 αφορούσαν ακτινομύκητες (Abbott et al., 1977).
- Αποδόμηση της n-pentyl πλευρικής αλυσίδας των κανναβινοειδών CBD, CBN,  $\Delta^8$ -THC και  $\Delta^9$ -THC (Robertson et al., 1978a,b).
- Βιομετατροπή της  $\Delta^9$ -THC σε 11- $\alpha$ -; 8β-; 3'- και 4'-υδροξυ- $\Delta^9$ -THC και 4',11-διυδροξυ- $\Delta^9$ -THC. Έγιναν δοκιμές με 51 διαφορετικά γένη μυκήτων (Binder & Meisenberg, 1978).

- Βιομετατροπή της Δ<sup>1</sup>-τετραϋδροκανναβινόλη από μύκητες *Fusarium nivale*, *Gibberella fujikuroi* και *Thamnidium elegans* (Binder & Popp, 1980).
- Βιομετατροπή της ολιβετόλης από τον μύκητα *S. racemosum* (McClanahan & Robertson, 1984)
- Βιομετατροπή των συνθετικών κανναβινοειδών JWH-018, JWH-073 and AM2201 από τον μύκητα *Cunninghamella elegans*, που οδήγησε στη παραγωγή νέων μεταβολιτών (Watanabe et al., 2016)
- Μεταβολισμός των συνθετικών κανναβινοειδών 5F-PB-22, XLR-11 PB-22 και UR-144 από τον μύκητα *C. elegans* (Watanabe et al., 2017)
- Βιομετατροπή του συνθετικού κανναβινοειδούς AM1220 από τον μύκητα *C. elegans* (Watanabe et al., 2018).
- Παραγωγή 15 μεταβολιτών του συνθετικού κανναβινοειδούς EG-018 και 21 μεταβολιτών του EG-2201, που υδροξυλιώθηκαν από τον μύκητα *C. elegans* (Gaunitz et al., 2019).
- Βιομετατροπή της CBD μέσω καρβοξυλίωσης, υδροξυλίωσης και αποακυλίωσης από τους μύκητες *Mucor ramannianus*, *Beauveria bassiana* και *Absidia glauca* (Ahmed et al., 2021).
- Απομόνωση νέων προϊόντων βιομετατροπής της CBD από τον μύκητα *Chaetomium globosum*. Οι μεταβολίτες που παράχθηκαν ήταν οι δεϋδροκανναβιελσοΐνη (dehydrocannabielsoin, (5aS,9 R,9aR )-6-methyl- 3-pentyl-9-(prop-1-en-2-yl)-5 a,8,9,9 a - tetrahydrodibenzo [b,d]furan -1-ol), 4''-υδροξυ-δεϋδροκανναβιελσοΐνη (4''-hydroxy-dehydrocannabielsoin, (5aS,9R,9aR) - 3 -(4-hydroxypentyl)-6-methyl-9- (prop -1-en-2-yl)-5a,8,9,9a-tetrahydrodibenzo[b,d]furan-1-ol), 3''-υδροξυ δεϋδροκανναβιελσοΐνη (3''-hydroxy-dehydrocannabielsoin, (5aS,9 R,9aR)-3-(3-hydroxypentyl)-6-methyl-9 - (prop - 1 -en - 2 -yl) - 5 a,8,9,9 a - tetrahydrodibenzo [ b , d]furan-1-ol), 7-υδροξυ - δεϋδροκανναβιελσοΐνη (7 - hydroxy-dehydrocannabielsoin, (5aS,9R,9aR) - 6 - (hydroxymethyl) - 3 -pentyl - 9 - (prop - 1 -en - 2 -yl) -5a,8,9,9a - tetrahydrodibenzo[b,d]furan-1-ol), 5'-O-β-D-γλυκοκυρανοσίδη της 7-υδροξυκανναβιδιόλης (7-OH-CBD-5'-O-β-D- glucopyranoside, 7 -hydroxy-cannabidiol 5'-O-β-D-glucopyranoside,(2S,3R,4S,5S,6R)-2-(((1'R,2'R)-6-hydroxy-5'-(hydroxymethyl) - 4 -pentyl - 2' -(prop - 1 -en - 2 -yl) -1',2',3',4' - tetrahydro -[1,1' - biphenyl] - 2 - yl)oxy) - 6 - (hydroxymethyl)tetrahydro - 2H -pyran -3,4,5 -triol) (Αντωνόπουλος, 2021)

- Παραγωγή 23 μεταβολιτών από τον μύκητα *C. elegans*, μετά από καρβοξυλίωση, υδροξυλίωση στο τμήμα πεντυλίου, γλυκοσυλίωση (Watanabe et al., 2022).

## Σκοπός της μελέτης

Η *C.sativa* είναι υψηλής σημασίας φυτό για τη βιομηχανία φαρμάκων, γεγονός που οφείλεται στην πληθώρα χημικών ουσιών που συναντώνται σε αυτό. Σημαντικότερες ουσίες είναι τα κανναβινοειδή, που σύμφωνα με έρευνες η παραγωγή τους σχετίζεται με ενδοφυτικούς μύκητες οι οποίοι έχουν την ικανότητα να βιομετατρέπουν τέτοιες ενώσεις, χωρίς το πεδίο αυτό να έχει μελετηθεί ιδιαίτερα. Έτσι, σκοπός της παρούσας διπλωματικής διατριβής ήταν η διερεύνηση της ικανότητας στελεχών μυκήτων, που αποτελούν μέρος της ελληνικής βιοποικιλότητας, να βιομετασχηματίζουν κανναβινοειδή. Λόγω της χρήσης καθαρής μορφής κανναβιδιόλης, ιδιαίτερος σκοπός ήταν η τροποποίηση του μορίου αυτού μέσω των χημικών αντιδράσεων που πραγματοποιούνται από τους ενδοφυτικούς μύκητες του φυτού.

## Κεφάλαιο 2

### Υλικά και Μέθοδοι

## 2. Πειραματικό μέρος

### 2.1 Οργανολογία

Η επαγωγός όπου πραγματοποιήθηκαν όλες οι διεργασίες στερεών και υγρών καλλιιεργειών είναι η ESCO Airstream Class II Biohazard Safety Cabinet με ηλεκτρονικό λύχνο Bunsen OMM Galaxy 1.

Ο επωαστικός θάλαμος ήταν της εταιρείας VELP FTC 90E Refrigerated Incubator που λειτουργούσε στους 25°C. Στην ίδια θερμοκρασία επώαστηκαν τόσο οι στερεές όσο και οι υγρές καλλιέργειες με τη διαφορά ότι οι υγρές τοποθετήθηκαν σε ZHWY-200B Incubator Shaker σε φυσικό φως υπό ανάδευση 180 στροφών ανά λεπτό.

Η διατήρηση των καλλιιεργειών έγινε σε θάλαμο ο CDR CLD Walk-in DG /DX Cold Room στους 5°C.

Το αυτόκαυστο όπου έλαβαν χώρα όλες οι αποστειρώσεις των υλικών και των σκευών ήταν το SN FMS 07060101 3000W ελληνικής κατασκευής (Αφοί Μ. Ανδριανόπουλοι ΟΕ Αρ. Εγκρ. 83651 61) στις 2 atm πίεση και 121°C για 20 min.

Για την οπτική παρατήρηση των καλλιιεργειών χρησιμοποιήθηκε στερεοσκόπιο BREUKHOVEN BMS74957 και μικροσκόπιο ο ZEISS Axio Imager A1.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του στερεού θρεπτικού μέσου των καλλιιεργειών ήταν:

- Potato Dextrose Agar (PDA) της σειράς Difco
- Αποσταγμένο H<sub>2</sub>O από αποστακτήρα Water Distilling Apparatus της Schott

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του υγρού θρεπτικού μέσου των υγρών καλλιιεργειών ήταν:

- Πεπτόνη της Merck
- Εκχύλισμα ζύμης της MP
- Εκχύλισμα βύνης της Merck
- D(+)- Γλυκόζη της Merck
- Αποσταγμένο H<sub>2</sub>O από αποστακτήρα Water Distilling Apparatus της Schott

Οι φυγοκεντρίσεις πραγματοποιήθηκαν σε OHAUS Frontier Centrifuge 5816 στις 4000 στροφές το λεπτό για 20 λεπτά στους 2°C.

Η λυοφιλοποίηση πραγματοποιήθηκε σε κενό 0.05 mbar για 90 h στους -54.8°C. Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας ZIRBUS VaCo 5 Freezedryer με:

- Αντλία EDWARDS RV8
- Φίλτρο λαδιού EDWARDS Oil Mist Filter EMF10

Το λουτρό υπερήχων που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας ELMA Elmasonic S 100 / Η (Ultrasound Assisted Extraction, UAE), όπου τα δείγματα παρέμειναν για 30 λεπτά.

Η εξάτμιση σε ροή αζώτου πραγματοποιήθηκε σε συνθήκες 48°C, σε συσκευή της εταιρείας THERMO SCIENTIFIC Recti-Therm III #TS-18824 Heating & Evaporation Module

Η συμπύκνωση των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε στους 45°C σε BÜCHI Rotavapor R210 με αντλία κενού V700 (Εικ.8).



**Εικόνα 8.** Η συμπύκνωση των εκχυλισμάτων σε συσκευή BÜCHI Rotavapor.

Για τις TLC χρησιμοποιήθηκαν MERK TLC Silica gel 60 F254 20 x 20 cm x 200 μm Aluminium sheets κανονικής φάσης, ενώ για την παρατήρησή τους χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα CAMAG TLC Visualizer 2. Ο ψεκασμός των TLC Silica gel έγινε με βανιλίνη της Acros Organics 5% v/v σε MeOH καιθειικό οξύ Empsure της Merk 5% v/v σε MeOH. Η αναλογία τους ήταν 50:50 και η παρατήρησή τους στο ορατό έγινε επίσης στο TLC Visualizer 2 της CAMAG (Εικ.9).



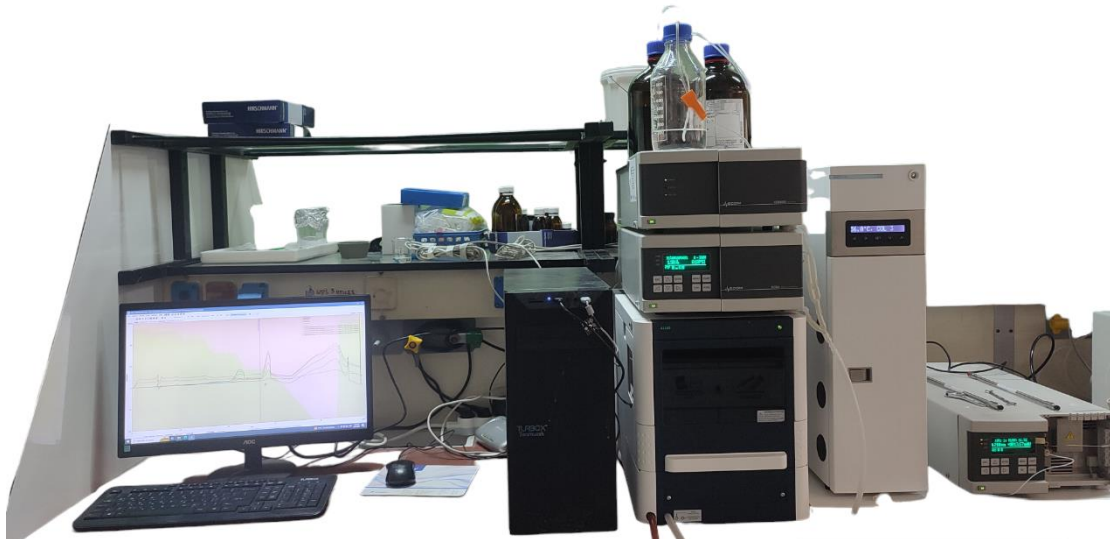


**Εικόνα 9.** CAMAG TLC Visualizer 2 για την παρατήρηση των TLC.

Η χρωματογραφία υψηλής πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) πραγματοποιήθηκε σε σύστημα ECOM (Εικ.10). Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει:

- Αντλία ECOM ECP2010
- Απαερωτή ECOM ECB2004
- Αυτόματο δειγματολήπτη ALIAS Autosampler (Spark Holland, Emmen, Holland)
- Ανιχνευτή ECOM UV-VIS PDA ECDA2800
- Συλλέκτη ECOM ECF2000
- Ημιπαρασκευαστική στήλη FORTIS C18 (25 cm x 10 mm με σωματίδια 5μm)
- Αναλυτική στήλη SUPELCO Discovery HS-C18 (25 cm x 4.6 mm με σωματίδια 5 μm)

Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε είναι το Clarity Chromatography Station της DataApex. Η χρήση του αποσκοπεί στην λήψη των φασμάτων και την ανάλυση των αποτελεσμάτων.



**Εικόνα 10.** Η HPLC που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των μεταβολιτών.

Για την Υγρή Χρωματογραφία Μέτριας Πίεσης (Medium Pressure Liquid Chromatography, MPLC) αξιοποιήθηκε η συσκευή Biotage Selekt με στήλη Biotage® Sfär HC Duo 5g. Ο ρυθμός ροής ήταν 18 mL/min (Εικ.11).

Η Υγρή Χρωματογραφία Βαρύτητας (Column Chromatography, CC) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση στήλης συνολικού ύψους 66 cm και πλήρωσης έως τα 58 cm, διαμέτρου 2.3 cm, λαϊμό NS 29.2/32, πορώδη ηθμό νούμερο P2 και διάμετρο προχοϊδας 2.5 mm. Χρησιμοποιήθηκαν 200g γέλης πυριτίου κανονικής φάσης 0.060-0.200 mm και 60A της Acros Organics. Το πακετάρισμα της στήλης πραγματοποιήθηκε με cHEX.



**Εικόνα 11.** Η συσκευή MPLC που χρησιμοποιήθηκε για την κλασμάτωση του δείγματος DPA18.

Η Υγρή Χρωματογραφία- Φασματομετρία Μάζας (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS) πραγματοποιήθηκε σε σύστημα Vanquish Duo HPLC and UHPLC System for Inverse Gradient της Thermo Fisher Scientific (Εικ.12) και τα δεδομένα που προέκυψαν αναλύθηκαν με το Xcalibur της Thermo Scientific.



**Εικόνα 12.** Σύστημα Vanquish Duo HPLC and UHPLC, όπου πραγματοποιήθηκε η LC-MS.

Η Φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, NMR spectroscopy) πραγματοποιήθηκε με τους φασματογράφους:

- BRUKER Avance DRX 400 MHz
- BRUKER Ultrashield PLUS 600 MHz

Η κλίμακα που χρησιμοποιήθηκε για τις χημικές μετατοπίσεις  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  NMR είναι η  $\delta$  με μονάδα μέτρησης τα ppm. Η κορυφή του  $\text{CDCl}_3$  στα 7,26 και 77,0 ppm και της  $\text{CD}_3\text{OD}$  στα 3,31 και 49,0 ppm θεωρήθηκαν σημεία αναφοράς. Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των αποτελεσμάτων ήταν το Topspin της Bruker. Οι χημικές δομές σχεδιάστηκαν σε λογισμικό της ChemDraw Ultra της Cambridgesoft.

## 2.2 Αποστείρωση επιφανειών και εργαλείων

Όλες οι επιφάνειες και τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν, αποστειρώθηκαν με σκοπό την αποφυγή επιμολύνσεων των καλλιεργειών. Συγκεκριμένα, ο θάλαμος νηματικής ροής απολυμάνθηκε με διάλυμα EtOH 70% v/v και τη βοήθεια απορροφητικού χαρτιού. Τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν, όπως η λαβίδα και το νυστέρι, αποστειρώθηκαν επίσης με την άμεση επαφή τους με φλόγιστρο και στη συνέχεια απολυμάνθηκαν σε διάλυμα EtOH.

### 2.3 Παρασκευή στερεού θρεπτικού υλικού

Η καλλιέργεια των επιλεγμένων στελεχών ενδοφυτικών μυκήτων έγινε σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Potato dextrose agar (PDA). Για την παρασκευή ενός λίτρου θρεπτικού μέσου χρησιμοποιήθηκαν 39g σκόνη PDA, που τοποθετήθηκε σε μπουκάλι αντιδραστηρίου χωρητικότητας ενός λίτρου. Προστέθηκε αποσταγμένο νερό μέχρι να πληρωθεί το μπουκάλι ως το ένα λίτρο. Ακολούθησε ανάδευση μέχρι τη διαλυτοποίηση της σκόνης PDA και κατόπιν το διάλυμα μεταφέρθηκε σε μεταλλικό σκεύος πάνω σε εστία, μέχρι να φτάσει σε βρασμό το διάλυμα. Εν συνεχεία μεταφέρθηκε σε γυάλινη κωνική φιάλη και αποστειρώθηκε στο αυτόκαυστο. Το θρεπτικό μέσο επιστρώθηκε σε αποστειρωμένα πλαστικά τρυβλία με τη χρήση λύχνου Bunsen και παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την στερεοποίησή του υπό ασηπτικές συνθήκες εντός του θαλάμου νηματικής ροής. Όσα τρυβλία δε χρησιμοποιήθηκαν άμεσα φυλάχθηκαν σε ψυκτικό θάλαμο στους 5°C.

### 2.4 Καλλιέργεια απομονωμένων ενδοφυτικών μυκήτων

Επιλέχθηκαν δέκα στελέχη ενδοφυτικών μυκήτων, τα οποία είχαν απομονωθεί από φυτικά τμήματα θηλυκών φυτών κάνναβης (Αντωνόπουλος 2021) (Εικ.13). Τα στελέχη αυτά είναι κατατεθειμένα στη Συλλογή Καλλιεργειών της Μυκητοθήκης ATHUM του ΕΚΠΑ (Πίν.3), σε κεκλιμένους σωλήνες με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα PDA.

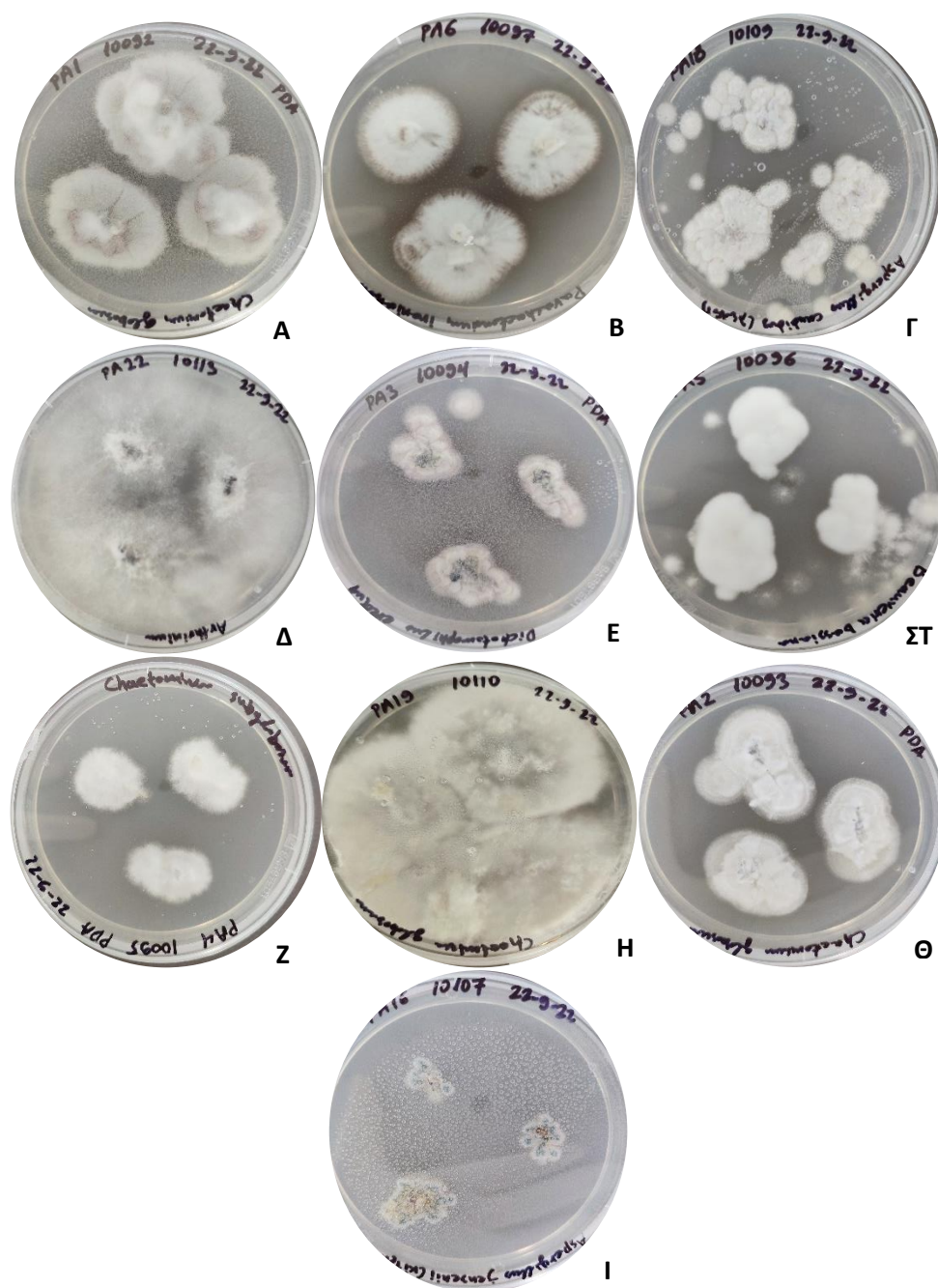
**Πίνακας 3.** Τα στελέχη των ενδοφυτικών μυκήτων που επελέγησαν για μελέτη αναφερόμενα με τον κωδικό ATHUM (σε παρένθεση ο προσωπικός κωδικός του ερευνητή που τα απομόνωσε, Αντωνόπουλος 2021)

Κωδικός ATHUM	Είδος
10092 (PA01)	<i>Chaetomium globosum</i>
10093 (PA02)	<i>Chaetomium globosum</i>
10094 (PA03)	<i>Dichotomopilus erectus</i>
10095 (PA04)	<i>Chaetomium subglobosum</i>
10096 (PA05)	<i>Beauveria bassiana</i>
10097 (PA06)	<i>Parachaetomium iridium</i>
10107 (PA16)	<i>Aspergillus</i> sp.
10109 (PA18)	<i>Aspergillus candidus</i>
10110 (PA19)	<i>Chaetomium globosum</i>
10113 (PA22)	<i>Arthrinium</i> spp.

Κάθε ενδοφυτικός μύκητας κωδικοποιήθηκε με αύξουσα αρίθμηση που ακολουθεί έναν μοναδικό κωδικό με τα αρχικά του ερευνητή PA και με κωδικό της μυκητοθήκης του ATHUM

όπως αναγράφονται στον Πίνακα 1. Επίσης, σε κάθε τρυβλίο αναγραφόταν η ακριβής ημερομηνία απομόνωσης του κάθε μύκητα.

Η απομόνωση έγινε από τις άκρες των μυκηλίων, με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας. Από κάθε κεκλιμένο σωλήνα λαμβάνονταν τρία τμήματα της περιφέρειας του μυκηλίου και τοποθετούνταν στο επιστρωμένο με PDA τρυβλίο. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν στους 25°C και ακολούθησε επώαση για μία εβδομάδα.



**Εικόνα 13.** Καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υλικό των στελεχών Α. *Chaetomium globosum*, Β. *Parachaetomium iridium*, Γ. *Aspergillus* sp., Δ. *Arthrinium* sp., Ε. *Dichotomopilus erectus*, ΣΤ.

*Beauveria bassiana*, *Z. Chaetomium globosum*, *H. Chaetomium globosum*, *Θ. Chaetomium globosum*, *I. Aspergillus jensenii*, μετά από επώαση επτά ημερών. (προσωπικό αρχείο)

## 2.5 Υγρές καλλιέργειες

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της ικανότητας κάποιων στελεχών μυκήτων να βιομετατρέπουν κανναβινοειδή. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες, ώστε να αξιολογηθεί η ικανότητα βιομετατροπής. Σε υγρή καλλιέργεια υποβλήθηκαν και τα δέκα στελέχη μυκήτων που είχαν επιλεγεί και είχαν καλλιεργηθεί σε στερεό θρεπτικό μέσο. Για την παρασκευή του υγρού θρεπτικού μέσου χρησιμοποιήθηκε κατάλληλη ποσότητα κανναβιδιόλης CBD σε καθαρή μορφή. Ακολούθησε επώαση υπό συνεχή ανάδευση των δειγμάτων σε κωνικές φιάλες.

Για την παρασκευή του υγρού θρεπτικού μέσου ακολουθήθηκε όμοια διαδικασία με των Gaunitz et al. (2019), όπου οι ποσότητες και τα υλικά για παραγωγή 1L θρεπτικού μέσου αναγράφονται στον Πίνακα 4. Τα στερεά υλικά μετρήθηκαν σε ζυγό ακριβείας και προστέθηκαν σε μεταλλικό σκεύος, μαζί με το αποσταγμένο νερό. Τα υλικά αναδεύτηκαν πάνω σε εστία υπό υψηλή θερμοκρασία για καλύτερη ομογενοποίησή τους. Για τις καλλιέργειες μικρής κλίμακας, το διάλυμα που προέκυψε κατανεμήθηκε σε κωνικές φιάλες χωρητικότητας 250mL για κάθε μύκητα και των 100mL για τους αντίστοιχους μάρτυρες (Εικ.14). Σε κάθε κωνική φιάλη των 250mL προστέθηκαν 100mL διαλύματος, ενώ στις φιάλες των 100mL προστέθηκαν 50mL υγρού θρεπτικού υλικού και σφραγίστηκαν με τη βοήθεια πώματος βάμβακος, γάζας και αλουμινίου. Για τις καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες χωρητικότητας 2L στις οποίες προστέθηκε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα 800mL, ενώ στους αντίστοιχους μάρτυρες προστέθηκαν 100mL υγρού διαλύματος. Οι κωνικές φιάλες αποστειρώθηκαν στο αυτόκαυστο στους 121°C για 25 λεπτά.

**Πίνακας 4.** Υλικά και ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του υγρού θρεπτικού μέσου κατά Gaunitz et al. (2019).

Υλικά	Ποσότητα (g,L)
Αποσταγμένο νερό	1L
Πεπτόνη	5g
Εκχύλισμα μαγιάς	3g
Εκχύλισμα βύνης	3g
D(+)-γλυκόζη	15g



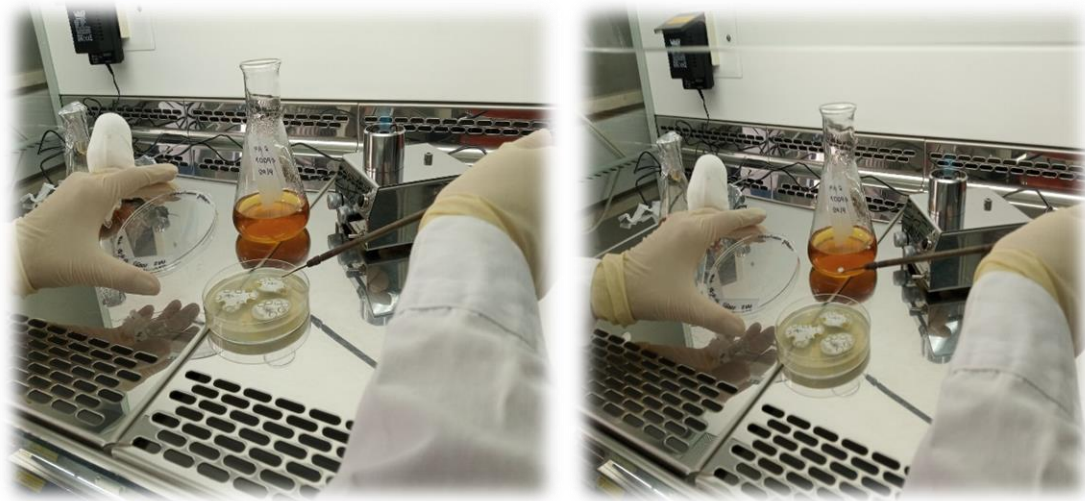


**Εικόνα 14.** Κωνικές φιάλες με υγρό θρεπτικό μέσο. (προσωπικό αρχείο)

Μετά την εξαγωγή των κωνικών φιαλών από το αυτόκαυστο και την ψύξη τους σε θερμοκρασία δωματίου, ακολούθησε ο εμβολιασμός των μυκήτων εντός των υγρών θρεπτικών μέσων. Από την περιφέρεια των αποικιών των στελεχών που αναπτύσσονταν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα λήφθηκαν κυκλικά κομμάτια με τη βοήθεια κυκλικού διακορευτή (cork borer) διαμέτρου 6mm (Εικ.16). Στις κωνικές φιάλες των 250mL πληρωμένες με 100mL υγρού θρεπτικού μέσου προστέθηκαν 10 κομμάτια μυκηλίου, δηλαδή ένα κομμάτι ανά 10mL θρεπτικού μέσου, ενώ στις κωνικές φιάλες που φιλοξενούσαν τους μάρτυρες της καλλιέργειας, προστέθηκαν πέντε κομμάτια. Οι κωνικές φιάλες τοποθετήθηκαν σε μηχανήμα συνεχούς ανάδευσης (incubator shaker) (Εικ.15), όπου επωάστηκαν για μία εβδομάδα.



**Εικόνα 15.** Incubator shaker όπου επωάστηκαν οι υγρές καλλιέργειες για μία εβδομάδα. (προσωπικό αρχείο)



**Εικόνα 16.** Αφαίρεση των τμημάτων μυκηλίου από τα τρυβλία με αποστειρωμένο κυλινδρικό διακορευτή και σπάτουλα σε άσηπτες συνθήκες. (προσωπικό αρχείο)

Μετά την επώαση ακολούθησε η διαδικασία προσθήκης της κανναβιδιόλης (CBD). Στις κωνικές φιάλες των 250ml προστέθηκαν 10 mg CBD διαλυμένη σε 100  $\mu$ l MeOH, ενώ στις κωνικές φιάλες των 100ml δεν προστέθηκε CBD, ώστε να λειτουργήσουν ως μάρτυρες. Επίσης, σε μία κωνική φιάλη πληρωμένη ως τα 50ml με υγρό θρεπτικό μέσο χωρίς προσθήκη μυκηλίου, χορηγήθηκε ανάλογη ποσότητα κανναβιδιόλης. Η χορήγηση τους έγινε με πιπέτα ακριβείας. Ακολούθησε επώαση των υγρών καλλιεργειών (και των μαρτύρων) για μία εβδομάδα (Εικ.17).







**Εικόνα 17.** Καλλιέργειες σε υγρό θρεπτικό μέσο, μετά από μία εβδομάδα επώασης (προσωπικό αρχείο)

## 2.5.1 Εκχυλίσσεις υγρών καλλιιεργειών

### 2.5.1.1 Εκχυλίσσεις καλλιιεργειών μικρής κλίμακας υποβοηθούμενες με υπερήχους (Ultrasonounds Assisted Extraction, UAE)

Για τις καλλιέργειες μικρής κλίμακας, μετά το πέρας επτά ημερών, ακολούθησαν εκχυλίσσεις υποβοηθούμενες με υπερήχους όπου οι κωνικές φιάλες απομακρύνθηκαν από το incubator shaker και το περιεχόμενο τους μεταφέρθηκε σε κωνικά σωληνάρια φυγόκεντρο τύπου Falcon χωρητικότητας 50mL. Τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν στη φυγόκεντρο για 20 λεπτά, 4.000 στροφές και στους 2°C, ώστε να διαχωριστεί το υπερκείμενο διάλυμα από τη μυκηλιακή μάζα. Το υπερκείμενο διάλυμα με πιπέτα Pasteur μεταφέρθηκε σε καθαρό σωληνάριο, με παράλληλη προσθήκη Ethyl acetate (EtOAc) σε αναλογία 1:1. Τα σωληνάρια τοποθετήθηκαν σε συσκευή υπερήχων, για μέγιστη ομογενοποίηση του διαλύματος και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν ξανά στη φυγόκεντρο στις ίδιες συνθήκες για 5 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντριση, το υπερκείμενο διάλυμα συμπυκνώθηκε υπό κενό σε σφαιρικές φιάλες. Κατόπιν, μεταφέρθηκε σε vials πενικιλίνης και εξατμίστηκε περαιτέρω σε ροή αζώτου (Πίν.5). Στη συνέχεια, προστέθηκε στις φιάλες με το στερεό κατάλοιπο ποσότητα EtOAc και επαναλήφθηκε η ανωτέρω διαδικασία. Η μυκηλιακή μάζα υπέστη λυοφιλοποίηση και τοποθετήθηκε σε συνθήκες κενού για 90h. Ακολούθησε η διαδικασία της εκχύλισης όπως ακριβώς στην περίπτωση του υπερκείμενου διαλύματος. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την ανάλυσή τους.

**Πίνακας 5.** Μάζες των δειγμάτων και των αντίστοιχων μαρτύρων τους που λήφθηκαν μετά τις εκχυλίσσεις, όσον αφορά τις καλλιέργειες μικρής κλίμακας.

Κωδικός δείγματος	Μάζα δείγματος (mg)	Κωδικός μάρτυρα	Μάζα μάρτυρα (mg)
DPA01	5,1	MPA01	4,2

DPA02	3,4	MPA02	3,1
DPA03	4,1	MPA03	4,3
DPA04	6	MPA04	4,8
DPA05	2	MPA05	2,2
DPA06	2	MPA06	2,2
DPA16	4,3	MPA16	7,7
DPA18	6,4	MPA18	4
DPA19	5,7	MPA19	3,8
DPA22	1,9	MPA22	1,9

### 2.5.1.2 Εκχυλίσεις καλλιεργείων μεγάλης κλίμακας υγρής-υγρής οργανικής φάσης (Liquid Liquid Extraction, LLE)

Οι καλλιέργειες που έδειξαν ενδιαφέρον χημικό προφίλ αναπτύχθηκαν σε μεγαλύτερη κλίμακα της τάξεως των 800mL υγρού θρεπτικού μέσου, με τον ίδιο παρασκευαστικό τρόπο που αναπτύχθηκαν και οι καλλιέργειες μικρής κλίμακας.

Οι καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας διηθήθηκαν υπό κενό με τη χρήση αντλίας Buchner και διηθητικού χαρτιού (Εικ.18Α). Με τον τρόπο αυτό διαχωρίστηκε το υγρό θρεπτικό μέσο, στο οποίο αναπτύχθηκε ο εκάστοτε μύκητας, από τη μυκηλιακή μάζα. Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις υγρής-υγρής φάσης. Αναλυτικά, χρησιμοποιήθηκε διαχωριστική χοάνη, στην οποία προστέθηκε το διηθημένο υγρό θρεπτικό μέσο και EtOAc σε αναλογία 1:1 (υδατικό διήθημα:EtOAc). Αναδεύτηκαν μεταξύ τους και αφέθηκαν για μερικά λεπτά σε στασιμότητα. Η εκχύλιση για κάθε δείγμα και μάρτυρα πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Δημιουργήθηκαν δύο φάσεις (Εικ.18Β), εκ των οποίων η υπερκείμενη (οργανική) συλλέχθηκε σε σφαιρική φιάλη και συμπυκνώθηκε υπό κενό και μεταφέρθηκε σε vial πενικιλίνης (Πίν.6). Τα εκχυλίσματα εξατμίστηκαν περαιτέρω σε ροή αζώτου και αποθηκεύτηκαν στους -20°C.

**Πίνακας 6.** Μάζες των δειγμάτων και των αντίστοιχων μαρτύρων τους, όσον αφορά τις καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας.

Κωδικός δείγματος	Μάζα δείγματος (mg)	Κωδικός μάρτυρα	Μάζα μάρτυρα (mg)
DPA03	142,3	MPA03	11
DPA18	196	MPA18	46,9



**Εικόνα 18.** Α. Διήθηση των εκχυλισμάτων Β. Διαχωρισμός των φάσεων με προσθήκη EtOAc σε διαχωριστική χοάνη.

## 2.6 Αναλυτική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (αναλυτική HPLC)

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (ή Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης, HPLC) πρόκειται για χρωματογραφία στήλης που αποσκοπεί στο διαχωρισμό ενώσεων, την ταυτοποίησή τους και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους. Όσον αφορά τον τρόπο λειτουργίας ενός μηχανήματος HPLC, λειτουργεί μέσω μια στατικής φάσης, της στήλης, και μέσω της κινητής φάσης που μετακινείται με τη βοήθεια αντλίας. Αποτελείται και από έναν ανιχνευτή, ο οποίος συμβάλει στην καταγραφή του χρόνου απομόνωσης μιας ένωσης. Τα δείγματα τοποθετούνται στο ρεύμα της κινητής φάσης, όπου εισάγονται διαλύτες αναλόγως με τις απαιτήσεις του πειράματος (Malviya et al., 2010).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η HPLC αντίστροφης φάσης, που βασίζεται στο διαχωρισμό των μορίων με βάση την πολικότητά τους (Πίν.7)(Πίν.8). Τα εκχυλίσματα

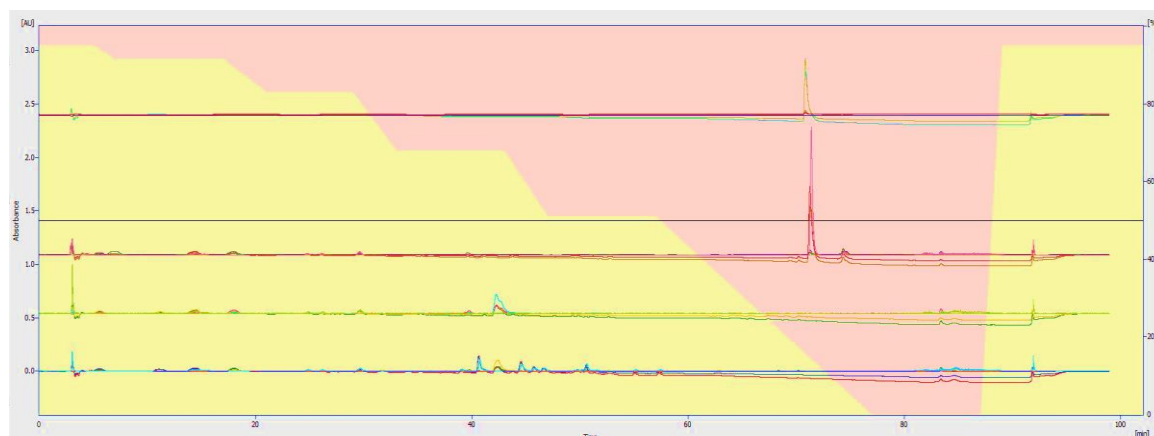
αραιώθηκαν μέχρι συγκεντρώσεως 3mg/mL με τη προσθήκη MeOH και αναλύθηκαν με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (Εικ.19)(Εικ.20).

**Πίνακας 7.** Πειραματικές συνθήκες Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης.

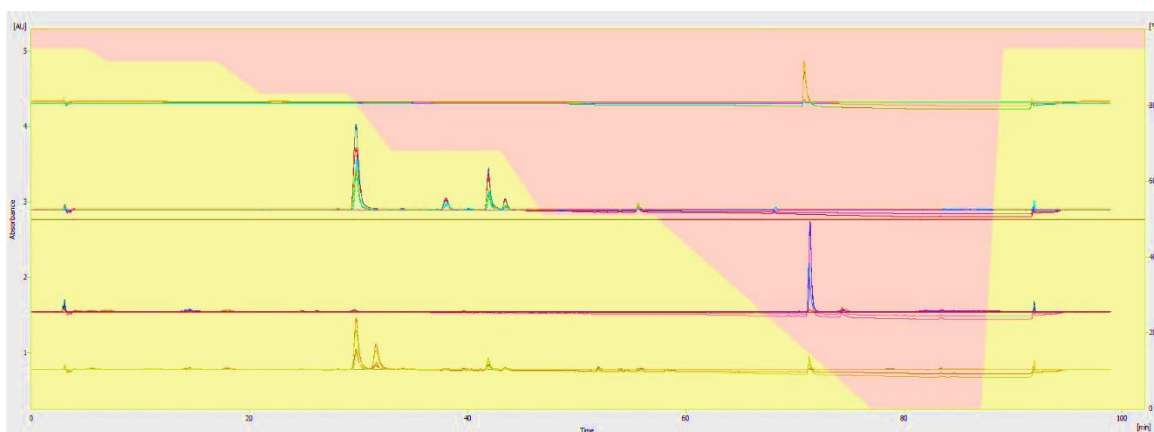
Πειραματικές συνθήκες HPLC	
Στατική φάση	Supelco Discovery HS-C18, 250x4.6 mm, particle size 5 μm
Κινητή φάση	ACN, H <sub>2</sub> O (0,1% TFA)
Θερμοκρασία	36°C
Όγκος ένεσης	20 μL
Συγκέντρωση δείγματος	3 mg/mL
Απορρόφηση	210nm, 220nm, 278nm, 256nm, 366nm

**Πίνακας 8.** Σύστημα βαθμιδωτής έκλυσης.

Πρόγραμμα έκλυσης αναλυτικής HPLC		
Χρόνος (min)	Σύσταση διαλυτών	Ροή (mL/min)
0-5	95% H <sub>2</sub> O + 5% ACN	1
5-7	91,5% H <sub>2</sub> O + 8,5% H <sub>2</sub> O	1
7-17	91,5% H <sub>2</sub> O + 8,5% H <sub>2</sub> O	1
17-21	83% H <sub>2</sub> O + 17% ACN	1
21-29	83% H <sub>2</sub> O + 17% ACN	1
29-33	68% H <sub>2</sub> O + 32% ACN	1
33-43	68% H <sub>2</sub> O + 32% ACN	1
43-47	51% H <sub>2</sub> O + 49% ACN	1
47-57	51% H <sub>2</sub> O + 49% ACN	1
57-77	100% ACN	1
77-87	100% ACN	1
87-89	95% H <sub>2</sub> O + 5% ACN	1
89-99	95% H <sub>2</sub> O + 5% ACN	1



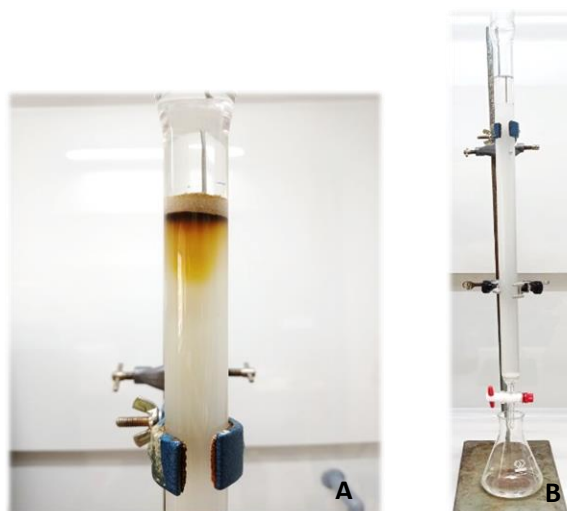
**Εικόνα 19.** Χρωματογράφημα HPLC για το εκχύλισμα του δείγματος PA03 σε μήκη κύματος 210nm, 220nm, 256nm, 278nm, 366nm, όπου παρατηρείται το εκχύλισμα θρεπτικού μέσου μύκητα με (δείγμα) και χωρίς (μάρτυρας) την προσθήκη κανναβιδιόλης το εκχύλισμα του θρεπτικού μέσου και της κανναβιδιόλης.



**Εικόνα 20.** Χρωματογράφημα HPLC για το εκχύλισμα του δείγματος PA18 σε μήκη κύματος 210nm, 220nm, 256nm, 278nm, 366nm, όπου παρατηρείται το εκχύλισμα θρεπτικού μέσου μύκητα με (δείγμα) και χωρίς (μάρτυρας) την προσθήκη κανναβιδιόλης, το εκχύλισμα του θρεπτικού μέσου και της κανναβιδιόλης.

## 2.7 Υγρή Χρωματογραφία Βαρύτητας (Column Chromatography, CC)

Στην περίπτωση των καλλιιεργειών μεγάλης κλίμακας και συγκεκριμένα για το δείγμα PA03, που αντιστοιχεί στον μύκητα *D. erectus*, την HPLC ακολούθησε η διαδικασία της υγρής χρωματογραφίας βαρύτητας σε στήλη γέλης πυριτίου, ώστε να απομονωθούν οι μεταβολίτες. Η στήλη επρόκειτο για κανονικής φάσης με τη χρήση διάφορων συστημάτων διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την αύξηση της πολικότητας του συστήματος. Η χρωματογραφία στήλης στηρίζεται στην προσρόφηση ενώσεων στη γέλη πυριτίου (Silica Gel) (Εικ.21B), οπότε τα κλάσματα που προκύπτουν μπορούν να διαχωριστούν καθώς κινούνται με διαφορετικό ρυθμό μέσα στη στήλη. Το πακετάρισμα της στήλης πραγματοποιήθηκε με cHex και το δείγμα που τοποθετήθηκε εντός της στήλης ήταν διαλυμένο σε  $\text{CHCl}_3$  (Εικ.21A) μάζας 135mg. Η κινητή φάση της στήλης αναλύεται στον Πίνακα 9.



**Εικόνα 21. Α.** Εφαρμογή του δείγματος στη στήλη γέλης πυριτίου, πάνω από στρώμα άμμου.  
**Β.** Η στήλη γέλης πυριτίου μετά την προσθήκη 200g γέλης πυριτίου.

Προέκυψαν 925 κλάσματα όγκου 10 mL, ποσότητα από τα οποία χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση TLC, δηλαδή χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας με σκοπό τον διαχωρισμό μη πτητικών μιγμάτων. Επίσης, με την παρατήρηση των χρωματογραφημάτων λεπτής στιβάδας αναλύονται τα κλάσματα και συνενώνονται όσα παρουσιάζουν όμοιο προφίλ.

**Πίνακας 9.** Συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για την γέλη πυριτίου και οι αντίστοιχοι όγκοι τους.

Συστήματα διαλυτών και αντίστοιχοι όγκοι	
Σύστημα διαλυτών	Όγκος (mL)
cHex (100%)	130
cHex:EtOAc (97:3)	500
cHex:EtOAc (90:10)	1000
cHex:EtOAc (85:15)	700
cHex:EtOAc (75:25)	500
cHex:EtOAc (65:35)	500
cHex:EtOAc (55:45)	1100
cHex:EtOAc (45:55)	1000
cHex:EtOAc (35:65)	600
cHex:EtOAc (25:75)	800
cHex:EtOAc (15:85)	600
cHex:EtOAc (10:90)	400
EtOAc (100%)	700
EtOAc:MeOH (98:2)	700
EtOAc:MeOH (95:5)	1200
EtOAc:MeOH (90:10)	400
EtOAc:MeOH (85:15)	400

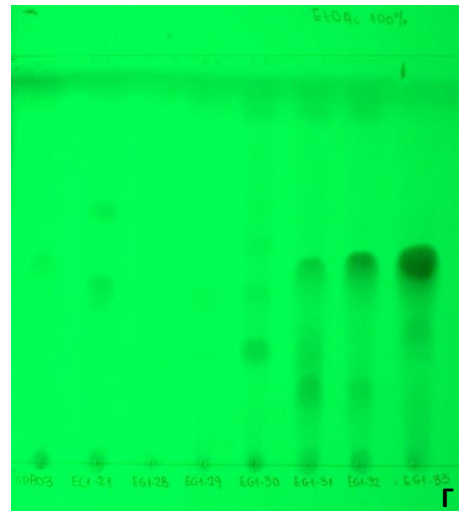
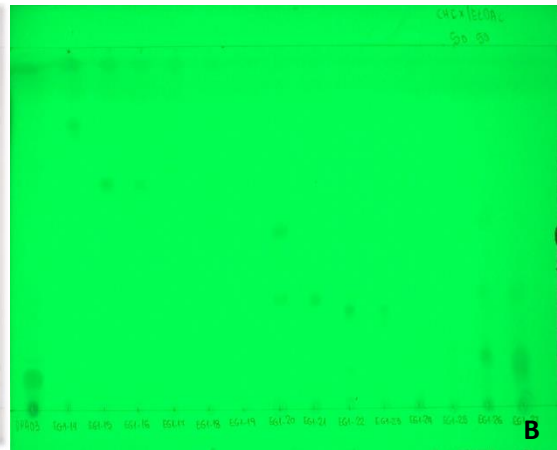
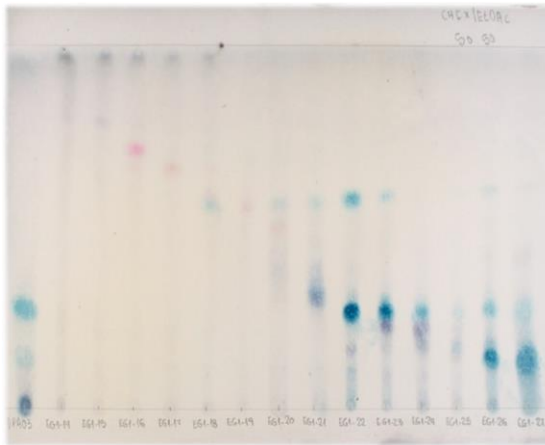
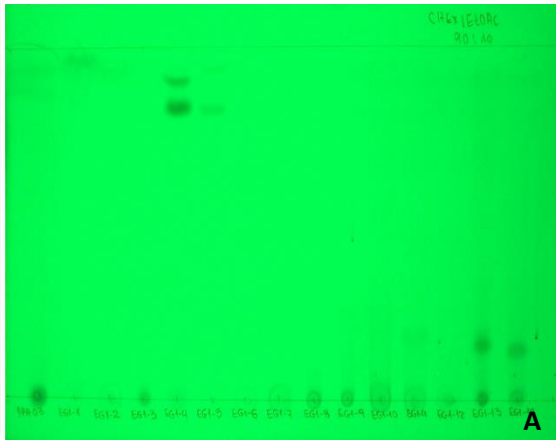
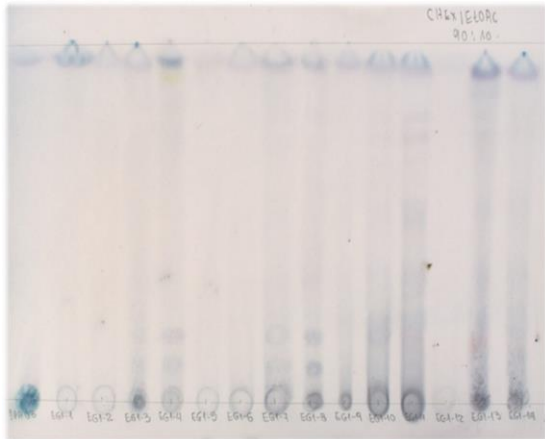
Έτσι, όσα από τα κλάσματα είχαν παρόμοια εικόνα στην TLC, συνενώθηκαν και παρατηρήθηκαν ξανά με TLC (Εικ.22). Συνολικά, προέκυψαν 40 συνενώσεις (Πίν.10). Ο κωδικός των συνενώσεων προέκυψε από τα αρχικά γράμματα του ονοματεπώνυμου του ερευνητή (Eleni Georgoula, EG<sub>x</sub>).

**Πίνακας 10.** Συνενώσεις κλασμάτων που προέκυψαν μετά από την παρατήρηση των TLC και οι αντίστοιχες μάζες που προέκυψαν μετά από συμπύκνωση.

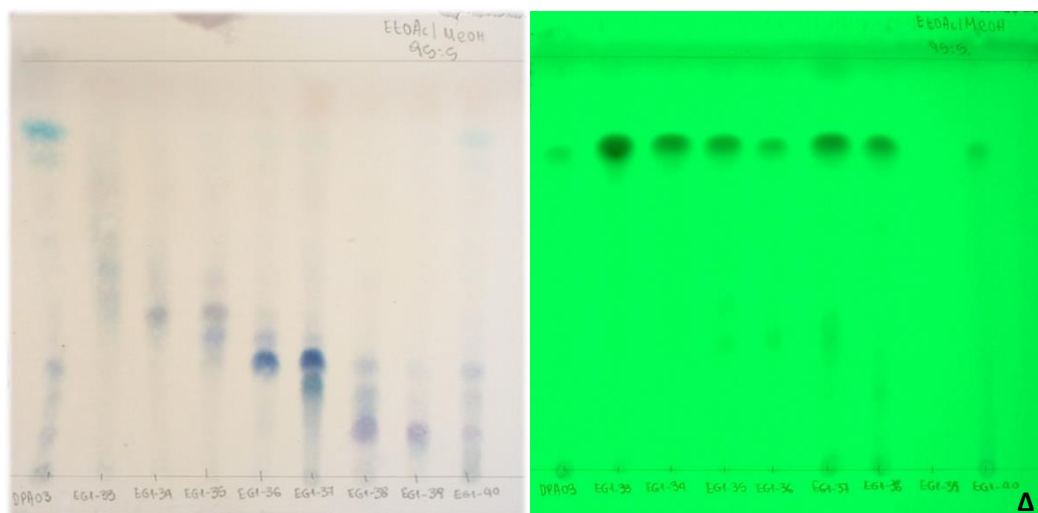
Μάζες συνενωμένων κλασμάτων		
Κλάσματα	Κωδικός	Μάζα (mg)
1-22	EG1-1	17
23-32	EG1-2	1,3
33-42	EG1-3	1,8
43-47	EG1-4	6,3
48-51	EG1-5	0,9
52-56	EG1-6	0,8
57-62	EG1-7	1,8
63-76	EG1-8	3,7
77-84	EG1-9	2,8
85-102	EG1-10	1,3
103-107	EG1-11	1,3
108-111	EG1-12	0
112-124	EG1-13	3,3
125-154	EG1-14	5,2
155-173	EG1-15	5,6
174-213	EG1-16	3,6
214-221	EG1-17	0,5
222-251	EG1-18	4,6
252-264	EG1-19	0,1
265-303	EG1-20	2,5
304-317	EG1-21	2
318-341	EG1-22	8,5
342-351	EG1-23	1,4
352-388	EG1-24	2,8
389-409	EG1-25	1,3
410-438	EG1-26	2,8
439-479	EG1-27	1,5
480-491	EG1-28	0,5
492-504	EG1-29	0,5
505-537	EG1-30	4,1
538-609	EG1-31	8,4
610-679	EG1-32	6
680-687	EG1-33	3,9
688-695	EG1-34	2,3
696-708	EG1-35	4,1
709-722	EG1-36	4,5
723-783	EG1-37	10
784-805	EG1-38	3,6



806-885	EG1-39	16,9
886-925	EG1-40	6,5







**Εικόνα 22.** TLC που πραγματοποιήθηκαν στα 40 συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από τη στήλη γέλης πυριτίου του PA03 δείγματος, ψεκασμένες με διάλυμα βανιλίνης και θειϊκού οξέος. Παρατηρείται ο διαχωρισμός μορίων αυξανομένης της πολικότητας. Τα συστήματα διαλυτών όπου αναπτύχθηκε η TLC ήταν Α. CHEX:EtOAc (90:10), Β. CHEX:EtOAc (50:50), Γ. EtOAc (100%) και Δ. EtOAc:MeOH (95:5). Οι εικόνες της δεξιάς πλευράς αντιστοιχούν στις TLC που παρατηρήθηκαν σε UV 245nm.

Στην περίπτωση του δείγματος PA18 χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Μέτριας Πίεσης Υγρής Χρωματογραφίας (Medium Pressure Liquid Chromatography, MPLC) της εταιρείας Biotage, με σκοπό την απομόνωση των μεταβολιτών. Προέκυψαν 105 κλάσματα των 10 mL με ρυθμό ροής 18 mL/min, που συλλέχθηκαν σε γυάλινους σωλήνες διαμέτρου 16 x 150 mm. Κατά τη λειτουργία της συσκευής προστέθηκαν διαλύτες σε διαφορετικά συστήματα κάθε φορά, ώστε να αυξηθεί η πολικότητα του συστήματος (Πίν.11).

Τα κλάσματα ελέγχθηκαν χρωματογραφικά με TLC και κατόπιν, όσα παρουσίασαν όμοιο χημικό προφίλ συνενώθηκαν και παρατηρήθηκαν με τον ίδιο τρόπο (Εικ.23). Οι συνενώσεις που προέκυψαν ήταν 16 σε αριθμό (Πίν.12). Οι συνθήκες υπό τις οποίες υλοποιήθηκε η παραπάνω διαδικασία, καθώς και το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε, καταγράφονται στους Πίνακες 11 και 12.

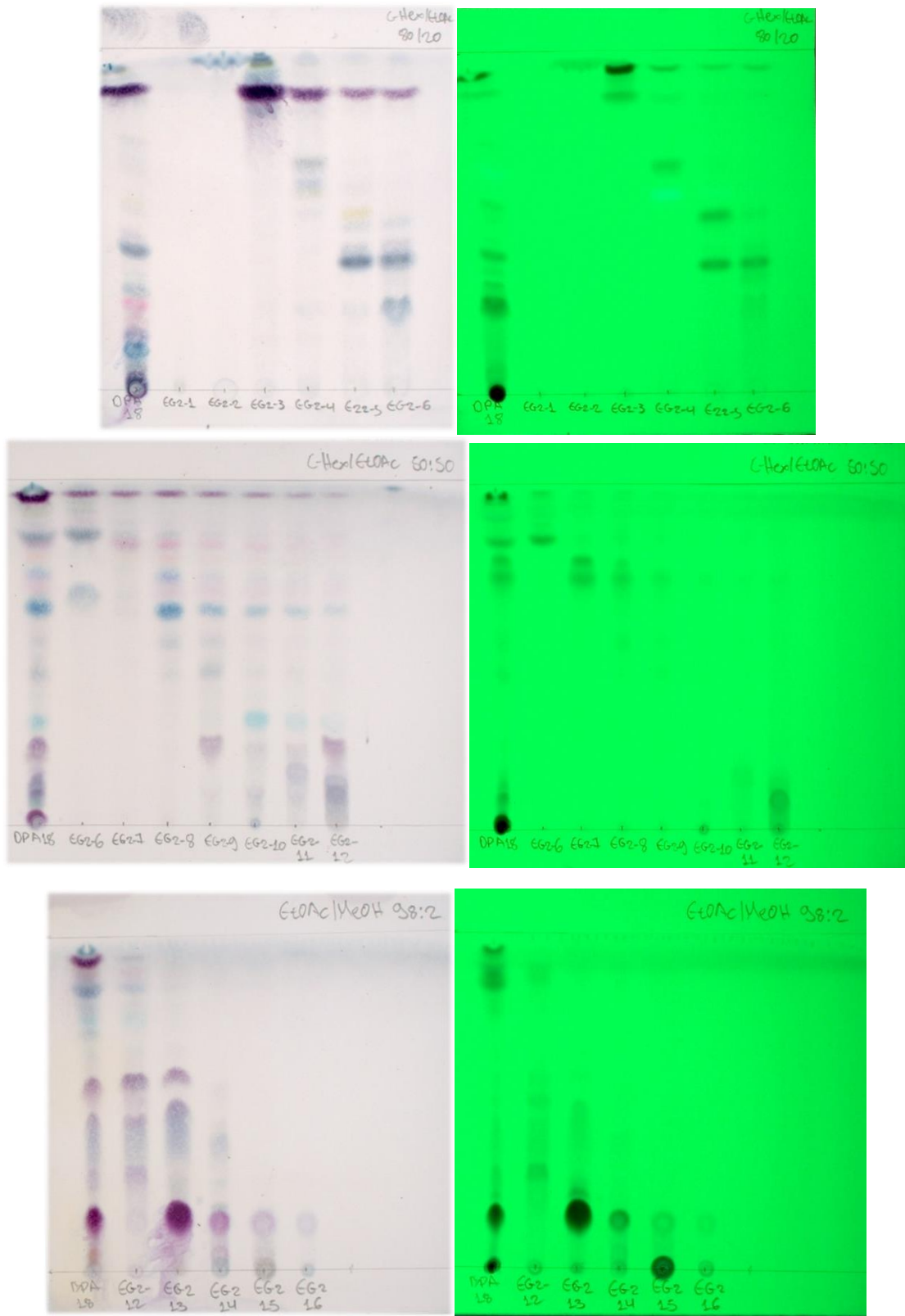
**Πίνακας 11.** Τα συστήματα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διεξαγωγή της MPLC.

Συστήματα διαλυτών		
Διαλύτες	Αναλογία	Χρόνος (min:s)
-	-	00:00 (Έναρξη)
EtOAc : cHex	2-2%	26:10
EtOAc : cHex	2-12%	26:10
EtOAc : cHex	12-12%	35:24
EtOAc : cHex	12-100%	35:24

EtOAc : cHex	100-100%	35:48
EtOAc : cHex	100-100%	35:48
EtOAc : cHex	100-100%	35:48
EtOAc : MeOH	100-30%	47:52
EtOAc : MeOH	30-30%	48:37
EtOAc : MeOH	30-0%	51:37
EtOAc : MeOH	0-0%	55:06
EtOAc : MeOH	0-0%	55:06
-	-	00:00 (Λήξη)

**Πίνακας 12.** Οι μάζες των κλασμάτων που προέκυψαν μετά από τις συνενώσεις.

<b>Μάζες συνενωμένων κλασμάτων</b>		
<b>Κλάσματα</b>	<b>Κωδικός</b>	<b>Μάζα (mg)</b>
1	EG2-1	0
2-4	EG2-2	12,4
5-8	EG2-3	11,8
9-11	EG2-4	2
12-13	EG2-5	1,4
14-18	EG2-6	4,6
19-20	EG2-7	2,9
21-24	EG2-8	3,8
25-28	EG2-9	3,2
29-32	EG2-10	1,7
33-36	EG2-11	2,9
37-48	EG2-12	9,3
49-78	EG2-13	47,5
79-90	EG2-14	10,4
91-99	EG2-15	15,2
100-105	EG2-16	2



**Εικόνα 23.** TLC που πραγματοποιήθηκαν στα 16 συνενωμένα κλάσματα που προέκυψαν από την MPLC του δείγματος PA18, ψεκασμένες με διάλυμα βανιλίνης και θειϊκού οξέος στα αριστερά και παρατήρηση σε UV 245nm στα δεξιά.

## 2.8 Ημιπαρασκευαστική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

### 2.8.1 Ημιπαρασκευαστική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης για τη συνένωση

#### EG1-22

Η Ημιπαρασκευαστική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (Semi-Preparative High Pressure Liquid Chromatography, Semi-Prep HPLC) χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό οργανικών ενώσεων που παρουσιάζουν κάποιο ενδιαφέρον κι είναι εύλογη η δομική ανάλυσή τους.

Για την συνένωση EG1-22 πραγματοποιήθηκε Semi-Prep HPLC (Πίν.13)(Πίν.14) από την οποία προέκυψε μία καθαρή ουσία (Πίν.15).

**Πίνακας 13.** Συνθήκες διεξαγωγής ημιπαρασκευαστικής HPLC για τη συνένωση EG1-22.

Πειραματικές συνθήκες Semi-Prep HPLC	
Στατική φάση	Fortis C <sub>18</sub> , 100x2,1mm, particle size 1,7 μm
Κινητή φάση	ACN, H <sub>2</sub> O (0,1% TFA)
Θερμοκρασία	36°C
Όγκος ένεσης	100 μL
Μάζα δείγματος	8,5 mg
Απορρόφηση	210nm, 220nm, 278nm, 256nm, 366nm

**Πίνακας 14.** Πρόγραμμα έκλουσης για τη συνένωση EG1-22

Χρόνος (min)	H <sub>2</sub> O/TFA (%)	ACN (%)	Ροή (ml/min)
0	70	30	1,5
20	70	30	1,5
28	40	60	1,5
42	40	60	1,5
45	70	30	1,5
55	70	30	1,5

**Πίνακας 15.** Μάζα της καθαρής ουσίας που προέκυψε από την Semi-Prep HPLC.

Κλάσματα συνενώσεων	Μάζες (mg)
EG1-22-1	1,8

Η ουσία προσδιορίστηκε φασματοσκοπικά με NMR.

### 2.8.2 Ημιπαρασκευαστική Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης για τη συνένωση

#### EG1-23/EG1-24

Από τις συνενώσεις EG1-23 και EG1-24 προέκυψαν τρία κλάσματα, με τους ακόλουθους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς (Πίν.16)(Πίν.17).

**Πίνακας 16.** Συνθήκες διεξαγωγής ημιπαρασκευαστικής HPLC για τις συνενώσεις EG1-23/EG1-24.

<b>Πειραματικές συνθήκες Semi-Prep HPLC</b>	
<b>Στατική φάση</b>	Fortis C <sub>18</sub> , 100x2,1mm, particle size 1,7 μm
<b>Κινητή φάση</b>	ACN, H <sub>2</sub> O (0,1% TFA)
<b>Θερμοκρασία</b>	36°C
<b>Όγκος ένεσης</b>	100 μL
<b>Μάζα δείγματος EG1-23</b>	1,4 mg
<b>Μάζα δείγματος EG1-24</b>	2,8 mg
<b>Απορρόφηση</b>	210nm, 220nm, 278nm, 256nm, 366nm

**Πίνακας 17.** Πρόγραμμα έκλουσης για τη συνένωση EG1-23/EG1-24

<b>Χρόνος (min)</b>	<b>H<sub>2</sub>O (%)</b>	<b>ACN (%)</b>	<b>Ροή (mL/min)</b>
0	95	5	1
5	95	5	1
7	91.5	8.5	1
17	91.5	8.5	1
21	83	17	1
29	83	17	1
33	68	32	1
43	68	32	1
47	51	49	1
52	51	49	1
55	0	100	1
65	0	100	1
67	95	5	1
77	95	5	1

Οι μάζες των κλασμάτων που προέκυψαν παρατίθενται στον παρακάτω Πίνακα. Τα κλάσματα αυτά αναλύθηκαν φασματοσκοπικά με NMR.

**Πίνακας 18.** Μάζες των τριών κλασμάτων που προέκυψαν από την Semi-Prep HPLC.

<b>Κλάσματα συνενώσεων</b>	<b>Μάζες (mg)</b>
EG1-23/EG1-24-1	0,7
EG1-23/EG1-24-2	0,4
EG1-23/EG1-24-3	0,3

## Κεφάλαιο 3

### Αποτελέσματα

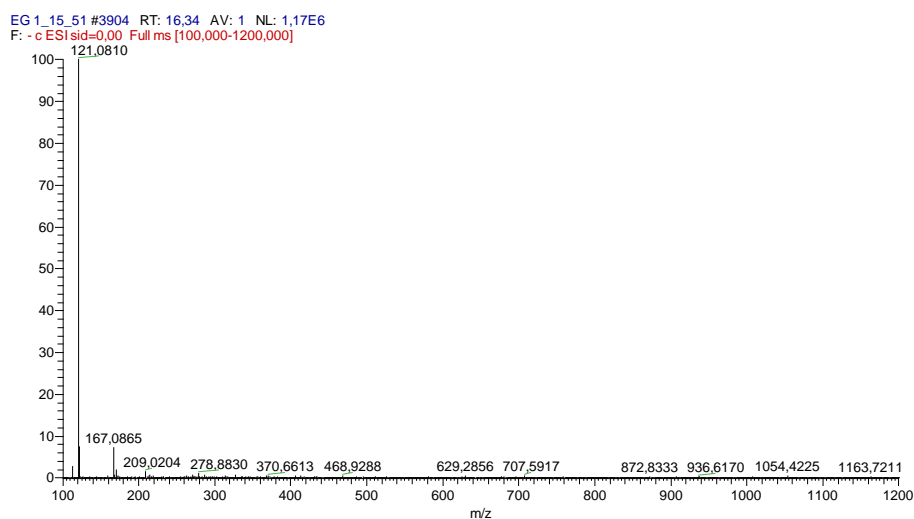
### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1 Χημικό προφίλ ενδοφυτικών μυκήτων

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν οι καλλιέργειες μικρής κλίμακας για να μελετηθεί η παρουσία ή μη μεταβολιτών βιομετατροπής. Μετά το πέρας των αναλύσεων των 10 επιλεγμένων μυκήτων φάνηκε πως ο μύκητας *D. erectus* με κωδικό ATHUM 10094 (PA03) παρουσίασε το μεγαλύτερο ενδιαφέρον. Έτσι, πραγματοποιήθηκε για τον μύκητα αυτό καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας και αφού αναλύθηκε χρωματογραφικά και με τη βοήθεια φασματοσκοπικών δεδομένων και φαρματομετρίας μάζας, εντοπίστηκαν εννιά μεταβολίτες εκ των οποίων οι τρεις αποτέλεσαν νέα φυσικά προϊόντα.

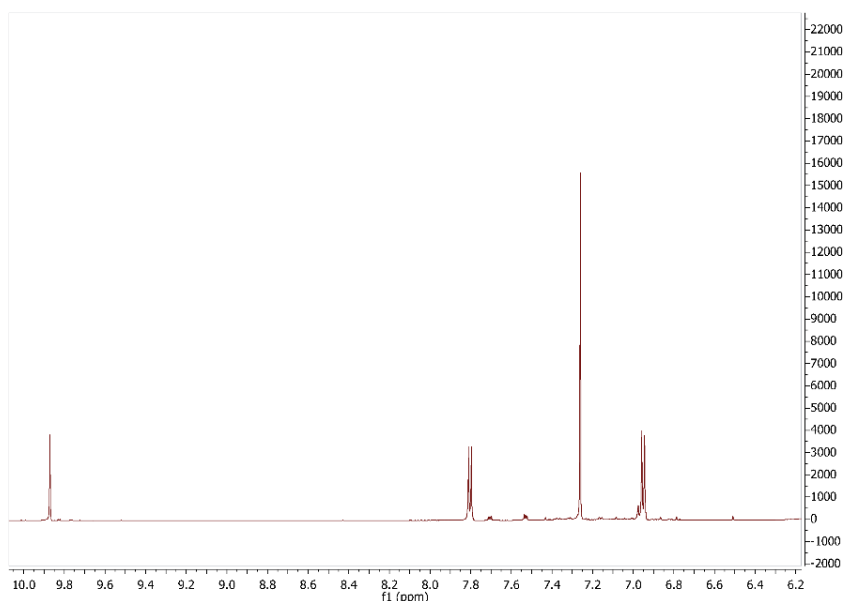
##### 3.1.1 Μεταβολίτης 1

Ο μεταβολίτης 1 παραλήφθηκε από την στήλη βαρύτητας του εκχυλίσματος DPA03 υγρής καλλιέργειας και ταυτοποιήθηκε ως η 4-υδρόξυ-βενζαλδεΐδη με τη βοήθεια φασματοσκοπικών δεδομένων ενώ με την χρήση φασματομετρίας μάζας (Εικ.24) προσδιορίστηκε το ψευδομοριακό ιόν  $[M-H]^-$  με  $m/z$  121,0810, και υπολογίστηκε ότι ο μεταβολίτης αυτός έχει μοριακό βάρος 122,1230 και μοριακό τύπο  $C_7H_6O_2$ .



Εικόνα 24. Φάσμα μάζας του μεταβολίτη 1.

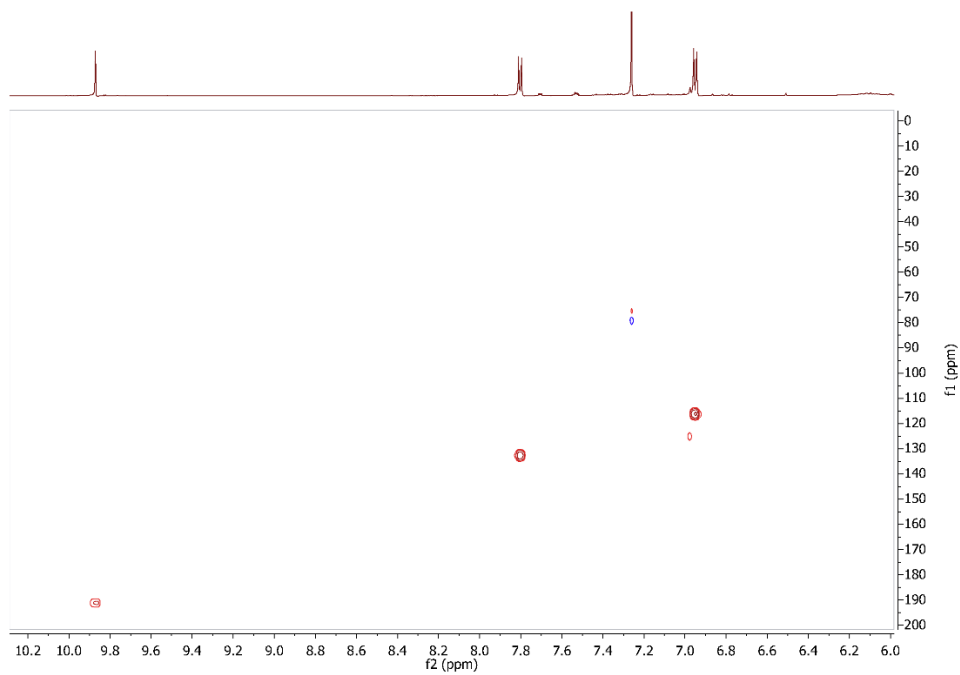
Από το φάσμα  $^1H$  NMR (Εικ.25), παρατηρούνται δύο διπλές κορυφές με ortho σύζευξη σε  $\delta$  7,80 ( $d, J = 8,6$  Hz) και 6,95 ( $d, J = 8,4$  Hz) οι οποίες ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια η καθεμία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H3/H5 και H2/H6 αντίστοιχα, ενώ το πρωτόνιο της αλδεΐδης εντοπίζεται ως μια απλή κορυφή σε  $\delta$  9,87 η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο.



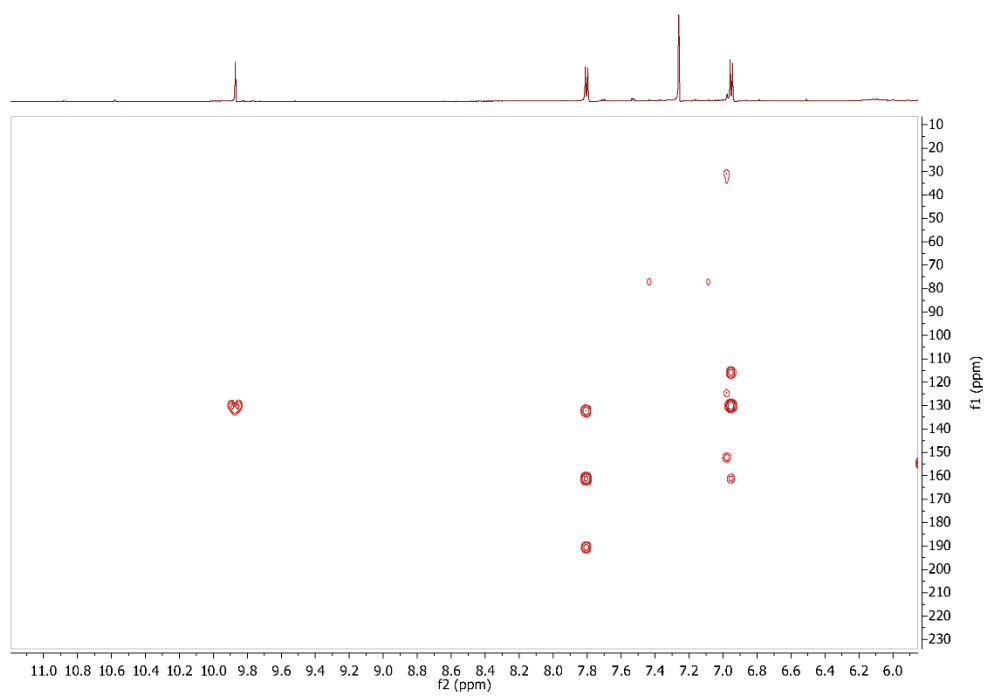
**Εικόνα 25.** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του μεταβολίτη 1 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.

Στο φάσμα HSQC (Εικ.26) παρατηρούνται οι  $J^1$  συσχετίσεις  $\text{H3/H5-C3/C5}$  ( $\delta$  7,80 και  $\delta$  132,8) και  $\text{H2/H6-C2/C6}$  ( $\delta$  6,95 και  $\delta$  116,2). Τέλος, από το φάσμα HMBC (Εικ.27), παρατηρούνται οι συσχετίσεις των πρωτονίων  $\text{H3/H5}$  με άνθρακες σε  $\delta$  160,5,  $\delta$  132,5 και  $\delta$  190,4 που αντιστοιχούν στους άνθρακες  $\text{C4}$  ( $J^2$ ),  $\text{C1}$  ( $J^3$ ) και  $\text{C7}$  ( $J^3$ ) και οι συσχετίσεις των πρωτονίων  $\text{H2/H6}$  με τους άνθρακες  $\text{C3/C5}$  ( $J^2$ ) και  $\text{C4}$  ( $J^3$ ) στα  $\delta$  132,8 και  $\delta$  160,5, αντίστοιχα. Η δομή (Εικ.28) επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Gurpta et al., 2016).





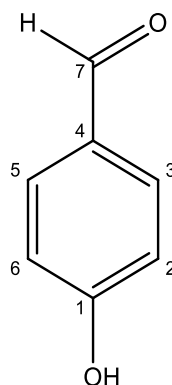
**Εικόνα 26.** Φάσμα μάζας HSQC του μεταβολίτη 1 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.



**Εικόνα 27.** Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 1 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.

**Πίνακας 19.** Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  NMR του μεταβολίτη 1 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.

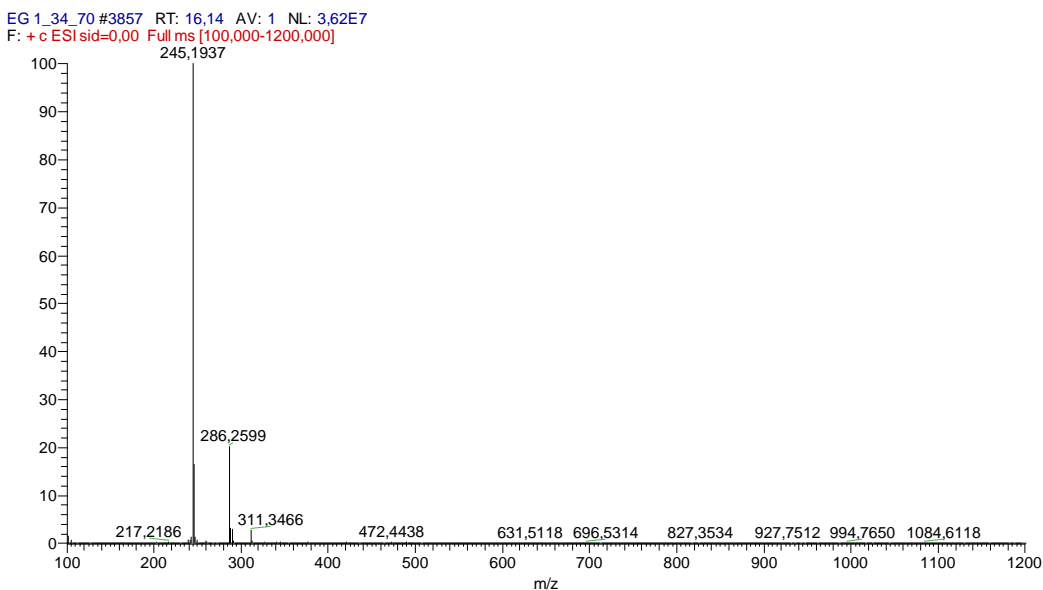
Θέση	$^1\text{H}$ NMR $\delta$ σε ppm ( $J$ σε Hz)	$^{13}\text{C}$ NMR $\delta$ σε ppm
1	nd	132,5
2	6,95 (2H, <i>d</i> , $J = 8,4$ )	116,2
3	7,80 (2H, <i>d</i> , $J = 8,6$ )	132,8
4	nd	160,5
5	7,80 (2H, <i>d</i> , $J = 8,6$ )	132,8
6	6,95 (2H, <i>d</i> , $J = 8,4$ )	116,2
7	9,87 (1H, <i>s</i> )	190,4



**Εικόνα 28.** Η χημική δομή του μεταβολίτη 1.

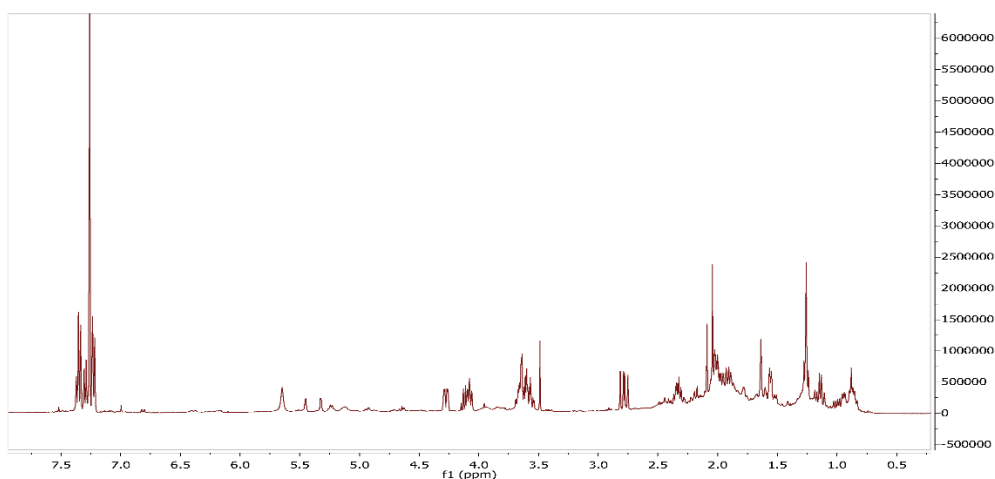
### 3.1.2 Μεταβολίτης 2

Ο μεταβολίτης 2 παραλήφθηκε από την στήλη βαρύτητας του εκχυλίσματος DPA03 υγρής καλλιέργειας και ταυτοποιήθηκε ως η κυκλο-(L-προλυλ-L-φαινυλαλανίνη) με τη βοήθεια φασματοσκοπικών δεδομένων, ενώ με την χρήση φασματομετρίας μάζας (Εικ.29) προσδιορίστηκε το ψευδομοριακό ιόν  $[\text{M}-\text{H}]^+$  με  $m/z$  245,1937, δηλαδή υπολογίστηκε ότι ο μεταβολίτης αυτός έχει μοριακό βάρος 244,2940 και μοριακό τύπο  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ .



**Εικόνα 29.** Φάσμα μάζας του μεταβολίτη 2.

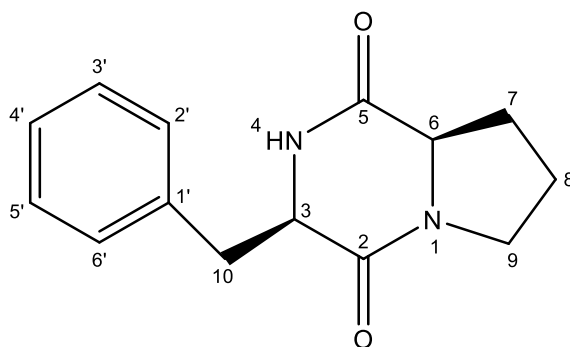
Από τη μελέτη του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR (Εικ.30) παρατηρείται μια πολλαπλή κορυφή στα 4,08 ppm, που αντιστοιχεί στο H6 και η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο. Το πρωτόνιο H3 εντοπίζεται σε  $\delta$  4,27 ως μια διπλή διπλής κορυφή ( $dd$ ,  $J= 10,6/3$  Hz) η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο. Σε  $\delta$  2,78 εμφανίζεται χαρακτηριστική κορυφή ως διπλή διπλής ( $dd$ ,  $J=10,6/14,4$  Hz) η οποία αντιστοιχεί στα πρωτόνια του μεθυλενίου H10 η οποία ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια. Τα πρωτόνια H7 εντοπίζονται στα 2,02 και 2,34 ppm ως πολλαπλές κορυφές που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία, τα πρωτόνια H8 εμφανίζονται σε  $\delta$  2,02 και 1,91 ως πολλαπλές κορυφές οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και τα πρωτόνια H9 εντοπίζονται σε  $\delta$  3,59 και 3,62 ως πολλαπλές κορυφές που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία. Τέλος, τα πρωτόνια H2', H3', H4', H5', H6' εντοπίζονται στα 7,22-7,35 ppm ως πολλαπλή κορυφή η οποία ολοκληρώνει για 5 πρωτόνια. Η παρακάτω δομή (Εικ.31) επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα ενώ οι μετατοπίσεις των  $^{13}\text{C}$  αποδόθηκαν σύμφωνα με τους Harizani et al., 2020.



Εικόνα 30. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του μεταβολίτη 2 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.

Πίνακας 20. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  NMR του μεταβολίτη 2 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.

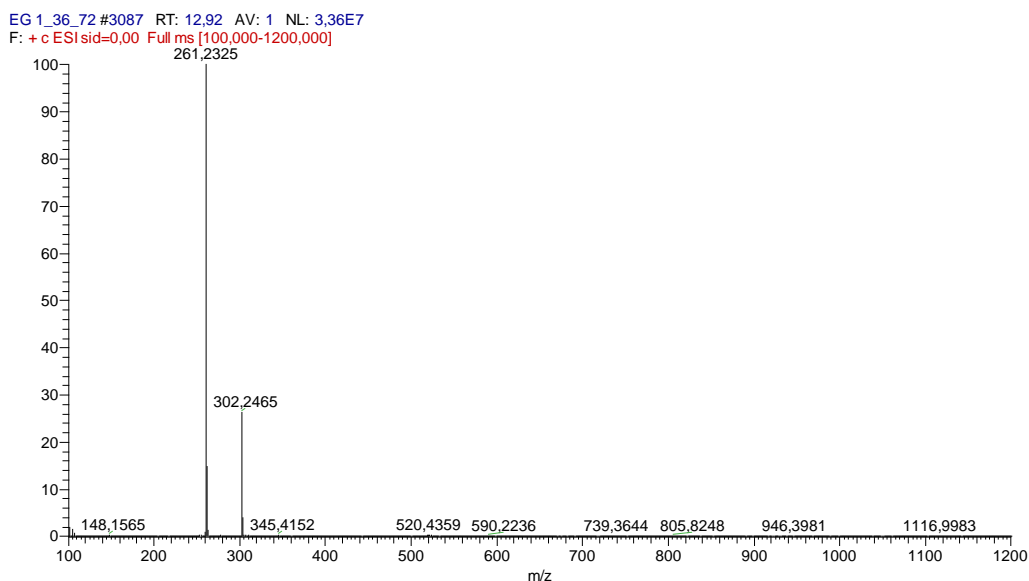
Θέση	$^1\text{H}$ NMR $\delta$ σε ppm ( $J$ σε Hz)	$^{13}\text{C}$ NMR $\delta$ σε ppm
1	-	-
2	-	165,0
3	4,27 (1H, <i>dd</i> , $J = 10,6/3$ )	56,2
4	5,65 (1H, <i>brs</i> )	nd
5	-	169,4
6	4,08 (1H, <i>m</i> )	59,1
7	2,02 (1H, <i>m</i> )/2,34 (1H, <i>m</i> )	28,3
8	2,02 (1H, <i>m</i> )/1,91 (1H, <i>m</i> )	22,5
9	3,59 (1H, <i>m</i> )/ 3,62 (1H, <i>m</i> )	45,5
10	2,78 (2H, <i>dd</i> , $J=10,6/14,4$ )	36,8
1'	-	135,9
2'	7,22-7,35 (1H, <i>m</i> )	129,3
3'	7,22-7,35 (1H, <i>m</i> )	129,1
4'	7,22-7,35 (1H, <i>m</i> )	127,6
5'	7,22-7,35 (1H, <i>m</i> )	129,1
6'	7,22-7,35 (1H, <i>m</i> )	129,3



Εικόνα 31. Η χημική δομή του μεταβολίτη 2.

### 3.1.3 Μεταβολίτης 3

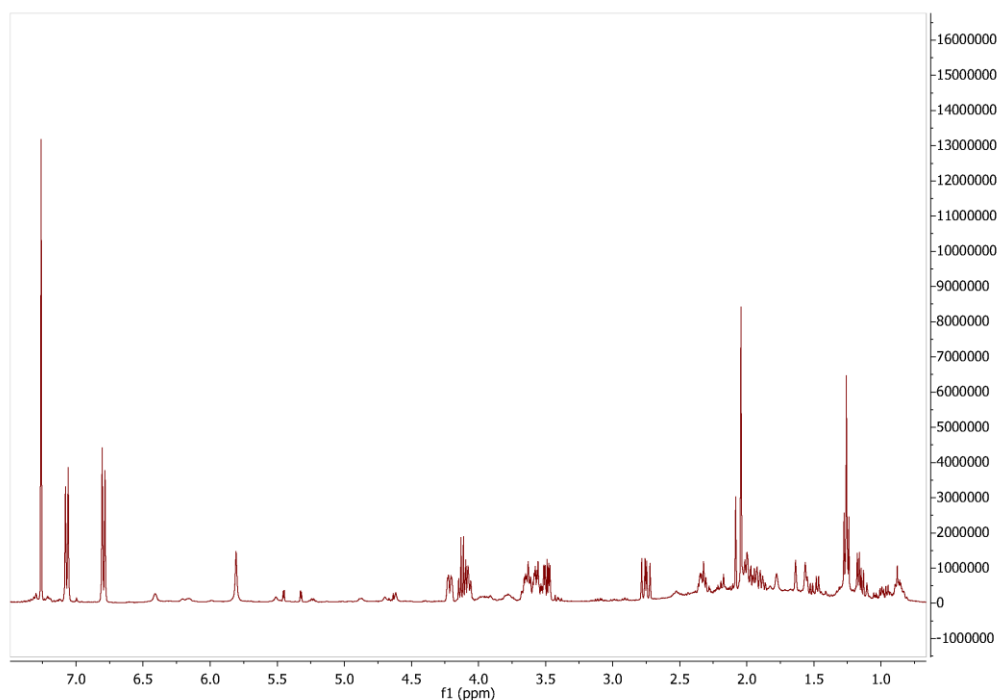
Ο μεταβολίτης 3 παραλήφθηκε από την στήλη βαρύτητας του εκχυλίσματος DPA03 υγρής καλλιέργειας και ταυτοποιήθηκε ως η κυκλο-(L-προλυλ-L-τυροσίνη) με τη βοήθεια φασματοσκοπικών δεδομένων, ενώ με την χρήση φασματομετρίας μάζας (Εικ.32) προσδιορίστηκε το ψευδομοριακό ιόν  $[M+H]^+$  με  $m/z$  261,2325, δηλαδή υπολογίστηκε ότι ο μεταβολίτης αυτός έχει μοριακό βάρος 260,2930 και μοριακό τύπο  $C_{14}H_{16}N_2O_3$ .



Εικόνα 32. Φάσμα μάζας του μεταβολίτη 3.

Από τη μελέτη του φάσματος  $^1H$  NMR (Εικ.33) παρατηρείται μια πολλαπλή κορυφή στα 4,07 ppm, που αντιστοιχεί στο H6 και ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο. Το πρωτόνιο H3 εντοπίζεται σε  $\delta$  4,22 ως μια διπλή διπλής κορυφή ( $dd$ ,  $J = 10,5/3$  Hz) η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο. Σε  $\delta$  2,75 εμφανίζεται χαρακτηριστική κορυφή ως διπλή διπλής ( $dd$ ,  $J = 10,5/14,7$  Hz) η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και σε  $\delta$  3,49 ( $dd$ ,  $J = 4/14,7$  Hz) εντοπίζεται άλλη μια διπλή διπλής κορυφή, οι οποίες αντιστοιχούν στα πρωτόνια του μεθυλενίου H10. Τα πρωτόνια H7 εντοπίζονται στα 1,94 και 2,34 ppm ως πολλαπλές κορυφές που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία, τα πρωτόνια H8 εμφανίζονται σε  $\delta$  2,02 και 1,90 ως πολλαπλές κορυφές που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και τα πρωτόνια H9 εντοπίζονται σε  $\delta$  3,57 και 3,63 ως πολλαπλές κορυφές που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία. Τέλος, παρατηρούνται τα σήματα της αρωματικής περιοχής που είναι χαρακτηριστικά για την παρα υποκατάσταση του αρωματικού δακτυλίου με τα πρωτόνια H2' και H6' να εμφανίζονται ως μια διπλή κορυφή ( $d$ ,  $J = 8,5$  Hz) στα 7,03 ppm και τα πρωτόνια H-3' και H5' να εμφανίζονται ως μια διπλή κορυφή ( $d$ ,  $J = 8,5$  Hz) στα 6,79 ppm. Η παρακάτω δομή (Εικ.34)

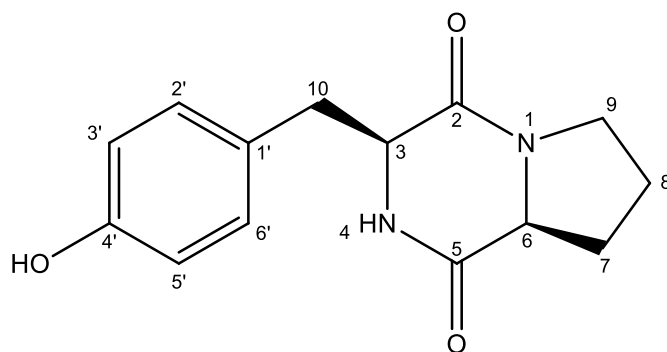
επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα ενώ οι μετατοπίσεις των  $^{13}\text{C}$  αποδόθηκαν σύμφωνα με τους Harizani et al., 2020.



**Εικόνα 33.** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του μεταβολίτη 3 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.

**Πίνακας 21.** Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  NMR του μεταβολίτη 3 σε δευτεριωμένο χλωροφόρμιο.

Θέση	$^1\text{H}$ NMR $\delta$ σε ppm ( $J$ σε Hz)	$^{13}\text{C}$ NMR $\delta$ σε ppm
1	-	-
2	-	165,0
3	4,22 (1H, <i>m</i> , $J = 10,5/3$ )	56,2
4	5,81 (1H, <i>brs</i> )	nd
5	-	169,4
6	4,07 (1H, <i>m</i> )	59,1
7	1,94 (1H, <i>m</i> )/2,34 (1H, <i>m</i> )	28,3
8	1,90 (1H, <i>m</i> )/2,02 (1H, <i>m</i> )	22,5
9	3,57 (1H, <i>m</i> )/ 3,63 (1H, <i>m</i> )	45,5
10	2,75 (1H, <i>dd</i> , $J=10,5/14,7$ )/3,49 (1H, <i>dd</i> , $J=4/14,7$ )	36,8
1'	-	135,9
2'	7,03 (1H, <i>d</i> , $J=8,5$ )	129,3
3'	6,79 (1H, <i>d</i> , $J=8,5$ )	129,1
4'	-	127,6
5'	6,79 (1H, <i>d</i> , $J=8,5$ )	129,1
6'	7,03 (1H, <i>d</i> , $J=8,5$ )	129,3

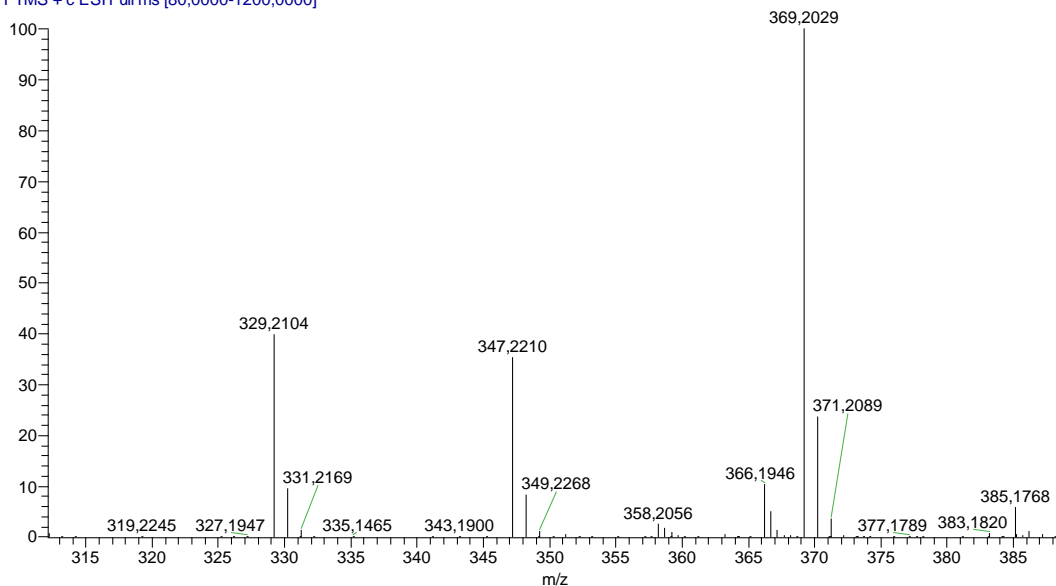


**Εικόνα 34.** Η χημική δομή του μεταβολίτη 3.

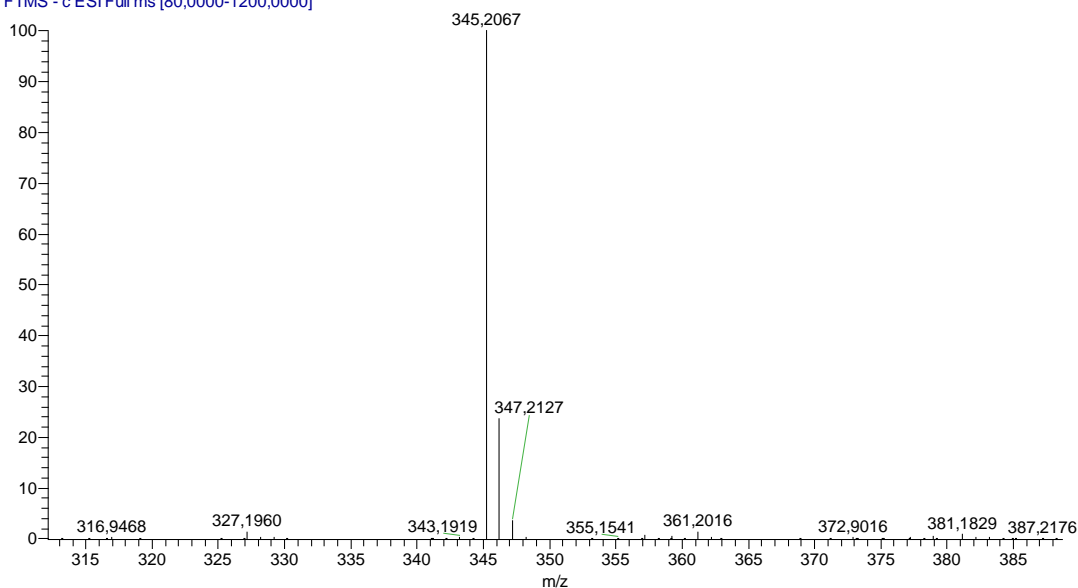
### 3.1.4 Μεταβολίτης 4

Ο μεταβολίτης 4 παραλήφθηκε από την στήλη βαρύτητας του εκχυλίσματος DPA03 υγρής καλλιέργειας και ταυτοποιήθηκε ως η 4'',7-διυδροξυ-κανναβιδιόλη (Εικ.40) με τη βοήθεια φασματοσκοπικών δεδομένων, αλλά και με την χρήση φασματοσκοπίας μάζας (Εικ.35), καθώς στα φάσματα σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό διακρίνονται τα ψευδομοριακά ιόντα  $[M+Na]^+$  με  $m/z$  369,2029 και  $[M-H]^-$  με  $m/z$  345,2067, δηλαδή υπολογίστηκε ότι ο μεταβολίτης αυτός έχει μοριακό βάρος 346,2149 που αντιστοιχεί σε μοριακό τύπο  $C_{21}H_{30}O_4$ .

230726\_07 #867 RT: 3.90 AV: 1 NL: 1,48E9  
T: FTMS + c ESI Full ms [80,0000-1200,0000]



230726\_07 #857 RT: 3,86 AV: 1 NL: 1,39E9  
T: FTMS - c ESI Full ms [80,0000-1200,0000]

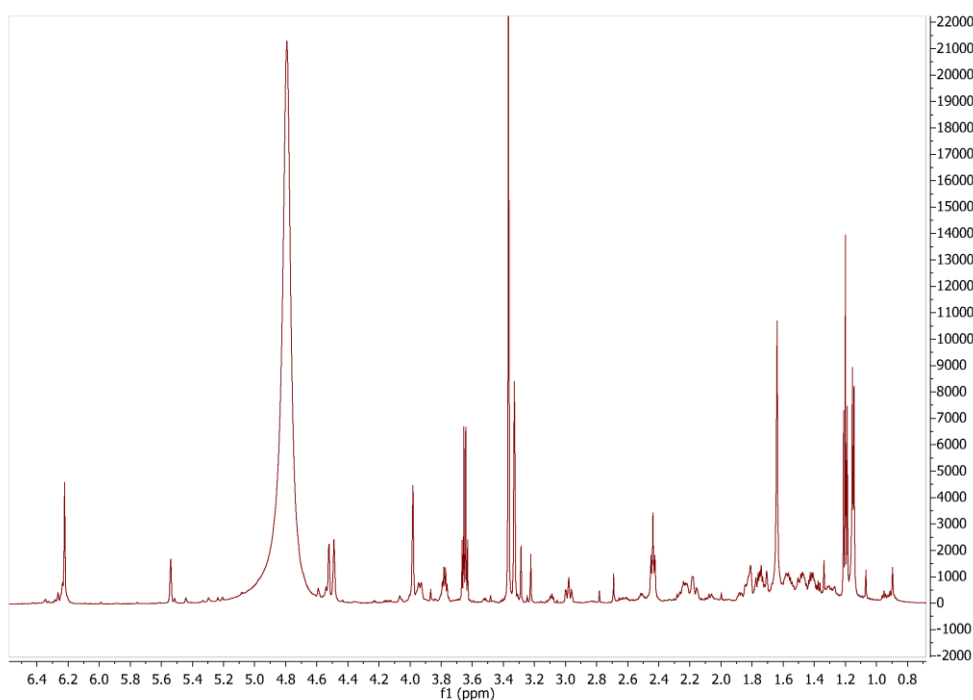


Εικόνα 35. Φάσματα μάζας του μεταβολίτη 4.

Από τη μελέτη του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR (Εικ.36) παρατηρούνται δύο απλές αλληλεπικαλυπτόμενες κορυφές σε  $\delta$  6,20 που αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια H2' και H4', μία μονή κορυφή σε  $\delta$  5,52 που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο ολεφινικό πρωτόνιο δακτυλίου H2, μία ευρεία διπλή κορυφή και μία ευρεία απλή κορυφή σε  $\delta$  4,50 (*brd*,  $J = 1,88$  Hz) και  $\delta$  4,44 αντίστοιχα, που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H9, μία πολλαπλή κορυφή σε  $\delta$  3,92 που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο H3, μία απλή κορυφή σε  $\delta$  3,94 η οποία ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στο μεθυλένιο οξυγονωμένου αλλυλικού άνθρακα H7, μία εξαπλή κορυφή σε  $\delta$  3,76 (*sx*,  $J = 6,2$  Hz) που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο οξυγονωμένου μεθυλενίου αλειφατικής αλυσίδας H4'', μία τριπλή πολλαπλών κορυφών σε  $\delta$  2,96 (*tm*,  $J = 10,5$  Hz) η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο τριτοταγή άνθρακα δακτυλίου H4, μία τριπλή διπλή κορυφή σε  $\delta$  2,42 (*t*,  $J = 7,5$  Hz) που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια μεθυλενίου H1'', μία πολλαπλή κορυφή από  $\delta$  2,10 μέχρι  $\delta$  2,25 που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα μεθυλένια δακτυλίου H6, δύο πολλαπλές κορυφές σε  $\delta$  1,81 και σε  $\delta$  1,74 που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H5 μεθυλενίου δακτυλίου, μία απλή κορυφή σε  $\delta$  1,64 που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια η οποία αντιστοιχεί στα πρωτόνια H10 βινυλικού μεθυλίου, δύο πολλαπλές κορυφές σε  $\delta$  1,52 και  $\delta$  1,67 που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και

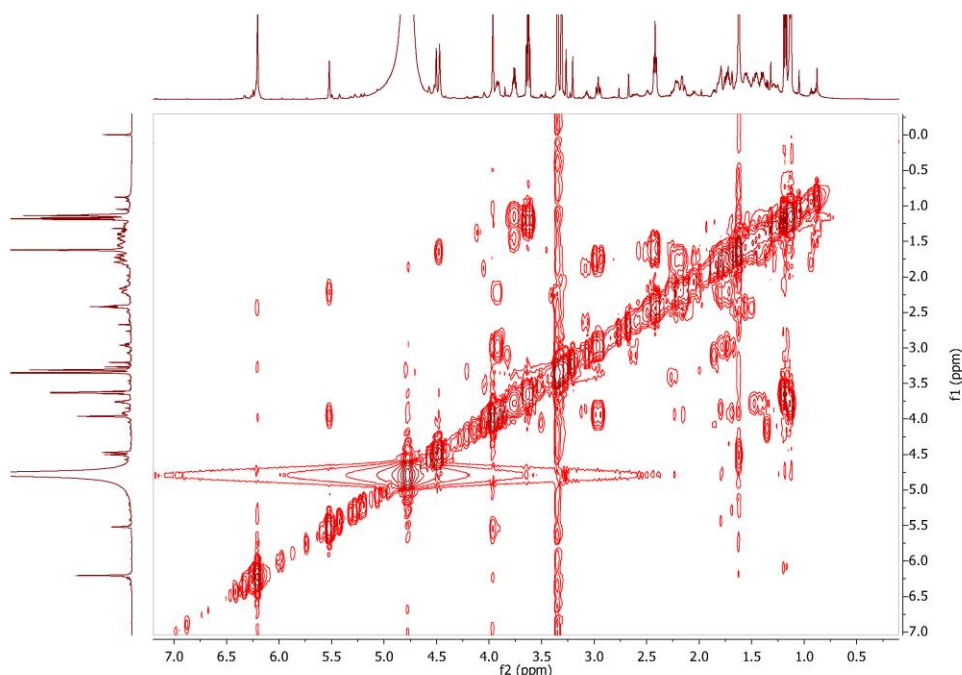


αντιστοιχούν στα πρωτόνια H2'' μεθυλενίου αλειφατικής αλυσίδας, δύο αλληλεπικαλυπτόμενες πολλαπλές κορυφές από δ 1,38 μέχρι δ 1,48 που ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H3'' μεθυλενίου αλειφατικής αλυσίδας και μία διπλή κορυφή σε δ 1,13 ( $d, J = 6,2$  Hz) που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια H5'' τερματικού μεθυλίου αλειφατικής αλυσίδας δίπλα σε οξυγονωμένο μεθίλιο.



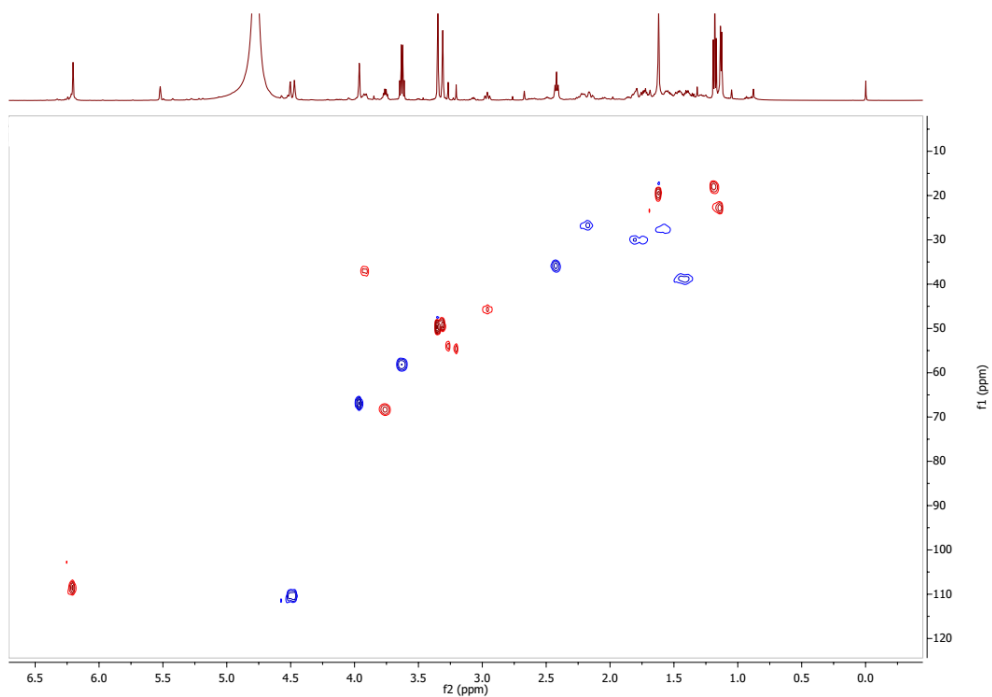
**Εικόνα 36.** Φάσματα μάζας  $^1\text{H}$  NMR του μεταβολίτη 4 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Στο φάσμα COSY (Εικ.37) παρατηρείται η συσχέτιση των πρωτονίων H5'' (δ 1,13) και H3'' (δ 1,38-1,48) με το πρωτόνιο H4'' (δ 3,76) και τις συσχετίσεις H2''-H3'' (δ 1,52/1,67 και δ 1,38-1,48) και H2''-H1'' (δ 1,52/1,67 και δ 2.42). Επιπλέον, παρατηρούνται οι συσχετίσεις H2-H3 (δ 5,52 και δ 3,92) και H3-H4 (δ 3,92 και δ 2,96) και επιπλέον οι συσχετίσεις H4-H5 (δ 2.96 και δ 1,74/1,81) και H5-H6 (δ 1,74/1,81 και 2,10-2,25).

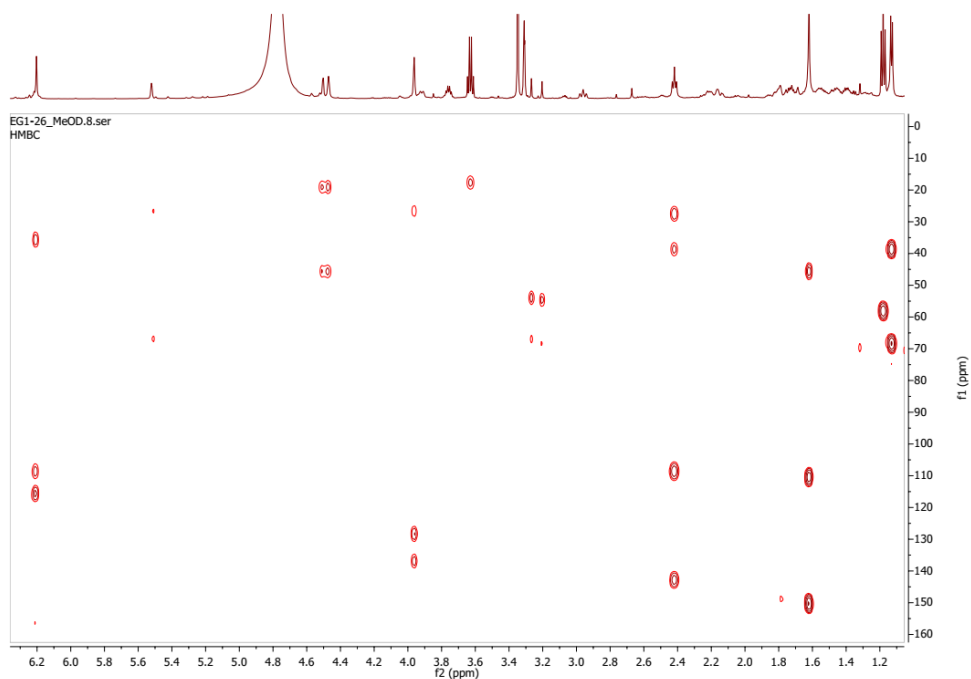


**Εικόνα 37.** Φάσμα COSY του μεταβολίτη 4 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Στο φάσμα HSQC (Εικ.38) παρατηρούνται οι  $J^1$  συσχετίσεις  $H5''-C5''$  ( $\delta$  1,13 και  $\delta$  22,9),  $H4''-C4''$  ( $\delta$  3,76 και  $\delta$  68,3),  $H3''-C3''$  ( $\delta$  1,38-1,48 και  $\delta$  38,8),  $H2''-C2''$  ( $\delta$  1,52/1,67 και  $\delta$  27,6) και  $H1''-C1''$  ( $\delta$  2,42 και  $\delta$  35,9) της πλευρικής αλυσίδας. Επιπλέον, παρατηρούνται οι συσχετίσεις  $H2-C2$  ( $\delta$  5,52 και  $\delta$  128,3, αποθωράκιση που αντιστοιχεί σε ολεφινικό άνθρακα δακτυλίου),  $H3-C3$  ( $\delta$  3,92 και  $\delta$  37,1),  $H4-C4$  ( $\delta$  2,92 και  $\delta$  45,7),  $H5-C5$  ( $\delta$  1,74/1,81 και  $\delta$  29,1),  $H6-C6$  ( $\delta$  2,10-2,25 και  $\delta$  25,8),  $H7-C7$  ( $\delta$  3,94 και  $\delta$  66,9),  $H9-C9$  ( $\delta$  4,44/4.50 και  $\delta$  110,4), που αντιστοιχεί σε άνθρακα τερματικού μεθυλενίου) και  $H10-C10$  ( $\delta$  1,64 και  $\delta$  19,5) του μονοτερπενικού τμήματος του μορίου. Τέλος, παρατηρούνται οι συσχετίσεις  $H4'/H2'-C4'/C2'$  ( $\delta$  6,20 και  $\delta$  108,6) των πρωτονίων του αρωματικού δακτυλίου.



Εικόνα 38. Φάσμα HSQC του μεταβολίτη 4 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

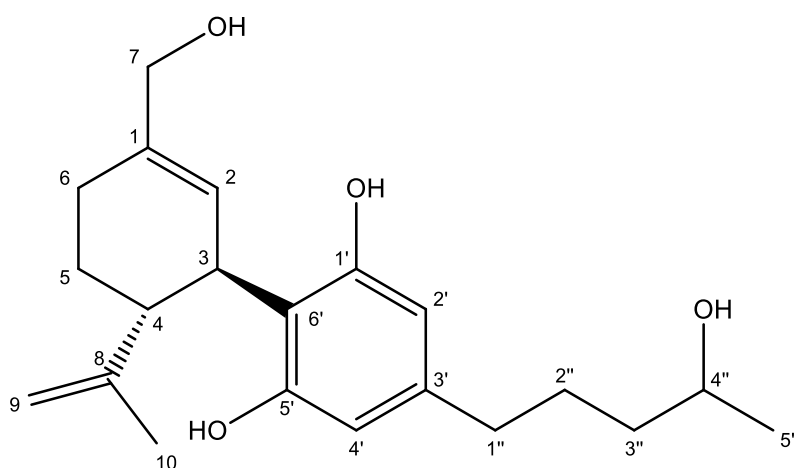


Εικόνα 39. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 4 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Πίνακας 22. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  NMR του μεταβολίτη 4 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Θέση	$^1\text{H}$ NMR $\delta$ σε ppm ( $J$ σε Hz)	$^{13}\text{C}$ NMR $\delta$ σε ppm
------	--	--

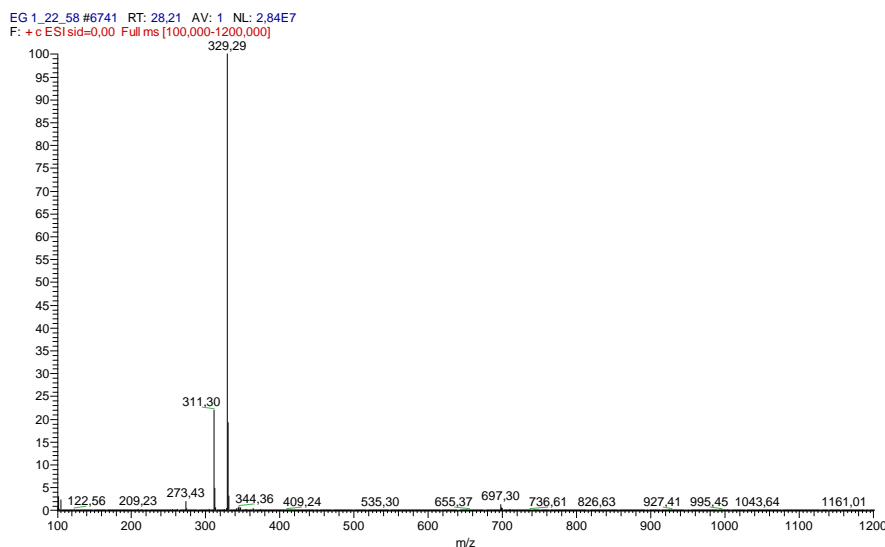
1	nd	136,8
2	5,52 (1H, s)	128,3
3	3,92 (1H, m)	37,1
4	2,96 (1H, <i>tm</i> , <i>J</i> = 10,5 Hz)	45,7
5	1,74 (1H, <i>m</i> )/1,81 (1H, <i>m</i> )	29,1
6	2,10-2,25 (2H, <i>m</i> )	25,8
7	3,94 (2H, s)	66,9
8	-	150,1
9	4,50 (1H, <i>brd</i> , <i>J</i> = 1,88)/4,44 (1H, <i>brs</i> )	110,4
10	1,64 (3H, s)	19,5
1'	-	156,3
2'	6,20 (1H, s) <sup>ov</sup>	108,6
3'	-	142,8
4'	6,20 (1H, s) <sup>ov</sup>	108,6
5'	-	156,3
6'	-	115,4
1''	2,42 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7,5)	35,9
2''	1,52 (1H, <i>m</i> )/1,67 (1H, <i>m</i> )	27,6
3''	1,38 – 1,48 (2H, <i>m</i> )	38,8
4''	3,76 (1H, <i>sx</i> , <i>J</i> = 6,2)	68,3
5''	1,13 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,2)	22,9



**Εικόνα 40.** Η χημική δομή του μεταβολίτη 4.

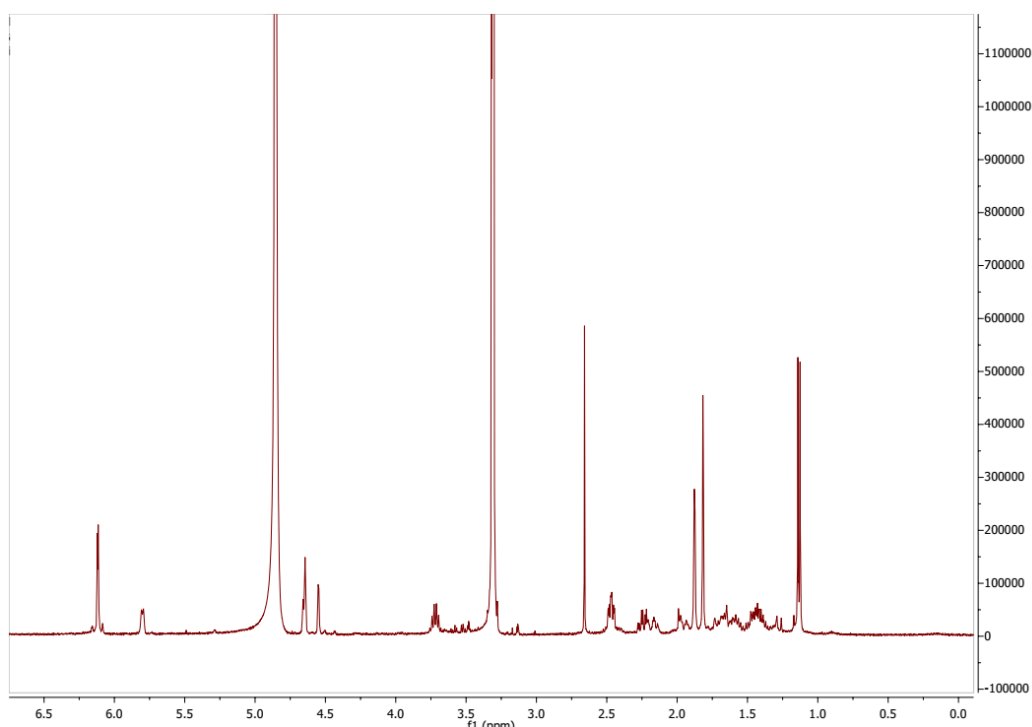
### 3.1.5 Μεταβολίτης 5

Ο μεταβολίτης 5 παραλήφθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών και ταυτοποιήθηκε ως η 4''-υδροξυ-δεϋδροκανναβιελσοΐνη (Εικ.46) με τη βοήθεια φασματοσκοπικών δεδομένων αλλά και από τα δεδομένα φασματομετρίας μάζας (Εικ.41). Πιο συγκεκριμένα, σε φάσμα θετικού ιοντισμού διακρίνεται το ψευδομοριακό ιόν  $[M+H]^+$  με  $m/z$  329,29, που παραπέμπει στον μοριακό τύπο  $C_{21}H_{28}O_3$  με μοριακό βάρος 328,2044.



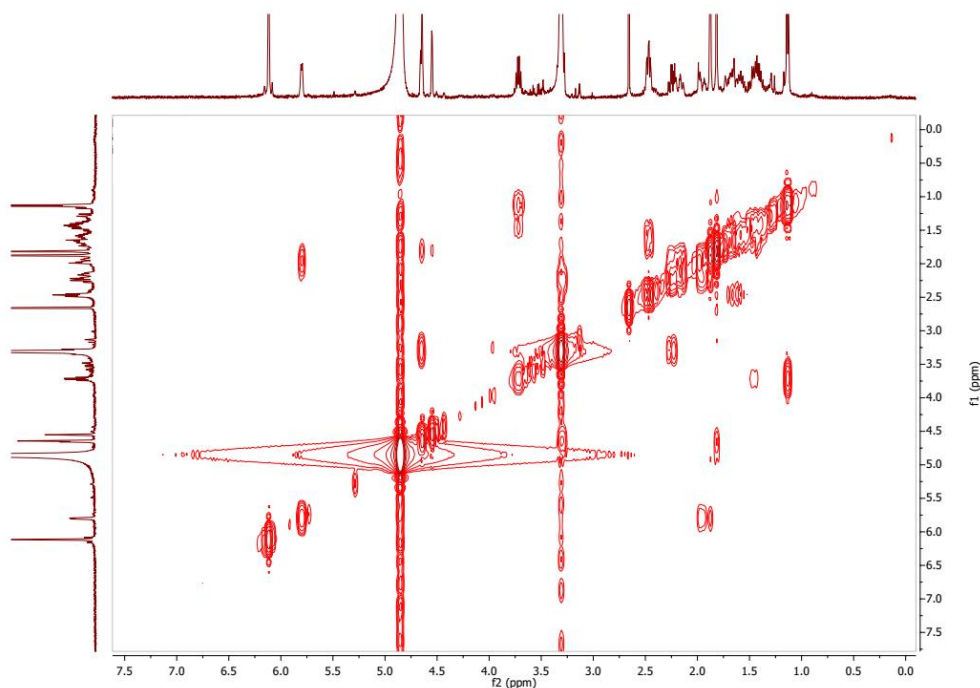
**Εικόνα 41.** Φάσμα μάζας του μεταβολίτη 5.

Από τη μελέτη του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR (Εικ.42) παρατηρούνται δύο απλές αλληλεπικαλυπτόμενες κορυφές σε  $\delta$  6,12 και  $\delta$  6,11 οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια αρωματικού δακτυλίου H2' και H4' αντίστοιχα, μία διπλή πολλαπλών κορυφή σε  $\delta$  5,79 (*dm*,  $J = 5,8$  Hz) η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί σε ολεφινικό πρωτόνιο δακτυλίου (H6), δύο αλληλεπικαλυπτόμενες πολλαπλές κορυφές σε  $\delta$  4,66 και  $\delta$  4,65 οι οποίες αντιστοιχούν σε πρωτόνιο τριτοταγή οξυγονωμένου άνθρακα δακτυλίου και πρωτόνιο τερματικής ομάδας μεθυλενίου αντίστοιχα (H2 και H9), μία πολλαπλή κορυφή σε  $\delta$  4,55 η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο δεύτερο πρωτόνιο της τερματικής ολεφινικής μονάδας (H9), μία εξαπλή κορυφή σε  $\delta$  3,72 (*sx*,  $J = 6,2$  Hz) η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί σε πρωτόνιο οξυγονωμένου μεθυλενίου αλειφατικής αλυσίδας (H4''), μία τριπλή διπλών κορυφή σε  $\delta$  2,47 (*td*,  $J = 8,0/2,6$  Hz) η οποία ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί σε πρωτόνια μεθυλενίου (H1''), μία τριπλή διπλών κορυφή σε  $\delta$  2,25 (*td*,  $J = 10,5/4,1$  Hz) η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί σε πρωτόνιο τριτοταγή άνθρακα δακτυλίου (H4), δύο πολλαπλές κορυφές σε  $\delta$  2,18 και σε  $\delta$  1,95 που αντιστοιχούν σε μεθυλενικά πρωτόνια δακτυλίου (H5), δύο απλές κορυφές σε  $\delta$  1,87 και  $\delta$  1,81 οι οποίες ολοκληρώνουν για τρία πρωτόνια η καθεμία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια μεθυλίων H7 και H10 αντίστοιχα.



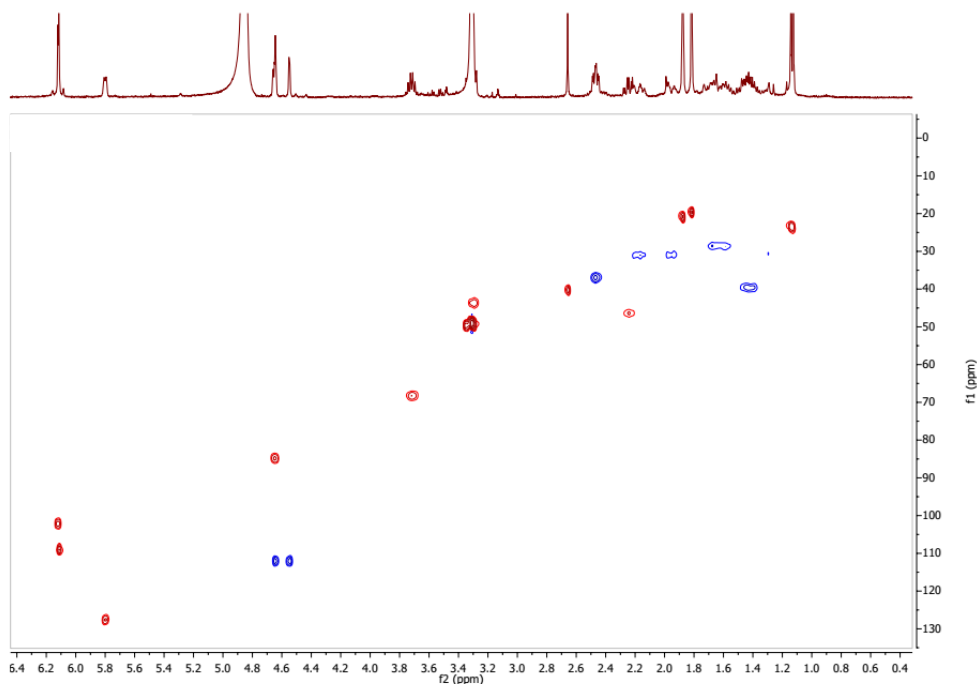
**Εικόνα 42.** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του μεταβολίτη 5 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Στο φάσμα COSY (Εικ.43) παρατηρείται η συσχέτιση των πρωτονίων  $\text{H5}''$  ( $\delta$  1,13) και  $\text{H3}''$  ( $\delta$  1,40/1,45) με το πρωτόνιο  $\text{H4}''$  ( $\delta$  3,72). Επιπλέον παρατηρούνται οι συσχετίσεις  $\text{H2}''$ - $\text{H3}''$  ( $\delta$  1,59/1,70 και  $\delta$  1,40/1,45) και  $\text{H2}''$ - $\text{H1}''$  ( $\delta$  1,59/1,70 και  $\delta$  2,47). Επίσης, παρατηρούνται οι συσχετίσεις  $\text{H2}$ - $\text{H3}$  ( $\delta$  4,66 και  $\delta$  3,31) και  $\text{H3}$ - $\text{H4}$  ( $\delta$  3,31 και  $\delta$  2,25) και επιπλέον οι συσχετίσεις  $\text{H4}$ - $\text{H5}$  ( $\delta$  2,25 και  $\delta$  1,95/2,18) και  $\text{H5}$ - $\text{H6}$  ( $\delta$  1,95/2,18 και 5,79).



**Εικόνα 43.** Φάσμα COSY του μεταβολίτη 5 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Στο φάσμα HSQC (Εικ.44) παρατηρούνται οι  $J^1$  συσχετίσεις H5'' - C5'' ( $\delta$  1,13 και  $\delta$  22,9), H4' - C4'' ( $\delta$  3,72 και  $\delta$  68,3) H3'' - C3'' ( $\delta$  1,40/1,45 και  $\delta$  38,8), H2'' - C2'' ( $\delta$  1,59/1,70 και  $\delta$  27,6) και H1'' - C1'' ( $\delta$  2,47 και  $\delta$  35,9) της πλευρικής αλυσίδας. Επιπλέον, παρατηρούνται οι συσχετίσεις H2 - C2 ( $\delta$  4,66 και  $\delta$  84,6, αποθωράκιση που αντιστοιχεί σε οξυγονωμένο τριτοταγή άνθρακα δακτυλίου), H3-C3 ( $\delta$  3,31 και  $\delta$  43,7), H4-C4 ( $\delta$  2,25 και  $\delta$  46,2), H5-C5 ( $\delta$  1,95/2,18 και  $\delta$  31,0), H6 - C6 ( $\delta$  5,79 και  $\delta$  127,6, αποθωράκιση που αντιστοιχεί σε ολεφινικό άνθρακα δακτυλίου), H7 - C7 ( $\delta$  1,87 και  $\delta$  20,6), H9 - C9 ( $\delta$  4,55/4,65 και  $\delta$  112,1, που αντιστοιχεί σε άνθρακα τερματικού μεθυλενίου) και H10 - C10 ( $\delta$  1,81 και  $\delta$  19,8) του μονοτερπενικού τμήματος του μορίου. Τέλος, παρατηρούνται οι συσχετίσεις H4' - C4' ( $\delta$  6,11 και  $\delta$  109,1) και H2' - C2' ( $\delta$  6,12 και  $\delta$  102,2) των πρωτονίων του αρωματικού δακτυλίου.



**Εικόνα 44.** Φάσμα HSQC του μεταβολίτη 5 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Στο φάσμα HMBC (Εικ.45) παρατηρούνται στο κομμάτι της πλευρικής αλυσίδας της, τις συσχετίσεις των πρωτονίων H5'' ( $\delta$  1,13) με άνθρακες σε  $\delta$  38,8 και  $\delta$  68,3 που αντιστοιχούν στους άνθρακες C3'' ( $J^3$ ) και C4'' ( $J^2$ ), τις συσχετίσεις των πρωτονίων H3'' ( $\delta$  1,40/1,45) με άνθρακα σε  $\delta$  68,3 που αντιστοιχούν στον άνθρακα C4'' ( $J^2$ ), τις συσχετίσεις των πρωτονίων H2'' ( $\delta$  1,59/1,70) με άνθρακες σε  $\delta$  35,9,  $\delta$  38,8 και  $\delta$  144,8 που αντιστοιχούν στους άνθρακες C1'' ( $J^2$ ), C3'' ( $J^2$ ) και C3' (απόσταση  $J^3$  και αποθωράκιση που αντιστοιχεί σε τεταρτοταγή αρωματικό άνθρακα) και τις συσχετίσεις των πρωτονίων H1'' ( $\delta$  2,47) με άνθρακες σε 102,2, 109,1 και 144,8 που αντιστοιχούν στους άνθρακες C2' ( $J^3$ ), C4' ( $J^3$ ) και C3' ( $J^2$ ) του αρωματικού τμήματος του μορίου.

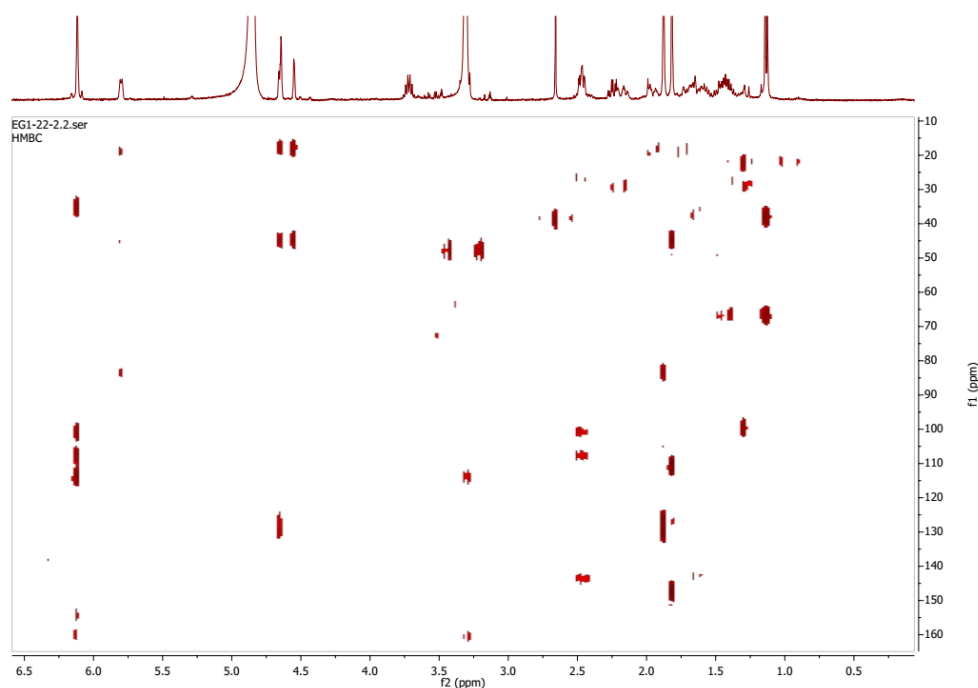
Στον αρωματικό δακτύλιο παρατηρούνται οι συσχετίσεις του πρωτονίου H4' ( $\delta$  6,11) με άνθρακες σε  $\delta$  35,9,  $\delta$  102,2,  $\delta$  115,2 και  $\delta$  155,6 που αντιστοιχούν στους άνθρακες C1'' ( $J^3$ ), C2' ( $J^2$ ), C6' ( $J^3$ ) και C5' (απόσταση  $J^2$  και αποθωράκιση που αντιστοιχεί σε φαινολικό άνθρακα) και τις συσχετίσεις του πρωτονίου H2' ( $\delta$  6,12) με άνθρακες σε  $\delta$  35,9,  $\delta$  109,1,  $\delta$  115,2 και  $\delta$  161,6 που αντιστοιχούν στους άνθρακες C1'' ( $J^3$ ), C4' ( $J^3$ ), C6' ( $J^3$ ) και C1' (απόσταση  $J^2$  και αποθωράκιση που αντιστοιχεί σε οξυγυνομένο άνθρακα αρωματικού δακτυλίου).

Στο μονοτερπενικό κομμάτι παρατηρούνται οι συσχετίσεις των πρωτονίων H10 ( $\delta$  1,81) με άνθρακες σε  $\delta$  46,2,  $\delta$  112,1 και  $\delta$  148,6 που αντιστοιχούν στους άνθρακες C4 ( $J^3$ ), C9 ( $J^3$ ) και στον τεταρτοταγή άνθρακα C8 ( $J^2$ ), οι συσχετίσεις των πρωτονίων H7 ( $\delta$  1,87) με άνθρακες σε  $\delta$  84,6,  $\delta$  131,5 και 127,6 που αντιστοιχούν στον άνθρακα C2 ( $J^3$ ), στον τεταρτοταγή άνθρακα



C1 ( $J^2$ ) και στον άνθρακα C6 ( $J^3$ ), οι συσχετίσεις του πρωτονίου H4 ( $\delta$  2,25) με τον άνθρακα σε  $\delta$  31,0 που αντιστοιχεί στον άνθρακα C5 ( $J^2$ ), οι συσχετίσεις των πρωτονίων H9 ( $\delta$  4.55/4.65.) με άνθρακες σε  $\delta$  19,8 και  $\delta$  46,2 που αντιστοιχούν στους άνθρακα C10 ( $J^3$ ) και C4 ( $J^3$ ), οι συσχετίσεις του πρωτονίου H2 ( $\delta$  4,66) με άνθρακες σε  $\delta$  127,6 και  $\delta$  131,5 που αντιστοιχούν στους άνθρακες C6 ( $J^3$ ) και C1 ( $J^2$ ), οι συσχετίσεις του πρωτονίου H6 ( $\delta$  5,79) με άνθρακες σε  $\delta$  20,6, και  $\delta$  84,6 που αντιστοιχούν στους άνθρακες C7 ( $J^3$ ), C4 ( $J^3$ ) και τέλος οι συσχετίσεις του πρωτονίου H3 ( $\delta$  3,31) με άνθρακες σε  $\delta$  115,2, και  $\delta$  161,6 που αντιστοιχούν στους άνθρακες C6' (απόσταση  $J^2$  και αποθωράκιση που αντιστοιχεί σε τεταρτοταγή αρωματικό άνθρακα) και C1' (απόσταση  $J^3$  και αποθωράκιση που αντιστοιχεί σε οξυγυνομένο άνθρακα αρωματικού δακτυλίου).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αναζήτησης στη βάση δεδομένων 'REAXYS' η προαναφερόμενη ένωση αποτελεί ένα **νέο φυσικό προϊόν**.

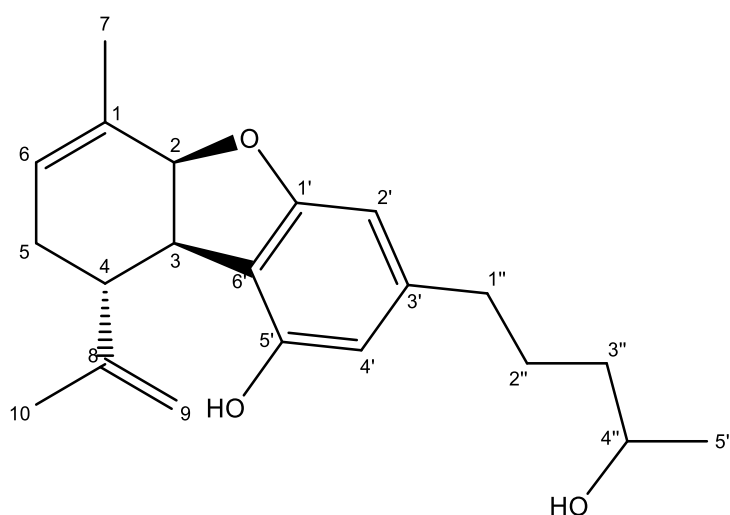


Εικόνα 45. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 5 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Πίνακας 23. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  NMR του μεταβολίτη 5 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Θέση	$^1\text{H}$ NMR $\delta$ σε ppm ( $J$ σε Hz)	$^{13}\text{C}$ NMR $\delta$ σε ppm
1	-	131,5
2	4,66 (1H, <i>m</i> )	84,6
3	3,31 <sup>ov</sup>	43,7
4	2,25 (1H, <i>tm</i> , $J= 10.5/4,1$ )	46,2

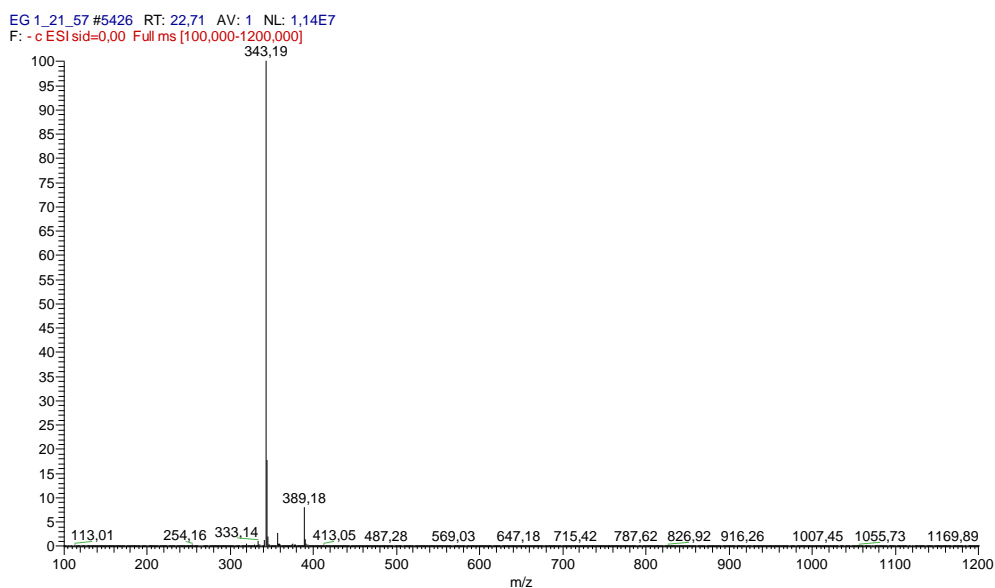
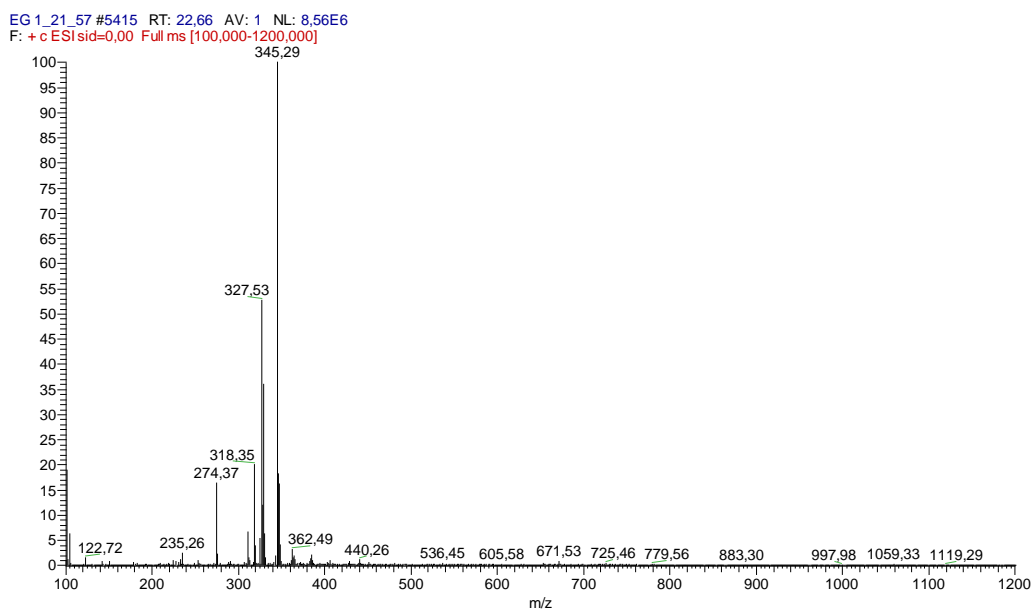
5	1,95 (1H, <i>m</i> )/2,18 (1H, <i>m</i> )	31,0
6	5,79 (1H, <i>dm</i> , <i>J</i> = 5,8)	127,6
7	1,87 (3H, <i>s</i> )	20,6
8	-	148,6
9	4,65 (1H, <i>m</i> )/4,55 (1H, <i>m</i> )	112,1
10	1,81 (3H, <i>s</i> )	19,8
1'	-	161,6
2'	6,12 (1H, <i>s</i> ) <sup>ov</sup>	102,2
3'	-	144,8
4'	6,11 (1H, <i>s</i> ) <sup>ov</sup>	109,1
5'	-	155,6
6'	-	115,2
1''	2,47 (2H, <i>td</i> , <i>J</i> = 8.0/2.6)	35,9
2''	1.59 (1H, <i>m</i> )/1.70 (1H, <i>m</i> )	27,6
3''	1.40 (1H, <i>m</i> )/1.45 (1H, <i>m</i> )	38,8
4''	3,72 (1H, <i>sx</i> , <i>J</i> = 6,1)	68,3
5''	1,13 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,2)	22,9



Εικόνα 46. Η χημική δομή του μεταβολίτη 5.

### 3.1.6 Μεταβολίτης 6

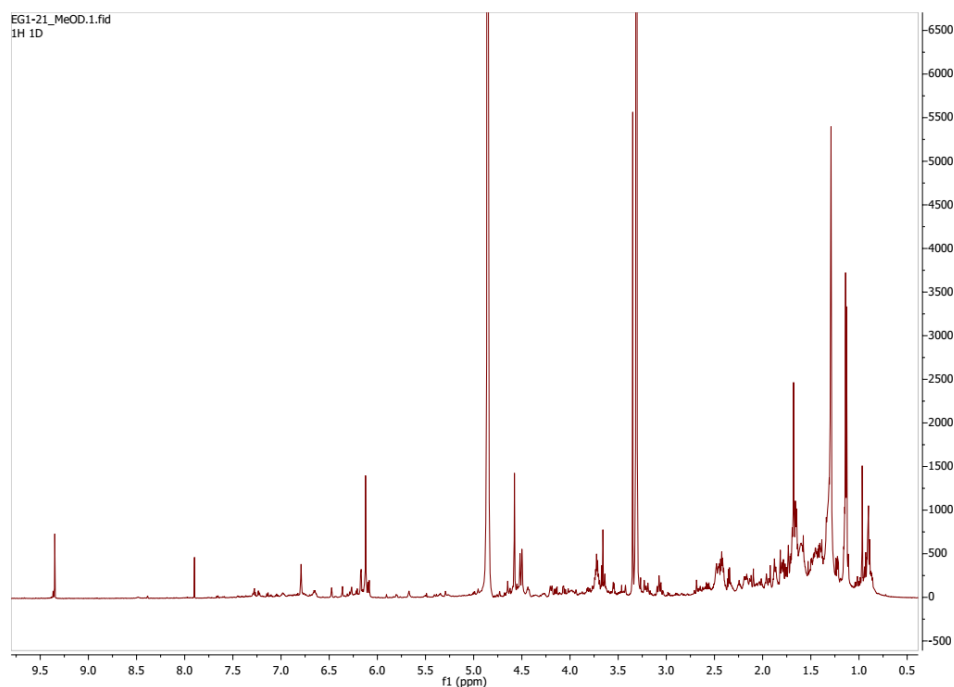
Ο μεταβολίτης 6 παραλήφθηκε από την στήλη βαρύτητας του εκχυλίσματος DPA03 υγρής καλλιέργειας και ταυτοποιήθηκε ως η 4''-υδροξυ-κανναβιδιολαδεΰδη (Εικ.52) με τη βοήθεια φασματοσκοπικών δεδομένων αλλά και από τα δεδομένα φασματομετρίας μάζας (Εικ.47), καθώς διακρίνονται τα ψευδομοριακά ιόντα  $[M+H]^+$  με  $m/z$  345,29 και  $[M-H]^-$  με  $m/z$  343,19 δηλαδή υπολογίστηκε ότι ο μεταβολίτης αυτός έχει μοριακό βάρος 344,4510 και μοριακό τύπο  $C_{21}H_{28}O_4$ .



**Εικόνα 47.** Φάσματα μάζας του μεταβολίτη 6.

Από τη μελέτη του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR (Εικ.48) παρατηρούνται δύο απλές αλληλεπικαλυπτόμενες κορυφές σε  $\delta$  6,12 που αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια H2' και H4', μία μονή κορυφή σε  $\delta$  6,79 που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο ολεφινικό πρωτόνιο δακτυλίου H2, μία ευρεία διπλή κορυφή και μία ευρεία απλή κορυφή σε  $\delta$  4,50 (*brd*,  $J = 1,88$  Hz) και  $\delta$  4,52 αντίστοιχα, που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H9, μία διπλή πολλαπλών κορυφών σε  $\delta$  4,20 (*tm*,  $J = 10,5$  Hz) που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί σε πρωτόνιο τριτοταγή άνθρακα δακτυλίου σε θέση  $\alpha$  ως προς διπλό δεσμό (H3), μία απλή κορυφή σε  $\delta$  9,35 η οποία

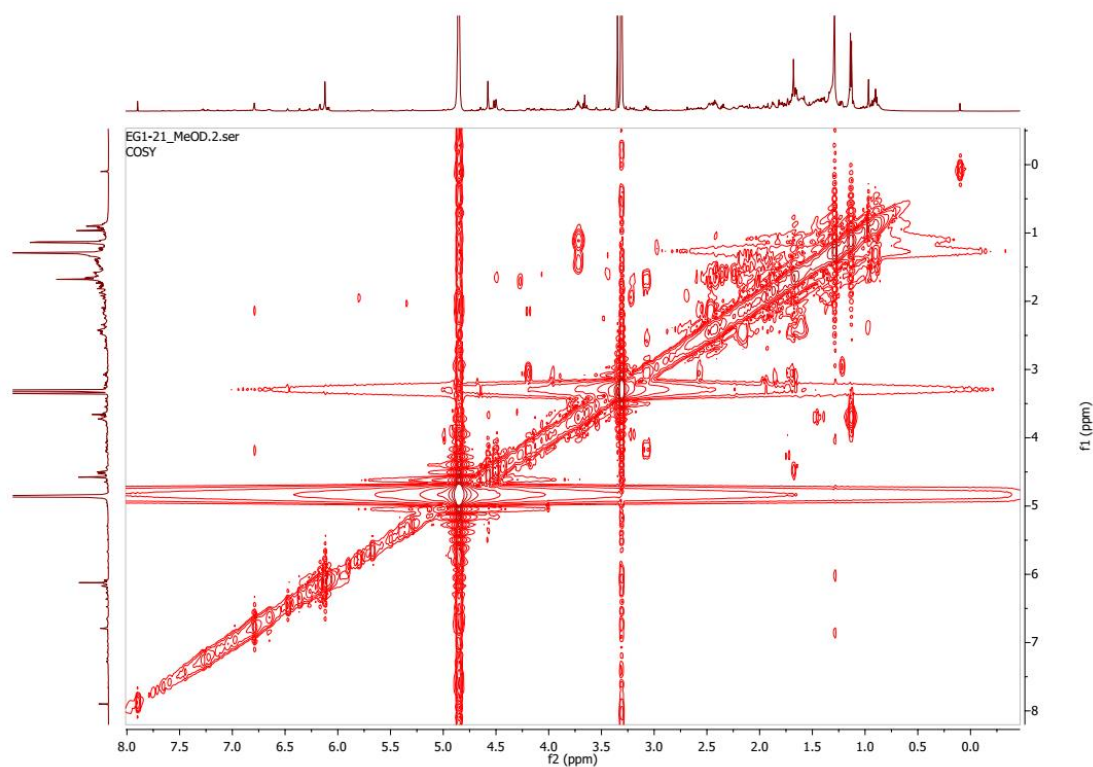
ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο της αλδεΐδης H7, μία εξαπλή κορυφή σε  $\delta$  3,72 (*sx*,  $J = 6,1$  Hz) που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο οξυγονωμένου μεθυλενίου αλειφατικής αλυσίδας H4'', μία τριπλή πολλαπλών κορυφών σε  $\delta$  3,08 (*tm*,  $J = 12,5/2,4$ ) η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο τριτοταγή άνθρακα δακτυλίου H4, μία τριπλή διπλή κορυφή σε  $\delta$  2,45 (*td*,  $J = 8,0/2,6$ ) που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια μεθυλενίου H1'', μία πολλαπλή κορυφή σε  $\delta$  4,28 που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στο μεθυλένιο δακτυλίου H6, μία πολλαπλή κορυφή σε  $\delta$  1,70 η οποία ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια H5 μεθυλενίου δακτυλίου, μία απλή κορυφή σε  $\delta$  1,68 που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια η οποία αντιστοιχεί στα πρωτόνια H10 βινυλικού μεθυλίου, δύο πολλαπλές κορυφές σε  $\delta$  1,59 σε  $\delta$  1,70 που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H2'' μεθυλενίου αλειφατικής αλυσίδας, δύο αλληλεπικαλυπτόμενες πολλαπλές κορυφές σε  $\delta$  1,40 σε  $\delta$  1,45 που ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H3'' μεθυλενίου αλειφατικής αλυσίδας και μία διπλή κορυφή σε  $\delta$  1,13 (*d*,  $J = 6,2$  Hz) που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια H5'' τερματικού μεθυλίου αλειφατικής αλυσίδας δίπλα σε οξυγονωμένο μεθίλιο.



**Εικόνα 48.** Φάσμα  $^1\text{NMR}$  του μεταβολίτη 6 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

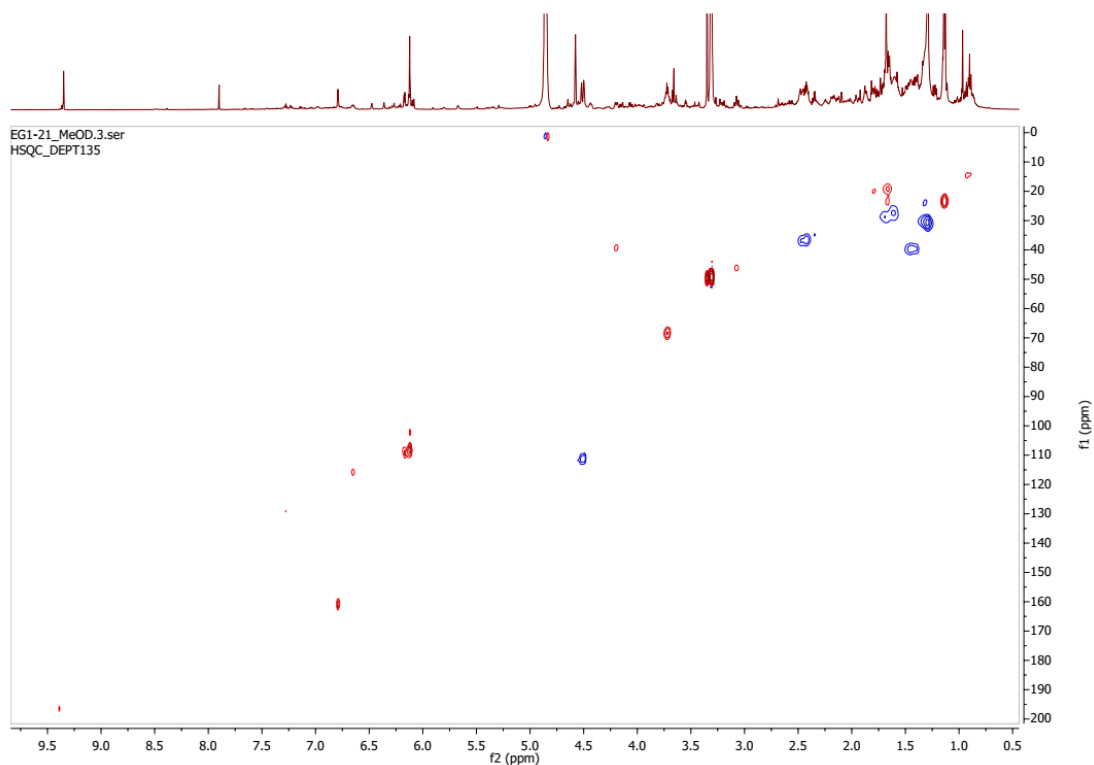
Στο φάσμα COSY (Εικ.49) παρατηρείται η συσχέτιση των πρωτονίων H5'' ( $\delta$  1,13) και H3'' ( $\delta$  1,38-1,48) με το πρωτόνιο H4'' ( $\delta$  3,76) και τις συσχετίσεις H2''-H3'' ( $\delta$  1,52-1,67 και  $\delta$  1,40-

1,45) και H2''-H1'' ( $\delta$  1,59-1,70 και  $\delta$  2,45). Επιπλέον, παρατηρούνται οι συσχετίσεις H2-H3 ( $\delta$  6,79 και  $\delta$  4,20) και H3-H4 ( $\delta$  4,20 και  $\delta$  3,08) και επιπλέον οι συσχετίσεις H4-H5 ( $\delta$  3,08 και  $\delta$  1,70) και H5-H6 ( $\delta$  1,70 και 2,16)



**Εικόνα 49.** Φάσμα COSY του μεταβολίτη 6 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Στο φάσμα HSQC (Εικ.50) παρατηρούνται οι  $J^1$  συσχετίσεις H5''-C5'' ( $\delta$  1,13 και  $\delta$  23,4), H4''-C4'' ( $\delta$  3,72 και  $\delta$  68,4, H3''-C3'' ( $\delta$  1,40-1,45 και  $\delta$  39,7), H2''-C2'' ( $\delta$  1,59-1,70 και  $\delta$  27,6) και H1''-C1'' ( $\delta$  2,45 και  $\delta$  36,7) της πλευρικής αλυσίδας. Επιπλέον, παρατηρούνται οι συσχετίσεις H2-C2 ( $\delta$  6,79 και  $\delta$  160,9), H3-C3 ( $\delta$  4,20 και  $\delta$  39,4), H4-C4 ( $\delta$  3,08 και  $\delta$  46,1), H5-C5 ( $\delta$  1,70 και  $\delta$  28,5), H6-C6 ( $\delta$  2,16 και  $\delta$  23,3), H7-C7 ( $\delta$  9,35 και  $\delta$  196,4), H8-C8 ( $\delta$  2,02-1,90 και  $\delta$  22,5) H9-C9 ( $\delta$  4,50/4.52 και  $\delta$  110,4), που αντιστοιχεί σε άνθρακα τερματικού μεθυλενίου) και H10-C10 ( $\delta$  1.68 και  $\delta$  19.1) του μονοτερπενικού τμήματος του μορίου. Τέλος, παρατηρούνται οι συσχετίσεις H4'-C4' ( $\delta$  6,12 και  $\delta$  109,1) και H2'-C2' ( $\delta$  6,12 και  $\delta$  108,2) των πρωτονίων του αρωματικού δακτυλίου.



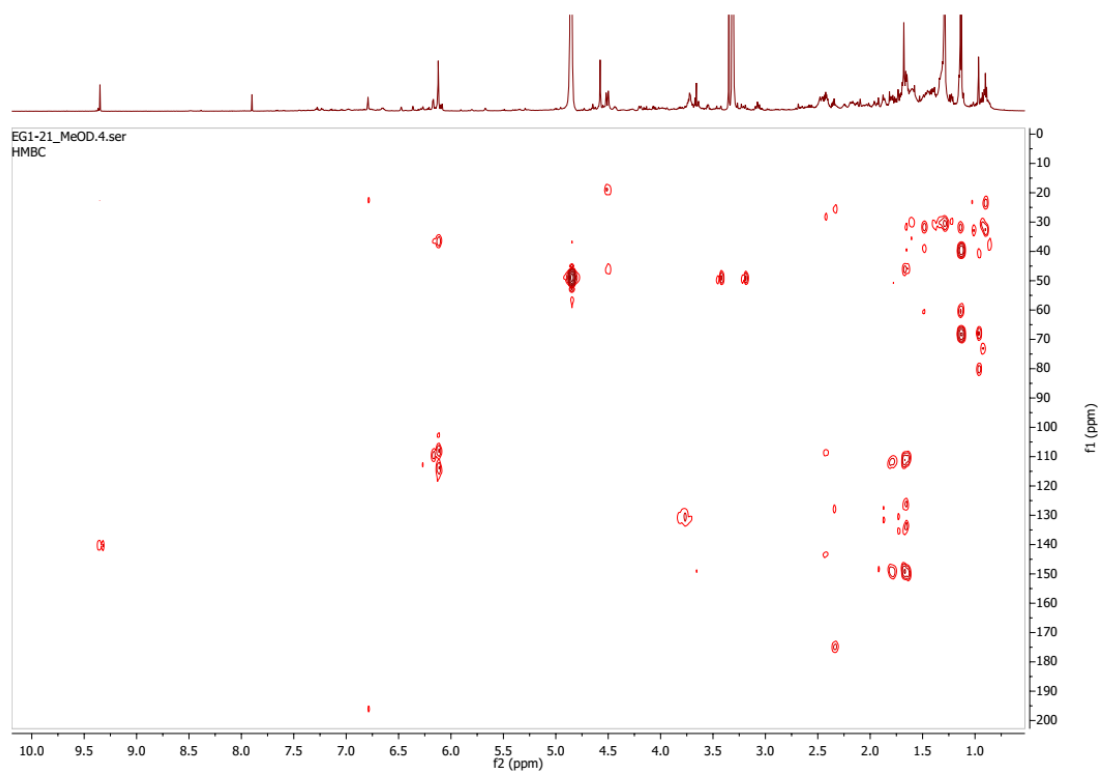
**Εικόνα 50.** Φάσμα HSQC του μεταβολίτη 6 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Στο φάσμα HMBC (Εικ.51) παρατηρείται στο κομμάτι της πλευρικής αλυσίδας της, τις συσχετίσεις των πρωτονίων H5'' ( $\delta$  1,13) με άνθρακες σε  $\delta$  39,7 και  $\delta$  68,4 που αντιστοιχούν στους άνθρακες C3'' ( $J^3$ ) και C4'' ( $J^2$ ), και τις συσχετίσεις των πρωτονίων H1'' ( $\delta$  2,45) με άνθρακες σε 109,1 και 143,5 που αντιστοιχούν στους άνθρακες C4'/C2' ( $J^3$ ) και C3' ( $J^2$ ) του αρωματικού τμήματος του μορίου.

Στον αρωματικό δακτύλιο παρατηρούμε τις συσχετίσεις του πρωτονίου H4'/H2' ( $\delta$  6,12) με άνθρακες σε  $\delta$  36,7,  $\delta$  108,3 και  $\delta$  113,8 που αντιστοιχούν στους άνθρακες C1'' ( $J^3$ ), C4'/C2' ( $J^3$ ) και C6' ( $J^3$ ).

Στο μονοτερπενικό κομμάτι παρατηρούνται οι συσχετίσεις των πρωτονίων H7 ( $\delta$  9,35) με τον άνθρακα σε  $\delta$  140,4 που αντιστοιχεί στον τεταρτοταγή άνθρακα C1 ( $J^2$ ), τις συσχετίσεις των πρωτονίων H10 ( $\delta$  1,68) με άνθρακες σε  $\delta$  46,1,  $\delta$  111,4 και 149,1 που αντιστοιχούν στον άνθρακα C4 ( $J^3$ ), στον τεταρτοταγή άνθρακα C9 ( $J^3$ ) και στον τεταρτοταγή άνθρακα C8 ( $J^2$ ), τις συσχετίσεις των πρωτονίων H9 ( $\delta$  4,50/4,52) με άνθρακες σε  $\delta$  19,1 και  $\delta$  46,1 που αντιστοιχούν στους άνθρακα C10 ( $J^3$ ) και C4 ( $J^3$ ) και τέλος τις συσχετίσεις του πρωτονίου H2 ( $\delta$  6,79) με άνθρακες σε  $\delta$  23,3 και  $\delta$  196,4 που αντιστοιχούν στους άνθρακες C6 ( $J^3$ ) και C7 ( $J^3$ ).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αναζήτησης στη βάση δεδομένων 'REAXYS' η προαναφερόμενη ένωση αποτελεί ένα **νέο φυσικό προϊόν**.

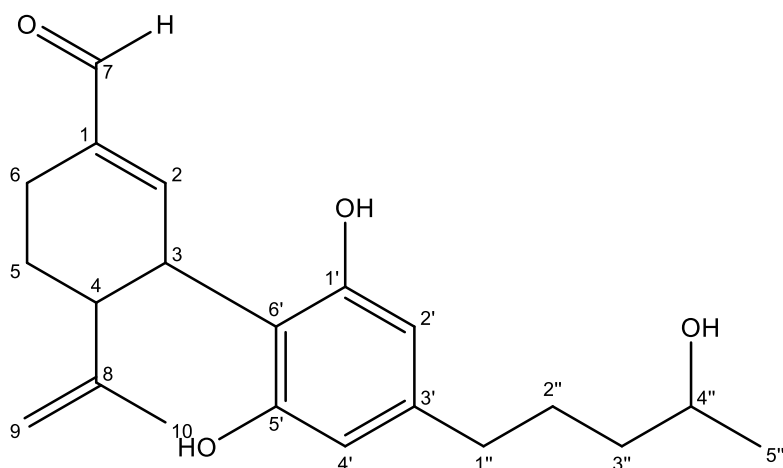


**Εικόνα 51.** Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 6 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

**Πίνακας 24.** Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  NMR του μεταβολίτη 6 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Θέση	$^1\text{H}$ NMR $\delta$ σε ppm ( $J$ σε Hz)	$^{13}\text{C}$ NMR $\delta$ σε ppm
1	nd	140,4
2	6,79 (1H, <i>brt</i> , $J = 2$ )	160,9
3	4,20 (1H, <i>tm</i> , $J = 10,5$ )	39,4
4	3,08 (1H, <i>tm</i> , $J = 10,5/2,4$ )	46,1
5	1,70 (2H, <i>m</i> )	28,5
6	2,16 (2H, <i>m</i> )	23,3
7	9,35 (1H, <i>s</i> )	196,4
8	nd	149,1
9	4,50 (1H, <i>m</i> )/4.52 (1H, <i>m</i> )	111,4
10	1,68 (3H, <i>s</i> )	19,1
1'	nd	157,3
2'	6,12 (1H, <i>s</i> ) <sup>ov</sup>	108,2
3'	nd	143,5
4'	6,12 (1H, <i>s</i> ) <sup>ov</sup>	108,3
5'	nd	157,2
6'	nd	113,8

1''	2.45 (2H, <i>td</i> , <i>J</i> = 8.0/2.6)	36,7
2''	1.59(1H, <i>m</i> )/1.70 (1H, <i>m</i> )	27,6
3''	1.40 (1H, <i>m</i> )/1.45 (1H, <i>m</i> )	39,7
4''	3,72 (1H, <i>sx</i> , <i>J</i> = 6,1)	68,4
5''	1,13 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,2)	23,4

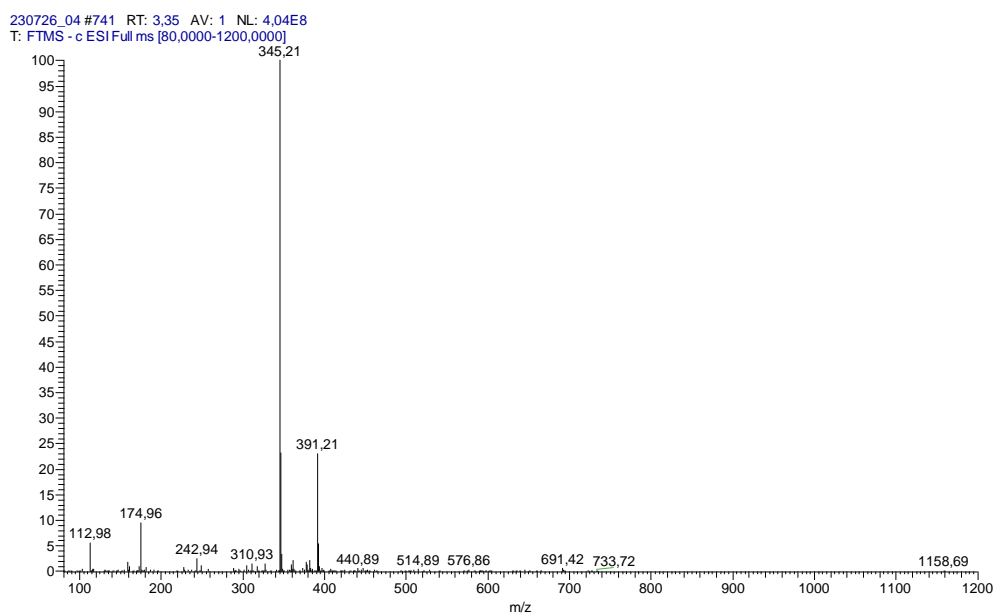
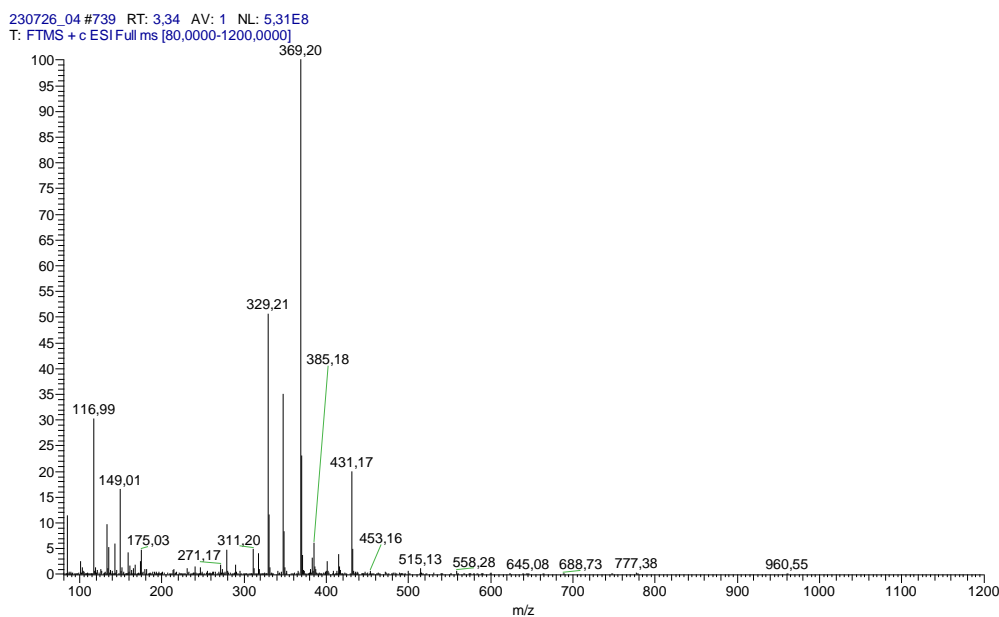


**Εικόνα 52.** Η χημική δομή του μεταβολίτη 6.

### 3.1.7 Μεταβολίτης 7

Ο μεταβολίτης 7 παραλήφθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών και ταυτοποιήθηκε ως η (6*R*,4''*S*)-6,4''-διυδροξυ-κανναβιδιόλη (Εικ.59) με τη βοήθεια φασματοσκοπικών δεδομένων αλλά και από τα δεδομένα φασματομετρίας μάζας (Εικ.53) καθώς σε φάσματα HRMS σε θετικό και αρνητικό ιοντισμό διακρίνονται τα ψευδομοριακά ιόντα  $[M+Na]^+$  με  $m/z$  369,20 και  $[M-H]^-$  με  $m/z$  345,21, βάσει των οποίων υπολογίστηκε ότι ο μεταβολίτης αυτός έχει μοριακό βάρος 346,4670 και μοριακό τύπο  $C_{21}H_{30}O_4$ .

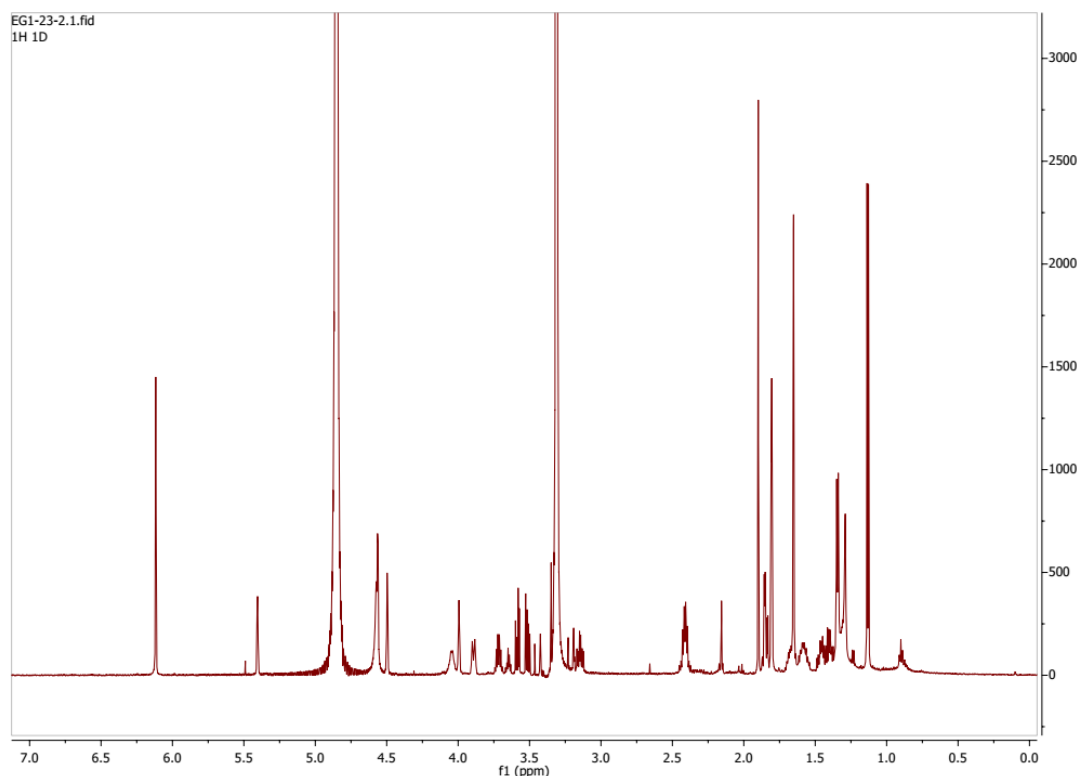




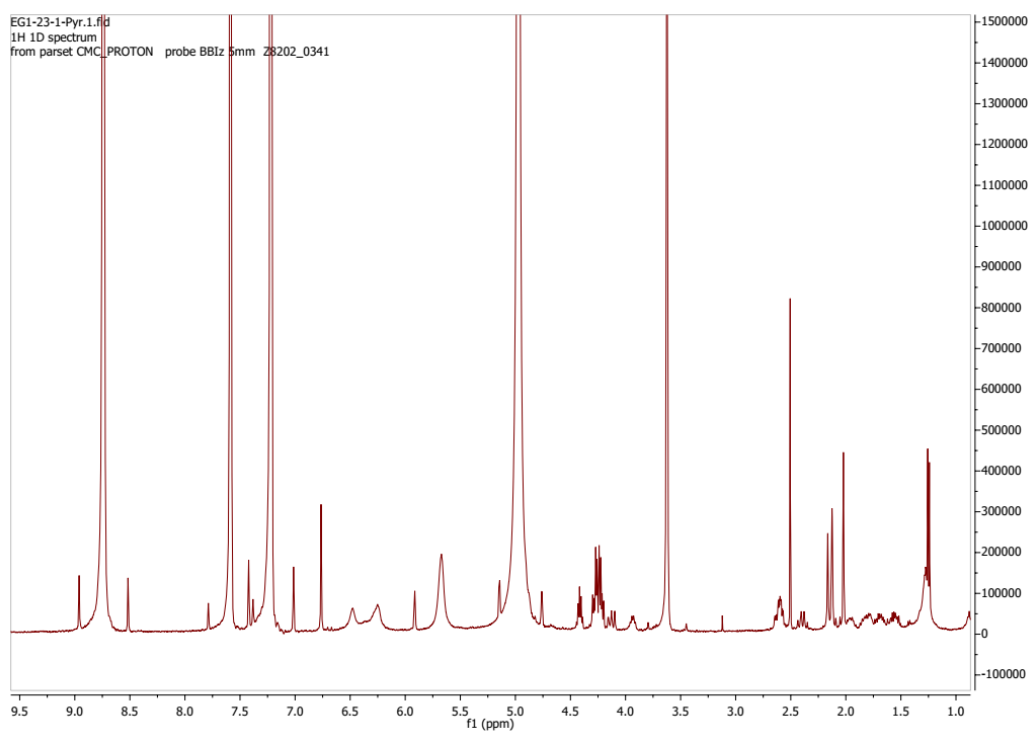
**Εικόνα 53.** Φάσματα μάζας του μεταβολίτη 7.

Από τη μελέτη του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR (Εικ.54) παρατηρούνται δύο απλές αλληλεπικαλυπτόμενες κορυφές σε  $\delta$  6,08 που αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια H2' και H4', μία διπλή κορυφή σε  $\delta$  5,29 που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο ολεφινικό πρωτόνιο δακτυλίου H2, μία ευρεία διπλή κορυφή και μία ευρεία απλή κορυφή σε  $\delta$  4,43 (*brd*,  $J = 1,62$  Hz) και  $\delta$  4,50 αντίστοιχα, που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H9, μία τριπλή πολλαπλή κορυφή σε  $\delta$  4,27 (*tm*,  $J=5,3$ ) που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο οξυγονωμένου μεθυλενίου δακτυλίου H6, μία πολλαπλή κορυφή σε  $\delta$  3,97 που ολοκληρώνει

για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί σε πρωτόνιο τριτοταγή άνθρακα δακτυλίου σε θέση α ως προς διπλό δεσμό (H3), μία εξαπλή κορυφή σε  $\delta$  3,72 (*sx*,  $J=6,2$  Hz) που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο οξυγονωμένου μεθυλενίου αλειφατικής αλυσίδας H4'', μία πολλαπλή κορυφή σε  $\delta$  3,21 η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο τριτοταγή άνθρακα δακτυλίου H4, μία τριπλή διπλή κορυφή σε  $\delta$  2,40 (*td*,  $J = 8/2,6$ ) που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια μεθυλενίου H1'', μία απλή κορυφή σε  $\delta$  1,74 που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια η οποία αντιστοιχεί στα πρωτόνια H7 μεθυλίου, δύο πολλαπλές κορυφές σε  $\delta$  1,71 και σε  $\delta$  2,02 που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H5 μεθυλενίου δακτυλίου, δύο πολλαπλές κορυφές από  $\delta$  1,60 σε  $\delta$  1,68 που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H2'' μεθυλενίου αλειφατικής αλυσίδας, μια απλή κορυφή σε  $\delta$  1,65 η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια H10 μεθυλίου, δύο αλληλεπικαλυπτόμενες πολλαπλές κορυφές σε  $\delta$  1,45 που ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H3'' μεθυλενίου αλειφατικής αλυσίδας και μία διπλή κορυφή σε  $\delta$  1,13 (*d*,  $J = 6,17$ Hz) που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια H5'' τερματικού μεθυλίου αλειφατικής αλυσίδας δίπλα σε οξυγονωμένο μεθίλιο.

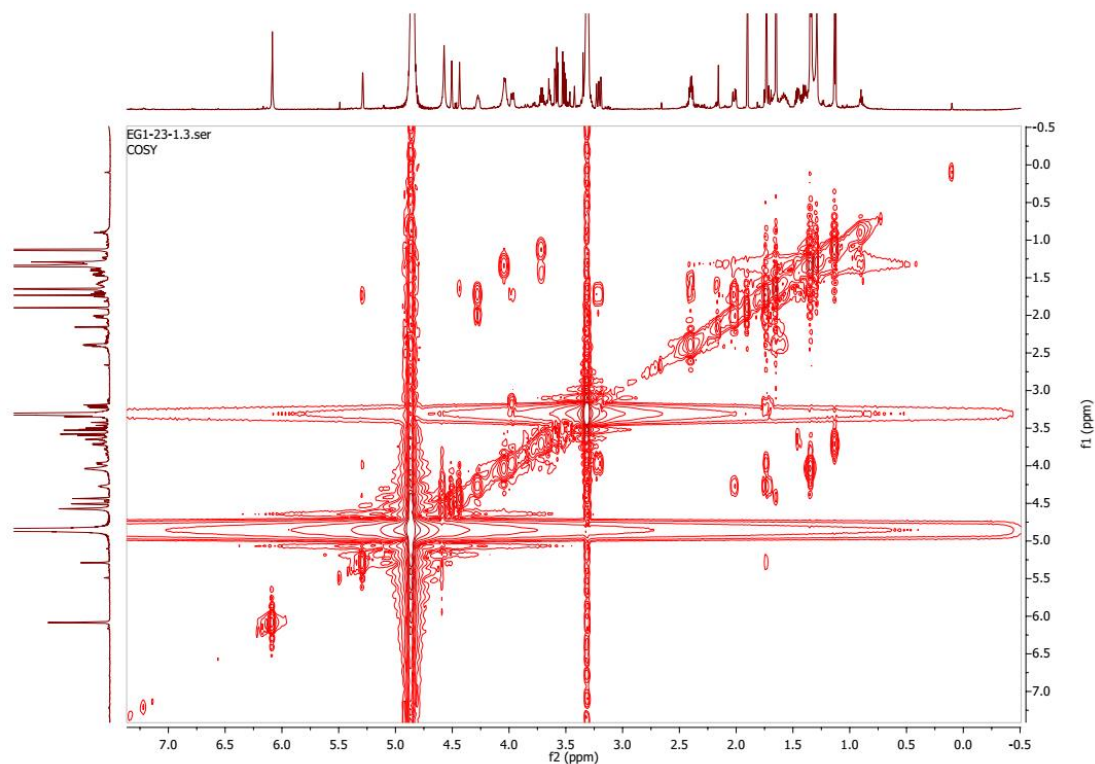


Εικόνα 54. Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του μεταβολίτη 7 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.



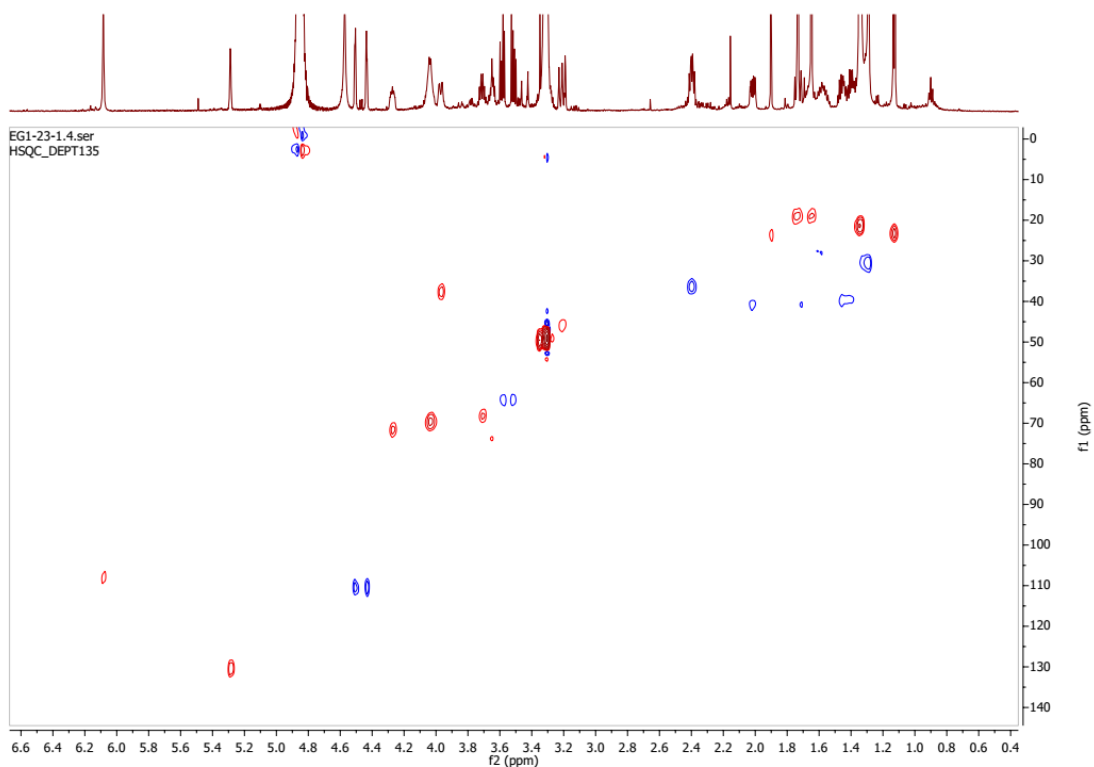
**Εικόνα 55.** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του μεταβολίτη 7 σε δευτεριωμένη πυριδίνη.

Στο φάσμα COSY (Εικ.56) παρατηρείται η συσχέτιση των πρωτονίων  $\text{H5}''$  ( $\delta$  1,13) και  $\text{H3}''$  ( $\delta$  1,45) με το πρωτόνιο  $\text{H4}''$  ( $\delta$  3,72) και τις συσχετίσεις  $\text{H2}''\text{-H3}''$  ( $\delta$  1,60-1,68 και  $\delta$  1,45) και  $\text{H2}''\text{-H1}''$  ( $\delta$  1,60-1,68 και  $\delta$  2.40). Επιπλέον, παρατηρούνται οι συσχετίσεις  $\text{H2}\text{-H3}$  ( $\delta$  5,29 και  $\delta$  3,97) και  $\text{H3}\text{-H4}$  ( $\delta$  3,97 και  $\delta$  3,21) και επιπλέον οι συσχετίσεις  $\text{H4}\text{-H5}$  ( $\delta$  3,21 και  $\delta$  1,71/2.02) και  $\text{H5}\text{-H6}$  ( $\delta$  1,71/2.02 και  $\delta$  4,27).



**Εικόνα 56.** Φάσμα COSY του μεταβολίτη 7 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

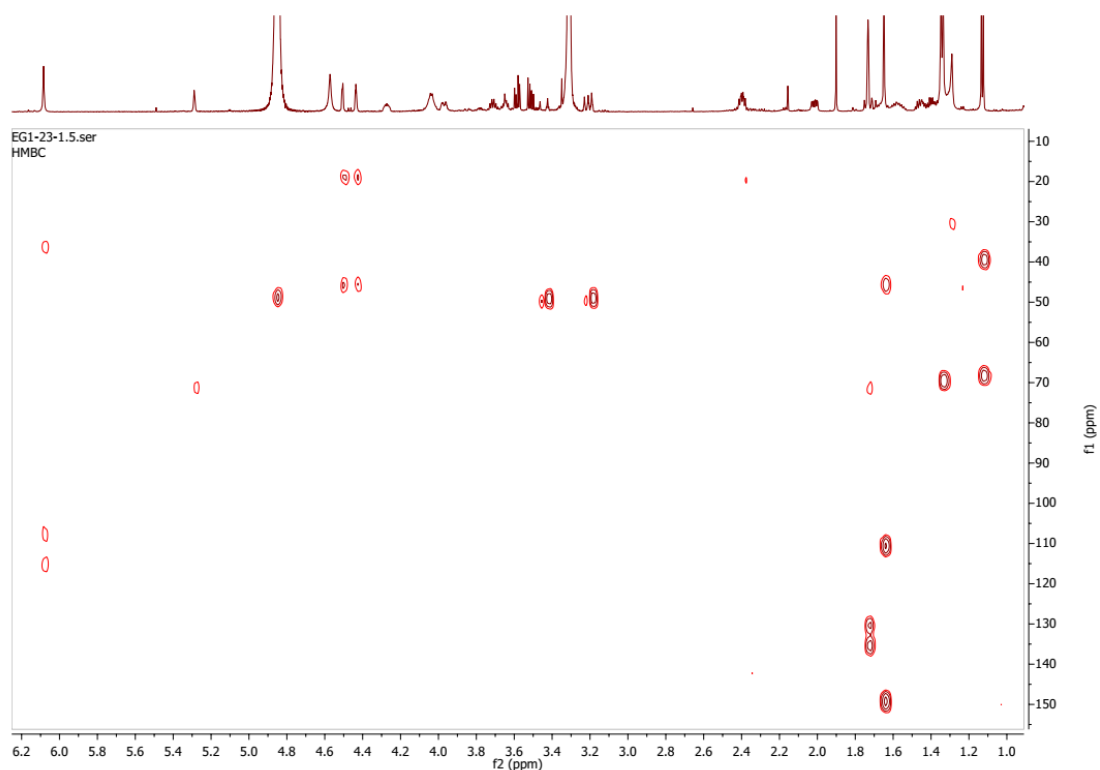
Στο φάσμα HSQC (Εικ.57) παρατηρούνται οι  $J^1$  συσχετίσεις  $H5''-C5''$  ( $\delta$  1,13 και  $\delta$  23,4),  $H4''-C4''$  ( $\delta$  3,72 και  $\delta$  68,4),  $H3''-C3''$  ( $\delta$  1,45 και  $\delta$  39,7),  $H2''-C2''$  ( $\delta$  1,60-1,68 και  $\delta$  27,6) και  $H1''-C1''$  ( $\delta$  2,40 και  $\delta$  36,7) της πλευρικής αλυσίδας. Επιπλέον, παρατηρούνται οι συσχετίσεις  $H2-C2$  ( $\delta$  5,29 και  $\delta$  130,4),  $H3-C3$  ( $\delta$  3,97 και  $\delta$  37,7),  $H4-C4$  ( $\delta$  3,21 και  $\delta$  46,1),  $H5-C5$  ( $\delta$  1,70-2,02 και  $\delta$  40,7),  $H6-C6$  ( $\delta$  4,27 και  $\delta$  71,6),  $H7-C7$  ( $\delta$  1,74 και  $\delta$  19,1),  $H9-C9$  ( $\delta$  4,43/4,50 και  $\delta$  110,4), που αντιστοιχεί σε άνθρακα τερματικού μεθυλενίου) και  $H10-C10$  ( $\delta$  1,65 και  $\delta$  19,1) του μονοτερπενικού τμήματος του μορίου. Τέλος, παρατηρούνται οι συσχετίσεις  $H4'/H2'-C4'/C2'$  ( $\delta$  6,12 και  $\delta$  108,2) των πρωτονίων του αρωματικού δακτυλίου.



**Εικόνα 57.** Φάσμα HSQC του μεταβολίτη 7 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Στο φάσμα HMBC (Εικ.58) παρατηρούνται στο κομμάτι της πλευρικής αλυσίδας της, οι συσχετίσεις των πρωτονίων H5'' ( $\delta$  1,13) με άνθρακες σε  $\delta$  39,7 και  $\delta$  68,4 που αντιστοιχούν στους άνθρακες C3'' ( $J^3$ ) και C4'' ( $J^2$ ). Στον αρωματικό δακτύλιο παρατηρούνται οι συσχετίσεις των πρωτονίων H4'/H2' ( $\delta$  6,12) με άνθρακες σε  $\delta$  36,7,  $\delta$  108,3 και  $\delta$  113,8 και που αντιστοιχούν στους άνθρακες C1'' ( $J^3$ ), C2'/C4' ( $J^2$ ) και C6' ( $J^3$ ).

Στο μονοτερπενικό κομμάτι παρατηρούνται οι συσχετίσεις των πρωτονίων H10 ( $\delta$  1,65) με άνθρακες σε  $\delta$  46,1,  $\delta$  110,4 και  $\delta$  149,3 που αντιστοιχούν στους άνθρακες C4 ( $J^3$ ), C9 ( $J^3$ ) και στον τεταρτοταγή άνθρακα C8 ( $J^2$ ), οι συσχετίσεις των πρωτονίων H7 ( $\delta$  1,74) με άνθρακες σε  $\delta$  71,4,  $\delta$  130,4 και 135,5 που αντιστοιχούν στον άνθρακα C6 ( $J^3$ ), στον άνθρακα C2 ( $J^3$ ) και στον τεταρτοταγή άνθρακα C1 ( $J^2$ ), οι συσχετίσεις των πρωτονίων H9 ( $\delta$  4,43/4,50) με άνθρακες σε  $\delta$  19,1 και  $\delta$  46,1 που αντιστοιχούν στους άνθρακα C10 ( $J^3$ ) και C4 ( $J^3$ ) και τέλος οι συσχετίσεις του πρωτονίου H2 ( $\delta$  5,29) με τον άνθρακα σε  $\delta$  71,4 που αντιστοιχεί στον άνθρακα C6 ( $J^3$ ). Η παρακάτω δομή (Εικ.59) επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Ahmed et al., 2021).



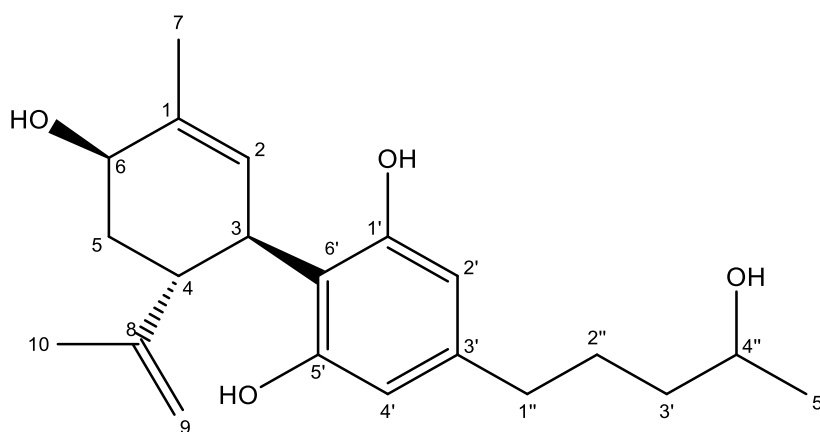
Εικόνα 58. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 7 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Πίνακας 25. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  NMR του μεταβολίτη 7 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Θέση	$^1\text{H}$ NMR $\delta$ σε ppm ( $J$ σε Hz)	$^{13}\text{C}$ NMR $\delta$ σε ppm
1	-	135,5
2	5,29 (1H, <i>d</i> , $J = 1,6$ )	130,4
3	3,97 (1H, <i>m</i> )	37,7
4	3,21 (1H, <i>m</i> )	46,1
5	1,71/2,02 (2H, <i>m</i> )	40,7
6	4,27 (1H, <i>tm</i> , $J = 5$ )	71,6
7	1,74 (3H, <i>s</i> )	19,1
8	-	149,3
9	4,43 (1H, <i>brd</i> , $J = 1,62$ )/4,50 (1H, <i>m</i> )	110,4
10	1,65 (3H, <i>s</i> )	19,1
1'	-	nd
2'	6,08 (1H, <i>s</i> ) <sup>ov</sup>	108,2
3'	-	143,5
4'	6,08 (1H, <i>s</i> ) <sup>ov</sup>	108,2
5'	-	nd
6'	-	113,8
1''	2,40 (2H, <i>td</i> , $J = 8,0/2,6$ )	36,7
2''	1,60 (1H, <i>m</i> )/1,68 (1H, <i>m</i> )	27,6
3''	1,45 (2H, <i>m</i> )	39,7
4''	3,72 (1H, <i>sx</i> , $J = 6,2$ )	68,4
5''	1,13 (3H, <i>d</i> , $J = 6,2$ )	23,4

**Πίνακας 26.** Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H}$  NMR του μεταβολίτη 7 σε δευτεριωμένη πυριδίνη.

Θέση	$^1\text{H}$ NMR $\delta$ σε ppm ( <i>J</i> σε Hz)
1	-
2	5,91 (1H, <i>s</i> )
3	4,82 <sup>ov</sup>
4	4,13 (1H, <i>m</i> )
5	2,40 (2H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 11,2/12,4)
6	4,90 <sup>ov</sup>
7	2,13 (3H, <i>s</i> )
8	-
9	4,76 (1H, <i>brs</i> )/5,15 (1H, <i>brs</i> )
10	2,02 (3H, <i>s</i> )
1'	-
2'	6,76 (2H, <i>s</i> )
3'	-
4'	6,76 (2H, <i>s</i> )
5'	-
6'	-
1''	2.40 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7,4)
2''	1,80 (2H, <i>m</i> )
3''	1.45 (2H, <i>m</i> )
4''	3,93 (1H, <i>sx</i> , <i>J</i> = 6,2)
5''	1,25 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,2)

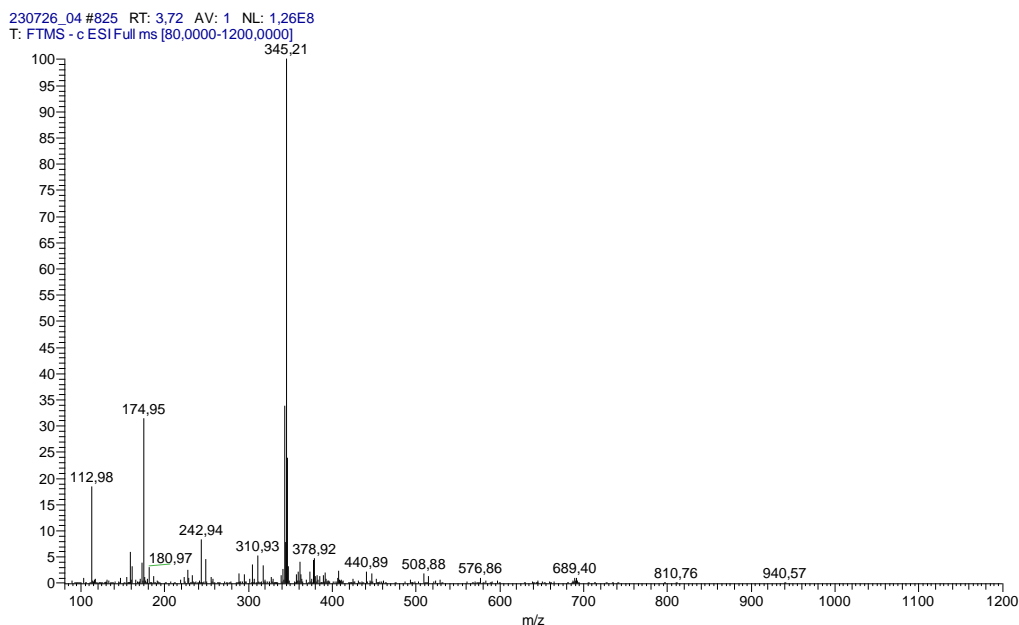
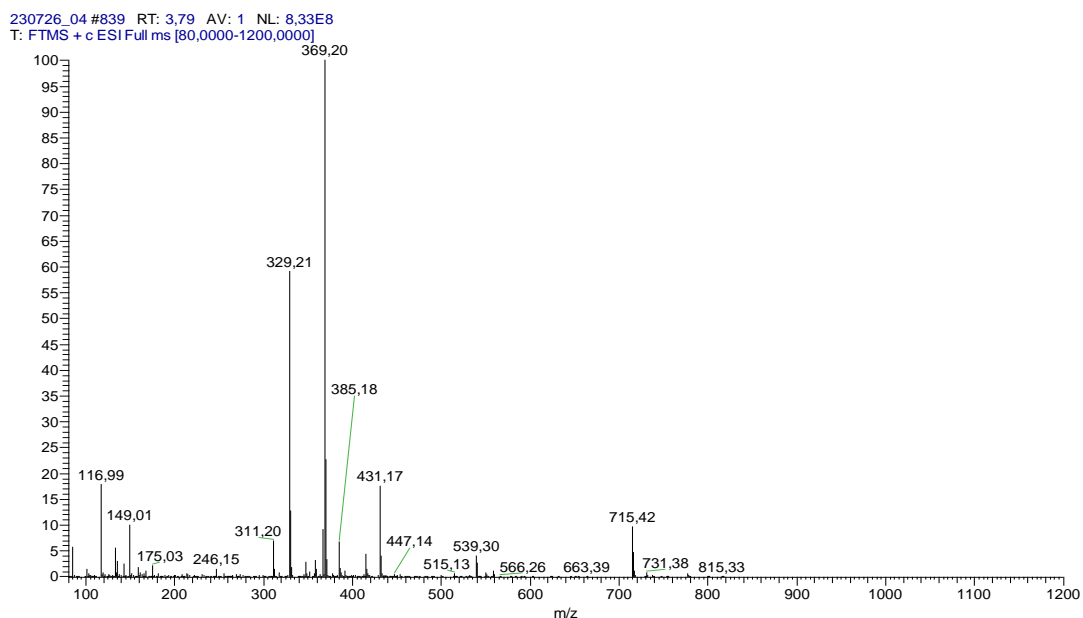


**Εικόνα 59.** Η χημική δομή του μεταβολίτη 7.

### 3.1.8 Μεταβολίτης 8

Ο μεταβολίτης 8 παραλήφθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών και ταυτοποιήθηκε ως η (6*S*,4''*S*)-6,4''-διυδροξυ-κανναβιδιόλη με τη βοήθεια φασματοσκοπικών

δεδομένων αλλά και από τα δεδομένα φασματομετρίας μάζας. (Εικ.60). Αναλυτικότερα, στα φάσματα HRMS θετικού και αρνητικού ιοντισμού διακρίνονται τα ψευδομοριακά ιόντα  $[M+Na]^+$  με  $m/z$  369,20 και  $[M-H]^-$  με  $m/z$  345,21, που αντιστοιχούν στον μεταβολίτη 8 με μοριακό τύπο  $C_{21}H_{30}O_4$  και μοριακό βάρος 346,4670.

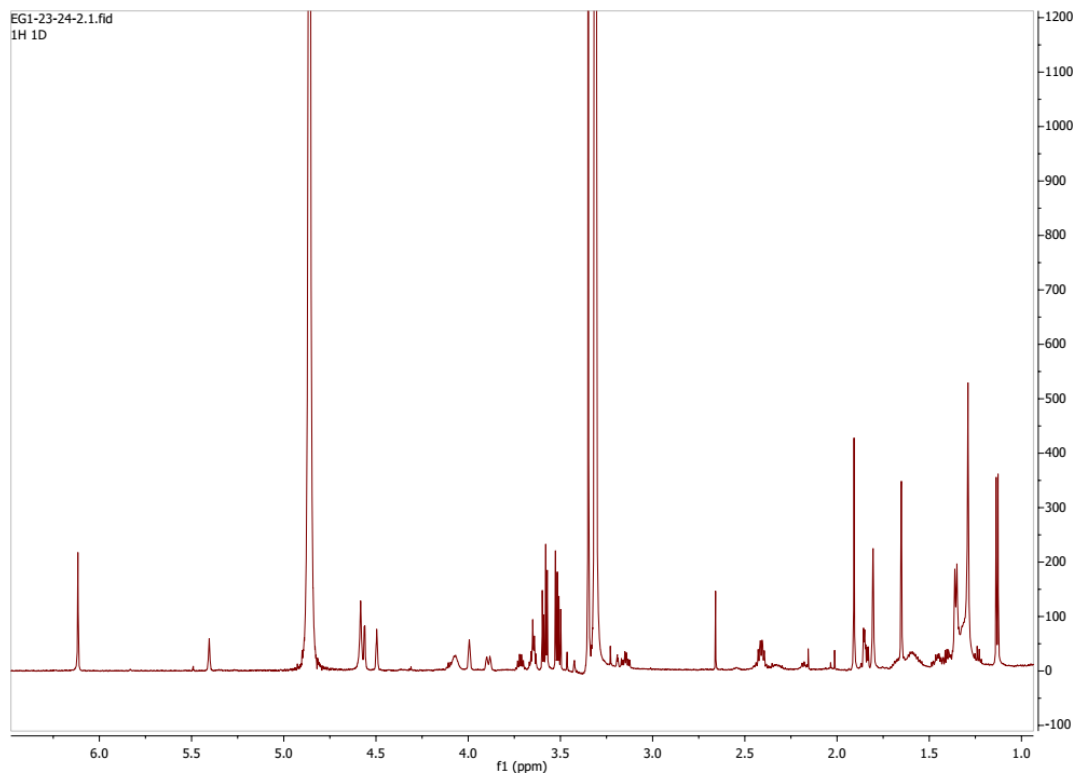


**Εικόνα 60.** Φάσματα μάζας του μεταβολίτη 8.

Από τη μελέτη του φάσματος  $^1H$  NMR (Εικ.61) παρατηρούνται δύο απλές αλληλεπικαλυπτόμενες κορυφές σε  $\delta$  6,12 που αντιστοιχούν στα αρωματικά πρωτόνια H2'

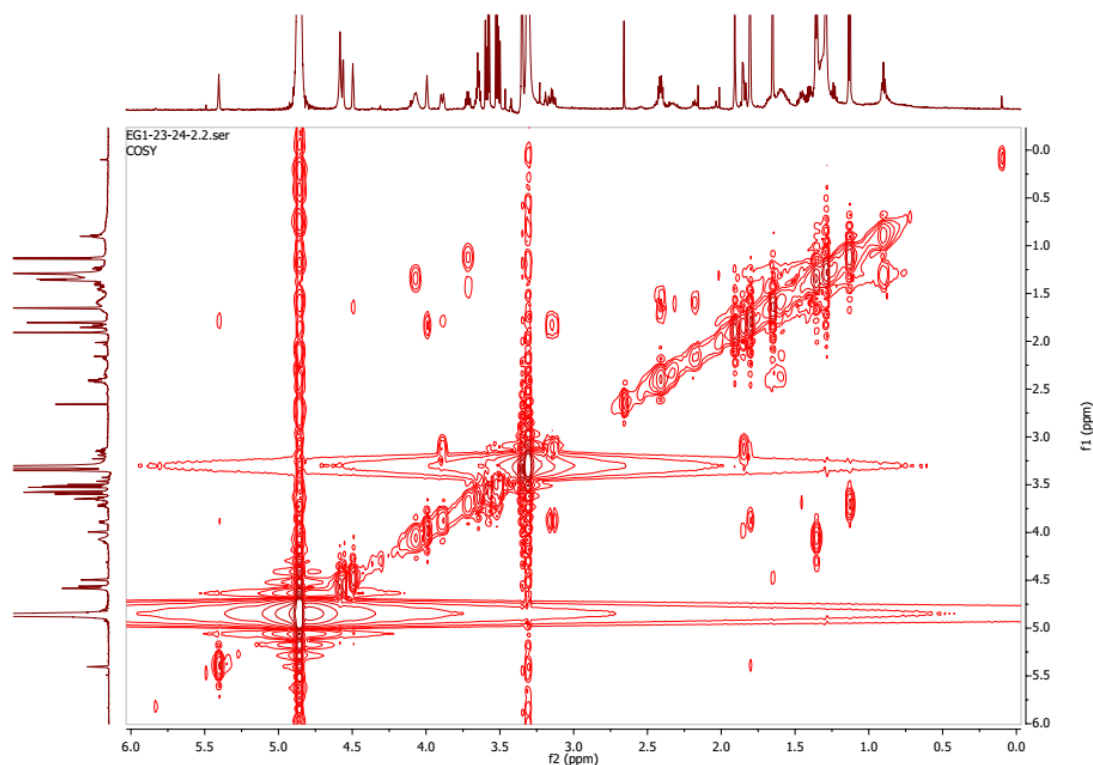


και H4', μία διπλή κορυφή σε  $\delta$  5,40 ( $d, J=1,6$  Hz) που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο ολεφινικό πρωτόνιο δακτυλίου H2, μία ευρεία διπλή κορυφή και μία ευρεία απλή κορυφή σε  $\delta$  4,50 ( $brd, J= 1,62$  Hz) και  $\delta$  4,56 αντίστοιχα, που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H9, μία ευρεία απλή κορυφή σε  $\delta$  3,99 που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο οξυγονωμένου μεθυλενίου H6, μία πολλαπλή κορυφή σε  $\delta$  3,89 που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί σε πρωτόνιο τριτοταγή άνθρακα δακτυλίου σε θέση  $\alpha$  ως προς διπλό δεσμό (H3), μία εξαπλή κορυφή σε  $\delta$  3,72 ( $sx, J=6,2$  Hz) που ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο οξυγονωμένου μεθυλενίου αλειφατικής αλυσίδας H4'', μία πολλαπλή κορυφή σε  $\delta$  3,15 η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο τριτοταγή άνθρακα δακτυλίου H4, μία τριπλή διπλή κορυφή σε  $\delta$  2,40 ( $td, J = 8/2,6$ ) που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια μεθυλενίου H1'', μία απλή κορυφή σε  $\delta$  1,81 που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια η οποία αντιστοιχεί στα πρωτόνια H7 μεθυλίου, μία πολλαπλή κορυφή σε  $\delta$  1,85 που ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια τα οποία αντιστοιχούν στα πρωτόνια H5 μεθυλενίου, δύο πολλαπλές κορυφές από  $\delta$  1,60 σε  $\delta$  1,68 που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H2'' μεθυλενίου αλειφατικής αλυσίδας, μια απλή κορυφή σε  $\delta$  1,65 η οποία ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια H10 μεθυλίου, δύο αλληλεπικαλυπτόμενες πολλαπλές κορυφές σε  $\delta$  1,45 που ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H3'' μεθυλενίου αλειφατικής αλυσίδας και μία διπλή κορυφή σε  $\delta$  1,13 ( $d, J = 6,17$  Hz) που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια H5'' τερματικού μεθυλίου αλειφατικής αλυσίδας δίπλα σε οξυγονωμένο μεθίλιο.



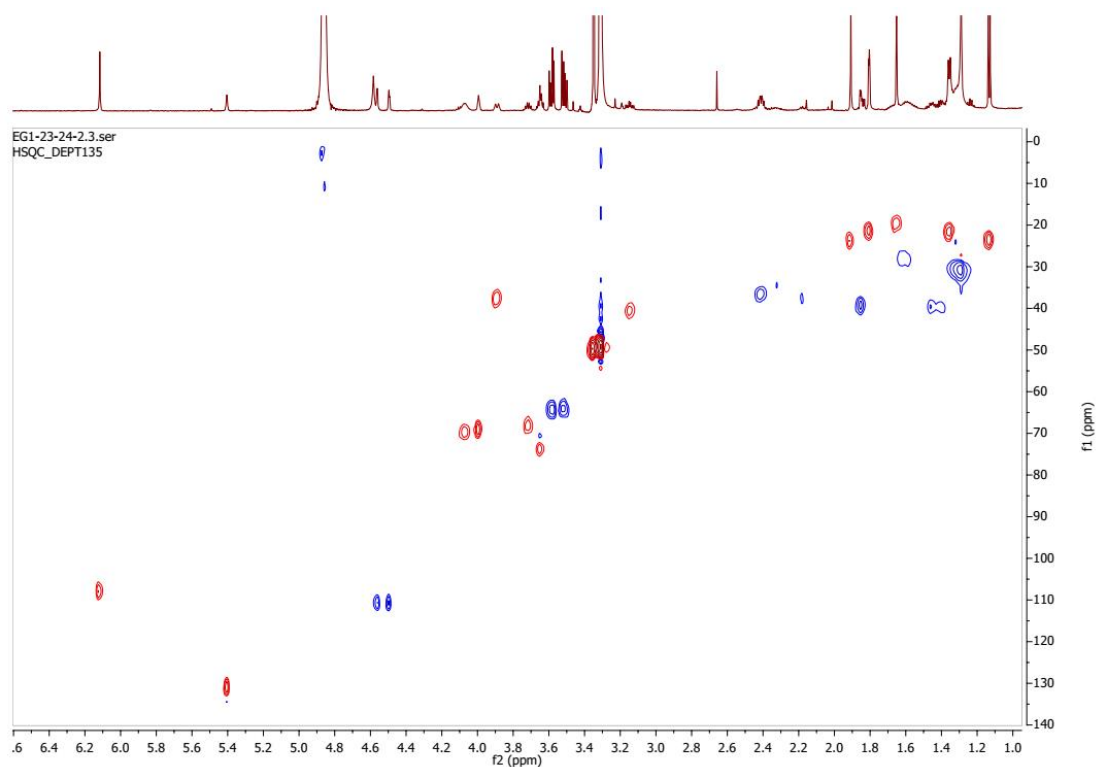
**Εικόνα 61.** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του μεταβολίτη 8 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Στο φάσμα COSY (Εικ.62) παρατηρείται η συσχέτιση των πρωτονίων  $\text{H5}''$  ( $\delta$  1,13) και  $\text{H3}''$  ( $\delta$  1,45) με το πρωτόνιο  $\text{H4}''$  ( $\delta$  3,72) και τις συσχετίσεις  $\text{H2}''\text{-H3}''$  ( $\delta$  1,60-1,68 και  $\delta$  1,45) και  $\text{H2}''\text{-H1}''$  ( $\delta$  1,60-1,68 και  $\delta$  2.40). Επιπλέον, παρατηρούνται οι συσχετίσεις  $\text{H2}\text{-H3}$  ( $\delta$  5,40 και  $\delta$  3,89) και  $\text{H3}\text{-H4}$  ( $\delta$  3,89 και  $\delta$  3,15) και επιπλέον οι συσχετίσεις  $\text{H4}\text{-H5}$  ( $\delta$  3,15 και  $\delta$  1,85) και  $\text{H5}\text{-H6}$  ( $\delta$  1,85 και  $\delta$  3,99).



**Εικόνα 62.** Φάσμα COSY του μεταβολίτη 8 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

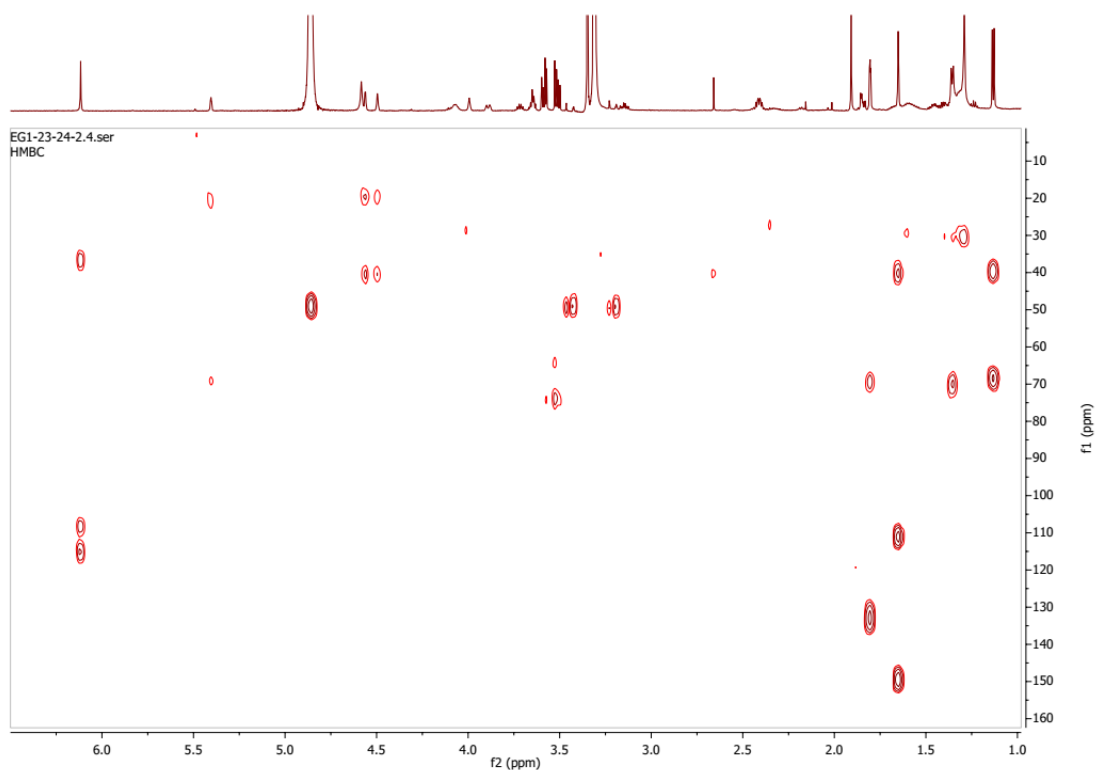
Στο φάσμα HSQC (Εικ.63) παρατηρούνται οι  $J^1$  συσχετίσεις  $H5''-C5''$  ( $\delta$  1,13 και  $\delta$  23,4),  $H4''-C4''$  ( $\delta$  3,72 και  $\delta$  68,4),  $H3''-C3''$  ( $\delta$  1,45 και  $\delta$  39,7),  $H2''-C2''$  ( $\delta$  1,60-1,68 και  $\delta$  27,6) και  $H1''-C1''$  ( $\delta$  2,40 και  $\delta$  36,7) της πλευρικής αλυσίδας. Επιπλέον, παρατηρούνται οι συσχετίσεις  $H2-C2$  ( $\delta$  5,40 και  $\delta$  130,8),  $H3-C3$  ( $\delta$  3,89 και  $\delta$  37,7),  $H4-C4$  ( $\delta$  3,15 και  $\delta$  40,7),  $H5-C5$  ( $\delta$  1,85 και  $\delta$  39,1),  $H6-C6$  ( $\delta$  3,99 και  $\delta$  69,3),  $H7-C7$  ( $\delta$  1,81 και  $\delta$  21,3),  $H9-C9$  ( $\delta$  4,50/4,56 και  $\delta$  110,8), που αντιστοιχεί σε άνθρακα τερματικού μεθυλενίου) και  $H10-C10$  ( $\delta$  1,65 και  $\delta$  19,9) του μονοτερπενικού τμήματος του μορίου. Τέλος, παρατηρούνται οι συσχετίσεις  $H4'/H2'-C4'/C2'$  ( $\delta$  6,08 και  $\delta$  108,0) των πρωτονίων του αρωματικού δακτυλίου.



**Εικόνα 63.** Φάσμα HSQC του μεταβολίτη 8 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Στο φάσμα HMBC (Εικ.64) παρατηρούνται στο κομμάτι της πλευρικής αλυσίδας, οι συσχετίσεις των πρωτονίων H5'' ( $\delta$  1,13) με άνθρακες σε  $\delta$  39,7 και  $\delta$  68,4 που αντιστοιχούν στους άνθρακες C3'' ( $J^3$ ) και C4'' ( $J^2$ ). Στον αρωματικό δακτύλιο παρατηρούνται οι συσχετίσεις του πρωτονίου H4'/H2' ( $\delta$  6,12) με άνθρακες σε  $\delta$  36,7,  $\delta$  108,2 και  $\delta$  115,2 και που αντιστοιχούν στους άνθρακες C1'' ( $J^3$ ), C2'/C4' ( $J^2$ ) και C6' ( $J^3$ ).

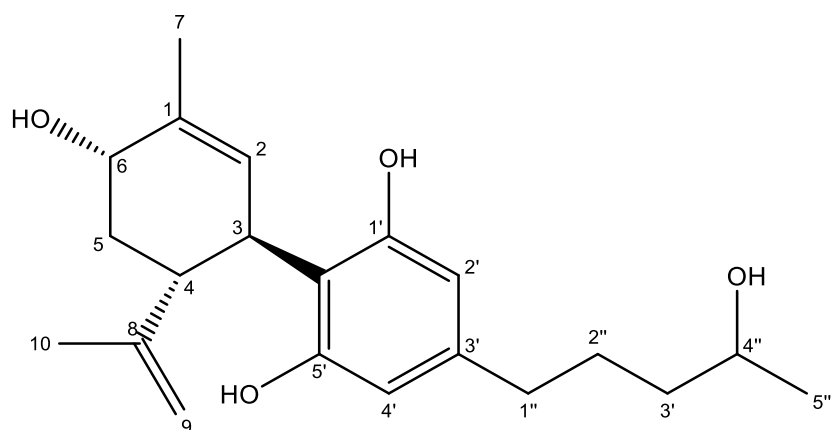
Στο μονοτερπενικό κομμάτι παρατηρούνται οι συσχετίσεις των πρωτονίων H10 ( $\delta$  1,65) με άνθρακες σε  $\delta$  40,7,  $\delta$  111,0 και  $\delta$  149,5 που αντιστοιχούν στους άνθρακες C4 ( $J^3$ ), C9 ( $J^3$ ) και στον τεταρτοταγή άνθρακα C8 ( $J^2$ ), οι συσχετίσεις των πρωτονίων H7 ( $\delta$  1,81) με άνθρακες σε  $\delta$  69,3,  $\delta$  130,8 και 132,7 που αντιστοιχούν στους άνθρακες C6 ( $J^3$ ), C2 ( $J^3$ ) και στον τεταρτοταγή άνθρακα C1 ( $J^2$ ), οι συσχετίσεις των πρωτονίων H9 ( $\delta$  4,43/4,50) με άνθρακες σε  $\delta$  19,9 και  $\delta$  40,7 που αντιστοιχούν στους άνθρακα C10 ( $J^3$ ) και C4 ( $J^3$ ) και τέλος οι συσχετίσεις του πρωτονίου H2 ( $\delta$  5,29) με τους άνθρακες σε  $\delta$  21,3 και σε  $\delta$  69,3 που αντιστοιχεί στους άνθρακες C7 ( $J^3$ ) C6 ( $J^3$ ). Η παρακάτω δομή (Εικ.65) επιβεβαιώθηκε και από τη σύγκριση των πειραματικών τιμών με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Ahmed et al., 2021).



Εικόνα 64. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 8 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Πίνακας 27. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  NMR του μεταβολίτη 8 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

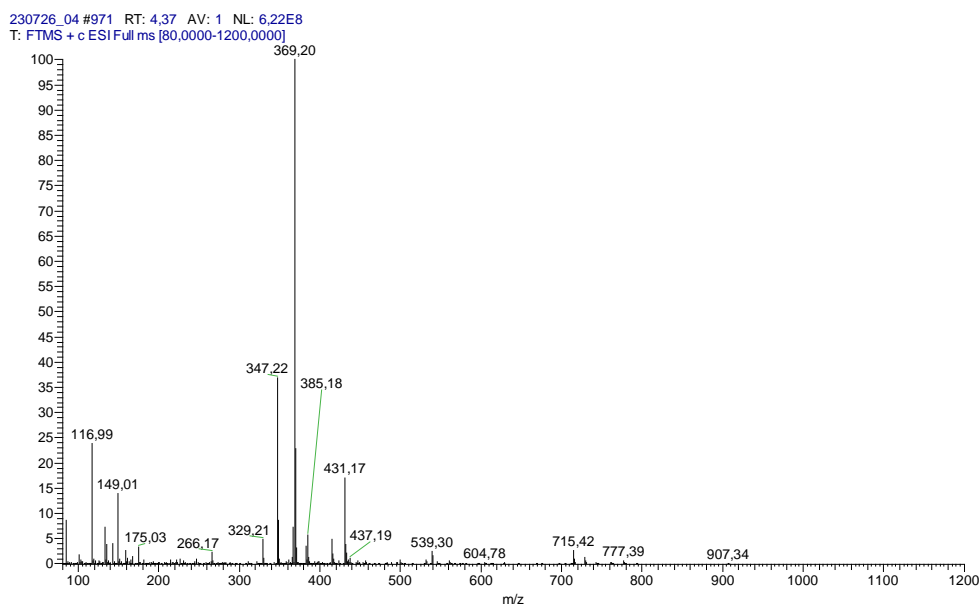
Θέση	$^1\text{H}$ NMR $\delta$ σε ppm ( $J$ σε Hz)	$^{13}\text{C}$ NMR $\delta$ σε ppm
1	-	132,7
2	5,40 (1H, <i>d</i> , $J = 1,6$ )	130,8
3	3,89 (1H, <i>m</i> )	37,7
4	3,15 (1H, <i>m</i> )	40,7
5	1,85 (2H, <i>m</i> )	39,1
6	3,99 (1H, <i>brs</i> )	69,3
7	1,81 (3H, <i>s</i> )	21,3
8	-	149,5
9	4,50 (1H, <i>brd</i> , $J = 1,62$ )/4,56 (1H, <i>m</i> )	110,8
10	1,65 (3H, <i>s</i> )	19,9
1'	-	nd
2'	6,08 (1H, <i>s</i> ) <sup>ov</sup>	108,0
3'	-	nd
4'	6,08 (1H, <i>s</i> ) <sup>ov</sup>	108,0
5'	-	-
6'	-	115,2
1''	2,40 (2H, <i>td</i> , $J = 8,0/2,6$ )	36,7
2''	1,60 (1H, <i>m</i> )/1,68 (1H, <i>m</i> )	27,6
3''	1,45 (2H, <i>m</i> )	39,7
4''	3,72 (1H, <i>sx</i> , $J = 6,2$ )	68,4
5''	1,13 (3H, <i>d</i> , $J = 6,2$ )	23,4

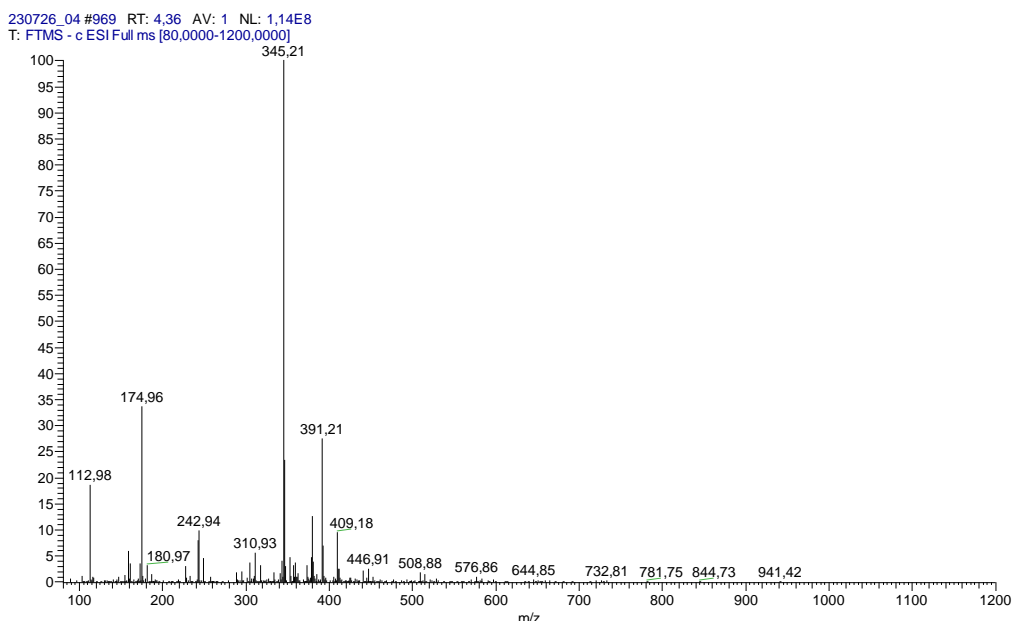


Εικόνα 65. Η χημική δομή του μεταβολίτη 8.

### 3.1.9 Μεταβολίτης 9

Ο μεταβολίτης 9 παραλήφθηκε κατόπιν σειράς χρωματογραφικών διαχωρισμών και ταυτοποιήθηκε ως η 4'',7-διυδροξυ-κανναβιελσοΐνη (Εικ.71) με τη βοήθεια φασματοσκοπικών δεδομένων καθώς και από τα δεδομένα φασματομετρίας μάζας (Εικ.66). Αναλυτικότερα, στα φάσματα HRMS θετικού και αρνητικού ιοντισμού διακρίνονται τα ψευδομοριακά ιόντα  $[M+Na]^+$  με  $m/z$  369,20 και  $[M-H]^-$  με  $m/z$  345,21, που αντιστοιχούν στον μεταβολίτη 9 με μοριακό τύπο  $C_{21}H_{30}O_4$  και μοριακό βάρος 346,4670.

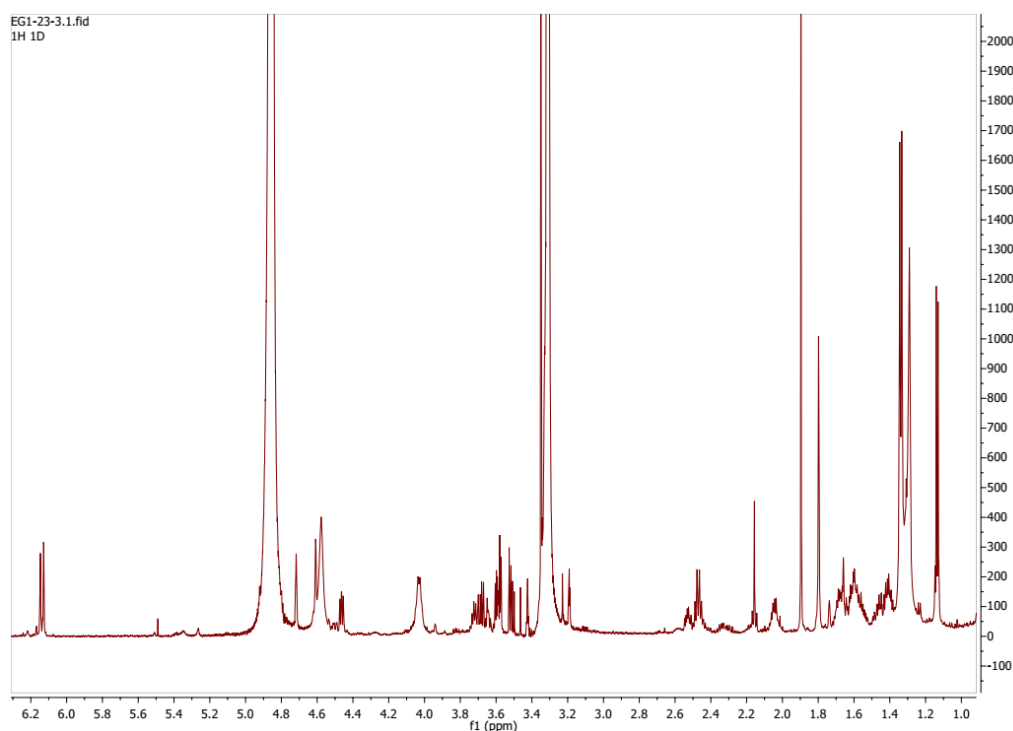




**Εικόνα 66.** Φάσματα μάζας του μεταβολίτη 9.

Από τη μελέτη του φάσματος  $^1\text{H}$  NMR (Εικ.67) παρατηρούνται δύο απλές αλληλεπικαλυπτόμενες κορυφές σε  $\delta$  6,15 και  $\delta$  6,13 οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια αρωματικού δακτυλίου H2' και H4' αντίστοιχα, μία ευρεία διπλή κορυφή και μία ευρεία απλή κορυφή σε  $\delta$  4,61 (*brd*,  $J = 1,88$ ) και  $\delta$  4,72 αντίστοιχα, που ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H9, μια πολλαπλή κορυφή σε  $\delta$  4,46 η οποία αντιστοιχεί σε πρωτόνιο τριτοταγή οξυγονωμένου άνθρακα δακτυλίου (H2), μία εξαπλή κορυφή σε  $\delta$  3,72 (*sx*,  $J = 6,2$  Hz) η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί σε πρωτόνιο οξυγονωμένου μεθυλενίου αλειφατικής αλυσίδας (H4''), δύο πολλαπλές κορυφές σε  $\delta$  3,59 και  $\delta$  3,69 οι οποίες ολοκληρώνουν για ένα πρωτόνιο η καθεμία και αντιστοιχούν στο μεθυλένιο οξυγονωμένου άνθρακα H7, μία τριπλή διπλών κορυφή σε  $\delta$  2,53 (*td*,  $J = 9,1/4,5$  Hz) η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί σε πρωτόνιο τριτοταγή άνθρακα δακτυλίου (H4) μία τριπλή διπλών κορυφή σε  $\delta$  2,47 (*t*,  $J = 7,5$  Hz) η οποία ολοκληρώνει για δύο πρωτόνια και αντιστοιχεί σε πρωτόνια μεθυλενίου (H1''), μια πολλαπλή κορυφή σε  $\delta$  2,05 η οποία ολοκληρώνει για ένα πρωτόνιο και αντιστοιχεί στο πρωτόνιο τριτοταγή άνθρακα H1, δύο πολλαπλές κορυφές σε  $\delta$  1,62 και σε  $\delta$  1,65 που αντιστοιχούν σε μεθυλενικά πρωτόνια (H2''), δύο πολλαπλές κορυφές σε  $\delta$  1,53 και σε  $\delta$  1,67 που αντιστοιχούν σε μεθυλενικά πρωτόνια δακτυλίου (H6), δύο πολλαπλές κορυφές σε  $\delta$  1,42 και σε  $\delta$  1,63 που αντιστοιχούν σε μεθυλενικά πρωτόνια δακτυλίου (H5), δύο αλληλεπικαλυπτόμενες πολλαπλές κορυφές από  $\delta$  1,40 μέχρι  $\delta$  1,48 που ολοκληρώνουν για δύο πρωτόνια και αντιστοιχούν στα πρωτόνια H3'' μεθυλενίου

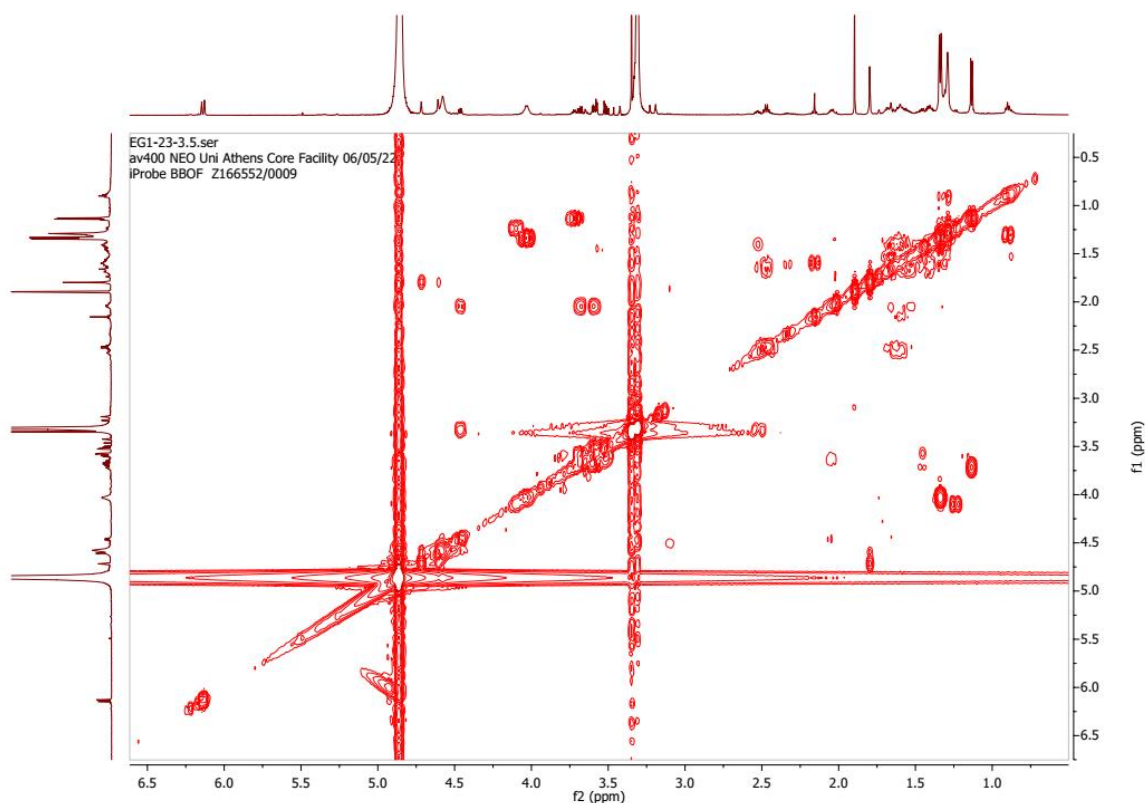
αλειφατικής αλυσίδας και μία διπλή κορυφή σε  $\delta$  1,13 ( $d$ ,  $J = 6,2$  Hz) που ολοκληρώνει για τρία πρωτόνια και αντιστοιχεί στα πρωτόνια H5'' τερματικού μεθυλίου αλειφατικής αλυσίδας δίπλα σε οξυγονωμένο μεθίλιο.



**Εικόνα 67.** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR του μεταβολίτη 9 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

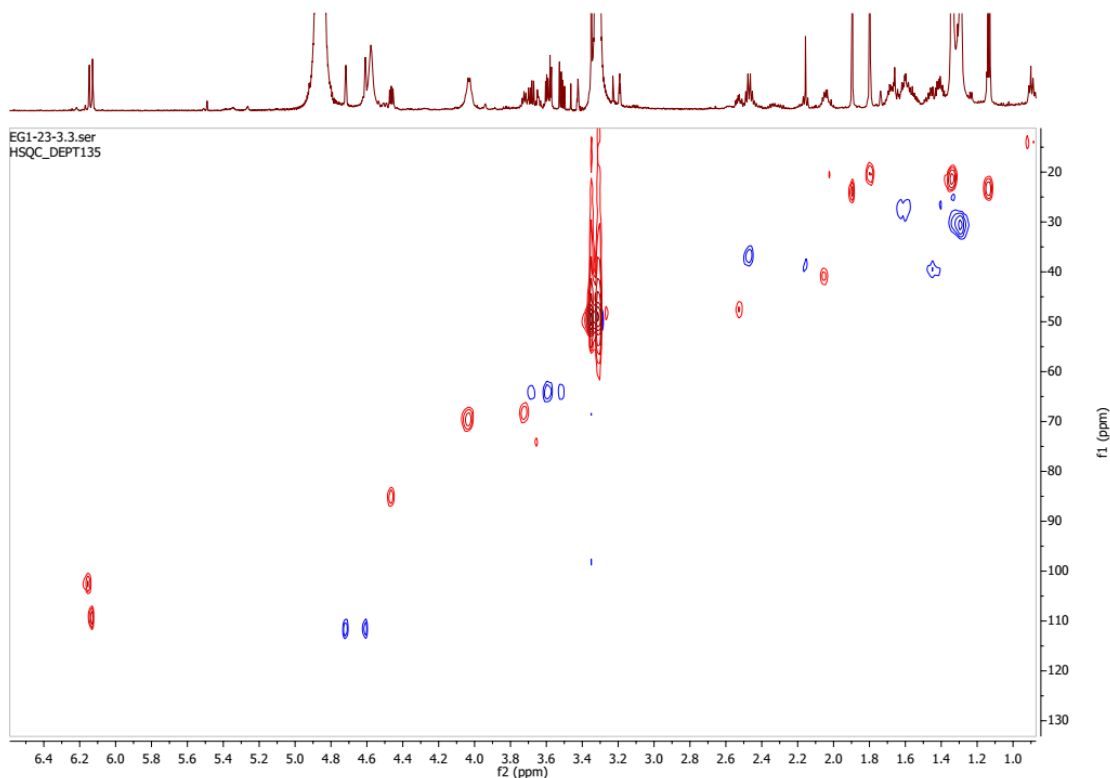
Στο φάσμα COSY (Εικ.68) παρατηρείται η συσχέτιση των πρωτονίων H5'' ( $\delta$  1,13) και H3'' ( $\delta$  1,40-1,48) με το πρωτόνιο H4'' ( $\delta$  3,72). Επιπλέον παρατηρούνται οι συσχετίσεις H2''-H3'' ( $\delta$  1,62/1,65 και  $\delta$  1,40-1,45) και H2''-H1'' ( $\delta$  1,62/1,65 και  $\delta$  2,47). Επίσης, παρατηρούνται οι συσχετίσεις H2-H3 ( $\delta$  4,46 και  $\delta$  3,32) και H3-H4 ( $\delta$  3,32 και  $\delta$  2,53), οι συσχετίσεις H4-H5 ( $\delta$  2,53 και  $\delta$  1,53/1,67), H5-H6 ( $\delta$  1,53/1,67 και  $\delta$  1,42/1,63), H6-H1 ( $\delta$  1,42/1,63 και  $\delta$  2,05) και H1-H7 ( $\delta$  2,05 και  $\delta$  3,59/3,69).





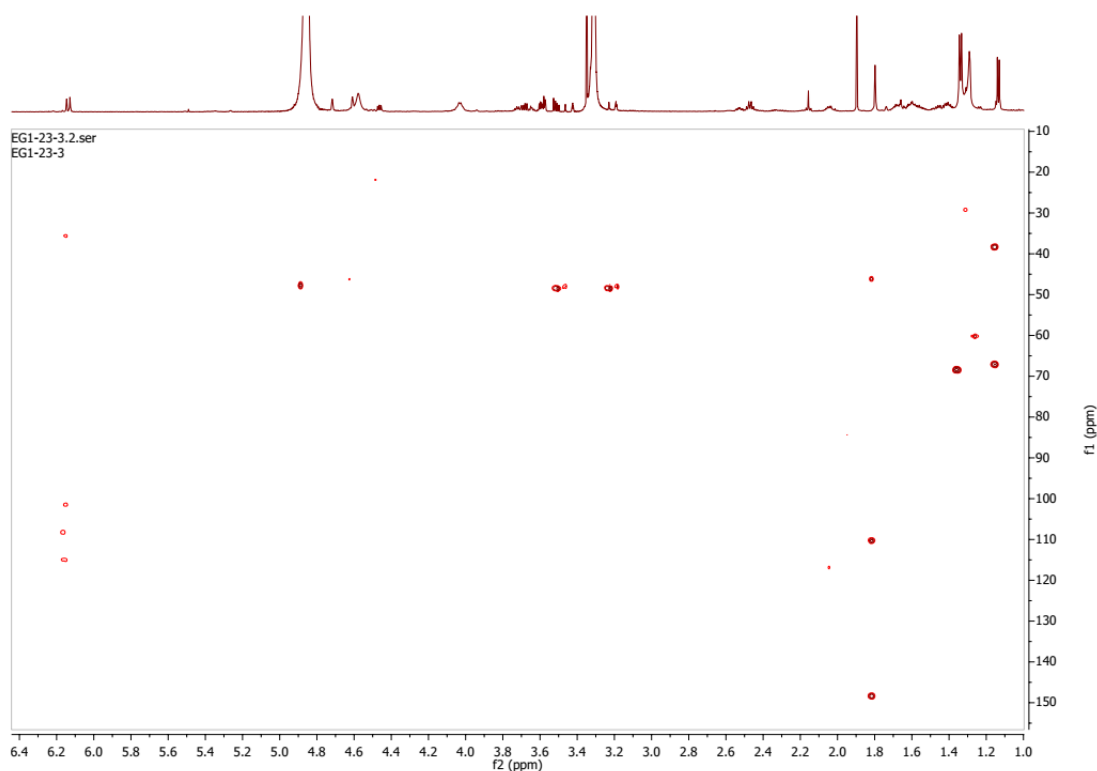
**Εικόνα 68.** Φάσμα COSY του μεταβολίτη 9 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Στο φάσμα HSQC (Εικ.69) παρατηρούνται οι  $J^1$  συσχετίσεις  $H5'' - C5''$  ( $\delta$  1,13 και  $\delta$  22,9),  $H4' - C4''$  ( $\delta$  3,72 και  $\delta$  68,3),  $H3'' - C3''$  ( $\delta$  1,40-1,48 και  $\delta$  39,7),  $H2'' - C2''$  ( $\delta$  1,62/1,65 και  $\delta$  27,7) και  $H1'' - C1''$  ( $\delta$  2,47 και  $\delta$  36,8) της πλευρικής αλυσίδας. Επιπλέον, παρατηρούνται οι συσχετίσεις  $H1-C1$  ( $\delta$  2,05 και  $\delta$  40,9),  $H2 - C2$  ( $\delta$  4,46 και  $\delta$  85,1, αποθωράκιση που αντιστοιχεί σε οξυγονωμένο τριτοταγή άνθρακα δακτυλίου),  $H3-C3$  ( $\delta$  3,31 και  $\delta$  43,7),  $H4-C4$  ( $\delta$  2,53 και  $\delta$  47,6),  $H5-C5$  ( $\delta$  1,42/1,63 και  $\delta$  26,3),  $H6 - C6$  ( $\delta$  1,53/1,67 και  $\delta$  25,8),  $H7 - C7$  ( $\delta$  3,59/3,69 και  $\delta$  64,2),  $H9 - C9$  ( $\delta$  4,61/4,72 και  $\delta$  110,7), που αντιστοιχεί σε άνθρακα τερματικού μεθυλενίου) και  $H10 - C10$  ( $\delta$  1,80 και  $\delta$  20,4) του μονοτερπενικού τμήματος του μορίου. Τέλος, παρατηρούνται οι συσχετίσεις  $H4' - C4'$  ( $\delta$  6,13 και  $\delta$  109,4) και  $H2' - C2'$  ( $\delta$  6,15 και  $\delta$  102,5) των πρωτονίων του αρωματικού δακτυλίου.



**Εικόνα 69.** Φάσμα HSQC του μεταβολίτη 9 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

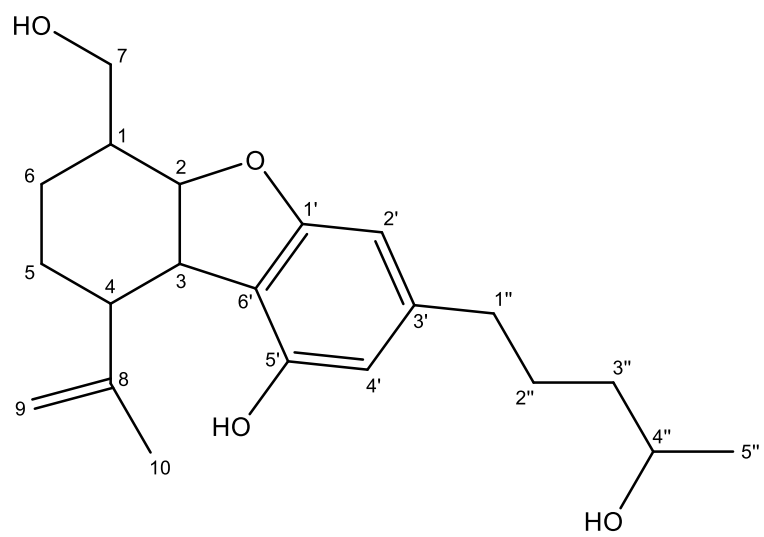
Στο φάσμα HMBC (Εικ.70) παρατηρούνται στο κομμάτι της πλευρικής αλυσίδας, τις συσχετίσεις των πρωτονίων H5'' ( $\delta$  1,13) με άνθρακες σε  $\delta$  39,7 και  $\delta$  68,3 που αντιστοιχούν στους άνθρακες C3'' ( $J^3$ ) και C4'' ( $J^2$ ). Στον αρωματικό δακτύλιο παρατηρούνται οι συσχετίσεις του πρωτονίου H4' ( $\delta$  6,13) με άνθρακες σε  $\delta$  36,8,  $\delta$  102,5 και  $\delta$  115,6 που αντιστοιχούν στους άνθρακες C1'' ( $J^3$ ), C2' ( $J^3$ ) και C6' ( $J^3$ ) και τις συσχετίσεις του πρωτονίου H2' ( $\delta$  6,15) με άνθρακες σε  $\delta$  36,8,  $\delta$  109,4 και  $\delta$  115,6 που αντιστοιχούν στους άνθρακες C1'' ( $J^3$ ), C4' ( $J^3$ ) και C6' ( $J^3$ ). Στο μονοτερπενικό κομμάτι παρατηρούνται οι συσχετίσεις των πρωτονίων H10 ( $\delta$  1,80) με άνθρακες σε  $\delta$  47,6,  $\delta$  110,7 και  $\delta$  149,1 που αντιστοιχούν στους άνθρακες C4 ( $J^3$ ), C9 ( $J^3$ ) και στον τεταρτοταγή άνθρακα C8 ( $J^2$ ), η συσχέτιση του πρωτονίου H4 ( $\delta$  4,46) με άνθρακα σε  $\delta$  20,4 που αντιστοιχεί στον άνθρακα C10 ( $J^3$ ) και η συσχέτιση των πρωτονίων H9 ( $\delta$  4,61 και  $\delta$  4,72) με άνθρακα σε  $\delta$  47,6 που αντιστοιχεί στον άνθρακα C4 ( $J^3$ ). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της αναζήτησης στη βάση δεδομένων 'REAXYS' η προαναφερόμενη ένωση αποτελεί ένα **νέο φυσικό προϊόν**.



Εικόνα 70. Φάσμα HMBC του μεταβολίτη 9 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Πίνακας 28. Φασματοσκοπικά δεδομένα  $^1\text{H}$  και  $^{13}\text{C}$  NMR του μεταβολίτη 9 σε δευτεριωμένη μεθανόλη.

Θέση	$^1\text{H}$ NMR $\delta$ σε ppm ( $J$ σε Hz)	$^{13}\text{C}$ NMR $\delta$ σε ppm
1	2,05 (1H, <i>m</i> )	40,9
2	4,46 (1H, <i>m</i> )	85,1
3	3,32 <sup>ov</sup>	43,7
4	2,53 (1H, <i>td</i> , $J = 9,1/4,5$ )	47,6
5	1,42 (1H, <i>m</i> )/1,63 (1H, <i>m</i> )	26,3
6	1,53 (1H, <i>m</i> )/1,67 (1H, <i>m</i> )	25,8
7	3,59 (1H, <i>m</i> )/3,69 (1H, <i>m</i> )	64,2
8	-	149,1
9	4,61 (1H, <i>brd</i> , $J = 1,88$ )/4,72 (1H, <i>brs</i> )	110,7
10	1,80 (3H, <i>s</i> )	20,4
1'	-	nd
2'	6,15 (1H, <i>s</i> ) <sup>ov</sup>	102,5
3'	-	nd
4'	6,13 (1H, <i>s</i> ) <sup>ov</sup>	109,4
5'	-	nd
6'	-	115,6
1''	2,47 (2H, <i>t</i> , $J = 7,5$ )	36,8
2''	1,62 (1H, <i>m</i> )/1,65 (1H, <i>m</i> )	27,7
3''	1,40 – 1,48 (2H, <i>m</i> )	39,7
4''	3,72 (1H, <i>sx</i> , $J = 6,2$ )	68,3
5''	1,13 (3H, <i>d</i> , $J = 6,2$ )	22,9



**Εικόνα 71.** Η χημική δομή του μεταβολίτη 9.

## Κεφάλαιο 4

### Συμπεράσματα

#### 4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία, από τους 10 ενδοφυτικούς μύκητες που καλλιεργήθηκαν σε στερεά και υγρά θρεπτικά υποστρώματα, τα στελέχη *D. erectus* και *A. candidus* παρουσίασαν το πιο ενδιαφέρον χημικό προφίλ. Στο *D. erectus* πραγματοποιήθηκαν χημικές αναλύσεις και μετά από χρωματογραφικούς διαχωρισμούς απομονώθηκαν συνολικά εννέα μεταβολίτες, όπως συνοπτικά αναφέρονται παρακάτω. Η ταυτοποίησή τους έγινε με τη βοήθεια φασματοσκοπικών δεδομένων NMR και ο προσδιορισμός του ψευδομοριακού ιόντος έγινε με τη χρήση φασματομετρίας μάζας.

Το είδος *D. erectus* είναι ομοιοτυπικά συνώνυμο με τον μύκητα *Chaetomium erectum*, το οποίο ταυτοποιήθηκε από τους Skolko και J.W. Groves το 1948. Η αναφορά του ως *D. erectus* έγινε το 2016 από τους X. Wei Wang & Samson. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγεί και την ικανότητα του στελέχους αυτού να βιομετατρέπει κανναβινοειδή, καθώς ανά καιρούς έχουν γίνει αναφορές βιομετατροπής από μύκητες του γένους *Chaetomium*, όπως το *C. globosum*.

Πρόέκυψαν τρία νέα φυσικά προϊόντα, τα οποία είναι αποτέλεσμα βιομετατροπής της CBD από το στέλεχος του μύκητα που μελετήθηκε. Τα νέα προϊόντα ταυτοποιήθηκαν ως 4''-υδροξυ-δεϋδροκανναβιελσοΐνη, 4''-υδροξυ-κανναβιδιολαλδεΐδη και 4'',7-διυδροξυ-κανναβιελσοΐνη. Οι υπόλοιποι έξι μεταβολίτες, 4-υδροξυ-βενζαλδεΐδη (Gurta et al., 2016), κυκλο-(L-προλυλ-L-φαινυλαλανίνη) (Harizani et al., 2020), κυκλο-(L-προλυλ-L-τυροσίνη) (Harizani et al., 2020), 4'',7-διυδροξυ-κανναβιδιόλη (Αντωνόπουλος, 2021), (6*R*,4''*S*)-6,4''-διυδροξυ-κανναβιδιόλη (Ahmed et al., 2021) και (6*S*,4''*S*)-6,4''-διυδροξυ-κανναβιδιόλη (Ahmed et al., 2021) αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Τα ανωτέρω έξι προϊόντα, σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, αναφέρονται πρώτη φορά από τον *D. erectus*:

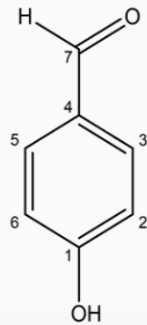
- 4'',7-διυδροξυ-κανναβιδιόλη (προϊόν βιομετατροπής της CBD από τον μύκητα *C. globosum*, Αντωνόπουλος, 2021)
- κυκλο-(L-προλυλ-L-φαινυλαλανίνη) και κυκλο-(L-προλυλ-L-τυροσίνη) (προϊόντα βακτηριακής προελεύσεως (Harizani et al., 2020) και μυκήτων)
- (6*R*,4''*S*)-6,4''-διυδροξυ-κανναβιδιόλη και (6*S*,4''*S*)-6,4''-διυδροξυ-κανναβιδιόλη (προϊόντα βιομετατροπής μυκήτων, Ahmed et al., 2021)
- 4-υδροξυ-βενζαλδεΐδη (προϊόν πολλών οργανισμών)

Η ανακάλυψη αυτή συμπληρώνει την έρευνα γύρω από τους ενδοφυτικούς μύκητες που συναντώνται στη κάνναβη, δεδομένου ότι ενισχύει την άποψη ότι οι μύκητες αυτοί προάγουν την παραγωγή μιας ποικιλίας μεταβολιτών και συμβάλλουν στη μετατροπή της δομής διαφόρων ενώσεων. Οι πληροφορίες αυτές πρέπει να ληφθούν υπόψη από την

επιστημονική κοινότητα, ώστε να αξιοποιηθούν οι νέοι μεταβολίτες που ανευρίσκονται, προς όφελος του ανθρώπου, δηλαδή ως ουσίες φαρμακευτικών σκευασμάτων με θεραπευτική δράση έναντι παθολογικών ή ψυχικών διαταραχών του ανθρώπου.

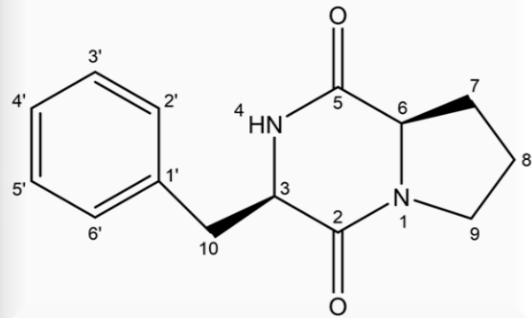
### Μεταβολίτης 1

4-υδροξυ-βενζαλδεΐδη



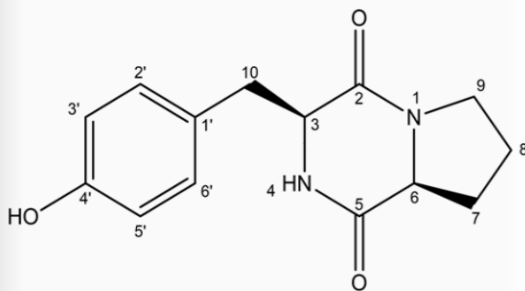
### Μεταβολίτης 2

κυκλο-(L-προλυλ-L-φαιτυλαλανίνη)



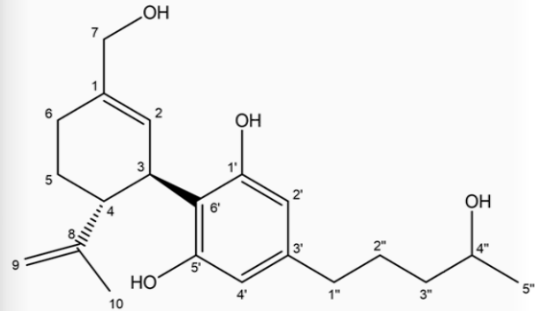
### Μεταβολίτης 3

κυκλο-(L-προλυλ-L-τυροσίνη)



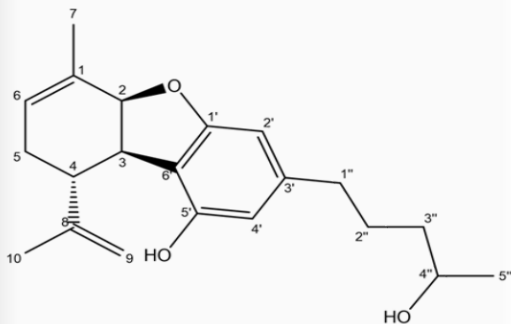
### Μεταβολίτης 4

4'',7-διυδροξυ-κανναβιδιόλη



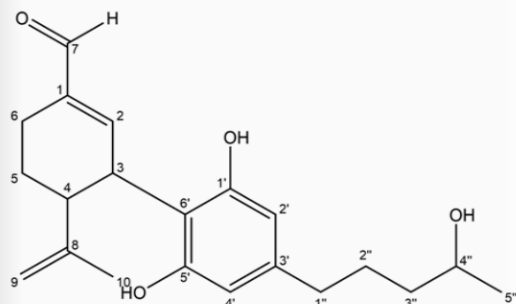
### Μεταβολίτης 5 (Νέο φυσικό προϊόν)

4''-υδροξυ-δεϋδροκανναβιελσοΐνη



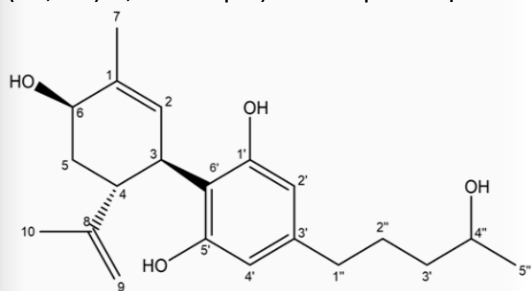
### Μεταβολίτης 6 (Νέο φυσικό προϊόν)

4''-υδροξυ-κανναβιδιολαλδεΐδη



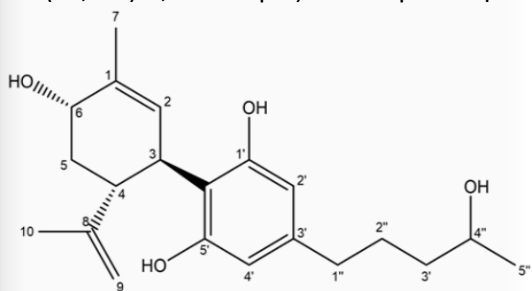
### Μεταβολίτης 7

(6*R*,4''*S*)-6,4''-διυδροξυ-κανναβιδιόλη



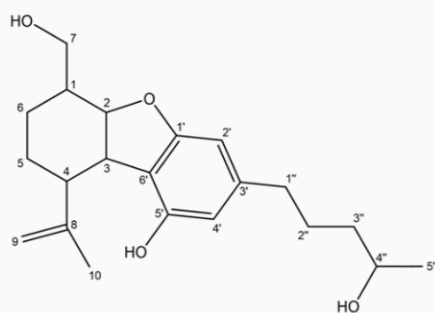
### Μεταβολίτης 8

(6*S*,4''*S*)-6,4''-διυδροξυ-κανναβιδιόλη



### Μεταβολίτης 9 (Νέο φυσικό προϊόν)

4'',7-διυδρο ξυ-κανναβιελσίνη





# Βιβλιογραφία

## Ξένη βιβλιογραφία

- Abbott, B. J., Fukuda, D. S., & Archer, R. A. (1977). Microbiological transformation of cannabinoids. *Experientia*, *33*, 718–720.
- Abdel-Azeem, A. M., Abdel-Azeem, M. A., & Khalil, W. F. (2019). Chapter 21 - Endophytic Fungi as a New Source of Antirheumatoid Metabolites. In R. R. Watson & V. R. Preedy (Eds.), *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases (Second Edition)* (pp. 355–384). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813820-5.00021-0>
- Ahmed Amany K.; Radwan Mohamed M.; Slade Desmond; Chandra Suman; Khan Ikhlas A.; ElSohly Mahmoud A., S. A. ; I. (2021). Microbial Biotransformation of Cannabidiol (CBD) from *Cannabis sativa*. *Planta Medica*, *88*(05), 389–397. <https://doi.org/10.1055/a-1468-3781>
- Ahmed, S., Ibrahim, A., Radwan, M., Slade, D., Chandra, S., Khan, I., & Elsohly, M. (2021). Microbial Biotransformation of Cannabidiol (CBD) from *Cannabis sativa*. *Planta Medica*, *88*. <https://doi.org/10.1055/a-1468-3781>
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., & Blackwell, M. (1996). *Introductory mycology*. (Issue Ed. 4). John Wiley and Sons.
- Aliferis, K. A., & Bernard-Perron, D. (2020). Cannabinomics: Application of Metabolomics in *Cannabis (Cannabis sativa L.)* Research and Development. *Frontiers in Plant Science*, *11*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.00554>
- Anon, 2021. Ascomycota- The Sac Fungi. Biology for Majors II (Lumen). Available at: <https://bio.libretexts.org/@go/page/43924>
- Anon, 2022. Ascomycota - The Sac Fungi. General Biology. Available at: <https://bio.libretexts.org/@go/page/13606>
- Babu, P. R., & Sarma, V. V. (2019). Chapter 11 - Fungi as Promising Biofuel Resource. In J. S. Singh & D. P. Singh (Eds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 149–164). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64191-5.00011-0>
- Berenji, J., Sikora, V., Fournier, G., & Beherec, O. (2013). Genetics and selection of hemp. In *Hemp: industrial production and uses* (pp. 48–71). CABI Wallingford UK.
- Binder, M. (1976). Microbial Transformation of (-)- $\Delta^1$ -3, 4-trans-Tetrahydrocannabinol by *Cunninghamella blakesleeana* Lender. *Helvetica Chimica Acta*, *59*(5), 1674–1684.
- Binder, M., & Meisenberg, G. (1978). Microbial transformation of cannabinoids: Part 2; A screening of different microorganisms. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, *5*, 37–50.
- Binder, M., & Popp, A. (1980). Microbial transformation of cannabinoids. Part 3: Major metabolites of (3R, 4R)- $\Delta^1$ -tetrahydrocannabinol. *Helvetica Chimica Acta*, *63*(8), 2515–2518. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/hlca.19800630846>

- Brader, G., Compant, S., Vescio, K., Mitter, B., Trognitz, F., Ma, L.-J., & Sessitsch, A. (2017). Ecology and genomic insights into plant-pathogenic and plant-nonpathogenic endophytes. *Annual Review of Phytopathology*, *55*, 61–83.
- Bugni, T. S. (2003). *Investigation of marine-derived fungi for bioactive natural products*. The University of Utah.
- Campos, A. C., Moreira, F. A., Gomes, F. V., Del Bel, E. A., & Guimaraes, F. S. (2012). Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *367*(1607), 3364–3378.
- Cascini, F., & Boschi, I. (2017). Chapter e1 - Tetrahydrocannabinol Concentration and Genetic Characterization of Cannabis. In V. R. Preedy (Ed.), *Handbook of Cannabis and Related Pathologies* (pp. e1–e10). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800756-3.00003-X>
- Chandra, S., Lata, H., Khan, I. A., & ElSohly, M. A. (2017). *Cannabis sativa* L.: Botany and horticulture. *Cannabis Sativa I.-Botany and Biotechnology*, 79–100.
- Cheek, M., Nic Lughadha, E., Kirk, P., Lindon, H., Carretero, J., Looney, B., Douglas, B., Haelewaters, D., Gaya, E., & Llewellyn, T. (2020). New scientific discoveries: Plants and fungi. *Plants, People, Planet*, *2*(5), 371–388.
- Cole, G. T. (1996). Basic biology of fungi. *Medical Microbiology. 4th Edition*.
- Cousin, M. A. (2014). FUNGI | Classification of the Eukaryotic Ascomycetes. In C. A. Batt & M. Lou Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 35–40). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00137-3>
- Deacon, J. W. (2005). *Fungal biology*. John Wiley & Sons.
- Devinsky, O., Cilio, M. R., Cross, H., Fernandez-Ruiz, J., French, J., Hill, C., Katz, R., Di Marzo, V., Jutras-Aswad, D., & Notcutt, W. G. (2014). Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia*, *55*(6), 791–802.
- Fashola, M. O., Ajilogba, C. F., Aremu, B. R., & Babalola, O. O. (2023). Chapter 7 - Airborne fungi and mycotoxins. In M. O. Ilori, O. S. Obayori, & L. B. Salam (Eds.), *Aeromicrobiology* (pp. 147–175). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-96122-6.00007-4>
- Fleming, A., 1929. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzae. *Br. J. Exp. Pathol.* *10*, 226–236.
- Gadd, G. M. (2007). Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research*, *111*(1), 3–49.
- Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H. C., Rivera, J., & Trevijano-Contador, N. (2020). The fungal cell wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* species. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 2993.
- Gaunitz, F., Dahm, P., Mogler, L., Thomas, A., Thevis, M., & Mercer-Chalmers-Bender, K. (2019). In vitro metabolic profiling of synthetic cannabinoids by pooled human liver

- microsomes, cytochrome P450 isoenzymes, and *Cunninghamella elegans* and their detection in urine samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(16), 3561–3579. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01837-8>
- Gautam, A. K., Kant, M., & Thakur, Y. (2013). Isolation of endophytic fungi from *Cannabis sativa* and study their antifungal potential. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46(6), 627–635.
- Gould, A. B. (2009). Fungi: Plant Pathogenic. In M. Schaechter (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)* (pp. 457–477). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00347-3>
- Govindarajan, R. K., Mishra, A. K., Cho, K.-H., Kim, K.-H., Yoon, K. M., & Baek, K.-H. (2023). Biosynthesis of Phytocannabinoids and Structural Insights: A Review. *Metabolites*, 13(3), 442.
- Gülck, T., & Møller, B. L. (2020). Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 25(10), 985–1004. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.05.005>
- Gupta, P. K. (2018). Chapter 15 - Veterinary toxicology. In P. K. Gupta (Ed.), *Illustrated Toxicology* (pp. 427–517). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813213-5.00015-8>
- Gupta, S., Chaudhary, P., Srivastava, V., & Kandasamy, J. (2016). A chemoselective ipso-hydroxylation of arylboronic acids using urea-hydrogen peroxide under catalyst free condition. *Tetrahedron Letters*, 57(23), 2506–2510. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.04.099>
- Hajirahimkhan, S., Hefferon, K., & Jackowitz, N. (2023). 3.05 - The Functional Compounds of *Cannabis sativa*. In P. Ferranti (Ed.), *Sustainable Food Science - A Comprehensive Approach* (pp. 51–59). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823960-5.00044-5>
- Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M., & Sessitsch, A. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293–320.
- Harizani, M., Katsini, E., Georgantea, P., Roussis, V., & Ioannou, E. (2020). New Chlorinated 2,5-Diketopiperazines from Marine-Derived Bacteria Isolated from Sediments of the Eastern Mediterranean Sea. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25. <https://doi.org/10.3390/molecules25071509>
- Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology Spectrum*, 5(4), 10–1128.
- Hesami, M., Baiton, A., Alizadeh, M., Pepe, M., Torkamaneh, D., & Jones, A. (2021). Advances and Perspectives in Tissue Culture and Genetic Engineering of Cannabis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 5671. <https://doi.org/10.3390/ijms22115671>
- Hussain, T., Jeena, G., Pitakbut, T., Vasilev, N., & Kayser, O. (2021). *Cannabis sativa* research trends, challenges, and new-age perspectives. *Iscience*, 24(12).

- Jia, M., Chen, L., Xin, H.-L., Zheng, C.-J., Rahman, K., Han, T., & Qin, L.-P. (2016). A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 906.
- Kaba, A., & Ray, S. D. (2023). Cannabinoids. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.00380-8>
- Khalsa, J. H., Bunt, G., Blum, K., Maggirwar, S. B., Galanter, M., & Potenza, M. N. (2022). Cannabinoids as medicinals. *Current Addiction Reports*, 9(4), 630–646.
- Kusari, P., Kusari, S., Spiteller, M., & Kayser, O. (2012). Endophytic fungi harbored in *Cannabis sativa* L.: Diversity and potential as biocontrol agents against host plant-specific phytopathogens. *Fungal Diversity*, 60, 131–151. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-0216-3>
- Kusari, P., Kusari, S., Spiteller, M., & Kayser, O. (2013). Endophytic fungi harbored in *Cannabis sativa* L.: diversity and potential as biocontrol agents against host plant-specific phytopathogens. *Fungal Diversity*, 60, 137–151.
- Kusari, P., Kusari, S., Spiteller, M., & Kayser, O. (2017). Cannabis Endophytes and Their Application in Breeding and Physiological Fitness. In S. Chandra, H. Lata, & M. A. ElSohly (Eds.), *Cannabis sativa L. - Botany and Biotechnology* (pp. 419–437). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6\\_20](https://doi.org/10.1007/978-3-319-54564-6_20)
- Kusari, P., Spiteller, M., Kayser, O., & Kusari, S. (2014). Recent Advances in Research on *Cannabis sativa* L. Endophytes and Their Prospect for the Pharmaceutical Industry. In R. N. Kharwar, R. S. Upadhyay, N. K. Dubey, & R. Raghuwanshi (Eds.), *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security* (pp. 3–15). Springer India. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-1801-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1801-2_1)
- Lubna, Asaf, S., Hamayun, M., Gul, H., Lee, I.-J., Hussain, A., 2018. *Aspergillus niger* CSR3 regulates plant endogenous hormones and secondary metabolites by producing gibberellins and indoleacetic acid. *J. Plant Interact.* 13, 100–111. <https://doi.org/10.1080/17429145.2018.1436199>
- Malviya, R., Bansal, V., Pal, O. P., & Sharma, P. K. (2010). High performance liquid chromatography: a short review. *Journal of Global Pharma Technology*, 2(5), 22–26.
- McClanahan, R. H. (1985). *MICROBIAL AND CHEMICAL TRANSFORMATIONS OF CANNABINOIDS AND RELATED ALKYL PHENOLS (MARIHUANA, BIOTRANSFORMATION, NITROCANNABINOIDS, METABOLISM, OLIVETOL)*. The Ohio State University.
- McClanahan, R. H., & Robertson, L. W. (1984). Biotransformation of olivetol by *Syncephalastrum racemosum*. *Journal of Natural Products*, 47(5), 828–834.
- McCoy, P. (2016). *Radical mycology: A treatise on seeing and working with fungi*. Chthaeus press Portland, OR, USA.
- Mishra, S. R. (2005). *Morphology of fungi*. Discovery Publishing House.
- Morton, J. B. (2021). 6 - Fungi. In T. J. Gentry, J. J. Fuhrmann, & D. A. Zuberer (Eds.), *Principles and Applications of Soil Microbiology (Third Edition)* (pp. 149–170). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820202-9.00006-X>

- Murillo-Rodríguez, E. (2008). The role of the CB1 receptor in the regulation of sleep. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 32(6), 1420–1427. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2008.04.008>
- Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*, 94(6), 2101–2137.
- Nisa, H., Kamili, A. N., Nawchoo, I. A., Shafi, S., Shameem, N., & Bandh, S. A. (2015). Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: a review. *Microbial Pathogenesis*, 82, 50–59.
- Pereira, J., & Wiegand, T. (2014). Marijuana. In P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)* (pp. 157–159). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00745-4>
- Punja, Z. K., & Scott, C. (2023). Organically grown cannabis (*Cannabis sativa* L.) plants contain a diverse range of culturable epiphytic and endophytic fungi in inflorescences and stem tissues. *Botany*.
- Qadri, M., Johri, S., Shah, B.A., Khajuria, A., Sidiq, T., Lattoo, S.K., Abdin, M.Z., Riyaz-Ul-Hassan, S., 2013. Identification and bioactive potential of endophytic fungi isolated from selected plants of the Western Himalayas. *SpringerPlus* 2, 8. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-8>
- Qiu, J., Hou, K., Li, Q., Chen, J., Li, X., Hou, H., Wang, L., Liu, J., Xue, Q., & Wang, C. (2022). Boosting the Cannabidiol Production in Engineered *Saccharomyces cerevisiae* by Harnessing the Vacuolar Transporter BPT1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(38), 12055–12064.
- Quandt, C. A., & Haelewaters, D. (2021). Phylogenetic Advances in Leotiomycetes, an Understudied Clade of Taxonomically and Ecologically Diverse Fungi. In Ó. Zaragoza & A. Casadevall (Eds.), *Encyclopedia of Mycology* (pp. 284–294). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819990-9.00052-4>
- Richards, T. A., Leonard, G., & Wideman, J. G. (2017). What defines the “kingdom” fungi? *Microbiology Spectrum*, 5(3), 3–5.
- Robertson LW, Lyle MA (1975) Biotransformation of cannabinoids by *Syncephalastrum racemosum*. *Biol Mass Spectrom* 2:266–271
- Robertson, L. W., Lyle, M. A., & Billels, S. (1975). Biotransformation of cannabinoids by *Syncephalastrum racemosum*. *Biomedical Mass Spectrometry*, 2(5), 266–271. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bms.1200020505>
- Robertson LW, Huff SR, Ghosh A, Malhotra R (1978a) Acidic biotransformation products of cannabinoids produced by *Mycobacterium rhodochrous*. *Lloydia* 41:659
- Robertson LW, Koh SW, Huff SR, Malhotra RK, Ghosh A (1978b) Microbiological oxidation of pentyl side-chain of cannabinoids. *Experientia* 34:1020–1022
- Sarao, A. K. (2006). *Microbial biotransformation of cannabinoids*.

- Saroz, Y., Kho, D. T., Glass, M., Graham, E. S., & Grimsey, N. L. (2019). Cannabinoid receptor 2 (CB2) signals via G-alpha-s and induces IL-6 and IL-10 cytokine secretion in human primary leukocytes. *ACS Pharmacology & Translational Science*, *2*(6), 414–428.
- Scott, M., Rani, M., Samsatly, J., Charron, J.-B., & Jabaji, S. (2018). Endophytes of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) cultivars: identification of culturable bacteria and fungi in leaves, petioles, and seeds. *Canadian Journal of Microbiology*, *64*(10), 664–680.
- Singh, G., Bhalla, A., Kaur, P., Capalash, N., & Sharma, P. (2011). Laccase from prokaryotes: a new source for an old enzyme. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, *10*, 309–326.
- Straiker, A. J., Maguire, G., Mackie, K., & Lindsey, J. (1999). Localization of cannabinoid CB1 receptors in the human anterior eye and retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *40*(10), 2442–2448.
- Tadych, M., & White, J. F. (2009). Endophytic Microbes. In M. Schaechter (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology (Third Edition)* (pp. 431–442). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00328-X>
- Taghinasab Phd, M., & Jabaji, S. (2020). Cannabis Microbiome and the Role of Endophytes in Modulating the Production of Secondary Metabolites: An Overview. *Microorganisms*, *8*, 355. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030355>
- Tahir, M. N., Shahbazi, F., Rondeau-Gagné, S., & Trant, J. F. (2021). The biosynthesis of the cannabinoids. *Journal of Cannabis Research*, *3*(1), 1–12.
- Tudzynski, B. (2014). Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Frontiers in Microbiology*, *5*, 656.
- Upadhyay, P., Shrivastava, R., & Agrawal, P. K. (2016). Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech*, *6*(1), 15.
- Varma, A., & Kharkwal, A. C. (2009). Symbiotic fungi. *Springer*, *10*, 973–978.
- Vidic, H., Hoyer, G., Kielich, K., & Rosenberg, D. (1976). Mikrobiologische Umwandlungen nichtsteroider Strukturen. IX Mikrobiologische Hydroxylierung von  $\Delta^8$ -Tetrahydrocannabinol. *Chemische Berichte*, *109*(11), 3606–3614.
- Volk, T. J. (2013). Fungi. In S. A. Levin (Ed.), *Encyclopedia of Biodiversity (Second Edition)* (pp. 624–640). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384719-5.00062-9>
- Watanabe, S., Iwai, T., Matsushita, R., Nakanishi, T., Kuzhiumparambil, U., Fu, S., & Seto, Y. (2022). Comparison between human liver microsomes and the fungus *Cunninghamella elegans* for biotransformation of the synthetic cannabinoid JWH-424 having a bromonaphthyl moiety analysed by high-resolution mass spectrometry. *Forensic Toxicology*, *40*(2), 278–288. <https://doi.org/10.1007/s11419-022-00612-2>
- Watanabe, S., Kuzhiumparambil, U., & Fu, S. (2018). In vitro metabolism of synthetic cannabinoid AM1220 by human liver microsomes and *Cunninghamella elegans* using liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. *Forensic Toxicology*, *36*(2), 435–446. <https://doi.org/10.1007/s11419-018-0424-y>

- Watanabe, S., Kuzhiumparambil, U., Nguyen, M. A., Cameron, J., & Fu, S. (2017). Metabolic profile of synthetic cannabinoids 5F-PB-22, PB-22, XLR-11 and UR-144 by *Cunninghamella elegans*. *The AAPS Journal*, *19*, 1148–1162.
- Watanabe, S., Kuzhiumparambil, U., Winiarski, Z., & Fu, S. (2016). Biotransformation of synthetic cannabinoids JWH-018, JWH-073 and AM2201 by *Cunninghamella elegans*. *Forensic Science International*, *261*, 33–42. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.12.023>
- Wijayawardene, N. N., Hyde, K. D., Al-Ani, L. K. T., Tedersoo, L., Haelewaters, D., Rajeshkumar, K. C., Zhao, R. L., Aptroot, A., Leontyev, D. V., & Saxena, R. K. (2020). Outline of Fungi and fungus-like taxa. *Mycosphere Online: Journal of Fungal Biology*, *11*(1), 1060–1456.
- Wijayawardene, N. N., Hyde, K. D., & Dai, D.-Q. (2021). Outline of Ascomycota. In Ó. Zaragoza & A. Casadevall (Eds.), *Encyclopedia of Mycology* (pp. 246–254). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819990-9.00064-0>
- Wilson AM, Wilken PM, van der Nest MA, Wingfield MJ, Wingfield BD. It's All in the Genes: The Regulatory Pathways of Sexual Reproduction in Filamentous Ascomycetes. *Genes* (Basel). 2019 Apr 30;10(5):330. doi: 10.3390/genes10050330. PMID: 31052334; PMCID: PMC6562746.
- Wynns AA. Convergent evolution of highly reduced fruiting bodies in Pezizomycotina suggests key adaptations to the bee habitat. *BMC Evol Biol*. 2015 Jul 21;15:145. doi: 10.1186/s12862-015-0401-6. PMID: 26194954; PMCID: PMC4509751

### Ελληνική Βιβλιογραφία

1. Αντωνόπουλος Ρ. (2021). «Μελέτη της μετατροπής της κανναβιδιόλης από ενδοφυτικούς μύκητες της κάνναβης». Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία, ΕΚΠΑ. Αθήνα. 8-20 σελ.
2. Η Εφημερίδα των Συντακτών (2021). «Κανναβιδιόλη (CBD): Η ουσία που χαρίζει ευεξία και θωρακίζει τον οργανισμό». Αθήνα
3. Θωλμούδη Ε. (2018). «Απομόνωση και χαρακτηρισμός ενδοφυτικών μικροοργανισμών από το *Teucrium polium*». Μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία, ΓΠΑ. Αθήνα. 13-33 σελ.
4. Κωνσταντίνου Ν. 2022. Μορφολογική και μοριακή μελέτη ενδοφυτικών μυκήτων απομονωμένων από την κλωστική κάνναβη. Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ
5. Ξένου Π. (2022). «Εδώδιμη κάνναβη: Βιοδραστικές ουσίες, αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση». Προπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, ΠΑΔΑ. Αθήνα. 22 σελ.
6. Χανδρινού Δ. (2019). «Σχεδιασμός και Σύνθεση νέων κανναβινομιμητικών ενώσεων». Μεταπτυχιακή διπλωματική διατριβή, ΕΚΠΑ. Αθήνα. 12-27 σελ.

## Ιστότοποι

1. Analysis of 17 Cannabinoids in Hemp and Cannabis. Διαθέσιμο σε:  
<https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/technical-documents/protocol/analytical-chemistry/small-molecule-hplc/analysis-of-cannabinoids>
2. Minagric. Διαθέσιμο σε:  
[https://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/KANABH/odhgos\\_kaliergeias2021\\_Cannabis.pdf](https://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/KANABH/odhgos_kaliergeias2021_Cannabis.pdf)
3. Κοινότητα SCIRE (2020). «Κάναβη (Μαριχουάνα) και Κανναβινοειδή». Διαθέσιμο σε:  
<https://community.scireproject.com/wp-content/uploads/SCIRE-C.-Cannabis.-5-Download.-Greek.pdf>
4. Euro+Med Plant Base. Διαθέσιμο σε:  
<https://www.emplantbase.org/home.html>



«Δηλώνω ρητά ότι το κείμενο της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας δεν αποτελεί προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον»

Ελένη Γεωργούλα